

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0610938-1 A2**

(22) Data de Depósito: 05/06/2006
(43) Data da Publicação: 03/08/2010
(RPI 2065)



(51) *Int.Cl.:*

C07K 16/28
A61K 39/395
G01N 33/577
C12N 5/18
A61P 3/00
A61P 17/00
A61P 25/00
A61P 31/00
A61P 35/00

(54) Título: **ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-TRKB E USOS DOS MESMOS**

(30) Prioridade Unionista: 06/06/2005 US 60/687,705

(73) Titular(es): WYETH

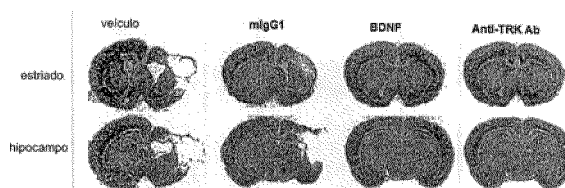
(72) Inventor(es): Davinder Singh Gill, Ming Diana Qian, Seongeun Cho, Xiang-Yang Tan

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2006021878 de 05/06/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/133164 de 14/12/2006

(57) Resumo: A presente invenção fornece anticorpos monoclonais para TrkB humano. Em certas modalidades, os anticorpos inventivos ligam e ativam TrkB humano. Em certas modalidades os anticorpos inventivos são seletivos para TrkB humano em que eles não ligam (ou ativam) TrkA humano ou TrkC humano. Em algumas modalidades os anticorpos inventivos monoclonais reagem cruzado com TrkB de murino. Versões humanizadas ou embutidas dos anticorpos inventivos também são abrangidas. Composições farmacêuticas que compreendem anticorpos inventivos são fornecidas como são os métodos para preparar os anticorpos inventivos e métodos de uso dos mesmos para propósitos de tratamento, detecção ou purificação.



P10610938-1

PET: 20080091419

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**ANTICOR-
POS MONOCLONAIS ANTI-TRKB E USOS DOS MESMOS**".

INFORMAÇÃO DE PRIORIDADE

O presente pedido reivindica o benefício do U.S. Série Nº
5 60/687.705, depositado em 6 de junho de 2005, os conteúdos inteiros do
qual são por meio do mesmo incorporados por referência.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Receptores de tirosina cinase Trk são receptores de transmem-
brana única de domínio múltiplo que desempenham um papel importante em
10 um espectro amplo de respostas neuronais incluindo sobrevivência, diferen-
ciação, crescimento e regeneração. Eles são receptores de afinidade eleva-
da para neurotrofinas, uma família de fatores de crescimento de proteína,
que inclui fator de crescimento nervoso (NGF), fator neurotrófico derivado do
cérebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3) e neurotrofina-4/5 (NT-4/5). As neuro-
15 trofinas compartilham características estruturais altamente conservadas, a-
inda suas seqüências de aminoácido únicas permitem que cada membro
evoque interações de afinidade elevada com o domínio extracelular de re-
ceptores de Trk específicos, isto é, TrkA, B ou C. Assim, NGF é um ligando
preferido para TrkA; BDNF e NT-4/5 são ligandos preferidos para TrkB; e
20 NT-3 mostrou ligar TrkC, embora também pareça ligar TrkA e TrkB com afi-
nidades mais baixas.

Entre os receptores de Trk, o papel de TrkB foi bem caracteriza-
do no sistema nervoso central (CNS). TrkB são amplamente distribuídas no
cérebro, incluindo no neocórtex, hipocampo, estriado, formação olfativa e
25 haste cerebral. Usando BDNF como um ligando cognato, os papéis indis-
pensáveis de TrkB na sobrevivência, diferenciação e neurorregeneração
neuronal foram mostrados em vários modelos neurodegenerativos, inclu-
indo acidente vascular cerebral, lesão na medula espinhal, axotomia e ALS.

Através de várias análises de sinalização e sistemas desprovi-
30 dos de receptor, as respostas de BDNF mostraram depender da ligação e
ativação de TrkB. Como observado, receptores de Trk são proteínas de
transmembrana única de domínio múltiplo. Eles consistem em um domínio

de ligação de ligando extracelular, uma região de transmembrana, e um domínio de tirosina cinase intracelular. O domínio extracelular é composto de um motivo rico em leucina flanqueado por dois agrupamentos de cisteína e dois domínios semelhantes à imunoglobulina (Ig). Os receptores de Trk mostraram interagir com seus ligandos principalmente através do segundo domínio semelhante a Ig, embora a contribuição de outras regiões tais como um motivo rico em leucina e o primeiro domínio de Ig em acoplamento de ligando foi proposto. As estruturas de cristal do domínio de ligação de ligandos de receptores de Trk assim como complexos de ligando-receptor foram resolvidos. A interface ligando-receptor parece consistir em duas porções: uma para um motivo de ligação conservada compartilhado entre todas as neurotrofinas e a outra específica para cada neurotrofina.

Na ligação de neurotrofinas aos receptores de Trk, a dimerização do receptor e mudanças conformacionais subseqüentes ocorrem, o que acredita-se levar à ativação do domínio de tirosina cinase intracelular. Existem várias tirosinas conservadas no domínio intracelular de receptores de Trk. A fosforilação da alça autoreguladora do domínio de cinase ativa a atividade de cinase, e a fosforilação de outros resíduos promove a sinalização criando-se sítios de acoplamento para proteínas adaptadoras que ligam estes receptores a cascatas de sinalização intracelular, incluindo via de proteína cinase de Ras/cinase regulada por sinal extracelular (ERK), a via de PI3K/Akt cinase e fosfolipase C-gama. Embora um pouco sobrepostas, estas vias individuais estão envolvidas em atividades biológicas distintas: Ras/MAPK regula a diferenciação e proliferação neuronais, as vias de PI3K/Akt controlam a dinâmica e sobrevivência de atina e PLC gama está envolvido na mobilização de cálcio.

Até agora, não existe nenhum exemplo bem-sucedido de reagentes que agem como agonistas potentes e seletivos *in vivo* de TrkB. Embora BDNF, como uma proteína recombinante, mostrou aumentar a sobrevivência e neuroregeneração neuronais em vários modelos degenerativos do CNS *in vitro* e *in vivo*, os efeitos da terapia de proteína BDNF em clínicas foram negativos, o mais provavelmente porque BDNF tem uma meia-vida *in*

vivo curta. Portanto existe uma necessidade na técnica para reagentes farmacêuticos que agem como agonistas potentes e seletivos *in vivo* de TrkB.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção fornece anticorpos monoclonais para TrkB humano. Em certas modalidades os anticorpos inventivos ligam e ativam TrkB humano. Em certas modalidades os anticorpos inventivos são seletivos para TrkB humano em que eles ligam-se preferencialmente a TrkB em TrkA humano ou TrkC humano. Em algumas modalidades os anticorpos monoclonais inventivos reagem cruzado com TrkB de murino.

10 A invenção também fornece composições farmacêuticas que compreendem um ou mais dos mesmos anticorpos. A invenção fornece ainda métodos para preparar os anticorpos monoclonais inventivos. Versões humanizadas ou embutidas dos anticorpos inventivos também são abrangidas como são os hibridomas que produzem os anticorpos inventivos.

15 A invenção fornece ainda métodos de usar estes anticorpos monoclonais como agonistas de TrkB. Em certas modalidades os anticorpos monoclonais são usados como agonistas de TrkB humano. De acordo com tais modalidades, os anticorpos podem ser usados para tratar condições que requerem ativação de TrkB, incluindo condições neurológicas.

20 A invenção fornece ainda outros métodos para detectar TrkB em uma amostra e métodos para purificar TrkB a partir de uma amostra usando os anticorpos inventivos.

DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

25 A Figura 1 descreve atividades de anticorpo específico de TrkB em soros imunes de cinco camundongos imunizados (M1 a M5). A ligação de soros imunes resulta de um ensaio ELISA com uma proteína recombinante que inclui o domínio extracelular de TrkB humano fundido à região Fc de IgG1 humana (rhTrkB-EDC-Fc) são mostrados em (A). A ligação de soros imunes resulta de um ensaio ELISA com uma proteína recombinante que
30 inclui o domínio extracelular de TrkB de murino (rmTrkB-EDC) são mostrados em (B). A extensão para que soros imunes podem bloquear a interação de rhTrkB-EDC-Fc e BDNF em um ensaio ELISA de competição são mos-

trados em (C). A ligação de soros imunes a rhTrkB de superfície em células HEK-293 é mostrada em (D).

5 A Figura 2 descreve resultados de controle que foram obtidos com neurotrofinas em um ensaio de atividade de luciferase que usa células HEK-293 que expressam rhTrkB de superfície. Estes resultados de controle mostram que o ensaio pode representar seletivamente a ativação de TrkB.

10 A Figura 3 descreve resultados que foram obtidos com soros imunes no mesmo ensaio de atividade de luciferase como a Fig. 2. Estes resultados mostram que a incubação de células hTrkB com sangrias imunes significativamente aumentou os sinais de luciferase em uma maneira dependente de dose.

15 A Figura 4 descreve resultados que foram obtidos com certos anticorpos de TrkB no mesmo ensaio de atividade de luciferase como a Fig. 2. Todos os anticorpos causaram aumentos dependentes de dose no sinal com EC_{50} na faixa de 10^{-10} (M). A janela de sinal máximo foi ~ 7 vezes mais basal para a maioria dos anticorpos, que foi comparável à resposta induzida por BDNF a 200 ng/ml (6,2 vezes mais basal).

20 A Figura 5 descreve os resultados que foram obtidos com certos anticorpos de TrkB em um ensaio de crescimento de neurito. O ensaio usou células SY5Y de neuroblastoma humano, que mostraram expressar TrkB na diferenciação neuronal. A adição de BDNF e da maioria dos anticorpos promoveu o crescimento de neurito como demonstrado por aumentos no comprimento de neurito (A) e no número de pontos de ramificação (B). Imagens representativas de alguns grupos de tratamento são mostradas em (C). Os resultados de análises de resposta de dose completa obtidas para um sub-
25 conjunto dos mesmos anticorpos são mostrados em (D).

30 A Figura 6 descreve os resultados que foram obtidos com certos anticorpos de TrkB em um ensaio de neuroproteção. O ensaio mede a sobrevivência de células SY5Y diferenciadas a seguir do dano de retirada de soro. Os resultados mostraram que BDNF e vários anticorpos protegeram células SY5Y diferenciadas, demonstrando aumentos dependentes de dose na viabilidade celular.

A Figura 7 descreve alguns dos resultados que foram obtidos quando três anticorpos anti-TrkB, 18C3, 29D7 e 17D11, que mostraram ligar-se a TrkB de murino recombinante (rmTrkB), foram testados em culturas de neurônio de grânulo cerebelar (CGN) de rato quanto à atividade contra o receptor de TrkB de rato endógeno. Resultados são mostrados para um ensaio de crescimento de neurito e um ensaio de neuroproteção (29D7 apenas).

A Figura 8 descreve os resultados que foram obtidos quando certos anticorpos anti-TrkB foram avaliados na análise de Western quanto à indução de autofosforilação de TrkB. Todos os anticorpos levaram à fosforilação de TrkB robusta, e estes efeitos foram antagonizados por tratamento com o inibidor de cinase K252a, indicando que estes anticorpos que ligam TrkB causaram ativação de TrkB.

A Figura 9 descreve os resultados de um ensaio FACS de ligação de TrkA (A) e um ensaio de atividade de luciferase de TrkA (B) que foram obtidos com certos anticorpos anti-TrkB. Estes resultados mostram que anticorpos inventivos não ligam ou ativam células de TrkA humano.

A Figura 10 descreve os resultados que foram obtidos quando certos anticorpos anti-TrkB foram avaliados em um ensaio de atividade de luciferase de TrkC. Estes resultados mostram que anticorpos inventivos não ativam células de TrkC humano.

A Figura 11 descreve o modelo de roedor de hipoxia-isquemia (HI) neonatal que é fundamentado no procedimento de Levine.

A Figura 12 descreve a sequência de aminoácido de TrkB humano (SEQ ID NO: 1).

A Figura 13 descreve a sequência de aminoácido de TrkB de murino (SEQ ID NO: 2).

A Figura 14 descreve a sequência de aminoácido de TrkB de rato (SEQ ID NO: 3).

A Figura 15 descreve a sequência de aminoácido de TrkB de galinha (SEQ ID NO: 4).

A Figura 16 descreve a sequência de aminoácido de TrkA hu-

mano (SEQ ID NO: 5).

A Figura 17 descreve a sequência de aminoácido de TrkC humano (SEQ ID NO: 6).

5 A Figura 18 mostra os dados de ELISA de ligação de fago a partir de um conjunto representativo de clones de scFv positivos de TrkB (seleção de mistura da biblioteca de BMV).

10 A Figura 19 mostra a especificidade de ligação de anticorpos de scFv selecionados de TrkB testados usando o ensaio FACS. Os dados mostram que os anticorpos de scFv selecionados de TrkB reagem com TrkB associado à membrana em uma maneira específica (histogramas cheios) sem nenhuma reatividade cruzada para controlar células (histogramas abertos).

15 A Figura 20 mostra resultados de ligação de ELISA para anticorpo de IgG 29D7 e seu fragmento Fab com TrkB humano (A) e de camundongo (B). Tanto IgG total quanto Fab de 29D7 mostraram atividades de ligação dependente de dose a TrkB humano e de camundongo. Entretanto, o valor de ED_{50} do Fab foi cerca de 100 vezes mais baixo do que aquele de 29D7 intacto. Nem uma IgG1 de controle de isótipo nem seu fragmento Fab ligado a TrkB.

20 A Figura 21 mostra atividade de luciferase em células HEK-293 medida 16 horas pós tratamento com IgG de 29D7 ou Fab de 29D7. Tanto IgG total quanto Fab de 29D7 induziram atividades de luciferase dependentes de dose, indicando a ativação de TrkB. Entretanto, o valor de EC_{50} de Fab de 29D7 foi cerca de 27 vezes mais alto do que aquele de IgG de 29D7 (0,083 nM e 2,28 nM para IgG de 29D7 e Fab de 29D7, respectivamente).
25 Nem uma IgG1 de controle de isótipo nem seu fragmento Fab tiveram efeitos na ativação de TrkB.

30 A Figura 22 mostra resultados da análise de mapeamento de epítipo de anticorpos monoclonais anti-TrkB 17D11, 29D7, 7F5, 11E1 e 19E12. O anticorpo monoclonal 17D11 reconhece a alça-3 do segmento de IgG-2 de TrkB humano (KNEYGKD, SEQ ID NO: 7, aminoácidos 364 a 370 da SEQ ID NO: 1); e alça-1 do segmento de IgG-2 de TrkB humano (KGNPKP, SEQ ID NO: 8, aminoácidos 308 a 313 da SEQ ID NO: 1). Todos

os anticorpos monoclonais 29D7, 7F5, 11E1 e 19E12 reconhecem a alça-3 do segmento de IgG-1 de TrkB humano (ENLVGED, SEQ ID NO: 10, aminoácidos 269 a 275 da SEQ ID NO: 1); e também podem reconhecer a alça-1 do segmento de IgG-1 de TrkB humano (AGDPVP, SEQ ID NO: 11, aminoácidos 221 a 226 da SEQ ID NO: 1).

A Figura 23 compara as manchas que foram obtidas do estriado e hipocampo para tratamentos diferentes depois de lesão hipóxica-isquêmica (HI).

A Figura 24 compara a perda de tecido cerebral total (A) e perda de tecido sub-regional (B) para tratamentos diferentes depois de lesão HI. Os dados são mostrados como média e erro padrão da média (S.E.M.). BDNF e anticorpo monoclonal anti-TrkB 29D7 mostraram proteção dependente de dose significativa do cérebro a partir da lesão HI. A proteção não foi localizada a qualquer sub-região específica do cérebro mas proteção máxima foi geralmente observada no córtex.

A Figura 25 mostra os resultados de um ensaio de clivagem de DEVD-AMC que foi usado para determinar atividades de caspase-3 para tratamentos diferentes depois da lesão HI. Os resultados para regiões diferentes do cérebro são mostrados como média $\pm$ S.E.M. BDNF e anticorpo monoclonal anti-TrkB 29D7 bloquearam a ativação de caspase-3 causada por lesão HI.

A Figura 26 mostra imunomanchas de amostras de proteína tomadas de camundongos fornecidos com tratamentos diferentes depois de lesão HI. As amostras foram separadas por SDS-PAGE e submetidas a imunoblotting com anticorpos contra certos substratos de caspase-3 (PARP e α -espectrina). Anticorpos contra β -actina foram usados como controles para verificar a carga igual de proteínas. Os resultados mostram que a clivagem dos mesmos substratos de caspase-3 foi inibida por BDNF e anticorpo monoclonal anti-TrkB 29D7 (lados C = contra e I = ipsi da ligação da carótida).

A Figura 27 mostra imunoblots de amostras de proteína tomadas de camundongos normais depois de uma injeção intracerebroventricular de anticorpo anti-TrkB 29D7 (ou veículo como controle). Amostras foram toma-

das 1, 2, 6, 12 e 24 horas depois da injeção. Amostras foram separadas por SDS-PAGE e submetidas ao imunoblotting com anticorpos específicos para proteínas que são fosforiladas como um resultado da ativação de TrkB (fosfo-ERK1/2 e fosfo-AKT). Anticorpos contra β -actina foram usados como con-

5 troles para verificar a carga igual de proteínas. Os resultados mostram que o anticorpo monoclonal anti-TrkB 29D7 induziu a fosforilação dependente do tempo de ERK1/2 e AKT (dados de amostras hipocâmpais e corticais são mostrados e são representativos de resultados obtidos de quatro outras amostras).

10 A Figura 28 é uma quantificação densitométrica da fosforilação de ERK mostrada na Figura 27.

A Figura 29 é uma quantificação densitométrica da fosforilação de AKT mostrada na Figura 27.

15 A Figura 30 mostra tecidos cerebrais tratados com veículo e 29D7 que foram fixados e imunofluorescentemente rotulados com um anticorpo para o marcador específico de neurônio NeuN (esquerda) e um anticorpo anti-fosfo-ERK1/2 (centro). As figuras do lado direito mostram estes dois unidos. A fosforilação de ERK1/2 é significativamente mais forte nas amostras tratadas com 29D7.

20 A Figura 31 mostra o curso de tempo da ativação de ERK1/2 nos tecidos corticais e hipocâmpais a seguir da injeção intracerebroventricular de anticorpo monoclonal anti-TrkB 29D7.

A Figura 32 mostra a inibição dependente de dose de crescimento de neurito de neurônios de grânulo cerebelar primários causada por

25 (A) MAG e (B) mielina.

A Figura 33 mostra a reversão de inibição de neurito mediada por (A) MAG e (B) mielina que é causada por anticorpo monoclonal anti-TrkB 29D7.

DESCRIÇÃO DE CERTAS MODALIDADES

30 A presente invenção originou-se em parte da compreensão que anticorpos monoclonais que especificamente ligam-se aos domínios extracelulares do receptor de TrkB podem dimerizar TrkB e serem suficientes para

induzir a ativação do receptor e respostas biológicas similares às aquelas mediadas por BDNF.

Anticorpos monoclonais em geral representam uma única classe de proteínas que têm utilidades diversas em pesquisa, diagnose médica, e no tratamento clínico de doença. Vantajosamente, anticorpos monoclonais são considerados terem maior estabilidade farmacocinética do que proteínas recombinantes tais como BDNF do mesmo modo considerando efeitos farmacológicos sustentáveis que têm um benefício significativo para aplicações clínicas. Por exemplo, os usos clinicamente aprovados correntes de medicações de anticorpo monoclonal incluem prevenção de rejeição a transplante de órgão, tratamento de cânceres (por exemplo, mama, cólon, linfoma que não de Hodgkin, leucemia), artrite reumatóide, profilaxia contra doença do vírus sincicial respiratório, doença de Crohn, intervenção coronária percutânea, e asma. Outras aplicações médicas para tratar uma variedade de doenças humanas com anticorpos monoclonais também estão correntemente em experiências clínicas. Os efeitos biológicos dos mesmos anticorpos monoclonais são geralmente conduzidos bloqueando-se ou neutralizando-se eventos moleculares exercidos por ligandos endógenos, assim primariamente agindo como antagonistas de afinidade alta específicos. Na presente invenção, anticorpos monoclonais são usados como agonistas que imitam os efeitos biológicos de interações de receptor-ligando.

1. Anticorpos monoclonais e hibridomas

Em um aspecto, a presente invenção fornece anticorpos monoclonais que ligam TrkB humano (SEQ ID NO: 1). Em certas modalidades, estes anticorpos ligam TrkB humano (SEQ ID NO: 1) com um ED_{50} na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 500 nM, por exemplo na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 1 nM, cerca de 10 pM a cerca de 100 pM, ou cerca de 10 pM a cerca de 50 pM. Como usado aqui o termo "cerca de" é definido para abranger variações de $\pm 15\%$.

Em uma modalidade, os anticorpos inventivos também são agonistas de TrkB humano. Em certas modalidades, estes anticorpos ativam TrkB humano (SEQ ID NO: 1) com uma EC_{50} na faixa de cerca de 10 pM a

cerca de 500 nM, por exemplo, na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 1 nM, cerca de 10 pM a cerca de 100 pM, ou cerca de 10 pM a cerca de 50 pM.

Em uma modalidade, anticorpos inventivos são seletivos para TrkB humano (SEQ ID NO: 1) em que eles ligam-se preferencialmente a TrkB (SEQ ID NO: 1) em TrkA humano (SEQ ID NO: 5) ou TrkC humano (SEQ ID NO: 6). Em algumas modalidades, anticorpos inventivos não ligam-se a TrkA humano ou TrkC humano. Como definido aqui, um anticorpo inventivo "não liga" TrkA humano (SEQ ID NO: 5) ou TrkC humano (SEQ ID NO: 6) se ele não exibe nenhuma ligação detectável com estes receptores em concentrações acima de cerca de 1 nM, por exemplo, acima de cerca de 10 nM, acima de cerca de 100 nM ou acima de cerca de 1 pM.

Em uma modalidade, anticorpos inventivos são seletivos para TrkB humano em que eles não ativam TrkA humano (SEQ ID NO: 5) ou TrkC humano (SEQ ID NO: 6). Como definido aqui, um anticorpo inventivo "não ativa" TrkA humano (SEQ ID NO: 5) ou TrkC humano (SEQ ID NO: 6) se ele não causa nenhuma ativação detectável com estes receptores em concentrações acima de cerca de 1 nM, por exemplo acima de cerca de 10 nM, acima de cerca de 100 nM ou acima de cerca de 1 µM.

Em uma modalidade, anticorpos inventivos bloqueiam a ligação entre BDNF e TrkB humano (SEQ ID NO: 1) com uma IC₅₀ na faixa de cerca de 100 pM a cerca de 500 nM, por exemplo na faixa de cerca de 100 pM a cerca de 1 nM, ou cerca de 100 pM a cerca de 500 pM. Em outras modalidades estes anticorpos não bloqueiam a ligação entre BDNF e TrkB humano (SEQ ID NO: 1). Como definido aqui, um anticorpo inventivo "não bloqueia" a ligação entre BDNF e TrkB humano (SEQ ID NO: 1) se ele não exibe nenhuma atividade de bloqueio detectável em concentrações acima de cerca de 1 nM, por exemplo acima de cerca de 10 nM, acima de cerca de 100 nM ou acima de cerca de 1 µM.

Em certas modalidades os anticorpos da invenção pertencem a um isótipo de IgG, por exemplo, o isótipo de IgG1, IgG2a ou IgG2b.

Em um outro aspecto, a presente invenção fornece anticorpos monoclonais com qualquer uma das propriedades acima que ligam e/ou ati-

vam ainda TrkB de camundongo (SEQ ID NO: 2). Em certas modalidades, estes anticorpos ligam e/ou ativam TrkB de camundongo (SEQ ID NO: 2) com um ED₅₀ na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 500 nM, por exemplo na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 1 nM, incluindo na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 500 pM e na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 100 pM.

Em um outro aspecto, a presente invenção fornece anticorpos monoclonais com qualquer uma das propriedades acima que ligam ainda um ou mais epítomos específicos de TrkB humano (SEQ ID NO: 1) e opcionalmente um ou mais epítomos específico de TrkB de camundongo (SEQ ID NO: 2). Em certas modalidades, estes anticorpos ligam um ou ambos epítomos de TrkB humano com as seqüências KNEYGKD (SEQ ID NO: 7, aminoácidos 364 a 370 da SEQ ID NO: 1) e KGNPKP (SEQ ID NO: 8, aminoácidos 308 a 313 da SEQ ID NO: 1). Em uma modalidade, estes anticorpos também ligam um ou ambos epítomos de TrkB de camundongo com as seqüências KNEYGKD (SEQ ID NO: 7, aminoácidos 364 a 370 da SEQ ID NO: 2) e RGNPKP (SEQ ID NO: 9, aminoácidos 308 a 313 da SEQ ID NO: 2). Em outras modalidades, a presente invenção fornece anticorpos que ligam um epítomo de TrkB humano com a seqüência ENLVGED (SEQ ID NO: 10, aminoácidos 269 a 275 da SEQ ID NO: 1) e opcionalmente um epítomo de TrkB humano com a seqüência AGDPVP (SEQ ID NO: 11, aminoácidos 221 a 226 da SEQ ID NO: 1). Em uma modalidade, estes anticorpos também ligam um epítomo de TrkB de camundongo com a seqüência ENLVGED (SEQ ID NO: 10, aminoácidos 269 a 275 da SEQ ID NO: 2).

Ainda em um outro aspecto, a presente invenção fornece hibridomas que produzem qualquer um dos mesmos anticorpos monoclonais. Por exemplo, hibridomas que foram depositados com a ATCC em 18 de Agosto de 2005 e foram fornecidos com ATCC designações de depósito de patente PTA-6948 (17D11) e PTA-6949 (29D7) são fornecidas.

Ainda em um outro aspecto, a presente invenção fornece anticorpos monoclonais que são produzidos pelos hibridomas que foram depositados com a ATCC em 18 de agosto de 2005 e foram fornecidos com designações de depósito de patente de ATCC PTA-6948 (17D11) e PTA-6949

(29D7), respectivamente. A presente invenção também fornece anticorpos que bloqueiam a ligação dos mesmos anticorpos e portanto compartilham o mesmo epítopo de ligação em TrkB humano (SEQ ID NO: 1).

2. Preparação de anticorpos monoclonais e hibridomas

5 Deve ser entendido que os anticorpos monoclonais da invenção podem ser preparados por qualquer método mostrado. Por exemplo, eles podem ser preparados usando tecnologia sintética, recombinante ou de hibridoma (por exemplo, como descrito em Antibodies: A Laboratory Manual, Ed. por E. Harlow e D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 ou
10 Monoclonal Antibodies: Principles and Practice por J. W. Goding, Academic Press, 1996). Em particular será avaliado que os anticorpos inventivos podem ser preparados inicialmente imunizando-se um animal com TrkB humano ou um derivado do mesmo (por exemplo, uma proteína recombinante que inclui o domínio extracelular de TrkB humano) e depois preparando monoclonais a partir de hibridomas adequadamente preparados.
15

 Em um aspecto, os anticorpos monoclonais da presente invenção são preparados por tecnologia de hibridoma padrão usando pelo menos dois imunógenos de proteína que são derivados de proteínas de TrkB de espécies diferentes. Por exemplo, os imunógenos podem incluir um primeiro
20 imunógeno que foi derivado de TrkB humano e um segundo imunógeno que foi derivado de um TrkB não humano. Preferivelmente, todos os imunógenos incluem o domínio extracelular de TrkB. Em certas modalidades o pelo menos dois imunógenos são combinados como uma mistura para propósitos de imunização.

25 Em uma modalidade, o primeiro dos mesmos imunógenos é uma proteína recombinante que inclui o domínio extracelular (ECD) de TrkB humano. O ECD de TrkB humano é compreendido de resíduos de aminoácido C32-H430 da proteína de tamanho natural (que é apresentada como SEQ ID NO: 1 na Fig. 12, Acesso no GenBank Nº NP_006171). Nota-se que todas
30 as seqüências de proteína e ácido nucléico que estão presentes como da data de arquivamento no GenBank, SwissProt, bases de dados de EMBL ou qualquer outra base de dados publicamente disponível são incorporados

aqui por referência (incluindo sem limitação as seqüências das neurotrofinas, por exemplo, NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5, etc.). O segundo imunógeno é uma proteína recombinante que inclui o domínio extracelular (ECD) de TrkB de murino. O ECD de TrkB de murino é compreendido de resíduos de aminoácido C32-H429 da proteína de tamanho natural (que é apresentada como SEQ ID NO: 2 na Fig. 13, Acesso no GenBank Nº P15209). Aqueles habilitados na técnica avaliarão que imunógenos adequados que incluem estes domínios podem ser preparados usando tecnologia recombinante padrão (por exemplo, ver *Protocols in Molecular Biology* Ed. por Ausubel *et al.*, John Wiley & Sons, Nova Iorque, NY, 1989 and *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Ed. por Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY, 1989, os conteúdos dos quais são incorporados aqui por referência).

Em certas modalidades, os primeiro e segundo imunógenos são administrados em uma razão (em peso) que é maior do que cerca de 1. Por exemplo, a razão pode ser de cerca de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais. Em uma modalidade a razão é maior do que cerca de 5. Em uma modalidade a razão é cerca de 10. Em uma modalidade os primeiro e segundo imunógenos são administrados simultaneamente como uma mistura.

Em uma modalidade, um ou ambos imunógenos incluem versões de seus domínios extracelulares respectivos que diferem um pouco dos domínios que ocorrem naturalmente. Por exemplo, aminoácidos no término N-ou-C do domínio extracelular podem estar ausentes. Alternativamente alguns aminoácidos dentro da seqüência que ocorre naturalmente podem ser mutados. Preferivelmente estas mutações são substituições conservativas. Deve ser entendido que estas versões que não ocorrem naturalmente devem incluir uma seqüência de aminoácido que é pelo menos 95%, preferivelmente pelo menos 96%, mais preferivelmente pelo menos 97%, ainda mais preferivelmente pelo menos 98% e ainda mais preferivelmente pelo menos 99% idêntica aos domínios extracelulares que são encontrados na SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 2.

Em certas modalidades, os primeiro e/ou segundo imunógenos não incluem nenhum dos aminoácidos que são encontrados fora do domínio

extracelular de TrkB (por exemplo, eles não incluem os aminoácidos que são encontrados em domínios de transmembrana e/ou intracelulares de TrkB). Em certas modalidades, os imunógenos podem incluir um ou mais aminoácidos terminais que são ausentes das proteínas de TrkB que ocorrem naturalmente. Em particular, aminoácidos terminais podem ser adicionados para aumentar a expressão da proteína recombinante, como uma consequência do vetor usado para a expressão, etc. Além disso, segmentos de aminoácido que são ausentes do alérgeno de proteína podem ser adicionados ao término amino e/ou carboxila da proteína recombinante, por exemplo, caracteres para purificação, rótulos para detecção, caracteres que aumentam a solubilidade do alérgeno recombinante, caracteres que aumentam a estabilidade dos imunógenos, fusão com uma proteína não relacionada ou proteína veículo adjuvante, etc. Um sítio de clivagem proteolítico pode ser introduzido na junção do segmento de aminoácido adicionado e no término de proteína recombinante para permitir a remoção do segmento adicionado depois que a proteína recombinante foi purificada, absorvida, etc. Modificações terminais comuns usadas na tecnologia recombinante são descritas em *Current Protocols in Molecular Biology* Ed. por Ausubel *et al.*, John Wiley & Sons, Nova Iorque, NY, 1989 e *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Ed. por Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY, 1989.

Em uma modalidade, os primeiro e segundo imunógenos têm a mesma composição como os dois imunógenos que são descritos nos Exemplos e que foram obtidos da R&D systems, Inc. (Cat. Nº 397-TR/CF e 1494-TB/CF, respectivamente).

Em certas modalidades, o primeiro imunógeno é como descrito acima, mas o segundo imunógeno inclui o domínio extracelular (ECD) de uma outra espécie de TrkB não humano que não murino (por exemplo, rato, galinha, coelho, etc.). O ECD de TrkB de rato é compreendido de resíduos de aminoácido C32-H429 da proteína de tamanho natural (que é apresentada como SEQ ID NO: 3 na Fig. 14, Acesso no GenBank Nº NP036863). O ECD de TrkB de galinha é compreendido de resíduos de aminoácido C32-T428 da proteína de tamanho natural (que é apresentada como SEQ ID NO:

4 na Fig. 15, Acesso no GenBank Nº CAA54468).

Uma vez que imunógenos adequados foram preparados, os imunógenos são injetados em qualquer um de uma variedade ampla de animais (por exemplo, camundongos, ratos, coelhos, etc.). Em uma modalidade os imunógenos são injetados em camundongos como descrito nos Exemplos. Por exemplo, os imunógenos são injetados subcutânea e intraperitonealmente com adjuvante de Freund completo. Em certas modalidades, cada animal é injetado subcutaneamente em sítios diferentes múltiplos. Nesta etapa, as proteínas recombinantes podem servir como imunógenos sem outra modificação. Alternativamente, uma resposta imune superior pode ser evocada se as proteínas recombinantes são unidas a uma proteína veículo adjuvante, tal como albumina sérica bovina ou hemocianina de lapa buraco de fechadura (KLH). Os imunógenos são injetados no hospedeiro animal, preferivelmente de acordo com um programa predeterminado incorporando uma ou mais imunizações de reforço e os animais são sangrados periodicamente. Por exemplo, em certas modalidades, uma ou mais imunizações de reforço são administradas intravenosamente. A ligação entre soros imunes e o primeiro (e opcionalmente o segundo) imunógeno depois é opcionalmente avaliada para confirmar que um título adequado de anticorpos foi elevado.

Anticorpos monoclonais que são específicos para um ou ambos os imunógenos podem ser preparados por qualquer método padrão. Por exemplo, a técnica de Kohler e Milstein, Eur. J Immunol. 6:511, 1976 e melhoras a esta podem ser usadas. Brevemente, estes métodos geralmente envolvem a preparação de linhagens de célula imortais capazes de produzir anticorpos tendo a especificidade desejada. Tais linhagens de célula podem ser produzidas, por exemplo, de células do baço obtidas de um ou mais animais imunizados como descrito acima. As células do baço depois são imortalizadas, por exemplo, por fusão com um parceiro de fusão de célula de mieloma, preferivelmente um que é isogênico com o animal imunizado. Em certas modalidades animais com soros adequados são reforçados uma ou mais vezes com os primeiro e/ou segundo imunógeno antes que as células do baço sejam removidas. Uma variedade de técnicas de fusão pode ser

utilizada. Por exemplo, as células do baço e células de mieloma podem ser combinadas com um detergente não iônico durante alguns minutos e depois plaqueadas em densidade baixa em um meio seletivo que sustenta o crescimento de células híbridas, mas não células de mieloma. Uma certa técnica de seleção usa a seleção de HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina). Depois de um tempo suficiente, usualmente cerca de 1 a 2 semanas, colônias de híbridos são observadas. Colônias únicas são selecionadas e seus sobrenadantes de cultura testados quanto à atividade de ligação contra o primeiro (e opcionalmente o segundo) imunógeno como descrito abaixo.

Anticorpos monoclonais podem ser isolados dos sobrenadantes de colônias de hibridoma em crescimento. Além disso, várias técnicas podem ser utilizadas para realçar o rendimento, tal como injeção da linhagem de célula de hibridoma na cavidade peritoneal de um hospedeiro vertebrado adequado, tal como um murino. Anticorpos monoclonais depois podem ser colhidos do fluido de ascite ou do sangue. Contaminantes podem ser removidos dos anticorpos por técnicas convencionais, tais como cromatografia, filtração de gel, precipitação e extração. Os isótipos de anticorpo podem ser determinados usando métodos padrão. Como debatido nos Exemplos e mostrado na Tabela 1, preparam-se anticorpos de murino específicos que pertencem aos isótipos IgG1, IgG2a e IgG2b usando estes métodos.

3. Caracterização da ligação de anticorpo

Em certas modalidades, anticorpos inventivos são caracterizados por suas atividades de ligação a TrkB humano (por exemplo, usando ELISA e/ou FACS como descrito nos Exemplos). Em certas modalidades a ligação a proteínas de TrkB humano que são expressadas em uma superfície celular também pode ser avaliada (por exemplo, usando células HEK293 como descrito nos Exemplos). Preferivelmente, os anticorpos inventivos também são testados quanto à sua atividade de ligação de espécie cruzada (por exemplo, com o segundo imunógeno). Isto permite que anticorpos monoclonais que ligam TrkB de ambas as espécies sejam identificados. Estes anticorpos são de interesse visto que eles podem ser testados em modelos de animal com o conhecimento de que eles também podem ser aplicados

em experiências clínicas humanas.

Em certas modalidades pode provar ser vantajoso caracterizar ainda as propriedades de ligação de qualquer anticorpo monoclonal dado. Em particular, uma pessoa pode usar um ensaio de competição (por exemplo, um ELISA) para determinar se os anticorpos bloqueiam a interação de TrkB e BDNF. Uma pessoa também pode avaliar se os anticorpos ligam TrkB não humano e/ou TrkA humano ou TrkC.

O mapeamento dos epítomos de ligação de anticorpo relativos em TrkB (humano ou outros) também pode ser conduzido, por exemplo, examinando-se a atividade de cada anticorpo individual em bloquear a ligação de outros anticorpos a TrkB. Por exemplo, a observação de que dois anticorpos bloqueiam cada outra ligação sugere que estes anticorpos podem ligar-se ao mesmo epítopo ou epítomos sobrepostos em TrkB.

4. Caracterização da função de anticorpo

Em certas modalidades, anticorpos inventivos são caracterizados por sua capacidade funcional para ativar TrkB humano. Qualquer ensaio agonista pode ser usado. Os Exemplos descrevem um ensaio de luciferase exemplar que mostrou representar seletivamente a ativação de TrkB. A autofosforilação de TrkB (por exemplo, como medido por Western blot) também pode ser usada como uma medida da ativação de TrkB.

Alternativa ou adicionalmente, a atividade de agonista de TrkB humano dos anticorpos inventivos pode ser avaliada em um ensaio que envolve TrkB endógeno (por exemplo, em células SY5Y de neuroblastoma humano). Como descrito nos Exemplos, tais ensaios testam quanto à capacidade de cada anticorpo para promover o crescimento de neurito ou para aumentar a sobrevivência de células diferenciadas a seguir da lesão (por exemplo, dano de retirada de soro). Em certas modalidades os efeitos dependentes de dose dos anticorpos inventivos no crescimento de neurito e/ou viabilidade de célula são medidos.

Em certas modalidades os anticorpos monoclonais purificados também são caracterizados por sua capacidade funcional para ativar TrkB não humano (por exemplo, murino, rato, galinha, coelho, etc.). Os Exemplos

descrevem um ensaio em que os anticorpos foram testados em culturas de neurônio de grânulo cerebelar (CGN) de rato quanto à atividade contra o receptor de TrkB de rato endógeno. Como com as células humanas um ensaio de crescimento de neurito e um ensaio de neuroproteção pode ser realizado. Outros ensaios úteis são mostrados na técnica e serão reconhecidos por aqueles habilitados no ramo.

Ainda em outras modalidades e como descrito nos Exemplos, os anticorpos monoclonais purificados são caracterizados ainda por sua capacidade funcional para ativar TrkA e/ou TrkC humanos.

