

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 015 004**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/532 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.11.2019** **PCT/US2019/059446**
87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2020** **WO20092937**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.11.2019** **E 19878411 (8)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2024** **EP 3873525**

54 Título: **Composiciones y métodos para tratar una lesión cerebral**

30 Prioridad:

02.11.2018 US 201862754750 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.04.2025

73 Titular/es:

ANNEXON, INC. (50.00%)
1400 Sierra Point Parkway, Building C, 2nd Floor
Brisbane, CA 94005, US y
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
CALIFORNIA (50.00%)

72 Inventor/es:

ROSI, SUSANNA;
KRUKOWSKI, KAREN;
YEDNOCK, TED y
SANKARANARAYANAN, SETHU

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 015 004 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para tratar una lesión cerebral

5 Antecedentes

En el documento nº WO 2010/022149 se divulgan unos métodos para tratar o aliviar los daños resultantes de la hemorragia intracerebral. Los métodos implican la administración de un inhibidor del complemento a fin de inhibir la formación o actividad de C3a o C5a en el tejido afectado.

La lesión cerebral traumática (TBI) es la principal causa de mortalidad y discapacidad en adultos jóvenes en las sociedades occidentales, y se producen más de 20.000 TBI al año en personal militar de EE. UU. La TBI resulta especialmente preocupante para las personas de mayor edad, ya que existe tanto una mayor incidencia de TBI como una menor recuperación funcional en esta población. Además, la TBI es el factor de riesgo ambiental más importante de desarrollo de enfermedad de Alzheimer y otros trastornos neurodegenerativos. La mayoría de pacientes que sufren de TBI moderada a grave presentan secuelas neuropsicológicas crónicas y debilitantes, incluyendo cambios de personalidad, deterioro cognitivo e una incidencia incrementada de enfermedades psiquiátricas. Desafortunadamente, las opciones de tratamiento para la TBI actualmente son limitadas y consisten principalmente en soporte médico y rehabilitación. Claramente se necesitan mejores opciones terapéuticas para el tratamiento de la TBI, incluyendo fármacos que mejoren los resultados cognitivos y conductuales tanto a corto como a largo plazo.

Sumario

La presente invención se define mediante las reivindicaciones.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la presente invención se refiere a un inhibidor de la ruta clásica del complemento para la utilización en el tratamiento de una lesión cerebral, en donde el inhibidor es un anticuerpo anti-C1q que comprende:

un dominio variable de cadena ligera que comprende una HVR-L1 que presenta la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 5, una HVR-L2 que presenta el aminoácido de SEC ID nº: 6 y una HVR-H3 que presenta el aminoácido de SEC ID nº: 7; y

un dominio variable de cadena ligera que comprende una HVR-L1 que presenta la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 9, una HVR-L2 que presenta el aminoácido de SEC ID nº: 10 y una HVR-H3 que presenta el aminoácido de SEC ID nº: 11.

Según una forma de realización preferida, el inhibidor debe administrarse durante o dentro de las primeras cuatro semanas posteriores a la lesión cerebral; el inhibidor debe administrarse durante o dentro de la primera semana posterior a la lesión cerebral, el inhibidor debe administrarse durante o dentro de las 24 horas posteriores a la lesión cerebral, o el inhibidor debe administrarse durante o dentro de las 1, 2, 3, 4, 5 o 6 horas posteriores a la lesión cerebral.

De acuerdo con una forma de realización preferida, el inhibidor inhibe la pérdida de sinapsis inducida por la lesión cerebral.

De acuerdo con otra forma de realización preferida, la lesión cerebral es una lesión cerebral traumática, una lesión cerebral hipóxica, una infección cerebral o un accidente cerebrovascular.

De acuerdo con una forma de realización preferida, el anticuerpo anti-C1q se une específicamente y neutraliza una actividad biológica de C1q.

De acuerdo con una forma de realización preferida adicional, el anticuerpo anti-C1q es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo multispecifico o un fragmento de unión a antígeno de los mismos.

De acuerdo con una forma de realización preferida diferente, el anticuerpo es un fragmento de unión a antígeno y el fragmento de unión a antígeno es un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un fragmento FV, un diacuerpo o una molécula de anticuerpo de cadena sencilla.

De acuerdo con una forma de realización preferida, el anticuerpo anti-C1q comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos con una homología de por lo menos 95 % respecto a la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID nº: 4 y 35-38, y en el que el dominio variable de cadena

ligera comprende una HVR-L1 que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 5, una HVR-L2 que presenta el aminoácido de SEC ID nº: 6 y una HVR-L3 que presenta el aminoácido de SEC ID nº: 7.

De acuerdo con una forma de realización más preferida, el dominio variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID nº: 4 y 35-38.

De acuerdo con una forma de realización preferida, el anticuerpo anti-C1q comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos con una homología de por lo menos 95 % respecto a la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID nº: 8 y 31-34, y en el que el dominio variable de cadena pesada comprende una HVR-H1 que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 9, una HVR-H2 que presenta el aminoácido de SEC ID nº: 10 y una HVR-H3 que presenta el aminoácido de SEC ID nº: 11.

De acuerdo con una forma de realización más preferida, el dominio variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID nº: 8 y 31-34.

Descripción de las figuras

Las figuras 1A-1D representa lesiones y tamaños de cavitación tras la lesión por contusión en animales de edad avanzada. Las figuras 1A-1B representan unas imágenes de resonancia magnética (RM) de cerebros lesionados de animales. La figura 1C representa cómo se alcanza el máximo del tamaño de la lesión un día después del daño, alcanzando una meseta transcurrido un mes. La figura 1D representa el incremento del tamaño de cavitación durante el tiempo.

Las figuras 2A-2B representa que la integridad de la BHE se ha visto comprometida tras el daño. La figura 2A representa una acumulación incrementada de agente de contraste por fuga vascular. La figura 2B representa la alteración de la BHE.

Las figuras 3A-3C representan el incremento del número de microglía y de la actividad fagocítica de modo crónico después de la lesión por contusión. La figura 3A representa la medición mediante análisis de qPCR de los cambios en la expresión génica de CD11b en el hipocampo de animales de edad avanzada, en la que se comparan los niveles de expresión entre referencia ("sham"), y tras 7 y 30 días de la lesión. El CD11b, un marcador de microglía y macrófagos, aumenta significativamente después de la lesión. La figura 3B representa que era evidente un incremento significativo del número de microglías en animales lesionados de edad avanzada tanto 10 como 30 dpi en comparación con los animales de referencia. La figura 3C representa un incremento significativo del porcentaje de microglía que endocitó ("engulfed") sinapsis marcadas en animales lesionados de edad avanzada 30 dpi en comparación con controles de referencia correspondientes. Un análisis ANOVA unidireccional reveló diferencias significativas ($F=21.12$, $p<0.0001$). Los análisis posthoc de Tukey revelaron diferencias entre grupos. $n=4$ a 6/grupo.

Las figuras 4A-4D representan que la lesión por contusión induce un robusto inicio del complemento en el cerebro de edad avanzada. La figura 4A y la figura 4B representan cambios de expresión génica de C1q y C3, respectivamente, en el hipocampo de animales de edad avanzada medidos mediante análisis de qPCR, en una comparación entre los niveles de expresión entre referencia, 7, 14 y 30 días después de la lesión. Los niveles de expresión tanto de C1q como de C3 se incrementaron tras la lesión. Un análisis ANOVA unidireccional reveló que las diferencias eran significativas (C1q: $F=15.89$; $p<0.0001$; C3: $F=50.58$, $p<0.0001$). Las pruebas posthoc de Tukey revelaron diferencias entre grupos. $n=4$ a 6/grupo. La figura 4C representa la medición de la expresión de la proteína C1q mediante tinción inmunohistoquímica del hipocampo dorsal. Se muestran imágenes representativas de animales de referencia y de TBI (30 dpi), detalle. La expresión de la proteína C1q se incrementó crónicamente después de la lesión. No se observó reactividad en el control secundario solo. Magnificación: 200x. $n=4$ a 6/grupo. La figura 4D representa la recogida de hipocampos y el aislamiento de sinaptosomas mediante gradiente de sacarosa seguido de microesferas de calibración de tamaño. La colocalización de C1q en las sinapsis, medida mediante tinción de anticuerpos que teñían la TBI (30 dpi), se incrementó significativamente en comparación con los animales de referencia. Prueba t de Student. $n=6$ /grupo. Las columnas muestran media y SEM de grupo.

Las figuras 5A-5B representan que el daño contusivo resulta en la pérdida crónica de sinapsis en el cerebro de edad avanzada. La figura 5A representa la recogida de hipocampos y el aislamiento de sinaptosomas mediante gradiente de sacarosa seguido de microesferas de calibración de tamaño, y coexpresión de marcadores pre- y postsinápticos. El marcador presináptico sinapsina-1 y los marcadores postsinápticos PSD-95 mostraron reducciones significativas en el número total de sinaptosomas en el grupo de TBI (30 dpi) en comparación con el grupo de referencia. $n=8-9$ /grupo. La figura 5B representa la medición de los niveles sinápticos mediante tinción con PSD-95 del hipocampo dorsal. Se incluyen imágenes representativas. Los animales con TBI (30 dpi) de edad avanzada presentaban una expresión reducida de PSD-95. No se observó reactividad en los controles secundarios solos. Magnificación: 200x. $n=3$ /grupo. Prueba t de Student. Las columnas ilustran las medias y SEM grupales.

Las figuras 6A-6B representan que el bloqueo del complemento previene los déficits de memoria en animales de edad envejecida tras la lesión por contusión. Se midieron los déficits de memoria inducidos por el traumatismo mediante el reconocimiento de objetos nuevos. Los animales fueron expuestos a dos objetos idénticos; 24 horas después fueron expuestos a un objeto familiar y a un objeto nuevo. Se calcularon los déficits de memoria mediante un déficit en la diferenciación del objeto nuevo. La figura 6A representa que los animales tanto macho como hembra manifestaron déficits de memoria tras la TBI (30 dpi). El análisis ANOVA bidireccional reveló un efecto significativo de la lesión ($p < 0.05$). Machos, $n = 15$ a 17/grupo; hembras, 6-7/grupo. La figura B representa que el bloqueo genético ($C3^{-/-}$) o farmacológico (anticuerpos inhibidores de C1q) de los factores de inicio del complemento evitan los déficits inducidos por traumatismo. TBI (WT)=27 ratones; TBI ($C3^{-/-}$)=4 ratones; TBI⁺ antic. C1q=7 ratones. El análisis ANOVA unidireccional reveló diferencias significativas ($F = 6.35$, $p < 0.01$). Análisis posthoc de Tukey para diferencias entre grupos.

Descripción detallada

Parte general

Aunque la presente invención se define únicamente mediante las reivindicaciones, la presente divulgación asimismo se refiere de manera general a métodos de prevención, que reducen los riesgos de desarrollo, o que tratan, la lesión cerebral traumática (TBI), que comprenden la administración a un sujeto, de un inhibidor de la ruta del complemento, preferentemente un inhibidor de la ruta clásica del complemento.

La lesión cerebral traumática (TBI), asimismo conocida como lesión intracraneal, ocurre cuando una fuerza externa daña el cerebro. La TBI puede clasificarse basándose en la gravedad, el mecanismo (lesión cefálica cerrada o penetrante), u otras características (por ejemplo, que ocurren en una localización específica o en una zona amplia). La lesión cefálica es una categoría más amplia que puede implicar el daño a otras estructuras, tales como el cuero cabelludo y el cráneo. La TBI puede resultar en síntomas físicos, cognitivos, sociales, emocionales y conductuales, y el resultado puede variar desde una recuperación total a una discapacidad permanente o la muerte.

Entre las causas de la TBI se incluyen caídas, colisiones de vehículos y violencia. El traumatismo cerebral se produce como consecuencia de una aceleración o desaceleración súbita dentro del cráneo o por una combinación compleja de movimiento e impacto súbito. Además del daño causado en el momento del daño, una variedad de acontecimientos en los minutos a días posteriores al daño puede resultar en un daño secundario. Entre estos procesos se incluyen alteraciones en el flujo sanguíneo cerebral y la presión dentro del cráneo. Entre algunas de las técnicas de imagen utilizadas para el diagnóstico se incluyen la tomografía computarizada y la resonancia magnética (RM).

En la presente invención se ha descubierto que la delección de genes del complemento o la inhibición de proteínas del complemento atenúa la patología de la TBI o los déficits conductuales en modelos de roedor. De acuerdo con ello, en determinadas puestas en práctica, la inhibición de rutas de activación del complemento mediante el bloqueo de C1q, el factor de inicio en la cascada clásica del complemento, previene y/o reduce el riesgo de desarrollar TBI y/o trata la TBI. En la presente memoria se divulgan anticuerpos inhibidores altamente específicos y potentes contra C1q, que son capaces de cruzar la BHE a niveles suficientes para bloquear C1q dentro del SNC. En roedores, los niveles libres de C1q son completamente eliminados en el suero y el LCR con el tratamiento con anticuerpos anti-C1q. De manera similar, en primates, se eliminan los niveles de C1q libre en suero y LCR durante 20 días tras una única dosis de anticuerpo anti-C1q. Este anticuerpo resulta eficaz en varios modelos de ratón de neurodegeneración y desmielinización, incluyendo modelos del síndrome de Guillain-Barré, neuromielitis óptica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington y atrofia muscular espinal. Se observa una expresión de C1q incrementada en puntos temporales de efecto agudo tras la TBI y se mantiene incrementada durante puntos temporales de efectos subagudos al medir asimismo la pérdida de sinapsis. En determinadas puestas en práctica, la activación de la cascada del complemento podría resultar en la pérdida de función neuronal/conductual. Sin restringirse a ninguna teoría en particular, en la TBI, los anticuerpos anti-C1q divulgados en la presente memoria podrían actuar mediante el bloqueo de la activación aguda del complemento/el daño y muerte neuronal, y/o mediante la prevención del inicio de la CMND a lo largo de los días a semanas posteriores a la TBI.

Se utilizó la RM ponderada en T2 para determinar que se producía un incremento del tamaño y cavitación de la lesión prolongado en el tiempo que persistía durante hasta un mes después del daño en los animales de edad avanzada. Utilizando RM ponderada en T1 con inyección posterior de agente de contraste basado en gadolinio, se identificó el compromiso de la integridad de la BHE, tal como muestra una acumulación incrementada de agente de contraste por fuga vascular. Se produjeron alteraciones de larga duración del tamaño de la lesión, la cavitación y la degradación de la BHE un mes después del daño que previamente se había mostrado que no estaban presentes en animales lesionados jóvenes. La alteración persistente de la función de barrera protectora podría crear un medio permisivo a una entrada exacerbada de células inmunitarias periféricas en el parénquima cerebral y conducente a las respuestas inflamatorias prolongadas que se midieron.

Se investigó la respuesta inflamatoria en la presente memoria en un punto temporal crónico después de la lesión en el cerebro envejecido. Un mes después del daño se observó una activación persistente y significativa de las

células microgliales, y el desarrollo por las células microgliales de una actividad fagocítica creciente durante el tiempo (30 dpi). Aunque la activación de las células microgliales ocurre rápidamente después de la lesión, resulta interesante que no se observó una actividad endocítica aumentada en un punto de comprobación temprano (10 días después de la lesión). Estos resultados indican que los cambios en el compartimiento mieloide pueden progresar durante un periodo de tiempo prolongado después de la lesión y podrían estar relacionados con el hecho de que los animales de edad avanzada desarrollan déficits cognitivos peores tras la lesión. Al considerar intervenciones terapéuticas, dichos resultados sugieren que una ventana terapéutica más larga o posterior podría resultar beneficiosa al focalizarse en la activación de las células mieloides.

Se detectó una expresión incrementada de C1q, C3 y CR3 (CD11b) que se prolongó hasta un mes después del daño. Junto con la acumulación de C1q en las sinapsis, se observaron una pérdida de sinapsis y una capacidad fagocítica incrementada de las células microgliales en los animales lesionados de edad avanzada. Estos resultados muestran que el etiquetado con complemento de las sinapsis y la actividad endocítica incrementada de las células microgliales son posibles reguladores del declive cognitivo en el cerebro lesionado de edad avanzada.

La TBI induce la expresión del complemento y los receptores del complemento durante por lo menos un mes en animales de edad avanzada, lo que se asocia a un incremento progresivo de la actividad fagocítica de las células microgliales. Resulta importante que la interferencia genética o farmacológica con la ruta del complemento evita el declive de la memoria en animales de edad avanzada. La edad y las lesiones podrían presentar un efecto aditivo sobre la expresión del complemento y las rutas neuroinflamatorias, lo que sugiere opciones y ventanas terapéuticas más amplias para estas rutas. El bloqueo de la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC) del complemento reduce los déficits agudos que siguen a la TBI grave, mientras que la inhibición de C3 resulta necesaria para prevenir la inflamación crónica y la pérdida neuronal continua (en 30 dpi). Se investigaron las condiciones degenerativas especializadas en el SNC de los animales de edad avanzada. La modulación específica de la cascada clásica del complemento (mediante la inhibición de C1q) es protectora frente a la pérdida de función cognitiva. La C1q es la molécula iniciadora de la ruta clásica del complemento, y se ha mostrado que se acumula en las sinapsis con la edad, alcanzando niveles hasta 300 veces superiores a los observados en animales más jóvenes. Dicha acumulación de C1q potencialmente pone en riesgo al cerebro de edad avanzada frente a insultos neurodegenerativos, incluyendo la TBI. La activación de C1q conduce al etiquetado de las sinapsis por componentes activados de C3, que son reconocidos por el receptor CR3 sobre las microglías, conduciendo a la eliminación de la sinapsis y a neuroinflamación. Aunque la inhibición de C1q bloquea la función corriente abajo de C3 en esta ruta, permite que C3 conserve su función inmunitaria normal en las rutas de la lectina y alternativa del complemento, las cuales podrían ser importantes para la salud neuronal.

Los déficits de memoria a largo plazo inducidos por la TBI en animales de edad avanzada implica una expresión incrementada de los componentes tempranos de la cascada del complemento (C1q, C3 y CR3) en el cerebro; la expresión incrementada del complemento y la inflamación están asociadas a un incremento progresivo de la actividad endocítica sináptica por las células microgliales, y la inhibición de la cascada clásica del complemento, ya sea mediante inhibición de C1q o por la deleción de C3 proporciona protección frente al declive cognitivo. Resulta importante que la interferencia basada en el complemento puede proporcionar opciones terapéuticas para el tratamiento de los déficits cognitivos inducidos por TBI en el cerebro en envejecimiento.

Los anticuerpos anti-C1q divulgados en la presente memoria son potentes inhibidores de C1q y pueden recibir dosis para la inhibición continua tanto en la periferia como en el SNC durante cualquier periodo, y después opcionalmente retirarse para permitir la vuelta a la función normal de C1q en momentos en que su actividad podría ser importante para la reparación del SNC. Los resultados obtenidos con anticuerpos anti-C1q divulgados en la presente memoria en estudios animales puede pasarse fácilmente a la clínica con una versión humanizada del mismo anticuerpo (los anticuerpos divulgados en la presente memoria reaccionan de manera cruzada con C1q de ratón y humano).

C1q es una proteína multimérica grande de 460 kDa que consiste en 18 cadenas polipeptídicas (6 cadenas A de C1q, 6 cadenas B de C1q y 6 cadenas C de C1q). Las proteínas del complemento C1r y C1s se unen a la región de cola de C1q formando el complejo de C1 (C1qr₂s₂).

La neutralización de la actividad de factores del complemento tales como C1q, C1r o C1s inhiben la actividad del complemento clásico, y ralentizan o evitan una lesión cerebral, preferentemente una lesión cerebral traumática, una lesión cerebral hipóxica, infección cerebral o accidente cerebrovascular. En la presente memoria se divulgan métodos relacionados con la neutralización de factores del complemento, tales como C1q, C1r o C1s en una lesión cerebral, preferentemente una lesión cerebral traumática, una lesión cerebral hipóxica, infección cerebral o accidente cerebrovascular.

En determinados aspectos, en la presente memoria se divulga un método de prevención, reducción del riesgo de desarrollo o tratamiento de una lesión cerebral, preferentemente una lesión cerebral traumática, lesión cerebral hipóxica, infección cerebral o accidente cerebrovascular, que comprende administrar a un sujeto un inhibidor de la ruta del complemento.

En la presente memoria se divulga un método de inhibición de una lesión cerebral, preferentemente una lesión cerebral traumática, una lesión cerebral hipóxica, una infección cerebral, o un accidente cerebrovascular, que comprende administrar a un paciente un anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-C1q, un anticuerpo anti-C1r o un anticuerpo anti-C1s. En determinadas puestas en prácticas preferidas, el anticuerpo se une a C1q, C1r o C1s e inhibe la activación del complemento.

Pueden prepararse anticuerpos de longitud completa mediante la utilización de técnicas de ingeniería de ADN recombinante. Entre tales versiones de ingeniería se incluyen aquellas creadas, por ejemplo, a partir de regiones variables de anticuerpo naturales mediante inserciones, deleciones o cambios en las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos naturales. Entre los ejemplos particulares de este tipo se incluyen aquellos dominios de región variable manipulados que contienen por lo menos una CDR y opcionalmente uno o más aminoácidos de marco de un anticuerpo y el resto del dominio de región variable de un segundo anticuerpo. El ADN codificante del anticuerpo puede prepararse mediante delección de la totalidad a excepción de la parte deseada del ADN que codifica el anticuerpo de longitud completa. El ADN codificante de los anticuerpos quimerizados puede prepararse mediante recombinación de ADN sustancial o exclusivamente codificante de regiones constantes humanas y ADN codificante de regiones variables derivadas sustancial o exclusivamente de la secuencia de la región variable de un mamífero que no es un ser humano. El ADN codificante de anticuerpos humanizados puede prepararse mediante recombinación de ADN codificante de regiones constantes y regiones variables diferentes de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) derivadas sustancial o exclusivamente de las regiones de anticuerpo humano correspondientes y ADN codificante de CDR derivado sustancial o exclusivamente de un mamífero que no es un ser humano.

Entre las fuentes adecuadas de moléculas de ADN que codifican anticuerpos se incluyen células, tales como hibridomas, que expresan el anticuerpo de longitud completa. Por ejemplo, el anticuerpo puede aislarse a partir de una célula hospedadora que expresa un vector de expresión que codifica la cadena pesada y/o ligera del anticuerpo.

Asimismo pueden prepararse fragmentos de anticuerpo mediante la utilización de técnicas de ingeniería de ADN recombinante que implican la manipulación y reexpresión de ADN codificante de regiones variables y constantes de anticuerpo. Pueden utilizarse técnicas estándares de biología molecular para modificar, añadir o delecionar aminoácidos o dominios adicionales, según se desee. Cualesquiera alteraciones de las regiones variables o constantes todavía se encuentran comprendidas en los términos "variables" y "constantes" referidos a regiones tal como se utilizan en la presente memoria. En algunos casos, se utiliza PCR para generar un fragmento de anticuerpo mediante la introducción de un codón de parada inmediatamente después del codón codificante de la cisteína intercadena de C_H1, de manera que la traducción del dominio C_H1 se detiene en la cisteína intercadena. Los métodos para diseñar cebadores de PCR adecuados son bien conocidos en la materia y las secuencias de los dominios C_H1 de anticuerpo están fácilmente disponibles. En algunas puestas en práctica, pueden introducirse codones de parada utilizando técnicas de mutagénesis dirigida a sitio.

Puede derivarse un anticuerpo de la presente divulgación de cualquier isotipo de anticuerpo ("clase"), incluyendo, por ejemplo, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, y subclases de las mismas, incluyendo, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En determinadas puestas en práctica preferidas, las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo son de IgG1 murina.

En algunas puestas en práctica, el inhibidor es un anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-C1q, un anticuerpo anti-C1r o un anticuerpo anti-C1s. El anticuerpo anti-C1q puede inhibir la interacción entre C1q y un autoanticuerpo, o entre C1q y C1r, o entre C1q y C1s. El anticuerpo anti-C1r puede inhibir la interacción entre C1r y C1q, o entre C1r y C1s. El anticuerpo anti-C1r puede inhibir la actividad catalítica de C1r, o el anticuerpo anti-C1r puede inhibir el procesamiento de pro-C1r en una proteasa activa. El anticuerpo anti-C1s puede inhibir la interacción entre C1s y C1q, o entre C1s y C1r, o entre C1s y C2 o C4, o el anticuerpo anti-C1s puede inhibir la actividad catalítica de C1s, o puede inhibir el procesamiento de pro-C1s en una proteasa activa. En algunos casos, el anticuerpo anti-C1q, anti-C1r o anti-C1s provoca el aclaramiento de C1q, C1r o C1s de la circulación o de un tejido.

El anticuerpo divulgado en la presente memoria puede ser un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, que se une a C1q, C1r o C1s de mamífero, preferentemente C1q, C1r o C1s humano. El anticuerpo puede ser un anticuerpo de ratón, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico o un fragmento de anticuerpo. Los anticuerpos divulgados en la presente memoria asimismo pueden cruzar la barrera hematoencefálica (BHE). El anticuerpo puede activar un sistema de transporte mediado por receptor de BHE, tal como un sistema que utiliza el receptor de insulina, receptor de transferrina, receptor de leptina, receptor de LDL o receptor de IGF. El anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico con suficiente secuencia humana que resulta adecuado para la administración a un ser humano. El anticuerpo puede estar glucosilado o no glucosilado; en algunas puestas en práctica, el anticuerpo está glucosilado, por ejemplo, en un patrón de glucosilación producido mediante modificación postraduccional en una célula CHO.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo biespecífico, que reconoce un primer y un segundo antígeno, por ejemplo, el primer antígeno se selecciona de C1q, C1r y C1s y/o el segundo antígeno es un antígeno que permite que el

anticuerpo cruce la barrera hematoencefálica, tal como un antígeno seleccionado de receptor de transferrina (TR), receptor de insulina (HIR), receptor de factor de crecimiento similar a insulina (IGFR), proteínas 1 y 2 relacionadas con receptor de lipoproteína de baja densidad (LPR-1 y 2), receptor de toxina diftérica, CRM197, un anticuerpo de dominio único de llama, TMEM 30(A), un dominio de transducción de proteína, TAT, Syn-B, penetratina, un péptido poliarginina, un péptido angiopep o ANG1005.

Un anticuerpo de la presente divulgación puede unirse e inhibir una actividad biológica de C1q, C1r o C1. Por ejemplo, (1) unión de C1q a un autoanticuerpo, (2) unión de C1q a C1r, (3) unión de C1q a C1s, (4) unión de C1q a fosfatidilserina, (5) unión de C1q a pentraxina-3, (6) unión de C1q a proteína C reactiva (CRP), (7) unión de C1q a receptor globular de C1q (gC1qR), (8) unión de C1q a receptor 1 del complemento (CR1), (9) unión de C1q a amiloide B, o (10) unión de C1q a calreticulina. En otras puestas en práctica, la actividad biológica de C1q es (1) activación de la ruta de activación clásica del complemento, (2) activación de anticuerpos y citotoxicidad dependiente del complemento (3) hemólisis de CH50, (4) pérdida sináptica, (5) producción de anticuerpos células B, (6) maduración de células dendríticas, (7) proliferación de células T, (8) producción de citocinas, (9) activación de microglías, (10) reacción de Arthus, (11) fagocitosis de sinapsis o terminaciones nerviosas, o (12) activación de células que expresan el receptor 3 del complemento (CR3/C3).

En algunas puestas en práctica, la hemólisis de CH50 comprende la hemólisis de CH50 humano, de ratón y/o de rata. En algunas puestas en práctica, el anticuerpo es capaz de neutralizar por lo menos aproximadamente 50 % a por lo menos aproximadamente 95 % de la hemólisis de CH50. El anticuerpo asimismo podría ser capaz de neutralizar por lo menos 50 % de la hemólisis de CH50 a una dosis inferior a 150 ng/ml, inferior a 100 ng/ml, inferior a 50 ng/ml o inferior a 20 ng/ml.

Entre otros ensayos *in vitro* para medir la actividad del complemento se incluyen ensayos ELISA para la medición de los productos de división de componentes del complemento o complejos que se forman durante la activación del complemento. La activación del complemento mediante la ruta clásica puede medirse mediante el seguimiento de los niveles de C4d y C4 en el suero. La activación de la ruta alternativa puede medirse en un ELISA mediante evaluación de los niveles de los complejos de Bb o C3bBbP en circulación. Asimismo puede utilizarse un ensayo *in vitro* de activación del complemento mediada por anticuerpo, a fin de evaluar la inhibición de la producción de C3a.

Un anticuerpo de la presente divulgación puede ser un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo multiespecífico o un fragmento de anticuerpo de los mismos.

Los anticuerpos de la presente divulgación asimismo pueden ser un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fv, un diacuerpo o una molécula de anticuerpo de cadena sencilla.

En la presente memoria se divulgan métodos de administración al sujeto de un segundo agente, tal como un segundo anticuerpo o un segundo inhibidor. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-C1q, un anticuerpo anti-C1r o un anticuerpo anti-C1s. El inhibidor puede ser un inhibidor de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, la ruta de activación del complemento alternativo, y/o un inhibidor de la interacción entre el autoanticuerpo y un autoantígeno.

En algunas puestas en práctica, se proporciona un método para determinar el riesgo de un sujeto de desarrollar una lesión cerebral, preferentemente una lesión cerebral traumática, lesión cerebral hipóxica, infección cerebral, o accidente cerebrovascular, que comprende: (a) administrar un anticuerpo al sujeto (es decir, un anticuerpo anti-C1q, anti-C1r o anti-C1s), en el que el anticuerpo se acopla a un marcaje detectable, (b) detectar el marcaje detectable para medir la cantidad o localización de C1q, C1r o C1s en el sujeto, y (c) comparar la cantidad o localización de uno o más de C1q, C1r o C1s con una referencia, en el que el riesgo de desarrollar una lesión cerebral, preferentemente una lesión cerebral traumática, lesión cerebral hipóxica, infección cerebral o accidente cerebrovascular se caracteriza basándose en la comparación de la cantidad o localización de uno o más de C1q, C1r o C1s con la referencia. El marcaje detectable puede comprender un ácido nucleico, oligonucleótido, enzima, isótopo radioactivo, biotina o un marcaje fluorescente. En algunos casos, el anticuerpo puede marcarse con un coenzima, tal como biotina, utilizando el proceso de biotilación. En el caso de que se utilice biotina como un marcaje, la detección del anticuerpo se lleva a cabo mediante adición de una proteína, tal como avidina o su contrapartida bacteriana, cualquiera de los cuales puede unirse a un marcador detectable, tal como el pigmento anteriormente indicado, un marcador fluorescente tal como fluoresceína, un isótopo radioactivo o un enzima, tal como peroxidasa. En algunas puestas en práctica, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, el fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, scFv o F(ab')₂).

