I888027

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 **(11)證書號數：TW I888027 B**

(45)公告日： 中華民國 114 (2025) 年 06 月 21 日

(21)申請案號：113107264 (22)申請日： 中華民國 108 (2019) 年 04 月 11 日

(51)Int. Cl.： ***C07K14/475 (2006.01)*** ***C07K19/00 (2006.01)***
C12N15/62 (2006.01) ***A61K39/395 (2006.01)***
A61P9/00 (2006.01) ***A61P35/00 (2006.01)***

(30)優先權：2018/04/11 美國 62/656,246

(71)申請人：美商信立泰生物醫藥公司 (美國) SALUBRIS BIOTHERAPEUTICS, INC. (US)
美國
大陸商信立泰（成都）生物技術有限公司 (中國大陸) SALUBRIS (CHENGDU) BIOTECH CO., LTD. (CN)
中國大陸

(72)發明人：李 月華 LI, JOHN (US) ；李生偉 LI, SHENGWEI (CN) ；羅弟祥 LUO, DIXIANG (CN) ；鄔怡然 WU, YIRAN (CN) ；周明 ZHOU, MING (CN) ；莊曉蕾 ZHUANG, XIAOLEI (CN) ；華亮 HUA, LIANG (CN) ；雒蓬軼 LUO, PENGYI (CN) ；王楊 WANG, YANG (CN)

(74)代理人：林志剛

(56)參考文獻：

US 20070081992A1 US 20090226435A1

WO 2015155998A1

審查人員：張維纓

申請專利範圍項數：27 項 圖式數：12 共 135 頁

(54)名稱

人神經調節蛋白－１（ＮＲＧ－１）重組融合蛋白組成物及其使用方法

(57)摘要

本發明係關於重組融合蛋白，其包含與單株抗體(mAb)骨架融合的心臟保護蛋白神經調節蛋白-1(NRG-1)的片段，以及治療有需要的受試者的疾病或病症的方法，包括投予治療有效量的本文揭露的重組融合蛋白或包含重組融合蛋白的醫藥組成物。

The present invention relates to a recombinant fusion protein comprising a fragment of the cardioprotective protein neuregulin-1 (NRG-1) fused to a monoclonal antibody (mAb) backbone and to a method of treating a disease or condition in a subject in need thereof comprising administering a therapeutically effective amount of the recombinant fusion protein or the pharmaceutical composition comprising the recombinant fusion protein disclosed herein.

專利案號：113107264
原申請案號：108112630
I888027

【發明摘要】

【中文發明名稱】

人神經調節蛋白－１（ＮＲＧ－１）重組融合蛋白組成物及其使用方法

【英文發明名稱】

HUMAN NEUREGULIN-1 (NRG-1) RECOMBINANT FUSION PROTEIN COMPOSITIONS AND METHODS OF USE THEREOF

【中文】

本發明係關於重組融合蛋白，其包含與單株抗體(mAb)骨架融合的心臟保護蛋白神經調節蛋白-1(NRG-1)的片段，以及治療有需要的受試者的疾病或病症的方法，包括投予治療有效量的本文揭露的重組融合蛋白或包含重組融合蛋白的醫藥組成物。

【英文】

The present invention relates to a recombinant fusion protein comprising a fragment of the cardioprotective protein neuregulin-1 (NRG-1) fused to a monoclonal antibody (mAb) backbone and to a method of treating a disease or condition in a subject in need thereof comprising administering a therapeutically effective amount of the recombinant fusion protein or the pharmaceutical composition comprising the recombinant fusion protein disclosed herein.

【指定代表圖】無

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

人神經調節蛋白－１（ＮＲＧ－１）重組融合蛋白組成物及其使用方法

【英文發明名稱】

HUMAN NEUREGULIN-1 (NRG-1) RECOMBINANT FUSION PROTEIN COMPOSITIONS AND METHODS OF USE THEREOF

【技術領域】

【0001】本發明係關於一種人神經調節蛋白-1重組融合蛋白組成物及其使用方法。

[相關申請的交叉引用]

【0002】本申請要求2018年4月11日提交的美國臨時申請No.62/656,246的優先權和權益，其內容通過引用整體併入本文。

[通過引用序列表引入]

【0003】本申請包含序列表，該序列表已經通過EFS-Web以ASCII格式提交，並且其全部內容通過引用併入本文。在2019年3月16日創建的所述ASCII複本命名為SBTI-001-001WO_SeqList.txt，大小為31,328位元組。

