

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043771**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.06.21

(21) Номер заявки
201992883

(22) Дата подачи заявки
2018.06.08

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К TRKB

(31) 17175122.5

(32) 2017.06.09

(33) EP

(43) 2020.05.08

(86) PCT/EP2018/065107

(87) WO 2018/224630 2018.12.13

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:
**Херрманн Рольф, Баккер Ремко
Александр, Бандхольц Зебастиан,
Бенц Петер Михаэль (DE),
Дзегелевски Майкл, Флорин Лоре,
Кенни Синтия Хесс, Лоу Сара (US),
Розенброк Хольгер (DE), Сингх
Санджая (US), Шталь Хайко Фридрих
(DE), Венкатарамани Сатьядеви,
Войнов Владимир, Сяо Хайгуан (US)**

(74) Представитель:
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)**

(56) WO-A1-2011103667
WO-A1-2017085035
WO-A2-2006133164
WO-A1-2017019907
WO-A2-2010086828
US-A1-2010150914
WO-A1-2012156505

DANIEL TODD ET AL.: "A Monoclonal Antibody TrkB Receptor Agonist as a Potential Therapeutic for Huntington's Disease", PLOS ONE, vol. 9, no. 2, 4 February 2014 (2014-02-04), page e87923, XP055339993, DOI: 10.1371/journal.pone.0087923 page 5; table 1 page 5, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 1

WO-A1-2008078179
CAZORLA M ET AL.: "Pharmacological characterization of six trkB antibodies reveals a novel class of functional agents for the study of the BDNF receptor", BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, WILEY-BLACKWELL, UK, vol. 162, no. 4, 1 February 2011 (2011-02-01), pages 947-960, XP002679847, ISSN: 0007-1188, DOI: 10.1111/J.1476-5381.2010.01094.X [retrieved on 2011-01-21] page 953; table 2, page 959, left-hand column, paragraph 2

WO-A1-2009092049
YUJING BAI ET AL.: "An Agonistic TrkB mAb Causes Sustained TrkB Activation, Delays RGC Death, and Protects the Retinal Structure in Optic Nerve Axotomy and in Glaucoma", INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY & VISUAL SCIENCE, vol. 51, no. 9, 1 September 2010 (2010-09-01), pages 4722-4731, XP055330962, US, ISSN: 1552-5783, DOI: 10.1167/iovs.09-5032, the whole document

(57) Настоящее изобретение относится к новым агонистическим антителам к TrkB и терапевтическим и диагностическим способам и композициям для их применения.

B1

043771

043771 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение в целом относится к агонистическим антителам к TrkB для диагностического и терапевтического применения и в особенности к гуманизированным агонистическим антителам к TrkB. Более специфически, описаны агонистические антитела к TrkB и способы применения для лечения различных заболеваний или нарушений. Также описаны фармацевтические композиции и наборы, содержащие агонистическое антитело к TrkB.

Предпосылки создания изобретения

Тропомиеозин-рецепторная киназа B (TrkB), также известная как тирозин-рецепторная киназа B, или рецептор BDNF/NT-3 факторов роста или нейротрофическая тирозинкиназа, рецептор, типа 2, представляет собой белок, который у людей кодируется геном NTRK2 (Genbank ID: 4915). TrkB представляет собой рецептор для нейротрофического фактора из тканей головного мозга (BDNF).

Нейротрофический тирозин-киназный рецептор B (TrkB; символ гена: NTRK2) экспрессируется нейронами сетчатки и глиальными клетками. В нормальной сетчатке, передача сигналов TrkB противодействует клеточному стрессу и способствует выживанию клеток. При заболеваниях глаза, таких как при диабетической ретинопатии или географической атрофии, происходит потеря и функциональные нарушения нейронов сетчатки и глиальных клеток, что вызывает нарушения зрения и потерю зрения. Активация передачи сигналов TrkB выше базального уровня (что уменьшено при диабетической ретинопатии), может противодействовать потере и функциональным нарушениям нейронов и глиальных клеток, улучшая, таким образом, зрительную функцию. Кроме того, активация TrkB имеют потенциал регенерировать потерю синаптических связей в больном глазу, таким образом способствуя восстановлению зрительной функции. При связывании лиганда, TrkB подвергается гомодимеризации с последующим аутофосфорилированием. В зависимости от сайтов фосфорилирования (Y516, Y702, Y706, Y707 или Y817) активируются различные пути передачи сигналов, включая активность PLC γ 1 или различных подформ АКТ и ERK, которые регулируют различные перекрывающиеся каскады передачи сигналов, включая рост аксонов/нейритов, увеличение синаптической пластичности или увеличение выживания клеток.

Агонистические антитела к TrkB были описаны в US 20100196390 и US 20100150914, а также предложено их применение для лечения, например, болезни Шарко-Мари-Тута или диабета.

Тем не менее, сохраняется значительная потребность в новых эффективных агонистических антителах к TrkB, которые можно применять для активирования TrkB пути и, таким образом, предоставляется возможность их применения для терапевтических вмешательств, например, при нейродегенеративных и психических расстройствах.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение обеспечивает моноклональные антитела, которые специфически связываются с TrkB человека. В одном аспекте, антитела согласно настоящему изобретению имеют агонистическую активность и индуцируют фосфорилирование и/или активацию TrkB. В другом аспекте, антитела согласно настоящему изобретению пригодны, например, для лечения заболеваний глаз и сетчатки, таких как, географическая атрофия, вызванная возрастной дегенерацией желтого пятна, диабетическая ретинопатия, глаукома и/или диабетический отек желтого пятна.

В другом аспекте, настоящее изобретение обеспечивает антитело к TrkB, в особенности гуманизированное антитело к TrkB, имеющее одно или несколько свойств, описанных в настоящей заявке ниже.

В другом аспекте, антитело к TrkB согласно настоящему изобретению связывается с высокой аффинностью с TrkB человека. В одном варианте осуществления, относящемся к этому аспекту, антитело к TrkB согласно настоящему изобретению связывается с TrkB человека при $K_D < 10$ нМ. В другом варианте осуществления, антитело к TrkB согласно настоящему изобретению связывается с TrkB человека при $K_D < 5$ нМ.

В другом аспекте, антитело к TrkB согласно настоящему изобретению активирует TrkB с высокой эффективностью. В одном варианте осуществления, относящемся к этому аспекту, антитело к TrkB согласно настоящему изобретению активирует TrkB человека с $EC_{50} < 100$ пМ. В дальнейшем варианте осуществления, антитело к TrkB согласно настоящему изобретению активирует TrkB человека с $EC_{50} < 50$ пМ.

В другом аспекте, антитело к TrkB согласно настоящему изобретению является более эффективным для индуцирования активации нижерасположенных TrkB путей передачи сигналов по сравнению с природным TrkB лигандом, BDNF. В дальнейшем аспекте, антитело к TrkB согласно настоящему изобретению регулирует экспрессию гена посредством TrkB-опосредованного пути передачи сигналов сопоставимым образом относительно BDNF.

В дальнейшем аспекте, антитело к TrkB согласно настоящему изобретению связывает новый эпитоп во внеклеточном домене TrkB человека. В дальнейшем аспекте, антитело к TrkB согласно настоящему изобретению перекрестно не реагирует с TrkB из других видов, в особенности перекрестно не реагирует с TrkB грызунов.

В одном аспекте, антитело к TrkB согласно настоящему изобретению может быть приготовлено в виде препарата в высоких концентрациях для интравитреальных инъекций в глаза.

В дальнейшем аспекте, антитело к TrkB согласно настоящему изобретению имеет низкий риск иммуногенности, как измерено с помощью способа, описанного в примере 5.

В другом аспекте, CDR последовательности антитела к TrkB согласно настоящему изобретению имеют низкие подверженности последовательностей, как определено с помощью способа, описанного в примере 4.

В еще одном аспекте, антитело к TrkB согласно настоящему изобретению не уменьшает BDNF индуцированное ERK фосфорилирование.

В дальнейшем аспекте, антитело к TrkB согласно настоящему изобретению является специфическим для фосфорилирования и/или активации TrkB и неспецифически не фосфорилирует /не активирует TrkA или TrkC. В другом аспекте, антитело к TrkB не связывается неспецифически с VEGF человека.

Дальнейшие аспекты охватывают молекулу (ы) полинуклеотидов, кодирующие антитела согласно настоящему изобретению, экспрессионные векторы и вирусные векторы, а также клетки-хозяева, содержащие такую (ие) молекулу (ы) полинуклеотидов, и способы приготовления антител согласно настоящему изобретению. Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает терапевтические применения антител согласно настоящему изобретению, в особенности для заболеваний сетчатки/глаз.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее (содержащий):

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48 (L-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49 (L-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50 (L-CDR3); и

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52 (H-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53 (H-CDR3), или

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 (H-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57 (H-CDR3), или

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59 (H-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60 (H-CDR3).

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее (содержащий):

вариабельную легкую цепь и вариабельную тяжелую цепь, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 12, соответственно,

вариабельную легкую цепь и вариабельную тяжелую цепь, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 13, соответственно,

вариабельную легкую цепь и вариабельную тяжелую цепь, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 14, соответственно,

вариабельную легкую цепь и вариабельную тяжелую цепь, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 15, соответственно,

вариабельную легкую цепь и вариабельную тяжелую цепь, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 16, соответственно,

вариабельную легкую цепь и вариабельную тяжелую цепь, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 17, соответственно,

вариабельную легкую цепь и вариабельную тяжелую цепь, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 18, соответственно,

вариабельную легкую цепь и вариабельную тяжелую цепь, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 19, соответственно, или

вариабельную легкую цепь и вариабельную тяжелую цепь, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 20, соответственно.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее (содержащий):

легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 или 23,

легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 или 26,

легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28 или 29,

легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31 или 32,

легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34 или 35,

легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37 или 38,

легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, и тяжелую цепь,

содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40 или 41, легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43 или 44, или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46 или 47.

В особенно предпочтительном варианте осуществления антитело к TrkB представляет собой гуманизированное антитело к TrkB.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в медицине.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент для применения для лечения заболеваний сетчатки/глаз.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент для применения для лечения заболеваний нейронного/неврального глаза или сетчатки.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент для применения для лечения географической атрофии.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент для применения для лечения возрастной дегенерации желтого пятна или диабетической ретинопатии.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию, содержащую антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводятся с помощью парентерального пути, внутривенного пути, интравитреального пути или подкожного пути введения.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает выделенный(е) полинуклеотид или полинуклеотиды, содержащий(е) последовательность, кодирующую легкую цепь или переменную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающий фрагмент и тяжелую цепь или переменную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающий фрагмент.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает экспрессионный вектор, содержащий выделенный(е) полинуклеотид или полинуклеотиды, кодирующий(е) легкую цепь или переменную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающий фрагмент и тяжелую цепь или переменную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающий фрагмент.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает вирусный вектор, содержащий выделенный(е) полинуклеотид или полинуклеотиды, кодирующий(е) легкую цепь или переменную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающий фрагмент и тяжелую цепь или переменную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающий фрагмент.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает клетку-хозяина, содержащую экспрессионный вектор или выделенный(е) полинуклеотид или полинуклеотиды, кодирующий(е) легкую цепь или переменную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающий фрагмент и тяжелую цепь или переменную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающий фрагмент.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает способ получения антитела к TrkB или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий:

получение клетки-хозяина, содержащей экспрессионный вектор или выделенный(е) полинуклеотид или полинуклеотиды, кодирующий(е) легкую цепь или переменную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающий фрагмент и тяжелую цепь или переменную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающий фрагмент; и культивирование клетки-хозяина.

В одном варианте осуществления, способ получения антитела к TrkB или его антигенсвязывающего фрагмента дополнительно включает восстановление и очистку антитела к TrkB или его антигенсвязывающего фрагмента.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (который) связывается с по меньшей мере одним аминокислотным остатком в пределах аминокислотных областей 92-112, 130-143 и/или 205-219 внеклеточного домена TrkB человека с последовательностью SEQ ID NO: 54.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (который) связывается с по меньшей мере одним аминокислотным остатком в пределах аминокислотных областей 92-112 и 130-143; или 92-112 и 205-219; или 130-143 и 205-219; или 92-112 и 130-143 и 205-219 внеклеточного домена TrkB человека с последовательностью SEQ ID NO: 54.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело к TrkB или его

антигенсвязывающий фрагмент, которое (который) связывается с по меньшей мере одним аминокислотным остатком в пределах любой из вышеуказанных комбинаций и дополнительно также с по меньшей мере одним аминокислотным остатком в пределах аминокислотных областей 313-330 и/или 348-367 внеклеточного домена TrkB человека с последовательностью SEQ ID NO: 54.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (который) связывается с по меньшей мере одним аминокислотным остатком в пределах аминокислотных областей 92-112, 130-143, 205-219, 313-330 и 348-367 внеклеточного домена TrkB человека с последовательностью SEQ ID NO: 54.

Краткое описание фигур

Фиг. 1. Картирование эпитопов BDNF, 277-антитела, C2 или C20 антител к внеклеточному домену TrkB человека.

Фиг. 2. Данные кПЦР экспрессии (ось Y) для регулируемых генов (ось X) по отношению к синаптической пластичности на SH-SY5Y клетках после обработки с применением BDNF, контроль IgG1 (анти-2,4,6-тринитрофенил, анти-TNP) или D003 антитело.

Фиг. 3. График концентрации 277-антитела в компартментах глаза, как указано, и плазме после ивт инъекции 1 мг 277-антитела в глаза кроликам в зависимости от времени.

Фиг. 4. Рассчитанная глазная ФК IgG1 антител. На оси Y показано витреальная концентрация и на оси X дни после ивт применения. Время после ивт инъекции для достижения витреальной концентрации, эквивалентной EC_{50} , указано стрелками.

Фиг. 5. Общая схема исследования, включая группы животных и временную динамику. В неделю 5, осуществляли оценку исходной ЭРГ (до ивт применения) для определения степени индуцированной гипергликемией нейронной дисфункции в сетчатке. Группа 1 и Группа 2 получали ивт инъекции IgG1 контрольного антитела к 2,4,6-тринитрофенилу (анти-TNP), которое не вызывает каких-либо эффектов на функцию сетчатки. Глаза группы 3 лечили с применением C2 (анти-TrkB агонистическое суррогатное антитело). Функцию сетчатки снова оценивали в неделю 7 (после ивт).

Фиг. 6. Изменения латентности опосредованной палочками b-волны относительно средней латентности контрольной группы, на исходном уровне (до ивт) и через 1 неделю после ивт введения (см. фиг. 5 относительно общей схемы исследования). Недиабетическая контрольная группа 1 (черные, n=23 исследованных глаз) и гипергликемическая группа 2 (обозначенные точками, n=21 исследованных глаз) получали ивт инъекции с применением контрольного IgG1. Группа 3 получала ивт лечение с применением C2 (n=24 исследованных глаз). Данные представляют собой среднее значение + СПС. нд, недостоверно; *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001; отличия до ивт между гипергликемическими группами 2 и 3 и контрольной группой 1 являются достоверными (статистические данные условно не показаны; однофакторный дисперсионный анализ с критерием множественного сравнения Тьюки).

Фиг. 7. Светочувствительности, S, опосредованных палочками b-волн, нормированные к средним светочувствительностям контрольной группы, $S_{\text{контроль}}$, на исходном уровне (до ивт) или через 1 неделю после ивт введения (см. фиг. 5 относительно общей схемы исследования). Недиабетическая контрольная группа 1 (черные, n=23 исследованных глаз) и гипергликемическая группа 2 (красные, n=20 исследованных глаз) получали ивт инъекции с применением контрольного IgG1. Группа 3 получала ивт лечение с применением C2 (n=24 исследованных глаз). Данные представляют собой среднее значение + СПС. нд, недостоверно; *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001; отличия до ивт между гипергликемическими группами 2 и 3 и контрольной группой 1 являются достоверными (статистические данные условно не показаны; однофакторный дисперсионный анализ с критерием множественного сравнения Тьюки).

Фиг. 8. Ответы опосредованной палочками a-волны, вызванные вспышкой света $0,1 \text{ кдс/м}^2$, R, нормированные к среднему ответу контролей, на исходном уровне (до ивт) или через 1 неделю после ивт введения (см. фиг. 5 относительно общей схемы исследования). Недиабетическая контрольная группа 1 (черные, n=23 исследованных глаз) и гипергликемическая группа 2 (красные, n=20 исследованных глаз) получали ивт инъекции с применением контрольного IgG1. Группа 3 получала ивт лечение с применением C2 (n=24 исследованных глаз). Данные представляют собой среднее значение + СПС. нд, недостоверно; *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001; отличия до ивт между гипергликемическими группами 2 и 3 и контрольной группой 1 являются достоверными (статистические данные условно не показаны; однофакторный дисперсионный анализ с критерием множественного сравнения Тьюки).

Фиг. 9. Изменения латентности УФ опосредованной колбочками b-волны относительно средней латентности контрольной группы, на исходном уровне (до ивт) и через 1 неделю после ивт введения (см. фиг. 5 относительно общей схемы исследования). Недиабетическая контрольная группа 1 (черные, n=24 исследованных глаз) и гипергликемическая группа 2 (красные, n=22 исследованных глаз) получали ивт инъекции с применением контрольного IgG1. Группа 3 получала ивт лечение с применением C2 (n=24 исследованных глаз). Данные представляют собой среднее значение + СПС. нд, недостоверно; *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001; отличия до ивт между гипергликемическими группами 2 и 3 и контрольной группой 1 являются достоверными (статистические данные условно не показаны; однофакторный дисперсионный анализ с критерием множественного сравнения Тьюки).

Фиг. 10. Изменения латентности опосредованной колбочками M-типа b-волны относительно сред-

ней латентности контрольной группы, на исходном уровне (до ивт) и через 1 неделю после ивт введения (см. фиг. 5 относительно общей схемы исследования). Недиабетическая контрольная группа 1 (черные, $n=24$ исследованных глаз) и гипергликемическая группа 2 (красные, $n=22$ исследованных глаз) получали ивт инъекции с применением контрольного IgG1. Группа 3 получала ивт лечение с применением C2 ($n=24$ исследованных глаз). Данные представляют собой среднее значение + СПС. нд, недостоверно; *, $p<0,05$; **, $p<0,01$; ***, $p<0,001$; отличия до ивт между гипергликемическими группами 2 и 3 и контрольной группой 1 являются достоверными (статистические данные условно не показаны; однофакторный дисперсионный анализ с критерием множественного сравнения Тьюки).

Фиг. 11. Светочувствительности, S , УФ опосредованных колбочками b -волн, нормированные к средним светочувствительностям контрольных групп, $S_{\text{контроль}}$, на исходном уровне (до ивт) или через 1 неделю после ивт введения (см. Фиг. 5 относительно общей схемы исследования). Недиабетическая контрольная группа 1 (черные, $n=22$ исследованных глаз) и гипергликемическая группа 2 (красные, $n=22$ исследованных глаз) получали ивт инъекции с применением контрольного IgG1. Группа 3 получала ивт лечение с применением C2 ($n=21$ исследованных глаз). Данные представляют собой среднее значение + СПС. нд, недостоверно; *, $p<0,05$; **, $p<0,01$; ***, $p<0,001$; отличия до ивт между гипергликемическими группами 2 и 3 и контрольной группой 1 являются достоверными (статистические данные условно не показаны; однофакторный дисперсионный анализ с критерием множественного сравнения Тьюки).

Фиг. 12. Амплитуды насыщающих колебаний, R_{max} , опосредованных колбочками М-типа b -волн, нормированные к средней амплитуде насыщающих колебаний контролей, $R_{\text{max, контроль}}$, на исходном уровне (до ивт) или через 1 неделю после ивт введения (см. фиг. 5 относительно общей схемы исследования). Недиабетическая контрольная группа 1 (черные, $n=24$ исследованных глаз) и гипергликемическая группа 2 (красные, $n=22$ исследованных глаз) получали ивт инъекции с применением контрольного IgG1. Группа 3 получала ивт лечение с применением C2 ($n=24$ исследованных глаз). Данные представляют собой среднее значение + СПС. нд, недостоверно; *, $p<0,05$; **, $p<0,01$; ***, $p<0,001$; отличия до ивт между гипергликемическими группами 2 и 3 и контрольной группой 1 являются достоверными (статистические данные условно не показаны; однофакторный дисперсионный анализ с критерием множественного сравнения Тьюки).

Фиг. 13. ERK-фосфорилирование в CHO клетках, экспрессирующих рецептор TrkB человека после стимуляции с применением (А) BDNF, 277-антитела, или комбинации 1 нМ BDNF с возрастающими концентрациями 277-антитела или (В) BDNF, C2 антитела, или комбинации 1 нМ BDNF с возрастающими концентрациями C2-антитела. Данные (символы) представлены в виде средних значений \pm СПС (для некоторых точек, "усы" погрешностей являются более короткими, чем высота символа); соединительные линии отображают нелинейную регрессию (лог(агонист) отн. ответа (три параметра)). Показан один из репрезентативных примеров из серии из трех экспериментов с независимыми клеточными партиями; н.д., недостоверное отличие между 1 нМ BDNF отдельно и 1 нМ BDNF с указанными концентрациями 277-антитела. $\#p<0,001$ 1 нМ BDNF отдельно отн. 1 нМ BDNF с указанными концентрациями C2-антитела; однофакторный дисперсионный анализ с критерием множественного сравнения.

Фиг. 14. Связывание 277-антитела или C2 антитела с VEGF человека или крысы в *in vitro* ELISA анализе. Данные (символы) представлены в виде средних значений \pm СПС (примечание: "усы" погрешностей являются более короткими, чем высота символа); соединительные линии отображают нелинейную регрессию (лог(агонист) отн. ответа (три параметра)). Показан один из репрезентативных примеров из серии из пяти независимых экспериментов. $\#p<0,01$ hVEGF-C2 отн. hVEGF-Изотип IgG1 при указанных концентрациях (критерий Стьюдента для одной выборки).

Подробное описание изобретения

Определения

Общая структура антител или иммуноглобулина хорошо известна специалистам в данной области, эти молекулы представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины, как правило с молекулярной массой примерно 150000 Да, состоящие из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Каждая легкая цепь ковалентно связана с тяжелой цепью с помощью одной дисульфидной связи с образованием гетеродимера, и гетеротримерная молекула образуется посредством ковалентной дисульфидной связи между двумя идентичными тяжелыми цепями гетеродимеров. Хотя легкие и тяжелые цепи связаны с помощью одной дисульфидной связи, количество дисульфидных связей между двумя тяжелыми цепями варьируется в зависимости от изоформа иммуноглобулина. Каждая тяжелая и легкая цепь имеет также равномерно распределенные внутрицепочечные дисульфидные мостики. Каждая тяжелая цепь имеет аминоконцевую вариабельную область (V_H =вариабельная тяжелая цепь), за которой расположены три или четыре константных домена (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} и C_{H4}), а также шарнирный участок между C_{H1} и C_{H2} . Каждая легкая цепь имеет две области, аминоконцевую вариабельную область (V_L =вариабельная легкая цепь) и карбоксиконцевый константный домен (C_L). V_L -область нековалентно связана с V_H -областью, а C_L -домен, как правило, ковалентно связан с C_{H1} -доменом через дисульфидную связь. Вероятно, определенные аминокислотные остатки образуют поверхность раздела между вариабельными областями легких и тяжелых цепей (Chothia и др., J. Mol. Biol. 186, 1985, сс. 651-663).

Определенные участки в переменных областях значительно различаются у различных антител, т.е. они являются "гипервариабельными". Эти гипервариабельные участки содержат остатки, которые непосредственно участвуют в связывании и определяют специфичность каждого конкретного антитела в отношении специфической для него антигенной детерминанты. Гипервариабельность в переменных областях, как легкой цепи, так и тяжелой цепи, концентрируется в трех сегментах, которые обозначают как определяющие комплементарности участки (гипервариабельные участки) (CDR) или гипервариабельные петли (HVL). CDR определяют путем сравнения последовательностей согласно методу, описанному у Kabat и др., в: *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-е изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991, а HVL структурно определяют на основе трехмерной структуры переменной области согласно методу, описанному у Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196, 1987, сс. 901-917. Если эти два метода приводят к некоторым различиям при идентификации CDR, то предпочтительным является определение на основе структуры. Согласно номенклатуре Кэбота CDR-L1 расположен примерно на остатках 24-34, CDR-L2 примерно на остатках 50-56 и CDR-L3 примерно на остатках 89-97 в переменной области легкой цепи; CDR-H1 расположен примерно на остатках 31-35, CDR-H2 примерно на остатках 50-65 и CDR-H3 примерно на остатках 95-102 в переменной области тяжелой цепи. Таким образом, CDR1, CDR2, CDR3 тяжелых и легких цепей определяют уникальные и функциональные свойства, специфические для данного антитела.

Три CDR в каждой из тяжелых и легких цепей разделены каркасными участками (FR), которые содержат последовательности, в меньшей степени имеющие тенденцию к вариабельности. Начиная с аминоконца по направлению к карбоксиконцу переменных областей тяжелых и легких цепей FR и CDR упорядочены следующим образом: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. В значительной степени β -складчатая конформация FR позволяет CDR в каждой из цепей находиться в непосредственной близости друг с другом, а также с CDR из другой цепи. Полученная конформация присуща антигенсвязывающему центру (см. Kabat и др., *NIH Publ. № 91-3242*, т. I, 1991, сс. 647-669), хотя не является необходимым условием, чтобы все остатки CDR непосредственно участвовали в связывании антигена.

Остатки FR и константные домены Ig не вовлечены непосредственно в связывание антигена, но участвуют в связанной с антигеном и/или опосредуемой антигеном эффекторной функции. Некоторые остатки FR, вероятно, оказывают выраженное воздействие на связывание антигена по меньшей мере тремя путями: путем нековалентного связывания непосредственно с эпитопом, путем взаимодействия с одним или несколькими остатками CDR и путем влияния на поверхность раздела между тяжелыми и легкими цепями. Константные домены не участвуют непосредственно в связывании антигена, но опосредуют различные эффекторные функции Ig, такие как участие антитела в антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), комплементзависимой цитотоксичности (CDC) и антителозависимом клеточном фагоцитозе (ADCP).

Легкие цепи иммуноглобулинов позвоночных животных относят к одному или двух четко различимых классов, каппа (κ) и лямбда (λ), на основе аминокислотной последовательности константного домена. Для сравнения, тяжелые цепи иммуноглобулинов млекопитающих относятся к одному из пяти основных классов с учетом последовательности константных доменов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. IgG и IgA дополнительно подразделяют на подклассы (изоотипы), например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂, соответственно. Константные домены тяжелых цепей, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, обозначают как α , δ , ϵ , γ и μ соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации классов нативных иммуноглобулинов хорошо известны.

В контексте настоящего описания понятия "антитело", "антитело к TrkB", "гуманизованное антитело к TrkB" и "вариант гуманизованного антитела к TrkB" применяют в наиболее широком смысле, и они относятся, в частности, к моноклональным антителам (включая полноразмерные моноклональные антитела), мультиспецифическим антителам (например, биспецифическим антителам), антителам с незначительными модификациями, такими как N- или C-концевые усечения, и фрагментам антител, таким как переменные области и другие участки антител, которые обладают требуемой биологической активностью, например, способностью связываться с TrkB.

