

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-545781
(P2008-545781A)

(43) 公表日 平成20年12月18日(2008.12.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28 Z N A	4 B O 2 4
C12P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 B O 6 4
C12N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 B	4 B O 6 5
C12N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	4 C O 8 5
A61K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 54 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-515819 (P2008-515819)
 (86) (22) 出願日 平成18年6月5日 (2006.6.5)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年2月4日 (2008.2.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/021878
 (87) 国際公開番号 W02006/133164
 (87) 国際公開日 平成18年12月14日 (2006.12.14)
 (31) 優先権主張番号 60/687,705
 (32) 優先日 平成17年6月6日 (2005.6.6)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

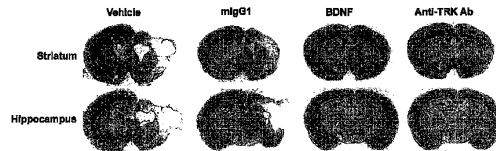
(71) 出願人 591011502
 ワイス
 W y e t h
 アメリカ合衆国07940-0874ニュー
 ジャージー州 マディソン、ファイブ・
 ジラルダ・ファームズ
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100084146
 弁理士 山崎 宏
 (74) 代理人 100116311
 弁理士 元山 忠行
 (74) 代理人 100122301
 弁理士 富田 憲史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗TrkBモノクローナル抗体およびその使用

(57) 【要約】

本発明は、ヒトTrkBに対するモノクローナル抗体を提供する。特定の実施態様において、本発明の抗体は、ヒトTrkBと結合し、そしてそれを活性化する。特定の実施態様において、本発明の抗体は、それらがヒトTrkAまたはヒトTrkCと結合しない(または、それを活性化しない)という点でヒトTrkBに選択的である。いくつかの実施態様において、本発明のモノクローナル抗体は、マウスTrkBと交差反応する。本発明の抗体のヒト化または張り合わせ型もまた含まれる。本発明の抗体を含む医薬組成物が、本発明の抗体を製造する方法および処置、検出または精製目的のためのこれらの使用方法と同様に提供される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト Trk B に結合するモノクローナル抗体。

【請求項 2】

ヒト Trk B との結合が約 10 pM ~ 約 500 nM の範囲の ED₅₀ を有する、請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 3】

ヒト Trk B との結合が約 10 pM ~ 約 1 nM の範囲の ED₅₀ を有する、請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 4】

ヒト Trk B との結合が約 10 pM ~ 約 100 pM の範囲の ED₅₀ を有する、請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 5】

ヒト Trk B との結合が約 10 pM ~ 約 50 pM の範囲の ED₅₀ を有する、請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 6】

モノクローナル抗体が、約 10 pM ~ 約 500 nM の範囲の EC₅₀ でヒト Trk B を活性化する、請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 7】

モノクローナル抗体が、約 10 pM ~ 約 1 nM の範囲の EC₅₀ でヒト Trk B を活性化する、請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 8】

モノクローナル抗体が、約 10 pM ~ 約 100 pM の範囲の EC₅₀ でヒト Trk B を活性化する、請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 9】

モノクローナル抗体が、約 10 pM ~ 約 50 pM の範囲の EC₅₀ でヒト Trk B を活性化する、請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 10】

モノクローナル抗体がヒト Trk A に結合しない、および / またはヒト Trk A を活性化しない、請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 11】

モノクローナル抗体が、約 1 nM より高い抗体濃度で、ヒト Trk A との検出可能な結合を示さない、および / またはヒト Trk A のいかなる検出可能な活性化も引き起こさない、請求項 10 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 12】

モノクローナル抗体が、約 10 nM より高い抗体濃度で、ヒト Trk A との検出可能な結合を示さない、および / またはヒト Trk A のいかなる検出可能な活性化も引き起こさない、請求項 10 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 13】

モノクローナル抗体が、約 100 nM より高い抗体濃度で、ヒト Trk A との検出可能な結合を示さない、および / またはヒト Trk A のいかなる検出可能な活性化も引き起こさない、請求項 10 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 14】

モノクローナル抗体が、約 1 μM より高い抗体濃度で、ヒト Trk A との検出可能な結合を示さない、および / またはヒト Trk A のいかなる検出可能な活性化も引き起こさない、請求項 10 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 15】

モノクローナル抗体がヒト Trk C と結合しない、および / またはヒト Trk C を活性化しない、請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 16】

10

20

30

40

50

モノクローナル抗体が、約 1 nM より高い抗体濃度で、ヒト Trk C との検出可能な結合を示さない、および / またはヒト Trk C のいかなる検出可能な活性化も引き起こさない、請求項 15 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 17】

モノクローナル抗体が、約 10 nM より高い抗体濃度で、ヒト Trk C との検出可能な結合を示さない、および / またはヒト Trk C のいかなる検出可能な活性化も引き起こさない、請求項 15 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 18】

モノクローナル抗体が、約 100 nM より高い抗体濃度で、ヒト Trk C との検出可能な結合を示さない、および / またはヒト Trk C のいかなる検出可能な活性化も引き起こさない、請求項 15 記載のモノクローナル抗体。

10

【請求項 19】

モノクローナル抗体が、約 1 μ より高い抗体濃度で、ヒト Trk C との検出可能な結合を示さない、および / またはヒト Trk C のいかなる検出可能な活性化も引き起こさない、請求項 15 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 20】

モノクローナル抗体がヒト Trk C と結合しない、および / または Yrk C を活性化しない、請求項 10 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 21】

モノクローナル抗体が BDNF とヒト Trk B との間の結合をブロックする、請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

20

【請求項 22】

モノクローナル抗体が、約 100 pM ~ 約 500 nM の範囲の IC₅₀ で BDNF とヒト Trk B との間の結合をブロックする、請求項 21 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 23】

モノクローナル抗体が、約 100 pM ~ 約 1 nM の範囲の IC₅₀ で BDNF とヒト Trk B との間の結合をブロックする、請求項 21 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 24】

モノクローナル抗体が、約 100 pM ~ 約 500 pM の範囲の IC₅₀ で BDNF とヒト Trk B との間の結合をブロックする、請求項 21 記載のモノクローナル抗体。

30

【請求項 25】

モノクローナル抗体が BDNF とヒト Trk B との間の結合をブロックしない、請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 26】

モノクローナル抗体が、約 1 nM より高い抗体濃度で、検出可能なブロック活性を示さない、請求項 25 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 27】

モノクローナル抗体が、約 10 nM より高い抗体濃度で、検出可能なブロック活性を示さない、請求項 25 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 28】

モノクローナル抗体が、約 100 nM より高い抗体濃度で、検出可能なブロック活性を示さない、請求項 25 記載のモノクローナル抗体。

40

【請求項 29】

モノクローナル抗体が、約 1 μ M より高い抗体濃度で、検出可能なブロック活性を示さない、請求項 25 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 30】

モノクローナル抗体が IgG1 アイソタイプを有する、請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 31】

モノクローナル抗体が IgG2a アイソタイプを有する、請求項 1 記載のモノクローナ

50

ル抗体。

【請求項 32】

モノクローナル抗体が I g G 2 b アイソタイプを有する、請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 33】

モノクローナル抗体がマウス T r k B と結合する、および/またはマウス T r k B を活性化する、請求項 1 ~ 32 のいずれか 1 項記載のモノクローナル抗体。

【請求項 34】

マウス T r k B との結合が約 1 0 p M ~ 約 5 0 0 n M の範囲の E D ₅₀ を有する、請求項 33 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 35】

マウス T r k B との結合が約 1 0 p M ~ 約 1 n M の範囲の E D ₅₀ を有する、請求項 33 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 36】

マウス T r k B との結合が約 1 0 p M ~ 約 5 0 0 p M の範囲の E D ₅₀ を有する、請求項 33 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 37】

マウス T r k B との結合が約 1 0 p M ~ 約 1 0 0 p M の範囲の E D ₅₀ を有する、請求項 33 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 38】

モノクローナル抗体が、配列 K N E Y G K D (配列番号 7) および K G N P K P (配列番号 8) を有するヒト T r k B のエピトープの一方または両方に結合する、請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 39】

モノクローナル抗体が、配列 K N E Y G K D (配列番号 7) および R G N P K P (配列番号 9) を有するマウス T r k B のエピトープの一方または両方にさらに結合する、請求項 38 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 40】

モノクローナル抗体が、配列 E N L V G E D (配列番号 10) を有するヒト T r k B のエピトープと結合し、そして A G D P V P (配列番号 11) を有するヒト T r k B のエピトープと結合してもよい、請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 41】

モノクローナル抗体が、配列 E N L V G E D (配列番号 10) を有するマウス T r k B のエピトープとさらに結合する、請求項 40 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 42】

2005年8月18日に A T C C に寄託されそして A T C C 特許寄託名 P T A - 6948 を有するハイブリドーマまたはその前駆細胞から産生されるモノクローナル抗体。

【請求項 43】

2005年8月18日に A T C C に寄託されそして A T C C 特許寄託名 P T A - 6949 を有するハイブリドーマまたはその前駆細胞から産生されるモノクローナル抗体。

【請求項 44】

モノクローナル抗体が請求項 42 記載のモノクローナル抗体と同じエピトープに結合する、請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 45】

モノクローナル抗体が請求項 43 記載のモノクローナル抗体と同じエピトープに結合する、請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 46】

請求項 1 ~ 41 のいずれか 1 項記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項 47】

2005年8月18日に A T C C に寄託されそして A T C C 特許寄託名 P T A - 694

10

20

30

40

50

8を有するハイブリドーマまたはその前駆細胞。

【請求項48】

2005年8月18日にATCCに寄託されそしてATCC特許寄託名PTA-6949を有するハイブリドーマまたはその前駆細胞。

【請求項49】

異なる種のTrkBタンパク質に由来する少なくとも2つのタンパク質免疫原を用いて動物を免疫する工程；および

免疫された動物由来の脾臓細胞をミエローマ細胞と融合させて、ハイブリドーマを製造する工程、

を包含する方法

10

【請求項50】

少なくとも2つのタンパク質免疫原がヒトTrkB由来の第1の免疫原および非ヒトTrkB由来の第2の免疫原を含む、請求項49記載の方法。

【請求項51】

第1の免疫原がヒトTrkBの細胞外ドメインを含み、そして第2の免疫原が非ヒトTrkBの細胞外ドメインを含む、請求項50記載の方法。

【請求項52】

第2の免疫原が、マウスTrkB、ラットTrkBおよびニワトリTrkBからなる群より選択される非ヒトTrkBの細胞外ドメインを含む、請求項51記載の方法。

【請求項53】

20

第2の免疫原がマウスTrkBの細胞外ドメインを含む、請求項52記載の方法。

【請求項54】

免疫する工程において、第1の免疫原および第2の免疫原が約1より大きな比率を有する量（重量）で投与される、請求項50記載の方法。

【請求項55】

比率が約5より大きい、請求項54記載の方法。

【請求項56】

比率が約10である、請求項55記載の方法。

【請求項57】

第1および第2の免疫原が、TrkBの細胞外ドメインの外側に見出されるいずれのアミノ酸も含まない、請求項51記載の方法。

30

【請求項58】

請求項49～57のいずれか1項記載の方法に従って製造されるハイブリドーマ。

【請求項59】

ハイブリドーマからモノクローナル抗体を生成する工程をさらに包含する、請求項49～57のいずれか1項記載の方法。

【請求項60】

請求項59記載の方法に従って製造されるモノクローナル抗体。

【請求項61】

請求項1～41のいずれか1項記載のモノクローナル抗体の治療有効量を個体に投与する工程を包含する、個体におけるヒトTrkBの活性化方法。

40

【請求項62】

個体がTrkBの活性化を必要とする神経学的状態に罹患している、請求項61記載の方法。

【請求項63】

個体の神経系が創傷、外科手術、虚血、感染症、代謝疾患、栄養失調、悪性腫瘍または毒性薬物によって損傷されている、請求項61記載の方法。

【請求項64】

個体が脳卒中、脊髄損傷または軸索切断に罹患している、請求項61記載の方法。

【請求項65】

50

個体が先天性または神経変性状態に罹患している、請求項 6 1 記載の方法。

【請求項 6 6】

状態が、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン舞踏病および筋萎縮性側索硬化症 (ALS) からなる群より選択される、請求項 6 5 記載の方法。

【請求項 6 7】

モノクローナル抗体が非経口で個体に投与される、請求項 6 1 記載の方法。

【請求項 6 8】

モノクローナル抗体が静脈内または腹腔間で個体に投与される、請求項 6 1 記載の方法。

【請求項 6 9】

モノクローナル抗体とヒト Trk B との間の特異的な結合を可能にする条件下で、請求項 1 ~ 4 1 のいずれか 1 項記載のモノクローナル抗体を、ヒト Trk B の量を含むサンプルと合する工程；および

特異的な結合を検出し、それによりサンプル中のヒト Trk B の存在を示す工程、を包含する方法。

【請求項 7 0】

モノクローナル抗体とヒト Trk B との間の特異的な結合を可能にする条件下で、請求項 1 ~ 4 1 のいずれか 1 項記載のモノクローナル抗体を、ヒト Trk B の量を含むサンプルと合し、それにより抗体 - Trk B 複合体を生じさせる工程；

抗体 - ヒト Trk B 複合体を、サンプルの残りから分離する工程；および

抗体をヒト Trk B から分離し、それにより精製ヒト Trk B を得る工程、を包含する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権情報

本出願は、2005年6月6日出願のU.S. Serial No. 60/687,705の利益を主張し、その全体の内容を出典明示で援用する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

Trkチロシンキナーゼ受容体は、生存、分化、増殖および再生を含む広い範囲の神経細胞応答において重要な役割を担う多ドメイン1回膜貫通受容体である。それらは神経成長因子(NGF)、脳由来神経栄養因子(BDNF)、ニューロトロフィン3(NT-3)およびニューロトロフィン4/5(NT-4/5)を含むタンパク質増殖因子のファミリーであるニューロトロフィンの高親和性受容体である。ニューロトロフィンは高度に保存された構造的特徴を共有するが、それらの特有のアミノ酸配列は、各メンバーが特異的なTrk受容体(すなわち、Trk A、BまたはC)の細胞外ドメインとの高親和性相互作用を誘発することを可能にする。従って、NGFはTrk Aについての好ましいリガンドであり；BDNFおよびNT-4/5はTrk Bについての好ましいリガンドであり；そして、NT-3はTrk Cと結合することが示されているが、それはまたTrk AおよびTrk Bにより低い親和性で結合するようである。

Trk受容体の中で、Trk Bの役割は、中枢神経系(CNS)においてよく特徴付けられている。Trk Bは、新皮質、海馬、線条体、嗅覚形成および脳幹を含む脳において広く分布している。同族のリガンドとしてBDNFを使用して、神経細胞生存、分化および神経再生におけるTrk Bの不可欠な役割が、脳卒中、脊髄損傷、軸索切断およびALSを含む多くの神経変性モデルにおいて示されている。

【0003】

種々のシグナル伝達分析および受容体ノックアウト系を通じて、BDNFの応答は、Trk Bの結合および活性化に依存することが示されている。上記のように、Trk受容体

10

20

30

40

50

は、多ドメイン1回膜貫通タンパク質である。それらは、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通領域および細胞内チロシンキナーゼドメインからなる。細胞外ドメインは、2つのシステインクラスターおよび2つの免疫グロブリン(Ig)様ドメインによって隣接されるロイシンリッチモチーフから構成される。リガンドドッキングにおける他の領域(例えば、ロイシンリッチモチーフおよび第1のIgドメイン)の寄与が提唱されているが、Trk受容体は主に第2のIg様ドメインを通じてそれらのリガンドと相互作用することが示されている。リガンド-受容体複合体およびTrk受容体のリガンド結合ドメインの結晶構造が決定されている。リガンド-受容体インターフェースは、以下の2つのパッチからなるようである:全てのニューロトロフィンの間で共有される保存された結合モチーフについての一方、および各ニューロトロフィンに特異的な他方。

10

【0004】

ニューロトロフィンのTrk受容体への結合に際して、受容体二量体形成および続く立体構造変化が起き、これは細胞内チロシンキナーゼドメインの活性化を導くと考えられている。Trk受容体の細胞内ドメイン中に、いくつかの保存されたチロシンが存在する。キナーゼドメインの自己調節ループのリン酸化はキナーゼ活性を活性化し、他の残基のリン酸化は、これらの受容体を細胞内シグナル伝達カスケード(Ras/細胞外シグナル制御キナーゼ(ERK)タンパク質キナーゼ経路、PI3K/Aktキナーゼ経路およびホスホリパーゼCを含む)と共役させるアダプタータンパク質のためのドッキング部位を作ることによってシグナル伝達を促進する。いくぶん重複するものの、これらの個々の経路は、別個の生物学的活性に關与する:Ras/MAPKは神経細胞の分化および増殖を調節し、PI3K/Akt経路はアクチン動態および生存を制御し、そしてPLCはカルシウム動員に關与する。

20

【0005】

今日までに、TrkBの強力かつ選択的なインビボアゴニストとして作用する試薬の成功例は存在しない。多くのインビトロおよびインビボでのCNS変性モデルにおいて、BDNF(組換えタンパク質として)は、神経細胞生存および神経再生を増加させることが示されているが、おそらくBDNFが短いインビボ半減期を有するので、臨床におけるBDNFタンパク質療法の成績は否定的であった。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0006】

それゆえ、当該分野において、TrkBの強力かつ選択的なインビボアゴニストとして作用する医薬試薬の必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

【0007】

発明の概要

本発明は、ヒトTrkBに対するモノクローナル抗体を提供する。特定の実施態様において、本発明の抗体は、ヒトTrkBに結合し、そしてそれを活性化する。特定の実施態様において、本発明の抗体は、それらがヒトTrkAまたはヒトTrkCよりTrkBに優先的に結合する点で、ヒトTrkBに選択的である。いくつかの実施態様において、本発明のモノクローナル抗体は、マウスTrkBと交差反応する。

40

【0008】

本発明はまた、1つ以上のこれらの抗体を含む医薬組成物を提供する。本発明はさらに、本発明のモノクローナル抗体を調製する方法を提供する。本発明の抗体のヒト化または張り合わせ(veneered)型もまた、本発明の抗体を産生するハイブリドーマと同様に含まれる。

【0009】

本発明はさらに、これらのモノクローナル抗体をTrkBのアゴニストとして使用する方法を提供する。特定の実施態様において、モノクローナル抗体は、ヒトTrkBのアゴニストとして使用される。そのような実施態様によれば、抗体は、TrkBの活性化を必

50

要とする状態（神経学的な状態を含む）を処置するために使用され得る。

【0010】

本発明はさらに、本発明の抗体を使用して、サンプル中のTrkBを検出する方法およびサンプルからTrkBを精製する方法を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

特定の実施態様の説明

本発明は、一つには、TrkB受容体の細胞外ドメインに特異的に結合するモノクローナル抗体が、TrkBを二量体化し、そしてBDNFによって媒介されるものと同様の、受容体の活性化および生物学的応答を誘導するために十分であり得るという認識に端を発する。

10

【0012】

一般に、モノクローナル抗体は、研究、医学的診断および疾患の臨床的処置における多様な有用性を有するタンパク質の特有のクラスを表す。有利には、モノクローナル抗体は組換えタンパク質（例えば、BDNF）より高い薬物動態学的安定性を有すると考えられており、それにより臨床的適用について有意な利益を有する持続可能な薬理学的効果を可能にする。例えば、モノクローナル抗体薬物療法の現在臨床的に承認されている使用としては、臓器移植拒絶反応の予防、ガン（例えば、乳、結腸、非ホジキンリンパ腫、白血病）の処置、関節リウマチ、呼吸器多核体ウイルス疾患に対する予防、クローン病、経皮的冠動脈形成術および喘息が挙げられる。モノクローナル抗体を用いて種々のヒト疾患を処置するための他の医学的適用はまた現在、臨床試験中である。これらのモノクローナル抗体の生物学的効果は一般に、内因性リガンドによって発揮される分子事象をブロックまたは中和し、従って主に特異的高親和性アンタゴニストとして作用することによって伝達される。本発明において、モノクローナル抗体は、受容体-リガンド相互作用の生物学的効果を模倣するアゴニストとして使用される。

20

【0013】

1. モノクローナル抗体およびハイブリドーマ

1つの態様において、本発明はヒトTrkB（配列番号1）に結合するモノクローナル抗体を提供する。特定の実施態様において、これらの抗体は、約10pM～約500nMの範囲、例えば、約10pM～約1nM、約10pM～約100pMまたは約10pM～約50pMの範囲のED₅₀でヒトTrkB（配列番号1）に結合する。本明細書において用いる用語「約」は、±15%の変動を含むと定義される。

30

【0014】

1つの実施態様において、本発明の抗体はまた、ヒトTrkBのアゴニストである。特定の実施態様において、これらの抗体は、約10pM～約500nMの範囲、例えば、約10pM～約1nM、約10pM～約100pMまたは約10pM～約50pMの範囲のED₅₀でヒトTrkB（配列番号1）を活性化する。

【0015】

1つの実施態様において、本発明の抗体は、それらがヒトTrkA（配列番号5）またはヒトTrkC（配列番号6）よりTrkB（配列番号1）に優先的に結合するという点でヒトTrkB（配列番号1）に選択的である。いくつかの実施態様において、本発明の抗体は、ヒトTrkAまたはヒトTrkCに結合しない。本明細書で定義する場合、本発明の抗体は、それが約1nMより高い、例えば、約10nMより高い、約100nMより高い、または1μMより高い濃度でヒトTrkA（配列番号5）またはヒトTrkC（配列番号6）との検出可能な結合を示さない場合、これらの受容体に「結合しない」。

40

【0016】

1つの実施態様において、本発明の抗体は、それらがヒトTrkA（配列番号5）またはヒトTrkC（配列番号6）を活性化しないという点でヒトTrkBに選択的である。本明細書で定義する場合、本発明の抗体は、それが約1nMより高い、例えば、約10nMより高い、約100nMより高い、または約1μMより高い濃度でヒトTrkA（配列

50

番号5)またはヒトTrkC(配列番号6)との検出可能な活性化を引き起こさない場合、これらの受容体を「活性化しない」。

【0017】

1つの実施態様において、本発明の抗体は、約100pM~約500nMの範囲、例えば、約100pM~約1nM、または約100pM~約500pMの範囲のIC₅₀でBDNFとTrkB(配列番号1)との間の結合をブロックする。他の実施態様において、これらの抗体はBDNFとヒトTrkB(配列番号1)との間の結合をブロックしない。本明細書で定義する場合、本発明の抗体は、それが約1nMより高い、例えば、約10nMより高い、約100nMより高い、または1μMより高い濃度で検出可能なブロッキング活性を示さない場合、BDNFとヒトTrkB(配列番号1)との間の結合をブロックしない。

