

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **044580**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.09.07**

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

**(21)** Номер заявки  
**202090966**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2018.11.28**

---

**(54) МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИ-TRKB АНТИТЕЛА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

**(31)** **62/592,657**

**(32)** **2017.11.30**

**(33)** **US**

**(43)** **2020.08.26**

**(86)** **PCT/US2018/062863**

**(87)** **WO 2019/108662 2019.06.06**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**РИДЖЕНЕРОН  
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Кролл Сьюзан Д., Гао Мин, Ху Ин  
(US)**

**(74)** Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

**(56)** **US-A1-2010196390  
WO-A1-2017085035  
WO-A2-2006133164**

**M. D. QIAN ET AL: "Novel Agonist Monoclonal Antibodies Activate TrkB Receptors and Demonstrate Potent Neurotrophic Activities", THE JOURNAL OF NEUROSCIENCE, vol. 26, no. 37, 13 September 2006 (2006-09-13), pages 9394-9403, XP055552463, US ISSN: 0270-6474, DOI:10.1523/JNEUROSCI.1118-06.2006**

**GAB SEOK KIM ET AL: "TrkB Agonist Antibody Pretreatment Enhances Neuronal Survival and Long-Term Sensory Motor Function Following Hypoxic Ischemic Injury in Neonatal Rats", PLOS ONE, vol. 9, no. 2, 14 February 2014 (2014-02-14), page e88962, XP055339994, DOI: 10.1371/journal.pone.0088962**

---

**(57)** Описаны антитела, которые специфически связываются с TrkB, а также способы их применения. Описаны агонистические антитела, которые являются нейропротекторными, что подтверждается их эффектом в отношении повышения выживаемости ганглионарных клеток сетчатки *in vitro*, и эти агонистические антитела могут применяться в лечении заболеваний глаз, таких как глаукома. Кроме того, лечение этими агонистическими антителами оказывает положительный эффект в отношении других заболеваний или расстройств нейронов, включая заболевания или расстройства, которые отчасти характеризуются повреждением нейронов. В некоторых вариантах осуществления изобретение включает антитела, которые связываются с TrkB и опосредуют клеточную сигнализацию. Антитела по изобретению могут быть полностью человеческими, не встречающимися в природе антителами, объединенными со вспомогательными веществами в составе лекарственного препарата для инъекций.

---

**B1**

**044580**

**044580**

**B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к моноклональным антителам против тропомиозинового тирозинкиназного рецептора В (TrkB). Более конкретно, изобретение относится к композициям, содержащим моноклональные анти-TrkB антитела, и способам применения этих антител.

### Уровень техники

Тропомиозиновый тирозинкиназный рецептор В (TrkB) принадлежит к семейству отдельных трансмембранных рецепторных тирозинкиназ, которые включают TrkA и TrkC. Эти рецепторные киназы опосредуют активность нейротрофинов, которые необходимы для выживания и развития нейронов. Нейротрофины включают, но ими не ограничиваются, фактор роста нервов (NGF), нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), нейротрофин-3 (NT-3) и нейротрофин-4/5 (NT-4/5). (Lo, K Y et al., *J. Biol. Chem.*, 280:41744-52(2005)).

TrkB является рецептором с высокой аффинностью к BDNF (Minichiello, et al., *Neuron* 21: 335-45 (1998)), но также известно, что он связывается с NT4/5. Связывание BDNF с trkB вызывает димеризацию рецептора, что приводит к аутофосфорилированию специфических остатков тирозина на рецепторе и активации сигнальных путей с участием митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK), фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) и фосфолипазы C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ). (Jing, et al., *Neuron* 9:1067-1079 (1992); Barbacid, *J. Neurobiol.* 25:1386-1403 (1994); Bothwell, *Ann. Rev. Neurosci.* 18:223 253 (1995); Segal and Greenberg, *Ann. Rev. Neurosci.* 19:463 489 (1996); Kaplan and Miller, *Curr. Opin. Neurobiol.* 10:381 391 (2000)). После связывания с BDNF, TrkB опосредует различные эффекты нейротрофина, которые включают дифференцировку и выживание нейронов.

Поскольку TrkB играет основную роль в выживании, дифференцировке и функционировании нейронов, агонисты TrkB могут обладать терапевтическим потенциалом для лечения ряда нейродегенеративных и метаболических нарушений.

Некоторые агонисты TrkB были описаны в US 2010/0150914; US 2003/0157099; US 2010/0196390 и US 2017/0157099. Однако все еще существует потребность в идентификации и разработке дополнительных агонистов TrkB, которые обеспечивают улучшенную специфичность помимо проявления нейронального выживания и нейропротекторных свойств, например таких, которые описаны в настоящем документе.

### Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к выделенным моноклональным антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с тропомиозиновым тирозинкиназным рецептором В (TrkB). Выделенные антитела и антигенсвязывающие фрагменты по изобретению применяются для лечения заболеваний и расстройств, связанных с активностью или экспрессией TrkB.

В широком смысле изобретение относится к антителам-агонистам TrkB, которые активируют TrkB и способствуют выживанию нейронов. Эти антитела могут применяться для улучшения нервной функции и лечения любого заболевания или расстройства, характеризующегося, частично, клеточной дегенерацией, включая повреждение нервных клеток, ассоциированное с повреждением нервной системы и/или хроническими нейродегенеративными заболеваниями.

В некоторых вариантах осуществления, анти-TrkB антитела могут применяться для лечения различных глазных заболеваний или нарушений и им может быть придана лекарственная форма для внутриглазной или интравитреальной доставки для лечения глазных заболеваний, таких как, среди прочих, глаукома.

Антитела по изобретению могут быть полноразмерными (например, антитело IgG1 или IgG4) или могут содержать только антигенсвязывающую часть (например, фрагмент Fab, F(ab')<sub>2</sub> или scFv), а также могут быть модифицированы с целью оказать влияние на функциональность, например, для устранения остаточных эффекторных функций (Reddy et al., 2000, *J. Immunol.* 164:1925-1933).

Типичные анти-TrkB антитела по настоящему изобретению перечислены в табл. 1 и 2 в настоящем документе. В табл. 1 приведены идентификаторы аминокислотной последовательности переменных областей тяжелой цепи (HCVR), переменных областей легкой цепи (LCVR), областей, определяющих комплементарность тяжелых цепей (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), и областей, определяющих комплементарность легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) типичных анти-TrkB антител. В табл. 2 приведены идентификаторы последовательности нуклеиновых кислот HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 типичных анти-TrkB антител.

Настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с TrkB, включающим HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1, или по существу аналогичную последовательность, которая, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична этим последовательностям.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с TrkB, включающим LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1, или по существу аналогичную последовательность, которая, по меньшей мере, на 90%, по мень-

шей мере, на 95%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична этим последовательностям.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с TrkB, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1, в сочетании с любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащуюся в любом из типичных анти-TrkB антител, перечисленных в табл. 1.

Соответственно, в первом аспекте изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который специфически связывается с тропомиозиновый тирозинкиназный рецептором B (TrkB), причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три области, определяющие комплементарность тяжелой цепи (CDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность, указанную в табл. 1, или по существу аналогичную последовательность, которая, по меньшей мере, на 90% идентична этой последовательности; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность, указанную в табл. 1, или по существу аналогичную последовательность, которая, по меньшей мере, на 90% идентична этой последовательности.

В одном из вариантов осуществления, анти-TrkB антитело или его антигенсвязывающий фрагмент проявляет одно или несколько свойств, выбранных из группы, состоящей из:

- (a) представляет собой агонистическое антитело;
- (b) связывается с TrkB человека с  $K_D$  меньше чем около 200 нМ, что определено поверхностным плазмонным резонансом при 25°C или при 37°C;
- (c) связывается с TrkB человека с диссоциационным периодом полувыведения ( $t^{1/2}$ ), большим чем около 10 мин, что определено поверхностным плазмонным резонансом при 25°C или при 37°C;
- (d) активирует передачу сигналов TrkB человека в отсутствие нейротрофического фактора, происходящего из мозга (BDNF), в клетках, сконструированных для экспрессии TrkB человека, с  $EC_{50}$  в диапазоне от 35 до 82 пМ;
- (e) усиливает фосфорилирование TrkB при инъекции в гиппокамп мышей, гомозиготных по человеческому рецептору TrkB ( $TrkB^{hu/hu}$ );
- (f) способствует снижению массы при инъекции мышам, гомозиготным по человеческому рецептору TrkB ( $TrkB^{hu/hu}$ );
- (g) увеличивает выживаемость ганглиозных клеток сетчатки (RGC), как было оценено на модели трансекции зрительного нерва у гуманизированных TrkB крыс;
- (h) активирует сигнальные пути MAPK/ERK и PI3K/Akt;
- (i) повышает выживаемость нейрональных клеток *in vitro*; и
- (j) блокирует связывание TrkB с BDNF и/или NT-4 с  $IC_{50}$  меньше 5 нМ.

В одном из вариантов осуществления, изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который специфически связывается с тропомиозиновым тирозинкинасным рецептором B (TrkB), причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (a) определяющие комплементарность области (CDR) вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность, указанную в табл. 1; и (b) CDR вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность, как указано в табл. 1.

В одном из вариантов осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с TrkB, содержит три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в любой из последовательностей HCVR, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 49, 59 и 68, или по существу аналогичной последовательности, которая, по меньшей мере, на 90% идентична этой последовательности; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в любой из последовательностей LCVR, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 53, 63 и 72, или по существу аналогичной последовательности, которая, по меньшей мере, на 90% идентична этой последовательности.

В одном из вариантов осуществления, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с TrkB, содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 49, 59 и 68.

В одном из вариантов осуществления, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с TrkB, дополнительно содержит LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 53, 63 и 72.

В одном из вариантов осуществления, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с TrkB, содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 49, 59 и 68; и LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 53, 63 и 72.

кислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 53, 63 и 72.

В одном из вариантов осуществления, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с TrkB, содержит CDR пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 49/53, 59/63 и 68/72.

В одном из вариантов осуществления, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с TrkB, содержит: CDR пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26 и 34/42.

В одном из вариантов осуществления, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с TrkB, содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 49/53, 59/63 и 68/72.

В одном из вариантов осуществления, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с TrkB, содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26 и 34/42.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связывают TrkB, включая CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в табл. 1, или по существу аналогичную последовательность, которая, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична этой последовательности.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связывают TrkB, включая CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в табл. 1, или по существу аналогичную последовательность, которая, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична этой последовательности.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связывают TrkB, включая CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в табл. 1, или по существу аналогичную последовательность, которая, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична этой последовательности.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связывают TrkB, включая CDR1 легкой цепи (LCDR1), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в табл. 1, или по существу аналогичную последовательность, которая, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична этой последовательности.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связывают TrkB, включая CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в табл., или по существу аналогичную последовательность, которая, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична этой последовательности.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связывают TrkB, включая CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в табл. 1, или по существу аналогичную последовательность, которая, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична этой последовательности.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с TrkB, включая пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в табл. 1, в сочетании с любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в табл. 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, содержащуюся в любом из типичных анти-TrkB антител, перечисленных в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 выбрана из группы, состоящей из: 8/16, 24/32, 40/48, 52/56, 62/66 и 71/75.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связывают TrkB, включающим сочетание из шести CDR (то есть HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3), содержащихся в любом из типичных анти-TrkB антител, перечислен-

ных в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления, сочетание аминокислотных последовательностей HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3 выбрано из группы, состоящей из: (a) SEQ ID NO: 4, 6, 8, 12, 14, 16; (b) SEQ ID NO: 20, 22, 24, 28, 30, 32; (c) SEQ ID NO: 36, 38, 40, 44, 46, 48; (d) SEQ ID NO: 50, 51, 52, 54, 55, 56; (e) SEQ ID NO: 60, 61, 62, 64, 65, 66; и (f) SEQ ID NO: 69, 70, 71, 73, 74, 75.

В сходном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связывают TrkB, включающим сочетание из шести CDR (то есть HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3), содержащихся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, в соответствии с определением любого из типичных анти-TrkB антител, перечисленных в табл. 1. Например, настоящее изобретение включает антитело или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с TrkB, включающие сочетание HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3 аминокислотных последовательностей, содержащееся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из: 2/10, 18/26, 34/42, 49/53, 59/63 и 68/72. Способы и методы идентификации CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны в данной области техники и могут использоваться для идентификации CDR в указанных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, описанных в настоящем документе. Типичные условные обозначения, которые могут быть использованы для идентификации границ CDR, включают, например, определение по Kabat, определение по Chothia и определение на основе модели антитела. В общем виде, определение по Kabat основано на вариативности последовательности, определение по Chothia основано на расположении областей структурных петель, а определение AbM является компромиссом между подходами Kabat и Chothia. См., например, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); и Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989). Также доступны базы данных для идентификации последовательностей CDR в антителах.

В одном из вариантов осуществления, изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который специфически связывается с TrkB, содержащему:

- (a) домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 36, 50, 60 и 69;
- (b) домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 38, 51, 61 и 70;
- (c) домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 52, 62 и 71;
- (d) домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28, 44, 54, 64 и 73;
- (e) домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46, 55, 65 и 74; и
- (f) домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 56, 66 и 75.

В одном из вариантов осуществления, изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который специфически связывается с TrkB, содержащему:

- (a) домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20 и 36;
- (b) домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22 и 38;
- (c) домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24 и 40;
- (d) домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28 и 44;
- (e) домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30 и 46; и
- (f) домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32 и 48.

В одном из вариантов осуществления, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит сочетание из шести CDR (HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), выбранных из группы, состоящей из: (a) SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16; (b) SEQ ID NO: 20-22-24-28-30-32; (c) SEQ ID NO: 36-38-40-44-46-48; (d) SEQ ID NO: 50-51-52-54-55-56; (e) SEQ ID NO: 60-61-62-64-65-66; и (f) SEQ ID NO: 69-70-71-73-74-75.

В одном из вариантов осуществления, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с TrkB, включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который конкурирует за связывание с TrkB с эталонным антителом, где эталонное антитело содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 49/53, 59/63 and 68/72.

В одном из вариантов осуществления, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент

мент, который связывается с TrkB, включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, где эталонное антитело содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 49/53, 59/63 и 68/72.

В одном из вариантов осуществления, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с TrkB человека с  $K_D$  меньше чем около 300 нМ, что определено посредством поверхностного плазмонного резонанса при 25 или 37°C.

В одном из вариантов осуществления, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с TrkB человека с  $K_D$  меньше чем около 200 нМ, что определено посредством поверхностного плазмонного резонанса при 25 или 37°C.

В одном из вариантов осуществления, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с TrkB человека с  $K_D$  меньше чем около 150 нМ, что определено посредством поверхностного плазмонного резонанса при 25 или 37°C.

В одном из вариантов осуществления, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с TrkB человека с  $K_D$  меньше чем около 50 нМ, что определено посредством поверхностного плазмонного резонанса при 25 или 37°C.

В одном из вариантов осуществления, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с TrkB человека с  $K_D$  меньше чем около 100 пМ, что определено посредством поверхностного плазмонного резонанса при 25 или 37°C.

В одном из вариантов осуществления, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с TrkB человека с диссоциационным периодом полувыведения ( $t^{1/2}$ ) больше, чем около 10 мин, что определено посредством поверхностного плазмонного резонанса при 25 или 37°C.

В одном из вариантов осуществления, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с TrkB человека с  $t^{1/2}$  больше, чем около 40 мин, что определено посредством поверхностного плазмонного резонанса при 25 или 37°C.

В одном из вариантов осуществления, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с TrkB человека с  $t^{1/2}$  больше, чем около 120 мин, что определено посредством поверхностного плазмонного резонанса при 25 или 37°C.

В одном из вариантов осуществления, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с TrkB, активирует передачу сигналов TrkB человека в отсутствие BDNF в клетках, сконструированных для экспрессии TrkB, при  $EC_{50}$  меньше чем около 100 пМ.

В одном из вариантов осуществления, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с TrkB, активирует передачу сигналов TrkB человека в отсутствие BDNF в клетках, сконструированных для экспрессии TrkB, при  $EC_{50}$  в диапазоне от около 35 до около 82 пМ.

В одном из вариантов осуществления, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с TrkB, усиливает активацию передачи сигналов TrkB человека в присутствии BDNF в клетках, сконструированных для экспрессии TrkB, с  $EC_{50}$  меньше чем около 100 пМ.

В одном из вариантов осуществления, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с TrkB, который при инъекции в гиппокамп гуманизированных TrkB мышей демонстрирует активацию TrkB, о чем свидетельствует увеличение фосфорилирования TrkB.

В одном из вариантов осуществления, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с TrkB, демонстрирует активацию сигнальных путей MAPK/ERK и PI3K/Akt, что продемонстрировано после инкубации первичных кортикальных нейронов мыши с агонистическим анти-TrkB антителом.

В одном из вариантов осуществления, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с TrkB, усиливает/повышает выживаемость ганглионарных клеток сетчатки, как показано на модели трансекции зрительного нерва у гуманизированных TrkB крыс.

В одном из вариантов осуществления, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с TrkB, усиливает/повышает выживаемость нейрональных клеток *in vitro*.

В одном из вариантов осуществления, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с TrkB, способствует снижению массы гуманизированных TrkB мышей.

В одном из вариантов осуществления, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с TrkB, способствует потере жировой массы у гуманизированных TrkB мышей.

В одном из вариантов осуществления, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с TrkB, способствует снижению потребления корм и воды у гуманизированных TrkB мышей.

В одном из вариантов осуществления, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с TrkB, способствует увеличению двигательной активности у гуманизированных TrkB мышей.

В одном из вариантов осуществления, изобретение относится к анти-TrkB антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который специфически связывается с TrkB и блокирует связывание TrkB с BDNF с  $IC_{50}$  меньше чем около 5 нМ.



лотных последовательностей LCDR1, LCDR2, LCDR3 находится в соответствии с определением любого из типичных анти-TrkB антител, перечисленных в табл. 1.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим как HCVR, так и LCVR, где HCVR содержит аминокислотную последовательность любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1, и где LCVR включает аминокислотную последовательность любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленные в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот HCVR, перечисленных в табл. 2, или по существу аналогичную последовательность, которая, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична этой последовательности, и полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот LCVR, перечисленных в табл. 2, или по существу аналогичную последовательность, которая, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична этой последовательности. В некоторых вариантах осуществления в соответствии с этим аспектом изобретения, молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, где оба HCVR и LCVR получены из одного и того же анти-TrkB антитела, указанного в табл. 1.

В третьем аспекте, настоящее изобретение относится к рекомбинантным векторам экспрессии, способным экспрессировать полипептид, содержащий варибельную область тяжелой или легкой цепи анти-TrkB антитела. Например, настоящее изобретение включает рекомбинантные векторы экспрессии, содержащие любую из указанных выше молекул нуклеиновой кислоты, то есть молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, как указано в табл. 1. Также в объем настоящего изобретения включены клетки-хозяева, в которые были введены такие векторы, а также способы получения антител или их участков путем культивирования клеток-хозяев в условиях, позволяющих продуцировать антитела или фрагменты антител, и извлечения антител и их фрагментов, продуцированных таким образом.

Настоящее изобретение включает анти-TrkB антитела, имеющие модифицированный профиль гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления, может быть использована модификация для удаления нежелательных участков гликозилирования, или антитело с недостатком фукозного фрагмента, присутствующего в олигосахаридной цепи, например, для усиления функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (см. Shield et al. (2002) JBC. 277: 26733). В других применениях, модификация галактозилирования может быть осуществлена для модификации комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

В четвертом аспекте, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей, по меньшей мере, одно антитело по изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с TrkB, и фармацевтически приемлемый носитель.

В связанном аспекте, изобретение относится к композиции, которая представляет собой сочетание анти-TrkB антитела и второго терапевтического средства. В одном из вариантов осуществления, второе терапевтическое средство представляет собой любое средство, которое предпочтительно объединяется с анти-TrkB антителом. Второе терапевтическое средство может применяться для облегчения, по меньшей мере, одного симптома нейродегенеративного заболевания или расстройства.

В пятом аспекте, изобретение относится к способу усиления биологической активности, опосредованной TrkB, включающему контакт TrkB с биологически эффективным количеством агонистического анти-TrkB антитела, представленного в табл. 1, или контакт TrkB с фармацевтической композицией, содержащий биологически эффективное количество агонистического анти-TrkB-антитела, представленного в табл. 1.

В некоторых вариантах осуществления, биологическая активность представляет собой защиту нейронов или выживание нейронов, и защита нейронов или выживание нейронов усиливается при контакте TrkB с агонистическим анти-TrkB антителом.

В некоторых вариантах осуществления, биологическая активность представляет собой нейропротекцию и выживание ганглионарных клеток сетчатки (RGC).

В шестом аспекте, изобретение относится к терапевтическим способам лечения заболевания или расстройства, связанного с активностью или экспрессией TrkB, или, по меньшей мере, одного симптома, связанного с заболеванием или расстройством, с применением анти-TrkB антитела или антигенсвязывающего участка антитела по изобретению. Терапевтические способы в соответствии с этим аспектом изобретения включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело или антигенсвязывающего фрагмента антитела по изобретению, субъекту, нуждающемуся в таком лечении. Подлежащее лечению расстройство представляет собой любое заболевание или состояние, которое регрессирует, улучшается, ингибируется или предотвращается путем нацеливания на TrkB и/или путем активации TrkB-опосредованной клеточной сигнализации.

В одном из вариантов осуществления, анти-TrkB антитела по изобретению могут обеспечивать способ предотвращения повреждения или гибели нейронов сетчатки. В одном из вариантов осуществления, анти-TrkB антитела по изобретению могут обеспечивать способ лечения патологических заболеваний,



при котором происходит дегенерация сетчатки. В одном из вариантов осуществления, анти-TrkB антитела по изобретению могут обеспечивать способ лечения живого глаза до или после офтальмологической операции, воздействия света или другой экзогенной травмы, предотвращая тем самым дегенерацию клеток сетчатки. В одном из вариантов осуществления, анти-TrkB антитела по изобретению могут обеспечивать способ предотвращения повреждения фоторецептора и дегенерации в живом глазу. В одном из вариантов осуществления, анти-TrkB антитела по изобретению могут обеспечивать способ защиты нейронов сетчатки не вызывая побочных эффекты, возможно, вследствие перекрестной реактивности с другими рецепторами, такими как рецептор р75. В одном из вариантов осуществления, анти-TrkB антитела по изобретению могут обеспечивать способ, позволяющий поврежденным фоторецепторам восстанавливаться или регенерировать.

В некоторых вариантах осуществления, заболевание или расстройство, подлежащее лечению посредством антитела по изобретению, представляет собой глазное заболевание или расстройство, выбранное из группы, состоящей из глаукомы, диабетической ретинопатии, возрастной дегенерации желтого пятна, ишемической оптической нейропатии, неврита зрительного нерва, ишемии сетчатки, дегенерация фоторецепторов, пигментной дистрофии сетчатки, врожденного амавроза Лебера, наследственной оптической нейропатии Лебера, синдрома Ашера, болезни Штаргарда и окклюзии артерий или вен сетчатки.

Другие патологические состояния, поддающиеся лечению посредством одного или нескольких анти-TrkB антител по изобретению, включают отслоение сетчатки, фотические ретинопатии, вызываемые оперативным вмешательством (механически или индуцированные светом), токсические ретинопатии, ретинопатию недоношенных, вирусные ретинопатии, такие как цитомегаловирусная или ВИЧ-ретинопатия, связанная со СПИДом; увеит; ишемическую ретинопатию, вызванную венозной или артериальной окклюзией или другим сосудистым нарушением, ретинопатии, вызванные травмой или проникающими поражениями глаза, периферическую витреоретинопатию или наследственные дегенерации сетчатки.

В одном из вариантов осуществления, глазное заболевание или расстройство, подлежащее лечению агонистическим анти-TrkB антителом по изобретению, представляет собой глаукому.

Седьмой аспект изобретения предусматривает обеспечение снижения массы организма у субъекта, причем способ включает введение субъекту антитела-агониста TrkB, описанного в табл. 1, или фармацевтической композиции, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

В связанном аспекте, изобретение относится к способу обеспечения снижения массы жировой ткани у субъекта, включающему введение антитела-агониста TrkB, описанного в табл. 1, или фармацевтической композиции, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

Восьмой аспект изобретения относится к способу стимуляции выживания нейронов у субъекта, включающему введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела-агониста TrkB, представленного в табл. 1, или фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество антитела или его антигенсвязывающий фрагмент.

В одном из вариантов осуществления, описанные выше способы могут быть осуществлены путем введения агонистического анти-TrkB-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента субъекту, нуждающемуся в таком введении, где агонистическое анти-TrkB-антитело содержит три определяющие комплементарности области тяжелой цепи (CDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в вариательной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность, представленную в табл. 1, или по существу аналогичную последовательность, которая, по меньшей мере, на 90% идентична этой последовательности; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в вариательной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность, представленную в табл. 1, или по существу аналогичную последовательность, которая, по меньшей мере, на 90% идентична этой последовательности.

В одном из вариантов осуществления, способы по изобретению могут быть осуществлены путем введения антитела-агониста TrkB по изобретению, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в любой из последовательностей HCVR, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 49, 59 и 68, или по существу аналогичной последовательности, которая, по меньшей мере, на 90% идентична этой последовательности; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в любой из последовательностей LCVR, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 53, 63 и 72, или по существу аналогичную последовательность, которая, по меньшей мере, на 90% идентична этой последовательности.

В одном из вариантов осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 49, 59 и 68.

В одном из вариантов осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 53, 63 и 72.

В одном из вариантов осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID

NO: 2, 18, 34, 49, 59 и 68; и LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 53, 63 и 72.

В одном из вариантов осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 49/53, 59/63 и 68/72.

В одном из вариантов осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 49/53, 59/63 и 68/72.

В одном из вариантов осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(а) домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 36, 50, 60 и 69;

(б) домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 38, 51, 61 и 70;

(с) домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 52, 62 и 71;

(d) домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28, 44, 54, 64 и 73;

(е) домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46, 55, 65 и 74; и

(f) домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 56, 66 и 75.

