

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 978 917**

51 Int. Cl.:

A61P 11/06 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.07.2014** **PCT/US2014/046042**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.01.2015** **WO15006504**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2014** **E 14822371 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2024** **EP 3019240**

54 Título: **Anticuerpos anti-factor del complemento C1q y usos de los mismos**

30 Prioridad:

09.07.2013 US 201361844369 P

29.08.2013 US 201361871813 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.09.2024

73 Titular/es:

ANNEXON, INC. (100.0%)

**1400 Sierra Point Parkway Building C, 2nd Floor
Brisbane, CA 94005, US**

72 Inventor/es:

**ROSENTHAL, ARNON y
LEVITEN, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

Observaciones:

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

ES 2 978 917 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

Anticuerpos anti-factor del complemento C1q y usos de los mismos

5 **Antecedentes**

1. Campo

10 La presente invención se define por las reivindicaciones. La presente divulgación se refiere generalmente a anticuerpos anti-C1q y a métodos de uso de los mismos.

2. Descripción de la técnica relacionada

15 Una activación excesiva del complemento se ha asociado con una gama de afecciones patológicas, incluyendo numerosas enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias. Más recientemente, también se ha demostrado que el sistema del complemento contribuye a la patología de enfermedades neurodegenerativas. Específicamente, se demostró que los factores del complemento, tales como C1q, se expresan en las sinapsis neuronales y marcan estas sinapsis para su eliminación. Véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente estadounidense n.ºs 2012/0195880 y 2012/328601. La evolución molecular y funcional de C1q se caracterizó en teleósteos por Hu *et al.* (Hu Yu-Lan *et al.* (2010) *Journal of Biological Chemistry* 285, 28777-28786). Aunque la pérdida selectiva de sinapsis es un aspecto esencial del desarrollo cerebral normal ("poda sináptica"), una pérdida excesiva de sinapsis, especialmente en un cerebro maduro o envejecido, da como resultado neurodegeneración y deterioro cognitivo. Se halló que una expresión elevada del complemento sináptico contribuía a la pérdida sináptica en el envejecimiento normal y en la progresión de enfermedades neurodegenerativas. A la inversa, se halló que una disminución de la expresión del complemento neuronal era neuroprotectora. Basándose en estos hallazgos, la neutralización de la actividad de factores del complemento tales como C1q se considera como una estrategia terapéutica prometedora para prevenir la pérdida de sinapsis y ralentizar la progresión de enfermedades neurodegenerativas así como el deterioro cognitivo en el envejecimiento normal.

30 Las enfermedades neurodegenerativas que implican pérdida de sinapsis y se considera que son susceptibles a tratamientos que tienen como objetivo la neutralización de factores del complemento tales como C1q incluyen enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, glaucoma, distrofia miotónica, síndrome de Down, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, y similares.

35 Hasta la fecha se conocen sólo un número limitado de anticuerpos neutralizantes del complemento (véanse, por ejemplo, Klos A. *et al.*, *Mol Immunol.* 2009, 46(14), 2753-2766; Carroll S. y Georgiou G., *Immunobiology* 2013, 218(8), 1041-1048; Tuzun *et al.*, *J. Neuroimmunol.* 2007, 182, 167-176; Nelson *et al.*, *J. Clin. Invest.* 2006, 116:2892-2900; Heinz *et al.*, *J. Immunol.* 1984, 133, 400-404; Jiang *et al.*, *J. Immunol.* 1991, 146, 2324-2330; Trinder *et al.*, *Scand. J. Immunol.* 1999, 50, 635-641; Hwang *et al.*, *Mol. Immunol.* 2008, 45, 2570-2580). Phuan *et al.* desarrollaron un anticuerpo monoclonal contra la proteína C1q para terapia en neuromielitis óptica (Phuan PW *et al.* (2013) *Acta Neuropathologica* 125, 829-840). En la publicación n.º WO 2005/002513 A2 se produjo otro anticuerpo monoclonal contra C1q mediante una línea celular de hibridoma. Hasta la fecha, sólo el anticuerpo neutralizante de C5, eculizumab, un inhibidor de la ruta de activación del complemento terminal, ha obtenido la aprobación reguladora; eculizumab se comercializa para el tratamiento de hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN; Hillmen *et al.*, *N Engl J Med.* 2006, 355(12):1233-43). Pardridge *et al.* desarrollaron productos biofarmacéuticos que pueden administrarse a través de la barrera hematoencefálica mediante la utilización de IgG penetrante en la barrera hematoencefálica (Pardridge WM *et al.* (2012) *Methods in Enzymology* 503, 269-292). Además, la patente estadounidense 6.197.930 B1 describe un polipéptido unido covalentemente a etiquetas de afinidad, toxinas, radionucleótidos, enzimas y fluoróforos. López-Requena A *et al.* presentan un idiotipo altamente inmunogénico (López-Requena A *et al.* (2007) *Molecular Immunology* 44, 3076-3082). En la publicación n.º WO 2012/176765 A1 se describe un anticuerpo recombinante contra cadherina P humana con actividad citotóxica, que comprende diferentes CDR. La publicación n.º WO 03/052377 A2 describe novedosas proteínas secretadas humanas, sus regiones codificantes, así como anticuerpos y métodos terapéuticos útiles relacionados con estas novedosas proteínas secretadas humanas. La publicación n.º WO 98/23761 A1 describe anticuerpos humanizados contra CD11 con un valor de Cl_{50} de 1 nM en diferentes ensayos.

Por tanto, existe la necesidad de desarrollar anticuerpos adicionales que se unan específicamente a, y neutralicen las actividades biológicas de, factores del complemento tales como C1q.

60 **Breve resumen**

La presente invención se define por las reivindicaciones. Por consiguiente, la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-C1q aislado que comprende una cadena ligera que comprende un dominio variable de cadena ligera y una cadena pesada que comprende un dominio variable de cadena pesada, en el que el dominio variable de cadena ligera comprende HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5, HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6 y HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos

de SEQ ID NO:7; y el dominio variable de cadena pesada comprende HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9, HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10 y HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11.

5 Según una realización preferida, el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4.

Según una realización preferida adicional, el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8.

10 Según una realización preferida adicional, el anticuerpo se ha modificado por ingeniería para aumentar la penetración en el cerebro.

15 Según una realización preferida adicional, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que reconoce un primer antígeno y un segundo antígeno.

Según una realización más preferida, el primer antígeno es una proteína C1q y el segundo antígeno es un antígeno que facilita el transporte a través de la barrera hematoencefálica.

20 Según una realización incluso más preferida, el segundo antígeno se selecciona de receptor de transferrina (TR), receptor de insulina (HIR), receptor de factor de crecimiento similar a la insulina (IGFR), proteínas relacionadas con el receptor de lipoproteínas de baja densidad 1 y 2 (LPR-1 y 2), receptor de toxina diftérica, CRM197, un anticuerpo de un solo dominio de llama, TMEM 30(A), un dominio de transducción de proteínas, TAT, Syn-B, penetratina, un péptido de poliarginina, un péptido de angiopep y ANG1005.

25 Según una realización preferida, el anticuerpo es un fragmento Fab, F(ab')₂, Fab' o Fv de cadena sencilla.

La presente invención también se refiere a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para el anticuerpo de la invención.

30 La presente invención se refiere además a una célula huésped aislada que comprende la secuencia de ácido nucleico de la invención.

La presente invención se refiere además a un anticuerpo según la invención para su uso en medicina.

35 Según una realización preferida, el uso en medicina es para tratar un trastorno neurodegenerativo, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmunitaria o un trastorno metabólico.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo según la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

40 Según una realización más preferida, la enfermedad inflamatoria, la enfermedad autoinmunitaria o el trastorno metabólico se selecciona del grupo que consiste en diabetes, obesidad, artritis reumatoide (AR), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), lesión tisular remota después de isquemia y reperfusión, dermatomiositis, pénfigo, nefritis lúpica y glomerulonefritis y vasculitis resultantes, circulación extracorpórea, disfunción endotelial coronaria inducida por cardioplejia, glomerulonefritis membranoproliferativa de tipo II, nefropatía por IgA, insuficiencia renal aguda, crioglobulinemia, síndrome antifosfolipídico, enfermedades degenerativas maculares, degeneración macular asociada a la edad (DMAE), neovascularización coroidea (NVC), uveítis, retinopatía diabética, retinopatía asociada a isquemia, endoftalmitis, enfermedad neovascular intraocular, edema macular diabético, miopía patológica, enfermedad de von Hippel-Lindau, histoplasmosis del ojo, neuromielitis óptica (NMO), oclusión de la vena central retiniana (OVCR), neovascularización corneal, neovascularización retiniana, rechazo hiperagudo, hemodiálisis, síndrome de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, neumonía por aspiración, miastenia grave, diabetes mellitus de tipo 1, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Addison, celiaquía, enfermedad de Crohn, anemia perniciosa, pénfigo vulgar, vitiligo, anemias hemolíticas autoinmunitarias, síndromes paraneoplásicos, una enfermedad por vasculitis, polimialgia reumática, arteritis temporal y granulomatosis de Wegener.

Según una realización incluso más preferida, la enfermedad inflamatoria, la enfermedad autoinmunitaria o el trastorno metabólico es degeneración macular asociada a la edad.

60 Según otra realización incluso más preferida, la enfermedad inflamatoria, la enfermedad autoinmunitaria o el trastorno metabólico es nefritis lúpica.

Según una realización más preferida, la enfermedad es una enfermedad autoinmunitaria seleccionada del grupo que consiste en síndrome de Guillain-Barré, miastenia grave, diabetes mellitus de tipo 1, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Addison, celiaquía, enfermedad de Crohn, anemia perniciosa, pénfigo vulgar, vitiligo, anemias

hemolíticas autoinmunitarias, síndromes paraneoplásicos, una enfermedad por vasculitis, polimialgia reumática, arteritis temporal y granulomatosis de Wegener.

Según una realización incluso más preferida, la enfermedad autoinmunitaria es síndrome de Guillain-Barré.

Según una realización incluso aún más preferida, la enfermedad autoinmunitaria es anemia hemolítica autoinmunitaria.

Según otra realización incluso más preferida, la enfermedad autoinmunitaria es miastenia grave.

Según una realización más preferida, la enfermedad es un trastorno neurodegenerativo asociado con la pérdida de sinapsis o conexiones nerviosas.

Según una realización más preferida, el trastorno neurodegenerativo se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, glaucoma, distrofia miotónica, síndrome de Down, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington.

Según una realización incluso más preferida, el trastorno neurodegenerativo es enfermedad de Huntington.

Según otra realización incluso más preferida, el trastorno neurodegenerativo es esclerosis lateral amiotrófica.

Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, a las composiciones farmacéuticas y a los medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

Descripción detallada

Técnicas generales

Las técnicas y los procedimientos descritos o a los que se hace referencia en el presente documento se entienden generalmente bien y se emplean habitualmente usando una metodología convencional por los expertos en la técnica, tal como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas 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); Culture (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths and D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction (Mullis *et al.*, eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan *et al.*, eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty, ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y Cancer: Principles and Practice of Oncology (V.T. DeVita *et al.*, eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

Definiciones

Tal como se usa en el presente documento, el término "*prevenir*" incluye proporcionar profilaxis con respecto a la aparición o recidiva de una enfermedad, un trastorno o una afección particular en un individuo. Un individuo puede tener predisposición o ser susceptible a una enfermedad, un trastorno o una afección particular, o estar en riesgo de desarrollar una enfermedad, un trastorno o una afección de este tipo, pero aún no se le ha diagnosticado la enfermedad, el trastorno o la afección.

Tal como se usa en el presente documento, un individuo "*en riesgo*" de desarrollar una enfermedad, un trastorno o una afección particular puede padecer o no una enfermedad o síntomas de una enfermedad detectables, y puede haber mostrado o no una enfermedad o síntomas de una enfermedad detectables antes de los métodos de tratamiento descritos en el presente documento. "*En riesgo*" indica que un individuo tiene uno o más factores de riesgo, que son parámetros medibles que se correlacionan con el desarrollo de una enfermedad, un trastorno o una afección particular, tal como se conoce en la técnica. Un individuo que tiene uno o más de estos factores de riesgo tiene una mayor probabilidad de desarrollar una enfermedad, un trastorno o una afección particular que un individuo sin uno o más de estos factores de riesgo.

Tal como se usa en el presente documento, el término "*tratamiento*" se refiere a la intervención clínica diseñada para alterar el transcurso natural del individuo que está tratándose durante el transcurso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen disminución de la tasa de progresión, mejora o paliación del estado patológico y remisión o pronóstico mejorado de una enfermedad, un trastorno o una afección particular. Un individuo se "trata" con éxito, por ejemplo, si se mitigan o eliminan uno o más síntomas asociados con una enfermedad, un trastorno o una afección particular.

Una "*cantidad eficaz*" se refiere a al menos una cantidad eficaz, a las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado. Una cantidad eficaz puede proporcionarse en una o más administraciones.

Una "*cantidad terapéuticamente eficaz*" es al menos la concentración mínima requerida para efectuar una mejora medible de una enfermedad, un trastorno o una afección particular. Una cantidad terapéuticamente eficaz en el presente documento puede variar según factores tales como el estado patológico, la edad, el sexo y el peso del paciente y la capacidad del anticuerpo anti-C1q para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo anti-C1q es superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

Administración "*crónica*" se refiere a la administración del/de los medicamento(s) en un modo continuo en contraposición a agudo, para mantener el efecto terapéutico (actividad) inicial durante un periodo de tiempo prolongado. Administración "*intermitente*" se refiere al tratamiento que no se realiza consecutivamente sin interrupción, sino que más bien es de naturaleza cíclica.

Tal como se usa en el presente documento, administración "*conjunta*" con respecto a otro compuesto u otra composición incluye administración simultánea y/o administración en momentos diferentes. La administración conjunta también abarca la administración como coformulación o la administración como composiciones independientes, incluyendo a intervalos o frecuencias de dosificación diferentes, y usando la misma vía de administración o vías de administración diferentes.

Un "*individuo*" con fines de tratamiento, prevención o reducción del riesgo se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja y animales de zoológico, deportivos o mascotas, tales como perros, caballos, conejos, ganado bovino, cerdos, hámsteres, jerbos, ratones, hurones, ratas, gatos, y similares. En algunas implementaciones, el individuo es un ser humano.

Tal como se usa en el presente documento, "*autoanticuerpo*" significa cualquier anticuerpo que reconoce un antígeno huésped.

El término "*inmunoglobulina*" (Ig) se usa indistintamente con "*anticuerpo*" en el presente documento. El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos y fragmentos de anticuerpo siempre que muestren la actividad biológica deseada.

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

La cadena L de cualquier especie de vertebrado puede asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa ("κ") y lambda ("λ"), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. En función de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (C_H), las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases o isotipos. Hay cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen cadenas pesadas denominadas alfa ("α"), delta ("δ"), épsilon ("ε"), gamma ("γ") y mu ("μ"), respectivamente. Las clases γ y α se dividen además en subclases (isotipos) basándose en diferencias relativamente pequeñas en la secuencia y la función de C_H , por ejemplo, los seres humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Las configuraciones tridimensionales y las estructuras de las subunidades de las diferentes clases de inmunoglobulinas se conocen bien y se describen generalmente en, por ejemplo, Abbas *et al.*, Cellular and Molecular Immunology, 4ª ed. (W.B. Saunders Co., 2000).

Los "*anticuerpos nativos*" son habitualmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 Dalton compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, aunque el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de los diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene un dominio variable (V_H) en un extremo seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable (V_L) en un extremo y

un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácido particulares forman una superficie de contacto entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada.

Un anticuerpo "*aislado*", tal como un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación, es uno que se ha identificado, separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno de producción (por ejemplo, de manera natural o recombinante). En algunas implementaciones, el polipéptido aislado está libre de asociación con todos los demás componentes contaminantes procedentes de su entorno de producción. Los componentes contaminantes procedentes de su entorno de producción, tales como los resultantes de las células transfectadas recombinantes, son materiales que normalmente interferirían con los usos investigacionales, diagnósticos o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En algunas implementaciones, el polipéptido se purificará: (1) hasta más del 95 % en peso de anticuerpo tal como se determinado mediante, por ejemplo, el método de Lowry y, en algunas implementaciones, hasta más del 99 % en peso; (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras usando tinción de plata o azul de Coomassie. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células T recombinantes, puesto que no estará presente al menos un componente del entorno natural del anticuerpo. Sin embargo, habitualmente, un polipéptido o anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

La "*región variable*" o el "*dominio variable*" de un anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación, se refiere a los dominios amino-terminales de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. Los dominios variables de la cadena pesada y cadena ligera pueden denominarse " V_H " y " V_L ", respectivamente. Estos dominios son generalmente las partes más variables del anticuerpo (con 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 cuanto a secuencia entre anticuerpos, tales como anticuerpos anti-C1q de la presente divulgación. El dominio V media en la unión al antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a lo largo de toda la extensión de los dominios variables. En su lugar, se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables (HVR) en los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones de marco (FR). Cada uno de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprende cuatro regiones FR, que adoptan principalmente una configuración de lámina beta, conectada por tres HVR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina 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 (véase Kabat *et al.*, Sequences of Immunological Interest, quinta edición, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión del anticuerpo a un antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

El término "*anticuerpo monoclonal*", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación, obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que se producen de manera natural y/o modificaciones posteriores a la traducción (por ejemplo, isomerizaciones, amidaciones) que pueden estar presentes en cantidades pequeñas. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y se dirigen contra un único sitio antigénico. A diferencia de las preparaciones de anticuerpo policlonal que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra determinantes (epítopos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque se sintetizan mediante el cultivo de hibridoma, no contaminado por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que van a usarse 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 (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.816.567), tecnologías de presentación en fago (véanse, 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 tienen parte o la totalidad de los loci de inmunoglobulina humana o genes que codifican para secuencias de inmunoglobulina humana (véanse, por ejemplo, el documento WO 1998/24893; el

documento WO 1996/34096; el documento WO 1996/33735; el documento 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); las patentes estadounidenses n.ºs 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 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)).

Los términos "*anticuerpo de longitud completa*", "*anticuerpo intacto*" o "*anticuerpo completo*" se usan indistintamente para referirse a un anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación, en su forma sustancialmente intacta, en contraposición a un fragmento de anticuerpo. Específicamente, los anticuerpos completos incluyen aquellos con las cadenas pesada y ligera que incluyen una región Fc. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de secuencia nativa humana) o variantes de secuencia de aminoácidos de los mismos. En algunos casos, el anticuerpo intacto puede tener una o más funciones efectoras.

Un "*fragmento de anticuerpo*" comprende una porción de un anticuerpo intacto, el sitio de unión a antígeno y/o la región variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (véanse la patente estadounidense 5.641.870, ejemplo 2; Zapata *et al.*, Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995)); moléculas de anticuerpo de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

La digestión con papaína de anticuerpos, tales como anticuerpos anti-C1q de la presente divulgación, produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "*Fab*", y un fragmento "*Fc*" residual, una denominación que refleja la capacidad para cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consiste en una cadena L completa 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, tiene un único sitio de unión a antígeno. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo produce un único fragmento F(ab')₂ grande que corresponde aproximadamente a dos fragmentos Fab unidos por disulfuro que tienen actividad de unión a antígeno diferente y todavía puede reticular el antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab porque tienen algunos residuos adicionales en el extremo carboxilo-terminal del dominio C_H1, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. En el presente documento, Fab'-SH es la denominación para Fab' en el que el/los residuo(s) de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

El fragmento Fc comprende las porciones carboxilo-terminales de ambas cadenas H mantenidas juntas por disulfuros. Las funciones efectoras de los anticuerpos se determinan por las secuencias en la región Fc, región que también reconocen los receptores de Fc (FcR) encontrados en determinados tipos de células.

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

"Fv de cadena sencilla" también abreviado como "sFv" o "scFv" son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios de anticuerpo V_H y V_L conectados para formar una única cadena polipeptídica. En algunas implementaciones, el polipéptido sFv comprende además un ligador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que sFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión del sFv, véase Plückthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315 (1994).

Los "*fragmentos funcionales*" de anticuerpos, tales como anticuerpos anti-C1q de la presente divulgación, comprenden una porción de un anticuerpo intacto, que generalmente incluye la región variable o de unión a antígeno del anticuerpo intacto o la región F de un anticuerpo que conserva capacidad de unión a FcR o tiene capacidad de unión a FcR modificada. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen anticuerpo lineal, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

El término "*diacuerpos*" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo preparados construyendo fragmentos sFv (véase el párrafo anterior) con ligadores cortos (aproximadamente 5-10 residuos) entre los dominios V_H y V_L, de manera que se logra el emparejamiento intercatenario, pero no intracatenario, de los dominios V, dando como resultado de ese modo un fragmento bivalente, es decir, un fragmento que tiene 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 cadenas polipeptídicas diferentes. Los diacuerpos se describen en más

detalle en, por ejemplo, el documento EP 404,097; el documento WO 93/11161; Hollinger *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90:6444-48 (1993).

Tal como se usa en el presente documento, un "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo (inmunoglobulina), tal como un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación, en el que una porción 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(s) cadena(s) es/son idéntica(s) u homóloga(s) a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (patente estadounidense n.º 4.816.567; Morrison *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 81:6851-55 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos PRIMATIZED® en los que la región de unión a antígeno del anticuerpo se deriva de un anticuerpo producido, por ejemplo, inmunizando monos macacos con un antígeno de interés. Tal como se usa en el presente documento, "anticuerpo humanizado" utiliza un subconjunto de "anticuerpos quiméricos".

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos), tales como anticuerpos anti-C1q de la presente divulgación, son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En una implementación, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que los residuos de una HVR del receptor se reemplazan por residuos de una HVR de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, la afinidad y/o la capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de FR de la inmunoglobulina humana se reemplazan por residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones pueden realizarse para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo, tal como la afinidad de unión. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, 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 de FR individuales que mejoran el rendimiento del anticuerpo, tal como la afinidad de unión, la isomerización, la inmunogenicidad, y similares. El número de estas sustituciones de aminoácidos en FR es normalmente no mayor de 6 en la cadena H y no mayor de 3 en la cadena L. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véanse, 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). Véanse también, por ejemplo, Vaswani y Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995); Hurle y Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994); y las patentes estadounidenses n.ºs 6.982.321 y 7.087.409.

Un "anticuerpo humano" es uno que presenta una secuencia de aminoácidos correspondiente a la de un anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación, producido por un ser humano y/o que se ha preparado usando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos tal como se da a conocer en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la técnica, incluyendo bibliotecas de presentación en fago (Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581 (1991)). Para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos también están disponibles los métodos descritos en Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pág. 77 (1985); Boerner *et al.*, J. Immunol., 147(1):86-95 (1991). Véase también van Dijk y van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5:368-74 (2001). Los anticuerpos humanos pueden prepararse mediante la administración del antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir tales anticuerpos en respuesta a la exposición antigénica, pero cuyos loci endógenos se han desactivado, por ejemplo, xenorratones inmunizados (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 6.075.181 y 6.150.584 con respecto a la tecnología XENOMOUSE™). Véase también, por ejemplo, Li *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006) con respecto a anticuerpos humanos generados mediante una tecnología de hibridoma de células B humanas.

El término "región hipervariable", "HVR" o "HV", cuando se usa en el presente documento, se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo, tales como las de un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación, que son hipervariables en cuanto a secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en V_H (H1, H2, H3) y tres en V_L (L1, L2, L3). En los anticuerpos nativos, H3 y L3 presentan la mayor diversidad de las seis HVR, y se creen que H3, en particular, desempeña un papel singular a la hora de conferir una especificidad fina a los anticuerpos. Véanse, por ejemplo, Xu *et al.*, Immunity 13:37-45 (2000); Johnson y Wu en Methods in Molecular Biology 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)). De hecho, los anticuerpos camélidos que se producen de manera natural, que consisten únicamente en una cadena pesada, son funcionales y estables en ausencia de cadena ligera. Véanse, por ejemplo, Hamers-Casterman *et al.*, Nature 363:446-448 (1993) y Sheriff *et al.*, Nature Struct. Biol. 3:733-736 (1996).

El presente documento usa y abarca varias delineaciones de HVR. Las HVR que son regiones determinantes de complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de secuencia y son las más comúnmente usadas (Kabat *et al.*, citado anteriormente). En su lugar, Chothia se refiere a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Las HVR de AcM representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y se usan por el software de modelado de anticuerpos AcM de Oxford Molecular. Las HVR de "contacto" se basan en un análisis de las complejas estructuras cristalinas disponibles. A continuación se indican los residuos de cada una de estas HVR.

Bucle	Kabat	AcM	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 (enumeración según Kabat)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (enumeración según Chothia)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Las HVR pueden comprender "HVR ampliadas" tal como sigue: 24-36 ó 24-34 (L1), 46-56 ó 50-56 (L2) y 89-97 u 89-96 (L3) en V_L y 26-35 (H1), 50-65 ó 49-65 (H2) y 93-102, 94-102 ó 95-102 (H3) en V_H . Los residuos de dominio variable se enumeran según Kabat *et al.*, citado anteriormente, para cada una de estas definiciones de HVR ampliadas.

Los residuos de "marco" o "FR" son aquellos residuos de dominio variable distintos de los residuos de HVR tal como se define en el presente documento.

La expresión "enumeración de residuos de dominio variable según Kabat" o "enumeración de posiciones de aminoácidos según Kabat", y variaciones de las mismas, se refiere al sistema de enumeración usado para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, citado anteriormente. Usando este sistema de enumeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos o más aminoácidos correspondientes a un acortamiento de, o una inserción en, una FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir un único inserto de aminoácido (residuo 52a según Kabat) después del 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 enumeración de residuos según Kabat puede determinarse para un anticuerpo dado mediante alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia "patrón" enumerada según Kabat.

El sistema de enumeración de Kabat se usa generalmente cuando se hace referencia a un residuo en el dominio variable (aproximadamente los residuos 1-107 de la cadena ligera y los residuos 1-113 de la cadena pesada) (por ejemplo, Kabat *et al.*, Sequences of Immunological Interest. 5ª ed., Servicio Público de Salud, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Md. (1991)). El "sistema de enumeración EU" o "índice EU" se usa generalmente cuando se hace referencia a un residuo en una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, el índice EU notificado en Kabat *et al.*, citado anteriormente). El "índice EU según Kabat" se refiere a la enumeración de residuos del anticuerpo EU IgG1 humano. A menos que se indique lo contrario en el presente documento, las referencias a números de residuo en el dominio variable de anticuerpos significan la enumeración de residuos mediante el sistema de enumeración de Kabat. A menos que se indique lo contrario en el presente documento, las referencias a números de residuo en el dominio constante de anticuerpos significan la enumeración de residuos mediante el sistema de enumeración EU (por ejemplo, véase la publicación de patente estadounidense n.º 2010-280227).

Un "marco humano aceptor", tal como se usa en el presente documento, es un marco que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco de V_L o V_H derivado de un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano. Un marco humano aceptor "derivado de" un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos del mismo, o puede contener cambios de secuencia de aminoácidos preexistentes. En algunas implementaciones, el número de cambios de aminoácido preexistentes 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. En algunas implementaciones, cuando los cambios de aminoácido preexistentes están presentes en V_H , esos cambios se producen únicamente en tres, dos o una de las posiciones 71H, 73H y 78H; por ejemplo, los residuos de aminoácido en esas posiciones pueden ser 71A, 73T y/o 78A. En una implementación, el marco humano aceptor de V_L es idéntico en cuanto a secuencia a la secuencia de marco de consenso humano o secuencia de marco de inmunoglobulina humana de V_L .