10

【0018】

特定の実施態様において、本発明の抗体は、IgGアイソタイプ(例えば、IgG1、IgG2aまたはIgG2bアイソタイプ)に属する。

【0019】

別の態様において、本発明は、マウスTrkB(配列番号2)にさらに結合する、および/またはそれを活性化する上記の特性のいずれかを有するモノクローナル抗体を提供する。特定の実施態様において、これらの抗体は、約10pM~約500nMの範囲、例えば、約10pM~約1nMの範囲(約10pM~約500pMの範囲および約10pM~約100pMの範囲を含む)のED₅₀でマウスTrkB(配列番号2)に結合する、および/またはそれを活性化する。

20

【0020】

別の態様において、本発明は、ヒトTrkB(配列番号1)の1つ以上の特異的エピトープ、および所望によりマウスTrkB(配列番号2)の1つ以上の特異的エピトープにさらに結合する上記の特性のいずれかを有するモノクローナル抗体を提供する。特定の実施態様において、これらの抗体は、配列KNEYGKD(配列番号7、配列番号1のアミノ酸364~370)およびKGNPKP(配列番号8、配列番号1のアミノ酸308~313)を有するヒトTrkBのエピトープの一方または両方に結合する。1つの実施態様において、これらの抗体はまた、配列KNEYGKD(配列番号7、配列番号2のアミノ酸364~370)およびRGNPKP(配列番号9、配列番号2のアミノ酸308~313)を有するマウスTrkBのエピトープの一方または両方に結合する。他の実施態様において、本発明は、配列ENLVGED(配列番号10、配列番号1のアミノ酸269~275)を有するヒトTrkBのエピトープ、および所望により配列AGDPVP(配列番号11、配列番号1のアミノ酸221~226)を有するヒトTrkBのエピトープに結合する抗体を提供する。1つの実施態様において、これらの抗体はまた、配列ENLVGED(配列番号10、配列番号2のアミノ酸269~275)を有するマウスTrkBのエピトープに結合する。

30

【0021】

さらに別の態様において、本発明は、これらのモノクローナル抗体のいずれかを産生するハイブリドーマを提供する。例えば、2005年8月18日にATCCに寄託され、そしてATCC特許寄託名PTA-6948(17D11)およびPTA-6949(29D7)が与えられたハイブリドーマが提供される。

40

【0022】

さらに別の態様において、本発明は、2005年8月18日にATCCに寄託され、そしてそれぞれATCC特許寄託名PTA-6948(17D11)およびPTA-6949(29D7)が与えられたハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体を提供する。本発明はまた、これらの抗体の結合をブロックし、それゆえヒトTrkB(配列番号1)上の同じ結合エピトープを共有する抗体を提供する。

【0023】

2.モノクローナル抗体およびハイブリドーマの調製

50

本発明のモノクローナル抗体は、任意の公知の方法によって調製され得ることが理解されるべきである。例えば、それらは、合成、組換え、またはハイブリドーマ技術（例えば、Antibodies: A Laboratory Manual, E. HarlowおよびD. Lane編, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988、またはMonoclonal Antibodies: Principles and Practice, J.W. Goding, Academic Press, 1996）に記載）を使用して調製され得る。特に、本発明の抗体は、最初にヒトTrkBまたはその誘導體（例えば、ヒトTrkBの細胞外ドメインを含む組換えタンパク質）を用いて動物を免疫し、次いで適切に調製されたハイブリドーマからモノクローナルを調製することによって調製され得ることが理解される。

10

【0024】

1つの態様において、本発明のモノクローナル抗体は、異なる種のTrkBタンパク質に由来する少なくとも2つのタンパク質免疫原を使用する標準的なハイブリドーマ技術によって調製される。例えば、免疫原は、ヒトTrkBに由来する第1の免疫原および非ヒトTrkBに由来する第2の免疫原を含み得る。好ましくは、各免疫原は、TrkBの細胞外ドメインを含む。特定の実施態様において、少なくとも2つの免疫原は免疫の目的のために混合物として合せられる。

【0025】

1つの実施態様において、これらの免疫原の第1のものは、ヒトTrkBの細胞外ドメイン（ECD）を含む組換えタンパク質である。ヒトTrkBのECDは、全長タンパク質（図12において配列番号1として記載される、GenBank Accession No. NP_006171）由来のアミノ酸残基C32~H430から構成される。出願日時点でGenBank、SwissProt、EMBLデータベース、または任意の他の公的に利用可能なデータベースに存在する全てのタンパク質および核酸配列を出典明示で援用することに留意のこと（限定するものではないが、ニューロトロフィン（例えば、NGF、BDNF、NT-3、NT-4/5など）の配列を含む）。第2の免疫原は、マウスTrkBの細胞外ドメイン（ECD）を含む組換えタンパク質である。マウスTrkBのECDは、全長タンパク質（図13において配列番号2として記載される、GenBank Accession No. P15209）由来のアミノ酸残基C32~H429から構成される。当業者は、これらのドメインを含む適切な免疫原が、標準的な組換え技術（例えば、Protocols in Molecular Biology, Ausubelら編, John Wiley & Sons, New York, NY, 1989およびMolecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrookら編, Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY, 1989（その内容を出典明示で援用する））を使用して調製され得ることを理解する。

20

30

【0026】

特定の実施態様において、第1および第2の免疫原は、約1より大きな比率（重量）で投与される。例えば、比率は、約2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれより大きくてもよい。1つの実施態様において、比率は約5より大きい。1つの実施態様において、比率は約10である。1つの実施態様において、第1および第2の免疫原は、混合物として同時に投与される。

40

【0027】

1つの実施態様において、一方または両方の免疫原は、天然ドメインとわずかに異なるそれらのそれぞれの細胞外ドメインの型を含む。例えば、細胞外ドメインのNまたはC末端のアミノ酸は欠損し得る。あるいは、天然配列内の少数のアミノ酸は変異され得る。好ましくは、これらの変異は保存的置換である。これらの非天然型は、配列番号1または配列番号2において見出される細胞外ドメインと少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、より好ましくは少なくとも97%、さらにより好ましくは少なくとも98%、そ

50

してさらにより好ましくは少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含むであろうことが理解されるべきである。

【0028】

特定の実施態様において、第1および/または第2の免疫原は、TrkBの細胞外ドメインの外側に見出されるいずれのアミノ酸も含まない(例えば、それらは、TrkBの膜貫通および/または細胞内ドメインにおいて見出されるアミノ酸を含まない)。特定の実施態様において、免疫原は天然TrkBタンパク質に存在しない1つ以上の末端アミノ酸を含み得る。特に、組換えタンパク質の発現を増加させるために末端アミノ酸が付加され得る(発現のために使用されるベクターの結果としてなど)。さらに、タンパク質アレルゲンに存在しないアミノ酸セグメントが、組換えタンパク質のアミノおよび/またはカルボキシル末端に付加され得る(例えば、精製用のタグ、検出用の標識、組換えアレルゲンの可溶性を増加させるタグ、免疫原の安定性を増加させるタグ、非関連タンパク質またはアジュバント担体タンパク質との融合など)。組換えタンパク質が精製、吸収などされた後に、付加されたセグメントの除去を可能にするように、付加されたアミノ酸セグメントと組換えタンパク質末端の連結部にタンパク質切断部位が導入され得る。組換え技術において使用される一般的な末端修飾は、Current Protocols in Molecular Biology, Ausubelら編, John Wiley & Sons, New York, NY, 1989、およびMolecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrookら, Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY, 1989に記載される。

10

20

【0029】

1つの実施態様において、第1および第2の免疫原は、実施例において記載され、R&D Systems, Inc. (それぞれCat. No. 397-TR/CFおよび1494-TB/CF)から入手した2つの免疫原と同じ組成を有する。

【0030】

特定の実施態様において、第1の免疫原は上記のとおりであるが、第2の免疫原はマウス以外(例えば、ラット、ニワトリ、ウサギなど)の非ヒトTrkB種由来の細胞外ドメイン(ECD)を含む。ラットTrkBのECDは、全長タンパク質(図14において配列番号3として記載される、GenBank Accession No. NP_036863)由来のアミノ酸残基C32~H429から構成される。ニワトリTrkBのECDは、全長タンパク質(図15において配列番号4として記載される、GenBank Accession No. CAA54468)由来のアミノ酸残基C32~T428から構成される。

30

【0031】

一旦適切な免疫原が調製されると、免疫原は任意の広範な動物(例えば、マウス、ラット、ウサギなど)に注射される。1つの実施態様において、免疫原は、実施例に記載のようにマウスに注射される。例えば、免疫原は、フロイント完全アジュバントを用いて皮下および腹腔内に注射される。特定の実施態様において、各動物は複数の異なる部位で皮下に注射される。この工程において、組換えタンパク質はさらなる修飾なしに免疫原として作用し得る。あるいは、組換えタンパク質がアジュバント担体タンパク質(例えば、ウシ血清アルブミンまたはキーホールリンペットヘモシアニン(KLH))に結合される場合、優れた免疫応答が誘発され得る。好ましくは、1つ以上の追加免疫を組み込む、事前に決定されたスケジュールに従って、免疫原は動物宿主に注射され、そして動物は定期的に採血される。例えば、特定の実施態様において、1つ以上の追加免疫が静脈内に投与される。次いで、免疫血清と第1(および所望により第2)の免疫原との間の結合が所望により評価されて、抗体の適切な力価が生じたことが確認される。

40

【0032】

一方または両方の免疫原に特異的なモノクローナル抗体は任意の標準的な方法によって調製され得る。例えば、Kohler and Milstein, Eur. J.

50

Immunol. 6:511, 1976の技術およびその改良が使用され得る。簡潔に記載すると、これらの方法は一般に、所望される特異性を有する抗体を産生する能力を有する不死細胞株の調製を含む。そのような細胞株は、例えば、上記のように免疫された1つ以上の動物から得られた脾臓細胞から製造され得る。次いで、例えばミエローム細胞融合パートナー（好ましくは、免疫化動物と同系もの）との融合によって、脾臓細胞は不死化される。特定の実施態様において、適切な血清を有する動物は、脾臓細胞が取り出される前に、第1および/または第2の免疫原を用いて1回以上追加免疫される。種々の融合技術が用いられ得る。例えば、脾臓細胞およびミエローム細胞は、非イオン性界面活性剤と数分間合せられ、次いでハイブリッド細胞の増殖は支持するがミエローム細胞の増殖は支持しない選択培地上に低密度でプレティングされ得る。特定の選択技術は、HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）選択を使用する。十分な時間（通常、約1~2週間）の後に、ハイブリッドのコロニーが観察される。単コロニーが選択され、そして下記のように第1（および所望により第2）の免疫原に対する結合活性についてそれらの培養上清が試験される。

10

【0033】

モノクローナル抗体は、増殖中のハイブリドーマコロニーの上清から単離され得る。さらに、収量を増強するために種々の技術（例えば、ハイブリドーマ細胞株の適切な脊椎動物宿主（例えば、マウス）の腹腔への注入）が用いられ得る。次いで、モノクローナル抗体は、腹水または血液から回収され得る。混入物は、従来技術（例えば、クロマトグラフィー、ゲル濾過、沈降および抽出）によって抗体から除去され得る。抗体アイソタイプは、標準的な方法を使用して決定され得る。実施例において考察されそして表1に示されるように、本発明者らは、これらの方法を使用して、アイソタイプIgG1、IgG2aおよびIgG2bに属する特異的マウス抗体を調製した。

20

【0034】

3. 抗体結合の特徴付け

特定の実施態様において、本発明の抗体は、ヒトTrkBに対するそれらの結合活性について特徴付けられる（例えば、実施例に記載のようなELISAおよび/またはFACSを使用して）。特定の実施態様において、細胞表面上で発現されるヒトTrkBタンパク質に対する結合もまた評価され得る（例えば、実施例に記載のようなHEK293細胞を使用して）。好ましくは、本発明の抗体はまた、それらの異種間結合活性（例えば、第2の免疫原との）について試験される。これは、両方の種由来のTrkBに結合するモノクローナル抗体が同定されることを可能にする。これらの抗体は、それらがまたヒト臨床試験に適用され得るとの知見を有してそれらを動物モデルにおいて試験し得るので、興味深い。

30

【0035】

特定の実施態様において、任意の所定のモノクローナル抗体の結合特性をさらに特徴付けることが有利であると判明し得る。特に、競合アッセイ（例えば、ELISSA）を使用して、抗体がTrkBとBDNFの相互作用をブロックするかどうかを決定し得る。また、抗体が非ヒトTrkBおよび/またはヒトTrkAもしくはTrkCに結合するかどうか評価し得る。

40

【0036】

例えば、他の抗体のTrkBに対する結合のブロックにおける個別の抗体各々の活性を検討することによって、TrkB（ヒトまたはその他）上の相対的抗体結合エピトープのマッピングがまた実施され得る。例えば、2つの抗体が互いの結合をブロックするという観察は、これらの抗体がTrkB上の同じエピトープまたは重複するエピトープに結合し得ることを示唆する。

【0037】

4. 抗体機能の特徴付け

特定の実施態様において、本発明の抗体は、ヒトTrkBを活性化するそれらの機能的な能力について特徴付けられる。任意のアゴニストアッセイが使用され得る。実施例は、T

50

Trk Bの活性化を選択的に表すことが示された例示的なルシフェラーゼアッセイを記載する。Trk B自己リン酸化（例えば、ウェスタンブロットによって測定される）はまた、Trk B活性化の尺度として使用され得る。

【0038】

あるいはまたはさらに、本発明の抗体のヒトTrk Bアゴニスト活性は、内因性Trk Bを含むアッセイ（例えば、ヒト神経芽細胞腫SY5Y細胞における）において評価され得る。実施例に記載のように、そのようなアッセイは、各抗体が神経突起成長を促進する能力、または損傷（例えば、血清除去損傷）後の分化細胞の生存を増加させる能力について試験する。特定の実施態様において、神経突起成長および/または細胞生存率に対する本発明の抗体の用量依存的な効果が測定される。

10

【0039】

特定の実施態様において、精製モノクローナル抗体はまた、非ヒトTrk B（例えば、マウス、ラット、ニワトリ、ウサギなど）を活性化するそれらの機能的な能力について特徴付けられる。実施例は、抗体を、ラット小脳顆粒神経細胞（CGN）培養物において、内因性ラットTrk B受容体に対する活性について試験したアッセイを記載する。ヒト細胞と同じように、神経突起成長アッセイおよび神経保護アッセイが実施され得る。他の有用なアッセイは当該分野において公知であり、当業者によって認識される。

【0040】

さらに他の実施態様においてそして実施例に記載のように、精製モノクローナル抗体は、ヒトTrk Aおよび/またはTrk Cを活性化するそれらの機能的な能力についてさらに特徴付けられる。

20

【0041】

5. ヒト化および張り合わせ抗体

治療目的のために本発明の抗体を使用する場合、目的の抗体のヒト化または張り合わせ型を使用して、任意の潜在的な免疫原性反応を減少させることが有利であると判明し得る。一般に、ヒト化または張り合わせ抗体は、ヒトレシピエントにおける非ヒト抗体の治療的適用の持続期間および有効性を制限する望まれない免疫学的な応答を最小化する。

【0042】

非ヒト抗体由来の抗原結合部分を含むヒト化抗体の多くの調製方法が、当該分野において記載されている。特に、ヒト定常ドメインに融合されたげっ歯類可変領域およびそれらの関連相補性決定領域（CDR）を有する抗体が記載されている（例えば、Winter et al., Nature 349:293, 1991; Lobuglio et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:4220, 1989; Shaw et al., J. Immunol. 138:4534, 1987; および Brown et al., Cancer Res. 47:3577, 1987を参照のこと）。適切なヒト抗体定常ドメインとの融合の前にヒト支持フレームワーク領域（FR）にグラフトされたげっ歯類CDR（例えば、Riechmann et al., Nature 332:323, 1988; Verhoeyen et al., Science 239:1534, 1988; および Jones et al., Nature 321:522, 1986を参照のこと）ならび

30

40

【0043】

完全ヒト抗体は特に、ヒト患者の治療的処置に望ましい。そのような抗体は、内因性免疫グロブリンHおよびL鎖遺伝子を発現できないが、ヒトHおよびL鎖遺伝子を発現し得るトランスジェニックマウスを使用して製造され得る。（例えば、Lonberg and Huszar Int. Rev. Immunol. 13:65-93, 1995、ならびにU.S. Patent Nos. 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; および5,661,016を

50

参照のこと)

【0044】

本発明の抗体の張り合わせ型はまた、本発明の方法において使用され得る。張り合わせのプロセスは、実質的に全ての天然FRタンパク質折り畳み構造を保持する抗原結合部分を含む抗体を提供するために、例えば、マウスHまたはL鎖可変領域由来のFR残基をヒトFR残基と選択的に置換することを含む。張り合わせ技術は、抗原結合部分の抗原結合特性が、抗原会合表面内のH鎖およびL鎖CDRセットの構造および相対的配置によって主に決定されるという理解に基づく(例えば、Davies et al., Ann. Rev. Biochem. 59:439, 1990を参照のこと)。従って、抗原会合特異性は、CDR構造、それらの互いの相互作用および可変領域ドメインの残りとのそれらの相互作用が慎重に維持されたヒト化抗体においてのみ保持され得る。貼り合わせ技術を使用することによって、免疫系によって容易に遭遇される外部(例えば、溶媒接近可能)FR残基がヒト残基と選択的に置換されて、弱く免疫原性のまたは実質的に非免疫原性の張り合わせ表面のいずれかを含むハイブリッド分子を提供する。

10

【0045】

6. 単鎖抗体

単鎖抗体はまた、本発明の抗体に基づいて調製され得る。例えば、単鎖抗体(scFV)は、例えばColcher et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 880:263-80, 1999;およびReiter, Clin. Cancer Res. 2:245-52, 1996に記載のように加工され得る。特定の方法を実施例に記載する。単鎖抗体は、ヒトTrkBの異なるエピトープに対する特異性を有する多価抗体を生成するように2量体化または多量体化され得る。

20

【0046】

7. 医薬組成物

本発明のモノクローナル抗体は、本発明に従ってTrkBを活性化するために混ぜ物なしで投与され得る。しかしより一般には、それらは、医薬組成物の処方のために当業者に公知の1つ以上の他の成分とともに1つ以上の抗体の治療有効量を含む医薬組成物の関連で投与され得る。

【0047】

本明細書で使用される用語「医薬有効量」または「治療有効量」は、意味ある患者の利益(すなわち、TrkB活性化を必要とする状態の処置、予防または寛解)を示すために十分である医薬組成物または方法の各有効成分の総量を意味する。単独で投与される個別の有効成分に適用される場合、用語はその有効成分単独をいう。有効成分の組み合わせに適用される場合、組み合わせで、連続してまたは同時にのいずれかで投与されるかどうかにかかわらず、用語は治療効果をもたらす有効成分の組み合わせられた量をいう。

30

【0048】

本発明の特定の実施態様において、本発明の抗体は、約0.1~約1000mg/kg体重、または約1~約500mg/kg体重、特定の実施態様において約10~約300mg/kg体重の範囲の1週間当たりの用量を用いて投与される。用量は、単一養生法または1日もしくは1週間の過程にわたって2回以上の用量に分割された連続的養生法として投与され得る。送達は、ポラスとして、または特定の実施態様において徐々の注入として(例えば、30分間にわたる注射によって)であり得る。特定の実施態様において、1回以上のより高い用量(例えば、2、3、4倍高い)が最初に投与され得、1回以上のより低い維持用量がそれに続く。より高い用量が処置の開始時にのみまたは各処置周期の最初に投与され得る。本明細書において、これらの投与量レベルおよび他の投与量レベルは、静脈内または腹腔内投与用である。当業者は、異なる経路投与に必要とされる投与量レベルを容易に決定することができる。一般に、使用される正確な用量は、処方する医師によって決定され、そして対象の体重および投与経路だけでなく、対象の年齢および症状の重篤度にも依存することが理解される。

40

【0049】

50

本発明に従う医薬組成物の調製において有用であるさらなる成分としては、例えば、担体（例えば、液体もしくは固体形態での）、香味剤、潤滑剤、可溶化剤、懸濁剤、充填剤、流動促進剤、圧縮補助剤、結合剤、錠剤崩壊剤、被包化材料、乳化剤、緩衝剤、保存料、甘味料、増粘剤、着色剤、粘性調節剤、安定化剤もしくは浸透圧調節剤、またはその組み合わせが挙げられる。

【0050】

好ましくは、液体医薬組成物は1つ以上の本発明のモノクローナル抗体および1つ以上の液体担体を含んで、溶液、懸濁液、乳濁液、シロップ、エリキシル剤または加圧組成物を形成する。医薬上許容される液体担体としては、例えば、水、有機溶媒、医薬上許容される油もしくは脂肪、またはその組み合わせが挙げられる。液体担体は、他の適切な医薬添加物（例えば、可溶化剤、乳化剤、緩衝剤、保存料、甘味料、香味料、懸濁剤、増粘剤、色、粘性調節剤、安定化剤もしくは浸透圧調節剤、またはその組み合わせ）を含み得る。液体処方物が小児用途を意図される場合、一般に、アルコールの含有を回避することが望ましい。

10

【0051】

経口または非経口投与に適切な液体担体の例としては、水（好ましくは、添加剤（例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウムのようなセルロース誘導体）を含む）、アルコールまたはその誘導体（一価アルコールもしくは多価アルコール（例えば、グリコール）を含む）あるいは油（例えば、分別ヤシ油およびピーナツ油）が挙げられる。非経口投与について、担体はまた、油性エステル（例えば、オレイン酸エチルおよびミリスチン酸イソプロピル）であり得る。加圧組成物のための液体担体は、ハロゲン化炭化水素または他の医薬上許容される噴霧剤であり得る。

20

【0052】

好ましくは、固体医薬組成物は、1つ以上の固体担体および所望により1つ以上の他の添加物（例えば、香味料、潤滑剤、可溶化剤、懸濁剤、充填剤、流動促進剤、圧縮補助剤、結合剤もしくは錠剤崩壊剤または被包化材料）を含む。適切な固体担体としては、例えば、リン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、タルク、糖、ラクトース、デキストリン、デンプン、ゼラチン、セルロース、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリビニルピロリジン、低融点ワックスもしくはイオン交換樹脂、またはその組み合わせが挙げられる。散剤医薬組成物において、好ましくは、担体は、細かく分割された有効成分と混合された細かく分割された固体である。錠剤において、有効成分は一般に、適切な割合で必要な圧縮特性を有する担体、および所望により他の添加物と混合され、そして所望の形状および大きさに圧縮される。

