

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **3 013 108**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/18	(2006.01)	A61P 9/10	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)	A61P 21/04	(2006.01)
A61K 49/00	(2006.01)	A61P 25/00	(2006.01)
A61K 49/16	(2006.01)	A61P 25/14	(2006.01)
G01N 33/564	(2006.01)	A61P 25/16	(2006.01)
G01N 33/68	(2006.01)	A61P 25/28	(2006.01)
A61P 3/00	(2006.01)	A61P 29/00	(2006.01)
A61P 3/04	(2006.01)	A61P 35/00	(2006.01)
A61P 3/10	(2006.01)	A61P 37/02	(2006.01)
A61P 7/06	(2006.01)	A61P 37/06	(2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.11.2015 PCT/US2015/059185**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **12.05.2016 WO16073685**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2015 E 15857258 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2025 EP 3215527**

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

(30) Prioridad:

05.11.2014 US 201462075793 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.04.2025

(73) Titular/es:

**ANNEXON, INC. (100.00%)
1400 Sierra Point Parkway, Building C, 2nd Floor
Brisbane, CA 94005, US**

(72) Inventor/es:

**ROSENTHAL, ARNON y
LEVITEN, MICHAEL**

(74) Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

ES 3 013 108 T3

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

DESCRIPCIÓN

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

5 Antecedentes

1. Campo

10 La presente invención se define por las reivindicaciones y se refiere a anticuerpos anti-C1q humanizados tal como se definen por las reivindicaciones.

2. Descripción de la técnica relacionada

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

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

35 Hasta la fecha se conocen sólo un número limitado de anticuerpos neutralizantes del complemento (véanse, por ejemplo, Klos A. et al., Mol Immunol. 2009, 46(14), 2753-2766; Carroll S. y Georgiou G., Immunobiology 2013, 218(8), 1041-1048; Tuzun et al., J. Neuroimmunol. 2007, 182, 167-176; Nelson et al., J. Clin. Invest. 2006, 116:2892-2900; Heinz et al., J. Immunol. 1984, 133, 400-404; Jiang et al., J. Immunol. 1991, 146, 2324-2330; Trinder et al., Scand. J. Immunol. 1999, 50, 635-641; Hwang et al., Mol. Immunol. 2008, 45, 2570-2580). El documento WO2005/002513 da a conocer el anticuerpo anti-C1q neutralizante, P1 H10. El documento WO2014/169076 y Tuzun et al., Current Topics in Complement II, 632, 254-261 dan a conocer el anticuerpo anti-C1q neutralizante 4A4B11. Hasta la fecha, sólo el anticuerpo neutralizante de C5, eculizumab, un inhibidor de la ruta de activación del complemento terminal, ha obtenido la aprobación reguladora; eculizumab se comercializa para el tratamiento de hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN; Hillmen et al., N Engl J Med. 2006, 355(12):1233-43).

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

Breve sumario

50 La presente invención se define por las reivindicaciones y se refiere a un anticuerpo anti-C1q humanizado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: a) un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; b) un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; c) un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; o d) un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

60 En determinados aspectos de la invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena pesada de IgG4 humana.

65 En algunas realizaciones de la invención la región constante de cadena pesada de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37.

En determinados aspectos de la invención, la región constante de cadena pesada de IgG4 humana comprende una región Fc y la región Fc comprende una sustitución de aminoácido en la posición 248 y/o posición 241 según la convención de enumeración de Kabat.

5 En determinados aspectos de la invención, la sustitución de aminoácido en la posición 248 es una sustitución de aminoácido de leucina a glutamato.

10 En determinados aspectos, la sustitución de aminoácido en la posición 241 es una sustitución de aminoácido de serina a prolina. En determinados aspectos, el fragmento de unión a antígeno de la invención es un fragmento Fab, F(ab')₂, o Fab'.

15 En determinados aspectos, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención.

20 En determinados aspectos, la presente invención proporciona una célula huésped aislada que comprende la secuencia de ácido nucleico de la invención.

25 En determinados aspectos, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

30 En determinados aspectos, la presente invención proporciona el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención para su uso en medicina.

35 En determinados aspectos de la invención, el uso en medicina es para tratar o prevenir una enfermedad asociada con la activación del complemento, en el que la enfermedad es un trastorno neurodegenerativo, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmunitaria o un trastorno metabólico.

40 En algunas realizaciones de la invención, la enfermedad es un trastorno neurodegenerativo seleccionado de enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, glaucoma, distrofia miotónica, síndrome de Guillain-Barré (SGB), miastenia grave, penfigoide ampolloso, atrofia muscular espinal, síndrome de Down, enfermedad de Parkinson, y enfermedad de Huntington.

45 En algunas otras realizaciones de la invención, la enfermedad es una enfermedad inflamatoria, enfermedad autoinmunitaria o trastorno metabólico selección de diabetes, vitíligo, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Addison, celiaquía, enfermedad de Crohn, anemia perniciosa, miastenia grave, obesidad, anemias hemolíticas autoinmunitarias, síndromes paraneoplásicos, vasculitis urticarial hipocomplementémica (VUH), polimialgia reumática, granulomatosis de Wegener, artritis reumatoide (AR), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), lesión tisular remota después de isquemia y reperfusión, activación del complemento durante cirugía de circulación extracorpórea, dermatomiositis, pénfigo, nefritis lúpica y glomerulonefritis y vasculitis resultantes, circulación extracorpórea, disfunción endotelial coronaria inducida por cardiolejía, glomerulonefritis membranoproliferativa de tipo II, nefropatía por IgA, insuficiencia renal aguda, crioglobulinemia, síndrome antifosfolipídico, glaucoma crónico de ángulo abierto, glaucoma agudo de ángulo cerrado, enfermedades degenerativas maculares, degeneración macular asociada a la edad (DMAE), (DMAE húmeda), atrofia geográfica, neovascularización coroidea (NVC), uveítis, retinopatía diabética, retinopatía asociada a isquemia, endoftalmitis, enfermedad neovascular intraocular,

50 edema macular diabético, miopía patológica, enfermedad de von Hippel-Lindau, histoplasmosis del ojo, neuromielitis óptica (NMO), oclusión de la vena central retiniana (OVCR), neovascularización corneal, neovascularización retiniana, neuropatía óptica hereditaria de Leber, neuritis óptica, retinopatía de Behcet, neuropatía óptica isquémica, vasculitis retiniana, vasculitis asociada a ANCA, retinopatía de Purtscher, enfermedad de sequedad ocular de Sjögren, DMAE seca, sarcoidosis, arteritis temporal, poliarteritis nodular, esclerosis múltiple, alotrasplante, rechazo hiperagudo, hemodiálisis, síndrome de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma y neumonía por aspiración.

Descripción de las figuras

55 La figura 1 representa mapas de plásmidos para vectores de expresión de cadena ligera y cadena pesada. La figura 1A representa un mapa de plásmidos para el vector de expresión de cadena ligera pANTV_k. La figura 1B representa un mapa de plásmidos para y el vector de expresión de cadena pesada pANTVhG4 (S241P L248E). Ambos vectores VH y V_k contienen fragmentos de ADN genómico que incorporan intrones y secuencias de poliA. La expresión de ambas cadenas está dirigida por un promotor de CMV y la selección (en el vector de cadena pesada) es a través de un minigén de DHFR.

60 La figura 2A representa una alineación de secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo M1 y las secuencias de aminoácidos de las variantes de VH humanizadas VH1-VH2. La figura 2B representa una alineación de secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo M1 y las secuencias de aminoácidos de las variantes de VH humanizadas VH3-VH4. La figura 2C representa una alineación de secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera kappa (V_k) del anticuerpo M1 y las

secuencias de aminoácidos de las variantes de V κ humanizadas V κ 1-V κ 2. La figura 2D representa una alineación de secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera kappa (V κ) del anticuerpo M1 y las secuencias de aminoácidos de las variantes de V κ humanizadas V κ 3-V κ 4.

5 La figura 3 representa un gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de anticuerpos purificados con proteína A. Se cargaron 2 μ g de cada muestra en un gel de Bis-Tris al 4-12 % de NuPage y se hizo correr a 200 V durante 35 min. El marcador de tamaño es el patrón de proteínas preteñidas PageRuler Plus de Fermentas.

10 La figura 4 representa ensayos ELISA de competencia para C1q de ser humano. Una serie de dilución de anticuerpos anti-C1q humanizados purificados estaba en competencia frente a una concentración fija de anticuerpo monoclonal biotinilado M1 por la unión a C1q de ser humano. Se detectó el anticuerpo M1 biotinilado unido usando conjugado de estreptavidina-peroxidasa y sustrato TMB. La figura 4A representa los resultados con los anticuerpos humanizados VH1/V κ 1, VH1/V κ 2, y VH1/V κ 3. La figura 4B representa los resultados con los anticuerpos humanizados VH1/V κ 4, VH2/V κ 1, VH2/V κ 2, VH2/V κ 3, y VH2/V κ 4. La figura 4C representa los resultados con los anticuerpos humanizados VH3/V κ 1, VH3/V κ 2, VH3/V κ 3, y VH3/V κ 4. La figura 4D representa los resultados con los anticuerpos humanizados VH4/V κ 1, VH4/V κ 2, VH4/V κ 3, y VH4/V κ 4.

15 La figura 5 representa ensayos ELISA de competencia para C1q de ratón. Una serie de dilución de anticuerpos anti-C1q humanizados purificados estaba en competencia frente a una concentración fija del anticuerpo M1 químérico por la unión a C1q de ratón. Se detectó M1 químérico biotinilado unido usando conjugado de estreptavidina-peroxidasa y sustrato TMB.

20 La figura 6 representa un gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de anticuerpos purificados por filtración en gel. Se cargó 1 μ g de cada muestra en un gel de Bis-Tris al 4-12 % de NuPage y se hizo correr a 200 V durante 35 min. El marcador de tamaño (M) es el patrón de proteínas preteñidas PageRuler Plus de Fermentas. El carril 1 representa VH3/V κ 3 de Fab en condiciones reducidas; el carril 2 representa VH3/V κ 3 de Fab en condiciones no reducidas; el carril 3 representa VH3/V κ 3 de V de IgG en condiciones reducidas; y el carril 4 representa VH3/V κ 3 de IgG en condiciones no reducidas.

25 La figura 7 ilustra las actividades neutralizantes de C1q de anticuerpos anti-C1q en ensayos hemolíticos de CH50 humano, y de rata en un formato de dosis-respuesta. La figura 7A ilustra los resultados de un ensayo hemolítico de CH50 humano. La figura 7B ilustra los resultados de un ensayo hemolítico de CH50 de rata. "ANN-005" corresponde al anticuerpo monoclonal M1, "3E2" corresponde a un anticuerpo M1 químérico, "2B12" corresponde al anticuerpo VH1/V κ 1, "5H7" corresponde al anticuerpo VH3/V κ 3, "3F1" corresponde al anticuerpo VH3/V κ 4, y "1D3" corresponde al anticuerpo VH4/V κ 3.

30 La figura 8 representa el transcurso temporal de los niveles de 5H7 en suero en monos para una dosis i.v. única a 15 y 100 mg/kg.

35 La figura 9 ilustra el transcurso temporal de los niveles de C1q en suero en monos para una dosis i.v. única a 15 y 100 mg/kg. La figura 9A representa el transcurso temporal de los niveles de C1q en suero en monos usando el ensayo de JL1-M1. La figura 9B representa el transcurso temporal de los niveles de C1q en suero en monos usando el ensayo de JL1-JL1.

40 La figura 10 muestra la reducción sostenida de la hemólisis sérica en monos para una dosis i.v. única a 15 y 100 mg/kg.

Descripción detallada

50 Técnicas generales

Las técnicas y los procedimientos descritos o a los que se hace referencia en el presente documento se entienden generalmente bien y se emplean habitualmente usando una metodología convencional por los expertos en la técnica, tal como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3^a edición (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel, *et al.* eds., (2003)); la serie Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); PCR 2: A Practical Approach (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, and Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed. (1987)); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1987); Culture (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths and D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction (Mullis *et al.*, eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan *et al.*, eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway and P. Travers,

5 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y Cancer: Principles and Practice of Oncology (V.T. DeVita *et al.*, eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

Definiciones

- 10 Tal como se usa en el presente documento, el término “*prevenir*” incluye proporcionar profilaxis con respecto a la aparición o recidiva de una enfermedad, un trastorno o una afección particular en un individuo. Un individuo puede tener predisposición o ser susceptible a una enfermedad, un trastorno o una afección particular, o estar en riesgo de desarrollar una enfermedad, un trastorno o una afección de este tipo, pero aún no se le ha diagnosticado la enfermedad, el trastorno o la afección.
- 15 Tal como se usa en el presente documento, un individuo “*en riesgo*” de desarrollar una enfermedad, un trastorno o una afección particular puede padecer o no una enfermedad o síntomas de una enfermedad detectables, y puede haber mostrado o no una enfermedad o síntomas de una enfermedad detectables antes de los métodos de tratamiento descritos en el presente documento. “*En riesgo*” indica que un individuo tiene uno o más factores de riesgo, que son parámetros medibles que se correlacionan con el desarrollo de una enfermedad, un trastorno o una afección particular, tal como se conoce en la técnica. Un individuo que tiene uno o más de estos factores de riesgo tiene una mayor probabilidad de desarrollar una enfermedad, un trastorno o una afección particular que un individuo sin uno o más de estos factores de riesgo.
- 20 Tal como se usa en el presente documento, el término “*tratamiento*” se refiere a la intervención clínica diseñada para alterar el transcurso natural del individuo que está tratándose durante el transcurso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen disminución de la tasa de progresión, mejora o paliación del estado patológico y remisión o pronóstico mejorado de una enfermedad, un trastorno o una afección particular. Un individuo se “trata” con éxito, por ejemplo, si se mitigan o eliminan uno o más síntomas asociados con una enfermedad, un trastorno o una afección particular.
- 25 Tal como se usa en el presente documento, una “*cantidad eficaz*” se refiere a al menos una cantidad eficaz, a las dosificaciones y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado. Una cantidad eficaz puede proporcionarse en una o más administraciones.
- 30 Una “*cantidad terapéuticamente eficaz*” es al menos la concentración mínima requerida para efectuar una mejora medible de una enfermedad, un trastorno o una afección particular. Una cantidad terapéuticamente eficaz en el presente documento puede variar según factores tales como el estado patológico, la edad, el sexo y el peso del paciente y la capacidad del anticuerpo anti-C1q para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo anti-C1q es superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos.
- 35 Administración “*crónica*” se refiere a la administración del/de los medicamento(s) en un modo continuo en contraposición a agudo, para mantener el efecto terapéutico (actividad) inicial durante un periodo de tiempo prolongado. Administración “*intermitente*” se refiere al tratamiento que no se realiza consecutivamente sin interrupción, sino que más bien es de naturaleza cíclica.
- 40 Tal como se usa en el presente documento, administración “*conjunta*” con respecto a otro compuesto u otra composición incluye administración simultánea y/o administración en momentos diferentes. La administración conjunta también abarca la administración como coformulación o la administración como composiciones independientes, incluyendo a intervalos o frecuencias de dosificación diferentes, y usando la misma vía de administración o vías de administración diferentes.
- 45 Un “*individuo*” con fines de tratamiento, prevención o reducción del riesgo se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja y animales de zoológico, deportivos o mascotas, tales como perros, caballos, conejos, ganado bovino, cerdos, hámsteres, jiribas, ratones, hurones, ratas, gatos, y similares. En algunas implementaciones, el individuo es un ser humano.
- 50 Tal como se usa en el presente documento, “*autoanticuerpo*” significa cualquier anticuerpo que reconoce un antígeno huésped.
- 55 El término “*inmunoglobulina*” (Ig) se usa indistintamente con “*anticuerpo*” en el presente documento. El término “anticuerpo” en el presente documento se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos y fragmentos de anticuerpo siempre que muestren la actividad biológica deseada.

- La unidad de anticuerpo de 4 cadenas básica es una glicoproteína heterotetramérica compuesta por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. El emparejamiento de un V_H y un V_L juntos forma un único sitio de unión a antígeno. Para la estructura y las propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, véanse, por ejemplo, Basic and Clinical Immunology, 8^a ed., Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton and Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y capítulo 6.
- La cadena L de cualquier especie de vertebrado puede asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa ("κ") y lambda ("λ"), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. En función de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (C_H), las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases o isótipos. Hay cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen cadenas pesadas denominadas alfa ("α"), delta ("δ"), epsilon ("ε"), gamma ("γ") y mu ("μ"), respectivamente. Las clases γ y α se dividen además en subclases (isótipos) basándose en diferencias relativamente pequeñas en la secuencia y la función de C_H , por ejemplo, los seres humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Las configuraciones tridimensionales y las estructuras de las subunidades de las diferentes clases de inmunoglobulinas se conocen bien y se describen generalmente en, por ejemplo, Abbas *et al.*, Cellular and Molecular Immunology, 4^a ed. (W.B. Saunders Co., 2000).
- Los "anticuerpos nativos" son habitualmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 Dalton compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, aunque el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de los diferentes isótipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene un dominio variable (V_H) en un extremo seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable (V_L) en un extremo y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácido particulares forman una superficie de contacto entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada.
- Un anticuerpo "aislado", tal como un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación, es uno que se ha identificado, separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno de producción (por ejemplo, de manera natural o recombinante). En algunas implementaciones, el polipéptido aislado está libre de asociación con todos los demás componentes contaminantes procedentes de su entorno de producción. Los componentes contaminantes procedentes de su entorno de producción, tales como los resultantes de las células transfundidas recombinantes, son materiales que normalmente interferirían con los usos investigacionales, diagnósticos o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En algunas implementaciones, el polipéptido se purificará: (1) hasta más del 95 % en peso de anticuerpo tal como se determinado mediante, por ejemplo, el método de Lowry y, en algunas implementaciones, hasta más del 99 % en peso; (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras usando tinción de plata o azul de Coomassie. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células T recombinantes, puesto que no estará presente al menos un componente del entorno natural del anticuerpo. Sin embargo, habitualmente, un polipéptido o anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.
- La "región variable" o el "dominio variable" de un anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación, se refiere a los dominios amino-terminales de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. Los dominios variables de la cadena pesada y cadena ligera pueden denominarse " V_H " y " V_L ", respectivamente. Estos dominios son generalmente las partes más variables del anticuerpo (con respecto a otros anticuerpos de la misma clase) y contienen los sitios de unión a antígeno.
- El término "variable" se refiere al hecho de que determinados segmentos de los dominios variables difieren ampliamente en cuanto a secuencia entre anticuerpos, tales como anticuerpos anti-C1q de la presente divulgación. El dominio V media en la unión al antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a lo largo de toda la extensión de los dominios variables. En su lugar, se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables (HVR) en los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones de marco (FR). Cada uno de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprende cuatro regiones FR, que adoptan principalmente una configuración de lámina beta, conectada por tres HVR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina beta. Las HVR en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad mediante las regiones FR y, con las HVR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, Sequences of Immunological Interest, quinta edición, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión del anticuerpo a un antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

El término "*anticuerpo monoclonal*", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación, obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que se producen de manera natural y/o modificaciones posteriores a la traducción (por ejemplo, isomerizaciones, amidaciones) que pueden estar presentes en cantidades pequeñas. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y se dirigen contra un único sitio antigénico. A diferencia de las preparaciones de anticuerpo policlonal que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra determinantes (epítopos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque se sintetizan mediante el cultivo de hibridoma, no contaminado por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que van a usarse según la presente divulgación pueden prepararse mediante una variedad de técnicas, incluyendo, por ejemplo, el método del hibridoma (por ejemplo, Kohler y Milstein., Nature, 256:495-97 (1975); Hongo *et al.*, Hybridoma, 14 (3):253-260 (1995), Harlow *et al.*, Antibodies:: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2^a ed. 1988); Hammerling *et al.*, en: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.^o 4.816.567), tecnologías de presentación en fago (véanse, por ejemplo, Clackson *et al.*, Nature, 352:624-628 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1992); Sidhu *et al.*, J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, J. Mol. Biol. 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 101(34):12467-472 (2004); y Lee *et al.*, J. Immunol. Methods 284(1-2):119-132 (2004) y tecnologías para producir anticuerpos humanos o similares a humanos en animales que tienen parte o la totalidad de los loci de inmunoglobulina humana o genes que codifican para secuencias de inmunoglobulina humana (véanse, por ejemplo, el documento WO 1998/24893; el documento WO 1996/34096; el documento WO 1996/33735; el documento WO 1991/10741; Jakobovits *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature 362:255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, Year in Immunol. 7:33 (1993); las patentes estadounidenses n.^os 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016; Marks *et al.*, Bio/Technology 10:779-783 (1992); Lonberg *et al.*, Nature 368:856-859 (1994); Morrison, Nature 368:812-813 (1994); Fishwild *et al.*, Nature Biotechnol. 14:845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnol. 14:826 (1996); y Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995)).

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

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

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

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

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión a, y reconocimiento de, antígeno completo. Este fragmento consiste en un dímero de un dominio variable de región de cadena pesada y uno de cadena ligera en estrecha asociación no covalente. A partir del plegamiento de estos dos dominios emanan seis bucles

hipervariables (3 bucles cada uno de la cadena H y L) que contribuyen a los residuos de aminoácido para la unión al antígeno y confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

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

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

15 20 El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo preparados construyendo fragmentos sFv (véase el párrafo anterior) con ligadores cortos (aproximadamente 5-10 residuos) entre los dominios V_H y V_L , de manera que se logra el emparejamiento intercatenario, pero no intracatenario, de los dominios V, dando como resultado de ese modo un fragmento bivalente, es decir, un fragmento que tiene dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv "cruzados" en los que los dominios V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes en cadenas polipeptídicas diferentes. Los diacuerpos se describen en más detalle en, por ejemplo, el documento EP 404,097; el documento WO 93/11161; Hollinger *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90:6444-48 (1993).

25 30 Tal como se usa en el presente documento, un "anticuerpo químérico" se refiere a un anticuerpo (inmunoglobulina), tal como un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación, en el que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es/son idéntica(s) u homóloga(s) a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (patente estadounidense n.º 4.816.567; Morrison *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 81:6851-55 (1984)). Los anticuerpos químéricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos PRIMATIZED® en los que la región de unión a antígeno del anticuerpo se deriva de un anticuerpo producido, por ejemplo, inmunizando monos macacos con un antígeno de interés. Tal como se usa en el presente documento, "anticuerpo humanizado" utiliza un subconjunto de "anticuerpos químéricos".

35 40 Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos), tales como anticuerpos anti-C1q de la presente divulgación, son anticuerpos químéricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En una implementación, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que los residuos de una HVR del receptor se reemplazan por residuos de una HVR de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, la afinidad y/o la capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de FR de la inmunoglobulina humana se reemplazan por residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones pueden realizarse para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo, tal como la afinidad de unión. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que la totalidad o sustancialmente la totalidad de los bucles hipervariables corresponden a los de una secuencia de inmunoglobulina no humana y la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana, aunque las regiones FR pueden incluir una o más sustituciones de residuos de FR individuales que mejoran el rendimiento del anticuerpo, tal como la afinidad de unión, la isomerización, la inmunogenicidad, y similares. El número de estas sustituciones de aminoácidos en FR es normalmente no mayor de 6 en la cadena H y no mayor de 3 en la cadena L. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véanse, por ejemplo, Jones *et al.*, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992). Véanse también, por ejemplo, Vaswani y Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995); Hurle y Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994); y las patentes estadounidenses n.ºs 6.982.321 y 7.087.409.

45 50 55 60 65 Un "anticuerpo humano" es uno que presenta una secuencia de aminoácidos correspondiente a la de un anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación, producido por un ser humano y/o que se ha preparado usando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos tal como se da a conocer en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que

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

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

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

Bucle	Kabat	AcM	Chothia	Contacto
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (enumeración según Kabat)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (enumeración según Chothia)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

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

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

La expresión “enumeración de residuos de dominio variable según Kabat” o “enumeración de posiciones de aminoácidos según Kabat”, y variaciones de las mismas, se refiere al sistema de enumeración usado para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, citado anteriormente. Usando este sistema de enumeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos o más aminoácidos correspondientes a un acortamiento de, o una inserción en, una FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir un único inserto de aminoácido (residuo 52a según Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo, residuos 82a, 82b y 82c, etc., según Kabat) después del residuo 82 de FR de cadena pesada. La enumeración de residuos según Kabat puede determinarse para un anticuerpo dado mediante alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia “patrón” enumerada según Kabat.

El sistema de enumeración de Kabat se usa generalmente cuando se hace referencia a un residuo en el dominio variable (aproximadamente los residuos 1-107 de la cadena ligera y los residuos 1-113 de la cadena pesada) (por ejemplo, Kabat *et al.*, Sequences of Immunological Interest. 5^a ed., Servicio Público de Salud, Institutos Nacionales

- de Salud, Bethesda, Md. (1991)). El "sistema de enumeración EU" o "índice EU" se usa generalmente cuando se hace referencia a un residuo en una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, el índice EU notificado en Kabat *et al.*, citado anteriormente). El "índice EU según Kabat" se refiere a la enumeración de residuos del anticuerpo EU IgG1 humano. A menos que se indique lo contrario en el presente documento, las referencias a números de residuo en el dominio variable de anticuerpos significan la enumeración de residuos mediante el sistema de enumeración de Kabat. A menos que se indique lo contrario en el presente documento, las referencias a números de residuo en el dominio constante de anticuerpos significan la enumeración de residuos mediante el sistema de enumeración EU (por ejemplo, véase la publicación de patente estadounidense n.º 2010-280227).
- Un "marco humano aceptor", tal como se usa en el presente documento, es un marco que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco de V_L o V_H derivado de un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano. Un marco humano aceptor "derivado de" un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos del mismo, o puede contener cambios de secuencia de aminoácidos preexistentes. En algunas implementaciones, el número de cambios de aminoácido preexistentes es de 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos. En algunas implementaciones, cuando los cambios de aminoácido preexistentes están presentes en V_H , esos cambios se producen únicamente en tres, dos o una de las posiciones 71H, 73H y 78H; por ejemplo, los residuos de aminoácido en esas posiciones pueden ser 71A, 73T y/o 78A. En una implementación, el marco humano aceptor de V_L es idéntico en cuanto a secuencia a la secuencia de marco de consenso humano o secuencia de marco de inmunoglobulina humana de V_L .
- Un "marco de consenso humano" es un marco que representa los residuos de aminoácido que se producen más comúnmente en una selección de secuencias de marco de V_L o V_H de inmunoglobulina humana. Generalmente, la selección de secuencias de V_L o V_H de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. Generalmente, el subgrupo de secuencias es un subgrupo según Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a ed. Servicio Público de Salud, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD (1991). Los ejemplos incluyen, para V_L , el que el subgrupo puede ser el subgrupo kappa I, kappa II, kappa III o kappa IV según Kabat *et al.*, citado anteriormente. Adicionalmente, para V_H , el subgrupo puede ser el subgrupo I, subgrupo II o subgrupo III según Kabat *et al.*, citado anteriormente.
- Una "modificación de aminoácido" en una posición especificada, por ejemplo, de un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación, se refiere a la sustitución o delección del residuo especificado o a la inserción de al menos un residuo de aminoácido adyacente al residuo especificado. La inserción "adyacente" a un residuo especificado significa la inserción dentro de uno a dos residuos del mismo. La inserción puede ser N-terminal o C-terminal con respecto al residuo especificado. En algunas implementaciones, la modificación de aminoácido en el presente documento es una sustitución.
- Un anticuerpo "madurado por afinidad", tal como un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación, es uno con una o más alteraciones en una o más HVR del mismo que dan como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no presenta esa(s) alteración/alteraciones. En una implementación, un anticuerpo madurado por afinidad presenta afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, Marks *et al.*, Bio/Technology 10:779-783 (1992) describen la maduración por afinidad mediante intercambio de dominios V_H y V_L . La mutagénesis al azar de los residuos de HVR y/o marco se describe en, por ejemplo: Barbas *et al.* Proc Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813 (1994); Schier *et al.* Gene 169:147-155 (1995); Yelton *et al.* J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins *et al.*, J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992).
- Tal como se usa en el presente documento, el término "reconoce específicamente" o "se une específicamente a" se refiere a interacciones medibles y reproducibles tales como atracción o unión entre una diana y un anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación, que es determinante de la presencia de la diana en presencia de una población heterogénea de moléculas incluyendo moléculas biológicas. Por ejemplo, un anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación, que se une específicamente o preferentemente a una diana o a un epítopo es un anticuerpo que se une a esta diana o a este epítopo con mayor afinidad, avidez, más facilidad y/o con mayor duración en comparación con su unión a otras dianas o a otros epítopos de la diana. Mediante la lectura de esta definición también se entiende que, por ejemplo, un anticuerpo (o un resto) que se une específica o preferentemente a una primera diana puede unirse o no específica o preferentemente a una segunda diana. Como tal, la "unión específica" o "unión preferente" no requiere necesariamente (aunque puede incluir) la unión exclusiva. Un anticuerpo que se une específicamente a una diana puede tener una constante de asociación de al menos aproximadamente 10^3 M^{-1} o 10^4 M^{-1} , algunas veces de aproximadamente 10^5 M^{-1} o 10^6 M^{-1} , en algunos casos de aproximadamente 10^6 M^{-1} o 10^7 M^{-1} , de aproximadamente 10^8 M^{-1} a 10^9 M^{-1} o de aproximadamente 10^{10} M^{-1} a 10^{11} M^{-1} , o superior. Pueden usarse una variedad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, rutinariamente se usan inmunoensayos ELISA en fase sólida para seleccionar anticuerpos monoclonales específicamente inmunorreactivos con una proteína. Véase, por ejemplo, Harlow and Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor

Publications, Nueva York, para una descripción de condiciones y formatos de inmunoensayo que pueden usarse para determinar la inmunorreactividad específica.

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

10
15 Un anticuerpo "bloqueante", un anticuerpo "antagonista", un anticuerpo "inhibidor" o un anticuerpo "neutralizante" es un anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación, que inhibe o reduce una o más actividades biológicas del antígeno al que se une, tales como las interacciones con una o más proteínas. En algunas implementaciones, los anticuerpos bloqueantes, los anticuerpos antagonistas, los anticuerpos inhibidores o los anticuerpos "neutralizantes" inhiben sustancial o completamente una o más actividades biológicas o interacciones del antígeno.

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

25
30 El término "región Fc" se usa en el presente documento para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, habitualmente se define que la región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde un residuo de aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo-terminal del mismo. La lisina C-terminal (residuo 447 según el sistema de enumeración EU) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo, o mediante modificación por ingeniería recombinante del ácido nucleico que codifica para una cadena pesada del anticuerpo. Por consiguiente, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpos con todos los residuos K447 eliminados, poblaciones de anticuerpos sin los residuos K447 eliminados y poblaciones de anticuerpos que tienen una mezcla de anticuerpos con y sin el residuo K447. Las regiones Fc de secuencia nativa adecuadas para su uso en los anticuerpos de la presente divulgación incluyen IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas.

35
40 Una "región Fc de secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc encontrada en la naturaleza. Las regiones Fc humanas de secuencia nativa incluyen una región Fc de IgG1 humana de secuencia nativa (alotipos A y distintos de A); una región Fc de IgG2 humana de secuencia nativa; una región Fc de IgG3 humana de secuencia nativa; y una región Fc de IgG4 humana de secuencia nativa, así como variantes que se producen de manera natural de las mismas.

45
50 Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia nativa en virtud de al menos una modificación de aminoácido. En algunas implementaciones, la región Fc variante difiere en una o más sustitución/sustituciones de aminoácido. En algunas implementaciones, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácido en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo, desde aproximadamente una hasta aproximadamente diez sustituciones de aminoácido y, en algunas implementaciones, desde aproximadamente una hasta aproximadamente cinco sustituciones de aminoácido en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido parental. En algunas implementaciones, la región Fc variante presentará en el presente documento al menos aproximadamente el 80 % de homología con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido parental y, en algunas implementaciones, al menos aproximadamente el 90 % de homología con la misma y, en algunas implementaciones, al menos aproximadamente el 95 % de homología con la misma.

55 "Receptor de Fc" o "FcR" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En algunas implementaciones, el FcR es un FcR humano de secuencia nativa. Además, en algunas implementaciones, un FcR es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye los receptores de las subclases Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII, incluyendo variantes alélicas y formas sometidas a corte y empalme alternativo de estos receptores, los receptores Fc γ RII incluyen Fc γ RIIA (un "receptor activante") y Fc γ RIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de los mismos. El receptor activante Fc γ RIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina de inmunorreceptor ("ITAM") en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor Fc γ RIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina de inmunorreceptor ("ITIM") en su dominio citoplásmico (véase, por ejemplo, M. Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991); Capel *et al.*, Immunomethods 4:25-34 (1994); y de Haas *et al.*, J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo aquellos que se identificarán en el futuro, están abarcados por el término "FcR" en el presente documento. Los FcR

también pueden aumentar la semivida sérica de los anticuerpos.

