

ANTICUERPOS ANTI-TRKB

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] En general, la presente invención se refiere a anticuerpos agonistas anti-TrkB para uso diagnóstico y terapéutico y, en particular, a anticuerpos agonistas anti-TrkB humanizados. Más específicamente, se divulgan anticuerpos agonistas anti-TrkB y métodos de uso para el tratamiento de varias enfermedades o trastornos. También se divulgan composiciones y kits farmacéuticos que comprenden el anticuerpo agonista anti-TrkB.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] El receptor tropomiosina quinasa B (TrkB), también conocido como receptor tirosina quinasa B, o receptor de los factores de crecimiento BDNF/NT-3 o receptor tirosina quinasa neurotrófica tipo 2, es una proteína que en los seres humanos se codifica mediante el gen NTRK2 (Genbank ID: 4915). TrkB es un receptor del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF).

[0003] El receptor tirosina quinasa B (TrkB; símbolo del gen: NTRK2) es expresado por neuronas retinianas y células gliales. En la retina normal, la señalización de TrkB contrarresta el estrés celular y promueve la supervivencia celular. En el ojo enfermo, tal como en retinopatía diabética o atrofia geográfica, se producen la pérdida y las deficiencias funcionales de las neuronas y las células gliales retinianas, que producen deficiencias visuales y pérdida de la vista. La activación de la señalización de TrkB por encima del nivel basal (que es reducido en la retinopatía diabética) puede contrarrestar la pérdida y las deficiencias funcionales de las neuronas y células gliales, y así mejorar la función visual. Asimismo, la activación de TrkB tiene el potencial para regenerar conexiones sinápticas perdidas en el ojo enfermo, lo que promueve la recuperación de la vista. Después de la fijación al ligando, TrkB se somete a homodimerización y luego a autofosforilación. Según los sitios de fosforilación (Y516, Y702, Y706, Y707 o Y817), se activan diferentes vías de transducción de señal, que incluyen la actividad de PLC γ 1 o diferentes subformas de AKT y ERK que regulan diferentes cascadas de señalización superpuestas que inducen el brote de axones/neuritas, lo que aumenta la plasticidad sináptica o aumenta la supervivencia celular.

[0004] Los anticuerpos agonistas anti-TrkB se describieron en US20100196390 y US20100150914, al igual que su uso propuesto en el tratamiento de, por ejemplo, síndrome de Charcot-Marie-Tooth o diabetes.

[0005] Sin embargo, aún existe una necesidad significativa de nuevos anticuerpos agonistas anti-TrkB potentes que se pueden usar para activar la vía de TrkB y así permitir su uso en intervenciones terapéuticas de, por ejemplo, trastornos neurodegenerativos y psiquiátricos.

SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN

[0006] La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales que se fijan específicamente a TrkB humana. En un aspecto, los anticuerpos de la presente invención tienen actividad agonista e inducen la fosforilación y/o la activación de TrkB. En otro aspecto, los anticuerpos de la presente invención son útiles, por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades oculares o retinianas, tales como atrofia geográfica secundaria a la degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía diabética, glaucoma y/o edema macular diabético.

[0007] En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-TrkB, en particular, un anticuerpo anti-TrkB humanizado, que tiene una o más de las propiedades descritas en la presente más adelante.

[0008] En otro aspecto, un anticuerpo anti-TrkB de la presente invención se fija con afinidad alta a TrkB humana. En una forma de realización relacionada con este aspecto, un anticuerpo anti-TrkB de la presente invención se fija a TrkB humana a una $K_D < 10$ nM. En otra forma de realización, un anticuerpo anti-TrkB de la presente invención se fija a TrkB humana a una $K_D < 5$ nM.

[0009] En otro aspecto, un anticuerpo anti-TrkB de la presente invención activa TrkB con alta potencia. En una forma de realización relacionada con este aspecto, un anticuerpo anti-TrkB de la presente invención activa TrkB humana con una $EC_{50} < 100$ pM. En otra forma de realización, un anticuerpo anti-TrkB de la presente invención activa TrkB humana con una $EC_{50} < 50$ pm.

[0010] En otro aspecto, el anticuerpo anti-TrkB de la presente invención es más potente para inducir la activación de vías de señalización corriente abajo de TrkB que el ligando de TrkB natural, BDNF. En otro aspecto, un anticuerpo anti-TrkB de la presente invención regula la expresión génica a través de vías de señalización mediadas por TrkB en un patrón comparable con el de BDNF.

[0011] En otro aspecto, un anticuerpo anti-TrkB de la presente invención se fija a un epítipo novedoso en el dominio extracelular de TrkB humana. En otro aspecto, un anticuerpo anti-TrkB de la presente invención no reacciona de manera cruzada con TrkB de otras especies, en particular, no reacciona de manera cruzada con TrkB de roedores.

[0012] En un aspecto, un anticuerpo anti-TrkB de la presente invención se puede formular a concentraciones altas para inyecciones intravítreas en el ojo.

[0013] En otro aspecto, un anticuerpo anti-TrkB de la presente invención tiene bajo riesgo de inmunogenicidad según se midió mediante el método descrito en el Ejemplo 5.

[0014] En otro aspecto, las secuencias de CDR de un anticuerpo anti-TrkB de la presente invención tienen pocas características no deseadas de secuencia según se determinó mediante el método descrito en el Ejemplo 4.

[0015] Aun en otro aspecto, un anticuerpo anti-TrkB de la presente invención no reduce la fosforilación de ERK inducida por BDNF.

[0016] En otro aspecto, un anticuerpo anti-TrkB de la presente invención es específico para la fosforilación y/o activación de TrkB y no fosforila/activa de manera inespecífica TrkA o TrkC. En otro aspecto, un anticuerpo anti-TrkB no se fija de manera inespecífica a VEGF humano.

[0017] Otros aspectos abarcan moléculas de polinucleótidos que codifican anticuerpos de la presente invención, vectores de expresión y vectores virales, así como células huésped que comprenden esas moléculas de polinucleótidos y métodos para obtener los anticuerpos de la presente invención. La presente invención también proporciona usos terapéuticos para los anticuerpos de la presente invención, en particular para enfermedades retinianas/oculares.

[0018] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que comprende:

una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48 (L-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49 (L-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50 (L-CDR3); y

una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 (H-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52 (H-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 (H-CDR3), o

una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55 (H-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56 (H-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57 (H-CDR3), o

una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58 (H-CDR1); la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59 (H-CDR2); y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60 (H-CDR3).

[0019] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo

anti-TrkB, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que comprende:

una cadena liviana variable y una cadena pesada variable que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 12, respectivamente,

una cadena liviana variable y una cadena pesada variable que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 13, respectivamente,

una cadena liviana variable y una cadena pesada variable que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 14, respectivamente,

una cadena liviana variable y una cadena pesada variable que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 15, respectivamente,

una cadena liviana variable y una cadena pesada variable que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 16, respectivamente,

una cadena liviana variable y una cadena pesada variable que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 17, respectivamente,

una cadena liviana variable y una cadena pesada variable que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 18, respectivamente,

una cadena liviana variable y una cadena pesada variable que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 19, respectivamente, o

una cadena liviana variable y una cadena pesada variable que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 20, respectivamente,

[0020] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que comprende:

una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 o 23,

una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 o 26,

una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 o 29,

una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 o 32,

una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID

NO: 34 o 35,

una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 o 38,

una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 o 41,

una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43 o 44, o

una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46 o 47.

[0021] En una forma de realización de particular preferencia, el anticuerpo anti-TrkB es un anticuerpo anti-TrkB humanizado.

[0022] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento de fijación al antígeno de este, para usar en la medicina.

[0023] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento de fijación al antígeno de este, para usar en el tratamiento de enfermedades retinianas u oculares.

[0024] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento de fijación al antígeno de este, para usar en el tratamiento de enfermedades retinianas u oculares neurales/neuronales.

[0025] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento de fijación al antígeno de este, para usar en el tratamiento de atrofia geográfica.

[0026] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento de fijación al antígeno de este, para usar en el tratamiento de degeneración macular relacionada con la edad o retinopatía diabética.

[0027] En una forma de realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una molécula de anticuerpo anti-TrkB, o fragmento de fijación al antígeno de este, y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

[0028] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento de fijación al antígeno de este, o una composición

farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento de fijación al antígeno de este, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, se administran por una vía de administración parenteral, intravenosa, intravítrea o subcutánea.

[0029] En una forma de realización, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado o polinucleótidos que comprenden una secuencia que codifica una cadena liviana o región variable de la cadena liviana de un anticuerpo, o un fragmento de fijación al antígeno de este, y una cadena pesada o región variable de la cadena pesada de un anticuerpo, o un fragmento de fijación al antígeno de este.

[0030] En una forma de realización, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende un polinucleótido aislado o polinucleótidos que codifican una cadena liviana o región variable de la cadena liviana de un anticuerpo, o un fragmento de fijación al antígeno de este, y una cadena pesada o región variable de la cadena pesada de un anticuerpo, o un fragmento de fijación al antígeno de este.

[0031] En una forma de realización, la presente invención proporciona un vector viral que comprende un polinucleótido aislado o polinucleótidos que codifican una cadena liviana o región variable de la cadena liviana de un anticuerpo, o un fragmento de fijación al antígeno de este, y una cadena pesada o región variable de la cadena pesada de un anticuerpo, o un fragmento de fijación al antígeno de este.

[0032] En una forma de realización, la presente invención proporciona una célula huésped que comprende un vector de expresión o un polinucleótido aislado o polinucleótidos que codifican una cadena liviana o región variable de la cadena liviana de un anticuerpo, o un fragmento de fijación al antígeno de este, y una cadena pesada o región variable de la cadena pesada de un anticuerpo, o un fragmento de fijación al antígeno de este.

[0033] En una forma de realización, la presente invención proporciona un método para producir un anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que comprende:

obtener una célula huésped que comprende un vector de expresión o un polinucleótido aislado o polinucleótidos que codifican una cadena liviana o región variable de la cadena liviana de un anticuerpo, o un fragmento de fijación al antígeno de este, y una cadena pesada o región variable de la cadena pesada de un anticuerpo, o un fragmento de fijación al antígeno de este; y cultivar la célula huésped.

[0034] En una forma de realización, el método para producir un anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento de fijación al antígeno de este, también comprende recuperar y purificar

el anticuerpo anti-TrkB, o el fragmento de fijación al antígeno de este.

[0035] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que se fija a al menos un residuo de aminoácidos en las regiones de aminoácidos 92-112, 130-143 y/o 205-219 del dominio extracelular de TrkB humana con SEQ ID NO: 54.

[0036] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que se fija a al menos un residuo de aminoácidos en las regiones las regiones de aminoácidos 92-112 y 130-143; o 92-112 y 205-219; o 130-143 y 205-219; o 92-112 y 130-143 y 205-219 del dominio extracelular de TrkB humana con SEQ ID NO: 54.

[0037] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que se fija a al menos un residuo de aminoácidos dentro de cualquiera de las combinaciones mencionadas anteriormente, y además, a al menos un residuo de aminoácidos en las regiones de aminoácidos 313-330 y/o 348-367 del dominio extracelular de TrkB humana con SEQ ID NO: 54.

[0038] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que se fija a al menos un residuo de aminoácidos en las regiones de aminoácidos 92-112, 130-143, 205-219, 313-330 y 348-367 del dominio extracelular de TrkB humana con SEQ ID NO: 54.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0039] FIGURA 1: Mapeo de epítomos de BDNF, anticuerpo 277, anticuerpos C2 o C20 al dominio extracelular de TrkB humana.

[0040] FIGURA 2: Datos de expresión de qPCR (eje y) para genes regulados (eje x) con respecto a la plasticidad sináptica en células SH-SY5Y después del tratamiento con BDNF, IgG1 de control (anti-2,4,6-trinitrofenilo, anti-TNP) o anticuerpo D003.

[0041] FIGURA 3: Representación de la concentración del anticuerpo 277 en compartimentos oculares como se indica y en plasma después de la inyección intravítrea (ivt) de 1 mg de anticuerpo 277 en los ojos de conejos en función del tiempo.

[0042] FIGURA 4: PK ocular calculada de anticuerpos IgG1. El eje Y muestra la concentración vítrea, y el eje X muestra los días después de la aplicación intravítrea. El tiempo después de la inyección intravítrea necesario para alcanzar la concentración vítrea equivalente a EC₅₀ se indica mediante flechas.

[0043] FIGURA 5: Resumen del estudio que incluye grupos de animales y

transcurso del tiempo. La semana 5, se realizó una evaluación de ERG inicial (antes de la aplicación intravítrea) a fin de evaluar el alcance de la disfunción neuronal en la retina inducida por hiperglucemia. El grupo 1 y el grupo 2 recibieron inyecciones intravítreas de un anticuerpo de control IgG1 anti-2,4,6-trinitrofenilo (anti-TNP) que no produjo ningún efecto en la función retiniana. Los ojos del grupo 3 se trataron con C2 (un anticuerpo indirecto agonista anti-TrkB). La función retiniana se volvió a evaluar la semana 7 (después de la inyección intravítrea).

[0044] FIGURA 6: Los cambios en los tiempos implícitos de onda b de bastones con respecto a la media de tiempo implícito del grupo de control, en el inicio (antes de la aplicación intravítrea) y una semana después de la aplicación intravítrea (véase la Figura 5 para un resumen del estudio). El grupo 1 de control no diabético (negro, n=23 ojos investigados) y el grupo 2 hiperglucémico (punteado, n=21 ojos investigados) recibieron inyecciones intravítreas con una IgG1 de control. El grupo 3 recibió tratamiento intravítreo con C2 (n=24 ojos investigados). Los datos se presentan como media + SEM. ns, no significativo; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; las diferencias antes de la aplicación intravítrea entre los grupos 2 y 3 hiperglucémicos y el grupo 1 de control son significativas (se omiten las estadísticas para mayor claridad; ANOVA de un factor con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey).

[0045] FIGURA 7: Sensibilidad a la luz, S , de ondas b de bastones, normalizada a la sensibilidad media a la luz del grupo de control, $S_{control}$, en el inicio (antes de la aplicación intravítrea) o una semana después de la aplicación intravítrea (véase la Figura 5 para un resumen del estudio). El grupo 1 de control no diabético (negro, n=23 ojos investigados) y el grupo 2 hiperglucémico (punteado, n=20 ojos investigados) recibieron inyecciones intravítreas con una IgG1 de control. El grupo 3 recibió tratamiento intravítreo con C2 (n=24 ojos investigados). Los datos se presentan como media + SEM. ns, no significativo; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; las diferencias antes de la aplicación intravítrea entre los grupos 2 y 3 hiperglucémicos y el grupo 1 de control son significativas (se omiten las estadísticas para mayor claridad; ANOVA de un factor con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey).

[0046] FIGURA 8: Respuestas de onda A de bastones producidas por un destello de luz de $0,1 \text{ cd} \cdot \text{s/m}^2$, R , normalizadas a la respuesta media de los controles, en el inicio (antes de la aplicación intravítrea) o una semana después de la aplicación intravítrea (véase la Figura 5 para un resumen del estudio). El grupo 1 de control no diabético (negro, n=23 ojos investigados) y el grupo 2 hiperglucémico (punteado, n=20 ojos investigados) recibieron inyecciones intravítreas con una IgG1 de control. El grupo

3 recibió tratamiento intravítreo con C2 (n=24 ojos investigados). Los datos se presentan como media + SEM. ns, no significativo; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; las diferencias antes de la aplicación intravítrea entre los grupos 2 y 3 hiperglucémicos y el grupo 1 de control son significativas (se omiten las estadísticas para mayor claridad; ANOVA de un factor con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey).

[0047] FIGURA 9: Cambios en tiempos implícitos de onda b de conos UV con respecto a la media de tiempo implícito del grupo de control, en el inicio (antes de la aplicación intravítrea) y una semana después de la aplicación intravítrea (véase la Figura 5 para un resumen del estudio). El grupo 1 de control no diabético (negro, n=24 ojos investigados) y el grupo 2 hiperglucémico (punteado, n=22 ojos investigados) recibieron inyecciones intravítreas con una IgG1 de control. El grupo 3 recibió tratamiento intravítreo con C2 (n=24 ojos investigados). Los datos se presentan como media + SEM. ns, no significativo; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; las diferencias antes de la aplicación intravítrea entre los grupos 2 y 3 hiperglucémicos y el grupo 1 de control son significativas (se omiten las estadísticas para mayor claridad; ANOVA de un factor con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey).

[0048] FIGURA 10: Cambios en tiempos implícitos de onda b de conos M con respecto a la media de tiempo implícito del grupo de control, en el inicio (antes de la aplicación intravítrea) y una semana después de la aplicación intravítrea (véase la Figura 5 para un resumen del estudio). El grupo 1 de control no diabético (negro, n=24 ojos investigados) y el grupo 2 hiperglucémico (punteado, n=22 ojos investigados) recibieron inyecciones intravítreas con una IgG1 de control. El grupo 3 recibió tratamiento intravítreo con C2 (n=24 ojos investigados). Los datos se presentan como media + SEM. ns, no significativo; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; las diferencias antes de la aplicación intravítrea entre los grupos 2 y 3 hiperglucémicos y el grupo 1 de control son significativas (se omiten las estadísticas para mayor claridad; ANOVA de un factor con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey).

[0049] FIGURA 11: Sensibilidad a la luz, S , de ondas b de conos UV, normalizada a la sensibilidad media a la luz de los grupos de control, $S_{control}$, en el inicio (antes de la aplicación intravítrea) o una semana después de la aplicación intravítrea (véase la Figura 5 para un resumen del estudio). El grupo 1 de control no diabético (negro, n=22 ojos investigados) y el grupo 2 hiperglucémico (punteado, n=22 ojos investigados) recibieron inyecciones intravítreas con una IgG1 de control. El grupo 3 recibió tratamiento intravítreo con C2 (n=21 ojos investigados). Los datos se presentan como media + SEM. ns, no significativo; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; las diferencias

antes de la aplicación intravítrea entre los grupos 2 y 3 hiperglucémicos y el grupo 1 de control son significativas (se omiten las estadísticas para mayor claridad; ANOVA de un factor con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey).

[0050] FIGURA 12: Amplitudes de respuesta de saturación, R_{max} , de ondas b de conos M normalizadas a la media de amplitud de respuesta de saturación de controles, $R_{max, control}$, en el inicio (antes de la aplicación intravítrea) o una semana después de la aplicación intravítrea (véase la Figura 5 para un resumen del estudio). El grupo 1 de control no diabético (negro, n=24 ojos investigados) y el grupo 2 hiperglucémico (punteado, n=22 ojos investigados) recibieron inyecciones intravítreas con una IgG1 de control. El grupo 3 recibió tratamiento intravítreo con C2 (n=24 ojos investigados). Los datos se presentan como media + SEM. ns, no significativo; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; las diferencias antes de la aplicación intravítrea entre los grupos 2 y 3 hiperglucémicos y el grupo 1 de control son significativas (se omiten las estadísticas para mayor claridad; ANOVA de un factor con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey).

[0051] FIGURA 13: La fosforilación de ERK en células CHO que expresan el receptor de TrkB humana después de la estimulación con (A) BDNF, anticuerpo 277, o una combinación de 1 nM de BDNF con concentraciones en aumento de anticuerpo 277 o (B) BDNF, anticuerpo C2, o una combinación de 1 nM de BDNF con concentraciones en aumento de anticuerpo C2. Los datos (símbolos) se expresan como media $\pm$ SEM (para algunos puntos, las barras de error son más cortas que la altura del símbolo); las líneas conectoras muestran la regresión no lineal (log(agonista) en comparación con la respuesta (tres parámetros)). Se muestra un experimento representativo de una serie de tres con lotes de células independientes; n.s., diferencia no significativa entre 1 nM de BDNF solo y 1 nM de BDNF con las concentraciones indicadas de anticuerpo 277. # $p < 0,001$ 1 nM de BDNF solo en comparación con 1 nM de BDNF con las concentraciones indicadas de anticuerpo C2; ANOVA de un factor con prueba de comparaciones múltiples.

[0052] FIGURA 14: Fijación del anticuerpo 277 o anticuerpo C2 a VEGF humano o de rata en un ensayo ELISA *in vitro*. Los datos (símbolos) se expresan como media $\pm$ SEM (nota: las barras de error son más cortas que la altura del símbolo); las líneas conectoras muestran la regresión no lineal (log(agonista) en comparación con la respuesta (tres parámetros)). Se muestra un experimento representativo de una serie de cinco experimentos diferentes. # $p < 0,01$ hVEGF-C2 en comparación con hVEGF-isotipo IgG1 en las concentraciones indicadas (prueba t desapareada).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0053] Definiciones

[0054] La estructura generalizada de anticuerpos o inmunoglobulina es conocida por las personas del oficio de nivel medio, estas moléculas son glucoproteínas heterotetraméricas, en general de alrededor de 150.000 daltons, compuestas por dos cadenas livianas (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena liviana se liga de manera covalente a una cadena pesada mediante un puente disulfuro para formar un heterodímero, y la molécula heterotrimérica se forma mediante un enlace de disulfuro covalente entre las dos cadenas pesadas idénticas de los heterodímeros. Si bien las cadenas livianas y pesadas se ligan mediante un puente disulfuro, la cantidad de enlaces de disulfuro entre las dos cadenas pesadas varía según el isotipo de la inmunoglobulina. Cada cadena pesada y liviana también tiene puentes disulfuro intracatenarios separados regularmente. Cada cadena pesada tiene en el terminal amino un dominio variable (V_H = cadena pesada variable), seguido por 3 o 4 dominios constantes (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} y C_{H4}), así como una región bisagra entre C_{H1} y C_{H2} . Cada cadena liviana tiene 2 dominios, un dominio variable del terminal amino (V_L = cadena liviana variable) y un dominio constante del terminal carboxi (C_L). El dominio V_L se asocia de manera no covalente con el dominio V_H , mientras que el dominio C_L , habitualmente, se liga de manera covalente al dominio C_{H1} mediante un puente disulfuro. Se cree que los residuos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de la cadena liviana y la cadena pesada (Chothia et al., 1985, J. Mol. Biol. 186:651-663.)

[0055] Ciertos dominios en los dominios variables difieren en gran medida entre los diferentes anticuerpos, es decir, son "hipervariables". Estos dominios hipervariables contienen residuos que están directamente involucrados en la fijación y especificidad de cada anticuerpo particular con su determinante antigénico específico. La hipervariabilidad, en los dominios variables de la cadena liviana y de la cadena pesada, se concentra en tres segmentos conocidos como regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o bucles hipervariables (HVL). Las CDR se definen mediante comparación de secuencias en Kabat et al., 1991, en: Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., mientras que los HVL se definen estructuralmente de acuerdo con la estructura tridimensional del dominio variable, como lo describen Chothia y Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196: 901-917. Cuando estos dos métodos dan como resultado identificaciones levemente diferentes de una CDR, se prefiere la definición estructural.

Como lo define Kabat, CDR-L1 se ubica aproximadamente en los residuos 24-34, CDR-L2 aproximadamente en los residuos 50-56 y CDR-L3 aproximadamente en los residuos 89-97 en el dominio variable de la cadena liviana; CDR-H1 se ubica aproximadamente en los residuos 31-35, CDR-H2 aproximadamente en los residuos 50-65 y CDR-H3 aproximadamente en los residuos 95-102 en el dominio variable de la cadena pesada. Por lo tanto, las CDR1, CDR2, CDR3 de las cadenas pesadas y livianas definen las propiedades únicas y funcionales específicas para un anticuerpo determinado.