Un "marco de consenso humano" es un marco que representa los residuos de aminoácido que se producen más comúnmente en una selección de secuencias de marco de V_L o V_H de inmunoglobulina humana. Generalmente, la

selección de 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 según Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Servicio Público de Salud, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD (1991). Los ejemplos incluyen, para V_L , el que el subgrupo puede ser el subgrupo kappa I, kappa II, kappa III o kappa IV según Kabat *et al.*, citado anteriormente. Adicionalmente, para V_H , el subgrupo puede ser el subgrupo I, subgrupo II o subgrupo III según Kabat *et al.*, citado anteriormente.

Una “*modificación de aminoácido*” en una posición especificada, por ejemplo, de un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación, se refiere a la sustitución o delección del residuo especificado o a la inserción de al menos un residuo de aminoácido adyacente al residuo especificado. La inserción “adyacente” a un residuo especificado significa la inserción dentro de uno a dos residuos del mismo. La inserción puede ser N-terminal o C-terminal con respecto al residuo especificado. En algunas implementaciones, la modificación de aminoácido en el presente documento es una sustitución.

Un anticuerpo “*madurado por afinidad*”, tal como un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación, es uno con una o más alteraciones en una o más HVR del mismo que dan como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no presenta esa(s) alteración/alteraciones. En una implementación, un anticuerpo madurado por afinidad presenta afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, Marks *et al.*, Bio/Technology 10:779-783 (1992) describen la maduración por afinidad mediante intercambio de dominios V_H y V_L . La mutagénesis al azar de los residuos de HVR y/o marco se describe en, por ejemplo: 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); y Hawkins *et al.*, J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992).

Tal como se usa en el presente documento, el término “*reconoce específicamente*” o “*se une específicamente a*” se refiere a interacciones medibles y reproducibles tales como atracción o unión entre una diana y un anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación, que es determinante de la presencia de la diana en presencia de una población heterogénea de moléculas incluyendo moléculas biológicas. Por ejemplo, un anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación, que se une específica o preferentemente a una diana o a un epítipo es un anticuerpo que se une a esta diana o a este epítipo con mayor afinidad, avidez, más facilidad y/o con mayor duración en comparación con su unión a otras dianas o a otros epítipos de la diana. Mediante la lectura de esta definición también se entiende que, por ejemplo, un anticuerpo (o un resto) que se une específica o preferentemente a una primera diana puede unirse o no específica o preferentemente a una segunda diana. Como tal, la “*unión específica*” o “*unión preferente*” no requiere necesariamente (aunque puede incluir) la unión exclusiva. Un anticuerpo que se une específicamente a una diana puede tener una constante de asociación de al menos aproximadamente $10^3 M^{-1}$ o $10^4 M^{-1}$, algunas veces de aproximadamente $10^5 M^{-1}$ o $10^6 M^{-1}$, en algunos casos de aproximadamente $10^6 M^{-1}$ o $10^7 M^{-1}$, de aproximadamente $10^8 M^{-1}$ a $10^9 M^{-1}$ o de aproximadamente $10^{10} M^{-1}$ a $10^{11} M^{-1}$, o superior. Pueden usarse una variedad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, rutinariamente se usan inmunoensayos ELISA en fase sólida para seleccionar anticuerpos monoclonales específicamente inmunorreactivos con una proteína. Véase, por ejemplo, Harlow and Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, para una descripción de condiciones y formatos de inmunoensayo que pueden usarse para determinar la inmunorreactividad específica.

Tal como se usa en el presente documento, una “*interacción*” entre una proteína del complemento, tal como factor del complemento C1q, y una segunda proteína abarca, sin limitación, interacción proteína-proteína, una interacción física, una interacción química, unión, unión covalente y unión iónica. Tal como se usa en el presente documento, un anticuerpo “*inhibe la interacción*” entre dos proteínas cuando el anticuerpo interrumpe, reduce o elimina completamente una interacción entre las dos proteínas. Un anticuerpo de la presente divulgación, o un fragmento del mismo, “*inhibe la interacción*” entre dos proteínas cuando el anticuerpo, o un fragmento del mismo, se une a una de las dos proteínas.

Un anticuerpo “*bloqueante*”, un anticuerpo “*antagonista*”, un anticuerpo “*inhibidor*” o un anticuerpo “*neutralizante*” es un anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación, que inhibe o reduce una o más actividades biológicas del antígeno al que se une, tales como las interacciones con una o más proteínas. En algunas implementaciones, los anticuerpos bloqueantes, los anticuerpos antagonistas, los anticuerpos inhibidores o los anticuerpos “*neutralizantes*” inhiben sustancial o completamente una o más actividades biológicas o interacciones del antígeno.

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

El término “*región Fc*” se usa en el presente documento para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la

región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, habitualmente se define que la región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde un residuo de aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo-terminal del mismo. La lisina C-terminal (residuo 447 según el sistema de enumeración EU) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo, o mediante modificación por ingeniería recombinante del ácido nucleico que codifica para una cadena pesada del anticuerpo. Por consiguiente, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpos con todos los residuos K447 eliminados, poblaciones de anticuerpos sin los residuos K447 eliminados y poblaciones de anticuerpos que tienen una mezcla de anticuerpos con y sin el residuo K447. Las regiones Fc de secuencia nativa adecuadas para su uso en los anticuerpos de la presente divulgación incluyen IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas.

Una "región Fc de secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc encontrada en la naturaleza. Las regiones Fc humanas de secuencia nativa incluyen una región Fc de IgG1 humana de secuencia nativa (alotipos A y distintos de A); una región Fc de IgG2 humana de secuencia nativa; una región Fc de IgG3 humana de secuencia nativa; y una región Fc de IgG4 humana de secuencia nativa, así como variantes que se producen de manera natural de las mismas.

Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia nativa en virtud de al menos una modificación de aminoácido. En algunas implementaciones, la región Fc variante difiere en una o más sustitución/sustituciones de aminoácido. En algunas implementaciones, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácido en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo, desde aproximadamente una hasta aproximadamente diez sustituciones de aminoácido y, en algunas implementaciones, desde aproximadamente una hasta aproximadamente cinco sustituciones de aminoácido en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido parental. En algunas implementaciones, la región Fc variante presentará en el presente documento al menos aproximadamente el 80 % de homología con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido parental y, en algunas implementaciones, al menos aproximadamente el 90 % de homología con la misma y, en algunas implementaciones, al menos aproximadamente el 95 % de homología con la misma.

"Receptor de Fc" o "FcR" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En algunas implementaciones, el FcR es un FcR humano de secuencia nativa. Además, en algunas implementaciones, un FcR es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye los receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas sometidas a corte y empalme alternativo de estos receptores, los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activante") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de los mismos. El receptor activante FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina de inmunorreceptor ("ITAM") en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina de inmunorreceptor ("ITIM") en su dominio citoplásmico (véase, por ejemplo, M. Daéron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan 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 aquellos que se identificarán en el futuro, están abarcados por el término "FcR" en el presente documento. Los FcR también pueden aumentar la semivida sérica de los anticuerpos.

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

Se pretende que el término " k_{on} ", tal como se usa en el presente documento, se refiera a la constante de velocidad para la asociación de un anticuerpo a un antígeno.

Se pretende que el término " k_{off} ", tal como se usa en el presente documento, se refiera a la constante de velocidad para la disociación de un anticuerpo a partir del complejo anticuerpo/antígeno.

Se pretende que el término " K_D ", tal como se usa en el presente documento, se refiera a la constante de disociación en equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno.

Tal como se usa en el presente documento, "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" y "homología" con respecto a una secuencia de péptido, polipéptido o anticuerpo se refiere al porcentaje de residuos de aminoácido en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácido en la secuencia de péptido o polipéptido específica después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación con fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de diversas maneras que se encuentran dentro de la habilidad en la técnica, por

ejemplo, usando software informático disponible públicamente tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o MEGALIGN™ (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo conocido en la técnica necesario para lograr una alineación máxima a lo largo de toda la longitud de las secuencias que están comparándose.

Una molécula o célula "*aislada*" es una molécula o célula que se identifica y separa a partir de al menos una molécula o célula contaminante con la que habitualmente está asociada en el entorno en el que se produjo. En algunas implementaciones, la molécula o célula aislada está libre de asociación con todos los componentes asociados con el entorno de producción. La molécula o célula aislada está en una forma distinta de la forma o configuración en la que se encuentra en la naturaleza. Por tanto, las moléculas aisladas se distinguen de las moléculas que existen de manera natural en las células; las células aisladas se distinguen de las células que existen de manera natural en los tejidos, órganos o individuos. En algunas implementaciones, la molécula aislada es un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación. En otras implementaciones, la célula aislada es una célula huésped o célula de hibridoma que produce un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación.

Una molécula de ácido nucleico "*aislada*" que codifica para un anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación, es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa a partir de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que habitualmente está asociada en el entorno en el que se produjo. En algunas implementaciones, el ácido nucleico aislado está libre de asociación con todos los componentes asociados con el entorno de producción. Las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican para los polipéptidos y anticuerpos en el presente documento están en una forma distinta de la forma o configuración en la que se encuentran en la naturaleza. Por tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen del ácido nucleico que codifica para los polipéptidos y anticuerpos en el presente documento que existe de manera natural en las células.

Se pretende que el término "*vector*", tal como se usa en el presente documento, se refiera a una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector de fago. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que segmentos de ADN adicionales pueden ligarse en el genoma viral. Determinados vectores pueden replicarse de manera autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamíferos) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras su introducción en la célula huésped y, de ese modo, se replican junto con el genoma del huésped. Además, determinados vectores pueden dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Tales vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión recombinante" o simplemente "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante a menudo están en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente, ya que plásmido es la forma de vector más comúnmente usada.

"*Polinucleótido*" o "*ácido nucleico*", tal como se usan indistintamente en el presente documento, 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 incorporarse en un polímero mediante ADN o ARN polimerasa o mediante una reacción de síntesis. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación a la estructura del nucleótido puede impartirse antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede estar interrumpida por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede comprender una(s) modificación/modificaciones realizada(s) después de la síntesis, tal(es) como conjugación con un marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "caperuzas", sustitución de uno o más de los nucleótidos que se producen de manera natural por un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces no cargados (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellas que contienen restos colgantes, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), aquellas con agentes intercalantes (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquellas que contienen agentes quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidantes, etc.), aquellas que contienen agentes alquilantes, aquellas con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa-anoméricos, etc.), así como formas no modificadas del/de los polinucleótidos(s). Además, cualquiera de los grupos hidroxilo habitualmente presentes en los azúcares puede reemplazarse, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegerse por grupos protectores convencionales o activarse para preparar enlaces adicionales con nucleótidos adicionales, o puede conjugarse con soportes sólidos o semisólidos. El OH 5'-terminal y 3'-terminal puede fosforilarse o sustituirse con aminas o restos orgánicos de grupo de remate de extremos de desde 1 hasta 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivatizarse con grupos protectores convencionales. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que generalmente se conocen en la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares α -anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos básicos tales como ribósido de metilo. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden reemplazarse por grupos de unión

alternativos. Estos grupos de unión alternativos incluyen, pero no se limitan a, implementaciones en las que el fosfato se reemplaza por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), en los que cada R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o no sustituido (1-20 C) que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. 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 el presente documento, incluyendo ARN y ADN.

Una "célula huésped" incluye una célula individual o un cultivo celular que puede ser o ha sido un receptor para vector(es) para la incorporación de insertos de polinucleótidos. Las células huésped incluyen la progenie de una única célula huésped, y la progenie no tiene por qué ser completamente idéntica (en cuanto a morfología o en cuanto a complemento de ADN genómico) a la célula parental original debido a una mutación natural, accidental o intencionada. Una célula huésped incluye células transfectadas *in vivo* con un(os) polinucleótido(s) de la presente divulgación.

"Portadores", tal como se usa en el presente documento, incluye portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o el mamífero que está exponiéndose a los mismos a las dosificaciones y concentraciones empleadas. A menudo, el portador fisiológicamente aceptable es una disolución acuosa con pH tamponado. Los ejemplos de portadores fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptido de bajo peso molecular (menos de 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 hidratos de carbono 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 TWEEN™, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS™.

El término "aproximadamente", tal como se usa en el presente documento, se refiere al intervalo de error habitual para el valor respectivo fácilmente conocido por el experto en este campo técnico. En el presente documento, la referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro incluye (y describe) implementaciones que se refieren a ese valor o parámetro por sí mismo.

Tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno/a" y "el/la" incluyen la referencia en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la referencia a un "anticuerpo" es una referencia a desde uno hasta muchos anticuerpos, tales como cantidades molares, e incluye equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

Se entiende que las implementaciones de la presente divulgación descrita en el presente documento incluyen "que comprende", "que consiste en" y "que consiste esencialmente en" aspectos e implementaciones.

Visión general

La presente divulgación proporciona anticuerpos anti-C1q y usos de los mismos. Los anticuerpos anti-C1q de esta divulgación se unen específicamente a una proteína C1q de esta divulgación. En algunas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q son anticuerpos neutralizantes contra C1q. En algunas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q de esta divulgación pueden unirse al complejo C1.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal murino M1, que se produce por una línea celular de hibridoma denominada hibridoma de ratón C1q-M1 7788-1(M) 051613 y que se depositó en la ATCC el 6 de junio de 2013 con el número de registro de la ATCC PTA-120399.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona un anticuerpo anti-C1q que comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio variable de cadena pesada, en el que el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de dominio variable de cadena ligera del anticuerpo M1; y/o en el que la cadena pesada comprende la secuencia de dominio variable de cadena pesada del anticuerpo M1.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona un anticuerpo anti-C1q que comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio variable de cadena pesada, en el que el dominio variable de cadena ligera comprende HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 del anticuerpo monoclonal M1 producido por una línea celular de hibridoma depositada en la ATCC con el número de registro de la ATCC PTA-120399 o progenie de la misma; y/o en el que el dominio variable de cadena pesada comprende HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 del anticuerpo monoclonal M1 producido por una línea celular de hibridoma depositada en la ATCC con el número de registro PTA-120399 o progenie de la misma.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona un anticuerpo anti-C1q, que se une esencialmente al mismo epítipo de C1q que (1) el anticuerpo M1 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC el 6 de junio de 2013 y que tiene el número de registro de la ATCC PTA-120399 o progenie de la misma, (2) un

fragmento de unión a antígeno del anticuerpo M1 o (3) un anticuerpo que comprende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 del anticuerpo M1.

En algunas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q de esta divulgación neutralizan una actividad biológica de C1q. Los usos para los anticuerpos anti-C1q incluyen, sin limitación, la detección de factor del complemento C1q, por ejemplo, en individuos que padecen un trastorno neurodegenerativo asociado con la pérdida de sinapsis patológica dependiente del factor del complemento 1 (CF1). Los usos no limitativos adicionales incluyen la inhibición de la ruta clásica de activación del complemento, por ejemplo, en casos en los que la ruta clásica del complemento se activa por autoanticuerpos, tales como autoanticuerpos específicos de NMO. Los usos no limitativos adicionales para los anticuerpos anti-C1q incluyen el diagnóstico y tratamiento de trastornos que están asociados con una expresión elevada de factores del complemento, tales como C1q, o asociados con la activación de la ruta del complemento. Tales trastornos pueden incluir, sin limitación, trastornos autoinmunitarios, trastornos inflamatorios y trastornos neurodegenerativos, incluyendo trastornos neurodegenerativos asociados con la pérdida de sinapsis.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para un anticuerpo de esta divulgación.

La presente divulgación también proporciona células huésped aisladas que contienen una molécula de ácido nucleico que codifica para un anticuerpo de esta divulgación. En algunas implementaciones, se proporciona una línea de células huésped aislada que produce el anticuerpo murino monoclonal neutralizante M1. Esta línea de células huésped aislada se depositó en la ATCC y tiene el número de registro de la ATCC PTA-120399.

Adicionalmente, se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen anticuerpos anti-C1q, tales como anticuerpos neutralizantes contra C1q de esta divulgación, en combinación con portadores farmacéuticamente aceptables. La presente divulgación también proporciona un kit que contiene un anticuerpo anti-C1q para su uso en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

La presente divulgación proporciona además métodos de uso de los anticuerpos contra C1q de esta divulgación (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes contra C1q de esta divulgación) para tratar o prevenir una enfermedad neurodegenerativa o una enfermedad autoinmunitaria en un individuo que necesita tal tratamiento, para detectar la sinapsis en un individuo que padece una enfermedad neurodegenerativa o una enfermedad autoinmunitaria y para detectar la sinapsis en una muestra biológica. La presente divulgación también proporciona kits que contienen los anticuerpos contra C1q de esta divulgación (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes contra C1q de esta divulgación).

Proteínas del complemento

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

Tal como se usa en el presente documento, "*complejo C1*" se refiere a un complejo proteico que puede incluir, sin limitación, una proteína C1q, dos proteínas C1r y dos proteínas C1s (por ejemplo, C1q²s²).

Tal como se usa en el presente documento, "*factor del complemento C1q*" se refiere tanto a secuencias de tipo natural como a secuencias variantes que se producen de manera natural.

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

C1q, cadena A (Homo sapiens), n.º de registro de la base de datos de proteínas: NP_057075.1; n.º de GenBank: NM_015991:

```
>gi|7705753|ref|NP_057075.1| precursor de la subunidad A subcomponente del complemento C1q [Homo sapiens]
MEGPRGWLVLCLVLAISLASMVTEDLCRAPDGKKGEAGRPGRRRGRPGLKGEQGEPEGAP
GIRTGIQGLKGDQGEPPSGNPGKVGYPGPGSPLGARGIPGIKGTGSGPNIKDQPRPAF
SAIRRNPPMGGNVVIFDTVITNQEEPYQNHSGRFVCTVPGYYYFTFQVLSQWEICLSIVS
SSRGQVRRSLGFCDTTNKGLFQVVSGGMVLQLQQGDQVWVEKDPKKGHIYQGSEADS
VFSGFLIFPSA (SEQ ID NO:1)
```

C1q, cadena B (*Homo sapiens*), n.º de registro de la base de datos de proteínas: NP_000482.3; n.º de GenBank: NM_000491.3;

>gi|87298828|ref|NP_000482.3| precursor de la subunidad B subcomponente del complemento C1q [*Homo sapiens*]

MMMKIPWGSIPVLMLLLLLGLIDISQAQLSCTGPPAIPGIPGIPGTPGPDGQPGTPGIKGEK
GLPGLAGDHGEFGEKGDPGIPGNPGKVGPKGPMGPKGGPGAPGAPGPKGESGDYKATQ
KIAFSATRTINVPLRRDQTIRFDHVITNMNNNYEPRSGKFTCKVPGLYYFTYHASSRGNL
CVNLMRGRERAQKVVTFCDYAYNTFQVTTGGMVLKLEQGENVFLQATDKNSLLGME
GANSIFSGFLLFPDMEA (SEQ ID NO:2)

C1q, cadena C (*Homo sapiens*), n.º de registro de la base de datos de proteínas: NP_001107573.1; n.º de GenBank: NM_001114101.1;

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

MDVGPSSLPHLGLKLLLLLLLLPLRGQANTGCYGIPGMPGLPGAPGKDGVDGLPGPKGE
PGIPAIPGIRGPKGQKGEPGLPGHPGKNGPMGPPGMPGVPGPMGIPGEPGEEGRYKQKF
QSVFTVTRQTHQPPAPNSLIRFNAVLTNPQGDYDTSTGKFTCKVPGLYYFVYHASHTAN
LCVLLYRSGVKVVTFCGHTSKTNQVNSGGVLLRLQVGEEVWLAVNDYYDMVGIQGS
SVFSGFLLFPD (SEQ ID NO:3)

Por consiguiente, un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación puede unirse a la cadena polipeptídica A, a la cadena polipeptídica B y/o a la cadena polipeptídica C de una proteína C1q. En algunas implementaciones, un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación se une a la cadena polipeptídica A, a la cadena polipeptídica B y/o a la cadena polipeptídica C de C1q de ser humano o un homólogo del mismo, tal como C1q de ratón, rata, conejo, mono, perro, gato, vaca, caballo, camello, oveja, cabra o cerdo.

Anticuerpos anti-C1q

Los anticuerpos de esta divulgación se unen específicamente a un factor del complemento C1q y/o a C1q en el complejo C1 de la ruta clásica del complemento. En algunas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q se unen específicamente a C1q de ser humano. En algunas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q se unen específicamente a C1q de ser humano y de ratón. En algunas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q se unen específicamente a C1q de rata. En algunas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q se unen específicamente a C1q de ser humano, C1q de ratón y C1q de rata.

En algunas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q de esta divulgación neutralizan una actividad biológica del factor del complemento C1q. En algunas implementaciones, los anticuerpos inhiben la interacción entre el factor del complemento C1q y otros factores del complemento, tales como C1r o C1s, o entre C1q y un anticuerpo, tal como un autoanticuerpo. Tal como se da a conocer en el presente documento, un autoanticuerpo de la presente divulgación incluye, sin limitación, un anticuerpo que reconoce un antígeno huésped y activa la ruta clásica de activación del complemento. En la primera etapa de este proceso de activación, el factor del complemento C1q se une al inmunocomplejo autoanticuerpo-autoantígeno. En algunas implementaciones, los anticuerpos inhiben la interacción entre el factor del complemento C1q y un factor no del complemento. Un factor no del complemento puede incluir fosfatidilserina, pentraxina-3, proteína C reactiva (CRP), receptor de C1q globular (gC1qR), receptor 1 del complemento (CR1), β -amiloide y calreticulina. En algunas implementaciones, los anticuerpos inhiben la ruta clásica de activación del complemento. En determinadas implementaciones, los anticuerpos inhiben además la ruta alternativa. En algunas implementaciones, los anticuerpos inhiben la citotoxicidad dependiente del complemento y de autoanticuerpos (CDC). En algunas implementaciones, los anticuerpos inhiben la citotoxicidad mediada por células dependiente del complemento (CDCC). En algunas implementaciones, los anticuerpos inhiben la producción de anticuerpos por células B, la maduración de células dendríticas, la proliferación de células T, la producción de citocinas o la activación de microglías. En algunas implementaciones, los anticuerpos inhiben la reacción de Arthus. En algunas implementaciones, los anticuerpos inhiben la fagocitosis de las sinapsis o terminaciones nerviosas. En algunas implementaciones, los anticuerpos inhiben la activación de células que expresan el receptor del complemento 3 (CR3/C3).

Las propiedades funcionales de los anticuerpos de la presente divulgación, tales como las constantes de disociación para los antígenos, la inhibición de las interacciones proteína-proteína (por ejemplo, interacciones C1q-

autoanticuerpo), la inhibición de la citotoxicidad dependiente del complemento y de autoanticuerpos (CDC), la inhibición de la citotoxicidad mediada por células dependiente del complemento (CDCC) o la formación de lesiones, pueden medirse, sin limitación, en experimentos *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*.

Las constantes de disociación (K_D) de los anticuerpos anti-C1q para C1q pueden ser menores de 100 nM, menores de 90 nM, menores de 80 nM, menores de 70 nM, menores de 60 nM, menores de 50 nM, menores de 40 nM, menores de 30 nM, menores de 20 nM, menores de 10 nM, menores de 9 nM, menores de 8 nM, menores de 7 nM, menores de 6 nM, menores de 5 nM, menores de 4 nM, menores de 3 nM, menores de 2 nM, menores de 1 nM, menores de 0,5 nM, menores de 0,1 nM, menores de 0,05 nM, menores de 0,01 nM o menores de 0,005 nM. En algunas implementaciones, las constantes de disociación oscilan entre menos de aproximadamente 30 nM y menos de aproximadamente 100 pM. En algunas implementaciones, las constantes de disociación son menores de aproximadamente 30 nM. En algunas implementaciones, las constantes de disociación son menores de aproximadamente 20 nM. En algunas implementaciones, las constantes de disociación son menores de aproximadamente 10 nM. En algunas implementaciones, las constantes de disociación son menores de aproximadamente 5 nM. En algunas implementaciones, las constantes de disociación son menores de aproximadamente 1 nM. En algunas implementaciones, las constantes de disociación son menores de aproximadamente 100 pM. En determinadas implementaciones, las constantes de disociación del anticuerpo anti-C1q oscilan entre menos de aproximadamente 30 nM y menos de aproximadamente 100 pM para C1q de ser humano y oscilan entre menos de aproximadamente 30 nM y menos de aproximadamente 100 pM para C1q de ratón. En determinadas implementaciones, las constantes de disociación del anticuerpo anti-C1q son menores de aproximadamente 30 nM para C1q de ser humano y menores de aproximadamente 30 nM para C1q de ratón. En determinadas implementaciones, las constantes de disociación del anticuerpo anti-C1q son menores de aproximadamente 20 nM para C1q de ser humano y menores de aproximadamente 20 nM para C1q de ratón. En determinadas implementaciones, las constantes de disociación del anticuerpo anti-C1q son menores de aproximadamente 10 nM para C1q de ser humano y menores de aproximadamente 10 nM para C1q de ratón. En determinadas implementaciones, las constantes de disociación del anticuerpo anti-C1q son menores de aproximadamente 5 nM para C1q de ser humano y menores de aproximadamente 5 nM para C1q de ratón. En determinadas implementaciones, las constantes de disociación del anticuerpo anti-C1q son menores de aproximadamente 1 nM para C1q de ser humano y menores de aproximadamente 1 nM para C1q de ratón. En determinadas implementaciones, las constantes de disociación del anticuerpo anti-C1q son menores de 100 pM para C1q de ser humano y menores de 100 pM para C1q de ratón. Las constantes de disociación de anticuerpo para antígenos distintos de C1q pueden ser al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 100 veces, al menos 1.000 veces, al menos 10.000 veces o al menos 100.000 veces mayores que las constantes de disociación para C1q. Por ejemplo, la constante de disociación de un anticuerpo contra C1q de esta divulgación puede ser al menos 1.000 veces mayor para C1s que para C1q. Las constantes de disociación pueden determinarse a través de cualquier técnica analítica, incluyendo cualquier técnica bioquímica o biofísica tal como ELISA, resonancia de plasmón superficial (SPR), interferometría de biocapa (véase, por ejemplo, el sistema Octet de ForteBio), calorimetría de titulación isotérmica (ITC), calorimetría diferencial de barrido (DSC), dicroísmo circular (CD), análisis de flujo detenido y análisis colorimétricos o de fusión de proteínas fluorescentes. Las constantes de disociación (K_D) de los anticuerpos anti-C1q para C1q pueden determinarse, por ejemplo, usando anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo, tales como fragmentos Fab.

