

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201992883 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.05.08

(22) Дата подачи заявки
2018.06.08

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

(54) АНТИТЕЛА К TrkB

(31) 17175122.5

(32) 2017.06.09

(33) EP

(86) PCT/EP2018/065107

(87) WO 2018/224630 2018.12.13

(71) Заявитель:
БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:

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

(74) Представитель:

Веселицкая И.А., Веселицкий М.Б.,
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,
Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)

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

A1

201992883

201992883

A1

АНТИТЕЛА К TRKB

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

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

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

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

пути передачи сигналов, включая активность PLC γ 1 или различных подформ АКТ и ERK, которые регулируют различные перекрывающиеся каскады передачи сигналов, включая рост аксонов/нейритов, увеличение синаптической пластичности или увеличение выживания клеток.

5 Агонистические антитела к TrkB были описаны в US20100196390 и US20100150914, а также предложено их применение для лечения, например, болезни Шарко-Мари-Тута или диабета.

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

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

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

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

 В другом аспекте, антитело к TrkB согласно настоящему изобретению активирует TrkB с высокой эффективностью. В одном варианте осуществления, относящемся к этому аспекту, антитело к TrkB согласно настоящему

изобретению активирует TrkB человека с $EC_{50} < 100$ пМ. В дальнейшем варианте осуществления, антитело к TrkB согласно настоящему изобретению активирует TrkB человека с $EC_{50} < 50$ пМ.

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

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

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

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

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

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

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

Дальнейшие аспекты охватывают молекулу (ы) полинуклеотидов, кодирующие антитела согласно настоящему изобретению, экспрессионные векторы и вирусные векторы, а также клетки-хозяева, содержащие такую (ие) молекулу (ы) полинуклеотидов, и способы приготовления антител согласно настоящему изобретению. Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает

терапевтические применения антител согласно настоящему изобретению, в особенности для заболеваний сетчатки/глаз.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент для применения для 20 лечения заболеваний сетчатки/глаз.

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

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

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

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

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

композицию, содержащую антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят с помощью парентерального пути, внутривенного пути, интравитреального пути или подкожного пути введения.

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

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

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

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

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

получение клетки-хозяина, содержащей экспрессионный вектор или выделенный (е) полинуклеотид или полинуклеотиды, кодирующий (е) легкую цепь или переменную область лёгкой цепи антитела или его

антигенсвязывающий фрагмент и тяжелую цепь или вариабельную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающий фрагмент; и культивирование клетки-хозяина.

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

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

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

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

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

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

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

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

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

ФИГУРА 4: Рассчитанная глазная ФК IgG1 антител. На оси Y показано витреальная концентрация и на оси X дни после ивт применения. Время после ивт инъекции для достижения витреальной концентрации, эквивалентной EC₅₀,
10 указано стрелками.

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

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

ФИГУРА 7: Светочувствительности, S , опосредованных палочками b-волн, нормированные к средним светочувствительностям контрольной группы, $S_{\text{контроль}}$, на исходном уровне (до ивт) или через 1 неделю после ивт введения

(см. ФИГУРУ 5 относительно общей схемы исследования). Недиабетическая контрольная группа 1 (черные, n=23 исследованных глаз) и гипергликемическая группа 2 (красные, n=20 исследованных глаз) получали ивт инъекции с применением контрольного IgG1. Группа 3 получала ивт лечение с применением С2 (n=24 исследованных глаз). Данные представляют собой среднее значение + СПС. нд, недостоверно; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; отличия до ивт между гипергликемическими группами 2 и 3 и контрольной группой 1 являются достоверными (статистические данные условно не показаны; однофакторный дисперсионный анализ с критерием множественного сравнения Тьюки).

ФИГУРА 8: Ответы опосредованной палочками а-волны, вызванные вспышкой света $0,1 \text{ кд} \cdot \text{с}/\text{м}^2$, R , нормированные к среднему ответу контролей, на исходном уровне (до ивт) или через 1 неделю после ивт введения (см. ФИГУРУ 5 относительно общей схемы исследования). Недиабетическая контрольная группа 1 (черные, n=23 исследованных глаз) и гипергликемическая группа 2 (красные, n=20 исследованных глаз) получали ивт инъекции с применением контрольного IgG1. Группа 3 получала ивт лечение с применением С2 (n=24 исследованных глаз). Данные представляют собой среднее значение + СПС. нд, недостоверно; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; отличия до ивт между гипергликемическими группами 2 и 3 и контрольной группой 1 являются достоверными (статистические данные условно не показаны; однофакторный дисперсионный анализ с критерием множественного сравнения Тьюки).

ФИГУРА 9: Изменения латентности УФ опосредованной колбочками b-волны относительно средней латентности контрольной группы, на исходном уровне (до ивт) и через 1 неделю после ивт введения (см. ФИГУРУ 5 относительно общей схемы исследования). Недиабетическая контрольная группа 1 (черные, n=24 исследованных глаз) и гипергликемическая группа 2 (красные, n=22 исследованных глаз) получали ивт инъекции с применением контрольного IgG1. Группа 3 получала ивт лечение с применением С2 (n=24 исследованных глаз). Данные представляют собой среднее значение + СПС. нд, недостоверно; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; отличия до ивт между гипергликемическими группами 2 и 3 и контрольной группой 1 являются достоверными (статистические данные условно не показаны; однофакторный дисперсионный анализ с критерием множественного сравнения Тьюки).

ФИГУРА 10: Изменения латентности опосредованной колбочками М-типа b-волны относительно средней латентности контрольной группы, на исходном уровне (до ивт) и через 1 неделю после ивт введения (см. ФИГУРУ 5 относительно общей схемы исследования). Недиабетическая контрольная группа 1 (черные, n=24 исследованных глаз) и гипергликемическая группа 2 (красные, n=22 исследованных глаз) получали ивт инъекции с применением контрольного IgG1. Группа 3 получала ивт лечение с применением C2 (n=24 исследованных глаз). Данные представляют собой среднее значение + СПС. нд, недостоверно; *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001; отличия до ивт между гипергликемическими группами 2 и 3 и контрольной группой 1 являются достоверными (статистические данные условно не показаны; однофакторный дисперсионный анализ с критерием множественного сравнения Тьюки).

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

ФИГУРА 12: Амплитуды насыщающих колебаний, R_{max} , опосредованных колбочками М-типа b-волн, нормированные к средней амплитуда насыщающих колебаний контролей, $R_{\text{max, контроль}}$, на исходном уровне (до ивт) или через 1 неделю после ивт введения (см. ФИГУРУ 5 относительно общей схемы исследования). Недиабетическая контрольная группа 1 (черные, n=24 исследованных глаз) и гипергликемическая группа 2 (красные, n=22 исследованных глаз) получали ивт инъекции с применением контрольного IgG1. Группа 3 получала ивт лечение с применением C2 (n=24 исследованных глаз). Данные представляют собой среднее значение + СПС. нд, недостоверно; *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001; отличия до ивт между гипергликемическими

группами 2 и 3 и контрольной группой 1 являются достоверными (статистические данные условно не показаны; однофакторный дисперсионный анализ с критерием множественного сравнения Тьюки).

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

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

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

Общая структура антител или иммуноглобулина хорошо известна специалистам в данной области, эти молекулы представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины, как правило с молекулярной массой примерно 150000 Да, состоящие из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Каждая легкая цепь ковалентно связана с

тяжелой цепью с помощью одной дисульфидной связи с образованием гетеродимера, и гетеротримерная молекула образуется посредством ковалентной дисульфидной связи между двумя идентичными тяжелыми цепями гетеродимеров. Хотя легкие и тяжелые цепи связаны с помощью одной дисульфидной связи, количество дисульфидных связей между двумя тяжелыми цепями варьируется в зависимости от изотипа иммуноглобулина. Каждая тяжелая и легкая цепь имеет также равномерно распределенные внутрицепочечные дисульфидные мостики. Каждая тяжелая цепь имеет аминоконцевую переменную область (V_H = переменная тяжелая цепь), за которой расположены три или четыре константных домена (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} и C_{H4}), а также шарнирный участок между C_{H1} и C_{H2} . Каждая легкая цепь имеет две области, аминоконцевую переменную область (V_L = переменная легкая цепь) и карбоксиконцевой константный домен (C_L). V_L -область нековалентно связана с V_H -областью, а C_L -домен, как правило, ковалентно связан с C_{H1} -доменом через дисульфидную связь. Вероятно, определенные аминокислотные остатки образуют поверхность раздела между переменными областями легких и тяжелых цепей (Chothia и др., J. Mol. Biol. 186, 1985, сс. 651-663).

Определенные участки в переменных областях значительно различаются у различных антител, т.е. они являются «гиперпеременными». Эти гиперпеременные участки содержат остатки, которые непосредственно участвуют в связывании и определяют специфичность каждого конкретного антитела в отношении специфической для него антигенной детерминанты. Гиперпеременность в переменных областях, как легкой цепи, так и тяжелой цепи, концентрируется в трех сегментах, которые обозначают как определяющие комплементарность участки (гиперпеременные участки) (CDR) или гиперпеременные петли (HVL). CDR определяют путем сравнения последовательностей согласно методу, описанному у Kabat и др., в: Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991, а HVL структурно определяют на основе трехмерной структуры переменной области согласно методу, описанному у Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196, 1987, сс. 901-917. Если эти два метода приводят к некоторым различиям при идентификации CDR, то предпочтительным является определение на основе структуры. Согласно номенклатуре Кэбота CDR-L1 расположен примерно на остатках 24-34, CDR-L2

примерно на остатках 50-56 и CDR-L3 примерно на остатках 89-97 в
вариабельной области легкой цепи; CDR-H1 расположен примерно на остатках
31-35, CDR-H2 примерно на остатках 50-65 и CDR-H3 примерно на остатках 95-
102 в вариабельной области тяжелой цепи. Таким образом, CDR1, CDR2, CDR3
5 тяжелых и легких цепей определяют уникальные и функциональные свойства,
специфические для данного антитела.

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

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

Легкие цепи иммуноглобулинов позвоночных животных относят к одному
30 или двух четко различимых классов, каппа (κ) и лямбда (λ), на основе
аминокислотной последовательности константного домена. Для сравнения,
тяжелые цепи иммуноглобулинов млекопитающих относятся к одному из пяти
основных классов с учетом последовательности константных доменов: IgA, IgD,
IgE, IgG и IgM. IgG и IgA дополнительно подразделяют на подклассы (изотипы),

например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂, соответственно. Константные домены тяжелых цепей, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, обозначают как α , δ , ϵ , γ и μ соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации классов нативных иммуноглобулинов хорошо известны.

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

Понятие «моноклональное антитело» (mAb) относится к антителу из популяции практически гомогенных антител; т.е. индивидуальные антитела в указанной популяции являются идентичными за исключением встречающихся в естественных условиях мутаций, которые могут присутствовать в очень небольших количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифическими, их мишенью является индивидуальная антигенная детерминанта, «эпитоп». Таким образом, прилагательное «моноклональные» является отличительным признаком практически гомогенной популяции антител, мишенью которых является идентичный эпитоп, и понятие не ограничено требованием к получению антител с помощью какого-либо конкретного метода. Должно быть очевидно, что моноклональные антитела можно получать с помощью любой техники или методологии, известной в данной области; включая, например, метод гибридом (Kohler и др., Nature 256, 1975, с. 495), или методы рекомбинантной ДНК, известные в данной области (см., например, US 4816567), или методы выделения моноклональных полученных с помощью рекомбинантной ДНК антител с использованием фаговых библиотек антител, которые описаны у Clackson и др., Nature 352, 1991, сс. 624-628 и у Marks и др., J. Mol. Biol. 222, 1991, сс. 581-597.

Химерные антитела состоят из вариабельных областей тяжелой и легкой цепи антител из одного вида (например, из млекопитающего кроме человека,

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

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

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

который несет два антигенсвязывающих центра и все еще сохраняет способность к перекрестному сшиванию с антигеном.

Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов присутствием дополнительных остатков, включая один или несколько остатков цистеина из шарнирной области антитела на С-конце C_{H1} -домена. $F(ab')_2$ -фрагменты антител представляют собой пары Fab'-фрагментов, связанных с помощью остатков цистеина в шарнирной области. Известны другие химические сочетания фрагментов антител.

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

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

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

Гуманизированное антитело или фрагмент гуманизированного антитела представляет собой специфический тип химерного антитела, которое включает вариант аминокислотной последовательности иммуноглобулина или его

фрагмента, который обладает способностью связываться с предварительно определенным антигеном и который содержит один или несколько FR, который(ые) имеет(ют) аминокислотную последовательность, практически соответствующую последовательности человеческого иммуноглобулина, и один или несколько CDR, который(ые) имеет(ют) аминокислотную последовательность, которая практически соответствует аминокислотной последовательности нечеловеческого иммуноглобулина. Указанную нечеловеческую аминокислотную последовательность, которую часто обозначают как «импортная» последовательность, как правило, получают из «импортной» области антитела, в частности, вариабельной области. В целом, гуманизированное антитело включает по меньшей мере CDR или HVL нечеловеческого антитела, встроенные между FR вариабельного домена человеческой тяжелой или легкой цепи.

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

В одном аспекте, гуманизированное антитело к TrkB содержит практически все из по меньшей мере одной и, как правило, двух вариабельных областей (таких, например, как входящие в Fab-, Fab'-, F(ab')₂-, Fabc- и Fv-фрагменты), в которых все или практически все CDR соответствуют CDR нечеловеческих иммуноглобулинов, и согласно настоящему изобретению CDR представляют собой мышинные последовательности лидерного D003, и FR представляют собой FR, которые имеют консенсусную последовательность или последовательность зародышевой линии человеческого иммуноглобулина. В другом объекте изобретения гуманизированное антитело к TrkB включает также по меньшей мере часть Fc-области иммуноглобулина, как правило, человеческого иммуноглобулина. Как правило, антитело должно содержать как легкую цепь, так и по меньшей мере вариабельную область тяжелой цепи. Антитело может

включать также при необходимости один или несколько из следующих участков: C_{H1}, шарнирная область, C_{H2}, C_{H3} и/или C_{H4} тяжелой цепи.

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

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

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

15 Понятия «консенсусная последовательность» и «консенсусное антитело»
относятся к аминокислотной последовательности, которая содержит наиболее
часто встречающийся аминокислотный остаток в каждом положении во всех
иммуноглобулинах любого класса, изотипа или в любой субъединичной
структуре, например, вариабельной области человеческого иммуноглобулина.
20 Консенсусная последовательность может базироваться на иммуноглобулинах
конкретных видов или множества видов. Под «консенсусной/консенсусным»
последовательностью, структурой или антителом подразумевают консенсусную
человеческую последовательность, указанную в конкретных вариантах
осуществления изобретения, и понятие относится к аминокислотной
25 последовательности, которая содержит наиболее часто встречающиеся остатки в
каждом положении во всех человеческих иммуноглобулинах конкретного
класса, изотипа или субъединичной структуры. Таким образом, консенсусная
последовательность содержит аминокислотную последовательность, которая
имеет в каждом положении аминокислоту, которая присутствует в одном или
30 нескольких известных иммуноглобулинах, но которая может не представлять
собой точную копию полной аминокислотной последовательности любого
индивидуального иммуноглобулина. Вариабельную область консенсусной
последовательности не получают из какого-либо встречающегося в
естественных условиях антитела или иммуноглобулина (Kabat и др., Sequences

of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991) и его вариантов. Консенсусные последовательности FR тяжелой и легкой цепи и их варианты представляют собой ценные последовательности для получения гуманизированных антител к TrkB (см., например, US 6037454 и 6054297).

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

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

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

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

аффинности антитела к антигену (Kd), конформация антитела, стабильность белка и время полужизни антитела.

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

Определение процента идентичности или процента сходства между двумя последовательностями можно осуществлять с помощью математического

алгоритма. Предпочтительным примером математического алгоритма, который можно применять для сравнения двух последовательностей, является (но не ограничиваясь только ими) алгоритм Karlin и Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1990, сс. 2264-2268, модифицированный согласно описанному у Karlin и Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1993, сс. 5873-5877. Указанный алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST, описанные у Altschul и др., J. Mol. Biol. 215, 1990, сс. 403-410. Анализ нуклеотидов с помощью BLAST можно осуществлять с помощью программы NBLAST, в которой балл = 100, длина слова = 12, для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных нуклеиновой кислоте, кодирующей представляющей интерес белок. Анализ белков с помощью BLAST можно осуществлять с помощью программы XBLAST, в которой балл = 50, длина слова = 3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных представляющему интерес белку. Для осуществления сравнительных анализов первичной структуры, включающей брешу, можно применять программу Gapped BLAST, описанную у Altschul и др., Nucleic Acids, 25, 1997, сс. 3389-3402. В другом варианте можно применять PSI-Blast для осуществления итерационного поиска, позволяющего определять отдаленные взаимосвязи между молекулами (Id.). При применении программ BLAST, Gapped BLAST и PSI-Blast можно применять задаваемые по умолчанию параметры соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). Другим предпочтительным примером (но, не ограничиваясь только им) математического алгоритма, который можно применять для сравнения последовательностей, является алгоритм, описанный у Myers и Miller, CABIOS, 1989. Указанный алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью пакета программ для сравнительного анализа первичной структуры последовательностей GCG. Когда программу ALIGN применяют для сравнения аминокислотных последовательностей, то можно применять таблицу взвешенных остатков PAM120, штраф за длину брешу 12 и штраф за брешь 4. Дополнительные алгоритмы для анализа последовательностей известны в данной области и включают ADVANCE и ADAM, описанные у Torellis и Robotti, Comput. Appl. Biosci. 10, 1994, сс. 3-5; и FASTA, описанный у Pearson и Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1988, сс. 2444-2448. В программе FASTA параметр ktup обозначает контрольный параметр, который задает чувствительность и скорость поиска. Если ktup = 2, то сходные области в двух подлежащих

сравнению последовательностях выявляют путем просмотра пар выравненных остатков; если $ktup = 1$, то оценивают индивидуальные выравненные аминокислоты. Для белковых последовательностей можно задавать значение $ktup$, равное 2 или 1, а для последовательностей ДНК значения в пределах от 1 до 6. В альтернативном варианте сравнительный анализ первичной структуры белковых последовательностей можно осуществлять с помощью алгоритма CLUSTAL W, описанного у Higgins и др., Methods Enzymol. 266, 1996, сс. 383-402.