Понятие "моноклональное антитело" (mAb) относится к антителу из популяции практически гомогенных антител; т.е. индивидуальные антитела в указанной популяции являются идентичными за исключением встречающихся в естественных условиях мутаций, которые могут присутствовать в очень небольших количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифическими, их мишенью является индивидуальная антигенная детерминанта, "эпитоп". Таким образом, прилагательное "моноклональные" является отличительным признаком практически гомогенной популяции антител, мишенью которых является идентичный эпитоп, и понятие не ограничено требованием к получению антител с помощью какого-либо конкретного метода. Должно быть очевидно, что моноклональные антитела можно получать с помощью любой техники или методологии, известной в данной области; включая, например, метод гибридом (Kohler и др., *Nature* 256, 1975, с. 495), или методы рекомбинантной ДНК, известные в данной области (см., например, US 4816567), или методы выделения моноклональных полученных с помощью рекомбинантной ДНК антител с использованием фаговых библиотек антител, которые описаны у

Clackson и др., Nature 352, 1991, сс. 624-628 и у Marks и др., J. Mol. Biol. 222, 1991, сс. 581-597.

Химерные антитела состоят из переменных областей тяжелой и легкой цепи антител из одного вида (например, из млекопитающего кроме человека, такого как мышь) и константных областей легкой и тяжелой цепи антитела из других видов (например, человека), и их можно получать путем соединения последовательностей ДНК, кодирующих переменные области антитела из первого вида (например, мыши), с последовательностями ДНК константных областей антитела из второго вида (например, человека), и трансформации хозяина экспрессионным вектором, содержащим связанные последовательности, что позволяет хозяину продуцировать химерное антитело. В альтернативном варианте химерное антитело может также представлять собой антитело, в котором одна или несколько областей или доменов тяжелой и/или легкой цепи идентичны, гомологичны или являются вариантом соответствующей последовательности в моноклональном антителе из другого класса или изоформа иммуноглобулина или из консенсусной последовательности или последовательности зародышевой линии. Химерные антитела могут включать фрагменты указанных антител при условии, что фрагмент антитела обладает требуемой биологической активностью родительского антитела, например способностью связываться с одним и тем же эпитопом (см., например, US 4816567; и Morrison и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1984, сс. 6851-6855).

Понятия "фрагмент антитела", "антигенсвязывающий фрагмент", "фрагмент антитела к TrkB", "фрагмент гуманизированного антитела к TrkB" и "фрагмент варианта гуманизированного антитела к TrkB" относятся к части полноразмерного антитела к TrkB, в котором сохраняется переменная область или ее функциональная способность, например, специфичность связывания с эпитопом TrkB. Примерами фрагментов антител являются (но, не ограничиваясь только ими) Fab-, Fab'-, F(ab')₂-, Fd-, Fv-, scFv- и scFv-Fc-фрагмент, димерное антитело (диабоди), линейное антитело, одноцепочечное антитело, минитело, димерное антитело, образованное из фрагментов антитела, и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Полноразмерные антитела можно обрабатывать ферментами, такими как папаин или пепсин, с получением требуемых фрагментов антител. Расщепление папаином применяют для получения двух идентичных антигенсвязывающих фрагментов, которые называют "Fab"-фрагментами, каждый с одним антигенсвязывающим центром, при этом оставшуюся часть обозначают как "Fc"-фрагмент. Fab-фрагмент содержит также константный домен легкой цепи и C_{H1}-домен тяжелой цепи. После обработки пепсином получают F(ab')₂-фрагмент, который несет два антигенсвязывающих центра и все еще сохраняет способность к перекрестному сшиванию с антигеном.

Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов присутствием дополнительных остатков, включая один или несколько остатков цистеина из шарнирной области антитела на C-конце C_{H1}-домена. F(ab')₂-фрагменты антител представляют собой пары Fab'-фрагментов, связанных с помощью остатков цистеина в шарнирной области. Известны другие химические сочетания фрагментов антител.

"Fv"-фрагмент содержит полный антиген-распознающий и антиген-связывающий центр, состоящий из димера, включающего переменную область одной тяжелой и одной легкой цепи в тесной нековалентной ассоциации. В этой конфигурации три CDR каждой переменной области взаимодействуют с определенным антигенсвязывающим центром на поверхности димера V_H-V_L. В целом, шесть CDR обуславливают специфичность антитела в отношении связывания антигена.

"Одноцепочечный Fv" или "scFv"-фрагмент антитела представляет собой одноцепочечный Fv-вариант, содержащий V_H- и V_L-области антитела, при этом области присутствуют в одной полипептидной цепи. Одноцепочечный Fv обладает способностью распознавать антиген и связываться с ним. Полипептид scFv необязательно может содержать также полипептидный линкер, расположенный между V_H- и V_L-областями для облегчения образования трехмерной структуры, требуемой для связывания антигена с помощью scFv (см., например, Pluckthun, в: The Pharmacology of monoclonal Antibodies, т. 113, под ред. Rosenburg и Moore, изд-во Springer-Verlag, New York, 1991, сс. 269-315).

Другие обладающие способностью к распознаванию фрагменты антител включают фрагменты, которые содержат пару расположенных в виде тандема Fd-сегментов (V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}), образующих пару антигенсвязывающих участков. Указанные "линейные антитела" могут быть биспецифическими или моноспецифическими, что описано, например, у Zapata и др., Protein Eng. 8(10), 1995, сс. 1057-1062.

Гуманизированное антитело или фрагмент гуманизированного антитела представляет собой специфический тип химерного антитела, которое включает вариант аминокислотной последовательности иммуноглобулина или его фрагмента, который обладает способностью связываться с предварительно определенным антигеном и который содержит один или несколько FR, который(ые) имеет(ют) аминокислотную последовательность, практически соответствующую последовательности человеческого иммуноглобулина, и один или несколько CDR, который(ые) имеет(ют) аминокислотную последовательность, которая практически соответствует аминокислотной последовательности нечеловеческого иммуноглобулина. Указанную нечеловеческую аминокислотную последовательность, которую часто обозначают как "импортная" последовательность, как правило, получают из "импортной" области антитела, в частности, переменной области. В целом, гуманизированное антитело включает по меньшей мере CDR или HVL нечеловеческого антитела, встроенные между FR переменной области человеческого тяжелой или легкой цепи.

Настоящее изобретение описаны специфические гуманизированные антитела к TrkB, которые содержат CDR, полученные из мышинового лидерного D003, встроенные между FR последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепи человеческой зародышевой линии. Должно быть очевидно, что определенные остатки мышинового FR можно импортировать для обеспечения функции гуманизированных антител, и следовательно, определенные остатки последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепи человеческой зародышевой линии модифицируют для того, чтобы они были такими же как в соответствующей мышиново последовательности.

В одном аспекте, гуманизированное антитело к TrkB содержит практически все из по меньшей мере одной и, как правило, двух переменных областей (таких, например, как входящие в Fab-, Fab'-, F(ab')₂-, Fabc- и Fv-фрагменты), в которых все или практически все CDR соответствуют CDR нечеловеческих иммуноглобулинов, и согласно настоящему изобретению CDR представляют собой мышинные последовательности лидерного D003, и FR представляют собой FR, которые имеют консенсусную последовательность или последовательность зародышевой линии человеческого иммуноглобулина. В другом аспекте изобретения гуманизированное антитело к TrkB включает также по меньшей мере часть Fc-области иммуноглобулина, как правило, человеческого иммуноглобулина. Как правило, антитело должно содержать как легкую цепь, так и по меньшей мере переменную область тяжелой цепи. Антитело может включать также при необходимости один или несколько из следующих участков: C_{H1}, шарнирная область, C_{H2}, C_{H3} и/или C_{H4} тяжелой цепи.

Гуманизированное антитело к TrkB может быть выбрано из любого класса иммуноглобулинов, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любого изотипа, включая IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. Например, константный домен может представлять собой комплементсвязывающий константный домен, где является желательным, чтобы гуманизированное антитело проявляло цитотоксическую активность, и изотип типично представлял собой IgG₁. В тех случаях, когда такая цитотоксическая активность не является желательной, то константный домен может представлять собой другой изотип, например, IgG₂. Альтернативное гуманизированное антитело к TrkB может содержать последовательности из более чем одного класса или изотипа иммуноглобулинов, и выбор конкретных константных доменов для оптимизации требуемых эффекторных функций находится в компетенции обычного специалиста в данной области. Конкретными вариантами осуществления настоящего изобретения являются антитела, которые представляют собой антитела изотипа IgG1 и более конкретно антитела изотипа IgG1, в которых "выключены" эффекторные функции.

FR и CDR или HVL гуманизированного антитела к TrkB не обязательно должны точно соответствовать родительским последовательностям. Например, один или несколько остатков в импортном CDR или HVL или в консенсусной последовательности или последовательности зародышевой линии FR можно изменять (например, посредством мутагенеза) путем замены, инсерции или делеции, в результате чего полученный аминокислотный остаток становится не идентичным исходному остатку в соответствующем положении любой родительской последовательности, но, тем не менее, антитело сохраняет функцию, такую как способность связываться с TrkB. Указанное изменение, как правило, не должно быть обширным и должно представлять собой консервативные изменения. Как правило, по меньшей мере 75% остатков, чаще по меньшей мере на 90% и наиболее часто более 95% или более 98% или более 99%, гуманизированного антитела должно соответствовать остаткам родительской консенсусной последовательности или последовательности зародышевой линии FR и импортных последовательностей CDR.

Остатки иммуноглобулина, которые влияют на поверхность раздела между переменными областями тяжелой и легкой цепи ("поверхность раздела V_L-V_H"), представляют собой остатки, которые влияют на близость или ориентацию двух цепей относительно друг друга. Конкретными остатками, которые могут участвовать во взаимодействиях между цепями, являются остатки VL 34, 36, 38, 44, 46, 87, 89, 91, 96 и 98 и остатки V_H 35, 37, 39, 45, 47, 91, 93, 95, 100 и 103 (согласно системе нумерации, предложенной Kabat и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987)). В US 6407213 обсуждается также, что в указанном взаимодействии могут участвовать такие остатки как остатки V_L 43 и 85 и остатки V_H 43 и 60. Хотя указанные остатки указаны только для человеческого IgG, их можно рассматривать и для других видов. Важные остатки антитела, которые, как ожидается, могут участвовать во взаимодействиях между цепями, отбирают для замены в консенсусной последовательности.

Понятия "консенсусная последовательность" и "консенсусное антитело" относятся к аминокислотной последовательности, которая содержит наиболее часто встречающийся аминокислотный остаток в каждом положении во всех иммуноглобулинах любого класса, изотипа или в любой субъединичной структуре, например, переменной области человеческого иммуноглобулина. Консенсусная последовательность может базироваться на иммуноглобулинах конкретных видов или множества видов. Под "консенсусной/консенсусным" последовательностью, структурой или антителом подразумевают консенсусную человеческую последовательность, указанную в конкретных вариантах осуществления изобретения, и понятия относятся к аминокислотной последовательности, которая содержит наиболее часто встречающиеся остатки в каждом положении во всех человеческих иммуноглобулинах конкретного класса, изотипа или субъединичной структуры. Таким образом, консенсусная последовательность содержит

аминокислотную последовательность, которая имеет в каждом положении аминокислоту, которая присутствует в одном или нескольких известных иммуноглобулинах, но которая может не представлять собой точную копию полной аминокислотной последовательности любого индивидуального иммуноглобулина. Вариативную область консенсусной последовательности не получают из какого-либо встречающегося в естественных условиях антитела или иммуноглобулина (Kabat и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991) и его вариантов. Консенсусные последовательности FR тяжелой и легкой цепи и их варианты представляют собой ценные последовательности для получения гуманизированных антител к TrkB (см., например, US 6037454 и 6054297).

Человеческие последовательности зародышевой линии присутствуют в естественных условиях в популяции человеческих антител. Комбинация этих генов зародышевой линии создает разнообразие антител. Последовательности зародышевой линии антитела легкой цепи антитела получают из консервативных человеческих v-генов и j-генов зародышевой линии каппа или ламбда. Аналогично этому последовательности тяжелой цепи получают из v-, d- и j-генов зародышевой линии (LeFranc M-P и LeFranc G, "The Immunoglobulin Facts Book", изд-во Academic Press, 2001).

"Выделенное" антитело представляет собой антитело, которое идентифицировано и отделено и/или очищено от компонента его естественного окружения. Загрязняющие компоненты естественного окружения антитела представляют собой субстанции, которые могут влиять на диагностическое или терапевтическое применение антитела и могут представлять собой ферменты, гормоны или другие белковые или небелковые растворенные вещества. В одном из объектов изобретения выделенное антитело должно представлять собой антитело, очищенное до степени, превышающей 95 мас. %.

Выделенное антитело представляет собой антитело *in situ* внутри рекомбинантных клеток, в которых оно продуцировано, если в нем не присутствует ни один компонент естественного окружения антитела. Однако, как правило, выделенное антитело получают с помощью по меньшей мере одной стадии очистки, во время которой удаляют рекомбинантный клеточный материал.

Понятие "характеристика антитела" относится к факторам/свойствам, которые описывают распознавание антителом антигена или эффективность антитела *in vivo*. Изменения в аминокислотной последовательности антитела могут влиять на свойства антитела, такие как фолдинг, и могут влиять на физические факторы, такие как начальная скорость связывания антитела с антигеном (k_a), константа диссоциации антитела от антигена (k_d), константа аффинности антитела к антигену (K_d), конформация антитела, стабильность белка и время полужизни антитела.

В контексте настоящего описания понятия "идентичный" или "процент идентичности" касательно двух или большего количества нуклеотидных или полипептидных последовательностей относится к двум или большему количеству последовательностей или подпоследовательностей, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент одинаковых нуклеотидов или аминокислотных остатков при сравнении и выравнивании для максимального соответствия. Для определения процента идентичности последовательности выравнивают для оптимального сравнения (например, можно интродуцировать брешу в последовательность первой аминокислотной или нуклеотидной последовательности для оптимального сравнительного анализа первичной структуры со второй аминокислотной или нуклеотидной последовательностью). Затем сравнивают аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих положениях аминокислот или положениях нуклеотидов. Когда в положении в первой последовательности находится такой же аминокислотный остаток или нуклеотид, что и в соответствующем положении во второй последовательности, то молекулы являются идентичными в указанном положении. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией от количества идентичных положений в последовательностях (т.е. % идентичности = количество идентичных положений/общее количество положений (например, перекрывающихся положений) $\times 100$). В некоторых вариантах осуществления изобретения две сравниваемые последовательности имеют одинаковую длину после интродукции при необходимости брешей в последовательности (например, исключая дополнительную последовательность, простирающуюся за последовательностями, подлежащими сравнению). Например, когда сравнивают последовательности вариативных областей, то лидерные и/или последовательности константных доменов не рассматриваются. При сравнении последовательностей двух последовательностей, "соответствующий" CDR относится к CDR, расположенному в одинаковом положении в обеих последовательностях (например, CDR-H1 каждой последовательности).

Определение процента идентичности или процента сходства между двумя последовательностями можно осуществлять с помощью математического алгоритма. Предпочтительным примером математического алгоритма, который можно применять для сравнения двух последовательностей, является (но не ограничиваясь только ими) алгоритм Karlin и Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1990, сс. 2264-2268, модифицированный согласно описанному у Karlin и Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1993, сс. 5873-5877. Указанный алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST, описанные у Altschul и др., J. Mol. Biol. 215, 1990, сс. 403-410. Анализ нуклеотидов с помощью BLAST можно осуществлять с помощью программы NBLAST, в которой балл = 100, длина слова = 12, для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных нуклеиновой кислоте, кодирующей представляющей интерес белок.

Анализ белков с помощью BLAST можно осуществлять с помощью программы XBLAST, в которой балл = 50, длина слова = 3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных представляющему интерес белку. Для осуществления сравнительных анализов первичной структуры, включающей брешу, можно применять программу Gapped BLAST, описанную у Altschul и др., *Nucleic Acids*, 25, 1997, сс. 3389-3402. В другом варианте можно применять PSI-Blast для осуществления итерационного поиска, позволяющего определять отдаленные взаимосвязи между молекулами (Id.). При применении программ BLAST, Gapped BLAST и PSI-Blast можно применять задаваемые по умолчанию параметры соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). Другим предпочтительным примером (но, не ограничиваясь только им) математического алгоритма, который можно применять для сравнения последовательностей, является алгоритм, описанный у Myers и Miller, CABIOS, 1989. Указанный алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью пакета программ для сравнительного анализа первичной структуры последовательностей GCG. Когда программу ALIGN применяют для сравнения аминокислотных последовательностей, то можно применять таблицу взвешенных остатков PAM120, штраф за длину брешу 12 и штраф за брешу 4. Дополнительные алгоритмы для анализа последовательностей известны в данной области и включают ADVANCE и ADAM, описанные у Torellis и Robotti, *Comput. Appl. Biosci.* 10, 1994, сс. 3-5; и FASTA, описанный у Pearson и Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 1988, сс. 2444-2448. В программе FASTA параметр *ktup* обозначает контрольный параметр, который задает чувствительность и скорость поиска. Если *ktup*=2, то сходные области в двух подлежащих сравнению последовательностях выявляют путем просмотра пар выравненных остатков; если *ktup*=1, то оценивают индивидуальные выравненные аминокислоты. Для белковых последовательностей можно задавать значение *ktup*, равное 2 или 1, а для последовательностей ДНК значения в пределах от 1 до 6. В альтернативном варианте сравнительный анализ первичной структуры белковых последовательностей можно осуществлять с помощью алгоритма CLUSTAL W, описанного у Higgins и др., *Methods Enzymol.* 266, 1996, сс. 383-402.

Последовательность нуклеиновой кислоты "функционально связана", если она расположена в функциональной взаимосвязи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, предпоследовательность нуклеиновой кислоты или секреторная лидерная последовательность функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид, если она экспрессируется в виде белок-предшественник, который принимает участие в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он оказывает влияние на транскрипцию последовательности; или сайт связывания рибосомы функционально связан с кодирующей последовательностью, если он позиционирован таким образом, что облегчает трансляцию. В целом, "функционально связана" обозначает, что последовательности ДНК, которые связаны, являются соприкасающимися, и, в случае секреторной лидерной последовательности, соприкасаются и в рамке считывания. Однако энхансеры не обязательно являются соприкасающимися. Связывание может осуществляться путем лигирования в подходящих сайтах рестрикции. Если такие сайты не существуют, то можно использовать синтетические олигонуклеотидные адаптеры или линкеры.

Как используется в настоящей заявке, выражения "клетка", "клеточная линия" и "культура клеток" используются взаимозаменяемо и все такие обозначения охватывают их потомство. Таким образом, "трансформанты" и "трансформированные клетки" включают первичные рассматриваемые клетки и культуры, имеющие происхождение из них, независимо от количества переносов.

Понятие "млекопитающее", подлежащее лечению, относится к любому животному, которое принадлежит к классу млекопитающих, включая людей, домашних и сельскохозяйственных животных, а также живущих в зоопарке животных, предназначенных для спорта или комнатных животных, таких как собаки, лошади, кошки, коровы и т.д. Предпочтительно млекопитающее представляет собой человека.

"Нарушение", как используется в настоящей заявке, представляет собой любое состояние, которое будет получать преимущество от лечения с применением гуманизированного антитела к TrkB, описанного в настоящей заявке. Оно включает хронические и острые нарушения или заболевания, включая те патологические состояния, которые вызывают предрасположенность млекопитающего к указанному нарушению. Неограничивающие примеры или нарушения, подвергаемые лечению в соответствии с настоящей заявкой, включают глазные нарушения или нарушения сетчатки.

Как используется в настоящей заявке, термин "нарушение, связанное с TrkB" или "заболевание, связанное с TrkB", относится к состоянию, при котором показана модификация или активация клеток, экспрессирующих TrkB. Нарушение, связанное с TrkB включает заболевания и нарушения, такие как возрастная дегенерация желтого пятна, географическая атрофия, диабетическая ретинопатия, диабетический отек желтого пятна, пигментная дистрофия сетчатки, наследственная дистрофия сетчатки, наследственная макулодистрофия, миопическая дегенерация, окклюзии вены сетчатки, окклюзии артерии сетчатки, эндофтальмит, увеит, кистозный макулярный отек, хороидальная неоваскулярная мембрана вследствие любого из заболеваний сетчатки, оптические нейропатии, глаукома, отслойка сетчатки, токсическая ретинопатия, лучевая ретинопатия, и травматическая ретинопатия, а также продромальная и от легкой до умеренной болезнь Альцгеймера, задержка прогрессирования заболевания у пациентов с болезнью Альцгеймера, болезнь Хантингтона, болезнь Паркинсона, большое депрессивное расстройство, шизоф-

рения, когнитивное нарушение, связанное с шизофренией, предотвращение первого приступа психоза у индивидуумов с ослабленным психозным синдромом, предотвращение повторения у пациентов с шизофренией, терапевтически резистентная депрессия, и метаболические заболевания, такие как гиперфагия, ожирение или метаболический синдром.

Термин "интравитреальная инъекция" имеет общепринятое значение в данной области техники и относится к интродукции антитела к TrkB или его антигенсвязывающего фрагмента в стекловидное тело пациента.

Термин "подкожное введение" относится к интродукции антитела к TrkB или его антигенсвязывающего фрагмента под кожу больного животного или человека, предпочтительно в карман между кожей и низлежащей тканью, путем относительно медленного пролонгированного введения из содержащего лекарственное средство резервуара. Пощипывание или оттягивание кожи вверх вниз от низлежащей ткани может создавать карман.

Понятие "подкожная инфузия" относится к интродукции лекарственного средства под кожу больного животного или человека, предпочтительно в карман между кожей и низлежащей тканью, путем относительно медленного пролонгированного введения из содержащего лекарственное средство резервуара в течение периода времени, составляющего (но, не ограничиваясь только указанным) 30 мин или менее или 90 мин или менее. Необязательно инфузию можно осуществлять путем подкожной имплантации насоса для введения лекарственного средства, имплантированного под кожу больного животного или человека, при этом насос обеспечивает введение лекарственного средства в предварительно определенном количестве в течение предварительно определенного периода времени, составляющего 30 мин, 90 мин или периода времени, соответствующего продолжительности схемы лечения.

Понятие "подкожный болюс" относится к введению лекарственного средства под кожу больного животного или человека, при этом продолжительность введения лекарственного средства в виде болюса составляет менее примерно 15 мин; в другом объекте изобретения менее 5 мин, а еще в одном объекте изобретения в течение менее 60 с. В следующем объекте изобретения введение осуществляют в карман между кожей и низлежащей тканью, где карман можно создавать путем пощипывания или оттягивания кожи вверх вниз от низлежащей ткани.

Термин "терапевтически эффективное количество" используется по отношению к количеству антитела к TrkB или его антигенсвязывающего фрагмента, при использовании которого происходит ослабление или облегчение одного или нескольких симптомов нарушения, подлежащего лечению. Действующее вещество применяют таким образом, что в указанном количестве оно оказывало благоприятное действие на пациента. В одном аспекте, терапевтически эффективное количество имеет нейрозащитный или нейрорегенеративный эффект. В другом аспекте, терапевтически эффективное количество относится к целевой концентрации в сыворотке пациента, при которой оно проявляется как эффективное, например, в отношении замедления прогрессирования заболевания. Эффективность можно оценивать общепринятыми путями в зависимости от подлежащего лечению состояния. Например, при заболеваниях или нарушениях глаз/сетчатки, которые характеризуются клетками, экспрессирующими TrkB, эффективность может быть измерена путем определения частоты ответов, например, восстановление зрения или путем оценки времени задержки до прогрессирования заболевания.

Термины "лечение" и "терапия" и подобные, как используются в настоящей заявке, относятся к терапевтическим, а также профилактическим или подавляющим мероприятиям в отношении заболевания или нарушения, которые приводят к любому клинически важному или благоприятному действию, включая (но, не ограничиваясь только ими) облегчение или ослабления одного или нескольких симптомов, регресс, замедление или прекращение развития заболевания или нарушения. Таким образом, например, под понятие "лечение" подпадает введение антитела к TrkB или его антигенсвязывающего фрагмента до или после начала проявления симптома заболевания или нарушения, что приводит к предупреждению или устранению одного или нескольких признаков заболевания или нарушения. В другом примере понятие относится к введению антитела к TrkB или его антигенсвязывающего фрагмента после клинического проявления болезни для борьбы с симптомами болезни. Кроме того, в контексте настоящего описания понятие "лечение" или "терапия" относится к введению антитела к TrkB или его антигенсвязывающего фрагмента после возникновения и после развития клинических симптомов, где введение оказывает воздействие на клинические параметры заболевания или нарушения, такие как степень повреждения ткани или количество и распространение метастазов, вне зависимости от того приводит или нет лечение к облегчению заболевания. Кроме того, если применение композиций, предлагаемых в изобретении, либо индивидуально, либо в сочетании с другим терапевтическим средством купирует или облегчает по меньшей мере один из симптомов подлежащего лечению нарушения по сравнению с указанным симптомом без применения содержащей композиции антитела к TrkB или его антигенсвязывающего фрагмента, результат следует рассматривать как эффективное лечение требуемого нарушения вне зависимости от того, происходит или нет облегчение всех симптомов нарушения.

Термин "листовка-вкладыш в упаковке" относится к инструкциям, которые принято включать в предназначенные для продажи упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, методах применения, введения, противопоказаниях и/или мерах предосторожности при при-

менении указанных терапевтических продуктов.

Антитела

Описанные и раскрытые в настоящей заявке антитела представляют собой антитела к TrkB, в особенности гуманизированные антитела к TrkB, а также композиции и изделия, содержащие антитела к TrkB согласно настоящему изобретению. Также описаны антигенсвязывающие фрагменты антитела к TrkB. Антитела к TrkB и их антигенсвязывающие фрагменты можно применять для лечения различных заболеваний или нарушений, которые характеризуются уменьшенной активностью TrkB пути. Антитело к TrkB и его антигенсвязывающий фрагмент каждый включает по меньшей мере компонент, который специфически распознает TrkB эпитоп.

При исходной характеристике, выбран анти-TrkB мышинный лидерный D003 на основании его намного лучшей эффективности функционирования антитела. Создавали библиотеку вариантов путем помещения CDR мышинной лидерной последовательности в FR консенсусных переменных доменов тяжелой и легкой цепи человека, а также, путем конструирования FR с различными изменениями.

Это приводило к получению различных гуманизированных переменных последовательностей тяжелой и легкой цепи, как показано ниже:

VL Последовательности.

