



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 119136830 A

(43) 申请公布日 2024.12.13

(21) 申请号 202380037102.8

(22) 申请日 2023.04.28

(30) 优先权数据

63/336,539 2022.04.29 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.10.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/066393 2023.04.28

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/212719 EN 2023.11.02

(83) 生物保藏信息

PTA-120399 2013.06.06

(71) 申请人 安尼艾克松股份有限公司

地址 美国

(72) 发明人 T·耶德诺克 L·泰勒

A·格罗夫 D·方

(74) 专利代理机构 北京嘉和天工知识产权代理

事务所(普通合伙) 11269

专利代理师 缪策 甘玲

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

权利要求书2页 说明书51页

序列表(电子公布) 附图18页

(54) 发明名称

用于治疗眼部疾病的组合物和方法

(57) 摘要

本公开总体上涉及预防遗传性视网膜疾病(IRD)(例如,色素性视网膜炎、脉络膜缺损、眼底黄色斑点症、视锥-视杆营养不良、莱伯先天性黑蒙)、X连锁RP和厄舍综合征或视网膜脱离、降低发展为这些疾病的风险或治疗这些疾病的组合物和方法。

1. 一种治疗人类患者的遗传性视网膜疾病的方法,其包括通过玻璃体内注射向所述患者施用包含约1mg至约10mg抗C1q抗体的组合物,

其中所述抗体包含轻链可变结构域和重链可变结构域,所述轻链可变结构域包含具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L1、具有SEQ ID NO:6的氨基酸的HVR-L2和具有SEQ ID NO:7的氨基酸的HVR-L3;所述重链可变结构域包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、具有SEQ ID NO:10的氨基酸的HVR-H2和具有SEQ ID NO:11的氨基酸的HVR-H3。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述遗传性视网膜疾病是色素性视网膜炎。

3. 如权利要求1所述的方法,其中所述遗传性视网膜疾病是脉络膜缺损。

4. 如权利要求1所述的方法,其中所述遗传性视网膜疾病是眼底黄色斑点症。

5. 如权利要求1所述的方法,其中所述遗传性视网膜疾病是视锥-视杆营养不良。

6. 如权利要求1所述的方法,其中所述遗传性视网膜疾病是莱伯先天性黑蒙。

7. 如权利要求1所述的方法,其中所述遗传性视网膜疾病是X连锁RP。

8. 如权利要求1所述的方法,其中所述遗传性视网膜疾病为厄舍综合征。

9. 一种治疗人类患者的视网膜脱离的方法,其包括通过玻璃体内注射向所述患者施用包含约1mg至约10mg抗C1q抗体的组合物,

其中所述抗体包含轻链可变结构域和重链可变结构域,所述轻链可变结构域包含具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L1、具有SEQ ID NO:6的氨基酸的HVR-L2和具有SEQ ID NO:7的氨基酸的HVR-L3;所述重链可变结构域包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、具有SEQ ID NO:10的氨基酸的HVR-H2和具有SEQ ID NO:11的氨基酸的HVR-H3。

10. 如权利要求9所述的方法,其中所述抗C1q抗体在视网膜脱离手术之前施用。

11. 如权利要求9所述的方法,其中所述抗C1q抗体在视网膜脱离手术后施用。

12. 如权利要求9所述的方法,其中所述抗C1q抗体与视网膜脱离手术同时施用。

13. 如权利要求1至12中任一项所述的方法,其中所述方法恢复所述人类患者的视力。

14. 如权利要求1至12中任一项所述的方法,其中所述方法改善所述人类患者的视力。

15. 如权利要求1至14中任一项所述的方法,其中所述抗体包含轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含与选自SEQ ID NO:4和35-38的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列,并且其中所述轻链可变结构域包含具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L1、具有SEQ ID NO:6的氨基酸的HVR-L2和具有SEQ ID NO:7的氨基酸的HVR-L3。

16. 如权利要求15所述的方法,其中所述轻链可变结构域包含选自SEQ ID NO:4和35-38的氨基酸序列。

17. 如权利要求1至16中任一项所述的方法,其中所述抗体包含重链可变结构域,所述重链可变结构域包含与选自SEQ ID NO:8和31-34的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列,并且其中所述重链可变结构域包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、具有SEQ ID NO:10的氨基酸的HVR-H2和具有SEQ ID NO:11的氨基酸的HVR-H3。

18. 如权利要求17所述的方法,其中所述重链可变结构域包含选自SEQ ID NO:8和31至34的氨基酸序列。

19. 如权利要求1至18中任一项所述的方法,其中所述抗体是单克隆抗体、人源化抗体、人抗体、嵌合抗体、抗体片段或它们的抗体衍生物。

20. 如权利要求19所述的方法,其中所述抗体是抗体片段,并且所述抗体片段是Fab片

段、Fab' 片段、F(ab')₂片段、Fv片段、双体抗体或单链抗体分子。

21. 如权利要求20所述的方法,其中所述Fab片段包含SEQ ID NO:39的重链Fab片段和SEQ ID NO:40的轻链Fab片段。

22. 如权利要求1至21中任一项所述的方法,其中所述抗体每周施用一次。

23. 如权利要求1至21中任一项所述的方法,其中所述抗体每隔一周施用一次。

24. 如权利要求1至21中任一项所述的方法,其中所述抗体每三周施用一次。

25. 如权利要求1至21中任一项所述的方法,其中所述抗体每月施用一次。

26. 如权利要求1至21中任一项所述的方法,其中所述抗体每四周施用一次。

27. 如权利要求1至21中任一项所述的方法,其中所述抗体每六周施用一次。

28. 如权利要求1至21中任一项所述的方法,其中所述抗体每8周施用一次。

29. 如权利要求1至21中任一项所述的方法,其中所述抗体每隔一月施用一次。

30. 如权利要求1至21中任一项所述的方法,其中所述抗体每10周施用一次。

31. 如权利要求1至21中任一项所述的方法,其中所述抗体每12周施用一次。

32. 如权利要求1至21中任一项所述的方法,其中所述抗体每三个月施用一次。

33. 如权利要求1至21中任一项所述的方法,其中所述抗体每4个月施用一次。

34. 如权利要求22至33中任一项所述的方法,其中所述抗体施用至少3个月、至少4个月、至少6个月、至少7个月、至少8个月、至少9个月、至少10个月、至少11个月或至少12个月。

35. 如权利要求22至34中任一项所述的方法,其中所述抗体施用12个月。

36. 如权利要求1至35中任一项所述的方法,其中所施用的组合物包含约1mg、约1.5mg、约2mg、约2.5mg、约3mg、约3.5mg、约4mg、约4.5mg、约5mg、约5.5mg、约6mg、约6.5mg、约7mg、约7.5mg、约8mg、约8.5mg、约9mg、约9.5mg或约10mg的所述抗C1q抗体。

37. 如权利要求1至36中任一项所述的方法,其中所述组合物包含施用约1mg的所述抗C1q抗体。

38. 如权利要求1至36中任一项所述的方法,其中所述组合物包含施用约2.5mg的所述抗C1q抗体。

39. 如权利要求1至36中任一项所述的方法,其中所述组合物包含施用约5mg的所述抗C1q抗体。

40. 如权利要求1至36中任一项所述的方法,其中所述组合物包含施用约2mg的所述抗C1q抗体。

41. 如权利要求1至36中任一项所述的方法,其中所述组合物包含施用约5mg的所述抗C1q抗体。

42. 如权利要求1至36中任一项所述的方法,其中所述组合物包含施用约10mg的所述抗C1q抗体。

43. 如权利要求1至36中任一项所述的方法,其中所述组合物包含施用约1mg至约2.5mg、约2.5mg至约5mg、约5mg至约7.5mg或约7.5mg至约10mg的所述抗C1q抗体。

用于治疗眼部疾病的组合物和方法

[0001] 相关申请

[0002] 本专利申请要求2022年4月29日提交的美国临时专利申请第63/336,539号的优先权,所述美国临时专利申请据此通过引用以其整体并入本文。

背景技术

[0003] 遗传性视网膜疾病是一组可导致严重视力丧失或甚至失明的疾病。每个IRD都是由至少一个功能不正常的基因引起的。IRD(诸如色素性视网膜炎)可以影响所有年龄的个体,可以以不同的速度发展,并且是罕见的。然而,大多数是进行性的,这意味着疾病的症状会随着时间的推移而恶化。目前的治疗方法旨在修复遗传缺陷,但是存在许多遗传缺陷,并且每个缺陷仅影响少数患者。唯一被批准的治疗方法是voretigene neparvovec-rzyl,适用于基因突变RPE65,但该基因仅出现在1-2%的IRD患者中。另一种方法是使用一种称为“视网膜假体”的装置,将光转化为电能以直接刺激视网膜,但这种方法没有解决疾病的病理生理学问题。目前,对于IRD没有基因不可知的批准的治疗或疗法。因此,对于患有IRD的患者的治疗存在显著的未满足的需求。

[0004] 视网膜脱离是一种眼睛病症,其中视网膜从其下面的支持组织层剥离。每年每100,000人中约发生10-12例视网膜脱离。在大约50%的病例中,中央视网膜脱离导致黄斑脱离视网膜脱离。当中央视网膜脱离时,视力恢复仅达到脱离前视力的约50%,尽管成功地重新附着了视网膜。这种有限的视力恢复的原因是感光细胞退化。在成功的黄斑脱离视网膜脱离手术后,没有被批准的治疗或疗法来改善视觉功能。因此,对于视网膜脱离患者的治疗存在显著的未满足的需求。

发明内容

[0005] 本公开总体上涉及预防人类患者的遗传性视网膜疾病(IRD)(例如,色素性视网膜炎/视杆-视锥营养不良、脉络膜缺损、眼底黄色斑点症(Stargardt disease)、视锥-视杆营养不良、莱伯先天性黑蒙(leber congenital amaurosis)、X连锁RP、厄舍综合征(Usher Syndrome))和/或视网膜脱离、降低发展为这些疾病的风险或治疗这些疾病的组合物和方法。在一些实施方案中,在视网膜脱离手术之前、之后和/或与视网膜脱离手术同时施用抗C1q抗体。这些方法可以恢复人类患者的视力和/或改善人类患者的视力。

[0006] 此类方法包括通过玻璃体内注射向所述患者施用包含约1mg至约10mg抗C1q抗体的组合物,其中所述抗体包含轻链可变结构域和重链可变结构域,所述轻链可变结构域包含具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L1、具有SEQ ID NO:6的氨基酸的HVR-L2和具有SEQ ID NO:7的氨基酸的HVR-L3;所述重链可变结构域包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、具有SEQ ID NO:10的氨基酸的HVR-H2和具有SEQ ID NO:11的氨基酸的HVR-H3。在一些实施方案中,抗体包含轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含与选自SEQ ID NO:4和35-38的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列,并且其中所述轻链可变结构域包含具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L1、具有SEQ ID NO:6的氨基酸的HVR-L2

和具有SEQ ID NO:7的氨基酸的HVR-L3。在一些实施方案中,所述轻链可变结构域包含选自SEQ ID NO:4和35-38的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体包含重链可变结构域,所述重链可变结构域包含与选自SEQ ID NO:8和31-34的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列,并且其中所述重链可变结构域包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、具有SEQ ID NO:10的氨基酸的HVR-H2和具有SEQ ID NO:11的氨基酸的HVR-H3。在一些实施方案中,所述重链可变结构域包含选自SEQ ID NO:8和31-34的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗体包含轻链可变结构域和重链可变结构域,所述轻链可变结构域包含与选自SEQ ID NO:4和35-38的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列,并且其中所述轻链可变结构域包含具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L1、具有SEQ ID NO:6的氨基酸的HVR-L2和具有SEQ ID NO:7的氨基酸的HVR-L3,所述重链可变结构域包含与选自SEQ ID NO:8和31-34的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列,并且其中所述重链可变结构域包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、具有SEQ ID NO:10的氨基酸的HVR-H2和具有SEQ ID NO:11的氨基酸的HVR-H3。在一些实施方案中,所述抗体包含轻链可变结构域和重链可变结构域,所述轻链可变结构域包含选自SEQ ID NO:4和35-38的氨基酸序列,所述重链可变结构域包含选自SEQ ID NO:8和31-34的氨基酸序列。所述抗体可以是单克隆抗体、人源化抗体、人抗体、嵌合抗体、抗体片段或其抗体衍生物。所述抗体片段可以是Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、Fv片段、双抗体(diabody)或单链抗体分子。在一些实施方案中,所述Fab片段包含SEQ ID NO:39的重链Fab片段和SEQ ID NO:40的轻链Fab片段。

[0007] 在一些实施方案中,所述抗体每周施用一次、每隔一周施用一次、每三周施用一次、每月施用一次、每4周施用一次、每6周施用一次、每8周施用一次、每隔一个月施用一次、每10周施用一次、每12周施用一次、每三个月施用一次或每4个月施用一次。在一些实施方案中,所述抗体施用至少6个月、至少7个月、至少8个月、至少9个月、至少10个月、至少11个月或至少12个月。

[0008] 在一些实施方案中,所施用的组合物包含约1mg、约1.5mg、约2mg、约2.5mg、约3mg、约3.5mg、约4mg、约4.5mg、约5mg、约5.5mg、约6mg、约6.5mg、约7mg、约7.5mg、约8mg、约8.5mg、约9mg、约9.5mg或约10mg的所述抗C1q抗体。所施用的组合物可以包含约1mg至约5mg的所述抗C1q抗体。所施用的组合物可以包含约1mg至约2.5mg、约2.5mg至约5mg、约5mg至约7.5mg或约7.5mg至约10mg的所述抗C1q抗体。所施用的组合物可以包含约5mg的所述抗C1q抗体。所施用的组合物可以包含约10mg的所述抗C1q抗体。

附图说明

[0009] 图1A-1F显示了光暴露后的感光细胞损伤和小胶质细胞增生。图1A-1C显示了免疫荧光(IF)图像和定量,其显示了光损伤后的感光细胞突触(巴松管)和细胞体(Dapi)的进行性丧失。图1D-1F显示了光损伤后的小胶质细胞/巨噬细胞反应性(Iba1和CD68)增加的IF图像和定量。吞噬细胞小胶质细胞在突触层中的分布在第1天达到高峰,此时首次观察到显著的突触丧失。

[0010] 图2A-2E显示了光暴露后的视网膜中的补体信号和C1q分布。图2A-2C显示了ELISA测定,其显示了光损伤后的视网膜裂解物中起始经典补体组分C1q和C1s以及下游活化产物C3d的水平增加。图2D显示了IF,其显示了视网膜C1q分布及其与小胶质细胞/巨噬细胞

(Iba1) 和突触(巴松管)的共定位。图2E显示了相关性分析,其显示了OPL中的C1q水平和感光细胞突触密度之间显著负相关,与因果关系一致。

[0011] 图3A-3E显示了光暴露后的小胶质细胞突触吞噬。图3A显示了IF,其显示了在光损伤视网膜OPL中C1q水平的增加及其与巴松管+ve突触的接近度(i)。图3B显示了高分辨率和3D表面渲染图像,其显示了光损伤视网膜中小胶质细胞吞噬C1q标记的突触。图3C-3E显示了定量分析,其显示了与未受损伤的相比,光损伤的视网膜中突触密度显著降低(图3C)、C1q标记的突触百分比增加(图3D)、吞噬C1q标记的突触的小胶质细胞增加(图3E)。

[0012] 图4A-4F显示了感光细胞突触上的磷脂酰丝氨酸(PS)外化以及与C1q的体外结合。图4A显示了IF,其显示了光损伤视网膜的OPL中PS的PSVue标记。3D表面渲染图像(i-ii)显示了PSVue接近巴松管和C1q,表明突触上的PS外化。图4B显示了显示C1q与PS脂质珠结合的测定。不与对照磷脂酰胆碱(PC)珠结合。图4C-4D显示了显示C1q和C4在血清暴露的PS脂质珠上沉积的测定。在PC珠上没有观察到沉积。图4E-4F显示了竞争测定,其显示了在抗C1q中和抗体存在下,C1q和C4在血清暴露的PS脂质珠上的沉积减少。

[0013] 图5A-5D显示了抗C1q治疗后的视网膜PK/PD。图5A-5D显示了PK/PD数据,其显示了来自抗C1q治疗的动物的视网膜裂解物中可测量的药物水平,以及抗C1q治疗后C1q、C1s和C3d水平的显著降低。

[0014] 图6A-6C显示了人GA视网膜中的C1q分布:图6A-6B显示了IF,其显示了前突触标志物Vglut1的免疫反应性降低(图6A)和感光细胞突触层OPL中C1q的标记增加(图6B),证实了与健康供体相比,GA视网膜中发生了突触丧失和C1q积累。图6C显示了C1q(灰色)、前突触标志物Vglut1和突触后标志物(HOMER1)的三重免疫标记,证实了在人GA供体视网膜中C1q与感光细胞突触的共定位。

[0015] 图7显示了人C1q结合测定法。在单侧ELISA中,Mab2-Fab、FabA和Mab2与人C1q的结合。结合的抗体或Fab分子使用酶标记的抗人Fc或抗人κ抗体,然后使用酶底物来检测。这些抗体对人C1q显示出相当的结合亲和力。Mab2-Fab、FabA和Mab2的EC50分别为4.4、2.5和4.9ng/mL(范围为34-95pM)。

[0016] 图8显示,FabA抑制经典途径,但不抑制凝集素和替代补体途径。使用来自Eurodiagnostica(Weislab™)的基于ELISA的测定试剂盒来评估FabA和Mab2抑制经典、凝集素和替代途径的能力。用经典途径(IgM)、凝集素途径(甘露聚糖)或替代途径(脂多糖)的特异性活化剂来涂覆孔,并且使用C5b-9末端复合物检测抗体来评估所有途径的活化。针对C5的抑制性抗体被用作阳性对照。FabA和Mab2选择性地阻断经典途径,其中IC50≤0.3μg/mL,而抗C5抑制全部三个途径。

[0017] 图9显示了人血清中IgM涂覆的RBC的溶血的抑制。将用表面反应性多克隆IgM抗体预敏化的绵羊RBC与人血清(稀释100倍)在37°C处共温育20-30分钟。RBC溶血通过测量血红蛋白的释放来定量,并且表示为由未处理引起的溶血的百分比。

[0018] 图10显示了用Mab1-Fab、Mab1或Mab2治疗的眼睛视神经的受损轴突的数量减少。通过在第1天将1μl的6μm聚苯乙烯珠粒、1μl的10μm聚苯乙烯珠粒(Polybead Microspheres;Polysciences,Inc.,Warrington,PA,USA)和1μl的粘弹性溶液(10mg/mL透明质酸钠;Advanced Medical Optics Inc.,USA)注射到眼睛的前房来在每只动物的单眼中诱导IOP增加。对侧眼睛保持不接触以作为对照。在微珠注射前一天和一周后(第0天和第

7天;每次注射2 μ L的10mg/mL抗体盐水溶液以及单独的盐水),将抗体Mab2、Mab1和Mab1-Fab(通过Mab1的酶消化产生的Fab)以及盐水通过玻璃体内施用于微珠注射的眼睛。在损伤后两周,从动物收集视神经(用盐水和4%多聚甲醛灌注),用4%多聚甲醛和1%锇对视神经进行后固定,在递增的醇浓度中对视神经进行脱水并将视神经放置于1%乙酸双氧铀/乙醇中。将神经包埋于环氧树脂中并切下半薄切片(1 μ m)。使用StereoInvestigator软件(MicroBrightfield, Inc, VT, USA)来估计退化轴突的总数。比例尺=20 μ m。Mab1-Fab和Mab2二者均显著减少了视神经中受损轴突的形成,而抗体Mab1显示出类似的趋势。

[0019] 图11A-11D显示了使用Mab1抗体在小鼠光损伤模型中产生的对感光神经元丧失和视网膜功能的保护作用。图11A显示了7天的小鼠光损伤模型,然后玻璃体内(IVT)施用Mab1抗体,并在第14天评估视网膜功能和组织学。在第7天通过IVT施用向小鼠施用1 μ L的7.5mg/mL Mab1或同种型对照抗体。图11B显示,与同种型对照相比,Mab1处理导致视网膜的外核层中的Tunel+ve感光细胞显著减少。图11C显示,与同种型对照相比,Mab1处理导致外核层中的感光细胞行数增加。图11D显示,与同种型对照抗体相比,Mab1抗体治疗导致在第14天视网膜电图中的A-波和B-波显著增加。

[0020] 图12显示了在单次IVT注射之后房水中游离的C1q。

[0021] 图13A-13D显示了免疫荧光(IF)数据。图13B显示了在治疗后第3天,视网膜的外丛状层(OPL)(也称为外突触层)中减少的小胶质细胞增生。小胶质细胞增生的减少与炎症减少有关。图13C显示了感光细胞突触的显著保留,并且图13D显示了在治疗后第5天,细胞体的显著保留。

[0022] 图14A-14B显示了视网膜中可测量的PK和靶标接合。

[0023] 图15A是显示免疫荧光图像的定量的条形图。

[0024] 图15B显示了证明用C1q抑制剂处理后感光细胞突触(BSN标志物)的保留的免疫荧光图像。

具体实施方式

[0025] 概述

[0026] 本公开总体上涉及预防遗传性视网膜疾病(IRD)(例如,色素性视网膜炎、脉络膜缺损、眼底黄色斑点症、视锥-视杆营养不良和莱伯先天性黑蒙)或视网膜脱离、降低发展为这些疾病的风险或治疗这些疾病的组合物和方法。

[0027] 本文公开了一种重组人源化免疫球蛋白G(IgG1)抗原结合片段(Fab),所述抗原结合片段抑制经典补体级联,但不影响凝集素或替代补体途径。抗C1q Fab(例如,FabA,一种包含SEQ ID NO:39的重链Fab片段和SEQ ID NO:40的轻链Fab片段的抗C1q Fab)被开发为玻璃体内(IVT)施用的药剂,用于治疗遗传性视网膜疾病(IRD)(例如,色素性视网膜炎、脉络膜缺损、眼底黄色斑点症、视锥-视杆营养不良和莱伯先天性黑蒙)和视网膜脱离。来源于鼠抗体M1(包含SEQ ID NO:3的重链可变结构域和SEQ ID NO:7的轻链可变结构域的Mab1抗体)的高变区表达为人IgG1 Fab片段构建体(FabA)。包含来源于Mab1的高变区的全长人IgG4抗体(Mab2,即包含SEQ ID NO:8的重链可变结构域和SEQ ID NO:4的轻链可变结构域的抗体)也得以表达。Mab1和Mab2以及它们的Fab(Mab1-Fab和Mab2-Fab)在药理学研究中被用作FabA的替代分子。作为缺乏Fc重链恒定结构域2和3(CH2和CH3)的单价Fab构建体,FabA

不能通过Fc结构域相互作用结合至C1q。此外,FabA只有一个抗原结合臂,在广泛的FabA浓度范围内不表现出对C1q的激动活性。

[0028] 补体级联是先天免疫的关键组成部分,并且可以通过3种不同的途径活化:经典途径、凝集素途径和替代补体途径。全部3种途径都会导致补体组分C3的活化,最终导致免疫细胞募集、炎症、通过膜攻击复合物进行的膜裂解和细胞死亡。

[0029] C1q是经典补体级联反应的起始分子,与神经退化性疾病的起始和传播有关。C1q抑制可以阻断经典补体级联的起始,并且通过直接减少对神经细胞膜的损伤和通过减少补体活化的炎症结果来减缓神经元和突触损伤。

[0030] 如通过Biacore (<10pM) 和酶联免疫吸附测定法(ELISA) (40-50pM;图7)所测量,Mab2-Fab和/或FabA表现出与人C1q的高亲和力结合。Mab1结合至C1q的分离的球状头部结构域,但是不结合至C1q的胶原蛋白尾部(如通过ELISA所确定)。与这一发现一致的是,Mab1抑制由C1q的球状头部结构域(IgM、C反应蛋白[CRP]和磷脂酰丝氨酸)介导的底物相互作用;并且FabA抑制C1q与免疫球蛋白M(IgM)涂覆的红细胞(RBC)的功能性相互作用(阻断溶血;图9)。抗体Mab1特异性识别C1q,显示出不结合至其他补体组分(C3b和C5)或其他C1q/肿瘤坏死因子(TNF)超家族成员,包括TNF和脂联素,所述成员是在它的球状头部结构域中与C1q共有最高序列同一性的蛋白质。与这些结果一致的是,FabA不抑制由甘露糖结合性凝集素(MBL,C1q/TNF超家族的另一个成员)启动的凝集素补体途径,也不抑制替代补体途径(由C3b启动)(图8)。

[0031] 定义

[0032] 如本文中说明书中所用,“一个/种(a)”或“一个/种(an)”可以意指一个/种或多个/种。如本文在一条或多条权利要求中所用,当与词语“包含”结合使用时,词语“一个/种(a)”或“一个/种(an)”可以表示一个/种或一个/种以上。例如,对“抗体”的提及是从一个到多个抗体的提及。如本文中所用,“另一个/种(another)”可以指至少第二个/种或更多个/种。

[0033] 如本文所用,与另一种化合物或组合物“联合”施用包括同时施用和/或在不同时间施用。联合施用还涵盖作为共同配制物施用或作为单独组合物施用,包括以不同的给药频率或间隔,并且使用相同的施用途径或不同的施用途径。

[0034] 术语“免疫球蛋白”(Ig)在本文中可与“抗体”互换使用。术语“抗体”在本文中以最广泛的意义使用,并且具体包括单克隆抗体、多克隆抗体、由至少两种完整抗体形成的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、抗体片段(只要其展现生物活性)和抗体衍生物。

[0035] 基本的4链抗体单位是由两条%同一的轻链(L)和两条%同一的重链(H)组成的异源四聚糖蛋白。将V_H和V_L配对在一起形成单一抗原结合位点。对于不同类别的抗体的结构和特性,参见例如Basic and Clinical Immunology,第8版,Daniel P.Stites,Abba I.Terr和Tristram G.Parslow(编),Appleton&Lange,Norwalk,CT,1994,第71页和第6章。

[0036] 来自任何脊椎动物物种的L链都可以基于其恒定结构域的氨基酸序列被分为两种明显不同的类型,称为卡帕(“κ”)和兰姆达(“λ”)。取决于其重链(CH)的恒定结构域的氨基酸序列,免疫球蛋白可分为不同的类别或同种型。有五种类别免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,其重链分别命名为阿尔法(“α”)、德尔塔(“δ”)、艾普斯龙(“ε”)、伽马(“γ”)和缪(“μ”)。基于CH序列和功能的相对较小差异,γ和α类进一步分为亚类(同种型),例如,人表

达以下亚类：IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。不同类别的免疫球蛋白的亚单位结构和三维构型是众所周知的，并且通常描述于例如在例如Abbas等人, Cellular and Molecular Immunology, 第4版. (W.B.Saunders Co., 2000) 中。

[0037] “全长抗体”通常是约150,000道尔顿的异四聚糖蛋白，其包含两条%同一的轻(L)链和两条%同一的重(H)链。每条轻链通过一个共价二硫键连接至重链，而不同免疫球蛋白同种型的重链之间的二硫键的数量各不相同。每条重链和轻链也有规则间隔的链内二硫键。每条重链在一端具有一个可变结构域(V_H)，后面是许多恒定结构域。每条轻链在一端具有可变结构域(V_L)，并且在另一端具有恒定结构域；轻链的恒定结构域与重链的第一个恒定结构域比对，并且轻链可变结构域与重链可变结构域比对。据信特定的氨基酸残基形成轻链可变结构域与重链可变结构域之间的界面。

[0038] “分离的”分子或细胞是从至少一种污染物分子或细胞中鉴定并分离出来的分子或细胞，所述污染物分子或细胞通常在其产生的环境中与其相关。优选地，分离的分子或细胞不与产生环境相关的所有组分缔合。分离的分子或细胞的形式不同于其在自然界中的形式或环境。因此，分离的分子不同于细胞中天然存在的分子；分离的细胞不同于组织、器官或个体中天然存在的细胞。在一些实施方案中，分离的分子是本公开的抗C1q抗体。在其他实施方案中，分离的细胞是产生本公开的抗C1q抗体的宿主细胞或杂交瘤细胞。

[0039] “分离的”抗体是已经从其产生环境的组分中鉴定、分离和/或回收的抗体(例如，天然地或重组地)。优选地，分离的多肽不与来自其产生环境的所有其他污染组分缔合。来自其产生环境的污染组分(例如来自重组转染细胞的污染组分)是通常干扰抗体的研究、诊断或治疗用途的物质，并且可能包括酶、激素和其他蛋白质或非蛋白质溶质。在某些优选的实施方案中，多肽将被纯化：(1) 达至大于抗体的95重量%，如通过例如Lowry方法所测定，在一些实施方案中，达至大于抗体的99重量%；(2) 通过使用旋转杯测序仪达至足以获得N末端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度，或(3) 通过SDS-PAGE在非还原或还原条件下使用考马斯蓝(Coomassie blue)或优选银染达至均一性。分离的抗体包括重组T细胞中原位的抗体，因为抗体天然环境中的至少一种组分将不存在。然而，通常，分离的多肽或抗体将通过包括至少一个纯化步骤的方法来制备。

[0040] 抗体的“可变区”或“可变结构域”是指抗体的重链或轻链的氨基末端结构域。重链和轻链的可变结构域可以分别称为“ V_H ”和“ V_L ”。这些结构域通常是抗体的最易变部分(相对于同类别的其他抗体)，并且含有抗原结合位点。

[0041] 术语“可变的”是指抗体中可变结构域的某些区段在序列上有很大差异。V结构域介导抗原结合并定义特定抗体对其特定抗原的特异性。然而，可变性并不是均匀地分布在可变结构域整个跨度上。相比之下，其集中在轻链和重链可变结构域中被称为高变区(HVR)的三个区段中。可变结构域的更加高度保守的部分称为框架区(FR)。天然重链和轻链的可变结构域各自包含四个FR区，其大多采用 β -折叠构型，由三个HVR连接，其形成连接 β -片层结构的环，并且有时形成 β -片层结构的部分。每条链中的HVR通过FR区紧密结合在一起，并且与来自另一条链的HVR一起有助于形成抗体的抗原结合位点(参见Kabat等人, Sequences of Immunological Interest, 第五版, National Institute of Health, Bethesda, MD(1991))。恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合，但展现出各种效应功能，例如抗体参与抗体依赖性细胞毒性。

[0042] 如本文所用,术语“CDR”或“互补决定区”是指在重链和轻链多肽的可变区内发现的非连续抗原结合位点。Kabat等人,J.Biol.Chem.252:6609-6616(1977);Kabat等人,U.S.Dept.of Health and Human Services,“Sequences of proteins of immunological interest”(1991)(本文也称为Kabat 1991);Chothia等人,J.Mol.Biol.196:901-917(1987)(本文也称为Chothia 1987);和MacCallum等人,J.Mol.Biol.262:732-745(1996)描述CDR,其中在相互比较时,定义包括氨基酸残基的重叠或子集。然而,应用任一定义来指代抗体或移植抗体或其变体的CDR意图都在本文所定义和使用的术语的范围内。

[0043] 如本文所用,术语“CDR-L1”、“CDR-L2”和“CDR-L3”分别指轻链可变区中的第一、第二和第三CDR。如本文所用,术语“CDR-H1”、“CDR-H2”和“CDR-H3”分别指重链可变区中的第一、第二和第三CDR。如本文所用,术语“CDR-1”、“CDR-2”和“CDR-3”分别指任一链可变区的第一、第二和第三CDR。