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

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

Понятие «млекопитающее», подлежащее лечению, относится к любому животному, которое принадлежит к классу млекопитающих, включая людей, домашних и сельскохозяйственных животных, а также живущих в зоопарке

животных, предназначенных для спорта или комнатных животных, таких как собаки, лошади, кошки, коровы и т.д. Предпочтительно млекопитающее представляет собой человека.

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

Как используется в настоящей заявке, термин «нарушение, связанное с TrkB» или «заболевание, связанное с TrkB», относится к состоянию, при котором показана модификация или активация клеток, экспрессирующих TrkB. Нарушение, связанное с TrkB включает заболевания и нарушения, такие как возрастная дегенерация жёлтого пятна, географическая атрофия, диабетическая ретинопатия, диабетический отёк жёлтого пятна, пигментная дистрофия сетчатки, наследственная дистрофия сетчатки, наследственная макулодистрофия, миопическая дегенерация, окклюзии вены сетчатки, окклюзии артерии сетчатки, эндофтальмит, увеит, кистозный макулярный отёк, хороидальная неоваскулярная мембрана вследствие любого из заболеваний сетчатки, оптические нейропатии, глаукома, отслойка сетчатки, токсическая ретинопатия, лучевая ретинопатия, и травматическая ретинопатия, а также продромальная и от легкой до умеренной болезнь Альцгеймера, задержка прогрессирования заболевания у пациентов с болезнью Альцгеймера, болезнь Хантингтона, болезнь Паркинсона, большое депрессивное расстройство, шизофрения, когнитивное нарушение, связанное с шизофренией, предотвращение первого приступа психоза у индивидуумов с ослабленным психозным синдромом, предотвращение повторения у пациентов с шизофренией, терапевтически резистентная депрессия, и метаболические заболевания, такие как гиперфагия, ожирение или метаболический синдром.

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

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

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

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

Термин "терапевтически эффективное количество" используется по отношению к количеству антитела к TrkB или его антигенсвязывающего фрагмента, при использовании которого происходит ослабление или облегчение одного или нескольких симптомов нарушения, подлежащего лечению. Действующее вещество применяют таким образом, что в указанном количестве оно оказывало благоприятное действие на пациента. В одном аспекте, терапевтически эффективное количество имеет нейрозащитный или нейрорегенеративный эффект. В другом аспекте, терапевтически эффективное

количество относится к целевой концентрации в сыворотке пациента, при которой оно проявляется как эффективное, например, в отношении замедления прогрессирования заболевания. Эффективность можно оценивать общепринятыми путями в зависимости от подлежащего лечению состояния.

5 Например, при заболеваниях или нарушениях глаз/ сетчатки, которые характеризуются клетками, экспрессирующими TgkB, эффективность может быть измерена путем определения частоты ответов, например, восстановление зрения или путем оценки времени задержки до прогрессирования заболевания.

Термины "лечение" и "терапия" и подобные, как используются в настоящей заявке, относятся к терапевтическим, а также профилактическим или подавляющим мероприятиям в отношении заболевания или нарушения, которые приводят к любому клинически важному или благоприятному действию, включая (но, не ограничиваясь только ими) облегчение или ослабления одного или нескольких симптомов, регресс, замедление или прекращение развития

10 заболевания или нарушения. Таким образом, например, под понятие «лечение» подпадает введение антитела к TgkB или его антигенсвязывающего фрагмента до или после начала проявления симптома заболевания или нарушения, что приводит к предупреждению или устранению одного или нескольких признаков заболевания или нарушения. В другом примере понятие относится к введению

20 антитела к TgkB или его антигенсвязывающего фрагмента после клинического проявления болезни для борьбы с симптомами болезни. Кроме того, в контексте настоящего описания понятие «лечение» или «терапия» относятся к введению антитела к TgkB или его антигенсвязывающего фрагмента после возникновения и после развития клинических симптомов, где введение оказывает воздействие

25 на клинические параметры заболевания или нарушения, такие как степень повреждения ткани или количество и распространение метастазов, вне зависимости от того приводит или нет лечение к облегчению заболевания. Кроме того, если применение композиций, предлагаемых в изобретении, либо индивидуально, либо в сочетании с другим терапевтическим средством купирует

30 или облегчает по меньшей мере один из симптомов подлежащего лечению нарушения по сравнению с указанным симптомом без применения содержащей композиции антитела к TgkB или его антигенсвязывающего фрагмента, результат следует рассматривать как эффективное лечение требуемого нарушения вне

зависимости от того, происходит или нет облегчение всех симптомов нарушения.

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

Антитела

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

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

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

VL ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

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

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

5

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

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

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

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

VH ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

D003_VH, (мышинная лидерная) переменная тяжелая цепь, SEQ ID NO: 11
QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFTGYWMHWVKQRPGQGLEWIGYI
15 NPSTDYTEYNQKFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSRGTGNY
WGQGTTTLTVSS

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

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

277-35_VH, (гуманизированная) переменная тяжелая цепь, SEQ ID NO: 14
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQRPQGLEWIGYIN
PSTDYTEYNQKFKDRVTLTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSRGTGNYW
25 GQGTTVTTVSS

277-42_VH, (гуманизированная) переменная тяжелая цепь, SEQ ID NO: 15
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQRPQGLEWIGYIN
30 PSTDYTEYNQKFKDRVTLTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSRGTGNYW
GQGTTVTTVSS

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

5 277-48_VH, (гуманизированная) переменная тяжелая цепь, SEQ ID NO: 17
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQRPQGLEWIGYIN
PSTDYTEYNQKFKDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDAVYYCARSRTGNYW
 GQGTTVTVSS

10 277-51_VH, (гуманизированная) переменная тяжелая цепь, SEQ ID NO: 18
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQRPQGLEWIGYIN
PSTDYTEYNQKFKDRATLTRDTSTSTVYMELSSLRSEDAVYYCARSRTGNYW
 GQGTTVTVSS

15 277-64_VH, (гуманизированная) переменная тяжелая цепь, SEQ ID NO: 19
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQAPGQGLEWIGYIN
PSTDYTEYNQKFKDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDAVYYCARSRTGNYW
 GQGTTVTVSS

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

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

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

ТАБЛИЦА 1:

Антитело	Последовательность	SEQ ID NO:
277-gr (Легкая цепь, IgG1)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQK NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGQGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFN	21

Антитело	Последовательность	SEQ ID NO:
	RGEC	
277-gr (Тяжелая цепь, IgG1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHW VRQAPGQGLEWMGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR <u>SRTGNYWGQG</u> TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG	22
277-gr (Тяжелая цепь, IgG1-КО)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHW VRQAPGQGLEWMGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR <u>SRTGNYWGQG</u> TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG	23
277-33 (Легкая цепь, IgG1)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLYSSNQK NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQYYSYPYTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC	24
277-33 (Тяжелая цепь, IgG1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHW VRQRPQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTLTR DTSTSTVYMELSSLTSEDTAVYYCAR <u>SRTGNYWGQG</u> TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG	25
277-33 (Тяжелая цепь, IgG1-КО)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHW VRQRPQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTLTR DTSTSTVYMELSSLTSEDTAVYYCAR <u>SRTGNYWGQG</u>	26

Антитело	Последовательность	SEQ ID NO:
	TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG	
277-35 (Легкая цепь, IgG1)	DIVMTQSPDLSAVSLGERATISCKSSQSLLYSSNQK NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSG SGTDFTLTITSSSLQAEDVAVYYCQQYYSPYTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPRFAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFN RGEC	27
277-35 (Тяжелая цепь, IgG1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHW VRQRPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTLTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSTRGNWGGQ TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG	28
277-35 (Тяжелая цепь, IgG1-КО)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHW VRQRPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTLTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSTRGNWGGQ TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG	29
277-42 (Легкая цепь, IgG1)	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQK NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSG SGTDFTLTITSSSLQAEDVAVYYCQQYYSPYTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPRFAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFN RGEC	30

Антитело	Последовательность	SEQ ID NO:
277-42 (Тяжелая цепь, IgG1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHW VRQRPQGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTLTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSRTGNYWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHEALHN HYTQKSLSLSPG	31
277-42 (Тяжелая цепь, IgG1-КО)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHW VRQRPQGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTLTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSRTGNYWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHEALHN HYTQKSLSLSPG	32
277-44 (Легкая цепь, IgG1)	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQK NYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTITSSSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGQGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC	33
277-44 (Тяжелая цепь, IgG1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHW VRQAPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTMTR DTSTSTVYMELSSLTSEDTAVYYCARSRTGNYWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHEALHN HYTQKSLSLSPG	34
277-44 (Тяжелая цепь, IgG1-КО)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHW VRQAPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTMTR DTSTSTVYMELSSLTSEDTAVYYCARSRTGNYWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV	35

Антитело	Последовательность	SEQ ID NO:
	KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHN HYTQKSLSLSPG	
277-48 (Легкая цепь, IgG1)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQK NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSPYTFGQGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC	36
277-48 (Тяжелая цепь, IgG1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHW VRQRPQGQLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSTRGNWGGQ TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHN HYTQKSLSLSPG	37
277-48 (Тяжелая цепь, IgG1-КО)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHW VRQRPQGQLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSTRGNWGGQ TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHN HYTQKSLSLSPG	38
277-51 (Легкая цепь, IgG1)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLYSSNQK NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSPYTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC	39
277-51 (Тяжелая	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHW	40

Антитело	Последовательность	SEQ ID NO:
цепь, IgG1)	VRQRPQGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRATLTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSRGTGNYWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGGFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHEALHN HYTQKSLSLSPG	
277-51 (Тяжелая цепь, IgG1-КО)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHW VRQRPQGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRATLTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSRGTGNYWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGGFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHEALHN HYTQKSLSLSPG	41
277-64 (Легкая цепь, IgG1)	DIVMTQSPDLSAVSLGERATISCKSSQSLLYSSNQK NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTITSSSLQAEDVAVYYCQQYYSPYTFGQGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEN	42
277-64 (Тяжелая цепь, IgG1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHW VRQAPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSRGTGNYWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGGFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHEALHN HYTQKSLSLSPG	43
277-64 (Тяжелая цепь, IgG1-КО)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHW VRQAPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSRGTGNYWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV	44

Антитело	Последовательность	SEQ ID NO:
	KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSFGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG	
277-67 (Легкая цепь, IgG1)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQK NYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSG SGTDFTLTITSSSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGQGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPRFAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEN	45
277-67 (Тяжелая цепь, IgG1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHW VRQAPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSRGTGNYWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSFGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG	46
277-67 (Тяжелая цепь, IgG1-KO)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHW VRQAPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSRGTGNYWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSFGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG	47
277 L-CDR1	<u>KSSQSLLYSSNQKNYLA</u>	48
277 L-CDR2	<u>WASTRES</u>	49
277 L-CDR3	<u>QQYYSYPYT</u>	50
277 H-CDR1 (CCG)	<u>GYTFTGYWMH</u>	51

Антитело	Последовательность	SEQ ID NO:
277 H-CDR2 (CCG)	<u>YINPSTDYTEYNQKFKD</u>	52
277 H-CDR3 (CCG)	<u>SRTGNY</u>	53
277 H-CDR1 (Кэбот)	GYWMH	55
277 H-CDR2 (Кэбот)	YINPSTDYTEYNQKFKD	56
277 H-CDR3 (Кэбот)	SRTGNY	57
277 H-CDR1 (Чотиа)	<i>GYTFTGY</i>	58
277 H-CDR2 (Чотиа)	<i>NPSTDY</i>	59
277 H-CDR3 (Чотиа)	<i>SRTGNY</i>	60

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

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

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

к TrkB согласно настоящему изобретению фосфорилирует TrkB человека с EC₅₀ приблизительно 20 пМ.

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

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

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

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

В дальнейшем аспекте, антитело к TrkB согласно настоящему изобретению имеет низкий риск иммуногенности и низкую подверженность последовательностей по отношению к его CDR последовательностям. Иммуногенность и гетерогенность являются двумя важными аспектами терапевтического антитела. Измерения таких аспектов можно осуществить с помощью способов, как описано в Примерах 4 и 5. Антитела согласно

настоящему изобретению были осторожно сконструированы, что иметь минимальную или не иметь иммуногенности и/или гетерогенности.

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

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

В другом аспекте, антитело к TrkB не связывается неспецифически с VEGF человека и/или VEGF крысы. Связывание неспецифически в настоящем контексте обозначает, что антитело к TrkB согласно изобретению не связывается с VEGF человека, как измерено, например, с помощью ELISA, как описано в Примере 14. В одном варианте осуществления, отсутствие неспецифического связывания антитела к TrkB может быть определено путем измерения статистически значимое различие (например, критерий Стьюдента для одной выборки, $p < 0,05$) при связывании с VEGF человека между антителом к TrkB и подходящим IgG изотипным контрольным антителом. В особенности, отсутствие неспецифического связывания антитела к TrkB согласно изобретению может быть измерено путем определения любых отличий при связывании с VEGF человека между антителом к TrkB и IgG1 изотипным контрольным антителом. Антитело к TrkB согласно изобретению существенно не отличается относительно отсутствия связывания с VEGF человека по сравнению с аналогичной концентрацией IgG1 изотипного контрольного антитела вплоть до концентрации приблизительно 0,3 нМ, 0,4 нМ, 0,5 нМ, 0,6 нМ, 0,7 нМ, 0,8 нМ, 0,9 нМ, 1 нМ, 5 нМ, 10 нМ, 20 нМ, 30 нМ, 40 нМ, 50 нМ, 60 нМ, 70 нМ, 80 нМ,

90 нМ, 100 нМ, 110 нМ, 120 нМ, 130 нМ, 140 нМ, 150 нМ, 160 нМ, 170 нМ, 180 нМ, 190 нМ или 200 нМ. В альтернативном варианте осуществления, отсутствие неспецифического связывания антитела к TrkB согласно изобретению может быть измерено путем определения значения IC₅₀ связывания антитела к TrkB с любым одним из VEGF человека или крысы. В особенности, антитело к TrkB согласно изобретению будет проявлять значение IC₅₀ связывания с VEGF человека или крысы приблизительно выше 0,9 мкМ, предпочтительно выше 1 мкМ, выше 2 мкМ, выше 3 мкМ, выше 5 мкМ, выше 10 мкМ, выше 20 мкМ, выше 30 мкМ, выше 40 мкМ, выше 50 мкМ, выше 100 мкМ, выше 150 мкМ, выше 200 мкМ, выше 250 мкМ, выше 300 мкМ, выше 350 мкМ, выше 400 мкМ, выше 450 мкМ, выше 500 мкМ, выше 550 мкМ, выше 600 мкМ, выше 650 мкМ, выше 700 мкМ, выше 750 мкМ, выше 800 мкМ, выше 850 мкМ, или выше 900 мкМ.

Гуманизация и варианты аминокислотной последовательности

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

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение включает антитела к TrkB или их фрагменты антител, имеющие вариабельную легкую

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

30 В определенных вариантах осуществления, антитело к TrkB представляет собой фрагмент антитела. Существуют техники, которые были разработаны для получения фрагментов антител. Фрагменты можно получать путем протеолитического расщепления интактных антител (см., например, Morimoto и др., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24, 1992, сс. 107-117 и

Brennan и др., Science 229, 1985, с. 81). В альтернативном варианте фрагменты можно получать непосредственно в рекомбинантных клетках-хозяевах. Например, Fab'-SH-фрагменты можно выделять непосредственно из *E. coli* и химически сшивать с получением F(ab')₂-фрагментов (см., например, Carter и др., Bio/Technology 10, 1992, сс. 163-167). Согласно другому подходу F(ab')₂-фрагменты можно выделять непосредственно из культуры рекомбинантной клетки-хозяина. Другие методики получения фрагментов антител должны быть очевидны специалисту в данной области.

Антитела к TrkB и их антигенсвязывающие фрагменты могут включать модификации.

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

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

выбранными боковыми цепями или аминоконцевыми или карбоксиконцевыми остатками.

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

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

Связывание эпитопа

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

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

CPTSCKCSASRIWCSDPSPGIVAFPRLEPNSVDPENITEIFIANQKRLEIINEDDVE
AYVGLRNLTIIVDSGLKFVAHKAFLKNSNLQHINFTRNKLTSLSRKHFRHLDLSE
LILVGNPFTCSCDIMWIKTLQEAKSSPDTQDLYCLNESSKNIPLANLQIPNCGLPS
ANLAAPNLTVEEGKSITLSCSVAGDPVPMYWDVGNLVSKHNMNETSHTQGSLR
ITNISSDDSGKQISCVAENLVGEDQDSVNLTVHFAPTITFLESPTSDDHHWCIPFTV
KGNPKPALQWFYNGAILNESKYICTKIHVTNHTEYHGCCLQLDNPTHMNGDYT
LIAKNEYGKDEKQISAHFMGWPGIDDGANPNYPDVIYEDYGTAANDIGDTTNRS
NEIPSTDVTDKTGREH

Как используется в настоящей заявке, термины «эпитоп TrkB антигена» и «TrkB эпитоп» относятся к молекуле (например, пептиду) или фрагменту молекулы, способной (ому) связываться с антителом к TrkB или его

антигенсвязывающим фрагментом. Эти термины дополнительно включают, например, TrkB антигенную детерминанту, которая распознается любыми из антител или фрагментов антител согласно настоящему изобретению, которая имеет комбинацию CDR легкой и тяжелой цепей, выбранной из CDR легкой цепи, представленных в SEQ ID NO 48 - 50, и CDR тяжелой цепи, представленных в SEQ ID NO: 51 - 53.

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

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

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

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

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с по меньшей мере одним аминокислотным остатком в пределах

аминокислотных областей 92-112, 130-143, 205-219, 313-330 и 348-367 внеклеточного домена TrkB человека с последовательностью SEQ ID NO: 54.