D003_VL (мышинная лидерная), переменная легкая цепь, SEQ ID NO: 1

DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLI
YWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQQYYSYPYTFGGGT
 KLEIK

277-gr_VL, (гуманизированная) переменная легкая цепь, SEQ ID NO: 2
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLI
YWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGQGT
KLEIK

277-33_VL: (гуманизированная) переменная легкая цепь, SEQ ID NO: 3
DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIY
WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGGGTK
LEIK

277-35_VL: (гуманизированная) переменная легкая цепь, SEQ ID NO: 4
DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIY
WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGGGTK
LEIK

277-42_VL, (гуманизированная) переменная легкая цепь, SEQ ID NO: 5
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLI
YWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGGGT
KLEIK

277-44_VL, (гуманизированная) переменная легкая цепь, SEQ ID NO: 6
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLI
YWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGQGT
KLEIK

277-48_VL, (гуманизированная) переменная легкая цепь, SEQ ID NO: 7
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLI
YWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGQGT
KLEIK

277-51_VL, (гуманизированная) переменная легкая цепь, SEQ ID NO: 8
DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIY
WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGGGTK
LEIK

277-64_VL, (гуманизированная) переменная легкая цепь, SEQ ID NO: 9
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIY
WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGQGTK
 LEIK

277-67_VL, (гуманизированная) переменная легкая цепь, SEQ ID NO: 10
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLI
YWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGQGT
 KLEIK

VH ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

D003_VH, (мышинная лидерная) переменная тяжелая цепь, SEQ ID NO: 11
 QVQLVQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFTGYWMHWVKQRPGQGLEWIGYI
NPSTDYTEYNQKFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSRGTGNY
 WGQGTTLTVSS

277-gr_VH, (гуманизированная) переменная тяжелая цепь, SEQ ID NO: 12
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQAPGQGLEWMGYI
NPSTDYTEYNQKFKDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSRGTGNY
 WGQGTTLTVSS

277-33_VH, (гуманизированная) переменная тяжелая цепь, SEQ ID NO: 13
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQAPGQGLEWIGYIN
PSTDYTEYNQKFKDRVTLTRDTSTSTVYMELSSLTSEDTAVYYCARSRGTGNYW
 GQGTTLTVSS

277-35_VH, (гуманизированная) переменная тяжелая цепь, SEQ ID NO: 14
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQAPGQGLEWIGYIN
PSTDYTEYNQKFKDRVTLTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSRGTGNYW
 GQGTTLTVSS

277-42_VH, (гуманизированная) переменная тяжелая цепь, SEQ ID NO: 15
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQAPGQGLEWIGYIN
PSTDYTEYNQKFKDRVTLTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSRGTGNYW
 GQGTTLTVSS

277-44_VH, (гуманизированная) переменная тяжелая цепь, SEQ ID NO: 16
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQAPGQGLEWIGYIN
 PSTDYTEYNQKFKDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLTSEDTAVYYCARSRTGNYW
 GQGTTVTVSS

277-48_VH, (гуманизированная) переменная тяжелая цепь, SEQ ID NO: 17
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQRPQGLEWIGYIN
 PSTDYTEYNQKFKDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSRTGNYW
 GQGTTVTVSS

277-51_VH, (гуманизированная) переменная тяжелая цепь, SEQ ID NO: 18
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQRPQGLEWIGYIN
 PSTDYTEYNQKFKDRATLTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSRTGNYW
 GQGTTVTVSS

277-64_VH, (гуманизированная) переменная тяжелая цепь, SEQ ID NO: 19

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQAPGQGLEWIGYIN
 PSTDYTEYNQKFKDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSRTGNYW
 GQGTTVTVSS

277-67_VH, (гуманизированная) переменная тяжелая цепь, SEQ ID NO: 20
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQAPGQGLEWIGYIN
 PSTDYTEYNQKFKDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSRTGNYW
 GQGTTVTVSS

Подчеркнутые последовательности соответствовали CDR областям переменных областей легких и тяжелых цепей.

Гуманизированные антитела к TrkB согласно настоящему изобретению представляют собой антитела, которые имеют последовательности легких и тяжелых цепей, как представлено в таблице ниже. Были созданы IgG1-KO мутанты путем интродукции двух мутаций в Fc область, Leu232Ala и Leu233Ala для уменьшения эффекторной функции.

Таблица 1

Антитело	Последовательность	SEQ ID NO:
277-gr (Легкая цепь, IgG1)	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQK NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGQGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN	21

	RGEC	
277-гг (Тяжелая цепь, IgG1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHW VRQAPGQGLEWMGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTMTR DTSTSTVYME LS LRSEDTAVYYCARSRTGNYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVPS SS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG	22
277-гг (Тяжелая цепь, IgG1-KO)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHW VRQAPGQGLEWMGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTMTR DTSTSTVYME LS LRSEDTAVYYCARSRTGNYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVPS SS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAEEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG	23
277-33 (Легкая цепь, IgG1)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLYSSNQK NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC	24
277-33 (Тяжелая цепь, IgG1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHW VRQAPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTLTR DTSTSTVYME LS LTSEDTAVYYCARSRTGNYWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVPS SS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG	25
277-33 (Тяжелая цепь, IgG1-KO)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHW VRQAPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTLTR DTSTSTVYME LS LTSEDTAVYYCARSRTGNYWGQG	26

	TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVPEK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSAFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG	
277-35 (Легкая цепь, IgG1)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLYSSNQK NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEK	27
277-35 (Тяжелая цепь, IgG1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHW VRQRPQGQLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTLTR DTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARSRTGNYWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVPEK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSAFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG	28
277-35 (Тяжелая цепь, IgG1-KO)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHW VRQRPQGQLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTLTR DTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARSRTGNYWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVPEK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSAFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG	29
277-42 (Легкая цепь, IgG1)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQK NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEK	30

277-42 (Тяжелая цепь, IgG1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHW VRQRPQGQLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTLTR DTSTSTVYME LSS LRSEDTAVYYCARSRGTGNYWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG	31
277-42 (Тяжелая цепь, IgG1-KO)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHW VRQRPQGQLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTLTR DTSTSTVYME LSS LRSEDTAVYYCARSRGTGNYWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG	32
277-44 (Легкая цепь, IgG1)	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQK NYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGQGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC	33
277-44 (Тяжелая цепь, IgG1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHW VRQAPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTMTR DTSTSTVYME LSS LTSEDTAVYYCARSRGTGNYWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG	34
277-44 (Тяжелая цепь, IgG1-KO)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHW VRQAPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTMTR DTSTSTVYME LSS LTSEDTAVYYCARSRGTGNYWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV	35

	KDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHN HYTQKSLSLSPG	
277-48 (Легкая цепь, IgG1)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQK NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGQGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC	36
277-48 (Тяжелая цепь, IgG1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYWMHW VRQRPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTMTR DTSTSTVYMELSLRSSEDTAVYYCARSTRGNYWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHN HYTQKSLSLSPG	37
277-48 (Тяжелая цепь, IgG1-KO)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYWMHW VRQRPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTMTR DTSTSTVYMELSLRSSEDTAVYYCARSTRGNYWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHN HYTQKSLSLSPG	38
277-51 (Легкая цепь, IgG1)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLYSSNQK NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC	39
277-51 (Тяжелая	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYWMHW	40

цепь, IgG1)	VRQRPQGQLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRATLTR DTSTSTVYME LS LRSEDTAVYYCARSR TG NYWGQ TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTS GV HTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKG GF YPSDIAVEWESNGQPENNYK TT PPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ Q GNVFSCSV M HEALHN HYTQKSLSLSPG	
277-51 (Тяжелая цепь, IgG1-KO)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYWMHW VRQRPQGQLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRATLTR DTSTSTVYME LS LRSEDTAVYYCARSR TG NYWGQ TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTS GV HTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAEEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKG GF YPSDIAVEWESNGQPENNYK TT PPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ Q GNVFSCSV M HEALHN HYTQKSLSLSPG	41
277-64 (Легкая цепь, IgG1)	DIVMTQSPDLSAVSLGERATISCKSSQSLLYSSNQK NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SL QAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGQGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LL LN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DS TY LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KS FN RGEC	42
277-64 (Тяжелая цепь, IgG1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYWMHW VRQAPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTMTR DTSTSTVYME LS LRSEDTAVYYCARSR TG NYWGQ TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTS GV HTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKG GF YPSDIAVEWESNGQPENNYK TT PPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ Q GNVFSCSV M HEALHN HYTQKSLSLSPG	43
277-64 (Тяжелая цепь, IgG1-KO)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYWMHW VRQAPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTMTR DTSTSTVYME LS LRSEDTAVYYCARSR TG NYWGQ TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV	44

	KDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDRVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHN HYTQKSLSLSPG	
277-67 (Легкая цепь, IgG1)	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQK NYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISISLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGQGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC	45
277-67 (Тяжелая цепь, IgG1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHW VRQAPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTMTR DTSTSTVYMELSLRSEDTAVYYCARSTRGNWYWGQ TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHN HYTQKSLSLSPG	46
277-67 (Тяжелая цепь, IgG1-КО)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHW VRQAPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTMTR DTSTSTVYMELSLRSEDTAVYYCARSTRGNWYWGQ TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDRVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHN HYTQKSLSLSPG	47
277 L-CDR1	<u>KSSQSLLYSSNQKNYLA</u>	48
277 L-CDR2	<u>WASTRES</u>	49
277 L-CDR3	<u>QQYYSYPYT</u>	50
277 H-CDR1 (CCG)	<u>GYTFTGYWMH</u>	51
277 H-CDR2 (CCG)	<u>YINPSTDYTEYNQKFKD</u>	52
277 H-CDR3 (CCG)	<u>SRTGNY</u>	53
277 H-CDR1 (Кэбот)	GYWMH	55
277 H-CDR2 (Кэбот)	YINPSTDYTEYNQKFKD	56
277 H-CDR3 (Кэбот)	SRTGNY	57
277 H-CDR1 (Чотиа)	<i>GYTFTGY</i>	58
277 H-CDR2 (Чотиа)	<i>NPSTDY</i>	59
277 H-CDR3 (Чотиа)	<i>SRTGNY</i>	60

Представленные выше CDR согласно нумерации Computing Group (CCG) подчеркнуты (Almagro и др., Proteins 2011; 79:3050-3066 и Maier и др., Proteins 2014; 82:1599-1610). Последовательности, определенные согласно номенклатуре Кэбота, выделенные жирным шрифтом, а определенные согласно системе

нумерации Чотиа, выделены курсивом.

В одном аспекте, антитело к TrkB согласно настоящему изобретению связывается с TrkB человека при $K_D < 10$ нМ. В дальнейшем аспекте, антитело к TrkB согласно настоящему изобретению связывается с TrkB человека при $K_D < 5$ нМ. В еще дальнейшем аспекте, антитело к TrkB согласно настоящему изобретению связывается с TrkB человека при K_D приблизительно 1 нМ. Аффинности связывания антител к TrkB могут быть определены согласно способу, описанному в примере 6.

В другом аспекте, антитело к TrkB согласно настоящему изобретению индуцирует фосфорилирование и/или активацию TrkB с высокой эффективностью. В одном аспекте, антитело к TrkB согласно настоящему изобретению фосфорилирует TrkB человека с $EC_{50} < 100$ пМ. В дальнейшем аспекте, антитело к TrkB согласно настоящему изобретению фосфорилирует TrkB человека с $EC_{50} < 50$ пМ. В дальнейшем аспекте, антитело к TrkB согласно настоящему изобретению фосфорилирует TrkB человека с $EC_{50} < 40$ пМ. В дальнейшем аспекте, антитело к TrkB согласно настоящему изобретению фосфорилирует TrkB человека с $EC_{50} < 30$ пМ. В дальнейшем аспекте, антитело к TrkB согласно настоящему изобретению фосфорилирует TrkB человека с EC_{50} приблизительно 20 пМ.

В другом аспекте, антитело к TrkB согласно настоящему изобретению является более эффективным для индуцирования активации нижерасположенных TrkB путей передачи сигналов по сравнению с природным TrkB лигандом BDNF. Эффективность антител к TrkB может быть определена в дифференцированных SH-SY5Y клетках согласно способу, описанному в примере 8.

В дальнейшем аспекте, антитело к TrkB согласно настоящему изобретению индуцирует экспрессию генов, сопоставимую с природным TrkB лигандом BDNF. Стимуляция с помощью агонистических антител к TrkB увеличивает экспрессию мРНК ARC, VGF, EGR1, которые являются маркерами для повышенной синаптической пластичности и, следовательно, индикаторами, что антитела к TrkB действуют подобно пригодному лиганду BDNF на модуляцию функции нейронов, то есть, повышение выживания нейронов и/или синаптическую пластичность. Картины экспрессии генов могут быть определены согласно способу, описанному в примере 10.

В еще дальнейшем аспекте антитело к TrkB согласно настоящему изобретению защищает нейроны, глиальные клетки и/или нейроваскулярную единицу в сетчатке пациентов, например, с возрастной дегенерацией желтого пятна, географической атрофией или диабетической ретинопатией путем стимуляции TrkB-зависимых путей передачи сигналов выживания и обеспечивая, таким образом, нейропротективное действие.

В другом аспекте антитело к TrkB согласно настоящему изобретению регенерирует аксоны/дендриты и/или синапсы в сетчатке после начала заболевания, например, при возрастной дегенерации желтого пятна, географической атрофии или диабетической ретинопатии и обеспечивая таким образом нейрорегенерацию.

В дальнейшем аспекте, антитело к TrkB согласно настоящему изобретению имеет низкий риск иммуногенности и низкую подверженность последовательностей по отношению к его CDR последовательностям. Иммуногенность и гетерогенность являются двумя важными аспектами терапевтического антитела. Измерения таких аспектов можно осуществить с помощью способов, как описано в примерах 4 и 5. Антитела согласно настоящему изобретению были осторожно сконструированы, что иметь минимальную или не иметь иммуногенности и/или гетерогенности.

В еще одном аспекте, антитело к TrkB согласно настоящему изобретению не уменьшает BDNF индуцированное ERK фосфорилирование. Для этого, ERK фосфорилирование может быть измерено, например, в CHO клетках, экспрессирующих TrkB человека, как описано в примере 13. Это может означать, что ERK фосфорилирование, индуцированное эндогенно экспрессируемым BDNF, не уменьшается при введении антитела к TrkB согласно изобретению. Это также может означать, что антитело к TrkB согласно изобретению не уменьшает ERK фосфорилирование при введении перед, одновременно или впоследствии после экзогенно введенного BDNF. В некоторых случаях, антитело к TrkB не конкурирует с или снижает BDNF индуцированное ERK фосфорилирование по сравнению с индукцией BDNF отдельно.

В дальнейшем аспекте, антитело к TrkB согласно настоящему изобретению является специфическим для фосфорилирования и/или активации TrkB и неспецифически не фосфорилирует и/или не активирует TrkA или TrkC.

В другом аспекте, антитело к TrkB не связывается неспецифически с VEGF человека и/или VEGF крысы. Связывание неспецифически в настоящем контексте обозначает, что антитело к TrkB согласно изобретению не связывается с VEGF человека, как измерено, например, с помощью ELISA, как описано в Примере 14. В одном варианте осуществления, отсутствие неспецифического связывания антитела к TrkB может быть определено путем измерения статистически значимое различие (например, критерий Стьюдента для одной выборки, $p < 0,05$) при связывании с VEGF человека между антителом к TrkB и подходящим IgG изотипным контрольным антителом. В особенности, отсутствие неспецифического связывания антитела к TrkB согласно изобретению может быть измерено путем определения любых отличий при связывании с VEGF человека между антителом к TrkB и IgG1 изотипным контрольным антителом. Антитело к TrkB согласно изобретению существенно не отличается относительно отсутствия связывания

с VEGF человека по сравнению с аналогичной концентрацией IgG1 изотипного контрольного антитела вплоть до концентрации приблизительно 0,3 нМ, 0,4 нМ, 0,5 нМ, 0,6 нМ, 0,7 нМ, 0,8 нМ, 0,9 нМ, 1 нМ, 5 нМ, 10 нМ, 20 нМ, 30 нМ, 40 нМ, 50 нМ, 60 нМ, 70 нМ, 80 нМ, 90 нМ, 100 нМ, 110 нМ, 120 нМ, 130 нМ, 140 нМ, 150 нМ, 160 нМ, 170 нМ, 180 нМ, 190 нМ или 200 нМ. В альтернативном варианте осуществления, отсутствие неспецифического связывания антитела к TrkB согласно изобретению может быть измерено путем определения значения IC_{50} связывания антитела к TrkB с любым одним из VEGF человека или крысы. В особенности, антитело к TrkB согласно изобретению будет проявлять значение IC_{50} связывания с VEGF человека или крысы приблизительно выше 0,9 мкМ, предпочтительно выше 1 мкМ, выше 2 мкМ, выше 3 мкМ, выше 5 мкМ, выше 10 мкМ, выше 20 мкМ, выше 30 мкМ, выше 40 мкМ, выше 50 мкМ, выше 100 мкМ, выше 150 мкМ, выше 200 мкМ, выше 250 мкМ, выше 300 мкМ, выше 350 мкМ, выше 400 мкМ, выше 450 мкМ, выше 500 мкМ, выше 550 мкМ, выше 600 мкМ, выше 650 мкМ, выше 700 мкМ, выше 750 мкМ, выше 800 мкМ, выше 850 мкМ, или выше 900 мкМ.

Гуманизация и варианты аминокислотной последовательности

Дальнейшие варианты антител к TrkB и фрагментов антител могут быть сконструированы на основе набора CDR, идентифицированных в мышином лидерном D003. Предполагается, что в указанных вариантах аминокислотных последовательностей антител к TrkB и фрагментов антител CDR остаются неизменными, но окружающие области, например, FR области, могут быть сконструированы. Варианты аминокислотной последовательности антитела к TrkB можно получать путем интродукции соответствующих нуклеотидных изменений в ДНК антитела к TrkB или с помощью пептидного синтеза. Указанные варианты включают, например, делеции и/или инсерции и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антител к TrkB, представленных в качестве примера в настоящем описании. Для получения конечной конструкции применяют любую комбинацию делеций, инсерций и замен при условии, что конечная конструкция обладает требуемыми характеристиками. Аминокислотные изменения могут также изменять посттрансляционный процессинг гуманизированного антитела к TrkB или его варианта, например, изменение количества или положения сайтов гликозилирования.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение включает антитела к TrkB или их фрагменты антител, имеющие варибельную легкую цепь и варибельную тяжелую цепь, где аминокислотная последовательность варибельной легкой цепи и аминокислотная последовательность варибельной тяжелой цепи являются по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 2 и 12, или 3 и 13, или 4 и 14, или 5 и 15, или 6 и 16, или 7 и 17, или 8 и 18, или 9 и 19, или 10 и 20, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение включает антитела к TrkB или их фрагменты антитела, имеющие легкую цепь и тяжелую цепь, где аминокислотная последовательность легкой цепи и аминокислотная последовательность тяжелой цепи являются по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 21 и 22 или 23; 24 и 25 или 26; 27 и 28 или 29; 30 и 31 или 32; 33 и 34 или 35; 36 и 37 или 38; 39 и 40 или 41; 42 и 43 или 44; 45 и 46 или 47 соответственно.

В дальнейшем варианте осуществления, настоящее изобретение включает антитела к TrkB, которые конкурируют за связывание с TrkB с любым из следующих антител.

Антитело, имеющее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 или 23.

Антитело, имеющее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 или 26.

Антитело, имеющее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28 или 29.

Антитело, имеющее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31 или 32.

Антитело, имеющее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34 или 35.

Антитело, имеющее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37 или 38.

Антитело, имеющее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40 или 41.

Антитело, имеющее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43 или 44.

Антитело, имеющее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46 или 47.

Другим типом получения аминокислотного варианта антитела является изменение исходной схемы гликозилирования антитела. Термин "изменение" в контексте настоящей заявки означает делецию одного или нескольких углеводных фрагментов, присутствующих в антителе, и/или добавление одного или

нескольких сайтов гликозилирования, ранее не присутствующих в антителе.

В некоторых аспектах, настоящее изобретение включает молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют варианты аминокислотных последовательностей антител к TrkB, описанных в настоящей заявке. Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие варианты аминокислотных последовательностей антитела к TrkB, приготавливают с помощью различных методов, известных в данной области техники. Эти методы включают, но не ограничиваясь только ими, выделение из природного источника (в случае встречающихся в природе вариантов аминокислотных последовательностей) или получение с помощью мутагенеза с использованием олигонуклеотидов (или сайтнаправленного мутагенеза), ПЦР-мутагенеза и касетного мутагенеза полученного ранее варианта или не являющейся вариантом версии антитела к TrkB.

В определенных вариантах осуществления, антитело к TrkB представляет собой фрагмент антитела. Существуют техники, которые были разработаны для получения фрагментов антител. Фрагменты можно получать путем протеолитического расщепления интактных антител (см., например, Morimoto и др., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24, 1992, сс. 107-117 и Brennan и др., *Science* 229, 1985, с. 81). В альтернативном варианте фрагменты можно получать непосредственно в рекомбинантных клетках-хозяевах. Например, Fab'-SH-фрагменты можно выделять непосредственно из *E. coli* и химически сшивать с получением F(ab')₂-фрагментов (см., например, Carter и др., *Bio/Technology* 10, 1992, сс. 163-167). Согласно другому подходу F(ab')₂-фрагменты можно выделять непосредственно из культуры рекомбинантной клетки-хозяина. Другие методики получения фрагментов антител должны быть очевидны специалисту в данной области.

Антитела к TrkB и их антигенсвязывающие фрагменты могут включать модификации.

В определенных вариантах осуществления, может желательным применять фрагмент антитела к TrkB, а не интактное антитело. Может желательным модифицировать фрагмент антитела для повышения его времени полужизни в сыворотке крови. Это можно осуществлять, например, путем инкорпорирования эпитопа связывания рецептора реутилизации в фрагмент антитела. В одном способе, подходящий участок фрагмента антитела может быть изменен (например, мутирован), или эпитоп может быть инкорпорирован в пептидную метку, которую затем сливают с фрагментом антитела на любом конце или в середине, например, путем синтеза ДНК или пептидного синтеза. См., например, WO 96/32478.

В других вариантах осуществления, настоящее изобретение включает ковалентные модификации антител к TrkB. Ковалентные модификации включают модификацию цистеинильных остатков, гистидильных остатков, лизинильных и аминоконцевых остатков, аргинильных остатков, тирозильных остатков, карбоксильных боковых групп (аспартил или глутамил), глутаминильных и аспарагинильных остатков, или серильных, или треонильных остатков. Другой тип ковалентной модификации включает химическое или ферментативное сшивание гликозидов с антителом. Указанные модификации можно осуществлять с помощью химического синтеза или путем ферментативного или химического расщепления антитела, если это возможно. Для интродукции других типов ковалентных модификаций в молекулу антитела можно применять взаимодействие меченых аминокислотных остатков антитела с органическим дериватизирующим агентом, который может взаимодействовать с выбранными боковыми цепями или аминоконцевыми или карбоксиконцевыми остатками.

Удаление любых углеводных фрагментов, присутствующих на антителе, можно осуществлять химическим или ферментативным путем. Химическое дегликозилирование описано у Hakimuddin и др., *Arch. Biochem. Biophys.* 259, 1987, с. 52 и у Edge и др., *Anal. Biochem.*, 118, 1981, с. 131. Ферментативное отщепление углеводных фрагментов на антителах можно осуществлять с помощью эндо- и экзогликозидаз согласно методу, описанному у Thotakura и др., *Meth. Enzymol.*, 138, 1987, с. 350.

Другой тип пригодной ковалентной модификации предусматривает связывание антитела с одним из многочисленных небелковых полимеров, таких, например, как полиэтиленгликоль (ПЭГ), полипропиленгликоль или полиоксипалкены, с помощью методов, описанных в одном или нескольких US 4640835, US 4496689, US 4301144, US 4670417, US 4791192 и US 4179337.

Связывание эпитопа

Антитела согласно изобретению специфически связываются с нативным или рекомбинантным TrkB человека. Антитела согласно настоящему изобретению распознают специфические "эпитоп TrkB антигена" и "TrkB эпитоп". В особенности, антитела согласно изобретению связываются с эпитопом во внеклеточном домене TrkB человека с последовательностью SEQ ID NO: 54.

Внеклеточный домен TrkB человека по существу включает следующую последовательность (SEQ ID NO. 54):

CPTSCKCSASRIWCSDPSPGIVAFPRLEPNSVDPENITEIFIANQKRLEIINEDDVE
 AYWGLRNLTIIVDSGLKFFVAHKAFLKNSNLQHINFRNKLTSLSRKHFRHLDLSE
 LILVGNPFTCSCDIMWIKTLQEAKSSPDTQDLYCLNESSKNIPLANLQIPNCGLPS
 ANLAAPNLVVEEGKSITLSCSVAGDPVPMYWDVGNLVSKHMNETSHTQGLSR
 ITNISSDDSGKQISCVAENLVGEDQDSVNLTVHFAPTITFLESPTSDHHWCIPFTV
 KGNPKPALQWFYNGAILNESKYICTKIHVTNHTEYHGCLQLDNPTHMNGDYT
 LIAKNEYGKDEKQISAHFMGWPIDDGANPNYPDVIYEDYGTAANDIGDTTNRS
 NEIPSTDVTDKTGREH

Как используется в настоящей заявке, термины "эпитоп TrkB антигена" и "TrkB эпитоп" относятся к молекуле (например, пептиду) или фрагменту молекулы, способной (ому) связываться с антителом к TrkB или его антигенсвязывающим фрагментом. Эти термины дополнительно включают, например, TrkB антигенную детерминанту, которая распознается любыми из антител или фрагментов антител согласно настоящему изобретению, которая имеет комбинацию CDR легкой и тяжелой цепей, выбранной из CDR легкой цепи, представленных в SEQ ID NO 48-50, и CDR тяжелой цепи, представленных в SEQ ID NO: 51-53.

Эпитопы TrkB антигена могут быть включены в белки, фрагменты белков, пептиды или подобные. Эпитопы наиболее часто представляют собой белки, короткие олигопептиды, олигопептидные имитаторы (то есть, органические соединения, которые имитируют антителосвязывающие свойства TrkB антигена), или их комбинации.

Было обнаружено, что антитела или фрагменты антител согласно настоящему изобретению связываются с уникальными эпитопами во внеклеточном домене TrkB человека. Предпочтительно, антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с по меньшей мере одним аминокислотным остатком в пределах аминокислотных областей 92-112, 130-143 и/или 205-219 внеклеточного домена TrkB человека с последовательностью SEQ ID NO: 54.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (который) связывается с по меньшей мере одним аминокислотным остатком в пределах аминокислотных областей 92-112 и 130-143; или 92-112 и 205-219; или 130-143 и 205-219; или 92-112 и 130-143 и 205-219 внеклеточного домена TrkB человека с последовательностью SEQ ID NO: 54.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (который) связывается с по меньшей мере одним аминокислотным остатком в пределах любой из вышеуказанных комбинаций аминокислотных областей и дополнительно также с по меньшей мере одним аминокислотным остатком в пределах аминокислотных областей 313-330 и/или 348-367 внеклеточного домена TrkB человека с последовательностью SEQ ID NO: 54.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (который) связывается с по меньшей мере одним аминокислотным остатком в пределах аминокислотных областей 92-112, 130-143, 205-219, 313-330 и 348-367 внеклеточного домена TrkB человека с последовательностью SEQ ID NO: 54.

Таким образом, в контексте связывания эпитопа, выражение "связывается в пределах аминокислотных областей X-Y..." обозначает, что антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с по меньшей мере одним аминокислотным остатком в пределах аминокислотной области, указанной в последовательности.

Если, например, антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с по меньшей мере одним аминокислотным остатком в пределах аминокислотных областей 92-112 или 130-143, то это обозначает, что антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с по меньшей мере одним аминокислотным остатком либо в пределах аминокислотных областей 92-112 или 130-143.

В дальнейшем примере, если антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с по меньшей мере одним аминокислотным остатком в пределах аминокислотных областей 92-112 и 130-143, то это обозначает, что антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с по меньшей мере одним аминокислотным остатком в пределах аминокислотной области 92-112 и также связывается с по меньшей мере одним аминокислотным остатком в пределах аминокислотной области 130-143 SEQ ID NO: 54.

В другом аспекте, антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, или 100% аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 92-112, 130-143 и/или 205-219 внеклеточного домена TrkB человека с последовательностью SEQ ID NO: 54.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (который) связывается с по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, или 100% аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 92-112 и 130-143; или 92-112 и 205-219; или 130-143 и 205-219; или 92-112 и 130-143 и 205-219

внеклеточного домена TrkB человека с последовательностью SEQ ID NO: 54.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (который) связывается с по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, или 100% аминокислотных остатков в пределах любой из вышеуказанных комбинаций аминокислотных областей и дополнительно также с по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, или 100% аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 313-330 и/или 348-367 внеклеточного домена TrkB человека с последовательностью SEQ ID NO: 54.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (который) связывается с по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, или 100% аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 92-112, 130-143, 205-219, 313-330 и 348-367 внеклеточного домена TrkB человека с последовательностью SEQ ID NO: 54.