Un modo ejemplificativo de determina la afinidad de unión de anticuerpos a C1q es midiendo la afinidad de unión de fragmentos Fab monofuncionales del anticuerpo. Para obtener fragmentos Fab monofuncionales, un anticuerpo (por ejemplo, IgG) puede escindirse con papaína o expresarse de manera recombinante. La afinidad de un fragmento Fab de un anticuerpo puede determinarse mediante resonancia de plasmón superficial (sistema de resonancia de plasmón superficial (SPR) Biacore3000™, Biacore.TM., INC, Piscataway N.J.) equipado con chips sensores de estreptavidina (SA) previamente inmovilizados usando tampón de desarrollo HBS-EP (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005 % v/v). Puede diluirse C1q de ser humano biotinilado (o cualquier otro C1q) en tampón HBS-EP hasta una concentración menor de 0,5 µg/ml e inyectarse a través de los canales de chip individuales usando tiempos de contacto variables para lograr dos intervalos de densidad de antígeno, o bien 50-200 unidades de respuesta (UR) para estudios cinéticos detallados o bien 800-1.000 UR para ensayos de cribado. Estudios de regeneración han demostrado que NaOH 25 mM en etanol al 25 % v/v elimina eficazmente el Fab unido mientras mantiene la actividad de C1q en el chip durante más de 200 inyecciones. Normalmente, se inyectan diluciones en serie (que abarcan concentraciones de 0,1-10 veces, K_D estimada) de muestras de Fab purificadas durante 1 min a 100 µl/minuto y se permiten tiempos de disociación de hasta 2 horas. Se determinan las concentraciones de las proteínas Fab mediante ELISA y/o electroforesis SDS-PAGE usando un Fab de concentración conocida (tal como se determina mediante análisis de aminoácidos) como patrón. Se obtienen simultáneamente las velocidades de asociación (k_{on}) y las velocidades de disociación (k_{off}) cinéticas ajustando los datos globalmente a un modelo de unión de Langmuir 1:1 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). Methods Enzymology 6. 99-110) usando el programa BIAevaluation. Se calculan los valores de constante de disociación en equilibrio (K_D) como k_{off}/k_{on} . Este protocolo es adecuado para su uso para determinar la afinidad de unión de un anticuerpo a cualquier C1q, incluyendo C1q de ser humano, C1q de otro mamífero (tal como C1q de ratón, C1q de rata, C1q de primate), así como diferentes formas de C1q. La afinidad de unión de un anticuerpo se mide generalmente a 25 °C, pero también puede medirse a 37 °C.

Los anticuerpos de esta divulgación pueden unirse a antígenos de C1q derivados de cualquier organismo que tenga un sistema del complemento, incluyendo cualquier organismo mamífero tal como ser humano, ratón, rata, conejo, mono, perro, gato, vaca, caballo, camello, oveja, cabra o cerdo. En algunas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q se unen específicamente a epítomos en C1q de ser humano. En algunas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q se unen específicamente a epítomos en C1q tanto de ser humano como de ratón. En algunas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q se unen específicamente a epítomos en C1q de ser humano, de ratón y de rata.

En algunas implementaciones, en el presente documento se proporciona un anticuerpo anti-C1q que se une a un epítomo de C1q que es el mismo que, o solapa con, el epítomo de C1q al que se une otro anticuerpo de esta divulgación. En determinadas implementaciones, en el presente documento se proporciona un anticuerpo anti-C1q que se une a un epítomo de C1q que es el mismo que, o solapa con, el epítomo de C1q al que se une el anticuerpo anti-C1q M1. En algunas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q compite con otro anticuerpo de esta divulgación por la unión a C1q. En determinadas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q compite con el anticuerpo anti-C1q M1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo por la unión a C1q.

Los métodos que pueden usarse para determinar a qué epítomo de C1q se une un anticuerpo anti-C1q, o si dos anticuerpos se unen al mismo epítomo o a un epítomo solapante, pueden incluir, sin limitación, cristalografía de rayos X, espectroscopía de RMN, mutagénesis de barrido mediante alanina, cribado de bibliotecas de péptidos que incluyen péptidos derivados de C1q con secuencias de C1q solapantes y ensayos de competencia. Los ensayos de competencia son especialmente útiles para determinar si dos anticuerpos se unen al mismo epítomo mediante el reconocimiento de epítomos idénticos o estéricamente solapantes o si un anticuerpo inhibe de manera competitiva la unión de otro anticuerpo al antígeno. Estos ensayos se conocen en la técnica. Normalmente, un antígeno o células que expresan antígeno se inmovilizan en una placa de múltiples pocillos y se mide la capacidad de los anticuerpos no marcados para bloquear la unión de los anticuerpos marcados. Marcadores habituales para tales ensayos de competencia son marcadores radiactivos o marcadores enzimáticos.

Los anticuerpos competitivos abarcados en el presente documento son anticuerpos que inhiben (es decir, en comparación con un control, previenen o interfieren con) o reducen la unión de cualquier anticuerpo anti-C1q de esta divulgación (tal como M1 o un fragmento de unión a antígeno de M1) a C1q en al menos el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % y el 95 % a 1 μ M o menos. Por ejemplo, la concentración de anticuerpo competitivo en el ensayo de competencia puede ser igual o inferior a la K_D del anticuerpo M1 o un fragmento de unión a antígeno de M1. La competencia entre los miembros de unión puede someterse a ensayo fácilmente *in vitro*, por ejemplo, usando ELISA y/o monitorizando la interacción de los anticuerpos con C1q en disolución. El medio exacto para llevar a cabo el análisis no es crítico. C1q puede inmovilizarse en una placa de 96 pocillos o puede colocarse en una disolución homogénea. En implementaciones específicas, puede medirse la capacidad de anticuerpo(s) candidato(s) no marcado(s) para bloquear la unión del anticuerpo anti-C1q marcado, por ejemplo M1, usando marcadores radiactivos, enzimáticos u otros. En el ensayo inverso, se determina la capacidad de anticuerpos no marcados para interferir con la interacción de un anticuerpo anti-C1q marcado con C1q, en el que dicho anticuerpo anti-C1q marcado, por ejemplo, M1, y C1q ya están unidos. La lectura es a través de la medición de marcador unido. C1q y el/los anticuerpo(s) candidato(s) pueden añadirse en cualquier orden o al mismo tiempo.

En algunas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q inhibe la interacción entre C1q y un autoanticuerpo. En algunas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q es anticuerpo monoclonal murino anti-C1q de ser humano M1, que se produce por una línea celular de hibridoma depositada en la ATCC el 6 de junio de 2013 con el número de registro de la ATCC PTA-120399.

En algunas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q es un anticuerpo aislado que se une esencialmente al mismo epítomo de C1q que M1. En algunas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q es un anticuerpo aislado que comprende HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 de los dominios variables de cadena ligera del anticuerpo monoclonal M1 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC el 6 de junio de 2013 con el número de registro de la ATCC PTA-120399, o progenie de la misma. En algunas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q es un anticuerpo aislado que comprende HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 de los dominios variables de cadena pesada del anticuerpo monoclonal M1 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC el 6 de junio de 2013 con el número de registro de la ATCC PTA-120399, o progenie de la misma. En algunas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q es un anticuerpo aislado que comprende HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 de los dominios variables de cadena ligera y HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 de los dominios variables de cadena pesada del anticuerpo monoclonal M1 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC el 6 de junio de 2013 con el número de registro de la ATCC PTA-120399, o progenie de la misma.

En algunas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q se une a una proteína C1q y se une a uno o más aminoácidos de la proteína C1q dentro de los residuos de aminoácido seleccionados de (a) residuos de aminoácido 196-226 de SEQ ID NO:1 (SEQ ID NO:16) o residuos de aminoácido de una cadena A de proteína C1q (C1qA) correspondiente a los residuos de aminoácido 196-226 (GLFQVVSGGMVLQLQQGDQVWVEKDPKKGHI) de SEQ ID NO:1 (SEQ ID NO:16); (b) residuos de aminoácido 196-221 de SEQ ID NO:1 (SEQ ID NO:17) o residuos de aminoácido de una C1qA correspondiente a los residuos de aminoácido 196-221 (GLFQVVSGGMVLQLQQGDQVWVEKDP) de SEQ ID.

NO:1 (SEQ ID NO:17); (c) residuos de aminoácido 202-221 de SEQ ID NO:1 (SEQ ID NO:18) o residuos de aminoácido de una C1qA correspondiente a los residuos de aminoácido 202-221 (SGGMVLQLQQGDQVWVEKDP) de SEQ ID NO:1 (SEQ ID NO:18); (d) residuos de aminoácido 202-219 de SEQ ID NO:1 (SEQ ID NO:19) o residuos de aminoácido de una C1qA correspondiente a los residuos de aminoácido 202-219 (SGGMVLQLQQGDQVWVEK) de SEQ ID NO:1 (SEQ ID NO:19); y (e) residuos de aminoácido Lys 219 y/o Ser 202 de SEQ ID NO:1 o residuos de aminoácido de una C1qA correspondiente a Lys 219 y/o Ser 202 de SEQ ID NO:1.

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

En determinadas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q se une al residuo de aminoácido Lys 219 y Ser 202 de C1qA de ser humano tal como se muestra en SEQ ID NO:1 o a los aminoácidos de una C1qA de ser humano correspondiente a Lys 219 y Ser 202 tal como se muestra en SEQ ID NO:1, y al residuo de aminoácido Tyr 225 de C1qC de ser humano tal como se muestra en SEQ ID NO:3 o a un residuo de aminoácido de una C1qC de ser humano correspondiente a Tyr 225 tal como se muestra en SEQ ID NO:3. En determinadas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q se une al residuo de aminoácido Lys 219 de C1qA de ser humano tal como se muestra en SEQ ID NO:1 o a un residuo de aminoácido de una C1qA de ser humano correspondiente a Lys 219 tal como se muestra en SEQ ID NO:1, y al residuo de aminoácido Ser 185 de C1qC de ser humano tal como se muestra en SEQ ID NO:3 o a un residuo de aminoácido de una C1qC de ser humano correspondiente a Ser 185 tal como se muestra en SEQ ID NO:3.

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

En algunas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q de esta divulgación inhibe la interacción entre C1q y C1s. En algunas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q inhibe la interacción entre C1q y C1r. En algunas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q inhibe la interacción entre C1q y C1s y entre C1q y C1r. En algunas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q inhibe la interacción entre C1q y otro anticuerpo, tal como un autoanticuerpo. En algunas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q inhibe las interacciones respectivas, a una estequiometría de menos de 2,5:1; 2,0:1; 1,5:1; ó 1,0:1. En algunas implementaciones, el anticuerpo contra C1q inhibe una interacción, tal como la interacción C1q-C1s, a concentraciones aproximadamente equimolares de C1q y el anticuerpo anti-C1q. En otras implementaciones, el anticuerpo anti-C1q se une a C1q con una estequiometría de menos de 20:1; menos de 19,5:1; menos de 19:1; menos de 18,5:1; menos de 18:1; menos de 17,5:1; menos de 17:1; menos de 16,5:1; menos de 16:1; menos de 15,5:1; menos de 15:1; menos de 14,5:1; menos de 14:1; menos de 13,5:1; menos de 13:1; menos de 12,5:1; menos de 12:1; menos de 11,5:1; menos de 11:1; menos de 10,5:1; menos de 10:1; menos de 9,5:1; menos de 9:1; menos de 8,5:1; menos de 8:1; menos de 7,5:1; menos de 7:1; menos de 6,5:1; menos de 6:1; menos de 5,5:1; menos de 5:1; menos de 4,5:1; menos de 4:1; menos de 3,5:1;

menos de 3:1; menos de 2,5:1; menos de 2,0:1; menos de 1,5:1; o menos de 1,0:1. En determinadas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q se une a C1q con una estequiometría de unión que oscila entre 20:1 y 1,0:1 o menos de 1,0:1. En determinadas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q se une a C1q con una estequiometría de unión que oscila entre 6:1 y 1,0:1 o menos de 1,0:1. En determinadas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q se une a C1q con una estequiometría de unión que oscila entre 2,5:1 y 1,0:1 o menos de 1,0:1. En algunas implementaciones, 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 implementaciones, 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 implementaciones, el anticuerpo anti-C1q se une a la cadena A de C1q. En otras implementaciones, el anticuerpo anti-C1q se une a la cadena B de C1q. En otras implementaciones, el anticuerpo anti-C1q se une a la cadena C de C1q. En algunas implementaciones, 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 implementaciones, el anticuerpo anti-C1q se une al dominio globular de la cadena A, la cadena B y/o la cadena C de C1q. En otras implementaciones, el anticuerpo anti-C1q se une al dominio similar al colágeno de la cadena A de C1q, la cadena B de C1q y/o la cadena C de C1q.

Cuando los anticuerpos de esta divulgación inhiben la interacción entre dos o más factores del complemento, tal como la interacción de C1q y C1s, o la interacción entre C1q y C1r, puede reducirse la interacción que se produce en presencia del anticuerpo en al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 99 % con respecto a un control en el que están ausentes los anticuerpos de esta divulgación. En determinadas implementaciones, la interacción que se produce en presencia del anticuerpo se reduce en una cantidad que oscila entre al menos el 30 % y al menos el 99 % con respecto a un control en el que están ausentes los anticuerpos de esta divulgación.

En algunas implementaciones, los anticuerpos de esta divulgación inhiben la escisión de C4 en al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 99 %, o en una cantidad que oscila entre al menos el 30 % y al menos el 99 %, con respecto a un control en el que están ausentes los anticuerpos de esta divulgación. Los métodos para medir la escisión de C4 se conocen bien en la técnica. Los valores de CE_{50} para los anticuerpos de esta divulgación con respecto a la escisión de C4 pueden ser menores de 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 implementaciones, los anticuerpos de esta divulgación inhiben la escisión de C4 a concentraciones aproximadamente equimolares de C1q y el anticuerpo anti-C1q respectivo.

En algunas implementaciones, los anticuerpos de esta divulgación inhiben la citotoxicidad dependiente del complemento y de autoanticuerpos (CDC) en al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 99 %, o en una cantidad que oscila entre al menos el 30 % y al menos el 99 %, con respecto a un control en el que están ausentes los anticuerpos de esta divulgación. Los valores de CE_{50} para los anticuerpos de esta divulgación con respecto a la inhibición de la citotoxicidad dependiente del complemento y de autoanticuerpos pueden ser menores de 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 implementaciones, los anticuerpos de esta divulgación inhiben la citotoxicidad mediada por células dependiente del complemento (CDCC) en al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 99 %, o en una cantidad que oscila entre al menos el 30 % y al menos el 99 %, con respecto a un control en el que están ausentes los anticuerpos de esta divulgación. Los métodos para medir la CDCC se conocen bien en la técnica. Los valores de CE_{50} para los anticuerpos de esta divulgación con respecto a la inhibición de la CDCC pueden ser menores de 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 implementaciones, los anticuerpos de esta divulgación inhiben la CDCC, pero no la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

En algunas implementaciones, los anticuerpos de esta divulgación inhiben la hemólisis de C1F (también denominada hemólisis de CH50) en al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 99 %, o en una cantidad que oscila entre al menos el 30 % y al menos el 99 %, con respecto a un control en el que están ausentes los anticuerpos de esta divulgación o en el que se usan anticuerpos de control que no se unen a ningún factor del complemento ni a ningún otro anticuerpo tal como un autoanticuerpo (véase, por ejemplo, el ejemplo 3). Los métodos para medir la hemólisis de C1F se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, el ejemplo 3). Los valores de CE_{50} para los anticuerpos de esta divulgación con respecto a la hemólisis de C1F pueden ser menores de 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 implementaciones, los anticuerpos anti-C1q de esta divulgación neutralizan al menos el 50 % de hemólisis de C1F a una dosis de menos de 200 ng/ml, menos de 100 ng/ml, menos de 50 ng/ml o menos de 20 ng/ml. En algunas implementaciones, los anticuerpos de esta divulgación neutralizan la hemólisis de C1F a concentraciones aproximadamente equimolares de C1q y el anticuerpo anti-C1q. En algunas implementaciones, los anticuerpos anti-

C1q de esta divulgación neutralizan la hemólisis en un ensayo de hemólisis de C1F de ser humano. En algunas implementaciones, los anticuerpos de esta divulgación neutralizan la hemólisis en un ensayo de hemólisis de C1F de ser humano, de ratón y de rata (véase, por ejemplo, el ejemplo 3).

En algunas implementaciones, la ruta alternativa puede amplificar la CDC iniciada por la unión de C1q y la posterior activación de C1s; en al menos algunas de estas implementaciones, los anticuerpos de esta divulgación inhiben la ruta alternativa en al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 99 %, o en una cantidad que oscila entre al menos el 30 % y al menos el 99 %, con respecto a un control en el que están ausentes los anticuerpos de esta divulgación.

En algunas implementaciones, los anticuerpos de esta divulgación previenen la pérdida sináptica en un modelo celular *in vitro* o un modelo *in vivo* de pérdida sináptica, tal como un modelo de ratón *in vivo*. Los modelos de ratón *in vivo* pueden incluir Tg2576, un modelo transgénico de proteína precursora amiloide (APP) de ratón de enfermedad de Alzheimer, R6/2 NT-CAG150, un modelo transgénico de enfermedad de Huntington, o SMA Δ 7, un modelo de ratón de atrofia muscular espinal, o DBA/2J, un modelo de ratón genético de glaucoma. En general, puede usarse cualquier modelo de enfermedad neurodegenerativa que muestre pérdida de sinapsis.

Los métodos para medir la pérdida sináptica *in vitro* o *in vivo* se conocen bien en la técnica. Puede reducirse la formación de lesiones *in vitro* en al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o al menos el 95 %, o en una cantidad que oscila entre al menos el 30 % y al menos el 95 %, con respecto a un experimento de control en el que están ausentes los anticuerpos de esta divulgación. Los valores de CE₅₀ para los anticuerpos de esta divulgación con respecto a la prevención de la formación de lesiones *in vitro* pueden ser menores de 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. Puede reducirse la pérdida sináptica *in vivo* en al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 35 %, al menos el 40 % o al menos el 50 %, o en una cantidad que oscila entre al menos el 5 % y al menos el 50 %, con respecto a un experimento de control en el que están ausentes los anticuerpos de esta divulgación.

En algunas implementaciones, los anticuerpos de esta divulgación previenen la formación de lesiones en un modelo de corte de médula espinal *ex vivo* de NMO o en un modelo de ratón *in vivo* de NMO. Los métodos para medir la formación de lesiones *ex vivo* o *in vivo* se conocen bien en la técnica. Puede reducirse la formación de lesiones *ex vivo* al menos en una puntuación relativa de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5 ó 4,0. Los valores de CE₅₀ para los anticuerpos de esta divulgación con respecto a la prevención de formación de lesiones *ex vivo* pueden ser menores de 3 µg/ml; menores de 2,5 µg/ml; menores de 2,0 µg/ml; menores de 1,5 µg/ml; menores de 1,0 µg/ml; menores de 0,5 µg/ml; menores de 0,25 µg/ml; menores de 0,1 µg/ml; o menores 0,05 µg/ml. Puede reducirse la formación de lesiones *in vivo* en al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 35 %, al menos el 40 % o al menos el 50 %, o en una cantidad que oscila entre al menos el 5 % y al menos el 50 %, en cuanto a la pérdida de tinción (% de área). La tinción puede evaluarse, sin limitación, mediante tinción con APQ4, tinción con GFAP o tinción con MBP.

La presente divulgación proporciona anticuerpos anti-C1q. Los anticuerpos de esta divulgación pueden presentar una o más de las siguientes características. Los anticuerpos de esta divulgación pueden ser anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, fragmentos de anticuerpo, anticuerpos biespecíficos y poliespecíficos, anticuerpos multivalentes o anticuerpos heteroconjugados. Los fragmentos de anticuerpo de esta divulgación pueden ser fragmentos funcionales que se unen al mismo epítipo que cualquiera de los anticuerpos anti-C1q de esta divulgación. En algunas implementaciones, los fragmentos de anticuerpo de esta divulgación se unen específicamente a C1q y neutralizan una actividad biológica de C1q. En algunas implementaciones, los fragmentos de anticuerpo son versiones miniaturizadas de los anticuerpos anti-C1q o fragmentos de anticuerpo de esta divulgación que tienen el mismo epítipo del anticuerpo de longitud completa correspondiente, pero tienen un peso molecular mucho más pequeño. Tales fragmentos de anticuerpo anti-C1q miniaturizados pueden presentar una mejor capacidad de penetración en el cerebro y una semivida más corta, lo cual es ventajoso para utilidades de obtención de imágenes y diagnóstico (véanse, por ejemplo, Lütje S *et al.*, Bioconjug Chem. 19 de febrero de 2014;25(2):335-41; Tavaré R *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 21 de enero de 2014;111(3):1108-13; y Wiehr S *et al.*, Prostate. Mayo de 2014;74(7):743-55). Por consiguiente, en algunas implementaciones, los fragmentos de anticuerpo anti-C1q de esta divulgación presentan una mejor penetración en el cerebro en comparación con sus anticuerpos de longitud completa correspondientes y/o presentan una semivida más corta en comparación con sus anticuerpos de longitud completa correspondientes. En algunas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q de la presente divulgación son anticuerpos biespecíficos que reconocen un primer antígeno y un segundo antígeno. En algunas implementaciones, el primer antígeno es un antígeno C1q. En algunas implementaciones, el segundo antígeno es un antígeno que facilita el transporte a través de la barrera hematoencefálica, incluyendo, sin limitación, receptor de transferrina (TR), receptor de insulina (HIR), receptor de factor de crecimiento similar a la insulina (IGFR), proteínas relacionadas con el receptor de lipoproteínas de baja densidad 1 y 2 (LPR-1 y 2), receptor de toxina diftérica, CRM197, un anticuerpo de un solo dominio de llama, TMEM 30(A), un dominio de transducción de proteínas, TAT, Syn-B, penetratina, un péptido de poliarginina, un péptido de

angiopep y ANG1005. Los anticuerpos de esta divulgación pueden contener además funciones efectoras modificadas por ingeniería, modificaciones de secuencia de aminoácidos u otras modificaciones de anticuerpo conocidas en la técnica; por ejemplo, la región constante de los anticuerpos anti-C1q descritos en el presente documento puede modificarse para alterar la activación del complemento.

Pueden identificarse, cribarse y/o caracterizarse anticuerpos anti-C1q adicionales, por ejemplo, anticuerpos que se unen específicamente a una proteína C1q de la presente divulgación, para determinar sus propiedades físicas/químicas y/o actividades biológicas mediante diversos ensayos conocidos en la técnica.

Preparación de anticuerpos

Los anticuerpos anti-C1q de la presente divulgación pueden abarcar anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanos, fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos Fab, Fab'-SH, Fv, scFv y F(ab')₂), anticuerpos biespecíficos y poliespecíficos, anticuerpos multivalentes, anticuerpos heteroconjugados, anticuerpos derivados de bibliotecas, anticuerpos que tienen funciones efectoras modificadas, proteínas de fusión que contienen una porción de anticuerpo y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que incluya un sitio de reconocimiento de antígeno, tal como un epítopo que tiene residuos de aminoácido de una proteína C1q de la presente divulgación, incluyendo variantes de glicosilación de anticuerpos, variantes de secuencia de aminoácidos de anticuerpos y anticuerpos modificados covalentemente. Los anticuerpos anti-C1q pueden ser de ser humano, murinos, de rata o de cualquier otro origen (incluyendo anticuerpos quiméricos o humanizados).

(1) Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales, tales como anticuerpos policlonales anti-C1q, se producen generalmente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (s.c.) o intraperitoneales (i.p.) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante (por ejemplo, una proteína C1q purificada o recombinante de la presente divulgación) con una proteína que es inmunogénica en la especie que va a inmunizarse, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina sérica, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja, usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, maleimidobenzoílo éster de sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl₂ o R¹N=C=NR, donde R y R¹ son independientemente grupos alquilo inferior. Los ejemplos de adyuvantes que pueden emplearse incluyen adyuvante completo de Freund y adyuvante MPL-TDM (monofosforil lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético). El protocolo de inmunización puede seleccionarlo un experto en la técnica sin experimentación indebida.

Los animales se inmunizan contra el antígeno, los conjugados inmunogénicos o los derivados deseados combinando, por ejemplo, 100 µg (para conejos) o 5 µg (para ratones) de la proteína o el conjugado con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la disolución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes después, a los animales se les administra el refuerzo con de 1/5 a 1/10 la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a catorce días después, se extraen muestras de sangre de los animales y se somete a ensayo el suero para determinar el título de anticuerpo. A los animales se les administra el refuerzo hasta que se estabiliza el título. Los conjugados también pueden prepararse en cultivo celular recombinante como fusiones de proteínas. Además, los agentes de agregación tales como el alumbre son adecuados para potenciar la respuesta inmunitaria.

(2) Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales, tales como anticuerpos monoclonales anti-C1q, se obtienen a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que se producen de manera natural y/o modificaciones posteriores a la traducción (por ejemplo, isomerizaciones, amidaciones) que pueden estar presentes en cantidades pequeñas. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que no es una mezcla de anticuerpos independientes.

Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales anti-C1q pueden prepararse usando el método del hibridoma descrito por primera vez por Köhler *et al.*, Nature, 256:495 (1975) o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (patente estadounidense n.º 4.816.567).

En el método del hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, se inmuniza tal como se describió anteriormente en el presente documento para producir linfocitos que producen o pueden producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización (por ejemplo, una proteína C1q purificada o recombinante de la presente divulgación). Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Luego se fusionan los linfocitos con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, páginas 59-103 (Academic Press, 1986)).

El agente de inmunización incluirá normalmente la proteína antigénica (por ejemplo, una proteína C1q purificada o recombinante de la presente divulgación) o una variante de fusión de la misma. Generalmente, se usan linfocitos de sangre periférica ("PBL") si se desean células de origen humano, mientras que se usan células de bazo o ganglio linfático si se desean fuentes de mamíferos no humanos. Luego se fusionan los linfocitos con una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986), páginas 59-103.

Las líneas celulares inmortalizadas son habitualmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen roedor, bovino o humano. Habitualmente, se emplean líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Se siembran las células de hibridoma así preparadas y se hacen crecer en un medio de cultivo adecuado que puede contener una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá normalmente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), que son sustancias que previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

En algunas implementaciones, las células de mieloma inmortalizadas son aquellas que se fusionan de manera eficiente, soportan la producción estable de alto nivel del anticuerpo por las células productoras de anticuerpo seleccionadas y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Entre éstas, se encuentran las líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de tumores MOPC-21 y MPC-11 de ratón (disponibles del Centro de Distribución de Células del Instituto Salk, San Diego, California, EE.UU.), así como células SP-2 y derivados de las mismas (por ejemplo, X63-Ag8-653) (disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, Virginia, EE. UU.). Las líneas celulares de mieloma de ser humano y heteromieloma de ratón-ser humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, páginas 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

El medio de cultivo en el que se hacen crecer las células de hibridoma se somete a ensayo para determinar la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno (por ejemplo, una proteína C1q de la presente divulgación). En algunas implementaciones, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA).

El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma puede someterse a ensayo para determinar la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno deseado (por ejemplo, una proteína C1q de la presente divulgación). En algunas implementaciones, la afinidad y la especificidad de unión del anticuerpo monoclonal pueden determinarse mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA). Tales técnicas y ensayos se conocen en la técnica. Por ejemplo, la afinidad de unión puede determinarse mediante el análisis de Scatchard de Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Después de identificar células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, la afinidad y/o la actividad deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y hacerse crecer mediante métodos convencionales (Goding, citado anteriormente). Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden hacerse crecer *in vivo* como tumores en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan de manera adecuada a partir del medio de cultivo, líquido ascítico o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, cromatografía de proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxipatita, electroforesis en gel, diálisis, cromatografía de afinidad y otros métodos tal como se describió anteriormente.

Los anticuerpos monoclonales anti-C1q también pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante, tales como los dados a conocer en la patente estadounidense n.º 4.816.567, y tal como se describió anteriormente. El ADN que codifica para los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que se unen específicamente a genes que codifican para las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como fuente de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que luego se transfectan en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, con el fin de sintetizar anticuerpos monoclonales en tales células huésped recombinantes. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica para el anticuerpo incluyen Skerra *et al.*, *Curr. Opin. Immunol.*, 5:256-262 (1993) y Plückthun, *Immunol. Rev.* 130:151-188 (1992).

En determinadas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q pueden aislarse a partir de bibliotecas de fagos de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty *et al.*, *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson *et*

al., Nature, 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) describieron el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, a partir de bibliotecas de fagos. Las publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nanomolar ("nM")) mediante intercambio de cadenas (Marks *et al.*, Bio/Technology, 10:779-783 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación *in vivo*, como estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse *et al.*, Nucl. Acids Res., 21:2265-2266 (1993)). Por tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridoma de anticuerpo monoclonal tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales de especificidad deseada (por ejemplo, aquellos que se unen a una proteína C1q de la presente divulgación).