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

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

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

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

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

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый)

связывается с по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, или 100% аминокислотных остатков в пределах любой из вышеуказанных комбинаций аминокислотных областей и дополнительно также с по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, или 100% аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 313-330 и/или 348-367 внеклеточного домена TrkB человека с последовательностью SEQ ID NO: 54.

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

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

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

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

5 Полинуклеотиды, векторы, клетки-хозяева и рекомбинантные методы

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

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

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

Антитела к TrkB также могут быть получены в виде слитых полипептидов, в которых антитело слито с гетерологичным полипептидом, таким как сигнальная последовательность или другой полипептид, имеющий специфический сайт расщепления на аминоконце зрелого белка или полипептида. Гетерологическую сигнальную последовательность типично выбирают из последовательности, которая распознается и процессируется (то есть, расщепляется сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. Для прокариотических клеток-хозяев, которые не распознают и не процессируют сигнальную последовательность антитела к TrkB, сигнальная последовательность может быть заменена прокариотической сигнальной последовательностью. Сигнальная последовательность может представлять собой, например, щелочную фосфатазу, пенициллиназу, липопротейн, лидерные последовательности термостабильного энтеротоксина II и подобные. Для секретиции дрожжами, нативная сигнальная последовательность может быть заменена, например, лидерной последовательностью, полученной из инвертазы альфа-фактора дрожжей (включая лидерные последовательности α -факторов *Saccharomyces* и *Kluuyveromyces*), кислой фосфатазой, глюкоамилазой *C. albicans* или сигнальной последовательностью, описанной в WO90/13646. В клетках млекопитающих, можно использовать сигнальные последовательности млекопитающих, а также вирусные секреторные лидерные последовательности, например, gD сигнальную последовательность простого герпеса. ДНК для такого участка-прекурсора лигируют в рамке считывания с ДНК, кодирующей гуманизированное антитело к TrkB.

Экспрессионные и клонирующие векторы содержат нуклеотидную последовательность, которая предоставляет возможность вектору реплицироваться в одной или нескольких выбранных клетках-хозяевах. В целом, в клонирующих векторах эта последовательность представляет собой последовательность, которая предоставляет возможность вектору реплицироваться независимо от хромосомной ДНК хозяина, и включает начала репликации или автономно реплицирующиеся последовательности. Такие последовательности хорошо известны для различных бактерий, дрожжей и вирусов. Начало репликации из плазмиды pBR322 является подходящим для большинства грамм-отрицательных бактерий, начало репликации 2- ϕ . Плазмиды являются подходящими для дрожжей, и различные вирусные начала репликации

(SV40, полиома, аденовирус, VSV, и BPV) пригодны для клонирующих векторов в клетках млекопитающих. В целом, компонент начала репликации не является необходимым для экспрессионных векторов млекопитающих (начало репликации SV40 типично можно использовать только потому, что он содержит ранний промотор).

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

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

Альтернативно, клетки-хозяева (предпочтительно хозяева дикого типа, которые содержат эндогенный DHFR), трансформированные или ко-

трансформированные последовательностями ДНК, кодирующими антитело к TrkB, белок DHFR дикого типа, и другой селектируемый маркер, такой как аминокликозид 3'-фосфотрансфераза (APH), могут быть селектированы путем роста клеток в среде, содержащей селектируемый агент для селектируемого маркера, такой как аминокликозидный антибиотик, например, канамицин, неомидин, или G418. см., например, патент US 4,965,199.

Когда рекомбинантное получение осуществляют в дрожжевой клетке в качестве клетки-хозяина, то в качестве селектируемого маркера можно использовать ген TRP1, присутствующий в дрожжевой плазмиде YRp7 (Stinchcomb и др., 1979, Nature 282: 39). Ген TRP1 обеспечивает селекционный маркер для мутантного штамма дрожжей, у которого отсутствует способность расти в триптофане, например, № ATCC 44076 или PEP4-1 (Jones, 1977, Genetics 85:12). Впоследствии присутствие *trp1* поражения в геноме дрожжевой клетки-хозяина обеспечивает эффективное окружение для обнаружения трансформации путем роста при отсутствии триптофана. Аналогичным образом, штаммы дрожжей с дефицитом *Leu2p*, такие как ATCC 20,622 и 38,626 дополняются известными плазмидами, несущими ген LEU2.

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

Экспрессионные и клонирующие векторы обычно содержат промотор, который распознается организмом-хозяином и функционально связан с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело к TrkB или его полипептидную цепь. Промоторы, подходящие для применения с прокариотическими хозяевами, включают *phoA* промотор, β -лактамазную и лактозную промоторные системы, щелочную фосфатазу, триптофановую (*trp*) промоторную систему, и гибридные промоторы, такие как *tac* промотор. Подходящими также являются другие известные бактериальные промоторы. Промоторы для применения в бактериальных системах также будут содержать

последовательность Шайна-Дальгамо (Shine-Dalgarno, S.D.), функционально связанную с ДНК, кодирующей гуманизированное антитело к TrkB.

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

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

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

Транскрипция антитела к TrkB из векторов в клетках-хозяевах млекопитающих контролируется, например, промоторами, полученными из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы кур, аденовирус (такой как Аденовирус 2), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В и вирус обезьян 40 (SV40), из гетерологичных промоторов млекопитающих, например, актиновый промотор

или иммуноглобулиновый промотор, или из промоторов теплового шока, при условии, что такие промоторы совместимы с системами клеток-хозяев.

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

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

Экспрессионные векторы, используемые в эукариотических клетках-хозяевах (дрожжи, грибы, насекомые, растения, животные, люди или ядросодержащих клетках из других многоклеточных организмов) также могут содержать последовательности, необходимые для терминации транскрипции и для стабилизации мРНК. Такие последовательности являются общедоступными из 5' и, иногда 3', нетранслируемых участков эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Эти участки содержат нуклеотидные сегменты,

транскрибируемые в виде полиаденилированных фрагментов в нетранслируемой части мРНК, кодирующей антитело к TrkB. Одним из пригодных компонентов терминации транскрипции является участок полиаденилирования бычьего гормона роста. См. WO94/11026 и экспрессионный вектор, описанный в этом документе. В некоторых вариантах осуществления, антитела к TrkB могут быть экспрессированы, используя CHEF систему. (См., например, патент US № 5888809; содержание которого включено в настоящую заявку в качестве ссылки.)

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

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

такие как *Schwanniomyces occidentalis*; и нитчатые грибы, такие как, например, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, и хозяева *Aspergillus*, такие как *A. nidulans* и *A. niger*.

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

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

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

В другом аспекте, экспрессию антител к TrkB осуществляют в клетках позвоночных. Размножение клеток позвоночных в культуре (тканевая культура) стало обычной процедурой и техники являются широкодоступными. Примерами пригодных линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия почек обезьян CV1, трансформированная с помощью SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651), линий почки эмбриона человека (293 или 293 клетки, субклонированные для роста в суспензионной культуре, (Graham и др., 1977, J. Gen Virol. 36: 59), клетки почки новорожденного хомяка (BHK, ATCC CCL 10), клетки яичника китайского хомячка/-DHFR1 (CHO, Urlaub и др., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216; например, DG44), клетки Сертоли мышей (TM4, Mather, 1980, Biol. Reprod. 23:243-251), клетки почки обезьян (CV1 ATCC CCL 70), клетки почки африканской зеленой обезьяны (VERO-76, ATCC CRL-1587), клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2), клетки почки собаки (MDCK,

ATCC CCL 34), клетки почки крысы линии Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442), клетки легких человека (W138, ATCC CCL 75), клетки печени человека (Hep G2, HB 8065), опухоль молочной железы мышей (MMT 060562, ATCC CCL51), TR1 клетки (Mather и др., 1982, Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68), MRC 5 клетки, FS4
5 клетки, и линия гепатомы человека (Hep G2).

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

Клетки-хозяева, используемые для продуцирования антитела к TrkB, описанные в настоящей заявке, могут культивироваться в различных питательных средах. Коммерчески доступные среды, такие как Ham F10 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo.), минимальная питательная среда ((MEM), (Sigma-
15 Aldrich Co.), RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Co.), и модифицированная по способу Дульбекко среда Игла ((DMEM), Sigma-Aldrich Co.) являются подходящими для культивирования клеток-хозяев. Дополнительно, любая из сред, описанных в одном или нескольких источниках: Ham и др., 1979, Meth. Enz. 58: 44, Barnes и др., 1980, Anal. Biochem. 102: 255, патент US № 4,767,704, патент US №
20 4,657,866, патент US № 4,927,762, патент US № 4,560,655, патент US № 5,122,469, WO 90/103430, и WO 87/00195, может использоваться в качестве культуральной среды для клеток-хозяев. Любые из этих сред могут быть дополнены, при необходимости, гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или фактор роста эпидермиса), солями
25 (такими как хлорид натрия, кальция, магния, и фосфат), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как аденозин и тимидин), антибиотиками (такими как гентамицин), микроэлементами (определяемые как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне), и глюкозой или эквивалентным источником
30 энергии. Другие добавки также можно включать в подходящих концентрациях, что является очевидным для квалифицированного специалиста в данной области техники. Условия культивирования, такие как температура, pH и другие, представляют собой условия, которые ранее использовались для клетки-хозяина,

выбранной для экспрессии, и будут понятными квалифицированному специалисту в данной области техники.

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

Композиция антитела, приготовленная из клеток, может быть очищена, например, путем хроматографии с гидроксипатитом, гель-электрофореза, диализа и афинной хроматографии, где типичной техникой очистки является афинная хроматография. Пригодность белка А в качестве афинного лиганда зависит от видов и изоформа любого домена Fc иммуноглобулина, который присутствует в антителе. Белок А можно использовать для очистки антитела, которые основываются на тяжелых цепях гамма1, гамма2, или гамма4 человека (см., например, Lindmark и др., 1983 J. Immunol. Meth. 62:1-13). Белок G рекомендуется для всех мышинных изоформ и для гамма3 человека (см., например, Guss и др., 1986 EMBO J. 5:1567-1575). Матрицей, к которой присоединен афинный лиганд, наиболее часто представляет собой агарозу, но доступны также другие матрицы. Механично стабильные матрицы, такие как

стекло с заданным размером пор или поли(стиролдивинил)бензол предоставляют возможность более быстрых скоростей потоков и более короткого времени обработки, которого можно достичь с агарозой. Если антитело включает C_{H3} домен, то смола Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) является

5 подходящей для очистки. Также доступны других технологии для очистки белков, такие как фракционирование на ионо-обменной колонке, осаждение с этанолом, ВЭЖХ с обращенной фазой, хроматография на диоксиде кремния, хроматография на гепарин SEPHAROSE™ хроматография на анион- или катион-

10 обменной смоле (такой как колонка с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусирование, SDS-PAGE, и осаждение с сульфатом аммония, в зависимости от восстанавливаемого антитела.

После любой (ых) подготовительной (ых) стадии (й) очистки, смесь, содержащую представляющее интерес антитело и загрязнители, можно подвергать хроматографии с гидрофобным взаимодействием при низких pH,

15 используя элюирующий буфер при pH в диапазоне 2,5-4,5, типично осуществляют при низких концентрациях соли (например, от приблизительно 0-0,25 М соли).

Изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, которые гибридизуются в расслабленных, умеренных или строгих условиях, как указано

20 в настоящей заявке, со всей или частью (например, частью, которая кодирует переменную область) нуклеотидной последовательности, которая представляет собой выделенную (ые) полинуклеотидную (ые) последовательность (и), кодирующую (ие) антитело к TrkB или фрагмент антитела. Гибридирующаяся область гибридизующейся нуклеиновой кислоты, как правило, состоит из по

25 меньшей мере 15 (например, 20, 25, 30 или 50) нуклеотидов. Гибридирующаяся область гибридизующейся нуклеиновой кислоты идентична по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, или по меньшей мере на 98%, последовательности участка или всей нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид к TrkB (например, переменную область

30 тяжелой цепи или легкой цепи), или ее комплементу. Гибридирующие нуклеиновые кислоты описанного в настоящей заявке типа можно использовать, например, в качестве зонда для клонирования, праймера, например, ПЦР-праймера или диагностического зонда.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение включает выделенный (е) полинуклеотид (ы), включающий (е) последовательности, которые кодируют антитело или фрагмент антитела, имеющее/имеющий переменную легкую цепь и переменную тяжелую цепь, где аминокислотная последовательность переменной легкой цепи и аминокислотная последовательность переменной тяжелой цепи являются по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 2 и 12, или 3 и 13, или 4 и 14, или 5 и 15, или 6 и 16, или 7 и 17, или 8 и 18, или 9 и 19, или 10 и 20, соответственно.

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

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

Нетерапевтические применения

Антитела, представленные в настоящем описании, можно применять в качестве средств, используемых для очистки на основе аффинности. При осуществлении этого процесса антитела иммобилизуют на твердой фазе, такой как смола, содержащая белок А, с помощью методов, хорошо известных в данной области. Иммобилизованное антитело приводят в контакт с образцом, содержащим белок TrkB (или его фрагмент), который подлежит очистке, и затем

подложку отмывают приемлемым растворителем, который должен удалять практически весь материал в образце, кроме белка TrkB, связанного с иммобилизованным антителом. И, наконец, подложку отмывают другим приемлемым растворителем, который должен отделять белок TrkB от антитела.

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

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

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

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

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

Примерами ферментативных меток являются люциферазы, такие как люцифераза светляка и бактериальная люцифераза (US 4737456), люциферин, 2,3-дигидрофталазиндионы, малатдегидрогеназа, уреазы, пероксидазы, например, пероксидаза из хрена (HRPO), щелочная фосфатаза, β -галактозидаза, глюкоамилаза, лизоцим, оксидазы сахаридов (такие как оксидаза глюкозы, оксидаза галактозы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа), оксидазы гетероциклических соединений (такие как уриказа и оксидаза ксантина), лактопероксидаза, микропероксидаза и т.п. Методики конъюгации ферментов с антителами описаны, например, у O'Sullivan и др., *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, в: *Methods in Enzym.*, под ред. J. Langone и H. Van Vunakis, изд-во Academic press, N.Y., 73, 1981, сс. 147-166.

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

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

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

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

Диагностические наборы

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

Терапевтические применения и TrkB-связанные нарушения

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

Антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент вводят любыми приемлемыми путями, включая интравитреальный, пероральный, парентеральный, подкожный, внутрибрюшинный, внутрилегочный и

внутриносовой. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Дополнительно, антитело к TrkB подходяще вводят путем пульсирующей инфузии, прежде всего с понижающими дозами антитела. В одном аспекте, дозирование осуществляют путем инъекций, наиболее предпочтительно внутривенных или подкожных инъекций, в том числе в зависимости от того является ли обработка кратковременной или пролонгированной. Предпочтительно, антитело к TrkB вводят путем интравитреальной инъекции в глаза.

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

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

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

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

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

5 Агонистические антитела к TrkB согласно настоящему изобретению стимулируют передачу сигналов TrkB. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, полагают, что передача сигналов TrkB благоприятна для защиты фоторецепторов, других нейронов сетчатки, включая ганглиозные клетки и клеток пигментного эпителия сетчатки от клеточной гибели в сетчатке.

10 Следовательно, агонистические антитела к TrkB могут защищать нейроны сетчатки, такие как фоторецепторы от дегенерации, то есть, предотвращать нейро-дегенерацию, и также повышать выживание и/или пластичность нейронов, в конечном итоге противодействуя потере зрения, связанной либо с уменьшенной активностью TrkB и/или повышенному клеточному стрессу или

15 апоптотической активности. Таким образом, антитела пригодны для лечения заболевания глаз или заболеваний сетчатки, в особенности нейродегенеративных заболеваний сетчатки или заболеваний глаз. Такие заболевания включают, но не ограничиваясь только ими, возрастную дегенерацию жёлтого пятна, географическую атрофию, диабетическую ретинопатию, диабетический отёк

20 жёлтого пятна, пигментную дистрофию сетчатки, наследственную дистрофию сетчатки, наследственную макулодистрофию, миопическую дегенерацию, окклюзии вены сетчатки, окклюзии артерии сетчатки, эндофтальмит, увеит, кистозный макулярный отёк, хороидальную неоваскулярную мембрану вследствие любого из заболеваний сетчатки, оптические нейропатии, глаукому,

25 отслойку сетчатки, токсическую ретинопатию, лучевую ретинопатию и травматическую ретинопатию.

Антитела также пригодны для лечения заболеваний центральной нервной системы, таких как продромальная и от легкой до умеренной болезнь Альцгеймера, задержка прогрессирования заболевания у пациентов с болезнью

30 Альцгеймера, болезнь Хантингтона, болезнь Паркинсона, большое депрессивное расстройство, шизофрения, когнитивное нарушение, связанное с шизофренией, предотвращение первого приступа психоза у индивидуумов с ослабленным психозным синдромом, предотвращение повторения у пациентов с шизофренией или терапевтически резистентная депрессия.

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

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

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

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

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

В другом аспекте, антитела к TrkB согласно настоящему изобретению могут применяться в способе лечения и/или предотвращения нарушения, связанного с TrkB, в особенности географической атрофии, который включает введение терапевтически эффективного количества антитела к TrkB согласно

изобретению индивидууму, страдающему от географической атрофии, таким образом ослабляя один или несколько симптомов географической атрофии.

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

Фармацевтические композиции и их введение

Композиция, содержащая антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент, может вводиться субъекту, который страдает от или имеет риск развития заболевания глаз или сетчатки. Изобретение дополнительно обеспечивает применение антитела к TrkB или его антигенсвязывающего фрагмента для приготовления лекарственного средства для предотвращения или лечения TrkB заболевания. Термин «субъект», как используется в настоящей заявке, обозначает любого пациента-млекопитающего, которому можно вводить антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент, включая, например, людей и млекопитающих, отличающихся от человека, таких как приматы, грызуны и собаки. Субъектов, включая людей, в частности, можно лечить с использованием способов, представленных в настоящем описании. Антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить либо отдельно или в комбинации с другими композициями.

