



Organización y
Digitalización CSA Ltda

POS

BT
OK
RGF



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PCT

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

09-47482

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: ANTICUERPOS AGONISTAS DEL TRKB Y USOS DE LOS MISMOS

SOLICITANTE: IRM LLC

DIRECCIÓN: Hurst Holme, 12 Trott Road, Hamilton, HM 11, Bermudas

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 11 de Mayo de 2009
991

P2009/000077

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK MOURE &



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-047482-00000-0000

Fecha: 2009-05-11 16:45:32 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379-FASE NACIONALII
Act. 411 PRESENTACION - Folios: 95

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2009/000077

SOLICITUD DE:

1



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.

(folios 127)



Capítulo II.

2

SOLICITANTE (71)

Nombre: IRM LLC

Dirección: Hurts Holme, 12 Trot Road,
Hamilton, HM 11 Bermudas

Nacionalidad o Domicilio: Bermudas

Lugar de Constitución: Bermudas

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: World Trade Center Torre A,
Calle 100 No. 8A-37 Piso 10

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual _____

Número 79782747Bta

TP 74.295

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: 1) Yan WANG, 2) Steven B. Cohen, 3) Mar Nasoff

Dirección: 1) 849 West Orange Avenue, #1012, South San Francisco, California
94080 E.U.A.; 2) 4104 Vía Candidiz #89, San Diego, California 92130 E.U.A.;

3) 11734 Mira Lago Way, San Diego, California 92131 E.U.A.

Nacionalidad o Domicilio: 1) Canadiense 2 y 3) Estadounidenses

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2007/083774

Fecha

Noviembre 6, 2007

Publicación Internacional No. WO 2008/058127

Fecha

Mayo 15, 2008

6

Título (54) ANTICUERPOS AGONISTAS DEL TRKB Y USOS DE LOS MISMOS

Clasificación Internacional (51) C07K 16/28, A61K 39/395, A61P 3/10

Prioridad

SI



NO



(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Noviembre 9, 2006

(31) Número de
Solicitud

60/858,169

9

Comprobante de pago No. 09- 34090

Fecha Mayo 8 de 2009

10

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☒

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple ver expediente No. 06-122.179

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☐

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☐

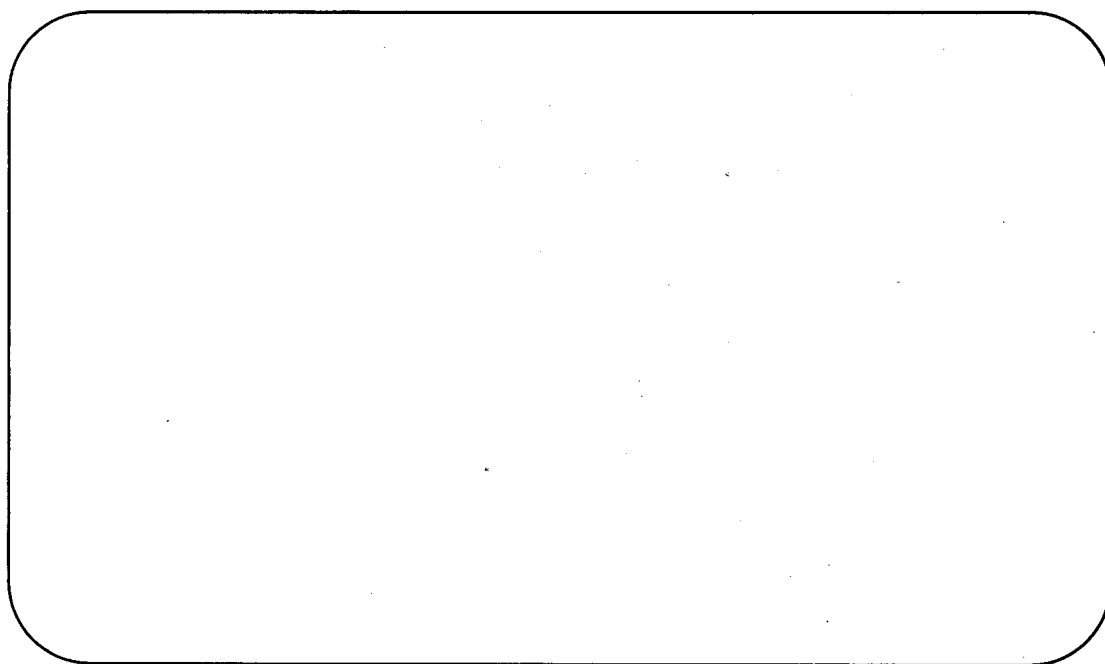
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:



☐

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE


C.C. 79.782.747 Bta T.P. 74.295

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NTT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 34,090
FECHA : MAYO 8 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-047482- -00000-0000

Fecha: 2009-05-11 16:45:32 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 95

**** CONSIGNACION ****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARTE RAISBEK	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	105800295	09/05/2009	4,016,000.00

**** CONCEPTO ****

CANT. KENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
	TOTAL :	\$ 540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

TRADUCCIÓN OFICIAL DE UN DOCUMENTO QUE ESTÁ ORIGINALMENTE EN INGLÉS

El documento de Poder adjunto de IRM LLC. a Delaware Limited Liability Company lleva la siguiente certificación notarial:

CERTIFICACIÓN

Yo, el suscrito Notario Público de Basilea, Suiza, certifico la autenticidad de las firmas anteriores correspondientes al Dr. Dirk Hillebrand, ciudadano Alemán, residente en Bad Säckingen, Alemania y al Dr. Peter Roth, ciudadano Aleman, residente en Friburgo, Alemania, ambos actuando en nombre de IRM LLC, en Hamilton, Bermuda, ambos apoderados, ambos con firma mancomunada.

La autenticidad de las firmas se estableció por comparación.

Basilea, este día 20 (veinte) de Noviembre de 2006 (dos mil seis).

(Firmado)

Sello: "Dr. Mattias Staehelin - Notario de Basilea"

Protocolo de Legalización No. 1571/2006

Apostilla:


Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

APOSTILLA:	
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)	
1. País:	Suiza
<u>El presente documento público</u>	
2. Ha sido firmado por:	Dr. M. Staehelin
3. Actuando en calidad de:	Notario
4. Lleva el sello/estampilla de:	(Ilegible).
<u>Certificado</u>	
5. En:	Basilea.
6. El:	20 de Noviembre de 2006.
7. Por:	Cancillería municipal del Cantón de la ciudad de Basilea.
8. Bajo el No.:	10413/17.594
9. Sello / estampilla:	Cancillería municipal · Ciudad de Basilea.
10. Firma:	Heidi Fischer

Certificación:

Certifico que la presente es una traducción verdadera y completa del documento adjunto:

Título: "IRM LLC – Cert."

Fecha: 29 de Noviembre de 2006.

Traductor: Jorge Enrique Sierra Reyes.

Licencia No. 376 de 1993, del Ministerio de Justicia.

Dirección: Carrera 15 No. 99-13 Oficina 411. Bogotá, Colombia.

Teléfono: (57-1) 2182308, (57-1) 6232925.

E-mail: treseser1@yahoo.com. 8845


Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Ministerio de Justicia

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI LTDA.

33842-CO-PCT

Power of Attorney

The undersigned,

domiciled in

IRM LLC, a Delaware Limited Liability Company

'Hurst Holme', 12 Trott Road, Hamilton, Bermuda, HM 11

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte and/or J. Ian Raisbeck and/or Ana María Frieri and/or Juan Guillermo Moure and/or Natalia Castro** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents for Inventions, Utility Models, Layout-Designs (topographies) of Integrated Circuits, Industrial Designs, Trademarks, Advertising Slogans, Trade Names, Commercial Emblems, Geographical Indications, Protection of Trade Secrets, Obtainer's Certificates, Copyrights, Registration of Domain Names, Health Registrations, or any other intellectual property right in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, recourses, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

Signature/Firma:


Dirk Hillebrand
Group Head Patents, MCD

Date/Fecha: 08 November 2006

City/Country/Ciudad,País: Basel, CH

Poder

El suscrito,

domiciliado en

por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro** poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Lemas Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, recursos, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.


Peter Roth
Snr. Patent Attorney

Carlos R. Olarte
J. Ian Raisbeck
Ana María Frieri
Juan Guillermo Moure
Natalia Castro
Zayde Chahin
Jacqueline Chaparro
José Luis Londoño
Felipe Mendoza
Simón Salinas

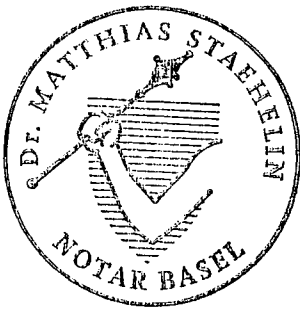
Of Counsel
Guillermo Chahin
Graciela Melo

Attestation

I, the undersigned notary public in Basel, Switzerland, certify herewith that the above signatures are the genuine signatures of **Dr. Dirk Hillebrand**, German citizen, residing in Bad Säckingen, Germany, and **Dr. Peter Roth**, German citizen, residing in Freiburg, Germany, both acting for **IRM LLC**, in Hamilton, Bermuda, both as proxy holders, both with joint signature.

The authenticity of the signatures was established by means of comparison.

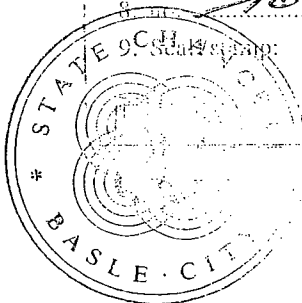
BASEL, this 20th (twentieth) day of November 2006 (twothousandandsix).



H. Staehelin, Note

Leg.Prot.Nr. 1571 /2006

APOSTILLE (Hague Convention of October 5 th , 1961)	
1. Country: Switzerland (Canton of Basel-Stadt)	
2. This official document is signed by <i>Dr. Dirk Hillebrand</i>	
3. In his/her function of <i>Dr. Peter Roth</i>	
4. And certified by <i>Dr. Matthias Staehelin</i>	
Certified 20. NOV. 2006	
5. in Basel (Basle)	6. on
7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt	
8. <i>20.11.2006/17.894</i>	10. Signature: <i>Heidi Fischer</i>
9. State stamp:	



(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
15 May 2008 (15.05.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/058127 A2

(51) International Patent Classification:

C07K 16/28 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2007/083774

(22) International Filing Date:

6 November 2007 (06.11.2007)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

60/858,169 9 November 2006 (09.11.2006) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **IRMLLC**
[US/—]; Hurst Holme, 12 Trott Road, Hamilton, HM 11
(BM).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **WANG, Yan**
[CN/US]; 849 West Orange Avenue, #1012, South San
Francisco, California 94080 (US). **COHEN, Steven B.**
[US/US]; 4104 Via Candidiz #89, San Diego, California
92130 (US). **NASOFF, Marc** [US/US]; 11734 Mira Lago
Way, San Diego, California 92131 (US).

(74) Agents: **SMITH, Timothy L.** et al.; 10675 John Jay Hop-
kins Drive, Genomics Institute of the Novartis Research
Found., San Diego, California 92121 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every

kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG,
ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL,
PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every

kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaration under Rule 4.17:

— of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report
— with sequence listing part of description published sepa-
rately in electronic form and available upon request from
the International Bureau

WO 2008/058127 A2

(54) Title: AGONIST TRKB ANTIBODIES AND USES THEREOF

(57) Abstract: TrkB agonist antibodies and methods of their use are provided.

2

AGONIST TRKB ANTIBODIES AND USES THEREOF

CROSS-REFERENCE TO RELATED PATENT APPLICATION

The present application claims benefit to U.S. Provisional Patent Application 60/858,169, filed November 9, 2006, which is incorporated by reference in its entirety for all
5 purposes.

BACKGROUND OF THE INVENTION

I. TrkB

[0001] Tyrosine receptor kinase B (TrkB) belongs to a family of single transmembrane
10 receptor tyrosine kinases that includes TrkA and TrkC. These tyrosine receptor kinases (trks) mediate the activity of neurotrophins. Neurotrophins are required for neuronal survival and development and regulate synaptic transmission via modulation of neuronal architecture and synaptic plasticity. Neurotrophins include, but are not limited to, nerve growth factor (NGF), brain derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT-3), and neurotrophin-4/5
15 (NT-4/5). (Lo, KY *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 280:41744-52 (2005)). TrkB is a high affinity receptor of BDNF (Minichiello, *et al.*, *Neuron* 21:335-45 (1998)). Neurotrophin binding to trk activates the receptor which dimerizes and auto-phosphorylates specific tyrosine residues on the intracellular domain of the receptor (Jing, *et al. Neuron* 9:1067-1079 (1992); Barbacid, *J. Neurobiol.* 25:1386-1403 (1994); Bothwell, *Ann. Rev. Neurosci.* 18:223 253 (1995); Segal
20 and Greenberg, *Ann. Rev. Neurosci.* 19:463 489 (1996); Kaplan and Miller, *Curr. Opinion Neurobiol.* 10:381 391 (2000)). These phospho-tyrosine residues serve as docking sites for elements of intracellular signaling cascades that lead to the suppression of neuron death and other effects of the neurotrophins. For example, Shc, FRS-2, SH2B, rAPS and PLC γ interact with TrkB via phosphorylated tyrosine residues. Association of these adaptor molecules with
25 activated TrkB results in the initiation of signaling pathways, including the mitogen-activated protein kinase, phosphatidylinositol 3-kinase, and PLC γ pathways, thereby mediating the actions of neurotrophins (Lo, KY *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 280:41744-52 (2005)).

II. Diabetes

[0002] The concentration of glucose in the human bloodstream must be controlled within a
30 relatively tight range (60-120 milligrams per deciliter of blood) to maintain normal health. If blood glucose drops too low, a condition known as hypoglycemia results, with symptoms

such as faintness, weakness, headache, confusion and personality changes. Excessive blood glucose, or hyperglycemia, may cause tissue damage due to the chemical reactions between the excess glucose and proteins in cells, tissues, and organs. This damage is thought to cause the diabetic complications of blindness, kidney failure, impotence, atherosclerosis, and increased vulnerability to infection.

[0003] Diabetes mellitus is associated with continuous and pathologically elevated blood glucose concentration; it is one of the leading causes of death in the United States and is responsible for about 5% of all mortality. Diabetes is divided into two major sub-classes: Type I, also known as juvenile diabetes, or Insulin-Dependent Diabetes Mellitus (IDDM), and Type II, also known as adult onset diabetes, or Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus (NIDDM).

[0004] The diagnosis of Type II diabetes mellitus includes assessment of symptoms and measurement of glucose in the urine and blood. Blood glucose level determination is necessary for an accurate diagnosis. More specifically, fasting blood glucose level determination is a standard approach used. However, the oral glucose tolerance test (OGTT) is considered to be more sensitive than fasted blood glucose level. Type II diabetes mellitus is associated with impaired oral glucose tolerance (OGT). The OGTT thus can aid in the diagnosis of Type II diabetes mellitus, although generally not necessary for the diagnosis of diabetes (Emancipator K, Am J Clin Pathol 1997 November ;112(5):665 74; Type 2 Diabetes Mellitus, Decision Resources Inc., March 2000).

[0005] Thus, impaired glucose tolerance is diagnosed in individuals that have fasting blood glucose levels less than those required for a diagnosis of Type II diabetes mellitus, but have a plasma glucose response during the OGTT between normal and diabetics. Impaired glucose tolerance is considered a prediabetic condition, and impaired glucose tolerance (as defined by the OGTT) is a strong predictor for the development of Type II diabetes mellitus (Haffner S M, *Diabet Med* 1997 August ; 14 Suppl 3:S12 8).

[0006] Type II diabetes mellitus is a progressive disease associated with the reduction of pancreatic function and/or other insulin-related processes, aggravated by increased plasma glucose levels. Thus, Type II diabetes mellitus usually has a prolonged prediabetic phase and various pathophysiological mechanisms can lead to pathological hyperglycemia and impaired glucose tolerance, for instance, abnormalities in glucose utilization and effectiveness, insulin action and/or insulin production in the prediabetic state (Goldberg R B, *Med Clin North Am* 1998 July ;82(4):805 21).

[0007] The prediabetic state associated with glucose intolerance can also be associated with a predisposition to abdominal obesity, insulin resistance, hyperlipidemia, and high blood pressure (Groop L, Forsblom C, Lehtovirta M, *Am J Hypertens* 1997 September ;10(9 Pt 2):172S 180S; Haffner S M, *J Diabetes Complications* 1997 March-April, 11(2):69 76; Beck-
5 Nielsen H, Henriksen J E, Alford F, Hother-Nielson O, *Diabet Med* 1996 September ;13 (9 Suppl 6):S78 84).

[0008] Early intervention in individuals at risk to develop Type II diabetes mellitus, focusing on reducing the pathological hyperglycemia or impaired glucose tolerance may prevent or delay the progression towards Type II diabetes mellitus and associated
10 complications. Therefore, by effectively treating impaired oral glucose tolerance and/or elevated blood glucose levels, one can prevent or inhibit the progression of the disorder to Type II diabetes mellitus. See, e.g., U.S. Patent No. 7,109,174.

[0009] Insulin and sulfonylureas (oral hypoglycemia therapeutic agents) are the two major classes of diabetes medicines prescribed today in the United States. Insulin is prescribed for
15 both Type I and Type II diabetes, while sulfonylureas are usually prescribed for Type II diabetics only. Sulfonylureas stimulate natural insulin secretion and reduce insulin resistance; these compounds do not replace the function of insulin in metabolism. Approximately one-third of patients who receive sulfonylurea become resistant to it. Some Type II diabetics do not respond to sulfonylurea therapy. Of patients who do respond to initial treatment with
20 sulfonylureas, 5-10% are likely to experience a loss of sulfonylurea effectiveness after about ten years. See, e.g., U.S. Patent No. 7,115,284.

[0010] Many anti-diabetic agents typically prescribed for the treatment of Type II diabetes mellitus, for example, sulfonylureas and thiazolidinediones, have an undesired side effect of increasing body weight. Increased body weight in patients with prediabetic conditions or with
25 diagnosed Type II diabetes mellitus results in deleterious effects due to accentuation of the metabolic and endocrine dysregulation, and obesity per se is a pivotal risk factor for the development and progressive worsening of Type II diabetes mellitus. Thus it is desirable to have an anti-diabetic agent which maintains or lowers body weight. See, e.g., U.S. Patent No. 7,199,174.

30 [0011] Obesity is a common and very serious public health problem as it increases a person's risk for a number of serious conditions, including diabetes, heart disease, stroke, high blood pressure, and some types of cancers. Considerable increase in the number of obese

individuals over the past two decades has created profound public health implications. Although studies have demonstrated that reduction in obesity by diet and exercise reduces the associated risk factors dramatically, these treatments are largely unsuccessful considering obesity is strongly associated with genetically inherited factors that contribute to increased appetite, preferences for highly caloric foods, reduced physical activity, and increased lipogenic metabolism. *See, e.g.*, U.S. Patent No. 7,115,767. Thus, it is an object of the invention to address the shortcomings in current hyperglycemia, obesity, and diabetes treatments.

10

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

[0012] The present invention provides isolated antibody agonists of Tyrosine Kinase Receptor B (TrkB). In some embodiments, the antibody is a humanized antibody. In some embodiments, the antibody is a single chain antibody. In some embodiments, the antibody does not bind to Tyrosine Kinase Receptor A or Tyrosine Kinase Receptor C.

15

[0013] In some embodiments, the antibody binds to the Ligand Binding Domain (LBD) of TrkB. In some embodiments, the antibody competes with the binding of Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) to TrkB. In some embodiments, the antibody competes for binding to TrkB with a competitor antibody comprising a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:3 and a light chain variable region comprising SEQ ID NO:4. In

20

some embodiments, the antibody comprises a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:7 and a light chain variable region comprising SEQ ID NO:8. In some embodiments, the antibody comprises a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:11 and a light chain variable region comprising SEQ ID NO:12. In some embodiments, the antibody comprises a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:15 and a light chain variable region comprising SEQ ID NO:16. In some embodiments, the antibody comprises a heavy chain variable region comprising SEQ ID NOs:7, 11, and 15 and a light chain variable region comprising SEQ ID NOs:8, 12, and 16. In some embodiments, the antibody comprises a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:3 and a light chain variable region comprising SEQ ID NO:4.

25

30

[0014] In some embodiments, the antibody does not bind to the ligand binding domain of TrkB. In some embodiments, the antibody does not compete with the binding of Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) to TrkB. In some embodiments, the antibody

competes for binding to TrkB with a competitor antibody comprising a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:1 and a light chain variable region comprising SEQ ID NO:2. In some embodiments, the antibody comprises a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:5 and a light chain variable region comprising SEQ ID NO:6. In some embodiments, the antibody comprises a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:9 and a light chain variable region comprising SEQ ID NO:10. In some embodiments, the antibody comprises a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:13 and a light chain variable region comprising SEQ ID NO:14. In some embodiments, the antibody comprises a heavy chain variable region comprising SEQ ID NOs:5, 9, and 13 and a light chain variable region comprising SEQ ID NOs:6, 10, and 14. In some embodiments, the antibody comprises a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:1 and a light chain variable region comprising SEQ ID NO:2.

[0015] The present invention also provides physiological compositions comprising, a therapeutically effective amount of the antibody of claim 1; and a pharmaceutical carrier. In some embodiments, the pharmaceutical composition further comprises an agent that reduces blood glucose levels in an individual. In some embodiments, the pharmaceutical composition further comprises an agent that reduces body weight in an individual.

[0016] The present invention also provides methods of reducing blood glucose levels and/or body weight in an individual in need thereof. In some embodiments, the methods comprise administering a therapeutically effective amount of an antibody agonist of Tyrosine Kinase Receptor B (TrkB) to the individual. In some embodiments, the individual is pre-diabetic. In some embodiments, the individual has type I diabetes. In some embodiments, the individual has type II diabetes. In some embodiments, the individual is overweight. In some embodiments, the individual is obese.

[0017] In some embodiments, a therapeutically effective amount of a second agent effective in reducing blood glucose is administered to the individual in combination with the antibody agonist of TrkB. In some embodiments, the second agent and the antibody agonist of TrkB are administered as a mixture. In some embodiments, the second agent is administered separately from the antibody agonist of TrkB. In some embodiments, the second agent is selected from the group consisting of: insulin, sulfonylureas, insulinotropic agents, metformin, PPAR γ agonists, PPAR α agonists, PPAR δ agonists, PPAR α/γ dual

agonists, PPAR $\alpha/\gamma/\delta$ pan agonists, alpha-glucosidase inhibitors, DPP-IV inhibitors, and GLP-1/GLP-1 analogs.

[0018] In some embodiments, a therapeutically effective amount of a second agent effective in reducing weight or obesity is administered to the individual in combination with the antibody agonist of TrkB. In some embodiments, the second agent and the antibody agonist of TrkB are administered as a mixture. In some embodiments, the second agent is administered separately from the antibody agonist of TrkB. In some embodiments, the second agent is selected from the group consisting of lipase inhibitors, sibutramine, CB-1 inhibitors, topiramate, amylin, amylin analogs, leptin, PYY/PYY analogs, and GLP-1/GLP-1 analogs.

DEFINITIONS

[0019] "Antibody" refers to a polypeptide comprising a framework region from an immunoglobulin gene or fragments thereof that specifically binds and recognizes an antigen. The recognized immunoglobulin genes include the kappa, lambda, alpha, gamma, delta, epsilon, and mu constant region genes, as well as the myriad immunoglobulin variable region genes. Light chains are classified as either kappa or lambda. Heavy chains are classified as gamma, mu, alpha, delta, or epsilon, which in turn define the immunoglobulin classes, IgG, IgM, IgA, IgD and IgE, respectively.

[0020] Naturally occurring immunoglobulins have a common core structure in which two identical light chains (about 24 kD) and two identical heavy chains (about 55 or 70 kD) form a tetramer. The amino-terminal portion of each chain is known as the variable (V) region and can be distinguished from the more conserved constant (C) regions of the remainder of each chain. Within the variable region of the light chain is a C-terminal portion known as the J region. Within the variable region of the heavy chain, there is a D region in addition to the J region. Most of the amino acid sequence variation in immunoglobulins is confined to three separate locations in the V regions known as hypervariable regions or complementarity determining regions (CDRs) which are directly involved in antigen binding. Proceeding from the amino-terminus, these regions are designated CDR1, CDR2 and CDR3, respectively. The CDRs are held in place by more conserved framework regions (FRs). Proceeding from the amino-terminus, these regions are designated FR1, FR2, FR3, and FR4, respectively. The

locations of CDR and FR regions and a numbering system have been defined by, e.g., Kabat *et al.* (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)).

- [0021] An exemplary naturally-occurring immunoglobulin (antibody) structural unit comprises a tetramer. Each tetramer is composed of two identical pairs of polypeptide chains, each pair having one "light" (about 25 kDa) and one "heavy" chain (about 50-70 kDa). The N-terminus of each chain defines a variable region of about 100 to 110 or more amino acids primarily responsible for antigen recognition. The terms variable light chain (V_L) and variable heavy chain (V_H) refer to these light and heavy chains respectively.
- 10 [0022] Antibodies exist, e.g., as intact immunoglobulins or as a number of well-characterized fragments produced by digestion with various peptidases. Thus, for example, pepsin digests an antibody below the disulfide linkages in the hinge region to produce $F(ab)_2$, a dimer of Fab which itself is a light chain joined to V_H-C_{H1} by a disulfide bond. The $F(ab)_2$ may be reduced under mild conditions to break the disulfide linkage in the hinge region, thereby converting the $F(ab)_2$ dimer into an Fab' monomer. The Fab' monomer is essentially
- 15 Fab with part of the hinge region (see FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul ed., 3d ed. 1993). While various antibody fragments are defined in terms of the digestion of an intact antibody, one of skill will appreciate that such fragments may be synthesized *de novo* either chemically or by using recombinant DNA methodology. Thus, the term "antibody", as used herein, also
- 20 includes antibody fragments either produced by the modification of whole antibodies, or those synthesized *de novo* using recombinant DNA methodologies (e.g., single chain Fv) or those identified using phage display libraries (see, e.g., McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554 (1990)).

