

ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-TRKB Y MÉTODOS DE USO

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales del receptor-quinasa B de la antitropomiosina (TrkB). Más específicamente, la invención se refiere a composiciones que comprenden anticuerpos monoclonales anti-TrkB y métodos de uso de estos anticuerpos.

ANTECEDENTES

[0002] La quinasa B del receptor de tropomiosina (TrkB) pertenece a una familia de tirosina quinasas receptoras de transmembrana simple, que incluye TrkA y TrkC. Estas quinasas receptoras median la actividad de las neurotrofinas, que son necesarias para la supervivencia y el desarrollo neuronal. Las neurotrofinas incluyen, pero no se limitan a, factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3) y neurotrofina-4/5 (NT-4/5). (Lo, K Y et al., J. Biol. Chem., 280: 41744-52 (2005)).

[0003] TrkB es el receptor de alta afinidad para BDNF (Minichiello, et al., Neuron 21: 335-45 (1998)), pero también se sabe que se une a NT4/5. La unión de BDNF a trkB hace que el receptor se dimerice, lo que resulta en la autofosforilación de residuos de tirosina específicos en el receptor y la activación de vías de señalización que involucran a la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y fosfolipasa C- γ (PLC- γ). (Jing, et al. Neuron 9: 1067-1079 (1992); Barbacid, J. Neurobiol. 25:1386-1403 (1994); Bothwell, Ann. Rev. Neurosci. 18:223 253 (1995); Segal y Greenberg, Ann. Rev. Neurosci. 19:463 489 (1996); Kaplan y Miller, Curr. Opinión Neurobiol. 10:381 391 (2000)). Después de unirse al BDNF, TrkB media los múltiples efectos de la neurotrofina, que incluye la diferenciación neuronal y la supervivencia.

[0004] Dado que TrkB juega un papel importante en la supervivencia, diferenciación y función neuronal, los agonistas de TrkB pueden tener potencial terapéutico para tratar una serie de trastornos neurodegenerativos y metabólicos.

[0005] Ciertos agonistas de TrkB se han descrito en US2010/0150914; US2003/0157099; US2010/0196390 y US2017/0157099. Sin embargo, todavía existe la necesidad de identificar y desarrollar agonistas de TrkB adicionales que proporcionen una especificidad mejorada además de exhibir propiedades neuroprotectoras y de supervivencia neuronal, como las descritas en el presente documento.

Breve resumen de la invención

[0006] La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales aislados y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente al receptor quinasa B de la tropomiosina (TrkB). Los anticuerpos aislados y los

fragmentos de unión a antígeno de la invención son útiles para tratar enfermedades y trastornos asociados con la actividad o expresión de TrkB.

[0007] En su aspecto más amplio, la invención proporciona anticuerpos agonistas anti-TrkB, que activan TrkB y promueven la supervivencia neuronal. Estos anticuerpos pueden usarse para mejorar la función nerviosa y para tratar cualquier enfermedad o trastorno caracterizado en parte por degeneración celular, incluido el daño de las células nerviosas asociado con la lesión del sistema nervioso y/o enfermedades neurodegenerativas crónicas.

[0008] En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-TrkB pueden ser útiles para tratar diversas enfermedades o trastornos del ojo y pueden formularse para el suministro intraocular o intravítreo, para tratar enfermedades del ojo, tales como, pero sin limitación a, glaucoma.

[0009] Los anticuerpos de la invención pueden ser de longitud completa (por ejemplo, un anticuerpo IgG1 o IgG4) o pueden comprender solo una porción de unión a antígeno (por ejemplo, un fragmento Fab, F(ab')₂ o scFv), y pueden modificarse para afectar la funcionalidad, por ejemplo, para eliminar las funciones efectoras residuales (Reddy et al., 2000, J. Immunol. 164:1925-1933).

[0010] Los ejemplos de anticuerpos anti-TrkB de la presente invención se listan en las Tablas 1 y 2 de la presente memoria. La Tabla 1 establece los identificadores de secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada (HCVR), las regiones variables de la cadena ligera (LCVR), las regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) y las regiones determinantes de la complementariedad de la cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) de los ejemplos de anticuerpos anti-TrkB. La Tabla 2 establece los identificadores de secuencia de ácido nucleico de los HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2 HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de los ejemplos de anticuerpos anti-TrkB.

[0011] La presente invención proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a TrkB, que comprende un HCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR listadas en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar de las mismas que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con los mismos.

[0012] La presente invención también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a TrkB, que comprende una LCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCVR listadas en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar de las mismas que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con los mismos.

[0013] La presente invención también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a TrkB, que

comprende un par de secuencias de aminoácidos HCVR y LCVR (HCVR/LCVR) que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR listadas en la Tabla 1 pareados con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCVR listadas en la Tabla 1. De acuerdo con ciertas realizaciones, la presente invención proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden un par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR contenidas en cualquiera de los anticuerpos anti-TrkB ejemplares listados en la Tabla 1.

[0014] Por consiguiente, en un primer aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente al receptor quinasa B de la tropomiosina (TrkB), en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (CDR) (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidos dentro de una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90% de identidad de secuencia a la misma; y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con la misma.

[0015] En una realización, el anticuerpo anti-TrkB o fragmento de unión a antígeno del mismo exhibe una o más propiedades seleccionadas del grupo que consiste en:

- (a) es un anticuerpo agonista;
- (b) se une a TrkB humano con un K_D de menos de aproximadamente 200 nM medido por resonancia de plasmón superficial a 25° C o a 37° C;
- (c) se une a TrkB humano con una vida media disociativa ($t_{1/2}$) mayor de aproximadamente 10 minutos, medido por resonancia de plasmón superficial a 25° C o 37° C;
- (d) activa la señalización de TrkB humano en ausencia de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en células diseñadas para expresar TrkB humano con una EC_{50} que varía de aproximadamente 35 a 82 pM;
- (e) mejora la fosforilación de TrkB cuando se inyecta en el hipocampo de ratones homocigotos para el receptor TrkB humano ($TrkB^{hu/hu}$);
- (f) promueve la pérdida de peso cuando se inyecta en ratones homocigotos para el receptor TrkB humano ($TrkB^{hu/hu}$);
- (g) aumenta la supervivencia de las células ganglionares de la retina (RGC) de acuerdo con lo evaluado en un modelo de transección del nervio óptico en ratas TrkB humanizadas;
- (h) activa las vías de señalización MAPK/ERK y PI3K/Akt;

- (i) aumenta la supervivencia de las células neuronales in vitro; y
- (j) bloquea la unión de TrkB a BDNF y/o NT-4 con una IC₅₀ de menos de 5 nM.

[0016] en una realización, la invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente al receptor quinasa B de la tropomiosina (TrkB), en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: (a) las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la Tabla 1; y (b) las CDR de una región variable de la cadena ligera (LCVR) que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la Tabla 1.

[0017] En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a TrkB comprende tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de cualquiera de las secuencias de HCVR seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 18, 34, 49, 59 y 68, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con la misma; y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de cualquiera de las secuencias de LCVR seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, 26, 42, 53, 63 y 72, o una secuencia sustancialmente similar de las mismas que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la misma

[0018] En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a TrkB comprende un HCVR que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 18, 34, 49, 59 y 68.

[0019] En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a TrkB comprende además un LCVR que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, 26, 42, 53, 63 y 72.

[0020] En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a TrkB comprende un HCVR que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 18, 34, 49, 59 y 68; y un LCVR que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, 26, 42, 53, 63 y 72.

[0021] En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a TrkB comprende las CDR de un par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 49/53, 59/63 y 68/72.

[0022] En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a TrkB comprende: las CDR de un par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2/10, 18/26 y 34/42.

[0023] En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a TrkB comprende un par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 49/53, 59/63 y 68/72.

[0024] En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a TrkB comprende un par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2/10, 18/26 y 34/42.

[0025] La presente invención también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a TrkB, que comprende una CDR1 de cadena pesada (HCDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR1 listadas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con las mismas.

[0026] La presente invención también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a TrkB, que comprende una CDR2 de cadena pesada (HCDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR2 listadas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con las mismas.

[0027] La presente invención también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a TrkB, que comprende una CDR3 de cadena pesada (HCDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR3 listadas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con las mismas.

[0028] La presente invención también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a TrkB, que comprende una CDR1 de cadena ligera (LCDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCDR1 listadas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con las mismas.

[0029] La presente invención también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a TrkB, que comprende una CDR2 de cadena ligera (LCDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCDR2 listadas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con las mismas.

[0030] La presente invención también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a TrkB, que comprende una CDR3 de cadena ligera (LCDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCDR3 listadas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con las mismas.

[0031] La presente invención también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a TrkB, que comprende un par de secuencias de aminoácidos HCDR3 y LCDR3 (HCDR3/LCDR3) que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR3 listadas en la Tabla 1 pareadas con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCDR3 listadas en la Tabla 1. De acuerdo con ciertas realizaciones, la presente invención proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden un par de secuencias de aminoácidos HCDR3/LCDR3 contenidas dentro de cualquiera de los ejemplos de anticuerpos anti-TrkB listados en la Tabla 1. En ciertas realizaciones, el par de secuencias de aminoácidos HCDR3/LCDR3 se selecciona del grupo que consiste en: 8/16, 24/32, 40/48, 52/56, 62/66 y 71/75.

[0032] La presente invención también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a TrkB, que comprende un conjunto de seis CDR (es decir, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3) contenidos dentro de cualquiera de los anticuerpos anti-TrkB ejemplares listados en la tabla 1. En ciertas realizaciones, el conjunto de secuencias de aminoácidos HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3 se selecciona del grupo que consiste en: (a) SEQ ID NO: 4, 6, 8, 12, 14, 16; (b) SEQ ID NO: 20, 22, 24, 28, 30, 32; (c) SEQ ID NO: 36, 38, 40, 44, 46, 48; (d) SEQ ID NO: 50, 51, 52, 54, 55, 56; (e) SEQ ID NO: 60, 61, 62, 64, 65, 66; y (f) SEQ ID NO: 69, 70, 71, 73, 74, 75.

[0033] En una realización relacionada, la presente invención proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a TrkB, que comprende un conjunto de seis CDR (es decir, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3) contenidos dentro de un par de secuencias de aminoácido HCVR/LCVR como se define por cualquiera de los anticuerpos anti-TrkB ejemplares listados en la Tabla 1. Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a TrkB, que comprende las secuencias de aminoácidos HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3 contenidas dentro de un par de secuencias de aminoácidos HCVR/LCVR seleccionadas del grupo compuesto por: 2/10, 18/26, 34/42, 49/53, 59/63 y 68/72. Los métodos y técnicas para identificar CDR dentro de las secuencias de aminoácidos de HCVR y LCVR son bien conocidos en la técnica y pueden usarse para identificar CDR dentro de las secuencias de aminoácidos de HCVR y/o LCVR divulgadas aquí. Las convenciones ejemplares que se pueden usar para identificar los límites de las CDR incluyen, por ejemplo, la definición de Kabat, la definición de Chothia y la definición de AbM. En términos generales, la definición de Kabat se basa en la variabilidad de secuencia, la definición de

Chothia se basa en la ubicación de las regiones del bucle estructural, y la definición de AbM es un compromiso entre los enfoques de Kabat y Chothia. Ver, por ejemplo, Kabat, "Secuencias de proteínas de interés inmunológico", Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Maryland (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273: 927-948 (1997); y Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9268-9272 (1989). Las bases de datos públicas también están disponibles para identificar secuencias de CDR dentro de un anticuerpo.

[0034] En una realización, la invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a TrkB que comprende:

- (a) un dominio HCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, 20, 36, 50, 60 y 69;
- (b) un dominio HCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6, 22, 38, 51, 61 y 70;
- (c) un dominio HCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, 24, 40, 52, 62 y 71;
- (d) un dominio LCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, 28, 44, 54, 64 y 73;
- (e) un dominio LCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, 30, 46, 55, 65 y 74; y
- (f) un dominio LCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16, 32, 48, 56, 66 y 75.

[0035] En una realización, la invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a TrkB que comprende:

- (a) un dominio HCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, 20 y 36;
- (b) un dominio HCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6, 22 y 38;
- (c) un dominio HCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, 24 y 40;
- (d) un dominio LCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, 28 y 44;
- (e) un dominio LCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, 30 y 46; y
- (f) un dominio LCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16, 32 y 48.

[0036] En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un conjunto de seis CDR (HCDR1 - HCDR2 - HCDR3 - LCDR1 - LCDR2 - LCDR3) seleccionados del grupo que consiste en: (a) SEQ ID NO: 4 – 6 – 8 – 12 – 14 - 16; (b) SEQ ID NO: 20 – 22 – 24 – 28 – 30

- 32; (c) SEQ ID NO: 36 – 38 – 40 – 44 – 46 - 48; (d) SEQ ID NO: 50 – 51 – 52 – 54 – 55 - 56; (e) SEQ ID NO: 60 – 61 – 62 – 64 – 65 - 66; y (f) SEQ ID NO: 69 – 70 – 71 – 73 – 74 - 75.

[0037] En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a TrkB comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que compite por unirse a TrkB con un anticuerpo de referencia, en donde el anticuerpo de referencia comprende un par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 49/53, 59/63 y 68/72.

[0038] En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a TrkB comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo de referencia, en donde el anticuerpo de referencia comprende un par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 49/53, 59/63 y 68/72.

[0039] En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a TrkB humano con un K_D de menos de aproximadamente 300 nM, medido por resonancia de plasmón superficial a 25° C o 37° C.

[0040] En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a TrkB humano con un K_D de menos de aproximadamente 200 nM, medido por resonancia de plasmón superficial a 25° C o 37° C.

[0041] En una realización, el anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno del mismo se une a TrkB humano con un K_D de menos de aproximadamente 150 nM medido por resonancia de plasmón superficial a 25° C o 37° C.

[0042] En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a TrkB humano con un K_D de menos de aproximadamente 50 nM, medido por resonancia de plasmón superficial a 25° C o 37° C.

[0043] En una realización, el anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno del mismo se une a TrkB humano con un K_D de menos de aproximadamente 100 pM medido por resonancia de plasmón superficial a 25° C o 37° C.

[0044] En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a TrkB humano con una vida media disociativa ($t_{1/2}$) mayor de aproximadamente 10 minutos, medido por resonancia de plasmón superficial a 25° C o 37° C. En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a TrkB humano con una $t_{1/2}$ mayor de aproximadamente 40 minutos, medido por resonancia de plasmón superficial a 25° C o 37° C.

[0046] En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a TrkB humano con un $t_{1/2}$ mayor de aproximadamente 120 minutos, medido por resonancia de plasmón superficial a 25° C o 37° C.

[0047] En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a TrkB activa la señalización de TrkB humano en ausencia de BDNF en células diseñadas para expresar TrkB, con una EC_{50} de menos de aproximadamente 100 pM.

[0048] En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a TrkB activa la señalización de TrkB humano en ausencia de BDNF en células diseñadas para expresar TrkB, con una EC_{50} que varía de aproximadamente 35 pM a aproximadamente 82 pM.

[0049] En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a TrkB aumenta la activación de la señalización de TrkB humana en presencia de BDNF en células diseñadas para expresar TrkB, con una EC_{50} de menos de aproximadamente 100 pM.

[0050] En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a TrkB, que cuando se inyecta en el hipocampo de ratones TrkB humanizados, demuestra la activación de TrkB, como se muestra por un aumento en la fosforilación de TrkB.

[0051] En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a TrkB demuestra la activación de las vías de señalización MAPK/ERK y PI3K/Akt, como se demostró después de la incubación de neuronas corticales de ratón primarias con un anticuerpo anti-TrkB agonista.

[0052] En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a TrkB mejora/aumenta la supervivencia de las células ganglionares de la retina como se muestra en un modelo de transección del nervio óptico en ratas humanizadas TrkB.

[0053] En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a TrkB mejora/aumenta la supervivencia de las células neuronales in vitro.

[0054] En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a TrkB promueve la pérdida de peso en ratones TrkB humanizados.

[0055] En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a TrkB promueve una pérdida de masa grasa en ratones TrkB humanizados.

[0056] En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a TrkB promueve una disminución en el consumo de alimentos y agua en ratones TrkB humanizados.

[0057] En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a TrkB promueve un aumento de la actividad locomotora en ratones TrkB humanizados.

[0058] En una realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-TrkB o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a TrkB y bloquea la unión de TrkB a BDNF con una IC_{50} de menos de aproximadamente 5 nM.

[0059] En una realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-TrkB o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a TrkB y bloquea la unión de TrkB a BDNF con una IC_{50} de menos de aproximadamente 500 pM.

[0060] En una realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-TrkB o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a TrkB y bloquea la unión de TrkB a BDNF con una IC_{50} de menos de aproximadamente 200 pM.

[0061] En un segundo aspecto, la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos anti-TrkB o porciones de los mismos. Por ejemplo, la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR listadas en la Tabla 1; en ciertas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de HCVR listadas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con éstas.

[0062] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCVR listadas en la Tabla 1; en ciertas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de LCVR listadas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99 % de identidad de secuencia con éstas.

[0063] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR1 listadas en la Tabla 1; en ciertas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de HCDR1 listadas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con éstas.

[0064] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR2 listadas en la Tabla 1; en ciertas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de HCDR2 listadas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con estas.

[0065] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR3 listadas en la Tabla 1; en ciertas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de HCDR3 listadas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con estas.

[0066] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCDR1 listadas en la Tabla 1; en ciertas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico LCDR1 listadas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con estas.

[0067] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCDR2 listadas en la Tabla 1; en ciertas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico LCDR2 listadas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con estas.

[0068] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCDR3 listadas en la Tabla 1; en ciertas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico LCDR3 listadas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con estas.

[0069] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican un HCVR, en donde el HCVR comprende un conjunto de tres CDR (es decir, HCDR1, HCDR2, HCDR3), en donde el conjunto de secuencias de aminoácidos HCDR1, HCDR2, HCDR3 es como se define por cualquiera de los anticuerpos anti-TRKB ejemplares listados en la Tabla 1.

[0070] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican un LCVR, en donde el LCVR comprende un conjunto de tres

CDR (es decir, LCDR1, LCDR2, LCDR3), en donde el conjunto de secuencias de aminoácidos LCDR1, LCDR2, LCDR3 es como se define por cualquiera de los anticuerpos anti-TRKB ejemplares listados en la Tabla 1.

[0071] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican un HCVR y un LCVR, en donde el HCVR comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las secuencias de aminoácidos del HCVR listadas en la Tabla 1, y en donde el LCVR comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCVR listadas en la Tabla 1. En ciertas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de HCVR listadas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia a la misma, y una secuencia de polinucleótidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de LCVR listadas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencial con éstas. En ciertas realizaciones de acuerdo con este aspecto de la invención, la molécula de ácido nucleico codifica un HCVR y LCVR, en donde el HCVR y el LCVR se derivan del mismo anticuerpo anti-TrkB listado en la Tabla 1.

[0072] En un tercer aspecto, la presente invención proporciona vectores de expresión recombinantes capaces de expresar un polipéptido que comprende una región variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-TrkB. Por ejemplo, la presente invención incluye vectores de expresión recombinantes que comprenden cualquiera de las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente, es decir, moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de HCVR, LCVR y/o CDR como se establece en la Tabla 1. También se incluyen dentro del alcance de la presente invención las células huésped en las que se han introducido dichos vectores, así como los métodos para producir los anticuerpos o porciones de los mismos mediante el cultivo de las células huésped en condiciones que permitan la producción de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, y recuperar los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos así producidos.

[0073] La presente invención incluye anticuerpos anti-TrkB que tienen un patrón de glicosilación modificado. En algunas realizaciones, la modificación para eliminar sitios de glicosilación indeseables puede ser útil, o un anticuerpo que carece de una fracción de fucosa presente en la cadena de oligosacáridos, por ejemplo, para aumentar la función de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (ver Shield et al. (2002) JBC 277: 26733). En otras aplicaciones, se puede realizar una modificación de la galactosilación para modificar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

[0074] En un cuarto aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo de la invención, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a TrkB y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0075] En un aspecto relacionado, la invención presenta una composición, que es una combinación de un anticuerpo anti-TrkB y un segundo agente terapéutico. En una realización, el segundo agente terapéutico es cualquier agente que se combina ventajosamente con un anticuerpo anti-TrkB. El segundo agente terapéutico puede ser útil para aliviar al menos un síntoma de la enfermedad o trastorno neurodegenerativo.

[0076] En un quinto aspecto, la invención proporciona un método para potenciar una actividad biológica mediada por TrkB, el método comprende poner en contacto TrkB con una cantidad biológicamente efectiva de un anticuerpo anti-TrkB agonista de la Tabla 1, o poner en contacto TrkB con una composición farmacéutica que contiene una cantidad biológicamente efectiva de un anticuerpo agonista anti-TrkB de la Tabla 1.

[0077] En ciertas realizaciones, la actividad biológica es la protección neuronal o la supervivencia neuronal y la protección neuronal o la supervivencia neuronal se mejoran al contacto de TrkB con un anticuerpo agonista anti-TrkB.

[0078] En ciertas realizaciones, la actividad biológica es neuroprotección y supervivencia de las células ganglionares de la retina (RGC).

[0079] En un sexto aspecto, la invención proporciona métodos terapéuticos para tratar una enfermedad o trastorno asociado con la actividad o expresión de TrkB, o al menos un síntoma asociado con la enfermedad o trastorno, usando un anticuerpo anti-TrkB o una porción de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención. Los métodos terapéuticos de acuerdo con este aspecto de la invención comprenden administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención a un sujeto que lo necesite. El trastorno tratado es cualquier enfermedad o afección que se mejora, mitiga, inhibe o previene dirigiéndose a TrkB y/o activando la señalización celular mediada por TrkB.

[0080] En una realización, los anticuerpos anti-TrkB de la invención pueden proporcionar un método para prevenir lesiones o muerte de neuronas retinianas. En una realización, los anticuerpos anti-TrkB de la invención pueden proporcionar un método para tratar enfermedades patológicas en donde se produce la degeneración de la retina. En una realización, los anticuerpos anti-TrkB de la invención pueden proporcionar un método para tratar el ojo vivo antes o después de una cirugía ocular, exposición a la luz u otro trauma ambiental, evitando así la degeneración de las células de la retina. En una realización, los anticuerpos anti-TrkB de la invención pueden proporcionar un método para prevenir la lesión y la degeneración del fotorreceptor en el ojo vivo. En una realización, los anticuerpos anti-TrkB de la invención pueden proporcionar un método para proteger las neuronas retinianas sin la inducción de efectos secundarios, posiblemente debido a la reactividad cruzada con otros receptores, como el receptor p75. En una realización, los anticuerpos anti-TrkB de la invención pueden proporcionar un método para permitir que los fotorreceptores lesionados se recuperen o regeneren.

[0081] En ciertas realizaciones, la enfermedad o trastorno a tratar con un anticuerpo de la invención es una enfermedad o trastorno del ojo seleccionado del grupo que consiste en glaucoma, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad, neuropatía óptica isquémica, neuritis óptica, isquemia de retina, degeneración de fotorreceptores, retinitis pigmentosa, amaurosis congénita de Leber, neuropatía óptica hereditaria de Leber, síndrome de Usher, enfermedad de Stargardt y oclusiones de venas o arterias retinianas.

[0082] Otras afecciones patológicas tratables con uno o más anticuerpos anti-TrkB de la invención incluyen desprendimiento de retina, retinopatías luminosas, retinopatías inducidas por cirugía (ya sea mecánicamente o inducidas por la luz), retinopatías tóxicas, retinopatía del prematuro, retinopatías virales tales como CMV o retinopatía por VIH relacionado con el SIDA; uveítis; retinopatías isquémicas por oclusión venosa o arterial u otro trastorno vascular, retinopatías por traumatismo o lesiones penetrantes del ojo, vitreoretinopatía periférica o degeneraciones retinianas hereditarias.

[0083] En una realización, la enfermedad o trastorno del ojo a tratar con un anticuerpo anti-TrkB agonista de la invención es el glaucoma.

[0084] Un séptimo aspecto de la invención proporciona lograr una reducción en el peso corporal en un sujeto, comprendiendo el método administrar un anticuerpo agonista de TrkB de la Tabla 1, o una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, al sujeto.

[0085] En un aspecto relacionado, la invención proporciona un método para lograr una reducción de la masa grasa en un sujeto, el método comprende administrar un anticuerpo agonista TrkB de la Tabla 1, o una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, al sujeto.

[0086] Un octavo aspecto de la invención proporciona un método para promover la supervivencia neuronal en un sujeto, el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo agonista TrkB de la Tabla 1, o una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo, al sujeto.

[0087] En una realización, los métodos descritos anteriormente se pueden lograr administrando un anticuerpo anti-TrkB agonista o un fragmento de unión a antígeno del mismo a un sujeto que lo necesite, en donde el anticuerpo anti-TrkB agonista comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (CDR) (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidos dentro de una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la misma; y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la Tabla 1, o

una secuencia sustancialmente similar de la misma con al menos un 90% de identidad de secuencia con ésta.

[0088] En una realización, los métodos de la invención pueden lograrse administrando un anticuerpo TrkB agonista de la invención, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidos dentro de una cualquiera de las secuencias HCVR seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 18, 34, 49, 59 y 68, o una secuencia sustancialmente similar de las mismas que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con las mismas; y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de cualquiera de las secuencias de LCVR seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, 26, 42, 53, 63 y 72, o una secuencia sustancialmente similar de las mismas que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con ésta

[0089] En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un HCVR que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 18, 34, 49, 59 y 68.

[0090] En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un LCVR que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, 26, 42, 53, 63 y 72.

[0091] En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un HCVR que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 18, 34, 49, 59 y 68; y un LCVR que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, 26, 42, 53, 63 y 72.

[0092] En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende las CDR de un par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 49/53, 59/63 y 68/72.

[0093] En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 49/53, 59/63 y 68/72.

