

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 97196249.9

C12N 15/12

C12N 15/13

C12N 15/62

C07K 14/71

C07K 19/00

C12N 15/79

C12N 5/10

[45] 授权公告日 2005 年 5 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 1202247C

[22] 申请日 1997.7.8 [21] 申请号 97196249.9

[30] 优先权

[32] 1996.7.12 [33] US [31] 60/021,640

[32] 1997.2.10 [33] US [31] 08/798,326

[86] 国际申请 PCT/US1997/011825 1997.7.8

[87] 国际公布 WO1998/002540 英 1998.1.22

[85] 进入国家阶段日期 1999.1.8

[71] 专利权人 基因技术股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 V·D·菲茨帕特里克

M·斯利沃科夫斯基

R·L·范德仑

审查员 彭郁葱

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 张平元

C07K 16/30

A61K 38/17

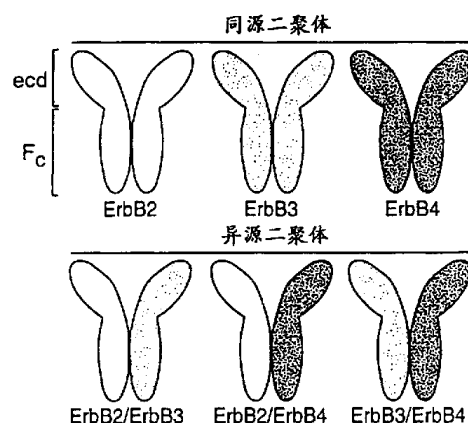
A61K 39/395

权利要求书 2 页 说明书 42 页 附图 5 页

[54] 发明名称 嵌合异源多亚基粘附素

[57] 摘要

本发明揭示了一种嵌合异源多亚基粘附素及其用途，它结合天然多亚基受体的配体。异源多亚基粘附素的嵌合分子包括一异源多亚基受体之单体的胞外区和用于稳定粘附素内嵌合分子间相互作用的多聚化区。本发明特别揭示了以下异源多亚基粘附素，它包含 ErbB2 和 ErbB3 或 ErbB2 和 ErbB4 的胞外区。本发明的嵌合 ErbB 异源多亚基粘附素可用作神经调节蛋白的拮抗剂或活化剂，用于治疗以各种癌症为例的疾病。



ISSN 1008-4274

1. 一种分离的重组嵌合异源多亚基粘附素，它包含：
 - 第一氨基酸序列，包含 ErbB2 受体之单体的胞外区和第一异源多聚化区
 - 5 且不含 ErbB2 受体之单体的跨膜区和胞内区；
 - 另一氨基酸序列，包含 ErbB3 或 ErbB4 受体之单体的胞外区和第二异源多聚化区且不含 ErbB3 或 ErbB4 受体之单体的跨膜区和胞内区；
 - 所述第一氨基酸序列和另一氨基酸序列的多聚化区包含免疫球蛋白的恒定区；
 - 10 所述第一氨基酸序列的胞外区和另一氨基酸序列的胞外区通过第一氨基酸序列的第一异源多聚化区和另一氨基酸序列的第二异源多聚化区结合在一起形成嵌合异源多亚基粘附素的结合区，
 - 所述嵌合异源多亚基粘附素可溶于水。
2. 根据权利要求 1 所述的分离的重组嵌合异源多亚基粘附素，其配体
- 15 是神经调节蛋白。
3. 根据权利要求 1-2 中任一项所述的嵌合异源多亚基粘附素，所述的嵌合异源多亚基粘附素是配体的拮抗剂。
4. 一种分离的核酸序列，它编码权利要求 1-3 中任一项所述的嵌合异源多亚基粘附素的氨基酸序列，其中所述粘附素的多聚化区包含亮氨酸拉
- 20 链、二硫键、包含 CH1 和至少部分铰链区的免疫球蛋白重链区的一部分、包含 CH2 和 CH3 区的免疫球蛋白重链区的一部分、或者突出-进入-空穴形式的相互作用，该相互作用是这样形成的：用具有大侧链的残基替换第一或第二多聚化区中的氨基酸残基而产生突出；用具有小侧链的残基替换其它多聚化区的氨基酸残基而产生互补性空穴。
- 25 5. 根据权利要求 4 所述的分离的核酸序列，它还包括与所述核酸分子可操作性连接的启动子。
6. 一种载体，它包含权利要求 4 或 5 所述的分离的核酸。
7. 一种宿主细胞，它包含权利要求 4 或 5 所述的核酸，或权利要求 7 所述的载体。
- 30 8. 一种在含配体的分离样品中形成嵌合异源多亚基粘附素-配体复合物的方法，所述方法包括：

将权利要求1至3中任一项所述的嵌合异源多亚基粘附素在可使配体结合嵌合异源多亚基粘附素以形成嵌合异源多亚基粘附素-配体复合物的条件下接触。

- 5 9. 根据权利要求8所述的方法，其中的复合物抑制配体与天然异源多聚体的结合，其中的样品来自哺乳动物的组织或体液。

10. 一种抑制天然 ErbB 异源多亚基受体活化的非治疗性方法，所述受体包含 ErbB2 与 ErbB3 的胞外区或 ErbB2 与 ErbB4 的胞外区，该方法包括：

将权利要求1-3中任一项所述的嵌合异源多亚基粘附素与含天然异源多亚基受体的配体和该受体的样品接触；和

- 10 将嵌合异源多亚基粘附素与配体一起孵育形成复合物以抑制天然异源多亚基受体被配体激活。

11. 一种抑制天然 ErbB 异源多亚基受体活化的非治疗性方法，该方法包括将权利要求8所述的拮抗性抗体与天然异源多亚基受体接触以形成拮抗性抗体-异源多亚基受体复合物，受体的活化被抑制。

- 15 12. 一种药物组合物，它包含权利要求1至3中任一项所述的嵌合异源多亚基粘附素和药学上可接受的载体。

13. 一种产品，它包括：

一容器；

所述容器上的标签；

- 20 所述容器内的组合物；

其中所述的组合物包含权利要求1至3中任一项所述的嵌合异源多亚基粘附素，其中所述的组合物能够拮抗配体与其天然异源多亚基受体的结合，容器上的标签说明组合物如何可用于拮抗配体与天然异源多亚基受体的结合。

- 25 14. 权利要求1至3中任一项所述嵌合异源多亚基粘附素在制造用于治疗炎症、癌症、神经疾病和心脏疾病的药物的用途。

15. 权利要求12所述的药物组合物用于制造治疗炎症、癌症、神经疾病和心脏疾病的药物的用途。

嵌合异源多亚基粘附素

5

发明领域

本发明主要涉及嵌合异源多亚基粘附素，它包含异源多亚基受体的胞外结合区，该嵌合异源多亚基粘附素与天然受体的配体结合。本发明还涉及针对异源粘附素的抗体，产生粘附素的方法和使用异源粘附素及其抗体的方法。

10

发明背景

调节细胞生长和分化的信号的传导部分地受各种细胞蛋白的磷酸化作用的调控。蛋白质酪氨酸激酶是催化该过程的酶。据信，受体蛋白质酪氨酸激酶通过对胞内基质的受配体刺激的酪氨酸磷酸化作用来控制细胞的生长。

单一全长受体酪氨酸激酶的 ErbB 族有 4 个成员：表皮生长因子受体(EGFR)，
15 ErbB2(HER2/neu)， ErbB3(HER3)和 ErbB4(HER4)，已经鉴定到许多配体(都是不同基因的产物)结合并激活 EGFR(Groenen 等在 1994 年对此有所论述)。相反，一个神经调节蛋白基因编码许多蛋白质异构体，其原因在于 mRNA 转录产物的不同剪接(参见 Lemke, G.(1996), mol. Cell. Neurosci. 7: 247-262)。ErbB3(Carraway, K.L.等,(1994) J. Biol. Chem. 269: 14303-14306)或 ErbB4(Plowman, G.D.等, (1993)
20 Nature 366: 473-475)可以作为神经调节蛋白的受体。这些受体和配体在正常的细胞生长和分化中起着重要作用。

生长因子受体蛋白酪氨酸激酶的 I 类亚族包括由 *erbB1* 基因编码的 170kDa 的表皮生长因子受体(EGFR)。 *erbB1* 已经被认为与导致人类恶性肿瘤有关。具体地说，已经在侵害性较强的乳房癌、膀胱癌、肺癌和胃癌中观察到该基因表达的增加(Modjtahedi, H.和 Dean, C.(1994) Int. J. Oncol. 4: 277-296)。
25

I 类亚族的第二个成员，p185^{neu} 最初被认定是经化学处理过的大鼠的成神经细胞瘤的转化基因的产物。该 *neu* 基因(又称 *erbB2* 或 HER2)编码一 185kDa 的受体蛋白酪氨酸激酶。人 HER2 基因的扩增和/或过表达与乳房癌和卵巢癌的预后差有关(Slamon, D.J.等, Science 235:177-182(1987);和 Slamon, D.J.等, Science
30 244:707-712(1989))，已经发现 HER2 的过表达与其它癌症有关，其中包括胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、肺癌、肾癌、结肠癌和膀胱癌。所以，Slamon 等在美国专利 4,968,603 中说明了许多检测 HER2 基因在肿瘤细胞内扩增或表达的诊断

试验并要求保护。Slamon 等发现, HER2 癌基因的多基因拷贝的存在表示疾病更可能由原发肿瘤位置发生扩散,所以需要更积极的治疗,而不是象可能由其它诊断性因素所显示的那样。Slamon 等认定, HER2 基因扩增测试结合对淋巴结状态的检测极大地改善了预后的效果。

- 5 另一相关基因,称 *erbB3* 或 HER3, 已经被人描述过。参见美国专利 5,183,884; Kraus 等, Proc. Natl. Acad. Sci USA 86:9193-9197(1989); 欧洲专利申请 No.444,961 A1; 和 Kraus 等 Proc. Natl. Acad. Sci USA 90:2900-2904(1989)。Kraus 等发现, 人乳房肿瘤细胞系中存在着 *erbB3* 水平的显著升高, 这意味着 *erbB3* 和 *erbB1* 及 *erbB2* 一样, 可能在人恶性肿瘤中起着一定的作用。此外, Kraus 等(1993)
- 10 证明, 对嵌合受体 EGFR/ErbB3 的 ErbB3 催化功能区的 EGF 依赖性激活在转染 NIH-3T3 细胞中引起了增殖应答。而且, 这些研究人员证明, 某些人乳房肿瘤细胞系表现出明显的稳态 ErbB3 酪氨酸磷酸化加强, 这意味着该受体可能在人恶性肿瘤中起一定的作用。其它研究者已经对 *erbB3* 在癌症中的作用进行了研究。已经发现它在乳房癌(Lemoine 等, Br.J. Cancer 66: 1116-1121(1992))、胃肠癌(Poller 等, J. Pathol. 168:275-280(1992) Raykumar 等, J. Pathol, 170: 271-278 (1993)和 Sanidas 等, Int. J. Cancer 54:935-940(1993)和胰腺癌(Lemoine 等, J. Cancer 168: 269-273 和 Friess 等, Clinical Cancer Research 1:1413-1420(1995)中过量表达。

- ErbB3 在 ErbB 受体族中的独特性在于它具有极小或没有固有的酪氨酸激酶活性(Guy 等, Proc. Natl. Acad. Sci USA 91:8132-8136(1994)和 Kim 等, J. Biol. Chem., 269:24747-55(1994))。当 ErbB3 与 ErbB2 共表达时, 形成一活性信号复合物, 针对 ErbB2 的抗体能够分裂该复合物(Sliwkowski 等, J. Biol. Chem., 269(20):14661-14665(1994))。此外, 在与 ErbB2 共表达时, ErbB3 与 heregulin(HRG)的亲合性升高。参见 Levi 等, Journal of Neuroscience 15:1329-1340(1995); Morrissey 等, Proc. Natl. Acad. Sci USA 92:1431-1435(1995); Lewis, G.D.等, Cancer Res., 56:1457-1465(1996); Pinkas-Kramarski, R 等, (1996)EMBO J.15:2452-2467; Beerli, R 等(1995) Mol. Cell. Biol.15: 6496-6505;和 Karunagaran,D. 等(1996)EMBO J.15:254 - 264 有关体内 ErbB2-ErbB3 蛋白质复合物的内容。
- 20
- 25

- 生长因子的受体蛋白酪氨酸激酶 I 类亚族还包括 HER4/Erb4 受体。参见, 欧洲专利申请 No.599,274; Plowman 等, Proc. Natl. Acad. Sci USA 90:1746-1750(1993);和 Plowman 等, Nature366:473-475(1993)。Plowman 等发现, HER4 表达的增加与源于上皮细胞的某些癌症密切相关, 其中包括乳腺癌。欧洲专利申请 No.599,274 说明了评价 HER4 表达的检测人肿瘤性疾病(尤其是乳房癌)的诊断
- 30

方法。

找寻 HER2 癌基因的激活物导致发现了一族 heregulin 多肽。这些蛋白似乎是来自同一基因的不同剪接，该基因在图谱上位于人 8 号染色体的短臂上(Lee, J.和 Wood, W.I.(1993) *Genomics* 16:790-791)。

- 5 Holmes 等分离并克隆得到一族 HER2 受体的多肽激活物，它们称其为 heregulin- α (HRG- α)、heregulin- β 1(HRG- β 1)、heregulin- β 2(HRG- β 2)、类 heregulin- β 2(类 HRG- β 2)和 heregulin- β 3(HRG- β 3)。参见 Holmes 等, *Science* 256:1205-1210(1992); WO 92/20798; 和美国专利 5,367,060, 45kDa 的多肽, HRG- α 是从 MDA-MB-231 人乳房癌细胞系的条件培养基中纯化得到的。这些研究
- 10 者证实了纯化 heregulin 多肽在 MCF7 乳房癌细胞中激活 HER2 受体的酪氨酸磷酸化作用的能力。而且，对 heregulin 多肽对 SK-BR-3 细胞(高水平地表达 HER2 受体)的促细胞分裂活性进行了说明。和其它 EGF 族的生长因子一样，可溶性 HRG 多肽似乎衍生自一膜结合前体(称前-HRG)，该前体被蛋白酶加工后释放出 45kDa 的可溶形式。这些前-HRG 没有 N 末端的信号肽。

- 15 虽然各 heregulin 的前 213 个氨基酸残基基本一致，但是根据区别在于 C 末端部分的两种不同的类 EGF 区，仍将它们归为两大类， α 和 β 。但是，这些类 EGF 区都具有一段 6 个半胱氨酸构成的间隔。根据氨基酸序列比较，Holmes 等发现，在类 EGF 区的第一个至第六个半胱氨酸之间，HRGs 与肝素结合性类 EGF 生长因子(BH-EGF)具有 45%的相似性，与双调蛋白(AR)具有 35%的一致性，与 TGF- α 具有 32%的一致性，与 EGF 具有 27%的一致性。

- 20 Peles 等在 *Cell*, 69:205-216(1992)和 Wen 等在 *Cell*, 69:559-572(1992)中首次描述了 44kDa 的 *neu* 分化因子(NDF)，它是大鼠内的相当于人 HRG，和 HRG 多肽一样，NDF 具有一个免疫球蛋白(Ig)同源区，后续一个类 EGF 区，而且没有 N 末端的信号肽。后来，Wen 等在 *Mol. Cell. Biol.*中, 14(3):1909-1919(1994)中进行了“全面克隆”以拓展 NDF 族。由此发现了 6 种不同的成纤维细胞性前-NDF，
- 25 采用 Holmes 等的命名法，这些 NDF 根据其类 EGF 区的序列被归为 α 或 β 多肽。同种型 1 至 4 的特征在于各自不同的膜延伸段(介于类 EGF 区和跨膜区之间)。而且，同种型 a, b 和 c 据称具有长度不同的胞质区。以上研究者论定，不同的 NDF 同种型是由于剪接的不同而产生的，并且行使着不同的组织特异性功能。参见
- 30 EP505,148; WO93/22424;和 WO94/28133 中有关 NDF 的内容。

虽然最初鉴定 heregulin 多肽是基于其激活 HER2 受体的能力(参见 Holmes 等, 同上)，已发现，有些表达 *neu* 的卵巢细胞和 *neu* 转染的成纤维细胞不与 NDF

结合或交联,也不对 NDF 产生应答而进行酪氨酸磷酸化作用(参见 Peles 等, EMBO J. 12:961-971(1993)). 这意味着提供完全的 heregulin 应答性必需有另一种细胞组份。Carraway 等后来证明, ^{125}I -rHRG β 1₁₇₇₋₂₄₄ 与牛 *erbB3* 稳定转染的 NIH-3T3 成纤维细胞结合,但不与非转染亲本细胞结合。所以,他们认为, ErbB3 是 HRG 的受体,并在表达所述两种受体的细胞内介导固有酪氨酸残基的磷酸化作用 5 和 ErbB2 受体的磷酸化作用。Carraway 等, J.Biol.Chem.269(19):14303-14306(1994)和 Sliwkowski 等, J.Biol.Chem.269(20):14661-14665(1994)发现,仅以 HER3 转染的细胞表现出与 heregulin 的亲合性很低,但用 HER2 和 HER3 共转染的细胞则表现出较高的亲和性。

10 这一发现与先前 Kokai 等, Cell 58:287-292(1989); Stem 等, EMBO J.7:995-1001(1998)和 King 等, 4:13-18(1989)所述的“受体串话”有关。以上研究者发现, EGF 与 EGFR 的结合导致 EGFR 激酶区的活化和 p185^{HER2} 交叉磷酸化。这被认为是配体诱导的受体异二聚作用和与之相伴的异源二聚体内受体间交叉磷酸化的结果(Wada 等, Cell 61:1339-1347(1990)).