В одном из вариантов осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит сочетание из шести CDR (HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), выбранных из группы, состоящей из: (а) SEQ ID NO: 4- 6-8-12-14-16; (б) SEQ ID NO: 20-22-24-28-30-32; (с) SEQ ID NO: 36-38-40-44-46-48; (d) SEQ ID NO: 50-51-52-54-55-56; (е) SEQ ID NO: 60-61-62-64-65-66; и (f) SEQ ID NO: 69-70-71-73-74-75.

В одном из вариантов осуществления, заболевание или расстройство, подлежащее лечению анти-TrkB антителом по изобретению, представляет собой ожирение и любое осложнение, возникающее в результате ожирения.

Предполагается, что любое заболевание или расстройство, связанное с активностью или экспрессией TrkB, поддается лечению антителом по изобретению. Эти заболевания могут включать любое заболевание, при котором наблюдается дегенерация клеток, например, при нейродегенеративном состоянии или после повреждения нерва.

Другие варианты осуществления станут очевидными из обзора следующего полного описания.

#### **Краткое описание фигур**

Фиг. 1. Показаны вестерн-блоты, оценивающие уровни общего TRKB и уровни фосфо-TRKB у гомозиготных гуманизированных TRKB мышей через 1 ч, 4 ч и 18 ч после прямой инъекции в гиппокамп антител-агонистов TRKB H4N9816P2 или антител изотипического контроля.

Фиг. 2. Показано, что антитело-агонист TrkB, H4N9816P2, активизирует нисходящие отделы сигнального пути MAPK/ERK и PI3K/Akt. На фиг. показаны вестерн-блоты фосфо-TrkB, общего TrkB, фосфо-Akt, общего AKT, фосфо-ERK и общего ERK через 15 мин и 2 ч после обработки первичных кортикальных нейронов, полученных в день 1 после рождения от гомозиготных гуманизированных TRKB мышат, различными антителами-агонистами TrkB или BDNF.

Фиг. 3. Показано, что три антитела-агониста TrkB, в зависимости от дозы, повышали выживаемость клеток SH-SY5Y *in vitro*. Антитела изотипического контроля не оказывали влияние на выживаемость клеток.

Фиг. 4. Показаны фармакокинетические профили агонистического анти-TrkB антитела H4N9816P2 у мышей TrkB и мышей дикого типа. Мышам вводили одну подкожную дозу 10 мг/кг в день 0. Концентрации общего H4N9816P2 в сыворотке крови измеряли посредством иммуноанализа Cugos. Точки данных по дозе через 6 ч, 1, 2, 3, 6, 9, 16, 21 и 30 дней указывают на среднюю концентрацию антитела. Общие концентрации антител H4N9816P2 представлены черными сплошными кружками для мышей TrkB<sup>hu/hu</sup> и сплошными черными квадратами для мышей дикого типа. Данные представлены в виде среднего значения+стандартное отклонение.

Фиг. 5. Включает фиг. 5A и фиг. 5B, которые показывают способность моноклональных анти-TrkB антител мыши блокировать взаимодействие TrkB мыши или крысы со своим лигандом BDNF (нейротрофический фактор из тканей мозга). Методы на основе ИФА(ELISA) использовали для оценки связывания (фиг. 5A с двумя графиками) TrkB.hFc мыши и (фиг. 5B с двумя графиками) TrkB.mmh крысы с покрывающим планшет BDNF при различных концентрациях антитела к мышиному TrkB и моноклональных антител (mAb) изотипического контроля. На фиг. 5A с двумя графиками показана кривая зависимости доза-эффект, описывающая связывание TrkB.hFc мыши (REGN2277) с BDNF со значением EC<sub>50</sub> 780 пМ. На фиг. 5B с двумя графиками показана кривая зависимости доза-эффект, описывающая связывание TrkB.mmh крысы (REGN1808) с BDNF со значением EC<sub>50</sub> 2,2 нМ. Молярность (M) указывает концентра-

цию антител для mAb. "Усы" соответствуют стандартному отклонению.

#### Полное описание

Перед рассмотрением настоящего изобретения, следует понимать, что это изобретение не ограничивается конкретными описанными способами и условиями эксперимента, поскольку такие способы и условия могут изменяться. Также следует понимать, что используемая в настоящем документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимают специалисты в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Используемый здесь термин "около", при использовании в отношении конкретного приведенного числового значения, означает, что значение может отличаться от приведенного значения не более чем на 1%. Например, как используется в настоящем документе, выражение "около 100" включает 99 и 101 и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

Хотя при практическом применении или испытании настоящего изобретения могут использоваться любые способы и вещества, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе, предпочтительные способы и вещества описаны в настоящем документе. Все патенты, заявки и непатентные публикации, приведенные в этом описании, включены в настоящий документ посредством ссылки полностью.

#### Определения

Выражение "TrkB" и тому подобное, также известное как "тропомиозиновый тирозинкиназный рецептор B", относится к человеческому рецептору (если не обозначен как принадлежащий к другому виду), содержащему аминокислотную последовательность, представленную в аминокислотных остатках с 32 по 430 с номером доступа NP\_001018074.1. TrkB человека, содержащий тус-тус-гексагистидиновую метку, представлен в виде SEQ ID NO: 76 (аминокислотные остатки 1-399 соответствуют TrkB человека, а аминокислотные остатки 400-427 соответствуют тус-тус-гексагистидиновой метке). В настоящем документе описаны другие форматы, содержащие белки TrkB человека, включая SEQ ID NO: 77, соответствующую TrkB человека (остатки 1-399) с Fc-областью мыши (остатки 400-632); и SEQ ID NO: 78, соответствующую TrkB человека (остатки 1-399) с Fc-областью человека (остатки 400-626). TrkB мыши содержит аминокислотную последовательность, представленную в аминокислотных остатках с 32 по 429 с номером доступа NP\_001020245. TrkB мыши, содержащий тус-тус-гексагистидиновую метку, показан как SEQ ID NO: 79 (аминокислотные остатки 1-398 соответствуют мышиный TrkB, а аминокислотные остатки 399-426 соответствуют тус-тус-гексагистидиновой метке). В настоящем документе описаны другие форматы, содержащие белки TrkB мыши, включая SEQ ID NO: 80, соответствующую TrkB мыши (остатки 1-398) с Fc-областью мыши (остатки 399-631); и SEQ ID NO: 81, соответствующую TrkB мыши (остатки 1-398) с Fc-областью человека (остатки 399-625). TrkB кролика содержит аминокислотную последовательность, представленную в аминокислотных остатках с 32 по 430 с номером доступа XP\_002721319.1. TrkB кролика, содержащий тус-тус-гексагистидиновую метку, показан как SEQ ID NO: 82 (аминокислотные остатки 1-399 соответствуют TrkB кролика, а аминокислотные остатки 400-427 соответствуют тус-тус-гексагистидиновой метке). В настоящем документе описаны другие форматы, содержащие белки TrkB кролика, включая SEQ ID NO: 83, соответствующую TrkB кролика (остатки 1-399) с Fc-областью мыши (остатки 400-632). TrkB крысы содержит аминокислотную последовательность, представленную в аминокислотных остатках с 32 по 429 с номером доступа NP\_036863.1. TrkB крысы, содержащий тус-тус-гексагистидиновую метку, показан как SEQ ID NO: 84 (с аминокислотными остатками 1-398, соответствующими TrkB крысы, и аминокислотными остатками 399-426, соответствующими тус-тус-гексагистидиновой метке). В настоящем документе описаны другие форматы, содержащие белки TrkB крысы, включая SEQ ID NO: 85, соответствующую TrkB крысы (остатки 1-398) с Fc-областью мыши (остатки 399-631). TrkB макака-резуса (*Macaca mulatta*) показан как SEQ ID NO: 95 (аминокислоты с 32 по 838 с номером доступа NP\_001248226.1), и TrkB яванского макака (*Macaca flavicularis*) показан как SEQ ID NO: 96 (аминокислоты с 32 по 838) с номером доступа XP\_005582102.1).

Белок "TrkA" человека представлен в виде SEQ ID NO: 86, причем аминокислоты 1-375 соответствуют TrkA (аминокислоты 34-414 с номером доступа NP\_001012331.1 с V263L, C300S), аминокислоты 376-378 соответствуют линкеру GPG и аминокислоты 379-605, соответствуют Fc человека.

Белок "TrkC" человека представлен в виде SEQ ID NO: 87, причем аминокислоты 1-398 соответствуют TrkC (аминокислоты 32-429 с номером доступа NP\_001012338.1) и аминокислоты 399-426 соответствуют тус-тус-гистидиновой метке.

Белок "TrkC" мыши представлен в виде SEQ ID NO: 88, где аминокислоты 1-398 соответствуют TrkC (аминокислоты 32-429 с номером доступа NP\_032772.3) и аминокислоты 399-426 соответствуют тус-тус-гистидиновой метке.

Белок "TrkC" яванского макака показан в виде SEQ ID NO: 89, где аминокислоты 1-398 соответствуют TrkC (аминокислоты 32-429 с номером доступа XP\_015308837.1) и аминокислоты 399-426 соответствуют тус-тус-гистидиновой метке.

В некоторых случаях были получены клеточные линии, которые экспрессировали белки TrkB, включая эктодомен, а также трансмембранные и цитоплазматические домены белка TrkB. Например, SEQ ID NO: 91 представляет собой белок TrkB человека, содержащий все три домена, содержащиеся в аминокислотах 32-822 (номер доступа NP\_001018074.1) или Uniprot Q16620-1, причем аминокислоты 1-398 представляют собой эктодомен, а трансмембранная/цитоплазматическая область определяется, приближенно, аминокислотными остатками 399-790. В одном случае, была получена клеточная линия TrkB, которая экспрессирует TrkB мыши (аминокислоты 32-476 с номером доступа NP\_032771.1; см. также SEQ ID NO: 92). В другом случае, была получена клеточная линия, которая экспрессирует химерный белок TrkB с эктодоменом TrkB мыши из аминокислот 32-429 с номером доступа NP\_OO 1020245.1 (см. также SEQ ID NO: 93) или с номером базы данных Uniprot P15209-1, и трансмембранный и цитоплазматический домены TrkB человека (аминокислоты 431-822 с номером доступа NP\_001018074.1 (см. также SEQ ID NO: 91)). Также была получена клеточная линия, которая экспрессирует TrkB африканской зеленой марьшши (Chlorocebus sabaeus) TrkB (аминокислоты 32-822 с номером доступа XP\_007967815.1 (см. также SEQ ID NO: 94)).

Термин "нейротрофический фактор из тканей мозга" или "BDNF" относится к лиганду для TrkB, и аминокислотная последовательность BDNF показана в SEQ ID NO: 90 (изоформа A 1-120, с аминокислотами 129-247 с номером доступа NP\_733928.1 с добавлением Met на N-конце). В некоторых экспериментах, описанных в настоящем документе, поставщиком BDNF является R&D Systems, 248-BD/CF.

Все ссылки на белки, полипептиды и фрагменты белка в настоящем документе предназначены для ссылки на человеческий вариант соответствующего белка, полипептида или фрагмента белка, если явно не указано, что он не относится к человеческому виду. Таким образом, выражение "TrkB" означает TrkB человека, если не указано, что он не относится к человеческому виду, например, "TrkB обезьяны", "TrkB мыши", "TrkB крысы" и т.д.

Используемое в настоящем документе выражение "анти-TrkB антитело" включает как моновалентные антитела с одной специфичностью, так и биспецифичные антитела, включающие первое плечо, которое связывается с TrkB, и второе плечо, которое связывается со вторым (целевым) антигеном, где анти-TrkB плечо содержит любую из последовательностей HCVR/LCVR или CDR, как указано в табл. 1 в настоящем документе. Выражение "анти-TrkB антитело" также включает конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), содержащие анти-TrkB антитело или его антигенсвязывающий участок, конъюгированный с лекарственным средством или токсином (то есть цитотоксическим агентом). Выражение "анти-TrkB антитело" также включает конъюгаты антитело-радионуклид (ARC), содержащие анти-TrkB антитело или его антигенсвязывающий участок, конъюгированный с радионуклидом.

Используемый в настоящем документе термин "анти-TrkB антитело" означает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащий, по меньшей мере, одну определяющую комплементарность область (CDR), которая специфически связывается или взаимодействует с TrkB или участком TrkB. Термин "антитело" включает молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные между собой дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи (сокращенно обозначенную здесь как HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи включает три домена, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи (сокращенно обозначенную здесь как LCVR или VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C<sub>L</sub>1). Области V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), вставленными в областях, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждый V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных вариантах осуществления изобретения, FR анти-TrkB антитела (или его антигенсвязывающий участок) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть природно или искусственно модифицированными. Аминокислотная консенсусная последовательность может быть определена на основе параллельного анализа двух или более CDR.

Используемый в настоящем документе термин "антитело" также включает антигенсвязывающие фрагменты полноразмерной молекул антитела. Термины "антигенсвязывающий участок" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и тому подобное, используемые в настоящем документе, включают любой ферментативно получаемый, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывается с антигеном с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из молекул полного антитела, используя любые подходящие стандартные методы, такие как протеолитическое расщепление или методы рекомбинантной геномной инженерии, включающие манипуляцию и экспрессию ДНК, кодирующей вариабельные и необязательно константные домены антител. Такая ДНК известна и общедоступна, например, из коммерческих источников, ДНК-библиотек (включающих, например, фаговые библиотеки антител), или может быть синтезирована. ДНК может быть секвенирована, и с ней проводят манипуляции с использованием химических методов или с использованием методов молекулярной биологии, на-

пример, для расположения одного или нескольких переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или для введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, вставки или делеции аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты F(ab')<sub>2</sub>; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb; и (vii) минимальные распознающие компоненты, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гиперпеременную область антитела (например, изолированную определяющую комплементарность область (CDR), такую как пептид CDR3), или ограниченный пептид FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, антитела с привитой CDR, диатела, триатела, тетраатела, минитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, двухвалентные нанотела и т.д.), иммунофармацевтические средства на основе модульного белка малого размера (SMIP) и переменные домены акул IgNAR также включены в выражение "антигенсвязывающий фрагмент", используемое в настоящем документе.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит, по меньшей мере, один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и обычно будет содержать, по меньшей мере, одну CDR, смежную или с сохранением рамки считывания с одной или несколькими каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих V<sub>H</sub>-домен, ассоциированный с V<sub>L</sub>-доменом, V<sub>H</sub>- и V<sub>L</sub>-домены могут быть расположены относительно друг друга в любом подходящем порядке. Например, переменная область может быть димерной и содержать димеры V<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>, V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> или V<sub>L</sub>-V<sub>L</sub>. Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный V<sub>H</sub>- или V<sub>L</sub>-домен.

В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать, по меньшей мере, один переменный домен, ковалентно связанный с, по меньшей мере, одним константным доменом. Неограничивающие примерные конфигурации переменных и константных доменов, которые могут быть обнаружены в антигенсвязывающем фрагменте антитела по настоящему изобретению, включают: (i) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1; (ii) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>2; (iii) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>3; (iv) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2; (v) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; (vi) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; (vii) V<sub>H</sub>-C<sub>L</sub>; (viii) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>1; (ix) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>2; (x) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>3; (xi) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2; (xii) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; (xiii) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; и (xiv) V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>. В любой конфигурации переменных и константных доменов, включая любую из типичных конфигураций, перечисленных выше, переменные и константные домены могут быть либо непосредственно связаны друг с другом, либо могут быть связаны посредством полной или частичной шарнирной или линкерной области. Шарнирная область может состоять, по меньшей мере, из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что приводит к гибкой или полугибкой связи между соседними переменными и/или константными доменами в отдельной полипептидной молекуле. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций переменного и константного домена, перечисленных выше, в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub> доменами (например, посредством дисульфидной связи(связей)).

В отношении полных молекул антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифичными или мультиспецифичными (например, биспецифичными). Полиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно будет содержать, по меньшей мере, два разных переменных домена, причем каждый переменный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом на одном и том же антигене. Любой формат мультиспецифических антител, включая примеры форматов биспецифических антител, описанных в настоящем документе, может быть адаптирован для использования в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению с использованием рутинных методик, доступных в данной области.

В некоторых случаях, может быть желательно вызывать антагонизм TrkB, например, для ингибирования роста или пролиферации, например, опухолевой клетки нейрона. Однако антитела по настоящему изобретению действуют как агонистические антитела, которые служат в качестве усилителей выживания нейронов и нейропротекторов. Антитела по настоящему изобретению могут функционировать путем усиления взаимодействия между TrkB и его лигандом, BDNF. Альтернативно, антитела по изобретению могут опосредовать передачу сигналов TrkB через механизм, который не включает усиление взаимодействия TrkB со своим лигандом.

Предполагается, что используемый в настоящем документе термин "антитело человека" включает не встречающиеся в природе человеческие антитела. Термин включает антитела, которые рекомбинантно продуцируются у млекопитающего, не являющегося человеком, или в клетках млекопитающего, не являющегося человеком. Термин не подразумевает включения антител, выделенных или генерированных у человека.

Антитела по изобретению в некоторых вариантах осуществления могут быть рекомбинантными и/или не встречающимися в природе человеческими антителами. Термин "рекомбинантное антитело человека", используемый в настоящем документе, включает все человеческие антитела, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, например, антитела, экспресси-

руемые с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, введенного в клетку-хозяина (описано далее ниже), антитела, полученные из комбинаторной библиотеки рекомбинантных антител человека (описано далее ниже), антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным в отношении генов иммуноглобулина человека (см., например, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295), или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любым другими способами, которые включают сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина человека до других последовательностей ДНК. В некоторых вариантах осуществления, такие рекомбинантные антитела человека подвергают мутагенезу *in vitro* (или, если используют животное, трансгенное по последовательностям Ig человека, соматическому мутагенезу *in vivo*) и, таким образом, аминокислотные последовательности участков  $V_H$  и  $V_L$  рекомбинантных антител являются последовательностями, которые, поскольку они выделены из последовательностей зародышевых  $V_H$  и  $V_L$  человека и близки к ним, не могут в естественных условиях существовать в зародышевом наборе антител человека *in vivo*.

Антитела человека могут существовать в двух формах, которые ассоциированы с гетерогенностью шарнирной области. В одной форме молекула иммуноглобулина содержит стабильную четырехцепочечную конструкцию с массой около 150-160 кДа, в которой димеры удерживаются вместе взаимодействием дисульфидной связи тяжелой цепи. Во второй форме, димеры не связаны межцепными дисульфидными связями и образуется молекула около 75-80 кДа, составленная из ковалентно связанных легкой и тяжелой цепи (полуантитело). Эти формы чрезвычайно трудно разделить, даже после аффинной очистки.

Частота встречаемости второй формы в разных интактных изотипах IgG обусловлена, но не ограничивается ими, структурными различиями, ассоциированными с изотипом шарнирной области этого антитела. Замена единственной аминокислоты в шарнирной области шарнира IgG4 человека может значительно уменьшать появление второй формы (Angal et al. (1993) Molecular Immunology 30:105) до уровней, обычно наблюдаемых с использованием шарнира IgG1 человека. Настоящее изобретение охватывает антитела, имеющие одну или несколько мутаций в шарнирной области, в области  $C_H2$  или  $C_H3$ , которые могут быть желательными, например, в производстве, для улучшения выхода желаемой формы антитела.

Термин "специфическое связывание" или "специфически связывается с" или тому подобное означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образует комплекс с антигеном, который относительно стабилен в физиологических условиях. Специфическое связывание может характеризоваться равновесной константой диссоциации, равной, по меньшей мере, около  $1 \times 10^{-6}$  М или меньше (например, меньшее значение  $K_D$  означает более сильное связывание). Способы для определения специфичности связывания двух молекул хорошо известны в данной области и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и тому подобное. Как описано в настоящем документе, антитела, которые специфически связываются с TrkB, идентифицировали посредством поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™. Кроме того, мультиспецифичные антитела, которые связываются с белком TrkB и одним или несколькими дополнительными антигенами, или би-специфичные, которые связываются с двумя различными областями TrkB, тем не менее, считаются антителами, которые "специфически связываются" в контексте настоящего документа.

Антитела по изобретению могут быть выделенными антителами. Используемый в настоящем документе термин "выделенное антитело" означает антитело, которое идентифицировали и отделяли и/или извлекали, по меньшей мере, из одного компонента его естественной среды. Например, антитело, которое было отделено или удалено, по меньшей мере, из одного компонента организма или из ткани или клетки, в которой антитело существует или продуцируется в естественных условиях, является "выделенным антителом" в рамках настоящего изобретения. Выделенное антитело также включает антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенные антитела представляют собой антитела, которые подвергали, по меньшей мере, одной стадии очистки или выделения. В соответствии с некоторыми вариантам осуществления, выделенное антитело может по существу не содержать другой клеточный материал и/или химические вещества.

Анти-TrkB антитела, описанные в настоящем документе, могут содержать одну или несколько аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных и/или CDR-областях переменных доменов тяжелой и легкой цепи. Такие мутации могут быть легко установлены путем сравнения описанных в настоящем документе аминокислотных последовательностей с последовательностями, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. После получения, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько мутаций, можно легко подвергнуть исследованию исследовать на предмет присутствия одного или нескольких желаемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в соответствующих случаях), пониженная иммуногенность и т.д. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные этим общим способом, включены в настоящее изобретение.

Настоящее изобретение также включает анти-TrkB антитела, содержащие варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описанных в настоящем документе, с одной или несколькими консервативными заменами. Например, настоящее изобретение включает анти-

TrkB антитела, содержащие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или меньше, 8 или меньше, 6 или меньше, 4 или меньше и т.д. консервативными аминокислотными заменами относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, указанных в табл. 1 в настоящем документе.

Термин "эпитоп" означает антигенную детерминанту, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим участком в варибельной области молекулы антитела, известным как паратоп. Отдельный антиген может иметь более чем один эпитоп. Соответственно, разные антитела могут связываться с различными участками антигена и могут оказывать разные биологические эффекты. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп продуцируется пространственно расположенными рядом аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, продуцируемый смежными аминокислотными остатками в полипептидной цепи. При определенных обстоятельствах, эпитоп может включать фрагменты сахаридов, фосфорильных групп или сульфонильных групп этого антигена.

Термин "существенная идентичность" или "по существу идентичные", когда он относится к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту, указывает на то, что при оптимальном сопоставлении с подходящими нуклеотидными инсерциями или делециями с другой молекулой нуклеиновой кислоты (или ее комплементарной цепью) имеется идентичность нуклеотидной последовательности, по меньшей мере, в приблизительно 95% или более предпочтительно, по меньшей мере, приблизительно 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидных оснований, что измеряется посредством любого хорошо известного алгоритма определения идентичности последовательности, такого как FASTA, BLAST или Gap, рассмотренных ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, имеющая существенную идентичность с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, может, в некоторых случаях, кодировать полипептид, имеющий такую же или по существу аналогичную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

Применительно к полипептидам, термин "существенная идентичность" или "по существу идентичный" означает, что две пептидные последовательности, когда они оптимально выровнены, например, посредством программ GAP или BESTFIT с использованием веса делеции по умолчанию, имеют идентичность последовательности, по меньшей мере, 95%, даже более предпочтительно, по меньшей мере, 98% или 99% идентичности последовательности. Предпочтительно положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой такую замену, при которой аминокислотный остаток замещается другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (группу R) со сходными химическими свойствами (например, заряд или гидрофобность). В целом, консервативная аминокислотная замена существенно не изменяет функциональных свойств белка. В случаях, когда две или более аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, выраженная в процентах идентичность последовательности или степень идентичности могут быть скорректированы в сторону увеличения, чтобы скорректировать консервативные свойства замены. Средства для этой корректировки хорошо известны специалистам в данной области. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, включенная в настоящий документ посредством ссылки. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатические гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат, и (7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. Альтернативно, консервативной заменой является любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, описанной в Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-1445, включенной в настоящий документ посредством ссылки. "Умеренно консервативной" заменой является любое изменение, имеющее неотрицательное значение при оценке с использованием матрицы логарифмической функции правдоподобия PAM250.

Сходство последовательности для полипептидов, которое также называют идентичностью последовательности, обычно измеряют с использованием программного обеспечения анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков сопоставляет сходные последовательности с использованием измерений сходства, приписанных различным заменам, делециям и другим модификациям, в том числе аминокислотным заменам. Например, программное обеспечение GCG содержит программы, такие как Gap и Bestfit, которые могут быть использованы с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из разных видов организмов или между белком дикого вида и его мутантом. См., например, GCG Version 6.1. Полипептидные последовательности могут также сравниваться посредством FASTA с использованием параметров по умолчанию или рекомендуемых параметров, программы в GCG Version 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает

сопоставления и процентную идентичность последовательности областей наилучшего совпадения между запрашиваемыми последовательностями и последовательностями поиска (Pearson (2000) выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности по изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей из разных организмов, является компьютерная программа BLAST, в частности BLASTP или TBLASTN, использующие параметры по умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 and Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402, каждая из которых включен здесь посредством ссылки.

#### Биологические характеристики антител

Настоящее изобретение включает анти-TrkB антитела, которые связываются с TrkB человека с  $K_D$  меньше чем около 200 нМ, что определено посредством поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или при 37°C. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, изобретение включает анти-TrkB антитела, которые связываются с TrkB человека со значением  $K_D$  меньше чем около 600 пМ, меньше чем около 300 пМ, меньше чем около 200 пМ, меньше чем около 150 пМ, меньше чем около 100 пМ, меньше чем около 80 пМ, меньше чем около 50 пМ, меньше чем около 40 пМ, меньше чем около 30 пМ, меньше чем около 20 пМ, меньше чем около 10 пМ, меньше чем около 5 пМ, меньше чем около 3 пМ или меньше чем около 1 пМ.

Настоящее изобретение включает анти-TrkB антитела, которые связываются с TrkB человека с диссоциационным периодом полувыведения ( $t^{1/2}$ ) больше, чем около 10 мин, что определено посредством поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37°C. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, изобретение включает анти-TrkB антитела, которые связываются с TrkB человека с  $t^{1/2}$  больше, чем около 20 мин, больше, чем около 50 мин, больше, чем около 100 мин, больше, чем около 120 мин, больше, чем около 150 мин, больше, чем около 300 мин, больше, чем около 350 мин, больше, чем около 400 мин, больше, чем около 450 мин, больше, чем около 500 мин, больше, чем около 550 мин, больше, чем около 600 мин, больше, чем около 700 мин, больше, чем около 800 мин, больше, чем около 900 мин, больше, чем около 1000 мин, больше, чем около 1100 мин или больше, чем около 1200 мин.