- La unión a FcRn *in vivo* y la semivida sérica de polipéptidos de unión con alta afinidad a FcRn humano pueden someterse a ensayo, por ejemplo, en ratones transgénicos o líneas celulares humanas transfectadas que expresan FcRn humano o en primates a los que se les administran polipéptidos que tienen una región Fc variante. El documento WO 2004/42072 (Presta) describe variantes de anticuerpos con unión a FcR mejorada o disminuida. Véase también, por ejemplo, Shields *et al.*, J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001).
- 5 Se pretende que el término " k_{on} ", tal como se usa en el presente documento, se refiera a la constante de velocidad para la asociación de un anticuerpo a un antígeno.
- 10 Se pretende que el término " k_{off} ", tal como se usa en el presente documento, se refiera a la constante de velocidad para la disociación de un anticuerpo a partir del complejo anticuerpo/antígeno.
- 15 Se pretende que el término " K_D ", tal como se usa en el presente documento, se refiera a la constante de disociación en equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno.
- 20 Tal como se usa en el presente documento, "*porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos*" y "*homología*" con respecto a una secuencia de péptido, polipéptido o anticuerpo se refiere al porcentaje de residuos de aminoácido en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácido en la secuencia de péptido o polipéptido específica después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación con fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de diversas maneras que se encuentran dentro de la habilidad en la técnica, por ejemplo, usando software informático disponible públicamente tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o MEGALIGN™ (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo conocido en la técnica necesario para lograr una alineación máxima a lo largo de toda la longitud de las secuencias que están comparándose.
- 25
- 30 Una molécula o célula "*aislada*" es una molécula o célula que se identifica y separa a partir de al menos una molécula o célula contaminante con la que habitualmente está asociada en el entorno en el que se produjo. En algunas implementaciones, la molécula o célula aislada está libre de asociación con todos los componentes asociados con el entorno de producción. La molécula o célula aislada está en una forma distinta de la forma o configuración en la que se encuentra en la naturaleza. Por tanto, las moléculas aisladas se distinguen de las moléculas que existen de manera natural en las células; las células aisladas se distinguen de las células que existen de manera natural en los tejidos, órganos o individuos. En algunas implementaciones, la molécula aislada es un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación. En otras implementaciones, la célula aislada es una célula huésped o célula de hibridoma que produce un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación.
- 35
- 40 Una molécula de ácido nucleico "*aislada*" que codifica para un anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación, es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa a partir de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que habitualmente está asociada en el entorno en el que se produjo. En algunas implementaciones, el ácido nucleico aislado está libre de asociación con todos los componentes asociados con el entorno de producción. Las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican para los polipéptidos y anticuerpos en el presente documento están en una forma distinta de la forma o configuración en la que se encuentran en la naturaleza. Por tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen del ácido nucleico que codifica para los polipéptidos y anticuerpos en el presente documento que existe de manera natural en las células.
- 45
- 50 Se pretende que el término "*vector*", tal como se usa en el presente documento, se refiera a una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "*plásmido*", que se refiere a un ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector de fago. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que segmentos de ADN adicionales pueden ligarse en el genoma viral. Determinados vectores pueden replicarse de manera autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamíferos) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras su introducción en la célula huésped y, de ese modo, se replican junto con el genoma del huésped. Además, determinados vectores pueden dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Tales vectores se denominan en el presente documento "*vectores de expresión recombinante*" o simplemente "*vectores de expresión*". En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante a menudo están en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "*plásmido*" y "*vector*" pueden usarse indistintamente, ya que plásmido es la forma de vector más comúnmente usada.
- 55
- 60
- 65 "Polinucleótido" o "*ácido nucleico*", tal como se usan indistintamente en el presente documento, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados y/o sus análogos, o cualquier sustrato que

pueda incorporarse en un polímero mediante ADN o ARN polimerasa o mediante una reacción de síntesis. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación a la estructura del nucleótido puede impartirse antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede estar interrumpida por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede comprender una(s) modificación/modificaciones realizada(s) después de la síntesis, tal(es) como conjugación con un marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "caperuzas", sustitución de uno o más de los nucleótidos que se producen de manera natural por un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces no cargados (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellas que contienen restos colgantes, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), aquellas con agentes intercalantes (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquellas que contienen agentes quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidantes, etc.), aquellas que contienen agentes alquilantes, aquellas con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa-anoméricos, etc.), así como formas no modificadas del/de los polinucleótidos(s). Además, cualquiera de los grupos hidroxilo habitualmente presentes en los azúcares puede reemplazarse, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegerse por grupos protectores convencionales o activarse para preparar enlaces adicionales con nucleótidos adicionales, o puede conjugarse con soportes sólidos o semisólidos. El OH 5'-terminal y 3'-terminal puede fosforilarse o sustituirse con aminas o restos orgánicos de grupo de remate de extremos de desde 1 hasta 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivatizarse con grupos protectores convencionales. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que generalmente se conocen en la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares α -anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos básicos tales como ribósido de metilo. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden reemplazarse por grupos de unión alternativos. Estos grupos de unión alternativos incluyen, pero no se limitan a, implementaciones en las que el fosfato se reemplaza por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), en los que cada R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o no sustituido (1-20 C) que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No es necesario que todos los enlaces en un polinucleótido sean idénticos. La descripción anterior se aplica a todos los polinucleótidos a los que se hace referencia en el presente documento, incluyendo ARN y ADN.

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

"Portadores", tal como se usa en el presente documento, incluye portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o el mamífero que está exponiéndose a los mismos a las dosificaciones y concentraciones empleadas. A menudo, el portador fisiológicamente aceptable es una disolución acuosa con pH tamponado. Los ejemplos de portadores fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptido de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS™.

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

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

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

Visión general

- La presente divulgación proporciona anticuerpos anti-C1q humanizados y usos de los mismos. Los anticuerpos anti-C1q humanizados de la presente divulgación se unen específicamente a una proteína C1q de esta divulgación. En algunas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q humanizados son anticuerpos neutralizantes contra C1q. En algunas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q humanizados de esta divulgación pueden unirse al complejo C1.
- En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona un anticuerpo humanizado, que se une específicamente a una proteína C1q, en el que el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región constante de cadena pesada humana, en el que la región variable de cadena pesada comprende una región Fab y la región constante de cadena pesada comprende una región Fc, en el que la región Fab se une específicamente a la proteína C1q, y en el que la región Fc no puede unirse a la proteína C1q.
- En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona un anticuerpo anti-C1q humanizado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, comprendiendo el anticuerpo un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera, en el que el dominio variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 1-4, o una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente el 90 % homología con la secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 1-4.
- En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona un anticuerpo anti-C1q humanizado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, comprendiendo el anticuerpo un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera, en el que el dominio variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 5-8, o una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente el 90 % homología con la secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 5-8.
- En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona un anticuerpo anti-C1q humanizado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, comprendiendo el anticuerpo: un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 1-4, o una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente el 90 % homología con la secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 1-4; y/o un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 5-8, o una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente el 90 % homología con la secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 5-8.
- En algunas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q humanizados de la presente divulgación neutralizan una actividad biológica de C1q. Los usos para los anticuerpos anti-C1q humanizados incluyen, sin limitación, la detección de factor del complemento C1q, por ejemplo, en individuos que padecen un trastorno neurodegenerativo asociado con la pérdida de sinapsis patológica dependiente del factor del complemento 1 (CF1). Los usos no limitativos adicionales incluyen la inhibición de la ruta clásica de activación del complemento por autoanticuerpos. Los usos no limitativos adicionales para los anticuerpos anti-C1q humanizados incluyen el diagnóstico y tratamiento de trastornos que están asociados con una expresión elevada de factores del complemento, tales como C1q, o asociados con la activación de la ruta del complemento. Tales trastornos pueden incluir, sin limitación, trastornos autoinmunitarios, trastornos inflamatorios y trastornos neurodegenerativos, incluyendo trastornos neurodegenerativos asociados con la pérdida de sinapsis.
- En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para un anticuerpo de la presente divulgación.
- La presente divulgación también proporciona células huésped aisladas que contienen una molécula de ácido nucleico que codifica para un anticuerpo de esta divulgación. Adicionalmente, se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen anticuerpos anti-C1q, tales como anticuerpos neutralizantes contra C1q humanizados de esta divulgación, en combinación con portadores farmacéuticamente aceptables. La presente divulgación también proporciona un kit que contiene un anticuerpo anti-C1q humanizado para su uso en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.
- La presente divulgación proporciona además métodos de uso de los anticuerpos anti-C1q humanizados de la presente divulgación (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes contra C1q humanizados de esta divulgación) para tratar o prevenir una enfermedad neurodegenerativa o una enfermedad autoinmunitaria en un individuo que necesita tal tratamiento, para detectar la sinapsis en un individuo que padece una enfermedad neurodegenerativa o una enfermedad autoinmunitaria y para detectar la sinapsis en una muestra biológica. La presente divulgación también proporciona kits que contienen los anticuerpos anti-C1q humanizados de la presente divulgación (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes contra C1q humanizados de esta divulgación).

Proteínas del complemento

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

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

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

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

C1q_cadena A (Homo sapiens), n.º de registro de la base de datos de proteínas: NP_057075.1; n.º de GenBank: NM_015991: >gi|7705753|ref|NP_057075.1| precursor de la subunidad A subcomponente del complemento C1q [Homo sapiens]

MEGPRGWLVLCVLAISLASMVTE DLCRAPDGKKGEAGRPGRRGRPGLKGEQGEP
GAPGIRTGIQGLKG DQGEPGPSGNPGKVGYPGPSGPLGARGIPGIKGTKGSPGNIKD
QPRPAFSAIRRNPPMGGNVVIFDTVTINQE PYQNHSGRFVCTVPGYYYFTFQVLSQ
WEICLSIVSSSRGQVRSLGFCDTTNKG LFQVVSGGMVLQLQQGDQVWVEKDPKK
GHIYQGSEADSVFSGFLIFPSA (SEQ ID NO:9).

C1q_cadena B (Homo sapiens), n.º de registro de la base de datos de proteínas: NP_000482.3; n.º de GenBank: NM_000491.3: >gi|87298828|ref|NP_000482.3| precursor de la subunidad B subcomponente del complemento C1q [Homo sapiens]

MMMKIPWGSIPVLMLLLLLGLIDISQAQLSCTGPPAIPGIPGIPGTPGPDGQPGTPGIK
GEKGLPGLAGDHGEFGEKGDPGIPGNGPKVGPKGPMGPKGGPGAPGAPGPKG ESG
DYKATQKIAFSATRTINVPLRRDQTIRFDHVITNMNNNYEPRSGKFTCKVPGLYYFT
YHASSRGNLCVNLMRGRERAQKVVFCDYAYNTFQVTGGMVLKLEQGENVFLQ
ATDKNSLLGMEGANSIFSGFLFPDMEA (SEQ ID NO:10).

C1q_cadena C (Homo sapiens), n.º de registro de la base de datos de proteínas: NP_001107573.1; n.º de GenBank: NM_001114101.1: >gi|1662359031|ref|NP_001107573.1| precursor de la subunidad C subcomponente del complemento C1q [Homo sapiens]

MDVGPSLPHLGLKLLLLLPLRGQANTGCY GIPGMPGLPGAPGKDGYDGLPGP
KGEPGIPAIPGIRGPKGQKGEPLPGHPGKNGPMGPPGMPGVPGPMGIPGEPGE EGR
YKQKFQS VFTVTRQTHQPPAPNSLIRFNAVLTNPQGDYDTSTGKFTCKVPGLYYFV
YHASHTANLCVLLYRSGVKVVFCDTSKTNQVNSGGVLLRLQVGEEVWLAVND
YYDMVGIQGSDSVFSGFLFPD (SEQ ID NO:11).

Por consiguiente, un anticuerpo anti-C1q humanizado de la presente divulgación puede unirse a la cadena polipeptídica A, a la cadena polipeptídica B y/o a la cadena polipeptídica C de una proteína C1q. En algunas implementaciones, un anticuerpo anti-C1q humanizado de la presente divulgación se une a la cadena polipeptídica

A, a la cadena polipeptídica B y/o a la cadena polipeptídica C de C1q de ser humano o un homólogo del mismo, tal como C1q de ratón, rata, conejo, mono, perro, gato, vaca, caballo, camello, oveja, cabra o cerdo.

Anticuerpos anti-C1q humanizados

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

10 En algunas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q humanizados de la presente divulgación incluyen una región variable de cadena pesada que contiene una región Fab y una región constante de cadena pesada que contiene una región Fc, donde la región Fab se une específicamente a una proteína C1q de la presente divulgación, pero la región Fc no puede unirse a la proteína C1q. En algunas implementaciones, la región Fc es de un isotipo de IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4 humana. En algunas implementaciones, la región Fc no puede inducir actividad del complemento y/o no puede inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En algunas implementaciones, la región Fc comprende una o más modificaciones, incluyendo, sin limitación, sustituciones de aminoácido. En determinadas implementaciones, la región Fc de los anticuerpos anti-C1q humanizados de la presente divulgación comprende una sustitución de aminoácido en la posición 248 según la convención de numeración de Kabat o una posición correspondiente a la posición 248 según la convención de numeración de Kabat, y/o en la posición 241 según la convención de numeración de Kabat o una posición correspondiente a la posición 241 según la convención de numeración de Kabat. En algunas implementaciones, la sustitución de aminoácido en la posición 248 o una posición correspondiente a la posición 248 inhibe la interacción de la región Fc con un receptor de Fc. En algunas implementaciones, la sustitución de aminoácido en la posición 248 o una posición correspondiente a la posición 248 es una sustitución de aminoácido de leucina a glutamato. En algunas implementaciones, la sustitución de aminoácido en la posición 241 o una posición correspondiente a la posición 241 impide un intercambio de brazo en el anticuerpo. En algunas implementaciones, la sustitución de aminoácido en la posición 241 o una posición correspondiente a la posición 241 es una sustitución de aminoácido de serina a prolina. En determinadas implementaciones, la región Fc de los anticuerpos anti-C1q humanizados de la presente divulgación comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37, o una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 % de homología con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37.

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

20 Las propiedades funcionales de los anticuerpos de la presente divulgación, tales como las constantes de disociación para los antígenos, la inhibición de las interacciones proteína-proteína (por ejemplo, interacciones C1q-autoanticuerpo), la inhibición de la citotoxicidad dependiente del complemento y de autoanticuerpos (CDC), la inhibición de la citotoxicidad mediada por células dependiente del complemento (CDCC) o la formación de lesiones, pueden medirse, sin limitación, en experimentos *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*.

25 Las constantes de disociación (K_D) de los anticuerpos anti-C1q humanizados para C1q pueden ser menores de 125 nM, menores de 120 nM, menores de 115 nM, menores de 110 nM, menores de 100 nM, menores de 90 nM, menores de 80 nM, menores de 70 nM, menores de 60 nM, menores de 50 nM, menores de 40 nM, menores de

30 nM, menores de 20 nM, menores de 10 nM, menores de 9 nM, menores de 8 nM, menores de 7 nM, menores de 6 nM, menores de 5 nM, menores de 4 nM, menores de 3 nM, menores de 2 nM, menores de 1 nM, menores de 0,5 nM, menores de 0,1 nM, menores de 0,05 nM, menores de 0,01 nM o menores de 0,005 nM. En algunas implementaciones, las constantes de disociación oscilan entre menos de aproximadamente 125 nM y menos de 5 pM.

En algunas implementaciones, las constantes de disociación de los anticuerpos anti-C1q humanizados de la presente divulgación son menores de aproximadamente 10 pM a menores de aproximadamente 5 pM para C1q de ser humano. En algunas implementaciones, las constantes de disociación son menores de aproximadamente 10 pM, menores de aproximadamente 9,9 pM, menores de aproximadamente 9,8 pM, menores de aproximadamente 9,7 pM, menores de aproximadamente 9,6 pM, menores de aproximadamente 9,5 pM, menores de aproximadamente 9,4 pM, menores de aproximadamente 9,3 pM, menores de aproximadamente 9,2 pM, menores de aproximadamente 9,1 pM, menores de aproximadamente 9 pM, menores de aproximadamente 8,9 pM, menores de aproximadamente 8,8 pM, menores de aproximadamente 8,7 pM, menores de aproximadamente 8,6 pM, menores de aproximadamente 8,5 pM, menores de aproximadamente 8,4 pM, menores de aproximadamente 8,3 pM, menores de aproximadamente 8,2 pM, menores de aproximadamente 8,1 pM, menores de aproximadamente 8 pM, menores de aproximadamente 7,9 pM, menores de aproximadamente 7,8 pM, menores de aproximadamente 7,7 pM, menores de aproximadamente 7,6 pM, menores de aproximadamente 7,5 pM, menores de aproximadamente 7,4 pM, menores de aproximadamente 7,3 pM, menores de aproximadamente 7,2 pM, menores de aproximadamente 7,1 pM, menores de aproximadamente 7 pM, menores de aproximadamente 6,9 pM, menores de aproximadamente 6,8 pM, menores de aproximadamente 6,7 pM, menores de aproximadamente 6,6 pM, menores de aproximadamente 6,5 pM, menores de aproximadamente 6,4 pM, menores de aproximadamente 6,3 pM, menores de aproximadamente 6,2 pM, menores de aproximadamente 6,1 pM, menores de aproximadamente 6 pM, menores de aproximadamente 5,9 pM, menores de aproximadamente 5,8 pM, menores de aproximadamente 5,7 pM, menores de aproximadamente 5,6 pM, menores de aproximadamente 5,5 pM, menores de aproximadamente 5,4 pM, menores de aproximadamente 5,3 pM, menores de aproximadamente 5,2 pM, menores de aproximadamente 5,1 pM, o menores de aproximadamente 5 pM, para C1q de ser humano.

En algunas implementaciones, las constantes de disociación de los anticuerpos anti-C1q humanizados de la presente divulgación son menores de 125 nM, menores de 120 nM, menores de 115 nM, menores de 110 nM, menores de 100 nM, menores de 90 nM, menores de 80 nM, menores de 70 nM, menores de 60 nM, menores de 50 nM, menores de 40 nM, menores de 30 nM, menores de 20 nM, menores de 10 nM, menores de 9 nM, menores de 8 nM, menores de 7 nM, menores de 6 nM, menores de 5 nM, menores de 4 nM, menores de 3 nM, menores de 2 nM, menores de 1 nM, menores de 0,5 nM, menores de 0,1 nM, o menores de 0,05 nM para C1q de ratón.

Las constantes de disociación de anticuerpo para antígenos distintos de C1q pueden ser al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 100 veces, al menos 1.000 veces, al menos 10.000 veces o al menos 100.000 veces mayores que las constantes de disociación para C1q. Por ejemplo, la constante de disociación de un anticuerpo anti-C1q humanizado de la presente divulgación puede ser al menos 1.000 veces mayor para C1s que para C1q. Las constantes de disociación pueden determinarse a través de cualquier técnica analítica, incluyendo cualquier técnica bioquímica o biofísica tal como ELISA, resonancia de plasmón superficial (SPR), interferometría de biocapa (véase, por ejemplo, el sistema Octet de ForteBio), calorimetría de titulación isotérmica (ITC), calorimetría diferencial de barrido (DSC), dicroísmo circular (CD), análisis de flujo detenido y análisis colorimétricos o de fusión de proteínas fluorescentes. Las constantes de disociación (K_D) de los anticuerpos anti-C1q para C1q pueden determinarse, por ejemplo, usando anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo, tales como fragmentos Fab.

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

su uso para determinar la afinidad de unión de un anticuerpo a cualquier C1q, incluyendo C1q de ser humano, C1q de otro mamífero (tal como C1q de ratón, C1q de rata, C1q de primate), así como diferentes formas de C1q. La afinidad de unión de un anticuerpo se mide generalmente a 25 °C, pero también puede medirse a 37 °C.

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

En algunas implementaciones, en el presente documento se proporciona un anticuerpo anti-C1q humanizado que se une a un epítopo de C1q que es el mismo que, o solapa con, el epítopo de C1q al que se une otro anticuerpo de esta divulgación. En determinadas implementaciones, en el presente documento se proporciona un anticuerpo anti-C1q humanizado que se une a un epítopo de C1q que es el mismo que, o solapa con, el epítopo de C1q al que se une el anticuerpo anti-C1q M1 producido por la línea celular de hibridoma con número de registro de la ATCC, PTA-120399. En algunas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q humanizado compite con otro anticuerpo de esta divulgación por la unión a C1q. En determinadas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q compite con el anticuerpo anti-C1q M1 producido por la línea celular de hibridoma con número de registro de la ATCC, PTA-120399 o fragmentos de unión anti-C1q del mismo.

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

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

50 En algunas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q humanizado inhibe la interacción entre C1q y un autoanticuerpo.

En algunas implementaciones, un anticuerpo anti-C1q humanizado de la presente divulgación se une esencialmente al mismo epítopo de C1q que el anticuerpo M1 producido por la línea celular de hibridoma con el número de registro de la ATCC PTA-120399 o fragmentos de unión anti-C1q del mismo.

55 En algunas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q humanizado es un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 1-4, o una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 % de homología con la secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 1-4. En algunas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q humanizado es un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 5-8, o una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 % de homología con la secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 5-8. En

algunas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q humanizado es un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 1-4, o una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 % de homología con la secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 1-4; y/o un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 5-8, o una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 % de homología con la secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 5-8.

En algunas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q humanizado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 % de homología con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, o una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 % de homología con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5. En algunas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q humanizado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 % de homología con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, o una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 % de homología con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. En algunas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q humanizado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende un dominio variable de cadena pesada que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 % de homología con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, o una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 % de homología con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7. En algunas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q humanizado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 % de homología con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, o una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 % de homología con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

En algunas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q humanizado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, o una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 % de homología con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, o una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 % de homología con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5. En algunas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q humanizado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, o una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos

aproximadamente el 95 % de homología con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, o una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 % de homología con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. En algunas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q humanizado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, o una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 % de homología con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, o una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 % de homología con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7. En algunas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q humanizado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, o una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 % de homología con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, o una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 % de homología con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

En algunas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q humanizados de la presente divulgación pueden comprender al menos una HVR seleccionada de HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 de los dominios variables de cadena ligera del anticuerpo monoclonal M1 producido por la línea celular de hibridoma que tiene el número de registro de la ATCC PTA-120399, o progenie de la misma. En algunas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q humanizados de la presente divulgación pueden comprender al menos una HVR seleccionada de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 de los dominios variables de cadena pesada del anticuerpo monoclonal M1 producido por la línea celular de hibridoma que tiene el número de registro de la ATCC PTA-120399, o progenie de la misma. En algunas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q humanizados de la presente divulgación pueden comprender al menos una HVR seleccionada de HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 de los dominios variables de cadena ligera y al menos una HVR seleccionada de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 de los dominios variables de cadena pesada del anticuerpo monoclonal M1 producido por la línea celular de hibridoma que tiene el número de registro de la ATCC PTA-120399, o progenie de la misma.

En algunas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q humanizados de la presente divulgación pueden unirse a una proteína C1q y se une a uno o más aminoácidos de la proteína C1q dentro de los residuos de aminoácido seleccionados de (a) residuos de aminoácido 196-226 de SEQ ID NO: 9 (SEQ ID NO: 12) o residuos de aminoácido de una cadena A de proteína C1q (C1qA) correspondiente a los residuos de aminoácido 196-226 (GLFQVVSGGMVLQLQQGDQVWVEKDPKKGHI) de SEQ ID NO: 9 (SEQ ID NO: 12); (b) residuos de aminoácido 196-221 de SEQ ID NO: 9 (SEQ ID NO: 13) o residuos de aminoácido de una C1qA correspondiente a los residuos de aminoácido 196-221 (GLFQVVSGGMVLQLQQGDQVWVEKDP) de SEQ ID NO: 9 (SEQ ID NO: 13); (c) residuos de aminoácido 202-221 de SEQ ID NO: 9 (SEQ ID NO: 14) o residuos de aminoácido de una C1qA correspondiente a los residuos de aminoácido 202-221 (SGGMVLQLQQGDQVWVEKDP) de SEQ ID NO: 9 (SEQ ID NO: 14); (d) residuos de aminoácido 202-219 de SEQ ID NO: 9 (SEQ ID NO: 15) o residuos de aminoácido de una C1qA correspondiente a los residuos de aminoácido 202-219 (SGGMVLQLQQGDQVWVEK) de SEQ ID NO: 9 (SEQ ID NO: 15); y (e) residuos de aminoácido Lys 219 y/o Ser 202 de SEQ ID NO: 9 o residuos de aminoácido de una C1qA correspondiente a Lys 219 y/o Ser 202 de SEQ ID NO: 9.

En algunas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q humanizados pueden unirse además a uno o más aminoácidos de la proteína C1q dentro de los residuos de aminoácido seleccionados de: (a) residuos de aminoácido 218-240 de SEQ ID NO: 11 (SEQ ID NO: 16) o residuos de aminoácido de una cadena C de proteína C1q (C1qC) correspondiente a los residuos de aminoácido 218-240 (WLAVNDYYDMVGI QGSDSVFSGF) de SEQ ID NO: 11 (SEQ ID NO: 16); (b) residuos de aminoácido 225-240 de SEQ ID NO: 11 (SEQ ID NO: 17) o residuos de aminoácido de una C1qC correspondiente a los residuos de aminoácido 225-240 (YDMVGI QGSDSVFSGF) de SEQ ID NO: 11 (SEQ ID NO: 17); (c) residuos de aminoácido 225-232 de SEQ ID NO: 11 (SEQ ID NO: 18) o residuos de aminoácido de una C1qC correspondiente a los residuos de aminoácido 225-232 (YDMVGIQG) de SEQ ID NO: 11 (SEQ ID NO: 18); (d) residuo de aminoácido Tyr 225 de SEQ ID NO: 11 o un residuo de aminoácido de una C1qC correspondiente al residuo de aminoácido Tyr 225 de SEQ ID NO: 11; (e) residuos de aminoácido 174-196 de SEQ ID NO: 11 (SEQ ID NO: 19) o residuos de aminoácido de una C1qC correspondiente a los residuos de aminoácido 174-196 (HTANLCVLLYRSGVKVVTFCGHT) de SEQ ID NO: 11 (SEQ ID NO: 19); (f) residuos de aminoácido 184-192 de SEQ ID NO: 11 (SEQ ID NO: 20) o residuos de aminoácido de una C1qC correspondiente a los residuos de aminoácido 184-192 (RSGVKVVT) de SEQ ID NO: 11 (SEQ ID NO: 20); (g) residuos de aminoácido 185-187 de SEQ ID NO: 11 o residuos de aminoácido de una C1qC correspondiente a los residuos de aminoácido 185-187 (SGV) de SEQ ID NO: 11; (h) residuo de aminoácido Ser 185 de SEQ ID NO: 11 o un residuo de aminoácido de una C1qC correspondiente al residuo de aminoácido Ser 185 de SEQ ID NO: 11.

En determinadas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q humanizados de la presente divulgación pueden unirse a los residuos de aminoácido Lys 219 y Ser 202 de C1qA de ser humano tal como se muestra en SEQ ID NO: 9 o a los aminoácidos de una C1qA de ser humano correspondiente a Lys 219 y Ser 202 tal como se muestra en SEQ ID NO: 9, y al residuo de aminoácido Tyr 225 de C1qC de ser humano tal como se muestra en SEQ ID NO: 11 o a un residuo de aminoácido de una C1qC de ser humano correspondiente a Tyr 225 tal como se muestra en SEQ ID NO: 11. En determinadas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q se une al residuo de aminoácido Lys 219 de C1qA de ser humano tal como se muestra en SEQ ID NO: 9 o a un residuo de aminoácido de una C1qA de ser humano correspondiente a Lys 219 tal como se muestra en SEQ ID NO: 9, y al residuo de aminoácido Ser 185 de C1qC de ser humano tal como se muestra en SEQ ID NO: 11 o a un residuo de aminoácido de una C1qC de ser humano correspondiente a Ser 185 tal como se muestra en SEQ ID NO: 11.

En algunas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q humanizados de la presente divulgación pueden unirse a una proteína C1q y se une a uno o más aminoácidos de la proteína C1q dentro de los residuos de aminoácido seleccionados de: (a) residuos de aminoácido 218-240 de SEQ ID NO: 11 (SEQ ID NO: 16) o residuos de aminoácido de una C1qC correspondiente a los residuos de aminoácido 218-240 (WLAVNDYYDMVGI QGSDSVFSGF) de SEQ ID NO: 11 (SEQ ID NO: 16); (b) residuos de aminoácido 225-240 de SEQ ID NO: 11 (SEQ ID NO: 17) o residuos de aminoácido de una C1qC correspondiente a los residuos de aminoácido 225-240 (YDMVGI QGSDSVFSGF) de SEQ ID NO: 11 (SEQ ID NO: 17); (c) residuos de aminoácido 225-232 de SEQ ID NO: 11 (SEQ ID NO: 18) o residuos de aminoácido de una C1qC correspondiente a los residuos de aminoácido 225-232 (YDMVGIQG) de SEQ ID NO: 11 (SEQ ID NO: 18); (d) residuo de aminoácido Tyr 225 de SEQ ID NO: 11 o un residuo de aminoácido de una C1qC correspondiente al residuo de aminoácido Tyr 225 de SEQ ID NO: 11; (e) residuos de aminoácido 174-196 de SEQ ID NO: 11 (SEQ ID NO: 19) o residuos de aminoácido de una C1qC correspondiente a los residuos de aminoácido 174-196 (HTANLCVLLYRSGVKWTFCGHT) de SEQ ID NO: 11 (SEQ ID NO: 19); (f) residuos de aminoácido 184-192 de SEQ ID NO: 11 (SEQ ID NO: 20) o residuos de aminoácido de una C1qC correspondiente a los residuos de aminoácido 184-192 (RSGVKWTF) de SEQ ID NO: 11 (SEQ ID NO: 20); (g) residuos de aminoácido 185-187 de SEQ ID NO: 11 o residuos de aminoácido de una C1qC correspondiente a los residuos de aminoácido 185-187 (SGV) de SEQ ID NO: 11; (h) residuo de aminoácido Ser 185 de SEQ ID NO: 11 o un residuo de aminoácido de una C1qC correspondiente al residuo de aminoácido Ser 185 de SEQ ID NO: 11.

En algunas implementaciones, un anticuerpo anti-C1q humanizado de la presente divulgación inhibe la interacción entre C1q y C1s. En algunas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q humanizado inhibe la interacción entre C1q y C1r. En algunas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q humanizado inhibe la interacción entre C1q y C1s y entre C1q y C1r. En algunas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q humanizado inhibe la interacción entre C1q y otro anticuerpo, tal como un autoanticuerpo. En algunas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q humanizado inhibe las interacciones respectivas, a una estequiometría de menos de 2,5:1; 2,0:1; 1,5:1; ó 1,0:1. En algunas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q humanizado inhibe una interacción, tal como la interacción C1q-C1s, a concentraciones aproximadamente equimolares de C1q y el anticuerpo anti-C1q. En otras implementaciones, el anticuerpo anti-C1q se une a C1q con una estequiometría de menos de 20:1; menos de 19,5:1; menos de 19:1; menos de 18,5:1; menos de 18:1; menos de 17,5:1; menos de 17:1; menos de 16,5:1; menos de 16:1; menos de 15,5:1; menos de 15:1; menos de 14,5:1; menos de 14:1; menos de 13,5:1; menos de 13:1; menos de 12,5:1; menos de 12:1; menos de 11,5:1; menos de 11:1; menos de 10,5:1; menos de 10:1; menos de 9,5:1; menos de 9:1; menos de 8,5:1; menos de 8:1; menos de 7,5:1; menos de 7:1; menos de 6,5:1; menos de 6:1; menos de 5,5:1; menos de 5:1; menos de 4,5:1; menos de 4:1; menos de 3,5:1; menos de 3:1; menos de 2,5:1; menos de 2,0:1; menos de 1,5:1; ó menos de 1,0:1. En determinadas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q humanizado se une a C1q con una estequiometría de unión que oscila entre 20:1 y 1,0:1 o menos de 1,0:1. En determinadas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q humanizado se une a C1q con una estequiometría de unión que oscila entre 6:1 y 1,0:1 o menos de 1,0:1. En determinadas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q humanizado se une a C1q con una estequiometría de unión que oscila entre 2,5:1 y 1,0:1 o menos de 1,0:1. En algunas implementaciones, un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación que tiene una estequiometría de unión para C1q de 1,0:1 produce aproximadamente el 50 % de inhibición de la hemólisis de C1F, tal como se determina por ejemplo mediante ensayos de CH50 de la presente divulgación. En algunas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q humanizado inhibe la interacción entre C1q y C1r, o entre C1q y C1s, o entre C1q y tanto C1r como C1s. En algunas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q humanizado inhibe la interacción entre C1q y C1r, entre C1q y C1s y/o entre C1q y tanto C1r como C1s. En algunas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q humanizado se une a la cadena A de C1q. En otras implementaciones, el anticuerpo anti-C1q humanizado se une a la cadena B de C1q. En otras implementaciones, el anticuerpo anti-C1q humanizado se une a la cadena C de C1q. En algunas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q humanizado se une a la cadena A de C1q, a la cadena B de C1q y/o a la cadena C de C1q. En algunas implementaciones, el anticuerpo anti-C1q humanizado se une al dominio globular de la cadena A, la cadena B y/o la cadena C de C1q. En otras implementaciones, el anticuerpo anti-C1q humanizado se une al dominio similar al colágeno de la cadena A de C1q, la cadena B de C1q y/o la cadena C de C1q.

Cuando los anticuerpos anti-C1q humanizados de esta divulgación inhiben la interacción entre dos o más factores del complemento, tal como la interacción de C1q y C1s, o la interacción entre C1q y C1r, puede reducirse la interacción que se produce en presencia del anticuerpo en al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al

menos el 95 % o al menos el 99 % con respecto a un control en el que están ausentes los anticuerpos de esta divulgación. En determinadas implementaciones, la interacción que se produce en presencia del anticuerpo anti-C1q humanizado se reduce en una cantidad que oscila entre al menos el 30 % y al menos el 99 % con respecto a un control en el que están ausentes los anticuerpos humanizados de esta divulgación.