15 Plowman 和他的同事对 p180^{HER4}/p185^{HER2} 的活化进行了类似的研究。它们在人 T 淋巴细胞内单独表达 p185^{HER2}, 单独表达 p180^{HER4} 或者共表达两种受体,证明, heregulin 能够激发 p180^{HER4} 的酪氨酸磷酸化,但只能在表达两种受体的细胞内激发 p185^{HER2} 的磷酸化。Plowman 等, Nature336:473-475(1993)。所以, heregulin 是能与数种受体相作用的 EGF 生长因子族成员之一例(Carraway 和 20 Cantley, Cell78:5-8(1994)). 此外, β -动物纤维素(cellulin)配体被证明结合 EGF 受体和 HER4, 但不结合 HER3(Riese II, D.J.等, (1996) Oncogene 12:345-353),

多人对 heregulin 的生物作用进行了研究。例如 Falls 等(Cell 72:801-815(1993))发现, ARIA 在肌管分化中起一定作用,即影响运动神经元突触后肌细胞内神经递质受体的合成和浓缩。Corfas 和 Fischbach 证明 ARIA 还增加鸡肌(chick muscle) 25 内钠通道的数量。Corfas 和 Fischbach, J.Neuroscience, 13(5):2118-2125(1993)。已经证明, GGFII 对亚铺满(subconfluent)静息人成肌细胞具有促细胞分裂活性,而且,克隆的人成肌细胞在 GGFII 连续存在下,在 6 天的分化后产生大量肌管(Sklar 等,J.Cell Biochem., Abst. W462, 18D, 540(1994)). 还可参见 1994 年 11 月 24 日公开的 WO94/26298。

30 Holmes 等, 见上面, 发现 HRG 对哺乳动物细胞系(例如 SK-BR3 和 MCF-7)具有促细胞分裂作用。GGF 对 Schwann 细胞的促细胞分裂活性也已为人所报道。参见, 例如, Brockes 等, J. Biol.Chem. 255(18):8374-8377(1980); Lemke 和

- Brookes, J. Neurosci. 4:75-83(1984); Brookes 等, J. Neurosci. 4(1):75-83(1984); Brookes 等, Ann. Neurol. 20(3):317-322(1986); Brookes 等, Methods in Enzym., 147:217-225(1987)和 Marchionni 等, 同上。Schwann 细胞在神经元轴突周围形成髓鞘, 由此形成单独的神经纤维。所以, 显然, Schwann 细胞在外周神经的发育、功能和再生中起着重要作用。Levi 等在 J. Neurosci. 14(3):1309-1319(1994)中从治疗性角度论述了这种内在联系。Levi 等论述了构建一包含 Schwann 细胞的细胞假体(prosthesis)的可能性, 所述假体能够移植到脊索的受损部位。体外培养 Schwann 细胞的方法已经有所说明, 参见 WO94/00140 和 Li 等 J. Neurosci. 16(6):2012-2019(1996)。
- 10 Pinkas-Kramarski 等发现, NDF 可能是在胚胎期和成年大鼠大脑内神经元和神经胶质细胞内, 以及在大鼠脑细胞的原代培养物中表达, 而且提出, 它可能起着星形细胞存活和成熟因子的作用(Pinkas-Kramarski 等, NSPA, USA 91:9387-9391(1994))。Meyer 和 Birchmeier 在 PNAS, USA 91:1064-1068(1994)中利用原位杂交法和核糖核酸酶(RNase)保护实验, 分析了小鼠胚胎发育期间和围生期动物内 heregulin 的表达。以上作者论定, 根据 heregulin 的表达, 它在体内起着间充质和神经元因子的作用。而且, 它们的发现还暗示, heregulin 在上皮细胞的发育中起着作用。同样, Danilenko 等, Abstract 3101, FASEB 8(4-5):A535(1994)发现, 创伤修复期间, NDF 和 HER2 受体的相互作用在指导表皮细胞迁移和分化中十分重要。
- 20 已经对 ErbB 族内成员间的相互作用进行了体内和体外研究。由配体与其它 ErbB 族成员间相互作用引起的 ErbB2 的反式激活是常见而且在生理上十分重要的事件(Dougall, W.C.等(1993) J. Cell. Biochem. 53:61-73; Earp, H.S.等, (1995), Breast Cancer Res. Treatment 35:115-132)。ErbB2 和 ErbB3 的共表达导致形成高亲和性 heregulin(HRG)结合位点(Sliwkowski, M.X.等(1994), J.Biol.Chem. 269:14661-14665)。ErbB2 调节 ErbB3 对 HRG 的亲合性, 而且似乎为 ErbB3-HRG 复合物提供酪氨酸激酶活性, 因为 ErbB3 是没有酪氨酸激酶活性的功能障碍性信号受体(Guy, P.M.等(1994) PANS USA 91:8132-8136)。生理-化学研究没有证明 ErbB2 的 EDCs 与 ErbB3 在体外的缔合(Horan 等, J. Biol. Chem. 270:24604-24608(1995))。此外, neu 分化因子(NDF)与可溶性 HER3 的结合并没有因可溶性
- 30 HER2 的存在而加强。

发明概述

本发明涉及一出人意料地发现,即包含异源多聚受体单体的胞外区的可溶性嵌合异源多聚体结合该受体的配体。本发明还涉及产生这种异源多聚体的方法,将其用作受体之配体拮抗剂的方法,具有受体之配体的拮抗剂或活化剂作用的嵌合异源多聚体的抗体,和治疗涉及配体-受体相互作用的疾病的方法。

一方面,本发明包括一种嵌合异源多聚体,它包含一段第一氨基酸序列,所述序列形成一嵌合单体并包含(即一天然异源多亚基受体的第一单体)的胞外区(ECD)或其配体结合片段和一多聚化功能区,其中, ECD 与多聚化功能区相融合。本发明的嵌合异源粘附素还包含另一氨基酸序列,该序列形成另一嵌合单体,该单体包含天然异源多亚基受体的另一单体的胞外区和一多聚化功能区。根据本发明这一方面的内容,天然异源多亚基受体的第一和另一些单体在同一细胞内缔合形成一天然异源多亚基受体,该受体一旦与配体结合即被激活,而且,其中,可溶性嵌合异源多亚基粘附素对配体的亲和性为天然受体之单体和天然受体之同源多聚体的 10^{-1} 至 10^6 倍。在本发明优选实施方案之一中,所述嵌合异源多亚基粘附素是一种水溶性粘附素。

在本发明实施方案之一中,该嵌合多亚基粘附素是结合天然异源多亚基受体胞外区的配体的拮抗剂。

在本发明另一实施方案中,第一氨基酸序列的多聚化功能区能够与各另外氨基酸序列的多聚化功能区相互作用而形成一异源多聚体。

在本发明另一实施方案中,该嵌合异源多亚基粘附素包含多聚化功能区,该区包含免疫球蛋白区,以免疫球蛋白(例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM 和 IgF)恒定区为佳。

在本发明另一实施方案中,该嵌合异源粘附素包括多聚化功能区,该区能够形成稳定的蛋白质-蛋白质相互作用。所述的蛋白质-蛋白质相互作用区(或多聚化区)包括一亮氨酸拉链(即一段含凸起序列与另一含凹陷序列互配),一疏水区、一亲水区和一段含游离巯基的氨基酸序列,所述巯基能与其它氨基酸序列的多聚化区反应形成分子间二硫键。

本发明的另一实施方案是一嵌合异源多亚基粘附素,其中,第一氨基酸序列包含 ErbB2 受体单体的胞外区,另一氨基酸序列包含 ErbB3 受体单体的胞外区,第一序列和另一序列的多聚化区各自包含一段免疫球蛋白恒定区。该多聚化区能够使得第一氨基酸序列和另一氨基酸序列之间发生稳定的蛋白质-蛋白质相互作用。所述嵌合异源粘附素的优选配体是 heregulin。

本发明的另一实施方案是一嵌合异源多亚基粘附素, 其中, 第一氨基酸序列包含 ErbB2 受体单体的胞外区, 另一氨基酸序列包含 ErbB4 受体单体的胞外区, 第一序列和另一序列的多聚化区各自包含一段免疫球蛋白恒定区。该多聚化区能够使得第一氨基酸序列和另一氨基酸序列之间发生稳定的蛋白质-蛋白质相互作用。所述嵌合异源粘附素的优选配体是 heregulin。

另一方面, 本发明包括分离的核酸分子, 所述分子编码本发明的嵌合异源粘附素的氨基酸序列。

在另一实施方案中本发明提供一分离的核酸分子, 该分子编码异源多亚基粘附素的单体如 ErbB2-IgG, ErbB3-IgG 和 ErbB4-IgG。例如, 核酸分子可选自以下组: (a)一段包含天然异源多亚基受体单体之一的胞外区(即配体结合区或其结合片段)核苷酸序列的核酸, 所述核酸以一致的转录相位和转录方向与编码多聚化区的核酸序列共价结合, 例如免疫球蛋白的恒定区; 和(b)在基因编码简并性范围之内与(a)序列对应的核酸。该分离核酸还可以任选地包含一个与之可操作性连接的可操纵的启动子。

该分离的核酸还可以用于体内或体外基因疗法。本发明的这种实施方案包括给一哺乳动物使用本发明的核酸、包含所述核酸的载体或包含所述核酸的细胞, 使得所编码的嵌合粘附素在哺乳动物体内表达, 并起到其配体的拮抗剂的作用。例如, 哺乳动物体内表达的 ErbB2/3-IgG 可以用来降低 ErbB2/3 受体周围的 heregulin 局部浓度, 从而抑制表面具有该受体的细胞的生长。较好的是, 表达的 ErbB2/3-IgG 被用来治疗细胞增殖性疾病, 例如癌症, 其中对 heregulin 与其受体结合的拮抗作用抑制细胞的生长。

在本发明另一实施方案中, 分离的嵌合氨基酸的核酸序列编码 ErbB2 受体的胞外区或其结合片段, 其中的多聚化区包括免疫球蛋白恒定区。

本发明另一实施方案中, 分离的嵌合氨基酸的核酸序列编码 ErbB3 受体 ECD 的胞外区或其结合片段, 其中的多聚化区包括免疫球蛋白恒定区。

本发明另一实施方案中, 分离的嵌合氨基酸的核酸序列编码 ErbB4 受体 ECD 的胞外区或其结合片段, 其中的多聚化区包括免疫球蛋白恒定区。

本发明的另一实施方案包括与所述核酸可操作性连接的启动子。

在另一实施方案中, 本发明包括包含本发明分离核酸的载体。例如, 本发明提供了包含核酸分子的载体(即包含核酸分子的表达载体, 所述核酸与一调控序列可操作性连接, 所述调控序列被载体所转化的宿主细胞识别); 一种包含所述核酸分子的宿主细胞; 和利用编码嵌合异源多亚基粘附素(例如 ErbB-IgG)的核酸分子

来产生粘附素的方法，其步骤包括培养宿主细胞和由宿主细胞培养物中收获粘附素。在一相关实施方案中，利用核酸产生粘附素的方法包括引入编码不同嵌合粘附素的多条核酸并表达这些嵌合粘附素的混合物。例如，将编码 ErbB2-IgG 的核酸与编码 ErbB3-IgG 的核酸引入同一宿主细胞，经表达，由细胞或培养基分离得到同源二聚体和异源二聚体的混合物。

本发明的实施方案之一还包括包含本发明核酸的宿主细胞。较好的是，该宿主细胞能够表达所述核酸，所述的表达包括翻译和产生本发明的嵌合异源粘附素。本发明的实施方案包括一个宿主细胞，它包含并表达异源粘附素嵌合单体之一，同时在本发明另一宿主细胞内表达异源粘附素的另一嵌合单体。或者，本发明实施方案包括在同一宿主细胞内表达一个以上的嵌合单体。

在本发明一优选实施方案中，宿主细胞包含第一分离核酸序列，所述核酸编码本发明可溶性嵌合异源多亚基粘附素的第一氨基酸序列，其中的胞外区来自 ErbB2 受体，而其中的多聚化区包含免疫球蛋白恒定区；第二分离核酸序列，所述核酸编码本发明嵌合异源多亚基粘附素的另一氨基酸序列，其中的胞外区来自 ErbB3 受体，而其中的多聚化区包含免疫球蛋白恒定区。

在本发明另一优选实施方案中，宿主细胞包含第一分离核酸序列，所述核酸编码本发明可溶性嵌合异源多亚基粘附素的第一氨基酸序列，其中的胞外区来自 ErbB2 受体，而其中的多聚化区包含免疫球蛋白恒定区；第二分离核酸序列，所述核酸编码本发明嵌合异源多亚基粘附素的另一氨基酸序列，其中的胞外区来自 ErbB4 受体，而其中的多聚化区包含免疫球蛋白恒定区。

本发明另一方面内容包括本发明嵌合异源多亚基粘附素的拮抗性抗体，所述抗体与天然异源多亚基受体结合，并抑制其活化。

本发明另一方面内容包括本发明嵌合异源多亚基粘附素的活化性抗体，所述抗体与天然异源多亚基受体结合，并将其活化。在本发明优选实施方案中，活化性抗体能够激活天然异源多亚基受体的活性是其天然配体的 10^{-1} 至 10^6 倍。

嵌合异源多聚体特异性抗体的用途之一是用在检测异源多亚基受体的方法中，其步骤包括疑含有异源多亚基受体的样品与抗体(可以是标记过的)接触，和检测是否结合。抗体还可以用在纯化异源多亚基受体的方法中，其步骤包括将含异源多亚基受体的混合物通过一结合有所述抗体的固相，并回收含有异源多亚基受体的流份。较好的是，在本发明实施方案之一中，异源多亚基受体是 ErbB2/ErbB4，而异源多亚基粘附素是 ErbB2-IgG/ErbB4-IgG。在另一优选实施方案中，异源多亚基受体是 ErbB2/ErbB3，而异源多亚基粘附素是 ErbB2-

IgG/ErbB3-IgG。

另一方面，本发明包括在含有配体的样品中形成嵌合异源多亚基粘附素-配体复合物的方法。本发明的该方法包括在一定条件下将本发明的嵌合异源多亚基粘附素与样品接触，所述条件使得配体结合异源多聚体而形成嵌合异源二聚体粘附素-配体复合物。

本发明实施方案之一中，嵌合异源多亚基粘附素-配体复合物抑制配体与天然异源多亚基受体的结合。较好的是，样品是哺乳动物的组织或哺乳动物体液，包括但不限于血液、血清、血浆、淋巴液和尿液。较好的是，所述哺乳动物是人。

另一方面，本发明包括抑制天然异源多亚基受体活化的方法。该方法包括 1) 将本发明嵌合多亚基粘附素与含有天然多亚基受体的配体和该受体的样品接触；和 2) 孵育嵌合异源多亚基粘附素与配体，形成一复合物，由此抑制天然异源多亚基受体被配体活化。

在抑制配体与天然异源多亚基受体结合的方法实施方案之一中，天然异源多亚基受体是 ErbB，而可溶性嵌合多聚体包含 ErbB2 和 ErbB3 的胞外区。

在另一抑制配体与天然异源多亚基受体结合的方法实施方案中，天然异源多亚基受体是 ErbB，而可溶性嵌合多聚体包含 ErbB2 和 ErbB4 的胞外区。

本发明的另一实施方案是抑制配体结合天然异源多亚基受体的方法，其中受体的活化被抑制。所述方法包括将本发明的拮抗性抗体与天然异源多亚基受体接触，形成拮抗性抗体-异源多亚基受体复合物，由此使得受体的活化被抑制。

另一方面，本发明涉及活化一天然异源多亚基受体的方法，其步骤包括经本发明的活化性抗体与天然异源多亚基受体接触，形成活化性抗体-异源多亚基受体复合物，由此将受体激活。

另一方面，本发明涉及一种治疗疾病的方法，包括给需要治疗的哺乳动物以治疗有效量的本发明嵌合异源多亚基粘附素。本发明的实施方案包括如下疾病，即该疾病可以通过一种配体与天然异源多亚基受体间的接触(例如异源粘附素与配体的竞争性结合)来治疗。

在本发明实施方案之一中，嵌合异源多亚基粘附素是 ErbB2/ErbB3-Ig 异源粘附素。在另一实施方案中，嵌合异源多聚体是 ErbB2/ErbB4-Ig 异源粘附素。

本发明包括一种包含嵌合异源多亚基粘附素的组合物。该包含粘附素的组合物最好是无菌的。如果组合物是水溶液，粘附素宜为可溶性的。如果组合物是冻干粉，以粉末能够在合适的溶剂中再生为宜。

在本发明另一实施方案中，治疗方法包括给予嵌合单体组成的异源多亚基粘

附素,各自用目标异源多亚基受体单体的胞外区制得。所述的胞外区宜来自选自以下异源多亚基受体的受体: Axl, Rse, 上皮生长因子(EGF)受体, 肝细胞生长因子(HGF)受体, IL-2, c-mer, Al-1, EPH, TrkA, TrkB, TrkC, TNF, IL-10, CRF2-4, RXR, RON, AChR α/δ , TR α /RXR α , TR α /DR4, TR α /MHC-TRE, TR α /ME, TR α /F2, 5 KDR/FLT-1, FLT/VEGF, VEGF121/165, Arnt/Ahr, CGA/CGB, EGFR/p185-neu, 促乳素受体(PRL), T 细胞受体(TCR), 成纤维细胞生长因子(FGF)和 Cak 受体(Kishimoto, T 等, (1994) Cell 76:253-262; Kendall, R.L.等, (1996) Biochem Biophys. Res. Comm. 226:324-328; Chang, W.-P. 和 Clevenger, C.V. (1996) PNAS USA 93:5947-5952; Lala, D.S.等, (1996) Nature 383:450-453; Collesi, C.等, (1996) 10 Mol. Cell. Biol. 16:5518-5526; Tzahar, E 等(1996) Mol. Cell. Biol. 16: 5276-5287; Shtrom, S.S.和 Hall, Z. W. (1996) J. Biol. Chem. 271:25506-25514; Nagaya, T.等(1996) Biochem. Biophys. Res. Comm. 226: 426-430; Dendall, R.L.等(1996) Biochem. Biophys Res. Comm, 226:324-328; Kainu, T.等(1995) Neuroreport 6:2557-2560; Yoo, S.H.和 Lewis, M.S. (1996) J. Biol. Chem. 271:17041-17046; Murali, R 等 15 (1996) PNAS USA 93:6252-6257; Dietrich J.等(1996) J. Cell. Biol. 132:299-310; Tanahashi, T.等(1996) J. Biol. Chem. 271:8221-8227; 和 Perez, J. L. 等(1996) Oncogene 12:1469-1477)。较好的是, 胞外区是以下受体的: IL-6/gp130, IL-11/gp130 白血病抑制因子(LIF)/gp130, cardiotrophin-1/gp130(CT-1), IL-11/gp130, 睫状神经营养因子 CNTF/gp130, 制癌蛋白 M(OSM)/gp130, γ 干扰素和 α 、 β 干扰素(Kishimoto, T.等(1994), 同上, Taga, T. (1996) J. Neurochem. 67:1-10; Pennica, D.等(1995) J. Biol. Chem. 270: 10915-10922; Marsters, S.A. (1995) PNAS USA 92:5401-5405; 和 Wollert, K.C.等(1996) J. Biol. Chem. 271:9535-9545)。最好, 胞外区选自 ErbB 族受体。

治疗方法实施方案涉及诸如免疫失调、癌症和神经失调等疾病或状态。

25 如果实施方案中的异源粘附素是 ErbB2/ErbB3-Ig 或 ErbB2/ErbB4-Ig 异源粘附素, 治疗方法涉及以下疾病: 炎症、癌症、例如神经纤维瘤和外周神经病等神经失调, 和例如心脏肥大等心脏病。

本发明还包括一种治疗哺乳动物的方法, 包括给以哺乳动物治疗有效量的嵌合异源多亚基粘附素, 例如 ErbB2/ErbB3-IgG 或 ErbB2/ErbB4-IgG。例如, 所述 30 哺乳动物可能患有神经失调或细胞增殖性疾病。该患者可能因 HRG 水平/生物活性的降低而得到缓解(例如癌症)。

另一方面, 本发明包括药物组合物。在药物组合物的实施方案之一中, 所述

组合物包含本发明的嵌合异源多亚基粘附素，所述粘附素 1)具有一天然异源多亚基受体的 ECD 或其结合片段， 2)而且是结合天然异源多亚基受体 ECD 的配体的拮抗剂。

5 在本发明另一实施方案中，药物组合物包含本发明嵌合异源多亚基粘附素的抗体，所述抗异源粘附素抗体 1)具有一天然异源多亚基受体的 ECD 或其结合片段， 2)而且与该天然异源多亚基受体的 ECD 结合，是结合该天然异源多亚基受体的配体的拮抗剂。

在本发明另一实施方案中，药物组合物包含本发明嵌合异源多亚基粘附素的抗体，所述抗异源粘附素抗体 1)具有一天然异源多亚基受体的 ECD 或其结合片段， 2)而且与该天然异源多亚基受体的 ECD 结合，是结合该天然异源多亚基受体的配体的活化剂。