[0094] En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

(a) un dominio HCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, 20, 36, 50, 60 y 69;

(b) un dominio HCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6, 22, 38, 51, 61 y 70;

(c) un dominio HCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, 24, 40, 52, 62 y 71;

(d) un dominio LCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, 28, 44, 54, 64 y 73;

(e) un dominio LCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, 30, 46, 55, 65 y 74; y

(f) un dominio LCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16, 32, 48, 56, 66 y 75.

[0095] En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un conjunto de seis CDR (HCDR 1 -HCDR2 -HCDR3 -LCDR 1 -LCDR2 -LCDR3) seleccionados del grupo que consiste en: (a) SEQ ID NO: 4 - 6 - 8- 12 -14 -16; (b) SEQ ID NO: 20 - 22 - 24 - 28 - 30 - 32; (c) SEQ ID NO: 36 - 38 - 40 - 44 - 46 - 48; (d) SEQ ID NO: 50 - 51 - 52 - 54 - 55 - 56; (e) SEQ ID NO: 60 - 61 - 62 - 64 - 65 - 66; y (f) SEQ ID NO: 69 - 70 - 71 - 73 - 74 - 75.

[0096] En una realización, la enfermedad o trastorno a tratar con un anticuerpo anti-TrkB de la invención es la obesidad y cualquier complicación resultante de la obesidad.

[0097] Se prevé que cualquier enfermedad o trastorno asociado con la actividad o expresión de TrkB sea susceptible de tratamiento con un anticuerpo de la invención. Estas enfermedades pueden incluir cualquier enfermedad en la que sea evidente la degradación celular, como en una condición neurodegenerativa o después de una lesión nerviosa.

[0098] Otras realizaciones resultarán evidentes a partir de una revisión de la siguiente descripción detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0099] Figura 1. Muestra inmunotransferencias que evalúan los niveles totales de TRKB y los niveles de fosfo-TRKB en ratones TRKB humanizados homocigotos a 1 hora, 4 horas y 18 horas después de la inyección directa del hipocampo del anticuerpo agonista de TRKB H4H9816P2 o el anticuerpo de control de isotipo.

[0100] Figura 2. Muestra que el anticuerpo agonista TrkB, H4H9816P2, activó las vías aguas abajo de MAPK/ERK y PI3K/Akt. La figura muestra inmunotransferencias de fosfo-TrkB, TrkB total, fosfo-Akt, AKT total, fosfo-ERK y ERK total a los 15 minutos y 2 horas después del tratamiento de neuronas corticales primarias aisladas de cachorros de ratón TRKB humanizados homocigotos del día 1 postnatal con diversos anticuerpos agonistas de TrkB o BDNF.

[0101] Figura 3. Muestra que la dependencia de la dosis de tres anticuerpos agonistas TrkB aumentó la supervivencia de las células SH-SY5Y *in vitro*. El anticuerpo de control de isotipo no tuvo efecto sobre la supervivencia celular.

[0102] Figura 4. Muestra los perfiles farmacocinéticos del anticuerpo agonista anti-TrkB. H4H9816P2 en ratones TrkB^{hu/hu} y ratones WildType. A los ratones se les administró una dosis subcutánea única de 10 mg/kg el día 0. Las concentraciones de H4H9816P2 total en suero se midieron usando un inmunoensayo Gyros. Los puntos de datos posteriores a la dosis de 6 horas, 1, 2, 3, 6, 9, 16, 21 y 30 días indican la concentración media de anticuerpo. Las concentraciones totales de anticuerpos de H4H9816P2 se representan como círculos sólidos negros para ratones TrkB^{hu/hu} y cuadrados negros sólidos para ratones WildType. Los datos se grafican como media $\pm$ DE.

[0103] Figura 5. Consiste en la Figura 5A y la Figura 5B, que muestran la capacidad de los anticuerpos monoclonales anti-TrkB de ratón para bloquear la interacción entre TrkB de rata o ratón y su ligando BDNF (Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro). Se usaron métodos basados en ELISA para evaluar la unión de (Figura 5A con dos gráficos) TrkB.hFc de ratón y (Figura 5B con dos gráficos) TrkB.mmh de rata a BDNF recubierto con placa en presencia de un rango de concentraciones de anti-TrkB de ratón y mAbs de control de isotipo. El inserto en (Figura 5 A con dos gráficos) muestra la curva de respuesta de dosis de TrkB.hFc de ratón (REGN2277) que se une a BDNF con un valor EC₅₀ de 780 pM. El inserto en (Figura 5B con dos gráficos) muestra la curva de respuesta de dosis de la rata TrkB.mmh (REGN1808) que se une a BDNF con un valor de EC₅₀ de 2.2 nM. La molaridad (M) indica la concentración de anticuerpos para mAbs. Las barras de error representan la desviación estándar.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0104] Antes de describir la presente invención, debe entenderse que esta invención no se limita a métodos particulares y condiciones experimentales descritas, ya que tales métodos y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende ser limitativa, ya que el alcance de la presente invención estará limitado solo por las reivindicaciones adjuntas.

[0105] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente", cuando se usa en referencia a un valor numérico citado particular, significa que el valor puede variar del valor citado en no más del 1%. Por ejemplo, como se usa en este documento, la expresión "aproximadamente 100" incluye 99 y 101 y todos los valores intermedios (por ejemplo, 99.1, 99.2, 99.3, 99.4, etc.).

[0106] Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en este documento se pueden usar en la práctica o prueba de la presente invención, los métodos y materiales preferidos se describen ahora. Todas las patentes, solicitudes y publicaciones no patente mencionadas en esta especificación se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

Definiciones

[0107] La expresión "TrkB", y similares, también conocida como "receptor quinasa B de tropomiosina", se refiere al receptor humano (a menos que se designe como de otra especie) que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en los residuos de aminoácidos 32 a 430 del número de acceso NP_001018074.1. El TrkB humano que contiene una etiqueta de myc-myc-hexahistidina se muestra como SEQ ID NO: 76 (con los restos de aminoácidos 1-399 siendo TrkB humano y los restos de aminoácidos 400-427 siendo la etiqueta de myc-myc-hexahistidina). Otros formatos que contienen proteínas TrkB humanas se describen en el presente documento, incluida la SEQ ID NO: 77, que es TrkB humana (residuos 1-399) con una región Fc de ratón (residuos 400-632); y SEQ ID NO: 78, que es TrkB humano (residuos 1-399) con una región Fc humana (residuos 400-626). El TrkB de ratón comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en los residuos de aminoácidos 32 a 429 del número de acceso NP_001020245. El TrkB de ratón que contiene una etiqueta de myc-myc-hexahistidina se muestra como SEQ ID NO: 79 (siendo los residuos de aminoácidos 1-398 TrkB de ratón y los restos de aminoácidos 399-426 siendo la etiqueta de myc-myc-hexahistidina). En este documento se describen otros formatos que contienen proteínas TrkB de ratón, incluida la SEQ ID NO: 80, que es TrkB de ratón (residuos 1-398) con una región Fc de ratón (residuos 399-631); y SEQ ID NO: 81, que es TrkB de ratón (residuos 1-398) con una región Fc humana (residuos 399-625). El TrkB de conejo comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en los residuos de aminoácidos 32 a 430 del número de acceso XP_002721319.1. El TrkB de conejo que contiene una etiqueta de myc-myc-hexahistidina se muestra como SEQ ID NO: 82 (con los residuos de aminoácidos 1-399 siendo TrkB de conejo y los residuos de aminoácidos 400-427 siendo la etiqueta de myc-myc-hexahistidina). En este documento se describen otros formatos que contienen proteínas TrkB de conejo, incluida la SEQ ID NO: 83, que es TrkB de conejo (residuos 1-399) con una región Fc de ratón (residuos 400-632). TrkB de rata comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en los residuos de aminoácidos 32 a 429 del número de acceso NP_036863.1. La TrkB de rata que contiene una etiqueta de myc-myc-hexahistidina se muestra como SEQ ID NO: 84 (siendo los residuos de aminoácidos 1-398 TrkB de rata y los residuos de aminoácidos 399-426 siendo la etiqueta de myc-myc-hexahistidina). En el presente documento se describen otros formatos que contienen proteínas TrkB de rata, incluida la SEQ ID NO: 85, que es TrkB de rata (residuos 1-398) con una región Fc de ratón (residuos 399-631). El TrkB del macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) se muestra como SEQ ID NO: 95 (aminoácidos 32 a 838 del número de acceso NP_001248226.1) y el TrkB del mono cynomolgus (*Macaca fascicularis*) se muestra como SEQ ID NO: 96 (aminoácidos 32 a 838 del número de acceso XP_005582102.1).

[0108] La proteína humana "TrkA" se muestra como SEQ ID NO: 86, siendo los aminoácidos 1-375 TrkA (aminoácidos 34-414 de número de acceso NP_001012331.1 con V263L, C300S), siendo los aminoácidos 376-378 un enlace GPG y siendo los aminoácidos 379-605 un Fc humano.

[0109] La proteína humana "TrkC" se muestra como SEQ ID NO: 87, siendo los aminoácidos 1-398 TrkC (aminoácidos 32-429 con el número de acceso

NP_001012338.1) y los aminoácidos 399-426 siendo una etiqueta myc-myc-his.

[0110] La proteína "TrkC" del ratón se muestra como SEQ ID NO: 88, siendo los aminoácidos 1-398 TrkC (aminoácidos 32-429 del número de acceso NP_032772.3) y siendo los aminoácidos 399-426 una etiqueta de myc-myc-his.

[0111] La proteína "TrkC" del mono cynomolgus se muestra como SEQ ID NO: 89, siendo los aminoácidos 1-398 TrkC (aminoácidos 32-429 del número de acceso XP_015308837.1) y siendo los aminoácidos 399-426 una etiqueta myc-myc-his.

[0112] En ciertos casos, se prepararon líneas celulares que expresaban las proteínas TrkB, incluido el ectodominio, así como los dominios transmembrana y citoplasmático de la proteína TrkB. Por ejemplo, SEQ ID NO: 91 es la proteína TrkB humana que contiene los tres dominios contenidos dentro de los aminoácidos 32-822 del número de acceso NP_001018074.1) o Uniprot Q16620-1, siendo los aminoácidos 1-398 el ectodominio, y la región transmembrana/citoplasmática definida por aproximadamente los residuos de aminoácidos 399-790. En un caso, se preparó una línea celular TrkB que expresaba TrkB de ratón (aminoácidos 32-476 de número de acceso NP_032771.1; Véase también la SEQ ID NO: 92). En otro caso, se preparó una línea celular que expresaba una proteína TrkB quimérica, con el ectodominio de TrkB de ratón a partir de los aminoácidos 32-429 del número de acceso NP_001020245.1 (Véase también la SEQ ID NO: 93) o el número Uniprot P15209-1 y los dominios transmembrana y citoplasmático TrkB humano (aminoácidos 431-822 del número de acceso NP_001018074.1 (Véase también la SEQ ID NO: 91). También se preparó una línea celular que expresaba TrkB de mono verde africano (*Chlorocebus sabaeus*) (aminoácidos 32-822 del número de acceso XP_007967815.1 (véase también la SEQ ID NO: 94)).

[0113] El término "factor neurotrófico derivado del cerebro" o "BDNF" se refiere al ligando para TrkB y la secuencia de aminoácidos de BDNF se muestra en la SEQ ID NO: 90 (isoforma A 1-120, con los aminoácidos 129-247 del número de acceso NP_73392.1 con una Met agregada en el extremo N-terminal). En ciertos experimentos descritos aquí, la fuente del BDNF es de R & D Systems, 248-BD/CF.

[0114] Todas las referencias a proteínas, polipéptidos y fragmentos de proteínas en el presente documento pretenden referirse a la versión humana de la proteína, polipéptido o fragmento de proteína respectivo a menos que se especifique explícitamente como siendo de especie no humana. Por lo tanto, la expresión "TrkB" significa TrkB humano a menos que se especifique que proviene de una especie no humana, por ejemplo, "TrkB mono", "TrkB de ratón", "TrkB de rata", etc.

[0115] Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo anti-TrkB" incluye tanto anticuerpos monovalentes con una sola especificidad, como anticuerpos biespecíficos que comprenden un primer brazo que se une a TrkB y un segundo brazo que se une a un segundo antígeno (objetivo), en donde el

brazo anti-TrkB comprende cualquiera de las secuencias de HCVR/LCVR o CDR como se establece en la Tabla 1 en este documento. La expresión "anticuerpo anti-TrkB" también incluye conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) que comprenden un anticuerpo anti-TrkB o una porción de unión a antígeno del mismo conjugada con un fármaco o toxina (es decir, agente citotóxico). La expresión "anticuerpo anti-TrkB" también incluye conjugados de anticuerpo-radionúclido (ARC) que comprenden un anticuerpo anti-TrkB o una porción de unión a antígeno del mismo conjugado con un radionúclido.

[0116] El término "anticuerpo anti-TrkB", como se usa en el presente documento, significa cualquier molécula de unión a antígeno o complejo molecular que comprende al menos una región determinante de complementariedad (CDR) que se une específicamente o interactúa con TrkB o una porción de TrkB. El término "anticuerpo" incluye moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, así como multímeros de las mismas (por ejemplo, IgM). Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada aquí como HCVR o V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada aquí como LCVR o V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de la cadena ligera comprende un dominio (C_{L1}). Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al terminal carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. En diferentes realizaciones de la invención, los FR del anticuerpo anti-TrkB (o la porción de unión a antígeno del mismo) pueden ser idénticos a las secuencias de la línea germinal humana, o pueden modificarse natural o artificialmente. Se puede definir una secuencia consenso de aminoácidos en base a un análisis en paralelo de dos o más CDR.

[0117] El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, también incluye fragmentos de unión a antígeno de moléculas de anticuerpo de longitud completa. Los términos "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo, "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo y similares, como se usa en el presente documento, incluyen cualquier polipéptido enzimáticamente obtenible, sintético, o genéticamente diseñado o glicoproteína que se une específicamente a un antígeno para formar un complejo. Los fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo pueden derivarse, por ejemplo, de moléculas de anticuerpo completas usando cualquier técnica estándar adecuada tal como digestión proteolítica o técnicas de ingeniería genética recombinante que implican la manipulación y expresión de ADN que codifica los dominios variables y opcionalmente constantes del anticuerpo. Dicho ADN es conocido y/o está fácilmente disponible en, por ejemplo, fuentes comerciales, bibliotecas de ADN (que incluyen, por ejemplo, bibliotecas de fago-anticuerpo), o puede sintetizarse. El ADN puede secuenciarse y manipularse químicamente o utilizar técnicas de biología molecular, por

ejemplo, para organizar uno o más dominios variables y/o constantes en una configuración adecuada, o para introducir codones, crear residuos de cisteína, modificar, agregar o eliminar aminoácidos. etc.

[0118] Los ejemplos no limitantes de fragmentos de unión a antígeno incluyen: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos F(ab')₂; (iii) fragmentos de Fd; (iv) fragmentos Fv; (v) moléculas de Fv de cadena sencilla (scFv); (vi) fragmentos dAb; y (vii) unidades de reconocimiento mínimas que consisten en los residuos de aminoácidos que imitan la región hipervariable de un anticuerpo (por ejemplo, una región determinante de complementariedad aislada (CDR) como un péptido CDR3) o un péptido FR3-CDR3-FR4 restringido. Otras moléculas diseñadas, tal como anticuerpos específicos de dominio, anticuerpos de dominio único, anticuerpos con dominio eliminado, anticuerpos quiméricos, anticuerpos injertados con CDR, diacuerpos, triacuerpos, los tetracuerpos, minicuerpos, nanocuerpos (por ejemplo, nanocuerpos monovalentes, nanocuerpos bivalentes, etc.), inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP) y dominios IgNAR variables de tiburón, también se incluyen dentro de la expresión "fragmento de unión a antígeno", como se usa en el presente documento.

[0119] Un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo típicamente comprenderá al menos un dominio variable. El dominio variable puede ser de cualquier tamaño o composición de aminoácidos y generalmente comprenderá al menos una CDR, que está adyacente o en marco con una o más secuencias marco. En los fragmentos de unión a antígeno que tienen un dominio V_H asociado con un dominio V_L, los dominios V_H y V_L pueden estar situados entre sí en cualquier disposición adecuada. Por ejemplo, la región variable puede ser dimérica y contener los dímeros V_H-V_H, V_H-V_L o V_L-V_L. Alternativamente, el fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener un dominio V_H o V_L monomérico.

[0120] En ciertas realizaciones, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener al menos un dominio variable unido covalentemente a al menos un dominio constante. Las configuraciones ejemplares no limitantes de dominios variables y constantes que se pueden encontrar dentro de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención incluyen: (i) V_H-C_H1; (ii) V_H-C_H2; (iii) V_H-C_H3; (iv) V_H-C_H1-C_H2; (v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3; (vi) V_H-C_H2-C_H3; (vii) V_H-C_L; (viii) V_L-C_H1; (ix) V_L-C_H2; (x) V_L-C_H3; (xi) V_L-C_H1-C_H2; (xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3; (xiii) V_L-C_H2-C_H3; y (xiv) V_L-C_L. En cualquier configuración de dominios variables y constantes, incluida cualquiera de las configuraciones ejemplares listadas anteriormente, los dominios variables y constantes pueden estar directamente vinculados entre sí o pueden estar unidos por una bisagra completa o parcial o región enlazadora. Una región de bisagra puede consistir en al menos 2 (por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 40, 60 o más) aminoácidos, que dan como resultado un enlace flexible o semiflexible entre dominios variables y/o constantes adyacentes en una sola molécula de polipéptido. Además, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención puede comprender un homodímero o heterodímero (u otro multímero) de cualquiera de las configuraciones de dominio variable y constante listadas anteriormente en asociación no covalente entre sí y/o con

uno o más dominios monoméricos V_H o V_L (por ejemplo, por enlace(s) de disulfuro).

[0121] Al igual que con las moléculas de anticuerpos completas, los fragmentos de unión a antígeno pueden ser monoespecíficos o multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos). Un fragmento de unión a antígeno multiespecífico de un anticuerpo típicamente comprenderá al menos dos dominios variables diferentes, en donde cada dominio variable es capaz de unirse específicamente a un antígeno separado o a un epítipo diferente en el mismo antígeno. Cualquier formato de anticuerpo multiespecífico, incluidos los formatos de anticuerpos biespecíficos ejemplares divulgados en este documento, puede adaptarse para su uso en el contexto de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención usando técnicas de rutina disponibles en la técnica.

[0122] En ciertos casos, puede ser deseable antagonizar TrkB, por ejemplo, para inhibir el crecimiento o la proliferación de, por ejemplo, una célula tumoral neuronal. Sin embargo, los anticuerpos de la presente invención actúan como anticuerpos agonistas, que sirven como mejoradores de la supervivencia neuronal y como neuroprotectores. Los anticuerpos de la presente invención pueden funcionar potenciando la interacción entre TrkB y su ligando, BDNF. Alternativamente, los anticuerpos de la invención pueden mediar la señalización de TrkB a través de un mecanismo que no implica potenciar la interacción de TrkB con su ligando.

[0123] El término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos humanos no naturales. El término incluye anticuerpos que son recombinantemente producidos en un mamífero no humano, o en células de un mamífero no humano. El término no pretende incluir anticuerpos aislados o generados en un sujeto humano.

[0124] Los anticuerpos de la invención pueden, en algunas realizaciones, ser anticuerpos humanos recombinantes y/o no naturales. El término "anticuerpo humano recombinante", como se usa en el presente documento, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped (descrito más adelante), anticuerpos aislados de una biblioteca, de anticuerpos humanos recombinante, combinatoria (descritos más adelante), anticuerpos aislados de un animal (p. ej., un ratón) que es transgénico para los genes de inmunoglobulina humana (véase p. ej., Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que involucre el empalme de secuencias del gen de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. En ciertas realizaciones, tales anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y, por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque está relacionado con las secuencias V_H y V_L de la línea germinal

humana, puede que no exista naturalmente dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

[0125] Los anticuerpos humanos pueden existir en dos formas que están asociadas con la heterogeneidad de la bisagra. En una forma, una molécula de inmunoglobulina comprende una construcción estable de cuatro cadenas de aproximadamente 150-160 kDa en la que los dímeros se mantienen unidos mediante un enlace disulfuro de cadena pesada entre cadenas. En una segunda forma, los dímeros no están enlazados a través de enlaces disulfuro intercadenas y se forma una molécula de aproximadamente 75-80 kDa compuesta de una cadena ligera y pesada (medio anticuerpo) acoplada covalentemente. Estas formas han sido extremadamente difíciles de separar, incluso después de la purificación por afinidad.

[0126] La frecuencia de aparición de la segunda forma en diversos isotipos de IgG intactos se debe, pero no se limita a, diferencias estructurales asociadas con el isotipo de la región bisagra del anticuerpo. Una sola sustitución de aminoácidos en la región bisagra de la bisagra IgG4 humana puede reducir significativamente la apariencia de la segunda forma (Angal et al. (1993) Molecular Immunology 30: 105) a niveles típicamente observados usando una bisagra de IgG1 humana. La presente invención abarca anticuerpos que tienen una o más mutaciones en la región bisagra, C_H2 o C_H3, que pueden ser deseables, por ejemplo, en producción, para mejorar el rendimiento de la forma de anticuerpo deseada.

[0127] El término "se une específicamente", o "se une específicamente a", o similar, significa que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo forma un complejo con un antígeno que es relativamente estable en condiciones fisiológicas. La unión específica se puede caracterizar por una constante de disociación de equilibrio de al menos aproximadamente 1×10^{-6} M o menos (por ejemplo, una K_D más pequeña indica una unión más estrecha). Los métodos para determinar si dos moléculas se unen específicamente son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, diálisis de equilibrio, resonancia de plasmón superficial y similares. Como se describe en el presente documento, los anticuerpos se han identificado mediante resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, BIACORE™, que se une específicamente a TrkB. Además, los anticuerpos multiespecíficos que se unen a la proteína TrkB y uno o más antígenos adicionales o un bi-específico que se une a dos regiones diferentes de TrkB se consideran, sin embargo, anticuerpos que "se unen específicamente", como se usa en el presente documento.

[0128] Los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos aislados. Un "anticuerpo aislado", como se usa en el presente documento, significa un anticuerpo que se ha identificado y separado y/o recuperado de al menos un componente de su entorno natural. Por ejemplo, un anticuerpo que se ha separado o eliminado de al menos un componente de un organismo, o de un tejido o célula en donde el anticuerpo existe naturalmente o se produce naturalmente, es un "anticuerpo aislado" para los fines de la presente invención. Un anticuerpo aislado también incluye un anticuerpo *in situ* dentro de una célula recombinante. Los anticuerpos aislados son anticuerpos que han

sido sometidos a al menos una etapa de purificación o aislamiento. De acuerdo con ciertas realizaciones, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

[0129] Los anticuerpos anti-TrkB divulgados en el presente documento pueden comprender una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos en las regiones marco y/o CDR de los dominios variables de la cadena pesada y ligera. Dichas mutaciones se pueden determinar fácilmente comparando las secuencias de aminoácidos divulgadas en el presente documento con secuencias disponibles, por ejemplo, de bases de datos públicas de secuencias de anticuerpos. Una vez obtenidos, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno que contienen una o más mutaciones pueden analizarse fácilmente para una o más propiedades deseadas tales como, especificidad de unión mejorada, mayor afinidad de unión, propiedades biológicas antagonistas o agonistas mejoradas o potenciadas (según sea el caso), inmunogenicidad reducida, etc. Los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno obtenidos de esta manera general están incluidos en la presente invención.

[0130] La presente invención también incluye anticuerpos anti-TrkB que comprenden variantes de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR divulgadas aquí que tienen una o más sustituciones conservadoras. Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos anti-TrkB que tienen secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR con, por ejemplo, 10 o menos, 8 o menos, 6 o menos, 4 o menos, etc. sustituciones de aminoácidos conservadoras relativas a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR establecidas en la Tabla 1 de este documento.

[0131] El término "epítipo" se refiere a un determinante antigénico que interactúa con un sitio de unión a antígeno específico en la región variable de una molécula de anticuerpo conocida como paratopo. Un solo antígeno puede tener más de un epítipo. Por lo tanto, diferentes anticuerpos pueden unirse a diferentes áreas en un antígeno y pueden tener diferentes efectos biológicos. Los epítipos pueden ser conformacionales o lineales. Un epítipo conformacional es producido por aminoácidos espacialmente yuxtapuestos de diferentes segmentos de la cadena polipeptídica lineal. Un epítipo lineal es uno producido por residuos de aminoácidos adyacentes en una cadena de polipéptidos. En ciertas circunstancias, un epítipo puede incluir restos de sacáridos, grupos fosforilo o grupos sulfonilo en el antígeno.

[0132] El término "identidad sustancial" o "sustancialmente idéntico", cuando se refiere a un ácido nucleico o fragmento del mismo, indica que, cuando se alinea de manera óptima con inserciones o deleciones de nucleótidos apropiadas con otro ácido nucleico (o su cadena complementaria), existe identidad de secuencia de nucleótidos en al menos aproximadamente el 95%, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 96%, 97%, 98% o 99% de las bases de nucleótidos, medido por cualquier algoritmo bien conocido de identidad de secuencia, como FASTA, BLAST o Gap, como se discute más adelante. Una molécula de ácido nucleico que tiene identidad sustancial con

una molécula de ácido nucleico de referencia puede, en ciertos casos, codificar un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos o una secuencia de aminoácidos sustancialmente similar al polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de referencia.