- 5 En algunas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q humanizados de la presente divulgación inhiben la escisión de C4 en al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 99 %, o en una cantidad que oscila entre al menos el 30 % y al menos el 99 %, con respecto a un control en el que están ausentes los anticuerpos de esta divulgación. Los métodos para medir la escisión de C4 se conocen bien en la técnica. Los valores de CE₅₀ para los anticuerpos de esta divulgación con respecto a la escisión de C4 pueden ser menores de 3 µg/ml; 2,5 µg/ml; 2,0 µg/ml; 1,5 µg/ml; 1,0 µg/ml; 0,5 µg/ml; 0,25 µg/ml; 0,1 µg/ml; 0,05 µg/ml. En algunas implementaciones, los anticuerpos de esta divulgación inhiben la escisión de C4 a concentraciones aproximadamente equimolares de C1q y el anticuerpo anti-C1q respectivo.
- 10 En algunas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q humanizados de la presente divulgación inhiben la citotoxicidad dependiente del complemento y de autoanticuerpos (CDC) en al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 99 %, o en una cantidad que oscila entre al menos el 30 % y al menos el 99 %, con respecto a un control en el que están ausentes los anticuerpos de esta divulgación. Los valores de CE₅₀ para los anticuerpos de esta divulgación con respecto a la inhibición de la citotoxicidad dependiente del complemento y de autoanticuerpos pueden ser menores de 3 µg/ml; 2,5 µg/ml; 2,0 µg/ml; 1,5 µg/ml; 1,0 µg/ml; 0,5 µg/ml; 0,25 µg/ml; 0,1 µg/ml; 0,05 µg/ml.
- 15 En algunas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q humanizados de la presente divulgación inhiben la citotoxicidad mediada por células dependiente del complemento (CDCC) en al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 99 %, o en una cantidad que oscila entre al menos el 30 % y al menos el 99 %, con respecto a un control en el que están ausentes los anticuerpos de esta divulgación. Los valores de CE₅₀ para los anticuerpos de esta divulgación con respecto a la inhibición de la CDCC pueden ser menores de 3 µg/ml; 2,5 µg/ml; 2,0 µg/ml; 1,5 µg/ml; 1,0 µg/ml; 0,5 µg/ml; 0,25 µg/ml; 0,1 µg/ml; 0,05 µg/ml. En algunas implementaciones, los anticuerpos de esta divulgación inhiben la CDCC, pero no la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).
- 20 En algunas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q humanizados de la presente divulgación inhiben la hemólisis de C1F (también denominada hemólisis de CH50) en al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 99 %, o en una cantidad que oscila entre al menos el 30 % y al menos el 99 %, con respecto a un control en el que están ausentes los anticuerpos de esta divulgación o en el que se usan anticuerpos de control que no se unen a ningún factor del complemento ni a ningún otro anticuerpo tal como un autoanticuerpo (véase, por ejemplo, la sección de ejemplos a continuación). Los métodos para medir la hemólisis de C1F se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, la sección de ejemplos a continuación). Los valores de CE₅₀ para los anticuerpos humanizados de esta divulgación con respecto a la hemólisis de C1F pueden ser menores de 3 µg/ml; 2,5 µg/ml; 2,0 µg/ml; 1,5 µg/ml; 1,0 µg/ml; 0,5 µg/ml; 0,25 µg/ml; 0,1 µg/ml; 0,05 µg/ml. En algunas implementaciones, los anticuerpos humanizados anti-C1q de esta divulgación neutralizan al menos el 50 % de hemólisis de C1F a una dosis de menos de 200 ng/ml, menos de 100 ng/ml, menos de 50 ng/ml o menos de 20 ng/ml. En algunas implementaciones, los anticuerpos humanizados de esta divulgación neutralizan la hemólisis de C1F a concentraciones aproximadamente equimolares de C1q y el anticuerpo anti-C1q. En algunas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q humanizados de esta divulgación neutralizan la hemólisis en un ensayo de hemólisis de C1F de ser humano. En algunas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q humanizados de esta divulgación neutralizan la hemólisis en un ensayo de hemólisis de C1F de ser humano y de rata (véase, por ejemplo, la sección de ejemplos a continuación).
- 25 En algunas implementaciones, la ruta alternativa puede amplificar la CDC iniciada por la unión de C1q y la posterior activación de C1s; en al menos algunas de estas implementaciones, los anticuerpos de esta divulgación inhiben la ruta alternativa en al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 99 %, o en una cantidad que oscila entre al menos el 30 % y al menos el 99 %, con respecto a un control en el que están ausentes los anticuerpos de esta divulgación.
- 30 En algunas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q humanizados de la presente divulgación previenen la pérdida sináptica en un modelo celular *in vitro* o un modelo *in vivo* de pérdida sináptica, tal como un modelo de ratón *in vivo*. Los modelos de ratón *in vivo* pueden incluir Tg2576, un modelo transgénico de proteína precursora amiloide (APP) de ratón de enfermedad de Alzheimer, R6/2 NT-CAG150, un modelo transgénico de enfermedad de Huntington, o SMAΔ7, un modelo de ratón de atrofia muscular espinal, o DBA/2J, un modelo de ratón genético de glaucoma. En general, puede usarse cualquier modelo de enfermedad neurodegenerativa que muestre pérdida de
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

sinapsis.

Los métodos para medir la pérdida sináptica *in vitro* o *in vivo* se conocen bien en la técnica. Puede reducirse la formación de lesiones *in vitro* en al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o al menos el 95 %, o en una cantidad que oscila entre al menos el 30 % y al menos el 95 %, con respecto a un experimento de control en el que están ausentes los anticuerpos de esta divulgación. Los valores de CE₅₀ para los anticuerpos de esta divulgación con respecto a la prevención de la formación de lesiones *in vitro* pueden ser menores de 3 µg/ml; 2,5 µg/ml; 2,0 µg/ml; 1,5 µg/ml; 1,0 µg/ml; 0,5 µg/ml; 0,25 µg/ml; 0,1 µg/ml; 0,05 µg/ml. Puede reducirse la pérdida sináptica *in vivo* en al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 35 %, al menos el 40 % o al menos el 50 %, o en una cantidad que oscila entre al menos el 5 % y al menos el 50 %, con respecto a un experimento de control en el que están ausentes los anticuerpos de esta divulgación.

En algunas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q humanizados de la presente divulgación previenen la formación de lesiones en un modelo de corte de médula espinal *ex vivo* de NMO o en un modelo de ratón *in vivo* de NMO. Los métodos para medir la formación de lesiones *ex vivo* o *in vivo* se conocen bien en la técnica. Puede reducirse la formación de lesiones *ex vivo* al menos en una puntuación relativa de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5 ó 4,0. Los valores de CE₅₀ para los anticuerpos de esta divulgación con respecto a la prevención de formación de lesiones *ex vivo* pueden ser menores de 3 µg/ml; menores de 2,5 µg/ml; menores de 2,0 µg/ml; menores de 1,5 µg/ml; menores de 1,0 µg/ml; menores de 0,5 µg/ml; menores de 0,25 µg/ml; menores de 0,1 µg/ml; o menores 0,05 µg/ml. Puede reducirse la formación de lesiones *in vivo* en al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 35 %, al menos el 40 % o al menos el 50 %, o en una cantidad que oscila entre al menos el 5 % y al menos el 50 %, en cuanto a la pérdida de tinción (% de área). La tinción puede evaluarse, sin limitación, mediante tinción con AQP4, tinción con GFAP o tinción con MBP.

La presente divulgación proporciona anticuerpos anti-C1q humanizados. Los anticuerpos humanizados de la presente divulgación pueden presentar una o más de las siguientes características. Los anticuerpos de esta divulgación pueden ser anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos químicos, anticuerpos humanos, fragmentos de anticuerpo, anticuerpos biespecíficos y poliespecíficos, anticuerpos multivalentes o anticuerpos heteroconjugados. Los fragmentos de anticuerpo de esta divulgación pueden ser fragmentos funcionales que se unen al mismo epítopo que cualquiera de los anticuerpos anti-C1q humanizados de esta divulgación. En algunas implementaciones, los fragmentos de anticuerpo de esta divulgación se unen específicamente a C1q y neutralizan una actividad biológica de C1q. En algunas implementaciones, los fragmentos de anticuerpo son versiones miniaturizadas de los anticuerpos anti-C1q humanizados o fragmentos de anticuerpo de esta divulgación que tienen el mismo epítopo del anticuerpo de longitud completa correspondiente, pero tienen un peso molecular mucho más pequeño. Tales fragmentos de anticuerpo anti-C1q miniaturizados pueden presentar una mejor capacidad de penetración en el cerebro y una semivida más corta, lo cual es ventajoso para utilidades de obtención de imágenes y diagnóstico (véanse, por ejemplo, Lütje S *et al.*, Bioconjug Chem. 19 de febrero de 2014;25(2):335-41; Tavaré R *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 21 de enero de 2014;111(3):1108-13; y Wiehr S *et al.*, Prostate. Mayo de 2014;74(7):743-55). Por consiguiente, en algunas implementaciones, los fragmentos de anticuerpo anti-C1q humanizados de esta divulgación presentan una mejor penetración en el cerebro en comparación con sus anticuerpos de longitud completa correspondientes y/o presentan una semivida más corta en comparación con sus anticuerpos de longitud completa correspondientes. En algunas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q humanizados de la presente divulgación son anticuerpos biespecíficos que reconocen un primer antígeno y un segundo antígeno. En algunas implementaciones, el primer antígeno es un antígeno C1q. En algunas implementaciones, el segundo antígeno es un antígeno que facilita el transporte a través de la barrera hematoencefálica, incluyendo, sin limitación, receptor de transferrina (TR), receptor de insulina (HIR), receptor de factor de crecimiento similar a la insulina (IGFR), proteínas relacionadas con el receptor de lipoproteínas de baja densidad 1 y 2 (LPR-1 y 2), receptor de toxina diftérica, CRM197, un anticuerpo de un solo dominio de llama, TMEM 30(A), un dominio de transducción de proteínas, TAT, Syn-B, penetratina, un péptido de poliarginina, un péptido de angiopep y ANG1005.

Los anticuerpos anti-C1q humanizados de la presente divulgación pueden contener además funciones efectoras modificadas por ingeniería, modificaciones de secuencia de aminoácidos u otras modificaciones de anticuerpo conocidas en la técnica; por ejemplo, la región constante de los anticuerpos anti-C1q descritos en el presente documento puede modificarse para alterar la activación del complemento. Por ejemplo, y sin desechar limitarse por la teoría, a diferencia de la región Fc de IgG1, IgG2, e IgG3 humanas, la región Fc de IgG4 humana no se une a C1q. Por consiguiente, en algunas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q humanizados de esta divulgación pueden comprender además la región Fc de IgG4 humana. En algunas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q humanizados de esta divulgación comprenden una o más sustituciones de aminoácido dentro de la región Fc que, por ejemplo, impiden el intercambio de brazo y/o reduce o inhibe de otro modo la capacidad de interacción de la región Fc con receptores de Fc expresados en células (véanse por ejemplo, Angal S *et al.*, Mol Immunol. Ene de 1993;30(1):105-8 ; y Morgan A *et al.*, Immunology 1995 86 319-324). En algunas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q humanizados de esta divulgación comprenden una región Fc que comprende una sustitución de aminoácido en la posición 241 ó 248 según la convención de numeración de Kabat. En algunas implementaciones,

- la región Fc comprende una sustitución de aminoácido de serina a prolina en la posición 241 que impiden el intercambio de brazo. En algunas implementaciones, la región Fc comprende una sustitución de aminoácido de serina a prolina en la posición 241 según la convención de numeración de Kabat. En algunas implementaciones, la región Fc comprende una sustitución de aminoácido de leucina a glutamato en la posición 248 que reduce o inhibe 5 de otro modo la capacidad de interacción de la región Fc con un receptor de Fc. En algunas implementaciones, la región Fc comprende una sustitución de aminoácido de leucina a glutamato en la posición 248 según la convención de numeración de Kabat. En algunas implementaciones los anticuerpos anti-C1q humanizados de esta divulgación comprenden una región Fc que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37.
- 10 Pueden identificarse, cribarse y/o caracterizarse anticuerpos anti-C1q humanizados adicionales, por ejemplo, anticuerpos humanizados que se unen específicamente a una proteína C1q de la presente divulgación, para determinar sus propiedades físicas/químicas y/o actividades biológicas mediante diversos ensayos conocidos en la técnica.
- 15 *Preparación de anticuerpos*
- Los anticuerpos anti-C1q de la presente divulgación pueden producirse usando cualquier método descrito en el presente documento o conocido en la técnica. Pueden producirse anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos humanizados) de la presente divulgación usando una variedad de técnicas conocidas, tales como la 20 técnica de hibridación de células somáticas convencional descrita por Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495 (1975). Aunque se prefieren procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio, también pueden emplearse otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo, transformación viral u oncogénica de linfocitos B y técnica de presentación en fago usando bibliotecas de genes de anticuerpos humanos.
- 25 Un método para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales de la presente divulgación es el sistema murino. La producción de hibridomas en el ratón se conoce bien en la técnica, incluyendo protocolos y técnicas de inmunización para aislar y fusionar esplenocitos inmunizados.
- 30 Pueden prepararse anticuerpos policlonales inmunizando un sujeto adecuado con un inmunogén polipeptídico. El título de anticuerpos polipeptídicos en el sujeto inmunizado puede monitorizarse a lo largo del tiempo mediante técnicas convencionales, tales como con un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) usando polipéptido inmovilizado. Si se desea, el anticuerpo dirigido contra el antígeno puede aislarse del mamífero (por ejemplo, de la sangre) y purificarse adicionalmente mediante técnicas bien conocidas, tales como cromatografía con proteína A para obtener la fracción de IgG. En un momento apropiado después de la inmunización, por ejemplo, 35 cuando los títulos de anticuerpo son los más elevados, pueden obtenerse células productoras de anticuerpos del sujeto y usarse para preparar anticuerpos monoclonales mediante técnicas convencionales, tales como la técnica del hibridoma descrita originariamente por Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256:495-497 (véanse también Brown *et al.* (1981) *J. Immunol.* 127:539-46; Brown *et al.* (1980) *J. Biol. Chem.* 255:4980-83; Yeh *et al.* (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:2927-31; y Yeh *et al.* (1982) *Int. J. Cancer* 29:269-75), la técnica más reciente del hibridoma de células 40 B humanas (Kozbor *et al.* (1983) *Immunol. Today* 4:72), la técnica del hibridoma de VEB (Cole *et al.* (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96) o técnicas de trioma. La tecnología para producir hibridomas de anticuerpos monoclonales se conoce bien (véanse generalmente Kennet, R. H. en *Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses*, Plenum Publishing Corp., Nueva York, Nueva York (1980); Lerner, E. A. (1981) *Yale J. Biol. Med.* 54:387-402; Gefter, M. L. *et al.* (1977) *Somatic Cell Genet.* 3:231-36).
- 45 En resumen, una línea celular inmortal (normalmente, un mieloma) se fusiona a linfocitos (normalmente, esplenocitos) de un mamífero inmunizado con un inmunógeno tal como se ha descrito anteriormente, y los sobrenadantes de cultivo de las células de hibridoma resultantes se criban para identificar un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se une al polipéptido antígeno, preferiblemente específicamente.
- 50 Puede aplicarse cualquiera de los muchos protocolos bien conocidos usados para fusionar linfocitos y líneas celulares inmortalizadas con el propósito de generar un anticuerpo monoclonal anti-PD-1, PD-L1, o PD-L2 (véanse, por ejemplo, Galfre, G. *et al.* (1977) *Nature* 266:55052; Getter *et al.* (1977) citado anteriormente; Lerner (1981) citado anteriormente; Kennet (1980) citado anteriormente). Además, el trabajador experto habitual apreciará que hay muchas variaciones de tales métodos que también serían útiles. Normalmente, la línea celular inmortal (por ejemplo, 55 una línea de celular mieloma) se deriva de la misma especie de mamífero que los linfocitos. Por ejemplo, pueden producirse hibridomas murinos fusionando linfocitos de un ratón inmunizado con una preparación inmunogénica de la presente divulgación con una línea celular de ratón inmortalizada. Líneas celulares inmortales preferidas son líneas celulares de mieloma de ratón que son sensibles al medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"). Puede usarse cualquiera de varias líneas celulares de mieloma como pareja de fusión según 60 técnicas convencionales, por ejemplo, las líneas de mieloma P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8,653 o Sp2/O-Ag14. Estas líneas de mieloma están disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Rockville, Md. Normalmente, se fusionan células de mieloma de ratón sensibles a HAT a esplenocitos de ratón usando polietilenglicol ("PEG"). Las células de hibridoma resultantes de la fusión se seleccionan entonces usando medio 65 HAT, que destruye células de mieloma no fusionadas y fusionadas de manera no productiva (los esplenocitos no fusionados mueren después de varios días porque no se transforman). Las células de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal de la presente divulgación se detectan mediante cribado de los sobrenadantes de cultivo de

hibridomas para anticuerpos que se unen a un polipéptido dado, por ejemplo, usando un ensayo ELISA convencional.

Como alternativa a preparar hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales, puede identificarse y aislar un anticuerpo monoclonal específico para un polipéptido deseado (por ejemplo, C1q) mediante cribado de una biblioteca de inmunoglobulinas combinatoria recombinante (por ejemplo, una biblioteca de presentación en fago de anticuerpos) con el polipéptido apropiado para aislar de ese modo miembros de la biblioteca de inmunoglobulinas que se unen al polipéptido. Están disponibles comercialmente kits para generar y cribar bibliotecas de presentación en fago (por ejemplo, el sistema de anticuerpos en fagos recombinantes de Pharmacia, n.º de catálogo 27-9400-01; y el kit de presentación SurfZAP™ de Stratagene, n.º de catálogo 240612). Adicionalmente, pueden hallarse ejemplos de métodos y reactivos particularmente adecuados para su uso en la generación y el cribado de una biblioteca de presentación de anticuerpos, por ejemplo, en Ladner *et al.* patente estadounidense n.º 5.223.409; Kang *et al.* publicación internacional n.º WO 92/18619; Dower *et al.* publicación internacional n.º WO 91/17271; Winter *et al.* publicación internacional WO 92/20791; Markland *et al.* publicación internacional n.º WO 92/15679; Breitling *et al.* publicación internacional WO 93/01288; McCafferty *et al.* publicación internacional n.º WO 92/01047; Garrard *et al.* publicación internacional n.º WO 92/09690; Ladner *et al.* publicación internacional n.º WO 90/02809; Fuchs *et al.* (1991) Biotechnology (NY) 9:1369-1372; Hay *et al.* (1992) Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85; Huse *et al.* (1989) Science 246:1275-1281; Griffiths *et al.* (1993) EMBO J. 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) J. Mol. Biol. 226:889-896; Clarkson *et al.* (1991) Nature 352:624-628; Gram *et al.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3576-3580; Garrard *et al.* (1991) Biotechnology (NY) 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) Nucleic Acids Res. 19:4133-4137; Barbas *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982; y McCafferty *et al.* (1990) Nature 348:552-554.

Adicionalmente, pueden generarse anticuerpos anti-C1q recombinantes, tales como anticuerpos monoclonales humanizados y químéricos, que pueden producirse usando técnicas de ADN recombinante convencionales. Tales anticuerpos monoclonales humanizados y químéricos pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica, por ejemplo usando métodos descritos en Robinson *et al.* publicación de patente internacional PCT/US86/02269; Akira *et al.* solicitud de patente europea 184.187; Taniguchi, M. solicitud de patente europea 171.496; Morrison *et al.* solicitud de patente europea 173.494; Neuberger *et al.* solicitud PCT WO 86/01533; Cabilly *et al.* patente estadounidense n.º 4.816.567; Cabilly *et al.* solicitud de patente europea 125.023; Better *et al.* (1988) Science 240:1041-1043; Liu *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liu *et al.* (1987) J. Immunol. 139:3521-3526; Sun *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. 84:214-218; Nishimura *et al.* (1987) Cancer Res. 47:999-1005; Wood *et al.* (1985) Nature 314:446-449; y Shaw *et al.* (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison, S. L. (1985) Science 229:1202-1207; Oi *et al.* (1986) Biotechniques 4:214; Winter patente estadounidense 5.225.539; Jones *et al.* (1986) Nature 321:552-525; Verhoeven *et al.* (1988) Science 239:1534; y Beidler *et al.* (1988) J. Immunol. 141:4053-4060.

Además, pueden producirse anticuerpos humanizados según protocolos convencionales tales como los dados a conocer en la patente estadounidense 5.565.332. En otra implementación, pueden producirse cadenas de anticuerpo o miembros de pares de unión específicos mediante recombinación entre vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican para una fusión de una cadena de polipéptido de un miembro de par de unión específico y un componente de un paquete de presentación genérico replicable y vectores que contienen moléculas de ácido nucleico que codifican para un segundo polipéptido cadena de un único miembro de par de unión usando técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en las patentes estadounidenses 5.565.332, 5.871.907, o 5.733.743. El uso de anticuerpos intracelulares para inhibir la función de proteínas en una célula es también conocido en la técnica (véanse, por ejemplo, Carlson, J. R. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:2638-2646; Biocca, S. *et al.* (1990) EMBO J. 9:101-108; Werger, T. M. *et al.* (1990) FEBSLett. 274:193-198; Carlson, J. R. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7427-7428; Marasco, W. A. *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7889-7893; Biocca, S. *et al.* (1994) Biotechnology (NY) 12:396-399; Chen, S-Y. *et al.* (1994) Hum. Gene Ther. 5:595-601; Duan, L *et al.* (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5075-5079; Chen, S-Y. *et al.* (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5932-5936; Beerli, R. R. *et al.* (1994) J. Biol. Chem. 269:23931-23936; Beerli, R. R. *et al.* (1994) Biochem. Biophys. Res. Commun. 204:666-672; Mhashilkar, A. M. *et al.* (1995) EMBO J. 14:1542-1551; Richardson, J. H. *et al.* (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:3137-3141; publicación PCT n.º WO 94/02610 por Marasco *et al.*; y la publicación PCT n.º WO 95/03832 por Duan *et al.*).

En otra implementación, pueden generarse anticuerpos anti-C1q monoclonales humanos usando ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmunitario humano en vez del de ratón. En una implementación, ratones transgénicos, denominados en el presente documento "ratones HuMAb" que contienen miniloci de un gen de inmunoglobulina humana que codifica para secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada (μ y γ) y ligera κ humanas no reordenadas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci de cadena μ y κ endógenos (Lonberg, N. *et al.* (1994) Nature 368(6474): 856-859). Por consiguiente, los ratones presentan una expresión reducida de IgM o κ de ratón, y en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadenas pesada y ligera humanas introducidos experimentan intercambio de clase switching y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgG κ de alta afinidad humanos (Lonberg, N. *et al.* (1994), citado anteriormente; revisado en Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13: 65-93, y Harding, F. y Lonberg, N. (1995) Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:536-546). La preparación de ratones HuMAb se describe en Taylor, L. *et al.* (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J. *et al.*

(1993) International Immunology 5: 647-656; Tuaillon *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci USA 90:3720-3724; Choi *et al.* (1993) Nature Genetics 4:117-123; Chen, J. *et al.* (1993) EMBO J. 12: 821-830; Tuaillon *et al.* (1994) J. Immunol. 152:2912-2920; Lonberg *et al.*, (1994) Nature 368(6474): 856-859; Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Taylor, L. *et al.* (1994) International Immunology 6: 579-591; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13: 65-93; Harding, F. y Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci 764:536-546; Fishwild, D. *et al.* (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851. Véanse además, las patentes estadounidenses n.^{os} 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429; todas concedidas a Lonberg y Kay, y GenPharm International; la patente estadounidense n.^o 5.545.807 concedida a Surani *et al.*; las publicaciones internacionales n.^{os} WO 98/24884, publicada el 11 de junio de 1998; WO 94/25585, publicada el 10 de noviembre de 1994; WO 93/1227, publicada el 24 de junio de 1993; WO 92/22645, publicada el 23 de diciembre de 1992; WO 92/03918, publicada el 19 de marzo de 1992.

Aún otro aspecto de la presente divulgación se refiere a anticuerpos anti-C1q que pueden obtenerse mediante un procedimiento que comprende, inmunizar un animal con un polipéptido de C1q inmunogénico, respectivamente, o una porción inmunogénica del mismo; y luego aislar del animal anticuerpos que se unen específicamente al polipéptido.

En todavía otro aspecto de la presente divulgación, pueden usarse secuencias de anticuerpo parciales o conocidas para generar y/o expresar nuevos anticuerpos. Los anticuerpos interaccionan con antígenos diana predominantemente a través de residuos de aminoácido que están ubicados en las seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadenas pesada y ligera. Por este motivo, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son más diversas entre anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Dado que las secuencias de CDR son responsables de la mayoría de interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos que se producen de manera natural específicos mediante la construcción de vectores de expresión que incluyen secuencias de CDR del anticuerpo que se produce de manera natural específico injertado sobre secuencias de marco de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (véanse, por ejemplo, Riechmann, L. *et al.*, 1998, Nature 332:323-327; Jones, P. *et al.*, 1986, Nature 321:522-525; y Queen, C. *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. U.S.A. 86:10029-10033). Tales secuencias de marco pueden obtenerse de bases de datos de ADN públicas que incluyen secuencias génicas de anticuerpo de línea germinal o línea distinta a la germinal. Estas secuencias de línea germinal diferirán de las secuencias génicas de anticuerpo porque no incluirán genes variables completamente ensamblados, que se forman mediante unión V(D)J durante la maduración de células B. Las secuencias génicas de línea germinal también diferirán de las secuencias de un anticuerpo de repertorio secundario de alta afinidad de manera individual de manera uniforme a través de la región variable. Por ejemplo, las mutaciones somáticas son relativamente poco frecuentes en la porción amino-terminal de la región de marco. Por ejemplo, las mutaciones somáticas son relativamente poco frecuentes en la porción amino terminal de la región de marco 1 y en la porción carboxi-terminal de la región de marco 4. Además, muchas mutaciones somáticas no alteran significativamente las propiedades de unión del anticuerpo. Por este motivo, no es necesario obtener toda la secuencia de ADN de un anticuerpo particular con el fin de reproducir un anticuerpo recombinante intacto que tiene propiedades de unión similares a las del anticuerpo original (véase el documento PCT/US99/05535 presentado el 12 de marzo de 1999). La secuencia de cadenas pesada y ligera parcial que abarca las regiones CDR es suficiente normalmente con este propósito. La secuencia parcial se usa para determinar qué segmentos génicos variables y de unión de línea germinal y/o distintos de línea germinal contribuyeron a los genes variables de anticuerpo recombinados. La secuencia de línea germinal y/o distinta de línea germinal se usa entonces para llenar en porciones faltantes de las regiones variables. Se escinden secuencias líder de cadenas pesada y ligera durante la maduración de proteínas y no contribuyen a las propiedades del anticuerpo final. Para añadir secuencias faltantes, pueden combinarse secuencias de ADN clonadas con oligonucleótidos sintéticos mediante ligamiento o amplificación por PCR. Alternativamente, toda la región variable puede sintetizarse como un conjunto de oligonucleótidos cortos, solapantes y combinarse mediante amplificación por PCR para crear un clón de región variable totalmente sintético. Este procedimiento tiene determinadas ventajas tales como la eliminación o inclusión de sitios de restricción particulares, o la optimización de codones particulares. El procedimiento también puede usarse para cribar bibliotecas de secuencias codificantes de inmunoglobulina particulares en una especie (por ejemplo, ser humano) para designar para diseñar secuencias codificantes de inmunoglobulina afines a partir de secuencias de anticuerpos conocidas en otra especie (por ejemplo, ratón) (véase, por ejemplo, la sección de Ejemplos a continuación).

Las secuencias de nucleótidos de las transcripciones de las cadenas pesada y ligera de un hibridoma pueden usarse para diseñar un conjunto solapante de oligonucleótidos sintéticos para crear secuencias de V sintéticas con capacidades de codificación de aminoácidos idénticas a las de las secuencias naturales. Las secuencias sintéticas de las cadenas pesada y kappa pueden diferir de las secuencias naturales de tres maneras: las cadenas de bases de nucleótidos repetidas se interrumpen para facilitar la síntesis de oligonucleótidos y la amplificación por PCR; se incorporan sitios óptimos de inicio de la traducción según las reglas de Kozak (Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266L19867019870); y se modifican por ingeniería sitios HindIII en el sentido de 5' de los sitios de inicio de la traducción.

Para las regiones variables tanto de cadena pesada como ligera, las secuencias de hebra codificante y no codificante correspondiente optimizadas se descomponen en 30-50 nucleótidos aproximadamente en el punto medio

5 del oligonucleótido no codificante correspondiente. De este modo, para cada cadena, los oligonucleótidos pueden ensamblarse en conjuntos bicatenarios solapantes que abarcan segmentos de 150-400 nucleótidos. Los grupos se usan luego como moldes para producir productos de amplificación por PCR de 150-400 nucleótidos. Normalmente, un único conjunto de oligonucleótidos de región variable se descompondrá en dos grupos que se amplifican por separado para generar dos productos de PCR solapantes. Estos productos solapantes se combinan luego mediante amplificación por PCR para formar la región variable completa. También puede ser deseable incluir un fragmento solapante de la región constante de cadena pesada o ligera en la amplificación por PCR para generar fragmentos que puedan clonarse fácilmente para dar los constructos del vector de expresión.

10 Las regiones variables de cadenas pesada y ligera reconstruidas se combinan luego con el promotor clonado, la secuencia líder, la secuencia de inicio de la traducción, la secuencia líder, la región constante, el extremo 3' no traducido, las secuencias de poliadenilación y terminación de la transcripción para formar constructos de vector de expresión. Los constructos de expresión de cadenas pesada y ligera pueden combinarse en un único vector, cotransfектarse, transfecitarse en serie o transfecitarse por separado en células huésped que luego se fusionan para 15 formar una célula huésped que expresa ambas cadenas.

20 Se conocen en la técnica plásmidos para este uso e incluyen los plásmidos proporcionados en la sección de Ejemplos a continuación. Los anticuerpos completamente humanos y quiméricos de la presente divulgación también incluyen anticuerpos IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA, IgM e IgD, y variantes y mutantes de los mismos. Pueden construirse plásmidos similares para la expresión de otros isotipos de cadena pesada, o para la expresión de anticuerpos que comprenden cadenas ligeras lambda.

25 Por tanto, en un aspecto de la presente divulgación, las características estructurales de los anticuerpos conocidos, humanos o no humanos (por ejemplo, un anticuerpo de ratón anti-C1q de ser humano, tal como el anticuerpo monoclonal M1 producido por la línea celular de hibridoma que tiene el número de registro de la ATCC PTA-120399) se usan para crear anticuerpos anti-C1q de ser humano relacionados estructuralmente que conservan al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la presente divulgación, tal como la unión a una proteína C1q. Otra propiedad funcional incluye la inhibición de la unión del anticuerpo monoclonal M1 a C1q en un ensayo ELISA de competencia. En algunas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q de ser humano relacionados estructuralmente tienen una afinidad de unión comparable al antígeno en comparación con el anticuerpo monoclonal M1, tal como se mide mediante el valor de Cl_{50} tal como se describe en la sección de Ejemplos a continuación. En algunas implementaciones, los anticuerpos anti-C1q de ser humano relacionados estructuralmente tienen una mayor afinidad por el antígeno en comparación con el anticuerpo monoclonal M1, tal como se mide mediante el valor de Cl_{50} , tal como se describe en la sección de Ejemplos a continuación. Además, una o más regiones CDR o variables de un 30 anticuerpo anti-C1q (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal M1 producido por la línea celular de hibridoma que tiene el número de registro de la ATCC PTA-120399) puede combinarse de manera recombinante con regiones de marco y CDR humanas conocidas para crear anticuerpos anti-C1q de ser humano adicionales, modificados por ingeniería de manera recombinante, de la presente divulgación.

35

40 Puesto que se conoce bien en la técnica que los dominios de CDR3 de cadenas pesada y ligera de anticuerpos desempeñan un papel particularmente importante en la especificidad/afinidad de unión de un anticuerpo por un antígeno, los anticuerpos recombinantes de la presente divulgación preparados tal como se expuso anteriormente pueden, en algunas implementaciones, comprender las CDR3 de cadenas pesada y ligera de regiones variables del anticuerpo monoclonal M1 producido por la línea celular de hibridoma que tiene el número de registro de la ATCC 45 PTA-120399. En algunas implementaciones, los anticuerpos pueden comprender además las CDR2 de regiones variables del anticuerpo monoclonal M1. En algunas implementaciones, los anticuerpos pueden comprender además las CDR1 de regiones variables del anticuerpo monoclonal M1. En algunas implementaciones, los anticuerpos pueden comprender además cualquier combinación de las CDR.

50 En algunas implementaciones, las regiones CDR1, 2 y/o 3 de los anticuerpos modificados por ingeniería descritos anteriormente pueden comprender la(s) secuencia(s) de aminoácidos exacta(s) a las de las regiones variables del anticuerpo monoclonal M1 producido por la línea celular de hibridoma que tiene el número de registro de la ATCC PTA-120399. Sin embargo, el experto habitual apreciará que puede ser posible cierta desviación de las secuencias de CDR exactas mientras que todavía se conserva la capacidad del anticuerpo para unirse a C1q de manera efectiva (por ejemplo, modificaciones de secuencia conservativas). Por consiguiente, en otra implementación, el anticuerpo modificado por ingeniería puede componerse de una o más CDR que son, por ejemplo, el 50 %, 60 %, 55 70 %, 80 %, 85%, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 99,5 % idénticas a una o más CDR del anticuerpo monoclonal M1.