[0056] Las tres CDR en cada una de las cadenas pesadas y livianas están separadas por las regiones marco (FR), que contienen secuencias que tienden a ser menos variables. Desde el terminal amino hasta el terminal carboxi de los dominios variables de las cadenas pesada y liviana, las FR y CDR están dispuestas en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La configuración de lámina β de las FR acerca las CDR entre sí dentro de cada una de las cadenas y también las acerca a las CDR de la otra cadena. La conformación resultante contribuye con el sitio de fijación al antígeno (véase Kabat et al., 1991, NIH Publ. N.º 91-3242, vol. I, páginas 647-669), aunque no necesariamente todos los residuos de CDR participan de manera directa en la fijación al antígeno.

[0057] Los residuos de FR y los dominios constantes de Ig no participan directamente en la fijación al antígeno, pero contribuyen a la fijación al antígeno y/o intervienen en la función efectora del anticuerpo. Se cree que algunos residuos de FR tienen un efecto significativo en la fijación al antígeno en al menos tres maneras: mediante la fijación no covalente directamente a un epítipo, mediante la interacción con uno o más residuos de CDR, y mediante la afectación de la interfaz entre las cadenas pesadas y livianas. Los dominios constantes no participan directamente en la fijación al antígeno, pero median varias funciones efectoras de la Ig, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC), la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y la fagocitosis celular dependiente del anticuerpo (ADCP).

[0058] Las cadenas livianas de las inmunoglobulinas de los vertebrados se asignan a una de dos clases que se diferencian claramente, kappa (κ) y lambda (λ), de acuerdo con la secuencia de aminoácidos del dominio constante. En términos comparativos, las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas de los mamíferos se asignan a una de cinco clases principales, de acuerdo con la secuencia de los dominios constantes: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. A su vez, IgG e IgA se dividen en subclases (isotipos), por

ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂, respectivamente. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ ψ μ , respectivamente. Se conocen las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las clases de inmunoglobulinas nativas.

[0059] Las expresiones “anticuerpo”, “anticuerpo anti-TrkB”, “anticuerpo anti-TrkB humanizado” y “variante del anticuerpo anti-TrkB humanizado” se usan en la presente en el sentido más amplio y abarcan específicamente anticuerpos monoclonales (que incluyen anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos multiespecíficos, (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos con leves modificaciones, tales como truncamientos del terminal N o C, y fragmentos de anticuerpo, tales como dominios variables y otras porciones de anticuerpos que exhiben una actividad biológica deseada, por ejemplo, fijación a TrkB.

[0060] La expresión “anticuerpo monoclonal” (mAb) se refiere a un anticuerpo de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos; es decir, los anticuerpos individuales en la población son idénticos, excepto por las posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos y se dirigen contra un solo sitio determinante antigénico, un “epítipo”. Por lo tanto, el modificador “monoclonal” indica una población sustancialmente homogénea de anticuerpos que se dirigen al epítipo idéntico y no debe interpretarse en el sentido de que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún método particular. Cabe destacar que los anticuerpos monoclonales se pueden fabricar mediante cualquier técnica o metodología conocidas en el estado de la técnica; que incluye, por ejemplo, el método de hibridoma (Kohler et al., 1975, Nature 256:495) o métodos de ADN recombinante conocidos en el estado de la técnica (véase, por ejemplo, patente estadounidense N.º 4.816.567), o métodos de aislamiento de anticuerpos monoclonales producidos de manera recombinante usando colecciones de anticuerpos de fago, mediante las técnicas descritas en Clackson et al., 1991, Nature 352: 624-628 y Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222: 581-597.

[0061] Los anticuerpos quiméricos consisten en las regiones variables de las cadenas pesadas y livianas de un anticuerpo de una especie (por ejemplo, un mamífero no humano, tal como un ratón), en y las regiones constantes de las cadenas pesadas y livianas de un anticuerpo de otra especie (por ejemplo, un ser humano), y se pueden obtener mediante la unión de las secuencias de ADN que codifican las regiones variables del anticuerpo de la primera especie (por ejemplo, un ratón) con las

secuencias de ADN de las regiones constantes del anticuerpo de la segunda especie (por ejemplo, un ser humano), y la transformación de un huésped con un vector de expresión que contiene las secuencias unidas para que pueda producir un anticuerpo quimérico. De manera alternativa, el anticuerpo quimérico también podría ser aquel en donde una o más regiones o dominios de la cadena pesada y/o cadena liviana son idénticas, homólogas o una variante de la secuencia correspondiente en un anticuerpo monoclonal de otra clase o isotipo de inmunoglobulina, o de una secuencia de consenso o línea germinal. Los anticuerpos quiméricos pueden incluir fragmentos de esos anticuerpos, siempre que el fragmento de anticuerpo exhiba la actividad biológica deseada de su anticuerpo de origen, por ejemplo, la fijación al mismo epítipo (véase, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 4.816.567; y Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855).

[0062] Las expresiones “fragmento de anticuerpo”, “fragmento de fijación al antígeno”, “fragmento de anticuerpo anti-TrkB”, “fragmento de anticuerpo anti-TrkB humanizado”, “variante del fragmento de anticuerpo anti-TrkB humanizado” se refieren a una porción de un anticuerpo anti-TrkB de longitud completa, en donde se retiene una región variable o una capacidad funcional, por ejemplo, la fijación a un epítipo de TrkB específica. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, entre otros, un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, scFv y scFv-Fc, un diacuerpo, un anticuerpo lineal, un anticuerpo monocatenario, un minicuerpo, un diacuerpo formado de fragmentos de anticuerpos y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpos.

[0063] Los anticuerpos de longitud completa se pueden tratar con enzimas, tales como papaína o pepsina, para generar fragmentos de anticuerpos útiles. La digestión de papaína se usa para producir dos fragmentos de anticuerpos de fijación al antígeno idénticos, denominados fragmentos “Fab”, cada uno con un solo sitio de fijación al antígeno y un fragmento “Fc” residual. El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena liviana y el dominio C_{H1} de la cadena pesada. El tratamiento de pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de fijación al antígeno e incluso es capaz de generar reticulación con el antígeno.

[0064] Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la presencia de residuos adicionales que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo en el terminal C del dominio C_{H1}. Los fragmentos de anticuerpos F(ab')₂ son pares de fragmentos Fab' ligados mediante residuos de cisteína en la región bisagra. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de

anticuerpos.

[0065] El fragmento “Fv” contiene un sitio de reconocimiento y fijación al antígeno completo que consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y la cadena liviana con una fuerte asociación no covalente. En esta configuración, las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de fijación al antígeno en la superficie del dímero V_H - V_L . En conjunto, las seis CDR confieren al anticuerpo especificidad de fijación al antígeno.

[0066] Un fragmento de anticuerpo “Fv monocatenario” o “scFv” es una variante de Fv monocatenario que comprende los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, en donde los dominios están presentes en una sola cadena de polipéptidos. El Fv monocatenario es capaz de reconocer el antígeno y fijarse a este. Opcionalmente, el polipéptido scFv también puede contener un ligador polipeptídico ubicado entre los dominios V_H y V_L , a fin de facilitar la formación de una estructura tridimensional deseada para la fijación al antígeno mediante el scFv (véase, por ejemplo, Pluckthun, 1994, en *The Pharmacology of monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315).

[0067] Otros fragmentos de anticuerpos reconocidos incluyen aquellos que comprenden un par de fragmentos Fd en tándem (V_H - C_{H1} - V_H - C_{H1}) para formar un par de regiones de fijación al antígeno. Estos “anticuerpos lineales” pueden ser biespecíficos o monoespecíficos, como se describe, por ejemplo, en Zapata et al. 1995, *Protein Eng.* 8(10):1057-1062.

[0068] Un anticuerpo humanizado o un fragmento de anticuerpo humanizado es un tipo específico de anticuerpo quimérico que incluye una variante de la secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina, o un fragmento de esta, que es capaz de fijarse a un antígeno predeterminado y que comprende una o más FR que tienen sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana y una o más CDR que tienen sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina no humana. Esta secuencia de aminoácidos no humana, a menudo denominada secuencia “importada”, generalmente se toma de un dominio de anticuerpo “importado”, en particular, un dominio variable. En general, un anticuerpo humanizado incluye al menos las CDR o los HVL de un anticuerpo no humano, insertado entre las FR de un dominio variable de la cadena pesada o liviana humano.

[0069] La presente invención describe anticuerpos anti-TrkB humanizados específicos que contienen CDR derivadas de D003 murino inicial insertado entre las FR de dominios variables de la cadena pesada y la cadena liviana de la secuencia de línea

germinal humana. Se debe tener en cuenta que ciertos residuos de FR murinos pueden ser importantes para la función de los anticuerpos humanizados y, por ello, algunos de los residuos de los dominios variables de las cadenas pesada y liviana de la secuencia de línea germinal humana se modifican para que sean iguales a los de la secuencia murina correspondiente.

[0070] En un aspecto, un anticuerpo anti-TrkB humanizado comprende sustancialmente todos o al menos uno, y en general dos, dominios variables (tales como, contenidos, por ejemplo, en los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc y Fv), en donde todas o sustancialmente todas las CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana, y específicamente en la presente, las CDR son secuencias murinas del D003 de partida, y las FR son las de una secuencia de línea germinal o de consenso de inmunoglobulina humana. En otro aspecto, un anticuerpo anti-TrkB humanizado también incluye al menos una porción de una región Fc de inmunoglobulina, en general, de una inmunoglobulina humana. Con frecuencia, el anticuerpo contiene la cadena liviana y al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir una o más de las regiones C_{H1}, bisagra, C_{H2}, C_{H3} y/o C_{H4} de la cadena pesada, según corresponda.

[0071] Un anticuerpo anti-TrkB humanizado se puede seleccionar de cualquier clase de inmunoglobulinas, que incluyen IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, que incluye gG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Por ejemplo, el dominio constante puede ser un dominio constante de fijación al complemento, en donde se desea que el anticuerpo humanizado exhiba actividad citotóxica, y el isotipo es generalmente IgG₁. Cuando no se desea esa actividad citotóxica, el dominio constante puede ser de otro isotipo, por ejemplo, IgG₂. Un anticuerpo anti-TrkB humanizado alternativo puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo de inmunoglobulina, y la selección de dominios constantes particulares para optimizar las funciones efectoras deseadas se encuentra dentro del alcance de una persona del oficio de nivel medio. En formas de realización específicas, la presente invención proporciona anticuerpos que son anticuerpos IgG₁ y, más en particular, son anticuerpos IgG₁ en donde las funciones efectoras están inactivadas.

[0072] No es necesario que las FR, las CDR o los HVL de un anticuerpo anti-TrkB humanizado correspondan exactamente con las secuencias parentales. Por ejemplo, uno o más residuos en la secuencia HVL o CDR importada, en la secuencia de consenso o en la secuencia FR de línea germinal se pueden alterar (por ejemplo, mutagenizar) mediante sustitución, inserción o eliminación, de modo que el residuo de

aminoácido resultante ya no sea idéntico al residuo original en la posición correspondiente en ninguna de las secuencias parentales, pero que sin embargo el anticuerpo retenga la función de fijación a TrkB. En general, esta alteración no es extensiva y tiene alteraciones conservadoras. En general, al menos el 75 % de los residuos de anticuerpos humanizados corresponderán a los de las secuencias de consenso parentales o las secuencias FR de línea germinal y CDR importadas, con mayor frecuencia, al menos el 90 % y, con máxima frecuencia, más del 95%, más del 98% o más del 99%.

[0073] Los residuos de inmunoglobulina que afectan la interfaz entre las regiones variables de la cadena pesada y liviana (“la interfaz V_L - V_H ”) son aquellos que afectan la proximidad u orientación de las dos cadenas entre sí. Determinados residuos que pueden estar involucrados en las interacciones intercatenarias incluyen los residuos V_L 34, 36, 38, 44, 46, 87, 89, 91, 96, y 98, y los residuos V_H 35, 37, 39, 45, 47, 91, 93, 95, 100 y 103 (utilizando el sistema de numeración descrito en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987)). La patente estadounidense N.º 6.407.213 además explica que los residuos, tales como los residuos V_L 43 y 85, y los residuos V_H 43 y 60, también pueden participar en esta interacción. Si bien estos residuos se indican solo para la IgG humana, también se pueden aplicar a otras especies. Los residuos de anticuerpos importantes que se prevé razonablemente que estén involucrados en las interacciones intercatenarias se seleccionan para la sustitución en la secuencia de consenso.

[0074] Las expresiones “secuencia de consenso” y “anticuerpo de consenso” se refieren a una secuencia de aminoácidos que comprende el residuo de aminoácido más frecuente en cada lugar en todas las inmunoglobulinas de cualquier clase, isotipo o estructura de subunidad particulares, por ejemplo, un dominio variable de inmunoglobulina humana. La secuencia de consenso se puede basar en inmunoglobulinas de una especie particular o de varias especies. Una secuencia, estructura o anticuerpo de “consenso” abarca una secuencia de consenso humana, como se describe en ciertas formas de realización, y se refiere a una secuencia de aminoácidos que comprende los residuos de aminoácidos más frecuentes en cada lugar, en todas las inmunoglobulinas humanas de cualquier clase, isotipo o estructura de subunidad particulares. Por ello, la secuencia de consenso contiene una secuencia de aminoácidos que tiene, en cada posición, un aminoácido que está presente en una o más inmunoglobulinas conocidas, pero que puede no duplicar exactamente la secuencia de aminoácidos completa de una inmunoglobulina simple. La secuencia de

consenso de la región variable no se obtiene de ningún anticuerpo o inmunoglobulina producida de manera natural. Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., y sus variantes. Las FR de las secuencias de consenso de las cadenas pesada y liviana, y sus variantes, proporcionan secuencias útiles para la preparación de anticuerpos anti-TrkB humanizados. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.ºs 6.037.454 y 6.054.297.

[0075] Las secuencias de línea germinal humanas se encuentran naturalmente en la población humana. La combinación de esos genes de línea germinal genera diversidad de anticuerpos. Las secuencias de anticuerpos de la línea germinal para la cadena liviana del anticuerpo derivan de genes ν y j kappa o lambda de la línea germinal humanos conservados. De modo similar, las secuencias de la cadena pesada derivan de genes ν , d y j de la línea germinal (LeFranc, M-P y LeFranc, G, "The immunoglobulin Facts Book" Academic Press, 2001).

[0076] Un anticuerpo "aislado" es aquel que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes del entorno natural del anticuerpo son aquellos materiales que pueden interferir en los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden ser enzimas, hormonas u otros solutos proteicos o no proteicos. En un aspecto, el anticuerpo se purifica hasta obtener al menos más del 95% de aislamiento en peso del anticuerpo.

[0077] Un anticuerpo aislado incluye un anticuerpo *in situ* dentro de las células recombinantes en las que se produce, debido a que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Sin embargo, en general, un anticuerpo aislado se puede preparar mediante al menos una etapa de purificación en la que se retira el material celular recombinante.

[0078] La expresión "rendimiento del anticuerpo" se refiere a factores/propiedades que contribuyen al reconocimiento del antígeno por parte del anticuerpo o a la eficacia de un anticuerpo *in vivo*. Los cambios en la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo pueden afectar las propiedades del anticuerpo, como el plegamiento, y pueden influir en los factores físicos, como la velocidad inicial de la fijación del anticuerpo al antígeno (k_a), la constante de disociación del anticuerpo del antígeno (k_d), la constante de afinidad del anticuerpo con el antígeno (K_d), la conformación del anticuerpo, la estabilidad de las proteínas y la semivida del anticuerpo.

[0079] Como se usan en la presente, la expresiones "idéntico" o "porcentaje de identidad", en el contexto de dos o más secuencias de polipéptidos o ácidos nucleicos,

se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y se alinean para lograr una máxima correspondencia. Para determinar el porcentaje de identidad, las secuencias se alinean para lograr una comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir espacios en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos para lograr una alineación óptima con una segunda secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos). Luego se comparan los nucleótidos o residuos de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos o nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia es ocupada por el mismo nucleótido o residuo de aminoácido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función de la cantidad de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad= cant. de posiciones idénticas/cant. total de posiciones (por ejemplo, posiciones superpuestas)x100). En algunas formas de realización, las dos secuencias que se comparan tienen la misma longitud después de que se introducen los espacios dentro de las secuencias, según corresponda (por ejemplo, excluyendo la secuencia adicional que se extiende más allá de las secuencias que se comparan). Por ejemplo, cuando se comparan secuencias de la región variable, no se consideran las secuencias de dominio constante y/o líder. Para las comparaciones de secuencias entre dos secuencias, una CDR “correspondiente” se refiere a una CDR que tiene la misma ubicación en ambas secuencias (por ejemplo, CDR-H1 de cada secuencia).

[0080] El porcentaje de identidad o el porcentaje de similitud entre dos secuencias se pueden determinar mediante el uso de un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitativo preferido de un algoritmo matemático que se usa para comparar dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, modificado en Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. Este algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410. Las búsquedas de nucleótidos con BLAST pueden llevarse a cabo con el programa NBLAST, calificación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a un ácido nucleico que codifica una proteína de interés. Las búsquedas de proteínas con BLAST pueden llevarse a cabo con el programa XBLAST, calificación=50, longitud de palabra=3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una proteína de interés. A fin de obtener alineaciones espaciadas para fines comparativos, se puede

utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul et al., 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402. De manera alternativa, se puede usar PSI-Blast para una búsqueda reiterada que detecta las relaciones distantes entre moléculas (Id.). Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, se pueden usar los parámetros predeterminados de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Otro ejemplo no limitativo preferido de un algoritmo matemático que se usa para comparar secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, CABIOS (1989). Este algoritmo se incorpora en el programa ALIGN (versión 2.0), que es parte del paquete de software de alineación de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar las secuencias de aminoácidos, se pueden usar una tabla de residuos ponderados PAM120, una penalidad por longitud de espacio de 12 y una penalidad por espacio de 4. En el estado de la técnica, se conocen algoritmos adicionales para el análisis de secuencia e incluyen ADVANCE y ADAM, como se describe en Torellis and Robotti, 1994, *Comput. Appl. Biosci.* 10:3-5; y FASTA como se describe en Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-8. En FASTA, ktup es una opción de control que establece la sensibilidad y la velocidad de la búsqueda. Si ktup=2, las regiones similares en las dos secuencias que se comparan se encuentran observando los pares de residuos alineados; si ktup=1, se examinan los aminoácidos alineados simples. ktup se puede establecer en 2 o 1 para las secuencias de proteínas, o de 1 a 6 para las secuencias de ADN. Si no se especifica ktup, el valor predeterminado es 2 para proteínas y 6 para ADN. De manera alternativa, la alineación de secuencias de proteínas se puede llevar a cabo usando el algoritmo CLUSTAL W, como se describe en Higgins et al., 1996, *Methods Enzymol.* 266:383-402.

[0081] Una secuencia de ácidos nucleicos está “ligada operativamente” cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, una presecuencia de ácidos nucleicos o líder secretor está ligado operativamente a un ácido nucleico que codifica un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está ligado operativamente a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de fijación al ribosoma está ligado operativamente a una secuencia codificante si está ubicado para facilitar la traducción. En general, “ligado operativamente” significa que las secuencias de ADN ligadas son contiguas y, en caso de un líder secretor, son contiguas y se encuentran en el marco de lectura. Sin embargo, los potenciadores son opcionalmente contiguos. La fijación se puede

obtener mediante la ligadura en sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, se pueden usar ligadores o adaptadores de oligonucleótidos sintéticos.

[0082] Como se usan en la presente, las expresiones “célula”, “línea celular” y “cultivo celular” se usan indistintamente y todas las denominaciones incluyen la progenie de aquellos. Por ello, las expresiones “transformantes” y “células transformantes” incluyen los cultivos y las células sujeto primarias derivados de aquellos sin perjuicio de la cantidad de transferencias.

[0083] El término “mamífero”, a los fines de tratamiento, se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluidos los seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológicos, deportes o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas y similares. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.

[0084] Como se usa en la presente, un “trastorno” es cualquier afección que recibiría un beneficio del tratamiento con un anticuerpo anti-TrkB humanizado descrito en la presente. Esto incluye enfermedades o trastornos crónicos y agudos, incluidas las afecciones patológicas que predisponen al mamífero a su trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitativos de trastornos que se pueden tratar en la presente incluyen trastornos oculares o retinianos.

[0085] Como se usa en la presente, las expresiones “trastorno asociado a TrkB” o “enfermedad asociada a TrkB” se refieren a una afección en donde se indica la modificación o activación de células que expresan TrkB. Un trastorno asociado a TrkB incluye enfermedades o trastornos tales como degeneración macular relacionada con la edad, atrofia geográfica, retinopatía diabética, edema macular diabética, retinitis pigmentosa, distrofia retiniana hereditaria, distrofia macular hereditaria, degeneración miópica, oclusiones venosas de la retina, oclusiones arteriales de la retina, endoftalmitis, uveítis, edema macular cistoide, membrana neovascular coroidea secundaria a cualquier enfermedad retiniana, neuropatías ópticas, glaucoma, desprendimiento de retina, retinopatía tóxica, retinopatía por radiaciones y retinopatía traumática, al igual que enfermedades de Alzheimer prodrómicas y leves a moderadas, atraso de la progresión de la enfermedad en pacientes con enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, trastorno depresivo mayor, esquizofrenia, deficiencia cognitiva asociada a la esquizofrenia, prevención de primer episodio psicótico en individuos con síndrome de psicosis atenuado, prevención de recaída en pacientes con esquizofrenia, depresión resistente al tratamiento, y enfermedades metabólicas, tales como hiperfagia, obesidad o síndrome metabólico.

[0086] La expresión “inyección intravítrea” tiene su significado normal en el estado de la técnica y se refiere a la introducción de un anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento de fijación al antígeno de este, en el cuerpo vítreo de un paciente.

[0087] La expresión “administración subcutánea” se refiere a la introducción de un anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento de fijación al antígeno de este, debajo de la piel de un animal o paciente humano, preferentemente, dentro de un reservorio entre la piel y el tejido subyacente, mediante la administración prolongada y relativamente lenta de un receptáculo de fármaco. El reservorio se puede crear apretando o separando la piel del tejido subyacente.

[0088] La expresión “infusión subcutánea” se refiere a la introducción de un fármaco debajo de la piel de un animal o paciente humano, preferentemente en un reservorio entre la piel y el tejido subyacente, mediante la administración prolongada y relativamente lenta de un receptáculo de fármaco durante un período de, por ejemplo, 30 minutos o menos, o 90 minutos o menos. De manera opcional, la infusión se puede realizar mediante la implantación subcutánea de una bomba de administración de un fármaco implantada debajo de la piel de un animal o paciente humano, en donde la bomba administra una cantidad predeterminada del fármaco durante un período predeterminado, tal como 30 minutos, 90 minutos, o un período que abarca la longitud del régimen de tratamiento.