[0133] Tal como se aplica a los polipéptidos, el término "similitud sustancial" o "sustancialmente similar" significa que dos secuencias peptídicas, cuando están alineadas de manera óptima, tal como por los programas GAP o BESTFIT que usan pesos de brecha predeterminados, comparten al menos un 95% de identidad de secuencia, incluso más preferiblemente al menos 98% o 99% de identidad de secuencia. Preferiblemente, las posiciones de residuos que no son idénticas difieren en sustituciones conservadoras de aminoácidos. Una "sustitución conservadora de aminoácidos" es aquella en la que un residuo de aminoácido está sustituido por otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución conservadora de aminoácidos no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos en que dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí por sustituciones conservadoras, el porcentaje de identidad de secuencia o grado de similitud puede ajustarse hacia arriba para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Los medios para realizar este ajuste son bien conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, incorporado aquí como referencia. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen (1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; (2) cadenas laterales de hidroxilo alifáticas: serina y treonina; (3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; (4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; (5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; (6) cadenas laterales ácidas: aspartato y glutamato, y (7) las cadenas laterales que contienen azufre son cisteína y metionina. Los grupos conservadores de sustitución de aminoácidos preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina. Alternativamente, un reemplazo conservador es cualquier cambio que tenga un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250 divulgada en Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-1445, incorporado aquí como referencia. Un reemplazo "moderadamente conservador" es cualquier cambio que tenga un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250.

[0134] La similitud de secuencia para polipéptidos, que también se conoce como identidad de secuencia, se mide típicamente usando un software de análisis de secuencia. El software de análisis de proteínas empareja secuencias similares utilizando medidas de similitud asignadas a diversas sustituciones, delecciones y otras modificaciones, incluidas las sustituciones conservadoras de aminoácidos. Por ejemplo, el software GCG contiene programas como Gap y Bestfit que se pueden usar con parámetros predeterminados para determinar la homología de secuencia o la identidad de secuencia entre polipéptidos estrechamente relacionados, como polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos o entre una proteína de tipo

silvestre y una muteína de los mismos. Ver, por ejemplo, GCG Versión 6.1. Las secuencias de polipéptidos también se pueden comparar usando FASTA usando parámetros predeterminados o recomendados, un programa en GCG Versión 6.1. FASTA (p. Ej., FASTA2 y FASTA3) proporciona alineaciones y porcentaje de identidad de secuencia de las regiones de mejor superposición entre las secuencias de consulta y búsqueda (Pearson (2000) *supra*). Otro algoritmo preferido cuando se compara una secuencia de la invención con una base de datos que contiene una gran cantidad de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST, especialmente BLASTP o TBLASTN, que utiliza parámetros predeterminados. Ver, por ejemplo, Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 y Altschul *et al.* (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-402, cada uno incorporado aquí como referencia.

Características biológicas de los anticuerpos.

[0135] La presente invención incluye anticuerpos anti-TrkB que se unen a TrkB humano con un K_D de menos de aproximadamente 200 nM medido por resonancia de plasmón superficial a 25° C, o a 37° C. De acuerdo con ciertas realizaciones, la invención incluye anticuerpos anti-TrkB que se unen a TrkB humano con un K_D de menos de aproximadamente 600 pM, menos de aproximadamente 300 pM, menos de aproximadamente 200 pM, menos de aproximadamente 150 pM, menos de aproximadamente 100 pM, menos de aproximadamente 80 pM, menos de aproximadamente 50 pM, menos de aproximadamente 40 pM, menos de aproximadamente 30 pM, menos de aproximadamente 20 pM, menos de aproximadamente 10 pM, menos de aproximadamente 5 pM, menos de aproximadamente 3 pM o menos de aproximadamente 1 pM.

[0136] La presente invención incluye anticuerpos anti-TrkB que se unen a TrkB humano con una vida media disociativa ($t_{1/2}$) mayor de aproximadamente 10 minutos, medida por resonancia de plasmón superficial a 25° C o 37° C. De acuerdo con ciertas realizaciones, la invención incluye anticuerpos anti-TrkB que se unen a TrkB humano con un $t_{1/2}$ mayor de aproximadamente 20 minutos, mayor de aproximadamente 50 minutos, mayor de aproximadamente 100 minutos, mayor de aproximadamente 120 minutos, mayor de aproximadamente 150 minutos, mayor de aproximadamente 300 minutos, mayor de aproximadamente 350 minutos, mayor de aproximadamente 400 minutos, mayor de aproximadamente 450 minutos, mayor de aproximadamente 500 minutos, mayor de aproximadamente 550 minutos, mayor de aproximadamente 600 minutos, mayor de aproximadamente 700 minutos, mayor de aproximadamente 800 minutos, mayor de aproximadamente 900 minutos, mayor de aproximadamente 1000 minutos, mayor de aproximadamente 1100 minutos o mayor de aproximadamente 1200 minutos.

[0137] La presente invención incluye anticuerpos anti-TrkB que pueden unirse o no a TrkB de mono, o TrkB de ratón o rata. Como se usa en el presente documento, un anticuerpo "no se une" a un antígeno particular (por ejemplo, TrkB de mono, ratón o rata si el anticuerpo, cuando se prueba en un ensayo de unión a antígeno, tal como la resonancia de plasmón superficial, exhibe un K_D de más de aproximadamente 1000 nM, o no exhibe ninguna unión a antígeno,

en dicho ensayo. Otro formato de ensayo que puede usarse para determinar si un anticuerpo se une o no a un antígeno particular, de acuerdo con este aspecto de la invención, es ELISA.

[0138] La presente invención incluye anticuerpos anti-TrkB que activan la señalización de TrkB humana en células diseñadas para expresar un receptor TrkB con una EC_{50} de menos de aproximadamente 100 pM. Usando un formato de ensayo descrito en el Ejemplo 5, o un formato de ensayo sustancialmente similar, se puede calcular un valor EC_{50} como la concentración de anticuerpo requerida para activar la señalización mediada por TrkB a la señal semimáxima observada. Por lo tanto, de acuerdo con ciertas realizaciones, la invención incluye anticuerpos anti-TrkB que median la señalización de TrkB humana en células diseñadas para expresar un receptor TrkB en presencia o ausencia de BDNF con una EC_{50} de menos de aproximadamente 500 pM, menos de aproximadamente 400 pM, menos de aproximadamente 300 pM, menos de aproximadamente 200 pM, menos de aproximadamente 100 pM, menos de aproximadamente 90 pM, menos de aproximadamente 80 pM, menos de aproximadamente 70 pM, menos de aproximadamente 60 pM, menos de aproximadamente 50 pM, menos de aproximadamente 40 pM, menos de aproximadamente 30 pM, menos de aproximadamente 20 pM, menos de aproximadamente 10 pM, o menos de aproximadamente 5 pM, medido usando el formato de ensayo descrito en el Ejemplo 5 del presente documento o un ensayo sustancialmente similar.

[0139] La presente invención incluye anticuerpos anti-TrkB que activan el receptor TrkB como se muestra mediante la fosforilación de TrkB después de la inyección directa al hipocampo en ratones humanizados para expresar el receptor TrkB humano, como se muestra en el Ejemplo 6.

[0140] La presente invención incluye anticuerpos anti-TrkB que promueven la pérdida de peso en ratones humanizados para expresar el receptor TrkB humano. Los anticuerpos de la invención también sirven para promover la pérdida de masa grasa y aumentar la actividad locomotora en estos ratones, al tiempo que disminuyen la ingesta de alimentos y agua (ver Ejemplo 7)

[0141] Los anticuerpos de la invención promueven la supervivencia de las células ganglionares de la retina (RGC) en ratas humanizadas para expresar el receptor TrkB humano, cuando se prueban en un modelo de transección del nervio óptico. Ver ejemplo 8.

[0142] Los anticuerpos de la invención activan las vías aguas abajo MAPK/ERK y PI3K/Akt, como se muestra por exposición de neuronas corticales de ratón primarias obtenidas de ratones TrkB humanizados a los anticuerpos de la invención. (Ver ejemplo 9).

[0143] Los anticuerpos agonistas anti-TrkB de la invención también promueven la supervivencia de las células SH-SY5Y de una manera dependiente de la dosis, como se muestra en el Ejemplo 10.

[0144] La presente invención incluye anticuerpos anti-TrkB que bloquean la unión de TrkB a BDNF con una IC_{50} de menos de aproximadamente 5 nM. Por ejemplo, como se muestra en el Ejemplo 12, todos los tres anticuerpos probados bloquearon > 50% de la unión de TrkB de ratón o rata a BDNF. Usando el formato de ensayo descrito en el Ejemplo 12, o un formato de ensayo sustancialmente similar, se puede calcular un valor IC_{50} como la concentración de anticuerpo requerida para bloquear la unión de TrkB a BDNF en comparación con la señal máxima observada en ausencia de anticuerpo.

Por lo tanto, de acuerdo con ciertas realizaciones, la invención incluye anticuerpos anti-TrkB que bloquean la unión de TrkB a BDNF con una IC_{50} de menos de aproximadamente 5 nM, menos de aproximadamente 4 nM, menos de aproximadamente 3 nM, menos de aproximadamente 2 nM, menos de aproximadamente 1 nM, menos de aproximadamente 900 pM, menos de aproximadamente 800 pM, menos de aproximadamente 700 pM, menos de aproximadamente 600 pM, menos de aproximadamente 500 pM, menos de aproximadamente 400 pM, menos de aproximadamente 300 pM, menos de aproximadamente 200 pM, menos de aproximadamente 100 pM, menos de aproximadamente 90 pM, menos de aproximadamente 80 pM, menos de aproximadamente 70 pM, menos de aproximadamente 60 pM, menos de aproximadamente 50 pM, menos de aproximadamente 40 pM, menos de aproximadamente 30 pM, o menos de aproximadamente 20 pM, medido usando el formato de ensayo descrito en el Ejemplo 12 en este documento o un ensayo sustancialmente similar. En una realización, los anticuerpos TrkB de la invención bloquean la unión de TrkB a BDNF con una IC_{50} que varía de aproximadamente 180 pM a aproximadamente 4 nM.

[0145] Una característica de unión de un anticuerpo de la invención (por ejemplo, cualquiera de las características de unión mencionadas anteriormente en este documento), cuando se divulga en términos de ser "medido por resonancia de plasmón superficial" significa que la característica de unión relevante perteneciente a la interacción entre el anticuerpo y el antígeno se mide usando un instrumento de resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, un instrumento Biacore®, GE Healthcare) usando condiciones de ensayo estándar de Biacore como se ilustra en los Ejemplos 3 y 4 de este documento, o un formato de ensayo sustancialmente similar. En ciertas realizaciones, los parámetros de unión se miden a 25° C, mientras que en otras realizaciones, los parámetros de unión se miden a 37° C.

[0146] La presente invención incluye anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a TrkB, que comprende un HCVR y/o un LCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR y/o LCVR listadas en la Tabla 1.

[0147] Los anticuerpos de la presente invención pueden poseer una o más de las características biológicas mencionadas anteriormente, o cualquier combinación de las mismas. La lista anterior de características biológicas de los anticuerpos de la invención no pretende ser exhaustiva. Otras características biológicas de los anticuerpos de la presente invención serán evidentes para una persona de habilidad ordinaria en la técnica a partir de una

revisión de la presente divulgación que incluye los ejemplos de trabajo en este documento.

Maapeo de epítapos y tecnologías relacionadas

[0148] El epítapo al que se unen los anticuerpos de la presente invención puede consistir en una única secuencia contigua de 3 o más (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más) aminoácidos de una proteína TrkB. Alternativamente, el epítapo puede consistir en una pluralidad de aminoácidos no contiguos (o secuencias de aminoácidos) de TrkB. En algunas realizaciones, el epítapo está ubicado en o cerca de una superficie de TrkB, por ejemplo, en el dominio que interactúa con su ligando, BDNF. En otras realizaciones, el epítapo está ubicado en o cerca de una superficie de TrkB que no interactúa con el ligando de TrkB, por ejemplo, en una ubicación en la superficie de TrkB en la que un anticuerpo, cuando está unido a dicho epítapo, no interfiere con la interacción entre TrkB y su ligando.

[0149] Se pueden usar diversas técnicas conocidas por los expertos en la materia para determinar si un anticuerpo "interactúa con uno o más aminoácidos" dentro de un polipéptido o proteína. Las técnicas ejemplares incluyen, por ejemplo, un ensayo de bloqueo cruzado de rutina tal como el descrito Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), análisis mutacional de escaneo de alanina, análisis de transferencia de péptidos (Reineke, 2004, Methods Mol Biol 248: 443-463), y análisis de división de péptidos. Además, se pueden emplear métodos tales como la división del epítapo, la extracción del epítapo y la modificación química de los antígenos (Tomer, 2000, Protein Science 9: 487-496). Otro método que puede usarse para identificar los aminoácidos dentro de un polipéptido con el que interactúa un anticuerpo es el intercambio de hidrógeno/deuterio detectado por espectrometría de masas. En términos generales, el método de intercambio de hidrógeno/deuterio implica el marcado con deuterio de la proteína de interés, seguido de la unión del anticuerpo a la proteína marcada con deuterio. A continuación, el complejo proteína/anticuerpo se transfiere al agua para permitir que se produzca el intercambio de hidrógeno-deuterio en todos los residuos, excepto los residuos protegidos por el anticuerpo (que permanecen marcados con deuterio). Después de la disociación del anticuerpo, la proteína diana se somete a división de proteasa y análisis de espectrometría de masas, revelando así los residuos marcados con deuterio que corresponden a los aminoácidos específicos con los que interactúa el anticuerpo. Ver, por ejemplo, Ehring (1999) Analytical Biochemistry 267 (2): 252-259; Engen y Smith (2001) Anal. Chem 73: 256A-265A.

[0150] La presente invención incluye anticuerpos anti-TrkB que se unen al mismo epítapo que cualquiera de los anticuerpos ejemplares específicos descritos en este documento (por ejemplo, anticuerpos que comprenden cualquiera de las secuencias de aminoácidos como se establece en la Tabla 1 aquí). Asimismo, la presente invención también incluye anticuerpos anti-TrkB que compiten por unirse a TrkB con cualquiera de los anticuerpos ejemplares específicos descritos en este documento (por ejemplo, anticuerpos que comprenden cualquiera de las secuencias de aminoácidos como se establece en la Tabla 1 en este documento).

[0151] Se puede determinar fácilmente si un anticuerpo se une al mismo epítopo o compite por unirse a un anticuerpo anti-TrkB de referencia utilizando métodos de rutina conocidos en la técnica y ejemplificados aquí. Por ejemplo, para determinar si un anticuerpo de prueba se une al mismo epítopo que un anticuerpo anti-TrkB de referencia de la invención, se permite que el anticuerpo de referencia se una a una proteína TrkB. A continuación, se evalúa la capacidad de un anticuerpo de prueba para unirse a la molécula TrkB. Si el anticuerpo de prueba puede unirse a TrkB después de la unión de saturación con el anticuerpo anti-TrkB de referencia, se puede concluir que el anticuerpo de prueba se une a un epítopo diferente que el anticuerpo anti-TrkB de referencia. Por otro lado, si el anticuerpo de prueba no puede unirse a la molécula TrkB después de la unión de saturación con el anticuerpo anti-TrkB de referencia, entonces el anticuerpo de prueba puede unirse al mismo epítopo que el epítopo unido por el anticuerpo anti-TrkB de referencia de la invención. Luego se puede llevar a cabo una experimentación de rutina adicional (p. Ej., Mutación de péptidos y análisis de unión) para confirmar si la falta observada de unión del anticuerpo de prueba se debe realmente a la unión al mismo epítopo que el anticuerpo de referencia o si el bloqueo estérico (u otro fenómeno) es responsable de la falta de unión observada. Los experimentos de este tipo se pueden realizar utilizando ELISA, RIA, Biacore, citometría de flujo o cualquier otro ensayo de unión a anticuerpos cuantitativo o cualitativo disponible en la técnica. De acuerdo con ciertas realizaciones de la presente invención, dos anticuerpos se unen al mismo epítopo (o superponen) si, por ejemplo, un exceso de 1, 5, 10, 20 o 100 veces de un anticuerpo inhibe la unión del otro en al menos 50%, pero preferiblemente 75%, 90% o incluso 99%, medido en un ensayo de unión competitiva (véase, por ejemplo, Junghans *et al.*, Cancer Res. 1990:50:1495-1502). Alternativamente, se considera que dos anticuerpos se unen al mismo epítopo si esencialmente todas las mutaciones de aminoácidos en el antígeno que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro. Se considera que dos anticuerpos tienen "epítomos superpuestos" si solo un subconjunto de las mutaciones de aminoácidos que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reduce o elimina la unión del otro.

[0152] Para determinar si un anticuerpo compite por la unión (o compite cruzadamente por la unión) con un anticuerpo anti-TrkB de referencia, la metodología de unión descrita anteriormente se realiza en dos orientaciones: en una primera orientación, se permite que el anticuerpo de referencia se una a una proteína TrkB en condiciones de saturación seguido de evaluación de la unión del anticuerpo de prueba a la molécula TrkB. En una segunda orientación, se permite que el anticuerpo de prueba se una a una molécula de TrkB en condiciones de saturación seguido de una evaluación de la unión del anticuerpo de referencia a la molécula de TrkB. Si, en ambas orientaciones, solo el primer anticuerpo (saturante) es capaz de unirse a la molécula TrkB, entonces se concluye que el anticuerpo de prueba y el anticuerpo de referencia compiten por la unión a TrkB (ver, por ejemplo, el formato de ensayo descrito en el Ejemplo 4 aquí, en la que la proteína TrkB se captura en las puntas de los sensores y las puntas de los sensores recubiertas con TrkB se tratan con un anticuerpo de referencia [mAb-1] y un anticuerpo anti-TrkB de prueba [mAb-2] secuencialmente y en ambos órdenes de unión). Como apreciará una persona

de habilidad ordinaria en la técnica, un anticuerpo que compite por unirse con un anticuerpo de referencia no necesariamente se une al mismo epítopo que el anticuerpo de referencia, pero puede bloquear estéricamente la unión del anticuerpo de referencia uniéndose a un epítopo traslapante o adyacente.

Preparación de anticuerpos humanos

[0153] Los anticuerpos anti-TrkB de la presente invención pueden ser anticuerpos completamente humanos pero no naturales. Los métodos para generar anticuerpos monoclonales, incluidos los anticuerpos monoclonales completamente humanos, son conocidos en la técnica. Cualquiera de dichos métodos conocidos puede usarse en el contexto de la presente invención para producir anticuerpos humanos que se unan específicamente a TrkB humano.

[0154] Usando la tecnología VELOCIMMUNE® (ver, por ejemplo, US 6,596,541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) o cualquier otro método conocido para generar anticuerpos monoclonales, los anticuerpos quiméricos de alta afinidad para un alérgeno se aíslan inicialmente con una región variable humana y una región constante de ratón. La tecnología VELOCIMMUNE® implica la generación de un ratón transgénico que tiene un genoma que comprende regiones variables de cadena pesada y ligera humana unidas operativamente a loci de región constante de ratón endógeno de modo que el ratón produce un anticuerpo que comprende una región variable humana y una región constante de ratón en respuesta a una estimulación antigénica. El ADN que codifica las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo se aísla y se une operativamente al ADN que codifica las regiones constantes humanas de la cadena pesada y ligera. El ADN luego se expresa en una célula capaz de expresar el anticuerpo completamente humano.

[0155] En general, un ratón VELOCIMMUNE® se expone al antígeno de interés, y las células linfáticas (como las células B) se recuperan de los ratones que expresan anticuerpos. Las células linfáticas pueden fusionarse con una línea celular de mieloma para preparar líneas celulares de hibridoma inmortales, y tales líneas celulares de hibridoma se tamizan y seleccionan para identificar líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos específicos para el antígeno de interés. El ADN que codifica las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera puede aislarse y enlazarse a regiones isotópicas constantes deseables de la cadena pesada y la cadena ligera. Tal proteína de anticuerpo puede producirse en una célula, tal como una célula CHO. Alternativamente, el ADN que codifica los anticuerpos quiméricos específicos de antígeno o los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas se puede aislar directamente de los linfocitos específicos de antígeno.

[0156] Como se describe en la sección experimental a continuación, los anticuerpos quiméricos de alta afinidad, que se aíslan con una región variable humana y una región constante de ratón, se caracterizan y seleccionan por características deseables, que incluyen afinidad, selectividad, epítopo, etc. Las regiones constantes de ratón se reemplazan luego con una región constante humana deseada para generar el anticuerpo completamente humano de la invención, por ejemplo IgG1 o IgG4 de tipo silvestre o modificado. Si bien la región constante seleccionada puede variar de acuerdo con el uso específico,

las características de especificidad de unión y antígeno de alta afinidad residen en la región variable.

[0157] En ciertas realizaciones, puede ser deseable probar anticuerpos anti-TrkB humanos en ratones o ratas que se han diseñado para expresar un receptor TrkB humano. Estos ratones o ratas pueden ser beneficiosos en circunstancias en las que los anticuerpos anti-TrkB solo pueden unirse a TrkB humano, pero no reaccionarán de forma cruzada con TrkB de ratón o rata. Ciertos ejemplos en la presente invención se llevaron a cabo utilizando ratones y ratas que se modificaron genéticamente para expresar el trkB humano. Cualquier método conocido por los expertos en la técnica puede usarse para generar tales ratones y ratas humanizadas TrkB.

[0158] En general, los anticuerpos de la presente invención poseen afinidades muy altas, que típicamente poseen K_D de aproximadamente 10^{-12} a aproximadamente 10^{-9} M, cuando se miden uniéndose al antígeno inmovilizado en fase sólida o en fase de solución.

Bioequivalentes

[0159] Los anticuerpos anti-TrkB y los fragmentos de anticuerpos de la presente invención abarcan proteínas que tienen secuencias de aminoácidos que varían de las de los anticuerpos descritos pero que retienen la capacidad de unirse a TrkB humano. Dichos anticuerpos variantes y fragmentos de anticuerpos comprenden una o más adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia parental, pero exhiben actividad biológica que es esencialmente equivalente a la de los anticuerpos descritos. Del mismo modo, las secuencias de ADN que codifican el anticuerpo anti-TrkB de la presente invención abarcan secuencias que comprenden una o más adiciones, deleciones o sustituciones de nucleótidos en comparación con la secuencia divulgada, pero que codifican un anticuerpo anti-TrkB o fragmento de anticuerpo que es esencialmente bioequivalente a un anticuerpo anti-TrkB o fragmento de anticuerpo de la invención. Los ejemplos de tales secuencias de aminoácidos y ADN variantes se discuten anteriormente.

[0160] Dos proteínas de unión a antígeno, o anticuerpos, se consideran bioequivalentes si, por ejemplo, son equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas cuya velocidad y grado de absorción no muestran una diferencia significativa cuando se administran a la misma dosis molar en condiciones experimentales similares, ya sea en dosis simples o dosis múltiples. Algunos anticuerpos se considerarán equivalentes o alternativas farmacéuticas si son equivalentes en el grado de su absorción pero no en su tasa de absorción y, sin embargo, pueden considerarse bioequivalentes porque tales diferencias en la tasa de absorción son intencionales y se reflejan en el etiquetado, no son esenciales para lograr concentraciones efectivas de medicamentos corporales en, por ejemplo, el uso crónico, y se consideran médicamente insignificantes para el medicamento en particular estudiado.

[0161] En una realización, dos proteínas de unión a antígeno son bioequivalentes si no hay diferencias clínicamente significativas en su seguridad, pureza y potencia.

[0162] En una realización, dos proteínas de unión a antígeno son bioequivalentes si un paciente puede cambiarse una o más veces entre el producto de referencia y el producto biológico sin un aumento esperado en el riesgo de efectos adversos, incluido un cambio clínicamente significativo en la inmunogenicidad, o efectividad disminuida, en comparación con la terapia continua sin tal cambio.

[0163] En una realización, dos proteínas de unión a antígeno son bioequivalentes si ambas actúan por un mecanismo o mecanismos de acción comunes para la afección o condiciones de uso, en la medida en que dichos mecanismos son conocidos.

[0164] La bioequivalencia puede demostrarse por métodos *in vivo* e *in vitro*.

Las medidas de bioequivalencia incluyen, por ejemplo, (a) una prueba *in vivo* en humanos u otros mamíferos, en la que la concentración del anticuerpo o sus metabolitos se mide en sangre, plasma, suero u otro fluido biológico en función del tiempo; (b) una prueba *in vitro* que se ha correlacionado y es razonablemente predictiva de los datos de biodisponibilidad *in vivo* en humanos; (c) una prueba *in vivo* en humanos u otros mamíferos en la que se mide el efecto farmacológico agudo apropiado del anticuerpo (o su objetivo) en función del tiempo; y (d) en un ensayo clínico bien controlado que establece la seguridad, eficacia o biodisponibilidad o bioequivalencia de un anticuerpo.

[0165] Las variantes bioequivalentes de los anticuerpos anti-TrkB de la invención pueden construirse, por ejemplo, haciendo varias sustituciones de residuos o secuencias o eliminando residuos o secuencias terminales o internas que no son necesarias para la actividad biológica. Por ejemplo, los residuos de cisteína que no son esenciales para la actividad biológica se pueden eliminar o reemplazar con otros aminoácidos para evitar la formación de puentes de disulfuro intramoleculares innecesarios o incorrectos tras la renaturalización. En otros contextos, los anticuerpos bioequivalentes pueden incluir variantes de anticuerpos anti-TrkB que comprenden cambios de aminoácidos que modifican las características de glucosilación de los anticuerpos, por ejemplo, mutaciones que eliminan o remueven la glucosilación.

Selectividad de especies y reactividad cruzada de especies

[0166] La presente invención, de acuerdo con ciertas realizaciones, proporciona anticuerpos anti-TrkB que se unen a TrkB humano pero no a TrkB de otras especies. La presente invención también incluye anticuerpos anti-TrkB que se unen a TrkB humano y a TrkB de una o más especies no humanas. Por ejemplo, los anticuerpos anti-TrkB de la invención pueden unirse al TrkB humano y pueden unirse o no, según sea el caso, a uno o más TrkB de ratones, ratas, conejillo de indias, hámster, jerbos, cerdos, gatos, perros, conejos, cabras, ovejas, vacas, caballos, camellos, cinomologous, tití, rhesus o chimpancé. De acuerdo con ciertas realizaciones ejemplares de la presente invención, se proporcionan anticuerpos anti-TrkB que se unen específicamente a TrkB humano pero no se unen, o se unen solo débilmente, a TrkB de ratón o rata.