[0044] 本文所用的术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群体中获得的抗体,即所述群体中的单个抗体是相同的,除了可能以少量存在的可能的天然发生的突变和/或翻译后修饰(例如,异构化、酰胺化)。单克隆抗体具有高度特异性(针对单一抗原位点)。与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂形成对比,每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。除了其特异性之外,单克隆抗体是有利的,因为它们通常由杂交瘤培养物合成,未被其他免疫球蛋白污染。修饰语“单克隆”指示作为基本上同质的抗体群体获得的抗体的特征并且不应解释为需要通过任何特定方法产生所述抗体。例如,根据本公开使用的单克隆抗体可以通过多种技术制备,包括例如杂交瘤方法(例如,Kohler和Milstein,Nature,256:495-97(1975);Hongo等人,Hybridoma,14(3):253-260(1995);Harlow等人,Antibodies:A Laboratory Manual,(Cold Spring Harbor Laboratory Press,第2版.1988);Hammerling等人,Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681(Elsevier,N.Y.,1981))、重组DNA方法(参见例如,美国专利第4,816,567号)、噬菌体展示技术(参见例如,Clackson等人,Nature,352:624-628(1991);Marks等人,J.Mol.Biol.222:581-597(1992);Sidhu等人,J.Mol.Biol.338(2):299-310(2004);Lee等人,J.Mol.Biol.340(5):1073-1093(2004);Fellouse,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 101(34):12467-472(2004);和Lee等人,J.Immunol.Methods 284(1-2):119-132(2004)和在具有部分或全部人免疫球蛋白基因座或编码人免疫球蛋白序列的基因的动物中产生人或类人抗体的技术(参见例如,WO 1998/24893;WO 1996/34096;WO 1996/33735;WO 1991/10741;Jakobovits等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 90:2551(1993);Jakobovits等人,Nature 362:255-258(1993);Bruggemann等人,Year in Immunol.7:33(1993);美国专利第5,545,807号;第5,545,806号;第5,569,825号;第5,625,126号;第5,633,425号;和第5,661,016号;Marks等人,Bio/Technology10:779-783(1992);Lonberg等人,Nature 368:856-859(1994);Morrison,Nature368:812-813(1994);Fishwild等人,Nature Biotechnol.14:845-851(1996);Neuberger,Nature Biotechnol.14:826(1996);和Lonberg和Huszar,Intern.Rev.Immunol.13:65-93(1995)。

[0045] 术语“全长抗体”、“完整抗体”和“全抗体”可互换使用以指基本上完整形式的抗体,与抗体片段或抗体衍生物相对。具体来说,全抗体包括具有包括Fc区的重链和轻链的那些抗体。恒定区可为天然序列恒定结构域(例如人天然序列恒定结构域)或其氨基酸序列变

体。在一些情况下,完整抗体可以具有一种或多种效功能。

[0046] 抗体的“抗体片段”或“抗原结合片段”或“功能片段”包含完整抗体的一部分,优选完整抗体的抗原结合和/或可变区,或保留或具有修饰的FcR结合能力的抗体的F区。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段;双抗体;和线性抗体(参见美国专利5,641,870,实施例2;Zapata等人,Protein Eng.8(10):1057-1062(1995))。抗体片段的其他实例包括抗体衍生物,例如单链抗体分子、单价抗体和由抗体片段形成的多特异性抗体

[0047] “抗体衍生物”是包含抗体的抗原结合区的任何构建体。抗体衍生物的实例包括单链抗体分子、单价抗体和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0048] 抗体的木瓜蛋白酶消化产生两个%同一的抗原结合片段,称为“Fab”片段,和一个残留的“Fc”片段,这一名称反映了容易结晶的能力。Fab片段由一条完整的L链以及H链的可变区结构域(V_H)和一条重链的第一个恒定结构域(C_{H1})组成。就抗原结合而言,每个Fab片段都是单价的,即其具有单个抗原结合位点。抗体的胃蛋白酶处理产生单个大的F(ab')₂片段,其大致相当于具有不同抗原结合活性的两个二硫键连接的Fab片段,并且仍然能够交联抗原。Fab'片段与Fab片段的不同之处在于在C_{H1}结构域的羧基末端具有几个额外的残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。本文中将其恒定结构域的(多个)半胱氨酸残基具有游离硫醇基的Fab'称为Fab'-SH。F(ab')₂抗体片段起初以Fab'片段对的形式产生,所述Fab'片段对在Fab'片段之间具有铰链半胱氨酸。抗体片段的其他化学偶联也是已知的。

[0049] Fc片段包含由二硫化物结合在一起的两条H链的羧基末端部分。抗体的效应功能由Fc区的序列决定,所述Fc区也被某些类型细胞上发现的Fc受体(FcR)识别。

[0050] 术语“Fc区”在本文中用于定义免疫球蛋白重链的C末端区域,包括天然序列Fc区和变体Fc区。尽管免疫球蛋白重链的Fc区的边界可能不同,但人IgG重链Fc区通常被定义为从位置Cys226处的氨基酸残基或从Pro230延伸至其羧基末端。可例如在产生或纯化抗体期间或通过重组工程化编码抗体的重链的核酸来去除Fc区的C末端赖氨酸(根据EU编号系统,残基447)。因此,完整抗体的组合物可以包含所有K447残基被去除的抗体群体、没有K447残基被去除的抗体群体以及具有含和不含K447残基的抗体混合物的抗体群体。适用于本公开的抗体的天然序列Fc区包括人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。

[0051] “天然序列Fc区”包含与自然中存在的Fc区的氨基酸序列%同一的氨基酸序列。天然序列人Fc区包括天然序列人IgG1 Fc区(非A和A同种异型);天然序列人IgG2 Fc区;天然序列人IgG3 Fc区;和天然序列人IgG4 Fc区,以及其天然存在的变体。

[0052] “变体Fc区”包含以至少一个氨基酸修饰(优选一个或多个氨基酸取代)而区别于天然序列Fc区氨基酸序列的氨基酸序列。优选地,变体Fc区与天然序列Fc区或亲本多肽的Fc区相比具有至少一个氨基酸取代,例如在天然序列Fc区或亲本多肽的Fc区中存在约一个至约十个氨基酸取代,优选约一个至约五个氨基酸取代。本文中的变体Fc区将优选地与天然序列Fc区和/或与亲本多肽的Fc区具有至少约80%同源性,最优选与其具有至少约90%同源性,更优选与其具有至少约95%同源性。

[0053] “Fc受体”或“FcR”描述了与抗体的Fc区结合的受体。优选的FcR是天然序列人FcR。此外,优选的FcR是结合IgG抗体(γ受体)并包括FcγRI、FcγRII和FcγRIII亚类的受体的FcR,包括这些受体的等位基因变体和替代剪接形式,FcγRII受体包括FcγRIIA(“活化受

体”)和Fc γ RIIB(“抑制受体”),其具有主要不同之处在于其胞质结构域的相似氨基酸序列。活化受体Fc γ RIIA在其胞质结构域中含有免疫受体酪氨酸基活化基序(“ITAM”)。抑制性受体Fc γ RIIB在其胞质结构域中含有免疫受体酪氨酸基抑制基序(“ITIM”)。(参见例如, M. Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997))。FcR综述于Ravetch和Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel等人, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); 和de Haas等人, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995)中。其他FcR(包括将在未来被鉴定的那些)都涵盖在术语“FcR”中。FcR还可以增加抗体的血清半衰期。

[0054] 可以例如在表达人FcRn的转基因小鼠或转染的人细胞系中或在施用具有变体Fc区的多肽的灵长类动物中测定人FcRn高亲和力结合多肽在体内与FcRn的结合和血清半衰期。WO 2004/42072 (Presta) 描述了与FcRs结合增强或减弱的抗体变体。也参见例如 Shields等人, *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001)。

[0055] “Fv”是含有完全抗原识别和抗原结合位点的最小抗体片段。这个片段由一个重链可变区结构域和一个轻链可变区结构域紧密非共价缔合的二聚体组成。从这两个结构域的折叠中衍生出六个高变环(H链和L链各3个环),其为抗原结合提供氨基酸残基并赋予抗体抗原结合特异性。然而,即便是单一可变结构域(或是仅包含对抗原具有特异性的三个HVR的Fv的一半)也具有识别并结合抗原的能力,尽管其亲合力低于完整的结合位点。

[0056] “单链Fv”也缩写为“sFv”或“scFv”,是包含连接成单个多肽链的V_H和V_L抗体结构域的抗体片段。优选地,sFv多肽还包含V_H与V_L结构域之间的多肽接头,所述接头使sFv能够形成抗原结合所需的结构。关于sFv的综述,参见Plückthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*,第113卷,Rosenburg和Moore编, Springer-Verlag, New York, 第269-315页 (1994)。

[0057] 术语“双抗体”是指通过在V_H与V_L结构域之间构建具有短接头(约5-10个残基)的sFv片段(见上一段)而制备的小抗体片段,使得实现V结构域的链间配对而非链内配对,从而产生二价片段,即具有两个抗原结合位点的片段。双特异性双抗体是两个“交叉”sFv片段的异二聚体,其中两种抗体的V_H和V_L结构域存在于不同的多肽链上。双抗体详细描述于例如 EP 404,097; WO 1993/011161; WO/2009/121948; WO/2014/191493; Hollinger等人, *Proc. Nat’l Acad. Sci. USA* 90:6444-48 (1993)中。

[0058] 如本文所用,“嵌合抗体”是指一种抗体(免疫球蛋白),其中重链和/或轻链的一部分与来源于特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的其余部分与来源于其他物种或属于其他抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,只要其展现所需的生物学活性即可(美国专利第4,816,567号;和Morrison等人, *Proc. Nat’l Acad. Sci. USA*, 81:6851-55 (1984))。本文的所关注嵌合抗体包括PRIMATIZED®抗体,其中抗体的抗原结合区来源于通过例如用所关注抗原免疫猕猴产生的抗体。如本文所用,“人源化抗体”是“嵌合抗体”的子集。

[0059] 非人(例如,鼠)抗体的“人源化”形式是嵌合抗体,其含有来源于非人免疫球蛋白的最少序列。在一些实施方案中,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的HVR的残基被来自具有所需的特异性、亲和力和/或能力的非人物种(供体抗体)(例如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物)的HVR的残基替换。在一些情况下,人免疫球蛋白的FR残基被相应的非人残基替换。另外,人源化抗体可包含在受体抗体中或在供体抗体中没有发现的残

基。可以进行这些修饰来进一步改进抗体的性能,例如结合亲和力。一般而言,人源化抗体将包含基本上所有的至少一个、通常两个可变结构域,其中所有或基本上所有的高变环对应于非人免疫球蛋白序列的高变环,并且所有或基本上所有的FR区是人免疫球蛋白序列的那些FR区,但FR区可以包括一个或多个单独的FR残基取代,所述取代可改善抗体性能,例如结合亲和力、异构化、免疫原性等。FR中这些氨基酸取代的数目在H链中通常不超过6,并且在L链中不超过3。人源化抗体任选地还包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白的恒定区。关于另外的细节,参见例如Jones等人,Nature 321:522-525(1986);Riechmann等人,Nature 332:323-329(1988);和Presta,Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596(1992)。还参见例如Vaswani和Hamilton,Ann.Allergy,Asthma&Immunol.1:105-115(1998);Harris,Biochem.Soc.Transactions23:1035-1038(1995);Hurle和Gross,Curr.Op.Biotech.5:428-433(1994);和美国专利第6,982,321号和第7,087,409号。

[0060] “人抗体”是具有与由人产生的抗体的氨基酸序列相对应的氨基酸序列的抗体,和/或使用本文公开的制备人抗体的任何技术制备的抗体。人抗体的此定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。可以使用本领域已知的各种技术产生人抗体,包括噬菌体展示文库。Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol.,227:381(1991);Marks等人,J.Mol.Biol.,222:581(1991)。也可用于制备人单克隆抗体的是描述于Cole等人,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,第77页(1985);Boerner等人,J.Immunol.,147(1):86-95(1991)中的方法。还参见van Dijk和van de Winkel,Curr.Opin.Pharmacol.5:368-74(2001)。人抗体可以通过向转基因动物施用抗原来制备,所述转基因动物已经被修饰以响应抗原攻击产生此类抗体,但是其内源基因座已经被禁用,例如免疫的异种小鼠(关于XENOMOUSE™技术,参见例如美国专利第6,075,181号和第6,150,584号)。关于通过人B细胞杂交瘤技术产生的人抗体,还参见例如Li等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA,103:3557-3562(2006)。

[0061] 术语“高变区”、“HVR”或“HV”在用于本文时是指序列高变和/或形成结构确定的环的抗体可变结构域的区域。通常,抗体包含六个HVR,三个在VH(H1、H2、H3)中,三个在VL(L1、L2、L3)中。在天然抗体中,H3和L3在六个HVR中显示出最大的多样性,尤其是H3被认为在赋予抗体良好特异性中起着独特的作用。参见例如Xu等人,Immunity 13:37-45(2000);Johnson和Wu,Methods in Molecular Biology 248:1-25(Lo编,Human Press,Totowa,NJ,2003)。事实上,仅由重链组成的天然存在的骆驼科抗体在不存在轻链的情况下是有功能的和稳定的。参见例如Hamers-Casterman等人,Nature 363:446-448(1993)和Sheriff等人,Nature Struct.Biol.3:733-736(1996)。

[0062] 许多HVR描绘正在使用并涵盖在本文中。作为Kabat互补决定区(CDR)的HVR基于序列的可变性,并且是最常用的(Kabat等人,同上)。Chothia指的是结构环的位置(Chothia和Lesk J.Mol.Biol.196:901-917(1987))。AbM HVR代表了Kabat CDR与Chothia结构环之间的折衷,并且被Oxford Molecular的AbM抗体建模软件使用。“接触”HVR基于对可用的复杂晶体结构的分析。来自这些HVR中的每一个的残基如下所示。

	环	Kabat	AbM	Chothia	接触
	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
[0063]	H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (Kabat 编号)
	H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (Chothia 编号)
	H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
	H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0064] HVR可以包括如下“扩展的HVR”：VL中的24-36或24-34 (L1)、46-56或50-56 (L2) 和89-97或89-96 (L3)，VH中的26-35 (H1)、50-65或49-65 (优选的实施方案) (H2) 和93-102、94-102或95-102 (H3)。对于这些扩展的HVR定义中的每一个，可变结构域残基根据Kabat等人，同上进行编号。

[0065] “框架”或“FR”残基是除如本文定义的HVR残基以外的那些可变结构域残基。

[0066] 短语“如Kabat中的可变结构域残基编号”或“如Kabat中的氨基酸位置编号”及其变体指的是用于Kabat等人，同上中的抗体汇编的重链可变结构域或轻链可变结构域的编号系统。使用这种编号系统，实际的线性氨基酸序列可以含有更少或额外的氨基酸，对应于可变结构域的FR或HVR的缩短或插入。例如，重链可变结构域可以包括H2的残基52之后的单个氨基酸插入物（根据Kabat的残基52a）和重链FR残基82之后的插入的残基（例如，根据Kabat的残基82a、82b和82c等）。对于给定的抗体，残基的Kabat编号可以通过将抗体序列的同源区域与“标准”Kabat编号序列进行比对来确定。

[0067] 当涉及可变结构域中的残基（大约轻链的残基1-107和重链的残基1-113）时，通常使用Kabat编号系统（例如，Kabat等人，Sequences of Immunological Interest, 第5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)）。当提到免疫球蛋白重链恒定区中的残基时，通常使用“EU编号系统”或“EU索引”（例如，Kabat等人，同上中报道的EU索引）。“如Kabat中的EU索引”是指人IgG1 EU抗体的残基编号。除非本文另有说明，否则提及抗体可变结构域中的残基编号是指通过Kabat编号系统进行的残基编号。除非本文另有说明，否则提及抗体恒定结构域中的残基编号是指通过EU编号系统进行的残基编号（参见例如美国专利公开第2010-280227号）。

[0068] 如本文所用的“受体人框架”是包含来源于人免疫球蛋白框架或人共有框架的VL或VH框架的氨基酸序列的框架。“来源于”人免疫球蛋白框架或人共有框架的受体人框架可包含其%同一的氨基酸序列，或其可含有预先存在的氨基酸序列变化。在一些实施方案中，预先存在的氨基酸变化的数量为10个或更少、9个或更少、8个或更少、7个或更少、6个或更少、5个或更少、4个或更少、3个或更少、或2个或更少。当预先存在的氨基酸变化存在于VH中时，优选的这些变化仅发生在位置71H、73H和78H中的三个、两个或一个位置处；例如，那些位置的氨基酸残基可以是71A、73T和/或78A。在一些实施方案中，VL受体人框架序列与VL人免疫球蛋白框架序列或人共有框架序列%同一。

[0069] “人共有框架”是代表在选择人免疫球蛋白VL或VH框架序列中最通常存在的氨基酸残基的框架。通常，人免疫球蛋白VL或VH序列的选择来自可变结构域序列的亚组。通常，序列的亚组是如Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版

Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) 中的亚组。实例包括对于VL, 亚组可以是如Kabat等人, 同上中的亚组 κ I、 κ II、 κ III或 κ IV。此外, 对于VH, 亚组可以是如Kabat等人, 同上中的亚组I、亚组II或亚组III。

[0070] 特定位置处的“氨基酸修饰”是指特定残基的取代或缺失, 或特定残基附近插入至少一个氨基酸残基。“邻近”特定残基的插入是指在其一个至两个残基内的插入。插入可以是特定残基的N末端或C末端。本文优选的氨基酸修饰是取代。

[0071] “亲和力成熟”抗体是指其一个或多个HVR中具有一个或多个改变的抗体, 与不具有那些改变的亲本抗体相比, 其引起抗体对抗原的亲和力提高。在一些实施方案中, 亲和力成熟的抗体对靶抗原具有纳摩尔或甚至皮摩尔的亲和力。通过本领域已知的方法生产亲和力成熟的抗体。例如, Marks等人, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) 描述了通过VH和VL结构域改组进行的亲和力成熟。HVR和/或框架残基的随机诱变描述于例如: Barbas等人 *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier等人 *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton等人 *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson等人, *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); 和 Hawkins等人, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992)。

[0072] 如本文所用, 术语“特异性识别”或“特异性结合”是指可测量和可重复的相互作用, 例如靶标和抗体之间的吸引或结合, 其决定了在包括生物分子在内的异质分子群的存在下靶标的存在。例如, 特异性或优先结合至靶标或表位的抗体是以比结合其他靶标或靶标的其他表位更大的亲和力、亲合力、更容易和/或更长的持续时间结合靶标或表位的抗体。还应理解, 例如, 特异性或优先结合第一靶标的抗体(或部分)可以或不特异性或优先结合第二靶标。因此, “特异性结合”或“优先结合”不一定要求(但其可以包括)排他性结合。特异性结合至靶标的抗体可以具有至少约 10^3M^{-1} 或 10^4M^{-1} , 有时约 10^5M^{-1} 或 10^6M^{-1} , 在其他情况下约 10^6M^{-1} 或 10^7M^{-1} 、约 10^8M^{-1} 至 10^9M^{-1} 或约 10^{10}M^{-1} 至 10^{11}M^{-1} 或更高的缔合常数。多种免疫测定形式可用于选择与特定蛋白质特异性免疫反应的抗体。例如, 固相ELISA免疫测定常规地用于选择与蛋白质特异性免疫反应的单克隆抗体。关于可以用来确定特异性免疫反应的免疫测定形式和条件的描述, 参见例如Harlow和Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York。

[0073] 如本文所用的“同一性”表示在比对序列的任何特定位置处, 序列之间的氨基酸残基是%同一的。本文所用的“相似性”指示, 在比对序列的任何特定位置处, 序列之间的氨基酸残基具有相似的类型。例如, 亮氨酸可以代替异亮氨酸或缬氨酸。经常可以相互取代的其他氨基酸包括但不限于:

[0074] -苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸(具有芳香侧链的氨基酸);

[0075] -赖氨酸、精氨酸和组氨酸(具有碱性侧链的氨基酸);

[0076] -天冬氨酸和谷氨酸(具有酸性侧链的氨基酸);

[0077] -天冬酰胺和谷氨酰胺(具有酰胺侧链的氨基酸); 和

[0078] -半胱氨酸和甲硫氨酸(具有含硫侧链的氨基酸)。

[0079] 可以容易地计算出同一性和相似性的程度。(参见例如, *Computational Molecular Biology*, Lesk, A.M.编, Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing, Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W.编, Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data*, 第1部分, Griffin, A.M.和Griffin,

H.G.编, Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; 和 Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. 和 Devereux, J. 编, M Stockton Press, New York, 1991)。

[0080] 如本文所用, 补体蛋白与第二种蛋白质之间的“相互作用”涵盖但不限于蛋白-蛋白相互作用、物理相互作用、化学相互作用、结合、共价结合和离子结合。如本文所用, 当抗体破坏、减少或完全消除两种蛋白质之间的相互作用时, 抗体“抑制”两种蛋白质之间的相互作用。当本公开的抗体或其片段与两种蛋白质中的一种结合时, 所述抗体或其片段“抑制”两种蛋白质之间的相互作用。

[0081] “阻断”抗体、“拮抗”抗体、“抑制”抗体或“中和”抗体是抑制或降低其结合的抗原的一种或多种生物活性的抗体, 例如与一种或多种蛋白质的相互作用。在一些实施方案中, 阻断抗体、拮抗抗体、抑制抗体或“中和”抗体基本上或完全抑制抗原的一种或多种生物活性或相互作用。

[0082] 术语“抑制剂”是指能够通过降低靶标生物分子的活性或表达来抑制靶标生物分子(例如, mRNA或蛋白质)的生物功能的化合物。抑制剂可以是抗体、小分子或核酸分子。术语“拮抗剂”是指与受体结合并阻断或抑制受体的生物响应的化合物。术语“抑制剂”也可以指“拮抗剂”。

[0083] 抗体“效应功能”是指归因于抗体Fc区(天然序列Fc区或氨基酸序列变体Fc区)的那些生物活性, 并且随着抗体同种型而变化。

[0084] 如本文所用, 术语“亲和力”是指两种试剂(例如, 抗体和抗原)可逆地结合的平衡常数, 并表示为解离常数(KD)。亲和力可以比抗体对不相关氨基酸序列的亲和力大至少1倍、大至少2倍、大至少3倍、大至少4倍、大至少5倍、大至少6倍、大至少7倍、大至少8倍、大至少9倍、大至少10倍、大至少20倍、大至少30倍、大至少40倍、大至少50倍、大至少60倍、大至少70倍、大至少80倍、大至少90倍、大至少100倍或大至少1,000倍或更多倍。抗体对靶蛋白的亲和力可以是例如约100纳摩尔(nM)至约0.1nM、约100nM至约1皮摩尔(pM)或约100nM至约1飞摩尔(fM)或更高。如本文所用, 术语“亲和力”是指两种或更多种试剂的复合物在稀释后对解离的抗性。关于抗体和/或抗原结合片段, 术语“免疫反应性”和“优先结合”在本文中可互换使用。

[0085] 术语“结合”是指两个分子之间的直接缔合, 这是由于例如共价、静电、疏水和离子和/或氢键相互作用, 包括例如盐桥和水桥的相互作用。例如, 受试抗C1q抗体特异性结合补体C1q蛋白内的表位。“特异性结合”指亲和力为至少约 10^{-7} M或更大, 例如 5×10^{-7} M、 10^{-8} M、 5×10^{-8} M和更大。“非特异性结合”指亲和力小于约 10^{-7} M, 例如, 以 10^{-6} M、 10^{-5} M、 10^{-4} M等的亲和力结合。

[0086] 本文使用的术语“ k_{on} ”是指抗体与抗原缔合的速率常数。

[0087] 本文使用的术语“ k_{off} ”是指抗体从抗体/抗原复合物中解离的速率常数。

[0088] 本文使用的术语“ K_D ”是指抗体-抗原相互作用的平衡解离常数。

[0089] 如本文所用, 关于肽、多肽或抗体序列的“氨基酸序列同一性百分比(%)”和“同源性”是指在序列比对和引入缺口(如果必要)以达到最大序列同一性百分比之后, 候选序列中与特定肽或多肽序列中的氨基酸残基%同一的氨基酸残基的百分比, 并且不考虑作为序列同一性的部分的任何保守取代。为了测定氨基酸序列同一性百分比的比对可以通过本领域

域技术范围内的多种方式实现,例如,使用公开获得的计算机软件诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或MEGALIGN™ (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可以确定用于测量比对的合适参数,包括本领域已知的在被比较的全长序列上实现最大比对所需的任何算法。

[0090] “生物样品”涵盖从个体获得的多种样品类型,并且可用于诊断或监测测定。所述定义涵盖血液和其他生物来源的液体样品、固体组织样品(例如活组织检查标本或组织培养物或由其衍生的细胞)及其后代。所述定义还包括在获得后以任何方式处理过的样品,例如通过用试剂处理、溶解或富集某些组分,例如多核苷酸。术语“生物样品”涵盖临床样品,并且也包括培养的细胞、细胞上清液、细胞裂解物、血清、血浆、生物液体和组织样品。术语“生物样品”包括尿液、唾液、脑脊液、间质液、眼液、滑液、血液成分(例如血浆和血清)等。术语“生物样品”还包括固体组织样品、组织培养样品和细胞样品。

[0091] “分离的”核酸分子是从至少一种污染核酸分子中鉴定并分离出来的核酸分子,所述污染核酸分子通常在其产生的环境中与其缔合。优选地,分离的核酸不与产生环境相关的所有组分缔合。编码本文多肽和抗体的分离的核酸分子的形式不同于其在自然界中发现的形式或环境。因此,分离的核酸分子不同于细胞中天然存在的编码任何多肽和抗体的核酸。

[0092] 如本文所用,术语“载体”是指能够转运已与其连接的其他核酸的核酸分子。一类载体为“质粒”,其是指其中可连接额外DNA区段的环状双链DNA。另一类载体是噬菌体载体。另一类载体为病毒载体,其中可将额外DNA区段连接到病毒基因组中。某些载体能够在其所导入的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。其他载体(例如,非附加型哺乳动物载体)可在导入宿主细胞后整合到宿主细胞的基因组中,由此随宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够引导与其可操作性连接的基因的表达。此类载体在本文中称为“重组表达载体”或简称为“表达载体”。通常,在重组DNA技术中有用的表达载体通常呈质粒形式。在本说明书中,“质粒”和“载体”可互换使用,因为质粒是最常用的载体形式。

[0093] 本文中可互换使用的“多核苷酸”或“核酸”是指任何长度的核苷酸的聚合物,并且包括DNA和RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、修饰的核苷酸或碱基和/或其类似物,或可以通过DNA或RNA聚合酶或通过合成反应并入聚合物中的任何底物。多核苷酸可以包含修饰的核苷酸,例如甲基化的核苷酸及其类似物。如果存在,可以在聚合物组装之前或之后对核苷酸结构进行修饰。核苷酸的序列可能被非核苷酸组分中断。多核苷酸可以包含合成后进行的修饰,例如与标记缀合。其他类型的修饰包括例如“帽”(用类似物取代一个或多个天然存在的核苷酸);核苷酸间修饰,例如带有不带电的键(例如,甲基磷酸酯、磷酸三酯、磷酸胺酯、氨基甲酸酯等)和带电荷的键(例如,硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)的那些修饰;含有侧基部分,例如蛋白质(例如,核酸酶、毒素、抗体、信号肽、ply-L-赖氨酸等)的那些修饰;具有嵌入剂(例如,吡啶、补骨脂素等)的那些修饰;含有螯合剂(例如,金属、放射性金属、硼、氧化性金属等)的那些修饰;含有烷基化剂的那些修饰;具有修饰的键(例如, α 异头核酸等)的那些修饰;以及未修饰形式的多核苷酸。此外,糖中通常存在的任何羟基可被例如磷酸酯基团、磷酸酯基团替换,被标准保护基团保护,或被活化以制备与额外核苷酸的额外连接,或可与固体或半固体载体缀合。5' 和3' 末端OH可以被磷酸化或被1个至20个碳原子的胺或有机封端基团部分取代。其他羟基也可以衍生成标准保护基团。多核苷酸还可

以含有本领域通常已知的核糖或脱氧核糖的类似形式,包括例如2'-0-甲基-、2'-0-烯丙基-、2'-氟-或2'-叠氮基-核糖、碳环糖类似物、 α -异头糖、差向异构糖(例如阿拉伯糖、木糖或来苏糖)、吡喃糖、呋喃糖、景天庚酮糖(sedoheptulose)、无环类似物和碱性核苷类似物(例如甲基核糖苷)。一个或多个磷酸二酯键可以被替代的连接基团替换。这些替代的连接基团包括但不限于这样的实施方案,其中磷酸酯被P(O)S(“硫代酸酯”)、P(S)S(“二硫代酸酯”)、(O)NR₂(“酰胺化物”)、P(O)R、P(O)OR'、CO或CH₂(“甲乙缩醛”)替换,其中每个R或R'独立地是H或任选含有醚(-O-)键的取代或未取代的烷基(1-20 C)、芳基、烯基、环烷基、环烯基或芳烷基。并非多核苷酸中的所有键都需要相同。前面的描述适用于本文提及的所有多核苷酸,包括RNA和DNA。

[0094] “宿主细胞”包括单个细胞或细胞培养物,其可以是或已经是用于并入多核苷酸插入物的载体的受体。宿主细胞包括单个宿主细胞的后代,并且由于自然、意外或有意的突变,后代不一定与原始亲代细胞完全相同(在形态学或基因组DNA互补方面)。宿主细胞包括用本公开的多核苷酸在体内转染的细胞。

[0095] 本文所用的“载体”包括药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂,其在所用的剂量和浓度下对暴露于其中的细胞或哺乳动物是无毒的。通常生理上可接受的载体是pH缓冲水溶液。生理上可接受的载体的实例包括缓冲液,例如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸;低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,例如EDTA;糖醇,例如甘露醇或山梨醇;成盐抗衡离子,例如钠;和/或非离子型表面活性剂,例如TWEENTM、聚乙二醇(PEG)和PLURONICSTM。

[0096] 术语“预防”是本领域公认的,并且当用于与诸如遗传性视网膜疾病(IRD)(例如,色素性视网膜炎/视杆-视锥营养不良、脉络膜缺损、眼底黄色斑点症、视锥-视杆营养不良、莱伯先天性黑蒙、X连锁RP和厄舍综合征)或视网膜脱离或相关症状的疾患相关时,相对于未接受治疗的患者而言。

[0097] 本文使用的术语“受试者”是指活的哺乳动物,并且可以与术语“患者”互换使用。哺乳动物的实例包括但不限于哺乳动物类别的任何成员:人;非人灵长类动物,例如黑猩猩和其他猿和猴物种;家畜,例如牛、马、绵羊、山羊、猪;家养动物,如兔、狗和猫;实验动物,包括啮齿动物,例如大鼠、小鼠和豚鼠等。所述术语不表示特定的年龄或性别。

[0098] 如本文所用,术语“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”包括减轻疾患、阻止疾患或逆转疾患的症状、临床体征或潜在病理,以稳定或改善受试者的疾患,或降低受试者的疾患恶化的可能性,如同受试者没有接受治疗一样。

[0099] “恢复”是指回到正常或健康状况的行为。恢复可以是部分的(例如,当受试者回到低于正常或健康状况的状况时)或全部的(例如,当受试者回到与正常或健康状况相同或几乎相同的状况时)。正常或健康状况的实例是视网膜脱离前患者的视力。

[0100] “改善视力”是指相对于治疗前,增强能够看见的能力或状态的行为,包括改善视敏度、灵敏度和/或视野范围。

[0101] 关于主题治疗方法的术语化合物的“治疗有效量”是指制剂中的化合物的量,当作为所需给药方案的部分(向哺乳动物,优选人)施用,根据待治疗的病症或疾患的临床可

接受标准或美容目的,例如以适用于任何药物治疗的合理效益/风险比,所述量减轻症状、改善疾患或减缓疾病疾患的发作。本文中的治疗有效量可根据例如疾病状态、年龄、性别和患者体重以及抗体在个体中引发所需响应的能力的因素而变化。

[0102] 如本文所用,处于发展特定疾病、病症或疾患的“风险”下的个体可以具有或不具有可检测的疾病或疾病症状,并且在本文所述的治疗方法之前可以具有或不具有可检测的疾病或疾病症状。“处于风险下”表示个体具有一种或多种风险因素,如本领域所已知,所述风险因素是与特定疾病、病症或疾患的发展相关的可测量参数。具有一种或多种这些风险因素的个体与不具有一种或多种这些风险因素的个体相比具有更高的发展特定疾病、病症或疾患的可能性。

[0103] “慢性”施用是指以连续而非急性的方式施用,从而在一段延长的时间内保持最初的治疗效果(活性)。“间歇”施用是指不是不间断地连续施用的治疗,而是本质上是循环/周期性的。