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

Также охватываются антитела для применения в таких фармацевтических композициях, представляющие собой гуманизированное антитело или фрагменты антител, имеющее (ие) переменную легкую цепь и переменную тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности

SEQ ID NO: 2 и 12, или 3 и 13, или 4 и 14, или 5 и 15, или 6 и 16, или 7 и 17, или 8 и 18, или 9 и 19, или 10 и 20, соответственно.

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

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

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

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

Антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент можно водить в виде фармацевтических композиций, содержащих терапевтически эффективное

количество антитела к TrkB или его антигенсвязывающего фрагмента и один или несколько фармацевтически совместимых ингредиентов.

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

Кроме того, фармацевтическую композицию можно включать в фармацевтический набор, который содержит (а) контейнер, содержащий антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент в лиофилизованной
25 форме и (б) второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый разбавитель (например, стерильную воду) для инъекций. Фармацевтически приемлемый разбавитель можно использовать для восстановления или разведения лиофилизованного антитела к TrkB или его антигенсвязывающего фрагмента. Необязательно к указанному(ым) контейнеру(ам) может прилагаться
30 уведомление в форме, утвержденной официальным агентством, разрешающим производство, применение или продажу фармацевтических препаратов или биологических продуктов, где в уведомлении отражено разрешение агентства на производство, применение или продажу с целью введения людям.

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

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

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

для человека. Можно определять концентрации в плазме крови, например, с помощью жидкостной хроматографии высокого разрешения, ELISA и т.п.

Для интравитреальной инъекции антитела к TrkB, как правило, предпочтительными являются более длительные интервалы между лечениями.

5 Благодаря их улучшенной эффективности, антитела к TrkB согласно настоящему изобретению могут вводиться с более длительными интервалами.

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

В одном варианте осуществления, антитело к TrkB вводят субъекту, который в этом нуждается, в начальной дозе 1-2000 мг. В другом варианте 15 осуществления, необязательно вводят одну или несколько последующих доз, каждая из которых содержит 1-2000 мг антитела к TrkB.

В связи с тем, что объем, которые может вводиться в глаз, существенно ограничен, то чрезвычайно важным является то, что антитело к TrkB может быть 20 приготовлено в виде препарата в высоких концентрациях. Кроме того, эффективность антитела к TrkB является чрезвычайно важной, поскольку эффективное антитело может проявлять свой эффект даже в очень низких дозах и, следовательно, пролонгирует активность, а также интервалы между лечениями.

Антитела согласно настоящему изобретению могут быть приготовлены в 25 виде препаратов в чрезвычайно высоких дозах, которые включают, но не ограничиваясь только ими, 20 мг/мл, 30 мг/мл, 40 мг/мл, 50 мг/мл, 60 мг/мл, 70 мг/мл, 80 мг/мл, 90 мг/мл или 100 мг/мл.

Типичная дозировка, которая может вводиться пациенту, составляет приблизительно 3 мг/глаз. Типичные буферные компоненты, которые можно 30 применять для такого препарата, содержат, например, ацетат натрия, PS20 и дигидрат трегалозы.

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

В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции, содержащие антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент могут дополнительно включать терапевтическое средство, конъюгированное или неконъюгированное со связывающим агентом. Антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент можно совместно вводить в комбинации с одним или несколькими терапевтическими средствами для лечения или предотвращения заболевания, связанного с TrkB. Например, комбинированная терапия может включать анти-VEGF, анти-PDGF или анти-ANG2.

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

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

Изделия

Другим объектом изобретения является изделие, содержащее вещества, пригодные для лечения нарушений, описанных выше. Изделие включает контейнер и этикетку. Приемлемыми контейнерами являются, например, бутылки, флаконы, шприцы и лабораторные пробирки. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит композицию, которая является эффективной для лечения конкретного состояния, и может иметь стерильное отверстие для доступа. Например, контейнер может представлять собой мешок или флакон для внутривенного раствора, имеющий запирающее устройство, проницаемое для инъекционной иглы для подкожного введения. Действующее вещество в композиции представляет собой антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент. На этикетке на контейнере или связанной с ним указывается, что композиция используется для лечения выбранного состояния. Изделие может дополнительно

включать второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как забуференный фосфатом физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Он может дополнительно включать другие вещества, присутствие которых желательно с коммерческой и потребительской точки зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши в упаковку с инструкциями по применению.

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

ПРИМЕРЫ

1. Создание антитела (иммунизация)

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

2. Получение гуманизированных антител

Мышиный лидерный D003 отбирали для дальнейшей оптимизации. Мышиный лидерный компонент имел вариабельную легкую цепь, соответствующую SEQ ID NO: 1 и вариабельную тяжёлую цепь, соответствующий SEQ ID NO: 11.

Для оптимизации последовательности TrkB мышиного лидерного D003, отбирали наиболее сходные последовательности антител зародышевой линии человека, IGKV4-1*01, KJ2 для легкой цепи и IGHV1-46*03, HJ6 для тяжелой цепи. Создавали библиотеку вариантов. Это приводило к получению гуманизированных вариабельных последовательностей легкой цепи, представленных в SEQ ID NO: 2-10, и вариабельных последовательностей тяжелой цепи, представленных в SEQ ID NO: 12-20.

ТАБЛИЦА 2:

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

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

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

ТАБЛИЦА 3:

277-gr (Легкая цепь, IgG1)	21
277-gr (Тяжелая цепь, IgG1)	22
277-gr (Тяжелая цепь, IgG1-КО)	23
277-33 (Легкая цепь, IgG1)	24
277-33 (Тяжелая цепь, IgG1)	25
277-33 (Тяжелая цепь, IgG1-КО)	26
277-35 (Легкая цепь, IgG1)	27
277-35 (Тяжелая цепь, IgG1)	28
277-35 (Тяжелая цепь, IgG1-КО)	29
277-42 (Легкая цепь, IgG1)	30
277-42 (Тяжелая цепь, IgG1)	31
277-42 (Тяжелая цепь, IgG1-КО)	32
277-44 (Легкая цепь, IgG1)	33
277-44 (Тяжелая цепь, IgG1)	34
277-44 (Тяжелая цепь, IgG1-КО)	35
277-48 (Легкая цепь, IgG1)	36
277-48 (Тяжелая цепь, IgG1)	37
277-48 (Тяжелая цепь, IgG1-КО)	38
277-51 (Легкая цепь, IgG1)	39
277-51 (Тяжелая цепь, IgG1)	40
277-51 (Тяжелая цепь, IgG1-КО)	41
277-64 (Легкая цепь, IgG1)	42

277-64 (Тяжелая цепь, IgG1)	43
277-64 (Тяжелая цепь, IgG1-KO)	44
277-67 (Легкая цепь, IgG1)	45
277-67 (Тяжелая цепь, IgG1)	46
277-67 (Тяжелая цепь, IgG1-KO)	47
277 L-CDR1	48
277 L-CDR2	49
277 L-CDR3	50
277 H-CDR1	51
277 H-CDR2	52
277 H-CDR3	53

3. Информация об эпитопе

Материалы

- Вода (Sigma Aldrich, номер по каталогу 37877-4L)
- 5 Ацетонитрил (Sigma Aldrich, номер по каталогу 34998-4L)
- Муравьиная кислота (Fluka, номер по каталогу 94318)
- Мочевина (Sigma Aldrich, номер по каталогу 51456-500G)
- ТСЕР-HCl – 10 г (Thermo Scientific - Pierce, номер по каталогу 20491)
- Двухосновный фосфат натрия (Sigma Aldrich, номер по каталогу S7907-100G)
- 10 Одноосновный фосфат натрия (Sigma Aldrich, номер по каталогу S8282 – 500G)
- Предколонка ACQUITY UPLC BEH C18 VanGuard, 130Å, 1,7 мкм, 2,1 мм X 5 мм (Waters Technologies Corp, 186003975)
- Картридж с иммобилизованным пепсином Poroszyme® I, 2,1 мм x 30 мм (Life
- 15 Technologies Corp, 2313100)
- Колонка Acquity UPLC BEH C18 1,7 мкм, 1 мм X 50 мм (Waters, 186002344)
- Растворитель А: 0,1 % Муравьиная кислота /99% вода /1% ацетонитрил
- Растворитель В: 0,1 % Муравьиная кислота /5% вода /95% ацетонитрил
- Водный буфер: H₂O 10 mM фосфат натрия pH 7,4
- 20 Дейтериевый буфер: D₂O 10 mM фосфат натрия pH 7,4
- Закаливающий буфер: Вода 8 М Мочевина, 0,4М ТСЕР-HCl

В контрольных образцах для картирования эпитопов, антиген прогоняли с антителом и без него. Для определения перечня антигенных пептидов, в этом

проколе сначала осуществляли первый прогон, используя водный буфер вместо

25 дейтериевого буфера. 4 мкл образца смешивали с 40 мкл дейтериевого буфера. Эту смесь инкубировали при 20°C для нескольких временных точек (1, 2 и 4

минуты). После этого 40 мкл смеси переносили в 40 мкл 4°C закаливающего буфера (4М Мочевина, 0,4М Тсер-НСl) и смешивали. Инъецировали 60 мкл закаливающего белка, где он расщепляется на пепсиновой колонке в течение 2 минут путем промывания 200 мкл/мл растворителя А: 0,1 %Муравьиная кислота /99% вода /1% ацетонитрил. Последующие пептиды обессоливали на предколонке Vanguard в течение 3 минут. Расщепленные пепсином пептиды отправляли на колонку с обращенной фазой ВЕН C18 внутри колонки /клапана терморегулируемого компартмента. Использовали градиент системы растворителей, состоящей из: растворитель А: 0,1 %Муравьиная кислота /99% вода /1% ацетонитрил и растворитель В: 0,1 % Муравьиная кислота /5% вода /95% ацетонитрил. Процентное содержание растворителя В повышали от 10% до 15% через 5,1 минуты, до 50% через 11 минут, до 90% через 11,5 минуты, выдерживая до 12,5 минут, до 0% В через 13 минут, выдерживая до 14 минут. Хроматографическое разделение происходило при 4°C при скорости потока 180 мкл/мин. После хроматографического разделения образец поступал на Thermo Scientific Orbitrap Fusion масс-спектрометр, работающий в режиме положительной электрораспылительной ионизации. Используемый метод включал активационные типы CID и ETD при идентификации контрольных пептидов, используя разделение 120 тыс., минимальный сигнал 10 тыс., ширину выделения 1,0 и нормированную энергию столкновений 35,0 В. RF уровень S-линз устанавливали на 60%. Для контрольных пептидов тип сбора данных представлял собой профили для полного MS сканирования и центроид для CID MS/MS данных. Для дейтерированных образцов, не собирали MS /мс. Данные собирали для массового диапазона 280-1800 Да. Для анализа необработанных данных ЖХ-МС /мс фрагментации, контрольные образцы (с CID и ETD MS/мс) анализировали, используя Proteome Discover 1.4 (Thermo Scientific) и PMi Byonic (Protein Metrics) по отношению к заданной последовательности для создания перечня пептидов и времени удерживания. Файлы с необработанными данными предварительно обрабатывали и превращали в ASCII формат, используя собственное разработанное программное обеспечение SHARC. После этого отмечали идентифицированные пептиды и обобщали полученные данные, используя собственное разработанное программное обеспечение SHAFT. Эпитопы определяли на основании отличий сдвига средней массы,

индуцированного связыванием после мечения дейтерием. На уровне пептида, защита больше 0,4 Да рассматривалась как достоверная.

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

4. Подверженности последовательностей в CDR

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

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

ТАБЛИЦА 4

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

5. Иммуногенность

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

ТАБЛИЦА 5:

VL	Оценка Eprivaх	VH	Оценка Eprivaх
277-gr VL	-24	277-gr VH	-46
277-33 VL	-31	277-33 VH	-32
277-35 VL	-31	277-35 VH	-26
277-42 VL	-27	277-42 VH	-26
277-44 VL	-14	277-44 VH	-49
277-48 VL	-24	277-48 VH	-29
277-51 VL	-31	277-51 VH	-22
277-64 VL	-28	277-64 VH	-44
277-67 VL	-14	277-67 VH	-44
C2 VL	-2	C2 VH	-21
C20 VL	+9	C20 VH	+20
TAM163 VL	-51	TAM163 VH	-19

6. Аффинность:

Использовали технологию поверхностного плазмонного резонанса (SPR) для определения аффинности связывания 277-антител, C2 (US20100196390), и C20 (US20100150914) и TAM-163 (WO2015173756) с Hu-TrkB-His. Эксперимент осуществляли на приборе ProteOn XPR36.

Метод: Подвижный буфер для этого эксперимента и все разведения (за исключением тех случаев, когда конкретно указано) осуществляли в PBS-T-EDTA с 0,01% Tween20 [100 мкл 100% Tween20 добавляли к 2 л PBS-T-EDTA для получения конечной концентрации Tween 20 0,01%]. Сенсорный чип GLM нормировали и устанавливали предварительные условия согласно инструкциям производителя. Сенсорный чип активировали с применением уравновешенной смеси EDC/s-NHS в горизонтальном направлении в течение 300 секунд при скорости потока 30 мкл/мин и иммобилизовали с Рекомбинантным белком A/G (60 мкг/мл в 10 mM ацетате pH 4,5) в горизонтальном направлении в течение 300 секунд при скорости потока 30 мкл/мин, что приводило к ~ 7100-7130 ЕО Белка A/G на поверхности. Сенсорный чип деактивировали с применением 1M этаноламина HCl в горизонтальном направлении в течение 300 секунд при скорости потока 30 мкл/мин. Сенсорный чип стабилизировали в течение 18 секунд с 0,85% фосфорной кислотой при скорости потока 100 мкл/мин 3 раза горизонтально и 3 раза вертикально. 277-антитело (0,6 мкг/мл), C2 (2,1 мкг/мл), C20 (1,2 мкг/мл), и TAM-163 (5 мкг/мл) захватывали на поверхность Белка A/G вертикально в течение 70 секунд при скорости потока 30 мкл/мин, что

приводило к уровням захвата ~615, 1390, 780 и 3380 ЕО, соответственно. Исходный уровень стабилизировали путем инъектирования PBS-T-EDTA в течение 60 секунд при скорости потока 100 мкл/мин горизонтально и затем второй инъекции PBS-T-EDTA в течение 60 секунд при скорости потока 100 мкл/мин и диссоциации 120 секунд горизонтально. Аналит (Hu-TrkB-His) инъектировали горизонтально над захваченным антителом в течение 600 секунд при скорости потока 30 мкл/мин и диссоциации в течение 1800 секунд. Концентрации аналитов составляли 0 нМ, 1,23 нМ, 3,7 нМ, 11,11 нМ, 33,33 нМ и 100 нМ. Поверхность регенерировали путем инъектирования 0,85% фосфорной кислоты в течение 18 секунд при скорости потока 100 мкл/мин один раз горизонтально и один раз вертикально. PBS-T-EDTA инъектировали в течение 60 секунд при скорости потока 100 мкл/мин один раз вертикально. Взаимные помехи (взаимодействия с поверхностью сенсора) и холостые данные (PBS-T-EDTA с 0,01% Tween20 или 0 нМ аналита) вычитали из необработанных данных. После этого сенсограммы подгоняли глобально к 1:1 связыванию Ленгмюра, получая значения ассоциации (k_a), диссоциации (k_d) и аффинности (K_D).

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

ТАБЛИЦА 6:

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

7. Неспецифическое связывание:

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

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

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

Метод:

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

Для приготовления поверхности для эксперимента неспецифического связывания, белый лизоцим куриных яиц и ингибитор трипсина типа 1-S из сои связывали вручную с сериями S CM5 чипа с плотностью поверхности 3000-5000 ЕО, используя набор для иммобилизации по амино-группе согласно инструкциям производителя. FC1 и FC2 активировали путем инъектирования 1:1 смеси EDC и NHS в течение 7 минут. Поверхностью белого лизоцима куриных яиц приготавливали на FC2 путем инъектирования 150 мкг/мл белого лизоцима куриных яиц в 10 mM NaOAc, pH 5,5 в течение 5 минут. FC1 и FC2 дезактивировали путем инъектирования 1 M этаноламин-HCl в течение 7 минут. FC1 использовали в качестве эталонной поверхности. FC3 активировали путем инъектирования 1:1 смеси EDC и HNS в течение 7 минут. Поверхность

ингибитора трипсина типа 1-S из сои приготавливали на FC3 путем инъектирования 300 мкг/мл ингибитора трипсина типа 1-S из сои в 10 mM NaOAc, pH 4,0 буфера в течение 20 минут с последующей 7 мин. инъекцией 1 M этаноламин-HCl для дезактивации проточной ячейки. Поликлональное антитело к лизоциму, антитело к ингибитору трипсина, и ВІ отрицательный контроль использовали в качестве контролей в анализе. Контроли и антитела приготавливали в 1 мкМ в 1X HBS-EP буфере. Образцы инъектировали над FC1, FC2 и FC3 поверхностями с 10 мин. ассоциацией и 15 мин. диссоциацией. Поверхности регенерировали между каждым циклом связывания путем инъектирования 1 мин. 0,85% фосфорной кислоты и 30 с 50 mM NaOH при скорости потока 50 мкл/мин с последующим периодом стабилизации 2 мин. с 1X HBS-EP буфером, текущим через все поверхности. Поликлональное антитело к лизоциму и антитело к ингибитору трипсина инъектировали над FC1, FC2 и FC3 в начале и конце эксперимента. Данные собирали, используя Biacore T200 Control Software версия 2.0.1, и анализировали, используя Biacore T200 Evaluation Software версия 3.0.