[0089] La expresión “bolo subcutáneo” se refiere a la administración de un fármaco debajo de la piel de un animal o paciente humano, en donde la administración del fármaco en bolo tiene una duración menor de aproximadamente 15 minutos; en otro aspecto, menor de 5 minutos, y aun en otro aspecto, menor de 60 segundos. Aun en otro aspecto, la administración se realiza dentro de un reservorio entre la piel y el tejido subyacente, en donde el reservorio se puede crear apretando o separando la piel del tejido subyacente.

[0090] La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que alivia o mejora uno o más síntomas del trastorno que se trata. Al lograr esto, dicha cantidad genera una evolución beneficiosa del paciente. En un aspecto, la cantidad terapéuticamente eficaz tiene un efecto neuroprotector o neuroregenerativo. En otro aspecto, la cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a la concentración sérica diana que demostró ser eficaz para, por ejemplo, ralentizar la progresión de la enfermedad. La eficacia se puede medir en formas convencionales, en función de la afección que se tratará. Por ejemplo, en enfermedades o trastornos oculares/retinianos

caracterizados por células que expresan TrkB, la eficacia se puede medir determinando las tasas de respuesta, por ejemplo, la recuperación de la vista, o evaluando el tiempo de atraso hasta la progresión de la enfermedad.

[0091] Los términos “tratamiento”, “terapia” y similares, como se usan en la presente, incluyen medidas terapéuticas, profilácticas o supresoras que producen cualquier efecto deseable o beneficioso, incluidos, entre otros, el alivio o la mejora de uno o más síntomas, la regresión, la ralentización o el cese de la progresión de la enfermedad o el trastorno. Por ello, por ejemplo, el término “tratamiento” incluye la administración de un anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento de fijación al antígeno de este, antes o después de la aparición de un síntoma de una enfermedad o un trastorno, lo que implica la prevención o eliminación de uno o más signos de la enfermedad o el trastorno. Como otro ejemplo, el término incluye la administración de un anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento de fijación al antígeno de este, después de la manifestación clínica de la enfermedad para combatir los síntomas de la enfermedad. Asimismo, como se usan en la presente, el “tratamiento” o la “terapia” comprenden la administración de un anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento de fijación al antígeno de este, después de la aparición y después del desarrollo de síntomas clínicos, en donde la administración afecta los parámetros clínicos de la enfermedad o del trastorno, tal como el grado de lesión tisular, o la amplitud o el grado de metástasis, en donde el tratamiento produce la mejora de la enfermedad, o no. Además, en la medida en que las composiciones de la invención, ya sea solas o en combinación con otro agente terapéutico, alivien o mejoren al menos un síntoma de un trastorno que se trata, en comparación con ese síntoma en ausencia del uso de la composición del anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento de fijación al antígeno de este, el resultado se debe considerar como un tratamiento eficaz del trastorno subyacente independientemente de si se produce un alivio de todos los síntomas del trastorno, o no.

[0092] El término “prospecto” se refiere a las instrucciones que habitualmente se incluyen en los envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, el uso, la administración, las contraindicaciones y/o las advertencias de uso de dichos productos terapéuticos.

[0093] Anticuerpos

[0094] En la presente se describen y se divulgan anticuerpos anti-TrkB, en particular, anticuerpos anti-TrkB humanizados, al igual que composiciones y artículos de fabricación que comprenden anticuerpos anti-TrkB de la presente invención. También se describen fragmentos de fijación al antígeno de un anticuerpo anti-TrkB. Los

anticuerpos anti-TrkB, y los fragmentos de fijación al antígeno de estos, se pueden usar en el tratamiento de diversas enfermedades o trastornos caracterizados por una reducción en la vía de TrkB. Un anticuerpo anti-TrkB y un fragmento de fijación al antígeno de este incluyen al menos una porción que reconoce específicamente un epítipo de TrkB.

[0095] En una caracterización inicial, D003 anti-TrkB murino inicial se seleccionó en función de su rendimiento superior como anticuerpo. Se generó una colección de variantes colocando las CDR del anticuerpo murino inicial en las FR de los dominios variables de las cadenas pesada y liviana de consenso humano y, además, mediante modificación por ingeniería genética de las FR con diferentes alteraciones.

[0096] Esto generó diversas secuencias variables de las cadenas liviana y pesada humanizadas, como se muestra a continuación:

[0097] SECUENCIAS VL

[0098] D003_VL (anticuerpo murino inicial), cadena liviana variable, SEQ ID NO: 1
 DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWAS
STRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQQYYSPYTFGGGTKLEIK

[0099] 277-gr_VL, cadena liviana variable (humanizada), SEQ ID NO: 2
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAS
TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSPYTFGQGTKLEIK

[0100] 277-33_VL: cadena liviana variable (humanizada), SEQ ID NO: 3
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAS
TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSPYTFGGGTKLEIK

[0101] 277-35_VL: cadena liviana variable (humanizada), SEQ ID NO: 4
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAS
TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSPYTFGGGTKLEIK

[0102] 277-42_VL, cadena liviana variable (humanizada), SEQ ID NO: 5
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAS
TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSPYTFGGGTKLEIK

[0103] 277-44_VL, cadena liviana variable (humanizada), SEQ ID NO: 6
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWAS
TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSPYTFGQGTKLEIK

[0104] 277-48_VL, cadena liviana variable (humanizada), SEQ ID NO: 7
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAS
TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSPYTFGQGTKLEIK

[0105] 277-51_VL, cadena liviana variable (humanizada), SEQ ID NO: 8

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAS
TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSPYTFGGGTKLEIK

[0106] 277-64_VL, cadena liviana variable (humanizada), SEQ ID NO: 9

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAS
TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSPYTFGQGTKLEIK

[0107] 277-67_VL, cadena liviana variable (humanizada), SEQ ID NO: 10

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWAS
TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSPYTFGQGTKLEIK

[0108] SECUENCIAS VH

[0109] D003_VH, cadena pesada variable (anticuerpo murino inicial), SEQ ID NO: 11

QVQLVQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFTGYWMHWWKQRPQGQGLEWIGYINPST
DYTEYNQKFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSRTGNYWGQGTTLT
 VSS

[0110] 277-gr_VH, cadena pesada variable (humanizada), SEQ ID NO: 12

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTGYWMHWWVRQAPQGQGLEWMGYINPST
DYTEYNQKFKDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSRTGNYWGQGTLV
 TVSS

[0111] 277-33_VH, cadena pesada variable (humanizada), SEQ ID NO: 13

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTGYWMHWWVRQRPQGQGLEWIGYINPST
DYTEYNQKFKDRVTLTRDTSTSTVYMELSSLTSEDTAVYYCARSRTGNYWGQGTTVT
 VSS

[0112] 277-35_VH, cadena pesada variable (humanizada), SEQ ID NO: 14

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTGYWMHWWVRQRPQGQGLEWIGYINPST
DYTEYNQKFKDRVTLTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSRTGNYWGQGTTV
 TVSS

[0113] 277-42_VH, cadena pesada variable (humanizada), SEQ ID NO: 15

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTGYWMHWWVRQRPQGQGLEWIGYINPST
DYTEYNQKFKDRVTLTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSRTGNYWGQGTTV
 TVSS

[0114] 277-44_VH, cadena pesada variable (humanizada), SEQ ID NO: 16

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTGYWMHWWVRQAPQGQGLEWIGYINPST
DYTEYNQKFKDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLTSEDTAVYYCARSRTGNYWGQGTTV
 TVSS

[0115] 277-48_VH, cadena pesada variable (humanizada), SEQ ID NO: 17

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTGYWMHWWVRQRPQGQGLEWIGYINPST

DYTEYNQKFKDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDAVYYCARSRTGNYWGQGTTV
TVSS

[0116] 277-51_VH, cadena pesada variable (humanizada), SEQ ID NO: 18

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQRPQGQGLEWIGYINPST
DYTEYNQKFKDRATLTRDTSTSTVYMELSSLRSEDAVYYCARSRTGNYWGQGTTV
TVSS

[0117] 277-64_VH, cadena pesada variable (humanizada), SEQ ID NO: 19

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQAPQGQGLEWIGYINPST
DYTEYNQKFKDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDAVYYCARSRTGNYWGQGTTV
TVSS

[0118] 277-67_VH, cadena pesada variable (humanizada), SEQ ID NO: 20

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQAPQGQGLEWIGYINPST
DYTEYNQKFKDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDAVYYCARSRTGNYWGQGTTV
TVSS

[0119] Las secuencias subrayadas corresponden a las regiones CDR de las regiones variables de las cadenas pesada y liviana.

[0120] Los anticuerpos anti-TrkB humanizados de la presente invención son aquellos que tienen las secuencias de las cadenas pesada y liviana establecidas en la siguiente tabla. Se generaron mutantes IgG1-KO mediante la introducción de dos mutaciones en la región Fc, Leu232Ala y Leu233Ala, a fin de reducir la función efectora.

[0121] TABLA 1:

Anticuerpo	Secuencia	SEQ ID NO:
277-gr (cadena liviana, IgG1)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNY LAWYQQKPGQPPLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD FTLTISSLQAEDVAVYYCQYYSYPYTFGQGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	21
277-gr (cadena pesada, IgG1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVR QAPQGQLEWMGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTMTRDTST STVYMELSSLRSED AVYYCAR <u>SRTGNYWGQ</u> GLTVTS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG	22

277-gr (cadena pesada, IgG1-KO)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVR QAPGQGLEWMGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTMTRDTST STVYMEISSLRSEDVAVYYCARSRTGNYWGQGTTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLEFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG	23
277-33 (cadena liviana, IgG1)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLYSSNQKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD FTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSPYTFGGGKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	24
277-33 (cadena pesada, IgG1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVR QRPQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTTLTRDTST STVYMEISSLTSEDVAVYYCARSRTGNYWGQGTTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLEFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG	25
277-33 (cadena pesada, IgG1-KO)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVR QRPQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTTLTRDTST STVYMEISSLTSEDVAVYYCARSRTGNYWGQGTTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLEFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG	26
277-35 (cadena liviana, IgG1)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLYSSNQKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD FTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSPYTFGGGKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	27

277-35 (cadena pesada, IgG1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVR QRPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTLTRDTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCARSRTGNYWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG	28
277-35 (cadena pesada, IgG1-KO)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVR QRPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTLTRDTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCARSRTGNYWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG	29
277-42 (cadena liviana, IgG1)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNY LAWYQQKPGQPPLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSDT FTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGGGKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	30
277-42 (cadena pesada, IgG1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVR QRPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTLTRDTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCARSRTGNYWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG	31

277-42 (cadena pesada, IgG1-KO)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVR QRPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTLTRDTST STVYMELSSLSRSEDVAVYYCARSRTGNYWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLEFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG	32
277-44 (cadena liviana, IgG1)	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNY LAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD FTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSPYTFGQGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	33
277-44 (cadena pesada, IgG1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVR QAPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTMTRDTST STVYMELSSLSLTS EDTAVYYCARSRTGNYWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLEFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG	34
277-44 (cadena pesada, IgG1-KO)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVR QAPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTMTRDTST STVYMELSSLSLTS EDTAVYYCARSRTGNYWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLEFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG	35
277-48 (cadena liviana, IgG1)	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD FTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSPYTFGQGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	36

277-48 (cadena pesada, IgG1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVR QRPQGQLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTMTRDTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCARSRTGNYWGQGT ^T TVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG	37
277-48 (cadena pesada, IgG1-KO)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVR QRPQGQLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTMTRDTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCARSRTGNYWGQGT ^T TVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG	38
277-51 (cadena liviana, IgG1)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLYSSNQKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGV ^P DRFSGSGSDT FTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGGG ^T TKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	39
277-51 (cadena pesada, IgG1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVR QRPQGQLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRATL ^T TRDTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCARSRTGNYWGQGT ^T TVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG	40

277-51 (cadena pesada, IgG1-KO)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYWMHWVR QRPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRATLTRDTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCARSRTGNYWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLEFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG	41
277-64 (cadena liviana, IgG1)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLYSSNQKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD FTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGQGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	42
277-64 (cadena pesada, IgG1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYWMHWVR QAPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTMTRDTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCARSRTGNYWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLEFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG	43
277-64 (cadena pesada, IgG1-KO)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYWMHWVR QAPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTMTRDTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCARSRTGNYWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLEFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG	44
277-67 (cadena liviana, IgG1)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNY LAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD FTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGQGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	45

277-67 (cadena pesada, IgG1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVR QAPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKF KDRVTMTRDTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCAR SRTGNYWGQGT TVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG	46
277-67 (cadena pesada, IgG1-KO)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVR QAPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKF KDRVTMTRDTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCAR SRTGNYWGQGT TVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG	47
277 L-CDR1	<u>KSSQSLLYSSNQKNYLA</u>	48
277 L-CDR2	<u>WASTRES</u>	49
277 L-CDR3	<u>QQYYSYPYT</u>	50
277 H-CDR1 (CCG)	<u>GYTFTGYWMH</u>	51
277 H-CDR2 (CCG)	<u>YINPSTDYTEYNQKFKD</u>	52
277 H-CDR3 (CCG)	<u>SRTGNY</u>	53
277 H-CDR1 (Kabat)	<u>GYWMH</u>	55
277 H-CDR2 (Kabat)	<u>YINPSTDYTEYNQKFKD</u>	56
277 H-CDR3 (Kabat)	<u>SRTGNY</u>	57
277 H-CDR1 (Chothia)	<u>GYTFTGY</u>	58
277 H-CDR2 (Chothia)	<u>NPSTDY</u>	59
277 H-CDR3 (Chothia)	<u>SRTGNY</u>	60

[0122] Las CDR anteriores de acuerdo con la numeración Chemical Computing Group (CCG) (Almagro et al., Proteins 2011; 79:3050-3066 y Maier et al, Proteins 2014; 82:1599-1610). La numeración Kabat para las secuencias se indica en negrita, y el

sistema de numeración Chothia se indica en *itálica*.

[0123] En un aspecto, un anticuerpo anti-TrkB de la presente invención se fija a TrkB humana a una $K_D < 10$ nM. En otro aspecto, un anticuerpo anti-TrkB de la presente invención se fija a TrkB humana a una $K_D < 5$ nM. Aun en otro aspecto, un anticuerpo anti-TrkB de la presente invención se fija a TrkB humana a una K_D de alrededor de 1 nM. Las afinidades de fijación de anticuerpos anti-TrkB se pueden determinar de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 6.

[0124] En otro aspecto, un anticuerpo anti-TrkB de la presente invención induce la fosforilación de TrkB y/o la activación con alta potencia. En un aspecto, un anticuerpo anti-TrkB de la presente invención fosforila TrkB humana con una $EC_{50} < 100$ pM. En otro aspecto, un anticuerpo anti-TrkB de la presente invención fosforila TrkB humana con una $EC_{50} < 50$ pM. En otro aspecto, un anticuerpo anti-TrkB de la presente invención fosforila TrkB humana con una $EC_{50} < 40$ pM. En otro aspecto, un anticuerpo anti-TrkB de la presente invención fosforila TrkB humana con una $EC_{50} < 30$ pM. En otro aspecto, un anticuerpo anti-TrkB de la presente invención fosforila TrkB humana con una EC_{50} de alrededor de 20 pM.

[0125] En otro aspecto, el anticuerpo anti-TrkB de la presente invención es más potente para inducir la activación de vías de señalización corriente abajo de TrkB que el ligando de TrkB natural, BDNF. La potencia de anticuerpos anti-TrkB se puede determinar en células SH-SY5Y diferenciadas de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 8.

[0126] En otro aspecto, un anticuerpo anti-TrkB de la presente invención induce una expresión génica comparable con el ligando de TrkB natural, BDNF. La estimulación con anticuerpos agonistas anti-TrkB aumenta la expresión de mRNA de ARC, VGF, EGR1, que son marcadores del aumento de plasticidad sináptica y, por lo tanto, indicadores de que los anticuerpos anti-Trkb actúan como el ligando natural BDNF en la modulación de la función neuronal, es decir, el aumento de la supervivencia neuronal y/o la plasticidad sináptica. Los patrones de expresión génica se pueden determinar de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 10.

[0127] Aun en otro aspecto, un anticuerpo anti-TrkB de la presente invención protege neuronas, células gliales y/o la unidad neurovascular en la retina de pacientes con, por ejemplo, degeneración macular relacionada con la edad, atrofia geográfica o retinopatía diabética, estimulando las vías de señalización de supervivencia dependientes de TrkB y, en consecuencia, proporcionando neuroprotección.

[0128] En otro aspecto, un anticuerpo anti-TrkB de la presente invención regenera

axones/dendritas y/o sinapsis en la retina después de la aparición de la enfermedad en, por ejemplo, degeneración macular relacionada con la edad, atrofia geográfica o retinopatía diabética, y en consecuencia, produce neuroregeneración.

[0129] En otro aspecto, un anticuerpo anti-TrkB de la presente invención tiene bajo riesgo de inmunogenicidad y pocas características no deseadas de secuencia con respecto a sus secuencias de CDR. La inmunogenicidad y la heterogeneidad son dos aspectos importantes de un anticuerpo terapéutico. La medición de tales aspectos se puede realizar mediante los métodos descritos en los Ejemplos 4 y 5. Los anticuerpos de la presente invención se modificaron cuidadosamente por ingeniería genética para tener inmunogenicidad y/o heterogeneidad mínimas o nulas.

[0130] Aun en otro aspecto, un anticuerpo anti-TrkB de la presente invención no reduce la fosforilación de ERK inducida por BDNF. Con este fin, la fosforilación de ERK se puede medir, por ejemplo, en células CHO que expresan TrkB humana como se describe en el Ejemplo 13. Esto podría significar que la fosforilación de ERK inducida por BDNF expresado en forma endógena no se reduce cuando se administra el anticuerpo anti-TrkB de la invención. También podría significar que el anticuerpo anti-TrkB de la invención no reduce la fosforilación de ERK cuando se administra antes, durante o después de la administración exógena de BDNF. En algunos casos, un anticuerpo anti-TrkB no compite con la fosforilación de ERK inducida por BDNF ni la reduce en comparación con la inducción por BDNF únicamente.

[0131] En otro aspecto, un anticuerpo anti-TrkB de la presente invención es específico para la fosforilación y/o activación de TrkB y no fosforila y/o activa de manera inespecífica TrkA o TrkC.

[0132] En otro aspecto, un anticuerpo anti-TrkB no se fija de manera inespecífica a VEGF humano ni VEGF de rata. En este contexto, la fijación no específica significa que el anticuerpo anti-TrkB inventivo no se fija a VEGF humano, según se midió, por ejemplo, en un ELISA descrito en el Ejemplo 14. En una forma de realización, la falta de fijación no específica de un anticuerpo anti-TrkB se puede determinar mediante la medición de una diferencia estadísticamente significativa (por ejemplo, prueba t desapareada, $p < 0,05$) en la fijación a VEGF humano entre un anticuerpo anti-TrkB y un anticuerpo de control de isotipo IgG adecuado. En particular, la falta de fijación no específica del anticuerpo anti-TrkB inventivo se puede medir mediante la determinación de cualquier diferencia en la fijación a VEGF humano entre un anticuerpo anti-TrkB y un anticuerpo de control de isotipo IgG1. Un anticuerpo anti-TrkB inventivo no se diferenciará considerablemente en la falta de fijación a VEGF

humano en comparación con un anticuerpo de control de isotipo IgG1 hasta una concentración de alrededor de 0,3 nM, 0,4 nM, 0,5 nM, 0,6 nM, 0,7 nM, 0,8 nM, 0,9 nM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 40 nM, 50 nM, 60 nM, 70 nM, 80 nM, 90 nM, 100 nM, 110 nM, 120 nM, 130 nM, 140 nM, 150 nM, 160 nM, 170 nM, 180 nM, 190 nM o 200 nM. En una forma de realización alternativa, la falta de fijación no específica del anticuerpo anti-TrkB inventivo se puede medir determinando el valor de fijación de IC_{50} del anticuerpo anti-TrkB a uno de VEGF humano o VEGF de rata. En particular, un anticuerpo anti-TrkB inventivo presentará un valor de fijación de IC_{50} a VEGF humano o de rata mayor de alrededor de 0,9 μ M, preferentemente, mayor de 1 μ M, mayor de 2 μ M, mayor de 3 μ M, mayor de 5 μ M, mayor de 10 μ M, mayor de 20 μ M, mayor de 30 μ M, mayor de 40 μ M, mayor de 50 μ M, mayor de 100 μ M, mayor de 150 μ M, mayor de 200 μ M, mayor de 250 μ M, mayor de 300 μ M, mayor de 350 μ M, mayor de 400 μ M, mayor de 450 μ M, mayor de 500 μ M, mayor de 550 μ M, mayor de 600 μ M, mayor de 650 μ M, mayor de 700 μ M, mayor de 750 μ M, mayor de 800 μ M, mayor de 850 μ M o mayor de 900 μ M.

[0133] Humanización y variantes de secuencias de aminoácidos

[0134] Otras variantes de anticuerpos anti-TrkB y fragmentos de anticuerpo se pueden modificar por ingeniería genética en función del conjunto de CDR identificadas en D003 murino de partida. Se entiende que, en dichas variantes de anticuerpos anti-TrkB y fragmentos de anticuerpo, la secuencia de aminoácidos de las CDR se mantiene inalterada pero las regiones circundantes, por ejemplo, las regiones FR, se pueden modificar por ingeniería genética. Las variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-TrkB se pueden preparar incorporando cambios de nucleótidos adecuados en el ADN del anticuerpo anti-TrkB o mediante síntesis de péptidos. Tales variantes incluyen, por ejemplo, eliminaciones y/o sustituciones de residuos, y/o inserciones en estos en las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos anti-TrkB de los ejemplos de la presente. Cualquier combinación de eliminaciones, inserciones y sustituciones se lleva a cabo para obtener el constructo final, siempre que el constructo final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos posteriores a la traducción del anticuerpo anti-TrkB humanizado o de su variante, tal como el cambio de la cantidad o de la posición de los sitios de glucosilación.

[0135] En algunas formas de realización, la presente invención incluye anticuerpos anti-TrkB, o fragmentos de anticuerpo de estos, que tienen una cadena liviana variable y una cadena pesada variable, en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena

liviana variable y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable son al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % idénticas a las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 12, o 3 y 13, o 4 y 14, o 5 y 15, o 6 y 16, o 7 y 17, o 8 y 18, o 9 y 19, o 10 y 20, respectivamente.

[0136] En algunas formas de realización, la presente invención incluye anticuerpos anti-TrkB, o fragmentos de anticuerpo de estos, que tienen una cadena liviana y una cadena pesada, en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada son al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % idénticas a las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y 22 o 23; 24 y 25 o 26; 27 y 28 o 29; 30 y 31 o 32; 33 y 34 o 35; 36 y 37 o 38; 39 y 40 o 41; 42 y 43 o 44; 45 y 46 o 47, respectivamente.

[0137] En otra forma de realización, la presente invención incluye anticuerpos anti-TrkB que compiten para fijarse a TrkB con cualquiera de los siguientes anticuerpos:

[0138] Un anticuerpo que tiene una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 o 23,

[0139] Un anticuerpo que tiene una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 o 26,

[0140] Un anticuerpo que tiene una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 o 29,

[0141] Un anticuerpo que tiene una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 o 32,

[0142] Un anticuerpo que tiene una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34 o 35,

[0143] Un anticuerpo que tiene una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 o 38,

[0144] Un anticuerpo que tiene una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 o 41,

[0145] Un anticuerpo que tiene una cadena liviana que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 42 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43 o 44, o

[0146] Un anticuerpo que tiene una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46 o 47.