【先前技術】

【0004】神經調節蛋白(NRG；調蛋白，HRG)，也稱為神經膠質生長因數(GGF)和新分化因數(NDF)，是一種分子量為44KD的糖蛋白。NRG蛋白家族有四個成員：NRG-1、NRG-2、NRG-3和NRG-4。NRG(包括NRG-1)在心臟發育中起著特別重要的作用。作為ErbB家族酪氨酸激酶受體的配體，NRG-1直接與膜結合的ErbB3或ErbB4結合，誘導二聚合以產生ErbB2/ErbB4、ErbB2/ErbB3、ErbB3/ErbB3和ErbB4/ErbB4複合物，以及隨後的細胞內訊息傳導。在動物模型中，NRG的表達誘導旁分泌訊息傳導，以在胚胎發生期間促進心臟組織中的生長和分化，同時ErbB2、ErbB4或NRG-1任何的缺失導致胚胎致死。此外，已顯示阻斷ErbB2受體訊息傳導的癌症療法具有顯著的心臟毒性副作用，證明在人類中ErbB2介導的訊息傳導不僅對於發育而且對於健康心臟組織的穩態也是必需的。

【0005】證據還表明，NRG-1訊息轉導在其他器官系統的發育和功能以及人類疾病(包括精神分裂症和頭頸癌)的發病機理中起作用。NRG-1含有許多異構體。對基因突變小鼠(基因剔除小鼠)的研究表明，具有不同N末端區域或EGF樣結構域的異構體具有不同的體內功能。本發明基於NRG-1βa2同功型。

【0006】內源性NRG-1結合ErbB4(HER4)，並通過ErbB3(HER3)誘導訊息傳導。許多臨床前和臨床研究顯示NRG-1在多種心血管適應症中的治療潛力，主要是通過其

與心肌細胞表達的ErbB4(HER4)的相互作用。然而，三個關鍵因素限制了重組人NRG-1(rhNRG-1)的臨床應用和效用。首先，NRG-1通過HER3的訊息傳導可以促進癌症發展和/或進展，引起對需要長期施用或沒有嚴重心血管(CV)風險因數的任何應用的顯著關注。其次，NRG-1對HER3的過度活化可破壞胃腸(GI)上皮完整性和體內平衡，導致嚴重的GI毒性並因此喪失NRG-1的治療窗口。第三，rhNRG-1的臨床階段活性蛋白片段均顯示出短的半衰期，表明可能需要繁瑣的給藥和給藥方案以達到所需的治療暴露水準。因此，需要提供基於NRG-1的治療劑，其在各種心血管適應症中保留臨床上顯著的治療潛力，但具有較低的腫瘤發生或促進癌症進展的風險，更好的GI耐受性和更有利的藥代動力學(PK)特徵。

【0007】本發明通過提供包含rhNRG-1活性結構域與HER3特異性拮抗劑抗體的融合體的重組蛋白來滿足這些需要：HER3訊息傳導被阻斷以減輕rhNRG-1的致癌風險和GI毒性，並且同時，抗體骨架形式賦予典型單株抗體的分子半衰期，使得產品的給藥和投予更方便。

【發明內容】

【0008】於一態樣中，本發明係關於重組融合蛋白，其包含與單株抗體(mAb)骨架融合的心臟保護蛋白神經調節蛋白-1(NRG-1)的片段。在相關態樣中，NRG-1片段通過連接子與抗體重鏈的C-端融合。在另一個相關態樣中，

NRG-1通過NRG-1的N-端上的第一(第1)胺基酸連接到連接子，在一個實施方式中，其是絲胺酸(S或Ser)胺基酸。在相關態樣中，片段是包含NRG-1的活性結構域的活性片段。在另一個相關態樣中，mAb對於ErbB3(HER3)是單特異性。在另一個相關態樣中，NRG-1是NRG-1 β2a同功型。

【0009】另一態樣中，本發明係關於包含重組融合蛋白的醫藥組成物，重組融合蛋白包含與抗HER3單株抗體骨架融合的心臟保護蛋白神經調節蛋白-1(NRG-1)的片段和醫藥上可接受的載體、稀釋劑或賦形劑。