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

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

ТАБЛИЦА 7:

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

8. Активность (SY5Y) и эффективность

Дифференциация SH-SY5Y клеток к нейронному фенотипу

Клетки SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™) культивировали в DMEM:F12 (Lonza № BE12-719F) с 15% фетальной бычьей сывороткой в колбе для культивирования ткани 175 см² (Corning №353112). Для высевания клеток колбу промывали один раз с помощью D-PBS (Lonza № 17-512Q) и клетки отсоединяли с применением 37°C предварительно нагретого раствора аккутазы (A6964 SIGMA). После инкубирования в течение 3 минут при комнатной температуре клетки присоединены с помощью пипетки 10 мл и перенесены в пробирку фирмы Falcon объемом 15 мл. Клетки подсчитывали и 6000 клеток в 100 мкл DMEM:F12 с 15% FBS на лунку высевали в покрытые коллагеном-I планшеты на 96 лунок (BD Biosciences № 354407). Клетки поддерживали во влажном инкубаторе при 37°C, 5% CO₂. Через 8 часов, в каждую лунку добавляли 100 мкл 6 мкМ раствора ретиноевой кислоты (Sigma № R2625). Конечная концентрация ретиноевой кислоты составляла 3 мкМ. Через 48 часов и 96 часов, необходима стимуляция с дополнительным количеством ретиноевой кислоты. Для этого, удаляли 100 мкл среды на лунку и добавляли 100 мкл свежей среды с 6 мкМ ретиноевой кислоты. После дифференциации в течение 7 дней SH-SY5Y клетки имели допаминергически-подобный фенотип и были готовы к использованию.

Стимуляция и лизис дифференцированных клеток SH-SY5Y

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

После этого содержимое планшета перемешивали на встряхивателе для планшетов эппендорфа при 500 об./мин. в течение 5 минут.

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

Определение ERK1/2 Фосфорилирования

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

Определение AKT1/2/3 Фосфорилирования

Измерение Akt 1/2/3 (Thr308) фосфорилирования осуществляли с применением 8 кл клеточного лизата согласно инструкциям производителя

((AlphaScreen SureFire p-Akt 1/2/3 (Thr308) набора (PerkinElmer № TGRA3S10K)).

Несколько антител к TrkB согласно изобретению анализировали для определения их потенциальной активности активировать TrkB, а также инициировать нижерасположенные сигналы. Также в исследование включали природный лиганд BDNF и антитела C2 и C20. Антитела к TrkB согласно настоящему изобретению в среднем в десять раз более активны относительно активации TrkB по сравнению с природным лигандом BDNF. При сравнении с антителами C2 и C20, антитела к TrkB согласно изобретению в среднем в три
 5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65
 70
 75
 80
 85
 90
 95
 100
 105
 110
 115
 120
 125
 130
 135
 140
 145
 150
 155
 160
 165
 170
 175
 180
 185
 190
 195
 200
 205
 210
 215
 220
 225
 230
 235
 240
 245
 250
 255
 260
 265
 270
 275
 280
 285
 290
 295
 300
 305
 310
 315
 320
 325
 330
 335
 340
 345
 350
 355
 360
 365
 370
 375
 380
 385
 390
 395
 400
 405
 410
 415
 420
 425
 430
 435
 440
 445
 450
 455
 460
 465
 470
 475
 480
 485
 490
 495
 500
 505
 510
 515
 520
 525
 530
 535
 540
 545
 550
 555
 560
 565
 570
 575
 580
 585
 590
 595
 600
 605
 610
 615
 620
 625
 630
 635
 640
 645
 650
 655
 660
 665
 670
 675
 680
 685
 690
 695
 700
 705
 710
 715
 720
 725
 730
 735
 740
 745
 750
 755
 760
 765
 770
 775
 780
 785
 790
 795
 800
 805
 810
 815
 820
 825
 830
 835
 840
 845
 850
 855
 860
 865
 870
 875
 880
 885
 890
 895
 900
 905
 910
 915
 920
 925
 930
 935
 940
 945
 950
 955
 960
 965
 970
 975
 980
 985
 990
 995
 1000
 1005
 1010
 1015
 1020
 1025
 1030
 1035
 1040
 1045
 1050
 1055
 1060
 1065
 1070
 1075
 1080
 1085
 1090
 1095
 1100
 1105
 1110
 1115
 1120
 1125
 1130
 1135
 1140
 1145
 1150
 1155
 1160
 1165
 1170
 1175
 1180
 1185
 1190
 1195
 1200
 1205
 1210
 1215
 1220
 1225
 1230
 1235
 1240
 1245
 1250
 1255
 1260
 1265
 1270
 1275
 1280
 1285
 1290
 1295
 1300
 1305
 1310
 1315
 1320
 1325
 1330
 1335
 1340
 1345
 1350
 1355
 1360
 1365
 1370
 1375
 1380
 1385
 1390
 1395
 1400
 1405
 1410
 1415
 1420
 1425
 1430
 1435
 1440
 1445
 1450
 1455
 1460
 1465
 1470
 1475
 1480
 1485
 1490
 1495
 1500
 1505
 1510
 1515
 1520
 1525
 1530
 1535
 1540
 1545
 1550
 1555
 1560
 1565
 1570
 1575
 1580
 1585
 1590
 1595
 1600
 1605
 1610
 1615
 1620
 1625
 1630
 1635
 1640
 1645
 1650
 1655
 1660
 1665
 1670
 1675
 1680
 1685
 1690
 1695
 1700
 1705
 1710
 1715
 1720
 1725
 1730
 1735
 1740
 1745
 1750
 1755
 1760
 1765
 1770
 1775
 1780
 1785
 1790
 1795
 1800
 1805
 1810
 1815
 1820
 1825
 1830
 1835
 1840
 1845
 1850
 1855
 1860
 1865
 1870
 1875
 1880
 1885
 1890
 1895
 1900
 1905
 1910
 1915
 1920
 1925
 1930
 1935
 1940
 1945
 1950
 1955
 1960
 1965
 1970
 1975
 1980
 1985
 1990
 1995
 2000
 2005
 2010
 2015
 2020
 2025
 2030
 2035
 2040
 2045
 2050
 2055
 2060
 2065
 2070
 2075
 2080
 2085
 2090
 2095
 2100
 2105
 2110
 2115
 2120
 2125
 2130
 2135
 2140
 2145
 2150
 2155
 2160
 2165
 2170
 2175
 2180
 2185
 2190
 2195
 2200
 2205
 2210
 2215
 2220
 2225
 2230
 2235
 2240
 2245
 2250
 2255
 2260
 2265
 2270
 2275
 2280
 2285
 2290
 2295
 2300
 2305
 2310
 2315
 2320
 2325
 2330
 2335
 2340
 2345
 2350
 2355
 2360
 2365
 2370
 2375
 2380
 2385
 2390
 2395
 2400
 2405
 2410
 2415
 2420
 2425
 2430
 2435
 2440
 2445
 2450
 2455
 2460
 2465
 2470
 2475
 2480
 2485
 2490
 2495
 2500
 2505
 2510
 2515
 2520
 2525
 2530
 2535
 2540
 2545
 2550
 2555
 2560
 2565
 2570
 2575
 2580
 2585
 2590
 2595
 2600
 2605
 2610
 2615
 2620
 2625
 2630
 2635
 2640
 2645
 2650
 2655
 2660
 2665
 2670
 2675
 2680
 2685
 2690
 2695
 2700
 2705
 2710
 2715
 2720
 2725
 2730
 2735
 2740
 2745
 2750
 2755
 2760
 2765
 2770
 2775
 2780
 2785
 2790
 2795
 2800
 2805
 2810
 2815
 2820
 2825
 2830
 2835
 2840
 2845
 2850
 2855
 2860
 2865
 2870
 2875
 2880
 2885
 2890
 2895
 2900
 2905
 2910
 2915
 2920
 2925
 2930
 2935
 2940
 2945
 2950
 2955
 2960
 2965
 2970
 2975
 2980
 2985
 2990
 2995
 3000
 3005
 3010
 3015
 3020
 3025
 3030
 3035
 3040
 3045
 3050
 3055
 3060
 3065
 3070
 3075
 3080
 3085
 3090
 3095
 3100
 3105
 3110
 3115
 3120
 3125
 3130
 3135
 3140
 3145
 3150
 3155
 3160
 3165
 3170
 3175
 3180
 3185
 3190
 3195
 3200
 3205
 3210
 3215
 3220
 3225
 3230
 3235
 3240
 3245
 3250
 3255
 3260
 3265
 3270
 3275
 3280
 3285
 3290
 3295
 3300
 3305
 3310
 3315
 3320
 3325
 3330
 3335
 3340
 3345
 3350
 3355
 3360
 3365
 3370
 3375
 3380
 3385
 3390
 3395
 3400
 3405
 3410
 3415
 3420
 3425
 3430
 3435
 3440
 3445
 3450
 3455
 3460
 3465
 3470
 3475
 3480
 3485
 3490
 3495
 3500
 3505
 3510
 3515
 3520
 3525
 3530
 3535
 3540
 3545
 3550
 3555
 3560
 3565
 3570
 3575
 3580
 3585
 3590
 3595
 3600
 3605
 3610
 3615
 3620
 3625
 3630
 3635
 3640
 3645
 3650
 3655
 3660
 3665
 3670
 3675
 3680
 3685
 3690
 3695
 3700
 3705
 3710
 3715
 3720
 3725
 3730
 3735
 3740
 3745
 3750
 3755
 3760
 3765
 3770
 3775
 3780
 3785
 3790
 3795
 3800
 3805
 3810
 3815
 3820
 3825
 3830
 3835
 3840
 3845
 3850
 3855
 3860
 3865
 3870
 3875
 3880
 3885
 3890
 3895
 3900
 3905
 3910
 3915
 3920
 3925
 3930
 3935
 3940
 3945
 3950
 3955
 3960
 3965
 3970
 3975
 3980
 3985
 3990
 3995
 4000
 4005
 4010
 4015
 4020
 4025
 4030
 4035
 4040
 4045
 4050
 4055
 4060
 4065
 4070
 4075
 4080
 4085
 4090
 4095
 4100
 4105
 4110
 4115
 4120
 4125
 4130
 4135
 4140
 4145
 4150
 4155
 4160
 4165
 4170
 4175
 4180
 4185
 4190
 4195
 4200
 4205
 4210
 4215
 4220
 4225
 4230
 4235
 4240
 4245
 4250
 4255
 4260
 4265
 4270
 4275
 4280
 4285
 4290
 4295
 4300
 4305
 4310
 4315
 4320
 4325
 4330
 4335
 4340
 4345
 4350
 4355
 4360
 4365
 4370
 4375
 4380
 4385
 4390
 4395
 4400
 4405
 4410
 4415
 4420
 4425
 4430
 4435
 4440
 4445
 4450
 4455
 4460
 4465
 4470
 4475
 4480
 4485
 4490
 4495
 4500
 4505
 4510
 4515
 4520
 4525
 4530
 4535
 4540
 4545
 4550
 4555
 4560
 4565
 4570
 4575
 4580
 4585
 4590
 4595
 4600
 4605
 4610
 4615
 4620
 4625
 4630
 4635
 4640
 4645
 4650
 4655
 4660
 4665
 4670
 4675
 4680
 4685
 4690
 4695
 4700
 4705
 4710
 4715
 4720
 4725
 4730
 4735
 4740
 4745
 4750
 4755
 4760
 4765
 4770
 4775
 4780
 4785
 4790
 4795
 4800
 4805
 4810
 4815
 4820
 4825
 4830
 4835
 4840
 4845
 4850
 4855
 4860
 4865
 4870
 4875
 4880
 4885
 4890
 4895
 4900
 4905
 4910
 4915
 4920
 4925
 4930
 4935
 4940
 4945
 4950
 4955
 4960
 4965
 4970
 4975
 4980
 4985
 4990
 4995
 5000
 5005
 5010
 5015
 5020
 5025
 5030
 5035
 5040
 5045
 5050
 5055
 5060
 5065
 5070
 5075
 5080
 5085
 5090
 5095
 5100
 5105
 5110
 5115
 5120
 5125
 5130
 5135
 5140
 5145
 5150
 5155
 5160
 5165
 5170
 5175
 5180
 5185
 5190
 5195
 5200
 5205
 5210
 5215
 5220
 5225
 5230
 5235
 5240
 5245
 5250
 5255
 5260
 5265
 5270
 5275
 5280
 5285
 5290
 5295
 5300
 5305
 5310
 5315
 5320
 5325
 5330
 5335
 5340
 5345
 5350
 5355
 5360
 5365
 5370
 5375
 5380
 5385
 5390
 5395
 5400
 5405
 5410
 5415
 5420
 5425
 5430
 5435
 5440
 5445
 5450
 5455
 5460
 5465
 5470
 5475
 5480
 5485
 5490
 5495
 5500
 5505
 5510
 5515
 5520
 5525
 5530
 5535
 5540
 5545
 5550
 5555
 5560
 5565
 5570
 5575
 5580
 5585
 5590
 5595
 5600
 5605
 5610
 5615
 5620
 5625
 5630
 5635
 5640
 5645
 5650
 5655
 5660
 5665
 5670
 5675
 5680
 5685
 5690
 5695
 5700
 5705
 5710
 5715
 5720
 5725
 5730
 5735
 5740
 5745
 5750
 5755
 5760
 5765
 5770
 5775
 5780
 5785
 5790
 5795
 5800
 5805
 5810
 5815
 5820
 5825
 5830
 5835
 5840
 5845
 5850
 5855
 5860
 5865
 5870
 5875
 5880
 5885
 5890
 5895
 5900
 5905
 5910
 5915
 5920
 5925
 5930
 5935
 5940
 5945
 5950
 5955
 5960
 5965
 5970
 5975
 5980
 5985
 5990
 5995
 6000
 6005
 6010
 6015
 6020
 6025
 6030
 6035
 6040
 6045
 6050
 6055
 6060
 6065
 6070
 6075
 6080
 6085
 6090
 6095
 6100
 6105
 6110
 6115
 6120
 6125
 6130
 6135
 6140
 6145
 6150
 6155
 6160
 6165
 6170
 6175
 6180
 6185
 6190
 6195
 6200
 6205
 6210
 6215
 6220
 6225
 6230
 6235
 6240
 6245
 6250
 6255
 6260
 6265
 6270
 6275
 6280
 6285
 6290
 6295
 6300
 6305
 6310
 6315
 6320
 6325
 6330
 6335
 6340
 6345
 6350
 6355
 6360
 6365
 6370
 6375
 6380
 6385
 6390
 6395
 6400
 6405
 6410
 6415
 6420
 6425
 6430
 6435
 6440
 6445
 6450
 6455
 6460
 6465
 6470
 6475
 6480
 6485
 6490
 6495
 6500
 6505
 6510
 6515
 6520
 6525
 6530
 6535
 6540
 6545
 6550
 6555
 6560
 6565
 6570
 6575
 6580
 6585
 6590
 6595
 6600
 6605
 6610
 6615
 6620
 6625
 6630
 6635
 6640
 6645
 6650
 6655
 6660
 6665
 6670
 6675
 6680
 6685
 6690
 6695
 6700
 6705
 6710
 6715
 6720
 6725
 6730
 6735
 6740
 6745
 6750
 6755
 6760
 6765
 6770
 6775
 6780
 6785
 6790
 6795
 6800
 6805
 6810
 6815
 6820
 6825
 6830
 6835
 6840
 6845
 68

9. Экспрессия генов

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

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

Анализы TaqMan экспрессии генов от ThermoFischer Scientific:

ACTB - актин бета: Hs01060665_g1; № кат. 4331182

NTRK2 - нейротрофическая рецепторная тирозинкиназа 2: Hs00178811_m1; № кат. 4331182

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

VGF – индуцибельный фактор роста нервов: Hs00705044_s1, № кат. 4331182

EGR1 – ранний ростовой ответ 1: Hs00152928_m1; № кат. 4331182

5

10. Фармакокинетическое исследование интравитреального введения (ивт) на кроликах

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

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

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

ТАБЛИЦА 9:

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

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

11. Частота ивт инъекции IgG1 антитела

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

Для оценки частоты ивт инъекции, следует принять во внимание, что эффективность *in vivo* может поддерживаться при витреальных концентрациях $\geq$ клеточным EC_{50} , как определено на основании анализов TrkB-фосфорилирования в SH-SY5Y клетках (Пример 8). Время после ивт инъекции для достижения витреальной концентрации, эквивалентной EC_{50} , указано стрелками на Фигуре 4. На основании этого анализа, время до достижения такой витреальной

концентрации после инъекции 1 мг антитела обобщено в следующей таблице для каждого антитела:

ТАБЛИЦА 10:

Соединение	Время после ивт до достижения $C_{\text{стекловидн.}} = EC_{50}$ [дни]
277-gr (IgG1)	154
277-gr (IgG1-KO)	151
277-64 (IgG1)	150
277-64 (IgG1-KO)	152
C2	136

5 Например, после инъектирования 1 мг C2 в глаз человеку, витреальная концентрация, соответствующая EC_{50} для C2 (ТАБЛИЦА 10), достигается через 136 дней (то есть, через 136 дней, необходима следующая ивт инъекция). Для сравнения, в случае с 277-64 (IgG1), это время будет удлинено до 150 дней после ивт инъекции. В этом случае, следующая ивт инъекция будет необходима на 14
10 дней позже по сравнению с C2. Принимая во внимание, что минимальная эффективная доза значений в 10 раз выше, чем EC_{50} , будет снижать время между инъекциями, однако, временное отличие в частоте инъекции между C2 и другими антителами, перечисленными ТАБЛИЦЕ 10 выше, будет оставаться идентичным.

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

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

25

Ни одно из 277-антител не является перекрестно реактивным у грызунов, следовательно, исследования для подтверждения концепции и эффективности *in vivo* осуществляли с применением TrkB активирующего антитела C2 в качестве антитела суррогатных средств для тестирования гипотезы о том, что TrkB

активирующие подход I) обеспечивает нейропротективное действие ('нейрозащитный подход'), и II) обеспечивает реактивацию дисфункциональных нейронов/совокупностей ('регенерационный подход'). Оба подхода рассматриваются в нескольких исследованиях. В качестве моделей болезней животных, использовали модель диабета, индуцированного стрептозотоцином (STZ) у крыс, которая характеризуется потерей бета-клеток поджелудочной железы, низкими уровнями инсулина, стабильной гипергликемией и последующей нейронной дисфункцией в сетчатке.