Настоящее изобретение включает анти-TrkB антитела, которые могут или не могут связываться с TrkB обезьяны, TrkB мыши или крысы. Как используется в данном документе, антитело "не связывается" с конкретным антигеном (например, TrkB обезьяны, мыши или крысы, если антитело при тестировании в исследовании связывания антигена, таком как поверхностный плазмонный резонанс, демонстрирует  $K_D$  больше, чем около 1000 нМ, или не демонстрирует какого-либо связывания антигена в таком исследовании. Другим форматом исследования, который можно использовать для определения того, связывается ли антитело или не связывается с конкретным антигеном, согласно этому аспекту изобретения, является ИФА(ELISA).

Настоящее изобретение включает анти-TrkB антитела, которые активируют передачу сигналов TrkB человека в клетках, сконструированных для экспрессии рецептора TrkB с  $EC_{50}$  меньше чем около 100 пМ. Используя формат анализа, описанный в примере 5, или по существу аналогичный формат анализа, значение  $EC_{50}$  можно рассчитать как концентрацию антитела, необходимую для активации передачи сигналов, опосредованной TrkB, до наблюдаемого полумаксимального сигнала. Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретение включает анти-TrkB антитела, которые опосредуют передачу сигналов TrkB человека в клетках, сконструированных для экспрессии рецептора TrkB в присутствии или в отсутствии BDNF с  $EC_{50}$  меньше чем около 500 пМ, меньше чем около 400 пМ, меньше чем около 300 пМ, меньше чем около 200 пМ, меньше чем около 100 пМ, меньше чем около 90 пМ, меньше чем около 80 пМ, меньше чем около 70 пМ, меньше чем около 60 пМ, меньше чем около 50 пМ, меньше чем около 40 пМ, меньше чем около 30 пМ, меньше чем около 20 пМ, меньше чем около 10 пМ или меньше чем около 5 пМ, что определено с использованием формата анализа, описанного в примере 5 в настоящем документе, или по существу аналогичного исследования.

Настоящее изобретение включает анти-TrkB антитела, которые активируют рецептор TrkB, что показано фосфорилированием TrkB после прямой гиппокампальной инъекции мышам, гуманизированным для экспрессии рецептора TrkB человека, как показано в примере 6.

Настоящее изобретение включает анти-TrkB антитела, которые способствуют потере массы у мышей, гуманизированных для экспрессии рецептора TrkB человека. Антитела по изобретению также служат для ускорения потери жировой массы и увеличения двигательной активности у этих мышей при одновременном снижении потребления корма и воды (см. пример 7).

Антитела по изобретению способствуют выживанию ганглионарных клеток сетчатки (RGC) у крыс, гуманизированных для экспрессии рецептора TrkB человека, при исследовании на модели транссекции зрительного нерва. См. пример 8.

Антитела по изобретению активируют нисходящие отделы сигнального пути MAPK/ERK и PI3K/Akt, что показано при воздействии на первичные мышечные кортикальные нейроны, полученные из TrkB гуманизированных мышей, антителами по изобретению, (см. пример 9).

Агонистические анти-TrkB антитела по изобретению также способствуют выживанию клеток SH-SY5Y в зависимости от дозы, как показано в примере 10.

Настоящее изобретение включает анти-TrkB антитела, которые блокируют связывание TrkB с



BDNF с  $IC_{50}$  меньше чем около 5 нМ. Например, как показано в примере 12, все три исследованных антитела блокировали >50% связывания TrkB мыши или крысы с BDNF. Используя формат анализа, описанный в примере 12, или по существу аналогичный формат анализа, значение  $IC_{50}$  можно вычислить как концентрацию антитела, необходимую для блокирования связывания TrkB с BDNF, по сравнению с максимальным сигналом, наблюдаемым в отсутствие антитела. Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, изобретение включает анти-TrkB антитела, которые блокируют связывание TrkB с BDNF с  $IC_{50}$  меньше чем около 5 нМ, меньше чем около 4 нМ, меньше чем около 3 нМ, меньше чем около 2 нМ, меньше чем примерно 1 нМ, меньше чем около 900 пМ, меньше чем около 800 пМ, меньше чем около 700 пМ, меньше чем около 600 пМ, меньше чем около 500 пМ, меньше чем около 400 пМ, меньше чем около 300 пМ, меньше чем около 200 пМ, меньше чем примерно 100 пМ, меньше чем около 90 пМ, меньше чем около 80 пМ, меньше чем около 70 пМ, меньше чем около 60 пМ, меньше чем около 50 пМ, меньше чем около 40 пМ, меньше чем около 30 пМ, или меньше чем около 20 пМ, что определено с использованием формата исследования, описанного в примере 12 в настоящем документе, или по существу аналогичного исследования. В одном из вариантов осуществления, антитела к TrkB по изобретению блокируют связывание TrkB с BDNF с  $IC_{50}$  в диапазоне от около 180 пМ до около 4 нМ.

Характеристика связывания антитела по изобретению (например, любая из характеристик связывания, указанных в настоящем документе выше), когда она описана в терминах "измерения посредством поверхностного плазмонного резонанса", означает, что соответствующую характеристику связывания, относящуюся к взаимодействию между антителом и антигеном, определяют с использованием прибора поверхностного плазмонного резонанса (например, прибора Biacore®, GE Healthcare), используя стандартные условия исследования Biacore, как показано в примерах 3 и 4, или по существу аналогичный формат исследования. В некоторых вариантах, параметры связывания определяются при 25°C, при этом в других вариантах осуществления, параметры связывания определяются при 37°C.

Настоящее изобретение включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с TrkB, включающие HCVR и/или LCVR, включающие аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCVR и/или LCVR, перечисленных в табл. 1.

Антитела по настоящему изобретению могут обладать одной или несколькими из вышеуказанных биологических характеристик или любым их сочетанием. Приведенный выше перечень биологических характеристик антител по изобретению не является исчерпывающим. Другие биологические характеристики антител по настоящему изобретению будут очевидны для специалиста в данной области из обзора настоящего описания, включая рабочие примеры, приведенные в настоящем документе.

#### Картирование эпитопов и родственные технологии

Эпитоп, с которым связываются антитела по настоящему изобретению, может состоять из одной непрерывной последовательности 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот белка TrkB. Альтернативно, эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей) TrkB. В некоторых вариантах осуществления, эпитоп расположен на поверхности или вблизи поверхности TrkB, например, в домене, который взаимодействует с его лигандом, BDNF. В других вариантах осуществления, эпитоп расположен на поверхности или вблизи поверхности TrkB, которая не взаимодействует с лигандом TrkB, например, в месте на поверхности TrkB, на котором антитело, когда связано с таким эпитопом, не мешает взаимодействию между TrkB и его лигандом.

Различные методы, известные специалистам в данной области техники, могут быть использованы для определения "взаимодействует ли антитело с одной или несколькими аминокислотами" в полипептиде или белке. Типичные методы включают, например, рутинный эпитоп перекрестный конкурентный анализ, например описанный в *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), анализ мутантов, получаемых при аланиновом сканировании, пептидный блоттинг (Reineke, 2004, *Methods Mol Biol.* 248: 443-463) и анализ расщепления пептидов. Кроме того, могут быть использованы такие методы, как удаление эпитопа, экстракция эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomec, 2000, *Protein Science* 9: 487-496). Другим методом, который можно использовать для идентификации аминокислот в полипептиде, с которым взаимодействует антитело, является обмен водорода с дейтерием, обнаруживаемый посредством масс-спектрометрии. В общих чертах, метод обмена водорода с дейтерием включает мечение дейтерием представляющего интерес белка с последующим связыванием антитела с меченым дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду, чтобы обеспечить обмен водорода с дейтерием на всех остатках, кроме остатков, защищенных антителом (которые остаются мечеными дейтерием). После диссоциации антитела, целевой белок подвергают расщеплению протеазой и масс-спектрометрическому анализу, таким образом выявляя меченные дейтерием остатки, которые соответствуют специфическим аминокислотам, с которыми антитело взаимодействует. См., например, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

Настоящее изобретение включает анти-TrkB антитела, которые связываются с тем же эпитопом, что и любое из конкретных типичных антител, описанных в настоящем документе (например, антитела, содержащие любую из аминокислотных последовательностей, указанных в табл. 1 в настоящем докумен-

те). Аналогичным образом, настоящее изобретение также включает анти-TrkB антитела, которые конкурируют за связывание с TrkB с любым из типичных специфичных антител, описанных в настоящем документе (например, антитела, содержащие любую из аминокислотных последовательностей, указанных в табл. 1 в настоящем документе).

Можно легко определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом или конкурирует за связывание с эталонным анти-TrkB антителом, используя рутинные методы, известные в данной области и приведенные в качестве примера в настоящем документе. Например, чтобы определить, связывается ли исследуемое антитело с тем же эпитопом, что и эталонное анти-TrkB антитело по изобретению, эталонному антителу позволяют связываться с белком TrkB. Затем оценивают способность исследуемого антитела связываться с молекулой TrkB. Если исследуемое антитело способно связываться с TrkB после насыщения связывания с эталонным анти-TrkB антителом, можно сделать вывод, что исследуемое антитело, а не эталонное анти-TrkB антитело, связывается с другим эпитопом. С другой стороны, если исследуемое антитело не способно связываться с молекулой TrkB после насыщения связывания с эталонным анти-TrkB антителом, тогда исследуемое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, связанный с эталонным анти-TrkB антителом по изобретению. Затем можно провести дополнительные рутинные эксперименты (например, анализы пептидные мутации и связывания), чтобы подтвердить, является ли наблюдаемое отсутствие связывания исследуемого антитела фактически следствием связывания с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, или же причиной отсутствия наблюдаемого связывания является стерическое блокирование (или другое явление). Эксперименты такого рода могут быть выполнены с использованием ELISA, RIA, Biacore, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антител, доступного в данной области. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения, два антитела связываются с одним и тем же (или перекрывающимся) эпитопом, если, например, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует связывание другого, по меньшей мере, на 50%, но предпочтительно на 75%, 90% или даже 99%, что определено в конкурентном анализе связывания (см., например, Junghans et al., Cancer Res. 1990:50:1495-1502). Альтернативно, полагают, что два антитела связываются с одним и тем же эпитопом, если по существу все аминокислотные мутации в антигене, которые ослабляют или устраняют связывание одного антитела, ослабляют или устраняют связывание другого. Полагают, что два антитела имеют "перекрывающиеся эпитопы", только если подмножество аминокислотных мутаций, которые ослабляют или устраняют связывание одного антитела, ослабляют или устраняют связывание другого.

Чтобы определить, конкурирует ли антитело за связывание (или перекрестно конкурирует за связывание) с эталонным анти-TrkB антителом, описанный выше метод связывания осуществляется в двух направлениях: в первом направлении эталонному антителу обеспечивают связывание с белком TrkB в условиях насыщения с последующей оценкой связывания исследуемого антитела с молекулой TrkB. Во втором направлении, исследуемому антителу обеспечивают связывание с молекулой TrkB в условиях насыщения с последующей оценкой связывания эталонного антитела с молекулой TrkB. Если в обоих направлениях только первое (насыщающее) антитело способно связываться с молекулой TrkB, то делается вывод, что исследуемое антитело и эталонное антитело конкурируют за связывание с TrkB (см., например, формат анализа, описанный в примере 4, в котором белок TrkB захватывается на сенсорных наконечниках, и сенсорные наконечники, покрытые TrkB, обрабатывают эталонным антителом [mAb-1] и исследуемым анти-TrkB антителом [mAb-2] последовательно и в обоих порядках связывания). Как будет понятно специалисту в данной области, антитело, которое конкурирует за связывание с эталонным антителом, необязательно может связываться с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, но может стерически блокировать связывание эталонного антитела путем связывания перекрывающегося или смежного эпитопа.

#### Получение антител человека

Анти-TrkB антитела по настоящему изобретению могут быть полностью человеческими, но не встречающимися в природе антителами. Способы генерирования моноклональных антител, включая полностью человеческие моноклональные антитела, известны в данной области. Любые такие известные способы можно использовать в контексте настоящего изобретения для получения антител человека, которые специфически связываются с TrkB человека.

С использованием технологии VELOCIMMUNE® (см., например, US 6,596,541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) или любым другим известным способом получения моноклональных антител сначала выделяют химерные антитела с высоким сродством к аллергену, имеющие варибельную область человека и константную область мыши. Технология VELOCIMMUNE® включает создание трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий варибельные области тяжелой и легкой цепи человека, функционально связанные с эндогенными локусами константной области мыши, так что эта мышь продуцирует антитело, содержащее варибельную область человека и константную область мыши, в ответ на антигенную стимуляцию. ДНК, кодирующие варибельные области тяжелой и легкой цепей этого антитела, выделяют и функционально связывают с ДНК, кодирующей константные области тяжелой и легкой цепей человека. Затем эту ДНК экспрессируют в клетке, способной экспрессировать полностью

человеческое антитело.

Обычно, созданную по технологии VELOCIMMUNE® мышь заражают интересующим антигеном и выделяют лимфатические клетки (такие как В-клетки) у мышей, которые экспрессируют антитела. Лимфатические клетки могут быть слиты с линией клеток миеломы с получением иммортализованных гибридных клеточных линий, и такие гибридные клеточные линии подвергаются скринингу и отбираются для идентификации гибридных клеточных линий, которые продуцируют антитела, специфичные к интересующему антигену. ДНК, кодирующая вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи, может быть выделена и связана с желаемыми изотипическими константными областями тяжелой цепи и легкой цепи. Такой белок антитела может продуцироваться в клетке, такой как клетка СНО. Альтернативно, ДНК, кодирующая антигенспецифические химерные антитела или вариабельные домены легкой и тяжелой цепей, может быть выделена непосредственно из антигенспецифических лимфоцитов.

Как описано в экспериментальной части ниже, химерные антитела с высокой аффинностью, которые выделены с вариабельной областью человека и константной областью мыши, охарактеризованы и отобраны для обеспечения желаемых характеристик, включая аффинность, селективность, эпитоп и т.д. Затем константные области мышь заменяют желаемой константной областью человека для генерации полностью человеческого антитела по изобретению, например, IgG1 или IgG4-подобного типа или модифицированного. Хотя выбранная константная область может изменяться в зависимости от конкретного применения, характеристики связывания антигена с высокой аффинностью и специфичности в отношении мишени локализованы в вариабельной области.

В некоторых вариантах осуществления, может быть желательным исследовать антитела к TrkB человека у мышей или крыс, которые были сконструированы для экспрессии рецептора TrkB человека. Эти мыши или крысы могут быть использованы в обстоятельствах, когда анти-TrkB антитела могут связываться только с TrkB человека, но не будут перекрестно реагировать с TrkB мыши или крысы. Некоторые примеры в настоящем изобретении были выполнены с использованием мышей и крыс, которые были генетически модифицированы для экспрессии trkB человека. Любой метод, известный специалистам в данной области, может быть использован для получения таких TrkB гуманизированных мышей и крыс.

Обычно, антитела по настоящему изобретению обладают очень высокими аффинностями, обычно с  $K_D$  от около  $10^{-12}$  до около  $10^{-9}$  М при измерении по связыванию с антигеном либо в виде иммобилизованных на твердой фазе, либо в фазе раствора антител.

#### Биоэквиваленты

Анти-TrkB антитела и фрагменты антител по настоящему изобретению включают белки, имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от последовательностей описанных антител, но которые сохраняют способность связываться с TrkB человека. Такие варианты антитела и фрагменты антител содержат одну или несколько добавлений, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но демонстрируют биологическую активность, которая по существу эквивалентна активности описанных антител. Аналогично, последовательности ДНК, кодирующие анти-TrkB антитело по настоящему изобретению, включают последовательности, которые включают одно или несколько добавлений, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с описанной последовательностью, но которые кодируют анти-TrkB антитело или фрагмент антитела, который является по существу, биоэквивалентным анти-TrkB антителу или фрагменту антитела по изобретению. Примеры таких вариантов аминокислотных и ДНК-последовательностей рассмотрены выше.

Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биоэквивалентными, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, скорость и степень абсорбции которых не показывают значительного различия при введении в одной и той же молярной дозе в аналогичных условиях эксперимента, либо однократной дозе, либо многократной дозе. Некоторые антитела будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны по степени их абсорбции, но не по скорости их абсорбции, и все же их можно считать биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются намеренными и отражаются в маркировке, не являются принципиально значимыми для достижения эффективных концентраций препарата в организме, например, при длительном применении, и считаются, с медицинской точки зрения, незначительным для конкретного исследуемого лекарственного препарата.

В одном из вариантов осуществления, два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если нет клинически значимых различий в их безопасности, чистоте и эффективности.

В одном из вариантов осуществления, два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациента можно "переводить" один или несколько раз с эталонного продукта на биологический продукт и обратно без ожидаемого увеличения риска побочных эффектов, включая клинически значимое изменение иммуногенности или снижение эффективности по сравнению с продолжением терапии без такого "перевода".

В одном из вариантов осуществления, два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если они оба действуют по общему механизму или механизмам действия для условия или условий применения в тех случаях, когда такие механизмы известны.

Биоэквивалентность может быть продемонстрирована методами *in vivo* и *in vitro*. Измерения биоэк-

вивалентности включают, например, (a) исследование *in vivo* на людях или других млекопитающих, в котором концентрация антитела или его метаболитов измеряется в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости как функция времени; (b) исследование *in vitro*, которое согласовывалось и является достаточно прогнозным по данным биодоступности у человека *in vivo*; (c) исследование *in vivo* на людях или других млекопитающих, в котором соответствующий острый фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряется как функция времени; и (d) хорошо контролируемое клиническое исследование, которое устанавливает безопасность, эффективность или биодоступность или биоэквивалентность антитела.

Биоэквивалентные варианты анти-TrkB антител по изобретению могут быть сконструированы, например, путем осуществления различных замен остатков или последовательностей, или удаления концевых или внутренних остатков или последовательностей, не оказывающих влияние на биологическую активность. Например, остатки цистеина, несущественные для биологической активности, могут быть удалены или заменены другими аминокислотами для предотвращения образования ненужных или несоответствующих внутримолекулярных дисульфидных связей при ренатурации. В других контекстах, биоэквивалентные антитела могут включать варианты анти-TrkB антител, содержащие аминокислотные замены, которые модифицируют характеристики гликозилирования антител, например мутации, которые устраняют или удаляют гликозилирование.

#### Селективность видов и межвидовая перекрестная реактивность

Настоящее изобретение, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, относится к анти-TrkB антителам, которые связываются с TrkB человека, но не с TrkB других видов. Настоящее изобретение также включает анти-TrkB антитела, которые связываются с TrkB человека и с TrkB одного или нескольких видов, отличных от человека. Например, анти-TrkB антитела по изобретению могут связываться с TrkB человека и могут связываться или не связываться, в зависимости от обстоятельств, с одним или несколькими TrkB мыши, крысы, морской свинки, хомяка, песчанки, свиньи, кошки, собаки, кролика, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда, яванского макака, мартышки, макака-резуса или шимпанзе. В соответствии с некоторыми приведенными в качестве примера вариантами осуществления настоящего изобретения, предусмотрены анти-TrkB антитела, которые специфически связываются с TrkB человека, но не связываются или слабо связываются с TrkB мыши или крысы.

#### Мультиспецифичные антитела

Антитела по настоящему изобретению могут быть моноспецифичными или мультиспецифичными (например, биспецифичными). Полиспецифичные антитела могут быть специфичными в отношении разных эпитопов одного целевого полипептида или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфичные в отношении более чем одного целевого полипептида. См., например, Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufner et al., 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244. Анти-TrkB антитела по настоящему изобретению могут быть связаны или коэкспрессированы с другой функциональной молекулой, например другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент могут быть функционально связаны (например, путем химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одним или несколькими другими молекулярными объектами, такими как другое антитело или фрагмент антитела, для продуцирования биспецифичного или мультиспецифичного антитела со второй специфичностью связывания.

Настоящее изобретение включает биспецифичные антитела, в которых одна часть иммуноглобулина связывает TrkB человека, а другая часть иммуноглобулина специфична в отношении второго антигена. Связывающее TrkB плечо может содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, как указано в табл. 1 в настоящем документе.

Приведенный в качестве примера формат биспецифичных антител, который можно использовать в контексте настоящего изобретения, включает использование первого домена C<sub>H</sub>3 иммуноглобулина (Ig) и второго домена C<sub>H</sub>3 Ig, где первый и второй домены C<sub>H</sub>3 Ig3 отличаются друг от друга, по меньшей мере, одной аминокислотой, и где, по меньшей мере, одно отличие в аминокислотах ослабляет связывание биспецифичного антитела с белком А по сравнению с биспецифичным антителом, в котором отсутствуют аминокислотные отличия. В одном из вариантов осуществления, первый домен C<sub>H</sub>3 Ig связывается с белком А, а второй домен C<sub>H</sub>3 Ig содержит мутацию, которая ослабляет или устраняет связывание с белком А, такую как модификация H95R (в соответствии с нумерацией экзонов IMGT; H435R в соответствии с нумерацией EU). Второй C<sub>H</sub>3 может дополнительно содержать модификацию Y96F (в соответствии с IMGT; Y436F в соответствии с EU). Дополнительные модификации, которые могут быть обнаружены во втором C<sub>H</sub>3, включают: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (в соответствии с IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I в соответствии с EU) в случае антител IgG1; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I от EU) в случае антител IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (в соответствии с IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I в соответствии с EU) в случае антител IgG4. Варианты формата биспецифичных антител, описанные выше, включены в объем настоящего изобретения.

Другие приведенные в качестве примера биспецифичные форматы, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, включают, без ограничения, например, биспецифичные форматы на

основе диантител или на основе scFv, слияния IgG-scFv, двойной вариабельный домен (DVD)-Ig, квадрому, "выступы-во-впадины", общую легкую цепь (например, общую легкую цепь с "выступами-во-впадины" и т.д.), CrossMab, CrossFab, (SEED)-тело, лейциновая "молния", Duobody, IgG1/IgG2, Fab (DAF)-IgG двойного действия и Mab биспецифичные форматы (см., например, Klein et al., 2012, mAbs 4:6, 1-11 и ссылки, приведенные в них, для обзора вышеуказанных форматов). Биспецифические антитела также можно конструировать при помощи конъюгации пептидов и нуклеиновых кислот, например, в случае, когда не встречающиеся в природе аминокислоты с ортогональной химической реакционной способностью применяют для получения сайт-специфических конъюгатов антитело-нуклеотид, которые затем самособираются в мультимерные комплексы с определенным составом, валентностью и геометрической формой. (См., например, Kazane et al., J. Am. Chem. Soc. [Epub: Dec. 4, 2012]).

#### Терапевтическая композиция и введение

Изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим анти-TrkB антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению. Фармацевтические композиции по изобретению объединяют в составе препарата с подходящими носителями, вспомогательными веществами и другими агентами, которые обеспечивают улучшенный перенос, доставку, переносимость и тому подобное. Множество подходящих составов можно найти в справочнике, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Эти композиции включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, содержащие липиды (катионные или анионные) везикулы (например, LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA), конъюгаты ДНК, безводные абсорбирующие пасты, эмульсии типа масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии карбовакса (полиэтиленгликоли различной молекулярной массы), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс.

См. также Powell et al. "Compendium of вспомогательные вещества for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Доза антитела, вводимого пациенту, может изменяться в зависимости от возраста и размера пациента, заболевания-мишени, состояний, способа введения и тому подобного. Предпочтительная доза обычно определяется в зависимости от массы организма или площади поверхности организма. Для взрослого пациента может быть эффективным внутривенное введение антитела по настоящему изобретению обычно в однократной дозе, составляющей от около 0,01 до около 20 мг/кг массы организма, более предпочтительно от около 0,02 до около 7, от около 0,03 до около 5 или от около 0,05 до около 3 мг/кг массы организма. В зависимости от тяжести состояния, частота и продолжительность лечения могут быть скорректированы. Эффективные дозы и схемы введения анти-TrkB антител могут быть определены экспериментальным путем; например, течение заболевания пациента может контролироваться путем периодической оценки и, соответственно, корректироваться доза. Кроме того, межвидовое приведение доз может выполняться хорошо известными в данной области способами (например, Mordenti et al., 1991, Pharmaceut. Res. 8:1351).

Хорошо известны различные системы доставки, которые можно использовать для введения фармацевтической композиции по изобретению, например инкапсулирование в липосомы, микрокапсулы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецепторами эндоцитоз (см., например, Wu et al., 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432). Способы введения включают, но ими не ограничиваются, интравитреальный, внутриглазный, внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный способы. Композицию можно вводить любым удобным способом, например, путем инфузии или болюсной инъекции, путем абсорбции через эпителиальные или слизистые выстилки (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и т.д.) и можно вводить вместе с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или локальным.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может доставляться подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, в отношении подкожной доставки, устройство для доставки типа шприц-ручка легко находит применение при доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Такое устройство для доставки типа шприц-ручка может быть многоразовым или одноразовым. В многоразовом устройстве для доставки типа шприц-ручка обычно используется сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После того, как вся фармацевтическая композиция, находящаяся внутри картриджа, введена и картридж пуст, пустой картридж можно легко утилизировать и заменить новым картриджем, который содержит фармацевтическую композицию. Затем устройство для доставки типа шприц-ручка может быть повторно использовано. В одноразовом устройстве для доставки типа шприц-ручка отсутствует сменный картридж. Предпочтительно, одноразовое устройство для доставки типа шприц-ручка поставляется предварительно заполненным фармацевтической композицией, удерживаемой в резервуаре внутри устройства. Как только фармацевтическая композиция заканчивается в резервуаре, устройство утилизируется целиком.