Если, например, антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, или 100% аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 92-112 или 130-143, то это обозначает, что антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, или 100% аминокислотных остатков в пределах аминокислотной области 92-112 или связывается с по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, или 100% аминокислотных остатков в пределах аминокислотной области 130-143.

В дальнейшем примере, если антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, или 100% аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 92-112 и 130-143, то это обозначает, что антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, или 100% аминокислотных остатков в пределах аминокислотной области 92-112 и также связывается с по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, или 100% аминокислотных остатков в пределах аминокислотной области 130-143.

Не желая ограничиваться какой-либо теорией, полагают, что благодаря связыванию с новыми эпитопами TrkB антитело проявляет свои намного превосходящие свойства в активации TrkB.

Полинуклеотиды, векторы, клетки-хозяева и рекомбинантные методы

Другие варианты осуществления охватывают выделенные полинуклеотиды, которые включают последовательность, кодирующую антитело к TrkB, векторы и клетки-хозяева, содержащие полинуклеотиды, и рекомбинантные методики для получения антитела. Выделенные полинуклеотиды могут кодировать любую желательную форму антитела к TrkB, включая, например, полноразмерные моноклональные антитела, Fab, Fab', F(ab')₂, и Fv фрагменты, диатела, линейные антитела, одноцепочечные молекулы антител и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Полинуклеотид(ы), который(е) содержит(ат) последовательность, кодирующую антитело к TrkB или его фрагмент или цепь, может(ут) быть сопряжен(ы) с одной или несколькими регуляторными или контролирующими последовательностями, как известно в данной области техники, и могут содержаться в подходящих экспрессионных векторах или клетках-хозяевах, как известно в данной области техники. Каждая из полинуклеотидных молекул, кодирующих переменные домены тяжелой или легкой цепи, может быть независимо сопряжена с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей константный домен, такой как константный домен человека, предоставляющий возможность продуцировать интактные антитела. Альтернативно, полинуклеотиды, или их части, могут быть сопряжены совместно, обеспечивая матрицу для получения одноцепочечного антитела.

Для рекомбинантного получения, полинуклеотид, кодирующий антитело, вставлен в реплицируемый вектор для клонирования (амплификации ДНК) или для экспрессии. Доступны различные подходящие векторы для экспрессии рекомбинантных антител. Компоненты вектора обычно включают, но не ограничиваясь только ими, один или несколько следующих компонентов: сигнальная последовательность, начало репликации, один или несколько маркерных генов, энхансерный элемент, промотор, и последовательность терминации транскрипции.

Антитела к TrkB также могут быть получены в виде слитых полипептидов, в которых антитело слито с гетерологичным полипептидом, таким как сигнальная последовательность или другой полипептид, имеющий специфический сайт расщепления на аминоконце зрелого белка или полипептида. Гетерологическую сигнальную последовательность типично выбирают из последовательности, которая распознается и процессируется (то есть, расщепляется сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. Для прокариотических клеток-хозяев, которые не распознают и не процессируют сигнальную последовательность антитела к TrkB, сигнальная последовательность может быть заменена прокариотической сигнальной последовательностью. Сигнальная последовательность может представлять собой, например, щелочную фосфатазу, пенициллиназу, липопротеин, лидерные последовательности термостабильного энтеротоксина II и подобные. Для секреции дрожжами, нативная сигнальная последовательность может быть заменена, например, лидерной последовательностью, полученной из инвертазы альфа-фактора дрожжей (включая

лидерные последовательности α -факторов *Saccharomyces* и *Kluyveromyces*), кислой фосфатазой, глюкоамилазой *S. albicans* или сигнальной последовательностью, описанной в WO 90/13646. В клетках млекопитающих, можно использовать сигнальные последовательности млекопитающих, а также вирусные секреторные лидерные последовательности, например, gD сигнальную последовательность простого герпеса. ДНК для такого участка-прекурсора лигируют в рамке считывания с ДНК, кодирующей гуманизованное антитело к TrkB.

Экспрессионные и клонирующие векторы содержат нуклеотидную последовательность, которая предоставляет возможность вектору реплицироваться в одной или нескольких выбранных клетках-хозяевах. В целом, в клонирующих векторах эта последовательность представляет собой последовательность, которая предоставляет возможность вектору реплицироваться независимо от хромосомной ДНК хозяина, и включает начала репликации или автономно реплицирующиеся последовательности. Такие последовательности хорошо известны для различных бактерий, дрожжей и вирусов. Начало репликации из плазмиды pBR322 является подходящим для большинства грамм-отрицательных бактерий, начало репликации 2- ν . Плазмиды являются подходящими для дрожжей, и различные вирусные начала репликации (SV40, полиома, аденовирус, VSV, и BPV) пригодны для клонирующих векторов в клетках млекопитающих. В целом, компонент начала репликации не является необходимым для экспрессионных векторов млекопитающих (начало репликации SV40 типично можно использовать только потому, что он содержит ранний промотор).

Экспрессионные и клонирующие векторы могут содержать ген, который кодирует селективируемый маркер для облегчения идентификации экспрессии. Типичные селективируемые маркерные гены кодируют белки, которые придают резистентность к антибиотикам или другим токсинам, например, ампициллину, неомицину, метотрексату или тетрациклину, или альтернативно, являются компонентами аксотрофных дефицитов, или в других альтернативных вариантах, восполняют специфические питательные вещества, которые не присутствуют в комплексных питательных средах, например, ген, кодирующий D-аланин рацемат для *Bacilli*.

В одном из примеров схемы селекции используется лекарственное средство для остановки роста клетки-хозяина. Те клетки, которые успешно трансформированы гетерологичным геном, продуцируют белок, придающий резистентность к лекарственному средству, и, следовательно, выживают в схеме селекции. Примерами такой доминантной селекции является использование лекарственных средств неомицин, микофеноловая кислота и гигромицин. Общепринятыми селективируемыми маркерами для клеток млекопитающих являются те, которые предоставляют возможность идентификации клеток, компетентных за принятие нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизованное антитело к TrkB, такие как DHFR (дигидрофолатредуктаза), тимидинкиназа, металлотioneин-I и -II (такие как гены металлотioneина приматов), аденозиндеаминаза, орнитиндекарбоксилаза, и другие. Клетки, трансформируемые с помощью DHFR-селективируемого гена, сначала идентифицируют путем культивирования всех трансформантов в культуральной среде, которая содержит метотрексат (Mtx), конкурентный антагонист DHFR. Применяемая подходящая клетка-хозяин, если используют DHFR дикого типа, представляет собой клеточную линию яичников китайского хомячка (CHO) с дефицитом активности DHFR (например, DG44).

Альтернативно, клетки-хозяева (предпочтительно хозяева дикого типа, которые содержат эндогенный DHFR), трансформированные или котрансформированные последовательностями ДНК, кодирующими антитело к TrkB, белок DHFR дикого типа, и другой селективируемый маркер, такой как аминокликозид 3'-фосфотрансфераза (APH), могут быть селективированы путем роста клеток в среде, содержащей селективируемый агент для селективируемого маркера, такой как аминокликозидный антибиотик, например, канамицин, неомицин, или G418. см., например, патент US 4,965,199.

Когда рекомбинантное получение осуществляют в дрожжевой клетке в качестве клетки-хозяина, то в качестве селективируемого маркера можно использовать ген TRP1, присутствующий в дрожжевой плазмиде YRp7 (Stinchcomb и др., 1979, Nature 282: 39). Ген TRP1 обеспечивает селекционный маркер для мутантного штамма дрожжей, у которого отсутствует способность расти в триптофанае, например, № ATCC 44076 или PEP4-1 (Jones, 1977, Genetics 85:12). Впоследствии присутствие *trp1* поражения в геноме дрожжевой клетки-хозяина обеспечивает эффективное окружение для обнаружения трансформации путем роста при отсутствии триптофана. Аналогичным образом, штаммы дрожжей с дефицитом *Leu2r*, такие как ATCC 20,622 и 38,626 дополняются известными плазмидами, несущими ген *LEU2*.

Дополнительно, векторы, имеющие происхождение из кольцевой плазмиды 1,6 мкм pKD1, можно использовать для трансформации дрожжей *Kluyveromyces*. Альтернативно была описана экспрессионная система для промышленного получения рекомбинантного телячьего химозина для *K. lactis* (Van den Berg, 1990, Bio/Technology 8:135). Также были описаны стабильные многокопийные экспрессирующие векторы для секреции зрелого рекомбинантного сывороточного альбумина человека с помощью промышленных штаммов *Kluyveromyces* (Fleeg и др., 1991, Bio/Technology 9:968-975).

Экспрессионные и клонирующие векторы обычно содержат промотор, который распознается организмом-хозяином и функционально связан с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело к TrkB или его полипептидную цепь. Промоторы, подходящие для применения с прокариотическими хо-

зьявами, включают rhoA промотор, β -лактамазную и лактозную промоторные системы, щелочную фосфатазу, триптофановую (trp) промоторную систему, и гибридные промоторы, такие как tac промотор. Подходящими также являются другие известные бактериальные промоторы. Промоторы для применения в бактериальных системах также будут содержать последовательность Шайна-Дальгамо (Shine-Dalgarno, S.D.), функционально связанную с ДНК, кодирующей гуманизованное антитело к TrkB.

Известны многие эукариотические промоторные последовательности. В действительности, все эукариотические гены имеют АТ-обогащенный участок, расположенный на приблизительно 25-30 пар против хода транскрипции от сайта инициации транскрипции. Другая последовательность, в которой 70-80 оснований против хода транскрипции от старта транскрипции многих генов, представляет собой CNCAAT участок, где N может представлять собой любой нуклеотид. На 3' конце большинства эукариотических генов присутствует AATAAA последовательность, которая может являться сигналом для добавления поли-А хвоста к 3' концу кодирующей последовательности. Все эти последовательности подходяще вставлены в экспрессионные векторы.

Примеры подходящих промоторных последовательностей для применения с дрожжами-хозяевами, включают промоторы для 3-фосфоглицерат киназы или других гидролитических ферментов, таких как енoлаза, глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназа, гексокиназа, пируват декарбоксилаза, фосфофруктокиназа, глюкозо-6-фосфат изомераза, 3-фосфоглицерат мутаза, пируват киназа, триозофосфат изомераза, фосфоглюкозоизомераза, и глюкокиназа.

Индукцибельные промоторы имеют дополнительные преимущества транскрипции под контролем условий роста. Они включают промоторные участки дрожжей для алкогольдегидрогеназы 2, изоцитохрома C, кислой фосфатазы, производных ферментов, связанных с метаболизмом азота, металлотионеина, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, и ферментов, отвечающих за утилизацию мальтозы и галактозы. Подходящие векторы и промоторы для применения для экспрессии в дрожжах дополнительно описаны в EP 73,657. Дрожжевые энхансеры также благоприятно используются с дрожжевыми промоторами.

Транскрипция антитела к TrkB из векторов в клетках-хозяевах млекопитающих контролируется, например, промоторами, полученными из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы кур, аденовирус (такой как Аденовирус 2), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В и вирус обезьян 40 (SV40), из гетерологичных промоторов млекопитающих, например, актиновый промотор или иммуноглобулиновый промотор, или из промоторов теплового шока, при условии, что такие промоторы совместимы с системами клеток-хозяев.

Ранние и поздние промоторы вируса SV40 легко получают в виде рестрикционного фрагмента SV40, который также содержит начало репликации вируса SV40. Немедленно-ранний промотор цитомегаловируса человека легко получают в виде рестрикционного фрагмента HindIII E. Система для экспрессии ДНК в млекопитающих-хозяевах, используя вирус папилломы крупного рогатого скота в качестве вектора, описан в патенте US № 4,419,446. Модификация этой системы описана в патенте US № 4,601,978. См. также Reyes и др., 1982, Nature 297:598-601, где описана экспрессия кДНК п-интерферона человека в мышечных клетках под контролем тимидинкиназного промотора из вируса простого герпеса. Альтернативно, в качестве промотора можно использовать длинный концевой повтoр вируса саркомы Рауса.

Другим полезным элементом, который может использоваться в рекомбинантном экспрессионном векторе, является энхансерная последовательность, которую используют для усиления транскрипции ДНК, кодирующей антитело к TrkB, высшими эукариотами. В настоящее время известны много энхансерных последовательностей из генов млекопитающих (например, глобин, эластаза, альбумин, α -фетопротейн и инсулин). Тем не менее, типично используют энхансер из вируса эукариотической клетки. Примеры включают SV40 энхансер на поздней стороне начала репликации (по 100-270), энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомы на поздней стороне начала репликации и аденовирусные энхансеры. Также см. Yaniv, 1982, Nature 297:17-18 относительно описания энхансерных элементов для активации эукариотических промоторов. Энхансер может быть сплайсирован в вектор в положении 5' или 3' к антителу к TrkB-кодирующей последовательности, но предпочтительно он расположен на 5' сайте от промотора.

Экспрессионные векторы, используемые в эукариотических клетках-хозяевах (дрожжи, грибы, насекомые, растения, животные, люди или ядросодержащих клетках из других многоклеточных организмов) также могут содержать последовательности, необходимые для терминации транскрипции и для стабилизации мРНК. Такие последовательности являются общедоступными из 5' и, иногда 3', нетранслируемых участков эукариотических или вирусных ДНК или к ДНК. Эти участки содержат нуклеотидные сегменты, транскрибируемые в виде полиаденилированных фрагментов в нетранслируемой части мРНК, кодирующей антитело к TrkB. Одним из пригодных компонентов терминации транскрипции является участок полиаденилирования бычьего гормона роста. См. WO94/11026 и экспрессионный вектор, описанный в этом документе. В некоторых вариантах осуществления, антитела к TrkB могут быть экспрессированы, используя CHEF систему. (См., например, патент US № 5888809; содержание которого включено в настоящую заявку в качестве ссылки.)

Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессирования ДНК в векторах согласно настоящему изобретению представляют собой клетки прокариот, дрожжей или высших эукариот, описанные выше. Подходящие прокариоты для этой цели включают эубактерии, такие как грамм-отрицательные или грамм-положительные организмы, например, Enterobacteriaceae, такие как *Escherichia*, например, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, например, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, например, *Serratia marcescens*, и *Shigella*, а также Bacilli, такие как *B. subtilis* и *B. licheniformis* (например, *B. licheniformis* 41 P, раскрытые в DD 266,710, опубликованном 12 апреля 1989 г.), *Pseudomonas*, такие как *P. aeruginosa*, и *Streptomyces*. Одним из предпочтительных хозяев для клонирования *E. coli* является *E. coli* 294 (ATCC 31,446), хотя пригодны также другие штаммы, такие как *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31,537), и *E. coli* W3110 (ATCC 27,325). Эти примеры являются иллюстративными, а не ограничительными.

Дополнительно к прокариотам, эукариотические микроорганизмы, такие как нитчатые грибы или дрожжи являются подходящими хозяевами для клонирования или экспрессирования векторов, кодирующих антигенов к TrkB. *Saccharomyces cerevisiae*, или общераспространенные хлебопекарные дрожжи наиболее часто используются среди низших эукариотических микроорганизмов-хозяев. Тем не менее, различные другие рода, виды и штаммы являются общедоступными и пригодными в настоящей заявке, такие как *Schizosaccharomyces pombe*; хозяева *Kluuyveromyces*, такие как, например, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilum* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans*, и *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244,234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, такие как *Schwanniomyces occidentalis*; и нитчатые грибы, такие как, например, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, и хозяева *Aspergillus*, такие как *A. nidulans* и *A. niger*.

Подходящие клетки-хозяева для экспрессии гликозилированного антигена к TrkB имеют происхождение из многоклеточных организмов. Примеры беспозвоночных клеток включают клетки растений и насекомых, включая, например, различные бакуловирусные штаммы и варианты и соответствующие разрешенные насекомые клетки-хозяева из таких организмов, как *Spodoptera frugiperda* (гусеница), *Aedes aegypti* (комар), *Aedes albopictus* (комар), *Drosophila melanogaster* (плодовая мушка), и *Bombyx mori* (шелковичный червь). Общедоступны различные вирусные штаммы для трансфекции, например, L-1 вариант *Autographa californica* NPV и Vm-5 штамм *Bombyx mori* NPV, и такие вирусы можно использовать, в особенности, для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

Также в качестве хозяев могут использоваться культуры растительных клеток хлопчатника, кукурузы, картофеля, сои, петунии, томата и табака.

Антигена к TrkB или их антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению также могут быть инкорпорированы в вирусные векторы, то есть, полинуклеотид, кодирующий антигеном к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент, интродуцируют в вирусный вектор и затем экспрессируют в организме пациента после инфицирования вирусом.

В другом аспекте, экспрессию антигена к TrkB осуществляют в клетках позвоночных. Размножение клеток позвоночных в культуре (тканевая культура) стало обычной процедурой и техники являются широкодоступными. Примерами пригодных линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия почек обезьян CV1, трансформированная с помощью SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651), линий почки эмбриона человека (293 или 293 клетки, субклонированные для роста в суспензионной культуре, (Graham и др., 1977, J. Gen Virol. 36: 59), клетки почки новорожденного хомяка (BHK, ATCC CCL 10), клетки яичника китайского хомячка-DHFR1 (CHO, Urlaub и др., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216; например, DG44), клетки Сертоли мышей (TM4, Mather, 1980, Biol. Reprod. 23:243-251), клетки почки обезьян (CV1 ATCC CCL 70), клетки почки африканской зеленой обезьяны (VERO-76, ATCC CRL-1587), клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2), клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34), клетки почки крысы линии Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442), клетки легких человека (W138, ATCC CCL 75), клетки печени человека (Hep G2, HB 8065), опухоль молочной железы мышей (MMT 060562, ATCC CCL51), TR1 клетки (Mather и др., 1982, Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68), MRC 5 клетки, FS4 клетки, и линия гепатомы человека (Hep G2).

Клетки-хозяева трансформируют с помощью вышеописанных экспрессионных или клонирующих векторов для продукции антигена к TrkB и культивируют в подходящей питательной среде, модифицированной, если это является подходящим, для индуцирования промоторов, отбора трансформантов, или амплификации генов, кодирующих желательные последовательности.

Клетки-хозяева, используемые для продуцирования антигена к TrkB, описанные в настоящей заявке, могут культивироваться в различных питательных средах. Коммерчески доступные среды, такие как Ham F10 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo.), минимальная питательная среда ((MEM), (Sigma-Aldrich Co.), RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Co.), и модифицированная по способу Дульбекко среда Игла ((DMEM), Sigma-Aldrich Co.) являются подходящими для культивирования клеток-хозяев. Дополнительно, любая из сред, описанных в одном или нескольких источниках: Ham и др., 1979, Meth. Enz. 58: 44, Barnes и др., 1980, Anal. Biochem. 102: 255, патент US № 4,767,704, патент US № 4,657,866, патент US № 4,927,762, патент US № 4,560,655, патент US № 5,122,469, WO 90/103430, и WO 87/00195, может использоваться в

качестве культуральной среды для клеток-хозяев. Любые из этих сред могут быть дополнены, при необходимости, гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или фактор роста эпидермиса), солями (такими как хлорид натрия, кальция, магния, и фосфат), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как аденозин и тимидин), антибиотиками (такими как гентамицин), микроэлементами (определяемые как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне), и глюкозой или эквивалентным источником энергии. Другие добавки также можно включать в подходящих концентрациях, что является очевидным для квалифицированного специалиста в данной области техники. Условия культивирования, такие как температура, pH и другие, представляют собой условия, которые ранее использовались для клетки-хозяина, выбранной для экспрессии, и будут понятными квалифицированному специалисту в данной области техники.

При использовании рекомбинантных техник, антитело может продуцироваться внутриклеточно, в периплазматическое пространство, или непосредственно секретируется в питательную среду. Если антитело продуцируется внутриклеточно, то клетки могут быть разрушены для высвобождения белка в качестве первой стадии. Отходы в виде частичек, либо клетки-хозяева или лизированные фрагменты, могут быть удалены, например, путем центрифугирования или ультрафильтрации. В Carter и др., 1992, *Bio/Technology* 10:163-167 описана процедура для выделения антител, которые секретируются в периплазматическое пространство *E. coli*. Вкратце, клеточную массу размораживают в присутствии ацетата натрия (pH 3,5), EDTA, и фенилметилсульфонилфторид (PMSF) приблизительно в течение 30 минут. Клеточный дебрис может быть удален путем центрифугирования. Если антитело секретируется в питательную среду, то супернатанты с таких экспрессирующих систем в целом сначала концентрируют, используя коммерчески доступный фильтр для концентрации белка, например, ультрафильтрационный блок Amicon или Millipore Pellicon. Ингибитор протеазы, такой как PMSF, может быть включен в любую из вышеуказанных стадий для ингибирования протеолиза и антибиотики могут быть включены для предотвращения роста случайных загрязнителей. Для выделения антитела из клетки-хозяина можно использовать различные методы.

Композиция антитела, приготовленная из клеток, может быть очищена, например, путем хроматографии с гидроксипатитом, гель-электрофореза, диализа и афинной хроматографии, где типичной техникой очистки является афинная хроматография. Пригодность белка А в качестве афинного лиганда зависит от видов и изотипа любого домена Fc иммуноглобулина, который присутствует в антителе. Белок А можно использовать для очистки антитела, которые основываются на тяжелых цепях гамма1, гамма2, или гамма4 человека (см., например, Lindmark и др., 1983 *J. Immunol. Meth.* 62:1-13). Белок G рекомендуется для всех мышинных изотипов и для гамма3 человека (см., например, Guss и др., 1986 *EMBO J.* 5:1567-1575). Матрицей, к которой присоединен афинный лиганд, наиболее часто представляет собой агарозу, но доступны также другие матрицы. Механично стабильные матрицы, такие как стекло с заданным размером пор или поли(стиролдивинил)бензол предоставляют возможность более быстрых скоростей потоков и более короткого времени обработки, которого можно достичь с агарозой. Если антитело включает C_{H3} домен, то смола Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) является подходящей для очистки. Также доступны других технологии для очистки белков, такие как фракционирование на ионо-обменной колонке, осаждение с этанолом, ВЭЖХ с обращенной фазой, хроматография на диоксиде кремния, хроматография на гепарин SEPHAROSE™ хроматография на анион- или катион-обменной смоле (такой как колонка с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусирование, SDS-PAGE, и осаждение с сульфатом аммония, в зависимости от восстанавливаемого антитела.

После любой (любых) подготовительной (подготовительных) стадии (стадий) очистки, смесь, содержащую представляющее интерес антитело и загрязнители, можно подвергать хроматографии с гидрофобным взаимодействием при низких pH, используя элюирующий буфер при pH в диапазоне 2,5-4,5, типично осуществляют при низких концентрациях соли (например, от приблизительно 0-0,25 М соли).

Изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, которые гибридизуются в расслабленных, умеренных или строгих условиях, как указано в настоящей заявке, со всей или частью (например, частью, которая кодирует переменную область) нуклеотидной последовательности, которая представляет собой выделенную(е) полинуклеотидную(е) последовательность(и), кодирующую(е) антитело к TrkB или фрагмент антитела. Гибридирующаяся область гибридирующейся нуклеиновой кислоты, как правило, состоит из по меньшей мере 15 (например, 20, 25, 30 или 50) нуклеотидов. Гибридирующаяся область гибридирующейся нуклеиновой кислоты идентична по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, или по меньшей мере на 98%, последовательности участка или всей нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид к TrkB (например, переменную область тяжелой цепи или легкой цепи), или ее комплементу. Гибридирующие нуклеиновые кислоты описанного в настоящей заявке типа можно использовать, например, в качестве зонда для клонирования, праймера, например, ПЦР-праймера или диагностического зонда.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение включает выделенный(е) полинуклеотид(ы), включающий(е) последовательности, которые кодируют антитело или фрагмент антитела, имеющее/имеющий переменную легкую цепь и переменную тяжелую цепь, где аминокислотная по-

следовательность вариабельной легкой цепи и аминокислотная последовательность вариабельной тяжелой цепи являются по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 2 и 12, или 3 и 13, или 4 и 14, или 5 и 15, или 6 и 16, или 7 и 17, или 8 и 18, или 9 и 19, или 10 и 20, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение включает выделенный (е) полинуклеотид (ы), включая последовательности, которые кодируют антитело или фрагмент антитела, имеющее/имеющий легкую цепь и тяжелую цепь, где аминокислотная последовательность легкой цепи и аминокислотная последовательность тяжелой цепи являются по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 21 и 22 или 23; 24 и 25 или 26; 27 и 28 или 29; 30 и 31 или 32; 33 и 34 или 35; 36 и 37 или 38; 39 и 40 или 41; 42 и 43 или 44; 45 и 46 или 47, соответственно.

Подразумевается, что в указанных антителах к TrkB и фрагментах антител последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей CDR, остаются неизменными (неизменными по отношению к аминокислоте, которую они кодируют, возможны эквиваленты ДНК последовательности вследствие вырожденности генетического кода), но окружающие участки, например, FR участки, могут быть сконструированы.

Нетерапевтические применения

Антитела, представленные в настоящем описании, можно применять в качестве средств, используемых для очистки на основе аффинности. При осуществлении этого процесса антитела иммобилизуют на твердой фазе, такой как смола, содержащая белок А, с помощью методов, хорошо известных в данной области. Иммобилизованное антитело приводят в контакт с образцом, содержащим белок TrkB (или его фрагмент), который подлежит очистке, и затем подложку отмывают приемлемым растворителем, который должен удалять практически весь материал в образце, кроме белка TrkB, связанного с иммобилизованным антителом. И, наконец, подложку отмывают другим приемлемым растворителем, который должен отделять белок TrkB от антитела.

Антитела к TrkB можно применять также в диагностических анализах для выявления и/или количественной оценки белка TrkB, например, путем определения экспрессии TrkB в конкретных клетках, тканях или сыворотке.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения целесообразно, например, для диагностических целей, метить антитело с помощью выявляемого фрагмента. Известны и доступны многочисленные выявляемые метки, такие как радиоизотопы, флуоресцентные метки, метки, представляющие собой субстраты для ферментов и т.п. Метку можно опосредованно конъюгировать с антителом с помощью различных известных методик. Например, антитело можно конъюгировать с биотином, и любую из указанных выше меток, относящихся к трем широким категориям, можно конъюгировать с авидином, или наоборот. Биотин избирательно связывается с авидином и поэтому метку можно конъюгировать с антителом опосредованным образом. В альтернативном варианте для достижения опосредованной конъюгации метки с антителом антитело можно конъюгировать с небольшим гаптеном (таким как дигоксин) и одну из различных типов указанных выше меток конъюгировать с антителом к гаптену (например, антителом к дигоксину). Таким образом можно осуществлять опосредованную конъюгацию метки с антителом.

Примерами радиоизотопных меток являются ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H и ^{131}I . Антитело можно метить радиоизотопом с помощью методик, описанных, например, в *Current Protocols in Immunology*, т. 1 и 2, 1991, под ред. Coligen и др., изд-во Wiley-Interscience, New York, N.Y., 1991. Радиоактивность можно измерять, например, с помощью сцинтилляционного счетчика.

Примерами флуоресцентных меток являются известные метки, полученные на основе хелатов редкоземельных металлов (хелаты европия), или метки на основе флуоресцеина и его производных, родамина и его производных, дансила, лиссамина, фикоэритрина и техасского красного. Флуоресцентные метки можно конъюгировать с антителом с помощью известных методик, например, описанных в *Current Protocols in Immunology*, выше. Флуоресценцию можно оценивать количественно с помощью флуориметра.