El ADN que codifica para anticuerpos o fragmentos de los mismos también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante por los dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias murinas homólogas (patente estadounidense n.º 4.816.567; Morrison, *et al.*, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81 :6851 (1984)) o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina la totalidad o parte de la secuencia codificante para un polipéptido distinto de inmunoglobulina. Normalmente, tales polipéptidos distintos de inmunoglobulina están sustituidos por los dominios constantes de un anticuerpo o están sustituidos por los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

Los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento (por ejemplo, anticuerpos anti-C1q de la presente divulgación o fragmentos de los mismos) pueden ser monovalentes, cuya preparación se conoce bien en la técnica. Por ejemplo, un método implica la expresión recombinante de la cadena ligera de inmunoglobulina y una cadena pesada modificada. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier punto en la región Fc para prevenir la reticulación de la cadena pesada. Alternativamente, los residuos de cisteína relevantes pueden sustituirse por otro residuo de aminoácido, o se delecionan, para prevenir la reticulación. Los métodos *in vitro* también son adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente fragmentos Fab, puede lograrse usando técnicas de rutina conocidas en la técnica.

También pueden prepararse *in vitro* anticuerpos anti-C1q quiméricos o híbridos usando métodos conocidos en la química de proteínas sintéticas, incluyendo aquellos que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o mediante la formación de un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y 4-mercaptobutirimidato de metilo.

(3) Anticuerpos humanizados

Los anticuerpos anti-C1q de la presente divulgación o fragmentos de anticuerpo de los mismos pueden incluir además anticuerpos humanizados o humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en la que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se reemplazan por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata o conejo, que tiene la especificidad, la afinidad y la capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de marco de Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR o marco importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones FR son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá, óptimamente, al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana. Jones *et al.*, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332: 323-329 (1988) y Presta, Curr. Opin. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992). En algunas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q es un anticuerpo quimérico que comprende los dominios variables de cadena pesada y ligera de cualquiera de los anticuerpos anti-C1q descritos en el presente documento (por ejemplo, anticuerpos M1 y 4A4B11) y las regiones constantes de una inmunoglobulina humana.

Los métodos para humanizar anticuerpos anti-C1q no humanos se conocen bien en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácido introducidos en el mismo a partir de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácido no humanos a menudo se denominan residuos de "importación", que normalmente se toman de un dominio variable de "importación". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores, Jones *et al.*, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, Science 239:1534-1536 (1988) o a través de la sustitución de las CDR o secuencias de CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente estadounidense n.º 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de

una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que van a usarse en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. Según el denominado método de "ajuste óptimo", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a toda la biblioteca de secuencias de dominios variables humanos conocidas. Entonces se acepta la secuencia humana que es más próxima a la del roedor como marco (FR) humano para el anticuerpo humanizado. Sims *et al.*, J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia *et al.*, J. Mol. Biol., 196:901 (1987). Otro método usa un marco particular derivado de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes. Carter *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol. 151:2623 (1993).

Además, es importante que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están disponibles habitualmente y son familiares para los expertos en la técnica. Hay disponibles programas informáticos que ilustran y visualizan las probables estructuras conformacionales tridimensionales de las secuencias de inmunoglobulina candidata seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite el análisis del probable papel de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De este modo, los residuos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias de receptor y de importación, de modo que se logre la característica de anticuerpo deseada, tal como una mayor afinidad por el antígeno o los antígenos diana (por ejemplo, proteínas C1q de la presente divulgación). En general, los residuos de CDR están implicados directamente y más sustancialmente en la influencia en la unión al antígeno.

Se contemplan diversas formas del anticuerpo anti-C1q humanizado. Por ejemplo, el anticuerpo anti-C1q humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un Fab, que está opcionalmente conjugado con uno o más agente(s) citotóxico(s) con el fin de generar un inmunconjugado. Alternativamente, el anticuerpo anti-C1q humanizado puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto.

(4) Anticuerpos humanos

Alternativamente, pueden generarse anticuerpos anti-C1q humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que pueden producir, tras su inmunización, un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulinas endógenas. La delección homocigótica del gen de la región de unión de cadena pesada (J_H) del anticuerpo en ratones mutantes de línea germinal y quiméricos da como resultado la completa inhibición de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la matriz génica de inmunoglobulina de línea germinal humana en tales ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Véanse, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, Year in Immunol., 7:33 (1993); las patentes estadounidenses n.ºs 5.591.669 y WO 97/17852.

Alternativamente, puede usarse la tecnología de presentación en fago para producir anticuerpos y fragmentos de anticuerpo anti-C1q humanos *in vitro* a partir de repertorios de genes del dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. McCafferty *et al.*, Nature 348:552-553 (1990); Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol. 227: 381 (1991). Según esta técnica, los genes del dominio V de anticuerpo se clonan dentro del marco en un gen de proteína de cubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se presentan como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula de fago. Dado que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma de fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica para el anticuerpo que muestra esas propiedades. Por tanto, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La presentación en fago puede realizarse en una variedad de formatos, revisados en, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Curr. Opin. Struct. Biol. 3:564-571 (1993). Pueden usarse varias fuentes de segmentos de genes V para la presentación en fago. Clackson *et al.*, Nature 352:624-628 (1991) aislaron una diversa gama de anticuerpos anti-oxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V derivados de los bazos de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes V a partir de donantes humanos no inmunizados y pueden aislarse anticuerpos contra una diversa gama de antígenos (incluyendo autoantígenos) esencialmente siguiendo las técnicas descritas por Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991) o Griffith *et al.*, EMBO J. 12:725-734 (1993). Véanse también las patentes estadounidenses n.ºs 5.565.332 y 5.573.905. Adicionalmente, puede usarse la tecnología de presentación en levadura para producir anticuerpos y fragmentos de anticuerpo anti-C1q humanos *in vitro* (por ejemplo, documento WO 2009/036379; documento WO 2010/105256; documento WO 2012/009568; documento US 2009/0181855; documento US 2010/0056386; y Feldhaus y Siegel (2004) J. Immunological Methods 290:69-80). En otras implementaciones, puede usarse la tecnología de presentación en ribosoma para producir

anticuerpos y fragmentos de anticuerpo anti-C1q humanos *in vitro* (por ejemplo, Roberts y Szostak (1997) Proc Natl Acad Sci 94:12297-12302; Schaffitzel *et al.* (1999) J. Immunological Methods 231:119-135; Lipovsek y Plückthun (2004) J. Immunological Methods 290:51-67).

Las técnicas de Cole *et al.*, y Boerner *et al.*, también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales anti-C1q humanos (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pág. 77 (1985) y Boerner *et al.*, J. Immunol. 147(1): 86-95 (1991). De manera similar, pueden prepararse anticuerpos anti-C1q humanos introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógenos se han inactivado de manera parcial o completa. Tras la exposición, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se asemeja estrechamente a lo observado en seres humanos en todos los aspectos, incluyendo el reordenamiento génico, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.ºs 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016 y en las siguientes publicaciones científicas: Marks *et al.*, Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-13 (1994), Fishwild *et al.*, Nature Biotechnology 14: 845-51 (1996), Neuberger, Nature Biotechnology 14: 826 (1996) y Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995).

Finalmente, también pueden generarse anticuerpos anti-C1q humanos *in vitro* mediante células B activadas (véanse las patentes estadounidenses n.ºs 5.567.610 y 5.229.275).

(5) Fragmentos de anticuerpo

En determinadas implementaciones, hay ventajas con respecto al uso de fragmentos de anticuerpo anti-C1q, en lugar de anticuerpos anti-C1q completos. Los tamaños de fragmento más pequeños permiten un rápido aclaramiento.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban mediante la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véanse, por ejemplo, Morimoto *et al.*, J. Biochem. Biophys. Method. 24:107-117 (1992); y Brennan *et al.*, Science 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos ahora pueden producirse directamente mediante células huésped recombinantes, por ejemplo, usando ácidos nucleicos que codifican para anticuerpos anti-C1q de la presente divulgación. Todos y cada uno de los fragmentos Fab, Fv y scFv de anticuerpo pueden expresarse en, y secretarse a partir de, *E. coli*, permitiendo de ese modo la producción directa de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo anti-C1q también pueden aislarse a partir de las bibliotecas de fagos de anticuerpos tal como se comentó anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente a partir de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, Bio/Technology 10:163-167 (1992)). Según otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ pueden aislarse directamente a partir de un cultivo de células huésped recombinantes. La producción de fragmentos de anticuerpo Fab y F(ab')₂ con mayores semividas *in vivo* se describe en la patente estadounidense n.º 5.869.046. En otras implementaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv). Véanse el documento WO 93/16185, la patente estadounidense n.º 5.571.894 y la patente estadounidense n.º 5.587.458. El anticuerpo anti-C1q, anti-C1r o el fragmento de anticuerpo anti-C1q también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, tal como se describe en la patente estadounidense 5.641.870. Tales fragmentos de anticuerpo lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

(6) Anticuerpos biespecíficos y poliespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos (AcBs) son anticuerpos que presentan especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes, incluyendo aquellos en la misma u otra proteína (por ejemplo, una o más proteínas C1q de la presente divulgación). Alternativamente, una parte de un AcBs puede presentar un brazo para unirse al antígeno C1q diana y otra puede combinarse con un brazo que se une a una segunda proteína. Tales anticuerpos pueden derivarse de anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

Los métodos para preparar anticuerpos biespecíficos se conocen en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas presentan especificidades diferentes. Millstein *et al.*, Nature, 305:537-539 (1983). Debido a la selección aleatoria de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una posible mezcla de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales sólo una presenta la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa y los rendimientos del producto son bajos. Se dan a conocer procedimientos similares en el documento WO 93/08829 y en Traunecker *et al.*, EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

Según un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión puede ser con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte

de las regiones bisagra, C_H2 y C_H3. En algunas implementaciones, la primera región constante de cadena pesada (C_H1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera está presente en al menos una de las fusiones. Se insertan ADN que codifican para las fusiones de cadenas pesadas de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina en vectores de expresión independientes y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad para ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en implementaciones cuando razones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en razones iguales da como resultado altos rendimientos o cuando las razones no tienen ninguna importancia particular.

En algunas implementaciones de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos por una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se halló que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado a partir de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo la mitad de las moléculas biespecíficas proporciona un modo fácil de separación. Este enfoque se da a conocer en el documento WO 94/04690. Para más detalles de la generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology* 121: 210 (1986).

Según otro enfoque descrito en el documento WO 96/27011 o la patente estadounidense n.º 5.731.168, la superficie de contacto entre un par de moléculas de anticuerpo puede modificarse por ingeniería para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan a partir del cultivo celular recombinante. La superficie de contacto puede comprender al menos una parte de la región C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácido pequeñas de la superficie de contacto de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de un tamaño idéntico o similar a la(s) cadenas(s) lateral(es) grande(s) en la superficie de contacto de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando las cadenas laterales de aminoácido grandes por unas más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero con respecto a otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

En la bibliografía se han descrito técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse usando unión química. Brennan *et al.*, *Science* 229:81 (1985) describen un procedimiento en el que los anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol arsenito de sodio para estabilizar los dítilos vecinos y prevenir la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten entonces en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte entonces en el derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Los fragmentos Fab' pueden recuperarse directamente a partir de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.* 175: 217-225 (1992) describen la producción de moléculas de anticuerpo biespecífico F(ab')₂ completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó por separado a partir de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado pudo unirse a células que sobreexpresan el receptor ErbB2 y a células T humanas normales, así como desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumores de mama humanos.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo bivalentes directamente a partir de cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido heterodímeros bivalentes usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de cremalleras de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Se redujeron los homodímeros de anticuerpo en la región bisagra para formar monómeros y luego volvieron a oxidarse para formar los heterodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpos" descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos/bivalentes. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) mediante un ligador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando de ese modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha notificado otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos/bivalentes mediante el uso de dímeros de Fv de cadena sencilla (sFv). Véase Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

También se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos triespecíficos. Tutt *et al.*, *J. Immunol.* 147:60 (1991).

Los anticuerpos biespecíficos ejemplificativos pueden unirse a dos antígenos diferentes. En algunas implementaciones, un anticuerpo biespecífico se une a un primer antígeno, C1q, y a un segundo antígeno que facilita el transporte a través de la barrera hematoencefálica. En la técnica se conocen numerosos antígenos que facilitan el transporte a través de la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, Gabathuler R., Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases, Neurobiol. Dis. 37 (2010) 48-57). Tales segundos antígenos incluyen, sin limitación, receptor de transferrina (TR), receptor de insulina (HIR), receptor de factor de crecimiento similar a la insulina (IGFR), proteínas relacionadas con el receptor de lipoproteínas de baja densidad 1 y 2 (LPR-1 y 2), receptor de toxina diftérica, incluyendo CRM197 (un mutante no tóxico de la toxina diftérica), anticuerpos de un solo dominio de llama tales como TMEM 30(A) (flipasa), dominios de transducción de proteínas tales como TAT, Syn-B o penetratina, poliarginina o en general péptidos cargados positivamente y péptidos de angiopep tales como ANG1005 (véase, por ejemplo, Gabathuler, 2010).

(7) Anticuerpos multivalentes

Un multivalente anticuerpo puede internalizarse (y/o catabolizarse) más rápido que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos anti-C1q de la presente divulgación o fragmentos de anticuerpo de los mismos pueden ser anticuerpos multivalentes (que son distintos de la clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que pueden producirse fácilmente mediante la expresión recombinante de un ácido nucleico que codifica para las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. En algunas implementaciones, el dominio de dimerización comprende una región Fc o una región bisagra. En esta situación, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno amino-terminales con respecto a la región Fc. En algunas implementaciones, el anticuerpo multivalente en el presente documento contiene de tres a aproximadamente ocho, y en algunas implementaciones cuatro, sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente contiene al menos una cadena polipeptídica (y en algunas implementaciones dos cadenas polipeptídicas), en el que la(s) cadena(s) polipeptídica(s) comprende(n) dos o más dominios variables. Por ejemplo, la(s) cadena(s) polipeptídica(s) puede(n) comprender VD1-(X1)n-VD2-(X2)n-Fc, donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido y n es 0 ó 1. De manera similar, la(s) cadena(s) polipeptídica(s) puede(n) comprender la cadena V_H-C_{H1}-ligador flexible-V_H-C_{H1}-región Fc; o la cadena V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}-región Fc. El anticuerpo multivalente en el presente documento puede comprender además al menos dos (y en algunas implementaciones cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente en el presente documento puede comprender, por ejemplo, desde aproximadamente dos hasta aproximadamente ocho polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de cadena ligera contemplados en este caso comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, comprenden además un dominio C_L.

(8) Anticuerpos heteroconjugados

Los anticuerpos heteroconjugados también están dentro del alcance de la presente divulgación. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos por dos anticuerpos unidos covalentemente (por ejemplo, anticuerpos anti-C1q de la presente divulgación o fragmentos de anticuerpo de los mismos). Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse con avidina y el otro con biotina. Tales anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas, patente estadounidense n.º 4.676.980, y se han usado para tratar la infección por VIH. Publicaciones internacionales n.ºs WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 0308936. Se contempla que los anticuerpos pueden prepararse *in vitro* usando métodos conocidos en la química de proteínas sintéticas, incluyendo los que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o mediante la formación de un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y 4-mercaptobutirimidato de metilo y los dados a conocer, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 4.676.980. Los anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse usando cualquier método de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados se conocen bien en la técnica y se dan a conocer en la patente estadounidense n.º 4.676.980, junto con varias técnicas de reticulación.

(9) Modificación por ingeniería de funciones efectoras

También puede ser deseable modificar un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación para modificar la función efectora y/o para aumentar la semivida sérica del anticuerpo. Por ejemplo, el sitio de unión al receptor de Fc en la región constante puede modificarse o mutarse para eliminar o reducir la afinidad de unión a determinados receptores de Fc, tales como FcγRI, FcγRII y/o FcγRIII. En algunas implementaciones, la función efectora se altera mediante la eliminación de la N-glicosilación de la región Fc (por ejemplo, en el dominio C_{H2} de IgG) del anticuerpo. En algunas implementaciones, la función efectora se altera mediante la modificación de regiones tales como 233-236, 297 y/o 327-331 de IgG humana tal como se describe en el documento PCT WO 99/58572 y Armour *et al.*, Molecular Immunology 40: 585-593 (2003); Reddy *et al.*, J. Immunology 164:1925-1933 (2000).

La región constante de los anticuerpos anti-complemento descritos en el presente documento también puede modificarse para alterar la activación del complemento. Por ejemplo, la activación del complemento de anticuerpos IgG tras la unión del componente C1 del complemento puede reducirse mediante la mutación de los residuos de aminoácido en la región constante en un motivo de unión a C1 (por ejemplo, motivo de unión a C1q). Se ha notificado que la mutación con Ala para cada uno de D270, K322, P329, P331 de IgG1 humana redujo significativamente la capacidad del anticuerpo para unirse a C1q y activar el complemento. Para IgG2b murina, el motivo de unión a C1q constituye los residuos E318, K320 y K322. Idusogie *et al.* (2000) J. Immunology 164:4178-4184; Duncan *et al.* (1988) Nature 322: 738-740. Como se cree que el motivo de unión a C1s E318, K320 y K322 identificados para IgG2b murina es común para otros isotipos de anticuerpo (Duncan *et al.* (1988) Nature 322:738-740), puede eliminarse la actividad de unión a C1q para IgG2b reemplazando uno cualquiera de los tres residuos especificados por un residuo que tenga una funcionalidad inapropiada en su cadena lateral. No es necesario reemplazar los residuos iónicos sólo por Ala para eliminar la unión a C1q. También es posible usar otros residuos no iónicos sustituidos con alquilo, tales como Gly, Ile, Leu o Val, o residuos apolares aromáticos, tales como Phe, Tyr, Trp y Pro, en lugar de uno cualquiera de los tres residuos con el fin de eliminar la unión a C1q. Además, también es posible usar residuos no iónicos polares, tales como Ser, Thr, Cys y Met, en lugar de los residuos 320 y 322, pero no 318, con el fin de eliminar la actividad de unión a C1s. Además, la eliminación de modificaciones de hidratos de carbono de la región Fc necesarias para la unión al complemento puede prevenir la activación del complemento. La glicosilación de una asparagina conservada (Asn 297) en el dominio C_H2 de las cadenas pesadas de IgG es esencial para las funciones efectoras del anticuerpo (Jefferis *et al.* (1998) Immunol Rev 163:59-76). La modificación del glicano de Fc altera la conformación de IgG y reduce la afinidad de Fc por la unión de la proteína del complemento C1q y el receptor de células efectoras FcR (Alhom *et al.* (2008) PLoS ONE 2008;3:e1413). La completa eliminación del glicano de Fc elimina la CDC y la ADCC. Puede realizarse desglicosilación usando enzimas glicosidasa, por ejemplo, endoglicosidasa S (EndoS), una enzima de 108 kDa codificada por el gen endoS de *Streptococcus pyogenes* que digiere selectivamente glicanos unidos a asparagina en la cadena pesada de todas las subclases de IgG, sin acción sobre otras clases de inmunoglobulina u otras glicoproteínas (Collin *et al.* (2001) EMBO J 2001;20:3046-3055).

Para aumentar la semivida sérica del anticuerpo, puede incorporarse un epítipo de unión al receptor de rescate en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) tal como se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense 5.739.277. Tal como se usa en el presente documento, el término "*epítipo de unión al receptor de rescate*" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄) que es responsable de aumentar la semivida sérica *in vivo* de la molécula de IgG.

(10) Otras modificaciones de secuencias de aminoácidos

También se contemplan modificaciones de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos anti-C1q de la presente divulgación, o fragmentos de anticuerpo de los mismos. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo. Las variantes de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo se preparan mediante la introducción de cambios nucleotídicos apropiados en el ácido nucleico que codifica para los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo o mediante la síntesis de péptidos. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, delecciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de delección, inserción y sustitución se realiza para llegar al constructo final, siempre que el constructo final presente las características deseadas (es decir, la capacidad para unirse a o interactuar físicamente con una proteína C1q de la presente divulgación). Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos posteriores a la traducción del anticuerpo, tal como cambiar el número o la posición de los sitios de glicosilación.

Un método útil para la identificación de determinados residuos o determinadas regiones del anticuerpo anti-C1q que son ubicaciones preferidas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de barrido mediante alanina" tal como se describe por Cunningham y Wells en Science, 244:1081-1085 (1989). En este caso, se identifica un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se reemplaza por un aminoácido neutro o cargado negativamente (lo más preferiblemente alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con el antígeno diana. Esas ubicaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan entonces mediante la introducción de variantes adicionales u otras en, o para, los sitios de sustitución. Por tanto, aunque el sitio para la introducción de una variación de secuencia de aminoácidos es predeterminado, no es necesario que la naturaleza de la mutación por sí misma sea predeterminada. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se lleva a cabo mutagénesis de barrido mediante alanina o al azar en el codón o la región diana y se criban las variantes de anticuerpo expresadas para determinar la actividad deseada.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino-("N")-terminales y/o carboxilo-("C")-terminales que varían en cuanto a longitud desde un residuo hasta polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuencia de residuos de aminoácido individuales o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo metionilo N-terminal o el anticuerpo fusionado con un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión con el extremo N-terminal o C-terminal del anticuerpo a una enzima o a un polipéptido que aumenta la semivida sérica del anticuerpo.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácido. Estas variantes tienen al menos un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo reemplazado por un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis por sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan las alteraciones de FR. Las sustituciones conservadoras se muestran en la tabla A a continuación bajo el encabezado de "sustituciones preferidas". Si tales sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces pueden introducirse más cambios sustanciales, denominados "sustituciones ejemplificativas" en la tabla A, o tal como se describe adicionalmente a continuación en referencia a las clases de aminoácidos, y cribarse los productos.

TABLA A: Sustituciones de aminoácidos

Residuo original	Sustituciones ejemplificativas	Sustituciones preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp; lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gin	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

Se logran modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo mediante la selección de sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la estructura principal polipeptídica en el área de la sustitución, por ejemplo, como conformación de lámina o hélice, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos que se producen de manera natural se dividen en grupos basándose en propiedades de cadena lateral comunes:

(1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;

(2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr;

(3) ácidos: asp, glu;

(4) básicos: asn, gin, his, lys, arg;

(5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y

(6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservadoras implican intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

Cualquier residuo de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo también puede sustituirse, generalmente por serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir la reticulación aberrante. A la inversa, puede(n) añadirse un(os) enlace(s) de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fv).

En algunas implementaciones, la variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo anti-C1q humanizado o humano). Generalmente, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo parental a partir del cual se generan. Un modo conveniente para generar tales variantes de sustitución implica maduración por afinidad usando presentación en fago. Brevemente, se mutan varios sitios de región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Las variantes de anticuerpo así generadas se presentan de manera monovalente desde partículas de fago filamentosas como fusiones con el producto del gen III de M13 empaquetado dentro de cada partícula. Las variantes sometidas a presentación en fago se criban entonces para determinar su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) tal como se da a conocer en el presente documento. Con el fin de identificar sitios de región hipervariable candidatos para la modificación, puede realizarse mutagénesis de barrido mediante alanina para identificar residuos de región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión al antígeno. Alternativa o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno (por ejemplo, una proteína C1q de la presente divulgación). Tales residuos de contacto y los residuos vecinos son candidatos para la sustitución según las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez generadas tales variantes, el panel de variantes se somete a cribado tal como se describe en el presente documento y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes pueden seleccionarse para su desarrollo adicional.

Otro tipo de variante de aminoácido del anticuerpo altera el patrón de glicosilación original del anticuerpo. Por alterar quiere decirse delecionar uno o más restos de hidrato de carbono encontrados en el anticuerpo y/o añadir uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo.

La glicosilación de anticuerpos normalmente está o bien unida a N o bien unida a O. Unida a N se refiere a la unión del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un posible sitio de glicosilación. Glicosilación unida a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, lo más habitualmente serina o treonina, aunque también puede usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se logra convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de manera que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glicosilación unida a N). La alteración también puede realizarse mediante la adición de, o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina en la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación unida a O).

Las moléculas de ácido nucleico que codifican para variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-IgE se preparan mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, aislamiento a partir de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos que se producen de manera natural) o preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis por PCR y mutagénesis en casete de una variante preparada anteriormente o una versión no variante de los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación) o fragmentos de anticuerpo.

(11) Otras modificaciones de anticuerpos

Los anticuerpos anti-C1q de la presente divulgación, o fragmentos de anticuerpo de los mismos, pueden modificarse adicionalmente para contener restos no proteicos adicionales que se conocen en la técnica y están disponibles fácilmente. En algunas implementaciones, los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Los ejemplos no limitativos de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (o bien homopolímeros o bien copolímeros al azar) y dextrano o poli(N-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de polipropilenglicol, copolímeros de poli(óxido de propileno/óxido de etileno), polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), poli(alcohol vinílico), y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede tener cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si se une más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o el tipo de polímeros usados para la derivatización pueden determinarse basándose en consideraciones incluyendo, pero sin limitarse a, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que va a mejorarse, si el derivado de anticuerpo se usará en una terapia en condiciones definidas, etc. Tales técnicas y otras formulaciones adecuadas se dan a conocer en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20^a ed., Alfonso Gennaro, Ed., Philadelphia College of Pharmacy and Science (2000).

Ácidos nucleicos, vectores y células huésped

Los anticuerpos anti-C1q de la presente divulgación pueden producirse usando métodos y composiciones recombinantes, por ejemplo, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 4.816.567. En algunas implementaciones, se proporcionan ácidos nucleicos aislados que tienen una secuencia de nucleótidos que codifica para cualquiera de los anticuerpos anti-C1q de la presente divulgación. Tales ácidos nucleicos pueden codificar para una secuencia de aminoácidos que contiene V_L y/o una secuencia de aminoácidos que contiene V_H del anticuerpo anti-C1q (por ejemplo, las cadenas ligera y/o pesada del anticuerpo). En algunas implementaciones, se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que contienen tales ácidos nucleicos. En algunas implementaciones, también se proporciona una célula huésped que contiene tal ácido nucleico. En algunas implementaciones, la célula huésped contiene (por ejemplo, se ha transducido con): (1) un vector que contiene un ácido nucleico que codifica para una secuencia de aminoácidos que contiene V_L del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que contiene V_H del anticuerpo, o (2) un primer vector que contiene un ácido nucleico que codifica para una secuencia de aminoácidos que contiene V_L del anticuerpo y un segundo vector que contiene un ácido nucleico que codifica para una secuencia de aminoácidos que contiene V_H del anticuerpo. En algunas implementaciones, la célula huésped es eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfóide (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp20).

Se proporcionan métodos de preparación de un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación. En algunas implementaciones, el método incluye cultivar una célula huésped de la presente divulgación que contiene un ácido nucleico que codifica para el anticuerpo anti-C1q en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo. En algunas implementaciones, el anticuerpo se recupera posteriormente a partir de la célula huésped (o medio de cultivo de células huésped). Véase también el ejemplo 1.

Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación, se aísla un ácido nucleico que codifica para el anticuerpo anti-C1q y se inserta en uno o más vectores para la clonación y/o la expresión adicionales en una célula huésped. Tal ácido nucleico puede aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que pueden unirse específicamente a genes que codifican para las cadenas pesada y ligera del anticuerpo).