- [0023] For preparation of monoclonal or polyclonal antibodies, any technique known in the art can be used (see, e.g., Kohler & Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975); Kozbor *et al.*, *Immunology Today* 4:72 (1983); Cole *et al.*, pp. 77-96 in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy* (1985)). "Monoclonal" antibodies refer to antibodies derived from a single clone. Techniques for the production of single chain antibodies (U.S. Pat. No. 4,946,778) can be adapted to produce antibodies to polypeptides of this invention. Also, transgenic mice, or
- 25 other organisms such as other mammals, may be used to express humanized antibodies. Alternatively, phage display technology can be used to identify antibodies and heteromeric
- 30

Fab fragments that specifically bind to selected antigens (*see, e.g., McCafferty et al., Nature* 348:552-554 (1990); Marks *et al., Biotechnology* 10:779-783 (1992)).

[0024] A "chimeric antibody" is an antibody molecule in which (a) the constant region, or a portion thereof, is altered, replaced or exchanged so that the antigen binding site (variable region) is linked to a constant region of a different or altered class, effector function and/or species, or an entirely different molecule which confers new properties to the chimeric antibody, e.g., an enzyme, toxin, hormone, growth factor, drug, etc.; or (b) the variable region, or a portion thereof, is altered, replaced or exchanged with a variable region having a different or altered antigen specificity.

10 [0025] A "humanized" antibody is an antibody that retains the reactivity of a non-human antibody while being less immunogenic in humans. This can be achieved, for instance, by retaining the non-human CDR regions and replacing the remaining parts of the antibody with their human counterparts. *See, e.g., Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984); Morrison and Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65-92 (1988); Verhoeyen *et al., Science*, 15 239:1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.*, 28:489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immun.*, 31(3):169-217 (1994).

[0026] The phrase "specifically (or selectively) binds" to an antibody or "specifically (or selectively) immunoreactive with," when referring to a protein or peptide, refers to a binding reaction that is determinative of the presence of the protein in a heterogeneous population of proteins and other biologics. Thus, under designated immunoassay conditions, the specified antibodies bind to a particular protein at least two times the background and do not substantially bind in a significant amount to other proteins present in the sample. Specific binding to an antibody under such conditions may require an antibody that is selected for its specificity for a particular protein. This selection may be achieved by subtracting out antibodies that cross-react with, e.g., TrkA or TrkC. A variety of immunoassay formats may be used to select antibodies specifically immunoreactive with a particular protein. For example, solid-phase ELISA immunoassays are routinely used to select antibodies specifically immunoreactive with a protein (*see, e.g., Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual* (1988), for a description of immunoassay formats and conditions that can be used to determine specific immunoreactivity). Typically a specific or selective reaction will be at least twice background signal or noise and more typically more than 10 to 100 times background.

15

[0027] The term "antibody agonist" refers to an antibody capable of activating a receptor to induce a full or partial receptor-mediated response. For example, an agonist of TrkB binds to TrkB and induces TrkB-mediated signaling. In some embodiments, a TrkB antibody agonist can be identified by its ability to bind TrkB and induce neurite outgrowth when contacted to SH-SY5Y cells or as otherwise described herein. Agonist antibodies are those that activate a receptor response at least 10% above the response in the absence of the antibody. In some cases, an agonist antibody activates a receptor response more than 25%, 50%, 75%, or 100% above the response in the absence of the antibody. Some antibody agonists activate a receptor response of 200%, 300%, 400%, 500%, or more above the response in the absence of the antibody.

[0028] "Activity" of a polypeptide of the invention refers to structural, regulatory, or biochemical functions of a polypeptide in its native cell or tissue. Examples of activity of a polypeptide include both direct activities and indirect activities. Exemplary direct activities are the result of direct interaction with the polypeptide, including ligand binding, such as binding of BDNF to the Ligand Binding Domain (LBD) (*see, e.g., Naylor et al., Biochem Biophys Res Commun.* 291(3):501-7 (2002) and SEQ ID NO:18) of TrkB, production or depletion of second messengers (*e.g., cAMP, cGMP, IP₃, DAG, or Ca²⁺*), ion flux, and changes in the level of phosphorylation or transcription. Exemplary indirect activities in the context of TrkB are observed as a change in phenotype or response in a cell or tissue to a polypeptide's directed activity, *e.g.,* reducing overall blood glucose levels as a result of the interaction of the polypeptide with other cellular or tissue components.

[0029] The term "obese," when used in reference to adult humans, refers to an individual with a body mass index (BMI) of 30 or more. "Overweight," when used in reference to adult humans, refers to an individual with a BMI of 25 or more. For children, the charts of Body-Mass-Index for Age are used, where a BMI greater than the 85th percentile is considered "overweight" and a BMI greater than the 95th percentile is considered "obese". *See, e.g., Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adult* (National Heart, Lung and Blood Institute, June 17, 1998) and *Preventing and Managing the Global Epidemic of Obesity* in Report of the World Health Organization Consultation of Obesity (WHO, Geneva, June 1997).

[0030] A "pre-diabetic individual" refers to an adult with a fasting blood glucose level greater than 110 mg/dl but less than 126 mg/dl or a 2 hour PG reading of greater than 140

mg/dl but less than 200mg/dl. A "diabetic individual," when used to compare with a sample from a patient, refers to an adult with a fasting blood glucose level greater than 126 mg/dl or a 2 hour PG reading of greater than 200 mg/dl. "Fasting" refers to no caloric intake for at least 8 hours. A "2 hour PG" refers to the level of blood glucose after challenging a patient to a glucose load containing the equivalent of 75g anhydrous glucose dissolved in water. The overall test is generally referred to as an oral glucose tolerance test (OGTT). *See, e.g., Diabetes Care*, 2003, 26(11): 3160-3167 (2003).

[0031] The term "isolated," when applied to a nucleic acid or protein, denotes that the nucleic acid or protein is essentially free of other cellular components with which it is associated in the natural state. It is preferably in a homogeneous state. It can be in either a dry or aqueous solution. Purity and homogeneity are typically determined using analytical chemistry techniques such as polyacrylamide gel electrophoresis or high performance liquid chromatography. A protein that is the predominant species present in a preparation is substantially purified. In particular, an isolated gene is separated from open reading frames that flank the gene and encode a protein other than the gene of interest. The term "purified" denotes that a nucleic acid or protein gives rise to essentially one band in an electrophoretic gel. Particularly, it means that the nucleic acid or protein is at least 85% pure, more preferably at least 95% pure, and most preferably at least 99% pure.

[0032] The term "nucleic acid" or "polynucleotide" refers to deoxyribonucleotides or ribonucleotides and polymers thereof in either single- or double-stranded form. Unless specifically limited, the term encompasses nucleic acids containing known analogues of natural nucleotides that have similar binding properties as the reference nucleic acid and are metabolized in a manner similar to naturally occurring nucleotides. Unless otherwise indicated, a particular nucleic acid sequence also implicitly encompasses conservatively modified variants thereof (*e.g.*, degenerate codon substitutions) and complementary sequences as well as the sequence explicitly indicated. Specifically, degenerate codon substitutions may be achieved by generating sequences in which the third position of one or more selected (or all) codons is substituted with mixed-base and/or deoxyinosine residues (Batzer *et al.*, *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); and Cassol *et al.* (1992); Rossolini *et al.*, *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)). The terms "nucleic acid" and "polynucleotide" are used interchangeably.

B

[0033] The terms "polypeptide," "peptide" and "protein" are used interchangeably herein to refer to a polymer of amino acid residues. The terms apply to amino acid polymers in which one or more amino acid residue is an artificial chemical mimetic of a corresponding naturally occurring amino acid, as well as to naturally occurring amino acid polymers and non-
5 naturally occurring amino acid polymers. As used herein, the terms encompass amino acid chains of any length, including full-length proteins, wherein the amino acid residues are linked by covalent peptide bonds.

[0034] The term "amino acid" refers to naturally occurring and synthetic amino acids, as well as amino acid analogs and amino acid mimetics that function in a manner similar to the
10 naturally occurring amino acids. Naturally occurring amino acids are those encoded by the genetic code, as well as those amino acids that are later modified, *e.g.*, hydroxyproline, γ -carboxyglutamate, and O-phosphoserine. Amino acid analogs refers to compounds that have the same basic chemical structure as a naturally occurring amino acid, *i.e.*, an α carbon that is bound to a hydrogen, a carboxyl group, an amino group, and an R group, *e.g.*, homoserine,
15 norleucine, methionine sulfoxide, methionine methyl sulfonium. Such analogs have modified R groups (*e.g.*, norleucine) or modified peptide backbones, but retain the same basic chemical structure as a naturally occurring amino acid. "Amino acid mimetics" refers to chemical compounds that have a structure that is different from the general chemical structure of an amino acid, but which functions in a manner similar to a naturally occurring amino acid.

20 [0035] Amino acids may be referred to herein by either the commonly known three letter symbols or by the one-letter symbols recommended by the IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission. Nucleotides, likewise, may be referred to by their commonly accepted single-letter codes.

[0036] "Conservatively modified variants" applies to both amino acid and nucleic acid
25 sequences. With respect to particular nucleic acid sequences, "conservatively modified variants" refers to those nucleic acids that encode identical or essentially identical amino acid sequences, or where the nucleic acid does not encode an amino acid sequence, to essentially identical sequences. Because of the degeneracy of the genetic code, a large number of functionally identical nucleic acids encode any given protein. For instance, the codons GCA,
30 GCC, GCG and GCU all encode the amino acid alanine. Thus, at every position where an alanine is specified by a codon, the codon can be altered to any of the corresponding codons described without altering the encoded polypeptide. Such nucleic acid variations are "silent

variations,” which are one species of conservatively modified variations. Every nucleic acid sequence herein that encodes a polypeptide also describes every possible silent variation of the nucleic acid. One of skill will recognize that each codon in a nucleic acid (except AUG, which is ordinarily the only codon for methionine, and TGG, which is ordinarily the only
5 codon for tryptophan) can be modified to yield a functionally identical molecule. Accordingly, each silent variation of a nucleic acid that encodes a polypeptide is implicit in each described sequence.

[0037] As to amino acid sequences, one of skill will recognize that individual substitutions, deletions or additions to a nucleic acid, peptide, polypeptide, or protein sequence which
10 alters, adds or deletes a single amino acid or a small percentage of amino acids in the encoded sequence is a “conservatively modified variant” where the alteration results in the substitution of an amino acid with a chemically similar amino acid. Conservative substitution tables providing functionally similar amino acids are well known in the art. Such conservatively modified variants are in addition to and do not exclude polymorphic variants, interspecies
15 homologs, and alleles of the invention.

[0038] The following eight groups each contain amino acids that are conservative substitutions for one another:

- 1) Alanine (A), Glycine (G);
 - 2) Aspartic acid (D), Glutamic acid (E);
 - 20 3) Asparagine (N), Glutamine (Q);
 - 4) Arginine (R), Lysine (K);
 - 5) Isoleucine (I), Leucine (L), Methionine (M), Valine (V);
 - 6) Phenylalanine (F), Tyrosine (Y), Tryptophan (W);
 - 7) Serine (S), Threonine (T); and
 - 25 8) Cysteine (C), Methionine (M)
- (see, e.g., Creighton, *Proteins* (1984)).

[0039] “Percentage of sequence identity” is determined by comparing two optimally aligned sequences over a comparison window, wherein the portion of the polynucleotide sequence in the comparison window may comprise additions or deletions (*i.e.*, gaps) as
30 compared to the reference sequence (e.g., a polypeptide of the invention), which does not comprise additions or deletions, for optimal alignment of the two sequences. The percentage is calculated by determining the number of positions at which the identical nucleic acid base or amino acid residue occurs in both sequences to yield the number of matched positions,

dividing the number of matched positions by the total number of positions in the window of comparison and multiplying the result by 100 to yield the percentage of sequence identity.

[0040] The terms "identical" or percent "identity," in the context of two or more nucleic acids or polypeptide sequences, refer to two or more sequences or subsequences that are the same sequences. Sequences are "substantially identical" if two sequences have a specified percentage of amino acid residues or nucleotides that are the same (*i.e.*, 60% identity, optionally 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% identity over a specified region, or, when not specified, over the entire sequence), when compared and aligned for maximum correspondence over a comparison window, designated region as measured using one of the following sequence comparison algorithms or by manual alignment and visual inspection, or across the entire sequence where not indicated. The invention provides polypeptides or polynucleotides encoding polypeptides that are substantially identical, or comprising sequences substantially identical, to the polypeptides exemplified herein (e.g., SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). This definition also refers to the complement of a nucleotide test sequence. Optionally, the identity exists over a region that is at least about 50 nucleotides in length, or more preferably over a region that is 100 to 500 or 1000 or more nucleotides in length.

[0041] For sequence comparison, typically one sequence acts as a reference sequence, to which test sequences are compared. When using a sequence comparison algorithm, test and reference sequences are entered into a computer, subsequence coordinates are designated, if necessary, and sequence algorithm program parameters are designated. Default program parameters can be used, or alternative parameters can be designated. The sequence comparison algorithm then calculates the percent sequence identities for the test sequences relative to the reference sequence, based on the program parameters.

[0042] A "comparison window", as used herein, includes reference to a segment of any one of the number of contiguous positions selected from the group consisting of from 20 to 600, usually about 50 to about 200, more usually about 100 to about 150 in which a sequence may be compared to a reference sequence of the same number of contiguous positions after the two sequences are optimally aligned. Methods of alignment of sequences for comparison are well known in the art. Optimal alignment of sequences for comparison can be conducted, *e.g.*, by the local homology algorithm of Smith and Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482c, by the homology alignment algorithm of Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol.*

Biol. 48:443, by the search for similarity method of Pearson and Lipman (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, by computerized implementations of these algorithms (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), or by manual alignment and visual inspection (see, e.g., Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* (1995 supplement)).

[0043] Two examples of algorithms that are suitable for determining percent sequence identity and sequence similarity are the BLAST and BLAST 2.0 algorithms, which are described in Altschul *et al.* (1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402, and Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410, respectively. Software for performing BLAST analyses is publicly available through the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). This algorithm involves first identifying high scoring sequence pairs (HSPs) by identifying short words of length W in the query sequence, which either match or satisfy some positive-valued threshold score T when aligned with a word of the same length in a database sequence. T is referred to as the neighborhood word score threshold (Altschul *et al.*, *supra*). These initial neighborhood word hits act as seeds for initiating searches to find longer HSPs containing them. The word hits are extended in both directions along each sequence for as far as the cumulative alignment score can be increased. Cumulative scores are calculated using, for nucleotide sequences, the parameters M (reward score for a pair of matching residues; always > 0) and N (penalty score for mismatching residues; always < 0). For amino acid sequences, a scoring matrix is used to calculate the cumulative score. Extension of the word hits in each direction are halted when: the cumulative alignment score falls off by the quantity X from its maximum achieved value; the cumulative score goes to zero or below, due to the accumulation of one or more negative-scoring residue alignments; or the end of either sequence is reached. The BLAST algorithm parameters W, T, and X determine the sensitivity and speed of the alignment. The BLASTN program (for nucleotide sequences) uses as defaults a wordlength (W) of 11, an expectation (E) of 10, M=5, N=-4 and a comparison of both strands. For amino acid sequences, the BLASTP program uses as defaults a wordlength of 3, and expectation (E) of 10, and the BLOSUM62 scoring matrix (see Henikoff and Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915) alignments (B) of 50, expectation (E) of 10, M=5, N=-4, and a comparison of both strands.

[0044] The BLAST algorithm also performs a statistical analysis of the similarity between two sequences (*see, e.g.,* Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787). One measure of similarity provided by the BLAST algorithm is the smallest sum probability (P(N)), which provides an indication of the probability by which a match between
5 two nucleotide or amino acid sequences would occur by chance. For example, a nucleic acid is considered similar to a reference sequence if the smallest sum probability in a comparison of the test nucleic acid to the reference nucleic acid is less than about 0.2, more preferably less than about 0.01, and most preferably less than about 0.001.

10

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0045] Figure 1 illustrates effect of BDNF in an Anoikis assay.

[0046] Figure 2 shows the effect of various identified TrkB antibodies in an Anoikis assay.

[0047] Figure 3 displays thereactivity of the isolated TrkB antibodies.

15 [0048] Figure 4 shows that the purified TrkB functional antibody agonists are not reactive against human TrkA or TrkC.

[0049] Figure 5 shows antibody agonists in a SH-SY5Y differentiation assay.

[0050] Figure 6 shows isotyping results of TrkB monoclonal functional antibodies.

[0051] Figure 7 summarizes information for various agonist antibodies identified.

20 [0052] Figure 8 illustrates that TrkB agonist antibodies reduce serum glucose levels and promote weight loss prophylactically.

[0053] Figure 9 illustrates that TrkB agonist antibodies reduce serum glucose levels and promote weight loss prophylactically and therapeutically.

25 [0054] Figure 10 provides the variable region sequences of the A10 and C20 antibodies disclosed herein. For each sequence, the first underlined portion is CR1, the second underlined portion is CDR2 and the third underlined portion is CDR3.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

I. Introduction

[0055] The present invention provides novel TrkB agonist antibodies. The TrkB agonist antibodies of the invention bind specifically to TrkB and activate TrkB. Surprisingly, the present application demonstrates that the TrkB agonist antibodies of the invention also dramatically reduce blood glucose levels in diabetic mice *in vivo*. Further, treatment with the TrkB agonist antibodies of the invention prevented the weight gain that is normally observed in these mice. These results demonstrate that the antibodies of the invention are specific for TrkB and are effective in activating the receptor. Moreover, the results reveal that TrkB activation is useful in preventing hyperglycemia and its associated conditions, obesity, pre-diabetes, and type-II diabetes.

II. *Antibodies that bind TrkB*

1. Introduction

[0056] Any TrkB agonist antibodies can be used according to the methods of the invention.

[0057] In some embodiments, TrkB agonist antibodies of the invention bind to the TrkB ligand binding site and/or competes with BDNF for binding to TrkB. An exemplary antibody that binds to the ligand binding site of TrkB is Antibody A10F18.2 (also referred to herein as "A10F18" or "A10"). The heavy chain variable region of antibody A10 is exemplified in SEQ ID NO:1 and the light chain variable region of antibody A10 is exemplified in SEQ ID NO:2. Accordingly, the invention provides agonist antibodies that compete for binding to TrkB with an antibody comprising a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:1 and a light chain variable region comprising SEQ ID NO:2. In some embodiments, the antibodies of the invention comprise at least of the complementarity determining regions (CDRs) of SEQ ID NO:1 and/or 2. Without intending to limit the scope of the invention, it is believed that CDR3 plays a significant role in the binding of antibody A10. Accordingly, in some embodiments, an antibody of the present invention comprises SEQ ID NOs: 5 and/or 6. However, CDR1 and/or CDR2 also play a role in binding. Accordingly, in some embodiments, an antibody of the present invention comprises SEQ ID NOs: 9 and/or 10 or 13 and/or 14.

[0058] In some embodiments, TrkB agonist antibodies of the invention do not bind to the TrkB ligand binding site and/or compete with BDNF for binding to TrkB. An exemplary antibody that does not bind to the ligand binding site of TrkB is Antibody C20.i1.1 (also referred to herein as "C20.i1", "C20.I1" and "C20"). The heavy chain variable region of

13

antibody C20 is exemplified in SEQ ID NO:3 and the light chain variable region of antibody C20 is exemplified in SEQ ID NO:4. Accordingly, the invention provides agonist antibodies that compete for binding to TrkB with an antibody comprising a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:3 and a light chain variable region comprising SEQ ID NO:4. In
5 some embodiments, the antibodies of the invention comprise at least of the complementarity determining regions (CDRs) of SEQ ID NO:3 and/or 4. Without intending to limit the scope of the invention, it is believed that CDR3 plays a significant role in the binding of antibody C20. Accordingly, in some embodiments, an antibody of the present invention comprises SEQ ID NOs: 7 and/or 8. However, CDR1 and/or CDR2 also play a role in binding.
10 Accordingly, in some embodiments, an antibody of the present invention comprises SEQ ID NOs: 11 and/or 12 or 15 and/or 16.

[0059] Any type of antibody agonist may be used according to the methods of the invention. Generally, the antibodies used are monoclonal antibodies. Monoclonal antibodies can be generated by any method known in the art (e.g., using hybridomas, recombinant
15 expression and/or phage display).

2. Humanized Antibodies

[0060] In some embodiments, the antibody used according to the present invention is a chimeric (e.g., mouse/human) antibody made up of regions from a non-human anti-TrkB
20 antibody agonist together with regions of human antibodies. For example, a chimeric H chain can comprise the antigen binding region of the heavy chain variable region (e.g., SEQ ID NOs:1 or 3 or at least parts thereof, such as a CDR) of the non-human antibody linked to at least a portion of a human heavy chain constant region. This humanized or chimeric heavy chain may be combined with a chimeric L chain that comprises the antigen binding region of
25 the light chain variable region (e.g., SEQ ID NOs:2 or 4 or at least parts thereof, such as a CDR) of the non-human antibody linked to at least a portion of the human light chain constant region. In some embodiments, the heavy chain constant region can be an IgM or IgA antibody.

[0061] The chimeric antibodies of the invention may be monovalent, divalent, or
30 polyvalent immunoglobulins. For example, a monovalent chimeric antibody is a dimer (HL) formed by a chimeric H chain associated through disulfide bridges with a chimeric L chain, as noted above. A divalent chimeric antibody is a tetramer (H₂ L₂) formed by two HL dimers

associated through at least one disulfide bridge. A polyvalent chimeric antibody is based on an aggregation of chains.

[0062] The DNA sequences of the antibodies of the invention can be identified, isolated, cloned, and transferred to a prokaryotic or eukaryotic cell for expression by procedures well-known in the art. Such procedures are generally described in Sambrook *et al.*, *supra*, as well as CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Ausubel *et al.*, eds., 1989). Expression vectors and host cells suitable for expression of recombinant antibodies and humanized antibodies in particular, are well known in the art. The following references are representative of methods and vectors suitable for expression of recombinant immunoglobulins which may be utilized in carrying out the present invention: Weidle *et al.*, *Gene*, 51: 21-29 (1987); Dorai *et al.*, *J. Immunol.*, 13(12):4232-4241 (1987); De Waele *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 176:287-295 (1988); Colcher *et al.*, *Cancer Res.*, 49:1738-1745 (1989); Wood *et al.*, *J. Immunol.*, 145(a):3011-3016 (1990); Bulens *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 195:235-242 (1991); Beggington *et al.*, *Biol. Technology*, 10:169 (1992); King *et al.*, *Biochem. J.*, 281:317-323 (1992); Page *et al.*, *Biol. Technology*, 2:64 (1991); King *et al.*, *Biochem. J.*, 290:723-729 (1993); Chaudary *et al.*, *Nature*, 339:394-397 (1989); Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Morrison and Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65-92 (1988); Benhar *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:12051-12055 (1994); Singer *et al.*, *J. Immunol.*, 150:2844-2857 (1993); Cooto *et al.*, *Hybridoma*, 13(3):215-219 (1994); Queen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:10029-10033 (1989); Caron *et al.*, *Cancer Res.*, 32:6761-6767 (1992); Cotoma *et al.*, *J. Immunol. Meth.*, 152:89-109 (1992). Moreover, vectors suitable for expression of recombinant antibodies are commercially available.

[0063] Host cells capable of expressing functional immunoglobulins include, e.g., mammalian cells such as Chinese Hamster Ovary (CHO) cells; COS cells; myeloma cells, such as NSO and SP2/O cells; bacteria such as *Escherichia coli*; yeast cells such as *Saccharomyces cerevisiae*; and other host cells.

3. Single Chain Antibodies

[0064] In some embodiments, the antibodies of the invention are single chain Fvs (scFvs). The V_H and the V_L regions (e.g., SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2, or SEQ ID NO:3 and SEQ ID NO:4) of a scFv antibody comprise a single chain which is folded to create an antigen binding site similar to that found in two chain antibodies. Once folded, noncovalent

b

interactions stabilize the single chain antibody. While the V_H and V_L regions of some antibody embodiments can be directly joined together, one of skill will appreciate that the regions may be separated by a peptide linker consisting of one or more amino acids. Peptide linkers and their use are well-known in the art. See, *e.g.*, Huston *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 8:5879 (1988); Bird *et al.*, *Science* 242:4236 (1988); Glockshuber *et al.*, *Biochemistry* 29:1362 (1990); U.S. Patent No. 4,946,778, U.S. Patent No. 5,132,405 and Stemmer *et al.*, *Biotechniques* 14:256-265 (1993). Generally the peptide linker will have no specific biological activity other than to join the regions or to preserve some minimum distance or other spatial relationship between the V_H and V_L. However, the constituent amino acids of the peptide linker may be selected to influence some property of the molecule such as the folding, net charge, or hydrophobicity. Single chain Fv (scFv) antibodies optionally include a peptide linker of no more than 50 amino acids, generally no more than 40 amino acids, preferably no more than 30 amino acids, and more preferably no more than 20 amino acids in length.