[0104] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。虽然还可在本发明的实践或测试中使用类似于或等同于本文所述的那些方法和材料的任何方法和材料,但现在描述优选的方法和材料。本文提及的所有出版物都通过引用并入本文,以公开并描述与引用的出版物相关的方法和/或材料。例如,Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual第3版(2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.;Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel等人编(2003));the series Methods in Enzymology(Academic Press,Inc.):PCR 2:A Practical Approach(M.J.MacPherson,B.D.Hames和G.R.Taylor编(1995)),Harlow和Lane编(1988)Antibodies,ALaboratory Manual,and Animal Cell Culture(R.I.Freshney编,(1987));Oligonucleotide Synthesis(M.J.Gait编,1984);Methods in Molecular Biology,Humana Press;Cell Biology:A Laboratory Notebook(J.E.Cellis编,1998)Academic Press;Animal Cell Culture(R.I.Freshney)编,1987);Introduction to Cell and Tissue Culture(J.P.Mather和P.E.Roberts,1998)Plenum Press;Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures(A.Doyle,J.B.Griffiths和D.G.Newell编,1993-8)J.Wiley and Sons;Handbook of Experimental Immunology(D.M.Weir和C.C.Blackwell编);Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(J.M.Miller和M.P.Calos编,1987);PCR:The Polymerase Chain Reaction,(Mullis等人编,1994);Current Protocols in Immunology(J.E.Coligan等人编,1991);Short Protocols in Molecular Biology(Wiley和Sons,1999);Immunobiology(C.A.Janeway和P.Travers,1997);Antibodies(P.Finch,1997);Antibodies:A Practical Approach(D.Catty编,IRL Press,1988-1989);Monoclonal Antibodies:APractical Approach(P.Shepherd和C.Dean编,Oxford University Press,2000);Using Antibodies:A Laboratory Manual(E.Harlow和D.Lane(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999);The Antibodies(M.Zanetti和J.D.Capra编,Harwood Academic Publishers,1995);和Cancer:Principles and Practice of Oncology(V.T.DeVita等人编,J.B.Lippincott Company,1993)中描述的广泛使用的方法。

[0105] 抗体

[0106] 本公开中提到的所有序列都通过引用并入美国专利申请第14/933,517号、美国专利申请第14/890,811号、美国专利第8,877,197号、美国专利第9,708,394号、美国专利申请第15/360,549号、美国专利第9,562,106号、美国专利第10,450,382号、美国专利第10,457,745号、国际专利申请第PCT/US2018/022462号,这些专利中的每一个公开的抗体和相关组合物在此通过引用并入。

[0107] 全长抗体可以通过使用重组DNA工程化技术来制备。此类工程化版本包括例如通过在天然抗体的氨基酸序列中插入、缺失或改变天然抗体可变区而产生的版本。这种类型的特定实例包括含有至少一个CDR和任选的一个或多个来自一种抗体的框架氨基酸以及来自第二种抗体的可变区结构域的剩余部分的那些工程化可变区结构域。编码抗体的DNA可以通过缺失编码全长抗体的DNA中除所需部分之外的所有部分来制备。编码嵌合抗体的DNA可以通过重组基本上或专门编码人恒定区的DNA和编码基本上或专门来源于除人以外的哺乳动物的可变区序列的可变区的DNA来制备。编码人源化抗体的DNA可以通过重组编码除基本上或专门来源于相应的人抗体区的互补决定区(CDR)以外的恒定区和可变区的DNA和编码基本上或专门来源于除人以外的哺乳动物的CDR的DNA来制备。

[0108] 编码抗体的DNA分子的合适来源包括表达全长抗体的细胞,例如杂交瘤。例如,抗体可以从表达编码抗体的重链和/或轻链的表达载体的宿主细胞中分离。

[0109] 抗体片段,包括但不限于Fab片段和/或抗体衍生物,也可以通过使用重组DNA工程化技术来制备,该技术涉及编码抗体可变区和恒定区的DNA的操纵和再表达。标准分子生物学技术可用于根据需要修饰、添加或缺失更多的氨基酸或结构域。如本文所用的术语“可变”和“恒定”区仍然涵盖对可变或恒定区的任何改变。在一些情况下,通过在编码 C_H1 的链间半胱氨酸的密码子后立即引入终止密码子,使用PCR来产生抗体片段,使得 C_H1 结构域的翻译在链间半胱氨酸处终止。设计合适的PCR引物的方法是本领域众所周知的,并且抗体 C_H1 结构域的序列是容易获得的。在一些实施方案中,可以使用定点诱变技术引入终止密码子。

[0110] 本公开的抗体可以来源于任何抗体同种型(“类”),包括例如IgG、IgM、IgA、IgD和IgE及其亚类,包括例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。在某些优选的实施方案中,抗体的重链和轻链来自IgG。抗体的重链和/或轻链可以来自鼠IgG或人IgG。在某些其他优选的实施方案中,抗体的重链和/或轻链来自人IgG1。在另外其他优选的实施方案中,抗体的重链和/或轻链来自人IgG4。

[0111] 本公开的抗体可以结合并抑制C1q、C1r或C1s的生物活性。例如,(1) C1q与自身抗体的结合,(2) C1q与C1r的结合,(3) C1q与C1s的结合,(4) C1q与磷脂酰丝氨酸的结合,(5) C1q与五聚蛋白-3的结合,(6) C1q与C-反应蛋白(CRP)的结合,(7) C1q与球状C1q受体(gC1qR)的结合,(8) C1q与补体受体1(CR1)的结合,(9) C1q与 β -淀粉样蛋白的结合,或(10) C1q与钙网蛋白的结合。在其他实施方案中,C1q的生物活性是(1) 经典补体活化途径的活化,(2) 裂解的减少和/或C3沉积的减少,(3) 抗体和补体依赖性细胞毒性的活化,(4) CH50溶血,(5) 红血细胞裂解的减少,(6) 红血细胞吞噬作用的减少,(7) 树突细胞浸润的减少,(8) 补体介导的红血细胞裂解的抑制,(9) 淋巴细胞浸润的减少,(10) 巨噬细胞浸润的减少,(11) 抗体沉积的减少,(12) 嗜中性粒细胞浸润的减少,(13) 血小板吞噬作用的减少,(14) 血小板裂解的减少,(15) 移植移植物存活的改善,(16) 巨噬细胞介导的吞噬作用的减少,(17)

自身抗体介导的补体活化的减少, (18) 由输血反应所致的红血细胞破坏的减少, (19) 由同种抗体所致的红血细胞裂解的减少, (20) 由输血反应所致的溶血的减少, (21) 同种抗体介导的血小板裂解的减少, (22) 贫血的改善, (23) 嗜酸性粒细胞增多的减少, (24) 红血细胞上C3沉积的减少(例如, RBC上C3b、iC3b等的沉积的减少), (25) 血小板上C3沉积的减少(例如, 血小板上C3b、iC3b等的沉积的减少), (26) 过敏毒素产生的减少, (27) 自身抗体介导的水疱形成的减少, (28) 自身抗体诱导的红斑的减少, (29) 由输血反应所致的红血细胞破坏的减少, (30) 由输血反应所致的血小板裂解的减少, (31) 肥大细胞活化的减少, (32) 肥大细胞组胺释放的减少, (33) 血管通透性的降低, (34) 移植移植物内皮上补体沉积的减少, (35) B细胞抗体产生, (36) 树突细胞成熟, (37) T细胞增殖, (38) 细胞因子产生, (39) 小胶质细胞活化, (40) 阿瑟反应, (41) 移植移植物内皮中过敏毒素产生的减少, 或(42) 补体受体3(CR3/C3)表达细胞的活化。

[0112] 在一些实施方案中, CH50溶血包括人、小鼠和/或大鼠CH50溶血。在一些实施方案中, 抗体能够中和至少约50%至至少约95%的CH50溶血。在一些实施方案中, 抗体能够中和50%、60%、70%、80%、90%或100%的CH50溶血。抗体还能够在小于150ng/ml、小于100ng/ml、小于50ng/ml或小于20ng/ml的剂量下中和至少50%的CH50溶血。

[0113] 测量补体活性的其他体外测定包括用于测量补体活化过程中形成的补体组分或复合物的裂解产物的ELISA测定。通过经典途径进行的补体活化可以通过跟踪血清中C4d和C4的水平来测量。可以在ELISA中通过评估循环中Bb或C3bBbP复合物的水平来测量替代途径的活化。体外抗体介导的补体活化测定也可以用于评估对C3a产生的抑制。

[0114] 本公开的抗体可以是单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、人源化抗体、人抗体、嵌合抗体、多特异性抗体、其抗体片段或其衍生物。在一些实施方案中, 抗体是人源化抗体。

[0115] 本公开的抗体也可以是抗体片段, 例如Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、Fv片段、双抗体或单链抗体分子。在一些实施方案中, 抗体片段是Fab片段。

[0116] 在一些实施方案中, 抗体是可通过重组手段制备、表达、产生或分离的人单克隆抗体, 例如(a) 从对人免疫球蛋白基因为转基因或跨染色体的动物(例如, 小鼠) 或由其制备的杂交瘤(下文进一步描述) 中分离的抗体, (b) 从经转化以表达抗体的宿主细胞(例如来自转染瘤) 中分离的抗体, (c) 从重组、组合的人抗体文库中分离的抗体, 和(d) 通过涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接到其他DNA序列的任何其他手段制备、表达、产生或分离的抗体。此类重组人抗体具有来自人种系和/或非种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。然而, 在某些实施方案中, 可以使此类重组人抗体经受体外诱变(或, 当使用人Ig序列的转基因动物时, 进行体内体细胞诱变), 并且因此重组抗体的V_H和V_L区的氨基酸序列是这样的序列, 其虽然来源于人种系V_H和V_L序列并与其相关, 但可能不天然存在于体内的人抗体种系库内。

[0117] 在一些实施方案中, 抗体是人源化和/或嵌合单克隆抗体, 其可以通过用(1) 来源于酶消化来自人血浆或血清的纯化补体组分的天然补体组分(例如, C1q), 或(2) 由真核或原核系统表达的重组补体组分或其产生片段免疫啮齿动物(例如, 小鼠、大鼠、仓鼠和豚鼠) 来产生。其他动物可用于免疫, 例如非人灵长类动物、表达人免疫球蛋白的转基因小鼠和移植有人B淋巴细胞的严重联合免疫缺陷(SCID) 小鼠。

[0118] 多克隆和单克隆抗体作为免疫球蛋白(Ig) 分子在免疫系统对病原体的反应中自然产生。约150kDa的IgG1分子是人血清中浓度为8mg/ml的主要形式, 由两条同一的约50kDa

重链和两条同一的约25kDa轻链构成。

[0119] 杂交瘤可以通过常规程序,通过将来自免疫动物的B淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合来产生。此外,通过在噬菌体展示系统中从人B淋巴细胞中筛选重组单链Fv或Fab文库,可以产生抗C1q抗体。可以通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)、蛋白质免疫印迹(Western immunoblotting)或其他免疫化学技术来测试MAb对人C1q的特异性。

[0120] 可以通过溶血测定法,针对替代补体途径使用未致敏的兔或豚鼠RBC或针对经典补体途径使用致敏的鸡或羊RBC来评估筛选过程中鉴定的抗体对补体活化的抑制活性。通过有限稀释克隆展现对经典补体途径具有特异性的抑制活性的那些杂交瘤。通过上述测定法纯化抗体以用于表征对人C1q的特异性。

[0121] 抗补体C1q抗体

[0122] 本文公开的抗C1q抗体是有效的C1q抑制剂,并且可以在任何时期给药以持续抑制C1q功能,然后任选地停药,以允许在其活性可能重要时恢复正常的C1q功能。用本文公开的抗C1q抗体在动物研究中获得的结果可以容易地与人源化或人抗体及其片段和/或衍生物一起带入临床。

[0123] C1q是一种460kDa的大多聚体蛋白,由18条多肽链(6条C1q A链、6条C1q B链和6条C1q C链)组成。C1r和C1s补体蛋白与C1q尾区结合以形成C1复合物(C1qr₂s₂)。

[0124] 本公开的抗体特异性识别补体因子C1q和/或经典补体活化途径的C1复合物中的C1q。结合补体因子可以非限制性地来源于具有补体系统的任何生物,包括任何哺乳动物生物,例如人、小鼠、大鼠、兔、猴、狗、猫、牛、马、骆驼、绵羊、山羊或猪。

[0125] 如本文所用,“C1复合物”是指蛋白质复合物,其可包括但不限于一种C1q蛋白质、两种C1r蛋白质和两种C1s蛋白质(例如,C1qr²s²)。

[0126] 本文公开的抗C1q抗体可以抑制C1复合物形成。

[0127] 如本文所用,“补体因子C1q”是指野生型序列和天然存在的变体序列。

[0128] 由本公开的抗体识别的补体因子C1q的非限制性实例是人C1q,包括三条多肽链A、B和C:

[0129] C1q,链A(智人(homo sapiens)),登录号蛋白质

[0130] 数据库:NP_057075.1;基因库编号:NM_015991:

[0131] >gi|7705753|ref|NP_057075.1|组分C1q

[0132] 子组分亚基A前体[智人]

[0133] (SEQ ID NO:1)

[0134] MEGPRGWLVLCLVLAISLASMVTE DLCRAPDGKKGEAGRPGRRGRPGLKGEQGE PGAPGIRTGIQGLKG
DQGE PGPSGNPGKVGYPGSGPLGARGIPGIKGTGKSPGNIKDQPRPAFSAIRRNPPMGGNVVIFDVTITNQEEPY
QNHSGRFVCTVPGY YFTFQVLSQWEICLSIVSSSRGQVRRSLGFCDTTNKGLFQVVS GGMVLQLQQGDQVWVEKD
PKKGHIYQGSEADSVFSGFLIFPSA。

[0135] C1q,链B(智人),登录号蛋白质

[0136] 数据库:NP_000482.3;基因库编号:NM_000491.3:

[0137] >gi|87298828|ref|NP_000482.3|组分C1q

[0138] 子组分亚单位B前体[智人]

[0139] (SEQ ID NO:2)

[0140] MMMKIPWGSIPVLMLLLLLGLIDISQAQLSCTGPPAIPGIPGIPGTGPGDGGQPGTPGIKGEKGLPGLA
GDHGEFGEKGDPIPGNPGKVGPKGPMGPKGGPGAPGAPGPKGESGDYKATQKIAFSATRTINVPLRRDQTIRFDH
VITNMNNYEPKFTCKVPGLYFYTYHASSRGNLCVNLMRGRERAQKVVTFCDYAYNTFQVTTGGMVLKLEQGE
NVFLQATDKNSLLGMEGANSIFSGFLLFPDMEA。

[0141] C1q, 链C (智人), 登录号蛋白质

[0142] 数据库:NP_001107573.1; 基因库编号:

[0143] NM_001114101.1:

[0144] >gi|166235903|ref|NP_001107573.1|组分C1q

[0145] 亚组分亚单位C前体[智人]

[0146] (SEQ ID NO:3)

[0147] MDVGPSSLPHLGLKLLLLLLLLPLRGQANTGCYGIPGMPGLPGAPGKGDYDGLPGPKGEPGIPAIPGIR
GPKGQKGEPLPGHPGKNGPMGPPGMPGVPGPMGIPGEPGEEGRYKQKFQSVFTVTRQTHQPPAPNSLIRFNAVLTN
PQGDYD

[0148] TSTGKFTCKVPGLYFVYHASHTANLCVLLYRSGVKVVTFCGHTSKTNQVNSGGVLLRLQVGEEVWLA
VNDYYDMVGIQGSDFVSGFLLFPD。

[0149] 因此, 本公开的抗C1q抗体可以结合C1q蛋白的多肽链A、多肽链B和/或多肽链C。在
一些实施方案中, 本公开的抗C1q抗体结合人C1q或其同源物的多肽链A、多肽链B和/或多肽
链C, 所述同源物例如小鼠、大鼠、兔、猴、狗、猫、牛、马、骆驼、绵羊、山羊或猪C1q。在
一些实施方案中, 抗C1q抗体是人抗体、人源化抗体、嵌合抗体或其片段或其衍生物。在
一些实施方案中, 抗体是人源化抗体。在一些实施方案中, 抗体是抗体片段, 例如Fab片段。

[0150] 以下二十个段落中提到的所有序列都通过引用并入美国专利第9,708,394号, 其
公开的抗体和相关组合物在此通过引用并入。

[0151] 抗体M1 (Mab1) 的轻链和重链可变结构域序列

[0152] 使用标准技术, 确定了编码抗体M1的轻链可变结构域和重链可变结构域的核酸和
氨基酸序列。抗体M1轻链可变结构域的氨基酸序列是:

DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSINKYLAWYQEKPCKTNKLLIYSGS

[0153] **TLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYCYCQQHNEYPLTFGAGTKL**
ELK (SEQ ID NO:4)。

[0154] 轻链可变结构域的高可变区 (HVR) 以粗体和下划线标出。在一些实施方案中, M1轻
链可变结构域的HVR-L1具有序列RASKSINKYLA (SEQ ID NO:5), M1轻链可变结构域的HVR-L2
具有序列SGSTLQS (SEQ ID NO:6), 并且M1轻链可变结构域的HVR-L3具有序列QQHNEYPLT
(SEQ ID NO:7)。

[0155] 抗体M1重链可变结构域的氨基酸序列是:

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKSSGYHFTSYWMHWVKQRPGQGLEWI

[0156] **GVIHPNSGSINYNEKFESKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAGE**
RDSTEVLPMDYWGGTGSVTVSS (SEQ ID NO:8)。

[0157] 重链可变结构域的高可变区 (HVR) 以粗体和下划线标出。在一些实施方案中, M1重
链可变结构域的HVR-H1具有序列GYHFTSYWMH (SEQ ID NO:9), M1重链可变结构域的HVR-H2

具有序列VIHPNSGSINYNEKFES (SEQ ID NO:10), 并且M1重链可变结构域的HVR-H3具有序列ERDSTEVLPMDY (SEQ ID NO:11)。

[0158] 编码轻链可变结构域的核酸序列被确定为:

[0159] GATGTCCAGATAACCCAGTCTCCATCTTATCTTGCTGCATCTCCTGGAGAAACCATTACTATTAATTG CAGGGCAAGTAAGAGCATTAACAAATATTTAGCCTGGTATCAAGAGAAACCTGGGAAAATAATAAGCTTCTTATC TACTCTGGATCCACTTTGCAATCTGGAATCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTTCACTCTCA CCATCAGTAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGCAATGTATTACTGTCAACAACATAATGAATACCCGCTCACGTTCCGG TGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA (SEQ ID NO:12)。

[0160] 编码重链可变结构域的核酸序列被确定为:

[0161] CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCCTGCAA GTCTTCTGGCTACCATTTACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATT GGAGTGATTTCATCCTAATAGTGGTAGTATTAATACTACAATGAGAAGTTTCGAGAGCAAGGCCACACTGACTGTAGACA AATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCGGCGGTCTATTATTGTGCAGGAGA GAGAGATTCTACGGAGTTCTCCCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:13)。

[0162] Mab1-Fab是Mab1 (M1) 抗体的Fab。

[0163] Mab3是鼠抗C1q抗体, 其衍生自Mab 1抗体并针对鼠实验进行了优化, 并且Mab3-Fab是Mab3抗体的Fab。

[0164] 物质保藏

[0165] 以下物质已根据布达佩斯条约 (Budapest Treaty) 保藏在美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection), ATCC专利保管处, 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209, USA (ATCC):

[0166]	样品 ID	同种型	保藏物	
			日期	ATCC 登录号
			保藏物	
			日期	ATCC 登录号
[0167]	小鼠杂交瘤 C1qM1 7788-1(M) 051613 产生 抗 C1q 抗体 M1	IgG1, κ	6月6日, 2013	PTA-120399

[0168] 产生M1抗体的杂交瘤细胞系 (小鼠杂交瘤C1qM1 7788-1 (M) 051613) 已在确保在专利申请未决期间可获得培养物的条件下保藏在ATCC, 期限为30年, 或最近请求后的5年, 或专利的有效期限, 以较长者为准。如果在此期间保藏物变得不可行, 那么将替换保藏物。根据主题申请的对应物或其后代提交的国家的外国专利法的要求, 保藏物是可用的。然而, 应该理解的是, 保藏物的可用性并不构成在减损由政府行为授予的专利权的情况下实践主题发明的许可。

[0169] 本文公开了施用包含轻链可变结构域和重链可变结构域的抗C1q抗体的方法。抗体可以至少结合人C1q、小鼠C1q或大鼠C1q。抗体可以是人源化抗体、嵌合抗体或人抗体。抗体可以是单克隆抗体、其抗体片段和/或其抗体衍生物。在一些实施方案中, 抗体是人源化

抗体。在一些实施方案中,抗体是抗体片段,例如Fab片段。轻链可变结构域包含由以登录号PTA-120399保藏的杂交瘤细胞系产生的单克隆抗体M1的HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3。重链可变结构域包含由以ATCC登录号PTA-120399保藏的杂交瘤细胞系产生的单克隆抗体M1的HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3。

[0170] 在一些实施方案中,轻链可变结构域和重链可变结构域的氨基酸序列包含HVR-L1的SEQ ID NO:5、HVR-L2的SEQ ID NO:6、HVR-L3的SEQ ID NO:7、HVR-H1的SEQ ID NO:9、HVR-H2的SEQ ID NO:10和HVR-H3的SEQ ID NO:11中的一个或多个。

[0171] 抗体可包含与SEQ ID NO:4至少85%、90%或95%同一的轻链可变结构域氨基酸序列,优选地同时保留HVR-L1 RASKSINKYLA(SEQ ID NO:5)、HVR-L2 SGSTLQS(SEQ ID NO:6)和HVR-L3 QQHNEYPLT(SEQ ID NO:7)。抗体可包含与SEQ ID NO:8至少85%、90%或95%同一的重链可变结构域氨基酸序列,优选地同时保留HVR-H1 GYHFTSYWMH(SEQ ID NO:9)、HVR-H2 VIHPNSGSINYNEKFES(SEQ ID NO:10)和HVR-H3 ERDSTEVLP MDY(SEQ ID NO:11)。

[0172] 本文公开了施用抗C1q抗体的方法,所述抗体抑制C1q与自身抗体之间的相互作用。在优选的实施方案中,抗C1q抗体促使从循环或组织中清除C1q。

[0173] 在一些实施方案中,本公开的抗C1q抗体抑制C1q与C1s之间的相互作用。在一些实施方案中,抗C1q抗体抑制C1q与C1r之间的相互作用。在一些实施方案中,抗C1q抗体抑制C1q与C1s之间和C1q与C1r之间的相互作用。在一些实施方案中,抗C1q抗体抑制C1q与另一种抗体(例如自身抗体)之间的相互作用。在优选的实施方案中,抗C1q抗体促使从循环或组织中清除C1q。在一些实施方案中,抗C1q抗体以小于2.5:1、2.0:1、1.5:1或1.0:1的化学计量抑制各自的相互作用。在一些实施方案中,C1q抗体在大约等摩尔浓度的C1q和抗C1q抗体下抑制相互作用,例如C1q-C1s相互作用。在其他实施方案中,抗C1q抗体以小于20:1、小于19.5:1;小于19:1、小于18.5:1、小于18:1、小于17.5:1、小于17:1、小于16.5:1、小于16:1、小于15.5:1、小于15:1、小于14.5:1、小于14:1、小于13.5:1、小于13:1、小于12.5:1、小于12:1、小于11.5:1、小于11:1、小于10.5:1、小于10:1、小于9.5:1、小于9:1、小于8.5:1、小于8:1、小于7.5:1、小于7:1、小于6.5:1、小于6:1、小于5.5:1、小于5:1、小于4.5:1、小于4:1、小于3.5:1、小于3:1、小于2.5:1、小于2.0:1、小于1.5:1或小于1.0:1的化学计量结合C1q。在某些实施方案中,抗C1q抗体以20:1至1.0:1或小于1.0:1的结合化学计量结合C1q。在某些实施方案中,抗C1q抗体以6:1至1.0:1或小于1.0:1的结合化学计量结合C1q。在某些实施方案中,抗C1q抗体以2.5:1至1.0:1或小于1.0:1的结合化学计量结合C1q。在一些实施方案中,抗C1q抗体抑制C1q与C1r之间、或C1q与C1s之间、或C1q与C1r和C1s两者之间的相互作用。在一些实施方案中,抗C1q抗体抑制C1q与C1r之间、C1q与C1s之间和/或C1q与C1r和C1s两者之间的相互作用。在一些实施方案中,抗C1q抗体结合至C1q A链。在其他实施方案中,抗C1q抗体结合至C1q B链。在其他实施方案中,抗C1q抗体结合至C1q C链。在一些实施方案中,抗C1q抗体结合C1q A链、C1q B链和/或C1q C链。在一些实施方案中,抗C1q抗体结合C1q A链、B链和/或C链的球状结构域。在其他实施方案中,抗C1q抗体结合至C1q A链、C1q B链和/或C1q C链的胶原样结构域。

[0174] 当本公开的抗体抑制两种或更多种补体因子之间的相互作用,例如C1q与C1s之间的相互作用或C1q与C1r之间的相互作用时,相对于其中不存在本公开的抗体的对照,在抗体的存在下发生的相互作用可以减少至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、

至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99%。在一些实施方案中,本公开的抗体将两种或更多种补体因子之间的相互作用减少50%、60%、70%、80%、90%或100%。在某些实施方案中,相对于其中不存在本公开的抗体的对照,在抗体的存在下发生的相互作用减少了范围介于至少30%至至少99%的量。

[0175] 在一些实施方案中,相对于其中不存在本公开的抗体的对照,本公开的抗体使C2或C4裂解抑制至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99%,或抑制范围介于至少30%至至少99%的量。用于测量C2或C4裂解的方法是本领域熟知的。本公开的抗体关于C2或C4裂解的 EC_{50} 值可以小于 $3\mu\text{g/ml}$; $2.5\mu\text{g/ml}$; $2.0\mu\text{g/ml}$; $1.5\mu\text{g/ml}$; $1.0\mu\text{g/ml}$; $0.5\mu\text{g/ml}$; $0.25\mu\text{g/ml}$; $0.1\mu\text{g/ml}$; $0.05\mu\text{g/ml}$ 。在一些实施方案中,本公开的抗体在大约等摩尔浓度的C1q和相应的抗C1q抗体下抑制C2或C4裂解。

[0176] 在一些实施方案中,相对于其中不存在本公开的抗体的对照,本公开的抗体使自身抗体依赖性和补体依赖性细胞毒性(CDC)抑制至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99%,或抑制范围介于至少30%至至少99%的量。本公开的抗体关于抑制自身抗体依赖性和补体依赖性细胞毒性的 EC_{50} 值可以小于 $3\mu\text{g/ml}$; $2.5\mu\text{g/ml}$; $2.0\mu\text{g/ml}$; $1.5\mu\text{g/ml}$; $1.0\mu\text{g/ml}$; $0.5\mu\text{g/ml}$; $0.25\mu\text{g/ml}$; $0.1\mu\text{g/ml}$; $0.05\mu\text{g/ml}$ 。

[0177] 在一些实施方案中,相对于其中不存在本公开的抗体的对照,本公开的抗体使补体依赖性细胞介导的细胞毒性(CDCC)抑制至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99%,或抑制范围介于至少30%至至少99%的量。用于测量CDCC的方法是本领域熟知的。本公开的抗体关于CDCC抑制的 EC_{50} 值可以小于 $3\mu\text{g/ml}$; $2.5\mu\text{g/ml}$; $2.0\mu\text{g/ml}$; $1.5\mu\text{g/ml}$; $1.0\mu\text{g/ml}$; $0.5\mu\text{g/ml}$; $0.25\mu\text{g/ml}$; $0.1\mu\text{g/ml}$; $0.05\mu\text{g/ml}$ 。在一些实施方案中,本公开的抗体抑制CDCC,但不抑制抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。

[0178] 人源化抗补体C1q抗体

[0179] 本公开的人源化抗体特异性结合经典补体途径的C1复合物中的补体因子C1q和/或C1q蛋白。人源化抗C1q抗体可特异性结合人C1q、人和小鼠C1q、大鼠C1q或人C1q、小鼠C1q和大鼠C1q。

[0180] 以下十六个段落中提到的所有序列都通过引用并入美国专利申请第14/933,517号,其公开的抗体和相关组合物在此通过引用并入。

[0181] 在一些实施方案中,人重链恒定区是人IgG4重链恒定区,其包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:47具有至少70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%同源性。根据Kabat编号,人IgG4重链恒定区可以包含具有一个或多个修饰和/或氨基酸取代的Fc区。在这种情况下,Fc区包含位置248处的亮氨酸至谷氨酸的氨基酸取代,其中这种取代抑制Fc区与Fc受体相互作用。在一些实施方案中,Fc区包含位置241处的丝氨酸至脯氨酸的氨基酸取代,其中这种取代防止抗体中的臂转换。

[0182] 人IgG4(S241P L248E)重链恒定结构域的氨基酸序列是:ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVKDRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR

EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 47)。

[0183] 抗体可包含重链可变结构域和轻链可变结构域,其中重链可变结构域包含选自SEQ ID NO:31-34中的任一个的氨基酸序列,或与选自SEQ ID NO:31-34中的任一个的氨基酸序列具有至少约90%同源性的氨基酸序列。在某些这样的实施方案中,轻链可变结构域包含选自SEQ ID NO:35-38中的任一个的氨基酸序列,或与选自SEQ ID NO:35-38中的任一个的氨基酸序列具有至少约90%同源性的氨基酸序列。

[0184] 重链可变结构域变体1 (VH1) 的氨基酸序列是: **QVQLVQSGAELKKPGA**
SVKVSCKSSGYHFTSYWMHWVKQAPGQGLEWIGVIHPNSGSINYNEKFE
SKATITVDKSTSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAGERDSTEVLPMDYWGQG
TSVTVSS (SEQ ID NO: 31)。VH1的高变区 (HVR) 以粗体和下划线标出。

[0186] 重链可变结构域变体2 (VH2) 的氨基酸序列是: **QVQLVQSGAELKKPGA**
SVKVSCKSSGYHFTSYWMHWVKQAPGQGLEWIGVIHPNSGSINYNEKFE
SRATITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGERDSTEVLPMDYWGQGT
TVTVSS (SEQ ID NO: 32)。VH2的高可变区 (HVR) 以粗体和下划线标出。

[0188] 重链可变结构域变体3 (VH3) 的氨基酸序列是: **QVQLVQSGAELKKPGA**
SVKVSCKSSGYHFTSYWMHWVKQAPGQGLEWIGVIHPNSGSINYNEKFE
SRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGERDSTEVLPMDYWGQGT
TVTVSS (SEQ ID NO: 33)。VH3的高可变区 (HVR) 以粗体和下划线标出。

[0190] 重链可变结构域变体4 (VH4) 的氨基酸序列是: **QVQLVQSGAELKKPGA**
SVKVSCKSSGYHFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGVIHPNSGSINYNEKFE
SRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGERDSTEVLPMDYWGQGT
TVTVSS (SEQ ID NO: 34)。VH4的高可变区 (HVR) 以粗体和下划线标出。

[0192] κ 轻链可变结构域变体1 (V κ 1) 的氨基酸序列是:
DVQITQSPSYLAASLGERATINCRASKSINKYLAWYQQKPGKTNKLLIYSG
STLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAMYQCQQHNEYPLTFGQGT
KLEIK (SEQ ID NO: 35)。V κ 1的高可变区 (HVR) 以粗体和下划线标出。

[0194] κ 轻链可变结构域变体2 (V κ 2) 的氨基酸序列是:
DVQITQSPSSLSASLGERATINCRASKSINKYLAWYQQKPGKANKLLIYSG
STLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAMYQCQQHNEYPLTFGQGT
KLEIK (SEQ ID NO: 36)。V κ 2的高可变区 (HVR) 以粗体和下划线标出。

[0195] κ 轻链可变结构域变体3 (V κ 3) 的氨基酸序列是:

DVQITQSPSSLSASLGERATINCR**RASKSINKYLA**WYQQKPGKAPKLLIY**SGS**
TLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYC**QQHNEYPLT**FGQG**GTK**
 LEIK (SEQ ID NO: 37)。V κ 3的高可变区 (HVR) 以粗体和下划线标出。

[0197] κ 轻链可变结构域变体4 (V κ 4) 的氨基酸序列是:

DIQLTQSPSSLSASLGERATINCR**RASKSINKYLA**WYQQKPGKAPKLLIY**SGS**
TLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYC**QQHNEYPLT**FGQG**GTK**
 LEIK (SEQ ID NO: 38)。V κ 4的高可变区 (HVR) 以粗体和下划线标出。