Los vectores adecuados que contienen una secuencia de ácido nucleico que codifica para cualquiera de los anticuerpos anti-C1q de la presente divulgación, o fragmentos de los mismos y polipéptidos (incluyendo anticuerpos), descritos en el presente documento incluyen, sin limitación, vectores de clonación y vectores de expresión. Pueden construirse vectores de clonación adecuados según técnicas convencionales, o pueden seleccionarse de un gran número de vectores de clonación disponibles en la técnica. Aunque el vector de clonación seleccionado puede variar según la célula huésped que pretende usarse, los vectores de clonación útiles generalmente tienen la capacidad de autorreplicarse, pueden presentar una única diana para una endonucleasa de restricción particular y/o pueden portar genes para un marcador que pueden usarse en la selección de clones que contienen el vector. Los ejemplos adecuados 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 de fago y vectores lanzadera tales como pSA3 y pAT28. Estos y muchos otros vectores de clonación están disponibles de proveedores comerciales tales como BioRad, Strategene e Invitrogen.

Los vectores de expresión generalmente son constructos polinucleotídicos replicables que contienen un ácido nucleico de la presente divulgación. El vector de expresión puede replicarse en las células huésped o bien como episomas o bien como una parte solidaria del ADN cromosómico. Los vectores de expresión adecuados incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, vectores virales, incluyendo adenovirus, virus adenoasociados, retrovirus, cósmidos y vector(es) de expresión dado(s) a conocer en la publicación PCT n.º WO 87/04462. Los componentes del vector pueden incluir generalmente, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal; un origen de replicación; uno o más genes marcadores; elementos de control de la transcripción adecuados (tales como promotores, potenciadores y terminador). Para la expresión (es decir, traducción), también se requieren habitualmente uno o más elementos de control de la traducción, tales como sitios de unión al ribosoma, sitios de inicio de la traducción y codones de parada.

Los vectores que contienen los ácidos nucleicos de interés pueden introducirse en la célula huésped mediante cualquiera de varios medios apropiados, incluyendo electroporación; transfección empleando cloruro de calcio, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAE-dextrano u otras sustancias; bombardeo de microproyectiles; lipofección; e infección (por ejemplo, donde el vector es un agente infeccioso tal como virus de la vacuna). La elección de introducir los vectores o polinucleótidos a menudo dependerá de las características de la célula huésped. En algunas implementaciones, el vector contiene un ácido nucleico que contiene una o más secuencias de aminoácidos que codifican para un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación.

Las células huésped adecuadas para la clonación o expresión de vectores que codifican para anticuerpos incluyen células procariotas o eucariotas. Por ejemplo, los anticuerpos anti-C1q de la presente divulgación pueden producirse en bacterias, en particular cuando no son necesarias ni función efectora de Fc ni glicosilación. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias (por ejemplo, patentes estadounidenses n.ºs 5.648.237,

5.789.199 y 5.840.523; y Charlton, *Methods in Molecular Biology*, vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), páginas 245-254, que describen la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*). Después de la expresión, el anticuerpo puede aislarse a partir de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y puede purificarse adicionalmente.

Además de procariotas, los microorganismos eucariotas, tales como levaduras u hongos filamentosos, también son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican para anticuerpos, incluyendo cepas de levaduras y hongos cuyas rutas de glicosilación se han "humanizado", dando como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glicosilación parcial o totalmente humano (por ejemplo, Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004); y Li *et al.*, *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006)).

Las células huésped adecuadas para la expresión de anticuerpos glicosilados también pueden derivarse de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas e insectos. Se han identificado numerosas cepas baculovirales que pueden usarse junto con células de insectos, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. También pueden utilizarse cultivos de células de plantas como huéspedes (por ejemplo, patentes estadounidenses n.ºs 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429, que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

También pueden usarse células de vertebrados como huéspedes. Por ejemplo, pueden ser útiles líneas celulares de mamíferos que se adaptan para crecer en suspensión. Otros ejemplos de líneas de células huésped de mamíferos útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); la línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 tal como se describe, por ejemplo, en Graham *et al.*, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK); células de Sertoli de ratón (células TM4 tal como se describe, por ejemplo, en Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma cervical humano (HELA); células de riñón canino (MDCK); células de hígado de rata Buffalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); tumor mamario de ratón (MMT 060562); células TRI, tal como se describe, por ejemplo, en Mather *et al.*, *Annals N. Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); células MRC-5; y células FS4. Otras líneas de células huésped de mamíferos útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO DHFR- (Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); y líneas celulares de mieloma tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas de células huésped de mamíferos adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), páginas 255-268 (2003).

Composiciones farmacéuticas

Los anticuerpos anti-C1q de la presente divulgación pueden incorporarse en una variedad de formulaciones para uso terapéutico (por ejemplo, mediante administración) o en la fabricación de un medicamento (por ejemplo, para tratar o prevenir una enfermedad neurodegenerativa o una enfermedad autoinmunitaria) combinando los anticuerpos con portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables apropiados, y pueden formularse en preparaciones en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas. Los ejemplos de tales formulaciones incluyen, sin limitación, comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, disoluciones, supositorios, inyecciones, inhalatorios, geles, microesferas y aerosoles. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir, en función de la formulación deseada, portadores o diluyentes no tóxicos farmacéuticamente aceptables, que son vehículos habitualmente usados para formular composiciones farmacéuticas para su administración a animales o seres humanos. El diluyente se selecciona para no afectar a la actividad biológica de la combinación. Los ejemplos de tales diluyentes incluyen, sin limitación, agua destilada, agua tamponada, solución salina fisiológica, PBS, disolución de Ringer, disolución de dextrosa y disolución de Hank. Una formulación o composición farmacéutica de la presente divulgación puede incluir además otros portadores, adyuvantes o estabilizadores, excipientes y similares no tóxicos, no terapéuticos y no inmunogénicos. Las composiciones también pueden incluir sustancias adicionales para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales agentes tampón y de ajuste del pH, agente de ajuste de la toxicidad, agentes humectantes y detergentes.

Una composición farmacéutica de la presente divulgación también puede incluir cualquiera de una variedad de agentes estabilizantes tales como, por ejemplo, un antioxidante. Cuando la composición farmacéutica incluye un polipéptido, el polipéptido puede complejarse con diversos compuestos bien conocidos que potencian la estabilidad *in vivo* del polipéptido, o potencian de otro modo sus propiedades farmacológicas (por ejemplo, aumentar la semivida del polipéptido, reducen su toxicidad y potencian la solubilidad o la captación). Los ejemplos de tales modificaciones o agentes complejantes incluyen, sin limitación, sulfato, gluconato, citrato y fosfato. Los polipéptidos de una composición también pueden complejarse con moléculas que potencian sus atributos *in vivo*. Tales moléculas incluyen, sin limitación, hidratos de carbono, poliaminas, aminoácidos, otros péptidos, iones (por ejemplo, sodio, potasio, calcio, magnesio, manganeso) y lípidos.

Pueden encontrarse ejemplos adicionales de formulaciones que son adecuadas para diversos tipos de administración en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Filadelfia, PA, 17ª ed. (1985). Para una breve revisión de métodos para la administración de fármacos, véase Langer, *Science* 249:1527-1533

(1990).

Para administración oral, el principio activo puede administrarse en formas de dosificación sólidas, tales como cápsulas, comprimidos y polvos, o en formas de dosificación líquidas, tales como elixires, jarabes y suspensiones. El/los componente(s) activo(s) puede(n) encapsularse en cápsulas de gelatina junto con principios inactivos y portadores en polvo, tales como glucosa, lactosa, sacarosa, manitol, almidón, celulosa o derivados de celulosa, estearato de magnesio, ácido esteárico, sacarina de sodio, talco, carbonato de magnesio. Ejemplos de principios inactivos adicionales que pueden añadirse para proporcionar características deseables de color, sabor, estabilidad, capacidad tamponante, dispersión u otras características deseables conocidas son óxido de hierro rojo, gel de sílice, laurilsulfato de sodio, dióxido de titanio y tinta blanca comestible. Pueden usarse diluyentes similares para preparar comprimidos fabricados mediante compresión. Tanto los comprimidos como las cápsulas pueden fabricarse como productos de liberación sostenida para proporcionar una liberación continua del medicamento a lo largo de un periodo de horas. Los comprimidos fabricados mediante compresión pueden recubrirse con azúcar o recubrirse con película para enmascarar cualquier sabor desagradable y proteger al comprimido de la atmósfera, o recubrirse entéricamente para la disgregación selectiva en el tracto gastrointestinal. Las formas de dosificación líquidas para administración oral pueden contener agentes colorantes y aromatizantes para aumentar la aceptación por parte del paciente.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen disoluciones para inyección estériles isotónicas acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizadores, agentes espesantes, estabilizadores y conservantes.

Los componentes usados para formular las composiciones farmacéuticas son preferiblemente de alta pureza y están sustancialmente libres de contaminantes potencialmente perjudiciales (por ejemplo, al menos de calidad de alimento nacional (NF), generalmente al menos de calidad analítica y más normalmente al menos de calidad farmacéutica). Además, las composiciones destinadas al uso *in vivo* son habitualmente estériles. En la medida en que un compuesto dado debe sintetizarse antes de su uso, normalmente el producto resultante está sustancialmente libre de cualquier agente potencialmente tóxico, particularmente cualquier endotoxina, que pueda estar presente durante el procedimiento de síntesis o purificación. Las composiciones para administración parental también son estériles, son sustancialmente isotónicas y se preparan en condiciones de BPF.

Las formulaciones pueden optimizarse para su retención y estabilización en el cerebro o el sistema nervioso central. Cuando el agente se administra al compartimento craneal, es deseable que el agente quede retenido en el compartimento y no difunda o atraviese de otro modo la barrera hematoencefálica. Las técnicas de estabilización incluyen reticulación, multimerización o unión a grupos tales como polietilenglicol, poliácridamida, portadores proteicos neutros, etc., con el fin de lograr un aumento del peso molecular.

Otras estrategias para aumentar la retención incluyen el atrapamiento del anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación, en un implante biodegradable o bioerosionable. La tasa de liberación del agente terapéuticamente activo se controla mediante la tasa de transporte a través de la matriz polimérica y la biodegradación del implante. El transporte del fármaco a través de la barrera polimérica también se verá afectado por la solubilidad del compuesto, la hidrofilia del polímero, el grado de reticulación del polímero, la expansión del polímero tras la absorción de agua para hacer que la barrera polimérica sea más permeable al fármaco, la geometría del implante, y similares. Los implantes tienen dimensiones que corresponden con el tamaño y la forma de la región seleccionada como sitio de implantación. Los implantes pueden ser partículas, láminas, 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, que tienen el agente activo distribuido homogéneamente a través de la matriz polimérica, o estar encapsulados, donde la matriz polimérica encapsula un depósito de agente activo. La selección de la composición polimérica que va a emplearse variará según el sitio de administración, el periodo de tratamiento deseado, la tolerancia del paciente, la naturaleza de la enfermedad que va a tratarse, y similares. Las características de los polímeros incluirán biodegradabilidad en el sitio de implantación, compatibilidad con el agente de interés, facilidad de encapsulación, una semivida en el entorno fisiológico.

Composiciones poliméricas biodegradables que pueden emplearse pueden ser ésteres o éteres orgánicos, que cuando se degradan dan como resultado productos de degradación fisiológicamente aceptables, incluyendo los monómeros. Pueden encontrar uso anhídridos, amidas, ortoésteres o similares, por sí mismo o en combinación con otros monómeros. Los polímeros serán polímeros de condensación. Los polímeros pueden ser reticulados o no reticulados. Son de particular interés los polímeros de ácidos carboxílicos hidroxialifáticos, ya sean homopolímeros o copolímeros, y los polisacáridos. Entre los poliésteres de interés se incluyen polímeros de ácido D-láctico, ácido L-láctico, ácido láctico racémico, ácido glicólico, policaprolactona, y combinaciones de los mismos. Mediante el empleo de L-lactato o D-lactato, se logra un polímero que se biodegrada lentamente, mientras que la degradación se potencia sustancialmente con el racemato. Los copolímeros de ácido glicólico y láctico son de particular interés,

donde la tasa de biodegradación se controla por la razón de ácido glicólico con respecto a láctico. El copolímero degradado más rápidamente tiene cantidades aproximadamente iguales de ácido glicólico y láctico, donde cualquier homopolímero es más resistente a la degradación. La razón de ácido glicólico con respecto a ácido láctico también afectará a la fragilidad del implante, donde es deseable un implante más flexible para geometrías más grandes.

Entre los polisacáridos de interés se encuentran el alginato de calcio y las celulosas funcionalizadas, particularmente ésteres de carboximetilcelulosa caracterizados por ser insolubles en agua, tener un peso molecular de aproximadamente 5 kD a 500 kD, etc. También pueden emplearse hidrogeles biodegradables en los implantes de la presente divulgación. Los hidrogeles son normalmente un material copolimérico caracterizado por la capacidad de embeber un líquido. Se describen hidrogeles biodegradables ejemplificativos que pueden emplearse en Heller en:

Hydrogels in Medicine and Pharmacy, N. A. Peppes ed., vol. III, CRC Press, Boca Ratón, Fla., 1987, págs. 137-149.

Dosificaciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación que contienen un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación pueden usarse (por ejemplo, administrarse a un individuo que necesita tratamiento con un anticuerpo anti-C1q, tal como un individuo humano) según métodos conocidos, tales como administración intravenosa como bolo o mediante infusión continua a lo largo de un periodo de tiempo, por las vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, intracraneal, intraespinal, subcutánea, intraarticular, intrasínovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación.

Las dosificaciones y la concentración de fármaco deseada de las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden variar en función del uso particular previsto. La determinación de la dosificación o la vía de administración apropiada se encuentra dentro de la habilidad de un experto habitual. Los experimentos con animales proporcionan una guía fiable para la determinación de las dosis eficaces para la terapia en seres humanos. El escalado entre especies de las dosis eficaces puede realizarse siguiendo los principios descritos en Mordenti, J. y Chappell, W. "The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics", en *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi *et al.*, Eds, Pergamon Press, Nueva York 1989, páginas 42-46.

Para la administración *in vivo* de cualquiera de los anticuerpos anti-C1q de la presente divulgación, las cantidades de dosificación normales pueden variar desde aproximadamente 10 ng/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg del peso corporal de un individuo o más al día, dependiendo de la vía de administración. En algunas implementaciones, la cantidad de dosis es de aproximadamente 1 mg/kg/día a 10 mg/kg/día. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o más, en función de la gravedad de la enfermedad, el trastorno o la afección que va a tratarse, el tratamiento se mantiene hasta lograr una supresión deseada de los síntomas.

Una pauta posológica ejemplificativa puede incluir administrar una dosis inicial de un anticuerpo anti-C1q de aproximadamente 2 mg/kg, seguido a una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 1 mg/kg cada dos semanas. Pueden ser útiles otras pautas posológicas, en función del patrón de disminución farmacocinética que desee lograr el médico. Por ejemplo, en el presente documento se contempla la dosificación a un individuo desde una hasta veintiuna veces a la semana. En determinadas implementaciones, puede usarse la dosificación que oscila entre aproximadamente 3 µg/kg y aproximadamente 2 mg/kg (tal como aproximadamente 3 µg/kg, aproximadamente 10 µg/kg, aproximadamente 30 µg/kg, aproximadamente 100 µg/kg, aproximadamente 300 µg/kg, aproximadamente 1 mg/kg o aproximadamente 2 mg/kg). En determinadas implementaciones, la frecuencia de dosificación es de tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, una vez cada dos días, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas, una vez cada seis semanas, una vez cada siete semanas, una vez cada ocho semanas, una vez cada nueve semanas, una vez cada diez semanas, o una vez al mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, o más. El progreso de la terapia se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales. La pauta posológica, que incluye el anticuerpo anti-C1q administrado, puede variar a lo largo del tiempo independientemente de la dosis usada.

Las dosificaciones para un anticuerpo anti-C1q particular pueden determinarse empíricamente en individuos a los que se les han proporcionado una o más administraciones del anticuerpo anti-C1q. A los individuos se les proporcionan dosis crecientes de un anticuerpo anti-C1q. Para evaluar la eficacia de un anticuerpo anti-C1q, puede monitorizarse cualquier síntoma clínico de un trastorno neurodegenerativo, un trastorno inflamatorio o un trastorno autoinmunitario.

La administración de un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación puede ser continua o intermitente, dependiendo de, por ejemplo, el estado fisiológico del receptor, si el propósito de la administración es terapéutico o profiláctico y otros factores conocidos por los médicos expertos. La administración de un anticuerpo anti-C1q puede ser esencialmente continua a lo largo de un periodo de tiempo preseleccionado o puede ser en una serie de dosis espaciadas.

En la bibliografía se proporciona una guía sobre dosificaciones y métodos de administración particulares; véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 4.657.760; 5.206.344; ó 5.225.212. Se encuentra dentro del alcance de la presente divulgación que formulaciones diferentes serán eficaces para tratamientos diferentes y trastornos diferentes, y que la administración destinada a tratar un órgano o tejido específico puede necesitar la administración

de una manera diferente con respecto a la de otro órgano o tejido. Además, las dosificaciones pueden administrarse mediante una o más administraciones independientes o mediante infusión continua. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o más, en función de la afección, el tratamiento es sostenido hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas posológicas. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

Usos terapéuticos

La presente divulgación proporciona anticuerpos anti-C1q, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que pueden unirse a y neutralizar una actividad biológica de C1q. Estos anticuerpos anti-C1q son útiles para prevenir, reducir el riesgo de o tratar una variedad de enfermedades asociadas con la activación del complemento, incluyendo, sin limitación, trastornos neurodegenerativos, trastornos inflamatorios y trastornos autoinmunitarios. Por consiguiente, tal como se da a conocer en el presente documento, los anticuerpos anti-C1q de la presente divulgación pueden usarse para tratar, prevenir o reducir el riesgo de una enfermedad asociada con la activación del complemento, incluyendo, sin limitación, trastornos neurodegenerativos, trastornos inflamatorios y trastornos autoinmunitarios, en un individuo. En algunas implementaciones, el individuo padece una enfermedad de este tipo. En algunas implementaciones, el individuo es un ser humano.

Los trastornos neurodegenerativos que pueden tratarse con los anticuerpos anti-C1q de esta divulgación incluyen trastornos asociados con la pérdida de conexiones nerviosas o sinapsis, incluyendo pérdida de sinapsis dependiente de CF1. Tales trastornos pueden incluir, sin limitación, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, glaucoma, distrofia miotónica, síndrome de Down, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington. En algunos trastornos neurodegenerativos, la pérdida de sinapsis depende del receptor del complemento 3 (CR3)/C3 o del receptor del complemento CR1. En algunos trastornos neurodegenerativos, la pérdida de sinapsis está asociada con la poda sináptica dependiente de la actividad patológica. En algunos trastornos, las sinapsis son fagocitadas por las microglías. Por consiguiente, los anticuerpos anti-C1q de la presente divulgación pueden usarse para tratar, prevenir o mejorar uno o más síntomas de un trastorno neurodegenerativo de la presente divulgación. En algunas implementaciones, la presente divulgación proporciona métodos de tratamiento, prevención o mejora de uno o más síntomas en individuos que padecen un trastorno neurodegenerativo de la presente divulgación mediante la administración de un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación para, por ejemplo, inhibir la interacción entre C1q y un autoanticuerpo, tal como un autoanticuerpo anti-gangliósido, la interacción de C1q y C1r y/o la interacción de C1q y C1s.

Las enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias que pueden tratarse con los anticuerpos anti-C1q de esta divulgación incluyen, sin limitación, artritis reumatoide (AR), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), lesión tisular remota después de isquemia y reperusión, activación del complemento durante cirugía de circulación extracorpórea, dermatomiositis, pénfigo, nefritis lúpica y glomerulonefritis y vasculitis resultantes, circulación extracorpórea, disfunción endotelial coronaria inducida por cardioplejia, glomerulonefritis membranoproliferativa de tipo II, nefropatía por IgA, insuficiencia renal aguda, crioglobulinemia, síndrome antifosfolípido, enfermedades degenerativas maculares, tales como degeneración macular asociada a la edad (DMAE), neovascularización coroidea (NVC), uveítis, retinopatía diabética y otras retinopatías asociadas a isquemia, endoftalmitis y otras enfermedades neovasculares intraoculares, tales como edema macular diabético, miopía patológica, enfermedad de von Hippel-Lindau, histoplasmosis del ojo, neuromielitis óptica (NMO), oclusión de la vena central retiniana (OVCR), neovascularización corneal, neovascularización retiniana, así como alotrasplante, rechazo hiperagudo, hemodiálisis, síndrome de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma y neumonía por aspiración. En algunas implementaciones, la enfermedad autoinmunitaria puede incluir, además, sin limitación, síndrome de Guillain-Barré, miastenia grave, diabetes mellitus de tipo 1, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Addison, celiaquía, enfermedad de Crohn, anemia perniciosa, pénfigo vulgar, vitíligo, anemias hemolíticas autoinmunitarias, síndromes paraneoplásicos, una enfermedad por vasculitis, polimialgia reumática, arteritis temporal y granulomatosis de Wegener.

En las enfermedades autoinmunitarias, tales como neuromielitis óptica (NMO), los autoanticuerpos activan el sistema del complemento. En pacientes con NMO, la ruta clásica del complemento se desencadena por la unión de un autoanticuerpo, tal como un autoanticuerpo dirigido a AQP4, a su autoantígeno, AQP4. De ese modo, AQP4 activa la ruta clásica de activación del complemento. En la primera etapa de este proceso de activación, el factor del complemento C1q se une al inmunocomplejo autoanticuerpo-autoantígeno. Los autoanticuerpos pueden incluir anticuerpos que se producen de manera natural, tales como anticuerpos séricos de pacientes con NMO (habitualmente denominados NMO-IgG) o anticuerpos monoclonales, tales como rAb-53.

Por consiguiente, los anticuerpos anti-C1q de la presente divulgación pueden usarse para tratar, prevenir o mejorar uno o más síntomas de una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria de la presente divulgación. En algunas implementaciones, la presente divulgación proporciona métodos de tratamiento, prevención o mejora de uno o más síntomas en individuos que padecen una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria de la presente divulgación mediante la administración de un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación para, por ejemplo, inhibir la interacción entre C1q y un autoanticuerpo, tal como un autoanticuerpo anti-gangliósido, la interacción de C1q y C1r y/o la interacción de C1q y C1s.

Las enfermedades metabólicas que pueden tratarse con los anticuerpos anti-C1q incluyen, sin limitación, diabetes, tal como diabetes de tipo II, y obesidad. Los modelos *in vitro* e *in vivo* de trastornos metabólicos que pueden usarse para las pruebas de anticuerpos anti-C1q se conocen bien en la técnica. Por consiguiente, los anticuerpos anti-C1q de la presente divulgación pueden usarse para tratar, prevenir o mejorar uno o más síntomas de una enfermedad metabólica de la presente divulgación. En algunas implementaciones, la presente divulgación proporciona métodos de tratamiento, prevención o mejora de uno o más síntomas en individuos que padecen una enfermedad metabólica de la presente divulgación mediante la administración de un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación para, por ejemplo, inhibir la interacción entre C1q y un autoanticuerpo, tal como un autoanticuerpo anti-gangliósido, la interacción de C1q y C1r y/o la interacción de C1q y C1s.

Tratamientos de combinación

Los anticuerpos de la presente divulgación pueden usarse, sin limitación, en combinación con cualquier tratamiento adicional para trastornos neurodegenerativos, trastornos inflamatorios y/o trastornos autoinmunitarios.

En algunas implementaciones, un anticuerpo anti-C1q de esta divulgación en cantidades terapéuticamente eficaces en combinación con un segundo anticuerpo anti-factor del complemento (por ejemplo, un anticuerpo anti-factor del complemento neutralizante), tal como un anticuerpo anti-C1s o anti-C1r, o un segundo anticuerpo anti-C1q. En algunas implementaciones, un anticuerpo anti-C1q de esta divulgación se administra en cantidades terapéuticamente eficaces con un segundo y un tercer anticuerpo anti-factor del complemento neutralizante, tal como un segundo anticuerpo anti-C1q, un anticuerpo anti-C1s y/o un anticuerpo anti-C1r.

En algunas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q de esta divulgación se administran en combinación con un inhibidor de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Los inhibidores de la ADCC pueden incluir, sin limitación, receptores inhibidores de células NK solubles tales como los receptores similares a Ig de células citolíticas (KIR), que reconocen HLA-A, HLA-B o HLA-C, y heterodímeros CD94/NKG2A de lectina de tipo C, que reconocen HLA-E (véanse, por ejemplo, López-Botet M., T. Bellón, M. Llano, F. Navarro, P. García y M. de Miguel. (2000), Paired inhibitory and triggering NK cell receptors for HLA class I molecules. *Hum. Immunol.* 61: 7-17; Lanier L.L. (1998) Follow the leader: NK cell receptors for classical and nonclassical MHC class I. *Cell* 92: 705-707), y cadmio (véase, por ejemplo, *Immunopharmacology* 1990; volumen 20, páginas 73-8).

En algunas implementaciones, los anticuerpos de esta divulgación se administran en combinación con un inhibidor de la ruta alternativa de activación del complemento. Tales inhibidores pueden incluir, sin limitación, anticuerpos bloqueantes del factor B, anticuerpos bloqueantes del factor D, formas solubles, unidas a la membrana, etiquetas o de proteína de fusión de CD59, DAF, CR1, CR2, Crry o péptidos similares a comstatina que bloquean la escisión de C3, antagonistas de C3aR no peptídicos tales como SB 290157, factor de veneno de cobra o inhibidores inespecíficos del complemento tales como mesilato de nafamostat (FUTHAN; FUT-175), aprotinina, ácido monocarboxílico de K-76 (MX-1) y heparina (véase, por ejemplo, T.E. Mollnes y M. Kirschfink, *Molecular Immunology* 43 (2006) 107-121). En algunas implementaciones, los anticuerpos de esta divulgación se administran en combinación con un inhibidor de la interacción entre el autoanticuerpo y su autoantígeno. Tales inhibidores pueden incluir formas solubles purificadas del autoantígeno o miméticos de antígeno tales como mimotopos derivados de péptidos o ARN, incluyendo mimotopos del antígeno AQP4. Alternativamente, tales inhibidores pueden incluir agentes bloqueantes que reconocen el autoantígeno y previenen la unión del autoanticuerpo sin desencadenar la ruta clásica del complemento. Tales agentes bloqueantes pueden incluir, por ejemplo, anticuerpos o aptámeros de ARN de unión a autoantígeno que carecen de sitio de unión a C1q funcionales en sus dominios Fc (por ejemplo, fragmentos Fab o anticuerpos modificados por ingeniería de otro modo para no unirse a C1q).

Usos diagnósticos

Los anticuerpos de esta divulgación, o fragmentos funcionales de los mismos, también tienen utilidad diagnóstica. Por tanto, esta divulgación proporciona métodos de uso de los anticuerpos de esta divulgación, o fragmentos funcionales de los mismos, con propósitos de diagnóstico, tales como la detección de C1q en un individuo o en muestras tisulares derivadas de un individuo. En algunas implementaciones, el individuo es un ser humano. En algunas implementaciones, el individuo es un paciente humano que padece un trastorno neurodegenerativo o una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria. En algunas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q de esta divulgación se usan para detectar sinapsis y pérdida de sinapsis. Por ejemplo, la pérdida de sinapsis puede medirse en un individuo que padece un trastorno neurodegenerativo tal como enfermedad de Alzheimer o glaucoma.

