

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-517787  
(P2019-517787A)

(43) 公表日 令和1年6月27日(2019.6.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 B 0 6 5
C 0 7 K 16/40 (2006.01)	C 0 7 K 16/40 Z N A	4 C 0 8 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	4 H 0 4 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 5/0793 (2010.01)	C 1 2 N 5/0793	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 48 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-557427 (P2018-557427)  
 (86) (22) 出願日 平成29年5月2日 (2017.5.2)  
 (85) 翻訳文提出日 平成30年12月27日 (2018.12.27)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/030570  
 (87) 国際公開番号 W02017/192538  
 (87) 国際公開日 平成29年11月9日 (2017.11.9)  
 (31) 優先権主張番号 62/331,046  
 (32) 優先日 平成28年5月3日 (2016.5.3)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 501244222  
 ザ スクリプス リサーチ インスティテ  
 ユート  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 92  
 037, ラ ホヤ, ノース トーリー  
 パインズ ロード 10550  
 (71) 出願人 517287659  
 ゼブラ・バイオロジクス・インコーポレイ  
 テッド  
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01  
 742、コンコード、オールド・マルボロ  
 ・ロード・1041  
 (74) 代理人 100114188  
 弁理士 小野 誠

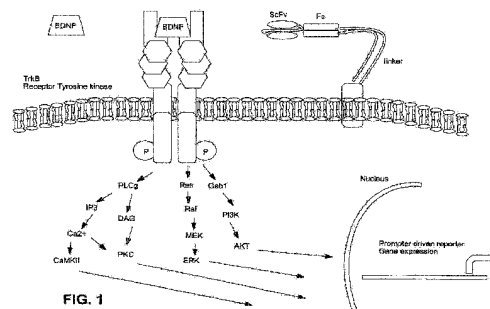
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経変性障害の処置のための Trk B アゴニスト抗体

(57) 【要約】

本発明により、Trk B シグナル伝達活性を特異的に増強する Trk B アゴニスト抗体または抗原結合断片を提供する。また、本発明により、網膜神経節細胞の生存および再生を促進させるため、ならびに種々の神経変性性のコキシディション (cox idition)、例えば緑内障に罹っているか、またはその発症リスクがある被験体を処置または予防するためにかかる抗体を用いる治療方法を提供する。

【選択図】 図 1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

トロポミオシン受容体キナーゼ B ( T r k B ) に特異的に結合する抗体または抗原結合断片であって、第 2 の抗体のものと同じ結合特異性を有し、前記第 2 の抗体が、それぞれ ( 1 ) V S D N S G A W N ( 配列番号 : 6 5 )、Y R S K W Y T ( 配列番号 : 6 6 )、V R G Y Y Y A F H I ( 配列番号 : 6 7 )、S L R T Y Y ( 配列番号 : 6 8 )、G K N および S S R D S S R S H H L L ( 配列番号 : 7 3 ) ; ( 2 ) G Y S F T S Y W ( 配列番号 : 4 6 )、I Y P G D S D T ( 配列番号 : 4 7 )、A R Q G A S S T S Y D Y ( 配列番号 : 4 8 )、Q S I S S Y ( 配列番号 : 4 9 )、A A S および Q Q A N S F P V A ( 配列番号 : 5 0 ) ; ( 3 ) G F I F S R Y N ( 配列番号 : 5 1 )、I N T D G S V I ( 配列番号 : 5 2 )、V R Q M L F ( 配列番号 : 5 3 )、S G I N V G T Y R ( 配列番号 : 5 4 )、Y K S D S D K ( 配列番号 : 5 5 ) および A I W H S S A W V ( 配列番号 : 5 6 ) ; ( 4 ) G F I F S R Y N ( 配列番号 : 5 1 )、I N T D G S V I ( 配列番号 : 5 2 )、V R Q M L F ( 配列番号 : 5 3 )、S G I N V G A Y R ( 配列番号 : 5 7 )、Y K T D S D K ( 配列番号 : 5 8 ) および A I W H S S A W V ( 配列番号 : 5 6 ) ; ( 5 ) G F I F S R Y N ( 配列番号 : 5 1 )、I N T D G S V I ( 配列番号 : 5 2 )、V R Q M L F ( 配列番号 : 5 3 )、S G I N V G A Y R ( 配列番号 : 5 7 )、Y K S D S D K ( 配列番号 : 5 5 )、A I W H S S A W V ( 配列番号 : 5 6 ) ; ( 6 ) G F I F S R Y N ( 配列番号 : 5 1 )、I N T D G S V I ( 配列番号 : 5 2 )、V R Q M L F ( 配列番号 : 5 3 )、S G I N V G T Y R ( 配列番号 : 5 4 )、Y K S D S D K ( 配列番号 : 5 5 ) および A I W H S S A C V ( 配列番号 : 5 9 ) ; ( 7 ) G F I F S R Y N ( 配列番号 : 5 1 )、I N T D G S V I ( 配列番号 : 5 2 )、A R Q L L Y ( 配列番号 : 6 0 )、S G I N V G A Y R ( 配列番号 : 5 7 )、Y K S D S D K ( 配列番号 : 6 1 )、A I W H S S A W V ( 配列番号 : 5 6 ) ; ( 8 ) G Y S F T S Y W ( 配列番号 : 4 6 )、I Y P G D S D T ( 配列番号 : 4 7 )、A T R V L P A G H F ( 配列番号 : 6 2 )、N I G D K F ( 配列番号 : 6 3 )、Y D S および Q V W D N S S N Q G V ( 配列番号 : 6 4 ) ; ( 9 ) V S D N S G A W N ( 配列番号 : 6 5 )、Y R S K W Y T ( 配列番号 : 6 6 )、V R G Y Y Y A F H I ( 配列番号 : 6 7 )、S L R T Y Y ( 配列番号 : 6 8 )、G K N および N S R D G S G N N V V ( 配列番号 : 6 9 ) ; または ( 1 0 ) G Y T F T S Y A ( 配列番号 : 7 0 )、I N T N T G N P ( 配列番号 : 7 1 )、A S R L A A A G F D Y ( 配列番号 : 7 2 )、S G I N V G T Y R ( 配列番号 : 5 4 )、Y K S D S D K ( 配列番号 : 5 5 ) および A I W H S S A W V ( 配列番号 : 5 6 ) と同一である重鎖 C D R 1 ~ 3 および軽鎖 C D R 1 ~ 3 の配列を含む、抗体または抗原結合断片。

## 【請求項 2】

重鎖可変領域の配列と軽鎖可変領域の配列を含み、その一方または両方が、それぞれ ( 1 ) 配列番号 : 3 8 と配列番号 : 3 9 ; ( 2 ) 配列番号 : 1 4 と配列番号 : 1 5 ; ( 3 ) 配列番号 : 1 6 と配列番号 : 1 7 ; ( 4 ) 配列番号 : 1 8 と配列番号 : 1 9 ; ( 5 ) 配列番号 : 2 0 と配列番号 : 2 1 ; ( 6 ) 配列番号 : 2 2 と配列番号 : 2 3 ; ( 7 ) 配列番号 : 2 4 と配列番号 : 2 5 ; ( 8 ) 配列番号 : 2 6 と配列番号 : 2 7 ; ( 9 ) 配列番号 : 2 8 と配列番号 : 2 9 ; ( 1 0 ) 配列番号 : 3 0 と配列番号 : 3 1 ; ( 1 1 ) 配列番号 : 3 2 と配列番号 : 3 3 ; ( 1 2 ) 配列番号 : 3 4 と配列番号 : 3 5 ; または ( 1 3 ) 配列番号 : 3 6 と配列番号 : 3 7 に示す重鎖可変領域の配列および軽鎖可変領域の配列と同一である、請求項 1 に記載の抗体または抗原結合断片。

## 【請求項 3】

それぞれ ( 1 ) 配列番号 : 3 8 と配列番号 : 3 9 ; ( 2 ) 配列番号 : 1 4 と配列番号 : 1 5 ; ( 3 ) 配列番号 : 1 6 と配列番号 : 1 7 ; ( 4 ) 配列番号 : 1 8 と配列番号 : 1 9 ; ( 5 ) 配列番号 : 2 0 と配列番号 : 2 1 ; ( 6 ) 配列番号 : 2 2 と配列番号 : 2 3 ; ( 7 ) 配列番号 : 2 4 と配列番号 : 2 5 ; ( 8 ) 配列番号 : 2 6 と配列番号 : 2 7 ; ( 9 ) 配列番号 : 2 8 と配列番号 : 2 9 ; ( 1 0 ) 配列番号 : 3 0 と配列番号 : 3 1 ; ( 1 1 ) 配列番号 : 3 2 と配列番号 : 3 3 ; ( 1 2 ) 配列番号 : 3 4 と配列番号 : 3 5 ; または (

13) 配列番号：36と配列番号：37に示す重鎖可変領域の配列および軽鎖可変領域の配列を含む、請求項1に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項4】

それぞれ(1) VSDNSGAWN (配列番号：65)、YRSKWYT (配列番号：66)、VRGYYYAFHI (配列番号：67)、SLRTYY (配列番号：68)、GKNおよびSSRDSRSRSHHLL (配列番号：73)；(2) GYSFTSYW (配列番号：46)、IYPGDSDT (配列番号：47)、ARQGASSTSYDY (配列番号：48)、QSISSY (配列番号：49)、AASおよびQQANSFPVA (配列番号：50)；(3) GFIFSRYN (配列番号：51)、INTDGSVI (配列番号：52)、VRQMLF (配列番号：53)、SGINVGTYR (配列番号：54)、YKSDSDK (配列番号：55) および AIWHSSAWV (配列番号：56)；(4) GFIFSRYN (配列番号：51)、INTDGSVI (配列番号：52)、VRQMLF (配列番号：53)、SGINVGAYR (配列番号：57)、YKTDSDK (配列番号：58) および AIWHSSAWV (配列番号：56)；(5) GFIFSRYN (配列番号：51)、INTDGSVI (配列番号：52)、VRQMLF (配列番号：53)、SGINVGAYR (配列番号：57)、YKSDSDK (配列番号：55)、AIWHSSAWV (配列番号：56)；(6) GFIFSRYN (配列番号：51)、INTDGSVI (配列番号：52)、VRQMLF (配列番号：53)、SGINVGTYR (配列番号：54)、YKSDSDK (配列番号：55) および AIWHSSACV (配列番号：59)；(7) GFIFSRYN (配列番号：51)、INTDGSVI (配列番号：52)、ARQLLY (配列番号：60)、SGINVGAYR (配列番号：57)、YKSDSDK (配列番号：61)、AIWHSSAWV (配列番号：56)；(8) GYSFTSYW (配列番号：46)、IYPGDSDT (配列番号：47)、ATRVLPAGHF (配列番号：62)、NIGDKF (配列番号：63)、YDS および QVWDNSSNQGV (配列番号：64)；(9) VSDNSGAWN (配列番号：65)、YRSKWYT (配列番号：66)、VRGYYYAFHI (配列番号：67)、SLRTYY (配列番号：68)、GKN および NSRDGSGNNVV (配列番号：69)；または(10) GYTFTSYA (配列番号：70)、INTNTGNP (配列番号：71)、ASRLAAGFDY (配列番号：72)、SGINVGTYR (配列番号：54)、YKSDSDK (配列番号：55) および AIWHSSAWV (配列番号：56) と実質的に同一である重鎖CDR1～3および軽鎖CDR1～3の配列を含む、請求項1に記載の抗体または抗原結合断片。

10

20

30

【請求項5】

配列番号：46～48、51～53、60、62、65～67および70～72からなる群より選択される重鎖CDRの配列を含む、請求項1に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項6】

配列番号：49、50、54～59、61、63、64、68、69および73からなる群より選択される軽鎖CDRの配列をさらに含む、請求項5に記載の抗体または抗原結合断片。

40

【請求項7】

それぞれ(1) 配列番号：70～72、(2) 配列番号：46～48、(3) 配列番号：51～53、(4) 配列番号：51、52、60、(5) 配列番号：46、47および62、または(6) 配列番号：65～67と同一である重鎖CDR1～3の配列を含む、請求項5に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項8】

それぞれ(1) 配列番号：65～68、GKN および 配列番号：73；(2) 配列番号：46～49、AAS および 配列番号：50；(3) 配列番号：51～56；(4) 配列番号：51～53、57、58 および 56；(5) 配列番号：51～53、57、55 および 56；(6) 配列番号：51～55 および 59；(7) 配列番号：51、52、60

50

、 57、61および56；(8)配列番号：46、47、62、63、YDSおよび配列番号：64；(9)配列番号：65～68、GKNおよび配列番号：69；または(10)配列番号：70～72および54～56に示す重鎖CDR1～3および軽鎖CDR1～3の配列を含む、請求項7に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項9】

配列番号：49、50、54～59、61、63、64、68、69および73ならびに配列AAS、YDSおよびGKNからなる群より選択される軽鎖CDRの配列を含む、請求項1に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項10】

配列番号：46～48、51～53、60、62、65～67および70～72からなる群より選択される重鎖CDRの配列をさらに含む、請求項9に記載の抗体または抗原結合断片。

10

【請求項11】

それぞれ(1)配列番号：68、GKNおよび配列番号：73；(2)配列番号：49、AASおよび配列番号：50；(3)配列番号：54～56；(4)配列番号：57、58および56；(5)配列番号：57、55および56；(6)配列番号：54、55および59；(7)配列番号：57、61および56；(8)配列番号：63、YDSおよび配列番号：64；または(8)配列番号：68、GKNおよび配列番号：69と同一である軽鎖CDR1～3の配列を含む、請求項9に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項12】

配列番号：14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36または38と実質的に同一である重鎖可変領域を含む、請求項1に記載の抗体または抗原結合断片。

20

【請求項13】

s c F v断片であり、重鎖と軽鎖の可変領域の配列がリンカー配列によって連結されている、請求項1に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項14】

リンカー配列が、配列番号：40～45のいずれか1つに示す配列を含む、請求項13に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項15】

配列番号：1～13のいずれか1つに示す配列を含む、請求項13に記載の抗体または抗原結合断片。

30

【請求項16】

I g A 1、I g A 2、I g D、I g E、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g M、F ( a b ) 2、F v、s c F v、I g G A C H 2、F ( a b ' ) 2、s c F v 2 C H 3、F a b、V L、V H、s c F v 4、s c F v 3、s c F v 2、d s F v、F v、s c F v - F c、( s c F v ) 2、非枯渴性I g G、ダイアボディおよび二価抗体である、請求項1に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項17】

I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4および合成I g Gからなる群より選択されるI g Gである、請求項16に記載の抗体または抗原結合断片。

40

【請求項18】

F a b、s c F vまたはd s F vである、請求項16に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項19】

合成分子にコンジュゲートさせた、請求項16に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項20】

治療有効量の請求項1に記載の抗体または抗原結合断片および薬学的に許容され得る担体を含む医薬組成物。

【請求項21】

50

請求項 1 に記載の抗体または抗原結合断片を含む二重特異性化合物。

【請求項 2 2】

請求項 1 に記載の抗体または抗原結合断片を備えたキット。

【請求項 2 3】

請求項 1 に記載の抗体または抗原結合断片の重鎖および / または軽鎖の可変領域をコードしているポリヌクレオチド。

【請求項 2 4】

請求項 2 3 に記載のポリヌクレオチドを有するベクター。

【請求項 2 5】

被験体の網膜神経節細胞、運動ニューロンまたは中枢神経系 ( C N S ) のニューロンの生存、シナプス機能または再生を促進させるための方法であって、前記被験体に治療有効量の請求項 1 に記載の T r k B アゴニスト抗体もしくは抗原結合断片または請求項 2 4 に記載のベクターを含む医薬組成物を投与し、それにより前記被験体の網膜神経節細胞の生存または再生を促進させることを含む方法。

10

【請求項 2 6】

前記医薬組成物が被験体の片目または両目に投与される、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記医薬組成物が薬学的に許容され得る担体をさらに含む、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記被験体が目の変性障害、運動ニューロン疾患または中枢神経系 ( C N S ) の変性疾患に罹っているか、またはその発症リスクがある、請求項 2 5 に記載の方法。

20

【請求項 2 9】

前記目の変性障害が緑内障、視神経損傷、視神経炎、視神経症、網膜中心動脈閉塞症、網膜中心静脈閉塞症、糖尿病性ニューロパチー、加齢性黄斑変性 ( A M D )、前部虚血性視神経症 ( A I O N ) または糖尿病性網膜症である、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記運動ニューロン疾患が A L S、特発性運動ニューロパチー、遺伝性痙性対麻痺 ( H S P )、原発性側索硬化症 ( P L S )、進行性筋萎縮症 ( P M A )、進行性球麻痺 ( P B P ) および偽球麻痺、ベル麻痺または脊髄筋萎縮症 ( S M A ) である、請求項 2 8 に記載の方法。

30

【請求項 3 1】

前記中枢神経系 ( C N S ) の変性疾患がアルツハイマー病、パーキンソン病またはハンチントン病である、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 2】

被験体の目の変性性の病的状態を処置または予防するための方法であって、前記被験体に治療有効量の請求項 1 に記載の抗体もしくは抗原結合断片または請求項 2 4 に記載の前記ベクターを含む医薬組成物を投与し、それにより前記被験体の視神経症を処置または予防することを含む方法。

【請求項 3 3】

前記医薬組成物が前記被験体の片目または両目に投与される、請求項 3 2 に記載の方法。

40

【請求項 3 4】

前記医薬組成物が薬学的に許容され得る担体をさらに含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記被験体が目の変性性の病的状態に冒されているか、またはその発症リスクがある、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記目の変性性の病的状態が緑内障、視神経損傷、視神経炎、視神経症、網膜中心動脈閉塞症、網膜中心静脈閉塞症、糖尿病性ニューロパチー、加齢性黄斑変性 ( A M D )、前部虚血性視神経症 ( A I O N ) または糖尿病性網膜症である、請求項 3 5 に記載の方法。

50

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

## 関連出願の相互参照

本特許出願は、本出願は、米国特許仮出願第62/331,046号(2016年5月3日出願)の優先権の利益を主張するものである。この優先権出願の全開示内容は、引用によりその全体があらゆる目的のために本明細書に組み込まれる。

## 【背景技術】

## 【0002】

Trk受容体ファミリーは、ニューロン組織および非ニューロン組織の両方の生理的過程および疾患過程において重要である。このような受容体キナーゼの中でも、TrkBは、末梢神経系および中枢神経系の両方のニューロンの分化、生存および機能に不可欠である脳由来神経栄養因子(BDNF)、ニューロトロフィン-3(NT3)およびニューロトロフィン-4(NT4)のシグナル伝達において枢要な役割を果たしている。ニューロトロフィンがTrk受容体の細胞外ドメインに結合するとシグナル伝達経路が起始され、これは該受容体の二量体化および自己リン酸化をもたらす。TrkBの自己リン酸化により、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ(MAPK)、ホスホリパーゼC-およびホスファチジルイノシトール-3キナーゼ(PI3-K)を含むシグナル伝達経路の活性化をもたらされる。

## 【0003】

BDNFおよびTrkBはどちらも、網膜内の網膜神経節細胞の生存に極めて重要な役割を果たしていることが示されている。異常なTrkBシグナル伝達およびその抑制が種々の神経障害および変性性の病的状態、例えば緑内障の発症に寄与していることが示唆されている。緑内障は、2番目に多い目の疾患であり、失明に至り、世界中で60Mより多くの人々が冒されており、米国で診断された有病数はおよそ2.3M例である。主に、眼圧(IOP)上昇に至る「ブラミング(plumbing)」問題で、緑内障により、網膜神経節細胞(RGC)およびその軸索(すべての視覚的刺激を脳に伝える)に対する損傷をもたらされる。IOPを下げるための数多くの薬物およびデバイスが承認されているが、RGCまたは他の網膜のニューロンの細胞委縮および減少を抑制、遅滞または逆転させ、10%より多くの緑内障患者において最終的に起こる失明が食い止められるであろう薬物はまだ開発されていない。TrkBシグナル伝達を特異的にモジュレートできることは、この経路と関連している種々の病理学的シナリオにおいて極めて重要であり得る。

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0004】

当該技術分野では、種々の網膜の疾患および障害、特に緑内障などの神経障害の処置においてTrkBおよびBDNFシグナル伝達活性を促進させるための手段が強く必要とされている。例えば、現在行われている緑内障の処置選択肢ではIOPは下がるがRGC変性は逆転しない。本発明は、このようなおよび他の必要性に取り組むことに関するものである。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0005】