60 *Fragmentos de anticuerpo*

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

65 Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos

fragmentos se derivaban mediante la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véanse, por ejemplo, Morimoto *et al.*, J. Biochem. Biophys. Method. 24:107-117 (1992); y Brennan *et al.*, Science 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos ahora pueden producirse directamente mediante células huésped recombinantes, por ejemplo, usando ácidos nucleicos que codifican para anticuerpos anti-C1q de la presente divulgación. Todos y cada uno de los 5 fragmentos Fab, Fv y scFv de anticuerpo pueden expresarse en, y secretarse a partir de, *E. coli*, permitiendo de ese modo la producción directa de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo anti-C1q también pueden aislararse a partir de las bibliotecas de fagos de anticuerpos tal como se comentó anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente a partir de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, Bio/Technology 10:163-167 (1992)). Según otro 10 enfoque, los fragmentos F(ab')₂ pueden aislararse directamente a partir de un cultivo de células huésped recombinantes. La producción de fragmentos de anticuerpo Fab y F(ab')₂ con mayores semivididas *in vivo* se describe en la patente estadounidense n.º 5.869.046. En otras implementaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv). Véanse el documento WO 93/16185, la patente estadounidense n.º 5.571.894 y la 15 patente estadounidense n.º 5.587.458. El anticuerpo anti-C1q, anti-C1r o el fragmento de anticuerpo anti-C1q también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, tal como se describe en la patente estadounidense 5.641.870. Tales fragmentos de anticuerpo lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

Anticuerpos biespecíficos y poliespecíficos

20 En algunas implementaciones, los anticuerpos de la presente divulgación abarcan anticuerpos biespecíficos y anticuerpos poliespecíficos.

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

30 Los métodos para preparar anticuerpos biespecíficos se conocen en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas presentan especificidades diferentes. Millstein *et al.*, Nature, 305:537-539 (1983). Debido a la selección aleatoria de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una posible mezcla de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales sólo 35 una presenta la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa y los rendimientos del producto son bajos. Se dan a conocer procedimientos similares en el documento WO 93/08829 y en Traunecker *et al.*, EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

40 Según un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión puede ser con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, C_H2 y C_H3. En algunas implementaciones, la primera región constante de cadena pesada (C_H1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera está presente en al menos una de las 45 fusiones. Se insertan ADN que codifican para las fusiones de cadenas pesadas de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina en vectores de expresión independientes y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad para ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipeptido en implementaciones cuando razones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos 50 dos cadenas polipeptídicas en razones iguales da como resultado altos rendimientos o cuando las razones no tienen ninguna importancia particular.

55 En algunas implementaciones de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos por una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se halló que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado a partir de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo la mitad de las moléculas biespecíficas proporciona un modo fácil de separación. Este 60 enfoque se da a conocer en el documento WO 94/04690. Para más detalles de la generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, Methods in Enzymology 121: 210 (1986).

Según otro enfoque descrito en el documento WO 96/27011 o la patente estadounidense n.º 5.731.168, la superficie de contacto entre un par de moléculas de anticuerpo puede modificarse por ingeniería para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan a partir del cultivo celular recombinante. La superficie de contacto puede comprender al menos una parte de la región C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o 65

5 más cadenas laterales de aminoácido pequeñas de la superficie de contacto de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de un tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) en la superficie de contacto de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando las cadenas laterales de aminoácido grandes por unas más 10 pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero con respecto a otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

10 En la bibliografía se han descrito técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse usando unión química. Brennan *et al.*, Science 229:81 (1985) describen un procedimiento en el que los anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para 15 generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol arsenito de sodio para estabilizar los dítoles vecinos y prevenir la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten entonces en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte entonces en el derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

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

25 También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo bivalentes directamente a partir de cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido heterodímeros bivalentes usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de cremalleras de leucina de las 30 proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Se redujeron los homodímeros de anticuerpo en la región bisagra para formar monómeros y luego volvieron a oxidarse para formar los heterodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpos" descrita por Hollinger *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos/bivalentes. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) mediante un ligador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento 35 se fuerzan a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando de ese modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha notificado otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos/bivalentes mediante el uso de dímeros de Fv de cadena sencilla (sFv). Véase Gruber *et al.*, J. Immunol., 152:5368 (1994).

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

45 Los anticuerpos biespecíficos ejemplificativos pueden unirse a dos antígenos diferentes. En algunas implementaciones, un anticuerpo biespecífico se une a un primer antígeno, C1q, y a un segundo antígeno que facilita el transporte a través de la barrera hematoencefálica. En la técnica se conocen numerosos antígenos que facilitan el transporte a través de la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, Gabathuler R., Approaches to 50 transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases, Neurobiol. Dis. 37 (2010) 48-57). Tales segundos antígenos incluyen, sin limitación, receptor de transferrina (TR), receptor de insulina (HIR), receptor de factor de crecimiento similar a la insulina (IGFR), proteínas relacionadas con el receptor de lipoproteínas de baja densidad 1 y 2 (LPR-1 y 2), receptor de toxina diftérica, incluyendo CRM197 (un mutante no tóxico de la toxina diftérica), anticuerpos de un solo dominio de llama tales como TMEM 30(A) (flipasa), dominios de transducción de proteínas tales como TAT, Syn-B o penetratina, poliarginina o en general péptidos cargados positivamente y péptidos de angiopep tales como ANG1005 (véase, por ejemplo, Gabathuler, 2010).

55 Anticuerpos multivalentes

60 En algunas implementaciones, los anticuerpos de la presente divulgación abarcan anticuerpos multivalentes. Un multivalente anticuerpo puede internalizarse (y/o catabolizarse) más rápido que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos anti-C1q de la presente divulgación o fragmentos de anticuerpo de los mismos pueden ser anticuerpos multivalentes (que son distintos de la clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que pueden producirse fácilmente mediante la expresión recombinante de un ácido nucleico que codifica para las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. En algunas implementaciones, el dominio de dimerización comprende una región Fc o una región bisagra. 65 En esta situación, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno amino-terminales con respecto a la región Fc. En algunas implementaciones, el anticuerpo multivalente en el presente documento

contiene de tres a aproximadamente ocho, y en algunas implementaciones cuatro, sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente contiene al menos una cadena polipeptídica (y en algunas implementaciones dos cadenas polipeptídicas), en el que la(s) cadena(s) polipeptídica(s) comprende(n) dos o más dominios variables. Por ejemplo, la(s) cadena(s) polipeptídica(s) puede(n) comprender VD1-(X1)n-VD2-(X2)n-Fc, donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido y n es 0 ó 1. De manera similar, la(s) cadena(s) polipeptídica(s) puede(n) comprender la cadena V_H-C_H1-ligador flexible-V_H-C_H1-región Fc; o la cadena V_H-C_H1-V_H-C_H1-región Fc. El anticuerpo multivalente en el presente documento puede comprender además al menos dos (y en algunas implementaciones cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente en el presente documento puede comprender, por ejemplo, desde aproximadamente dos hasta aproximadamente ocho polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de cadena ligera contemplados en este caso comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, comprenden además un dominio C_L.

15 *Anticuerpos heteroconjugados*

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

Modificación por ingeniería de funciones efectoras

35 En algunas implementaciones, también puede ser deseable modificar un anticuerpo anti-C1q humanizado de la presente divulgación para modificar la función efectora y/o para aumentar la semivida sérica del anticuerpo. Por ejemplo, el sitio de unión al receptor de Fc en la región constante puede modificarse o mutarse para eliminar o reducir la afinidad de unión a determinados receptores de Fc, tales como Fc_γRI, Fc_γRII y/o Fc_γRIII. En algunas implementaciones, la función efectora se altera mediante la eliminación de la N-glicosilación de la región Fc (por ejemplo, en el dominio C_H2 de IgG) del anticuerpo. En algunas implementaciones, la función efectora se altera mediante la modificación de regiones tales como 233-236, 297 y/o 327-331 de IgG humana tal como se describe en el documento PCT WO 99/58572 y Armour *et al.*, Molecular Immunology 40: 585-593 (2003); Reddy *et al.*, J. Immunology 164:1925-1933 (2000).

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

pyogenes que digiere selectivamente glicanos unidos a asparagina en la cadena pesada de todas las subclases de IgG, sin acción sobre otras clases de inmunoglobulina u otras glicoproteínas (Collin *et al.* (2001) EMBO J 2001;20:3046-3055).

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

10 *Otras modificaciones de secuencias de aminoácidos*

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

- 25 Un método útil para la identificación de determinados residuos o determinadas regiones del anticuerpo anti-C1q que son ubicaciones preferidas para la mutagénesis se denomina “mutagénesis de barrido mediante alanina” tal como se describe por Cunningham y Wells en Science, 244:1081-1085 (1989). En este caso, se identifica un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se reemplaza por un aminoácido neutro o cargado negativamente (lo más preferiblemente alanina o polialanina) para afectar a la 30 interacción de los aminoácidos con el antígeno diana. Esas ubicaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan entonces mediante la introducción de variantes adicionales u otras en, o para, los sitios de sustitución. Por tanto, aunque el sitio para la introducción de una variación de secuencia de aminoácidos es predeterminado, no es necesario que la naturaleza de la mutación por sí misma sea 35 predeterminada. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se lleva a cabo mutagénesis de barrido mediante alanina o al azar en el codón o la región diana y se criban las variantes de anticuerpo expresadas para determinar la actividad deseada.

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

- 45 Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácido. Estas variantes tienen al menos un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo reemplazado por un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis por sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan las alteraciones de FR. Las sustituciones conservadoras se muestran en la tabla A a continuación bajo el encabezado de “sustituciones preferidas”. Si tales sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces pueden 50 introducirse más cambios sustanciales, denominados “sustituciones ejemplificativas” en la tabla A, o tal como se describe adicionalmente a continuación en referencia a las clases de aminoácidos, y cribarse los productos.

TABLA A: Sustituciones de aminoácidos

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

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

- 10 (1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
15 (2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr;
15 (3) ácidos: asp, glu;
15 (4) básicos: asn, gin, his, lys, arg;
20 (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y
20 (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

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

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

En algunas implementaciones, la variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo anti-C1q humanizado o humano). Generalmente, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo parental a partir del cual se generan. Un modo conveniente para generar tales variantes de sustitución implica maduración por afinidad usando presentación en fago. Brevemente, se mutan varios sitios de región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Las variantes de anticuerpo así generadas se presentan de manera monovalente desde partículas de fago

filamentosas como fusiones con el producto del gen III de M13 empaquetado dentro de cada partícula. Las variantes sometidas a presentación en fago se criban entonces para determinar su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) tal como se da a conocer en el presente documento. Con el fin de identificar sitios de región hipervariante candidatos para la modificación, puede realizarse mutagénesis de barrido mediante alanina para identificar residuos de región hipervariante que contribuyen significativamente a la unión al antígeno. Alternativa o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno (por ejemplo, una proteína C1q de la presente divulgación). Tales residuos de contacto y los residuos vecinos son candidatos para la sustitución según las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez generadas tales variantes, el panel de variantes se somete a cribado tal como se describe en el presente documento y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes pueden seleccionarse para su desarrollo adicional.

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

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

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

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

Otras modificaciones de anticuerpos

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

Ácidos nucleicos, vectores y células huésped

Los anticuerpos anti-C1q humanizados de la presente divulgación pueden producirse usando métodos y composiciones recombinantes, por ejemplo, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 4.816.567. En algunas implementaciones, se proporcionan ácidos nucleicos aislados que tienen una secuencia de nucleótidos que codifica para cualquiera de los anticuerpos anti-C1q de la presente divulgación. Tales ácidos nucleicos pueden codificar para una secuencia de aminoácidos que contiene V_L y/o una secuencia de aminoácidos que contiene V_H del anticuerpo anti-C1q (por ejemplo, las cadenas ligera y/o pesada del anticuerpo). En algunas implementaciones, se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que contienen tales ácidos nucleicos. En

algunas implementaciones, también se proporciona una célula huésped que contiene tal ácido nucleico. En algunas implementaciones, la célula huésped contiene (por ejemplo, se ha transducido con): (1) un vector que contiene un ácido nucleico que codifica para una secuencia de aminoácidos que contiene V_L del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que contiene V_H del anticuerpo, o (2) un primer vector que contiene un ácido nucleico que codifica para una secuencia de aminoácidos que contiene V_L del anticuerpo y un segundo vector que contiene un ácido nucleico que codifica para una secuencia de aminoácidos que contiene V_H del anticuerpo. En algunas implementaciones, la célula huésped es eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfóide (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp20).

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

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

Los vectores adecuados que contienen una secuencia de ácido nucleico que codifica para cualquiera de los anticuerpos anti-C1q de la presente divulgación, o fragmentos de los mismos y polipéptidos (incluyendo anticuerpos), descritos en el presente documento incluyen, sin limitación, vectores de clonación y vectores de expresión. Pueden construirse vectores de clonación adecuados según técnicas convencionales, o pueden seleccionarse de un gran número de vectores de clonación disponibles en la técnica. Aunque el vector de clonación seleccionado puede variar según la célula huésped que pretende usarse, los vectores de clonación útiles generalmente tienen la capacidad de autorreplicarse, pueden presentar una única diana para una endonucleasa de restricción particular y/o pueden portar genes para un marcador que pueden usarse en la selección de clones que contienen el vector. Los ejemplos adecuados incluyen plásmidos y virus bacterianos, por ejemplo, pUC18, pUC19, Bluescript (por ejemplo, pBS SK+) y sus derivados, mpl8, mpl9, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, ADN de fago y vectores lanzadera tales como psA3 y pAT28. Estos y muchos otros vectores de clonación están disponibles de proveedores comerciales tales como BioRad, Strategene e Invitrogen.

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

45 Los vectores que contienen los ácidos nucleicos de interés pueden introducirse en la célula huésped mediante cualquiera de varios medios apropiados, incluyendo electroporación; transfección empleando cloruro de calcio, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAE-dextrano u otras sustancias; bombardeo de microproyectiles; lipofección; e infección (por ejemplo, donde el vector es un agente infeccioso tal como virus de la vacuna). La elección de 50 introducir los vectores o polinucleótidos a menudo dependerá de las características de la célula huésped. En algunas implementaciones, el vector contiene un ácido nucleico que contiene una o más secuencias de aminoácidos que codifican para un anticuerpo anti-C1q de la presente divulgación.

Las células huésped adecuadas para la clonación o expresión de vectores que codifican para anticuerpos incluyen células procariotas o eucariotas. Por ejemplo, los anticuerpos anti-C1q de la presente divulgación pueden producirse en bacterias, en particular cuando no son necesarias ni función efectora de Fc ni glicosilación. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias (por ejemplo, patentes estadounidenses n.^{os} 5.648.237, 5.789.199 y 5.840.523; y Charlton, Methods in Molecular Biology, vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), páginas 245-254, que describen la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*). Después de la expresión, el anticuerpo puede aislarse a partir de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y puede purificarse adicionalmente.

Además de procariotas, los microorganismos eucariotas, tales como levaduras u hongos filamentosos, también son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican para anticuerpos, incluyendo cepas de levaduras y hongos cuyas rutas de glicosilación se han "humanizado", dando como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glicosilación parcial o totalmente humano (por ejemplo, Gerngross, Nat. Biotech.

22:1409-1414 (2004); y Li *et al.*, Nat. Biotech. 24:210-215 (2006)).

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

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

Composiciones farmacéuticas

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

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

Pueden encontrarse ejemplos adicionales de formulaciones que son adecuadas para diversos tipos de administración en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Filadelfia, PA, 17^a ed. (1985). Para una breve revisión de métodos para la administración de fármacos, véase Langer, Science 249:1527-1533 (1990).

Para administración oral, el principio activo puede administrarse en formas de dosificación sólidas, tales como cápsulas, comprimidos y polvos, o en formas de dosificación líquidas, tales como elixires, jarabes y suspensiones. El/los componente(s) activo(s) puede(n) encapsularse en cápsulas de gelatina junto con principios inactivos y portadores en polvo, tales como glucosa, lactosa, sacarosa, manitol, almidón, celulosa o derivados de celulosa, estearato de magnesio, ácido esteárico, sacarina de sodio, talco, carbonato de magnesio. Ejemplos de principios inactivos adicionales que pueden añadirse para proporcionar características deseables de color, sabor, estabilidad, capacidad tamponante, dispersión u otras características deseables conocidas son óxido de hierro rojo, gel de sílice,

- laurilsulfato de sodio, dióxido de titanio y tinta blanca comestible. Pueden usarse diluyentes similares para preparar comprimidos fabricados mediante compresión. Tanto los comprimidos como las cápsulas pueden fabricarse como productos de liberación sostenida para proporcionar una liberación continua del medicamento a lo largo de un periodo de horas. Los comprimidos fabricados mediante compresión pueden recubrirse con azúcar o recubrirse con película para enmascarar cualquier sabor desagradable y proteger al comprimido de la atmósfera, o recubrirse entéricamente para la disgregación selectiva en el tracto gastrointestinal. Las formas de dosificación líquidas para administración oral pueden contener agentes colorantes y aromatizantes para aumentar la aceptación por parte del paciente.
- 5 Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen disoluciones para inyección estériles isotónicas acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizadores, agentes espesantes, estabilizadores y conservantes.
- 10 Los componentes usados para formular las composiciones farmacéuticas son preferiblemente de alta pureza y están sustancialmente libres de contaminantes potencialmente perjudiciales (por ejemplo, al menos de calidad de alimento nacional (NF), generalmente al menos de calidad analítica y más normalmente al menos de calidad farmacéutica). Además, las composiciones destinadas al uso *in vivo* son habitualmente estériles. En la medida en que un compuesto dado debe sintetizarse antes de su uso, normalmente el producto resultante está sustancialmente libre de cualquier agente potencialmente tóxico, particularmente cualquier endotoxina, que pueda estar presente durante el procedimiento de síntesis o purificación. Las composiciones para administración parental también son estériles, son sustancialmente isotónicas y se preparan en condiciones de BPF.
- 15 Las formulaciones pueden optimizarse para su retención y estabilización en el cerebro o el sistema nervioso central. Cuando el agente se administra al compartimento craneal, es deseable que el agente quede retenido en el compartimento y no difunda o atraviese de otro modo la barrera hematoencefálica. Las técnicas de estabilización incluyen reticulación, multimerización o unión a grupos tales como polietilenglicol, poliacrilamida, portadores proteicos neutros, etc., con el fin de lograr un aumento del peso molecular.
- 20 Otras estrategias para aumentar la retención incluyen el atrapamiento del anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-C1q humanizado de la presente divulgación, en un implante biodegradable o bioerosionable. La tasa de liberación del agente terapéuticamente activo se controla mediante la tasa de transporte a través de la matriz polimérica y la biodegradación del implante. El transporte del fármaco a través de la barrera polimérica también se verá afectado por la solubilidad del compuesto, la hidrofilia del polímero, el grado de reticulación del polímero, la expansión del polímero tras la absorción de agua para hacer que la barrera polimérica sea más permeable al fármaco, la geometría del implante, y similares. Los implantes tienen dimensiones que corresponden con el tamaño y la forma de la región seleccionada como sitio de implantación. Los implantes pueden ser partículas, láminas, parches, placas, fibras, microcápsulas, y similares, y pueden ser de cualquier tamaño o forma compatible con el sitio de inserción seleccionado.
- 25 Los implantes pueden ser monolíticos, es decir, que tienen el agente activo distribuido homogéneamente a través de la matriz polimérica, o estar encapsulados, donde la matriz polimérica encapsula un depósito de agente activo. La selección de la composición polimérica que va a emplearse variará según el sitio de administración, el periodo de tratamiento deseado, la tolerancia del paciente, la naturaleza de la enfermedad que va a tratarse, y similares. Las características de los polímeros incluirán biodegradabilidad en el sitio de implantación, compatibilidad con el agente de interés, facilidad de encapsulación, una semivida en el entorno fisiológico.
- 30 Composiciones poliméricas biodegradables que pueden emplearse pueden ser ésteres o éteres orgánicos, que cuando se degradan dan como resultado productos de degradación fisiológicamente aceptables, incluyendo los monómeros. Pueden emplearse anhídridos, amidas, ortoésteres o similares, por sí mismo o en combinación con otros monómeros. Los polímeros serán polímeros de condensación. Los polímeros pueden ser reticulados o no reticulados. Son de particular interés los polímeros de ácidos carboxílicos hidroxialifáticos, ya sean homopolímeros o copolímeros, y los polisacáridos. Entre los poliésteres de interés se incluyen polímeros de ácido D-láctico, ácido L-láctico, ácido láctico racémico, ácido glicólico, policaprolactona, y combinaciones de los mismos. Mediante el empleo de L-lactato o D-lactato, se logra un polímero que se biodegrada lentamente, mientras que la degradación se potencia sustancialmente con el racemato. Los copolímeros de ácido glicólico y láctico son de particular interés, donde la tasa de biodegradación se controla por la razón de ácido glicólico con respecto a láctico. El copolímero degradado más rápidamente tiene cantidades aproximadamente iguales de ácido glicólico y láctico, donde cualquier homopolímero es más resistente a la degradación. La razón de ácido glicólico con respecto a ácido láctico también afectará a la fragilidad del implante, donde es deseable un implante más flexible para geometrías más grandes. Entre los polisacáridos de interés se encuentran el alginato de calcio y las celulosas funcionalizadas, particularmente ésteres de carboximetilcelulosa caracterizados por ser insolubles en agua, tener un peso molecular de aproximadamente 5 kD a 500 kD, etc. También pueden emplearse hidrogeles biodegradables en los implantes de la presente divulgación. Los hidrogeles son normalmente un material copolimérico caracterizado por la capacidad de embeber un líquido. Se describen hidrogeles biodegradables ejemplificativos que pueden emplearse en Heller en:
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

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

Dosificaciones farmacéuticas

- 5 Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación que contienen un anticuerpo anti-C1q humanizado de la presente divulgación pueden usarse (por ejemplo, administrarse a un individuo que necesita tratamiento con un anticuerpo anti-C1q, tal como un individuo humano) según métodos conocidos, tales como administración intravenosa como bolo o mediante infusión continua a lo largo de un periodo de tiempo, por las vías intramuscular, 10 intraperitoneal, intracerebroespinal, intracraneal, intraespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación.

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

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

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

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

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

55 En la bibliografía se proporciona una guía sobre dosificaciones y métodos de administración particulares; véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.^{os} 4.657.760; 5.206.344; ó 5.225.212. Se encuentra dentro del alcance de la presente divulgación que formulaciones diferentes serán eficaces para tratamientos diferentes y trastornos diferentes, y que la administración destinada a tratar un órgano o tejido específico puede necesitar la administración de una manera diferente con respecto a la de otro órgano o tejido. Además, las dosificaciones pueden administrarse mediante una o más administraciones independientes o mediante infusión continua. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o más, en función de la afección, el tratamiento es sostenido hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas posológicas. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

Usos terapéuticos

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

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

Las enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias que pueden tratarse con anticuerpos anti-C1q humanizados de esta divulgación incluyen, sin limitación, artritis reumatoide (AR), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), lesión tisular remota después de isquemia y reperfusión, activación del complemento durante cirugía de circulación extracorpórea, dermatomiositis, pénfigo, nefritis lúpica y glomerulonefritis y vasculitis resultantes, circulación extracorpórea, disfunción endotelial coronaria inducida por cardioplejia, glomerulonefritis membranoproliferativa de tipo II, nefropatía por IgA, insuficiencia renal aguda, crioglobulinemia, síndrome antifosfolipídico, glaucoma crónico de ángulo abierto, glaucoma agudo de ángulo cerrado, enfermedades degenerativas maculares, tales como degeneración macular asociada a la edad (DMAE), (DMAE húmeda), atrofia geográfica, neovascularización coroidea (NVC), uveítis, retinopatía diabética, retinopatía asociada a isquemia, endoftalmitis, enfermedad neovascular intraocular, edema macular diabético, miopía patológica, enfermedad de von Hippel-Lindau, histoplasmosis del ojo, neuromielitis óptica (NMO), oclusión de la vena central retiniana (OVCR), neovascularización corneal, neovascularización retiniana, neuropatía óptica hereditaria de Leber, neuritis óptica, retinopatía de Behcet, neuropatía óptica isquémica, vasculitis retiniana, vasculitis asociada a ANCA, retinopatía de Purtscher, enfermedad de sequedad ocular de Sjögren, DMAE seca, sarcoidosis, arteritis temporal, poliarteritis nodular, esclerosis múltiple, así como alotrasplante, rechazo hiperagudo, hemodiálisis, síndrome de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma y neumonía por aspiración. En algunas implementaciones, la enfermedad autoinmunitaria puede incluir, además, sin limitación, síndrome de Guillain-Barré, miastenia grave, diabetes mellitus de tipo 1, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Addison, celiaquía, enfermedad de Crohn, anemia perniciosa, pénfigo vulgar, vitíligo, anemias hemolíticas autoinmunitarias, síndromes paraneoplásicos, una enfermedad por vasculitis, vasculitis urticarial hipocomplementémica (VUH), polimialgia reumática, arteritis temporal y granulomatosis de Wegener.

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

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

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

Tratamientos de combinación

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

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

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

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

Usos diagnósticos

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

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

X, tomografía computarizada por emisión de fotón único (TCEFU), tomografía computarizada (TC) y tomografía axial computarizada (TAC).

En algunas implementaciones, los métodos de diagnóstico implican detectar las sinapsis en una muestra biológica, tal como una muestra de biopsia, un tejido o una célula. Un anticuerpo anti-C1q humanizado, o un fragmento funcional del mismo, se pone en contacto con la muestra biológica y se detecta el anticuerpo unido a sinapsis. El método de detección puede implicar la cuantificación del anticuerpo unido a sinapsis. La detección del anticuerpo en muestras biológicas puede producirse con cualquier método conocido en la técnica, incluyendo microscopía de inmunofluorescencia, inmunocitoquímica, inmunohistoquímica, ELISA, análisis por FACS, inmunoprecipitación o microtomografía por emisiones de positrones. En determinadas implementaciones, el anticuerpo se radiomarca, por ejemplo con ^{18}F y posteriormente se detecta utilizando análisis mediante microtomografía por emisiones de positrones.

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

Kits

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

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

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

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

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

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

5 **Ejemplos**

Ejemplo 1: Producción de anticuerpos anti-C1q humanizados

10 Introducción

Este ejemplo describe la generación de anticuerpos completamente humanizados a partir del hibridoma murino M1 (que expresa el anticuerpo de ratón anti-C1q de ser humano M1). Se generaron genes de región variable de anticuerpo humano compuestos usando oligonucleótidos sintéticos que codifican para combinaciones de segmentos de secuencias humanas seleccionados. Entonces se clonaron estos en vectores que codifican para la cadena pesada y la cadena ligera kappa humana de IgG4 humana (S241P L248E). Se expresaron de manera estable anticuerpos humanizados en células NS0 (línea celular de mieloma de ratón), se purificaron con proteína A y se sometieron a prueba para determinar la unión a C1q de ser humano usando un ensayo ELISA de competencia contra anticuerpo M1 murino biotinilado. También se sometieron a prueba anticuerpos seleccionados para determinar la unión a C1q de ratón usando ensayo ELISA de competencia contra anticuerpo químérico biotinilado.

20 **Resultados**

Secuenciación de regiones V de anticuerpo anti-C1q de ser humano

25 Se extrajo ARN del sedimento celular de hibridoma que expresa anticuerpo M1 usando un kit RNAqueousR-4PCR (n.º de cat. de Ambion AM1914). Inicialmente, se realizó RT-PCR usando grupos de cebadores degenerados para secuencias señal murinas junto con cebadores de región constante para ambas de IgG e Igκ. Se amplificó ARN de región V de cadena pesada usando un conjunto de seis grupos de cebadores degenerados (HA a HF) y se amplificó ARNm de región V de cadena ligera usando un conjunto de siete grupos de cebadores degenerados para la agrupación κ (KA a KG).

30 Para la región VH, se hallaron productos de amplificación del tamaño esperado en los grupos de cebadores de IgG, HB y HE. Para la región Vκ, se hallaron productos de amplificación del tamaño esperado en los grupos de cebadores kappa, KC, KE, y KG. Se purificaron los productos de PCR obtenidos a partir de cada una de las amplificaciones satisfactorias y se clonaron en un vector de clonación 'TA' (pGEM-T Easy, n.º de cat. de Promega A1360) y se secuenciaron. Se secuenciaron un total de 14 clones de VH y 24 de Vκ.

35 Se identificó un único gen de VH funcional en 14 clones de los grupos de IgG, HB y HE. Se identificó una única secuencia génica de Vκ funcional a partir de 9 clones del grupo de cebadores, KC. La secuencia codificante en 3' en el sentido de 3' de la región variable obtenida a partir de grupos de cebadores de IgG concordó con el isotipo de anticuerpo que era IgG.

40 Se identificó un único gen de Vκ funcional en 14 clones de los grupos de IgG, HB y HE. Se identificó una única secuencia génica de Vκ funcional a partir de 9 clones del grupo de cebadores, KC. La secuencia codificante en 3' en el sentido de 3' de la región variable obtenida a partir de grupos de cebadores de IgG concordó con el isotipo de anticuerpo que era IgG.

45 Las secuencias génicas de VH y Vκ funcionales eran idénticas a las secuencias de hibridoma con la excepción de cinco aminoácidos al comienzo de la secuencia de VH y dos aminoácidos al comienzo de secuencia de Vκ. De la manera más probable, estas diferencias se debían al método de secuenciación, y fueron el resultado de usar cebadores que son degenerados con respecto a la secuencia señal en vez de cebadores que son degenerados con respecto al extremo 5' de regiones V.

50 La secuencia de aminoácidos de VH funcional es:

QVQLQPGAEVLVPGASVKLSCKSSGYHFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGVIHP **NSGSINYNEKFESKATLTVDKSS**
STAYMOLSSLTSEDSAVYYCAGERD**STEVLPM DYWGOGTSVTVSS** (SEQ ID NO: 21).

Las regiones hipervariables (HVR) de VH se representan con texto en negrita y subrayado.

La secuencia de aminoácidos de Vκ funcional es:

DVOITOSPSYLAASPGETITINCRASKSINKYLAWYOEKPGTKNLIIYS**SGSTLOSSG IPSRFSGGGSGTDFTLTISLEP**
EDFAMYCYQQHNEYPLTFGAGTKLEK (SEQ ID NO: 22).

Las regiones hipervariables (HVR) de Vκ se representan con texto en negrita y subrayado.

55 *Construcción de anticuerpo químérico*

60 Las secuencias de VH y Vκ del anticuerpo M1 murino se amplificaron por PCR usando cebadores que introdujeron sitios flanqueantes de enzimas de restricción para la clonación en los vectores de expresión de cadena pesada y kappa de IgG4 (S241P L248E) (figura 1). Se eliminaron los sitios de restricción *Bam*H1, *Hind*III y *Ssp*I de la secuencia de Vκ con el fin de clonar el gen. Se clonó la región VH usando los sitios *Mlu*I e *Hind*III, y se clonó la

región V κ usando los sitios de restricción *BssHII* y *BamHI*. Se confirmaron ambos constructos mediante secuenciación.

Diseño de secuencias de región variable humana compuestas

5 Se elaboraron modelos estructurales de las regiones V del anticuerpo M1 murino usando Swiss PDB y se analizaron para identificar aminoácidos "limitantes" importantes en las regiones V que probablemente fueran esenciales para las propiedades de unión del anticuerpo. La mayoría de los residuos contenidos en las HVR (usando las definiciones tanto de Kabat como de Chothia) junto con una serie de residuos de marco se consideraron importantes. Las 10 secuencias de VH y V κ de M1 contienen residuos de marco típicos y los motivos de HVR 1, 2 y 3 son comparables en muchos anticuerpos murinos.

A partir del análisis anterior, se consideró que podían crearse secuencias humanas compuestas de M1 con una 15 amplia latitud para residuos alternativos fuera de las HVR pero sólo con un menú reducido de posibles residuos dentro de las secuencias de HVR. El análisis preliminar indicó que los segmentos de secuencia correspondientes de varios anticuerpos humanos podían combinarse para crear HVR similares o idénticas a las de las secuencias murinas. Para regiones fuera de y flanqueando las HVR, se identificó una amplia selección de segmentos de 20 secuencia humanos como posibles componentes de las nuevas regiones V humanizadas.

20 *Evitación de epítopos de células T CD4⁺*

Basándose en el análisis estructural, se seleccionó y analizó un gran conjunto preliminar de segmentos de 25 secuencia que podían usarse para crear variantes de M1 humanizadas usando la tecnología iTope™ para análisis *in silico* de la unión de péptidos a alelos del CMH humano de clase II (Perry, LCA et al. Drugs R D. 2008;9(6):385-96), y usando la base de datos de epítopos de células T TCED™ de epítopos de células T relacionados con secuencias 30 de anticuerpos conocidos (Bryson, CJ et al. BioDrugs. 1 de feb. de 2010;24(1):1-8). Se descartaron los segmentos de secuencia que se identificaron como agentes de unión significativos de línea germinal no humana para el CMH humano de clase II o que obtuvieron coincidencias significativas frente al TCED™. Esto dio como resultado un conjunto reducido de segmentos, y se analizaron de nuevo combinaciones de estos, tal como se indicó anteriormente, para garantizar que las uniones entre segmentos no contuvieran epítopos potenciales de células T. Los segmentos de secuencia seleccionados se ensamblaron para dar secuencias de región V completas que 35 carecían de epítopos de células T significativos. Luego se eligieron cuatro secuencias de cadena pesada (VH1-VH4) y cuatro secuencias de cadena ligera (V κ 1-V κ 4) para la síntesis génica, la expresión en células de mamíferos, y pruebas de actividad.