En algunas implementaciones, los métodos de diagnóstico implican las etapas de administrar un anticuerpo anti-C1q de esta divulgación, o un fragmento funcional del mismo, a un individuo y detectar el anticuerpo unido a una sinapsis del individuo. La unión del anticuerpo a las sinapsis puede cuantificarse, por ejemplo, mediante técnicas no invasivas tales como tomografía por emisiones de positrones (TEP), tomografía computarizada de rayos X, tomografía computarizada por emisión de fotón único (TCEFU), tomografía computarizada (TC) y tomografía axial computarizada (TAC).

En algunas implementaciones, los métodos de diagnóstico implican detectar las sinapsis en una muestra biológica, tal como una muestra de biopsia, un tejido o una célula. Un anticuerpo anti-C1q, o un fragmento funcional del mismo, se pone en contacto con la muestra biológica y se detecta el anticuerpo unido a sinapsis. El método de detección puede implicar la cuantificación del anticuerpo unido a sinapsis. La detección del anticuerpo en muestras biológicas puede producirse con cualquier método conocido en la técnica, incluyendo microscopía de inmunofluorescencia, inmunocitoquímica, inmunohistoquímica, ELISA, análisis por FACS o inmunoprecipitación.

La cuantificación de anticuerpos unidos a sinapsis proporciona una medida relativa del número de sinapsis presentes en el individuo. Normalmente, las sinapsis se cuantifican repetidamente a lo largo de un periodo de tiempo. La periodicidad exacta de la cuantificación de sinapsis depende de muchos factores, incluyendo la naturaleza de la enfermedad neurodegenerativa, el estadio de progresión de la enfermedad, las modalidades de tratamiento y muchos otros factores. Las mediciones repetidas habitualmente revelan una pérdida de sinapsis progresiva en individuos que padecen un trastorno neurodegenerativo. Alternativamente, los recuentos de sinapsis relativos pueden compararse en poblaciones de individuos enfermos e individuos de control sanos en un único punto de tiempo. En individuos enfermos que se someten a tratamiento, puede evaluarse la eficacia del tratamiento comparando las tasas de pérdida de sinapsis en los individuos tratados con las tasas de pérdida de sinapsis en un grupo de control. Los miembros del grupo de control o bien no han recibido ningún tratamiento o bien han recibido un tratamiento de control, tal como un control de placebo.

Kits

La presente divulgación también proporciona kits que contienen un anticuerpo de esta divulgación, o un fragmento funcional del mismo. Los kits de la divulgación incluyen uno o más recipientes que comprenden un anticuerpo anti-C1q purificado de esta divulgación. En algunas implementaciones, los kits incluyen además instrucciones para su uso según los métodos de esta divulgación. En algunas implementaciones, estas instrucciones comprenden una descripción de la administración del anticuerpo anti-C1q para tratar o diagnosticar una enfermedad asociada con la activación del complemento, incluyendo, sin limitación, un trastorno neurodegenerativo (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer), una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmunitaria y/o un trastorno metabólico, según cualquier método de esta divulgación. En algunas implementaciones, las instrucciones comprenden una descripción de cómo detectar C1q, por ejemplo, en un individuo, en una muestra tisular o en una célula. El kit puede comprender además una descripción para seleccionar un individuo adecuado para el tratamiento basándose en la identificación de si ese individuo padece la enfermedad y el estadio de la enfermedad.

Las instrucciones incluyen generalmente información sobre la dosificación, la pauta posológica y la vía de administración para el tratamiento previsto. Los recipientes pueden ser dosis unitarias, envases a granel (por ejemplo, envases de múltiples dosis) o subdosis unitarias. Las instrucciones suministradas en los kits de la presente divulgación son normalmente instrucciones escritas sobre una etiqueta o un prospecto (por ejemplo, una hoja de papel incluida en el kit), pero también son aceptables instrucciones legibles por máquina (por ejemplo, instrucciones portadas en un disco de almacenamiento magnético u óptico).

La etiqueta o el prospecto indica que la composición se usa para tratar, por ejemplo, una enfermedad neurodegenerativa. Las instrucciones pueden proporcionarse para poner en práctica cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

Los kits de esta divulgación se encuentran en un envase adecuado. Un envase adecuado incluye, pero no se limita a, viales, botes, frascos, envases flexibles (por ejemplo, bolsas de plástico o Mylar selladas), y similares. También se contemplan envases para su uso en combinación con un dispositivo específico, tal como un inhalador, un dispositivo de administración nasal (por ejemplo, un atomizador) o un dispositivo de infusión tal como una minibomba. Un kit puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón que puede perforarse mediante una aguja de inyección hipodérmica). El recipiente también puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón que puede perforarse mediante una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un inhibidor de la ruta clásica del complemento. El recipiente puede comprender además un segundo agente farmacéuticamente activo.

Los kits pueden proporcionar opcionalmente componentes adicionales tales como tampones e información interpretativa. Normalmente, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o un(os) prospecto(s) en o asociados con el recipiente.

La presente divulgación se entenderá más completamente mediante referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, no deben interpretarse como limitativos del alcance de la presente divulgación.

Ejemplos

Ejemplo 1: Producción de anticuerpos anti-C1q

- 5 El anticuerpo anti-C1q M1 fue generado por Antibody Solutions Inc. (Sunnyvale CA) mediante la inmunización de ratones con C1q inactivado con C1q de ser humano usando tecnologías convencionales de inmunización de ratones y cribado de hibridoma (Milstein, C (1999). Bioassays 21: 966-73; Mark Page, Robin Thorpe, The Protein Protocols Handbook 2002, editores: John M. Walquer, págs. 1111-1113).
- 10 Los anticuerpos anti-C1q 1C7, 2A1, 3A2 y 5A3 se generaron en ImmunoPrecise Ltd. (Victoria, BC, Canadá) mediante la inmunización de ratones con proteína C1q humana purificada a partir de plasma humano (Complement Technology Inc. Tyler Texas, n.º de cat. A-099). Brevemente, a ratonas BALB/c se les inyectaron por vía intraperitoneal 25 µg de proteína en adyuvante completo de Freund (CFA) el día 0 y se realizaron refuerzos con 25 µg de enzima C1q en adyuvante incompleto de Freund (IFA) los días 21, 42, 52 y un refuerzo intravenoso final el día 63. Cuatro días después del refuerzo final, se sacrificaron los ratones, se extirparon los bazo y se fusionaron los
- 15 esplenocitos con la línea celular de mieloma SP2/0. Las células fusionadas se hicieron crecer en medio semisólido selectivo de hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT) durante 10-12 días y los clones de hibridoma resultantes se transfirieron a placas de histocultivo de 96 pocillos y se hicieron crecer en medio HAT hasta que el título de anticuerpo fue alto. Se aislaron los sobrenadantes ricos en anticuerpos de los clones y se sometieron a prueba en un ensayo ELISA para determinar la reactividad con C1q. Los clones positivos se sometieron a isotipado y se cultivaron
- 20 durante 32 días (tras la selección en HAT) para identificar clones de expresión estable.

- Se depositó una línea celular de hibridoma que produce el anticuerpo anti-C1q M1 y denominada hibridoma de ratón C1q-M1 7788-1(M) 051613 en la ATCC el 06/06/2013 con el número de registro de la ATCC PTA-120399. Se demostró que M1 se unía específicamente a C1q de ser humano y de ratón y neutralizaba las funciones biológicas de C1q, tales como la hemólisis mediada por el complemento (véase, por ejemplo, el ejemplo 3).
- 25

Ejemplo 2: Los anticuerpos anti-C1q se unen específicamente a C1q

30 *Cribado mediante ELISA*

- Los anticuerpos anti-C1q 1C7, 2A1, 3A2 y 5A3 se cribaron para la unión a C1q usando protocolos de ELISA convencionales.
- 35 Brevemente, el día antes de realizar el ensayo, se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos a 0,2 µg/pocillo de antígeno de enzima C1q en 100 µl/pocillo de tampón de recubrimiento de carbonato, pH 9,6, durante la noche a 4 °C. Los pocillos de control se recubrieron con transferrina humana. A continuación, se bloquearon las placas con leche en polvo al 3 % en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, se sembraron en placas los sobrenadantes de histocultivo de hibridoma a 100 µl/pocillo durante 1 hora a 37 °C con
- 40 agitación. Se aplicó el anticuerpo secundario (anticuerpo de cabra anti-IgG/IgM(H+L) de ratón-HRP 1:10.000) a 100 µl/pocillo durante 1,5 horas a temperatura ambiente con agitación. Se añadió sustrato TMB a 50 µl/pocillo durante 5 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se detuvo la reacción con 50 µl/pocillo de HCl 1 M y se tomaron lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 450 nm.
- 45 Se sometieron a prueba cuatro sobrenadantes de hibridoma que contenían los anticuerpos anti-C1q 1C7, 2A1, 3A2 y 5A3 para determinar la unión a C1q de ser humano (figura 1). Mediante ELISA, los cuatro sobrenadantes mostraron unas intensas señales de unión en presencia de C1q de ser humano, mientras que sólo se observaron las señales de fondo en los pocillos de control que contenían transferrina humana. Este experimento demostró que los anticuerpos anti-C1q 1C7, 2A1, 3A2 y 5A3 se unen específicamente a C1q de ser humano.
- 50

Análisis cinéticos

- En primer lugar, se midieron las interacciones del anticuerpo anti-C1q M1 de longitud completa con proteínas C1q de ser humano y de ratón en un modo cinético y posteriormente se calcularon las constantes de disociación termodinámicas. Adicionalmente, se compararon los datos de unión de M1 con los datos correspondientes obtenidos usando el anticuerpo de referencia 4A4B11. 4A4B11 se describe en la patente estadounidense n.º 4.595.654. La línea celular de hibridoma productora de 4A4B11 está disponible de la ATCC (ATCC HB-8327TM).
- 55

- Se midieron las interacciones C1q-anticuerpo usando un sistema OCTET™ según protocolos convencionales y las instrucciones del fabricante. Brevemente, se inmovilizaron por separado proteínas C1q de ser humano y de ratón en un biosensor a tres concentraciones (3 nM, 1,0 nM y 0,33 nM). A continuación, se inyectó el anticuerpo anti-C1q M1 en el biosensor recubierto con C1q a una concentración de 2,0 µg/ml y se midieron las constantes de asociación (k_{on}) y las constantes de disociación (k_{off}) para los anticuerpos anti-C1q M1 y 4A4B11. Los datos se ajustaron mediante análisis de regresión no lineal y usando el software de análisis de datos Octet para dar lugar a la afinidad (K_D) y los parámetros cinéticos ($k_{on/off}$) para las interacciones de M1 y 4A4B11 con C1q de ser humano y de ratón,
- 60
- 65

respectivamente (véase la tabla B).

TABLA B: Análisis cinético de M1 y 4A4B11

Anticuerpo	Antígeno	K_D (M)	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)
M1	C1q de ser humano	$1,28 \cdot 10^{-11}$	$5,18 \cdot 10^6$	$6,31 \cdot 10^{-5}$
M1	C1q de ratón	$3,23 \cdot 10^{-11}$	$1,81 \cdot 10^6$	$5,84 \cdot 10^{-5}$
4A4B11	C1q de ser humano	$2,29 \cdot 10^{-11}$	$4,49 \cdot 10^6$	$1,03 \cdot 10^{-4}$
4A4B11	C1q de ratón	indetectable	indetectable	indetectable

En esta serie experimental, se demostró que el anticuerpo anti-C1q M1 se unía tanto a proteínas C1q tanto de ser humano como de ratón con afinidades muy altas ($K_D < 10^{-10}$ M). A modo de comparación, se halló que el anticuerpo de referencia 4A4B11 se unía a C1q de ser humano, mientras que la unión a C1q de ratón fue indetectable. Mientras que las afinidades de M1 y 4A4B11 para C1q de ser humano fueron del mismo orden de magnitud (es decir, en el intervalo picomolar de dos dígitos; $K_D \sim 10$ -30 pM), se determinó que la afinidad de M1 para C1q de ratón era aproximadamente cuatro órdenes de magnitud mayor ($K_D \sim 30$ pM) que la afinidad de 4A4B11 para C1q de ratón ($K_D \sim 40$ nM).

Los anticuerpos anti-C1q M1 y 4A4B11 no compiten por la unión a C1q

Se realizaron experimentos de bloqueo para determinar si los anticuerpos anti-C1q M1 y 4A4B11 se unen a epítomos iguales o solapantes de C1q de ser humano o si M1 y 4A4B11 se unen a epítomos de C1q independientes.

Para este fin, se recubrió un chip biosensor (BIAcore™) con M1 y posteriormente se puso en contacto con una combinación de C1q de ser humano y M1, una combinación de C1q de ser humano y 4A4B11 o C1q de ser humano solo. Se siguió la unión de C1q a M1 durante 10 min y posteriormente se siguió la disociación de los complejos M1-C1q durante 20 min. Se registraron las señales de unión relativas al final de los periodos de asociación y disociación. La tabla C muestra los resultados de estos experimentos.

TABLA C: Análisis de las interacciones simultáneas de M1 y 4A4B11 con C1q de ser humano

ID de Ac de sensor:	ID de antígeno:	ID de Ac en disolución:	Respuesta de asociación (nm) a los 600 s	Respuesta de disociación (nm) a los 1200 s
M1	hC1q	M1	-0,0119	-0,00945
M1	hC1q	4A4B11	0,8213	0,82139
M1	hC1q	Ninguno (sólo Ag)	0,4715	0,45137

Se halló que C1q solo se unió eficazmente al anticuerpo M1 inmovilizado en el chip biosensor. La incubación previa de C1q con anticuerpo M1 soluble impidió toda la unión del complejo M1-C1q resultante a M1 inmovilizado. En cambio, la incubación previa de C1q con 4A4B11 no impidió la interacción del complejo 4A4B11-C1q resultante con M1 inmovilizado. Las señales de unión relativas más grandes observadas en el experimento de unión que implica al complejo 4A4B11-C1q con respecto al experimento de unión que implica a C1q solo se deben al hecho de que las señales de unión relativas se correlacionan con el peso molecular de las parejas de unión solubles y que el complejo 4A4B11-C1q presenta un mayor peso molecular que C1q solo.

Estos resultados demuestran que 4A4B11 no compite con M1 por la unión a C1q. Por tanto, 4A4B11 y M1 pueden reconocer epítomos independientes en C1q.

Ejemplo 3: Los anticuerpos anti-C1q inhiben la hemólisis mediada por el complemento

Los anticuerpos anti-C1q se sometieron a prueba en ensayos hemolíticos (CH50) en ser humano y roedor para determinar su capacidad para neutralizar C1q y bloquear su activación de la cascada del complemento aguas abajo. Los ensayos de CH50 se llevaron a cabo esencialmente tal como se describe en Current Protocols in Immunology (1994), suplemento 9, unidad 13.1. Brevemente, se diluyeron 5 microlitros (μ l) de suero humano (Cedarlane, Burlington, NC), 0,625 μ l de suero de rata Wistar o 2,5 μ l de suero de ratón C57BL/6 hasta 50 μ l de tampón GVB (Cedarlane, Burlington, NC) y se añadieron a 50 μ l de los anticuerpos monoclonales (1 μ g) diluidos en tampón GVB. La mezcla anticuerpo:suero se incubó previamente durante 30 minutos sobre hielo y luego se añadió a 100 μ l de células EA (2×10^8 /ml) para ensayos en rata y ser humano y 4×10^7 /ml para ensayos en ratón. Las células EA se generaron exactamente tal como se especifica en Current Protocols usando sangre de oveja en disolución de Alsever (n.º de cat. de Cedarlane CL2581) y hemolisina (n.º de cat. de Cedarlane CL9000). Se incubó la mezcla de células EA, suero y anticuerpo durante 30 minutos a 37 °C y luego se colocó sobre hielo. A continuación, se

añadieron 1,2 ml de NaCl 0,15 M a la mezcla y se leyó la DO_{412} de la muestra en un espectrofotómetro para determinar la cantidad de lisis celular. Se determinó el porcentaje de inhibición de los anticuerpos de prueba con respecto a un anticuerpo IgG1 de ratón de control (Abcam, ab18447).

Se realizó un ensayo de CH50 modificado (también denominado ensayo de hemólisis de C1F) que proporcionó cantidades limitantes del complejo C1 a partir de suero humano para proporcionar una mayor sensibilidad para evaluar la actividad de C1 y la posible inhibición de C1. Brevemente, el ensayo se llevó a cabo tal como sigue. En primer lugar, se incubaron 3×10^7 glóbulos rojos (RBC) de oveja con anticuerpo anti-IgM de RBC de oveja para generar eritrocitos activados (células EA). Luego se incubaron las células EA con proteína C4b purificada para crear células EAC4b. Posteriormente se incubaron las células EAC4b con suero humano normal (NHS) diluido (1:1000-1:10000) que se incubó previamente con o sin anticuerpos anti-C1q y anti-IgG de ratón de control, para proporcionar una cantidad limitante de C1 de ser humano. A continuación, se incubaron las células EAC14 resultantes con proteína C2 humana purificada para generar células EAC14b2a. Finalmente, se añadió suero de cobaya en un tampón EDTA y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Se midió la lisis celular en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm.

En primer lugar, se sometieron a prueba cuatro anticuerpos de unión a C1q (1C7, 2A1, 3A2 y 5A3) en el ensayo de CH50 de ser humano a una única concentración (1 µg) (figura 2). Se halló que los cuatro anticuerpos inhibieron la hemólisis. El anticuerpo anti-C1q 1C7 inhibió la hemólisis en más del 90 %, 2A1 inhibió la hemólisis en más del 40 %, 3A2 inhibió la hemólisis en más del 60 % y 5A3 inhibió la hemólisis en más del 50 %.

A continuación, se sometieron a prueba los anticuerpos anti-C1q 1C7 y 3A2 en el ensayo de hemólisis de CH50 de ser humano en un formato de dosis-respuesta (figura 3). Se usó el anticuerpo anti-C1q 4A4B11 como referencia. Ambos anticuerpos 1C7 y 3A2 inhibieron la hemólisis de CH50 de manera dependiente de la dosis. Se requirieron aproximadamente 100 ng del anticuerpo 1C7 y aproximadamente 200 ng de 3A2 para inhibir el 50 % de la hemólisis observada (figura 3).

Se sometió a prueba el anticuerpo anti-C1q M1 para determinar su actividad neutralizante de C1q en ensayos de CH50 de ser humano, de ratón y de rata (figuras 4A-C). Las pruebas se llevaron a cabo en formatos de dosis-respuesta. Se usó el anticuerpo anti-C1q 4A4B11 como referencia. Se demostró que M1 neutralizó la actividad de C1q en ensayos de hemólisis de CH50 de ser humano, de ratón y de rata de manera dependiente de la dosis (figuras 4A-4C). En cambio, se halló que 4A4B11 neutralizó la actividad de C1q sólo en el ensayo de CH50 de ser humano, mientras que el anticuerpo de referencia fue inactivo en los ensayos de hemólisis de CH50 de ratón y de rata (hasta 2 µg). En los ensayos de hemólisis de CH50 de ser humano y de rata, M1 inhibió más del 90 % y hasta el 100 % de la hemólisis (figuras 4A y 4C); en el ensayo de ratón, M1 inhibió más del 50 % de la hemólisis (figura 4B). En el ensayo de CH50 de ser humano, se requirieron menos de 125 ng de M1 para lograr el 50 % de inhibición de hemólisis. En el ensayo de CH50 de ratón, se requirieron aproximadamente 500 ng de M1 para lograr el 50 % de inhibición de hemólisis. En el ensayo de CH50 de rata, se requirieron menos de 16 ng para lograr el 50 % de inhibición de hemólisis.

Ejemplo 4: Mapeo de epítomos para los anticuerpos 4A4B11 y M1

Con el fin de determinar la naturaleza del epítomo (es decir, lineal o conformacional), se evaluó la inhibición de la interacción entre la proteína C1q y los anticuerpos 4A4B11 (ANN-001) y M1 (ANN-005) mediante péptidos sin estructura generados mediante proteólisis del antígeno C1q. Si los péptidos generados mediante la proteólisis completa del antígeno pueden inhibir la unión del antígeno en el anticuerpo, la interacción no se basa en la conformación y el epítomo es lineal. Si los péptidos generados mediante la proteólisis completa del antígeno no pueden inhibir la unión del antígeno en los anticuerpos 4A4B11 y M1, la conformación es necesaria para la interacción. Basándose en los datos descritos en detalle a continuación, los péptidos sin estructura generados mediante la digestión de C1q nativa no compitieron con C1q intacta por la unión a los anticuerpos 4A4B11 (ANN-001) y M1 (ANN-005) (véase la figura 2), lo que sugiere que el epítomo de C1q para estos anticuerpos es un epítomo conformacional complejo.

Con el fin de determinar los residuos clave del epítomo de C1q conformacional que se une a ANN-001 y ANN-005 en el antígeno C1q con alta resolución, se incubaron los complejos anticuerpo/antígeno con agentes de reticulación deuterados y se sometieron a escisión proteolítica con múltiples enzimas. Después del enriquecimiento de los péptidos reticulados, se analizaron las muestras mediante espectrometría de masas de alta resolución (dispositivo de EM nLC-Orbitrap) y se analizaron los datos generados usando el software XQuest. El análisis descrito a continuación indica que el anticuerpo 4A4B11 (ANN-001) se une a un epítomo que incluye los aminoácidos S202 y K219 de C1qA de ser humano e Y225 de C1qC de ser humano y el anticuerpo M1 (ANN-005) se une a un epítomo que incluye el aminoácido K219 de C1qA de ser humano y S185 de C1qC de ser humano. Véase la alineación de secuencias de aminoácidos de C1qA y C1qC de ser humano y de ratón tal como se muestra a continuación.

Alineación de secuencias de aminoácidos de C1qA de ser humano y de ratón

MEGPRGWLVLCLVLAISLASMTEDLCRAPDGKKGEAGRPGRGRPGGLKGEQGEPEGAPGIR ser humano
 METSQGWLVLACVLTMTLVWTVAEDEVCRAPNGKDGAPGNPGRPGRPGLKGERGEPGAAGIR ratón
 ** .:**** ***:::*. *:***:*****:***.* *.*** *****:*****.***
 TGIQGLKGDQGEPPSGNPGKVGYPGPGSGLGARGIPGIKGTGKSPGNIKDQPRPAFSAI ser humano
 TGIRGFKGDPGESGPPGKPGNVGLPGPSGLGDSGPQGLKGVKGNPGNIRDQPRPAFSAI ratón
 :*. **.*.***:***:*** ***** * *:***.***.***:*****
 RRNPPMGGNVVIFDTVITNQEEPYQNHSGRFVCTVPGYYYFTFQVLSQWEICLSIVSSSR ser humano
 RQNPMTLGNVVIFDKVLTNQESPYQNHTGRFICAVPGFYFNFQVISKWDLCLFIKSSSG ratón
 *:*** *****.***:***.***:***:***:***.***:***:*** * ***
 GQVRRSLGFCDTTNKGFLQVVS⁵GGMVLQLQ¹⁰GDQVWVEK¹⁵DPKKGHIYQGSEADSVFSGFL ser humano
 GQPRDSL⁵SFSNTNNKGFLQVLA¹⁰GGTVLQLRRGDEVWIEK¹⁵DKPAKGRIYQGT²⁰EADSI²⁵FGFL ratón
 ** * **.*.:*.*****:.* *****:.*:***:***** **:*****:*****:*****

IFPSA ser humano (SEQ ID NO:1)

IFPSA ratón (SEQ ID NO:14)

Alineación de secuencias de aminoácidos de C1qC de ser humano y de ratón

MDVGPSSSLPHLGLKLLLLLLLLLP-LRGQANTGCYGI PGMPGLPGAPGKDG⁵YDGLPGPKGE ser humano
 MVVGPSCQPPCGLC⁵LLLLFLLALPLRSQASAGCYGI PGMPGMPGAPGKDG¹⁰HDGLQGPKGE ratón
 * ****. ** ** *****:*** **.*.:*****:*****:*** *****
 PGIPAIPIGIRGPKGQKGE⁵PGLPGHPGKNGPMGPPGMPGVPGPMGIPGEPGEEGRYKQKFQ ser humano
 PGIPAVPGTRGPKGQKGE⁵PGMPGHRGKNGPRGTSGLPGDPGPRGPPGEPGVEGRYKQKHQ ratón
 *****:*** *****:*** ***** * *:*** *** * ***** ***** *
 SVFTVTRQTHQPPAPNSLIRFNAVLTNPQGDYDTSTGKFTCKVPGLYYFVYHASHTANLC ser humano
 SVFTVTRQTTQYPEANALVRFNSVVTNPQGHYNPSTGKFTCEVPGLYYFVYYTSHTANLC ratón
 ***** * *.***:***:***:***.***:*****:*****:*****:*****
 VLLYRSGVKVVTFCGHTSKTNQVNSGGVLLRLQVGEEVWLAVNDY¹⁵DMVGIQGS²⁰DSVFSG ser humano
 VHLN¹⁵LN²⁰LARVASFCDHMFNSKQVSSGGVLLRLQRGDEVWLSVNDY²⁵NGMVGIEGSNSVFSG ratón
 * * . .:*.***.* :::***.***** *;****;**** .*****:***:*****

FLLFPD ser humano (SEQ ID NO:3)

FLLFPD ratón (SEQ ID NO:15)

1. Identificación de los complejos C1q/anticuerpo mediante espectrometría de masas

- 25 Los complejos C1q/anticuerpo se generaron mezclando disoluciones equimolares de antígeno C1q y anticuerpo (4 µM en 5 µl cada uno). Se mezcló 1 µl de la mezcla obtenida con 1 µl de una matriz compuesta por una matriz recristalizada de ácido sinapínico (10 mg/ml) en acetonitrilo/agua (1:1, v/v), TFA al 0,1 % (kit K200 MALDI). Después del mezclado, se aplicó en forma de puntos 1 µl de cada muestra sobre la placa de MALDI (SCOUT 384). Después

de la cristalización a temperatura ambiente, se introdujo la placa en el espectrómetro de masas MALDI y se analizó inmediatamente. El análisis se ha repetido por triplicado. La figura 5 muestra la presencia del antígeno, del anticuerpo y de los complejos antígeno/anticuerpo para C1q/4A4B11 (figura 5A) y C1q/M1 (figura 5B). Los picos están presentes a los pesos moleculares predichos de anticuerpo monomérico (~150 kDa) y monómero de C1q (~460 kDa) y hay presente un complejo anticuerpo:antígeno 1:1 a ~615 kDa.

2. Los péptidos de C1q sin estructura generados mediante proteólisis no compiten por la unión de C1q al anticuerpo

Para determinar si los complejos C1q/anticuerpo podían competir con los péptidos, se digirió el antígeno C1q con pepsina inmovilizada. Se mezclaron 25 µl del antígeno con una concentración de 10 µM con pepsina inmovilizada 5 µM y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después del tiempo de incubación, se centrifugó la muestra y se pipeteó el sobrenadante. La completitud de la proteólisis se controló mediante espectrometría de masas High-Mass MALDI en modo lineal. La proteólisis con pepsina se optimizó con el fin de obtener una gran cantidad de péptido en el intervalo de 1000-3500 Da. A continuación, se mezclaron 5 µl de los péptidos antígenos generados mediante proteólisis con 5 µl de ANN-001 o ANN-005 (8 µM) y se incubaron a 37 °C durante 6 horas. Después de la incubación de ANN-001 o ANN-005 con los péptidos antígenos C1q, se mezclaron 5 µl de la mezcla con 5 µl del antígeno C1q (4 µM) de modo que la mezcla final contenía 2 µM/2 µM/2,5 µM de antígeno C1q/4A4B11 o M1/péptidos antígenos C1q.