一態様において、本発明により、トロポミオシン受容体キナーゼB(TrkB)に特異的に結合するTrkBアゴニスト抗体または抗原結合断片であって、第2の抗体のものと同一結合特異性を有するTrkBアゴニスト抗体または抗原結合断片を提供する。第2の抗体は、それぞれ(1)VSDNSGAWN(配列番号:65)、YRSKWYT(配列番号:66)、VRGYYYAFHI(配列番号:67)、SLRTYY(配列番号:68)、GKNおよびSSRDSRSRSHHLL(配列番号:73);(2)GYSFTSYW(配列番号:46)、IYPGDSDT(配列番号:47)、ARQGASSTSYDY(配列番号:48)、QSISSY(配列番号:49)、AASおよびQQANSF

PVA (配列番号: 50); (3) GFIFSRYN (配列番号: 51)、INTDGSVI (配列番号: 52)、VRQMLF (配列番号: 53)、SGINVGTYR (配列番号: 54)、YKSDSDK (配列番号: 55) および AIWHSSAWV (配列番号: 56); (4) GFIFSRYN (配列番号: 51)、INTDGSVI (配列番号: 52)、VRQMLF (配列番号: 53)、SGINVGAYR (配列番号: 57)、YKTDSDK (配列番号: 58) および AIWHSSAWV (配列番号: 56); (5) GFIFSRYN (配列番号: 51)、INTDGSVI (配列番号: 52)、VRQMLF (配列番号: 53)、SGINVGAYR (配列番号: 57)、YKSDSDK (配列番号: 55)、AIWHSSAWV (配列番号: 56); (6) GFIFSRYN (配列番号: 51)、INTDGSVI (配列番号: 52)、VRQMLF (配列番号: 53)、SGINVGTYR (配列番号: 54)、YKSDSDK (配列番号: 55) および AIWHSSACV (配列番号: 59); (7) GFIFSRYN (配列番号: 51)、INTDGSVI (配列番号: 52)、ARQLLY (配列番号: 60)、SGINVGAYR (配列番号: 57)、YKSDSDK (配列番号: 61)、AIWHSSAWV (配列番号: 56); (8) GYSFTSYW (配列番号: 46)、IYPGDSDT (配列番号: 47)、ATRVLPAGHF (配列番号: 62)、NIGDKF (配列番号: 63)、YDS および QVWDNS SNQGV (配列番号: 64); (9) VSDNSGAWN (配列番号: 65)、YRSKWYT (配列番号: 66)、VRGYYYAFHI (配列番号: 67)、SLRTYY (配列番号: 68)、GKN および NSRDGSGNNVV (配列番号: 69); または (10) GYTFTSYA (配列番号: 70)、INTNTGNP (配列番号: 71)、ASRLAAGFDY (配列番号: 72)、SGINVGTYR (配列番号: 54)、YKSDSDK (配列番号: 55) および AIWHSSAWV (配列番号: 56) と同一である重鎖 CDR 1 ~ 3 および 軽鎖 CDR 1 ~ 3 の配列を含む。

10

20

30

40

50

#### 【0006】

本発明の一部の抗体または抗原結合断片は重鎖可変領域の配列と軽鎖可変領域の配列を有し、その一方または両方が、それぞれ (1) 配列番号: 38 と配列番号: 39; (2) 配列番号: 14 と配列番号: 15; (3) 配列番号: 16 と配列番号: 17; (4) 配列番号: 18 と配列番号: 19; (5) 配列番号: 20 と配列番号: 21; (6) 配列番号: 22 と配列番号: 23; (7) 配列番号: 24 と配列番号: 25; (8) 配列番号: 26 と配列番号: 27; (9) 配列番号: 28 と配列番号: 29; (10) 配列番号: 30 と配列番号: 31; (11) 配列番号: 32 と配列番号: 33; (12) 配列番号: 34 と配列番号: 35; または (13) 配列番号: 36 と配列番号: 37 に示す重鎖可変領域の配列および軽鎖可変領域の配列と同一である。一部の抗体または抗原結合断片は、それぞれ (1) 配列番号: 38 と配列番号: 39; (2) 配列番号: 14 と配列番号: 15; (3) 配列番号: 16 と配列番号: 17; (4) 配列番号: 18 と配列番号: 19; (5) 配列番号: 20 と配列番号: 21; (6) 配列番号: 22 と配列番号: 23; (7) 配列番号: 24 と配列番号: 25; (8) 配列番号: 26 と配列番号: 27; (9) 配列番号: 28 と配列番号: 29; (10) 配列番号: 30 と配列番号: 31; (11) 配列番号: 32 と配列番号: 33; (12) 配列番号: 34 と配列番号: 35; または (13) 配列番号: 36 と配列番号: 37 に示す重鎖可変領域の配列および軽鎖可変領域の配列を含む。

#### 【0007】

本発明の一部の抗体または抗原結合断片は、それぞれ (1) VSDNSGAWN (配列番号: 65)、YRSKWYT (配列番号: 66)、VRGYYYAFHI (配列番号: 67)、SLRTYY (配列番号: 68)、GKN および SSRDSSRS HLL (配列番号: 73); (2) GYSFTSYW (配列番号: 46)、IYPGDSDT (配列番号: 47)、ARQGASSTSYDY (配列番号: 48)、QSISSY (配列番号: 49)、AAS および QQANSFPVA (配列番号: 50); (3) GFIFSRYN (配列番号: 51)、INTDGSVI (配列番号: 52)、VRQMLF (配列番号: 53)、SGINVGTYR (配列番号: 54)、YKSDSDK (配列番号: 55) および AIWHSSAWV (配列番号: 56) と同一である重鎖 CDR 1 ~ 3 および 軽鎖 CDR 1 ~ 3 の配列を含む。

: 53)、SGINVGTYR (配列番号: 54)、YKSDSDK (配列番号: 55) およびAIWHS SAWV (配列番号: 56); (4) GFIFSRYN (配列番号: 51)、INTDGSVI (配列番号: 52)、VRQMLF (配列番号: 53)、SGINVGAYR (配列番号: 57)、YKTSDSDK (配列番号: 58) およびAIWHS SAWV (配列番号: 56); (5) GFIFSRYN (配列番号: 51)、INTDGSVI (配列番号: 52)、VRQMLF (配列番号: 53)、SGINVGAYR (配列番号: 57)、YKSDSDK (配列番号: 55)、AIWHS SAWV (配列番号: 56); (6) GFIFSRYN (配列番号: 51)、INTDGSVI (配列番号: 52)、VRQMLF (配列番号: 53)、SGINVGTYR (配列番号: 54)、YKSDSDK (配列番号: 55) およびAIWHS SACV (配列番号: 59); (7) GFIFSRYN (配列番号: 51)、INTDGSVI (配列番号: 52)、ARQLLY (配列番号: 60)、SGINVGAYR (配列番号: 57)、YKSDSDK (配列番号: 61)、AIWHS SAWV (配列番号: 56); (8) GYSFTSYW (配列番号: 46)、IYPGDS DT (配列番号: 47)、ATRVLPAGHF (配列番号: 62)、NIGDKF (配列番号: 63)、YDS およびQVWDNSSNQGV (配列番号: 64); (9) VSDNSGAWN (配列番号: 65)、YRSKWYT (配列番号: 66)、VRGYYYAFHI (配列番号: 67)、SLRTYY (配列番号: 68)、GKN およびNSRDGSGNNVV (配列番号: 69); または (10) GYTFTSYA (配列番号: 70)、INTNTGNP (配列番号: 71)、ASRLAAAGFDY (配列番号: 72)、SGINVGTYR (配列番号: 54)、YKSDSDK (配列番号: 55) およびAIWHS SAWV (配列番号: 56) と実質的に同一である重鎖CDR1~3 および軽鎖CDR1~3の配列を含む。一部の抗体または抗原結合断片は配列番号: 46~48、51~53、60、62、65~67 および70~72 からなる群より選択される重鎖CDRの配列を有する。このような分子の一部のものは、配列番号: 49、50、54~59、61、63、64、68、69 および73 からなる群より選択される軽鎖CDRの配列をさらに含む。このような分子の一部のものは、それぞれ (1) 配列番号: 70~72、(2) 配列番号: 46~48、(3) 配列番号: 51~53、(4) 配列番号: 51、52、60、(5) 配列番号: 46、47 および62、または (6) 配列番号: 65~67 と同一である重鎖CDR1~3の配列を含む。このような抗体または抗原結合断片の一部のものは、それぞれ (1) 配列番号: 65~68、GKN および配列番号: 73; (2) 配列番号: 46~49、AAS および配列番号: 50; (3) 配列番号: 51~56; (4) 配列番号: 51~53、57、58 および56; (5) 配列番号: 51~53、57、55 および56; (6) 配列番号: 51~55 および59; (7) 配列番号: 51、52、60、57、61 および56; (8) 配列番号: 46、47、62、63、YDS および配列番号: 64; (9) 配列番号: 65~68、GKN および配列番号: 69; または (10) 配列番号: 70~72 および54~56 に示す重鎖CDR1~3 および軽鎖CDR1~3の配列を有する。

**【0008】**

本発明の一部の抗体または抗原結合断片は、配列番号: 49、50、54~59、61、63、64、68、69 および73 ならびに配列AAS、YDS およびGKN からなる群より選択される軽鎖CDRの配列を含む。このような分子の一部のものはさらに、配列番号: 46~48、51~53、60、62、65~67 および70~72 からなる群より選択される重鎖CDRの配列を含む。このような分子の一部のものは、それぞれ (1) 配列番号: 68、GKN および配列番号: 73; (2) 配列番号: 49、AAS および配列番号: 50; (3) 配列番号: 54~56; (4) 配列番号: 57、58 および56; (5) 配列番号: 57、55 および56; (6) 配列番号: 54、55 および59; (7) 配列番号: 57、61 および56; (8) 配列番号: 63、YDS および配列番号: 64; または (8) 配列番号: 68、GKN および配列番号: 69 と同一である軽鎖CDR1~3の配列を含む。

**【0009】**

10

20

30

40

50



本発明の一部の抗体または抗原結合断片は、配列番号：14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36または38と実質的に同一である重鎖可変領域を含む。一部の抗体または抗原結合断片はs c F v断片であり、これは、重鎖と軽鎖の可変領域の配列を連結しているリンカー配列を含む。一部の例示的なリンカー配列を配列番号：40～45に示す。本発明の一部のs c F v断片は、配列番号：1～13のいずれか1つに示す配列を含む。

#### 【0010】

本発明の抗体または抗原結合断片は任意の抗体構造形式、例えば、I g A 1、I g A 2、I g D、I g E、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g M、F ( a b ) 2、F v、s c F v、I g G A C H 2、F ( a b ' ) 2、s c F v 2 C H 3、F a b、V L、V H、s c F v 4、s c F v 3、s c F v 2、d s F v、F v、s c F v - F c、( s c F v ) 2、非枯渇性 ( n o n - d e p l e t i n g ) I g G、ダイアボディおよび二価抗体であり得る。また該分子を合成分子にコンジュゲートさせてもよい。一部の実施形態では、本発明により、本明細書に記載のT r k Bアゴニスト抗体または抗原結合断片を含む二重特異性化合物（例えば、二重特異性抗体）を提供する。

10

#### 【0011】

別の態様において、本発明により、本発明の抗体または抗原結合断片の重鎖および/または軽鎖の可変領域をコードしているポリヌクレオチド、ならびにかかるポリヌクレオチドを有するベクターを提供する。別の態様において、本発明により、治療有効量の本明細書に記載の抗体もしくは抗原結合断片または該抗体を発現するポリヌクレオチドもしくはベクターを含む医薬組成物またはキットを提供する。

20

#### 【0012】

さらに別の態様において、本発明により、被験体の網膜神経節細胞、運動ニューロンまたは中枢神経系 ( C N S ) のニューロンの生存、シナプス機能または再生を促進させるための方法を提供する。また、被験体の目の変性性の病的状態、運動ニューロン疾患または中枢神経系 ( C N S ) の変性疾患を処置または予防するための方法も提供する。このような本発明の治療方法は、被験体に治療有効量の本明細書に記載のT r k Bアゴニスト抗体もしくは抗原結合断片または該抗体をコードしているポリヌクレオチドもしくは発現ベクターを含む医薬組成物を投与することを伴う。種々の実施形態において、医薬組成物は被験体の片目または両目に投与され得る。典型的には、投与される医薬組成物は薬学的に許容され得る担体をさらに含む。該方法に適した被験体は、目の変性障害、運動ニューロン疾患または中枢神経系 ( C N S ) の変性疾患に罹っているか、またはその発症リスクがある被験体であり得る。本発明の方法に適した目の変性障害は、例えば、緑内障、視神経損傷、視神経炎、視神経症、網膜中心動脈閉塞症、網膜中心静脈閉塞症、糖尿病性ニューロパチー、加齢性黄斑変性 ( A M D )、前部虚血性視神経症 ( A I O N ) または糖尿病性網膜症であり得る。本発明の方法での処置に適した運動ニューロン疾患の例としては、例えば、A L S、特発性運動ニューロパチー、遺伝性痙攣性対麻痺 ( H S P )、原発性側索硬化症 ( P L S )、進行性筋萎縮症 ( P M A )、進行性球麻痺 ( P B P ) および偽球麻痺、ベル麻痺または脊髄筋萎縮症 ( S M A ) が挙げられる。本発明の方法で処置され得るC N Sの変性疾患の例としては、例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病またはハンチントン病が挙げられる。

30

40

#### 【0013】

本発明の本質および利点のさらなる理解は、本明細書の残りの部分および特許請求の範囲を参照することにより実現され得よう。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0014】

【図1】図1は、T r k BアゴニストA bを選択するためのヒトT r k Bレポーターの構築のためのスキームを示す。

【図2】図2は、T r k Bレポーター細胞株によって調べた培養上清み中のいくつかの未精製のs c F v - F c T r k Bアゴニスト抗体の活性を示す。

50

【図3】図3は、TrkBレポーター細胞アッセイでのいくつかのTrkBアゴニストIgG抗体の活性を示す。

【図4】図4は、同定されたTrkBアゴニスト抗体の選択性(TrkAに対する効果なし)を示す。

【図5】図5は、TrkBアゴニストAbのシグナル伝達によりTrkBレポーター細胞においてP-PLC、P-AktおよびP-MAPKの活性化がもたらされたことを示す。

【図6】図6は、培養マウス皮質ニューロンにおけるアゴニストAb誘導性TrkBリン酸化を示す。

【図7】図7は、BDNFおよびTrkBアゴニストAb NFAT-85によって誘導されたArcの発現を示す。

【図8】図8は、マウス胚性幹細胞においてアゴニスト抗体NFAT-85によって誘導されたTrkBリン酸化を示す。

【図9】図9は、TrkBアゴニストAb NFAT-85がRGC樹状突起の退縮を抑制することを示す。

【図10】図10は、緑内障のラットモデルでのTrkBアゴニスト抗体の効果の有効性試験の実験パラダイムである。

【図11】図11は、OHTラットモデルのIOPの特徴を示す。

【図12】図12は、OHTラットにおけるTrkBアゴニストAb 85およびBDNFの効果のショールプロット解析を示す。

【図13】図13は、図12に示すショール解析の dendritic metrics)を示す。

【発明を実施するための形態】

【0015】

## I. 概論

本発明では、一部において、網膜の障害、例えば緑内障の神経保護的および神経再生的処置における有用性が示されたTrkB活性化抗体の本発明者らによる開発に関して記載する。BDNFの神経保護活性および神経再生活性を本明細書において、BDNFがRGCの樹状突起の退縮を大きく遅滞させること、およびBDNFがRGC樹状突起の変性を逆転させ得ることによって示した。重要なことに、本発明者らは、本発明のTrkBアゴニスト抗体がRGCの神経保護薬としてBDNFと等しいかまたはより良好な特性を示すことを実証した。

【0016】

本明細書において詳述するように、本発明者らは、コンビナトリアルライブラリーからrare活性化アゴニスト抗体を選択することによって完全ヒトアゴニスト抗体ファミリーを作製した。例示した試験において、TrkBアゴニスト抗体は、RGCの樹状突起樹(arbor)の維持または再生において軸索切断した成体哺乳動物の網膜において速やかに反応するBDNFの有効性を模倣できることが示された。具体的には、BDNFと比べて、該抗体は、TrkB細胞株およびBDNF応答性一次ニューロン培養物の両方において強力で選択的であることが示された。また、該抗体は、TrkBシグナル伝達の活性化においてBDNFと同等であり、また、異種間活性(例えば、ヒトとマウス)を有することもわかった。インサイチュでは、該抗体は、成体マウスの網膜外植片アッセイでRGC変性の遅滞および回復において活性であることがわかった。さらに、高眼圧緑内障のラットモデルによる評価時、TrkBアゴニストAbは、網膜神経節ニューロンの樹状突起樹に対して再生効果を示した。

【0017】

BDNFと比較すると、本発明のTrkBアゴニスト抗体はまた、ヒト被験体においてBDNFそのものよりも大きく改善された生物学的特性を有し(例えば、BDNFとは異なり、この抗体は「粘着性(sticky)」のタンパク質ではない)、ずっと長い半減期(例えば、より良好な薬物動態)を有する。また、緑内障に対して現在承認されてい

10

20

30

40

50

るすべての処置は目の前眼房内の眼圧（IOP）を下げることに重点がおかれている。しかしながら、このような処置単独では疾患の進行を止めるのに不十分である。対照的に、本明細書に開示のTrkBアゴニスト抗体の疾患修飾性神経保護活性は、RGCの樹状突起および細胞体の委縮または減少を低減させ得、したがって疾患の進行が遅滞され得る。また、該抗体神経再生活性により、障害されたRGCの機能的完全性が回復され得る

このような試験に従い、本発明により、TrkBチロシンキナーゼ受容体の特異的に活性化し、RGCの生存または再生を促進させるモノクローナル抗体および関連する抗原結合断片を提供する。また、本発明において、このような抗体薬剤を、RGCの死滅もしくは変性と関連している種々の神経変性疾患、例えば網膜変性障害、または異常もしくは障害されたTrkBシグナル伝達活性によって媒介される眼疾患、例えば緑内障を処置するための治療用途に使用する方法を提供する。

#### 【0018】

##### II. 定義

特に定義していない限り、本明細書で用いる科学技術用語はすべて、本発明が関する技術分野の当業者に一般的に理解されているものと同じ意味を有する。以下の参考文献は、当業者に、本発明で用いている用語の多くの一般的な定義を示すものである：Academic Press Dictionary of Science and Technology, Morris (Ed.), Academic Press (1<sup>st</sup> ed., 1992); Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Smith et al. (Eds.), Oxford University Press (revised ed., 2000); Encyclopaedic Dictionary of Chemistry, Kumar (Ed.), Anmol Publications Pvt. Ltd. (2002); Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, Singleton et al. (Eds.), John Wiley & Sons (3<sup>rd</sup> ed., 2002); Dictionary of Chemistry, Hunt (Ed.), Routledge (1<sup>st</sup> ed., 1999); Dictionary of Pharmaceutical Medicine, Nahler (Ed.), Springer-Verlag Telos (1994); Dictionary of Organic Chemistry, Kumar and Anand (Eds.), Anmol Publications Pvt. Ltd. (2002); および A Dictionary of Biology (Oxford Paperback Reference), Martin and Hine (Eds.), Oxford University Press (4<sup>th</sup> ed., 2000)。また、以下の定義は、読み手の本発明の実施を補助するために示している。

#### 【0019】

用語「抗体」または「抗原結合断片」は、所与の抗原、エピトープ（1つまたは複数）に対して強い一価、二価または多価の結合を示す（1または複数の）ポリペプチド鎖をいう。特に記載のない限り、本発明において使用される抗体または抗原結合断片は、任意の脊椎動物種、例えばラクダ科、鳥類または魚類の種に由来する配列を有するものであり得る。これは、任意の適当な技術、例えばハイブリドーマ技術、リボソームディスプレイ、ファージディスプレイ、遺伝子シャッフリングライブラリー、半合成もしくは完全合成のライブラリーまたはその組合せを用いて作製され得る。特に記載のない限り、用語「抗体」は、本明細書で用いる場合、インタクトな抗体、抗原結合ポリペプチド断片および後述するか、または当該技術分野でよく知られた他のデザイナー抗体（例えば、Serafini, J Nucl. Med. 34: 533-6, 1993参照）を包含している。

#### 【0020】

インタクトな「抗体」は典型的には、ジスルフィド結合によって相互連結された少なくとも2つの重（H）鎖（約50～70kD）と2つの軽（L）鎖（約25kD）を含む。

10

20

30

40

50

抗体鎖をコードしている認知された免疫グロブリン遺伝子としては、 $\gamma$ 、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\alpha$ 、 $\beta$  および  $\mu$  定常領域の遺伝子ならびに無数の免疫グロブリン可変領域の遺伝子が挙げられる。軽鎖は  $\kappa$  または  $\lambda$  のいずれかに分類される。重鎖は  $\nu$ 、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$  または  $\alpha$  に分類され、これらはさらに、それぞれ免疫グロブリンクラス I g G、I g M、I g A、I g D および I g E を規定する。