35 *Secuencias de dominios variables de cadenas pesada y ligera humanizados*

Usando técnicas convencionales, se determinaron las secuencias de aminoácidos y de ácido nucleico que codifican 40 para las variantes de dominio variable de cadena pesada (VH) y de dominio variable de cadena ligera kappa (V κ).

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

QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKSSGYHFTSYWMHWVKQAPGQGLEWIGVIHP **NSGSINYNEKFESKATITVKST**
STAYMOLSSLTSEOSAVYYCAGERD**STEVLPM DYWGQGT**TVSS (SEQ ID NO: 1).

Las regiones hipervariables (HVR) de VH1 se representan con texto en negrita y subrayado.

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

QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKSSGYHFTSYWMHWVKQAPGQGLEWIGVIHP **NSGSINYNEKFESRATITVKST**
STAYMELSSLRSED**TAVYYCAGERDSTEVLPM DYWGQGT**TVSS (SEQ ID NO: 2).

Las regiones hipervariables (HVR) de VH2 se representan con texto en negrita y subrayado.

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

QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKSSGYHFTSYWMHWVKQAPGQGLEWIGVIHP **NSGSINYNEKFESRVTITVKST**
STAYMELSSLRSED**TAVYYCAGERDSTEVLPM DYWGQGT**TVSS (SEQ ID NO: 3).

Las regiones hipervariables (HVR) de VH3 se representan con texto en negrita y subrayado.

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

QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKSSGYHFTSYWMHWVKQAPGQGLEWIGVIHP **NSGSINYNEKFESRVTITVKST**
STAYMELSSLRSED**TAVYYCAGERDSTEVLPM DYWGQGT**TVSS (SEQ ID NO: 4).

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

60 En algunas realizaciones, HVR-H1 de uno cualquiera de VH1, VH2, VH3 o VH4 tiene la secuencia GYHFTSYWMH (SEQ ID NO: 23), HVR-H2 de uno cualquiera de VH1, VH2, VH3 o VH4 tiene la secuencia VIHPNSGSINYNEKFES (SEQ ID NO: 24), y HVR-H3 de uno cualquiera de VH1, VH2, VH3 o VH4 tiene la secuencia ERDSTEVLPMDY (SEQ ID NO: 25).

La secuencia de ácido nucleico que codifica para la variante 1 de dominio variable de cadena pesada (VH1) es:

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGGGCTGAGCTGAAGAAGCCTGGGCTTCAGT
GAAGGTTCTGCAAGTCTCTGGCTACCATTCACCAGCTACTGGATGCACTG
GGTGAAGCAGGCCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGTGATTCATCCTA
ATAGTGGTAGTATTAACATACAATGAGAAGTCGAGAGCAAGGCCACAATTACT
GTAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGA
GGACTCGGCGGTCTATTATTGTGCAGGAGAGAGAGATTCTACGGAGGTTCTCCC
TATGGACTACTGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 26).

- 5 La secuencia de ácido nucleico que codifica para la variante 2 de dominio variable de cadena pesada (VH2) es:

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGGGCTGAGCTGAAGAAGCCTGGGCTTCAGT
GAAGGTTCTGCAAGTCTCTGGCTACCATTCACCAGCTACTGGATGCACTG
GGTGAAGCAGGCCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGTGATTCATCCTA
ATAGTGGTAGTATTAACATACAATGAGAAGTCGAGAGCAGAGCCACAATTACT
GTAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGA
GGACACGGCGGTCTATTATTGTGCAGGAGAGAGAGATTCTACGGAGGTTCTCC
CTATGGACTACTGGGTCAAGGAACCAACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 27).

- 10 La secuencia de ácido nucleico que codifica para la variante 3 de dominio variable de cadena pesada (VH3) es:

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGGGCTGAGCTGAAGAAGCCTGGGCTTCAGT
GAAGGTTCTGCAAGTCTCTGGCTACCATTCACCAGCTACTGGATGCACTG
GGTGAAGCAGGCCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGTGATTCATCCTA
ATAGTGGTAGTATTAACATACAATGAGAAGTCGAGAGCAGAGTCACAATTACT
GTAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGA
GGACACGGCGGTCTATTATTGTGCAGGAGAGAGAGATTCTACGGAGGTTCTCC
CTATGGACTACTGGGTCAAGGAACCAACGGTCACCGTCTCCTCAG (SEQ ID NO: 28).

La secuencia de ácido nucleico que codifica para la variante 4 de dominio variable de cadena pesada (VH4) es:

**CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGGCTGAGCTGAAGAAGCCTGGGGCTTCAGT
GAAGGTTCTGCAAGTCTTCTGGCTACCATTCACCAAGCTACTGGATGCACTG
GGTGCACAGGCCCTGGACAAGGCCTGAGTGGATTGGAGTGATTCATCCTA
ATAGTGGTAGTATTAACATACAATGAGAAGTCGAGAGCAGAGTCACAATTACT
GTAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGA
GGACACGGCGGTCTATTATTGTGCAGGAGAGAGAGATTCTACGGAGGTTCTCC
CTATGGACTACTGGGTCAAGGAACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:
29).**

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

5 DVOITOSPSYLAASLGERATINRASKSINKYLAWYOOOKPGKTNKLLIYSGSTLOS GIPARFSGSGSGTDFTLTISSE
PEDFAMYYCQQHNEYPLTFGOGTKLEIK (SEQ ID NO: 5).

Las regiones hipervariables (HVR) de V κ 1 se representan con texto en negrita y subrayado.

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

10 DVOITOSPSSLSASLGERATINRASKSINKYLAWYOOOKPGKANKLLIYSGSTLOS GIPARFSGSGSGTDFTLTISSE
PEDFAMYYCQQHNEYPLTFGOGTKLEIK (SEQ ID NO: 6).

Las regiones hipervariables (HVR) de V κ 2 se representan con texto en negrita y subrayado.

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

15 DVOITOSPSSLSASLGERATINRASKSINKYLAWYOOOKPGKAPKLLIYSGSTLOS GIPARFSGSGSGTDFTLTISSE
PEDFAMYYCQQHNEYPLTFGOGTKLEIK (SEQ ID NO: 7).

Las regiones hipervariables (HVR) de V κ 3 se representan con texto en negrita y subrayado.

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

20 DIOLTOSPSSLSASLGERATINRASKSINKYLAWYOOOKPGKAPKLLIYSGSTLQSG IPARFSGSGSGTDFTLTISSE
EDFAMYYCQQHNEYPLTFGGQTKLEIK (SEQ ID NO: 8).

Las regiones hipervariables (HVR) de V κ 4 se representan con texto en negrita y subrayado.

En algunas realizaciones, HVR-L1 de cualquiera de V κ 1, V κ 2, V κ 3 o V κ 4 tiene la secuencia RASKSINKYLA (SEQ ID NO: 30), HVR-L2 de cualquiera de V κ 1, V κ 2, V κ 3 o V κ 4 tiene la secuencia SGSTLQS (SEQ ID NO: 31), y HVR-L3 de cualquiera de V κ 1, V κ 2, V κ 3 o V κ 4 tiene la secuencia QQHNEYPLT (SEQ ID NO: 32).

La secuencia de ácido nucleico que codifica para la variante 1 de dominio variable de cadena ligera kappa (V κ 1) es:

**GATGTCCAGATCACACAGTCTCCATCTTATCTTGTGCATCTCTCGGAGAAAGA
GCTACTATTAAATTGCAGGGCAAGTAAGAGCATTAACAAATACTTAGCCTGGTAT
CAACAGAAACCTGGAAAACTAATAAGCTCCTATCTACTCTGGCTCCACTTG
CAATCTGGATTCCAGCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTCACT
CTCACCATCAGTAGCCTGGAGCCTGAAGATTTCGAATGTATTACTGTCAACAA
CATATAATGAATAACCCGCTCACGTTGGTCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAA
(SEQ ID NO: 33).**

30

La secuencia de ácido nucleico que codifica para la variante 2 de dominio variable de cadena ligera kappa (V κ 2) es:

GATGTCCAGATCACACAGTCTCCATCTTCCCTTCTGCATCTCTCGGAGAAAGA
 GCTACTATTAAATTGCAGGGCAAGTAAGAGCATTAAACAAATACTTAGCCTGGTAT
 CAACAGAAACCTGGAAAGCTAATAAGCTCCTTATCTACTCTGGCTCCACTTG
 CAATCTGGAATTCCAGCAAGGTTAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTCACT
 CTCACCACAGTAGCCTGGAGCCTGAAGATTGCAATGTATTACTGTCAACAA
 CATAATGAATACCCGCTCACGTTGGTCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAA
 (SEQ ID NO: 34).

5 La secuencia de ácido nucleico que codifica para la variante 3 de dominio variable de cadena ligera kappa (V κ 3) es:

GATGTCCAGATCACACAGTCTCCATCTTCCCTTCTGCATCTCTCGGAGAAAGA
 GCTACTATTAAATTGCAGGGCAAGTAAGAGCATTAAACAAATACTTAGCCTGGTAT
 CAACAGAAACCTGGAAAGCTCCTAAGCTCCTTATCTACTCTGGCTCCACTTG
 CAATCTGGAATTCCAGCAAGGTTAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTCACT
 CTCACCACAGTAGCCTGGAGCCTGAAGATTGCAATGTATTACTGTCAACAA
 CATAATGAATACCCGCTCACGTTGGTCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAA
 (SEQ ID NO: 35).

La secuencia de ácido nucleico que codifica para la variante 4 de dominio variable de cadena ligera kappa (V κ 4) es:

10 GATATTCAAGCTCACACAGTCTCCATCTTCCCTTCTGCATCTCTCGGAGAAAGA
 GCTACTATTAAATTGCAGGGCAAGTAAGAGCATTAAACAAATACTTAGCCTGGTAT
 CAACAGAAACCTGGAAAGCTCCTAAGCTCCTTATCTACTCTGGCTCCACTTG
 CAATCTGGAATTCCAGCAAGGTTAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTCACT
 CTCACCACAGTAGCCTGGAGCCTGAAGATTGCAATGTATTACTGTCAACAA
 CATAATGAATACCCGCTCACGTTGGTCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAA
 (SEQ ID NO: 36).

Secuencias de dominio constante de cadena pesada de IgG4 humana (S241P L248E)

15 Usando técnicas convencionales, se determinaron las secuencias de aminoácidos y de ácido nucleico que codifican para el dominio constante de cadena pesada de IgG4 humana (S241P L248E) (es decir, CH1, CH2, CH3, y región bisagra).

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

20 ASTKGPSVFPLAPOSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTFPAPL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
 KTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP~~PC~~PAPEF EGGPSVFLFPPPKD~~T~~LMSRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF
 NWYVQGV~~E~~VHN~~A~~KT KPREEQFNSTYRVVSVLVLHQDWLN~~G~~KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTL
 PPSQEEMTKNQVSLTOLVKG~~F~~YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSF~~F~~LYSRLTVOKSRW-
 QEGNVFSCSV~~M~~HEALHNHYTQKSL~~S~~SLGK (SEQ ID NO: 37).

La mutación S241P y la mutación L248E se muestran con texto en negrita y subrayado.

La secuencia de aminoácidos de CH1 de IgG4 humana (S241P L248E) es:

**ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPABL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVVDHKPSNTKVDKRV (SEQ ID NO: 38).**

- 5 La secuencia de aminoácidos de la región bisagra de IgG4 humana (S241P L248E) es: **ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO: 39).** La mutación S241P se representa con texto en negrita y subrayado.

La secuencia de aminoácidos de CH2 de IgG4 humana (S241P L248E) es:

APEFE~~G~~GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVL
10 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK (SEQ ID NO: 40).

La mutación L248E se representa con texto en negrita y subrayado.

La secuencia de aminoácidos de CH3 de IgG4 humana (S241P L248E) es:

**GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSGK (SEQ
15 ID NO: 41).**

La secuencia de ácido nucleico que codifica para el dominio constante de cadena pesada de IgG4 humana (S241P L248E) es:

GTAAGCTTCTGGGCAGGCCGGCCTGACTTGGCTGGGGCAGGGAGGGGG
CTAAGGTGACGCAGGTGGCGCCAGCCAGGTGCACACCCAATGCCATGAGCCC
AGACACTGGACCCTGCATGGACCATCGCGGATAGACAAGAACCGAGGGGCCTC
TGCGCCCTGGCCCAGCTCTGTCCCACACCGCGGTACATGGCACCACCTCT
TGCAGCTCCACCAAGGGCCATCCGTCTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAG
CACCTCCAGAGACACAGCCGCCCTGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTCCCCG
AACCGGTGACGGTGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACC
TTCCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACC
GTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAATGTAGATCACAA
GCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGA
GGGAGGGTGTCTGCTGGAGCCAGGCTCAGCCCTGCCTGGACGCACCCCG

GCTGTGCAGCCCCAGCCCAGGGCAGCAAGGCAGGCCCATCTGTCTCCTCACCT
 GGAGGCCTCTGACCACCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGCTTCTGGATTTTC
 CACCAGGCTCCGGGCAGCCACAGGCTGGATGCCCTACCCAGGCCCTGCGCA
 TACAGGGGCAGGTGCTGCGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGGGAGGACC
 CTGCCCTGACCTAACGCCACCCAAAGGCCAAACTCTCCACTCCCTCAGCTCA
 GACACCTTCTCTCCTCCCAGATCTGAGTAACTCCCAATCTTCTCTGCAGAGTC
 CAAATATGGTCCCCATGCCACCATGCCAGGTAAGCCAACCCAGGCCCTCGC
 CCTCCAGCTCAAGGCAGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAG
 GCCCCAGCCGGGTGCTGACGCATCCACCTCCATCTTCCCTCAGCACCTGAGTT
 CGAGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCAT
 GATCTCCCGAACCCCTGAGGTACCGTGCCTGGTGGACGTGAGCCAGGAAG
 ACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
 AAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAGTTAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT
 CCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG
 TCTCCAACAAAGGCCCTCCGTCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAA
 GGTGGGACCCACGGGTGCGAGGCCACATGGACAGAGGTAGCTCGGCCAC
 CCTCTGCCCTGGGAGTGACCGCTGTGCCAACCTCTGCCCTACAGGGCAGCCCC
 GAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAAC
 CAGGTCACTGACCTGCCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATGCCGTG
 GAGTGGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCGT
 GCTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAG
 CAGGTGGCAGGAGGGAAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTTGCA
 CAACCAACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTGGTAAA (SEQ ID NO:
 42).

La secuencia de ácido nucleico que codifica para CH1 de cadena pesada de IgG4 humana (S241P L248E) es:

CTTCCACCAAGGGCCATCCGTCTCCCCCTGGGCCCTGCTCCAGGAGCACCT
 CCGAGAGCACAGCCGCCCTGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG
 GTGACGGTGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGGTGCACACCTTCCC
 GGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCC
 CTCCAGCAGCTGGCACGAAGACCTACACCTGCAATGTAGATACAAGCCCA
 GCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTG (SEQ ID NO: 43).

La secuencia de ácido nucleico que codifica para la región bisagra de cadena pesada de IgG4 humana (S241P L248E) es:

AGTCCAAATATGGTCCCCATGCCACCATGCCAG (SEQ ID NO: 44).

La secuencia de ácido nucleico que codifica para CH2 de cadena pesada de IgG4 humana (S241P L248E) es:

CACCTGAGTCGAGGGGGGACCATCAGTCTCCTGTTCCCCCAAAACCCAAGG
 ACACTCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGACGTGA
 GCCAGGAAGACCCCGAGGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTG
 CATAATGCCAAGACAAAGCCGCAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGT
 GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACA
 AGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCA
 AAGCCAAAG (SEQ ID NO: 45).

- 5 La secuencia de ácido nucleico que codifica para CH3 de cadena pesada de IgG4 humana (S241P L248E) es:

GGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCTCATCCCAGGGAGGAGATG
 ACCAAGAACCAAGGTCAAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGA
 CATCGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACC
 ACGCCTCCCGTGGACTCCGACGGCTCCTCTTCCTCTACAGCAGGCTAACCC
 GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA
 TGAGGCTCTGCACAAACCACTACACACAGAACAGGCCTCTCCCTGTCTGGGTAA
 A (SEQ ID NO: 46).

- 10 La figura 2 muestra una alineación de las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) de M1 y las secuencias de aminoácidos de las variantes de VH humanizadas, VH1-VH4, y de las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena ligera kappa (V κ) de M1 y las secuencias de aminoácidos de las variantes de V κ humanizadas, V κ 1-V κ 4.

Construcción de variantes de anticuerpos humanos compuestas

- 15 Todos los genes de las regiones VH y V κ variantes para M1 se sintetizaron usando una serie de oligonucleótidos solapantes que se hibridaron, ligaron y amplificaron por PCR para dar regiones V sintéticas de longitud completa con todos los sitios de restricción eliminados. Las variantes ensambladas se clonaron luego directamente en el sistema de vector de expresión pANT para la cadena pesada y la cadena ligera kappa de IgG4 (S241 L248E) (figura 1). Se clonó la región VH usando los sitios *Mlu*I y *Hind*III y se clonó la región V κ usando sitios de restricción *Bss*HII y *Bam*HI. Se confirmaron todos los constructos mediante secuenciación.

Expresión y purificación de anticuerpos

- 25 Un total de 16 anticuerpos completamente humanizados se transfecaron de manera estable en células NS0 mediante electroporación. Además, se incluyeron el anticuerpo M1 químérico junto con dos controles: VH químérico (ChVH) con la variante V κ 1 y la variante VH1 con V κ químérico (ChV κ). Se seleccionaron transfectantes estables usando metotrexato 200 nM (n.^o de cat. de Sigma M8407). Se analizaron las colonias resistentes a metotrexato para cada constructo para determinar los niveles de expresión de IgG usando un ELISA de IgG4, y se seleccionaron las 30 líneas con mejor expresión, se expandieron y se congelaron con nitrógeno líquido. Se logró una transfección satisfactoria y una selección de clones estables para las 16 variantes de M1 humanizadas, así como para los anticuerpos químéricos M1, ChVH/V κ 1 y VH1/ChV κ . La identidad de cada línea celular se confirmó mediante la secuenciación de ADN de los dominios variables a partir de ADN genómico.
- 35 Los anticuerpos se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivo celular en una columna de proteína A-Sepharose (n.^o de cat. de GE Healthcare 110034-93), se intercambió el tampón en PBS, pH 7,4 y se cuantificaron mediante DO_{280 nm} usando un coeficiente de extinción basado en las secuencias de aminoácidos predichas. Las variantes de IgG químéricas y humanizadas se analizaron mediante SDS-PAGE. Se observaron bandas correspondientes a los 40 tamaños predichos de las cadenas VH y V κ sin evidencias de agregación, degradación u otras características inusuales (figura 3).

ELISA de competencia contra el antígeno C1q de ser humano

Se analizó la unión de las variantes de M1 humanizadas a C1q de ser humano mediante ELISA de competencia. Se premezcló una serie de diluciones triples del anticuerpo de prueba (de 5 µg/ml a 0,002 µg/ml) con una concentración constante de anticuerpo M1 de ratón biotinilado (0,02 µg/ml, concentración final) antes de incubarse durante 1 hora a 37 °C con agitación en placas recubiertas previamente con C1q de ser humano a 1,0 µg/ml. La unión del anticuerpo M1 de ratón se detectó con conjugado de estreptavidina-peroxidasa (n.º de cat. de Sigma-Aldrich S5512) y sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) (n.º de cat. de Thermo Scientific 34029). La reacción se detuvo con HCl 1 M, se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas MRX TC II de Dynex Technologies y se representaron gráficamente las curvas de unión.

La figura 4 muestra que todas las variantes de M1 humanizadas generadas tienen perfiles de unión similares al anticuerpo M1 químérico. Las curvas de unión se usaron para calcular los valores de CI_{50} (concentración del anticuerpo de prueba que inhibe la unión del competidor marcado en el 50 %) para cada anticuerpo normalizado a la CI_{50} , también se compararon los rendimientos de anticuerpos y M1 químéricos de los transfectantes NS0 (tabla 1).

TABLA 1: Valores de CI_{50} relativos de unión a C1q de ser humano y niveles de expresión de proteínas

Anticuerpo	CI_{50} relativa	Niveles de expresión (µg/ml)
M1 químérico	1,00	12,6
ChV1/V κ 1	1,09	7,0
VH1/ChV κ	0,92	11,9
VH1/V κ 1	0,90	14,0
VH1/V κ 2	0,84	14,5
VH1/V κ 3	0,91	28,9
VH1/V κ 4	0,80	22,6
VH2/V κ 1	1,15	1,4
VH2/V κ 2	1,12	3,8
VH2/V κ 3	0,75	21,3
VH2/V κ 4	0,72	6,1
VH3/V κ 1	0,65	16,9
VH3/V κ 2	0,82	8,7
VH3/V κ 3	0,63	19,8
VH3/V κ 4	0,83	32,2
VH4/V κ 1	1,03	8,5
VH4/V κ 2	0,84	1,6
VH4/V κ 3	0,77	18,3
VH4/V κ 4	0,92	2,4

La tabla 1 muestra los valores de CI_{50} relativa calculados para las variantes de M1 humanizadas que se unen a C1q de ser humano y los niveles de expresión de proteínas de la línea celular NS0 correspondiente.

Los datos de CI_{50} normalizados todas las variantes sometidas a prueba oscilaron entre 0,63 y 1,15, lo que indica que las eficacias de unión de todos los anticuerpos M1 completamente humanizados a C1q de ser humano fueron comparables a la del M1 químérico. Además, la mayoría de las variantes humanizadas lograron un aumento del nivel de expresión en comparación con el anticuerpo químérico.

ELISA de competencia contra el antígeno C1q de ratón

Se analizó la unión de las variantes de M1 humanizadas a C1q de ratón mediante ELISA de competencia con cuatro anticuerpos seleccionados, VH1/V κ 1, VH3/V κ 3, VH3/V κ 4 y VH4/V κ 3. También se incluyó un anticuerpo de IgG4 irrelevante (S241P L248E) como control de unión. Se premezcló una serie de diluciones triples del anticuerpo de prueba (de 100 µg/ml a 0,046 µg/ml) con una concentración constante de anticuerpo M1 químérico biotinilado (0,03 µg/ml, concentración final) antes de incubarse durante 1 hora a 37 °C con agitación en placas recubiertas previamente con C1q de ratón a 5,0 µg/ml. La unión del anticuerpo M1 químérico se detectó con conjugado de estreptavidina-peroxidasa (n.º de cat. de Sigma-Aldrich S5512) y sustrato TMB (n.º de cat. de Thermo Scientific 34029). La reacción se detuvo con HCl 1M, se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas MRX TC II de Dynex Technologies y se representaron gráficamente las curvas de unión.

La figura 5 muestra que las variantes de M1 humanizadas generadas tienen perfiles de unión similares al anticuerpo M1 químérico. Las curvas de unión se usaron para calcular los valores de CI_{50} de cada anticuerpo normalizados a la CI_{50} del M1 químérico (tabla 2).

TABLA 2: Valores de Cl₅₀ relativa para la unión a C1q de ratón

Anticuerpo	Cl ₅₀ relativa
M1 químérico	1,00
VH1/V _k 1	1,62
VH3/V _k 3	1,50
VH3/V _k 4	1,91
VH4/V _k 3	1,84

La tabla 2 muestra los valores de Cl₅₀ relativa calculados para variantes de M1 humanizadas que se unen a C1q de ratón.

Conclusión

Los genes de la región V del anticuerpo murino M1 se clonaron en vectores para generar un anticuerpo químérico que comprendía las regiones V murinas combinadas con la región constante de cadena pesada de IgG4 humana (S241P L248E) y regiones constantes de cadena ligera κ. Además, se diseñaron y construyeron una serie de cuatro regiones VH humanizadas para IgG4 (S241P L248E) y cuatro regiones V_k humanizadas.

El anticuerpo químérico y las combinaciones de genes de la región V humanizados (16 anticuerpos en total) se expresaron en células NS0, se purificaron y se analizó su unión a C1q de ser humano en un ensayo ELISA de competencia. Los datos de unión (tabla 1) se usaron para clasificar las variantes de M1 humanizadas en comparación con el anticuerpo M1 químérico. No se detectaron diferencias significativas en la calidad de las bandas de cadenas pesada y ligera mediante SDS-PAGE.

Ejemplo 2: Caracterización cinética del anticuerpo anti-C1q humanizado VH3/V_k3

Introducción

Biosensores inmunológicos, por ejemplo, los instrumentos de resonancia de plasmón superficial (SPR) Biacore™, que miden la unión y disociación de complejos antígeno-anticuerpo en tiempo real, permiten dilucidar la cinética de unión. La velocidad de disociación y su posterior optimización son especialmente importantes para el desarrollo de anticuerpos biofarmacéuticos.

Biacore usa SPR para monitorizar la interacción entre una molécula unida a la superficie (un "ligando") y su pareja de unión en la disolución (un "analito"), en tiempo real. SPR es un fenómeno de onda de densidad de carga electrónica que surge en la superficie de una capa metálica cuando se refleja la luz en la capa en condiciones de reflectancia interna total. Los plasmones de superficie que se generan son sensibles a cualquier cambio en el índice de refracción del medio en el lado opuesto de la capa metálica de la luz reflejada. Las interacciones proteína-proteína que se producen en la superficie afectan al índice de refracción del medio y, por tanto, pueden detectarse.

La unión de moléculas a la superficie del sensor modificado por ligando genera una respuesta que es proporcional a la masa unida, lo que permite detectar pequeños cambios en la cantidad de analito unido (hasta bajos niveles de picogramos). La técnica puede usarse para medir las constantes de afinidad (K_D) en el rango de 10⁻⁵ M a 10⁻¹² M, constantes de velocidad de asociación (k_a) de entre 10³ M⁻¹s⁻¹ y 10⁷ M⁻¹s⁻¹, y constantes de velocidad de disociación (k_d) de entre 10⁻¹ s⁻¹ y 10⁻⁶ s⁻¹.

La técnica requiere sólo pequeñas cantidades de material y ambas biomoléculas que interactúan pueden usarse sin necesidad de etiquetas. Sin embargo, el diseño experimental es importante, ya que algunas características de la tecnología, y el hecho de que una de las proteínas debe estar adherida a la superficie, pueden dar lugar a resultados engañosos (Huber y Mueller, Curr Pharm Des. 2006;12(31):3999-4021; y Lakey y Raggett, Curr Opin Struct Biol., 1998. 8(1): págs. 119-123).

Este ejemplo describe la caracterización cinética de la interacción entre el anticuerpo anti-C1q humanizado VH3/V_k3 (tanto el fragmento Fab como la IgG de longitud completa) y la proteína C1q utilizando el instrumento de resonancia plasmónica de superficie Biacore T200 para alta resolución.

Materiales y métodos

Muestras

Los reactivos usados en este ejemplo se enumeran en la tabla 3.

TABLA 3: Muestras

Muestra	Volumen a la concentración (mg/ml)
IgG-VH3/V κ 3	400 μ l a 1,2 mg/ml
Fab-VH3/V κ 3	450 μ l a 0,3 mg/ml
C1q de ratón	4 \times 50 μ l a 1,0 mg/ml
C1q de ser humano	10 \times 50 μ l a 1,0 mg/ml

5 Se almacenaron C1q de ratón y de ser humano a -80 °C, excepto que una vez descongelados se almacenaron a +4 °C. se almacenaron Fab e IgG de VH3/V κ 3 a +4 °C. Una vez diluidas, las disoluciones de C1q se mantuvieron en hielo y se usaron en el plazo de 24 horas.

Equipos

10 Se utilizó un instrumento Biacore T200 (SN: CN 12231) con software de evaluación de Biacore T200 V1.1 (Uppsala, Suecia).

Materiales

15 Se obtuvieron los siguientes materiales de Biacore tal como sigue:

Kit de mantenimiento preventivo n.º 2 de Biacore:	BR-1006-51, n.º de lote 164110
Chips de sensor CM5 de la serie S:	BR-1006-68, n.º de lote 10102398
Kit de acoplamiento de amina:	BR-1000-50, n.º de lote 2027942/41
10 mM Acetato pH 5,0:	BR-1003-51, n.º de lote 21702813
Tampón de desarrollo HBS-EP:	BR-1006-69, n.º de lote 2027942/59

BSA se obtuvo de Sigma (A3294).

20 *Procedimientos*

Todos los experimentos se desarrollaron con el software "wizard" de Biacore. Se usaron los siguientes métodos de Biacore:

25 Inmovilización

Cinética/afinidad

Desorber y desinfectar

30 Resultados

Preparación de Fab de VH3/V κ 3

35 El fragmento Fab del anticuerpo humanizado anti-C1q VH3/V κ 3 se preparó usando un kit de micropreparación de Fab siguiendo el protocolo del fabricante. La concentración inicial de IgG de VH3/V κ 3 de longitud completa fue de 1,88 mg/ml. Para obtener una cantidad suficiente de fragmentos Fab, se dirigieron, agruparon y purificaron 6 reacciones de 225 μ g cada una de IgG de longitud completa. El Fab purificado y la IgG de longitud completa se purificaron adicionalmente mediante cromatografía de exclusión molecular usando una columna Superdex 200 Increase 10/300 GL (n.º de cat. de GE Healthcare 28-9909-44) con PBS 1x como tampón de desarrollo. Las muestras se cuantificaron mediante $D_{280\text{ nm}}$ usando un coeficiente de extinción (CE_(0,1%)) basado en la secuencia de aminoácidos predicha (CE_(0,1%) = 1,45 para IgG de VH3/V κ 3 y 1,4 para Fab de VH3/V κ 3). Ambas muestras se analizaron mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras y reductoras. (figura 6). La figura 6 representa un gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de anticuerpos purificados por filtración en gel. Se cargó 1 μ g de cada muestra en un gel de Bis-Tris al 4-12 % de NuPage (n.º de cat. de Invitrogen NP0322BOX) y se desarrolló a 200 V durante 35 min. El marcador de tamaño (M) es el patrón de proteínas preteñidas PageRuler Plus de Fermentas (n.º de cat. SM1811). El carril 1 muestra el Fab de VH3/V κ 3 en condiciones reducidas; el carril 2 muestra el Fab de VH3/V κ 3 en condiciones no reducidas; el carril 3 muestra IgG de VH3/V κ 3 en condiciones reducidas; y el carril 4 muestra IgG de VH3/V κ 3 en condiciones no reducidas.

50

Preparación de antígenos

5 Se almacenaron las muestras de antígenos C1q de ratón (mC1q) y C1q de ser humano (hC1q) a -80 °C y, tras la descongelación inicial, se prepararon múltiples alícuotas, se volvieron a congelar y se almacenaron a -80 °C. Se realizaron diluciones adicionales de los analitos en HBS-EP (HEPES 10 mM pH 7,4 y NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y P20 al 0,05 % (v/v)) para las series cinéticas.

Preparación de instrumentos

10 Antes de analizar las muestras y durante el estudio, se realizó una verificación del sistema (kit de mantenimiento preventivo n.º 2 de Biacore). Todos los sistemas evaluados pasaron la prueba (bomba de reactivos, refractómetro, inyecciones, ruido, mezclado y selector de tampón), lo que indica que el instrumento funcionaba según los criterios establecidos por el fabricante.

15 Preparación del sistema

20 Tras la inserción de un chip CM5, se preparó el sistema y luego se normalizó con disolución de normalización BIA (kit de mantenimiento preventivo n.º 2 de Biacore). Todas las muestras se analizaron a 25 °C con una gradilla de muestras incubada a 10 °C. El chip se añadió al sistema con HBS-EP usado como tampón de desarrollo; antes de la inmovilización, la superficie del chip se preparó con dos inyecciones de NaOH 50 mM.

Condiciones de inmovilización

25 Debido a preocupaciones sobre la estabilidad, se prepararon dos chips; uno con hC1q y mC1q (chip A11) como ligandos y otro con IgG y Fab (chip A13) como ligandos. La inmovilización para m/hC1q se llevó a cabo a una concentración de proteína de 5 µg/ml en tampón acetato 10 mM pH 5,5, mientras que la inmovilización para IgG y Fab se llevó a cabo a una concentración de proteína de 0,5-2 µg/ml en tampón acetato 10 mM pH 5,0, ambos en un chip sensor CM5 Serie S (Biacore). Los niveles de respuesta finales para los chips A11 y A13 usados en el análisis cinético se muestran en la tabla 4.

30

TABLA 4: Nivel de respuesta final (UR)

	F _c 1	F _c 2	F _c 3	F _c 4
A11	Blanco	hC1q 808,3	mC1q 801,3	mC1q 824,1
A13	Blanco	Fab 10,4	IgG 12,8	IgG 51,9

35 La tabla 4 muestra los niveles finales de inmovilización logrados a partir de los chips A11 y A13 para cada celda de flujo (F_c).