另一方面，本发明涉及一种产品，它包括一个容器、容器的标签和容器内的组合物。在本发明实施方案之一中，所述组合物含有本发明嵌合异源多亚基粘附素组合物，所述粘附素是配体的拮抗剂。该组合物能够有效地拮抗配体与其天然异源多亚基受体的结合，而容器上的标签说明如何拮抗配体与其天然受体的结合。在优选实施方案中，嵌合异源多亚基粘附素选自 ErbB2/ErbB3-Ig 或 ErbB2/ErbB4-Ig。

在另一产品实施方案中，所述组合物包含抗嵌合异源多亚基粘附素抗体，所述抗体是配体的拮抗剂。该组合物能够拮抗配体与其天然异源多亚基受体的结合，而容器上的标签说明如何拮抗配体与其天然受体的结合。在优选实施方案中，抗嵌合异源多亚基粘附素抗体针对的嵌合异源粘附素选自 ErbB2/ErbB3-Ig 或 ErbB2/ErbB4-Ig。

在另一产品实施方案中，所述组合物包含抗嵌合异源多亚基粘附素抗体，所述抗体是配体的活化剂。该组合物能够激活配体与其天然异源多亚基受体的结合，而容器上的标签说明如何激活配体与其天然受体的结合。在优选实施方案中，抗嵌合异源多亚基粘附素抗体针对的嵌合异源粘附素选自 ErbB2/ErbB3-Ig 或 ErbB2/ErbB4-Ig。

根据以下详细说明，本发明上述以及其它方面的内容对于本领域技术人员来说将是显而易见的。

30

附图简述

图 1 是 ErbB 族嵌合同源二聚体和异源二聚体的图示，图中表示出嵌合体的

胞外区(ECD)和免疫球蛋白(Fc)区。胞外区来自天然异源多亚基受体,并通过重组技术与多聚化区,即免疫球蛋白区融合。

图2曲线显示嵌合免疫粘附素的结合分析。同源二聚体 ErbB3-Ig 和 ErbB4-Ig 能够特异性结合 ^{125}I - HRG,但是没有测出 ErbB2-Ig 构建物的结合。

5 图3A - 3D 显示嵌合粘附素 ErbB2/3-IgG, ErbB2/4-IgG 和 ErbB3/4-IgG 的 ^{125}I - HRG 结合研究结果。如图3A所示,用含 ErbB2 的异源二聚体可以检测到一个 HRG 高亲和性结合位点,但是用 ErbB3/4-IgG 则不能。

图4A和4B显示对抗 ErbB2 单克隆抗体(2C4)的结合研究结果,其中,在2C4的存在下,比较了嵌合 ErbB 同源二聚体与嵌合 ErbB 异源二聚体的活性。

10 图5是条框图,显示 ErbB-IgG 蛋白在乳房癌细胞系, MCF7 中抑制 HRG 依赖性胸苷掺入作用的能力。不同浓度的不同 ErbB-IgG 蛋白与 1nM 的 rHRG 一起孵育,然后加到 MCF7 细胞的无血清单层培养物中。用 ^3H -胸苷标记细胞以测定 DNA 合成。能够结合 HRG 的受体融合体以剂量依赖性方式抑制了 HRG 介导的有丝分裂应答。异源二聚体 IgG,即 ErbB3/2-IgG 和 ErbB4/2-IgG 比各自相应的
15 同源二聚融合蛋白更有效。

图6以图解表示, ErbB2 和 ErbB3 或 ErbB4 相互作用的可能的模型,左为“接触”模型,右为“构象”模型。

详细说明

20 至此,对本发明的嵌合异源多亚基粘附素,其制造方法及其用途进行了说明,应该理解的是,本发明不局限于所述的具体粘附素或方法,因为化合物和方法当然可以是变化的。还应该理解的是,在此所用的术语仅是为了说明具体的实施方案,而不是为了限定本发明的范围,因为,本发明的范围仅由后面的权利要求来限定。

25

定义

一般说来,以下单词和词组在说明、实施例和权利要求中具有以下定义。

除非另作说明,“ErbB”在此指哺乳动物 ErbB 受体中的任何一种或多种(即 ErbB1 或上皮生长因子(EGF)受体; ErbB2 或 HER2 受体; ErbB3 或 HER3 受体;
30 ErbB4 或 HER4 受体;和将被鉴定为该 I 类酪氨酸激酶族的任何其它成员),而“*erbB*”则指编码所述受体的哺乳动物 *erbB* 基因。

“HRG”(或“heregulin”)在此表示具有天然序列 HRG 生物活性(见下文)

至少其一的任何多肽序列(美国专利申请 No.60/021,640, PR1043, 同上)。该定义不仅包括自天然 HRG 源(例如人 MDA - MB - 175 细胞, 或例如其它动物的其它来源)分离得到的多肽, 而且包括利用重组或合成方法制备得到的多肽。它还包括它们的变体形式, 例如功能性衍生物, 同位变体, 天然同种型或类似物。有时,

5 HRG 是“天然 HRG”, 即从哺乳动物分离得到的内源 HRG 多肽。只要具有与天然 HRG(如人 HRG)相同的氨基酸序列, 该 HRG 也可以是“天然序列 HRG”。但是, “天然序列 HRG”包括利用重组或合成方法制得的多肽。“成熟的 HRG”是可溶性的, 或是由细胞释放的分泌 HRG(即没有氨基末端序列)。HRG “同种型”指具有至少部分 HRG 的 N 末端区的天然多肽。

10 “免疫粘附素”在此指抗体样分子, 它将某种蛋白的结合区(例如某种细胞表面受体的胞外区(粘附素区))与具有免疫球蛋白恒定区功能的效应物结合。免疫粘附素可能具有多种人抗体的有用的活性和生物特性。由于所述免疫粘附素可以由具有所需特异性并与合适的人免疫球蛋白铰链区和恒定区(Fc)连接的人蛋白质序列构建, 所以, 完全使用人源组份就可以获得所需的结合特异性。这样的免疫

15 粘附素对患者的免疫原性最小, 可以安全地长期或重复使用。

文献中有报道的免疫粘附素包括以下受体的融合体: T 细胞受体(Gascoigen 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2936-2940(1987)); CD4(Capon 等, Nature 337:525-531(1989); Traunecker 等 Nature 339:68-70(1989); Zettmeissl 等, DNA Cell Biol. USA 9:347-353(1990)和 Byrn 等 Nature 344:667-670(1990)); L-选择蛋白或归巢受体(Watson 等, J. Cell. Biol. 110:2221-2229(1990); 和 Watson 等 Nature 349:164-167(1991); CD44(Aruffo 等, Cell 61:1303-1313(1990)); CD28 和 B7(Linsley 等, J. Exp. Med. 173:721-730(1991); CTLA-4(Lisley 等, J. Exp. Med. 174:561-569(1991); CD22(Stamenkovic 等, Cell 66:1133-1144(1991)); TNF 受体(Ashkenazi 等, Proc. Natl. Aca. Sci. USA 88:10535-10539(1991); Lesslauer 等,

20 Eur. J. Immunol. 27:2883-2886(1991); 和 Peppel 等, J. Exp. Med. 174:1483-1489(1991)); NP 受体(Bennett 等, J. Biol. Chem. 266:23060-23067(1991)); γ 干扰素受体(Kurschner 等, J. Biol. Chem. 267:9354-9360(1992)); 4-1BB(Chalupny 等, PNAS USA 89:10360-10364(1992)) 和 IgE 受体 α (Ridgway 和 Gorman, J. Cell. Biol. 115:Abstract No.1448(1991)).

30 有记载的治疗用同源多亚基免疫粘附素的例子包括用于抑制 HIV 与细胞表面 CD4 结合的 CD4-IgG 免疫粘附素。I 期临床实验(临产前给孕妇使用 CD4-IgG)获得的信息显示, 该免疫粘附素可以用于防止 HIV 的母亲-胎儿传递。Ashkenazi

等, Intern. Rev. Immunol.10:219-227(1993). 已经开发出来结合肿瘤坏死因子(TNF)的免疫粘附素。TNF 是一种促炎细胞因子, 被证明是浓毒性休克的主要介导物。根据浓毒性休克的小鼠模型, 一种 TNF 受体免疫粘附素被证明有望临床用于治疗浓毒性休克(Ashkenazi A.等(1991)PNAS USA 88:10535-10539)。免疫粘附素还有非治疗性用途。例如, L 选择蛋白受体的免疫粘附素被用作外周淋巴结高内皮小静脉(HEV)的组织化学染色剂。它还被用于分离和鉴定 L 选择素配体(Ashkenazi A.等, 同上)。

如果免疫粘附素结构的两臂具有不同的特异性, 则比照双特异性抗体称该免疫粘附素为“双特异性免疫粘附素”。Deitsch 等, J. Immunol. Methods162:123(1993)描述了这样一种双特异性免疫粘附素, 它结合了粘附分子即 E 选择素和 P 选择素的胞外区, 在天然情况下, 各自是在不同细胞种类中表达的。结合研究显示, 由此形成的双特异性免疫粘附素与髓样细胞系的结合能力强于作为其来源的单特异性粘附素。

“异源粘附素”在此与“嵌合异源多亚基粘附素”通用, 表示一种嵌合分子复合物(氨基酸序列), 其中各嵌合性分子将一生物活性区(例如异源多亚基受体各单体的胞外区)和一多聚化区结合。“多聚化区”促进异源多亚基受体内嵌合分子之间的稳定相互作用。多聚化区可以通过免疫球蛋白序列、亮氨酸拉链、一个疏水区, 一个亲水区或在嵌合多聚体嵌合分子之间形成分子间二硫键的游离巯基相互作用。多聚化区可包含免疫球蛋白恒定区。一种可用于本发明的多聚化区可参见描述了一种杂和免疫球蛋白的美国专利申请 No.07/440,625, P565P1(为本文所参考)。此外, 多聚化区可以工程化, 由此空间相互作用不仅促进稳定的相互作用, 而且促进由单体混合物形成的异源多聚体再形成异源多聚体。参见, 例如, 美国专利申请 No.08/399,106, P0927(完整地为本文所参考), 其中描述了一种作为第一和第二多肽异源寡聚界面的“突出-进入-空穴”的方法。“突出”是通过用大侧链(例如酪氨酸或色氨酸)替换第一多肽界面的小氨基酸侧链构成的。大小与突出相同或相近的互补性“空穴”是在第二多肽界面上用小氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)替换大氨基酸侧链构成的。免疫球蛋白序列最好但不一定是免疫球蛋白的恒定区。本发明嵌合体中的免疫球蛋白可以来自 IgG₁, IgG₂, IgG₃或 IgG₄亚类, IgA, IgE, IgD 或 IgM, 但是以 IgG₁或 IgG₃为佳。

“表位记号的”在此表示这样的嵌合多肽, 它包含与一“记号多肽”融合的完整嵌合异源粘附素或其片段。记号多肽应具有足量的残基以形成产生其对应抗体所需的表位, 但又短到不至于影响嵌合异源粘附素的活性。记号多肽宜具有相

当的独特性，以致其抗体基本上不与其它表位交叉反应。适宜的记号多肽一般具有至少6个氨基酸残基，一般介于约8至50个氨基酸残基(以约9至30个残基为宜)。本发明实施方案之一包含一种与表位记号连接的嵌合异源粘附素，所述的记号被用来检测样品中的粘附素或从样品回收粘附素。

- 5 “分离的嵌合异源多亚基粘附素”，“高度纯化的嵌合异源多亚基粘附素”和“基本均一的嵌合异源多亚基粘附素”在此通用，都表示从某种来源纯化得到或利用重组或合成方法制备得到，而且经层析或其它纯化技术(例如非还原性条件或还原性条件下使用考马氏(Commassie)蓝或者银染色(更好)的 SDS-PAGE)基本上不含其它肽或蛋白质而到达均一的粘附素。均一性在此表示被其它蛋白质源的
- 10 污染小于约5%。如下文所述，本发明的 ErbB2/3-IgG 或 ErbB2/4-IgG 嵌合异源粘附素比之同源二聚体具足够大的结合亲和性，使用同源二聚体和异源二聚体的混合物也认为是本发明的有用的实施方案之一。“嵌合异源多亚基粘附素”，“嵌合异源粘附素”和“CHA”在此通用。

- “生物特性”在此与“嵌合异源多亚基粘附素”联用时表示结合配体和起到
- 15 配体结合天然受体的拮抗剂作用的能力。“生物特性”在此与“嵌合异源多亚基粘附素的抗体”联用时表示结合粘附素内编码的胞外区或天然异源多亚基受体胞外区，抗体从而成为配体拮抗剂或活化剂的能力。

- “生物活性”在与嵌合异源多亚基粘附素(例如 ErbB 异源粘附素)联用时，包括以下功能：通过结合细胞表面缔合 heregulin 或分泌 heregulin 作为 heregulin 受体活化作用拮抗剂(例如抗 ErbB2，ErbB3 和/或 ErbB4 受体的活化)；抑制在其表面表达 ErbB 受体的细胞的生长(例如 SK-BR-3 细胞，Schwann 细胞，肝细胞，成
- 20 胶质细胞瘤细胞，上皮细胞(包括乳房、卵巢、前列腺、肺、胰、结肠和直肠内的))，肌细胞，星形细胞和/或少突神经胶质细胞)；抑制与受体结合(例如与 ErbB2/3，ErbB2/4，ErbB3 和/或 ErbB4 受体)；抑制有丝分裂活性；抑制神经肌肉连接处
- 25 乙酰胆碱受体的合成；和抑制神经元和肌肉、神经或腺细胞之间突触连接的形成。

- “生物活性”在与嵌合异源多亚基粘附素活化性抗体(例如抗 ErbB 异源粘附素抗体活化剂)联用时，包括以下功能：作为 heregulin 受体活化作用的活化剂(例如激活 ErbB2，ErbB3 和/或 ErbB4 受体)；结合并激活例如 ErbB2/3，ErbB2/4，
- 30 ErbB3 和/或 ErbB4 受体；促进在其表面表达 ErbB 受体的细胞的生长；促进表达上述受体的细胞的分化和/或增殖(例如 SK-BR-3 细胞，Schwann 细胞，肝细胞，成胶质细胞瘤细胞，上皮细胞(包括乳房、卵巢、前列腺、肺、胰、结肠和直肠内

的)), 肌细胞, 星形细胞和/或少突神经胶质细胞); 促进有丝分裂活性; 促进神经肌肉连接处乙酰胆碱受体的合成; 和促进神经元和肌肉、神经或腺细胞之间突触连接的形成。

“氨基酸序列一致性百分比”就嵌合异源多亚基粘附素而言在此表示将序列
5 对齐并在必要时引入空距以获得最大的序列一致性百分比之后, 与天然异源多亚基受体之单体的胞外区序列内残基相同的候选胞外区序列内残基的百分比, 而且
不将任何保守性取代作为部分序列一致性。N 末端、C 末端或内部的延伸, 缺失
或插入都被视为影响序列一致性或同源性。

“疾病状态”在此指细胞或哺乳动物整体的一种生理状态, 其中发生了细胞
10 或机体的功能系统或器官的中断、停止或紊乱。

“癌症”或“癌性的”指或用于描述细胞或哺乳动物整体的一种生理状态,
其特征是细胞生长失控。癌症的例子包括但不限于恶性肿瘤、淋巴瘤、胚细胞瘤、
肉瘤和白血病。上述癌症更具体的例子包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞
15 性肺癌、胃癌、胰癌、神经胶质细胞肿瘤(例如成神经胶质瘤和神经纤维瘤病)、
子宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳房癌、结肠癌、结肠直肠癌、
子宫内膜癌、唾液腺癌、肾癌、肾癌、前列腺癌、阴道癌、甲状腺癌、肝管癌和
各种脑癌和颈癌。如果本发明的嵌合异源粘附素是 ErbB-Ig 异源粘附素, 其治疗的
癌症最好是表达 ErbB 受体的细胞的癌性生长, 例如乳房细胞、卵巢细胞、前
列腺细胞、肺细胞、胰细胞和结肠直肠细胞的癌性生长。

“炎症”在此指一种基础病理过程, 即应答因物理、化学或生物因子引起的
20 损伤或异常刺激, 在受损的血管及其邻近组织内发生的一系列动态复合的细胞学
和组织学反应, 它包括: 1) 局部反应及造成的形态变化; 2) 损伤性物质的降解或
去除; 3) 引起修复和愈合的应答反应。可用本发明治疗的炎症是与白细胞介素和
白血病抑制因子之类的细胞因子有关的那些。这样的疾病例如血小板生成异常、
25 巨噬细胞生长和分化、造血祖细胞的增殖等。

“神经病”指或描述哺乳动物内以神经细胞生长、分化或细胞信号传递为特
征的生理状态。神经病的例子包括但不限于神经纤维瘤和外周神经病。

“心脏病”指或描述哺乳动物内以心脏细胞生长和分化为特征的生理状态。
心脏病的例子包括但不限于心脏肥大和心力衰竭(包括充血性心力衰竭), 心肌梗
30 塞和心动过速。“心力衰竭”指心脏功能异常, 即心脏不能以代谢组织所需的速
度泵送血液。

“确定疾病状态”指确定癌症(尤其是乳房癌、卵巢癌、胃癌、子宫内膜癌、

唾液腺癌、肺癌、肾癌、结肠癌和膀胱癌)患者存活的可能性和癌症复发时间的活动。具体地说, 本发明的抗体可以用来在取自癌症患者的癌变组织中定量异源多亚基受体(例如 ErbB2, ErbB3 或 ErbB4, 但通常是 ErbB2)的过表达。这又称为“确定适合癌症患者的疗程”。例如, 与根据其它确诊因素所可能指示的疾病相比, 以 ErbB2 过表达或 ErbB2/3 或 ErbB2/4 细胞表面受体增加为特征的患者可能需要更积极的治疗(例如大剂量的化疗或放疗)。该用语包括对高级导管性癌症患者的原位诊断, 包括广延性管内癌。参见, 例如 Disis 等, *Cancer Research*, 54:16-20(1994)。

“样品”指取自患者的组织、体液或细胞。一般说来, 由患者取出组织或细胞, 但是也考虑体内诊断。如果是实体瘤, 可以由手术切除的肿瘤获取组织样品并利用常规技术制备用于测试。如果是淋巴瘤或白血病, 就获取淋巴细胞、白血病细胞或淋巴组织并适当处理。根据具体的肿瘤也可以使用患者的其它样品, 包括尿液、泪液、血清、脑脊髓液、粪便、唾液、细胞提取物等。

“标记过的”在此指分子(以 ErbB2/3-IgG 为例的嵌合异源粘附素)直接或间接地与一可测化合物或组合物结合。标记可以本身就是可测的(例如放射性同位素标记或荧光标记), 或者, 如果是酶标记, 它可能催化某种底物化合物或组合物的可测的化学转变。

“固相”表示有用的物质(例如 ErbB2/3-IgG、ErbB2/4-IgG 或其抗体)可与之粘附的非液相基质。固相的实例在此包括部分或完全由玻璃(调孔玻璃)、多糖(例如琼脂糖)、聚丙烯酰胺、聚苯乙烯、聚乙烯醇和二氧化硅形成的那些。在某些实施方案中, 根据上下文, 固相可以是测试板上的孔; 在其它实施例中, 它是纯化柱(例如亲和性层析柱)。该用语还包括分散颗粒这样的不连续固相, 例如美国专利 No.4,275,149 中所述的那些。