Los anticuerpos divulgados en la presente memoria asimismo pueden acoplarse con un grupo de marcaje, por ejemplo, un isótopo radioactivo, radionucleido, un grupo enzimático, grupo biotinilo, un ácido nucleico, oligonucleótido, enzima o un marcaje fluorescente. Puede acoplarse un grupo de marcaje con el anticuerpo a través de un brazo espaciador de cualquier longitud adecuada para reducir el potencial impedimento estérico. Se

conocen en la materia diversos métodos para el marcaje de proteínas y pueden utilizarse para preparar dichos anticuerpos marcados.

Se encuentran contempladas diversas vías de administración. Entre dichos métodos de administración se incluyen, aunque sin limitación, la administración tópica, parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, intratecal, intranasal e intralesional. Entre las infusiones parenterales se incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Para el tratamiento de las afecciones del sistema nervioso central, el anticuerpo puede adaptarse para cruzar la barrera hematoencefálica tras una administración por una vía periférica no invasiva, tal como la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal o incluso oral.

Entre los anticuerpos adecuados se incluyen anticuerpos que se unen al componente del complemento C1q, C1r o C1s. Entre dichos anticuerpos se incluyen anticuerpos monoclonales y homólogos, análogos y formas modificadas o derivadas de los mismos, incluyendo anticuerpos Fab, F(ab')₂, Fv y de cadena sencilla.

Los anticuerpos preferidos son anticuerpos monoclonales, que pueden generarse mediante inmunización de roedores (por ejemplo, ratones, ratas, hámsteres o cobayas) con (1) el componente del complemento natural (por ejemplo, C1q, C1r o C1s) derivado de la digestión enzimática de un componente del complemento purificado a partir de plasma o suero humano, o (2) un componente del complemento recombinante, o su fragmento derivado, expresado por sistemas eucarióticos o procarióticos. Pueden utilizarse otros animales para la inmunización, por ejemplo, primates no humanos, ratones transgénicos que expresan inmunoglobulinas humanas y ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) en los que se han trasplantado linfocitos B humanos.

Los anticuerpos policlonales y monoclonales se generan naturalmente como moléculas de inmunoglobulina (Ig) en la respuesta del sistema inmunitario a un patógeno. Una forma dominante con una concentración de 8 mg/ml en suero humano, la molécula de IgG1 de ~150 kDa, está compuesta por dos cadenas pesadas idénticas de ~50 kDa y dos cadenas ligeras idénticas de ~25 kDa.

Pueden generarse hibridomas mediante procedimientos convencionales, mediante la fusión de linfocitos B procedentes de los animales inmunizados con células de mieloma. Además, pueden generarse anticuerpos anti-C1q, anti-C1r o anti-C1s mediante cribado de bibliotecas de Fv de cadena sencilla o Fab recombinante a partir de linfocitos B humanos en un sistema de exposición fágica. La especificidad de los anticuerpos monoclonales para C1q, C1r o C1s humano puede someterse a ensayo mediante ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA), inmunotransferencia western u otras técnicas inmunoquímicas.

La actividad inhibidora de la activación del complemento de los anticuerpos identificados en el procedimiento de cribado puede evaluarse mediante ensayos hemolíticos utilizando RBC de conejo o cobaya insensibilizados para la ruta alternativa del complemento, o RBC de pollo u oveja sensibilizados para la ruta clásica del complemento. Aquellos hibridomas que muestran una actividad inhibidora específica para la ruta clásica del complemento son clonados mediante dilución limitante. Los anticuerpos se purifican para la caracterización para la especificidad para C1q, C1r o C1s humano mediante los ensayos indicados anteriormente.

Basándose en las estructuras moleculares de las regiones variables de los anticuerpos anti-C1q, anti-C1r o anti-Cs, pueden utilizarse el modelado molecular y el diseño molecular racional para generar y cribar moléculas pequeñas que mimeticen las estructuras moleculares de la región de unión de los anticuerpos e inhiban las actividades de C1q, C1r o C1s. Estas moléculas pequeñas pueden ser péptidos, peptidomiméticos, oligonucleótidos o compuestos orgánicos. Las moléculas miméticas pueden utilizarse como inhibidores de la activación del complemento en indicaciones inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias. Alternativamente, pueden utilizarse procedimientos de cribado a gran escala utilizados habitualmente en el campo para aislar moléculas pequeñas adecuadas a partir de bibliotecas de compuestos combinatoriales.

Una dosis adecuada de un anticuerpo tal como se divulga en la presente memoria puede ser de entre 10 y 500 µg/ml de suero. La dosis real puede determinarse en ensayos clínicos siguiendo la metodología convencional para determinar las dosis óptimas, es decir, administrar diversas dosis y determinar qué dosis proporcionan una eficacia adecuada sin efectos secundarios indeseables.

Antes de la aparición de la tecnología de ADN recombinante, se utilizaban enzimas proteolíticas (proteasas) que cortaban secuencias polipeptídicas para diseccionar la estructura de las moléculas de los anticuerpos y para determinar qué partes de la molécula eran responsables de sus diversas funciones. La digestión limitada con la proteasa papaína corta las moléculas de anticuerpo en tres fragmentos. Dos fragmentos, conocidos como fragmentos Fab, son idénticos y contienen la actividad de unión a antígeno. Los fragmentos Fab corresponden a los dos brazos idénticos de la molécula del anticuerpo, cada uno de los cuales consiste en una cadena ligera completa emparejada con los dominios V_H y C_{H1} de una cadena pesada. El otro fragmento no contiene actividad de unión a antígeno pero se observó originalmente que cristalizaba con facilidad, y por este motivo se denominó "fragmento Fc" (fragmento cristizable).

Una molécula Fab es un fragmento artificial de ~50 kDa de la molécula de Ig con una cadena pesada que carece de los dominios constantes C_H2 y C_H3. Dos interacciones de dominio heterófilas (V_L-V_H y C_L-C_H1) subyacen a la estructura de dos cadenas de la molécula de Fab, que resulta adicionalmente estabilizada por un puente disulfuro entre C_L y C_H1. Fab e IgG presentan sitios de unión a antígeno idénticos, formados por seis regiones determinantes de complementariedad (CDR), tres de cada uno de V_L y V_H (LCDR1, LCDR2, LCDR3 y HCDR1, HCDR2 y HCDR3). Las CDR definen el sitio de unión a antígeno hipervariable de los anticuerpos. La variación de secuencia más alta se encuentra en LCDR3 y HCDR3, que en los sistemas inmunitarios naturales se generan mediante la reorganización de genes V_L y J_L o genes V_H, D_H y J_H, respectivamente. LCDR3 y HCDR3 normalmente forman el núcleo del sitio de unión a antígeno. Las regiones conservadas que conectan y exponen las seis CDR se denominan regiones marco. En la estructura tridimensional del dominio variable, las regiones de marco forman un sándwich de dos hojas β antiparalelas opuestas que están unidas mediante bucles de CDR hipervariables en el exterior y por un puente disulfuro conservado en el interior.

Las publicaciones expuestas en la presente memoria se proporcionan únicamente para su divulgación previamente a la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en la presente memoria debe interpretarse como una admisión de que la presente divulgación no tiene derecho a ser de fecha anterior a dicha publicación en virtud de una divulgación previa. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales, que podrían necesitar ser confirmadas de manera independiente.

Anticuerpos anti-C1q del complemento

Los anticuerpos de la presente divulgación reconocen específicamente el factor C1q del complemento y/o C1q en el complejo C1 de la ruta clásica de activación del complemento. El factor del complemento reconocido puede obtenerse, aunque sin limitación, de cualquier organismo que presente un sistema del complemento, incluyendo cualquier organismo de mamífero, tal como ser humano, ratón, rata, conejo, mono, perro, gato, vaca, caballo, camello, oveja, cabra o cerdo.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "complejo C1" se refiere a un complejo proteico que puede incluir, aunque sin limitación, una proteína C1q, dos proteínas C1r y dos proteínas C1s (por ejemplo, C1qr²s²).

Tal como se utiliza en la presente memoria, "factor del complemento C1q" se refiere tanto a secuencias de tipo salvaje como a secuencias variantes naturales.

Un ejemplo no limitativo de un factor del complemento C1q reconocido por anticuerpos de la presente divulgación es C1q humano, que incluye las tres cadenas polipeptídicas A, B y C:

C1q, cadena A (Homo sapiens), nº de acceso de base de datos de proteínas: NP_05075.1; nº de GenBank: NM_015991:

gi|7705753|ref|NP_05075.1|precursor de subunidad A de subcomponente C1q del complemento [*Homo sapiens*]

(SEC ID nº: 1)

MEGPRGWLVLCLVLAISLASMVTEDLCRAPDGKKGEAGRPGRGRPGLKGEQGEPG
APGIRTGIQGLKGDQGEPPSGNPGKVGYPGSPGLGARGIPGIKGTGSPGNIKDQP
RPAFSAIRRNPPMGGNVVFDTVITNQEEPYQNHSGRFVCTVPGYYFTFQVLSQWEI
CLSIVSSSRGQVRRSLGFCDTTNKGLFQVVS GGMVLQLQQGDQVWVEKDPKKGHIY
QGSEADSVFSGFLIFPSA.

C1q, cadena B (Homo sapiens), nº de acceso de base de datos de proteínas: NP_000482.3; nº de GenBank: NM_000491.3

>gi|7298828|ref|NP_000482.3|precursor de subunidad B del subcomponente C1q del complemento

(SEC ID nº: 2)

MMMKIPWGSIPVLMLLLLGLIDISQAQLSCTGPPAIPGIPGIPGTPGPDGQPGTPGIKG
EKGLPGLAGDHGEFGEKGDPGIPGNPGKVGPKGPMGPKGGPGAPGAPGPKGESGDY
KATQKIAFSATRTINVPLRRDQTIRFDHVITNMNNNYEPRSGKFTCKVPGLYYFTYHA
SSRGNLCVNLMRGRERAQKVVTFCDYAYNTFQVTTGGMVLKLEQGENVFLQATDK
NSLLGMEGANSIFSGFLLFPDMEA.

5 C1q, cadena C (Homo sapiens), nº de acceso de base de datos de proteínas: NP_001107573.1; GenBank No.: NM_001114101.1:

>gi|166235903|ref|NP_001107573.1| precursor de subunidad C de subcomponente C1q del complemento
[Homo sapiens]

10 (SEC ID nº: 3)

MDVGPSSPLHLGLKLLLLLLLLPLRGQANTGCYGIPGMPGLPGAPGKDGYDGLPGPK
GEPGIPAIPGIRGPKGQKGEPGLPGHPGKNGPMGPPGMPGVPGMPGIPGEPGEEGRYK
QKFQSVFTVTRQTHQPPAPNSLIRFNAVL TNPQGDYDTSTGKFTCKVPGLYYFVYHA
SHTANLCVLLYRSGVKVVTFCGHTSKTNQVNSGGVLLRLQVGEEVWLAVNDYYD
MVGIQGSDSVFSGFLLFPD.

15 De acuerdo con lo anterior, un anticuerpo anti-C1q humanizado de la presente divulgación puede unirse a la cadena polipeptídica A, cadena polipeptídica B y/o cadena polipeptídica C de una proteína C1q. En algunas puestas en práctica, un anticuerpo anti-C1q humanizado de la presente divulgación se une a la cadena polipeptídica A, cadena polipeptídica B y/o cadena polipeptídica C de C1q humano o un homólogo del mismo, tal como C1q de ratón, rata, conejo, mono, perro, gato, vaca, caballo, camello, oveja, cabra o cerdo.

20 Entre los inhibidores adecuados se incluyen un anticuerpo que se une a la proteína C1q del complemento (es decir, un anticuerpo anti-C1q del complemento, asimismo denominado en la presente memoria "anticuerpo anti-C1q" y "anticuerpo de C1q") y una molécula de ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo para un método de prevención, reducción del riesgo de desarrollo, o tratamiento de una lesión cerebral, preferentemente una lesión cerebral traumática, una lesión cerebral hipóxica, una infección cerebral o un accidente cerebrovascular.

25 Otros anticuerpos anti-C1q adecuados para la unión a la proteína C1q son bien conocidos en la materia y entre ellos se incluyen, por ejemplo, los anticuerpos nº de cat.: AF2379, AF2379, AF1696, MAB1696, and MAB23791 (R&D System), NBP1-87492, NB100-64420, H00000712-B01P, H00000712-D01P, and H00000712-D01 (Novus Biologicals), MA1-83963, MA1-40311, PA5-14208, PA5-29586, and PA1-36177 (ThermoFisher Scientific), ab71940, ab11861, ab4223, ab72355, ab182451, ab46191, ab227072, ab182940, ab216979, and ab235454 (abcam), etc. Además, pueden encontrarse múltiples constructos de ARNip, ARNch y CRISPR para reducir la expresión de C1q, en las listas de productos comerciales de la compañías anteriormente referenciadas, tales como los productos de ARNip nº sc-43651, sc-44962, sc-105153 y sc-141842; los productos de ARNhp nº sc-43651-SH, sc-43651-V, sc-44962-SH, sc-44962-V, sc-105153-SH, sc-105153-V, sc-141842-SH y sc-141842-V; los productos de CRISPR nº 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 y sc-419386-NIC-2 (Santa Cruz Biotechnology, etc).

40 Secuencias de dominio variable de cadena ligera y de cadena pesada del anticuerpo M1

Utilizando técnicas estándares, se determinaron las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos codificantes del dominio variable de cadena ligera y dominio variable de cadena pesada del anticuerpo M1. La secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo M1 es:

45 DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSINKYLAWYQEKPGKTNKLLIYSGSTLQSGIF
SRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYCQOHNEYPLTFGAGTKLELK (SEC ID
NO:4).

Las regiones hipervariables (HVR) del dominio variable de cadena ligera se muestran en negrita y subrayadas. En algunas puestas en práctica, la HVR-L1 del dominio variable de cadena ligera de M1 presenta la secuencia

RASKSINKYLA (SEC ID nº: 5); la HVR-L2 del dominio variable de cadena ligera de M1 presenta la secuencia SGSTLQS (SEC ID nº: 6) y la HVR-L3 del dominio variable de cadena ligera de M1 presenta la secuencia QQHNEYPLT (SEC ID nº: 7).

- 5 La secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo M1 es:

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKSS**GYHFTSYWMH**WVKQRPQG**LEWIGVIHPN**
SGSINYNEKFESKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAGE**ERDSTEVLPM**DY
 WGQGTSTVTSS (SEC ID NO:8).

- 10 Las regiones hipervariables (HVR) del dominio variable de cadena pesada se muestran en negrita y subrayadas. En algunas puestas en práctica, la HVR-H1 del dominio variable de cadena pesada de M1 presenta la secuencia GYHFTSYWMH (SEC ID nº: 9); la HVR-H2 del dominio variable de cadena pesada de M1 presenta la secuencia VIHPNSGSINYNEKFES (SEC ID nº: 10) y la HVR-H3 del dominio variable de cadena pesada de M1 presenta la secuencia ERDSTEVLPM DY (SEC ID nº: 11).

- 15 La secuencia de ácido nucleico codificante del dominio variable de cadena ligera se determinó que era la siguiente:

GATGTCCAGATAACCCAGTCTCCATCTTATCTTGCTGCATCTCCTGGAGAAACCA
 TTACTATTAATTGCAGGGCAAGTAAGAGCATTAAACAAATATTTAGCCTGGTATCA
 AGAGAAACCTGGGAAACTAATAAGCTTCTTATCTACTCTGGATCCACTTTGCAA
 TCTGGAATTCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTTCACTCTCA
 CCATCAGTAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGCAATGTATTACTGTCAACAACATAA
 TGAATACCCGCTCACGTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA (SEC ID
 NO:12).

- 20 La secuencia de ácido nucleico codificante del dominio variable de cadena pesada se determinó que era la siguiente:

CAGGTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTG
 AAGTTGTCCTGCAAGTCTTCTGGCTACCATTTTACCAGCTACTGGATGCACTGGG
 TGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGTGATTCATCCTAATA
 GTGGTAGTATTAATACTACAATGAGAAGTTTCGAGAGCAAGGCCACACTGACTGTAG
 ACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACT
 CGGCGGTCTATTATTGTGCAGGAGAGAGAGATTCTACGGAGGTTCTCCCTATGGA
 CTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEC ID NO:13).

Depósito de material

- 25 Los materiales siguientes han sido depositados de acuerdo con el Budapest Treaty en la American Type Culture Collection, ATCC Patent Depository, 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209, EE. UU. (ATCC):

ID de muestra	Isotipo	Depósito en la ATCC	
Hibridoma de ratón C1qM1 7788-1(M)	IgG1 kappa	Fecha	n.º de acceso
051613 productor de anticuerpo anti-C1q M1		6 de junio de 2013	PTA-120399

- 30 La estirpe celular de hibridoma productora del anticuerpo M1 (hibridoma de ratón C1qM1 7788-1(M) 051613) ha sido depositada en la ATCC bajo condiciones que garantizan que el acceso al cultivo será posible durante el trámite de la solicitud de la patente y durante un periodo de 30 años, o 5 años después de la petición más reciente, o durante la vida efectiva de la patente, lo que sea más largo. Se sustituirá el depósito si este deviene no viable durante dicho periodo. El depósito se encuentra disponible según requiere la normativa de patentes extranjeras en
- 35 países en los que se presenten copias de la presente solicitud o su progenie.

En la presente memoria se divulgan métodos de administración de un anticuerpo anti-C1q que comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio variable de cadena pesada. El anticuerpo puede unirse a por lo menos un C1q humano, un C1q de ratón o un C1q de rata. El anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humano. El dominio variable de cadena ligera comprende el HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 del anticuerpo monoclonal M1 producido por una estirpe celular de hibridoma depositada con el número de acceso PTA-120399. El dominio variable de cadena pesada comprende el HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 del anticuerpo monoclonal M1 producido por una estirpe celular de hibridoma depositada con el número de acceso de ATCC PTA-120399.

En algunas puestas en práctica, la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera y del dominio variable de cadena pesada comprende uno o más de SEC ID nº: 5 de HVR-L1, SEC ID nº: 6 de HVR-L2, SEC ID nº: 7 de HVR-L3, SEC ID nº: 9 de HVR-H1, SEC ID nº: 10 de HVR-H2 y SEC ID nº: 11 de HVR-H3.

El anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera que es por lo menos 85 %, 90 % o 95 % idéntica a SEC ID nº: 4, preferentemente a la vez que retiene la secuencia de HVR-L1 RASKSINKYLA (SEC ID nº: 5), la secuencia de HVR-L2 SGSTLQS (SEC ID nº: 6) y la secuencia de HVR-L3 QQHNEYPLT (SEC ID nº: 7). El anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada que es por lo menos 85 %, 90 % o 95 % idéntica a SEC ID nº: 8, preferentemente a la vez que retiene la secuencia de HVR-H1 GYHFTSYWMH (SEC ID nº: 9), la secuencia de HVR-H2 VIHPSGSINYNKES (SEC ID nº: 10) y la secuencia de HVR-H3 ERDSTEVLPM DY (SEC ID nº: 11).

En la presente memoria se divulgan métodos de administración de un anticuerpo anti-C1q, que inhibe la interacción entre C1q y un autoanticuerpo. En las puestas en práctica preferidas, el anticuerpo anti-C1q provoca el aclaramiento de C1q de la circulación o tejido.

El anticuerpo anti-C1q puede unirse a una proteína C1q, y se une a uno o más aminoácidos de la proteína C1q dentro de los residuos aminoácidos seleccionados de (a) los residuos aminoácidos 196 a 226 de SEC ID nº: 1 (SEC ID nº: 16) o los residuos aminoácidos de la cadena A de la proteína C1q (C1qA) correspondientes a los residuos aminoácidos 196 a 226 (GLFQVVS GGMVLQLQQGDQVWVEKDPKKGHI) de SEC ID nº:1 (SEC ID nº:16); (b) los residuos aminoácidos 196 a 221 de SEC ID nº:1 (SEC ID nº:17), o los residuos aminoácidos de un C1qA correspondiente a los residuos aminoácidos 196 a 221 (GLFQVVS GGMVLQLQQGDQVWVEKDP) de SEC ID nº: 1 (SEC ID nº: 17); (c) los residuos aminoácidos 202 a 221 de SEC ID nº:1 (SEC ID nº: 18), o los residuos aminoácidos de un C1qA correspondiente a los residuos aminoácidos 202 a 221 (SGGMVLQLQQGDQVWVEKDP) de SEC ID nº: 1 (SEC ID nº: 18); (d) los residuos aminoácidos 202 a 219 de SEC ID nº: 1 (SEC ID nº: 19), o los residuos aminoácidos de un C1qA correspondiente a los residuos aminoácidos 202 a 219 (SGGMVLQLQQGDQVWVEK) de SEC ID nº:1 (SEC ID nº: 19); y (e) los residuos aminoácidos Lys 219 y/o Ser 202 de SEC ID nº: 1, o los residuos aminoácidos de un C1qA correspondiente a Lys 219 y/o Ser 202 de SEC ID nº: 1.

En algunas puestas en práctica, el anticuerpo se une, además, a uno o más aminoácidos de la proteína C1q dentro de los residuos aminoácidos seleccionados de: (a) los residuos aminoácidos 218 a 240 de SEC ID nº: 3 (SEC ID nº: 20) o los residuos aminoácidos de la cadena C de una proteína C1q (C1qC) correspondiente a los residuos aminoácidos 218 a 240 (WLA VNDYYDMVGI QGSDSVFSGF) de SEC ID nº:3 (SEC ID nº:20); (b) los residuos aminoácidos 225 a 240 de SEC ID nº:3 (SEC ID nº:21) o los residuos aminoácidos de un C1qC correspondiente a los residuos aminoácidos 225 a 240 (YDMVGI QGSDSVFSGF) de SEC ID nº:3 (SEC ID nº:21); (c) los residuos aminoácidos 225 a 232 de SEC ID nº:3 (SEC ID nº:22) o los residuos aminoácidos de a C1qC correspondientes a los residuos aminoácidos 225 a 232 (YDMVGIQG) de SEC ID nº:3 (SEC ID nº:22); (d) residuo aminoácido Tyr 225 de SEC ID nº:3 o un residuo aminoácido de un C1qC correspondiente al residuo aminoácido Tyr 225 de SEC ID nº:3; (e) los residuos aminoácidos 174 a 196 de SEC ID nº:3 (SEC ID nº:23) o los residuos aminoácidos de a C1qC correspondientes a los residuos aminoácidos 174 a 196 (HTANLCVLLYRSGVKVVTFCGHT) de SEC ID nº:3 (SEC ID nº:23); (f) los residuos aminoácidos 184 a 192 de SEC ID nº:3 (SEC ID nº:24) o los residuos aminoácidos de a C1qC correspondientes a los residuos aminoácidos 184 a 192 (RSGVKVVTTF) de SEC ID nº:3 (SEC ID nº:24); (g) los residuos aminoácidos 185 a 187 de SEC ID nº:3 o los residuos aminoácidos de a C1qC correspondientes a los residuos aminoácidos 185 a 187 (SGV) de SEC ID nº:3; (h) el residuo aminoácido Ser 185 de SEC ID nº:3 o un residuo aminoácido de un C1qC correspondiente al residuo aminoácido Ser 185 de SEC ID nº:3.

En determinadas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1q se une a los residuos aminoácidos Lys 219 y Ser 202 del C1qA humano, tal como se muestra en SEC ID nº: 1 o a los aminoácidos de un C1qA humano correspondientes a Lys 219 y Ser 202, tal como se muestra en SEC ID nº: 1, y al residuo aminoácido Tyr 225 del C1qC humano, tal como se muestra en SEC ID nº: 3, o a un residuo aminoácido de un C1qC humano correspondiente a Tyr 225, tal como se muestra en SEC ID nº: 3. En determinadas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1q se une al residuo aminoácido Lys 219 del C1qA humano, tal como se muestra en SEC ID nº: 1, o a un residuo aminoácido de un C1qA humano correspondiente a Lys 219, tal como se muestra en SEC ID nº: 1, y el residuo aminoácido Ser 185 del C1qC humano, tal como se muestra en SEC ID nº: 3 o un residuo aminoácido de un C1qC humano correspondiente a Ser 185, tal como se muestra en SEC ID nº: 3.

En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1q se une a una proteína C1q y se une a uno o más aminoácidos de la proteína C1q entre los residuos aminoácidos seleccionados de: (a) los residuos aminoácidos 218 a 240 de SEC ID nº: 3 (SEC ID nº: 20) o los residuos aminoácidos de un C1qC correspondiente a los residuos aminoácidos 218 a 240 (WLAVNDYYDMVGI QGSDSVFSGF) de SEC ID nº: 3 (SEC ID nº: 20); (b) los residuos aminoácidos 225-240 de SEC ID nº: 3 (SEC ID nº: 21) o los residuos aminoácidos de a C1qC correspondientes a los residuos aminoácidos 225 a 240 (YDMVGI QGSDSVFSGF) de SEC ID nº: 3 (SEC ID nº: 21); (c) los residuos aminoácidos 225-232 de SEC ID nº: 3 (SEC ID nº: 22) o los residuos aminoácidos de a C1qC correspondientes a los residuos aminoácidos 225 a 232 (YDMVGIQG) de SEC ID nº: 3 (SEC ID nº: 22); (d) el residuo aminoácido Tyr 225 de SEC ID nº: 3 o un residuo aminoácido de un C1qC correspondiente al residuo aminoácido Tyr 225 de SEC ID nº: 3; (e) los residuos aminoácidos 174 a 196 de SEC ID nº: 3 (SEC ID nº: 23) o los residuos aminoácidos de a C1qC correspondientes a los residuos aminoácidos 174 a 196 (HTANLCVLLYRSGVKVTF) de SEC ID nº: 3 (SEC ID nº: 23); (f) los residuos aminoácidos 184 a 192 de SEC ID nº: 3 (SEC ID nº: 24) o los residuos aminoácidos de a C1qC correspondientes a los residuos aminoácidos 184 a 192 (RSGVKVTF) de SEC ID nº: 3 (SEC ID nº: 24); (g) los residuos aminoácidos 185 a 187 de SEC ID nº: 3 o los residuos aminoácidos de a C1qC correspondientes a los residuos aminoácidos 185 a 187 (SGV) de SEC ID nº: 3; (h) el residuo aminoácido Ser 185 de SEC ID nº: 3 o un residuo aminoácido de un C1qC correspondiente al residuo aminoácido Ser 185 de SEC ID nº: 3.

En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación inhibe la interacción entre C1q y C1s. En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1q inhibe la interacción entre C1q y C1r. En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1q inhibe la interacción entre C1q y C1s, y entre C1q y C1r. En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1q inhibe la interacción entre C1q y otro anticuerpo, tal como un autoanticuerpo. En las puestas en práctica preferidas, el anticuerpo anti-C1q provoca el aclaramiento de C1q de la circulación o tejido. En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1q inhibe las interacciones respectivas, a un estequiometría inferior a 2.5:1, 2.0:1, 1.5:1 o 1.0:1. En algunas puestas en práctica, el anticuerpo de C1q inhibe una interacción, tal como la interacción C1q-C1s, a concentraciones aproximadamente equimolares de C1q y el anticuerpo anti-C1q. En otras puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1q se une a C1q con una estequiometría inferior a 20:1, inferior a 19.5:1, inferior a 19:1, inferior a 18.5:1, inferior a 18:1, inferior a 17.5:1, inferior a 17:1, inferior a 16.5:1, inferior a 16:1, inferior a 15.5:1, inferior a 15:1, inferior a 14.5:1, inferior a 14:1, inferior a 13.5:1, inferior a 13:1, inferior a 12.5:1, inferior a 12:1, inferior a 11.5:1, inferior a 11:1, inferior a 10.5:1, inferior a 10:1, inferior a 9.5:1, inferior a 9:1, inferior a 8.5:1, inferior a 8:1, inferior a 7.5:1, inferior a 7:1, inferior a 6.5:1, inferior a 6:1, inferior a 5.5:1, inferior a 5:1, inferior a 4.5:1, inferior a 4:1, inferior a 3.5:1, inferior a 3:1, inferior a 2.5:1, inferior a 2.0:1, inferior a 1.5:1, o inferior a 1.0:1. En determinadas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1q se une a C1q con una estequiometría de unión comprendida entre 20:1 y 1.0:1 o inferior a 1.0:1. En determinadas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1q se une a C1q con una estequiometría de unión comprendida entre 6:1 y 1.0:1 o inferior a 1.0:1. En determinadas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1q se une a C1q con una estequiometría de unión comprendida entre 2.5:1 y 1.0:1 o inferior a 1.0:1. En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1q inhibe la interacción entre C1q y C1r, o entre C1q y C1s, o entre C1q y tanto C1r como C1s. En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1q inhibe la interacción entre C1q y C1r, entre C1q y C1s, y/o entre C1q y tanto C1r como C1s. En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1q se une a la cadena A de C1q. En otras puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1q se une a la cadena B de C1q. En otras puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1q se une a la cadena C de C1q. En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1q se une a la cadena A de C1q, a la cadena B de C1q y/o a la cadena C de C1q. En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1q se une al dominio globular de la cadena A, a la cadena B y/o a la cadena C de C1q. En otras puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1q se une al dominio similar a colágeno de la cadena A de C1q, de la cadena B de C1q y/o de la cadena C de C1q.