El análisis por MALDI-ToF-EM se realizó usando el módulo de interacción HM3 de CovalX con un láser de nitrógeno convencional y centrándose en diferentes intervalos de masas desde 0 hasta 2000 kDa. Para el análisis, se han aplicado los siguientes parámetros para el espectrómetro de masas: modo lineal y positivo; fuente de iones 1: 20 kV; fuente de iones 2: 17 kV; extracción de iones por pulso: 400 ns; para HM3: tensión de ganancia: 3,14 kV; tensión de aceleración: 20 kV.

Para calibrar el instrumento, se ha aplicado una calibración externa con agrupaciones de insulina, BSA e IgG. Para cada muestra, se analizaron 3 puntos (300 disparos láser por punto). El espectro presentado corresponde a la suma de 300 disparos láser. Los datos de EM se analizaron usando el software de análisis Complex Tracker versión 2.0 (CovalX Inc.).

Los resultados se muestran en la figura 6, y demuestran que los péptidos C1q no compiten con C1q intacta por la unión al anticuerpo monoclonal ANN-005 (M1).

3. Identificación de los epítomos conformacionales para la unión de C1q a ANN-001 y ANN-005

Usando reticulación química, espectrometría de masas High-Mass MALDI y espectrometría de masas nLC-Orbitrap, se caracterizó la superficie de contacto de interacción entre el antígeno C1Q y dos anticuerpos monoclonales, ANN-001 y ANN-005. Se mezclaron 5 µl del antígeno C1q de muestra (concentración de 4 µM) con 5 µl de ANN-001 (concentración de 4 µM) o ANN-005 (concentración de 4 µM) de muestra con el fin de obtener una mezcla anticuerpo/antígeno con una concentración final de 2 µM/2 µM. Se incubó la mezcla a 37 °C durante 180 minutos. En una primera etapa, se mezcló 1 mg del agente de reticulación suberato de disuccinimidilo H12 (DSS-H12) con 1 mg del agente de reticulación suberato de disuccinimidilo D12 (DSS-D12). Se mezclaron los 2 mg preparados con 1 ml de DMF con el fin de obtener una disolución 2 mg/ml de DSS H12/D12. Se mezclaron 10 µl de la mezcla anticuerpo/antígeno preparada previamente con 1 µl de la disolución de agente de reticulación d0/d12 preparada (2 mg/ml). Se incubó la disolución durante 180 minutos a temperatura ambiente con el fin de lograr la reacción de reticulación. Con el fin de facilitar la proteólisis, fue necesario reducir el enlace disulfuro presente en esta proteína. Se mezcló la muestra reticulada con 20 µl de bicarbonato de amonio (25 mM, pH 8,3). Después del mezclado, se añadieron 2,5 µl de DTT (500 mM) a la disolución. Luego se incubó la mezcla durante 1 hora a 55 °C. Después de la incubación, se añadieron 2,5 µl de yodoacetamida (1 M) antes de 1 hora de incubación a temperatura ambiente en una sala con oscuridad. Después de la incubación, se diluyó la disolución 1/5 mediante la adición de 120 µl del tampón usado para la proteólisis. Se mezclaron 145 µl de la muestra reticulada reducida/alquilada con 2 µl de tripsina (Sigma, T6567). Se incubó la mezcla proteolítica durante la noche a 37 °C. Para la proteólisis con α-quimotripsina, el tampón de proteólisis fue Tris-HCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 7,8. Se mezclaron los 145 µl del complejo reticulado reducido/alquilado con 2 µl de α-quimotripsina 200 µM y se incubaron durante la noche a 30 °C. Para este análisis, se usó un dispositivo nLC en combinación con espectrometría de masas Orbitrap. Se analizaron los péptidos de agente de reticulación usando los software Xquest versión 2.0 y Stavrox. Los péptidos identificados y los aminoácidos reticulados se indican en la tabla D a continuación.

TABLA D: Péptidos reticulados con C1q y residuos de contacto necesarios para la unión a ANN-001 y ANN-005

Digesto de proteasa	Péptido unido a X	Subunidad de C1q	Residuo de contacto	Anticuerpo
Tripsina	GLFQVVSGGMVLQLQQGDQVWVEK (SEQ ID NO:25, residuos 196-219 de SEQ ID NO:1)	C1qA	K219	ANN-001
Tripsina	FQVVSGGMVLQL (SEQ ID NO:26, residuos 198-209 de SEQ ID NO:1)	C1qA	S202	ANN-001
Quimotripsina	YDMVGIQGSDFVSGF (SEQ ID NO:21, residuos 225-240 de SEQ ID NO:3)	C1qC	Y225	ANN-001
Tripsina	GLFQVVSGGMVLQLQQGDQVWVEK (SEQ ID NO:25, residuos 196-219 de SEQ ID NO:1)	C1qA	K219	ANN-005
Quimotripsina	RSGVKVTF (SEQ ID NO:24, residuos 184-192 de SEQ ID NO:3)	C1qC	S185	ANN-005

4. Secuencias de dominios variables de cadena ligera y cadena pesada del anticuerpo M1

Usando técnicas convencionales, se determinaron las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos que codifican para el dominio variable de cadena ligera y el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo M1.

La secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo M1 es: DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSINKYLAWYQEKPQKTNKLLIYSGSTLQSGIPSRFSGSGSGTDFLTISLEP EDFAMYYCQQHNEYPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:4). Las regiones hipervariables (HVR) del dominio variable de cadena ligera se representan con texto en negrita y subrayado. En algunas implementaciones, HVR-L1 del dominio variable de cadena ligera de M1 tiene la secuencia RASKSINKYLA (SEQ ID NO:5), HVR-L2 del dominio variable de cadena ligera de M1 tiene la secuencia SGSTLQS (SEQ ID NO:6) y HVR-L3 del dominio variable de cadena ligera de M1 tiene la secuencia QQHNEYPLT (SEQ ID NO:7).

La secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo M1 es: QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKSSGYHFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGVIHPNSGSINYNEKFESKATLTVDKSS STAYMQLSSLTSEDSAVYYCAGERDSTEVLPM DYWGQGTSTVSS (SEQ ID NO:8). Las regiones hipervariables (HVR) del dominio variable de cadena pesada se representan con texto en negrita y subrayado. En algunas implementaciones, HVR-H1 del dominio variable de cadena pesada de M1 tiene la secuencia GYHFTSYWMH (SEQ ID NO:9), HVR-H2 del dominio variable de cadena pesada de M1 tiene la secuencia VIHPNSGSINYNEKFES (SEQ ID NO:10) y HVR-H3 del dominio variable de cadena pesada de M1 tiene la secuencia ERDSTEVLPM DY (SEQ ID NO:11).

Se determinó que la secuencia de ácido nucleico que codifica para el dominio variable de cadena ligera era:

GATGTCCAGATAACCCAGTCTCCATCTTATCTTGCTGCATCTCCTGGAGAAACCAT
 ACTATTAATTGCAGGGCAAGTAAGAGCATTAACAAATATTTAGCCTGGTATCAAGA
 GAAACCTGGGAAAACCTAATAAGCTTCTTATCTACTCTGGATCCACTTTGCAATCTGG
 AATTCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTTCACTCTCACCATCAG
 TAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGCAATGTATTACTGTCAACAACATAATGAATACCC
 GCTCACGTTCCGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA (SEQ ID NO:12).

Se determinó que la secuencia de ácido nucleico que codifica para el dominio variable de cadena pesada era:

CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAA
 GTTGTCCTGCAAGTCTTCTGGCTACCATTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAA
 GCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGTGATTCATCCTAATAGTGGTA
 GTATTAACCTACAATGAGAAGTTCGAGAGCAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCC
 TCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCGGCGGTCTA
 TTATTGTGCAGGAGAGAGAGATTCTACGGAGGTTCTCCCTATGGACTACTGGGGTCA
 AGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:13).

Depósito del material

Los siguientes materiales se han depositado según el Tratado de Budapest en la Colección Americana de Cultivos Tipo, Depósito de Patentes de la ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209, EE. UU. (ATCC):

5

ID de muestra	Isotipo	Fecha de depósito	N.º de registro de la ATCC
Hibridoma de ratón C1q-M1 7788-1(M) 051613 que produce anticuerpo anti-C1q M1	IgG1, kappa	06/06/2013	PTA-120399

10

La línea celular de hibridoma que produce el anticuerpo M1 (hibridoma de ratón C1q-M1 7788-1(M) 051613) se ha depositado en la ATCC en condiciones que garantizan que el acceso al cultivo estará disponible durante la pendencia de la solicitud de 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. Un depósito será reemplazado si el depósito se vuelve inviable durante ese periodo. El depósito está disponible según lo requieran las leyes de patentes extranjeras en países en los que se presenta homólogos de la presente solicitud, o su progenie.

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo anti-C1q aislado que comprende una cadena ligera que comprende un dominio variable de cadena ligera y una cadena pesada que comprende un dominio variable de cadena pesada, en el que:
 - (i) el dominio variable de cadena ligera comprende HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5, HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6 y HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7; y
 - (ii) el dominio variable de cadena pesada comprende HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9, HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10 y HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11.
2. Anticuerpo según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4.
3. Anticuerpo según cualquier reivindicación anterior, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8.
4. Anticuerpo según cualquier reivindicación anterior, que se ha modificado por ingeniería para aumentar la penetración en el cerebro.
5. Anticuerpo según cualquier reivindicación anterior, que es un anticuerpo biespecífico que reconoce un primer antígeno y un segundo antígeno.
6. Anticuerpo según la reivindicación 5, en el que el primer antígeno es una proteína C1q y el segundo antígeno es un antígeno que facilita el transporte a través de la barrera hematoencefálica.
7. Anticuerpo según la reivindicación 6, en el que el segundo antígeno se selecciona de receptor de transferrina (TR), receptor de insulina (HIR), receptor de factor de crecimiento similar a la insulina (IGFR), proteínas relacionadas con el receptor de lipoproteínas de baja densidad 1 y 2 (LPR-1 y 2), receptor de toxina diftérica, CRM197, un anticuerpo de un solo dominio de llama, TMEM 30(A), un dominio de transducción de proteínas, TAT, Syn-B, penetratina, un péptido de poliarginina, un péptido de angiopep y ANG1005.
8. Anticuerpo según cualquier reivindicación anterior, que es un fragmento Fab, F(ab')₂, Fab' o Fv de cadena sencilla.
9. Polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para el anticuerpo según cualquier reivindicación anterior.
10. Célula huésped aislada que comprende la secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 9.
11. Anticuerpo según una de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en medicina.
12. Anticuerpo para su uso según la reivindicación 11, en el que el uso en medicina es para tratar un trastorno neurodegenerativo, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmunitaria o un trastorno metabólico.
13. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo según una de las reivindicaciones 1 a 8 y un portador farmacéuticamente aceptable.
14. Anticuerpo para su uso según la reivindicación 12, en el que la enfermedad inflamatoria, la enfermedad autoinmunitaria o el trastorno metabólico se selecciona del grupo que consiste en diabetes, obesidad, artritis reumatoide (AR), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), lesión tisular remota después de isquemia y reperfusión, dermatomiositis, pénfigo, nefritis lúpica y glomerulonefritis y vasculitis resultantes, circulación extracorpórea, disfunción endotelial coronaria inducida por cardioplejia, glomerulonefritis membranoproliferativa de tipo II, nefropatía por IgA, insuficiencia renal aguda, crioglobulinemia, síndrome antifosfolípido, enfermedades degenerativas maculares, degeneración macular asociada a la edad (DMAE), neovascularización coroidea (NVC), uveítis, retinopatía diabética, retinopatía asociada a isquemia, endoftalmítis, enfermedad neovascular intraocular, edema macular diabético, miopía patológica, enfermedad de von Hippel-Lindau, histoplasmosis del ojo, neuromielitis óptica (NMO), oclusión de la vena central retiniana (OVCR), neovascularización corneal, neovascularización retiniana, rechazo hiperagudo, hemodiálisis, síndrome de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, neumonía por aspiración, miastenia grave, diabetes mellitus de tipo 1, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Addison, celiaquía, enfermedad de Crohn, anemia perniciosa, pénfigo vulgar, vitíligo, anemias hemolíticas

autoinmunitarias, síndromes paraneoplásicos, una enfermedad por vasculitis, polimialgia reumática, arteritis temporal y granulomatosis de Wegener.

- | | | |
|----|-----|---|
| 5 | 15. | Anticuerpo para su uso según la reivindicación 14, en el que la enfermedad inflamatoria, la enfermedad autoinmunitaria o el trastorno metabólico es degeneración macular asociada a la edad. |
| | 16. | Anticuerpo para su uso según la reivindicación 14, en el que la enfermedad inflamatoria, la enfermedad autoinmunitaria o el trastorno metabólico es nefritis lúpica. |
| 10 | 17. | Anticuerpo para su uso según la reivindicación 12, en el que la enfermedad es una enfermedad autoinmunitaria seleccionada del grupo que consiste en síndrome de Guillain-Barré, miastenia grave, diabetes mellitus de tipo 1, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Addison, celiaquía, enfermedad de Crohn, anemia perniciosa, pénfigo vulgar, vitíligo, anemias hemolíticas autoinmunitarias, síndromes paraneoplásicos, una enfermedad por vasculitis, polimialgia reumática, arteritis temporal y granulomatosis de Wegener. |
| 15 | 18. | Anticuerpo para su uso según la reivindicación 17, en el que la enfermedad autoinmunitaria es síndrome de Guillain-Barré. |
| 20 | 19. | Anticuerpo para su uso según la reivindicación 17, en el que la enfermedad autoinmunitaria es anemia hemolítica autoinmunitaria. |
| | 20. | Anticuerpo para su uso según la reivindicación 17, en el que la enfermedad autoinmunitaria es miastenia grave. |
| 25 | 21. | Anticuerpo para su uso según la reivindicación 12, en el que la enfermedad es un trastorno neurodegenerativo asociado con la pérdida de sinapsis o conexiones nerviosas. |
| 30 | 22. | Anticuerpo para su uso según la reivindicación 12, en el que el trastorno neurodegenerativo se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, glaucoma, distrofia miotónica, síndrome de Down, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington. |
| | 23. | Anticuerpo para su uso según la reivindicación 22, en el que el trastorno neurodegenerativo es enfermedad de Huntington. |
| 35 | 24. | Anticuerpo para su uso según la reivindicación 22, en el que el trastorno neurodegenerativo es esclerosis lateral amiotrófica. |

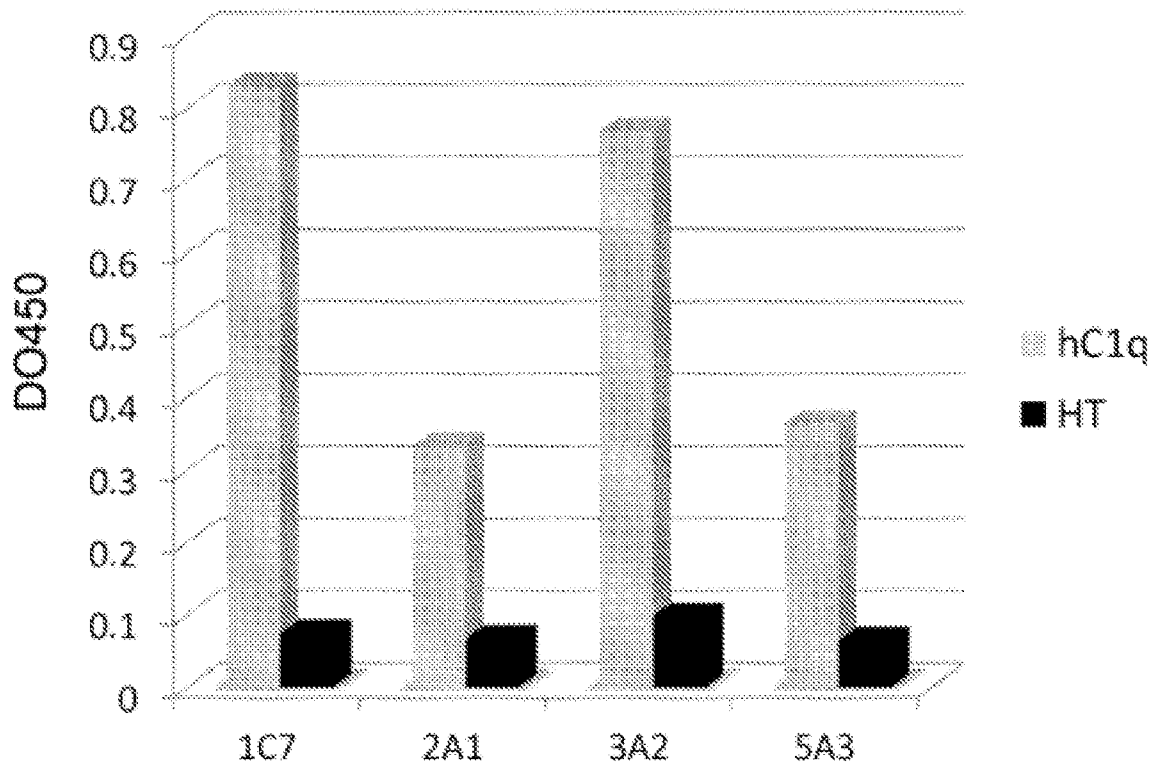


FIG. 1

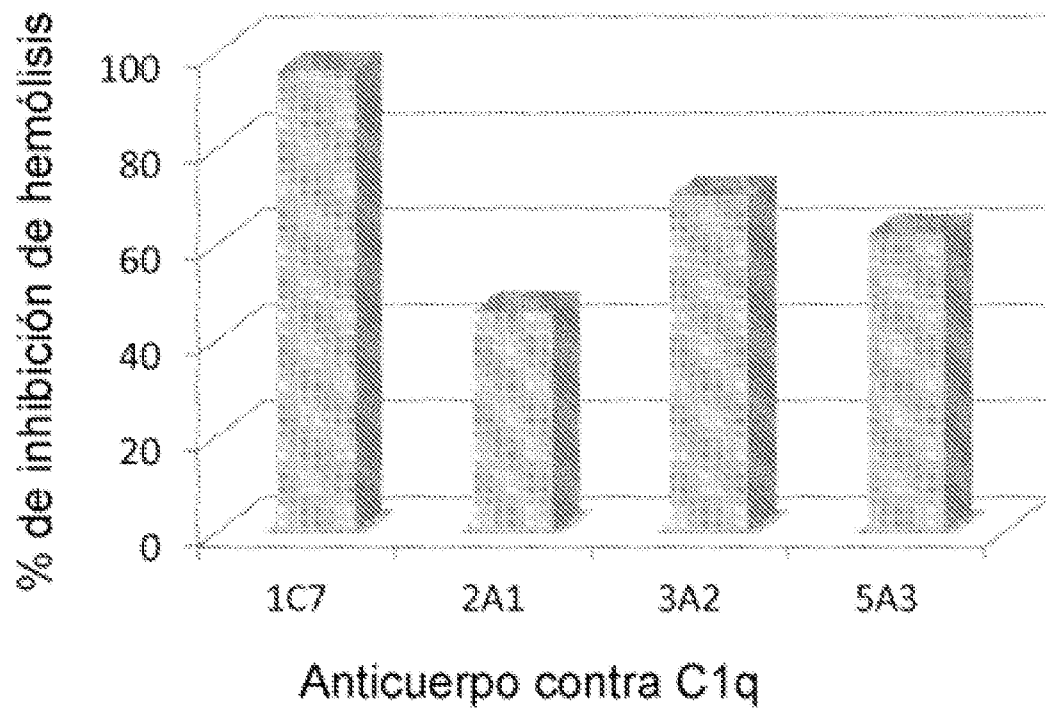


FIG. 2

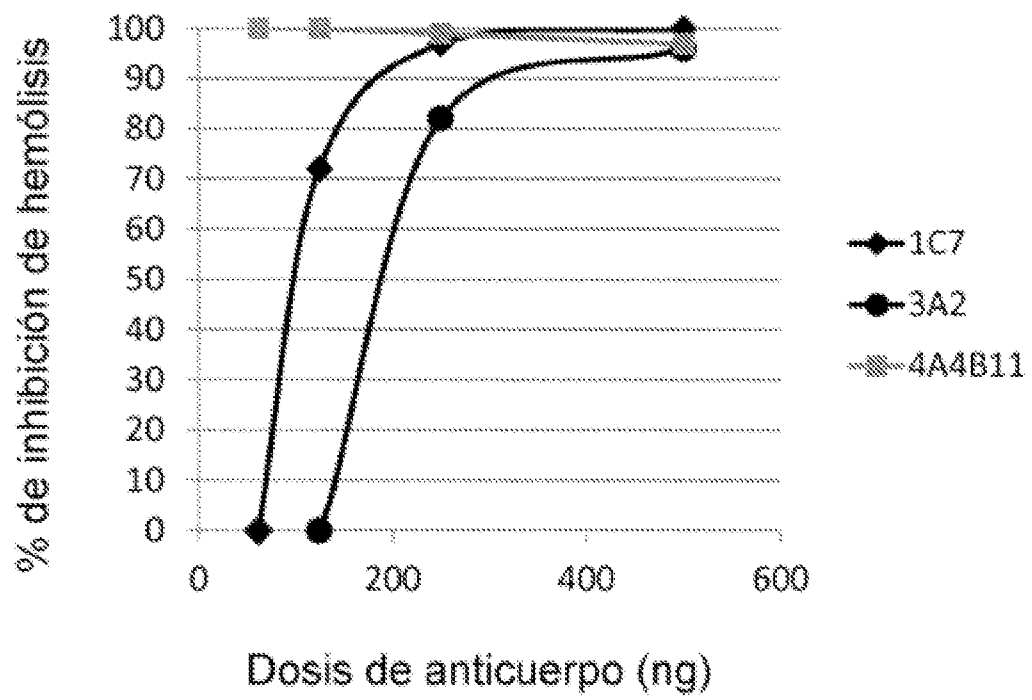


FIG. 3

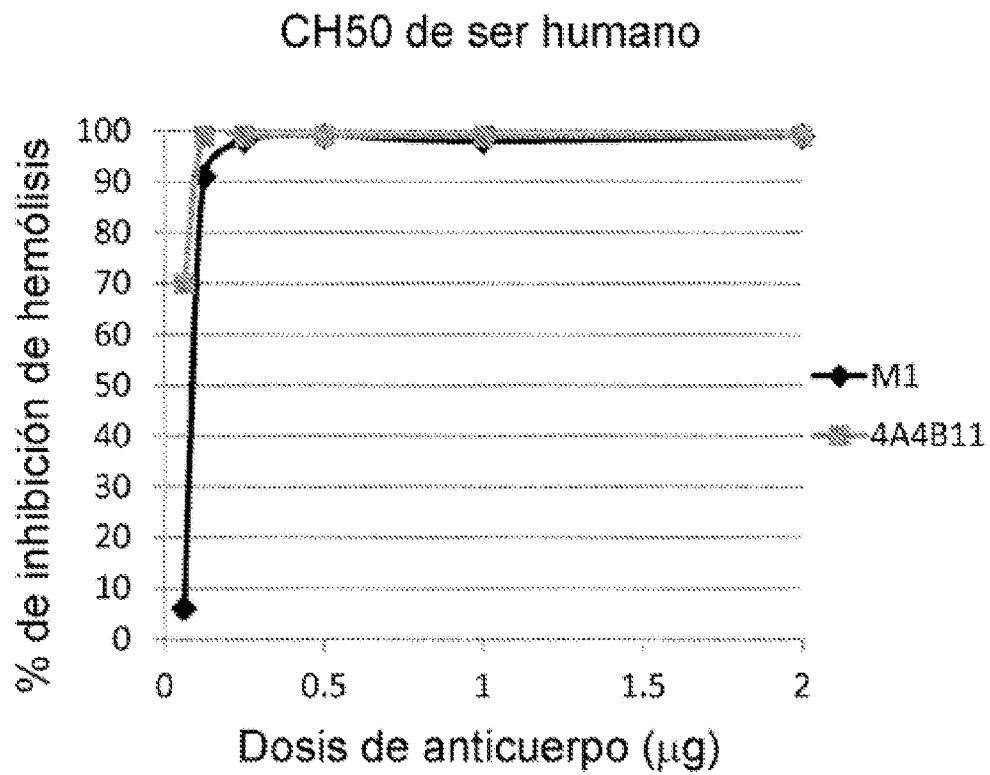


FIG. 4A

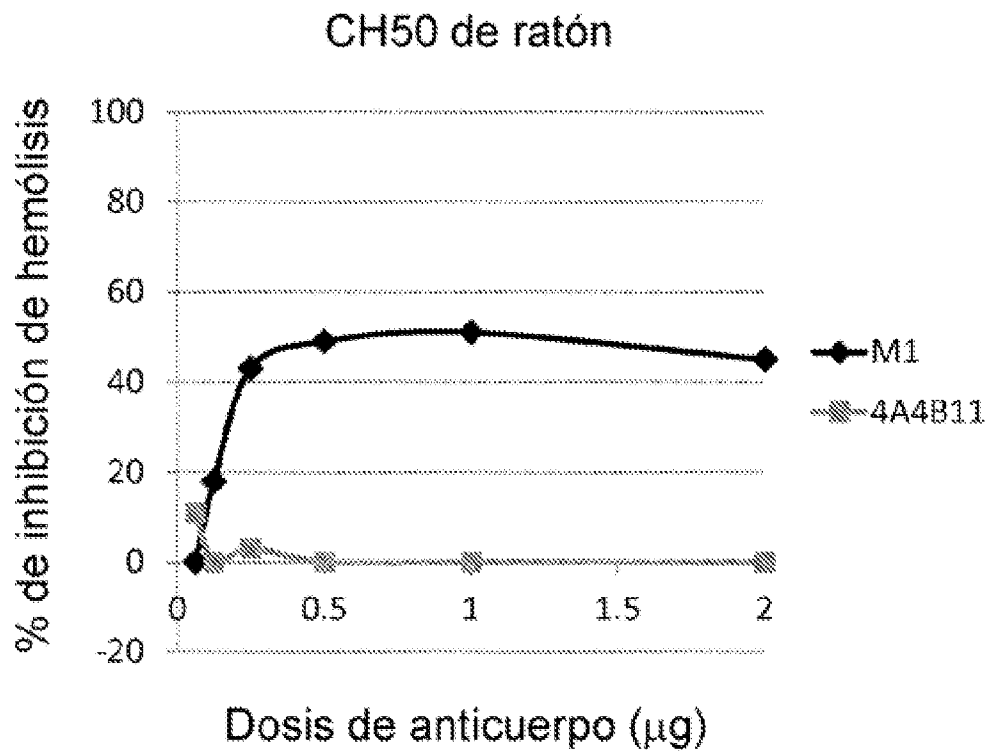
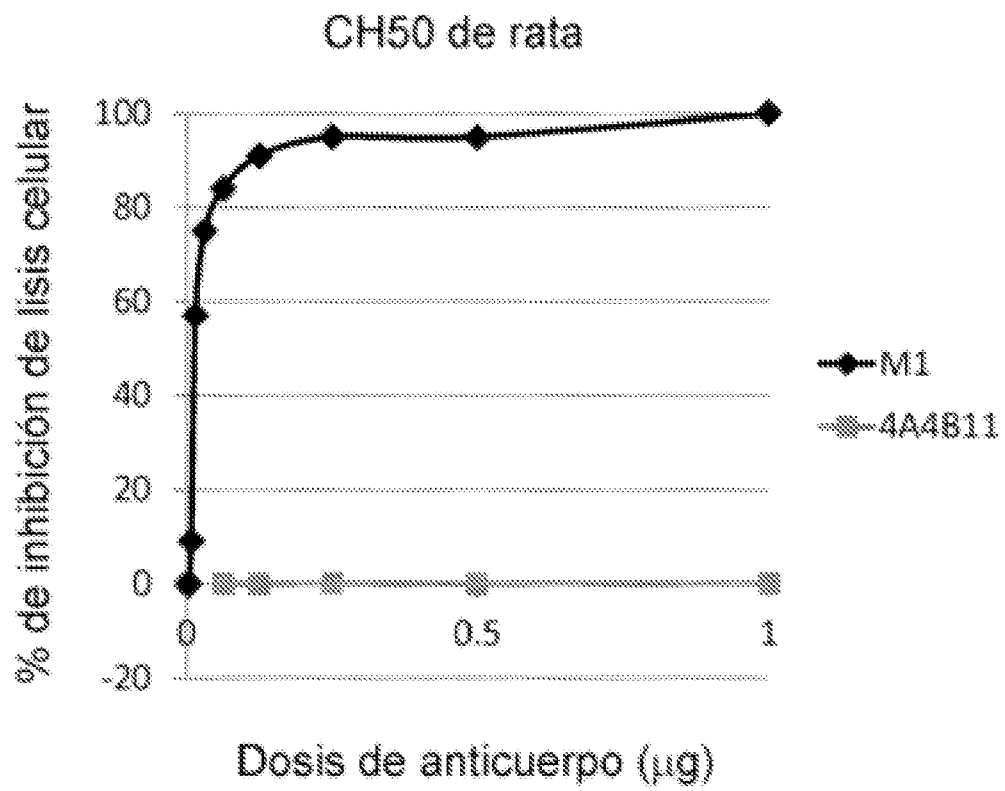