【0010】另一態樣中，本發明係關於治療有需要的受試者的疾病或病症的方法，該方法包括投予治療有效量的本文揭露的重組融合蛋白或包含重組融合蛋白的醫藥組成物。

【0011】另一態樣中，本發明係關於預防、抑制、遏制或延遲受試者心血管疾病或病症發作的方法，該方法包括投予有效量的本文揭露的重組融合蛋白。

【0012】另一態樣中，本發明係關於在有需要的受試者中治療CNS相關疾病或病症的方法，該方法包括投予治療有效量的重組融合蛋白。

【0013】另一態樣中，本發明係關於預防、抑制、遏制或延遲受試者中CNS相關疾病或病症發作的方法，該方法包括投予有效量的重組融合蛋白。

【0014】在另一個相關態樣中，NRG-1結合ErbB4

(HER4)，並通過ErbB4(HER4)誘導訊息傳導。在另一個相關態樣中，mAb通過ErbB3(HER3)抑制NRG-1訊息傳導。

【0015】另一態樣中，本發明係關於套組，其包含有效量的本發明的重組融合蛋白或包含本發明的重組融合蛋白的醫藥組成物。

【0016】從以下詳細描述實施例和附圖中，本發明的其他特徵和優點將變得顯而易見。然而，應該理解的是，在指示本發明的實施例時的詳細描述和具體示例僅以說明的方式給出，因為從本詳述出發而在本發明的精神和範圍內的各種改變和修改對於本領域技術人員而言將變得顯而易見。

【圖式簡單說明】

【0017】通過參考以下詳細說明和所附申請專利範圍並結合附圖，本發明的各種目的和優點以及對本發明的更全面理解是顯而易見的，其中：

【0018】[圖1]顯示了用於表達本文揭露的重組融合蛋白的表現質體的構建。

【0019】[圖2A-D]說明了本文揭露的重組融合蛋白的示意性結構。圖2A說明了本發明的抗HER3mAb/NRG-1融合蛋白的分子示意圖。圖2B顯示了通過SDS-PAGE分析產生的代表性資料。圖2C顯示通過對包含HER3/4結合結構域的NRG-1的61-胺基酸活性片段(“NRG-1”，R&D Systems，Minneapolis，MN)特異性的第一抗體檢測的西方墨點轉

漬法結果。圖2D顯示了通過IgG特異性的第一抗體檢測的西方墨點轉漬法結果。

【0020】[圖3]說明結合分析，其顯示本文揭露的重組融合蛋白結合HER3蛋白(曲線1，步驟2)並且可以同時結合抗NRG-1抗體(曲線1，步驟3)。注意，將Fc突變引入本文揭露的重組融合蛋白中以剔除編碼HER3特異性抗體的親本抗體序列的Fc效應子功能，這可以減輕對表達HER3受體的正常組織的非所欲細胞毒性。

【0021】[圖4A-D]顯示代表性圖，顯示用抗HER3mAb/NRG-1融合蛋白或對照處理的不同癌細胞株的平均相對生長速率±SEM(n = 3)。圖4A顯示NCI-N87胃癌細胞株中的平均相對生長速率。圖4B顯示MCF-7乳癌細胞株中的平均相對生長速率。圖4C顯示RT-112膀胱癌細胞株中的平均相對生長速率。圖4D顯示T47D乳癌細胞株中的平均相對生長速率。與對照NRG-1肽和GP120 mAb/NRG-1融合蛋白相比，本文提供的重組融合蛋白在促進癌細胞增生方面證實顯著較低的活性。

【0022】[圖5A-B]說明儘管降低癌細胞生長潛力，但本文提供的重組融合蛋白完全保留了在心肌細胞中誘導PI3K/AKT訊息傳導的能力，證實與重組NRG-1和GP120 mAb/NRG-1融合蛋白相當的活性。圖5A是顯示用本揭露的重組融合蛋白和對照處理的人心肌細胞中磷酸-AKT(pAKT)與總AKT(tAKT)相對於抗體濃度(以nM計)的相對比例的圖。圖5B是用本揭露的重組融合蛋白和對照處理的人