30

【0053】

本発明のいくつかの実施態様において、医薬組成物は、単位投与形態（例えば、錠剤またはカプセル）で提供される。そのような形態において、組成物は、適切な量の有効成分を含む単位用量に細分される。単位投与形態は、包装組成物（例えば、小包散剤、バイアル、アンプル、前充填シリンジまたはサッシェ（液体を含む））であり得る。単位投与形態は、例えば、カプセルまたは錠剤自体であり得、あるいは適切な数の任意のそのような包装形態の組成物であり得る。

40

【0054】

従って、本発明はまた、TrkBを活性化するための単位投与形態の医薬組成物を提供し、ここで組成物は、少なくとも1つの本発明のモノクローナル抗体の治療有効単位投与量を含む。当業者が認識するように、特定の医療有効単位投与量は、投与方法に依存する。

【0055】

本発明はまた、本発明のモノクローナル抗体をTrkB活性化を必要とする状態について処置される個体に分配するための治療包装を、提供する。いくつかの実施態様において、治療包装は、少なくとも1つの本発明のモノクローナル抗体の1つ以上の単位投与量、1つ以上の単位投与量を含む容器、および処置のための包装の使用を指示するラベルを含

50

む。特定の実施態様において、単位用量は錠剤またはカプセル形態である。いくつかの場合、各单位投与量は治療有効量である。

【0056】

8. 他の医薬剤

本発明によれば、本発明のモノクローナル抗体は単独で投与されて、TrkB活性を調節し得る。あるいは、抗体は、TrkB活性を必要とする1つ以上の状態（症状、障害、または疾患を含む）の処置、予防または寛解において有用な1つ以上の他の医薬剤との組み合わせで（同時または順次のいずれかにかかわらず）投与され得る。

【0057】

例えば、TrkB活性を調節し得る他の医薬剤は、本発明のモノクローナル抗体との組み合わせで使用され得る（TrkBの他の活性化剤を含む）。U.S. Patent Nos. 5,770,577; 6,077,829; 6,723,701および6,800,607（各々その全体を出典明示で援用する）は、本発明の実施に従って有用であり得るBDNF誘導体および組成物を記載する。

【0058】

さらにまたはあるいは、モノクローナル抗体は、神経学的障害および疾患の処置、予防または寛解において有用である他の医薬剤と共同して使用され得る。特定の実施態様において、モノクローナル抗体は神経系への損傷（例えば、創傷、外科手術、虚血、感染症、代謝疾患、栄養失調、悪性腫瘍、有毒薬物など）によって引き起こされる障害および疾患の処置、予防または寛解において有用である薬剤と組み合わせられる。the Physicians' Desk Reference, 55th Edition, 2001 Medical Economics Company Inc., Monvale, NJ出版（その関連部分を出典明示で援用する）において列挙されるものを含む、当該分野において公知の任意の適切な薬剤が使用され得ることが理解されるべきである。

【0059】

9. 治療用途

1つの態様において、本発明の抗体は、TrkBの活性化を必要とする状態（症状、障害または疾患を含む）を処置するために有用である。そのような方法は、1つ以上の本発明の抗体の治療有効量を個体に投与することを包む。特定の実施態様において、本発明は、神経学的状態を処置するための方法を提供する。例えば、限定するものではないが、本発明の抗体は、創傷、外科手術、虚血、感染症、代謝疾患、栄養失調、悪性腫瘍、有毒薬物などによって損傷した神経系を有する個体を処置するために使用され得る。特定の例としては、脳卒中、脊髄損傷、外傷性脳損傷、網膜変性症および軸索切断が挙げられる。本発明の抗体はまた、障害（例えば、注意欠陥多動性障害（ADHD）、抑鬱および年齢関連性精神的欠陥）を処置するために使用され得る（すなわち、認知増強を提供することによって）。本発明の抗体はまた、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン舞蹈病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）およびそれらに関連する状態を含む、先天性または神経変性状態を処置するために使用され得る。非神経学的疾患（例えば、ガンおよび糖尿病）の処置におけるTrkB活性化の利益もまた記載されており、そして本発明の抗体はそれゆえ、そのような関連における有用性を見出し得る（例えば、U.S. Patent Nos. 5,877,016および6,800,607はそれぞれ、ガンおよび糖尿病の処置についてのTrkB活性化の利益を記載する）。

【0060】

本発明の方法は、成人および小児において本明細書に記載の状態を処置するために有用である。それらはまた、獣医学的適用（特に、イヌおよびネコ適用を含む）のために利用され得る。所望の場合、本明細書の方法はまた、家畜（例えば、ヒツジ、ウシ、ブタおよびウマ品種）に使用され得る。

【0061】

本発明の方法は、例えば、非経口、静脈内、局所、経鼻、経口（頬側もしくは舌下を含む）、直腸または他の型を含む任意の適切な投与経路を介する本発明のモノクローナル抗

体の送達を含む。一般に、抗体は、即時、遅延、改変、持続、パルス、または制御放出送達のために処方され得る。

【0062】

特定の実施態様において、抗体は、注射による送達のために処方される。そのような実施態様において、投与は例えば、空洞内、静脈内、動脈内、腹腔内、くも膜下腔内、脳室内、尿道内、胸骨内、頭蓋内、筋肉内もしくは皮下で、または注入もしくは無針注射技術を介してであり得る。そのような非経口投与について、本発明の抗体は、従来凍結乾燥処方物中に調製および維持され、そして投与の前に医薬上許容される生理食塩水（例えば、0.9%生理食塩水）を用いて再構成され得る。注射用処方物のpHは、当該分野において公知のように、医薬上許容される酸（例えば、メタンスルホン酸）を用いて調整され得る。用いられ得る他の許容されるビヒクルおよび溶剤としては、リンゲル液およびU.S.P.が挙げられる。さらに、滅菌固定油が溶媒または懸濁媒体として慣習的に用いられる。この目的のために、合成モノまたはジグリセリドを含む、任意の無刺激性固定油が用いられ得る。さらに、脂肪酸（例えば、オレイン酸）が、注射液の調製において使用される。注射用処方物は、例えば、細菌保持フィルターを通しての濾過によって、または使用前に滅菌水もしくは他の滅菌注射用媒体中で溶解または分散され得る滅菌固体組成物の形態の滅菌剤を組み込むことによって滅菌され得る。

10

【0063】

本発明の抗体の効果を延長するために、筋肉内または皮下注射からのその吸収を遅延させることが望ましくあり得る。そのような投与抗体の遅延吸収は、油性ビヒクル中に薬剤を溶解または懸濁することによって達成され得る。注射用デポ形態は、生分解性ポリマー（例えば、ポリ乳酸-ポリグリコリド）中に抗体のマイクロカプセル（microencapsule）マトリックスを形成することによって製造される。ポリマーに対する抗体の速度、および用いる特定のポリマーの性質に依存して、抗体放出の比率は制御され得る。他の生分解性ポリマーの例としては、ポリ（オルトエステル）およびポリ（無水物）が挙げられる。デポ注射用処方物はまた、身体組織と適合性であるリボソームまたはマイクロエマルジョン中に抗体を封入することによって調製される。

20

【0064】

皮膚への局所的な適用について、抗体は、例えば、以下の1つ以上との混合物中で懸濁または溶解された有効成分を含む適切な軟膏として処方され得る：鉱油、流動ワセリン、白色ワセリン、プロピレングリコール、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレン化合物、乳化剤および水。あるいは、それらは、例えば、以下の1つ以上の混合物中で懸濁または溶解された適切なローションまたはクリームとして処方され得る：鉱油、モノステアリン酸ソルビタン、ポリエチレングリコール、流動パラフィン、ポリソルベート60、セチルエステルワックス、セテアリルアルコール、2-オクチルドデカノール、ベンジルアルコールおよび水。

30

【0065】

本発明の抗体はまた、鼻腔内でまたは吸入によって投与され得、加圧容器、ポンプ、スプレー、アトマイザまたはネブライザからの、適切な噴射剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、ヒドロフルオロアルカン、二酸化炭素または他の適切な気体の使用有りまたは無しでの乾燥粉末吸入器またはエアロゾルスプレー提示の形態で簡便に送達される。加圧エアロゾルの場合、投与量単位は、計量された量を送達するための弁を提供することによって決定され得る。加圧容器、ポンプ、スプレー、アトマイザまたはネブライザは、抗体の溶液または懸濁液を含み得る（例えば、エタノールと噴射剤の混合物（これはさらに潤滑剤（例えば、トリオレイン酸ソルビタン）を含み得る）を溶媒として使用する）、吸入器または注入器における使用のためのカプセルおよび薬包（例えば、ゼラチンから製造される）が、本発明の抗体および適切な粉末基剤（例えば、ラクトースまたはデンプン）の粉末混合物を含むように処方され得る。

40

【0066】

50

経口送達を利用する本発明の方法について、そのような送達は、固体または液体処方物（例えば、錠剤、カプセル、多微粒子、ゲル、フィルム、小卵、エリキシル剤、溶液または懸濁液の形態の）を使用して達成され得る。特定の実施態様において、モノクローナル抗体は、経口錠剤またはカプセルとして投与される。例えば、子供、錠剤を嚥下する能力が損なわれている個体、または動物への投与を容易にするために、所望される場合、そのような調製物は、混合された、咀嚼可能なまたは液体の処方物または食品材料または液体であり得る。

【0067】

好ましくは、直腸投与用の組成物は、本発明の抗体を適切な非刺激性賦形剤または担体（例えば、ココアバター、ポリエチレングリコール、または坐薬ワックス（これらは周囲温度では固体であるが体温では液体であり、それゆえ直腸円蓋において融解し、抗体を放出する））と混合することによって調製され得る坐薬である。保持浣腸および直腸カテーテルがまた当該分野において公知であるように使用され得る。粘性増強担体（例えば、ヒドロキシプロピルセルロース）はまた、直腸投与のための本発明の特定の担体である。なぜならそれらは直腸内での医薬組成物の保持を促進するからである。一般に、医薬組成物に添加される担体の容量は、組成物の保持を最大化するように選択される。特に、容量は、直腸円蓋における投与された組成物の保持を危うくするほど大きくあるべきでない。

【0068】

10. 診断用途

別の態様において、本発明の抗体は、サンプル中の $Trk B$ を検出するために（例えば、 $Trk B$ の過剰または過小発現によって特徴付けられる障害を診断するために）使用され得る。そのような方法に従って、本発明の抗体は、特異的な結合を可能にする条件下でサンプルと合される。次いで、特異的な結合が検出され、それによりサンプル中の $Trk B$ の存在が示される。

【0069】

サンプルは、体液（例えば、脳脊髄液、血液、血清、尿など）または細胞もしくは組織の抽出物（例えば、生検サンプル）に由来し得る。結合の検出は、抗体を検出可能な物質と結合（すなわち、物理的に連結）させる（すなわち、抗体標識化することによって、容易にされ得る。検出可能な物質の例としては、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質および放射性物質が挙げられる。適切な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ；適切な補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられ；適切な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリンが挙げられ；発光物質の例としては、ルミノールが挙げられ；生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンが挙げられ；そして、適切な放射性物質の例としては、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S または 3H が挙げられる。

【0070】

$ELISA$ および $FACS$ を含む、抗体結合を測定するための種々のプロトコルが当該分野において公知であり、そして $Trk B$ 発現の変化したまたは異常なレベルを診断するための基礎を提供する。実施例において、 $ELISA$ および $FACS$ がさらに記載される。 $Trk B$ 発現についての正常または標準的な値は、複合体形成に適切な条件下で、正常な個体から採取されたサンプルを本発明の抗体と合することによって確立される。標準的な複合体形成の量は、検出可能な物質の性質に依存して種々の方法によって定量化され得る。好ましくは、標準的な複合体形成の量は、測光手段によって定量化される。次いで、罹患個体由来のサンプル中の $Trk B$ 発現のレベルは標準値と比較される。標準および罹患値の間の偏差は、疾患を診断するためのパラメーターを確立する。

【0071】

特定の実施態様において、本発明の方法は、 $Trk B$ の過剰または過小発現によって

特徴付けられる神経学的状態を診断するために使用され得る。例えば、限定するものではないが、本発明の方法は、創傷、外科手術、虚血、感染症、代謝疾患、栄養失調、悪性腫瘍、有毒薬物などによって損傷した神経系を同定するために使用され得る。特定の例としては、脳卒中、脊髄損傷、外傷性脳損傷、網膜変性症および軸索切断が挙げられる。本発明の方法はまた、障害（例えば、注意欠陥多動性障害（ADHD）、抑鬱および年齢関連精神的欠陥）を診断するために使用され得る（すなわち、認知増強を提供することによって）。本発明の方法はまた、先天性または神経変性状態（アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン舞蹈病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）およびそれらに関連する状態を含む）を診断するために使用され得る。

【0072】

11. 精製用途

本発明はまた、以下の工程を包含する、抗体を使用してサンプルからTrkBを精製する方法を提供する：特異的な結合を可能にする条件下で、本発明の抗体をサンプルと合し、それによって抗体-TrkB受容体複合体を生じさせる工程、抗体-TrkB受容体複合体をサンプルの残りから分離する工程、次いで抗体をTrkB受容体から分離し、それによって精製TrkB受容体を得る工程。本発明の抗体が、任意の標準的な技術（例えば、アフィニティークロマトグラフィーまたは免疫沈降）によってTrkBを単離するために使用され得ることが理解される。

【実施例】

【0073】

以下の実施例によって、本発明をさらに説明および支持する。しかし、これらの実施例が本発明の範囲をさらに制限するとは決してみなすべきではない。それとは反対に、当業者は、本発明の精神および/または添付の特許請求の範囲から逸脱することなく、本発明の他の実施態様、改変および等価物が存在することを容易に理解する。

【0074】

実施例 1

この実施例では、複数のTrkB抗体の調製およびインビトロでの特徴付けおよび試験を記載する。

材料および方法

免疫原

以下の2つのタンパク質免疫原の混合物を使用して、マウス抗TrkB抗体を調製した：ヒトTrkBの細胞外ドメイン（ECD）を含む第1の組換えタンパク質（rhTrkB-ECD）（R&D systems, Inc., Cat. No. 397-TR/CF）、およびマウスTrkBの細胞外ドメインを含む第2の組換えタンパク質（rmTrkB-ECD）（R&D system, Inc., Cat. No. 1494-TB/CF）。

【0075】

ヒトTrkBの細胞外ドメインは全長タンパク質（図12において配列番号1として記載する、GenBank Accession No. NP_006171）のアミノ酸残基C32~H430から構成される。マウスミエローマ細胞株NS0においてrhTrkB-ECDを発現させた。単量体rhTrkB-ECDの計算上の分子量は44kDaである；しかし、グリコシル化された場合、還元条件下でのSDS-PAGEにおいて、それは80~100kDaのブロードなバンドとして移動する。

【0076】

マウスTrkBの細胞外ドメインは全長タンパク質のアミノ酸残基C32~H429から構成される（図13において配列番号2として記載する、GenBank Accession No. P15209）。この実施例について使用したmhTrkB-ECDにおいて、この配列は、発現の間に切断されるN末端ヒトCD33シグナルペプチド、およびC末端Hisタグに隣接される。マウスミエローマ細胞株NS0において、rhTrkB-ECDもまた発現させた。単量体mhTrkB-ECDの計算上の分子量は、45

10

20

30

40

50

・9 kDaである；しかし、グリコシル化された場合、還元条件下でのSDS-PAGEにおいて、それは75～100 kDaのブロードなバンドとして移動する。

【0077】

免疫化スケジュール

フロイント完全アジュバント(CFA)と事前に混合したrhTrkB-EDC 10 μgを用いて、5匹の8週齢雌性BALB/cマウスを免疫した。混合物を、2週間毎に4回(すなわち、0、2、4および6週目で)皮下および腹腔内に注射する部分に分離した。フロイント完全アジュバント(CFA)と事前に混合したrmTrkB-EDC 1 μgを用いた皮下および腹腔内注射によって、7週目でマウスをまた免疫した。5および7週目でマウスの採血をし、血清中での抗体応答を評価した。

10

【0078】

マウス抗TrkBモノクローナル抗体(mAbs)の生成

細胞融合(12週目に行った)の3日前、rhTrkB 10 μgおよびrmTrkB 1 μgを用いて、静脈内に、5匹のマウスのうち3匹をさらに追加免疫した。50%ポリエチレングリコール(MW1500)(Roche Diagnostics Corp., Cat. No. 783641)を使用して、4:1の比率で、これらの3匹のマウス由来の脾細胞をマウスミエローマ細胞P3X63Ag8.653(ATCC, Cat. No. CRL-1580)と融合させた。融合後に、96ウェルプレートにおいて 1×10^5 細胞/ウェルで選択培地(20% FBSおよび5% Origenを含むRPMI1640)(IGEN International, Inc., Cat. No. 210001)、2 mM L-グルタミン、100 U/ml ペニシリン、100 μg/ml ストレプトマイシン、1xHEPESならびに1xHAT(ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン)(Sigma, Cat. No. H0262)中に細胞を播種し、そして培養した。ハイブリドーマ上清を、ELISA、およびFACS分析によるrhTrkB発現HEK293安定細胞に対する染色によってrhTrkBとの結合についてスクリーニングした(下記を参照のこと)。続いて、陽性であると選択されたハイブリドーマ上清を、ルシフェラーゼアッセイを使用してrhTrkBに対するアゴニスト活性について試験した(下記を参照のこと)。段階希釈によって4回、FACSソーティングによって1回、選択したハイブリドーマをサブクロニングした(下記を参照のこと)。安定ハイブリドーマ培養物から馴化培地を回収した。Prosop-A(Montage Antibody Purification Spinカラム, Millipore, Cat. No. P36486)を使用して、ハイブリドーマ馴化培地からIgGを精製した。各mAbのIgクラスを、マウスmAbアイソタイピングキット(IsoStrip, Boehringer Mannheim Corp., Cat. No. 1493027)を用いて決定した。

20

30

【0079】

ELISA

TrkB特異的抗体の存在を測定するために、96ウェルプレート(Maxisorp, Nunc)を、1 μg/mlのrhTrkB-EDC-Fc(R&D system, Cat. No. 688-TK)またはrmTrkB-Fc(R&D system)でコーティングし、4℃で一晩インキュベートした。プレートを洗浄し、1% BSAおよび0.05% Tween-20を含むPBS(10 mM リン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH7.2)を用いてウェルをブロッキングした後で、100 μlの希釈した免疫血清またはハイブリドーマ上清を添加し、1時間室温でインキュベートした。プレートを洗浄し、ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウスIgG(H+L)(PIERCE, Cat. No. 31434)を使用し、続いて基質TMB(BioFX Laboratories, Cat. No. TMBW_1000-01)とともにインキュベートして、結合した抗TrkB抗体を検出した。分光光度計で、450 nmでの吸光度値を決定した。

40

【0080】

50

ハイブリドーマ上清中のmAb濃度を決定するために、96ウェルプレートにPBS中の1μg/mlのヤギ抗マウスIgG(Fc)(PIERCE, Cat. No. 31123)でコーティングし、4℃で一晩インキュベートした。1%BSAおよび0.05%Tween-20を含むPBSを用いてウェルを洗浄およびブロッキングした後、100μlの希釈したハイブリドーマ上清を1時間室温で添加した。精製アイソタイプ適合マウスIgGを、抗TrkB IgG濃度の定量化についての標準として使用した。プレートを洗浄し、HRP標識化ヤギ抗マウスIgG-Fcを添加し、1時間室温でインキュベートした。ウェルの洗浄後に、基質TMBを添加した。450nmでの吸光度を決定した。

【0081】

競合結合を使用する相対抗体結合エピトープの特徴付け

TrkBタンパク質への抗TrkB IgGの結合がどのようにしてTrkBとのBDNFの相互作用に影響を及ぼすかを決定するために、96ウェルプレートにPBS中の0.3μg/mlのBDNF(R&D system, Cat. No. 248-BD/CF)でコーティングし、一晩4℃でインキュベートした。1%BSAおよび0.05%Tween-20を含むPBSを用いてウェルを洗浄およびブロッキングした後、事前にインキュベートしたハイブリドーマ上清(または希釈した免疫血清)のrhTrkB-EDC-Fcとの混合物100μlをプレートに添加し、1時間室温でインキュベートした。プレートを洗浄した後に、ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ヒトIgG、(Fc)(PIERCE, Cat. No. 31416)を添加し、1時間室温でインキュ

【0082】

rhTrkB上の相対抗体結合エピトープをマッピングするために、96ウェルプレートをPBS中の1μg/mlの個別のTrkB特異的mAbの各々でコーティングし、一晩4℃でインキュベートした。1%BSAおよび0.05%Tween-20を含むPBSを用いてウェルを洗浄およびブロッキングした後、個別の事前にインキュベートしたTrkB mAb(20μg/ml)およびrhTrkB-EDC-Fc(0.1μg/ml)の各々の混合物100μlをウェルに添加し、1時間室温でインキュベートした。プレートを洗浄し、そしてペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ヒトIgG、(Fc)とともに1時間インキュベートした。プレートを洗浄した後に、基質TMBを添加した。450nmにおける吸光度を決定した。

【0083】

ルシフェラーゼアッセイ

pcDNA-hTrkB(全長、GenBank Accession No. NM_006180を参照のこと)を用いてHEK-293細胞をトランスフェクトすることによって、rhTrkBを発現するHEK-293細胞の安定株を生成した。限界希釈を用いて2週間ハイグロマイシンの存在下で、トランスフェクトした細胞を選択した。最初の評価の後、研究のために細胞の単一クローンを選択した。ルシフェラーゼアッセイのために、96ウェルプレート中、増殖培地100μl中に1.5×10⁴細胞/ウェルで細胞をプレーティングした。翌日、細胞を試験抗体または10×終濃度のBDNF 10μlで処理した。製造者のプロトコルに従って、Promega Steady-Gloアッセイキットを使用して、処理の16時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。簡潔に記載すると、培地を100μlのPBSと置換し、そして100μlのSteady-Glo試薬を添加した。TopSealを用いてプレートを密封した後、Titer Plate Shakerでプレートを振盪(速度約5、5分間)し、次いでTopCount NXT v2.13機器(Packard)を使用して発光を測定した。

【0084】

FACS分析

5mMEDTAを含むPBSを用いて、rhTrkBを発現するHEK-293細胞

10

20

30

40

50

をプレートから剥がし、 2×10^5 細胞/チューブで5 ml Falconチューブ (Becton Dickinson, Cat. No. 352063) 中に移した。遠心分離 (800 rpm、4、3分間) することによって細胞を1回PBSで洗浄し、そして100 μ lのハイブドーマ培養上清、精製抗体、または1% FBSを含むPBS中に希釈した免疫血清とともに、30分間4 でインキュベートした。1% FBSを含むPBS 1 mlを用いて細胞を3回洗浄し、30分間4 で暗所において、1% FBSを含むPBS中のPE標識化ヤギ抗マウスIgG、F(ab')₂フラグメント (DAKO Corporation, Cat. No. R0480) とともにインキュベートした。再び細胞を3回洗浄し、1% FBSを含むPBS 250 μ l中に再懸濁した。ヨウ化プロピジウムを死細胞の検出のために使用し、これを分析から除外した。FACSscanフローサイトフルオロメータ (Becton Dickinson) によって、5000細胞/チューブの蛍光を計数した。