15 [0065] Methods of making scFv antibodies have been described. See, *e.g.*, Huse *et al.*, *Science* 246:1275-1281 (1989); Ward *et al.*, *Nature* 341:544-546 (1989); and Vaughan *et al.*, *Nature Biotech.* 14:309-314 (1996). In brief, mRNA from B-cells from an immunized animal is isolated and cDNA is prepared. The cDNA is amplified using primers specific for the variable regions of heavy and light chains of immunoglobulins. The PCR products are purified and the nucleic acid sequences are joined. If a linker peptide is desired, nucleic acid sequences that encode the peptide are inserted between the heavy and light chain nucleic acid sequences. The nucleic acid which encodes the scFv is inserted into a vector and expressed in the appropriate host cell. The scFv that specifically bind to the desired antigen are typically found by panning of a phage display library. Panning can be performed by any of several methods. Panning can conveniently be performed using cells expressing the desired antigen on their surface or using a solid surface coated with the desired antigen. Conveniently, the surface can be a magnetic bead. The unbound phage are washed off the solid surface and the bound phage are eluted.

30 [0066] Finding the antibody with the highest affinity is dictated by the efficiency of the selection process and depends on the number of clones that can be screened and the stringency with which it is done. Typically, higher stringency corresponds to more selective panning. If the conditions are too stringent, however, the phage will not bind. After one round of panning, the phage that bind to TrkB coated plates or to cells expressing TrkB on

their surface are expanded in *E. coli* and subjected to another round of panning. In this way, an enrichment of many fold occurs in 3 rounds of panning. Thus, even when enrichment in each round is low, multiple rounds of panning will lead to the isolation of rare phage and the genetic material contained within which encodes the scFv with the highest affinity or one which is better expressed on phage.

[0067] Regardless of the method of panning chosen, the physical link between genotype and phenotype provided by phage display makes it possible to test every member of a cDNA library for binding to antigen, even with large libraries of clones.

4. Human Antibodies

[0068] In some embodiments, human antibodies are used according to the present invention. Human antibodies can be made by a variety of methods known in the art including by using phage display methods using antibody libraries derived from human immunoglobulin sequences. *See, e.g.,* Lonberg and Huszar, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995), U.S. Pat. Nos. 4,444,887 and 4,716,111; and PCT publications WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, and WO 91/10741; each of which is incorporated herein by reference in its entirety.

[0069] In some embodiments, the antibodies of the present invention are generated using phage display. For example, functional antibody domains are displayed on the surface of phage particles that carry the polynucleotide sequences encoding them. Such phage can be utilized to display antigen-binding domains expressed from a repertoire or combinatorial antibody library (e.g., human or murine). Phage expressing an antigen binding domain that binds TrkB can be selected or identified with TrkB, e.g., using labeled TrkB. Phage used in these methods are typically filamentous phage including fd and M13 binding domains expressed from phage with Fab, Fv or disulfide stabilized Fv antibody domains recombinantly fused to either the phage gene III or gene VIII protein. Examples of phage display methods that can be used to make the antibodies of the present invention include those disclosed in Brinkman *et al.*, *J. Immunol. Methods* 182:41-50 (1995); Ames *et al.*, *J. Immunol. Methods* 184:177-186 (1995); Kettleborough *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 24:952-958 (1994); Persic *et al.*, *Gene* 187:9-18 (1997); Burton *et al.*, *Advances in Immunology* 57:191-280 (1994); PCT application No. PCT/GB91/01134; PCT publications WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; and

U.S. Pat. Nos. 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743 and 5,969,108; each of which is incorporated herein by reference in its entirety.

5 **5. Generating agonist antibodies**

[0070] Agonist antibodies can be identified by generating anti-TrkB antibodies and then testing each antibody for the ability trigger TrkB mediated events, e.g., initiating differentiation and/or dendrification of SH-SY5Y cells, measuring Anoikis (apoptosis resulting from loss of cell-matrix interactions) in response to treatment of cells with potential
10 TrkB agonist, or using a BaF3/TrkB cell proliferation assay.

[0071] SH-SY5Y assays involve plating out SH-SY5Y cells and treating the cells with retenoic acid with or without potential agonist antibodies and/or BDNF and subsequently measure neurite outgrowth. Generally, retinoic acid alone will induce a small amount of neurite outgrowth. BDNF alone should not induce significant neurite outgrowth and
15 antibody alone should not induce significant neurite outgrowth. However, cells treated with retinoic acid, BDNF, and antibody should exhibit extensive neurite outgrowth. An exemplary SH-SY5Y assay is described in Kaplan DR, *et al.*, *Neuron* 11:321-331 (1993).

[0072] BaF3/TrkB cell proliferation assays involve measuring proliferation of cells stimulates by agonism of the TrkB receptor. For example, BaF3 cells are grown in complete
20 RPMI medium with IL-3 and infected with TrkB retrovirus. Cells are washed in the absences of IL-3 and plated. Potential agonist antibodies and cell survival is measured (e.g., using luminescent cell viability detection reagent such as Cell-Titer Glo™) after an appropriate incubation. Positive control cells are incubated with rhBDNF.

[0073] Anoikis assays involve resuspending RIE/TrkB cells (e.g., in DMEM medium) and
25 contacting cells, optionally in multi-well containers, with a potential antibody agonist (e.g., 2.5×10^4 cells $10 \mu\text{l}$ of 1-20 $\mu\text{g/ml}$ antibody). The mixtures are incubated in the presence or absence of a hBDNF control and then measured for cell viability (e.g., using luminescent cell viability detection reagent such as Cell-Titer Glo™). An exemplary Anoikis assay is described in Douma *et al.*, *Nature* 430:1034-1039(2004).

30 [0074] TrkB agonists can also be evaluated on SH-SY5Y cells for their ability to protect cells from vinblastine and cisplatin toxicity. This assays has been described in, e.g., Scala *et*

al., *Cancer Res.* 56(16):3737-42 (1996); and Jaboin *et al.*, *Cancer Res.* 62(22):6756-63 (2002).

III. Antibody Uses

5 [0075] The TrkB agonists antibodies of the invention can be used to treat or ameliorate any diseases or conditions that benefit from increased TrkB activity.

[0076] In some embodiments, the TrkB agonist antibodies of the invention are used to treat or alleviate hyperglycemia and/or diabetes or symptoms thereof in an individual.

Alternatively, or in combination, the antibodies of the invention can be used to reduce weight
10 in an individual in need thereof. In some embodiments, the antibodies are used to alleviate obesity. This can be particularly useful as obese individuals are more prone to insulin resistance and type II diabetes.

[0077] The present invention also provides for methods of treatment or prevention of neurodegenerative or central nervous system (CNS) diseases by administration of the TrkB
15 agonist antibodies of the invention to an individual in need thereof. Exemplary CNS diseases include, e.g., Alzheimer's, Parkinson's, Huntington's or ALS diseases.

[0078] Increasing TrkB activation has also be implicated in alleviation of substance abuse. See, e.g., U.S. Patent Publication No. 2005/0203011. Accordingly, the present invention provides for methods of alleviating substance (e.g., alcohol, nicotine and/or narcotics) abuse
20 and dependence by administering the TrkB agonist antibodies of the invention to an individual in need there of.

[0079] The antibodies and agents of the invention can be administered directly to the mammalian subject in need thereof. Administration of the compositions of the present invention is by any of the routes normally used for introducing pharmaceuticals, including
25 antibodies, into ultimate contact with the tissue to be treated. The antibodies are administered in any suitable manner, optionally with pharmaceutically acceptable carriers. Suitable methods of administering such antibodies and agents are available and well known to those of skill in the art, and, although more than one route can be used to administer a particular composition, a particular route can often provide a more immediate and more effective
30 reaction than another route.

[0080] Pharmaceutically acceptable carriers are determined in part by the particular composition being administered, as well as by the particular method used to administer the

composition. Accordingly, there is a wide variety of suitable formulations of pharmaceutical compositions of the present invention (see, e.g., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17th ed. 1985)).

[0081] The antibodies, alone or in combination with other suitable components, can be made into aerosol formulations (i.e., they can be "nebulized") to be administered via inhalation. Aerosol formulations can be placed into pressurized acceptable propellants, such as dichlorodifluoromethane, propane, nitrogen, and the like.

[0082] Formulations suitable for administration include aqueous and non-aqueous solutions, isotonic sterile solutions, which can contain antioxidants, buffers, bacteriostats, and solutes that render the formulation isotonic, and aqueous and non-aqueous sterile suspensions that can include suspending agents, solubilizers, thickening agents, stabilizers, and preservatives. In the practice of this invention, compositions can be administered, for example, by orally, topically, intravenously, intraperitoneally, intravesically or intrathecally. Optionally, the compositions are administered nasally. The formulations of compounds can be presented in unit-dose or multi-dose sealed containers, such as ampules and vials. Solutions and suspensions can be prepared from sterile powders, granules, and tablets of the kind previously described. The modulators can also be administered as part of a prepared food or drug. The compounds of the present invention can also be used effectively in combination with one or more additional active agents (e.g., chemotherapeutics) depending on the desired therapy or effect.

[0083] The dose administered to a patient, in the context of the present invention should be sufficient to effect a beneficial response in the subject over time. The dose will be determined by the efficacy of the particular antibodies and reagents employed and the condition of the subject, as well as the body weight or surface area of the area to be treated. The size of the dose also will be determined by the existence, nature, and extent of any adverse side-effects that accompany the administration of a particular compound or vector in a particular subject. Administration can be accomplished via single or divided doses.

[0084] The TrkB antibody agonist can be used in combination with agents known to be beneficial for reducing weight, reducing blood glucose levels, treat diabetes or alleviate diabetic symptoms, treating neurodegenerative diseases or reducing substance abuse. Exemplary agents used to treat diabetes include, e.g., insulin; sulfonylureas (e.g. Glipizide and Amaryl) and insulinotropic agents (e.g. nateglinide and repaglinide); metformin;

PPARgamma agonists (e.g. rosiglitazone and pioglitazone) as well as PPARalpha, PPARdelta, PPARalpha/gamma dual agonists and PPARalpha/gamma/delta pan agonists; alpha-glucosidase inhibitors (e.g. Acarbose); DPP-IV inhibitors (e.g. vildagliptin); and GLP-1/GLP-1 analogs (e.g. exenatide). Exemplary agents used to treat obesity include, e.g., lipase inhibitors (e.g. orlistat); sibutramine; CB-1 inhibitors (e.g.rimonabant); topiramate; amylin/amylin analogs (e.g. pramlintide), leptin, PYY/PYY analogs; and GLP-1/GLP-1 analogs (e.g. exenatide).

[0085] Active agents that can be administered together in a mixture with the TrkB agonist antibody or each can be administered separately. The antibody agent and the other active agent can, but need not, be administered concurrently.

EXAMPLE

Example 1

[0086] This example discusses the identification and characterization of antibody agonists of TrkB.

[0087] Mice were immunized with human trkB receptor and hybridoma supernatants from serum IgG positive mice were screened for reactivity to TrkB by ELISA. Resulting antibodies were screened for their ability to activate TrkB by testing the antibodies' ability to rescue RIE/TrkB cells from Anoikis. BDNF is known to rescue RIE/TrkB cells from Anoikis and therefore this assay is a good measure of an antibody's ability to activate TrkB. See, Figure 1. Multiple TrkB antibody agonists were identified that mimic the activity of BDNF in an Anoikis assay, as shown in Figure 2. Positive antibody agonists were purified from low IgG media.

[0088] Antibody agonists were screened for reactivity to huTrkB, muTrkB, and TrkB ligand binding domain (LBD), as shown in Figure 3. Most of the agonists did not bind to the LBD. In particular, it was found that C20 is reactive with mouse and human trkB. A10 is reactive with mouse and human trkB and binds to the ligand binding domain epitope. As shown in Figure 4, many of the functional antibodies were shown to be reactive against mouse Trk B, but did not bind to TrkA, or TrkC.

[0089] Antibody agonists were confirmed in a neurite outgrowth *in vitro* model. The results showed that TrkB antibody agonists stimulate neurite outgrowth similar to BDNF.

[0090] The functional antibodies were isotypized as shown in Figure 6. The functional antibodies were further shown to bind to human TrkB over-expressed in RIE cells by western blots. Figure 7 summarizes information for various agonist antibodies identified.

5 Example 2

[0091] This example shows that TrkB agonist antibodies effectively reduce blood glucose and weight in mice.

[0092] The two most potent agonists, A10 and C20 (whose variable regions are displayed in SEQ ID NOs:3 and 4 and SEQ ID NOs: 1 and 2, respectively), were tested in a db/db
10 mouse model of type 2 diabetes. As shown in Figures 8 and 9, both antibodies appeared to reduce serum glucose levels and promote weight loss prophylactically and therapeutically.

[0093] As shown in the top graph of Figure 9, mice prone to high blood glucose levels did not have increased blood glucose levels when antibodies A10 or C20 were administered, whereas control mice did have elevated levels. This result shows that the antibodies have a
15 prophylactic effect. Thirty-two days into the study the hyperglycemic, obese control animals (8) were split into 2 groups. One group was treated with antibody A10 and the other was treated with PBS. Treatment reversed hyperglycemia within 1 week and reduced weight by 25%. The original treated animals were left untreated for 4 additional weeks. The C20
20 treated group had increased glucose levels and increase weight gain. The A10 group maintained normal glucose and showed a small weight increase. These results are shown in the top and bottom panels of Figure 9. A PK study revealed that the A10 antibody had a much better serum half-life, which corresponds to the effects seen *in vivo*.

[0094] Although the invention has been described in some detail by way of illustration and
25 example for purposes of clarity of understanding, it will be readily apparent to one of ordinary skill in the art in light of the teachings of this invention that certain changes and modifications may be made thereto without departing from the spirit or scope of the appended claims.

[0095] All publications, databases, Genbank sequences, patents, and patent applications cited
30 in this specification are herein incorporated by reference as if each was specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

WHAT IS CLAIMED IS:

- 1 1. An isolated antibody agonist of Tyrosine Kinase Receptor B (TrkB).
- 1 2. The antibody of claim 1, wherein the antibody is a humanized
2 antibody.
- 1 3. The antibody of claim 1, wherein the antibody is a single chain
2 antibody.
- 1 4. The antibody of claim 1, wherein the antibody does not bind to
2 Tyrosine Kinase Receptor A or Tyrosine Kinase Receptor C.
- 1 5. The antibody of claim 1, wherein the antibody binds to the Ligand
2 Binding Domain (LBD) of TrkB.
- 1 6. The antibody of claim 1, wherein the antibody competes with the
2 binding of Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) to TrkB.
- 1 7. The antibody of claim 1, wherein the antibody comprises
2 i. a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:7; and
3 ii. a light chain variable region comprising SEQ ID NO:8.
- 1 8. The antibody of claim 7, wherein the antibody comprises
2 i. a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:7, SEQ ID
3 NO:11, and SEQ ID NO:15; and
4 ii. a light chain variable region comprising SEQ ID NO:8, SEQ ID
5 NO:12, and SEQ ID NO:16.
- 1 9. The antibody of claim 8, wherein the antibody comprises
2 i. a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:3; and
3 ii. a light chain variable region comprising SEQ ID NO:4.
- 1 10. The antibody of claim 1, wherein the antibody does not bind to the
2 LBD of TrkB.
- 1 11. The antibody of claim 1, wherein the antibody does not compete with
2 the binding of BDNF to TrkB.

- 1 12. The antibody of claim 1, wherein the antibody comprises
2 i. a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:5; and
3 ii. a light chain variable region comprising SEQ ID NO:6.
- 1 13. The antibody of claim 12, wherein the antibody comprises
2 i. a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:5, SEQ ID
3 NO:9, and SEQ ID NO:13; and
4 ii. a light chain variable region comprising SEQ ID NO:6, SEQ ID
5 NO:10, and SEQ ID NO:14.
- 1 14. The antibody of claim 13, wherein the antibody comprises
2 i. a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:1; and
3 ii. a light chain variable region comprising SEQ ID NO:2.
- 1 15. A pharmaceutical composition comprising
2 i. a therapeutically effective amount of the antibody of claim 1; and
3 ii. a pharmaceutical carrier.
- 1 16. The pharmaceutical composition of claim 15, wherein the antibody is
2 selected from the group consisting of:
3 i. an antibody comprising a heavy chain variable region comprising SEQ
4 ID NO:5 and a light chain variable region comprising SEQ ID NO:6; and
5 ii. an antibody comprising a heavy chain variable region comprising SEQ
6 ID NO:7 and a light chain variable region comprising SEQ ID NO:8.
- 1 17. The pharmaceutical composition of claim 15, wherein the
2 pharmaceutical composition further comprises an agent that reduces blood glucose levels
3 and/or body weight in an individual.
- 1 18. A method of reducing blood glucose levels and/or body weight in an
2 individual in need thereof, the method comprising administering a therapeutically effective
3 amount of the antibody of claim 1 to the individual.

- 1 19. The method of claim 18, wherein the individual has a condition
2 selected from the group consisting of: pre-diabetes, type I diabetes, type II diabetes, being
3 overweight, and obesity.
- 1 20. The method of claim 18, wherein a therapeutically effective amount of
2 a second agent effective in reducing blood glucose and/ or body weight is administered to the
3 individual in combination with the antibody of claim 1.
- 1 21. The method of claim 20, wherein the second agent and the antibody of
2 claim 1 are administered as a mixture.
- 1 22. The method of claim 20, wherein the second agent is administered
2 separately from the antibody of claim 1.
- 1 23. The method of claim 20, wherein the second agent is selected from the
2 group consisting of: insulin, sulfonylureas, insulinotropic agents, metformin, PPAR γ agonists
3 PPAR α agonists, PPAR δ agonists, PPAR α/γ dual agonists, PPAR $\alpha/\gamma/\delta$ pan agonists, alpha-
4 glucosidase inhibitors, DPP-IV inhibitors, lipase inhibitors, sibutramine, CB-1 inhibitors,
5 topiramate, amylin, amylin analogs, leptin, PYY/PYY analogs, and GLP-1/GLP-1 analogs.
- 1 24. The method of claim 18, wherein the antibody is a humanized
2 antibody.
- 1 25. The method of claim 18, wherein the antibody is selected from the
2 group consisting of:
3 i. an antibody comprising the heavy chain variable region comprising
4 SEQ ID NO:5 and a light chain variable region comprising SEQ ID NO:6; and
5 ii. an antibody comprising a heavy chain variable region comprising SEQ
6 ID NO:7 and a light chain variable region comprising SEQ ID NO:8.
- 35

Figure 1

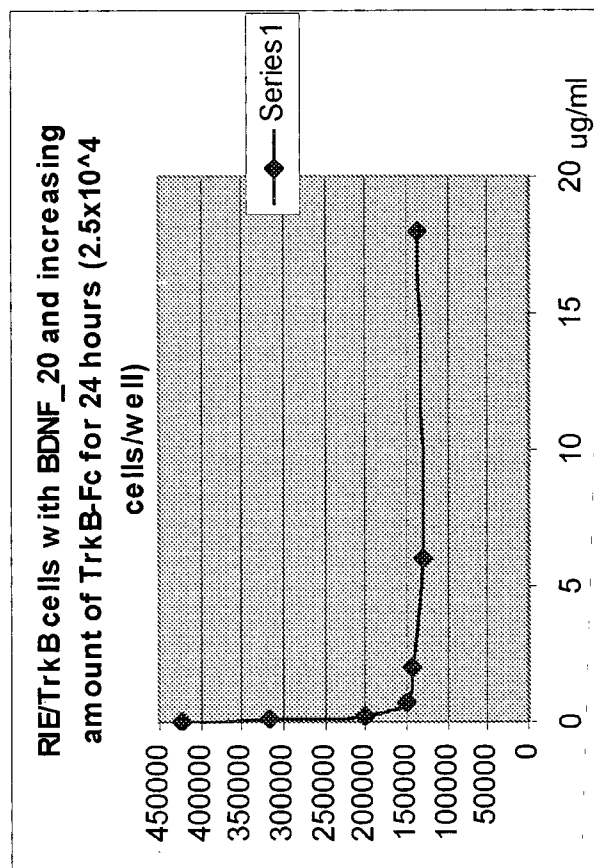
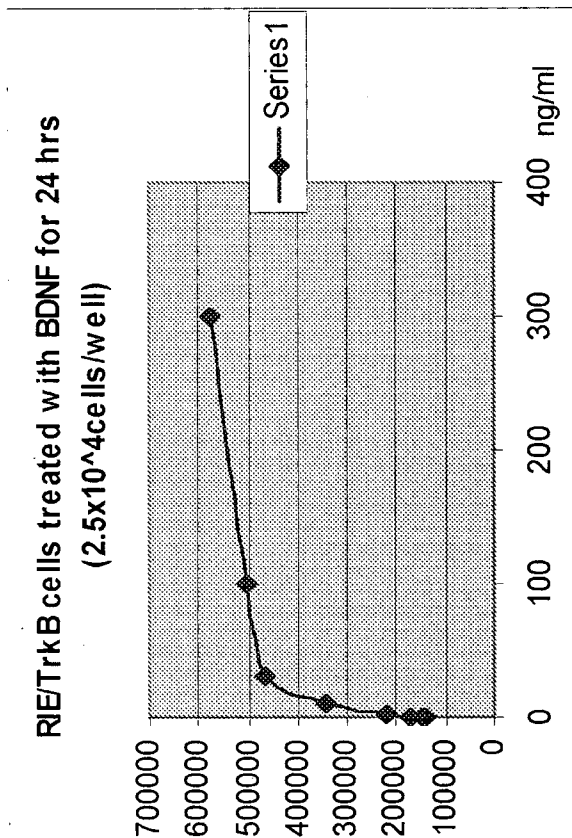
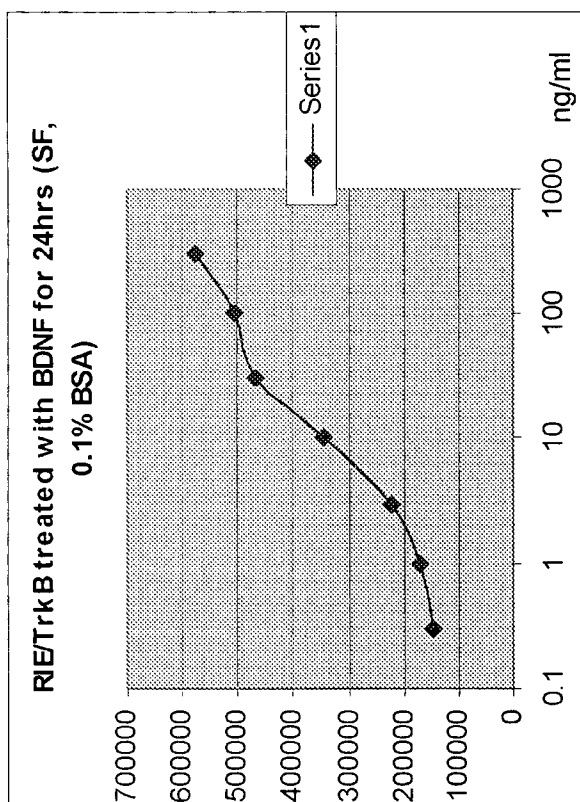
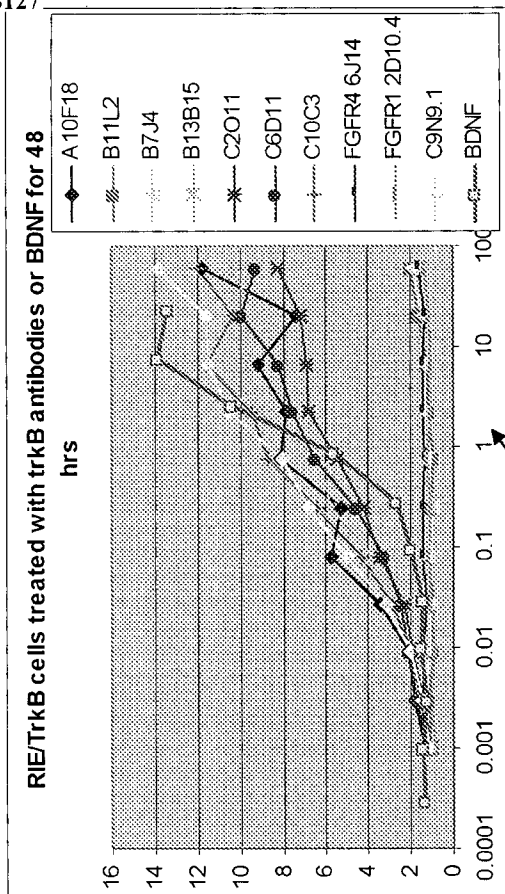
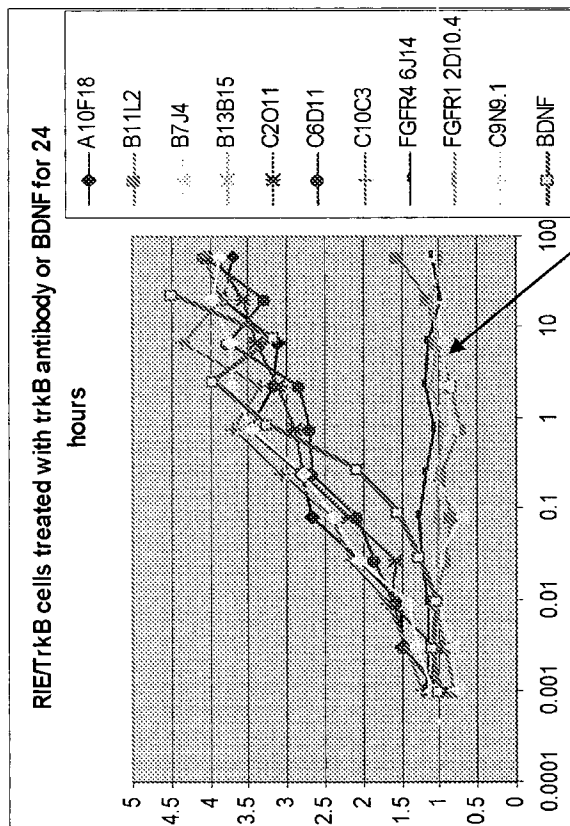