FIG. 4B

**FIG. 4C**

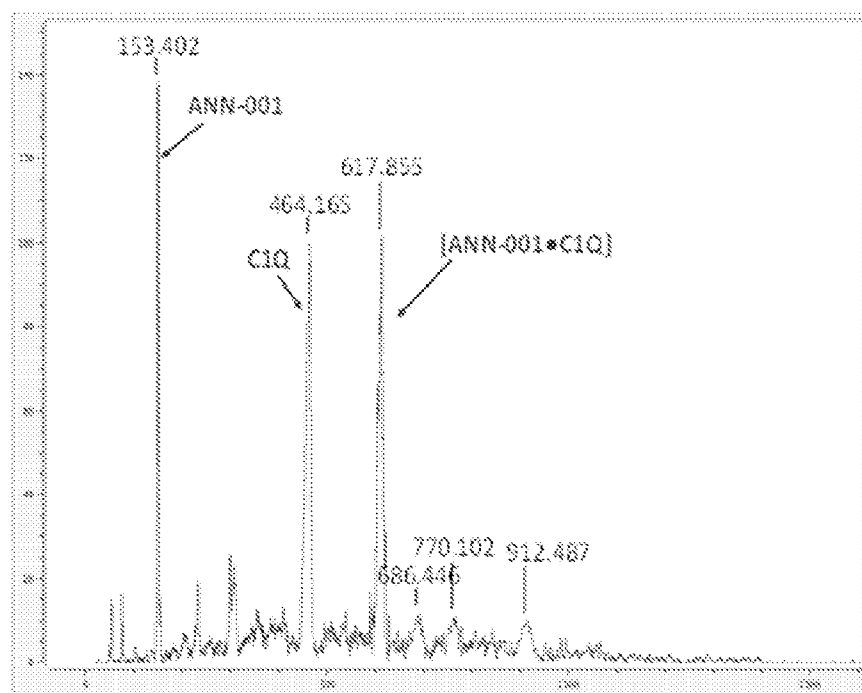


FIG. 5A

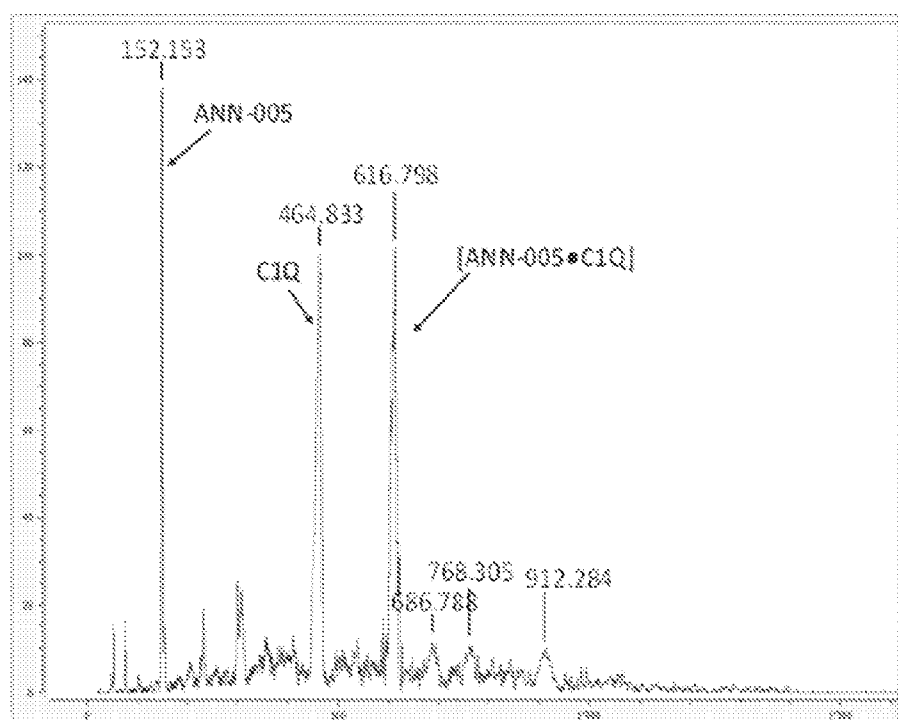


FIG. 5B

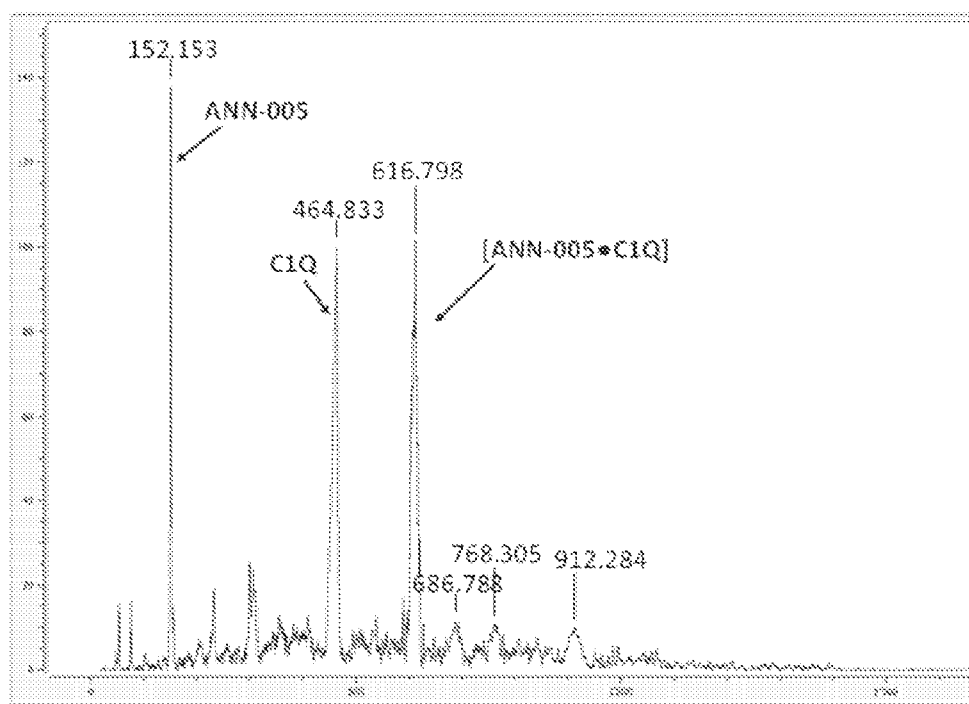


FIG. 6A

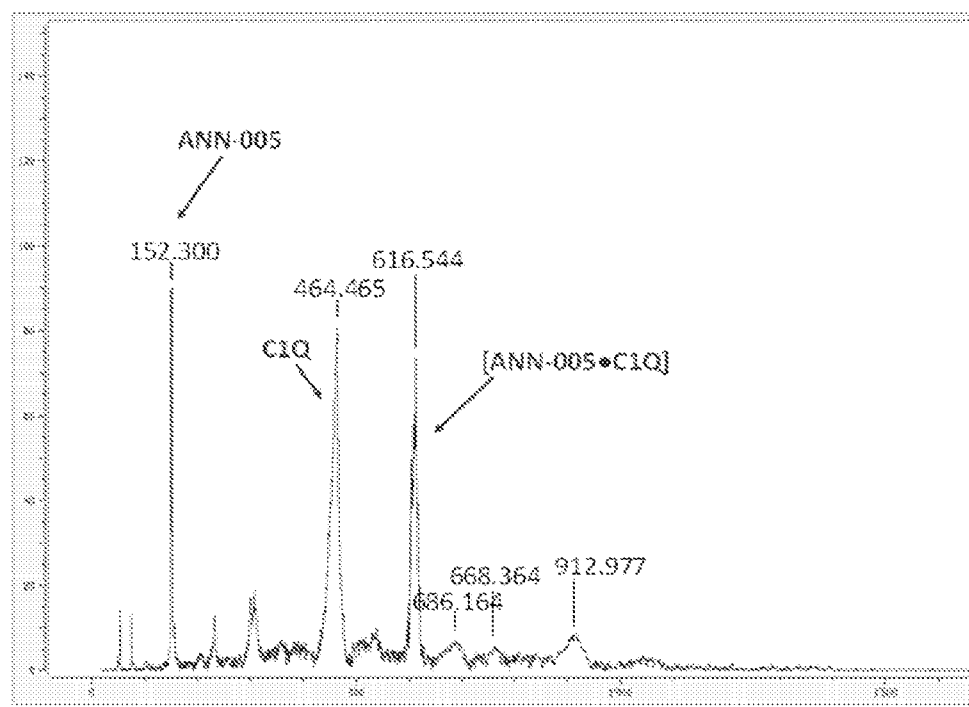


FIG. 6B

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCION

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al recopilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

- * US 20120195880 A [0002]
- * US 2012338801 A [0002]
- * WO 2005003513 A2 [0004]
- * US 6197930 B1 [0004]
- * WO 2012176785 A1 [0004]
- * WO 03052377 A2 [0004]
- * WO 9823781 A1 [0004]
- * US 4818587 A [0048] [0057] [0138] [0147] [0149] [0153] [0191]
- * WO 199824993 A [0048]
- * WO 199834098 A [0048]
- * WO 199833735 A [0048]
- * WO 199110741 A [0048]
- * US 5545807 A [0048] [0159]
- * US 5545808 A [0048] [0159]
- * US 5588825 A [0048] [0159]
- * US 5625126 A [0048] [0159]
- * US 5833425 A [0048] [0159]
- * US 5661016 A [0048] [0159]
- * US 5641870 A [0050] [0162]
- * EP 404097 A [0056]
- * WO 9311161 A [0056]
- * US 6982321 B [0058]
- * US 7087409 B [0058]
- * US 6076161 A [0059]
- * US 6150584 A [0059]
- * US 2010280227 A [0065]
- * WO 200442072 A [0078]
- * US 5591669 A [0157]
- * WO 9717852 A [0157]
- * US 5665332 A [0158]
- * US 5573805 A [0158]
- * WO 2009036379 A [0158]
- * WO 2010105258 A [0158]
- * WO 2012009568 A [0158]
- * US 20090181955 A [0158]
- * US 20100058388 A [0158]
- * US 5567610 A [0160]
- * US 5229275 A [0160]
- * US 5889048 A [0162]
- * WO 9316185 A [0162]
- * US 5571894 A [0162]
- * US 5597456 A [0162]
- * WO 9308829 A [0164]
- * WO 9404890 A [0166]
- * WO 9827011 A [0167]
- * US 5731166 A [0167]
- * US 4878980 A [0174]
- * WO 9100360 A [0174]
- * WO 92200373 A [0174]
- * EP 0308936 A [0174]
- * WO 9858572 A [0175]
- * US 5739277 A [0177]
- * WO 8704462 A [0185]
- * US 5648237 A [0197]
- * US 5759199 A [0197]
- * US 5840523 A [0197]
- * US 5959177 A [0199]
- * US 6040498 A [0199]
- * US 6420548 B [0199]
- * US 7135976 B [0199]
- * US 6417428 B [0199]
- * US 4857760 A [0217]
- * US 5206344 A [0217]
- * US 5225212 A [0217]
- * US 4595554 A [0244]

Literatura no patente citada en la descripción

- * HU YU-LAN et al. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, vol. 285, 28777-28786 [0002]
- * KLOS A. et al. *Mol Immunol.*, 2009, vol. 48 (14), 2753-2766 [0004]
- * CARROLL S.; GEORGIU G. *Immunobiology*, 2013, vol. 218 (9), 1041-1048 [0004]
- * TUZUN et al. *J. Neuroimmunol.*, 2007, vol. 182, 167-176 [0004]
- * NELSON et al. *J. Clin. Invest.*, 2006, vol. 116, 2692-2699 [0004]
- * HEINZ et al. *J. Immunol.*, 1984, vol. 133 [0004]
- * JIANG et al. *J. Immunol.*, 1991, vol. 146, 2324-2330 [0004]
- * TRINDER et al. *Scand. J. Immunol.*, 1999, vol. 50, 635-641 [0004]
- * HWANG et al. *Mol. Immunol.*, 2006, vol. 45, 2670-2680 [0004]
- * PHUAN FW et al. *Acta Neuropathologica*, 2013, vol. 125, 829-840 [0004]
- * HILLMEN et al. *N Engl J Med.*, 2006, vol. 355 (12), 1233-43 [0004]
- * FARDRIDGE WM et al. *Methods in Enzymology*, 2012, vol. 503, 269-293 [0004]

- * LÓPEZ-REQUENA A et al. *Molecular Immunology*, 2007, vol. 44, 3078-3082 [0004]
- * SAMBROOK et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 [0031]
- * *Current Protocols in Molecular Biology*, 2003 [0031]
- * *Methods in Enzymology*, PCR 2: A Practical Approach. Academic Press, Inc. 1995 [0031]
- * *Antibodies, A Laboratory Manual, and Animal Cell Culture*, 1987 [0031]
- * *Oligonucleotide Synthesis*, 1984 [0031]
- * *Methods in Molecular Biology*. Humana Press [0031]
- * *Cell Biology: A Laboratory Notebook*. Academic Press, 1998 [0031]
- * *Animal Cell Culture*, 1987 [0031]
- * J.P. MATHER ; P.E. ROBERTS. *Introduction to Cell and Tissue Culture*. Plenum Press, 1998 [0031]
- * *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures*. J. Wiley and Sons, August 1993 [0031]
- * *Handbook of Experimental Immunology* [0031]
- * *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells*, 1987 [0031]
- * *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, 1994 [0031]
- * *Current Protocols in Immunology*, 1991 [0031]
- * *Short Protocols in Molecular Biology*. Wiley and Sons, 1999 [0031]
- * C.A. JANEWAY ; P. TRAVERS. *Immunobiology*, 1997 [0031]
- * P. FINCH. *Antibodies*, 1997 [0031]
- * *Antibodies: A Practical Approach*. IRL Press, 1988 [0031]
- * *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach*. Oxford University Press, 2000 [0031]
- * E. HARLOW ; D. LANE. *Using Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999 [0031]
- * *The Antibodies*. Harwood Academic Publishers, 1995 [0031]
- * *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. J.B. Lippincott Company, 1993 [0031]
- * *Basic and Clinical Immunology*. Appleton & Lange, 1994, 71 [0042]
- * ABBAS et al. *Cellular and Molecular Immunology*. W.B. Saunders Co, 2000 [0043]
- * KABAT et al. *Sequences of Immunological Interest*. National Institute of Health, 1991 [0047]
- * KOHLER ; MILSTEIN. *Nature*, 1975, vol. 256, 495-97 [0048]
- * HONGO et al. *Hybridoma*, 1995, vol. 14 (3), 263-266 [0048]
- * HARLOW et al. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998 [0048]
- * HAMMERLING et al. *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*. Elsevier, 1981, 563-581 [0048]
- * CLACKSON et al. *Nature*, 1991, vol. 352, 824-828 [0048] [0148] [0158]
- * MARKS et al. *J. Mol. Biol.*, 1992, vol. 222, 591-597 [0048]
- * SHIHU et al. *J. Mol. Biol.*, 2004, vol. 338 (2), 299-310 [0048]
- * LEE et al. *J. Mol. Biol.*, 2004, vol. 340 (5), 1073-1093 [0048]
- * FELLOUSE. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 2004, vol. 101 (34), 12467-472 [0048]
- * LEE et al. *J. Immunol. Methods*, 2004, vol. 284 (1-2), 119-132 [0048]
- * JAKOBOVITS et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 2551 [0048] [0157]
- * JAKOBOVITS et al. *Nature*, 1993, vol. 362, 256-258 [0048] [0157]
- * BRUGGEMANN et al. *Year in Immunol*, 1993, vol. 7, 33 [0048]
- * MARKS et al. *BioTechnology*, 1992, vol. 10, 779-783 [0048] [0069] [0148] [0159]
- * LONBERG et al. *Nature*, 1994, vol. 368, 856-859 [0048] [0159]
- * MORRISON. *Nature*, 1994, vol. 368, 812-813 [0048]
- * FISHWILD et al. *Nature Biotechnol.*, 1996, vol. 14, 845-851 [0048]
- * NEUBERGER. *Nature Biotechnol.*, 1996, vol. 14, 836 [0048]
- * LONBERG ; HUSZAR. *Intern. Rev. Immunol.*, 1995, vol. 13, 55-93 [0048] [0159]
- * ZAPATA et al. *Protein Eng.*, 1996, vol. 9 (10), 1057-1062 [0050]
- * Plückerthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*. Springer-Verlag, 1994, vol. 113, 289-315 [0054]
- * HOLLINGER et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 6444-48 [0056]
- * MORRISON et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 6661-66 [0057]
- * JONES et al. *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0058] [0152] [0153]
- * RIECHMANN et al. *Nature*, 1988, vol. 332, 323-329 [0058] [0152]
- * PRESTA. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593-598 [0058]
- * VASWANI ; HAMILTON. *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.*, 1996, vol. 1, 105-115 [0058]
- * HARRIS. *Biochem. Soc. Transactions*, 1995, vol. 23, 1035-1038 [0058]
- * HURLE ; GROSS. *Curr. Op. Biotech.*, 1994, vol. 5, 428-433 [0058]
- * HOOGENBOOM ; WINTER. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 227, 381 [0059] [0158]
- * MARKS et al. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 591 [0059]
- * COLE ; ALAN R. LISS et al. *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, 1995, 77 [0059] [0159]
- * BOERNER et al. *J. Immunol.*, 1991, vol. 147 (1), 96-95 [0059] [0159]
- * VAN DIJK ; VAN DE WINKEL. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2001, vol. 5, 368-74 [0059]
- * LI et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 2006, vol. 103, 3557-3562 [0059]
- * XU et al. *Immunity*, 2000, vol. 13, 37-45 [0060]

- JOHNSON ; WU. *Methods in Molecular Biology*. Human Press, 2003, vol. 246, 1-26 [0060]
- HAMERS-CASTERMAN et al. *Nature*, 1993, vol. 363, 448-449 [0060]
- SHERIFF et al. *Nature Struct. Biol.*, 1998, vol. 3, 733-736 [0060]
- CHOTHIA ; LESK. *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901-917 [0061]
- KABAT et al. Sequences of Immunological Interest. Public Health Service, National Institutes of Health, 1991 [0065]
- KABAT et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest. Public Health Service, National Institutes of Health, 1991 [0067]
- BARBAS et al. *Proc Nat Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 3809-3813 [0069]
- SCHER et al. *Gene*, 1995, vol. 169, 147-155 [0069]
- YELTON et al. *J. Immunol.*, 1995, vol. 155, 1994-2004 [0069]
- JACKSON et al. *J. Immunol.*, 1995, vol. 154 (7), 3310-9 [0069]
- HAWKINS et al. *J. Mol. Biol.*, 1992, vol. 226, 889-896 [0069]
- HARLOW ; LANE. *Antibodies, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Publications, 1988 [0070]
- M. DAERON. *Annu. Rev. Immunol.*, 1997, vol. 15, 203-234 [0077]
- RAVETCH ; KINET. *Annu. Rev. Immunol.*, 1991, vol. 9, 457-52 [0077]
- CAPEL et al. *Immunomethods*, 1994, vol. 4, 25-34 [0077]
- DE HAAS et al. *J. Lab. Clin. Med.*, 1995, vol. 126, 330-41 [0077]
- SHIELDS et al. *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 9 (2), 6591-6604 [0078]
- KARLSSON, R ; ROOS, H ; FAGERSTAM, L ; PETERSSON, B. *Methods Enzymology*, 1994, vol. 8, 99-110 [0111]
- LÜTJE S et al. *Bioconjug Chem.*, 19 February 2014, vol. 25 (2), 335-41 [0132]
- TAVARE R et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 21 January 2014, vol. 111 (3), 1108-13 [0132]
- WIEHR S et al. *Prostate*, May 2014, vol. 74 (7), 743-55 [0132]
- KÖHLER et al. *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0136]
- GODING. *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*. Academic Press, 1988, 59-103 [0139]
- KOZBOR. *J. Immunol.*, 1984, vol. 133, 2031 [0142]
- BRODEUR et al. *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*. Marcel Dekker, Inc, 1987, 51-63 [0142]
- MUNSON et al. *Anal. Biochem.*, 1980, vol. 107, 220 [0144]
- SKERRA et al. *Curr. Opin. Immunol.*, 1993, vol. 5, 256-262 [0147]
- PLÜCKTHUN. *Immunol. Rev.*, 1992, vol. 130, 151-188 [0147]
- MCCAFFERTY et al. *Nature*, 1990, vol. 348, 552-554 [0148]
- MARKS et al. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581-597 [0148] [0158]
- WATERHOUSE et al. *Nucl. Acids Res.*, 1993, vol. 21, 2265-2266 [0148]
- MORRISON et al. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 8951 [0149]
- PRESTA. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593-596 [0152]
- RIECHMANN et al. *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0153]
- VERHOEVEN et al. *Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0153]
- SIMS et al. *J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 2296 [0154]
- CHOTHIA et al. *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901 [0154]
- CARTER et al. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 4265 [0154]
- PRESTA et al. *J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 2623 [0154]
- BRUGGERMANN et al. *Year in Immunol.*, 1993, vol. 7, 32 [0157]
- MCCAFFERTY et al. *Nature*, 1990, vol. 348, 552-553 [0158]
- JOHNSON, KEVIN S. ; CHISWELL, DAVID J. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1993, vol. 3, 564-571 [0158]
- GRIFFITH et al. *EMBO J.*, 1993, vol. 12, 725-734 [0158]
- FELSHAUS ; SIEGEL. *J. Immunological Methods*, 2004, vol. 280, 69-80 [0158]
- ROBERTS ; SZOSTAK. *Proc Natl Acad Sci*, 1997, vol. 94, 12297-12302 [0158]
- SCHAFFITZEL et al. *J. Immunological Methods*, 1999, vol. 231, 119-135 [0158]
- LIPOVSEK ; PLÜCKTHUN. *J. Immunological Methods*, 2004, vol. 290, 61-67 [0158]
- MORRISON. *Nature*, 1994, vol. 368, 812-13 [0158]
- FISHWILD et al. *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 845-51 [0159]
- NEUBERGER. *Nature Biotechnology*, 1998, vol. 14, 826 [0159]
- MORIMOTO et al. *J. Biochem. Biophys. Method.*, 1992, vol. 24, 107-117 [0162]
- BRENNAN et al. *Science*, 1985, vol. 229, 81 [0162]
- CARTER et al. *BioTechnology*, 1992, vol. 10, 163-167 [0162]
- MILLSTEIN et al. *Nature*, 1983, vol. 305, 537-539 [0164]
- TRAUNECKER et al. *EMBO J.*, 1991, vol. 10, 3655-3660 [0164]
- SURESH et al. *Methods in Enzymology*, 1988, vol. 121, 210 [0166]
- SHALABY et al. *J. Exp. Med.*, 1992, vol. 175, 217-225 [0169]
- KOSTELNY et al. *J. Immunol.*, 1992, vol. 148 (5), 1547-1553 [0170]

- HOLLINGER et al. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 6444-6448 [0176]
- GRUBER et al. *J. Immunol.*, 1994, vol. 152, 5358 [0176]
- TUTT et al. *J. Immunol.*, 1991, vol. 147, 80 [0171]
- GABATHULER R. Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases. *Neurobiol. Dis.*, 2010, vol. 37, 48-57 [0172]
- ARMOUR et al. *Molecular Immunology*, 2000, vol. 40, 585-593 [0175]
- REDDY et al. *J. Immunology*, 2000, vol. 164, 1925-1933 [0175]
- IDUSOGIE et al. *J. Immunology*, 2000, vol. 164, 4178-4184 [0176]
- DUNCAN et al. *Nature*, 1988, vol. 322, 738-740 [0176]
- JEFFERIS et al. *Immunol Rev*, 1998, vol. 163, 59-76 [0176]
- ALHOM et al. *PLoS ONE* 2008, 2008, vol. 3, e1413 [0176]
- COLLIN et al. *EMBO J* 2001, 2001, vol. 20, 3046-3055 [0176]
- CUNNINGHAM; WELLS. *Science*, 1989, vol. 244, 1081-1085 [0179]
- Remington. *The Science and Practice of Pharmacy*. Philadelphia College of Pharmacy and Science, 2000 [0190]
- CHARLTON. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, 2003, vol. 248, 245-254 [0197]
- GERNIGROSS. *Nat. Biotech.*, 2004, vol. 22, 1409-1414 [0198]
- LI et al. *Nat. Biotech.*, 2006, vol. 24, 210-215 [0198]
- GRAHAM et al. *J. Gen Virol.*, 1977, vol. 36, 59 [0200]
- MATHER. *Biol. Reprod.*, 1988, vol. 23, 243-251 [0208]
- MATHER et al. *Annals N. Y. Acad. Sci.*, 1982, vol. 363, 44-88 [0208]
- URLAUB et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4216 [0208]
- YAZAKI; WU. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, 2003, vol. 248, 255-268 [0208]
- Remington's *Pharmaceutical Sciences*. Macs Publishing Company, 1985 [0203]
- LANGER. *Science*, 1990, vol. 249, 1527-1533 [0203]
- HELLER. *Hydrogels in Medicine and Pharmacy*. CRC Press, 1987, 137-148 [0210]
- The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics. MORDENTI, J. ; CHAPPELL, W. et al. *Toxicokinetics and New Drug Development*. Pergamon Press, 1988, 42-48 [0212]
- LÓPEZ-BOTET M. ; T. BELLEN ; M. LLANO ; F. NAVARRO ; P. GARCIA ; M. DE MIGUEL. Paired inhibitory and triggering NK cell receptors for HLA class I molecules. *Hum. Immunol.*, 2000, vol. 61, 7-17 [0226]
- LANER L.L. Follow the leader: NK cell receptors for classical and nonclassical MHC class I. *Cell*, 1998, vol. 92, 705-707 [0226]
- *Immunopharmacology*, 1990, vol. 20, 73-8 [0226]
- T.E. MOLLNES ; M. KIRSCHFINK. *Molecular Immunology*, 2006, vol. 43, 107-121 [0227]
- MILSTEIN, C. *Bioessays*, 1999, vol. 21, 966-73 [0238]
- MARK PAGE; ROBIN THORPE. *The Protein Protocols Handbook*, 2002, 1111-1113 [0238]
- *Current Protocols in Immunology*, 1994, vol. 13, 1 (3 [0251]