[0147] Otro tipo de variante de aminoácidos del anticuerpo implica alterar el patrón de glucosilación adicional del anticuerpo. En este contexto, el término “alterar” significa eliminar una o más porciones de carbohidratos que se encuentran en el anticuerpo, y/o agregar uno o más sitios de glucosilación que no estaban presentes previamente en el anticuerpo.

[0148] En algunos aspectos, la presente invención incluye moléculas de ácidos nucleicos que codifican las variantes de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos anti-TrkB descritos en la presente. Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-TrkB se preparan mediante una variedad de métodos conocidos en el estado de la técnica. Estos métodos incluyen, entre otros, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos naturales) o preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis PCR y mutagénesis con casete de una variante preparada con anterioridad o una versión sin variante del anticuerpo anti-TrkB.

[0149] En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-TrkB es un fragmento de anticuerpo. Existen técnicas que se desarrollaron para la producción de fragmentos de anticuerpo. Los fragmentos se pueden derivar mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véanse, por ejemplo, Morimoto et al., 1992, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117; y Brennan et al., 1985, Science 229:81). De manera alternativa, los fragmentos se pueden producir directamente en células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de E. coli y acoplar químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (véase, por ejemplo, Carter et al., 1992, Bio/Technology 10:163-167). Mediante otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ se pueden aislar directamente del cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para las personas del oficio de nivel medio.

[0150] Los anticuerpos anti-TrkB, y fragmentos de fijación al antígeno de estos, pueden incluir modificaciones.

[0151] En determinadas formas de realización, puede resultar conveniente usar un

fragmento de anticuerpo anti-TrkB, en lugar de un anticuerpo intacto. Puede ser conveniente modificar el fragmento del anticuerpo a fin de aumentar su semivida sérica. Esto se puede obtener, por ejemplo, incorporando un epítipo de fijación al receptor de rescate en el fragmento del anticuerpo. En un método, la región adecuada del fragmento del anticuerpo se puede alterar (por ejemplo, mutar), o el epítipo se puede incorporar en una etiqueta del péptido que luego se fusiona al fragmento del anticuerpo en cualquier extremo o en el medio, por ejemplo, mediante síntesis de ADN o péptido. Véase, por ejemplo, WO 96/32478.

[0152] En otras formas de realización, la presente invención incluye modificaciones covalentes de los anticuerpos anti-TrkB. Las modificaciones covalentes incluyen la modificación de residuos de cisteinilo, residuos de histidilo, residuos de lisinilo y terminal amino, residuos de arginilo, residuos de tirosilo, grupos laterales de carboxilo (aspartilo o glutamilo), residuos de glutaminilo y asparaginilo, o serilo, o residuos de treonilo. Otro tipo de modificación covalente incluye el acoplamiento químico o enzimático de glucósidos al anticuerpo. Tales modificaciones se pueden obtener mediante síntesis química, o escisión enzimática o química del anticuerpo, si correspondiese. Otros tipos de modificaciones covalentes del anticuerpo se pueden incorporar en la molécula haciendo reaccionar residuos de aminoácidos dirigidos del anticuerpo con un agente de derivatización orgánico que sea capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o residuos del terminal amino o carboxi.

[0153] La eliminación de cualquier porción de carbohidrato presente en el anticuerpo se puede lograr en forma química o enzimática. La desglucosilación química es descrita por Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 y Edge et al., 1981, Anal. Biochem., 118:131. La escisión enzimática de las porciones de carbohidratos en los anticuerpos se puede lograr mediante el uso de una variedad de endo- y exo-glucosidasas, como describen Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol 138:350.

[0154] Otro tipo de modificación covalente útil comprende la ligadura del anticuerpo a uno de una variedad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, en la forma establecida en una o más de las patentes estadounidenses N.º 4.640.835, patente estadounidense N.º 4.496.689, patente estadounidense N.º 4.301.144, patente estadounidense N.º 4.670.417, patente estadounidense N.º 4.791.192 y la patente estadounidense N.º 4.179.337.

[0155] Fijación al epítipo

[0156] Los anticuerpos de la invención se fijan específicamente a TrkB humana de

origen o recombinante. Los anticuerpos de la presente invención reconocen “epítipo del antígeno de TrkB” y “epítipo de TrkB” específicos. En particular, los anticuerpos de la invención se fijan a un epítipo en el dominio extracelular de TrkB humana con SEQ ID NO: 54.

[0157] El dominio extracelular de TrkB humana comprende esencialmente la siguiente secuencia (SEQ ID NO.54):

CPTSCKCSASRIWCSDPSPGIVAFPRLEPNSVDPENITEIFIANQKRLEIINEDDVEAYV
GLRNLTIVDSGLKFVAHKAFLKNSNLQHINFTRNKLTSLSRKHFRHLDLSELILVGNPFT
CSCDIMWIKTLQEAKSSPDTQDLYCLNESSKNIPLANLQIPNCGLP SANLAAPNLTVEE
GKSITLSCSVAGDPVPMYWDVGNLVSKHMNETSHTQGSLRITNISSDDSGKQISCV
AENLVGEDQDSVNLTVHFAPTITFLESPTSDHHWCIPFTVKGNPKPALQWFYNGAILN
ESKYICTKIHVTNHTEYHGCLQLDNPTHMNGDYTLIAKNEYGKDEKQISAHFMGWP
GIDDGANPNYPDVIYEDYGTAANDIGDTTNRSEIPSTDVTDKGTGREH

[0158] Como se usan en la presente, las expresiones “epítipo del antígeno de TrkB” y “epítipo de TrkB” se refieren a una molécula (por ejemplo, un péptido) o un fragmento de una molécula capaz de fijarse a un anticuerpo anti-TrkB o un fragmento de fijación al antígeno de este. Estas expresiones también incluyen, por ejemplo, un determinante antigénico de TrkB reconocido por cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la presente invención, que tiene una combinación de CDR de cadena liviana y pesada seleccionada de CDR de cadena liviana de SEQ ID NO 48 a 50 y CDR de cadena pesada de SEQ ID NO: 51 a 53.

[0159] Los epítopos del antígeno de TrkB se pueden incluir en proteínas, fragmentos de proteínas, péptidos o similares. En general, los epítopos son proteínas, oligopéptidos cortos, imitadores de oligopéptidos (es decir, compuestos orgánicos que imitan las propiedades de fijación al anticuerpo del antígeno de TrkB) o combinaciones de estos.

[0160] Se descubrió que los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la presente invención se fijan a epítopos únicos en el dominio extracelular de TrkB humana. Preferentemente, un anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento de fijación al antígeno de este, se fija a al menos un residuo de aminoácidos en las regiones de aminoácidos 92-112, 130-143 y/o 205-219 del dominio extracelular de TrkB humana con SEQ ID NO: 54.

[0161] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que se fija a al menos un residuo de aminoácidos en las regiones de aminoácidos 92-112 y 130-143; o 92-112 y

205-219; o 130-143 y 205-219; o 92-112 y 130-143 y 205-219 del dominio extracelular de TrkB humana con SEQ ID NO: 54.

[0162] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que se fija a al menos un residuo de aminoácidos en cualquiera de las combinaciones mencionadas anteriormente de regiones de aminoácidos, y además, a al menos un residuo de aminoácidos en las regiones de aminoácidos 313-330 y/o 348-367 del dominio extracelular de TrkB humana con SEQ ID NO: 54.

[0163] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que se fija a al menos un residuo de aminoácidos en las regiones de aminoácidos 92-112, 130-143, 205-219, 313-330 y 348-367 del dominio extracelular de TrkB humana con SEQ ID NO: 54.

[0164] Por lo tanto, en el contexto de la fijación al epítipo, la expresión “se fija en las regiones de aminoácidos X-Y...” significa que el anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento de fijación al antígeno de este, se fija a al menos un residuo de aminoácidos en la región de aminoácidos especificada en la secuencia.

[0165] Si, por ejemplo, el anticuerpo anti-TrkB o el fragmento de fijación al antígeno de este se fija a al menos un residuo de aminoácidos en las regiones de aminoácidos 92-112 o 130-143, significa que el anticuerpo anti-TrkB, o el fragmento de fijación al antígeno de este, se fija a al menos un residuo de aminoácidos en las regiones de aminoácidos 92-112 o 130-143.

[0166] En otro ejemplo, si el anticuerpo anti-TrkB o un fragmento de fijación al antígeno de este se fija a al menos un residuo de aminoácidos en las regiones de aminoácidos 92-112 y 130-143, significa que el anticuerpo anti-TrkB, o el fragmento de fijación al antígeno de este, se fija a al menos un residuo de aminoácidos en la región de aminoácidos 92-112, y también se fija a al menos un residuo de aminoácidos en la región de aminoácidos 130-143 de SEQ ID NO: 54.

[0167] En otro aspecto, un anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento de fijación al antígeno de este, se fija a al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de los residuos de aminoácidos en las regiones de aminoácidos 92-112, 130-143 y/o 205-219 del dominio extracelular de TrkB humana con SEQ ID NO: 54.

[0168] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que se fija a al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de los

residuos de aminoácidos en las regiones de aminoácidos 92-112 y 130-143; o 92-112 y 205-219; o 130-143 y 205-219; o 92-112 y 130-143 y 205-219 del dominio extracelular de TrkB humana con SEQ ID NO: 54.

[0169] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que se fija a al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de los residuos de aminoácidos en cualquiera de las combinaciones mencionadas anteriormente de regiones de aminoácidos, y también a al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de los residuos de aminoácidos en las regiones de aminoácidos 313-330 y/o 348-367 del dominio extracelular de TrkB humana con SEQ ID NO: 54.

[0170] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que se fija a al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de los residuos de aminoácidos en las regiones de aminoácidos 92-112, 130-143, 205-219, 313-330 y 348-367 del dominio extracelular de TrkB humana con SEQ ID NO: 54.

[0171] Si, por ejemplo, el anticuerpo anti-TrkB, o el fragmento de fijación al antígeno de este, se fija a al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de los residuos de aminoácidos en las regiones de aminoácidos 92-112 o 130-143, significa que el anticuerpo anti-TrkB, o el fragmento de fijación al antígeno de este, se fija a al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de los residuos de aminoácidos en la región de aminoácidos 92-112 o se fija a al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de los residuos de aminoácidos en la región de aminoácidos 130-143.

[0172] En otro ejemplo, si el anticuerpo anti-TrkB, o el fragmento de fijación al antígeno de este, se fija a al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de los residuos de aminoácidos en las regiones de aminoácidos 92-112 y 130-143, significa que el anticuerpo anti-TrkB, o la porción de fijación al antígeno de este, se fija a al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de los residuos de aminoácidos en la región de aminoácidos 92-112 y también se fija a al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de los residuos de aminoácidos en la región de aminoácidos 130-143.

[0173] Sin pretender limitarse a ninguna teoría, se considera que, debido a la fijación a

los epítomos novedosos, el anticuerpo contra TrkB ejerce sus efectos superiores para activar TrkB.

[0174] Polinucleótidos, vectores, células huésped y métodos recombinantes

[0175] Otras formas de realización abarcan polinucleótidos aislados que comprenden una secuencia que codifica un anticuerpo anti-TrkB, vectores y células huésped que comprenden los polinucleótidos y técnicas recombinantes para la producción del anticuerpo. Los polinucleótidos aislados pueden codificar cualquier forma deseada del anticuerpo anti-TrkB que incluye, por ejemplo, anticuerpos monoclonales de longitud completa, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos monocatenarias y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpos.

[0176] Los polinucleótidos que comprenden una secuencia que codifica un anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento o cadena de aquel se pueden fusionar con una o más secuencias reguladoras o de control, como se conocen en el estado de la técnica, y se pueden contener en vectores de expresión o células huésped adecuadas, como se conoce en el estado de la técnica. Cada una de las moléculas de polinucleótidos que codifican los dominios variables de las cadenas pesada y liviana se pueden fusionar independientemente con una secuencia de polinucleótidos que codifica un dominio constante, tal como un dominio constante humano, lo que permite la producción de anticuerpos intactos. De manera alternativa, los polinucleótidos, o las porciones de estos, se pueden fusionar juntos, lo que permite proporcionar un modelo para la producción de anticuerpos monocatenarios.

[0177] Para la producción recombinante, un polinucleótido que codifica el anticuerpo se inserta en un vector replicable para la clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. Se encuentran disponibles diversos vectores adecuados para expresar el anticuerpo recombinante. Los componentes del vector, en general, incluyen, entre otros, uno o más de los siguientes: una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento mejorador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

[0178] Los anticuerpos anti-TrkB también se pueden producir como polipéptidos de fusión, en donde el anticuerpo se fusiona con un polipéptido heterólogo, tal como una secuencia de señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el terminal amino del polipéptido o de la proteína madura. La secuencia de señal heteróloga seleccionada es, en general, una reconocida y procesada (es decir, escindida mediante una peptidasa de señal) mediante la célula huésped. En el caso de

las células huésped procariotas que no reconocen ni procesan la secuencia de señal del anticuerpo anti-TrkB, la secuencia de señal se puede sustituir mediante una secuencia de señal procariótica. La secuencia de señal puede ser, por ejemplo, fosfatasa alcalina, penicilinas, lipoproteína, líderes de enterotoxina termoestable II, y similares. En el caso de secreción de levadura, la secuencia de señal natural se puede sustituir, por ejemplo, con una secuencia líder obtenida del factor alfa invertasa de levadura (que incluye líderes del factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), fosfatasa ácida, glucoamilasa de *C. albicans* o la señal descrita en WO90/13646. En células de mamífero, se pueden usar las secuencias de señales de mamíferos, así como líderes secretorios virales, por ejemplo, la señal gD del herpes simple. El ADN para dicha región precursora está ligado en el marco de lectura al ADN que codifica el anticuerpo anti-TrkB humanizado.

[0179] Los vectores de expresión y clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permite que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. En general, en vectores de clonación, esta secuencia es una que permite que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico huésped, e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónoma. Estas secuencias son conocidas para diversas bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram-negativas, el origen del plásmido 2- μ es adecuado para la levadura, y varios orígenes virales (SV40, polioma, adenovirus, VSV y BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamíferos. En general, el origen del componente de replicación no es necesario para los vectores de expresión de mamíferos (el origen de SV40 puede usarse, en general, solo porque contiene el promotor temprano).

[0180] Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen que codifica un marcador seleccionable para facilitar la identificación de la expresión. Los genes marcadores seleccionables habituales codifican proteínas que confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, o de manera alternativa, son deficiencias auxotróficas del complemento, o en otras alternativas, suministran nutrientes específicos que no están presentes en medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica D-alanina racemasa para *Bacilli*.

[0181] Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Aquellas células que se transforman exitosamente con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia al fármaco y, por ende, sobrevive al régimen de selección. Los ejemplos de tal selección dominante

usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina. Los marcadores seleccionables comunes de células de mamíferos son aquellos que permiten la identificación de células competentes para absorber un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-TrkB humanizado, tal como DHFR (dihidrofolato reductasa), timidina quinasa, metalotioneína-I y -II (tales como genes de metalotioneína de primates), adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa y similares. Las células transformadas con el gen de selección DHFR se identifican, primero, mediante el cultivo de todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula huésped adecuada cuando se usa DHFR de tipo silvestre es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) con deficiencia de actividad DHFR (por ejemplo, DG44).

[0182] De manera alternativa, las células huésped (en particular, los huéspedes de tipo silvestre que contienen DHFR endógeno) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifican el anticuerpo anti-TrkB, la proteína DHFR de tipo silvestre y otro marcador seleccionable, tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH), se pueden seleccionar mediante el crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección del marcador seleccionable, tal como un antibiótico aminoglucosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina o G418. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 4.965.199.

[0183] Cuando la producción recombinante se realiza en una célula de levadura como célula huésped, el gen TRP1 presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb et al., 1979, Nature 282: 39) se puede usar como un marcador seleccionable. El gen TRP1 proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que no tiene la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC N.º 44076 o PEP4-1 (Jones, 1977, Genetics 85:12). La presencia de una lesión *trp1* en el genoma de la célula huésped de levadura proporciona un entorno eficaz para detectar la transformación mediante el crecimiento en ausencia del triptófano. En forma similar, las cepas de levadura con deficiencia de Leu2p, tales como ATCC 20.622 y 38.626 se complementan mediante plásmidos conocidos que tienen el gen LEU2.

[0184] Además, los vectores derivados del plásmido circular de 1,6 μ m pKD1 se pueden usar para la transformación de levaduras *Kluyveromyces*. De manera alternativa, un sistema de expresión para la producción a gran escala de quimosina de ternero recombinante se informó en *K. lactis* (Van den Berg, 1990, Bio/Technology 8:135). También se divulgaron vectores de expresión estables de copias múltiples para la secreción de albúmina de suero recombinante madura humana mediante cepas

industriales de *Kluyveromyces* (Fleer et al., 1991, Bio/Technology 9:968-975).

[0185] Los vectores de expresión y clonación, por lo general, contienen un promotor que se reconoce por el organismo huésped, y está ligado operativamente a la molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-TrkB o cadena de polipéptidos de aquel. Los promotores adecuados para usar con huéspedes procarióticos incluyen el promotor *phoA*, los sistemas promotores de β -lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, el sistema promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos, tales como el promotor *tac*. Otros promotores bacterianos conocidos también son adecuados. Los promotores para usar en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia Shine-Dalgarno (S.D.) ligada operativamente al ADN que codifica el anticuerpo anti-TrkB humanizado.

[0186] Se conocen muchas secuencias del promotor eucariótico. Prácticamente, todos los genes eucarióticos tienen una región rica en AT ubicada aproximadamente de 25 a 30 bases corriente arriba del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada de 70 a 80 bases corriente arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT en donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucarióticos, se encuentra una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas aquellas secuencias se insertan de manera adecuada en los vectores de expresión eucarióticos.

[0187] Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para usar con huéspedes de la levadura incluyen los promotores de 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glucolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

[0188] Los promotores inducibles tienen la ventaja adicional de transcripción controlada mediante condiciones de crecimiento. Estos incluyen regiones promotoras de levadura para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas derivativas asociadas al metabolismo de nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para usar en la expresión de levadura también se describen en EP 73.657. Los mejoradores de levadura también se usan en forma conveniente con promotores de levadura.

[0189] La transcripción del anticuerpo anti-TrkB humanizado de vectores en células

huésped de mamíferos se controla, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus, tales como virus de polio, virus de difteria aviar, adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y virus del simio 40 (SV40), de promotores mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina o de promotores de choque término, siempre que tales promotores sean compatibles con los sistemas de célula huésped.

[0190] Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación viral SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción HindIII E. Un sistema para expresar ADN en huéspedes mamíferos usando el virus del papiloma bovino como vector se divulga en la patente estadounidense N.º 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente estadounidense N.º 4.601.978. Véase también Reyes et al., 1982, *Nature* 297:598-601, que describen la expresión de cADN de interferón γ humano en las células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa del virus del herpes simple. De manera alternativa, se puede usar la repetición del terminal largo del virus del sarcoma de Rous como promotor.

[0191] Otro elemento útil que se puede usar en un vector de expresión recombinante es una secuencia potenciadora, que se usa para aumentar la transcripción de un ADN que codifica un anticuerpo anti-TrkB humanizado mediante eucariotas superiores. En la actualidad, se conocen varias secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (por ejemplo, globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Sin embargo, en general, se usa un potenciador de un virus de células eucariotas. Los ejemplos incluyen el potenciador SV40 en el último sitio del origen de replicación (bp 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polio en el último sitio del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, 1982, *Nature* 297:17-18 para obtener una descripción de elementos potenciadores para la activación de promotores eucarióticos. El potenciador se puede escindir en el vector en una posición 5' o 3' con respecto a la secuencia que codifica el anticuerpo anti-TrkB, pero preferentemente se ubica en el sitio 5' del promotor.

[0192] Los vectores de expresión que se usan en las células huésped eucariotas (levadura, hongos, insectos, plantas, animales, seres humanos o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también pueden contener secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del mRNA. En general,

estas secuencias se encuentran disponibles en las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente, 3' de ADN o cADN eucarióticos o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del mRNA que codifica el anticuerpo anti-TrkB. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase WO94/11026 y el vector de expresión allí divulgado. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-TrkB se pueden expresar usando el sistema CHEF. (Véase, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 5.888.809, cuya descripción se incorpora por referencia en la presente.)

[0193] Las células huésped adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores de la presente son las células procariotas, de levadura o eucariotas superiores descritas anteriormente. Los procariotas adecuados para ello incluyen eubacterias, tales como organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae*, tal como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans* y *Shigella*, así como bacilos, tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41 P divulgado en DD 266.710 que se publicó el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas*, tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Un huésped de clonación de *E. coli* preferido es *E. coli* 294 (ATCC 31,446), aunque también son adecuadas otras cepas, tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31,537) y *E. coli* W3110 (ATCC 27,325). Estos ejemplos son ilustrativos y no limitativos.

[0194] Además de los procariotas, los microbios eucarióticos, tales como hongos filamentosos o levadura, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para los vectores que codifican el anticuerpo anti-TrkB. *Saccharomyces cerevisiae*, comúnmente conocido como levadura de panadería, es el más habitual entre los microorganismos huésped eucarióticos inferiores. Sin embargo, hay varios géneros, especies y cepas diferentes generalmente disponibles y útiles en la presente, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes de *Kluyveromyces*, tales como *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilum* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070); *Candida*; *Trichoderma reesei* (EP 244,234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, tal como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos, tales como *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* y huéspedes de *Aspergillus*, tales como *A. nidulans* y *A.*

niger.

[0195] Las células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo anti-TrkB glucosilado derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas e insectos, que incluyen, por ejemplo, numerosas cepas y variantes baculovirales, y las correspondientes células huésped permisivas de insectos de huéspedes, tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori* (gusano de la seda). En el comercio se encuentran varias cepas virales para la transfección, por ejemplo, la variante L-1 de Autographa californica NPV y la cepa Bm-5 de Bombyx mori NPV; se pueden usar esos virus, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

[0196] Los cultivos de células vegetales de algodón, maíz, papa, soja, petunia, tomate y tabaco también se pueden usar como huéspedes.

[0197] Los anticuerpos anti-TrkB inventivos, o los fragmentos de fijación al antígeno de estos, también se pueden incorporar en vectores virales, es decir, el polinucleótido que codifica el anticuerpo anti-TrkB o el fragmento de fijación al antígeno de este se introduce en el vector viral y luego se expresa en el cuerpo del paciente después de la infección por el virus.

[0198] En otro aspecto, la expresión de anti-TrkB se realiza en las células de vertebrados. La propagación de las células de vertebrados en el cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento de rutina, y las técnicas se usan ampliamente. Los ejemplos de líneas de células huésped de mamíferos útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651), la línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para la proliferación en cultivo de suspensión (Graham et al., 1977, J. Gen Virol. 36: 59), células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10), células de ovarios de hámster chino/-DHFR1 (CHO, Urlaub et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216; por ejemplo, DG44), células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, 1980, Biol. Reprod. 23:243-251), células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70), células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587), células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2), células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34), células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442), células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75), células de hígado humano (Hep G2, HB 8065), tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51), células TR1 (Mather et al., 1982, Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68), células MRC 5, células FS4 y línea de hepatoma humano (Hep G2).