Figure 2



Negative Controls

Figure 3

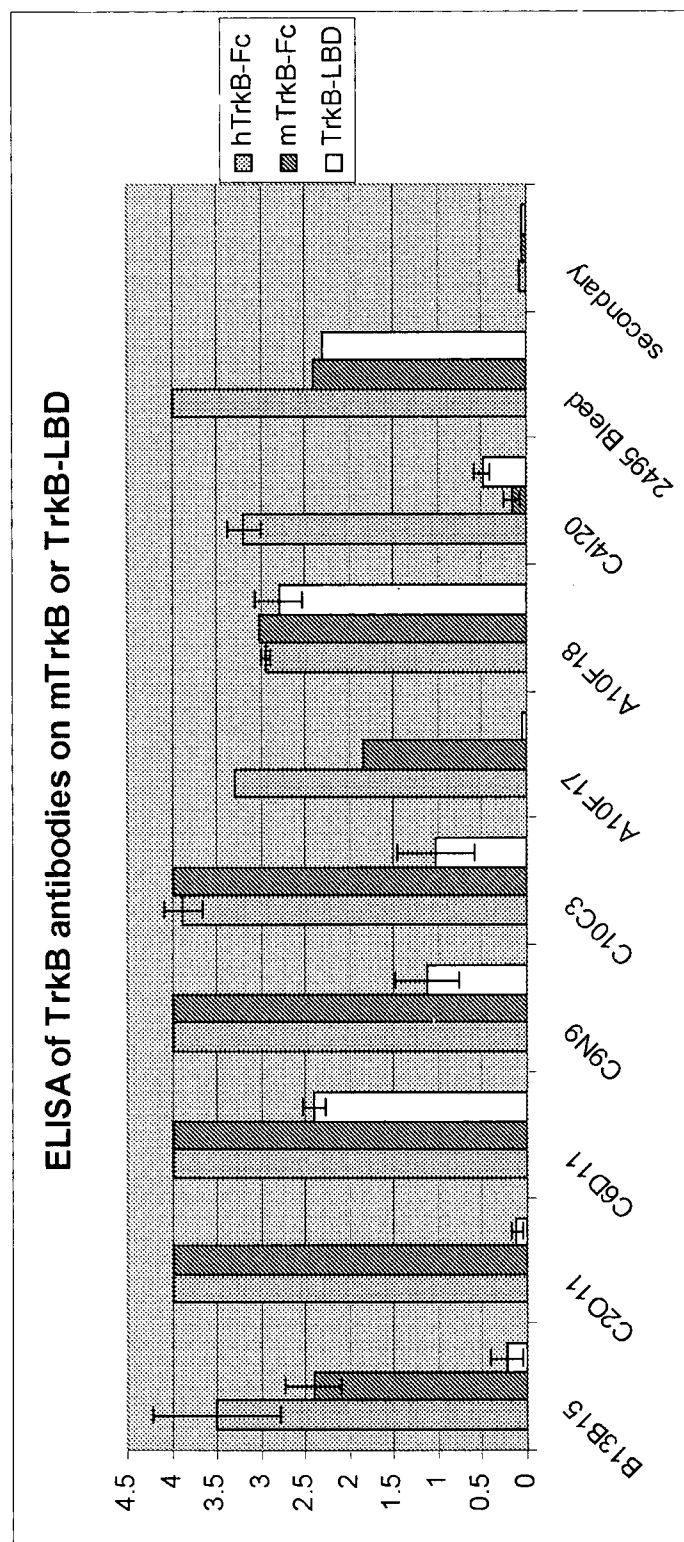


Figure 4

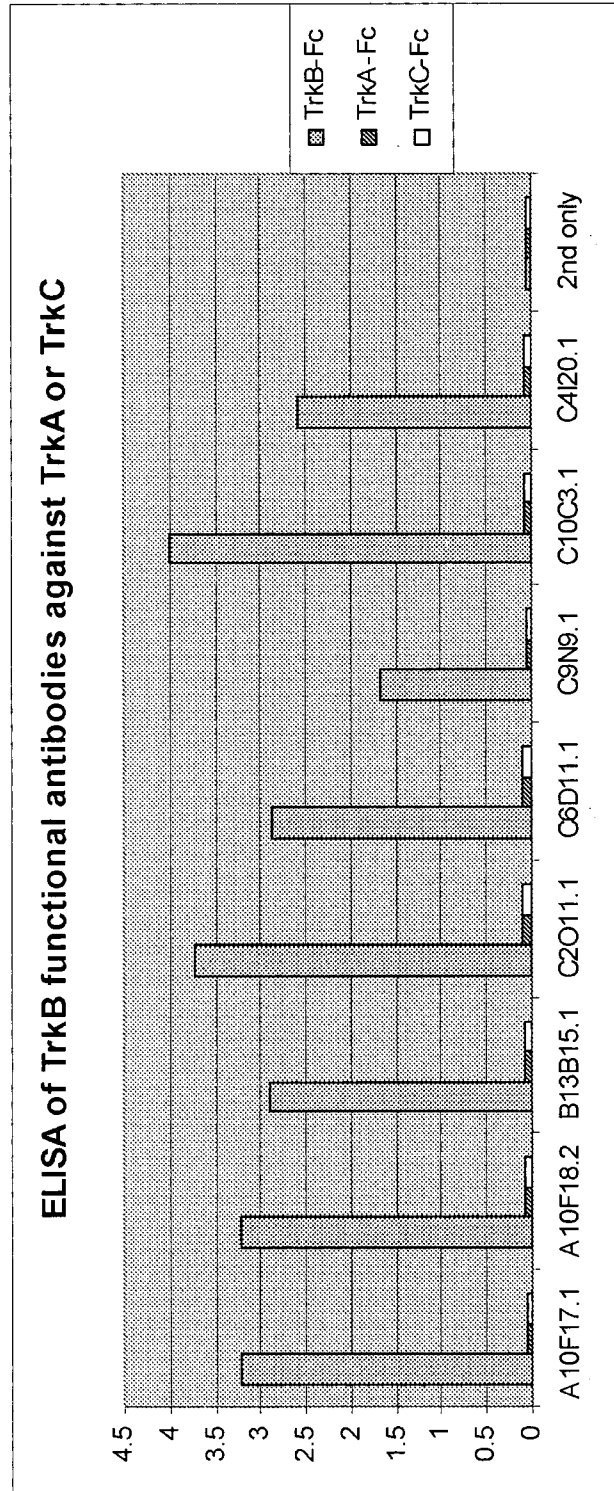


Figure 5

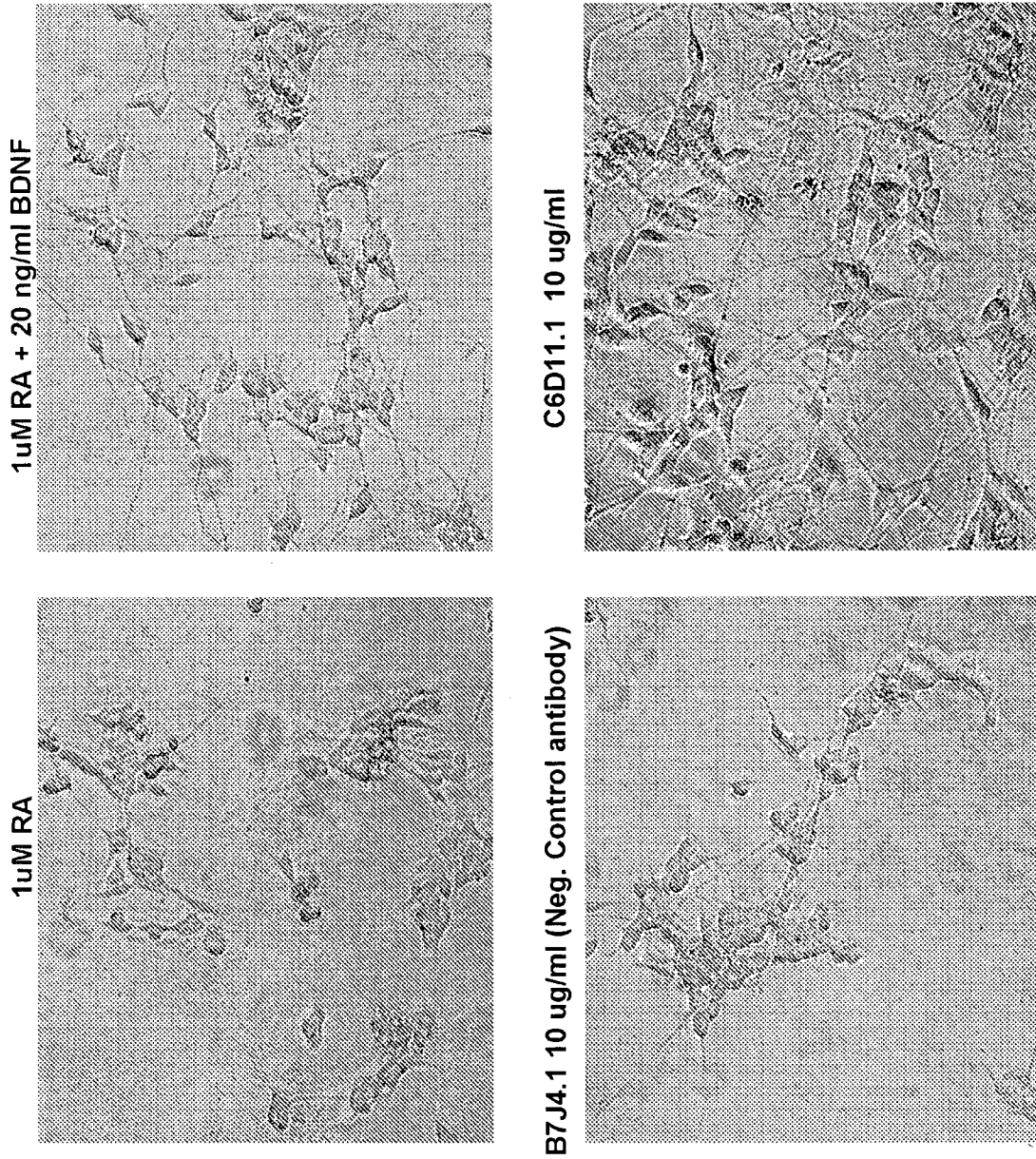


Figure 6

subclone	Ab control	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgA	IgM	Kappa light chain	Lambda light chain
A10F18.2		X						X	
B13B15.1		X						X	
C20H1.1		X						X	
C6D11.1			X					X	
C10C3.1		X						X	
C9N9.1		X						X	
C4I20.1		X						X	
A10F17.1		X							X

Figure 7

Clone#	Isotype	Agonistic Activity	Binds Mouse receptorX	Binds LBD	Immunoblot
A10F18.2	IgG1, κ	++	Yes	Yes	+
B13B15.1	IgG1, κ	++	Yes	No	++
C20I1.1	IgG1, κ	++	Yes	No	+++
C6D11.1	IgG2a, κ	++	Yes	Yes	++
C10C3.1	IgG1, κ	++	Yes	Yes	++
C9N9.1	IgG1, κ	++	Yes	Yes	++
C4I20.1	IgG1, κ	++	No	Yes	+
A10F17.1	IgG1, λ	++	Yes	No	+++

Figure 8

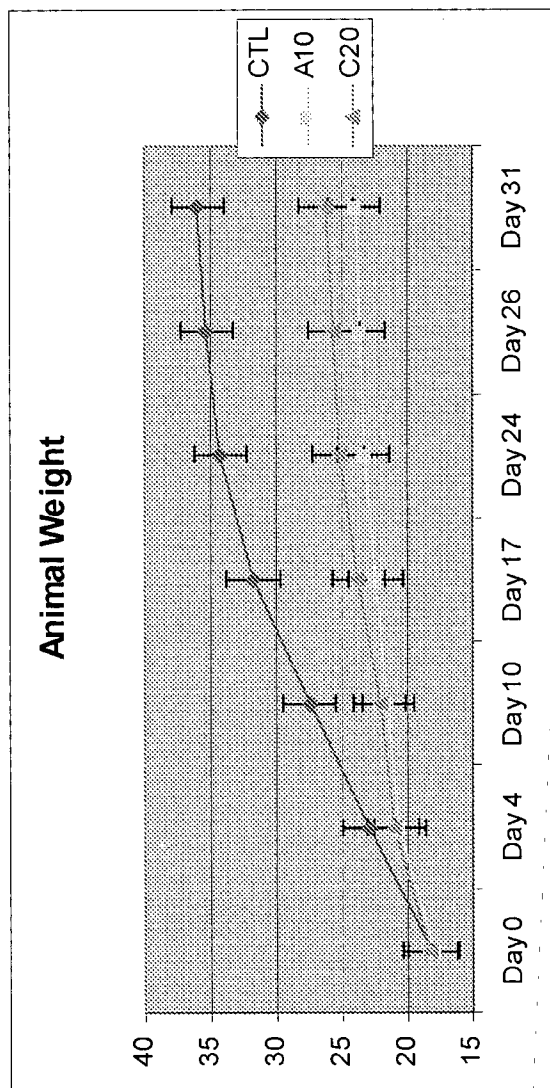
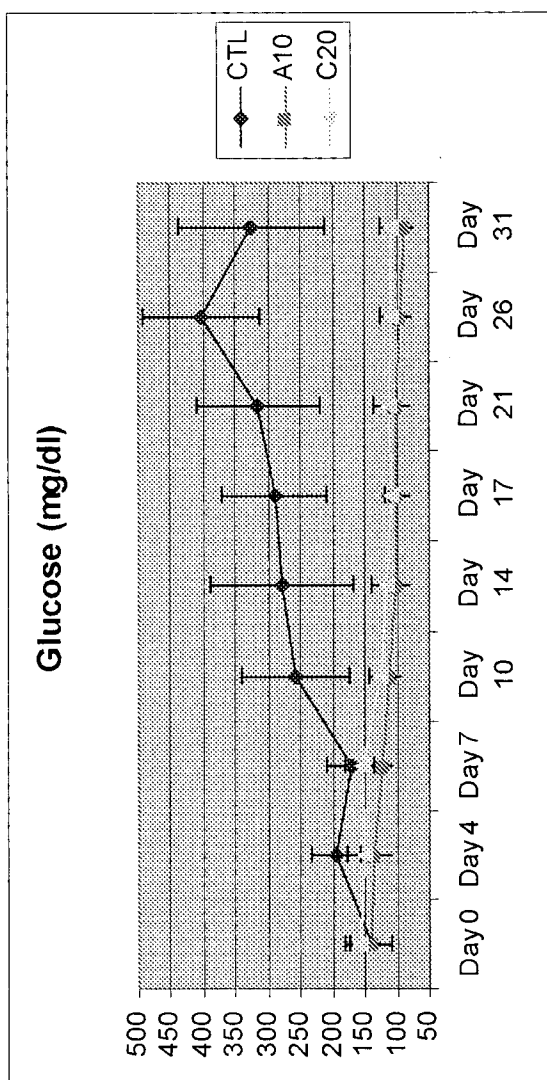
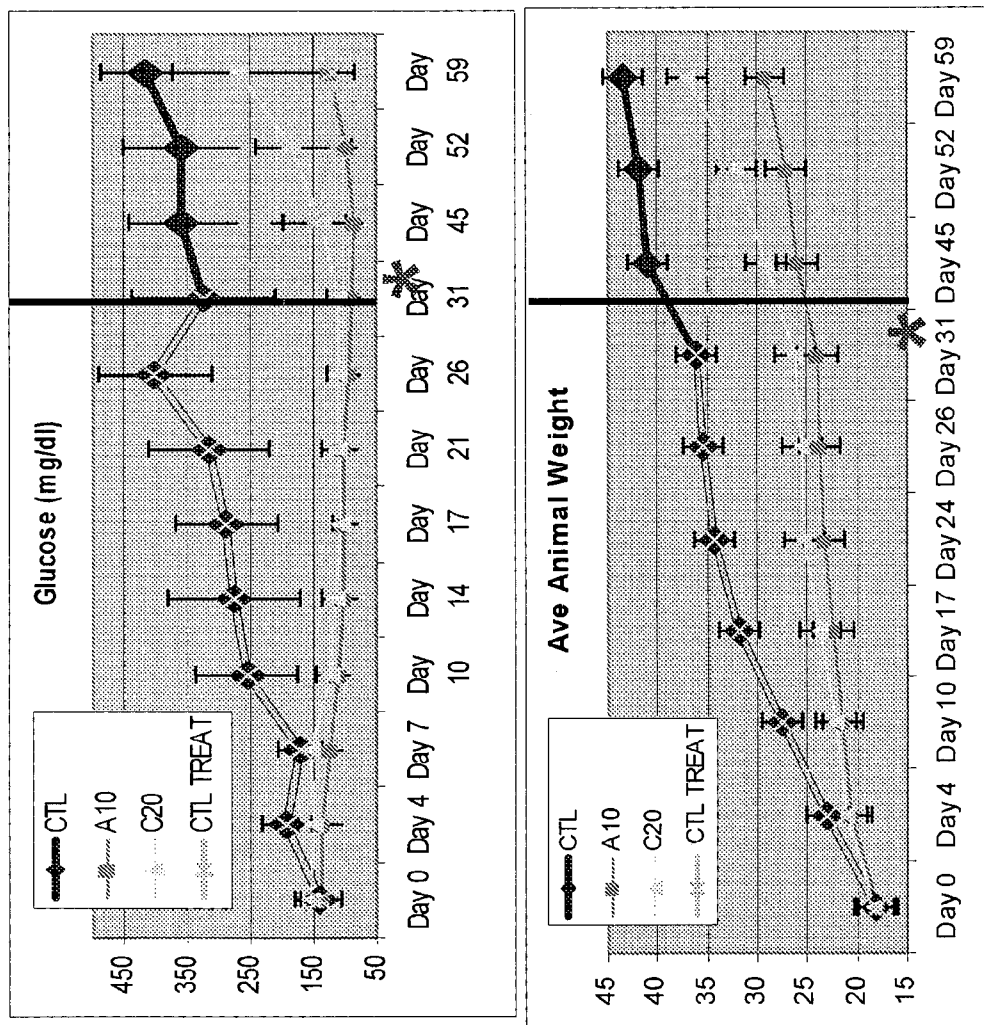


Figure 9



* Day ~32 - split CTL group
 - 4 animal treated with PBS (dark blue)
 - 4 animals treated with A10 (light blue)
 - Original treated groups were left untreated for 4 weeks

Figure 10

CDR1 first underlined sequence for each
 CDR2 second underlined sequence for each
 CDR3 third underlined sequence for each

C20 Antibody C20i1.1

AA sequences

Heavy Chain:

QVQLQQSGPELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYDINWVKQRPQGQGLEWIGWYPRDGSIKFNEKFKGKA
 TLTVDTSSTAYMELHSLTSEDSAAAYFCARRGRLLLYGFAYWGQGTLLVTVSA

Light Chain:

DVVMTQLPLSLPVILGDQASISCRSSQSLHSNGNTYLHWYLVKPKGQSPKLLIYKVSNRFSGVDPDRFSG
 SGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSSQSTHVPFTFGSGTKLEIKRA

A10 Antibody A10F18.2

AA sequences

Heavy Chain:

QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCASGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLEWIGTIDPETAGTAYNQKFKGK
 AILTAGKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTGVTTWFAYWGQGTLLVTVSA

Light Chain:

DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLVKPKGQSPNLLIYKVSNRFSGVDPDRFS
 GSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSSQGTTHVPYTFGGGTKLEIKRA

ANTICUERPOS AGONISTAS DEL TRKB Y USOS DE LOS MISMOS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUD DE PATENTE RELACIONADA

La presente solicitud reivindica beneficio de la Solicitud de Patente Provisional U.S. 60/858,169 presentada el 9 de noviembre de 2006, la cual está incorporada como referencia en su totalidad para todo propósito.

ANTECEDENTES DEL INVENTO

I. *TrkB*

El receptor tirosinquinasa B (TrkB, por su sigla en inglés) pertenece a una familia de receptores tirosinquinasa transmembranales sencillos que incluye a los TrkA y TrkC. Estos receptores tirosinquinasa (RTKs) median la actividad de las neurotrofinas. Las neurotrofinas son requeridos para la supervivencia y desarrollo neuronal y regulan la transmisión sináptica por medio de la modulación de la arquitectura neuronal y la plasticidad sináptica. Las neurotrofinas incluyen pero no están limitados al factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3), y la neurotrofina-4/5 (NT-4/5). (Lo, KY et al., J. Biol. Chem., 280: 41744-52 (2005)). El TrkB es un receptor de alta afinidad por el BDNF. (Minichiello, et al., Neuron 21:335-45 (1998)). La unión de neurotrofinas con RTKs activan el receptor el cual dimeriza y auto-fosforila residuos de tirosina específicos sobre el dominio intracelular del receptor (Jing, et al., Neuron 9:1067-1079 (1992); Barbacid, J. Neurobiol. 25:1386-1403 (1994); Bothwell, Ann. Rev. Neurosci. 18:223 253 (1995); Segal y Greenberg, Ann. Rev. Neurosci. 19:463-489 (1996); Kaplan y Millar, Curr. Opinión Neurobiol. 10:381 391 (2000)). Estos residuos fosfo-tirosina sirven como sitios de unión para elementos de cascadas de señalización intracelular que conllevan a la supresión de la muerte neuronal y otros efectos de las neurotrofinas. Por ejemplo, Shc, FRS-2, SH2B, rAPS, y PLC γ interactúan con el TrkB por medio de residuos de tirosina fosforilados. La asociación de estas moléculas adaptadoras con el TrkB activado resulta en la iniciación de vías de señalización, incluyendo las vías de la proteinquinasa activada por mitógenos, fosfatidilinositol 3-quinasa y PLC γ , por lo tanto mediando las acciones de las neurotrofinas (Lo, KY et al., J. Biol. Chem., 280:41744-52 (2005)).

II. *Diabetes*

La concentración de glucosa en el torrente sanguíneo humano debe controlarse dentro de un rango relativamente estrecho (60-120 miligramos por decilitro de sangre) para mantener una buena salud. Si la glucosa en sangre cae demasiado, una condición conocida como hipoglicemia aparece, con síntomas tales como desmayos, debilidad, cefalea, confusión y cambios de la personalidad. La excesiva glucosa en sangre, o la hiperglicemia, puede causar daño tisular debido a las reacciones químicas entre la glucosa en exceso y las proteínas en las células, tejidos y órganos. Se considera que este daño sea el causante de complicaciones diabéticas como la ceguera, fallo renal, impotencia, aterosclerosis, y una aumentada vulnerabilidad a la infección.

La diabetes mellitus está asociada con la concentración continua y patológicamente elevada de la glucosa en sangre; es una de las principales causas de muerte en los Estados Unidos

y es responsable de un 5% de toda mortalidad. La diabetes está clasificada en dos sub-clases principales: la Tipo I, también conocida como diabetes juvenil, o la Diabetes Mellitus Insulinodependiente (DMID), y la Tipo II, también conocida como la diabetes del adulto, o Diabetes Mellitus no Insulinodependiente (NIDDM).

El diagnóstico de la diabetes mellitus tipo II incluye la evaluación de los síntomas y la medición de la glucosa en la orina y en la sangre. La determinación del nivel de glucosa en sangre es necesaria para un diagnóstico preciso. De manera más específica, la determinación del nivel de glucosa en sangre en ayunas es una manera estándar usada. Sin embargo, la prueba oral de tolerancia a la glucosa (OGTT) es considerada ser más sensible que el nivel de glucosa en sangre en ayunas. La diabetes mellitus Tipo II está asociada con una tolerancia deteriorada a la glucosa oral. La OGTT por lo tanto puede ayudar con el diagnóstico de la diabetes mellitus tipo II, aunque generalmente no es necesaria para el diagnóstico de la diabetes (Emancipator K, Am J Clin Pathol 1997 noviembre; 112(5):665 74; Diabetes Mellitus Tipo II, Decision Resources Inc., marzo de 2000).

Por lo tanto, una tolerancia a la glucosa deteriorada es diagnosticada en aquellos individuos que tengan niveles de glucosa en sangre en ayunas menores a los requeridos para un diagnóstico de la diabetes mellitus Tipo II, pero que tengan respuesta de glucosa en plasma durante la OGTT entre lo normal y diabético. Se considera que la tolerancia a la glucosa deteriorada es una condición prediabética, y la tolerancia a la glucosa deteriorada (tal cual lo define la OGTT) es un fuerte predicador del desarrollo de una diabetes mellitus Tipo II (Haffner S M. Diabet Med 1997 agosto; 14 Suppl 3:S12 8).

La diabetes mellitus es una enfermedad progresiva asociada con la reducción de la función pancreática y/u otros procesos relacionados con la insulina, agravados por niveles aumentados de glucosa en plasma. Por consiguiente, la diabetes mellitus Tipo II usualmente tiene una fase prediabética prolongada y varios mecanismos patofisiológicos pueden conllevar a una hiperglicemia patológica y a una tolerancia a la glucosa deteriorada, como por ejemplo, anomalías en la utilización y efectividad de la glucosa, acción de la insulina y/o producción de la insulina en el estado prediabético (Goldberg R B, Med Clin North Am 1998 julio; 82(4):805 21).