В данной области известны различные хорошо охарактеризованные фермент-субстратные метки (см., например, обзор, приведенный в US 4275149). Фермент, как правило, катализирует химическое изменение хромогенного субстрата, которое можно оценивать с помощью различных методик. Например, изменение может представлять собой изменение цвета субстрата, которое можно оценивать спектрофотометрически. В другом варианте фермент может изменять флуоресценцию или хемилюминесценцию субстрата. Методики количественной оценки флуоресценции описаны выше. В результате химической реакции в хемилюминесцентном субстрате возникает электронно-возбужденное состояние, вследствие чего он может испускать свет, который можно оценивать, например, с помощью хемилюминометра, или он является донором энергии для флуоресцентного акцептора.

Примерами ферментативных меток являются люциферазы, такие как люцифераза светляка и бактериальная люцифераза (US 4737456), люциферин, 2,3-дигидрофалазиндионы, малатдегидрогеназа, уреазы, пероксидаза, например, пероксидаза из хрена (HRPO), щелочная фосфатаза, β -галактозидаза, глюкоамилаза, лизоцим, оксидазы сахаридов (такие как оксидаза глюкозы, оксидаза галактозы и глюкозо-6-

фосфатдегидрогеназа), оксидазы гетероциклических соединений (такие как уриказа и оксидаза ксантина), лактопероксидаза, микропероксидаза и т.п. Методики конъюгации ферментов с антителами описаны, например, у O'Sullivan и др., *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, в: *Methods in Enzym.*, под ред. J. Langone и H. Van Vunakis, изд-во Academic press, N.Y., 73, 1981, сс. 147-166.

Примерами комбинаций фермент-субстрат являются, например: пероксидаза из хрена (HRPO) и гидрогенпероксидаза в качестве субстрата, при этом гидрогенпероксидаза окисляет краситель-предшественник, такой как ортофенилендиамин (OPD) или гидрохлорид 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМВ); щелочная фосфатаза (AP) и пара-нитрофенилфосфонат в качестве хромогенного субстрата; и β -D-галактозидаза (β -D-Gal) и хромогенный субстрат, такой, например, как пара-нитрофенил- β -D-галактозидаза, или флуорогенный субстрат, такой как 4-метилумбеллиферил- β -D-галактозидаза.

Специалистам в данной области известны многочисленные другие комбинации фермент-субстрат. Общий обзор представлен, например, в US 4275149 и US 4318980.

В других вариантах осуществления изобретения антитело к TrkB применяют в меченом виде и выявляют с помощью меченого антитела, связанного с антителом к TrkB.

Антитела, представленные в настоящем описании, можно применять в любом известном методе анализа, таком как конкурентные анализы связывания, прямые и косвенные сэндвич-анализы и анализы на основе иммунопреципитации (см., например, Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, изд-во CRC Press, Inc., 1987, сс. 147-158).

Диагностические наборы

Можно применять антитело к TrkB, входящее в состав диагностического набора, представляющего собой упаковку, которая содержит комбинацию реагентов, взятых в предварительно определенных количествах, в сочетании с инструкциями по осуществлению диагностического анализа. Если антитело мечено ферментом, то набор может включать необходимые для фермента субстраты и кофакторы, такие как субстрат-предшественник, образующий выявляемый хромофор или флуорофор. Кроме того, можно включать другие добавки, такие как стабилизаторы и буферы (например, блокирующий буфер или лизирующий буфер) и т.п. Относительные количества различных реагентов могут варьироваться в широких пределах, обеспечивая концентрации реагентов в растворе, которые в значительной степени оптимизируют чувствительность анализа. Реагенты могут представлять собой сухие порошки, как правило, лиофилизированные, включая эксципиенты, которые при растворении должны образовывать раствор реагента, имеющий соответствующую концентрацию.

Терапевтические применения и TrkB-связанные нарушения

В другом варианте осуществления, антитело к TrkB (или его функциональный фрагмент), описанные в настоящей заявке, пригодны для лечения различных нарушений, связанных с экспрессией TrkB, как описано в настоящей заявке.

Антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент вводят любыми приемлемыми путями, включая интравитреальный, пероральный, парентеральный, подкожный, внутрибрюшинный, внутривенный и внутримышечный. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Дополнительно, антитело к TrkB подходяще вводят путем пульсирующей инфузии, прежде всего с понижающими дозами антитела. В одном аспекте, дозирование осуществляют путем инъекций, наиболее предпочтительно внутривенных или подкожных инъекций, в том числе в зависимости от того является ли обработка кратковременной или пролонгированной. Предпочтительно, антитело к TrkB вводят путем интравитреальной инъекции в глаза.

Для предотвращения или лечения заболевания соответствующая доза антитела должна зависеть от ряда факторов, таких как тип заболевания, подлежащего лечению, серьезность и процесс течения заболевания, вводят ли антитело для профилактических или терапевтических целей, предшествующая терапия, история болезни пациента и ответ на антитело, а также от предписания лечащего врача. Антитело можно вводить пациенту однократно или путем серий обработок.

В контексте настоящего описания понятие "подавление" имеет такое же значение, что и понятия "облегчение" и "купирование", и относится к ослаблению или понижению одной или нескольких характеристик заболевания.

Композицию антитела можно включать в препаративную форму, дозировать и вводить в соответствии с надлежащей клинической практикой. Важные в этом плане факторы включают конкретное нарушение, подлежащее лечению, клиническое состояние индивидуального пациента, причину нарушения, область введения агента, метод введения, схему введения и другие факторы, известные практикующим медикам. В этой связи "терапевтически эффективное количество" антитела, подлежащего введению, регулируют таким образом, чтобы оно представляло собой минимальное количество, необходимое для предупреждения, облегчения или лечения нарушения, ассоциированного с экспрессией TrkB.

Антитело необязательно, но в определенных случаях, включают в препаративную форму в сочетании с одним или несколькими агентами, применяемыми в настоящее время для предупреждения или лечения рассматриваемого нарушения. Эффективное количество указанных других агентов зависит от ко-

личества антитела к TrkB, присутствующего в препаративной форме, типа нарушения или лечения и других указанных выше факторов. Их, как правило, применяют в таких же дозах и с использованием таких же путей введения, в которых их применяли ранее, или с использованием в дозе, составляющей примерно от 1 до 99% от их принятых для применения доз.

Агонистические антитела к TrkB согласно настоящему изобретению стимулируют передачу сигналов TrkB. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, полагают, что передача сигналов TrkB благоприятна для защиты фоторецепторов, других нейронов сетчатки, включая ганглиозные клетки и клеток пигментного эпителия сетчатки от клеточной гибели в сетчатке. Следовательно, агонистические антитела к TrkB могут защищать нейроны сетчатки, такие как фоторецепторы от дегенерации, то есть, предотвращать нейро-дегенерацию, и также повышать выживание и/или пластичность нейронов, в конечном итоге противодействуя потере зрения, связанной либо с уменьшенной активностью TrkB и/или повышенному клеточному стрессу или апоптотической активности. Таким образом, антитела пригодны для лечения заболевания глаз или заболеваний сетчатки, в особенности нейродегенеративных заболеваний сетчатки или заболеваний глаз. Такие заболевания включают, но не ограничиваясь только ими, возрастную дегенерацию желтого пятна, географическую атрофию, диабетическую ретинопатию, диабетический отек желтого пятна, пигментную дистрофию сетчатки, наследственную дистрофию сетчатки, наследственную макулодистрофию, миопическую дегенерацию, окклюзии вены сетчатки, окклюзии артерии сетчатки, эндофтальмит, увеит, кистозный макулярный отек, хороидальную неоваскулярную мембрану вследствие любого из заболеваний сетчатки, оптические нейропатии, глаукому, отслойку сетчатки, токсическую ретинопатию, лучевую ретинопатию и травматическую ретинопатию.

Антитела также пригодны для лечения заболеваний центральной нервной системы, таких как продромальная и от легкой до умеренной болезнь Альцгеймера, задержка прогрессирования заболевания у пациентов с болезнью Альцгеймера, болезнь Хантингтона, болезнь Паркинсона, большое депрессивное расстройство, шизофрения, когнитивное нарушение, связанное с шизофренией, предотвращение первого приступа психоза у индивидуумов с ослабленным психозным синдромом, предотвращение повторения у пациентов с шизофренией или терапевтически резистентная депрессия.

В другом варианте осуществления антитела могут применяться для лечения потери слуха, в особенности индуцированной цисплатином потери слуха, а также потери слуха от воздействия шума и возрастной потери слуха.

В особенности, агонистические антитела к TrkB согласно настоящему изобретению показаны для лечения непролиферативной и/или пролиферативной диабетической ретинопатии и/или диабетического отека желтого пятна дополнительно к стандартному лечению: Дисфункция нейронов сетчатки и нейродегенерация являются одним из серьезных патологических событий при диабетической ретинопатии и диабетическом отеке желтого пятна (на всех стадиях заболевания), которые в конечном итоге вызывают потерю зрения и зрительную дисфункцию. Активация TrkB будет противодействовать потере и функциональным нарушениям нейронов сетчатки и, таким образом, помогать поддерживать нормальное зрение, уменьшать потерю зрительной функции при заболевании и потенциально помогать восстанавливать зрительную функцию.

Кроме того, существует потенциальное применение активации TrkB в качестве дополнительного к анти-VEGF лечению, которое будет существенно усиливать терапевтические преимущества последнего, поскольку анти-VEGF нацелено только на сосудистую дисфункцию в глазу, но не на систему нейронов /глиальные клетки; дополнительно, длительное анти-VEGF лечение может вызывать нейродегенеративные побочные эффекты. Подход активации TrkB в качестве дополнения к анти-VEGF будет уменьшать такие нейродегенеративные побочные эффекты.

Антитела к TrkB или их антигенсвязывающие фрагменты в особенности пригодны для лечения или предотвращения нарушений сетчатки, таких как диабетическая ретинопатия, диабетический отек желтого пятна, географическая атрофия и глаукома.

В дальнейшем аспекте, антитела к TrkB или их антигенсвязывающие фрагменты также пригодны для лечения метаболических заболеваний, таких как гиперфагия, ожирение и метаболический синдром.

В другом аспекте, антитела к TrkB согласно настоящему изобретению могут применяться в способе лечения и/или предотвращения нарушения, связанного с TrkB, в особенности географической атрофии, который включает введение терапевтически эффективного количества антитела к TrkB согласно изобретению индивидууму, страдающему от географической атрофии, таким образом ослабляя один или несколько симптомов географической атрофии.

В еще дальнейшем аспекте, агонистические антитела к TrkB могут применяться в способе лечения и/или предотвращения географической атрофии, который включает введение терапевтически эффективного количества агонистического антитела к TrkB индивидууму, страдающему от географической атрофии, таким образом ослабляя один или несколько симптомов географической атрофии.

Фармацевтические композиции и их введение

Композиция, содержащая антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент, может вводиться субъекту, который страдает от или имеет риск развития заболевания глаз или сетчатки. Изобретение дополнительно обеспечивает применение антитела к TrkB или его антигенсвязывающего фрагмента для

приготовления лекарственного средства для предотвращения или лечения TrkB заболевания. Термин "субъект", как используется в настоящей заявке, обозначает любого пациента-млекопитающего, которому можно вводить антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент, включая, например, людей и млекопитающих, отличающихся от человека, таких как приматы, грызуны и собаки. Субъектов, включая людей, в частности, можно лечить с использованием способов, представленных в настоящем описании. Антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить либо отдельно или в комбинации с другими композициями.

Предпочтительными антителами для применения в таких фармацевтических композициях являются антитела, представляющие собой гуманизованное антитело или фрагменты антител, имеющее (имеющие) переменную легкую цепь и переменную тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2 и 12, или 3 и 13, или 4 и 14, или 5 и 15, или 6 и 16, или 7 и 17, или 8 и 18, или 9 и 19, или 10 и 20, соответственно.

Также охватываются антитела для применения в таких фармацевтических композициях, представляющие собой гуманизованное антитело или фрагменты антител, имеющее (ие) переменную легкую цепь и переменную тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 и 12, или 3 и 13, или 4 и 14, или 5 и 15, или 6 и 16, или 7 и 17, или 8 и 18, или 9 и 19, или 10 и 20 соответственно.

Дальнейшими предпочтительными антителами для применения в таких фармацевтических композициях являются антитела, представляющие гуманизованное антитело или фрагменты антител, имеющее (имеющие) аминокислотную последовательность легкой цепи и тяжелой цепи SEQ ID NO: 21 и 22 или 23; 24 и 25 или 26; 27 и 28 или 29; 30 и 31 или 32; 33 и 34 или 35; 36 и 37 или 38; 39 и 40 или 41; 42 и 43 или 44; 45 и 46 или 47, соответственно.

Дальнейшие предпочтительные антитела для применения в таких фармацевтических композициях, которые представляют собой гуманизованное антитело или фрагменты антител, имеющее (ие) аминокислотную последовательность легкой цепи и тяжелой цепи по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21 и 22 или 23; 24 и 25 или 26; 27 и 28 или 29; 30 и 31 или 32; 33 и 34 или 35; 36 и 37 или 38; 39 и 40 или 41; 42 и 43 или 44; 45 и 46 или 47 соответственно.

Подразумевается, что в указанных антителах к TrkB и фрагментах антител, аминокислотная последовательность CDR остается неизменной, но окружающие области, например, FR области, могут быть сконструированы.

Известны различные системы доставки и они могут использоваться для введения антитела к TrkB или его антигенсвязывающего фрагмента. Способ введения включают, но не ограничиваясь только ими, интравитреальный, глазные капли, внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, внутринозовой, эпидуральный и пероральный пути. Антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент могут вводиться, например, путем инфузии, болюса или инъекции, и могут вводиться совместно с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или местным. В предпочтительных вариантах осуществления, введение осуществляют путем интравитреальной инъекции. Препараты для таких инъекций могут быть приготовлены, например, в предварительно заполненных шприцах.

Антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить в виде фармацевтических композиций, содержащих терапевтически эффективное количество антитела к TrkB или его антигенсвязывающего фрагмента и один или несколько фармацевтически совместимых ингредиентов.

Согласно типичным вариантам осуществления изобретения фармацевтическую композицию готовят согласно общепринятым процедурам с получением фармацевтической композиции, пригодной для внутривенного или подкожного введения человеку. Как правило, композиции для введения путем инъекции представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буфере. При необходимости фармацевтическое средство может содержать также солубилизирующий агент и местный анестетик, такой как лидокаин, для снятия боли в месте инъекции. Как правило, ингредиенты поставляются либо по отдельности, либо их смешивают с получением стандартной дозы лекарственного средства, например, в виде сухого лиофилизованного порошка или не содержащего воду концентрата в герметично закрытом контейнере, таком как ампула или саше, с указанием количества действующего вещества. В тех случаях, когда фармацевтическое средство предназначено для введения путем инфузии, то его можно разливать по бутылкам для инфузий, содержащим стерильную воду или физиологический раствор фармацевтической степени чистоты. В тех случаях, когда фармацевтическое средство вводят с помощью инъекции, то можно использовать ампулу со стерильной водой для инъекций или физиологическим раствором для того, чтобы ингредиенты можно было перемешивать перед введением.

Кроме того, фармацевтическую композицию можно включать в фармацевтический набор, который содержит (а) контейнер, содержащий антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент в лиофилизованной форме и (б) второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый разбавитель (например, стерильную воду) для инъекций. Фармацевтически приемлемый разбавитель можно использо-

вать для восстановления или разведения лиофилизованного антитела к TrkB или его антигенсвязывающего фрагмента. Необязательно к указанному(ым) контейнеру(ам) может прилагаться уведомление в форме, утвержденной официальным агентством, разрешающим производство, применение или продажу фармацевтических препаратов или биологических продуктов, где в уведомлении отражено разрешение агентства на производство, применение или продажу с целью введения людям.

Количество антитела к TrkB или его антигенсвязывающего фрагмента, которое эффективно для лечения или предотвращения нарушения, связанного с TrkB, можно определять обычными методами клинических исследований. Кроме того, необязательно можно использовать анализы *in vitro*, результаты которых могут способствовать определению оптимальных пределов доз. Точная доза для применения в препаративной форме также должна зависеть от пути введения и стадии нарушения, и она должна приниматься на основе рекомендаций лечащего врача и обстоятельств, характерных для каждого пациента. Эффективные дозы можно определять путем экстраполяции на основе кривых дозовой зависимости, полученных по результатам опытов *in vitro* или на модельных тест-системах с использованием животных.

Например, токсичность и терапевтическую эффективность антитела к TrkB или его антигенсвязывающего фрагмента можно определить в клеточных культурах или на экспериментальных животных стандартными фармацевтическими методами, используемыми для определения ED₅₀ (терапевтически эффективная доза для 50% популяции). Предпочтительным является антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (который) проявляет высокий терапевтический индекс.

Данные, полученные по результатам анализов на клеточных культурах и исследований на животных, можно использовать при определении предела доз, предназначенных для применения на человеке. Как правило, доза антитела к TrkB или его антигенсвязывающего фрагмента находится в пределах концентраций в кровотоке, которые включают ED₅₀, обладая при этом низкой токсичностью или не проявляя токсичности. Дозу можно варьировать в указанных пределах в зависимости от используемой лекарственной формы и применяемого пути введения. Для любого антитела к TrkB или его антигенсвязывающего фрагмента, используемого согласно способу, терапевтически эффективную дозу можно первоначально устанавливать по результатам анализов на клеточных культурах. Дозу можно определить, исходя из данных, полученных на животных моделях, достигая пределов концентраций в плазме крови, которые включают IC₅₀ (т.е. концентрацию тестируемого соединения, при которой достигается ингибирование симптомов, составляющее половину от максимального) по данным, полученным на культуре клеток. Такую информацию можно использовать для более точного определения пригодных доз для человека. Можно определять концентрации в плазме крови, например, с помощью жидкостной хроматографии высокого разрешения, ELISA и т.п.

Для интравитреальной инъекции антитела к TrkB, как правило, предпочтительными являются более длительные интервалы между лечениями. Благодаря их улучшенной эффективности, антитела к TrkB согласно настоящему изобретению могут вводиться с более длительными интервалами.

В одном варианте осуществления, антитело к TrkB вводят каждые 6 недель, предпочтительно каждые 7 недель, также предпочтительно каждые 8 недель, в дальнейшем предпочтительно каждые 9 недель, более предпочтительно каждые 10 недель, в дальнейшем предпочтительно каждые 11 недель, и более предпочтительно каждые 12 недель. В дальнейшем предпочтительном варианте осуществления, антитело к TrkB вводят один раз каждые 3 месяца.

В одном варианте осуществления, антитело к TrkB вводят субъекту, который в этом нуждается, в начальной дозе 1-2000 мг. В другом варианте осуществления, необязательно вводят одну или несколько последующих доз, каждая из которых содержит 1-2000 мг антитела к TrkB.

В связи с тем, что объем, который может вводиться в глаз, существенно ограничен, то чрезвычайно важным является то, что антитело к TrkB может быть приготовлено в виде препарата в высоких концентрациях. Кроме того, эффективность антитела к TrkB является чрезвычайно важной, поскольку эффективное антитело может проявлять свой эффект даже в очень низких дозах и, следовательно, пролонгирует активность, а также интервалы между лечениями.

Антитела согласно настоящему изобретению могут быть приготовлены в виде препаратов в чрезвычайно высоких дозах, которые включают, но не ограничиваясь только ими, 20 мг/мл, 30 мг/мл, 40 мг/мл, 50 мг/мл, 60 мг/мл, 70 мг/мл, 80 мг/мл, 90 мг/мл или 100 мг/мл.

Типичная дозировка, которая может вводиться пациенту, составляет приблизительно 3 мг/глаз. Типичные буферные компоненты, которые можно применять для такого препарата, содержат, например, ацетат натрия, PS20 и дигидрат трегалозы.

В одном варианте осуществления, антитело к TrkB приготовлено в виде препарата с 10 мМ гистидиновым буфером, 240 мМ сахарозой, 0,02% мас./об. полисорбата 20 при pH 5,5 с конечной концентрацией белка 60 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции, содержащие антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент могут дополнительно включать терапевтическое средство, конъюгированное или неконъюгированное со связывающим агентом. Антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент можно совместно вводить в комбинации с одним или несколькими терапевтическими средствами для лечения или предотвращения заболевания, связанного с TrkB. Например, комби-

нированная терапия может включать анти-VEGF, анти-PDGF или анти-ANG2.

Такая комбинированная терапия может обладать аддитивным или синергетическим действием в отношении признаков заболевания (например, тяжести проявления симптома, количества симптомов или частоты рецидивов).

При применении схем лечения при комбинированном введении в конкретном варианте осуществления изобретения, антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент вводят одновременно с терапевтическим средством. В другом конкретном варианте осуществления изобретения, терапевтическое средство вводят до или после введения антитела к TrkB или его антигенсвязывающего фрагмента, в течение от 1 часа до нескольких месяцев, например, по меньшей мере, в течение 1 часа, 5 часов, 12 часов, суток, недели, месяца или трех месяцев до или после введения антитела к TrkB или его антигенсвязывающего фрагмента.

Изделия

Другим объектом изобретения является изделие, содержащее вещества, пригодные для лечения нарушений, описанных выше. Изделие включает контейнер и этикетку. Приемлемыми контейнерами являются, например, бутылки, флаконы, шприцы и лабораторные пробирки. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит композицию, которая является эффективной для лечения конкретного состояния, и может иметь стерильное отверстие для доступа. Например, контейнер может представлять собой мешок или флакон для внутривенного раствора, имеющий запирающее устройство, проникаемое для инъекционной иглы для подкожного введения. Действующее вещество в композиции представляет собой антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент. На этикетке на контейнере или связанной с ним указывается, что композиция используется для лечения выбранного состояния. Изделие может дополнительно включать второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как забуференный фосфатом физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Он может дополнительно включать другие вещества, присутствие которых желательно с коммерческой и потребительской точки зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши в упаковку с инструкциями по применению.

Изобретение описано ниже с помощью представленных примеров, которые не направлены на ограничение объема изобретения.

Примеры

1. Создание антитела (иммунизация).

В-клетки от мышей при осуществлении комплекса иммунизации подвергали скринингу, используя собственную разработанную платформу единичных В-клеток. Анти-TrkB связыватели минимизировали после тестирования для определения активности, эффективность и действенности в исследовании фосфорилирования TrkB in-vitro.

2. Получение гуманизированных антител.

Мышиный лидерный D003 отбирали для дальнейшей оптимизации. Мышиный лидерный компонент имел переменную легкую цепь, соответствующую SEQ ID NO: 1 и переменную тяжелую цепь, соответствующую SEQ ID NO: 11. Для оптимизации последовательности TrkB мышиного лидерного D003, отбирали наиболее сходные последовательности антител зародышевой линии человека, IGKV4-1*01, KJ2 для легкой цепи и IGHV1-46*03, HJ6 для тяжелой цепи. Создавали библиотеку вариантов. Это приводило к получению гуманизированных переменных последовательностей легкой цепи, представленных в SEQ ID NO: 2-10, и переменных последовательностей тяжелой цепи, представленных в SEQ ID NO: 12-20.

Таблица 2

277-gr VL, (гуманизированная) переменная легкая цепь	SEQ ID NO: 2
277-33 VL: (гуманизированная) переменная легкая цепь	SEQ ID NO: 3
277-35 VL: (гуманизированная) переменная легкая цепь	SEQ ID NO: 4
277-42 VL, (гуманизированная) переменная легкая цепь	SEQ ID NO: 5
277-44 VL, (гуманизированная) переменная легкая цепь	SEQ ID NO: 6
277-48 VL, (гуманизированная) переменная легкая цепь	SEQ ID NO: 7
277-51 VL, (гуманизированная) переменная легкая цепь	SEQ ID NO: 8
277-64 VL, (гуманизированная) переменная легкая цепь	SEQ ID NO: 9
277-67 VL, (гуманизированная) переменная легкая цепь	SEQ ID NO: 10

277-gr_VH, (гуманизированная) переменная тяжелая цепь	SEQ ID NO: 12
277-33_VH: (гуманизированная) переменная тяжелая цепь	SEQ ID NO: 13
277-35_VH: (гуманизированная) переменная тяжелая цепь	SEQ ID NO: 14
277-42_VH, (гуманизированная) переменная тяжелая цепь	SEQ ID NO: 15
277-44_VH, (гуманизированная) переменная тяжелая цепь	SEQ ID NO: 16
277-48_VH, (гуманизированная) переменная тяжелая цепь	SEQ ID NO: 17
277-51_VH, (гуманизированная) переменная тяжелая цепь	SEQ ID NO: 18
277-64_VH, (гуманизированная) переменная тяжелая цепь	SEQ ID NO: 19
277-67_VH, (гуманизированная) переменная тяжелая цепь	SEQ ID NO: 20

Типичные гуманизированные антитела согласно настоящему изобретению представляют собой антитела, которые имеют последовательности легкой и тяжелой цепи, как указано в таблице ниже. IgG1-KO имеет две мутации в Fc области, Leu234Ala и Leu235Ala для уменьшения эффекторной функции.

Таблица 3

277-gr (Легкая цепь, IgG1)	21
277-gr (Тяжелая цепь, IgG1)	22
277-gr (Тяжелая цепь, IgG1-KO)	23
277-33 (Легкая цепь, IgG1)	24
277-33 (Тяжелая цепь, IgG1)	25
277-33 (Тяжелая цепь, IgG1-KO)	26
277-35 (Легкая цепь, IgG1)	27
277-35 (Тяжелая цепь, IgG1)	28
277-35 (Тяжелая цепь, IgG1-KO)	29
277-42 (Легкая цепь, IgG1)	30
277-42 (Тяжелая цепь, IgG1)	31
277-42 (Тяжелая цепь, IgG1-KO)	32
277-44 (Легкая цепь, IgG1)	33
277-44 (Тяжелая цепь, IgG1)	34
277-44 (Тяжелая цепь, IgG1-KO)	35
277-48 (Легкая цепь, IgG1)	36
277-48 (Тяжелая цепь, IgG1)	37
277-48 (Тяжелая цепь, IgG1-KO)	38
277-51 (Легкая цепь, IgG1)	39
277-51 (Тяжелая цепь, IgG1)	40
277-51 (Тяжелая цепь, IgG1-KO)	41
277-64 (Легкая цепь, IgG1)	42
277-64 (Тяжелая цепь, IgG1)	43
277-64 (Тяжелая цепь, IgG1-KO)	44
277-67 (Легкая цепь, IgG1)	45
277-67 (Тяжелая цепь, IgG1)	46
277-67 (Тяжелая цепь, IgG1-KO)	47
277 L-CDR1	48
277 L-CDR2	49
277 L-CDR3	50
277 H-CDR1	51
277 H-CDR2	52
277 H-CDR3	53

3. Информация об эпитопе.

Материалы.

Вода (Sigma Aldrich, номер по каталогу 37877-4L).

Ацетонитрил (Sigma Aldrich, номер по каталогу 34998-4L).

Муравьиная кислота (Fluka, номер по каталогу 94318).

Мочевина (Sigma Aldrich, номер по каталогу 51456-500G).

ТСЕР-НС1 - 10 г (Thermo Scientific - Pierce, номер по каталогу 20491).

Двухосновный фосфат натрия (Sigma Aldrich, номер по каталогу S7907-100G).

Одноосновный фосфат натрия (Sigma Aldrich, номер по каталогу S8282-500G).

Предколонка ACQUITY UPLC BEH C18 VanGuard, 130Å, 1,7 мкм, 2,1 мм X 5 мм (Waters Technolo-

gies Corp, 186003975).

Картридж с иммобилизованным пепсином Poroszyme® I, 2,1 мм x 30 мм (Life Technologies Corp, 2313100).

Колонка Acquity UPLC BEH C18 1,7 мкм, 1 мм X 50 мм (Waters, 186002344).