#### 【0021】

抗体の各重鎖は重鎖可変領域 ( $V_H$ ) と重鎖定常領域で構成されている。重鎖定常領域は3つのドメイン  $C_{H1}$ 、 $C_{H2}$  および  $C_{H3}$  で構成されている。各軽鎖は軽鎖可変領域 ( $V_L$ ) と軽鎖定常領域で構成されている。軽鎖定常領域は1つのドメイン  $C_L$  で構成されている。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、免疫グロブリンが宿主の組織または因子、例えば免疫機構の種々の細胞および古典的補体系の第一成分 ( $C1q$ ) に結合するのを媒介し得る。

10

#### 【0022】

抗体の  $V_H$  および  $V_L$  領域は超可変領域にさらに細分され得、これは相補性決定領域 ( $CDR$ ) とともに散在している。各  $V_H$  および  $V_L$  は、アミノ末端からカルボキシル末端に向かって以下の順:  $FR1$ 、 $CDR1$ 、 $FR2$ 、 $CDR2$ 、 $FR3$ 、 $CDR3$ 、 $FR4$  で配列された3つの  $CDR$  と4つの  $FR$  で構成されている。 $CDR$  および  $FR$  領域の位置ならびにナンバリングシステムは、例えば、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1987 および 1991) によって規定されている。

20

#### 【0023】

結合親和性は一般的に、平衡の結合定数または解離定数 (それぞれ  $K_a$  または  $K_d$ ) で表示され、これらはさらに、解離速度定数および結合速度定数 (それぞれ  $k_{off}$  および  $k_{on}$ ) の逆比である。したがって、速度定数の比が同じままである限り、同等の親和性が異なる速度定数に相当し得る。

#### 【0024】

用語「保存的修飾バリエーション」は、アミノ酸配列および核酸配列の両方に適用される。具体的な核酸配列に関して、保存的修飾バリエーションは、同一または本質的に同一であるアミノ酸配列をコードしている核酸、または核酸がアミノ酸配列をコードしていない場合は本質的に同一である配列をいう。遺伝コードの縮重のため、任意の所与のタンパク質は、大量数の機能的に同一である核酸にコードされている。例えば、コドン  $GCA$ 、 $GCC$ 、 $GCG$  および  $GCU$  はすべて、アミノ酸アラニンをコードしている。したがって、コドンによってアラニンが指定される位置はどこも、該コドンは、コードされたポリペプチドが改変されることなく記載のいずれかの対応するコドンに改変され得る。かかる核酸変異は「サイレント変異」であり、これは、保存的修飾変異である種の1つである。また、ポリペプチドをコードしている本明細書における核酸配列はどれも、該核酸の考えられ得るどのサイレント変異をも示している。当業者には、核酸内の各コドン (通常メチオニンの唯一のコドンである  $AUG$  および通常トリプトファンの唯一のコドンである  $TGG$  を除く) は、機能的に同一である分子が得られるように修飾され得ることが認識されよう。したがって、ポリペプチドをコードしている核酸の各サイレント変異は記載の各配列に黙示的である。

30

40

#### 【0025】

ポリペプチド配列では、「保存的修飾バリエーション」は、同様の電荷を有する側鎖を有する他のアミノ酸残基で置き換えられたアミノ酸残基である保存的アミノ酸置換体を有するバリエーションをいう。同様の電荷を有する側鎖を有するアミノ酸残基ファミリーは当該技術分野で規定されている。このようなファミリーとしては、塩基性側鎖を有するアミノ酸 (例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖を有するアミノ酸 (例えば、アス

50

パラギン酸、グルタミン酸)、非荷電性の極性側鎖を有するアミノ酸(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン)、無極性側鎖を有するアミノ酸(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、 $\beta$ -分枝側鎖を有するアミノ酸(例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン)および芳香族側鎖を有するアミノ酸(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)が挙げられる。

【0026】

用語「接触させること」はその通常の意味を有し、2種類以上の薬剤(例えば、ポリペプチドもしくはファージ)を合わせることを、薬剤と細胞を合わせることを、または2つの異なる細胞集団を合わせることをいう。接触させることは、インビトロで、例えば、抗体と細胞を混合して、または抗体集団を細胞集団と試験管内もしくは増殖培地中で混合して行なわれ得る。また、接触させることを、細胞内またはインサイチュで、例えば、2種類のポリペプチドを、細胞内で該2種類のポリペプチドをコードしている組換えポリヌクレオチドの該細胞内での共発現によって、または細胞ライセート中で接触させて行なってもよい。また、接触させることを、被験体内でインビボにて、例えば、薬剤を被験体に該薬剤の標的細胞への送達のために投与することによって行なってもよい。

10

【0027】

用語「エピトープ」は、抗体のパラトープが結合する対象であり、1つ以上のアミノ酸セグメントで構成された抗原上の任意の抗原決定基をいう。エピトープは、線状エピトープであっても立体的エピトープであってもよく、連続的であっても不連続的であってもよい。典型的には、線状エピトープは連続的である、すなわち1つの連続的なアミノ酸鎖で構成されている。立体的エピトープは不連続的であり得る、すなわち、抗原が折り畳まれている場合に一緒になってエピトープを形成する2つ以上の不連続アミノ酸セグメントで構成されたものであり得る。抗体が同じエピトープに結合するかどうかを調べるための方法は当該技術分野で知られている。エピトープは、当該技術分野でよく知られた標準的な方法によって規定またはマッピングされ得る。例えば、エピトープは、ELISAアッセイなどのアッセイを用いて、ペプチドライブラリーを用いて、または抗原の部位特異的変異誘発(例えば、抗原のアラニンスキャニング)でマッピングされ得る。

20

【0028】

本明細書で用いる場合、2種類以上の抗体に関して「同じエピトープに結合する」とは、該抗体が、抗原に対する結合について競合し、重複するか、または網羅的な連続または不連続の同じアミノ酸セグメントに結合することを意味する。当業者には、語句「同じエピトープに結合する」ことが、必ずしも抗体が全く同じアミノ酸に結合することを意味しているのではないことは理解されよう。抗体が結合する対象の厳密なアミノ酸は異なってもよい。例えば、第1の抗体は、第2の抗体が結合するアミノ酸セグメントに完全に包含される該アミノ酸のセグメントに結合し得る。別の例では、第1の抗体が、第2の抗体が結合する1つ以上のアミノ酸セグメントと有意に重複する該1つ以上のセグメントに結合する。本明細書における解釈上、かかる抗体は「同じエピトープに結合する」とみなされる。

30

【0029】

抗体競合アッセイは、抗体が別の抗体と「同じエピトープに結合する」かどうかを調べるために使用され得る。かかるアッセイは当該技術分野でよく知られている。典型的には、エピトープと相互作用することがわかっている抗体の、第2の抗体が過剰でありすべての部位が第1のもので飽和されている条件下での該第2の抗体による70%またはそれ以上、例えば70%、71%、72%、73%、74%、75%、80%、85%、90%、95%またはそれ以上の競合は、該抗体が「同じエピトープに結合する」ことを示す。2種類の抗体間の競合レベルを評価するためには、例えば、ラジオイムノアッセイまたは抗体用の他の標識、例えばビオチンを使用するアッセイが使用され得る。例えば、抗原は、標識化合物(例えば、 $^3\text{H}$ 、 $^{125}\text{I}$ またはビオチン)にコンジュゲートさせた飽和量の第1の抗体またはその抗原結合断片とともに、同じ量の第2の非標識抗体の存在下でイ

40

50

ンキュベートされ得る。次いで、非標識ブロッキング抗体の存在下で抗原に結合した標識された抗体の量を評価し、非標識ブロッキング抗体の非存在下での結合と比較する。競合は、ブロッキング抗体なしと比べたときの非標識ブロッキング抗体の存在下におけるシグナル結合の変化パーセンテージによって測定する。したがって、ブロッキング抗体の非存在下での結合と比べてブロッキング抗体の存在下において標識抗体の結合の70%阻害がみられる場合、この2種類の抗体間に70%の競合が存在する。したがって、第1の抗体と第2の抗体間の70%またはそれ以上、例えば70%、71%、72%、73%、74%、75%、80%、85%、90%、95%またはそれ以上の競合に対する言及は、第1の抗体が抗原に対する第2の抗体の結合（またはその逆）を70%、71%、72%、73%、74%、75%、80%、85%、90%、95%またはそれ以上（第1の抗体の非存在下での第2の抗体による抗原結合と比べて）を阻害することを意味する。したがって、抗原に対する第1の抗体の結合の第2の抗体による70%、71%、72%、73%、74%、75%、80%、85%、90%、95%またはそれ以上の阻害は、この2種類の抗体が同じエピトープに結合することを示す。用語「同一である」または「同一性」パーセントは、2種類以上の核酸配列またはポリペプチド配列の状況において、2種類以上の配列または部分配列が同じであることを示す。2つの配列は、比較ウィンドウにおいて、または以下の配列比較アルゴリズムのうちの1つを用いて、もしくは手作業のアライメントと目視検査によって測定する場合は指定された領域において、最大限の一致で比較し、アライメントしたとき、この2つの配列が指定された領域において指定されたパーセンテージの同じのアミノ酸残基またはヌクレオチドを有する場合（すなわち、60%の同一性、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または99%の同一性であってもよく、あるいは指定されていない場合は、配列全体において）、「実質的に同一である」。任意に、同一性は、少なくとも約50ヌクレオチド（または10アミノ酸）長である領域において、またはより好ましくは100~500もしくは1000以上のヌクレオチド（または20、50、200以上のアミノ酸）長である領域において存在する。

#### 【0030】

比較のための配列アライメントの方法は当該技術分野でよく知られている。比較のための至適配列アライメントは、例えば、Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482c, 1970の局所相同性アルゴリズム; Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443, 1970の相同性アライメントアルゴリズム; Pearson and Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444, 1988の類似性検索法; これらのアルゴリズムのコンピュータ実装 (Wisconsin Genetics Software Package (Genetics Computer Group, Madison, WI) 内のGAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA); または手作業のアライメントと目視検査 (例えば、Brent et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (Ringbou編, 2003) 参照) によって行なうことができる。配列同一性および配列類似性のパーセントを調べるのに適したアルゴリズムの2つの例はBLASTおよびBLAST 2.0アルゴリズムであり、それぞれ、Altschul et al., *Nuc. Acids Res.* 25: 3389-3402, 1977; およびAltschul et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410, 1990に記載されている。

#### 【0031】

本明細書で用いる場合、目の変性性の病的状態または障害は、網膜神経節細胞 (RGC) の変性もしくは死滅を特徴とするか、もしくは該変性もしくは死滅と関連している目の疾患、またはTrkBシグナル伝達活性によって媒介されるか、もしくはその障害と関連している眼障害をいう。これには、種々の臨床像および病因が包含される。このような障害の例としては、緑内障、視神経損傷、視神経炎、視神経症、網膜中心動脈閉塞症および

10

20

30

40

50

網膜中心静脈閉塞症が挙げられる。

【0032】

緑内障は、視神経の病理学的変化、視神経円板における可視および対応する視野欠損、未処置の場合は失明に至ることを特徴とする例示的な目の変性性の病的状態である。緑内障は高い眼圧と関連しているが、他の要素も関与している。緑内障には、より一般的な型の開放隅角緑内障およびあまり一般的でない型、例えば閉塞隅角緑内障ならびに正常眼圧緑内障が包含される。緑内障に対して現在使用されている治療は眼圧降下に関するものである。薬物療法としては、経表面点眼薬または経口投薬物（これは、眼内液の流出の発生もしくは増大を低減させる）が挙げられる。しかしながら、緑内障に対するこのような薬物治療は、場合によっては有意な副作用、例えば頭痛、霧視、アレルギー反応、心肺合併症による死亡および他の薬物との相互作用の可能性を伴う。また、外科的治療も使用されるが、これも数多くの不都合点を有し、成功率は低めである。

10

【0033】

運動ニューロン疾患（MND）は、身体の随意筋を制御する細胞である運動ニューロンが選択的に冒されるいくつかの神経系の障害の任意のものである。該疾患としては、例えば、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、遺伝性痙攣性対麻痺（HSP）、原発性側索硬化症（PLS）、進行性筋萎縮症（PMA）、進行性球麻痺（PBP）および偽球麻痺が挙げられる。また、場合によっては脊髄筋萎縮症もこのグループに含められる。運動ニューロン疾患は、性質が神経変性性であり、次第に身体障害、最終的には死が引き起こされる。本明細書に開示のTrkBアゴニスト抗体は、このような障害の任意のもの、例えばALSの症状を処置するため、または寛解させるために使用され得る。

20

【0034】

用語「被験体」は、ヒトおよび非ヒト動物（特に、非ヒト哺乳動物）をいう。用語「被験体」は本明細書において、例えば、治療方法および診断方法との関連においてヒト被験体または動物被験体を示すために用いている。動物被験体としては、限定されないが、網膜神経節細胞の変性または死滅と関連している病的状態または障害の動物モデル、例えば哺乳動物モデルが挙げられる。非ヒト被験体の他の具体例としては、例えば、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、サルが挙げられる。

【0035】

用語「標的」、「標的分子」または「標的細胞」は、解析対象または検出対象の目的の分子または生体細胞、例えば、その死滅をモジュレートする真核生物細胞をいう。

30

【0036】

本明細書で用いている用語「処置する」、「処置すること」、「処置」および「治療上有効な」は、必ずしも100%または完全な処置を含意しているのではない。そうではなく、潜在的有益性または治療効果を有すると当業者によって認識されるさまざまな度合の処置が存在する。これとの関連において、本発明の方法は、任意の量の任意のレベルの処置をもたらすものであり得る。さらに、本発明の方法によってもたらされる処置には、処置対象の疾患の1つ以上の病的状態または症状の処置が包含され得る。

【0037】

トロポミオシン受容体キナーゼB（TrkB）は、チロシン受容体キナーゼB、BDNF/NT-3成長因子受容体または2型神経栄養受容体型チロシンキナーゼとしても知られており、ヒトではNTRK2遺伝子にコードされたタンパク質である。TrkBは、脳由来神経栄養因子（BDNF）の受容体である。Klein et al., Cell 61: 647-56, 1990; および Squinto et al., Cell 65: 885-93, 1991。TrkBは、相違する細胞集団の生存および分化を誘導する小型タンパク質の成長因子であるいくつかの「ニューロトロフィン」の高親和性触媒性受容体である。TrkBを活性化するニューロトロフィンは：BDNF（脳由来神経栄養因子）、ニューロトロフィン-4（NT-4）およびニューロトロフィン-3（NT-3）である。そのため、TrkBは、このような神経栄養因子の複数の効果（ニュー

40

50

ロンの分化および生存が挙げられる)を媒介する。研究により、TrkB受容体の活性化によってCNSの細胞内のKCC2クロライドトランスポーターの下方調節がもたらされることが示されている。

【0038】

「ベクター」はレプリコン、例えばプラスミド、ファージまたはコスミドであり、これに別のポリヌクレオチドセグメントが、結合された該セグメントの複製がもたらされるように結合され得る。1種類以上のポリペプチドをコードしている遺伝子の発現を指令し得るベクターは「発現ベクター」と称される。

【0039】

III. TrkBアゴニスト抗体および関連する抗原結合分子

本発明により、TrkB(例えば、ヒトTrkB)に特異的に結合してTrkBシグナル伝達経路を活性化する抗体または抗原結合断片を提供する。好ましくは、本発明のTrkBアゴニスト抗体は、本明細書に例示したTrkBアゴニスト抗体(例えば、表1に示す抗体NFAT-85または抗体CRE-30)のものと同じ結合特異性を有する。したがって、本発明には、それぞれ(1)VSDNSGAWN(配列番号:65)、YRSKWYT(配列番号:66)、VRGYYYAFHI(配列番号:67)、SLRTYY(配列番号:68)、GKNおよびSSRDSRSRSHHLL(配列番号:73);(2)GYSFTSYW(配列番号:46)、IYPGDSDT(配列番号:47)、ARQGA SSTSYDY(配列番号:48)、QSISSY(配列番号:49)、AASおよびQQANSFPVA(配列番号:50);(3)GFIFSRYN(配列番号:51)、INTDGSVI(配列番号:52)、VRQMLF(配列番号:53)、SGINVGTYR(配列番号:54)、YKSDSDK(配列番号:55)およびAIWHSSAWV(配列番号:56);(4)GFIFSRYN(配列番号:51)、INTDGSVI(配列番号:52)、VRQMLF(配列番号:53)、SGINVGAYR(配列番号:57)、YKTDSDK(配列番号:58)およびAIWHSSAWV(配列番号:56);(5)GFIFSRYN(配列番号:51)、INTDGSVI(配列番号:52)、VRQMLF(配列番号:53)、SGINVGAYR(配列番号:57)、YKSDSDK(配列番号:55)、AIWHSSAWV(配列番号:56);(6)GFIFSRYN(配列番号:51)、INTDGSVI(配列番号:52)、VRQMLF(配列番号:53)、SGINVGTYR(配列番号:54)、YKSDSDK(配列番号:55)およびAIWHSSACV(配列番号:59);(7)GFIFSRYN(配列番号:51)、INTDGSVI(配列番号:52)、ARQLLY(配列番号:60)、SGINVGAYR(配列番号:57)、YKSDSDK(配列番号:61)、AIWHSSAWV(配列番号:56);(8)GYSFTSYW(配列番号:46)、IYPGDSDT(配列番号:47)、ATRVLPAGHF(配列番号:62)、NIGDKF(配列番号:63)、YDSおよびQVWDNS SNQGV(配列番号:64);(9)VSDNSGAWN(配列番号:65)、YRSKWYT(配列番号:66)、VRGYYYAFHI(配列番号:67)、SLRTYY(配列番号:68)、GKNおよびNSRDGSGNNVV(配列番号:69);または(10)GYTFTSYA(配列番号:70)、INTNTGNP(配列番号:71)、ASRLAAGFDY(配列番号:72)、SGINVGTYR(配列番号:54)、YKSDSDK(配列番号:55)およびAIWHSSAWV(配列番号:56)と同一である重鎖CDR1~3および軽鎖CDR1~3の配列を有する抗体のものと同じ結合特異性を有する抗体または抗原結合断片が包含される。

【0040】

本発明の一部の抗体は、TrkBに対する結合について、例示した抗体と競合し得る。本発明の一部の抗体は、本明細書に例示したTrkB抗体のうちの一つによって認識されるものと同じエピトープに結合する。本発明の一部の抗体は、本明細書に例示したTrkB抗体のうちの一つのものと同じかまたは同様の親和性で、TrkB上の同じエピトープに結合する。TrkBに結合したら、本発明の一部の抗体は、本明細書に例示したTrk

10

20

30

40

50



B抗体のうちの1つによるものと同じかまたは同様の様式でTrkBの生物学的活性の1つ以上をモジュレートし得るか、あるいは細胞応答（例えば、MAPK、ホスホリパーゼC - および/またはPI3 - Kシグナル伝達経路の活性化）を生じさせ得る。

#### 【0041】

本発明の抗体には、インタクトな抗体（例えば、IgG1抗体）、インタクトな抗体の抗原結合部分を含んでおり、コグネイト抗原に対する結合能を保持しているインタクトな抗体断片または抗原結合断片（例えば、本明細書に例示したscFv抗体）が包含される。典型的なインタクトな抗体は標的抗原と、主に、重鎖および軽鎖の6つの相補性決定領域（CDR）内に位置するアミノ酸残基を介して相互作用する。本発明の機能性TrkBアゴニスト抗体には、例示したTrkBアゴニスト抗体の対応するCDR配列と同じかまたは実質的に同一である重鎖CDRの配列および軽鎖CDRの配列のうち少なくとも1つを有する抗体または抗原結合断片が包含される。一部の実施形態では、本発明のTrkBアゴニストは、例示した抗体に由来する抗体断片または抗原結合分子である。かかる抗体断片の例としては、(i)  $V_L$ 、 $V_H$ 、 $C_L$  および  $C_{H1}$  ドメインからなる一価の断片であるFab断片；(ii) ヒンジ領域でジスルフィド結合によって連結された2つのFab断片を含む二価の断片である $F(ab')_2$ 断片；(iii)  $V_H$  および  $C_{H1}$  ドメインからなるFd断片；(iv) インタクトな抗体の片方のアームの $V_L$  および  $V_H$  ドメインからなるFv断片；(v) 構造的に保存されたフレームワーク領域間で操作された鎖間ジスルフィド結合を有するジスルフィド安定化Fv(dsfv)；(vi)  $V_H$  または  $V_L$  ドメインからなるシングルドメイン抗体(dAb)（例えば、Ward et al., Nature 341: 544 - 546, 1989参照）；ならびに(vii) 線状または環状ペプチドとしての単独の相補性決定領域（CDR）が挙げられる。