Anticuerpos Multiespecíficos

[0167] Los anticuerpos de la presente invención pueden ser monoespecíficos o multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos). Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítopos de un polipéptido objetivo o pueden contener dominios de unión a antígeno específicos para más de un polipéptido objetivo. Ver, por ejemplo, Tutt et al, 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer *et al*, 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244. Los anticuerpos anti-TrkB de la presente invención pueden estar enlazados o coexpresarse con otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo se puede enlazar funcionalmente (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más entidades moleculares, como otro anticuerpo o fragmento de anticuerpo para producir un anticuerpo biespecífico o multiespecífico con una segunda especificidad de unión.

[0168] La presente invención incluye anticuerpos biespecíficos en los que un brazo de una inmunoglobulina se une a TrkB humano, y el otro brazo de la inmunoglobulina es específico para un segundo antígeno. El brazo de unión a TrkB puede comprender cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR o CDR como se establece en la Tabla 1 en este documento.

[0169] Un formato de anticuerpo biespecífico ejemplar que puede usarse en el contexto de la presente invención implica el uso de un primer dominio C_H3 de inmunoglobulina (Ig) y un segundo dominio Ig C_H3, en donde los dominios primero y segundo Ig C_H3 difieren entre sí al menos en un aminoácido, y en donde al menos una diferencia de aminoácidos reduce la unión del anticuerpo biespecífico a la proteína A en comparación con un anticuerpo biespecífico que carece de la diferencia de aminoácidos. En una realización, el primer dominio Ig C_H3 se une a la proteína A y el segundo dominio Ig C_H3 contiene una mutación que reduce o elimina la unión a la proteína A tal como una modificación H95R (por numeración de exón IMGT; H435R por numeración de la UE). El segundo C_H3 puede comprender además una modificación Y96F (por IMGT; Y436F por EU). Otras modificaciones que se pueden encontrar dentro del segundo C_H3 incluyen: D16E, F18M, N44S, K52N, V57M y V82I (por IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M y V422I por EU) en el caso de anticuerpos IgG1; N44S, K52N y V82I (IMGT; N384S, K392N y V422I por EU) en el caso de anticuerpos IgG2; y Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q y V82I (por IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q y V422I por EU) en el caso de los anticuerpos IgG4. Las variaciones en el formato de anticuerpo biespecífico descrito anteriormente se contemplan dentro del alcance de la presente invención.

[0170] Otros formatos biespecíficos ejemplares que pueden usarse en el contexto de la presente invención incluyen, sin limitación, por ejemplo, formatos biespecíficos basados en scFv o diacuerpo, fusiones de IgG-scFv, dominio de doble variable (DVD)-Ig, Quadroma, botón en ojal, cadena de luz común (p. ej., cadena de luz común con botones en ojales, etc.), CrossMab, CrossFab, (SEED)body, cremallera de leucina, Duobody, IgG1/IgG2, Fab de doble acción (DAF)-IgG, y formatos biespecíficos Mab² (ver, por ejemplo, Klein *et al.* 2012, mAbs 4: 6, 1-11, y referencias citadas allí, para una revisión de los formatos

anteriores). Los anticuerpos biespecíficos también se pueden construir usando conjugación péptido/ácido nucleico, por ejemplo, en donde los aminoácidos no naturales con reactividad química ortogonal se usan para generar conjugados de anticuerpo-oligonucleótido específicos del sitio que luego se autoensamblan en complejos multiméricos con composición, valencia y geometría definidas. (Véase, por ejemplo, Kazane *et al.*, J. Am. Chem. Soc. [Epub: dic. 4, 2012]).

Formulación terapéutica y administración

[0171] La invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos anti-TrkB o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención. Las composiciones farmacéuticas de la invención están formuladas con vehículos, excipientes y otros agentes adecuados que proporcionan transferencia, suministro, tolerancia y similares mejorados. Se pueden encontrar una multitud de formulaciones apropiadas en el formulario conocido por todos los químicos farmacéuticos: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, vesículas que contienen polvos, pastas, ungüentos, jaleas, ceras, aceites, lípidos, lípido (catiónicos o aniónicos) (tales como LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidra, emulsiones de aceite en agua y agua en aceite, emulsiones carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos, y mezclas semisólidos que contienen carbowax. Ver también Powell *et al.* "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52: 238-311.

[0172] La dosis de anticuerpo administrada a un paciente puede variar dependiendo de la edad y el tamaño del paciente, la enfermedad objetivo, las condiciones, la ruta de administración y similares. La dosis preferida se calcula típicamente de acuerdo con el peso corporal o el área de superficie corporal. En un paciente adulto, puede ser ventajoso administrar por vía intravenosa el anticuerpo de la presente invención normalmente a una dosis única de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal, más preferiblemente de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 7, de aproximadamente 0,03 a aproximadamente 5, o aproximadamente 0,05 a aproximadamente 3 mg/kg de peso corporal. Dependiendo de la gravedad de la afección, la frecuencia y la duración del tratamiento se pueden ajustar. Las dosis efectivas y los programas para administrar anticuerpos anti-TrkB se pueden determinar empíricamente; Por ejemplo, el progreso del paciente puede controlarse mediante una evaluación periódica y la dosis ajustada en consecuencia. Además, el escalado de dosis entre especies puede realizarse usando métodos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, Mordenti *et al.*, 1991, Pharmaceut. Res. 5:1351).

[0173] Se conocen diversos sistemas de administración y pueden usarse para administrar la composición farmacéutica de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar los virus mutantes, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu *et al.*, 1987 J. Biol. Chem 262:4429-4432). Los métodos de introducción incluyen, pero no se limitan a, rutas intravítreas, intraoculares, intradérmicas, intramusculares, intraperitoneales, intravenosas,

subcutáneas, intranasales, epidurales y orales. La composición puede administrarse por cualquier ruta conveniente, por ejemplo mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y puede ser administrado junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local.

[0174] Una composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse por vía subcutánea o intravenosa con una aguja y jeringa estándar. Además, con respecto al suministro subcutáneo, un dispositivo de suministro de pluma tiene aplicaciones fácilmente en el suministro de una composición farmacéutica de la presente invención. Tal dispositivo de entrega de pluma puede ser reutilizable o desechable. Un dispositivo de entrega de pluma reutilizable generalmente utiliza un cartucho reemplazable que contiene una composición farmacéutica. Una vez que toda la composición farmacéutica dentro del cartucho ha sido administrada y el cartucho está vacío, el cartucho vacío se puede desechar fácilmente y reemplazar por un nuevo cartucho que contiene la composición farmacéutica. El dispositivo de entrega de pluma se puede reutilizar. En un dispositivo de entrega de pluma desechable, no hay cartucho reemplazable. Más bien, el dispositivo de entrega de pluma desechable viene precargado con la composición farmacéutica contenida en un depósito dentro del dispositivo. Una vez que el depósito se vacía de la composición farmacéutica, se desecha todo el dispositivo.

[0175] Numerosos dispositivos de suministro reutilizables de pluma y autoinyector tienen aplicaciones en el suministro subcutáneo de una composición farmacéutica de la presente invención. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, Reino Unido), pluma DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Suiza), pluma HUMALOG MIX 75/25™, pluma HUMALOG™, pluma HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianápolis, IN), NOVOPEN™ I, II y III (Novo Nordisk, Copenhague, Dinamarca), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhague, Dinamarca), pluma BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ y OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Alemania), por nombrar solo algunos. Los ejemplos de dispositivos de administración de pluma desechables que tienen aplicaciones en la administración subcutánea de una composición farmacéutica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, la pluma SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), el FLEXPEN™ (Novo Nordisk) y el KWIKPEN™ (Eli Lilly), el autoinyector SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), el PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Alemania), el EPIPEN (Dey, LP) y la pluma HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park IL), para nombrar solo unos pocos.

[0176] En ciertas situaciones, la composición farmacéutica puede administrarse en un sistema de liberación controlada. En una realización, se puede usar una bomba (véase Langer, supra; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). En otra realización, se pueden usar materiales poliméricos; ver, Aplicaciones médicas de liberación controlada, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. En otra realización más, se puede colocar un sistema de liberación controlada cerca del objetivo de la composición, requiriendo así solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo,

Goodson, 1984, en *Medical Applications of Controlled Release* Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, páginas. 115-138). Otros sistemas de liberación controlada se discuten en la revisión de Langer, 1990, *Science* 249: 1527-1533.

[0177] Las preparaciones inyectables pueden incluir formas de dosificación para inyecciones intravenosas, intravítreas, intraoculares, subcutáneas, intracutáneas e intramusculares, infusiones por goteo, etc. Estas preparaciones inyectables pueden prepararse por métodos conocidos públicamente. Por ejemplo, las preparaciones inyectables pueden prepararse, por ejemplo, disolviendo, suspendiendo o emulsionando el anticuerpo o su sal descrita anteriormente en un medio acuoso estéril o un medio aceitoso usado convencionalmente para inyecciones. Como medio acuoso para inyecciones, existen, por ejemplo, solución salina fisiológica, una solución isotónica que contiene glucosa y otros agentes auxiliares, etc., que se pueden usar en combinación con un agente solubilizante apropiado como un alcohol (por ejemplo, etanol), un polialcohol (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol), un tensioactivo no iónico [por ejemplo, polisorbato 80, aducto de HCO-50 (polioxietileno (50 mol) de aceite de ricino hidrogenado)], etc. Como medio oleoso, se emplean, por ejemplo, aceite de sésamo, aceite de soja, etc., que se pueden usar en combinación con un agente solubilizante como benzoato de bencilo, alcohol bencílico, etc. La inyección así preparada se llena preferiblemente en una ampolla apropiada.

[0178] Ventajosamente, las composiciones farmacéuticas para uso oral o parenteral descritas anteriormente se preparan en formas de dosificación en una dosis unitaria adecuada para ajustarse a una dosis de los ingredientes activos. Dichas formas de dosificación en una dosis unitaria incluyen, por ejemplo, tabletas, píldoras, cápsulas, inyecciones (ampollas), supositorios, etc. La cantidad del anticuerpo mencionado anteriormente contenida es generalmente de aproximadamente 5 a aproximadamente 500 mg por forma de dosificación en una dosis unitaria; especialmente en forma de inyección, se prefiere que el anticuerpo mencionado anteriormente esté contenido en aproximadamente 5 a aproximadamente 100 mg y en aproximadamente 10 a aproximadamente 250 mg para las otras formas de dosificación.

Usos terapéuticos de los anticuerpos

[0179] La presente invención incluye métodos que comprenden administrar a un sujeto que lo necesita una composición terapéutica que comprende un anticuerpo anti-TrkB (por ejemplo, un anticuerpo anti-TrkB que comprende cualquiera de las secuencias de HCVR/LCVR o CDR como se establece en la Tabla 1 aquí). La composición terapéutica puede comprender uno o más de los anticuerpos anti-TrkB o fragmentos de unión a antígeno de los mismos divulgados aquí, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

[0180] Los anticuerpos de la invención son útiles, entre otros, para el tratamiento, prevención y/o mejora de cualquier enfermedad o trastorno asociado o mediado por la expresión o actividad de TrkB. Los anticuerpos agonistas de TrkB de la invención pueden usarse para mejorar la función

nerviosa y pueden usarse para tratar o prevenir cualquier enfermedad o afección que se caracterice en parte por degradación celular, en particular por lesión de células nerviosas o degeneración de células nerviosas, p. ej., una lesión aguda del sistema nervioso o una enfermedad neurodegenerativa crónica.

[0181] La presente invención incluye métodos para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno del ojo mediante la administración a un paciente que necesite dicho tratamiento de un anticuerpo anti-TrkB o un fragmento de unión a antígeno del mismo como se divulga en otra parte del presente documento.

[0182] En una realización, los anticuerpos anti-TrkB de la invención pueden proporcionar un método para prevenir la lesión o muerte de las neuronas retinianas. En una realización, los anticuerpos anti-TrkB de la invención pueden proporcionar un método para tratar enfermedades patológicas en las que se produce la degeneración de la retina. En una realización, los anticuerpos anti-TrkB de la invención pueden proporcionar un método para tratar el ojo antes o después de una cirugía ocular, exposición a la luz u otro trauma ambiental, evitando así la degeneración de las células de la retina. En una realización, los anticuerpos anti-TrkB de la invención pueden proporcionar un método para prevenir la lesión y la degeneración del fotorreceptor en el ojo. En una realización, los anticuerpos anti-TrkB de la invención pueden proporcionar un método para proteger las neuronas retinianas sin la inducción de efectos secundarios. En una realización, los anticuerpos anti-TrkB de la invención pueden proporcionar un método para permitir que los fotorreceptores lesionados se recuperen o regeneren.

[0183] En ciertas realizaciones, las enfermedades oculares tratables usando uno o más de los anticuerpos anti-TrkB de la invención pueden seleccionarse del grupo que consiste en glaucoma, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad u otras maculopatías, neuropatía óptica isquémica, neuritis óptica, isquemia retiniana, degeneración de fotorreceptores, retinitis pigmentosa, amaurosis congénita de Leber, neuropatía óptica hereditaria de Leber, síndrome de Usher, enfermedad de Stargardt y oclusiones de venas o arterias retinianas.

[0184] Otras afecciones patológicas tratables con uno o más anticuerpos anti-TrkB de la invención incluyen desprendimiento de retina, retinopatías fóticas, retinopatías inducidas por cirugía (ya sea mecánicamente o inducidas por la luz), retinopatías tóxicas, retinopatía del prematuro, retinopatías virales como CMV o retinopatía por VIH relacionado con el SIDA; uveítis retinopatías isquémicas por oclusión venosa o arterial u otro trastorno vascular, retinopatías por traumatismo o lesiones penetrantes del ojo, vitreoretinopatía periférica o degeneraciones retinianas hereditarias.

[0185] En una realización, los anticuerpos anti-TrkB de la invención pueden formularse para administración intraocular o intravítrea.

[0186] La presente invención también proporciona métodos para tratar otras enfermedades o trastornos del sistema nervioso central o periférico, tales como

accidente cerebrovascular o lesión cerebral traumática. Además, dado que los anticuerpos de la presente invención actúan para promover la supervivencia neuronal y actúan como neuroprotectores, uno o más de estos anticuerpos agonistas pueden resultar beneficiosos para tratar a un paciente que padece una enfermedad o trastorno del sistema nervioso por el cual la supervivencia neuronal es de primordial importancia en la recuperación o reparación del daño celular causado por una lesión en el sistema nervioso o por una enfermedad que tiene un efecto importante en el sistema nervioso, incluidas las enfermedades neurodegenerativas.

[0187] En el contexto de los métodos de tratamiento descritos aquí, el anticuerpo anti-TrkB puede administrarse como una monoterapia (es decir, como el único agente terapéutico) o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales.

Terapias y formulaciones de combinación

[0188] La presente invención incluye composiciones y formulaciones terapéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-TrkB descritos en el presente documento en combinación con uno o más componentes terapéuticamente activos y métodos de tratamiento que comprenden administrar tales combinaciones a sujetos que lo necesiten.

[0189] Los anticuerpos anti-TrkB de la presente invención pueden formularse conjuntamente y/o administrarse en combinación con uno o más componentes terapéuticamente activos adicionales seleccionados del grupo que consiste en: un fármaco que ayuda a reducir la presión intraocular (un fármaco reductor de la PIO), una neurotrofina y un antagonista del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), como una trampa de VEGF, p. ej. Aflibercept (EYLEA®).

Otros medicamentos que se pueden combinar con los anticuerpos TrkB de la invención incluyen, pero no se limitan a, un análogo de prostaglandina (p. Ej. ZIOPTAN™, XALATAN®), un betabloqueador, (p. Ej., TIMOPTIC XE®, ISTALOL®, BETOPTIC®S); un agonista adrenérgico alfa-2 (p. ej., apraclonidina), inhibidores de la anhidrasa carbónica (p. ej. TRUSOPT®, AZOPT®), un agente colinérgico (p. Ej., ISOPTO®CARPINE, gel de PILOPINE HS®), o un agente terapéutico combinado (un betabloqueante más un inhibidor de la anhidrasa carbónica, p. Ej. COMBIGAN™, COSOPT®).

[0190] Los anticuerpos anti-TrkB de la invención también pueden administrarse y/o coformularse en combinación con antivirales, antibióticos, analgésicos, antioxidantes, inhibidores de la COX y/o los AINE. Los anticuerpos anti-TrkB también pueden usarse junto con otros tipos de terapia, incluida la terapia con células madre, cirugía de filtración de glaucoma, cirugía láser o terapia génica.

[0191] El(los) componente(s) terapéuticamente activo(s) adicional(es), por ejemplo, cualquiera de los agentes listados anteriormente o derivados de los mismos, puede administrarse justo antes, concurrente o poco después de la administración de un anticuerpo anti-TrkB de la presente invención; (a los fines de la presente divulgación, dichos regímenes de administración se consideran la administración de un anticuerpo anti-TrkB "en combinación con" un

componente terapéuticamente activo adicional). La presente invención incluye composiciones farmacéuticas en las que un anticuerpo anti-TrkB de la presente invención se formula conjuntamente con uno o más de los componentes terapéuticamente activos adicionales como se describe en otra parte del presente documento.

Regímenes de administración

[0192] De acuerdo con ciertas realizaciones de la presente invención, se pueden administrar dosis múltiples de un anticuerpo anti-TrkB (o una composición farmacéutica que comprende una combinación de un anticuerpo anti-TrkB y cualquiera de los agentes terapéuticamente activos adicionales mencionados aquí) a un sujeto sobre un curso de tiempo definido. Los métodos de acuerdo con este aspecto de la invención comprenden administrar secuencialmente a un sujeto dosis múltiples de un anticuerpo anti-TrkB de la invención. Como se usa en este documento, "administrar secuencialmente" significa que cada dosis de anticuerpo anti-TrkB se administra al sujeto en un momento diferente, por ejemplo, en días diferentes separados por un intervalo predeterminado (por ejemplo, horas, días, semanas o meses). La presente invención incluye métodos que comprenden administrar secuencialmente al paciente una dosis inicial única de un anticuerpo anti-TrkB, seguido de una o más dosis secundarias del anticuerpo anti-TrkB, y opcionalmente seguido de una o más dosis terciarias del anticuerpo anti-TrkB.

[0193] Los términos "dosis inicial", "dosis secundarias" y "dosis terciarias" se refieren a la secuencia temporal de administración del anticuerpo anti-TrkB de la invención. Por lo tanto, la "dosis inicial" es la dosis que se administra al comienzo del régimen de tratamiento (también conocida como "dosis de referencia"); las "dosis secundarias" son las dosis que se administran después de la dosis inicial; y las "dosis terciarias" son las dosis que se administran después de las dosis secundarias. Las dosis iniciales, secundarias y terciarias pueden contener la misma cantidad de anticuerpo anti-TrkB, pero generalmente pueden diferir entre sí en términos de frecuencia de administración. Sin embargo, en ciertas realizaciones, la cantidad de anticuerpo anti-TrkB contenida en las dosis iniciales, secundarias y/o terciarias varía entre sí (por ejemplo, ajustada hacia arriba o hacia abajo según sea apropiado) durante el curso del tratamiento. En ciertas realizaciones, se administran dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4 o 5) dosis al comienzo del régimen de tratamiento como "dosis de carga" seguidas de dosis posteriores que se administran sobre una base de menos frecuencia (por ejemplo, "dosis de mantenimiento").

[0194] En ciertas realizaciones ejemplares de la presente invención, cada dosis secundaria y/o terciaria se administra de 1 a 26 (por ejemplo, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ o más) semanas después de la dosis inmediatamente anterior. La frase "la dosis inmediatamente anterior", como se usa en este documento, significa, en una secuencia de administraciones múltiples, la dosis de anticuerpo anti-TrkB, que se administra a un paciente antes de la administración de la siguiente dosis en la secuencia sin dosis intermedias

[0195] Los métodos de acuerdo con este aspecto de la invención pueden comprender administrar a un paciente cualquier número de dosis secundarias y/o terciarias de un anticuerpo anti-TrkB. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, solo se administra una dosis secundaria única al paciente. En otras realizaciones, se administran dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más) dosis secundarias al paciente. Asimismo, en ciertas realizaciones, solo se administra una dosis terciaria única al paciente. En otras realizaciones, se administran dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más) dosis terciarias al paciente. El régimen de administración puede llevarse a cabo indefinidamente durante la vida de un sujeto en particular, o hasta que dicho tratamiento ya no sea terapéuticamente necesario o ventajoso.

[0196] En realizaciones que implican múltiples dosis secundarias, cada dosis secundaria puede administrarse con la misma frecuencia que las otras dosis secundarias. Por ejemplo, cada dosis secundaria puede administrarse al paciente 1 a 2 semanas o 1 a 2 meses después de la dosis inmediatamente anterior. De manera similar, en realizaciones que implican múltiples dosis terciarias, cada dosis terciaria puede administrarse con la misma frecuencia que las otras dosis terciarias. Por ejemplo, cada dosis terciaria puede administrarse al paciente 2 a 12 semanas después de la dosis inmediatamente anterior. En ciertas realizaciones de la invención, la frecuencia a la que se administran las dosis secundarias y/o terciarias a un paciente puede variar durante el transcurso del régimen de tratamiento. La frecuencia de administración también puede ser ajustada durante el curso del tratamiento por un médico dependiendo de las necesidades del paciente individual después del examen clínico.

[0197] La presente invención incluye regímenes de administración en los que se administran de 2 a 6 dosis de carga a un paciente en una primera frecuencia (por ejemplo, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez al mes, una vez cada dos meses, etc.), seguido de la administración de dos o más dosis de mantenimiento al paciente sobre una base de menos frecuencia. Por ejemplo, de acuerdo con este aspecto de la invención, si las dosis de carga se administran con una frecuencia de una vez al mes, las dosis de mantenimiento se pueden administrar al paciente una vez cada seis semanas, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, etc.

Usos diagnósticos de los anticuerpos

[0198] Los anticuerpos anti-TrkB de la presente invención también pueden usarse para detectar y/o medir TrkB, o células que expresan TrkB en una muestra, por ejemplo, con fines de diagnóstico. Por ejemplo, un anticuerpo anti-TrkB, o un fragmento del mismo, puede usarse para diagnosticar una afección o enfermedad caracterizada por una expresión aberrante (por ejemplo, sobreexpresión, infraexpresión, falta de expresión, etc.) de TrkB. Los ensayos de diagnóstico ejemplares para TrkB pueden comprender, por ejemplo, poner en contacto una muestra, obtenida de un paciente, con un anticuerpo anti-TrkB de la invención, en donde el anticuerpo anti-TrkB está marcado con un marcador detectable o molécula reportera. Alternativamente, un anticuerpo anti-TrkB no marcado puede usarse en aplicaciones de diagnóstico en

combinación con un anticuerpo secundario que está en si mismo marcado de manera detectable. La etiqueta detectable o molécula reportera puede ser un radioisótopo, como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S o ^{125}I ; un resto fluorescente o quimioluminiscente tal como isotiocianato de fluoresceína o rodamina; o una enzima tal como fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, peroxidasa de rábano picante o luciferasa. Los ensayos ejemplares específicos que se pueden usar para detectar o medir TrkB en una muestra incluyen el ensayo de inmunosorción enzimática (ELISA), el radioinmunoensayo (RIA) y la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

[0199] Las muestras que se pueden usar en los ensayos de diagnóstico de TrkB de acuerdo con la presente invención incluyen cualquier muestra de tejido o fluido obtenible de un paciente, que contenga cantidades detectables de proteína TrkB, o fragmentos de la misma, en condiciones normales o patológicas. En general, los niveles de TrkB en una muestra particular obtenida de un paciente sano (p. Ej., Un paciente no afectado por una enfermedad o afección asociada con niveles o actividad anormales de TrkB) se medirán para establecer inicialmente un nivel de referencia o estándar de TrkB. Este nivel de referencia de TrkB se puede comparar con los niveles de TrkB medidos en muestras obtenidas de individuos sospechosos de tener una enfermedad o afección relacionada con TrkB.

EJEMPLOS

[0200] Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la materia una descripción completa y una descripción de cómo hacer y usar los métodos y composiciones de la invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invento. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura está en grados centígrados, la temperatura ambiente es de aproximadamente 25 ° C y la presión es igual o cercana a la atmosférica.

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos humanos contra TrkB

[0201] Se generaron anticuerpos humanos contra TrkB en un ratón que comprende ADN que codifica regiones variables de cadena ligera kappa y pesada de inmunoglobulina humana. En una realización, los anticuerpos humanos se generaron en un ratón VELOCIMMUNE®. En una realización, los ratones VelocImmune® (VI) se inmunizaron con TrkB (ecto) mFc humano (SEQ ID NO: 77). En una realización, los ratones VelocImmune® (VI) se inmunizaron con TrkB (ecto) mFc de ratón (SEQ ID NO: 80). La respuesta inmune del anticuerpo se controló mediante inmunoensayo específico TrkB. Por ejemplo, los sueros se ensayaron para títulos de anticuerpos específicos para TrkB de longitud completa purificada. Los clones productores de anticuerpos se aislaron utilizando la tecnología de clasificación de células B (BST) y los métodos de hibridoma. Por ejemplo, cuando se logró una respuesta inmune deseada, los esplenocitos se cosecharon y se fusionaron con células de mieloma de ratón

para preservar su viabilidad y formar líneas celulares de hibridoma. Las líneas celulares de hibridoma se tamizaron y seleccionaron para identificar líneas celulares que producen anticuerpos específicos para TrkB. Ciertos anticuerpos anti ratón TrkB se generaron de esta manera y se designan M2aM14173N, M2aM4178N y M2aM14179N.