“激活 ErbB 受体”指引起 ErbB 受体胞内激酶区将酪氨酸残基磷酸化的活动。简而言之, 这涉及(例如抗 ErbB2/3-IgG)抗体的结合(所述的抗体已就其作为 heregulin 活化剂的能力经与两种或多种 ErbB 受体构成的受体复合物的结合接受了测定), 这种结合激活了上述受体中一种或多种的激酶区, 由此造成一个或多个受体内酪氨酸残基的磷酸化, 和/或其它底物多肽内酪氨酸残基的磷酸化。ErbB 受体磷酸化可以利用下文所述的酪氨酸磷酸化试验来定量。“抑制某 ErbB 受体”指嵌合 ErbB 异源粘附素或其抗体在与 ErbB 受体结合时阻止受体活化(即抑制激酶功能)的拮抗性。

“降低细胞存活率”指在体外或体内, 与未经嵌合 ErbB-IgG(或其拮抗性抗

体)接触处理的非处理细胞相比, 缩短细胞存活时间的活动, “降低细胞繁殖率”指体外或体内, 与非处理细胞相比, 与嵌合 ErbB-IgG(或其拮抗性抗体)接触后样群内细胞数量的减少。

“提高细胞的存活率”或“提高细胞的繁殖”指在体外或体内, 与非处理细胞相比, 接触抗本发明嵌合 ErbB-IgG 的活化性抗体后样群内细胞生存时间和数量的增加。细胞培养物内细胞繁殖的提高和降低可以通过在接触活化性抗 ErbB-IgG 抗体前和接触后计数细胞数量来确定。繁殖程度可以通过显微镜检铺满程度来定量。细胞繁殖还可以通过测定细胞对 ^3H -胸苷的摄取来定量。

“加强细胞的分化”指提高获得或具有一种或多种不同于原细胞的特征或功能程度的活动(例如细胞特化)。这可以通过筛选细胞的表型变化来检测(例如检测细胞的形态变化)。加强细胞分化在此还指细胞的成熟, 期间, 例如, 与成熟细胞相关的特种蛋白质被合成。

“神经胶质细胞”来自中枢和外周神经系统, 可以选自少突神经胶质细胞、星形细胞、室管膜细胞或小神经胶质细胞以及神经节的卫星细胞和外周神经纤维周围的神经鞘细胞。

“肌细胞”包括骨骼肌、心肌或平滑肌组织细胞。它包括那些分化为更加特化的肌细胞的细胞(例如成肌细胞)。

“分离的核酸”指没有在天然状态下通常与之缔合的污染性来源核酸中至少一种的 RNA 或 DNA, 没有任何其它哺乳动物 RNA 或 DNA 则更好。“没有在天然状态下通常与之缔合的污染性来源核酸中至少一种”包括这样的情况, 即核酸存在于来源或天然细胞内, 但位于不同的染色体位置, 或者其两侧的序列不是正常情况下来源细胞中的。分离的核酸是编码具生物活性的嵌合异源多亚基粘附素的 RNA 或 DNA, 所述粘附素各自的胞外区与作为其来源的天然受体中单体的胞外区具有至少 75% 的序列一致性, 至少约 80% 为佳, 至少 85% 更好, 至少 90% 还要好, 95% 则最好。

“严谨条件”指以下条件: a) 用低离子强度高温洗涤, 例如 0.015M NaCl/0.0015M 柠檬酸钠/0.1%NaDodSO₄(SDS), 50 °C; 或 b) 在杂交过程中使用甲酰胺之类变性剂, 例如 50%(vol/vol)甲酰胺加 0.1%牛血清白蛋白/0.1%聚蔗糖(Ficoll)/0.1%聚乙烯吡咯烷酮/50mM 硫酸钠缓冲液, pH6.5, 加 750mM NaCl, 75mM 柠檬酸钠, 42 °C。另一实例是使用 50%甲酰胺, 5 × SSC(0.75M NaCl, 0.075M 柠檬酸钠), 50mM 磷酸钠(pH6.8), 0.1%焦磷酸钠, 5 × Denhardt's 溶液, 经超声处理的鲑鱼精子 DNA(50 微克/毫升), 0.1%SDS 和 10%硫酸葡聚糖,

42 °C, 在 42 °C 用 0.2 × SSC 和 0.1%SDS 洗涤。

Sambrook 等在 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中说明了一种“较严谨条件”，它包括使用严谨性略低于以上所述的洗涤溶液和杂交条件(例如温度，离子强度和%SDS)。较

5 严谨条件例如在以下溶液中于 37 °C 培养过夜：20%甲酰胺，5 × SSC(150mM NaCl, 15mM 柠檬酸三钠)，50mM 磷酸钠(pH7.6)，10%硫酸葡聚糖和 20mg/mL 变性剪切的鲑鱼精子 DNA，然后用 1 × SSC 在约 37 至 50 °C 洗涤滤膜。技术人员懂得如何适应探针长度等因素来视必要调整温度、离子强度等。“调控序列”指在特定的宿主微生物内为表达可操作性连接的编码序列所必需的 DNA 序列。

10 适用于原核宿主的调控序列例如启动子、可能是一段操纵子序列和一个核糖体结合位点。已知，真核生物使用启动子、聚腺苷酸化信号和增强子。

核酸被“可操作性连接”表示使其与另一段核酸序列具有某种功能关系。例如，如果某多肽分泌后参与其分泌，则一段前导序列或分泌前导序列与多肽的 DNA 可操作性连接；如果影响序列的转录，则一段启动子或增强子与编码序列可

15 操作性连接；如果其位置有利于翻译，则一个核糖体结合位点与编码序列可操作性连接。一般说来，“可操作性连接的”表示连接的 DNA 序列是毗邻，如果是分泌前导，则毗邻而且在阅读相位内。但是，增强子不一定毗邻的。连接是通过在常规限制性酶切位点的连接完成的。如果没有这样的位点，可以按照常规方法使用合成寡聚核苷酸接泊或接头。

20 HRG “拮抗剂”指阻止或干扰 HRG 效应物功能的分子(例如阻止或干扰 HRG 结合和/或激活 ErbB 受体的分子)。例如，可以在本文所述的酪氨酸磷酸化试验中筛选它们竞争性抑制 ErbB 被 HRG 激活的能力。较好的拮抗剂不明显干扰其它 heregulin 多肽与 ErbB 受体间的相互作用。HRG 拮抗剂的例子如抗本发明 ErbB2/3-Ig 或 ErbB2/4-Ig 嵌合异源粘附素的中和抗体。

25 “抗体”使用其最广义的意义，具体包括单个抗嵌合异源粘附素(例如抗 ErbB2/3-IgG 或抗 ErbB2/4-IgG)的单克隆抗体和具有多表位特异性的抗嵌合异源粘附素抗体组合物(包括中和和非中和抗体)。本发明中特别有用的抗体是基本上不与其它异源多亚基受体发生交叉反应的那种，例如上面在背景部分中所述的那些，所以也就是那些“特异性结合”异源多亚基受体(例如 ErbB2/3 或 ErbB2/4)

30 的那种。在这类实施方案中，根据例如放射性免疫沉淀法(RIA)测定，抗体与非 ErbB 受体的结合程度将低于 10%。

“单克隆抗体”在此指由一群基本同源的抗体获得的抗体，即，构成该抗体

群的各抗体是完全相同的，除了可能少量天然发生的突变。单克隆抗体具有很高的特异性，只针对单一的抗原性位点。而且，与一般包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的常规(多克隆)抗体相比，各单克隆抗体只针对抗原上的一个决定簇。

5 此处的单克隆抗体包括杂和和重组抗体，即抗嵌合异源粘附素抗体的可变区(包括超变区)与恒定区(例如“人源化”的抗体)剪接而成，或轻链与重链剪接而成，或一个物种的链与另一物种的链剪接而成，或异源蛋白(不论来自的种类或免疫球蛋白的类和亚类)以及抗体片段(例如 Fab, F(ab)₂ 和 Fv)的融合，只要它们表现出所需的生物活性(参见美国专利 4,816,567 和 Mage 和 Lamoyi, Monoclonal Antibody
10 Production Techniques and Applications, pp.79-97(Marcel Dekker, Inc.), New York(1987))。

所以修饰语“单克隆抗体”表明抗体的特征在于来自一群基本同源的抗体，而不应理解成需要特殊的方法来产生所述的抗体。例如，本发明使用的单克隆抗体可以按照最先由 Kohler 和 Milstein 在 Nature256:495(1975)所述的杂交瘤法来制
15 备，或利用重组 DNA 法制备(美国专利 4,816,567)。“单克隆抗体”还可以从利用 McCafferty 等在 Nature348:552-554(1990)中所述方法建立的噬菌体文库中分离得到。

非人(例如鼠)抗体的“人源化”形式是一种特殊的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(例如 Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ 或抗体的其它抗原结合性序列)，它们
20 含有尽可能少的来自非人免疫球蛋白的序列。就多数而言，人源化抗体是人免疫球蛋白(接受抗体)，即接受抗体的互补性决定区(CDR)内的残基被具有所需特异性、亲和性和功能的来自非人(供体抗体)(例如小鼠、大鼠)CDR 内的残基所取代。有时，人免疫球蛋白 Fv 框架区(FR)残基被相应的非人 FR 残基所取代。而且，人源化抗体可能包含既不存在于接受抗体也不存在于输入 CDR 或 FR 序列的残基。
25 这样的修饰是为了进一步改良和优化抗体的性能。一般说来，人源化抗体具有几乎完整的至少一个，通常为两个可变区，其中整个或几乎整个 CDR 区和非人免疫球蛋白的相对应，或者，几乎全部 FR 残基是人免疫球蛋白的共同序列。人源化抗体还可以包含至少一免疫球蛋白，通常是人免疫球蛋白恒定区(Fc)的一部分。

30 “中和抗体”在此指能够抑制或明显降低天然序列 HRG 效应物功能的抗体分子。例如，在本文所述的酪氨酸磷酸化试验中，中和抗体可以抑制或减低 HRG 激活 ErbB 受体的能力。在本文所述的细胞增殖试验中，中和抗体还可以抑制 HRG

的有丝分裂活性。

“治疗”包括治疗性的和预防性的。需要治疗的包括那些已经患有疾病的，和容易患上疾病或需要防止疾病发生的那些。

就治疗目的而言，“哺乳动物”包括各种归为哺乳类的动物，其中包括人、家畜、动物园内的、用于比赛的或宠物动物，例如绵羊、狗、马、猫、母牛等。在此，最好是人。

“药学上可接受的”载体、赋形剂或稳定剂指在使用剂量和浓度下对与之接触的细胞或哺乳动物无毒的那些。通常，生理上可接受的载体是水性 pH 缓冲液。生理上可接受的载体例如磷酸、柠檬酸或其它有机酸缓冲液；抗氧化剂，包括抗坏血酸；低分子量多肽(小于 10 个残基)；蛋白质，例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物，例如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸；多糖，二糖或其它碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂，例如 EDTA；糖醇，例如甘露醇或山梨醇；成盐反离子，例如钠；和/或非离子表面活性剂，例如 TweenTM，聚乙二醇和 PluronicTM。

15

II. 本发明实施方式

1. 嵌合异源多亚基粘附素的产生

本发明嵌合异源粘附素宜在宿主细胞内表达并从中分离来产生。通常，用本发明核酸转化宿主细胞。较好的是，将核酸加入表达载体。在此，适合克隆或表达载体的合适的宿主细胞是原核细胞(例如大肠杆菌，芽孢杆菌，假单胞菌或其它细菌)，酵母和其它真核微生物，以及高级真核细胞(例如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)和其它哺乳动物细胞)。细胞也可以存在于动物活体(例如母牛、山羊或绵羊)内，也可以使用昆虫细胞。克隆和表达的方法是本领域众所周知的。

为了表达嵌合异源多聚体，例如 ErbB2-IgG，ErbB3-IgG 和/或 ErbB4-IgG，需要通过转化或转染将载体引入宿主细胞，并在常规营养培养基(被改进成适合引入启动子、选择重组细胞或扩增 ErbB-IgG DNA)中培养所得的重组宿主细胞。简而言之，为了在体外，在哺乳动物细胞培养物中获得最大的产量，原理、方案和操作技术可以参见 Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler 等(IREL Press, 1991)。

“转化”和“转染”在此通用，都指将 DNA 引入细胞的过程。在转化或转染之后，本发明的核酸可以整合到宿主细胞的染色体内，或者以染色体外元件的形式存在。如果使用原核细胞或具有完整细胞壁结构的细胞作为宿主细胞，优选

的转染细胞的方法是钙处理法，参见 Cohen, S.N.等, Pro. Natl. Aca. Sci. USA., 69:2110-2114(1972) 或聚乙二醇法，参见 Chung 等, Nuc. Acids, Res. 16:3580(1988)。如果使用酵母作为宿主细胞，一般利用聚乙二醇完成转染，参见 Hinnen, Pro. Natl. Aca. Sci. USA., 75:1929 - 1933(1978)。如果使用哺乳动物细胞

5 作为宿主细胞，通常通过磷酸钙沉淀法进行转染，参见 Graham 等, Virology 52:546(1978), Gorman 等, DNA and Protein Eng. Tech. 2:3-10(1990)。但是，用于将 DNA 引入原核和真核细胞的其它已知方法，例如细胞核注射、电穿孔或原生质体融合等也可以用于本发明。

本发明中特别有用的是能够在哺乳动物细胞内提供 DNA(编码 ErbB2/3-Ig 或 ErbB2/4-Ig)瞬时表达的表达载体。简而言之，瞬时表达涉及使用能够在宿主细胞

10 内高效复制的表达载体，使得宿主细胞积累表达载体的大量拷贝，然后，高水平地合成表达载体所编码的所需多肽。包括合适的表达载体和宿主细胞的瞬时表达系统能够使人方便地鉴定到克隆 DNA 编码的多肽，并就所需的生物或生理特性筛选出这样的多肽。

15 嵌合异源粘附素最好以分泌多肽的形式从培养基中回收得到，虽然它也可以从宿主细胞的裂解液中收获。第一步，通过例如离心或超滤去除颗粒状碎片(或者是宿主细胞或者是裂解片段)；可选的是，可以利用市售蛋白质浓缩过滤器浓缩蛋白质，然后用一种或多种以下纯化方法将嵌合异源粘附素与其它杂质分离：在免疫亲和性柱上层析分离；在离子交换柱上层析；硫酸铵或乙醇沉淀；反相 HPLC；

20 二氧化硅柱层析；肝素 Sepharose 层析；阳离子交换树脂层析；层析聚焦；SDS-PAGE；和凝胶过滤。

使用记号表位嵌合异源多聚体(例如 ErbB-IgG)有助于使用免疫亲和柱的纯化。所述的柱具有吸附融合多肽的针对表位的抗体。可以使用例如家兔多克隆抗 ErbB 柱之类免疫亲和柱来通过与一 ErbB 免疫表位的结合来吸附 ErbB-IgG。

25 嵌合异源粘附素内天然胞外区序列的氨基酸变体可以通过在天然胞外区 DNA 序列中引入合适的核苷酸变化来制备，或者通过体外合成所需嵌合异源粘附素单体多肽来制备。这样的变体包括，例如，在嵌合粘附素序列内的残基的缺失、插入或取代。

上述天然序列的改变可以利用任何用于保守或非保守性突变的技术来制备，参见美国专利 5,364,934。特别注意其中的表 I，和围绕该表所作的论述，其中指导了如何选择改变、加入或缺失的氨基酸。

30

胞外区天然序列的氨基酸序列变体的编码核酸序列可以利用许多本领域已

知的方法来制备。这些方法包括但不限于,从天然来源中分离(如果是天然存在的氨基酸序列变体)或对原先制备的天然序列 ErbB2, 3 和/或 4 的变体或非变体通过寡核苷酸介导的诱变(或点突变), PCR 诱变和盒式诱变来制备。

较好的一种嵌合氨基酸序列是融合蛋白,它包括一个胞外区(例如一个 ErbB 单体)与一异源多肽(例如多聚化区(免疫球蛋白恒定区等))连接。这样的序列可以利用重组 DNA 技术来构建。或者,异源多肽可以通过本领域的已知技术,例如使用异源双官能交联剂与胞外区多肽共价结合。偶合剂例如 N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二巯基)丙酸(SPDP), iminothiolane(IT), 亚氨酸酯的双官能衍生物(例如盐酸二甲基 adipimide), 活泼酯(例如辛二酸二琥珀酰亚胺酯), 醛(例如戊二醛), 双叠氮基化合物(例如双(对叠氮苯甲酰己二胺), 双-重氮衍生物(例如双-(对重氮基苯甲酰)-乙二胺), 二异氰酸酯(例如 2,6-二异氰酸甲苯酯)和双活性氟化合物(例如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。

在实施方案之一中,嵌合异源粘附素多肽包含嵌合异源粘附素单体与记号肽(提供抗记号抗体可以选择性结合的表位)的融合。嵌合异源粘附素的这种表位记号形式是有用的,因为其存在可以利用抗该记号多肽的标记抗体来检测到。而且,提供了表位记号能够使用抗记号抗体方便地通过亲和纯化法来纯化嵌合异源粘附素。记号多肽及其相应的抗体是本领域众所周知的。例如 flu HA 记号多肽及其抗体 12CA5, (Field 等, Mol. Cell. Biol. 8:2159-2165(1988)); c-myc 记号及其抗体 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 和 9E10(Evan 等, Molecular and Cellular Biology 5(12):3610-3616(1985); 和单纯性疱疹病毒糖蛋白 D(gD)记号及其抗体 (Paborsky 等, Protein Engineering 3(6): 547-553(1990))。

在制备本发明嵌合异源粘附素时,编码天然异源多亚基受体的胞外区的核酸在 C 末端与编码免疫球蛋白恒定区序列 N 末端的核酸融合,但是,也可以在 N 末端融合。典型的是,在这样的融合中,被编码的嵌合多肽将保留至少功能活性的铰链区,即免疫球蛋白重链恒定区的 CH2 和 CH3 区。也可以与恒定区 Fc 部分的 C 末端,或者紧靠重链 CH1 区的 N 末端或轻链的相应区融合。所得的 DNA 融合结构体在合适的宿主细胞内表达。

对嵌合异源多聚体的另一种共价修饰包括将异源多聚体的一个单体多肽与多种非蛋白质聚合物(例如聚乙二醇,聚丙二醇,聚氧化烯或聚乙二醇和聚丙二醇的共聚物)连接。可以将嵌合异源多聚体包裹在微囊中,所述微囊通过团聚化技术或界面聚合法来制备(例如相应的羟甲基纤维素或明胶微囊和聚-(甲基异丁烯酸甲酯微囊),呈胶体药物传递系统(例如脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒

和纳米胶囊), 或呈大颗粒乳液(macroemulsion)。以上技术可参见 *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 第 16 版, Oslo,A.编辑(1980)。

总的说来, 本发明的 ErbB 嵌合异源多聚体将具有以下特性任何一种或多种:
5 (a)与异源多亚基受体竞争结合神经调节蛋白(例如 heregulin)的能力; (b)形成 ErbB2-IgG/ErbB3-IgG 和/或 ErbB2-IgG/ErbB4-IgG 复合物的能力; (c)通过去除天然受体周围的 heregulin 来抑制天然异源多亚基受体被激活, 由此抑制表达 ErbB2 和 ErbB3 受体和/或 ErbB2 和 ErbB4 受体的能力。