10 5. Anticorpos humanizados e embutidos

Quando do uso de um anticorpo inventivo para propósitos terapêuticos pode provar ser vantajoso usar uma versão humanizada ou embutida do anticorpo de interesse para reduzir qualquer reação imunogênica potencial. Em geral, anticorpos humanizados ou embutidos minimizam respostas imunológicas indesejadas que limitam a duração e efetividade de aplicações terapêuticas de anticorpos não humanos em receptores humanos.

Vários métodos para preparar anticorpos humanizados compreendendo uma porção de ligação de antígeno derivada de um anticorpo não humano foram descritos na técnica. Em particular, anticorpos com regiões variáveis de roedor e suas regiões determinantes de complementaridade (CDRs) associadas fundidas aos domínios constantes humanos foram descritos (por exemplo, ver Winter *et al.*, Nature 349:293, 1991; Lobuglio *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:4220, 1989; Shaw *et al.*, J. Immuna 138:4534, 1987; e Brown *et al.*, Cancer Res. 47:3577, 1987). CDRs de roedor enxertadas em um ser humano que sustenta região de estrutura (FR) antes da fusão com um domínio constante de anticorpo humano apropriado (por exemplo, ver Riechmann *et al.*, Nature 332:323, 1988; Verhoeyen *et al.*, Science 239:1534, 1988; e Jones *et al.* Nature 321:522, 1986) e CDRs de roedor sustentadas por FRs de roedor recombinantemente embutidas também foram descritas (por exemplo, ver Pub. de Patente EPO Nº 519.596).

Anticorpos completamente humanos são particularmente desejáveis para tratamento terapêutico de pacientes humanos. Tais anticorpos

podem ser produzidos usando camundongos transgênicos que são incapazes de expressar genes de cadeias pesadas e leves de imunoglobulina endógena, mas que podem expressar genes de cadeia pesada e leve humanos (por exemplo, ver Lonberg e Huszar *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93, 1995 e Patente U.S. N^{os} 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; e 5.661.016).

Versões embutidas dos anticorpos inventivos também podem ser usadas nos métodos da presente invenção. O processo de embutimento envolve seletivamente substituir resíduos de FR, por exemplo, de uma região variável de cadeia pesada ou leve de murino, com resíduos de FR humanos de modo a fornecer um anticorpo que compreende uma porção de ligação de antígeno que retém substancialmente toda a estrutura de dobradura de proteína FR nativa. As técnicas de embutimento são fundamentadas no entendimento de que as características de ligação de antígeno de uma porção de ligação de antígeno são determinadas primariamente pela estrutura e disposição relativa dos conjuntos de CDR de cadeia pesada e leve dentro da superfície de associação de antígeno (por exemplo, ver Davies *et al.*, *Ann. Rev. Biochem.* 59:439, 1990). Assim, a especificidade de associação de antígeno pode ser preservada em um anticorpo humanizado apenas em que as estruturas de CDR, sua interação entre si e sua interação com o restante dos domínios de região variável são cuidadosamente mantidas. Usando-se técnicas de embutimento, resíduos de FR exterior (por exemplo; acessível a solvente) que são facilmente encontrados pelo sistema imune são seletivamente substituídos com resíduos humanos para fornecer uma molécula híbrida que compreende uma superfície embutida fracamente imunogênica, ou substancialmente não imunogênica.

6. Anticorpos de cadeia única

Anticorpos de cadeia única também podem ser preparados com base nos anticorpos inventivos. Por exemplo, um anticorpo de cadeia única (scFv) pode ser engendrado como descrito, por exemplo, em Colcher *et al.*, *Ann. N Y Acad. Sci.* 880:263-80, 1999; e Reiter, *Clin. Cancer Res.* 2:245-52, 1996. Métodos específicos são descritos nos Exemplos. O anticorpo de cadeia única pode ser dimerizado ou multimerizado para gerar anticorpos mul-

tivalentes tendo especificidades para epítomos diferentes de TrkB humano.

7. Composições farmacêuticas

Anticorpos monoclonais da invenção podem ser administrados puros de modo a ativar TrkB de acordo com a presente invenção. Mais comumente, entretanto, eles são administrados no contexto de uma composição farmacêutica, que contém uma quantidade terapeuticamente eficaz de um ou mais anticorpos juntamente com um ou mais outros ingredientes mostrados àqueles habilitados na técnica para formular composições farmacêuticas.

Como aqui usado, os termos "quantidade farmaceuticamente eficaz" ou "quantidade terapeuticamente eficaz" significam a quantidade total de cada ingrediente ativo da composição farmacêutica ou método que é suficiente para mostrar um benefício significativo do paciente, isto é, tratamento, prevenção ou melhora de uma condição que requer ativação de TrkB. Quando aplicado a um ingrediente ativo individual que é administrado sozinho, o termo refere-se àquele ingrediente sozinho. Quando aplicado a uma combinação de ingredientes ativos, o termo refere-se a quantidades combinadas dos ingredientes ativos que resultam no efeito terapêutico, se administrados em combinação, serial ou simultaneamente.

Em certas modalidades da invenção, anticorpos inventivos são administrados com uma dose semanal na faixa de cerca de 0,1 a cerca de 1000 mg/kg de peso corporal, ou cerca de 1 a cerca de 500 mg/kg de peso corporal, em certas modalidades cerca de 10 a cerca de 300 mg/kg de peso corporal. Doses podem ser administradas como um único regime ou como um regime contínuo dividido por duas ou mais doses durante o curso de um dia ou semana. A liberação pode ser como um bolo ou em certas modalidades como uma infusão gradual (por exemplo, por injeção durante 30 min). Em certas modalidades uma ou mais doses mais altas (por exemplo, 2, 3 ou 4 vezes mais altas) podem ser administradas inicialmente seguido por uma ou mais doses de manutenção mais baixas. A(s) dose(s) mais alta(s) podem ser administradas no início do tratamento apenas ou no começo de cada ciclo de tratamento. Estes níveis de dosagem e outros níveis de dosagem

aqui são para administração intravenosa ou intraperitoneal. A pessoa habilitada facilmente será capaz de determinar os níveis de dosagem necessários para uma via diferente de administração. Será avaliado que, em geral, a dose exata usada será como determinado pelo médico prescrevente e dependerá não apenas do peso do paciente e da via de administração, mas também da idade do paciente e da severidade dos sintomas.

Ingredientes adicionais úteis na preparação de composições farmacêuticas de acordo com a presente invenção incluem, por exemplo, veículos (por exemplo, na forma líquida ou sólida), agentes flavorizantes, lubrificantes, solubilizantes, agentes de suspensão, enchimentos, deslizantes, auxiliares de compressão, aglutinantes, agentes desintegrantes de comprimido, materiais encapsulantes, emulsificadores, tampões, conservantes, adoçantes, agentes espessantes, agentes colorantes, reguladores de viscosidade, estabilizantes ou osmo-reguladores, ou combinações dos mesmos.

Composições farmacêuticas líquidas preferivelmente contêm um ou mais anticorpos monoclonais da invenção e um ou mais veículos líquidos para formar soluções, suspensões, emulsões, xaropes, elixires, ou composições pressurizadas. Veículos líquidos farmaceuticamente aceitáveis incluem, por exemplo água, solventes orgânicos, óleos farmaceuticamente aceitáveis ou gordura, ou combinações dos mesmos. O veículo líquido pode conter outros aditivos farmacêuticos adequados tais como solubilizantes, emulsificadores, tampões, conservantes, adoçantes, agentes flavorizantes, agentes de suspensão, agentes espessantes, cores, reguladores de viscosidade, estabilizantes ou osmo-reguladores, ou combinações dos mesmos. Se a formulação líquida é intencionada para o uso pediátrico, é geralmente desejável evitar a inclusão de álcool.

Exemplos de veículos líquidos adequados para a administração oral ou parenteral incluem água (preferivelmente contendo aditivos tais como derivados de celulose tais como carboximetil celulose de sódio), álcoois ou seus derivados (incluindo álcoois monoídricos ou álcoois poliídricos tais como glicóis) ou óleos (por exemplo, óleo de coco fracionado e óleo de amendoim). Para a administração parenteral o veículo também pode ser um éster

oleoso tal como oleato de etila e miristato de isopropila. O veículo líquido para composições pressurizadas pode ser hidrocarbonetos halogenados ou outro propulsor farmacêuticamente aceitável.

Composições farmacêuticas sólidas preferivelmente contêm um ou mais veículos sólidos, e opcionalmente um ou mais outros aditivos tais como agentes flavorizantes, lubrificantes, solubilizantes, agentes de suspensão, enchimentos, deslizantes, auxiliares de compressão, aglutinantes ou agentes desintegrantes de comprimido ou um material encapsulante. Veículos sólidos adequados incluem, por exemplo, fosfato de cálcio, estearato de magnésio, talco, açúcares, lactose, dextrina, amido, gelatina, celulose, metilcelulose, carboximetil celulose de sódio, polivinilpirrolidina, ceras de fusão baixa ou resinas de troca de íon, ou combinações dos mesmos. Em composições farmacêuticas em pó, o veículo é preferivelmente um sólido finamente dividido que está em mistura com o ingrediente ativo finamente dividido. Em comprimidos, o(s) ingrediente(s) ativo(s) são geralmente misturados com um veículo tendo as propriedades de compressão necessárias em proporções adequadas, e opcionalmente, outros aditivos, e compactados na forma e tamanho desejados.

Em algumas modalidades da invenção, composições farmacêuticas são fornecidas na forma de dosagem unitária, tais como comprimidos ou cápsulas. Em tal forma, a composição é subdividida em dose unitária contendo quantidades apropriadas do(s) ingrediente(s) ativo(s). As formas de dosagem unitárias podem ser composições empacotadas, por exemplo pós empacotados, frascos, ampolas, seringas pré-cheias ou sachês contendo líquidos. A forma de dosagem unitária pode ser, por exemplo, uma cápsula ou comprimido por si só, ou ela pode ser um número apropriado de qualquer uma de tais composições na forma de pacote.

Assim, a presente invenção também fornece uma composição farmacêutica na forma de dosagem unitária para ativar TrkB, onde a composição contém uma dosagem unitária terapeuticamente eficaz de pelo menos um anticorpo monoclonal da invenção. Como uma pessoa habilitada na técnica reconhecerá, certa dosagem unitária terapeuticamente eficaz depende-

rá do método de administração.

A presente invenção também fornece um pacote terapêutico para dispensar os anticorpos monoclonais da invenção a um indivíduo que é tratado para uma condição que requer ativação de TrkB. Em algumas modalidades, o pacote terapêutico contém uma ou mais dosagens unitárias de pelo menos um anticorpo monoclonal inventivo, um recipiente contendo uma ou mais dosagens unitárias, e rotulagem que dirige-se ao uso do pacote para o tratamento. Em certas modalidades, a dose unitária está na forma de comprimido ou cápsula. Em algumas casos, cada dosagem unitária é uma quantidade terapeuticamente eficaz.

8. Outros agentes farmacêuticos

De acordo com a presente invenção, anticorpos monoclonais da invenção podem ser administrados sozinhos para modular a atividade de TrkB. Alternativamente os anticorpos podem ser administrados em combinação com (se simultânea ou seqüencialmente) um ou mais outros agentes farmacêuticos úteis no tratamento, prevenção ou melhora de uma ou mais outras condições (incluindo sintomas, distúrbios, ou doenças) que requerem atividade de TrkB.

Por exemplo, outros agentes farmacêuticos que podem modular a atividade de TrkB podem ser usados em combinação com os anticorpos monoclonais da invenção, incluindo outros ativadores de TrkB. As Patentes U.S. N^{os} 5.770.577; 6.077.829; 6.723.701 e 6.800.607 (todas incorporadas aqui por referência em sua totalidade) descrevem derivados de BDNF e composições que podem ser úteis de acordo com a prática da presente invenção.

Adicional ou alternativamente, os anticorpos monoclonais podem ser usados em combinação com outros agentes farmacêuticos que são úteis no tratamento, prevenção ou melhora de distúrbios e doenças neurológicos. Em certas modalidades, os anticorpos monoclonais são combinados com agentes que são úteis no tratamento, prevenção ou melhora de distúrbios e doenças causados por lesões ao sistema nervoso (por exemplo, por ferimento, cirurgia, isquemia, infecção, doenças metabólicas, subnutrição, tumor

5 maligno, medicamentos tóxicos, etc.). Deve ser entendido que qualquer agente adequado mostrado na técnica pode ser usado, incluindo aqueles listados na Physicians' Desk Reference, 55^a Edição, 2001, publicado por Medical Economics Company, Inc. at Monvale, NJ, as porções relevantes do qual são incorporadas aqui por referência.

9. Usos terapêuticos

Em um aspecto, anticorpos inventivos são úteis para tratar condições (incluindo sintomas, distúrbios, ou doenças) que requerem ativação de TrkB. Tais métodos envolvem administrar uma quantidade terapêutica-
10 mente eficaz de um ou mais anticorpos inventivos ao indivíduo. Em certas modalidades, a invenção fornece métodos para tratar condições neurológicas. Por exemplo, e sem limitação, anticorpos inventivos podem ser usados para tratar indivíduos com um sistema nervoso que foi lesionado por ferimento, cirurgia, isquemia, infecção, doenças metabólicas, subnutrição, tumor
15 maligno, medicamento tóxico, etc. Exemplos específicos incluem acidente vascular cerebral, lesão na medula espinhal, lesão cerebral traumática, degeneração retiniana e axotomia. Os anticorpos inventivos também podem ser usados para tratar distúrbios tais como distúrbio de hiperatividade com déficit de atenção (ADHD), depressão e dano mental associado à idade (isto
20 é, fornecendo-se aumento cognitivo). Os anticorpos inventivos também podem ser usados para tratar condições congênitas ou neurodegenerativas incluindo doença de Alzheimer, doença de Parkinson, coreia de Huntington, esclerose lateral amiotrófica (ALS) e condições relacionadas a estas. Os benefícios de ativação de TrkB no tratamento de doenças não neurológicas tais
25 como câncer e diabetes também foi descrito e os anticorpos inventivos portanto podem encontrar utilidade em tais contextos (por exemplo, Patentes U.S. Nºs 5.877.016 e 6.800.607 descrevem os benefícios de ativação de TrkB para tratar câncer e diabetes, respectivamente).

Os métodos desta invenção são úteis para tratar as condições
30 descritas aqui em adultos e crianças. Eles também podem ser utilizados para aplicações veterinárias, particularmente incluindo aplicações em caninos e felinos. Se desejado, os métodos aqui também podem ser usados com ani-

mais de criação, tais como criações de ovino, bovino, porcino e eqüino.

Métodos inventivos envolvem a liberação de anticorpos monoclonais inventivos por intermédio de qualquer via apropriada de administração incluindo, por exemplo, modos parenteral, intravenoso, tópico, nasal, oral (incluindo bucal ou sublingual), retal ou outros modos. Em geral, os anticorpos podem ser formulados para a liberação imediata, retardada, modificada, prolongada, pulsada, ou controlada.

Em certas modalidades, os anticorpos são formulados para a liberação por injeção. Em tais modalidades, a administração pode ser, por exemplo, intracavernosa, intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intra-uretral, intra-esternal, intracranial, intramuscular ou subcutânea, ou por intermédio de técnicas de infusão ou injeção sem agulha. Para tal administração parenteral, os anticorpos da invenção podem ser preparados e mantidos em formulações liofilizadas convencionais e reconstituídos antes da administração com uma solução salina farmaceuticamente aceitável, tal como uma solução salina a 0,9%. O pH da formulação injetável pode ser ajustado, como é mostrado na técnica, com um ácido farmaceuticamente aceitável, tal como ácido metanossulfônico. Outros veículos e solventes aceitáveis que podem ser utilizados incluem solução de Ringer e U.S.P. Além disso, óleos fixos, estéreis são convencionalmente utilizados como um solvente ou meio de suspensão. Para este propósito qualquer óleo fixo brando pode ser utilizado incluindo mono- ou diglicerídeos sintéticos. Além disso, ácidos graxos tais como ácido oléico são usados na preparação de injetáveis. As formulações injetáveis podem ser esterilizadas, por exemplo, por filtração através de um filtro de retenção bacteriana, ou incorporando-se agentes esterilizantes na forma de composições sólidas estéreis que podem ser dissolvidas ou dispersas em água estéril ou outro meio injetável estéril antes do uso.

De modo a prolongar o efeito do anticorpo inventivo, pode ser desejável reduzir sua absorção a partir de uma injeção intramuscular ou subcutânea. A absorção retardada de um tal anticorpo administrado pode ser realizada dissolvendo-se ou colocando-se em suspensão o agente em

um veículo oleoso. Formas de depósito injetáveis são fabricadas formando-se matrizes de microcápsula do anticorpo em polímeros biodegradáveis tais como polilactídeo-poliglicolídeo. Dependendo da razão de anticorpo para polímero e da natureza do polímero particular utilizado, a taxa de liberação de anticorpo pode ser controlada. Exemplos de outros polímeros biodegradáveis incluem poli(ortoésteres) e poli(anidridos). Formulações de depósito injetáveis também são preparadas capturando-se os anticorpos em lipossomos ou microemulsões que são compatíveis com tecidos corporais.

Para a aplicação topicamente à pele, os anticorpos podem ser formulados como um ungüento adequado contendo o ingrediente ativo colocado em suspensão ou dissolvido em, por exemplo, uma mistura com um ou mais dos seguintes: óleo mineral, petrolato líquido, petrolato branco, propileno glicol, composto de polioxietileno polioxipropileno, cera emulsificante e água. Alternativamente, eles podem ser formulados como uma loção ou creme adequados, colocados em suspensão ou dissolvidos em, por exemplo, uma mistura de um ou mais dos seguintes: óleo mineral, monoestearato de sorbitano, um polietileno glicol, parafina líquida, polisorbato 60, cera de ésteres cetílicos, álcool cetearílico, 2-octildodecanol, álcool benzílico e água.

Os anticorpos inventivos também podem ser administrados intranasal ou por inalação e são convenientemente liberados na forma de um inalador de pó seco ou uma apresentação de pulverização por aerossol a partir de um recipiente pressurizado, bomba, pulverizador, atomizador ou nebulizador, com ou sem o uso de um propulsor adequado, por exemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, um hidrofluoroalcano, dióxido de carbono ou outro gás adequado. No caso de um aerossol pressurizado, a unidade de dosagem pode ser determinada fornecendo-se uma válvula para liberar uma quantidade medida. O recipiente pressurizado, bomba, pulverizador, atomizador ou nebulizador podem conter uma solução ou suspensão do anticorpo, por exemplo, usando uma mistura de etanol e o propulsor como o solvente, que adicionalmente pode conter um lubrificante, por exemplo, trioleato de sorbitano. Cápsulas e cartuchos (fabricados, por exemplo, de gelatina) para o uso em um inalador ou insuflador

podem ser formulados para conter uma mistura em pó dos anticorpos da invenção e uma base de pó adequada tal como lactose ou amido.

Para métodos inventivos utilizando liberação oral, tal liberação pode ser realizada usando formulações sólidas ou líquidas, por exemplo na
 5 forma de comprimidos, cápsulas, multiparticulados, géis, películas, óvulos, elixires, soluções ou suspensões. Em certas modalidades, os anticorpos monoclonais são administrados como comprimidos ou cápsulas orais. Tais preparações podem ser formulações mastigáveis ou líquidas mistas ou materiais alimentícios ou líquidos se desejável, por exemplo para facilitar a ad-
 10 ministração a crianças, a indivíduos cuja capacidade para engolir comprimidos é comprometida, ou a animais.

Composições para a administração retal são preferivelmente supositórios que podem ser preparados misturando-se os anticorpos inventivos com adequados excipientes ou veículos não irritantes tais como mantei-
 15 ga de cacau, polietileno glicol ou uma cera de supositório que são sólidos na temperatura ambiente, mas líquidos na temperatura corporal e portanto fundem na abóbada retal e liberam os anticorpos. Enemas de retenção e cateteres retais também podem ser usados como é mostrado na técnica. Veículos que realçam a viscosidade tais como hidroxipropil celulose também são
 20 alguns veículos da invenção para a administração retal visto que eles facilitam a retenção da composição farmacêutica dentro do reto. Geralmente, o volume de veículo que é adicionado à composição farmacêutica é selecionado de modo a maximizar a retenção da composição. Em particular, o volume não deve ser tão grande como para expor a retenção da composição
 25 administrada na abóbada retal.

10. Usos de diagnóstico

Em um outro aspecto, anticorpos inventivos podem ser usados para detectar TrkB em uma amostra (por exemplo, de modo a diagnosticar um distúrbio caracterizado por super ou sub expressão de TrkB). De acordo
 30 com tais métodos um anticorpo inventivo é combinado com uma amostra sob condições para permitir a ligação específica. A ligação específica depois é detectada indicando do mesmo modo a presença de TrkB na amostra.

A amostra pode ser derivada de um fluido corporal (por exemplo, do fluido cerebrospinal, sangue, soro, urina, etc.) ou um extrato de células ou tecido (por exemplo, uma amostra de biópsia). A detecção da ligação pode ser facilitada ligando-se (isto é, fisicamente ligando) o anticorpo a uma substância detectável (isto é, rotulagem de anticorpo). Exemplos de substâncias detectáveis incluem várias enzimas, grupos prostéticos, materiais fluorescentes, materiais luminescentes, materiais bioluminescentes, e materiais radioativos. Exemplos de enzimas adequadas incluem peroxidase de rábano silvestre, fosfatase alcalina, β -galactosidase, ou acetilcolinesterase; exemplos de complexos de grupo prostético adequados incluem estreptavidina/biotina e avidina/biotina; exemplos de materiais fluorescentes adequados incluem umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, dansil cloreto ou ficoeritrina; um exemplo de um material luminescente inclui luminol; exemplos de materiais bioluminescentes incluem luciferase, luciferina, e aequorina; e exemplos de material radioativo adequado incluem ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S ou ^3H .

Uma variedade de protocolos para medir a ligação de anticorpo, incluindo ELISA e FACS, são mostrados na técnica e fornecem uma base para diagnosticar níveis alterados ou anormais de expressão de TrkB. ELISA e FACS são descritos ainda nos Exemplos. Valores normais ou padrão para a expressão de TrkB são estabelecidos combinando-se amostras tomadas de indivíduos normais com um anticorpo inventivo sob condições adequadas para a formação de complexo. A quantidade de formação de complexo padrão pode ser quantificada por vários métodos dependendo da natureza da substância detectável. Preferivelmente a quantidade de formação de complexo padrão é quantificada por meios fotométricos. Níveis de expressão de TrkB em amostras de indivíduos doentes depois são comparados com os valores padrão. O desvio entre valores padrão e de doente estabelece os parâmetros para diagnosticar a doença.

Em certas modalidades, os métodos inventivos podem ser usados para diagnosticar condições neurológicas que são caracterizadas por super ou subexpressão de TrkB. Por exemplo, e sem limitação, métodos

inventivos podem ser usados para identificar sistemas nervosos que foram lesionados por ferimento, cirurgia, isquemia, infecção, doenças metabólicas, subnutrição, tumor maligno, medicamento tóxico, etc. Exemplos específicos incluem acidente vascular cerebral, lesão na medula espinhal, lesão cerebral traumática, degeneração retiniana e axotomia. Os métodos inventivos também podem ser usados para diagnosticar distúrbios tais como distúrbio de hiperatividade com déficit de atenção (ADHD), depressão e dano mental associado à idade (isto é, fornecendo-se aumento cognitivo). Os métodos inventivos também podem ser usados para diagnosticar condições congênitas ou neurodegenerativas incluindo doença de Alzheimer, doença de Parkinson, coreia de Huntington, esclerose lateral amiotrófica (ALS) e condições relacionada a estes.

11. Usos de purificação

A invenção também fornece um método de usar um anticorpo para purificar TrkB de uma amostra compreendendo combinar um anticorpo inventivo com uma amostra sob condições para permitir a ligação específica, do mesmo modo produzindo um complexo de anticorpo-receptor de TrkB, separar o complexo de anticorpo-receptor de TrkB do restante da amostra e depois separar o anticorpo do receptor de TrkB, obtendo do mesmo modo um receptor de TrkB purificado. Será avaliado que os anticorpos inventivos podem ser usados para isolar TrkB por qualquer técnica padrão, tal como cromatografia por afinidade ou imunoprecipitação.

EXEMPLOS

A presente invenção é ilustrada e sustentada ainda pelos exemplos seguintes. Entretanto, estes exemplos não devem ser de nenhum modo considerados para limitar mais o escopo da invenção. Ao contrário, uma pessoa tendo habilidade comum na técnica facilmente entenderia que existem outras modalidades, modificações, e equivalentes da presente invenção sem divergir do espírito da presente invenção e/ou do escopo das reivindicações anexas.

EXEMPLO 1

Este exemplo descreve a preparação e caracterização e teste *in*

vitro de uma pluralidade de anticorpos de TrkB.

Materiais e Métodos

Imunógenos

Anticorpos de murino anti-TrkB foram preparados usando uma
 5 mistura de dois imunógenos de proteína: uma primeira proteína recombinante que inclui o domínio extracelular (ECD) de TrkB humano (rhTrkB-ECD) (R&D systems, Inc., Cat. Nº 397-TR/CF) e uma segunda proteína recombinante que inclui o domínio extracelular de TrkB de murino (rmTrkB-ECD) (R&D system, Inc., Cat. Nº 1494-TB/CF).

10 O domínio extracelular de TrkB humano é compreendido de resíduos de aminoácido C32-H430 da proteína de tamanho natural (que é apresentada como a SEQ ID NO: 1 na Fig. 12, Acesso no GenBank Nº NP 006171). rhTrkB-ECD foi expressado em linhagem de célula de mieloma de murino NSO. A massa molecular calculada de rhTrkB-ECD monomérico é 44
 15 kDa; entretanto, quando glicosilado ele migra como uma faixa ampla de 80 a 100 kDa em SDS-PAGE sob condições de redução.

O domínio extracelular de TrkB de murino é compreendido de resíduos de aminoácido C32-H429 da proteína de tamanho natural (que é apresentada como a SEQ ID NO: 2 na Fig. 13, Acesso no GenBank Nº
 20 P15209). No rhTrkB-ECD usado para este exemplo, esta sequência é flanqueada por um peptídeo de sinal humano CD33 de terminal N que é clivado durante a expressão e um Rótulo-His de terminal C. rhTrkB-ECD também foi expressado em linhagem de célula de mieloma de murino NSO. A massa molecular calculada do rhTrkB-ECD monomérico é de 45,9 kDa; entretanto,
 25 quando glicosilado ele migra como uma faixa ampla de 75 a 100 kDa em SDS-PAGE sob condições de redução.

Programas de imunização

Cinco camundongos BALB/c fêmeas de 8 semanas de idade foram imunizados com 10 µg de rhTrkB-ECD que foi pré-misturado com adjuvante de Freund completo (CFA). A mistura foi separada em porções que
 30 foram injetadas subcutânea e intraperitonealmente 4 vezes quinzenalmente (isto é, nas semanas 0, 2, 4, e 6). Os camundongos também foram imuniza-

dos na semana 7 por injeção subcutânea e intraperitoneal com 1 µg de rm-TrkB-ECD que foi pré-misturado com adjuvante de Freund completo (CFA). As sangrias dos camundongos foram coletadas nas semanas 5 e 7 e respostas de anticorpo nos soros foram avaliadas.

5 Geração de anticorpos monoclonais anti-TrkB de murino (mAbs)

Três dos cinco camundongos foram adicionalmente reforçados intravenosamente com 10 µg de rhTrkB e 1 µg de rmTrkB 3 dias antes da fusão celular (que ocorreu na semana 12). Esplenócitos dos mesmos três camundongos foram fundidos com células de mieloma de murino P3X63Ag8.653 (ATCC, Cat. Nº CRL-1580) na razão de 4:1 usando 50% de polietileno glicol (MW 1500) (Roche Diagnostics Corp., Cat. Nº 783641). Depois da fusão, as células foram semeadas e cultivadas em placas de 96 cavidades a 1×10^5 células/cavidade em meio de seleção (RPMI1640 contendo 20% de FBS e 5% de Origen) (IGEN International, Inc., Cat. Nº. 210001), 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 1 x HEPES e 1 x HAT (hipoxantina-aminopterina-timidina) (Sigma, Cat. Nº H0262). Sobrenadantes de hibridoma foram triados quanto à ligação com rhTrkB por ELISA e manchamento em células estáveis HEK293 que expressam rhTrkB por análise FACS (ver abaixo). Os sobrenadantes de hibridoma selecionados para ser positivos foram subsequentelemente testados quando as atividades agonistas em rhTrkB usando um ensaio de luciferase (ver abaixo). Os hibridomas selecionados foram subclonados quatro vezes por diluições seriais e uma vez por classificação FACS (ver abaixo). O meio condicional foi colhido da cultura de hibridoma estável. Prosep-A (Montage Antibody Purification Spin columns, Millipore, Cat. Nº. P36486) foi usado para purificar IgG do meio condicional de hibridoma. A classe de Ig de cada mAb foi determinada com um kit de isotipagem de mAb de murino (IsoStrip, Boehringer Mannheim Corp., Cat. Nº 1493027).

ELISAs

30 Para medir a presença de anticorpos de TrkB específicos, placas de 96 cavidades (Maxisorp, Nunc) foram revestidas com 1 µg/ml de rhTrkB-EDC-Fc (R&D system, Cat. Nº 688-TK) ou rmTrkB-Fc (R&D system) e incu-

badas durante a noite a 4° C. Depois de lavar as placas e bloquear os cavidades com PBS (10 mM de fosfato de sódio, 150 mM de NaCl, pH 7,2) contendo 1% de BSA e 0,05% de Tween-20, 100 µl de soro imune diluído ou sobrenadantes de hibridoma foram adicionados e incubados durante 1 h na temperatura ambiente. As placas foram lavadas, e os anticorpos anti-TrkB ligados foram detectados usando IgG anti-murino de cabra conjugado a peroxidase (H+L) (PIERCE, Cat. Nº. 31434) seguido por incubação com o substrato TMB (BioFX Laboratories, Cat. Nº TMBW_1000-01). Os valores de absorbância foram determinados a 450 nm em um espectrofotômetro.

10 Para determinar a concentração de mAb no sobrenadante de hibridoma, placas de 96 cavidades foram revestidas com 1 µg/ml de IgG antimurino de cabra (Fcγ) (PIERCE, Cat. Nº 31123) em PBS e incubadas durante a noite a 4° C. Depois de lavar e bloquear as cavidades com PBS contendo 1% de BSA e 0,05% de Tween-20, 100 µl de sobrenadantes de hibridoma diluídos foram adicionados durante 1 h na temperatura ambiente. IgG de murino de emparelhamento de isótipo purificado foi usado como um padrão para a quantificação de concentrações de IgG anti-TrkB. As placas foram lavadas, e IgG-Fc anti-murino de cabra rotulado com HRP foram adicionadas e incubadas durante 1 h na temperatura ambiente. Depois de lavar os cavidades, o substrato TMB foi adicionado. A absorbância foi determinada a 450 nm.

Caracterização de epítomos de ligação de anticorpo relativos usando ligação por competição

25 Para determinar como a ligação de IgG anti-TrkB à proteína TrkB afeta a interação de BDNF com TrkB, uma placa de 96 cavidades foi revestida com 0,3 µg/ml de BDNF (R&D system, Cat. Nº 248-BD/CF) em PBS e incubada durante a noite a 4° C. Depois de lavar e bloquear os cavidades com PBS contendo 1% de BSA e 0,05% de Tween-20, 100 µl de mistura de sobrenadante de hibridoma pré-incubado (ou soro imune diluído) com rhTrkB-EDC-Fc foi adicionado à placa e incubado durante 1 h na temperatura ambiente. Depois de lavar a placa, IgG anti-humano de cabra conjugado à peroxidase, (Fcγ) (PIERCE, Cat. Nº 31416) foi adicionado e incu-

bado durante 1 h na temperatura ambiente. As cavidades foram lavadas e o substrato TMB foi adicionado. A absorbância foi determinada a 450 nm.

Para mapear os epítomos de ligação de anticorpo relativos em rhTrkB, uma placa de 96 cavidades foi revestida com 1 µg/ml de cada mAb específico de TrkB individual em PBS e incubada durante a noite a 4° C. Depois de lavar e bloquear os cavidades com PBS contendo 1% de BSA e 0,05% de Tween-20, 100 µl de mistura de cada mAb de TrkB pré incubado individual (20 µg/ml) e rhTrkB-EDC-Fc (0,1 µg/ml) foi adicionado as cavidades e incubado durante 1 h na temperatura ambiente. A placa foi lavada e incubada durante 1 h com IgG anti-humano de cabra conjugado à peroxidase (Fcγ). Depois de lavar a placa, o substrato TMB foi adicionado. A absorbância foi determinada a 450 nm.

Ensaio de luciferase

Uma linhagem estável de células HEK-293 que expressam rhTrkB foi gerada transfectando-se as células HEK-293 com pcDNA-hTrkB (tamanho natural, ver Acesso no GenBank Nº NM_006180). Células transfectadas foram selecionadas na presença de higromicina durante 2 semanas com diluições limitadas. A seguir da avaliação inicial, um único clone de células foi escolhido para o estudo. Para o ensaio de luciferase, células foram plaqueadas a $1,5 \times 10^4$ células/cavidade em 100 µl de meio de crescimento em placas de 96 cavidades. No dia seguinte, as células foram tratadas com 100 µl de 10x concentração final de BDNF ou anticorpos de teste. Atividades de luciferase foram medidas 16 h depois dos tratamentos usando o kit de ensaio Steady-Glo da Promega de acordo com o protocolo do fabricante. Em poucas palavras, o meio foi substituído com 100 µl de PBS e 100 µl de reagente Steady-Glo foram adicionados. Depois de vedar as placas com Top-Seal, as placas foram agitadas em Agitador de Placa Tituladora em velocidade ~ 5 durante 5 minutos e depois a luminescência foi medida usando um instrumento TopCount NXT v2.13 (Packard).

30 Análise FACS

Células HEK-293 que expressam rhTrkB foram destacadas das placas com PBS contendo 5 mM de EDTA e transferidas para tubos Falcon

de 5 ml (Becton Dickinson, Cat. No. 352063) com 2×10^5 células por tubo. As células foram lavadas uma vez com PBS centrifugando-se a 800 rpm a 4° C durante 3 min, e incubadas durante 30 min a 4° C com 100 µl de sobrenadante de cultura de hibridoma, anticorpos purificados ou soro imune diluído em PBS com 1% de FBS. As células foram lavadas 3 vezes com 1 ml de PBS contendo 1% de FBS e incubadas durante 30 min a 4° C no escuro com IgG anti-murino de cabra rotulado com PE, fragmento F(ab')₂ (DAKO Corporation, Cat. No. R0480) em PBS contendo 1% de FBS. As células foram lavadas três vezes novamente e re-colocadas em suspensão em 250 µl de PBS contendo 1% de FBS. Iodeto de propídio foi usado para a detecção de células mortas, que foram excluídas da análise. A fluorescência de 5000 células/tubo foi contada por um citofluorômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson).

Ensaio de autofosforilação de TrkB

Células HEK-293 que expressam rhTrkB foram plaqueadas em placas de 24 cavidades a 2×10^5 células/cavidade em um meio de crescimento DMEM. No dia seguinte, as células foram incubadas em DMEM isento de soro durante 90 min, depois estimuladas com BDNF ou anticorpos de teste em concentrações diferentes durante 30 min a 37° C. Depois de lavar com PBS uma vez, as células foram lisadas em Tampão de Amostra Laemmli (Bio-Rad) pré aquecido a 95° C. Os lisatos foram conduzidos através de coluna QIAshredder (Qiagen) e 20 µl de amostras foram resolvidos em 4 a 12% de gel Bis-Tris (Invitrogen). A seguir da transferência às membranas de nitrocelulose, faixas de TrkB fosforilado foram detectadas usando anticorpo específico de PY490 fosfo-Trk (1:100, Cell Signaling, Cat. No. 9141) seguido por incubação com anticorpo secundário anti-coelho conjugado a HRP (Molecular Probes). Os sinais foram desenvolvidos usando o kit ECL plus (Amersham).

Ensaio de crescimento de neurito

Células SH-SY5Y de neuroblastoma humanas foram cultivadas em DMEM:F12(1:1) suplementado com 2 mM de L-glutamina, 15 FBS e pen/estrep. Para o ensaio de crescimento de neurito, as células foram pla-

queadas em placas de cultura de tecido de 96 cavidades na densidade de 4×10^3 células/cavidade e incubadas com $10 \mu\text{M}$ de ácido all-trans-retinóico (RA) para induzir a diferenciação neuronal. No terceiro dia, o meio foi substituído com meio de crescimento fresco com ou sem BDNF ou anticorpos de teste, como indicado nos resultados. Depois de três dias adicionais em cultura, as células foram fixadas por IC-Fix durante 30 min na temperatura ambiente e processadas ainda para o imunomanchamento de beta-Tubulina III. Primeiro, as células foram permeabilizadas por incubação breve em 0,2% de Triton em solução tamponada com fosfato (TPBS). Depois as amostras foram incubadas em 1,5% de soro de cabra normal (NGS) em TPBS durante 30 min para bloquear a ligação não específica, seguido por incubação com mAb anti-beta-Tubulina III (Tuj1, 1:1000, Covance) em 1,5% de NGS/TPBS. Os sinais de Tuj1 foram detectados usando anticorpo anti-cabra de murino Alexa 488 (1:500, Molecular Probes) e crescimento de neurito foi analisado usando Cellomics varredura de arranjo.

Para a medição de efeitos promotores de neurito nos neurônios primários, culturas de neurônio granular cerebelar de rato ou murino (CGN) foram preparadas. Brevemente, o cerebelo foi dissecado dos animais pós natal no dia 7 e cortado em pedaços pequenos. O tecido foi tratado com papaína (Worthington Biochemical Corp.) durante 30 min a 37°C e dispersados por trituração suave. A seguir da centrifugação a 300 g durante 5 min, células dissociadas foram reconstituídas em meio Neurobasal contendo suplemento B27, 0,5 mM de L-glutamina, e 25 mM de cloreto de potássio e plaqueadas em placas Biocoat de 96 cavidades pré-revestidas com poli-D-lisina (BD bioscience) em uma densidade de $1,2 \times 10^4$ células/cavidade. As células foram tratadas com BDNF ou anticorpos de teste durante 24 h, fixadas com IC-Fix durante 30 min na temperatura ambiente e processadas para imunomanchamento com Tuj1 como descrito acima.

Ensaio de sobrevivência celular

As células SH-SY5Y foram plaqueadas em placas de 96 cavidades a 1×10^4 células/cavidade e incubadas com RA ($10 \mu\text{M}$) para induzir a diferenciação neuronal. Depois de 3 dias, o meio de cultura foi mudado para

- o meio de crescimento sem soro (meio isento de soro) e as células foram tratadas com BDNF, anticorpos de teste ou veículo. A seguir de dois dias adicionais em cultura, a viabilidade de célula foi medida por ensaio de MTT usando o Kit de Ensaio de Proliferação de Célula Não Radioativa CellTiter 96 (Promega) de acordo com o protocolo do fabricante.

Ensaio de neuroproteção

- Culturas de CGN de rato ou murino foram preparadas de filhotes de 7 dias de idade como descrito acima e plaqueadas em placas Biocoat de 96 cavidades pré revestidas com poli-d-lisina (BD bioscience) em uma densidade de $7,3 \times 10^4$ células/cavidade. 24 h depois do plaqueamento, as células foram submetidas a lesão de privação de soro de potássio (KSD), que é mostrada resultar em morte significativa de neurônios granulares cerebelares. Culturas irmãs foram co-tratadas com BDNF ou anticorpos de teste. A seguir de 24 h de incubação, viabilidade de célula foi medida usando um Kit de Ensaio de Proliferação de Célula Não Radioativa CellTiter 96 (Promega).