[0202] Los anticuerpos anti-TrkB también se aislaron directamente de las células B de ratón con antígeno positivo sin fusión con células de mieloma, como se describe en la Patente de Estados Unidos 7582298, incorporada aquí específicamente como referencia en su totalidad. Usando este método, se obtuvieron varios anticuerpos anti-TrkB completamente humanos (es decir, anticuerpos que poseen dominios variables humanos y dominios constantes humanos); Los anticuerpos ejemplares generados de esta manera se designaron como H4H9780P, H4H9814P y H4H9816P2.

[0203] Las propiedades biológicas de los anticuerpos ejemplares generados de acuerdo con los métodos de este ejemplo se describen en detalle en los ejemplos que se exponen a continuación.

Ejemplo 2: Secuencias de aminoácidos y nucleótidos de región variable de cadena pesada y ligera

[0204] La tabla 1 establece los identificadores de secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y ligera y las CDR de los anticuerpos anti-TrkB seleccionados de la invención. La Tabla 1b establece los identificadores de secuencia de aminoácidos para las cadenas pesadas y ligeras de longitud completa de anticuerpos anti-TrkB seleccionados de la invención. Los correspondientes identificadores de secuencia de ácido nucleico para anticuerpos anti-TrkB seleccionados de la invención se establecen en la Tabla 2.

Tabla 1a: identificadores de secuencia de aminoácidos

Nombre Ab	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LC VR	LCDR1	LCDR2	LCDR 3	mIgG 2a	Constante LC
H4H9780P	2	4	6	8	10	12	14	16		
H4H9814P	18	20	22	24	26	28	30	32		
H4H9816P2	34	36	38	40	42	44	46	48		
M2aM14173 N	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58
M2aM14178 N	59	60	61	62	63	64	65	66	57	67
M2aM14179 N	68	69	70	71	72	73	74	75	57	58

Tabla 1b

Nombre Ab	Cadena pesada de longitud completa	Cadena ligera de longitud completa
H4H9780P	99	100
H4H9814P	101	102
H4H9816P2	103	104

Tabla 2: Identificadores de secuencia de ácido nucleico

Nombre Ab	VH	HCDR1	HCDR2	HCDR3	VK	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4H9780P	1	3	5	7	9	11	13	15
H4H9814P	17	19	21	23	25	27	29	31
H4H9816P2	33	35	37	39	41	43	45	47

[0205] Los anticuerpos se mencionan típicamente en este documento de acuerdo con la siguiente nomenclatura: prefijo Fc (p. Ej. "H4H", "H2M", etc.), seguido de un identificador numérico (por ejemplo, "9780", "9816", etc., como se muestra en la Tabla 1 o 2), seguido de un sufijo "P", "P2" o "N". El prefijo H4H en las designaciones de anticuerpos indica el isotipo particular de la región Fc del anticuerpo. Por lo tanto, de acuerdo con esta nomenclatura, un anticuerpo puede denominarse en este documento como, por ejemplo, "H4H9780P", que indica una región Fc de IgG4 humana y M2aM14179N, por ejemplo, indica una región Fc IgG2a de ratón. Las regiones variables son completamente humanas si se denotan por el primer "H" en la designación de anticuerpos. Un prefijo "M" designa una región variable del mouse. Como apreciará una persona de habilidad ordinaria en la técnica, un anticuerpo que tiene un isotipo Fc particular puede convertirse en un anticuerpo con un isotipo Fc diferente (por ejemplo, un anticuerpo con un IgG1 Fc de ratón puede convertirse en un anticuerpo con un IgG4 humano, etc.), pero en cualquier caso, los dominios variables (incluidos los CDR), que se indican mediante los identificadores numéricos que se muestran en la Tabla 1 o 2, seguirán siendo los mismos, y se espera que las propiedades de unión al antígeno sean idénticas o sustancialmente similares independientemente de la naturaleza del dominio Fc.

Ejemplo 3. Cinética de unión Biacore de anticuerpos monoclonales anti-TrkB que se unen a diferentes reactivos TrkB medidos a 25° C y 37 ° C

[0206] Las constantes de disociación de equilibrio (valores K_D) para la unión de TrkB a anticuerpos monoclonales anti-TrkB purificados se determinaron usando un biosensor de resonancia de plasmón superficial en tiempo real usando un instrumento Biacore 4000. Todos los estudios de unión se realizaron en 10mM Hepes pH 7.4, 150mM NaCl, EDTA 3 mM y Tween-20 tensioactivo 0.05% v/v (tampón de ejecución HBS-ET) a 25° C y 37° C. La superficie del sensor Biacore se derivatizó primero mediante el acoplamiento de amina con el anticuerpo policlonal específico Fcy anti-humano de cabra del fragmento F(ab')₂ (Jackson ImmunoResearch Laboratories, # 109-006-098) o el anticuerpo policlonal Fc anti-ratón de conejo (GE Healthcare # BR-1008-38) para capturar anticuerpos monoclonales anti-TrkB. Se realizaron estudios de unión en los siguientes reactivos TrkB; dominio extracelular TrkB humano expresado con una etiqueta myc-myc-hexahistidina C-terminal (hTRKB.mmH; SEQ ID NO: 76; número de acceso NP_001018074.1), dominio extracelular TrkB de ratón expresado con una etiqueta myc-myc-hexahistidina C-terminal (mTRKB.mmH; SEQ ID NO: 79; número de acceso NP_001020245), dominio extracelular TrkB de rata expresado con una etiqueta myc-myc-hexahistidina C-terminal (rTRKB.mmH; SEQ ID NO: 84; número de acceso NP_036863.1), y el dominio extracelular de TrkB humano expresado con una etiqueta Fc IgG2a de ratón C-terminal (hTrkB-mFc; SEQ ID NO: 77; número de acceso NP_001018074.1). Primero se prepararon diferentes concentraciones de reactivos TrkB en tampón de ejecución HBS-ET (100 nM – 1.23 nM; dilución en serie 3 veces) y se inyectaron sobre una superficie de anticuerpo monoclonal anti-TrkB capturado con Fc antihumano durante 4 minutos a una velocidad de flujo de 30 µl/minuto, mientras que la disociación del reactivo TrkB unido al anticuerpo monoclonal se monitorizó durante 10 minutos en tampón de ejecución HBS-ET. Las constantes de velocidad de asociación cinética (k_a) y disociación (k_d) se determinaron ajustando los sensorgramas de unión en tiempo real a un modelo de unión 1: 1 con limitación de transporte de masa usando el software de ajuste de curvas Scrubber 2.0c. Las constantes de equilibrio de disociación de unión (K_D) y las semividas disociativas ($t_{1/2}$) se calcularon a partir de las constantes de velocidad cinética como:

$$K_D (M) = \frac{k_d}{k_a}, \quad y \quad t_{1/2} (min) = \frac{\ln(2)}{60 * k_d}$$

[0207] Los parámetros cinéticos de unión para hTrkB.mmH, mTrkB.mmH, rTrkB.mmH o hTrkB-mFc se unen a diferentes anticuerpos monoclonales anti-TrkB de la invención a 25° C y 37° C se muestran en las Tablas 3 a 10.

Resumen de Resultados:

[0208] A 25° C, los anticuerpos monoclonales anti-TrkB se unieron a hTrkB.mmH con valores de K_D que varían de 545 pM a 41.3nM, como se muestra en la Tabla 3. A 37° C, los anticuerpos monoclonales se unen a

hTrkB.mmH con valores de KD que varían de 2.28nM a 135hM, como se muestra en la Tabla 4.

[0209] A 25° C, los anticuerpos monoclonales anti-TrkB se unieron a hTrkB-mFc con valores de KD que varían de 31.1 pM a 4.48 nM, como se muestra en la Tabla 5. A 37° C, los anticuerpos monoclonales anti-TrkB se unen a hTrkB-mFc con valores de KD que varían de 73.3 pM a 3.46 nM, como se muestra en la Tabla 6.

[0210] A 25° C, el anticuerpo monoclonal anti-TrkB del comparador, denominado en este documento H1M8037C, (véase el documento US2010/0196390, el anticuerpo designado como C2; véase también las SEQ ID NO: 97 y 98 para la cadena pesada y ligera del comparador, respectivamente, secuencias de aminoácidos) unidas a mTrkB.mmH con un valor KD de 40.8 nM, como se muestra en la Tabla 7. Los anticuerpos anti-TrkB de la invención no se unieron a mTrkB.mmH a 25° C, como se muestra en la Tabla 7. A 37° C, el anticuerpo monoclonal anti-TrkB comparador se unió a mTrkB.mmH con un valor de KD de 94.1 nM, como se muestra en la Tabla 8. Los anticuerpos anti-TrkB de la invención no se unieron a mTrkB.mmH a 37° C, como se muestra en la Tabla 8.

[0211] A 25° C, el anticuerpo monoclonal anti-TrkB comparador se unió a rTrkB.mmH con un valor de KD de 31.8 nM, como se muestra en la Tabla 9. Los anticuerpos anti-TrkB de la invención no se unieron a rTrkB.mmH a 25° C, como se muestra en la Tabla 9. A 37° C, el anticuerpo monoclonal anti-TrkB comparador se unió a rTrkB.mmH con un valor de KD de 87.5 nM, como se muestra en la Tabla 10. Los anticuerpos anti-TrkB de la invención no se unieron a rTrkB.mmH a 37° C, como se muestra en la Tabla 10.

Tabla 3: Parámetros de cinética de unión de hTrkB.mmH que se une a anticuerpos monoclonales TrkB a 25° C.

Analito capturado	Cantidad de analito capturado (RU)	100nM hTrkB.mmH unido (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H9780P	116 ± 2.8	20	4.00E+04	8.67E-04	2.17E-08	13
H4H9814P	93 ± 2.1	63	1.26E+06	6.86E-04	5.45E-10	17
H4H9816P2	138 ± 1.5	30	6.14E+04	8.45E-04	1.38E-08	14
H1M8037C* Comparador	757	23	4.65E+04	1.92E-03	4.13E-08	6

* indica que el mAb fue capturado usando una superficie inmovilizada anti-mFc

Tabla 4: Parámetros cinéticos de unión de la unión de hTrkB.mmH a anticuerpos monoclonales TrkB a 37° C.

Analito capturado	Cantidad de analito capturado (RU)	100nM hTrkB.mmH unido (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H9780P	64 ± 1.9	14	5.71E+04	3.64E-03	6.38E-08	3.2
H4H9814P	52 ± 1.2	32	2.05E+06	4.68E-03	2.28E-09	2.5
H4H9816P2	80 ± 2.3	12	5.28E+04	3.74E-03	7.08E-08	3.1
H1M8037C* Comparador	815.11	28	6.13E+04	8.31E-03	1.35E-07	1.4

* indica que el mAb fue capturado usando una superficie inmovilizada anti-mFc

Tabla 5: Parámetros cinéticos de unión de la unión de hTrkB-mFc a anticuerpos monoclonales TrkB a 25° C.

Analito capturado	Cantidad de analito capturado (RU)	100nM hTrkB-mFc unido (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H9780P	105 ± 1.6	14	3.74E+04	1.68E-04	4.48E-09	69
H4H9814P	83 ± 1.3	69	1.91E+06	5.95E-05	3.11E-11	194
H4H9816P2	131 ± 1	25	6.52E+04	7.98E-05	1.22E-09	145
H1M8037C* Comparador	753	41	8.80E+04	9.55E-05	1.09E-09	121

* indica que el mAb se capturó utilizando la superficie inmovilizada anti-mFc.

Tabla 6: Parámetros de cinética de unión de la unión de TiTrkB.mFc a anticuerpos monoclonales TrkB a 37° C.

Analito capturado	Cantidad de analito capturado (RU)	100nM hTrkB-mFc unido (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H9780P	56 ± 1	14	6.65E+04	2.22E-04	3.33E-09	52
H4H9814P	46 ± 1	42	2.83E+06	2.08E-04	7.33E-11	56
H4H9816P2	71 ± 1.4	14	6.95E+04	2.40E-04	3.46E-09	48
H1M8037C* Comparador	814.46	58	2.35E+05	2.92E-04	1.24E-09	40

* Indica que mAb se capturó utilizando una superficie inmovilizada anti-mFc

Tabla 7: Parámetros de cinética de unión de la unión de mTrkB.mmH a anticuerpos monoclonales TrkB a 25° C.

Analito capturado	Cantidad de analito capturado (RU)	100nM mTrkB.mmH unido (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H9780P	111 ± 0.7	-1	NB	NB	NB	NB
H4H9814P	88 ± 0.7	-2	NB	NB	NB	NB
H4H9816P2	135 ± 0.6	0	NB	NB	NB	NB
H1M8037C* Comparador	755	26	4.12E+04	1.68E-03	4.08E-08	7

* indica que mAb se capturó utilizando una superficie inmovilizada anti-mFc

Tabla 8: Parámetros de cinética de unión de la unión de mTrkB.mmH a anticuerpos monoclonales TrkB a 37° C.

Analito capturado	Cantidad de analito capturado (RU)	100nM mTrkBmmH unido (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H9780P	60 ± 0.7	1	NB	NB	NB	NB
H4H9814P	49 ± 0.6	0	NB	NB	NB	NB
H4H9816P2	75 ± 0.9	0	NB	NB	NB	NB
H1M8037C* Comparador	815.95	31	7.40E+04	6.96E-03	9.41E-08	1.7

* indica que mAb se capturó utilizando una superficie inmovilizada anti-mFc

Tabla 9: Parámetros de cinética de unión de la unión de rTrkB.mmH a anticuerpos monoclonales TrkB a 25° C.

Analito capturado	Cantidad de analito capturado (RU)	100nM rTrkB.mmH unido (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H9780P	108 ± 0.7	-1	NB	NB	NB	NB
H4H9814P	86 ± 0.4	-1	NB	NB	NB	NB
H4H9816P2	134 ± 0.3	0	NB	NB	NB	NB
H1M8037C* Comparador	756	26	5.16E+04	1.60E-03	3.10E-08	7

* indica que mAb se capturó utilizando una superficie inmovilizada anti-mFc

Tabla 10: Parámetros de cinética de unión de la unión de rTrkB.mmH a anticuerpos monoclonales TrkB a 37° C.

Analito capturado	Cantidad de analito capturado (RU)	100nM rTrkB. mmH unido (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H9780P	59 ± 0.2	0	NB	NB	NB	NB
H4H9814P	48 ± 0.5	-1	NB	NB	NB	NB
H4H9816P2	74 ± 0.6	0	NB	NB	NB	NB
H1M8037C* Comparador	815.45	32	7.93E+04	6.94E-03	8.75E-08	1.7

* indica que el mAb se capturó usando la superficie inmovilizada anti-mFc

Ejemplo 4. Cinética de unión Biacore de anticuerpos monoclonales anti-TrkB sustitutos que se unen a diferentes reactivos TrkB medidos a 25° C

[0212] Las constantes de disociación de equilibrio (valores K_D) para la unión de TrkB a anticuerpos monoclonales anti-TrkB purificados se determinaron usando un biosensor de resonancia de plasmón superficial en tiempo real usando un instrumento Biacore T200. Todos los estudios de unión se realizaron en Hepes 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y tensioactivo Tween-20 al 0.05% v/v (tampón de ejecución HBS-ET) a 25° C. La superficie del sensor Biacore se derivatizó primero mediante el acoplamiento de amina con anticuerpo policlonal Fc anti-ratón de conejo (GE Healthcare # BR-1008-38) para capturar anticuerpos monoclonales anti-TrkB. Se realizaron estudios de unión en los siguientes reactivos TrkB; dominio extracelular TrkB humano expresado con una etiqueta myc-myc-hexahistidina C-terminal (hTrkB.mmH; SEQ ID NO: 76; NP_001018074.1), el dominio extracelular TrkB de ratón expresado con una etiqueta myc-myc-hexahistidina C-terminal (mTRKB.mmH; SEQ ID NO: 79; NP_001020245) y el dominio extracelular TrkB de rata expresado con una etiqueta myc-myc-hexahistidina C-terminal (rTRKB.mmH; SEQ ID NO: 84; XP_002721319.1). Las diferentes concentraciones de reactivos TrkB se prepararon primero en tampón de ejecución HBS-ET (90 nM – 3.33 nM; dilución en serie 3 veces) y se inyectaron sobre una superficie de anticuerpo monoclonal anti-TrkB capturado con Fc anti-ratón durante 4 minutos a una velocidad de flujo de 50 µl/minuto, mientras que la disociación del reactivo TrkB unido al anticuerpo monoclonal se monitorizó durante 10 minutos en tampón de ejecución HBS-ET. Las constantes de velocidad de asociación cinética (k_a) y disociación (k_d) se determinaron ajustando los sensorgramas de unión en tiempo real a un modelo de unión 1: 1 con limitación de transporte de masa usando el software de ajuste de curvas Scrubber 2.0c. Las constantes de equilibrio de disociación de unión (K_D) y las semividas ($t_{1/2}$) disociativas se calcularon a partir de las constantes de velocidad cinética como:

$$K_D (M) = \frac{kd}{ka}, \quad y \quad t_{1/2} (min) = \frac{\ln(2)}{60 * kd}$$

[0213] Los parámetros cinéticos de unión para hTrkB.mmH, mTrkB.mmH o rTrkB.mmH que se unen a diferentes anticuerpos monoclonales anti-TrkB de la invención a 25° C se muestran en las Tablas 11 a 13.

Resultados:

[0214] A 25° C, los anticuerpos monoclonales sustitutos anti-TrkB de la invención no muestran unión a hTrkB.mmH, como se muestra en la Tabla 11.

[0215] A 25° C, los anticuerpos monoclonales sustitutos anti-TrkB de la invención se unieron a mTrkB.mmH con valores de KD que varían de 2.39 nM a 32.4 nM, como se muestra en la Tabla 12.

[0216] A 25° C, los anticuerpos monoclonales anti-TrkB sustitutos de la invención se unieron a rTrkB.mmH con valores de KD que varían de 2.56 nM a 26.9 nM, como se muestra en la Tabla 13.

Tabla 11: Parámetros de cinética de unión de la unión de hTrkB.mmH a anticuerpos monoclonales TrkB a 25° C.

Analito capturado	Cantidad de analito capturado (RU)	90nM hTrkB.mmH unido (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
M2aM14173N	230 ± 0.8	0	NB	NB	NB	NB
M2aM14178N	125 ± 0.1	-1	NB	NB	NB	NB
M2aM14179N	396 ± 2.1	-2	NB	NB	NB	NB

Tabla 12: Parámetros de cinética de unión de la unión de rTrkB.mmH a anticuerpos monoclonales TrkB a 25° C

Analito capturado	Cantidad de analito capturado (RU)	90nM mTrkB.mmH unido (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)

M2aM14173N	236 ± 1.1	33	7.41E+04	6.30E-04	8.49E-09	18
M2aM14178N	126 ± 0.3	12	1.03E+05	2.47E-04	2.39E-09	47
M2aM14179N	416 ± 4.3	32	1.15E+05	3.72E-03	3.24E-08	3.1

Tabla 13: Parámetros de cinética de unión de la unión de rTrkB.mmH a anticuerpos monoclonales TrkB a 25° C.

Analito capturado	Cantidad de analito capturado (RU)	90nM rTrkB.mmH unido (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
M2aM14173N	233 ± 0.7	33	7.90E+04	6.32E-04	8.00E-09	18
M2aM14178N	125 ± 0.3	11	9.00E+04	2.30E-04	2.56E-09	50
M2aM14179N	404 ± 2.5	33	1.48E+05	3.98E-03	2.69E-08	2.9

Ejemplo 5. Bioensayo con células HEK293/SRE-luc/hTrkB y HEK293/SRE-luc/mTrkB (Ecto) - hTrkB (TM-Cyto).

[0217] Se desarrolló un bioensayo para detectar la activación de TrkB utilizando un gen reportero de luciferasa bajo control del elemento de respuesta sérica (SRE) y el ligando, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, R & D Systems). Se generaron líneas celulares HEK293 que expresan de manera estable un reportero de luciferasa (elemento de respuesta SRE-luciferasa, SRE-luc, SA Bioscience, # CLS-010L) con TrkB humano (hTrkB, aminoácidos 32-429 de NP_001018074.1 o número de Uniprot Q 16620-1) o el dominio extracelular TrkB de ratón fusionado a los dominios transmembrana y citoplasmático de TrkB humano (mTrkB, aminoácidos 32-429 de NP_001020245.1 o número Uniprot PI 5209-1 fusionado a hTrkB, aminoácidos 431-822). Las líneas celulares estables, HEK293/SRE-Luc/hTrkB y HEK293/SRE-Luc/mTrkB, se mantuvieron en DMEM suplementado con 10% de FBS, aminoácidos no esenciales, penicilina/estreptomicina/glutamina, 1 g/ml de puromicina y 500 g/ml G418.

[0218] Para el bioensayo, las células se sembraron en placas de ensayo de 96 pocillos a 20,000 células/pocillo en Opti-MEM™ suplementado con 0.1% de FBS, penicilina/estreptomicina y L-glutamina, y luego se incubaron a 37° C en 5% de CO₂ durante la noche. A la mañana siguiente, BDNF humano o anticuerpos se diluyeron en serie de 100 nM a 0.002 nM (más una muestra que contenía tampón solo sin ligando) y se añadieron a las células para determinar la activación de la señalización de TrkB. Los anticuerpos diluidos en serie también se probaron con 100 pM de BDNF (R & D Systems, 248-BD/CF). Las células se incubaron luego durante 5.5 horas a 37° C en presencia de 5% de CO₂. La actividad de luciferasa se midió después de la adición del reactivo OneGlo (Promega) usando un instrumento Victor X (Perkin Elmer). Los resultados se analizaron mediante regresión no lineal (logística de 4 parámetros) con el software Prism 5 (GraphPad) para obtener valores de CE₅₀ e IC₅₀. La activación máxima de los anticuerpos se calculó utilizando lo siguiente:

$$\text{Activación Max. \%} = \frac{(\text{Máximo RLU logrado por anticuerpo}) - (\text{RLU logrado sin BDNF})}{(\text{Máximo RLU logrado por BDNF}) - (\text{RLU logrado sin BDNF})} \times 100$$

Resumen de resultados y conclusiones:

[0219] Como se muestra en la Tabla 14, tres anticuerpos anti-TrkB de la invención H4H9816P2, H4H9814P, H4H9780P mostraron la activación de la señalización de TrkB humana en células HEK293/SRE-luc/hTrkB en ausencia de BDNF con EC₅₀ de 35-82 pM con una activación máxima que varía 88 - 92%. También se probaron tres anticuerpos de la invención en presencia de 100 pM de BDNF. Mientras que 100 pM de BDNF mostró una activación del 56% en presencia de mAb de control irrelevante, mAb2 de control, los anticuerpos de la invención mostraron una activación adicional con EC₅₀ de 45 – 76 pM con una activación máxima que oscila entre 77 y 80%. Tres anticuerpos anti-TrkB de la invención no mostraron activación de la señalización de TrkB de ratón en células HEK293/SRE-luc/mTrkB en ausencia de BDNF o en presencia de 100 pM de BDNF. El mAb 1 de control, un anticuerpo comparador anti-TrkB H1M8037C, mostró la activación de la señalización de TrkB humano con un EC₅₀ de 76 pM con una activación máxima del 78% y TrkB de ratón con un EC₅₀ de 43 pM con una activación máxima del 85% sin BDNF. En la presencia de 100 pM de BDNF, el mAb 1 de control activó la señalización de TrkB humana con un EC₅₀ de 110 pM con una activación máxima del 79% y TrkB de ratón con un EC₅₀ de 42 pM con una activación máxima del 69%, mayor que la activación por el mAb 2 de control con 100 pM de BDNF. El mAb 2 de control, un anticuerpo IgG4 humano irrelevante, no mostró ninguna activación en ausencia o en presencia de 100 pM de BDNF.

[0220] Como se muestra en la Tabla 15, tres anticuerpos anti-TrkB de la invención M2aM14173N, M2aM14178N, M2aM14179N mostraron la activación de la señalización de TrkB de ratón en células HEK293/SRE-luc/mTrkB en

ausencia de BDNF con EC_{50} de 34-190 pM con una activación máxima que oscila entre 76 y 94%. También se probaron tres anticuerpos de la invención en presencia de 100 pM de BDNF. Mientras que 100 pM de BDNF mostró una activación del 60% en presencia de mAb de control de isotipo irrelevante, mAb4 de control, los anticuerpos de la invención mostraron una activación adicional con EC_{50} de 17 – 100 pM con una activación máxima que oscila entre 67 y 75%. Tres anticuerpos anti-TrkB de la invención no mostraron la activación de la señalización de TrkB humana en células HEK293/SRE-luc/hTrkB en ausencia de BDNF o en presencia de 100 pM de BDNF. El mAb 1 de control mostró la activación de la señalización de TrkB humano con una EC_{50} de 57 pM con una activación máxima del 80% y TrkB de ratón con una EC_{50} de 43 pM con una activación máxima del 85% sin BDNF. En presencia de 100 pM de BDNF, el mAb 1 de control activó la señalización de TrkB humano con un EC_{50} de 110 pM con una activación máxima del 79% y TrkB de ratón con un EC_{50} de 42 pM con una activación máxima del 69%, mayor que la activación por el mAb 4 de control con 100 pM de BDNF. El mAb 3 de control y el mAb 4 de control, anticuerpos de control de isotipo IgG2a de ratón irrelevantes, no mostraron ninguna activación en ausencia o en presencia de 100 pM de BDNF.