El estado prediabético asociado con la intolerancia a la glucosa también puede asociarse con una predisposición a la obesidad abdominal, resistencia a la insulina, hiperlipidemia, y una alta tensión arterial (Groop L, Forsblom C, Lehtovirta M, Am J Hypertens 1997 septiembre; 10(9 Pt 2): 172S 180S; Haffner S M, J Diabetes Complications 1997 marzo – abril, 11(2): 69 76; Beck-Nielsen H, Henriksen J E, Alford F, Hother-Nielsen O, Diabet Med 1996 septiembre; 13 (9 Suppl 6): S78 84).

Una intervención temprana en aquellos individuos con riesgo de desarrollar diabetes mellitus Tipo II, enfocándose en reducir la hiperglicemia patológica o la tolerancia a la glucosa deteriorada podría prevenir o retardar el progreso del desarrollo de una diabetes mellitus Tipo II y complicaciones relacionadas. Por lo tanto, al tratar de manera efectiva la tolerancia a la glucosa oral deteriorada y/o los niveles elevados de glucosa en sangre uno puede prevenir o inhibir la evolución del trastorno en una diabetes mellitus Tipo II. Ver por ejemplo la Patente US No. 7,109,174.

La insulina y la sulfonilureas (agentes terapéuticos orales para la hipoglicemia) son las dos principales clases de medicamentos para la diabetes hoy en día en los Estados Unidos. La insulina es prescrita tanto para la diabetes Tipo I como para la Tipo II, mientras que las sulfonilureas usualmente se prescriben para los diabéticos Tipo II solamente. Las sulfonilureas estimulan la secreción natural de la insulina y reducen la resistencia a la insulina; estos compuestos no reemplazan la función de la insulina en el metabolismo. Aproximadamente un tercio de los pacientes que reciben sulfonilurea se vuelven resistente a ella. Algunos diabéticos Tipo II no responden a la terapia con sulfonilurea. De los pacientes que si responden a un tratamiento con sulfonilureas, entre un 5 y 10% tienen la posibilidad de experimentar una pérdida de la efectividad de la sulfonilurea luego de diez años aproximadamente. Ver por ejemplo la Patente U.S. No. 7,115,284.

Muchos agentes anti-diabéticos típicamente formulados para el tratamiento de la diabetes mellitus Tipo II, como por ejemplo, las sulfonilureas y las tiazolidinadionas, tienen un efecto secundario no deseado de aumentar el peso corporal. El peso corporal aumentado en pacientes con condiciones prediabéticas o con diabetes mellitus Tipo II diagnosticado resulta en efectos dañinos debido a la pronunciación de la desregulación metabólica y endocrina, y en si la obesidad es un factor de riesgo crítico para el desarrollo y empeoramiento progresivo de la diabetes mellitus Tipo II. Por ende es deseable tener un agente anti-diabético el cual mantenga o disminuya el peso corporal. Ver por ejemplo la Patente U.S. No. 7,199,174.

La obesidad es un problema de salud pública muy serio y común puesto que aumenta el riesgo de una persona en adquirir varias condiciones serias incluyendo la diabetes, enfermedad coronaria, aneurismas, hipertensión y ciertas clases de cánceres. Un aumento considerable en el número de individuos obesos en las últimas dos décadas ha creado profundas implicaciones de salud pública. Aunque los estudios han demostrado que la reducción en la obesidad mediante dieta y ejercicio reduce los factores de riesgo asociados de manera dramática, estos tratamientos son inmensamente poco exitosos considerando que la obesidad está fuertemente asociada con factores congénitos que contribuyen con un apetito aumentado, preferencias por alimentos altamente calóricos, actividad física reducida, y un metabolismo lipogénico aumentado. Ver por ejemplo la Patente U.S. No. 7,115,767. Por lo tanto, es un objeto del invento tratar las deficiencias de los tratamientos para la hiperglicemia, obesidad, y diabetes.

BREVE RESUMEN DEL INVENTO

El presente invento suministra anticuerpos agonistas aislados del Receptor B Tirosinquinasa (TrkB). En algunas realizaciones, el anticuerpo de un anticuerpo humanizado. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla. En algunas realizaciones, el anticuerpo no se une al Receptor A Tirosinquinasa o al Receptor C Tirosinquinasa.

En algunas realizaciones, el anticuerpo se une al Dominio de Unión de Ligandos (LBD, por su sigla en inglés) del TrkB. En algunas realizaciones, el anticuerpo compite con la unión del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF) al TrkB. En algunas realizaciones, el anticuerpo compite en la unión al TrkB con un anticuerpo competidor que comprende una región variable de cadena pesada que comprenda la SEQ ID NO:3 y una región variable de cadena

liviana que comprenda la SEQ ID NO:4. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:7 y una región variable de cadena liviana que comprenda la SEQ ID NO:8. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:11 y una región variable de cadena liviana que comprenda la SEQ ID NO:12. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:15 y una región variable de cadena liviana que comprenda la SEQ ID NO:16. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende las SEQ ID NOs:7, 11 y 15 y una región variable de cadena liviana que comprenda las SEQ ID NOs:8, 12 y 16. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:3 y una región variable de cadena liviana que comprenda la SEQ ID NO:4.

En algunas realizaciones, el anticuerpo no se une al dominio de unión de ligandos del TrkB. En algunas realizaciones, el anticuerpo no compite con la unión del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF) al TrkB. En algunas realizaciones, el anticuerpo compite en la unión al TrkB con un anticuerpo competidor que comprende una región variable de cadena pesada que comprenda la SEQ ID NO:1 y una región variable de cadena liviana que comprenda la SEQ ID NO:2. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:5 y una región variable de cadena liviana que comprenda la SEQ ID NO:6. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:9 y una región variable de cadena liviana que comprenda la SEQ ID NO:10. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:13 y una región variable de cadena liviana que comprenda la SEQ ID NO:14. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende las SEQ ID NOs:5, 9 y 13 y una región variable de cadena liviana que comprenda las SEQ ID NOs:6, 10 y 14. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:1 y una región variable de cadena liviana que comprenda la SEQ ID NO:2.

El presente invento también proporciona composiciones fisiológicas que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo de la reivindicación 1; y un vehículo farmacéutico. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica además comprende un agente el cual reduce los niveles de glucosa en sangre en un individuo. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica además comprende un agente el cual reduce el peso corporal en un individuo.

El presente invento también proporciona métodos para reducir los niveles de glucosa en sangre y/o peso corporal en un individuo en necesidad del mismo. En ciertas realizaciones, los métodos comprenden administrar a un individuo una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo agonista del Receptor B Tirosinquinasa (TrkB). En ciertas realizaciones, el individuo es prediabético. En algunas realizaciones, el individuo tiene diabetes Tipo I. En algunas realizaciones, el individuo tiene diabetes Tipo II. En algunas realizaciones, el individuo está en sobrepeso. En algunas realizaciones, el individuo está obeso.

En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente efectiva de un segundo agente efectivo para reducir la glucosa en sangre es administrado al individuo en combinación con el

anticuerpo agonista del TrkB. En algunas realizaciones, el segundo agente y el anticuerpo agonista del TrkB son administrados como una mezcla. En algunas realizaciones, el segundo agente es administrado por separado del anticuerpo agonista del TrkB. En algunas realizaciones, el segundo agente es seleccionado a partir del grupo que consiste de: insulina, sulfonilureas, agentes insulíntrópicos, metformina, agonistas de PPAR γ , agonistas de PPAR α , agonistas de PPAR δ , agonistas duales de PPAR α/γ , pan agonistas de PPAR $\alpha/\gamma/\delta$, inhibidores de la alfa-glucosidasa, inhibidores de DPP-IV, y análogos GLP-1/GLP-1.

En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente efectiva de un segundo agente efectivo para reducir peso o la obesidad es administrado al individuo en combinación con el anticuerpo agonista del TrkB. En algunas realizaciones, el segundo agente y el anticuerpo agonista del TrkB son administrados como una mezcla. En algunas realizaciones, el segundo agente es administrado por separado del anticuerpo agonista del TrkB. En algunas realizaciones, el segundo agente es seleccionado a partir del grupo que consiste de inhibidores de la lipasa, sibutramina, inhibidores de CB-1, topiramato, amilina, análogos de la amilina, leptina, análogos de PYY/PYY, y análogos GLP-1/GLP-1.

DEFINICIONES

“Anticuerpo” se refiere a un polipéptido que comprende una región de marco a partir de un gen de inmunoglobulina o fragmentos del mismo los cuales se unen específicamente y reconocen un antígeno. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de las regiones constante kapa, lambda, alfa, gama, delta, épsilon, y mu, como también la cantidad de genes de inmunoglobulina de región variable. Las cadenas livianas están clasificadas tanto como kapa o lambda. Las cadenas pesadas están clasificadas como gama, mu, alfa, delta, o épsilon, las cuales a su vez definen las clases de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE respectivamente.

Las inmunoglobulinas que se dan naturalmente comparten una estructura central común en donde dos cadenas livianas idénticas (aproximadamente 24 kD) y dos cadenas pesadas idénticas (aproximadamente 55 ó 70 kD) forman un tetrámero. La porción del extremo amino de cada cadena se conoce como la región variable (V) y puede distinguirse de las regiones constantes (C) más conservadas de lo restante de cada cadena. Dentro de la región variable de la cadena liviana está una porción C-terminal conocida como la región J. Dentro de la región variable de la cadena pesada existe una región D adicional a la región J. La mayor parte de la variación de las secuencias aminoácidas en las inmunoglobulinas está ubicada en tres sitios separados en las regiones V conocidas como regiones hipervariables o regiones de determinación de complementariedad (CDRs por su sigla en inglés) las cuales están directamente involucradas con la unión antígenos. Iniciando desde el extremo amino, estas regiones se denominan CDR1, CDR2 y CDR3 respectivamente. Las CDR están sujetas en su lugar por regiones de marco más conservadas (FRs por su sigla en inglés). Desde el extremo amino, estas regiones se denominan FR1, FR2, FR3 y FR4 respectivamente. La ubicación de las regiones CDR y FR y un sistema de numeración han sido definidas por ejemplo por Kabat et al. (Kabat et al., Secuencias de proteínas de interés inmunológico, quinta edición, U.S. Departamento de Saludo y Servicios Humanos, Oficina de Imprenta del Gobierno de los Estados Unidos (1991)).

Una ejemplar unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) que se de naturalmente comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, cada par teniendo una cadena "liviana" (aproximadamente 25 kDa) y otra "pesada" (aproximadamente entre 50 y 70 kDa). El extremo N de cada cadena define una región variable entre 100 y 110 aproximadamente o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. Los términos cadena liviana variable (V_L) y cadena pesada variable (V_H) hacen referencia a estas cadenas livianas y pesadas respectivamente.

Los anticuerpos existen por ejemplo como inmunoglobulinas intactas o como un número de fragmentos bien caracterizados producidos mediante la digestión con varias peptidasas. Por lo tanto, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces de disulfuro en la región bisagra para producir $(Fab)'_2$, un dímero de Fab el cual por si mismo es una cadena liviana unida a V_H-C_{H1} mediante un enlace de disulfuro. El $F(ab)'_2$ puede reducirse bajo condiciones leves para romper el enlace de disulfuro en la región de bisagra, por lo tanto convirtiendo el dímero $F(ab)'_2$ en un monómero Fab' . El monómero Fab' es básicamente Fab con parte de la región de bisagra (ver FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul ed., 3d ed. 1993). Aunque varios fragmentos de anticuerpos son definidos en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, aquel experto se dará cuenta que tales fragmentos podrán sintetizarse *de novo* bien sea químicamente o mediante el uso de metodología de ADN recombinante. Por ende, el término "anticuerpo" tal cual se usa en la presente, también incluye fragmentos de anticuerpos producidos tanto mediante la modificación de anticuerpos enteros, como aquellos sintetizados *de novo* usando metodologías de ADN recombinante (por ejemplo Fv de cadena sencilla) o aquellos identificados usando bibliotecas de expresión en fago (ver, por ejemplo, McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990)).

Para la preparación de anticuerpos monoclonales o policlonales, cualquier técnica en el estado de la técnica podría utilizarse (ver por ejemplo, Kohler & Milstein, Nature 256:495-497 (1975); Kozbor et al., Immunology Today 4:72 (1983); Cole et al., páginas 77-96 en Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy (1985)). Anticuerpos "monoclonales" hacen referencia a anticuerpos derivados a partir de un solo clon. Puede adaptarse técnicas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (Patente U.S. No. 4,946,778) para producir desde anticuerpos hasta polipéptidos de este invento. Igualmente, ratones transgénicos, u otros organismos como otros mamíferos pueden usarse para expresar anticuerpos humanizados. De manera alterna, la tecnología de expresión en fagos puede usarse para identificar anticuerpos y fragmentos Fab heteroméricos que se unan específicamente a antígenos seleccionados (ver por ejemplo, McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990); Marks et al., Biotechnology 10:779-783 (1992)).

Un "anticuerpo quimérico" es una molécula de anticuerpo en donde (a) la región constante, o una porción de la misma, es alterada, reemplazada o intercambiada de tal manera que el sitio de unión del antígeno (región variable) está unido a una región constante de una clase diferente o alterada, función efectora y/o especie, o una molécula totalmente distinta la cual confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, una toxina, hormona, factor de crecimiento, droga, etcétera; o (b) la región variable, o una porción de la misma, es alterada, reemplazada o intercambiada con una región variable que tenga una especificidad de antígenos diferente o alterada.

Un anticuerpo “humanizado” es un anticuerpo que retiene la reactividad de un anticuerpo no humano al ser menos inmunogénico en humanos. Esto puede lograrse por ejemplo al retener las regiones CDR no humanas y reemplazar las partes restantes del anticuerpo con sus contrapartes humanas. Ver por ejemplo Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984); Morrison y Oi, Adv. Immunol., 44:65-92 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun., 28:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immun., 31(3):169-217 (1994).

La frase “se une específicamente (o selectivamente)” a un anticuerpo o “es inmunoreactivo específicamente (o selectivamente) con” al referirse a una proteína o péptido, se refiere a una reacción de unión que sea determinante de la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas y otros biológicos. Por ende, bajo condiciones de inmunoensayos específicos, los anticuerpos especificados se unen a una proteína en particular por lo menos veces el fondo y no se unen de manera sustancial en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra. La unión específica a un anticuerpo bajo tales condiciones puede requerir de un anticuerpo que sea seleccionado por su especificidad por una proteína en particular. Esta selección puede lograrse al sustraer anticuerpos que reaccionen cruzadamente con por ejemplo, TrkA o TrkC. Una variedad de formatos de inmunoensayos pueden usarse para seleccionar anticuerpos que sean específicamente inmunoreactivos con una proteína en particular. Por ejemplo, los inmunoensayos de ELISA de fase sólida son usados a manera de rutina para seleccionar anticuerpos que sean específicamente inmunoreactivos con una proteína (ver por ejemplo, Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (1988), para leer sobre una descripción de formatos de inmunoensayos y condiciones que pueden usarse para determinar inmunoreactividad específica). Típicamente una reacción específica o selectiva será por lo menos dos veces la señal y ruido de fondo y de manera más típica más de diez y hasta cien veces el fondo.

El término “anticuerpo agonista” se refiere a un anticuerpo capaz de activar un receptor para inducir una respuesta total o parcial mediada por el receptor. Por ejemplo, un agonista del TrkB se une al TrkB e induce una señalización mediada por TrkB. En algunas realizaciones, un anticuerpo agonista del TrkB puede identificarse por su capacidad de unir TrkB e inducir crecimiento de neurita al contactarse con células SH-SY5Y o según se describe en la presente. Anticuerpos agonistas son aquellos que activan una respuesta del receptor en por lo menos un 10% por encima de la respuesta en ausencia del anticuerpo. En ciertos casos, un anticuerpo agonista activa una respuesta del receptor en más del 25%, 50%, 75%, o 100% por encima de la respuesta en ausencia del anticuerpo. Algunos anticuerpos agonistas activan una respuesta del receptor del 200%, 300%, 400%, 500% o más por encima de la respuesta en ausencia del anticuerpo.

La “actividad” de un polipéptido del invento se refiere a funciones estructurales, regulatorias o bioquímicas de un polipéptido en su célula o tejido nativo. Ejemplos de actividad de un polipéptido incluyen tanto actividades directas como indirectas. Las actividades directas de ejemplo son el resultado de una interacción directa con el polipéptido, incluyendo la unión con ligandos, como por ejemplo la unión con el BDNF con el Dominio de Unión de Ligandos (LBD) (ver por ejemplo Naylor et al., Biochem Biophys Res Commun. 291(3):501-7 (2002) y la SEQ ID NO:18) del TrkB, producción o reducción de mensajeros secundarios (por ejemplo, AMPc, GMPc, IP₃, DAG, o Ca²⁺), flujo de iones, y cambios en el nivel de fosforilación o

transcripción. Las actividades indirectas de ejemplo en el contexto del TrkB se observan como un cambio en el fenotipo o respuesta en una célula o tejido a una actividad dirigida por polipéptido, como por ejemplo reducir los niveles generales de glucosa en sangre como resultado de la interacción del polipéptido con otros componentes celulares o tisulares.

El término “obeso” al usarse en referencia a adultos humanos, se refiere a un individuo con un índice de masa corporal (IMC) de 30 o más. “Sobrepeso” al usarse en referencia a adultos humanos, se refiere a un individuo con un IMC de 25 o más. Para niños, las tablas de Índice-Masa-Cuerpo para Edad son usadas, en donde un IMC mayor al percentil 85 es considerado “en sobrepeso” y un IMC mayor al percentil 95 es considerado “obeso”. Ver por ejemplo, Guías Clínicas sobre la Identificación, Evaluación, y Tratamiento del Sobrepeso y la Obesidad en Adultos (National Heart, Lung and Blood Institute, 17 de junio de 1998) y Prevención y Manejo de la Epidemia Global de la Obesidad en el Reporte de la Consulta sobre Obesidad por la Organización Mundial de la Salud (OMS, Ginebra, junio 1997).

Un “individuo prediabético” se refiere a un adulto con un nivel de glucosa en sangre en ayunas mayor a 110 mg/dl pero menos de 126 mg/dl o una lectura PG de dos horas de más de 140 mg/dl pero menos de 200 mg/dl. Un “individuo diabético”, al usarse este término para comparar con una muestra de un paciente, se refiere a un adulto con un nivel de glucosa en sangre en ayunas de más de 126 mg/dl o una lectura PG de dos horas mayor a 200 mg/dl. “En ayunas” se refiere a una ingesta no calórica de por lo menos 8 horas. Un “PG de dos horas” se refiere al nivel de glucosa en sangre luego de exponer al paciente a una carga de glucosa que contiene el equivalente de 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua. La prueba general generalmente se conoce como una prueba oral de tolerancia a la glucosa (OGTT). Ver por ejemplo. Diabetes Care, 2003, 26(11): 3160-3167 (2003).

El término “aislado” al usarse con ácido nucleico o proteína, se refiere a que el ácido nucleico o proteína está prácticamente libre de otros componentes celulares con los cuales se le asocia en el estado natural. Preferiblemente se encuentra en un estado homogéneo. Puede ser una solución seca o acuosa. La pureza y la homogeneidad son típicamente determinadas usando técnicas de química analítica tales como una electroforesis en geles de poliacrilamida o cromatografía líquida de alto rendimiento. Una proteína que sea la especie predominante presente en una preparación está sustancialmente purificada. En particular, un gen aislado es separado de marcos de lectura abiertos que flanquean el gen y codifican una proteína distinta al gen de interés. El término “purificado” se refiere a que un ácido nucleico o proteína conlleva a básicamente una banda en un gel electroforético. De manera particular, significa que el ácido nucleico o proteína es de una pureza de por lo menos 85%, más preferiblemente de una pureza de 95%, y lo más preferible de una pureza de por lo menos 99%.

El término “ácido nucleico” o “polinucleótido” se refiere a desoxiribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma tanto de hebra sencilla como de hebra doble. A menos que esté específicamente limitado, el término abarca ácidos nucleicos que contengan análogos conocidos de nucleótidos naturales que tengan propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia y sean metabolizados de manera similar a nucleótidos que ocurren naturalmente. A menos que se indique de otra manera, una secuencia de ácido nucleico en particular también abarca de manera implícita variantes modificados conservadoramente de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias como

también la secuencia explícitamente indicada. De manera específica, las sustituciones de codones degeneradas pueden lograrse al generar secuencias en donde la tercera posición de uno o más (o todos) codones seleccionados es sustituida con residuos de base mixta y/o de desoxiinosina (Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); y Cassol et al., (1992); Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)). Los términos “ácido nucleico” y “polinucleótido” son utilizado de manera intercambiable.

Los términos “polipéptido,” “péptidos” y “proteína” son usados aquí intercambiamente para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos aplican a polímeros de aminoácidos en los cuales uno o más residuos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido correspondiente que se encuentra naturalmente, como también polímeros de aminoácidos que se encuentran naturalmente y polímeros de aminoácidos que no se encuentran naturalmente. Como es usado aquí, los términos comprenden aminoácidos de cadena de cualquier longitud, incluyendo proteínas de longitud completa, en la cuales los residuos de aminoácidos son unidos mediante uniones peptídicas covalentes.

El término “aminoácido” se refiere a aminoácidos sintéticos que se encuentran naturalmente, como también análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos que se encuentran naturalmente. Los aminoácidos que se encuentran naturalmente son aquellos codificados por el código genético, como también aquellos aminoácidos que son modificados más tarde, ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, y O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica como un aminoácido que se encuentra naturalmente, es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, como por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metil sulfonio de metionina. Tales análogos tienen grupos R modificados (como por ejemplo, norleucina) o esqueletos peptídicos modificados, pero conservan la misma estructura química básica como un aminoácido que se encuentra naturalmente. “Aminoácidos miméticos” se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de las estructuras químicas generales de un aminoácido, pero el cual funciona de una manera similar a un aminoácido que se encuentra naturalmente.

Los aminoácidos pueden ser referidos en la presente mediante bien sea los símbolos conocidos comúnmente de tres letras o mediante símbolos de una letra recomendados por la IUPAC-IUB Comisión de Nomenclatura Bioquímica. Los nucleótidos, de la misma forma, pueden ser referidos por sus códigos de una sola letra aceptados comúnmente.

“Variantes modificadas conservadoramente” aplica a tanto aminoácidos como secuencias de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias de ácidos nucleicos particulares, “variantes modificadas conservadoramente” se refiere a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticos o esencialmente idénticos, o donde los ácidos nucleicos no codifican una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican una proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU todos codifican para el aminoácido alanina. Por ende, en cada posición donde una alanina esté especificada por un codón, el codón puede ser alterado a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácidos nucleicos son “variaciones

silenciosas", las cuales son una especie de variaciones modificadas conservadoramente. Cada secuencia de ácido nucleico en la presente que codifica un polipéptido además describe cada posible variación silenciosa de los ácidos nucleicos. Aquellos expertos reconocerán que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, el cual es ordinariamente el único codón para metionina, y TGG, el cual es ordinariamente el único codón para triptófano) puede ser modificado para ceder una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

Como una secuencia de aminoácidos, aquellos expertos reconocerán que sustituciones individuales, deleciones o adiciones a un ácido nucleico, péptido, polipéptido, o secuencia de proteína la cual altere, adicione o delecione un aminoácido sencillo o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada conservadoramente" donde la alteración resulta en la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Tablas de sustitución conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidos en el estado de la técnica. Tales variantes modificadas conservadoramente son en adición para y no excluyen variantes polimórficas, homólogos de interespecies, y alelos de la invención.

Los siguientes ocho grupos cada uno contiene aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí:

- 1) Alanina (A), Glicina (G);
 - 2) Acido aspártico (D), Acido Glutámico (E);
 - 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
 - 4) Arginina (R), Lisina (K);
 - 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V);
 - 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W);
 - 7) Serina (S), Treonina (T); y
 - 8) Cisteína (C), Metionina (M)
- (ver, por ejemplo, Creighton, *Proteins* (1984)).

"El porcentaje de identidad de secuencia" está determinado mediante la comparación de dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación, en la cual la porción de secuencia de polinucleótido en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (por ejemplo, espacios) en comparación con la secuencia de referencia (por ejemplo, un polipéptido de la invención), el cual no comprende adiciones o deleciones, para un óptimo alineamiento de las dos secuencias. El porcentaje es calculado mediante la determinación del número de posiciones en las cuales las bases de ácidos nucleicos idénticos o residuos de aminoácidos ocurren en ambas secuencias para dar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para así dar el porcentaje de identidad de secuencia.

Los términos "idéntico" o "identidad" porcentual, en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias de polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que sean las mismas secuencias. Secuencias son "idénticas sustancialmente" si dos secuencias tienen

un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que sean el mismo (por ejemplo, 60% de identidad, opcionalmente 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, o 95% de identidad sobre una región específica, o, cuando no sea especificado, sobre la secuencia completa), al comprarse y alinearse para una máxima correspondencia sobre una ventana de comparación, región diseñada como medida usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineación manual e inspección visual, o a lo largo de toda la secuencia donde no sea indicado. El invento proporciona polipéptidos o polinucleótidos codificando polipéptidos que son sustancialmente idénticos, o que comprenden secuencias sustancialmente idénticas, a los polipéptidos aquí ejemplificados (por ejemplo, SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Esta definición además se refiere al complemento de una secuencia de prueba de nucleótido. Opcionalmente, la identidad existe sobre una región que sea de al menos unos 50 nucleótidos de longitud, o más preferiblemente sobre una región que sea de 100 a 500 o 1000 o más nucleótidos de longitud.

Para una comparación de secuencia, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, frente a la cual las secuencias de prueba son comparadas. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencia, la prueba y las secuencias de referencia son ingresadas a un computador, subsecuentes coordinaciones son diseñadas, si es necesario, y los parámetros del programa de algoritmo de secuencias son diseñados. Los parámetros del programa predeterminados pueden ser usados, o parámetros alternativos pueden ser diseñados. El algoritmo de comparación de secuencia entonces calcula las identidades de secuencia porcentual para las secuencias de prueba con relación a la secuencia de referencia, basados en los parámetros del programa.