Donde los anticuerpos de la presente divulgación inhiben la interacción entre dos o más factores del complemento, tal como la interacción entre C1q y C1s, o la interacción entre C1q y C1r, la interacción que ocurre en la presencia del anticuerpo puede reducirse en por lo menos 10 %, por lo menos 20 %, por lo menos 30 %, por lo menos 40 %, por lo menos 50 %, por lo menos 60 %, por lo menos 70 %, por lo menos 80 %, por lo menos 90 %, por lo menos 95 %, o por lo menos 99 % respecto a un control en el que los anticuerpos de la presente divulgación están ausentes. En determinadas puestas en práctica, la interacción que ocurre en la presencia del anticuerpo se reduce en una cantidad comprendida entre por lo menos 30 % y por lo menos 99 % respecto a un control en el que los anticuerpos de la presente divulgación están ausentes.

En algunas puestas en práctica, los anticuerpos de la presente divulgación inhiben la escisión de C2 o C4 en por lo menos 20 %, por lo menos 30 %, por lo menos 40 %, por lo menos 50 %, por lo menos 60 %, por lo menos 70 %, por lo menos 80 %, por lo menos 90 %, por lo menos 95 %, o por lo menos 99 %, o en una cantidad comprendida entre por lo menos 30 % y por lo menos 99 %, respecto a un control en el que los anticuerpos de la presente divulgación están ausentes. Los métodos para medir la escisión de C2 o C4 son bien conocidos en la materia. Los valores de EC50 para los anticuerpos de la presente divulgación con respecto a la escisión de C2 o C4 pueden ser inferiores a 3 µg/ml, 2.5 µg/ml, 2.0 µg/ml, 1.5 µg/ml, 1.0 µg/ml, 0.5 µg/ml, 0.25 µg/ml, 0.1 µg/ml, 0.05 µg/ml. En algunas puestas en práctica, los anticuerpos de la presente divulgación inhiben la escisión de C2 o C4 a concentraciones aproximadamente equimolares de C1q y el anticuerpo anti-C1q correspondiente.

En algunas puestas en práctica, los anticuerpos de la presente divulgación inhiben la citotoxicidad dependiente de autoanticuerpos y dependiente del complemento (CDC) en por lo menos 20 %, por lo menos 30 %, por lo menos 40 %, por lo menos 50 %, por lo menos 60 %, por lo menos 70 %, por lo menos 80 %, por lo menos 90 %, por lo menos 95 %, o por lo menos 99 %, respecto a un control en el que los anticuerpos de la presente divulgación están ausentes. Los valores de EC50 para los anticuerpos de la presente divulgación con respecto a la inhibición de la citotoxicidad dependiente de autoanticuerpos y dependiente del complemento puede ser inferior a 3 µg/ml, 2.5 µg/ml, 2.0 µg/ml, 1.5 µg/ml, 1.0 µg/ml, 0.5 µg/ml, 0.25 µg/ml, 0.1 µg/ml o 0.05 µg/ml.

En algunas puestas en práctica, los anticuerpos de la presente divulgación inhiben la citotoxicidad mediada por células dependiente del complemento (CDCC) en por lo menos 20 %, por lo menos 30 %, por lo menos 40 %, por lo menos 50 %, por lo menos 60 %, por lo menos 70 %, por lo menos 80 %, por lo menos 90 %, por lo menos 95 %, o por lo menos 99 %, o por una cantidad comprendida entre por lo menos 30 % y por lo menos 99 %, respecto a un control en el que los anticuerpos de la presente divulgación están ausentes. Los métodos para medir la CDCC son bien conocidos en la materia. Los valores de EC50 para los anticuerpos de la presente divulgación con respecto a la inhibición de CDCC pueden ser inferiores a 3 µg/ml, 2.5 µg/ml, 2.0 µg/ml, 1.5 µg/ml, 1.0 µg/ml, 0.5 µg/ml, 0.25 µg/ml, 0.1 µg/ml o 0.05 µg/ml. En algunas puestas en práctica, los anticuerpos de la presente divulgación inhiben la CDCC pero no la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

Anticuerpos anti-C1q del complemento humanizados

Los anticuerpos humanizados de la presente divulgación se unen específicamente a un factor C1q del complemento y/o proteína C1q en el complejo C1 de la ruta clásica del complemento. El anticuerpo anti-C1q humanizado puede unirse específicamente a C1q humano, C1q humano y de ratón, a C1q de rata, o a C1q humano, C1q de ratón y C1q de rata.

En algunas puestas en práctica, la región constante de cadena pesada humana es una región constante de cadena pesada de IgG4 humana que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID n°: 47 o con una homología respecto a SEC ID n°: 47 de por lo menos 70 %, por lo menos aproximadamente 75 %, por lo menos aproximadamente 80 %, por lo menos aproximadamente 85 % o por lo menos aproximadamente 90 %. La región constante de cadena pesada de la IgG4 humana puede comprender una región Fc con una o más modificaciones y/o sustituciones de aminoácidos según la numeración de Kabat. En tales casos, la región Fc comprende una sustitución de aminoácido leucina a glutamato en la posición 248, en donde dicha sustitución inhibe la región Fc de interactuar con un receptor de Fc. En algunas puestas en práctica, la región Fc comprende una sustitución de aminoácido serina a prolina en la posición 241, en la que dicha sustitución evita el intercambio de brazos en el anticuerpo.

La secuencia de aminoácidos del dominio constante de cadena pesada de la IgG4 humana (S241P L248E) es:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPPAPEFEG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVY
TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLL
YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEC ID NO: 47).

El anticuerpo puede comprender un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera, en el que el dominio variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las SEC ID n°: 31 a 34, o una secuencia de aminoácidos con una homología de por lo menos aproximadamente 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las SEC ID n°: 31 a 34. En determinadas de tales puestas en práctica, el dominio variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las SEC ID n°: 35 a 38, o una secuencia de aminoácidos con una homología de por lo menos aproximadamente 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las SEC ID n°: 35 a 38.

La secuencia de aminoácidos de la variante 1 de dominio variable de cadena pesada (VH1) es:

QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKSSGYHFTSYWMHWVKQAPGQGLEWIGVIHPN
SGSINYNEKFESKATITVDKSTSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAGERDSTEVLPM
WDYWGQGTSTVTVSS (SEC ID n°: 31).

Las regiones hipervariables (HVR) de VH1 se muestran en negrita y subrayadas.

La secuencia de aminoácidos de la variante 2 de dominio variable de cadena pesada (VH2) es:

QVQLVQSGAELKKPGASVKVCKSS**GYHFTSYWMH**WVKQAPGQGLEWIG**VIHPN**
SGSINYNEKFESRATITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGE**ERDSTEVLPM**DY
 WGQGTTTVTVSS (SEC ID nº: 32).

Las regiones hipervariables (HVR) de VH2 se muestran en negrita y subrayadas.

La secuencia de aminoácidos de la variante 3 de dominio variable de cadena pesada (VH3) es:

QVQLVQSGAELKKPGASVKVCKSS**GYHFTSYWMH**WVKQAPGQGLEWIG**VIHPN**
SGSINYNEKFESRVITITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGE**ERDSTEVLPM**DY
 WGQGTTTVTVSS (SEC ID nº: 33).

Las regiones hipervariables (HVR) de VH3 se muestran en negrita y subrayadas.

La secuencia de aminoácidos de la variante 4 de dominio variable de cadena pesada (VH4) es:

QVQLVQSGAELKKPGASVKVCKSS**GYHFTSYWMH**WVRQAPGQGLEWIG**VIHPN**
SGSINYNEKFESRVITITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGE**ERDSTEVLPM**DY
 WGQGTTTVTVSS (SEC ID nº: 34).

Las regiones hipervariables (HVR) de VH4 se muestran en negrita y subrayadas.

La secuencia de aminoácidos de la variante 1 de dominio variable de cadena ligera kappa (Vk1) es:

DVQITQSPSYLAASLGERATINC**RASKSINKYLA**WYQQKPGKTNKLLIY**SGSTLOS**G
 IPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAMYYC**QQHNEYPLT**FGQGGTKLEIK (SEC ID NO: 35).

Las regiones hipervariables (HVR) de Vk1 se muestran en negrita y subrayadas.

La secuencia de aminoácidos de la variante 2 de dominio variable de cadena ligera kappa (Vk2) es:

DVQITQSPSSLSASLGERATINC**RASKSINKYLA**WYQQKPGKANKLLIY**SGSTLOS**GI
 PARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAMYYC**QQHNEYPLT**FGQGGTKLEIK (SEC ID NO: 36).

Las regiones hipervariables (HVR) de Vk2 se muestran en negrita y subrayadas.

La secuencia de aminoácidos de la variante 3 de dominio variable de cadena ligera kappa (Vk3) es:

DVQITQSPSSLSASLGERATINC**RASKSINKYLA**WYQQKPGKAPKLLIY**SGSTLOS**GI
 PARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAMYYC**QQHNEYPLT**FGQGGTKLEIK (SEC ID NO: 37).

Las regiones hipervariables (HVR) de Vk3 se muestran en negrita y subrayadas.

La secuencia de aminoácidos de la variante 4 de dominio variable de cadena ligera kappa (Vk4) es:

DIQLTQSPSSLSASLGERATINC**RASKSINKYLA**WYQQKPGKAPKLLIY**SGSTLOS**GI
 PARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAMYYC**QQHNEYPLT**FGQGGTKLEIK (SEC ID NO: 38).

Las regiones hipervariables (HVR) de Vk4 se muestran en negrita y subrayadas.

El anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera que es por lo menos 85 %, 90 % o 95 % idéntica a SEC ID nº: 35 a 38, a la vez que retiene la secuencia de HVR-L1 RASKSINKYLA (SEC ID nº: 5), la secuencia de HVR-L2 SGSTLQS (SEC ID nº: 6) y la secuencia HVR-L3 QQHNEYPLT (SEC ID nº: 7). El anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos de dominio variable

de cadena pesada que es por lo menos 85 %, 90 % o 95 % idéntica a SEC ID nº: 31 a 34, a la vez que retiene la secuencia de HVR-H1 GYHFTSYWMH (SEC ID nº: 9), la secuencia de HVR-H2 VIHPNSGSINYNEKFES (SEC ID nº: 10) y la secuencia de HVR-H3 ERDSTEVLPMDY (SEC ID nº: 11).

5 En algunas puestas en práctica, los anticuerpos anti-C1q humanizados de la presente divulgación incluyen una región variable de cadena pesada que contiene una región Fab y una región constante de cadena pesada que contiene una región Fc, en los que la región Fab se une específicamente a una proteína C1q de la presente divulgación, pero la región Fc no puede unirse a la proteína C1q. En algunas puestas en práctica, la región Fc es de un isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humano. En algunas puestas en práctica, la región Fc no puede inducir actividad del complemento y/o no puede inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En algunas puestas en práctica, la región Fc comprende una o más modificaciones, incluyendo, aunque sin limitación, sustituciones de aminoácidos. En determinadas puestas en práctica, la región Fc de los anticuerpos anti-C1q humanizados de la presente divulgación comprende una sustitución de aminoácido en la posición 28 según la convención de numeración de Kabat o una posición correspondiente a la posición 248 según la convención de numeración de Kabat, y/o en la posición 241 según la convención de numeración de Kabat o una posición correspondiente a la posición 241 según la convención de numeración de Kabat. En algunas puestas en práctica, la sustitución de aminoácido en la posición 248 o una posición correspondiente a la posición 248 inhibe la interacción de la región Fc con un receptor de Fc. En algunas puestas en práctica, la sustitución de aminoácido en la posición 248 o una posición correspondiente a la posición 248 es una sustitución de aminoácido leucina a glutamato. En algunas puestas en práctica, la sustitución de aminoácido en la posición 241 o una posición correspondiente a la posición 241 evita el intercambio de brazos en el anticuerpo. En algunas puestas en práctica, la sustitución de aminoácido en la posición 241 o una posición correspondiente a la posición 241 es una sustitución de aminoácido serina a prolina. En determinadas puestas en práctica, la región Fc de los anticuerpos anti-C1q humanizados de la presente divulgación comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 47 o una secuencia de aminoácidos con una homología de por lo menos aproximadamente 70 %, por lo menos aproximadamente 75 %, por lo menos aproximadamente 80 %, por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 % o por lo menos aproximadamente 95 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 47.

30 En algunas puestas en práctica, los anticuerpos anti-C1q humanizados de la presente divulgación pueden unirse a una proteína C1q y unirse a uno o más aminoácidos de la proteína C1q dentro de los residuos aminoácidos seleccionados de (a) los residuos aminoácidos 196 a 226 de SEC ID nº: 1 (SEC ID nº: 16), o los residuos aminoácidos de la cadena A de una proteína C1q (C1qA) correspondiente a los residuos aminoácidos 196 a 226 (GLFQVVSGGMVLQLQQGDQVWVEKDPKKGHI) de SEC ID nº: 1 (SEC ID nº: 16), (b) los residuos aminoácidos 196 a 221 de SEC ID nº: 1 (SEC ID nº: 17), o los residuos aminoácidos de un C1qA correspondiente a los residuos aminoácidos 196 a 221 (GLFQVVSGGMVLQLQQGDQVWVEKDP) de SEC ID nº: 1 (SEC ID nº: 17), (c) los residuos aminoácidos 202 a 221 de SEC ID nº: 1 (SEC ID nº: 18), o los residuos aminoácidos de un C1qA correspondiente a los residuos aminoácidos 202 a 221 (SGGMVLQLQQGDQVWVEKDP) de SEC ID nº: 1 (SEC ID nº: 18), (d) los residuos aminoácidos 202 a 219 de SEC ID nº: 1 (SEC ID nº: 19), o los residuos aminoácidos de un C1qA correspondiente a los residuos aminoácidos 202 a 219 (SGGMVLQLQQGDQVWVEK) de SEC ID nº: 1 (SEC ID nº: 19), y (e) los residuos aminoácidos Lys 219 y/o Ser 202 de SEC ID nº: 1, o los residuos aminoácidos de un C1qA correspondiente a Lys 219 y/o Ser 202 de SEC ID nº: 1.

45 En algunas puestas en práctica, los anticuerpos anti-C1q humanizados pueden unirse, además, a uno o más aminoácidos de la proteína C1q dentro de los residuos aminoácidos seleccionados de: (a) los residuos aminoácidos 218 a 240 de SEC ID nº: 3 (SEC ID nº: 20) o los residuos aminoácidos de la cadena C de una proteína C1q (C1qC) correspondientes a los residuos aminoácidos 218 a 240 (WLAVNDYYDMVGI QGSDSVFSGF) de SEC ID nº: 3 (SEC ID nº: 20), (b) los residuos aminoácidos 225-240 de SEC ID nº: 3 (SEC ID nº: 21) o los residuos aminoácidos de un C1qC correspondientes a los residuos aminoácidos 225 a 240 (YDMVGI QGSDSVFSGF) de SEC ID nº: 3 (SEC ID nº: 21), (c) los residuos aminoácidos 225 a 232 de SEC ID nº: 3 (SEC ID nº: 22) o los residuos aminoácidos de un C1qC correspondientes a los residuos aminoácidos 225 a 232 (YDMVGIQG) de SEC ID nº: 3 (SEC ID nº: 22), (d) el residuo aminoácido Tyr 225 de SEC ID nº: 3 o un residuo aminoácido de un C1qC correspondiente a un residuo aminoácido Tyr 225 de SEC ID nº: 3, (e) los residuos aminoácidos 174 a 196 de SEC ID nº: 3 (SEC ID nº: 23) o los residuos aminoácidos de un C1qC correspondientes a los residuos aminoácidos 174 a 196 (HTANLCVLLYRSGVKVVTFCGHT) de SEC ID nº: 3 (SEC ID nº: 23), (f) los residuos aminoácidos 184 a 192 de SEC ID nº: 3 (SEC ID nº: 24) o los residuos aminoácidos de un C1qC correspondientes a los residuos aminoácidos 184 a 192 (RSGVKVVT) de SEC ID nº: 3 (SEC ID nº: 24), (g) los residuos aminoácidos 185 a 187 de SEC ID nº: 3 o los residuos aminoácidos de un C1qC correspondientes a los residuos aminoácidos 185 a 187 (SGV) de SEC ID nº: 3, (h) el residuo aminoácido Ser 185 de SEC ID nº: 3 o un residuo aminoácido de un C1qC correspondiente al residuo aminoácido Ser 185 de SEC ID nº: 3.

65 En determinadas puestas en práctica, los anticuerpos anti-C1q humanizados de la presente divulgación pueden unirse a los residuos aminoácidos Lys 219 y Ser 202 de C1qA humano, tal como se muestra en SEC ID nº: 1 o a aminoácidos de un C1qA humano correspondiente a Lys 219 y Ser 202, tal como se muestra en SEC ID nº: 1, y al residuo aminoácido Tyr 225 de C1qC humano, tal como se muestra en SEC ID nº: 3, o a un residuo aminoácido de un C1qC humano correspondiente a Tyr 225, tal como se muestra en SEC ID nº: 3. En determinadas puestas

en práctica, el anticuerpo anti-C1q se une al residuo aminoácido Lys 219 del C1qA humano, tal como se muestra en SEC ID nº: 1 o a un residuo aminoácido de un C1qA humano correspondiente a Lys 219, tal como se muestra en SEC ID nº: 1, y al residuo aminoácido Ser 185 del C1qC humano, tal como se muestra en SEC ID nº: 3, o a un residuo aminoácido de un C1qC humano correspondiente a Ser 185, tal como se muestra en SEC ID nº: 3.

En algunas puestas en práctica, los anticuerpos anti-C1q humanizados de la presente divulgación pueden unirse a una proteína C1q y unirse a uno o más aminoácidos de la proteína C1q dentro de los residuos aminoácidos seleccionados de: (a) los residuos aminoácidos 218 a 240 de SEC ID nº: 3 (SEC ID nº: 20) o los residuos aminoácidos de un C1qC correspondientes a los residuos aminoácidos 218 a 240 (WLAVNDYYDMVGI QGSDSVFSGF) de SEC ID nº: 3 (SEC ID nº: 20), (b) los residuos aminoácidos 225 a 240 de SEC ID nº: 3 (SEC ID nº: 21) o los residuos aminoácidos de un C1qC correspondiente a los residuos aminoácidos 225 a 240 (YDMVGI QGSDSVFSGF) de SEC ID nº: 3 (SEC ID nº: 21), (c) los residuos aminoácidos 225 a 232 de SEC ID nº: 3 (SEC ID nº: 22) o los residuos aminoácidos de un C1qC correspondiente a los residuos aminoácidos 225 a 232 (YDMVGIQG) de SEC ID nº: 3 (SEC ID nº: 22), (d) el residuo aminoácido Tyr 225 de SEC ID nº: 3 o un residuo aminoácido de un C1qC correspondiente al residuo aminoácido Tyr 225 de SEC ID nº: 3, (e) los residuos aminoácidos 174 a 196 de SEC ID nº: 3 (SEC ID nº: 23) o los residuos aminoácidos de un C1qC correspondiente a los residuos aminoácidos 174 a 196 (HTANLCVLLYRSGVKVVTFCGHT) de SEC ID nº: 3 (SEC ID nº: 23), (f) los residuos aminoácidos 184 a 192 de SEC ID nº: 3 (SEC ID nº: 24) o los residuos aminoácidos de un C1qC correspondientes a los residuos aminoácidos 184 a 192 (RSGVKVVTFC) de SEC ID nº: 3 (SEC ID nº: 24), (g) los residuos aminoácidos 185 a 187 de SEC ID nº: 3 o los residuos aminoácidos de un C1qC correspondientes a los residuos aminoácidos 185 a 187 (SGV) de SEC ID nº: 3, (h) el residuo aminoácido Ser 185 de SEC ID nº: 3 o un residuo aminoácido de un C1qC correspondiente al residuo aminoácido Ser 185 de SEC ID nº: 3.

Anticuerpos anti-C1s del complemento

Entre los inhibidores adecuados se incluyen un anticuerpo que se une a la proteína C1s del complemento (es decir, un anticuerpo anti-C1s del complemento, asimismo denominado en la presente memoria "anticuerpo anti-C1s" y "anticuerpo de C1s") y una molécula de ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo. C1s del complemento es una diana atractiva ya que se encuentra corriente arriba en la cascada del complemento y presenta un intervalo estrecho de especificidad del sustrato. Además, resulta posible obtener anticuerpos (por ejemplo, aunque sin limitación, anticuerpos monoclonales) que se unen específicamente a la forma activada de C1s.

En determinados aspectos, en la presente memoria se divulgan métodos de administración de un anticuerpo anti-C1s. El anticuerpo puede ser un anticuerpo murino, humanizado o quimérico. En algunas puestas en práctica, el dominio variable de cadena ligera comprende HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3, y la cadena pesada comprende HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 del anticuerpo monoclonal murino anti-C1s humano 5A1 producido por una estirpe celular de hibridoma depositada en la ATCC el 15 de mayo de 2013, o progenie de la misma (n.º de acceso de la ATCC PTA-120351). En otras puestas en práctica, el dominio variable de cadena ligera comprende la HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 y el dominio variable de cadena pesada comprende la HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 del anticuerpo monoclonal murino anti-C1s humano 5C12 producido por la estirpe celular de hibridoma depositada en la ATCC el 15 de mayo de 2013, o progenie de la misma (n.º de acceso de la ATCC PTA-120352).

En algunas puestas en práctica, los anticuerpos se unen específicamente e inhiben la actividad biológica de C1s o el proenzima C1s, tal como la unión de C1 a C1q, la unión de C1s a C1r, o la unión de C1s a C2 o C4. La actividad biológica puede ser una actividad enzimática proteolítica de C1s, la conversión del proenzima de C1s en una proteasa activa, o el corte proteolítico de C2 o C4. En determinadas puestas en práctica, la actividad biológica es la activación de la ruta clásica de activación del complemento, la activación de citotoxicidad dependiente de anticuerpos y el complemento, o hemólisis de C1F.

En la presente memoria se divulgan métodos de administración de un anticuerpo monoclonal humanizado que se une específicamente a un epítipo dentro de una región que comprende los dominios IV y V del componente C1s del complemento. En algunos casos, el anticuerpo inhibe la unión de C1s al componente 4 del complemento (C4) y/o no inhibe la actividad de proteasa de C1s. En algunas puestas en práctica, el método comprende la administración de un anticuerpo monoclonal humanizado que se une al componente C1s del complemento en un complejo C1 con elevada avidéz.

En la presente memoria se divulgan métodos de administración de un anticuerpo anti-C1s con una o más de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una región variable de cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 57 y/o una o más de las CDR de una región variable de cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 58. El anticuerpo anti-C1s puede unirse a una proteína C1s del complemento humano o de rata. En algunas puestas en práctica, un anticuerpo anti-C1s inhibe el corte de por lo menos un sustrato cortado por la proteína C1s del complemento.

En determinadas puestas en práctica, el anticuerpo comprende: a) una región determinante de complementariedad (CDR) que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID nº: 51, SEC ID nº: 52, SEC ID nº: 53,

SEC ID nº: 54, SEC ID nº: 55 y SEC ID nº: 56, y/o b) una CDR que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID nº: 62, SEC ID nº: 63, SEC ID nº: 53, SEC ID nº: 64, SEC ID nº: 65 y SEC ID nº: 66.

El anticuerpo puede comprender una CDR-L1 que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 51, una CDR-L2 que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 52, una CDR-L3 que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 53, una CDR-H1 que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 54, una CDR-H2 que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 55, y una CDR-H3 que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 56.

En otras puestas en práctica, el anticuerpo puede comprender CDR de cadena ligera de una región variable con la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 67 y/o CDR de cadena pesada de una región variable con la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 68.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado que se une específicamente al componente C1s del complemento, en el que el anticuerpo compite para la unión del epítipo con un anticuerpo que comprende una o más CDR de una región variable de cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 57 o SEC ID nº: 67, y/o una o más de las CDR de una región variable de cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 58 o SEC ID nº: 68.

En otros casos, el anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado que se une específicamente a C1s del complemento, en el que el anticuerpo se selecciona de: a) un anticuerpo humanizado que se une específicamente a un epítipo dentro de la proteína C1s del complemento, en el que el anticuerpo compite para la unión al epítipo con un anticuerpo que comprende una CDR que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID nº: 51, SEC ID nº: 52, SEC ID nº: 53, SEC ID nº: 54, SEC ID nº: 55 y SEC ID nº: 56, y b) un anticuerpo humanizado que se une específicamente a un epítipo dentro de la proteína C1s del complemento, en el que el anticuerpo compite para la unión del epítipo con un anticuerpo que comprende una CDR que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID nº: 62, SEC ID nº: 63, SEC ID nº: 53, SEC ID nº: 64, SEC ID nº: 65 y SEC ID nº: 66. En algunos casos, el anticuerpo compite para la unión al epítipo con un anticuerpo que comprende CDR de cadena pesada y ligera que comprenden: a) SEC ID nº: 51, SEC ID nº: 52, SEC ID nº: 53, SEC ID nº: 54, SEC ID nº: 55 y SEC ID nº: 56, o b) SEC ID nº: 62, SEC ID nº: 63, SEC ID nº: 53, SEC ID nº: 64, SEC ID nº: 65 y SEC ID nº: 66.

El anticuerpo puede comprender una región de cadena ligera y una región de cadena pesada que están presentes en polipéptidos separados. El anticuerpo puede comprender una región Fc.

En la presente memoria se divulga un anticuerpo anti-C1s que comprende una región variable de cadena ligera de una secuencia de aminoácidos que es idéntica al 90 % a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 57, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al 90 % a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 58.

El anticuerpo anti-C1s puede seleccionarse de un fragmento de unión a antígeno, monómero de Ig, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fd, un scFv, un scAb, un dAb, un Fv, un anticuerpo de cadena pesada de dominio único, un anticuerpo de cadena ligera de dominio único, un anticuerpo monoespecífico, un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo multiespecífico.

En la presente memoria se divulgan métodos de administración de un anticuerpo que compite para la unión al epítipo al que se une el anticuerpo IPN003 (asimismo denominado en la presente memoria "IPN-M34" o "M34" o "TNT003"), por ejemplo, un anticuerpo que comprende un dominio variable del anticuerpo IPN003, tal como el anticuerpo IPN003.

En algunas puestas en práctica, el método comprende administrar un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo dentro de una proteína C1s del complemento. En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1s aislado se une a una proteína C1s activada. En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1s aislado se une a una forma inactiva de C1s. En otros casos, el anticuerpo anti-C1s aislado se une tanto a una proteína C1s activada como a una forma inactiva de C1s.

En algunas puestas en práctica, el método comprende administrar un anticuerpo monoclonal que inhibe el corte de C4, en el que el anticuerpo monoclonal aislado no inhibe el corte de C2. En algunas puestas en práctica, el método comprende administrar un anticuerpo monoclonal que inhibe el corte de C2, en el que el anticuerpo monoclonal aislado no inhibe el corte de C4. En algunos casos, el anticuerpo monoclonal aislado está humanizado. En algunos casos, el componente de la ruta clásica del complemento que resulta inhibida por el anticuerpo es C1s. La presente divulgación proporciona, además, métodos de tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por el complemento, mediante la administración al individuo que lo necesita de un anticuerpo monoclonal aislado que inhibe el corte de C4, o una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal aislado, en el que el anticuerpo monoclonal aislado no inhibe el corte de C2.

En algunas puestas en práctica, el método comprende administrar un anticuerpo monoclonal que inhibe el corte de C2 o C4 por C1s, es decir, inhibe el corte proteolítico mediado por C1s de C2 o C4. En algunos casos, el anticuerpo monoclonal se humaniza. En algunos casos, el anticuerpo inhibe el corte de C2 o C4 por C1s mediante inhibición de la unión de C2 o C4 a C1s; por ejemplo, en algunos casos, el anticuerpo inhibe el corte mediado por C1s de C2 o C4 mediante inhibición de la unión de C2 o C4 a un sitio de unión a C2 o C4 de C1s. De esta manera, en algunos casos, el anticuerpo funciona como un inhibidor competitivo. La presente divulgación proporciona, además, métodos de tratamiento de una lesión cerebral, preferentemente una lesión cerebral traumática, una lesión cerebral hipóxica, una infección cerebral, o un accidente cerebrovascular, mediante la administración a un individuo que lo necesita de un anticuerpo monoclonal aislado que inhibe el corte de C2 o C4 por C1s, es decir, inhibe el corte proteolítico mediado por C1s de C2 o C4.

En algunas puestas en práctica, el método comprende administrar un anticuerpo monoclonal que inhibe el corte de C4 por C1s, en el que el anticuerpo no inhibe el corte del componente C2 del complemento por C1s; es decir, el anticuerpo inhibe el corte mediado por C1s de C4, pero no inhibe el corte mediado por C1s de C2. En algunos casos, el anticuerpo monoclonal se humaniza. En algunos casos, el anticuerpo monoclonal inhibe la unión de C4 a C1s, pero no inhibe la unión de C2 a C1s. En algunas puestas en práctica, el método comprende tratar una enfermedad o trastorno mediado por el complemento, mediante la administración a un individuo que lo necesita de un anticuerpo monoclonal aislado que inhibe el corte de C4 por C1s, donde el anticuerpo no inhibe el corte del componente C2 del complemento por C1s; es decir, el anticuerpo inhibe el corte mediado por C1s de C4, pero no inhibe el corte mediado por C1s de C2. En algunas puestas en práctica del método, el anticuerpo se humaniza.

En algunas puestas en práctica, el método comprende administrar un anticuerpo monoclonal humanizado que se une específicamente a un epítipo dentro de una región que comprende los dominios IV y V de C1s. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal humanizado se une específicamente a un epítipo dentro de los aminoácidos 272 a 422 de la secuencia de aminoácidos representada en la figura 1 y proporcionada en SEC ID n°: 70. En algunos casos, el anticuerpo monoclonal humanizado se une específicamente a un epítipo dentro de los aminoácidos 272 a 422 de la secuencia de aminoácidos representada en la figura 1 y proporcionada en SEC ID n°: 70, e inhibe la unión de C4 a C1s. En algunas puestas en práctica, el método comprende tratar una enfermedad o trastorno mediado por el complemento, mediante la administración a un individuo que lo necesita de un anticuerpo monoclonal humanizado que se une específicamente a un epítipo dentro de los aminoácidos 272 a 422 de la secuencia de aminoácidos representada en la figura 1 y proporcionada en SEC ID n°: 70, e inhibe la unión de C4 a C1s.