Различные многоразовые устройства для доставки типа шприц-ручка и автоинжектор находят применение в подкожной доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Примеры

включают, но ими не ограничиваются, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II and III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Germany), которые являются лишь некоторыми из них. Примеры одноразового устройства для доставки типа шприц-ручки, имеющего применение при подкожной доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включают, но ими не ограничиваются, шприц-ручку SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинжектор SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLETT™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручку HUMIRATM (Abbott Labs, Abbott Park IL), которые являются лишь некоторыми из них.

В определенных ситуациях, фармацевтическая композиция может доставляться в системе с контролируемым высвобождением активного вещества. В одном из вариантов осуществления, можно использовать насос (см. Langer, выше; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201). В другом варианте осуществления, могут быть использованы полимерные вещества; см. Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. В еще одном варианте осуществления, система с контролируемым высвобождением может быть размещена в непосредственной близости от мишени композиции, и поэтому потребуется только часть системной дозы (см., например, Goodson, 1984, в Medical Applications of Controlled Release, выше, vol. 2, pp. 115-138). Другие системы с контролируемым высвобождением рассмотрены в обзоре Langer, 1990, Science 249: 1527-1533.

Препараты для инъекций могут включать лекарственные формы для внутривенных, интравитреальных, внутриглазных, подкожных, внутрикожных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т.д. Эти инъекционные препараты могут быть получены общеизвестными способами. Например, инъекционные препараты могут быть получены, например, путем растворения, суспендирования или эмульгирования антитела или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, обычно используемой для инъекций. В качестве водной среды для инъекций имеются, например, физиологический солевой раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные агенты и т.д., которые можно использовать в сочетании с подходящим солюбилизующим агентом, таким как спирт (например, этанол), полиспирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, HCO-50 (аддукт гидрированного касторового масла и полиоксиэтилена (50 моль))] и т.д. В качестве масляной среды используются, например, кунжутное масло, соевое масло и т.д., которые можно использовать в сочетании с солюбилизующим агентом, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.д. Полученную таким образом инъекцию предпочтительно заполняют в соответствующую ампулу.

Преимущественно, фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, получают в дозированных формах в стандартной дозе, соответствующая дозированию активных ингредиентов. Такие лекарственные формы в стандартной дозе включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.д. Количество содержащегося вышеуказанного антитела обычно составляет от около 5 до около 500 мг на лекарственную форму в стандартной дозе; в частности, в форме инъекций, предпочтительно, чтобы указанное антитело содержалось в количестве от около 5 до около 100 мг и от около 10 до около 250 мг для других лекарственных форм.

#### Терапевтическое применение антител

Настоящее изобретение относится к способам, включающим введение субъекту, нуждающемуся в таком введении, терапевтической композиции, содержащей анти-TrkB антитело (например, анти-TrkB антитело, содержащее любую из последовательностей HCVR/LCVR или CDR, как указано в табл. 1 в настоящем документе). Терапевтическая композиция может содержать любое одно или несколько анти-TrkB антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

Антитела по изобретению применяются, среди прочего, для лечения, профилактики и/или уменьшения интенсивности любого заболевания или расстройства, связанных или опосредованных экспрессией или активностью TrkB. Антитела-агонисты TrkB по изобретению могут применяться для улучшения функции нервной системы и могут применяться для лечения или предотвращения любого заболевания или состояния, которое частично характеризуется деграцией клеток, в частности повреждением нервных клеток или дегенерацией нервных клеток, например, острое повреждение нервной системы или хроническое нейродегенеративное заболевание.

Настоящее изобретение относится к способам лечения или предотвращения заболевания или нарушения зрения путем введения пациенту, нуждающемуся в таком лечении, анти-TrkB антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в других частях настоящего документа.

В одном из вариантов осуществления, анти-TrkB антитела по изобретению могут обеспечивать способ предотвращения повреждения или гибели нейронов сетчатки. В одном из вариантов осуществления,

анти-TrkB антитела по изобретению могут обеспечивать способ лечения патологических заболеваний, при котором происходит дегенерация сетчатки. В одном из вариантов осуществления, анти-TrkB антитела по изобретению могут обеспечивать способ лечения глаза до или после хирургического вмешательства на глазу, воздействия света или другой травмы окружающей среды, предотвращая тем самым дегенерацию клеток сетчатки. В одном из вариантов осуществления, анти-TrkB антитела по изобретению могут обеспечивать способ предотвращения повреждения фоторецепторов и дегенерации в глазу. В одном из вариантов осуществления, анти-TrkB антитела по изобретению могут обеспечивать способ защиты нейронов сетчатки без вызывания побочных эффектов. В одном из вариантов осуществления, анти-TrkB антитела по изобретению могут обеспечивать способ, позволяющий поврежденным фоторецепторам восстанавливаться или регенерировать.

В некоторых вариантах осуществления, заболевания глаз, которые можно лечить с использованием одного или нескольких анти-TrkB антител по изобретению, могут быть выбраны из группы, состоящей из глаукомы, диабетической ретинопатии, возрастной дегенерации желтого пятна или других макулопатий, ишемической оптической нейропатии, неврита зрительного нерва, ретиальной ишемии, дегенерации фоторецепторов, пигментная дистрофия сетчатки, врожденный амавроз Лебера, Наследственная оптическая нейропатия Лебера, синдром Ашера, болезнь Старгарда и окклюзия артерий или вен сетчатки.

Другие патологические состояния, поддающиеся лечению посредством одного или нескольких анти-TrkB антител по изобретению, включают отслоение сетчатки, фотические ретинопатии, вызванные оперативным вмешательством ретинопатии (механически или индуцированные светом), токсические ретинопатии, ретинопатию недоношенных, вирусные ретинопатии, такие как цитомегаловирусная или ВИЧ-ретинопатия, связанная со СПИДом; увеит; ишемическую ретинопатию, вызванную венозной или артериальной окклюзией или другим сосудистым нарушением, ретинопатии, вызванные травмой или проникающими поражениями глаза, периферическую витреоретинопатию или наследственные дегенерации сетчатки.

В одном из вариантов осуществления, анти-TrkB антитела по изобретению могут быть включены в состав лекарственного препарата для внутриглазной или интравитреальной доставки.

Настоящее изобретение также относится к способам лечения других заболеваний или нарушений центральной или периферической нервной системы, таких как инсульт или черепно-мозговая травма. Кроме того, поскольку антитела по настоящему изобретению способствуют выживанию нейронов и действуют как нейропротекторы, любое одно или несколько из этих антител-агонистов могут оказаться эффективными при лечении пациента, страдающего от заболевания или расстройства нервной системы, причем выживание нейронов имеет первостепенное значение в вылечивании или восстановлении клеточного повреждения, вызванного повреждением нервной системы или вызванного заболеванием, которое оказывает серьезное влияние на нервную систему, включая нейродегенеративные заболевания.

В контексте способов лечения, описанных в настоящем документе, анти-TrkB антитело можно вводить в виде монотерапии (то есть в качестве единственного терапевтического средства) или в сочетании с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами.

#### Комбинированная терапия и композиции

Настоящее изобретение включает композиции и терапевтические композиции, содержащие любое из анти-TrkB антител, описанных в настоящем документе, в сочетании с одним или несколькими дополнительными терапевтически активными компонентами, и способы лечения, включающие введение таких сочетаний субъектам, нуждающимся в таком лечении.

Анти-TrkB антитела по настоящему изобретению могут комбинироваться и/или вводиться в сочетании с одним или несколькими дополнительными терапевтически активными компонентами, выбранными из группы, состоящей из: лекарственного средства, которое помогает снизить внутриглазное давление (препарат, снижающий IOP), нейротрофина и антагониста фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), такого как ловушка VEGF, например афлиберцепт (EYLEA®). Другие лекарственные средства, которые можно комбинировать с TrkB антителами по изобретению, включают, но ими не ограничиваются, аналог простагландина (например, ZIOPTAN™, XALATAN®), бета-блокатор (например, TIMOPTIC XE®, ISTALOL®, BETOPTIC®S); альфа-2-адренергический агонист (например, апраклонидин), ингибиторы карбоангидразы (например, TRUSOPT®, AZOPT®), холинергический агент (например, ISOPTO® CARPINE, гель PLOPINE HS®) или комбинированное терапевтическое средство (бета-блокатор плюс ингибитор карбоангидразы, например, COMBIGAN™, COSOPT®).

Анти-TrkB антитела по изобретению также можно вводить и/или комбинировать в сочетании с противовирусными препаратами, антибиотиками, анальгетиками, антиоксидантами, ингибиторами ЦОГ и/или НПВП. Анти-TrkB антитела могут также применяться в сочетании с другими видами терапии, включая терапию стволовыми клетками, операцию фильтрации глаукомы, лазерную хирургию или генную терапию.

Дополнительный терапевтически активный компонент(ы), например любой из перечисленных выше агентов или их производные, могут быть введены непосредственно до, одновременно или вскоре после введения анти-TrkB антитела по настоящему изобретению; (для целей настоящего изобретения такие

схемы введения считаются введением анти-TrkВ антитела "в сочетании с" дополнительным терапевтически активным компонентом). Настоящее изобретение включает фармацевтические композиции, в которых анти-TrkВ-антитело по настоящему изобретению комбинируется с одним или несколькими дополнительными терапевтически активными компонентами (компонентами), как описано в каком-либо другой части настоящего документа.

#### Режимы введения

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения, множественные дозы анти-TrkВ антитела (или фармацевтической композиции, содержащей сочетание анти-TrkВ антитела и любого из дополнительных терапевтически активных средств, указанных в настоящем документе) могут быть введены субъекту в течение определенного времени. Способы согласно этому аспекту изобретения включают последовательное введение субъекту множества доз анти-TrkВ антитела по изобретению. Используемый в настоящем документе термин "последовательное введение" означает, что каждая доза анти-TrkВ антитела вводится субъекту в разное время, например в разные дни, разделенные заранее определенным интервалом (например, часы, дни, недели или месяцы). Настоящее изобретение относится к способам, которые включают последовательное введение пациенту одной начальной дозы анти-TrkВ антитела, затем одной или нескольких вторичных доз анти-TrkВ антитела и далее, необязательно, одной или нескольких третичных доз анти-TrkВ антитела.

Термины "начальная доза", "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся к временной последовательности введения анти-TrkВ антитела по изобретению. Таким образом, "начальная доза" представляет собой дозу, которую вводят в начале схемы лечения (также называемой "базовой дозой"); "вторичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; и "третичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Начальная, вторичная и третичная дозы могут содержать одинаковое количество анти-TrkВ антитела, но обычно могут отличаться друг от друга с точки зрения частоты введения. Однако в некоторых вариантах осуществления, количество анти-TrkВ антитела, содержащегося в начальной, вторичной и/или третичной дозах, изменяется (например, корректируется в зависимости от ситуации) в течение курса лечения. В некоторых вариантах осуществления, две или более (например, 2, 3, 4 или 5) дозы вводят в начале схемы лечения в виде "насыщающих доз" за которыми следуют последующие дозы, которые вводят в режиме с меньшей частотой (например, "поддерживающие дозы").

В некоторых приведенных в качестве примера вариантах осуществления настоящего изобретения, каждую вторичную и/или третичную дозу вводят от 1 до 26 (например, 1, 1<sup>1/2</sup>, 2, 2<sup>1/2</sup>, 3, 3<sup>1/2</sup>, 4, 4<sup>1/2</sup>, 5, 5<sup>1/2</sup>, 6, 6<sup>1/2</sup>, 7, 7<sup>1/2</sup>, 8, 8<sup>1/2</sup>, 9, 9<sup>1/2</sup>, 10, 10<sup>1/2</sup>, 11, 11<sup>1/2</sup>, 12, 12<sup>1/2</sup>, 13, 13<sup>1/2</sup>, 14, 14<sup>1/2</sup>, 15, 15<sup>1/2</sup>, 16, 16<sup>1/2</sup>, 17, 17<sup>1/2</sup>, 18, 18<sup>1/2</sup>, 19, 19<sup>1/2</sup>, 20, 20<sup>1/2</sup>, 21, 21<sup>1/2</sup>, 22, 22<sup>1/2</sup>, 23, 23<sup>1/2</sup>, 24, 24<sup>1/2</sup>, 25, 25<sup>1/2</sup>, 26, 26<sup>1/2</sup> или более) недель после непосредственно предшествующей дозы. Фраза "непосредственно предшествующая доза", используемая в настоящем документе, означает, в последовательности многократных введений, дозу анти-TrkВ антитела, которую вводят пациенту перед введением непосредственно следующей дозы в последовательности без промежуточных доз.

Способы согласно этому аспекту изобретения могут включать введение пациенту любого количества вторичных и/или третичных доз анти-TrkВ антитела. Например, в определенных вариантах осуществления, пациенту вводят только одну вторичную дозу. В других вариантах осуществления, пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Аналогично, в определенных вариантах осуществления, пациенту вводят только одну третичную дозу. В других вариантах осуществления, пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных доз. Схема введения может осуществляться неограниченно в течение всей жизни конкретного субъекта или до тех пор, пока такое лечение является терапевтически необходимым или выгодным.

В вариантах осуществления, включающих множество вторичных доз, каждую вторичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие вторичные дозы. Например, каждую вторичную дозу можно вводить пациенту через 1-2 недели или через 1-2 месяца после непосредственно предшествующей дозы. Аналогично, в вариантах осуществления, включающих множественные третичные дозы, каждую третичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие третичные дозы. Например, каждая третичная доза может вводиться пациенту через 2-12 недель после непосредственно предшествующей дозы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, частота, с которой вторичные и/или третичные дозы вводятся пациенту, может изменяться в течение курса лечения. Частота введения может также корректироваться врачом в течение курса лечения в зависимости от потребностей конкретного пациента после клинического обследования.

Настоящее изобретение включает схемы введения, при которых от 2 до 6 насыщающих доз вводят пациенту с первой частотой (например, один раз в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждые три недели, один раз в месяц, один раз каждые два месяца и т.д.) с последующим введением пациенту двух или более поддерживающих доз в режиме с меньшей частотой. Например, согласно этому аспекту изобретения, если насыщающие дозы вводят с частотой один раз в месяц, то поддерживающие дозы могут вводиться пациенту один раз каждые шесть недель, один раз каждые два месяца, один раз каждые три месяца и т.п.



### Диагностические применения антител

Анти-TrkB антитела по настоящему изобретению также можно использовать для обнаружения и/или измерения TrkB или TrkB-экспрессирующих клеток в образце, например, с диагностическими целями. Например, анти-TrkB антитело или его фрагмент можно использовать для диагностики состояния или заболевания, характеризующегося aberrантной экспрессией (например, избыточной экспрессией, недостаточной экспрессией, отсутствием экспрессии и т.д.) TrkB. Типичные диагностические анализы для TrkB могут включать, например, контактирование образца, полученного от пациента, с анти-TrkB антителом по изобретению, где анти-TrkB антитело мечено детектируемой меткой или репортерной молекулой. Альтернативно, немеченое анти-TrkB антитело может быть использовано в диагностических целях в сочетании со вторичным антителом, которое само детектируемо мечено. Детектируемая метка или репортерная молекула может быть радиоизотопом, таким как H, C, P, S или I; флуоресцентным или хемилюминесцентным фрагментом, таким как флуоресцеинизотиоцианат или родамин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Конкретные типичные анализы, которые можно использовать для обнаружения или измерения TrkB в образце, включают иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA) и сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS).

Образцы, которые можно использовать в диагностических анализах TrkB в соответствии с настоящим изобретением, включают любой образец ткани или жидкости, полученный от пациента, который содержит определяемые количества белка TrkB или его фрагментов в нормальных или патологических условиях. Обычно уровни TrkB в конкретном образце, полученном от здорового пациента (например, пациента, не страдающего заболеванием или состоянием, связанным с аномальными уровнями или активностью TrkB), будут измеряться для первоначального установления базового или стандартного уровня TrkB. Затем этот базовый уровень TrkB можно сравнить с уровнями TrkB, измеренными в образцах, полученных от лиц, подозреваемых на наличие заболевания или состояния, связанного с TrkB.

### Примеры

Следующие примеры приведены с целью предоставления специалистам в данной области полного раскрытия и описания того, как изготавливать и использовать способы и композиции по изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что изобретатели считают своим изобретением. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении используемых параметров (например, количествам, температуре и т.д.), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части представляют собой части по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура приведена в градусах Цельсия, комнатная температура составляет около 25°C, а давление равно атмосферному или близко к нему.

Пример 1. Получение антител человека к TrkB.

Антитела человека к TrkB генерировали у мыши, содержащей ДНК, кодирующую вариабельные области тяжелой и каппа-легкой цепи легкой иммуноглобулина человека. В одном из вариантов осуществления, антитела человека генерировали у мышей VELOCIMMUNE®. В одном из вариантов осуществления, мышей VelocImmune® (VI) иммунизировали TrkB(ecto)mFc человека (SEQ ID NO: 77). В одном из вариантов осуществления, мышей VelocImmune® (VI) иммунизировали TrkB(ecto)mFc мыши (SEQ ID NO: 80). Иммунный ответ антител контролировали посредством TrkB-специфичного иммуноанализа. Например, сыворотки анализировали на титры специфичных антител к очищенному полноразмерному TrkB. Антителопродуцирующие клоны выделяли с использованием технологии В-клеточного сортирования (BST) и гибридных методов. Например, когда был достигнут желаемый иммунный ответ, спленоциты собирали и сливали с клетками миеломы мыши с сохранением их жизнеспособности и формированием линии гибридных клеток. Линии гибридных клеток подвергали скринингу и отбирали для идентификации линий клеток, которые продуцируют TrkB-специфичные антитела. Определенные антитела против мышинового TrkB получали таким образом и обозначали M2aM14173N, M2aM14178N и M2aM14179N.

Ан-TrkB антитела также выделяли непосредственно из антиген-положительных В-клеток мыши без слияния с клетками миеломы, как описано в патенте США 7582298, который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки. Используя этот способ, было получено несколько полностью человеческих анти-TrkB антител (то есть антител, содержащих человеческие вариабельные домены и человеческие константные домены); типичные антитела, полученные таким образом, обозначали как H4N9780P, H4N9814P и H4N9816P2.

Биологические свойства приведенных в качестве примера антител, полученных в соответствии со способами этого примера, подробно описаны в изложенных ниже примерах.

Пример 2. Аминокислотные последовательности и нуклеотидные последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепей.

В табл. 1a приведены идентификаторы аминокислотной последовательности вариабельных областей тяжелой и легкой цепи и CDR выбранных анти-TrkB антител по изобретению. В табл. 1b приведены идентификаторы аминокислотной последовательности для полноразмерных тяжелых и легких цепей вы-

бранных анти-TrkB антител по изобретению. Соответствующие идентификаторы последовательности нуклеиновой кислоты для выбранных анти-TrkB антител по изобретению приведены в табл. 2.

Таблица 1a

Идентификаторы аминокислотных последовательностей										
Обозначение антитела	HC VR	HC DR1	HCD R2	HCD R3	LCV R	LCD R1	LCD R2	LCD R3	mIg G2a	Константная область легкой цепи
H4H9780P	2	4	6	8	10	12	14	16		
H4H9814P	18	20	22	24	26	28	30	32		
H4H9816P2	34	36	38	40	42	44	46	48		
M2aM1417 3N	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58
M2aM1417 8N	59	60	61	62	63	64	65	66	57	67
M2aM1417 9N	68	69	70	71	72	73	74	75	57	58

Таблица 1b

Обозначение антитела	Полноразмерная тяжелая цепь	Полноразмерная легкая цепь
H4H9780P	99	100
H4H9814P	101	102
H4H9816P2	103	104

Таблица 2

Идентификаторы последовательности нуклеиновых кислот								
Обозначение антитела	VH	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	VK	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
H4H9780P	1	3	5	7	9	11	13	15
H4H9814P	17	19	21	23	25	27	29	31
H4H9816P2	33	35	37	39	41	43	45	47

Антитела обычно обозначаются в настоящем документе в соответствии со следующей номенклатурой: префикс Fc (например, "H4H", "H2M" и т.д.), за которым следует числовой идентификатор (например, "9780", "9816" и т.д., как показано в табл. 1 или 2), за которым следует суффикс "P", "P2" или "N". Префикс H4H при обозначении антител указывает на конкретный изотип Fc-области антитела. Таким образом, в соответствии с этой номенклатурой, антитело может обозначаться в настоящем документе, например, как "H4H9780P", которое указывает на Fc-область IgG4 человека, а M2aM14179N, например, указывает на Fc-область IgG2a мыши. Варибельные области являются полностью человеческими, если они обозначены первым "H" в обозначении антитела. Префикс "M" обозначает варибельную область мыши. Как будет понятно специалисту в данной области, антитело, имеющее определенный изотип Fc, может быть превращено в антитело с другим изотипом Fc (например, антитело с Fc IgG1 мыши может быть превращено в антитело с IgG4 человека и т.д.), но в любом случае варибельные домены (включая CDR), которые обозначены числовыми идентификаторами, показанными в табл. 1 или 2, останутся прежними, и ожидается, что свойства связывания с антигеном будут идентичны или практически одинаковы независимо от природы Fc-домена.

Пример 3. Кинетика связывания моноклональных антител против TrkB, связывающихся с различными реагентами TrkB, измеренная с использованием системы Biacore при 25°C и 37°C.

Равновесные константы диссоциации (значения  $K_D$ ) для TrkB-связывания с очищенными монокло-

нальными анти-TrkB антителами определяли с использованием биосенсора, работающего на эффекте поверхностного плазмонного резонанса в реальном времени с использованием прибора Biacore 4000. Все исследования связывания проводили в 10 mM Hepes pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА и 0,05% об./об. ПАВ Tween-20 (рабочий буфер HBS-ET) при 25°C и 37°C. Поверхность сенсора Biacore сначала дериватизировали путем аминного связывания с F(ab')<sub>2</sub>-фрагментом козьего античеловеческого специфичного к Fc поликлонального антитела (Jackson ImmunoResearch Laboratories, # 109-006-098) или кроличьим поликлональным антителом к Fc мыши (GE Healthcare # BR-1008-38) для захвата моноклональных анти-TrkB антител. Исследования связывания проводили на следующих реагентах TrkB; внеклеточный домен TrkB человека, экспрессируемый C-терминальной мус-мус-гексагистидиновой меткой (hTRKB.mmH; SEQ ID NO: 76; номер доступа NP\_001018074.1), внеклеточный домен TrkB мыши, экспрессируемый C-терминальной мус-мус-гексагистидиновой меткой (mTRKB.mmH; SEQ ID NO: 79; номер доступа NP\_001020245), внеклеточный домен TrkB крысы, экспрессируемый C-терминальной мус-мус-гексагистидиновой меткой (rTRKB.mmH; SEQ ID NO: 84; номер доступа NP\_036863.1), и внеклеточный домен TrkB человека, экспрессируемый C-концевой Fc-меткой IgG2a мыши (hTrkB-mFc; SEQ ID NO: 77; номер доступа NP\_001018074.1). Различные концентрации TrkB реагентов сначала подготавливали в рабочем буфере HBS-ET (100 nM - 1,23 nM; 3-кратное серийное разведение) и инъецировали на поверхность захваченного антителом к Fc-фрагменту человека моноклонального анти-TrkB антитела, в течение 4 мин при скорости потока 30 мкл/мин, в то время как диссоциацию реагента TrkB, связанного с моноклональным антителом, контролировали в течение 10 мин в рабочем буфере FfflS-ET. Константы скорости кинетической ассоциации (k<sub>a</sub>) и диссоциации (k<sub>d</sub>) определяли путем аппроксимации сенсограмм связывания в реальном времени с моделью связывания 1:1 с ограничением массопереноса посредством программного обеспечения для обработки кривых Scrubber 2.0c. Равновесные константы связывания при диссоциации (K<sub>D</sub>) и периоды полувыведения при диссоциации (t<sup>1/2</sup>) вычисляли из констант кинетической скорости следующим образом:

$$K_D (M) = \frac{k_d}{k_a} \text{ и } t^{1/2} (\text{мин}) = 60 * k_d$$

Кинетические параметры связывания hTrkB.mmH, mTrkB.mmH, rTrkB.mmH или hTrkB-mFc с различными моноклональными анти-TrkB антителами по изобретению при 25°C и 37°C показаны в табл. 3-10.

Краткое изложение результатов:

При 25°C моноклональные анти-TrkB антитела связывались с hTrkB.mmH со значениями K<sub>D</sub> в диапазоне от 545 до 41,3 nM, как показано в табл. 3. При 37°C моноклональные антитела связывались с hTrkB.mmH со значениями K<sub>D</sub> в диапазоне от 2,28 до 135 nM, как показано в табл. 4.

При 25°C, моноклональные анти-TrkB антитела связывались с hTrkB-mFc со значениями K<sub>D</sub> в диапазоне от 31,1 мкМ до 4,48 nM, как показано в табл. 5. При 37°C, моноклональные анти-TrkB антитела связывались с hTrkB-mFc со значениями K<sub>D</sub> в диапазоне от 73,3 пМ до 3,46 nM, как показано в табл. 6.

При 25°C, моноклональное анти-TrkB антитело сравнения, обозначенное в настоящем документе как H1M8037C (см. US2010/0196390, антитело, обозначенное как C2; см. также аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 97 и 98 для тяжелой и легкой цепи сравнения соответственно), связывалось с mTrkB.mmH со значением K<sub>D</sub> 40,8 nM, как показано в табл. 7. Анти-TrkB антитела по изобретению не связывались с mTrkB.mmH при 25°C, как показано в табл. 7. При 37°C, моноклональное анти-TrkB антитело сравнения связывалось с mTrkB.mmH со значением K<sub>D</sub> 94,1 nM, как показано в табл. 8. Анти-TrkB антитела по изобретению не связывались с mTrkB.mmH при 37°C, как показано в табл. 8.

При 25°C, моноклональное анти-TrkB антитело сравнения связывалось с rTrkB.mmH со значением K<sub>D</sub> 31,8 nM, как показано в табл. 9. Анти-TrkB антитела по изобретению не связывались с rTrkB.mmH при 25°C, как показано в табл. 9. При 37°C, моноклональное анти-TrkB антитело сравнения связывалось с rTrkB.mmH со значением K<sub>D</sub> 87,5 nM, как показано в табл. 10. Анти-TrkB антитела по изобретению не связывались с rTrkB.mmH при 37°C, как показано в табл. 10.