[0199] 抗体可包含与SEQ ID NO:35-38至少85%、90%或95%同一的轻链可变结构域氨基酸序列,同时保留HVR-L1 RASKSINKYLA (SEQ ID NO:5)、HVR-L2 SGSTLQS (SEQ ID NO:6) 和HVR-L3 QQHNEYPLT (SEQ ID NO:7)。抗体可包含与SEQ ID NO:31-34至少85%、90%或95%同一的重链可变结构域氨基酸序列,同时保留HVR-H1 GYHFTSYWMH (SEQ ID NO:9)、HVR-H2 VIHPNSGSINYNEKFES (SEQ ID NO:10) 和HVR-H3 ERDSTEVLPMDY (SEQ ID NO:11)。

[0200] 在一些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:35的轻链可变结构域氨基酸序列和SEQ ID NO:31的重链可变结构域氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:36的轻链可变结构域氨基酸序列和SEQ ID NO:32的重链可变结构域氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:37的轻链可变结构域氨基酸序列和SEQ ID NO:33的重链可变结构域氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:38的轻链可变结构域氨基酸序列和SEQ ID NO:34的重链可变结构域氨基酸序列。

[0201] 全长抗体Mab2包含重链可变结构域变体3 (VH3) (SEQ ID NO:33) 和 κ 轻链可变结构域变体3 (V κ 3) (SEQ ID NO:37)。Mab2-Fab是Mab2抗体的Fab。

[0202] 在一些实施方案中,本公开的人源化抗C1q抗体包括含有Fab区的重链可变区和含有Fc区的重链恒定区,其中Fab区特异性结合本公开的C1q蛋白,但Fc区不能结合C1q蛋白。在一些实施方案中,Fc区来自人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型。在一些实施方案中,Fc区不能诱导补体活性和/或不能诱导抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。在一些实施方案中,Fc区包含一个或多个修饰,包括但不限于氨基酸取代。在某些实施方案中,本公开的人源化抗C1q抗体的Fc区包含根据Kabat编号惯例的位置248或根据Kabat编号惯例的对应于位置248的位置和/或根据Kabat编号惯例的位置241或根据Kabat编号惯例的对应于位置241的位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,位置248或对应于位置248的位置处的氨基酸取代抑制Fc区与Fc受体相互作用。在一些实施方案中,位置248或对应于位置248的位置处的氨基酸取代是亮氨酸至谷氨酸的氨基酸取代。在一些实施方案中,位置241或对应于位置241的位置处的氨基酸取代防止抗体中的臂转换。在一些实施方案中,位置241或对应于位置241的位置处的氨基酸取代是丝氨酸至脯氨酸的氨基酸取代。在某些实施方案中,本公开的人源化抗C1q抗体的Fc区包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:47的氨基酸序列具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%同源性的氨基酸序列。

[0203] 抗C1qFab片段(例如,FabA)

[0204] 在重组DNA技术出现之前,裂解多肽序列的蛋白水解酶(蛋白酶)已被用于解剖抗体分子的结构并确定分子的哪些部分负责其各种功能。蛋白酶木瓜蛋白酶的有限消化将抗

体分子裂解成三个片段。被称为Fab片段的两个片段是相同的,并且含有抗原结合活性。Fab片段对应于抗体分子的两条相同的臂,每条臂由与重链的 V_H 和 C_H1 结构域配对的完整轻链组成。其他片段不含抗原结合活性,但最初观察到容易结晶,并且因此命名为Fc片段(可结晶的片段)。当将Fab分子与IgG分子进行比较时,发现Fab对于某些体内应用中优于IgG,因为其具有更高的移动性和组织穿透能力,其的循环半衰期缩短,其能够单价结合抗原而不介导抗体效应功能,并且其的免疫原性较低。

[0205] Fab分子是Ig分子的大约50-kDa的人工片段,其重链被恒定结构域 C_H2 和 C_H3 缩短。两个异嗜性(V_L-V_H 和 C_L-C_H1)结构域相互作用是Fab分子双链结构的基础,其通过 C_L 与 C_H1 之间的二硫键进一步稳定。Fab和IgG具有由六个互补决定区(CDR)形成的相同抗原结合位点, V_L 和 V_H 各三个(LCDR1、LCDR2、LCDR3和HCDR1、HCDR2、HCDR3)。CDR定义了抗体的高变抗原结合位点。在LCDR3和HCDR3中发现了最高的序列变异,其在天然免疫系统中分别由 V_L 和 J_L 基因或 V_H 、 D_H 和 J_H 基因的重排产生。LCDR3和HCDR3通常形成抗原结合位点的核心。连接并显示六个CDR的保守区域被称为框架区。在可变结构域的三维结构中,框架区形成了两个反向平行的 β -折叠的夹层,其通过外部的高变CDR环和内部的保守二硫键连接。Fab和IgG的抗原结合位点的稳定性和多功能性的独特组合是其在疾病诊断、监测、预防和治疗的临床实践中成功的基础。

[0206] 所有抗C1q抗体Fab片段序列通过引用并入美国专利第15/360,549号,其公开的抗体和相关组合物在此通过引用并入。

[0207] 在某些实施方案中,本公开提供了结合包含重链(V_H/C_H1)和轻链(V_L/C_L)的C1q蛋白的抗C1q抗体Fab片段,其中抗C1q抗体Fab片段具有六个互补决定区(CDR), V_L 和 V_H 各三个(HCDR1、HCDR2、HCDR3和LCDR1、LCDR2、LCDR3)。抗体Fab片段的重链在IgG1的第一重链结构域(SEQ ID NO:39)后被截短,并且包含以下氨基酸序列:

QVQLVQSGAELKKPGASVKVSKSSGYHFTSYWMHWVKQAPGQGLEWIGVIHPNSGSINYNEKFESRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGE

[0208] **RDSTEVLPMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT** (SEQ ID NO: 39)

[0209] SEQ ID NO:39的互补决定区(CDR)以粗体和下划线标出。

[0210] 抗体Fab片段的轻链结构域包含以下氨基酸序列(SEQ ID NO:40):

DVQITQSPSSLASLGERATINCRASKSINKYLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYCQQHNEYPLTFGQGTK

[0211] **LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC** (SEQ ID NO: 40)

[0212] SEQ ID NO:40的互补决定区(CDR)以粗体和下划线标出。

[0213] FabA是抗C1q抗体Fab片段,其包含含有SEQ ID NO:39的重链结构域和含有SEQ ID NO:40的轻链结构域。

[0214] Mab1-Fab是Mab1(M1)抗体的Fab。

[0215] Mab2-Fab是Mab2抗体的Fab。

[0216] Mab3-Fab是Mab3抗体的Fab。

[0217] 核酸、载体和宿主细胞

[0218] 适用于本公开方法的抗体可以使用重组方法和组合物产生,例如,如美国专利第4,816,567号中所述。在一些实施方案中,提供了具有编码本公开的任何抗体的核苷酸序列的分离的核酸。此类核酸可以编码含有 V_L/C_L 的氨基酸序列和/或含有抗C1q抗体的 V_H/C_H1 的氨基酸序列。在一些实施方案中,提供了含有此类核酸的一种或多种载体(例如,表达载体)。也可以提供含有此类核酸的宿主细胞。宿主细胞可以含有以下(例如,已用以下转导): (1) 含有编码含有抗体的 V_L/C_L 的氨基酸序列和含有抗体的 V_H/C_H1 的氨基酸序列的核酸的载体,或(2) 含有编码含有抗体的 V_L/C_L 的氨基酸序列的核酸的第一载体,和含有编码含有抗体的 V_H/C_H1 的氨基酸序列的核酸的第二载体。在一些实施方案中,宿主细胞是真核的,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴样细胞(例如,Y0、NS0、Sp20细胞)。在一些实施方案中,宿主细胞是细菌,例如大肠杆菌。

[0219] 本文公开了制备抗C1q抗体的方法。所述方法包括在适于抗体表达的条件下,培养含有编码抗C1q抗体的核酸的本公开的宿主细胞。在一些实施方案中,随后从宿主细胞(或宿主细胞培养基)中回收抗体。

[0220] 为了重组产生本公开的人源化抗C1q抗体,分离编码抗体的核酸,并且将其插入一种或多种载体中以用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。可使用常规程序将此类核酸容易地分离并进行测序(例如,通过使用寡核苷酸探针,所述寡核苷酸探针能够特异性结合编码抗体的重链和轻链的基因)。

[0221] 含有编码本公开的任何抗体或其片段多肽(包括抗体)的核酸序列的合适载体包括但不限于克隆载体和表达载体。合适的克隆载体可以根据标准技术构建,或可以从本领域可获得的大量克隆载体中选择。虽然选择的克隆载体可以根据打算使用的宿主细胞而变化,但是有用的克隆载体通常具有自我复制的能力,可以具有特定限制性核酸内切酶的单一靶标,和/或可以携带可用于选择含有所述载体的克隆的标志物的基因。合适的例子包括质粒和细菌病毒,例如pUC18、pUC19、Bluescript(例如pBS SK+)及其衍生物、mp18、mp19、pBR322、pMB9、ColE1、pCR1、RP4、噬菌体DNA和穿梭载体,例如pSA3和pAT28。这些和许多其他克隆载体可从商业供应商,例如BioRad、Stratagene和Invitrogen获得。

[0222] 含有所关注核酸的载体可以通过许多合适的方法中的任何一种引入宿主细胞中,包括电穿孔;使用氯化钙、氯化铷、磷酸钙、DEAE葡聚糖或其他物质的转染;微粒轰击;脂质感染;和感染(例如,当载体是传染剂,例如痘苗病毒时)。引入载体或多核苷酸的选择将通常取决于宿主细胞的特征。在一些实施方案中,载体包含核酸,所述核酸含有编码本公开的抗C1q抗体的一个或多个氨基酸序列。

[0223] 适合于克隆或表达编码抗体的载体的宿主细胞包括原核或真核细胞。例如,本公开的抗C1q抗体可以在细菌中产生,特别是在不需要糖基化和Fc效应功能时。对于在细菌中表达抗体片段和多肽(例如美国专利第5,648,237号、第5,789,199号和第5,840,523号;和Charlton,Methods in Molecular Biology,第248卷(B.K.C.Lo编,Humana Press,Totowa,NJ,2003),第245-254页描述了抗体片段在大肠杆菌中的表达)。在其他实施方案中,本公开的抗体可以在真核细胞中产生,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴细胞(例如,Y0、NS0、

Sp20细胞) (例如,美国专利申请第14/269,950号;美国专利第8,981,071号;Eur JBiochem.1991年1月1日;195(1):235-42)。表达后,可以将抗体在可溶性级分中从细菌细胞糊中分离,并可以进一步纯化。

[0224] 药物组合物和施用

[0225] 本公开的抗C1q抗体(例如,FabA)可以以药物组合物的形式施用。

[0226] 本公开的抗体、抗体片段和/或抗体衍生物的治疗配制物可以通过将具有所需纯度的抗体与任选的药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合以冻干配制物或水溶液的形式来制备以用于储存(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,0sol,A编[1980])。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在采用的剂量和浓度下对接受者是无毒的,并且包括缓冲剂,例如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵;苜蓿素氯铵;苯酚、丁基或苄基醇;对羟基苯甲酸烷基酯,例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(小于约10个残基)的多肽;蛋白质,例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖及其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,例如EDTA;糖类,例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐抗衡离子,例如钠离子;金属络合物(例如,Zn-蛋白质络合物);和/或非离子型表面活性剂,例如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

[0227] 脂转染或脂质体也可用于将抗体或抗体片段或抗体衍生物递送至细胞中,其中特异性结合靶蛋白的结合结构域的表位或最小片段是优选的。

[0228] 抗体也可以包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊(例如,分别为羟甲基纤维素或明胶-微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)中、包埋在胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊)中或包埋在粗乳剂中。此类技术公开于Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,0sol,A编(1980)中。

[0229] 用于施用的制剂可以是无菌的。这易于通过经由无菌过滤膜过滤来实现。

[0230] 可以制备缓释制剂。缓释制备剂的合适实例包括包含抗体的固体疏水性聚合物的半透过性基质,所述基质为成形制品形式,例如膜或微胶囊。持续释放基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如,聚(甲基丙烯酸2-羟乙酯)或聚乙烯醇)、聚丙交酯(美国专利第3,773,919号)、L-谷氨酸和 γ -乙基-L-谷氨酸盐的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物(例如LUPRON DEPOT)(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林(leuprolide acetate)组成的可注射微球)和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。虽然例如乙烯-醋酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸的聚合物能够释放分子超过100天,但是某些水凝胶释放蛋白质的时间较短。

[0231] 本公开的抗体、抗体片段和/或抗体衍生物和组合物通常通过玻璃体内施用来施用。

[0232] 药物组合物还可包含(取决于所需的配制物)药学上可接受的、无毒的稀释剂载体,所述稀释剂载体被定义为通常用于配制针对动物或人施用的药物组合物的媒介物。选择稀释剂以便不影响组合的生物活性。此类稀释剂的实例为蒸馏水、缓冲水、生理盐水、PBS、林格氏溶液(Ringer's solution)、葡萄糖溶液及汉克溶液(Hank's solution)。另外,

药物组合物或配制物可以包括其他载体、佐剂或非毒性、非治疗性、非免疫原性稳定剂、赋形剂等。组合物还可包括接近生理条件的额外物质,例如pH调节剂和缓冲剂、毒性调节剂、湿润剂及去污剂。

[0233] 组合物还可以包括任何各种稳定剂,例如抗氧化剂。当药物组合物包括多肽时,多肽可以与各种众所周知的化合物复合,这些化合物增强多肽的体内稳定性,或增强其药理学特性(例如,增加多肽的半衰期,降低其毒性,增强其他药代动力学和/或药效动力学特征,或增强溶解度或吸收)。此类修饰或复合剂的实例包括硫酸盐、葡糖酸盐、柠檬酸盐以及磷酸盐。组合物的多肽也可以与增强其体内属性的分子复合。此类分子包括例如碳水化合物、多胺、氨基酸、其他肽、离子(例如,钠、钾、钙、镁、锰)以及脂质。适用于各种类型施用的另外关于配制物的指导可见于Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, Pa., 第17版(1985)中。对于用于药物递送的方法的简要综述参见Langer, Science 249:1527-1533(1990)。

[0234] 活性成分的毒性和治疗功效可根据细胞培养物和/或实验动物中的标准药物工序来确定,包括例如确定LD50(50%群体致死剂量)和ED50(50%群体有效治疗剂量)。毒性与治疗作用之间的剂量比为治疗指数并且其可表示为LD50/ED50比。展现出高治疗指数的治疗剂为优选的。

[0235] 从细胞培养和/或动物研究和/或人临床试验中获得的数据可用于配制用于人的剂量范围。活性成分的剂量通常处于包括具有低毒性的ED50的循环浓度范围内。剂量可取决于所采用的剂型和所利用的施用途径而在这个范围内变化。

[0236] 用来配制药物组合物的组分优选地具有高纯度并且基本上不含潜在有害的污染物(例如,至少国家食品(NF)级、通常至少分析级并且更通常至少药物级)。此外,意图用于肠胃外使用的组合物通常为无菌的。为了达到在使用之前必须合成给定的化合物的程度,所得到的产物通常大致上不含任何潜在的毒性剂、具体为任何内毒素,所述毒性剂可在合成或纯化过程期间存在。用于肠胃外施用的组合物通常也是基本等渗的,并且在GMP条件下制得。

[0237] 本公开的组合物可以使用任何医学上合适的程序,例如,玻璃体内注射来施用。

[0238] 治疗方法

[0239] 补体在感光细胞视网膜疾病中的作用已在感光细胞退化的多个临床前模型中报道,其中经典补体途径的遗传或药理学抑制导致感光细胞存活增加和视网膜功能改善。然而,C1q和经典补体途径驱动感光细胞退化的机制还不清楚。基于所描述的C1q在CNS发育和疾病中小胶质细胞介导的突触修剪中的作用,C1q可以标记视网膜退化性病症中的感光细胞突触,通过异常小胶质细胞介导的突触消除导致神经元损失。

[0240] 使用感光细胞退化的光氧化光损伤模型,本文提供了感光细胞突触上的C1q沉积和C1q标记的突触的小胶质细胞吞噬的证据。显示了视网膜和感光细胞突触中的C1q水平与细胞体损失之间的显著相关性。此外,显示了C1q底物磷脂酰丝氨酸(PS)在感光细胞突触上的外化,表明PS可能参与C1q在突触上的募集。最后,用抗C1q抗体进行玻璃体内治疗降低了轻度损伤的视网膜中补体组分的水平(证实了治疗后的靶标接合和神经保护)。

[0241] 与WT相比,在来自未治疗和IgG Rd10动物的视网膜裂解物中证实了经典补体组分C1q水平的增加(图14B)。与IgG1治疗和未治疗的rd10组相比,抗C1q治疗导致视网膜裂解物

中C1q水平降低(图14B),证实了视网膜中良好的可测量的PK和C1q接合。在用C1q抑制剂治疗后,感光细胞突触(BNS标志物)得以保留(图15B)。

[0242] 本公开总体上涉及预防人类患者的遗传性视网膜疾病(IRD)(例如,色素性视网膜炎、脉络膜缺损、眼底黄色斑点症、视锥-视杆营养不良和莱伯先天性黑蒙)或视网膜脱离、降低发展为这些疾病的风险或治疗这些疾病的组合物和方法。

[0243] 遗传性视网膜疾病(IRD)是一组可导致严重视力丧失或甚至失明的疾病。每个IRD都是由至少一个功能不正常的基因引起的。IRD可以影响所有年龄的个体,可以以不同的速率发展,并且是罕见的。然而,许多是进行性的,这意味着疾病的症状会随着时间的推移而恶化。

[0244] 已经鉴定了许多类型的IRD,还有一些尚未被发现。最常见的IRD类型包括:色素性视网膜炎/视杆-视锥营养不良、脉络膜缺损、眼底黄色斑点症、视锥-视杆营养不良、莱伯先天性黑蒙、X连锁RP和厄舍综合征。常见的途径是感光细胞退化。

[0245] 色素性视网膜炎(RP)/视杆-视锥营养不良是一组由影响视网膜的60种基因变异引起的相关眼病。在患有RP的人中,随着视网膜的感光细胞逐渐死亡,视力下降。根据受影响的基因,疾病的严重程度和发展速度因患有RP的人而异。RP可首先出现在儿童期(早发性RP)或成年期。RP的第一个迹象通常是夜视能力的丧失,称为夜盲症。之后,RP会导致周边(侧面)视觉出现盲点。随着时间的推移,这些盲点会发展为周边视觉下降。这种疾病随着时间的推移而发展,最终影响中央视力,也称为管状视,是诸如阅读、驾驶和识别面孔的任务所必需的。脉络膜缺损是具有进行性视力丧失的疾患,主要影响男性。这种疾患的第一个症状通常是夜盲症,可能发生在儿童早期。随着时间的推移,一个人会形成管状视并且失去看清细节的能力。这些视力问题是由于视网膜和附近的血管网络(称为脉络膜)中的细胞正在流失。脉络膜缺损的视力损害会随着时间的推移而恶化,但恶化的速度因受影响的个体而异。这种情况可能会导致成年后期完全失明。

[0246] 眼底黄色斑点症也被称为斯塔加特氏黄斑营养不良。这种疾病会对黄斑造成损害,黄斑是视网膜中心的一个小区域,负责敏锐的直视视觉。这种疾病通常会在儿童或青少年时期导致中央视力丧失。有时,视力下降可能直到成年后才被发现。患有这种疾病的人很少会完全丧失视力。

[0247] 视锥-视杆营养不良(CRD)是一组超过30个影响视锥和视杆的IRD。视锥和视杆是视网膜中的感光细胞。随着视锥和视杆的进行性退化,患有这种疾患的人会随着随着时间的推移而丧失视力。最初的症状通常发生在儿童期,并且可能包括视力模糊和对光强烈敏感(称为畏光)。这些症状之后是视觉中心的盲点、看颜色能力的丧失以及侧面或周边视觉的丧失。大多数患有这种疾患的人在成年中期会丧失大量视力。

[0248] 莱伯先天性黑蒙(LCA)是主要影响视网膜的眼病。视网膜是眼睛的一层,它的作用就像相机中的胶片,捕捉视觉图像并向大脑发送电信号。LCA是IRD的最早发病形式中的一者。患有这种病症的人通常在婴儿期就有严重的视觉障碍。LCA还与其他视力问题有关,诸如畏光:对光的敏感性增加;眼球震颤:眼睛无法控制的运动;极度远视:无法看清近处的物体,诸如书或表盘;反应迟钝的瞳孔:LCA患者的瞳孔对光的反应不正常,相反,瞳孔张开和闭合比正常人慢,或者他们可能对光根本没有反应;角膜畸形:LCA患者的角膜可能呈圆锥形且异常薄;和斜视:眼睛的肌肉没有形成或正常工作,导致眼睛同时看着两个不同的地

方。

[0249] X连锁RP (XLRP) 是色素性视网膜炎 (RP) 的严重形式。XLRP与位于X染色体上的基因突变有关,这意味着这种疾患主要影响男性。然而,一些女性携带者也可能受到临床影响,尽管通常比男性的表型严重得多。女性携带者的表型差异归因于携带野生型基因的X染色体在视网膜组织发育期间随机失活的模式,这种模式受到其他遗传和环境因素的调节。XLRP是最常见的由X染色体上的色素性视网膜炎GTP酶调节因子 (RPGR) 基因突变引起的。其特征是视力丧失的早期发作和快速进展,导致第三个十年结束时的法定失明。XLRP的不太常见形式是由RP2基因和OFD1基因中的突变引起的。RPGR基因中的突变可能与视杆-视锥或视锥-视杆营养不良表型相关。大多数病例表现为视杆-视锥营养不良型疾病进展,其中中心视敏度最初受到的损害小于周边视野损失。然而,在疾病的早期阶段期间,一些患者也出现早期视锥受累和相应的中心视敏度受损。在疾病的晚期阶段期间,视网膜中央凹最终会受到随后的视锥感光细胞退化的影响。

[0250] 厄舍综合征(也称为哈尔格伦综合征、亚瑟-哈尔格伦综合征、色素性视网膜炎-听力障碍综合征或营养不良性视网膜听力障碍综合征)是罕见的遗传性病症,其由至少11种基因中的任一者中的突变引起,导致听力丧失和视觉障碍的组合。这是导致聋盲的主要原因并且目前无法治愈。它会导致耳聋或听力丧失以及称为色素性视网膜炎 (RP) 的眼病。有时,它还会导致平衡问题。根据造成耳聋的基因和发病情况,厄舍综合征被分为三种亚型 (I、II和III)。所有这三种亚型都是由内耳和视网膜功能相关的基因突变引起的。这些突变以常染色体隐性方式遗传。

[0251] 视网膜脱离描述了眼睛后部的一薄层神经组织(视网膜)脱离其正常位置的情况。视网膜脱离将视网膜感光细胞与视网膜色素上皮 (RPE) 分离,视网膜色素上皮提供氧气和营养并清除废物。目前,视网膜与RPE分离,感光细胞退化,导致视力丧失。如果中央视网膜脱离,并且视网膜脱离得不到治疗的时间越长,受影响的眼睛永久失明的风险就越大。视网膜脱离的警告迹象可能包括以下中之一者或全部:飞蚊症和闪光的突然出现以及视力下降。每年每100,000人中约发生10-12例视网膜脱离。在大约50%的情况下,中央视网膜脱离。当中央视网膜脱离时,视力的恢复仅达到脱离前视力的大约50%,尽管成功地重新附着了视网膜。这种有限的视力恢复的原因是感光细胞退化。

[0252] 经典补体途径的遗传或药理学抑制导致感光细胞存活增加和视网膜功能改善。然而,C1q和经典补体途径驱动感光细胞退化的机制还不清楚。基于C1q在CNS发育和疾病中小胶质细胞介导的突触修剪中的作用,我们假设了由C1q介导的感光细胞损伤的三种机制:(1)C1q标记视网膜退化疾病中的感光细胞突触,通过异常的小胶质细胞介导的突触消除导致神经元损失;(2)C1q被损伤感光细胞(磷脂酰丝氨酸、c-反应蛋白以及改变的感光细胞细胞膜)的废物活化,导致吞噬细胞募集的损伤,这也带来了额外的C1q,和(3)整个经典补体途径的活化和导致细胞溶解的膜攻击复合物 (MAC) 的形成。

[0253] C1q识别某些病原体、自身抗原的修饰、抗原结合的抗体或细胞表面上的特定分子。在正常衰老过程中,C1q在突触(可能是那些因年龄或神经元应激而减弱的突触)上积聚并且后续的各种病理生理学刺激可以触发经典补体级联的活化,导致突触的不适当消除。这种与突触除去相关的异常炎症反应被称为补体介导的神经退化 (CMND)。CMND与阿尔茨海默病、精神分裂症、亨廷顿舞蹈病、额颞叶痴呆、脊髓性肌萎缩和青光眼有关。随着视网膜退

化性应激, C1q活化导致突触消除并且导致RGC和视神经的丧失。

[0254] 使用感光细胞退化的光氧化损伤模型, 我们提供了感光细胞突触上的C1q沉积的证据, 并且证明了C1q标记的突触的小胶质细胞吞噬。我们显示了视网膜和感光细胞突触中C1q水平与细胞体损失之间的显著相关性。我们还显示了C1q底物磷脂酰丝氨酸(PS)在感光细胞突触上的外化, 表明PS可能参与C1q在突触上的募集。最后, 我们发现使用抗C1q抗体的玻璃体内治疗降低了光损伤视网膜中补体组分的水平。此外, 我们证实了人类地理萎缩性视网膜组织的感光细胞突触上的C1q沉积, 表明这种机制与人类相关。

[0255] 本公开总体上涉及预防人类患者的遗传性视网膜疾病(IRD)(例如, 色素性视网膜炎、脉络膜缺损、眼底黄色斑点症、视锥-视杆营养不良和莱伯先天性黑蒙)或视网膜脱离、降低发展为这些疾病的风险或治疗这些疾病的组合物和方法。

[0256] 此类方法包括通过玻璃体内注射将包含约1mg至约10mg(例如, 约1mg、约1.5mg、约2mg、约2.5mg、约3mg、约3.5mg、约4mg、约4.5mg、约5mg、约5.5mg、约6mg、约6.5mg、约7mg、约7.5mg、约8mg、约8.5mg、约9mg、约9.5mg或约10mg的抗C1q抗体)的抗C1q抗体的组合物施用于患者。此类方法还包括通过玻璃体内注射将包含约1mg至约10mg(例如, 约1mg、约1.5mg、约2mg、约2.5mg、约3mg、约3.5mg、约4mg、约4.5mg、约5mg、约5.5mg、约6mg、约6.5mg、约7mg、约7.5mg、约8mg、约8.5mg、约9mg、约9.5mg或约10mg的抗C1q抗体)的抗C1q抗体的组合物施用于所述患者, 其中所述抗体包含轻链可变结构域和重链可变结构域, 所述轻链可变结构域包含具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L1、具有SEQ ID NO:6的氨基酸的HVR-L2和具有SEQ ID NO:7的氨基酸的HVR-L3; 所述重链可变结构域包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、具有SEQ ID NO:10的氨基酸的HVR-H2和具有SEQ ID NO:11的氨基酸的HVR-H3。所施用的组合物可以包含约1mg至约5mg的所述抗C1q抗体。所施用的组合物可以包含约1mg至约2.5mg、约2.5mg至约5mg、约5mg至约7.5mg或约7.5mg至约10mg的所述抗C1q抗体。所施用的组合物可以包含约5mg的所述抗C1q抗体。所施用的组合物可以包含约10mg的所述抗C1q抗体。在一些实施方案中, 抗体包含轻链可变结构域, 所述轻链可变结构域包含与选自SEQ ID NO:4和35-38的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列, 并且其中所述轻链可变结构域包含具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L1、具有SEQ ID NO:6的氨基酸的HVR-L2和具有SEQ ID NO:7的氨基酸的HVR-L3。在一些实施方案中, 所述轻链可变结构域包含选自SEQ ID NO:4和35-38的氨基酸序列。在一些实施方案中, 抗体包含重链可变结构域, 所述重链可变结构域包含与选自SEQ ID NO:8和31-34的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列, 并且其中所述重链可变结构域包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、具有SEQ ID NO:10的氨基酸的HVR-H2和具有SEQ ID NO:11的氨基酸的HVR-H3。在一些实施方案中, 所述重链可变结构域包含选自SEQ ID NO:8和31-34的氨基酸序列。在一些实施方案中, 所述抗体包含轻链可变结构域和重链可变结构域, 所述轻链可变结构域包含与选自SEQ ID NO:4和35-38的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列, 并且其中所述轻链可变结构域包含具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L1、具有SEQ ID NO:6的氨基酸的HVR-L2和具有SEQ ID NO:7的氨基酸的HVR-L3, 所述重链可变结构域包含与选自SEQ ID NO:8和31-34的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列, 并且其中所述重链可变结构域包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1、具有SEQ ID NO:10的氨基酸的HVR-H2和具有SEQ ID NO:11的氨基酸的HVR-H3。在一些实施方案中, 所述抗体包含轻链

可变结构域和重链可变结构域,所述轻链可变结构域包含选自SEQ ID NO:4和35-38的氨基酸序列,所述重链可变结构域包含选自SEQ ID NO:8和31-34的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗体可以是单克隆抗体、人源化抗体、人抗体、嵌合抗体、抗体片段或其抗体衍生物。所述抗体片段可以是Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、Fv片段、双抗体或单链抗体分子。在一些实施方案中,所述Fab片段包含SEQ ID NO:39的重链Fab片段和SEQ ID NO:40的轻链Fab片段。

[0257] 在一些实施方案中,所述抗体每周施用一次、每隔一周施用一次、每三周施用一次、每月施用一次、每4周施用一次、每六周施用一次、每8周施用一次、每隔一个月施用一次、每10周施用一次、每12周施用一次、每三个月施用一次或每4个月施用一次。在一些实施方案中,所述抗体施用至少6个月、至少7个月、至少8个月、至少9个月、至少10个月、至少11个月或至少12个月。

[0258] 在某些优选的实施方案中,FabA作为IVT注射剂以2.5mg/眼的剂量每月施用一次、每4周施用一次、每6周施用一次或每隔一个月施用一次。

[0259] 在某些优选的实施方案中,FabA作为IVT注射剂以5mg/眼的剂量每月施用一次、每4周施用一次、每6周施用一次或每隔一个月施用。在某些优选的实施方案中,FabA作为IVT注射剂以5mg/眼的剂量每月施用一次或每4周施用一次。在某些优选的实施方案中,FabA作为IVT注射剂以5mg/眼的剂量每6周施用一次。在某些优选的实施方案中,FabA作为IVT注射剂以5mg/眼的剂量每隔一个月施用一次或每8周施用一次。

[0260] 在某些优选的实施方案中,FabA作为IVT注射剂以10mg/眼的剂量每月施用一次、每4周施用一次、每6周施用一次或每隔一个月施用。在某些优选的实施方案中,FabA作为IVT注射剂以10mg/眼的剂量每月施用一次或每4周施用一次。在某些优选的实施方案中,FabA作为IVT注射剂以10mg/眼的剂量每6周施用一次。在某些优选的实施方案中,FabA作为IVT注射剂以10mg/眼的剂量每隔一个月施用一次或每8周施用一次。

[0261] FabA的注射由经过培训和经验合格的内科医生使用无菌技术通过进行IVT注射来完成。

[0262] 抗C1q抗体可以抑制C1q与自身抗体之间或C1q与C1r之间或C1q与C1s之间的相互作用,或可以促进C1q从循环或组织中的清除。在一些实施方案中,抗C1q抗体的解离常数(K_D)为100nM至0.005nM或小于0.005nM。在一些实施方案中,抗C1q抗体以20:1至1.0:1或小于1.0:1的结合化学计量、6:1至1.0:1或小于1.0:1的结合化学计量或2.5:1至1.0:1或小于1.0:1的结合化学计量结合C1q。