心肌細胞中AKT磷酸化的西方墨點轉漬法分析。

【0023】[圖6A-C]顯示了在本文揭露的重組融合蛋白和對照存在下HER2/4和HER2/3二聚合的直接比較。圖6A顯示了用於檢測配體誘導的二聚合的測定原理。由Eurofins DiscoverX(Fremont，CA)開發的PathHunter二聚合測定法用於檢測受體-二聚體對的兩個次單位的配體誘導的二聚合。β-gal酶分為兩個片段：ProLink(PK)和酶受體(EA)。已經將細胞工程化以共表現與酶供體PK融合的靶蛋白1及與酶受體EA融合的靶蛋白2。配體與一種靶蛋白的結合誘導其與另一種靶蛋白相互作用，迫使兩種酶片段互補並導致酶反應釋放化學發光訊息，其被檢測為相對螢光單位或RFU。圖6B是說明本文提供的重組融合蛋白可以誘導具有與NRG-1相當的效力的HER2/HER4二聚合的圖。圖6C是說明本文提供的重組融合蛋白在誘導HER2/HER3二聚合中顯著低於NRG-1的效力的圖。這些發現進一步證實，本文提供的重組融合蛋白保留NRG-1的完整HER2/4訊息傳導潛力，同時顯著降低HER2/3訊息傳導誘導。

【0024】[圖7]說明本發明的抗HER3 mAb/NRG-1融合蛋白與HER3抗原在不同物種(包括人、猴、大鼠和小鼠)之間的結合親和力。通過BIAcore分析測定的平衡解離速率(KD)分別為3.13×10^{-10}(人)、3.97×10^{-10}(猴)、2.68×10^{-9}(大鼠)和2.77×10^{-9}(小鼠)。這些資料表明，本發明的重組融合蛋白對人和猴HER3具有相似的結合親和力，而其對嚙齒

動物(大鼠和小鼠)HER3的親和力低約一個數量級。

【0025】[圖8]是說明重組融合蛋白對冠狀動脈結紮誘導的收縮性心臟衰竭大鼠模式中射出率(EF)的影響的圖。

【0026】[圖9A-F]是一系列6幅圖像，顯示由冠狀動脈結紮誘導的收縮性心臟衰竭大鼠模式中心肌結構的組織病理學變化。收集手術部位旁邊的心臟組織並用4%甲醛固定，然後製備石蠟切片並用H&E染色。圖9A顯示來自假手術對照大鼠的心臟組織。圖9B顯示來自用媒劑對照處理的收縮性心臟衰竭模式大鼠的心臟組織。圖9C顯示來自用GP120 mAb/NRG-1(10mg/kg)治療的收縮性心臟衰竭模式大鼠的心臟組織。圖9D顯示來自用抗HER3 mAb/NRG-1(1mg/kg)治療的收縮性心臟衰竭模式大鼠的心臟組織。圖9E顯示來自用抗HER3 mAb/NRG-1(3mg/kg)治療的收縮性心臟衰竭模式大鼠的心臟組織。圖9F顯示來自用抗HER3 mAb/NRG-1(10mg/kg)處理的收縮性心臟衰竭模式大鼠的心臟組織。

【0027】[圖10]是說明在NOD/SCID小鼠中使用皮下FaDu癌異種移植模式評估體內抗腫瘤活性的圖。

【0028】[圖11]是說明用本揭露的重組融合蛋白和對照處理的荷瘤小鼠的體重變化的圖。

【0029】[圖12]是說明重組融合蛋白在石蟹獼猴(獼猴)中的藥物動力學概況的圖。

【實施方式】

【0030】本發明利用重組融合蛋白，其包含與神經調節蛋白-1蛋白同功型的活性片段融合的單株抗體之間的融合，橫跨各種心血管和中樞神經系統(CNS)適應症。

[定義]

【0031】除非另外定義，否則本文使用的技術和科學術語具有與本發明所屬領域的普通技術人員通常理解的含義相同的含義。

【0032】出於解釋本說明書的目的，將應用以下定義，並且在適當時，以單數使用的術語也將包括複數，反之亦然。如果下面列出的任何定義與通過引用併入本文的任何文件衝突，則以下列出的定義為準。

【0033】「神經調節蛋白或神經調節蛋白類似物」是能夠啟動ErbB2/ErbB4或ErbB2/ErbB3異二聚體蛋白酪胺酸激酶的分子，例如所有神經調節蛋白同功型，單獨的神經調節蛋白EGF結構域，神經調節蛋白突變體和任何也啟動以上受體的神經調節蛋白樣基因產物。用於本發明的較佳「神經調節蛋白」是含有EGF樣結構域和受體結合結構域的人神經調節蛋白1β2同功型的多肽片段。在一個實施方式中，神經調節蛋白片段是活性片段。神經調節蛋白-1(NRG-1)及其同功型在本領域中也稱為神經調節蛋白1(NRG1)、神經膠質生長因子(GGF)、調蛋白(heregulin, HGL)、HRG、新分化因子(NDF)、ARIA、GGF2、HRG1、