Resultados

Avaliação de respostas de anticorpo a partir de camundongos imunizados com TrkB

- Para avaliar as respostas imunes específicas para TrkB, os cinco camundongos imunizados (M1 a M5) foram sangrados uma semana a seguir da terceira e quarta imunizações. Títulos de anticorpo anti-TrkB elevados no soro foram determinados por ELISA e análise FACS tanto na terceira quanto na quarta sangria. A Fig. 1 representa resultados das sangrias depois da quarta imunização. Todos os cinco camundongos geraram títulos elevados reconhecendo tanto rhTrkB-ECD quanto rmTrkB-ECD em ELISA (Figuras 1A e 1B).

- O local dos epítomos de ligação de anticorpo no hTrkB em relação ao sítio de ligação de BDNF também foi avaliado. Resultados de ELISA de competição mostraram que as sangrias imunes podem bloquear interações de rhTrkB-EDC-Fc e BDNF em uma ordem de $M2 = M5 > M3 > M4 = M1$ (Figura 1 C). Interessantemente, as eficácias de anticorpos em bloquear a interação de rhTrkB-BDNF correlacionada com os títulos de ligação de an-

ticorpo (comparar as Figuras 1A e 1 C). Todas as sangrias imunes também mostraram ligar-se a rhTrkB expressado na superfície celular em células HEK-293 como demonstrado por análise FACS (Fig. 1D).

A seguir da observação de ligação de título elevada específica de soros imunes a hTrkB, estas sangrias imunes foram avaliadas em um ensaio repórter de luciferase para testar suas atividades agonísticas. A atividade de luciferase em células HEK-293 que expressam rhTrkB mostrou seletivamente representar a ativação de TrkB (Fig. 2). A incubação destas células com sangrias imunes significativamente aumentou os sinais de luciferase em uma maneira dependente de dose (Fig. 3). Novamente, a eficácia de atividades agonísticas foi em uma ordem de $M2 = M5 > M3 > M4 = M1$. Os três camundongos com os títulos de anticorpo mais elevados e atividades agonistas robustas (M2, M3 e M5) foram escolhidos para a geração de hibridoma subsequente.

15 Produção de anticorpos monoclonais

Como descrito previamente, os três camundongos selecionados (M2, M3 e M5) foram reforçados intravenosamente com 10 µg de rhTrkB-ECD e 1 µg de rmTrkB-ECD três dias antes da fusão. A partir da primeira rodada de triagem de hibridoma, noventa e quatro clones foram adquiridos que ligaram-se fortemente a rhTrkB-EDC-Fc em um ensaio ELISA. Vinte dos mesmos clones reagiram cruzado com rmTrkB-ECD em um ensaio ELISA. A análise FACS confirmou que cinquenta e quatro clones ligaram-se a rhTrkB expressado na superfície de células HEK-293.

A atividade agonista de TrkB de cada clone foi testada usando um ensaio de luciferase e dezessete clones de hibridoma com atividades mais elevadas foram selecionados quanto à outra caracterização. A seguir da estabilização dos mesmos clones, três rodadas de subclonagem com diluição serial, e uma rodada de subclonagem com classificação FACS, os anticorpos monoclonais de cada meio de cultura condicional foram coletados e purificados usando-se ProSep-A (Montage Antibody Purification Kits). Os isótipos de IgG de cada anticorpo foram determinados por kit de teste de Isotipagem de Murino (Tabela 1). As concentrações de anticorpo foram de-

terminadas por quantificação de IgG de Murino ELISA e todos os dezessete clones produziram bons níveis de Ig nos sobrenadantes de cultura.

TABELA 1

mAb	Isótipo de IgG de Murino	Concentração de Ig (µg/ml)
2E8	IgG2b, <i>k</i>	14
4C7	IgG2b, <i>k</i>	8
5D8	IgG2b, <i>k</i>	28
5E11	IgG2b, <i>k</i>	55
6D5	IgG2b, <i>k</i>	26
6E2	IgG2b, <i>k</i>	18
6E6	IgG2b, <i>k</i>	14
7E1	IgG2b, <i>k</i>	26
7F5	IgG2b, <i>k</i>	16
11E1	IgG1, <i>k</i>	20
16E11	IgG2b, <i>k</i>	5
17D11	IgG1, <i>k</i>	22
18C3	IgG1, <i>k</i>	18
19E12	IgG2a, <i>k</i>	10
29D7	IgG1, <i>k</i>	52

Caracterização de anticorpos monoclonais

- 5 Os anticorpos monoclonais específicos de TrkB purificados foram caracterizados por suas atividades de ligação a hTrkB por ELISA. A maioria dos anticorpos ligados a rhTrkB com afinidades de ligação elevadas ($ED_{50} = 10^{-11}$ (M)), exceto para um clone 29D7, para o qual ED_{50} caiu de 10^{-11} (M) a 10^{-10} (M) depois da purificação (dados não mostrados). Dois clones
- 10 12F4 e 18C8 perderam suas atividades de ligação depois da purificação e portanto foram excluídos da lista de prioridade (e assim não foram incluídos na Tabela 1). Usando análises FACS, todos os quinze mAbs que ligam TrkB remanescentes também foram mostrados especificamente ligar-se a hTrkB expressado na superfície de células HEK293. Anticorpos também foram tes-
- 15 tados quando as suas atividades de ligação de espécie cruzada a rmTrkB por ELISA. Embora a maioria dos anticorpos foram descobertos ligar rmTrkB fracamente, clones 17D11, 18C3 e 29D7 foram descobertos ligar rmTrkB com $ED_{50} = 10^{-10-11}$ (M) (Tabela 2).

Um ensaio de competição ELISA foi usado para determinar se os anticorpos bloqueiam a interação de rhTrkB e BDNF. O clone 29D7 não mostrou nenhuma atividade de bloqueio, enquanto os clones 17D11, 18C3 e 19E12 parcialmente bloquearam a interação de rhTrkB-BDNF. Todos os outros clones bloquearam a interação de rhTrkB-BDNF com $IC_{50} = 3-5 \times 10^{-10}$ (M) (Tabela 2).

TABELA 2

mAb	Atividade de ligação		Atividade de bloqueio	
	rhTrkB [ED ₅₀ (nM)]	rmTrkB [ED ₅₀ (nM)]	293-hTrkB [Valor médio]	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	Bloqueio parcial
18C3	0,020	0,300	132,03	Bloqueio parcial
19E12	0,031	W*	194,41	Bloqueio parcial
29D7	0,120	0,013	95,59	Nenhum bloqueio

W*: Ligação fraca

NB**: Nenhuma ligação

O mapeamento dos epítomos de ligação de anticorpo relativos em rhTrkB foi conduzido examinando-se a atividade de cada anticorpo individual em bloquear a ligação de outros anticorpos a rhTrkB. Por exemplo, a observação de que dois anticorpos bloquearam cada ligação diferente com rhTrkB sugere que estes anticorpos podem ligar-se ao mesmo epítopo ou epítomos sobrepostos em rhTrkB (Tabela 3). Na Tabela 3, os anticorpos pré-

ligados são apresentados em cada linha enquanto os anticorpos de competição (isto é, revestimento) são apresentados em cada coluna. Os resultados mostraram que os clones 11E1, 19E12 e 29D7 podem reconhecer epítopos únicos. Os clones 17D11 e 18C3 parecem competir pelo mesmo sítio de ligação. Todos os clones remanescentes competiram entre si e podem compartilhar o mesmo epítipo de ligação.

TABELA 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*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Bloqueio completo. +/-: Bloqueio parcial. -: Nenhum bloqueio. c mAb*: Uma mistura de IgG1, IgG2a e IgG2b de murino.

Atividades de luciferase

Os anticorpos específicos de TrkB purificados foram examinados usando um ensaio de luciferase para demonstrar atividades agonistas. Todos os anticorpos causaram aumentos dependentes de dose no sinal com EC_{50} na faixa de 10^{-10} (M) (Fig. 4). A janela de sinal máximo foi ~ 7 vezes mais basal para a maioria dos anticorpos, que foi comparável à resposta induzida por BDNF a 200 ng/ml (6,2 vezes mais basal).

Atividades funcionais de mAbs

Para testar se os anticorpos que ligam TrkB têm atividades agonistas funcionais mediadas por ativação de receptor de TrkB endógeno, efeitos de promoção de neurito foram avaliados a seguir de tratamentos com estes anticorpos. Com base na ligação específica das espécies característica dos anticorpos, primeiro utilizaram-se células SY5Y de neuroblastoma humano, que mostraram expressar TrkB na diferenciação neuronal. Coerente com relatos anteriores, observou-se que a adição de BDNF promoveu o crescimento de neurito como demonstrado por aumentos no comprimento de neurito e no número de pontos de ramificação (Figs. 5A e 5B). Consideravelmente, a maioria dos anticorpos também aumentem significativamente o crescimento de neurito com eficácias comparáveis ou ainda superiores a BDNF (Figs. 5A e 5B). Exemplos de imagens representativas de alguns grupos de tratamento são mostrados na Fig. 5C.

Sete anticorpos de TrkB com atividades mais altas (6E2, 7F5, 11E1, 16E11, 17D11, 19E12 e 29D7) foram selecionados quanto à análise de resposta de dose total. Eles induziram aumentos dependentes de dose no crescimento de neurito com EC_{50} de cerca de 10^{-10} (M) (Fig. 5D, dados não foram obtidos para 6E2). Estes anticorpos também foram testados quanto a sua capacidade para aumentar a sobrevivência de células SY5Y diferenciadas a seguir do dano de retirada de soro. Os resultados mostraram que BDNF e vários anticorpos protegeram células SY5Y diferenciadas, demonstrando aumentos dependentes de dose em viabilidade de célula (Fig. 6).

Dois anticorpos de TrkB, 17D11, 18C3 e 29D7, que mostraram

ligar-se a rmTrkB, também foram testados em culturas de neurônio de grânulo cerebelar (CGN) de rato quanto à atividade contra o receptor de TrkB de rato endógeno. Tanto no ensaio de crescimento de neurito quanto no ensaio de neuroproteção, apenas 29D7 mostrou atividades comparáveis àsque-

5 las de BDNF, enquanto 17D11 e 18C3 foram inativos (Fig. 7 e dados não mostrados). Pode-se sugerir que 17D11 e 18C3 reconhecem um epítipo em TrkB de murino que contém aminoácidos diferentes em TrkB de rato.

Análise de fosforilação de TrkB

Sete anticorpos de TrkB (6E2, 7F5, 11E1, 16E11, 17D11, 19E12 e 29D7) selecionados com base em todas as atividades descritas acima foram avaliados na análise de Western quanto à indução de autofosforilação de TrkB. Todos os anticorpos levaram à fosforilação de TrkB robusta, e estes efeitos foram antagonizados por tratamento com o inibidor de cinase K252a, indicando que estes anticorpos que ligam TrkB causaram ativação

10 de TrkB (Fig. 8).

Dois anticorpos de TrkB, 17D11, 18C3 e 29D7, que mostraram ligar-se a rmTrkB, também foram testados em culturas de neurônio de grânulo cerebelar (CGN) de rato quanto à atividade contra o receptor de TrkB de rato endógeno. Tanto no ensaio de crescimento de neurito quanto no ensaio de neuroproteção, apenas 29D7 mostrou atividades comparáveis àsque-

20 las de BDNF, enquanto 17D11 e 18C3 foram inativos (Fig. 7 e dados não mostrados). Pode-se sugerir que 17D11 e 18C3 reconhecem um epítipo em TrkB de murino que contém aminoácidos diferentes em TrkB de rato.

Análise de fosforilação de TrkB

Sete anticorpos de TrkB (6E2, 7F5, 11E1, 16E11, 17D11, 19E12 e 29D7) selecionados com base em todas as atividades descritas acima foram avaliados em análise de Western quanto à indução de autofosforilação de TrkB. Todos os anticorpos levaram à fosforilação de TrkB robusta, e estes efeitos foram antagonizados por tratamento com o inibidor de cinase K252a, indicando que estes anticorpos que ligam TrkB causaram a ativação

25 de TrkB (Fig. 8).

30

Depósitos de ATCC

Os hibridomas que produziram os anticorpos de TrkB 17D11 e 29D7 foram depositados com a ATCC em 18 de Agosto de 2005 e foram dadas designações de depósito de patente ATCC PTA-6948 e PTA-6949, respectivamente.

EXEMPLO 2

Este exemplo descreve outra caracterização e teste *in vitro* de uma pluralidade de anticorpos de TrkB. Em particular, este exemplo descreve experimentos que foram realizados para avaliar a especificidade de TrkB vs. TrkA e TrkC de alguns dos anticorpos do Exemplo 1.

Materiais e Métodos

Análise FACS

Células HEK-293 que expressam TrkA humano foram destacadas das placas com PBS contendo 5 mM de EDTA e transferidas em tubos Falcon de 5 ml (Becton Dickinson, Cat. Nº 352063) com 2×10^5 células por tubo. As células foram lavadas uma vez que com PBS centrifugando-se a 800 rpm a 4° C durante 3 min, e incubadas durante 30 min a 4° C com 100 µl de sobrenadante de cultura de hibridoma ou soro imune diluído em PBS com 1% de FBS. As células foram lavadas 3 vezes com 1 ml de PBS contendo 1% de FBS e incubadas durante 30 min a 4° C no escuro com IgG antimurino de cabra rotulado com PE, fragmento F(ab')₂ (DAKO Corporation, Cat. Nº R0480) em PBS contendo 1% de FBS. As células foram lavadas três vezes novamente e recolocadas em suspensão em 250 µl de PBS contendo 1% de FBS. Iodeto de propídio foi usado para a detecção de células mortas, que foram excluídas da análise. A fluorescência de 5000 células/tubo foi contada por um citofluorômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson).

Ensaio de luciferase

Linhagens estáveis de células HEK-293 que expressam TrkA humano (ou TrkC humano) foram preparadas. As células transfectadas foram selecionadas na presença de higromicina durante 2 semanas com diluições limitadas. A seguir da avaliação inicial, um único clone de células foi escolhido para o estudo. Para o ensaio de luciferase, as células foram pla-

queadas a $1,5 \times 10^4$ células/cavidade em meio de crescimento de 100 μ l em placas de 96 cavidades. No dia seguinte, as células foram tratadas com 10 μ l de 10x concentração final de NGF (ou NT-3) ou anticorpos de teste. Atividades de luciferase foram medidas 16 h depois dos tratamentos usando o kit de ensaio Steady-Glo da Promega de acordo com o protocolo do fabricante. Em poucas palavras, o meio foi substituído com 10 μ l de PBS e 100 μ l de reagente Steady-Glo foram adicionados. Depois de vedar as placas com TopSeal, as placas foram agitadas em Agitador de Placa Tituladora em velocidade ~ 5 durante 5 minutos e depois a luminescência foi medida usando um instrumento TopCount NXT v2.13 (Packard).

Resultados

Análise FACS de anticorpos monoclonais

Os meios condicionados puros para cada um dos anticorpos monoclonais específicos de TrkB da Tabela 1 foram caracterizados por suas atividades de ligação a TrkA humano por FACS. Todos os anticorpos testado falharam para ligar-se a TrkA humano. Especificamente, os anticorpos foram testados em concentrações variando de cerca de 5 a cerca de 60 μ g/ml (ver concentrações específicas para cada anticorpo na Tabela 1, estas correspondem a concentrações na faixa de cerca de 30 a cerca de 500 nM) e cada anticorpo falhou para mostrar qualquer ligação detectável. Os dados de FACS são mostrados na Fig. 9A.

Atividades de luciferase

Um subconjunto dos anticorpos específicos de TrkB purificados da Tabela 2 também foram examinados usando um ensaio de luciferase de TrkA ou TrkC para avaliar as atividades agonistas. Nenhum dos anticorpos testados ativou TrkA ou TrkC. Especificamente, os anticorpos foram testados em concentrações de até cerca de 3 μ g/ml (cerca de 20 nM) e em cada caso os anticorpos falharam para causar aumento detectável acima do basal (ver Fig. 9B para TrkA e Fig. 10 para TrkC). Ao contrário, NGF induziu um aumento de ~ 6 vezes mais basal para TrkA a 300 ng/ml (Fig. 9A) e NT-3 induziu um aumento de sinal de ~ 6 vezes mais basal para TrkC a 300 ng/ml (Fig. 10).

EXEMPLO 3

Este exemplo descreve o teste *in vivo* de uma pluralidade de anticorpos de TrkB em um modelo de roedor de hipoxia-isquemia (HI) neonatal.

5 Materiais e Métodos

Animais e procedimentos cirúrgicos

O modelo de roedor de hipoxia-isquemia (HI) neonatal foi fundamentado no procedimento de Levine que é apresentado na Fig. 11 (por exemplo, ver Levine, Am. J. Pathol. 36:1-17, 1960; Rice *et al.*, Ann. Neurol., 9:131-141, 1981 e Gidday *et al.*, Neurosci. Lett. 168:221224, 1994 cada um dos quais é incorporado aqui por referência). Brevemente, filhotes em P7 foram anestesiados com 2,5% de halotano e a artéria carótida comum esquerda foi permanentemente ligada. Depois que as incisões foram suturadas, filhotes foram devolvidos à gaiola para recuperação e alimentação. Duas horas mais tarde, os filhotes foram colocados em recipientes individuais, através dos quais oxigênio a 8% umidificado foi fluído. Depois de 2,5 h de um período hipóxico isquêmico, os filhotes foram devolvidos a suas gaiolas. Para o tratamento, os animais receberam uma injeção intracerebroventricular de 5 µl de 0,1 ou 0,3 nmol de BDNF, anticorpo monoclonal anti-TrkB 29D7, controle IgG1 ou veículo exatamente antes do prejuízo hipóxico.

Avaliação da perda de tecido cerebral

Em P14, seções do cérebro foram preparadas de alguns dos camundongos para determinar o dano causado pela lesão HI. As seções coronais do estriado, córtex e hipocampo foram manchadas com violeta de cresila e a perda de área percentual no hemisfério lesionado foi comparada com a área intacta. A Fig. 23 compara as manchas que foram obtidas do estriado e hipocampo para tratamentos diferentes. As Figs. 24A e 24B comparam a perda de tecido cerebral total e perda de tecido sub-regional, respectivamente, para tratamentos diferentes. Os dados são mostrados como média e erro padrão da média (S.E.M.). BDNF e anticorpo monoclonal anti-TrkB 29D7 mostrou proteção dependente de dose significativa do cérebro do dano HI. A proteção não foi localizada a qualquer sub-região específica do

cérebro mas a proteção máxima foi geralmente observada no córtex.

Análise bioquímica

24 horas depois da lesão HI, seções do cérebro foram preparadas a partir de um subconjunto dos camundongos para a análise bioquímica.

- 5 Tecidos cerebrais hipocampais e corticais foram dissecados, lisados e submetidos a vários ensaios bioquímicos.

Um ensaio de clivagem de DEVD-AMC foi usado para determinar atividades de caspase-3 (por exemplo, ver Nagase *et al.*, Immunol Lett. 84:23, 2002 incorporado aqui por referência). Os resultados para as regiões diferentes do cérebro são mostrados na Fig. 25 para camundongos que foram fornecidos com 0,1 nmol de reagentes de teste diferentes (média $\pm$ S.E.M.). BDNF e anticorpo monoclonal anti-TrkB 29D7 bloquearam a ativação de caspase-3 causada por lesão HI.

Amostras de proteína (30 μ g/linha) de camundongos tratados com 0,3 nmol de reagentes de teste diferentes foram separadas por SDS-PAGE e submetidas ao imunoblotting com anticorpos contra certos substratos de caspase-3 (PARP e α -espectrina). Anticorpos contra β -actina foram usados como controles para verificar a carga igual de proteínas. Os resultados mostrados na Fig. 26 demonstram inibição da clivagem dos mesmos substratos de caspase-3 por BDNF e anticorpo monoclonal anti-TrkB 29D7 (lados C = contra e I = ipsi de ligação da carótida).

Experimentos de seguimento

Os seguintes são experimentos de seguimento proféticos que podem ser realizados nos camundongos do mesmo estudo. O desempenho dos camundongos remanescentes em testes de aprendizagem e memória espaciais pode ser avaliado (por exemplo, sem limitação os testes descritos em Almli *et al.*, Exp. Neurology 166:99-114, 2000 incorporado aqui por referência). Por exemplo, os camundongos podem ser testados entre P20-P30. Opcionalmente, o desempenho pode ser avaliado durante vários dias durante este período ou mesmo em pontos no tempo mais tardios.

Protocolos de tratamento que produzem um efeito positivo (como medido por uma redução na perda de tecido cerebral, uma melhora na

- aprendizagem e memória espaciais ou diferente) podem ser repetidos em uma faixa ainda maior de dosagens. Alternativa ou adicionalmente, protocolos de tratamento podem ser repetidos com modos diferentes de administração (por exemplo, administração intraperitoneal, administração intravenosa, etc.); com pontos de partida diferentes (por exemplo, antes da ligação, imediatamente depois da hipoxia, com um retardo variável depois de hipoxia, etc.); e/ou com duração ou frequência diferentes (por exemplo, tratamento diário durante 2 semanas pós lesão, etc.).

EXEMPLO 4

- Este exemplo descreve a preparação e teste de anticorpos Fv de cadeia única humanos (scFv) contra TrkB humano. Bibliotecas de exibição de fago de anticorpo humano (CS, BMV e DP-47; Cambridge Antibody Technology) contendo fragmentos Fv de cadeia única foram selecionados quanto à ligação de TrkB usando os métodos seguintes.

15 Materiais e Métodos

Seleção de anticorpos por movimentação

- 10 10 µg de hTrkB-EDC-Fc foram revestidos em placa Nunc Maxi-sorp em 100 ml e deixados durante a noite a 4° C. Uma biblioteca de fago foi pré-bloqueada (alíquota de 50 fagos adicionada a 50 µl de 6% de leite desnatado em 2 x PBS) e negativamente selecionada contra PSGL-Fc (Wyeth, Lot. Nº 00H25M004) durante 1 h na temperatura ambiente para suprimir fago reativo contra Fc. O fago excluído foi transferido à placa revestida com proteína alvo (hTrkB-EDC-Fc) e incubado na temperatura ambiente durante 2 h. Cavernas foram lavados 10 vezes com PBS/0,1% de Tween 20 e 5 vezes com PBS. O fago ligado foi eluído com 50 µl/caverna de TEA 100 mM recentemente fabricado (140 µl de TEA em 10 ml de água ultra pura). O fago eluído foi neutralizado usando 25 µl de Tris-HCl 1 M estéril pH 7,5. O fago foi infectado em 10 ml de um semi-log (O.D a 600 nm = 0,5) de células TG1 de *E. coli*. As células transformadas foram difundidas em uma placa de Bioensaio em ágar 2xTYAG e incubadas durante a noite a 30° C.

Seleção de fase solúvel (Seleção de biotina)

Anticorpos de fago foram selecionados usando hTrkB-EDC-Fc biotinilado de acordo com o protocolo descrito acima com as exceções seguintes. O fago pré-bloqueado foi excluído primeiro contra 100 nM de PSGL-Fc biotinilado seguido por seleção positiva em 100 nM de hTrkB-EDC-Fc biotinilado. Fago específico de TrkB humano foi capturado usando pérolas de estreptavidina magnéticas pré-bloqueadas (Dynabeads M-280 streptavidin, Cat. Nº 112.06). As pérolas foram lavadas 10 vezes com PBS/0,1% de Tween 20 e 3 vezes com PBS. O fago ligado foi eluído com 200 µl de TEA 100 mM recentemente fabricado (140 µl de TEA em 10 ml de água ultra pura) e neutralizado usando 100 µl de Tris-HCl 1 M estéril pH 7,5 ao fago eluído para neutralizar o TEA. O fago foi infectado em *E. coli* e propagado como descrito na etapa anterior.

Resgate de fago

E. coli infectada com fago foram fragmentadas nas placas em ágar de Bioensaio e misturada com 10 ml de 2xTYAG por placa de Bioensaio (2xTY com 100 µg/ml Amp e 2% de glicose). 20 ml de 2xTYAG foram inoculados com 100 ml de suspensão celular e cultivados a 37° C (300 rpm) a OD em 600 nm = 0,3 a 0,5. *E. coli* foram superinfectadas com 3,3 de fago auxiliar MK13KO7 e incubadas a 37° C (150 rpm) durante 1 h. As células superinfectadas foram re-colocadas em suspensão em 20 ml de meio 2xTYAK (2xTY/100 µg/ml de Amp/50 µg/ml de Canamicina) e cultivadas durante a noite a 25° C a 280 rpm. *E. coli* foram giradas a 3500 rpm durante 15 min e o sobrenadante contendo o fago foi usado para a rodada seguinte de seleção.

Preparação de anticorpo de fago para ELISA

Colônias únicas de *E. coli* infectadas foram escolhidas em cavidades de microtítulo (Costat Cellwells) contendo 150 µl de meio 2xTYAG media (2% de glicose) por cavidade. Os clones foram deixados crescer a 37° C (100 a 120 rpm) durante 5 a 6 h (OD a 600 nm = 0,5). Estoque de fago auxiliar M13K07 (10^{13} pfu/ml) foi diluído 1:1000 com meio 2xTYAG e 20 µl foram adicionado a cada cavidade. Os cavidades foram incubados a 37° C

(100 rpm) durante 1 h. As placas foram centrifugadas a 3200 rpm durante 10 min, o sobrenadante foi removido e as células foram recolocadas em suspensão em 150 µl de meio 2xTYAK. Culturas foram cultivadas durante a noite a 25° C (120 rpm). No dia seguinte, as placas foram centrifugadas a 3200 rpm durante 15 min e o sobrenadante foi transferido para uma placa nova para o ensaio ELISA de fago.

ELISA de fago

Placas de ELISA foram revestidas com 50 µl por cavidade de 1 µg/ml de hTrkB-EDC-Fc (BSA como um controle) em PBS a 4° C durante a noite. Cavidades foram enxaguadas 3 vezes com PBS e bloqueados com 300 µl por cavidade de PBS/3% de leite desnatado na temperatura ambiente durante 1 h. O fago foi bloqueado com volume igual de PBS/6% de leite desnatado e incubado na temperatura ambiente durante 1 h. 50 µl de fago bloqueado foram adicionados aos cavidades de ELISA e incubados na temperatura ambiente durante 1 h. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS/0,1% de Tween seguido por 3 vezes com PBS. 50 µl de anticorpo anti-M13 de HRP-Camundongo em PBS/3% de leite desnatado (1:5000, Amersham Pharmacia biotech, Cat. Nº 27-942101) foram adicionados a cada cavidade e incubados na temperatura ambiente durante 1 h. As placas foram lavadas como antes e 50 µl de substrato TMB foram adicionados a cada cavidade e desenvolvidos durante 2 a 5 min. A reação foi parada adicionando-se 50 µl de ácido sulfúrico 0,5 M e a absorbância foi lida a 450 nm.

Preparação de Fv de cadeia única para FACS

Colônias únicas foram escolhidas e cultivadas em placas de microtitulação de cavidade profundo contendo 0,9 ml de meio 2xTYAG a 37° C durante 5 a 6 h. A expressão de scFv foi induzida adicionando-se IPTG a uma concentração final de 0,02 mM em meio 2xTY e crescimento a 30° C durante a noite. *E. coli* foram colhidas depois do crescimento durante a noite e osmoticamente chocadas com 150 µl de tampão de TES diluído 1:5 em água e incubadas em gelo durante 30 min. As células foram centrifugadas e o sobrenadante transferido a uma placa nova para o ensaio FACS. 293 células estavelmente transfectadas com TrkB foram manchadas com scFv pre-

parado como descrito. As células foram incubadas em gelo durante 30 min e depois lavadas com tampão de PBS. Fv de cadeia única foi detectado usando uma solução contendo anticorpo anti-myc 9E10 diluído 1:1000 seguido por adição de anticorpo de IgG-Fc anticamundongo conjugado a PE diluído 1:500. As células manchadas foram analisadas em um Citômetro de Fluxo da Bectin-Dickinson.

Resultados

ELISA de fago

A Tabela 4 mostra os resultados de ensaios ELISA de fago das seleções de biblioteca de fago diferentes (seleções de movimentação e solúveis). A Fig. 18 mostra os dados de ELISA de ligação de fago de um conjunto representativo de clones positivos de TrkB (seleção de mistura da biblioteca de BMV). A maioria de clones selecionados de TrkB mostrou reatividade forte e específica contra TrkB-EDC-Fc e não para a proteína de controle PSGL-Fc.

TABELA 4

Antígeno (seleção)	Biblioteca	ELISA de fago (% de positivos)	Sequência (% de diversidade)
TrkB-EDC-Fc (movimentação)	CS	78	53
	BMV	58	23
	DP-47	45	39
TrkB-EDC-Fc Bio- tinilado (solúvel)	CS	3	100
	BMV	6	50
	DP-47	10	50

Depois de duas rodadas de seleção de movimentação, 78% de clones aleatoriamente escolhidos da biblioteca de CS foram positivos para a ligação de TrkB-EDC-Fc, mas não para a ligação de PSGL-Fc. Do mesmo modo, 3% de clones foram positivos depois de duas rodadas das seleções solúveis. Os números para as bibliotecas BMV e DP-47 foram 58% e 45% de clones positivos de seleção de movimentação e 6% e 10% de seleção solúvel. Usando seqüenciamento de DNA, confirmou-se que 53% dos clones de movimentação CS foram únicos ao passo que 100% dos clones de seleção solúvel CS foram únicos. Os números para as bibliotecas BMV e DP-47 fo-

ram 23% e 39% únicos de seleções de movimentação e 50% e 50% únicos de seleções solúveis.

Análise FACS

5 A Fig. 19 mostra a especificidade de ligação de anticorpos de scFv selecionados de TrkB testados usando o ensaio FACS. Os dados mostram que os anticorpos de scFv selecionados de TrkB reagem com TrkB associado à membrana em uma maneira específica (histogramas azuis cheios) sem nenhuma reatividade cruzada para controlar células (histogramas verdes abertos).

10 EXEMPLO 5

Este exemplo compara as atividades de ligação do anticorpo de TrkB 29D7 e um fragmento Fab 29D7 contra TrkB humano e de camundongo. TrkB de camundongo (rhTrkB-EDC-Fc) e humano (rmTrkB-EDC) foram revestidos em placas de ELISA como descrito acima no Exemplo 1.

15 As Figuras 20A e 20B mostram os resultados de ligação de ELISA para TrkB humano e de camundongo, respectivamente. Tanto o anticorpo de IgG 29D7 quanto seu fragmento Fab têm atividades de ligação dependente de dose para TrkB humano e de camundongo. Entretanto, o valor de ED_{50} do Fab foi cerca de 100 vezes mais baixo do que aquele de 29D7 intacto. Nenhum IgG1 de controle de isótipo nem seu fragmento Fab ligaram-se a TrkB.

20 EXEMPLO 6

Este exemplo compara as atividades agonísticas do anticorpo de TrkB 29D7 e do fragmento Fab do Exemplo 5 contra TrkB humano. Atividades agonísticas foram examinadas usando um ensaio de luciferase e células HEK-293 que expressam rhTrkB de superfície como descrito no Exemplo 1.

25 As células HEK-293 foram tratadas com IgG de 29D7 ou Fab de 29D7 em concentrações indicadas e atividades de luciferase de acúmulo foram medidas 16 horas pós-tratamento. Como mostrado na Fig. 21, tanto
30 IgG total quanto Fab de 29D7 induziram atividades de luciferase dependentes de dose, indicando a ativação de TrkB. Entretanto, o valor de EC_{50} de Fab de 29D7 foi cerca de 27 vezes mais alto do que aquele de IgG de 29D7

(0,083 nM e 2,28 nM para IgG de 27D7 e Fab de 29D7, respectivamente). Nenhum IgG1 de controle de isótipo nem seu fragmento Fab tiveram efeitos na ativação de TrkB.

EXEMPLO 7

5 Este exemplo descreve a análise de mapeamento de epítopo de certos anticorpos inventivos de TrkB monoclonais. O mapeamento foi realizado contra peptídeos lineares, de alça única e de alça dupla que foram deduzidos de seqüências dentro do domínio extracelular de TrkB humano.

10 Como mostrado na Fig. 22, o anticorpo monoclonal 17D11 reconhece a alça-3 do segmento de IgG-2 de TrkB humano (KNEYGKD, SEQ ID NO: 7, aminoácidos 364 a 370 da SEQ ID NO: 1); e alça-1 do segmento de IgG-2 de TrkB humano (KGNPKP, SEQ ID NO: 8, aminoácidos 308 a 313 da SEQ ID NO: 1). A seqüência de camundongo para o primeiro epítopo (KNEYGKD, SEQ ID NO: 7, aminoácidos 364 a 370 da SEQ ID NO: 2) é idêntica à seqüência humana. A seqüência de camundongo para o último epítopo (RGNPKP, SEQ ID NO: 9, aminoácidos 308 a 313 da SEQ ID NO: 2) difere em um aminoácido.

20 Como mostrado na Fig. 22, os anticorpos monoclonais 29D7, 7F5, 11E1 e 19E12 todos reconhecem a alça-3 do segmento de IgG-1 de TrkB humano (ENLVGED, SEQ ID NO: 10, aminoácidos 269 a 275 da SEQ ID NO: 1); e também podem reconhecer a alça-1 do segmento de IgG-1 de TrkB humano (AGDPVP, SEQ ID NO: 11, aminoácidos 221 a 226 da SEQ ID NO: 1). A seqüência de camundongo para o primeiro epítopo (ENLVGED, SEQ ID NO: 10, aminoácidos 269 a 275 da SEQ ID NO: 2) é idêntica à seqüência humana. A seqüência de camundongo para o último epítopo (GGDPLP, SEQ ID NO: 12, aminoácidos 221 a 226 da SEQ ID NO: 2) difere em dois aminoácidos.

EXEMPLO 8

30 Este exemplo descreve experimentos de ativação de TrkB *in vivo* que foram realizados com o anticorpo anti-TrkB 29D7. Brevemente, filhotes em P7 receberam uma injeção intracerebroventricular de 5 µl de 0,3 nmol de anticorpo monoclonal anti-TrkB 29D7 ou veículo. Tecidos cerebrais

depois foram dissecados 1, 2, 6, 12 e 24 horas depois da injeção. Tecidos foram lisados e quantidades iguais de amostras de proteína (30 µg/linha) foram separadas por SDS-PAGE e submetidas ao imunoblotting com anticorpos específicos para proteínas que são fosforiladas como um resultado da ativação de TrkB (fosfo-ERK1/2 e fosfo-AKT). Anticorpos contra β-actina foram usados como controles para verificar a carga igual de proteínas. Os resultados da Fig. 27 mostram que o anticorpo monoclonal anti-TrkB 29D7 induziu a fosforilação dependente do tempo de ERK1/2 e AKT (dados de amostras hipocâmpais e corticais são mostrados e são representativos dos resultados obtidos de quatro amostras diferentes).

A Fig. 28 é uma quantificação densitométrica da fosforilação de ERK mostrada na Fig. 27. A Fig. 29 é uma quantificação densitométrica da fosforilação de AKT mostrada na Fig. 27. A Fig. 30 mostra tecidos cerebrais tratados com veículo e 29D7 que foram fixados e imunofluorescentemente rotulados com um anticorpo para o marcador específico de neurônio NeuN (esquerdo) e um anticorpo anti-fosfo-ERK1/2 (central). As figuras do lado direito mostram estes dois unidos. A fosforilação de ERK1/2 é significativamente mais forte nas amostras tratadas com 29D7. A Fig. 31 mostra o curso de tempo de ativação de ERK1/2 nos tecidos corticais e hipocâmpais a seguir da injeção intracerebroventricular de anticorpo monoclonal anti-TrkB 29D7.

EXEMPLO 9

Este exemplo descreve um ensaio de inibição de neurito induzido por MAG/mielina que foi realizado com o anticorpo anti-TrkB 29D7. Brevemente, alíquotas de 50 µl de MAG(1-5) de rato recombinante ou mielina de rato purificada foram adicionadas a placas de cultura de tecido de fundo plano de 96 cavidades e secas ao ar durante a noite na temperatura ambiente. As quantidades totais de MAG(1-5) ou mielina foram de 0,25 a 0,5 µg por cavidade, a menos que indicado de outro modo. No dia seguinte, as placas revestidas com MAG ou mielina foram tratadas com 50 µl de poli-D-lisina (17 µg/ml) durante 1,5 hora, seguido por incubação com um meio contendo 10% de FBS durante 1 hora a 37° C. Depois da aspiração do meio, células CGN

de rato foram plaqueadas em uma densidade de 8.000 células/cavidade em meio de crescimento Neurobasal suplementado com B27 contendo 200 mM de L-Glutamina, 2 M de KCl, e 100 U/ml de penicilina e estreptomicina. Quando indicado, reagentes de tratamento foram adicionados no tempo do plaqueamento celular. Neurônios foram cultivados em uma incubadora a 37° C equilibrada com 5% de CO₂. Aproximadamente 20 horas pós plaqueamento, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído e prosseguiram o blotting com Tuj1. As células foram permeabilizadas com 0,2% de Triton X/PBS (TPBS) durante 5 minutos na temperatura ambiente seguido por incubação com 1,5% de soro de cabra normal em TPBS (S-TPBS) durante 30 minutos para bloquear a ligação não específica. Uma alíquota de anti- anti-corpo monoclonal b-Tubulina Classe III Neuronal (Tuj1, 1:1000; Covance # MMS-435P) foi adicionada às células. Depois de 1 horas de incubação na temperatura ambiente, anticorpos não ligados foram lavados com PBS três vezes e uma alíquota de anticorpo anticabra de IgG de camundongo Alexa Fluor 488 (1:500, Molecular Probe # A-11001) foi adicionada para visualizar os sinais. Hoechst 33342 (Molecular Probe # H-3570, 2 µg/ml) foi incluído para rotular o núcleo. Depois da lavagem, as placas foram seladas e analisadas quanto ao crescimento de neurito usando uma varredura de arranjo Cellomics. Tipicamente em torno de 300 células de 9 campos foram analisadas por cavidade e cada tratamento foi conduzido em grupos de quatro.

MAG e mielina inibem o crescimento de neurito de neurônios de grânulo cerebelar primários em culturas. Concentrações crescentes de MAG(1-5) de rato recombinante ou mielina de rato purificada foram revestidas em placas de cultura de tecido de 96 cavidades e a extensão de neurito de neurônios primários foi medida a 20 horas como descrito acima. Como mostrado na Figura 32, (A) MAG e (B) mielina resultaram na inibição dependente de dose de crescimento de neurito.

Neurônios CGN depois foram plaqueados em placas revestidas com MAG ou mielina com controle ou com uma faixa de concentrações do anticorpo de TrkB 29D7. A extensão de neurito foi medida 20 horas pós tratamento. Como mostrado na Figura 33, 29D7 levou à reversão de inibição de

neurito mediada por (A) MAG e (B) mielina.