Исследование на животных

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

Дозирование и интравитреальные инъекции

Общая схема исследования представлена на Фигуре 5. Для ивт инъекции, крыс анестезировали с применением 2,5-3% изофлурана (Forene; Abbvie). Вводили каплю 4 мг/мл оксибупрокаингидрохлорида (Novesine; Omnivision) в качестве местной локальной анестезии. 4,6 мкл C2 маточного раствора (10,9 мг/мл; буфер: 20 mM цитрат натрия, 115 mM NaCl, pH 6,0) инъецировали ивт в каждый глаз гипергликемических крыс (группа 3, n=24 глаза, ФИГУРА 5), что

приводило к инъекцируемой дозе ~50 мкг/глаз. В качестве контроля, 4,5 мкл анти- анти-2,4,6-тринитрофенильного маточного раствора (11,2 мг/мл; буфер 20 мМ цитрат натрия, 115 мМ NaCl, pH 6,0) инъекцировали ивт в глаза не-
5 диабетических и диабетических контрольных крыс (группа 1, n=24 глаза, и группа 2, n=22 глаза, ФИГУРА 5), что приводило к инъекцируемой дозе ~50 мкг/глаз. Ивт инъекции осуществляли под препарировальной лупой. Раствор Антитела доставляли с помощью иглы 34 калибра (насаженной на стеклянный шприц Гамильтона объемом 10 мкл) в стекловидное тело сразу позади лимба, и общее качество инъекции контролировали с помощью фундоскопии (используя
10 Micron IV Retinal Imaging Microscope, Phoenix Research Labs).

Электроретинография

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

продуцировали с помощью стимулятора Ganzfeld (ColorDome; Diagnosys), либо в темноте или на немигающем зеленом или красном фоновом свете.

ЭРГ Протоколы

ЭРГ ответы сначала записывали от адаптированных к темноте животных (для выделения опосредованных палочками ответов), после этого записывали от животных, адаптированных к красному фоновому свету (50 кд/м^2 , для выделения УФ опосредованных колбочками ЭРГ ответов) и затем адаптированных к зеленому фоновому свету ($25,5 \text{ кд/м}^2$, для выделения опосредованные колбочками М-типа ответы). В случае адаптированных к темноте ЭРГ, ответы вызвали сериями вспышек в диапазоне от $1 \cdot 10^{-5}$ до $0,1 \text{ кд} \cdot \text{с/м}^2$. Для вспышек с люминесценцией $1 \cdot 10^{-5}$ и $3 \cdot 10^{-5} \text{ кд} \cdot \text{с/м}^2$, ответы 20 опытов были усреднены. Для вспышек в диапазоне от $1 \cdot 10^{-4}$ вплоть до $0,05 \text{ кд} \cdot \text{с/м}^2$, ответы 10 опытов были усреднены, и для конечной вспышки $0,1 \text{ кд} \cdot \text{с/м}^2$, 8 опытов были усреднены. Интервалы между индивидуальными вспышками выбирали таким образом, чтобы обеспечить полное восстановление сетчатки от каждой вспышки (нет признаков индуцированного вспышкой уменьшения амплитуд ответов или сокращения латентности). На основании этого критерия, интервалы между вспышками составляли 2 с для $1 \cdot 10^{-5}$ и $3 \cdot 10^{-5} \text{ кд} \cdot \text{с/м}^2$ вспышки, 5 с для вспышек в диапазоне от $1 \cdot 10^{-4}$ вплоть до $0,05 \text{ кд} \cdot \text{с/м}^2$, и 10 с для вспышки $0,1 \text{ кд} \cdot \text{с/м}^2$.

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

Анализ данных

Для определения ЭРГ амплитуд b-волн (положительная реакция деполяризации, имеющая происхождение главным образом из биполярных клеток), записывали данные ЭРГ и анализировали с использованием программного обеспечения MATLAB (версия R2014a; MathWorks). Осцилляторные потенциалы (небольшие высокочастотные волны,

накладывающиеся на b-волну) удаляли от сигналов путем 55 Гц быстрого преобразования Фурье фильтрации низких частот, поскольку осцилляторные потенциалы могут оказывать влияние на амплитуду и положение пика b-волны, в особенности в адаптированных к свету условиях. Амплитуду b-волны вычисляли от нижнего уровня ответа a-волны (отрицательное отклонение, возникающее главным образом вследствие активности фоторецептора) к пику пика b-волны. Латентность b-волны измеряли как время после стимуляции вспышкой, необходимое для достижения пика b-волны.

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

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

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

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

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

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

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

Для анализа латентности опосредованной колбочками М-типа b-волны, рассчитывали относительные изменения латентности к среднему значению

контролей для b-волновых ответов, вызываемых интенсивностями вспышек 1, 5, 50 и 150 кд·с/м², и усредняли.

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

Результаты

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

Латентность опосредованной палочками b-волны:

Латентность b-волны представляет собой критерий для скорости индуцированного светом электрического ответа в сетчатке (главным образом на уровне биполярных клеток и синаптической трансмиссии фоторецептор-на-биполярные клетки). Латентность определяется как время, необходимое для достижения амплитуды ответа после стимуляции вспышкой света. Влияния гипергликемии и ивт лечения обобщены на Фигуре 6. Рассчитывали изменения латентности относительно средней латентности, измерённых от контрольных крыс, для данных, полученных до ивт лечения (оценка исходного состояния ЭРГ) и после ивт лечения. Существует сильное увеличение латентности на ~14 мс в двух гипергликемических группах до ивт лечения, указывая на индуцированное гипергликемией замедление кинетики ответа b-волны, то есть,

уменьшенная скорость опосредованного палочками процессинга в сетчатке. Ивт инъекция контрольного IgG1 к 2,4,6-тринитрофенилу не оказывала каких-либо существенных влияний на латентность у недиабетической контрольной группе и гипергликемической группе (группа 1, черные столбики, и группа 2, обозначенные точками столбики на Фигуре 6, после ивт, соответственно). Однако, ивт лечение с применением TrkB активатора C2 очевидно приводит к уменьшенной задержке латентности (группа 3, серый столбик на Фигуре 6, после ивт). В среднем, ивт лечение с применением C2 вызывает существенное ускорение ответов b-волны на ~9 мс (то есть, задержка латентности сокращается от 14 мс вплоть до 5 мс).

Светочувствительность опосредованной палочками b-волны:

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

Ответы опосредованной палочками a-волны:

Ответ опосредованной палочками a-волны является показателем для размера световых ответов палочкового фоторецептора, вызванных вспышкой света. Ответы опосредованной палочками a-волны нормировали к средним значениям, полученным от контрольных крыс (группа 1, до и после ивт лечения) и графически представляли на Фигуре 8. Нормированные амплитуды насыщающих колебаний снижались на ~17% у гипергликемических животных (группа 2 и 3, до ивт лечения). Ивт инъекция контрольного IgG1 не оказывала каких-либо существенных влияний на нормированные ответы a-волны у

контрольных крыс (группа 1, черные) или гипергликемических крыс (группа 2, обозначенные точками), где у последней группы проявляется дальнейшее снижение ответа а-волны во время проведения исследования. Однако, ивт лечение с применением TrkB активатора C2 (группа 3, серые) может полностью предотвращать дальнейшее снижение ответов а-волны, что наблюдается для гипергликемической группы 2.

УФ и Латентность опосредованной колбочками М-типа b-волны:

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

Светочувствительность УФ опосредованной колбочками b-волны:

ЭРГ ответы светочувствительности УФ опосредованной колбочками b-волна оценивали, как описано для опосредованной палочками ЭРГ. Светочувствительности нормировали к средним светочувствительностям контрольных крыс (группа 1, до и после ивт лечения) и графически представляли на Фигуре 11. Нормированные светочувствительности снижались на ~50% у гипергликемических животных на исходном уровне (до ивт). Ивт

инъекция контрольного IgG1 не оказывала каких-либо существенных влияний на светочувствительности, в то время как ивт лечение с применением С2 существенно повышало светочувствительность до уровня, наблюдаемого у здоровых контрольных крыс (группа 3, серые).

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

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

Основные результаты исследований обобщены ниже:

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

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

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

Активация TrkB также защищает фоторецепторы и наружную сетчатку, как показано с помощью анализа ЭРГ a-волны, которая является показателем световых ответов фоторецепторов. Подобно результатам, полученным для ЭРГ

а-волны, контрастная чувствительность глаз диабетических крыс снижается во время продолжающейся гипергликемии, в то время как ивт лечение с применением TrkB активатора C2 полностью сохраняет контрастную чувствительность. Кроме того, улучшение ЭРГ светочувствительности световых
5 ответов опосредованных палочками и колбочками b-волны, как описано выше (отображающее светочувствительности синаптической трансмиссии фоторецепторов на биполярные клетки) дополнительно усиливает концепцию о том, что активация TrkB может улучшать/защищать функцию наружной сетчатки, включая фоторецепторы.

10

13. BDNF функция при комбинированных лечениях

Культивирование CHO клеток, экспрессирующих TrkB рецептор человека

CHO клетки, экспрессирующие TrkB рецептор человека (hTrkB) (ThermoFisher Scientific, № K1491) культивировали в DMEM (Lonza, № BE12-
15 604F), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой, глутамаксом, заменимыми аминокислотами, 20 mM HEPES, 5 мкг/мл бластицидина и 200 мкг/мл зеоцина. За двадцать четыре часа до стимуляции, 5000 клеток (30 мкл) высевали в каждую полость прозрачного планшета для культивирования тканей на 384 лунки (BD Falcon, № 353963) и инкубировали в увлажненном инкубаторе
20 при 37°C и 5% CO₂.

Анализ ERK фосфорилирования в CHO клетках с помощью hTrkB рецептора

Через двадцать четыре часа после высевания, супернатант CHO/hTrkB клеток заменяли на 40 мкл DMEM комнатной температуры с 0,1% BSA, но без
25 других дополнительных компонентов. Через 15 минут, добавляли 10 мкл DMEM/0,1% BSA с возрастающими концентрациями BDNF (1E-13 до 3E-8 моль/л), 277-антитела (1E-13 до 2,025E-8 моль/л), или C2-антитела (1E-13 до 2,025E-8 моль/л) отдельно или комбинации с 1 нМ BDNF с возрастающими концентрациями 277- или C2-антитела (оба 1E-13 до 2,025E-8 моль/л) в трех
30 повторах для стимуляции ERK фосфорилирования. После инкубирования в течение 45 минут при комнатной температуре, супернатанты удаляли и клетки лизировали в течение 20 минут на жидком льду в 20 мкл лизирующего буфера на лунку (1x Tryton лизирующий буфер (CellSignaling № 9803-S), дополненным таблетками полного мини протеазного ингибитора (Roche № 04693124001) и

коктейлями ингибиторов фосфатаз 2 (Sigma № P5726) и 3 (Sigma № P0044), и 1 мМ PMSF (Sigma № 93482)). Пять микролитров полученного лизата использовали для количественного определения ERK1/2 фосфорилирования в T202/Y204, используя коммерчески доступный анализ (Perkin Elmer № TGRES500), согласно инструкциям производителя. Излучение света акцепторных шариков, отображающее ERK фосфорилирование, записывали при 570 нм на микропланшет-ридере Perkin Elmer EnVision и подготавливали для презентации с помощью GraphPad Prism (версия 7), включая необработанные данные (среднее $\pm$ СПС) и нелинейную регрессию (лог(агонист) отн. ответа (три параметра)).

Как показано на Фиг. 13, 277-антитело не уменьшает BDNF индуцированное ERK фосфорилирование. Возрастающие концентрации C2 антитела приводят к уменьшению BDNF индуцированного ERK фосфорилирования вплоть до уровня C2 индуцированного ERK фосфорилирования. Это может оказывать существенное влияние на дозирование антитела к TrkB в глаза, где антитела вводятся в высоких насыщающих концентрациях для пролонгирования времени, необходимого до следующего введения. 277-антитело может вводиться в высоких дозах без конфликтования с существующим BDNF индуцированным ERK фосфорилированием, в то время как C2 антитело уменьшает существующее BDNF индуцированное ERK фосфорилирование вплоть до уровня антитела.

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

Для анализа связывания *in vitro*, MaxiSorp планшеты на 96 лунок (Nunc № 437111) покрывали в течение ночи при 4°C с помощью 500 нг/мл VEGF человека (R&D Systems № 293-VE-050) или VEGF крысы (R&D Systems № 564-RV-050) в карбонатном/бикарбонатном буфере (3,03 г/л Na₂CO₃ и 6,00 г/л NaHCO₃, pH 9,6). Планшеты промывали три раза с помощью PBS-T (фосфатно-солевой буферный раствор (Invitrogen № 70011-036) с 0,05% Tween20 (Sigma № P7949)) и затем инкубировали с 1% BSA (Sigma № A3059) в PBS-T в течение трех часов при комнатной температуре для блокирования неспецифического связывания. Планшеты промывали три раза с помощью PBS-T и затем инкубировали с 1:4 серийным разведением 1 мкМ Авастина (Roche clinic package), C2-антитела, 277-антитела или человеческого IgG1 изотипного контрольного антитела в PBS-T в

течение ночи при 4°C. Планшеты промывали раза с помощью PBS-T и затем инкубировали с 1:2000 разведением Alexa fluor 647 козьего анти-человеческого IgG (Invitrogen № A21445) в течение двух часов при комнатной температуре. После трех дополнительных циклов промывания с помощью PBS-T, записывали
5 излучение света при 647 нм (отображающее связывание антитела с VEGF) на микропланшет-ридере Perking Elmer EnVision. Данные приготавливали для презентации с помощью GraphPad Prism (версия 7), включая необработанные данные (среднее $\pm$ СПС) и нелинейную регрессию (лог(агонист) отн. ответа (три параметра)).

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

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее (ий):

- 5 а. вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48 (L-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49 (L-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50 (L-CDR3); и
- 10 б. вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52 (H-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53 (H-CDR3), или
- 15 в. вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 (H-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57 (H-CDR3), или
- 20 г. вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58 (H-CDR1); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59 (H-CDR2); и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60 (H-CDR3).

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

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

- [illegible]

меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16,

5 е. вариабельную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7 и вариабельную тяжёлую цепь, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по
10 меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17,

 ж. вариабельную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, или по
15 меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8 и вариабельную тяжёлую цепь, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% идентичную
20 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18,

 з. вариабельную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, или по
25 меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 и вариабельную тяжёлую цепь, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% идентичную
 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19, или

30 и. вариабельную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10 и вариабельную тяжёлую цепь,

содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20.

5

3. Антитело к TrkB по пункту 1, где антитело содержит:

- а. легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21 и
10 тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:
15 22 или 23,
- б. легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24 и
20 тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:
25 25 или 26,
- в. легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27 и
30 тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:
28 или 29,

- [illegible]

99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 40 или 41,

3. легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 42 и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 43 или 44,

- и. легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 45 и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 46 или 47.

4. Антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент по пункту 1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

- а. переменную легкую цепь и переменную тяжелую цепь, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 12, соответственно,
- б. переменную легкую цепь и переменную тяжелую цепь, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 13, соответственно,
- в. переменную легкую цепь и переменную тяжелую цепь, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 14, соответственно,

- г. переменную легкую цепь и переменную тяжелую цепь, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 15, соответственно,
- 5 д. переменную легкую цепь и переменную тяжелую цепь, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 16, соответственно,
- е. переменную легкую цепь и переменную тяжелую цепь, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 17, соответственно,
- 10 ж. переменную легкую цепь и переменную тяжелую цепь, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 18, соответственно,
- з. переменную легкую цепь и переменную тяжелую цепь, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 19, соответственно, или
- 15 и. переменную легкую цепь и переменную тяжелую цепь, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 20, соответственно.
- 20 5. Антитело к TrkB по пункту 1, где антитело содержит:
- а. легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 или 23,
- б. легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24 и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 или 26,
- 25 в. легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27 и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28 или 29,
- 30 г. легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30 и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31 или 32,

- д. легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33 и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34 или 35,
- 5 е. легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36 и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37 или 38,
- ж. легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39 и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40 или 41,
- 10 з. легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42 и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43 или 44, или
- и. легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45 и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46 или 47, соответственно.
- 15

6. Антитело к TrkB по пункту 1, где антитело содержит:

- легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 или 23.
- 20

7. Антитело к TrkB по пункту 1, где антитело содержит:

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

8. Антитело к TrkB по пункту 1, где антитело содержит:

- легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27 и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28 или 29.
- 30

9. Антитело к TrkB по пункту 1, где антитело содержит:

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

- 5 10. Антитело к TrkB по пункту 1, где антитело содержит:
легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность
SEQ ID NO: 33 и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную
последовательность SEQ ID NO: 34 или 35.
- 10 11. Антитело к TrkB по пункту 1, где антитело содержит:
легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность
SEQ ID NO: 36 и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную
последовательность SEQ ID NO: 37 или 38.
- 15 12. Антитело к TrkB по пункту 1, где антитело содержит:
легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность
SEQ ID NO: 39 и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную
последовательность SEQ ID NO: 40 или 41.
- 20 13. Антитело к TrkB по пункту 1, где антитело содержит:
легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность
SEQ ID NO: 42 и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную
последовательность SEQ ID NO: 43 или 44.
- 25 14. Антитело к TrkB по пункту 1, где антитело содержит:
легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность
SEQ ID NO: 45 и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную
последовательность SEQ ID NO: 46 или 47.
- 30 15. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из
пунктов 1 - 14 для применения в медицине.

16. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент для применения по пункту 15, где применение представляет собой лечение заболеваний глаз или сетчатки или нейродегенеративных заболеваний.

5 17. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент для применения по пункту 16, где применение представляет собой лечение заболеваний нейронного/неврального глаза или сетчатки.

10 18. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент для применения по пункту 16, где применение представляет собой лечение географической атрофии.

19. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент для применения по пункту 15, где применение представляет собой лечение возрастной дегенерации жёлтого пятна, диабетической ретинопатии, диабетического отёка жёлтого
15 пятна, пигментной дистрофии сетчатки, наследственной дистрофии сетчатки, наследственной макулодистрофии, миопической дегенерации, окклюзий вены сетчатки, окклюзий артерии сетчатки, эндофтальмита, увеита, кистозного макулярного отёка, хороидаальной неоваскулярной мембраны вследствие любого из заболеваний сетчатки, оптических нейропатий, глаукомы, отслойки сетчатки,
20 токсической ретинопатии, лучевой ретинопатии и травматической ретинопатии, продромальной и от легкой до умеренной болезни Альцгеймера, задержки прогрессирования заболевания у пациентов с болезнью Альцгеймера, болезнью Хантингтона, болезнью Паркинсона, большого депрессивного расстройства, шизофрении, когнитивного нарушения, связанного с шизофренией,
25 предотвращения первого приступа психоза у индивидуумов с ослабленным психозным синдромом, предотвращения повторения у пациентов с шизофренией, терапевтически резистентной депрессии, гиперфагии, ожирения или метаболического синдрома.

30 20. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пунктов 1 - 14 и фармацевтически приемлемый носитель.

21. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пунктов 1 - 14 или фармацевтическая композиция по пункту 20, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят с помощью парентерального пути, внутривенного пути, интравитреального пути или подкожного пути введения.

22. Выделенный (е) полинуклеотид или полинуклеотиды, содержащий (е) последовательность, кодирующую легкую цепь или вариабельную область лёгкой цепи антитела или его антигенсвязывающий фрагмент и тяжелую цепь или вариабельную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пунктов 1 - 14.

23. Экспрессионный вектор, содержащий выделенный (е) полинуклеотид или полинуклеотиды по пункту 22.

24. Вирусный вектор, содержащий выделенный (е) полинуклеотид или полинуклеотиды по пункту 22.

25. Клетка-хозяин, содержащая выделенный (е) полинуклеотид или полинуклеотиды по пункту 22 или экспрессионный вектор по пункту 23.

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

а. получение клетки-хозяина по пункту 25; и

б. культивирование клетки-хозяина.

27. Способ по пункту 26, который дополнительно включает восстановление и очистку антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

28. Антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с по меньшей мере одним аминокислотным остатком в пределах аминокислотных областей 92-112, 130-143 и/или 205-219 внеклеточного домена TrkB человека с последовательностью SEQ ID NO: 54.

29. Антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент по пункту 28, которое (ый) связывается с по меньшей мере одним аминокислотным остатком в пределах аминокислотных областей 92-112 и 130-143; или 92-112 и 205-219; или 130-143 и 205-219; или 92-112 и 130-143 и 205-219 внеклеточного домена TrkB человека с последовательностью SEQ ID NO: 54.

30. Антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент по пункту 28, которое (ый) дополнительно связывается с по меньшей мере одним аминокислотным остатком в пределах аминокислотных областей 313-330 и/или 348-367 внеклеточного домена TrkB человека с последовательностью SEQ ID NO: 54.

31. Антитело к TrkB или его антигенсвязывающий фрагмент по пункту 28, которое (ый) связывается с по меньшей мере одним аминокислотным остатком в пределах аминокислотных областей 92-112, 130-143, 205-219, 313-330 и 348-367 внеклеточного домена TrkB человека с последовательностью SEQ ID NO: 54.

32. Антитело к TrkB, которое конкурирует за связывание с TrkB с любым из следующих антител:

- а. антитело, имеющее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 или 23,
- б. антитело, имеющее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24 и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 или 26,
- в. антитело, имеющее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27 и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28 или 29,
- г. антитело, имеющее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30 и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31 или 32,

- д. антитело, имеющее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33 и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34 или 35,
- 5 е. антитело, имеющее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36 и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37 или 38,
- ж. антитело, имеющее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39 и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40 или 41,
- 10 з. антитело, имеющее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42 и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43 или 44, или
- и. антитело, имеющее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45 и тяжелую цепь, содержащую
- 15 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46 или 47, соответственно.

ФИГУРА 1

Положение	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
BDNF	C	P	T	S	C	K	C	S	A	S	R	I	W	C	S	D	P	S	P	G	I	V	A	F	P	R	L	E	P	N	S	V	D	P	E	N	I	T	E	I	F	I	A	N	Q	K	R	L	E	I	I	N	E	D	D	V	E	A	Y	V	G	L	R	N	L	T	I	V	D	S	G	L	K	F	V	A	H	K	A	F	L	K	N	S	N	L	Q	H	I	N
277-антитело	C	P	T	S	C	K	C	S	A	S	R	I	W	C	S	D	P	S	P	G	I	V	A	F	P	R	L	E	P	N	S	V	D	P	E	N	I	T	E	I	F	I	A	N	Q	K	R	L	E	I	I	N	E	D	D	V	E	A	Y	V	G	L	R	N	L	T	I	V	D	S	G	L	K	F	V	A	H	K	A	F	L	K	N	S	N	L	Q	H	I	N
C2	C	P	T	S	C	K	C	S	A	S	R	I	W	C	S	D	P	S	P	G	I	V	A	F	P	R	L	E	P	N	S	V	D	P	E	N	I	T	E	I	F	I	A	N	Q	K	R	L	E	I	I	N	E	D	D	V	E	A	Y	V	G	L	R	N	L	T	I	V	D	S	G	L	K	F	V	A	H	K	A	F	L	K	N	S	N	L	Q	H	I	N
C20	C	P	T	S	C	K	C	S	A	S	R	I	W	C	S	D	P	S	P	G	I	V	A	F	P	R	L	E	P	N	S	V	D	P	E	N	I	T	E	I	F	I	A	N	Q	K	R	L	E	I	I	N	E	D	D	V	E	A	Y	V	G	L	R	N	L	T	I	V	D	S	G	L	K	F	V	A	H	K	A	F	L	K	N	S	N	L	Q	H	I	N

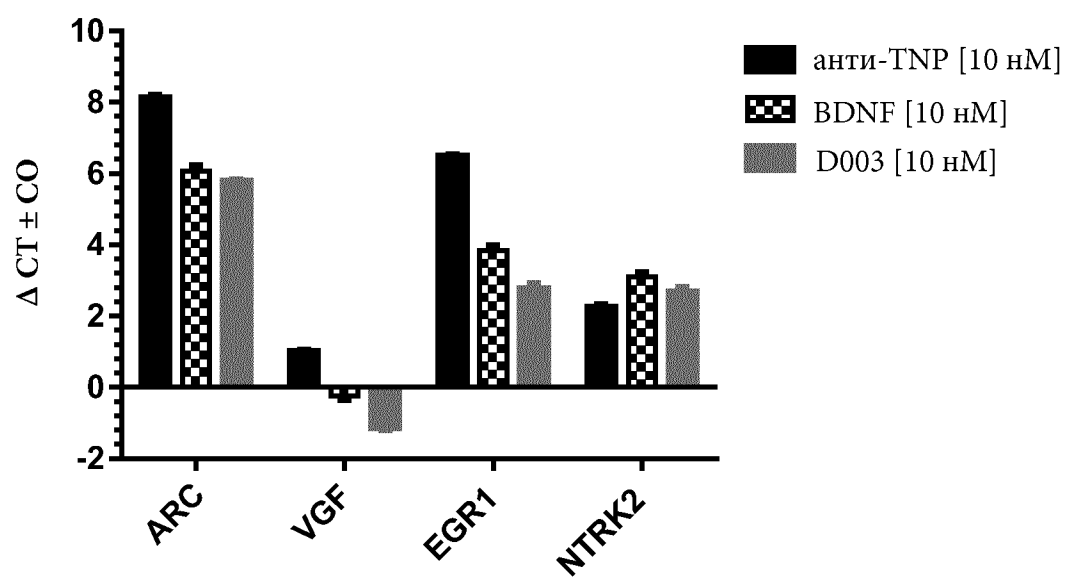
Положение	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
BDNF	F	T	R	N	K	L	T	S	L	S	R	K	H	F	R	H	L	D	L	S	E	L	I	L	V	G	N	P	F	T	C	S	C	D	I	M	W	I	K	T	L	Q	E	A	K	S	S	P	D	T	Q	D	L	Y	C	L	N	E	S	S	K	N	I	P	L	A	N	L	Q	I	P	N	C	G	L	P	S	A	N	L	A	A	P	N	L	T	V	E	E	G
277-антитело	F	T	R	N	K	L	T	S	L	S	R	K	H	F	R	H	L	D	L	S	E	L	I	L	V	G	N	P	F	T	C	S	C	D	I	M	W	I	K	T	L	Q	E	A	K	S	S	P	D	T	Q	D	L	Y	C	L	N	E	S	S	K	N	I	P	L	A	N	L	Q	I	P	N	C	G	L	P	S	A	N	L	A	A	P	N	L	T	V	E	E	G
C2	F	T	R	N	K	L	T	S	L	S	R	K	H	F	R	H	L	D	L	S	E	L	I	L	V	G	N	P	F	T	C	S	C	D	I	M	W	I	K	T	L	Q	E	A	K	S	S	P	D	T	Q	D	L	Y	C	L	N	E	S	S	K	N	I	P	L	A	N	L	Q	I	P	N	C	G	L	P	S	A	N	L	A	A	P	N	L	T	V	E	E	G
C20	F	T	R	N	K	L	T	S	L	S	R	K	H	F	R	H	L	D	L	S	E	L	I	L	V	G	N	P	F	T	C	S	C	D	I	M	W	I	K	T	L	Q	E	A	K	S	S	P	D	T	Q	D	L	Y	C	L	N	E	S	S	K	N	I	P	L	A	N	L	Q	I	P	N	C	G	L	P	S	A	N	L	A	A	P	N	L	T	V	E	E	G

Положение	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000
BDNF	K	S	I	T	L	S	C	S	V	A	G	D	P	V	P	N	M	Y	W	D	V	G	N	L	V	S	K	H	M	N	E	T	S	H	T	Q	G	S	L	R	I	T	N	I	S	D	S	D	S	G	K	Q	I	S	C	V	A	E	N	L	V	G	E	D	Q	D	S	V	N	L	T	V	H	F	A	P	T	I	T	F	L	E	S	P	T	S	D	H	H	W																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
277-антитело	K	S	I	T	L	S	C	S	V	A	G	D	P	V	P	N	M	Y	W	D	V	G	N	L	V	S	K	H	M	N	E	T	S	H	T	Q	G	S	L	R	I	T	N	I	S	D	S	D	S	G	K	Q	I	S	C	V	A	E	N	L	V	G	E	D	Q	D	S	V	N	L	T	V	H	F	A	P	T	I	T	F	L	E	S	P	T	S	D	H	H	W																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
C2	K	S	I	T	L	S	C	S	V	A	G	D	P	V	P	N	M	Y	W	D	V	G	N	L	V	S	K	H	M	N	E	T	S	H	T	Q	G	S	L	R	I	T	N	I	S	D	S	D	S	G	K	Q	I	S	C	V	A	E	N	L	V	G	E	D	Q	D	S	V	N	L	T	V	H	F	A	P	T	I	T	F	L	E	S	P	T	S	D	H	H	W																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
C20	K	S	I	T	L	S	C	S	V	A	G	D	P	V	P	N	M	Y	W	D	V	G	N	L	V	S	K	H	M	N	E	T	S	H	T	Q	G	S	L	R	I	T	N	I	S	D	S	D	S	G	K	Q	I	S	C	V	A	E	N	L	V	G	E	D	Q	D	S	V	N	L	T	V	H	F	A	P	T	I	T	F	L	E	S	P	T	S	D	H	H	W																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										

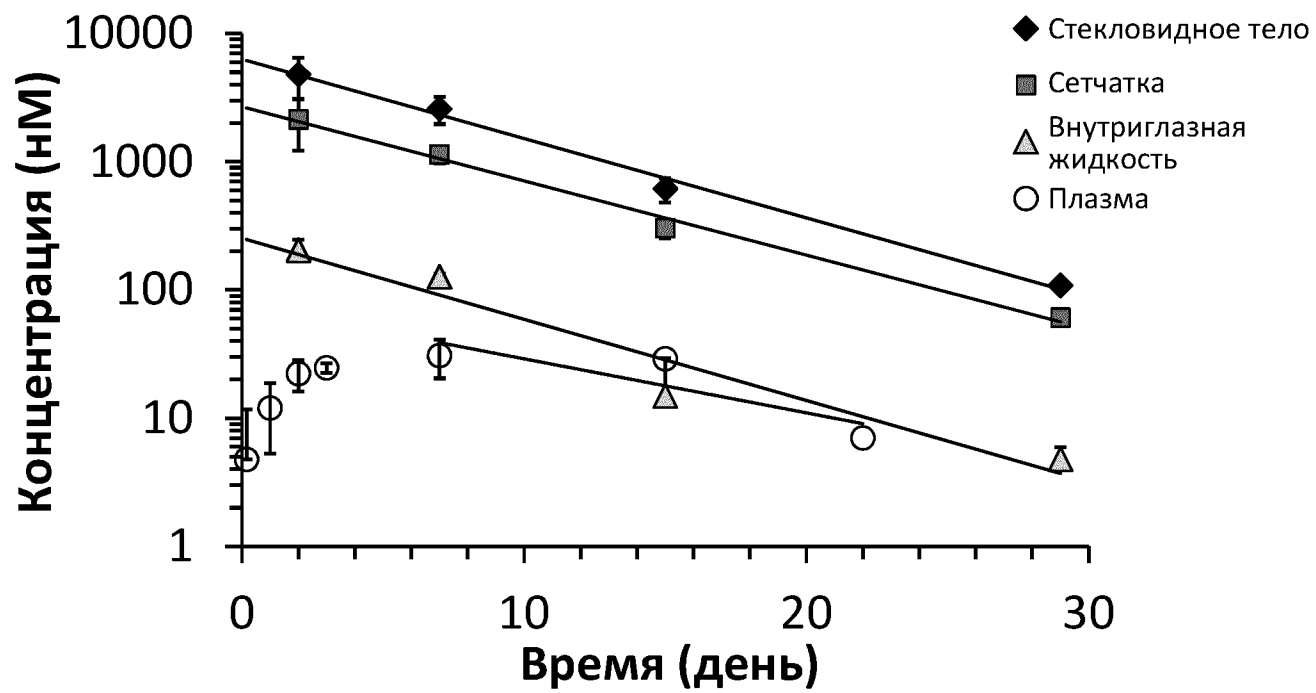
Положение	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360
BDNF	C	I	P	F	T	V	K	G	N	P	K	P	A	L	Q	W	F	Y	N	G	A	I	L	N	E	S	K	Y	I	C	T	K	I	H	V	T	N	H	T	E	Y	H	G	C	L	Q	L	D	N	P	T	H	M	N	N	G	D	Y	T	L	I	A	K	N	E	Y	G	K	D	E	K	Q	I	S	A	H	F	M	G	W	P	G	I	D	D	G	A	N	P	N
277-антитело	C	I	P	F	T	V	K	G	N	P	K	P	A	L	Q	W	F	Y	N	G	A	I	L	N	E	S	K	Y	I	C	T	K	I	H	V	T	N	H	T	E	Y	H	G	C	L	Q	L	D	N	P	T	H	M	N	N	G	D	Y	T	L	I	A	K	N	E	Y	G	K	D	E	K	Q	I	S	A	H	F	M	G	W	P	G	I	D	D	G	A	N	P	N
C2	C	I	P	F	T	V	K	G	N	P	K	P	A	L	Q	W	F	Y	N	G	A	I	L	N	E	S	K	Y	I	C	T	K	I	H	V	T	N	H	T	E	Y	H	G	C	L	Q	L	D	N	P	T	H	M	N	N	G	D	Y	T	L	I	A	K	N	E	Y	G	K	D	E	K	Q	I	S	A	H	F	M	G	W	P	G	I	D	D	G	A	N	P	N
C20	C	I	P	F	T	V	K	G	N	P	K	P	A	L	Q	W	F	Y	N	G	A	I	L	N	E	S	K	Y	I	C	T	K	I	H	V	T	N	H	T	E	Y	H	G	C	L	Q	L	D	N	P	T	H	M	N	N	G	D	Y	T	L	I	A	K	N	E	Y	G	K	D	E	K	Q	I	S	A	H	F	M	G	W	P	G	I	D	D	G	A	N	P	N

[illegible]