10

20

#### 【0042】

また、本発明の抗体には一本鎖抗体も包含される。用語「一本鎖抗体」は、ポリペプチド鎖内に、一般的にスパーサーペプチドまたはリンカー配列によって連結された $V_H$ ドメインおよび $V_L$ ドメインを含み、さらなるドメインまたはアミノ酸配列をアミノ - および/またはカルボキシル - 末端に含んでもよいポリペプチドをいう。例えば、一本鎖抗体は、コードポリヌクレオチドと連結するためのテザリングセグメントを含むものであり得る。一例として、単鎖可変領域断片(scFv)は一本鎖抗体である。別々の遺伝子にコードされたFv断片の $V_L$  および  $V_H$  ドメインと比較すると、scFvは、合成リンカーによって接続された（例えば、組換え方法によって）2つのドメインを有する。これにより、 $V_L$  および  $V_H$  領域のペアが一価の分子を形成した単一のタンパク質鎖とすることが可能になる。本発明のscFv TrkBアゴニスト抗体のいくつかを表1に列挙して示す。これらのscFv抗体の $V_L$  および  $V_H$  配列ならびに連結リンカー配列を表2に示す。

30

#### 【0043】

本明細書に例示したように、scFv TrkBアゴニスト抗体をIgGのFcドメインと融合させてscFv - Fc融合分子を得てもよい。Fc - ドメインとの融合により、いくつかの有益な生物学的および薬理学的特性がもたらされる。例えば、Fcドメインの存在によって、サルベージ新生児(salvage neonatal)Fc - 受容体との相互作用により、ならびに分子サイズが大きくなるため腎クリアランスが遅くなることにより、このハイブリッド分子の血漿中半減期が顕著に増大し得、これにより治療活性が長引く。さらに、Fc領域の付加によりまた、融合されたパートナーの可溶性および安定性が改善され得、製造時においてプロテイン - G/Aアフィニティクロマトグラフィーによる費用効果のある容易な精製が可能になる。scFv抗体断片と融合パートナー、例えばFcドメインを含むハイブリッド分子または融合分子は、標準的な組換え手法、常套的に実施されているタンパク質合成法または本明細書に記載のプロトコルに従って容易に作製され得る。

40

#### 【0044】

また、本発明の抗体には、ラクダ科骨格を有するシングルドメイン抗原結合単位も包含

50

される。ラクダ科の動物としてはラクダ、リャマおよびアルパカが挙げられる。ラクダ科により、軽鎖がない機能性抗体が作製される。重鎖可変 ( $V_H$ ) ドメインは、自発的にフォールディングし、抗原結合単位として独立して機能する。その結合表面にはCDRが3つしかないのに対して、古典的な抗原結合分子 (Fab) または単鎖可変断片 (scFv) には6つのCDRが含まれている。ラクダ科由来の抗体では、慣用的な抗体のものと同等の結合親和性が得られ得る。

#### 【0045】

機能スクリーニングによって最初に同定された本明細書に例示したTrkBアゴニスト抗体に加えて、本発明の種々の他の抗体または抗原結合断片もまた、インタクトな抗体の酵素による修飾もしくは化学修飾によって作製され得る、または組換えDNA方法論を用いてデノボ合成され得る、またはファージディスプレイライブラリーを用いて同定され得る。例示として、表1に示す具体的なscFv抗体は標準的な組換え手法によって、例えば、本明細書に記載のpFUSE IgG骨格ベクター内にクローニングすることによって容易にscFv-Fc融合体に変換することができる。本発明のその他のTrkBアゴニスト抗体または抗原結合分子を作製するために使用され得るさらなる方法はすべて、当該技術分野でよく知られている。例えば、一本鎖抗体は、ファージディスプレイライブラリーまたはリボソームディスプレイライブラリー、遺伝子シャッフルライブラリーを用いて同定され得る (例えば、McCafferty et al., Nature 348: 552-554, 1990; および米国特許第4,946,778号参照)。特に、scFv抗体は、例えば、Bird et al., Science 242: 423-426, 1988; およびHouston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883, 1988に記載の方法を用いて得ることができる。Fv抗体断片は、Skerra and Pluckthun, Science 240: 1038-41, 1988に記載のようにして作製することができる。ジスルフィド安定化Fv断片 (dsFv) は、例えば、Reiter et al., Int. J. Cancer 67: 113-23, 1996に記載の方法を用いて作製することができる。同様に、シングルドメイン抗体 (dAb) は、例えば、Ward et al., Nature 341: 544-546, 1989; およびCai and Garren, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 6280-85, 1996に記載のさまざまな方法によって作製され得る。ラクダ科由来のシングルドメイン抗体は、当該技術分野でよく知られた方法、例えば、Dumoulin et al., Nat. Struct. Biol. 11: 500-515, 2002; Ghahroudi et al., FEBS Letters 414: 521-526, 1997; およびBond et al., J. Mol. Biol. 332: 643-55, 2003を用いて作製することができる。また、他の型の抗原結合断片 (例えば、Fab、F(ab')<sub>2</sub> またはFd断片) も、常套的に実施されている免疫学の方法を用いて容易に作製され得る。例えば、Harlow & Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1998を参照のこと。

#### 【0046】

一部の実施形態では、本発明の抗体または抗原結合断片は、表1に示す抗体のものと同質的に同一である重鎖CDR1、CDR2およびCDR3の配列および/または軽鎖CDR1、CDR2およびCDR3の配列を有する。例示した抗体の軽鎖および重鎖のCDRの配列をすべて表2に示す。このような実施形態の一部のものでは、抗体または抗原結合断片が、(1) 配列番号: 46~49、AASおよび配列番号: 50; (2) 配列番号: 51~56; (3) 配列番号: 51~53、57、58および56; (4) 配列番号: 51~53、57、55および56; (5) 配列番号: 51~55および59; (6) 配列番号: 51、52、60、57、61および56; (7) 配列番号: 46、47、62、63、YDSおよび配列番号: 64; (8) 配列番号: 65~68、GKNおよび配列番

10

20

30

40

50

号：69；(9)配列番号：70～72および54～56；または(10)配列番号：65～68、GKNおよび配列番号：73と実質的に同一である重鎖CDR1～3の配列および軽鎖CDR1～3の配列を有する。このような実施形態の一部のものでは、配列同一性のパーセンテージが少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%またはさらには100%であり得る。したがって、本発明の一部の抗体または抗原結合断片は、例示した抗体のうちの1つの対応するCDRとそれぞれ少なくとも90%同一である重鎖CDR1～3および/または軽鎖CDR1～3の配列を有する。このような抗体の一部のものは、例示した抗体の対応するCDRとそれぞれ少なくとも95%同一である重鎖CDRの配列および/または軽鎖CDRの配列を含む。本発明の他の一部の抗体または抗原結合断片では、重鎖CDRの配列および/または軽鎖CDRの配列が、例示した抗体のうちの1つの対応するCDRとそれぞれ少なくとも95%同一である。一部の実施形態では、抗体の重鎖のCDR1～CDR3および軽鎖のCDR1～CDR3の配列はそれぞれ、(1)配列番号：46～49、AASおよび配列番号：50；(2)配列番号：51～56；(3)配列番号：51～53、57、58および56；(4)配列番号：51～53、57、55および56；(5)配列番号：51～55および59；(6)配列番号：51、52、60、57、61および56；(7)配列番号：46、47、62、63、YDSおよび配列番号：64；(8)配列番号：65～68、GKNおよび配列番号：69；(9)配列番号：70～72および54～56；または(10)配列番号：65～68、GKNおよび配列番号：73に示す配列と同一である。

10

20

#### 【0047】

他の実施形態では、ヒトTrkBに特異的に結合する抗体または抗原結合断片は、(a)配列番号：14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36または38と実質的に同一である重鎖可変領域、(b)配列番号：15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37もしくは39と実質的に同一である軽鎖可変領域、または(c)(a)の重鎖可変領域と(b)の軽鎖可変領域の両方を含む。一部の実施形態では、抗体は(a)の重鎖と(b)の軽鎖の両方を含む。一部の実施形態では、抗体または抗原結合断片は、(a)配列番号：14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36および38のうちのいずれか1つと少なくとも90%の同一性を有する重鎖可変ドメイン、(b)配列番号：15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37および39のうちのいずれか1つと少なくとも90%配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン、または(c)(a)の重鎖と(b)の軽鎖の両方を含む。一部の実施形態では、抗体または抗原結合断片は、配列番号：15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37および39のうちのいずれか1つと少なくとも90%の同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む。このような実施形態の一部のものでは、配列同一性のパーセンテージが少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%またはさらには100%であり得る。一部の実施形態では、軽鎖可変ドメインは、配列番号：15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37および39のうちのいずれか1つと少なくとも95%の同一性を有する。一部の実施形態では、軽鎖可変ドメインは、配列番号：15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37および39のうちのいずれか1つと100%の同一性を有する。他の一部の実施形態では、抗体または抗原結合断片は、配列番号：14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36および38のうちのいずれか1つと少なくとも90%の同一性を有する重鎖可変ドメインを含む。他の実施形態では、同一性のパーセンテージが少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%またはさらには100%であり得る。一部の実施形態では、重鎖可変ドメインは、配列番号：14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34

30

40

50

、36および38のうちのいずれか1つと少なくとも95%の同一性を有する。一部の実施形態では、重鎖可変ドメインは、配列番号：14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36および38のうちのいずれか1つと100%の同一性を有する。

#### 【0048】

上記の重鎖に加えて、本発明の抗体または抗原結合断片は、ナイーブ(naive)鎖の逐次シャッフリングを用いてFabライブラリーから選択される軽鎖をさらに含むものであってもよい。同様に、上記の軽鎖に加えて、本発明の抗体は、ナイーブ鎖の逐次シャッフリングを用いてFabライブラリーから選択される重鎖をさらに含むものであってもよい。一部の実施形態では、本発明の抗体または抗原結合断片は、本明細書に記載のいずれかの重鎖(例えば、配列番号：14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36および38に示す重鎖)を、任意の適当な軽鎖、例えば本明細書に例示したものととの組合せで含むものであり得る。同様に、抗体は、上記のいずれか軽鎖(例えば、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37および39に示す軽鎖)を、任意の適当な重鎖、例えば本明細書に例示したものととの組合せで含むものであり得る。例えば、一部の好ましい実施形態では、抗体は、配列番号：14と15、配列番号：16と17、配列番号：18と19、配列番号：20と21、配列番号：22と23、配列番号：24と25、配列番号：26と27、配列番号：28と29、配列番号：30と31、配列番号：32と33、配列番号：34と35、配列番号：36と37または配列番号：38と39とそれぞれ少なくとも90%同一である重鎖可変領域の配列および軽鎖可変領域の配列を含む。一部の実施形態では、抗体は、配列番号：14と15、配列番号：16と17、配列番号：18と19、配列番号：20と21、配列番号：22と23、配列番号：24と25、配列番号：26と27、配列番号：28と29、配列番号：30と31、配列番号：32と33、配列番号：34と35、配列番号：36と37または配列番号：38と39にそれぞれ示す重鎖配列および軽鎖配列を含むものであり得る。その種々の実施形態では、ペプチド配列の同一性パーセント(%)は、例えば、 $100 \times [(\text{同一である位置}) / \min(\text{TGA}, \text{TGB})]$ として計算され得、式中、TGAおよびTGBは、アラインメントされているペプチド配列AおよびBの残基と内部ギャップの位置の数の和であり、アラインメントはTGAおよびTGBが最小となるようにする。例えば、Russell et al., J. Mol. Biol., 244 : 332 - 350 (1994)を参照のこと。

#### 【0049】

本発明の抗体または抗原結合断片は、TrkB(例えば、ヒトTrkB)の細胞外ドメインに本明細書に例示したTrkBアゴニスト抗体(表1)のものと同一特異性で特異的に認識または結合する任意の抗体、例えば完全長抗体または抗体断片であり得る。本発明のTrkB抗体は好ましくはモノクローナルである。該抗体は、組換え抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体または完全ヒト抗体であってもよい。さらに、該抗体は、任意のアイソタイプ、例えば限定されないが、IgA、IgD、IgE、IgGまたはIgMのものであり得る。したがって、例えば、該抗体は、任意のIgA、例えばIgA1もしくはIgA2または任意のIgG、例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4あるいは合成IgGであり得る。また、該抗体は、ヒトTrkBの細胞外ドメインに対する特異性を有する任意の抗体断片、例えばF(ab)2、Fv、scFv、IgGACH2、F(ab')2、scFv2CH3、Fab、VL、VH、scFv4、scFv3、scFv2、dsFv、Fv、scFv-Fc、(scFv)2、ダイアボディおよび二価抗体であり得る。該抗体は、任意の修飾型または合成の抗体、例えば限定されないが、非枯渇性IgG抗体、CARまたは抗体の他のFcもしくはFabバリエーションであり得る。

#### 【0050】

一部の実施形態では、本発明により、本明細書に例示した抗TrkB抗体の保存的修飾バリエーションである抗体または抗原結合断片を提供する。典型的には、このようなバリエーションの可変領域は、例示したこれらの配列のうちの1つと1個以上のアミノ酸残基の保存的

10

20

30

40

50

置換以外は同一であるアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、本発明の抗体または抗原結合断片はTrkBに特異的に結合し、(a)配列番号：46～48、51～53、60、62、65～67および70～72からなる群より選択される配列を有する少なくとも1つのHCDR；および/または(b)配列番号：49、50、54～59、61、63、64、68、69および73ならびに配列AAS、YDSおよびGKNからなる群より選択される配列を有する少なくとも1つのLCDRを含む。また、本発明により、TrkBに特異的に結合し、前述のCDRの配列または実質的に同一のCDRの配列の1つ以上のバリエーションを含むTrkBアゴニスト抗体を提供する。このような抗体のバリエーションCDRの配列は、1、2または3つの置換、挿入、欠失またはその組合せを、配列番号：46～73ならびに配列AAS、YDSおよびGKNからなる群より選択される配列内に含むものであり得る。例えば、組換えのキメラもしくはヒト化抗体(またはその断片)は、前述のCDRの配列のうちの1、2、3、4、5または6つを含むものであり得る。

#### 【0051】

一部の実施形態では、本発明のTrkBアゴニスト抗体または抗原結合断片は、表1の抗体の同じ軽鎖または重鎖の3つのCDRの配列を含むものである。これらとしては、例えば、(1)配列番号：49、AASおよび配列番号：50、(2)配列番号：54～56、(3)配列番号：57、58および56、(4)配列番号：57、55および56、(5)配列番号：54、55および59、(6)配列番号：57、61および56、(7)配列番号：63、YDSおよび配列番号：64、(8)配列番号：68、GKNおよび配列番号：69ならびに(9)配列番号：68、GKNおよび配列番号：73に示す軽鎖CDR；または(1)配列番号：46～48、(2)配列番号：51～53、(3)配列番号：51、52、60、(4)配列番号：46、47および62、(5)配列番号：65～67ならびに(6)配列番号：70～72に示す重鎖CDRが挙げられる。一部の実施形態では、本発明のTrkBアゴニスト抗体または抗原結合断片は、同じ抗体の6つのCDRの配列、例えば、(1)配列番号：46～49、AASおよび配列番号：50(抗体CRE-6)；(2)配列番号：51～56(抗体CRE-30もしくはCRE-83)；(3)配列番号：51～53、57、58および56(抗体CRE-31もしくはCRE-53)；(4)配列番号：51～53、57、55および56(抗体CRE-39もしくはNFAT-79)；(5)配列番号：51～55および59(抗体CRE-87)；(6)配列番号：51、52、60、57、61および56(抗体CRE-93)；(7)配列番号：46、47、62、63、YDSおよび配列番号：64(抗体NFAT-27)；(8)配列番号：65～68、GKNおよび配列番号：69(抗体NFAT-40)；(9)配列番号：70～72および54～56(抗体NFAT-44)；または(10)配列番号：65～68、GKNおよび配列番号：73(抗体NFAT-85)を含むものであり得る。

#### 【0052】

一部の実施形態では、本発明により、TrkBに対して約10 $\mu$ M以下、5 $\mu$ M以下、2 $\mu$ M以下、1 $\mu$ M以下、500nM以下、400nM以下、300nM以下または200nM以下のアビディティを有する抗体または抗原結合断片を提供する。一部の実施形態では、抗体または抗原結合断片はTrkBに、約100nM以下、約75nM以下、約50nM以下、約25nM以下、約10nM以下または約5nM以下のアビディティで結合する。一部の実施形態では、抗体または抗原結合断片はTrkBに、約1nM以下、約800pM以下、約700pM以下、約600pM以下、約500pM以下、約400pM以下、約300pM以下、約200pM以下または約100pM以下のアビディティで結合する。アビディティは、当該技術分野で知られた手法、例えばELISAまたは表面プラズモン共鳴を用いて測定することができる。

#### 【0053】

本発明の抗体は、任意の適当な手法によって、例えば、任意の適当な真核生物発現系または非真核生物発現系を用いて産生させることができる。一部の特定の実施形態では、抗体を哺乳動物発現系を用いて産生させる。本発明の抗体または抗原結合断片を産生させる

10

20

30

40

50

ための具体的な手法の一例を本明細書に例示する。一部の実施形態では、本発明の抗体または抗原結合断片は、適当な非真核生物発現系、例えば細菌発現系を用いて作製することができる。細菌発現系は、断片、例えば  $F(ab)_2$ 、 $Fv$ 、 $scFv$ 、 $IgGACH_2$ 、 $F(ab')_2$ 、 $scFv_2CH_3$ 、 $Fab$ 、 $VL$ 、 $VH$ 、 $scFv_4$ 、 $scFv_3$ 、 $scFv_2$ 、 $dsFv$ 、 $Fv$ 、 $scFv-Fc$ 、 $(scFv)_2$  およびダイアボディを作製するために使用され得る。DNAコード配列を改変してかかる断片を生成させるための手法は当該技術分野で知られている。

#### 【0054】

本発明の抗体または抗原結合断片は合成分子に、任意の型の適当なコンジュゲーションを用いてコンジュゲートさせ得る。組換え操作およびセレノシステインの組み込み（例えば、2014年12月23日に発行された米国特許第8,916,159号に記載のもの）を使用して合成分子にコンジュゲートさせることができる。他のコンジュゲーション法としては、天然または操作されたリシン側鎖アミンまたはシステイン側鎖チオールとの共有結合性カップリングが挙げられ得る。例えば、Wu et al., Nat. Biotechnol., 23:1137-1146 (2005) を参照のこと。合成分子は任意の分子、例えば、目的の分子（例えば、細胞表面受容体）を標的化するものであり得る。一部の実施形態では、抗体とのコンジュゲーションのための合成分子はタンパク質（例えば、抗体）またはRNAもしくはDNAアプタマーである。一部の実施形態では、本発明のTrkBアゴニスト抗体（例えば、 $scFv$ 分子）は、二重特異性分子または多重特異性分子の成分として存在する。典型的には、本発明の二重特異性または多重特異性化合物は、目的の標的（例えば、TrkCまたはTNF）を特異的に認識する少なくとも1つの他の結合部分に共有結合または非共有結合によりコンジュゲートさせたTrkBアゴニスト抗体または抗原結合断片を含むものである。該結合部分は、任意の化学的性質の分子、例えば、別の抗体もしくは抗原結合断片、ポリペプチドもしくはペプチド薬剤、または小分子薬剤であり得る。一部の実施形態では、本発明の多重特異性分子は、TrkBアゴニスト抗体と、当該技術分野でよく知られた別の抗体または抗原結合断片、例えば本明細書に例示したTNF抗体アダリムマブとを含む二重特異性抗体である。種々の実施形態では、このような二重特異性または多重特異性分子の該他の結合部分はエドレコロマブ、カプロマブ(capromab)、イブリツモマブ、プリナツモマブ、アブキシマブ、リツキシマブ、パシリキシマブ、インフリキシマブ、セツキシマブ、ブレンツキシマブ、シルツキシマブ、パリビズマブ、トラスツズマブ、アレムツズマブ、オマリズマブ、ペバシズマブ、ナタリズマブ、ラニビズマブ、エクリズマブ、セルトリズマブ、ペルツズマブ、オビヌツズマブ、ベムプロリズマブ、ベドリズマブ、エロツズマブ、イダルシズマブ、メポリズマブ、アダリムマブ、パニツムマブ、カナキヌマブ、ゴリムマブ、オフアツムマブ、ウステキヌマブ、デノスマブ、ベリムマブ、イピリムマブ、ラキシバクマブ、ニボルマブ、ラムシルマブ、アリロクマブ、ダラツムマブ、エボロクマブ、ネシツムマブおよびセクキヌマブであり得る。他の一部の実施形態では、本発明の多重特異性分子は二重特異性小分子-抗体コンジュゲートである。単一特異性抗体と比べて、二重特異性化合物では、薬物の有効性の増強および/または所望の標的化操作がもたらされ得る。