Растворитель А: 0,1 % Муравьиная кислота /99% вода /1% ацетонитрил.

Растворитель В: 0,1 % Муравьиная кислота /5% вода /95% ацетонитрил.

Водный буфер: H₂O 10 mM фосфат натрия pH 7,4.

Дейтериевый буфер: D₂O 10 mM фосфат натрия pH 7,4.

Закаливающий буфер: вода, 8M мочевины, 0,4M TCEP-HCl.

В контрольных образцах для картирования эпитопов, антиген прогоняли с антителом и без него. Для определения перечня антигенных пептидов, в этом проколе сначала осуществляли первый прогон, используя водный буфер вместо дейтериевого буфера. 4 мкл образца смешивали с 40 мкл дейтериевого буфера. Эту смесь инкубировали при 20°C для нескольких временных точек (1, 2 и 4 мин). После этого 40 мкл смеси переносили в 40 мкл 4°C закаливающего буфера (4M Мочевина, 0,4M Tcep-HCl) и смешивали. Инъецировали 60 мкл закаливающего белка, где он расщепляется на пепсиновой колонке в течение 2 минут путем промывания 200 мкл/мл растворителя А: 0,1 %Муравьиная кислота /99% вода /1% ацетонитрил. Последующие пептиды обессоливали на предколонке Vanguard в течение 3 минут. Расщепленные пепсином пептиды отправляли на колонку с обратной фазой BEH C18 внутри колонки /клапана терморегулируемого компартамента. Использовали градиент системы растворителей, состоящей из: растворитель А: 0,1 %Муравьиная кислота /99% вода /1% ацетонитрил и растворитель В: 0,1 % Муравьиная кислота /5% вода /95% ацетонитрил. Процентное содержание растворителя В повышали от 10% до 15% через 5,1 минуты, до 50% через 11 минут, до 90% через 11,5 минуты, выдерживая до 12,5 минут, до 0% В через 13 минут, выдерживая до 14 минут. Хроматографическое разделение происходило при 4°C при скорости потока 180 мкл/мин. После хроматографического разделения образец поступал на Thermo Scientific Orbitrap Fusion масс-спектрометр, работающий в режиме положительной электрораспылительной ионизации. Используемый метод включал активационные типы CID и ETD при идентификации контрольных пептидов, используя разделение 120 тыс., минимальный сигнал 10 тыс., ширину выделения 1,0 и нормированную энергию столкновений 35,0 В. RF уровень S-линз устанавливали на 60%. Для контрольных пептидов тип сбора данных представлял собой профили для полного MS сканирования и центроид для CID MS/MS данных. Для дейтерированных образцов, не собирали MS /m/z. Данные собирали для массового диапазона 280-1800 Да. Для анализа необработанных данных ЖХ-МС /мс фрагментации, контрольные образцы (с CID и ETD MS/MS) анализировали, используя Proteome Discover 1.4 (Thermo Scientific) и PMi Byonic (Protein Metrics) по отношению к заданной последовательности для создания перечня пептидов и времени удерживания. Файлы с необработанными данными предварительно обрабатывали и превращали в ASCII формат, используя собственное разработанное программное обеспечение SHARC. После этого отмечали идентифицированные пептиды и обобщали полученные данные, используя собственное разработанное программное обеспечение SHAFT. Эпитопы определяли на основании отличий сдвига средней массы, индуцированного связыванием после мечения дейтерием. На уровне пептида, защита больше 0,4 Да рассматривалась как достоверная.

Результаты картирования эпитопов показаны для BDNF, 277-антител, (C2) (US20100196390), и (C20) (US20100150914) на фиг. 1. Специфические связывающие сайты для каждой молекулы с внеклеточным доменом TrkB человека с SEQ ID NO: 54 выделены темно-серым цветом. По сравнению с природным лигандом BDNF, 277-антитела связываются с другими новыми эпитопами.

4. Подверженности последовательностей в CDR.

Последовательности CDR проверяли относительно наличия любых потенциальных подверженностей, таких как сайты N-гликозилирования, мотивы сильного дезамидирования (NG, NS, NH, NA, ND, NT, NN), мотивы изомеризации аспартата (DG), мотивы фрагментации (DG, DS), цистеин. Эти аминокислот или мотивы могут подвергаться химической реакции и придавать продукту нежелательную гетерогенность, также с возможностью отрицательного влияния на целевое связывание и функционирования. Из этих соображений, является предпочтительным удалять такие аминокислоты или мотивы (если они присутствуют) из CDR.

CDR мышинной лидерной и гуманизированных последовательностей не содержали таких потенциальных мотивов подверженности.

Таблица 4

Антитело	D003/277	C2	C20	29D7 или TAM-163
Подверженности	0	2	3	6

5. Иммуногенность.

Иммуногенность последовательностей оценивали *in silico* с помощью алгоритма по лицензии от компании Epivax. Шкала EpiMatrix Treg-adj учитывает эпитопы Т-клеток и Treg эпитопы. Чем более низкая оценка иммуногенности, тем меньше вероятность того, что последовательность будет иммуногенной. В целом, отрицательная оценка рассматривается как низкий риск иммуногенности, в то время как поло-

жительная оценка расценивается как указание на потенциальную иммуногенность.

Таблица 5

VL	Оценка EpiVax	VH	Оценка EpiVax
277-gr VL	-24	277-gr VH	-46
277-33 VL	-31	277-33 VH	-32
277-35 VL	-31	277-35 VH	-26
277-42 VL	-27	277-42 VH	-26
277-44 VL	-14	277-44 VH	-49
277-48 VL	-24	277-48 VH	-29
277-51 VL	-31	277-51 VH	-22
277-64 VL	-28	277-64 VH	-44
277-67 VL	-14	277-67 VH	-44
C2 VL	-2	C2 VH	-21
C20 VL	+9	C20 VH	+20
TAM163_VL	-51	TAM163_VH	-19

6. Аффинность.

Использовали технологию поверхностного плазмонного резонанса (SPR) для определения аффинности связывания 277-антител, C2 (US 20100196390), и C20 (US 20100150914) и TAM-163 (WO 2015173756) с Hu-TrkB-His. Эксперимент осуществляли на приборе ProteOn XPR36.

Метод: Подвижный буфер для этого эксперимента и все разведения (за исключением тех случаев, когда конкретно указано) осуществляли в PBS-T-EDTA с 0,01% Tween20 [100 мкл 100% Tween20 добавляли к 2 л PBS-T-EDTA для получения конечной концентрации Tween 20 0,01%]. Сенсорный чип GLM нормировали и устанавливали предварительные условия согласно инструкциям производителя. Сенсорный чип активировали с применением уравновешенной смеси EDC/s-NHS в горизонтальном направлении в течение 300 с при скорости потока 30 мкл/мин и иммобилизовали с Рекомбинантным белком A/G (60 мкг/мл в 10 mM ацетате pH 4,5) в горизонтальном направлении в течение 300 с при скорости потока 30 мкл/мин, что приводило к ~7100-7130 ЕО Белка A/G на поверхности. Сенсорный чип деактивировали с применением 1M этаноламина HCl в горизонтальном направлении в течение 300 с при скорости потока 30 мкл/мин. Сенсорный чип стабилизировали в течение 18 с с 0,85% фосфорной кислотой при скорости потока 100 мкл/мин 3 раза горизонтально и 3 раза вертикально. 277-антитело (0,6 мкг/мл), C2 (2,1 мкг/мл), C20 (1,2 мкг/мл), и TAM-163 (5 мкг/мл) захватывали на поверхность Белка A/G вертикально в течение 70 с при скорости потока 30 мкл/мин, что приводило к уровням захвата ~615, 1390, 780 и 3380 ЕО, соответственно. Исходный уровень стабилизировали путем инъекции PBS-T-EDTA в течение 60 с при скорости потока 100 мкл/мин горизонтально и затем второй инъекции PBS-T-EDTA в течение 60 с при скорости потока 100 мкл/мин и диссоциации 120 с горизонтально. Аналит (Hu-TrkB-His) инъектировали горизонтально над захваченным антителом в течение 600 с при скорости потока 30 мкл/мин и диссоциации в течение 1800 с. Концентрации аналитов составляли 0 нМ, 1,23 нМ, 3,7 нМ, 11,11 нМ, 33,33 нМ и 100 нМ. Поверхность регенерировали путем инъекции 0,85% фосфорной кислоты в течение 18 с при скорости потока 100 мкл/мин один раз горизонтально и один раз вертикально. PBS-T-EDTA инъектировали в течение 60 с при скорости потока 100 мкл/мин один раз вертикально. Взаимные помехи (взаимодействия с поверхностью сенсора) и холостые данные (PBS-T-EDTA с 0,01% Tween20 или 0 нМ аналита) вычитали из необработанных данных. После этого сенсограммы подгоняли глобально к 1:1 связыванию Ленгмюра, получая значения ассоциации (k_a), диссоциации (k_d) и аффинности (K_D).

277-антитела связываются с Hu-TrkB-His с k_a $1,93 \times 10^5$ 1/мс, KD $3,51 \times 10^{-4}$ 1/с, и K_D 1,2 нМ. C2 связывается с Hu-TrkB-His с k_a $2,32 \times 10^4$ 1/мс, KD $3,39 \times 10^{-4}$ 1/с, и K_D 10,5 нМ. C20 связывается с Hu-TrkB-His с k_a $1,29 \times 10^5$ 1/мс, KD $6,13 \times 10^{-3}$ 1/с, и K_D 47,7 нМ. TAM-163 не связывается с 100 нМ Hu-TrkB-His.

Таблица 6

mAb	TrkB человека		
	k_a (1/мс)	k_d (1/с)	K_D (нМ)
TAM-163 анти-TrkB	не связывается при 100 нМ		
C20_химерное анти-TrkB huIgG1-КО EX00077781	1,29E+05	6,13E-03	47,7
анти-TrkB C2_HuIgG1ko (EX00077780)	2,32E+04	3,39E-04	10,5
Анти-TRKB 277 антитела	1,93E+05	3,51E-04	1,19

7. Неспецифическое связывание.

Разрабатывали анализ неспецифического связывания, используя технологию биосенсора, для определения, будут ли кандидаты новых биологических соединений (НБЕ) иметь существенное связывание с неродственными заряженными белками. В этом анализе, антитела проходили над двумя SPR поверхностями, одна из них была покрыта неродственным отрицательно заряженным белком, а вторая покрыта

неродственным положительно заряженным белком. Когда NBE кандидат демонстрирует существенное неспецифическое связывание с этими поверхностями, то, вероятно, что причиной связывания является присутствие положительно или отрицательно заряженных поверхностных участков на кандидате. Неспецифическое связывание NBE кандидатов могут приводить к плохим фармакокинетике (ФК) и биораспределению и также может отрицательно влиять на последующую производственную технологичность. Результаты этого анализа использовали в контексте оценки риска по данному проекту. Целью этого исследования являлось уменьшение риска плохой ФК, отсутствия распределения в целевой ткани и сложности последующей производственной технологичности.

Задачей являлось определение, будут ли 277-антитела проявлять неспецифическое связывание или не будут проявлять неспецифического связывания путем сбора сенсограмм связывания 277-антител и сравнения их с сенсограммами контролей для определения категории неспецифического связывания как благоприятное (зеленое), приемлемое (желтое) или неблагоприятное (красное).

Метод.

Эксперимент осуществляли на Biacore T200. Разведение, приготовление поверхности и эксперименты связывания осуществляли при 25°C в 1X HBS-EP буфере, приготовленном из 10X HBS-EP. Скорость течения для обоих протоколов, как протокола иммобилизации, так и эксперимента связывания, составляла 5 мкл/мин.

Для приготовления поверхности для эксперимента неспецифического связывания, белый лизоцим куриных яиц и ингибитор трипсина типа 1-S из сои связывали вручную с сериями S CM5 чипа с плотностью поверхности 3000-5000 ЕО, используя набор для иммобилизации по аминокислотной группе согласно инструкциям производителя. FC1 и FC2 активировали путем инъецирования 1:1 смеси EDC и NHS в течение 7 минут. Поверхностью белого лизоцима куриных яиц приготавливали на FC2 путем инъецирования 150 мкг/мл белого лизоцима куриных яиц в 10 mM NaOAc, pH 5,5 в течение 5 минут. FC1 и FC2 дезактивировали путем инъецирования 1 M этаноламин-HCl в течение 7 минут. FC1 использовали в качестве эталонной поверхности. FC3 активировали путем инъецирования 1:1 смеси EDC и NHS в течение 7 минут. Поверхность ингибитора трипсина типа 1-S из сои приготавливали на FC3 путем инъецирования 300 мкг/мл ингибитора трипсина типа 1-S из сои в 10 mM NaOAc, pH 4,0 буфера в течение 20 минут с последующей 7 мин. инъекцией 1 M этаноламин-HCl для дезактивации проточной ячейки. Поликлональное антитело к лизоциму, антитело к ингибитору трипсина, и В1 отрицательный контроль использовали в качестве контролей в анализе. Контроли и антитела приготавливали в 1 мкМ в 1X HBS-EP буфере. Образцы инъецировали над FC1, FC2 и FC3 поверхностями с 10 мин. ассоциацией и 15 мин. диссоциацией. Поверхности регенерировали между каждым циклом связывания путем инъецирования 1 мин. 0,85% фосфорной кислоты и 30 с 50 mM NaOH при скорости потока 50 мкл/мин с последующим периодом стабилизации 2 мин. с 1X HBS-EP буфером, текущим через все поверхности. Поликлональное антитело к лизоциму и антитело к ингибитору трипсина инъецировали над FC1, FC2 и FC3 в начале и конце эксперимента. Данные собирали, используя Biacore T200 Control Software версия 2.0.1, и анализировали, используя Biacore T200 Evaluation Software версия 3.0.

Сенсограммы связывания антител сравнивали с сенсограммами В1 отрицательного контроля для определения уровня неспецифического связывания с поверхностями белого лизоцима куриных яиц и ингибитора трипсина типа 1-S из сои.

Полученные данные показали, что 277-антитело не связывается существенно с неродственными заряженными белками; специфически белым лизоцимом куриных яиц и ингибитором трипсина типа 1-S из сои. 277-антитело классифицировано как благоприятное (зеленое) по сравнению с ответом связывания и формой кривых по сравнению с контролями. Следовательно, можно предположить, что 277-антитело будет обладать незначительным риском относительно фармакокинетики, биораспределения и приготовления на основании нецелевых заряженных видов.

Таблица 7

Образец	Поверхность ~4400 ЕО Лизоцим	Поверхность ~2300 ЕО Ингибитор трипсина
Анти-TRKB 277 антитела	Нет связывания	Нет связывания

8. Активность (SY5Y) и эффективность.

Дифференциация SH-SY5Y клеток к нейронному фенотипу.

Клетки SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™) культивировали в DMEM:F12 (Lonza № BE12-719F) с 15% фетальной бычьей сывороткой в колбе для культивирования ткани 175 см² (Corning №353112). Для высева клеток колбу промывали один раз с помощью D-PBS (Lonza № 17-512Q) и клетки отсоединяли с применением 37°C предварительно нагретого раствора аккутазы (A6964 SIGMA). После инкубирования в течение 3 минут при комнатной температуре клетки присоединены с помощью пипетки 10 мл и перенесены в пробирку фирмы Falcon объемом 15 мл. Клетки подсчитывали и 6000 клеток в 100 мкл

DMEM:F12 с 15% FBS на лунку высевали в покрытые коллагеном-I планшеты на 96 лунок (BD Biosciences № 354407). Клетки поддерживали во влажном инкубаторе при 37°C, 5% CO₂. Через 8 часов, в каждую лунку добавляли 100 мкл 6 мкМ раствора ретиноевой кислоты (Sigma № R2625). Конечная концентрация ретиноевой кислоты составляла 3 мкМ. Через 48 часов и 96 часов, необходима стимуляция с дополнительным количеством ретиноевой кислоты. Для этого, удаляли 100 мкл среды на лунку и добавляли 100 мкл свежей среды с 6 мкМ ретиноевой кислоты. После дифференциации в течение 7 дней SH-SY5Y клетки имели допаминергически-подобный фенотип и были готовы к использованию.

Стимуляция и лизис дифференцированных клеток SH-SY5Y.

Среду с лунок заменяли на 80 мкл предварительно нагретой DMEM-F12 с 0,2% BSA. Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Пептиды и антитела разводили в DMEM-F12 с 0,2% BSA. Все разведения приготавливали с наконечниками, пробирками и планшетами с низким связыванием. Клетки стимулировали путем добавления 20 мкл соответствующего пептида/антитела в течение 45 мин при комнатной температуре. Во время инкубирования приготавливали буфер для лизиса клеток в пробирке фирмы Falcon объемом 15 мл на льду: 1 мл 10x Triton X-100 лизирующий буфер 8,7 мл H₂O 1 таблетка полная мини, ингибитор протеазы 100 мкл коктейль ингибиторов фосфатаз 2 100 мкл коктейль ингибиторов фосфатаз 3 100 мкл 1 mM PMSF. После стимуляции клеток среду удаляли и на каждую лунку добавляли 30 мкл охлажденного на льду лизирующего буфера. Планшет покрывали верхним уплотнением и инкубировали на льду в течение 20 мин. После этого содержимое планшета перемешивали на встряхивателе для планшетов эппендорфа при 500 об/мин в течение 5 мин.

Для этой стадии все материалы и растворы хранили на льду. Планшет на 96 лунок с лизированными клетками центрифугировали при 235 g в течение 10 с и хранили на льду. Буфер для AlphaLISA иммуноанализа (PerkinElmer №AL000C) приготавливали путем разведения 260 мкл 10x маточного раствора в 2340 мкл H₂O. pNTRK2 акцепторные шарики (PerkinElmer № CUSM81822; шарики, покрытые Perkin Elmer с антителом от CellSignaling CST № 4621 клон C50F3) разводили в буфере для AlphaLISA иммуноанализа до конечной концентрации 10 мкг/мл. NTRK2 биотиновое антитело (PerkinElmer № CUSM81820; меченное с Perkin Elmer с антителом от CellSignaling CST=№4609 клон C17F1) разводили в буфере для AlphaLISA иммуноанализа до конечной концентрации 1 нМ и стрептавидин-донорные шарики (PerkinElmer № 6760002S) разводили в буфере для AlphaLISA иммуноанализа до конечной концентрации 20 мкг/мл. 5 мкл pNTRK2 акцепторных шариков и 2,5 мкл клеточного лизата на лунку переносили в белый планшет небольшого объема на 384 лунки (Greiner № 784075) с плоским дном и центрифугировали при 235 g в течение 10 с и хранили в течение 45 минут при комнатной температуре в темноте. После инкубирования добавляли 2,5 мкл NTRK2 биотинового антитела на лунку и планшет центрифугировали при 235 g в течение 10 с и хранили в течение 45 минут при комнатной температуре в темноте. В завершение, добавляли 2,5 мкл стрептавидин-донорных шариков на лунку и планшет центрифугировали при 235 g в течение 10 с и хранили в течение 30 минут при комнатной температуре в темноте. Сразу после этого планшет анализировали с помощью планшет-ридера EnVision, используя протокол AlphaScreen (фильтр 570 нМ № 244 и зеркало № 444).

Определение ERK1/2 фосфорилирования.

Измерение ERK 1/2 (Thr202/Tyr204) фосфорилирования осуществляли с применением 8 кл клеточного лизата согласно инструкциям производителя (AlphaScreen SureFire p-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204) набора (PerkinElmer №TGRES10k))

Определение АКТ 1/2/3 фосфорилирования.

Измерение Akt 1/2/3 (Thr308) фосфорилирования осуществляли с применением 8 кл клеточного лизата согласно инструкциям производителя ((AlphaScreen SureFire p-Akt 1/2/3 (Thr308) набора (PerkinElmer № TGRA3S10K)).

Несколько антител к TrkB согласно изобретению анализировали для определения их потенциальной активности активировать TrkB, а также инициировать нижерасположенные сигналы. Также в исследование включали природный лиганд BDNF и антитела C2 и C20. Антитела к TrkB согласно настоящему изобретению в среднем в десять раз более активны относительно активации TrkB по сравнению с природным лигандом BDNF. При сравнении с антителами C2 и C20, антитела к TrkB согласно изобретению в среднем в три раза - в пятнадцать раз более эффективными. Нижерасположенная передача сигналов p-ERK и АКТ1/2/3 полностью согласуется с этими измерениями относительно активации TrkB и проявляет сходную улучшенную активность антител к TrkB согласно изобретению.

Таблица 8

Соединение	EC50 нМ [среднее ± CO]
TrkB-P	
BDNF	430 [±254]
277-gr (IgG1)	39 [±18]
277-gr (IgG1-KO)	46 [±27]
277-64 (IgG1)	53 [±41]
277-64 (IgG1-KO)	44 [±23]
C2	134 [±72]
C20	654 [±180]
p-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204)	
BDNF	301 [±279]
277-gr (IgG1)	30 [±12]
277-gr (IgG1-KO)	47 [±42]
277-64 (IgG1)	38 [±11]
277-64 (IgG1-KO)	56 [±72]
C2	103 [±56]
C20	238 [±36]
АКТ 1/2/3-P (T308)	
BDNF	255 [±179]
277-gr (IgG1)	23 [±0]
277-gr (IgG1-KO)	39 [±22]
277-64 (IgG1)	25 [±3]
277-64 (IgG1-KO)	22 [±1]
C2	132 [±76]
C20	430 [±111]

9. Экспрессия генов.

Осуществляли анализ секвенирования следующего поколения (данные не показаны) для дифференцированных SH-SY5Y клеток после стимуляции с применением нескольких TrkB агонистов. Для подтверждения результатов, выбирали большинство регулируемых генов по отношению к синаптической пластичности и затем анализировали изменения с помощью кПЦР. ARC, VGF, EGR1 представляют собой известные маркеры для синаптической пластичности. Синаптическая пластичность представляет собой процесс, с помощью которого специфические паттерны синаптической активности приводят к изменениям синаптической силы. На фиг. 2 стимуляция дифференцированных SH-SY5Y клеток с помощью BDNF или агонистических антител повышает количество экспрессии мРНК ARC, VGF, EGR1, что может быть маркером для увеличенной синаптической пластичности. На экспрессию мРНК NTRK2 не влияет стимуляция с применением BDNF или агонистических антител. Изменения картин экспрессии, индуцированные BDNF и D003, в целом являются очень сходными. Эти результаты подтверждают данные, полученные при анализе секвенирования следующего поколения.

Специфически, SH-SY5Y клетки дифференцировали в течение 7 дней в культуральном планшете на 6 лунок (SIGMA № Corning CLS3516). После дифференциации, клетки стимулировали в бессывороточной DMEM:F12 с 0,2% BSA с контрольным IgG [10 нМ], BDNF [10 нМ] и D003 [10 нМ] в течение 6 часов во влажном инкубаторе при 37°C, 5% CO₂. После этого клетки промывали один раз с помощью предварительно нагретой 1x D-PBS и осуществляли выделение мРНК согласно инструкциям производителя (Qiagen № 74104 RNeasy Mini Kit). Транскрипцию мРНК до кДНК осуществляли согласно инструкциям производителя (Qiagen № 205310 QuantiTect Rev. Набор для транскрипции). кДНК использовали для анализов TaqMan ПЦР в режиме реального времени на основании 5' - нуклеазных зондов (ThermoFischer Scientific) на 7900HT Fast системе ПЦР в реальном времени (Applied Biosystems). Значения дельта СТ рассчитывали на основании значения СТ для АКТВ (СТ=18,18).

Анализы TaqMan экспрессии генов от ThermoFischer Scientific:

АКТВ-актин бета: Hs01060665_g1; № кат. 4331182,

NTRK2-нейротрофическая рецепторная тирозинкиназа 2: Hs0017881_1_ml; № кат. 4331182,

ARC-связанный с цитоскелетом белок с регулируемой активностью: Hs01045540_g1; № кат. 4331182,

VGF-индуцибельный фактор роста нервов: Hs00705044_s1, № кат. 4331182 EGR1 -ранний ростовой ответ 1: Hs00152928_ml; № кат. 4331182.

10. Фармакокинетическое исследование интравитреального введения (ивт) на кроликах.

Самки новозеландских белых кроликов (вес тела 1,7-2 кг) акклиматизировали >15 дней до начала исследования. Антитело 277 приготавливали стерильным в концентрации 20 мг/мл и 1 мг (в 50 мкл буфера: 60 мМ ацетат натрия, 150 мМ NaCl, pH 5,0) инъецировали билатерально в стекловидное тело анестезированных животных. В различные временные точки, 2 животных подвергали эвтаназии и собирали ткани глаза, состоящие из внутриглазной жидкости, стекловидного тела и сетчатки, и замораживали вплоть до проведения анализов. Образцы крови отбирали в различные временные точки (фиг. 3), центрифугировали и плазму замораживали вплоть до проведения анализов.

Количественное определение антитела осуществляли с помощью ELISA. Для каждого типа ткани, pripravивали калибровочную кривую антитела (в трех повторах в диапазоне 0,5-100 нг/мл) в идентичном буфере в качестве образцов и включали в каждый планшет. Поглощение измеряли при 405 нм, используя фотометр SpectraMax 340PC-384 и анализ данных осуществления с помощью SoftMaxPro6.5.

Концентрация 277-антитела представлена на фиг. 3, демонстрируя концентрацию в различных компартаментах глаза, как указано, и плазме после ивт инъекции 1 мг 277-антитела в глаза кроликам в зависимости от времени. Рассчитанное время полужизни в глазу и плазме представлены в таблице ниже.

Таблица 9

t _{1/2} (дни)			
Стекловидное тело	Внутриглазная жидкость	Сетчатка	Плазма
4,9	4,8	5,2	7,0

Рассчитанное время полужизни составляло 4,9, 4,8, 5,2 и 7,0 дней в стекловидном теле, внутриглазной жидкости, сетчатке и плазме, соответственно. Эти времена полужизни сходны с теми, которые описаны в литературе для клинически используемого рекомбинантного гуманизированного моноклонального IgG1 антитела Авастин (анти-VEGF, бевацизумаб, Baki и др., Ophthalmology, 2007), которые также были подтверждены экспериментально в собственных условиях. Эти результаты соответствовали предполагаемым, поскольку интравитреальный клиренс полноразмерных IgG главным образом зависит от их молекулярного размера, который сходен для нашего антитела 277 и Авастина. Таким образом, полагают, что ФК для человека, включая время полужизни в глазу антитела 277 и Авастина, является сходной. Описанное время полужизни в глазу человека для Авастина составляет 9,73±1,48 дня (Hutton-Smith, 2016).

11. Частота ивт инъекции IgG1 антитела.

На основании данных *in vivo*, полученных в фармакокинетическом исследовании (пример 10), а также данных активности, полученных в SH-SY5Y клетках, исследовали глазную ФК для человека (витреальную концентрацию в динамике) IgG1 антител и рассчитывали на основании хорошо зарекомендовавших себя однокамерных моделей кинетики относительно глазного клиренса биомолекул. Для расчетов, использовали следующие параметры: время полужизни в глазу человека t_{1/2} = 10 дней, как описано для Авастина, а также подтверждается приведенными данными *in vivo* в примере 10; молекулярный вес 149 кДа как для полноразмерных IgG1 антител, и количество ивт инъекцированного антитела 1 мг (см. фиг. 4). Поскольку глазная ФК главным образом зависит от молекулярного веса, то идентичный график глазной ФК получали для всех пяти антител.

Для оценки частоты ивт инъекции, следует принять во внимание, что эффективность *in vivo* может поддерживаться при витреальных концентрациях ≥ клеточным EC₅₀, как определено на основании анализов TrkB-фосфорилирования в SH-SY5Y клетках (Пример 8). Время после ивт инъекции для достижения витреальной концентрации, эквивалентной EC₅₀, указано стрелками на фиг. 4. На основании этого анализа, время до достижения такой витреальной концентрации после инъекции 1 мг антитела обобщено в следующей таблице для каждого антитела.