【0085】

TrkB自己リン酸化アッセイ

rhTrkBを発現するHEK-293細胞を、DMEM培地中、 2×10^5 細胞/ウェルで24ウェルプレート中にプレATINGした。翌日、細胞を無血清DMEM中で90分間インキュベートし、次いで、異なる濃度のBDNFまたは試験抗体を用いて、30分間37 で刺激した。PBSで1回洗浄した後に、細胞を95 で事前に加熱したLaemmli Sample Buffer (Bio-Rad) 中に溶解した。溶解物をQIAs shredderカラム (Qiagen) を通して流し、サンプル20 μ lを4~12% Bis-Trisゲル (Invitrogen) 上で分離した。ニトロセルロース膜への転写の後、PY490 リン酸Trk特異的抗体 (1:100, Cell Signaling, Cat. No. 9141) を使用して自己リン酸化TrkBバンドを検出し、続いてHRP結合抗ウサギ二次抗体 (Molecular Probes) とともにインキュベートした。ECLプラスキット (Amersham) を使用して、シグナルを発色させた。

【0086】

神経突起成長アッセイ

ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞を、2 mM L-グルタミン、15% FBSおよびpen/strepを補充したDMEM:F12 (1:1) 中で増殖させた。神経突起成長アッセイのために、細胞を、 4×10^3 細胞/ウェルの密度で96ウェル組織培養プレート中にプレATINGし、そして10 μ M オールトランスレチノイン酸 (RA) とともにインキュベートして、神経細胞分化を誘導した。3日目に、結果において示すように、培地を、BDNFまたは試験抗体を含むまたは含まない新たな培地と置換した。さらに3日間培養した後に、細胞をIC-Fixによって30分間室温において固定し、さらにチューブリンIIIの免疫染色について処理した。最初に、リン酸緩衝化溶液中の0.2% Triton (TPBS) 中での短時間インキュベーションによって、細胞を透過処理した。次いで、サンプルをTPBS中の1.5% 正常ヤギ血清 (NGS) 中で30分間インキュベートして、非特異的な結合をブロックし、続いて1.5% NGS/TPBS中の抗チューブリンIII mAb (Tuj1, 1:1000, Covance) とともにインキュベートした。Alexa 488マウス抗ヤギ抗体 (1:500, Molecular Probes) を使用して、Tuj1シグナルを検出し、Cellomicsアレイスキャンを使用して神経突起成長を分析した。

【0087】

一次神経細胞における神経突起促進効果の測定のために、ラットまたはマウス小脳顆粒神経細胞 (CGN) 培養物を調製した。簡潔に記載すると、出生後7日目の動物由来の小脳を解剖し、小片に切断した。組織を、ワザン (Worthington Biochemical Corp.) を用いて30分間37 で処理し、穏やかな研和によって分散した。遠心分離 (300 g、5分間) の後に、分離した細胞を、B27補充剤、0.5 mM L-グルタミンおよび25 mM 塩化カリウムを含むNeurobasal培地中

10

20

30

40

50

で再構成し、そしてポリ - d - リジンで事前にコーティングした96ウェルBio coatプレート(BD bioscience)中に 1.2×10^4 細胞/ウェルの密度でプレATINGした。細胞をBDNFまたは試験抗体を用いて24時間処理し、IC-Fixを用いて30分間室温で固定し、そして上記のようにTuj1免疫染色のために処理した。

【0088】

細胞生存アッセイ

SH-SY5Y細胞を、96ウェルプレート中に 1×10^4 細胞/ウェルでプレATINGし、そしてRA($10 \mu\text{M}$)とともにインキュベートして、神経細胞分化を誘導した。3日後に、培地を血清を含まない増殖培地(無血清培地)に切り替え、そして細胞をBDNF、試験抗体またはピヒクルで処理した。さらに2日間培養した後に、製造者のプロトコルに従ってCellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Kit (Promega)を使用するMTTアッセイによって、細胞生存率を測定した。

10

【0089】

神経保護アッセイ

上記のように7日齢の子からラットまたはマウスCGN培養物を調製し、 7.3×10^4 細胞/ウェルの密度でポリ - d - リジンで事前にコーティングした96ウェルBio coatプレート(BD bioscience)中にプレATINGした。プレATINGの24時間後に、細胞を、小脳顆粒神経細胞の有意な死滅をもたらすことが知られているカリウム血清欠乏(KSD)損傷に供した。姉妹培養物を、BDNFまたは試験抗体を用いて同時処理した。24時間のインキュベーションの後に、CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Kit (Promega)を使用して、細胞生存率を測定した。

20

【0090】

結果

TrkB免疫化マウス由来の抗体応答の評価

TrkBに対する特異的免疫応答を評価するために、第3および第4の免疫化の1週間後に5匹の免疫化マウス(M1~M5)から採血した。第3および第4両方の採血においてELISAおよびFACS分析によって、血清中での高い抗TrkB抗体力価を決定した。図1は、第4の免疫化後の採血由来の結果を表す。5匹全てのマウスが、ELISAにおいてrhTrkB-ECDおよびrmTrkB-ECDの両方を認識する高い力価を生じた(図1Aおよび1B)。

30

【0091】

BDNF結合部位に相対的なhTrkB上の抗体結合エピトープの位置もまた評価した。競合ELISA由来の結果は、免疫採血がM2=M5>M3>M4=M1の順序でrhTrkB-EDC-FcとBDNFとの相互作用をブロックし得ることを示した(図1C)。興味深いことに、rhTrkB-BDNF相互作用のブロッキングにおける抗体の有効性は、抗体結合力価と相関した(図1Aと1Cを比較のこと)。FACS分析によって実証されるように、全ての免疫採血もまた、HEK-293細胞上の細胞表面で発現されたrhTrkBに結合することが示された。

40

【0092】

hTrkBに対する免疫血清の高力価特異的結合の観察の後、これらの免疫採血を、これらのアゴニスト活性を試験するためのルシフェラーゼ Reporterアッセイにおいて評価した。rhTrkBを発現するHEK-293細胞におけるルシフェラーゼ活性は、TrkBの活性化を選択的に表すことが示されている(図2)。これらの細胞の免疫採血とのインキュベーションは、ルシフェラーゼシグナルを有意に用量依存的に増加させた(図3)。再び、アゴニスト活性の有効性は、M2=M5>M3>M4=M1の順序であった。最高の抗体力価および強力なアゴニスト活性を有する3匹のマウス(M2、M3およびM5)を、続くハイブリドーマ生成のために選択した。

50

【 0 0 9 3 】

モノクローナル抗体の製造

前記のように、3匹の選択したマウス(M2、M3およびM5)を、融合の3日前に10 μ gのrhTrkB-ECDおよび1 μ gのrmTrkB-ECDを用いて静脈内に追加免疫した。1回目のハイブリドーマスクリーニングから、ELISAアッセイにおいてrhTrkB-EDC-Fcに対して強く結合する94個のクローンを取り出した。これらのクローンのうち20個が、ELISAアッセイにおいてrmTrkB-ECDと交差反応した。FACS分析により、54個のクローンがHEK-293細胞の表面上で発現されるrhTrkBに結合することが確認された。

【 0 0 9 4 】

ルシフェラーゼアッセイを使用して各クローンのTrkBアゴニスト活性を試験し、そしてさらなる特徴付けのために、17個の最高の活性を有するハイブリドーマクローンを選択した。これらのクローンの安定化、段階希釈を用いた3回のサブクローニングおよびFACSソーティングを用いた1回のサブクローニングの後、各馴化培地由来のモノクローナル抗体を収集し、そしてProSep-A (Montage Antibody Purification Kits)を使用することによって精製した。各抗体のIgGアイソタイプを、Murine Isotyping試験キットによって決定した(表1)。抗体濃度をマウスIgG定量ELISAによって決定し、17個のクローン全てが培地上清中で良好なレベルのIgを産生した。

【 0 0 9 5 】

【表1】

表1

mAb	マウスIgGアイソタイプ ^o	Ig濃度(μ g/ml)
2E8	IgG2b, k	14
4C7	IgG2b, k	8
5D8	IgG2b, k	28
5E11	IgG2b, k	55
6D5	IgG2b, k	26
6E2	IgG2b, k	18
6E6	IgG2b, k	14
7E1	IgG2b, k	26
7F5	IgG2b, k	16
11E1	IgG1, k	20
16E11	IgG2b, k	5
17D11	IgG1, k	22
18C3	IgG1, k	18
19E12	IgG2a, k	10
29D7	IgG1, k	52

【 0 0 9 6 】

モノクローナル抗体の特徴付け

精製TrkB特異的モノクローナル抗体を、hTrkBに対するそれらの結合活性についてELISAによって特徴付けた。クローン29D7(これについては、精製後に、ED₅₀が10⁻¹¹(M)から10⁻¹⁰(M)に低下した(データは示さず))を除いて、大部分の抗体が高い結合親和性(ED₅₀=10⁻¹¹(M))でrhTrkBと結合した。2つのクローン12F4および18C8は、精製後にそれらの結合活性を失い、そのゆえ優先順位リストから除外した(従って、表1中には含まれない)。FACS分析を使用して、残りの15個のTrkB結合mAbの全てが、HEK293細胞の表面上に

発現された hTrkB と特異的に結合することもまた示された。抗体を、ELISA によって rmTrkB に対するそれらの異種間結合活性についてもまた試験した。大部分の抗体が rmTrkB に対して弱く結合することが見出されたが、クローン 17D11、18C3 および 29D7 は $ED_{50} = 10^{-10} \sim 10^{-11}$ (M) で rmTrkB に結合することが見出された (表 2)。

【0097】

競合 ELISA アッセイを使用して、抗体が rhTrkB と BDNF の相互作用をブロックするかどうか決定した。クローン 29D7 はブロッキング活性を示さなかったが、クローン 17D11、18C3 および 19E12 は rhTrkB - BDNF 相互作用を部分的にブロックした。他の全てのクローンは、 $IC_{50} = 3 \sim 5 \times 10^{-10}$ (M) で rhTrkB - BDNF 相互作用をブロックした (表 2)。

10

【表 2】

表2

mAb	結合活性		ブロッキング活性	
	rhTrkB [ED ₅₀ (nM)]	rmTrkB [ED ₅₀ (nM)]	293-hTrkB [平均値]	hTrkB-BDNF [IC ₅₀ (nM)]
2E8	0.020	W*	251.88	0.30
4C7	0.017	W*	241.26	0.30
5D8	0.019	W*	247.43	0.30
5E11	0.016	W*	263.27	0.40
6D5	0.021	W*	258.74	0.58
6E2	0.016	W*	235.47	0.28
6E6	0.019	W*	246.15	0.40
7E1	0.016	W*	237.89	0.27
7F5	0.016	W*	240.03	0.30
11E1	0.020	NB**	117.83	0.30
16E11	0.020	W*	224.55	0.28
17D11	0.020	0.300	134.52	部分的なブロック
18C3	0.020	0.300	132.03	部分的なブロック
19E12	0.031	W*	194.41	部分的なブロック
29D7	0.120	0.013	95.59	ブロックなし

20

30

W*:弱い結合

NB**:結合なし

【0098】

rhTrkB 上の相対的抗体結合エピトープのマッピングを、他の抗体の rhTrkB に対する結合のブロックにおける個別抗体各々の活性を検討することによって実施した。例えば、2つの抗体が互いの rhTrkB との結合をブロックするという観察は、これら抗体が rhTrkB 上の同じエピトープまたは重複するエピトープに結合し得ることを示唆する (表 3)。表 3 において、事前に結合した抗体を各列に示し、一方競合する (すなわち、コーティングした) 抗体を各行に示す。結果は、クローン 11E1、19E12 および 29D7 が特有のエピトープを認識し得ることを示した。クローン 17D11 および 18C3 は同じ結合部位について競合するようである。残りの全てのクローンが互いに競合し、同じ結合エピトープを共有し得る。

40

【0099】

【表 3】

	2E8	4C7	5D8	5E11	6D5	6E2	6E6	7E1	7F5	11E1	16E11	17D11	18C3	19E12	29D7	c mAb*
2E8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	-	-	-	-	-
4C7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	-	-	-	-	-
5D8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	-	-	-	-	-
5E11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	-	-	-	-	-
6D5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	-	-	-	-	-
6E2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	-	-	-	-	-
6E6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	-	-	-	-	-
7E1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	-	-	-	-	-
7F5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	-	-	-	-	-
11E1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+/-	-
16E11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	-	-	-	-	-
17D11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+/-	-	-
18C3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+/-	-	-
19E12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
29D7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
c mAb*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+/:完全なブロック, +/-:部分的なブロック, -:ブロックなし。 c mAb*:マウス IgG1、IgG2a および IgG2b の混合物。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 0 】

ルシフェラーゼ活性

アゴニスト活性を実証するためにルシフェラーゼアッセイを使用して精製 TrkB 特異的抗体を検査した。全ての抗体が、 10^{-10} (M) の範囲の EC_{50} でシグナルの用量依存的な増加を引き起こした (図 4)。大部分の抗体について、最大シグナルウィンドウは基礎の約 7 倍であり、これは 200 ng/ml の BDNF によって誘導された応答 (基礎の 6.2 倍) に匹敵した。

【0101】

mAbs の機能的活性

TrkB 結合抗体が内因性 TrkB 受容体活性化によって媒介される機能的アゴニスト活性を有するかどうか試験するために、これらの抗体を用いた処理の後に、神経突起促進効果を評価した。抗体の種特異的な結合特性に基づいて、発明者らはまず、神経細胞分化の際に TrkB を発現することが知られているヒト神経芽細胞腫 SY5Y 細胞を利用した。以前の報告と一致して、発明者らは、BDNF の添加が、神経突起長および分枝部位数の増加によって示されるように、神経突起成長を促進することを観察した (図 5 A および 5 B)。重要なことに、大部分の抗体はまた、BDNF に匹敵するかまたはより優れた有効性で神経突起成長を有意に増加させた (図 5 A および 5 B)。少数の処理群の代表的な画像の例を、図 5 C に示す。

【0102】

全用量応答分析のために、7 つの最高の活性を有する TrkB 抗体 (6E2、7F5、11E1、16E11、17D11、19E12 および 29D7) を選択した。それらは、約 10^{-10} (M) の EC_{50} で神経突起成長の用量依存的な増加を誘導した (図 5 D、6E2 についてのデータは得ず)。血清除去損傷後の分化 SY5Y 細胞の生存を増加させるそれらの能力についてもまた、これらの抗体を試験した。結果は、BDNF およびいくつかの抗体が分化 SY5Y 細胞を保護したことを示し、細胞生存率の用量依存的な増加を示した (図 6)。

【0103】

また、内因性ラット TrkB 受容体に対する活性について、ラット小脳顆粒神経細胞 (CGN) 培養物中で、2 つの TrkB 抗体、17D11、18C3 および 29D7 (これらは rmTrkB に結合することが示された) を試験した。神経突起成長アッセイおよび神経保護アッセイの両方において、29D7 のみが BDNF に匹敵する活性を示したが、一方 17D11 および 18C3 は不活性であった (図 7、データは示さず)。17D11 および 18C3 は、ラット TrkB 中の異なるアミノ酸を含むマウス TrkB 上のエピートプを認識することが示唆され得る。

【0104】

TrkB リン酸化分析

上記の全ての活性に基づいて選択された 7 つの TrkB 抗体 (6E2、7F5、11E1、16E11、17D11、19E12 および 29D7) を、TrkB 自己リン酸化の誘導について、ウェスタン分析において評価した。全ての抗体が強力な TrkB リン酸化を導き、そしてこれらの効果はキナーゼ阻害剤 K252a を用いた処理によって拮抗された。このことは、これらの TrkB 結合抗体が TrkB の活性化を引き起こしたことを示す (図 8)。

【0105】

また、内因性ラット TrkB 受容体に対する活性について、ラット小脳顆粒神経細胞 (CGN) 培養物中で、2 つの TrkB 抗体、17D11、18C3 および 29D7 (これらは rmTrkB に結合することが示された) を試験した。神経突起成長アッセイおよび神経保護アッセイの両方において、29D7 のみが BDNF に匹敵する活性を示したが、一方 17D11 および 18C3 は不活性であった (図 7、データは示さず)。17D11 および 18C3 はラット TrkB 中の異なるアミノ酸を含むマウス TrkB 上のエピートプを認識することが示唆され得る。

【0106】

TrkB リン酸化分析

上記の全ての活性に基づいて選択された7つのTrkB抗体(6E2、7F5、11E1、16E11、17D11、19E12および29D7)を、TrkB自己リン酸化の誘導について、ウェスタン分析において評価した。全ての抗体が強力なTrkBリン酸化を導き、そしてこれらの効果はキナーゼ阻害剤K252aを用いた処理によって拮抗された。このことは、これらのTrkB結合抗体がTrkBの活性化を引き起こしたことを示す(図8)。

【0107】

ATCC寄託

17D11および29D7 TrkB抗体を産生するハイブリドーマを、2005年8月18日にATCCに寄託し、それぞれATCC特許寄託名PTA-6948およびPTA-6949が与えられた。

10

【0108】

実施例2

この実施例では、複数のTrkB抗体のさらなるインビトロでの特徴付けおよび試験を記載する。特に、この実施例では、実施例1の抗体のいくつかのTrkB対TrkAおよびTrkC特異性を評価するために行った実験を記載する。

【0109】

材料および方法

FACS分析

ヒトTrkAを発現するHEK-293細胞を5mM EDTAを含むPBSを用いてプレートから剥がし、5ml Falconチューブ(Becton Dickinson, Cat. No. 352063)中に 2×10^5 細胞/チューブで移した。遠心分離(800rpm、4、3分間)することによって細胞をPBSで1回洗浄し、1% FBSを含むPSB中に希釈した免疫血清またはハイブリドーマ培養上清100 μ lとともに30分間4 でインキュベートした。1% FBSを含むPBS 1mlで細胞を3回洗浄し、そして1% FBSを含むPBS中のPE標識化ヤギ抗マウスIgG, F(ab')₂フラグメント(DAKO Corporation, Cat. No. R0480)とともに暗所で30分間4 でインキュベートした。再び細胞を3回洗浄し、1% FBSを含むPBS 250 μ l中に再懸濁した。ヨウ化プロピジウムを死細胞の検出のために使用し、これを分析から除外した。FACSscanフローサイトフルオロメータ(Becton Dickinson)によって5000細胞/チューブの蛍光を計数した。

20

30

【0110】

ルシフェラーゼアッセイ

ヒトTrkA(またはヒトTrkC)を発現するHEK-293細胞の安定株を調製した。限界希釈を用いて2週間ハイグロマイシンの存在下で、トランスフェクトした細胞を選択した。最初の評価の後、研究のために細胞の単一クローンを選択した。ルシフェラーゼアッセイのために、96ウェルプレート中、増殖培地100 μ l中に 1.5×10^4 細胞/ウェルで細胞をプレーティングした。翌日、細胞を試験抗体または10 \times 終濃度のNGF(もしくはNT-3)10 μ lで処理した。製造者のプロトコルに従って、Promega Steady-Gloアッセイキットを使用して、処理の16時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。簡潔に記載すると、培地を100 μ lのPBSと置換し、そして100 μ lのSteady-Glo試薬を添加した。TopSealでプレートを密封した後で、Titer Plate Shakerでプレートを振盪(速度約5、5分間)し、次いでTopCount NXT v2.13機器(Packard)を使用して蛍光を測定した。

40

【0111】

結果

モノクローナル抗体のFACS分析

FACSによって、ヒトTrkAに対するそれらの結合活性について、表1の各Trk

50

B特異的モノクローナル抗体についての混ぜ物なしの馴化培地を特徴付けた。試験した全ての抗体は、ヒトTrkAに結合できなかった。詳細には、約5～約60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲の濃度(表1中の各抗体についての詳細な濃度を参照のこと、これらは約30～約500nMの範囲の濃度に対応する)で抗体を試験し、そして各抗体はいかなる検出可能な結合も示さなかった。FACSデータを図9Aに示す。

【0112】

ルシフェラーゼ活性

また、アゴニスト活性を評価するためにTrkAまたはTrkCルシフェラーゼアッセイを使用して表2の精製TrkB特異的抗体のサブセットを検査した。試験した抗体のいずれも、TrkAまたはTrkCを活性化しなかった。詳細には、約3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (約20nM)までの濃度で抗体を試験し、そして各々の場合において、抗体は基礎を超える検出可能な増加を引き起こさなかった(TrkAについては図9Bを、そしてTrkCについては図10を参照のこと)。対照的に、NGFはTrkAについて300ng/mlで基礎の約6倍の増加を誘導し(図9A)、そしてNT-3はTrkCについて300ng/mlで基礎の約6倍のシグナル増加を誘導した(図10)。

【0113】

実施例3

この実施例では、新生児虚血性低酸素症(HI)のげっ歯類モデルにおける複数のTrkB抗体のインビボ試験を記載する。

【0114】

材料および方法

動物および外科的手順

新生児虚血性低酸素症(HI)のげっ歯類モデルは、図11に記載するLevine手順に基づいた(例えば、Levine, Am. J. Pathol. 36:1-17, 1960; Rice et al., Ann. Neurol., 9:131-141, 1981およびGidday et al., Neurosci. Lett. 168:221-224, 1994を参照のこと(各々を出典明示で援用する))。簡潔に記載すると、P7の子を2.5%ハロタンを用いて麻酔し、そして左総頸動脈を永久結紮した。切開部を縫合した後に、回復および給餌のために子を飼育ケージに戻した。2時間後に、子を個別の容器に入れ、そこを通して加湿8%酸素を流した。2.5時間の虚血性低酸素期間の後に、子をそれらの飼育ケージに戻した。処置のために、動物に、低酸素性発作の直前に0.1または0.3nmolの、BDNF、抗TrkBモノクローナル抗体29D7、コントロールIgG1またはビヒクルのいずれかの脳室内注射5 μl を与えた。

【0115】

脳組織損失の評価

P14で、何匹かのマウスから脳切片を調製して、HI損傷によって引き起こされた損傷を決定した。線状体、皮質および海馬の冠状切片を、クレシルバイオレットを用いて染色し、病変半球における%領域損失をインタクトな領域と比較した。図23は、異なる処置について線状体および海馬から得られた染色を比較する。図24Aおよび24Bは、それぞれ異なる処置についての総脳組織損失および小領域組織損失を比較する。データを平均および平均の標準偏差(S.E.M.)として示す。BDNFおよび抗TrkBモノクローナル抗体29D7は、有意な用量依存的なHI損傷からの脳の保護を示した。保護は脳のいかなる特定の小領域にも局在化していなかったが、最大の保護は一般に皮質において観察された。