Таблица 3

Кинетические параметры связывания hTrkB.mmH с моноклональными анти-TrkB антителами при 25°C.

Захваченный аналит	Количество захваченного аналита (RU)	100 нМ hTrkB.mmH связывание (RU)	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)	$t_{1/2}$ (мин)
H4H9780P	116 ± 2,8	20	4,00E+04	8,67E-04	2,17E-08	13
H4H9814P	93 ± 2,1	63	1,26E+06	6,86E-04	5,45E-10	17
H4H9816P2	138 ± 1,5	30	6,14E+04	8,45E-04	1,38E-08	14
H1M8037C* антитело сравнения	757	23	4,65E+04	1,92E-03	4,13E-08	6

\*указывает, что mAb было захвачено с использованием поверхности с иммобилизованными анти-mFc антителами

Таблица 4

Кинетические параметры связывания hTrkB.mmH с моноклональными анти-TrkB антителами при 37°C.

Захваченный аналит	Количество захваченного аналита (RU)	100нМ hTrkB.mmH связь (RU)	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)	$t_{1/2}$ (мин)
H4H9780P	64 ± 1,9	14	5,71E+04	3,64E-03	6,38E-08	3,2
H4H9814P	52 ± 1,2	32	2,05E+06	4,68E-03	2,28E-09	2,5
H4H9816P2	80 ± 2,3	12	5,28E+04	3,74E-03	7,08E-08	3,1
H1M8037C* антитело сравнения	815,11	28	6,13E+04	8,31E-03	1,35E-07	1,4

\*указывает, что mAb было захвачено с использованием поверхности с иммобилизованными анти-mFc антителами

Таблица 5

Кинетические параметры связывания hTrkB-mFc с моноклональными анти-TrkB антителами при 25°C.

Захваченный аналит	Количество захваченного аналита (RU)	100нМ hTrkB-mFc связь (RU)	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)	$t_{1/2}$ (мин)
H4N9780P	105 ± 1,6	14	3,74E+04	1,68E-04	4,48E-09	69
H4N9814P	83 ± 1,3	69	1,91E+06	5,95E-05	3,11E-11	194
H4N9816P2	131 ± 1	25	6,52E+04	7,98E-05	1,22E-09	145
H1M8037C* антитело сравнения	753	41	8,80E+04	9,55E-05	1,09E-09	121

\*указывает, что mAb было захвачено с использованием поверхности с иммобилизованными анти-mFc антителами

Таблица 6

Кинетические параметры связывания hTrkB.mFc с моноклональными анти-TrkB антителами при 37°C.

Захваченный аналит	Количество захваченного аналита (RU)	100нМ hTrkB-mFc связь (RU)	$k_a$ (1/ Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)	$t_{1/2}$ (мин)
H4N9780P	56 ± 1	14	6,65E+04	2,22E-04	3,33E-09	52
H4N9814P	46 ± 1	42	2,83E+06	2,08E-04	7,33E-11	56
H4N9816P2	71 ± 1,4	14	6,95E+04	2,40E-04	3,46E-09	48
H1M8037C* антитело сравнения	814,46	58	2,35E+05	2,92E-04	1,24E-09	40

\*указывает, что mAb было захвачено с использованием поверхности с иммобилизованными анти-mFc антителами

Таблица 7

Кинетические параметры связывания mTrkB.mmH с моноклональными анти-TrkB антителами при 25°C.

Захваченный анализ	Количество захваченного анализа (RU)	100нМ mTrkB.mmH связь (RU)	$k_a$ (1/ Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)	$t_{1/2}$ (мин)
H4H9780P	111 ± 0,7	-1	NB	NB	NB	NB
H4H9814P	88 ± 0,7	-2	NB	NB	NB	NB
H4H9816P2	135 ± 0,6	0	NB	NB	NB	NB
H1M8037C* антитело сравнения	755	26	4,12E+04	1,68E-03	4,08E-08	7

\*указывает, что mAb было захвачено с использованием поверхности с иммобилизованными анти-mFc антителами

Таблица 8

Кинетические параметры связывания mTrkB.mmH с моноклональными анти-TrkB антителами при 37°C.

Захваченный анализ	Количество захваченного анализа (RU)	100нМ mTrkBmmH связь (RU)	$k_a$ (1/ Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)	$t_{1/2}$ (мин)
H4H9780P	60 ± 0,7	1	NB	NB	NB	NB
H4H9814P	49 ± 0,6	0	NB	NB	NB	NB
H4H9816P2	75 ± 0,9	0	NB	NB	NB	NB
H1M8037C* антитело сравнения	815,95	31	7,40E+04	6,96E-03	9,41E-08	1,7

\*указывает, что mAb было захвачено с использованием поверхности с иммобилизованными анти-mFc антителами

Таблица 9

Кинетические параметры связывания гTrkB.mmH с моноклональными анти-TrkB антителами при 25°C.

Захваченный аналит	Количество захваченного аналита (RU)	100нМ гTrkB.mmH связь (RU)	$k_a(1/Ms)$	$k_d(1/s)$	$K_D(M)$	$t_{1/2}(мин)$
H4H9780P	108 ± 0,7	-1	NB	NB	NB	NB
H4H9814P	86 ± 0,4	-1	NB	NB	NB	NB
H4H9816P2	134 ± 0,3	0	NB	NB	NB	NB
H1M8037C* антитело сравнения	756	26	5,16E+04	1,60E-03	3,10E-08	7

\*указывает, что mAb было захвачено с использованием поверхности с иммобилизованными анти-mFc антителами

Таблица 10

Кинетические параметры связывания гTrkB.mmH с моноклональными анти-TrkB антителами при 37°C.

Захваченный аналит	Количество захваченного аналита (RU)	100нМ гTrkB.mmH связь (RU)	$k_a(1/Ms)$	$k_d(1/s)$	$K_D(M)$	$t_{1/2}(мин)$
H4H9780P	59 ± 0,2	0	NB	NB	NB	NB
H4H9814P	48 ± 0,5	-1	NB	NB	NB	NB
H4H9816P2	74 ± 0,6	0	NB	NB	NB	NB
H1M8037C* антитело сравнения	815,45	32	7,93E+04	6,94E-03	8,75E-08	1,7

\*указывает, что mAb было захвачено с использованием поверхности с иммобилизованными анти-mFc антителами

Пример 4. Определяемая посредством системы Biacore кинетика связывания суррогатных моноклональных анти-TrkB антител с различными реагентами TrkB, измеренная при 25°C.

Равновесные константы диссоциации (значения  $K_D$ ) для TrkB-связывания с очищенными моноклональными анти-TrkB антителами определяли с использованием биосенсора, работающего на эффекте поверхностного плазмонного резонанса в реальном времени с использованием прибора Biacore T200. Все исследования связывания проводили в 10 мМ HEPES при pH 7,4, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА и 0,05% об./об. ПАВ Tween-20 (рабочий буфер HBS-ET) при 25°C. Поверхность сенсора Biacore сначала дериватизировали путем аминного связывания с кроличьим поликлональным антителом против Fc мыши (GE Healthcare # BR-1008-38) для захвата моноклональных анти-TrkB антител. Исследования связывания проводили на следующих реагентах TrkB; внеклеточный домен TrkB человека, экспрессируемый C-терминальной мус-мус-гексагистидиновой меткой (hTrkB.mmH; SEQ ID NO: 76; NP\_001018074.1), внеклеточный домен TrkB мыши, экспрессируемый C-терминальной мус-мус-гексагистидиновой меткой (mTRKB.mmH; SEQ ID NO: 79; NP\_001020245) и внеклеточный домен TrkB крысы, экспрессированный C-терминальной мус-мус-гексагистидиновой меткой (gTRKB.mmH; SEQ ID NO: 84; XP\_002721319.1). Различные концентрации TrkB реагентов сначала подготавливали в рабочем буфере HBS-ET (90 нМ - 3,33 нМ; 3-кратное серийное разведение) и инъецировали на поверхность захваченного антителом к Fc-фрагменту мыши моноклонального анти-TrkB антитела, в течение 4 мин при скорости потока 50 мкл/мин, в то время как диссоциацию реагента TrkB, связанного с моноклональным антителом, контролировали в течение 10 мин в рабочем буфере HBS-ET. Константы скорости кинетической ассоциации ( $k_a$ ) и диссо-

циации ( $k_d$ ) определяли путем аппроксимации сенсограмм связывания в реальном времени с моделью связывания 1:1 с ограничением массопереноса посредством программного обеспечения для обработки кривых Scrubber 2.0 c. Равновесные константы связывания при диссоциации ( $K_D$ ) и периоды полувыведения при диссоциации ( $t_{1/2}$ ) вычисляли из констант кинетической скорости следующим образом:

$$K_D (M) = \frac{kd}{ka}, \text{ и } t_{1/2} (\text{мин}) = \frac{\ln(2)}{60 * kd}$$

Кинетические параметры связывания hTrkB.mmH, mTrkB.mmH или rTrkB.mmH с различными моноклональными анти-TrkB антителами по изобретению при 25°C показаны в табл. 11-13.

Результаты:

При 25°C суррогатные моноклональные анти-TrkB антитела по изобретению не показывают связывание с hTrkB.mmH, как показано в табл. 11.

При 25°C суррогатные моноклональные анти-TrkB антитела по изобретению связывались с mTrkB.mmH со значениями  $K_D$  в диапазоне от 2,39 нМ до 32,4 нМ, как показано в табл. 12.

При 25°C суррогатные моноклональные анти-TrkB антитела по изобретению связывались с rTrkB.mmH со значениями  $K_D$  в диапазоне от 2,56 нМ до 26,9 нМ, как показано в табл. 13.

Таблица 11

Кинетические параметры связывания hTrkB.mmH с моноклональными анти-TrkB антителами при 25°C.

Захваченный аналит	Количество захваченного аналита (RU)	90нМ hTrkB.mmH связь (RU)	$k_a(1/Ms)$	$k_d(1/s)$	$K_D(M)$	$t_{1/2}(\text{мин})$
M2aM14173N	230 ± 0,8	0	NB	NB	NB	NB
M2aM14178N	125 ± 0,1	-1	NB	NB	NB	NB
M2aM14179N	396 ± 2,1	-2	NB	NB	NB	NB

Таблица 12

Кинетические параметры связывания mTrkB.mmH с моноклональными анти-TrkB антителами при 25°C.

Захваченный аналит	Количество захваченного аналита (RU)	90нМ mTrkB.mH связь (RU)	$k_a(1/Ms)$	$k_d(1/s)$	$K_D(M)$	$t_{1/2}(\text{мин})$
M2aM14173N	236 ± 1,1	33	7,41E+04	6,30E-04	8,49E-09	18
M2aM14178N	126 ± 0,3	12	1,03E+05	2,47E-04	2,39E-09	47
M2aM14179N	416 ± 4,3	32	1,15E+05	3,72E-03	3,24E-08	3,1



Кинетические параметры связывания rTrkB.mnH с моноклональными анти-TrkB антителами при 25°C

Захваченный анализ	Количество захваченного анализа (RU)	90нМ rTrkB.mnH связь (RU)	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)	$t_{1/2}$ (мин)
M2aM14173 N	233 ± 0,7	33	7,90E+04	6,32E-04	8,00E-09	18
M2aM14178 N	125 ± 0,3	11	9,00E+04	2,30E-04	2,56E-09	50
M2aM14179 N	404 ± 2,5	33	1,48E+05	3,98E-03	2,69E-08	2,9
N						

Пример 5. Биоанализ с клетками HEK293/SRE-luc/hTrkB и HEK293/SRE-luc/mTrkB(Ecto)-hTrkB (TM-Cyto).

Был разработан биоанализ для детекции активации TrkB с использованием репортерного гена люциферазы под контролем элемента, ответственного за индукцию гена в ответ на сыровотку (SRE) и лиганда, нейротрофического фактора из тканей мозга (BDNF, R & D Systems). Были получены клеточные линии HEK293, которые стабильно экспрессируют люциферазный репортер (SRE-элемент ответственного люцифераза, SRE-люцифераза, SA Bioscience, # CLS-010L) с внеклеточным доменом либо TrkB человека (hTrkB, аминокислоты 32-429 NP\_001018074.1 или под номером базы данных Uniprot Q16620-1), либо TrkB мыши, слитый с трансмембранным и цитоплазматическим доменами TrkB человека (mTrkB, аминокислоты 32-429 NP\_001020245.1 или под номером базы данных Uniprot P15209-1, слитый с hTrkB, аминокислоты 431-822). Стабильные клеточные линии HEK293/SRE-Luc/hTrkB и HEK293/SRE-Luc/mTrkB содержали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM) с добавлением 10% ФБС, заменимых аминокислот, пенициллина/стрептомицина/глутамин, 1 мкг/мл пурамицина и 500 мкг/мл G418.

Для проведения биоанализа клетки высевали в 96-луночные налитические планшеты при концентрации 20000 клеток/луночку в среде Opti-MEM™ с добавлением 0,1% ФБС(FBS), пенициллина/стрептомицина и L-глутамин, а затем инкубировали при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> в течение ночи. На следующее утро нейротрофический фактор головного мозга человека (BDNF) или антитела последовательно разбавляли со 100 нМ до 0,002 нМ (плюс образец, содержащий только буфер без лиганда) и добавляли к клеткам для определения активации сигнального пути TrkB. Последовательно разбавленные антитела также исследовали в присутствии 100 пМ BDNF (R & D Systems, 248-BD/CF). Потом клетки инкубировали в течение 5,5 ч при 37°C в присутствии 5% CO<sub>2</sub>. Активность люциферазы измеряли после добавления реагента OneGlo (Promega) посредством прибора Victor X (Perkin Elmer). Результаты анализировали с использованием нелинейной регрессии (четырёхпараметрическая логистика) с помощью программного обеспечения Prism 5 (GraphPad) для получения значений EC<sub>50</sub> и IC<sub>50</sub>. Максимальную активацию антител определяли с использованием следующего уравнения:

$$\text{Макс. активация \%} = \frac{(\text{Максимальная интенсивность сигнала люминесценции (RLU), достигаемая антителом}) - (\text{Интенсивность сигнала люминесценции (RLU), достигаемая без BDNF})}{(\text{Максимальная интенсивность сигнала люминесценции (RLU), достигаемая BDNF}) - (\text{Интенсивность сигнала люминесценции (RLU), достигаемая без BDNF})} \times 100$$

Краткое изложение результатов и выводы:

Как показано в табл. 14, три анти-TrkB антитела по изобретению H4H9816P2, H4H9814P, H4H9780P показали активацию сигнального пути TrkB человека в клетках HEK293/SRE-luc/hTrkB без BDNF со значением EC<sub>50</sub> 35-82 пМ с максимальной активацией в диапазоне 88-92%. Три антитела по изобретению также исследовали в присутствии 100 пМ BDNF. Тогда как 100 пМ BDNF продемонстрировали активацию, составляющую 56%, в присутствии нерелевантного контрольного mAb, контрольного mAb2, антитела по изобретению показали большую активацию со значением EC<sub>50</sub> 45-76 пМ с максимальной активацией в диапазоне 77-80%. Три анти-TrkB-антитела по настоящему изобретению не показали активацию

передачи сигналов TrkB мыши в клетках HEK293/SRE-luc/mTrkB в отсутствии BDNF или в присутствии 100 пМ BDNF. Контрольное mAb1, анти-TrkB антитело сравнения H1M8037C, показало активацию передачи сигналов TrkB человека с  $EC_{50}$  76 пМ с максимальной активацией 78% и TrkB мыши с  $EC_{50}$  43 пМ с максимальной активацией 85% без BDNF. В присутствии 100 пМ BDNF, контрольное mAb 1 активировало передачу сигналов TrkB человека с  $EC_{50}$  110 пМ с максимальной активацией 79% и TrkB мыши с  $EC_{50}$  42 пМ с максимальной активацией 69%, что больше, чем активация контрольным mAb 2 с 100 пМ BDNF. Контрольное mAb 2, нерелевантное человеческое антитело IgG4, не показало никакой активации в отсутствии или в присутствии 100 пМ BDNF.

Как показано в табл. 15, три анти-TrkB антитела по изобретению, M2aM14173N, M2aM14178N, M2aM14179N, показали активацию сигнального пути TrkB мыши в клетках HEK293/SRE-luc/mTrkB в отсутствии BDNF с  $EC_{50}$  от 34 до 190 пМ с максимальной активацией в диапазоне от 76 до 94%. Три антитела по изобретению также исследовали в присутствии 100 пМ BDNF. Тогда как 100 пМ BDNF показывали активацию 60% в присутствии нерелевантного изотипического контрольного mAb, контрольного mAb4, антитела по изобретению демонстрировали большую активацию с  $EC_{50}$  17-100 пМ с максимальной активацией в диапазоне 67-75%. Три анти-TrkB антитела по изобретению не показали активацию сигнального пути TrkB человека в клетках HEK293/SRE-luc/hTrkB в отсутствии BDNF или в присутствии 100 пМ BDNF. Контрольное mAb 1 показало активацию сигнального пути TrkB человека с  $EC_{50}$  57 пМ с максимальной активацией 80% и TrkB мыши с  $EC_{50}$  43 пМ с максимальной активацией 85% без BDNF. В присутствии 100 пМ BDNF, контрольное mAb 1 активировало сигнальный путь TrkB человека с  $EC_{50}$  110 пМ с максимальной активацией 79% и TrkB мыши с  $EC_{50}$  42 пМ с максимальной активацией 69%, что больше, чем активация контрольного mAb 4 с 100 пМ BDNF. Контрольное mAb 3 и контрольное mAb 4, нерелевантные мышинные IgG2a антитела изотипического контроля, не показали какую-либо активацию в отсутствии или в присутствии 100 пМ BDNF.

Сводная таблица данных:

Таблица 14

Активация клеток HEK293/SRE-Luc/hTrkB и HEK293/SRE-Luc/mTrkB  
анти-TrkB антителами

Клетки	HEK293/SRE-luc/hTrkB				HEK293/SRE-luc/mTrkB			
BDNF	1,0E-10				7,4E-11			
Лиганд	Отсутствие BDNF		100пМ BDNF		Отсутствие BDNF		100пМ BDNF	
Антитело	EC50 (M)	Активация (%)	EC50 (M)	Активация (%)	EC50 (M)	Активация (%)	EC50 (M)	Активация (%)
H4H9780P	8,2E-11	88	7,6E-11	77	Отсутствие активации	0	Отсутствие активации	55
H4H9814P	3,5E-11	92	4,9E-11	80	Отсутствие активации	0	Отсутствие активации	54
H4H9816P2	6,3E-11	90	4,5E-11	78	Отсутствие активации	0	Отсутствие активации	58
Контрольное mAb 1 (H1M8037C антитело сравнения)	7,6E-11	78	1,1E-10	79	4,3E-11	85	4,2E-11	69
Отрицательный изотипический контроль mAb 2	Отсутствие активации	3	Отсутствие активации	56	Отсутствие активации	0	Отсутствие активации	54

Таблица 15

Активация клеток HEK293/SRE-Luc/hTrkB и HEK293/SRE-Luc/mTrkB  
анти-TrkB антителами (имитатор)

Клетки	HEK293/SRE-luc/hTrkB				HEK293/SRE-luc/mTrkB			
BDNF	1,3E-10		1,0E-10		7,4E-11		1,1E-10	
Лиганд	Отсутствие BDNF		100пМ BDNF		Отсутствие BDNF		100пМ BDNF	
Антитело	EC50 (M)	Активация (%)	EC50 (M)	Активация (%)	EC50 (M)	Активация (%)	EC50 (M)	Активация (%)

		(%)		(%)		(%)		(%)
M2aM14173N	Отсутс твие актива ции	2	Отсутст вие активац ии	59	3,6E- 11	94	1,7E-11	74
M2aM14178N	Отсутс твие актива ции	0	Отсутст вие активац ии	52	1,9E- 10	76	1,0E-10	67
M2aM14179N	Отсутс твие актива ции	4	Отсутст вие активац ии	52	3,4E- 11	87	2,1E-11	75
Контрольное mAb 1 (H1M8037C антитело сравнения)	5,7E- 11	80	1,1E-10	79	4,3E- 11	85	4,2E-11	69
Отрицательны й изотипически й контроль mAb 3	Отсутс твие актива ции	0	Не исследо ваны	Не исследо ваны	Не иссле дован ы	Не исследо ваны	Не исследо ваны	Не исследо ваны
Отрицательны й изотипически й контроль mAb 4	Не исследо ваны	Не иссле дован ы	Отсутст вие активац ии	61	Отсу тстви е актив ации	0	Отсутст вие активац ии	60

Пример 6. Сравнение *in vivo* действия антител-агонистов TrkB H4H9816P2 и IgG4 изотипического контроля REGN1945 на фосфорилирование TrkB в головном мозге после стереотаксической инъекции TrkB<sup>hu/hu</sup> мышам.

Для определения влияния антитела-агониста TrkB по изобретению, H4H9816P2, на кинетику активации TrkB, осуществляли кинетический анализ фосфорилирования TrkB, после прямой инъекции в гиппокамп, у мышей гомозиготных по рецептору TrkB человека, а не рецептора TrkB мыши (называемые TrkB<sup>hu/hu</sup> мышами). TrkB<sup>hu/hu</sup> мыши (N=48) получали двусторонние стереотаксические инъекции либо 2 мкл носителя (ФСБ), либо REGN1945, обозначаемые в настоящем документе как IgG4-антитела изотипического контроля (конечная концентрация 27,5 мг/мл), или антител-агонистов TrkB H4H9816P2 (конечная концентрация 27,5 мг/мл) в гиппокамп -2 мм сзади и +1,5 мм латерально от брегмы. Для минимизации повреждения ткани, инъекции и удаление иглы выполняли постепенно с 5-минутными интервалами. Затем мышам TrkB<sup>hu/hu</sup> умерщвляли путем эвтаназии с использованием CO<sub>2</sub> приблизительно через 30 мин, 1 ч, 4 ч или 18 ч после инъекции. Терминальное кровотоечение осуществляли посредством пункции сердца для сбора крови, и потом мышам транскардиально перфузировали холодным гепаринизированным физиологическим раствором. Головной мозг осторожно удаляли из черепа, и часть окружающей место инъекции ткани размером 2 мм иссекали, собирали в пробирку фирмы "Eppendorf" и хранили на льду. Далее часть головного мозга лизировали в 300 мкл лизирующего буфера RIPA (ThermoFisher Scientific, Cat # 89901), содержащего ингибиторы 2× протеазы и фосфатазы (ThermoFisher Scientific, Cat #

78444), и хранили на льду. Затем лизированную ткань гомогенизировали для дальнейшей обработки, аликвотировали и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Для оценки фосфорилирования TrkB в ткани головного мозга, осуществляли иммунопреципитацию и вестерн-блоттинг. Антитело против TrkB человека H4N10108N, которое не конкурирует за связывание с H4N9816P2, связывали с NHS-активированными гранулами сефарозы, (приготовленными в соответствии с протоколом производителя; GE Healthcare, Cat # 17-0906), и трижды промывали фосфатно-солевым буфером Дюльбекко (DPBS) для удаления остатков консервирующего раствора. Гомогенизированные лизаты головного мозга размораживали на льду и разбавляли до концентрации 1 мг/мл (масса головного мозга к объему буфера) в буфере, состоящем из 1% NP-40, 0,1% Tween-20, ингибиторов протеазы и фосфатазы в TBST. Концентрацию белка в гомогенизированном лизате головного мозга определяли количественно посредством стандартного анализа содержания белка (BCA) в соответствии с инструкциями производителя (Thermo Scientific Pierce, Cat # 23225). Для каждых 100 мкг белка, к раствору лизата головного мозга добавляли 15 мкл NHS-активированных сефарозой гранул, связанных с антителами против TrkB человека (H4N10108N), и смесь инкубировали в течение ночи при  $4^{\circ}\text{C}$  с легким встряхиванием при 20 об/мин (ротатор Thermo). На следующий день образцы центрифугировали при  $1000\times g$  в течение одной минуты и затем супернатант осторожно удаляли. Потом гранулы дважды промывали 400 мкл ТРИС-буферизированным физиологическим раствором (Bio-Rad, Cat # 1706435) с 1% Tween-20 (Sigma Aldrich, Cat # P9416) (TBST). После тщательной аспирации промывочного буфера, к каждому образцу добавляли 60 мкл 0,1% трифторуксусной кислоты (TFA; Sigma-Aldrich, T62200) в воде при pH 3,0. Раствор перемешивали и оставляли на 2 мин, затем собирали и переносили в отдельную пробирку. Этот процесс повторяли в отношении другой 0,1% TFA объемом 60 мкл при pH 3,0. Далее два 0,1% раствора TFA для каждого образца объединяли и добавляли 2 мкл 1M Трис-HCl (ThermoFisher Scientific, Cat # 15567-027) при pH 8,5.

Раствор сушили с использованием быстрого вакуума, а затем повторно суспендировали и восстанавливали смесью 20 мкл  $1\times$  буфера Лэмли (Bio-Rad, Cat # 1610737) и 355 нМ 2-меркаптоэтанола (BME; Gibco, Cat # 21985-023). Образцы кипятили при  $95^{\circ}\text{C}$  в течение 10 мин и загружали в электрофорезную камеру с 10-луночным модулем, 4-15% трис-глициновым гелем Mini-Protean (Bio-Rad, Cat # 4561086). После электрофореза образцы белка переносили из трис-глицинового геля на ПВДФ мембрану (Bio-Rad, Cat # 170-4156) посредством системы Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, Cat # 1704156) в течение 30 мин с постоянной скоростью 1,3 А и 25 В. После переноса, мембрану блокировали 2,5%-ным молоком (Bio-Rad, Cat # 170-6406) в TBST в течение одного часа при комнатной температуре и затем исследовали в течение ночи либо с анти-фосфо-TrkB антителом (Novus, Cat # NB100-92656), разведенным 1:1000 в растворе 2,5% БСА, либо с первичным анти-TrkB антителом (Cell Signaling, Cat # 4603), разведенным до 1:1000 в 2,5% молоке в буфере TBST при  $4^{\circ}\text{C}$  на шейкере при 30 об/мин. На следующий день блоты промывали TBST и инкубировали с антителом IgG кролика, конъюгированным с пероксидазой хрена (Jackson, Cat # 111-035-144) при 1:1000 в 1% молоке в буфере TBST в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем блоты вновь промывали, проявляли в растворе ECL (PerkinElmer, Inc. Cat # RPN2106), и последующие снимки делали каждые 30 с.