En algunas puestas en práctica, el método comprende administrar un anticuerpo monoclonal humanizado que se une específicamente a un epítipo conformacional dentro de una región que comprende los dominios IV y V de C1s. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal humanizado que se une específicamente a un epítipo conformacional dentro de los aminoácidos 272 a 422 de la secuencia de aminoácidos representada en la figura 1 y proporcionada en SEC ID n°: 70. En algunos casos, el anticuerpo monoclonal humanizado se une específicamente a un epítipo conformacional dentro de los aminoácidos 272 a 422 de la secuencia de aminoácidos representada en la figura 1 y proporcionada en SEC ID n°: 70, e inhibe la unión de C4 a C1s. En algunas puestas en práctica, el método comprende una lesión cerebral, preferentemente una lesión cerebral traumática, una lesión cerebral hipóxica, una infección cerebral, o un accidente cerebrovascular, en el que el método comprende administrar a un individuo que lo necesita un anticuerpo monoclonal humanizado que se une específicamente a un epítipo conformacional dentro de los aminoácidos 272 a 422 de la secuencia de aminoácidos representada en la figura 1 y proporcionada en SEC ID n°: 70, e inhibe la unión de C4 a C1s.

En algunas puestas en práctica, el método comprende administrar un anticuerpo monoclonal que se une al componente C1s del complemento en un complejo C1. El complejo C1 está compuesto por 6 moléculas de C1q, 2 moléculas de C1r y 2 moléculas de C1s. En algunos casos, el anticuerpo monoclonal se humaniza. De esta manera, en algunos casos, el anticuerpo monoclonal humanizado se une al componente C1s del complemento en un complejo C1. En algunos casos, el anticuerpo se une a C1s presente en un complejo C1 con avidez elevada.

En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1s (por ejemplo, un anticuerpo de la invención que se une específicamente a un epítipo en una proteína C1s del complemento) comprende: a) una región de cadena ligera que comprende una, dos o tres CDR de V_L del anticuerpo IPN003, y b) una región de cadena pesada que comprende una, dos o tres CDR de V_H del anticuerpo IPN003, donde las CDR de V_H y V_L son tal como define Kabat (ver, por ejemplo, la tabla 1 y Kabat 1991).

En otras puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1s (por ejemplo, un anticuerpo de la invención que se une específicamente a un epítipo en una proteína C1s del complemento) comprende: a) una región de cadena ligera que comprende una, dos o tres CDR de V_L del anticuerpo IPN003, y b) una región de cadena pesada que comprende una, dos o tres CDR de V_H del anticuerpo IPN003, donde las CDR de V_H y V_L son tal como define Chothia (ver, por ejemplo, la tabla 1, y Chothia 1987).

Las secuencias de aminoácidos de CDR y las secuencias de aminoácidos de V_L y V_H , del anticuerpo IPN003 se proporcionan en la tabla 2. La tabla 2 proporciona, además, las SEC ID n° asignadas a cada una de las secuencias de aminoácidos.

- 5 En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1s (por ejemplo, un anticuerpo de la invención que se une específicamente a un epítipo en una proteína C1s del complemento) comprende: a) una región de cadena ligera que comprende una, dos o tres CDR seleccionadas de SEC ID n°: 51, SEC ID n°: 52 y SEC ID n°: 53, y b) una región de cadena pesada que comprende una, dos o tres CDR seleccionadas de SEC ID n°: 54, SEC ID n°: 55 y SEC ID n°: 56. En algunas de dichas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1s incluye una región de marco de V_H y/o V_L humanizado.

SEC ID n°: 51	SSVSSSYLHWYQ;
SEC ID n°: 52	STSNLASGVP;
SEC ID n°: 53	HQYYRLPPIT;
SEC ID n°: 54	GFTFSNYAMSWV;
SEC ID n°: 55	ISSGGSHTYY;
SEC ID n°: 56	ARLFTGYAMDY.

- 10 En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-Cs comprende una CDR que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID n°: 51, SEC ID n°: 52, SEC ID n°: 53, SEC ID n°: 54, SEC ID n°: 55 y SEC ID n°: 56.

- 15 En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-Cs comprende una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos SEC ID n°: 51, SEC ID n°: 52 y SEC ID n°: 53.

En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-Cs comprende una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos SEC ID n°: 54, SEC ID n°: 55 y SEC ID n°: 56.

- 20 En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1s comprende una CDR-L1 que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID n°: 51, una CDR-L2 que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID n°: 52, una CDR-L3 que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID n°: 53, una CDR-H1 que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID n°: 54, una CDR-H2 que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID n°: 55, y una CDR-H3 que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID n°: 56.

- 25 En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1s comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a la secuencia de aminoácidos proporcionada en SEC ID n°: 57.

- 30 SEC ID n°: 57:

DIVMTQTTAIMSASLGERVTMTCTASSSVSSSYLHWYQQKPGSSPKLWIYSTSNLAS
GVPARFSGSGSGTFYSLTISMEAEEDATYYCHQYYRLPPITFGAGTKLELK.

- 35 En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1s comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a la secuencia de aminoácidos proporcionada en SEC ID n°: 57.

SEC ID n°: 58:

QVKLEESGGALVKPGSLKLSAASGFTFSNYAMSWVRQIPEKRLEWVATISSGGSH
TYYLDSVKGRFTISRDNARDTLYLQMSSLRSEDTALYYCARLFTGYAMDYWGQGTS

- 40 VT.

En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1s comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al 90 % a la secuencia de aminoácidos SEC ID n°: 57.

- 45 En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1s comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al 90 % a la secuencia de aminoácidos SEC ID n°: 58.

En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1s comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID n°: 57.

- 50 En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1s comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID n°: 58.

En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1s comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica al 90% a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 57 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al 90 % a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 58.

En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1s comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 57 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 58.

En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1s se une específicamente a un epítipo dentro de la proteína C1s del complemento, en el que el anticuerpo compite para la unión al epítipo con un anticuerpo que comprende las CDR de cadena ligera de una región variable de cadena ligera de anticuerpo que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 57 y CDR de cadena pesada de una región variable de cadena pesada de anticuerpo que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 58.

En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1s comprende CDR de cadena ligera de una región variable de cadena ligera de anticuerpo que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 57 y CDR de cadena pesada de una región variable de cadena pesada de anticuerpo que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 58.

En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1s (por ejemplo, un anticuerpo de la invención que se une específicamente a un epítipo en una proteína C1s del complemento) comprende: a) una región de cadena ligera que comprende una, dos o tres CDR seleccionadas de SEC ID nº: 62, SEC ID nº: 63 y SEC ID nº: 53, y b) una región de cadena pesada que comprende una, dos o tres CDR seleccionadas de SEC ID nº: 64, SEC ID nº: 65 y SEC ID nº: 66.

SEC ID nº 62:	TASSSVSSSYLH;
SEC ID nº 63:	STSNLAS;
SEC ID nº 53:	HQYYRLPPIT;
SEC ID nº 64:	NYAMS;
SEC ID nº 65:	TISSGGSHTYYLDSVKG;
SEC ID nº 66:	LFTGYAMDY

En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1s comprende una CDR que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada SEC ID nº: 62, SEC ID nº: 63, SEC ID nº: 53, SEC ID nº: 64, SEC ID nº: 65 y SEC ID nº: 66.

En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1s comprende una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos SEC ID nº: 62, SEC ID nº: 63 y SEC ID nº: 53.

En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1s comprende una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos SEC ID nº: 64, SEC ID nº: 65 y SEC ID nº: 66.

En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1s comprende una CDR-L1 que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 62, una CDR-L2 que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 63, una CDR-L3 que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 53, una CDR-H1 que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 64, una CDR-H2 que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 65 y una CDR-H3 que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 66.

En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1s comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a la secuencia de aminoácidos proporcionada en SEC ID nº: 67.

SEC ID nº: 67:

QIVLTQSPAISASLGERVTMTCTASSSVSSSYLHWYQKPGSSPKLWIYSTSNLASG
VPRFSGSGSGTFYSLTISSMEAEDDATYYCHQYYRLPPITFGAGTKLELK.

En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1s comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a la secuencia de aminoácidos proporcionada en SEC ID nº: 68.

SEC ID nº: 68:

EVMLVESGGALVKPGGSLKLSAASGFTFSNYAMSWVRQIPEKRLEWVATISSGGG
HTYYLDSVKGRFTISRDNARDTLYLQMSSLRSEDTALYYCARLFTGYAMDYWGQG
TSVTVSS.

- 5 En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1s comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al 90 % a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 67.
- En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1s comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al 90 % a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 68.
- 10 En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1s comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 67.
- En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1s comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 68.
- 15 En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1s comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al 90 % a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 67 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al 90 % a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 68.
- 20 En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1s comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al 95 % a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 67 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al 95 % a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 68.
- 25 En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1s comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 67 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 68.
- 30 En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1s se une específicamente a un epítipo dentro de la proteína C1s del complemento, en el que el anticuerpo compite por la unión al epítipo con un anticuerpo que comprende CDR de cadena ligera de una región variable de cadena ligera de anticuerpo que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 67 y CDR de cadena pesada de una región variable de cadena pesada de anticuerpo que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 68.
- 35 En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1s comprende CDR de cadena ligera de una región variable de cadena ligera de anticuerpo que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 67 y CDR de cadena pesada de una región variable de cadena pesada de anticuerpo que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 68.
- 40 En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1s comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a la secuencia de aminoácidos proporcionada en SEC ID nº: 67.
- 45 En algunas puestas en práctica, el anticuerpo anti-C1s comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a la secuencia de aminoácidos proporcionada en SEC ID nº: 68.
- 50 Un anticuerpo anti-C1s puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % a la secuencia de aminoácidos proporcionada en SEC ID nº: 79 y representada en la figura 2 (V_H variante 1).
- 55 Un anticuerpo anti-C1s puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % a la secuencia de aminoácidos proporcionada en SEC ID nº: 80 y representada en la figura 3 (V_H variante 2).
- 60 Un anticuerpo anti-C1s puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % a la secuencia de aminoácidos proporcionada en SEC ID nº: 81 y representada en la figura 4 (V_H variante 3).

Un anticuerpo anti-C1s puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % a la secuencia de aminoácidos proporcionada en SEC ID n°: 82 y representada en la figura 5 (V_H variante 4).

Un anticuerpo anti-C1s puede comprender una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % a la secuencia de aminoácidos proporcionada en SEC ID n°: 83 y representada en la figura 6 (V_K variante 1).

Un anticuerpo anti-C1s puede comprender una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % a la secuencia de aminoácidos proporcionada en SEC ID n°: 84 y representada en la figura 7 (V_K variante 2).

Un anticuerpo anti-C1s puede comprender una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % a la secuencia de aminoácidos proporcionada en SEC ID n°: 85 y representada en la figura 8 (V_K variante 3).

Un anticuerpo anti-C1s puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 de las sustituciones de aminoácido de marco (FR), respecto a las secuencias de aminoácidos de FR del anticuerpo parental IPN003, mostrado en la tabla 3 (figura 9).

Definiciones

Tal como se utiliza en la presente memoria, la especificación "un" o "una" puede significar uno o más. Tal como se utiliza en la presente memoria, en la reivindicación o reivindicaciones, al utilizarlos junto con la expresión "que comprende", los términos "un" o "una" pueden referirse a uno o a más de uno. Por ejemplo, la referencia a un "anticuerpo" es una referencia a entre uno y muchos anticuerpos. Tal como se utiliza en la presente memoria, "otro" se refiere a por lo menos un segundo o más.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la administración "conjunta" con otro compuesto o composición incluye la administración simultánea y/o la administración en diferentes tiempos. La administración conjunta comprende, además, la administración en forma de una coformulación o la administración en forma de composiciones separadas, incluyendo a diferentes frecuencias o intervalos de administración, y utilizando la misma vía de administración o vías de administración diferentes.

El término "inmunoglobulina" (Ig) se utiliza intercambiamente con "anticuerpo" en la presente memoria. El término "anticuerpo" en la presente memoria se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados de por lo menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos, con la condición de que muestren la actividad biológica deseada.

La unidad de anticuerpo básica de 4 cadenas es una glucoproteína heterotetramérica compuesta por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. El emparejamiento de un V_H y V_L juntos forma un único sitio de unión a antígeno. Para la estructura y propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, ver, por ejemplo, Basic and Clinical Immunology, 8a ed., Daniel P. Stites, Abba I. Terr y Tristram G. Parslow (editores), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, páginas 71 y capítulo 6.

La cadena L de cualquier especie de vertebrado puede asignarse a uno de dos posibles tipos claramente diferentes, llamados kappa ("κ") y lambda ("λ"), basados en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (CH), las inmunoglobulinas pueden asignarse a clases o isotipos diferentes. Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que presentan cadenas pesadas denominadas alfa ("α"), delta ("δ"), epsilon ("ε"), gamma ("γ") y mu ("μ"), respectivamente. Las clases γ y α se dividen adicionalmente en subclases (isotipos) basándose en diferencias relativamente menores en la secuencia y función de CH, por ejemplo, seres humanos que expresan las subclases siguientes: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Las estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas y se describen de manera general en, por ejemplo, Abbas et al., Cellular and Molecular Immunology, 4a ed. (W.B. Saunders Co., 2000).

Los "anticuerpos naturales" normalmente son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante un enlace covalente disulfuro, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y cada

cadena ligera asimismo presenta puentes disulfuro intracadena uniformemente espaciados. Cada cadena pesada presenta en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera presenta un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y de cadena pesada.

Una molécula o célula "aislada" es una molécula o una célula que se identifica y se separa de por lo menos una molécula o célula contaminante con la que está habitualmente asociada en el medio en que se produjo. Preferentemente, la molécula o célula aislada está libre de asociación con todos los componentes asociados con el medio de producción. La molécula o célula aislada se encuentra en una forma diferente de la forma o contexto en que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas aisladas se distinguen de las moléculas que existen naturalmente en las células; las células aisladas se distinguen de las células que existen naturalmente en tejidos, órganos o individuos. En algunas puestas en práctica, la molécula aislada es un anticuerpo anti-C1s, anti-C1q o anti-C1r de la presente divulgación. En otras puestas en práctica, la célula aislada es una célula hospedadora o célula de hibridoma que produce un anticuerpo anti-C1s, anti-C1q o anti-C1r de la presente divulgación.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado, separado y/o recuperado a partir de un componente de su medio de producción (por ejemplo, natural o recombinantemente). Preferentemente, el polipéptido aislado está libre de asociación con todos los demás componentes contaminantes de su medio de producción. Los componentes contaminantes de su medio de producción, tales como aquellos resultantes de células transfectadas recombinantes, son materiales que normalmente interferirían con los usos de investigación, diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En determinadas puestas en práctica preferidas, el polipéptido se purifica: (1) hasta más de 95 % en peso de anticuerpo según se determina mediante, por ejemplo, el método de Lowry, y en algunas puestas en práctica, hasta más de 99 % en peso, (2) en un grado suficiente para obtener por lo menos quince residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de taza giratoria, o (3) hasta la homogeneidad, mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras o reductoras utilizando tinción azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. Un anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células T recombinantes, ya que por lo menos un componente del medio natural del anticuerpo no estará presente. Sin embargo, habitualmente se preparará un polipéptido o anticuerpo aislado mediante un procedimiento que incluye por lo menos una etapa de purificación.

La "región variable" o "dominio variable" de un anticuerpo se refiere a los dominios aminoterminales de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. Los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera pueden denominarse " V_H " y " V_L ", respectivamente. Estos dominios generalmente son las partes más variables del anticuerpo (respecto a otros anticuerpos de la misma clase) y contienen los sitios de unión a antígeno.

El término "variable" se refiere al hecho de que determinados segmentos de los dominios variables difieren ampliamente en secuencia entre anticuerpos. El dominio V actúa de mediador en la unión de antígenos y define la especificada de un anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está uniformemente distribuida en toda la extensión de los dominios variables. Por el contrario, se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables (HVR), en los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan "regiones marco" (FR). Cada uno de los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras naturales comprende cuatro regiones FR, que mayoritariamente adoptan una configuración de hoja beta, conectadas mediante tres HVR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte, de la estructura de hojas beta. Las HVR en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad mediante las regiones FR y, con las HVR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (ver Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest*, quinta edición, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no participan directamente en la unión del anticuerpo al antígeno, sino que muestran diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "CDR", o "región determinante de complementariedad", pretende referirse a sitios de unión a antígeno no contiguos que se encuentran dentro de la región variable de los polipéptidos tanto de cadena pesada como de cadena ligera. Las CDR han sido descritas por Kabat et al., *J. Biol. Chem.* 252:6609-6616 (1977); Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of proteins of immunological interest" (1991) (a la que se hace referencia asimismo en la presente memoria como Kabat 1991); por Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987) (a la que se hace referencia asimismo en la presente memoria como Chothia 1987), y MacCallum et al., *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996), en los que las definiciones incluyen residuos aminoácidos solapantes o subgrupos de ellos al compararlos unos con otros. Sin embargo, la aplicación de cualquiera de las definiciones para referirse a una CDR de un anticuerpo o anticuerpos injertados o variantes de los mismos se pretende que esté comprendida dentro del alcance del término tal como se define y utiliza en la presente memoria. Los residuos aminoácidos, que comprenden las CDR, tal como se definen mediante cada una de las referencias anteriormente citadas, se proporcionan a continuación, en la tabla 1, a modo de comparación. Las CDR enumeradas en la tabla 2 se definen de acuerdo con Kabat 1991.

Tabla 1

Definiciones de CDR

5

	Kabat ¹	Chothia ²	MacCallum ³
V _H CDR-1	31-35	26-32	30-35
V _H CDR-2	50-65	53-55	47-58
V _H CDR-3	95-102	96-101	93-101
V _L CDR-1	24-34	26-32	30-36
V _L CDR-2	50-56	50-52	46-55
V _L CDR-3	89-97	91-96	89-96

¹La numeración de los residuos sigue la nomenclatura de Kabat et al., *supra*²La numeración de residuos sigue la nomenclatura de Chothia et al., *supra*³La numeración de residuos sigue la nomenclatura de MacCallum et al., *supra*

ES 3 015 004 T3

Tabla 2

Anticuerpo	CDR-1	CDR-2	CDR-3	Región V
V _L de IPN-M34	SEC ID nº. 51 SSVSSSYLHW YQ	SEC ID nº. 52 STSNLASGVP	SEC ID nº. 53 HQYYRLPPIT	SEC ID NO. 57 DIVMTQTAIMSASLGERVTMTCTASSSVSSS YLHWYQQKPGSSPKLWIYSTSNLASGVPARFS GSGSGTFYSLTISSMEAEDDATYYCHQYYRLP PITFGAGTKLELK
V _H de IPN-M34	SEC ID nº. 54 GFTFSNYAMS W V	SEC ID nº. 55 ISSGGSHTYY	SEC ID nº. 56 ARLFTGYAMD Y	SEC ID NO. 58 QVKLEESGGALVKPGGSLKLSCAASGFTFSNY AMSWVRQIPEKRLEWVATISSGGSHTYYLDS VKGRFTISRDNARDTL YLQMSSLRSEDALYY CARLFTGYAMDYWGQGTSTVT

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "CDR-L1", "CDR-L2" y "CDR-L3" se refieren a las primera, segunda y tercera CDR, respectivamente, en una región variable de cadena ligera. Tal como se utilizan en la presente memoria, los términos "CDR-H1", "CDR-H2" y "CDR-H3" se refieren a las primera, segunda y tercera CDR, respectivamente, en una región variable de cadena pesada. Tal como se utilizan en la presente memoria, los términos "CDR-1", "CDR-2" y "CDR-3" se refieren a las primera, segunda y tercera CDR, respectivamente, de cualquiera de la región variable de cualquiera de las cadenas.

La expresión "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, es decir, los anticuerpos individuales de la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales y/o modificaciones postraduccionales (por ejemplo, isomerizaciones o amidaciones) que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, al presentar como diana un único sitio antigénico. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que normalmente incluyen diferentes anticuerpos con diana en diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal presenta como diana un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales resultan ventajosos ya que son sintetizados habitualmente mediante cultivo de hibridoma, no contaminado por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido en forma de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que van a utilizarse según la presente divulgación pueden prepararse mediante una variedad de técnicas, incluyendo, por ejemplo, el método del hibridoma (por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo et al., *Hybridoma*, 14(3):253-260 (1995); Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2a ed., 1988); Hammerling et al., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), métodos de ADN recombinante (ver, por ejemplo, la patente US nº 4.816.567), tecnologías de expresión fágica (ver, por ejemplo, Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1992); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 101(34):12467-472 (2004) y Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 (2004), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o similares a humanos en animales que presentan partes o la totalidad de los loci o genes de inmunoglobulina humanos codificantes de secuencias de inmunoglobulina humana (ver, por ejemplo, los documentos WO 1998/24893, WO 1996/34096, WO 1996/33735, WO 1991/10741; Jakobovits et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature* 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.* 7:33 (1993); patentes US nº 5.545.807, nº 5.545.806, nº 5.569.825, nº 5.625.126, nº 5.633.425 y nº 5.661.016; Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368:812-813 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnol.* 14:845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14:826 (1996) y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995).

Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se utilizan intercambiamente para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, en lugar de un fragmento de anticuerpo. Específicamente, entre los anticuerpos completos se incluyen aquellos con cadenas pesadas y ligeras, incluyendo una región Fc. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia natural (por ejemplo, dominios constantes de secuencia natural humana) o variantes de secuencia de aminoácidos de los mismos. En algunos casos, el anticuerpo intacto puede presentar una o más funciones efectoras.

Un "fragmento de anticuerpo" comprende una parte de un anticuerpo intacto, preferentemente la región de unión a antígeno y/o la región variable del anticuerpo intacto. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (ver la patente US nº 5.641.870, ejemplo 2; Zapata et al., *Protein Eng.* 8(10):1057-1062 (1995)); moléculas de anticuerpo de cadena sencilla y anticuerpos multispecíficos formados por fragmentos de anticuerpos.

La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab" y un fragmento "Fc" residual, una designación que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consiste en una cadena L entera junto con el dominio de región variable de la cadena H (V_H) y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_{H1}). Cada fragmento Fab es monovalente con respecto a la unión de antígeno, es decir, presenta un único sitio de unión a antígeno. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo proporciona un único fragmento F(ab')₂ de gran tamaño que corresponde aproximadamente a dos fragmentos Fab unidos mediante enlace disulfuro que presentan diferente actividad de unión a antígeno y que todavía es capaz de enlace cruzado con un antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en que presentan unos cuantos residuos adicionales en el extremo carboxiterminal del dominio C_{H1}, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en la presente memoria de Fab' en la que el residuo o residuos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ originalmente se produjeron en forma de pares de fragmentos Fab' con cisteínas de bisagra entre ellos. Asimismo se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

El fragmento Fc comprende las partes carboxiterminales de ambas cadenas H que se mantienen juntas mediante disulfuros. Las funciones efectoras de los anticuerpos son determinadas por las secuencias en la región Fc, la región que asimismo es reconocida por los receptores de Fc (FcR) presentes en determinados tipos de células.

La expresión "región Fc" en la presente memoria se utiliza para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina podrían variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana habitualmente se define que se extiende desde un residuo aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo-terminal de la misma. La lisina C-terminal (residuo 447 según el sistema de numeración de la UE) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo, o mediante ingeniería recombinante del ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. De acuerdo con lo anterior, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpos de los que se han eliminado todos los residuos K447, las poblaciones de anticuerpos sin eliminación de ningún residuo K447 y las poblaciones de anticuerpos que presentan una mezcla de anticuerpos con o sin el residuo K447. Entre las regiones Fc de secuencia natural adecuadas para la utilización en los anticuerpos de la exposición se incluyen IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas.

Una "región Fc de secuencia natural" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc observada en la naturaleza. Entre las regiones Fc humanas de secuencia natural se incluyen una región Fc de IgG1 humana de secuencia natural (alotipos no A y A); una región Fc de IgG2 humana de secuencia natural; una región Fc de IgG3 humana de secuencia natural y una región Fc de IgG4 humana de secuencia natural, así como variantes naturales de las mismas.

Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia natural en virtud de por lo menos una modificación de aminoácido, preferentemente una o más sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, la región Fc variante presenta por lo menos una sustitución de aminoácido en comparación con una región Fc de secuencia natural o con la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo, entre aproximadamente una y aproximadamente diez sustituciones de aminoácido, y preferentemente entre aproximadamente una y aproximadamente cinco sustituciones de aminoácido en una región Fc de secuencia natural o en la región Fc del polipéptido parental. La región Fc variante en la presente memoria preferentemente poseerá una homología de por lo menos aproximadamente 80 % respecto a una región Fc de secuencia natural y/o respecto a una región Fc de un polipéptido parental, y de la manera más preferente, una homología de por lo menos aproximadamente 90 %, más preferentemente una homología de por lo menos aproximadamente 95 %.

La expresión "receptor de Fc", o "FcR", describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia natural. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas de procesamiento alternativo de dichos receptores; entre los receptores FcγRII se incluyen FcγRIIA (un "receptor activador" y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que presentan secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación a base de tirosinas inmunorreceptor ("ITAM") en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosinas de inmunorreceptor ("ITIM") en su dominio citoplasmático (ver, por ejemplo, M. Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)). Se proporciona una revisión de los FcR en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994) y de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, están comprendidos en el término "FcR" en la presente memoria. Los FcR asimismo pueden incrementar la semivida en suero de los anticuerpos.

La unión a FcRn *in vivo* y la semivida en suero de los polipéptidos de unión de alta afinidad de FcRn humano pueden someterse a ensayo, por ejemplo, en ratones transgénicos o estirpes celulares humanas transfectadas que expresan FcRn humano, o en primates a los que se administren los polipéptidos que presentan una región Fc variante. El documento WO 2004/42072 (Presta) describe variantes de anticuerpo con unión mejorada o disminuida a los FcR. Ver asimismo, por ejemplo, Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001).

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo, que contiene un sitio de reconocimiento y unión a antígeno completo. Este fragmento consiste en un dímero de un dominio de región variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en estrecha asociación no covalente. A partir del plegamiento de estos dos dominios surgen seis bucles hipervariables (3 bucles en cada una de las cadenas H y L) que contribuyen los residuos aminoácidos para la unión de antígenos y confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv, que comprende únicamente tres HVR específicos para un antígeno) presenta la capacidad de reconocer y unirse a un antígeno, aunque a una afinidad más baja que el sitio de unión completo.

"Fv de cadena sencilla", asimismo abreviado como "sFv" o "scFv", son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios de anticuerpo V_H y V_L conectados en una sola cadena polipeptídica. Preferentemente, el polipéptido sFv comprende, además, un conector polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que sFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de los sFv, ver Plückthun, en: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore, editores, Springer-Verlag, New York, páginas 269 a 315 (1994).

La expresión "fragmentos funcionales" de los anticuerpos comprenden una parte de un anticuerpo intacto, que generalmente incluye la región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto o la región F de un anticuerpo que conserva o presenta una capacidad modificada de unión a FcR. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpos se incluyen moléculas de anticuerpo lineal, de anticuerpo de cadena sencilla y anticuerpos multispecíficos formados de fragmentos de anticuerpos.

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo preparados mediante construcción de fragmentos sFv (ver el párrafo anterior) con conectores cortos (de aproximadamente 5 a 10 residuos) entre los dominios V_H y V_L , de manera que se consigue el emparejamiento entre cadenas pero no dentro de las cadenas de los dominios V, resultando de esta manera en un fragmento bivalente, es decir, un fragmento que presenta dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv "cruzados" en los que los dominios V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas polipeptídicas. Los diacuerpos se describen con mayor detalle en, por ejemplo, los documentos EP 404.097, WO 1993/011161, WO2009/121948, WO2014/191493; Hollinger et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90:6444-48 (1993).

Tal como se utiliza en la presente memoria, un "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo (inmunoglobulina) en el que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, con la condición de que muestren la actividad biológica deseada (patente US nº 4.816.567; Morrison et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 81:6851-55 (1984)). Entre los anticuerpos quiméricos de interés en la presente memoria se incluyen los anticuerpos PRIMATIZED®, en los que la región de unión a antígeno del anticuerpo deriva de un anticuerpo producido mediante, por ejemplo, la inmunización de monos macacos con un antígeno de interés. Tal como se utiliza en la presente memoria, "anticuerpo humanizado" es un subgrupo de "anticuerpos quiméricos".

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. En algunas puestas en práctica, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que los residuos de una HVR del receptor han sido sustituidos por una HVR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como el ratón, rata, conejo o primate no humano, que presenta las especificidad, afinidad y/o capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de FR de la inmunoglobulina humana se sustituyen por residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones pueden llevarse a cabo para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo, tal como la afinidad de unión. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de por lo menos un, y normalmente dos, dominios variables, en los que la totalidad, o sustancialmente la totalidad, de los bucles hipervariables corresponden a los de una secuencia de inmunoglobulina no humana, y la totalidad, o sustancialmente la totalidad, de las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana, aunque las regiones FR pueden incluir una o más sustituciones de residuos individuales de FR que mejoran el rendimiento del anticuerpo, tal como la afinidad de unión, la isomerización, la inmunogenicidad y similares. El número de dichas sustituciones de aminoácidos en la FR normalmente es mayor de 6 en la cadena H, y en la cadena L, no mayor de 3. El anticuerpo humanizado opcionalmente comprenderá, además, por lo menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, habitualmente la de una inmunoglobulina humana. Para más información, ver, por ejemplo, Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988) y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992). Ver asimismo, por ejemplo, Vaswani y Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995); Hurlé y Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994); y patentes US nº 6.982.321 y nº 7.087.409.

Un "anticuerpo humano" es un anticuerpo que posee una secuencia de aminoácidos correspondiente a la de un anticuerpo producido por un ser humano o que se ha producido utilizando cualquiera de las técnicas de generación de anticuerpos humanos tal como se divulgan en la presente memoria. Dicha definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos. Pueden producirse anticuerpos humanos utilizando diversas técnicas conocidas, incluyendo bibliotecas de exposición fágica. Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991). Asimismo se encuentran disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos los métodos descritos en Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, página 77 (1985); Boerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991). Ver asimismo van Dijk y van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5:368-74 (2001). Pueden prepararse anticuerpos humanos mediante la administración del antígeno a un animal transgénico que ha sido modificado para producir tales anticuerpos en respuesta al reto antigénico, pero cuyos loci endógenos han sido deshabilitados, por ejemplo, xenorratones inmunizados (ver, por ejemplo, las patentes US nº 6.075.181 y nº 6.150.584, referidas a la tecnología XENOMOUSE™). Ver asimismo, por ejemplo, Li et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006) referida a anticuerpos humanos generados mediante una tecnología de hibridoma de células B humanas.