【0116】

生化学的分析

HI損傷の24時間後に、生化学的分析のために、マウスのサブセットから脳切片を調製した。海馬および皮質脳組織を解剖し、溶解し、そしていくつかの生化学的アッセイに供した。

10

20

30

40

50

【0117】

DEV D - A M C 切断アッセイを使用して、カスパーゼ3活性を決定した（例えば、Nagase et al., Immunol Lett. 84:23, 2002を参照のこと（出典明示で援用する））。異なる試験試薬0.1 nmolを与えたマウスについて、脳の異なる領域についての結果を図25に示す（平均±S.E.M）。BDNFおよび抗TrkBモノクローナル抗体29D7は、HI損傷によって引き起こされるカスパーゼ3活性化をブロックした。

【0118】

0.3 nmolの異なる試験試薬で処置したマウス由来のタンパク質サンプル（30 μg/レーン）を、SDS-PAGEによって分離し、特定のカスパーゼ3基質（PARPおよびスペクトリン）に対する抗体を用いたイムノプロットングに供した。アクチンに対する抗体をコントロールとして使用して、負荷したタンパク質が等しいことを確認した。図26に示す結果は、BDNFおよび抗TrkBモノクローナル抗体29D7によるこれらのカスパーゼ3基質の切断の阻害を実証する（頸動脈結紮のC = 対側およびI = 同側）。

10

【0119】

フォローアップ実験

以下は、この研究のマウスに対して実施し得る予言的フォローアップ実験である。空間学習および記憶試験における残りのマウスの成績を評価し得る（例えば、限定するものではないが、Almli et al., Exp. Neurology 166:99-114, 2000（出典明示で援用する）に記載される試験）。例えば、マウスをP20~P30の間で試験し得る。所望により、その期間の間の数日にわたって、またはより後の時点でさえ成績を評価し得る。

20

【0120】

陽性の結果（脳組織損失の減少、空間学習および記憶における改善またはその他によって測定される）を生じる処置プロトコルを、投与量のより広い範囲にわたってさえ反復し得る。あるいはまたはさらに、処置プロトコルを、異なった型の投与（例えば、腹腔内投与、静脈内投与など）を用いて；異なる開始点（例えば、結紮前、低酸素の直後、低酸素後の可変遅延を用いてなど）を用いて；および/または異なる持続期間または頻度（例えば、損傷後に2週間毎日処置）を用いて反復し得る。

30

【0121】

実施例4

この実施例では、ヒトTrkBに対するヒト単鎖Fv(scFv)抗体の調製および試験を記載する。以下の方法を使用して、単鎖Fvフラグメントを含むヒト抗体ファージディスプレイライブラリー（CS, BMVおよびDP-47; Cambridge Antibody Technology）をTrkB結合について選択した。

【0122】

材料および方法

パニングによる抗体の選択

10 μgのhTrkB-EDC-Fcを100 μl中でNunc Maxisorpプレート上にコーティングし、一晚4℃で放置した。ファージライブラリーを事前にブロッキングし（2×PBS中の6%スキムミルク50 μlに添加したファージアリコート50 μl）、1時間室温でPSGL-Fc(Wyeth, Lot. No. 00H25M004)に対してネガティブ選択をして、Fcに対して反応性のファージを枯渇させた。除外したファージを標的タンパク質コーティングプレート(hTrkB-EDC-Fc)に移し、室温で2時間インキュベートした。ウェルを、PBS/0.1% Tween 20を用いて10回、そしてPBSを用いて5回洗浄した。結合したファージを新たに作製した100 mM TEA（超純水10 ml中のTEA 140 μl）50 μl/ウェルを用いて溶出した。滅菌1 M Tris-HCl pH 7.5 25 μlを使用して、溶出したファージを中和した。ファージを、対数増殖期中期（600 nmでのO.D = 0.5

40

50

)のイーコリTG1細胞10mlに感染させた。形質転換した細胞を2×TYAG寒天Bioassayプレート上に広げ、一晚30℃でインキュベートした。

【0123】

可溶性ファージ選択(ビオチン選択)

以下の例外を有して、上記のプロトコルに従ってビオチン化hTrkB-EDC-Fcを使用して、ファージ抗体を選択した。まず、100nMビオチン化PSGL-Fcに対して、事前にブロッキングしたファージを除外し、続いて100nMビオチン化hTrkB-EDC-Fcに対してポジティブ選択をした。事前にブロッキングした磁性ストレプトアビジンビーズ(Dynabeads M-280 streptavidin, Cat. No. 112.06)を使用して、ヒトTrkB特異的ファージを捕獲した。ビーズを、PBS/0.1% Tween20で10回、PBSで3回洗浄した。結合したファージを新たに作製した100mM TEA(超純水10ml中のTEA 140μl)200μlを用いて溶出し、滅菌1M Tris-HCl pH7.5 100μlを溶出したファージに使用して中和して、TEAを中和した。ファージをイーコリに感染させ、上記の工程に記載のように増殖させた。

10

【0124】

ファージレスキュー

ファージを感染させたイーコリをBioassay寒天プレートから掻き取り、Bioassayプレート当り2×TYGA10mlと混合した(100μg/ml Ampおよび2%グルコースを含む2×TY)。2×TYAG 20mlを細胞懸濁物100μlとともにインキュベートし、37℃(300rpm)で600nmでのOD=0.3~0.5まで増殖させた。イーコリをMK13K07ヘルパーファージ3.3μlに重感染させ、37℃(150rpm)で1時間インキュベートした。重感染させた細胞を、2×TYAK培地(2×TY/100μg/ml Amp/50μg/mlカナマイシン)20ml中に再懸濁し、一晚25℃、280rpmで増殖させた。イーコリを3500rpmで15分間スピンし、ファージを含む上清を次回の選択のために使用した。

20

【0125】

ELISAのためのファージ抗体調製

感染させたイーコリの単コロニーを、1ウェル当り2×TYAG培地(2%グルコース)150mlを含むマイクロタイターウェル(Costat Cellwells)に取り出した。クローンを37℃(100~120rpm)で5~6時間(600nmでのOD=0.5)増殖させた。M13K07ヘルパーファージストック(10¹³pfu/ml)を2×TYAG培地を用いて1:1000に希釈し、20μlを各ウェルに添加した。ウェルを、37℃(100rpm)で1時間インキュベートした。プレートを、遠心分離(3200rpm、10分間)し、上清を除き、そして細胞を2×TYAK培地150μl中に再懸濁した。培養物を一晚25℃(120rpm)で増殖させた。翌日、プレートを遠心分離(3200rpm、15分間)し、そして上清をファージELISAアッセイのために新たなプレートに移した。

30

【0126】

ファージELISA

ELISAプレートを、PBS中の1μg/ml hTrkB-EDC-Fc(コントロールとしてBSA)50μl/ウェルで、4℃で一晩コーティングした。ウェルを、PBSで3回リンスし、PBS/3%スキムミルク 300μl/ウェルを用いて室温で1時間ブロッキングした。ファージを、等量のPBS/6%スキムミルクでブロッキングし、室温で1時間インキュベートした。ブロッキングしたファージ50μlをELISAウェルに添加し、室温で1時間インキュベートした。プレートをPBS/0.1% Tweenで3回、続いてPBSで3回洗浄した。PBS/3%スキムミルク中のHRP-マウス抗M13抗体(1:5000, Amersham Pharmacia biotech, Cat. No. 27-9421-01)50μlを各ウェルに添加し、室温で1時間インキュベートした。プレートを上記のように洗浄し、TMB基質50μlを

40

50

各ウェルに添加し、2～5分間発色させた。0.5 M 硫酸 50 μ l を添加することによって反応を停止させ、吸光度を 450 nm で読み取った。

【0127】

FACSのための単鎖Fv調製

単コロニーを取り出し、37℃で5～6時間2×TYAG培地0.9 mlを含むディープウェルマイクロタイタープレート中で増殖させた。2×TY培地中0.02 mMの終濃度になるようにIPTGを添加することによってscFv発現を誘導し、30℃で一晩増殖させた。一晩の増殖の後にイーコリを回収し、水中で1:5希釈したTES緩衝液150 μ lを用いて浸透圧ショックし、氷上で30分間インキュベートした。細胞を遠心分離し、上清をFACSアッセイのために新たなプレートに移した。TrkBを用いて安定にトランスフェクトされた293細胞を、上記のように調製したscFvを用いて染色した。細胞を氷上で30分間インキュベートし、次いでPBS緩衝液で洗浄した。1:1000に希釈した9E10抗myc抗体を含む溶液を使用し、続いて1:500に希釈したPE結合抗マウスIgG-Fc抗体を添加することによって単鎖Fvを検出した。染色した細胞を、Bectin-Dickinson Flow Cytometerで分析した。

10

【0128】

結果

ファージELISA

表4は、異なるファージライブラリー選択（パニングおよび可溶性選択）からのファージELISAアッセイ由来の結果を示す。図18は、TrkB陽性クローン（BMVライブラリーパニング選択）の代表的なセット由来のファージ結合ELISAデータを示す。大部分のTrkB選択クローンは、TrkB-EDC-Fcに対して強く特異的な反応性を示し、コントロールタンパク質PSGL-Fcに対してはそうではなかった。

20

【0129】

【表4】

表4

抗原(選択)	ライブラリー	ファージELISA (%陽性)	配列 (%多様性)
TrkB-EDC-Fc (パニング)	CS	78	53
	BMV	58	23
	DP-47	45	39
ヒト化TrkB-EDC-Fc (可溶性)	CS	3	100
	BMV	6	50
	DP-47	10	50

30

【0130】

2回のパニング選択の後で、CSライブラリーからランダムに取り出したクローンの78%がTrkB-EDC-Fc結合について陽性であったが、PSGL-Fc結合についてはそうではなかった。同様に、2回の可溶性選択の後で、クローンの3%は陽性であった。BMVおよびDP-47ライブラリーについての数は、パニング選択からは58%および45%陽性クローンであり、可溶性選択からは6%および10%であった。DNA配列決定を使用して、本発明者らは、CSパニングクローンの53%は特有であり、一方CS可溶性選択クローンの100%が特有であることを確認した。BMVおよびDP-47ライブラリーについての数は、パニング選択からは23%および39%特有であり、可溶性選択からは50%および50%特有であった。

40

【0131】

FACS分析

図19は、FACSアッセイを使用して試験したTrkB選択scFv抗体の結合特異

50

性を示す。データは、TrkB選択scFv抗体が、特異的に（青色塗りつぶしヒストグラム）、コントロール細胞に対する交差反応性を有さないで（緑色白抜きヒストグラム）脱会合TrkBと反応することを示す。

【0132】

実施例5

この実施例では、29D7 TrkB抗体および29D7 FabフラグメントのヒトおよびマウスTrkBに対する結合活性を比較する。実施例1に記載のように、マウス（rhTrkB-EDC-Fc）およびヒト（rmTrkB-EDC）TrkBをELISAプレート上にコーティングした。

【0133】

図20Aおよび20Bは、それぞれヒトおよびマウスTrkBについてのELISA結合結果を示す。29D7 IgG抗体およびそのFabフラグメントの両方が、ヒトおよびマウスTrkBに対して用量依存的な結合活性を有する。しかし、FabのED₅₀値は、インタクトな27D7のものより約100倍低かった。アイソタイプコントロールIgG1もそのFabフラグメントもTrkBに結合しなかった。

【0134】

実施例6

この実施例では、実施例5の、29D7 TrkB抗体およびFabフラグメントのヒトTrkBに対するアゴニスト活性を比較する。実施例1に記載のルシフェラーゼアッセイ、および表面rhTrkBを発現するHEK-293細胞を使用して、アゴニスト活性を検討した。

【0135】

HEK293細胞を、示した濃度の29D7 IgGまたは29D7 Fabを用いて処理し、蓄積したルシフェラーゼ活性を処理の16時間後に測定した。図21に示すように、29D7の全IgGおよびFabの両方が用量依存的なルシフェラーゼ活性を誘導し、TrkBの活性化を示した。しかし、29D7 FabのEC₅₀値は、27D7 IgGのものより約27倍高かった（27D7 IgGおよび29D7 Fabについて、それぞれ0.083 nMおよび2.28 nM）。アイソタイプコントロールIgG1もそのFabフラグメントもTrkB活性化に対して効果を有さなかった。

【0136】

実施例7

この実施例では、特定の本発明のTrkBモノクローナル抗体のエピトープマッピング分析を記載する。ヒトTrkB細胞外ドメイン内の配列から推定される直鎖状、単ループおよび二重ループペプチドに対して、マッピングを実施した。

【0137】

図22に示すように、17D11モノクローナル抗体はヒトTrkBのIgG2セグメントのループ3（KNEYGKD、配列番号7、配列番号1のアミノ酸364～370）；およびヒトTrkBのIgG2セグメントのループ1（KGNPKP、配列番号8、配列番号1のアミノ酸308～313）を認識する。前者のエピトープに対するマウス配列（KNEYGKD、配列番号7、配列番号2のアミノ酸364～370）は、ヒト配列と同一である。後者のエピトープに対するマウス配列（RGNPKP、配列番号9、配列番号2のアミノ酸308～313）は、1つのアミノ酸で異なる。

【0138】

図22に示すように、29D7、7F5、11E1および19E12モノクローナル抗体の全てが、ヒトTrkBのIgG1セグメントのループ3（ENLVGED、配列番号10、配列番号1のアミノ酸269～275）を認識し；そしてヒトTrkBのIgG1セグメントのループ1（AGDPVP、配列番号11、配列番号1のアミノ酸221～226）もまた認識し得る。前者のエピトープに対するマウス配列（ENLVGED、配列番号10、配列番号2のアミノ酸269～275）は、ヒト配列と同一である。後者のエピトープに対するマウス配列（GGDPLP、配列番号12、配列番号2のアミノ酸22

10

20

30

40

50

1 ~ 226) は、2つのアミノ酸で異なる。

【0139】

実施例 8

この実施例では、抗 Trk B 抗体 29D7 を用いて実施したインビボでの Trk B 活性化実験を記載する。簡潔に記載すると、P7の子に 0.3 nmol の、抗 Trk B モノクローナル抗体 29D7 または ビヒクルのいずれかの脳室内注射 5 μ l を与えた。次いで、注射の 1、2、6、12 および 24 時間後に、脳組織を解剖した。組織を溶解し、等量のタンパク質サンプル (30 μ g / レーン) を SDS - PAGE によって分離し、Trk B 活性化の結果としてリン酸化されたタンパク質 (リン酸 - ERK 1 / 2 およびリン酸 - AKT) に特異的な抗体を用いたイムノブロッティングに供した。アクチンに対する抗体をコントロールとして利用して、負荷したタンパク質が等しいを確認した。図 27 の結果は、抗 Trk B モノクローナル抗体 29D7 が、ERK 1 / 2 および AKT の時間依存的なリン酸化を誘導することを示す (海馬および皮質サンプル由来のデータを示し、これは 4 つの他のサンプルから得られた結果の代表である)。

【0140】

図 28 は、図 27 に示す ERK リン酸化の濃度測定定量である。図 29 は図 27 に示す AKT リン酸化の濃度測定定量である。図 30 は、固定し、神経細胞特異的マーカー NeuN に対する抗体 (左) および抗リン酸 ERK 1 / 2 抗体 (中央) を用いて免疫蛍光標識化した、ビヒクルおよび 29D7 処理した脳組織を示す。右の図は、これらの 2 つを合わせたものを示す。ERK 1 / 2 リン酸化は、29D7 処理したサンプルにおいて有意により強い。図 31 は、抗 Trk B モノクローナル抗体 29D7 の脳室内注射後の、皮質および海馬組織における ERK 1 / 2 活性化の経時変化を示す。

【0141】

実施例 9

この実施例では、抗 Trk B 抗体 29D7 を用いて実施した MAG / ミエリン誘導神経突起阻害アッセイを記載する。簡潔に記載すると、組換えラット MAG (1 - 5) または精製ラット ミエリン 50 μ l のアリコート を 96 ウェル平底組織培養プレートに添加し、一晚室温で風乾した。別に示さない限り、MAG (1 - 5) または ミエリンの全量は、0.25 ~ 0.5 μ g / ウェルであった。翌日、MAG または ミエリンコーティングプレートをポリ - D - リジン (17 μ g / ml) 50 μ l で 1.5 時間処理し、続いて 10% FBS を含む培地とともに 1 時間 37 $^{\circ}$ C でインキュベートした。培地の吸引後に、ラット CGN 細胞を、200 mM L - グルタミン、2 M KCl および 100 U / ml ペニシリン および ストレプトマイシンを含む B27 補充 Neurobasal 増殖培地中に 8000 細胞 / ウェルの密度でプレーティングした。示した場合、処理試薬を細胞のプレーティング時に添加した。神経細胞を、5% CO₂ で平衡化した 37 $^{\circ}$ C インキュベーター中で増殖させた。プレーティングの約 20 時間後に、4% パラホルムアルデヒドで細胞を固定し、Tuj1 染色のために処理した。細胞を 0.2% Triton X / PBS (TPBS) を用いて 5 分間室温で透過処理し、続いて TPBS 中の 1.5% 正常ヤギ血清 (S - PBS) とともに 30 分間インキュベートして、非特異的な結合をブロックした。anti - Neuronal Class III β Tubulin モノクローナル抗体 (Tuj1, 1 : 1000; Covance # MMS - 435P) のアリコートを、細胞に添加した。1 時間室温でインキュベートした後で、PBS を用いて非結合抗体を 3 回洗浄し、Alexa Fluor 488 マウス抗ヤギ IgG 抗体 (1 : 500, Molecular Probe # A - 11001) のアリコートを添加して、シグナルを可視化した。Hoechst 33342 (Molecular Probe # H - 3570, 2 μ g / ml) を核を標識するために含めた。洗浄した後に、プレートを密封し、Cellomics アレイスキャンを使用して神経突起成長について分析した。代表的には、1 ウェルあたり、9 つの領域由来の約 300 個の細胞を分析し、各処置を四連で行った。

【0142】

M A G およびミエリンは、培養物中の一次小脳顆粒神経細胞の神経突起成長を阻害する。漸増濃度の組換えラットM A G (1 - 5) または精製ラットミエリンを96ウェル組織培養プレート上にコーティングし、一次神経細胞の神経突起伸展を、上記のように20時間目に測定した。図32に示すように、(A) M A G および(B) ミエリンは、神経突起成長の用量依存的な阻害をもたらした。

【0143】

次いで、コントロールまたは一定の範囲の濃度のT r k B 抗体29D7とともに、C G N 神経細胞をM A G またはミエリンのいずれかでコーティングしたプレートにプレATINGした。神経突起伸展を、処理の20時間後に測定した。図33に示すように、29D7は、(A) M A G および(B) ミエリン媒介神経突起阻害の逆転を導いた。

10

【0144】

他の実施態様

本発明の他の実施態様は、本明細書で開示される本発明の明細書または実施の考慮から当業者にとって明白となる。明細書および実施例は例示のみとして考えられ、本発明の真の範囲は特許請求の範囲によって示されることが意図される。

【図面の簡単な説明】

【0145】

【図1】図1は、5匹の免疫化マウス(M 1 ~ M 5) 由来の免疫血清中のT r k B 特異的抗体活性を示す。ヒトI g G 1 のF c 領域に融合されたヒトT r k B の細胞外ドメインを含む組換えタンパク質(r h T r k B - E D C - F c) を用いたE L I S A アッセイ由来の免疫血清結合結果を(A) において示す。マウスT r k B の細胞外ドメインを含む組換えタンパク質(r m T r k B - E D C) を用いたE L I S A アッセイの免疫血清結合結果を(B) に示す。競合E L I S A アッセイにおいて、免疫血清がr h T r k B - E D C - F c とB D N F との相互作用をブロックし得る程度を(C) に示す。H E K - 2 9 3 細胞上の表面r h T r k B への免疫血清結合を(D) に示す。

20

【図2】図2は、表面r h T r k B を発現するH E K - 2 9 3 細胞を使用するルシフェラーゼ活性アッセイにおいてニューロトロフィンを用いて得られたコントロール結果を示す。これらのコントロール結果は、アッセイがT r k B の活性化を選択的に表し得ることを示す。

【図3】図3は、図2と同じルシフェラーゼ活性アッセイにおいて、免疫血清を用いて得られた結果を示す。これらの結果は、h T r k B 細胞の免疫採血とのインキュベーションが、用量依存的にルシフェラーゼシグナルを有意に増加させたことを示す。

30

【図4】図4は、図2と同じルシフェラーゼ活性アッセイにおいて、特定のT r k B 抗体を用いて得られた結果を示す。全ての抗体が、 10^{-10} (M) の範囲のE C ₅₀ でシグナルの用量依存的な増加を行き起こした。最大シグナルウィンドウは、大部分の抗体について基礎の約7倍であり、これは200ng / ml のB D N F によって誘導された応答(基礎の6.2倍) に匹敵した。

【図5】図5は、神経突起成長アッセイにおいて特定のT r k B 抗体を用いて得られた結果を示す。アッセイは、神経細胞分化に際してT r k B を発現することが知られているヒト神経芽細胞腫S Y 5 Y 細胞を使用した。神経突起長(A) および分枝部位数(B) の増加によって実証されるように、B D N F および大部分の抗体の添加は、神経突起成長を促進した。少数の処理グループの代表的な画像を(C) に示す。これらの抗体のサブセットについて得られた全用量応答分析の結果を(D) に示す。

40

【図6】図6は、神経保護アッセイにおいて特定のT r k B 抗体を用いて得られた結果を示す。アッセイは、血清除去損傷後の分化S Y 5 Y 細胞の生存を測定する。結果は、B D N F およびいくつかの抗体が分化S Y 5 Y 細胞を保護したことを示し、このことは用量依存的な細胞生存率の増加を実証する。

【図7】図7は、組換えマウスT r k B (r m T r k B) に結合することが示された3つの抗T r k B 抗体(1 8 C 3 、 2 9 D 7 および 1 7 D 1 1) を、ラット小脳顆粒神経細胞(C G N) 培養物中で、内因性ラットT r k B 受容体に対する活性について試験した場合

50

に得られた結果のいくつかを示す。神経突起成長アッセイおよび神経保護アッセイについての結果を示す(29D7のみ)。

【図8】図8は、TrkB自己リン酸化の誘導について、ウェスタン分析において特定の抗TrkB抗体を評価した場合に得られた結果を示す。全ての抗体が強力なTrkBリン酸化を導き、これらの効果はキナーゼ阻害剤K252aを用いた処理によって拮抗され、このことはこれらのTrkB結合抗体がTrkBの活性化を引き起こしたことを示す。

【図9】図9は、特定の抗TrkB抗体を用いて得られたFACS TrkA結合アッセイ(A)およびTrkAルシフェラーゼ活性アッセイ(B)の結果を示す。これらの結果は、本発明の抗体がヒトTrkA細胞と結合せず、それを活性化しないことを示す。