[0263] 所述方法抑制C1q的生物活性。例如,(1)C1q与自身抗体的结合,(2)C1q与C1r的结合,(3)C1q与C1s的结合,(4)C1q与磷脂酰丝氨酸的结合,(5)C1q与五聚蛋白-3的结合,(6)C1q与C-反应蛋白(CRP)的结合,(7)C1q与球状C1q受体(gC1qR)的结合,(8)C1q与补体受体1(CR1)的结合,(9)C1q与 β -淀粉样蛋白的结合,或(10)C1q与钙网蛋白的结合。在其他实施方案中,C1q的生物活性是(1)经典补体活化途径的活化,(2)裂解的减少和/或C3沉积的减少,(3)抗体和补体依赖性细胞毒性的活化,(4)CH50溶血,(5)红血细胞裂解的减少,(6)红血细胞吞噬作用的减少,(7)树突细胞浸润的减少,(8)补体介导的红血细胞裂解的抑制,(9)淋巴细胞浸润的减少,(10)巨噬细胞浸润的减少,(11)抗体沉积的减少,(12)嗜中性粒细胞浸润的减少,(13)血小板吞噬作用的减少,(14)血小板裂解的减少,(15)移植移植体存活的改

善, (16) 巨噬细胞介导的吞噬作用的减少, (17) 自身抗体介导的补体活化的减少, (18) 由输血反应所致的红血细胞破坏的减少, (19) 由同种抗体所致的红血细胞裂解的减少, (20) 由输血反应所致的溶血的减少, (21) 同种抗体介导的血小板裂解的减少, (22) 贫血的改善, (23) 嗜酸性粒细胞增多的减少, (24) 红血细胞上C3沉积的减少 (例如, RBC上C3b、iC3b等的沉积的减少), (25) 血小板上C3沉积的减少 (例如, 血小板上C3b、iC3b等的沉积的减少), (26) 过敏毒素产生的减少, (27) 自身抗体介导的水疱形成的减少, (28) 自身抗体诱导的红斑的减少, (29) 由输血反应所致的红血细胞破坏的减少, (30) 由输血反应所致的血小板裂解的减少, (31) 肥大细胞活化的减少, (32) 肥大细胞组胺释放的减少, (33) 血管通透性的降低, (34) 移植移植物内皮上补体沉积的减少, (35) B细胞抗体产生, (36) 树突细胞成熟, (37) T细胞增殖, (38) 细胞因子产生, (39) 小胶质细胞活化, (40) 阿瑟反应, (41) 移植移植物内皮中过敏毒素产生的减少, 或 (42) 补体受体3 (CR3/C3) 表达细胞的活化。

[0264] 在一些实施方案中, CH50溶血包括人CH50溶血。抗体可能能够中和至少约50%至约100%的人CH50溶血。抗体可能能够中和约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约100%的人CH50溶血。抗体可能能够以小于150ng/ml、小于100ng/ml、小于50ng/ml或小于20ng/ml的剂量中和至少50%的CH50溶血。

[0265] 在一些实施方案中, 抗体是单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、人源化抗体、人抗体、嵌合抗体、单价抗体、多特异性抗体或抗体片段或其抗体衍生物。在一些实施方案中, 抗体是人源化抗体。在一些实施方案中, 抗体是抗体片段, 例如Fab片段。抗体片段的实例是Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、Fv片段、双抗体和单链抗体分子。

[0266] 预期可以在医生的指导下获得和使用用于体内使用的组合物。根据疾病的性质、施用频率、施用方式、剂从宿主体内的清除情况等, 治疗配制物的剂量可以广泛地变化。

[0267] 如本文所用, “长期施用”、“长期治疗”、“长期地治疗”或其类似的语法变型是指一种治疗方案, 其用于维持患者的眼中治疗剂的某一阈值浓度, 以便在延长的时间内完全或基本上抑制患者的全身性补体活性。因此, 用抗C1q抗体长期治疗的患者可以被治疗大于或等于2周的一段时间 (例如, 3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、17周、18周、19周、20周、21周、22周、23周、24周、25周、26周、27周、28周、29周、30周、31周、32周、33周、34周、35周、36周、37周、38周、39周、40周、41周、42周、43周、44周、45周、46周、47周、48周、49周、50周、51周或52周; 1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月或12个月; 或1年、1.5年、2年、2.5年、3年、3.5年、4年、4.5年、5年、5.5年、6年、6.5年、7年、7.5年、8年、8.5年、9年、9.5年、10年、10.5年或12年或患者的余生), 其中所述抗体的量和给药频率足以维持患者的眼中抑制或基本抑制患者全身性补体活性的抗体浓度。在一些实施方案中, 可以有效维持血清溶血活性低于或等于20% (例如, 19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%或甚至低于5%) 的量和频率向有需要的患者长期施用抗体。在一些实施方案中, 可以有效维持血清乳酸脱氢酶 (LDH) 水平在LDH的正常范围的至少20% (例如, 19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%或甚至低于5%) 内的量和频率向患者施用抗体。

[0268] 治疗剂, 例如, 抗C1q抗体, 可以通过与适当的药学上可接受的载剂或稀释剂组合而掺入多种制剂中用于治疗施用。

[0269] 实施例

[0270] 实施例1:方法

[0271] 光氧化白光损伤模型

[0272] 雄性Ba1b/C小鼠 (12周龄;Charles River Laboratories)用于实施例2-7中描述的研究。动物在实验中过夜适应黑暗,其黑暗期单次延长3-4小时,直到光诱导开始(急性:25k lux,4小时;轻度:5k Lux,30分钟)。急性光设置用于模型表征(结果见图1)。所有其他实验都使用轻度的光设置(结果见图2-5)。在基线、第1天、第3天和第7天处死动物并收集组织。

[0273] Rd10小鼠模型

[0274] Rd10小鼠从出生开始就在黑暗中饲养,并且在P30-P31时转移到光照受控环境(白天正常循环光约200lux)的房屋中。

[0275] 抗C1q抗体治疗(或IgG对照抗体)从P12开始以100mg/kg的剂量腹膜内(i.p)施用,每周两次。对于i.p注射,用手轻轻束缚小鼠,并且用8mm、31号针穿刺腹部以递送抗体。在P30、P33、P38处死动物并收集组织。

[0276] 终末血浆和眼组织收集

[0277] 将动物麻醉,通过心脏穿刺收集约300-500 μ l的终末全血。将血液立即置于K2EDTA试管中,并且以5,000x g离心10分钟以获得血浆。将血浆转移到1.7mL的弹簧盖试管中,并且储存在-80 $^{\circ}$ C下,直到在干冰上运送给客户。对于生化评估,用盐水经心脏灌注动物,并且摘除眼睛。视网膜/RPE被分离、称重、快速冷冻并储存在-80 $^{\circ}$ C下。对于组织病理学评估,用盐水,然后用4%PFA(最少10分钟/最少50毫升)经心脏灌注动物。在盐水/PFA灌注后,收集眼睛。将后眼杯滴在4% PFA中固定2小时,通过系列蔗糖梯度(10%、20%、30%)转移,包埋在最佳切割温度化合物(OCT)中并冷冻。

[0278] 玻璃体内注射

[0279] 动物被异氟烷麻醉。在手术显微镜下,用插入中部玻璃体的32G针头对眼睛进行注射。对于PSVue标记,在组织收集前6小时,将2 μ l的1mM PSVue注射到眼睛中。对侧眼用作未注射对照。对于抗C1q治疗,在光暴露前一天,双侧注射1 μ l优化的鼠抗C1q抗体(Mab3,优化自Mab1)或IgG1 MOPC对照抗体(7.5 μ g/ μ l),在基线、第3天和第5天进行组织收集。

[0280] ELISA

[0281] 用盐水经心脏灌注动物并摘除眼睛。视网膜/RPE被分离、称重、快速冷冻并储存在-80 $^{\circ}$ C下。在裂解缓冲液(25mM HEPES,0.1M NaCl,1% Triton X100,完全蛋白酶抑制剂混合物;或在Tris缓冲盐水中的10mM EDTA和Thermo Scientific#A32965)中使用杵马达匀浆冷冻组织。使用Micro BCA测定试剂盒(Thermo Scientific#23235)对蛋白质进行定量。使用标准夹心ELISA测定法确定补体信号。简而言之,在4 $^{\circ}$ C下,用75 μ L含10 μ g/mL捕获抗体的碳酸氢盐缓冲液(pH 9.4)包被黑色96孔ELISA板(Costar#3925)过夜。第二天,用dPBS(pH 7.4)洗涤板,并且用含有3%牛血清白蛋白的dPBS缓冲液(BSA,VWR#28382)封闭。在测定缓冲液(含有0.3% BSA,0.1% tween和0.05% EDTA的dPBS)中制备标准品和样品,并且在去除封闭溶液后添加到板中(75 μ L/孔)。将平/板在4 $^{\circ}$ C下以300rpm振荡培养过夜第二天,用洗涤缓冲液(含有0.05% Tween的dPBS)洗涤板三次,与检测抗体(75 μ l/孔)一起在室温下振荡孵育1小时。在孵育后,用洗涤缓冲液洗涤板三次,通过添加碱性磷酸酶底物(Life

Technologies, T2214) 显色, 并且使用光度计读取。对于PK测定, 小鼠C1q (M099, 补体Tech) 和AP缀合的抗小鼠抗体 (115-055-071, Jackson ImmunoResearch) 分别用作捕获和检测抗体。对于C1q测定, 使用内部捕获抗体 (JL1克隆, Atum) 和检测抗体 (M1-AP, 抗体溶液1:3000)。使用抗小鼠C1s (LSBio, 2ug/ml) 和抗小鼠C1s-AP (LSBio, 1:5000) 分别作为捕获和检测抗体进行C1s测定。分别使用抗人C3d (Dako, 1ug/ml) 和抗小鼠C3 (11H9克隆, Abcam, 1:1000) 作为捕获和检测抗体进行C3d测定。使用试剂盒 (Abcam, ab108792) 进行白蛋白测定。使用4PL逻辑拟合来拟合标准品, 并且将未知物转化为浓度, 进行稀释校正, 然后使用GraphPad Prism作图。

[0282] 免疫组织化学

[0283] 用盐水, 然后用4% PFA (最少10分钟/最少50毫升) 经心脏灌注动物。在盐水/PFA灌注后, 收集眼睛。将后眼杯滴在4% PFA中固定2小时, 通过系列蔗糖梯度 (10%、20%、30%) 转移, 包埋在最佳切割温度化合物 (OCT) 中并冷冻。在包埋后, 使用低温恒温器切下10 μm 厚的切片, 连续收集到显微镜载玻片上 (Superfrost plus; VWR) 上并储存在 -80°C 下, 直到进一步使用。对于组织学染色, 将视网膜切片在PBS中洗涤, 在封闭缓冲液 (含有4% 驴血清、0.3% Triton X-100的PBS) 中封闭1小时, 并且与一抗一起在 4°C 下孵育过夜。第二天, 洗涤切片, 与合适的Alexa-荧光团缀合的二抗 (ThermoFisher Scientific) 一起孵育2小时, 洗涤并用Fluoromount G (Southern Biotech) 盖片。所有洗涤步骤在PBS中进行 3×10 分钟。用Dapi复染核。使用以下抗体: 内部兔抗C1q (克隆4.8, ATUM, 1:500)、小鼠抗巴松管 (Abcam, 1:500)、豚鼠抗vGlut1 (Millipore Sigma, 1:500)、鸡抗homer1 (突触系统, 1:500)、山羊抗Iba1 (Novus, 1:500)、大鼠抗CD68 (BioRad, 1:200)。兔IgG同种型抗体 (ThermoFisher) 用作C1q染色的阴性对照。图像使用落射荧光显微镜 (Leica) 以10x或20x放大倍数并使用共焦显微镜 (Leica, Stellaris 5) 以63x放大倍数捕获。使用ImageJ处理图像。

[0284] C1q突触共定位和吞噬分析

[0285] 对每个切片拍摄两张Z堆叠图像 (Z堆叠尺寸: 0.7um, 12个平面), 并且对每个动物的至少三个切片进行分析。创建了每个z堆叠的3D体积表面渲染 (Imaris Software)。视网膜OPL被选为感兴趣的区域。表面渲染图像用于鉴定小胶质细胞的表面和体积, 以及突触和C1q元件。基于接近度 (C1q和巴松管元件距离 $\leq 400\mu\text{m}$) 定量C1q标记的突触。基于重叠 (巴松管-Iba1重叠率 $\geq 70\%$) 定量吞噬的突触, 并且计算为吞噬的C1q标记的突触数/突触总数。

[0286] 磷脂酰丝氨酸 (PS) -C1q结合测定

[0287] 磷脂酰丝氨酸 (PS) 和磷脂酰胆碱 (PC) 脂质微粒购自Echelon Biosciences (#P-B1PS和P-B1PC)。纯化的人C1q购自Complement Technology (#A099)。九十六 (96) 个完全透明的圆底板用于测定 (VWR#353227)。根据制造商的说明书制备微粒悬浮液。简而言之, 首先彻底涡旋微粒以确保均匀的珠悬浮。在膜联蛋白V结合缓冲液 (Thermo Fisher#BMS500BB) 中进行洗涤、稀释、滴定和孵育步骤。所有洗涤步骤都以10,000g的离心速度进行10分钟。使用前将珠稀释20倍。对于每个测试点, 使用150 μL 珠悬浮液 (约100,000个珠)。将微粒洗涤两次并重悬于结合缓冲液中。每孔五十微升被认为是反应体积。在结合缓冲液中制备C1q滴定 (1:10稀释, 100-0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。将C1q和脂质微粒以1:1的比例添加到孔中并在 37°C 下孵育30分钟。在孵育后, 用1体积的流动缓冲液 (PBS, 1% BSA, 2mM EDTA) 洗涤微粒两次。倾析上清液, 将微粒重悬于含有抗C1q-APC (Dako, 1:1000) 的流动缓冲液 (100 μL /孔) 中, 并且在 4°C 下

孵育30分钟。在孵育后,将微粒洗涤两次,重悬于流动缓冲液(150 μ l)中并利用用于微粒的绿色通道(FITC)和用于C1q结合的远红色通道(APC)通过流式细胞术进行分析。

[0288] 补体沉积测定

[0289] 在GVB++缓冲液(Complement Technology#B100)中进行洗涤、稀释、滴定和孵育步骤。将PS和PC脂质微粒洗涤两次并以合适的体积重悬,每个测试点考虑约100,000个珠。在GVB++中制备人血清滴定。九十六(96)个完全透明的圆底板用于测定(VWR 353227)。GVB EDTA(Complement Technologies#B105)用作阴性对照缓冲液。对于33.3 μ l的最终体积,反应混合物包括缓冲液(GVB++或GVB EDTA,+/-滴定的抗C1q抗体):脂质微粒:人血清比率为1:1:1。在37 $^{\circ}$ C下孵育30分钟后,用GVB++(150 μ l)洗涤板两次。将微粒重悬于含有抗C1q-APC(Dako,1:2000)或抗C4-APC(Dako,1:500)的流动缓冲液(PBS,1%BSA,2mM EDTA)中,并且在4 $^{\circ}$ C下孵育30分钟。在孵育后,将微粒洗涤两次,重悬于流动缓冲液(150 μ l)中并利用用于微粒的绿色通道(FITC)和用于C1q或C4沉积的远红色通道(APC)通过流式细胞术进行分析。

[0290] 人类GA供体组织获取和免疫组织化学

[0291] 人类供体眼睛在死后24小时内从美国加利福尼亚州圣地亚哥眼库获得。对所有捐献者进行临床记录和家庭问卷调查。人眼在4%中固定2小时,然后转移至PBS过夜。第二天,将后眼杯在30%蔗糖中冷冻保护24-48小时。然后使用6mm直径的解剖环钻(Biomedical Research Instruments,MD,USA)分离黄斑。使用相同的环钻对颞区、鼻区、上区和下区进行取样。将视网膜样品包埋在OCT中并冷冻。在包埋后,使用低温恒温器切下10 μ m厚的切片,连续收集到显微镜载玻片上(Superfrost plus;VWR)上并储存在-80 $^{\circ}$ C下,直到进一步使用。人类供体视网膜切片的组织学染色如上文对小鼠样品所述进行。使用下列抗体:兔抗人C1q(Dako,1:500)、豚鼠抗vGlut1(Millipore Sigma,1:500)、鸡抗homer1(突触系统,1:500)。兔IgG同种型抗体(ThermoFisher)用作C1q染色的阴性对照。图像使用落射荧光显微镜(Leica)以10x放大倍数并使用共焦显微镜(Leica,Stellaris 5)以63x放大倍数捕获。使用ImageJ处理图像。

[0292] 统计学分析

[0293] 所有数据均以平均值 \pm 标准偏差(SD)表示。使用GraphPad Prism,使用不成对的学生t检验或单向方差分析(ANOVA)或双向ANOVA,然后使用Bonferroni或Dunnet或Sidak或Tukey的事后检验进行统计分析。数据显示为平均值 \pm SD。所有的p值都显示在图例中,并且当小于0.05时被认为具有统计学意义。

[0294] 实施例2:光氧化光损伤模型中感光细胞突触丧失和小胶质细胞增多

[0295] 前突触标志物巴松管用于鉴定突触并使用表面荧光测量突触密度。感光细胞核的行数被用作感光细胞存活的量度。Iba1(在小胶质细胞中特异性表达钙结合蛋白)被用作泛小胶质细胞/巨噬细胞标志物。CD68(溶酶体蛋白)用于鉴定反应性吞噬小胶质细胞。在光氧化损伤后,观察到进行性感光细胞突触和细胞体损失(图1A-1C),以及小胶质细胞反应性增加(图1D-1F)。值得注意的是,吞噬细胞小胶质细胞在突触层中的分布在第1天达到高峰,这也是首次观察到显著突触丧失的时间点(图1E)。

[0296] 实施例3:在感光细胞退化的光氧化光损伤模型中,感光细胞突触上增加的C1q水平与感光细胞突触丧失相关

[0297] 通过标准ELISA,在来自光暴露动物的视网膜裂解物中观察到起始经典补体组分

C1q和C1s以及下游活化产物C3d的水平增加(图2A-2C)。接下来通过免疫荧光研究视网膜C1q分布。如图2D中所示,C1q(i)与Iba1(iii)和巴松管(iv)共定位,证实了C1q在小胶质细胞/巨噬细胞中的表达以及在突触上的表达/沉积。观察到C1q表达与感光细胞突触密度之间存在显著的负相关(图2G,皮尔逊相关系数 $= -0.72, p=0.00003$),表明存在因果关系(图2E)。

[0298] 实施例4:光氧化损伤后感光细胞C1q标记的前突触元件的小胶质细胞吞噬

[0299] 为了评估C1q标记的突触的小胶质细胞吞噬作用,我们对来自未受损伤的和光暴露的小鼠的视网膜切片进行了C1q、巴松管和Iba1的三重标记(图3A)。使用共焦显微镜进行高分辨率成像。使用3D重建和表面渲染软件进行吞噬分析(图3B)。突触密度的显著降低(图3C)与C1q标记的突触百分比的显著增加(图3D)相关,并且与未受损伤的相比,轻度损伤视网膜中吞噬C1q标记的突触的小胶质细胞的显著增加(图3E)。

[0300] 实施例5:磷脂酰丝氨酸与C1q结合并在光氧化损伤后在感光细胞突触上外化

[0301] 为了测试PS暴露是否发生在疾病期间的感光细胞突触处,我们在光损伤模型中进行了PS结合探针PSVue(PSVue 550)的IVT施用(Scott-Hewitt N等人,The EMBO Journal, 2020)。在光暴露后的第3天,使用IHC处理和分析视网膜组织。与未受损伤的相比,在轻度损伤的视网膜的OPL和ONL中,可检测到PSVue标记增加(图4A)。高分辨率共聚焦成像和3D重建/表面渲染证实了PSVue标记与C1q和巴松管的共定位(图4A)。值得注意的是,PSVue阳性表面以三明治样方式出现在巴松管和C1q阳性表面附近(图4A iii),表明突触上的PS外化和C1q相互作用。

[0302] 为了评估PS是否直接与C1q结合并活化补体级联,使用PS-脂质-绿色-荧光-微粒进行C1q结合和补体沉积测定。磷脂酰胆碱(PC)-脂质绿色荧光微粒用作阴性对照。在与浓度为10ng/mL的C1q一起孵育后,观察到C1q与PS脂质微粒而非PC直接结合(图4B)。在PS脂质微粒上观察到C1q和C4的沉积,但在PC脂质微粒上没有观察到。在阴性对照组中几乎没有观察到沉积(图4C和图4D)。血清中抗C1q中和抗体(Mab1-Fab)的滴定导致PS脂质微粒上的C1q和C4沉积减少(图4E和图4F),表明抗C1q抗体竞争性结合减少了PS介导的补体活化。

[0303] 实施例6:抗C1q玻璃体内治疗在光氧化光损伤后降低了视网膜补体组分水平

[0304] 在暴露于光损伤前一天进行中和优化的鼠抗C1q抗体(Mab3,优化自Mab1)的玻璃体内施用。在光损伤后第3天,通过标准ELISA评估可检测的药物水平和选择的补体组分水平。在接受抗C1q治疗的动物的视网膜裂解物中发现了可测量的药物水平,但在IgG1治疗组或未治疗组中没有发现(图5A)。与未治疗组相比,在未治疗组和IgG治疗组光暴露动物的视网膜裂解物中,经典补体组分C1q和C1s以及下游活化成分C3d的水平均有所提高(图5B-5D)。与IgG抗体相比,在抗C1q治疗后观察到C1q、C1s和C3d显著降低(图5B-5D)。验证研究证实了靶标接合并评估了治疗后的神经保护作用。

[0305] 实施例7:C1q在人类GA供体视网膜中的感光细胞突触上的表达和沉积

[0306] 获得GA供体眼睛并进行跨视网膜层的C1q分布的组织学评估。通过免疫荧光在GA供体与健康供体视网膜的黄斑区评估突触完整性。与健康供体相比,前突触标志物Vglut1的免疫反应性降低和感光细胞突触层中C1q的标记增加证实了GA视网膜中发生的突触丧失和C1q积累(图6A-6B)。最后,C1q(灰色)、前突触标志物Vglut1和突触后标志物(Homer1)的三重免疫标记证实了C1q与人类GA供体视网膜中的感光细胞突触共定位(图6C)。

[0307] 实施例8:在非临床研究中评估FabA

[0308] FabA药物产品是用于IVT注射的无菌等渗液体。

[0309] FabA以用于IVT注射的无菌一次性小瓶提供。

[0310] 已经对FabA进行了一系列广泛的体外和体内药理学研究。

[0311] 抗体Mab1、Mab1-Fab和Mab2在急性青光眼的小鼠模型中具有活性,可防止视网膜神经节细胞和/或神经纤维丧失。在小鼠的光氧化光诱导损伤模型中,玻璃体内施用的Mab1可防止眼睛中的感光细胞丧失和视网膜功能连接。

[0312] FabA GLP研究包括一项单剂量大鼠眼部毒理学研究和三项重复剂量食蟹猴眼部毒理学研究。毒理学研究的施用途径是IVT注射。在单剂量和两剂量(每月一次)IVT GLP研究中,FabA未显示任何不良眼部毒性的证据,在食蟹猴每月一次研究中,无可见不良反应水平(NOAEL)为5mg/眼(相当于10mg人剂量),在单剂量大鼠研究中为0.05mg/眼(相当于10mg人剂量)。在食蟹猴为期26周的慢性眼部毒理学研究中,不良眼部变化与双重注射程序相关和/或被确定为抗药物抗体(ADA)介导的,不是FabA IVT施用的直接作用。

[0313] 在大鼠和食蟹猴血清和玻璃体中进行FabA的药代动力学评估。在玻璃体中测量C1q水平,作为食蟹猴中C1q的FabA抑制的PD标志物。在食蟹猴中进行的PK/PD和TK/PD研究展示了与玻璃体中的FabA药物暴露水平一致的强大眼部PD效应。

[0314] FabA和前体分子对人C1q的结合和亲和力

[0315] FabA和前体分子的C1q结合亲和力也通过ELISA来检查。所有分子(Mab2-Fab、FabA和Mab2、Mab1和Mab1-Fab)均显示出对人C1q的亲和力,其中半最大效应浓度(EC50)在2.2-4.9ng/mL(20-95pM)的范围内。FabA与C1q结合的EC50为2.5ng/mL。

[0316] 对IgM介导的红细胞溶血的影响

[0317] 测量FabA、Mab2和Mab2-Fab在功能上抑制人血清中IgM调理RBC的经典补体依赖性溶血的活性(图9)。这三种分子表现出几乎相同的效力,与它们的等效结合亲和力一致。IgM涂覆的RBC溶血的FabA抑制的半最大抑制浓度(IC50)为0.62 μ g/mL(约12nM)。

[0318] 体内药理学研究

[0319] 抗C1q抗体治疗预防急性青光眼小鼠模型的视神经损伤

[0320] 在小鼠中,将聚苯乙烯珠粒注射到眼睛的前房会导致IOP急剧升高,视网膜神经节细胞丧失,并且在2周内造成视神经损伤。在IOP升高前一天和升高后7天,将Mab1、Mab1-Fab和Mab2玻璃体内注射至小鼠。在每个时间点施用2 μ L 10mg/mL抗体或盐水。基于小鼠眼中5-10 μ L的玻璃体体积,抗体浓度为2000-4000 μ g/mL。在损伤后2周收集视神经,并且对完整和受损轴突的数量进行定量。在这种诱导的青光眼小鼠模型中,抗C1q抗体治疗导致对RGC损失和/或视网膜神经纤维损伤的保护(图10)。

[0321] 抗C1q抗体治疗防止光氧化光诱导损伤模型中的感光细胞损伤

[0322] 当小鼠暴露于100Klux的天然白光LED持续1-7天时,光氧化损伤导致视网膜感光细胞丧失。在该模型中,C1qa基因表达在3-7天内呈时间依赖性增加,这与感光细胞死亡和小胶质细胞/巨噬细胞募集有关。C1qa^{-/-}小鼠在光损伤诱导后14天显示出较少的感光细胞死亡、减少的小胶质细胞/巨噬细胞向感光细胞病灶的募集以及更高的视觉功能,但是在第7天则没有。在光损伤后第7天Mab1抗体的IVT施用减少了感光细胞损失并维持了视网膜功能,如视网膜电图所测量的(图11)。向小鼠施用1 μ L 7.5mg/mL抗体,这相当于玻璃体中750-

1500 μ g/mL的浓度。相比之下,在第0、4和8天以100mg/kg全身递送Mab1对感光细胞丧失或功能没有影响。视网膜C1q主要由定位于早期AMD和小鼠视网膜的外层视网膜的视网膜下小胶质细胞/巨噬细胞表达。因此,抗C1q抗体的保护表明,C1q在感光细胞损伤的起始和人疾病GA发病机理中的经典补体级联中具有明确的作用。

[0323] 安全性药理学

[0324] 在为期26周的食蟹猴研究中,慢性IVT给药后的全身暴露不超过86.3ng/mL,而在为期26周的食蟹猴研究中,每周一次IV给药的具有相同CDR的Mab2的全身暴露在NOAEL为200mg/kg时超过1mg/mL。

[0325] 因此,在食蟹猴的为期4周的重复剂量GLP毒性研究中,全长抗体Mab2的安全性药理学终点在IV施用后高达每周200mg/kg,在食蟹猴的为期26周的重复剂量毒性研究中,高达每周200mg/kg,其中没有证据表明对心血管、呼吸或神经终点有治疗相关性影响,支持IVT施用的FabA的全身安全性。

[0326] 另外,在食蟹猴的为期4周的重复剂量GLP毒性研究中,FabA的安全性药理学终点在SC施用后高达每天20mg/kg,其中没有证据表明对心血管、呼吸或神经终点有治疗相关性影响,支持IVT施用的FabA的全身安全性。

[0327] 动物中的药代动力学

[0328] 被设计为表征FabA的PK、TK和PD的非临床研究在大鼠和食蟹猴中进行。这些研究包括在大鼠和食蟹猴中进行的单剂量IVT PK研究,以及在食蟹猴中使用FabA进行的重复剂量TK/PD研究。在食蟹猴中进行了更广泛的TK/PD研究,在大鼠或食蟹猴单剂量研究中均未发现眼部毒性。

[0329] 药代动力学/毒代动力学/药效动力学分析

[0330] FabA在玻璃体中的药代动力学

[0331] 在以0.01mg/眼(相当于2mg人剂量)或0.05mg/眼(相当于10mg人剂量)的剂量对大鼠进行FabA的单次双侧IVT施用后,药物相对快速地从玻璃体中除去,这与两个剂量水平的大约12小时的半衰期一致。在同样接受双侧IVT FabA的食蟹猴中,与大鼠相比,药物从玻璃体的分布更慢,1mg/眼(相当于2mg人剂量)和5mg/眼(相当于10mg人剂量)剂量组的半衰期为大约3天。

[0332] 在这两个物种中,FabA IVT PK的剂量都是线性的。来自食蟹猴的眼部毒理学研究的数据(其中FabA在28天内以1.0mg/眼(相当于2mg人剂量)、2.5mg/眼(相当于5mg人剂量)或5.0mg/眼(相当于10mg人剂量)的剂量给予两次)表明,在处死时(即在第二剂量后15天和30天),玻璃体浓度与单剂量IVT施用的数据基本一致。

[0333] 在食蟹猴的为期26周的慢性眼部毒理学研究中,其中FabA以每月2.5mg/眼(相当于5mg人剂量)、每月5mg/眼(相当于10mg人剂量)或每两周5mg/眼(两个5mg/眼剂量随后均减少至2.5mg/眼,并称为5/2.5mg/眼)的剂量IVT给药,在接受FabA的所有动物中,第184天至第169天的玻璃体液FabA浓度是可定量的,并且在10周无剂量恢复期后第242/243天,所有动物均低于定量限(BQL)。玻璃体液FabA浓度显示出高度差异,剂量组或性别之间没有明显差异或趋势。

[0334] FabA在血清中的药代动力学

[0335] 在单次IVT施用后,血清浓度远低于玻璃体中的浓度,其中 C_{\max} 血清/ C_{\max} 玻璃体在

大鼠中为约0.003,在食蟹猴中为0.000001。在28天的时期内两次接受双侧FabA IVT的食蟹猴中,血清浓度较低,最高平均峰值浓度(C_{max})为10.1ng/mL,这是在第二IVT剂量5mg/眼(相当于10mg人剂量)的施用后观察到的。由于FabA从玻璃体分布到血清区室中,FabA可以结合至C1q,或者保持其游离形式并可通过测定法进行定量,在1mg/眼组中产生无法定量的低FabA血清浓度(即,<1.25ng/mL),对于2.5和5.0mg/眼,平均 C_{max} 分别为3.3和10.1ng/mL。

[0336] 相比之下,在以10mg/kg剂量的IV施用FabA后,FabA在测试的2只食蟹猴中的最大浓度分别为13800和17000ng/mL,此后浓度下降非常迅速,与大约2小时的半衰期一致,如Fab片段所预期。

[0337] 当将在28天内两次双侧IVT施用(5mg/眼)后的血清FabA浓度与每周一次200mg/kg剂量的Mab2的全身IV施用4周后获得的血清FabA浓度进行比较时,FabA血清暴露显著降低(FabA/Mab2 C_{max} 比率为0.00000701)。

[0338] 在食蟹猴的为期26周的慢性眼部毒理学研究中,将FabA以每月2.5mg/眼、每月5/2.5mg/眼或每两周5/2.5mg/眼进行IVT给药,血清中FabA的全身暴露较低,与局部施途径一致。FabA的血清浓度在第85天不超过86.3ng/mL,并且在最后剂量施用后第169天,FabA血清浓度不超过60.8ng/mL。在剂量水平/方案和评估日中,在给药后24至48小时观察到最大血清FabA浓度。FabA在血清中的半衰期($T_{1/2}$)值仅在每两周5/2.5mg/眼组中的动物的少数情况下可计算/可报告,并且在所有评估日的范围为49.9至143小时,可能代表分布从眼部空间进入血清。以2.5mg/眼重复每月IVT给药时,血清中几乎没有FabA积聚。然而,在第1天后的每个后续评估日,该组中的可计算的FabA血清浓度越来越大。由于第57天后剂量水平的变化,无法从第1天确定任何其他组中的积聚。在每月一次5/2.5mg/眼的雄性和雌性中,第169天/第85天曲线下面积与时间“t”(AUC[0-t])的比率范围为0.0407至0.664,在每两周5/2.5mg/眼的雄性和雌性中,范围为0.132至7.15。当比较在食蟹猴的慢性26周给药后的FabA和Mab2平均性别组合全身暴露时,每两周双侧IVT施用5/2.5mg/眼后的FabA暴露AUC0-t(1,230hr*ng/mL或1.23hr* μ g/mL)与每周一次全身IV施用Mab2后获得的200mg/kg AUC0-t(3,150,000hr* μ g/mL)相比,FabA血清暴露相当低(FabA/Mab2 C_{max} 比率为0.000000073,AUC0-t比率为0.00000039)。