Una "ventana de comparación", como es usada aquí, incluye referencia para un segmento de cualquiera de los números de posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consiste desde 20 a 600, usualmente desde 50 a 200 aproximadamente, de manera más usual desde 100 a 150 aproximadamente en la cual una secuencia puede ser comparada a una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que dos secuencias sean óptimamente alineadas. Los métodos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en el estado de la técnica. La alineación óptima de secuencias para comparación puede ser realizada, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482c, mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, mediante la búsqueda de métodos de similaridad de Pearson y Lipman (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineación manual e inspección visual (*ver, por ejemplo, Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology* (suplemento 1995)).

Dos ejemplos de algoritmos que son apropiados para la determinación de identidad de secuencia porcentual y similaridad de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0 los cuales son descritos en Altschul *et al.* (1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402, y Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410, respectivamente. El software para realizar el análisis del BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo consiste primero en identificar pares de secuencias de puntajes altos (HSPs) mediante la identificación de palabras de longitud corta W en

la secuencia duda (*query*), la cual coincide o satisface algún puntaje de umbral T positivo cuando sea alineada con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T hace referencia al umbral de puntaje de palabra aledaña (Altschul *et al.*, *supra*). Estos aciertos de palabra aledaños iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSPs más largos que los contengan éstos. Estos aciertos de palabra son extendidos en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta que el puntaje de alineación acumulativo pueda ser incrementado. Los puntajes acumulativos son calculados usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntaje de premio para un par de residuos que coinciden; siempre >0) y N (puntaje de sanción para residuos que no coinciden; siempre <0). Para secuencias de aminoácidos, un puntaje matriz es usado para calcular el puntaje acumulativo. Las extensiones de estos aciertos de palabra en cada dirección son interrumpidas cuando: el puntaje de alineación acumulativo se cae por la cantidad X desde su máximo valor obtenido; el puntaje acumulativo cae a cero o por debajo, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntajes negativos; o se alcance el final de cualquier secuencia. Los parámetros W, T y X, del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa como valor predeterminado una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4 y una comparación de ambas hebras. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa como valor predeterminado una longitud de palabra de 3, y expectativa (E) de 10, y la matriz de puntaje BLOSUM62 (*ver* Henikoff y Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4, y una comparación de ambas hebras.

El algoritmo BLAST además realiza un análisis estadístico de la similaridad entre dos secuencias (*ver, por ejemplo*, Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787). Una medida de similaridad proporcionada por el algoritmo BLAST es la más pequeña probabilidad de suma (P(N)), la cual proporciona una indicación de la probabilidad mediante la cual una coincidencia entre secuencias de dos nucleótidos o aminoácidos ocurriría de manera aleatoria. Por ejemplo, un ácido nucleico es considerado similar a una secuencia de referencia si la más pequeña probabilidad de suma en una comparación del ácido nucleico de prueba a el ácido nucleico de referencia es menor que 0.2, más preferiblemente menor que 0.01, y lo más preferible menor que 0.001.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1 ilustra el efecto del BDNF en un ensayo de Anoikis

Figura 2 muestra el efecto de varios anticuerpos TrkB identificados en un ensayo de Anoikis.

Figura 3 muestra ahí actividad de los anticuerpos TrkB aislados.

Figura 4 muestra que los anticuerpos agonistas funcionales y purificados del TrkB no son reactivos contra TrkA o TrkC humanos.

Figura 5 muestra anticuerpos agonistas en un ensayo de diferenciación SH-SY5Y.

Figura 6 muestra resultados de isotipos de anticuerpos funcionales monoclonales TrkB.

Figura 7 resume información para varios anticuerpos agonistas identificados.

Figura 8 ilustra que los anticuerpos agonistas TrkB reducen los niveles de glucosa séricos y promueven profilácticamente la pérdida de peso.

Figura 9 ilustra que los anticuerpos agonistas TrkB reducen los niveles de glucosa séricos y promueven profiláctica y terapéuticamente la pérdida de peso.

Figura 10 proporciona las secuencias de regiones variables de los anticuerpos A10 y C20 divulgados en la presente. Para cada secuencia, la primera porción subrayada es CR1, la segunda porción subrayada es CDR2 y la tercera porción subrayada es CDR3.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL INVENTO

I. Introducción

El presente invento proporciona anticuerpos agonistas del TrkB novedosos. Los anticuerpos agonistas del TrkB del invento se unen específicamente al TrkB y activan el TrkB. Sorprendentemente, la presente solicitud demuestra que los anticuerpos agonistas del TrkB del invento además reducen dramáticamente los niveles de glucosa en sangre en ratones diabéticos *in vivo*. Además, el tratamiento con los anticuerpos agonistas del TrkB del invento previnieron la ganancia de peso que es normalmente observada en estos ratones. Estos resultados demuestran que los anticuerpos del invento son específicos para el TrkB y son efectivos en la activación del receptor. Además, los resultados revelan que la activación del TrkB es útil en prevenir la hiperglicemia y sus condiciones asociadas como la obesidad, pre-diabetes, y diabetes tipo II.

II. Anticuerpos que se unen al TrkB

1. Introducción

Cualquiera de los anticuerpos agonistas del TrkB pueden ser usados de acuerdo a los métodos del invento.

En algunas realizaciones, los anticuerpos agonistas del TrkB del invento se unen al sitio de unión ligando y/o compiten con el BDNF por unirse al TrkB. Un anticuerpo ejemplar que se une al sitio de unión ligando del TrkB es el Anticuerpo A10F18.2 (referido en la presente también como "A10F18" o "A10"). La región variable de cadena pesada del anticuerpo A10 está ejemplificada en la SEQ ID NO:1 y la región variable de cadena liviana del anticuerpo A10 está ejemplificada en la SEQ ID NO:2. Por consiguiente, el invento proporciona anticuerpos agonistas que compiten por unirse al TrkB con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada comprendiendo SEQ ID NO:1 y una región variable de cadena liviana comprendiendo SEQ ID NO:2. En algunas realizaciones, los anticuerpos del invento comprenden por lo menos de regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de la SEQ ID NO:1 y/o 2. Sin intención de limitar el alcance del invento, se cree que CDR3 juega un rol significativo en la unión del anticuerpo A10. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un anticuerpo del presente invento comprende las SEQ ID Nos: 5 y/o 6. Sin embargo, CDR1 y/o CDR2 juega además un rol en la

unión. Por consiguiente, en algunas realizaciones, un anticuerpo del presente invento comprende las SEQ ID Nos: 9 y/o 10 o 13 y/o 14.

En algunas realizaciones, anticuerpos agonistas del TrkB del invento no se unen al sitio de unión ligando TrkB y/o compiten con BDNF por unirse a TrkB. Un anticuerpo ejemplar que no se une al sitio de unión ligando de TrkB es el Anticuerpo C20.il.1 (referido en la presente también como "C20.il", "C20.II" y "C20"). La región variable de cadena pesada del anticuerpo C20 está ejemplificada en la SEQ ID NO:3 y la región variable de cadena liviana del anticuerpo C20 está ejemplificada en la SEQ ID NO:4. Por consiguiente, el invento proporciona anticuerpos agonistas que compiten por unirse al TrkB con un anticuerpo comprendiendo una región variable de cadena pesada comprendiendo la SEQ ID NO:3 y una región variable de cadena liviana comprendiendo la SEQ ID NO:4. En algunas realizaciones, los anticuerpos del invento comprenden por lo menos de regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de las SEQ ID NO:3 y/o 4. Sin intención de limitar el alcance del invento, se cree que CDR3 juega un rol significativo en la unión del anticuerpo C20. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un anticuerpo del presente invento comprende las SEQ ID Nos: 7 y/o 8. Sin embargo, CDR1 y/o CDR2 juega además un rol en la unión. Por consiguiente, en algunas realizaciones, un anticuerpo del presente invento comprende las SEQ ID Nos: 11 y/o 12 o 15 y/o 16.

Cualquier tipo de anticuerpo agonista puede ser usado de acuerdo a los métodos de la invención. Generalmente, los anticuerpos usados son anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden ser generados mediante cualquier método conocido en la materia (ejemplo, usando hibridomas, expresión recombinante y/o exposición en fagos.

2. Anticuerpos Humanizados

En algunas realizaciones, el anticuerpo usado de acuerdo al presente invento es un anticuerpo quimérico (ejemplo, ratón/humano) compuesto de regiones desde un anticuerpo agonista anti TrkB no humano juntos con regiones de anticuerpos humanos. Por ejemplo, una cadena quimérica H puede comprender la región de unión del antígeno de la región variable de cadena pesada (ejemplo, SEQ ID Nos:1 o 3 o por lo menos partes de éstas, tal como un CDR) del anticuerpo no humano ligado a por lo menos una porción de una región constante de cadena pesada humana. Esta cadena pesada quimérica o humanizada puede ser combinada con una cadena quimérica L que comprende la región de unión del antígeno de la región variable de cadena liviana (ejemplo, SEQ ID Nos:2 o 4 o por lo menos partes de éstas, tal como un CDR) del anticuerpo no humano ligado a por lo menos una porción de una región constante de cadena pesada humana. En algunas realizaciones, la región constante de cadena pesada puede ser un anticuerpo IgM ó IgA.

Los anticuerpos quiméricos del invento pueden ser inmunoglobulinas monovalentes, divalentes, o polivalentes. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico monovalente es un dímero₁(HL) formado por una cadena quimérica H asociada a través de puentes disulfuro con una cadena quimérica L, como se apuntó arriba. Un anticuerpo quimérico divalente es un tetrámero (H₂ L₂) formados por dos dímeros HL asociados a través de por lo menos un puente disulfuro. Un anticuerpo quimérico polivalente está basado en una agregación de cadenas.

Las secuencias de ADN de los anticuerpos del invento pueden ser identificadas, aisladas, clonadas, y transferidas a una célula procariótica o eucariótica para su expresión mediante procedimientos bien conocidos en el estado de la técnica. Tales procedimientos son generalmente descritos en Sambrook *et al.*, *supra*, como también CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Ausubel *et al.*, eds., 1989). Los vectores de expresión y células huésped apropiadas para la expresión de anticuerpos recombinantes y anticuerpos humanizados en particular, son bien conocidos en el estado de la técnica. Las siguientes referencias son representativas de los métodos y vectores apropiados para la expresión de inmunoglobulinas recombinantes las cuales pueden ser utilizadas en llevar a cabo el presente invento: Weidle *et al.*, *Gene*, 51: 21-29 (1987); Dorai *et al.*, *J. Immunol.*, 13(12):4232-4241 (1987); De Waele *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 176:287-295 (1988); Colcher *et al.*, *Cancer Res.*, 49:1738-1745 (1989); Wood *et al.*, *J. Immunol.*, 145(a):3011-3016 (1990); Bulens *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 195:235-242 (1991); Beggington *et al.*, *Biol. Technology*, 10:169 (1992); King *et al.*, *Biochem. J.*, 281:317-323 (1992); Page *et al.*, *Biol. Technology*, 2:64 (1991); King *et al.*, *Biochem. J.*, 290:723-729 (1993); Chaudary *et al.*, *Nature*, 339:394-397 (1989); Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Morrison y Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65-92 (1988); Benhar *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:12051-12055 (1994); Singer *et al.*, *J. Immunol.*, 150:2844-2857 (1993); Cooto *et al.*, *Hybridoma*, 13(3):215-219 (1994); Queen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 10029-10033 (1989); Caron *et al.*, *Cancer Res.*, 32:6761-6767 (1992); Cotoma *et al.*, *J. Immunol. Meth.*, 152:89-109 (1992). Además, vectores apropiados para la expresión de anticuerpos recombinantes están comercialmente disponibles.

Células del huésped capaces de expresar inmunoglobulinas funcionales incluyen, por ejemplo, células de mamíferos tales como las células del Chinese Hamster Ovary (CHO); células COS; células de mieloma, tales como las células NSO y SP2/O; bacterias tales como la *Escherichia coli*; células de levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*; y otras células huésped.

2. Anticuerpos de Cadena Sencilla

En algunas realizaciones, los anticuerpos del invento son cadenas sencillas Fvs (scFvs). Las regiones V_H y V_L (ejemplo, SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, o SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4) de un anticuerpo comprenden una cadena sencilla la cual es plegada para crear un sitio de unión del antígeno similar a aquel encontrado en anticuerpos de dos cadenas. Una vez plegada, interacciones no covalentes estabilizan el anticuerpo de cadena sencilla. Mientras las regiones V_H y V_L de algunas realizaciones de anticuerpos pueden ser juntas unidas directamente, aquellos expertos reconocerán que las regiones pueden ser separadas por un enlazador de péptidos consistente en uno o más aminoácidos. Los enlazadores de péptidos y sus usos son bien conocidos en el estado de la técnica. Ver, por ejemplo, Huston *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 8:5879 (1988); Bird *et al.*, *Science* 242:4236 (1988); Glockshuber *et al.*, *Biochemistry* 29:1362 (1990); U.S. Patente No. 5,132,405 y Stemmer *et al.*, *Biotechniques* 14:256-265 (1993). Generalmente el enlazador de péptidos no tendrá actividad biológica específica otra que unirse a regiones o para preservar alguna distancia mínima u otras relaciones espaciales entre las V_H y V_L . Sin embargo, los aminoácidos constituyentes del enlazador de péptidos pueden ser seleccionados para influenciar alguna propiedad molecular tales como la plegabilidad, carga neta, o hidrofobicidad. Los anticuerpos de cadena sencilla Fv (scFv) opcionalmente incluyen un enlazador de péptidos de no más de 50 aminoácidos, generalmente no más de 40 aminoácidos,

preferiblemente no más de 30 aminoácidos, y más preferiblemente no más de 20 aminoácidos en longitud.

Los métodos de fabricación de anticuerpos scFv han sido descritos. *Ver, ejemplo, Huse et al., Science* 246:1275-1281 (1989); Ward *et al., Nature* 341:544-546 (1989); y Vaughan *et al., Nature Biotech.* 14:309-314 (1996). En resumen, el ARNm de células B de un animal inmunizado es aislado y el ADNc es preparado. El ADNc es amplificado usando *primers* (cebadores) específicos para las regiones variables de las cadenas de inmunoglobulinas pesadas y livianas. Los productos de la PCR son purificados y las secuencias de ácidos nucleicos son unidas. Si un enlazador de péptidos es deseado, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los péptidos son insertadas entre las secuencias de ácidos nucleicos de las cadenas pesadas y livianas. El ácido nucleico que codifica el scFv es insertado dentro de un vector y expresado en la célula huésped apropiada. Los scFv que se unen específicamente al antígeno deseado son típicamente encontrados por cribado de un fago expuesto en la biblioteca. El cribado puede ser realizado por cualquiera de los muchos métodos. El cribado puede ser convenientemente realizado usando células que expresen el antígeno deseado o sus superficies o usando una superficie sólida revestida con el antígeno deseado. Convenientemente, la superficie puede ser una banda magnética. Los fagos no unidos son lavados fuera de la superficie sólida y los fagos unidos son eluidos.

El encontrar el anticuerpo con la más alta afinidad esta dictado por la eficiencia del proceso de selección y depende del número de clones que pueden ser revisados y la astringencia con lo cual esto es hecho. Típicamente, una mayor astringencia corresponde a un cribado más selectivo. Si las condiciones son demasiado estrictas, sin embargo, el fago no se unirá. Después de una ronda de cribado, el fago que se une a las placas revestidas con TrkB o a células que expresan TrkB sobre sus superficies son expandidas en *E. coli* y sometidas a otra ronda de cribado. De esta forma, un enriquecimiento de muchos plegamientos ocurre en 3 rondas de cribado. Por ende, inclusive cuando el enriquecimiento en cada ronda es bajo, múltiples rondas de cribado conducirán al aislamiento de fagos poco comunes y al material genético contenido dentro, el cual codifica el scFv con la más alta afinidad o alguno que sea mejor expresado sobre un fago.

A pesar del método de cribado escogido, la unión física entre el genotipo y fenotipo proporcionado por el fago expuesto hace posible probar cada miembro de una biblioteca de ADNc para la unión al antígeno, inclusive con grandes bibliotecas de clones.

4. Anticuerpos Humanos

En algunas realizaciones, los anticuerpos humanos son usados de acuerdo al presente invento. Los anticuerpos humanos pueden ser fabricados mediante una variedad de métodos conocidos en el estado de la técnica incluyendo mediante el uso de métodos de expresión en fagos usando bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulinas humanas. *Ver, ejemplo, Longerg y Huszar, Int. Rv. Immunol.* 13:65-93 (1995), U.S. Pat. Nos. 4,444,887 y 4,716,111; y publicaciones PCT, WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, y WO 91/10741; cada una de las cuales es aquí incorporada como referencia en su totalidad.

En algunas realizaciones, los anticuerpos del presente invento son generados usando expresión fagos. Por ejemplo, dominios de anticuerpos funcionales son expuestos sobre la superficie de partículas de fagos que llevan las secuencias de polinucleótidos que codifican a los mismos. Tales fagos pueden ser utilizados para exponer el dominio antígeno-unión expresado desde un repertorio o biblioteca de anticuerpos combinatorios (ejemplo, humano o murino). El fago que expresa un dominio de unión al antígeno que se une al TrkB puede ser seleccionado o identificado con TrkB, ejemplo, usando un TrkB marcado. Los fagos usados en estos métodos son típicamente fagos filamentosos incluyendo dominios de unión fd y M13 expresados desde fagos con Fab, Fv o dominios de anticuerpos Fv disulfuro estabilizados recombinantemente fusionados para el gen del fago III o para la proteína del gen VIII. Ejemplos de métodos de expresión fagos que pueden ser usados para elaborar los anticuerpos del presente invento incluyen aquellos divulgados en Brinkman *et al.*, *J. Immunol. Methods* 182:41-50(1995); Amés *et al.*, *J. Immunol. Methods* 184:177-186 (1995); Kettleborough *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 24:952-958 (1994); Persic *et al.*, *Gene* 187:9-18 (1997); Burton *et al.*, *Advances in Immunology* 57:191-280 (1994); PCT solicitud No. PCT/GB91/01134; PCT publicaciones WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y U.S. Pat. Nos. 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743; y 5,969,108; cada uno de los cuales está aquí incorporado como referencia en su totalidad.

5. Generando Anticuerpos Agonistas

Los anticuerpos agonistas pueden ser identificados por generar anticuerpos anti-TrkB y luego probar cada anticuerpo por la habilidad para desencadenar eventos mediados por TrkB, como por ejemplo, diferenciación de iniciación y/o dendritificación de células SH-SY5Y, midiendo Anoikis (apoptosis resultante de la pérdida de interacciones matriz-célula) en respuesta al tratamiento de células con agonistas TrkB potenciales, o usando un ensayo de proliferación celular BaF3/TrkB.

Ensayos de SH-SY5Y consiste en retirar células SH-SY5Y de una placa y tratando las células con ácido retinoico con o sin anticuerpos agonistas potenciales y/o BDNF y subsecuentemente medir el crecimiento de neurita. Generalmente, el ácido retinoico solo inducirá una pequeña cantidad de crecimiento de neurita. El BDNF por si solo no debería inducir crecimiento de neurita significativo y el anticuerpo por si solo no debería inducir crecimiento de neurita significativo. Sin embargo, las células tratadas con ácido retinóico, BDNF, y anticuerpos deberían exhibir un crecimiento de neurita extenso. Un ensayo ejemplar SH-SY5Y está descrito en Kaplan DR, *et al.*, *Neuron* 11:321-331 (1993).

Los ensayos de proliferación de células BaF3/TrkB consisten en medir la proliferación de células estimulada por el agonismo del receptor TrkB. Por ejemplo, células BaF3 son cultivadas en un medio RPMI completo con IL-3 e infectadas con retrovirus TrkB. Las células son lavadas en ausencia de IL-3 y puestas en la placa. Anticuerpos agonistas potenciales y la supervivencia celular es medida (por ejemplo, usando reactivos de detección de viabilidad de células luminiscentes tales como Cell-Titer GloTM) después de una incubación apropiada. Las células de control positivo son incubadas con rhBDNF.

Los ensayos de Anoikis consisten en resuspender células RIE/TrkB (como por ejemplo, en medio DMEM) y células de contacto, opcionalmente en recipientes de múltiples pozos, con un agonista de anticuerpo potencial (por ejemplo, 2.5×10^4 células $10 \mu\text{l}$ de $1\text{-}20 \mu\text{g/ml}$ de anticuerpos). Las mezclas son incubadas en presencia o ausencia de un control de hBDNF y luego medidas para observar viabilidad celular (ejemplo, reactivos de detección de viabilidad de células luminiscentes tales como el Cell-Titer GloTM). Un ensayo de Anoikis ejemplar está descrito en Douma *et al.*, *Nature* 430:1034-1039(2004).

Los agonistas del TrkB además pueden ser evaluados sobre células SH-SY5Y por su habilidad en proteger células de la toxicidad de la vinblastina y el cisplatino. Estos ensayos han sido descritos en, por ejemplo, Scala *et al.*, *Cancer Res.* 56(16):3737-42 (1996); y Jaboin *et al.*, *Cancer Res.* 62(22):6756-63 (2000).

III. Usos del Anticuerpo

Los anticuerpos agonistas del TrkB del invento pueden ser usados para tratar o mejorar cualesquiera enfermedades o condiciones que se beneficien de la incrementada actividad de del TrkB.

En algunas realizaciones, los anticuerpos agonistas del TrkB del invento son usados para tratar o aliviar la hiperglicemia y/o diabetes o síntomas de estos en un individuo. Alternativamente, o en combinación, los anticuerpos del invento pueden ser usados para reducir peso en un individuo en necesidad del mismo. En algunas realizaciones, los anticuerpos son usados para aliviar la obesidad. Esto puede ser particularmente útil ya que los individuos obesos son más propensos a la resistencia a la insulina y diabetes tipo II.

El presente invento además proporciona métodos de tratamiento o prevención de enfermedades neurodegenerativas o del sistema nervioso central (SNC) mediante la administración del anticuerpo agonista del invento TrkB a un individuo en necesidad del mismo. Ejemplarmente, las enfermedades del SNC incluyen, por ejemplo, enfermedades de ALS, de Alzheimer, Parkinson, o de Huntington.

La activación incrementada del TrkB además ha sido implicada en el alivio del abuso de sustancias. Ver, ejemplo, U.S. Publicación de Patente No. 2005/0203011. Por consiguiente, el presente invento proporciona métodos para el alivio del abuso de sustancias (ejemplo, alcohol, nicotina y/o narcóticos) y dependencia mediante la administración de anticuerpos agonistas del TrkB del invento a un individuo en necesidad del mismo.

Los anticuerpos y agentes del invento pueden ser administrados directamente al sujeto mamífero en necesidad de los mismos. La administración de las composiciones del presente invento es mediante cualquiera de las rutas normalmente usadas para introducir fármacos, incluyendo anticuerpos, dentro del contacto máximo con el tejido a ser tratado. Los anticuerpos son administrados de cualquier manera apropiada, opcionalmente con vehículos farmacéuticamente aceptables. Métodos apropiados de administración de tales anticuerpos y agentes están disponibles y son bien conocidos para aquellos expertos en el estado de la técnica, y, aunque más de una ruta puede ser usada para administrar una composición particular, una ruta

particular puede frecuentemente proporcionar una reacción más inmediata y más efectiva que otra ruta.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables son determinados en parte por la composición particular siendo administrada, como también mediante el método particular usado para administrar la composición. Por consiguiente, hay una amplia variedad de formulaciones apropiadas de composiciones farmacéuticas del presente invento (ver, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17th ed. 1985)).

Los anticuerpos, solos o en combinación con otros componentes apropiados, pueden ser hechos en formulaciones de aerosol (por ejemplo, ellos pueden ser "nebulizados") para ser administrados vía inhalación. Formulaciones de aerosol pueden ser colocadas dentro de propelentes aceptables presurizados, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno, y similares.

Las formulaciones apropiadas para la administración incluyen soluciones acuosas y no acuosas, soluciones estériles isotónicas, las cuales pueden contener antioxidantes, amortiguadores, bacteriostáticos, y solutos que vuelven la formulación isotónica, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes suspensores, solubilizadores, agentes espesantes, estabilizadores, y preservativos. En la práctica de este invento, las composiciones pueden ser administradas, por ejemplo, oralmente, tópicamente, intravenosamente, intraperitonealmente, intravesicalmente o intratecalmente. Opcionalmente, las composiciones son administradas nasalmente. Las formulaciones de los compuestos pueden ser presentadas en recipientes sellados de dosis única o de dosis múltiples, tales como en ampollas y frascos. Las soluciones y suspensiones pueden ser preparadas a partir de polvos estériles, gránulos, y tabletas de la clase previamente descritos. Los moduladores además pueden ser administrados como parte de comida o droga preparada. Los compuestos del presente invento además pueden ser usados efectivamente en combinación con uno o más agentes activos adicionales (por ejemplo, quimioterapéuticos) dependiendo del efecto o terapia deseado.

La dosis administrada a un paciente, en el contexto del presente invento debería ser suficiente para producir una respuesta beneficiosa en el sujeto al cabo de un tiempo. La dosis será determinada mediante la eficacia de los anticuerpos particulares y reactivos empleados y la condición del sujeto, como también el peso corporal o área de superficie del área a ser tratada. El tamaño de la dosis además será determinado mediante la existencia, naturaleza, y extensión de cualesquiera efectos secundarios adversos que acompañen la administración de un compuesto particular o vector en un sujeto particular. La administración puede ser lograda vía dosis sencilla o divididas.