【図10】図10は、TrkCルシフェラーゼ活性アッセイにおいて特定の抗TrkB抗体を評価した場合に得られた結果を示す。これらの結果は、本発明の抗体がヒトTrkC細胞を活性化しないことを示す。

【図11】図11は、Levine手順に基づく新生児虚血性低酸素症(HI)のげっ歯類モデルを示す。

【図12】図12は、ヒトTrkBのアミノ酸配列(配列番号1)を示す。

【図13】図13は、マウスTrkBのアミノ酸配列(配列番号2)を示す。

【図14】図14は、ラットTrkBのアミノ酸配列(配列番号3)を示す。

【図15】図15は、ニワトリTrkBのアミノ酸配列(配列番号4)を示す。

【図16】図16は、ヒトTrkAのアミノ酸配列(配列番号5)を示す。

【図17】図17は、ヒトTrkCのアミノ酸配列(配列番号6)を示す。

【図18】図18は、TrkB陽性scFvクローンの代表的なセット(BMVライブラリーパニング選択)由来のファージ結合ELISAデータを示す。

【図19】図19は、FACSアッセイを使用して試験されたTrkB選択scFv抗体の結合特異性を示す。データは、TrkB選択scFv抗体が、特異的に(塗りつぶしたヒストグラム)コントロール細胞に対して交差反応性を有せずに(白抜きのヒストグラム)、膜結合TrkBと反応することを示す。

【図20】図20は、29D7 IgG抗体およびそのFabフラグメントについてのヒト(A)およびマウス(B)TrkBとのELISA結合結果を示す。29D7の全IgGおよびFabの両方が、ヒトおよびマウスTrkBに対する用量依存的な結合活性を示した。しかし、FabのED₅₀値は、インタクトな27D7のものより約100倍低かった。アイソタイプIgG1もそのFabフラグメントもTrkBに結合しなかった。

【図21】図21は、29D7 IgGまたは29D7 Fabを用いた処理の16時間後に測定されたHEK-293細胞におけるルシフェラーゼ活性を示す。29D7の全IgGおよびFabの両方が用量依存的なルシフェラーゼ活性を誘導し、TrkBの活性化を示した。しかし、29D7 FabのEC₅₀値は、27D7 IgGのものより約27倍高かった(27D7 IgGおよび29D7 Fabについて、それぞれ0.083 nMおよび2.28 nM)。アイソタイプコントロールIgG1もそのFabフラグメントもTrkB活性化に対する効果を有さなかった。

【図22】図22は、抗TrkBモノクローナル抗体17D11、29D7、7F5、11E1および19E12のエピトープマッピング分析の結果を示す。17D11モノクローナル抗体は、ヒトTrkBのIgG2セグメントのループ3(KNEYGKD、配列番号7、配列番号1のアミノ酸364~370);および、ヒトTrkBのIgG2セグメントのループ1(KGNPKP、配列番号8、配列番号1のアミノ酸308~313)を認識する。29D7、7F5、11E1および19E12モノクローナル抗体は全て、ヒトTrkBのIgG1セグメントのループ3(ENLVGED、配列番号10、配列番号1のアミノ酸269~275)を認識し;ヒトTrkBのIgG1セグメントのループ1(AGDPVP、配列番号11、配列番号1のアミノ酸221~226)もまた認識し得る。

【図23】図23は、虚血性低酸素症(HI)損傷後の異なる処置について、線条体および海馬から得られた染色を比較する。

10

20

30

40

50

【図24】図24は、HI損傷後の異なる処置について、全脳組織損失(A)および小領域組織損失(B)を比較する。データを平均および平均の標準誤差(S.E.M.)として示す。BDNFおよび抗TrkBモノクローナル抗体29D7は、HI損傷由来の脳の有意な用量依存的保護を示した。保護は、いずれの特定の脳の小領域にも局在化されなかったが、最大の保護は一般に皮質において観察された。

【図25】図25は、HI損傷の後の異なる処置について、カスパーゼ3活性を決定するために使用したDEV D-AMC切断アッセイの結果を示す。脳の異なる領域についての結果を平均±S.E.M.として示す。BDNFおよび抗TrkBモノクローナル抗体29D7は、HI損傷によって引き起こされたカスパーゼ3活性化をブロックした。

【図26】図26は、HI損傷の後に異なる処置を与えられたマウスから取得されたタンパク質サンプルのイムノプロットを示す。SDS-PAGEによってサンプルを分離し、特定のカスパーゼ3基質(PARPおよびスペクトリン)に対する抗体を用いるイムノプロットングに供した。アクチンに対する抗体をコントロールとして使用して、負荷したタンパク質が等しいことを確認した。結果は、これらのカスパーゼ3基質の切断が、BDNFおよび抗TrkBモノクローナル抗体29D7によって阻害されたことを示す(頸動脈結紮のC=対側およびI=同側)。

【図27】図27は、抗TrkB抗体29D7(または、コントロールとしてビヒクル)の脳室内注射後の正常マウスから取得されたタンパク質サンプルのイムノプロットを示す。注射の1、2、6、12および24時間後にサンプルを取得した。SDS-PAGEによってサンプルを分離し、TrkB活性化の結果としてリン酸化されたタンパク質(リン酸-ERK1/2およびリン酸-AKT)に特異的な抗体を用いた免疫プロットングに供した。アクチンに対する抗体をコントロールとして使用して、負荷したタンパク質が等しいことを確認した。結果は、抗TrkBモノクローナル抗体29D7がERK1/2およびAKTの時間依存的なリン酸化を誘導したことを示す(海馬および皮質サンプル由来のデータを示し、これは4つの他のサンプルから得られた結果の代表である)。

【図28】図28は、図27において示されるERKリン酸化の濃度測定定量である。

【図29】図29は、図27において示されるAKTリン酸化の濃度測定定量である。

【図30】図30は、固定し、神経細胞特異的マーカーNeuNに対する抗体(左)および抗リン酸ERK1/2抗体(中央)を用いて免疫蛍光標識した、ビヒクルおよび29D7処理脳組織を示す。右側の図は、これらの2つを合わせたものを示す。ERK1/2リン酸化は、29D7処理サンプルにおいて有意により強い。

【図31】図31は、抗TrkBモノクローナル抗体29D7の脳室内注射後の、皮質および海馬組織におけるERK1/2活性化の経時変化を示す。

【図32】図32は、(A)MAGおよび(B)ミエリンによって引き起こされる一次小脳顆粒神経細胞の神経突起成長の用量依存的な阻害を示す。

【図33】図33は、抗TrkBモノクローナル抗体29D7によって引き起こされる(A)MAGおよび(B)ミエリン媒介神経突起阻害の逆転を示す。

10

20

30

【 図 1 - 1 】

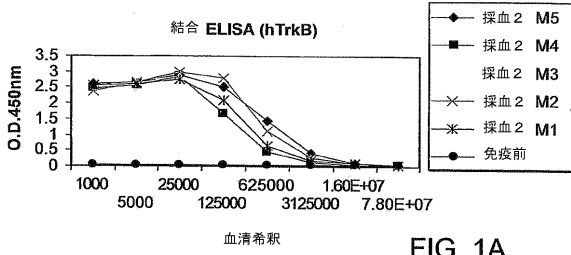


FIG. 1A

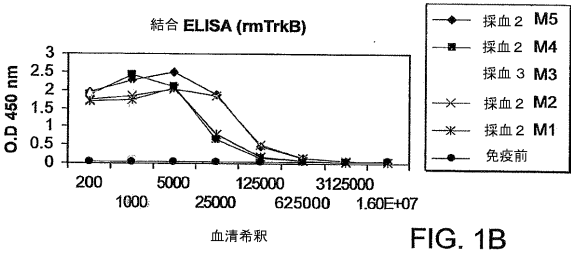


FIG. 1B

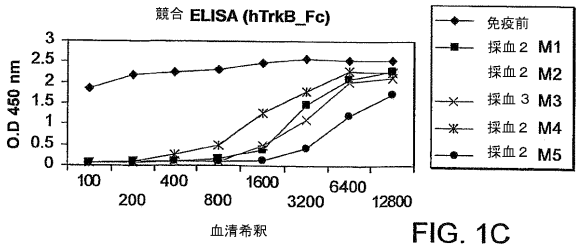


FIG. 1C

【 図 1 - 3 】

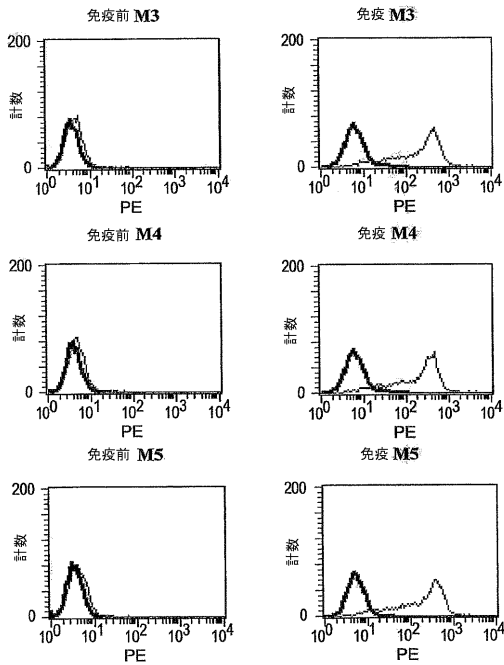


FIG. 1D-2

【 図 1 - 2 】

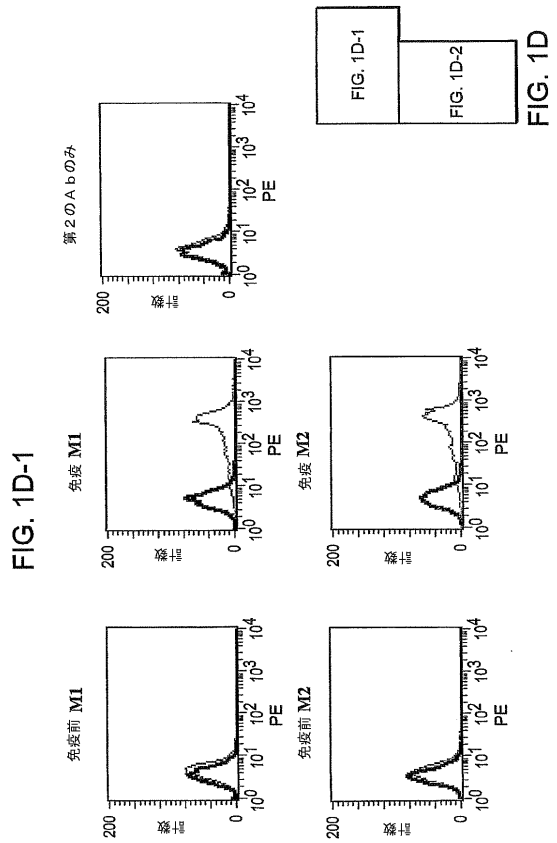


FIG. 1D-1

【 図 2 】

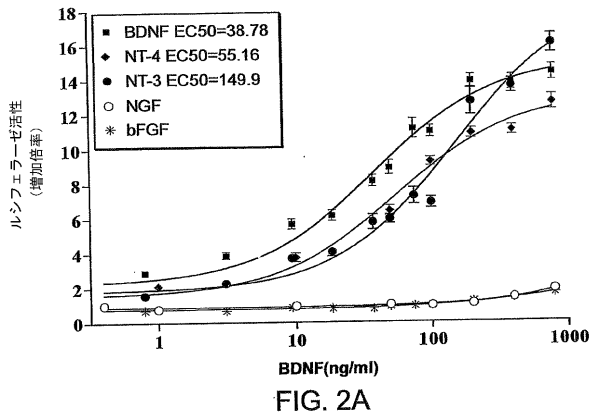


FIG. 2A

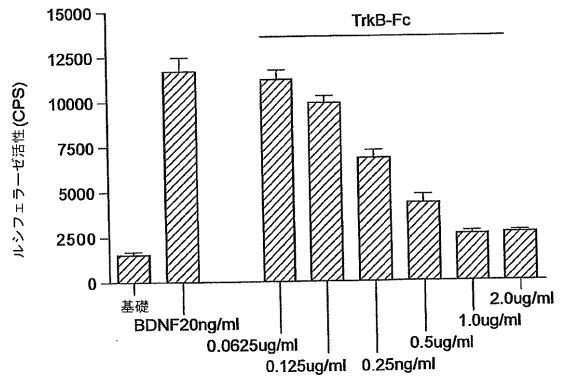
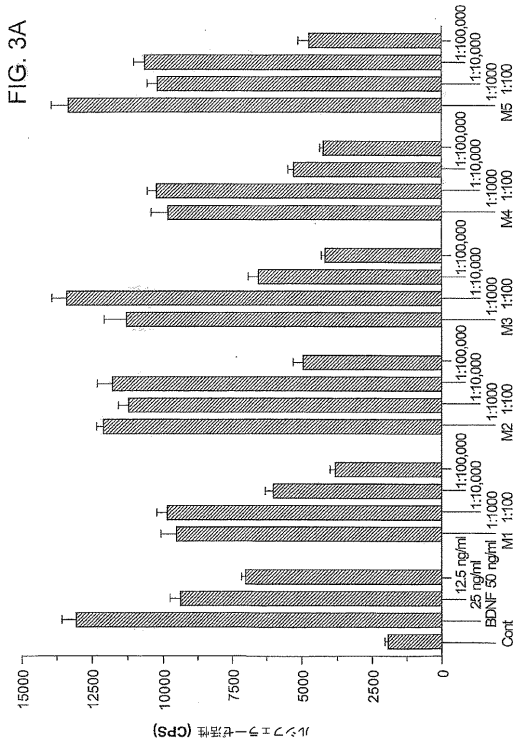
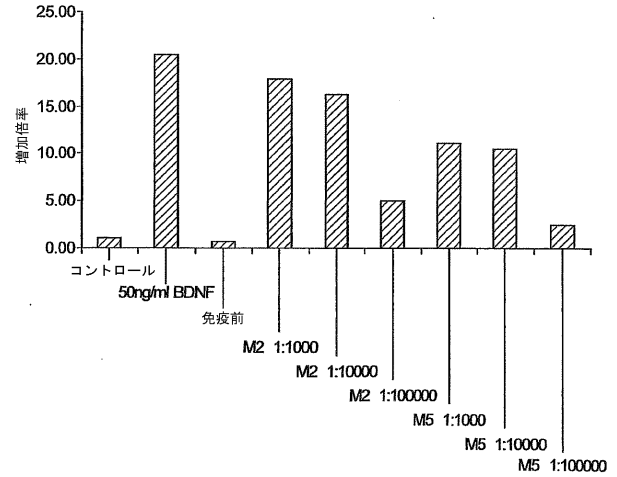
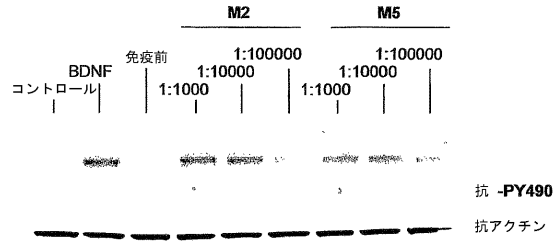


FIG. 2B

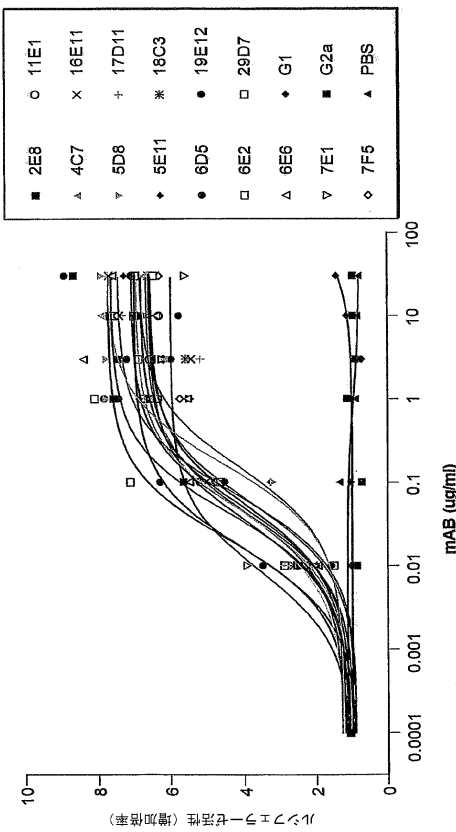
【 図 3 - 1 】



【 図 3 - 2 】



【 図 4 - 1 】



【 図 4 - 2 】

mAb	ルシフェラーゼ活性	
	増加倍率	EC50 (nM)
2 E8	7.7	0.28
4 C7	6.9	0.29
5 D8	7.8	1.07
5 E11	6.9	0.97
6 D5	6.6	0.36
6 E2	7.5	0.46
6 E6	7.1	0.30
7 E1	6.0	0.05
7 F5	6.6	0.33
11 E1	6.6	0.21
16 E11	6.8	0.31
17 D11	6.6	0.23
18 C3	6.7	0.29
19 E12	7.7	0.14
29 D7	7.0	0.10