40 Para los experimentos cinéticos, la cantidad de ligando inmovilizado/capturado debe limitarse para evitar efectos de transferencia de masa en la superficie del chip y, de manera ideal, la superficie debe tener una respuesta de unión máxima del analito (R_{\max}) de 100-150 unidades de respuesta (UR). Por tanto, la cantidad de ligando a inmovilizar se calcula usando la ecuación 1:

$$\text{Capacidad de unión de analito (UR)} = \frac{\text{Mw de analito}}{\text{Mw de ligando}} \times \text{ligando inmovilizado (UR)} \times Sm$$

45 Se empleó un MW promedio de 410 kDa (bibliografía y fabricantes de reactivos) tanto para mC1q como para hC1q, 150 kDa para IgG (valor estimado para anticuerpos) y 50 kDa para Fab (estimado). El objetivo era alcanzar 100 UR para R_{\max} y la estequiometría (Sm) como 1, una cantidad objetivo ideal de C1q a inmovilizar sería ~ 820 UR. Debido a las preocupaciones asociadas con la avidez por las superficies con Fab e IgG inmovilizados, la cantidad de ligando inmovilizado se mantuvo lo más baja posible (límite de 10 UR en el software de inmovilización de Biacore).

50

Control de unión no específica (NSB)

55 La unión no específica puede deberse o bien al analito o bien a contaminantes del analito, que interactúan con el ligando (no específico y difícil de detectar), la proteína de captura o la superficie del chip sensor. Al analizar la respuesta del blanco F_c1 en la superficie, después de una concentración relativamente alta (500 nM) y una inyección durante 300 segundos de mC1q y hC1q, se observó una unión no específica (NSB) significativa. Por tanto, se incluyó una etapa de bloqueo adicional, una inmovilización de ligando posterior de BSA 50 µg/ml (acetato 10 mM, pH 4,25) (Moore *et al.*, *MAbs*. Mar.-abr. de 2010;2(2):181-9). La etapa de bloqueo con BSA también se repitió en el canal de referencia (Fc1); para ambos, los niveles de inmovilización fueron de ~8000 UR. No se observó NSB usando Fab o IgG a 500 nM en la superficie de CM5, y a la concentración usada en las series cinéticas, no se observó NSB en la superficie bloqueada con BSA.

Exploración de regeneración

- 5 Cuando se requiera, puede administrarse una única inyección o dos inyecciones secuenciales de 30 segundos de NaCl 1 M / NaOH 50 mM para regenerar todas las superficies. Se introdujo una etapa de espera de 180 segundos después de la última inyección de regeneración para permitir que la superficie se estabilizara antes de comenzar el siguiente ciclo de unión.

Rendimiento de la superficie

- 10 El rendimiento de la superficie se analizó mediante inyecciones de control repetidas del analito al inicio, de manera intercalada y al final de una serie cinética. Se observó una unión estable durante toda la serie cinética, lo que destaca la idoneidad del sistema para el análisis cinético.

Control de transferencia de masa

- 15 La limitación del transporte de masa se produce cuando la velocidad de asociación contiene una componente significativa asociada con la velocidad de transporte del analito hacia y desde la superficie del chip. Cuando se halla que la transferencia de masa es significativa, el análisis cinético resultante podría ser inexacto. La disminución de la densidad del ligando inmovilizado o el aumento de la velocidad de flujo pueden reducir las limitaciones de transporte de masa. A partir de la experiencia previa en el uso de superficies de baja densidad y antígenos de MW similar, se seleccionó una velocidad de flujo de 40 $\mu\text{l}/\text{min}$ para este estudio.

Control de reacciones relacionadas

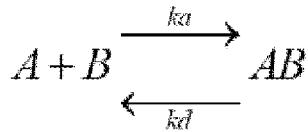
- 20 25 El experimento de control de reacciones relacionadas se usa para evaluar la interacción ligando-analito y comprobar si hay desviaciones con respecto a un modelo de unión 1 a 1. El analito se inyecta sobre la superficie durante diferentes períodos de tiempo (tiempos de contacto) y se analiza la velocidad de disociación para determinar si varía con el tiempo de contacto. Si se observa dicha relación, indica que se está produciendo un segundo acontecimiento de interacción después del acontecimiento de unión inicial que da como resultado un complejo estabilizado en la superficie.

- 30 35 Podría esperarse avidez asociada con un único hC1q que se une a dos anticuerpos si el anticuerpo se emplease como ligando. Por tanto, se realizó un control de reacciones relacionadas para proporcionar evidencias de respaldo para modelos de análisis de datos más complejos.

Análisis cinético

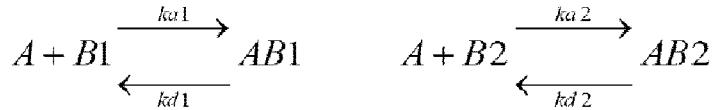
- 40 Inicialmente se supuso un modelo de enlace 1:1 para todas las interacciones ligando/complejo (véase la ecuación 2). Debido a la actividad del ligando y la deriva en la línea base (superficies bloqueadas con BSA), se estableció el parámetro R_{\max} como análisis local en oposición a global para análisis cinéticos seleccionados. Si fue necesario, también se evaluaron modelos adicionales, tales como el ligando heterogéneo (véase la ecuación 3) y unión bivalente (véase la ecuación 4) para determinar la bondad del ajuste.

- 45 Ecuación 2: unión 1 a 1:

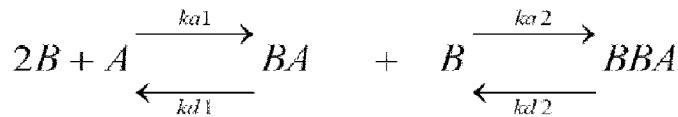


Ecuación 3: ligando heterogéneo

50



Ecuación 4: (avidez) bivalente



5 *Caracterización de anticuerpos*

Ambos complejos C1q se inmovilizaron debido a preocupaciones sobre la avidez (es decir, dos anticuerpos inmovilizados que se unen a C1q) y los niveles muy altos de NSB observados usando mC1q y en menor medida hC1q a la superficie de CM5 (C1q estimado mediado por carga: pl 8-9). Inicialmente se usó la cinética de ciclo único (SCK) para derivar las constantes cinéticas estimadas debido a la incertidumbre sobre la estabilidad del complejo C1q y las condiciones de regeneración. Se realizó un análisis cinético completo después de SCK. Las inyecciones de control de estabilidad de ligando realizadas durante la serie cinética indicaron que las condiciones de regeneración usadas estaban inactivando el ligando o que el ligando en sí mismo era inestable a 25 °C durante las 48 horas requeridas para el análisis cinético. La menor afinidad mostrada por mC1q para Fab permitió realizar el análisis cinético sin regeneración de la superficie.

Debido a problemas de estabilidad, se usaron tanto Fab como IgG como ligandos para el análisis cinético, y se minimizó la cantidad de ligando para evitar una posible avidez.

20 Se obtuvieron datos cinéticos a una velocidad de flujo de 40 µl/min para minimizar los posibles efectos de transferencia de masa. Se programaron dos repeticiones del blanco (sin antígeno) y una única concentración del analito en la serie cinética para comprobar la estabilidad tanto de la superficie como del analito a lo largo de los ciclos cinéticos. Para las series cinéticas iniciales se realizaron diluciones de analito de 3,33 veces. Para el análisis cinético y en las series posteriores se seleccionó un rango de dilución de 2 veces.

25 Se monitorizó la fase de asociación durante 500 segundos para permitir que algunas de las mayores concentraciones de analito alcanzaran el estado estacionario. Para observar una disminución suficiente de la señal ($\geq 10\%$) durante la fase de disociación del ciclo cinético, se midió la disociación durante hasta 10.800 segundos para permitir que se produjera una disociación suficiente para una evaluación precisa de la cinética. La señal del canal de referencia F_c1 se restó de la de F_c2 , F_c3 , y F_c4 .

30 Los parámetros cinéticos para la interacción de mC1q y el fragmento Fab de VH3/Vκ3 en diversos formatos de ensayo se muestran en la tabla 5. El valor de K_D para mC1q cuando se usó como analito fue de 123 nM y el valor de K_D para mC1q cuando se usó como ligando fue de 677 nM. La diferencia en los valores de KD notificados podría deberse al modo de interacción o al efecto del acoplamiento químico de un mC1q de subunidad múltiple a una superficie, lo que da como resultado cambios en la estructura secundaria o terciaria de la proteína.

TABLA 5: Análisis cinético con C1q de ratón

Ligando	Analito	k_a (1/Ms)	SE (k_a)	k_d (1/S)	SE (k_d)	R_{\max} (UR)	SE (R_{\max})	Chi^2 (UR ²)	K_D (nM)
mC1q	Fab de VH3/Vκ3	$6,23 \times 10^3$	$1,4 \times 10^2$	$4,6 \times 10^{-3}$	$1,7 \times 10^{-5}$	37,0	0,6	0,8	747,9
		$6,9 \times 10^3$	$2,4 \times 10^2$	$4,1 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-4}$	33,4	0,5	0,9	606,6
	Media	$6,5 \times 10^3$		$4,3 \times 10^{-3}$		35,2			677,3
	Est.	$5,0 \times 10^2$		$3,1 \times 10^{-4}$		2,6			99,9
Fab de VH3/Vκ3	mC1q	$4,5 \times 10^5$	$2,6 \times 10^4$	$5,6 \times 10^{-2}$	$3,4 \times 10^{-3}$	88,6	0,6	1,9	125,6
		$1,7 \times 10^5$	$1,8 \times 10^3$	$9,1 \times 10^{-3}$	$5,4 \times 10^{-5}$	50,0	0,3	5,6	121,2
	Media	$3,1 \times 10^5$		$3,2 \times 10^{-2}$		69,3			123,4
	Est.	$2,0 \times 10^5$		$3,3 \times 10^{-2}$		27,3			3,1

40 La tabla 5 muestra los parámetros cinéticos para las interacciones 1 a 1 de mC1q y Fab determinadas usando el instrumento Biacore T200. Los valores de Chi^2 muestran cómo de bien se ajustan los datos de asociación y disociación al modelo de unión propuesto. Cuanto menor sea el valor, mejor será el ajuste. Los valores de SE asociados para las constantes de velocidad representan la incertidumbre asociada con el ajuste de los datos al modelo descrito y no representan la incertidumbre total para los valores cinéticos reales. Los datos de respuesta media representan los valores cinéticos promedio y la DE asociada de 2 análisis independientes.

45 Los parámetros cinéticos de las interacciones de IgG y Fab con hC1q se encontraban en el rango picomolar bajo (la tabla 6 para el modelo 1 a 1 y la tabla 7 para el modelo heterogéneo). Para evitar la avidez, inicialmente se usó hC1q como ligando, sin embargo, esto limitó el análisis a la cinética de ciclo único y al uso de modelos más complejos, por ejemplo, modelos de unión de ligando heterogéneo (ecuación 3), que pueden representar las diferentes formas de la estructura de hC1q que se asociaron con el acoplamiento químico de una proteína de

múltiples subunidades a una superficie. Cuando se usó hC1q como analito, tanto IgG como Fab se inmovilizaron a las menores concentraciones posibles para evitar la avidez. Los datos se analizaron usando un modelo 1 a 1 y un modelo de analito bivalente más complejo (ecuación 4). El ajuste del modelo complejo no mejoró significativamente las métricas de ajuste y un control de reacciones relacionadas no mostró una fase de disociación dependiente del tiempo. Los resultados indican que, a la menor densidad de ligando, la unión no se debió predominantemente a la avidez. Usando hC1q como analito, el valor de KD para la IgG de VH3/V κ 3 de longitud completa fue de 5,8 pM y el valor de KD para el Fab de VH3/V κ 3 fue de 8,6. Cabe señalar que la velocidad de disociación fue demasiado lenta para medirla con precisión con esta técnica. Los tiempos de disociación más largos estuvieron limitados por la estabilidad del sistema (capa de bloqueo con BSA) y los bajos niveles de unión usados para evitar la avidez. Estos resultados se correlacionan bien con los resultados obtenidos usando hC1q como ligando.

TABLA 6: Análisis cinético con C1q de ser humano

Ligando	Analito	k_a (1/Ms)	SE (k_a)	k_d (1/S)	SE (k_d)	R_{\max} (UR)	SE (R_{\max})	χ^2 (UR ²)	K_D (nM)
hC1q	Fab de VH3/V κ 3	$5,2 \times 10^4$	82	$4,6 \times 10^{-8}$	$1,3 \times 10^{-7}$	154,9	0,033	14,8	0,87
	IgG de VH3/V κ 3	$3,9 \times 10^4$	96	$3,1 \times 10^{-7}$	$5,3 \times 10^{-8}$	387,9	0,11	206	7,9
Fab de VH3/V κ 3	hC1q	$1,1 \times 10^6$	190	$9,1 \times 10^{-6}$	$1,4 \times 10^{-8}$	13,5	0,0015	0,0773	8,6
IgG de VH3/V κ 3	hC1q	$9,6 \times 10^5$	360	$6,4 \times 10^{-6}$	$2,9 \times 10^{-8}$	6,5	$1,5 \times 10^{-3}$	0,076	6,7
		$1,1 \times 10^6$	190	$5,1 \times 10^{-6}$	$1,4 \times 10^{-8}$	17,4	0,002	0,143	4,9
	Media	$1,0 \times 10^6$		$5,8 \times 10^{-6}$					5,8
	Est.	$6,2 \times 10^4$		$9,1 \times 10^{-7}$					1,3

La tabla 6 muestra los parámetros cinéticos de las interacciones 1 a 1 de hC1q con Fab o IgG, determinadas usando el instrumento Biacore T200. Los datos resaltados en negrita indican criterios de ajuste deficientes, por lo que estos conjuntos de datos se analizaron usando un modelo más complejo (tabla 7).

TABLA 7: Análisis cinético para la interacción de ligando heterogéneo

Ligando	Analito	k_a^1 (1/Ms)	k_d^1 (1/S)	k_a^2 (1/Ms)	k_d^2 (1/S)	R_{\max}^1 (UR)	R_{\max}^2 (UR)	χ^2 (UR ²)	K_D^1 (nM)	K_D^2 (nM)
hC1q	Fab de VH3/V κ 3	$1,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^{-5}$	$1,8 \times 10^4$	$6,3 \times 10^{-8}$	80,3	78,7	0,1	175,0	3,4
	IgG de VH3/V κ 3	$2,0 \times 10^5$	$4,6 \times 10^{-6}$	$1,6 \times 10^4$	$1,1 \times 10^{-7}$	152,6	247,1	2,41	22,7	7,3

La tabla 7 muestra los parámetros cinéticos de las interacciones de ligandos heterogéneos de hC1q y Fab, o IgG, determinadas usando el instrumento Biacore T200. Los datos se ajustan a un modelo de ligando heterogéneo para representar la heterogeneidad esperada de la inmovilización de una proteína de múltiples subunidades en una superficie.

Conclusión

Se analizó la interacción de hC1q y mC1q con la IgG de longitud completa y el fragmento Fab de VH3/V κ 3 usando ambas especies como ligandos. Los problemas con la estabilidad y el acoplamiento químico de los complejos de C1q a la superficie de dextrano CMS requirieron el desarrollo de una superficie de IgG y Fab; los resultados indican que el modo de unión observado con esta superficie fue principalmente 1 a 1, es decir, el perfil cinético no mostró signos de avidez. Tanto la IgG de longitud completa como el fragmento Fab de VH3/V κ 3 mostraron una unión estrecha en el rango picomolar bajo para hC1q (5,8 y 8,6 pM, respectivamente), mientras que se observó una menor afinidad para la unión de mC1q al fragmento Fab de VH3/V κ 3 (123 nM).

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

Los anticuerpos anti-C1q humanizados se sometieron a prueba en ensayos hemolíticos (CH50) en ser humano y roedor para determinar su capacidad para neutralizar C1q y bloquear su activación de la cascada del complemento aguas abajo.

Los anticuerpos anti-C1q humanizados usados en este ejemplo se produjeron tal como se describe en el ejemplo 1. Se usaron los siguientes anticuerpos humanizados del ejemplo 1: el anticuerpo VH1/V κ 1 (2B12), el anticuerpo VH3/V κ 3 (5H7), el anticuerpo VH3/V κ 4 (3F1) y el anticuerpo VH4/V κ 3 (1D3). También se utilizaron como controles el anticuerpo M1 monoclonal de ratón (ANN-005) y el anticuerpo M1 químérico (3E2).

Los ensayos de CH50 se llevaron a cabo esencialmente tal como se describe en Current Protocols in Immunology (1994), suplemento 9, unidad 13.1. Brevemente, se diluyeron 5 microlitros (μl) de suero humano (Cedarlane, Burlington, NC), 0,625 μl de suero de rata Wistar hasta 50 μl de tampón GVB (Cedarlane, Burlington, NC) y se añadieron a 50 μl de los anticuerpos humanizados (1 μg) diluidos en tampón GVB. La mezcla anticuerpo:suero se incubó previamente durante 30 minutos sobre hielo y luego se añadió a 100 μl de células EA ($2 \times 10^8/\text{ml}$) para ensayos tanto en rata como en ser humano. Las células EA se generaron exactamente tal como se especifica en Current Protocols usando sangre de oveja en disolución de Alsever (n.^º de cat. de Cedarlane CL2581) y hemolisina (n.^º de cat. de Cedarlane CL9000). Se incubó la mezcla de células EA, suero y anticuerpo durante 30 minutos a 37 °C y luego se colocó sobre hielo. A continuación, se añadieron 1,2 ml de NaCl 0,15 M a la mezcla y se leyó la DO₄₁₂ de la muestra en un espectrofotómetro para determinar la cantidad de lisis celular. Se determinó el porcentaje de inhibición de los anticuerpos de prueba con respecto a un anticuerpo IgG1 de ratón de control (Abeam, ab18447).

Se sometieron a prueba cuatro anticuerpos de unión a C1q (2B12, 5H7, 3F1 y 1D3) para determinar su actividad neutralizante de C1q en el ensayo de hemólisis de CH50 de ser humano en un formato de dosis-respuesta (figura 7A). Se sometió a prueba cada uno de los anticuerpos en dosis de 3,9 ng, 15,9 ng, 62,5 ng y 260 ng, que corresponden a un rango de dosificación eficaz que da como resultado la unión del anticuerpo anti-C1q a C1q con una estequiometría que oscila entre aproximadamente 10:1 y aproximadamente 1:1. El anticuerpo anti-C1q murino M1 (ANN-005) y el anticuerpo M1 químérico (3E2) se usaron como referencias. El anticuerpo VH3/V κ 3 (5H7) inhibió la hemólisis de CH50 de manera dependiente de la dosis en un grado que fue comparable tanto al anticuerpo M1 murino como al anticuerpo M1 químérico (figura 7A). Además, se requirieron aproximadamente 60 ng del anticuerpo VH3/V κ 3 (5H7), el anticuerpo VH4/V κ 3 (1D3) y el anticuerpo VH1/V κ 1 (2B12) para inhibir el 50 % de la hemólisis observada (figura 7A). Se requirieron aproximadamente 250 ng del anticuerpo VH3/V κ 4 (3F1) para inhibir aproximadamente el 95 % de la hemólisis observada (figura 7A).

También se sometieron a prueba cuatro anticuerpos anti-C1q (2B12, 5H7, 3F1, and 1D3) para determinar su actividad neutralizante de C1q en ensayos de CH50 de rata (figura 7B). Cada uno de los anticuerpos se sometió a prueba en dosis de 3,9 ng, 15,9 ng, 62,5 ng y 260 ng, que corresponden a un rango de dosificación eficaz que da como resultado la unión del anticuerpo anti-C1q a C1q con una estequiometría que oscila entre aproximadamente 10:1 y aproximadamente 1:1. Las pruebas se llevaron a cabo en formatos de dosis-respuesta. Se usaron el anticuerpo anti-C1q murino M1 (ANN-005) y el anticuerpo M1 químérico (3E2) como referencias. El anticuerpo VH1/V κ 1 (2B12) inhibió la hemólisis de CH50 de manera dependiente de la dosis en un grado que fue comparable tanto al anticuerpo murino M1 como al anticuerpo M1 químérico (figura 7B). Además, se requirieron aproximadamente 60 ng del anticuerpo VH1/V κ 1 (2B12), el anticuerpo VH3/V κ 4 (3F1), el anticuerpo VH3/V κ 3 (5H7) y el anticuerpo VH4/V κ 3 (1D3) para inhibir aproximadamente entre el 50 % y el 80 % de la hemólisis observada (figura 7B).

Ejemplo 4: Estudio de dosificación intravenosa en mono para evaluar la farmacocinética del anticuerpo anti-C1q humanizado, los efectos farmacodinámicos sobre los niveles séricos de C1q y la hemólisis mediada por el complemento ex vivo

A macacos cangrejeros se les dosificó un anticuerpo anti-C1q humanizado VH3/V κ 3 (5H7) mediante una única inyección intravenosa (i.v.) en bolo en dosis de 15 y 100 mg/kg (N = 2 por dosis, 1 mono macho y 1 mono hembra por dosis).

Se recogieron muestras de sangre en los siguientes puntos de tiempo: día 1: antes del estudio, 0,5, 2, 4, 8, 12, 24, 72, 96 y 120 horas después de la dosis y los días: 7, 9, 12, 15, 18 y 21. Las muestras de sangre se dejaron coagular, se separó el suero por centrifugación y luego se almacenaron congeladas a -80 °C hasta su análisis.

Determinación de los niveles séricos de VH3/V κ 3 (5H7) a partir de muestras de monos: se midieron los niveles séricos de anticuerpos anti-C1q usando un ELISA directo con hC1q usado como analito de captura, seguido de la detección del anticuerpo 5H7 humano. Se recubrieron placas de ELISA de 96 pocillos de color negro (Corning, n.^º de cat. 3925) con C1q de ser humano (Complement Technology A099) a 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Después de la incubación durante la noche a 4 °C, las placas se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) (Thermo Scientific 28372) y se bloquearon durante la noche a 4 °C con DPBS que contenía BSA al 3 %. Al día siguiente, se retiró la disolución de bloqueo y se añadieron a las placas patrones de 5H7 o muestras de suero individuales en un rango de diluciones (de 2000 a 2000000 veces) a 50 μl por muestra en tampón de ensayo, DPBS que contenía BSA al 0,3 % y Tween al 0,1 % (KPL Inc. 51-12-10). Las muestras se incubaron a temperatura ambiente, agitando a 300 rpm durante 1 hora. Luego, se añadieron 50 μl de anticuerpo de cabra anti-FC de ser humano conjugado con fosfatasa alcalina (Jackson Immuno research, 109-055-098) a una concentración de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en tampón de ensayo. Después de la incubación durante 1 hora a temperatura ambiente, las placas se lavaron tres veces en DPBS que contenía Tween al 0,05 %. Cada lavado se realizó durante 10 minutos con agitación a 300 rpm en un agitador de placas. Luego, las placas se secaron con golpecitos y se revelaron usando una incubación con sustrato de fosfatasa alcalina durante 20 minutos (Life Technologies, n.^º T2214). Los recuentos de luminiscencia se leyeron en un lector Perkin Elmer Envision. Se ajustaron las curvas patrón usando el ajuste

logístico 4PL y los recuentos de señales desconocidas se convirtieron en concentraciones de µg/ml y se representaron gráficamente usando Graphpad Prism.

- 5 Determinación de los niveles séricos de C1q a partir de muestras de monos: se determinaron los niveles séricos de C1q usando dos ensayos ELISA específicos de hC1q distintos. En ambos ensayos ELISA, JL1, un anticuerpo que se une a la cola de colágeno de C1q se usó como anticuerpo de captura (Abeam ab71940). En el primer ensayo, la versión murina de VH3/V κ 3 (5H7) o M1, que se une al mismo sitio que 5H7, se usó como anticuerpo de detección para aislar los niveles de C1q libre. En el segundo ensayo, JL1 se usó como anticuerpo de detección para medir C1q que está tanto libre como unido a ANX en las muestras de suero.
- 10 Se recubrieron placas de ELISA de 96 pocillos de color negro (Corning, n.^o de cat. 3925) con JL1 a 1 µg/ml. Despues de una incubación durante la noche a 4 °C, las placas se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) (Thermo Scientific 28372) y se bloquearon durante la noche con DPBS que contenía BSA al 3 % a 4 °C. Al día siguiente, se retiró la solución de bloqueo y se analizaron los patrones de C1q o las muestras de suero individuales a diluciones en el rango de 1000x a 10000x, en tampón de ensayo DPBS con BSA al 0,3 % y Tween al 0,1 %, a 50 µl por muestra. Despues de la incubación a temperatura ambiente durante 1 hora, se añadieron 50 µl de los respectivos anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina M1 o JL1, a una concentración final de 200-400 ng/ml en el tampón de ensayo. Las muestras se incubaron durante la noche con agitación a 4 °C. Al día siguiente, las placas se lavaron tres veces en DPBS que contenía Tween al 0,05 %. Cada lavado tuvo una duración de 10 minutos con agitación a 300 rpm en un agitador de placas. A continuación, las placas se secaron con golpecitos y se revelaron usando una incubación con sustrato de fosfatasa alcalina durante 20 minutos. Los recuentos de luminiscencia se leyeron en un lector Perkin Elmer Envision. Se ajustaron curvas patrón usando el ajuste logístico 4PL y los recuentos de señales desconocidas se convirtieron a concentración, corrección de dilución y luego se representaron gráficamente usando Graphpad Prism.
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- Determinación de la actividad de hemólisis *ex vivo* en muestras de suero de mono: los ensayos de hemólisis fueron similares a los del ejemplo 3 con la siguiente modificación. Las muestras de suero de mono del estudio se diluyeron 1:50 en disolución tampón GVB++ (Complement Technology Cat# B100) y se mezclaron con un volumen igual de glóbulos rojos de oveja sensibilizados con anticuerpos a 17 millones de células/ml (Complement Technology, n.^o de cat. B201). Las muestras se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Se prepararon pocillos de control para determinar la línea base (sólo tampón sin suero) y el 100 % de hemólisis (usando agua desionizada). A continuación, las muestras se centrifugaron y los sobrenadantes se transfirieron a placas de ELISA transparentes y se leyó la absorbancia a 415 nm. La absorbancia de todas las muestras se restó de la línea base y se normalizó con respecto al 100 % de hemólisis (agua desionizada). En la dilución 1:50, las muestras de suero mostraron el 50-70 % de hemólisis observada con agua. Se representó gráficamente el % de hemólisis para cada mono individual después de la normalización inicial.
- Se observó un aumento dependiente de la dosis en los niveles séricos de 5H7 después de la dosificación i.v. con una exposición máxima de ~250 ug/ml a la dosis de 15 mg/kg y ~2000 ug/ml a la dosis de 100 mg/kg. Los niveles séricos sostenidos de 5H7 fueron evidentes durante los 20 días de muestreo a la dosis de 100 mg/kg, mientras que los niveles séricos de 5H7 disminuyeron hasta niveles por debajo del límite de detección después de 4 días a la dosis de 15 mg/kg (figura 8). Los niveles séricos de C1q (ensayo de JL1-M1) se redujeron > 90 % a lo largo de 5 días a la dosis de 15 mg/kg y se recuperaron de vuelta a los valores iniciales entre 5 y 11 días después del inicio de la dosificación (figura 9A). Por el contrario, la dosis de 100 mg/kg provocó una reducción sostenida de los niveles séricos de C1q hasta 20 días después del inicio de la dosificación (figura 9A). Se observó un patrón similar de reducción y transcurso temporal de C1q sérico con el ensayo de JL1-JL1 (figura 9B). La observación de una reducción robusta y sostenida de C1q sérico en dos ensayos ELISA independientes, uno con un anticuerpo de detección que se une al mismo sitio en C1q que 5H7 y el otro con un anticuerpo de detección contra un sitio independiente en C1q, sugiere que los niveles de C1q séricos se eliminan después del tratamiento con 5H7. En consonancia con la reducción de los niveles de C1q séricos, se observó una reducción sostenida de la hemólisis *ex vivo* a la dosis de 100 mg/kg hasta 20 días después del inicio de la dosificación (figura 10). A la dosis de 15 mg/kg de ANX, se redujo la hemólisis en > 90 % a lo largo de 5 días y se recuperó de vuelta al valor inicial entre 5 y 11 días después del inicio de la dosificación (figura 10).
- Estos resultados demuestran que el anticuerpo anti-C1q VH3/V κ 3 (5H7) muestra una exposición farmacocinética y un transcurso temporal robustos junto con una reducción sostenida de los niveles de C1q séricos y hemólisis en macacos cangrejeros.

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo anti-C1q humanizado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:
 - 5 a) un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5;
 - 10 b) un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8;
 - c) un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; o
 - 15 d) un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.
2. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena pesada de IgG4 humana.
- 20 3. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según la reivindicación 2, en el que la región constante de cadena pesada de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37.
- 25 4. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según la reivindicación 2, en el que la región constante de cadena pesada de IgG4 humana comprende una región Fc y en el que la región Fc comprende una sustitución de aminoácido en la posición 248 y/o la posición 241 según la convención de enumeración de Kabat.
- 30 5. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según la reivindicación 4, en el que la sustitución de aminoácido en la posición 248 es una sustitución de aminoácido de leucina a glutamato.
6. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según la reivindicación 4, en el que la sustitución de aminoácido en la posición 241 es una sustitución de aminoácido de serina a prolina.
- 35 7. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el fragmento de unión a antígeno es un fragmento Fab, F(ab')₂ o Fab'.
8. Polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 40 9. Célula huésped aislada que comprende la secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 8.
10. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 45 11. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según una de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en medicina.
12. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para su uso según la reivindicación 11, en el que el uso en medicina es para tratar o prevenir una enfermedad asociada con la activación del complemento, en el que la enfermedad es un trastorno neurodegenerativo, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmunitaria o un trastorno metabólico.
- 50 13. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para su uso según la reivindicación 12, en el que la enfermedad es un trastorno neurodegenerativo seleccionado de enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, glaucoma, distrofia miotónica, síndrome de Guillain-Barré (SGB), miastenia grave, penfigoide ampolloso, atrofia muscular espinal, síndrome de Down, enfermedad de Parkinson, y enfermedad de Huntington.
- 60 14. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para su uso según la reivindicación 12, en el que la enfermedad es una enfermedad inflamatoria, enfermedad autoinmunitaria o trastorno metabólico seleccionado de diabetes, vitíligo, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Addison, celiaquía, enfermedad de Crohn, anemia perniciosa, miastenia grave, obesidad, anemias hemolíticas autoinmunitarias, síndromes paraneoplásicos, vasculitis urticarial hipocomplementémica (VUH), polimialgia reumática, granulomatosis de Wegener, artritis reumatoide (AR), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), lesión tisular remota después de isquemia y reperfusión, activación del complemento durante cirugía de circulación

5 extracorpórea, dermatomiositis, pénfigo, nefritis lúpica y glomerulonefritis y vasculitis resultantes, circulación extracorpórea, disfunción endotelial coronaria inducida por cardioplejia, glomerulonefritis membranoproliferativa de tipo II, nefropatía por IgA, insuficiencia renal aguda, crioglobulinemia, síndrome antifosfolipídico, glaucoma crónico de ángulo abierto, glaucoma agudo de ángulo cerrado, enfermedades degenerativas maculares, degeneración macular asociada a la edad (DMAE), (DMAE húmeda), atrofia geográfica, neovascularización coroidea (NVC), uveítis, retinopatía diabética, retinopatía asociada a isquemia, endoftalmitis, enfermedad neovascular intraocular, edema macular diabético, miopía patológica, enfermedad de von Hippel-Lindau, histoplasmosis del ojo, neuromielitis óptica (NMO), oclusión de la vena central retiniana (OVCR), neovascularización corneal, neovascularización retiniana, neuropatía óptica hereditaria de Leber, neuritis óptica, retinopatía de Behcet, neuropatía óptica isquémica, vasculitis retiniana, vasculitis asociada a ANCA, retinopatía de Purtscher, enfermedad de sequedad ocular de Sjögren, DMAE seca, sarcoidosis, arteritis temporal, poliarteritis nodular, esclerosis múltiple, alotrasplante, rechazo hiperagudo, hemodiálisis, síndrome de dificultad pulmonar oclusiva crónica (EPOC), asma, y neumonía por aspiración.