为了筛选特性(a), 嵌合 ErbB 异源多亚基粘附素结合 γ -heregulin 的能力可以方便的体外测定。例如, 可以形成这些受体的免疫粘附素形式(见下文), 而
10 ErbB2/3-IgG 或 ErbB2/4-IgG 异源免疫粘附素则固定在固相(例如涂有山羊抗人抗体的测试板)上。然后可测定 HRG 结合固定化免疫粘附素的能力, 例如通过测定其它 heregulin 分子的竞争性置换。有关细节, 参见下文实施例中的 ^{125}I -HRG 结合试验。

关于特性(c), 实施例中所所述的使用 MCF7 细胞的酪氨酸磷酸化试验提供了筛选
15 ErbB 受体活化的方法。在本发明的另一实施方案中, 可以使用 WO95/14930 所述的 KIRA-ELISA 来定性定量地测定某 ErbB 嵌合异源粘附素抑制 ErbB 受体活化的能力。

嵌合异源粘附素(例如 ErbB2/3-IgG 或 ErbB2/4-IgG)刺激表达 ErbB2 和 ErbB3 受体和/或 ErbB2 和 ErbB4 受体的细胞繁殖的能力可以方便地在细胞培养物中测定。
20 适用于该试验的细胞包括 MCF7 细胞和来自 ATCC 和 Schwann 细胞 SK - BR - 3 细胞(参见, Li 等, *J. Neuroscience* 16(6):2012-2019(1996))。可将上述肿瘤细胞系铺在细胞培养板上任其与之粘附。加入有或没有 ErbB 嵌合异源粘附素的 HRG。细胞单层可以经洗涤, 并用结晶紫染色/固定。由此, 可以如所述的那样定量细胞的繁殖或生长抑制。

25 适合用本发明来制备有用的嵌合异源粘附素的其它异源多亚基受体包括: Axl, Rse, 上皮生长因子(EGF)受体, 肝细胞生长因子(HGF)受体, IL-2, c-mer, Al-1, EPH, TrkA, TrkB, TrkC, TNF, IL-10, CRF2-4, RXR, RON, AChR α/δ , TR α /RXR α , Tr α /DR4, Tr α /MHC-TRE, Tr α /ME, Tr α /F2, KDR/FLT-1, FLT/VEGF, VEGF121/165, Arnt/Ahr, CGA/CGB, EGFR/p185-neu, 促乳素受体(PRL), T 细胞受
30 体(TCR), 成纤维细胞生长因子(FGF)/gp130, Cak 受体, IL-6/gp130, IL-11/gp130 白血病抑制因子(LIF)/gp130, cardiotrophin-1/gp130(CT-1), IL-11/gp130, 睫状神经营养因子 CNTF/gp130, 制癌蛋白 M(OSM)/gp130, γ 干扰素和 α 、 β 干

扰素。

本发明嵌合异源粘附素包含天然异源多亚基受体的胞外区，如前所述，其中受体单体之一的 ECD(或其配体结合片段)与一多聚化区融合。异源粘附素的嵌合单体通过多聚化区稳定缔合形成嵌合异源粘附素。本发明的异源粘附素结合天然受体(ECD 来源)的配体，可以用作配体的拮抗剂。这样的拮抗剂可以用于治疗因配体结合并激活天然异源多亚基受体而引起的疾病。

2. 治疗用组合物和方法

将本发明嵌合异源粘附素用作治疗性组合物是本发明的实施方案之一。在此概述的用途只是对使用嵌合异源粘附素的一般性指导。进一步的指导以 EbrB 嵌合异源粘附素为例。

HRG 在体内促进神经元的发育、维持和/或再生，包括中枢(脑和脊索)、外周(交感、副交感、传感和肠神经元)和运动神经元。所以，HRG 活化剂例如抗 EbrB-Ig 抗体活化剂可以用作诊断和/或治疗多种“神经性疾病或失调”，这些疾病影响哺乳动物例如人的神经系统。根据本发明的实施方案，可制成针对 EbrB 嵌合异源粘附素的活化性抗体与 EbrB 受体交叉反应并将其激活。

上述疾病或失调可能发生在神经系统因创伤、手术、中风、局部缺血、感染、代谢性疾病、营养不良、恶性肿瘤或有毒药物而受损的患者中。该药物能够促进神经元的存活、增殖或分化。例如，抗 EbrB 嵌合营养粘附素活化剂抗体可以用来刺激因创伤或手术受损的运动神经元的存活或增殖。它还可以用来治疗运动神经元疾病，例如肌萎缩性侧索硬化(Lou Gehrig 氏病)，Bell 氏病、和各种与脊椎肌肉萎缩或麻痹有关的疾病。该活化性抗体可以用来治疗人“神经变性疾病”，例如 Alzheimer 氏病、Parkinson 氏病、癫痫、多发性硬化症、Huntington 舞蹈病、Down 氏综合征，神经麻木和 Meniere 氏病。

而且，抗 EbrB 粘附素活化性抗体可以用来治疗神经病，尤其是外周神经病。“外周神经病”指影响外周神经系统的疾病，多数表现为运动、传感、交感运动或自律神经功能失调之一或多种并发。多种外周神经病表现出的多种形态各自可独特地归因于同样多的原因中。例如，外周神经病可能是遗传获得的，可能是由全身性疾病造成的，或者是由有毒药物引起的。其实例包括但不限于末梢传感运动神经病或自律性神经病(例如胃肠道运动减弱或膀胱张力缺乏)。与全身性疾病相关的神经病例如脊髓灰质炎后综合征；遗传性神经病例如 Charcot-Marie-Tooth 病、Refsum 氏病、血内 β 脂蛋白缺乏症、Tangier 氏病、Krabbe 氏病，异染性脑白质营养不良，Fabry 氏病和 Dejerin-Sottas 综合征；有毒药物引起的神经病包括

因化疗引起的那些。

本发明的抗 EbrB 嵌合异源粘附素活化性抗体还可以用来治疗肌肉细胞或影响它们的疾病。例如, HRG 可以用来治疗哺乳动物肌肉系统病理生理病症, 例如骨骼肌疾病(例如肌病或营养不良), 心肌疾病(例如前房心律不齐、心肌病、心肌缺血损伤、充血性疾病或心脏创伤), 或平滑肌疾病(例如动脉硬化、脉管损伤或充血性脉管疾病); 治疗肌肉损伤; 减少肌肉细胞的萎缩; 提高哺乳动物肌肉细胞的存活、增殖和/或再生; 治疗高血压; 和/或治疗乙酰胆碱受体功能不足的肌肉细胞(例如在重症肌无力或心动过速患者中)。

抗 EbrB 嵌合异源粘附素活化性抗体可以用来诱导在细胞膜表面形成离子通道和/或加强个体内突触连接的形成。HRG 还可以用作记忆加强剂, 并可以消除对尼古丁的“上瘾性”。

抗 EbrB 嵌合异源粘附素活化性抗体可以用来加强修复和/或再生 EbrB 受体(尤其是 EbrB2 受体)的组织。例如, 抗 EbrB 嵌合异源粘附素活化性抗体可以用来治疗皮外伤、胃肠道疾病、Barrett 氏食管; 膀胱性或非膀胱性末期肾病; 和肠炎。同样, 该分子可以促进人胃肠道、呼吸道、生殖道或泌尿道内上皮的重新生成。

当哺乳动物内出现 HRG 水平过高和/或 HRG 对 EbrB 受体活化过度时, 可能需要用 HRG 拮抗剂, 例如 EbrB-Ig 嵌合异源粘附素来治疗该哺乳动物。用 HRG 拮抗剂治疗的疾病例如良性或恶性肿瘤(例如肾、肝、肾、膀胱、乳房、胃、卵巢、结肠直肠、前列腺、胰腺、肺、阴道、甲状腺、肝细胞癌; 肉瘤; 成神经胶质细胞瘤和各种脑部和颈部的癌症); 白血病和恶性淋巴瘤; 其它疾病例如神经元、胶质细胞、星形细胞、下丘脑和其它腺体、巨噬细胞、上皮细胞、基质和囊胚腔疾病; 炎性、血管生成性和免疫疾病; 牛皮癣或结缔组织的形成。HRG 拮抗剂还可以用来将肿瘤细胞对免疫应答的抗性逆转, 以抑制病理性血管生成和激发免疫系统。

在本发明另一实施方案中, 作为 HRG 拮抗剂的抗 EbrB 嵌合粘附素可以给以 HRG 产生过量和/或 ErbB 被 HRG 激活过度为特征的神经病患者使用。抗 EbrB 嵌合异源粘附素拮抗性多肽可以用于防止可能在手术后发生的传感神经元异常再生, 或用于在(例如)慢性疼痛综合征的治疗中选择性地消除传感神经元。

有两种主要方法将核酸(可操作性地包含于载体中)引入患者的细胞; 体内和体外。用于体内传递, 通常在需要嵌合异源粘附素的部位将核酸直接注入患者。用于体外传递, 取出患者的细胞, 将核酸引入这些分离的细胞, 然后直接将修饰后细胞回输给患者, 或者用多孔性薄膜包裹后植入患者(参见美国专利 4,892,538

和 5,283,187)。

有许多技术可用来将核酸引入活细胞。这些技术根据是要体外传递给培养中的细胞还是体内传递给目标受体的细胞而不同。适合体外将核酸转移到哺乳动物细胞的方法包括使用脂质体、电穿孔、微注射、细胞融合，DEAE-葡聚糖，磷酸钙沉淀法等。体外传递基因的载体之一是逆转录病毒。

目前较好的体内核酸转移技术包括利用病毒载体(例如腺病毒、单纯性 I 类疱疹病毒或腺相关性病毒)和基于脂质体的系统(适用于脂质体介导的基因转移的脂质体是 DOTMA, DOPE 和 DC-Chol)转染。有时，需要提供具有定向于靶细胞的物质(例如对细胞表面膜蛋白或靶细胞具有特异性的抗体，靶细胞上某受体的配体等)的核酸源。如果使用脂质体，结合与胞吞作用有关的细胞膜蛋白的蛋白可用作定向和/或帮助吸收，例如偏好特定细胞类型的衣壳蛋白或其片段，在细胞周期内经历内化作用的蛋白质的抗体和定向于胞内位置并加强胞内半衰期的蛋白。有关受体介导的胞吞作用的技术参见 Wu 等, J.Biol. Chem. 262:4429-4432(1987); 和 Wagner 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3410-3414(1990)。有关目前已知的基因标记和基因疗法的综述可参见 Anderson 等, Science 256:808-813(1992)。还可参见 WO93/25673 和其中引用的参考文献。

嵌合异源粘附素或其抗体的医疗性制剂可以通过将具有所需纯度的异源粘附素或其抗体与选择性生理学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂(Remington's Pharmaceutical Science, 第 16 版, Osol, A. 编辑(1980))混合, 制成冻干块或水溶液的形式保存。药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂在使用剂量和浓度对接受者无毒, 它包括磷酸、柠檬酸和其它有机酸缓冲液; 包括抗坏血酸在内的抗氧化剂; 低分子量(少于 10 个残基)多肽; 蛋白质, 例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白; 亲水性聚合物, 例如聚乙烯吡咯烷酮; 氨基酸, 例如甘氨酸、谷胺酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸; 单糖, 二糖和其它碳水化合物(包括葡萄糖、甘露糖或糊精); 螯合剂, 例如 EDTA; 糖醇, 例如甘露醇或山梨醇; 成盐反离子, 例如钠; 和/或非离子表面活性剂, 例如 TweenTM, PluronicTM 或聚乙二醇(PEG)。

体内使用的嵌合异源粘附素或抗嵌合异源粘附素抗体必须是无菌的。这通过在低温干燥和重建之前或之后进行灭菌滤膜过滤即可以做到。制剂一般以冻干形式或溶液形式保存。

通常将治疗用嵌合异源粘附素或抗嵌合异源粘附素抗体组合物放在一具有无菌出入口的容器内保存, 例如静脉输液袋或具有可被皮下注射针头刺穿的塞子的药瓶。

嵌合异源粘附素或抗体的给药途径可以根据已知方法, 例如静脉注射或输液、腹膜内、脑内、肌内、眼内、动脉内或损害部位内途径, 或通过下文中的缓释系统。异源粘附素或抗体通过输注或团块注射来连续给药。

缓释制剂的合适例子包括包含蛋白质的半透性固体疏水聚合物, 该基质是有形的(例如膜或微囊)。缓释基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸)Langer等在J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277(1981)中所述的和 Langer, Chem. Tech, 12:98-105(1982)所述的聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸)或聚乙烯醇), 聚丙烯交酯(美国专利 3,773,919, EP58,481), L-谷氨酸和 L-谷氨酸 γ 乙酯的共聚物(Sidman等, Biopolymers, 22:547-556(1983)), 不可降解的乙烯乙酸乙烯酯(Langer等, 同上), 可降解的乳酸-羟乙酸共聚物(例如 Lupron DepotTM(由乳酸-羟乙酸共聚物和 leuprolide 乙酸构成的可注射微球)), 和聚-D-(-)-3-羟基丁酸(EP133,988)。

嵌合异源粘附素或活化性或拮抗性抗异源粘附素抗体组合物还包括嵌入脂质体内的组合物。含有 HRG 的脂质体可利用以下已知方法制备: DE3,218,121; Epstein等, Proc. Natl. Acad. Sci.USA 82:3688-3692(1985); Hwang等, Proc. Natl. Acad. Sci.USA 77:4030-4034(1980); EP52, 322; EP36, 676; EP88, 046; EP143, 949; EP142,641; 日本专利申请 83-118008; 美国专利 4,485,045 和 4,544, 545; 和 EP102, 324。通常, 这些脂质体是小(约 200 - 800 Å)单片形式的, 其中的脂质含量为大于约 30%甾醇, 该比例根据最佳疗效来选择。特别有用的脂质体可以通过反相蒸发来制备, 其中的脂质组合物包含缩醛磷脂酰胆碱、甾醇和 PEG-衍生的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)。脂质体挤过具有特定孔径筛网, 从而得到具有所需直径的脂质体。可以将化疗药物(例如阿霉素)包含在脂质体中。参见 Gabizon等, J.National Cancer Inst. 81(19):1484(1989)。

本发明的 EbrB-Ig 嵌合异源粘附素可以用来在细胞内结合和隔离 HRG 配体, 由此抑制 EbrB 的活化, 抑制患者体内的细胞繁殖失调例如癌症。

需用本文中 EbrB2/3-Ig 或 EbrB2/4-Ig heregulin 拮抗剂或作为拮抗剂的抗 EbrB-Ig 抗体治疗的患者也可以接受放射治疗。或者, 另外给该患者使用化疗剂。可以根据生产商的说明来使用这类化疗药物的制备或剂量方案, 或者由熟练技术人员凭经验来确定。这类化疗药物的制备和剂量方案还可以参见 Chemotherapy Service Ed., M.C.Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD(1992)。化疗药物可以在给予拮抗剂之前、之后或同时给予。对癌症来说, 可能还需要使用抗肿瘤相关性抗原或抗原性因子的抗体, 例如结合 EGFR, EbrB2, EbrB3, EbrB4 或脉管内皮因子(VEGF)的抗体。或者, 还需要给患者另外联用一种或多种细胞因子。

治疗有效量的拮抗剂取决于治疗对象、给药途径和病人状态。所以，治疗者有必要滴定剂量和修改给药途径以获得最佳的治疗效果。典型的剂量可以在约 1 微克/千克至 100 毫克/千克患者体重范围内，较好的是约 10 微克/千克至 10 毫克/千克。通常临床医生将逐渐给以拮抗剂，直至达到对上述疾病具有治疗效果的剂量为止。

3.非治疗方法

HRG 活化性抗 EbrB2/3-Ig 抗体或抗 EbrB2/4-Ig 抗体可以用来体外培养细胞(例如胶质细胞和肌细胞)。为了分离得到细胞特异性因子(例如 Schwann 细胞特异性标记 P75^{NGFR})，需要在细胞培养物中含有此类细胞群。这类因子可以用作诊断工具，或者，以 P75^{NGFR} 为例，可用作抗原来产生诊断用抗体。较好的还有，获取哺乳动物细胞(例如 Schwann 细胞)群，用作置换细胞用于该哺乳动物移植(例如移植到受损的脊索区，以期作用于中断中枢神经节的再生，用于帮助外周神经所述的修复和作为多次自体移植的替代方法)。

根据本发明的体外方法，包含 EbrB 受体的细胞被提供并处于细胞培养基中。合适的培养基是本领域技术人员众所周知的，包括但不限于极限必需培养基(MEM)，RPMI - 1640 和 Dulbecco 修改的 Eagle's 培养基(DMEM)。这些组织培养基可以向 Sigma Chemical Company(St. Louis, MO)和 GIBCO(Grand Island, NY)订购。然后在一定条件下将细胞培养在细胞培养基中，所述的条件足以在有效量活化性抗体存在下保持细胞活性并生长。细胞可以多种方法培养，包括培养在培养块(clot)、琼脂板或液体培养。

抗 EbrB-Ig 抗体可以用来诊断以 erB(例如 ebrB2)过表达和/或扩增为特征的癌症，其中使用与 EbrB 受体交叉反应的抗嵌合异源粘附素抗体。这样的诊断试验可以与其它诊断/预后评价联用，例如测定淋巴结的情况、原发肿瘤的大小、组织学级别、雌激素或孕酮情况、肿瘤 DNA 含量(倍体)或细胞的繁殖(S 期分级)。参见 Muss 等，New Eng. J. Med., 330(18):1260-1266(1994)。

此处的样品是获得的，例如，来自患者初期损伤的组织样品。制备成福尔马林固定的、石蜡包埋块。参见 Muss 等，同上和 Press 等，Cancer Research 54:2771-2777(1994)。按照已知技术制备组织切片(例如 4 微米的)。然后定量测定抗 EbrB2/3-Ig 或抗 EbrB2/4-Ig 抗体与组织切片结合的程度。

一般说来，嵌合异源粘附素或抗嵌合异源粘附素抗体是用可测标记直接或间接标记的。有许多标记，大致分为以下几类：

(a)放射性同位素，例如 ³⁵S，¹⁴C，¹²⁵I，³H 和 ¹³¹I，γ-HRG 或抗体可以利

用已知技术用放射性同位素标记, 所述技术参见 *Current Protocols in Immunology*, Ed.Coligen 等, Wiley Publishers, VOL1 和 2, 例如, 可以利用闪烁计数法来测定放射性。

5 (b)荧光标记, 例如稀土螯合物(例如钕螯合物)或荧光素衍生物, 罗丹明及其衍生物, 丹酰、丽丝胺、藻红素和得克萨斯红都是可以购得的。这些荧光标记可以通过已知技术与嵌合异源粘附素或抗体结合, 所述技术可参见 *Current Protocols in Immunology*, 同上。可以利用荧光计(Dynatech)来测定荧光。