El anticuerpo agonista del TrkB puede ser usado en combinación con agentes conocidos en ser beneficiosos para reducir peso, reducir niveles de glucosa en sangre, tratar diabetes o aliviar síntomas diabéticos, tratando enfermedades neurodegenerativas o reduciendo el abuso de sustancias. Agentes ejemplares usados para tratar diabetes incluyen, por ejemplo, la insulina; sulfonilureas (ejemplo, Glipzida y Amaryl) y agentes insulíntrópicos (ejemplo, nateglinida y repaglinida); metformina; agonistas PPARgamma (ejemplo, rosiglitazona y pioglitazona) como también PPARalfa, PPARdelta, agonistas duales PPARalfa/gamma y pan agonistas PPARalfa/gamma/delta; inhibidores de la alfa-glucosidasa (ejemplo, Acarbosa); inhibidores de

DPP-IV (ejemplo, vildagliptina); y análogos de GLP-1/GLP-1 (ejemplo, exenatida). Agentes ejemplares usados para tratar la obesidad incluyen, por ejemplo, inhibidores de la lipasa (por ejemplo, orlistat); sibutramina; inhibidores de CB-1 (por ejemplo, rimonabant); topiramato; análogos de amilina/amilina (por ejemplo, pramlintina), leptina, análogos de PYY/PYY; y análogos de GLP-1/GLP-1 (por ejemplo, exenatida).

Agentes activos pueden ser administrados juntos en una mezcla con el anticuerpo agonista TrkB o cada uno puede ser administrado separadamente. El agente anticuerpo y los otros agentes activos pueden, pero no necesitan ser administrados de manera simultánea.

EJEMPLO

Ejemplo 1

Este ejemplo discute la identificación y caracterización de anticuerpos agonistas del TrkB.

Los ratones fueron inmunizados con un receptor TrkB humano y sobrenadantes de hibridomas de ratones IgG sérico positivos fueron sometidos para reactividad a TrkB mediante ELISA. Los anticuerpos resultantes fueron sometidos para sus habilidades en activar el TrkB mediante la habilidad de los anticuerpos para rescatar células RIE/TrkB de Anoikas. El BDNF es conocido en rescatar células RIE/TrkB de Anoikas y por lo tanto este ensayo es una buena medida de la habilidad de un anticuerpo para activar el TrkB. Ver, Figura 1. Múltiples anticuerpos agonistas del TrkB fueron identificados los cuales imitan o mimetizan la actividad del BDNF en un ensayo de Anoikis, como se mostró en la Figura 2. Los anticuerpos agonistas positivos fueron purificados de medios bajos en IgG.

Los anticuerpos agonistas fueron sometidos para reactividad al dominio de unión de ligandos (LBD) del huTrkB, muTrkB, y TrkB, como se mostró en la Figura 3. La mayoría de los agonistas no se unieron al LBD. En particular, se encontró que C20 es reactivo con el TrkB murino y humano. A10 es reactivo con TrkB murino y humano y se une al epítipo del dominio de unión de ligandos. Como se mostró en la Figura 4, muchos de los anticuerpos funcionales fueron vistos en ser reactivos contra el TrkB murino, pero no se unieron a TrkA o TrkC.

Los anticuerpos agonistas fueron confirmados en un modelo *in vitro* de crecimiento de neurita. Los resultados demostraron que los anticuerpos agonistas del TrkB estimulan el crecimiento de neurita similar al BDNF.

Los anticuerpos funcionales fueron isotipificados tal cual se ilustra en la Figura 6. Los anticuerpos funcionales fueron demostrados adicionalmente que efectivamente se unen al TrkB humano sobreexpresado en células RIE mediante western blots. La Figura 7 resume la información para varias anticuerpos agonistas definidos.

Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra que los anticuerpos agonistas al TrkB efectivamente reducen la glucosa en sangre y el peso en ratones.

Los dos más potentes agonistas, A10 y C20 (cuyas regiones variables están exhibidas en las SEQ ID Nos: 3 y 4 y las SEQ ID Nos: 1 y 2, respectivamente), fueron evaluados en un modelo murino db/db para diabetes tipo 2. Tal cual se muestra en las Figuras 8 y 9, ambos anticuerpos parecen reducir los niveles de glucosa séricos y promover el peso corporal tanto profilácticamente como terapéuticamente.

Según se observa en la gráfica superior de la Figura 9, aquellos ratones predispuestos a altos niveles de glucosa en sangre no tuvieron niveles aumentados de glucosa en sangre cuando fueron administrados los anticuerpos A10 o C20, mientras que los ratones control si demostraron niveles elevados. Este resultado muestra que los anticuerpos tienen un efecto profiláctico. Luego de treinta y dos días de estudio, los animales hiperglicémicos y obesos de control fueron divididos en dos grupos. Un grupo fue tratado con el anticuerpo A10 y el otro fue tratado con PBS. El tratamiento reversó la hiperglicemia dentro de una semana y redujo el peso corporal en un 25%. Los animales originalmente tratados fueron dejados sin tratamiento por otras cuatro semanas adicionales. El grupo tratado con C20 tuvo niveles de glucosa aumentada e igualmente un aumento en peso. El grupo A10 mantuvo una glucosa normal y mostró un pequeño aumento en peso. Estos resultados están mostrados en los paneles superior e inferior de la Figura 9. Un estudio PK reveló que el anticuerpo A10 tenía una vida media sérica mucho mejor, lo cual corresponde a los efectos vistos *in vivo*.

Aunque el invento ha sido descrito con cierto detalle mediante ilustraciones y ejemplos para fines de dar claridad en el entendimiento, será fácilmente aparente para aquellos expertos en el estado de la técnica a la luz de las enseñanzas del invento que ciertos cambios y modificaciones podrán hacerse en la presente sin salirse del alcance de las reivindicaciones anexas.

Todas las publicaciones, bases de datos, secuencias Genbank, y solicitudes de patente citadas en esta especificación están incorporadas en la presente como referencia como si cada una fuera indicada de manera específica como referencia.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo agonista aislado del Receptor B Tirosinquinasa (TrkB).
- 5 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla.
- 10 4. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo no se une al Receptor A Tirosinquinasa o al Receptor C Tirosinquinasa.
- 15 5. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se une al Dominio de Unión de Ligandos (LBD, por su sigla en inglés) del TrkB.
6. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo compite con la unión del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF) al TrkB.
- 20 7. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende
 - i. una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO. 7; y
 - ii. una región variable de cadena liviana que comprende la SEQ ID NO. 8.
- 25 8. El anticuerpo de la reivindicación 7, en donde el anticuerpo comprende
 - i. una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO: 11, y SEQ ID NO: 15; y
 - ii. una región variable de cadena liviana que comprende la SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO: 12, y SEQ ID NO: 16.
- 30 9. El anticuerpo de la reivindicación 8, en donde el anticuerpo comprende
 - i. una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO. 3; y
 - 35 ii. una región variable de cadena liviana que comprende la SEQ ID NO. 4.
10. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo no se une al LBD del TrkB.
- 40 11. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo no compite con la unión del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF) al TrkB.
12. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende
 - 45 i. una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO. 5; y
 - ii. una región variable de cadena liviana que comprende la SEQ ID NO. 6.

13. El anticuerpo de la reivindicación 12, en donde el anticuerpo comprende
- i. una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO: 9, y SEQ ID NO: 13; y
 - ii. una región variable de cadena liviana que comprende la SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO: 10, y SEQ ID NO: 14.
14. El anticuerpo de la reivindicación 13, en donde el anticuerpo comprende
- i. una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO. 1; y
 - ii. una región variable de cadena liviana que comprende la SEQ ID NO. 2.
15. Una composición farmacéutica la cual comprende
- i. una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo de la reivindicación 1; y
 - ii. un vehículo farmacéutico
16. La composición farmacéutica de la reivindicación 15, en donde el anticuerpo es seleccionado a partir del grupo que consiste de:
- i. un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO. 5 y una región variable de cadena liviana que comprende la SEQ ID NO. 6; y
 - ii. un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO. 7 y una región variable de cadena liviana que comprende la SEQ ID NO. 8.
17. La composición farmacéutica de la reivindicación 15, en donde la composición farmacéutica además comprende un agente el cual reduce los niveles de glucosa en sangre y/o el peso corporal de un individuo.
18. Un método para reducir los niveles de glucosa en sangre y/o el peso corporal de un individuo en necesidad de lo mismo, el método comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo de la reivindicación 1.
19. El método de la reivindicación 18, en donde el individuo tiene una condición seleccionada a partir del grupo que consiste de: pre-diabetes, diabetes tipo I, diabetes tipo II, sobrepeso, y obesidad.
20. El método de la reivindicación 18, en donde una cantidad terapéuticamente efectiva de un segundo agente efectivo en reducir la glucosa en sangre y/o peso corporal es administrada al individuo en combinación con el anticuerpo de la reivindicación 1.
21. El método de la reivindicación 20, en donde el segundo agente y el anticuerpo de la reivindicación 1 son administrados como una mezcla.

22. El método de la reivindicación 20, en donde el segundo agente es administrado por separado del anticuerpo de la reivindicación 1.

5 23. El método de la reivindicación 20, en donde el segundo agente es seleccionado a partir del grupo que consiste de: insulina, sulfonilureas, agentes insulino-trópicos, metformina, agonistas de PPAR γ , agonistas de PPAR α , agonistas de PPAR δ , agonistas duales de PPAR α/γ , pan agonistas de PPAR $\alpha/\gamma/\delta$, inhibidores de la alfa-glucosidasa, inhibidores de DPP-IV, inhibidores de la lipasa, sibutramina, inhibidores de CB-1, topiramato, amilina, análogos de la
10 amilina, leptina, análogos de PYY/PYY, y análogos GLP-1/GLP-1.

24. El método de la reivindicación 18, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

15 25. El método de la reivindicación 18, en donde el anticuerpo es seleccionado a partir del grupo que consiste de:

i. un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO. 5 y una región variable de cadena liviana que comprende la SEQ ID
20 NO. 6; y

ii. un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO. 7 y una región variable de cadena liviana que comprende la SEQ ID
25 NO. 8.

Figure 1

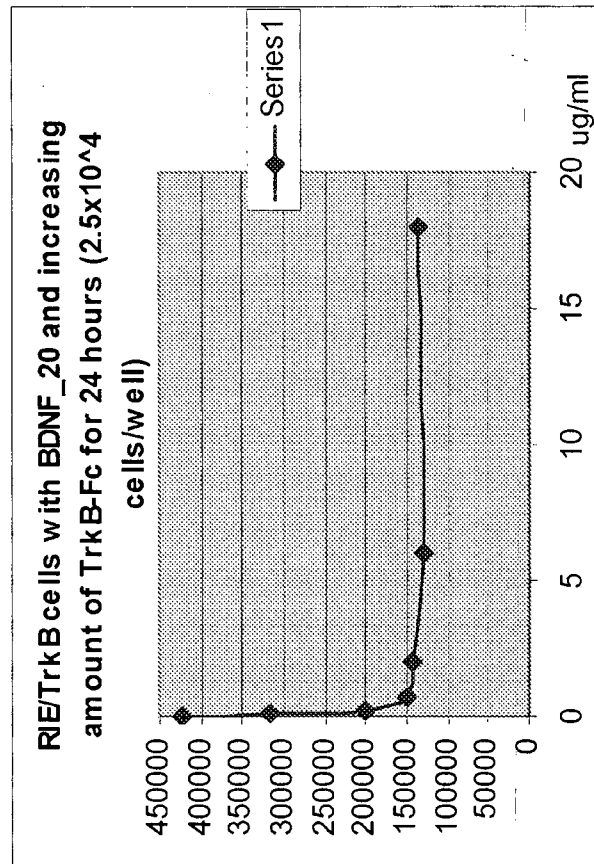
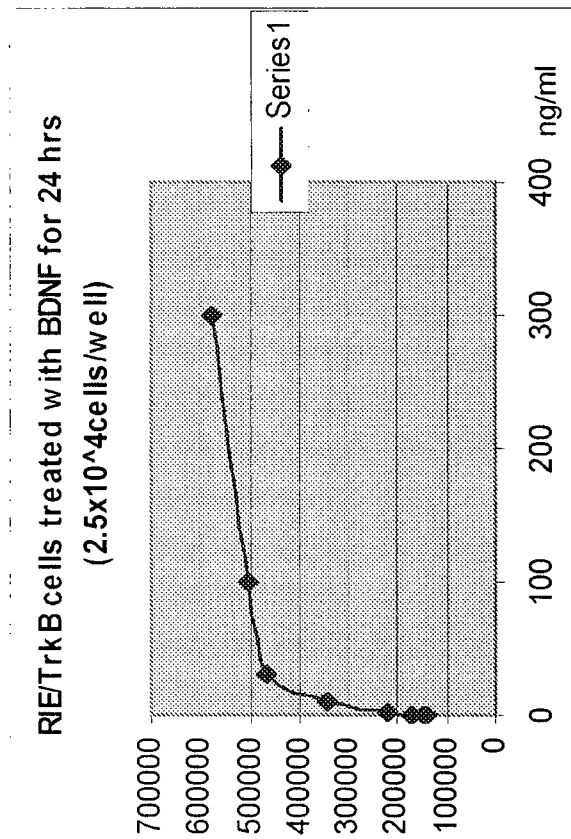
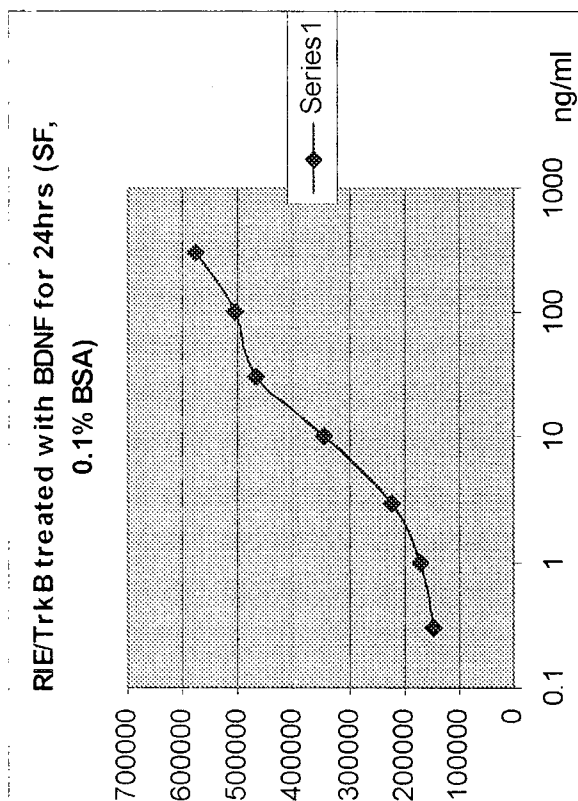


Figure 2

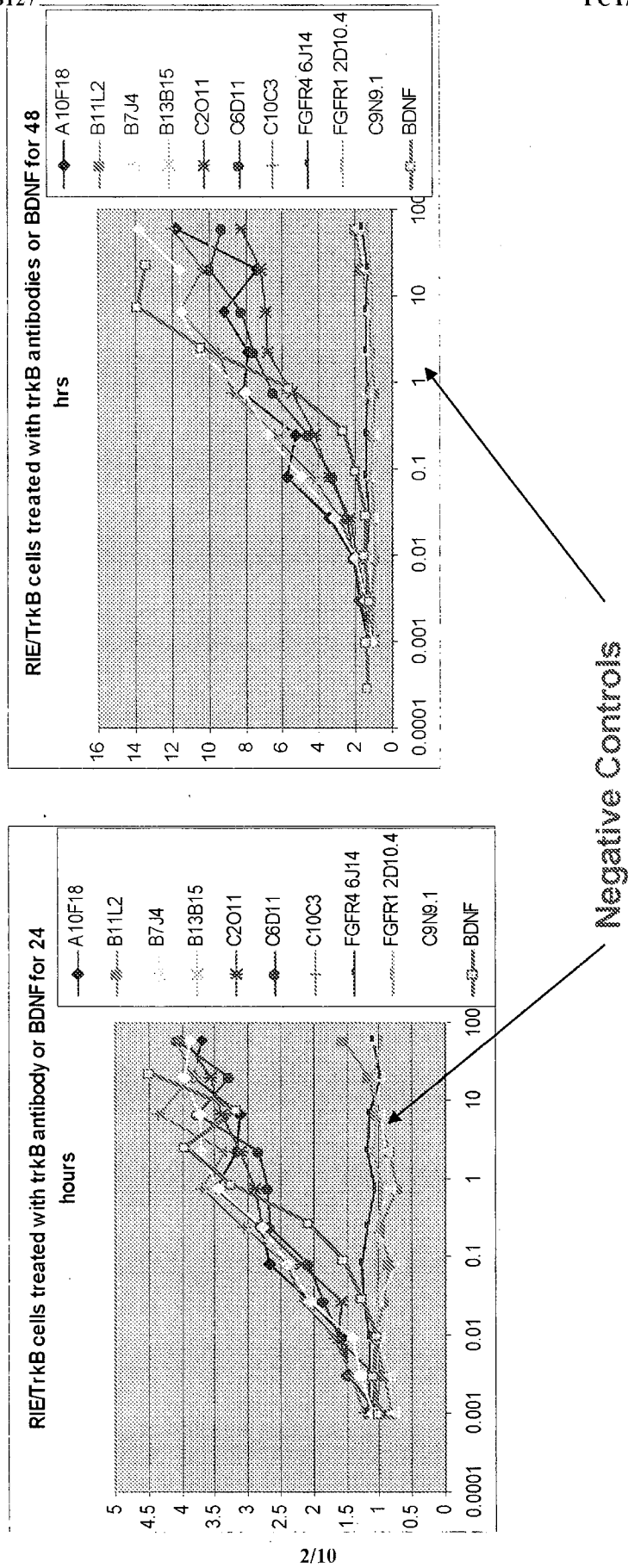


Figure 3

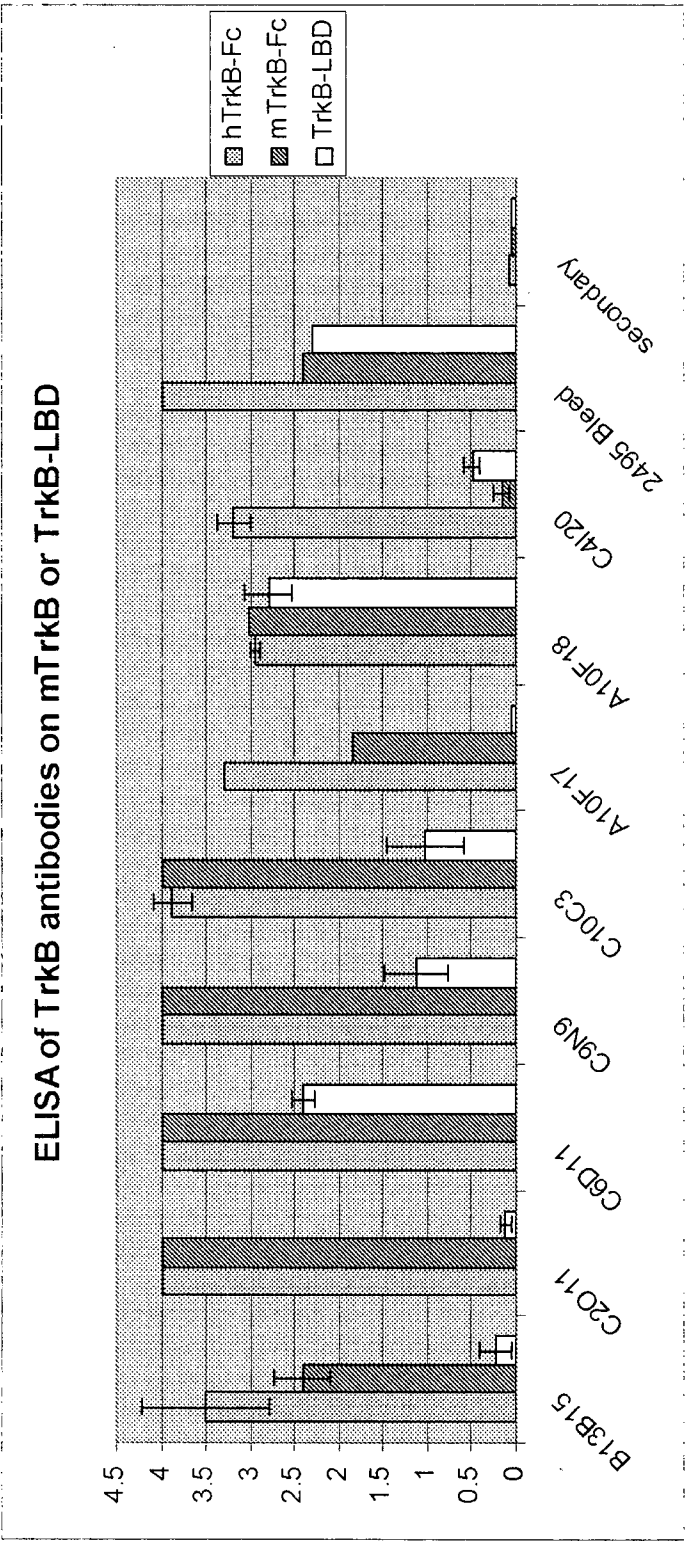
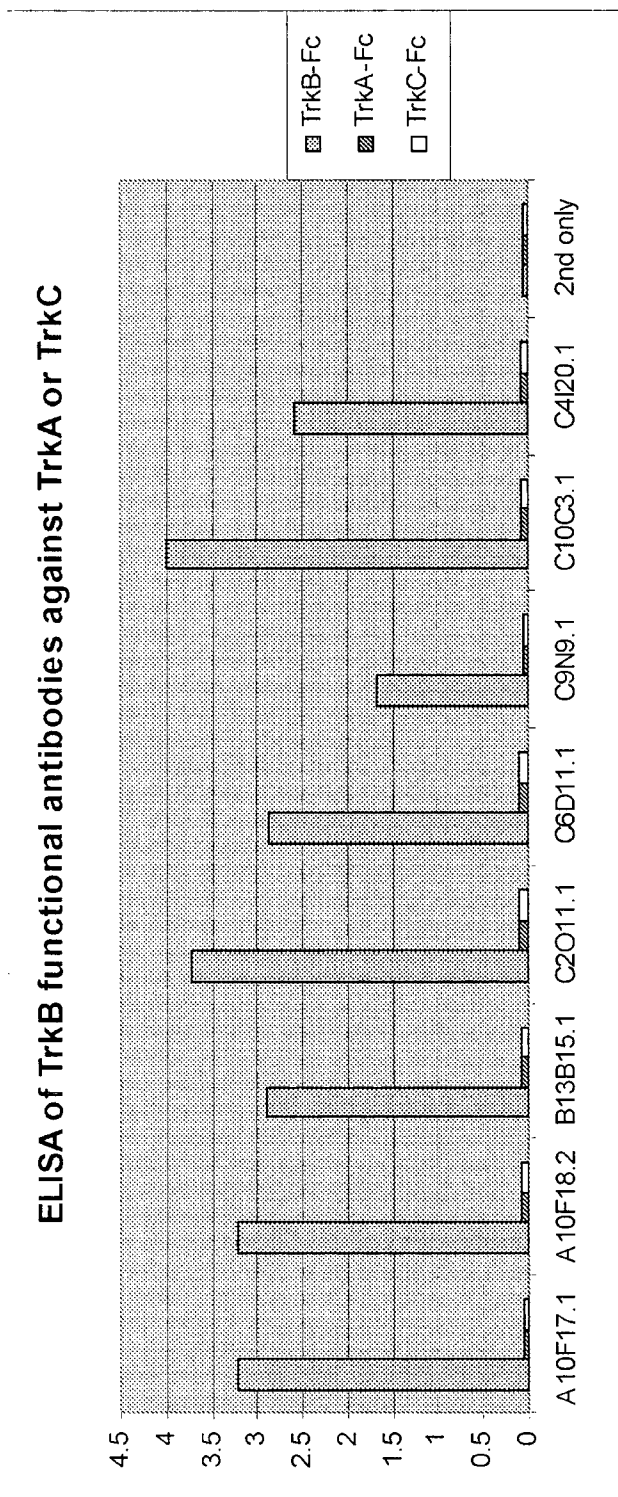