Краткое изложение результатов и выводы:

Иммунопреципитация и последующее вестерн-блоттинг белка, полученного из лизатов головного мозга TrkB<sup>hu/hu</sup> мыши, продемонстрировали, что гиппокампальное фосфорилирование TrkB было обнаружено у мышей, которым инъецировали антитело-агонист TrkB, H4N9816P2, но не у мышей, получавших носитель или антитела изотипического контроля, как показано на фиг. 1. Среди множества вычисленных временных точек, фосфорилирование TrkB достигло пика через 4 ч после стереотаксической инъекции мышам, которым вводили H4N9816P2. Фосфорилирование TrkB было также обнаружено посредством вестерн-блоттинга через 18 ч после введения дозы у некоторых, но не у всех мышей. И наоборот, инъекция носителя и антител IgG4 изотипического контроля не вызывала фосфорилирования TrkB в любой момент времени. Вестерн-блоттинг также показал, что уровни общего рецептора TrkB были снижены у некоторых, но не у всех TrkB<sup>hu/hu</sup> мышей, которым вводили H4N9816P2 по сравнению с мышами, которым вводили носитель и изотипический контроль. Уровни общего TrkB, вероятно, слегка снижены у субъектов, получавших H4N9816P2, через 18 ч после введения дозы. Таким образом, эти результаты показывают, что прямая инъекция антитела-агониста TrkB, H4N9816P2, индуцирует фосфорилирование гиппокампальных рецепторов TrkB у TrkB<sup>hu/hu</sup> мышей.

Пример 7. Сравнение *in vivo* эффекта, оказываемого антителом H4N9816 и REGN1945 изотипического контроля в отношении массы организма и обмена веществ у TrkB<sup>hu/hu</sup> мышей.

Для определения действия антитела-агониста TrkB по изобретению, H4N9816P2, на массу и состав тканей организма, осуществляли метаболическое исследование экспрессии рецептора TrkB человека вместо рецептора TrkB мыши (TrkB<sup>hu/hu</sup> мышей) на гомозиготных мышах после однократной подкожной инъекции антителами. TrkB<sup>hu/hu</sup> мышей (самцы в возрасте 20 недель) сначала перемещали из групповой клетки в индивидуальные клетки для двухнедельной акклиматизации. После этого периода, мышей перемещали в метаболические клетки (CLAMS, Columbus Instruments) для оценки изменений в потребле-

нии корма и воды, двигательной активности, расходе калорий и дыхании после введения антител. Обычный порошкообразный корм хранили в напольной камере на пружинных весах (Mettler Toledo, PL602E) для измерения потребления корма посредством изменения общей массы корма. Вода была доступна через верхний клапан в клетке, и ее потребление измеряли путем отслеживания изменений объема в напорной линии (Oxymax®/CLAMS Liquid Unit). Метаболический аппарат клетки CLAMS измерял каждый из этих параметров в непрерывных 16-18 минутных интервалах на протяжении всего исследования. Метаболические данные анализировали в отдельных измерениях и сводили в 24-часовые интервалы, включающие один полный цикл темноты и света, с использованием программного обеспечения OXY-MAX®/CLAMS (Columbus instruments, v5.35). После привыкания к клеткам в течение двух недель, TrkB<sup>hu/hu</sup> мыши получали однократную подкожную дозу 50 мг/кг либо антитела-агониста TrkB, H4N9816P2, либо IgG4-антитела изотипического контроля в ФСБ при pH 7,2. Группа не получавших лечение контрольных TrkB<sup>hu/hu</sup> мышей не получала инъекцию. Мышей взвешивали непосредственно перед дозированием и через 24, 48, 72, 96 и 120 ч после введения дозы. Для определения состава тканей организма, каждой мышце с помощью анализатора EchoMRITM-500 (EchoMRI LLC) выполняли ядерно-магнитную резонансную релаксометрию, также называемую количественным магнитным резонансом. Перед дозировкой мышей помещали в прозрачный пластиковый холдер и вставляли в ЯМР-МРТ устройство для определения массы нежировых тканей каждого субъекта, массы жировой ткани и состояния гидратации. Измерения каждой мышцы осуществляли в течение 0,5-3,2 мин, и повторно осуществляли приблизительно через 120 ч после введения дозы.

Краткое изложение результатов и выводы:

Для определения того, вызывает ли однократная подкожная инъекция H4N9816P2 потерю массы у TrkB<sup>hu/hu</sup> мышей, осуществляли ежедневный контроль массы организма. До введения дозы, отсутствовали значительные различия в средней массе организма в трех группах лечения, причем каждая из них соответствовала средней массе организма до введения дозы 28,39-29,85 г (табл. 16). Однако через 48 ч после введения дозы, обработанные H4N9816P2 TrkB<sup>hu/hu</sup> мыши, потеряли в среднем 1,70 г, или 5,96% от массы организма до введения дозы. В то же время, у TrkB<sup>hu/hu</sup> мышей, не получавших лечение, и у TrkB<sup>hu/hu</sup> и мышей, обработанных антителами изотипического контроля, массы их организмов увеличивались на 1,79-2,37% от массы до введения дозы. TrkB<sup>hu/hu</sup> мыши, обработанные H4N9816P2, продолжали терять массу на протяжении всего курса исследования, и через 72 и 96 ч после введения дозы эти мыши теряли в среднем 8,42% и 11,80% от массы тела до введения дозы, соответственно. Через 120 ч после введения дозы, TrkB<sup>hu/hu</sup> мыши, обработанные H4N9816P2, теряли в среднем 12,67% от массы тела до введения дозы. В то же время, у не получавших лечение и обработанных изотипическим контролем TrkB<sup>hu/hu</sup> мышей не наблюдали потерю массы организма до введения дозы в течение всего исследования. Поскольку масса организма у TrkB<sup>hu/hu</sup> мышей, обработанных H4N9816P2, была значительно снижена по сравнению с не получавшими лечение и изотипический контроль через 48, 72, 96 и 120 ч после введения дозы, было установлено, что антитело-агонист TrkB H4N9816P2 вызывает значительную потерю массы организма у TrkB<sup>hu/hu</sup> мышей.

Таблица 16

Масса организма TrkB<sup>hu/hu</sup> мышей после введения дозы антитела-агониста TrkB H4H9816P2

Экспериментальная группа	Средняя масса организма до введения дозы (г) ( $\pm$ стандартное отклонение)	Средняя масса организма а (г) через 24 ч после введения дозы ( $\pm$ стандартное отклонение)	Средняя масса организма а (г) через 48 ч после введения дозы ( $\pm$ стандартное отклонение)	Средняя масса организма а (г) через 72 ч после введения дозы ( $\pm$ стандартное отклонение)	Средняя масса организма а (г) через 96 ч после введения дозы ( $\pm$ стандартное отклонение)	Средняя масса организма (г) через 120 ч после введения дозы ( $\pm$ стандартное отклонение)
	Процентное изменение массы организма до введения дозы (+/- SD)	Процентное изменение массы организма а до введения дозы (+/- SD)	Процентное изменение массы организма а до введения дозы (+/- SD)	Процентное изменение массы организма а до введения дозы (+/- SD)	Процентное изменение массы организма а до введения дозы (+/- SD)	Процентное изменение массы организма до введения дозы (+/- SD)
Не получающая лечение (n=3)	28,85 (+/- 0,81)	29,69 (+/- 0,97)	29,36 (+/- 1,10)	29,32 (+/- 1,29)	29,29 (+/- 1,10)	28,88 (+/- 1,04)
	N/A	+2,91% (+/- 0,62)	+1,79% (+/- 1,62)	+1,65% (+/- 2,24)	+1,54% (+/- 1,22)	+0,10% (+/- 1,05)
Изотипический контроль (n=4)	29,21 (+/- 2,68)	30,27 (+/- 2,51)	29,90 (+/- 2,63)	30,08 (+/- 2,69)	29,87 (+/- 2,52)	29,69 (+/- 2,68)
	N/A	+3,61% (+/- 1,68)	+2,37% (+/- 1,50)	+2,98% (+/- 1,09)	+2,25% (+/- 1,56)	+1,65% (+/- 0,81)
H4H9816P2 (n=4)	28,39 (+/- 1,35)	27,87 (+/- 1,29)	26,69 (+/- 0,87)	26,00* (+/- 0,98)	25,04** (+/- 1,03)	24,79** (+/- 1,36)
	N/A	- 1,83% (+/- 0,56)	- 5,96% (+/- 1,88)	- 8,42% (+/- 1,85)	- 11,80% (+/- 1,52)	- 12,67% (+/- 1,66)

Примечание: указана статистическая значимость, определяемая двухфакторным дисперсионным анализом (two-way ANOVA) с методом апостериорных множественных сравнений Тьюки (\*= $p < 0,05$ , \*\*= $p < 0,01$ , \*\*\*= $p < 0,001$ , \*\*\*\*= $p < 0,0001$ , по сравнению с группой изотипического контроля: TrkB<sup>hu/hu</sup> мыши, получавшие 50 мг/кг антитела изотипического контроля.

Влияние инъекции антитела-агониста TrkB H4H9816P2 на состав тканей организма также измеряли посредством ЯМР-МРТ для каждого субъекта до и после введения дозы. До введения дозы, в трех группах обработки TrkB<sup>hu/hu</sup> мышей не было выявлено каких-либо существенных различий в массе жировой

ткани или массе нежировой ткани, поскольку в каждой группе было в среднем 4,19-4,75 г массы жировой ткани и 21,32-21,70 г массы нежировой ткани (табл. 17). Однако после введения антител, TrkB<sup>hu/hu</sup> мыши, которым вводили H4N9816P2, потеряли в среднем 48,90% от общей массы жировой ткани организма в течение исследования (табл. 17). Не получавшие лечение и обработанные антителами изотипического контроля TrkB<sup>hu/hu</sup> мыши, теряли в среднем 8,49% и 9,48% от массы своей жировой ткани до введения дозы, соответственно, что было значительно меньше, чем у субъектов, получавших H4N9816P2 (табл. 17). Кроме того, TrkB<sup>hu/hu</sup> мыши, обработанные H4N9816P2, теряли в среднем 7,84% массы своей нежировой ткани в течение всего исследования, что было значительно больше, чем 2,41% и 1,75% средней массы нежировой ткани до введения дозы, потерянной в группах, не получавших лечение и обработанных антителами изотипического контроля соответственно (табл. 17). Таким образом, описанная потеря массы организма может быть объяснена значительной потерей массы жировой ткани и умеренной потерей массы нежировой ткани после инъекции антитела-агониста TrkB H4N9816P2 TrkB<sup>hu/hu</sup> мышам.

Таблица 17

Состав тканей организма TrkB<sup>hu/hu</sup> мышей после введения дозы антитела-агониста TrkB H4N9816P2

Экспериментальная группа	Средняя масса жировой ткани до введения дозы (%) (±стандартное отклонение)	Средняя масса жировой ткани (%) через 120 ч после введения дозы (±стандартное отклонение)	Изменение средней массы жировой ткани (%) через 120 ч после введения дозы (±стандартное отклонение)	Средняя масса нежировой ткани до введения дозы (%) (±стандартное отклонение)	Средняя масса нежировой ткани (%) через 120 ч после введения дозы (±стандартное отклонение)	Изменение средней массы нежировой ткани (%) через 120 ч после введения дозы (±стандартное отклонение)
Не получающая лечение (n=3)	4,65(+/- 0,32)	4,27(+/- 0,55)	-8,49(+/- 7,18)	21,45 (+/- 0,79)	20,94(+/- 0,98)	-2,41(+/- 1,81)
Изотипический контроль (n=4)	4,75(+/- 2,98)	4,40(+/- 2,98)	-9,48(+/- 6,00)	21,70(+/- 0,50)	21,32(+/- 0,35)	-1,75(+/- 0,98)
H4N9816P2 (n=4)	4,19(+/- 1,15)	2,14(+/- 0,64)	- 48,90**** (+/- 5,06)	21,32 (+/- 1,87)	19,64 (+/- 1,69)	-7,84****(+/- 0,94)

Примечание: указана статистическая значимость, определяемая однофакторным дисперсионным анализом Крускала-Уоллиса с методом апостериорных множественных сравнений Тьюки (\*=p<0,05, \*\*=p<0,01, \*\*\*=p<0,001, \*\*\*\*=p<0,0001, по сравнению с группой изотипического контроля: TrkB<sup>hu/hu</sup> мыши, получавшие 50 мг/кг антитела изотипического контроля).

В дополнение к оценке влияния инъекции антитела-агониста TrkB H4N9816P2 на массу и состав тканей организма у TrkB<sup>hu/hu</sup> мышей, метаболический аппарат клетки непрерывно измерял потребление корма, жидкости и двигательную активность. Перед дозированием, TrkB<sup>hu/hu</sup> мыши потребляли в среднем от 3,49 до 3,73 г корма в день. Однако в течение 24 ч после введения дозы, у TrkB<sup>hu/hu</sup> мышей, обработан-



ных Н4Н9816Р2, значительно снижалось потребление корма, до 2,20 г в день. Средний уровень потребления корма у TrkB<sup>hu/hu</sup> мышей, обработанных Н4Н9816Р2, не превышал 2,49 г в день в течение оставшейся части исследования, в то время как не получавшие лечение и обработанные антителами изотипического контроля TrkB<sup>hu/hu</sup> мыши постоянно потребляли в среднем 3,62-4,07 г корма в день (табл. 18).

Аналогично, отсутствовали какие-либо существенные различия в ежедневном потреблении воды между группами лечения до введения дозы. TrkB<sup>hu/hu</sup> мыши потребляли в среднем 4,67-5,55 мл воды в день в каждой группе лечения (табл. 19). После введения дозы, у TrkB<sup>hu/hu</sup> мышей, обработанных Н4Н9816Р2, снижалось потребление воды до 2,05-3,24 мл воды в день. Это было значительно ниже, чем у TrkB<sup>hu/hu</sup> мышей, которые постоянно потребляли 4,50-5,77 мл воды в день на протяжении всего исследования (табл. 19). Таким образом, инъекция антитела-агониста TrkB, Н4Н9816Р2, по-видимому, обеспечивала значительное снижение потребления корма и воды у TrkB<sup>hu/hu</sup> мышей по сравнению с не получавшими лечение мышами и мышами изотипического контроля.

Таблица 18

Потребление корма TrkB<sup>hu/hu</sup> мышами после введения дозы антитела-агониста TrkB Н4Н9816Р2

Экспериментальная группа	Среднее общее потребление корма (г) в период 0-24 ч до введения дозы (±стандартное отклонение)	Среднее общее потребление корма (г) в период 0-24 ч после введения дозы (±стандартное отклонение)	Среднее общее потребление корма (г) в период 24-48 ч после введения дозы (±стандартное отклонение)	Среднее общее потребление корма (г) в период 48-72 ч после введения дозы (±стандартное отклонение)	Среднее общее потребление корма (г) в период 72-96 ч после введения дозы (±стандартное отклонение)
Не получающая лечение (n=3)	3,51(+/- 0,53)	3,98(+/- 0,08)	3,76(+/- 0,19)	3,62(+/- 0,35)	3,91(+/- 0,18)
Изотипический контроль (n=4)	3,73(+/- 0,48)	4,07(+/- 0,23)	3,99(+/- 0,17)	3,89(+/- 0,22)	3,80(+/- 0,22)
Н4Н9816Р2 (n=4)	3,49(+/- 1,07)	2,20****(+/- 0,16)	2,08****(+/- 0,36)	2,18****(+/- 0,37)	2,49****(+/- 0,47)

Примечание: указана статистическая значимость, определяемая однофакторным дисперсионным анализом Крускала-Уоллиса с методом апостериорных множественных сравнений Тьюки (\*=p<0,05, \*\*=p<0,01, \*\*\*=p<0,001, \*\*\*\*=p<0,0001, по сравнению с группой изотипического контроля: TrkB<sup>hu/hu</sup> мыши, получавшие 50 мг/кг антитела изотипического контроля.

Потребление воды TrkB<sup>hu/hu</sup> мышами после введения дозы антитела-агониста TrkB H4N9816P2

Экспериментальная группа	Среднее общее потребление воды (мл) в период 0-24 ч до введения дозы (±стандартное отклонение)	Среднее общее потребление воды (мл) в период 0-24 ч после введения дозы (±стандартное отклонение)	Среднее общее потребление воды (мл) в период 24-48 ч после введения дозы (±стандартное отклонение)	Среднее общее потребление воды (мл) в период 48-72 ч после введения дозы (±стандартное отклонение)	Среднее общее потребление воды (мл) в период 72-96 ч после введения дозы (±стандартное отклонение)
Не получающая лечение (n=3)	4,79 (+/- 0,21)	5,42 (+/- 0,94)	4,96 (+/- 0,91)	4,57 (+/- 0,56)	4,88 (+/- 0,32)
Изотипический контроль (n=4)	5,55 (+/- 1,23)	4,50 (+/- 1,08)	5,08 (+/- 1,39)	5,09 (+/- 1,10)	5,77 (+/- 1,62)
H4N9816P2 (n=4)	4,67 (+/- 1,13)	2,25** (+/- 0,55)	3,24* (+/- 1,10)	2,05*** (+/- 0,29)	2,25**** (+/- 0,24)

Примечание: указана статистическая значимость, определяемая однофакторным дисперсионным анализом Крускала-Уоллиса с методом апостериорных множественных сравнений Тьюки (\*=p<0,05, \*\*=p<0,01, \*\*\*=p<0,001, \*\*\*\*=p<0,0001, по сравнению с группой изотипического контроля: TrkB<sup>hu/hu</sup> мыши, получавшие 50 мг/кг антитела изотипического контроля.

Для определения эффектов обработки антителами в отношении активности, двигательную активность анализировали с использованием программного обеспечения OXYMAX®/CLAMS (Columbus instruments, v5.35), которое непрерывно измеряло общее количество передвижений в x-плоскости для каждой мыши. Одна мышь демонстрировала гиперактивность до введения дозы и была исключена из статистического анализа после введения дозы. В то время как субъекты, не получавшие лечение и обработанные антителами изотипического контроля, постоянно регистрировали в среднем 11000-15000 передвижений в день в течение всего исследования, у TrkB<sup>hu/hu</sup> мышей, обработанных H4N9816P2, регистрировали 28260 передвижений между 24-48 часами после введения дозы и регистрировали 21193 и 27028 передвижений у субъектов от 48-72 и 72-96 ч после дозирования, соответственно (табл. 20). У TrkB<sup>hu/hu</sup> мышей, обработанных H4N9816P2, регистрировали большее суммарное количество передвижений в каждый момент времени после введения антитела, предполагая, что гиперактивность является дополнительным эффектом инъекции H4N9816P2. В сочетании эти эффекты позволяют предположить, что однократная подкожная инъекция антитела-агониста TrkB, H4N9816P2, вызывала значительные изменения в массе организма, составе тканей организма, метаболизме и двигательной активности у TrkB<sup>hu/hu</sup> мышей.

Двигательная активность TrkB<sup>hu/hu</sup> мышей после введения дозы антитела-агониста TrkB H4N9816P2

Экспериментальная группа	Среднее количество суммарных передвижений (сигналы) в период 0-24 ч до введения дозы ( $\pm$ стандартное отклонение)	Среднее количество суммарных передвижений (сигналы) в период 0-24 ч после введения дозы ( $\pm$ стандартное отклонение)	Среднее количество суммарных передвижений (сигналы) в период 24-48 ч после введения дозы ( $\pm$ стандартное отклонение)	Среднее количество суммарных передвижений (сигналы) в период 48-72 ч после введения дозы ( $\pm$ стандартное отклонение)	Среднее количество суммарных передвижений (сигналы) в период 72-96 ч после введения дозы ( $\pm$ стандартное отклонение)
Не получающая лечение (n=3)	16562(+/-3380)	14692(+/-2792)	14387(+/-6126)	13279(+/-3607)	12525(+/-4121)
Изотипический контроль (REGN1945) (n=4)	18105(+/-4085)	13380(+/-2730)	13049(+/-3376)	11371(+/-2552)	11468(+/-2088)
H4N9816P2 (n=4)	13292(+/-5294)	16575(+/-6836)	28260(+/-19874)	21193(+/-6668)	27028*(+/-10969)

Примечание: указана статистическая значимость, определяемая однофакторным дисперсионным анализом Крускала-Уоллиса с методом апостериорных множественных сравнений Тьюки (\*= $p < 0,05$ , \*\*= $p < 0,01$ , \*\*\*= $p < 0,001$ , \*\*\*\*= $p < 0,0001$ , по сравнению с группой изотипического контроля: TrkB<sup>hu/hu</sup> мыши, получавшие 50 мг/кг антитела изотипического контроля).

Пример 8. Модель трансекции зрительного нерва для определения влияния антител против TrkB на выживание ганглиозной клеточной сетчатки (RGC).

Все процедуры проводили в соответствии с предписанием Ассоциации по исследованиям зрения и офтальмологии (ARVO) об Использовании животных в офтальмологических исследованиях и исследованиях зрения (Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research) и Regeneron Pharmaceutical Inc. IACUC. Использовали взрослых самок TrkB гуманизированных крыс (Velocigene, Regeneron Pharmaceutical Inc.) в возрасте 8-10 недель, каждая массой 200-250 г. Все хирургические вмешательства на крысах проводили под общим наркозом с использованием внутривентрикулярной инъекции кетамина (63 мг/кг) и силасина (6,0 мг/кг). Для защиты роговицы применяли глазную мазь, содержащую эритромицин (0,5%, Bausch & Lomb).

Аксотомия внутриорбитального зрительного нерва и интравитреальная инъекция

Левый зрительный нерв (ON) подвергался воздействию внутриорбитально, его мозговая оболочка была открыта. Зрительный нерв рассекали примерно на 1,5 мм позади глазного яблока. Были приняты меры к тому, чтобы не нарушить кровоснабжение сетчатки. Интравитреальные инъекции выполняли непосредственно за плоскую часть ресничного тела с помощью вытянутой стеклянной пипетки, соединенной со шприцем Гамильтона объемом 50 мкл. Были приняты меры для предотвращения травмирования хрусталика. Крысы с любыми значительными послеоперационными осложнениями (например, ретиальная ишемия, катаракта) исключались из дальнейшего исследования. Животных распределяли в разные экспериментальные группы. Одна контрольная группа получала интравитреальные инъекции 3 мкл

изотипического контроля REGN1945 (46,6 мкг/мкл); другая группа получала инъекцию 3 мкл анти-TrkB антитела человека H4N9816P2 (45,7 мкг/мкл) через 3 и 10 дней после аксотомии на зрительном нерве.

В другом эксперименте исследовали дозозависимый эффект антитела к TrkB человека H4N9816P2. Гомозиготные TrkB гуманизированные крысы в возрасте 1-9 месяцев получали интравитреальную инъекцию 3 мкл антитела к TrkB человека

H4N9816P2 (0,01, 0,1, 1 или 10 мкг/мкл) или изотипического контроля REGN1945 (10 мкг/мкл) через 3 и 10 дней после аксотомии зрительного нерва.

Иммуногистохимическое окрашивание и подсчет жизнеспособных ганглионарных клеток сетчатки (RGC)

Bn3a (мозгспецифический гомеобоксный/ПМ домен белка 3A) использовали в качестве маркера выживания ганглионарных клеток сетчатки (RGC), поскольку было показано, что он является эффективным и надежным методом селективного мечения жизнеспособных RGC в тотальном препарате сетчатки после повреждения зрительного нерва (Nadal-Nicolas FM, Jimenez-Lopez M, Sobrado-Calvo P, Nieto-Lopez L, Canovas-Martinez I, Salinas-Navarro M, Vidal-Sanz M, Agudo M., Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009 Aug;50(8):3860-8). Для Bn3a-иммуноокрашивания, сетчатки блокировали в 10% нормальной сыворотке осла и 0,5% Triton X-100 в течение 1 ч, затем инкубировали в той же среде с анти-Bn3a антителом (1:400; Cat #: sc-31984, Santa Cruz) 2 ч при комнатной температуре. После дополнительных промывок, сетчатки инкубировали с ослиным вторичным антикозным антителом, конъюгированным с Alexa594 (1:400; Cat #: A-11058, Invitrogen), в течение ночи при 4°C.

Краткое изложение результатов и выводы:

Для оценки влияния антитела-агониста TrkB на выживаемость RGC in vivo, авторы настоящего изобретения использовали полную модель трансекции зрительного нерва. Применяли антитело-агонист TrkB (H4N9816P2) или антитело изотипического контроля (отрицательный контроль) через 3 и 10 дней после хирургического вмешательства. Животных умерщвляли через 14 дней после аксотомии. Плотность RGC в нетравмированном контралатеральном глазе была аналогична трем генотипам TrkB, в среднем около 1600 на мм<sup>2</sup>, как показано в табл. 21. Плотность выживших RGC оценивали в тотальном препарате сетчатки посредством Bn3a-окрашивания. Было отмечено, что у гомозиготных TrkB гуманизированных крыс, антитело-агонист TrkB (H4N9816P2) значительно ( $p < 0,01$ , тест Манна-Уитни) повышало выживаемость RGC по сравнению с контролями ( $685 \pm 106$  по сравнению с  $255 \pm 66$  RGC на мм<sup>2</sup>). У гетерозиготных TrkB гуманизированных крыс также наблюдался значительный ( $p < 0,05$ , тест Манна-Уитни) эффект выживания, вызываемый антителом-агонистом TrkB ( $444 \pm 90$  по сравнению с  $208 \pm 50$  RGC на мм<sup>2</sup>). У TrkB крыс дикого типа наблюдалось небольшое, но незначительное увеличение количества RGC при использовании антитела-агониста TrkB по сравнению с изотипическим контролем (табл. 22). В исследовании дозозависимого эффекта, плотность RGC определялась количественно в тотальном препарате сетчатки с использованием Bn3a-окрашивания через 14 дней после аксотомии. Существовал явный дозозависимый эффект антитела-агониста TrkB. По сравнению с группой контрольных антител ( $168 \pm 43$  RGC на мм<sup>2</sup>), антитело-агонист TrkB (H4N9816P2) значительно ( $p < 0,01$ , однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным критерием Тьюки) повышало выживаемость RGC в группе, которой инъецировали 3 мкг ( $564 \pm 124$  RGC на мм<sup>2</sup>) или 30 мкг ( $543 \pm 242$  RGCs на мм<sup>2</sup>). Разница между группами с 3 мкг и 30 мкг отсутствовала. В группах, которым инъецировали 0,03 мкг ( $202 \pm 96$  RGCs на мм<sup>2</sup>) или 0,3 мкг ( $337 \pm 210$  RGCs на мм<sup>2</sup>), наблюдалась лишь тенденция, но не значительное повышение выживаемости RGC (табл. 23). В заключение необходимо отметить, что антитело-агонист TrkB H4N9816P2 показало значительно повышенную выживаемость RGC у TrkB<sup>hu/hu</sup> и TrkB<sup>hu/hu</sup> крыс.