La expresión "región hipervariable", "HVR" o "HV", cuando se utiliza en la presente memoria se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son de secuencia hipervariable y/o que forman bucles estructuralmente definidos. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis HVR: tres en la V_H (H1, H2 y H3) y tres en la V_L (L1, L2 y L3). En anticuerpos naturales, H3 y L3 muestran la mayor diversidad de las seis HVR, y H3 en particular se cree que desempeña una función única en que confiere especificidad fina a los anticuerpos. Ver, por ejemplo, Xu et al., *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson y Wu, en: *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003). En efecto, los anticuerpos de camélido naturales que consisten en una cadena pesada únicamente son funcionales y estables en la ausencia de cadena ligera. Ver, por ejemplo, Hamers-Casterman et al., *Nature* 363:446-448 (1993), y Sheriff et al., *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996).

Se utilizan varias delimitaciones de HVR, que se encuentran comprendidas en la presente memoria. Las HVR que son regiones determinantes de complementariedad (CDR) de Kabat están basadas en la variabilidad de la secuencia y son las utilizadas más habitualmente (Kabat et al., *supra*). Chothia se refiere, por el contrario, a la localización de los bucles estructurales (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Las HVR de AbM representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y se utilizan en el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las HVR "de contacto" se basan en un análisis de las complejas estructuras cristalinas disponibles. Los residuos de cada una de estas HVR se indican a continuación.

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
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 (numeración de Kabat)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (numeración de Chothia)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Las HVR pueden comprender "HVR extendidas", del modo siguiente: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 o 89-96 (L3) en la V_L , y 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (una puesta en práctica preferida) (H2) y 93-102, 94-102 o 95-102 (H3) en la V_H . Los residuos de dominio variable están numerados según Kabat et al., *supra*, para cada una de dichas definiciones de HVR extendida.

Los residuos "de marco" o "FR" son aquellos residuos de dominio variable diferentes de los residuos de HVR tal como se definen en la presente memoria.

La expresión "numeración de residuos de dominio variable tal como en Kabat" o "numeración de posición de aminoácidos tal como en Kabat" y variaciones de las mismas, se refieren al sistema de numeración utilizado para los dominios variables de cadena pesada o los dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat et al., *supra*. Utilizando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal actual puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento, o una inserción en un FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir la inserción de un solo aminoácido (residuo 52a según Kabat) tras el residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo, residuos 82a, 82b y 82c, etc. según Kabat) después del residuo 82 de FR de cadena pesada. La numeración de Kabat de los residuos puede determinarse para un anticuerpo dado mediante alineaciones en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "estándar".

El sistema de numeración de Kabat se utiliza generalmente en referencia a un residuo en el dominio variable (aproximadamente los residuos 1 a 107 de la cadena ligera y los residuos 1 a 113 de la cadena pesada) (por ejemplo, Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest*, 5a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). El "sistema de numeración de la UE" o "índice UE" se utiliza generalmente al hacer referencia a un residuo en una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, el índice UE informado en Kabat et al., *supra*). El "índice UE tal como en Kabat" se refiere a la numeración UE de residuos del anticuerpo IgG1 humano. A menos que se indique lo contrario en la presente memoria, las referencias a números de residuo en el dominio variable de anticuerpos se refieren a la numeración de residuos mediante el sistema de numeración de Kabat. A menos que se indique lo contrario en la presente memoria, las referencias a números de residuos en el dominio constante de los anticuerpos se refieren a la numeración de los residuos mediante el sistema de numeración de la UE (por ejemplo, ver la publicación de patente US nº 2010-280227).

Un "marco humano aceptor" tal como se utiliza en la presente memoria es un marco que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco de V_L o V_H derivado de un marco de inmunoglobulina humano o un marco de consenso humano. Un marco humano aceptor "derivado de" un marco de inmunoglobulina humano o un marco de consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos del mismo, o puede contener cambios preexistentes de la secuencia de aminoácidos. En algunas puestas en práctica, el número de cambios preexistentes de aminoácidos es de 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos. Cuando existen cambios preexistentes de aminoácidos en una V_H ,

preferentemente estos cambios ocurren en únicamente tres, dos o una de las posiciones 71H, 73H y 78H; por ejemplo, los residuos aminoácidos en esas posiciones pueden ser 71A, 73T y/o 78A. En algunas puestas en práctica, el marco humano del aceptor de V_L es idéntico en secuencia a la secuencia de marco de inmunoglobulina humana de V_L o a la secuencia de marco de consenso humana.

Un “marco de consenso humano” es un marco que representa los residuos aminoácidos más habitualmente presentes en una selección de secuencias de marco de V_L o V_H de inmunoglobulina humana. Generalmente, la selección de las secuencias de V_L o V_H de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. Generalmente, el subgrupo de secuencias es un subgrupo tal como en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Entre los ejemplos se incluyen, para la V_L , el subgrupo puede ser subgrupo kappa I, kappa II, kappa III o kappa IV, tal como en Kabat et al., *supra*. Además, para la V_H , el subgrupo puede ser subgrupo I, subgrupo II o subgrupo III, tal como en Kabat et al., *supra*.

Una “modificación de aminoácido” en una posición especificada se refiere a la sustitución o delección del residuo especificado, o la inserción de por lo menos un residuo aminoácido contiguo al residuo especificado. La inserción “contigua” a un residuo especificado se refiere a la inserción a uno o dos residuos del mismo. La inserción puede ser N-terminal o C-terminal al residuo especificado. La modificación de aminoácido preferente en la presente memoria es una sustitución.

Un anticuerpo “de afinidad madurada” es un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más HVR del mismo que resultan en una mejora de la afinidad del anticuerpo para el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee dicha alteración o alteraciones. En algunas puestas en práctica, un anticuerpo de afinidad madura presenta afinidades nanomolares o incluso picomolares para el antígeno diana. Los anticuerpos de afinidad madurada se producen mediante procedimientos conocidos en la materia. Por ejemplo, Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describen la maduración de la afinidad mediante reorganización de dominios V_H y V_L . La mutagénesis aleatoria de los residuos de HVR y/o marco ha sido descrita por, por ejemplo, Barbas et al., *Barbas et al. Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier et al. *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton et al. *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); and Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “específicamente reconoce” o “específicamente se une” se refiere a interacciones medibles y reproducibles, tales como la atracción o unión entre una diana y un anticuerpo que es determinativa de la presencia de la diana en la presencia de una población heterogénea de moléculas, incluyendo moléculas biológicas. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específica o preferentemente a una diana o a un epítipo es un anticuerpo que se une a dicha diana o epítipo con una mayor afinidad, aidez, más fácilmente y/o durante más tiempo que su unión a otras dianas u otros epítipos de la diana. Asimismo se entiende que, por ejemplo, un anticuerpo (o una fracción) que se une específica o preferentemente a una primera diana puede unirse o no específica o preferentemente a una segunda diana. De esta manera, “unión específica” o “unión preferida” no requiere necesariamente (aunque puede incluir) la unión exclusiva. Un anticuerpo que se une específicamente a una diana puede presentar una constante de asociación de por lo menos aproximadamente 10^3 M^{-1} o 10^4 M^{-1} , en ocasiones aproximadamente 10^5 M^{-1} o 10^6 M^{-1} , en otros casos, aproximadamente 10^6 M^{-1} o 10^7 M^{-1} , entre aproximadamente 10^8 M^{-1} y 10^9 M^{-1} , o entre aproximadamente 10^{10} M^{-1} y 10^{11} M^{-1} o mayor. Puede utilizarse una variedad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, se utilizan rutinariamente inmunoensayos ELISA en fase sólida para seleccionar anticuerpos monoclonales que son específicamente inmunorreactivos con una proteína. Ver, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York, para una descripción de los formatos y condiciones de inmunoensayo que pueden utilizarse para determinar la inmunoreactividad específica.

El término “identidad”, tal como se utiliza en la presente memoria, indica que en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, el residuo aminoácido es idéntico en las secuencias. El término “similitud”, tal como se utiliza en la presente memoria, indica que, en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, el residuo aminoácido es de un tipo similar entre las secuencias. Por ejemplo, puede sustituirse leucina por isoleucina o valina. Entre otros aminoácidos que con frecuencia pueden sustituirse por otro se incluyen, aunque sin limitarse a ellos:

- fenilalanina, tirosina y triptófano (aminoácidos que presentan cadenas laterales aromáticas),
- lisina, arginina e histidina (aminoácidos que presentan cadenas laterales básicas),
- aspartato y glutamato (aminoácidos que presentan cadenas laterales ácidas),
- asparagina y glutamina (aminoácidos que presentan cadenas laterales de amida), y
- cisteína y metionina (aminoácidos que presentan cadenas laterales que contienen azufre).

Los grados de identidad y similitud pueden calcularse fácilmente (ver, por ejemplo, Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987, y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991).

Tal como se utiliza en la presente memoria, una "interacción" entre una proteína del complemento y una segunda proteína comprende, aunque sin limitación, una interacción proteína-proteína, una interacción física, una interacción química, unión, unión covalente y unión iónica. Tal como se utiliza en la presente memoria, un anticuerpo "inhibe la interacción" entre dos proteínas en el caso de que el anticuerpo interrumpa, reduzca o limite por completo una interacción entre las dos proteínas. Un anticuerpo de la presente divulgación, o fragmento del mismo, "inhibe la interacción" entre dos proteínas en el caso de que el anticuerpo o fragmento del mismo se una a una de las dos proteínas.

Un anticuerpo "bloqueante", un anticuerpo "antagonista", un anticuerpo "inhibidor" o un anticuerpo "neutralizante" es un anticuerpo que inhibe o reduce una o más actividades biológicas del antígeno al que se une, tal como interacciones con una o más proteínas. En algunas puestas en práctica, los anticuerpos bloqueantes, anticuerpos antagonistas, anticuerpos inhibidores o anticuerpos "neutralizantes" inhiben sustancial o totalmente una o más actividades biológicas o interacciones del antígeno.

Las "funciones efectoras" de un anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia natural o región Fc de secuencia de aminoácidos variante) de un anticuerpo y varían con el isotipo del anticuerpo.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "afinidad" se refiere a la constante de equilibrio para la unión reversible de dos agentes (por ejemplo, un anticuerpo y un antígeno) y se expresa como una constante de disociación (KD). La afinidad puede ser por lo menos mayor en un factor de 1, en un factor de por lo menos 2, en un factor de por lo menos 3, en un factor de por lo menos 4, en un factor de por lo menos 5, en un factor de por lo menos 6, en un factor de por lo menos 7, en un factor de por lo menos 8, en un factor de por lo menos 9, en un factor de por lo menos 10, en un factor de por lo menos 20, en un factor de por lo menos 30, en un factor de por lo menos 40, en un factor de por lo menos 50, en un factor de por lo menos 60, en un factor de por lo menos 70, en un factor de por lo menos 80, en un factor de por lo menos 90, en un factor de por lo menos 100, o en un factor de por lo menos 1.000, respecto a la afinidad de un anticuerpo para secuencias de aminoácidos no relacionadas. La afinidad de un anticuerpo para una proteína diana puede ser, por ejemplo, de entre aproximadamente 100 nanomolar (nM) y aproximadamente 0.1 nM, de entre aproximadamente 100 nM y aproximadamente 1 picomolar (pM), o de entre aproximadamente 100 nM y aproximadamente 1 femtomolar (fM) o superior. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "avidez" se refiere a la resistencia de un complejo de dos o más agentes a la disociación tras la dilución. El término "inmunorreactivo" y la expresión "se une preferentemente" se utilizan intercambiamente en la presente memoria con respecto a anticuerpos y/o fragmentos de unión a antígeno.

El término "de unión" se refiere a una asociación directa entre dos moléculas, debido a, por ejemplo, interacciones covalentes, electrostáticas, hidrófobas e iónicas y/o de enlace de hidrógeno, incluyendo interacciones, tales como puentes salinos y puentes acuosos. Por ejemplo, un anticuerpo anti-C1s de la invención se une específicamente a un epítipo dentro de la proteína C1s del complemento. La expresión "unión específica" se refiere a la unión con una afinidad de por lo menos aproximadamente 10^{-7} M o superior, por ejemplo, de 5×10^{-7} M, 10^{-8} M, 5×10^{-8} M, y superior. La expresión "unión no específica" se refiere a la unión con una afinidad inferior a aproximadamente 10^{-7} M, por ejemplo, la unión con una afinidad de 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, etc.

El término " k_{on} ", tal como se utiliza en la presente memoria, pretende referirse a la constante de tasa de asociación entre un anticuerpo y un antígeno.

El término " k_{off} ", tal como se utiliza en la presente memoria, pretende referirse a la constante de tasa de disociación de un anticuerpo respecto del complejo de anticuerpo/antígeno.

El término " K_D ", tal como se utiliza en la presente memoria, pretende referirse a la constante de disociación de equilibrio de una interacción de anticuerpo-antígeno.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" y "homología" con respecto a una secuencia peptídica, polipeptídica o de anticuerpo se refiere al porcentaje de residuos aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos aminoácidos en la secuencia peptídica o polipeptídica específica, tras alinear las secuencias e introducir huecos, en caso necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia y no considerando ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación para fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede conseguirse de diversas maneras que están comprendidas en los

conocimientos del experto en la materia, por ejemplo utilizando programas informáticos disponibles públicamente, tales como BLAST, BLAST-2, ALIGN o MEGALIGN™ (DNASTAR). El experto en la materia puede determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualesquiera algoritmos conocidos en la materia y necesarios para conseguir la máxima alineación en la longitud completa de las secuencias que se comparan.

Una "muestra biológica" comprende una variedad de tipos de muestra obtenidos de un individuo y puede utilizarse en un ensayo diagnóstico o de seguimiento. La definición comprende sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras sólidas de tejido, tales como un espécimen de biopsia o cultivos de tejidos o células derivadas de los mismos y la progenie de los mismos. La definición incluye, además, muestras que han sido manipuladas de cualquier manera después de su obtención, tal como por el tratamiento con reactivos, la solubilización o el enriquecimiento en determinados componentes, tales como los polinucleótidos. La expresión "muestra biológica" comprende una muestra clínica, e incluye, además, células en cultivo, sobrenadantes celulares, lisados celulares, suero, plasma, líquido biológico y muestras de tejido. La expresión "muestra biológica" incluye orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, líquido intersticial, líquido ocular, líquido sinovial, fracciones sanguíneas, tales como plasma y suero, y similares. La expresión "muestra biológica" incluye, además, muestras sólidas de tejido, muestras de cultivo de tejido y muestras celulares.

Una molécula "aislada" de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico que ha sido identificada y separada de por lo menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está habitualmente asociada en el medio en el que se produjo. Preferentemente, el ácido nucleico aislado está libre de asociaciones con todos los componentes asociados al medio de producción. Las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican los polipéptidos y anticuerpos en la presente memoria se encuentran en una forma diferente de la forma o contexto en el que se encuentran naturalmente. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen de los ácidos nucleicos codificantes de cualesquiera polipéptidos y anticuerpos en la presente memoria que existen naturalmente en las células.

El término "vector", tal como se utiliza en la presente memoria, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que ha sido unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un ADN de doble cadena circular en el que pueden estar ligados segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector fago. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales al genoma vírico. Determinados vectores son capaces de replicación autónoma en la célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que presentan un origen de replicación bacteriano y vectores de mamífero episómicos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episómicos) pueden integrarse en el genoma de la célula hospedadora tras la introducción en la célula hospedadora y de esta manera replicarse junto con el genoma del hospedador. Además, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están ligados operablemente. Dichos vectores se denominan en la presente memoria "vectores de expresión recombinante", o simplemente, "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión útiles en las técnicas de ADN recombinante con frecuencia se encuentran en la forma de plásmidos. En la presente especificación, los términos "plásmido" y "vector" pueden utilizarse intercambiamente, ya que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector.

El término "polinucleótido" o la expresión "ácido nucleico", utilizados indistintamente en la presente memoria, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda ser incorporado en un polímero por una ADN o ARN polimerasa o mediante una reacción sintética. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. En caso de estar presente, la modificación de la estructura de nucleótidos puede realizarse antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede interrumpirse con componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede comprender una o más modificaciones realizadas después de la síntesis, tal como la conjugación con un marcaje. Entre otros tipos de modificación se incluyen, por ejemplo, "caperuzas", la sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales por un análogo, modificaciones internucleotídicas, tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces sin carga (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces con carga (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellos que contienen fracciones colgantes, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos de señal, poli-L-lisina, etc.), aquellos con intercalantes (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquellos que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidantes, etc.), aquellos que contienen alquilantes, aquellos con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa-anoméricos, etc.), así como formas no modificadas del polinucleótido o polinucleótidos. Además, puede sustituirse cualquiera de los grupos hidroxilo normalmente presentes en los azúcares, por ejemplo, con grupos fosfonato, grupos fosfato, protegerse con grupos protectores estándares, o activarse para preparar enlaces adicionales con nucleótidos adicionales, o pueden conjugarse con soportes sólidos o semisólidos. El OH 5'- y 3'-terminal puede fosforilarse o sustituirse por aminas o fracciones de grupo de caperuza orgánico de entre 1 y 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos asimismo pueden derivatizarse con grupos protectores estándares. Los polinucleótidos pueden contener, además, formas análogas de azúcares ribosa o desoxirribosa que son generalmente conocidas en la materia, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcar carbocíclico, azúcares α -anoméricos, azúcares epiméricos, tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares piranosa,

azúcares furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósido básico, tales como ribósido de metilo. Puede sustituirse uno o más enlaces fosfodiéster por grupos de enlace alternativos. Entre estos grupos de enlace alternativos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, puestas en práctica en las que se sustituye el fosfato por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), en el que cada R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o no sustituido (1 a 20 C) que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o aralquilo. No es necesario que todos los enlaces en un polinucleótido sean idénticos. La descripción anterior se aplica a todos los polinucleótidos a los que se hace referencia en la presente memoria, incluyendo ARN y ADN.

La expresión "agente de edición génica" tal como se utiliza en la presente memoria se define como un agente de edición génica, entre los ejemplos representativos del cual se incluyen nucleasas asociadas a CRISPR, tales como los ARNg de Cas9 y CpfI, la familia Argonauta de endonucleasas, las nucleasas de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR), nucleasas dedos de cinc (ZFN), nucleasas efectoras de tipo activador de transcripción (TALEN), meganucleasas, otras endonucleasas y/o exonucleasas. Ver Schiffer, 2012, J. Virol. 88(17):8920-8936.

La expresión "agente interferente de ARN" tal como se utiliza en la presente memoria se define como cualquier agente que interfiere o inhibe la expresión de un gen biomarcador diana mediante interferencia de ARN (ARNi). Entre dichos agentes de interferencia de ARN se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, moléculas de ácido nucleico que incluyen moléculas de ARN que son homólogas al gen biomarcador diana de la presente divulgación, o un fragmento de las mismas, ARN interferente corto (ARNic), y moléculas pequeñas que interfieren o inhiben la expresión de un ácido nucleico biomarcador diana mediante interferencia de ARN (ARNi).

La "interferencia de ARN (ARNi)" es un proceso evolutivamente conservado en el que la expresión o introducción del ARN de una secuencia que es idéntica o altamente similar a un ácido nucleico biomarcador diana da como resultado la degradación específica de secuencia o silenciamiento génico postranscripcional (SGPT) de ARN mensajero (ARNm) transcrito a partir de ese gen diana (ver Coburn, G. y Cullen, B. (2002) J. of Virology 76(18):9225), inhibiendo de esta manera la expresión del ácido nucleico biomarcador diana. En una puesta en práctica, el ARN es ARN de doble cadena (ARNdc). Este proceso ha sido descrito en plantas, invertebrados y células de mamífero. En la naturaleza, la interferencia de ARN es iniciada por la endonucleasa específica de ARNdc llamada Dicer, que promueve un corte procesivo del ARNdc largo en fragmentos de doble cadena denominados ARNic. Los ARNic son incorporados en un complejo de proteínas que reconoce y corta los ARNm diana. La interferencia de ARN asimismo puede ser iniciada mediante la introducción de moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, ARNic sintéticos, ARNhp u otros agentes de interferencia de ARN, para inhibir o silenciar la expresión de ácidos nucleicos biomarcadores diana. Tal como se utiliza en la presente memoria, "inhibición de la expresión de ácido nucleico biomarcador diana" o la "inhibición de la expresión de genes marcadores" incluye cualquier reducción de la expresión o actividad o nivel de proteína del ácido nucleico biomarcador o proteína diana codificado por el ácido nucleico biomarcador diana. La reducción puede ser de por lo menos 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % o más de la expresión de un ácido nucleico biomarcador diana o la actividad o nivel de la proteína codificada por un ácido nucleico biomarcador diana que no es la diana de un agente de interferencia de ARN.

Además de la interferencia de ARN, la edición del genoma puede utilizarse para modular el número de copia o la secuencia genética de un biomarcador de interés, tal como la desactivación constitutiva o inducida, o la mutación de un biomarcador de interés, tal como un componente de la ruta del complemento como C1q, C1r y/o C1s. Por ejemplo, el sistema CRISPR-Cas puede utilizarse para la edición precisa de ácidos nucleicos genómicos (por ejemplo, para crear mutaciones no funcionales o nulas). En tales puestas en práctica, puede expresarse el ARN guía de CRISPR y/o el enzima Cas. Por ejemplo, puede administrarse un vector que contiene únicamente el ARN guía a un animal o células transgénicas para el enzima Cas9. Pueden utilizarse estrategias similares (por ejemplo, dedos de cinc de diseño, efectores similares a activador de transcripción (TALE) o meganucleasas direccionadas ("homíng"). Dichos sistemas son bien conocidos en la materia (ver, por ejemplo, la patente US nº 8.697.359; Sander y Joung (2014) Nat. Biotech. 32:347-355; Hale et al. (2009) Cell 139:945-956; Karginov y Hannon (2010) Mol. Cell 37:7; publicaciones de patente US nº 2014/0087426 y 2012/0178169; Boch et al. (2011) Nat. Biotech. 29:135-136; Boch et al. (2009) Science 326:1509-1512; Moscou y Bogdanove (2009) Science 326:1501; Weber et al. (2011) PLoS One 6:e19722; Li et al. (2011) Nucl. Acids Res. 39:6315-6325; Zhang et al. (2011) Nat. Biotech. 29:149-153; Miller et al. (2011) Nat. Biotech. 29: 143-148; Lin et al. (2014) Nucl. Acids Res. 42:e47). Dichas estrategias genéticas pueden utilizar sistemas de expresión constitutivos o sistemas de expresión inducibles según métodos bien conocidos en la materia.

El "ARN de interacción con Piwi (ARNpi)" es la clase más grande de moléculas de ARN no codificante pequeñas. Los ARNpi forman complejos de ARN-proteína mediante interacciones con las proteínas piwi. Estos complejos de ARNpi se han asociado tanto al silenciamiento epigenético como génico postranscripcional de retrotransposones y otros elementos genéticos en las células de la línea germinal, particularmente aquellos en la espermatogénesis. Son diferentes al microARN (miARN) en cuanto al tamaño (26 a 31 nt frente a 21 a 24 nt), falta de conservación de la secuencia y complejidad incrementada. Sin embargo, al igual que otros ARN pequeños, los ARNpi se cree que participan en el silenciamiento génico, específicamente el silenciamiento de los transposones. La mayoría de

los ARNpi son antisentido respecto a las secuencias de transposón, lo que sugiere que los transposones son la diana del ARNpi. En los mamíferos aparentemente la actividad de los ARNpi en el silenciamiento de los transposones es más importante durante el desarrollo del embrión, y tanto en *C. elegans* como en seres humanos, los ARNpi resultan necesarios para la espermatogénesis. El ARNpi posee una función en el silenciamiento del ARN a través de la formación de un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC).

Los "aptámeros" son moléculas de oligonucleótido o péptido que se unen a una molécula diana específica. Los "aptámeros de ácido nucleico" son especies de ácido nucleico que han sido modificadas mediante rondas repetidas de selección *in vitro* o de manera equivalente, SELEX (evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial) para unirse a diversas dianas moleculares, tales como moléculas pequeñas, proteínas, ácidos nucleicos e incluso células, tejidos y organismos. Los "aptámeros peptídicos" son proteínas artificiales seleccionadas o modificadas para unirse a moléculas diana específicas. Estas proteínas consisten en uno o más bucles peptídicos de secuencia variable mostradas por un andamiaje proteico. Normalmente se aíslan a partir de bibliotecas combinatorias y con frecuencia se mejoran posteriormente mediante mutación dirigida o rondas de mutagénesis y selección de región variable. La "proteína Affimer", una evolución de los aptámeros peptídicos, es una proteína pequeña y altamente estable modificada para exponer bucles peptídicos que proporcionan una superficie de unión de alta afinidad para una proteína diana específica. Es una proteína de bajo peso molecular, de 12 a 14 kDa, derivada de la familia de inhibidores de cisteína-proteasa de cistatinas. Los aptámeros resultan útiles en aplicaciones biotecnológicas y terapéuticas, ya que ofrecen propiedades de reconocimiento molecular que rivalizan con la de la biomolécula utilizada comúnmente, el anticuerpo. Además de su capacidad de reconocimiento discriminante, los aptámeros proporcionan ventajas sobre los anticuerpos en que pueden manipularse completamente en el tubo de ensayo, se producen fácilmente mediante síntesis química, poseen propiedades de almacenamiento deseables e inducen poca o ninguna inmunogenicidad en aplicaciones terapéuticas.

La expresión "ARN interferente corto" (ARNic), asimismo utilizado en la presente memoria "ARN interferente pequeño", se define como un agente que funciona inhibiendo la expresión de un ácido nucleico biomarcador diana, por ejemplo, mediante interferencia de ARN. Puede sintetizarse químicamente un ARNic; puede producirse mediante transcripción *in vitro* o puede producirse dentro de una célula hospedadora. En una puesta en práctica, el ARNic es una molécula de ARN de doble cadena (ARNdc) de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 40 nucleótidos de longitud, preferentemente de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 28 nucleótidos, más preferentemente de entre aproximadamente 19 y aproximadamente 25 nucleótidos, y más preferentemente de aproximadamente 19, 20, 21 o 22 nucleótidos de longitud, y puede contener un extremo protuberante 3' y/o 5' en cada cadena, que presenta una longitud aproximada de 0, 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos. La longitud del extremo protuberante es independiente en las dos cadenas, es decir, la longitud del extremo protuberante en una cadena no es dependiente de la longitud del extremo protuberante en la segunda cadena. Preferentemente, el ARNic es capaz de promover la interferencia de ARN mediante degradación o silenciamiento génico postranscripcional específico (PTGS) del ARN mensajero (ARNm) diana.

En otra puesta en práctica, un ARNic es un ARN de horquilla pequeña (asimismo denominado de tallo-bucle) (ARNhp). En una puesta en práctica, estos ARNhp están compuestos de una cadena antisentido corta (por ejemplo, de 19 a 25 nucleótidos), seguido de un bucle de 5 a 9 nucleótidos, y la cadena de sentido análoga. Alternativamente, la cadena sentido puede preceder a la estructura de bucle de nucleótidos y puede seguir la cadena antisentido. Estos ARNhp pueden estar contenidos en plásmidos, retrovirus y lentivirus, y expresarse a partir de, por ejemplo, el promotor U6 pol III, u otro promotor (ver, por ejemplo, Stewart et al. (2003) RNA Apr;9(4):493-501).

Una "célula hospedadora" incluye una célula individual o cultivo celular que puede ser o ha sido un receptor para uno o más vectores para la incorporación de insertos polinucleótidos. Entre las células hospedadoras se incluye la progenie de una sola célula hospedadora y la progenie puede no ser necesariamente idéntica por completo (en morfología o en complemento de ADN genómico) a la célula parental original debido a mutación natural, accidental o deliberada. Una célula hospedadora incluye células transfectadas *in vitro* con uno o más polinucleótidos de la presente divulgación.

Entre los "portadores" utilizados en la presente memoria se incluyen portadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que resultan no tóxicos para la célula o mamífero expuesto a los mismos a las dosis y concentraciones utilizadas. Con frecuencia, el portador fisiológicamente aceptable es una solución acuosa de pH amortiguado. Entre los ejemplos de portadores fisiológicamente aceptables se incluyen amortiguadores, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos, antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes de azúcares, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio, y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEENTM, polietilenglicol (PEG) y PLURONICSTM.

El término “prevención” es un término reconocido de la materia y utilizado en relación a una afección, tal como una lesión cerebral, preferentemente una lesión cerebral traumática, lesión cerebral hipóxica, infección cerebral o accidente cerebrovascular, es bien entendida en la materia, e incluye la administración de una composición que reduce la frecuencia o gravedad, o retrasa la aparición, de uno o más síntomas de la afección médica en un sujeto en comparación con un sujeto que no reciba la composición. De esta manera, la prevención de una lesión cerebral, preferentemente una lesión cerebral traumática, lesión cerebral hipóxica, infección cerebral o accidente cerebrovascular incluye, por ejemplo, incrementar el recuento plaquetario en una población de pacientes que recibe una terapia respecto a una población de control que no ha recibido la terapia, por ejemplo, en una cantidad estadística y/o clínicamente significativa. De manera similar, la prevención de una lesión cerebral, preferentemente una lesión cerebral traumática, lesión cerebral hipóxica, infección cerebral o accidente cerebrovascular incluye reducir la probabilidad de que un paciente que recibe una terapia desarrolle una lesión cerebral, preferentemente una lesión cerebral traumática, lesión cerebral hipóxica, infección cerebral o accidente cerebrovascular, o síntomas relacionados, en comparación con un paciente que no reciba la terapia.