Figure 4



23

Figure 5

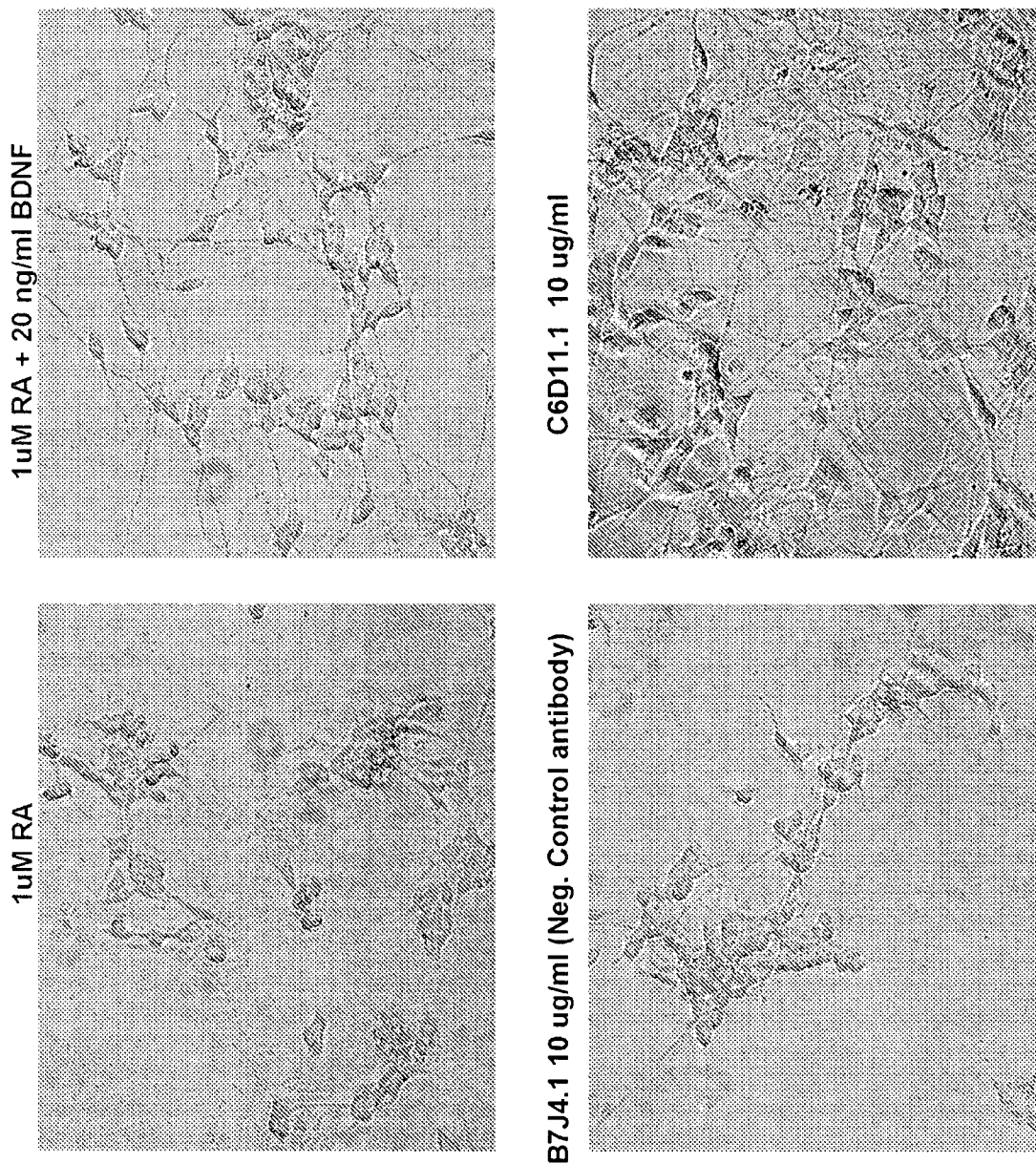


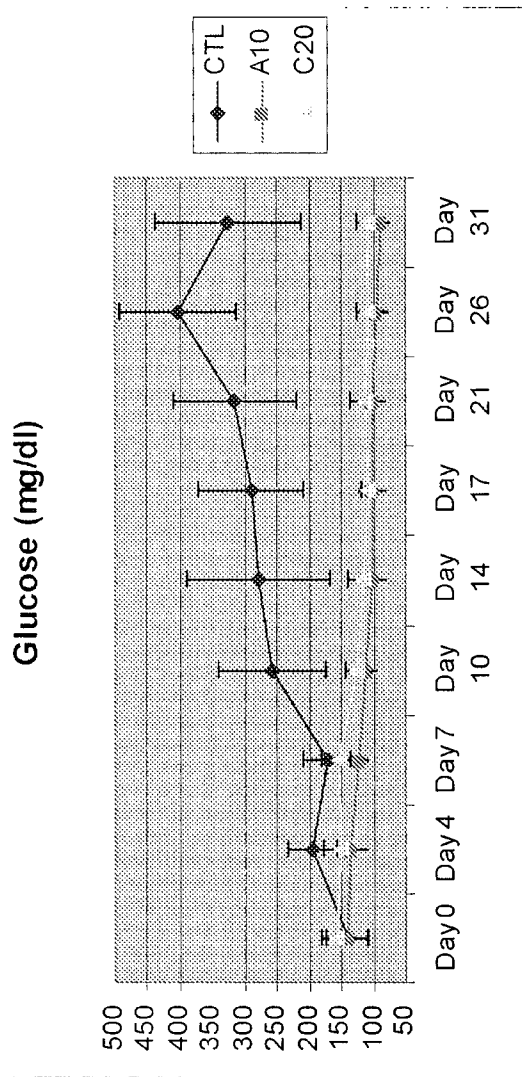
Figure 6

subclone	Ab control	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgA	IgM	Kappa light chain	Lambda light chain
A10F18.2		X						X	
B13B15.1		X						X	
C20I1.1		X						X	
C6D11.1			X					X	
C10C3.1		X						X	
C9N9.1		X						X	
C4I20.1		X						X	
A10F17.1		X							X

Figure 7

Clone#	Isotype	Agonistic Activity	Binds Mouse receptorX	Binds LBD	Immunoblot
A10F18.2	IgG1, κ	++	Yes	Yes	+
B13B15.1	IgG1, κ	++	Yes	No	++
C20I1.1	IgG1, κ	++	Yes	No	+++
C6D11.1	IgG2a, κ	++	Yes	Yes	++
C10C3.1	IgG1, κ	++	Yes	Yes	++
C9N9.1	IgG1, κ	++	Yes	Yes	++
C4I20.1	IgG1, κ	++	No	Yes	+
A10F17.1	IgG1, λ	++	Yes	No	+++

Figure 8



Animal Weight

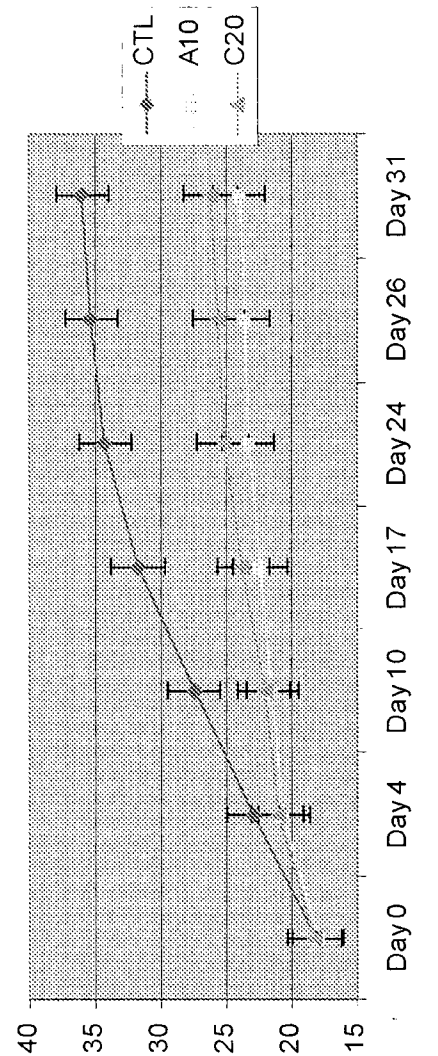
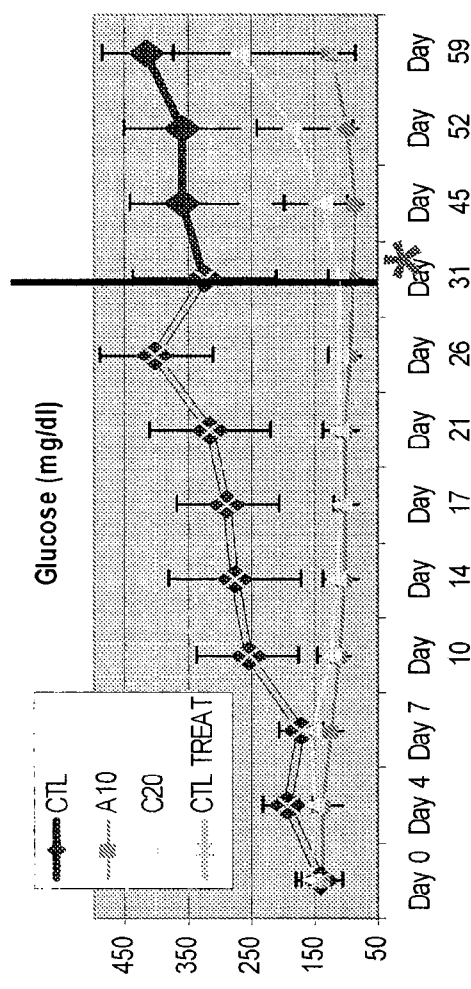


Figure 9



Day ~32 - split CTL group
- 4 animal treated with PBS (dark blue)
- 4 animals treated with A10 (light blue)
- Original treated groups were left untreated for 4 weeks

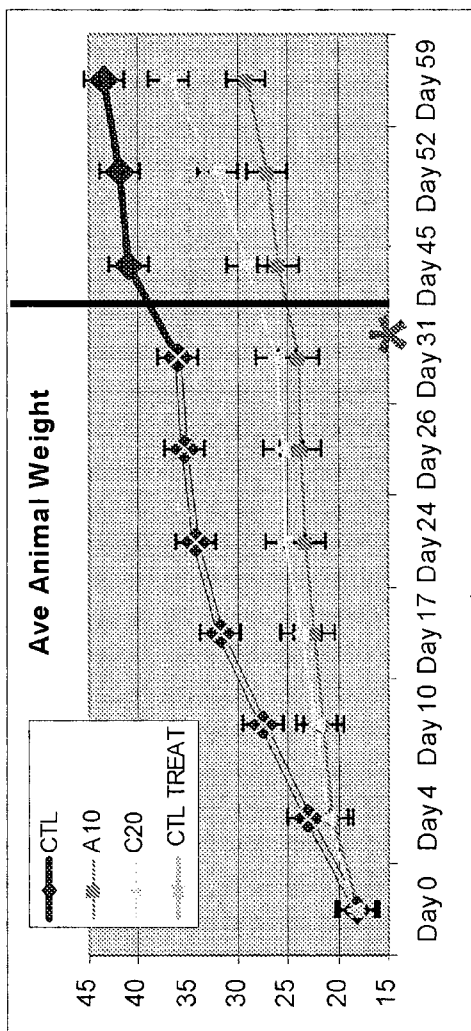


Figure 10

CDR1 first underlined sequence for each
 CDR2 second underlined sequence for each
 CDR3 third underlined sequence for each

C20 Antibody C20i1.1

AA sequences

Heavy Chain:

QVQLQQSGPELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYDINWVKQRPQGQGLEWIGWIYPRDGSIKFNEKFKGKA
 TLTVDTSSTAYMELHSLTSEDSAAAYFCARRGRLLLYGFAYWGQGLVTVSA

Light Chain:

DVVMTQLPLSLPVILGDQASISCRSSQSLIHSNGNTYLHWYLVKPKGQSPKLLIYKVSNRFSGVDPDRFSG
 SSGGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSSQSTHVPFTFGSGTKLEIKRA

A10 Antibody A10F18.2

AA sequences

Heavy Chain:

QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCASGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLEWIGTIDPETAGTAYNQKFKGK
 AILTAGKSSSTAYMELRSLTSEDSAVVYCTGVTTWFAYWGQGLVTVSA

Light Chain:

DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLVKPKGQSPNLLIYKVSNRFSGVDPDRFS
 GSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSSQSTHVPYTFGGGKLEIKRA

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To: GENOMICS INSTITUTE OF THE NOVARTIS RESEARCH FOUNDATION Attn: Smith, Timothy L. 10675 John Jay Hopkins Drive San Diego, CA 92121 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Applicant's or agent's file reference P1275PC10	FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International application No. PCT/US2007/083774	International filing date (day/month/year) 06/11/2007
Applicant IRM LLC	

1. ☒	The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith. Filing of amendments and statement under Article 19: The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46): When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the International Search Report. Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 338.82.70 For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.
2. ☐	The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.
3. ☐	With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that: ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices. ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.
4. Reminders Shortly after the expiration of 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication. The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date. Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices. In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months. See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the <i>PCT Applicant's Guide</i>, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.	

Name and mailing address of the International Searching Authority European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Sabina Maretto
---	---

80

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report and the written opinion of the International Searching Authority, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Annexes B1 and B2).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the International Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, paragraph 296).

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference P1275PC10	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2007/083774	International filing date (day/month/year) 06/11/2007	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 09/11/2006
Applicant IRM LLC		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

82

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2007/083774

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material

☒

a sequence listing

☐

table(s) related to the sequence listing

b. format of material

☒

on paper

☒

in electronic form

c. time of filing/furnishing

☒

contained in the international application as filed

☐

filed together with the international application in electronic form

☒

furnished subsequently to this Authority for the purpose of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2007/083774

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/28 A61K39/395 A61P3/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	QIAN M D ET AL: "Novel agonist monoclonal antibodies activate TrkB receptors and demonstrate potent neurotrophic activities" JOURNAL OF NEUROSCIENCE, NEW YORK, NY, US, vol. 26, no. 37, 1 September 2006 (2006-09-01), pages 9349-9403, XP009076184 ISSN: 0270-6474	1-17
Y	page 9397, right-hand column, line 1 - page 9400, right-hand column, paragraph 1 ----- -/--	18-25

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 July 2008

Date of mailing of the international search report

22/07/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Siaterli, Maria

84

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2007/083774

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HANYU O ET AL: "Brain-derived neurotrophic factor modulates glucagon secretion from pancreatic alpha cells: its contribution to glucose metabolism." DIABETES, OBESITY & METABOLISM JAN 2003, vol. 5, no. 1, January 2003 (2003-01), pages 27-37, XP002487874 ISSN: 1462-8902 page 30, left-hand column, paragraph 1 page 33, right-hand column, paragraph 2 page 35, left-hand column, paragraph 2; figures 2,3	18-25
Y	TONRA J R ET AL: "Brain-derived neurotrophic factor improves blood glucose control and alleviates fasting hyperglycemia in C57BLKS-Leprdb/1eprdb mice" DIABETES, NEW YORK, NY, US, vol. 48, no. 3, 1 March 1999 (1999-03-01), pages 588-594, XP002210327 ISSN: 0012-1797 page 592, right-hand column, line 5 - page 593, left-hand column, paragraph 1; figure 4; table 1	18-25
Y	ONO M ET AL: "BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR REDUCES BLOOD GLUCOSE LEVEL IN OBESE DIABETIC MICE BUT NOT IN NORMAL MICE" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 238, no. 2, 1 January 1997 (1997-01-01), pages 633-637, XP002933247 ISSN: 0006-291X page 633, right-hand column, last paragraph; figure 4a page 636	18-25
P,X	WO 2007/088476 A (RINAT NEUROSCIENCE CORP [US]; LIN JOHN CHIA-YANG [US]; ROSENTHAL ARNON) 9 August 2007 (2007-08-09) page 54 - page 55, paragraph 2; examples 1-4,6	1-6,10, 11,15, 17-24
P,A	WO 2007/088479 A (RINAT NEUROSCIENCE CORP [US]; LIN JOHN CHIA-YANG [US]; ROSENTHAL ARNON) 9 August 2007 (2007-08-09) claims 6-16; example 2	

-/--

85

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2007/083774

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 2006/133164 A (WYETH CORP [US]; CHO SEONGEUN [US]; GILL DAVINDER SINGH [US]; TAN XIAN) 14 December 2006 (2006-12-14) claims 11,15,21,33,42-48; example 8 -----	1-6,10, 11,15
T	TSAO DAVID ET AL: "TrkB Agonists Ameliorate Obesity and Associated Metabolic Conditions in Mice" ENDOCRINOLOGY, BALTIMORE, MD, US, vol. 149, no. 3, 1 March 2008 (2008-03-01), pages 1038-1048, XP009097722 ISSN: 0013-7227 figures 5c,5d -----	
T	LIN JOHN C ET AL: "Appetite enhancement and weight gain by peripheral administration of TrkB agonists in non-human primates." PLOS ONE 2008, vol. 3, no. 4, 2008, page e1900, XP002487900 ISSN: 1932-6203 page 1, right-hand column, paragraph 2 - page 3, right-hand column, paragraph 2; figure 14 -----	
A	WO 96/01837 A (PHILADELPHIA CHILDREN HOSPITAL [US]) 25 January 1996 (1996-01-25) -----	
A	R&D SYSTEMS ET AL: "Monoclonal Anti-mouse TrkB Antibody, Catalog Number: MAB1494" UNCEMENT R&D SYSTEMS, XX, XX, no. MAB1494, 21 December 2004 (2004-12-21), XP002411650 -----	
A	R&D SYSTEMS ET AL: "Monoclonal Anti-human TrkB Antibody, Catalog Number: MAB3971" UNCEMENT R&D SYSTEMS, XX, XX, no. MAB3971, 13 September 2004 (2004-09-13), XP002411651 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2007/083774

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007088476 A	09-08-2007	AR 059304 A1 NL 2000464 C2 NL 2000464 A1 UY 30128 A1	26-03-2008 11-09-2007 03-08-2007 28-09-2007
WO 2007088479 A	09-08-2007	NONE	
WO 2006133164 A	14-12-2006	AR 053401 A1 AU 2006255101 A1 CA 2610771 A1 EP 1891114 A2 KR 20080032070 A	02-05-2007 14-12-2006 14-12-2006 27-02-2008 14-04-2008
WO 9601837 A	25-01-1996	AU 2913395 A US 5601820 A	09-02-1996 11-02-1997

87

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference see form PCT/ISA/220	FOR FURTHER ACTION See paragraph 2 below
---	--

International application No. PCT/US2007/083774	International filing date (day/month/year) 06.11.2007	Priority date (day/month/year) 09.11.2006
--	--	--

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07K16/28 A61K39/395 A61P3/10

Applicant
IRM LLC

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☒ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☒ Box No. VI Certain documents cited
- ☒ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:  European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016	Date of completion of this opinion see form PCT/ISA/210	Authorized Officer Siaterli, Maria Telephone No. +31 70 340-8922
---	--	--

80

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2007/083774

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☒ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in electronic form.
 - ☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
4. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2007/083774

Box No. II Priority

1. ☐ The validity of the priority claim has not been considered because the International Searching Authority does not have in its possession a copy of the earlier application whose priority has been claimed or, where required, a translation of that earlier application. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date (Rules 43bis.1 and 64.1) is the claimed priority date.
2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43bis.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.
3. Additional observations, if necessary:

see separate sheet

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>6-9,12-14,16-25</u>
	No: Claims	<u>1-5,10-11,15</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>9,14</u>
	No: Claims	<u>1-8,10-13, 15-25</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-25</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43bis.1 and 70.10)
and / or
2. Non-written disclosures (Rules 43bis.1 and 70.9)

see form 210

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2007/083774

Box No. VII Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

see separate sheet

Re Item II Priority

The agonistic anti TrkB antibodies A10 & C20 were disclosed in the priority document. Thus, the priority is validly claimed and documents D5-D7 are not relevant to assess whether the claimed subject-matter satisfies the criteria of Art. 33 PCT.

Re Item V Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1 REMARKS

1.1 Claims 18-25 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 39.1(iv) / 67.1(iv) PCT. The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment.

1.2 Reference is made to the following documents:

D1: Qian et al: "Novel agonist monoclonal antibodies activate TrkB receptors and demonstrate potent neurotrophic Activities" Journal of Neuroscience, vol. 26, no. 37, 2006-09-01, pages 9349-9403, XP009076184.

D2: Hanyu et al: "Brain-derived neurotrophic factor modulates glucagon secretion from pancreatic alpha cells: its contribution to glucose metabolism." Diabetes, Obesity & Metabolism, vol. 5, no. 1, 2003-01, pages 27-37, XP002487874.

D3: Tonra et al: "Brain-derived neurotrophic factor improves blood glucose control and alleviates fasting hyperglycemia in C57BLKS-Leprdb/leprdb mice" Diabetes, vol. 48, no. 3, 1999-03-01, pages 588-594, XP002210327.

D4: Ono et al: "Brain-derived neurotrophic factor reduces blood glucose level in obese diabetic mice but not in normal mice" Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 238, no. 2, 1997-01-01, pages 633-637, XP002933247.

2 NOVELTY

2.1 Document D1 describes agonistic anti TrkB monoclonal antibodies (results). The antibodies don't bind to TrkA or TrkC (§ bridging pages 9398-9399). Some were binding to LBD (page 9398, left-hand column, § 2). Thus, it anticipates the subject matter of claims 1-5, 10-11, 15 Article 33(2) PCT.

2.2 None of the available prior art discloses antibodies C20 and A10 neither the use of agonistic TrkB antibodies to reduce blood glucose levels and/or body weight. Thus, claims 6-9, 12-14, 16-25 are novel (Article 33(2) PCT).

3 INVENTIVE STEP

- 3.1 The document D2 disclosing the use of Brain derived neurotrophic factor (BDNF), a TrkB ligand in daily subcutaneous injections at 10mg/kg (page 30, left-hand column, § 1) to decrease fasting plasma glucose and to decrease food intake (page 33, right-hand column, § 2) is considered to the closest prior art.
- 3.2 The subject-matter of the claims differs from the disclosure of D2 in that anti TrkB agonistic antibodies are used instead of BDNF.
- 3.3 The problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as the provision of alternative methods to reduce blood glucose level and/or body weight.
- 3.4 The solution proposed in the present application cannot be considered as involving an inventive step (Article 33(3) PCT) for the following reasons:
- 3.5 Document D3 describes the use of Brain derived neurotrophic factor (BDNF), a TrkB ligand in daily subcutaneous injections to decrease fasting plasma glucose and to decrease food intake in a type II diabetic animal model (table 1).
- 3.6 Document D4 describes the use of Brain derived neurotrophic factor (BDNF), a TrkB ligand in daily subcutaneous injections to decrease fasting plasma glucose and to decrease food intake in a type II diabetic animal model. The administration of NT-3, another TrkB ligand has a similar effect to BDNF (figure 4A).
- 3.7 In the light of the disclosure of documents D2-D4, each one independently and aware of the agonistic anti TrkB antibodies of D1, the skilled person would consider to use alternative agonists of TrkB, namely anti TrkB agonistic antibodies without exerting inventive skills. Thus, claims 6, 16-24 are not inventive (Article 33(3) PCT).
- 3.8 Claims 7-8 & 12-13, 25 relate to antibodies which are structurally only defined by the CDRs. However, an antibody is structurally made of two light and two heavy chains and the combination of the heavy and light chain variable regions confers the antigen-binding specificity. Not only the CDRs, but also residues of the framework and the relative disposition of the CDRs determines the antigen-binding specificity (Article 6 PCT, see § 6-7). Hence, said claims are not solving the problem posed.
- 3.9 The combination of an anti TrkB agonistic antibody with a second agent effective in reducing blood glucose level and/or body weight (claims 20-23) is considered to be arbitrary since no unexpected effect is associated with the combined use.
- 3.10 However, in present application antibodies A10 (claim 14) & C20 (claim 9) are shown to reduce serum glucose concentration and increase body loss. Thus, although the prior art (D2-D4) teaches the use of TrkB agonists to reduce blood glucose level and/or body

weight and anti TrkB agonistic antibodies were known (D1) the skilled person would not arrive to the specific antibodies A10 & C20 without exerting inventive skills. Thus, claims 9 & 14 are inventive in the sense of Article 33(3) PCT.

Re Item VI Certain documents cited

Certain published documents

Application No Patent No	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (valid claim) (day/month/year)
WO2007088476 (D5)	09.08.2007	01.02.2007	02.02.2006
WO2007088479 (D6)	09.08.2007	29.01.2007	02.02.2006
WO2006133164 (D7)	14.12.2006	05.06.2006	06.06.2005

- 4 Although documents D5-D7 do not constitute prior art within the meaning of Rule 64.1(b) PCT, they appear to disclose all the features of claims 1-5, 15, 17-24. They might therefore be taken into consideration in the regional phase before EPO.

Re Item VII Certain defects in the international application

- 5 Claims 1-5, 10-11, do not meet the requirements of Article 6 PCT in that the matter for which protection is sought is not clearly defined. The anti TrkB antibodies are defined in terms of function (agonist, binding/ not binding to.., competing or not with..). These functional statements do not enable the skilled person to determine which technical features are necessary to perform the stated functions.
- 6 The present claims 7, 12, 16 & 25 relate to anti-TrkB antibodies which are structurally only defined by 2 CDRs (CDR 3 of VH and of VL). It is not sufficient to characterise an antibody with one of the CDR sequences since an antibody is structurally made of two light and two heavy chains and it needs at least 6 CDRs to confer antigen binding specificity. Unless the contrary is shown it is considered that 2 CDR's are neither equivalent to an antibody, nor sufficient to define the specificity of an antibody. Thus, claims 7, 12, 16 & 25 do not meet the requirement following from Art. 6 PCT taken in combination with Rule 6.3(b) PCT that the claims must contain all the technical features essential to the definition of the invention.
- 7 Claims 8 & 13 relate antibodies which are structurally only defined by the CDRs. However, an antibody is structurally made of two light and two heavy chains and the combination of the heavy and light chain variable regions confers the antigen-binding specificity. Not only the CDRs, but also residues of the framework and the relative disposition of the CDRs determines the antigen-binding specificity. Furthermore, the framework also influences the stability of the antibody. In general, simply combining the CDR sequences from one antibody with the framework sequence of a second one is not

sufficient to retain antigen recognition. Thus, to define an antibody the full sequence of the heavy and light chain variable regions should be specified. Hence, claims 8 & 13 do not meet the requirements of Article 6 PCT.



No. 09-047482- -00000-0000

Fecha: 2009-05-11 16:45:32 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 95



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MÍNIMOS PARA ADMISIÓN A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD

☐

- ◇ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◇ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◇ Descripción de la invención ☒
- ◇ Dibujos de ser estos pertinentes ☐
- ◇ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL

☐

- ◇ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◇ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◇ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◇ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO

☐

- ◇ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◇ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◇ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◇ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Claudia M Neiva Cortes
Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5,7y10'
Conmutador: 3 82 0840
Fax: 3505220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá D.C. - Colombia