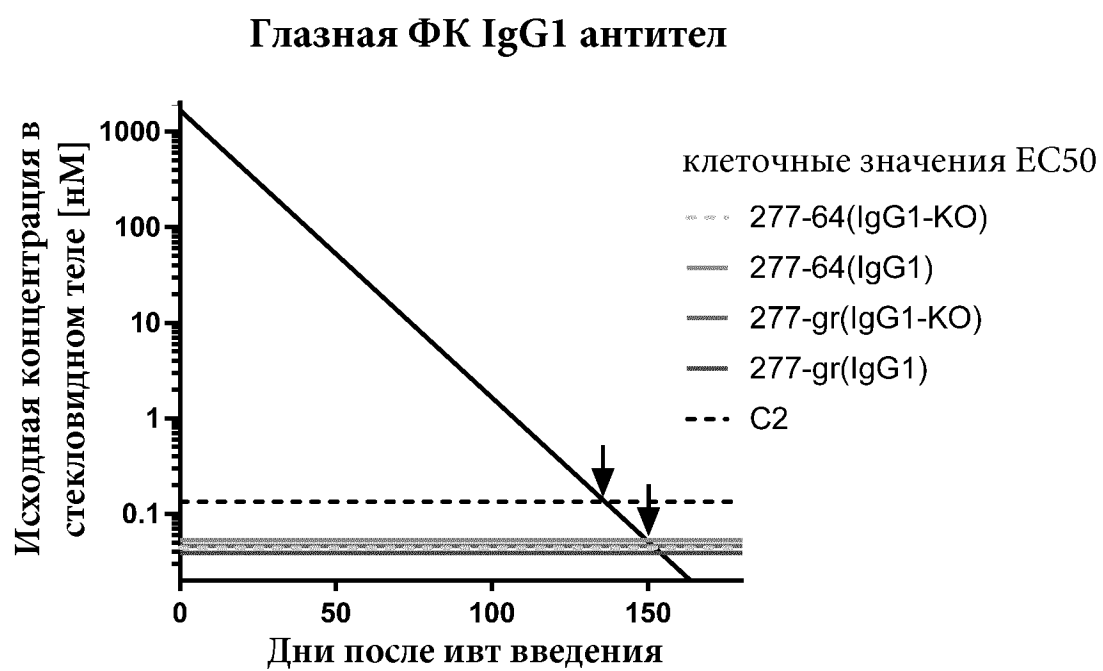
ФИГУРА 2



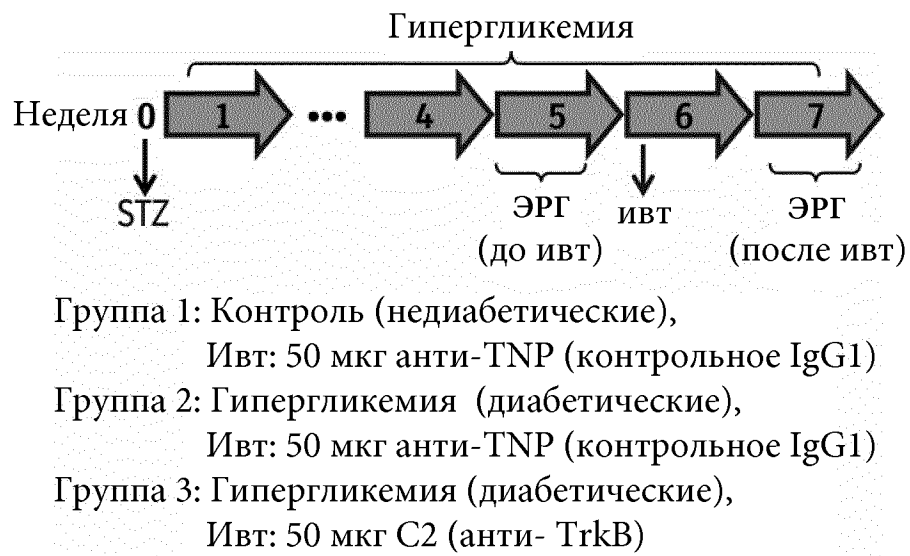
ФИГУРА 3



ФИГУРА 4

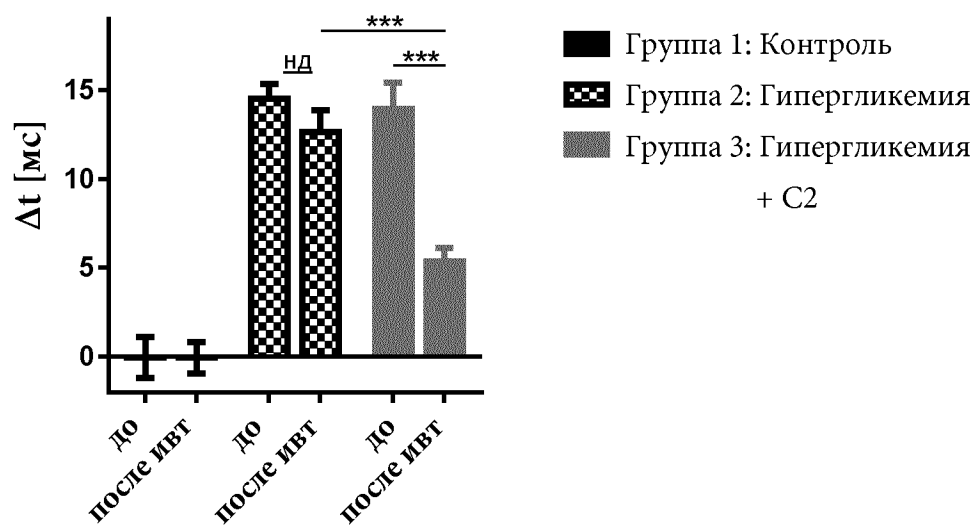


ФИГУРА 5



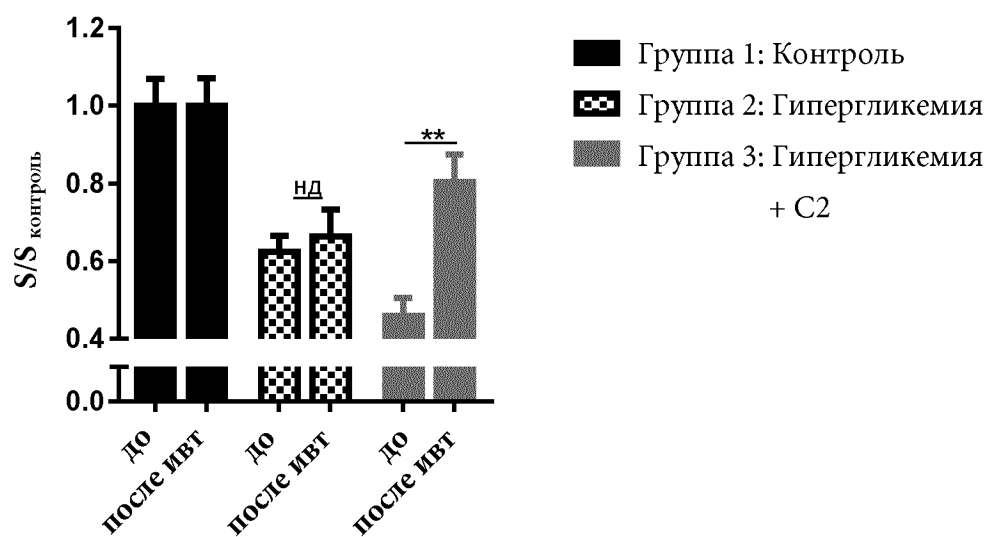
ФИГУРА 6

Изменение латентности
опосредованной палочками b-волны

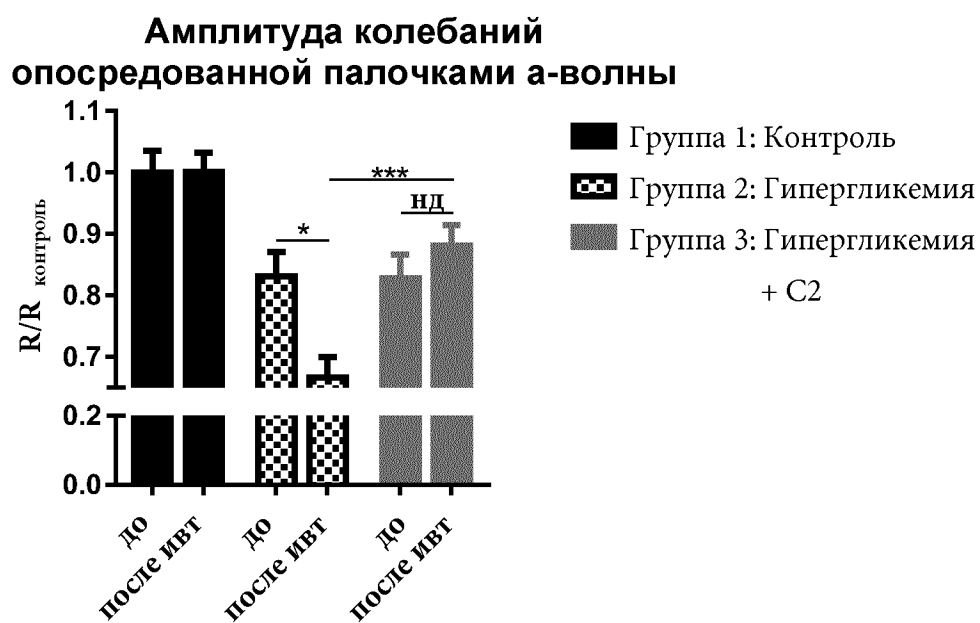


ФИГУРА 7

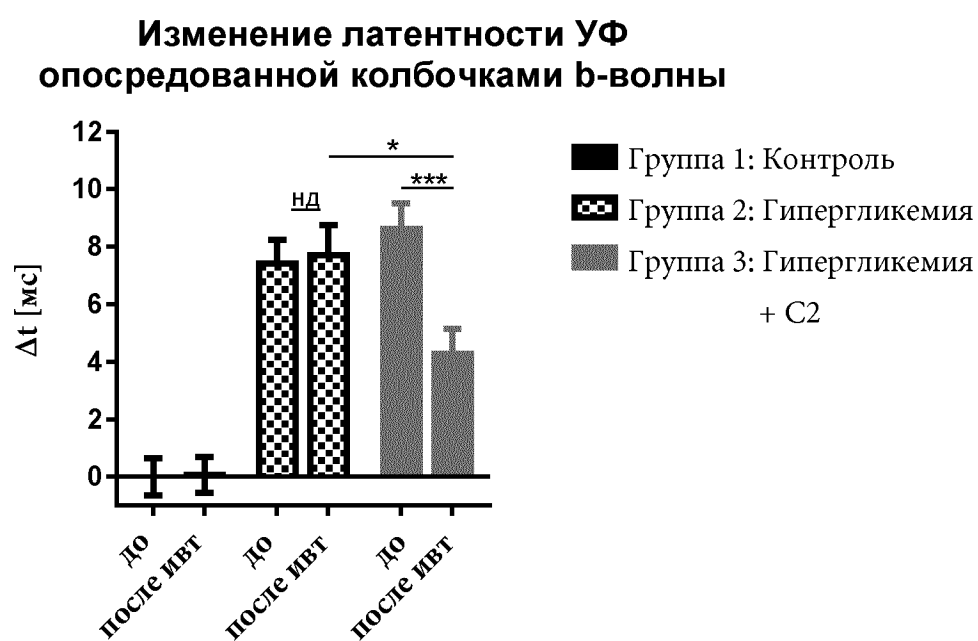
**Светочувствительность
опосредованной палочками b-волны**



ФИГУРА 8

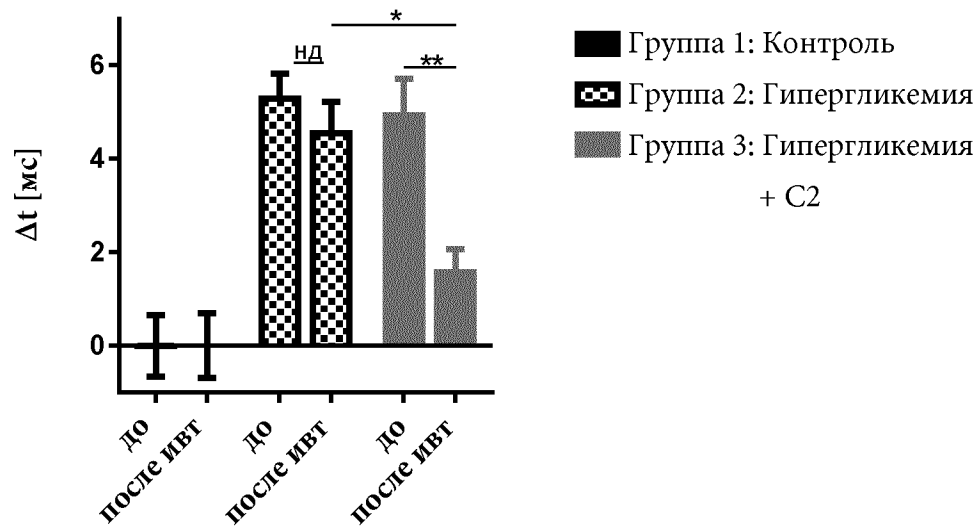


ФИГУРА 9



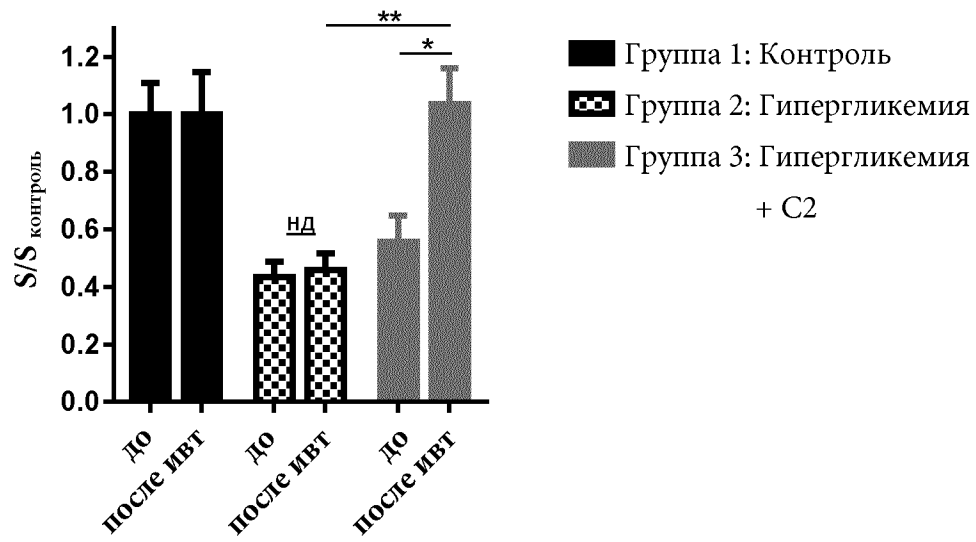
ФИГУРА 10

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



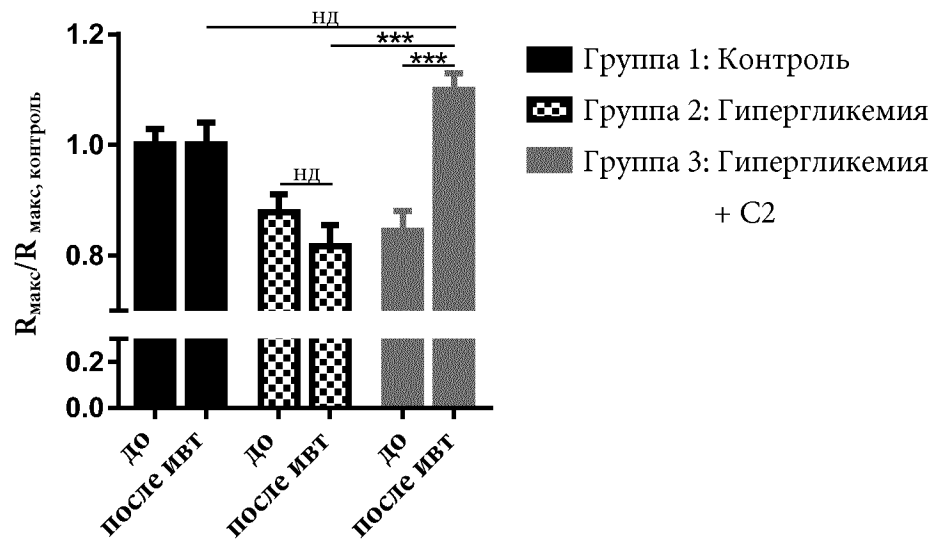
ФИГУРА 11

**Светочувствительность УФ
опосредованной колбочками b-волны**



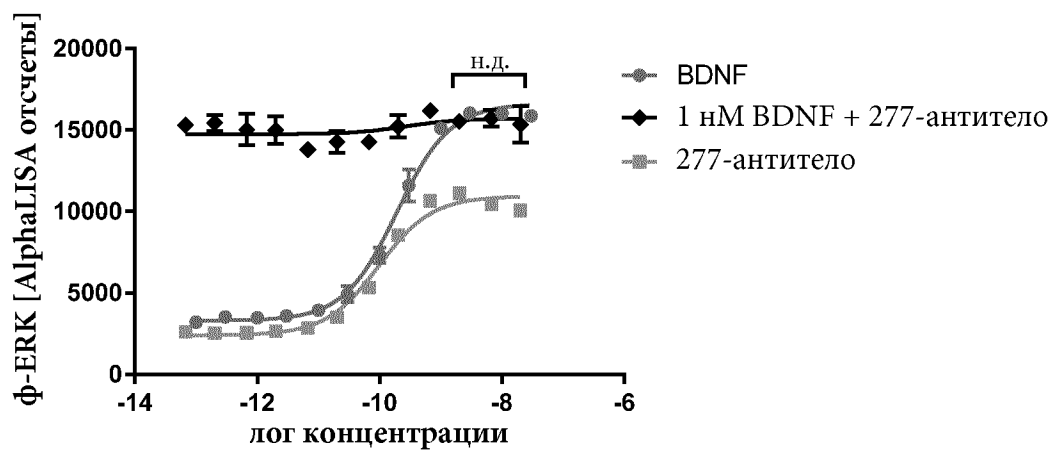
ФИГУРА 12

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

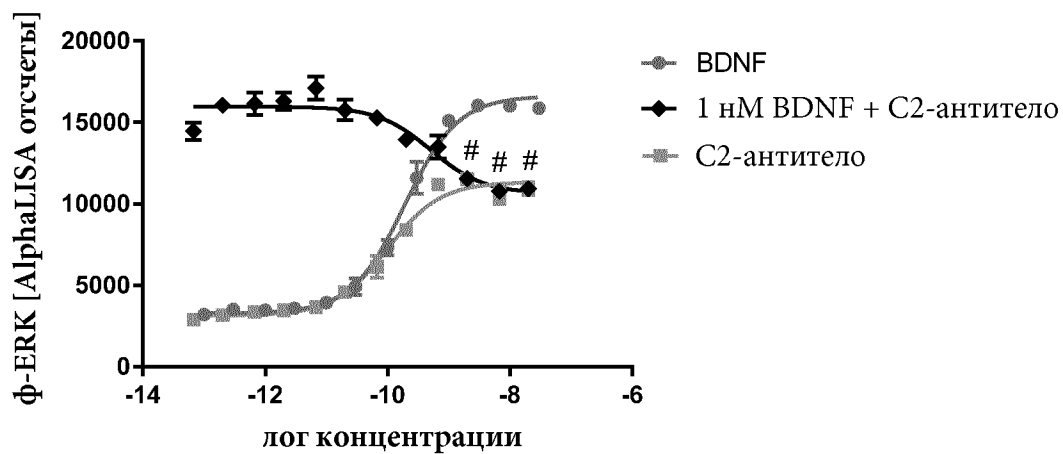


ФИГУРА 13 А и В

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



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



ФИГУРА 14