10

15

FIGURA 1A

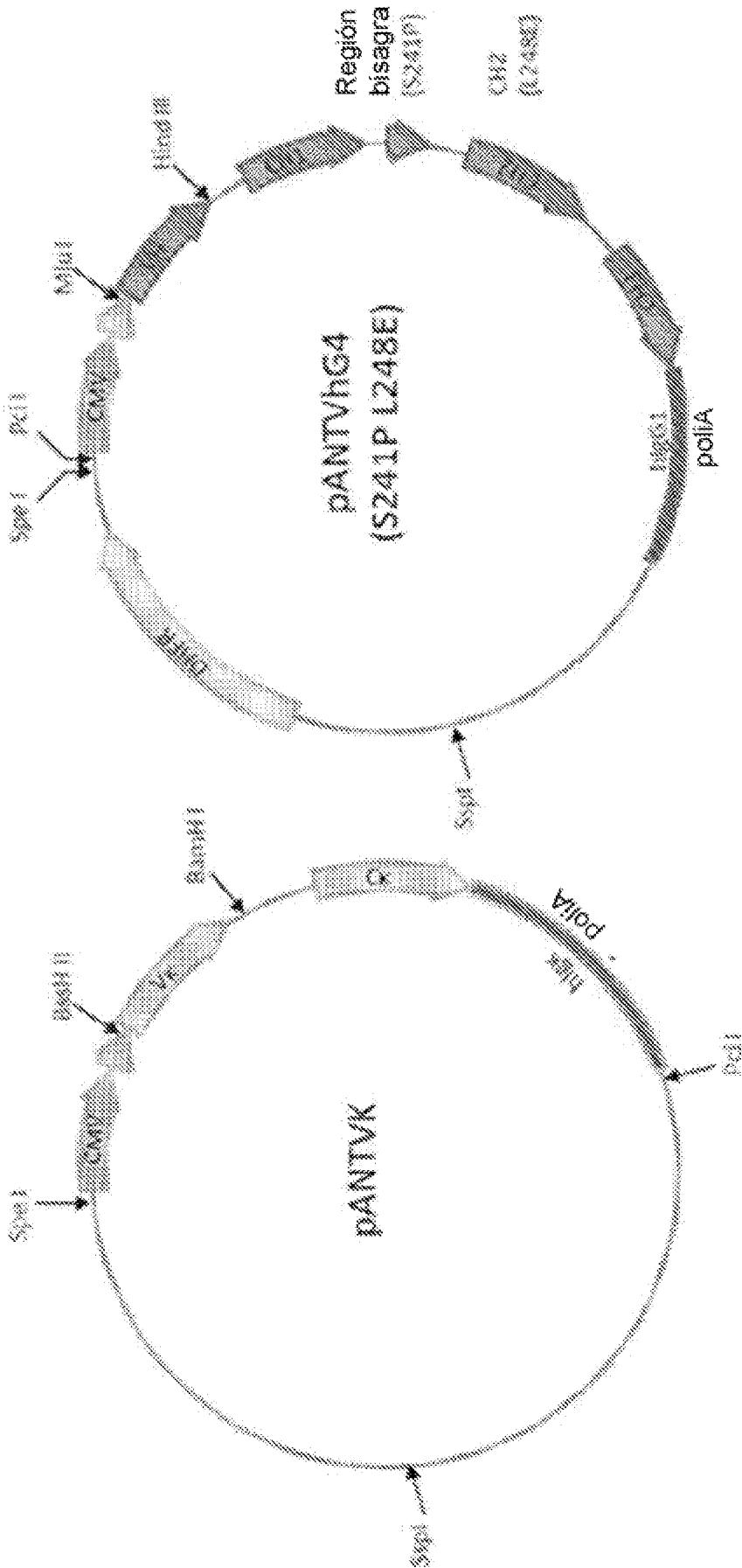


FIGURA 1B

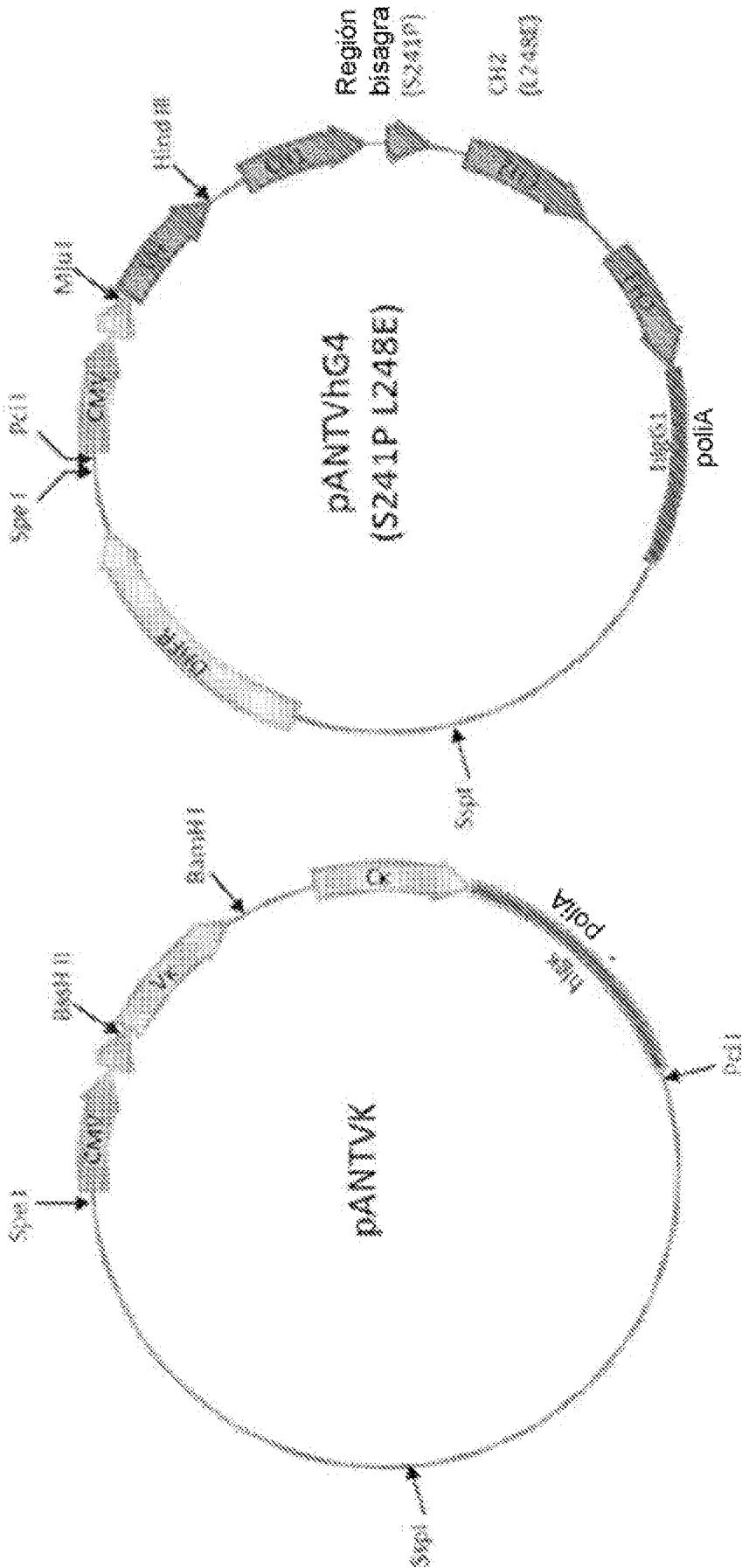


FIGURA 2A

Alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo anti-C1q M1 y las secuencias de aminoácidos de las variantes 1-2 de VH humanizadas

Variante 1 de VH:

M1-VH se refiere al VH del antícuero M1, y VH1 se refiere a la variante 1 de VH. Las tres secuencias CDR se representan en negrita.

Variante 2 de VH:

M1-VH se refiere al VH del anticuerpo M1, y VH2 se refiere a la variante 2 de VH. Las tres secuencias CDR se representan en **negrita**.

FIGURA 2B

Alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo anti-C1q M1 y las secuencias de las variantes 3-4 de VH humanizadas

Variant 3 de VH:

M1_VH se refiere al VH del antícuero M1, y VH3 se refiere a la variante 3 de VH. Las tres secuencias CDR se representan en **negrita**.

Variante 4 de VH:

M1 VH se refiere al VH del anticuerpo M1, y VH4 se refiere a la variante 4 de VH. Las tres secuencias CDR se representan en negrita.

FIGURA 2C

Alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera kappa (V_K) del anticuerpo anti-C1q M1 y las secuencias de las variantes 1-2 de V_K humanizadas

Variant 1 de Vkc:

M1-VK se refiere al VK del anticuerpo M1, VK1 se refiere a la variante 1 de VK. Las tres secuencias CDR se representan en negrita.

Variant 2 de V_K:

M1_VK se refiere al VK del anticuerpo M1, y VK2 se refiere a la variante 2 de VK. Las tres secuencias CDR se representan en negrita.

FIGURA 2D

Alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera kappa (V_K) del anticuerpo anti-C1q M1 y las secuencias de aminoácidos de las variantes 3-4 de V_K humanizadas

Variante 3 de V_K :

M1_VK	3:1_VK3	3:1_VK4	3:2_VK3	3:2_VK4
3:1_VK3	3:1_VK3	3:1_VK3	3:1_VK3	3:1_VK3
3:2_VK3	3:2_VK3	3:2_VK3	3:2_VK3	3:2_VK3
3:2_VK4	3:2_VK4	3:2_VK4	3:2_VK4	3:2_VK4
3:3_VK3	3:3_VK3	3:3_VK3	3:3_VK3	3:3_VK3
3:3_VK4	3:3_VK4	3:3_VK4	3:3_VK4	3:3_VK4
3:4_VK3	3:4_VK3	3:4_VK3	3:4_VK3	3:4_VK3
3:4_VK4	3:4_VK4	3:4_VK4	3:4_VK4	3:4_VK4

M1_VK se refiere al V_K del anticuerpo M1, y VK3 se refiere a la variante 3 de V_K . Las tres secuencias CDR se representan en **negrita**.

Variante 4 de V_K :

M1_VK	3:1_VK3	3:1_VK4	3:2_VK3	3:2_VK4
3:1_VK3	3:1_VK3	3:1_VK3	3:1_VK3	3:1_VK3
3:2_VK3	3:2_VK3	3:2_VK3	3:2_VK3	3:2_VK3
3:2_VK4	3:2_VK4	3:2_VK4	3:2_VK4	3:2_VK4
3:3_VK3	3:3_VK3	3:3_VK3	3:3_VK3	3:3_VK3
3:3_VK4	3:3_VK4	3:3_VK4	3:3_VK4	3:3_VK4
3:4_VK3	3:4_VK3	3:4_VK3	3:4_VK3	3:4_VK3
3:4_VK4	3:4_VK4	3:4_VK4	3:4_VK4	3:4_VK4

M1_VK se refiere al V_K del anticuerpo M1, y VK4 se refiere a la variante 4 de V_K . Las tres secuencias CDR se representan en **negrita**.

FIGURA 3

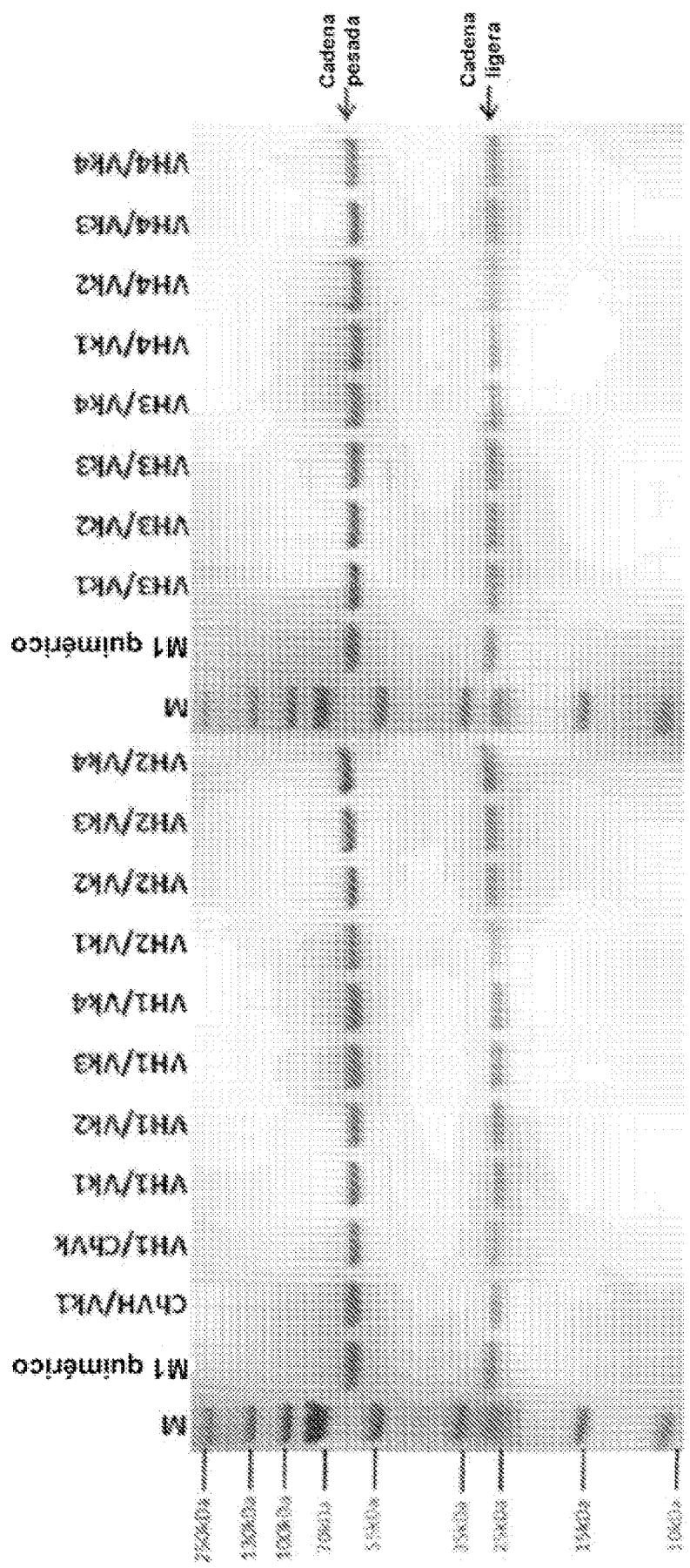


FIGURA 4A

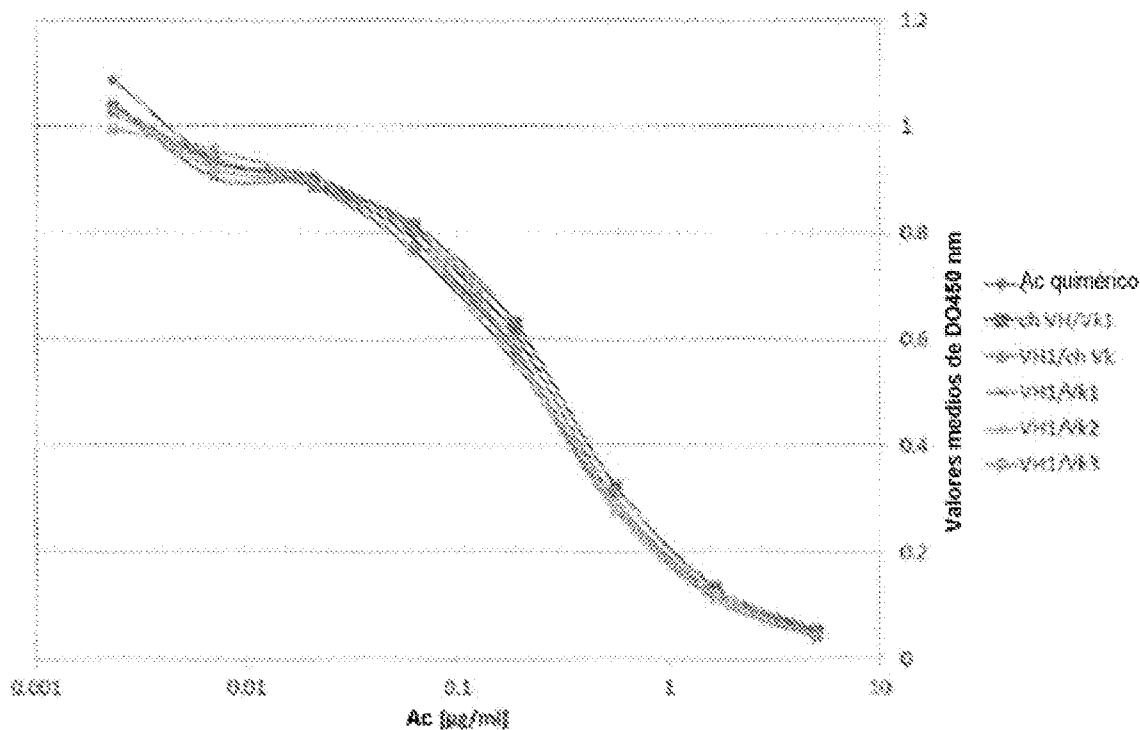


FIGURA 4B

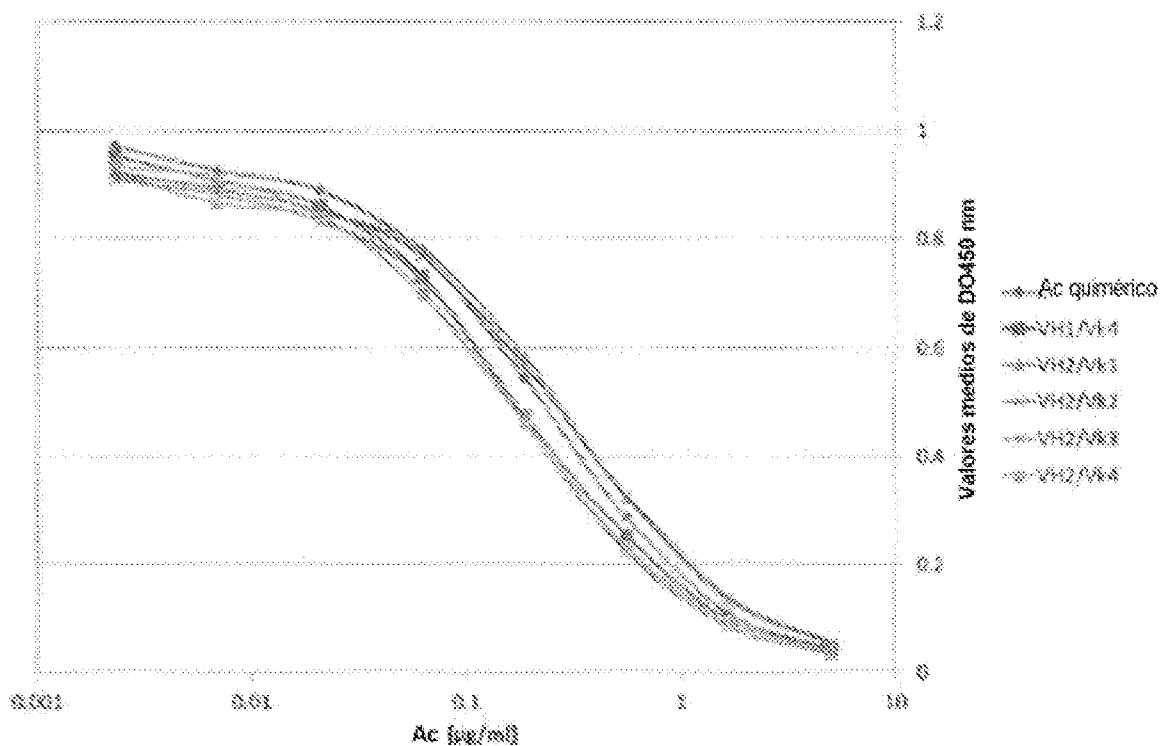


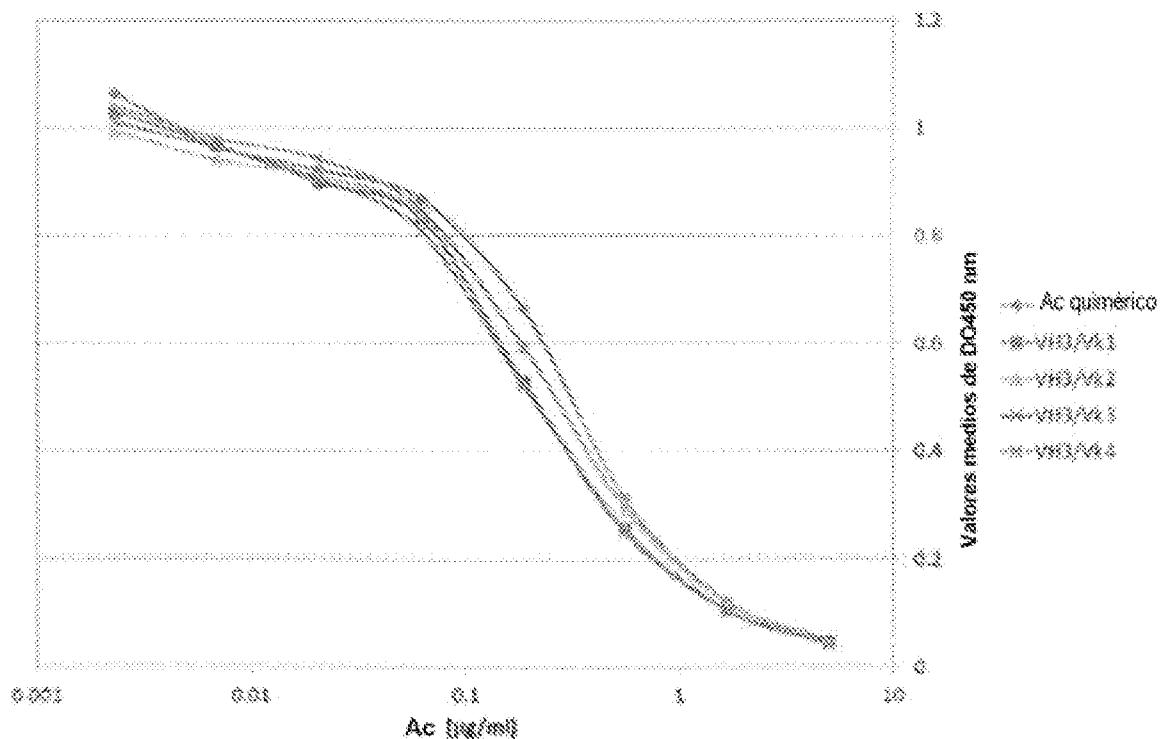
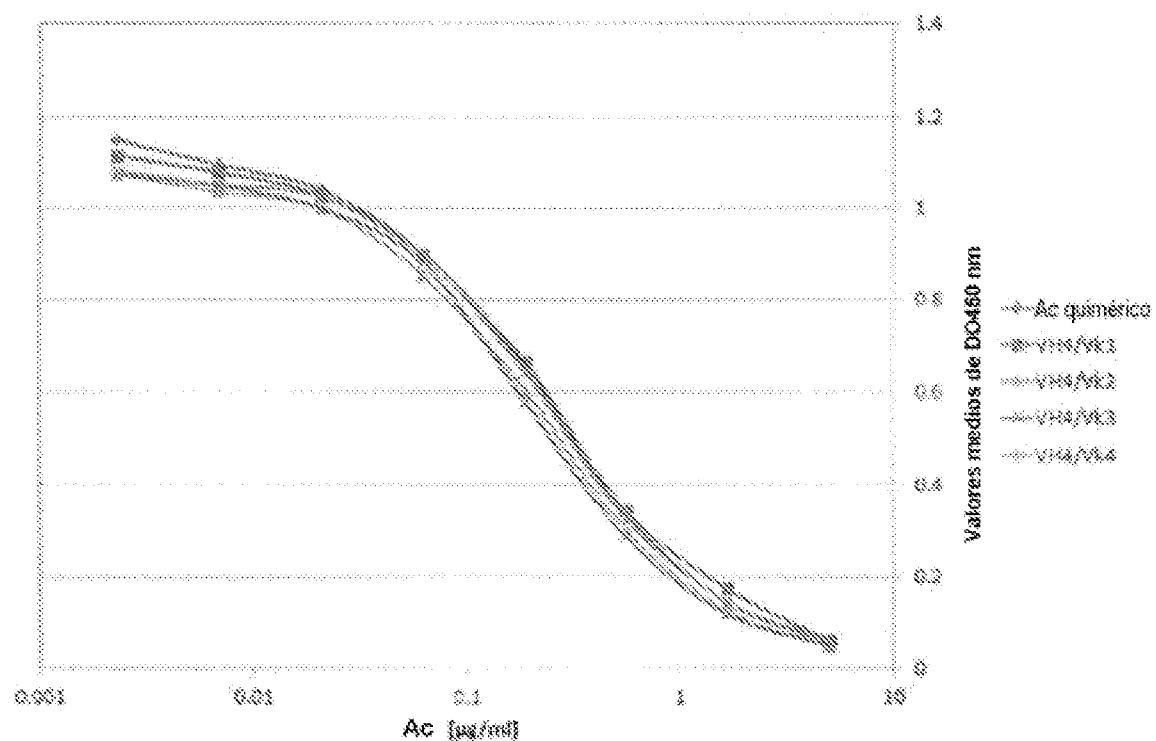
FIGURA 4C**FIGURA 4D**

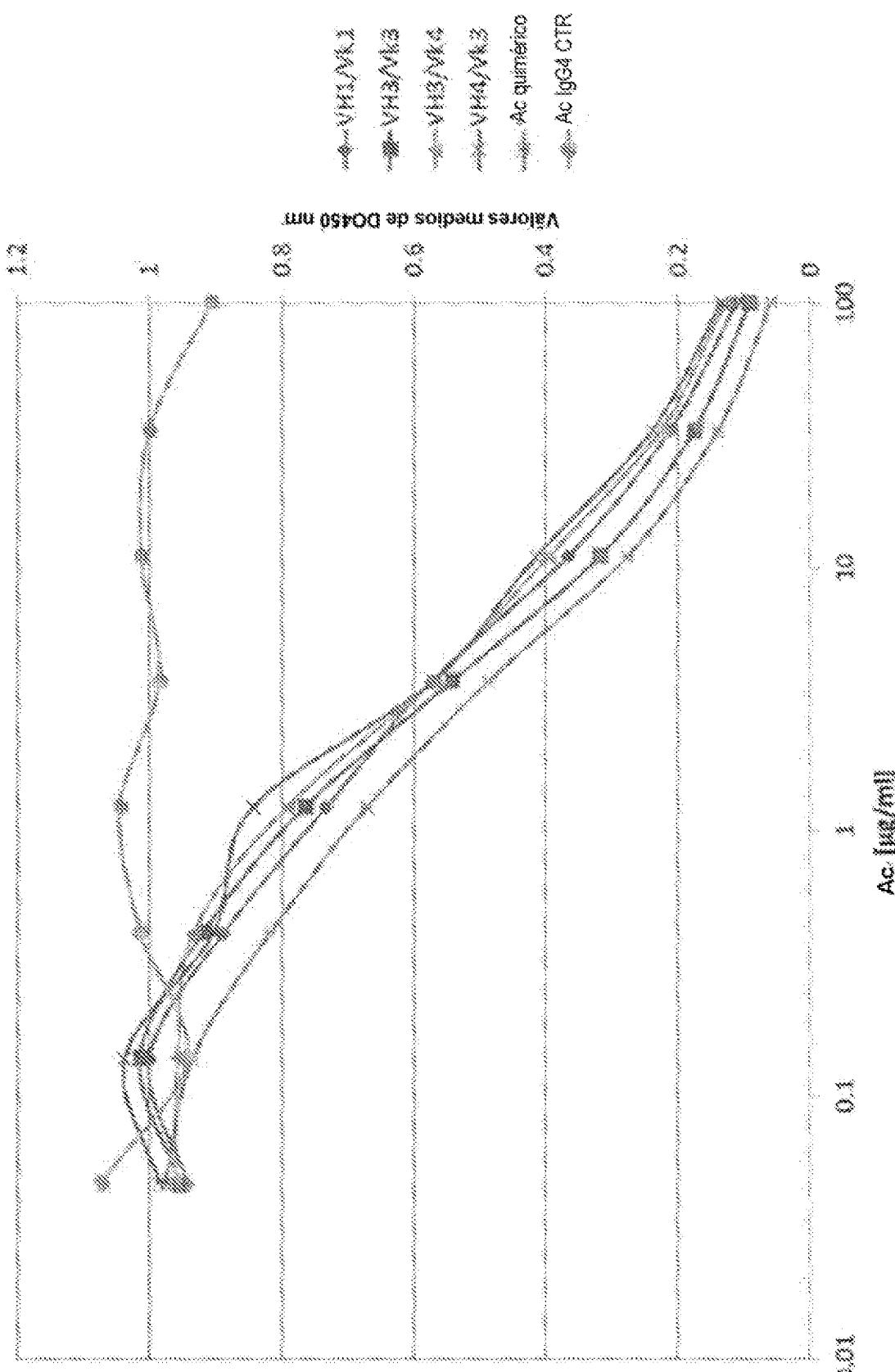
FIGURA 5

FIGURA 6

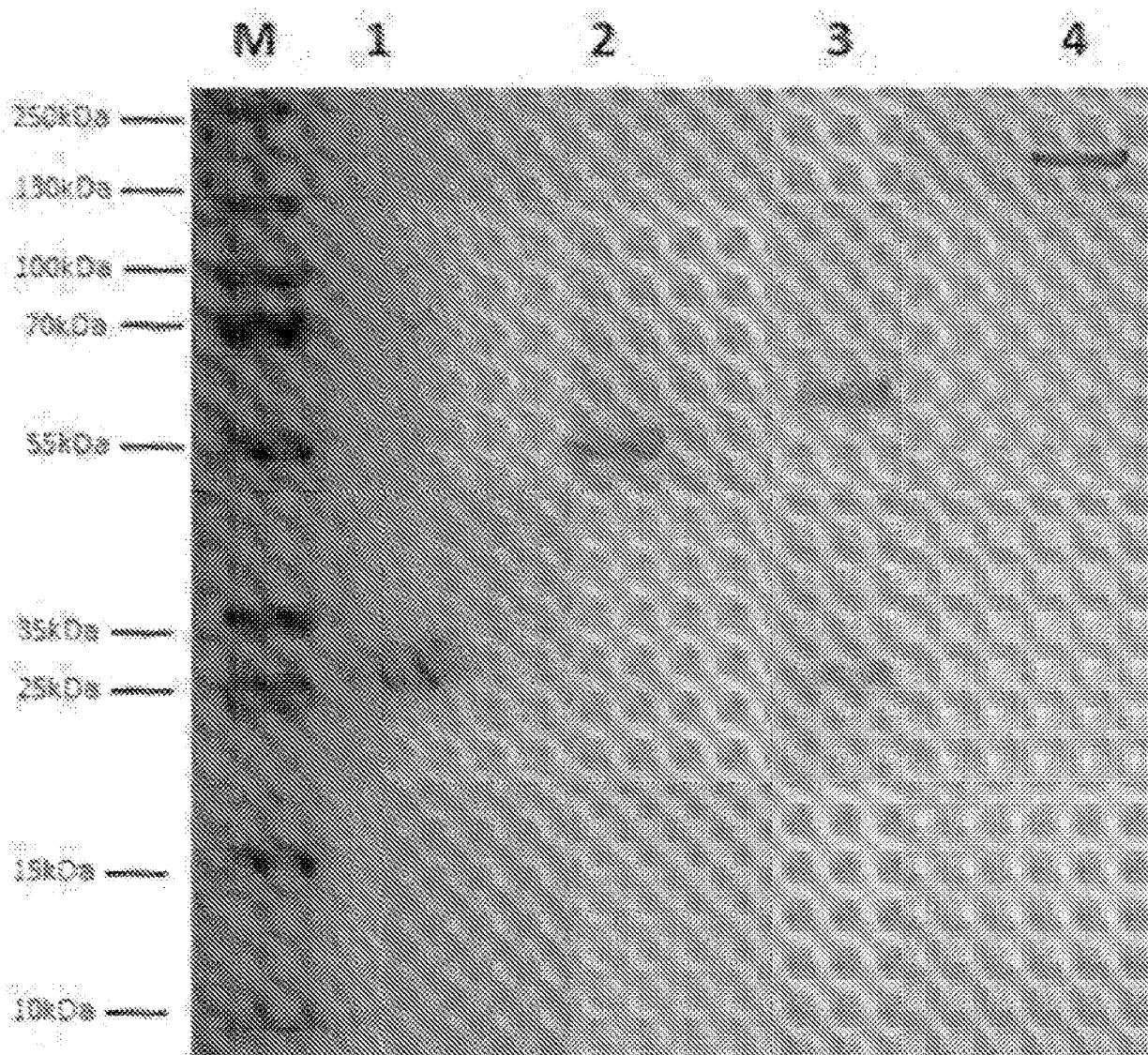


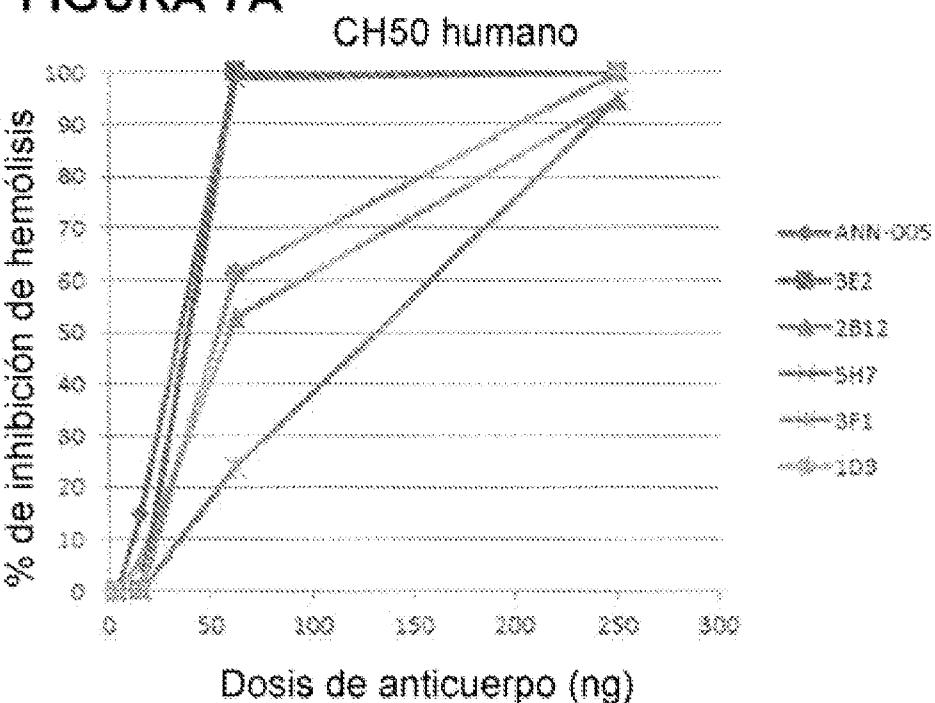
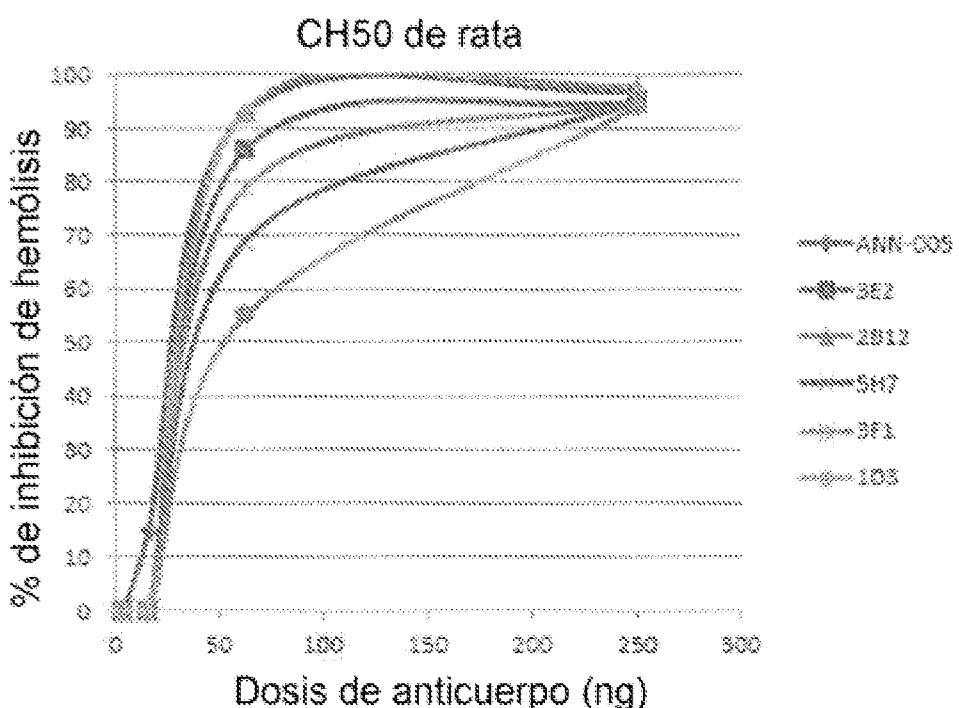
FIGURA 7A**FIGURA 7B**