OUTRAS MODALIDADES

- Outras modalidades da invenção estarão evidentes àqueles habilitados na técnica a partir de uma consideração do relatório descritivo ou prática da invenção divulgados aqui. É intencionado que o relatório descritivo e exemplos sejam considerados como exemplares apenas, com o escopo verdadeiro da invenção sendo indicado pelas reivindicações seguintes.
- 5

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> wyeth

<120> Anticorpos monoclonais anti-TRKB e usos dos mesmos

<130> 2004658-0338

<140> PCT/US2006/021878

<141> 2005-05-06

<150> 60/687,705

<151> 2005-06-06

<160> 11

<170> PatentIn versão 3.2

<210> 1

<211> 838

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humano - (homo sapiens) TrkB

<400> 1

Met Ser Ser Trp Ile Arg Trp His Gly Pro Ala Met Ala Arg Leu Trp
 1 5 10 15

Gly Phe Cys Trp Leu Val Val Gly Phe Trp Arg Ala Ala Phe Ala Cys
 20 25 30

Pro Thr Ser Cys Lys Cys Ser Ala Ser Arg Ile Trp Cys Ser Asp Pro
 35 40 45

Ser Pro Gly Ile Val Ala Phe Pro Arg Leu Glu Pro Asn Ser Val Asp
 50 55 60

Pro Glu Asn Ile Thr Glu Ile Phe Ile Ala Asn Gln Lys Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Ile Ile Asn Glu Asp Asp Val Glu Ala Tyr Val Gly Leu Arg Asn Leu
 85 90 95

Thr Ile Val Asp Ser Gly Leu Lys Phe Val Ala His Lys Ala Phe Leu
 100 105 110

Lys Asn Ser Asn Leu Gln His Ile Asn Phe Thr Arg Asn Lys Leu Thr
 115 120 125

Ser Leu Ser Arg Lys His Phe Arg His Leu Asp Leu Ser Glu Leu Ile
 130 135 140

Leu Val Gly Asn Pro Phe Thr Cys Ser Cys Asp Ile Met Trp Ile Lys
 145 150 155 160

Thr Leu Gln Glu Ala Lys Ser Ser Pro Asp Thr Gln Asp Leu Tyr Cys
 165 170 175

Leu Asn Glu Ser Ser Lys Asn Ile Pro Leu Ala Asn Leu Gln Ile Pro
 180 185 190

Asn Cys Gly Leu Pro Ser Ala Asn Leu Ala Ala Pro Asn Leu Thr Val
 195 200 205

Glu Glu Gly Lys Ser Ile Thr Leu Ser Cys Ser Val Ala Gly Asp Pro
 210 215 220

Val Pro Asn Met Tyr Trp Asp Val Gly Asn Leu Val Ser Lys His Met
 225 230 235 240

Asn Glu Thr Ser His Thr Gln Gly Ser Leu Arg Ile Thr Asn Ile Ser
 245 250 255

Ser Asp Asp Ser Gly Lys Gln Ile Ser Cys Val Ala Glu Asn Leu Val
 260 265 270

Gly Glu Asp Gln Asp Ser Val Asn Leu Thr Val His Phe Ala Pro Thr
 275 280 285

Ile Thr Phe Leu Glu Ser Pro Thr Ser Asp His His Trp Cys Ile Pro
 290 295 300

Phe Thr Val Lys Gly Asn Pro Lys Pro Ala Leu Gln Trp Phe Tyr Asn
 305 310 315 320

Gly Ala Ile Leu Asn Glu Ser Lys Tyr Ile Cys Thr Lys Ile His Val
 325 330 335

Thr Asn His Thr Glu Tyr His Gly Cys Leu Gln Leu Asp Asn Pro Thr
 340 345 350

His Met Asn Asn Gly Asp Tyr Thr Leu Ile Ala Lys Asn Glu Tyr Gly
 355 360 365

Lys Asp Glu Lys Gln Ile Ser Ala His Phe Met Gly Trp Pro Gly Ile
 370 375 380

Asp Asp Gly Ala Asn Pro Asn Tyr Pro Asp Val Ile Tyr Glu Asp Tyr
 385 390 395 400

Gly Thr Ala Ala Asn Asp Ile Gly Asp Thr Thr Asn Arg Ser Asn Glu
 405 410 415
 Ile Pro Ser Thr Asp Val Thr Asp Lys Thr Gly Arg Glu His Leu Ser
 420 425 430
 Val Tyr Ala Val Val Val Ile Ala Ser Val Val Gly Phe Cys Leu Leu
 435 440 445
 Val Met Leu Phe Leu Leu Lys Leu Ala Arg His Ser Lys Phe Gly Met
 450 455 460
 Lys Asp Phe Ser Trp Phe Gly Phe Gly Lys Val Lys Ser Arg Gln Gly
 465 470 475 480
 Val Gly Pro Ala Ser Val Ile Ser Asn Asp Asp Asp Ser Ala Ser Pro
 485 490 495
 Leu His His Ile Ser Asn Gly Ser Asn Thr Pro Ser Ser Ser Glu Gly
 500 505 510
 Gly Pro Asp Ala Val Ile Ile Gly Met Thr Lys Ile Pro Val Ile Glu
 515 520 525
 Asn Pro Gln Tyr Phe Gly Ile Thr Asn Ser Gln Leu Lys Pro Asp Thr
 530 535 540
 Phe Val Gln His Ile Lys Arg His Asn Ile Val Leu Lys Arg Glu Leu
 545 550 555 560
 Gly Glu Gly Ala Phe Gly Lys Val Phe Leu Ala Glu Cys Tyr Asn Leu
 565 570 575
 Cys Pro Glu Gln Asp Lys Ile Leu Val Ala Val Lys Thr Leu Lys Asp
 580 585 590
 Ala Ser Asp Asn Ala Arg Lys Asp Phe His Arg Glu Ala Glu Leu Leu
 595 600 605
 Thr Asn Leu Gln His Glu His Ile Val Lys Phe Tyr Gly Val Cys Val
 610 615 620
 Glu Gly Asp Pro Leu Ile Met Val Phe Glu Tyr Met Lys His Gly Asp
 625 630 635 640
 Leu Asn Lys Phe Leu Arg Ala His Gly Pro Asp Ala Val Leu Met Ala

645

650

655

Glu Gly Asn Pro Pro Thr Glu Leu Thr Gln Ser Gln Met Leu His Ile
660 665 670

Ala Gln Gln Ile Ala Ala Gly Met Val Tyr Leu Ala Ser Gln His Phe
675 680 685

Val His Arg Asp Leu Ala Thr Arg Asn Cys Leu Val Gly Glu Asn Leu
690 695 700

Leu Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Ser Arg Asp Val Tyr Ser Thr
705 710 715 720

Asp Tyr Tyr Arg Val Gly Gly His Thr Met Leu Pro Ile Arg Trp Met
725 730 735

Pro Pro Glu Ser Ile Met Tyr Arg Lys Phe Thr Thr Glu Ser Asp Val
740 745 750

Trp Ser Leu Gly Val Val Leu Trp Glu Ile Phe Thr Tyr Gly Lys Gln
755 760 765

Pro Trp Tyr Gln Leu Ser Asn Asn Glu Val Ile Glu Cys Ile Thr Gln
770 775 780

Gly Arg Val Leu Gln Arg Pro Arg Thr Cys Pro Gln Glu Val Tyr Glu
785 790 795 800

Leu Met Leu Gly Cys Trp Gln Arg Glu Pro His Met Arg Lys Asn Ile
805 810 815

Lys Gly Ile His Thr Leu Leu Gln Asn Leu Ala Lys Ala Ser Pro Val
820 825 830

Tyr Leu Asp Ile Leu Gly
835

<210> 2
<211> 821
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> TrkB murino (Mus musculus)

<400> 2

Met Ser Pro Trp Leu Lys Trp His Gly Pro Ala Met Ala Arg Leu Trp
1 5 10 15

Gly Leu Cys Leu Leu Val Leu Gly Phe Trp Arg Ala Ser Leu Ala Cys
 20 25 30
 Pro Thr Ser Cys Lys Cys Ser Ser Ala Arg Ile Trp Cys Thr Glu Pro
 35 40 45
 Ser Pro Gly Ile Val Ala Phe Pro Arg Leu Glu Pro Asn Ser Val Asp
 50 55 60
 Pro Glu Asn Ile Thr Glu Ile Leu Ile Ala Asn Gln Lys Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Ile Ile Asn Glu Asp Asp Val Glu Ala Tyr Val Gly Leu Arg Asn Leu
 85 90 95
 Thr Ile Val Asp Ser Gly Leu Lys Phe Val Ala Tyr Lys Ala Phe Leu
 100 105 110
 Lys Asn Ser Asn Leu Arg His Ile Asn Phe Thr Arg Asn Lys Leu Thr
 115 120 125
 Ser Leu Ser Arg Arg His Phe Arg His Leu Asp Leu Ser Asp Leu Ile
 130 135 140
 Leu Thr Gly Asn Pro Phe Thr Cys Ser Cys Asp Ile Met Trp Leu Lys
 145 150 155 160
 Thr Leu Gln Glu Thr Lys Ser Ser Pro Asp Thr Gln Asp Leu Tyr Cys
 165 170 175
 Leu Asn Glu Ser Ser Lys Asn Met Pro Leu Ala Asn Leu Gln Ile Pro
 180 185 190
 Asn Cys Gly Leu Pro Ser Ala Arg Leu Ala Ala Pro Asn Leu Thr Val
 195 200 205
 Glu Glu Gly Lys Ser Val Thr Leu Ser Cys Ser Val Gly Gly Asp Pro
 210 215 220
 Leu Pro Thr Leu Tyr Trp Asp Val Gly Asn Leu Val Ser Lys His Met
 225 230 235 240
 Asn Glu Thr Ser His Thr Gln Gly Ser Leu Arg Ile Thr Asn Ile Ser
 245 250 255
 Ser Asp Asp Ser Gly Lys Gln Ile Ser Cys Val Ala Glu Asn Leu Val

260 265 270
 Gly Glu Asp Gln Asp Ser Val Asn Leu Thr Val His Phe Ala Pro Thr
 275 280 285
 Ile Thr Phe Leu Glu Ser Pro Thr Ser Asp His His Trp Cys Ile Pro
 290 295 300
 Phe Thr Val Arg Gly Asn Pro Lys Pro Ala Leu Gln Trp Phe Tyr Asn
 305 310 315 320
 Gly Ala Ile Leu Asn Glu Ser Lys Tyr Ile Cys Thr Lys Ile His Val
 325 330 335
 Thr Asn His Thr Glu Tyr His Gly Cys Leu Gln Leu Asp Asn Pro Thr
 340 345 350
 His Met Asn Asn Gly Asp Tyr Thr Leu Met Ala Lys Asn Glu Tyr Gly
 355 360 365
 Lys Asp Glu Arg Gln Ile Ser Ala His Phe Met Gly Arg Pro Gly Val
 370 375 380
 Asp Tyr Glu Thr Asn Pro Asn Tyr Pro Glu Val Leu Tyr Glu Asp Trp
 385 390 395 400
 Thr Thr Pro Thr Asp Ile Gly Asp Thr Thr Asn Lys Ser Asn Glu Ile
 405 410 415
 Pro Ser Thr Asp Val Ala Asp Gln Ser Asn Arg Glu His Leu Ser Val
 420 425 430
 Tyr Ala Val Val Val Ile Ala Ser Val Val Gly Phe Cys Leu Leu Val
 435 440 445
 Met Leu Leu Leu Leu Lys Leu Ala Arg His Ser Lys Phe Gly Met Lys
 450 455 460
 Gly Pro Ala Ser Val Ile Ser Asn Asp Asp Asp Ser Ala Ser Pro Leu
 465 470 475 480
 His His Ile Ser Asn Gly Ser Asn Thr Pro Ser Ser Ser Glu Gly Gly
 485 490 495
 Pro Asp Ala Val Ile Ile Gly Met Thr Lys Ile Pro Val Ile Glu Asn
 500 505 510

Pro Gln Tyr Phe Gly Ile Thr Asn Ser Gln Leu Lys Pro Asp Thr Phe
515 520 525

Val Gln His Ile Lys Arg His Asn Ile Val Leu Lys Arg Glu Leu Gly
530 535 540

Glu Gly Ala Phe Gly Lys Val Phe Leu Ala Glu Cys Tyr Asn Leu Cys
545 550 555 560

Pro Glu Gln Asp Lys Ile Leu Val Ala Val Lys Thr Leu Lys Asp Ala
565 570 575

Ser Asp Asn Ala Arg Lys Asp Phe His Arg Glu Ala Glu Leu Leu Thr
580 585 590

Asn Leu Gln His Glu His Ile Val Lys Phe Tyr Gly Val Cys Val Glu
595 600 605

Gly Asp Pro Leu Ile Met Val Phe Glu Tyr Met Lys His Gly Asp Leu
610 615 620

Asn Lys Phe Leu Arg Ala His Gly Pro Asp Ala Val Leu Met Ala Glu
625 630 635 640

Gly Asn Pro Pro Thr Glu Leu Thr Gln Ser Gln Met Leu His Ile Ala
645 650 655

Gln Gln Ile Ala Ala Gly Met Val Tyr Leu Ala Ser Gln His Phe Val
660 665 670

His Arg Asp Leu Ala Thr Arg Asn Cys Leu Val Gly Glu Asn Leu Leu
675 680 685

Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Ser Arg Asp Val Tyr Ser Thr Asp
690 695 700

Tyr Tyr Arg Val Gly Gly His Thr Met Leu Pro Ile Arg Trp Met Pro
705 710 715 720

Pro Glu Ser Ile Met Tyr Arg Lys Phe Thr Thr Glu Ser Asp Val Trp
725 730 735

Ser Leu Gly Val Val Leu Trp Glu Ile Phe Thr Tyr Gly Lys Gln Pro
740 745 750

Trp Tyr Gln Leu Ser Asn Asn Glu Val Ile Glu Cys Ile Thr Gln Gly
755 760 765

Arg Val Leu Gln Arg Pro Arg Thr Cys Pro Gln Glu Val Tyr Glu Leu
 770 775 780

Met Leu Gly Cys Trp Gln Arg Glu Pro His Thr Arg Lys Asn Ile Lys
 785 790 795 800

Ser Ile His Thr Leu Leu Gln Asn Leu Ala Lys Ala Ser Pro Val Tyr
 805 810 815

Leu Asp Ile Leu Gly
 820

<210> 3
 <211> 821
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> TrkB de rato - (Rattus norvegicus)

<400> 3

Met Ser Pro Trp Pro Arg Trp His Gly Pro Ala Met Ala Arg Leu Trp
 1 5 10 15

Gly Leu Cys Leu Leu Val Leu Gly Phe Trp Arg Ala Ser Leu Ala Cys
 20 25 30

Pro Met Ser Cys Lys Cys Ser Thr Thr Arg Ile Trp Cys Thr Glu Pro
 35 40 45

Ser Pro Gly Ile Val Ala Phe Pro Arg Leu Glu Pro Asn Ser Ile Asp
 50 55 60

Pro Glu Asn Ile Thr Glu Ile Leu Ile Ala Asn Gln Lys Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Ile Ile Asn Glu Asp Asp Val Glu Ala Tyr Val Gly Leu Lys Asn Leu
 85 90 95

Thr Ile Val Asp Ser Gly Leu Lys Phe Val Ala Tyr Lys Ala Phe Leu
 100 105 110

Lys Asn Gly Asn Leu Arg His Ile Asn Phe Thr Arg Asn Lys Leu Thr
 115 120 125

Ser Leu Ser Arg Arg His Phe Arg His Leu Asp Leu Ser Asp Leu Ile
 130 135 140

Leu Thr Gly Asn Pro Phe Thr Cys Ser Cys Asp Ile Met Trp Leu Lys
145 150 155 160

Thr Leu Gln Glu Thr Lys Ser Ser Pro Asp Thr Gln Asp Leu Tyr Cys
165 170 175

Leu Asn Glu Ser Ser Lys Asn Thr Pro Leu Ala Asn Leu Gln Ile Pro
180 185 190

Asn Cys Gly Leu Pro Ser Ala Arg Leu Ala Ala Pro Asn Leu Thr Val
195 200 205

Glu Glu Gly Lys Ser Val Thr Ile Ser Cys Ser Val Gly Gly Asp Pro
210 215 220

Leu Pro Thr Leu Tyr Trp Asp Val Gly Asn Leu Val Ser Lys His Met
225 230 235 240

Asn Glu Thr Ser His Thr Gln Gly Ser Leu Arg Ile Thr Asn Ile Ser
245 250 255

Ser Asp Asp Ser Gly Lys Gln Ile Ser Cys Val Ala Glu Asn Leu Val
260 265 270

Gly Glu Asp Gln Asp Ser Val Asn Leu Thr Val His Phe Ala Pro Thr
275 280 285

Ile Thr Phe Leu Glu Ser Pro Thr Ser Asp His His Trp Cys Ile Pro
290 295 300

Phe Thr Val Arg Gly Asn Pro Lys Pro Ala Leu Gln Trp Phe Tyr Asn
305 310 315 320

Gly Ala Ile Leu Asn Glu Ser Lys Tyr Ile Cys Thr Lys Ile His Val
325 330 335

Thr Asn His Thr Glu Tyr His Gly Cys Leu Gln Leu Asp Asn Pro Thr
340 345 350

His Met Asn Asn Gly Asp Tyr Thr Leu Met Ala Lys Asn Glu Tyr Gly
355 360 365

Lys Asp Glu Arg Gln Ile Ser Ala His Phe Met Gly Arg Pro Gly Val
370 375 380

Asp Tyr Glu Thr Asn Pro Asn Tyr Pro Glu Val Leu Tyr Glu Asp Trp
385 390 395 400

Thr Thr Pro Thr Asp Ile Gly Asp Thr Thr Asn Lys Ser Asn Glu Ile
 405 410 415
 Pro Ser Thr Asp Val Ala Asp Gln Thr Asn Arg Glu His Leu Ser Val
 420 425 430
 Tyr Ala Val Val Val Ile Ala Ser Val Val Gly Phe Cys Leu Leu Val
 435 440 445
 Met Leu Leu Leu Leu Lys Leu Ala Arg His Ser Lys Phe Gly Met Lys
 450 455 460
 Gly Pro Ala Ser Val Ile Ser Asn Asp Asp Asp Ser Ala Ser Pro Leu
 465 470 475 480
 His His Ile Ser Asn Gly Ser Asn Thr Pro Ser Ser Ser Glu Gly Gly
 485 490 495
 Pro Asp Ala Val Ile Ile Gly Met Thr Lys Ile Pro Val Ile Glu Asn
 500 505 510
 Pro Gln Tyr Phe Gly Ile Thr Asn Ser Gln Leu Lys Pro Asp Thr Phe
 515 520 525
 Val Gln His Ile Lys Arg His Asn Ile Val Leu Lys Arg Glu Leu Gly
 530 535 540
 Glu Gly Ala Phe Gly Lys Val Phe Leu Ala Glu Cys Tyr Asn Leu Cys
 545 550 555 560
 Pro Glu Gln Asp Lys Ile Leu Val Ala Val Lys Thr Leu Lys Asp Ala
 565 570 575
 Ser Asp Asn Ala Arg Lys Asp Phe His Arg Glu Ala Glu Leu Leu Thr
 580 585 590
 Asn Leu Gln His Glu His Ile Val Lys Phe Tyr Gly Val Cys Val Glu
 595 600 605
 Gly Asp Pro Leu Ile Met Val Phe Glu Tyr Met Lys His Gly Asp Leu
 610 615 620
 Asn Lys Phe Leu Arg Ala His Gly Pro Asp Ala Val Leu Met Ala Glu
 625 630 635 640
 Gly Asn Pro Pro Thr Glu Leu Thr Gln Ser Gln Met Leu His Ile Ala
 645 650 655

Gln Gln Ile Ala Ala Gly Met Val Tyr Leu Ala Ser Gln His Phe Val
660 665 670

His Arg Asp Leu Ala Thr Arg Asn Cys Leu Val Gly Glu Asn Leu Leu
675 680 685

Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Ser Arg Asp Val Tyr Ser Thr Asp
690 695 700

Tyr Tyr Arg Val Gly Gly His Thr Met Leu Pro Ile Arg Trp Met Pro
705 710 715 720

Pro Glu Ser Ile Met Tyr Arg Lys Phe Thr Thr Glu Ser Asp Val Trp
725 730 735

Ser Leu Gly Val Val Leu Trp Glu Ile Phe Thr Tyr Gly Lys Gln Pro
740 745 750

Trp Tyr Gln Leu Ser Asn Asn Glu Val Ile Glu Cys Ile Thr Gln Gly
755 760 765

Arg Val Leu Gln Arg Pro Arg Thr Cys Pro Gln Glu Val Tyr Glu Leu
770 775 780

Met Leu Gly Cys Trp Gln Arg Glu Pro His Thr Arg Lys Asn Ile Lys
785 790 795 800

Asn Ile His Thr Leu Leu Gln Asn Leu Ala Lys Ala Ser Pro Val Tyr
805 810 815

Leu Asp Ile Leu Gly
820

<210> 4
<211> 818
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> TrkB de galinha - (Gallus gallus)

<400> 4

Met Val Ser Trp Arg Arg Arg Pro Gly Pro Gly Leu Ala Arg Leu Trp
1 5 10 15

Gly Leu Cys Cys Leu Val Leu Gly Cys Trp Arg Gly Ala Leu Gly Cys
20 25 30

Pro Ala Ser Cys Arg Cys Ser Ser Trp Arg Ile Trp Cys Ser Glu Pro
35 40 45

Val Pro Gly Ile Thr Ser Phe Pro Val Pro Gln Arg Ser Thr Glu Asp
50 55 60

Asp Asn Val Thr Glu Ile Tyr Ile Ala Asn Gln Arg Lys Leu Glu Ser
65 70 75 80

Ile Asn Asp Asn Glu Val Gly Phe Tyr Val Gly Leu Lys Asn Leu Thr
85 90 95

Val Val Asp Ser Gly Leu Arg Phe Val Ser Arg Gln Ala Phe Val Lys
100 105 110

Asn Ile Asn Leu Gln Tyr Ile Asn Leu Ser Arg Asn Lys Leu Ser Ser
115 120 125

Leu Ser Lys Lys Pro Phe Arg His Leu Gly Leu Ser Asp Leu Ile Leu
130 135 140

Val Asp Asn Pro Phe Lys Cys Ser Cys Glu Ile Met Trp Ile Lys Lys
145 150 155 160

Phe Gln Glu Thr Lys Phe Tyr Thr Glu Ala Gln Asp Ile Tyr Cys Val
165 170 175

Asp Asp Asn Asn Lys Arg Ile Ala Leu Met Asp Met Lys Val Pro Asn
180 185 190

Cys Asp Leu Pro Ser Ala Asn Leu Ser Asn Tyr Asn Ile Thr Val Val
195 200 205

Glu Gly Lys Ser Ile Thr Leu Tyr Cys Asp Thr Thr Gly Gly Pro Pro
210 215 220

Pro Asn Val Ser Trp Val Leu Thr Asn Leu Val Ser Asn His Glu Ser
225 230 235 240

Asp Thr Ser Lys Asn Pro Ala Ser Leu Thr Ile Lys Asn Val Ser Ser
245 250 255

Met Asp Ser Gly Leu Trp Ile Ser Cys Val Ala Glu Asn Ile Val Gly
260 265 270

Glu Val Gln Thr Ser Ala Glu Leu Thr Val Phe Phe Ala Pro Asn Ile
275 280 285

Thr Phe Ile Glu Ser Pro Thr Pro Asp His His Trp Cys Ile Pro Phe
290 295 300

Thr Val Lys Gly Asn Pro Lys Pro Thr Leu Gln Trp Phe Tyr Glu Gly
305 310 315 320

Ala Ile Leu Asn Glu Ser Glu Tyr Ile Cys Thr Lys Ile His Val Ile
325 330 335

Asn Gln Ser Glu Tyr His Gly Cys Leu Gln Leu Asp Asn Pro Thr His
340 345 350

Leu Asn Asn Gly Ala Tyr Thr Leu Leu Ala Lys Asn Glu Tyr Gly Glu
355 360 365

Asp Glu Lys Arg Val Asp Ala His Phe Met Ser Val Pro Gly Asp Gly
370 375 380

Ser Gly Pro Ile Val Asp Pro Asp Val Tyr Glu Tyr Glu Thr Thr Pro
385 390 395 400

Asn Asp Leu Gly Asp Thr Thr Asn Asn Ser Asn Gln Ile Thr Ser Pro
405 410 415

Asp Val Ser Asn Lys Glu Asn Glu Asp Ser Ile Thr Val Tyr Val Val
420 425 430

Val Gly Ile Ala Ala Leu Val Cys Thr Gly Leu Val Ile Met Leu Ile
435 440 445

Ile Leu Lys Phe Gly Arg His Ser Lys Phe Gly Met Lys Gly Pro Ser
450 455 460

Ser Val Ile Ser Asn Asp Asp Asp Ser Ala Ser Pro Leu His His Ile
465 470 475 480

Ser Asn Gly Ser Asn Thr Pro Ser Ser Ser Glu Gly Gly Pro Asp Ala
485 490 495

Val Ile Ile Gly Met Thr Lys Ile Pro Val Ile Glu Asn Pro Gln Tyr
500 505 510

Phe Gly Ile Thr Asn Ser Gln Leu Lys Pro Asp Thr Phe Val Gln His
515 520 525

Ile Lys Arg His Asn Ile Val Leu Lys Arg Glu Leu Gly Glu Gly Ala

530	535	540
Phe Gly Lys Val Phe	Leu Ala Glu Cys Tyr	Asn Leu Cys Pro Glu Gln
545	550	555 560
Asp Lys Ile Leu Val	Ala Val Lys Thr Leu Lys Asp Ala Ser Asp Asn	
	565	570 575
Ala Arg Lys Asp Phe His Arg Glu Ala Glu Leu Leu Thr Asn Leu Gln		
	580	585 590
His Glu His Ile Val Lys Phe Tyr Gly Val Cys Val Glu Gly Asp Pro		
	595	600 605
Leu Ile Met Val Phe Glu Tyr Met Lys His Gly Asp Leu Asn Lys Phe		
	610	615 620
Leu Arg Ala His Gly Pro Asp Ala Val Leu Met Ala Glu Gly Asn Arg		
	625	630 635 640
Pro Ala Glu Leu Thr Gln Ser Gln Met Leu His Ile Ala Gln Gln Ile		
	645	650 655
Ala Ala Gly Met Val Tyr Leu Ala Ser Gln His Phe Val His Arg Asp		
	660	665 670
Leu Ala Thr Arg Asn Cys Leu Val Gly Glu Asn Leu Leu Val Lys Ile		
	675	680 685
Gly Asp Phe Gly Met Ser Arg Asp Val Tyr Ser Thr Asp Tyr Tyr Arg		
	690	695 700
Val Gly Gly His Thr Met Leu Pro Ile Arg Trp Met Pro Pro Glu Ser		
	705	710 715 720
Ile Met Tyr Arg Lys Phe Thr Thr Glu Ser Asp Val Trp Ser Leu Gly		
	725	730 735
Val Val Leu Trp Glu Ile Phe Thr Tyr Gly Lys Gln Pro Trp Tyr Gln		
	740	745 750
Leu Ser Asn Asn Glu Val Ile Glu Cys Ile Thr Gln Gly Arg Val Leu		
	755	760 765
Gln Arg Pro Arg Thr Cys Pro Lys Glu Val Tyr Asp Leu Met Leu Gly		
	770	775 780

Cys Trp Gln Arg Glu Pro His Met Arg Leu Asn Ile Lys Glu Ile His
785 790 795 800

Ser Leu Leu Gln Asn Leu Ala Lys Ala Ser Pro Val Tyr Leu Asp Ile
805 810 815

Leu Gly

<210> 5
<211> 796
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> TrkA humano - (homo sapiens)

<400> 5

Met Leu Arg Gly Gly Arg Arg Gly Gln Leu Gly Trp His Ser Trp Ala
1 5 10 15

Ala Gly Pro Gly Ser Leu Leu Ala Trp Leu Ile Leu Ala Ser Ala Gly
20 25 30

Ala Ala Pro Cys Pro Asp Ala Cys Cys Pro His Gly Ser Ser Gly Leu
35 40 45

Arg Cys Thr Arg Asp Gly Ala Leu Asp Ser Leu His His Leu Pro Gly
50 55 60

Ala Glu Asn Leu Thr Glu Leu Tyr Ile Glu Asn Gln Gln His Leu Gln
65 70 75 80

His Leu Glu Leu Arg Asp Leu Arg Gly Leu Gly Glu Leu Arg Asn Leu
85 90 95

Thr Ile Val Lys Ser Gly Leu Arg Phe Val Ala Pro Asp Ala Phe His
100 105 110

Phe Thr Pro Arg Leu Ser Arg Leu Asn Leu Ser Phe Asn Ala Leu Glu
115 120 125

Ser Leu Ser Trp Lys Thr Val Gln Gly Leu Ser Leu Gln Glu Leu Val
130 135 140

Leu Ser Gly Asn Pro Leu His Cys Ser Cys Ala Leu Arg Trp Leu Gln
145 150 155 160

Arg Trp Glu Glu Glu Gly Leu Gly Gly Val Pro Glu Gln Lys Leu Gln

165 170 175

Cys His Gly Gln Gly Pro Leu Ala His Met Pro Asn Ala Ser Cys Gly
180 185 190

Val Pro Thr Leu Lys Val Gln Val Pro Asn Ala Ser Val Asp Val Gly
195 200 205

Asp Asp Val Leu Leu Arg Cys Gln Val Glu Gly Arg Gly Leu Glu Gln
210 215 220

Ala Gly Trp Ile Leu Thr Glu Leu Glu Gln Ser Ala Thr Val Met Lys
225 230 235 240

Ser Gly Gly Leu Pro Ser Leu Gly Leu Thr Leu Ala Asn Val Thr Ser
245 250 255

Asp Leu Asn Arg Lys Asn Val Thr Cys Trp Ala Glu Asn Asp Val Gly
260 265 270

Arg Ala Glu Val Ser Val Gln Val Asn Val Ser Phe Pro Ala Ser Val
275 280 285

Gln Leu His Thr Ala Val Glu Met His His Trp Cys Ile Pro Phe Ser
290 295 300

Val Asp Gly Gln Pro Ala Pro Ser Leu Arg Trp Leu Phe Asn Gly Ser
305 310 315 320

Val Leu Asn Glu Thr Ser Phe Ile Phe Thr Glu Phe Leu Glu Pro Ala
325 330 335

Ala Asn Glu Thr Val Arg His Gly Cys Leu Arg Leu Asn Gln Pro Thr
340 345 350

His Val Asn Asn Gly Asn Tyr Thr Leu Leu Ala Ala Asn Pro Phe Gly
355 360 365

Gln Ala Ser Ala Ser Ile Met Ala Ala Phe Met Asp Asn Pro Phe Glu
370 375 380

Phe Asn Pro Glu Asp Pro Ile Pro Val Ser Phe Ser Pro Val Asp Thr
385 390 395 400

Asn Ser Thr Ser Gly Asp Pro Val Glu Lys Lys Asp Glu Thr Pro Phe
405 410 415

Gly Val Ser Val Ala Val Gly Leu Ala Val Phe Ala Cys Leu Phe Leu
 420 425 430
 Ser Thr Leu Leu Leu Val Leu Asn Lys Cys Gly Arg Arg Asn Lys Phe
 435 440 445
 Gly Ile Asn Arg Pro Ala Val Leu Ala Pro Glu Asp Gly Leu Ala Met
 450 455 460
 Ser Leu His Phe Met Thr Leu Gly Gly Ser Ser Leu Ser Pro Thr Glu
 465 470 475 480
 Gly Lys Gly Ser Gly Leu Gln Gly His Ile Ile Glu Asn Pro Gln Tyr
 485 490 495
 Phe Ser Asp Ala Cys Val His His Ile Lys Arg Arg Asp Ile Val Leu
 500 505 510
 Lys Trp Glu Leu Gly Glu Gly Ala Phe Gly Lys Val Phe Leu Ala Glu
 515 520 525
 Cys His Asn Leu Leu Pro Glu Gln Asp Lys Met Leu Val Ala Val Lys
 530 535 540
 Ala Leu Lys Glu Ala Ser Glu Ser Ala Arg Gln Asp Phe Gln Arg Glu
 545 550 555 560
 Ala Glu Leu Leu Thr Met Leu Gln His Gln His Ile Val Arg Phe Phe
 565 570 575
 Gly Val Cys Thr Glu Gly Arg Pro Leu Leu Met Val Phe Glu Tyr Met
 580 585 590
 Arg His Gly Asp Leu Asn Arg Phe Leu Arg Ser His Gly Pro Asp Ala
 595 600 605
 Lys Leu Leu Ala Gly Gly Glu Asp Val Ala Pro Gly Pro Leu Gly Leu
 610 615 620
 Gly Gln Leu Leu Ala Val Ala Ser Gln Val Ala Ala Gly Met Val Tyr
 625 630 635 640
 Leu Ala Gly Leu His Phe Val His Arg Asp Leu Ala Thr Arg Asn Cys
 645 650 655
 Leu Val Gly Gln Gly Leu Val Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Ser
 660 665 670

Arg Asp Ile Tyr Ser Thr Asp Tyr Tyr Arg Val Gly Gly Arg Thr Met
675 680 685

Leu Pro Ile Arg Trp Met Pro Pro Glu Ser Ile Leu Tyr Arg Lys Phe
690 695 700

Thr Thr Glu Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Val Leu Trp Glu Ile
705 710 715 720

Phe Thr Tyr Gly Lys Gln Pro Trp Tyr Gln Leu Ser Asn Thr Glu Ala
725 730 735

Ile Asp Cys Ile Thr Gln Gly Arg Glu Leu Glu Arg Pro Arg Ala Cys
740 745 750

Pro Pro Glu Val Tyr Ala Ile Met Arg Gly Cys Trp Gln Arg Glu Pro
755 760 765

Gln Gln Arg His Ser Ile Lys Asp Val His Ala Arg Leu Gln Ala Leu
770 775 780

Ala Gln Ala Pro Pro Val Tyr Leu Asp Val Leu Gly
785 790 795

<210> 6
<211> 839
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> TrkC humano (homo sapiens)

<400> 6

Met Asp Val Ser Leu Cys Pro Ala Lys Cys Ser Phe Trp Arg Ile Phe
1 5 10 15

Leu Leu Gly Ser Val Trp Leu Asp Tyr Val Gly Ser Val Leu Ala Cys
20 25 30

Pro Ala Asn Cys Val Cys Ser Lys Thr Glu Ile Asn Cys Arg Arg Pro
35 40 45

Asp Asp Gly Asn Leu Phe Pro Leu Leu Glu Gly Gln Asp Ser Gly Asn
50 55 60

Ser Asn Gly Asn Ala Asn Ile Asn Ile Thr Asp Ile Ser Arg Asn Ile
65 70 75 80

Thr Ser Ile His Ile Glu Asn Trp Arg Ser Leu His Thr Leu Asn Ala
 85 90 95
 Val Asp Met Glu Leu Tyr Thr Gly Leu Gln Lys Leu Thr Ile Lys Asn
 100 105 110
 Ser Gly Leu Arg Ser Ile Gln Pro Arg Ala Phe Ala Lys Asn Pro His
 115 120 125
 Leu Arg Tyr Ile Asn Leu Ser Ser Asn Arg Leu Thr Thr Leu Ser Trp
 130 135 140
 Gln Leu Phe Gln Thr Leu Ser Leu Arg Glu Leu Gln Leu Glu Gln Asn
 145 150 155 160
 Phe Phe Asn Cys Ser Cys Asp Ile Arg Trp Met Gln Leu Trp Gln Glu
 165 170 175
 Gln Gly Glu Ala Lys Leu Asn Ser Gln Asn Leu Tyr Cys Ile Asn Ala
 180 185 190
 Asp Gly Ser Gln Leu Pro Leu Phe Arg Met Asn Ile Ser Gln Cys Asp
 195 200 205
 Leu Pro Glu Ile Ser Val Ser His Val Asn Leu Thr Val Arg Glu Gly
 210 215 220
 Asp Asn Ala Val Ile Thr Cys Asn Gly Ser Gly Ser Pro Leu Pro Asp
 225 230 235 240
 Val Asp Trp Ile Val Thr Gly Leu Gln Ser Ile Asn Thr His Gln Thr
 245 250 255
 Asn Leu Asn Trp Thr Asn Val His Ala Ile Asn Leu Thr Leu Val Asn
 260 265 270
 Val Thr Ser Glu Asp Asn Gly Phe Thr Leu Thr Cys Ile Ala Glu Asn
 275 280 285
 Val Val Gly Met Ser Asn Ala Ser Val Ala Leu Thr Val Tyr Tyr Pro
 290 295 300
 Pro Arg Val Val Ser Leu Glu Glu Pro Glu Leu Arg Leu Glu His Cys
 305 310 315 320
 Ile Glu Phe Val Val Arg Gly Asn Pro Pro Pro Thr Leu His Trp Leu
 325 330 335

His Asn Gly Gln Pro Leu Arg Glu Ser Lys Ile Ile His Val Glu Tyr
 340 345 350

Tyr Gln Glu Gly Glu Ile Ser Glu Gly Cys Leu Leu Phe Asn Lys Pro
 355 360 365

Thr His Tyr Asn Asn Gly Asn Tyr Thr Leu Ile Ala Lys Asn Pro Leu
 370 375 380

Gly Thr Ala Asn Gln Thr Ile Asn Gly His Phe Leu Lys Glu Pro Phe
 385 390 395 400

Pro Glu Ser Thr Asp Asn Phe Ile Leu Phe Asp Glu Val Ser Pro Thr
 405 410 415

Pro Pro Ile Thr Val Thr His Lys Pro Glu Glu Asp Thr Phe Gly Val
 420 425 430

Ser Ile Ala Val Gly Leu Ala Ala Phe Ala Cys Val Leu Leu Val Val
 435 440 445

Leu Phe Val Met Ile Asn Lys Tyr Gly Arg Arg Ser Lys Phe Gly Met
 450 455 460

Lys Gly Pro Val Ala Val Ile Ser Gly Glu Glu Asp Ser Ala Ser Pro
 465 470 475 480

Leu His His Ile Asn His Gly Ile Thr Thr Pro Ser Ser Leu Asp Ala
 485 490 495

Gly Pro Asp Thr Val Val Ile Gly Met Thr Arg Ile Pro Val Ile Glu
 500 505 510

Asn Pro Gln Tyr Phe Arg Gln Gly His Asn Cys His Lys Pro Asp Thr
 515 520 525

Tyr Val Gln His Ile Lys Arg Arg Asp Ile Val Leu Lys Arg Glu Leu
 530 535 540

Gly Glu Gly Ala Phe Gly Lys Val Phe Leu Ala Glu Cys Tyr Asn Leu
 545 550 555 560

Ser Pro Thr Lys Asp Lys Met Leu Val Ala Val Lys Ala Leu Lys Asp
 565 570 575

Pro Thr Leu Ala Ala Arg Lys Asp Phe Gln Arg Glu Ala Glu Leu Leu
 580 585 590

Thr Asn Leu Gln His Glu His Ile Val Lys Phe Tyr Gly Val Cys Gly
 595 600 605
 Asp Gly Asp Pro Leu Ile Met Val Phe Glu Tyr Met Lys His Gly Asp
 610 615 620
 Leu Asn Lys Phe Leu Arg Ala His Gly Pro Asp Ala Met Ile Leu Val
 625 630 635 640
 Asp Gly Gln Pro Arg Gln Ala Lys Gly Glu Leu Gly Leu Ser Gln Met
 645 650 655
 Leu His Ile Ala Ser Gln Ile Ala Ser Gly Met Val Tyr Leu Ala Ser
 660 665 670
 Gln His Phe Val His Arg Asp Leu Ala Thr Arg Asn Cys Leu Val Gly
 675 680 685
 Ala Asn Leu Leu Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Ser Arg Asp Val
 690 695 700
 Tyr Ser Thr Asp Tyr Tyr Arg Leu Phe Asn Pro Ser Gly Asn Asp Phe
 705 710 715 720
 Cys Ile Trp Cys Glu Val Gly Gly His Thr Met Leu Pro Ile Arg Trp
 725 730 735
 Met Pro Pro Glu Ser Ile Met Tyr Arg Lys Phe Thr Thr Glu Ser Asp
 740 745 750
 Val Trp Ser Phe Gly Val Ile Leu Trp Glu Ile Phe Thr Tyr Gly Lys
 755 760 765
 Gln Pro Trp Phe Gln Leu Ser Asn Thr Glu Val Ile Glu Cys Ile Thr
 770 775 780
 Gln Gly Arg Val Leu Glu Arg Pro Arg Val Cys Pro Lys Glu Val Tyr
 785 790 795 800
 Asp Val Met Leu Gly Cys Trp Gln Arg Glu Pro Gln Gln Arg Leu Asn
 805 810 815
 Ile Lys Glu Ile Tyr Lys Ile Leu His Ala Leu Gly Lys Ala Thr Pro
 820 825 830
 Ile Tyr Leu Asp Ile Leu Gly

835

<210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Ser humano (Homo sapiens)

<400> 7

Lys Asn Glu Tyr Gly Lys Asp
 1 5

<210> 8
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Ser humano (Homo sapiens)

<400> 8

Lys Gly Asn Pro Lys Pro
 1 5

<210> 9
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> murine (Mus musculus)

<400> 9

Arg Gly Asn Pro Lys Pro
 1 5

<210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Ser humano (Homo sapiens)

<400> 10

Glu Asn Leu Val Gly Glu Asp
 1 5

<210> 11
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> Ser humano (Homo sapiens)

<400> 11

Ala Gly Asp Pro Val Pro
1 5

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal que liga TrkB humano.
2. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 1, em que a ligação com TrkB humano tem uma ED_{50} na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 500 nM.
3. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 1, em que a ligação com TrkB humano tem uma ED_{50} na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 1 nM.
4. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 1, em que a ligação com TrkB humano tem uma ED_{50} na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 100 pM.
5. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 1, em que a ligação com TrkB humano tem uma ED_{50} na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 50 pM.
6. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo monoclonal ativa TrkB humano com um EC_{50} na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 500 nM.
7. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo monoclonal ativa TrkB humano com um EC_{50} na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 1 nM.
8. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo monoclonal ativa TrkB humano com um EC_{50} na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 100 pM.
9. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo monoclonal ativa TrkB humano com um EC_{50} na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 50 pM.
10. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo monoclonal não liga e/ou não ativa TrkA humano.
11. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 10, em que o anticorpo monoclonal não exibe nenhuma ligação detectável com TrkA humano e/ou não causa nenhuma ativação detectável de TrkA humano em concentrações de anticorpo acima de cerca de 1 nM.

12. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 10, em que o anticorpo monoclonal não exibe nenhuma ligação detectável com TrkA humano e/ou não causa nenhuma ativação detectável de TrkA humano em concentrações de anticorpo acima de cerca de 10 nM.

5 13. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 10, em que o anticorpo monoclonal não exibe nenhuma ligação detectável com TrkA humano e/ou não causa nenhuma ativação detectável de TrkA humano em concentrações de anticorpo acima de cerca de 100 nM.

10 14. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 10, em que o anticorpo monoclonal não exibe nenhuma ligação detectável com TrkA humano e/ou não causa nenhuma ativação detectável de TrkA humano em concentrações de anticorpo acima de cerca de 1 μ M.

15 15. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo monoclonal não liga e/ou não ativa TrkC humano.

15 16. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 15, em que o anticorpo monoclonal não exibe nenhuma ligação detectável com TrkC humano e/ou não causa nenhuma ativação detectável de TrkC humano em concentrações de anticorpo acima de cerca de 1 nM.

20 17. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 15, em que o anticorpo monoclonal não exibe nenhuma ligação detectável com TrkC humano e/ou não causa nenhuma ativação detectável de TrkC humano em concentrações de anticorpo acima de cerca de 10 nM.

25 18. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 15, em que o anticorpo monoclonal não exibe nenhuma ligação detectável com TrkC humano e/ou não causa nenhuma ativação detectável de TrkC humano em concentrações de anticorpo acima de cerca de 100 nM.

30 19. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 15, em que o anticorpo monoclonal não exibe nenhuma ligação detectável com TrkC humano e/ou não causa nenhuma ativação detectável de TrkC humano em concentrações de anticorpo acima de cerca de 1 μ M.

20. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 10, em que o anticorpo monoclonal não liga e/ou não ativa TrkC humano.

21. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo monoclonal bloqueia a ligação entre BDNF e TrkB humano.

22. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 21, em que o anticorpo monoclonal bloqueia a ligação entre BDNF e TrkB humano com uma IC_{50} na faixa de cerca de 100 pM a cerca de 500 nM.

23. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 21, em que o anticorpo monoclonal bloqueia a ligação entre BDNF e TrkB humano com uma IC_{50} na faixa de cerca de 100 pM a cerca de 1 nM.

24. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 21, em que o anticorpo monoclonal bloqueia a ligação entre BDNF e TrkB humano com uma IC_{50} na faixa de cerca de 100 pM a cerca de 500 pM.

25. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo monoclonal não bloqueia a ligação entre BDNF e TrkB humano.

26. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 25, em que o anticorpo monoclonal não exibe nenhuma atividade de bloqueio detectável em concentrações de anticorpo acima de cerca de 1 nM.

27. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 25, em que o anticorpo monoclonal não exibe nenhuma atividade de bloqueio detectável em concentrações de anticorpo acima de cerca de 10 nM.

28. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 25, em que o anticorpo monoclonal não exibe nenhuma atividade de bloqueio detectável em concentrações de anticorpo acima de cerca de 100 nM.

29. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 25, em que o anticorpo monoclonal não exibe nenhuma atividade de bloqueio detectável em concentrações de anticorpo acima de cerca de 1 μ M.

30. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo monoclonal tem um isótipo de IgG1.

31. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo monoclonal tem um isótipo de IgG2a.

32. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo monoclonal tem um isótipo de IgG2b.

33. Anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 32, em que o anticorpo monoclonal liga e/ou ativa TrkB de murino.

5 34. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 33, em que a ligação com TrkB de murino tem uma ED_{50} na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 500 nM.

35. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 33, em que a ligação com TrkB de murino tem uma ED_{50} na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 1 nM.

10 36. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 33, em que a ligação com TrkB de murino tem uma ED_{50} na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 500 pM.

15 37. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 33, em que a ligação com TrkB de murino tem uma ED_{50} na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 100 pM.

38. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo monoclonal liga um ou ambos dos epítomos de TrkB humano com seqüências KNEYGKD (SEQ ID NO: 7) e KGNPKP (SEQ ID NO: 8).

20 39. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 38, em que o anticorpo monoclonal liga ainda um ou ambos dos epítomos de TrkB de camundongo com seqüências KNEYGKD (SEQ ID NO: 7) e RGNPKP (SEQ ID NO: 9).

25 40. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo monoclonal liga um epítopo de TrkB humano com a seqüência ENLVGED (SEQ ID NO: 10) e opcionalmente um epítopo de TrkB humano com a seqüência AGDPVP (SEQ ID NO: 11).

41. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 40, em que o anticorpo monoclonal liga ainda um epítopo de TrkB de camundongo com a seqüência ENLVGED (SEQ ID NO: 10).

30 42. Anticorpo monoclonal que é produzido a partir do hibridoma depositado com a ATCC em 18 de Agosto de 2005 e tendo designação de depósito de patente de ATCC PTA-6948 ou a partir de uma célula progenito-

ra do mesmo.

43. Anticorpo monoclonal que é produzido a partir do hibridoma depositado com a ATCC em 18 de Agosto de 2005 e tendo a designação de depósito de patente de ATCC PTA-6949 ou a partir de uma célula progenitora do mesmo.

44. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo monoclonal liga ao mesmo epítipo como o anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 42.

45. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo monoclonal liga ao mesmo epítipo como o anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 43.

46. Hibridoma que produz um anticorpo monoclonal como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 41.

47. Hibridoma depositado com a ATCC em 18 de agosto de 2005 e tendo a designação de depósito de patente de ATCC PTA-6948 ou uma célula progenitora do mesmo.

48. Hibridoma depositado com a ATCC em 18 de agosto de 2005 e tendo a designação de depósito de patente de ATCC PTA-6949 ou uma célula progenitora do mesmo.

49. Método compreendendo:

imunizar um animal com pelo menos dois imunógenos de proteína que foram derivados de proteínas de TrkB de espécies diferentes; e

fundir células do baço do animal imunizado com células de mieloma para produzir um hibridoma.

50. Método de acordo com a reivindicação 49, em que pelo menos dois imunógenos de proteína incluem um primeiro imunógeno que foi derivado de TrkB humano e um segundo imunógeno que foi derivado de um TrkB não humano.

51. Método de acordo com a reivindicação 50, em que o primeiro imunógeno inclui o domínio extracelular de TrkB humano e o segundo imunógeno inclui o domínio extracelular de um TrkB não humano.

52. Método de acordo com a reivindicação 51, em que o segun-

do imunógeno inclui o domínio extracelular de um TrkB não humano selecionado do grupo consistindo em TrkB de murino, TrkB de rato e TrkB de galinha.

53. Método de acordo com a reivindicação 52, em que o segundo imunógeno inclui o domínio extracelular de TrkB de murino.

54. Método de acordo com a reivindicação 50, em que o primeiro imunógeno e o segundo imunógeno são administrados na etapa de imunização em quantidades (em peso) que têm uma razão que é maior do que cerca de 1.

55. Método de acordo com a reivindicação 54, em que a razão é maior do que cerca de 5.

56. Método de acordo com a reivindicação 55, em que a razão é de cerca de 10.

57. Método de acordo com a reivindicação 51, em que o primeiro e segundo imunógenos não incluem nenhum dos aminoácidos que são encontrados fora do domínio extracelular de TrkB.

58. Hibridoma que foi fabricado de acordo com o método como definido em qualquer uma das reivindicações de 49 a 57.

59. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 49 a 57, compreendendo ainda: gerar um anticorpo monoclonal a partir do hibridoma.

60. Anticorpo monoclonal que foi fabricado de acordo com o método como definido na reivindicação 59.

61. Método de ativar TrkB humano em um indivíduo, compreendendo: administrar a um indivíduo, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 41.

62. Método de acordo com a reivindicação 61, em que o dito indivíduo está sofrendo de uma condição neurológica que requer a ativação de TrkB.

63. Método de acordo com a reivindicação 61, em que o sistema nervoso do dito indivíduo foi lesionado por um ferimento, cirurgia, isquemia,

infecção, uma doença metabólica, subnutrição, um tumor maligno ou um medicamento tóxico.

5 64. Método de acordo com a reivindicação 61, em que o dito indivíduo sofreu um acidente vascular cerebral, uma lesão na medula espinhal, ou uma axotomia.

65. Método de acordo com a reivindicação 61, em que o dito indivíduo está sofrendo de uma condição congênita ou neurodegenerativa.

10 66. Método de acordo com a reivindicação 65, em que a dita condição é selecionada do grupo consistindo em doença de Alzheimer, doença de Parkinson, coréia de Huntington, e esclerose lateral amiotrófica (ALS).

67. Método de acordo com a reivindicação 61, em que o dito anticorpo monoclonal é administrado ao dito indivíduo parenteralmente.

15 68. Método de acordo com a reivindicação 61, em que o dito anticorpo monoclonal é administrado ao dito indivíduo intravenosa ou interperitonealmente.

69. Método compreendendo:

20 combinar um anticorpo monoclonal como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 41 com uma amostra que inclui uma quantidade de TrkB humano sob condições que permitem ligação específica entre o anticorpo monoclonal e TrkB humano; e

detectar a ligação específica, indicando do mesmo modo a presença de TrkB humano na amostra.

70. Método compreendendo:

25 combinar um anticorpo monoclonal como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 41, com uma amostra que inclui uma quantidade de TrkB humano sob condições que permitem a ligação específica entre o anticorpo monoclonal e TrkB humano, produzindo do mesmo modo um complexo de anticorpo-TrkB;

30 separar o complexo de anticorpo-TrkB humano do restante da amostra; e

separar o anticorpo de TrkB humano, obtendo do mesmo modo TrkB humano purificado.

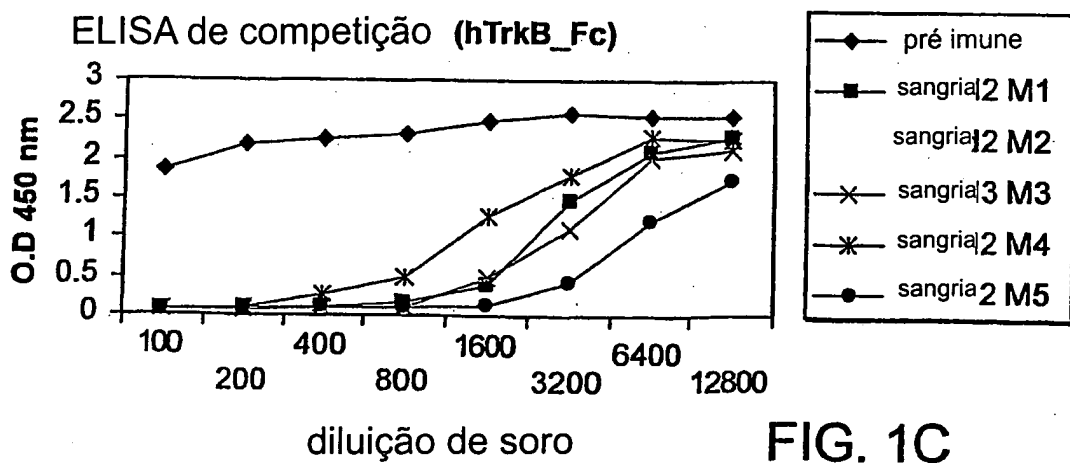
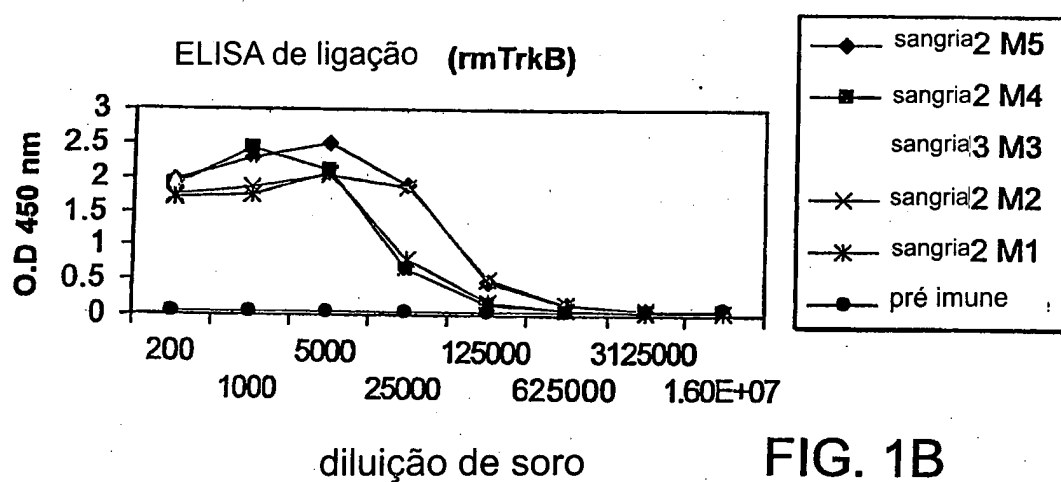
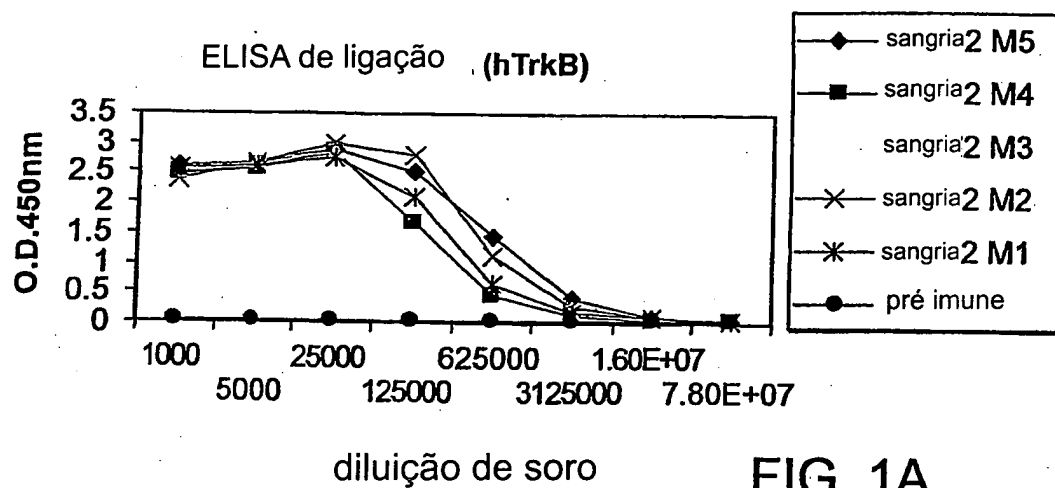
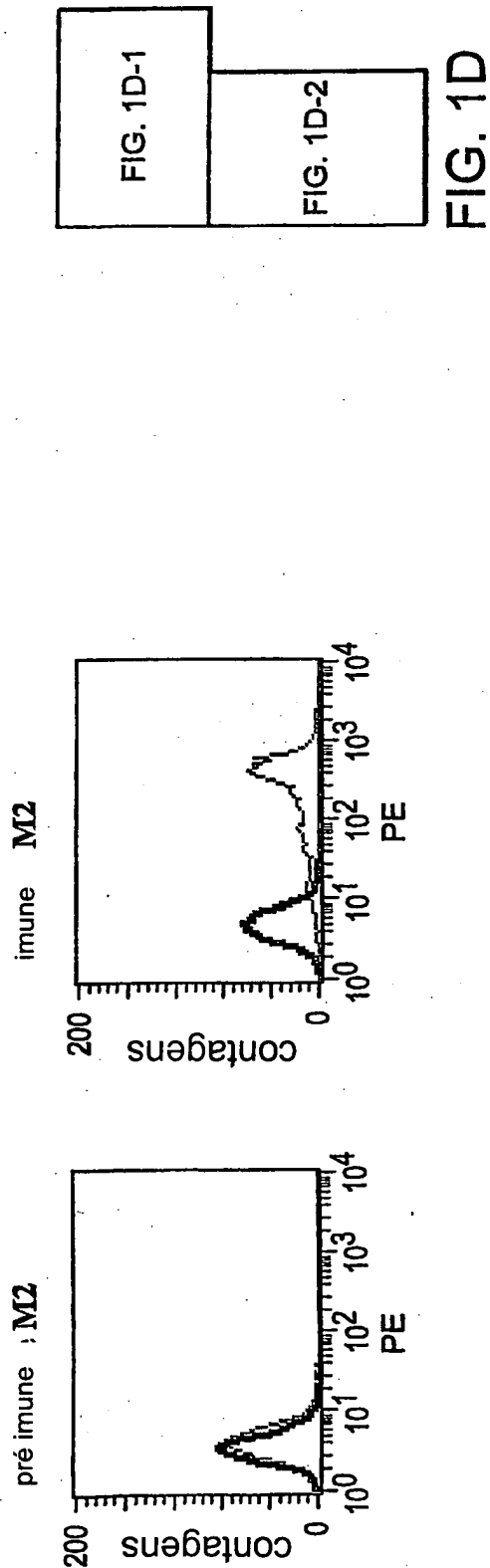
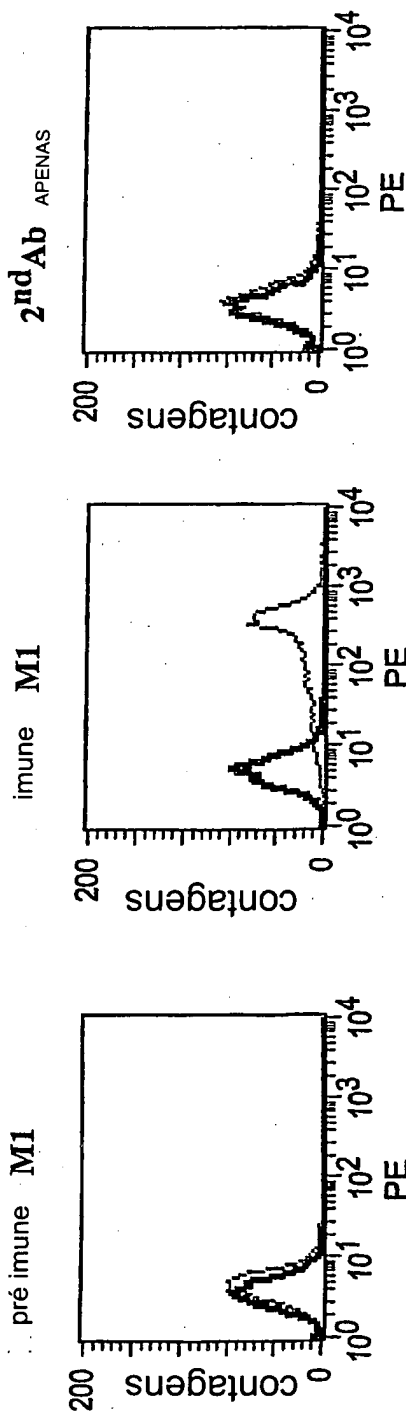


FIG. 1D-1



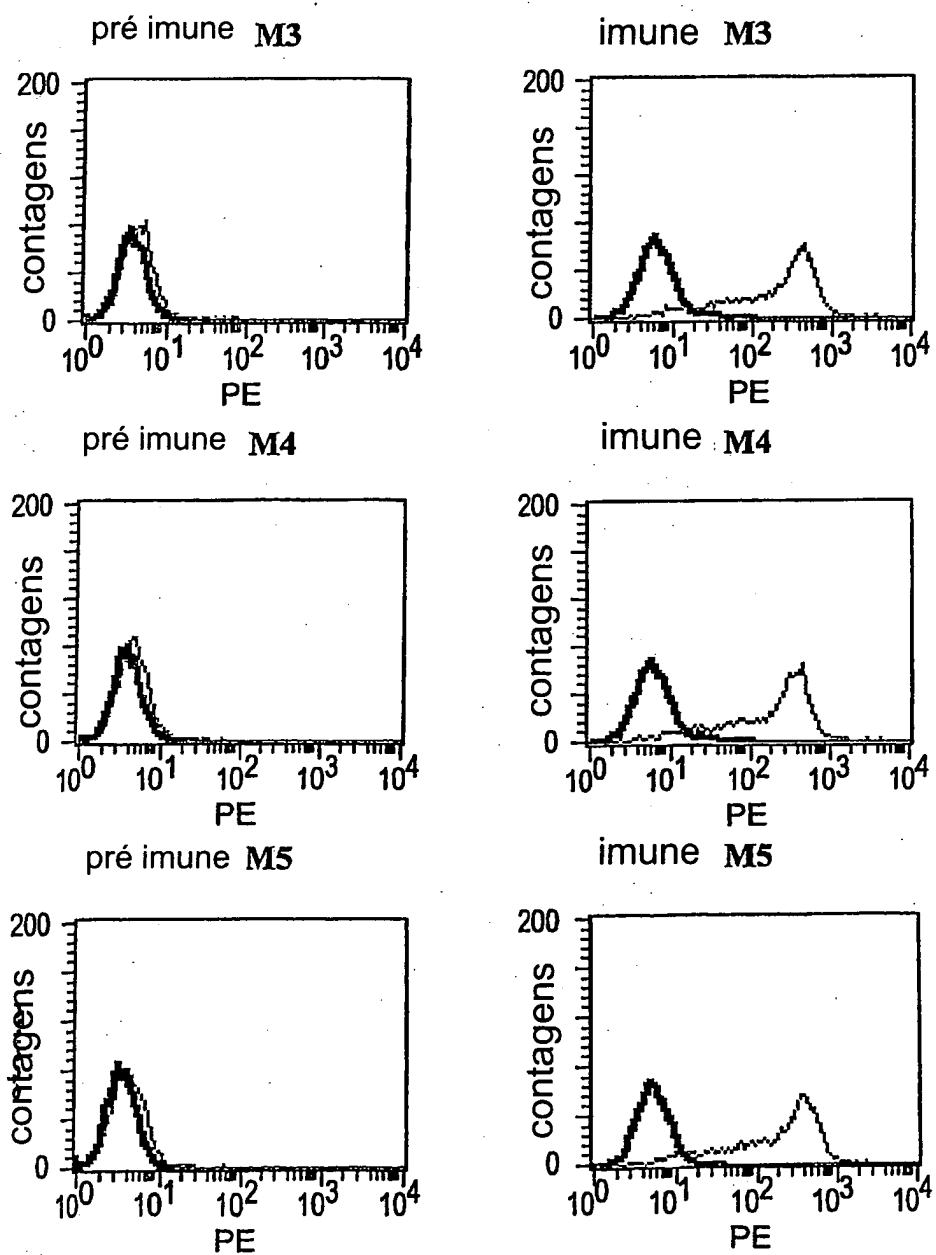


FIG. 1D-2

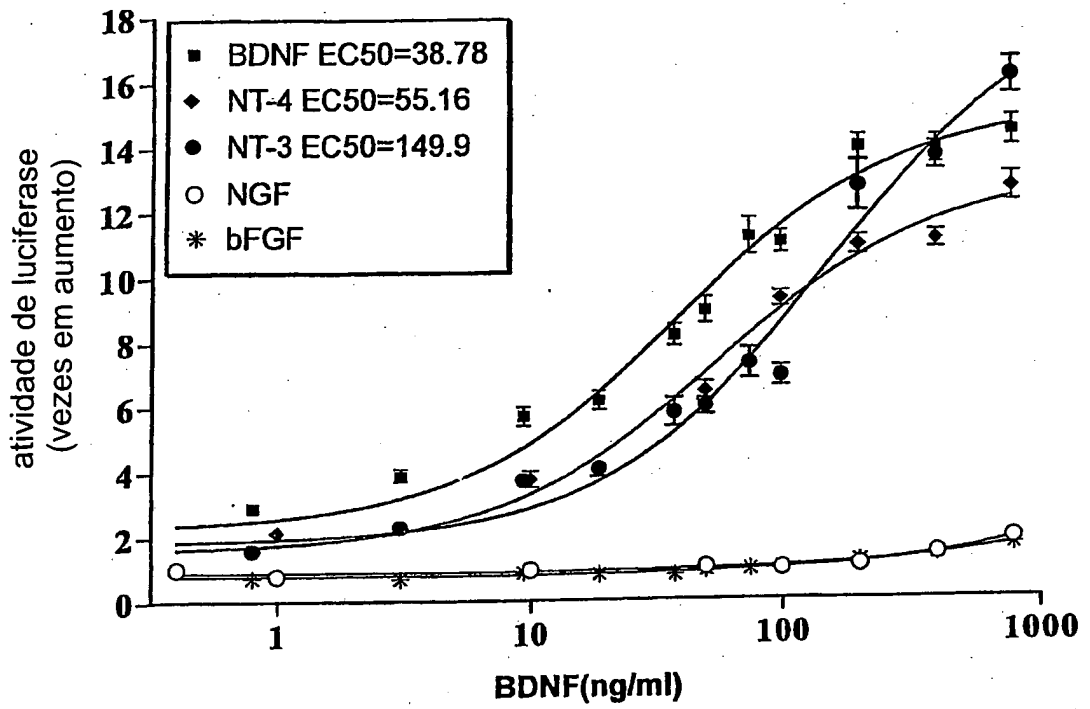


FIG. 2A

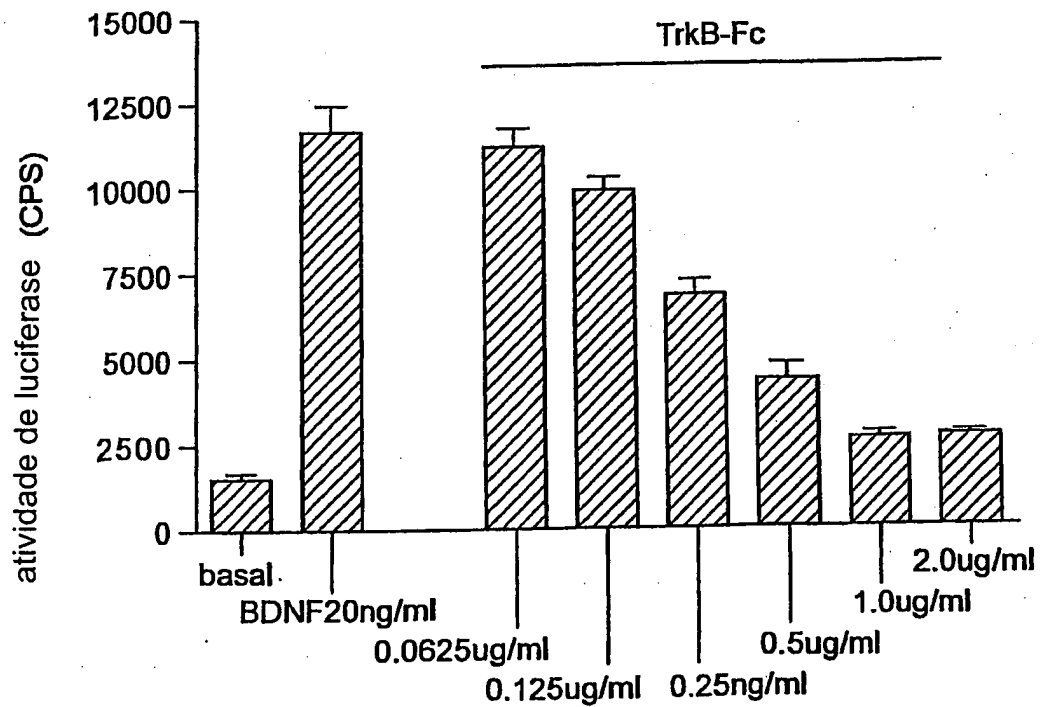
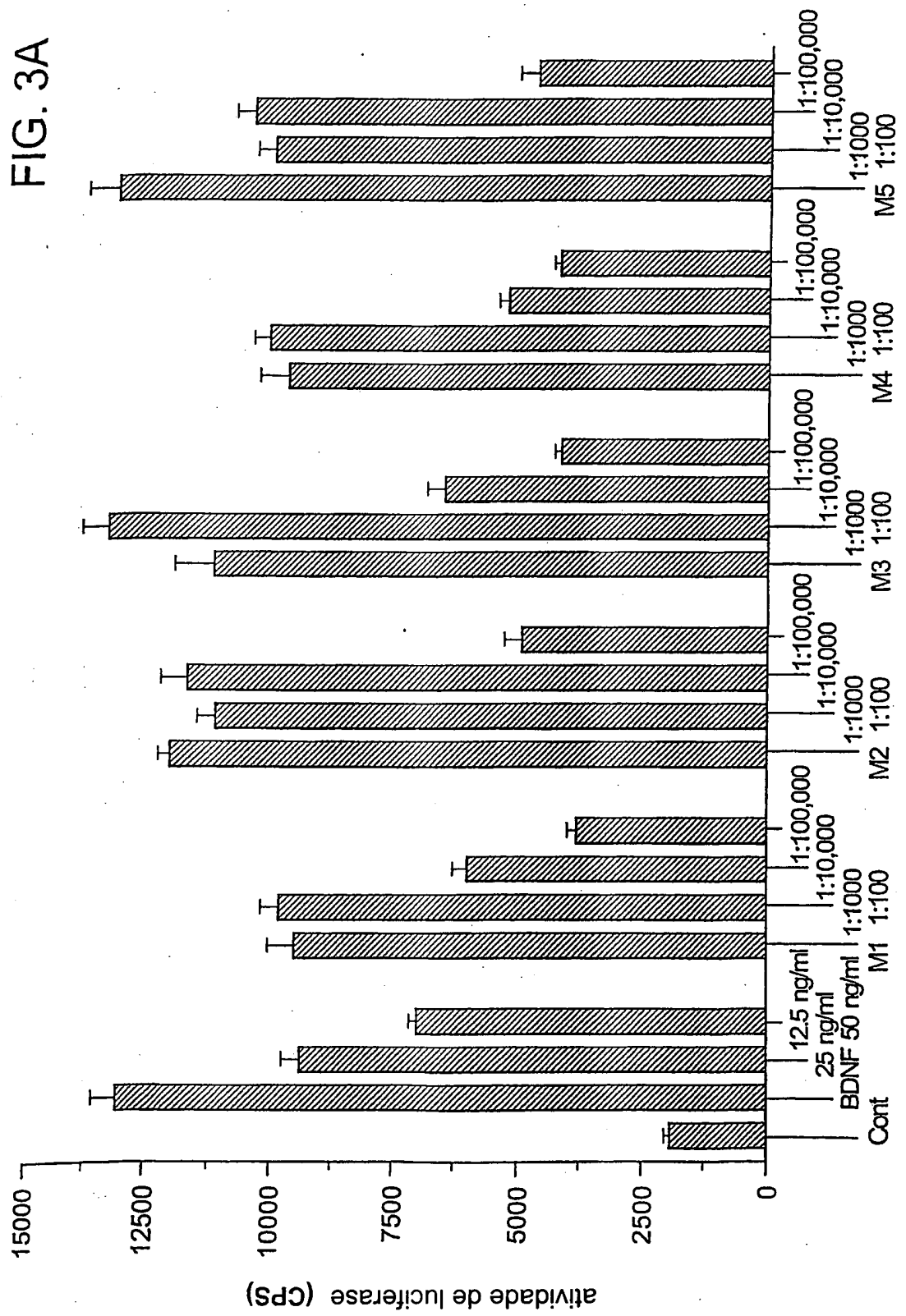