#### 【0055】

IV. TrkB抗体を作製するためのポリヌクレオチド、ベクターおよび宿主細胞

本発明により、本明細書に記載の抗体鎖または抗原結合分子のセグメントまたはドメインを含むポリペプチドをコードしている配列と同一であるか、または該配列に相補的な実質的に精製されたポリヌクレオチド(DNAまたはRNA)を提供する。一部の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、表1に示す重鎖および/または軽鎖のドメインの配列をコードしている。適切な発現ベクターで発現させると、このようなポリヌクレオチドにコードされたポリペプチドは抗原結合能を示し得る。また、本発明において、本明細書に記載の抗体の重鎖または軽鎖の少なくとも1つのCDR領域、通常、3つすべてのCDR領域をコードしているポリヌクレオチドを提供する。他の一部のポリヌクレオチドは、例示した抗体の重鎖および/または軽鎖の可変領域の配列のすべてまたは実質的にすべて

をコードしている。例えば、このようなポリヌクレオチドの一部のものは、配列番号：14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36もしくは38のうちいずれか1つに示す重鎖可変領域のアミノ酸配列および/または配列番号：15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37もしくは39のうちいずれか1つに示す軽鎖可変領域のアミノ酸配列をコードしている。コードの縮重のため、免疫グロブリンのアミノ酸配列の各々はさまざまな核酸配列にコードされている。

#### 【0056】

本発明のポリヌクレオチドは、例示した抗体の可変領域の配列のみをコードしているものであってもよい。また、該ポリヌクレオチドは、該抗体の可変領域と定常領域の両方をコードしているものであってもよい。本発明の核酸の一部のポリヌクレオチド配列は、配列番号：14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36または38のうちいずれか1つに示す成熟した重鎖可変領域の配列と実質的に（例えば、少なくとも80%、90%または99%）同一である成熟した重鎖可変領域の配列をコードしている。他の一部のポリヌクレオチド配列は、配列番号：15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37または39のうちいずれか1つに示す成熟した軽鎖可変領域の配列と実質的に同一である成熟した軽鎖可変領域の配列をコードしている。該ポリヌクレオチド配列の一部のものは、例示した抗体のうちの1つの重鎖および軽鎖の両方の可変領域を含むポリペプチドをコードしている。他の一部のポリヌクレオチドは、例示した抗体のうちの1つの重鎖および軽鎖の可変領域とそれぞれ実質的に同一である2種類のポリペプチドセグメントをコードしている。

10

20

#### 【0057】

該ポリヌクレオチド配列は、デノボ固相DNA合成によって、または例示した機能性抗体をコードしている既存の配列（例えば、以下の実施例に記載の配列）のPCR変異誘発によって作製され得る。核酸の直接化学合成は、当該技術分野で知られた方法、例えば、Narang et al., Meth. Enzymol. 68:90, 1979のリン酸トリエステル法；Brown et al., Meth. Enzymol. 68:109, 1979のホスホジエステル法；Beaucage et al., Tetra. Lett., 22:1859, 1981のジエチルホスホルアミダイト法；および米国特許第4,458,066号の固相支持体法によって行なわれ得る。PCRによるポリヌクレオチド配列への変異の導入は、例えば、PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H.A. Erlich (編), Freeman Press, NY, NY, 1992；PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al. (編), Academic Press, San Diego, CA, 1990；Mattila et al., Nucleic Acids Res. 19:967, 1991；およびEckert et al., PCR Methods and Applications 1:17, 1991に記載のようにして行なわれ得る。

30

#### 【0058】

また、本発明において、本明細書に記載の機能性抗体を作製するための発現ベクターおよび宿主細胞を提供する。該抗体を発現させるためのレンチウイルス系ベクターの具体例を以下の実施例に記載する。また、種々の他の発現ベクターが、該機能性抗体鎖または結合断片をコードしているポリヌクレオチドを発現させるために使用され得る。ウイルス系発現ベクターおよび非ウイルス発現ベクターの両方が、該抗体を哺乳動物宿主細胞内で産生させるために使用され得る。非ウイルスのベクターおよび系としては、プラスミド、エピソームベクター（典型的には、タンパク質またはRNAを発現させるための発現カセットを有する）およびヒト人工染色体（例えば、Harrington et al., Nat. Genet. 15:345, 1997参照）が挙げられる。例えば、哺乳動物（例えば、ヒト）の細胞内での該抗体ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの発現に有用な

40

50

非ウイルスベクターとしては、pCEP4、pREP4、pThioHis A、BおよびC、pcDNA3.1/His、pEBVHis A、BおよびC (Invitrogen, San Diego, CA)、MPSVベクター、ならびに他のタンパク質を発現させるための当該技術分野で知られた数多くの他のベクターが挙げられる。他の有用な非ウイルスベクターとしては、Sleeping Beauty、Piggy Backおよび他のトランスポゾン系が挙げられる。有用なウイルスベクターとしては、レンチウイルスまたは他のレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルスをベースにしたベクター、SV40、パピローマウイルス、HBPEプスタイン・パールウイルスをベースにしたベクター、ワクシニアウイルスベクターおよびセムリキ森林ウイルス(SFV)が挙げられる。Brent et al. (上掲); Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49: 807, 1995; および Rosenfeld et al., Cell 68: 143, 1992を参照のこと。

10

20

30

40

50

**【0059】**

発現ベクターの選択は、該ベクターを発現させることが意図される宿主細胞に依存する。典型的には、発現ベクターは、機能性抗体鎖または断片をコードしているポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターおよび他の調節配列(例えば、エンハンサー)を含む。一部の実施形態では、誘導条件下以外での挿入配列の発現を抑制するために誘導性プロモーターが使用される。誘導性プロモーターとしては、例えば、アラビノース、lacZ、メタロチオネインプロモーターまたはヒートショックプロモーターが挙げられる。形質転換された生物体の培養物は、非誘導条件下で、発現産物が宿主細胞によってより耐容性であるコード配列に対して該集団をバイアスすることなく拡大培養され得る。また、プロモーターに加えて、機能性抗体鎖または断片の効率的な発現のために他の調節エレメントが必要とされる、または所望される場合もあり得る。このようなエレメントとしては典型的には、ATG開始コドンおよび隣接するリボソーム結合部位または他の配列が挙げられる。また、発現の効率は、使用される細胞系に適切なエンハンサーを含めることによって増強され得る(例えば、Scharf et al., Results Probl. Cell Differ. 20: 125, 1994; および Bittner et al., Meth. Enzymol., 153: 516, 1987参照)。例えば、SV40エンハンサーまたはCMVエンハンサーは、哺乳動物宿主細胞内での発現を増大させるために使用され得る。

**【0060】**

また、発現ベクターは、挿入される機能性抗体の配列にコードされたポリペプチドとの融合タンパク質を形成するための分泌シグナル配列位置を供給するものであってもよい。たいていは、挿入される機能性抗体の配列は、ベクター内に含める前にシグナル配列に連結させる。また、場合によっては、機能性抗体の軽鎖および重鎖の可変ドメインをコードしている配列を受容するために使用されるベクターは定常領域またはその一部分もコードしている。かかるベクターでは、可変領域を、定常領域を有する融合タンパク質として発現させることが可能であり、それによりインタクテナ抗体またはその断片の作製がもたらされる。典型的には、かかる定常領域はヒト由来である。

**【0061】**

機能性抗体鎖を収容して発現させるための宿主細胞は原核生物系または真核生物系のいずれかであり得る。一部の好ましい実施形態では、本発明の抗体ポリペプチドを発現および産生させるために哺乳動物宿主細胞が使用される。例えば、該細胞は、内在性免疫グロブリン遺伝子発現するハイブリドーマ細胞株または外来性発現ベクターを収容する哺乳動物の細胞株のいずれかであり得る。このようなものとしては、任意の通常の死に至る、または通常もしくは異常な不死の動物細胞またはヒト細胞が挙げられる。本明細書に例示した細胞株に加えて、インタクテナ免疫グロブリンを分泌し得るいくつかの他の適当な宿主細胞株もまた当該技術分野で知られている。このようなものとしては、例えば、CHO細胞株、種々のHEK 293細胞株、種々のCos細胞株、HeLa細胞、ミエローマ細胞株、形質転換B細胞およびハイブリドーマが挙げられる。ポリペプチドを発現させるた



めの哺乳動物組織の細胞培養の使用は一般的に、例えば、Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987に論考されている。哺乳動物宿主細胞用の発現ベクターには、発現制御配列、例えば複製起点、プロモーターおよびエンハンサー、ならびに必要なプロセッシング情報部位、例えばリボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位および転写ターミネーター配列が含まれ得る。このような発現ベクターは通常、哺乳動物の遺伝子または哺乳動物のウイルスに由来するプロモーターを含む。好適なプロモーターは、構成的、細胞型特異的、期特異的および/またはモジュレーション可能もしくは調節可能なものであり得る。有用なプロモーターとしては、限定されないが、本明細書に例示したEF1 およびヒトUbCプロモーター、メタロチオネインプロモーター、構成的アデノウイルス主要後期プロモーター、デキサメタゾン誘導性MMTVプロモーター、SV40プロモーター、MRP polIIプロモーター、構成的MPSVプロモーター、テトラサイクリン誘導性CMVプロモーター（例えば、ヒト最初期CMVプロモーター）、構成的CMVプロモーター、ならびに当該技術分野で知られたプロモーター-エンハンサーの組合せが挙げられる。

10

20

30

40

50

#### 【0062】

目的のポリヌクレオチド配列を含む発現ベクターを導入するための方法は細胞宿主の型に応じてさまざまである。例えば、原核生物細胞には塩化カルシウム形質転換が一般的に使用されるが、他の細胞宿主ではリン酸カルシウム処理またはエレクトロポレーションが使用され得る（一般的には、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (第3版, 2001)参照)。他の方法としては、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム処理、リボソーム媒介性形質転換、注入およびマイクロインジェクション、弾道飛行方式の方法、ピロソーム、イムノリボソーム、ポリカチオン：核酸コンジュゲート、裸のDNA、人工ビリオン、ヘルペスウイルス構造タンパク質VP22との融合（Elliot and O'Hare, Cell 88:223, 1997）、DNAの薬剤増強性取込み、ならびにエキソピボ形質導入が挙げられる。組換えタンパク質の長期間の高収量産生のためには、安定な発現が多くの場合で所望される。例えば、該抗体鎖または結合断片を安定的に発現する細胞株は、ウイルスの複製起点または内在性発現エレメントおよび選択可能マーカー遺伝子を含む本発明の発現ベクターを用いて調製され得る。ベクターの導入後、細胞は富栄養培地中で1~2日間培養され得、その後、培地を選択培地に交換する。選択可能マーカーの目的は選択のための耐性を付与することであり、その存在により、導入された配列を成功裡に発現する細胞の選択培地中での増殖が可能になる。安定的にトランスフェクトされた耐性細胞は、細胞型に適切な組織培養手法を用いて増殖され得る。

#### 【0063】

##### V. 治療用途

本明細書に開示のTrkB抗体は種々の治療用途に使用され得る。本発明の一部の方法は、TrkB発現細胞、例えば網膜神経節細胞におけるTrkBシグナル伝達経路の活性化を誘導するため、または該経路のシグナル伝達活性を増強するために指示される。このような方法は、細胞のインビトロまたはインビボでの修飾のために使用され得る。このような方法では、治療有効量の本発明のTrkBアゴニストを典型的には細胞と接触させる。本発明の他の一部の方法は、哺乳動物被験体における網膜神経節細胞の再生または生存の促進に関するものである。例えば、このような方法は、目の変性性の病的状態に冒されているか、またはその発症リスクがある被験体の目の視覚機能を回復、改善または保持するために使用され得る。本発明の他の一部の方法は、目の変性性の病的状態を有するか、またはその発症リスクがある被験体の処置または予防に関するものである。このような方法では、治療有効量の本発明のTrkBアゴニストを含む医薬組成物が被験体に投与される。また、本発明のTrkB抗体を含む医薬組成物に加えて、本発明の治療用途では、該抗体をコードしており該抗体を発現する本明細書において論考したポリヌクレオチドまた

はベクターも使用され得る。例えば、本発明の抗体コードポリヌクレオチドまたはベクターを有する組成物が、本明細書に記載の種々の神経変性疾患のための遺伝子療法において使用され得る。

#### 【0064】

多くの目の変性性の病的状態が本発明の治療方法での治療的または予防的処置に適している。このようなものとしては、網膜神経節細胞（RGC）の変性もしくは死滅を特徴とするか、または該変性もしくは死滅と関連している任意の眼疾患または眼障害が挙げられる。かかる疾患または病的状態の具体例としては、例えば、緑内障、視神経損傷、視神経炎、視神経症、網膜中心動脈閉塞症および網膜中心静脈閉塞症が挙げられる。本発明の治療用抗体組成物での処置に適したものであり得る他の眼障害としては、例えば、糖尿病性ニューロパチー、ウェット型およびドライ型の両方の加齢性黄斑変性（AMD）を含む黄斑変性、前部虚血性視神経症（AION）、虚血性網膜症、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、網膜色素変性症ならびに網膜変性が挙げられる。

10

#### 【0065】

一部の実施形態では、本発明により、TrkBを発現する細胞（例えば、網膜神経節細胞）内でのTrkBシグナル伝達活性を、該細胞を本発明の抗体または抗原結合断片と接触させることによって向上させるための方法を提供する。関連する一部の実施形態では、本発明のTrkBアゴニストは、被験体の網膜神経節細胞の生存または再生を促進させるために使用され得る。このような実施形態では、投与されたTrkBアゴニスト薬剤によって誘起されるTrkBシグナル伝達活性の更新の結果、網膜神経節細胞の機能的完全性が保持または回復され得る。種々の実施形態において、投与されるTrkBアゴニスト抗体または抗原結合断片は、裸の（非コンジュゲート）分子であってもよく、合成分子、例えば標的化部分または別の治療用薬剤にコンジュゲートさせた抗体分子であってもよい。該方法は、細胞においてインビトロで、または被験体において（すなわちインビボで）TrkBシグナル伝達を上方調節するために使用され得る。接触させたTrkB発現細胞は、例えば、異常なもしくは障害されたTrkBシグナル伝達の活性化もしくはシグナル伝達活性と関連している障害または網膜神経節細胞の変性もしくは死滅を特徴とする疾患の細胞培養物中または動物モデル内に存在するものであり得る。

20

#### 【0066】

他の一部の実施形態では、本発明により、TrkBシグナル伝達の増強を必要とする被験体を処置するための方法を提供する。このような被験体としては、TrkBシグナル伝達活性の障害と関連している疾患またはTrkBシグナル伝達の増強によって処置される疾患、例えば運動ニューロン疾患、例えば筋萎縮性側索硬化症（ALS）を有するか、該疾患を有する疑いがあるか、またはその発症リスクがある被験体が挙げられる。一部の実施形態では、本発明により、運動ニューロンの生存、再生およびシナプス機能を促進させるための方法を提供する。このような方法は、種々の運動ニューロン疾患、例えばALS、特発性運動ニューロパチー、遺伝性痙性対麻痺（HSP）、原発性側索硬化症（PLS）、進行性筋萎縮症（PMA）、進行性球麻痺（PBP）および偽球麻痺、ベル麻痺または脊髄筋萎縮症（SMA）に冒されている被験体を処置するために使用され得る。他の一部の実施形態では、本発明により、中枢神経系（CNS）のニューロンの生存、再生およびシナプス機能を促進させるための方法を提供する。このような方法は、CNSの変性疾患に罹っている被験体を処置するために容易に使用され得る。多くのCNSの変性疾患または障害が本発明の治療用組成物での処置に適している。このようなものとしては、例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病およびトウレット照応群が挙げられる。

30

40

#### 【0067】

本発明の一部の治療方法は具体的には、網膜神経節細胞の変性または死滅を特徴とする眼障害を有するか、またはその発症リスクがある被験体の処置に関するものである。このようなものとしては、いくつかの目の変性性の病的状態、例えば、緑内障、視神経損傷、視神経炎、視神経症、網膜中心動脈閉塞症、網膜中心静脈閉塞症、糖尿病性ニューロパチ

50

一、ウェット型およびドライ型の両方の加齢性黄斑変性（AMD）を含む黄斑変性、前部虚血性視神経症（AION）ならびに糖尿病性網膜症が挙げられる。

【0068】

一般に、本明細書に記載の種々の治療方法は、被験体に、治療有効量の本発明の単離または精製されたTrkBアゴニスト抗体もしくは抗原結合断片（または該抗体を発現するポリヌクレオチドもしくはベクター）を含む医薬組成物を投与することを伴う。抗体は、本明細書において表1に記載の本発明の任意の抗TrkBアゴニスト抗体またはその誘導体、例えば、抗体NFAT-85から誘導された抗体および/またはNFAT-85のものと同じ結合特異性を有する抗体であり得る。したがって、投与される抗体は、合成抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体もしくは完全ヒト抗体または抗原結合断片であり得る。これは、F(ab)<sub>2</sub>、Fv、scFv、IgGACH<sub>2</sub>、F(ab')<sub>2</sub>、scFv<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、Fab、VL、VH、scFv<sub>4</sub>、scFv<sub>3</sub>、scFv<sub>2</sub>、dsFv、Fvまたは(scFv)<sub>2</sub>であり得る。一部の実施形態では、該方法は、IgG、scFv、dsFv、F(ab')<sub>2</sub>、ダイアボディまたは二価抗体を投与することを含む。一部の実施形態では、投与される抗体または抗原結合断片は、別の治療用薬剤（例えば、目の変性性の病的状態を処置するための既知の薬物もしくは化合物）または他の薬剤（例えば、標的化剤）にコンジュゲートさせたものであり得る。

10

【0069】

本発明のTrkBアゴニスト抗体を他の既知の薬剤との組合せで、TrkBシグナル伝達を促進させるため、および目の変性性の病的状態を処置するために使用してもよい。かかる既知のTrkBアゴニスト化合物としては、例えば、神経栄養因子BDNFおよび神経栄養因子模倣物が挙げられる。既知のTrkBアゴニスト化合物の具体例としては、例えば、L-783, 281アデノシン、CGS 21680などが挙げられる。例えば、Pollack et al. Curr. Drug Targ - CNS and Neurol. Disorders 1: 59 - 80 2002を参照のこと。また、TrkBアゴニスト化合物は、ニューロトロフィンの極めて重要な領域を模倣する小分子であり得る。例えば、該小分子はBDNFの - ターンループの模倣物であり得る。本発明に従って使用され得るかかかる小分子模倣物の具体例は、例えば米国特許出願公開第2007/0060526号に記載されている。好ましくは、TrkBアゴニスト抗体および本発明の方法において使用されるその他の既知のTrkBアゴニスト化合物はTrkBに対して選択的であり、TrkBをTrkAまたはTrkCより大きな程度に活性化させるものである。一部の実施形態では、使用される該薬剤はTrkBに特異的であり、TrkAまたはTrkCを活性化させないものである。

20

30

【0070】

一部の治療用途では、本発明のTrkBアゴニスト抗体は、視神経症または網膜変性障害、例えば緑内障を処置するための他の既知の投薬物またはレジメンとの組合せで使用され得る。例えば、該抗体は、既存の任意のIOP降下薬と一緒に使用され得る。このような既知の薬物としては、例えば、プロスタグランジンアナログ、例えばキサラタン（ラタノプロスト）ならびにルミガン（ピマトロプロスト）、遮断薬、例えばチモロール、ベタキソロールおよびメチプラノロールが挙げられる。治療用IOP降下薬に加えて、本発明の抗体との組合せで使用され得る多くの承認済の排液デバイスが存在する。

40

【0071】

一部の実施形態では、本発明のTrkBアゴニスト抗体または抗原結合分子は、本明細書に記載の治療方法で使用する場合、標的化部分にコンジュゲートさせ得る。標的化部分は、身体の特定の部分、例えば脳またはその区画への局在を指令するタンパク質またはペプチドであり得る。一部の実施形態では、TrkB抗体アゴニストは脳標的化部分と結合または融合され得る。脳標的化部分は共有結合によって（例えば、直接、翻訳による融合、または直接もしくはスペーサー分子（これは切断可能であってもよい）を介してのいずれかによる化学結合によって）結合させてもよく、非共有結合によって結合させてもよい（例えば、可逆的相互作用、例えばアビジン、ビオチン、プロテインA、IgGなどによ