FIGURA 8

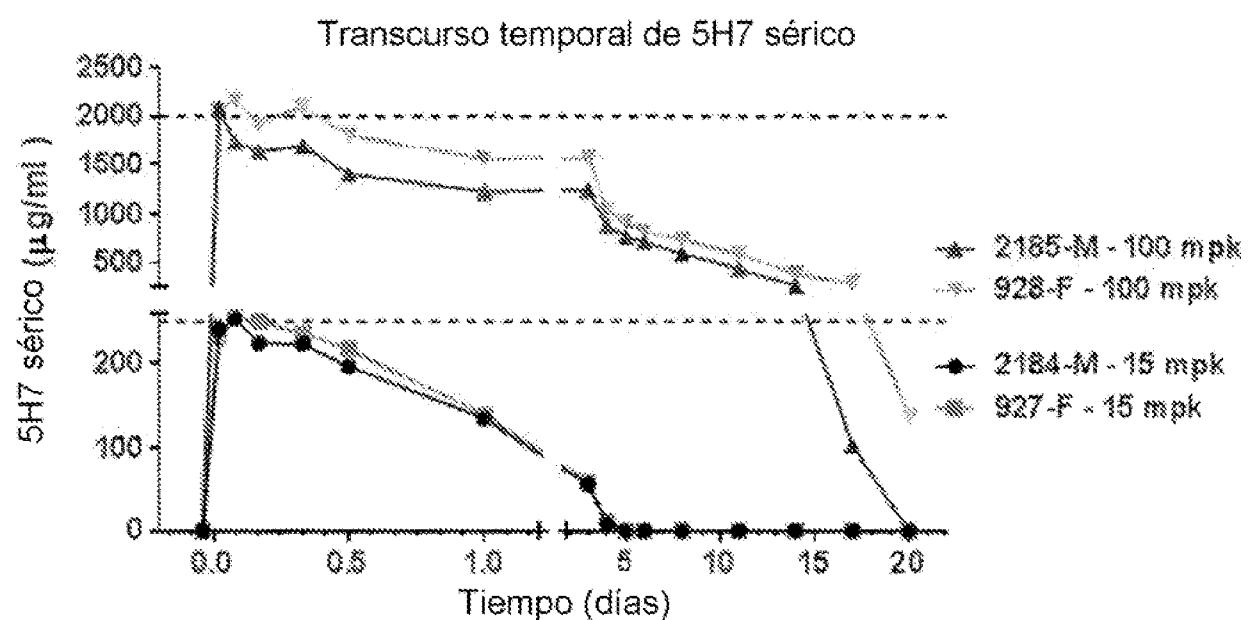
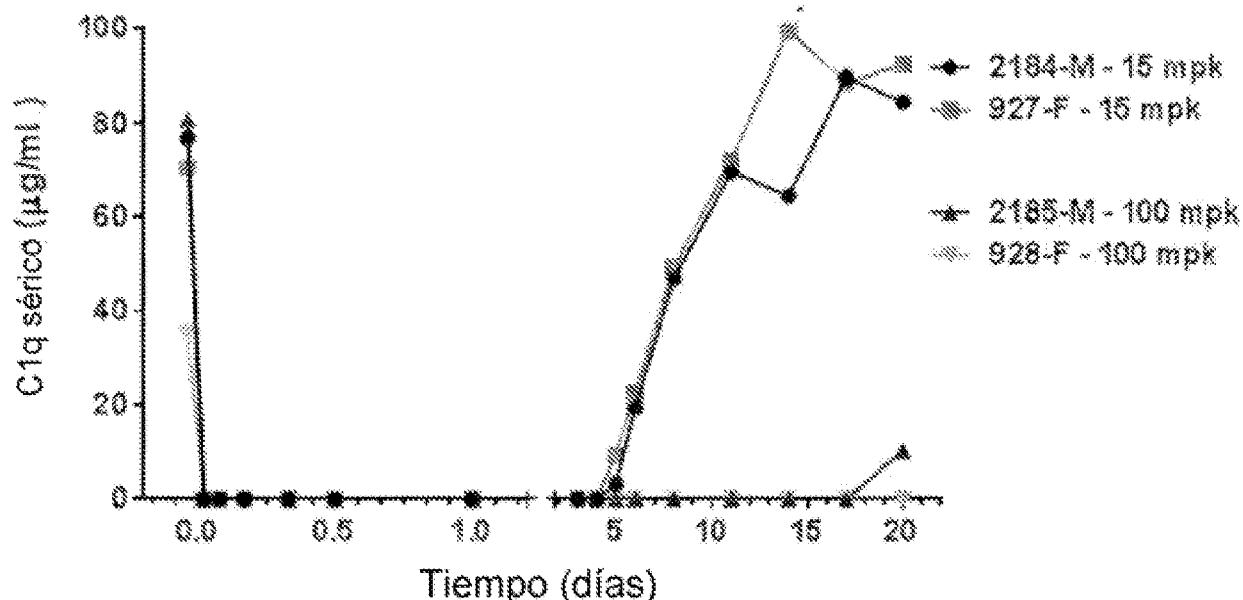


FIGURA 9A

Transcurso temporal de C1q sérico - JL1-M1

**FIGURA 9B**

Transcurso temporal de C1q sérico - JL1-JL1

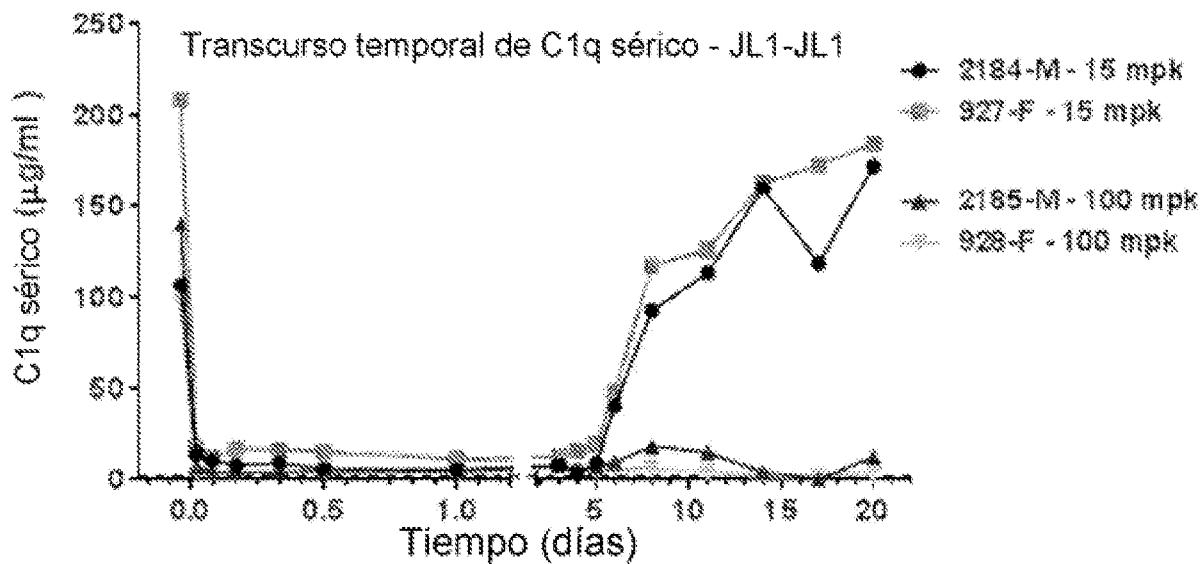
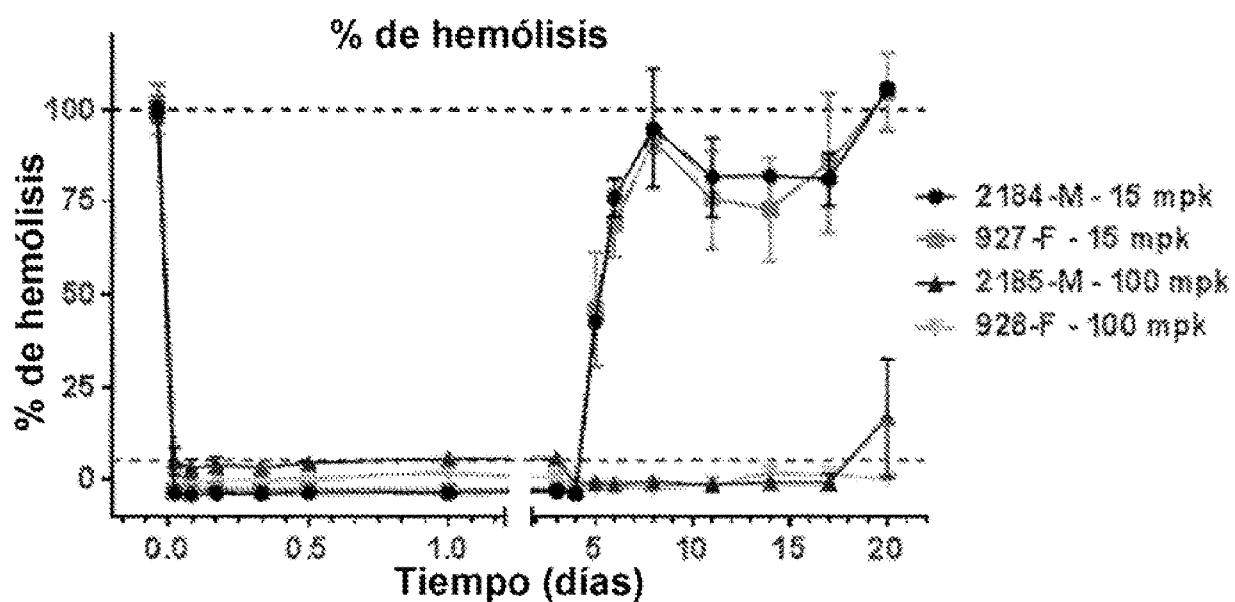


FIGURA 10

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCION

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

5

Documentos citados en la descripción

- * US 29120185880 A [0002]
- * US 2912328801 A [0002]
- * WO 2805002513 A [0004]
- * WO 2814188876 A [0004]
- * US 4916587 A [0037] [0046] [0138] [0141]
- * WO 199824993 A [0037]
- * WO 1998346366 A [0037]
- * WO 199833735 A [0037]
- * WO 199116741 A [0037]
- * US 6546907 A [0037] [0140]
- * US 6546898 A [0037] [0140]
- * US 6559825 A [0037] [0140]
- * US 6525126 A [0037] [0140]
- * US 6533425 A [0037] [0140]
- * US 6561010 A [0037] [0140]
- * US 6541870 A [0039] [0151]
- * EP 404027 A [0045]
- * WO 9311161 A [0045]
- * US 6822321 B [0047]
- * US 7587409 B [0047]
- * US 6075181 A [0048]
- * US 6150584 A [0048]
- * US 2010280227 A [0054]
- * WO 200442072 A, Presta [0067]
- * US 5223409 A, Ladner [0137]
- * WO 9218619 A, Kang [0137]
- * WO 9117271 A, Dower [0137]
- * WO 9220791 A, Winter [0137]
- * WO 9215679 A, Markland [0137]
- * WO 9301289 A, Breiling [0137]
- * WO 9201047 A, McCafferty [0137]
- * WO 9208686 A, Garrard [0137]
- * WO 9002809 A, Ledner [0137]
- * US 6802280 W, Robinson [0138]
- * EP 154187 A, Akira [0138]
- * EP 171498 A, Taniguchi, M. [0138]
- * EP 173494 A, Morrison [0138]
- * WO 8801533 A, Neuberger [0138]
- * EP 125823 A, Cabilio [0138]
- * US 5225539 A, Winter [0138]
- * US 5555332 A [0139]
- * US 5871807 A [0139]
- * US 5733743 A [0139]
- * WO 9402610 A, Marasco [0139]
- * WO 9503832 A, Duan [0139]
- * US 5789650 A [0140]
- * US 5877297 A [0140]
- * US 5814318 A [0140]
- * US 5874299 A [0140]
- * US 5770429 A [0140]
- * WO 2824884 A [0140]
- * WO 5425585 A [0140]
- * WO 931227 A [0140]
- * WO 9222845 A [0140]
- * WO 9203919 A [0140]
- * US 6805535 W [0142]
- * US 5869046 A [0151]
- * WO 9318185 A [0151]
- * US 5571694 A [0151]
- * US 5587458 A [0151]
- * WO 9308829 A [0154]
- * WO 9404620 A [0156]
- * WO 9627011 A [0157]
- * US 5731188 A [0157]
- * US 4876280 A [0164]
- * WO 9100380 A [0164]
- * WO 92206373 A [0164]
- * EP 0389938 A [0164]
- * WO 9958572 A [0165]
- * US 5738277 A [0167]
- * WO 9704483 A [0165]
- * US 5846237 A [0167]
- * US 5789199 A [0167]
- * US 5846223 A [0167]
- * US 5959177 A [0169]
- * US 6040468 A [0169]
- * US 6430548 B [0169]
- * US 7125978 B [0169]
- * US 6417429 B [0169]
- * US 4857760 A [0207]
- * US 5208344 A [0207]
- * US 5225212 A [0207]

10

Literatura no patente citada en la descripción

- * KLOS A. et al. *Mol Immunol.*, 2009, vol. 46 (14), 2753-2766 [0004]
- * CARROLL S., GEORGIOU G. *Immunobiology*, 2013, vol. 218 (2), 1041-1048 [0004]
- * TUZUN et al. *J. Neuroimmunol.*, 2007, vol. 182, 167-176 [0004]
- * NELSON et al. *J. Clin. Invest.*, 2006, vol. 116, 2892-2903 [0004]

15

- HEINZ et al. *J. Immunol.*, 1984, vol. 133, 400-404 [0004]
- JIANG et al. *J. Immunol.*, 1991, vol. 146, 2324-2330 [0004]
- TRINDER et al. *Scand. J. Immunol.*, 1989, vol. 50, 635-641 [0004]
- HWANG et al. *Mol. Immunol.*, 2003, vol. 45, 2570-2580 [0004]
- TUZUN et al. *Current Topics in Complement N*, vol. 692, 254-261 [0004]
- HILLMEN et al. *N Engl. J. Med.*, 2006, vol. 355 (12), 1233-43 [0004]
- SAMBROOK et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 [0020]
- Current Protocols in Molecular Biology. 2003 [0020]
- PCR 2: A Practical Approach. Methods in Enzymology. Academic Press, Inc, 1995 [0020]
- Antibodies. A Laboratory Manual. 1988 [0020]
- Animal Cell Culture. 1987 [0020]
- Oligonucleotide Synthesis. 1984 [0020]
- Methods in Molecular Biology. Humana Press [0020]
- Cell Biology. A Laboratory Notebook. Academic Press, 1988 [0020]
- J.P. MATHERS ; P.E. ROBERTS. *Introduction to Cell and Tissue Culture*. Plenum Press, 1998 [0020]
- Cell and Tissue Culture. Laboratory Procedures. J. Wiley and Sons, August 1993 [0020]
- Handbook of Experimental Immunology [0020]
- Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells. 1987 [0020]
- PCR. The Polymerase Chain Reaction. 1994 [0020]
- Current Protocols in Immunology. 1991 [0020]
- Short Protocols in Molecular Biology. Wiley and Sons, 1999 [0020]
- C.A. JANEWAY ; R. TRAVERS. *Immunobiology*. 1987 [0020]
- P. FINCH. *Antibodies*. 1997 [0020]
- Antibodies. A Practical Approach. IRL Press, 1988 [0020]
- Monoclonal Antibodies: A Practical Approach. Oxford University Press, 2000 [0020]
- E. HARLOW ; D. LANE. *Using Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999 [0020]
- The Antibodies. Harwood Academic Publishers, 1995 [0020]
- Cancer: Principles and Practice of Oncology. J.B. Lippincott Company, 1993 [0020]
- Basic and Clinical Immunology. Appleton & Lange, 1994, 71 [0031]
- ABSAS et al. *Cellular and Molecular Immunology*. W.B. Saunders Co., 2000 [0032]
- KASAT et al. *Sequences of Immunological Interest*. National Institute of Health, 1991 [0036]
- KOHLER ; MILSTEIN. *Nature*, 1975, vol. 256, 495-97 [0037]
- HONGO et al. *Hybndoma*, 1985, vol. 14 (3), 253-260 [0037]
- HARLOW et al. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 [0037]
- HAMMERLING et al. *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*. Elsevier, 1981, 563-881 [0037]
- CLACKSON et al. *Nature*, 1981, vol. 282, 324-328 [0037]
- MARKS et al. *J. Mol. Biol.*, 1993, vol. 222, 581-597 [0037]
- SNDHU et al. *J. Mol. Biol.*, 2004, vol. 338 (2), 299-310 [0037]
- LEE et al. *J. Mol. Biol.*, 2004, vol. 249 (5), 1073-1093 [0037]
- FELLOUSE. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, vol. 101 (34), 12467-472 [0037]
- LEE et al. *J. Immunol. Methods*, 2004, vol. 284 (1-2), 119-132 [0037]
- JAKOBOWITS et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 2551 [0037]
- JAKOBOWITS et al. *Nature*, 1993, vol. 362, 255-256 [0037]
- BRUGGEMANN et al. *Year in Immunol.*, 1993, vol. 7, 33 [0037]
- MARKS et al. *BioTechnology*, 1992, vol. 10, 772-783 [0037] [0038]
- LONBERG et al. *Nature*, 1994, vol. 368, 856-859 [0037]
- MORRISON. *Nature*, 1994, vol. 368, 812-813 [0037]
- FISHWILD et al. *Nature Biotechnol.*, 1995, vol. 14, 845-851 [0037]
- NEUBERGER. *Nature Biotechnol.*, 1995, vol. 14, 828 [0037]
- LONBERG ; HUSZAR. *Intern. Rev. Immunol.*, 1995, vol. 13, 85-93 [0037]
- ZAPATA et al. *Protein Eng.*, 1995, vol. 8 (10), 1057-1062 [0039]
- PLUCKTHUN. *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*. Springer-Verlag, 1994, vol. 113, 289-315 [0043]
- HOLLINGER et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 8444-48 [0045]
- MORRISON et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 8851-55 [0046]
- JONES et al. *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0047]
- RIECHMANN et al. *Nature*, 1988, vol. 332, 323-329 [0047]
- PRESTA. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593-596 [0047]
- VASWANI ; HAMILTON. *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.*, 1998, vol. 81, 105-115 [0047]
- HARRIS. *Biochem. Soc. Transactions*, 1995, vol. 23, 1935-1938 [0047]
- HURLE ; GROSS. *Curr. Op. Biotech.*, 1994, vol. 5, 428-433 [0047]
- HOOGENBOOM ; WINTER. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 227, 381 [0048]
- MARKS et al. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581 [0048]

- COLE et al. Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy. Alan R. Liss, 1985, 77 [0048]
- BOERNER et al. *J. Immunol.*, 1991, vol. 147 (1), 86-95 [0048]
- VAN DIJK ; VAN DE WINKEL. *Curr Opin. Pharmacol.*, 2001, vol. 5, 368-74 [0048]
- LI et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, vol. 103, 3557-3562 [0048]
- XU et al. *Immunity*, 2000, vol. 13, 37-45 [0049]
- JOHNSON ; WU. Methods in Molecular Biology. Human Press, 2003, vol. 248, 1-25 [0049]
- HAMERS-CASTERMAN et al. *Nature*, 1983, vol. 303, 446-448 [0049]
- SHERIFF et al. *Nature Struct. Biol.*, 1998, vol. 5, 733-736 [0049]
- CHOTHIA ; LESK. *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901-917 [0050]
- KABAT et al. Sequences of immunological interest.. Public Health Service, National Institutes of Health, 1991 [0054]
- KABAT et al. Sequences of Proteins of immunological interest. Public Health Service, 1991 [0056]
- BARBAS et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 3839-3843 [0058]
- SCHNER et al. *Gene*, 1995, vol. 162, 147-155 [0058]
- VELTON et al. *J. Immunol.*, 1995, vol. 155, 1994-2004 [0058]
- JACKSON et al. *J. Immunol.*, 1995, vol. 154 (7), 3310-6 [0058]
- HAWKINS et al. *J. Mol. Biol.*, 1982, vol. 226, 889-898 [0058] [0137]
- HARLOW ; LANE. Antibodies, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Publications, 1988 [0059]
- M. DAERON. *Annu. Rev. Immunol.*, 1997, vol. 15, 203-234 [0060]
- RAVETCH ; KINET. *Annu. Rev. Immunol.*, 1991, vol. 9, 457-82 [0060]
- CAPEL et al. *Immunomethods*, 1994, vol. 4, 25-34 [0068]
- DE HAAS et al. *J. Lab. Clin. Med.*, 1986, vol. 108, 330-41 [0066]
- SHIELDS et al. *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276 (2), 8591-8604 [0067]
- KARLSSON, R. ROOS ; H. FAGERSTAM ; L. PETERSSON. *B. Methods Enzymology*, 1994, vol. 23, 99-110 [0133]
- LÖTJE S et al. *Bioconjug. Chem.*, 19 February 2014, vol. 25 (2), 335-41 [0130]
- TAVARÉ R et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 21 January 2014, vol. 111 (3), 1108-13 [0130]
- WIEHR S et al. *Prestolet.*, May 2014, vol. 74 (7), 743-55 [0130]
- ANGAL S et al. *Mol. Immunol.*, January 1993, vol. 30 (1), 105-8 [0131]
- MORGAN A et al. *Immunology*, 1995, vol. 65, 319-324 [0131]
- KOHLER ; MILSTEIN. *Nature*, 1975, vol. 256, 495-497 [0133]
- BROWN et al. *J. Immunol.*, 1981, vol. 137, 639-68 [0135]
- BROWN et al. *J. Biol. Chem.*, 1980, vol. 255, 4980-83 [0135]
- YEH et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1978, vol. 75, 2927-31 [0135]
- YEH et al. *Int. J. Cancer*, 1982, vol. 29, 289-75 [0135]
- KOZBOR et al. *Immuno. Today*, 1983, vol. 4, 72 [0135]
- COLE et al. Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy. Alan R. Liss, Inc, 1985, 77-98 [0135]
- KENNETH, S. H. Monoclonal Antibodies: A New Dimension in Biological Analyses. Plenum Publishing Corp, 1993 [0135]
- LERNER, E. A. *Adv. J. Biol. Med.*, 1981, vol. 54, 367-402 [0135]
- GEFTER, M. L. et al. *Somatic Cell Genet.*, 1977, vol. 3, 231-36 [0135]
- GALFRE, G. et al. *Nature*, 1977, vol. 268, 583-582 [0136]
- FUCHS et al. *Biootechnology (NY)*, 1991, vol. 9, 1369-1372 [0137]
- HAY et al. *Hum. Antibod. Hybridomas*, 1992, vol. 3, 81-85 [0137]
- HUSE et al. *Science*, 1989, vol. 248, 1276-1281 [0137]
- GRIFFITHS et al. *EMBO J.*, 1993, vol. 12, 725-734 [0137]
- CLARKSON et al. *Nature*, 1991, vol. 352, 824-828 [0137]
- GRAM et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 3578-3580 [0137]
- GARRARD et al. *Biochemistry (NY)*, 1991, vol. 9, 1373-1377 [0137]
- HODGENBOOM et al. *Nucleic Acids Res.*, 1991, vol. 19, 4133-4137 [0137]
- BARBAS et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 7978-7982 [0137]
- McCAFFERTY et al. *Nature*, 1990, vol. 348, 552-554 [0137]
- BETTER et al. *Science*, 1988, vol. 248, 1841-1843 [0138]
- LIU et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 3438-3443 [0138]
- LIU et al. *J. Immunol.*, 1987, vol. 139, 3521-3528 [0138]
- SUN et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1987, vol. 84, 214-218 [0138]
- NISHIMURA et al. *Cancer Res.*, 1987, vol. 47, 989-1000 [0138]
- WOOD et al. *Nature*, 1985, vol. 314, 446-449 [0138]
- SHAW et al. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1988, vol. 80, 1553-1559 [0138]
- MORRISON, S. L. *Science*, 1985, vol. 239, 1203-1207 [0138]
- OT et al. *Biotechniques*, 1988, vol. 4, 214 [0138]

- JONES et al. *Nature*, 1986, vol. 321, 552-525 [0138]
- VERHOEYAN et al. *Science*, 1988, vol. 239, 1534 [0138]
- BEISLER et al. *J. Immunol.*, 1988, vol. 141, 4053-4060 [0138]
- CARLSON, J. R. *Mol. Cell. Biol.*, 1988, vol. 8, 2638-2646 [0138]
- BIOCCHI, S. et al. *EMBO J.*, 1990, vol. 9, 161-168 [0139]
- WERGE, T. M. et al. *FEBS Lett.*, 1990, vol. 274, 193-198 [0139]
- CARLSON, J. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 7427-7429 [0139]
- MARASCO, W. A. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 7889-7893 [0139]
- BIOCCHI, S. et al. *Biotechnology (NY)*, 1994, vol. 12, 398-399 [0139]
- CHEN, S.-Y. et al. *Hum. Gene Ther.*, 1994, vol. 5, 565-581 [0139]
- DUAN, L. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 5075-5079 [0139]
- CHEN, S.-Y. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 5932-5936 [0139]
- BEERLI, R. R. et al. *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269, 23831-23838 [0139]
- BEERLI, R. R. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994, vol. 204, 666-672 [0139]
- MHASHILKAR, A. M. et al. *EMBO J.*, 1995, vol. 14, 1542-1551 [0139]
- RICHARDSON, J. H. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, vol. 92, 3137-3141 [0139]
- LONBERG, N. et al. *Nature*, 1994, vol. 368 (6474), 856-859 [0140]
- LONBERG, N. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 1994, vol. 113 (49), 101 [0140]
- LONBERG, N.; HUSZAR, D. *Intern. Rev. Immunol.*, 1995, vol. 13 (95), 93 [0140]
- HARDING, F.; LONBERG, N. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1995, vol. 764 (538), 546 [0140]
- TAYLOR, L. et al. *Nucleic Acids Research*, 1992, vol. 20 (1227), 6295 [0140]
- CHEM, J. et al. *International Immunology*, 1993, vol. 5 (847), 858 [0140]
- TUAUILLON et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90 (3720), 3724 [0140]
- CHO et al. *Nature Genetics*, 1993, vol. 4 (117), 123 [0140]
- CHEN, J. et al. *EMBO J.*, 1993, vol. 12 (821), 833 [0140]
- TUAUILLON et al. *J. Immunol.*, 1994, vol. 152 (2912), 2920 [0140]
- LONBERG et al. *Nature*, 1994, vol. 368 (6474), 858-859 [0140]
- LONBERG, N. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 1994, vol. 113 (49), 101 [0140]
- TAYLOR, L. et al. *International Immunology*, 1994, vol. 6 (579), 591 [0140]
- HARDING, F.; LONBERG, N. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1995, vol. 764 (538), 546 [0140]
- FISHWILD, D. et al. *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14 (845), 861 [0140]
- BIECHMANN, L. et al. *Nature*, 1996, vol. 333 (623), 327 [0142]
- JONES, P. et al. *Nature*, 1986, vol. 321 (522), 526 [0142]
- QUEEN, C. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1993, vol. 88 (10329), 10333 [0142]
- KOZAK, J. *Biol. Chem.*, 1991, 266L18867318873 [0143]
- MORIMOTO et al. *J. Biochem. Biophys. Method.*, 1992, vol. 24, 107-117 [0151]
- BRENNAN et al. *Science*, 1995, vol. 229, 81 [0151]
- CARTER et al. *BioTechnology*, 1992, vol. 10, 163-167 [0151]
- MILLSTEIN et al. *Nature*, 1983, vol. 305, 537-539 [0154]
- TRAUNECKER et al. *EMBO J.*, 1991, vol. 10, 3655-3659 [0154]
- SURESH et al. *Methods in Enzymology*, 1986, vol. 121, 218 [0158]
- SHALABY et al. *J. Exp. Med.*, 1992, vol. 175, 217-225 [0158]
- KOSTELNY et al. *J. Immunol.*, 1992, vol. 148 (5), 1547-1553 [0160]
- HOLLINGER et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 6444-6449 [0160]
- GRUBER et al. *J. Immunol.*, 1994, vol. 152, 5368 [0160]
- TUTT et al. *J. Immunol.*, 1991, vol. 147, 60 [0161]
- GABATHULER R. *Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases*. *Neurobiol. Dis.*, 2010, vol. 37, 48-57 [0162]
- ARMOUR et al. *Molecular Immunology*, 2003, vol. 40, 565-583 [0163]
- REDDY et al. *J. Immunology*, 2000, vol. 164, 1925-1933 [0165]
- IDUNSOGLIE et al. *J. Immunology*, 2000, vol. 164, 4178-4184 [0166]
- DUNCAN et al. *Nature*, 1998, vol. 322, 738-740 [0166]
- JEFFERIS et al. *Immuno/Rev*, 1996, vol. 163, 59-79 [0166]
- ALHORN et al. *Plos ONE*, 2008, vol. 2008 (3), e1413 [0166]
- COLLIN et al. *EMBO J.*, 2001, vol. 20, 3046-3055 [0166]
- Cunningham and Wells in *Science*, 1993, vol. 244, 1081-1085 [0169]
- Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*. Philadelphia College of Pharmacy and Science, 2000 [0169]
- CHARLTON. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, 2003, vol. 248, 245-254 [0187]

- GERNGROSS. *Nat. Biotech.*, 2004, vol. 22, 1409-1414 [S188]
- LI et al. *Nat. Biotech.*, 2008, vol. 26, 213-215 [S188]
- GRAHAM et al. *J. Gen Virol.*, 1977, vol. 35, 59 [S198]
- MATHER. *Biol. Reprod.*, 1980, vol. 23, 243-251 [S198]
- MATHER et al. *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 1982, vol. 383, 44-58 [S198]
- URLAUB et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 77, 4216 [S198]
- YAZAKI ; WU. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, 2003, vol. 248, 255-268 [S198]
- Remington's Pharmaceutical Sciences. Mosby Publishing Company, 1985 [S198]
- LANGER. *Science*, 1990, vol. 249, 1527-1533 [S198]
- HELLER. *Hydrogels in Medicine and Pharmacy*. CRC Press, 1987, vol. 81, 137-149 [S200]
- The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics. MORDENTI J. , CHAPPELL, W et al. *Toxicokinetics and New Drug Development*. Pergamon Press, 1989, 42-46 [S202]
- LÓPEZ-BOTET M ; T. BELLÓN ; M. LLANO ; F. NAVARRO ; P. GARCIA ; M. DE MIGUEL. Paired inhibitory and triggering NK cell receptors for HLA class I molecules. *Hum. Immunol.*, 2000, vol. 61, 7-17 [S216]
- LANGER L.L. Follow the leader. NK cell receptors for classical and nonclassical MHC class I. *Cell*, 1998, vol. 92, 755-767 [S216]
- Immunopharmacology, 1990, vol. 20, 73-8 [S216]
- T.E. MOLLNES ; M. KIRSCHFINK. *Molecular Immunology*, 2006, vol. 43, 107-121 [S217]
- PERRY, LCA et al. *Drugs R D.*, 2008, vol. 9 (8), 285-96 [S238]
- BRYSON, CJ et al. *BioDrugs*, 01 February 2010, vol. 24 (1), 1-6 [S238]
- HUBER ; MUELLER. *Curr Pharm Des.*, 2006, vol. 12 (31), 3999-4021 [S284]
- LAKEY ; RAGGETT. *Curr Opin Struct Biol.*, 1998, vol. 8 (1), 118-123 [S284]
- Current Protocols in Immunology, 1994 [S319]