FIG. 2B



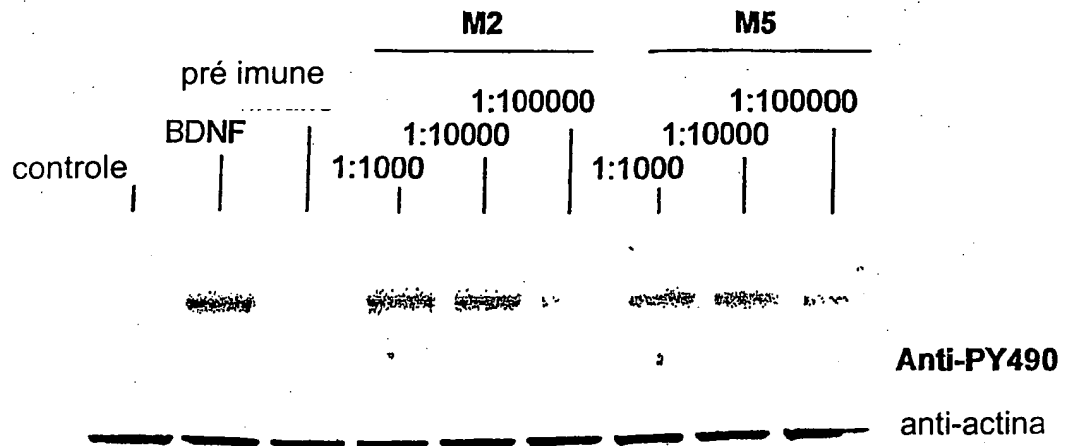


FIG. 3B

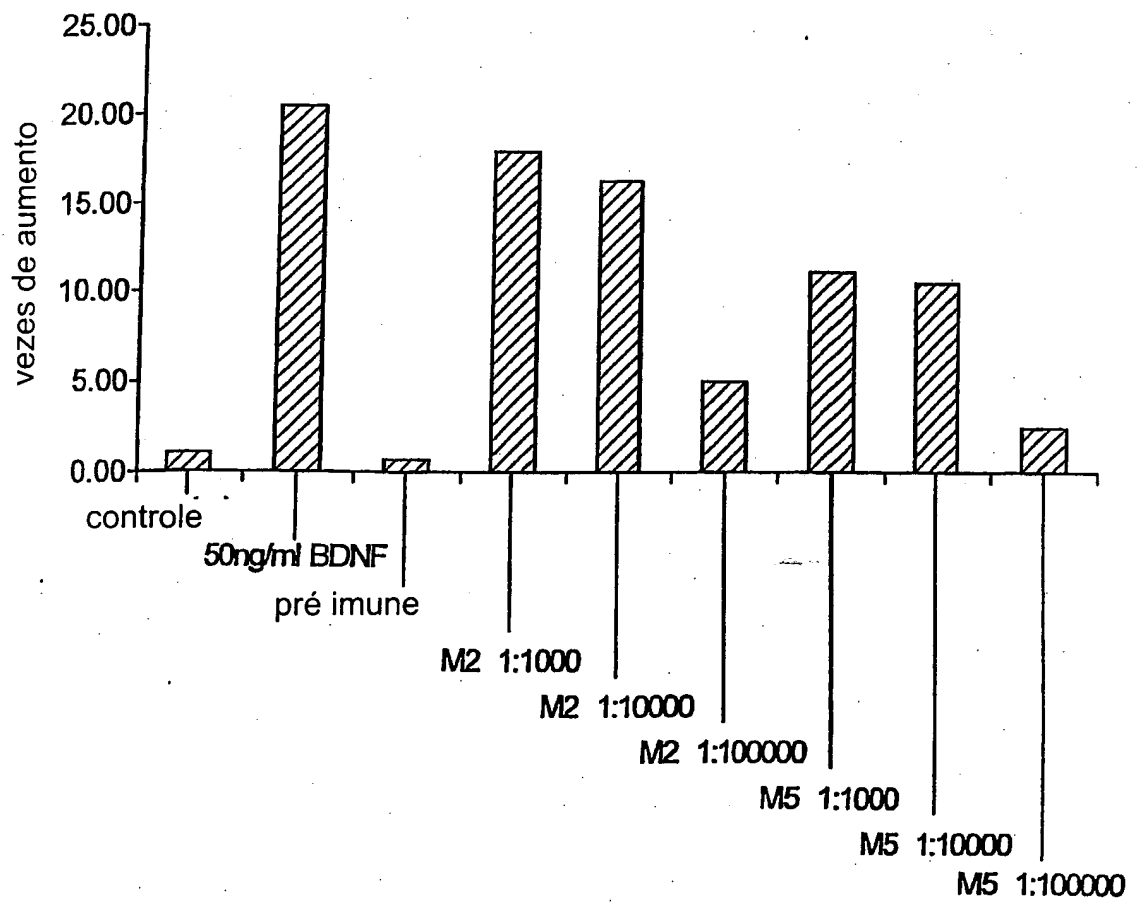


FIG. 3C

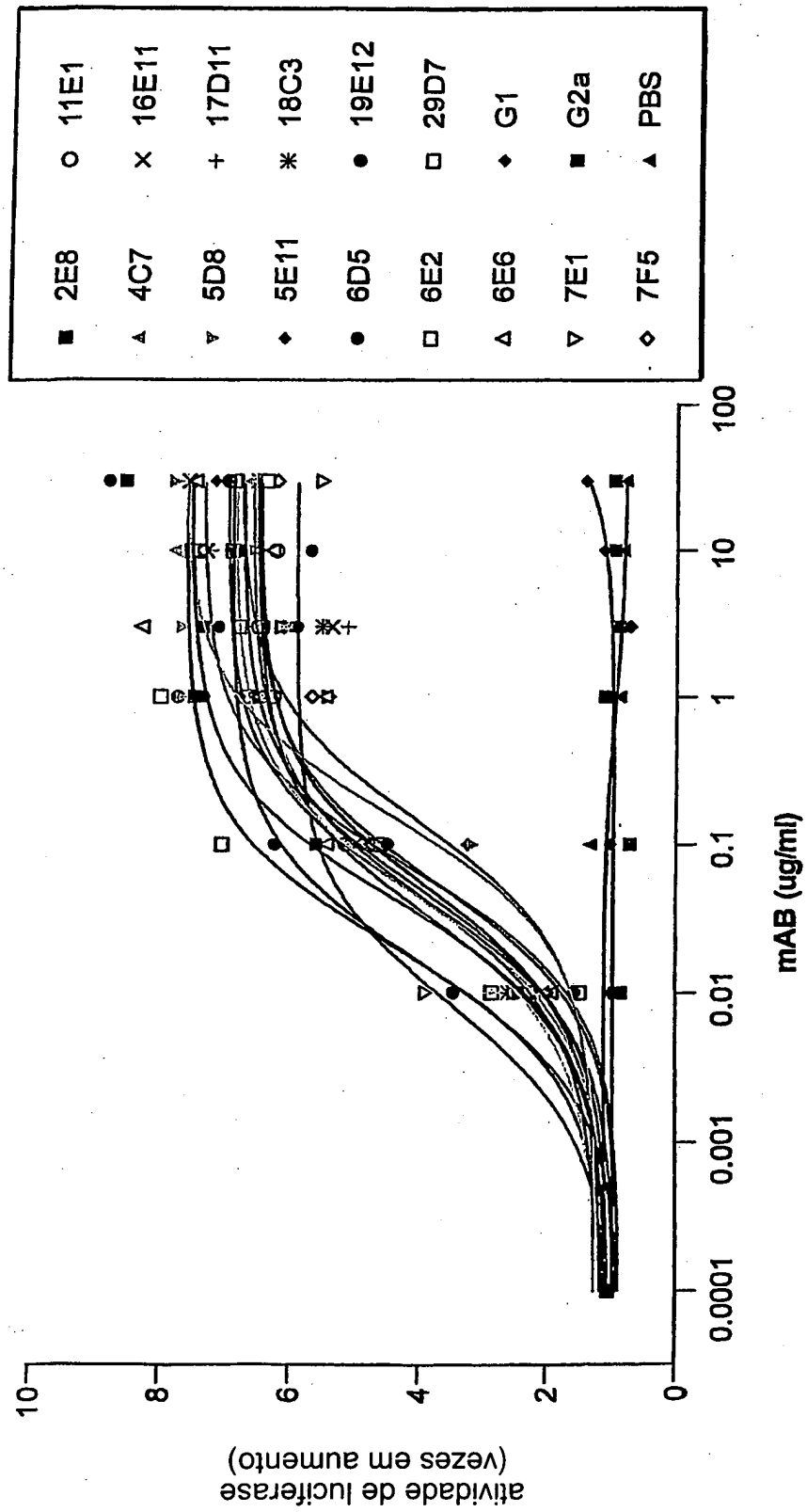
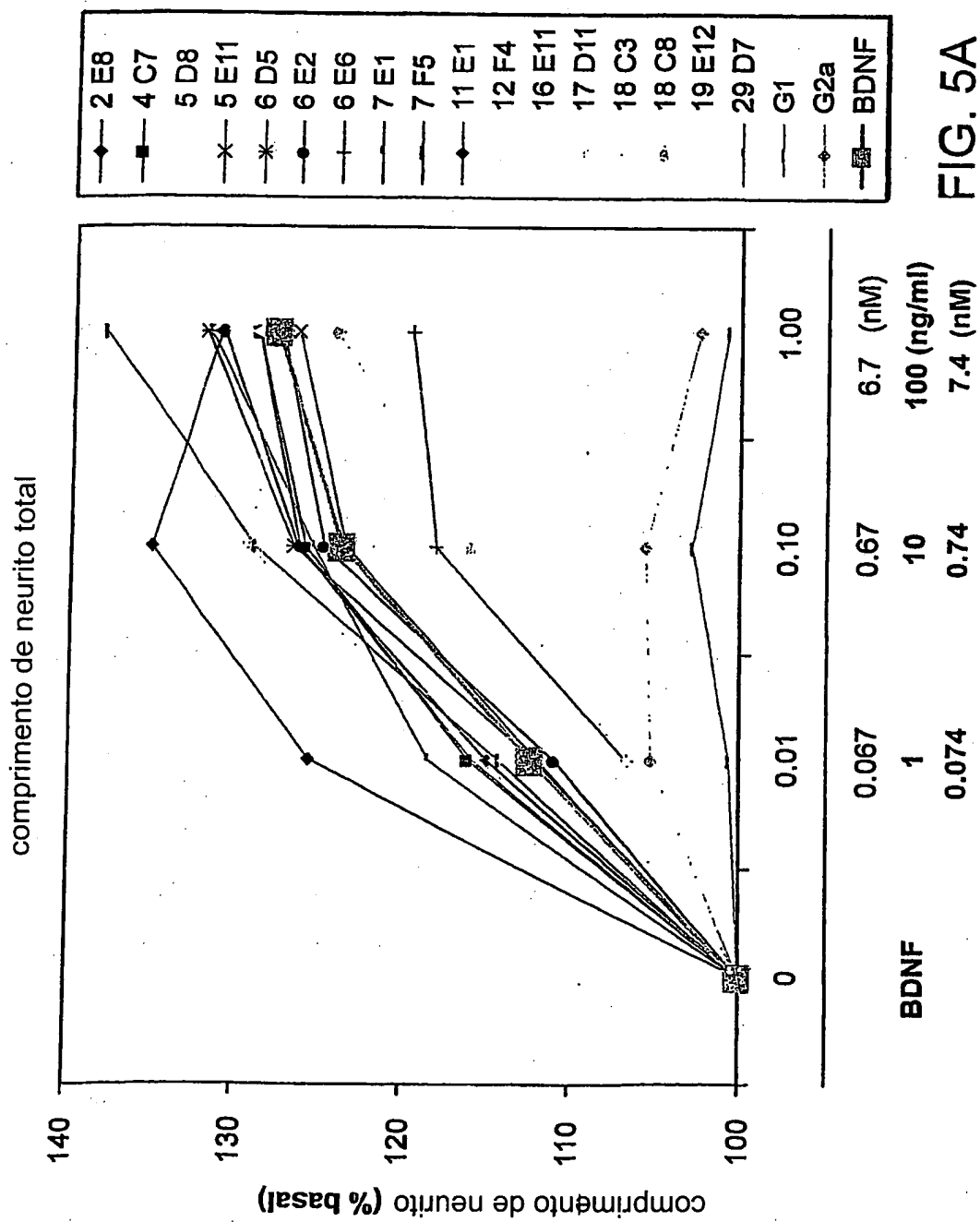
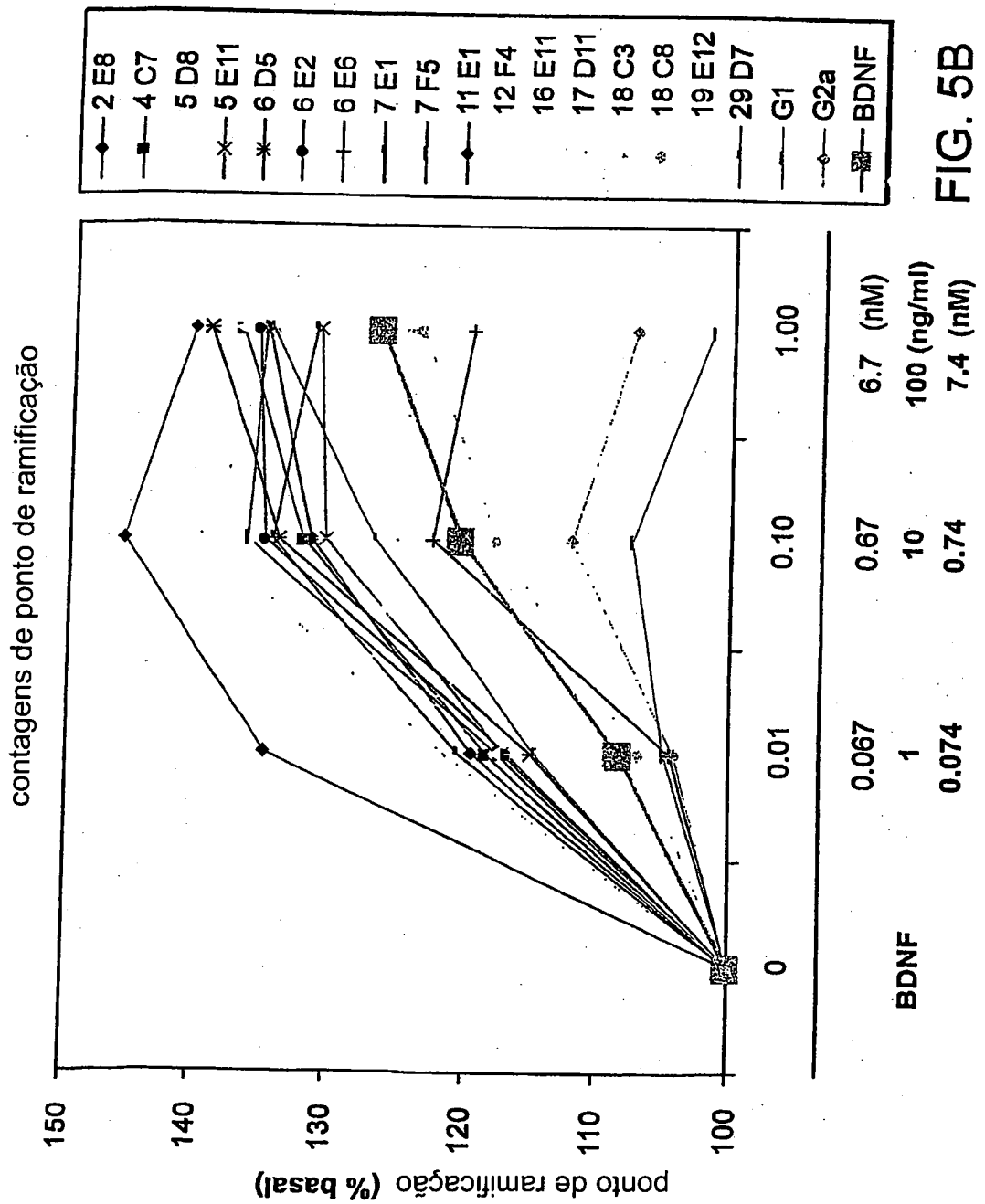


FIG. 4A

	atividade de luciferase	
mAb	Fold inc	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





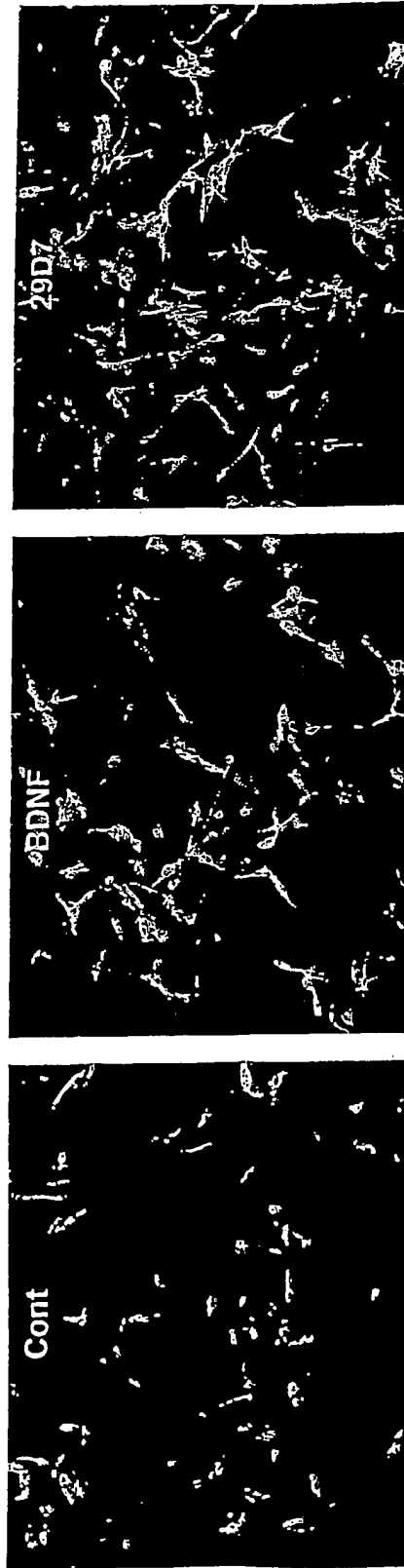
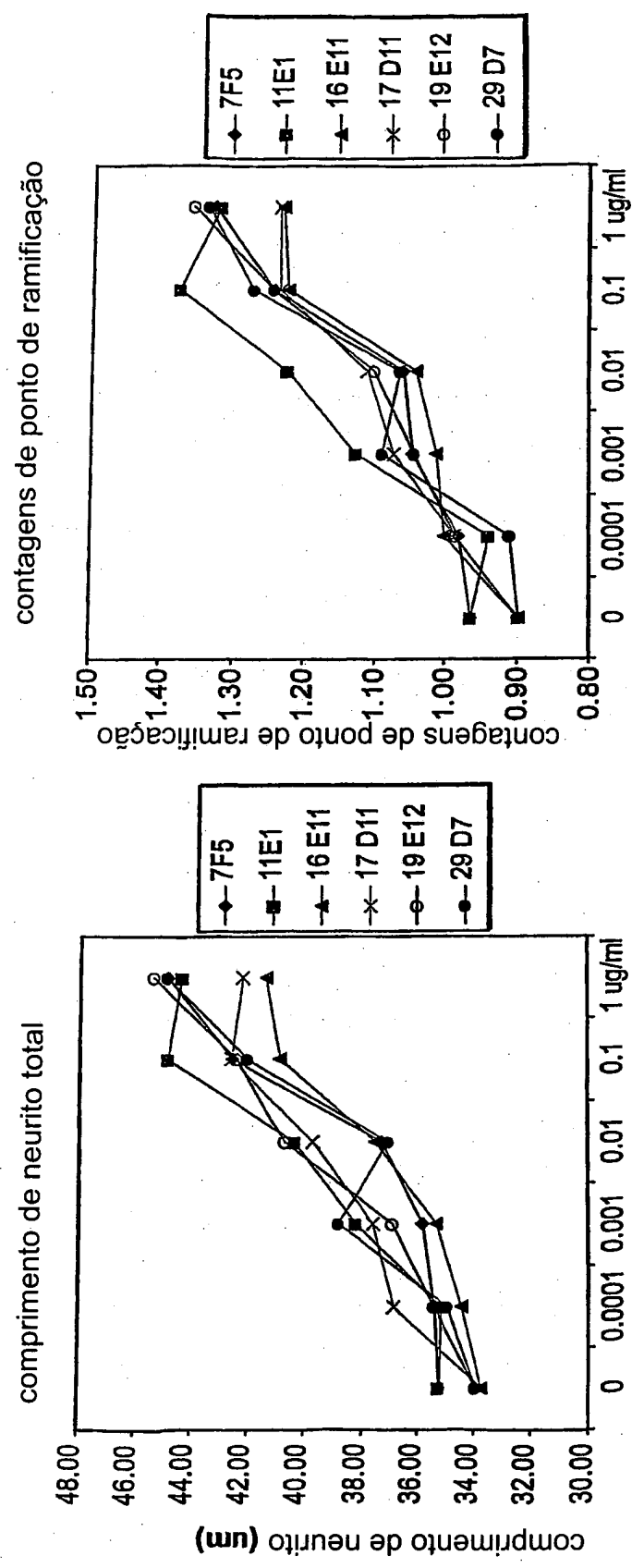


FIG. 5C



	7F5	11E1	16E11	17D11	19E12	29D7
EC50 (nM)	0.26	0.05	0.08	0.06	0.05	0.46

FIG. 5D

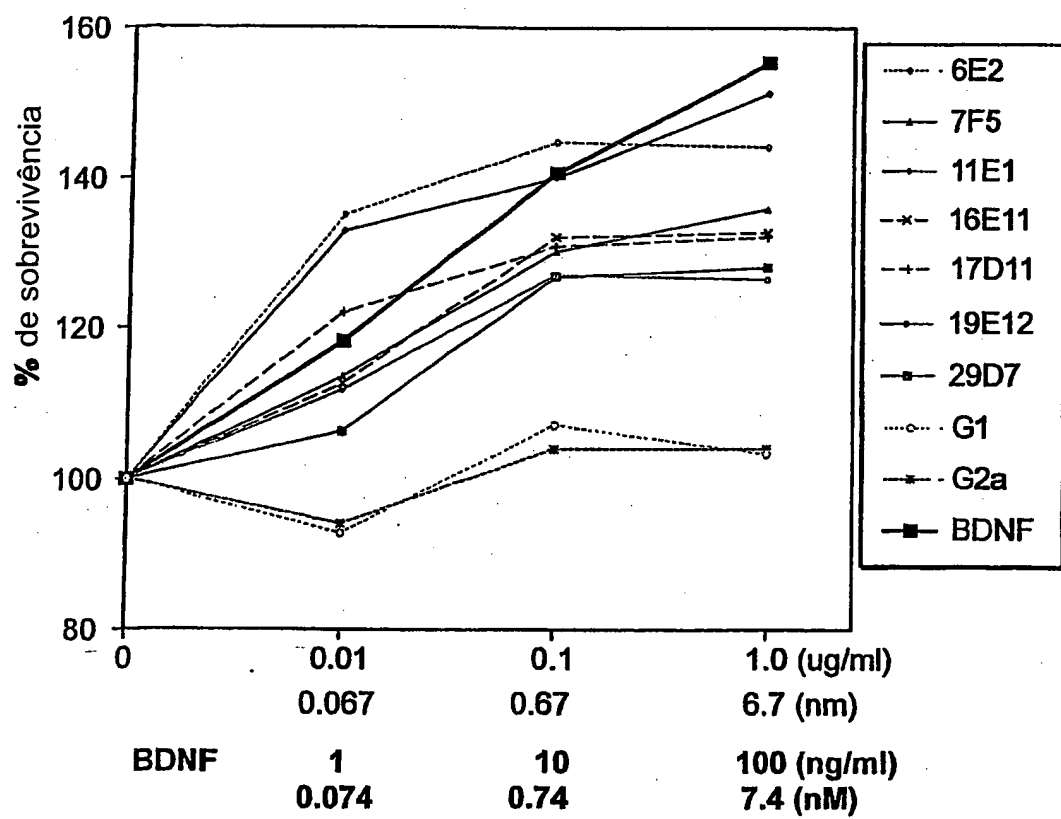


FIG. 6

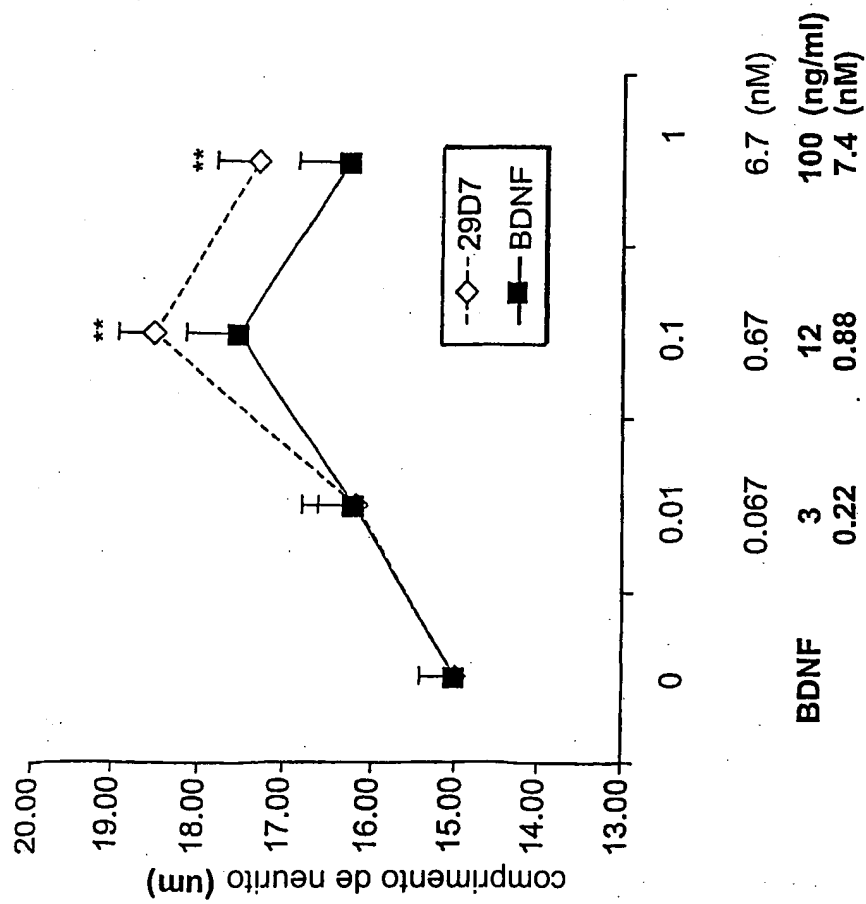


FIG. 7A

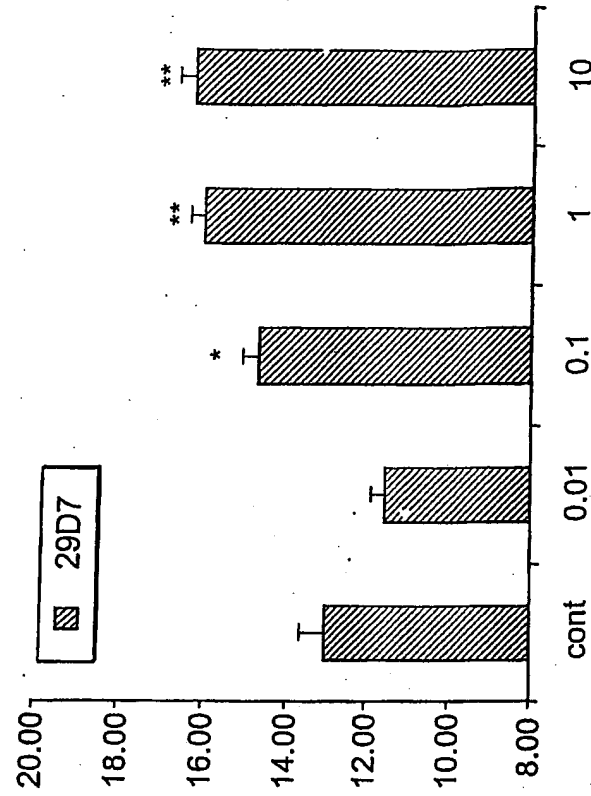


FIG. 7B

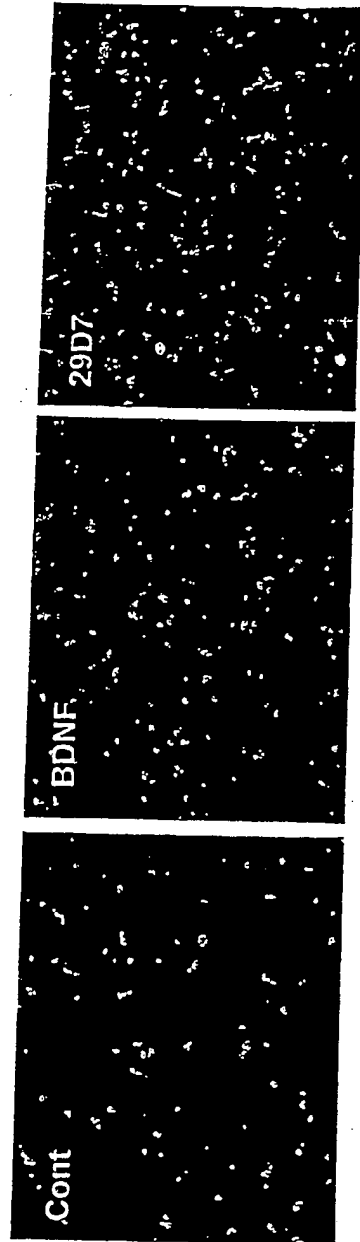


FIG. 7C

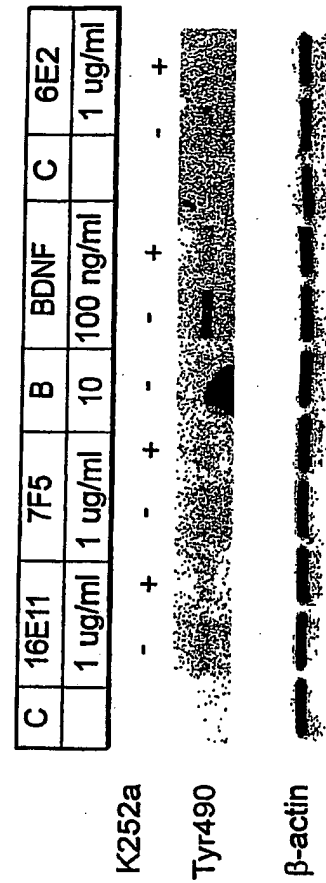
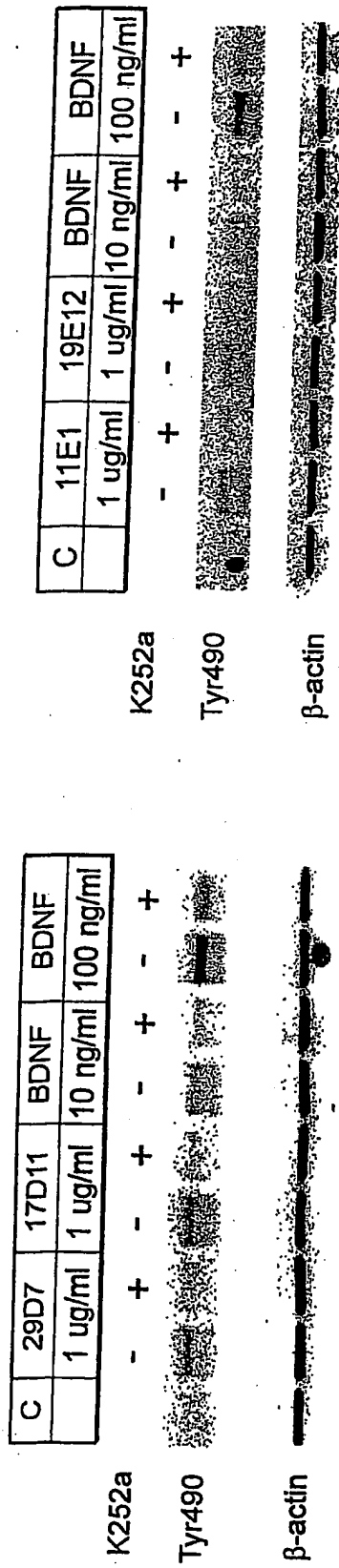


FIG. 8

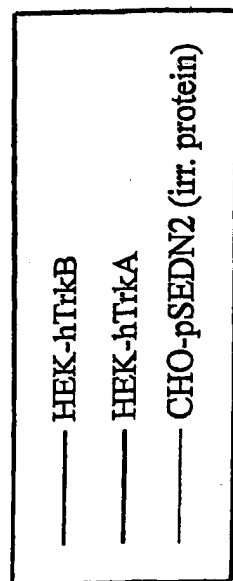
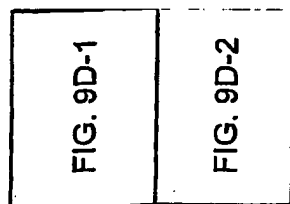


FIG. 9A



17/47

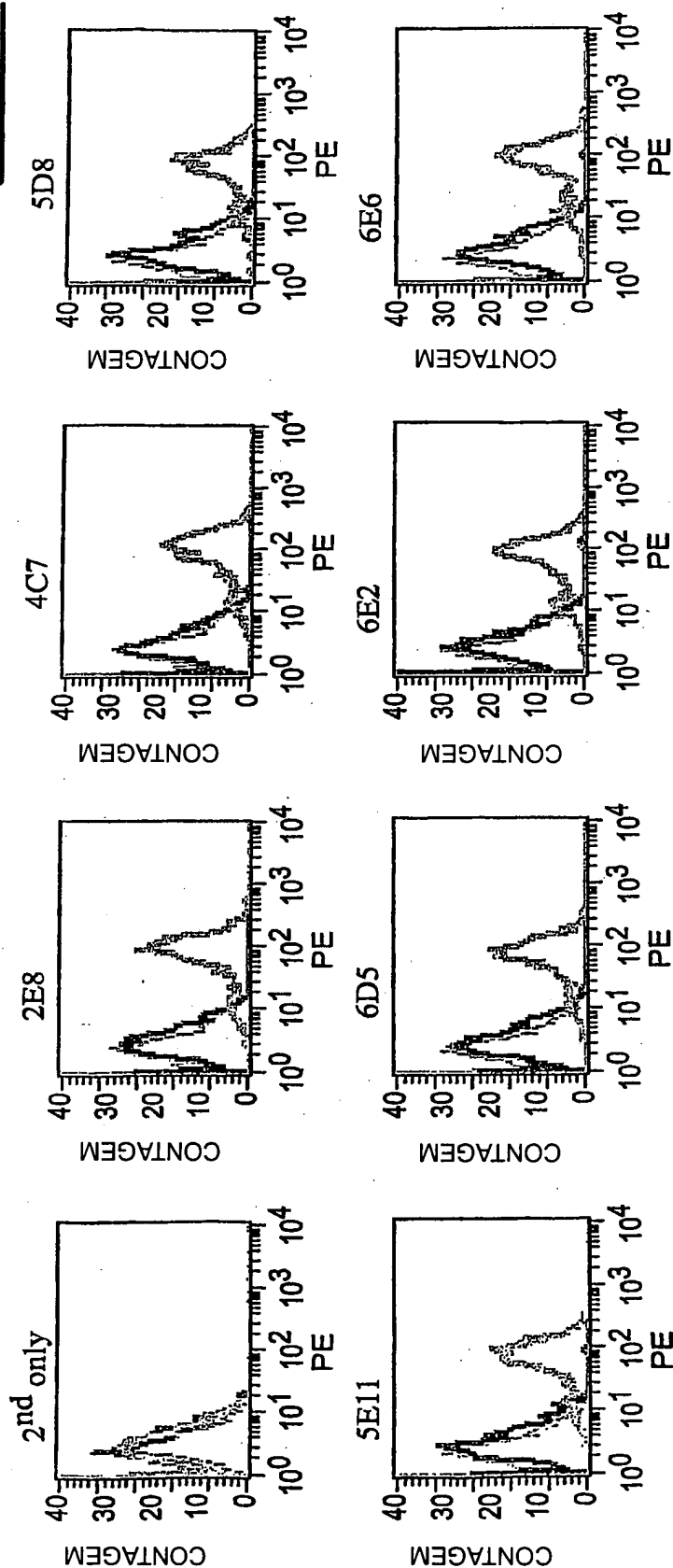


FIG. 9A-1

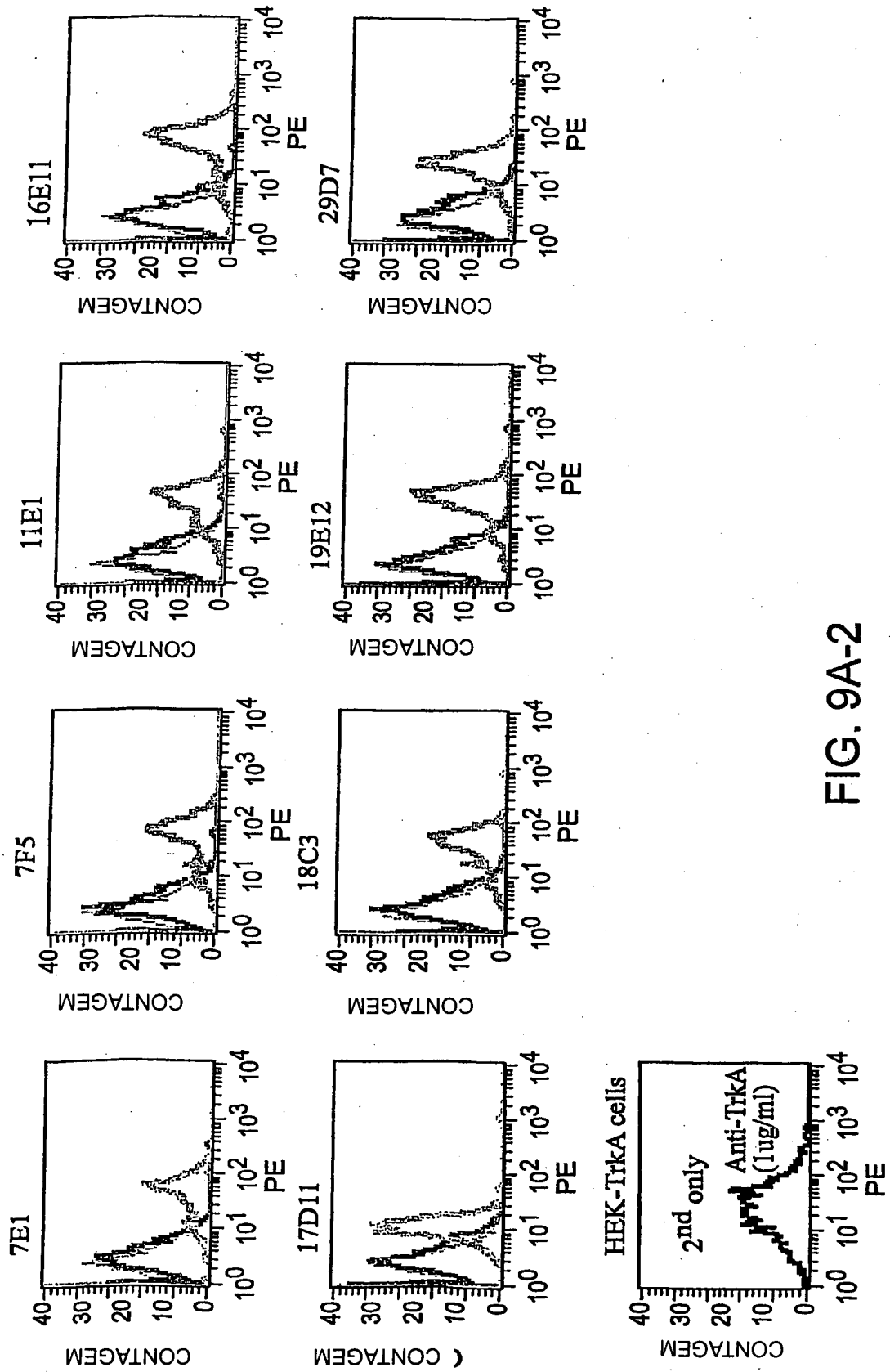


FIG. 9A-2

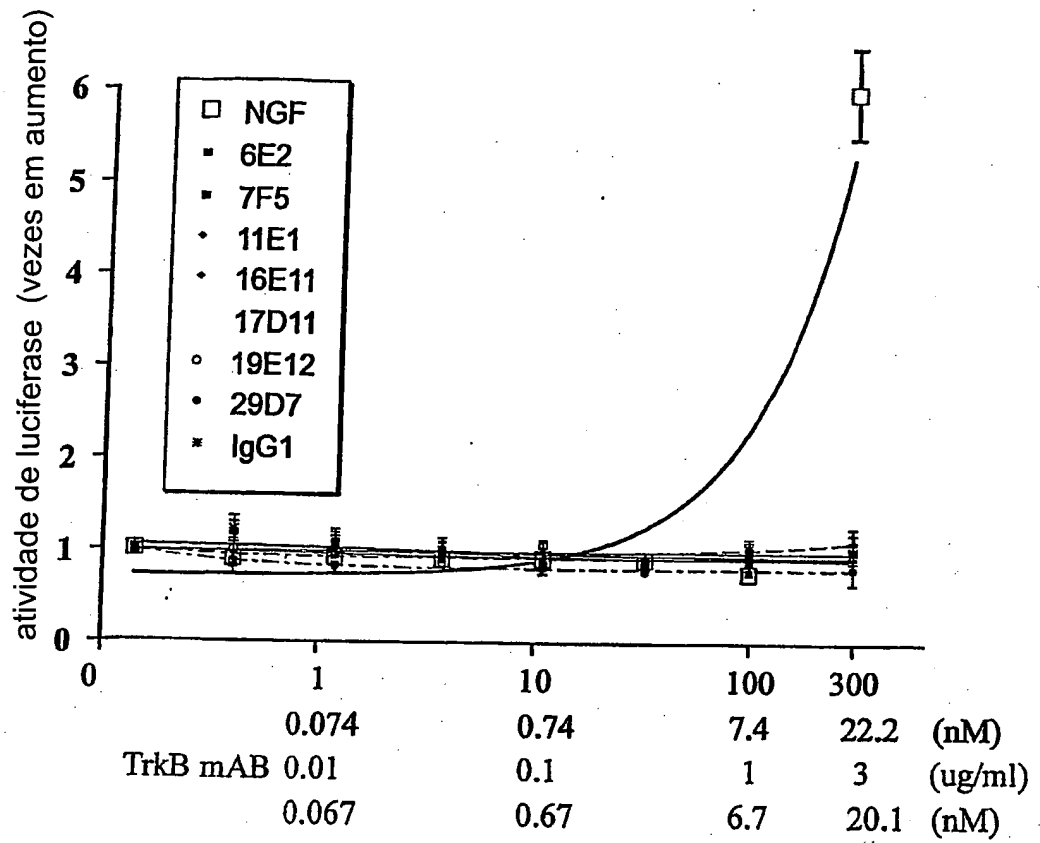


FIG. 9B

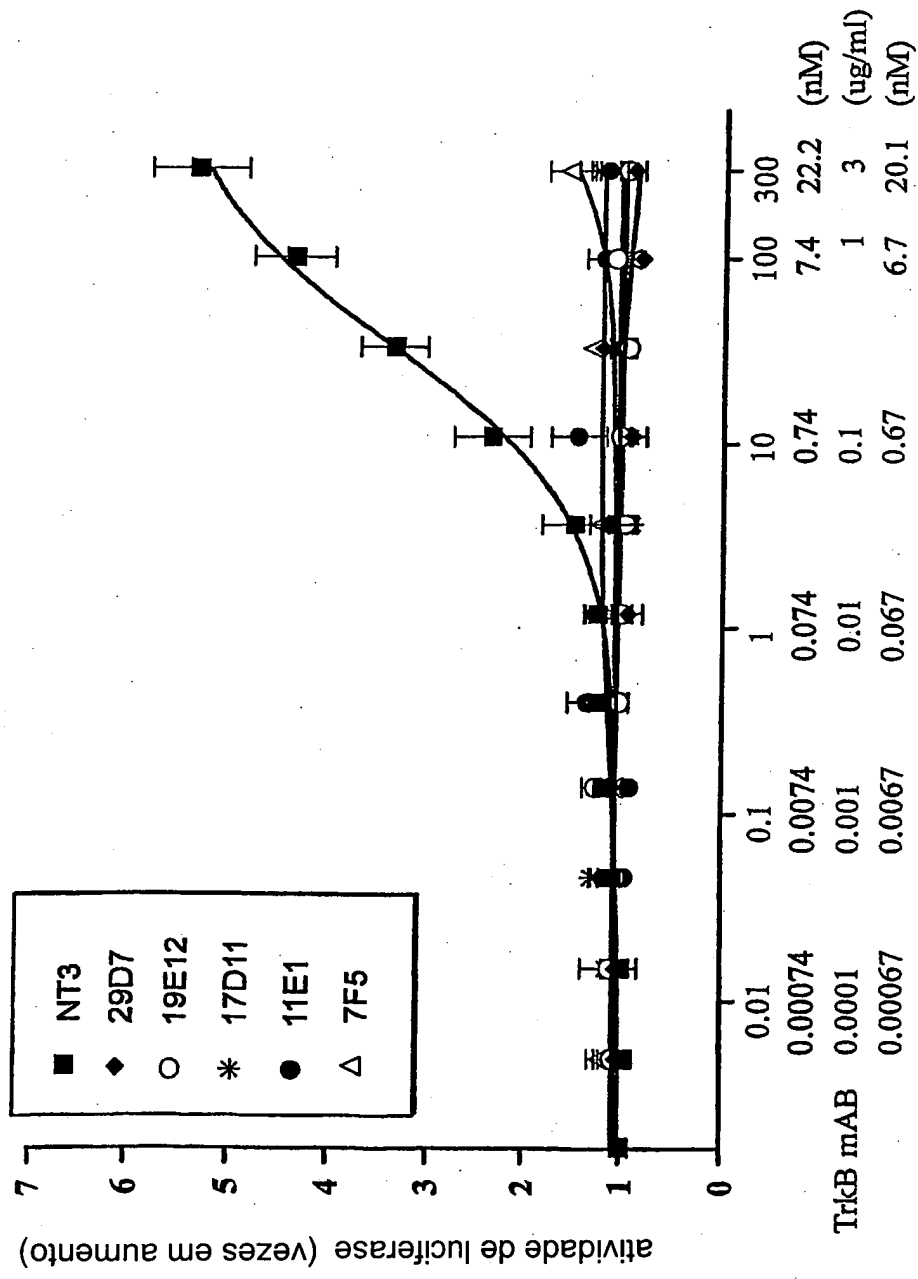


FIG. 10

um modelo de roedor de hipoxia-isquemia neonatal (HI)