10 (c)有许多酶-底物标记, 美国专利 4,275,149 对此有所综述。所述的酶通常催化一生色底物的化学改变, 该改变可用多种技术测得。例如, 酶催化底物中的变色反应, 这种变化可以利用分光光度计法来测得。或者, 酶改变底物的荧光或化学光。定量荧光改变的方法见前文。化学发光底物经化学反应被电子激发, 于是发光, 以被测得, 或向某荧光受体供能。酶标记例如荧光素酶(萤火虫荧光素酶和细菌荧光素酶; 美国专利 4,737,456)。萤光素、2,3-二羟基二氮杂萘二酮(2,3-dihydrophthalazinedione)、苹果酸脱氢酶、脲酶、以辣根过氧化物酶(HRPO)为例
15 的过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖酶、葡糖淀粉酶、溶菌酶、糖氧化酶(例如葡萄糖氧化酶, 半乳糖氧化酶和葡萄糖-6-磷酸酯脱氢酶)、杂环氧化酶(例如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶)、乳过氧化物酶、微过氧化物酶等。将酶与蛋白质结合的技术参见 O'Sullivan 等, *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, in *Methods in Enzym.*(J. Langone 和 H.Van.Vunakis 编辑), Academic press, New York, 73:147-166(1981),
20

酶-底物组合的例子包括: (a)辣根过氧化物酶(HRPO)与作为底物的过氧化氢酶, 其中过氧化氢酶氧化一染料前体(例如正苯基二胺(OPD)或 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)); (b)碱性磷酸酶(AP)与作为生色底物的磷酸对硝基苯酯; 和(c) β -D-半乳糖苷(β -D-Gal)与生色底物(例如对硝基苯基 β -D-半乳糖苷酶)或发荧光底物 4-
25 甲基伞形酰- β -D-半乳糖苷酶。

本领域技术人员还可以获得许多其它酶-底物组合物。有关综述可参见美国专利 4,275,149 和 4,318,980。

30 可选的是, 标记可以与嵌合异源粘附素或抗-CHA 抗体直接结合。熟练技术人员知道许多可以做到这一点的方法。例如, CHA 或抗 CHA 抗体可以与生物素连接, 而上述三种广泛围标记中任何一种都可以与抗生物素蛋白结合, 或者反过来也可进行。生物素选择性地结合抗生物素蛋白, 由此标记间接地与 CHA 或抗 CHA 抗体结合。有关涉及生物素-抗生物素蛋白结合技术的综述可参见 *Current*

Protocols in Immunology, 同上。或者, 为了将标记与 CHA 或抗 CHA 抗体间接结合, CHA 或抗 CHA 抗体先与一小半抗原(例如地高辛)结合, 而上述抗体中任何一种与抗半抗原抗体(例如抗地高辛抗体)结合。这样, 标记就与 CHA 或抗 CHA 抗体间接结合了。

- 5 在本发明另一实施方案中, CHA 或抗 CHA 抗体不必标记, 可以用标记的抗 CHA 抗体或抗抗体抗体(例如结合了 HRPO)来检测其存在。

在优选实施方案中, HRG 或抗体用酶标记标记, 所述的酶催化底物(例如四甲基联苯胺(TMB)或正苯基二胺(OPD))的变色反应。由此避免了使用放射性物质。可以在合适的波长处(例如对 TMB 而言是 450 纳米, 对 OPD 而言是 490 纳米, 10 参照波长为 650 纳米)利用分光光度计法测得反应试剂的颜色变化。

被认为表达配体(例如 HRG)的细胞与标记过的 EbrB CHA 接触, 然后测得细胞培养基的染色强度。虽然一般考虑体外分析, 但是也可以进行使用与可测基团结合的标记 EbrB CHA 进行体内诊断(例如为了造影)。参见美国专利 4,938,948。

- 15 当用放射性碘、酶、荧光团、自旋标记等标记时, CHA 或抗 CHA 抗体还可以用于放射性免疫试验、酶联免疫试验或放射性受体试验, 亲和性纯化技术(例如纯化 HRG, 或 EbrB 受体 EbrB3、EbrB4 受体)和竞争性受体结合试验。这样, CAH 可以用作产生抗 CHA 抗体的免疫原, 用于诊断。

4. 抗嵌合异源粘附素抗体及其用途

- 产生抗体, 例如多克隆抗体和单克隆抗体的方法是本领域众所周知的。多克
20 隆抗体一般通过用 CHA 或其片段(可以与对被免疫物种具有免疫原性的异源蛋白结合)免疫底物来产生。针对一种 CHA 的单克隆抗体可以利用多种方法来产生, 所述方法将在培养物中由连续细胞系产生抗体分子。适用于产生单克隆抗体的方法例如最初 Kohler 等, Nature 256:495-497(1975)所述的杂交瘤法和人 B 细胞杂交瘤法, Kozbor, J. Immunol. 133:3001(1984)的; Brodeur 等, Monoclonal
25 Antibody Production Techniques and Applications, pp.51-63(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 和 Boener 等, J. Immunol. 147:86-95(1991)。

- 利用常规技术可方便地分离得到编码本发明抗体的 DNA 并对其测序(例如通过使用寡核苷酸探针, 所述探针能够特异性结合编码抗体重链和轻链的基因)。本发明的杂交瘤细胞是此类 DNA 较好的来源。一旦分离后, 就可将 DNA 放入表达
30 载体, 然后转染到不转染则不产生免疫球蛋白的宿主细胞(例如大肠杆菌细胞、猴 COS 细胞, 中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞)内, 以期在重组宿主细胞内合成单克隆抗体。

可以对 DNA 进行修饰, 例如用人重链和轻链恒定区的编码序列替换同源鼠序列(Morrison 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851(1984)), 或将一非免疫球蛋白多肽编码序列的全部或部分与免疫球蛋白的编码序列共价连接, 以这种方式, 就制备得到了“嵌合”或“杂和”抗体, 它们具有对本文某抗 CHA 单克隆抗体的结合特异性。

人源化非人抗体的方法在本领域是众所周知的。总的说来, 人源化抗体中引入了一个或多个来自非人来源的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基常被称为“进口”残基, 多来自“进口”可变区。基本上, 人源化可以按照 Winter 及其同事(Jones 等, *Nature*, 321:522-525(1986); Riechmann 等, *Nature*, 332:323-327(1988)和 Verhoeyen 等, *Science* 239:1534-1536(1988)所述的方法来进行, 即将鼠 CDR 或 CDR 序列替换成人抗体的对应序列。所以, 这样的“人源化”抗体是嵌合抗体(美国专利 4,816,567), 其中实质上只是部分人可变区被非人物种的相应序列所取代。实际上, 人源化抗体通常是人抗体, 其中部分 CDR 残基以及可能部分 FR 残基被来自鼠抗体类似位置的残基所取代。

选择用于制造人源化抗体的人可变区(包括轻链和重链)对降低抗原性是十分重要的。根据所谓的“最适”法, 对完整的已知人可变区序列文库筛选鼠抗体的可变区序列。最接近鼠序列的人序列被作为人源化抗体的人框架(FR)(Sims 等, *J. Immunol.* 151:2296(1993); 和 Chothia 和 Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901(1987))。另一种方法使用来自特定轻链或重链亚类的所有人抗体的一段共有序列的一种特殊框架。相同的框架可以用于多种不同的人源化抗体(Carter 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285(1992); 和 Presta 等, *J. Immunol.* 151:2623(1993))。

更重要的是, 抗体的人源化必需保留对抗体的高度亲和性和其它有用的生物特性。为此, 根据优选方法, 如此制备人源化抗体, 即使用亲本或人源化序列的三维模型分析亲本和各种概念上的人源化产物。免疫球蛋白三维模型是常见的, 而且是本领域众所周知的。有计算机程序可以展现选定的候选免疫球蛋白序列可能的三维构象结构。对这种展示的检视可以分析出某残基在候选免疫球蛋白序列功能中可能起的作用, 即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原能力的残基。如此, FR 残基可以被选来与共有序列和进口序列结合, 由此获得所需的抗体特征, 例如对靶抗原的亲合性提高。总而言之, CDR 残基直接并且最本质地影响着抗原结合性。

根据另一种产生人抗体的方法, 可以使用转基因动物(例如小鼠), 它们能够在免疫后完全生成人抗体而没有内源性免疫球蛋白。例如, 已知, 嵌合种系突变

小鼠内抗体重链铰链区(J_H)具有的纯合缺失造成对内源性抗体产生的完全抑制。将人种系免疫球蛋白基因序列转移到这样的种系突变小鼠内将在以抗原刺激后生产人抗体。参见, Jakobovits 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551(1993); Jakobovits 等, *Nature* 362:255-258(1993)和 Bruggermann 等, *Year in Immunol.* 5 7:33(1993)。

或者, 可以用噬菌体展示技术(Mc Cafferty 等 *Nature*348:522-553(1990))由非免疫供体的全部免疫球蛋白可变区(V)基因体外生产人抗体和抗体片段。根据这一技术, 抗体 V 区基因克隆在丝状噬菌体(例如 M13 或 fd)的主包被蛋白或次要包被蛋白框架内, 在噬菌体颗粒表面表达为功能性抗体片段。因为丝状颗粒含有噬菌体基因组的单链 DNA 拷贝, 根据抗体功能进行的选择也就选出了编码具有所述特性的抗体的基因。所以, 噬菌体模拟了 B 细胞的部分特性。噬菌体展示技术还可以多种方式进行: 有关综述参见 Johnson, Kevin S.和 Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571(1993)。许多 V 基因片段可用于噬菌体展示。Clackson 等, *Nature* 352:624-628(1991)来自免疫小鼠脾脏的 V 基因随机组合文库分离到一种抗噁唑酮抗体的不同排列。根据 Marks 等, *J. Biol.* 222: 10 581-597(1991)或 Griffith 等, *EMBO J.*12:725-734(1993)所述的方法, 可以构建来自非免疫人供体的全部 V 基因, 并分离一系列不同抗原的抗体。

双特异性抗体是至少对两种不同抗原具有结合特异性的抗体。在此, 结合特异性之一针对 CHA(最好是 CHA 的 ECD), 另一特异性是针对其它抗原的。双特异性抗体可以制备成全长抗体或抗体片段(例如 F(ab')₂ 双特异性抗体)。下文所述的方法可用于制备双特异性抗体和制备本发明 CHA 的多聚化区。

制备双特异性抗体的方法是本领域已知的。生产全长双特异性抗体的常规方法基于两免疫球蛋白重链对的共表达, 所述的两链具有不同的特异性(Millstein 等, *Nature* 305:537-539(1983))。由于对免疫球蛋白重链和轻链的随机组合, 杂交瘤(四交瘤)可能产生 10 种不同抗体分子的混合物, 其中只有一种具有正确的双特异性结构。通常通过亲和性层析进行的正确分子的纯化非常繁琐, 所以得率很低。WO93/08829 和 Traunecker 等, *EMBO J.* 10:3655-3659(1991)中描述了类似的方法。

根据另一种不同的方法, 具有所需结合特异性的抗体可变区(抗体-抗原结合位点)与免疫球蛋白的恒定区序列融合。最好是与免疫球蛋白轻链的恒定区融合, 包含至少部分铰链区, CH2 和 CH3 区。第一重链恒定区(CH1)宜包含轻链(至少存在于融合体之一中)结合所必需的位点。编码免疫球蛋白重链融合体和(视必要)

轻链的 DNA 被分别插入不同的表达载体，共转染入合适的宿主生物体。当在构建中三种多肽链的不等比具有最佳的得率时，这为在实施中调整三种多肽片段的相互比例提供了很大的灵活性。但是，如果至少两种多肽链的等比表达具有最佳得率，或者所述的比例并不重要时，可以将编码三种多肽链中两种或全部的基因

5 插入同一表达载体中。

在这种方法的一优选实施方案中，双特异性抗体的一臂上为具有第一结合特异性的杂和免疫球蛋白重链，而在另一臂上是杂和的免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)。已发现，这种不对称结构有助于将所需的双特异性化合物与不需要的免疫球蛋白链混合物分离，因为只在双特异性分子的一半具有免疫球蛋白轻链为分离提供了便利。该方法参见 WO94/04690。有关生产双特异性抗体的进一步细节可参见 Suresh 等，*Methods in Enzymology*, 121:210(1986)。

根据另一种方法，可以人为改变抗体分子对之间的界面，从而达到从重组细胞培养物中回收异源二聚体的最大百分比。较好的界面具有某抗体恒定区的至少部分 C_H3 区。在该方法中，第一抗体分子的一个或多个小氨基酸侧链被较大的侧链(例如酪氨酸或色氨酸)所替换。通过以小侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)替换大侧链在第二抗体分子的界面上形成与大侧链大小相同或相近的互补“空穴”。这提供了一种机制使得异源二聚体的得率高于其它不需要的终产物(例如同源二聚体)。

双特异性抗体包括交联或“异源结合”的抗体。例如，异源结合物的抗体之一可以与抗生物素蛋白偶合，而另一个则与生物素偶合。有人提出用这样的抗体将免疫系统的细胞定向于不需要的细胞(美国专利 4,676,980)，和用于治疗 HIV 感染(WO91/00360)。异源结合抗体可以用任何一种常规交联方法来制备。合适的交联剂是本领域众所周知的，参见美国专利 4,676,980，其中还说明了许多交联技术。

文献中也记载了从抗体片段产生双特异性抗体的技术。例如，可以利用化学键制备双特异性抗体。Brennan 等，*Science* 229:81(1985)说明了一种方法，即完整的抗体经酶切产生 F(ab')₂ 片段。在二巯基磷酸钠存在下还原片段，稳定化连位二巯基以防形成分子内二硫键。然后将产生的 Fab' 片段转化成硫硝基苯甲酸(TNB)衍生物。然后通过巯基乙胺还原反应，将 Fab'-TNB 衍生物之一转化成 Fab'-巯基，并与等摩尔量的其它 Fab'-TNB 衍生物混合，形成双特异性抗体。所得的双特异性抗体可以用于选择性酶固定化。

最近的发展便利了从大肠杆菌直接回收 Fab'-SH 片段，它可以化学偶合成双特异性抗体。Shalaby 等，*J. Exp. Med.*, 175:217-225(1992)对生产完全人源化的

双特异性抗体 $F(ab')_2$ 分子进行了说明。各 Fab' 片段分别由大肠杆菌分泌，并在体外直接化学偶合成双特异性抗体。由此形成的双特异性抗体能够结合过表达 erbB 的细胞和正常的人 T 细胞，并激发人细胞毒性淋巴细胞对人乳房肿瘤目标的裂解活性。

- 5 制造和从重组细胞培养物直接分离双特异性抗体片段的各种技术也已经有所报道。例如，已经用亮氨酸拉链生产出了双特异性抗体。Kostelny 等，*J. Immunol.* 148(5):1547-1553(1992)。来自 Fos 和 Jun 蛋白的亮氨酸拉链通过基因融合技术与两种不同抗体的 Fab' 部分连接。抗体同源二聚体在铰链区经还原形成单体，然后再氧化成抗体异源二聚体。该方法也可以用来生产抗体同源二聚体。
- 10 Hollinger 等在 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448(1993)所述的“双体(diabody)”技术提供了另一种制造双特异性抗体片段的机制。这些片段包含通过一接头与一轻链可变区(V_L)连接的重链可变区(V_H)，接头短至不允许同一链中的上述两区配对。所以，一个片段的 V_H 和 V_L 区被迫与另一片段上互补的 V_L 和 V_H 配对，由此形成两个抗原结合位点。其它使用单链 Fv(sFv)制造双特异性抗体片段的方法也已经有所报道。参见 Gruber 等，*J. Immunol.* 152:5368(1994)。
- 15

也考虑过两价或两价以上的抗体。例如，可以制备三特异性抗体。Tutt 等，*J. Immunol.* 147:60(1991)。

- 为了制造中和抗体，使用产生以上所述分子的技术来制造抗体。较好的中和抗体具有对 CHA 胞外区的特异性，并与天然异源多亚基受体的胞外区交叉反应，但不与其它受体交叉反应。在产生了一组抗体后，为了确定哪些分子符合所需的标准(即能够在体外或体内中和天然异源多亚基受体的生物活性)对这些抗体进行筛选。例如，可以在任何上述试验之一或多个中评价 ErbB-Ig CHA 封闭 ErbB 活性的能力。可以选择能够在细胞上抑制 HRG 结合和/或激活 ErbB 受体和/或 HRG 有丝分裂活性能力的 CHA 或抗 CHA 抗体作为中和 CHA 或 CHA 抗体。
- 20

- 25 这些抗体可以与细胞毒素或酶(例如前药激活酶)偶合，所用方法与前文就 CHA 所述的相似。而且，可以如前所述标记抗体，尤其是当抗体用于诊断试验时。

5. 诊断试剂盒和产品

- 为了方便起见，本发明提供了两种诊断试验(即，用抗 ErbB-Ig 抗体检测癌症，和用 ErbB-Ig 检测样品中 HRG 的存在)，试验所用的试剂可以试剂盒的方式提供(包装在一起的试剂)以便与待测样品组合。试剂盒中的组成以预定的比例提供。这样，一个试剂盒可能包含以合适的标记直接或间接标记的 CHA 或抗 CHA 抗体。如果可测标记是酶，试剂盒还包括底物和酶所需要的辅因子(例如提供生色团
- 30

或荧光团的底物前体)。此外,还可以包括其它添加物,例如稳定剂、缓冲液等。为了使得试剂在溶液中的浓度使得试验具有尽可能高的灵敏度,各种试剂的相对比例可以在较宽范围内变化。具体地说,试剂可以是包含赋形剂的干燥粉末形式的(通常是低温干燥的),在溶解后就成为具有合适浓度的试剂溶液。试剂盒还宜

5 包括有关实施生物试验的说明。

在本发明另一实施方案中,提供了一种产品,其中包含治疗前文所述疾病所需的材料。所述产品包括一容器和一标签。合适的容器包括大瓶、小瓶、注射器和试管。容器可以多种材料制成,例如玻璃或塑料。容器中盛有能够有效治疗疾病的组合物,并具有无菌入口(例如,容器可以是静脉输液袋或其塞能被皮下注射

10 针头刺穿的小瓶)。组合物中活性物质是 CHA 或其 HRG 拮抗性抗 CHA 抗体。在容器上或与之放在一起的标签说明组合物是用来治疗选定疾病的。该产品还可以包含第二容器,其中包含药学上可接受的缓冲液,例如磷酸盐缓冲液、Ringer 溶液和葡萄糖溶液。还可以包括就商业和使用而言所需要的物质,包括缓冲液、稀释剂、针头、注射管和有关使用说明书的包装内附件。

15

实施例

以下实施例是说明而不是限定。以下实施例是为了向一般技术人员就如何制造和使用本发明的混合物、组合物和方法提供全面的揭示和说明,而不是要限定发明的范围。我们力求数据准确(例如数量、温度等),但是不能排除部分实验误差和偏差。除非另作说明,份都是重量份,温度都是℃,压力是大气压力或接近

20 大气压力。说明书所引用的已公开内容都在此公开地写入本文作为参考。

实施例 1: 材料和方法

本实施例说明了本发明 ErbB2-IgG、ErbB3-IgG 和 ErbB4-IgG 嵌合氨基酸序列及由其所得的嵌合异源多聚体的构建、分离和生物化学鉴定。

25

试剂: 在大肠杆菌内表达 HRGβ1₍₁₇₇₋₂₄₄₎ 的类 EGF 区,如前所述进行纯化和放射性碘化(Sliwkowski, M.等, J. Biol. Chem. 269:14661-14665(1994))。在中国仓鼠卵巢细胞内表达的全长 HRGβ1 被用于 Western 印迹分析实验。抗 ErbB2 单克隆抗体 2C4 和 4D5 可参见其它文献(Fendly 等, Cancer Research 50:1550-