[0339] 眼部C1q的药效动力学

[0340] 在对照动物中,平均玻璃体游离C1q浓度为40.3ng/mL,而在接受单次FabA IVT剂量为1mg/眼(相当于2mg人剂量)或5mg/眼(相当于10mg人剂量)的食蟹猴的玻璃体中,游离C1q水平在研究持续时间(30天)内低于检出限(<1.953ng/mL),这表明发生了完全C1q抑制。在每28天接受FabA总共2剂的食蟹猴中,在施用全部3个剂量水平(即,1、2.5和5mg/眼q28天×2剂)的第二剂后,C1q保持抑制15天。在第二FabA剂量的施用后三十天,C1q在一些但不是所有眼睛中仍低于检测限。

[0341] 在第二5mg/眼IVT施用后十五天,>80%的C1q结合至视网膜、脉络膜和视神经乳头中的FabA。在5mg/眼第二次施用后三十天,C1q仅在视网膜和脉络膜中仍然受到抑制。

[0342] 在食蟹猴的为期26周的慢性眼部毒理学研究中,将FabA以每月2.5mg/眼、每月5/2.5mg/眼或每两周5/2.5mg/眼进行IVT给药,在末期尸检时,在接受FabA的所有组中玻璃体液C1q水平减少;在末期和恢复期尸检时,给药假期和/或10周无剂量恢复期后的动物分别玻璃体液C1q水平有所恢复并且与对照组相当。

[0343] 血清C1q和血清溶血抑制

[0344] 在对食蟹猴进行双侧IVT施用5mg/眼(相当于10mg人剂量)后,C1q依赖性血清溶血被抑制约50-80%,这在第一IVT剂量施用后持续大约24-48小时,在第二FabA剂量的施用后持续长达96小时,此后恢复到基线。

[0345] 在向食蟹猴单次IV施用10mg/kg后,在1小时达到最大C1q依赖性血清溶血抑制。最大抑制维持约24小时,并在FabA施用后120小时恢复到基线。血清游离C1q也迅速下降,但是到120小时仍未恢复到基线值,这表明一些FabA在该时间范围内仍结合至循环C1q。

[0346] 毒理学

[0347] FabA的安全性得到综合非临床眼部毒理学计划的支持,该计划旨在支持在临床试验中使用FabA进行IVT施用。最初单剂量研究在大鼠和食蟹猴中使用FabA进行,在这些物种中均未观察到眼部毒性。基于在大鼠和食蟹猴中的相似发现,以及体外药理学数据和序列同源性数据(表明食蟹猴比大鼠更相关),选择食蟹猴进行FabA的重复剂量眼部毒理学研究。

[0348] 重复剂量眼部毒理学研究包括眼科检查(OE)、IOP、视网膜电图(ERG)、眼部组织病理学以及用于TK分析的血清和玻璃体中的FabA的测量。另外,FabA PD性质的特征在于测量玻璃体(对于所有重复剂量研究)和眼部组织(在两剂量研究中)中的C1q,以及抑制血清中的C1q依赖性溶血(在两剂量研究中)。

[0349] 单剂量毒性

[0350] FabA的IVT施用在单剂量(大鼠和食蟹猴)眼部毒理学研究中耐受性良好。在这些研究中,大鼠和食蟹猴的NOAEL分别被认为是0.05mg/眼(相当于10mg人剂量)和5mg/眼(相当于10mg人剂量),这是在每项研究中评估的最高剂量并且在校正玻璃体体积(大鼠0.02mL,食蟹猴2mL)时是等效的(2.5mg/mL)。

[0351] 在SpragueDawley大鼠中通过玻璃体内注射进行FabA的GLP单剂量眼部毒性研究

[0352] 在这项单剂量GLP大鼠眼部毒理学研究中,媒介物或FabA以0.01mg/眼(相当于2mg人剂量)和0.05mg/眼(相当于10mg人剂量)的剂量通过IVT注射一次双侧施用至幼成体雄性大鼠。FabA处理的动物在第1天(给药后6小时)、第3天、第7天、第10天、第20天、第30天终止,所有媒介物对照动物在第30天终止。所有动物都存活到预定的尸检。

[0353] 本研究包括标准安全性参数。在终止时收集血液样品,并获得末端玻璃体样品以进行TK分析。另外,还评估了眼科检查(OE),包括IOP和眼部组织病理学。

[0354] 在评估的任何安全性参数(包括OE、IOP和眼部组织病理学)中均未发现与FabA相关的变化。

[0355] 以0.01mg/眼(相当于2mg人剂量)和0.05mg/眼(相当于10mg人剂量)给药后6小时(第一次收集)至144小时,在处理的动物中通过TK证实了FabA的玻璃体暴露。以0.01和0.05mg/眼的处理动物(仅给药后2至48小时)中通过TK确认了FabA的血清暴露。

[0356] 在本研究中,以任何剂量水平(包括评估的最高剂量0.05mg/眼)均未观察到被认为与FabA相关的不良反应。基于这些结果,NOAEL为0.05mg/眼(在玻璃体中为2.5mg/mL)。

[0357] 在食蟹猴中通过玻璃体内注射进行FabA的非GLP单剂量眼部毒性研究

[0358] 在这项单剂量非GLP食蟹猴眼部毒理学研究中,将媒介物或FabA以1mg/眼(相当于2mg人剂量)和5mg/眼(相当于10mg人剂量)的剂量通过IVT注射双侧施用至幼成体雌性食蟹

猴。FabA处理的动物在第1天(给药后6小时)、第3天、第7天、第10天、第20天、第30天终止。所有媒介物对照动物在第30天终止,所有动物都存活到预定的尸检。

[0359] 本研究评估了标准安全性参数,包括OE、IOP和眼部组织病理学。另外,在整个研究过程中收集血液样品,并对末端玻璃体样品进行TK和PD的分析。

[0360] FabA相关变化仅限于与炎症无关的非不良发现。这些发现包括葡萄膜中的组织细胞浸润以及1mg/眼剂量组中的轻度嗜碱性粒细胞增多。5mg/眼剂量的结果包括葡萄膜中的组织细胞浸润,以及最小至轻度嗜碱性粒细胞增多。

[0361] 在OE和IOP中未观察到FabA相关变化。在本研究中,在任何剂量水平(包括5mg/眼(评估的最高剂量))下均未观察到被认为与FabA相关的不良反应。基于这些结果,NOAEL被认为是5mg/眼(在玻璃体中为2.5mg/mL)。

[0362] 在研究期间(到第30天),所有处理的动物的TK都证实了玻璃体中FabA的暴露。FabA的血清暴露在1mg/眼时不存在,在5mg/眼时是低且短暂的,并且不超过6ng/mL(LLoQ 1.25ng/mL)。到第30天,所有FabA处理的动物的玻璃体中都不存在C1q。

[0363] 重复剂量毒性研究

[0364] 在重复剂量眼部毒性研究中,FabA通过IVT注射至少每4周施用一次。FabA的重复剂量施用在食蟹猴中具有良好的耐受性。在最初重复剂量GLP眼部毒理学研究中,食蟹猴的NOAEL为5mg/眼(相当于10mg人剂量),每月一次,两剂,即评估的最高剂量。在食蟹猴的为期26周的慢性眼部毒理学研究中,不良眼部变化与双重注射程序相关和/或被确定为ADA介导的,不是FabA IVT施用的直接影响,因此在食蟹猴中NOAEL被确定为每两周或每月一次2.5mg/眼(相当于5mg人剂量),分别为13或7剂。

[0365] 在食蟹猴中通过玻璃体内注射进行FabA的6周GLP重复剂量眼部毒性研究

[0366] 本研究包括标准安全性参数,并且在整个研究过程中收集血液样品。还收集末端玻璃体样品用于TK和PD分析以及末端视神经切片用于TK和PD分析。另外,还评估了OE、IOP、ERG和眼部组织病理学。

[0367] 被确定为无不良反应的FabA结果仅限于一次高剂量(2.5mg/眼)(相当于5mg人剂量)雌性,其玻璃体的嗜碱性/蓝色染色极少,无相关炎症(称为嗜碱性粒细胞增多)。重要的是,在OE、IOP和ERG中未发现FabA相关变化。TK证实,在研究期间和恢复期间(最后剂量后30天),所有处理的动物的玻璃体都暴露于FabA。

[0368] 血清暴露在1mg/眼(相当于2mg人剂量)时不可测量,在2.5mg/眼(相当于5mg人剂量)时是低且短暂的(第一剂量后12至48小时,最后剂量后6至168小时),并且不超过8ng/mL(LLoQ 1.25ng/mL)。PD证实,当FabA水平为约100ng/mL时,所有处理动物的玻璃体中均不存在C1q。在1mg/眼(相当于2mg人剂量)(12只动物中的6只)和2.5mg/眼(相当于5mg人剂量)(12只动物中的7只)的动物中检测到FabA ADA,但是未对ADA的血清或玻璃体中的FabA暴露产生明显影响。

[0369] 在食蟹猴中通过玻璃体内注射进行FabA的6周GLP重复剂量眼部毒性研究

[0370] 在这项为期6周的GLP食蟹猴眼部毒理学研究中,将媒介物或FabA以5mg/眼(相当于10mg人剂量)的剂量通过IVT注射每四周(第1天和第29天)双侧施用至幼成体雄性和雌性食蟹猴,然后是4周恢复期。所有主要研究动物均在第44天终止,所有恢复动物均在第59/60天终止。所有主要研究和恢复动物均存活到预定的尸检。

[0371] 本研究包括标准安全性参数(系统组织病理学除外),并且在整个研究过程中收集血液样品,以及用于TK和PD分析的末端玻璃体样品。收集ADA和房水样品并进行存档。另外,还评估了OE、IOP、ERG和眼部组织病理学。

[0372] 在评估的任何安全性参数(包括OE、IOP、ERG和眼部组织病理学)中均未发现与FabA相关的变化。在治疗的动物和对照动物中均观察到无相关炎症的玻璃体最小至轻度嗜碱性/蓝色染色(称为嗜碱性粒细胞增多),因此不认为与FabA有关。

[0373] TK证实,在研究期间和恢复期间(最后剂量后30天),所有处理的动物的玻璃体都暴露于FabA。据证实,在对照动物的血清和玻璃体中不存在FabA。PD证实,在第44天所有治疗的主要研究动物的玻璃体中均不存在C1q。在第59天,2/4的恢复动物在玻璃体中具有可测量的C1q。在5mg/眼(相当于10mg人剂量)(10只动物中的9只)组的动物中检测到FabA ADA,但是未对ADA的血清或玻璃体中的FabA暴露产生明显影响。

[0374] 在FabA施用后24-48小时实现了对C1q依赖性溶血的抑制>80%,此后恢复到基线。

[0375] 视网膜、脉络膜和视神经乳头中的C1q水平在第44天也显著降低,并且在第59天继续降低,但是视神经乳头则不降低。

[0376] 在本研究中,在任何剂量水平(包括5mg/眼(相当于10mg人剂量)(评估的最高剂量))下均未观察到被认为与FabA相关的不良反应。基于这些结果,NOAEL为5mg/眼(相当于10mg人剂量)(在玻璃体中为2.5mg/mL)。

[0377] 在10周恢复的食蟹猴中通过玻璃体内注射进行FabA的26周GLP重复剂量眼部毒性研究

[0378] 在这项为期26周的GLP食蟹猴眼部毒理学研究中,将媒介物或FabA以每月一次2.5mg/眼(相当于5mg人剂量)、每月一次5mg/眼(相当于10mg人剂量)、每隔一周(每两周)一次5mg/眼的剂量通过IVT注射双侧施用至幼成体雄性和雌性食蟹猴,然后是10周恢复期。每2周(13个给药周期)或每4周(7个给药周期)单次注射50 μ L相当于2.5mg/眼,或两次注射总共100 μ L(两次50 μ L注射间隔10分钟相当于5mg/眼)。所有主要研究动物均在第184天终止,所有恢复动物均在第242/243天终止。所有主要研究和恢复动物均存活到预定的尸检。

[0379] 给药假期或给药停止发生在对照组、每月一次5mg/眼(相当于10mg人剂量)和每两周一次5mg/眼剂量组的动物中。由于OE检测到的不良发现,这些组中的双重注射被终止,并且被认为与程序和高剂量体积有关。从研究的第71天开始,每月一次5mg/眼组以每月一次2.5mg/眼(相当于5mg人剂量)给药(称为每月一次5/2.5mg/眼),每两周5mg/眼以每两周2.5mg/眼(称为每两周5/2.5mg/眼)给药。在双重注射停止后,在这些剂量组(包括对照组)中继续进行给药假期,这与程序和/或ADA相关,如下文所述。每月一次2.5mg/眼组(低剂量组)没有给药假期。

[0380] 本研究包括标准安全性参数(系统组织病理学除外),并且在整个研究过程中收集血液样品,以及用于TK和PD分析的末端玻璃体样品。收集ADA和房水样品并进行存档。另外,还评估了用于检测球体中沉积的免疫复合物的OE、IOP、ERG、眼部组织病理学和免疫组织化学(IHC)。

[0381] 在体重、食物消耗、视网膜电图测量、眼内压测量和临床病理学方面未发现与FabA相关的变化。

[0382] 被认为与FabA相关的眼部临床体征和眼科检查结果仅限于眼球混浊(可能是由于

前房、晶状体囊和/或后房的混浊)以及细胞和/或色素的存在。在血清中未检测到ADA的动物中存在这些发现(12只第2组动物中的4只,12只第3组动物中的2只以及12只第4组动物中的2只)表明与FabA相关。被认为与ADA相关且可能与免疫复合物沉积相关的发现往往更严重,包括房水耀斑和玻璃体混浊的存在、瞳孔对光反射的改变以及视网膜血管衰减。

[0383] 在向雄性和雌性食蟹猴IVT施用FabA后,通过血清FabA浓度测量的全身暴露是短暂的、低水平的,并且在第85天给药后不超过86.3ng/mL,或者在第169天最后剂量后不超过60.81ng/mL。TK证实,在第169天之前,几乎所有接受FabA治疗的动物都暴露于FabA,这与检测不到玻璃体C1q相对应,但是一些具有给药假期的动物除外。在10周无剂量恢复期后的第242/243天,无法测量FabA玻璃体浓度,并且在所有治疗的剂量组中都可检测到C1q浓度。据证实,在对照动物的血清和玻璃体中不存在FabA。

[0384] 在12只第1组(对照)动物中的4只、12只第2组动物中的8只、12只第3组动物中的10只和12只第4组动物中的10只中证实了抗FabA抗体在血清样品中的存在。在第1天后,两只第1组动物在每只动物的单个时间点确认呈阳性,而FabA治疗的ADA阳性动物在3个或4个或更多时间点得以鉴定(总共收集4或5个样品,分别用于主要研究和恢复动物)。ADA对血清或玻璃体中的FabA暴露无明显影响。

[0385] 在第184天的末期安乐死时,在每月和每两周5/2.5mg/眼(分别为中剂量组和高剂量组)下在右眼中观察到与ADA介导的对FabA的免疫反应一致的微观变化。与炎症相关的眼内变化包括睫状体和玻璃体腔的轻度混合细胞浸润、玻璃体腔内的轻度至中度纤维化(严重程度与剂量频率成正比)以及轻度至轻度晶状体后部退化(严重程度与剂量频率成正比)。在每两周和每月5/2.5mg/眼处理组中,每只雌性在后视网膜内也观察到最小血管周围单核细胞浸润。每两周和每月施用5/2.5mg/眼的动物的眼周角膜缘内观察到最小至轻度单核细胞浸润,严重程度与剂量频率成正比。

[0386] 在第242/243天的恢复安乐死中,与ADA介导的对FabA的免疫反应相关的右眼微观变化在每月5/2.5mg/眼下是有限的和轻度的,而其他变化在每两周5/2.5mg/眼下得以持续或发展。玻璃体腔和葡萄膜的最小组织细胞浸润以及玻璃体腔的嗜碱性粒细胞增多的增加是在恢复时每两周和/或每月施用FabA5/2.5mg/眼的动物所独有的。这些变化类似于在末期尸检时在对照动物中观察到的那些变化,其中它们被认为与IVT注射程序相关的前玻璃体的轻微炎症/破坏有关。然而,恢复期后这些变化的持续存在,这些变化在恢复期对照动物中的消退以及更严重的炎症变化在每两周和每月施用FabA 5/2.5mg/眼的动物的末期尸检中的存在表明,在恢复时的这些变化更可能代表与ADA介导的对FabA的免疫反应相关的炎症的消退,而不是注射过程的影响的残留。眼周角膜缘的最小单核细胞浸润在每两周和每月5/2.5mg/眼下持续存在。

[0387] 玻璃体腔的最小混合细胞浸润和纤维化在每两周5/2.5mg/眼下持续存在,而视网膜的细胞结构和血铁黄素蛋白色素适度减少。在每两周5/2.5mg/眼下观察到视盘处的视网膜的最小血管周围单核细胞浸润。这些变化也被认为是ADA介导的对FabA的反应继发的。

[0388] 病理学上不利的微观变化被认为是ADA介导的炎症继发的,并且包括玻璃体腔内的纤维化、晶状体退化以及每两周和每月5/2.5mg/眼下的视网膜细胞结构减少。

[0389] 在末期或恢复安乐死时,没有与FabA每月2.5mg/眼相关的微观变化。

[0390] 分别对第1、3和4组的12只动物中的2只、12只动物中的4只和12只动物中的6只进

行免疫组织化学。评估显示,在被选择用于IHC的中等剂量每月5/2.5mg/眼(4只动物中的2只)和高剂量每两周5/2.5mg/眼(6只动物中的2只)的10只处理的动物中的4只的左眼内,存在通过免疫组织化学检测到的含有FabA、食蟹猴IgG、IgM和/或C3的颗粒沉积物。这些壁内血管沉积物存在与血管周围炎性细胞浸润有关,类似于右眼的苏木精和伊红评估所观察到的那些。在右眼内观察到的其他微观变化与食蟹猴中对FabA的这种免疫反应相关的继发性变化一致。虽然未在所有被选择用于免疫组织化学的动物(包括一些血清ADA阴性的动物)中观察到眼部免疫复合物沉积物,但是这并不意外,因为沉积物识别可以因组织切片而异,并且血清ADA并不总是存在于动物中,其中显微证据与免疫复合物病理学一致。另外,在一些多剂量假期的动物中,ADA和/或免疫复合物可以在分析之前已经被清除。即使在一个动物子集中存在经免疫组织化学证实的沉积物,也被认为是最有说服力的证据,该证据表明,在右眼中观察到的相似且病理上一致的病理学可能与对FabA的免疫反应有关。

[0391] 在这项食蟹猴的为期26周的慢性眼部毒理学研究中,不良眼部变化被确定为与双重注射程序相关和/或ADA介导的,不是FabA IVT施用的直接影响,因此在食蟹猴中NOAEL被确定为每两周或每月一次2.5mg/眼(相当于5mg人剂量),分别为13或7剂。

[0392] 实施例9:在临床研究中评估FabA

[0393] FabA药物产品是用于IVT注射的无菌等渗液体。进行1期首次人体开放标签剂量递增研究(FabA-GLA-01),以评估原发性开角型青光眼患者的FabA的单次IVT注射的初始安全性和耐受性。

[0394] 进行1b期随机双盲研究(FabA-GLA-02),以评估原发性开角型青光眼患者的FabA的重复IVT注射的安全性和耐受性。

[0395] 两项研究的结果发现,FabA IVT的单剂量(1至5mg/眼)(相当于2-10mg人剂量)和重复剂量(2.5和5mg/眼,2剂,间隔4周)在青光眼患者中耐受性良好;未报告严重或显著的不良事件(AE)。在这些研究中,用FabA治疗的患者的眼部AE包括结膜充血、结膜出血和眼睛刺激,并且仅发生在经处理的眼中。在1b期研究中,假注射组患者的眼部AE包括眼痛、眼内异物感、眼部充血和视力模糊。未发生被认为与FabA IVT治疗相关的全身性AE。

[0396] 单次IVT注射2.5mg(相当于5mg人剂量)和5mg(相当于10mg人剂量)FabA在房水中抑制游离C1q至少29天(研究FabA-GLA-02)。

[0397] 人体药代动力学和药效动力学

[0398] 眼部药代动力学和药效动力学

[0399] FabA-GLA-02是1b期研究,其中对房水进行取样以评估PK和PD。向受试者施用两次IVT假注射,2.5mg/眼FabA(相当于5mg人剂量)或5mg/眼(相当于10mg人剂量)FabA,间隔29天。在该研究中,在第一FabA剂量后和第二剂量前的给药前和29天对房水进行采样。在第29天(D29)所有处理的患者的房水中检测到游离FabA。平行地,2.5mg/眼和5mg/眼的剂量水平的FabA抑制房水中的游离C1q持续至少29天(图12)。

[0400] 全身药代动力学和药效动力学

[0401] FabA-GLA-01是单剂量1期研究,其中在给药前和给药后3小时对血清FabA和C1q进行采样。FabA-GLA-02是多剂量1b期研究,其中在间隔29天的2剂中的每个的给药前和给药后3小时对血清和FabA和C1q进行采样。在1期或1b期临床研究中研究的任何剂量水平下的单次或重复IVT注射后,通常无法在体循环中检测到FabA。类似地,在这两项研究中的任一

项均未检测到循环游离C1q的变化。

[0402] 如下文所述,在FabA临床研究中,5mg/眼(相当于10mg人剂量)剂量水平作为单剂量或间隔29天的两剂量耐受性良好。如上所述,在1b期研究中,2.5mg(相当于5mg人类剂量)和5mg(相当于10mg人类剂量)的单剂量的FabA抑制了房水中的游离C1q持续至少29天(图12)。

[0403] 安全性和功效

[0404] 1期剂量递增(FabA-GLA-01)

[0405] 这是1期开放标签剂量递增研究,评估原发性开角型青光眼患者的FabA的单次IVT注射的安全性/耐受性和PK。符合条件的患者是在可靠的视野测试中平均偏差为3至18dB的成年人,他们能够在研究眼中进行可靠的视野测试,使用Humphrey视野分析仪-瑞典相关阈值算法(Humphrey Field Analyzer-Swedish Interactive Threshold Algorithm,HFA-SITA)24-2快速算法得到的注视丧失的截止值为33%,假阳性反应率为33%,并且在给药前 ≥ 4 周,在稳定的IOP治疗方案中,研究眼的IOP < 21 mmHg。将九名患者分配到3个群组,每个群组纳入3名患者,如下文所示:

[0406] • 群组1=1.0mg/眼,单剂量(0.02mL)×1剂

[0407] • 群组2=2.5mg/眼,单剂量(0.05mL)×1剂

[0408] • 群组3=5.0mg/眼,单剂量(0.10mL)×1剂

[0409] 在筛选后,将3名符合条件的患者纳入最低开放群组,只有在此前较低剂量下的耐受性和短期安全性得到证实后,才开始纳入下一个群组。每个群组中的所有患者都需要完成至少15天的安全观察期,然后才能对下一个群组中的患者进行注射。研究期间未报告剂量限制性毒性(DLT)。

[0410] 九名患者得以纳入、治疗并完成研究。

[0411] 安全性

[0412] 眼部治疗中出现的不良事件(TEAE)包括结膜充血(所有剂量水平)、结膜出血(仅2.5mg/眼)和眼睛刺激(仅1mg/眼),并且仅发生在研究眼中。

[0413] 研究中经历的唯一全身性TEAE是鼻窦炎。

[0414] • 所有TEAE的严重程度都是轻度。

[0415] • 没有严重或显著的TEAE。

[0416] • 没有患者因TEAE而停止治疗或退出研究。

[0417] • 9名患者中有9名在30分钟内IOP恢复正常(即刻注射前IOP的5mmHg以内或 < 21 mmHg)。

[0418] • 没有患者显示出任何抗FabA抗体的证据。

[0419] 总体总结/结论:

[0420] 在这项稳定型青光眼患者的研究中,单次IVT剂量的FabA耐受性良好,高达5mg/眼。所报告的眼部AE与批准药物的IVT施用的报告类似。未观察到FabA的安全性信号。

[0421] FabA在体循环中通常检测不到,并且在单次IVT施用后未检测到循环游离C1q的变化。

[0422] 1b期(FabA-GLA-02)

[0423] 这是双盲随机假对照研究,评估两种剂量水平的FabA与假注射,所述剂量作为患

有原发性开角型青光眼患者的重复IVT注射施用。符合条件的患者是在研究眼的可靠视野测试中平均偏差为-3至-24dB的成年人,他们能够在研究眼中进行可靠的视野测试,使用HFA-SITA快速算法得到的近视丧失的截止值为33%,假阳性反应率为33%,在筛选时和第1天IOP<21mmHg,并且针对注射前≥4周稳定的IOP治疗方案,在研究期间IOP治疗方案无预期的变化。患者接受两次注射,间隔4周,并接受总共12周的随访,以评估安全性、耐受性、PK、PD、免疫原性以及正在进行的探索性评估。将患者随机分配(1:1:1)至3个群组中的一个中(计划每个群组5名患者),如下文所示:

[0424] • 剂量水平1=2.5mg/眼,单剂量(0.05mL)×2剂

[0425] • 剂量水平2=5.0mg/眼,单剂量(0.10mL)×2剂

[0426] • 假注射=0mg/眼×2剂

[0427] 将十八名患者随机分配(7名分配至2.5FabA组,5名分配至5.0mg FabA组,6名分配至假注射组),17名患者得以治疗。2.5mg剂量组中的一名患者被随机分配,但是未接受治疗。十六名患者完成了研究。

[0428] 安全性

[0429] 用FabA治疗的患者经历的眼部TEAE包括结膜充血(2.5和5mg/眼)、结膜出血(仅5mg/眼)和眼睛刺激(仅5mg/眼);假注射组的患者未经历这些TEAE。假注射组中的眼部TEAE包括眼痛、眼内异物感、眼部充血和视力模糊各1例患者。

[0430] 研究中出现全身性TEAE;没有一例被研究者认为与研究治疗有关。

[0431] • 所有TEAE的严重度都是轻度。

[0432] • 除了一例报告的TEAE之外,所有TEAE均发生在第一剂量后,但是在研究治疗的第二次施用之前。

[0433] • 没有严重或显著的TEAE。

[0434] • 没有患者因TEAE而停止治疗或退出研究。

[0435] • 16/17名患者在IVT注射后30分钟内IOP恢复正常(<21mmHg),其余患者在45分钟内恢复正常。

[0436] • 在玻璃体内给予FabA的11名患者中,6名患者在至少一个时间点测试呈阳性。一名患者ADA呈阳性,滴度随时间推移适度增加,其余5名患者在所有时间点(包括给药前)均呈阳性,滴度随时间推移无任何变化。一名假注射患者在所有时间点(包括给药前)ADA均呈阳性,滴度随时间推移无任何变化。总之,这些数据表明,ADA测量和FabA给药之间的关系不明确。

[0437] 总体总结/结论:

[0438] 在稳定型青光眼患者中,间隔4周的2个IVT剂量的FabA耐受性良好,高达5mg/眼。所报告的眼部AE与批准药物的IVT施用的报告类似。在这项研究中,未观察到FabA的安全性信号。

[0439] 单剂量的FabA IVT(2.5和5mg/眼)抑制房水中的游离C1q至少29天。

[0440] 实施例10:在继发于年龄相关性黄斑退化(AMD)的地理萎缩(GA)患者中通过玻璃体内注射施用FabA的有效性、安全性和耐受性的2期、多中心、随机、平行组、双盲、4组、假对照研究

[0441] 基本原理:

[0442] 简要概述:

[0443] 这项研究正在AMD继发的GA患者中进行。该研究的目的是确定每月(EM)一次或每隔一个月(EOM)一次的FabA的玻璃体内(IVT)注射持续12个月是否可降低GA病灶的生长速率。该研究包括30天的筛选期和12个月的治疗期,然后是6个月(停止治疗)的随访期。患者参与的总持续时间为19个月。在12个月的治疗期期间,患者每个月都会去诊所进行治疗和/或安全性评估。

[0444] 大约240名患者被纳入并随机分配至4个治疗实验组中的一个,因此大约204名患者在第12个月可用于主要分析的评估(主要分析基于改良的意向治疗[ITT])。

[0445] 干预组和持续时间:

[0446] 研究干预分配基于随机分组(2:2:1:1)。将患者分配至以下治疗实验组之一。剂量水平是固定的,不会被修改。

[0447] • 第1实验组=FabA 5.0mg/眼(0.10mL),每月(EM)一次,持续12个月(12剂)

[0448] • 第2实验组=FabA 5.0mg/眼(0.10mL),每隔一个月(EOM)一次,持续12个月(6剂)

[0449] • 第3实验组=假注射EM 12个月(12次假注射)

[0450] • 第4实验组=假注射EOM 12个月(6次假注射)

[0451] 注射

[0452] FabA/假注射施用由注射医师使用无菌技术完成。

[0453] 所有随机分配到FabA的患者每月一次或每隔一个月一次接受5.0mg/眼IVT(固定体积为0.10mL),持续12个月。

[0454] 注射后

[0455] 在药物施用后,注射医师立即评估手动视力或中央视网膜动脉灌注可视化。必要时排除其他原因导致视力丧失,诸如玻璃体出血。如果需要,进行数字按摩,并施用局部/口服IOP降低药物,直到观察到手动视力或中央视网膜动脉灌注。

[0456] IOP(眼内压测量)仅在药物施用后30分钟在研究眼中进行评估,并且如果升高,则此后每15分钟评估一次,直到IOP<25mmHg。

[0457] 药代动力学、药效动力学和免疫原性

[0458] 用于PK(FabA血清浓度)和PD评估(血清C1q浓度和其他生物标志物的血浆浓度)的血液样品在就诊时在给药前30分钟内和给药后3小时(±15分钟)内收集。

[0459] 用于免疫原性测试(ADA)的样品在现场访视期间在注射前收集。另外,在第2周在现场或家庭健康访视时收集ADA样品。

[0460] 药代动力学:该测试需要血清。收集血液样品用于测量FabA的血清浓度。

[0461] 药效动力学:该测试需要血清和血浆。分析C1q的血清浓度和探索性补体生物标志物的血浆浓度。

[0462] 免疫原性:该测试需要血清。通过血清抗药(FabA)抗体(ADA)的分析来评估免疫原性。

[0463] 玻璃体内注射的程序

[0464] FabA的制备

[0465] 使用带19号×1-1/2英寸、5微米滤针的无菌1.0cc注射器,从FabA的无菌小瓶中吸

取整个体积的FabA(约0.3mL)。

[0466] 用30号×1/2英寸注射针来更换滤针。在注射前从注射器中排出多余的FabA体积,只在注射器中留下所需的注射体积。

[0467] FabA的剂量体积固定为0.10mL,每月(EM)一次,持续12个月(12剂),或者每隔一个月(EOM)一次,持续12个月(6剂)。

[0468] 玻璃体内注射的准备

[0469] 1. 验证研究眼。

[0470] 2. 在注射前测量并记录研究眼的术前眼压(IOP)。仅对研究眼进行眼内压测量。IOP必须 ≤ 21 mmHg才能继续。如果 >21 mmHg,则重新安排FabA的注射并根据研究者的判断管理IOP。

[0471] 3. 在注射前30分钟,将1滴2.5%盐酸苯肾上腺素眼药水局部施用于研究眼,以便在注射后对后极进行可视化(如有必要)。

[0472] 4. 注射前:

[0473] • 让患者仰卧在检查椅上,颈部得到良好支撑。

[0474] 玻璃体内注射

[0475] 1. 注射时需洗手,戴无菌手套,戴外科口罩。

[0476] 2. 将0.5%丙美卡因局部施用于研究眼。

[0477] 3. 将10%聚维酮碘施用于睫毛和眼睑边缘。避免在注射前或注射后过度按摩眼睑,以避免睑板腺表达。

[0478] 4. 在手术期间将眼睑从预定注射部位收回。建议使用开睑器。

[0479] 5. 将5%聚维酮碘施用于结膜表面,包括预定的注射部位。

[0480] 6. 对于FabA注射:将针垂直于巩膜插入,在角膜缘后3.5至4mm处,垂直和水平直肌之间。取出针后立即在注射部位施用无菌棉尖涂抹器,以减少玻璃体反流。