HRGA、SMDF、MST131、MSTP131和NRG1內含子轉錄物2(NRG1-IT2)。

【0034】術語「ErbB3」，「ErbB3(HER3)」，「HER3」是指相同的蛋白質(或當參考其時相同的基因)並且在本文中可互換使用。在一些實施方式中，重組融合體包含對ErbB3特異的單株抗體部分。ErbB3(erb-b2受體酪胺酸激酶3)在本領域中也稱為FERLK、LCCS2、ErbB-3、c-erbB3、erbB3-S、MDA-BF-1、c-erbB-3、p180-ErbB3、p45-sErbB3和p85-sErbB3。

【0035】在一個實施方式中，術語「ErbB4」，「ErbB4(HER4)」，「HER4」是指相同的蛋白質(或當參考其時相同的基因)並且在本文中可互換使用。ErbB4(erb-b2受體酪胺酸激酶4)在本領域中也稱為ALS19和p180erbB4。

【0036】在一個實施方式中，術語「ErbB2」，「ErbB2(HER2)」，「HER2」是指相同的蛋白質(或當參考其時相同的基因)並且在本文中可互換使用。ErbB2(erb-b2受體酪胺酸激酶2)在本領域中也稱為NEU、NGL、TKR1、CD340、HER-2、MLN19和HER-2/neu。

【0037】如本文所用，術語「活性」是指具有生物活性或生物學功能的片段。在一些實施方式中，活性等於或接近野生型蛋白質的活性。

【0038】本文使用的術語「受試者」包括但不限於哺乳動物、包括例如人、非人靈長類動物(例如猴)、小鼠、

豬、牛、山羊、兔、大鼠、天竺鼠、倉鼠、馬、猴、綿羊或其他非人哺乳動物，非哺乳動物，包括例如非哺乳動物脊椎動物，例如鳥(例如雞或鴨)或魚；和非哺乳動物的無脊椎動物。在一些實施方式中，本發明的方法和組合物用於治療(預防性和/或治療性)非人類動物。術語「受試者」還可以指患者，即等待或接受醫療護理的個體。

【0039】術語「醫藥組成物」在本文中是指適用於受試者(包括動物或人)的藥物用途的組合物。醫藥組成物通常包含有效量的活性劑(例如，本發明的重組融合蛋白)和醫藥上可接受的載體、稀釋劑或賦形劑(例如緩衝劑，佐劑等)。

【0040】術語「有效量」是指足以產生所需結果的劑量或量。期望的結果可以包括劑量或量的接受者的客觀或主觀改善(例如，長期存活、腫瘤的數量和/或大小的減少、疾病狀態的有效預防等)。

【0041】「預防性治療」是對不顯示疾病，病理學或醫學病症的徵象或症狀的受試者施用的治療，或僅顯示疾病，病理學或病症的早期徵象或症狀，以便施用治療。用於減少、預防或降低發展疾病，病理學或醫學病症的風險。預防性治療起到預防疾病或病症的作用。「預防活性」是藥劑的活性，例如本發明的重組融合蛋白或其組合物，當施用於不顯示病理，疾病或病症的跡象或症狀的受試者時(或僅顯示病理，疾病或病症的早期跡象或症狀)減少、預防或降低受試者發展病理，疾病或病症的風險。

「預防上有用的」藥劑或化合物(例如，本發明的重組融合蛋白)是指可用於減少、預防、治療或減少病理、疾病或病症發展的藥劑或化合物。

【0042】「治療性治療」是對顯示病理，疾病或病症的症狀或徵象的受試者施用的治療，其中對受試者施用治療以減少或消除病理學，疾病或病症的跡象或症狀。「治療活性」是藥劑，例如本發明的重組融合蛋白或其組合物的活性，當投予患有這些徵象的受試者時，其消除或減少病理，疾病或病症的跡象或症狀。「治療上有用的」藥劑或化合物(例如，本發明的重組融合蛋白)表明藥劑或化合物可用於減少，治療或消除病理，疾病或病症的這些跡象或症狀。