[0199] Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o clonación antes descritos para la producción de anticuerpos anti-TrkB y se cultivan en un medio de nutrientes convencional modificado convenientemente para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar genes que codifican las secuencias deseadas.

[0200] Las células huésped que se usan para producir un anticuerpo anti-TrkB descrito en la presente se pueden cultivar en varios medios. Los medios disponibles en el comercio, tales como Ham's F10 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo.), medio esencial mínimo ((MEM), (Sigma-Aldrich Co.), RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Co.) y medio Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma-Aldrich Co.) son adecuados para cultivar las células huésped. Además, se puede usar cualquiera de los medios descritos en uno o más de Ham et al., 1979, Meth. Enz. 58: 44, Barnes et al., 1980, Anal. Biochem. 102: 255, patente estadounidense N.º 4.767.704, patente estadounidense N.º 4.657.866, patente estadounidense N.º 4.927.762, patente estadounidense N.º 4.560.655, patente estadounidense N.º 5.122.469, WO 90/103430 y WO 87/00195, como medio de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios se puede complementar, según sea necesario, con hormonas y/u otros factores del crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), amortiguadores (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como gentamicina), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos que están presentes, en general, en concentraciones finales en el rango micromolar), glucosa o una fuente de energía equivalente. También se pueden incluir otros complementos en concentraciones adecuadas conocidos por las personas del oficio de nivel medio. Las condiciones del cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las que se usaron previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para la persona del oficio de nivel medio.

[0201] Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir de manera intracelular, en el espacio periplásmico, o se puede segregar directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce de manera intracelular, las células se pueden alterar para liberar proteína como primera etapa. Los residuos de partículas, ya sea células huésped o fragmentos lisados, se pueden retirar, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., 1992, Bio/Technology 10:163-167 describen un proceso para aislar anticuerpos que son segregados al espacio periplásmico de *E. coli*. En síntesis, la pasta celular es descongelada en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonio (PMSF) durante

alrededor de 30 minutos. Los restos celulares se pueden retirar mediante centrifugación. Cuando el anticuerpo es segregado en el medio, los sobrenadantes de esos sistemas de expresión en general primero se concentran usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el comercio, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Un inhibidor de proteasa, tal como PMSF, se puede incluir en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis, y se pueden incluir antibióticos para evitar el desarrollo de contaminantes no previstos. Se pueden usar varios métodos para aislar el anticuerpo de la célula huésped.

[0202] La composición de anticuerpos preparada de las células se puede purificar usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía por afinidad; la cromatografía por afinidad es una técnica de purificación típica. La conveniencia de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y del isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que está presente en el anticuerpo. La proteína A se puede usar para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas gamma1, gamma2 o gamma4 humanas (véase, por ejemplo, Lindmark et al., 1983 J. Immunol. Meth. 62:1-13). Se recomienda la proteína G para todos los isotipos de ratón y para gamma3 humana (véase, por ejemplo, Guss et al., 1986 EMBO J. 5:1567-1575). Una matriz a la que se une un ligando de afinidad es, con frecuencia, agarosa, pero también hay otras matrices disponibles. Las matrices mecánicamente estables, tales como el vidrio poroso controlado o poli(estirendivinil)benceno permiten tasas de flujo más rápidas y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_{H3}, la resina Bakerbond ABX™™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) es útil para la purificación. También hay otras técnicas disponibles para la purificación de las proteínas, tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina-SEPHAROSE™™, cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como columna de ácido poliaspártico), cromatografía en SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio, según el anticuerpo que se desee recuperar.

[0203] Después de cualquier etapa de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes puede someterse a cromatografía de interacción hidrófoba de pH bajo usando un amortiguador de elución a un pH de alrededor de 2,5 a 4,5, lo cual se realiza, en general, con bajas concentraciones de sal (por ejemplo, sal a alrededor de 0-0,25 M).

[0204] También se incluyen ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones de rigurosidad baja, moderada y alta, como se define en la presente, con la totalidad o con una porción (por ejemplo, la porción que codifica la región variable) de la secuencia de nucleótidos representada por secuencias de polinucleótidos aisladas que codifican un anticuerpo TrkB o un fragmento de anticuerpo. La porción de hibridación del ácido nucleico que se hibrida tiene, en general, una longitud de al menos 15 (por ejemplo, 20, 25, 30 o 50) nucleótidos. La porción de hibridación del ácido nucleico que se hibrida es al menos 80 %, por ejemplo, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 % idéntica a la secuencia de una porción o la totalidad de un ácido nucleico que codifica un polipéptido anti-TrkB (por ejemplo, una región variable de la cadena pesada o cadena liviana) o su complemento. Los ácidos nucleicos de hibridación del tipo que se describe en la presente se pueden usar, por ejemplo, como sonda de clonación, cebador, por ejemplo cebador de PCR, o sonda de diagnóstico.

[0205] En algunas formas de realización, la presente invención incluye polinucleótidos aislados que incluyen secuencias que codifican un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que tienen una cadena liviana variable y una cadena pesada variable, en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana variable y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable son al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % idénticas a las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 12, o 3 y 13, o 4 y 14, o 5 y 15, o 6 y 16, o 7 y 17, o 8 y 18, o 9 y 19, o 10 y 20, respectivamente.

[0206] En algunas formas de realización, la presente invención incluye polinucleótidos aislados que incluyen secuencias que codifican un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que tienen una cadena liviana y una cadena pesada, en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada son al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % idénticas a las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y 22 o 23; 24 y 25 o 26; 27 y 28 o 29; 30 y 31 o 32; 33 y 34 o 35; 36 y 37 o 38; 39 y 40 o 41; 42 y 43 o 44; 45 y 46 o 47, respectivamente.

[0207] Se entiende que en los anticuerpos anti-TrkB o fragmentos de anticuerpo la secuencia de ácidos nucleicos que codifica las CDR se mantiene inalterada (con respecto al aminoácido que codifican, son posibles los equivalentes de la secuencia de ADN debido a la degeneración de codones) pero las regiones circundantes, por ejemplo, las regiones FR, se pueden modificar por ingeniería genética.

[0208] Usos no terapéuticos

[0209] Los anticuerpos descritos en la presente son útiles como agentes de purificación por afinidad. En este proceso, los anticuerpos se inmovilizan en una fase sólida, tal como una resina de proteína A, usando métodos conocidos en el estado de la técnica. Se pone en contacto el anticuerpo inmovilizado con una muestra que contiene la proteína TrkB (o un fragmento de esta) que se debe purificar, y posteriormente el soporte se lava con un solvente adecuado que retirará prácticamente todo el material en la muestra, excepto la proteína TrkB, que se fija al anticuerpo inmovilizado. Finalmente, el soporte se lava con otro solvente adecuado que liberará la proteína TrkB del anticuerpo.

[0210] Los anticuerpos anti-TrkB también son útiles en ensayos de diagnóstico para detectar y/o cuantificar la proteína TrkB, por ejemplo, para detectar la expresión de TrkB en células, tejidos o sueros específicos.

[0211] En algunas formas de realización, por ejemplo, es conveniente etiquetar el anticuerpo con una porción detectable para fines de diagnóstico. En el comercio se encuentran muchas etiquetas detectables, que incluyen radioisótopos, etiquetas fluorescentes, etiquetas de sustratos enzimáticos y similares. La etiqueta se puede conjugar indirectamente con el anticuerpo usando varias técnicas conocidas. Por ejemplo, el anticuerpo se puede conjugar con biotina, y cualquiera de las tres amplias categorías de etiquetas antes mencionadas se puede conjugar con avidina, o viceversa. La biotina se fija selectivamente a la avidina y, por lo tanto, la etiqueta se puede conjugar con el anticuerpo de esta forma indirecta. De manera alternativa, para lograr la conjugación indirecta de la etiqueta con el anticuerpo, el anticuerpo se puede conjugar con un hapteno (tal como digoxina) pequeño, y uno de los distintos tipos de etiquetas antes mencionadas se conjuga con un anticuerpo antihapteno (por ejemplo, anticuerpo antidigoxina). Por lo tanto, se puede lograr la conjugación indirecta de la etiqueta con el anticuerpo.

[0212] Las etiquetas de radioisótopos de ejemplo incluyen ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H y ^{131}I . El anticuerpo se puede etiquetar con el radioisótopo mediante las técnicas descritas, por ejemplo, en *Current Protocols in Immunology*, volúmenes 1 y 2, 1991, Coligen et al., ed. Wiley-Interscience, Nueva York, N.Y., Pubs. La radioactividad se puede medir, por ejemplo, mediante conteo de centelleo.

[0213] Los ejemplos de etiquetas fluorescentes incluyen etiquetas que derivan de quelatos terrosos raros (quelatos de europio) o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, Lissamine, ficoeritrina y Texas Red, los cuales están disponibles en el comercio. Las etiquetas fluorescentes se pueden conjugar con el

anticuerpo mediante técnicas conocidas, como las que se divulgan, por ejemplo, en *Current Protocols In Immunology*, *supra*. La fluorescencia se puede cuantificar mediante un fluorímetro.

[0214] En el estado de la técnica se conocen varias etiquetas de sustratos enzimáticos bien caracterizados (véase, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 4.275.149 para obtener una reseña). En general, la enzima cataliza una alteración química de sustrato cromogénico que se puede medir usando varias técnicas. Por ejemplo, la alteración puede consistir en el cambio de color en un sustrato, que se puede medir con un espectrofotómetro. De manera alternativa, la enzima puede alterar la fluorescencia o la quimioluminiscencia del sustrato. Anteriormente se describieron técnicas para cuantificar un cambio de fluorescencia. El sustrato quimioluminiscente se excita electrónicamente mediante una reacción química y luego puede emitir una luz que se puede medir con un quimioluminómetro, por ejemplo, o dona energía a un aceptor fluorescente.

[0215] Los ejemplos de etiquetas enzimáticas incluyen luciferasas, tales como luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente estadounidense N.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, deshidrogenasa de malato, ureasa, peroxidasa, tal como peroxidasa de rábano picante (HRPO), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas de sacáridos (tales como glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa y similares. Las técnicas para conjugar enzimas con anticuerpos se describen, por ejemplo, en O'Sullivan et al., 1981, *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, en *Methods in Enzym.* (J. Langone & H. Van Vunakis, eds.), Academic press, N.Y., 73: 147-166.

[0216] Los ejemplos de combinaciones de enzima-sustrato incluyen, por ejemplo: Peroxidasa de rábano picante (HRPO) con peroxidasa de hidrógeno como sustrato, en donde la peroxidasa de hidrógeno oxida un precursor de tintura, tal como ortofenilendiamina (OPD) o clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB); fosfatasa alcalina (AP) con para-nitrofenilfosfato como sustrato cromogénico; y β -D-galactosidasa (β -D-Gal) con un sustrato cromogénico, tal como p-nitrofenil- β -D-galactosidasa o el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- β -D-galactosidasa.

[0217] Muchas otras combinaciones de enzima-sustrato son conocidas por las personas del oficio de nivel medio. Para obtener una reseña general de estos, véase la patente estadounidense N.º 4.275.149 y la patente estadounidense N.º 4.318.980.

[0218] En otra forma de realización, el anticuerpo anti-TrkB se usa sin etiquetar y se detecta con un anticuerpo etiquetado que se fija al anticuerpo anti-TrkB.

[0219] Los anticuerpos descritos en la presente se pueden usar en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de fijación competitivos, ensayos tipo sándwich directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación. Véase, por ejemplo, Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

[0220] Kits de diagnóstico

[0221] Un anticuerpo anti-TrkB se puede usar en un kit de diagnóstico, es decir, un paquete de reactivos combinados en cantidades predeterminadas con instrucciones para realizar el ensayo de diagnóstico. Cuando el anticuerpo está etiquetado con una enzima, el kit puede incluir sustratos y cofactores requeridos por la enzima, tales como un precursor del sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectables. Además, se pueden incluir otros aditivos, tales como estabilizadores, amortiguadores (por ejemplo, un amortiguador de bloqueo o un amortiguador de lisis) y similares. Las cantidades relativas de los distintos reactivos pueden variar ampliamente para proporcionar concentraciones en solución de los reactivos que optimizan de manera considerable la sensibilidad del ensayo. Los reactivos se pueden proveer como polvos secos, generalmente liofilizados, que incluyen excipientes que, al disolverse, proporcionarán una solución de reactivo con la concentración adecuada.

[0222] Usos terapéuticos y trastornos asociados a TrkB

[0223] En otra forma de realización, un anticuerpo anti-TrkB (o un fragmento funcional de este) divulgado en la presente es útil para el tratamiento de varios trastornos asociados a la expresión de TrkB, como se describe en la presente.

[0224] El anticuerpo anti-TrkB, o el fragmento de fijación al antígeno de este, se administra por cualquier medio adecuado, que incluye por vía intravítrea, oral, parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Asimismo, el anticuerpo anti-TrkB se administra de manera adecuada mediante infusión por impulso, en particular con dosis decrecientes del anticuerpo. En un aspecto, las dosis se administran mediante inyecciones, con máxima preferencia, mediante inyecciones intravenosas o subcutáneas, lo cual depende, en parte, de si la administración es breve o crónica. Preferentemente, el anticuerpo anti-TrkB se administra mediante una inyección intravítrea en el ojo.

[0225] Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosis adecuada de anticuerpo dependerá de varios factores, tales como el tipo de enfermedad que se

debe tratar, como se definió anteriormente, la gravedad y el transcurso de la enfermedad, si la administración del anticuerpo es con fines preventivos o terapéuticos, el tratamiento previo, los antecedentes patológicos del paciente, la respuesta al anticuerpo y el criterio del médico tratante. El anticuerpo se administra de manera adecuada al paciente de una sola vez o en una serie de tratamientos.

[0226] En la presente, el término “supresión” se usa en el mismo contexto como “mejora” y “alivio”, y significa una atenuación o disminución de una o más características de la enfermedad.

[0227] La composición de anticuerpos se formulará, dosificará y administrará de manera que respete las buenas prácticas médicas. Algunos factores que se consideran en este contexto son el trastorno particular que se trata, el mamífero particular que se trata, la afección clínica del paciente, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos por los médicos. La “cantidad terapéuticamente eficaz” del anticuerpo que se debe administrar dependerá de tales consideraciones y es la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar o tratar el trastorno asociado a la expresión de TrkB.

[0228] No es necesario que el anticuerpo se formule con uno o más agentes que se usan actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión, pero opcionalmente puede formularse de esa manera. La cantidad eficaz de esos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo anti-TrkB presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores analizados anteriormente. En general, estos se usan en las mismas dosis y con las vías de administración que se usaron anteriormente en la presente o de alrededor de 1 a 99 % de las dosis empleadas hasta ahora.

[0229] Los anticuerpos agonistas anti-TrkB de la presente invención estimulan la señalización de TrkB. Sin pretender limitarse a la teoría, se considera que la señalización de TrkB es beneficiosa para proteger fotorreceptores, otras neuronas retinianas que incluyen células ganglionares y células del epitelio pigmentario retiniano de la muerte celular en la retina. Por lo tanto, los anticuerpos agonistas anti-TrkB pueden proteger las neuronas retinianas, tales como fotorreceptores, de la degeneración, es decir, prevenir la neurodegeneración, y también aumentar la supervivencia y/o plasticidad neuronal que, en última instancia, compensa la pérdida de vista asociada a la reducción de actividad de TrkB y/o el aumento del estrés celular o la actividad apoptótica. Por ende, los anticuerpos son útiles para el tratamiento de enfermedades oculares o retinianas, en particular, enfermedades oculares o retinianas

neurodegenerativas. Tales enfermedades comprenden, entre otras, degeneración macular relacionada con la edad, atrofia geográfica, retinopatía diabética, edema macular diabético, retinitis pigmentosa, distrofia retiniana hereditaria, distrofia macular hereditaria, degeneración miópica, oclusiones venosas de la retina, oclusiones arteriales de la retina, endoftalmitis, uveítis, edema macular cistoide, membrana neovascular coroidea secundaria a cualquier enfermedad retiniana, neuropatías ópticas, glaucoma, desprendimiento de retina, retinopatía tóxica, retinopatía por radiación y retinopatía traumática.

[0230] Además, los anticuerpos son útiles para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central, tales como enfermedad de Alzheimer prodrómica y leve a moderada, atraso de la progresión de la enfermedad de pacientes con enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, trastorno depresivo mayor, esquizofrenia, deficiencia cognitiva asociada a la esquizofrenia, prevención del primer episodio de psicosis en individuos con síndrome psicótico atenuado, prevención de la recaída en pacientes con esquizofrenia o depresión resistente al tratamiento.

[0231] En otra forma de realización, los anticuerpos pueden ser útiles para el tratamiento de la pérdida de audición, en particular, la pérdida de oído inducida por cisplatino al igual que la pérdida de oído relacionada con la edad.

[0232] En particular, los anticuerpos agonistas anti-TrkB de la presente invención se indican para el tratamiento de retinopatía diabética no proliferativa y/o proliferativa y/o edema macular diabético, además del tratamiento de referencia: La disfunción de las neuronas retinianas y la neurodegeneración constituyen uno de los principales eventos patológicos en la retinopatía diabética y el edema macular diabético (en todas las etapas de la enfermedad) que, en última instancia, generan pérdida de la vista y disfunción visual. La activación de TrkB compensará la pérdida y las deficiencias funcionales de las neuronas retinianas y, de esta manera, ayuda a mantener una vista normal, reducir la pérdida de la función visual durante la enfermedad y, potencialmente, ayuda a recuperar la función visual.

[0233] Asimismo, existe el uso potencial de la activación de TrkB como un complemento para el tratamiento anti-VEGF que mejorará considerablemente los beneficios terapéuticos de este último, ya que el tratamiento anti-VEGF solo actúa sobre la disfunción vascular en el ojo, pero no el sistema de neuronas/células gliales; además, el tratamiento anti-VEGF a largo plazo podría generar efectos secundarios neurodegenerativos. Un método de activación de TrkB como complemento para el tratamiento anti-VEGF reducirá estos efectos secundarios neurodegenerativos.

[0234] Los anticuerpos anti-TrkB, o los fragmentos de fijación al antígeno de estos, son particularmente útiles para tratar o prevenir trastornos retinianos, tales como retinopatía diabética, edema macular diabético, atrofia geográfica y glaucoma.

[0235] En otro aspecto, los anticuerpos anti-TrkB, o los fragmentos de fijación al antígeno de estos, también son útiles para el tratamiento de enfermedades metabólicas, tales como hiperfagia, obesidad y síndrome metabólico.

[0236] En otro aspecto, los anticuerpos contra TrkB de la presente invención se pueden usar en un método para tratar y/o prevenir un trastorno asociado a TrkB, en particular, atrofia geográfica, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo contra TrkB inventivo a un individuo que padece atrofia geográfica, y así aliviar uno o más síntomas de atrofia geográfica.

[0237] Aun en otro aspecto, los anticuerpos agonistas contra TrkB se pueden usar en un método para tratar y/o prevenir la atrofia geográfica, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo agonista contra TrkB a un individuo que padece atrofia geográfica, y así aliviar uno o más síntomas de atrofia geográfica.

[0238] Composiciones farmacéuticas y su administración

[0239] Una composición que comprende un anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento de fijación al antígeno de este, se puede administrar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad ocular o retiniana. La invención también proporciona el uso de un anticuerpo anti-TrkB o un fragmento de fijación al antígeno de este en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad de TrkB. Como se usa en la presente, el término “sujeto” significa cualquier paciente mamífero al que se puede administrar un anticuerpo anti-TrkB o un fragmento de fijación al antígeno de este, lo que incluye, por ejemplo, seres humanos y mamíferos no humanos, tales como primates, roedores y perros. Los sujetos a los que se pretende tratar específicamente usando los métodos descritos en la presente incluyen los seres humanos. El anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento de fijación al antígeno de este, se puede administrar solo o en combinación con otras composiciones.

[0240] Los anticuerpos preferidos para usar en esas composiciones farmacéuticas son aquellos que comprenden un anticuerpo humanizado o fragmentos de anticuerpo que tienen una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana variable y de la cadena pesada variable de SEQ ID NO: 2 y 12, o 3 y 13, o 4 y 14, o 5 y 15, o 6 y 16, o 7 y 17, o 8 y 18, o 9 y 19, o 10 y 20, respectivamente.

[0241] También están contemplados los anticuerpos para usar en tales composiciones

farmacéuticas que comprenden anticuerpo humanizado o fragmentos de anticuerpo que tienen una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana variable y de la cadena pesada variable al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 12, o 3 y 13, o 4 y 14, o 5 y 15, o 6 y 16, o 7 y 17, o 8 y 18, o 9 y 19, o 10 y 20, respectivamente.

[0242] Los anticuerpos de mayor preferencia para usar en esas composiciones farmacéuticas son aquellos que comprenden un anticuerpo humanizado o fragmentos de anticuerpo que tienen una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana y de la cadena pesada de SEQ ID NO: 21 y 22 o 23; 24 y 25 o 26; 27 y 28 o 29; 30 y 31 o 32; 33 y 34 o 35; 36 y 37 o 38; 39 y 40 o 41; 42 y 43 o 44; 45 y 46 o 47, respectivamente.

[0243] Los anticuerpos de mayor preferencia para usar en tales composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpo humanizado o fragmentos de anticuerpo que tienen una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana y de la cadena pesada al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y 22 o 23; 24 y 25 o 26; 27 y 28 o 29; 30 y 31 o 32; 33 y 34 o 35; 36 y 37 o 38; 39 y 40 o 41; 42 y 43 o 44; 45 y 46 o 47, respectivamente.

[0244] Se entiende que, en dichos anticuerpos anti-TrkB y fragmentos de anticuerpo, la secuencia de aminoácidos de las CDR se mantiene inalterada pero las regiones circundantes, por ejemplo, las regiones FR, se pueden modificar por ingeniería genética.

[0245] Se conocen distintos sistemas de administración que se pueden usar para administrar el anticuerpo anti-TrkB o un fragmento de fijación al antígeno de este. Los métodos de introducción incluyen, entre otros, colirio, vía intravítrea, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. El anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento de fijación al antígeno de este, se puede administrar, por ejemplo, mediante infusión, bolo o inyección, y se puede administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. En formas de administración preferidas, la administración es mediante inyección intravítrea. Las formulaciones para tales inyecciones se pueden preparar, por ejemplo, en jeringas previamente llenadas.

[0246] Un anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento de fijación al antígeno de este, se puede administrar como composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento de fijación al antígeno de este, y uno o más ingredientes farmacéuticamente compatibles.