Таблица 10

Соединение	Время после ивт до достижения C _{стекловидн.} = EC ₅₀ [дни]
277-gr (IgG1)	154
277-gr (IgG1-KO)	151
277-64 (IgG1)	150
277-64 (IgG1-KO)	152
C2	136

Например, после инъекцирования 1 мг C2 в глаз человеку, витреальная концентрация, соответствующая EC₅₀ для C2 (табл. 10), достигается через 136 дней (то есть, через 136 дней, необходима следующая ивт инъекция). Для сравнения, в случае с 277-64 (IgG1), это время будет удлинено до 150 дней после ивт инъекции. В этом случае, следующая ивт инъекция будет необходима на 14 дней позже по сравнению с C2. Принимая во внимание, что минимальная эффективная доза значений в 10 раз выше, чем EC₅₀, будет снижать время между инъекциями, однако, временное отличие в частоте инъекции между C2 и другими антителами, перечисленными табл. 10 выше, будет оставаться идентичным.

Инъекцируемый объем, который можно вводить в глаз, сильно ограничен. В то же время, повторные инъекции в глаза необходимы для лечения глазных состояний. Улучшение времени полужизни антитела является одним из способов увеличения времени между интервалами инъекций, но, как указано, главным образом зависит от молекулярного веса молекулы. Как было показано *in vivo* в примере 10 и на SH-SY5Y клетках в примере 8, путем обеспечения улучшенного и более эффективного антитела интервалы инъекций можно удлинить, что для пациентов представляет возможность менее часто получать инъекции в глаза.

12. Нейрозащитный и нейрогенеративный эффекты агонистического антитела TrkB у STZ-индуцированных диабетических крыс.

Ни одно из 277-антител не является перекрестно реактивным у грызунов, следовательно, исследо-

вания для подтверждения концепции и эффективности *in vivo* осуществляли с применением TrkB активирующего антитела C2 в качестве антитела суррогатных средств для тестирования гипотезы о том, что TrkB активирующий подход I) обеспечивает нейропротективное действие ('нейрозащитный подход'), и II) обеспечивает реактивацию дисфункциональных нейронов/совокупностей ('регенерационный подход'). Оба подхода рассматриваются в нескольких исследованиях. В качестве моделей болезней животных, использовали модель диабета, индуцированного стрептозотоцином (STZ) у крыс, которая характеризуется потерей бета-клеток поджелудочной железы, низкими уровнями инсулина, стабильной гипергликемией и последующей нейронной дисфункцией в сетчатке.

Исследование на животных.

Самцов серых крыс (BN крысы) получали от Charles River (Германия). Животных содержали в группах по 2 в IVC в условиях контролируемой температуры и влажности, с 12-ти часовым циклом день/ночь (свет был выключен в период от 18 ч до 6 ч утра). Они получали питание *ad libitum* с гранулированным рационом № 3438 от Provimi Kliba (Швейцария) и имели свободный доступ к питьевой воде. Животных акклиматизировали к их окружающей среде в течение одной недели перед началом исследования. Возраст крыс составлял 6-8 недель на начало прижизненной фазы исследования. Гипергликемию индуцировали путем в/б инъекции STZ (65 мг/кг вес тела; Sigma № S0130-1G). Животных, которые не отвечают, или плохо отвечают, не включали в исследование, то есть, животных с концентрациями глюкозы в крови <20 мМ в день 5 после применения STZ. За весом тела и уровнями глюкозы в крови наблюдали регулярно. Животным вводили дозу путем однократной ивт инъекции C2 (50 мкг в 4,6 мкл) или контрольного антитела к 2,4,6-тринитрофенилу (анти-TNP) (50 мкг в 4,5 мкл) в день 36 после применения STZ. Функция сетчатки оценивали с помощью записей электроретинографии (ЭРГ), и животных умертвляли после последней записи с помощью смертельной дозы в/б введения фенобарбитала.

Дозирование и интравитреальные инъекции.

Общая схема исследования представлена на фиг. 5. Для ивт инъекции, крыс анестезировали с применением 2,5-3% изофлурана (Forene; Abbvie). Вводили каплю 4 мг/мл оксибупрокаингидрохлорида (Novesine; Omnivision) в качестве местной локальной анестезии. 4,6 мкл C2 маточного раствора (10,9 мг/мл; буфер: 20 мМ цитрат натрия, 115 мМ NaCl, pH 6,0) инъецировали ивт в каждый глаз гипергликемических крыс (группа 3, n=24 глаза, фиг. 5), что приводило к инъецируемой дозе ~50 мкг/глаз. В качестве контроля, 4,5 мкл анти- анти-2,4,6-тринитрофенильного маточного раствора (11,2 мг/мл; буфер 20 мМ цитрат натрия, 115 мМ NaCl, pH 6,0) инъецировали ивт в глаза недиабетических и диабетических контрольных крыс (группа 1, n=24 глаза, и группа 2, n=22 глаза, фиг. 5), что приводило к инъецируемой дозе ~50 мкг/глаз. Ивт инъекции осуществляли под препарировальной лупой. Раствор Антитела доставляли с помощью иглы 34 калибра (насаженной на стеклянный шприц Гамильтона объемом 10 мкл) в стекловидное тело сразу позади лимба, и общее качество инъекции контролировали с помощью фундоскопии (используя Micron IV Retinal Imaging Microscope, Phoenix Research Labs).

Электроретинография.

Электроретинография (ЭРГ) представляет собой неинвазивную электрофизиологическую технику для оценки индуцированной светом электрической активности различных нейронов сетчатки, и предоставляет возможность количественного определения различных аспектов функции сетчатки, таких как зрение при низком уровне освещенности или цветовое зрение. ЭРГ измеряли в качестве изменения потенциала между роговичным и эталонным электродом, используя систему записи Espion E3 ЭРГ (Diagnosys LLC). Перед записями ЭРГ, животных адаптировали к темноте в течение по меньшей мере 2 часов, и анестезировали путем в/б инъекции кетамина (Ketanest, прилб. 100 мг/кг) и ксилазина (Rompun, прилб. 5 мг/кг). Животных помещали на столик с подогревом для поддержания постоянной температуры тела при 37°C. Зрачки расширяли с помощью 1% циклопентолат-НCl и 2,5% фенилэфрина. Каплю раствора Methocel 2% (OmniVision) капали на роговицу для предотвращения высыхания глаза и развития катаракты во время записей. Записи осуществляли одновременно для обоих глаз с помощью золотых петлевых электродов. Эталонный электрод представлял собой беззубый зажим типа крокодил, увлажненный Methocel, и прикрепленный к щеке животного. Для электрического заземления, зажим присоединяли к хвосту животного. ЭРГ сигналы замерыли при 1 кГц и записывали с граничными режимами 0,15 Гц низкой частоты и 500 Гц высокой частоты. Световые стимулы состояли из коротких вспышек с полным полем, доставляемых с помощью набора светоизлучающих диодов (продолжительность, <4 мс). Все вспышки продуцировали с помощью стимулятора Ganzfeld (ColorDome; Diagnosys), либо в темноте или на немигающем зеленом или красном фоновом свете.

ЭРГ протоколы.

ЭРГ ответы сначала записывали от адаптированных к темноте животных (для выделения опосредованных палочками ответов), после этого записывали от животных, адаптированных к красному фоновому свету (50 кд/м², для выделения УФ опосредованных колбочками ЭРГ ответов) и затем адаптированных к зеленому фоновому свету (25,5 кд/м², для выделения опосредованные колбочками М-типа ответы). В случае адаптированных к темноте ЭРГ, ответы вызвали сериями вспышек в диапазоне от 1·10⁻⁵ до 0,1 кд·с/м². Для вспышек с люминесценцией 1·10⁻⁵ и 3·10⁻⁵ кд·с/м², ответы 20 опытов были усреднены.

Для вспышек в диапазоне от $1 \cdot 10^{-4}$ вплоть до $0,05$ кд·с/м², ответы 10 опытов были усреднены, и для конечной вспышки $0,1$ кд·с/м², 8 опытов были усреднены. Интервалы между индивидуальными вспышками выбирали таким образом, чтобы обеспечить полное восстановление сетчатки от каждой вспышки (нет признаков индуцированного вспышкой уменьшения амплитуд ответов или сокращения латентности). На основании этого критерия, интервалы между вспышками составляли 2 с для $1 \cdot 10^{-5}$ и $3 \cdot 10^{-5}$ кд·с/м² вспышки, 5 с для вспышек в диапазоне от $1 \cdot 10^{-4}$ вплоть до $0,05$ кд·с/м², и 10 с для вспышки $0,1$ кд·с/м².

Для записей УФ опосредованных колбочками ответов, животные были адаптированы к свету для красного фонового света в течение 2 мин. Световые ответы вызывали с помощью УФ вспышек $0,02$, $0,04$, $0,08$, $0,17$, $0,35$, $0,83$, $1,66$, $2,90$, и $4,15$ мкВт/м². Для записей опосредованных колбочками М-типа ответов, животные были адаптированы к свету для зеленого фонового света в течение 2 мин. Световые ответы вызывали с помощью зеленых вспышек $0,25$, $0,1$, $1,0$, $5,0$, 50 , и 150 кд·с/м². Для УФ и зеленых вспышек, ответы 10 опытов были усреднены с интервалами между вспышками 3 с.

Анализ данных.

Для определения ЭРГ амплитуд b-волн (положительная реакция деполяризации, имеющая происхождение главным образом из биполярных клеток), записывали данные ЭРГ и анализировали с использованием программного обеспечения MATLAB (версия R2014a; MathWorks). Осцилляторные потенциалы (небольшие высокочастотные волны, накладывающиеся на b-волну) удаляли от сигналов путем 55 Гц быстрого преобразования Фурье фильтрации низких частот, поскольку осцилляторные потенциалы могут оказывать влияние на амплитуду и положение пика b-волны, в особенности в адаптированных к свету условиях. Амплитуду b-волны вычисляли от нижнего уровня ответа a-волны (отрицательное отклонение, возникающее главным образом вследствие активности фоторецептора) к пику пика b-волны. Латентность b-волны измеряли как время после стимуляции вспышкой, необходимое для достижения пика b-волны.

Амплитуды b-волн в зависимости от интенсивности стимула подгоняли с помощью следующего уравнения, используя процедуру выравнивания методом наименьших квадратов (GraphPad Prism, версия 6.01):

$$R = \frac{R_{max} I^n}{(I^n + I_h^n)} \quad (\text{Уравнение 1})$$

где R представляет собой амплитуду ответа, R_{max} представляет собой амплитуду насыщающих колебаний, I интенсивность вспышки, I_h полунасыщающую интенсивность вспышки и p коэффициент Хилла.

Светочувствительность, S, определяли как соотношение между амплитудой насыщающих колебаний, R_{max} , и полунасыщающей интенсивностью вспышки, I_h .

S и R_{max} значения нормировали к средним значениям не-диабетических контролей, полученных для недели 5, до ивт, и для недели 7, после ивт лечения, соответственно.

Для анализа латентности опосредованной палочками b-волны, определяли среднюю латентность не-диабетических контрольных животных для b-волны, вызываемых вспышками $1 \cdot 10^{-5}$, $3 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-4}$ и $2 \cdot 10^{-4}$ кд·с/м² (соответствующая латентность является очень похожей). Для каждой исследуемой группы, рассчитывали относительное изменение для среднего значения контролей для интенсивностей вспышек, указанных выше, и усредняли, получая среднее относительное изменение латентности b-волны.

Для анализа УФ опосредованной колбочками латентности b-волны, рассчитывали относительные изменения латентности к среднему значению контролей для b-волновых ответов, вызываемых интенсивностями вспышек $0,042$, $0,083$, $0,166$ и $0,348$ мкВт/см², и усредняли.

Для анализа латентности опосредованной колбочками М-типа b-волны, рассчитывали относительные изменения латентности к среднему значению контролей для b-волновых ответов, вызываемых интенсивностями вспышек 1 , 5 , 50 и 150 кд·с/м², и усредняли.

Ответ опосредованной палочками a-волны определяли на пике a-волны (отрицательное отклонение сигнала сразу после светового стимула), вызываемого вспышкой $0,1$ кд·с/м².

Результаты.

В неделю 5 после индукции диабета, осуществляли записи исходных ЭРГ для количественного определения степени нейронной дисфункции в сетчатке перед ивт лечением (см. также фиг. 5). На основании этих результатов ЭРГ, было установлено, что две диабетические (гипергликемические) группы проявляли сходное распределение дисфункции сетчатки (которые получали последующее ивт лечение либо с применением контрольного IgG1 к 2,4,6-тринитрофенилу - группа 2 - или TrkB агонистическое IgG1 C2 - группа 3). В целом, все ивт лечения хорошо переносились и не наблюдали побочных эффектов. Глюкоза в крови была стабильной на уровне ~ 5 мМ у недиабетических контрольных крыс (группа 1, n=12) в период осуществления исследования. В STZ-индуцированных диабетических животных (группа 2 и 3, каждая n=12), концентрации глюкозы в крови достигали уровней >20 мМ через ~ 4 дня после STZ обработки, и не снижались ниже 20 мМ в период осуществления исследования. Ивт лечение с применением C2 или контрольного IgG1 к 2,4,6-тринитрофенилу не оказывает каких-либо влияний на уровни глюкозы в крови.

Латентность опосредованной палочками b-волны.

Латентность b-волны представляет собой критерий для скорости индуцированного светом электрического ответа в сетчатке (главным образом на уровне биполярных клеток и синаптической трансмиссии фоторецептор-на-биполярные клетки). Латентность определяется как время, необходимое для достижения амплитуды ответа после стимуляции вспышкой света. Влияния гипергликемии и ивт лечения обобщены на фиг. 6. Рассчитывали изменения латентности относительно средней латентности, измеренных от контрольных крыс, для данных, полученных до ивт лечения (оценка исходного состояния ЭРГ) и после ивт лечения. Существует сильное увеличение латентности на ~14 мс в двух гипергликемических группах до ивт лечения, указывая на индуцированное гипергликемией замедление кинетики ответа b-волны, то есть, уменьшенная скорость опосредованного палочками процессинга в сетчатке. Ивт инъекция контрольного IgG1 к 2,4,6-тринитрофенилу не оказывала каких-либо существенных влияний на латентность у недиабетической контрольной группы и гипергликемической группе (группа 1, черные столбики, и группа 2, обозначенные точками столбики на фиг. 6, после ивт, соответственно). Однако, ивт лечение с применением TrkB активатора C2 очевидно приводит к уменьшенной задержке латентности (группа 3, серый столбик на фиг. 6, после ивт). В среднем, ивт лечение с применением C2 вызывает существенное ускорение ответов b-волны на ~9 мс (то есть задержка латентности сокращается от 14 мс вплоть до 5 мс).

Светочувствительность опосредованной палочками b-волны.

ЭРГ ответы светочувствительности опосредованной палочками b-волны являются показателем количества нейронов, принимающих участие в опосредованных палочками путях передачи сигналов в сетчатке, и их чувствительность к световым стимулам для образования деполяризующих световых ответов. Светочувствительности нормировали к средним светочувствительностям контрольных крыс (группа 1, до и после ивт лечения) и графически представляли на фиг. 7. Нормированные светочувствительности снижались на ~40-50% у гипергликемических животных (до ивт лечения, группа 2 и 3). Ивт инъекция контрольного IgG1 не оказывала каких-либо существенных влияний на светочувствительности контрольных крыс (группа 1) или гипергликемических крыс (группа 2). Чрезвычайно важным является тот факт, что ивт лечение с применением TrkB активатора C2 существенно повышало светочувствительность на ~30% (группа 3, серые, после ивт по сравнению с до ивт).

Ответы опосредованной палочками a-волны.

Ответ опосредованной палочками a-волны является показателем для размера световых ответов палочкового фоторецептора, вызванных вспышкой света. Ответы опосредованной палочками a-волны нормировали к средним значениям, полученным от контрольных крыс (группа 1, до и после ивт лечения) и графически представляли на фиг. 8. Нормированные амплитуды насыщающих колебаний снижались на ~17% у гипергликемических животных (группа 2 и 3, до ивт лечения). Ивт инъекция контрольного IgG1 не оказывала каких-либо существенных влияний на нормированные ответы a-волны у контрольных крыс (группа 1, черные) или гипергликемических крыс (группа 2, обозначенные точками), где у последней группы проявляется дальнейшее снижение ответа a-волны во время проведения исследования. Однако, ивт лечение с применением TrkB активатора C2 (группа 3, серые) может полностью предотвращать дальнейшее снижение ответов a-волны, что наблюдается для гипергликемической группы 2.

УФ и латентность опосредованной колбочками M-типа b-волны.

Рассчитывали изменения латентности относительно средней латентности, измеренной для контрольных крыс, для данных, полученных до ивт лечения (оценка исходного состояния ЭРГ) и после ивт лечения. Этот анализ осуществляли для УФ латентности опосредованной колбочками b-волны (фиг. 9) и латентности опосредованной колбочками M-типа b-волны (фиг. 10). В случае УФ опосредованных колбочками ответов, существует сильное увеличение латентности на ~8 мс в двух гипергликемических группах до ивт лечения, в то время как увеличение опосредованный колбочками M-типа латентности составляет ~5 мс для гипергликемических крыс. Эти статистически достоверные эффекты указывают на индуцированное гипергликемией замедление кинетики ответов b-волны и уменьшает скорость опосредованного колбочками процессинга в сетчатке. Ивт инъекции контрольного IgG1 не оказывал каких-либо существенных влияний на латентность у недиабетической контрольной группы (группа 1, черные) или гипергликемической группы (группа 2, обозначенные точками), для обоих УФ и латентности опосредованной колбочками M-типа b-волны. Ивт лечение с применением C2 (группа 3, серые) сокращает латентность на ~5 мс в случае УФ колбочек (что соответствует ~50% нормализации кинетики ответов b-волны), и практически полное восстановление кинетики нормальных ответов b-волны в случае опосредованных колбочками M-типа b-волн.

Светочувствительность УФ опосредованной колбочками b-волны.

ЭРГ ответы светочувствительности УФ опосредованной колбочками b-волна оценивали, как описано для опосредованной палочками ЭРГ. Светочувствительности нормировали к средним светочувствительностям контрольных крыс (группа 1, до и после ивт лечения) и графически представляли на фиг. 11. Нормированные светочувствительности снижались на ~50% у гипергликемических животных на исходном уровне (до ивт). Ивт инъекция контрольного IgG1 не оказывала каких-либо существенных влияний на светочувствительности, в то время как ивт лечение с применением C2 существенно повышало свето-

чувствительность до уровня, наблюдаемого у здоровых контрольных крыс (группа 3, серые).

Амплитуда ответа опосредованной колбочками М-типа насыщающей b-волны.

Влияние гипергликемии на светочувствительность опосредованной колбочками М-типа b-волны является менее выраженным, чем для УФ опосредованной колбочками b-волны (в исследуемые временные точки). Тем не менее, можно наблюдать существенное ухудшение амплитуды насыщающих колебаний опосредованных колбочками М-типа b-волн в неделю 5 после начала гипергликемии (~15% уменьшение по сравнению с не-диабетическими контрольными крысами, фиг. 12). Ивт лечение с применением С2 может восстанавливать амплитуду насыщающих колебаний до уровня контролей (группа 3, серые), в то время как лечение с применением контрольного IgG1 не оказывало каких-либо существенных влияний (группа 2, обозначенные точками).

Основные результаты исследований обобщены ниже.

Активация TrkB вызывает нейропротективное действие и сохраняет функцию сетчатки. Нейропротективное действие было показано на модели STZ-индуцированного диабета у крыс, отображающей индуцированную гипергликемией нейронную дисфункцию. Было показано, что активация TrkB предотвращает дисфункцию фоторецепторов.

Активация TrkB индуцирует восстановление/улучшение функции нейронов в сетчатке на модели STZ-индуцированного диабета у крыс после пролонгированной гипергликемии, например, улучшенную латентность светового ответа (то есть, сокращение ЭРГ латентности b-волны), или улучшенные опосредованных палочками и колбочками светочувствительности.

Подводя итог, следует отметить, что фармакологические данные обеспечивают подтверждение терапевтической концепции о том, что активация TrkB может улучшать/восстанавливать функцию различных типов нейронных клеток в глазу при различных болезненных состояниях.

Активация TrkB также защищает фоторецепторы и наружную сетчатку, как показано с помощью анализа ЭРГ a-волны, которая является показателем световых ответов фоторецепторов. Подобно результатам, полученным для ЭРГ a-волны, контрастная чувствительность глаз диабетических крыс снижается во время продолжающейся гипергликемии, в то время как ивт лечение с применением TrkB активатора С2 полностью сохраняет контрастную чувствительность. Кроме того, улучшение ЭРГ светочувствительности световых ответов опосредованных палочками и колбочками b-волны, как описано выше (отображающее светочувствительности синаптической трансмиссии фоторецепторов на биполярные клетки) дополнительно усиливает концепцию о том, что активация TrkB может улучшать/защищать функцию наружной сетчатки, включая фоторецепторы.

13. BDNF функция при комбинированных лечениях.

Культивирование CHO клеток, экспрессирующих TrkB рецептор человека.

CHO клетки, экспрессирующие TrkB рецептор человека (hTrkB) (ThermoFisher Scientific, № K1491) культивировали в DMEM (Lonza, № BE12-604F), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой, глутамаксом, заменимыми аминокислотами, 20 мМ HEPES, 5 мкг/мл бластицидина и 200 мкг/мл зеоцина. За двадцать четыре часа до стимуляции, 5000 клеток (30 мкл) высевали в каждую полость прозрачного планшета для культивирования тканей на 384 лунки (BD Falcon, № 353963) и инкубировали в увлажненном инкубаторе при 37°C и 5% CO₂.

Анализ ERK фосфорилирования в CHO клетках с помощью hTrkB рецептора.

Через двадцать четыре часа после высевания, супернатант CHO/hTrkB клеток заменяли на 40 мкл DMEM комнатной температуры с 0,1% BSA, но без других дополнительных компонентов. Через 15 мин, добавляли 10 мкл DMEM/0,1% BSA с возрастающими концентрациями BDNF (1E-13 до 3E-8 моль/л), 277-антитела (1E-13 до 2,025E-8 моль/л), или С2-антитела (1E-13 до 2,025E-8 моль/л) отдельно или комбинации с 1 нМ BDNF с возрастающими концентрациями 277- или С2-антитела (оба 1E-13 до 2,025E-8 моль/л) в трех повторах для стимуляции ERK фосфорилирования. После инкубирования в течение 45 мин при комнатной температуре, супернатанты удаляли и клетки лизировали в течение 20 мин на жидком льду в 20 мкл лизирующего буфера на лунку (1x Triton лизирующий буфер (CellSignaling № 9803-S), дополненным таблетками полного мини протеазного ингибитора (Roche № 04693124001) и коктейлями ингибиторов фосфатаз 2 (Sigma № P5726) и 3 (Sigma № P0044), и 1 мМ PMSF (Sigma № 93482)). Пять микролитров полученного лизата использовали для количественного определения ERK1/2 фосфорилирования в T202/Y204, используя коммерчески доступный анализ (Perkin Elmer № TGRES500), согласно инструкциям производителя. Излучение света акцепторных шариков, отображающее ERK фосфорилирование, записывали при 570 нм на микропланшет-ридере Perkin Elmer EnVision и подготавливали для презентации с помощью GraphPad Prism (версия 7), включая необработанные данные (среднее ± СПС) и нелинейную регрессию (лог(агонист) отн. ответа (три параметра)).

Как показано на фиг. 13, 277-антитело не уменьшает BDNF индуцированное ERK фосфорилирование. Возрастающие концентрации С2 антитела приводят к уменьшению BDNF индуцированного ERK фосфорилирования вплоть до уровня С2 индуцированного ERK фосфорилирования. Это может оказывать существенное влияние на дозирование антитела к TrkB в глаза, где антитела вводятся в высоких насыщающих концентрациях для пролонгирования времени, необходимого до следующего введения.

277-антитело может вводиться в высоких дозах без конфликтования с существующим BDNF индуцированным ERK фосфорилированием, в то время как C2 антитело уменьшает существующее BDNF индуцированное ERK фосфорилирование вплоть до уровня антитела.

14. Связывание с VEGF человека *in vitro* анализ ELISA.

Для анализа связывания *in vitro*, MaxiSorp планшеты на 96 лунок (Nunc № 437111) покрывали в течение ночи при 4°C с помощью 500 нг/мл VEGF человека (R&D Systems № 293-VE-050) или VEGF крысы (R&D Systems № 564-RV-050) в карбонатном/бикарбонатном буфере (3,03 г/л Na₂CO₃ и 6,00 г/л NaHCO₃, pH 9,6). Планшеты промывали три раза с помощью PBS-T (фосфатно-солевой буферный раствор (Invitrogen № 70011-036) с 0,05% Tween20 (Sigma № P7949)) и затем инкубировали с 1% BSA (Sigma № A3059) в PBS-T в течение трех часов при комнатной температуре для блокирования неспецифического связывания. Планшеты промывали три раза с помощью PBS-T и затем инкубировали с 1:4 серийным разведением 1 мкМ Авастина (Roche clinic package), C2-антитела, 277-антитела или человеческого IgG1 изотипного контрольного антитела в PBS-T в течение ночи при 4°C. Планшеты промывали раз с помощью PBS-T и затем инкубировали с 1:2000 разведением Alexa fluor 647 козьего анти-человеческого IgG (Invitrogen № A21445) в течение двух часов при комнатной температуре. После трех дополнительных циклов промывания с помощью PBS-T, записывали излучение света при 647 нм (отображающее связывание антитела с VEGF) на микропланшет-ридере Perkin Elmer EnVision. Данные приготавливали для презентации с помощью GraphPad Prism (версия 7), включая необработанные данные (среднее ± СПС) и нелинейную регрессию (лог(агонист) отн. ответа (три параметра)).

Как показано на фиг. 14 отсутствует статистически значимое различие для связывания VEGF человека между 277 антителом к TrkB и IgG1 изотипным контрольным антителом при концентрациях антитела вплоть до 0,25 мкМ (критерий Стьюдента для одной выборки, $p > 0,05$). В отличие от этого, статистически значимое различие для связывания VEGF человека между C2 и изотипным контрольным антителом уже наблюдается при концентрации антитела 0,24 нМ (критерий Стьюдента для одной выборки, $**p < 0,01$).

Такое неспецифическое связывание с VEGF может вызывать, например, нежелательные побочные эффекты, затруднять контроль дозирования для активации TrkB, или повышать количество антитела, необходимое для достижения желательного эффекта.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое специфически связывается с тирозинкиназным рецептором В (TrkB), или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее (содержащий):

а) вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48 (L-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49 (L-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50 (L-CDR3); и

б) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52 (H-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53 (H-CDR3), или

в) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 (H-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57 (H-CDR3), или

г) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59 (H-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60 (H-CDR3).

2. Антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

а) вариабельную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, и вариабельную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12,

б) вариабельную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, и вариабельную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13,

в) вариабельную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, и вариабельную тяжелую

содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34 или 35,

е) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37 или 38,

ж) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40 или 41,

з) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43 или 44, или

и) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46 или 47 соответственно.

6. Антитело к TrkB по п.1, где антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 или 23.

7. Антитело к TrkB по п.1, где антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 или 26.

8. Антитело к TrkB по п.1, где антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28 или 29.

9. Антитело к TrkB по п.1, где антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31 или 32.

10. Антитело к TrkB по п.1, где антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34 или 35.