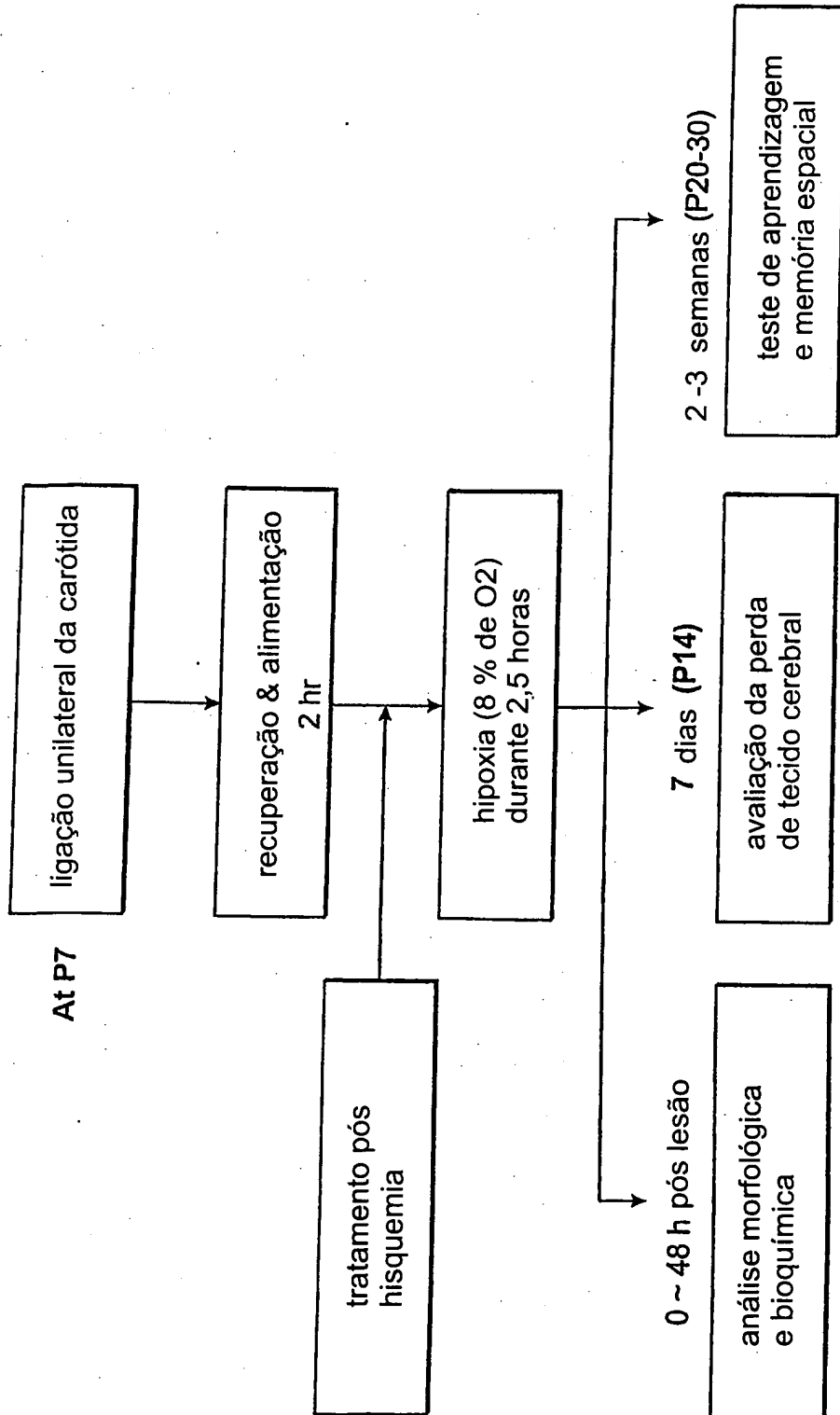


FIG. 11

(TRKB HUMANO GEN BANK ACCESSION NO. NP_006171)

SEQ ID NO:1

```

1  MSSWIRWHGP  AMARLWGFCW  LVVGEWRAAF  ACPTSCKCSA  SRIWCSDPSP  GIVAFPRLEP
61  NSVDPENITE  IFIANQKRLE  IINEDDVEAY  VGLRNLTIIVD  SGLKFVAHKA  FLKNSNLQHI
121  NFTRNKLTSL  SRKHFRHLDL  SELILVGNPF  TCSCDIMWIK  TLQEAKESSPD  TQDLYCLNES
181  SKNIPLANLQ  IPNCGLPAN  LAAPNLTVEE  GKSITLSCSV  AGDPVPNMYW  DVGNLVSKHM
241  NETSHTQGS  L  RITNISSDDS  GKQISCV AEN  LVGEDQDSVN  LTVHFAPTIT  FLESPTSDDH
301  WCIPTFTVKG  N  PKPALQWFYN  GAILNESKYI  CTKIHVTNHT  EYHGCCLQDN  PTHMNNGDYT
361  LIAKNEYGKD  EKQISAHFMG  WPGIDDGANP  NYPDVIYEDY  GTAANDIGDT  TNRSNEIPST
421  DVTDKTGREH  LSVYAVVVIA  SVVGFCLLVM  LFLLLKLARHS  KFGMKDFSWF  GFGKVKSRQG
481  VGPASVISND  DDSASPLHHI  SNGSNTPSSS  EGGPDAVIIG  MTKIPVIENP  QYFGITNSQL
541  KPDTFVQHIK  RHNIIVLKREL  GEGAFGKVFL  AECYNLCPEQ  DKILVAVKTL  KDASDNARKD
601  FHREAELLTN  LQHEHIVKFY  GVCVEGDPLI  MVFEYMKHGD  LNKFLRAHGP  DAVLMAEGNP
661  PTELTQSOML  HIAQQIAAGM  VYLASQHFVH  RDLATRNCLV  GENLLVKIGD  FGMSRDVYST
721  DYYRVGGHTM  LPIRWMPPE  IMYRKFTTES  DVWSLGVVLW  EIFTYKQKPW  YQLSNNEVIE
781  CITQGRVLQR  PRTCPOEVE  LMLGCWQREP  HMRKNIKGIH  TLLQNLAKAS  PVYLDILG

```

FIG. 12

(TRKB DE MURINO - GEN BANK ACCESSION NO. P15209)

SEQ ID NO:2

```

1 MSPWLKWHGP AMARLWGLCL LVLGFWRASL ACPTSCKCSS ARIWCTEPPSP GIVAFPRLEP
61 NSVDPENITE ILIANQKRLE IINEDDVEAY VGLRNLTIVD SGLKFVAYKA FLKNSNLRHI
121 NFRNKLTSL SRRHFRHLDL SDLILTGPNF TCSCDIMWLK TLQETKSSPD TQDLYCLNES
181 SKNMPLANLQ IPNCGLP SAR LAAPNLTVEE GKSVTLSCSV GGDPLPTIYW DVGNLVSKHM
241 NETSHTQGS L RITNISSDDS GKQISCAVEN LVGEDQDSVN LTVHFAPTIT FLESPTSDDH
301 WCIPTTVRGN PKPALQWFYN GAILNESKYI CTKIHVTNHT EYHGCLQLDN PTHMNNGDYT
361 LMAKNEYGKD ERQISAHFMG RPDVDYETNP NYPEVLYEDW TTPTDIGDIT NKSNEIPSTD
421 VADQSNREHL SVYAVVVIAS VVGFCLLVML LLLKLARHSK FGMKGPASVI SNDDDSASPL
481 HHISNGSNTP SSSEGGPDV IIGMTKIPVI ENPOYFGITN SQLKPDTFVQ HIKRHNIVLK
541 RELGEGAFGK VFLAECYNLC PEQDKILVAV KTLKDASDNA RKDFHREAEL LTNLQHEHIV
601 KFYGVCEVD PLIMVFEYMK HGDNLKFLRA HGPDAVLMAE GNPPTELTQS QMLHIAQQIA
661 AGMVYLASQH FVHRDLATRN CLVGENLLVK IGDFGMSRDV YSTDYRVRVG HTMLPIRWMP
721 PESIMYRKFT TESDVWSLGV VLWEIFTYCK QPWYQLSNNE VIECITQGRV LQRPRTCPQE
781 VYELMLGCWQ REPHTRKNIK SIHTLLQNLA KASPVYLDIL G

```

FIG. 13

TRKB DE - GEN BANK ACCESSION NO. NP_036863)
 (RATO

SEQ ID NO:3

```

1 MSPWPRWHGP AMARLWGLCL LVLGFWRASL ACPMSCKCST TRIWCTEPP GIVAFPRLEP
61 NSIDPENITE ILIANQKRLE IINEDDVEAY VGLKNLTIVD SGLKFVAYKA FLKNGNLRHI
121 NFRNKLTSL SRRHFRHLDL SDLILTGPF TCSCDIMWLK TLQETKSSPD TQDLYCLNES
181 SKNTPLANLQ IPNCGLP SAR LAAPNLTVEE GKSVTISCSV GGDPLPTLYW DVGNLVSKHM
241 NETSHTQGS L RITNISSDDS GKQISCAEN LVGEDQDSVN LTVHFAPTIT FLESPTSDDH
301 WCIPTFVRGN PKPALQWFYN GAILNESKYI CTKIHVTNHT EYHGCLQLDN PTHMNNGDYT
361 LMAKNEYGKD ERQISAHFMG RGVVDYETNP NYPEVLVEDW TTPTDIGDTT NKSNEIPSTD
421 VADQTNREHL SVYAVVVIAS VVGFCLLVML LLLKLARHSK FGMKGPASVI SNDDDSASPL
481 HHISNGSNTF SSSEGGPDV IIGMTKIPVI ENPOYFGITN SOLKPDTFVQ HIKRHNIVLK
541 RELGEGAFGK VFLAECYNLC PEQDKILVAV KTLKDAASNA RKDFHREAEL LTNLQHEHIV
601 KEYGVCVEGD PLIMVFEYMK HGDLNKF LRA HGPDAVLMAE GNPTELTQS QMLHIAQQIA
661 AGMVYLASQH FVHRDLATRN CLVGENLLVK IGDFGMSRDV YSTDYRVRGG HTMLPIRWMP
721 PESIMYRKFT TESDVWSLGV VLWEIFTYCK QPWYQLSNE VIECITQGRV LQRPRTCPQE
781 VYELMLGCWQ REPHTRKNIK NIHTLLQNL A KASPVYLDIL G

```

FIG. 14

TRKB DE
 (GALINHA - GEN BANK ACCESSION NO. CAA54468)

SEQ ID NO:4

```

1  MVSRRRRPGP GLARLWGLCC LVLGCWRGAL GCPASCRCSS WRIWCSEVPV GITSFPVPQR
61  STEDDNVTEI YIANQRKLES INDNEVGFYV GLKNLTVVDS GLRFVSRQAF VKNINLOYIN
121 ISRNKLSSLS KKPFRHLGLS DLILVDNPFK CSCEIMWIKK FQETKFYTEA QDIYCVDDNN
181 KRIALMDMKV PNCDLPSANL SNYNITVVEG KSITLYCDTT GGPPPNVSWV LTNLVSNNHES
241 DTSKNPASLT IKNVSSMDSG LWISCV AENI VGEVQTS AEL TVFFAPNITF IESPTPDHHW
301 CIPFTVKGNP KPTLQWFYEG AILNESEYIC TKIHVINQSE YHGCLQLDNP THLNNGAYTL
361 LAKNEYGEDE KRVD AHFMSV PGDGS GPIVD PDVY EYETTP ND LGDTT NNS NQITSPDVSN
421 KENEDSITVY VVGIAALVC TGLVIMLIIL KFG R HSKFGM KGPSSVISND DDSASPLHHI
481 SNGSNTPSSS EGGPD AVIIG MTKIPVIENP QYFGITNSQL KPDTFVQHIK RHNIVLKREL
541 GEGAFGKVFL AECYNLCPEQ DKILVAVKTL KDASDNARKD FHREAELLTN LQEHIVKFY
601 GVCVEGDPLI MVFEYMKHGD LNKFLRAHGR DAVLMAEGNR PAELTQSQML HIAQQIAAGM
661 VYLASQHFVH RDLATRNC LV GENLLVKIGD FGMSRDVYST D YRVGGHTM LPIRWMPPES
721 IMYRKFTTES DVWSLG VVLW EIFTY GKQPW YQLSNNEVIE CITQGRVLQR PRTCPEVYD
781 LMLGCWQREP HMR LNIKEIH SLLQN LAKAS PVYLDILG

```

FIG. 15

(TRKA
HUMANO - GEN BANK ACCESSION NO. NP_002520)

SEQ ID NO:5

```

1  MLRGRRGQL  GWSWAAGPG  SLLAWLILAS  AGAAPCPDAC  CPHGSSGLRC  TRDGALDSLH
61  HLPGAENLTE  LYIENQOHLQ  HLELRDLRGL  GELRNITIVK  SGLRFVAPDA  FHFTPRLSRL
121 NLSFNALESL  SWKTVQGISL  QELVLSGNPL  HCSCALRWLQ  RWEEEGLGGV  PEQKLOCHGQ
181 GPLAHMPNAS  CGVPTLKVVQ  PNASVDVGDD  VLLRCQVEGR  GLEQAGWILT  ELEQSATVMK
241 SGGLPISLGLT  LANVTSDLNR  KNVTCWAEND  VGRAEVSQV  NVSFPASVQL  HTAVEMHHWC
301 IPFSVDGQPA  PSLRWLNGS  VLNETSFIFT  EFLEPAANET  VRHGCLRINQ  PTHVNNNGNYT
361 LLAANPFGQA  SASIMAAFMD  NPFEFNPEDP  IPVSFSPVDT  NSTSGDPVEK  KDETPEFGVSV
421 AVGLAVFACL  FLSTLLVLN  KCGRRNKFGI  NRPAVLAPED  GLAMSLHFT  LGSSLSLTE
481 GKSGGLQCHI  IENPOYFSDA  CVHHIKRRDI  VLKWELEGGA  FGKVFIAECH  NLLPEQDKML
541 VAVKALKEAS  ESARQDFQRE  AELLTMLQHQ  HIVRFFGVCT  EGRPLLNVFE  YMRHGDINRE
601 LRSHGPDACL  LAGGEDVAPG  PLGLGQLLAV  ASQVAAGMVY  LAGLHFVHRD  LATRNCLVQ
661 GLVVKIGDFG  MSRDYIYSTDY  YRVGGRTMLP  IRWMPESIL  YRKFTTESDV  WSFGVVLWEI
721 FTYGKQPWYQ  LSNTAIDCI  TQGRELERPR  ACPPEVYAIM  RGCWQREPQ  RHSIKDVHAR
781 LQALAQAPPV  YLDVLG

```

FIG. 16

TRKC
(HUMANO - GEN BANK ACCESSION NO. Q16288)

SEQ ID NO:6

```

1 MDVSLCPAKC SFWRIFLLGS VWLDYVGSVL ACPANCVCSK TEINCRRPDD GNLFPILLEGO
61 DSGNSNGNAN INITDISRNI TSIHIENWRS LHTLNAVDME LYTGLOKLT I KNSGLRSIQP
121 RAFAKNPHLR YINLSSNRLT TLSWQLFQTL SLRELQLEQN FFNCSCDIRW MQLWQEQGEA
181 KLSQNLYCI NADGSQPLPF RMNISQCDLP EISVSHVNL VREGDNAVIT CNGSGSPLPD
241 VDWIVTGLQS INTHQTNLW TNVHAINLTL VNVTSEDNGF TLT'CIAENVV GMSNASVALT
301 VYYPPRVVSL EEPELRLEHC IEFVVRGNPP PTLHWLHNGO PLRESKIIHV EYYQEGEISE
361 GCLLENKPTH YNNGNYTLIA KNPLGTANQT INGHLKEPF PESTDNFILE DEVSPPTPIT
421 VTHKPEEDTF GVSIAVGIAA FACVLLVLF VMINKYGRRS KFGMKGPVAV ISGEEDSASP
481 LHHINHGIT PSSLDAGPDT VVIGMTRIPV IENPQYFRQG HNCCHKPDTYV QHIKRRDIVL
541 KRELGEAGFG KVFLAECYNL SPTKDKMLVA VKALKDPTLA ARKDFQREAE LLTNLQHEHI
601 VKFYGVCGDG DPLIMVFEYM KHGDLNKFLR AHGPDAMILV DGQPRQAKGE LGLSQMLHIA
661 SQIASGMVYL ASQHFVHRDL ATRNCLVGAN LLVKIGDFGM SRDVYSTDY RLFNPSGNDF
721 CIWCEVGGHT MLPIRWMPPE SIMYRKFTTE SDVWSFGVIL WEIFTYKQP WFQLSNTTEVI
781 ECITQGRVLE RPRVCPKEVY DVMLGCWQRE PQORLNKEI YKILHALGKA TPIYLDILG