Вывод:

Антитело-агонист TrkB (H4N9816P2) дозозависимо значительно повышало выживаемость RGC у гуманизированной TrkB крысы.

Таблица 21

Данные по количеству RGC ( $\text{RGC}/\text{mm}^2$ ) в неповрежденном контрольном глазу  
Генотипы TRKB

hu/hu	hu/+	+/+
1637,3	1720,4	1636,3
1551,5	2064,6	1873,4
1651,4	1738,8	1725,4
1628,2	2029,8	1973,4
1804,7	1929,6	
1741,3	1645,9	
1739,7	1761,5	
1698,8	1787,5	
1862,5	1914,0	
1779,4		

Таблица 22

Данные по количеству RGC ( $\text{RGC}/\text{mm}^2$ ) после повреждения зрительного нерва

	H4N9816P2					Антитело изотипического контроля				
	A:Y1	A:Y2	A:Y3	A:Y4	A:Y5	B:Y1	B:Y2	B:Y3	B:Y4	B:Y5
Hu/Hu	790,1	737,1	756,3	587,8	555,7	322,8	295,0	286,9	171,3	197,9
Hu/+	530,4	457,5	522,9	390,6	319,2	231,0	184,6	265,1	151,3	
+/+	320,9	355,5	256,9	342,7		112,3				

Таблица 23

Данные по количеству RGC ( $\text{RGC}/\text{mm}^2$ ) в исследовании зависимости доза-эффект

Контрольное антитело	H4N9816P2			
	0,03 мкг/интравитреа	0,3 мкг/интравитре	3 мкг/интравитре	30 мкг/интравитреал
реально	льно	ально	ально	ьно
222,3	162,7	341,7	637,9	493,0
205,9	190,2	269,1	686,4	613,5
131,7	127,7	292,2	533,2	557,6
136,3	174,0	252,8	574,7	227,1
144,3	163,8	128,3	334,4	954,3
	392,6	740,9	620,6	411,3

Пример 9. Эффект анти-TrkB антител в отношении активации сигнальных путей Akt и Erk.

Все процедуры проводили в соответствии с предписанием Ассоциации по исследованиям зрения и офтальмологии (ARVO) об Использовании животных в офтальмологических исследованиях и исследованиях зрения (Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research) и Regeneron Pharmaceutical Inc. IACUC. Первичные мышечные кортикальные нейроны выделяли и культивировали из гуманизированных TrkB мышей (MAID 7139) (Nat Protoc. 2012 Sep; 7(9): 1741-54. doi: 10.1038/nprot.2012.099). Вестерн-блоттинг (WB) проводили для определения эффекта антитела-агониста TrkB в отношении нисходящих сигнальных путей Akt и Erk (p-Akt, p-Erk1/2). Первичные кортикальные нейроны от гуманизированных TrkB мышат

в день 1 после рождения (P1) культивировали в течение 4 дней (DIV-4) в среде NeuralQ Basal Medium (Global Stem, cat. # GSM-9420) с добавлением GS21 Neural Supplement (Global Stem, cat. # GSM-3100), Glutamax (Invitrogen, cat. # 35050-061) и смеси пеницилина и стрептомицина. Клетки обрабатывали антителами-агонистами TrkB: H4H9816P-L1 (10 мкг/мл), H4H9780P-L1 (10 мкг/мл), H4H9814P-L1 (10 мкг/мл), изотипическим контролем IgG4 REGN1945 (10 мкг/мл), контрольным антителом H1M8037C-L1 (10 мкг/мл), BDNF (1 мкг/мл), в течение 15 мин или 2 ч. Вестерн-блоттинг проводили для определения того, существует ли разница у агонистов в поддержании и интенсивности нисходящей сигнализации. Обработанные клетки промывали и очищали в холодном ФБС (PBS), содержащем 1% ингибиторов протеазы и фосфатазы (Sigma). Концентрацию белка определяли методом Бредфорда (Pierce). Образцы (50 мкг) разделяли посредством ДНС-ПААГ (SDS-PAGE) в 3-8% трис-ацетатных восстановительных гелях (Novex) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad).

Мембрану инкубировали в течение 1 ч в блокирующем растворе, содержащем 5% молока и 0,1% Твин-20, с pH 7,6. Затем инкубировали в течение ночи при 4°C в блокирующем буфере, содержащем 5% БСА, 0,1% Tween-20 и кроличьи анти-фосфо-Trk (Cell Signaling, cat # 9141, 1: 500), кроличьи анти-фосфо-Akt (Cell Signaling, cat # 9271, 1: 1000) или кроличьи анти-фосфо-ERK1/2т антитела (Sigma, cat # E7028, 1:5000). Потом меченые белки визуализировали путем инкубации с антителами к IgG козы, мыши или кролика, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP), с последующей визуализацией с хемилюминесцентным субстратом для HRP (Pierce). Для определения количеств общего TrkB, MAPK или Akt, присутствующих в каждом треке, нитроцеллюлозные мембраны очищали от антител в буфере для stripping (Pierce) в течение 20 мин и инкубировали с кроличьим анти-TrkB (Cell Signaling, cat # 4603, 1:1000), кроличьими анти-Erk1/2 (Cell Signaling, cat # 06-182, 1:1000) или кроличьими анти-Akt-антителами (Cell Signaling, cat # 9272, 1:1000) и затем визуализировали способом, описанным выше. Бета-актин (Sigma, cat # A5316, 1:20000 и GAPDH (Sigma, cat # G9295) использовали в качестве контроля загрузки.

Краткое изложение результатов и выводы:

Как показано на фигуре 2, через 15 мин после инкубации, при том, что все антитела-агонисты TrkB демонстрировали активацию пути MAPK/ERK и PI3K/Akt, только BDNF и H4H9814P демонстрировали фосфорилирование TrkB. Через 2 ч после инкубации, все антитела-агонисты TrkB показали активацию TrkB.

Пример 10. Эффект агонистических анти-TrkB антител в отношении выживаемости клеток SH-SY5Y.

Культивирование клеток нейробластомы человека SH-SY5Y in vitro:

Клетки линии нейробластомы SH-SY5Y (Sigma ATCC # 94030304, cat # 11C016) высевали в питательную среду, содержащую смесь среды Игла, модифицированной по способу Дульбекко (DMEM) и субстрата Хэма F12 (Invitrogen cat # 11330), Смесь пенициллина и стрептомицина (Invitrogen cat. # 15140), ФБС 10% (Invitrogen cat # 10082-147) при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>. При пассаже, 23-27 клеток высевали в 96-луночные планшеты в среду для дифференцировки, содержащую 10 мкМ полностью транс-ретиноевую кислоту (Alfa Aesar cat. # 44540), смесь DMEM:F12 (Invitrogen cat # 11330), смесь пенициллина и стрептомицина (Invitrogen cat # 15140), ФБС 10% (Invitrogen cat # 10082-147). Клетки (30 К/лунку) дифференцировали в течение 4 дней. Антитела подвергали скринингу в биоанализе на выживаемость, в котором культуру заменяли на бессывороточную среду для дифференцировки (100 мкл/лунку), содержащую различные дозы антител (100-0,01 мкг/мл). Через 2 дня, добавляли реагент ССК8 (Dojindo, cat # СК04) (10 мкл/лунку), планшеты инкубировали в течение 3-4 ч, измеряли оптическую плотность (OD) при длине волны 450 нм (Victor или FlexStation III) для определения процента выживших клеток. Данные нормализовали к бессывороточной среде без обработки. Бессывороточная обработка без антител соответствует 100% выживаемости.

Краткое изложение результатов и выводы:

Как показано на фиг. 3 и в табл. 23, все антитела-агонисты TrkB по изобретению показали значительное дозозависимое увеличение выживаемости клеток SH-SY5Y по сравнению с антителом отрицательного изотипического контроля ( $p < 0,0001$  в соответствии с двухфакторным дисперсионным анализом).

Таблица 24

Средний % выживания				
Доза мкг/мл	H4H9816P-L1	H4H9780P-L1	H4H9814P-L1	REGN1945-L14 (отрицательный изотипический контроль)
100	116,7	119,7	114,5	97,1
10	122,3	125,3	116,6	97,7
1	120,2	121,7	116,0	92,5
0,1	113,9	116,4	116,3	92,9
0,01	98,0	103,0	97,0	93,6

Пример 11. Оценка фармакокинетики анти-TrkB антитела у гуманизированных TrkB мышей и WT мышей.

Оценку фармакокинетики анти-TrkB антител H4H9816P2 проводили на гуманизированных TrkB мышцах (мышей, гомозиготных по экспрессии TrkB человека, TrkB<sup>hu/hu</sup>) и мышцах дикого типа (WT). Группы содержали 5 мышей на один мышинный штамм. Все мыши получали однократную подкожную (SC) дозу 10 мг/кг. Образцы крови собирали через 6 ч 1, 2, 3, 6, 9, 16, 21 и 30 дней после введения дозы. Получали из крови сыворотку и ее замораживали при -80°C до проведения исследования.

Концентрации циркулирующих антител определяли путем анализа антитела к общему IgG4/hIgG1 человека с использованием GyroLab xPlore™ (Gyros, Uppsala, Sweden). Вкратце, биотинилированное мышинное античеловеческое IgG4/IgG1-специфичное моноклональное антитело (REGN2567), разведенное до 100 мкг/мл в буфере для разведения антител (0,05% Tween-20+ФСБ), захватывалось на Gyrolab Bioaffy 200 CD, который содержал колонки для аффинной хроматографии, предварительно загруженные частицами, покрытыми стрептавидином (Dynospheres™). Стандартом, используемым для калибровки в этом анализе, было H4H9816P в концентрациях от 0,488 до 2000 нг/мл в буфере для разведения (0,5% БСА+ФСБ), содержащем 0,1% нормальной мышинной сыворотки (NMS). Образцы сыворотки разводили 1:100 в буфере для разведения антител. Человеческий IgG, захваченный на покрытых антителом REGN2567 колонках для аффинной хроматографии на красителях CD, прогоняли при комнатной температуре, обнаруживали путем добавления 0,5 мкг/мл конъюгированного с Alexa-647 мышинного моноклонального антитела к каппа цепям человека (REGN654), разведенного в буфере для детекции (Rexchip F буфер); и полученный флуоресцентный сигнал регистрировали в единицах ответа (RU) посредством прибора GyroLab xPlore. Концентрации образцов определяли путем интерполяции по стандартной кривой, которую приближали с использованием 5-параметрического логистического приближения посредством программного обеспечения Gyrolab Evaluator. Средние концентрации из двух повторных экспериментов использовали для последующего фармакокинетического (PK) анализа.

Параметры фармакокинетики определяли посредством некомпартментального анализа (NCA) с использованием программного обеспечения Phoenix® WinNonlin® Version 6.3 (Certara, L.P., Princeton, NJ) и модели внесосудистого дозирования. Используя соответствующие средние значения концентрации для каждого антитела, все фармакокинетические параметры, включая наблюдаемую максимальную концентрацию в сыворотке ( $C_{max}$ ), предполагаемый наблюдаемый период полувыведения ( $t_{1/2}$ ) и площадь под кривой концентрации в зависимости от времени до последней измеряемой концентрации ( $AUC_{last}$ ) определяли с использованием линейного правила трапеции с линейной интерполяцией и единообразным взвешиванием.

Краткое изложение результатов и выводы:

После подкожного введения 10 мг/кг анти-TrkB антитела, H4H9816P2, наблюдали одинаковые максимальные концентрации ( $C_{max}$ ) антител в день 1 или 2 как у TrkB<sup>hu/hu</sup> мышей, так и у WT мышей (135 и 131 мкг/мл соответственно, см. таблицу 26). В день 9, H4H9816P2 демонстрировало более выраженное выведение у TrkB<sup>hu/hu</sup> мышей, чем у WT мышей, что указывает на мишень-опосредованный эффект. В день 30, концентрации антител были примерно в 35 раз ниже у TrkB<sup>hu/hu</sup> мышей. Экспозиция антител ( $AUC_{last}$ ) для H4H9816P2 у WT мышей была в ~1,7 раза выше, чем у TrkB<sup>hu/hu</sup> мышей (1730 и 1020 д\*мкг/мл соответственно). У WT мышей также наблюдалось увеличение периода полувыведения примерно в 3 раза ( $T_{1/2}$ ) по сравнению с TrkB<sup>hu/hu</sup> мышцами (8,4 и 2,9 дня соответственно).

Краткое изложение данных по концентрациям общего анти-TrkB антитела представлено в табл. 25, средние параметры фармакокинетики представлены в табл. 26, и средние концентрации общего антитела в зависимости от времени показаны на фиг. 4.

Таблица 25

Средние концентрации ( $\pm$ SD) общего IgG в сыворотке после однократной подкожной инъекции 10 мг/кг H4H9816P2 T<sub>rk</sub>B<sup>hu/hu</sup> мышам и мышам дикого типа в зависимости от времени

Антитело	Время (д)	Концентрация общего mAb в сыворотке	
		мышь	
		10 мг/кг	
		Среднее значение (мкг/мл)	+/- SD
T <sub>rk</sub> B <sup>hu/hu</sup> мышь	0,25	72,42	4,06
	1	132,0	18,0
	2	124,9	15,9
	3	113,4	11,8
	6	78,72	9,98
	9	37,74	14,0
	16	5,592	4,97
	21	2,060	2,11
	30	0,447	0,506
Мышь дикого типа	0,25	56,73	14,5
	1	120,8	6,26
	2	131,2	7,54
	3	125,7	7,46
	6	101,9	11,4
	9	75,94	7,06
	16	42,61	16,1
	21	27,75	16,9
	30	15,52	13,0

Аббревиатуры: время=время в днях после однократного введения; d=день исследования; SD=стандартное отклонение.

Таблица 26

Краткое изложение фармакокинетических параметров

Параметр	Единицы	H4H9816P2	
		T <sub>rk</sub> B <sup>hu/hu</sup> мышь	Мышь дикого типа
C <sub>max</sub>	мкг/мл	135 ± 15	131 ± 7,5
T <sub>max</sub>	день	1,4 ± 0,56	2,0 ± 0
T <sub>1/2</sub>	день	2,94 ± 1,1	8,36 ± 3,9
AUC <sub>last</sub>	д · мкг/мл	1020 ± 150	1730 ± 310

Фармакокинетические параметры получали из профилей зависимости средней концентрации от времени. T<sub>1/2</sub> и AUC<sub>last</sub> основаны на концентрациях до 30 дня.

Сокращения: C<sub>max</sub>=пиковая концентрация; AUC=площадь под кривой концентрация-время; AU-C<sub>last</sub>=AUC, рассчитанная от нулевого момента до момента последнего отбора пробы, при котором концентрация выше нижнего предела количественного определения; T<sub>1/2</sub>=конечный элиминационный период полувыведения; T<sub>max</sub>=время после введения антитела, когда достигается максимальная концентрация в сыворотке

Пример 12. Способность моноклональных антител против мышинового T<sub>rk</sub>B блокировать взаимодей-



ствие между TrkB мыши или крысы и его лигандом BDNF (нейротрофический фактор из тканей мозга).

Моноклональные антитела против мышинного TrkB (mAb) получали путем иммунизации гуманизированных TrkB мышей мышинным белком TrkB. Три основных mAb, идентифицированных при этой иммунизации, представляли собой: M2aM14173N, M2aM14178N и M2aM14179N. Основные mAb по изобретению характеризовали по их способности блокировать взаимодействие TrkB мыши или крысы со связанным на планшете BDNF в блокирующем ИФА.

Эксперименты проводились с использованием следующей процедуры. BDNF человека наносили в концентрации 0,5 мкг/мл (для блокирования взаимодействия TrkB.hFc мыши) или 0,3 мкг/мл (для блокирования взаимодействия TrkB.mmh крысы) в ФСБ на 96-луночный планшет для микротитрования и инкубировали в течение ночи при 4°C. Затем участки неспецифического связывания блокировали с использованием 5% (масса/объем) раствора БСА в ФСБ (аналитический буфер). В 96-луночном планшете для разведения смешивали 850 пМ TrkB.hFc мыши или TrkB.mmh крысы с трехкратно последовательно разбавленными антителами против мышинного TrkB и контрольными антителами. Конечные концентрации антител изменялись в диапазоне от 1,69 пМ до 100 нМ. Смесь белок-антитело инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Потом предварительно связанную смесь переносили в двух экземплярах на планшеты для микротитрования, покрытые BDNF. Контроль, содержащий только буфер для анализа, включали для вычисления исходных данных исследования. Планшеты для ИФА инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч и затем промывали раствором для промывки планшетов. Связанный с планшетом TrkB.hFc мыши определяли с помощью HRP-конъюгированного козьего античеловеческого распознающего Fc $\alpha$  фрагмент антитела (Jackson Immunoresearch), а крысиный TrkB.mmh определяли с помощью HRP-конъюгированного антитела к гистидину (Qiagen). Планшеты инкубировали с антителом для детекции в течение 1 ч при комнатной температуре и затем промывали раствором для промывки планшетов. Аналитические планшеты проявляли колориметрическими субстратами ТМВ в соответствии с процедурой, рекомендованной производителем.

Поглощение при 450 нм для каждой лунки регистрировали и наносили на график как функцию концентрации антитела. Данные анализировали посредством программного обеспечения GraphPad Prism, используя четырехпараметрическое логистическое уравнение по 11-точечной кривой зависимости "доза-эффект", и вычисляли значения IC<sub>50</sub>. Вычисленное значение IC<sub>50</sub>, определенное как концентрация антитела, необходимая для снижения связывания TrkB с BDNF на 50%, использовали в качестве показателя эффективности блокирования. Процент блокирования, при максимальной концентрации исследуемого антитела, вычисляли как показатель способности антител блокировать связывание TrkB с BDNF на планшете относительно исходных данных исследования. Сигнал связывания 850 пМ TrkB мыши или крысы в отсутствие антитела определяли как 100% связывание или 0% блокирование. Исходный сигнал только аналитического буфера определяли как 0% связывания или 100% блокирования.

Краткое изложение результатов и выводы:

Способность антител против TrkB мыши блокировать связывание TrkB мыши или крысы с BDNF оценивали с использованием блокирующих иммуноферментных анализов.

Результаты блокирования приведены в табл. 27 и на фиг. 5А и В. Выраженное в процентах блокирование представлено для всех антител и вычислено при самой высокой анализируемой концентрации антител (100 нМ). Значения IC<sub>50</sub> показаны только для антител, блокирующих >50% связывания TrkB мыши или крысы с BDNF. Из трех антител по настоящему изобретению, mAb к TrkB мыши, M2aM14178N, блокировало >50% связывания белка TrkB мыши и крысы с BDNF. M2aM14178N блокировало связывание 850 пМ TrkB.hFc мыши со значением IC<sub>50</sub> 426 пМ, и выраженным в процентах блокировании 84,4%. M2aM14178N блокировало связывание 850 пМ TrkB.mmh крысы с BDNF со значением IC<sub>50</sub> 184 пМ и выраженным в процентах блокировании 89,5%. M2aM14173N показало 29,7% блокирование связывания 850 пМ TrkB.hFc мыши с BDNF. M2aM14173N показало 80,7% блокирование 850 пМ связывания TrkB.mmh крысы с BDNF со значением IC<sub>50</sub> 3,81 нМ. M2aM14179N блокировало 11,6% связывания TrkB.hFc мыши с BDNF. M2aM14179N показало увеличение связывания TrkB.mmh крыс с BDNF в концентрациях, которые выше 1 нМ.

Моноклональное антитело к TrkB мыши для сравнения, H1M8037C, блокировало связывание 850 пМ TrkB.hFc мыши с BDNF со значением IC<sub>50</sub> 180 пМ и процентом блокирования 91,5%. H1M8037C блокировало связывание 850 пМ TrkB.mmh крысы со значением IC<sub>50</sub> 1,42 нМ и процентом блокирования 83,3%. mAb изотипического контроля mIgG2a, REGN1097, не показало какого-либо блокирования TrkB мыши или крысы в аналогичных условиях исследования. При концентрациях выше 10 нМ, REGN1027 показало увеличение связывания TrkB крыс.

Итоговые значения IC<sub>50</sub> (M) для блокирования связывания TrkB мыши или крысы с BDNF антителами к TrkB мыши

AbPID	Блокирование антителами связывания 780 пМ TrkB.hFc мыши с покрывающим планшет BDNF		Блокирование антителами связывания 780 пМ крысы TrkB.hFc с покрывающим планшет BDNF	
	IC <sub>50</sub> [M]	% блокирования с 100 нМ антитела	IC <sub>50</sub> [M]	% блокирования с 100 нМ антитела
M2aM14173N	не определено	29,7	3,81E-09	80,7
M2aM14178N	4,26E-10	84,4	1,84E-10	89,5
M2aM14179N	не определено	11,6	не определено	-38,1
H1M8037C (антитело сравнения)	1,80E-10	91,5	1,42E-09	83,3
Отрицательный изотипический контроль (REGN1097)	не определено	Отсутствие блокирования	не определено	-9,33

100% блокирование=значение OD<sub>450</sub> нм в лунках с HRP-конъюгированным вторичным антителом только в аналитическом буфере (без мышиноного или крысиного белка TrkB).

0% блокирование=значение оптической плотности при длине волны 450 нм в лунках с HRP-конъюгированным вторичным антителом в аналитическом буфере в присутствии мышиноного или крысиного белка TrkB (без антитела TrkB).

Выраженное в процентах отрицательное максимальное блокирование указывает на увеличение связывания TrkB, обнаруженное в присутствии антитела.

не определено=значения IC<sub>50</sub> не определяются количественно для блокирования антител <50% при самой высокой исследуемой концентрации.

Пример 13. Способность моноклональных антител против TrkB человека блокировать взаимодействие между TrkB человека и его природными лигандами BDNF и NT4 человека.

Способность антител против TrkB человека, обозначенных как H4N9814P, H4N9816P2 и H4N9780P, блокировать связывание белка TrkB с захваченным на планшете BDNF или NT-4, измеряли с использованием двух конкурентных сэндвич-ИФА. В исследованиях, различные концентрации анти-TrkB антитела предварительно смешивали с постоянным количеством димерного белка TrkB, и вычисляли снижение связывания TrkB с иммобилизованным на планшете BDNF или NT-4 вследствие присутствия антитела.

Рекомбинантный димерный белок TrkB, использованный в экспериментах, состоял из участка внеклеточного домена TrkB человека (aa Cys32-His430), экспрессируемого Fc-участком IgG1 человека на C-конце (hTrkB-hFc; номер доступа NP\_006171.2, молекулярная масса 69700 дальтон). Белки BDNF и NT-4 состоят из внеклеточного домена BDNF (aa His129-Arg247, Accession # P23560, R & D Systems) или NT-4 человека (aa Gly81-Ala210, Accession # P34130, R & D Systems), соответственно. Два антитела изотипического контроля, анти-Fel d 1 человеческое IgG4-антитело и антитело, специфичное к a-Fel d 1-антителу с мышинным IgG1, были включены в качестве контролей для детекции фона IgG.

Эксперименты проводились с использованием следующей процедуры. В течение ночи при 4°C в ФСБ 96-луночный планшет для микротитрования покрывали по отдельности человеческим BDNF или NT-4 в концентрации 0,5 мкг/мл или 2 мкг/мл соответственно. Участки неспецифического связывания впоследствии блокировали раствором БСА в ФСБ. Блокирующий раствор и буфер для разведения содержали 5% мас./об. раствор БСА в ФСБ для анализа с покрытием BDNF или 0,5% мас./об. раствор БСА в ФСБ для анализа с покрытием NT-4. На отдельных планшетах для микротитрования к серийным разведе-

дням антител добавляли фиксированное количество, 500 пМ, белка hTrkB-hFc с конечными концентрациями в диапазоне от 1,7 пМ до 100 нМ и растворы без антител. (Фиксированную концентрацию hTrkB-hFc для анализов ингибирования антител выбирали из аппроксимируемой средней точки на линейном участке отдельных кривых связывания hTrkB-hFc с покрывающим планшет hBDNF или hNT-4). Через один час инкубации при комнатной температуре, комплексы антитело-белок с 500 пМ фиксированной концентрации белка hTrkB-hFc переносили на планшеты для микротитрования, покрытые hBDNF или hNT-4. Через один час инкубации при комнатной температуре лунки промывали и определяли связанный с планшетами hTrkB-hFc с помощью античеловеческих специфичных к Fc $\gamma$ -фрагменту поликлональных антител козы, конъюгированных с пероксидазой хрена (JacksonImmunoResearch). Затем планшет проявляли с использованием раствора субстрата TMB (BD Biosciences) в соответствии с рекомендациями производителя, и оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм на планшетном ридере Victor (PerkinElmer™).

Анализ данных проводили с использованием модели сигмоидальной зависимости доза-эффект в программном обеспечении Prism™ (GraphPad). Вычисленное значение IC<sub>50</sub>, определяемое как концентрация антитела, необходимая для снижения связывания hTrkB-hFc с hBDNF или hNT-4 на 50%, использовали в качестве индикатора эффективности блокирования. Процент блокирования, при максимальной концентрации исследуемого антитела, вычисляли в виде показателя способности антител блокировать связывание 500 пМ hTrkB-hFc с hBDNF или hNT-4 на планшете относительно исходных данных исследования. При вычислении, сигнал связывания образца 500 пМ hTrkB-hFc без антитела соответствует 100% связыванию или 0% блокированию; и исходный сигнал образца буфера без hTrkB-hFc или антитела соответствует 0% связыванию или 100% блокированию.