[0481] 7. 假注射:假注射的准备和注射后护理与FabA注射相同。假注射通过使用无针头的空注射器的钝端在典型的玻璃体内注射位置对眼睛施加压力来进行。

[0482] 玻璃体内注射后

[0483] 1. 在注射后患者应留在诊所进行眼部评估和安全性随访。

[0484] 2. 立即评估手动视力或中央视网膜动脉灌注,排除其他导致视力丧失的原因,诸如玻璃体出血。如果未发现其他原因,则进行数字按摩并施用局部/口服IOP降低药物,直到观察到手动视力或中央视网膜动脉灌注。

[0485] 3. 仅在注射后30分钟对研究眼进行IOP测量,并且如果升高,则每15分钟测量一次,直到IOP <25 mmHg。眼内压超过30mmHg超过15分钟应根据医生的判断进行治疗。

[0486] 4. 不需要局部施用抗生素。

[0487] 实施例11:在感光细胞退化的光损伤模型中,C1q介导感光细胞突触的小胶质细胞修剪

[0488] 在光损伤模型中,抗C1q治疗(例如,Mab3)降低视网膜补体水平(图5A-5D),减少炎症(图13A和图13B)并减少神经退化(图13A和图13C-13D)。图13A-13D显示了免疫荧光(IF)数据。图13B显示了在治疗后第3天,视网膜的外丛状层(OPL)(也称为外突触层)中减少的小胶质细胞增生。小胶质细胞增生的减少与炎症减少有关。图13C显示了感光细胞突触的显著

保留,并且图13D显示了在治疗后第5天,细胞体的显著保留。治疗后对保留的感光细胞突触和细胞体的测量证明,在这种光损伤模型中,用抗C1q治疗减少了神经退化。

[0489] 实施例12:抗C1q玻璃体内治疗降低了rd10小鼠模型中的视网膜补体组分水平

[0490] 在接受抗C1q治疗的动物的视网膜裂解物中发现了可测量的治疗(例如,Mab3)水平,但在IgG1治疗组或未治疗组中未发现(图14A)。与WT相比,在来自未治疗和IgG d10动物的视网膜裂解物中证实了经典补体组分C1q水平的增加(图14B)。与IgG1治疗和未治疗的rd10组相比,抗C1q治疗导致视网膜裂解物中C1q水平降低(图14B),证实了视网膜中(和血浆中,数据未显示)良好的可测量PK和C1q结合。图15A是表示免疫荧光图像的定量的条形图,并且图15B显示了证明用C1q抑制剂处理后感光细胞突触(BSN标志物)的保留的免疫荧光图像。这是感光细胞突触保护的证据。

[0491] 以引用的方式并入

[0492] 本文引用的每个专利、公开的专利申请和非专利参考文献通过引用整体并入本文。

[0493] 等效方案

[0494] 本领域技术人员仅仅使用常规试验将认识到或者能够确定本文所描述的发明的具体实施方案的许多等效方案。此类等效方案意图由所附权利要求书涵盖。

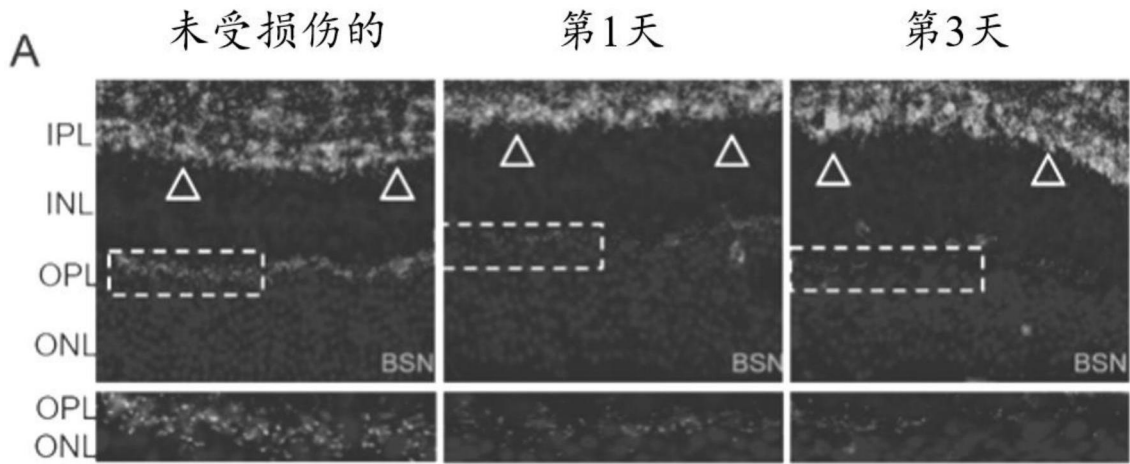


图1A

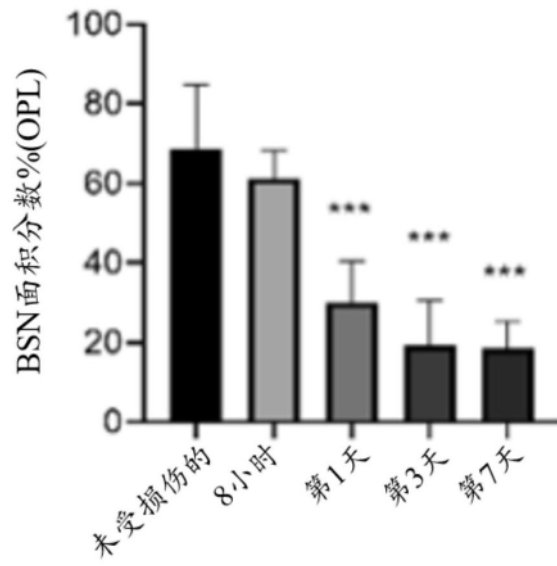


图1B

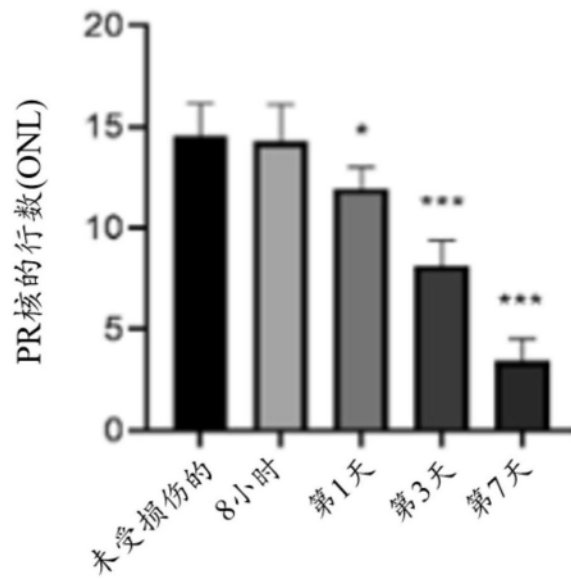


图1C

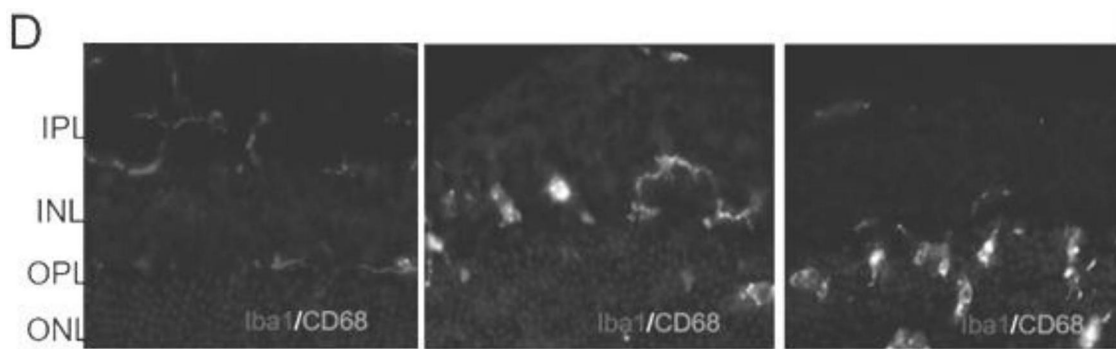


图1D

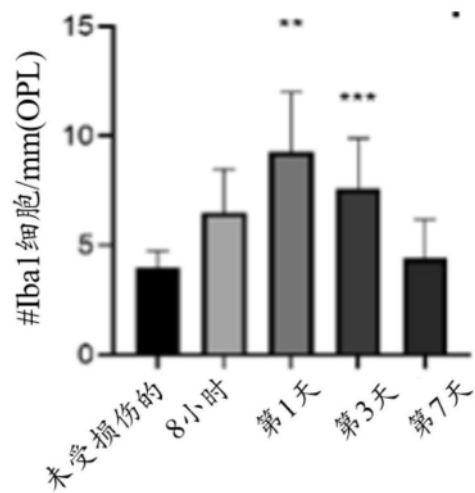


图1E

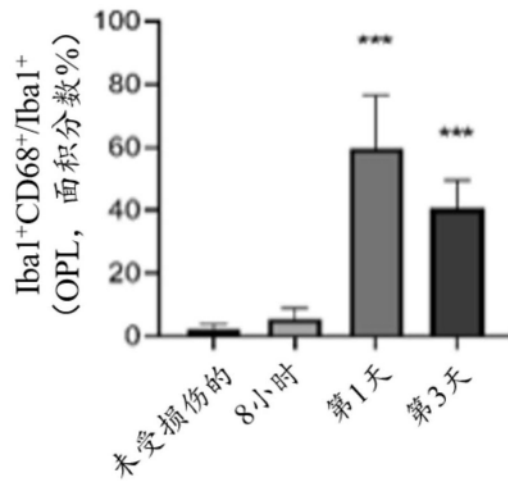


图1F

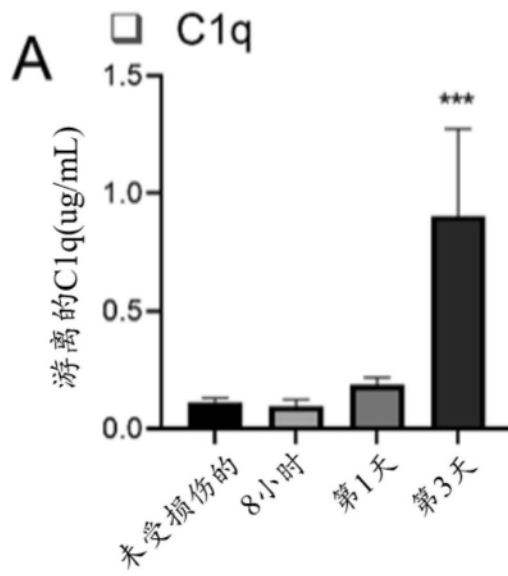


图2A

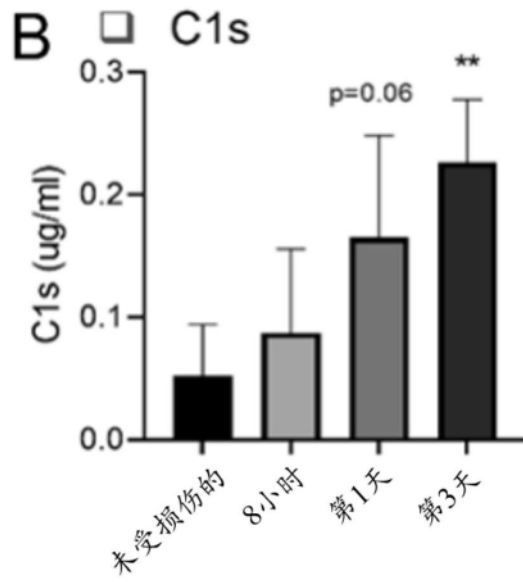


图2B

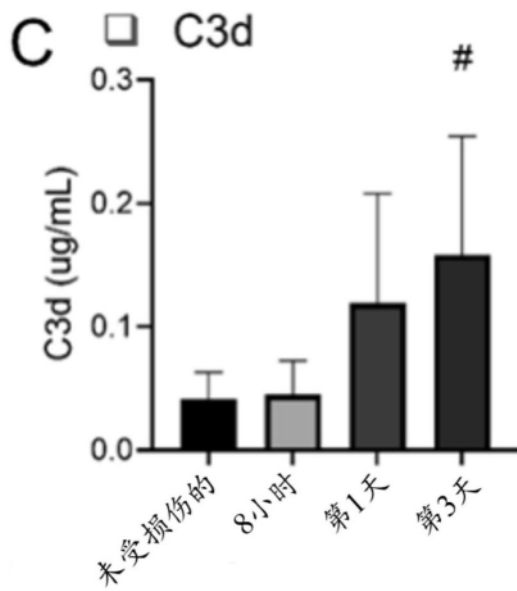


图2C

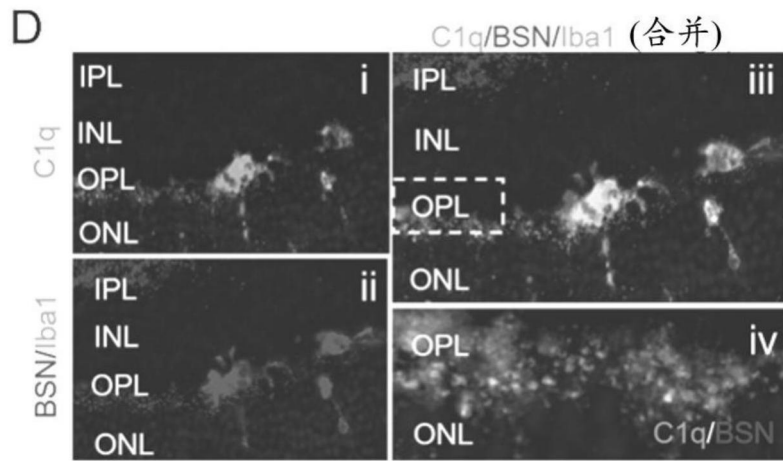


图2D

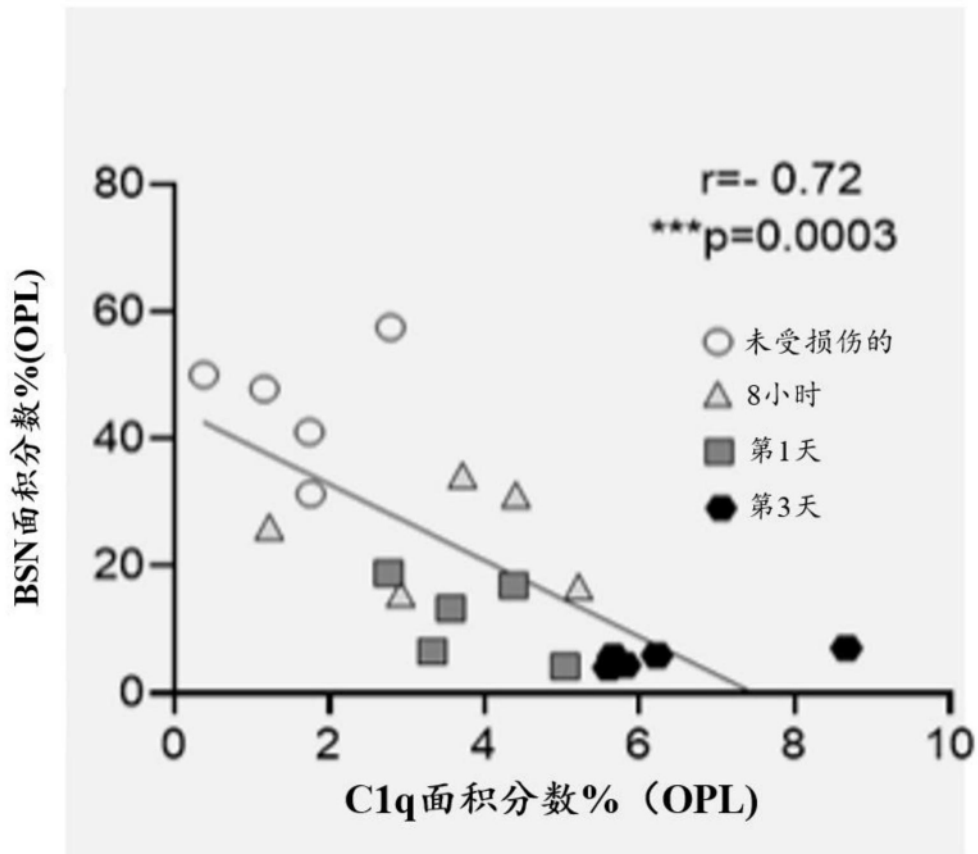


图2E

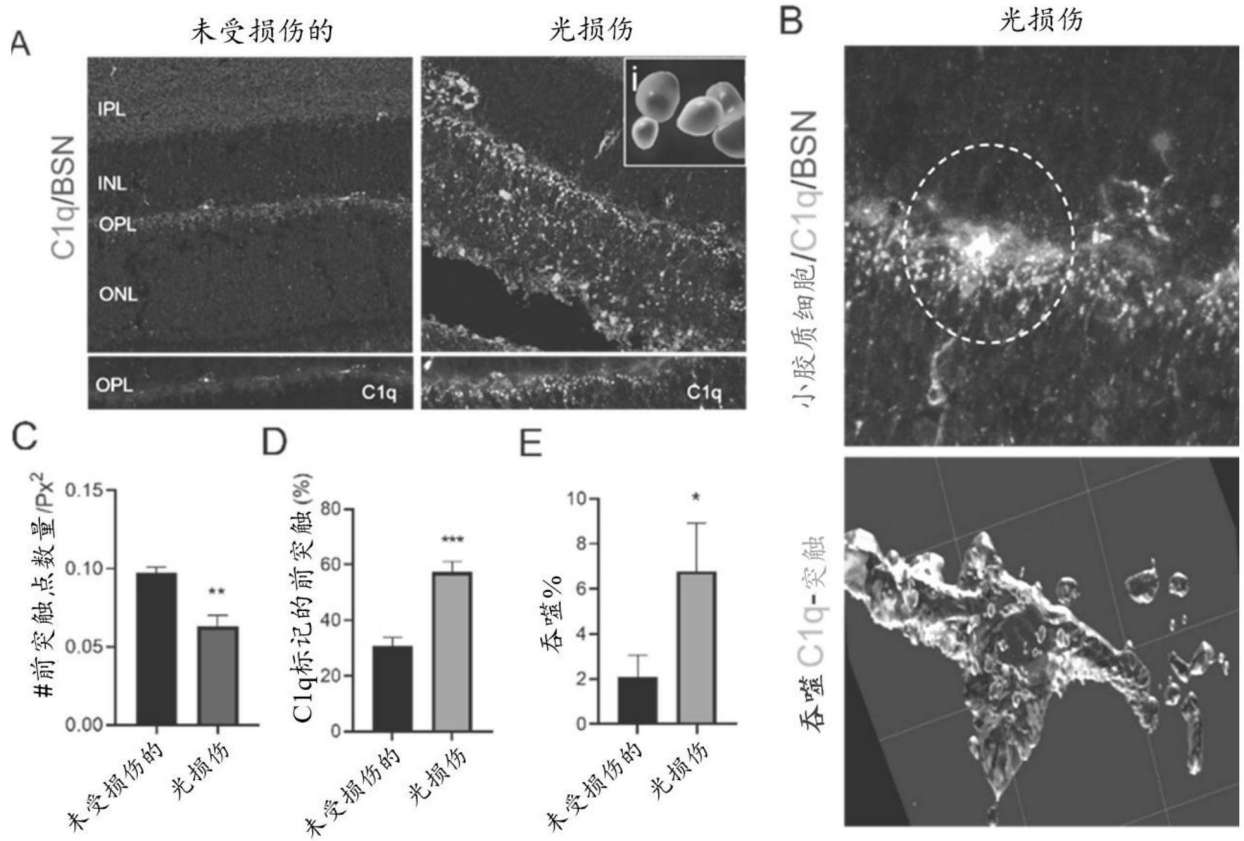
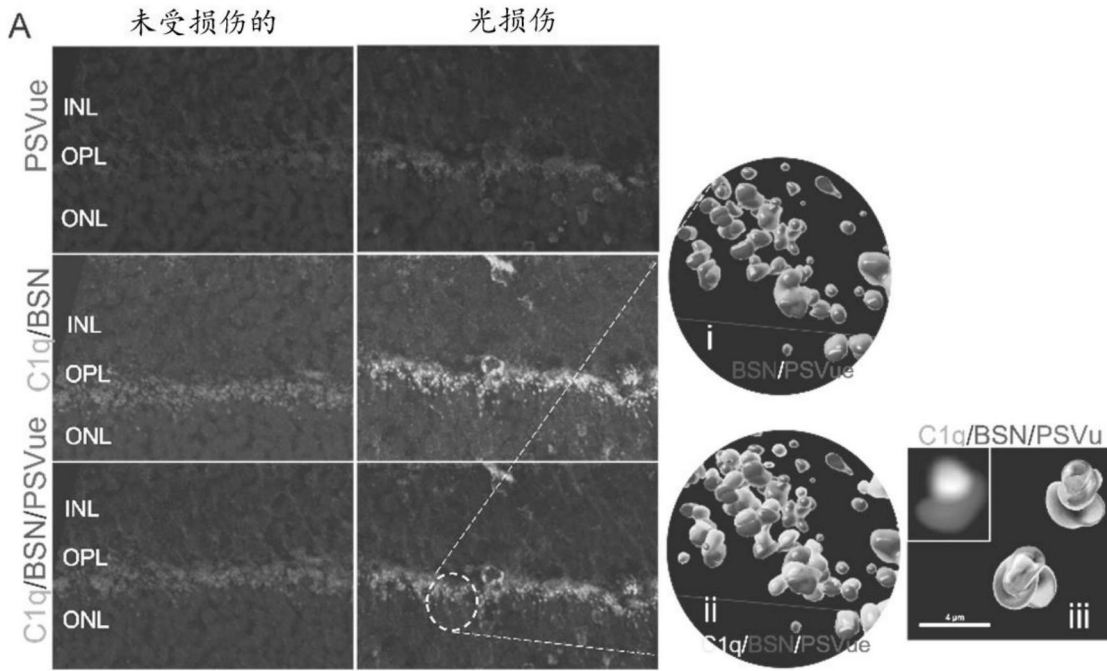