[0247] En formas de realización típicas, la composición farmacéutica se formula de acuerdo con procedimientos de rutina, como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa o subcutánea a seres humanos. Generalmente, las composiciones para la administración mediante inyección son soluciones en amortiguador acuoso isotónico estéril. En los casos en que sea necesario, la composición farmacéutica también puede incluir un agente solubilizante y anestesia local, tal como lignocaína, para aliviar el dolor en el lugar de la inyección. En general, los ingredientes se suministran en forma separada o combinados en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un concentrado libre de agua en un recipiente sellado herméticamente, tal como una ampolla o un sachet que indican la cantidad de agente activo. Cuando la composición farmacéutica se administra mediante infusión, se puede suministrar con una botella de infusión que contiene solución salina o agua estéril de grado farmacéutico. Cuando la composición farmacéutica se administra mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyectar o solución salina para que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

[0248] Además, la composición farmacéutica se puede proporcionar como un kit farmacéutico que comprende (a) un recipiente que contiene un anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento de fijación al antígeno de este, en forma liofilizada y (b) un segundo recipiente que contiene un diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico (por ejemplo, agua estéril) para inyectar. El diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico se puede usar para la reconstitución o la disolución del anticuerpo anti-TrkB liofilizado o el fragmento de fijación al antígeno de este. Opcionalmente asociado al recipiente, puede haber un aviso prescrito por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, en donde el aviso contiene la aprobación de la agencia de fabricar, usar o vender para la administración en seres humanos.

[0249] La cantidad de anticuerpo anti-TrkB, o fragmento de fijación al antígeno de este, que es eficaz en el tratamiento o la prevención de un trastorno relacionado con TrkB se puede determinar mediante técnicas clínicas estándares. Asimismo, se pueden usar opcionalmente ensayos *in vitro* para ayudar a identificar los rangos de dosis óptimos. La dosis precisa que se puede usar en la formulación también dependerá de la vía de administración y del estadio del trastorno, y debería decidirse de acuerdo con el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces se pueden extrapolar de las curvas de respuesta a la dosis, derivadas de

sistemas de prueba en modelos de animales o *in vitro*.

[0250] Por ejemplo, la eficacia terapéutica y de toxicidad del anticuerpo anti-TrkB o el fragmento de fijación al antígeno de este se puede determinar en cultivos celulares o animales experimentales mediante procedimientos farmacéuticos estándar para determinar la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en 50 % de la población). Se prefiere un anticuerpo anti-TrkB o un fragmento de fijación al antígeno de este que presenta un índice terapéutico alto.

[0251] Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios en animales se pueden usar en la formulación de un rango de dosis para uso en seres humanos. La dosis del anticuerpo anti-TrkB, o del fragmento de fijación al antígeno de este, yace normalmente dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyen la ED₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este rango en función de la forma de dosis empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier anticuerpo anti-TrkB o fragmento de fijación al antígeno de este usado en el método, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente en ensayos de cultivo celular. Una dosis puede formularse en modelos animales para alcanzar un rango de concentración en plasma circulante que incluye la IC₅₀ (es decir, la concentración del compuesto de prueba que alcanza la inhibición media máxima de síntomas) como se determina en el cultivo celular. Esta información se puede usar para determinar de manera más precisa las dosis útiles en seres humanos. Se pueden medir los niveles en plasma, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento, ELISA y similares.

[0252] Para la inyección intravítrea del anticuerpo TrkB generalmente se prefieren intervalos más prolongados entre tratamientos. Debido a su potencia mejorada, los anticuerpos contra TrkB de la presente invención se pueden administrar en intervalos más prolongados.

[0253] En una forma de realización, el anticuerpo contra TrkB se administra cada 6 semanas, preferentemente, cada 7 semanas, también preferentemente, cada 8 semanas, con mayor preferencia, cada 9 semanas, con mayor preferencia, cada 10 semanas, con mayor preferencia, cada 11 semanas y, aun con mayor preferencia, cada 12 semanas. En una forma de realización de mayor preferencia, el anticuerpo contra TrkB se administra una vez cada 3 meses.

[0254] En una forma de realización, el anticuerpo contra TrkB se administra al sujeto que lo necesita en una dosis inicial de 1-2000 mg. En otra forma de realización, se administran opcionalmente una o más dosis posteriores, cada una de las cuales

comprende 1-2000 mg del anticuerpo contra TrkB.

[0255] Debido a que el volumen que se puede administrar en el ojo es estrictamente limitado, es muy importante poder formular un anticuerpo anti-TrkB en concentraciones altas. Asimismo, la potencia del anticuerpo anti-TrkB es de gran importancia, ya que un anticuerpo potente puede ejercer su efecto incluso en las dosis más bajas y, en consecuencia, prolongar la actividad y los intervalos entre tratamientos.

[0256] Los anticuerpos de la presente invención se pueden formular en dosis muy altas que incluyen, entre otras, 20 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml o 100 mg/ml.

[0257] Una dosis habitual que se puede administrar a un paciente es alrededor de 3 mg/ojo. Los componentes amortiguadores habituales que se pueden usar para tal formulación comprenden, por ejemplo, acetato de sodio, PS20 y dihidrato de trehalosa.

[0258] En una forma de realización, el anticuerpo anti-TrkB está formulado con 10 mM de amortiguador de histidina, 240 mM de sacarosa, 0,02 p/v % de polisorbato 20 a pH 5,5 con una concentración de proteína final de 60 mg/ml.

[0259] En algunas formas de realización, las composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo anti-TrkB, o el fragmento de fijación al antígeno de este, pueden comprender también un agente terapéutico, conjugado o no conjugado con el agente de fijación. El anticuerpo anti-TrkB o el fragmento de fijación al antígeno de este se pueden coadministrar en combinación con uno o más agentes terapéuticos para el tratamiento o la prevención de una enfermedad relacionada con TrkB. Por ejemplo, el tratamiento conjunto pueden incluir anti-VEGF, anti-PDGF o anti-ANG2.

[0260] La administración del tratamiento conjunto puede tener un efecto aditivo o sinérgico en los parámetros de la enfermedad (por ejemplo, la gravedad de un síntoma, cantidad de síntomas o frecuencia de la recidiva).

[0261] Con respecto a los regímenes terapéuticos para la administración combinada, en una forma de realización específica, un anticuerpo anti-TrkB o un fragmento de fijación al antígeno de este se administran de manera concurrente con un agente terapéutico. En otra forma de realización específica, el agente terapéutico se administra al menos 1 hora y hasta varios meses antes o después de la administración del anticuerpo anti-TrkB o del fragmento de fijación al antígeno de este, por ejemplo, al menos 1 hora, 5 horas, 12 horas, 1 día, 1 semana, 1 mes o 3 meses antes o después de la administración del anticuerpo anti-TrkB o del fragmento de fijación al antígeno de este.

[0262] Artículos de fabricación

[0263] En otro aspecto, se incluye un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los recipientes pueden formarse de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para tratar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril. Por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial con un tapón que se puede perforar con una aguja de inyección hipodérmica. El agente activo en la composición es el anticuerpo anti-TrkB o el fragmento de fijación al antígeno de este. La etiqueta que se encuentra sobre el recipiente o que está asociada a este indica que la composición se usa para tratar la afección determinada. El artículo de fabricación también puede comprender un segundo recipiente que comprende un amortiguador aceptable desde el punto de vista farmacéutico, tal como una solución salina amortiguada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. También puede incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, que incluye otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones de uso.

[0264] La invención también se describe en los siguientes ejemplos, que no pretenden limitar el alcance de la invención.

EJEMPLOS

[0265] 1. Generación de anticuerpos (inmunización)

[0266] A través de la campaña de inmunización, los linfocitos B de ratones se sometieron a cribado utilizando la tecnología desarrollada internamente de plataforma de linfocito B único. Asimismo, los aglutinantes anti-TrkB se redujeron adicionalmente luego de la evaluación de la actividad, eficiencia y potencia en el ensayo de fosforilación de TrkB *in-vitro*.

[0267] 2. Producción de anticuerpos humanizados

[0268] Se seleccionó el D003 murino inicial para una optimización adicional. El anticuerpo murino inicial tuvo una cadena liviana variable correspondiente a SEQ ID NO: 1 y una cadena pesada variable correspondiente a SEQ ID NO: 11.

[0269] Para optimizar la secuencia del D003 murino inicial de TrkB, se seleccionaron las secuencias de anticuerpos de la línea germinal humana más similar, IGKV4-1*01, KJ2 para la cadena liviana y IGHV1-46*03, HJ6 para la cadena pesada. Se generó una colección de variantes. Se produjeron como resultado secuencias de la cadena liviana variable humanizadas de SEQ ID NO: 2-10 y secuencias de la cadena pesada variable

humanizadas de SEQ ID NO: 12-20.

[0270] TABLA 2:

277-gr_VL, cadena liviana variable (humanizada)	SEQ ID NO: 2
277-33_VL: cadena liviana variable (humanizada)	SEQ ID NO: 3
277-35_VL: cadena liviana variable (humanizada)	SEQ ID NO: 4
277-42_VL, cadena liviana variable (humanizada)	SEQ ID NO: 5
277-44_VL, cadena liviana variable (humanizada)	SEQ ID NO: 6
277-48_VL, cadena liviana variable (humanizada)	SEQ ID NO: 7
277-51_VL, cadena liviana variable (humanizada)	SEQ ID NO: 8
277-64_VL, cadena liviana variable (humanizada)	SEQ ID NO: 9
277-67_VL, cadena liviana variable (humanizada)	SEQ ID NO: 10
277-gr_VH, cadena pesada variable (humanizada)	SEQ ID NO: 12
277-33_VH: cadena pesada variable (humanizada)	SEQ ID NO: 13
277-35_VH: cadena pesada variable (humanizada)	SEQ ID NO: 14
277-42_VH, cadena pesada variable (humanizada)	SEQ ID NO: 15
277-44_VH, cadena pesada variable (humanizada)	SEQ ID NO: 16
277-48_VH, cadena pesada variable (humanizada)	SEQ ID NO: 17
277-51_VH, cadena pesada variable (humanizada)	SEQ ID NO: 18
277-64_VH, cadena pesada variable (humanizada)	SEQ ID NO: 19
277-67_VH, cadena pesada variable (humanizada)	SEQ ID NO: 20

[0271] Los anticuerpos humanizados de ejemplo de la presente invención son aquellos que tienen las secuencias de las cadenas liviana y pesada establecidas en la siguiente tabla. IgG1-KO tiene dos mutaciones en la región Fc, Leu234Ala y Leu235Ala para reducir la función efectora.

[0272] TABLA 3:

277-gr (cadena liviana, IgG1)	21
277-gr (cadena pesada, IgG1)	22
277-gr (cadena pesada, IgG1-KO)	23
277-33 (cadena liviana, IgG1)	24
277-33 (cadena pesada, IgG1)	25
277-33 (cadena pesada, IgG1-KO)	26
277-35 (cadena liviana, IgG1)	27
277-35 (cadena pesada, IgG1)	28

277-35 (cadena pesada, IgG1-KO)	29
277-42 (cadena liviana, IgG1)	30
277-42 (cadena pesada, IgG1)	31
277-42 (cadena pesada, IgG1-KO)	32
277-44 (cadena liviana, IgG1)	33
277-44 (cadena pesada, IgG1)	34
277-44 (cadena pesada, IgG1-KO)	35
277-48 (cadena liviana, IgG1)	36
277-48 (cadena pesada, IgG1)	37
277-48 (cadena pesada, IgG1-KO)	38
277-51 (cadena liviana, IgG1)	39
277-51 (cadena pesada, IgG1)	40
277-51 (cadena pesada, IgG1-KO)	41
277-64 (cadena liviana, IgG1)	42
277-64 (cadena pesada, IgG1)	43
277-64 (cadena pesada, IgG1-KO)	44
277-67 (cadena liviana, IgG1)	45
277-67 (cadena pesada, IgG1)	46
277-67 (cadena pesada, IgG1-KO)	47
277 L-CDR1	48
277 L-CDR2	49
277 L-CDR3	50
277 H-CDR1	51
277 H-CDR2	52
277 H-CDR3	53

[0273] 3. Información de epítipo

[0274] Materiales

Agua (Sigma Aldrich, P/N 37877-4L)

Acetonitrilo (Sigma Aldrich, P/N 34998-4L)

Ácido fórmico (Fluka, P/N 94318)

Urea (Sigma Aldrich, P/N 51456-500G)

TCEP-HCl – 10 g (Thermo Scientific - Pierce, P/N 20491)

Fosfato de sodio dibásico (Sigma Aldrich, P/N S7907-100G)

Fosfato de sodio monobásico (Sigma Aldrich, P/N S8282 – 500G)

Precolumna ACQUITY UPLC BEH C18 VanGuard, 130Å, 1,7 µm, 2,1 mm X 5 mm (Waters Technologies Corp, 186003975)

Cartucho de pepsina inmovilizada Poroszyme®, 2,1 mm x 30 mm (Life Technologies Corp, 2313100)

Columna Acquity UPLC BEH C18, 1,7µm, 1mm X 50 mm (Waters, 186002344)

Solvente A: 0,1 % de ácido fórmico /99 % de agua/1 % de acetonitrilo

Solvente B: 0,1 % de ácido fórmico /5% de agua/95% de acetonitrilo

Amortiguador de agua: 10 mM de H₂O, fosfato de sodio pH 7,4

Amortiguador de deuterio: 10 mM de D₂O, fosfato de sodio pH 7,4

Amortiguador de inactivación: Agua, urea 8 M, TCEP-HCl 0,4 M

[0275] En las muestras de control de mapeo de epítomos, el antígeno se prueba con y sin el anticuerpo. Para determinar la lista de péptidos antigénicos, se utilizó primero este protocolo usando amortiguador de agua en lugar de amortiguador de deuterio. Se mezclaron 4 µl de la muestra con 40 µl de amortiguador de deuterio. Esta mezcla se incubó a 20 °C durante múltiples puntos temporales (1, 2 y 4 minutos). Luego, se transfirieron 40 µl de la mezcla a 40 µl del amortiguador de inactivación a 4 °C (Urea 4M, Tcep-HCl 0,4M) y se mezcló. Se inyectaron 60 µl de la proteína inactivada, la cual se digirió en la columna de pepsina durante 2 minutos haciendo fluir 200 µl/ml del solvente A: 0,1 % de ácido fórmico /99 % de agua/1 % de acetonitrilo. Los péptidos siguientes se desalaron en la precolumna Vanguard durante 3 minutos. Los péptidos pépticos se enviaron a una columna de fase inversa BEH C18 dentro del compartimento de temperatura controlada de válvula/columna. Se utilizó un sistema de solventes de gradiente que consistía en el solvente A: 0,1 % de ácido fórmico /99 % de agua/1 % de acetonitrilo y el solvente B: 0,1 % de ácido fórmico /5 % de agua/95 % de acetonitrilo. El porcentaje de solvente B aumentó de 10 % a 15 % a los 5,1 minutos, a 50 % a los 11 minutos, a 90 % a los 11,5 minutos, que se mantuvo hasta los 12,5 minutos, a 0 % de B a los 13 minutos, que se mantuvo hasta los 14 minutos. La separación cromatográfica se produjo a 4 °C a una velocidad de flujo de 180 µl/min. Luego de la separación cromatográfica, la muestra se introdujo en un espectrómetro de masa Thermo Scientific Orbitrap Fusion operado en modo de ionización positiva de electrospray. El método utilizado incluyó tipos de activación de CID y ETD cuando se identificaron los péptidos de control, utilizando una resolución de 120.000, una señal mínima de 10.000, un ancho de aislamiento de 1,0 y una energía de colisión normalizada de 35,0 V. El nivel de RF de lentes S se estableció a un 60 %. El tipo de

recolección de datos para los péptidos de control es perfil para el barrido de MS completo y centroide para los datos de CID MS/MS. Para las muestras deuteradas, no se recolectó MS/MS. Los datos se recolectaron en un rango de masa de 280-1800 Da. Para el análisis de los datos de fragmentación de LC-MS/MS sin procesar, las muestras de control (con CID y ETD MS/MS) se analizaron utilizando Proteome Discover 1.4 (Thermo Scientific) y PMi Byonic (Protein Metrics) en comparación con la secuencia proporcionada para generar una lista de péptidos y tiempos de retención. Los archivos de los datos brutos se procesaron previamente y se convirtieron a formato ASCII utilizando el *software* interno registrado SHARC. Los péptidos identificados luego se emparejaron y se sintetizaron utilizando el *software* interno registrado SHAFT. Los epítomos se determinaron mediante las diferencias en el cambio de masa promedio inducido por la fijación luego del etiquetado con deuterio. A nivel peptídico, la protección mayor de 0,4 Da fue considerada significativa.

[0276] Se muestran los resultados del mapeo de epítomos para BDNF, anticuerpos 277, (C2) (US20100196390) y (C20) (US20100150914) en la Figura 1. Los sitios de fijación específicos de cada molécula al dominio extracelular de TrkB humana con SEQ ID NO: 54 se resaltan en gris oscuro. En comparación con el ligando natural BDNF, los anticuerpos 277 se fijan a nuevos epítomos distintos.

[0277] 4. Características no deseadas de las secuencias en las CDR

[0278] Las secuencias de las CDR se revisan para determinar la presencia de cualquier posible característica no deseada, tal como sitios de N-glicosilación, motivos de desamidación fuertes (NG, NS, NH, NA, ND, NT, NN), motivos de isomerización de aspartato (DG), motivos de fragmentación (DG, DS), cisteína. Estos aminoácidos o motivos pueden sufrir una reacción química y proporcionar heterogeneidad no deseada al producto, también con la posibilidad de generar un impacto negativo en la fijación y función dianas. Para estas reacciones, se prefiere eliminar dichos aminoácidos o motivos (si los hubiera) de las CDR.

[0279] Las CDR de las secuencias humanizadas y de ratón iniciales no poseen dichos motivos potenciales no deseados.

[0280] TABLA 4

Anticuerpo	D003/277	C2	C20	29D7 o TAM-163
Características no deseadas	0	2	3	6

[0281] 5. Inmunogenicidad

[0282] La inmunogenicidad de las secuencias se evaluó *in silico* con un algoritmo

proporcionado a través de una licencia mediante la compañía Epivax. El puntaje EpiMatrix ajustado a Treg consideró los epítomos de linfocitos T y los epítomos de Treg. A menor puntaje de inmunogenicidad, menor posibilidad de que una secuencia sea inmunógena. En general, se considera un puntaje negativo como un riesgo bajo de inmunogenicidad, mientras que un puntaje positivo es visto como una indicación de inmunogenicidad potencial.

[0283] TABLA 5:

VL	Puntaje Epivax	VH	Puntaje Epivax
277-gr_VL	-24	277-gr_VH	-46
277-33_VL	-31	277-33_VH	-32
277-35_VL	-31	277-35_VH	-26
277-42_VL	-27	277-42_VH	-26
277-44_VL	-14	277-44_VH	-49
277-48_VL	-24	277-48_VH	-29
277-51_VL	-31	277-51_VH	-22
277-64_VL	-28	277-64_VH	-44
277-67_VL	-14	277-67_VH	-44
C2_VL	-2	C2_VH	-21
C20_VL	+9	C20_VH	+20
TAM163_VL	-51	TAM163_VH	-19

[0284] 6. Afinidad:

[0285] Se utilizó tecnología de resonancia de plasmones superficiales (SPR) para determinar la afinidad de fijación de los anticuerpos 277, C2 (US20100196390) y C20 (US20100150914) y TAM-163 (WO2015173756) a Hu-TrkB-His. El experimento se realizó en un instrumento ProteOn XPR36.

[0286] Método: El amortiguador de corrida para este experimento y todas las diluciones (excepto cuando se comenzó) se realizaron en PBS-T-EDTA con 0,01 % de Tween20 [se agregaron 100 µl de Tween 20 al 100 % a 2l de PBS-T-EDTA para realizar la concentración de Tween 20 final de 0,01 %]. El chip sensor de GLM se normalizó y se preestableció conforme a las recomendaciones del fabricante. El chip sensor se activó con una mezcla equitativa de EDC/s-NHS en dirección horizontal durante 300 segundos a una velocidad de flujo de 30 µl/min y se inmovilizó con una proteína recombinante A/G (60 µg/ml en 10 mM de acetato, pH 4,5) en dirección horizontal durante 300 segundos a una velocidad de flujo de 30 µl/min, lo que produjo

~ 7100-7130 RU de la proteína A/G en la superficie. El chip sensor se desactivó con etanolamina HCl 1 M en dirección horizontal durante 300 s a una velocidad de flujo de 30 μ l/min. El chip sensor se estabilizó con 18 s de ácido fosfórico al 0,85 % a una velocidad de flujo de 100 μ l/min 3 veces horizontalmente y 3 veces verticalmente. El anticuerpo 277 (0,6 μ g/ml), C2 (2,1 μ g/ml), C20 (1,2 μ g/ml) y TAM-163 (5 μ g/ml) se capturaron en la superficie de la proteína A/G verticalmente durante 70 s a una velocidad de flujo de 30 μ l/min, lo que dio como resultado niveles de captura de ~615, 1390, 780 y 3380 RU, respectivamente. El valor inicial se estableció inyectando PBS-T-EDTA durante 60 s a una velocidad de flujo de 100 μ l/min horizontalmente y luego una segunda inyección de PBS-T-EDTA durante 60 s a una velocidad de flujo de 100 μ l/min y una disociación de 120 s horizontalmente. El analito (Hu-TrkB-His) se inyectó horizontalmente en el anticuerpo capturado durante 600 s a una velocidad de flujo de 30 μ l/min y una disociación durante 1800 s. La concentración de los analitos era 0 nM, 1,23 nM, 3,7 nM, 11,11 nM, 33,33 nM y 100 nM. La superficie se regeneró mediante la inyección de ácido fosfórico al 0,85 % durante 18 s a una velocidad de flujo de 100 μ l/min una vez horizontalmente y una vez verticalmente. Se inyectó PBS-T-EDTA durante 60 s a una velocidad de flujo de 100 μ l/min una vez verticalmente. El área de interacción (interacciones con la superficie del sensor) y el blanco (PBS-T-EDTA con 0,01 % de Tween20 o 0 nM de analito) se sustrajeron de los datos sin procesar. Luego, los sensogramas se ajustaron de manera global a fijación de Langmuir 1:1 para proporcionar valores de asociación (k_a), disociación (k_d) y afinidad (K_D).

[0287] Los anticuerpos 277 se fijaron a Hu-TrkB-His con una k_a de $1,93 \times 10^5$ 1/Ms, una k_d de $3,51 \times 10^{-4}$ 1/s y K_D de 1,2 nM. C2 se fijó a Hu-TrkB-His con una k_a de $2,32 \times 10^4$ 1/Ms, una k_d de $3,39 \times 10^{-4}$ 1/s y K_D de 10,5 nM. C20 se fijó a Hu-TrkB-His con una k_a de $1,29 \times 10^5$ 1/Ms, una k_d de $6,13 \times 10^{-3}$ 1/s y K_D de 47,7 nM. TAM-163 no se fija a 100 nM de Hu-TrkB-His.