Resumen de datos tabulados:

Tabla 14: Activación de las células HEK293/SRE-Luc/hTrkB y HEK293/SRE-Luc/mTrkB mediante anticuerpos anti-TrkB

Células	HEK293/SRE-luc/hTrkB				HEK293/SRE-luc/mTrkB			
BDNF	1.0E-10				7.4E-11			
Ligando	No BDNF		100pM BDNF		No BDNF		100pM BDNF	
Anticuerpo	EC50 (M)	Activación (%)	EC50 (M)	Activación (%)	EC50 (M)	Activación (%)	EC50 (M)	Activación (%)
H4H9780P	8.2E-11	88	7.6E-11	77	No activación	0	No activación	55
H4H9814P	3.5E-11	92	4.9E-11	80	No activación	0	No activación	54
H4H9816P2	6.3E-11	90	4.5E-11	78	No activación	0	No activación	58
mAb 1 de Control (Comparador)	7.6E-11	78	1.1E-10	79	4.3E-11	85	4.2E-11	69

H1M8037C)								
mAb 2 de control de isotipo negativo	No activación	3	No activación	56	No activación	0	No activación	54

Tabla 15: Activación de células HEK293/SRE-Luc/hTrkB y HEK293/SRE-Luc/mTrkB por anticuerpos anti-TrkB (sustituto)

Células	HEK293/SRE-luc/hTrkB				HEK293/SRE-luc/mTrkB			
BDNF	1.3E-10		1.0E-10		7.4E-11		1.1E-10	
Ligando	No BDNF		100pM BDNF		No BDNF		100pM BDNF	
Anticuerpo	EC50 (M)	Activación (%)	EC50 (M)	Activación (%)	EC50 (M)	Activación (%)	EC50 (M)	Activación (%)
M2aM14173N	No Activación	2	No Activación	59	3.6E-11	94	1.7E-11	74
M2aM14178N	No Activación	0	No Activación	52	1.9E-10	76	1.0E-10	67
M2aM14179N	No Activación	4	No Activación	52	3.4E-11	87	2.1E-11	75
mAb 1 de Control (Comparador H1M8037C)	5.7E-11	80	1.1E-10	79	4.3E-11	85	4.2E-11	69
mAb 3 de control de isotipo negativo	No activación	0	No probado	No probado	No probado	No probado	No probado	No probado
mAb 4 de control de	No probado	No probado	No activación	61	No activación	0	No activación	60

isotipo negativo	o	o	ón		ón		ón	
---------------------	---	---	----	--	----	--	----	--

Ejemplo 6. Comparación in vivo del efecto del anticuerpo agonista TrkB H4H9816P2 y el control de isotipo IgG4 REGN1945 sobre la fosforilación de TrkB en el cerebro después de la inyección estereotáctica en ratones TrkB^{hu/hu}

[0221] Para determinar el efecto de un anticuerpo agonista de TrkB de la invención, H4H9816P2, sobre la cinética de activación de TrkB, se realizó un estudio en el curso de tiempo de la fosforilación de TrkB después de la inyección directa del hipocampo en ratones homocigotos para el receptor TrkB humano en lugar del receptor TrkB de ratón (referidos como ratones TrkB^{hu/hu}). Los ratones TrkB^{hu/hu} (N = 48) recibieron inyecciones estereotáxicas bilaterales con 2 µl de vehículo (PBS), REGN1945 por la presente anotado como anticuerpo de control de isotipo IgG4 (concentración final de 27.5 mg/ml) o anticuerpo agonista de TrkB H4H9816P2 (concentración final de 27.5 mg/ml) en el hipocampo, -2 mm posterior y + 1.5 mm lateral a bregma. Para minimizar el daño tisular, la inyección y la extracción de la aguja se realizaron gradualmente durante intervalos de 5 minutos. Los ratones de TrkB^{hu/hu} fueron sacrificados por eutanasia con CO₂ aproximadamente 30 minutos, 1 hora, 4 horas o 18 horas después de la inyección. Se realizó una hemorragia terminal a través de una punción cardíaca para recolectar sangre, y luego los ratones se perfundieron transcárdicamente con solución salina heparinizada fría. Se extrajo cuidadosamente el cerebro del cráneo, y se diseccionó una sección de tejido de 2 mm³ que rodeaba el sitio de inyección, se recogió en un tubo Eppendorf y se almacenó en hielo. La sección del cerebro se lisó luego en 300 µl de tampón de lisis RIPA (ThermoFisher Scientific, Cat # 89901) que contenía 2x inhibidores de proteasa y fosfatasa (ThermoFisher Scientific, Cat # 78444) y se almacenó en hielo. El tejido lisado se homogeneizó para su posterior procesamiento, se dividió en alícuotas y se almacenó a -80° C. [0222] para evaluar la fosforilación de TrkB en el tejido cerebral, se realizó inmunotransferencia. El anticuerpo antihumano TrkB H4H10108N que no compite por la unión con H4H9816P2 se acopló a perlas de Sepharose activadas por NHS (preparadas usando el protocolo del fabricante; GE Healthcare, Cat # 17-0906) y se lavó con DPBS tres veces para eliminar cualquier solución de preservación residual. Los lisados cerebrales homogeneizados se descongelaron en hielo y se diluyeron a una concentración de 1 mg/ml (peso cerebral al volumen del tampón) en un tampón compuesto por 1% de NP-40, 0.1% de Tween-20, inhibidores de proteasa y fosfatasa en TBST. La concentración de proteína del lisado cerebral homogeneizado se cuantificó realizando un ensayo estándar de BCA de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Thermo Scientific Pierce, Cat # 23225). Por cada 100 µg de proteína, se agregaron 15 µl de perlas de Sepharose activadas con NHS de anticuerpo anti-TrkB antihumano (H4H10108N) a la solución de lisado cerebral y la mezcla se incubó durante la noche a 4° C con agitación suave a 20 rpm (rotador Thermo). Al día siguiente, las muestras se centrifugaron a 1000 x g durante un minuto, y el sobrenadante se retiró cuidadosamente. Las perlas

se lavaron posteriormente dos veces con 400 ul de solución salina tamponada con Tris (Bio-Rad, Cat # I706435) con Tween-20 al 1% (Sigma Aldrich, Cat # P9416) (TBST). Después de aspirar cuidadosamente el tampón de lavado, se añadieron 60 ul de ácido trifluoroacético al 0.1% (TFA; Sigma-Aldrich, T62200) en agua a pH 3.0 a cada muestra. La solución se mezcló y se dejó reposar durante dos minutos antes de recogerse y transferirse a un tubo separado. Este proceso se repitió con otros 60 ul de TFA al 0.1% a pH 3.0. Luego se combinaron las dos soluciones de TFA al 0.1% para cada muestra, y se agregaron 2 ul de Tris-HCl 1 M (ThermoFisher Scientific, Cat # 15567-027), a pH 8.5.

[0223] La solución se secó usando un vacío de velocidad y luego se resuspendió y redujo con una mezcla de 20 ul de tampón 1 x Laemmli (Bio-Rad, Cat # 1610737) más 355 nM de 2-mercaptoetanol (BME; Gibco, Cat # 21985-023). Las muestras se hirvieron a 95° C durante 10 minutos y se cargaron en un gel de Tris-Glicina 4-15% Mini-Protean de 10 pocillos (Bio-Rad, Cat # 4561086). Después de la electroforesis, las muestras de proteínas se transfirieron del gel Tris-Glicina a una membrana de PVDF (Bio-Rad, Cat # I70-4156) a través del Sistema de Transferencia Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, Cat # 1704156) a lo largo de 30 minutos a una velocidad constante de 1.3 A y 25 V. Después de la transferencia, la membrana se bloqueó con leche al 2.5% (Bio-Rad, Cat # I70-6406) en TBST durante una hora a temperatura ambiente, y posteriormente se sondeó durante la noche con un anticuerpo anti-fosfo-TrkB (Novus, Cat # NB 100-92656) diluido 1: 1000 en una solución de BSA al 2.5% o anticuerpo primario anti-TrkB (Cell Signaling, Cat # 4603) diluido a 1: 1000 en 2.5% de TBST leche a 4° C en un agitador a 30 rpm. Al día siguiente, las transferencias se lavaron con TBST y se incubaron con un anticuerpo IgG anticonejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (Jackson, Cat # 111-035-144) a 1: 1000 en leche al 1% en TBST durante 1 hora a temperatura ambiente. Las transferencias se lavaron nuevamente, se desarrollaron con solución de ECL (PerkinElmer, Inc. Cat # RPN2106), y las exposiciones posteriores a la imagen se tomaron cada 30 segundos.

Resumen de resultados y conclusiones:

[0224] La inmunoprecipitación y la posterior transferencia Western de proteína derivada de lisados cerebrales de ratón TrkB^{hu/hu} demostraron que la fosforilación de TrkB del hipocampo era detectable en ratones inyectados con un anticuerpo agonista TrkB, H4H9816P2, pero no en ratones tratados con vehículo o anticuerpo de control de isotipo, como lo muestra la figura 1. Entre los puntos de tiempo evaluados, la fosforilación de TrkB alcanzó su punto máximo a las 4 horas después de la inyección estereotáxica en ratones a los que se administró H4H9816P2. La fosforilación de TrkB también se detectó mediante inmunotransferencia a las 18 horas después de la administración en algunos ratones, pero no en todos. Por el contrario, la inyección del vehículo y el anticuerpo de control de isotipo IgG4 no indujo la fosforilación de TrkB en ningún punto de tiempo. La inmunotransferencia también indicó que los niveles totales de receptor TrkB estaban regulados negativamente en algunos, pero no todos los ratones TrkB^{hu/hu} dosificados con H4H9816P2 en relación con el vehículo y los ratones tratados con control de isotipo. Los niveles totales de TrkB parecían estar ligeramente regulados a la baja en sujetos tratados con

H4H9816P2 a las 18 horas después de la dosificación. Por lo tanto, estos resultados indican que la inyección directa del anticuerpo agonista TrkB, H4H9816P2, induce la fosforilación de los receptores TrkB del hipocampo en ratones TrkB^{hu/hu}.

Ejemplo 7. Comparación in vivo del efecto de H4H9816 y el control de isotipos de los anticuerpos REGN1945 sobre el peso corporal y el metabolismo en ratones TrkB^{hu/hu}.

[0225] Para determinar el efecto de un anticuerpo agonista TrkB de la invención, H4H9816P2, sobre el peso corporal y la composición, un estudio metabólico de ratones homocigotos para la expresión del receptor TrkB humano en lugar del receptor TrkB de ratón (ratones TrkB^{hu/hu}) se realizó después de una única inyección de anticuerpo subcutáneo. Los ratones TrkB^{hu/hu} (machos, de 20 semanas de edad) se transfirieron primero del alojamiento de la jaula grupal a la jaula sencilla durante dos semanas de aclimatación. Después de este período, los ratones fueron transferidos a jaulas metabólicas (CLAMS, Columbus Instruments) para evaluar los cambios en el consumo de alimentos y agua, locomoción, gasto de energía y respiración después de la administración de anticuerpos. La comida en polvo regular se almacenó en una cámara de piso en una balanza de resorte (Mettler Toledo, PL602E) para medir el consumo de alimentos a través de los cambios en el peso total de la comida. Se podía acceder al agua a través de un surtidor en la parte superior de la jaula y la ingesta se midió siguiendo los cambios en el volumen de la línea de bombeo (Unidad de líquido OxyMax®/CLAMS). Las jaulas metabólicas de CLAMS midieron cada uno de estos parámetros en intervalos continuos de 16-18 minutos a lo largo de la duración del estudio. Los datos metabólicos se analizaron en medidas individuales y se resumieron en intervalos de 24 horas que contenían un ciclo completo de luz y oscuridad usando el software OXYMAX®/CLAMS (Columbus instruments, v5.35). Después de aclimatarse a las jaulas durante dos semanas, los ratones TrkB^{hu/hu} recibieron una dosis subcutánea de 50 mg/kg única de un anticuerpo agonista TrkB, H4H9816P2 o un anticuerpo de control de isotipo IgG4 en PBS a pH 7.2. Un grupo de ratones TrkB^{hu/hu} de control sin tratamiento previo no recibió una inyección. Los ratones se pesaron inmediatamente antes de la dosificación, y a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas después de la dosificación. Para medir la composición corporal de cada ratón, se realizó una Relaxometría de Resonancia Magnética Nuclear, también conocida como Resonancia Magnética Cuantitativa, utilizando un Analizador EchoMRI™ -500 (EchoMRI LLC). Antes de la dosificación, los ratones se colocaron en un soporte de plástico transparente y se insertaron en el dispositivo de RMN-IRM para medir la masa magra, la masa grasa y el estado de hidratación de cada sujeto. Las mediciones se realizaron en el transcurso de 0.5-3.2 minutos por ratón, y se tomaron nuevamente aproximadamente 120 horas después de la dosificación.

Resumen de resultados y conclusiones:

[0226] Se realizó un control diario del peso corporal para determinar si una sola inyección subcutánea de H4H9816P2 induce la pérdida de peso en ratones TrkB^{hu/hu}. Antes de la dosificación, no hubo diferencias significativas en el peso

corporal promedio de los tres grupos de tratamiento, ya que cada uno tenía un peso corporal promedio antes de la dosis de 28.39 - 29.85 g (Tabla 16). Sin embargo, a las 48 horas posteriores a la dosificación, los ratones TrkB^{hu/hu} tratados con H4H9816P2 perdieron un promedio de 1.70 g, o 5.96% de su peso corporal predosis. Al mismo tiempo, los ratones TrkB^{hu/hu} sin tratamiento previo y tratados con anticuerpos de isotipo ganaron entre 1.79-2.37% de su peso corporal predosis. Los ratones TrkB^{hu/hu} tratados con H4H9816P2 continuaron perdiendo peso durante el transcurso de tiempo completo del estudio, y en 72 y 96 horas después de la dosificación, estos ratones habían perdido un promedio de 8.42% y 11.80% de su peso corporal predosis, respectivamente. A las 120 horas después de la dosificación, los ratones TrkB^{hu/hu} tratados con H4H9816P2 habían perdido un promedio de 12.67% de su peso corporal predosis. Por el contrario, los ratones TrkB^{hu/hu} sin tratamiento previo y tratados con anticuerpos de isotipo no mostraron ninguna pérdida en el peso corporal predosis durante todo el estudio. Como el peso corporal en los ratones TrkB^{hu/hu} tratados con H4H9816P2 se redujo significativamente en relación con los controles tanto sin tratamiento previo como de isotipo a las 48, 72, 96 y 120 horas después de la dosificación, se determinó que el anticuerpo agonista de TrkB H4H9816P2 inducía una pérdida de peso corporal significativa en ratones TrkB^{hu/hu}.

Tabla 16: Peso corporal de ratones TrkB^{hu/hu} después de la dosificación con el anticuerpo agonista TrkB H4H9816P2

Grupo Experimental	Peso corporal predosis promedio (g) ($\pm$ DE)	Peso corporal promedio (g) 24 horas postdosificación ($\pm$ DE)	Peso corporal promedio (g) 48 horas postdosificación ($\pm$ DE)	Peso corporal promedio (g) 72 horas postdosificación ($\pm$ DE)	Peso corporal promedio (g) 96 horas postdosificación ($\pm$ DE)	Peso corporal promedio (g) 120 horas postdosificación ($\pm$ DE)
	Cambio porcentual del peso corporal predosis (+/- DE)	Cambio porcentual del peso corporal predosis (+/- DE)	Cambio porcentual del peso corporal predosis (+/- DE)	Cambio porcentual del peso corporal predosis (+/- DE)	Cambio porcentual del peso corporal predosis (+/- DE)	Cambio porcentual del peso corporal predosis (+/- DE)
Sin tratamiento previo (n=3)	28.85 (+/- 0.81)	29.69 (+/- 0.97)	29.36 (+/- 1.10)	29.32 (+/- 1.29)	29.29 (+/- 1.10)	28.88 (+/- 1.04)

	N/A	+2.91% (+/- 0.62)	+1.79% (+/- 1.62)	+1.65% (+/- 2.24)	+1.54% (+/- 1.22)	+0.10% (+/- 1.05)
control de isotipo (n=4)	29.21 (+/- 2.68)	30.27 (+/- 2.51)	29.90 (+/- 2.63)	30.08 (+/- 2.69)	29.87 (+/- 2.52)	29.69 (+/- 2.68)
	N/A	+3.61% (+/- 1.68)	+2.37% (+/- 1.50)	+2.98% (+/- 1.09)	+2.25% (+/- 1.56)	+1.65% (+/- 0.81)
H4H9816P2 (n=4)	28.39 (+/- 1.35)	27.87 (+/- 1.29)	26.69 (+/- 0.87)	26.00* (+/- 0.98)	25.04** (+/- 1.03)	24.79** (+/- 1.36)
	N/A	-1.83% (+/- 0.56)	-5.96% (+/- 1.88)	-8.42% (+/- 1.85)	-11.80% (+/- 1.52)	-12.67% (+/- 1.66)

Nota: Se indica la significancia estadística determinada por ANOVA de dos vías con la prueba post hoc de comparación múltiple de Tukey (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$, en comparación con el grupo de control de isotipo: ratones $\text{TrkB}^{\text{hu/hu}}$ con dosis de 50 mg/kg de anticuerpo de control de isotipo.

[0227] El efecto de la inyección del anticuerpo agonista TrkB H4H9816P2 sobre la composición corporal también se midió realizando RMN-IRM en cada sujeto antes y después de la dosificación. Antes de la dosificación, los tres grupos de tratamiento de ratones $\text{TrkB}^{\text{hu/hu}}$ no mostraron diferencias significativas en la masa grasa o la masa magra, ya que cada grupo tenía un promedio de 4.19 - 4.75 g de masa grasa y 21.32 - 21.70 g de masa magra (Tabla 17). Sin embargo, después de la administración de anticuerpos, los ratones $\text{TrkB}^{\text{hu/hu}}$ que recibieron la dosis H4H9816P2 perdió un promedio de 48.90% de su masa total de grasa corporal en el transcurso del estudio (Tabla 17). Los ratones $\text{TrkB}^{\text{hu/hu}}$ sin tratamiento previo y tratados con anticuerpos de isotipo perdieron un promedio de 8.49% y 9.48% de su masa grasa predosis, respectivamente, que fue significativamente menor que los sujetos tratados con H4H9816P2 (Tabla 17). Además, los ratones $\text{TrkB}^{\text{hu/hu}}$ tratados con H4H9816P2 perdieron un promedio del 7.84% de su masa magra durante todo el estudio, que fue significativamente mayor que el 2.41% y el 1.75% de la masa

magra predosis promedio perdida por los grupos tratados con anticuerpo de control sin tratamiento previo e isotipo, respectivamente (Tabla 17). Como tal, la pérdida de peso corporal descrita podría explicarse por una pérdida significativa de masa grasa y una pérdida moderada de masa magra después de la inyección del anticuerpo agonista TrkB H4H9816P2 en ratones TrkB^{hu/hu}.

Tabla 17: Composición corporal de ratones TrkB^{hu/hu} después de la dosificación con el anticuerpo agonista TrkB H4H9816P2

Grupo Experimental	Masa de grasa predosis promedio (%) ($\pm$ DE)	Masa de grasa promedio (%) 120 horas postdosis ($\pm$ DE)	Cambio de masa de grasa promedio (%) 120 horas postdosis ($\pm$ DE)	Masa magra predosis promedio (%) ($\pm$ DE)	Masa magra promedio (%) 120 horas postdosis ($\pm$ DE)	Cambio de masa magra promedio (%) 120 horas postdosis ($\pm$ DE)
Sin tratamiento previo (n=3)	4.65 (+/- 0.32)	4.27 (+/- 0.55)	-8.49 (+/- 7.18)	21.45 (+/- 0.79)	20.94 (+/- 0.98)	-2.41 (+/- 1.81)
control de isotipo (n=4)	4.75 (+/- 2.98)	4.40 (+/- 2.98)	-9.48 (+/- 6.00)	21.70 (+/- 0.50)	21.32 (+/- 0.35)	-1.75 (+/- 0.98)
H4H9816P2 (n=4)	4.19 (+/- 1.15)	2.14 (+/- 0.64)	-48.90**** (+/- 5.06)	21.32 (+/- 1.87)	19.64 (+/- 1.69)	-7.84*** (+/- 0.94)

Nota: La significancia estadística determinada por ANOVA de una vía Kruskal-Wallis con la prueba post hoc de comparación múltiple de Tukey está indicada (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$, en comparación

con el grupo de control de isotipo: ratones TrkB^{hu/hu} con dosis de 50 mg/kg de anticuerpo de control de isotipo.

[0228] Además de evaluar los efectos de la inyección del anticuerpo agonista TrkB H4H9816P2 sobre el peso corporal y la composición en ratones TrkB^{hu/hu}, la alimentación, la bebida y la actividad locomotora se midieron continuamente mediante jaulas metabólicas. Antes de la dosificación, los ratones TrkB^{hu/hu} consumieron un promedio de 3.49 – 3.73 g de comida por día. Sin embargo, dentro de las 24 horas desde la dosificación, los ratones TrkB^{hu/hu} tratados con H4H9816P2 redujeron significativamente su ingesta de alimentos a 2.20 g de comida por día. El nivel promedio de ingesta de alimentos en ratones TrkB^{hu/hu} tratados con H4H9816P2 no superó los 2.49 g de comida por día durante el resto del estudio, mientras que los ratones TrkB^{hu/hu} sin tratamiento previo y tratados con anticuerpos de isotipo consumieron constantemente un promedio de 3.62 – 4.07 g de comida por día (Tabla 18).

[0229] Del mismo modo, no hubo diferencias significativas en el consumo diario de agua entre los grupos de tratamiento antes de la dosificación. Los ratones TrkB^{hu/hu} consumieron un promedio de 4.67 - 5.55 ml de agua por día en cada grupo de tratamiento (Tabla 19). Después de la dosificación, los ratones TrkB^{hu/hu} tratados con H4H9816P2 redujeron su ingesta de agua a 2.05 – 3.24 ml de agua por día. Esto fue significativamente más bajo que los ratones TrkB^{hu/hu} sin tratamiento previo y tratados con anticuerpo de control de isotipo, que consumieron constantemente 4.50 – 5.77 ml de agua por día durante todo el estudio (Tabla 19). Por lo tanto, la inyección del anticuerpo agonista TrkB, H4H9816P2, pareció dar como resultado una reducción significativa de la ingesta de alimentos y agua en ratones TrkB^{hu/hu} en relación con los controles sin tratamiento previo e isotipo.

Tabla 18: Consumo de alimentos de ratones TrkB^{hu/hu} después de la dosificación con anticuerpo agonista TrkB H4H9816P2.

Grupo Experimental	Ingesta de alimento total promedio (g) 0-24 horas predosis (±DE)	Ingesta de alimento total promedio (g) 0-24 horas postdosis (±DE)	Ingesta de alimento total promedio (g) 24-48 horas postdosis (±DE)	Ingesta de alimento total promedio (g) 48-72 horas postdosis (±DE)	Ingesta de alimento total promedio (g) 72-96 horas postdosis (±DE)
Sin tratamiento previo (n=3)	3.51 (+/- 0.53)	3.98 (+/- 0.08)	3.76 (+/- 0.19)	3.62 (+/- 0.35)	3.91 (+/- 0.18)
	3.73	4.07	3.99	3.89	3.80

control de isotipo (n=4)	(+/- 0.48)	(+/- 0.23)	(+/- 0.17)	(+/- 0.22)	(+/- 0.22)
H4H9816P2 (n=4)	3.49 (+/- 1.07)	2.20**** (+/- 0.16)	2.08**** (+/- 0.36)	2.18**** (+/- 0.37)	2.49*** (+/- 0.47)

Nota: La significancia estadística determinada por ANOVA de una vía Kruskal-Wallis con la prueba post hoc de comparación múltiple de Tukey está indicada (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$, en comparación con el grupo de control de isotipo: ratones TrkB^{hu/hu} con dosis de 50 mg/kg de anticuerpo de control de isotipo.

Tabla 19: Consumo de agua de ratones TrkB^{hu/hu} después de la dosificación con anticuerpo agonista TrkB H4H9816P2

Grupo Experimental p	Ingesta de agua total promedio (ml) 0-24 horas predosis (±DE)	Ingesta de agua total promedio (ml) 0-24 horas postdosis (±DE)	Ingesta de agua total promedio (ml) 24-48 horas postdosis (±DE)	Ingesta de agua total promedio (ml) 48-72 horas postdosis (±DE)	Ingesta de agua total promedio (ml) 72-96 horas postdosis (±DE)
Sin tratamiento previo (n=3)	4.79 (+/- 0.21)	5.42 (+/- 0.94)	4.96 (+/- 0.91)	4.57 (+/- 0.56)	4.88 (+/- 0.32)
control de isotipo (n=4)	5.55 (+/- 1.23)	4.50 (+/- 1.08)	5.08 (+/- 1.39)	5.09 (+/- 1.10)	5.77 (+/- 1.62)

H4H9816P2 (n=4)	4.67 (+/- 1.13)	2.25** (+/- 0.55)	3.24* (+/- 1.10)	2.05*** (+/- 0.29)	2.25**** (+/- 0.24)
--------------------	--------------------	----------------------	---------------------	-----------------------	------------------------

Nota: significancia estadística determinada por ANOVA de una vía Kruskal-Wallis con la prueba post-hoc de comparación múltiple de Tukey (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$, en comparación con el grupo de control de isotipo: ratones TrkB^{hu/hu} con dosis de 50 mg/kg de anticuerpo de control de isotipo.

[0230] Para determinar los efectos del tratamiento con anticuerpos sobre la actividad, la locomoción se analizó mediante el software OXYMAX®/CLAMS (Columbus instruments, v5.35), que midió continuamente el número total de deambulaciones en el plano x de cada ratón. Un ratón exhibió hiperactividad antes de la dosificación y se retiró del análisis estadístico posterior a la dosis. Mientras que los sujetos sin tratamiento previo y tratados con anticuerpos de isotipo registraron consistentemente un promedio de 11.000-15.000 deambulaciones por día durante todo el estudio, los TrkB^{hu/hu} tratados con H4H9816P2 registró 28.260 deambulaciones entre 24-48 horas después de la dosificación, y registró 21.193 y 27.028 deambulaciones de 48-72 y 72-96 horas después de la dosificación, respectivamente (Tabla 20). Los ratones TrkB^{hu/hu} tratados con H4H9816P2 registraron más recuentos de deambulación total en cada punto de tiempo después de la administración de anticuerpos, lo que sugiere que la hiperactividad es un efecto adicional de la inyección de H4H9816P2. En combinación, estos efectos sugieren que una sola inyección subcutánea del anticuerpo agonista TrkB, H4H9816P2, indujo cambios significativos en el peso corporal, la composición corporal, el metabolismo y la locomoción en ratones TrkB^{hu/hu}.