FIG. 4B

【 図 5 - 1 】

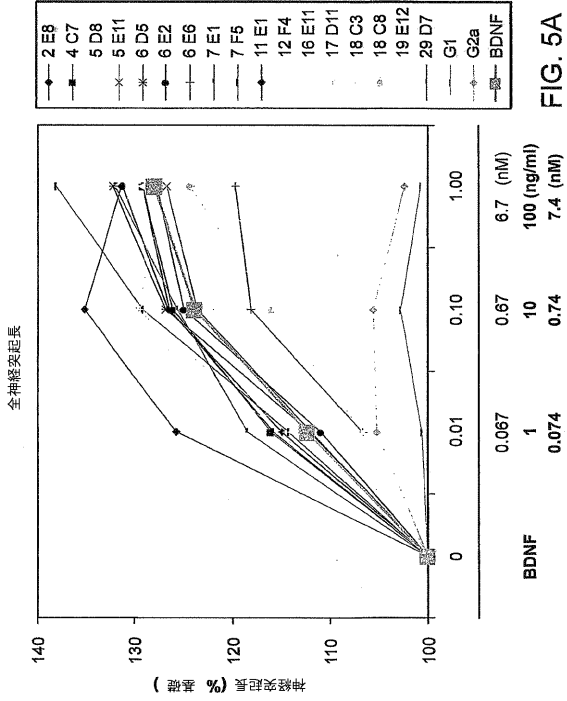


FIG. 5A

【 図 5 - 2 】

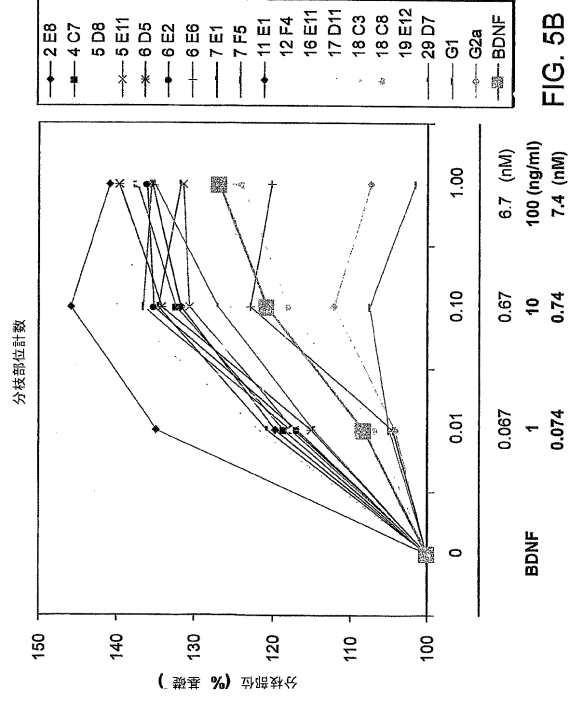


FIG. 5B

【 図 5 - 3 】

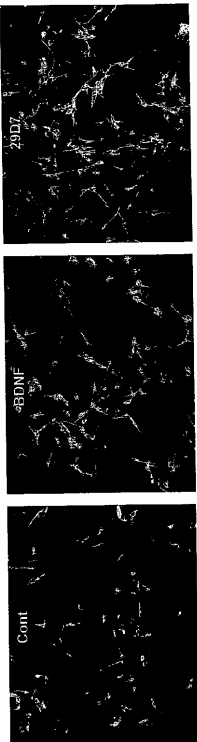


FIG. 5C

【 図 5 - 4 】

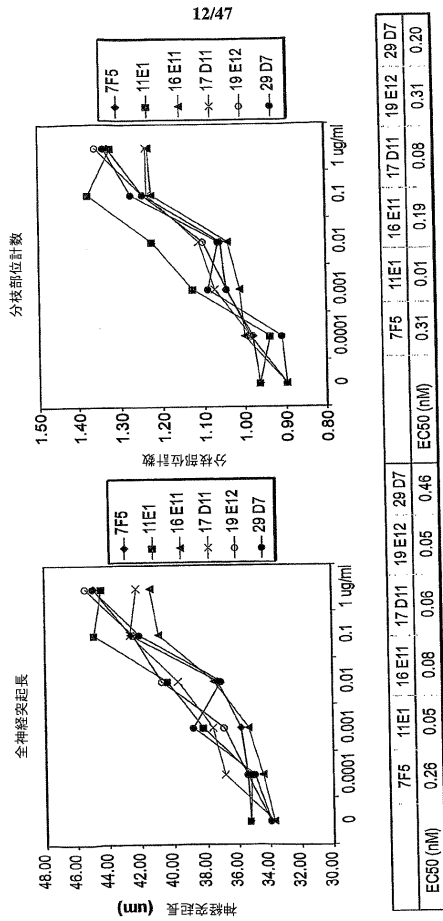


FIG. 5D

【 図 6 】

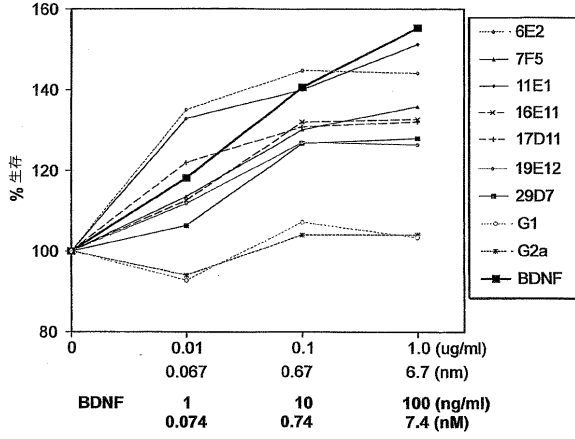


FIG. 6

【 図 7 - 1 】

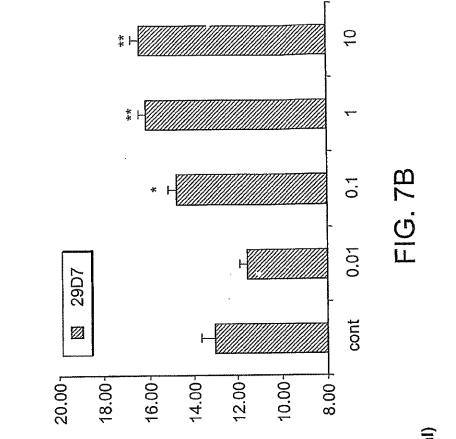


FIG. 7B

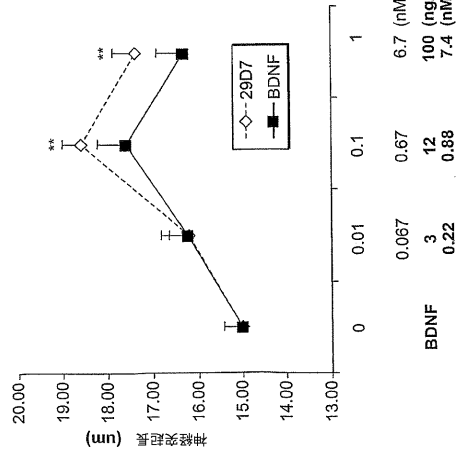


FIG. 7A

【 図 7 - 2 】



FIG. 7C

【 図 8 】

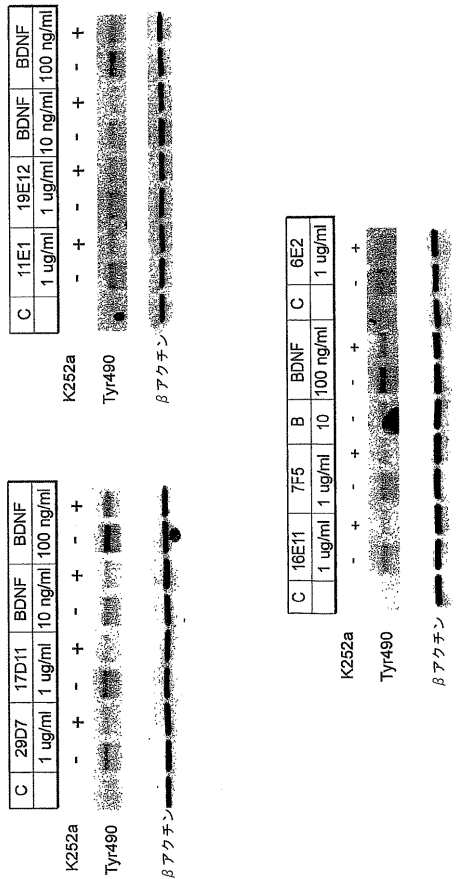


FIG. 8

【 図 9 - 1 】

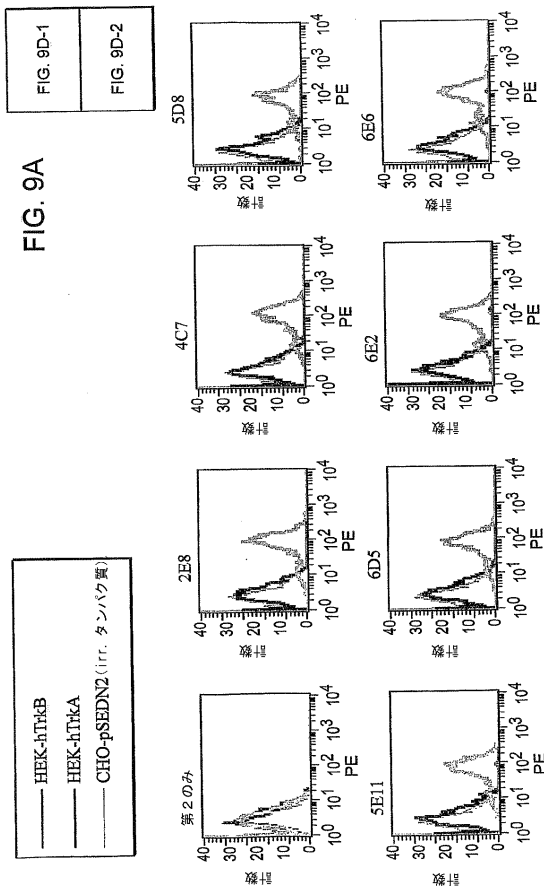


FIG. 9A

FIG. 9A-1

【 図 9 - 2 】

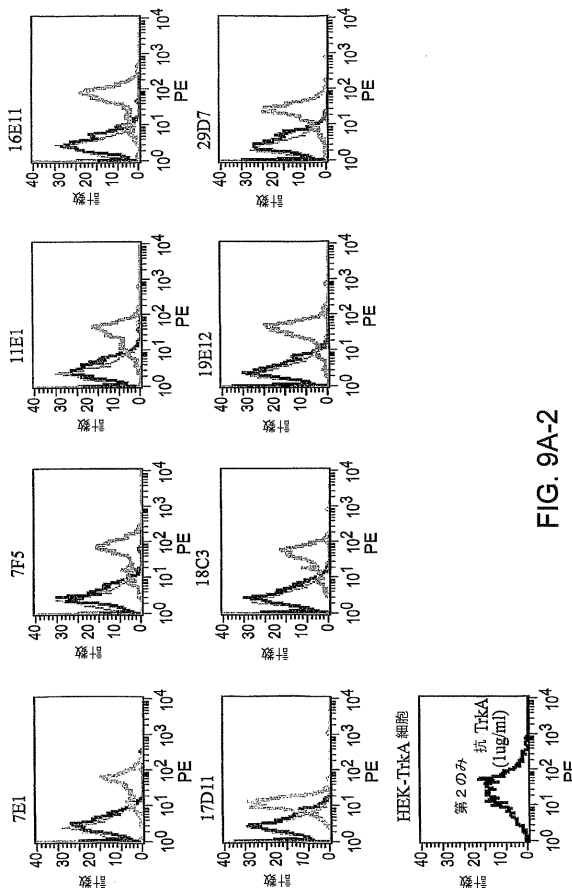


FIG. 9A-2

【 図 9 - 3 】

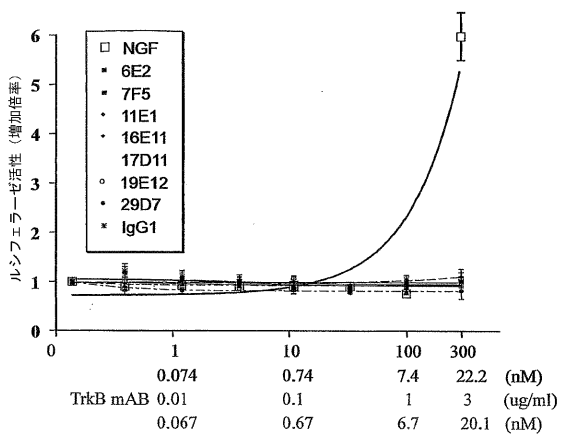


FIG. 9B

【 図 10 】

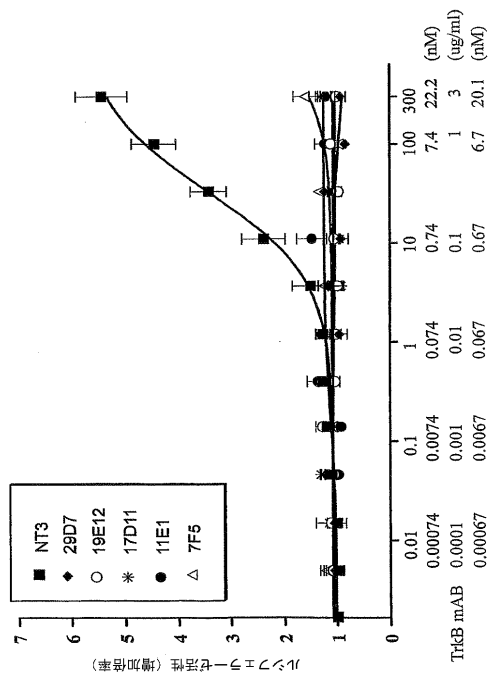


FIG. 10

【 図 1 1 】

新生児低酸素血症 (HI) のげっ歯類モデル

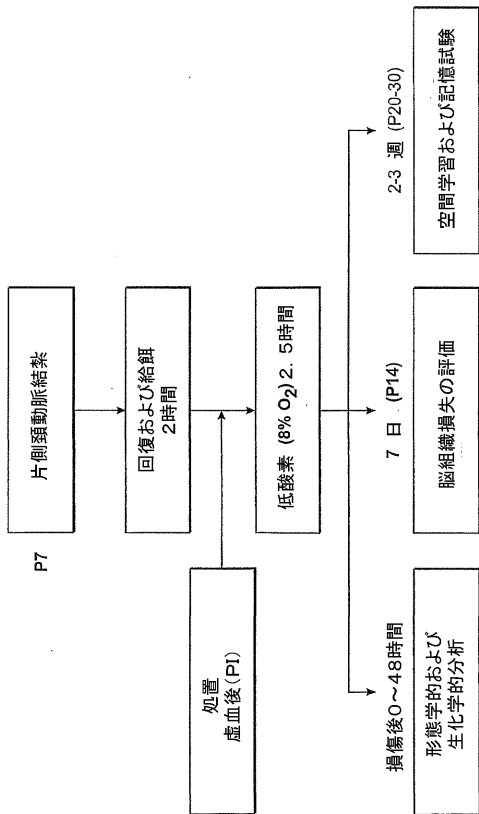


FIG. 11

【 図 1 3 】

(マウス TRKB - GEN BANK ACCESSION NO. P15209)

配列番号 2

1 MSPWLKWHGP AMARLWGLCL LVLGFWRASL ACPTSCCKSS ARIWCTEPPS GIVAFPRLEP
 61 NSVDPENITE ILIANQKRLE IINEDDVEAY VGLRNLTIYD SGLKFWAYKA FLKNSLRHI
 121 NFRNKLTSL SRHFRHLDL SDLILTGNEP TCSCDIMWLK TLQETKSSPD TODLYCLNES
 181 SKNTPLANLQ IPNCGLPASR LAAPNLVVEE GKSVTISCSV GGDPLPTLYW DVGNYLSKHM
 241 NETSHQGS LITNISSDDS GKQISCVAAEN LVGHFAPITIT FLESPTSDDH
 301 WCIPFTVRGN KPALQWFYN GALLNESKYI CTKIHVTNHT EYHGCLQLDN PTHMNGDYT
 361 LMAKNEYGKD ERQISAHFMG RFGVDYETNP NYPEVLEWDM TPTDIDGDTI NKSNEIPSTD
 421 VADQSNREHL SVYAVVVIAS VVGFCLLVML LLLKLARHSH FGMKGPASVI SNDDDSASPL
 481 HHISNGSNTF SSSEGGPDV IIGMTKIPVI ENPQYEGITN SGLKPTFVQ HIKRHNIVLK
 541 RELGEGAFGK VFLAECYNLC PEQDKLLVAV KTLKADASNA RKDFHREAEI LTNLQHEHIV
 601 KFYGVCEGD PLIMVFEYMK HGDLNKFLRA HGPDAVIMAE GNPPTTELQO QMLHIAQOIA
 661 AGWVYLAOSH FVHRDLATRN CLVGENLLVW IGDFGMSRDV YSTDIYRVGG HTMLPIRWMP
 721 PESIMYRKFY TEDSDVWSLGV VLWEIIFYGK QPWYQLSNNE VIECITQGRV LQRPRTCPQE
 781 VYELMLGCWQ REPHTRKNIK SIHTLLQNLAKASPVYLDLIL G

FIG. 13

【 図 1 2 】

(ヒト TRKB GEN BANK ACCESSION NO. NP_006171)

配列番号 1

1 MSSWIRWHGP AMARLWGFVW LVGFWRAAF ACPTSCKCSA SRIWCSDPSP GIVAFPRLEP
 61 NSVDPENITE IFTANQKRLE IINEDDVEAY VGLRNLTIYD SGLKFWAYKA FLKNSLRHI
 121 NFRNKLTSL SRHFRHLDL SELILVGNPF TCSCDIMWIK TLQETKSSPD TODLYCLNES
 181 SKNTPLANLQ IPNCGLPASR LAAPNLVVEE GKSVTISCSV AGDPVPMYW DVGNYLSKHM
 241 NETSHQGS LITNISSDDS GKQISCVAAEN LVGHFAPITIT FLESPTSDDH
 301 WCIPFTVRGN KPALQWFYN GALLNESKYI CTKIHVTNHT EYHGCLQLDN PTHMNGDYT
 361 LMAKNEYGKD ERQISAHFMG RFGVDYETNP NYPEVLEWDM TPTDIDGDTI NKSNEIPSTD
 421 VADQSNREHL SVYAVVVIAS VVGFCLLVW LFLKLARHS KFGMKDFSWF GFGKVSROG
 481 HHISNGSNTF SSSEGGPDV IIGMTKIPVI ENPQYEGITN SGLKPTFVQ HIKRHNIVLK
 541 RELGEGAFGK VFLAECYNLC PEQDKLLVAV KTLKADASNA RKDFHREAEI LTNLQHEHIV
 601 KFYGVCEGD PLIMVFEYMK HGDLNKFLRA HGPDAVIMAE GNPPTTELQO QMLHIAQOIA
 661 AGWVYLAOSH FVHRDLATRN CLVGENLLVW IGDFGMSRDV YSTDIYRVGG HTMLPIRWMP
 721 PESIMYRKFY TEDSDVWSLGV VLWEIIFYGK QPWYQLSNNE VIECITQGRV LQRPRTCPQE
 781 VYELMLGCWQ REPHTRKNIK SIHTLLQNLAKASPVYLDLIL G

FIG. 12

【 図 1 4 】

(ラット TRKB - GEN BANK ACCESSION NO. NP_036863)

配列番号 3

1 MSPWPRWHGP AMARLWGLCL LVLGFWRASL ACPMSCKGST TRIWCTEPPS GIVAFPRLEP
 61 NSVDPENITE ILIANQKRLE IINEDDVEAY VGLRNLTIYD SGLKFWAYKA FLKNSLRHI
 121 NFRNKLTSL SRHFRHLDL SDLILTGNEP TCSCDIMWLK TLQETKSSPD TODLYCLNES
 181 SKNTPLANLQ IPNCGLPASR LAAPNLVVEE GKSVTISCSV GGDPLPTLYW DVGNYLSKHM
 241 NETSHQGS LITNISSDDS GKQISCVAAEN LVGHFAPITIT FLESPTSDDH
 301 WCIPFTVRGN KPALQWFYN GALLNESKYI CTKIHVTNHT EYHGCLQLDN PTHMNGDYT
 361 LMAKNEYGKD ERQISAHFMG RFGVDYETNP NYPEVLEWDM TPTDIDGDTI NKSNEIPSTD
 421 VADQSNREHL SVYAVVVIAS VVGFCLLVML LLLKLARHS KFGMKGPASVI SNDDDSASPL
 481 HHISNGSNTF SSSEGGPDV IIGMTKIPVI ENPQYEGITN SGLKPTFVQ HIKRHNIVLK
 541 RELGEGAFGK VFLAECYNLC PEQDKLLVAV KTLKADASNA RKDFHREAEI LTNLQHEHIV
 601 KFYGVCEGD PLIMVFEYMK HGDLNKFLRA HGPDAVIMAE GNPPTTELQO QMLHIAQOIA
 661 AGWVYLAOSH FVHRDLATRN CLVGENLLVW IGDFGMSRDV YSTDIYRVGG HTMLPIRWMP
 721 PESIMYRKFY TEDSDVWSLGV VLWEIIFYGK QPWYQLSNNE VIECITQGRV LQRPRTCPQE
 781 VYELMLGCWQ REPHTRKNIK NIHTLLQNLAKASPVYLDLIL G

FIG. 14

【 図 1 5 】

(ニコト) TRKB - GEN BANK ACCESSION NO. CAA54468)

配列番号 4

1 MVSWRRRPGF GLARLWGLCC IVLGCVRGAL GCPASCRSS WRWICSEFVP GITSPFPQR
 61 STEDDNTVEI YIANQRKLES INDNEVGFYV GLKMLTVVDS GLRFVSRQAF VKNINLQYIN
 121 LSRNKLSSLS KPPFHHGLHS DLILVDNPFK CSCEIMWLKK FQETKFYTEA QDIYCVDDNN
 181 KRIALMDMKV PNCDDLPSANL SNYITVVEG KSIITLYCDTT GPPPNVSWV LTNVSNRHS
 241 DTSKNPASLT IKNVSMDSG LWISCAVANI VGEVQTSDEL TVFAPNITF IESFPDHHH
 301 CIPFFVKGNP KFTLQWFYEG AILNESEXIC TKIHVINOSE YHGCLQDNP THLANGAYTL
 361 LAKNEYGEDE KRVDAREMSV PDGSGPIVD PDVVEYETP NDIGDTNNS NOITSPDYSN
 421 KENEDSITVY VVVGIAALVC TGLVIMLIL KFRHRSKFGM KPSSVINSND DDSASPLHHI
 481 SNGSNTFSS EGGPDVAVIG MTKIPIENP QYFGITNSQL KPDTFVQIK RHNIVKREL
 541 GEGAFKVEL AECYNLCEQ DKILVAVKTL KDASNARKD FHREAEILT LQHHIVKVFY
 601 GYCVVEGDLI MVFEYMKGD INKFLRAHGP DAVLMAEGR PAELTQSQML HIAQOIAAGM
 661 VYLASQHFVH RDLATRNCLIV GENLIVKIGD FGMSRDVYST DYYRVGGHTM LPIRWMPPE
 721 IMYRKFTTES DVWSLGVIM EIFTYKQPW YQLSNNEVIE CITQGRVLQR PRTPCKEYVD
 781 IMLGCVQREP HMRINIKETIH SLLQNLAKAS PVYLDILG

FIG. 15

【 図 1 6 】

(ヒト) TRKA - GEN BANK ACCESSION NO. NP_002520)

配列番号 5

1 MLRGRRRQGL GWSWAAGFG SLLAWLILAS AGAAPCPDAC CPHGSSGLRC TRDGALDSLH
 61 HLPGANLTE LYIENQOHLQ HLELRDLRGL GELRNLTIVK SGLRFVAPDA FHTPRLSRL
 121 NLSFNALLES SWKTVQGLSL QELVLSGNPL HCSALRWIQ RWEELGLGV FEQLQCHGQ
 181 GPLAHMPNAS CGVPTLVQV PNASVDVGD D VLLRCQVEGR GLEQAGWILT ELEQATVMK
 241 SGLFSLGLT LANVTSDLNR KNVTCWAEND VGRAEVSQV NVSEFASVOL HTAVEMHHWC
 301 IFFSVYDQFA PSLRWLFNGS VLNETSFTF EFLEPANEI VRHGCLRLNQ PTHVNNNGNYT
 361 LLAANPFQA SASLMAAFMD NPFENRDPD IPVSFSPVDT NSTSGDPVEK KDETPFGVSV
 421 AVGLAVFACL FLSTLLLVIN KCGRRNKFGI NRPVLAEPD GLAMSLHMT LGGSSLSFTE
 481 KKGSLQGH IENPOYFSDA CVHHIKRRDI VLKWLGEHGA FGKVFLECH NLLPEQDKRL
 541 VAVKALKEAS ESARQDFORE AELLTMLQHQ HIVREFFVCT EGRPILMVEE YMRHGDLMRF
 601 IRRHGFDAKL LAGGEDVAPG FIGLQLLAV ASQVAAGMVY IAGLHFVHRD LATRNCLVQO
 661 GLVVKIGDFG MSRDITYSTDY YRVGGRTMLP IRWMPPELIL YRKFTTESDV WSFGVLLWEI
 721 FTYGKQPWQ LSNTEAIDCI TQRELEPRR ACPEVYAIM RGCWQREFQO RSHIKDVHAR
 781 IQALAQAPPV YLDVIG

FIG. 16

【 図 1 7 】

(ヒト) TRKC - GEN BANK ACCESSION NO. Q16288)

配列番号 6

1 MDVSLCPAK SFWRIELGS VWLDYVGSVL ACPANCVCCK TELNCRPDD GNLFPILLEQ
 61 DSGNSNGAN INITDSRNI TSIHIENWRS LHTLNAVDME LYTGLOKLI KNSGLRSIQP
 121 RAFAKPHLR YINLSSNRLT TLSWLFQTL SLRELOLEQN FFCNSCDIRW MOLWQOGEA
 181 KLSNQNYCI NADGSQLPLF RMNISQDDL EISVSHWLT VREGDNVIT CNGSGSPLPD
 241 VDWIVTGLQS INTHOINLW TNVHAINLTL VNVTSDDNGF PLESKLIHV EYQEGEISE
 301 VYPPRVVSL EPELELEHC IEFVVRGNPP PILHWLHNGQ PLESKLIHV EYQEGEISE
 361 GCLLFNKPTH YNNGNTYTLIA KNPGLTANQT INGHFLKEPF PESTDNFILF DEVSPPTT
 421 VTHKPEDTF GYSIAYGLAA FACVLLVWLF VMINKYGRRS KFGMKGPVAV ISGEEASAP
 481 LHINHIGITT PSSLDAGPDT VVIGMTRIPV IENPQYFRQG HNCCHKPDTYV QHAKRRDIVL
 541 KRELGGGAFG KVFLAECYNL SPTKDKMLVA VRALKDPTLA ARKDFQREAE LTLNLQHEHI
 601 VKEYGYCGDG DPLIMVEYFM KHGDLNKFEL AHGPDAMILV DGQPRQAKGE LGLSQMLHIA
 661 SQIASGMVYL ASQHFVHRDL ATRNCLVGAN LLVKIGDFGM SRDVSTDYI RLFNPSGNDF
 721 CIWCEYGGHT MLPFIRWMPPE SIMYRKFTTE SDWMSRGMV WEIFTYKQOP WFQLSNTEVI
 781 ECITQGRVLE RPRVCPKEVY DVMLGCVQRE POORLNKEI YKILHALGKA TFIYLDILG