El término “sujeto” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un mamífero vivo y puede utilizarse intercambiamente con el término “paciente”. Entre los ejemplos de mamíferos se incluyen, aunque sin limitación, cualquier miembro de la clase mamífero: seres humanos, primates no humanos, tales como chimpancés, y otras especies de simios y monos; animales de granja, tales como vacas, caballos, ovejas, cabras y cerdos; animales domésticos, tales como conejos, perros y gatos; animales de laboratorio, incluyendo roedores, tales como ratas, ratones y cobayas, y similares. El término no denota una edad o género en particular.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “que trata” o el término “tratamiento” incluye reducir, detener o revertir los síntomas, signos clínicos o patología subyacente de una afección para estabilizar o mejorar una afección del sujeto o para reducir la probabilidad de que la afección del sujeto se agrave tanto como en el caso de que el sujeto no reciba el tratamiento.

La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” de un compuesto con respecto al método de la invención de tratamiento se refiere a una cantidad del compuesto o compuestos en una preparación que, al administrarla como parte de una pauta posológica deseada (a un mamífero, preferentemente a un ser humano) alivia un síntoma, mejora una afección o ralentiza la aparición de afecciones patológicas según estándares clínicamente aceptables para el trastorno o afección que va a tratarse o el fin cosmético, por ejemplo, en una relación beneficio/riesgo razonable que sea aplicable a cualquier tratamiento médico. Una cantidad terapéuticamente eficaz en la presente memoria puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de enfermedad, edad, sexo y peso del paciente, y la capacidad del anticuerpo de inducir una respuesta deseada en el individuo.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un individuo “en riesgo” de desarrollar una enfermedad, trastorno o afección particular puede presentar o no una enfermedad detectable, o síntomas de enfermedad, y puede manifestar o no una enfermedad detectable, o síntomas de enfermedad, previamente a los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria. La expresión “en riesgo” denota que un individuo presenta uno o más factores de riesgo, que son parámetros medibles que correlacionan con el desarrollo de una enfermedad, trastorno o afección particular, tal como es conocido en la materia. Un individuo que presenta uno o más de dichos factores de riesgo presenta una mayor probabilidad de desarrollar una enfermedad, trastorno o afección particular que un individuo que no presente uno o más de dichos factores de riesgo.

La administración “crónica” se refiere a la administración del medicamento o medicamentos en un modo continuo, en lugar de un modo agudo, de manera que se mantenga el efecto (actividad) terapéutico inicial durante un periodo de tiempo prolongado. La administración “intermitente” se refiere a un tratamiento que no se administra consecutivamente sin interrupción, sino que es de naturaleza cíclica/periódica.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la administración “conjunta” con otro compuesto o composición incluye la administración simultánea y/o la administración en tiempos diferentes. La administración conjunta comprende, además, la administración como coformulación o administración como composiciones separadas, incluyendo a diferentes frecuencias o intervalos de administración, y utilizando la misma vía de administración o diferentes vías de administración.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en la presente memoria presentan los significados entendidos normalmente por el experto habitual en la materia a la que se refiere la presente divulgación. Las referencias que divulgan y describen los métodos y/o materiales en relación a los cuales se citan las publicaciones son, por ejemplo, las ampliamente utilizadas metodologías descritas en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3a edición (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel, et al. eds., (2003)); la serie *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.): *PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, and *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1987)); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum

Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths y D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller y M.P. Calos, eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway y P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty, ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y Cancer: Principles and Practice of Oncology (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

Ácidos nucleicos, vectores y células hospedadoras

Pueden producirse anticuerpos adecuados para la utilización en los métodos de la presente divulgación utilizando métodos y composiciones recombinantes, por ejemplo, tal como se describen en la patente US nº 4.816.567. En algunas puestas en práctica, se proporcionan ácidos nucleicos aislados que presentan una secuencia de nucleótidos codificante de cualquiera de los anticuerpos de la presente divulgación. Dichos ácidos nucleicos pueden codificar una secuencia de aminoácidos que contiene la secuencia de V_L/C_L y/o de aminoácidos que contiene V_H/C_H1 del anticuerpo anti-C1q, anti-C1r o anti-C1s. En algunas puestas en práctica, se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que contienen dichos ácidos nucleicos. Asimismo puede proporcionarse una célula hospedadora que contiene dicho ácido nucleico. La célula hospedadora puede contener (por ejemplo, ha sido transducida con): (1) un vector que contiene un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que contiene el V_L/C_L del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que contiene el V_H/C_H1 del anticuerpo, o (2) un primer vector que contiene un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que contiene el V_L/C_L del anticuerpo y un segundo vector que contiene un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que contiene el V_H/C_H1 del anticuerpo. En algunas puestas en práctica, la célula hospedadora es eucariótica, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfóide (por ejemplo, una célula Y0, NS0 o Sp20).

Se divulgan métodos de preparación de un anticuerpo anti-C1q, anti-C1r o anti-C1s en la presente memoria. El método incluye cultivar una célula hospedadora de la presente divulgación que contiene un ácido nucleico codificante del anticuerpo anti-C1q, anti-C1r o anti-C1s, bajo condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo. En algunas puestas en práctica, se recupera seguidamente el anticuerpo a partir de la célula hospedadora (o medio de cultivo de la célula hospedadora).

Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-C1q, anti-C1r o anti-C1s humanizado de la presente divulgación, se aísla un ácido nucleico codificante del anticuerpo y se inserta en uno o más vectores para la clonación y/o expresión adicionales en una célula hospedadora. Dicho ácido nucleico puede aislarse y secuenciarse fácilmente utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante la utilización de sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes codificantes de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo).

Entre los vectores adecuados que contienen una secuencia de ácido nucleico codificante de cualquiera de los anticuerpos de la presente divulgación, o fragmentos polipéptidos de los mismos (incluyendo anticuerpos) descritos en la presente memoria se incluyen, aunque sin limitación, vectores de clonación y vectores de expresión. Pueden construirse vectores de clonación adecuados de acuerdo con técnicas estándares, o pueden seleccionarse a partir de un número elevado de vectores de clonación disponibles en la materia. Aunque el vector de clonación seleccionado puede variar según la célula hospedadora que se pretenda utilizar, los vectores de clonación útiles generalmente poseen la capacidad de autorreplicación, pueden poseer una sola diana para una endonucleasa de restricción particular, y/o pueden portar genes para un marcador que pueden utilizarse en la selección de clones que contienen el vector. Entre los ejemplos adecuados se incluyen plásmidos y virus bacterianos, por ejemplo, pUC18, pUC19, Bluescript (por ejemplo, pBS SK+) y sus derivados, mpl8, mpl9, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, ADN fágicos y vectores lanzadera, tales como pSA3 y pAT28. Estos y muchos otros vectores de clonación se encuentran disponibles de proveedores comerciales tales como BioRad, Stratagene e Invitrogen.

Los vectores que contienen los ácidos nucleicos de interés pueden introducirse en la célula hospedadora mediante cualquiera de varios medios apropiados, incluyendo la electroporación, transfección con cloruro cálcico, cloruro de rubidio, fosfato cálcico, DEAE-dextrano u otras sustancias; bombardeo con microproyectiles, lipofección e infección (por ejemplo, donde el vector es un agente infeccioso, tal como el virus *vaccinia*). La opción de introducir vectores o polinucleótidos con frecuencia dependerá de las características de la célula hospedadora. En algunas puestas en práctica, el vector contiene un ácido nucleico que contiene una o más secuencias de ácidos nucleicos codificantes de un anticuerpo anti-C1q, anti-C1r o anti-C1s de la presente divulgación.

Entre las células hospedadoras adecuadas para la clonación o la expresión de vectores codificantes de anticuerpos se incluyen células procarióticas o eucarióticas. Por ejemplo, puede producirse un anticuerpo anti-C1q, anti-C1r o anti-C1s de la presente divulgación en bacterias, en particular en el caso de que no se requiera glucosilación y

función efectora de Fc. Para la expresión de fragmentos de anticuerpos y polipéptidos en bacterias (por ejemplo, patentes US nº 5.648.237, nº 5.789.199 y nº 5.840.523, y Charlton, *Methods in Molecular Biology*, vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), páginas 245 a 254, que describen la expresión de fragmentos de anticuerpos en *E. coli*9. Tras la expresión, el anticuerpo puede aislarse a partir de la pasta celular bacteriana en una fracción soluble y puede purificarse adicionalmente.

Cribado de anticuerpos

Los anticuerpos candidatos pueden cribarse para la capacidad de modular la activación del complemento. Dicho cribado puede llevarse a cabo utilizando un modelo *in vitro*, una célula o animal alterado genéticamente, o una proteína purificada. Puede utilizarse una amplia variedad de ensayos para este fin, tal como un sistema de cultivo *in vitro*.

Los anticuerpos candidatos asimismo pueden identificarse utilizando el modelado informático, mediante ensayos de unión, y similares. Pueden utilizarse diversos modelos *in vitro* para determinar si se une, o de otro afecta, al complemento y su actividad. Dichos anticuerpos candidatos pueden someterse a ensayo poniendo en contacto plasma procedente de un donante sano y determinando la activación del complemento (por ejemplo, mediante ELISA de captura de antígeno C3c). Dichos anticuerpos pueden someterse a ensayo adicional en un modelo *in vivo* para un efecto sobre una lesión cerebral, preferentemente una lesión cerebral traumática, lesión cerebral hipóxica, infección cerebral o accidente cerebrovascular.

Generalmente, se realiza el ensayo en una pluralidad de mezclas de ensayo en paralelo, con diferentes concentraciones de anticuerpo, a fin de obtener una respuesta diferencial a las diversas concentraciones. Normalmente, una de dichas concentraciones actúa como control negativo, es decir, a concentración cero o inferior al nivel de detección.

Composiciones farmacéuticas y administración

Puede administrarse un complemento (por ejemplo, un anticuerpo) en la forma de composiciones farmacéuticas.

Las formulaciones terapéuticas de un inhibidor de la divulgación pueden prepararse para el almacenamiento mediante la mezcla del inhibidor que presenta el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 16a edición, Osol, A. Ed. [1980]), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables resultan no tóxicos a los receptores a las dosis y concentraciones utilizadas, y entre ellos se incluyen amortiguadores, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil-amonio; cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, fenol, alcohol butílico o bencílico, alquilparabenos, tales como metil- o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína), y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG).

Las lipofecciones o los liposomas asimismo pueden utilizarse para administrar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo en una célula, en los que resulta preferido el epítipo o fragmento más pequeño que se una específicamente al dominio de unión de la proteína diana.

El inhibidor asimismo puede atraparse en microcápsulas preparadas mediante, por ejemplo, técnicas de coacervado o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente; en sistemas de administración de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 16a edición, Osol, A., editor (1980).

Las formulaciones para la utilización en la administración parental deben ser estériles. Ello se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estéril.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el inhibidor, las cuales se encuentran en la forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación sostenida se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(alcohol vinílico), poliláctidos (patente US nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-

ácido glicólico, tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprólido) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos.

Los anticuerpos y las composiciones de la presente divulgación normalmente se administran por diversas vías, incluyendo, aunque sin limitación, la administración tópica, parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, intranasal e intralesional. Entre las vías de administración parenteral se incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal o subcutánea.

Entre las composiciones farmacéuticas pueden incluirse, además, dependiendo de la formulación deseada, portadores no tóxicos farmacéuticamente aceptables de diluyentes, que se definen como vehículos utilizados habitualmente para formular composiciones farmacéuticas para la administración a animales o seres humanos. El diluyente se selecciona de manera que no afecta a la actividad biológica de la combinación. Son ejemplos de tales diluyentes, agua destilada, agua amortiguada, solución salina fisiológica, PBS, solución de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, la composición o formulación farmacéutica puede incluir otros portadores, adyuvantes o estabilizantes, excipientes y similares no tóxicos, no terapéuticos y no inmunogénicos. Las composiciones pueden incluir, además, sustancias adicionales para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes ajustadores y amortiguadores del pH, agentes ajustadores de la tonicidad, agentes humectantes y detergentes.

La composición puede incluir, además, cualquiera de una variedad de agentes estabilizantes, tales como un antioxidante, por ejemplo. En el caso de que la composición farmacéutica incluya un polipéptido, este puede formar complejo con diversos compuestos bien conocidos que potencian la estabilidad *in vivo* del polipéptido o que por el contrario potencien sus propiedades farmacológicas (por ejemplo, incrementar la semivida del polipéptido, reducir su toxicidad, potenciar otras características farmacocinéticas y/o farmacodinámicas, o potenciar la solubilidad o incorporación). Entre los ejemplos de dichas modificaciones o agentes de formación de complejo se incluyen sulfato, gluconato, citrato y fosfato. Los polipéptidos de una composición asimismo pueden formar un complejo con moléculas que potencien sus atributos *in vivo*. Entre tales moléculas se incluyen, por ejemplo, carbohidratos, poliaminas, aminoácidos, otros péptidos, iones (por ejemplo, sodio, potasio, calcio, magnesio y manganeso) y lípidos. Puede encontrarse una guía adicional sobre las formulaciones que resultan adecuadas para diversos tipos de administración en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17a edición (1985). Para una breve revisión de los métodos para la administración de fármacos, ver Langer, Science 249:1527-1533 (1990).

Pueden determinarse la toxicidad y la eficacia terapéutica del principio activo de acuerdo con procedimientos farmacéuticos estándares en cultivos celulares y/o animales experimentales, incluyendo, por ejemplo, la determinación de la DL50 (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y efectos terapéuticos es el índice terapéutico, y puede expresarse como el cociente DL50/DE50. Los compuestos que muestran índices terapéuticos elevados resultan preferidos.

Los datos obtenidos a partir del cultivo celular y/o estudios animales pueden utilizarse en la formulación de un abanico de dosis para el ser humano. La dosis del principio activo normalmente se encuentra comprendida dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluye la DE50 con baja toxicidad. La dosis puede variar dentro de dicho intervalo dependiendo de la forma de dosis utilizada y la vía de administración utilizada.

En la presente memoria se describen composiciones farmacéuticas de varias maneras diferentes. Entre los ejemplos se incluyen administrar una composición que contiene un portador farmacéuticamente aceptable mediante métodos orales, intranasales, rectales, tópicos, intraperitoneales, intravenosos, intramusculares, subcutáneos, subdérmicos, transdérmicos, intratecales e intracraneales.

Para la administración oral, el principio activo puede administrarse en formas de administración sólida, tales como cápsulas, comprimidos y polvos, o en formas de administración líquida, tales como elixires, jarabes y suspensiones. El componente o componentes activos pueden encapsularse en cápsulas de gelatina junto con ingredientes inactivos y portadores en polvo, tales como glucosa, lactosa, sacarosa, manitol, almidón, celulosa o derivados de celulosa, estearato de magnesio, ácido esteárico, sacarina sódica, talco y carbonato de magnesio. Son ejemplos de ingredientes inactivos adicionales que pueden añadirse para proporcionar color, sabor, estabilidad, capacidad de amortiguación y dispersión deseables, u otras características deseables conocidas, óxido de hierro rojo, gel de sílice, laurilsulfato sódico, dióxido de titanio y tinta blanca comestible. Pueden utilizarse diluyentes similares para preparar comprimidos por compresión. Pueden fabricarse tanto comprimidos como cápsulas en forma de productos de liberación sostenida para proporcionar una liberación continua de la medicación durante un periodo de horas. Los comprimidos por compresión pueden recubrirse con azúcar o con una película para enmascarar cualquier sabor desagradable y proteger el comprimido de la atmósfera, o proporcionarse un recubrimiento entérico para la desintegración selectiva en el tracto gastrointestinal. Las formas de administración líquidas para la administración oral pueden contener colorantes y saborizantes para incrementar la aceptación del paciente.

Entre las formulaciones adecuadas para la administración parenteral se incluyen soluciones para inyección estériles isotónicas acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, amortiguadores, bacteriostatos y solutos que convierten la formulación en isotónica con la sangre del receptor deseado, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizadores, agentes espesantes, estabilizantes y conservantes.

Los componentes utilizados para formular las composiciones farmacéuticas son preferentemente de alta pureza y están sustancialmente libres de contaminantes potencialmente dañinos (por ejemplo, por lo menos de grado National Food (NF), generalmente de como mínimo grado analítico y más habitualmente por lo menos grado farmacéutico). Además, las composiciones destinadas a la utilización parenteral habitualmente son estériles. En la medida en que un compuesto dado debe sintetizarse previamente a la utilización, el producto resultante normalmente está sustancialmente libre de cualesquiera agentes potencialmente tóxicos, particularmente cualesquiera endotoxinas, que pueden estar presentes durante el procedimiento de síntesis o purificación. Las composiciones para la administración parenteral habitualmente asimismo son sustancialmente isotónicas y se fabrican bajo condiciones de buenas prácticas de fabricación (BPF).

Las composiciones de la exposición pueden administrarse utilizando cualquier procedimiento médicamente apropiado, por ejemplo, mediante administración intravascular (intravenosa, intraarterial o intracápsula), inyección en el líquido cefalorraquídeo, inyección intravítrea, tópica, intracavitaria o directa en el cerebro. La administración intratecal puede llevarse a cabo mediante la utilización de un depósito Ommaya, de acuerdo con técnicas conocidas (F. Balis et al., Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol. 11, 74, 76 (1989)).

En el caso de que los agentes terapéuticos se administren localmente en el cerebro, un método para la administración de las composiciones terapéuticas de la exposición es mediante deposición en el sitio o en proximidad al sitio mediante cualquier técnica adecuada, tal como mediante inyección directa (ayudada mediante posicionamiento estereotáxico de una jeringa de inyección, en caso necesario) o colocando la punta de un depósito Ommaya en una cavidad o quiste, para la administración. Alternativamente, puede implantarse un catéter de administración potenciada por convección directamente en el sitio, en un quiste natural o creado quirúrgicamente, o en la masa cerebral normal. Dichos dispositivos de administración de composición farmacéutica potenciada por convección mejoran en gran medida la difusión de la composición en toda la masa cerebral. Los catéteres implantados de dichos dispositivos de administración utilizan la microinfusión de alto flujo (con caudales en el intervalo de entre aproximadamente 0.5 y 15.0 $\mu\text{l}/\text{minuto}$), en lugar del flujo difusivo, para administrar la composición terapéutica en el cerebro y/o masa tumoral. Dichos dispositivos se describen en la patente US nº 5.720.720.

La cantidad eficaz de una composición terapéutica administrada a un paciente particular puede depender de una variedad de factores, algunos de los cuales pueden ser diferentes de paciente a paciente. El médico clínico competente será capaz de determinar la cantidad eficaz de un agente terapéutico que se debe administrar al paciente. La posología del agente dependerá del tratamiento, vía de administración, naturaleza de los terapéuticos, sensibilidad del paciente a los terapéuticos, etc. Mediante la utilización de datos animales de DL50, y otra información, el médico clínico puede determinar la dosis segura máxima para un individuo, según la vía de administración. Utilizando conocimientos habituales, el médico clínico competente será capaz de optimizar la posología de una composición terapéutica particular durante el curso de ensayos clínicos rutinarios. Las composiciones pueden administrarse al sujeto en una serie de más de una administración. Para composiciones terapéuticas, en ocasiones se requerirá una administración periódica regular, o podría resultar deseable. Los regímenes terapéuticos variarán con el agente; por ejemplo, pueden tomarse algunos agentes durante periodos prolongados de tiempo diariamente o semidiariamente, mientras que agentes más selectivos pueden administrarse para cursos temporales más definidos, por ejemplo, uno, dos, tres o más días, una o más semanas, uno o más meses, etc., tomados diariamente, semidiariamente, semisemanalmente, semanalmente, etc.

Pueden optimizarse formulaciones para la retención y estabilización en el cerebro. En el caso de que se administre el agente en el compartimiento craneal, resulta deseable que el agente sea retenido en el compartimiento y que no se difunda o de otro modo atravesase la barrera hematoencefálica. Entre las técnicas de estabilización se incluyen la reticulación, la multimerización o la unión a grupos tales como polietilenglicol, poliácridamida, portadores proteicos neutros, etc., con el fin de conseguir un incremento del peso molecular.

Entre otras estrategias para incrementar la retención se incluyen el atrapamiento del agente en un implante biodegradable o bioerosionable. La tasa de liberación del agente terapéuticamente activo está controlada por la tasa de transporte a través de la matriz polimérica y la biodegradación del implante. El transporte de fármaco a través de la barrera polimérica asimismo resultará afectada por la solubilidad del compuesto, la hidrofiliidad del polímero, el grado de reticulación del polímero, la expansión del polímero al absorber agua de manera que haga que la barrera polimérica sea más permeable al fármaco, la geometría del implante, y similares. Los implantes son de dimensiones acordes al tamaño y forma de la región seleccionada como sitio de implantación. Los implantes pueden ser partículas, hojas, parches, placas, fibras, microcápsulas y similares, y pueden ser de cualquier tamaño o forma compatible con el sitio de inserción seleccionado.

Los implantes pueden ser monolíticos, es decir, presentan el agente activo homogéneamente distribuido en toda la matriz polimérica, o encapsulado, en los que se encapsula un reservorio de agente activo en la matriz polimérica. La selección de la composición polimérica que va a utilizarse variará con el sitio de administración, el periodo deseado de tratamiento, la tolerancia del paciente, la naturaleza de la enfermedad que va a tratarse y similares. Entre las características de los polímeros se incluyen la biodegradabilidad en el sitio de implantación, la compatibilidad con el agente de interés, la facilidad de encapsulación y la semivida en el medio fisiológico.

Las composiciones poliméricas biodegradables que pueden utilizarse pueden ser ésteres o éteres orgánicos, que al degradarse resultan en productos de degradación fisiológicamente aceptables, incluyendo los monómeros. Los anhídridos, amidas, ortoésteres o similares, por sí mismos o en combinación con otros monómeros, pueden encontrar utilidad. Los polímeros pueden ser polímeros de condensación. Los polímeros pueden estar reticulados o no reticulados. Resultan de particular interés los polímeros de ácidos carboxílicos hidroxialifáticos, ya sea homopolímeros o copolímeros, y los polisacáridos. Se encuentran incluidos en los poliésteres de interés los polímeros de ácido D-láctico, ácido L-láctico, ácido láctico racémico, ácido glicólico, policaprolactona y combinaciones de los mismos. Mediante la utilización de L-lactato o D-lactato, se consigue un polímero de biodegradación lenta, mientras que la degradación resulta sustancialmente potenciada con el racemato. Los copolímeros de ácido glicólico y láctico resultan de interés particular, en los que la tasa de biodegradación está controlada por la proporción entre ácido glicólico y ácido láctico. El copolímero más rápidamente degradado presenta aproximadamente cantidades iguales de ácido glicólico y ácido láctico, en el que cualquiera de los homopolímeros es más resistente a la degradación. La proporción entre ácido glicólico y ácido láctico asimismo afectará a la fragilidad del implante, en la que un implante más flexible resulta deseable para geometrías más grandes. Entre los polisacáridos de interés se encuentran el alginato cálcico, y celulosas funcionalizadas, particularmente ésteres de carboximetilcelulosa caracterizadas por ser insolubles en agua, presentar un peso molecular de entre aproximadamente 5 kD y 500 kD, etc. Asimismo pueden utilizarse hidrogeles biodegradables en los implantes de la presente divulgación. Los hidrogeles habitualmente son un material de copolímero, caracterizado por la capacidad de absorber un líquido. Los hidrogeles biodegradables de ejemplo que pueden utilizarse se describen en Heller, en: *Hydrogels in Medicine and Pharmacy*, N.A. Peppes ed., vol. III, CRC Press, Boca Raton, Fla., 1987, páginas 137 a 149.

Kits

La presente divulgación proporciona, además, un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más ingredientes de las composiciones farmacéuticas. Asociado a dicho recipiente o recipientes puede encontrarse un prospecto en la forma prescrita por una agencia gubernamental reguladora de la fabricación, utilización o comercialización de farmacéuticos o productos biológicos, en el que se refleje la aprobación por parte de la agencia de la fabricación, utilización o comercialización para la administración al ser humano.

Los kits de la presente divulgación pueden incluir uno o más recipientes que comprenden un anticuerpo anti-C1q, anti-C1r o anti-C1s purificado e instrucciones de utilización de acuerdo con métodos conocidos en la materia. Generalmente, estas instrucciones comprenden una descripción de la administración del inhibidor para tratar o diagnosticar una enfermedad, según cualesquiera métodos conocidos en la materia. El kit puede comprender, además, una descripción de selección de un individuo adecuada para el tratamiento basado en la identificación de si ese individuo presenta una lesión cerebral, preferentemente una lesión cerebral traumática, lesión cerebral hipóxica, infección cerebral o accidente cerebrovascular.

Las instrucciones generalmente incluyen información referida a las dosis, posología y vía de administración para el tratamiento pretendido. Los recipientes pueden ser dosis unitarias, paquetes en masa (por ejemplo, paquetes multidosis) o dosis subunitarias. Las instrucciones suministradas en los kits de la presente divulgación normalmente son instrucciones escritas en una etiqueta o prospecto (por ejemplo, una hoja de papel incluida dentro del kit), aunque asimismo son aceptables instrucciones legibles por máquina (por ejemplo, instrucciones portadas en un disco de almacenamiento magnético u óptico).

La etiqueta o prospecto indica que la composición se utiliza para el tratamiento de una lesión cerebral, preferentemente una lesión cerebral traumática, lesión cerebral hipóxica, infección cerebral o accidente cerebrovascular. Las instrucciones pueden proporcionarse para la práctica de cualquiera de los métodos indicados en la presente memoria.

Los kits de la presente divulgación preferentemente se disponen en un envasado adecuado. El envasado adecuado incluye, aunque sin limitación, viales, frascos, tarros, envases flexibles (por ejemplo, Mylar sellado o bolsas de plástico), y similares. Asimismo se encuentran contemplados los envases para la utilización en combinación con un dispositivo específico, tal como un inhalador, dispositivo de administración nasal (por ejemplo, un atomizador) o un dispositivo de infusión, tal como una minibomba. Un kit puede disponer de una abertura de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que presente un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). El envase puede presentar asimismo una abertura de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede ser unas bolas de solución intravenosa o un vial que presente un tapón perforable con

una aguja de inyección hipodérmica). Por lo menos un agente activo en la composición es un inhibidor de la ruta clásica del complemento. El envase puede comprender, además, un segundo agente farmacéuticamente activo.

- 5 Los kits opcionalmente pueden proporcionar componentes adicionales, tales como amortiguadores e información interpretativa. Normalmente, el kit comprende un envase y una etiqueta o uno o más prospectos sobre o asociados al envase.

Inhibición del complemento

- 10 Se conocen varias moléculas que inhiben la actividad del complemento. Además de compuestos conocidos, pueden cribarse inhibidores adecuados mediante métodos indicados en la presente memoria. Tal como se ha indicado anteriormente, las células normales pueden producir proteína que bloquea la actividad del complemento, por ejemplo, CD59, inhibidor de C1, etc. En algunas puestas en práctica de la divulgación, el complemento se inhibe mediante la regulación positiva de la expresión de genes codificantes de dichos polipéptidos.

- 15 Asimismo se conocen en la materia modificaciones de moléculas que bloquean la activación del complemento. Por ejemplo entre tales moléculas se incluyen, aunque sin limitación, receptores del complemento modificados, tales como CR1 soluble. La proteína madura del alotipo más habitual de CR1 contiene 1.998 residuos aminoácidos: un dominio extracelular de 1.930 residuos, una región transmembranaria de 25 residuos y un dominio citoplasmático de 43 residuos. El dominio extracelular completo está compuesto por 30 unidades repetidas denominadas repeticiones de consenso cortas (SCR) o repeticiones de proteína de control del complemento (CCPR), cada una de las cuales consiste en 60 a 70 residuos aminoácidos. Los últimos datos indican que C1q se une específicamente al CR1 humano. De esta manera, CR1 reconoce la totalidad de las tres opsoninas del complemento, es decir, C3b, C4b y C1q. Se ha producido una versión soluble de CR1 humana recombinante (sCR1) que carece de los dominios transmembranario y citoplasmático y se ha mostrado que retiene todas las funciones conocidas del CR1 natural. Se ha confirmado la función cardioprotectora de sCR1 en modelos animales de isquemia/daño por reperusión. Se han descrito varios tipos de receptores de C1q (C1qR) humanos. Entre ellos se incluyen el receptor ubicuamente distribuido de 60 a 67 kDa, denominado cC1qR debido a que se une al dominio similar a colágeno de C1q. Esta variante de C1qR se ha mostrado que es la calreticulina: un receptor de 126 kDa que modula la fagocitosis de los monocitos. La qC1qR no es una molécula unida a membrana, sino por el contrario una proteína soluble de secreción que presenta afinidad para las regiones globulares de C1q y que podría actuar como un regulador de fase líquida de la activación del complemento.

- 35 El factor acelerante de la degradación (DAF) (CD55) está compuesto por cuatro SCR más un dominio enriquecido en serina/treonina que es capaz de glucosilación unida a O extensiva. El factor DAF se une a las membranas celulares mediante un anclaje de glucosil-fosfatidilinositol (GPI) y, a través de su capacidad para unirse a C4b y C3b, actúa disociando las C3 y C5 convertasas. Se ha mostrado que las versiones solubles de DAF (sDAF) inhiben la activación del complemento.

- 40 El inhibidor de C1, un miembro de la familia de "serpina" de los inhibidores de serina proteasa, es una proteína plasmática fuertemente glucosilada que evita la activación de C1 en fase líquida. El inhibidor de C1 regula la ruta clásica de activación del complemento mediante el bloqueo del sitio activo de C1r y C1s y disociándolos de C1q.

- 45 Entre los inhibidores peptídicos de la activación del complemento se incluyen C5a y entre otras moléculas inhibidoras se incluyen el fucano.

Métodos de tratamiento

- 50 Mediante la administración de agentes que inhiben la activación del complemento, puede reducirse la producción de anticuerpos específicos de antígeno que actúan de mediadores en una lesión cerebral, una lesión cerebral traumática, una lesión cerebral hipóxica, una infección cerebral o un accidente cerebrovascular. Entre tales agentes se incluyen un inhibidor de anticuerpo anti-C1q, anti-C1r o anti-C1s. Entre otros agentes pueden incluirse inhibidores que regulan positivamente la expresión del complemento natural, o agentes que regulan negativamente la síntesis de C1q, C1r o C1s en las células, agentes que bloquean la activación del complemento, agentes que bloquean la señal para la activación del complemento, y similares.