图3

体内



体外

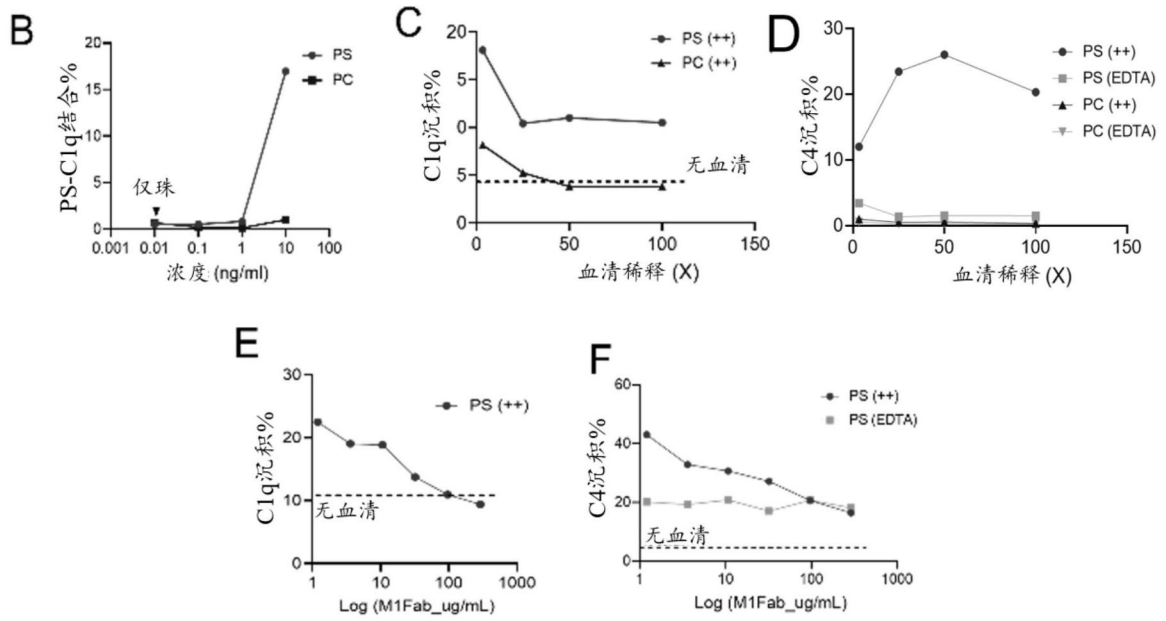


图4

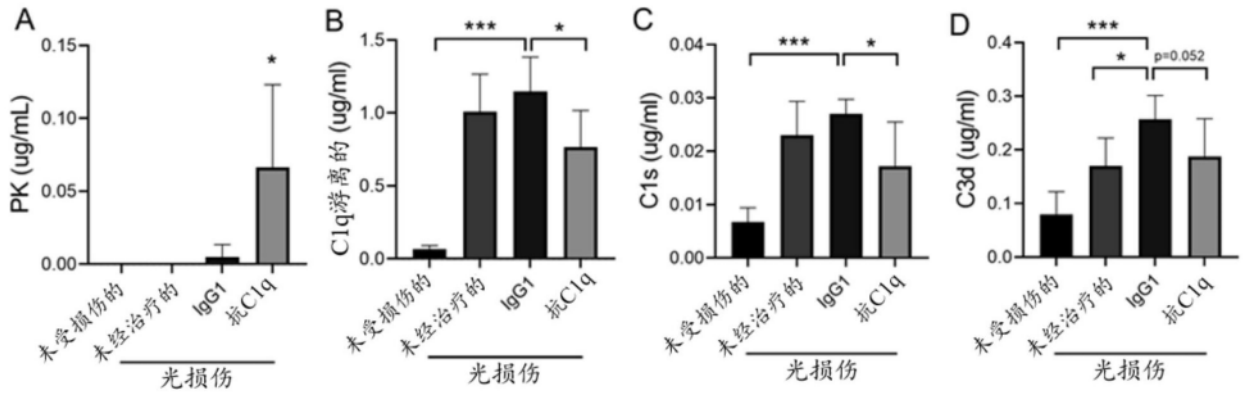


图5

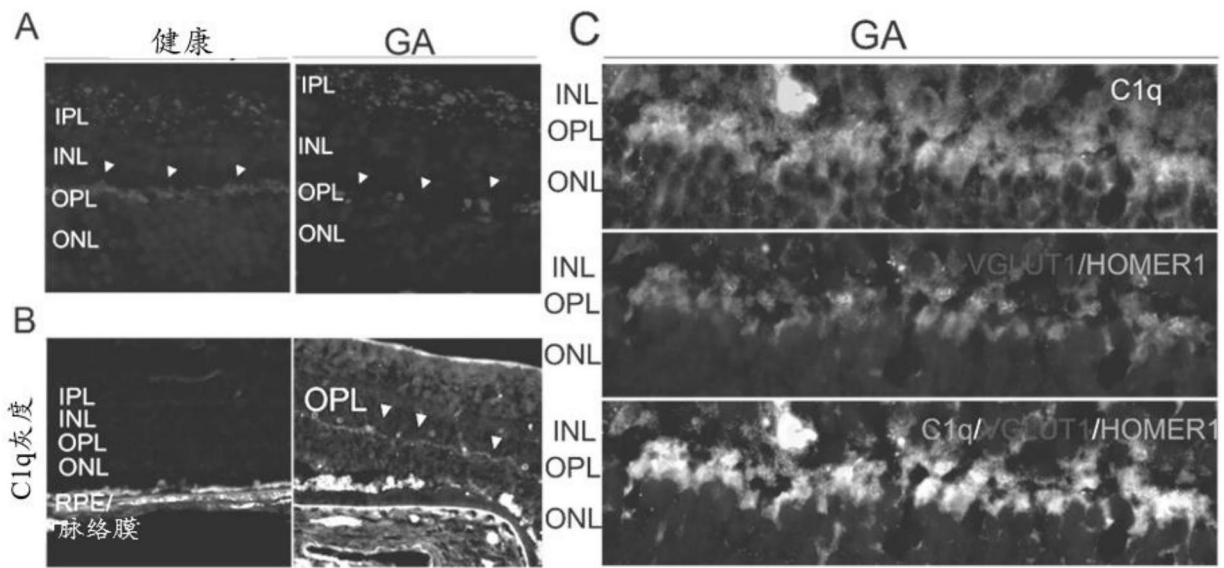


图6

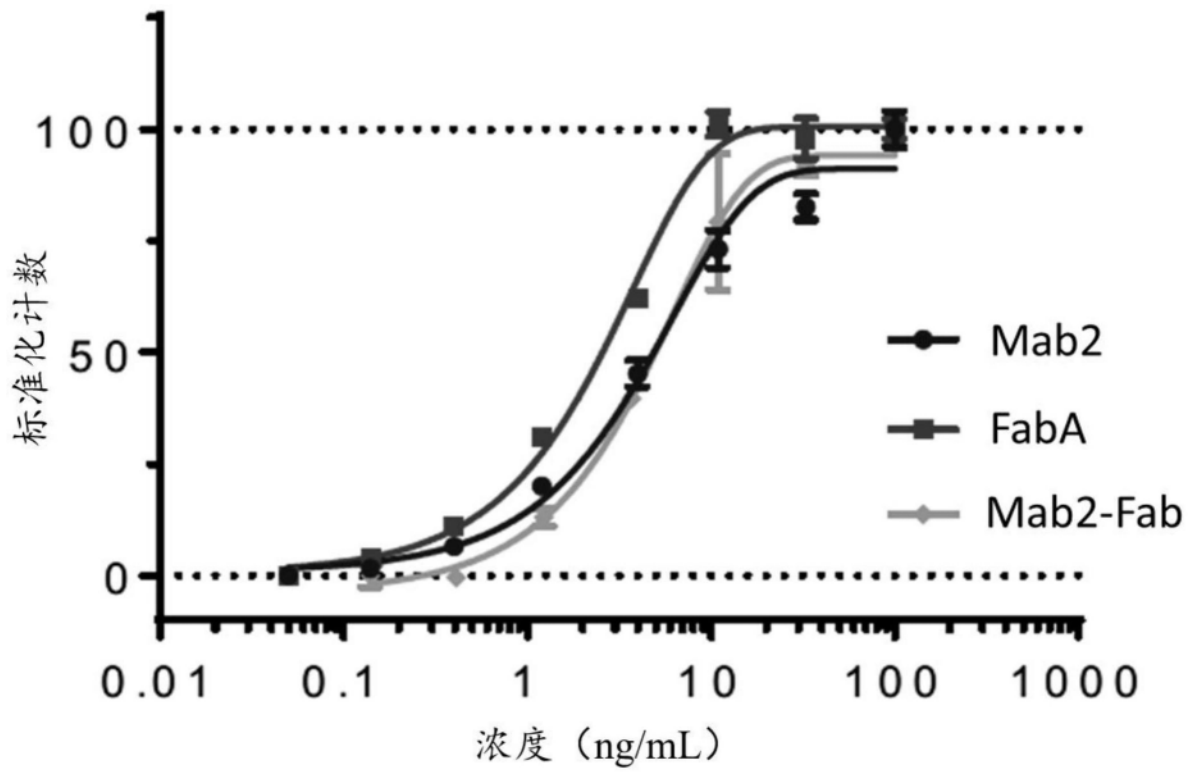


图7

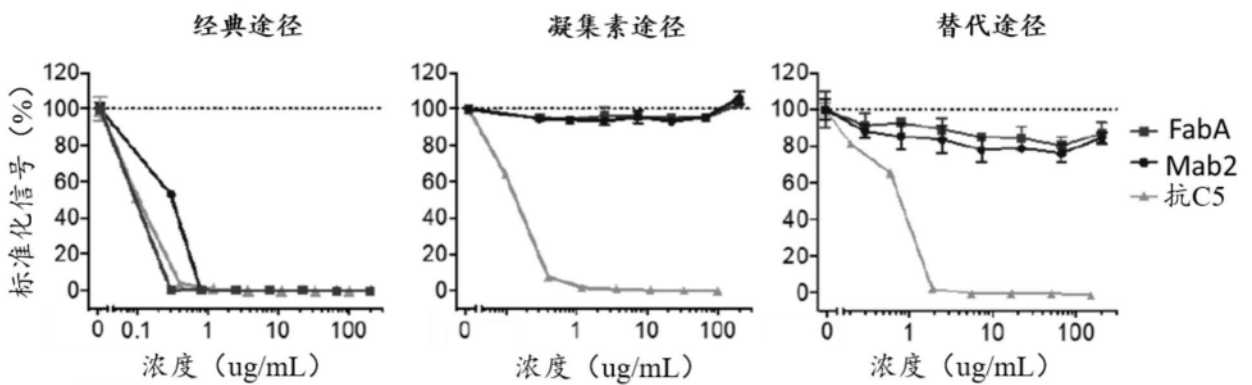


图8

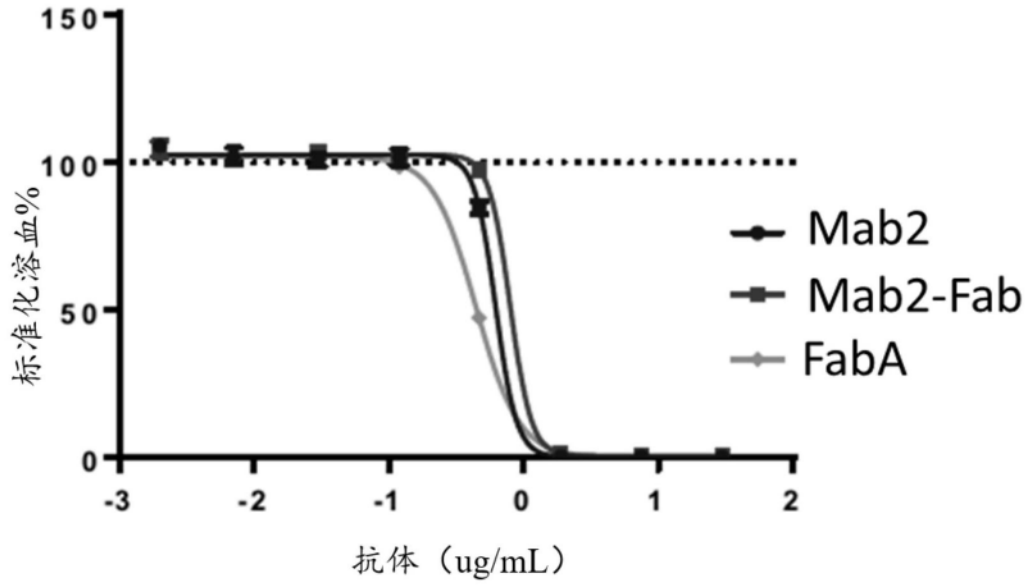


图9

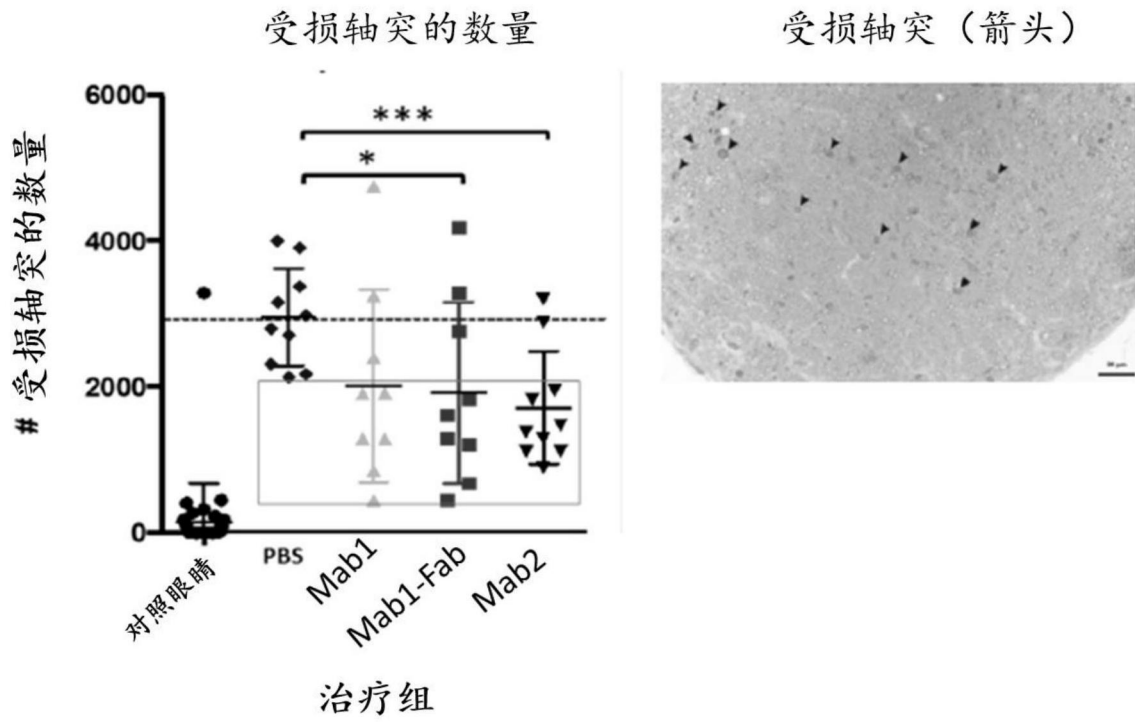


图10

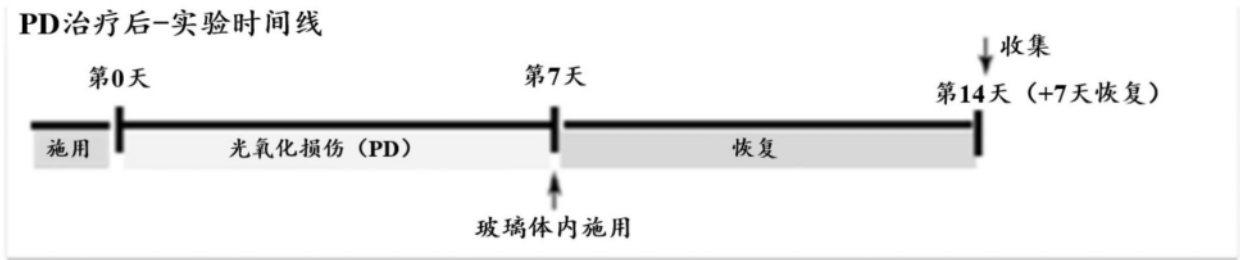


图11A

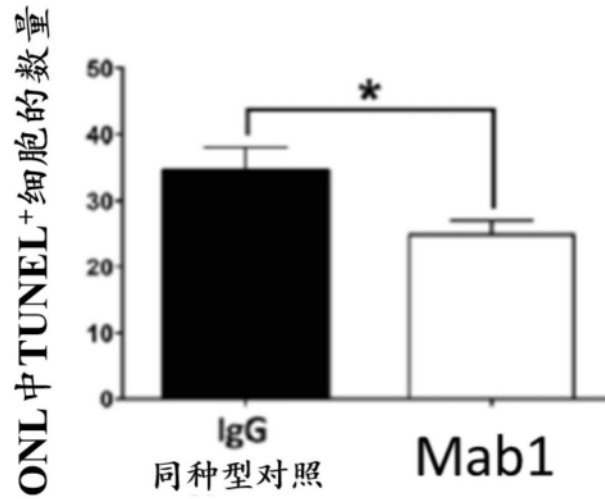


图11B

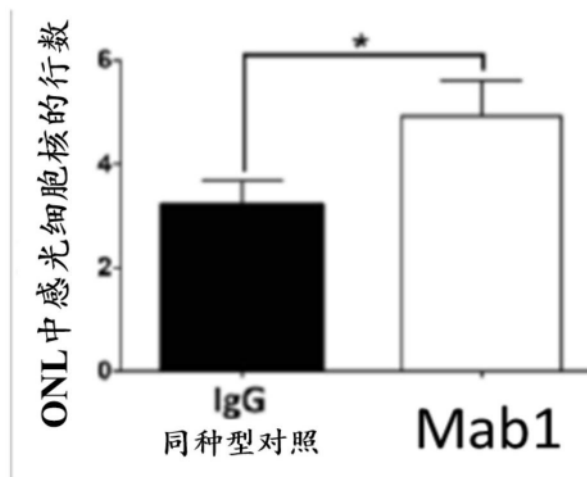


图11C

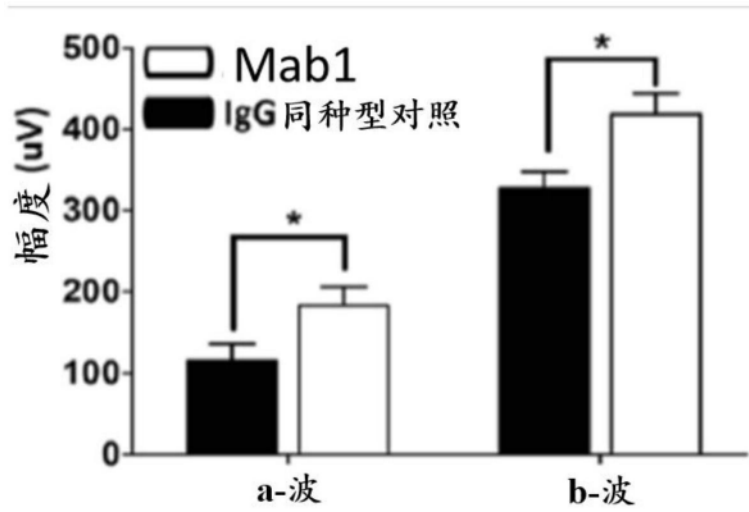


图11D

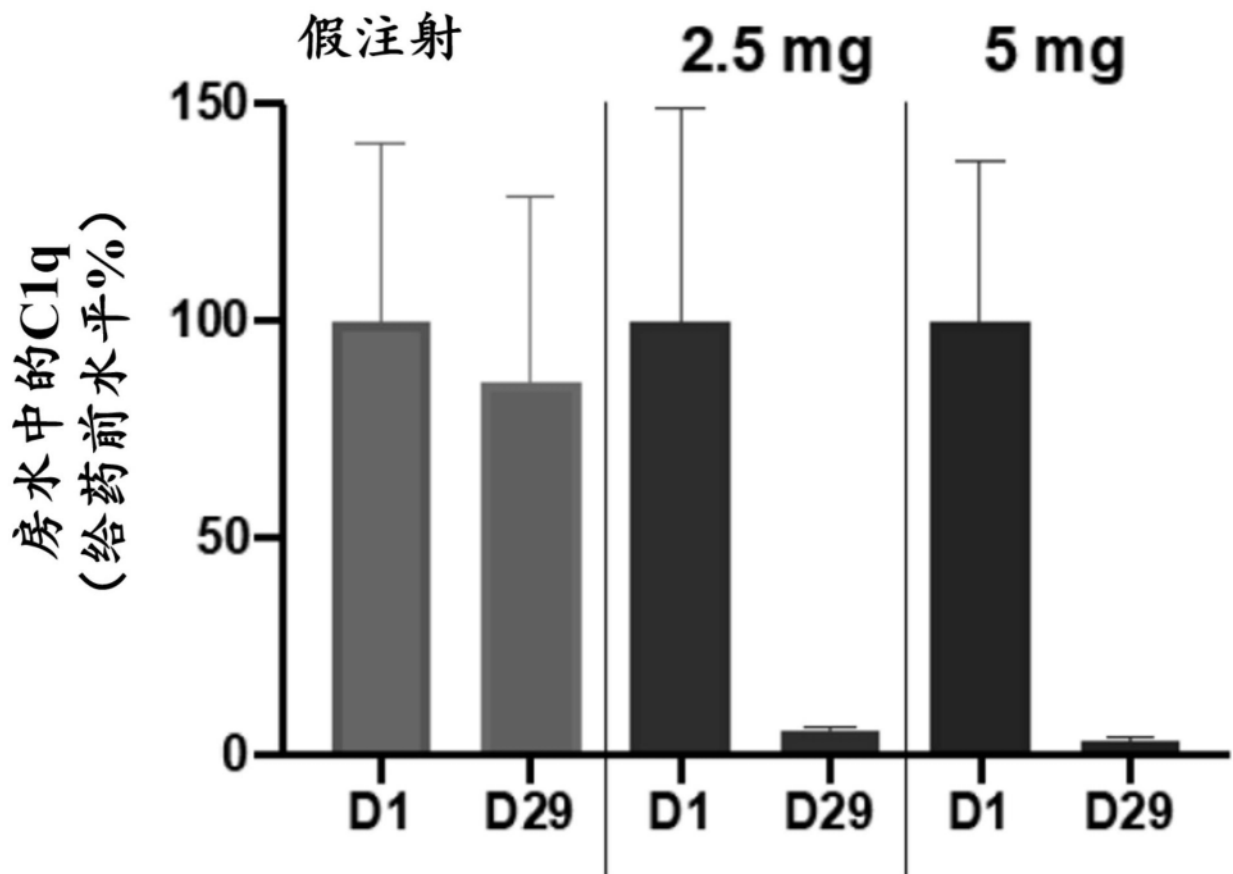


图12

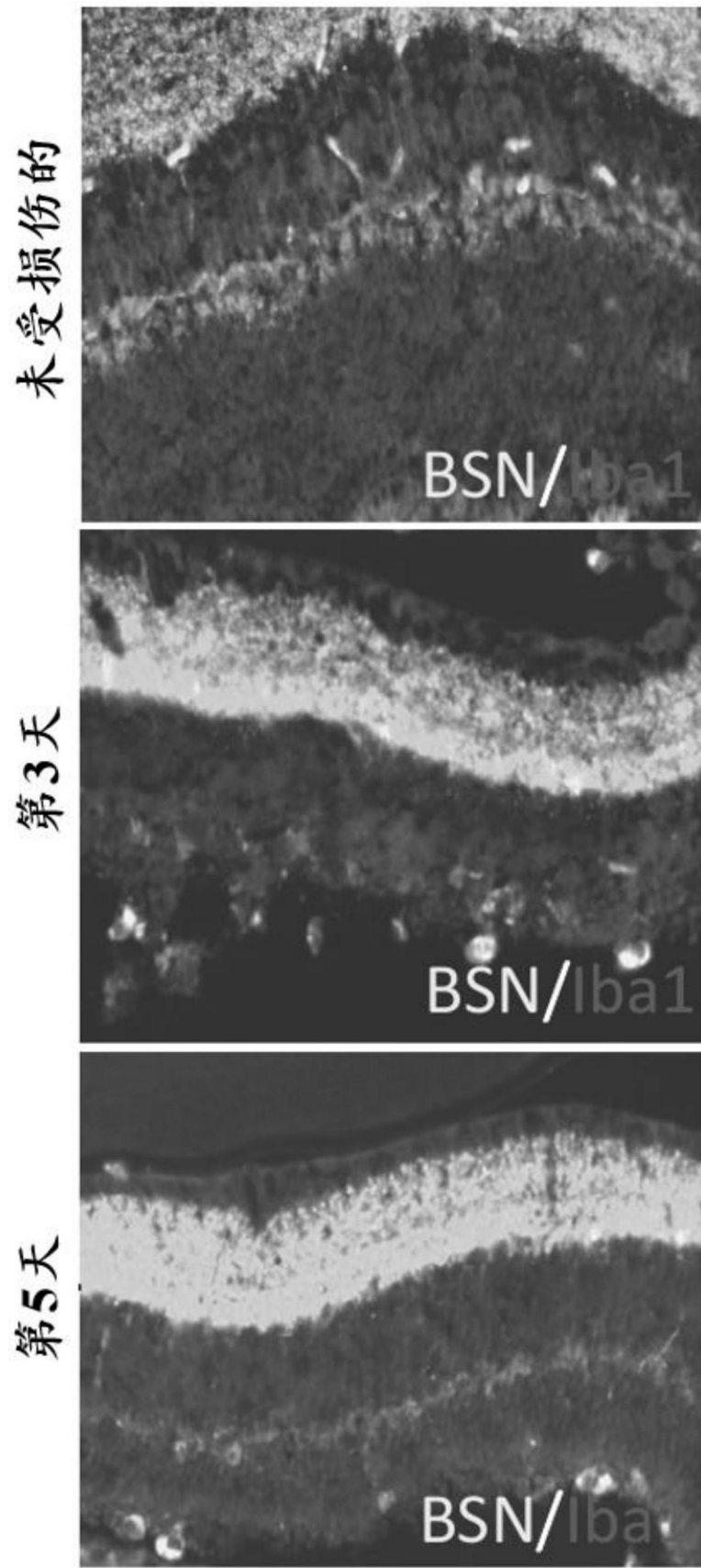


图13A

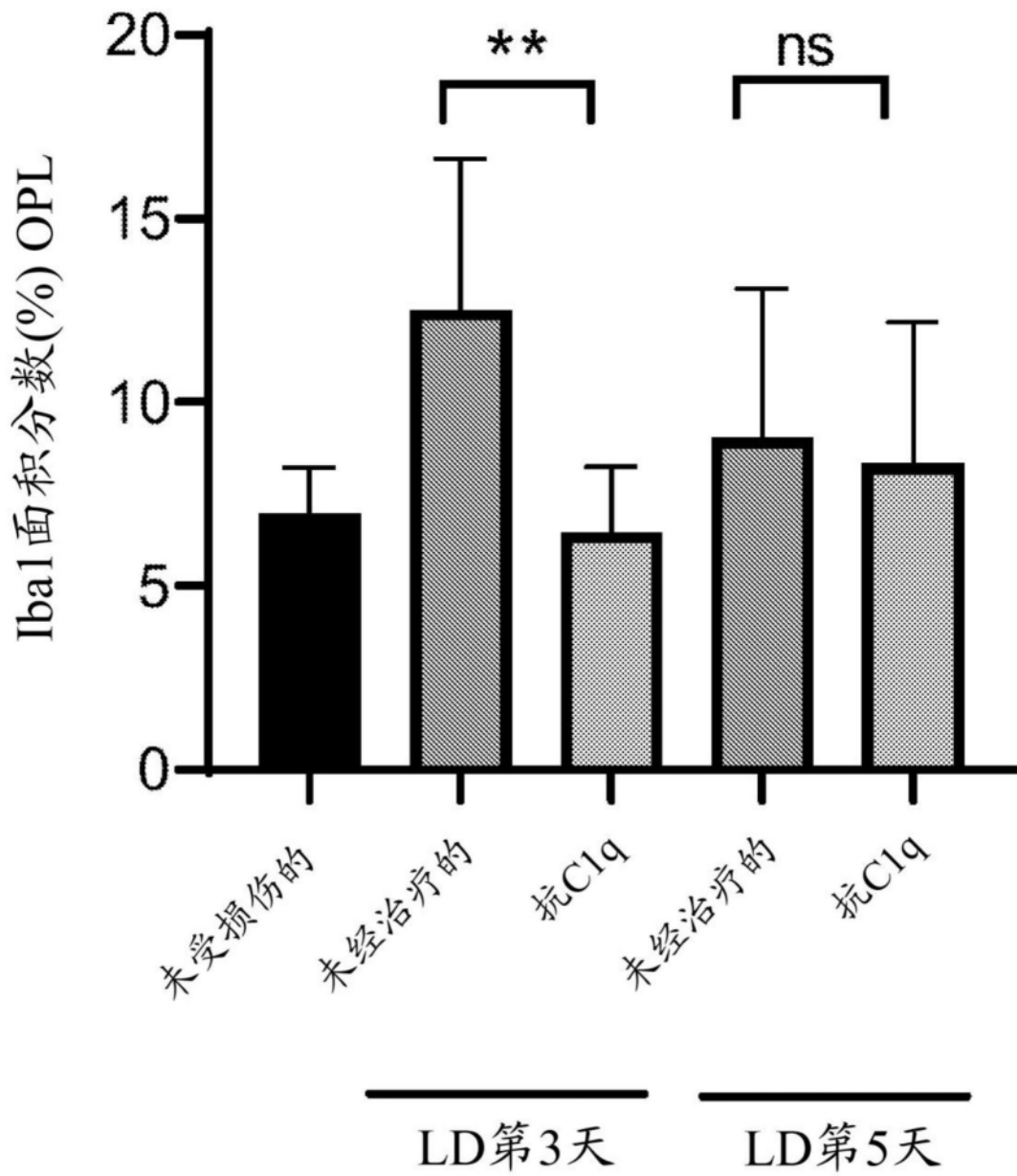


图13B

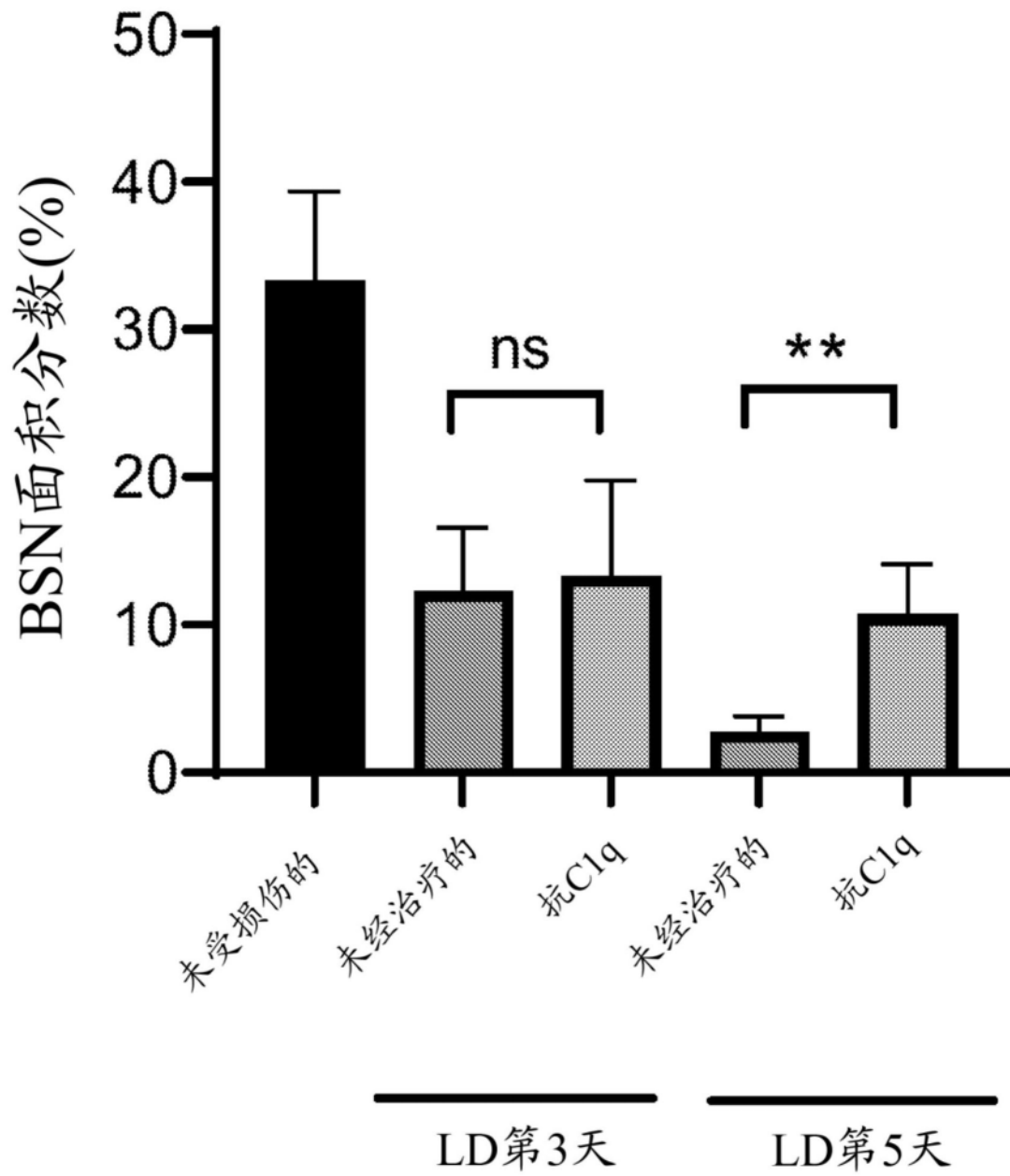


图13C

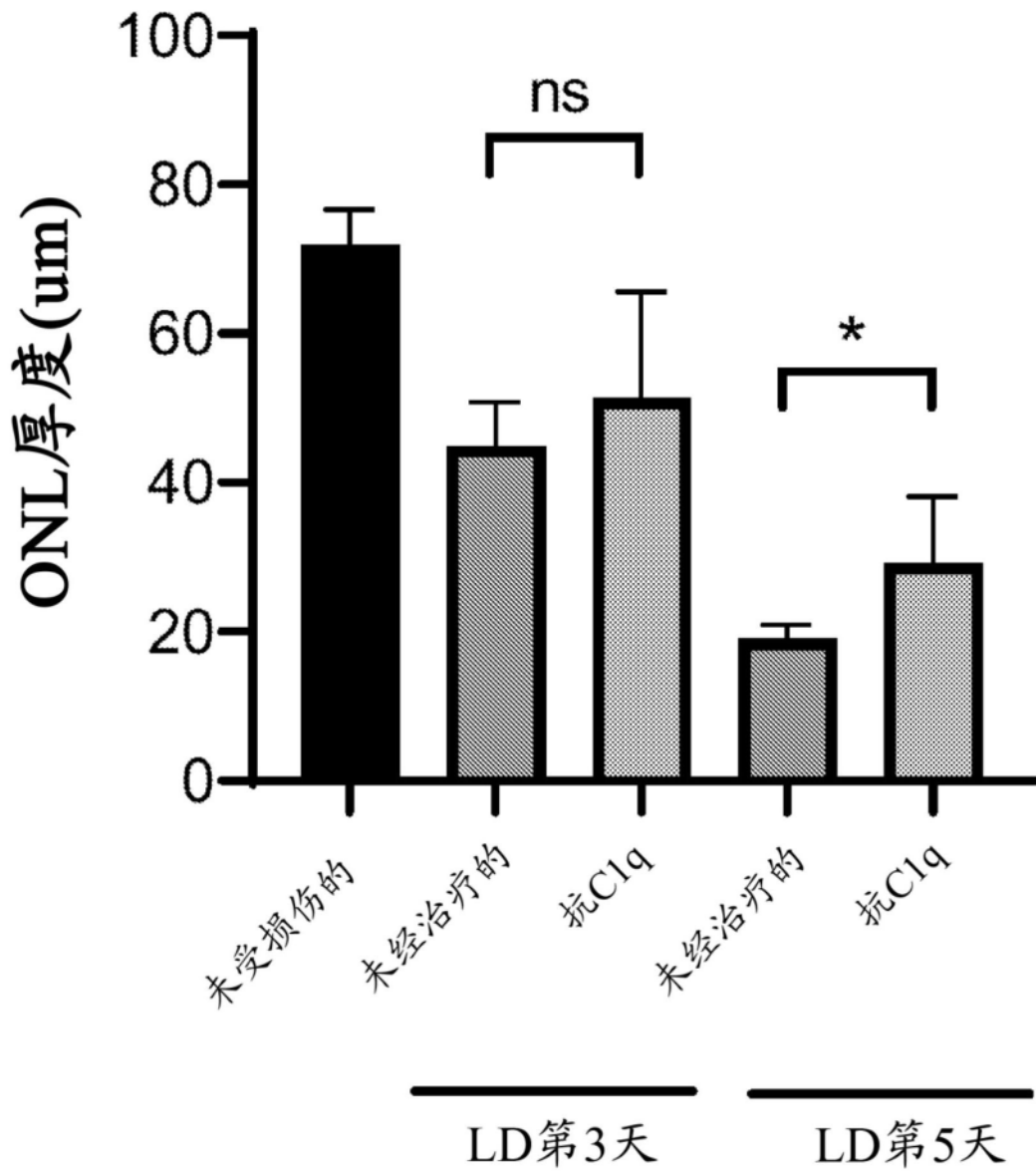


图13D

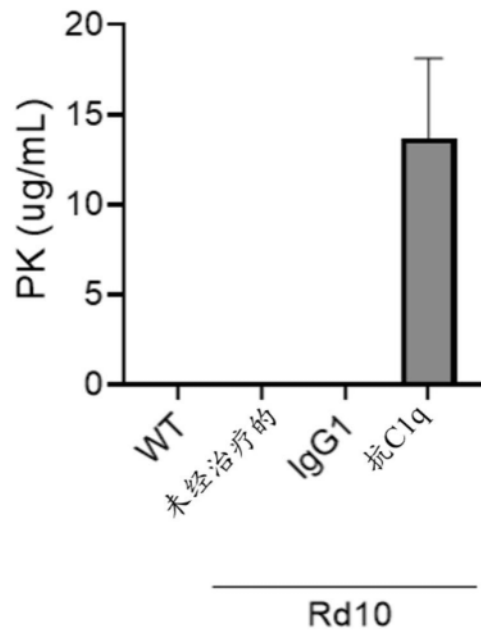


图14A

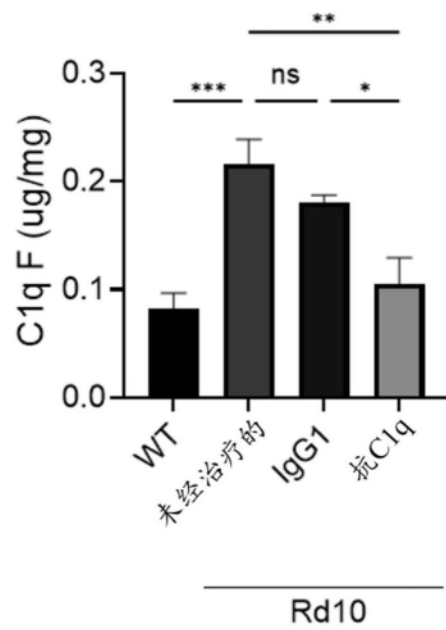


图14B

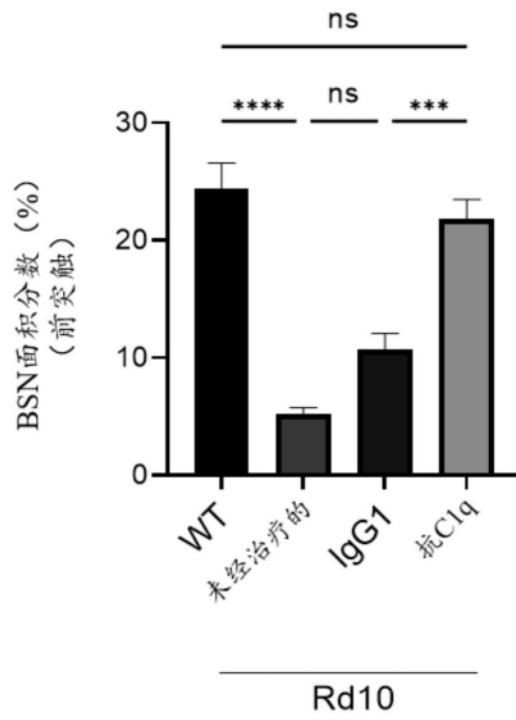


图15A

在63×油浸共焦下

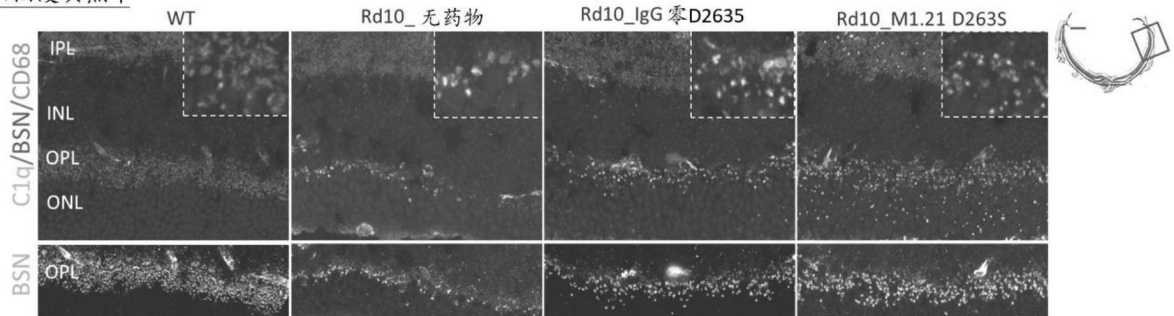


图15B