FIG. 17

【 図 1 8 】

scFv(s)はrhTrkB-EDC-Fcに結合する

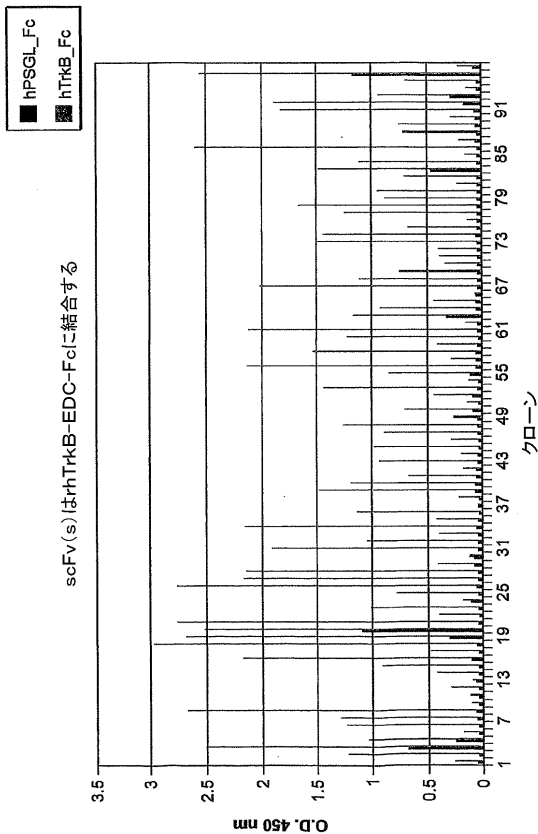


FIG. 18

【 図 2 0 】

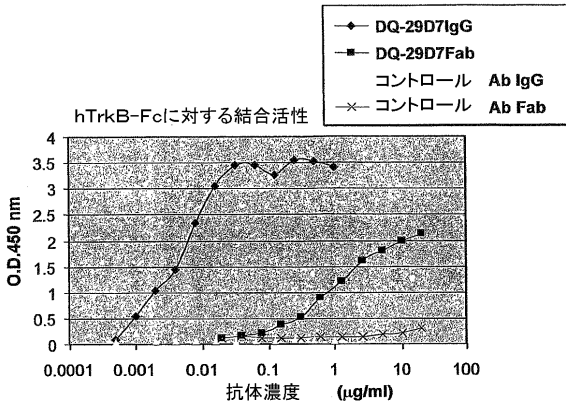


FIG. 20A

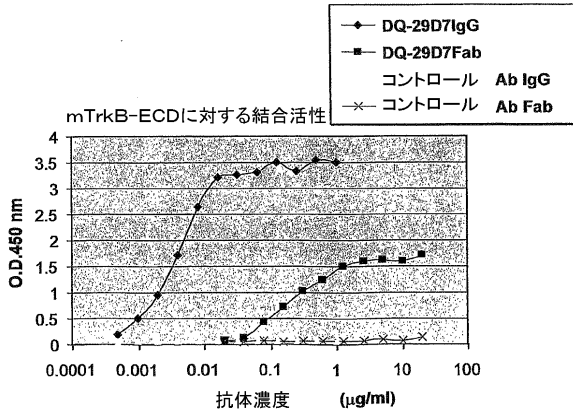


FIG. 20B

【 図 2 1 】

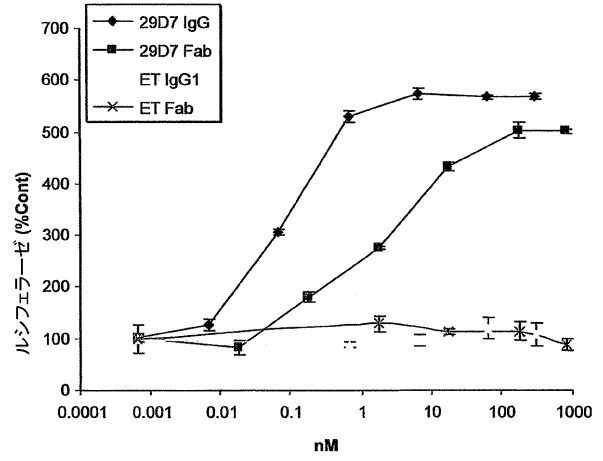


FIG. 21

【 図 2 2 】

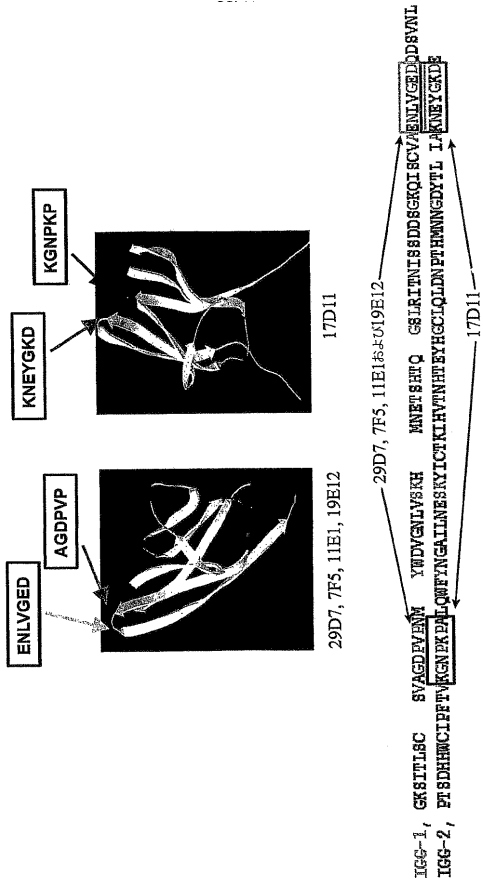


FIG. 22

【 図 2 3 】

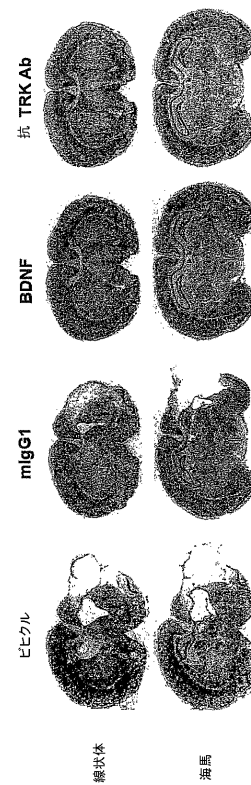


FIG. 23

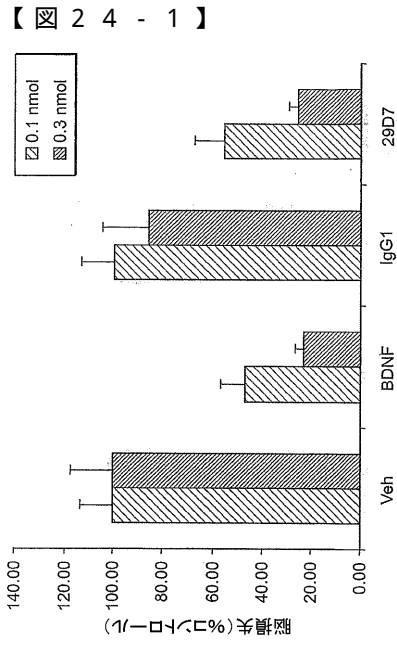


FIG. 24A

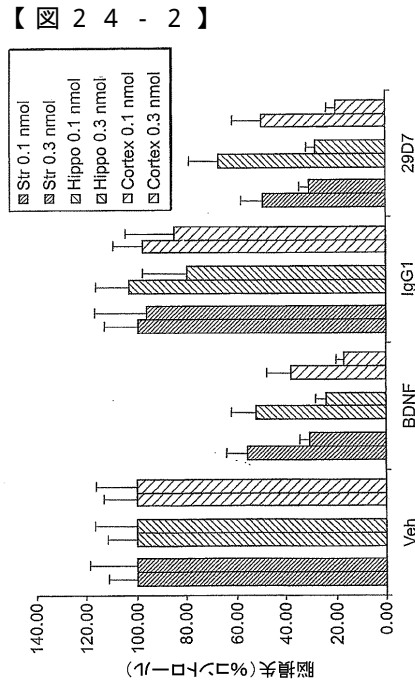


FIG. 24B

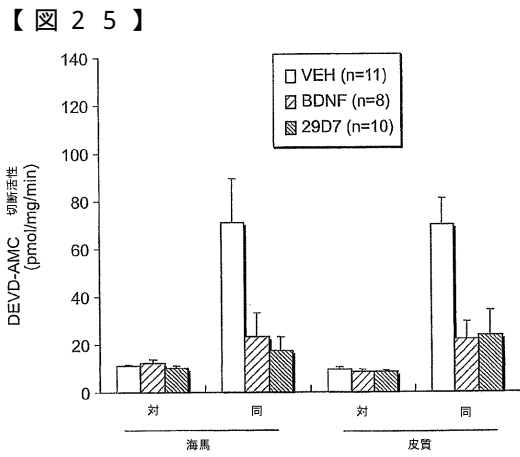


FIG. 25

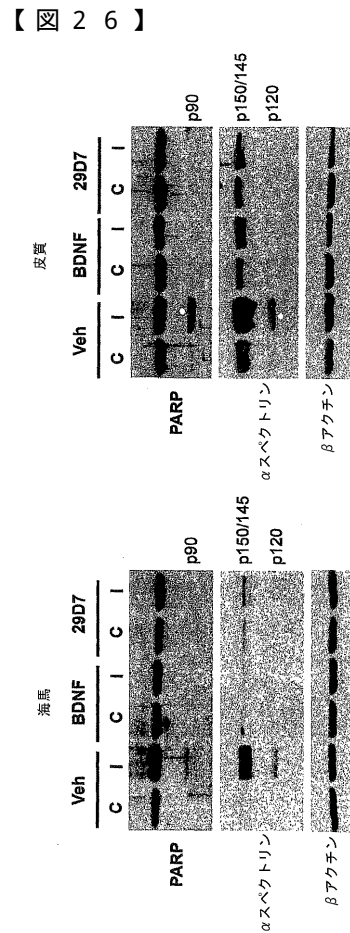


FIG. 26

【 図 2 7 】

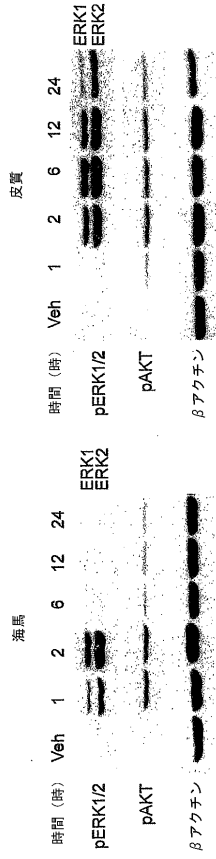


FIG. 27

【 図 2 8 】

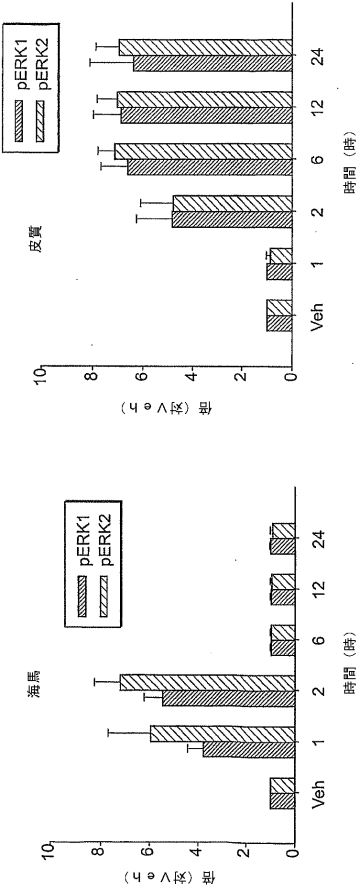


FIG. 28

【 図 2 9 】

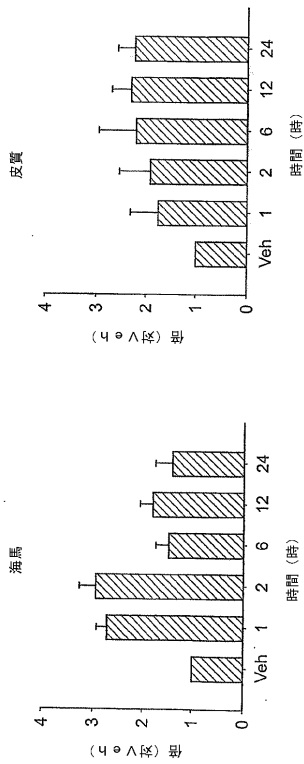


FIG. 29

【 図 3 0 】

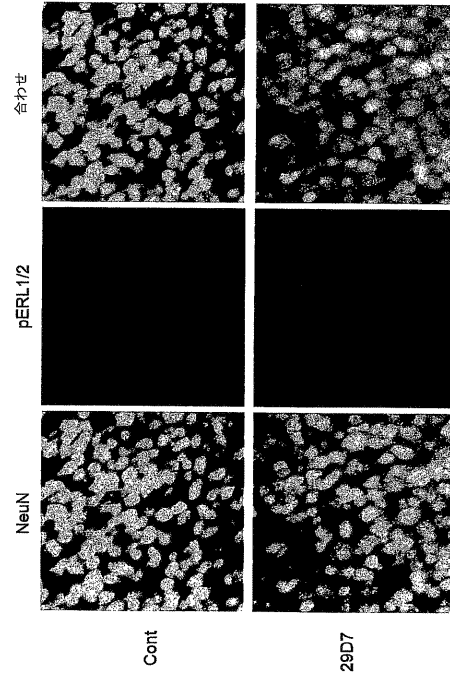


FIG. 30

【 図 3 1 】

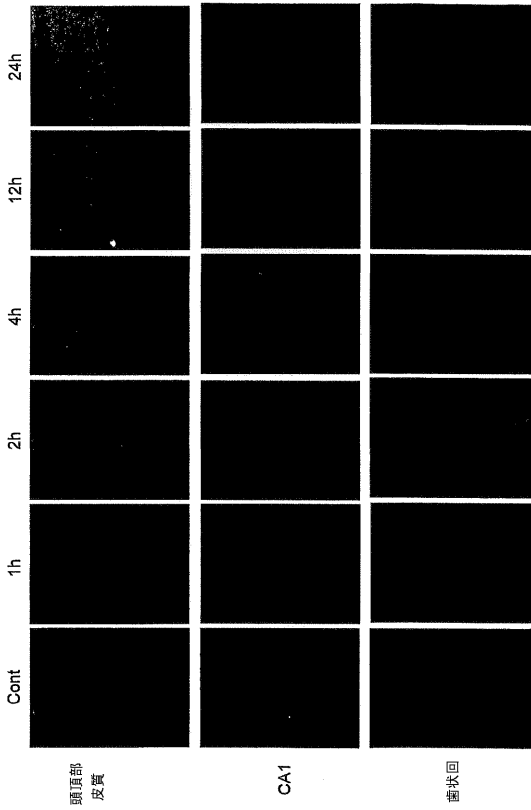


FIG. 31

【 図 3 2 】

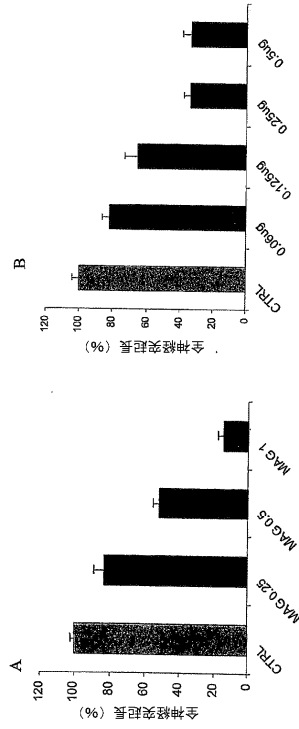


FIGURE 32

【 図 3 3 】

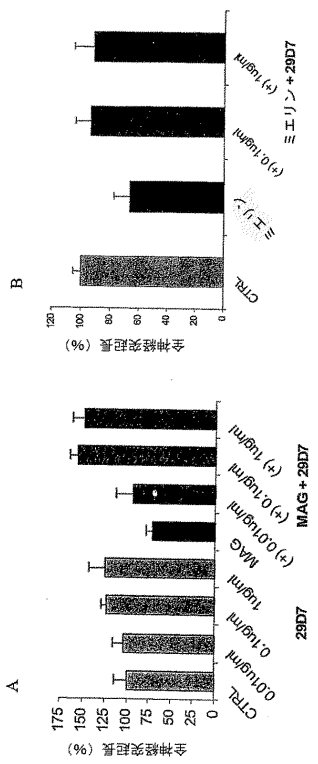


FIGURE 33

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2006/021878

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C07K16/28 A61P17/00	A61K39/395 A61P25/00	G01N33/577 A61P31/00
C12N5/18 A61P35/00	A61P3/00	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	R&D SYSTEMS, INC.: "Monoclonal Anti-mouse TrkB Antibody, Catalog Number: MAB1494" 21 December 2004 (2004-12-21), R&D SYSTEMS, INC., XP002411650 the whole document	1-69
X	R&D SYSTEMS, INC.: "Monoclonal Anti-human TrkB Antibody, Catalog Number: MAB3971" 13 September 2004 (2004-09-13), R&D SYSTEMS, INC., XP002411651 the whole document	1-69
X	R&D SYSTEMS, INC.: "Monoclonal Anti-human TrkB Antibody, Catalog Number: MAB397" 7 September 2003 (2003-09-07), R&D SYSTEMS, INC., XP002411652 the whole document	1-69
	----- -/-	
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		
<p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>*Z* document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 14 December 2006		Date of mailing of the international search report 23/01/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bayer, Annette

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/021878

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>GEETHA T ET AL: "Association of the atypical protein kinase C-interacting protein p62/ZIP with nerve growth factor receptor TrkA regulates receptor trafficking and Erk5 signaling" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,, US, vol. 278, no. 7, 5 December 2002 (2002-12-05), pages 4730-4739, XP002372986 ISSN: 0021-9258 "Materials" on page 4731</p>	1-69
X	<p>WO 95/15180 A (UNIV CALIFORNIA [US]) 8 June 1995 (1995-06-08) page 7, line 25 - page 11, line 4 page 12, line 19 - page 13, line 28 page 15, line 14 - line 32 page 16, line 9 - page 17, line 10 page 22, line 25 - page 23, line 4 page 26, lines 11-15,29-36 page 38, line 12 - page 39, line 5 claims 1-9,13-20</p>	1-69
X	<p>WO 96/01837 A (PHILADELPHIA CHILDREN HOSPITAL [US]) 25 January 1996 (1996-01-25) page 4, line 27 - page 5, line 2 page 6, line 25 - page 7, line 12 page 11, line 21 - page 12, line 6 page 24, line 30 - page 26, line 10 claims 16-21</p>	1-70
T	<p>QIAN MING D ET AL: "Novel agonist monoclonal antibodies activate TrkB receptors and demonstrate potent neurotrophic activities" JOURNAL OF NEUROSCIENCE, vol. 26, no. 37, September 2006 (2006-09), pages 9394-9403, XP009076184 ISSN: 0270-6474 the whole document</p>	1-70

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/021878**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 61-68 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/021878

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 9515180	A	08-06-1995	AU	1262095 A	19-06-1995
			US	5753225 A	19-05-1998
WO 9601837	A	25-01-1996	AU	2913395 A	09-02-1996
			US	5601820 A	11-02-1997

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	
A 6 1 P 25/14	(2006.01)	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P 25/24	(2006.01)	A 6 1 P 25/24	
A 6 1 P 25/18	(2006.01)	A 6 1 P 25/18	
A 6 1 P 25/28	(2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/16	(2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 21/04	(2006.01)	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 3/10	(2006.01)	A 6 1 P 3/10	
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 0 1 K 67/00	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
C 0 7 K 14/705	(2006.01)	A 0 1 K 67/00	5 0 1
		C 0 7 K 14/705	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 チョ・ソンゲン

アメリカ合衆国 0 8 8 4 4 ニュージャージー州ヒルズバーロウ、ハンブシャー・ドライブ 1 0 番

(72)発明者 ダビンダー・シン・ギル

アメリカ合衆国 0 1 8 1 0 マサチューセッツ州アンドーバー、シャーロット・ドライブ 2 0 番

(72)発明者 シャン・ヤン・タン

アメリカ合衆国 0 1 8 6 7 マサチューセッツ州レディング、ガゼボ・サークル 8 1 1 番

(72)発明者 ミン・ダイアナ・キアン

アメリカ合衆国 0 2 4 9 2 マサチューセッツ州ニードム、ドッグウッド・レイン 3 2 番

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA15 BA53 DA02 GA01 HA01 HA11
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 CE09 DA01 DA13
 4B065 AA90 AB04 AC14 BA08 CA25 CA44 CA46
 4C085 AA14 CC03 CC05 DD23 DD32 DD35 DD37 DD62 DD86 EE01
 EE03 EE05 GG01 GG02 GG03 GG04 GG06 GG08
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA40 DA50 DA76 EA21 EA50 FA72
 FA74 GA20

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2008545781A5	公开(公告)日	2009-04-09
申请号	JP2008515819	申请日	2006-06-05
[标]申请(专利权)人(译)	惠氏公司		
申请(专利权)人(译)	魏斯		
[标]发明人	チヨソングン ダビンダーシングル シャンヤンタン ミンダイアナキアン		
发明人	チヨ・ソングン ダビンダー・シン・ギル シャン・ヤン・タン ミン・ダイアナ・キアン		
IPC分类号	C07K16/28 C12P21/08 C12N5/10 C12N15/02 A61K39/395 A61P25/00 A61P43/00 A61P25/14 A61P25/24 A61P25/18 A61P25/28 A61P25/16 A61P21/04 A61P35/00 A61P3/10 G01N33/53 A01K67/00 C07K14/705		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P3/00 A61P17/00 A61P17/02 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/24 A61P25/28 A61P31/00 A61P35/00 C07K16/2863 C07K2317/34 C07K2317/55 C07K2317/622 C07K2317/75 C07K2317/92 C07K2319/30		
FI分类号	C07K16/28.ZNA C12P21/08 C12N5/00.B C12N15/00.C A61K39/395.N A61P25/00 A61P43/00 A61P25/14 A61P25/24 A61P25/18 A61P25/28 A61P25/16 A61P21/04 A61P35/00 A61P3/10 A61P43/00.111 G01N33/53.D A01K67/00.501 C07K14/705		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA15 4B024/BA53 4B024/DA02 4B024/GA01 4B024/HA01 4B024/HA11 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE09 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/CC03 4C085/CC05 4C085/DD23 4C085/DD32 4C085/DD35 4C085/DD37 4C085/DD62 4C085/DD86 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/EE05 4C085/GG01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG06 4C085/GG08 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/EA21 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA20		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 富田健二		
优先权	60/687705 2005-06-06 US		
其他公开文献	JP2008545781A		

摘要(译)

本发明提供了用于人TrkB的单克隆抗体。在某些实施方案中，本发明的抗体结合并激活人TrkB。在某些实施方案中，本发明的抗体对人TrkB具有选择性，因为它们不结合（或激活）人TrkA或人TrkC。在一些实施方案中，本发明的单克隆抗体与鼠TrkB交叉反应。还包括本发明抗体的人源化或胶合版本。提供包含本发明抗体的药物组合物以及制备本发明抗体的方法和将其用于治疗，检测或纯化目的的方法。