50

って)。本発明のTrkB抗体アゴニストにコンジュゲートさせる脳標的化部分によってTrkBアゴニストの脳送達が増強され得る。いくつかの薬剤が、本発明の実施における脳標的化部分として使用され得る。このようなものとしては、融合タンパク質または治療用薬剤を血液脳関門(BBB)を通過して送達することができるポリペプチドまたは抗体断片が挙げられる。かかる薬剤の例としては、シングルドメイン抗体FC5(Abulrobo et al. J. Neurochem. 95, 1201-1214, 2005); ヒトインスリン受容体に対するモノクローナル抗体mAB 83-14(Pardridge et al. Pharmacol. Res. 12, 807-816, 1995); ヒトトランスフェリン受容体(hTfR)に結合するB2、B6およびB8ペプチド(Xia et al. J. Virol. 74, 11359-11366, 2000); トランスフェリン受容体に対するOX26モノクローナル抗体(Pardridge et al. J. Pharmacol. Exp. Ther. 259, 66-70, 1991); ならびに米国特許第6,306,365号に記載のいくつかのポリペプチドが挙げられる。

10

20

30

40

50

### 【0072】

#### VI. 医薬組成物およびコンビネーション

本発明により、目の変性障害、例えば緑内障を処置するための医薬の製造において本発明のTrkBアゴニストを使用する方法を提供する。かかる病的状態の処置または緩和を必要とする被験体に本発明のTrkBアゴニストが単独で投与され得る。しかしながら、TrkBアゴニストおよび薬学的に許容され得る担体を含む医薬組成物の投与がより好ましい。医薬組成物に使用され得る本発明のTrkBアゴニストの例としては、本明細書に記載の任意のTrkBアゴニスト抗体または抗原結合分子が挙げられる。例示的な組成物は、それぞれ配列番号：14と15、配列番号：16と17、配列番号：18と19、配列番号：20と21、配列番号：22と23、配列番号：24と25、配列番号：26と27、配列番号：28と29、配列番号：30と31、配列番号：32と33、配列番号：34と35、配列番号：36と37または配列番号：38と39に示す成熟した重鎖および軽鎖可変ドメイン配列を有する抗体のうちの1種類以上を含む。一部の実施形態では、抗体は、配列番号：14と15、配列番号：16と17、配列番号：18と19、配列番号：20と21、配列番号：22と23、配列番号：24と25、配列番号：26と27、配列番号：28と29、配列番号：30と31、配列番号：32と33、配列番号：34と35、配列番号：36と37または配列番号：38と39にそれぞれ示す重鎖配列および軽鎖配列を含むものであり得る。本発明の医薬組成物に適した他の抗体としては、配列番号：14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36もしくは38に示す成熟した鎖の配列および/または配列番号：15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37もしくは39に示す成熟した軽鎖の配列を有するものが挙げられる。

### 【0073】

本発明のさらなる例示的な治療用組成物は、配列番号：46~73ならびに配列AAS、YDSおよびGKNからなる群より選択される1、2、3、4、5または6つのCDRを有する抗体を含むものであり得る。しかしながら、一部の実施形態では、抗体は、表1に示して例示した同じ軽鎖または重鎖の3つのCDRの配列を含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、表1に例示した同じ抗体の6つのCDRの配列、例えば、(1)配列番号：46~49、AASおよび配列番号：50(抗体CRE-6); (2)配列番号：51~56(抗体CRE-30もしくはCRE-83); (3)配列番号：51~53、57、58および56(抗体CRE-31もしくはCRE-53); (4)配列番号：51~53、57、55および56(抗体CRE-39もしくはNFAT-79); (5)配列番号：51~55および59(抗体CRE-87); (6)配列番号：51、52、60、57、61および56(抗体CRE-93); (7)配列番号：46、47、62、63、YDSおよび配列番号：64(抗体NFAT-27); (8)配列番号：65~68、GKNおよび配列番号：69(抗体NFAT-40); (9)配列番号：70~72

および54～56(抗体NFAT-44);または(10)配列番号:65～68、GKNおよび配列番号:73(抗体NFAT-85)を有する抗体を含む。さらに別の例示的な医薬組成物はdsFv断片を含み、該断片はそのアミノ酸配列に適宜、当業者によって理解されるように、1つ以上の修飾を含むものであってもよい。

【0074】

また、本発明により、医薬品たるコンビネーション製品(pharmaceutical combination)、例えばキットを提供する。かかる医薬品たるコンビネーション製品は、本開示のTrkBアゴニストであり遊離形態または組成物状態の活性薬剤、1種類以上の不活性な薬剤または他の成分ならびに該薬剤の投与のための使用説明書を含むものであり得る。一部の実施形態では、本発明の治療用キットは、本明細書に記載の医薬組成物中に存在させた1回以上の用量のTrkBアゴニスト(例えば、抗体NFAT-85)、該医薬組成物の硝子体内注射のための適当なデバイスならびに好適な被験体および該注射を行なうためのプロトコルを詳述した使用説明書を含むものであり得る。

10

【0075】

TrkBアゴニスト抗体を含む医薬組成物は種々の形態に調製され得る。好適な固形または液状の医薬調製物形態は、例えば顆粒剤、散剤、錠剤、コート錠、(マイクロ)カプセル剤、坐剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤、クリーム剤、エアロゾル剤、アンプル形態の滴剤または注射用液剤、また、活性化化合物の長時間放出を伴う調製物である。また、本発明の抗体組成物を、界面活性剤の形態で調製し、被験体に投与してもよい。本発明の医薬組成物は、当該技術分野でよく知られた標準的なプロトコル、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Gennaro(編), Lippincott Williams & Wilkins(第20版, 2003)に従って調製され得る。医薬組成物は、典型的には、目の変性障害の症状を軽減または寛解させるのに十分な有効量のTrkBアゴニスト抗体を含む。TrkBアゴニスト抗体に加えて、医薬組成物にはまた、該組成物を増強もしくは安定化させるか、または該組成物の調製を容易にする特定の薬学的に許容され得る担体も含めてもよい。例えば、TrkBアゴニスト抗体は、投与前に、安定性または薬理学的特性を増強するために担体タンパク質、例えばオボアルブミンまたは血清アルブミンと複合体形成され得る。また、種々の形態の医薬組成物にも賦形剤ならびに添加剤および/または補助剤、例えば崩壊剤、結合剤、コーティング剤、膨潤剤、滑沢剤、着色料、甘味料、および当該技術分野で一般的に使用されている不活性希釈剤(精製水など)を含むエリキシル剤が含まれ得る。

20

30

【0076】

薬学的に許容され得る担体は、一部において、投与される具体的な組成物ならびに該組成物を投与するために使用される具体的な方法によって決定される。また、該担体は、その他の成分と適合性であり被験体に有害でないという意味において薬学的および生理学的の両方で許容され得るものであるのがよい。担体は、投与に所望される調製物の形態、例えば、経口、舌下、経直腸、経鼻、静脈内または非経口に依りて多種多様な形態であり得る。例えば、非水性溶媒の例はプロピレングルコール、ポリエチレングルコール、植物油、例えばオリーブ油、および注射用有機エステル、例えばオレイン酸エチルである。閉鎖包帯用の担体は、皮膚透過性を増大させて吸収を増強するために使用され得る。経口投与のための液状投薬形態は、一般的に、該液状投薬形態を含むリポソーム液剤に構成され得る。

40

【0077】

治療用途または予防用途のために、TrkBアゴニスト抗体を含む医薬組成物は、局所または全身に治療有効量または治療有効用量で投与され得る。例えば、該組成物は、非経口、経腸、注射、急速輸液、鼻咽腔吸収、皮膚吸収および経口で投与され得る。しかしながら、好ましい実施形態では、意図された治療効果を得るために該組成物の局所投与が所望される。このような実施形態の一部のものでは、該組成物は、硝子体内注射による処置を必要とする被験体に投与され得る。これは、当該技術分野で知られた標準的な手順に従

50

って行なわれ得る。例えば、Russelakis - Carneiro et al., Neuropathol. Appl. Neurobiol. 25: 196 - 206, 1999; および Wray et al., Arch. Neurol. 33: 183 - 5, 1976 を参照のこと。本発明の医薬組成物を被験体の目に送達するために使用され得る他の局所投与経路としては、例えば眼内、眼窩内、結膜下、網膜下または経強膜経路が挙げられる。局所投与様式では、全身投与の際に起こり得る副作用（例えば、全身毒性）の発生の可能性が低減または解消され得ることが想定される。他の一部の実施形態では、本発明の医薬組成物はまた、患者に、例えば経口または非経口経路によって全身投与され得る。非経口経路としては、例えば静脈内、動脈内 (intrarterial)、筋肉内、皮内、皮下、鼻腔内および腹腔内経路が挙げられる。

10

#### 【0078】

治療有効量は、被験体の処置対象の障害または病的状態の症状が低減または抑止されるのに十分な量を意味する。本発明の実施において、投与される TrkB アゴニスト抗体の量は、眼変性、例えば RGC の変性または死滅の遅滞、停止または逆転のために有効なものであるのがよい。かかる有効量は、被験体が冒されている眼障害、障害の病期および重症度、被験体の一般的な体調（例えば、身長、体重、年齢および健康状態）、投与される具体的な化合物ならびに他の要素に応じて被験体ごとに異なる。所与の TrkB アゴニスト抗体について、当業者は、常套的に実施されている調剤法を使用することによって該化合物の有効量を容易に特定することができよう。典型的には、インビトロで使用される投薬量が、医薬組成物のインサイチュ投与に有用な量の有用な手引きをもたらし得、ヒト被験体の具体的な障害の処置のための有効投薬量を決定するために動物モデルが使用され得る。たいていは、適当な治療用量は臨床試験により、哺乳動物種で最大耐用量を調べ、正常ヒト被験体で安全な投薬量を調べることで決定され得る。

20

#### 【0079】

一般に、高投薬量が必要とされ得る特定の状況下を除き、TrkB アゴニスト抗体の好ましい投薬量は通常、1日あたり約 0.001 ~ 約 1000 mg、より通常には約 0.01 ~ 約 500 mg の範囲内である。一般的な法則として、投与される TrkB アゴニスト抗体の量は、被験体の病的状態が有効に確実に抑制または最小限にされる最小投薬量である。また、投与される投薬量および投与頻度は、処置が予防的か治療的かに応じて異なり得る。予防用途では、相対的に低投薬量が相対的に低頻度の間隔で長期間にわたって投与され得る。一部の被験体は、死ぬまで処置を受けることが継続され得る。治療用途では、相対的に短い間隔で相対的に高投薬量が、疾患の進行が低減または停止するまで、好ましくは被験体が眼球血管疾患の症状の一部または完全寛解を示すまで必要とされ得る。その後、被験体に予防体制を施してもよい。容易にわかるように、上記の投薬量範囲は、本明細書における教示に対する一般手引きを示してサポートすることを意図したものであり、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。また、本発明の医薬組成物の調製および投与のためのさらなる手引きは当該技術分野において報告されている。例えば、Goodman & Gilman's The Pharmacological Bases of Therapeutics, Hardman et al. 編, McGraw-Hill Professional (第10版, 2001); Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Gennaro 編, Lippincott Williams & Wilkins (第20版, 2003); および Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Ansel et al. (編), Lippincott Williams & Wilkins (第7版, 1999) を参照のこと。

30

40

#### 【0080】

##### [実施例]

以下の実施例は、本発明のさらなる実例を示すために示しており、本発明の範囲を限定するために示したものではない。本発明の他の変形例は当業者に容易にわかり、添付の特

50

許請求の範囲に包含される。

【0081】

[実施例1]

TrkBアゴニストAbの開発

細胞株：本明細書に例示した特異的TrkBアゴニスト抗体は、scFv抗体のコンビナトリアルライブラリーの機能ベースのスクリーニングによって選択し、同定した。このスクリーニングを行なうための詳細な手順はZhang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109:15728-33, 2012; およびZhang et al., Chem. Biol. 20:734-41, 2013に記載されている。簡単には、二段階法を使用した。第1に、ヒトTrkBをCHO細胞内にレンチウイルスベクターを用いてトランスフェクトすることによりレポーター細胞株を作製した。また、GFPレポーターに連結させたNFATプロモーターを使用し、コグネイトリガンDBDNFで活性化されたら蛍光シグナルが発生するように細胞にレポーターカセットもトランスフェクトした。第2に、 $10^{11}$ 個のscFvファージのライブラリーを使用し、ヒトTrkBのエクトドメインをパニングした。パニングプロセスでの陽性のもの(ヒット)をレンチウイルスベクター内にクローニングし、クローンをレポーター細胞に感染多重度(MOI)約1で感染させた(図1)。第2のスクリーニングでは、読み出し情報としてNFAT活性化を使用するのではなく、CREプロモーターをGFPレポーターに連結させたレポーターカセットを使用した。

10

【0082】

機能でのこの選択でヒットしたものを収集し、3回の感染/選択によりディープシーケンシングで多数のscFvクローンを得た。このscFv配列をpFUSE IgG骨格(ヒトIgG<sub>1</sub>)内にクローニングし、scFv-Fc融合抗体を作製した。選択されたTrkB抗体の活性の予備試験では、scFv-Fc構築物をHEK293細胞内にトランスフェクトした。2日間の培養後、各培養クローンの上清みを用いて、TrkBレポーター細胞株の活性化に対する効果を調べた。この試験の結果を図2に示す。図に示されるように、同定されたTrkB scFvアゴニスト抗体(例えば、scFv CRE-30)は、TrkBレポーター細胞株の活性化においてさまざまな度合の活性を示した。

20

【0083】

同定された抗体の活性をさらに特性評価するため、選択されたscFv-Fc抗体を、プロテインGアフィニティカラムを用いて精製し、レポーター細胞アッセイで試験して効力をBDNFと比べて測定した(図3)。図に示されるように、いくつかのAbはBDNFと比較すると完全アゴニストであったが、他のものは一部アゴニスト作用を示した。精製して試験したAb内でも、効力は0.3~30nMと異なっていた。Ab NFAT-85は最も高い効力( $EC_{50} = 1$  nM)を示し、完全な有効性を示した。すべてのTrkBアゴニストAbをTrkAレポーター細胞内での選択性について試験した。図4は、BDNFもいずれのAbもactivated TrkAを活性化しなかったが、NGFでは予測された口バスタな応答が得られたことを示し、選択性が確認される。

30

【0084】

選択されたTrkBアゴニストscFv抗体の一部のもののアミノ酸配列を表1に示す。「CRE」レポーターでのスクリーニングで同定された抗体クローンには表中に「CRE-」と示し、「NFAT」レポーターでのスクリーニングで同定された抗体には「NFAT-」と表示している。scFv抗体の重鎖および軽鎖の可変領域の配列ならびに他の配列エレメント(例えば、CDR)を、表2に示した配列識別子で表示している。

40

【0085】

表1. 機能スクリーニングで同定されたTrkBアゴニストscFv抗体

CRE-6 (配列番号:1)

MAQVQLVQSGAEVKKPAGESLKISCKGSGYSFISYWIGWVRQMPFGKGLEWMGHIYP  
GDSDFRYSFSPFQCQVTTISADKSISTAYLQWRSLKASDTAMYVCARQGASSTSYDYW

50

GQGPRSSPSPQSGGGSGGGSGGGSGGGSEIVLTQSPSSLSASVGDRVTTCRASQSISSYLN  
WYQQKPGKAPKLLIYAASSLQNGVPSRFSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQA  
NSFPVAFGQGTKVEIKR

CRE-30 (配列番号:2)

MAQVQLVESGAALVQPGGSLRLSCAASGFIFSRYNMNWVRQAPGKRPEWISFINTD  
GSVIHYADSVEGRFTVSRDNVNNSLYLQMNDLRDDDTAVYYCVROMLFWGQGTL  
VTVSSGGGGSQAVLTQPSSLSASPGASASLTCTLRSGINVGTYRIYWYQQKPGSP  
PQYLLRYKSDSDKHQGSGVPSRFSGSKAASANAGILLISGLQSEDEADYYCAIWHSS  
AWVFGGGTQLTVL

10

CRE-31 (配列番号:3)

MAQVQLVQSGAALVQPGGSLRLSCAASGFIFSRYNMNWVRQAPGKRPEWISFINTD  
GSVIHYADSVEGRFTVSRDNVNNSLYLQMNDLRDDDTAVYYCVROMLFWGQGTL  
VTVSSGGGGSQAVLTQPSSLSASPGASVSLTCTLRSGINVGAYRVYWYQQKPGSPP  
FLLRYKTDSDKQQGSGVSSRFSGSRDASANAGILLISGLRSEDEADYYCAIWHSSA  
VFGGGTQLTVL

CRE-39 (配列番号:4)

MAQVQLQESGAALVQPGGSLRLSCAASGFIFSRYNMNWVRQAPGKRPEWISFINTD  
GSVIHYADSVEGRFSVSRDNVNNSLYLQMNDLRDDDTAVYYCVROMLFWGQGTT  
VTVSSGGGGSQAVLTQPSSLSASPGASVSLTCTLRSGINVGAYRIYWYQQKPGSPP  
QFLLRYKSDSDKQQGSGVPSRFSGSRDASANAGILLISGLRSEDEADYYCAIWHSSA  
WVFGGGTQLTVL

20

CRE-53 (配列番号:5)

MAQVQLVESGAALVQPGGSLRLSCAASGFIFSRYNMNWVRQAPGKRPEWISFINTD  
GSVIHYADSVEGRFTVSRDNVNNSLYLQMNDLRDDDTAVYYCVROMLFWGQGTT  
VTVSSGGGGSQAVLTQPSSLSASPGASVSLTCTLRSGINVGAYRVYWYQQKPGSP  
PQFLLRYKTDSDKQQGSGVPSRFSGSRDASANAGILLISGLRSEDEADYYCAIWHSS  
AWVFGGGTKLTVL

30

CRE-83 (配列番号:6)

MAQVQLVESGAALVQPGGSLRLSCAASGFIFSRYNMNWVRQAPGKRPEWISFINTD  
GSVIHYADSVEGRFTVSRDNVNNSLYLQMNDLRDDDTAVYYCVROMLFWGQGTL  
VTVSSGGGGSQAVLTQPSSLSASPGASASLTCTLRSGINVGTYRIYWYQQKPGSP  
PQYLLRYKSDSDKQQGSGVPSRFSGSRDASANAGILLISGLRSEDEADYYCAIWHSS  
AWVFGGGTKLTVL

CRE-87 (配列番号:7)

MAQVQLVESGAALVQPGGSLRLSCAASGFIFSRYNMNWVRQAPGKRPEWISFINTD  
GSVIHYADSVEGRFTVSRDNVNNSLYLQMNDLRDDDTAVYYCVROMLFWGQGTL  
VTVSSGGGGSQAVLTQPSSLSASPGASASLTCTLRSGINVGTYRIYWYQQKPGSP  
PQYLLRYKSDSDKQQGSGVPSRFSGSRDASANAGILLISGLRSEDEADYYCAIWHSS  
ACVFGGGTKLTVL

40



## CRE-93 (配列番号:8)

MAQVQLQESGAALVQPGGSLRLSCAASGFI**FSRY**NMNVWRQAPGKRPEWISFIN**ID**  
GSVIHYADSVEGRFSVSRD**NVNNSLYLQMN**DLRDDDTAVYYC**ARQLLYWGQ**GTV  
 VTVSSGGGGGSQA**VLTPSSLSASPGASVSLTCTLRSGIN**VGAYRIY**WYQQKPGSP**  
 Q**FLRLRYKSD**SDK**Q**QGS**GVPSRFS**GSKDASANAGILLISGLRSEDEADYYCAI**WHSSA**  
 W**V**FGGGT**Q**LT**V**L

## NFAT-27 (配列番号:9)

QVQLVQSGAEVKKP**GESL**KISCKGSGYS**F**T**S**YWIGWVRQMPGK**GLEWMGI**Y**PGDS**  
 D**TR**YSP**S**FQ**Q**Q**V**TISVDNSVST**TYLQ**LNNLQASDTAMYYC**ATRVLPAGH**FYTL**D**VW  
 GQ**GT**L**V**TVSSGGGGSGGGGSSSYVLT**QPPSVSVAPGETAILTCVGN**NIGDK**FV**  
 HWY**Q**Q**KPGQAPV**LVMY**YDSDR**PSGIPER**FSGSNSGNTATLTISR**VEAGDEGE**YYCQ**  
 Y**W**DNSS**NOG**VFGGGT**Q**LT**V**L