- 60 Los métodos neutralizan la actividad biológica del complemento. La actividad biológica del complemento afectada podría ser: (1) la unión de C1q a un autoanticuerpo, (2) la unión de C1q a C1r, (3) la unión de C1q a C1s, (4) la unión de C1q a IgM, (5) la unión de C1q a fosfatidilserina, (6) la unión de C1q a pentraxina-3, (7) la unión de C1q a proteína C reactiva (CRP), (8) la unión de C1q al receptor de C1q globular (gC1qR), (9) la unión de C1q al receptor 1 del complemento (CR1), (10) la unión de C1q al amiloide beta, (11) la unión de C1q a la calreticulina, (12) la unión de C1q a células apoptóticas, o (13) la unión de C1q a células B. La actividad biológica del complemento afectada podría ser, además, (1) la activación de la ruta clásica de activación del complemento, (2) la activación de la citotoxicidad dependiente de anticuerpos y del complemento, (3) la hemólisis de CH50, (4) la pérdida sináptica, (5) la producción de anticuerpo células B, (6) la maduración de las células dendríticas, (7) la proliferación de las células T, (8) la producción de citocinas, (9) la activación de la microglía, (10) la reacción de

Arthus, (11) la fagocitosis de sinapsis o terminaciones nerviosas, o (12) la activación de células que expresan el receptor 3 del complemento (CR3/C3).

Se encuentra contemplado que puedan obtenerse y utilizarse composiciones bajo la guía de un médico para la utilización *in vivo*. Las dosis de la formulación terapéutica pueden variar ampliamente, según la naturaleza de la enfermedad, la frecuencia de administración, el modo de administración, el aclaramiento del agente en el hospedador, y similares.

La cantidad eficaz de una composición terapéutica administrada a un paciente particular puede depender de una variedad de factores, algunos de los cuales pueden ser diferentes de paciente a paciente. Utilizando conocimientos habituales, el médico competente podrá ajustar la dosis de una composición terapéutica o de prueba de imagen particular durante el curso de ensayos clínicos rutinarios.

Pueden incorporarse agentes terapéuticos, por ejemplo, inhibidores del complemento, activadores de la expresión génica, etc. en una variedad de formulaciones para la administración terapéutica mediante combinación con portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables apropiados, y pueden formularse en preparaciones en formas sólida, semisólida, líquida o gaseosa, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, soluciones, supositorios, inyecciones, inhalantes, geles, microesferas y aerosoles. De esta manera, la administración de los compuestos puede conseguirse de diversas maneras, incluyendo la administración oral, bucal, rectal, parenteral, intraperitoneal, intradérmica, transdérmica, intratecal, nasal, intratraqueal, etc. El agente activo puede ser sistémico tras la administración o estar localizado, mediante la utilización de administración regional, administración intramural o la utilización de un implante que actúa reteniendo la dosis activa en el sitio de la implantación.

Tratamientos de combinación

Los inhibidores del complemento de la presente divulgación pueden utilizarse, aunque sin limitación, junto con cualquier tratamiento adicional, tal como un anticoagulante, para tratar una lesión cerebral, preferentemente una lesión cerebral traumática, una lesión cerebral hipóxica, una infección cerebral o un accidente cerebrovascular.

En algunas puestas en práctica, los anticuerpos de la presente divulgación pueden administrarse en combinación con un inhibidor de la ruta alternativa de activación del complemento. Entre dichos inhibidores pueden incluirse, aunque sin limitación, anticuerpos de bloqueo del factor B, anticuerpos de bloqueo del factor D, formas de proteína solubles, unidas a membrana, etiquetadas o de fusión de CD59, DAF, CR1, CR2, Crry o péptidos similares a compstatina que bloquean el corte de C3, antagonistas no peptídicos de C3aR, tales como SB 290157, factor de veneno de cobra o inhibidores no específicos del complemento, tales como mesilato de nafamostat (Futhan, FUT-175), aprotinina, ácido monocarboxílico K-75 (MX-1) y heparina (ver, por ejemplo, T.E. Mollnes y M. Kirschfink, Molecular Immunology 43 (2006) 107-121).

Ensayos diagnósticos

La presente divulgación proporciona, en parte, métodos de determinación del riesgo de un sujeto de desarrollar una lesión cerebral, preferentemente una lesión cerebral traumática, una lesión cerebral hipóxica, una infección cerebral o un accidente cerebrovascular, que comprende: administrar un anticuerpo anti-C1q, anti-C1r o anti-C1s al sujeto, en los que el anticuerpo anti-C1q, anti-C1r o anti-C1s se acopla a un marcaje detectable; detectar el marcaje detectable para medir la cantidad o localización de C1q, C1r o C1s en el sujeto, y comparar la cantidad o localización de uno o más de C1q, C1r o C1s con una referencia, en los que el riesgo de desarrollar una lesión cerebral, preferentemente una lesión cerebral traumática, lesión cerebral hipóxica, infección cerebral o accidente cerebrovascular se caracteriza basándose en la comparación de la cantidad o localización de uno o más de C1q, C1r o C1s con la referencia.

Un método de ejemplo para detectar el nivel de C1q, C1r o C1s, y que de esta manera resulta útil para clasificar si una muestra está asociada a una lesión cerebral, preferentemente una lesión cerebral traumática, una lesión cerebral hipóxica, una infección cerebral o un accidente cerebrovascular, o un subtipo clínico de las mismas, implica obtener una muestra biológica a partir de un sujeto de ensayo y poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo capaz de detectar C1q, C1r o C1s, de manera que se detecte el nivel de C1q, C1r o C1s en la muestra biológica. En determinados casos, el algoritmo estadístico es un único sistema clasificador estadístico de aprendizaje. Por ejemplo, puede utilizarse un único sistema clasificador estadístico de aprendizaje para clasificar una muestra como muestra de C1q, C1r o C1s basándose en un valor de predicción o probabilidad y la presencia o el nivel de C1q, C1r o C1s. La utilización de un sistema único clasificador estadístico de aprendizaje normalmente clasifica la muestra como una muestra de C1q, C1r o C1s con una sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y/o exactitud global de por lo menos aproximadamente 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %.

Otros algoritmos estadísticos adecuados son bien conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, entre los sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje se incluyen una técnica algorítmica de aprendizaje máquina capaz de adaptarse a conjuntos de datos complejos (por ejemplo, un panel de marcadores de interés) y que toma decisiones basándose en dichos conjuntos de datos. En algunas puestas en práctica, se utiliza un único sistema clasificador estadístico de aprendizaje, tal como un árbol de clasificación (por ejemplo, un bosque aleatorio). En otras puestas en práctica, se utiliza una combinación de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje, preferentemente en tándem. Entre los ejemplos de sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, aquellos que utilizan el aprendizaje inductivo (por ejemplo, árboles de decisión/clasificación, tales como bosques aleatorios, árboles de clasificación y regresión (C&RT), árboles potenciados, etc.), aprendizaje probablemente aproximadamente correcto (PAC), aprendizaje conexionista (por ejemplo, redes neuronales (NN), redes neuronales artificiales (ANN), redes neurodifusas (NFN), estructuras de red, perceptrones, tales como perceptrones multicapa, redes de alimentación hacia adelante multicapa, aplicaciones de redes neuronales, aprendizaje bayesiano en redes de creencia, etc.), aprendizaje por refuerzo (por ejemplo, aprendizaje pasivo en un medio conocido, tal como aprendizaje *naïve*, aprendizaje dinámico adaptativo y aprendizaje por diferencia temporal, aprendizaje pasivo en un medio desconocido, aprendizaje activo en un medio desconocido, funciones de valor-acción de aprendizaje, aplicaciones de aprendizaje por refuerzo, etc.) y algoritmos genéticos y programación evolutiva. Entre otros sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje se incluyen máquinas de vectores de soporte (por ejemplo, métodos Kernel), *splines* de regresión adaptativa multivariante (MARS), algoritmos de Levenberg-Marquardt, algoritmos de Gauss-Newton, mezclas de gaussianos, algoritmos de descenso por gradiente y cuantificación vectorial de aprendizaje (LVQ).

En una puesta en práctica, los métodos implican, además, la obtención de una muestra biológica de control (por ejemplo, una muestra biológica procedente de un sujeto que no presenta una afección o trastorno mediado por C1q, C1r o C1s), una muestra biológica procedente del sujeto durante la remisión o antes de desarrollar una afección o trastorno mediado por C1q, C1r o C1s, o una muestra biológica procedente del sujeto durante el tratamiento para una afección o trastorno en desarrollo mediado por C1q, C1r o C1s.

Un método de ejemplo para detectar la presencia o ausencia de C1q, C1r o C1s es la administración de un anticuerpo anti-C1q, anti-C1r o anti-C1s al sujeto, en el que el anticuerpo anti-C1q, anti-C1r o anti-C1s está acoplado a un marcaje detectable. En algunas puestas en práctica, el marcaje detectable comprende un ácido nucleico, oligonucleótido, enzima, isótopo radioactivo, biotina o un marcaje fluorescente. En algunas puestas en práctica, el marcaje detectable se detecta utilizando un agente de imagen para rayos X, TAC, RM, ultrasonidos, PET y SPECT. En algunas puestas en práctica, el marcaje fluorescente se selecciona de fluoresceína, rodamina, pigmentos de cianina o BODIPY.

Ejemplos

Ejemplo 1: métodos

Cirugía traumatológica

Se anestesiaron animales de edad avanzada y se mantuvieron bajo isoflurano al 2% a 2.5 % y se fijaron en un marco estereotáxico con barras para oídos no traumáticas. Se eliminó el pelaje del cuero cabelludo mediante afeitado con una afeitadora eléctrica. Se aplicó lubricante ocular en los ojos y se aplicó betadina y alcohol al 70 % en el cuero cabelludo. Se realizó una incisión en la línea media para exponer el cráneo.

Se indujo una TBI unilateral mediante el modelo de impacto cortical controlado (ICC) en el lóbulo parietal. Los ratones recibieron una craneotomía de ~4 mm de diámetro utilizando un microtaladro eléctrico en las coordenadas siguientes: -2.00 mm anteroposterior y +2.00 mm mediolateral con respecto a bregma. Cualquier animal con sangrado excesivo debido a la disrupción de la duramadre fue eliminado del estudio. Tras la craneotomía, se provocó una contusión utilizando una punta convexa de 3 mm conectada a un impactador electromagnético (Impact One, Leica). Los parámetros del impacto se fijaron en una profundidad de contusión de 0.95 mm (desde la duramadre) a una velocidad de 4.0 m/s y sostenida durante 300 ms. Tras el ICC, se suturó el cuero cabelludo. Los animales de referencia se sometieron a un procedimiento similar, aunque con únicamente un ligero taladrado, sin exposición del cráneo.

Después de la cirugía, los animales fueron introducidos en una jaula sobre una almohadilla térmica hasta ser totalmente ambulantes y haberse recuperado. Tras la recuperación, se devolvieron los animales a su jaula de origen y se les realizó un seguimiento para comportamiento normal y mantenimiento del peso durante todo el periodo experimental.

Adquisiciones de RM *in vivo*

Todos los experimentos de RM *in vivo* se llevaron a cabo en un sistema de RM vertical de 14.1 Tesla (Agilent Technologies, Palo-Alto, CA) dotado de gradientes de 100 G/cm y una bobina volumétrica 1H (Ø1=40 mm).

Para cada sesión de obtención de imágenes, los ratones fueron anestesiados con isoflurano (al 1 % a 2 % en O₂) y se fijó un catéter 27G en la vena de la cola para permitir la inyección intravenosa (iv) de Magnevist®. A continuación, los animales fueron colocados en una base dedicada, manteniendo una anestesia constante y colocados en el tubo de RM; se realizó un seguimiento constante de la respiración y la temperatura corporal durante todas las adquisiciones para garantizar el bienestar animal y la reproducibilidad de los datos.

Tras las imágenes exploratorias iniciales, se adquirieron imágenes anatómicas ponderadas en T2 de alta resolución utilizando los parámetros siguientes: TE/TR=12/2.000 ms, grosor de sección=0.5 mm, número de medias=8, matriz=256x256, campo de visión (CdV)=30x30 mm², tiempo de adquisición=8 min. A continuación, se evaluaron las lesiones en la BHE utilizando dos secuencias eco de gradiente de alta resolución idénticas separadas por un retardo de 2 minutos 30 segundos durante los que se inyectaron 500 µl de Magnevist® (1 mmol/kg) a lo largo de 20 segundos. Los parámetros correspondientes fueron: TE/TR=4.6/112 ms, grosor de sección=0.5 mm, número de medias=30, ángulo de inversión=10, matriz=256x192, campo de visión (CdV)=25x25 mm², tiempo de adquisición=10 min 41 s.

Análisis de datos de RM

Utilizando imágenes ponderadas en T2, se delinearon tres regiones manualmente en cada sección y para cada animal a fin de crear máscaras para el cerebro, la lesión y la cavitación. La zona de interés (ZdI) de la lesión comprende una estructura cerebral de apariencia anormal en torno al punto focal del ICC. Se define la cavitación como tejido de sustitución hiperintenso en torno a la contusión. Todas las segmentaciones se llevaron a cabo con ImageJ (University of Wisconsin, EE. UU.). A partir de dichas máscaras, las reconstrucciones 3D se obtuvieron utilizando software AMIRA (Mercury Computer Systems, San Diego, EE. UU.).

Utilizando imágenes ponderadas en T1, se obtuvieron mapas de relación de realce obtenidos utilizando la ecuación siguiente:

$$\frac{S_{post}-S_{pre}}{S_{pre}} \times 100 \quad \frac{S_{post}-S_{pre}}{S_{pre}} \times 100 \quad \text{Ec. [X]}$$

en la que Spre y Spost representan la intensidad de señal antes y después de la inyección de Magnevist®, respectivamente, en cada vóxel. Utilizando ImageJ, se dibujó la ZdI manual en torno al punto de contusión (ipsilateral) y se reprodujo en la cara opuesta (contralateral). Se calculó la relación de realce medio para cada animal en ambas ZdI.

Recogida de tejidos

Todos los ratones recibieron una sobredosis letal de mezcla de ketamina (10 mg/ml) y xilazina (1 mg/ml). Una vez los animales habían sido completamente anestesiados, se abrió la cavidad torácica y los animales fueron perfundidos con solución amortiguadora de fosfato 1X (PBS), pH 7.5 (Gibco, Carlsbad, CA, 70011-044).

Para el tejido congelado, tras la solución PBS, se extrajo rápidamente el cerebro completo y se diseccionaron las regiones cerebrales (hipocampo, córtex, sitio de la lesión, etc.), se congelaron instantáneamente sobre hielo seco y se conservaron a -80 °C.

Análisis de qPCR

Los hipocampos ipsilaterales diseccionados se utilizaron para el análisis de qPCR. Se completaron el aislamiento del ARN y la conversión en ADNc. Se determinaron la concentración y la calidad del ARN utilizando un NanoDrop (Thermo Scientific). Se transcribieron inversamente trescientos nanogramos de ARN utilizando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems). Se investigaron muestras individuales por duplicado utilizando la mezcla maestra SYBR Green (Applied Biosystems) de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante. Se determinó la expresión relativa de los genes diana mediante el método 2-ΔΔCt y se normalizó frente a la expresión del gen de actina beta utilizando un sistema de PCR en tiempo real Stratagene Mx3005P. Los cebadores utilizados fueron:

CD11b: Directo 5' CTGAGACTGGAGGCAACCAT-3' (SEC ID nº: 69)

Inverso 5' GATATCTCCTTCGCGCAGAC-3' (SEC ID nº: 70)

C1qa: 5' - 3'

C3: 5' - 3'

GAPDH: Directo 5' AAATGGTGAAGGTCGGTGTG-3' (SEC ID nº: 71)

Inverso 5' TGAAGGGGTCGTTGATGG-3' (SEC ID nº: 72)

Análisis de inmunohistoquímica

Para el análisis de inmunohistoquímica, tras la solución PBS, los animales fueron perfundidos con paraformaldehído al 4 %, pH 7,5 (PFA, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, 441244); se fijaron los cerebros en paraformaldehído al 4 % helado, pH 7.5 (PFA, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, 441244) durante 2 horas, seguido de protección con sacarosa (Fisher Science Education, Nazareth, PA, S25590A) (15 % a 30 %). Se incluyeron los cerebros en mezcla de sacarosa al 30 %/compuesto por temperatura de corte óptima (Tissue Tek, Radnor, PA, 4583) sobre hielo seco y se conservaron a -80 °C. Se obtuvieron secciones de los cerebros, de 14 µm, utilizando un criostato Leica (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) y se montaron en portaobjetos (ThermoFisher Scientific, South San Francisco, CA). Se llevaron los portaobjetos a la temperatura ambiente (20 °C) antes de utilizarlos. Los portaobjetos se lavaron en solución de Tween-solución salina amortiguada con fosfato durante 10 minutos y dos veces con solución salina amortiguada con fosfato (TBS) durante 10 minutos cada uno. Se bloquearon todos los portaobjetos en reactivo de bloqueo (Perkin Elmer, Waltham, MA, FP1020) durante 30 minutos en la oscuridad. Los portaobjetos se tiñeron con anticuerpos primarios específicos para C1q o PSD-95 durante la noche, se lavaron tres veces en TBS y se tiñeron para el anticuerpo secundario, anticuerpo de cabra anticonejo-Alexa-568 (Invitrogen, Carlsbad, CA, A-11011). Los tejidos se fijaron utilizando ProLong Gold (Invitrogen, Carlsbad, CA, P36930) y un cubre de portaobjetos estándar sellado con esmalte de uñas. Se calcularon medias de 3 o 4 imágenes separadas por 50 a 100 µm en el hipocampo dorsal por cada animal. Se adquirieron imágenes Z-stack de nueve µm en un microscopio confocal de campo ancho de alta velocidad Nikon (fluorescencia invertida de Ti, CSU-W1) en el UCSF Nikon Imaging Center.

Sinaptocitometría de flujo

Se homogeneizaron hipocampos en sacarosa 0.32 M en HEPES (Sigma Aldrich, St. Louis, MO H0887) en un homogeneizador Dounce de vidrio. Se separaron los fragmentos de tejido gruesos mediante centrifugación (1.200xg durante 10 min) y se recogió el sobrenadante. Se aislaron los sinaptosomas mediante centrifugación adicional (13.000xg durante 20 minutos), se descartó el sobrenadante y se recogieron los sedimentos que contenían sinaptosomas. Las muestras se mantuvieron en frío (ya sea sobre hielo o en centrifugas refrigeradas) para los procedimientos de tinción. Se estandarizó la recogida de sinaptosomas entre muestras mediante la medición de las concentraciones de proteínas totales (ensayo de proteínas BCA de Pierce, Thermo Scientific, Rockford, IL, 23225). Los sinaptosomas (50 µg/ml) se dividieron en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml para la tinción. Para la tinción extracelular, los sinaptosomas se tiñeron con anticuerpos primarios (C1q) durante 30 minutos a 4 °C y se sometieron a agitación tras 15 minutos. Las muestras se lavaron 2x con 700 µl de amortiguador de tinción de anticuerpos (PBS + BSA al 5 %) a 13.000xg durante 5 min a 4 °C. Se añadieron anticuerpos secundarios (anticuerpo de cabra anticonejo 647, Invitrogen, Carlsbad, Ca, A21244) durante 30 minutos y se sometieron a agitación tras 15 minutos a 4 °C en la oscuridad. Para la tinción intracelular, los sinaptosomas en primer lugar se permeabilizaron mediante solución de fijación Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, San Diego, CA, 554722) durante 20 minutos sobre hielo. Las muestras se lavaron 2x con 700 µl de amortiguador de permeabilización/lavado (BD Biosciences, San Diego, CA, 554723) a 13.000xg durante 5 min a 4 °C. Se añadieron anticuerpos primarios (sinapsina-1 y PSD-95) durante 30 minutos y se sometieron a agitación tras 15 minutos. Las muestras se lavaron 2x con 700 µl de amortiguador de permeabilización/lavado a 13.000xg durante 5 min a 4 °C. Se añadieron anticuerpos secundarios (anticuerpo de cabra anticonejo 405, Invitrogen, Carlsbad, CA A31556; anticuerpo de cabra antirratón 488, Invitrogen, Carlsbad, CA, A11001; anticuerpo de cabra antirratón 647, Invitrogen, Carlsbad, CA, A21236) durante 30 minutos y se sometieron a agitación tras 15 minutos a 4 °C en la oscuridad. Todos los reactivos se prepararon frescos para cada día de tinción. Se determinaron los sinaptosomas mediante perlas de tamaño calibrado y se cotificaron con anticuerpos específicos para marcadores presinápticos (sinapsina-1) y postsinápticos (PSD-95, GluR1). No se observó tinción en muestras que contenían: (1) ningún sinaptosoma, (2) anticuerpos secundarios solos. Se seleccionó un subconjunto de muestras de cada grupo para el análisis de sinaptocitometría de flujo. Se analizó un máximo de cuatro muestras cada día. Cada día se analizó por lo menos una muestra de referencia y una muestra de TBI, estandarizada respecto al grupo de referencia. Las muestras se sometieron a ensayo por duplicado. Se recogieron los datos en un LSRII (BD) y se analizaron con el software Flowjo™ (v10, Tree Star Inc.). Se recogieron 30.000 eventos para los sinaptosomas totales. Se recogieron 50.000 eventos para los terminales que expresan C1q.

Administración de anticuerpo de C1q

A partir de inmediatamente después de la cirugía de lesión cerebral traumática (TBI), los animales macho recibieron inyecciones intraperitoneales de un anticuerpo inhibidor contra C1q (ANX-M1, M19 o un anticuerpo de control de isotipo coincidente (IgG1 de ratón). Los anticuerpos fueron proporcionados por Annexon Biosciences (South San Francisco, CA) y estaban libres de endotoxinas y conservantes, almacenados a 4 °C. Los animales recibieron inyecciones semanales (100 mg/kg) hasta completar el experimento (terminación de los animales).

Reconocimiento de objetos nuevos

Para todos los ensayos de comportamiento, los experimentos fueron enmascarados tanto para tipo de cirugía como tratamiento. Una semana antes del análisis de comportamiento, los animales fueron sometidos a

aclimatación a los experimentadores y las condiciones de alojamiento. Los comportamientos tuvieron lugar en salas oscuras durante el ciclo de vigilia de los animales. Se registraron todos los comportamientos utilizando una cámara cenital conectada a un sistema de rastreo y análisis de vídeo (Ethovision XT 12.0, Noldus Information Technology). Cuando el rastreo no era óptimo, los vídeos fueron puntuados manualmente por un investigador enmascarado a cirugía y tratamiento.

Se midió la función de memoria de reconocimiento a partir de un mes después de la cirugía, mediante un ensayo de reconocimiento de objetos nuevos (RON). El medio de ensayo consistía en una arena de campo abierto (30 cm²) bajo iluminación roja. Se permitió que los ratones explorasen la arena durante dos periodos de 1 minutos durante dos días consecutivos (etapa de habituación). El día tres (etapa de entrenamiento), se fijaron dos objetos idénticos (bloques de Lego™ rojos) al suelo en esquinas opuestas de la arena utilizando imanes y se permitió que los ratones explorasen la arena y los objetos durante 5 minutos. Veinticuatro horas después, día cuatro (etapa de ensayo), se substituyó uno de los objetos por un objeto nuevo (flor Lego™ naranja) de dimensiones y textura similares. Se permitió que los ratones explorasen durante 5 minutos. Se limpiaron los objetos y la arena con etanol al 70 % entre ensayos y animales. Se registraron los ensayos y se definió el comportamiento exploratorio como el tiempo dedicado por los animales a dirigir el hocico hacia un objeto. Los datos se expresan como porcentaje del tiempo dedicado por los ratones a explorar cada objeto. Los ratones que habían dedicado menos de 5 segundos de tiempo de exploración durante el entrenamiento o el ensayo fueron excluidos del análisis.

Análisis de los datos

Los resultados se analizaron utilizando el software Prism (v7.05, GraphPad™, La Jolla, CA) y se expresaron como medias $\pm$ errores estándares de la media (SEM). Se llevaron a cabo análisis estadísticos tal como se enumera posteriormente, en los que los valores de p inferiores a 0.05 se consideraron significativos.

Ejemplo 2: progresión de la lesión tras el daño por contusión en animales de edad avanzada.

Se examinaron lesiones por contusión focal leves a moderadas en animales de 19 meses de edad con el modelo altamente reproducible de lesión cortical controlada (LCC). Utilizando una combinación de métodos de obtención de imágenes de RM ponderados en T₂ y ponderados en T₁ pre- y postcontraste, se investigó el tamaño de la lesión, la cavitación y la degradación de la barrera hematoencefálica (BHE) durante el tiempo (figura 1 y figura 2). En la RM ponderada en T₂, las lesiones aparecen como una mezcla de contrastes hiper- e hipointensos, que delimitan un tamaño total de lesión medido. En las mismas imágenes, puede observarse cavitación hiperintensa bien delimitada en el hemisferio lesionado. Se midió el tamaño de lesión incrementado y cavitación un día después del daño (dpi) y persistieron hasta un mes después del daño. Aunque el tamaño de la lesión alcanzó un máximo en un dpi y después mantuvo un nivel constante hasta 1 mes después, el volumen de cavitación continuó creciendo y tras un mes había alcanzado un volumen de ~8 mm³ (figura 1C y figura 1D). A continuación, se midió la degradación de la BHE tras la lesión por contusión focal utilizando RM ponderada en T₁ después de la inyección de agente de contraste a base de gadolinio, tal como se utiliza habitualmente en el contexto clínico. En el cerebro de edad avanzada, la integridad de la BHE se vio comprometida después de la lesión, tal como muestra la acumulación incrementada de agente contraste por fuga vascular. Se midió la degradación de la BHE durante hasta un mes después del daño (figura 2). Globalmente tal como se esperaba, el tamaño de la lesión y la cavitación son peores en animales de edad avanzada en comparación con animales jóvenes después de la lesión por contusión.

Ejemplo 3: número incrementado de microglías de manera crónica tras la lesión por contusión.

En el cerebro lesionado de animales de edad avanzada, se produjo un incremento en las células microgliales en comparación con los cerebros de animales jóvenes (3 meses de edad) durante hasta 7 días después de la TBI. Se utilizaron dos métodos independientes: la medición de ARNm mediante PCR cuantitativa (qPCR) y los niveles de proteínas mediante tinción de citometría de flujo, a fin de determinar si el incremento de las microglías observado en 7 dpi persiste en puntos temporales posteriores cuando asimismo se observan déficits cognitivos. Se midió un incremento de la expresión de ARNm de CD11b (receptor 3 del complemento, o CR3) en el hipocampo lesionado a partir de 7 dpi y que duró hasta 30 días después del daño, en comparación con animales de referencia de edad coincidente (figura 3A). Estos resultados fueron adicionalmente confirmados utilizando tinción de citometría de flujo de microglías derivadas del hipocampo (CD45^{lo}, CD11b⁺). Resultaba evidente un incremento significativo del número de microglías en los animales lesionados de edad avanzada tanto en 10 dpi como en 30 dpi en comparación con los animales de referencia (figura 3B).

Ejemplo 4: la lesión por contusión exacerba la actividad fagocítica de microglías en el cerebro de edad avanzada.

Se investigaron las propiedades fagocíticas de las microglías en el cerebro de edad avanzada mediante un ensayo de endocitosis *in vivo* recién modificado. En este ensayo, se inyectan partículas de sinapsis PSD-95 marcadas con anticuerpo fluorescente en el hipocampo dañado de animales de referencia o lesionados de edad avanzada. Tres días después de la inyección, se aislaron microglías y se cuantificó la actividad fagocítica mediante medición del porcentaje de microglías que endocitaron sinapsis marcadas (CD45^{lo} CD11b⁺ coexpresantes con PSD-95-FITC

intracelular). Se observó un incremento significativo del porcentaje de microglías que endocitaron sinapsis marcadas en animales lesionados de edad avanzada en 30 dpi en comparación con controles de referencia correspondientes (figura 3C). Se destaca que el incremento de actividad endocítica de microglías está limitado a los puntos finales crónicos, ya que las diferencias entre animales de referencia y de TBI en 10 dpi no fueron medidos. Estos resultados sugieren que los cambios inducidos por el daño en el cerebro de edad avanzada tienen lugar progresivamente después del daño y podrían ser responsables de un resultado cognitivo peor.

Ejemplo 5: la lesión por contusión induce una expresión robusta del complemento en el cerebro de edad avanzada.

Debido a informes que asocian las microglías a la expresión/activación del complemento en diferentes afecciones neurodegenerativas, se investigó el efecto del daño sobre la expresión de C1q durante el tiempo. Utilizando en análisis de qPCR, se midieron incrementos significativos en la expresión del ARNm de C1q dentro del hipocampo lesionado en los días 7, 14 y 30 posteriores al daño (figura 4A). El factor del complemento C3 corriente abajo asimismo resultó regulado positivamente tras el daño (figura 4B). Se confirmó, además, la inducción crónica de C1q mediante análisis inmunohistoquímico del hipocampo (CA1) (figura 4C). Se destaca que, utilizando sinaptocitometría de flujo (figura 4D), la proteína C1q colocalizada con las sinapsis individuales se encontraba significativamente elevada en 30 dpi. Tal como se ha indicado anteriormente, la expresión del receptor del complemento C3 (CR3 o CD11b) asimismo se encontraba aumentada (figura 3A), lo que es consistente con estos resultados.

Ejemplo 6: resultados de lesión contusiva en la pérdida crónica de sinapsis en el cerebro de edad avanzada.

Se ha mostrado que la localización de C1q en la sinapsis está directamente asociada a reducciones en los números de sinapsis. Por lo tanto, se investigó si la acumulación crónica de C1q (30 dpi) estaba asociada a la pérdida de sinapsis hipocámpales tras el daño en animales de edad avanzada. Se evaluó el número de sinapsis en el hipocampo mediante tinción de citometría de flujo tras el aislamiento de sinapsis. Se utilizó la sinapsina-1 como marcador presináptico estándar y PSD-95 como marcador postsináptico. Se midieron reducciones significativas del número de sinapsis en los animales lesionados de edad avanzada en comparación con animales de referencia de edad coincidente (figura 5A). Las reducciones, medidas mediante análisis de citometría de flujo, se confirmaron adicionalmente mediante tinción inmunohistoquímica para el marcador postsináptico PSD-95 (figura 5B).