Краткое изложение результатов и выводы:

Способность анти-TrkB антител блокировать связывание TrkB с BDNF или NT-4 оценивали с использованием двух конкурентных сэндвич-ИФА. Связывание TrkB-hFc человека с hBDNF или hNT-4, покрывающего 96-луночные планшеты для микротитрования, в присутствии последовательно разбавленных антител или без контролей с антителами регистрировали с HRP-конъюгированными античеловеческими специфичными к Fc $\gamma$ -фрагменту поликлональными антителами козы. Значения IC<sub>50</sub> вычисляли и использовали в качестве индикатора активности антитела, блокирующего связывание hTrkB-hFc с hBDNF или hNT-4. Кроме того, вычисляли и сравнивали максимальное блокирование 500 мкМ hTrkB-hFc для каждого антитела при самой высокой исследуемой концентрации.

Результаты блокирования представлены в табл. 28. Процент блокирования представлен для всех антител и вычислен при самой высокой концентрации исследуемого антитела, составляющей 100 нМ. Процент отрицательного блокирования указывает на увеличение связывания TrkB, обнаруженного в присутствии антитела. Значения IC<sub>50</sub> показаны для антител, блокирующих >50% связывания TrkB с BDNF или NT-4. Количественно не определяющиеся значения IC<sub>50</sub> для антител, блокирующих <50%, обозначены как (-).

При самой высокой концентрации исследуемого антитела, одно (H4H9780P) из трех анти-TrkB антител блокировало >50% связывания hTrkB с лигандами BDNF или NT-4 со значениями IC<sub>50</sub> 150 пМ и 180 пМ, соответственно, с процентом блокирования, при концентрации антитела 100 нМ, составляющего 93% для BDNF и 80% для NT-4. При 3,7 нМ, это антитело блокировало связывание 500 пМ hTrkB-hFc с NT-4 на 99%. Уменьшение процента блокирования при самых высоких исследуемых концентрациях может быть связано с неспецифическим связыванием H4H9780P с планшетом для микротитрования и обнаружением этого связывания с HRP-конъюгированными античеловеческими специфичными к Fc $\gamma$ -фрагменту поликлональными антителами.

Два из трех анти-TrkB антител (H4H9814P и H4H9816P2) и нерелевантные блокирующие контрольные антитела блокировали <50% связывания hTrkB с BDNF или NT-4. Контрольное антитело блокировало связывание 500 мкМ hTrkB-hFc >50% как с BDNF, так и с NT-4.

Таблица 28

Ab PID	Блокирование посредством антител связывания 500 пМ hTrkB-hFc с покрывающим планшет hBDNF		Блокирование посредством антител связывания 500 пМ hTrkB-hFc с покрывающим планшет hNT-4	
	IC <sub>50</sub> (М)	% блокирования с 100 нМ антитела	IC <sub>50</sub> (М)	% блокирования с 100 нМ антитела
H4H9814P	-	6	-	38
H4H9816P2	-	-56	-	-123
H4H9780P	1,5E-10	93	1,8E-10	80*
Контроли				
a-TrkB-mIgG1 (H1M8037C антитело с рвнения)	1,7E-10	97	4,5E-11	95
hIgG4 отрицательный изотипический контроль	-	-31	-	-45
mIgG1	-	-19	-	-14
отрицательный изотипический контроль				

(\*) 99% блокирование при концентрации антитела H4H9780P 3,7 нМ.

Пример 14. Перекрестная конкуренция методом Octet между различными моноклональными анти-hTrkB антителами.

Для оценки того, конкурируют ли два антитела друг с другом за связывание со своими эпитопами на hTrkB-mmh, конкуренцию за связывание между моноклональными антителами против hTrkB определяли с использованием анализа в режиме реального времени - безмаркерной интерферометрии биослоев на биосенсоре Octet RED384 (Pall ForteBio Corp.). Эксперименты по перекрестной конкуренции проводили при 25°C в 0,01 М HEPES, pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3,4 мМ ЭДТА, 0,05% об./об. ПАВ Твин-20, 0,1 мг/мл БСА (буфер HBS-EP) со встряхиванием планшета со скоростью 1000 об/мин. Все растворы исследуемых анти-hTrkB антител и hTrkB-mmh подготавливали в буфере Octet HBS-EP. Для оценки способности двух антител конкурировать друг с другом за связывание со своими соответствующими эпитопами на hTrkB-mmh, сначала приблизительно ~0,14-0,24 нМ hTrkB-mmh захватывалось на концах биосенсора Octet, покрытых антителом к His, из лунок, содержащих 50 мкг/мл hTrkB-mmh в течение 5 мин. Концы биосенсора Octet с захваченным hTrkB-mmh насыщали путем погружения в течение 5 мин в лунки, содержащие 50 мкг/мл первого моноклонального анти-hTrkB антитела (далее обозначаемое как mAb-1), с последующим погружением в лунки, содержащие второе моноклональное анти-hTrkB антитело (обозначаемое как mAb-2) в течение дополнительных 5 мин. Между стадиями концы биосенсора Octet промывали в буфере HBS-EP в течение 30 с.

В процессе эксперимента контролировали ответ на связывание в режиме реального времени, и регистрировали ответ на связывание в конце каждой стадии. Ответ на связывание mAb-2 с hTrkB.mmh, предварительно образующим комплекс с mAb-1, сравнивали и определяли конкурентное/неконкурентное поведение различных моноклональных анти-hTrkB антител с использованием 60%-ного порога ингибирования.

В табл. 29 в явной форме определены взаимоотношения антител, конкурирующих в обоих направлениях, независимо от порядка связывания.

Результаты:

Таблица 29

Перекрестная конкуренция анти-hTrkB антител за связывание с hTrkB.mmh человека

<b>mAb-1</b>	<b>mAb-2</b>
H4H9814P	H4H9816P2
	H4H9814P
H4H9816P2	H4H9814P
	H4H9816P2
H4H9780P	H4H9780P
H1M8037C (антитело сравнения)	H1M8037C (антитело сравнения)

Пример 15. Висоге кинетика связывания суррогатных моноклональных антител к TrkB мыши, связывающихся с различными реагентами TrkB, измеренная при 25°C.

Для оценки того, конкурируют ли два антитела друг с другом за связывание со своими эпитопами на mTrkB-mmh, конкуренцию за связывание между моноклональными анти-mTrkB антителами определяли с использованием анализа в режиме реального времени - интерферометрии биослоя без меток на биосенсоре Octet HTX (Pall ForteBio Corp.). Эксперименты по перекрестной конкуренции проводили при 25°C в 0,01 М HEPES, pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3,4 мМ ЭДТА, 0,05% об./об. ПАВ Твин-20, 0,1 мг/мл БСА (буфер HBS-EP) со встряхиванием планшета со скоростью 1000 об/мин. Все растворы исследуемых анти-mTrkB антител и mTrkB-mmh подготавливали в буфере Octet HBS-EP. Для оценки способности двух антител конкурировать друг с другом за связывание со своими соответствующими эпитопами на mTrkB-mmh, сначала приблизительно ~0,20-0,27 нМ mTrkB-mmh захватывалось на концах биосенсора Octet, покрытых антителом к His, из лунок, содержащих 20 мкг/мл mTrkB-mmh в течение 5 мин. Концы биосенсора Octet с захваченным mTrkB-mmh насыщали путем погружения в течение 5 мин в лунки, содержащие 50 мкг/мл первого моноклонального анти-mTrkB антитела (далее обозначаемое как mAb-1), с последующим погружением в лунки, содержащие второе моноклональное анти-mTrkB антитело (обозначаемое как mAb-2) в течение дополнительных 3 мин. Между стадиями концы биосенсора Octet промывали в буфере HBS-EP в течение 30 с.

В процессе эксперимента контролировали ответ на связывание в режиме реального времени, и регистрировали ответ на связывание в конце каждой стадии. Ответ на связывание mAb-2 с mTrkB.mmh, предварительно образующим комплекс с mAb-1, сравнивали и определяли конкурентное/неконкурентное поведение различных моноклональных анти-mTrkB антител с использованием 50%-ного порога ингибирования.

В табл. 30 в явной форме определены взаимоотношения антител, конкурирующих в обоих направлениях, независимо от порядка связывания.

Результаты:

Таблица 30

Перекрестная конкуренция анти-mTrkB антител за связывание с hTrkB.mmh мыши

<b>mAb-1</b>	<b>mAb-2</b>
M2aM14173N	M2aM14178N
	M2aM14173N
M2aM14178N	M2aM14173N
	M2aM14178N
M2aM14179N	M2aM14179N
H1M8037C (антитело сравнения)	H1M8037C (антитело сравнения)

Пример 16. Оценка блокирования с использованием системы Octet: блокирование антител против TrkB человека или против TrkB мыши от связывания с TrkB посредством BDNF или NT-4.

Эксперимент 1.

Блокирование антител против TrkB человека или антител против TrkB мыши от связывания с TrkB

посредством BDNF или NT-4 оценивали с использованием прибора Octet HTX, анализирующего на основе метода биослойной интерферометрии (BLI) в режиме реального времени. Исследование полностью выполняли в 10 mM HEPES pH 7,4, 300 mM NaCl, 3 mM ЭДТА, 1 мг/мл БСА, 0,02% NaN<sub>3</sub> и 0,05% об./об. ПАВ Tween-20 (подвижный буфер HBS-EBT) при 25°C. Все образцы распределяли в 384-луночный наклонный планшет и помещали на орбитальный шейкер со скоростью встряхивания 1000 об/мин. hTrkB.mFc захватывался на сенсорах Octet с антителом к mFc (АМС), при этом hTrkB.hFc или mTrkB.hFc захватывался на сенсорах Octet с антителом к hFc (АНС) путем погружения в лунки, содержащие 10 мкг/мл TrkB реагентов в течение 2 мин. Биосенсоры Octet с захваченными hTrkB.mFc или hTrkB.hFc насыщали погружением в лунки, содержащие 20 нМ BDNF, hNT-4 или mNT-4, в течение 2 мин с последующим погружением биосенсоров Octet в лунки, содержащие 300 нМ различных TrkB mAb, в течение 4 мин. Связывание TrkB mAb с комплексом TrkB и BDNF, hNT-4 или mNT-4 определяли с использованием программного обеспечения для анализа Scrubber 2.0с.

Связывание любых антител против TrkB человека или антител против TrkB мыши по настоящему изобретению не блокировалось ни BDNF, ни NT-4, как показано в табл. 31 и табл. 32.

Таблица 31

Связывание моноклональных антител против TrkB человека с комплексом hTrkB-mFc и BDNF или NT-4 человека

			Связывание анти-TrkB антитела человека (нм)		
Поверхность захвата	Уровень захвата (нм)	mAb	Отсутствие лиганда	BDNF-насыщение (0,05 ± 0,007) нм	hNT-4-насыщение (0,05 ± 0,006) нм
hTrkB.mFc	0,29 ± 0,01	REGN1945 (отрицательный)	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
		изотипический контроль)			
		H4H9780P	0,18 ± 0,01	0,20 ± 0,014	0,2 ± 0,007
		H4H9814P	0,18 ± 0,01	0,22 ± 0,006	0,23 ± 0,00
		H4H9816P2	0,19 ± 0,00	0,26 ± 0,007	0,24 ± 0,007
hTrkB.hFc	0,47 ± 0,01	H1M8037C (антитело сравнения)	0,38 ± 0,01	0,07 ± 0,00	0,10 ± 0,006

Значения связывания антител против TrkB человека с комплексом hTrkB.mFc или hTrkB.hFc с BDNF или hNT-4, представляют собой среднее значение ответа на связывание, измеренное с использованием трех независимых биосенсоров Octet, со стандартным отклонением. Связывание BDNF или hNT-4 с hGFRA3.mFc не ингибирует связывание любых антител против TrkB человека.

Связывание моноклональных антител против TrkB мыши с комплексом mTrkB-hFc и BDNF или NT-4 мыши.

			Связывание антитела против TrkB мыши (нм)		
Поверхность захвата	Уровень захвата (нм)	mAb	Отсутствие лиганда	BDNF Насыщение (0,07 ± 0,006) нм	mNT-4 Насыщение (0,07 ± 0,005) нм
mTrkB.hFc	0,47 ± 0,01	REGN1318 (отрицательный изотипический контроль)	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,006
		M2aM14173N	0,42 ± 0,006	0,38 ± 0,006	0,4 ± 0,00
		M2aM14178N	0,47 ± 0,00	0,35 ± 0,007	0,41 ± 0,006
		M2aM14179N	0,42 ± 0,006	0,44 ± 0,006	0,43 ± 0,006
		H1M8037C (антитело сравнения)	0,42 ± 0,006	0,06 ± 0,006	0,11 ± 0,00

Значения связывания антител против TrkB мыши с комплексом mTrkB.mFc с BDNF или mNT-4, представляют собой среднее значение ответа на связывание, измеренное с использованием трех независимых биосенсоров Octet, со стандартным отклонением. Связывание BDNF или mNT-4 с mGFRA3.hFc не ингибирует связывание любых антител против TrkB мыши.

#### Эксперимент 2.

Блокирование BDNF или NT-4 от связывания с TrkB посредством антител против TrkB человека или антител против TrkB мыши оценивали с использованием прибора Octet HTX, анализирующего на основе метода биослойной интерферометрии в режиме реального времени. Исследование полностью выполняли в 10 mM HEPES pH 7,4, 300 mM NaCl, 3 mM ЭДТА, 1 мг/мл БСА, 0,02% NaN<sub>3</sub> и 0,05% об./об. ПАВ Tween-20 (рабочий буфер HBS-EVT) при 25°C. Все образцы распределяли в 384-луночный наклонный планшет и помещали на орбитальный шейкер со скоростью встряхивания 1000 об/мин. hTrkB.mFc захватывался на сенсорах Octet с антителом к mFc (AMC), при этом hTrkB.hFc или mTrkB.hFc захватывался на сенсорах Octet с антителом к hFc (АНС) путем погружения в лунки, содержащие 10 мкг/мл TrkB реагентов в течение 2 мин. Биосенсоры Octet с захваченными hTrkB.mFc или hTrkB.hFc насыщали погружением в лунки, содержащие 300 нМ различных mAb TrkB, в течение 4 мин с последующим погружением биосенсоров Octet в лунки, содержащие 20 нМ BDNF, hNT-4 или mNT-4 в течение 2 мин. Связывание BDNF, hNT-4 или mNT-4 с комплексом TrkB и различными TrkB mAb определяли с использованием программного обеспечения для анализа Scrubber 2.0с.

Связывание одного из трех антител против TrkB человека по настоящему изобретению блокировало связывание BDNF и hNT-4, как показано в табл. 33. Связывание одного из трех антител против TrkB мыши по настоящему изобретению частично блокировало связывание BDNF и mNT-4, как показано в табл. 34.

Связывание BDNF или hNT-4 человека с комплексом hTrkB-mFc и моноклональными антителами против TrkB человека.

			Связывание BDNF		Связывание hNT-4	
Поверхность захвата	Уровень захвата (нм)	mAb	Связывание mAb (нм)	BDNF	Связывание mAb (нм)	hNT-4
hTrkB.mFc	0,28 ± 0,01	отсутстви mAb	N/A	0,05 ± 0,007	N/A	0,04 ± 0,005
		REGN1945 (отрицатель ный изотипическ	0,01 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,033 ± 0,006
		ий контроль)				
		H4H9780P	0,18 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,18 ± 0,01	0,007 ± 0,006
		H4H9814P	0,18 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,18 ± 0,01	0,04 ± 0,00
		H4H9816P2	0,19 ± 0,00	0,057 ± 0,006	0,18 ± 0,01	0,043 ± 0,006
hTrkB.hFc	0,48 ± 0,01	H1M8037C (антитело сравнения)	0,38 ± 0,01	-0,017 ± 0,006	0,39 ± 0,01	-0,013 ± 0,006

Значения связывания BDNF или hNT-4 с комплексом hTrkB.mFc или hTrkB.hFc с антителами против TrkB человека представляют собой среднее значение ответа на связывание, измеренное с использованием трех независимых биосенсоров Octet, со стандартным отклонением. Связывание H4H9780P с hGFRA3.mFc блокировало связывание BDNF и hNT-4.



Связывание BDNF или NT-4 мыши с комплексом mTrkB-hFc и моноклональными антителами анти TrkB мыши.

			Связывание BDNF		Связывание hNT-4	
Поверхность захвата	Уровень захвата (нм)	mAb	Связывание mAb (нм)	BDNF	Связывание mAb (нм)	hNT-4
mTrkB.hFc	0,48 ± 0,01	Отсутствие mAb	N/A	0,07 ± 0,01	N/A	0,07 ± 0,005
		REGN1318 (отрицательный изотипический контроль)	0,01 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,06 ± 0,00
		M2aM14173N	0,42 ± 0,006	0,07 ± 0,00	0,413 ± 0,006	0,06 ± 0,00
		M2aM14178N	0,47 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,47 ± 0,01	0,033 ± 0,006
		M2aM14179N	0,42 ± 0,006	0,07 ± 0,00	0,41 ± 0,00	0,06 ± 0,00
		H1M8037C (антитело сравнения)	0,42 ± 0,006	-0,017 ± 0,006	0,40 ± 0,00	-0,02 ± 0,00

Значения связывания BDNF или mNT-4 с комплексом mTrkB.hFc и антител против TrkB мыши представляют собой среднее значение ответа на связывание, измеренное с использованием трех независимых биосенсоров Octet со стандартным отклонением. Связывание M2aM14178N с mTrkB.hFc частично блокировало связывание BDNF и mNT-4.

Объем настоящего изобретения не должен ограничиваться конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. Фактически, различные модификации изобретения, помимо представленных в настоящем документе, станут очевидными для специалистов в данной области техники из предшествующего описания и прилагаемых фигур. Такие модификации включены в объем прилагаемой формулы изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с тропомиозиновым тирозинкиназным рецептором B (TrkB), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит сочетание из шести определяющих комплементарность областей (HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащее HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.
2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащее переменную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; и переменную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.
3. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или п.2, где антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент связывается с TrkB человека с  $K_D$  меньше чем 300 нМ, что измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса при 25°C.

4. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с TrkB человека с диссоциационным периодом полувыведения ( $t^{1/2}$ ) больше чем 10 мин, что измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса при 25°C.

5. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент активирует передачу сигналов TrkB человека в отсутствие BDNF в клетках, сконструированных для экспрессии TrkB, с  $EC_{50}$  меньше чем 100 пМ.

6. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является полностью человеческим моноклональным антителом.

7. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

8. Фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель; и выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.2,

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент активирует передачу сигналов TrkB человека в отсутствие BDNF в клетках, сконструированных для экспрессии TrkB, при  $EC_{50}$  менее 100 пМ,

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело.

9. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с тропомиозиновым тирозинкиназным рецептором B (TrkB),

где переменная область тяжелой цепи (HCVR) антитела или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4,

HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и

HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и

вариабельная область легкой цепи (LCVR) антитела или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

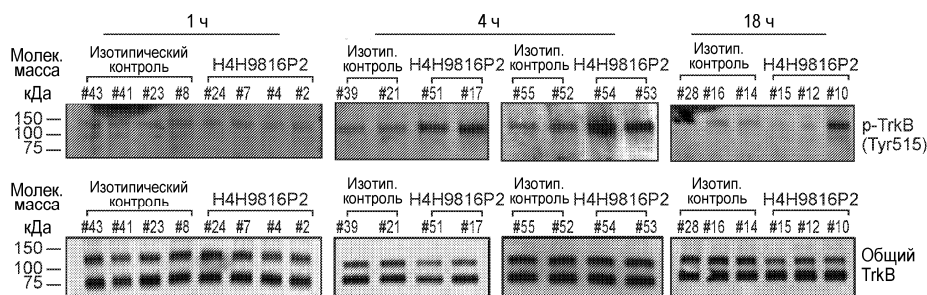
LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12,

LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и

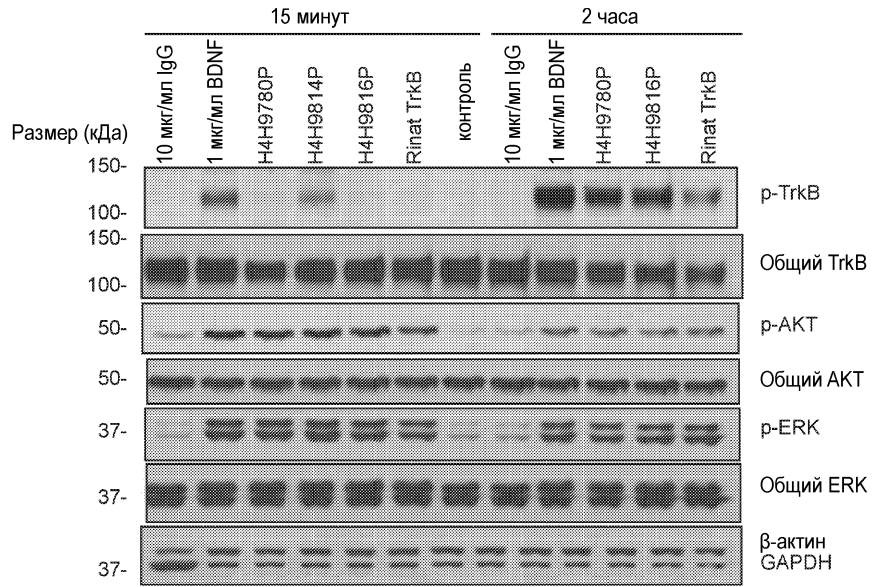
LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16,

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент активируют передачу сигналов TrkB человека в отсутствие BDNF в клетках, сконструированных для экспрессии TrkB, с  $EC_{50}$  менее 100 пМ, и

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело.

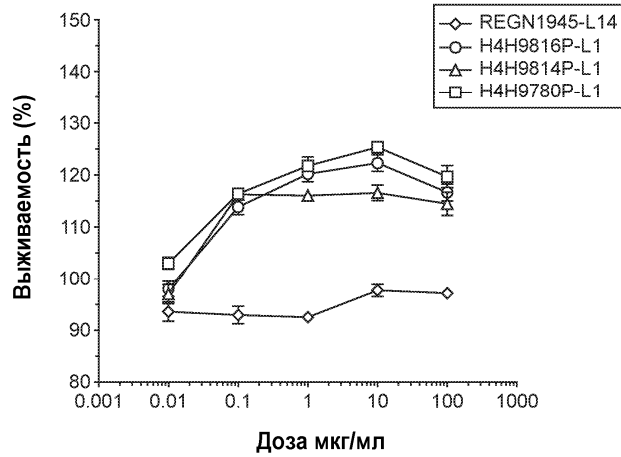


Фиг. 1

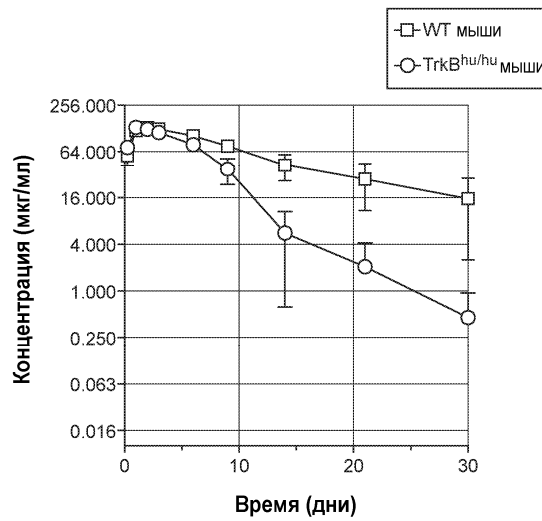


Фиг. 2

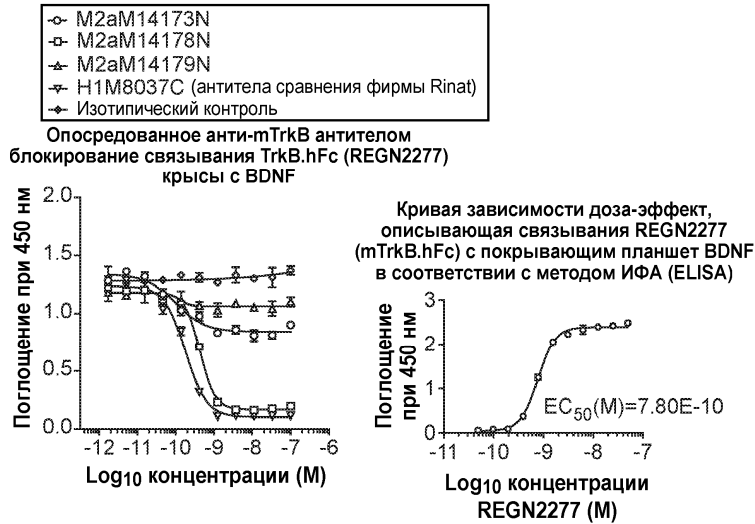
**Выживаемость линии клеток SH-SY5Y человека в бессывороточной среде**



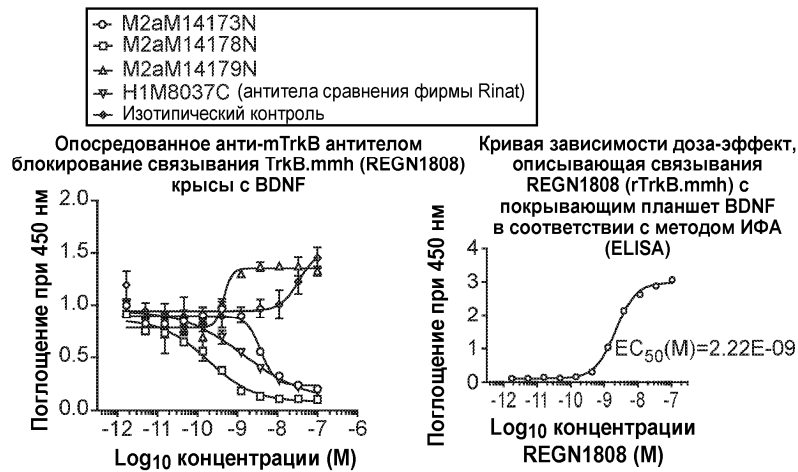
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5А



Фиг. 5В