10

## NFAT-40 (配列番号:10)

MAQVQLQ**QSGPGLVKPSQ**TL**SLTCVISGDSVSDNSGAWN**WIRQSPSR**GLEWLG**R**T**Y  
YRSKWYTDYADSVKSRIT**IPDIPKNQFSLHLNSVTP**EDTAVYYC**VRG**Y**Y**AF**HI**WG  
 Q**GT**M**V**TVSSGGGGSS**SELTQDPAVSVALGQTVRITCQGD**SLR**TY**YASWY**Q**Q**KPG**  
 QAPLL**VIYQKNNRPSGIPDR**FSGSSSGNTASLTITGAQA**ED**ADYYC**NSRDGSGNNV**  
 VFGGGT**K**LT**V**L

20

## NFAT-44 (配列番号:11)

MAQVQLVQSGSELKKPGASVKV**SCKASGYT**F**T**SYAMNVWRQAP**Q**GLEW**M**GW**I**  
 NTNTGN**PT**YA**Q**G**F**TGRFV**SLDTSVSTAYLQISSLKA**EDTAVYYC**ASRLAAAG**FDY  
 WGQ**GT**L**V**TVSSGGGGSGGGGSSQA**VLTPSSLSASPGASASLTCTLRSGIN**VG  
TYRIYWY**Q**Q**KPGSP**QYLL**RYKSDSDKQ**QGS**GVPSRFS**GSKDASANAGILLISGLR**S**  
 EDEADYYCAI**WHSSA**W**V**FGGGT**Q**LT**V**L

## NFAT-79 (配列番号:12)

MAQVQLVESGAALVQPGGSLRLSCAASGFI**FSRY**NMNVWRQAPGKRPEWISFIN**ID**  
GSVIHYADSVEGRFTVSRD**NVNNSLYLQMN**DLRDDDTAVYYC**VRQMLFWGQ**GTL  
 VTVSSGGGGGSQA**VLTPSSLSASPGASVSLTCTLRSGIN**VGAYRIY**WYQQKPGSP**  
 PQYLL**RYKSDSDKQ**QGS**GVPSRFS**GSKDASANAGILLISGLRSEDEADYYCAI**WHSS**  
 A**W**VFGGGT**K**LT**V**L

30

## NFAT-85 (配列番号:13)

MAQVQLQ**QSGPGLVKPSQ**TL**SLTCVISGDSVSDNSGAWN**WIRQSPSR**GLEWLG**R**T**Y  
YRSKWYTDYADSVKSRIT**IPDIPKNQFSLHLNSVTP**EDTAVYYC**VRG**Y**Y**AF**HI**WG  
 Q**GT**M**V**TVSSGGGGSS**SELTQDPAVSVALGQTVRITCQGD**SLR**TY**YASWY**Q**Q**KPG**  
 QAPV**LV**AAG**KNNRPSGIPDR**FSASSSGNTASLTITGAQA**ED**ADYYC**SSRDSSRSHH**  
 LLFGGGT**K**V**T**L

各 s c F V 配列は、G S リッチリンカー（イタリック体）によって軽鎖可変領域の配列に  
 連結された重鎖可変領域の配列を含む。重鎖 C D R の配列に下線を付し、軽鎖 C D R の配  
 列に二重下線を付している。

40

## 【表 1】

表 2.TrkB アゴニスト scFV 抗体の配列成分

scFv(配列番号:)	H鎖可変領域(配列番号:)	L鎖可変領域(配列番号:)	リンカー(配列番号:)	HCDR1~3(配列番号:)	LCDR1~3(配列番号:)
CRE-6(1)	14	15	40	46、47、48	49、AAS、50
CRE-30(2)	16	17	41	51、52、53	54、55、56
CRE-31(3)	18	19	42	51、52、53	57、58、56
CRE-39(4)	20	21	43	51、52、53	57、55、56
CRE-53(5)	22	23	44	51、52、53	57、58、56
CRE-83(6)	24	25	41	51、52、53	54、55、56
CRE-87(7)	26	27	41	51、52、53	54、55、59
CRE-93(8)	28	29	43	51、52、60	57、61、56
NFAT-27(9)	30	31	45	46、47、62	63、YDS、64
NFAT-40(10)	32	33	44	65、66、67	68、GKN、69
NFAT-44(11)	34	35	45	70、71、72	54、55、56
NFAT-79(12)	36	37	44	51、52、53	57、55、56
NFAT-85(13)	38	39	44	65、66、67	68、GKN、73

10

20

## 【0086】

## [実施例 2]

シグナル伝達における TrkB アゴニスト抗体の機能

アゴニスト Ab による TrkB シグナル伝達のさらなる特性評価を CHO レポーター細胞において行ない、BDNF のものと比較した。アゴニスト Ab は、度合は異なるが、5分と30分の時点で P-PLC、P-Akt および P-MAPK のリン酸化のシグナル伝達を刺激した(図 B5); レベルおよび時間的推移は BDNF と比べてさまざまであったが、シグナル強度はレポーター細胞内の蛍光シグナルに対する効果と相関している傾向にあった(図 5 参照)。

30

## 【0087】

BDNF / TrkB の古典的シグナル伝達は、Akt、MAPK および PLC 経路によるリン酸化カスケードを伴う。BDNF の機能、例えば生存、分化、神経突起伸長およびシナプス可塑性は、これらの経路の種々の側面に帰するものである。また、同定された TrkB アゴニスト Ab を、一次ニューロンにおける栄養活性およびシグナル伝達についても試験した。Ab NFAT-85、NFAT-44 および NFAT-27 は、3日間にわたる培養状態において BDNF (図示せず) と同様にマウス感覚ニューロンの生存を維持することがわかった。Ab NFAT-85 とのマウス皮質ニューロンのインキュベーションにより、時間依存性の TrkB のチロシンリン酸化がもたらされた。しかしながら、TrkB ホスホ-タンパク質のパターンは BDNF のものと相違しており、おそらく TrkB の切断産物を示していた(図 6)。TrkB アゴニスト Ab によるシグナル伝達が相違する可能性は現在調査中である。

40

## 【0088】

BDNF 活性化の下流標的を調べるため、シナプスタンパク質 Arc をマウスの一次皮質ニューロンにおいて Ab または BDNF での処理後に測定した。Arc は、最初は細胞骨格関連タンパク質として同定された。最近の試験により、樹状突起スパインにおいて Arc 発現の一過性増大が、シナプスの形態的拡大および安定な LTP の下地となっていると考えられている F-アクチンネットワークの安定な拡張と関連づけられている。BDNF (長く、シナプス可塑性および記憶保持に関与してきた) は、Arc 依存性の固定化を

50

活性化し、アクチン依存性のスパイン伸長に必要である。現時点での証拠により、F-アクチン形成、ArcおよびLTP固定化時の変換の互恵的相互作用の可能性がさらに示唆される。この試験の結果を図7に示す。BDNFと同様、抗体NFAT-85は2~4時間のインキュベーション後、Arcを刺激した。

【0089】

抗TrkBアゴニストAbをヒトTrkB受容体を用いたパニングおよび選択によって見出したため、本発明者らは、今後のインビトロおよびインビボ試験のために齧歯類細胞に対するAbの相対効力を調べた。これを調べるため、本発明者らは、BDNFに応答することが以前に示されたマウス胚性幹細胞株の細胞を使用し、Ab NFAT-85およびBDNFによって刺激されたTrkBリン酸化を比較した。Ab NFAT-85はリン酸化を濃度依存的様式で増大させることがわかった。しかしながら、効力は、ヒトレポーター細胞に対する効果よりも少なくとも2桁小さかった(約1nM)。マウス細胞およびヒト細胞の両方において、BDNFでは約2nMでロバストなシグナル伝達をもたらされた(図8)。

【0090】

総合すると、シグナル伝達および下流マーカーの試験は、アゴニストAbによる選択的な様式でのTrkB結合と整合する。マウス細胞における濃度-応答により、さらなる齧歯類試験のためのAb NFAT-85の相対効力を規定する。

【0091】

[実施例3]

網膜培養系におけるTrkBアゴニストAbの効果

インビトロでの網膜の生理機能に対するTrkBアゴニストの効果に関する試験を開始するため、マウス網膜外植片培養系を確立した。簡単には、成体マウスの網膜を切除分離し、培養培地中に(RGC層を上に向けて)0~14日の期間入れた。規定によりRGCを軸索切断し;この期間中、種々の網膜層およびRGC樹状突起領域(dendritic field)の進行性の減少がみられる。RGC樹状突起の退縮は、ショール解析(これは、樹状突起領域パラメータを細胞体からの距離の関数として測定する)による評価時、培養状態で6時間という早期に明白になる。培養状態で3日目までに、樹状突起の交差および樹状突起の分岐の有意な減少がみられる。

【0092】

3日間の培養期間により、RGCの樹状突起樹に対するBDNFおよびTrkBアゴニストAbの神経保護効果または神経再生効果について試験するための良好なダイナミックレンジが得られる。外植片を100ng/mlのBDNFとともにインキュベーションすると樹状突起の退縮が有意にブロックされ、その結果、培養状態で3日後のショール曲線下面積および樹状突起の分岐が時間点ゼロの外植片のものと同様になるということが観察され、軸索切断に対する樹状突起の退縮応答の完全な保護が示唆された。BDNFが軸索切断誘導性樹状突起の退縮を逆転させ得るかどうかを調べるため、外植片を培養状態で3日間維持し、この時点でBDNFを添加し、ショール解析を行なった。特筆すべきことに、BDNFの遅延適用でもパラメータに対する退縮応答は逆転され、この場合も時間点ゼロの外植片のものと同様であり、BDNFは損傷ニューロンにおいて神経再生の出芽応答を誘導することが示唆された。

【0093】

このパラダイムにより、TrkBアゴニストAbが網膜外植片において、BDNFで観察されたものと同様に樹状突起の退縮を抑制できるかどうかを試験するための土台が確立される。図9は、Ab NFAT-85が、軸索切断したRGC樹状突起の樹状突起パラメータをBDNFと同一の大きさに維持したことを示し、他の細胞型においてAb NFAT-85で観察された生化学パラメータおよびシグナル伝達パラメータが確認された。今後の実験で、Ab NFAT-85の遅延投与の効果、ならびにこの培養系におけるアゴニストAbの効果の持続性を調べる。

【0094】

10

20

30

40

50

上記の未発表の結果の確証において、最近の2例の報告で、RGCに対するBDNFの栄養性効果が示されている。第1に、Johnson et al. (Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 57: 253 - 264, 2016)により、BDNF + CNTF (毛様体神経栄養因子)をマウス網膜外植片に投与すると、7日目にRGCの分岐セグメント、接合部および末端分岐の数が改善されることが示された。また、Domenici et al. (PloS One 9(12): e115579, 2014)により、BDNFの硝子体内適用または経表面適用すると、自然発生緑内障のDBA/2Jマウスモデルでの電気生理学的評価時(図示せず)、視覚機能が改善されることが示された。興味深いことに、このような効果はIOPの上昇とは無関係に生じた。

【0095】

10

[実施例4]

緑内障のラットモデルにおけるTrkBアゴニストAbの有効性。

緑内障の高眼圧症(OHT)モデル作製をBrown Norwayラットにおいて、滅菌した5 $\mu$ mの磁気マイクロビーズを前眼房内に注入することによって行なった。実験手順は本質的に、Samsel et al., Invest. Ophthalmol. 52: 1671, 2011; およびMorgan and Tribble, Exp. Eye Res. 141: 9 - 14, 2015に記載のとおりに行なった。磁石を用いてビーズを虹彩角膜管に誘引し、小柱網を破壊し、ガラス質の流出を抑制し、続いて眼圧(IOP)を上昇させた。IOPの上昇をリバウンドトノメータで定期的に測定した。ビーズ注入は左目に行ない、右目は対照として使用した。

20

【0096】

ビーズ注入後5週目に、ラット左目に、硝子体内注射によってリン酸緩衝生理食塩水(PBS)、500ngのTrkBアゴニスト抗体NFAT-85(Ab85)または500ngのBDNFを1 $\mu$ lの容量で投与した。一部の動物では、Ab85またはBDNFの効果は正常眼圧(NT)の目(磁気マイクロビーズ注入を受けていない)において調べた。2週間後(マイクロビーズ注入後7週目)、ラットを致死させ、網膜を取り出し、網膜神経節細胞およびその樹状突起樹のDiolistic標識のために調製した。樹部の形態学(樹状突起の分岐指数、樹状突起の長さおよび樹状突起の交差)をショール解析によって定量した。網膜1つあたり平均6~10個の細胞を分析した。実験パラダイムの概要を図10に示す。

30

【0097】

図11は、PBS、Ab85またはBDNFで処置したOHT群およびNT群のラットの平均IOPおよびピークIOPレベル(単位: mmHg)を示す。この方法では、IOPはマイクロビーズ注入後、早期に上昇し、約3週間高値のままであり、4週間までに正常レベルに戻った。

【0098】

図12は、ショール解析による評価時の樹状突起樹の交差の平均の定量を示す。上のグラフは、正常眼圧(NT)の目である対照と比較した種々の薬剤で処置したOHTラットの比較である。BDNFおよびAb85(この方が度合がより大きい)は、ともに、PBS処理した目と比べて交差の増大を示し、NTの目とは異なっていない。下のプロットは、NTの目をBDNFまたはAb85で処置すると平均交差は有意に改変されなかったことを示す(OHTを比較点としてプロット)。

40

【0099】

図13は、図12に示すショール解析での曲線下面積(AUC)、分岐指数および樹状突起の長さの統計的比較を示す。すべての測定値で、OHT+PBSラットでは、NTの目と比べて有意に低かった。また、OHT+Ab85またはBDNFのいずれかでは、これらの測定値はNTの目に等しい値まで寛解した。Ab85処置もBDNF処置のなしのNTの目はNT対照と異なっていた。

【0100】

この試験の結果により、高眼圧緑内障のモデルのラットの網膜神経節ニューロンの樹状

50

突起樹に対する TrkB アゴニスト Ab の再生性のプラスの効果を示された。重要なことに、この再生効果は、緑内障に対して臨床的に実施されている病変後処置パラダイムと同様、眼圧上昇によって引き起こされる損傷の誘導後に生じる。

【0101】

[実施例5]

TrkB と TNF を標的化する二重特異性抗体

本発明らは、次いで、本明細書に記載の TrkB アゴニスト抗体 Ab85 およびよく知られた抗 TNF 抗体ヒュミラ (アダリムマブ) から二重特異性抗体を作製することを試み、概念実証の二重特異性抗体構造物を作製した。この二重特異性分子構造物は、Ab85 (TrkB 抗体) の一方のアームとアダリムマブの他方のアームを含む。簡単には、Ab85 scFv 断片を、Y407T 変異を有するヒト IgG1 Fc 断片と融合させた。得られた融合タンパク質を配列番号: 74 (Ab85 - Fc (407)) に示す。一方で、アダリムマブの Fab 重鎖を、T366Y 変異を有するヒト IgG1 Fc 断片と融合させた。得られた融合タンパク質を配列番号: 75 (アダリムマブ - 重鎖 - Fc (366)) に示す。

10

【0102】

二重特異性抗体の発現および合成のため、これらの2つの融合配列 (Ab85 - Fc (407)、アダリムマブ - 重鎖 - Fc (366)) を、アダリムマブの軽鎖コードコード (coding encoding) ベクターとともに一緒に Expi293 細胞内にトランスフェクトする。合成された抗体は、次いで、プロテインGアフィニティクロマトグラフィーによって精製され得る。

20

【0103】

配列番号: 74 (Ab85 - Fc (407))

MAQVQLQQSGPGLVKPSQTLSSLTCVIVSGDSVSDNSGAWNWI  
IRQSPSRGLEWLGRTYYSKWTADSVKSRITIIIPDIP  
KNQFSLHLNSVTPEDTAVYYCVRGYYAFHIWGGQGTMTVT  
SSGSGGGGSSSELTQDPAVSVVALGQTVRITCQGD SLRTYY  
ASWYQQKPGQAPVLAAGKNNRPSGIPDRFSASSSGNTAS  
LTITGAQAEDYCYCSRDSRSRSHHLLFGGGTKVTVLGG  
LGG LASEPKSCDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD  
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT  
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP  
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV  
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLTSK  
LTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

30

配列番号: 75 (アダリムマブ - 重鎖 - Fc (366))

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTTFDDYAMHWVRQA  
PGKGLEWVSAITWNSGHIDYADSVVEGRFTISRDNANKNSLY  
LQMNSLRAEDTAVYYCAKVS YLSTASSLDYWGQGT LVTVS  
SASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV  
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSSLGTQ  
TYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTCPCPAPELLG  
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  
WYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG  
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD  
ELTKNQVSLYCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP  
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHY  
TQKSLSLSPGK

40

前述の発明は、明瞭な理解の目的で実例および一例として、ある程度詳細に説明しているが、当業者には、本発明の教示に鑑みて、添付の特許請求の範囲の趣旨および範囲から

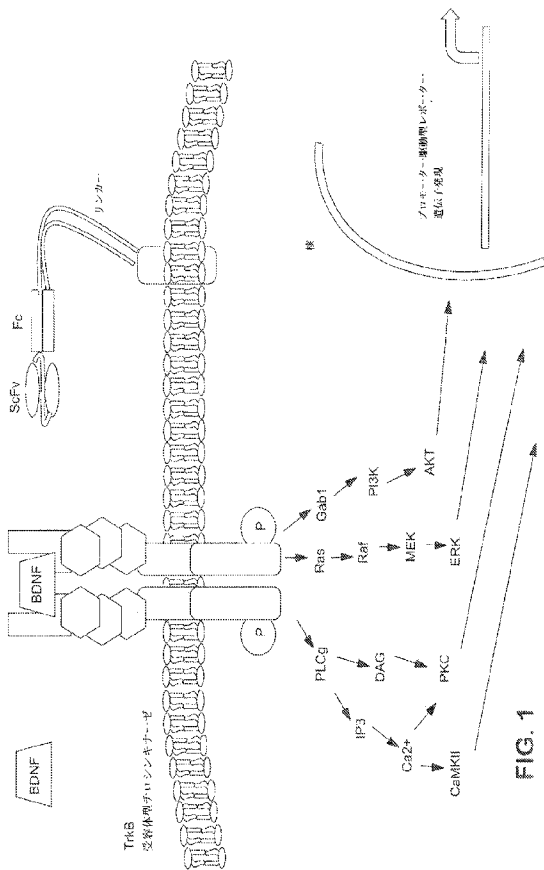
50

逸脱することなく、本発明に対していくつかの変更および修正が行なわれ得ることが容易にわかるであろう。

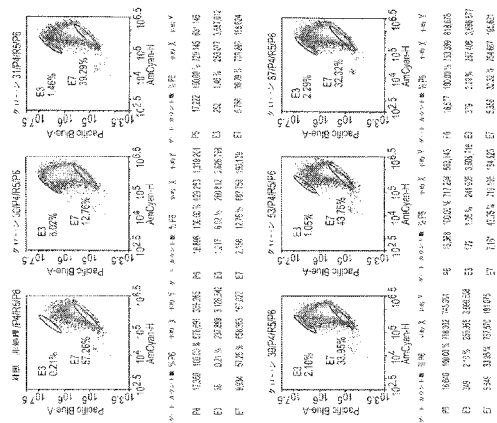
【0104】

本明細書において挙げた刊行物、データベース、GenBank配列、特許および特許出願はすべて、引用により、あたかも各々が具体的に個々に示されて引用により組み込まれているかのごとく本明細書に組み込まれる。