30 1558(1990))。

ErbB2-、ErbB3-和 ErbB4 免疫粘附素: 在表达人 IgG 重链的质粒(pDR, J. Ridgeway 和 P. Carter, Genentech, Inc.赠与)编码免疫球蛋白铰链区的区域内用基

因工程方法插入一个 Mlu I 位点。Mlu I 位点还被加入一组 ErbB 表达质粒，位于编码所述受体 ECD/TM 连接的区域。全部突变都用 Kunkel 法进行(Kunkel T., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488(1985))。Mlu I 位点被用来制造正确的 ErbB-IgG 融合构建物。各种 ErbB-IgG 嵌合物的融连物为：ErbB2, $L^{646}_{ErbB2}-(TR)-DKTH^{224}_{VH}$;
5 ErbB3, $E^{636}_{ErbB3}-(TR)-DKTH^{224}_{VH}$; ErbB4, $G^{640}_{ErbB4}-(TR)-DKTH^{224}_{VH}$, 其中 ErbB 多肽的氨基酸编号参见 Plowman 等所述(Plowman, G.D.等, (1993a)PNAS USA 90:1746-1750)。保守的 TR 序列来自 Mlu I 位点。用于制备这些融合结构的 Fc 区序列参见 Ellison, J.W.等(Ellison, J.W.等(1982)NAR 10:4071-4079)。最后的表达结构体位于 pRK 型质粒骨架内，在其中，由 CMV 启动子驱动真核性表达(Gorman
10 等, DNA Prot. Eng. Tech. 2:3-10(1990))。

为了获得用于体外实验的蛋白，以合适的表达质粒用标准磷酸钙法(Gorman 等, 同上和 Huang 等, Nucleic Acids Res. 18:937-947(1990))转染贴壁 HEK-293 细胞(ATCC No. CRL-1573)。转染后 15 小时，用无血清培养基替换含血清培养基，转染细胞培养 5 至 7 天。收获所得的条件培养基，并通过蛋白 A 层析柱(1ml
15 Pharmacia HiTrapTM)。用 0.1M 的柠檬酸(pH4.2)将纯化的 IgG 融合体洗脱在含 1M Tris pH9.0 的试管内。然后用 PBS 透析洗脱的蛋白，用 Centri-prep-30 过滤器(Amicon)浓缩。加入甘油至终浓度 25%，保存于-20℃。用 Fc-ELISA 测定物质的浓度。

¹²⁵I-HRG 结合试验：在 Nunc 碎裂(breakapart)免疫模式测试板上进行结合试验。测试孔涂以 100 微升 5 微克/毫升山羊抗人抗体(Boehringer Mannheim)的 50mM 碳酸盐缓冲溶液(pH9.6)，于 4℃ 过夜。测试板用 200 微升洗涤缓冲液(PBS/0.05%Tween-20TM)洗涤两次，然后与 100 微升 1%BSA/PBS 在室温下短暂孵育 30 分钟。去除缓冲液，各孔与 100 微升 IgG 融合蛋白的 1%BSA/PBS 在剧烈左右(side-to-side)旋转下孵育 1 小时。测试板用洗涤缓冲液洗涤 3 次，进行竞争性结合，即加入不同量的低温竞争物 γ -HRG 和 ¹²⁵I-HRG β 1 并在室温下，在剧烈左右(side-to-side)旋转下孵育 2 至 3 小时。迅速用洗涤缓冲液洗涤测试孔 3 次，沥干，
25 用一台 100Series Iso Data γ -计数器对各孔计数。使用经修改的 Ligand 程序进行 Scatchard 分析(Munson, P.和 Robard, D.(1980) Analytical Biochemistry 107:220-239)。

30 ³H-胸苷掺入试验：以 96 孔格式进行含氚胸苷掺入试验。MCF7-7 细胞以 10,000 细胞/孔的密度培养在 50:50F12/DMEM(高葡萄糖)0.1%胎牛血清(100 毫升)中。任细胞稳定 3 小时，然后在测试孔中加入 ErbB-IgG 融合蛋白和/或 heregulin(最

终体积为 200 毫升), 测试板在 37 °C 的组织培养箱内孵育 15 小时。在测试孔中加入含氟胸苷(20ml, 1/20 稀释的含氟胸苷储备液: Amersham TRA 120 B363, 1 毫居里/毫升), 测试板再孵育 3 小时。用 Packard Filtermate 196 收获仪将含氟物质收集到 GF/C 单层滤膜(96 孔格式)上。用 Packard Topcount 仪计数滤膜。

5

实施例 2: ErbB3-IgG 和 ErbB4-IgG 蛋白结合 HRG

如前所述, 制备了一系列可在真核宿主内表达与人 IgG 恒定区融合的 ErbB 受体胞外区(ECD)的质粒。如图 1 所示, 这些受体-IgG 结构体以二硫键结合的二聚体形式存在于溶液中。ErbB2、ErbB3 和 ErbB4 的同源二聚体 IgG 受体各自在 HEK-293 细胞内表达, 分泌出的受体融合蛋白在蛋白 A 上利用亲和性层析纯化。Chen 等(Chen, X 等(1996) J. Biol. Chem. 271:7620-7629)报道了一种类似的同源二聚结构 ErbB3-和 ErbB4-免疫粘附素, 它们被用作产生受体特异性单克隆抗体的免疫原。用微滴板进行嵌合免疫粘附素蛋白的结合分析(参见实施例 1)。如图 2 所示, 同源二聚 ErbB3-IgG 和 ErbB4-IgG 能够特异性结合 ^{125}I -HRG, 但是没有测得 ErbB2-IgG 结构体的结合。HRG 结合 ErbB3-IgG 的 Scatchard 分析显示单一一个亲和性结合位点, 其 K_d 为 $9.3 \pm 2.9 \text{ nM}$ 。除垢剂溶解的昆虫细胞表达的 ErbB3(Carraway 等, 1994), COS7 细胞表达的 ErbB3(Sliwkowski 等, (1994)同上)和 K562 细胞表达的 ErbB3 的结合常数在 0.8 至 1.9 nM。同源二聚 ErbB3-IgG 对 HRG 的亲合常数高于最近 Horan 等(Horan 等, (1995) g.Biol. Chem. 270 :24604-24608)报道的在使用单价可溶性 ErbB3 的 ECD 分析中所得的 26 nM。以上数据表明, ErbB3 上 HRG 结合位点的最佳构象可被脂质双层稳定化。与完全受体相比, EGF 受体可溶形式的结合亲和性损失较大也曾有报导(Brown, P.M.等, (1994)Eur. J. Biochem. 225:223-233; 和 Zhou, M 等, (1993) Biochemistry 32:8193-8198)。ErbB4-IgG 的亲合常数是 $5.0 \pm 0.8 \text{ nM}$ 。该值与 Tzahar 等报道的在 COS7 细胞中表达的全长 ErbB4 的 1.5 nM 接近(Tzahar 等, (1994) J. Biol. Chem. 269:25226-25233)。

虽然神经调节蛋白是因不同的 RNA 剪接产生的一族蛋白, 但受体结合是由所有活化形式中都有的类 EGF 模块介导的。只要存在这些蛋白的类 EGF 区, 含有 ErbB3 或 ErbB4 的 ECD 的嵌合同源二聚体免疫粘附素可与神经调节蛋白族中的多种形式结合。结合这些同源二聚体的 heregulin 变体包括 rHRG β_{1-244} , rHRG $\beta_{144-244}$, 硫氧还蛋白-rHRG $\beta_{144-244}$ 和硫氧还蛋白- γ HRG, rHRG α_{1-239} 。

30

实施例 3: 当 ErbB2 与 ErbB3 或 ErbB4 共存时, 异源二聚 ErbB-IgG 融合蛋白形

成高亲和性 HRG 结合位点

通过将编码不同受体的两个表达质粒共转染入同一细胞来产生异源二聚受体-IgG 结构体(参见实施例 1)。所得的受体-IgG 分泌形式是两种同源二聚体和预期的异源二聚体的混合物。进行了 3 次不同的转染以产生以下 ErbB 混合物:

5 ErbB2/3-IgG, ErbB2/4-IgG 和 ErbB3/4-IgG, 然后测定混合物中各自的结合亲和性。如图 3A 所示, 用含 ErbB2 的异源二聚体测得一高亲和性 HRG 结合位点, 但是 ErbB3/4-IgG 则不然。根据以上数据, 含 ErbB2 异源二聚体混合物的 Scatchard 图是曲直线形式的(图 3B 和 3C), 这表明存在着两种不同的结合位点(Munson, P. 和 Robard, D. (1980) Analytical Biochem. 107:220-239)。经测定, 高亲和性结合位点的 K_d 是 0.013nM, 而低亲和性结合位点的 K_d 是 12nM。高亲和性结合常数与 ErbB3 在含高水平 ErbB2 的细胞内表达时测得的值(Carraway 等, (1994), 同上)或在高 ErbB3 背景下对数据进行 2 位拟和确定高亲和性 HRG 结合位点时测得的值(Sliwkowski 等, (1994), 同上)一致。与 ErbB4-IgG 同源二聚体相比, ErbB2/4-IgG 也表现出类似的亲和性改变(图 3C)。测得的 ErbB2/4-IgG 的亲和性常数为

10 0.017nM。再次利用 2 位拟和法, 测得一 K_d 为 5nM 的低亲和性结合位点。该值接近 ErbB4-IgG 同源二聚体的测得 K_d 。相反, ErbB3/ErbB4-IgG 蛋白没有表现出高亲和性结合位点(图 3D), 只测得 6nM 的 K_d , 这与 ErbB3-IgG 和 ErbB4-IgG 同源二聚体的相当。高亲和性配体结合位点的形成与 ErbB2 的 ECD 与另一 ErbB 族成员的 ECD 共表达有关, 这表明 ErbB2 是形成高亲和性位点所必需的。表 I 简要地列出了 ErbB-IgG 融合蛋白的结合常数。形成的异源二聚 ErbB2/3-IgG 或

15 ErbB2/4-IgG 融合蛋白的高亲和性结合位点比相应的同源二聚体高 300 至 700 倍。

表 I. ErbB 同源二聚体和异源二聚体免疫粘附素的结合常数

ErbB-IgG 结构体	Kd (nM)
ErbB2	NB*
ErbB3	9.24±2.94
ErbB4	4.98±0.80
ErbB2/3	0.013±0.004
ErbB2/4	0.017±0.009
ErbB3/4	5.98±0.70

*NB: 没有可测得的结合

25 为了进一步证实 ErbB2 对形成高亲和性结合位点有贡献, 对抗 ErbB2 ECD

抗体抑制与 ErbB 免疫粘附素的高亲和性结合的作用进行了检查。结合反应在抗体 2C4 存在下进行, 2C4 具有对 ErbB2 ECD 的特异性(Lewis, G.D.等, (1996) Cancer Res. 56:1457-1465; Sliwkowski 等, (1994)同上)。如图 4A 所示, 加入 2C4 单克隆抗体明显抑制 HRG 与 ErbB2/ErbB3-IgG 异源二聚体的结合, 但是对其与相应的 ErbB3-IgG 同源二聚体没有作用。同样, 抗 ErbB2 单克隆抗体对 ErbB2/ErbB4-IgG 异源二聚体的结合也有影响, 但是对相应的 ErbB4-IgG 同源二聚体没有作用。以上数据表明, ErbB2 的 ECD 与 ErbB3 的或 ErbB4 的 ECD 间的物理作用导致在该可溶性受体系统内形成高亲和性生长因子结合位点。

10 实施例 4: ErbB-IgG 融合蛋白抑制 HRG 的生物作用

在用 HRG 处理后, 已知, 许多不同种细胞将经历增殖应答。在乳房癌细胞系 MCF7 中测定了 ErbB-IgG 蛋白抑制 HRG 依赖性胸苷掺入的能力(Lewis 等, (1996), 同上)。不同浓度的不同 ErbB-IgG 蛋白与 1nM rHRG 孵育, 然后加至无血清 MCF7 细胞单层培养物(参见实施例 1)。孵育 24 小时后, 用 ³H-胸苷标记细胞以测定 DNA 合成。如图 5 所示, 所有能够结合 HRG 的受体融合体都以剂量相关性方式抑制 HRG 介导的有丝分裂应答。异源二聚体 IgGs、ErbB3/2-IgG 和 ErbB4/2-IgG 比各自相应的同源二聚融合蛋白更有效。

讨论

20 ErbB 的胞外区调节 HRG 与 ErbB3 和 ErbB4 的结合

免疫粘附素为体外分析提供了许多优点(参见 Chamow, S.M.和 Ashkenazi, A. (1996) Trends in Biotechnology 14:52-60 综述)。是 IgG 融合体的二聚化能力(似乎模拟推定的 ErbB 族受体体内异源二聚化作用)导致了高亲和性 heregulin 结合位点的产生。HRG 结合分析证明, 包括 ErbB2 的异源二聚体混合物, 即 ErbB2/3-IgG 和 ErbB2/4-IgG, 产生的 heregulin 结合位点, 其亲和性比 ErbB3-IgG 或 ErbB4-IgG 同源二聚体或 ErbB3/ErbB4-IgG 异源二聚体高 300 倍。ErbB3/ErbB4-IgG 异源二聚体内有低亲和性 HRG 结合位点表明, 不是任意两种不同 ErbB-IgG 的组合都能形成高亲和性 heregulin 结合位点, 而是只有含 ErbB2-IgG 的混合物才能够。用抗 ErbB2 的单克隆抗体进一步证明了 ErbB2 为产生高亲和性结合位点所必需(Lewis 等, (1996)同上; Sliwkowski 等(1994)同上)。当用含 ErbB2 的异源二聚体进行结合研究时, 可以观察到, 在这些抗体的存在下, HRG 结合亲和性明显降低。

在以正常水平表达这些受体的细胞系内, 常会形成 HRG-ErbB3-ErbB2 复合

物。具体地说, HRG 结合 ErbB3 和 ErbB2 然后再加入到该 HRG 占据的受体内。该复合物的形成降低了配体的解离率, 产生高亲和性结合位点(Karunakaran,D 等, (1996) EMBO J. 15:254-264)。现在, 据报道, 只要存在多聚化模块, 即使没有跨膜区和胞内区, 在一可溶性受体系统内也会形成高亲和性复合物。相比之下, Horan 等(Horan, T.等, (1995) J. Biol. Chem. 270:24604-24608)报道, 加入 ErbB2-ECD 后, HRG 与 ErbB3-ECD 的结合没有明显增加。与这些发现一致的是, 如果将来自单转染相比的同源二聚 ErbB-IgG 混合, 测试其与 heregulin 的结合, 将获得类似的结果。所得的混合物, 即 ErbB2-IgG 同源二聚体与 ErbB3-IgG 或 ErbB4-IgG 同源二聚体的混合物表现出的配体亲和性一点都不比单独的 ErbB3-IgG 或 ErbB4-IgG 强。所以, 由 Fc 部分提供的二聚化模块是高亲和性结合位点形成中的一个重要特征。而且, 铰链区的灵活性可能也有助于所述的受体-配体相互作用。除理论所述之外, 当整个抗体包埋在细胞膜内时, 其它模块, 例如跨膜区或胞内区可能也有助于含 ErbB2 异源寡聚复合物的稳定化。

15 ErbB2 在寡聚 heregulin-受体信号复合物中的作用

配体诱导的受体寡聚化是单跨膜穿越受体的常见变化过程(Ullrich, A.和 Schlessinger, J.(1990) Cell 61:203-212;和 Wells, J.A.(1994) Curr. Opin. Cell Biol. 6:163-173)。根据在此发现的 ErbB3 或 ErbB4 与 ErbB2 构成的可溶性嵌合异源二聚体, 可以推断, 这样的嵌合异源二聚体足以形成高亲和性结合状态。为此提出了两种与以上信息相一致的模式(图 6)。“接触”模式与生长激素与其受体的模式类似(Wells, J.A.(1996) PNAS USA 93:1-6), 所不同的是, 位点 1 在 ErbB3 或 ErbB4 上, 而位点 2 由 ErbB2 提供。该模式推定, HRG 结合位点 1 的亲合性将与就 ErbB3 或 ErbB4 同源二聚体测得的亲和性接近。ErbB2 然后加入到 ErbB3-HRG 或 ErbB4-HRG 复合物中, 并与 ErbB3(或 ErbB4)-结合的 HRG 接触。ErbB3-HRG-ErbB2 复合物的形成降低了 HRG 的解离, 由此形成高亲和性结合状态。另一种是“构象”模式, 它假定, ErbB2 改变了 HRG 与 ErbB3 或 ErbB4 的相互作用, 但是 ErbB2 并不与 HRG 接触。在该模式中, ErbB2 与 ErbB3 或 ErbB4 的相互作用改变了所述受体的构象, 由此形成高亲和性结合状态。

用表达 ErbB3 和 ErbB2 的细胞上的放射性标记的 HRG 进行化学交联技术(Holmes, W.E.等, (1992) Science 256:1205-1210; Sliwkowski 等, (1994)同上), 观察到了交联复合物对分子量约为 190kDa 和大于 500kDa 的蛋白质的应答。这些结果表明, 受体复合物的寡聚结构可能包括多个 ErbB3 和 ErbB2 的拷贝。而且, 由

于 ErbB3 本没有酪氨酸激酶活性(Guy 等, (1994)同上), 该假设为观察到的 ErbB2 和 ErbB3 的配体依赖的酪氨酸磷酸化作用都加强提供了一种解释。例如, 包含双拷贝 ErbB3 和双拷贝 ErbB2 的复合物允许 ErbB3 的磷酸化和第二 ErbB2 受体的反磷酸化(transphosphorylation)。TNF 受体同源二聚体免疫粘附素(Ashkenazi, A 等, (1991) PNAS USA 88:10535-10539)似乎与 TNF 受体系统类似, 其中, 细胞表面的 TNF 受体是一三聚体(Banner, D.W.等, (1993) Cell 73-431-445)。

ErbB2 改变 ErbB3 和 ErbB4 的生物学意义

既然发现了 ErbB2, 所以假定一定存在与 ErbB2 作用并将其激活的配体。虽然提出了许多候选蛋白作为 ErbB2 的推定配体(参见 Hynes, N.E.和 Stern, D.F.(1994) Biochem. Biophys. Acta 1198:165-184), 但是没有一种蛋白在分子水平上经鉴定符合这一标准。其它研究表明, ErbB2 似乎在 EGF 和 heregulin 受体复合物中起着多面作用(Earp 等, (1995)同上; Karunakaran 等, (1996)同上)。ErbB2 在这些复合物中的作用包括: 改变配体结合区的亲和性, 提供一个很强的酪氨酸激酶部分和提供一旦被磷酸化则激活和放大多种信号传导途径的酪氨酸残基。