Tabla 20: Locomoción de ratones TrkB^{hu/hu} después de la dosificación con el anticuerpo agonista TrkB H4H9816P2

Grupo Experimental	Deambulacion es totales promedio (recuentos) 0-24 horas predosis (±DE)	Deambulacion es totales promedio (recuentos) 0-24 horas postdosis (±DE)	Deambulacion es totales promedio (recuentos) 24-48 horas postdosis (±DE)	Deambulacion es totales promedio (recuentos) 48-72 horas postdosis (±DE)	Deambulacion es totales promedio (recuentos) 72-96 horas postdosis (±DE)
--------------------	--	---	--	--	--

Sin tratamiento previo (n=3)	16562 (+/- 3380)	14692 (+/- 2792)	14387 (+/- 6126)	13279 (+/- 3607)	12525 (+/- 4121)
Control de Isotipo (REGN1945) (n=4)	18105 (+/- 4085)	13380 (+/- 2730)	13049 (+/- 3376)	11371 (+/- 2552)	11468 (+/- 2088)
H4H9816P2 (n=4)	13292 (+/- 5294)	16575 (+/- 6836)	28260 (+/- 19874)	21193 (+/- 6668)	27028* (+/- 10969)

Nota: La significancia estadística determinada por ANOVA de una vía Kruskal-Wallis con la prueba post-hoc de comparación múltiple de Tukey está indicada (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$, en comparación con el grupo de control de isotipo: ratones $TrkB^{hu/hu}$ con dosis de 50 mg/kg de anticuerpo de control de isotipo.

Ejemplo 8. Modelo de transección del nervio óptico para determinar el efecto del anticuerpo anti-TrkB en la supervivencia de la célula del ganglio retiniano (RGC)

[0231] Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con la declaración de ARVO para el uso de animales en la investigación oftálmica y de la visión y de Regeneron Pharmaceutical Inc. IACUC. Se usaron ratas humanizadas $TrkB$ hembras adultas (Velocigene, Regeneron Pharmaceutical Inc.), de 8-10 semanas de edad, cada una con un peso de 200-250 g. Todos los procedimientos quirúrgicos en ratas se realizaron bajo anestesia general usando una inyección intraperitoneal de ketamina (63 mg/kg) y xilazina (6.0 mg/kg). Se aplicó ungüento para los ojos que contenía eritromicina (0.5%, Bausch & Lomb) para proteger la córnea.

Axotomía del nervio óptico infraorbital e inyección intravítrea

[0232] El nervio óptico izquierdo (NO) se expuso intraorbitalmente, se abrió su duramadre. NO se cortó aproximadamente 1.5 mm detrás del globo. Se tuvo cuidado para evitar dañar el suministro de sangre a la retina. Las inyecciones

intravítreas se realizaron justo después de la pars plana con una pipeta de vidrio extraída conectada a una jeringa Hamilton de 50 µl. Se tuvo cuidado de no dañar la lente. Las ratas con complicaciones postoperatorias significativas (p. Ej., Isquemia retiniana, catarata) se excluyeron de análisis adicionales. Los animales fueron asignados a diferentes grupos experimentales. Un grupo de control recibió inyecciones intravítreas de 3 µl de control de isotipo REGN1945 (46.6 µg/µl); el otro grupo recibió la inyección de 3 µl de anticuerpo trkB antihumano H4H9816P2 (45.7 µg/µl) a los 3 y 10 días después de la axotomía del NO.

[0233] En otro experimento, se probó una respuesta de dosis del anticuerpo anti-TrkB humano H4H9816P2. Las ratas homocigotas TrkB humanizadas de 1 a 9 meses de edad recibieron una inyección intravítrea de 3 µl de anticuerpo TrkB antihumano H4H9816P2 (0.01, 0.1, 1 o 10 µg/µl) o control de isotipo REGN1945 (10 µg/µl) a los 3 y 10 días después de la axotomía del NO.

Tinción inmunohistoquímica y recuento de RGC viables

[0234] Bm3a (proteína 3A del dominio homeobox/POU específico del cerebro) se usó como marcador para las células ganglionares de la retina (RGC) sobrevivientes, porque se ha demostrado que es un método eficiente y confiable para el etiquetado selectivo de RGC viables en montajes completos de la retina después de la lesión del NO (Nadal- Nicolas FM, Jiménez-López M, Sobrado-Calvo P, Nieto-López L, Cánovas-Martínez I, Salinas-Navarro M, Vidal-Sanz M, Agudo M., Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009 Agosto; 50 (8): 3860-8). Para inmunotear Brn3a, las retinas se bloquearon en suero de burro normal al 10% y Triton X-100 al 0.5% durante 1 hora, luego se incubaron en el mismo medio con anticuerpo Brn3a (1: 400; Cat #: SC-31984, Santa Cruz) 2 horas a temperatura ambiente. Después de más lavados, las retinas se incubaron con el anticuerpo secundario anticabra de burro conjugado con Alexa594 (1: 400; Cat #: A-11058, Invitrogen) durante la noche a 4° C.

Resumen de resultados y conclusiones:

[0235] Para evaluar el efecto del anticuerpo agonista TrkB en la supervivencia de RGC *in vivo*, utilizamos un modelo completo de transección del nervio óptico. El anticuerpo agonista TrkB (H4H9816P2) o el anticuerpo de isotipo (control negativo) se aplicó a los 3 y 10 días después de la cirugía. Los animales fueron sacrificados 14 días después de la axotomía. La densidad de RGC en el ojo contralateral no lesionado es similar en los tres genotipos TrkB, con un promedio de alrededor de 1600 por mm² como se muestra en la Tabla 21. La densidad de los RGC supervivientes se evaluó en montajes completos de la retina usando tinción con Brn3a. Se observó que en la rata homocigota TrkB humanizada, el anticuerpo agonista TrkB (H4H9816P2) aumentó significativamente ($p < 0.01$, prueba de Mann-Whitney) la supervivencia de RGC en comparación con los controles (685 ± 10 vs. 255 ± 66 RGC por mm²). En la rata heterocigota TrkB humanizada, también hay un efecto de supervivencia significativo ($p < 0.05$, prueba de Mann-Whitney) del anticuerpo agonista TrkB (444 ± 90 vs. 208 ± 50 RGC por mm²). En la rata TrkB de tipo silvestre, hay un aumento leve pero no significativo del número de RGC en el anticuerpo agonista de TrkB en comparación con el control de isotipo (Tabla

22). En el experimento de respuesta de dosis, la densidad de RGC se cuantificó en montajes completos de la retina usando tinción con Brn3a 14 días después de la axotomía. Hay una clara respuesta a la dosis del anticuerpo agonista TrkB. En comparación con el grupo de control de anticuerpos (168 ± 43 RGC por mm^2), el anticuerpo agonista TrkB (H4H9816P2) incrementó significativamente ($p < 0.01$, ANOVA de una vía con postprueba Tukey) la supervivencia de RGC en 3 ug (564 ± 124 RGC por mm^2) o 30 ug (543 ± 242 RGC por mm^2) por grupo de inyección. No hay diferencia entre 3 y 30 grupos de ug. En los grupos que recibieron 0.03 ug (202 ± 96 RGC por mm^2) o 0.3 ug (337 ± 210 RGC por mm^2) por grupo de inyección, solo hay una tendencia pero no un aumento significativo en la supervivencia de RGC (tabla 23). En conclusión, el anticuerpo agonista TrkB H4H9816P2 mostró una supervivencia RGC significativamente aumentada en ratas $\text{TrkB}^{\text{hu/hu}}$ y $\text{TrkB}^{\text{hu/+}}$.

Conclusión:

[0236] El agonista de TrkB Ab (H4H9816P2) aumentó significativamente la supervivencia de RGC de manera dependiente de la dosis en una rata de TrkB humanizada.

Tabla 21. Cuantificación de RGC (RGC/ mm^2) en ojo de control no lesionado.

Genotipos TRKB

hu/hu	hu/+	+/+
1637.3	1720.4	1636.3
1551.5	2064.6	1670.2
1651.4	1738.8	1873.4
1628.2	2029.8	1725.4
1804.7	1929.6	1973.4
1741.3	1645.9	
1739.7	1761.5	
1698.8	1787.5	
1862.5	1914.0	
1779.4		

Tabla 22 Cuantificación de RGC (RGC/ mm^2) después de la lesión del nervio óptico

	H4H9816P2					Control de isotipo Ab				
	A:Y1	A:Y2	A:Y3	A:Y4	A:Y5	B:Y1	B:Y2	B:Y3	B:Y4	B:Y5
Hu/Hu	790.1	737.1	756.3	587.8	555.7	322.8	295.0	286.9	171.3	197.9
Hu/+	530.4	457.5	522.9	390.6	319.2	231.0	184.6	265.1	151.3	
+/+	320.9	355.5	256.9	342.7		112.3				

Tabla 23 Cuantificación de RGC (RGC/mm²) en el estudio de respuesta de dosis

Control Ab	H4H9816P2			
30 ug/ ivt	0.03 ug/ ivt	0.3 ug/ ivt	3 ug/ ivt	30 ug/ ivt
222.3	162.7	341.7	637.9	493.0
205.9	190.2	269.1	686.4	613.5
131.7	127.7	292.2	533.2	557.6
136.3	174.0	252.8	574.7	227.1
144.3	163.8	128.3	334.4	954.3
	392.6	740.9	620.6	411.3

Ejemplo 9. Efecto de los anticuerpos anti-TrkB en las vías de señalización de Akt y Erk

[0237] Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con la declaración de ARVO para el uso de animales en la investigación oftálmica y de la visión y Regeneron Pharmaceutical Inc. IACUC. Las neuronas corticales de ratón primarias se aislaron y cultivaron a partir de ratones TrkB humanizados (MAID 7139) (Nat Protoc. 2012 Sep; 7 (9): 1741-54. doi: 10.1038/nprot.2012.099). Se realizó una inmunotransferencia (WB) para determinar los efectos del agonista TrkB Ab en las vías aguas abajo de Akt y Erk (p-Akt, p- Erk1/2). La neurona cortical primaria del día 1 postnatal (P1) de crías de ratones TrkB humanizados se cultivaron durante 4 días (DIV-4) en medio neural Q basal (Global Stem, cat. # GSM-9420) complementado con GS21 Neural Supplement (Global Stem, cat. # GSM-3100), Glutamax (Invitrogen, cat. # 35050-061) y Penicilina/Estreptomicina. Las células se trataron con el agonista TrkB Abs: H4H9816P-L1 (10 ug/ml), H4H9780P-L1 (10 ug/ml), H4H9814P-L1 (10 ug/ml), control de isotipo IgG4 REGN1945 (10 ug/ml), anticuerpo de control H1M8037C-L1 (10 ug/ml), BDNF (1 ug/ml), durante 15 minutos o 2 horas. Se realizó una inmunotransferencia para determinar si los agonistas tienen una diferencia en el mantenimiento y la

fuerza de la señalización aguas abajo. Las células tratadas se enjuagaron y se rasparon en PBS frío que contenía 1% de proteasa e inhibidores de fosfatasa (Sigma). La concentración de proteínas se determinó mediante el ensayo de proteínas Bradford (Pierce). Las muestras (50 pg) se separaron por SDS-PAGE en geles reducidos con de tris- acetato 3-8% (Novex) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad).

[0238] La membrana se incubó durante 1 hora en solución de bloqueo que contenía leche al 5% y Tween-20 al 0.1%, pH 7.6. Esto fue seguido por una incubación durante la noche a 4° C en el tampón de bloqueo que contenía BSA al 5%, Tween-20 al 0.1% y anti-phosphoTrk de conejo (Cell Signaling, cat. # 9141, 1: 500), anti-fosfo-Akt de conejo (Cell Signaling, cat. # 9271, 1: 1000) o anticuerpo de conejo anti-fosfo-ERK1/2 (Sigma, cat. # E7028, 1: 5000). Posteriormente, las proteínas marcadas se visualizaron por incubación con una IgG anti-cabra, ratón o conejo conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) seguida de desarrollo con un sustrato de quimioluminiscencia para HRP (Pierce). Para determinar las cantidades de TrkB, MAPK o Akt totales presentes en cada carril, se despojaron las membranas de nitrocelulosa de los anticuerpos en tampón de separación (Pierce) durante 20 minutos y se incubaron con anti-TrkB de conejo (Cell Signaling, cat. # 4603, 1: 1000), anti-Erk1/2 de conejo (Cell Signaling, cat. # 06-182, 1: 1000) o anticuerpo anti-Akt de conejo (Cell Signaling, cat. # 9272, 1: 1000) y luego se visualiza como se describe anteriormente. Beta-Actina (Sigma, cat. # A5316, 1: 20000 y GAPDH (Sigma, cat. # G9295) se probaron como control de carga de muestra.

Resumen de resultados y conclusiones:

[0239] Como se muestra en la figura 2, a los 15 minutos después de la incubación, mientras que todos los agonistas de TrkB Ab mostraron la activación de la vía MAPK/ERK y PI3K/Akt, solo BDNF y H4H9814P mostraron fosforilación de TrkB. 2 horas después de la incubación, todos los agonistas de TrkB Abs mostraron activación de TrkB.

Ejemplo 10. Efecto de los anticuerpos anti-TrkB agonistas sobre la supervivencia de cultivo in vitro de la línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano de células SH-SY5Y:

[0240] Línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y (Sigma ATCC # 94030304, cat. # 11C016) las células se cultivaron en placas en medios de crecimiento que contenían DMEM: FI2 (Invitrogen cat # 11330), Pen/Strep (Invitrogen cat. # 15140), FBS 10% (Invitrogen cat # 10082-147) a 37° C en 5% de CO₂. En el pase 23-27, las células se sembraron en placas de 96 pocillos en medios de diferenciación que contenían ácido retinoico 10 uM todo trans (Alfa Aesar cat. # 44540), DMEM: FI2 (Invitrogen cat # 11330), Pen/Strep (Invitrogen cat # 15140), FBS 10% (Invitrogen cat # 10082-147). Las células (30K/pocillo) se diferenciaron durante 4 días. Los anticuerpos se cribaron en un bioensayo de supervivencia en donde el cultivo se cambió a medios de diferenciación libres de suero (100 ul/pocillo) que contenían diferentes dosis de anticuerpos (100-0.01 ug/ml). Después de 2 días se agregó reactivo CCK8 (Dojindo, cat. # CK04) (10 ul/pocillo), las placas se incubaron durante 3-4 horas, se midió la OD

a 450 nm (Victor o FlexStation III) para determinar el porcentaje de células supervivientes. Los datos se normalizaron a los medios libres de suero sin tratamiento. Tratamiento sin suero sin anticuerpos = 100% de supervivencia

Resumen de resultados y conclusiones:

[0241] Como se muestra en la figura 3 y la Tabla 23, todos los anticuerpos agonistas TrkB de la invención mostraron un aumento significativo dependiente de la dosis en la supervivencia de las células SH-SY5Y en comparación con el anticuerpo de control de isotipo negativo ($p < 0.0001$ por ANOVA de dos vías)

Tabla 24

Promedio % supervivencia				
Dosis ug/ml	H4H9816P-L1	H4H9780P-L1	H4H9814P-L1	REGN1945-L14 (control de isotipo negativo)
100	116.7	119.7	114.5	97.1
10	122.3	125.3	116.6	97.7
1	120.2	121.7	116.0	92.5
0.1	113.9	116.4	116.3	92.9
0.01	98.0	103.0	97.0	93.6

Ejemplo 11. Evaluación farmacocinética de un anticuerpo anti-TrkB en ratones humanizados TrkB y WT

[0242] La evaluación de la farmacocinética de un anticuerpo anti-TrkB, H4H9816P2 se realizó en ratones TrkB humanizados (ratones homocigotos para la expresión de TrkB humano, TrkB^{hu/hu}) y ratones WildType (WT). Las cohortes contenían 5 ratones por cepa de ratón. Todos los ratones recibieron una única dosis subcutánea (SC) de 10 mg/kg. Se recogieron muestras de sangre a las 6 horas y 1, 2, 3, 6, 9, 16, 21 y 30 días después de la dosificación. La sangre se procesó en suero y se congeló a -80° C hasta su análisis.

[0243] Las concentraciones circulantes de anticuerpos se determinaron mediante análisis de anticuerpos IgG4/hlgG1 humanos totales usando Gyrolab xPlore™ (Gyros, Uppsala, Suecia). Brevemente, el anticuerpo monoclonal específico de IgG4/IgG1 un antihumano de ratón biotinilado (REGN2567) diluido a 100 µg/ml en tampón de dilución de anticuerpos (Tween-20 + PBS al 0.05%) se capturó en un CD Gyrolab Bioaffy 200, que contenía columnas de afinidad precargadas con perlas recubiertas de estreptavidina (Dynospheres™).

El estándar utilizado para la calibración en este ensayo fue H4H9816P a concentraciones que varían de 0.488 a 2000 ng/ml en tampón de dilución (0.5% BSA + PBS) que contiene 0.1% de suero de ratón normal (NMS). Las muestras de suero se diluyeron 1: 100 en el tampón de dilución de anticuerpos. Se detectó IgG humano capturado en las columnas de afinidad recubiertas con anti-REGN2567 en el CD, corridas a temperatura ambiente, mediante la adición de 0.5 µg/ml de anticuerpo monoclonal kappa antihumano de ratón conjugado Alexa-647 (REGN654) diluido en tampón de detección (Tampón Rexpip F); y la señal fluorescente resultante fue registrada en unidades de respuesta (RU) por el instrumento GyroLab xPlore. Las concentraciones de la muestra se determinaron por interpolación a partir de una curva estándar que se ajustó usando un ajuste de curva logística de 5 parámetros usando el software Gyrolab Evaluator. Se usaron concentraciones promedio de 2 experimentos replicados para el análisis PK posterior.

[0244] Los parámetros PK se determinaron mediante análisis no compartimental (NCA) utilizando Software Phoenix® WinNonlin® Versión 6.3 (Certara, L.P., Princeton, NJ) y un modelo de dosificación extravascular. Usando los valores de concentración media respectivos para cada anticuerpo, todos los parámetros de PK, incluida la concentración máxima observada en suero (C_{max}), la vida media estimada observada ($t_{1/2}$) y el área bajo la curva de concentración frente al tiempo hasta la última concentración medible ($AUC_{último}$) se determinaron utilizando una regla trapezoidal lineal con interpolación lineal y ponderación uniforme.

Resumen de resultados y conclusiones:

[0245] Después de la administración de 10 mg/kg s.c. del anticuerpo anti-TrkB, H4H9816P2, se observaron concentraciones máximas similares (C_{max}) de anticuerpo el día 1 o 2 en ratones TrkB^{hu/hu} y WT (135 y 131 g/ml, respectivamente, ver Tabla 26). Para el día 9, H4H9816P2 exhibió una eliminación más pronunciada del fármaco en ratones TrkB^{hu/hu} que en ratones WT, lo que indica un efecto mediado por el objetivo. Las concentraciones de anticuerpos del día 30 fueron aproximadamente 35 veces menores en ratones TrkB^{hu/hu}. La exposición a anticuerpos ($AUC_{último}$) para H4H9816P2 en ratones WT fue ~ 1.7 veces mayor que la observada en ratones TrkB^{hu/hu} (1730 y 1020 d * µg / ml, respectivamente). Los ratones WT también exhibieron un aumento de aproximadamente 3 veces en la vida media ($T_{1/2}$) sobre ratones TrkB^{hu/hu} (8.4 y 2.9 días, respectivamente).

[0246] En la Tabla 25 se sintetiza un resumen de los datos de las concentraciones totales de anticuerpos anti-TrkB, los parámetros de PK promedios se describen en la Tabla 26 y las concentraciones de anticuerpos totales promedio frente al tiempo se muestran en la Figura 4.

Tabla 25: Concentraciones promedio ($\pm$ DE) de IgG total en suero después de una inyección subcutánea única de 10 mg/kg de H4H9816P2 en ratones TrkB^{hu/hu} y WildType con el tiempo

Anticuerpo	Tiempo (d)	Concentración de mAb Total en suero de ratón	
		10 mg/kg	
		Promedio (µg/ml)	+/- DE
Ratones TrkB ^{hu/hu}	0.25	72.42	4.06
	1	132.0	18.0
	2	124.9	15.9
	3	113.4	11.8
	6	78.72	9.98
	9	37.74	14.0
	16	5.592	4.97
	21	2.060	2.11
	30	0.447	0.506
Ratones WildType	0.25	56.73	14.5
	1	120.8	6.26
	2	131.2	7.54
	3	125.7	7.46
	6	101.9	11.4
	9	75.94	7.06
	16	42.61	16.1
	21	27.75	16.9
	30	15.52	13.0

Abreviaturas: Tiempo = Tiempo en días después de la inyección de dosis única; d = día de estudio; DE = desviación estándar.

Tabla 26: Resumen de parámetros farmacocinéticos

Parámetros	Unidades	H4H9816P2	
		Ratones TrkB ^{hu/hu}	Ratones WildType
C _{max}	µg/ml	135 ± 15	131 ± 7.5
T _{max}	d	1.4 ± 0.56	2.0 ± 0
T _{1/2}	d	2.94 ± 1.1	8.36 ± 3.9
AUC _{último}	d•µg/ml	1020 ± 150	1730 ± 310

Los parámetros PK se derivaron de los perfiles de concentración promedio versus tiempo. T_{1/2} y AUC_{último} se basan en concentraciones hacia el día 30.

Abreviaturas: C_{max} = concentración máxima; AUC = Área bajo la curva de concentración-tiempo; AUC_{último} = AUC calculado desde el tiempo cero hasta el tiempo de la última concentración positiva; T_{1/2} = vida media terminal de eliminación; T_{max} = el tiempo después de la administración del anticuerpo cuando se alcanza la concentración sérica máxima

Ejemplo 12: Capacidad de los anticuerpos monoclonales anti-TrkB de ratón para bloquear la interacción entre TrkB de ratón o rata y su ligando BDNF (Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro).

[0247] Los anticuerpos monoclonales anti-TrkB de ratón (mAbs) se generaron inmunizando ratones humanizados TrkB con proteína TrkB de ratón. Los tres mAbs principales identificados a partir de esta inmunización son; M2aM14173N, M2aM14178N y M2aM14179N. Los mAbs principales de la invención se caracterizaron por su capacidad para bloquear la interacción de TrkB de ratón o rata con BDNF unido a placa en un ELISA de bloqueo.

[0248] Los experimentos se llevaron a cabo utilizando el siguiente procedimiento. El BDNF humano se revistió a una concentración de 0.5 µg/ml (para bloquear la interacción TrkB.hFc de ratón) o 0.3 µg/ml (para bloquear la interacción TrkB.mmh de rata) en PBS en una placa de microtitulación de 96 pocillos y se incubó durante la noche a 4° C. Los sitios de unión inespecíficos se bloquearon posteriormente usando una solución de BSA al 5% (p/v) en PBS (tampón de ensayo). En una placa de dilución de 96 pocillos, se mezclaron TrkB.hFc de ratón de 850 pM o TrkB.mmh de rata con los anticuerpos anti-TrkB

de ratón tres veces diluidos en serie y el anticuerpo de control. Las concentraciones finales de anticuerpos oscilaron entre 1.69 pM y 100 nM. La mezcla de proteína-anticuerpo se incubó a temperatura ambiente (RT) durante 1 hora. La mezcla previamente unida se transfirió por duplicado a placas de microtitulación recubiertas con BDNF. Se incluyó un control que contenía tampón de ensayo solo para calcular la línea de base del ensayo. Las placas ELISA se incubaron a TA durante 1 hora y luego se lavaron con solución de lavado de placas. Se detectó TrkB.hFc de ratón unido a placa con anticuerpo específico de fragmento Fc γ anti-humano de cabra conjugado con HRP (Jackson Immunoresearch) y se detectó TrkB.mmh de rata con anticuerpo anti-histidina conjugado con HRP (Qiagen). Las placas se incubaron con anticuerpo de detección durante 1 hora a TA y luego se lavaron con solución de lavado de placas. Las placas de ensayo se desarrollaron con sustratos colorimétricos TMB de acuerdo con el procedimiento recomendado por el fabricante.

[0249] La absorbancia a 450 nm para cada pocillo se registró y se graficó en función de la concentración de anticuerpo. Los datos se analizaron en el software GraphPad Prism utilizando una ecuación logística de cuatro parámetros sobre una curva de respuesta a la dosis de 11 puntos y se calcularon los valores de IC₅₀. El valor calculado de IC₅₀, definido como la concentración de anticuerpo requerida para reducir el 50% de la unión de TrkB a BDNF, se usó como un indicador de potencia de bloqueo. El porcentaje de bloqueo a la concentración máxima del anticuerpo probado se calculó como un indicador de la capacidad de los anticuerpos para bloquear la unión de TrkB a BDNF en la placa con respecto a la línea de base del ensayo. La señal de unión de TrkB de ratón o rata 850 pM en ausencia del anticuerpo se definió como 100% de unión o 0% de bloqueo. La señal de referencia del tampón de ensayo solo se definió como 0% de unión o 100% de bloqueo.

Resumen de resultados y conclusiones

[0250] La capacidad de los anticuerpos anti-TrkB de ratón para bloquear la unión de TrkB de ratón o rata a BDNF se evaluó usando ELISA de bloqueo.