[0288] TABLA 6:

mAb	TrkB humana		
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)
TAM-163_anti-TrkB	Sin fijación a 100 nM		
C20_anti-TrkB hulgG1-KO_EX00077781 quimérico	1,29E+05	6,13E-03	47,7
anti-TrkB C2_HulgG1ko (EX00077780)	2,32E+04	3,39E-04	10,5
Anticuerpos 277 anti-TRKB	1,93E+05	3.51E-04	1,19

[0289] 7. Fijación no específica:

[0290] Se realizó un ensayo de fijación no específica utilizando tecnología de

biosensor para determinar si los candidatos de la nueva entidad biológica (NBE) tenían una fijación significativa a las proteínas con carga no relacionadas. En este ensayo, los anticuerpos se hicieron pasar por dos superficies de SPR, una cubierta con una proteína con carga negativa no relacionada y otra cubierta con una proteína con carga positiva no relacionada. Cuando un candidato de NBE muestra una fijación no específica significativa a estas superficies, es posible que la causa de fijación sea la presencia de fragmentos de superficie con carga positiva o negativa en el candidato. La fijación no específica de los candidatos de NBE puede generar farmacocinética (PK) y biodistribución deficientes, y también puede tener impactos en la producibilidad corriente abajo. Los resultados de este ensayo se utilizan en el contexto de una evaluación de riesgo específica del proyecto. El propósito de este ensayo es reducir el riesgo de PK deficiente, falta de distribución diana de tejido y dificultad de producibilidad corriente abajo.

[0291] El objetivo es determinar si los anticuerpos 277 exhiben fijación no específica mediante la recolección de sensogramas de fijación de los anticuerpos 277 y la comparación de estos con aquellos de los controles para asignarles una categoría de fijación no específica favorable (verde), aceptable (amarillo) o desfavorable (rojo).

[0292] Método:

[0293] El experimento se realizó en Biacore T200. Los experimentos de dilución, preparación de la superficie y fijación se realizaron a 25 °C en un amortiguador 1X HBS-EP preparado de 10X HBS-EP. La velocidad de flujo tanto para el protocolo de inmovilización como para el experimento de fijación era de 5 µl/min.

[0294] Para preparar la superficie para el experimento de fijación no específica, una lisozima de clara de huevo de gallina y un inhibidor de tripsina tipo 1-S de soja se acoplaron manualmente en un chip CM5 serie S con una densidad de superficie de 3000-5000 RU utilizando el kit de acoplamiento de amina de acuerdo con las instrucciones del fabricante. FC1 y FC2 se activaron mediante una inyección de una mezcla 1:1 de EDC y NHS durante 7 min. La superficie de la lisozima de clara de huevo de gallina se preparó en FC2 mediante una inyección de 150 µg/ml de lisozima de clara de huevo de gallina en 10 mM de NaOAc, pH 5,5 durante 5 min. FC1 y FC2 se desactivaron mediante una inyección de etanolamina-HCl 1 M durante 7 min. Se utilizó FC1 como la superficie de referencia. FC3 se activó mediante una inyección de una mezcla 1:1 de EDC y HNS durante 7 min. El inhibidor de tripsina tipo 1-S de la superficie de soja se preparó en FC3 mediante la inyección de 300 µg/ml del inhibidor de tripsina tipo 1-S de soja en 10 mM de NaOAc, amortiguador pH 4,0 durante 20 min

seguido de una inyección durante 7 min de etanolamina-HCl 1 M para desactivar la célula de flujo. El anticuerpo policlonal antilisozima, el anticuerpo anti-inhibidor de tripsina y un control negativo de BI se utilizaron como controles en el ensayo. Los controles y anticuerpos se prepararon a 1 μ M en un amortiguador 1X HBS-EP. Las muestras se inyectaron en superficies FC1, FC2 y FC3 con una asociación de 10 min y una disociación de 15 min. Las superficies se regeneraron entre cada ciclo de fijación mediante una inyección durante 1 min de 0,85 % de ácido fosfórico y 30 s de 50 mM de NaOH a una velocidad de flujo de 50 μ l/min y luego un período de estabilización de 2 min con amortiguador 1X HBS-EP que fluía en todas las superficies. El anticuerpo policlonal antilisozima y el anticuerpo anti-inhibidor de tripsina se inyectaron en FC1, FC2 y FC3 al comienzo y al final del experimento. Los datos se recolectaron utilizando un *software* Biacore T200 Control versión 2.0.1 y se analizaron utilizando un *software* Biacore T200 Evaluation versión 3.0.

[0295] Los sensogramas de fijación de los anticuerpos se compararon con los sensogramas de control negativo de BI para determinar el nivel de fijación no específica a la lisozima de clara de huevo de gallina y el inhibidor de tripsina tipo 1-S de las superficies de la soja.

[0296] Los datos mostraron que el anticuerpo 277 no se fija significativamente a las proteínas con cargas no relacionadas; específicamente, la lisozima de clara de huevo de gallina y el inhibidor de tripsina tipo 1-S de la soja. El anticuerpo 277 se clasificó como favorable (verde) en comparación con la respuesta de fijación y la forma de las curvas con respecto a los controles. Por lo tanto, se estableció que el anticuerpo 277 implica un riesgo leve en términos de farmacocinética, biodistribución y producción en función de los efectos no deseados de las especies con carga.

[0297] TABLA 7:

Muestra	Superficie de lisozima ~4400 RU	Superficie de inhibidor de tripsina ~2300 RU
Anticuerpos 277 anti- TRKB	Sin fijación	Sin fijación

[0298] 8. **Potencia (SY5Y) y eficiencia**

[0299] Diferenciación de células SH-SY5Y con respecto al fenotipo neuronal

[0300] Las células SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™) se cultivaron en DMEM:F12 (Lonza #BE12-719F) con 15 % de suero bovino fetal en un matraz de cultivo tisular de 175 cm² (Corning #353112). Para la siembra de células, el matraz se lavó una vez con D-PBS (Lonza # 17-512Q) y las células se desprendieron con una solución

precalentada a 37 °C de Accutase (A6964 SIGMA). Luego de 3 min de incubación a temperatura ambiente, las células se pueden asociar a una pipeta de 10 ml y transferirse a un tubo Falcon de 15 ml. Las células se contaron, y se sembraron 6000 células en 100 µl de DMEM:F12 con 15 % de FBS por cavidad en una placa de 96 cavidades recubierta con colágeno I (BD Biosciences # 354407). Las células se mantuvieron en una incubadora humidificada a 37 °C, 5 % de CO₂. Luego de 8 h, se agregaron 100 µl de una solución de 6 µM de ácido retinoico (Sigma # R2625) a cada cavidad. La concentración final de ácido retinoico era 3 µM. Luego de 48 h y 96 h, se necesita una estimulación adicional de ácido retinoico. Para este fin, se retiraron 100 µl de medio por cavidad, y se agregaron 100 µl de medio nuevo con 6 µM de ácido retinoico. Luego de 7 días de diferenciación, las células SH-SY5Y tuvieron un fenotipo similar a dopaminérgico y estaban listas para usar.

[0301] Estimulación y lisis de células SH-SY5Y diferenciadas

[0302] El medio de las cavidades se intercambió con 80 µl de DMEM-F12 precalentado con 0,2 % de BSA. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Los péptidos y los anticuerpos se diluyeron en DMEM-F12 con 0,2 % de BSA. Todas las diluciones se prepararon con puntas, tubos y placas de baja fijación. Las células se estimularon agregando 20 µl del correspondiente péptido/anticuerpo durante 45 min a temperatura ambiente. Durante el tiempo de incubación, el amortiguador de lisis celular se preparó en un tubo Falcon de 15 ml en hielo: 1 ml de amortiguador de lisis 10x Triton X-100, 8,7 ml de H₂O, 1 minicomprimido Complete inhibidor de proteasa, 100 µl de cóctel inhibidor de fosfatasa 2, 100 µl de cóctel inhibidor de fosfatasa 3, 100 µl de 1 mM de PMSF. Después de la estimulación celular, el medio se retiró, y se agregaron 30 µl de amortiguador de lisis helado por cavidad. La placa se recubrió con un sellador de superficie y se incubó en hielo durante 20 min. Luego, la placa se mezcló en un agitador de placas Eppendorf a 500 rpm durante 5 min.

[0303] Para esta etapa, todos los materiales y las soluciones se almacenaron en hielo. La placa de 96 cavidades con células lisadas se centrifugó con 235 g durante 10 s y se almacenó en hielo. El amortiguador de inmunoensayo AlphaLISA (PerkinElmer #AL000C) se preparó mediante dilución de 260 µl de 10x solución de reserva en 2340 µl de H₂O. Se diluyeron microesferas aceptoras de pNTRK2 (PerkinElmer # CUSM81822; microesferas recubiertas por Perkin Elmer con anticuerpo de CellSignaling CST#4621, clon C50F3) en amortiguador de inmunoensayo AlphaLISA a una concentración final de 10 µg/ml. El anticuerpo de biotina NTRK2 (PerkinElmer # CUSM81820; etiquetado por Perkin Elmer con anticuerpo de CellSignaling

CST=#4609, clon C17F1) se diluyó en amortiguador de inmunoensayo AlphaLISA a una concentración final de 1 nM, y se diluyeron microesferas donantes de estreptavidina (PerkinElmer #6760002S) en un amortiguador de inmunoensayo AlphaLISA a una concentración final de 20 µg/ml. Se transfirieron 5 µl de microesferas aceptoras de pNTRK2 y 2,5 µl de lisado celular por cavidad a una placa blanca de volumen pequeño de 384 cavidades (Greiner #784075) de fondo plano, se centrifugó con 235 g durante 10 s y se almacenó durante 45 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Luego de la incubación, se agregaron 2,5 µl de anticuerpo de biotina NTRK2 por cavidad, y la placa se centrifugó con 235 g durante 10 s y se almacenó durante 45 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Finalmente, se agregaron 2,5 µl de microesferas donantes de estreptavidina por cavidad, y la placa se centrifugó con 235 g durante 10 s y se almacenó durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Inmediatamente después, la placa se midió con un lector de placa EnVision utilizando el protocolo AlphaScreen (filtro 570nm #244 y espejo #444).

[0304] Determinación de fosforilación de ERK1/2

[0305] La medición de la fosforilación de ERK 1/2 (Thr202/Tyr204) se realizó con 8 µl de lisado celular de acuerdo con el protocolo de fabricación (kit AlphaScreen SureFire p-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204) (PerkinElmer #TGRES10k))

[0306] Determinación de fosforilación de AKT1/2/3

[0307] La medición de la fosforilación de Akt 1/2/3 (Thr308) se realizó con 8µl de lisado celular de acuerdo con el protocolo de fabricación (kit AlphaScreen SureFire p-Akt 1/2/3 (Thr308) (PerkinElmer #TGRA3S10K)).

[0308] Varios anticuerpos contra TrkB de la invención se analizaron para determinar su potencia para activar TrkB al igual que para iniciar la señalización corriente abajo. También se incluyeron el ligando natural BDNF y los anticuerpos C2 y C20. Los anticuerpos contra TrkB de la presente invención eran en promedio diez veces más potentes para activar TrkB que el ligando natural BDNF. En comparación con los anticuerpos contra C2 y C20, los anticuerpos contra TrkB de la invención eran en promedio tres a quince veces más potentes. La señalización corriente abajo de p-ERK y AKT1/2/3 se encontraban completamente alineadas con estas mediciones para la activación de TrkB y mostraron una potencia mejorada similar de los anticuerpos contra TrkB inventivos.

[0309] TABLA 8:

Compuesto	EC50 pM [media ± SD]
	TrkB-P
BDNF	430 [±254]

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

[0310] 9. Expresión génica

[0311] Se realizó un análisis de secuenciación de nueva generación (no se muestran datos) para células SH-SY5Y diferenciadas luego de la estimulación con varios agonistas de TrkB. Para validar los resultados, se eligieron los genes más regulados con respecto a la plasticidad sináptica y, posteriormente, se volvieron a analizar los cambios mediante qPCR. ARC, VGF, EGR1 son marcadores conocidos para la plasticidad sináptica. La plasticidad sináptica es el proceso mediante el cual los patrones específicos de la actividad sináptica producen cambios en la resistencia sináptica. En la Figura 2, la estimulación de las células SH-SY5Y diferenciadas con BDNF o anticuerpos agonistas aumenta la cantidad de expresión de mRNA de ARC, VGF, EGR1 que puede ser un marcador de mayor plasticidad sináptica. La expresión de mRNA de NTRK2 no se ve afectada por la estimulación con BDNF o anticuerpos agonistas. Los cambios en el patrón de expresión inducidos por BDNF y D003 son, en general, muy similares. Estos resultados confirmaron los datos del análisis de secuenciación de nueva generación.

[0312] Específicamente, las células SH-SY5Y se diferenciaron durante 7 días en una placa de cultivo de 6 cavidades (SIGMA # Corning CLS3516). Luego de la diferenciación, las células se estimularon en DMEM:F12 libre de suero con 0,2 % de BSA con IgG de control [10nM], BDNF [10nM] y D003 [10nM] durante 6 h en una

incubadora humidificada a 37 °C, 5 % de CO₂. A continuación, las células se lavaron una vez con 1x D-PBS precalentado, y el aislamiento de mRNA se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (minikit Qiagen# 74104 RNeasy). La transcripción de mRNA a cADN se realizó según las instrucciones del fabricante (kit de transcripción Qiagen# 205310 QuantiTect Rev.). Se utilizó cADN para ensayos de PCR en tiempo real TaqMan en función de sondas de nucleasa 5' (ThermoFischer Scientific) en un sistema de PCR en tiempo real rápido 7900HT (Applied Biosystems). Los valores CT Delta se calcularon en función del valor CT de ACTB (CT=18.18).

[0313] Ensayos de expresión génica TaqMan de ThermoFischer Scientific:

ACTB - actina beta: Hs01060665_g1; Cat. # 4331182

NTRK2 - receptor tirosina quinasa neurotrófica 2: Hs00178811_m1; Cat. # 4331182

ARC -proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad: Hs01045540_g1; Cat. # 4331182

VGF - factor de crecimiento nervioso inducible: Hs00705044_s1, Cat. # 4331182

EGR1 - respuesta de crecimiento prematuro 1: Hs00152928_m1; Cat. # 4331182

[0314] 10. Estudio farmacocinético intravítreo de conejo

[0315] Conejos blancos de Nueva Zelanda (1,7 – 2 kg de peso corporal) se aclimataron > 15 días antes de comenzar el estudio. El anticuerpo 277 se preparó estéril a 20 mg/ml y 1 mg (en 50 µl de amortiguador: Se inyectaron 60 mM de acetato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 5,0) bilateralmente en el cuerpo vítreo de los animales anestesiados. En diversos puntos temporales, 2 animales se sometieron a eutanasia, y se recolectaron y congelaron tejidos oculares que consistían en humor acuoso, cuerpo vítreo y retina para un posterior análisis. Las muestras de sangre se tomaron en diversos puntos temporales (Figura 3), se centrifugaron y se congelaron en plasma para un posterior análisis.

[0316] La cuantificación del anticuerpo se realizó mediante ELISA. Para cada tipo de tejido, se preparó una curva de calibración del anticuerpo (triplicados que variaban de 0,5 a 100 ng/ml) en el mismo amortiguador que las muestras y se incluyó en cada placa. La absorción se midió a 405 nm utilizando un fotómetro SpectraMax 340PC-384, y los datos se analizaron utilizando SoftMaxPro6.5.

[0317] La concentración de anticuerpo 277 se ilustra en la Figura 3, donde se muestra la concentración en diversos compartimentos oculares como se indica y en plasma

después de la inyección intravítrea de 1 mg de anticuerpo 277 en los ojos de conejos en función del tiempo. Las semividas plasmáticas y oculares calculadas se enumeran en la siguiente tabla.

[0318] TABLA 9:

$t_{1/2}$ (días)			
Cuerpo vítreo	Humor acuoso	Retina	Plasma
4,9	4,8	5,2	7,0

[0319] Las semividas calculadas eran 4,9, 4,8, 5,2 y 7,0 días en cuerpo vítreo, humor acuoso, retina y plasma, respectivamente. Estas semividas son similares a aquellas informadas en la literatura para el anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado recombinante Avastin (anti-VEGF, bevacizumab, Bakri et al., Ophthalmology, 2007) utilizado clínicamente, lo cual también se confirmó mediante experimentos de manera interna. Estos resultados fueron los esperados, ya que la depuración intravítrea de las IgG de longitud completa depende principalmente de su peso molecular, el cual es similar para el anticuerpo 277 de la presente y Avastin. Por lo tanto, se espera que la PK humana, que incluye la semivida ocular del anticuerpo 277 y Avastin, sea similar. La semivida ocular humana informada de Avastin es de $9,73 \pm 1,48$ días (Hutton-Smith, 2016).

[0320] 11. Frecuencia de inyección intravítrea de los anticuerpos IgG1

[0321] En función de los datos *in vivo* obtenidos en el estudio farmacocinético (Ejemplo 10) al igual que los datos de potencia obtenidos en las células SH-SY5Y, se investigó la PK ocular humana (concentración vítrea en el transcurso del tiempo) de anticuerpos IgG1 y se calculó en función de la cinética de compartimiento único conocida con respecto a la depuración ocular de biomoléculas. Para el cálculo, se utilizaron los siguientes parámetros: una semivida ocular humana de $t_{1/2} = 10$ días, como se informó para Avastin y también se sustentó mediante los datos *in vivo* que se muestran en el Ejemplo 10; un peso molecular de 149 KDa como para los anticuerpos IgG1 de longitud completa y 1 mg de anticuerpo inyectado por vía intravítrea (véase la Figura 4). Debido a que la PK ocular se determina predominantemente por el peso molecular, se obtiene la misma representación de la PK ocular para los cinco anticuerpos.

[0322] Para estimar la frecuencia de inyección intravítrea, se asumió que la eficacia *in vivo* se podría mantener a concentraciones vítreas $\geq EC_{50}$ celular como se determinó a partir de los ensayos de fosforilación de TrkB en las células SH-SY5Y (Ejemplo 8). El tiempo después de la inyección intravítrea necesario para alcanzar la concentración

vítrea equivalente a EC_{50} se indica mediante flechas en la Figura 4. En función de estas consideraciones, el tiempo para alcanzar esta concentración vítrea después de la inyección de 1 mg de anticuerpo se resume en la siguiente tabla para cada anticuerpo:

[0323] TABLA 10:

Compuesto	Tiempo después de la inyección ivt para alcanzar $C_{vítreo} = EC_{50}$ [días]
277-gr (IgG1)	154
277-gr (IgG1-KO)	151
277-64 (IgG1)	150
277-64 (IgG1-KO)	152
C2	136

[0324] Por ejemplo, luego de inyectar 1 mg de C2 en el ojo humano, una concentración vítrea correspondiente a EC_{50} de C2 (Tabla 10) se alcanza luego de los 136 días (es decir, después de los 136 días, la siguiente inyección intravítrea sería necesaria). Con fines comparativos, en el caso de 277-64 (IgG1), el tiempo se extendería a 150 días posteriores a la inyección intravítrea. En este caso, la siguiente inyección intravítrea sería necesaria 14 días después que para C2. Obtener una dosis mínima eficaz de valores 10 veces mayores que EC_{50} reduciría el tiempo entre las inyecciones intravítreas, sin embargo, la diferencia de tiempo en la frecuencia de inyección entre C2 y los otros anticuerpos enumerados en la Tabla 10 anterior permanecería igual.

[0325] El volumen de inyección que se puede administrar en el ojo es drásticamente limitado. Al mismo tiempo, las inyecciones respectivas en el ojo son necesarias para el tratamiento de afecciones oculares. Mejorar la semivida del anticuerpo es una manera de extender el tiempo entre los intervalos de inyecciones pero, como se mencionó, se determina predominantemente por el peso molecular. Como se mostró *in vivo* en el Ejemplo 10 y en las células SH-SY5Y en el Ejemplo 8, al proporcionar un anticuerpo mejorado y más potente, los intervalos se pueden extender para cumplir con las necesidades del paciente de recibir inyecciones menos frecuentes en el ojo.

[0326] 12. Efectos neuroprotectores y neuroregenerativos de un anticuerpo agonista contra TrkB en ratas diabéticas inducidas por STZ

[0327] Ninguno de los anticuerpos 277 reacciona de manera cruzada con roedores, por lo tanto, se realizaron estudios de eficacia y prueba de concepto *in vivo* con el anticuerpo C2 que activa TrkB como herramienta indirecta para evaluar la hipótesis de que un enfoque de activación de TrkB i) proporciona neuroprotección ('enfoque

neuroprotector'), y ii) proporciona reactivación de neuronas/circuitos disfuncionales ('enfoque de regeneración'). Ambos enfoques se trataron en diversos estudios. Como modelo de enfermedad en animales, se utilizó el modelo de rata diabética inducida por estreptozotocina (STZ), la cual se caracteriza por pérdida de células beta pancreáticas, bajos niveles de insulina, hiperglucemia estable y, consecuentemente, disfunción neuronal en la retina.

[0328] Estudio en animales

[0329] Se obtuvieron ratas macho marrones de Noruega (ratas BN) de Charles River (Alemania). Los animales se colocaron en grupos de 2 en IVC a una temperatura controlada y condiciones de humedad, con un ciclo de 12 h de luz/oscuridad (se apagaban las luces de 6 p.m. a 6 a.m.). Se alimentaron *ad libitum* con una dieta peletizada N.º 3438 de Provimi Kliba (Suiza) y tenían libre acceso al agua corriente. Los animales se aclimataron a su ambiente durante una semana antes de comenzar el estudio. La edad de las ratas era de 6-8 semanas al comienzo de la fase en vida del estudio. Se indujo la hiperglucemia mediante inyecciones intraperitoneales de STZ (65 mg/kg de peso corporal; Sigma #S0130-1G). Los animales que no respondían o respondían de manera deficiente no se incluyeron en el estudio, es decir, animales con concentraciones de glucosa en sangre <20 mM a los 5 posteriores a la aplicación de STZ. Los niveles de glucosa en sangre y el peso corporal se monitorearon regularmente. Los animales recibieron la dosis mediante una única inyección intravítrea de C2 (50 µg en 4,6 µl) o el anticuerpo de control anti-2,4,6-trinitrofenilo (anti-TNP) (50 µg en 4,5 µl) el día 36 posterior a la aplicación de STZ. La función retiniana se evaluó mediante registros de electroretinografía (ERG), y los animales se sacrificaron después del registro final mediante una sobredosis de pentobarbital administrado por vía intraperitoneal.

[0330] Dosificación e inyecciones intravítreas

[0331] El resumen del estudio se ilustra en la Figura 5. Para las inyecciones intravítreas, las ratas se anestesiaron con 2,5-3 % de isoflurano (Forene; Abbvie). Una gota de 4 mg/ml de oxibuprocaina clorhidrato (Novesine; Omnivision) se administró como anestesia local tópica. Se inyectaron por vía intravítrea 4,6 µl de solución de reserva de C2 (10,9 mg/ml; amortiguador: 20 mM de citrato de sodio, 115 mM de NaCl, pH 6,0) en cada ojo de las ratas hiperglucémicas (grupo 3, n=24 ojos, Figura 5), lo que produjo una dosis inyectada de ~50 µg/ojo. Como control, se inyectaron por vía intravítrea 4,5 µl de solución de reserva anti-2,4,6-trinitrofenilo (11,2 mg/ml; amortiguador 20 mM de citrato de sodio, 115 mM de NaCl, pH 6,0) en los ojos de las

ratas de control diabéticas y no diabéticas (grupo 1, n=24 ojos, y grupo 2, n=22 ojos, Figura 5), lo que produjo una dosis inyectada de ~50 µg/ojo. Las inyecciones intravítreas se realizaron en un microscopio de disección. La solución de anticuerpo se administró con una aguja de calibre 34 (ajustada en una jeringa de vidrio de 10 µl Hamilton) en el cuerpo vítreo justo detrás del limbo, y la calidad general de la inyección se controló mediante oftalmoscopia (utilizando microscopio de imagen retiniana Micron IV, Phoenix Research Labs).