```

FIG. 17

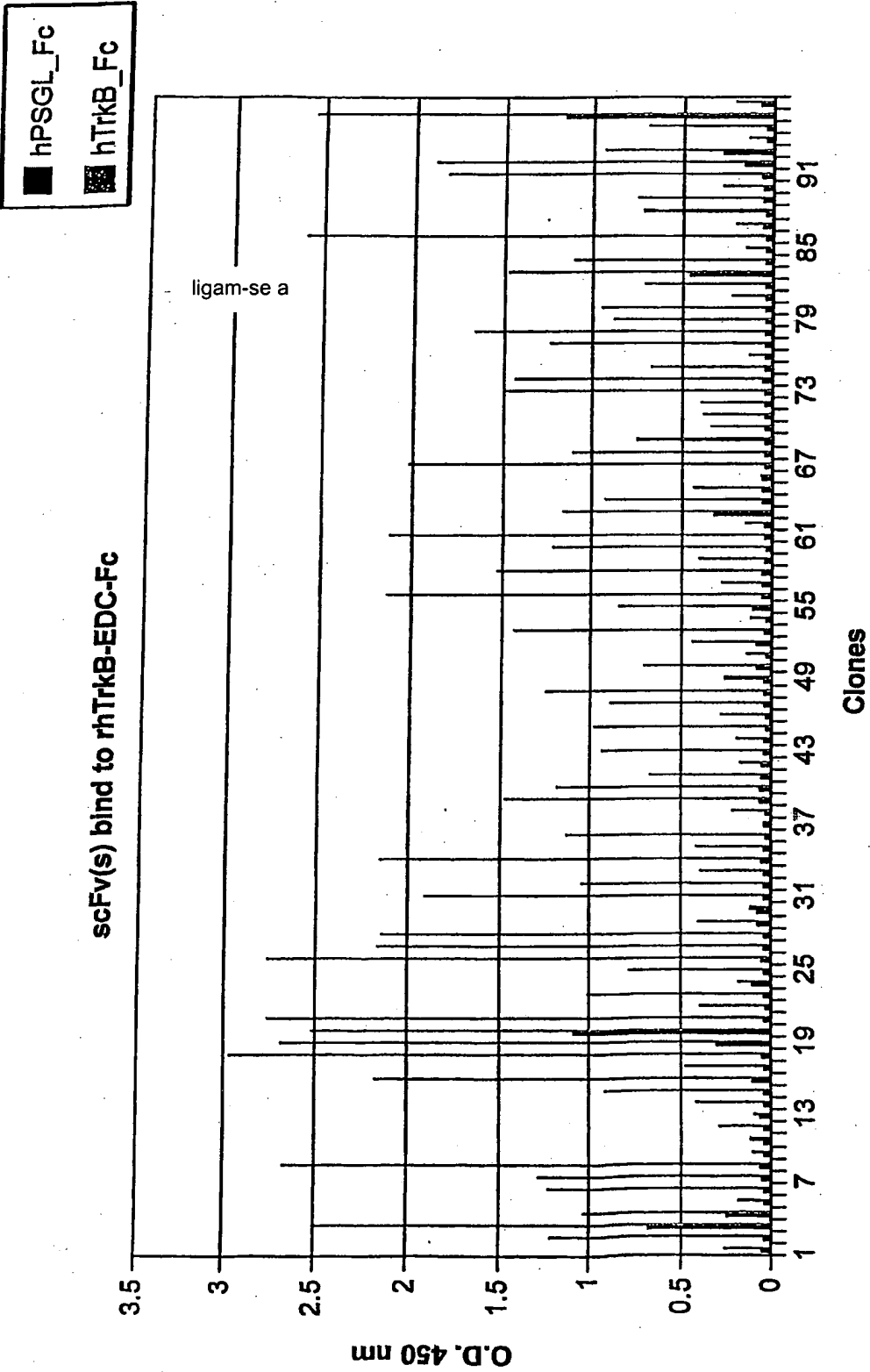


FIG. 18

FIG. 19A
FIG. 19B
FIG. 19C
FIG. 19D

FIG. 19

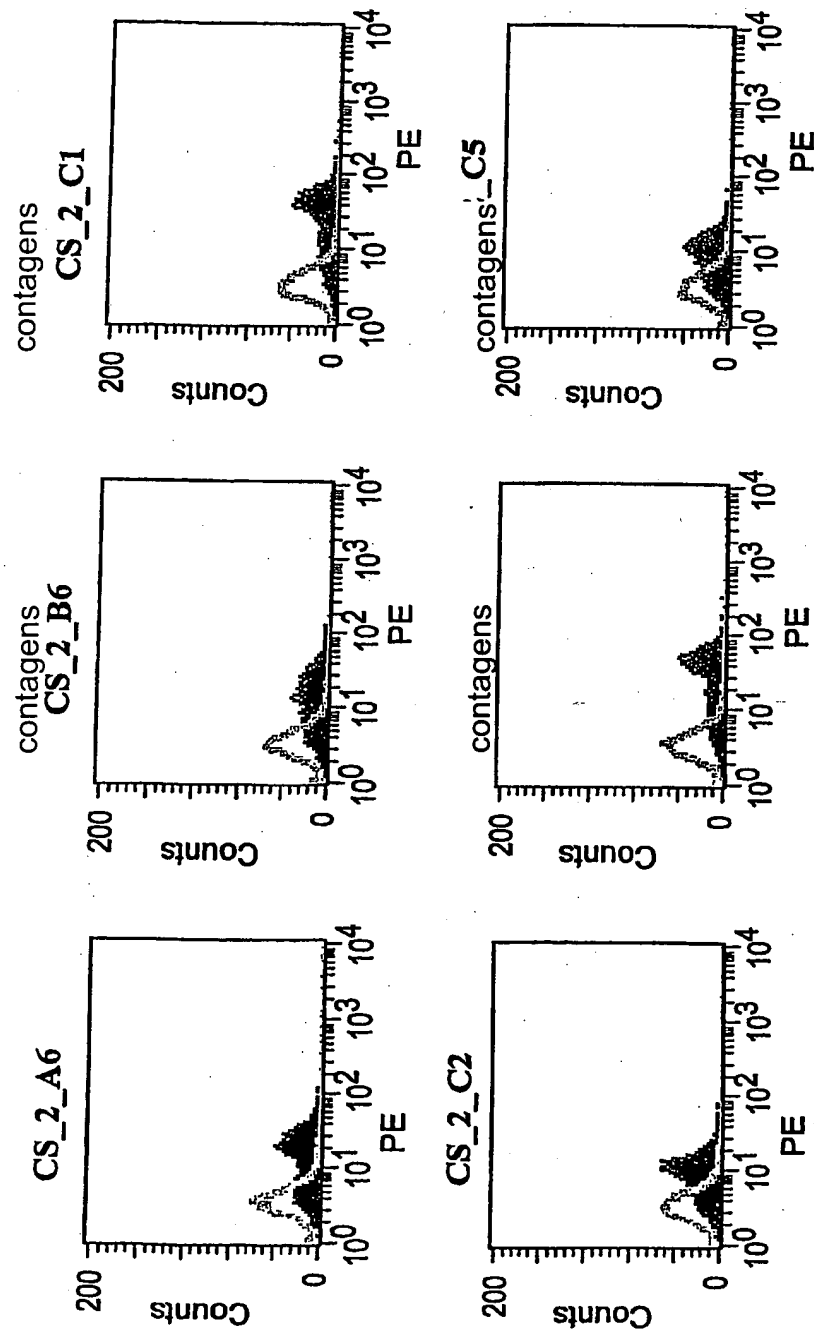


FIG. 19A

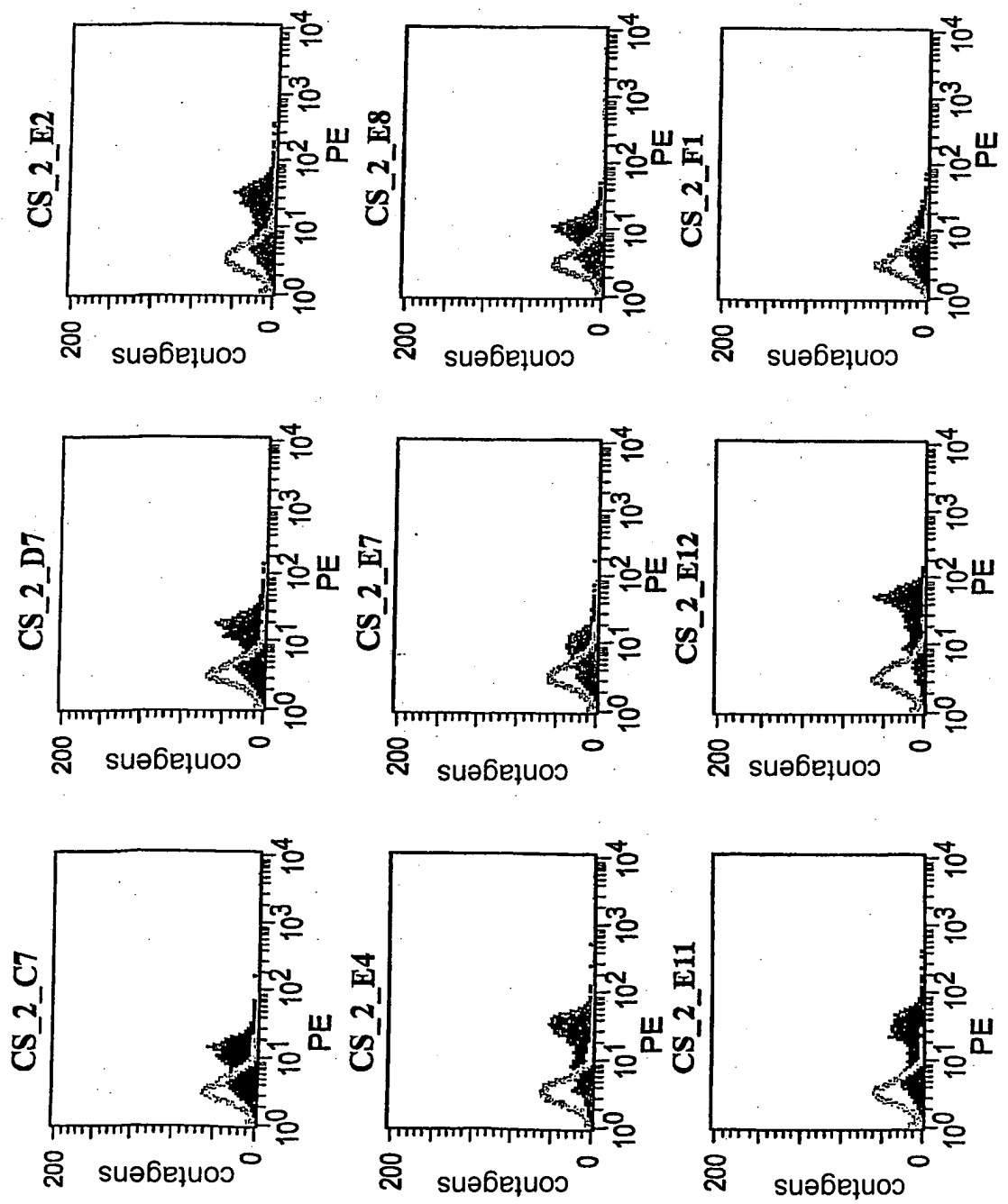


FIG. 19B

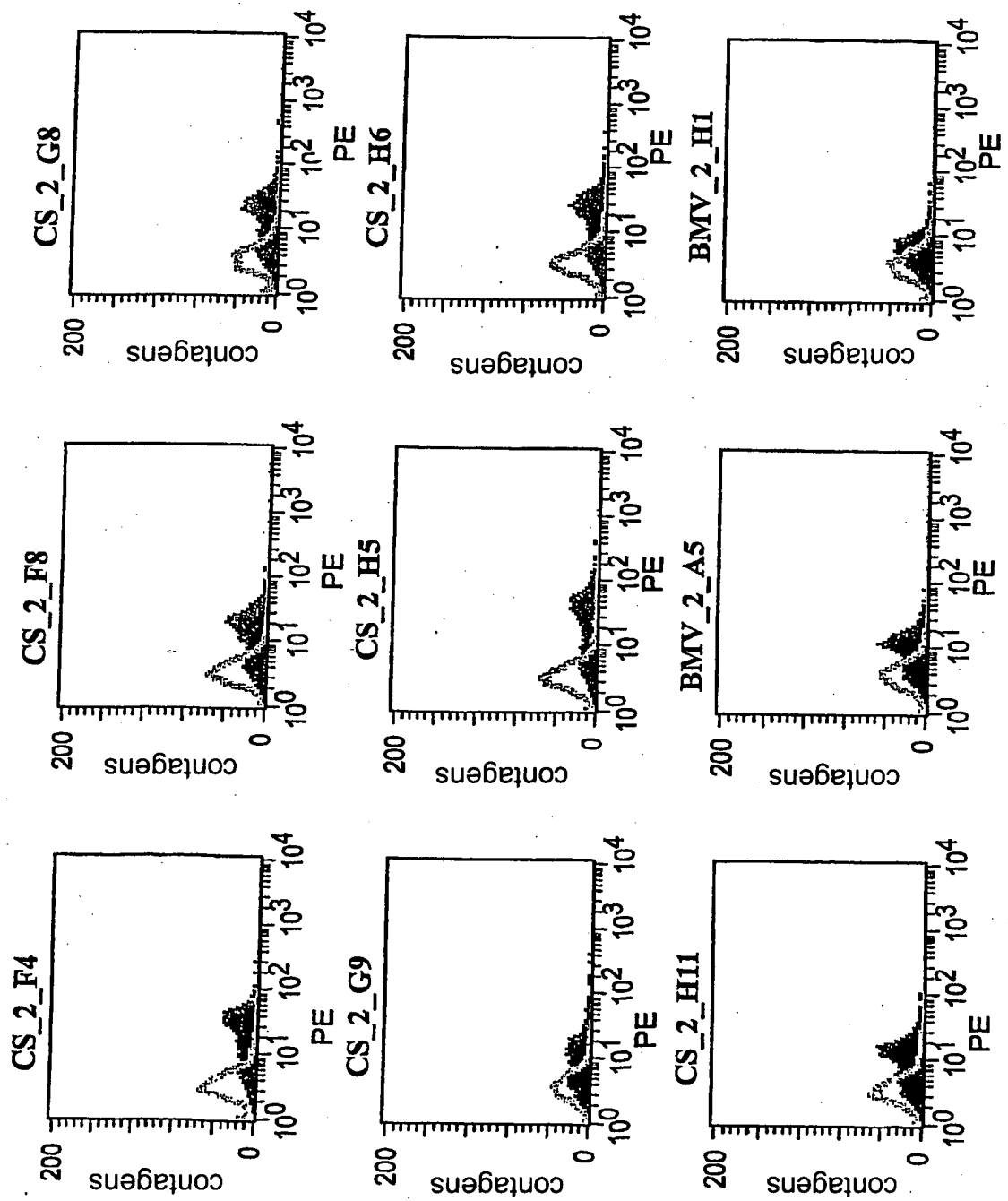


FIG. 19C

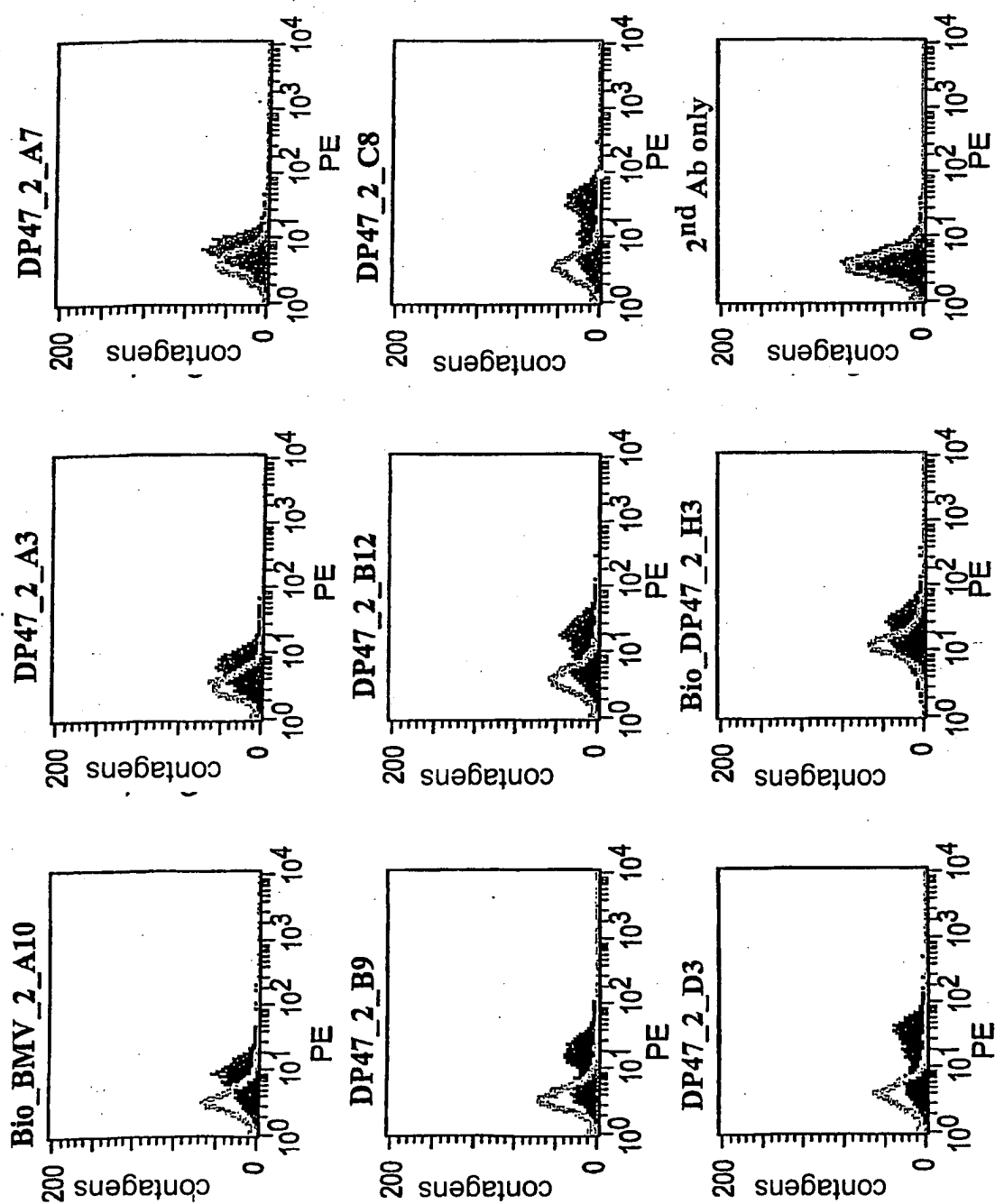


FIG. 19D

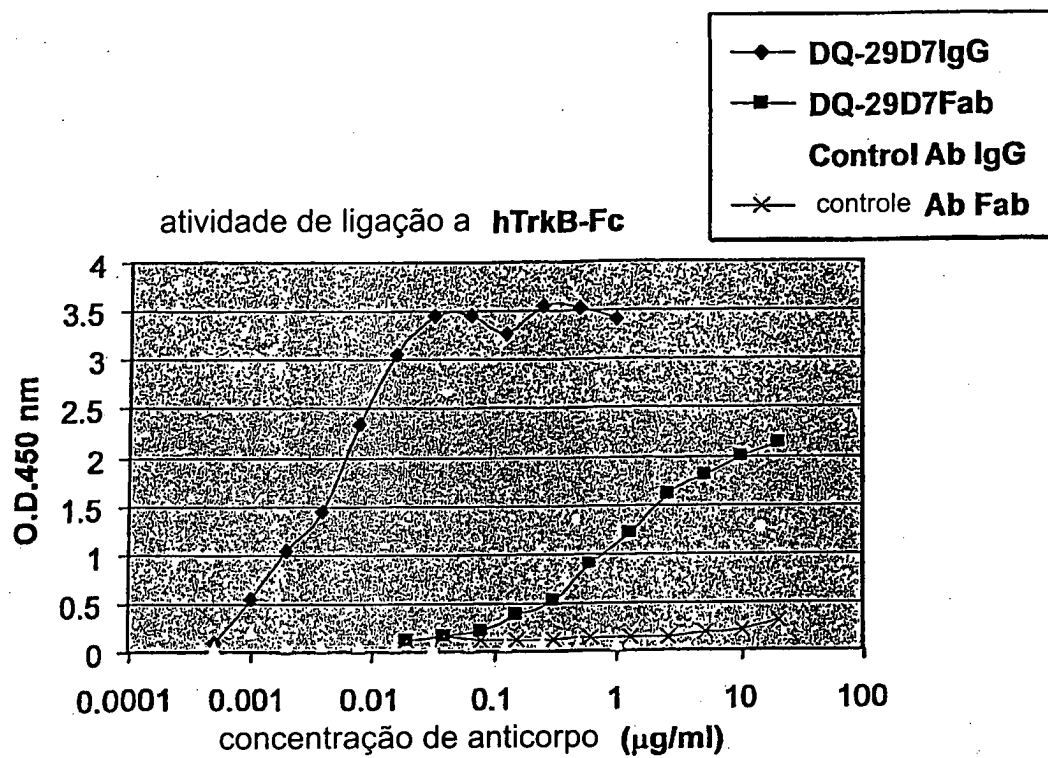


FIG. 20A

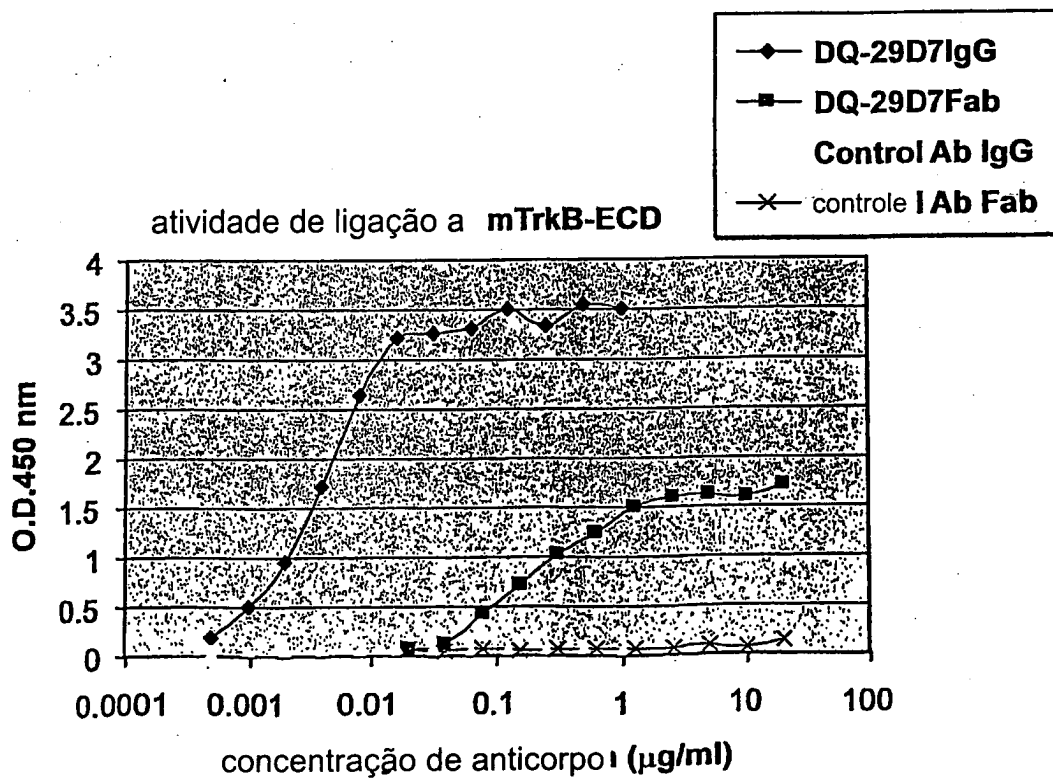


FIG. 20B

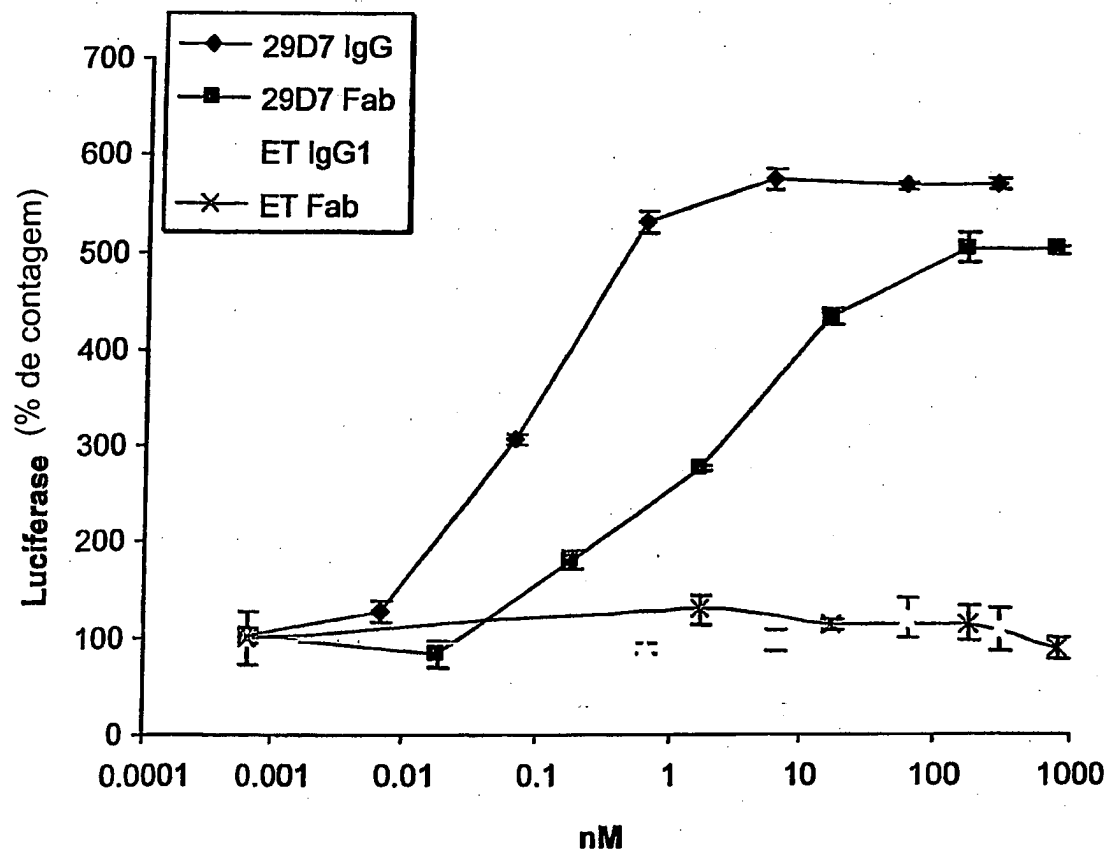


FIG. 21

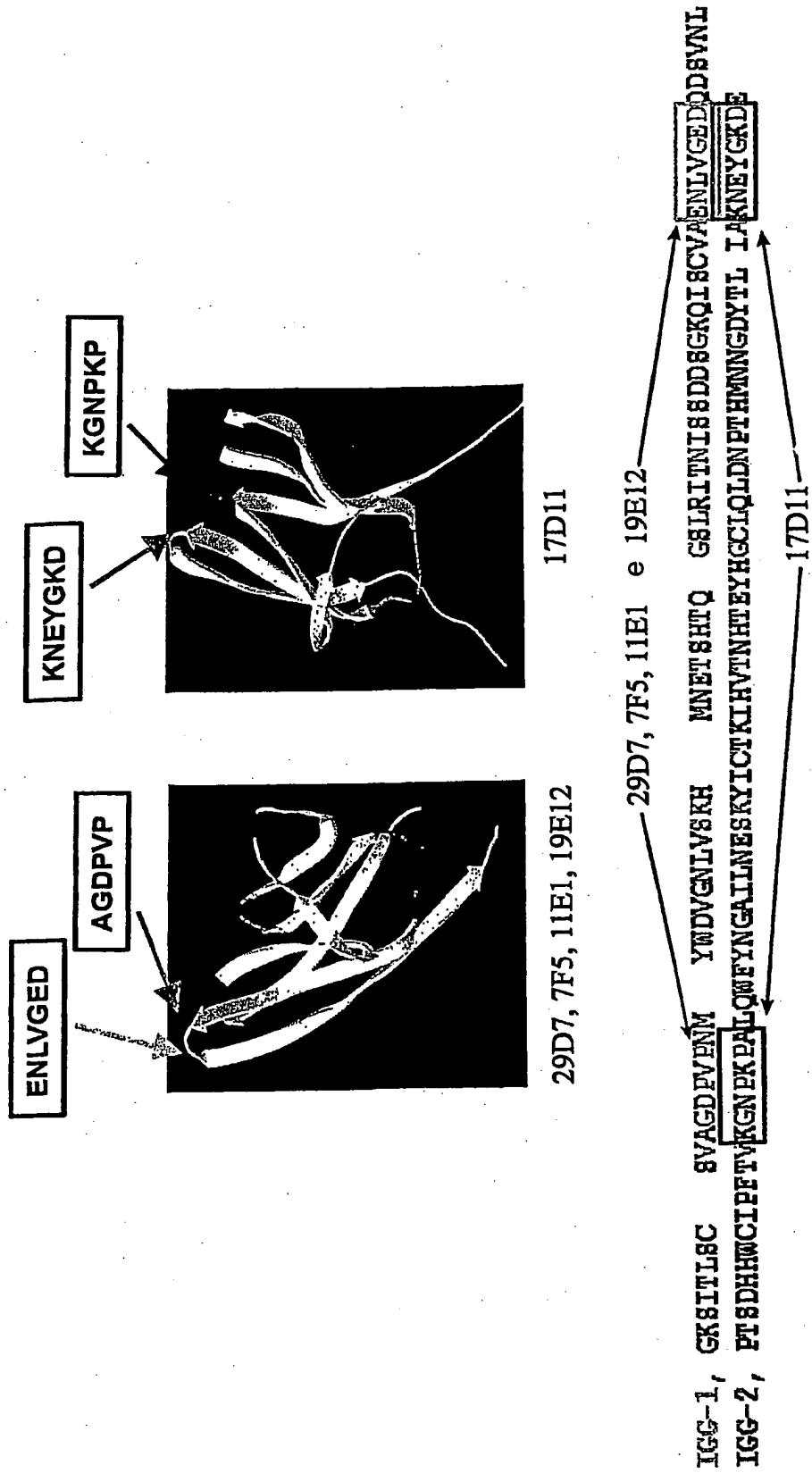


FIG. 22



FIG. 23

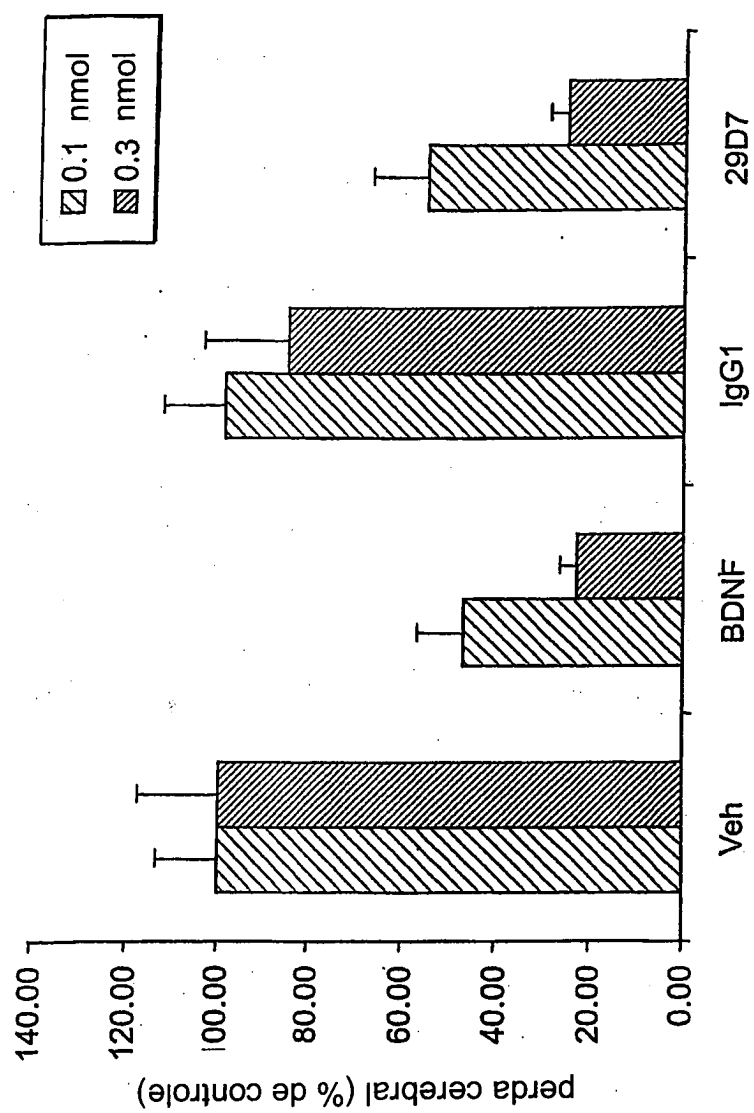


FIG. 24A

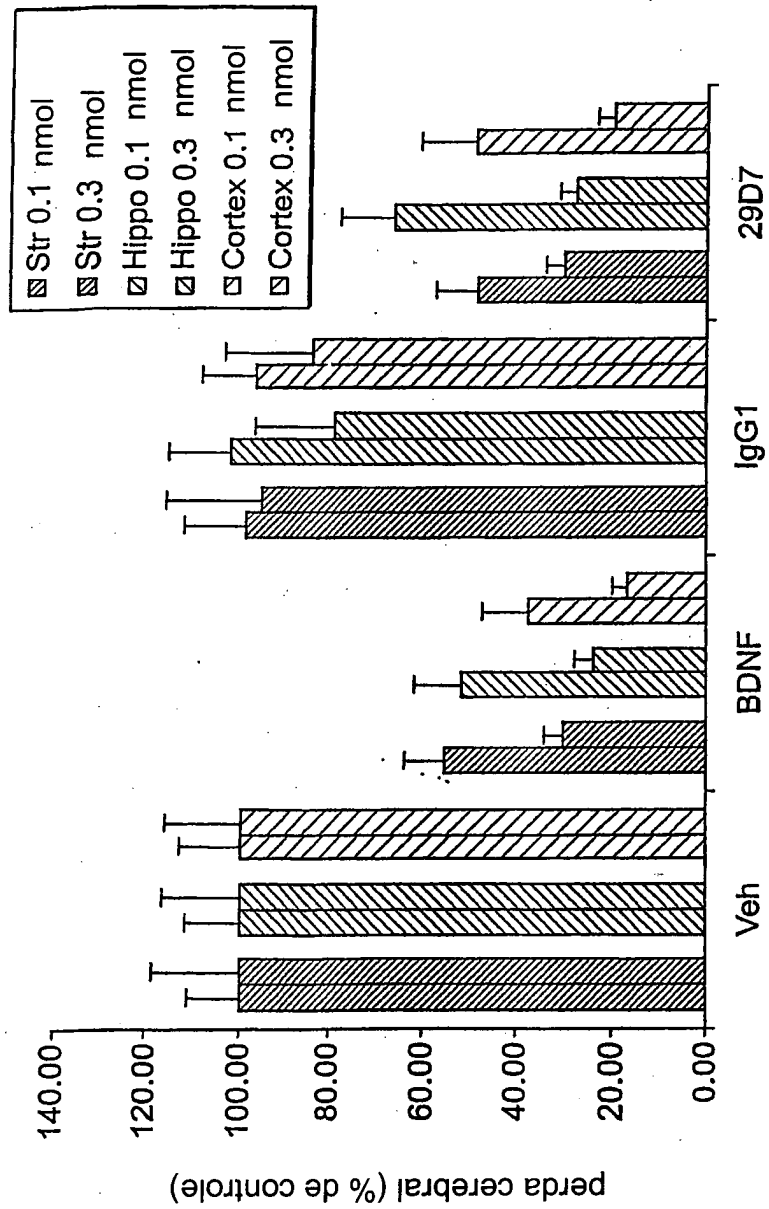


FIG. 24B

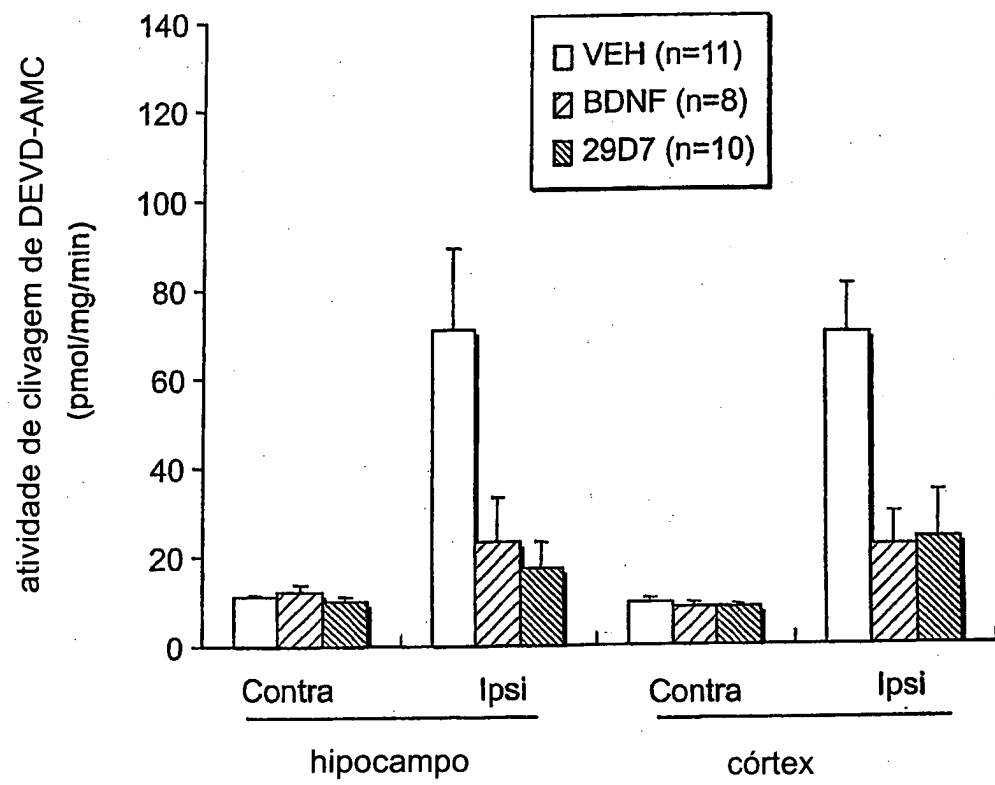


FIG. 25



FIG. 26

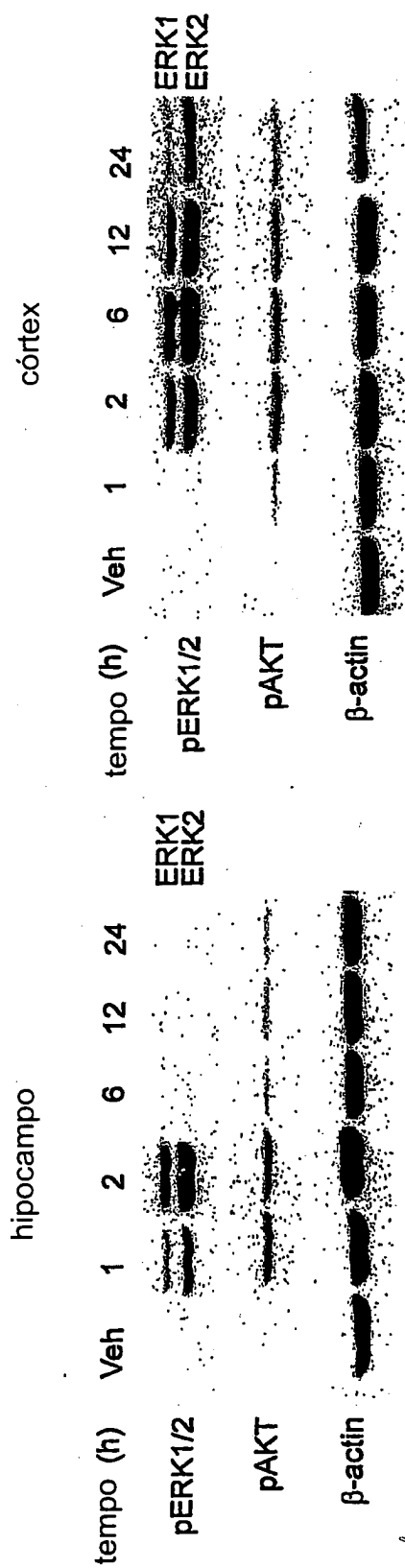


FIG. 27

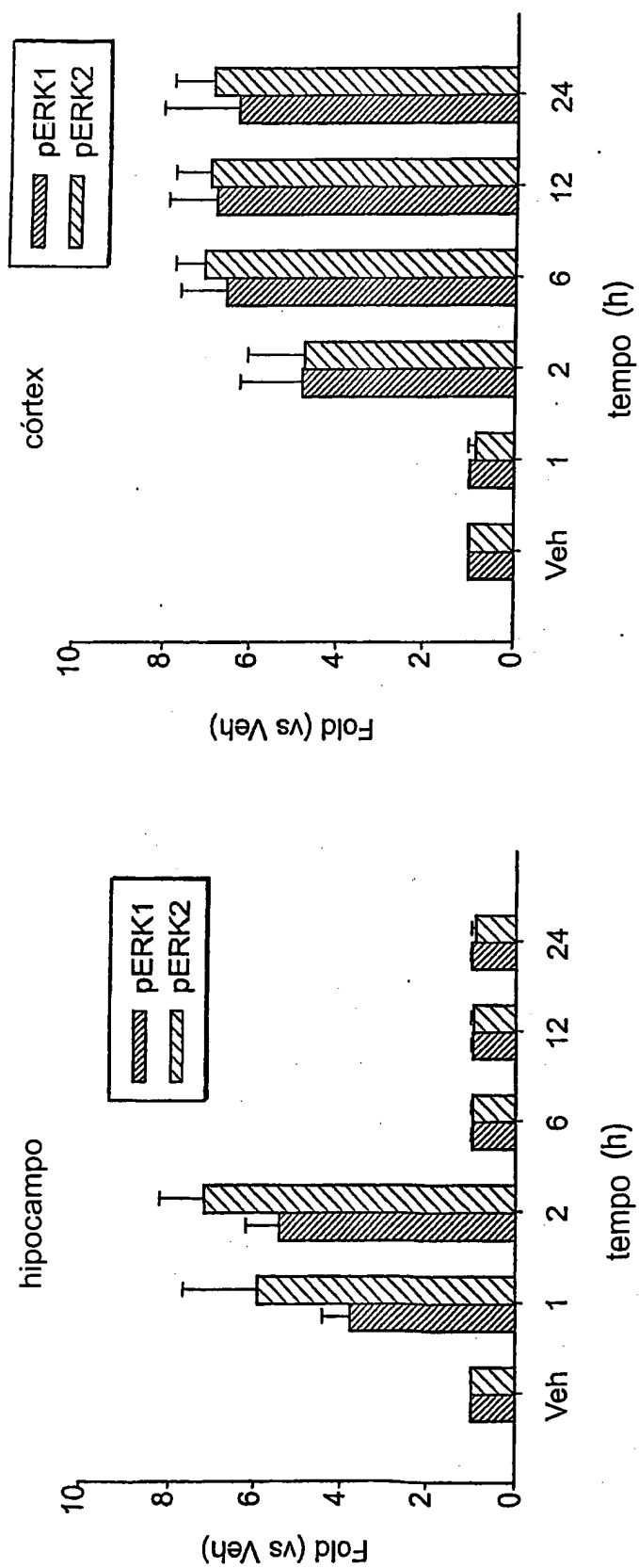


FIG. 28

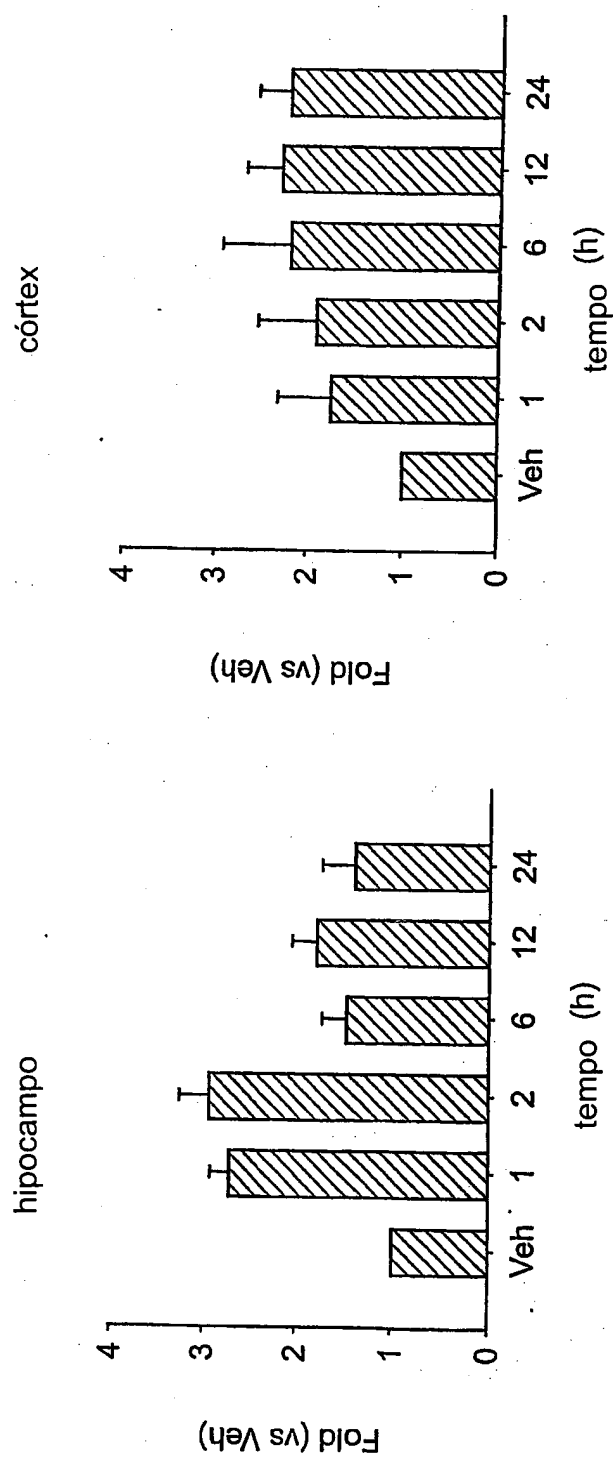


FIG. 29

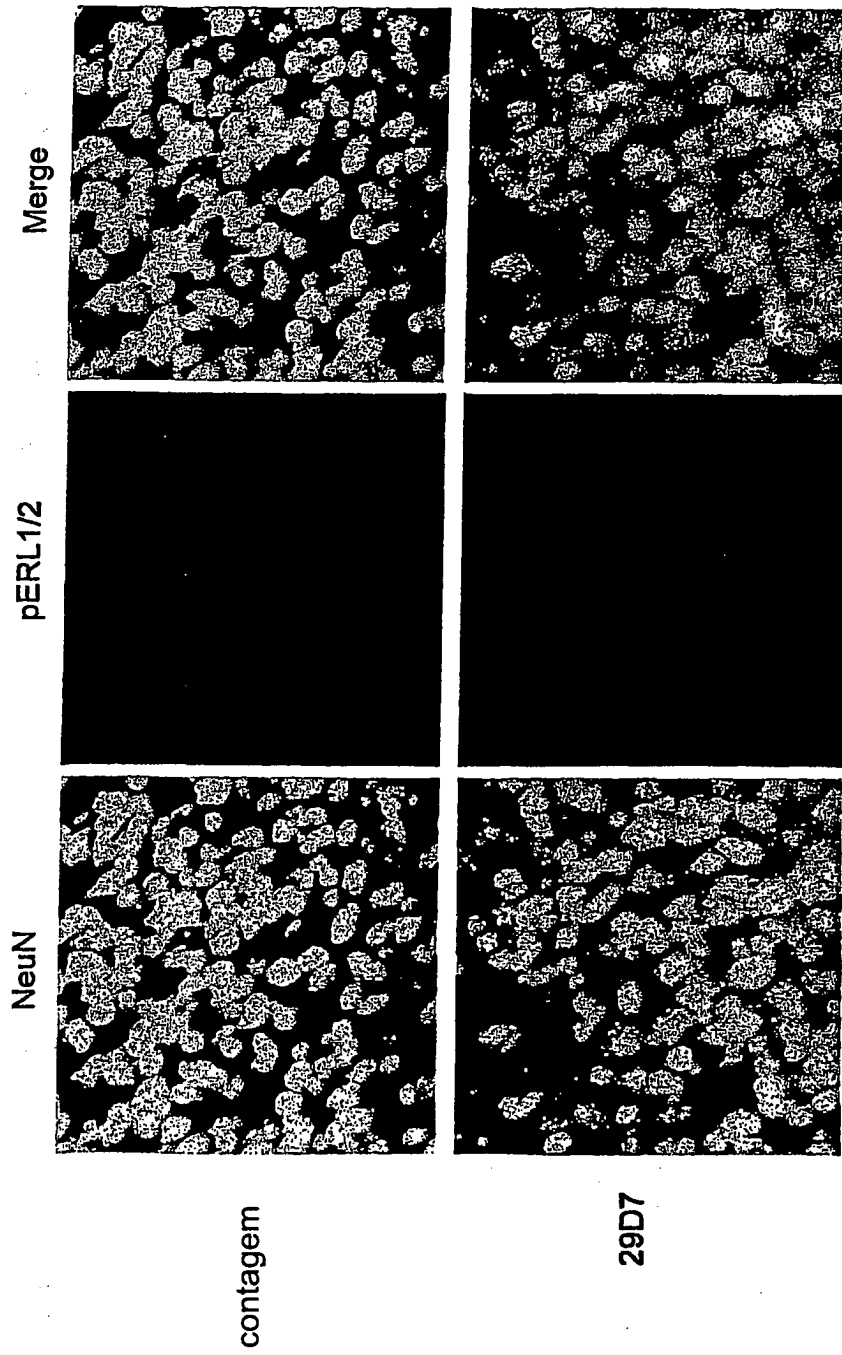


FIG. 30

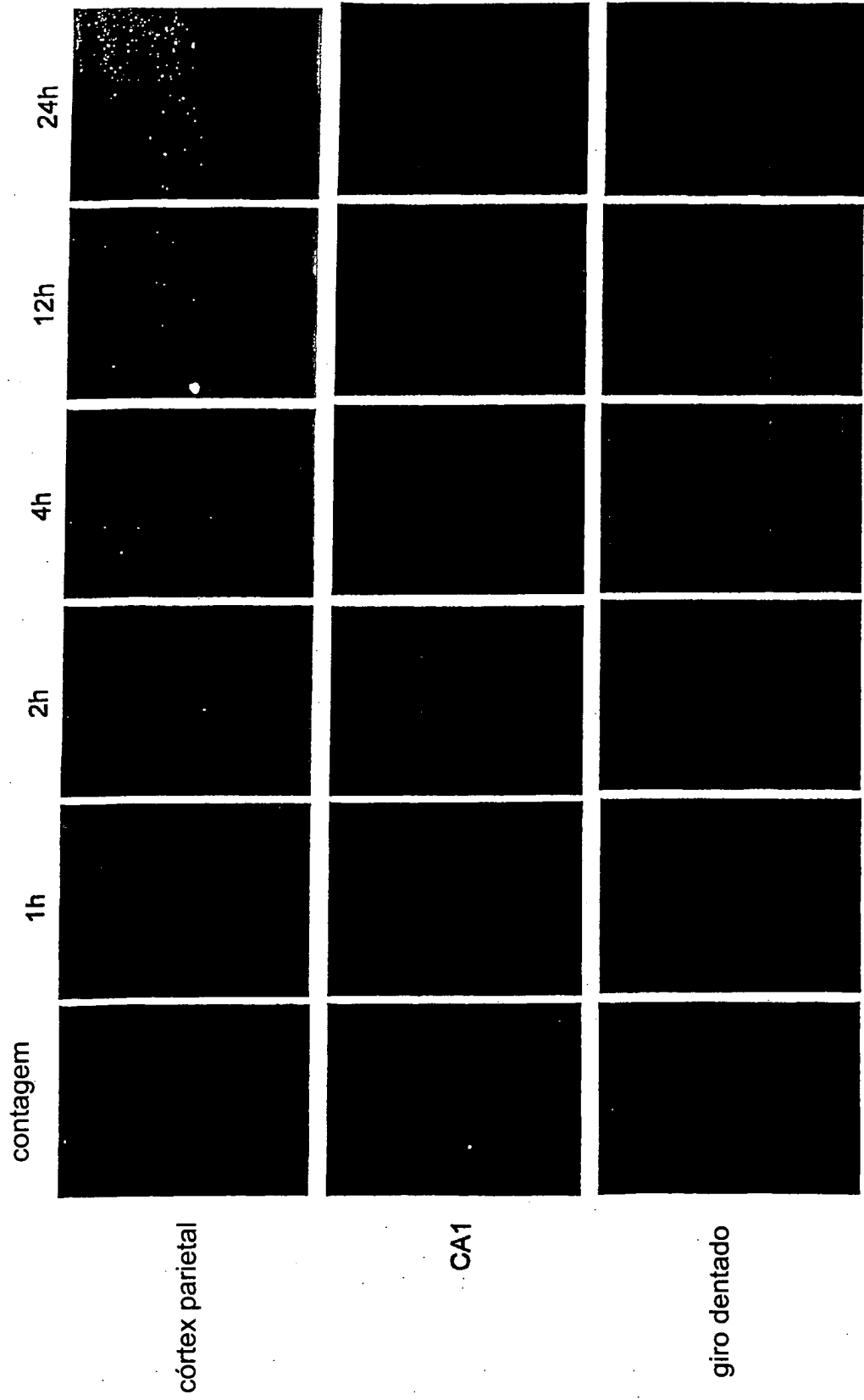


FIG. 31

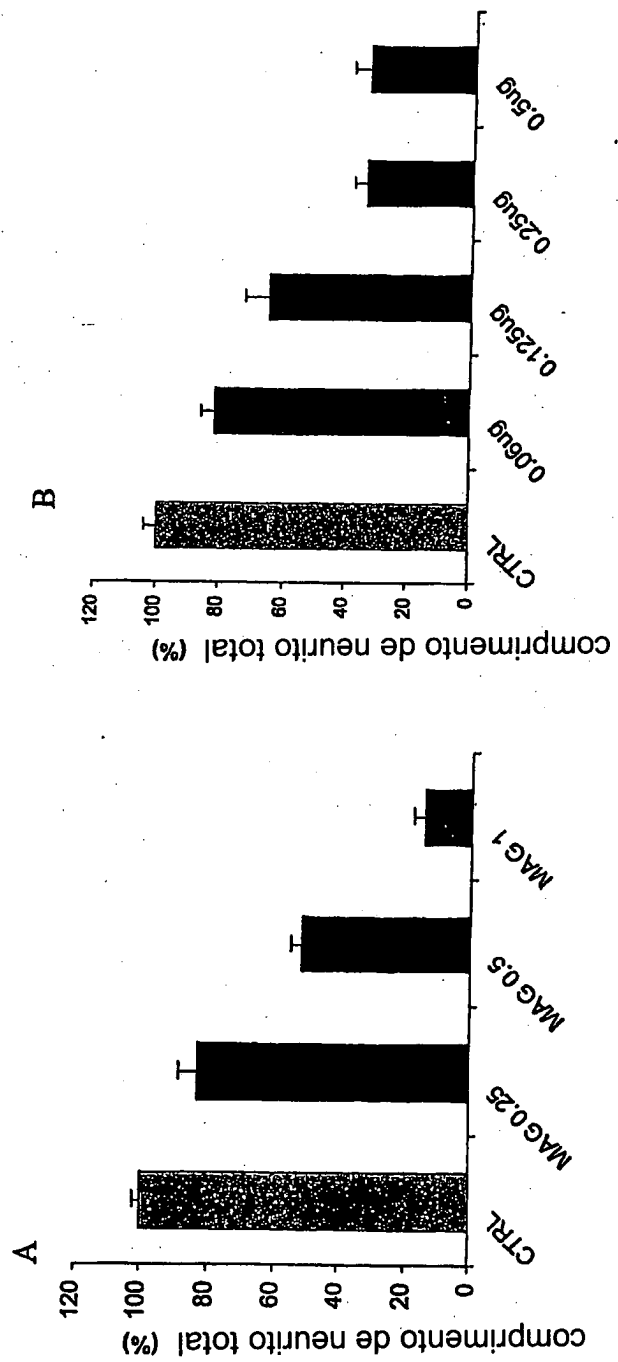


FIG.32

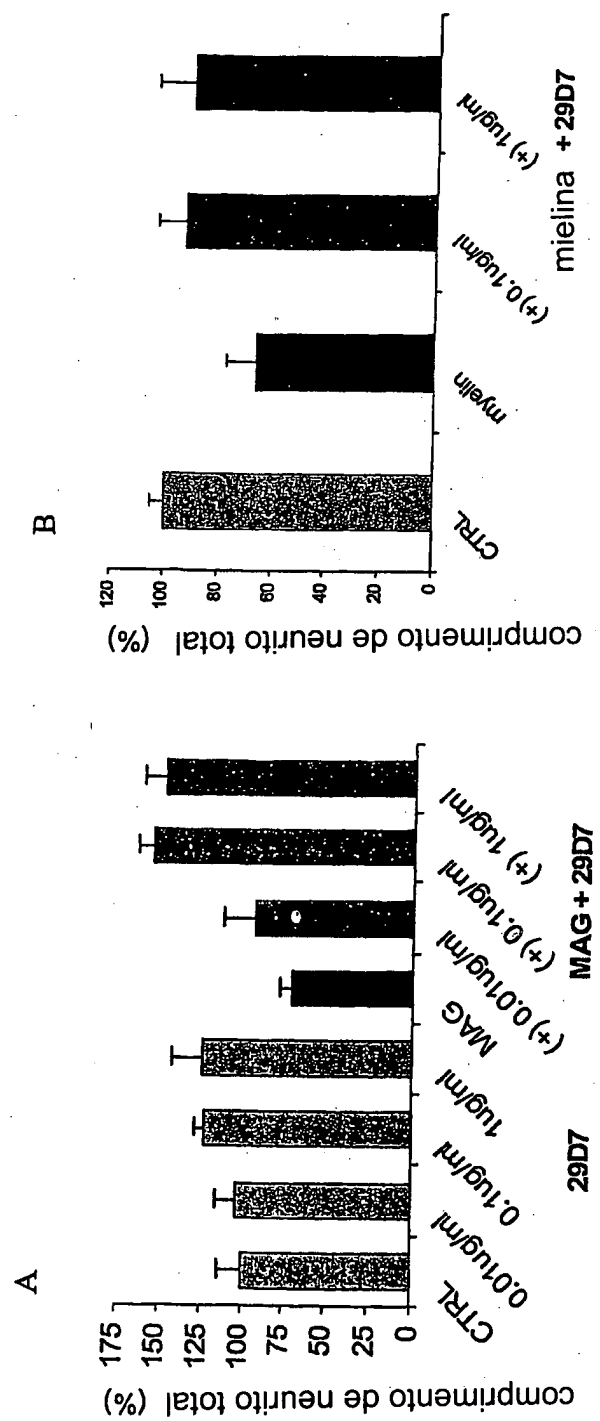


FIG. 33

RESUMO

Patente de Invenção: **"ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-TRKB E USOS DOS MESMOS"**.

5 A presente invenção fornece anticorpos monoclonais para TrkB humano. Em certas modalidades, os anticorpos inventivos ligam e ativam TrkB humano. Em certas modalidades os anticorpos inventivos são seletivos para TrkB humano em que eles não ligam (ou ativam) TrkA humano ou TrkC humano. Em algumas modalidades os anticorpos inventivos monoclonais reagem cruzado com TrkB de murino. Versões humanizadas ou embutidas
10 dos anticorpos inventivos também são abrangidas. Composições farmacêuticas que compreendem anticorpos inventivos são fornecidas como são os métodos para preparar os anticorpos inventivos e métodos de uso dos mesmos para propósitos de tratamento, detecção ou purificação.