[0251] Los resultados del bloqueo se resumen en la Tabla 27 y en las Figuras 5A y B. El % de bloqueo se informa para todos los anticuerpos y se calcula a la concentración de anticuerpos más alta (100 nM) probada. Los valores de IC₅₀ se muestran solo para anticuerpos que bloquean > 50% de la unión de TrkB de ratón o rata a BDNF. De los tres anticuerpos de esta invención, el mAb anti-TrkB de ratón, M2aM14178N bloqueó > 50% de la unión de la proteína TrkB de ratón y rata a BDNF. M2aM14178N bloqueó la unión de 850 pM de ratón TrkB.hFc con una IC₅₀ de 426 pM y % de bloqueo del 84.4%. M2aM14178N bloqueó la unión de TrkB.mmh de rata de 850 pM a BDNF con un valor de IC₅₀ de 184 pM y % de bloqueo del 89.5%. M2aM14173N mostró un bloqueo del 29.7% de la unión de TrkB.hFc de ratón de 850 pM a BDNF. M2aM14173N mostró un bloqueo del 80.7% de la unión de TrkB.mmh de rata 850 pM a BDNF con un valor de IC₅₀ de 3.81 nM. M2aM14179N bloqueó el 11.6% de la unión de TrkB.hFc de ratón a BDNF. M2aM14179N mostró un aumento en la unión de TrkB.mmh de rata a BDNF a concentraciones superiores a 1 nM.

[0252] El comparador mAb anti-TrkB de ratón, H1M8037C, bloqueó la unión de 850 pM de ratón TrkB.hFc a BDNF con un valor de IC_{50} de 180 pM y % de bloqueo del 91.5%. H1M8037C bloqueó la unión a TrkB.mmh de rata 850 pM con un valor de IC_{50} de 1.42 nM y % de bloqueo del 83.3%. El control de isotipo mlgG2a mAb, REGN1097, no mostró ningún bloqueo de TrkB de ratón o rata, en condiciones de ensayo idénticas. A concentraciones mayores que 10 nM, REGN1027 mostró un aumento de la unión de TrkB de rata.

Tabla 27: Resumen de los valores de IC_{50} (M) para el bloqueo anti-TrkB de ratón de la unión de TrkB de ratón o rata a BDNF

AbPID	Bloqueo Ab de unión de <u>TrkB.hFc</u> de ratón 780 pM a BDNF recubierta en placa		Bloqueo Ab de unión de <u>TrkB.hFc</u> de rata 780 pM a BDNF recubierta en placa	
	IC_{50} [M]	% de bloqueo con 100nM anticuerpo	IC_{50} [M]	% de bloqueo con 100nM anticuerpo
M2aM14173N	no calculado	29.7	3.81E-09	80.7
M2aM14178N	4.26E-10	84.4	1.84E-10	89.5
M2aM14179N	no calculado	11.6	no calculado	-38.1
H1M8037C (Comparador)	1.80E-10	91.5	1.42E-09	83.3
control de isotipo negativo (REGN1097)	no calculado	Sin bloqueo	no calculado	-9.33
100% de Bloqueo = valor de OD450nm de pocillos con anticuerpo secundario conjugado con HRP en tampón de ensayo solo (sin proteína TrkB de ratón o rata). 0% de bloqueo = valor OD450nm de pocillos con anticuerpo secundario conjugado con HRP en tampón de ensayo en presencia de proteína TrkB de ratón o rata (sin anticuerpo TrkB). El % de bloqueo máximo negativo indica un aumento de la unión de TrkB detectado en presencia de anticuerpo. No calculado = valores IC_{50} no cuantitativos para el bloqueo de anticuerpos < 50% a la concentración más alta probada.				

Ejemplo 13. Capacidad de los anticuerpos monoclonales anti-TrkB humanos para bloquear la interacción entre TrkB humano y sus ligandos naturales BDNF y NT4 humanos.

[0253] La capacidad de los anticuerpos anti-TrkB humanos, designados como H4H9814P, H4H9816P2 y H4H9780P, para bloquear la unión de la proteína TrkB a BDNF capturado en placa o NT-4 se midió usando dos ELISA sándwich de competición. En los ensayos, se premezclaron diversas concentraciones de

anticuerpo anti-TrkB con una cantidad constante de proteína TrkB dimérica y se calculó la reducción de la unión de TrkB a la placa BDNF o NT-4 inmovilizada, debido a la presencia del anticuerpo.

[0254] La proteína TrkB dimérica recombinante utilizada en los experimentos estaba comprendida por una porción del dominio extracelular humano TrkB (aa Cys32-His430) expresado con la porción Fc de la IgG1 humana en el extremo c (hTrkB-hFc; # de acceso NP_006171.2, peso molecular 69.700 daltons).

Las proteínas BDNF y NT-4 estaban comprendidas por el dominio extracelular de BDNF humano (aa His129-Arg247, # de acceso P23560, R&D Systems) o NT-4 (aa Gly81-Ala210, # de acceso P34130, R&D Systems), respectivamente. Se incluyeron dos controles de anticuerpos de isotipo, un anticuerpo IgG4 humano anti-Fe1 d 1 y un anticuerpo específico para el anticuerpo a-Fe 1 d 1 con IgG1 de ratón, como controles para la detección de fondo de IgG.

[0255] Los experimentos se llevaron a cabo utilizando el siguiente procedimiento. BDNF humano o NT-4 se revistieron por separado a una concentración de 0.5 µg/ml o 2 µg/ml, respectivamente, en PBS en una placa de microtitulación de 96 pocillos durante la noche a 4° C. Los sitios de unión inespecíficos se bloquearon posteriormente usando solución de BSA en PBS. La solución de bloqueo y el tampón de dilución contenían una solución de BSA al 5% (p/v) en PBS para el ensayo con recubrimiento BDNF, o una solución de BSA al 0.5% (p/v) en PBS para el ensayo con recubrimiento NT-4. En placas de microtitulación separadas, se añadió una cantidad constante de 500 pM de proteína hTrkB-hFc a diluciones en serie de anticuerpos con concentraciones finales que varían de 1.7 pM a 10 nM y soluciones sin anticuerpos presentes. (La concentración constante de hTrkB-hFc para los ensayos de inhibición de anticuerpos se seleccionó desde el punto medio aproximado dentro de la porción lineal de las curvas de unión individuales de hTrkB-hFc a hBDNF o hNT-4 recubiertos con placa). Después de una hora de incubación a temperatura ambiente, los complejos de anticuerpo-proteína con una concentración constante de 500 pM de proteína hTrkB-hFc se transfirieron a placas de microtitulación recubiertas con hBDNF o hNT-4. Después de una hora de incubación a temperatura ambiente, los pocillos se lavaron y se detectó hTrkB-hFc unido a la placa con anticuerpos policlonales de cabra específicos para fragmentos Fc γ antihumanos conjugados con peroxidasa de rábano picante (JacksonImmunoResearch). La placa se desarrolló luego utilizando una solución de sustrato TMB (BD Biosciences) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas Victor (PerkinElmer™).

[0256] El análisis de datos se realizó utilizando un modelo de dosis-respuesta sigmoidal dentro del software Prism™ (GraphPad). El valor calculado de IC₅₀, definido como la concentración de anticuerpo requerida para reducir el 50% de la unión de hTrkB-hFc a hBDNF o hNT-4, se usó como un indicador de la potencia de bloqueo. El porcentaje de bloqueo a la concentración máxima del anticuerpo probado se calculó como un indicador de la capacidad de los anticuerpos para bloquear la unión de 500 pM de hTrkB-hFc a hBDNF o hNT-4 en la placa, en relación con la línea de base del ensayo. En el cálculo, la señal de unión de la muestra de 500 pM de hTrkB-hFc sin la presencia del anticuerpo fue referenciada como 100% de unión o 0% de bloqueo; y la señal de

referencia de la muestra de tampón sin hTrkB-hFc o el anticuerpo se referenciaba como 0% de unión o 100% de bloqueo.

Resumen de resultados y conclusiones:

[0257] La capacidad de los anticuerpos anti-TrkB para bloquear la unión de TrkB a BDNF o NT-4 se evaluó mediante dos ELISA de sándwich de competición. La unión de TrkB-hFc humano a hBDNF o hNT-4 recubierto en placas de microtitulación de 96 pocillos, en presencia de anticuerpos diluidos en serie o sin controles de anticuerpos, se detectó con anticuerpos policlonales de cabra específicos de fragmentos Fcy antihumanos conjugados con HRP. Los valores de IC_{50} se calcularon y utilizaron como el indicador de potencia del anticuerpo que bloquea la unión de hTrkB-hFc a hBDNF o hNT-4. Además, se calculó y comparó el bloqueo máximo de 500 pM hTrkB-hFc con cada anticuerpo a la concentración más alta probada.

[0258] Los resultados del bloqueo se resumen en la Tabla 28. El % de bloqueo se reporta para todos los anticuerpos y se calcula a la concentración de anticuerpo más alta probada de 100 nM. El % de bloqueo negativo indica un aumento de la unión a TrkB detectado en presencia de anticuerpos. Los valores de IC_{50} se muestran para el bloqueo de anticuerpos > 50% de la unión de TrkB a BDNF o NT-4. Los valores de IC_{50} no son cuantitativos para el bloqueo de anticuerpos < 50% y se reportó como (-).

[0259] A la concentración más alta de anticuerpos probada, uno (H4H9780P) de los tres anticuerpos anti-TrkB bloqueó > 50% hTrkB que se une a los ligandos BDNF o NT-4 con valores de IC_{50} de 150 pM y 180 pM, respectivamente, con un porcentaje de bloqueo a 100 nM de 93% para BDNF y 80% para NT-4. A 3.7 nM, este anticuerpo bloqueó la unión de 500 pM hTrkB-hFc a NT-4 con un 99%. La disminución del % de bloqueo a las concentraciones más altas probadas puede atribuirse a la unión no específica de H4H9780P a la placa de microtitulación y a la detección de esta unión con anticuerpos policlonales específicos de fragmentos Fcy antihumanos conjugados con HRP.

[0260] Dos de los tres anticuerpos anti-TrkB (H4H9814P y H4H9816P2) y los anticuerpos de control de bloqueo irrelevantes bloquearon < 50% de la unión de hTrkB a BDNF o NT-4. El comparador bloqueó la unión de 500 pM hTrkB-hFc > 50% a BDNF y NT-4.

Tabla 28

Ab PID	Ab bloquea la unión de 500pM hTrkB-hFc a hBDNF recubierto con placa		Ab bloquea la unión de 500pM hTrkB-hFc recubierto con placa hNT-4	
	IC_{50} (M)	% de bloqueo con 100nM de	IC_{50} (M)	% de bloqueo con 100nM de

		anticuerpo		anticuerpo
H4H9814P	-	6	-	38
H4H9816P2	-	-56	-	-123
H4H9780P	1.5E-10	93	1.8E-10	80*
CONTROLES				
a-TrkB-mIgG1 (H1M8037C comparador)	1.7E-10	97	4.5E-11	95
Control de isotipo negativo de hIgG4	-	-31	-	-45
Control de isotipo negativo de mIgG1	-	-19	-	-14

(*) Bloqueado 99% a una concentración de anticuerpo 3.7nM H4H9780P.

Ejemplo 14. Competición cruzada en Octet entre diferentes anticuerpos monoclonales anti-hTrkB

[0261] Para evaluar si dos anticuerpos compiten entre sí por la unión a sus epítopos en hTrkB-mmh, se determinó la competencia de unión entre los anticuerpos monoclonales anti-hTrkB usando un ensayo de interferometría de biocapa sin etiqueta en tiempo real en un biosensor Octet RED384 (Pall ForteBio Corp.). Los experimentos de competencia cruzada se realizaron a 25° C en HEPES 0.01 M pH7.4, NaCl 0.15M, EDTA 3.4mM, tensioactivo Tween-20 0.05% v/v, BSA 0.1 mg/ml (tampón HBS-EP) con la placa agitándose a la velocidad de 1000 rpm. Todos los anticuerpos anti-hTrkB y las soluciones de hTrkB-mmh probados se prepararon en tampón Octet HBS-EP. Para evaluar si 2 anticuerpos pudieron competir entre sí por la unión a sus respectivos epítopos en hTrkB-mmh, aproximadamente ~0.14 - 0.24 nm de hTrkB-mmh se capturaron primero en puntas de biosensor Octet recubiertas con anti-His de pocillos que contenían 50 µg/ml de hTrkB-mmh durante 5 minutos. Las puntas de biosensor Octet capturadas con hTrkB-mmh se saturaron sumergiéndolas durante 5 minutos en pocillos que contenían 50 ug/ml del primer anticuerpo monoclonal anti-hTrkB (en lo sucesivo denominado mAb-1), seguido de sumergirlas en pocillos que contenían el segundo anticuerpo monoclonal anti-HTrkB (en lo sucesivo denominado mAb-2) durante 5 minutos adicionales. Entre los pasos, las puntas del biosensor Octet se lavaron en tampón HBS-EP durante 30 segundos.

[0262] La respuesta de unión en tiempo real se controló durante el transcurso del experimento y se registró la respuesta de unión al final de cada paso. Se comparó la respuesta de la unión de mAb-2 a hTrkB.mmh precomplejado con mAb-1 y se determinó el comportamiento competitivo/no competitivo de diferentes anticuerpos monoclonales anti-hTrkB usando un umbral de inhibición del 60%.

[0263] La Tabla 29 define explícitamente las relaciones de los anticuerpos que compiten en ambas direcciones, independientemente del orden de unión.

Resultados:

Tabla 29: Competencia cruzada de anticuerpos anti-hTrkB para la unión a hTrkB.mmh humano.

mAb-1	mAb-2
H4H9814P	H4H9816P2
	H4H9814P
H4H9816P2	H4H9814P
	H4H9816P2
H4H9780P	H4H9780P
H1M8037C	H1M8037C
(comparador)	(comparador)

Ejemplo 15. Cinética de unión Biacore de anticuerpos monoclonales anti-TrkB de ratón sustitutos que se unen a diferentes reactivos TrkB medidos a 25° C

[0264] Para evaluar si dos anticuerpos compiten entre sí por la unión a sus epítopos en mTrkB-mmh, se determinó la competencia de unión entre los anticuerpos monoclonales anti-mTrkB usando un ensayo de interferometría de biocapa sin marcador en tiempo real en un biosensor Octet HTX (Pall ForteBio Corp.). Los experimentos de competencia cruzada se realizaron a 25° C en HEPES 0.01 M pH 7.4, NaCl 0.15M, EDTA 3.4 mM, 0.05% v/v tensioactivo Tween-20, 0.1 mg/ml BSA (tampón HBS-EP) con la placa agitándose a la velocidad de 1000 rpm. Todos los anticuerpos anti-mTrkB y las soluciones mTrkB-mmh probadas se prepararon en tampón Octet HBS-EP. Para evaluar si 2 anticuerpos fueron capaces de competir entre sí para unirse a sus respectivos epítopos en mTrkB-mmh, aproximadamente ~0.20 - 0.27 nm de mTrkB-mmh se capturaron por primera vez en puntas de biosensor Octet

recubiertas con anti-His de pocillos que contenían 20 µg/ml de mTrkB-mmh durante 5 minutos. Las puntas de biosensor Octet capturadas con mTrkB-mmh se saturaron sumergiéndolas durante 5 minutos en pocillos que contenían 50 ug/ml del primer anticuerpo monoclonal anti-mTrkB (denominado en lo sucesivo mAb-1), seguido de sumergirlas en los pocillos que contenían el segundo anticuerpo monoclonal anti-mTrkB (en lo sucesivo denominado mAb-2) durante 3 minutos adicionales. Entre los pasos, las puntas del biosensor Octet se lavaron en tampón HBS-EP durante 30 segundos.

[0265] La respuesta de unión en tiempo real se controló durante el transcurso del experimento y se registró la respuesta de unión al final de cada paso. Se comparó la respuesta de la unión de mAb-2 a mTrkB.mmh precomplejado con mAb-1 y se determinó el comportamiento competitivo/no competitivo de diferentes anticuerpos monoclonales anti-mTrkB usando un umbral de inhibición del 50%.

[0266] La Tabla 30 define explícitamente las relaciones de los anticuerpos que compiten en ambas direcciones, independientemente del orden de unión.

Resultados:

Tabla 30: Competencia cruzada de anticuerpos anti-mTrkB para la unión a hTrkB.mmh de ratón.

mAb-1	mAb-2
M2aM14173N	M2aM14178N
	M2aM14173N
M2aM14178N	M2aM14173N
	M2aM14178N
M2aM14179N	M2aM14179N
H1M8037C	H1M8037C
(comparador)	(comparador)

Ejemplo 16: Bloqueo de Octet: bloqueo de anticuerpos anti-TrkB humanos o anti-TrkB de ratón para que no se unan a TrkB por BDNF o NT-4

Experimento 1.

[0267] El bloqueo de anticuerpos anti-TrkB humanos o anti-TrkB de ratón para que no se unan a TrkB por BDNF o NT-4 se evaluó usando un instrumento Octet HTX basado en interferometría de biocapa en tiempo real (BLI). Todo el

estudio se realizó en HEPES 10 mM pH 7.4, NaCl 300 mM, EDTA 3 mM, BSA 1 mg/ml, NaN₃ 0.02% y tensioactivo 0.05% v/v Tween-20 (tampón de migración HBS-EBT) a 25° C. Todas las muestras se dispensaron en una placa de pocillo inclinada 384 y la placa se colocó en el agitador orbital con la velocidad de agitación de 1000 ml. hTrkB.mFc se capturó en sensores Octet anti-mFc (AMC) mientras que hTrkB.hFc o mTrkB.hFc se capturaron en sensores Octet anti-hFc (AHC) sumergiéndolos en pocillos que contenían 10 µg/ml de reactivos TrkB durante 2 minutos. Los biosensores Octet capturados hTrkB.mFc o hTrkB.hFc se saturaron sumergiéndolos en pocillos que contenían 20 nM de BDNF, hNT-4 o mNT-4 durante 2 minutos, seguidos de sumergir biosensores Octet en pocillos que contenían 300 nM de mAb TrkB diferentes durante 4 minutos. La unión de los mAb TrkB al complejo de TrkB y BDNF, hNT-4 o mNT-4 se determinó usando el software de análisis Scrubber 2.0c.

[0268] La unión de cualquier anticuerpo anti-TrkB humano o anti-TrkB de ratón de esta invención no fue bloqueada tanto por BDNF como por NT-4 como se reportó en la Tabla 31 y la Tabla 32.

Tabla 31: Unión de anticuerpos monoclonales anti-TrkB humanos al complejo de hTrkB-mFc y BDNF o NT-4 humano.

			Unión de anticuerpo anti-TrkB humano (nm)		
Superficie de captura	Nivel de captura (nm)	mAb	No Ligando	Saturación BDNF (0.05 ± 0.007) nm	Saturación hNT-4 (0.05 ± 0.006) nm
hTrkB.mFc	0.29 ± 0.01	REGN1945 (control de isotipo negativo)	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		H4H9780P	0.18 ± 0.01	0.20 ± 0.014	0.2 ± 0.007
		H4H9814P	0.18 ± 0.01	0.22 ± 0.006	0.23 ± 0.00
		H4H9816P2	0.19 ± 0.00	0.26 ± 0.007	0.24 ± 0.007
hTrkB.hFc	0.47 ± 0.01	H1M8037C (Comparador)	0.38 ± 0.01	0.07 ± 0.00	0.10 ± 0.006
Los valores de los anticuerpos anti-TrkB humanos que se unen al complejo de hTrkB.mFc o hTrkB.hFc con BDNF o hNT-4 representan un promedio de respuesta de unión medida usando 3 biosensores Octet independientes junto con la desviación estándar. La unión de BDNF o hNT-4 a hGFRa3.mFc no inhibió la unión de ningún anticuerpo anti-TrkB humano.					

Tabla 32: Unión de anticuerpos monoclonales anti-TrkB de ratón al complejo de mTrkB-hFc y BDNF o NT-4 de ratón.

			Unión de anticuerpo anti-TrkB de ratón (nm)		
Superficie de captura	Nivel de captura (nm)	mAb	No Ligando	Saturación BDNF (0.07 ± 0.006) nm	Saturación mNT-4 (0.07 ± 0.005) nm
mTrkB.hFc	0.47 ± 0.01	REGN1318 (control de isotipo negativo)	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.006
		M2aM14173N	0.42 ± 0.006	0.38 ± 0.006	0.4 ± 0.00
		M2aM14178N	0.47 ± 0.00	0.35 ± 0.007	0.41 ± 0.006
		M2aM14179N	0.42 ± 0.006	0.44 ± 0.006	0.43 ± 0.006
		H1M8037C (Comparador)	0.42 ± 0.006	0.06 ± 0.006	0.11 ± 0.00
Los valores de los anticuerpos anti-TrkB de ratón que se unen al complejo de mTrkB.mFc con BDNF o mNT-4 representan un promedio de respuesta de unión medida usando 3 biosensores Octet independientes junto con la desviación estándar. La unión de BDNF o mNT-4 a mGFRa3.hFc no inhibió la unión de ningún anticuerpo anti-TrkB de ratón.					

Experimento 2.

[0269] El bloqueo de BDNF o NT-4 de la unión a TrkB por anticuerpos anti-TrkB humanos o anti-TrkB de ratón se evaluó usando un instrumento Octet HTX basado en interferometría de biocapa (BLI) en tiempo real. Todo el estudio se realizó en HEPES 10 mM pH 7.4, NaCl 300 mM, EDTA 3 mM, BSA 1 mg/ml, NaN₃ 0.02% y tensioactivo Tween-20 0.05% v/v (tampón de migración HBS-EBT) a 25° C. Todas las muestras se dispensaron en una placa de pocillo inclinado 384 y la placa se colocó en el agitador orbital con la velocidad de agitación de 1000 rpm. hTrkB.mFc se capturó en sensores Octet anti-mFc (AMC) mientras que hTrkB.hFc o mTrkB.hFc se capturaron en sensores Octet anti-hFc (AHC) sumergiéndolos en pocillos que contenían 10 µg/ml de reactivos TrkB durante 2 minutos. Los biosensores Octet capturados hTrkB.mFc o hTrkB.hFc se saturaron sumergiéndolos en pocillos que contenían 300 nM de mAb TrkB diferentes durante 4 minutos, seguidos de la inmersión de

biosensores Octet en pocillos que contenían 20 nM de BDNF, hNT-4 o mNT-4 durante 2 minutos. La unión de BDNF, hNT-4 o mNT-4 al complejo de TrkB y diferentes mAb de TrkB se determinó usando el software de análisis Scrubber 2.0c

[0270] La unión de 1 de 3 anticuerpos anti-TrkB humanos de esta invención bloqueó la unión de BDNF y hNT-4 como se reportó en la Tabla 33. La unión de 1 de 3 anticuerpos anti-TrkB de ratón de esta invención bloqueó parcialmente la unión de BDNF y mNT-4 como se reportó en la Tabla 34.

Tabla 33: Unión de BDNF o NT-4 humano al complejo de hTrkB-mFc y anticuerpos monoclonales anti-TrkB humanos.

			Unión BDNF		Unión hNT-4	
Superficie de captura	Nivel de captura (nm)	mAb	UNIÓN mAb (nm)	BDNF	Unión mAb (nm)	hNT-4
hTrkB.mFc	0.28 ± 0.01	No mAb	N/A	0.05 ± 0.007	N/A	0.04 ± 0.005
		REGN1945 (Control de isotipo negativo)	0.01 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.033 ± 0.006
		H4H9780P	0.18 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.18 ± 0.01	0.007 ± 0.006
		H4H9814P	0.18 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.18 ± 0.01	0.04 ± 0.00
		H4H9816P2	0.19 ± 0.00	0.057 ± 0.006	0.18 ± 0.01	0.043 ± 0.006
hTrkB.hFc	0.48 ± 0.01	H1M8037C (Comparador)	0.38 ± 0.01	-0.017 ± 0.006	0.39 ± 0.01	-0.013 ± 0.006
Los valores de unión de BDNF o hNT-4 al complejo de hTrkB.mFc o hTrkB.hFc con anticuerpos anti-TrkB humanos representan un promedio de respuesta de unión medida usando 3 biosensores Octet independientes junto con la desviación estándar. La unión de H4H9780P a hGFRa3.mFc bloqueó la unión de BDNF y hNT-4.						

Tabla 34: Unión de BDNF o NT-4 de ratón al complejo de anticuerpos monoclonales mTrkB-hFc y anti-TrkB de ratón.

			Unión BDNF		Unión hNT-4	
Superficie de captura	Nivel de captura (nm)	mAb	Unión mAb (nm)	BDNF	Unión mAb (nm)	hNT-4
mTrkB.hFc	0.48 ± 0.01	No mAb	N/A	0.07 ± 0.01	N/A	0.07 ± 0.005
		REGN1318 (Control de isotipo negativo)	0.01 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.06 ± 0.00
		M2aM14173N	0.42 ± 0.006	0.07 ± 0.00	0.413 ± 0.006	0.06 ± 0.00
		M2aM14178N	0.47 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.47 ± 0.01	0.033 ± 0.006
		M2aM14179N	0.42 ± 0.006	0.07 ± 0.00	0.41 ± 0.00	0.06 ± 0.00
		H1M8037C (Comparador)	0.42 ± 0.006	-0.017 ± 0.006	0.40 ± 0.00	-0.02 ± 0.00
Los valores de unión de BDNF o mNT-4 al complejo de mTrkB.hFc y anticuerpos anti-TrkB de ratón representan un promedio de respuesta de unión medida usando 3 biosensores Octet independientes junto con la desviación estándar. La unión de M2aM14178N a mTrkB.hFc bloqueó parcialmente la unión de BDNF y mNT-4.						

[0271] El presente invento no tiene un alcance limitado por las realizaciones específicas descritas aquí. De hecho, diversas modificaciones de la invención además de las descritas en el presente documento resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y las figuras que se acompañan. Dichas modificaciones están destinadas a caer dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.