[0332] Electrorretinografía

[0333] La electroretinografía (ERG) es una técnica electrofisiológica no invasiva para evaluar la actividad eléctrica inducida por la luz de diferentes neuronas retinianas, que permite cuantificar diferentes aspectos de la función retiniana, tales como visión escotópica o visión cromática. Las ERG se midieron como el cambio potencial entre un electrodo de la córnea y un electrodo de referencia utilizando el sistema de registro de ERG Espion E3 (Diagnosys LLC). Antes de los registros de ERG, los animales se adaptaron a la oscuridad durante al menos 2 h y se anestesiaron mediante inyección intravítrea de ketamina (Ketanest, aproximadamente 100 mg/kg) y xilazina (Rompun, aproximadamente 5 mg/kg). Los animales se colocaron en una plataforma calentada para mantener la temperatura corporal constante a 37 °C. Las pupilas se dilataron con 1 % de ciclopentolato-HCl y 2,5 % de fenilefrina. Una gota de solución de Methocel al 2 % (OmniVision) se colocó en la córnea para evitar que los ojos se sequen y evitar el desarrollo de cataratas durante el registro. El registro se realizó simultáneamente para los dos ojos con electrodos de oro en forma de bucle. El electrodo de referencia era una pinza de conexión humedecida con Methocel y sujeta a la mejilla del animal. Para la conexión a tierra, se colocó una pinza en la cola del animal. Se tomaron muestras de las señales de ERG a 1 kHz y se registraron con umbrales de 0,15 Hz de frecuencia baja y 500 Hz de frecuencia alta. Los estímulos de luz consistían en breves destellos de luz de campo completo administrados mediante un conjunto de diodos emisores de luz (duración, <4 ms). Todos los destellos se produjeron mediante un estimulador de Ganzfeld (ColorDome; Diagnosys), a oscuras o con luz de fondo constante roja o verde.

[0334] Protocolos de ERG

[0335] Las respuestas de ERG primero se registraron de animales adaptados a la oscuridad (para aislar las respuestas de bastones), luego se registraron de animales adaptados a la luz de fondo roja (50 cd/m², para aislar las respuestas de ERG de conos UV) y luego se adaptaron a la luz de fondo verde (25,5 cd/m², para aislar las

respuestas de conos M). En el caso de las ERG adaptadas a la oscuridad, las respuestas se provocaron mediante una serie de destellos que variaban de $1 \cdot 10^{-5}$ a $0,1 \text{ cd} \cdot \text{s/m}^2$. Para los destellos con una luminancia de $1 \cdot 10^{-5}$ y $3 \cdot 10^{-5} \text{ cd} \cdot \text{s/m}^2$, se promediaron las respuestas de 20 ensayos. Para los destellos de $1 \cdot 10^{-4}$ a $0,05 \text{ cd} \cdot \text{s/m}^2$, se promediaron las respuestas de 10 ensayos, y para el destello final de $0,1 \text{ cd} \cdot \text{s/m}^2$, se promediaron 8 ensayos. Los intervalos entre los destellos individuales se eligieron para asegurar la recuperación completa de la retina entre cada destello (sin indicaciones de reducción inducida por destellos de amplitudes de respuesta o reducción de tiempos implícitos). En función de estos criterios, los intervalos entre destellos eran de 2 s para los destellos de $1 \cdot 10^{-5}$ y $3 \cdot 10^{-5} \text{ cd} \cdot \text{s/m}^2$, 5 s para los destellos de $1 \cdot 10^{-4}$ a $0,05 \text{ cd} \cdot \text{s/m}^2$, y 10 s para el destello de $0,1 \text{ cd} \cdot \text{s/m}^2$.

[0336] Para los registros de las respuestas de conos UV, los animales se adaptaron a la luz de fondo roja durante 2 min. Las respuestas a la luz se provocaron mediante destellos UV de 0,02, 0,04, 0,08, 0,17, 0,35, 0,83, 1,66, 2,90 y $4,15 \mu\text{W/m}^2$. Para los registros de las respuestas de conos M, los animales se adaptaron a la luz de fondo verde durante 2 min. Las respuestas a la luz se provocaron mediante destellos UV de 0,25, 0,1, 1,0, 5,0, 50 y $150 \text{ cd} \cdot \text{s/m}^2$. Para los destellos UV y verdes, las respuestas de 10 ensayos se promediaron con intervalos entre destellos de 3 s.

[0337] Análisis de datos

[0338] Para determinar las amplitudes de onda b de ERG (respuestas despolarizadas positivas predominantemente originadas de células bipolares), los datos de ERG se procesaron y se analizaron utilizando el *software* MATLAB (versión R2014a; MathWorks). Los potenciales oscilatorios (ondículas pequeñas de alta frecuencia que superponen la onda b) se eliminaron de las señales mediante filtrado de frecuencias paso bajo con transformada rápida Fourier de 55 Hz debido a que los potenciales oscilatorios pueden afectar la amplitud y posición del pico de onda b, especialmente en condiciones adaptadas a la luz. Las amplitudes de onda b se calcularon de la parte inferior de la respuesta de la onda a (deflexión negativa mayormente originada de la actividad del fotorreceptor) al pico de la onda b. El tiempo implícito de la onda b se midió como el tiempo después de los estímulos de destellos necesarios para alcanzar el pico de la onda b.

[0339] Las amplitudes de la onda b como una función de la intensidad del estímulo se adaptaron mediante la siguiente ecuación utilizando un procedimiento de adaptación de mínimos cuadrados (GraphPad Prism, Versión 6.01):

$$\mathbf{[0340]} \quad R = \frac{R_{max} I^n}{(I^n + I_h^n)} \quad (\text{Ecuación 1})$$

[0341] con R como la amplitud de respuesta, R_{max} como la amplitud de respuesta de saturación, I como la intensidad de destello, I_h como la intensidad de destello de semisaturación y n como el coeficiente de Hill.

[0342] La sensibilidad a la luz, S , se definió como la relación de la amplitud de respuesta de saturación, R_{max} , con respecto a la intensidad de destello de semisaturación, I_h .

[0343] Los valores S y R_{max} se normalizaron a los valores medios de los controles no diabéticos obtenidos durante la semana 5, antes del tratamiento intravítreo, y durante la semana 7, después del tratamiento intravítreo, respectivamente.

[0344] Para el análisis de los tiempos implícitos de onda b de bastones, la media de tiempo implícito de los animales de control no diabéticos se determinó para la onda b provocada por los destellos de $1 \cdot 10^{-5}$, $3 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-4}$ y $2 \cdot 10^{-4}$ $\text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ (los tiempos implícitos correspondientes eran muy similares). Para cada grupo de estudio, el cambio relativo al valor medio de los controles se calculó para las intensidades de destello anteriores y se promedió, mediante lo cual se obtiene el cambio relativo medio en el tiempo implícito de onda b.

[0345] Para el análisis de los tiempos implícitos de onda b de conos UV, los cambios relativos en el tiempo implícito al valor medio de los controles se calcularon para las respuestas de onda b provocadas por las intensidades de destello de 0,042, 0,083, 0,166 y 0,348 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$, y se promediaron.

[0346] Para el análisis de los tiempos implícitos de onda b de conos M, los cambios relativos en el tiempo implícito al valor medio de los controles se calcularon para las respuestas de onda b provocadas por las intensidades de destello de 1, 5, 50 y 150 $\text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$, y se promediaron.

[0347] La respuesta de la onda a de bastones se determinó en el pico de la onda a (deflexión de señal negativa inmediatamente después del estímulo de luz) provocada por el destello de 0,1 $\text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$.

[0348] Resultados

[0349] La semana 5 después de la inducción de diabetes, se registraron los valores iniciales de ERG para cuantificar el alcance de la disfunción neuronal en la retina antes del tratamiento intravítreo (véase también la Figura 5). En función de estos resultados de ERG, se aseguró que los dos grupos diabéticos (hiperglucémicos) mostraban una distribución similar de disfunción de retina (que recibieron un tratamiento intravítreo de seguimiento con IgG1 de control anti-2,4,6-trinitrofenilo - grupo 2 - o C2 agonista IgG1 contra TrkB- grupo 3). Generalmente, todos los tratamientos intravítreos fueron bien

tolerados y no se observaron eventos adversos. La glucosa en sangre era estable a ~5 mM en las ratas de control no diabéticas (grupo 1, n=12) durante el transcurso del estudio. En los animales diabéticos inducidos por STZ (grupo 2 y 3, cada n=12), las concentraciones de glucosa en sangre alcanzaron niveles >20 mM ~4 días después del tratamiento con STZ, y no disminuyeron por debajo de los 20 mM durante el transcurso del estudio. El tratamiento con C2 o IgG1 de control anti-2,4,6-trinitrofenilo no tuvo ningún efecto en los niveles de glucosa en sangre.

[0350] Tiempo implícito de onda b de bastones:

[0351] Se mide el tiempo implícito de onda b para determinar la velocidad de la respuesta eléctrica inducida por la luz en la retina (predominantemente en el nivel de células bipolares y la transmisión sináptica de fotorreceptor a célula bipolar). El tiempo implícito se define como el tiempo necesario para alcanzar la amplitud de respuesta después de la estimulación por destellos. Los efectos de la hiperglucemia y el tratamiento intravítreo se resumen en la Figura 6. Los cambios en el tiempo implícito con respecto a la media de tiempo implícito medida de las ratas de control se calcularon para los datos obtenidos antes del tratamiento intravítreo (evaluación de los valores iniciales de ERG) y después del tratamiento intravítreo. Se observó un incremento robusto en el tiempo implícito de ~14 ms en los dos grupos hiperglucémicos antes del tratamiento intravítreo, lo que indica una reducción inducida por hiperglucemia de la cinética de respuesta de la onda b, es decir, una velocidad reducida del procesamiento retiniano de bastones. La inyección intravítrea de la IgG1 de control anti-2,4,6-trinitrofenilo no tuvo ningún efecto significativo en el tiempo implícito en el grupo de control no diabético y el grupo hiperglucémico (grupo 1, barras negras, y grupo 2, barras punteadas en la Figura 6, posterior al tratamiento intravítreo, respectivamente). Sin embargo, el tratamiento intravítreo con C2 activador de TrkB claramente produjo un atraso reducido en el tiempo implícito (grupo 3, barra gris en la Figura 6, después del tratamiento intravítreo). En promedio, el tratamiento intravítreo con C2 produjo una aceleración significativa en las respuestas de onda b de ~9 ms (es decir, el atraso en el tiempo implícito se redujo de 14 ms a 5 ms).

[0352] Sensibilidad a la luz de onda b de bastones:

[0353] La sensibilidad a la luz de las respuestas de ERG de onda b de bastones es una medida para la cantidad de neuronas que participan en la vía de retina de bastones, y su sensibilidad con respecto al estímulo de luz con el fin de producir respuestas a la luz despolarizantes. Las sensibilidades a la luz se normalizaron a la media de sensibilidades a la luz de las ratas de control (grupo 1, antes y después del

tratamiento intravítreo) y se ilustran en la Figura 7. Las sensibilidades a la luz normalizadas disminuyeron ~40-50 % en los animales hiperglucémicos (antes del tratamiento intravítreo, grupo 2 y 3). La inyección intravítrea de la IgG1 de control no tuvo ningún efecto en las sensibilidades a la luz de las ratas de control (grupo 1) o las ratas hiperglucémicas (grupo 2). De manera importante, el tratamiento intravítreo con C2 activador de TrkB aumentó significativamente la sensibilidad a la luz a ~30% (grupo 3, gris, después de la aplicación intravítrea en comparación con antes de la aplicación intravítrea).

[0354] Respuestas de onda a de bastones:

[0355] La respuesta de onda a de bastones es una medida para el tamaño de las respuestas a la luz del fotorreceptor de bastones provocadas por un destello. Las respuestas de onda a de bastones se normalizaron a los valores medios obtenidos de las ratas de control (grupo 1, antes y después del tratamiento intravítreo) y se ilustran en la Figura 8. Las amplitudes de respuesta de saturación normalizadas disminuyeron ~17 % en los animales hiperglucémicos (grupo 2 y 3, antes de la aplicación intravítrea). La inyección intravítrea de la IgG1 de control no tuvo ningún efecto significativo en las respuestas de onda a normalizadas de las ratas de control (grupo 1, negro) o las ratas hiperglucémicas (grupo 2, punteado), en donde estas últimas mostraron mayor disminución de la respuesta de onda a en el transcurso del estudio. Sin embargo, el tratamiento intravítreo con C2 activador de TrkB (grupo 3, gris) podría evitar totalmente la reducción adicional de las respuestas de la onda a como se observó para el grupo hiperglucémico 2.

[0356] Tiempos implícitos de onda b de conos UV y M :

[0357] Los cambios en el tiempo implícito con respecto a la media de tiempo implícito medida de las ratas de control se calcularon para los datos obtenidos antes del tratamiento intravítreo (evaluación de los valores iniciales de ERG) y después del tratamiento intravítreo. Este análisis se realizó para los tiempos implícitos de onda b de conos UV (Figura 9) y los tiempos implícitos de onda b de conos M (Figura 10). En el caso de las respuestas de conos UV, se observó un aumento considerable en el tiempo implícito de ~8 ms en los dos grupos hiperglucémicos antes del tratamiento intravítreo, mientras que el aumento del tiempo implícito de conos M era de ~5 ms en los grupos hiperglucémicos. Estos efectos estadísticamente significativos indican una reducción inducida por hiperglucemia de la cinética de respuesta de onda b y velocidad reducida del procesamiento retiniano de conos. Las inyecciones intravítreas de la IgG1 de control no tuvieron efectos significativos en el tiempo implícito en el

grupo de control no diabético (grupo 1, negro) o el grupo hiperglucémico (grupo 2, punteado), para los tiempos implícitos de onda b de conos UV y M. El tratamiento intravítreo con C2 (grupo 3, gris) redujo el tiempo implícito a ~5 ms en el caso de los conos UV (correspondiente a ~50 % de normalización de la cinética de la respuesta de onda b), y una restauración casi completa de la cinética de la respuesta de onda b normal en el caso de las ondas b de conos M.

[0358] Sensibilidad a la luz de onda b de conos UV:

[0359] La sensibilidad a la luz de las respuestas de ERG de onda b de conos UV se evaluó como se describe para las ERG de bastones. Las sensibilidades a la luz se normalizaron a la media de sensibilidades a la luz de las ratas de control (grupo 1, antes y después del tratamiento intravítreo) y se ilustran en la Figura 11. La sensibilidad a la luz normalizada disminuyó ~50 % en los animales hiperglucémicos en el inicio (antes de la aplicación intravítrea). La inyección intravítrea de la IgG1 de control no tuvo efectos significativos en las sensibilidades a la luz, mientras que el tratamiento intravítreo con C2 aumentó significativamente la sensibilidad a la luz al nivel observado en las ratas de control saludables (grupo 3, gris).

[0360] Amplitud de respuesta de onda b de saturación de conos M

[0361] El efecto de la hiperglucemia en la sensibilidad a la luz de onda b de conos M es menos pronunciada que para las ondas b de conos UV (en los puntos temporales investigados). Sin embargo, se pudo observar una deficiencia significativa en la amplitud de respuesta de saturación de onda b de conos M la semana 5 después del inicio de la hiperglucemia (~15 % de reducción en comparación con las ratas de control no diabéticas, Figura 12). El tratamiento intravítreo con C2 pudo restablecer la amplitud de la respuesta de saturación al nivel de los controles (grupo 3, gris), mientras que el tratamiento con la IgG1 de control no tuvo efectos significativos (grupo 2, punteado).

[0362] Los descubrimientos importantes se resumen a continuación:

[0363] La activación de TrkB genera neuroprotección y conservación de la función de la retina. La neuroprotección se mostró en el modelo de rata diabética inducida por STZ que muestra disfunción neuronal inducida por hiperglucemia. Se mostró que la activación de TrkB evitó la disfunción de fotorreceptores.

[0364] La activación de TrkB indujo recuperación/mejora de la función neuronal en la retina en el modelo de rata diabética inducida por STZ después de hiperglucemia prolongada, tal como latencia de respuesta a la luz mejorada (es decir, tiempos implícitos de onda b de ERG reducidos), o sensibilidades a la luz de conos o bastones

mejoradas.

[0365] En resumen, los datos farmacológicos proporcionan evidencia para el concepto terapéutico de que la activación de TrkB puede mejorar/restablecer la función de diferentes tipos de células neuronales dentro del ojo en diferentes afecciones.

[0366] La activación de TrkB también protege los fotorreceptores y la retina exterior como se demostró mediante el análisis de onda a de ERG, que es un reflejo de las respuestas a la luz del fotorreceptor. De manera similar a los resultados obtenidos para la onda a de ERG, la sensibilidad al contraste de los ojos de las ratas diabéticas disminuyó en el transcurso de la hiperglucemia persistente, mientras que el tratamiento intravítreo con C2 activador de TrkB conservó completamente la sensibilidad al contraste. Asimismo, la mejora en las sensibilidades a la luz de onda b de ERG de las respuestas a la luz de bastones y conos descritas anteriormente (que refleja la sensibilidad a la luz de la transmisión sináptica de fotorreceptor a célula bipolar) también refuerza el concepto de que la activación de TrkB puede mejorar/proteger la función de la retina exterior, que incluye los fotorreceptores.

[0367] 13. Función de BDNF en tratamientos conjuntos

[0368] Cultivo de células CHO que expresan el receptor de TrkB humana

Las células CHO que expresaban el receptor de TrkB humana (hTrkB) (ThermoFisher Scientific, #K1491) se cultivaron en DMEM (Lonza, #BE12-604F) enriquecido con 10 % de suero bovino fetal, glutamax, aminoácidos no esenciales, 20 mM de HEPES, 5 µg/ml de blasticidina y 200 µg/ml de zeocina. 24 horas antes de la estimulación, 5000 células (30 µl) se sembraron en cada cavidad de una placa transparente de cultivo de tejido de 384 cavidades (BD Falcon, # 353963) y se incubó en una incubadora humidificada a 37 °C y 5 % de CO₂.

[0369] Análisis de fosforilación de ERK en células CHO con el receptor de hTrkB

24 horas antes de la siembra, el sobrenadante de las células CHO/hTrkB se reemplazó con 40 µl de DMEM a temperatura ambiente con 0,1 % de BSA sin otros complementos. Luego de 15 minutos, 10 µl de DMEM/0,1 % de BSA con concentraciones en aumento de BDNF (1E-13 a 3E-8 mol/l), anticuerpo 277 (1E-13 a 2,025E-8 mol/l) o el anticuerpo C2 (1E-13 a 2,025E-8 mol/l) solo o una combinación de 1 nM de BDNF con concentraciones en aumento del anticuerpo 277 o C2 (ambos 1E-13 a 2,025E-8 mol/l) se agregaron en triplicado para estimular la fosforilación de ERK. Luego de la incubación durante 45 minutos a temperatura ambiente, se retiraron los sobrenadantes y las células se lisaron durante 20 minutos sobre hielo húmedo en 20 µl de amortiguador de lisis por cavidad (amortiguador de lisis 1x Tryton (CellSignaling #

9803-S), enriquecido con minicomprimidos de inhibidores de proteasa Complete (Roche # 04693124001) y cóctel de inhibidor de fosfatasa 2 (Sigma # P5726) y 3 (Sigma # P0044) y 1 mM de PMSF (Sigma # 93482)). Cinco microlitros del lisado resultante se utilizaron para la cuantificación de la fosforilación de ERK1/2 en T202/Y204 utilizando el ensayo disponible en el comercio (Perkin Elmer #TGRES500), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La emisión de luz de las microesferas aceptoras, que refleja la fosforilación de ERK, se registró a 570 nm en un lector de microplaca Perkin Elmer EnVision y se preparó para la presentación con GraphPad Prism (versión 7), lo que incluyó los datos sin procesar (media $\pm$ SEM) y la regresión no lineal (log(agonista) en comparación con la respuesta (tres parámetros)).

Como se muestra en la Figura 13, el anticuerpo 277 no redujo la fosforilación de ERK inducida por BDNF. Las concentraciones en aumento del anticuerpo C2 produjeron la reducción de la fosforilación de ERK inducida por BDNF hasta el nivel de fosforilación de ERK inducida por C2. Esto puede tener un impacto significativo en la dosificación de un anticuerpo anti-Trkb en el ojo en donde es necesario que los anticuerpos se administren en concentraciones de saturación altas para prolongar el tiempo hasta la siguiente administración. El anticuerpo 277 se puede administrar en dosis altas sin interferir con la fosforilación de ERK inducida por BDNF existente, en donde el anticuerpo C2 reduce la fosforilación de ERK inducida por BDNF existente hasta el nivel del anticuerpo.

[0370] 14. Ensayo ELISA *in vitro* de fijación a VEGF humano

[0371] Para el ensayo de fijación *in vitro*, se recubrieron placas de 96 cavidades MaxiSorp (Nunc #437111) durante la noche a 4 °C con 500 ng/ml de VEGF humano (R&D Systems #293-VE-050) o VEGF de rata (R&D Systems #564-RV-050) en amortiguador carbonato/bicarbonato (3,03 g/l Na₂CO₃ y 6,00 g/l de NaHCO₃, pH 9,6). Las placas se lavaron tres veces con PBS-T (solución salina amortiguada con fosfato (Invitrogen #70011-036) con 0,05 % de Tween 20 (Sigma #P7949)) y luego se incubó con 1 % de BSA (Sigma #A3059) en PBS-T durante tres horas a temperatura ambiente para bloquear la fijación inespecífica. Las placas se lavaron tres veces con PBS-T y luego se incubaron con una dilución en serie 1:4 de 1 μ M de Avastin (envase clínico Roche), anticuerpo C2, anticuerpo 277, o anticuerpo de control de isotipo de IgG1 humana en PBS-T durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron tres veces con PBS-T y luego se incubaron con una dilución 1:2000 de anti-IgG humana de cabra Alexa Fluor 647 (Invitrogen #A21445) durante dos horas a temperatura ambiente. Durante tres rondas adicionales de lavado con PBS-T, la emisión de luz a 647 nm

(refleja la fijación del anticuerpo a VEGF) se registró en un lector de microplaca Perking Elmer EnVision. Se prepararon los datos para la presentación con GraphPad Prism (versión 7), incluyendo los datos sin procesar (media $\pm$ SEM) y una regresión no lineal (log(agonista) en comparación con la respuesta (tres parámetros)).

[0372] Como se muestra en la Figura 14, no se observó una diferencia estadísticamente significativa en la fijación de VEGF humano entre el anticuerpo 277 anti-TrkB y el anticuerpo de control de isotipo de IgG1 en concentraciones de anticuerpo de hasta 0,25 μ M (prueba t desapareada, $p>0,05$). En contraste, una diferencia estadísticamente significativa en la fijación de VEGF humano entre C2 y el anticuerpo de control de isotipo se observó fácilmente en una concentración de anticuerpo de 0,24 nM (prueba t desapareada, $**p<0,01$).

[0373] Tal fijación inespecífica a VEGF puede causar, por ejemplo, efectos adversos no deseados, dificultar el control de dosis para la activación de TrkB, o aumentar la cantidad de anticuerpo necesaria para obtener el efecto deseado.