15 ErbB2 的 heregulin 活化作用在神经-肌肉连接处(Altiook, N.等(1995) EMBO J. 14:4258-4266; Chu, G.C.等, (1995) Neuron 14:329-339;和 Jo. S.A.等, (1995) Nature 373:158-161)和神经-Schwann 细胞连接处(Dong, Z.等, (1995) Neuron 15:585-596; Marchionni, M.A.等, (1993) Nature 362:312-318;和 Morrissey, T.K.等(1995)PNAS USA 92:1431-1435)具有生理学上的相关性。在人肿瘤细胞系培养实验中, 数种受体证明, 减弱 ErbB2 与 ErbB3 或 ErbB4 间的相互作用消除了下游的信号传导以及继而发生的生物应答(例如生长)(Karunakaran 等, (1996)同上; Lewis 等, (1996)同上; Pinkas - Kramarski, R.等, (1996)EMBO J. 15:2452-2467)。最近有关 ErbB2 表型和神经调节蛋白剔除(knockouts)的报道进一步支持了 ErbB2 是一长期的“孤儿”受体这一概念(Ionardo 等, 1990)。在两种情况中, 两种突变都为纯合的小鼠的胚胎死亡率接近 E10.5(Lee, K.-F.等, (1995) Nature 378:394-398;和 Meyer,D.和 Birchmeier, C.(1995)Nature 378:386-390)。在两种情况中, 胚胎都死于相同的心脏表型, 没有形成心室小梁。两种胚胎的菱脑畸形惊人地类似。这些发现进一步表明, ErbB2 对于传导 HRG 信号是至关重要的。在正常生理条件下, ErbB2 唯一的作用似乎就是作为这些受体复合物的共有成员介导 HRG 和 EGF 配体应答。

30 虽然在此参照优选实施例对本发明进行了说明, 应该理解的是, 在本发明宗旨之下可进行多种改变。所以, 本发明仅由下面的权利要求来限定。

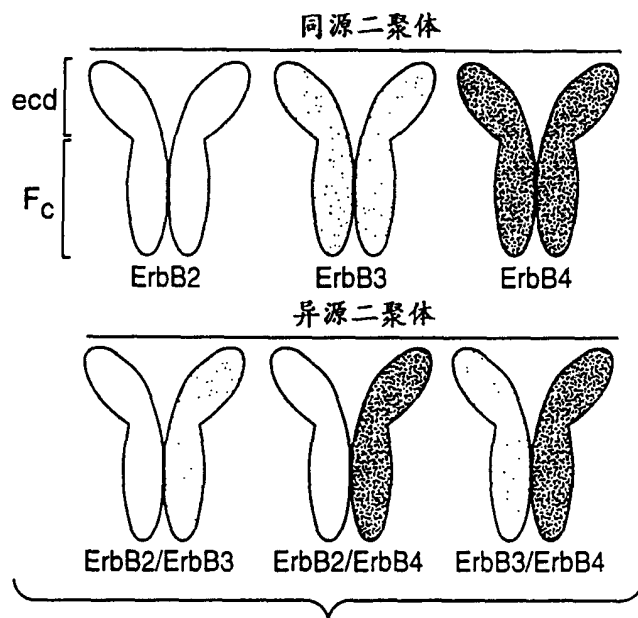


图 1

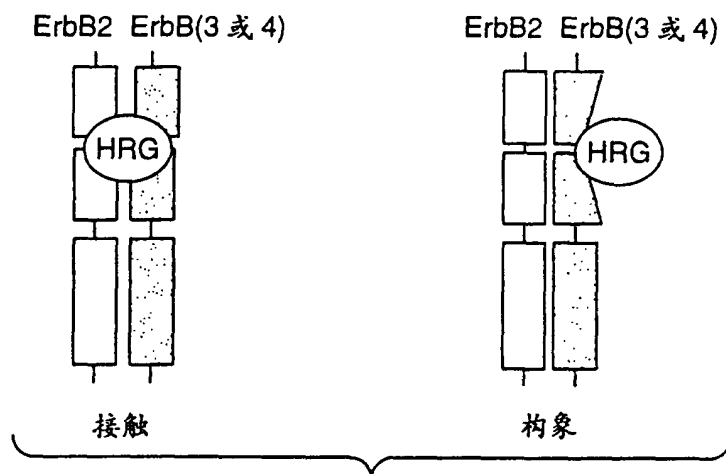


图 6

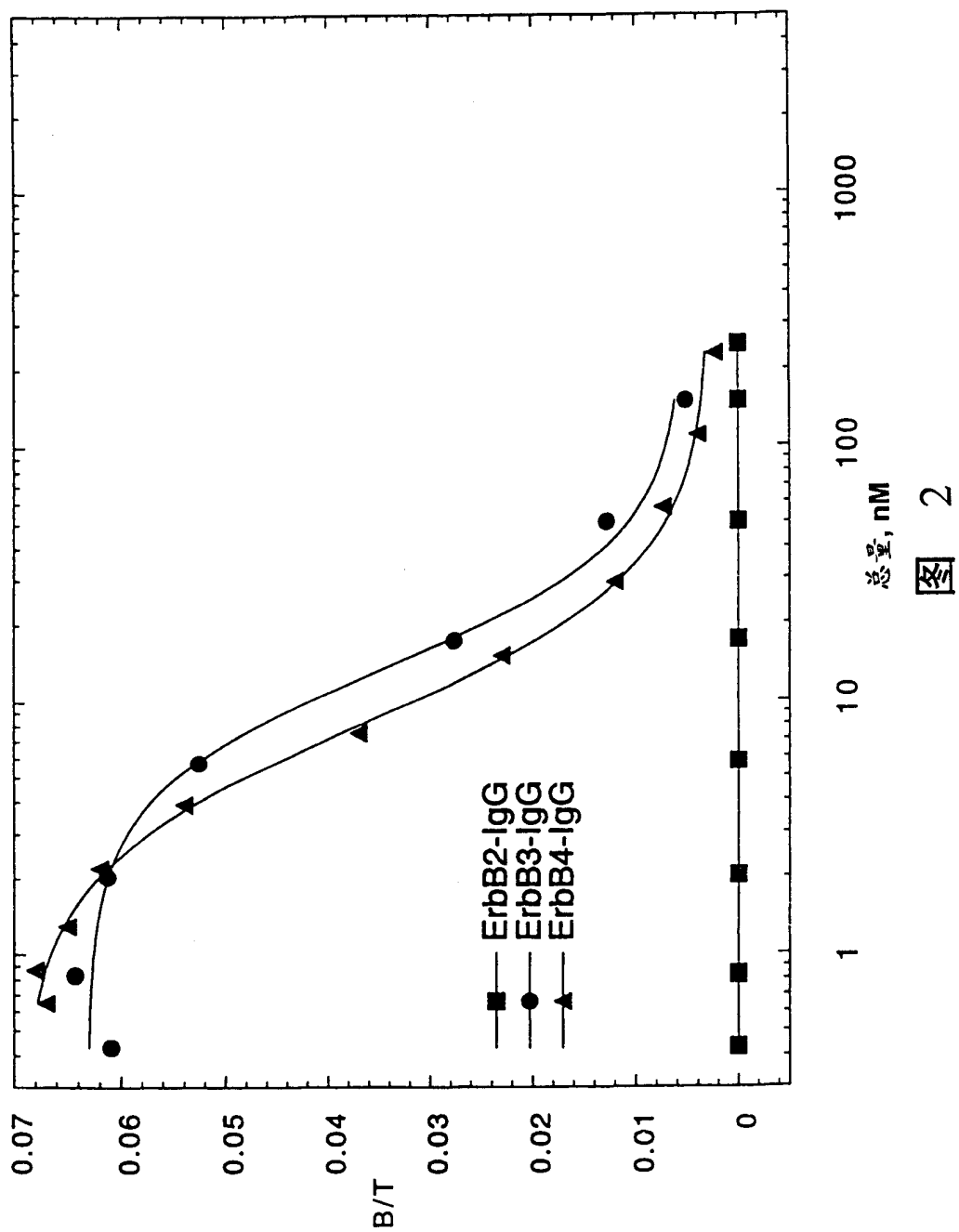
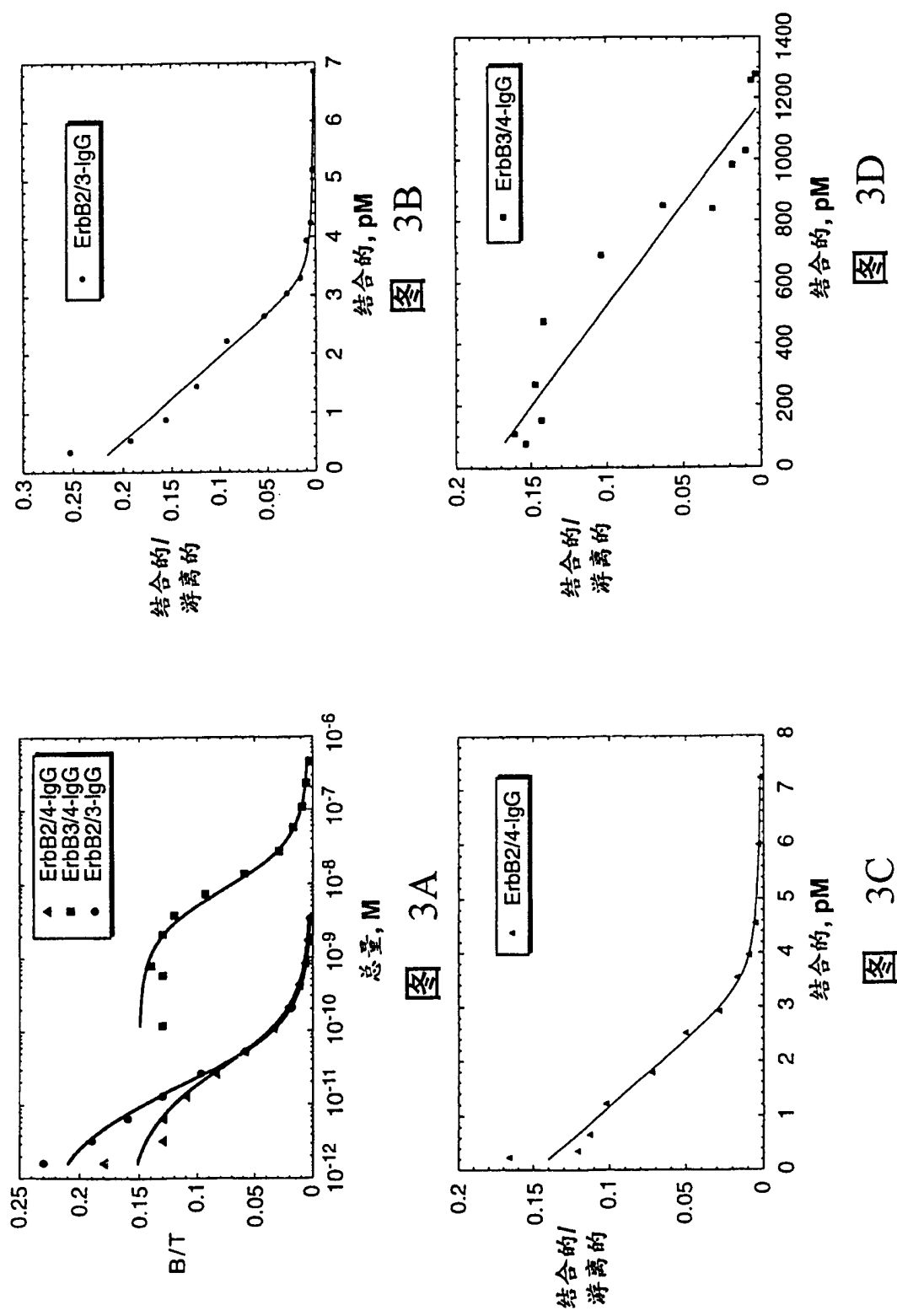


图 2



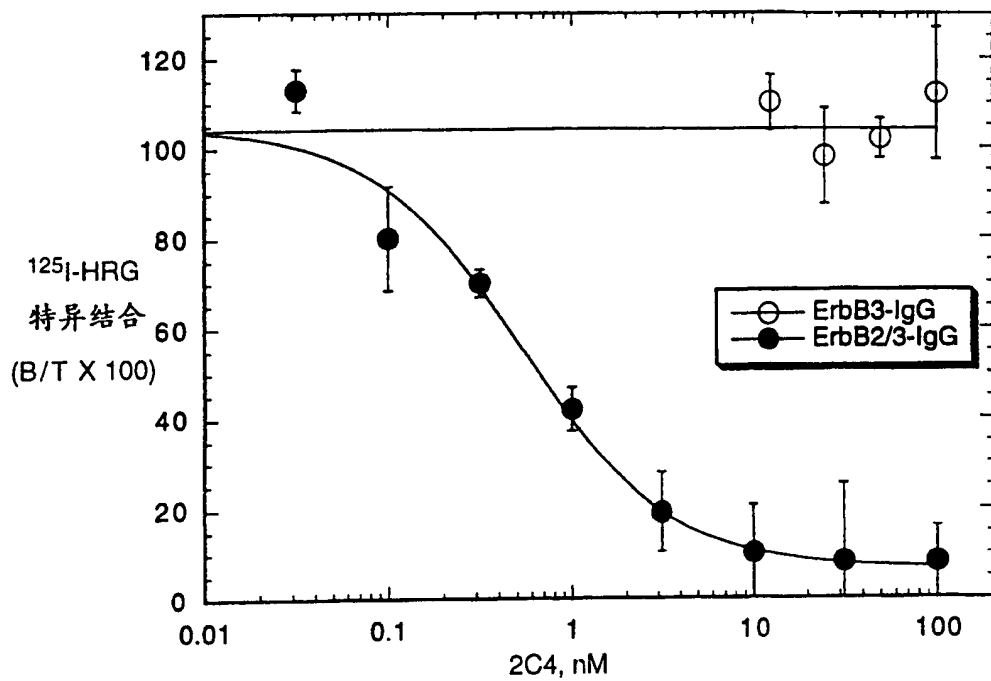


图 4A

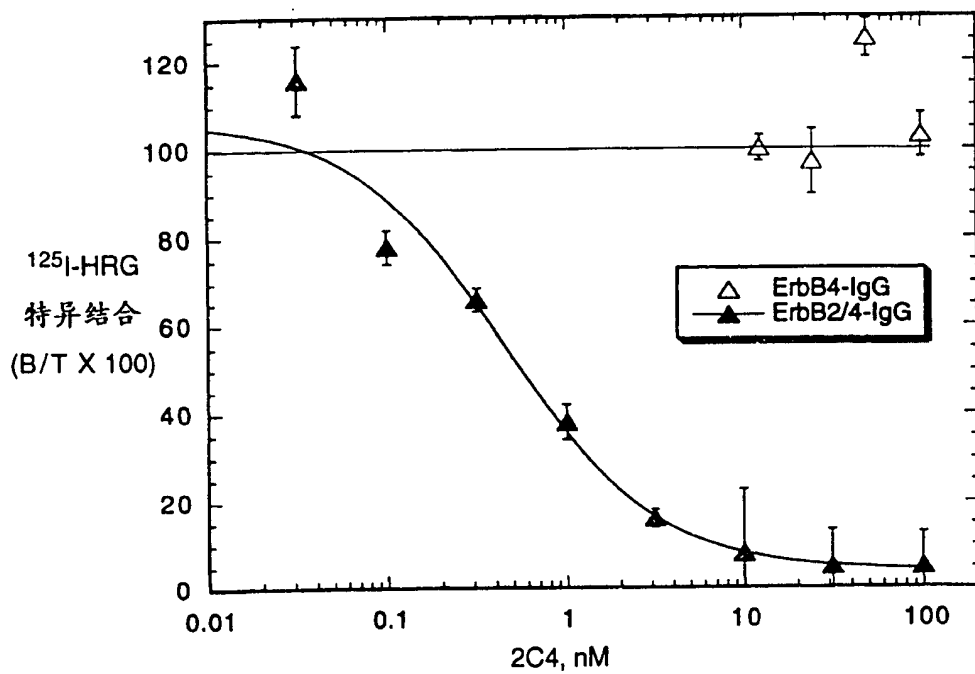


图 4B

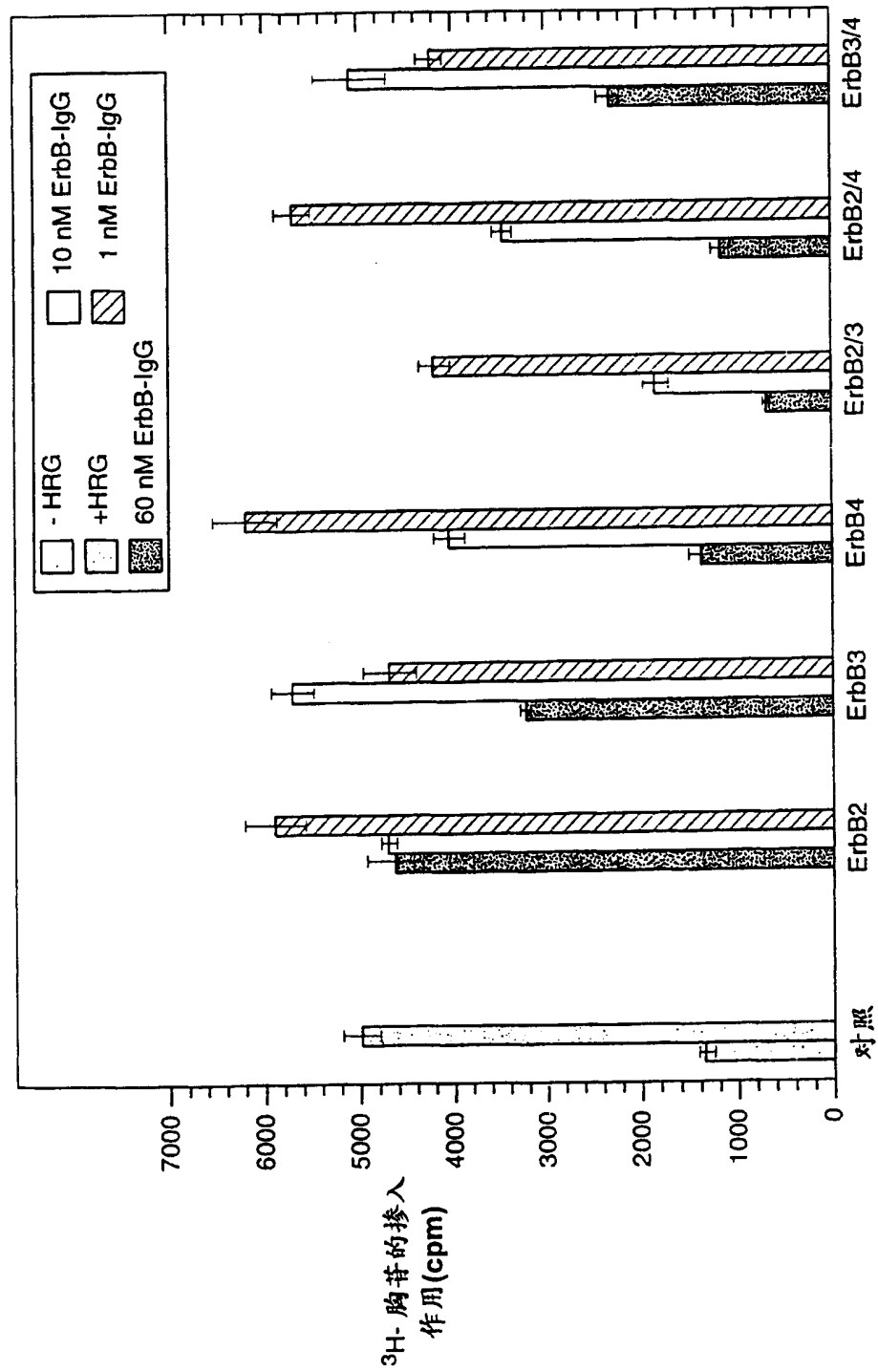


图 5