Ejemplo 7: el bloqueo del complemento previene los déficits de memoria en animales de edad avanzada tras la lesión por contusión.

Con el fin de determinar el papel potencial que la expresión incrementada del complemento desempeña en el desarrollo de déficits crónicos de memoria inducidos por el daño, se utilizaron dos enfoques complementarios: 1) un enfoque genético, con ratones con inactivación de C3 (C3^{-/-}) de edad avanzada, y 2) intervención farmacológica con un anticuerpo anti-C1q. Para medir la función de la memoria 30 dpi, se utilizó el ensayo de reconocimiento de objetos nuevos. Este ensayo no presenta ningún estímulo aversivo y se basa en la tendencia innata a explorar lo nuevo. En primer lugar, los animales fueron expuestos a dos objetos idénticos y veinticuatro horas después fueron expuestos a uno de los objetos encontrados previamente (objeto familiar) y a uno nuevo. Se midió la memoria de reconocimiento como el tiempo que los ratones dedicaban a explorar el objeto nuevo en comparación con el objeto familiar. Los animales lesionados de edad avanzada resultaron significativamente discapacitados en su capacidad de reconocer el objeto nuevo en comparación con animales de control coincidentes, indicando deterioros de la memoria (figura 6A). Cabe destacar que se observaron déficits de memoria tanto en animales lesionados de edad avanzada tanto machos como hembras, y no se observaron diferencias según sexo (figura 6A). Cabe destacar que los animales lesionados de edad avanzada C3^{-/-} y los animales lesionados de tipo salvaje de edad avanzada que recibieron el anticuerpo bloqueante de C1q (administrado semanalmente) mostraron capacidades de memoria de reconocimiento significativamente mejoradas en comparación con los animales de tipo salvaje lesionados de edad avanzada (figura 6B). Estos datos demuestran que la activación de la ruta clásica del complemento desempeña una función significativa en el desarrollo de los déficits de memoria en los animales de edad avanzada lesionados. Se destaca que la utilización de la ruta de inicio del complemento como diana puede prevenir los déficits crónicos inducidos por traumatismo en animales de edad avanzada.

REIVINDICACIONES

1. Inhibidor de la ruta clásica del complemento para la utilización en el tratamiento de una lesión cerebral, en el que el inhibidor es un anticuerpo anti-C1q que comprende:
5 un dominio variable de cadena ligera que comprende una HVR-L1 que presenta la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 5, una HVR-L2 que presenta el aminoácido de SEC ID nº: 6 y una HVR-L3 que presenta el aminoácido de SEC ID nº: 7; y
10 un dominio variable de cadena pesada que comprende una HVR-H1 que presenta la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 9, una HVR-H2 que presenta el aminoácido de SEC ID nº: 10 y una HVR-H3 que presenta el aminoácido de SEC ID nº: 11.
2. Inhibidor para la utilización según la reivindicación 1, en el que el inhibidor debe administrarse durante o dentro de las primeras 4 semanas después de una lesión cerebral, el inhibidor debe administrarse durante o dentro de la primera semana después de una lesión cerebral, el inhibidor debe administrarse durante o dentro de las 24 horas después de una lesión cerebral, o el inhibidor debe administrarse durante o dentro de las 1, 2, 3, 4, 5 o 6 horas después de una lesión cerebral.
3. Inhibidor para la utilización según la reivindicación 1 o 2, en el que el inhibidor inhibe la pérdida de sinapsis inducida por la lesión cerebral.
4. Inhibidor para la utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la lesión cerebral es una lesión cerebral traumática, una lesión cerebral hipóxica, una infección cerebral o un accidente cerebrovascular.
- 25 5. Inhibidor para la utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo anti-C1q se une específicamente a y neutraliza una actividad biológica de C1q.
- 30 6. Inhibidor para la utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el anticuerpo anti-C1q es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo multiespecífico o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 35 7. Inhibidor para la utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el anticuerpo es un fragmento de unión a antígeno y el fragmento de unión a antígeno es un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fv, un diácuerpo o una molécula de anticuerpo de cadena sencilla.
- 40 8. Inhibidor para la utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el anticuerpo anti-C1q comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos con una homología de por lo menos 95 % respecto a la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº: 4 y 35-38; y en el que el dominio variable de cadena ligera comprende una HVR-L1 que presenta la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 5, una HVR-L2 que presenta el aminoácido de SEC ID nº: 6 y una HVR-L3 que presenta el aminoácido de SEC ID nº: 7.
- 45 9. Inhibidor para la utilización según la reivindicación 8, en el que el dominio variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº: 4 y 35-38.
- 50 10. Inhibidor para la utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el anticuerpo anti-C1q comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos con una homología de por lo menos 95 % respecto a la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº: 8 y 31-34, y en el que el dominio variable de cadena pesada comprende una HVR-H1 que presenta la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 9, una HVR-H2 que presenta el aminoácido de SEC ID nº: 10 y una HVR-H3 que presenta el aminoácido de SEC ID nº: 11.
- 55 11. Inhibidor para la utilización según la reivindicación 10, en el que el dominio variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº: 8 y 31-34.

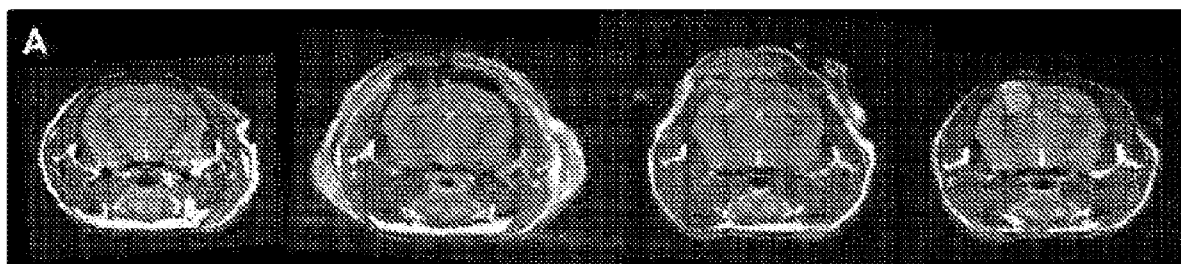


Fig. 1A

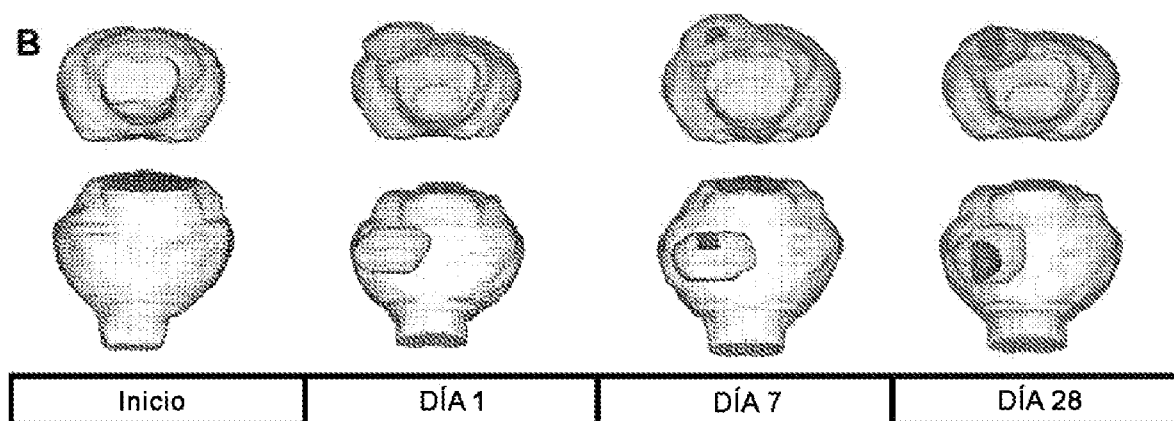


Fig. 1B

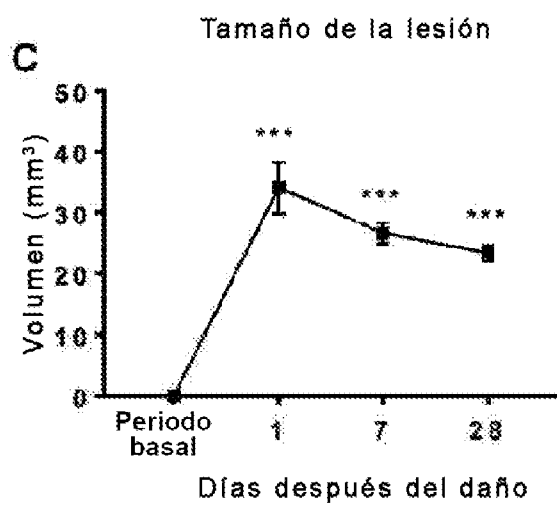


Fig. 1C

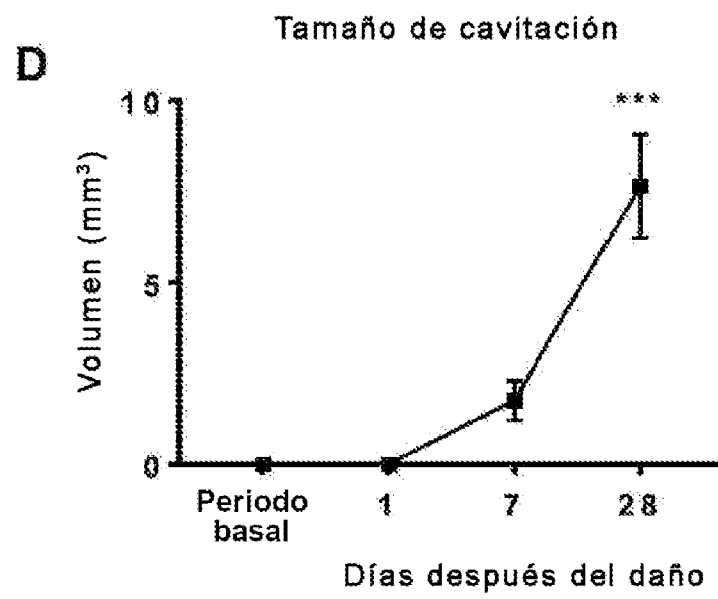


Fig. 1D

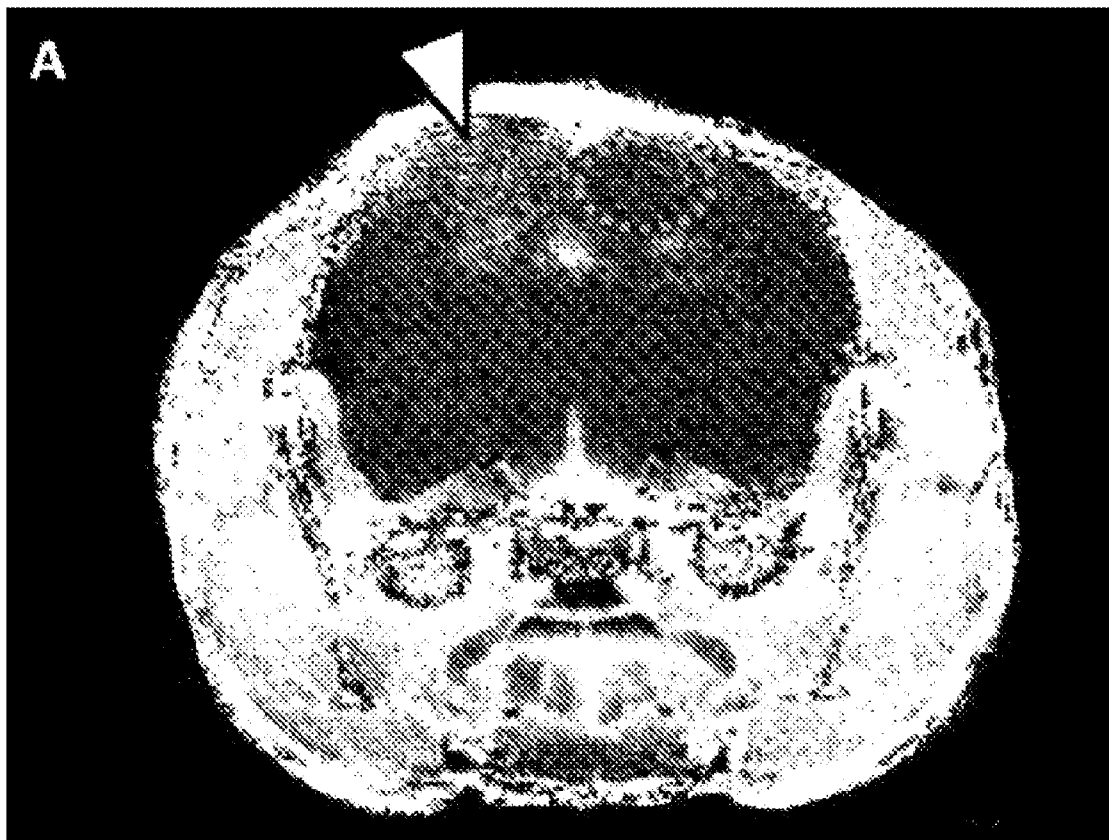


Fig. 2A

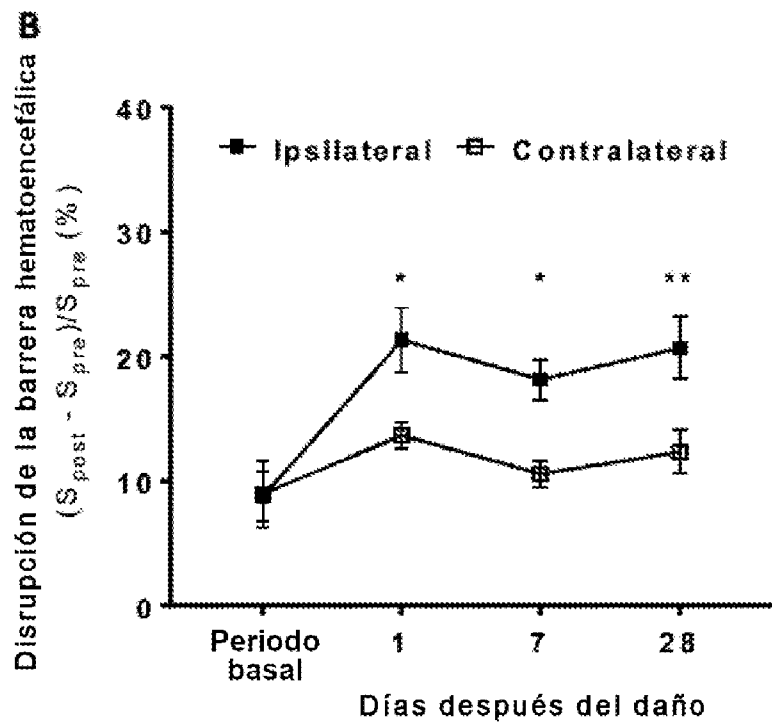


Fig. 2B

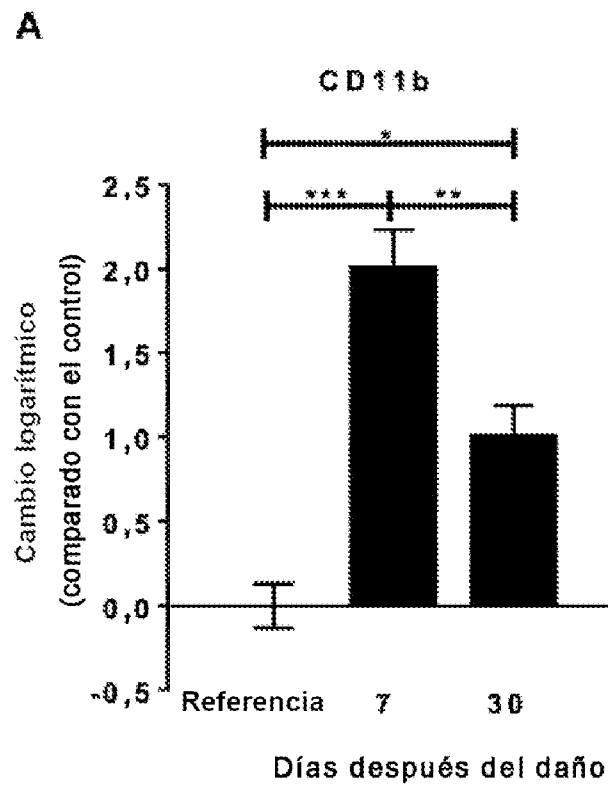


Fig. 3A

B

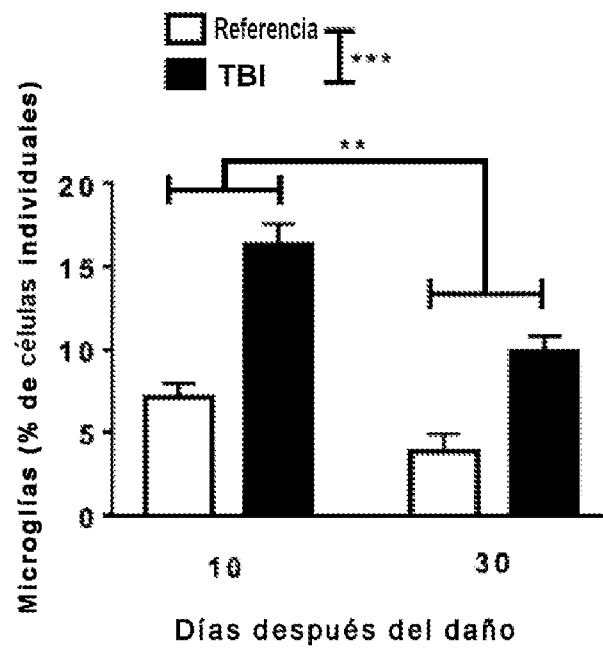


Fig. 3B

C

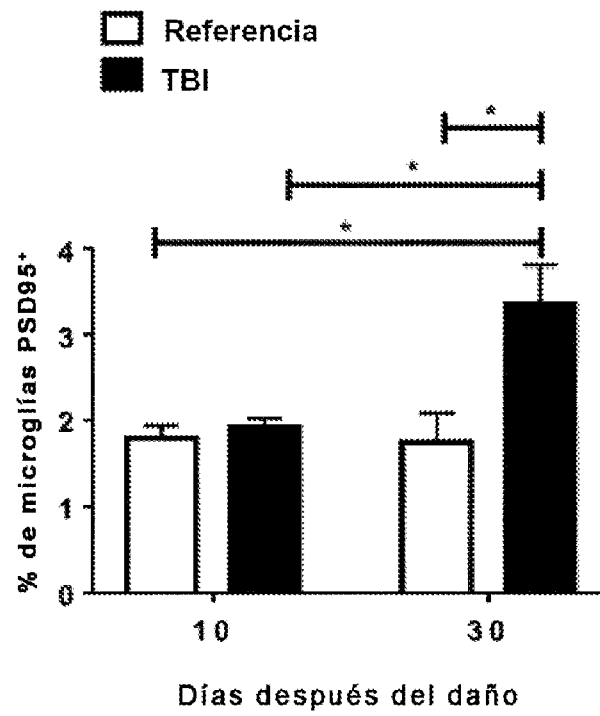


Fig. 3C

A

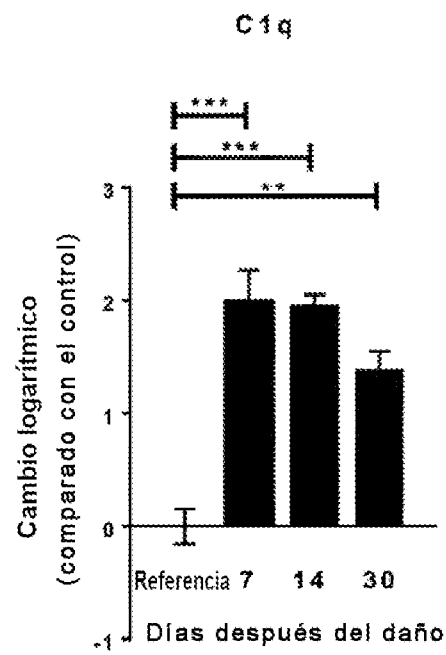


Fig. 4A

B

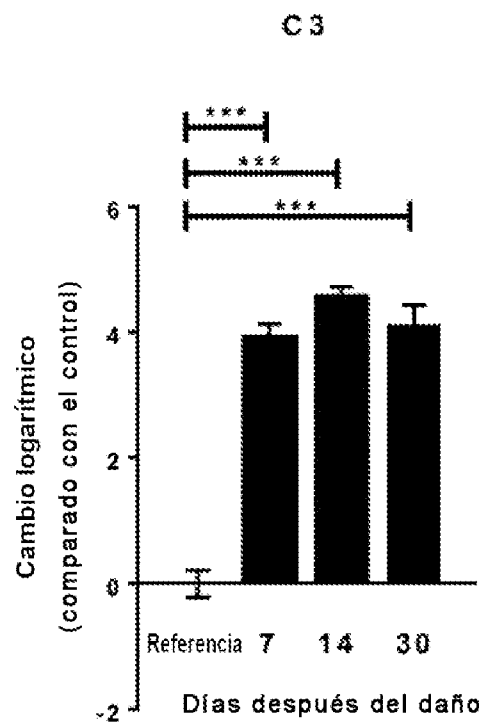


Fig. 4B

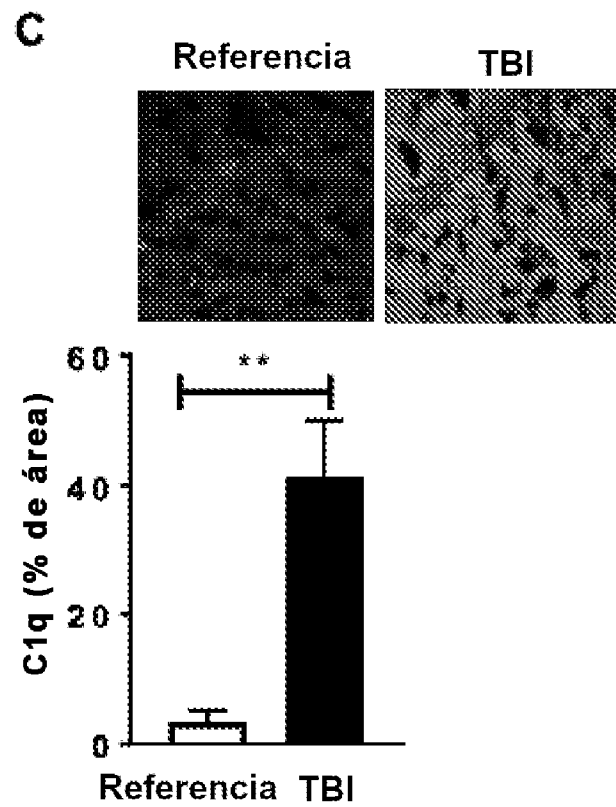


Fig. 4C

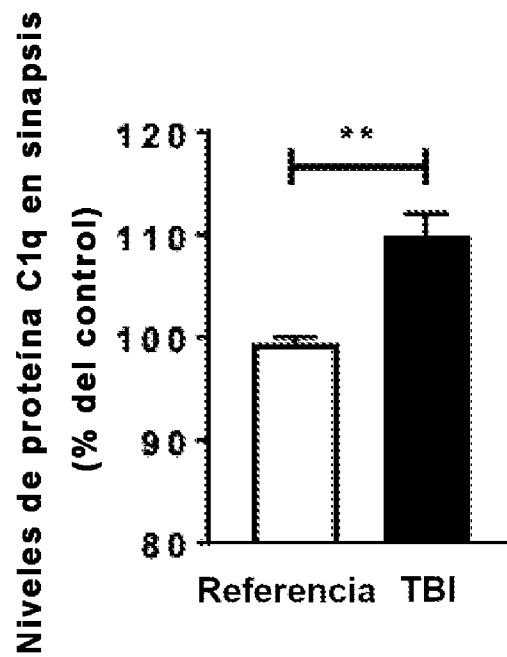


Fig. 4D

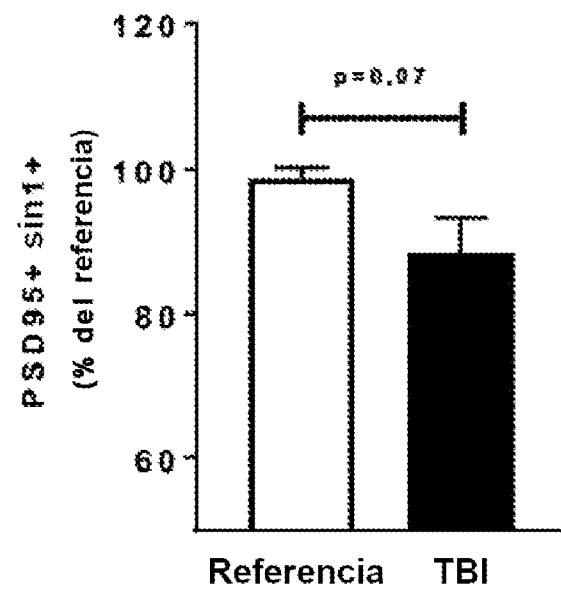


Fig. 5A

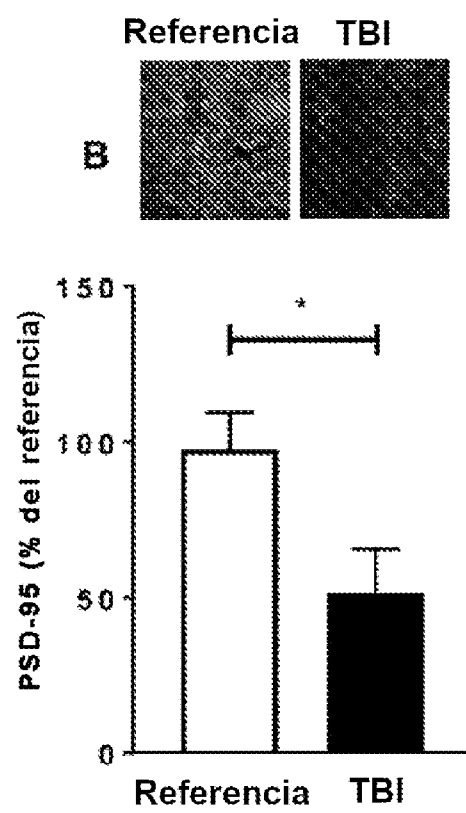


Fig. 5B

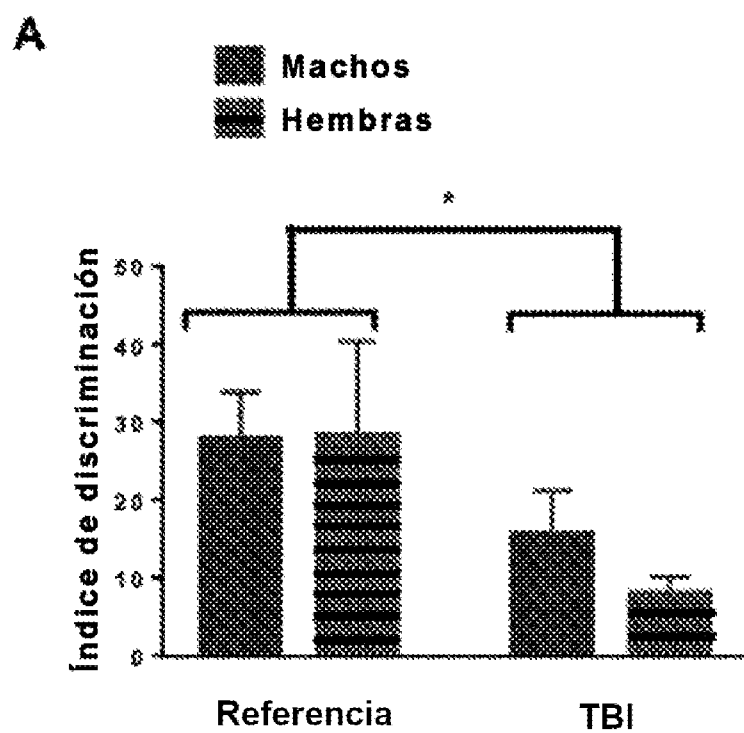


Fig. 6A

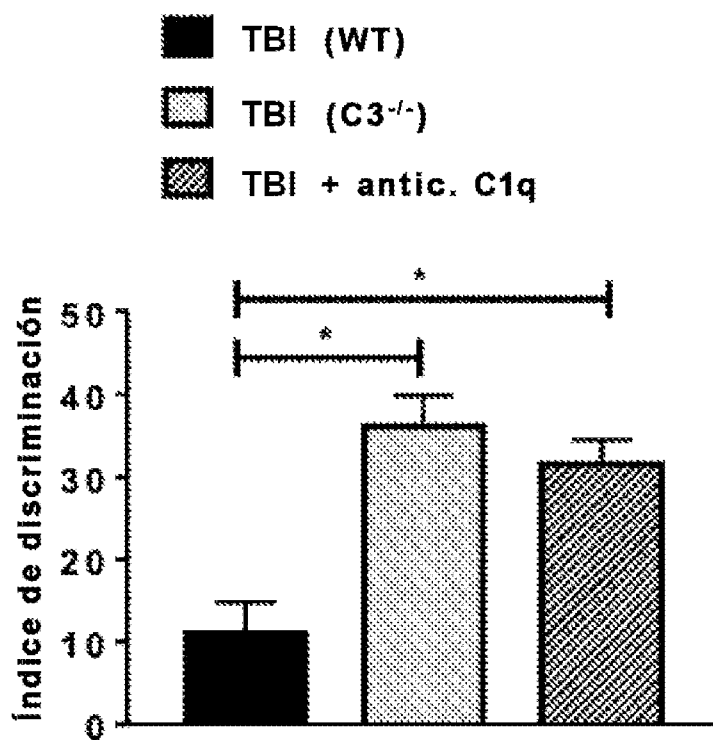


Fig. 6B