【図1】



【図2】



【 図 3 】

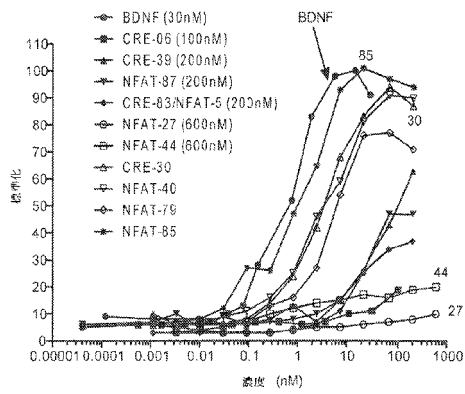


FIG. 3

【 図 5 】

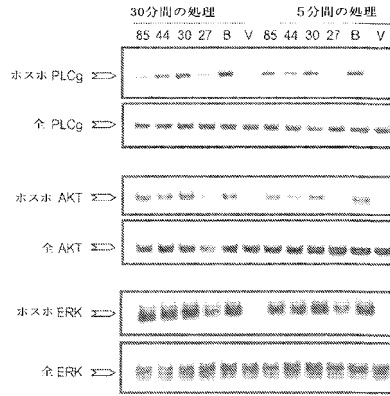


FIG. 5

【 図 4 】

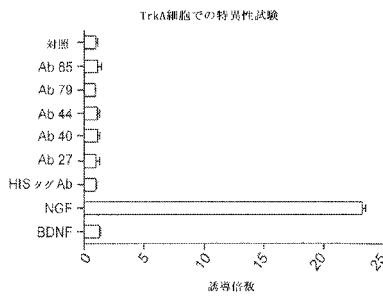


FIG. 4

【 図 6 】

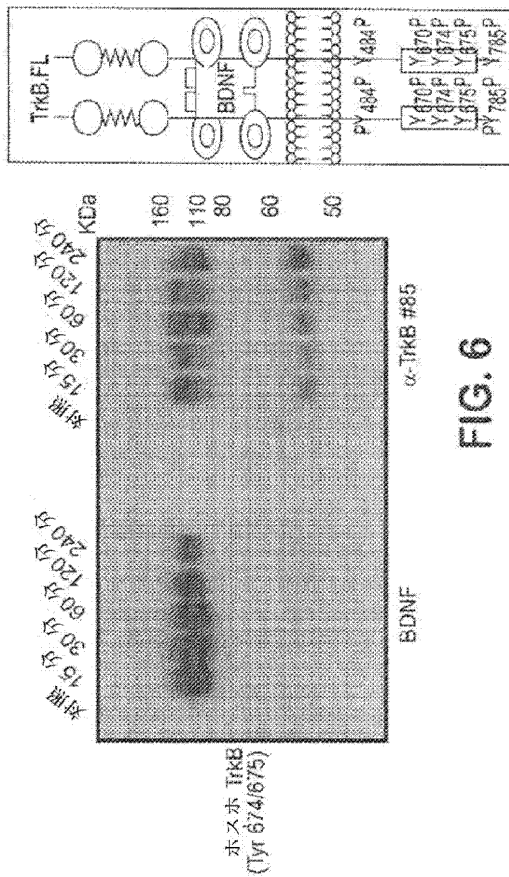


FIG. 6

【 図 7 】

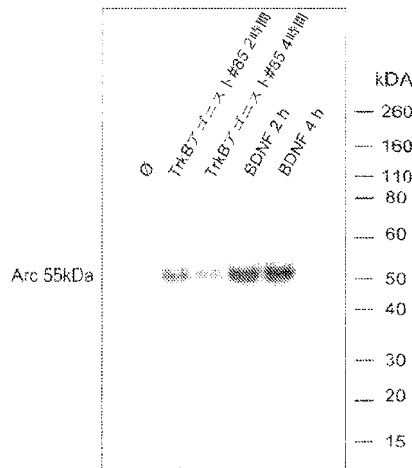


FIG. 7

【 図 8 】

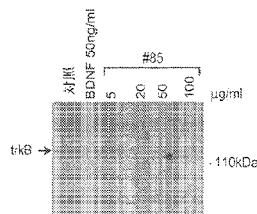


FIG. 8

【 図 9 】

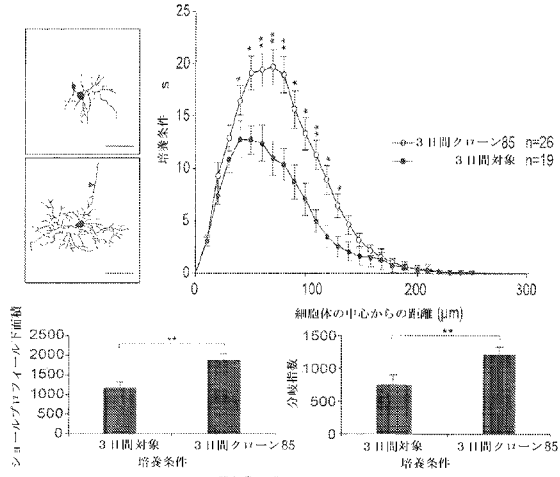


FIG. 9

【 図 10 】

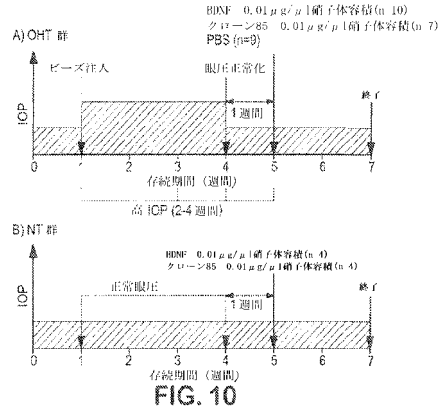


FIG. 10

【 図 11 】

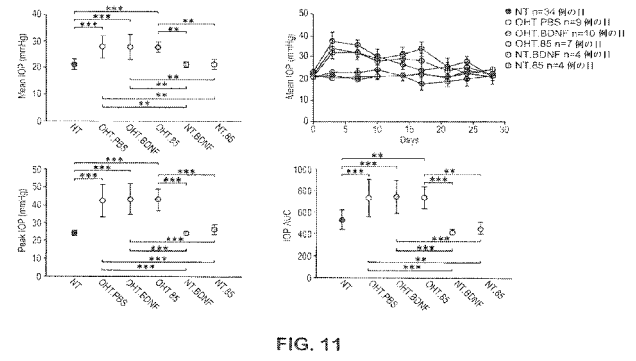


FIG. 11

【 図 12 】

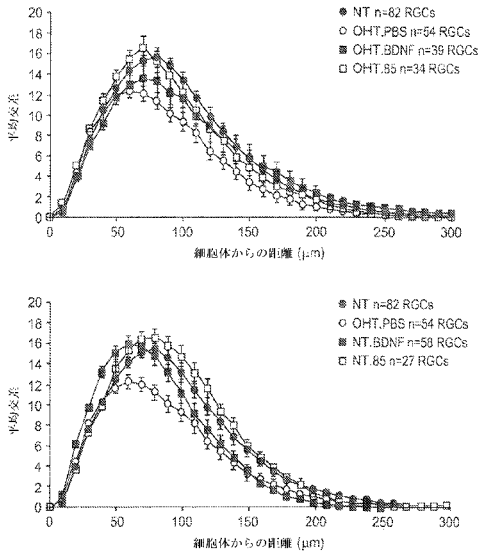


FIG. 12

【 図 13 】

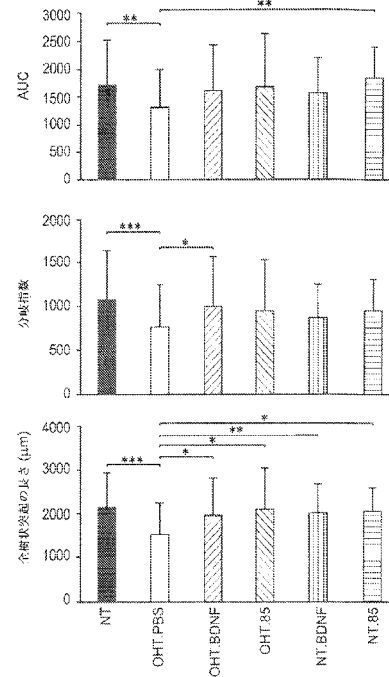


FIG. 13



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 17/30570
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 39/395, C07K 16/28, A61P 25/00 (2017.01) CPC - A61K 2039/505, C07K 16/2863, C07K 16/28, A61K 39/395, C07K 16/40		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History Document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History Document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History Document		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2010/0198390 A1 (LIN et al.) 5 August 2010 (05.08.2010) para [0012], [0016], [0017], [0018], [0029], [0154], [0238]	1-14, 16-22
A	US 2005/0220795 A1 (WITTRUP et al.) 6 October 2005 (06.10.2005) SEQ ID NO: 292	1-14, 16-22
A	US 2015/0010542 A1 (UNIVERSITY HEALTH NETWORK) 8 January 2015 (08.01.2015) SEQ ID NO: 230	1-14, 16-22
A	US 5,929,041 A (MAGAL) 27 July 1999 (27.07.1999) SEQ ID NO: 1	1-14, 16-22
A	A2N0U1, UniProtKB/TrEMBL Accession No. A2N0U1, 9 December 2015 [online]. [Retrieved on 9 September 2017]. Retrieved from the Internet: <URL: <a href="http://www.uniprot.org/uniprot/A2N0U1.bt?version=29">http://www.uniprot.org/uniprot/A2N0U1.bt?version=29</a> >. Entire document	1-14, 16-22
A	US 2014/0243506 A1 (MORPHOSYS AG) 28 August 2014 (28.08.2014) SEQ ID NO: 111	1-14, 16-22
A	US 2013/0323249 A1 (ZHOU et al.) 5 December 2013 (05.12.2013) SEQ ID NO: 19	1-14, 16-22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 September 2017		Date of mailing of the international search report <b>04 OCT 2017</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young  PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US 17/30570
--

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2015/089344 A1 (GENENTECH INC.) 18 June 2015 (18.06.2015) SEQ ID NO: 110	1-14, 16-22
A	S34014, PIR Accession No. S34014, 16 August 1996 [online]. [Retrieved on 9 September 2017]. Retrieved from the internet: <URL: <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/S34014">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/S34014</a> >. Entire document	1-14, 16-22
A	US 2004/0123343 A1 (LA ROSA et al.) 24 June 2004 (24.06.2004) SEQ ID NO: 154332	1-14, 16-22
A	A0A072VBU1, UniProtKB/TrEMBL Accession No. A0A072VBU1, 9 December 2015 [online]. [Retrieved on 9 September 2017]. Retrieved from the internet: <URL: <a href="http://www.uniprot.org/uniprot/A0A072VBU1.bt?version=8">http://www.uniprot.org/uniprot/A0A072VBU1.bt?version=8</a> >. Entire document	1-14, 16-22
A	G8PQJ0, UniProtKB/TrEMBL Accession No. G8PQJ0, 9 December 2015 [online]. [Retrieved on 9 September 2017]. Retrieved from the internet: <URL: <a href="http://www.uniprot.org/uniprot/G8PQJ0.bt?version=18">http://www.uniprot.org/uniprot/G8PQJ0.bt?version=18</a> >. Entire document	1-14, 16-22
A	US 2009/0324797 A1 (BOBZIN et al.) 31 December 2009 (31.12.2009) SEQ ID NO: 333	1-14, 16-22

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 17/30570

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

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

a.  forming part of the international application as filed:

in the form of an Annex C/ST.25 text file.

on paper or in the form of an image file.

b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

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

3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 17/30570

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

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

----- please see extra sheet -----

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1-14, 16-22, limited to SEQ ID NOs. 65-67, 68, GKN, 73, 3A-39, 40

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 17/30570

Continuation of: Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I+: Claims 1-22, drawn to an antibody that specifically binds to tropomyosin receptor kinase B (TrkB), and to compositions and kits comprising said antibody. The antibody will be searched to the extent that:

- the heavy chain CDRs 1-3 sequences comprise SEQ ID NOs: 65, 66, 67 (claims 1, 4, 5, 7, 8, 10),
- the light chain CDRs 1 and 3 sequences comprise SEQ ID NOs: 68, 73, and the light chain CDR 2 sequence comprises Gly Lys Asn (GKN) (claims 1, 4, 6, 8, 9, 11),
- the heavy chain variable region sequence comprises SEQ ID NO: 38 (claims 2, 3, 12),
- the light chain variable region sequence comprises SEQ ID NO: 39 (claims 2, 3),
- the linker sequence comprises SEQ ID NO: 40 (claim 14).

It is believed that claims 1-14, 16-22, limited to SEQ ID NOs: 65-67, 68, GKN, 73, 38-39, 40, encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass a TrkB antibody that comprises SEQ ID NOs: 65-67, 68, GKN, 73, 38-39, 40. [Note that claim 15 is not included in the first named invention because none of the sequences of SEQ ID NOs: 1-13 comprise the heavy and light chain CDRs sequences, heavy and light chain variable region sequences, and linker sequence as described above. The closest antibody, namely the sequence of SEQ ID NO: 13, requires a linker sequence of SEQ ID NO: 44, which is not the linker of the first named invention.] Additional TrkB antibodies will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected TrkB antibodies. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a TrkB antibody that encompasses an antibody wherein:

- the heavy chain CDRs 1-3 sequences comprise SEQ ID NOs: 46-48 (claims 1, 4, 5, 7, 8, 10),
  - the light chain CDRs 1 and 3 sequences comprise SEQ ID NOs: 49, 50, and the light chain CDR 2 sequence comprises Ala Ala Ser (AAS) (claims 1, 4, 6, 8, 9, 11),
  - the heavy chain variable region sequence comprises SEQ ID NO: 14 (claims 2, 3, 12),
  - the light chain variable region sequence comprises SEQ ID NO: 15 (claims 2, 3),
  - the linker sequence comprises SEQ ID NO: 40 (claim 14),
  - the antibody sequence comprises SEQ ID NO: 1 (claim 15),
- i.e. claims 1-22, limited to SEQ ID NOs: 46-48, 49, AAS, 50, 14, 15, 40, 1.

Group II: Claims 23-24, drawn to a polynucleotide encoding the variable region of the heavy chain and/or light chain of an antibody.

Group III: Claims 25-36, drawn to methods for promoting survival, synaptic function, or regeneration of neurons, and for treating or preventing an ocular degenerative condition in a subject.

The inventions listed as Groups I+, II, and III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

**Special Technical Features**

Group I+ requires an antibody, antibody compositions, and kit compositions, not required by Groups II and III. Further, the technical feature of each of the inventions listed as Group I+ is the specific TrkB antibody recited therein. Each invention requires a TrkB antibody, not required by any of the other inventions.

Group II requires a polynucleotide and vector comprising said polynucleotide, not required by Groups I+ and III.

Group III requires method steps for administering a therapeutic composition to promote survival, synaptic function, or regeneration of neurons, and to treat or prevent an ocular degenerative condition in a subject, not required by Groups I+ and II.

**Common Technical Features**

The feature shared by Groups I+, II, and III is the antibody or an antigen-binding fragment that specifically binds to tropomyosin receptor kinase B (TrkB) as described in claim 1.

Another feature shared by the inventions listed as Group I+ is the pharmaceutical composition of claim 20, the bispecific compound of claim 21, and the kit of claim 22.

Another feature shared by Groups II and III is the vector of claim 24 harboring the polynucleotide of claim 23.

-----please see continuation on next extra sheet-----

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 17/30570

Continuation of: Box No. III Observations where unity of invention is lacking

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art, because the shared technical features are taught by US 2010/0196390 A1 to Lin et al. (hereditary 'Lin').

Lin discloses [claim 1] an antibody or an antigen-binding fragment that specifically binds to tropomyosin receptor kinase B (TrkB) (para [0012] "This invention relates to agonist antibodies that selectively interact with and activate TrkB function"; para [0016] "the invention provides an antibody which specifically binds TrkB") with the same binding specificity as that of a second antibody (para [0029] "the invention provides a humanized agonist anti-TrkB antibody which comprises an antibody which binds to TrkB . . . wherein the humanized antibody overlaps the same epitope of TrkB that is recognized by monoclonal antibody 38B8"; para [0154] "Yet another method which can be used to characterize a TrkB agonist antibody is to use competition assays with other antibodies known to bind to the same antigen, i.e., various fragments on TrkB, to determine if the TrkB agonist antibody binds to the same epitope as other antibodies. Competition assays are well known to those of skill in the art"; para [0238] "It is understood that the compositions can comprise more than one TrkB agonist antibody (e.g., a mixture of TrkB agonist antibodies that recognize different epitopes of TrkB). Other exemplary compositions comprise more than one TrkB agonist antibodies that recognize the same epitope(s), or different spaces of TrkB agonist antibodies that bind to different epitopes of TrkB."), wherein the second antibody comprises heavy chain CDRs 1-3 and light chain CDRs 1-3 sequences (para [0016] "the invention provides an antibody which specifically binds TrkB and comprises a light chain having the amino acid sequence . . . a heavy chain having the amino acid sequence"; para [0017] "an antibody which specifically binds TrkB and comprises a VH CDR1 . . . a VH CDR2 . . . and/or a VH CDR3"; para [0018] "an antibody comprising a VL CDR1 . . . a CDR2 . . . and/or CDR3").

Lin discloses [claim 20] a pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of the antibody or antigen-binding fragment and a pharmaceutically acceptable carrier (para [0031] "The invention also provides a pharmaceutical composition comprising a humanized TrkB antibody as described herein"; para [0114] "Therapeutic formulations of the TrkB agonist antibody used in accordance with the present invention are prepared for storage by mixing an antibody or peptide having the desired degree of purity with optional pharmaceutically acceptable carriers, excipients or stabilizers"; para [0159] "This invention encompasses compositions, including pharmaceutical compositions, comprising antibodies described herein . . . compositions comprise one or more antibodies promote TrkB activity . . . These compositions may further comprise suitable excipients, such as pharmaceutically acceptable excipients including buffers, which are well known in the art").

Lin discloses [claim 21] a bispecific compound comprising the antibody or antigen-binding fragment (para [0128] "The antibodies useful in the present invention can encompass . . . bispecific antibodies"; para [0255] "a fusion antibody or immunoadhesin may be made that comprises all or a portion of a TrkB antibody of the invention linked to another polypeptide. . . . In addition, fusion antibodies can be created in which two (or more) single-chain antibodies are linked to one another. This is useful . . . if one wants to create a bispecific antibody").

Lin discloses [claim 22] a kit comprising an antibody or antigen-binding fragment (para [0241] "The invention also provides kits for use in the instant methods. Kits of the invention include one or more containers comprising a TrkB agonist antibody (such as a humanized antibody) or peptide described herein and instructions for use in accordance with any of the methods of the invention described herein").

Lin discloses [claim 23] a polynucleotide encoding the variable region of the heavy chain and/or light chain of the antibody or antigen-binding fragment (para [0140] "If desired, the TrkB agonist antibody (monoclonal or polyclonal) of interest may be sequenced and the polynucleotide sequence may then be cloned into a vector for expression or propagation. The sequence encoding the antibody of interest may be maintained in vector in a host cell and the host cell can then be expanded and frozen for future use"; para [0218] "In some embodiments, the composition comprises an expression vector comprising a polynucleotide encoding the antibody as described herein").

Lin discloses [claim 24] a vector harboring the polynucleotide (para [0140] "If desired, the TrkB agonist antibody (monoclonal or polyclonal) of interest may be sequenced and the polynucleotide sequence may then be cloned into a vector for expression or propagation. The sequence encoding the antibody of interest may be maintained in vector in a host cell and the host cell can then be expanded and frozen for future use"; para [0218] "In some embodiments, the composition comprises an expression vector comprising a polynucleotide encoding the antibody as described herein").

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

The inventions listed as Groups I+, II, and III therefore lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 27/06 (2006.01)	A 6 1 P 27/06	

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

- (74) 代理人 100119253  
弁理士 金山 賢教
- (74) 代理人 100124855  
弁理士 坪倉 道明
- (74) 代理人 100129713  
弁理士 重森 一輝
- (74) 代理人 100137213  
弁理士 安藤 健司
- (74) 代理人 100143823  
弁理士 市川 英彦
- (74) 代理人 100151448  
弁理士 青木 孝博
- (74) 代理人 100183519  
弁理士 櫻田 芳恵
- (74) 代理人 100196483  
弁理士 川崎 洋祐
- (74) 代理人 100203035  
弁理士 五味淵 琢也
- (74) 代理人 100185959  
弁理士 今藤 敏和
- (74) 代理人 100160749  
弁理士 飯野 陽一
- (74) 代理人 100160255  
弁理士 市川 祐輔
- (74) 代理人 100202267  
弁理士 森山 正浩
- (74) 代理人 100146318  
弁理士 岩瀬 吉和
- (74) 代理人 100127812  
弁理士 城山 康文
- (72) 発明者 ラーナー, リチャード・エー  
アメリカ合衆国、カリフォルニア・92037、ラ・ホヤ、ローズランド・ドライブ・7750

(72)発明者 リンジー, レオナルド・エム  
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01742、コンコード、オールド・マルボロ・ロード・1  
041

(72)発明者 シエ・ジア  
アメリカ合衆国、カリフォルニア・92122、サン・ディエゴ、コスタ・ヴェルデ・ブルバード・8730、アパートメント・2519

Fターム(参考) 4B065 AA93X AB01 BA02  
4C085 AA13 AA14 BB11 BB22 CC05 DD62 EE01 GG01  
4H045 AA11 AA20 AA30 BA40 CA40 DA76 EA20 FA74