11. Антитело к TrkB по п.1, где антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37 или 38.

12. Антитело к TrkB по п.1, где антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40 или 41.

13. Антитело к TrkB по п.1, где антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43 или 44.

14. Антитело к TrkB по п.1, где антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46 или 47.

15. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-14 в медицине для лечения заболеваний, которые характеризуются уменьшенной активностью TrkB пути.

16. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по п.15 для лечения заболеваний глаз или сетчатки.

17. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по п.16 для лечения нейронных/невральных заболеваний глаза или сетчатки.

18. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по п.16 для лечения географической атрофии.

19. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по п.16 для лечения возрастной дегенерации желтого пятна, диабетической ретинопатии, диабетического отека желтого пятна, пигментной дистрофии сетчатки, наследственной дистрофии сетчатки, наследственной макулодистрофии, миопической дегенерации, окклюзий вены сетчатки, окклюзий артерии сетчатки, эндофтальмита, увеита, кистозного макулярного отека, хороидальной неоваскулярной мембраны вследствие любого из заболеваний сетчатки, оптических нейропатий, глаукомы, отслойки сетчатки, токсической ретинопатии, лучевой ретинопатии и травматической ретинопатии.

20. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по п.15 для лечения нейродегенеративных заболеваний.

21. Применение по п.20 для лечения продромальной и от легкой до умеренной болезни Альцгеймера, задержки прогрессирования заболевания у пациентов с болезнью Альцгеймера, болезнью Хантингтона, болезнью Паркинсона, большого депрессивного расстройства, шизофрении, когнитивного нарушения, связанного с шизофренией, предотвращения первого приступа психоза у индивидуумов с ослабленным психозным синдромом, предотвращения повторения у пациентов с шизофренией, терапевтически резистентной депрессии.

22. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-14 и фармацевтически приемлемый носитель.

23. Способ лечения заболеваний, которые характеризуются уменьшенной активностью TrkB пути,

предусматривающий введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-14 или фармацевтической композиции по п.22, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят с помощью парентерального пути, внутривенного пути, интравитреального пути или подкожного пути введения.

24. Выделенный полинуклеотид, кодирующий последовательность тяжелой и легкой цепи или вариабельную область легкой и тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-14.

25. Набор для лечения заболеваний, которые характеризуются уменьшенной активностью TrkB пути, содержащий выделенные полинуклеотиды, кодирующие последовательность тяжелой и легкой цепи или вариабельную область легкой и тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-14.

26. Экспрессионный вектор, содержащий выделенный полинуклеотид по п.24 или набор полинуклеотидов по п.25.

27. Вирусный вектор, содержащий выделенный полинуклеотид по п.24 или набор полинуклеотидов по п.25.

28. Клетка-хозяин, содержащая выделенный полинуклеотид по п.24, или набор полинуклеотидов по п.25, или экспрессионный вектор по п.26.

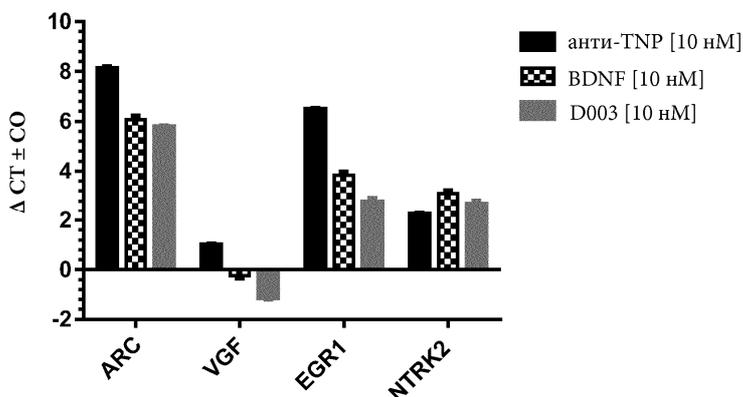
29. Способ получения антитела к TrkB или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий:

- а) получение клетки-хозяина по п.28; и
- б) культивирование клетки-хозяина.

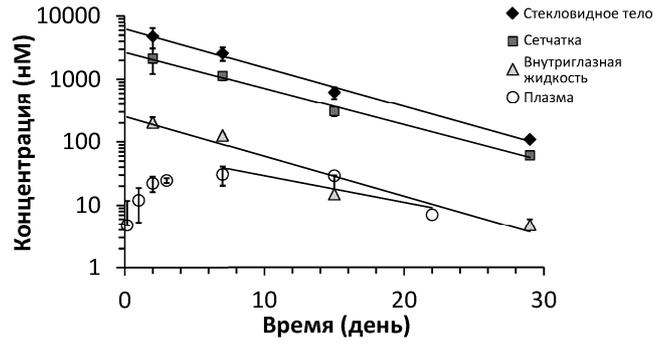
30. Способ по п.29, который дополнительно включает восстановление и очистку антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

Положение	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90
BDNF	CPTSCKCSASRIWCSDPSPGIVAFPRLEPNSVDPENITTEIFIANQKRLEIINEDDVEAYVGLRNLTI VDSGLKFFVAHKAFKLSNLSLQHIN
277-антитело	CPTSCKCSASRIWCSDPSPGIVAFPRLEPNSVDPENITTEIFIANQKRLEIINEDDVEAYVGLRNLTI VDSGLKFFVAHKAFKLSNLSLQHIN
C2	CPTSCKCSASRIWCSDPSPGIVAFPRLEPNSVDPENITTEIFIANQKRLEIINEDDVEAYVGLRNLTI VDSGLKFFVAHKAFKLSNLSLQHIN
C20	CPTSCKCSASRIWCSDPSPGIVAFPRLEPNSVDPENITTEIFIANQKRLEIINEDDVEAYVGLRNLTI VDSGLKFFVAHKAFKLSNLSLQHIN
Положение	91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180
BDNF	FTRNKLTLSLRKHFRLDLSLEILVGNPFTCSCDIMWIKT LQEA KSSPDTQDLYCLN ESKNIPLANLQIPNCGLP SANLAAPNLITVEEG
277-антитело	FTRNKLTLSLRKHFRLDLSLEILVGNPFTCSCDIMWIKT LQEA KSSPDTQDLYCLN ESKNIPLANLQIPNCGLP SANLAAPNLITVEEG
C2	FTRNKLTLSLRKHFRLDLSLEILVGNPFTCSCDIMWIKT LQEA KSSPDTQDLYCLN ESKNIPLANLQIPNCGLP SANLAAPNLITVEEG
C20	FTRNKLTLSLRKHFRLDLSLEILVGNPFTCSCDIMWIKT LQEA KSSPDTQDLYCLN ESKNIPLANLQIPNCGLP SANLAAPNLITVEEG
Положение	181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000
BDNF	KSITLCSVAGDVPNMYWDVGNLVSKHMNETSHTQGSRLRITNISDDSGKQISCAENLVGEDQDSVNLTVHFAPITITFLESPTS DHHW
277-антитело	KSITLCSVAGDVPNMYWDVGNLVSKHMNETSHTQGSRLRITNISDDSGKQISCAENLVGEDQDSVNLTVHFAPITITFLESPTS DHHW
C2	KSITLCSVAGDVPNMYWDVGNLVSKHMNETSHTQGSRLRITNISDDSGKQISCAENLVGEDQDSVNLTVHFAPITITFLESPTS DHHW
C20	KSITLCSVAGDVPNMYWDVGNLVSKHMNETSHTQGSRLRITNISDDSGKQISCAENLVGEDQDSVNLTVHFAPITITFLESPTS DHHW
Положение	1001 1002 1003 1004 1005 1006 1007 1008 1009 1010 1011 1012 1013 1014 1015 1016 1017 1018 1019 1020 1021 1022 1023 1024 1025 1026 1027 1028 1029 1030 1031 1032 1033 1034 1035 1036 1037 1038 1039 1040 1041 1042 1043 1044 1045 1046 1047 1048 1049 1050 1051 1052 1053 1054 1055 1056 1057 1058 1059 1060 1061 1062 1063 1064 1065 1066 1067 1068 1069 1070 1071 1072 1073 1074 1075 1076 1077 1078 1079 1080 1081 1082 1083 1084 1085 1086 1087 1088 1089 1090 1091 1092 1093 1094 1095 1096 1097 1098 1099 1100 1101 1102 1103 1104 1105 1106 1107 1108 1109 1110 1111 1112 1113 1114 1115 1116 1117 1118 1119 1120 1121 1122 1123 1124 1125 1126 1127 1128 1129 1130 1131 1132 1133 1134 1135 1136 1137 1138 1139 1140 1141 1142 1143 1144 1145 1146 1147 1148 1149 1150 1151 1152 1153 1154 1155 1156 1157 1158 1159 1160 1161 1162 1163 1164 1165 1166 1167 1168 1169 1170 1171 1172 1173 1174 1175 1176 1177 1178 1179 1180 1181 1182 1183 1184 1185 1186 1187 1188 1189 1190 1191 1192 1193 1194 1195 1196 1197 1198 1199 1200 1201 1202 1203 1204 1205 1206 1207 1208 1209 1210 1211 1212 1213 1214 1215 1216 1217 1218 1219 1220 1221 1222 1223 1224 1225 1226 1227 1228 1229 1230 1231 1232 1233 1234 1235 1236 1237 1238 1239 1240 1241 1242 1243 1244 1245 1246 1247 1248 1249 1250 1251 1252 1253 1254 1255 1256 1257 1258 1259 1260 1261 1262 1263 1264 1265 1266 1267 1268 1269 1270 1271 1272 1273 1274 1275 1276 1277 1278 1279 1280 1281 1282 1283 1284 1285 1286 1287 1288 1289 1290 1291 1292 1293 1294 1295 1296 1297 1298 1299 1300 1301 1302 1303 1304 1305 1306 1307 1308 1309 1310 1311 1312 1313 1314 1315 1316 1317 1318 1319 1320 1321 1322 1323 1324 1325 1326 1327 1328 1329 1330 1331 1332 1333 1334 1335 1336 1337 1338 1339 1340 1341 1342 1343 1344 1345 1346 1347 1348 1349 1350 1351 1352 1353 1354 1355 1356 1357 1358 1359 1360 1361 1362 1363 1364 1365 1366 1367 1368 1369 1370 1371 1372 1373 1374 1375 1376 1377 1378 1379 1380 1381 1382 1383 1384 1385 1386 1387 1388 1389 1390 1391 1392 1393 1394 1395 1396 1397 1398 1399 1400 1401 1402 1403 1404 1405 1406 1407 1408 1409 1410 1411 1412 1413 1414 1415 1416 1417 1418 1419 1420 1421 1422 1423 1424 1425 1426 1427 1428 1429 1430 1431 1432 1433 1434 1435 1436 1437 1438 1439 1440 1441 1442 1443 1444 1445 1446 1447 1448 1449 1450 1451 1452 1453 1454 1455 1456 1457 1458 1459 1460 1461 1462 1463 1464 1465 1466 1467 1468 1469 1470 1471 1472 1473 1474 1475 1476 1477 1478 1479 1480 1481 1482 1483 1484 1485 1486 1487 1488 1489 1490 1491 1492 1493 1494 1495 1496 1497 1498 1499 1500 1501 1502 1503 1504 1505 1506 1507 1508 1509 1510 1511 1512 1513 1514 1515 1516 1517 1518 1519 1520 1521 1522 1523 1524 1525 1526 1527 1528 1529 1530 1531 1532 1533 1534 1535 1536 1537 1538 1539 1540 1541 1542 1543 1544 1545 1546 1547 1548 1549 1550 1551 1552 1553 1554 1555 1556 1557 1558 1559 1560 1561 1562 1563 1564 1565 1566 1567 1568 1569 1570 1571 1572 1573 1574 1575 1576 1577 1578 1579 1580 1581 1582 1583 1584 1585 1586 1587 1588 1589 1590 1591 1592 1593 1594 1595 1596 1597 1598 1599 1600 1601 1602 1603 1604 1605 1606 1607 1608 1609 1610 1611 1612 1613 1614 1615 1616 1617 1618 1619 1620 1621 1622 1623 1624 1625 1626 1627 1628 1629 1630 1631 1632 1633 1634 1635 1636 1637 1638 1639 1640 1641 1642 1643 1644 1645 1646 1647 1648 1649 1650 1651 1652 1653 1654 1655 1656 1657 1658 1659 1660 1661 1662 1663 1664 1665 1666 1667 1668 1669 1670 1671 1672 1673 1674 1675 1676 1677 1678 1679 1680 1681 1682 1683 1684 1685 1686 1687 1688 1689 1690 1691 1692 1693 1694 1695 1696 1697 1698 1699 1700 1701 1702 1703 1704 1705 1706 1707 1708 1709 1710 1711 1712 1713 1714 1715 1716 1717 1718 1719 1720 1721 1722 1723 1724 1725 1726 1727 1728 1729 1730 1731 1732 1733 1734 1735 1736 1737 1738 1739 1740 1741 1742 1743 1744 1745 1746 1747 1748 1749 1750 1751 1752 1753 1754 1755 1756 1757 1758 1759 1760 1761 1762 1763 1764 1765 1766 1767 1768 1769 1770 1771 1772 1773 1774 1775 1776 1777 1778 1779 1780 1781 1782 1783 1784 1785 1786 1787 1788 1789 1790 1791 1792 1793 1794 1795 1796 1797 1798 1799 1800 1801 1802 1803 1804 1805 1806 1807 1808 1809 1810 1811 1812 1813 1814 1815 1816 1817 1818 1819 1820 1821 1822 1823 1824 1825 1826 1827 1828 1829 1830 1831 1832 1833 1834 1835 1836 1837 1838 1839 1840 1841 1842 1843 1844 1845 1846 1847 1848 1849 1850 1851 1852 1853 1854 1855 1856 1857 1858 1859 1860 1861 1862 1863 1864 1865 1866 1867 1868 1869 1870 1871 1872 1873 1874 1875 1876 1877 1878 1879 1880 1881 1882 1883 1884 1885 1886 1887 1888 1889 1890 1891 1892 1893 1894 1895 1896 1897 1898 1899 1900 1901 1902 1903 1904 1905 1906 1907 1908 1909 1910 1911 1912 1913 1914 1915 1916 1917 1918 1919 1920 1921 1922 1923 1924 1925 1926 1927 1928 1929 1930 1931 1932 1933 1934 1935 1936 1937 1938 1939 1940 1941 1942 1943 1944 1945 1946 1947 1948 1949 1950 1951 1952 1953 1954 1955 1956 1957 1958 1959 1960 1961 1962 1963 1964 1965 1966 1967 1968 1969 1970 1971 1972 1973 1974 1975 1976 1977 1978 1979 1980 1981 1982 1983 1984 1985 1986 1987 1988 1989 1990 1991 1992 1993 1994 1995 1996 1997 1998 1999 2000
BDNF	YPDVIEYDYGTAANDIGDITNRSNEIPSTDVTDKTRGRENAGS ANHHHH
277-антитело	YPDVIEYDYGTAANDIGDITNRSNEIPSTDVTDKTRGRENAGS ANHHHH
C2	YPDVIEYDYGTAANDIGDITNRSNEIPSTDVTDKTRGRENAGS ANHHHH
C20	YPDVIEYDYGTAANDIGDITNRSNEIPSTDVTDKTRGRENAGS ANHHHH

Фиг. 1

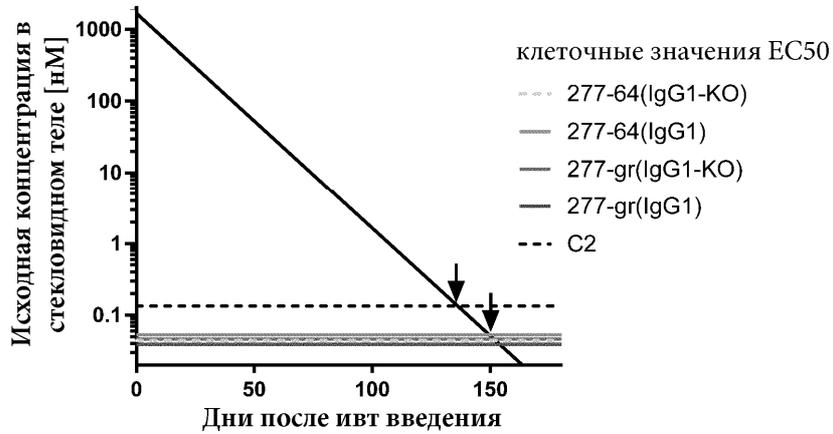


Фиг. 2

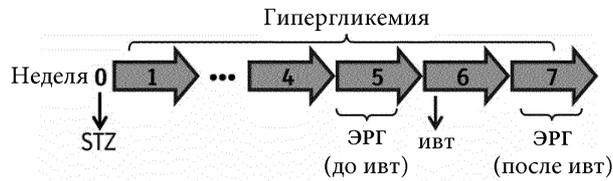


Фиг. 3

Глазная ФК IgG1 антител



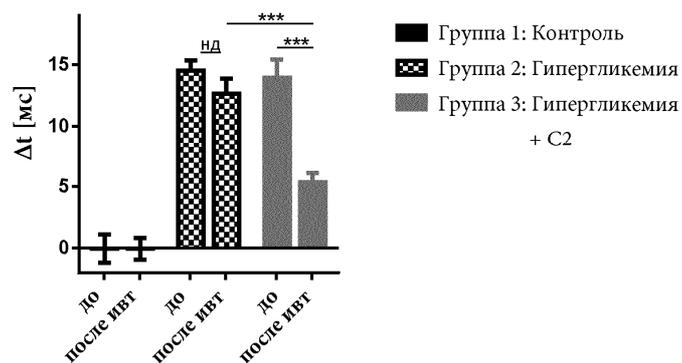
Фиг. 4



- Группа 1: Контроль (недиабетические),
Ивт: 50 мкг анти-TNP (контрольное IgG1)
- Группа 2: Гипергликемия (диабетические),
Ивт: 50 мкг анти-TNP (контрольное IgG1)
- Группа 3: Гипергликемия (диабетические),
Ивт: 50 мкг C2 (анти-TrkB)

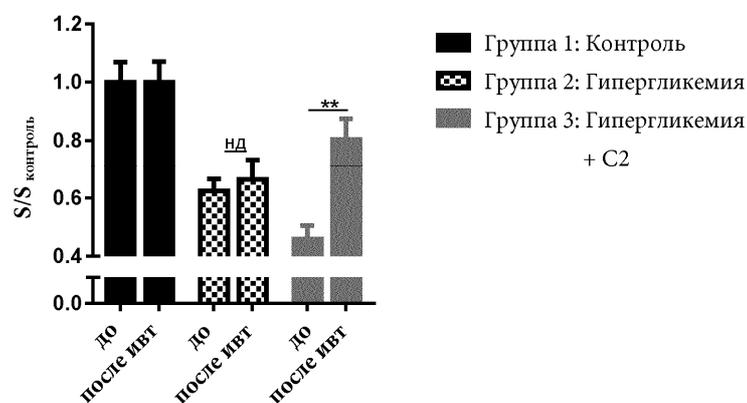
Фиг. 5

**Изменение латентности
опосредованной палочками b-волны**



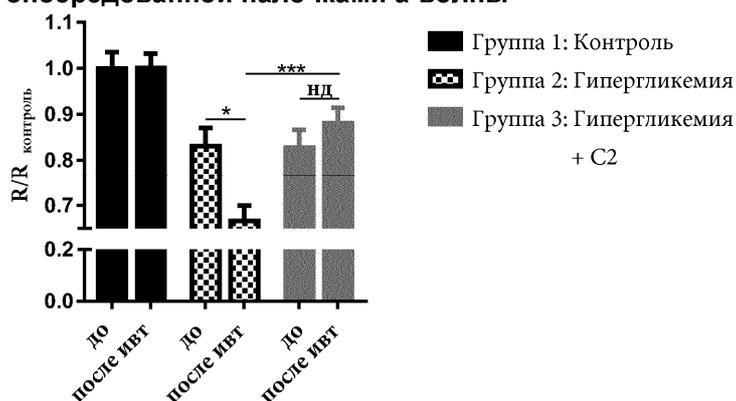
Фиг. 6

**Светочувствительность
опосредованной палочками b-волны**



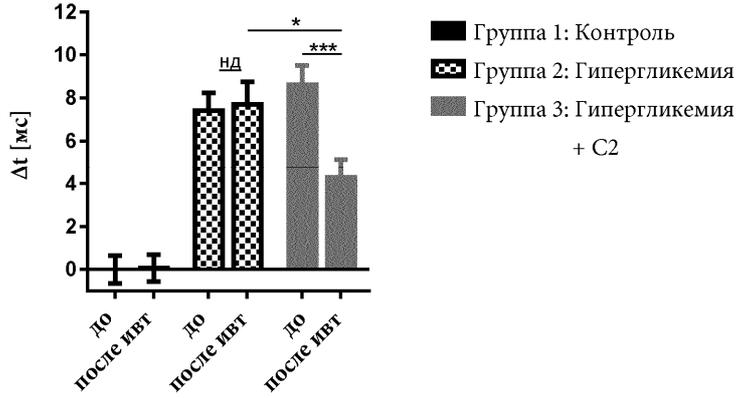
Фиг. 7

**Амплитуда колебаний
опосредованной палочками a-волны**



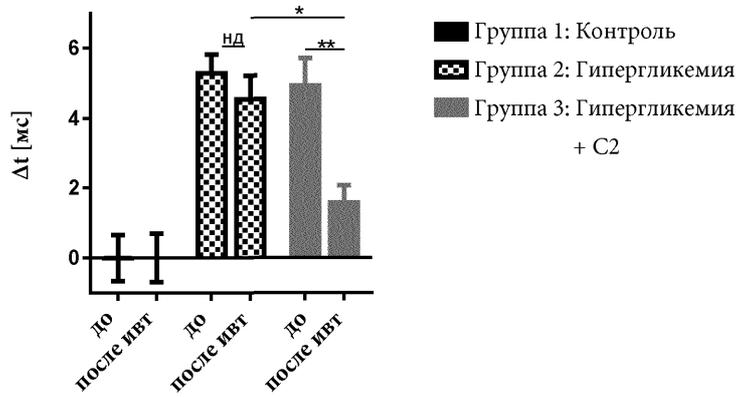
Фиг. 8

**Изменение латентности УФ
опосредованной колбочками b-волны**



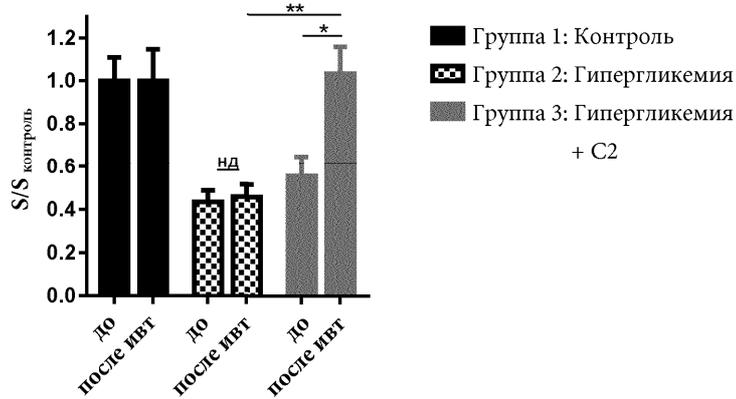
Фиг. 9

**Изменение латентности опосредованной
колбочками М-типа b-волны**



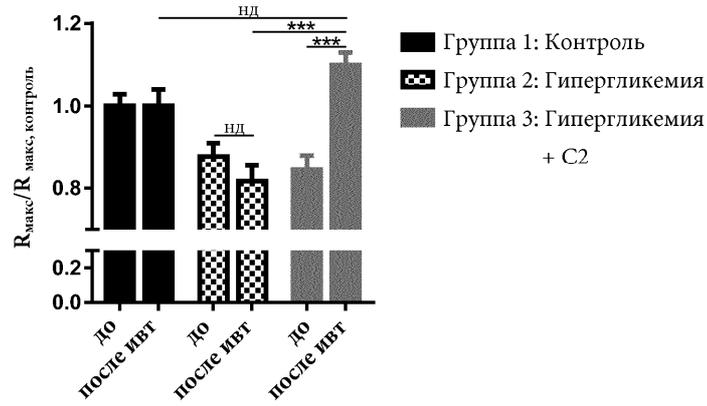
Фиг. 10

**Светочувствительность УФ
опосредованной колбочками b-волны**



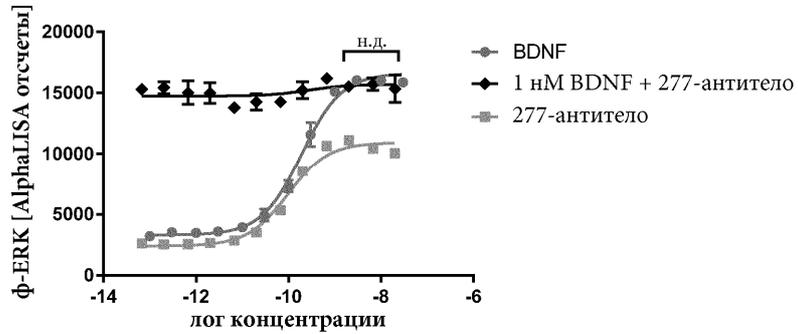
Фиг. 11

**Амплитуда опосредованной колбочками
М-типа насыщающей b-волны**

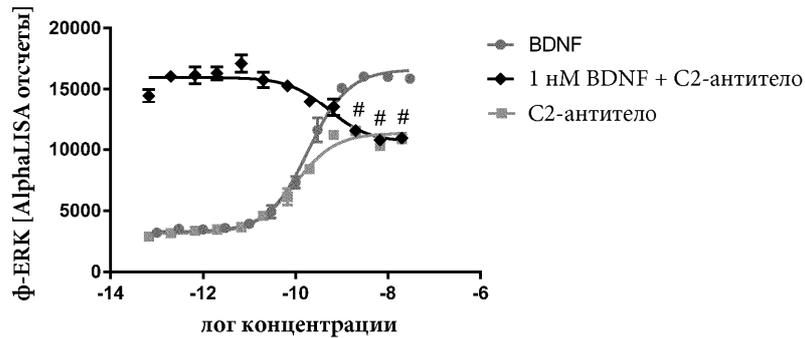


Фиг. 12

**фосфо-ERK после стимуляции
с помощью 277-антитела и/или BDNF**

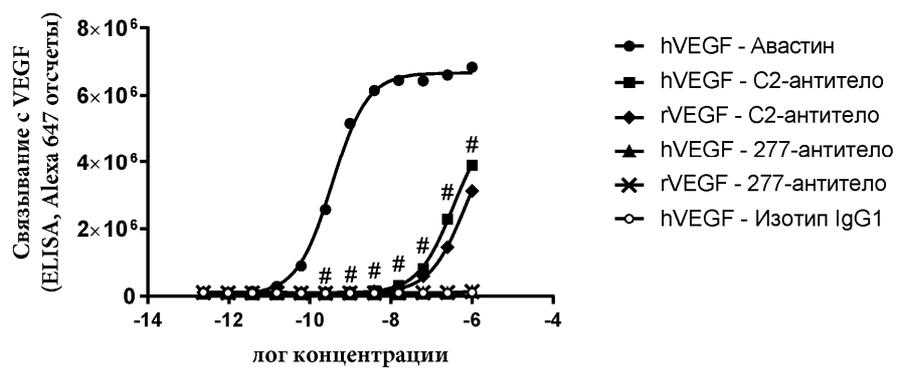


**фосфо-ERK после стимуляции с
помощью C2-антитела и/или BDNF**



Фиг. 13 А, В

Связывание in vitro C2- или 277-антитела с
человеческим или крысиным VEGF



Фиг. 14



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2