【0043】除非另有說明，本文所用的術語「治療癌症」是指逆轉、減輕、抑制或部分或完全阻止腫瘤，腫瘤轉移或其他致癌或腫瘤細胞生長的進展或預防。除非另有說明，本文所用的術語「治療」是指治療的行為。

【0044】除非另有說明，否則本文所用的術語「治療心血管疾病」是指部分或完全地預防、抑制、延遲、逆轉或減輕受試者中心血管疾病或病症的發作，或者受試者中預先存在的心血管疾病或病症或其症狀。可以通過本揭露的方法治療的心血管疾病的非限制性實例包括慢性心臟衰竭/充血性心臟衰竭(CHF)、急性心臟衰竭/心肌梗塞(MI)、左心室收縮功能障礙、與MI相關的再灌注損傷、化學療法引起的心臟毒性(成人或兒童)、放射誘導的心臟毒性、小

兒先天性心臟病的手術干預附屬病。心血管疾病症狀的非限制性實例包括呼吸短促、咳嗽、體重增加快、腿部、腳踝和腹部腫脹、頭暈、疲勞、虛弱、頭暈、胸痛、昏厥(暈厥)、心搏過速(tachychardia)和心搏徐緩(bradychardia)。對於本領域普通技術人員來說，確定心血管疾病進展和治療有效性的方法是顯而易見的。例如，各種心血管疾病的進展可以通過射出率、心電圖(ECG)、動態心電圖監測、心臟超音波圖、壓力測試、心臟導管插入術、心臟電腦斷層掃描(CT)掃描和心臟磁共振成像(MRI)來確定。

【0045】除非另有說明，否則本文所用的術語「治療中樞神經系統(CNS)相關疾病」是指部分或完全預防、抑制、遏制、延遲、逆轉或緩解受試者的CNS相關疾病或病症發作的方法。術語「治療CNS相關疾病」還可以意指逆轉，減緩或以其他方式緩解預先存在的CNS相關疾病或病症或其症狀。可以用本揭露的方法治療的CNS相關疾病或病症的示例性但非限制性實例包括肌萎縮側索硬化症(ALS)、帕金森氏病、阿茲海默症、貝爾氏麻痺、癲癇和癲癇發作、格巴二氏症候群、中風、創傷性腦損傷、多發性硬化或聯合用藥。治療CNS相關疾病可以改善或預防諸如震顫、運動遲緩、僵硬肌肉、失去平衡、姿勢受損、言語改變、運動控制喪失、癱瘓、吞咽困難、肌肉痙攣、癲癇發作、記憶喪失和混亂等症狀。

【0046】在兩個或更多個核酸或多肽序列的上下文中，術語「相同」或「同一性百分比」是指兩個或更多個

相同或具有特定百分比的核苷酸或胺基酸殘基的序列或子序列。同樣，在比較和對齊以獲得最大對應關係時。為了確定百分比同一性，對齊序列以進行最佳比較目的(例如，可以在第一胺基酸或核酸序列的序列中引入空位以與第二胺基酸或核酸序列最佳比對)。然後比較相應胺基酸位置或核苷酸位置的胺基酸殘基或核苷酸。當第一序列中的位置被與第二序列中的相應位置相同的胺基酸殘基或核苷酸佔據時，則該分子在該位置是相同的。兩個序列之間的同一性百分比是序列共有的相同位置數的函數(即，%同一性=相同位置的數量/位置總數(例如，重疊位置)×100)。在一些實施方式中，兩個序列長度相同。

【0047】在兩個核酸或多肽的上下文中，術語「基本上相同」是指兩個或更多個序列或子序列具有至少90%，至少91%，至少92%，至少93%，至少94%，至少95%，至少96%，至少97%，至少98%同一性或至少99%同一性(例如，使用下文方法之一測定)。

【0048】如本文所用，術語「結合」，「特異性結合」或「特異於」是指可測量的和可再現的相互作用，例如靶標和抗體之間的結合，其決定靶標在存在下的存在。包括生物分子在內的異質分子群。例如，特異性結合靶標(可以是表位)的抗體是以比其結合其他靶標更大的親和力，親合力，更容易和/或更長的持續時間結合該靶標的抗體。在一個實施方式中，抗體與不相關靶標的結合程度小於抗體與靶標結合的約10%，例如通過放射免疫測定法

(RIA)測量。在某些實施方式中，特異性結合靶的抗體具有＜1μM，＜100nM，＜10nM，＜1nM或＜0.1nM的解離常數(Kd)。

【0049】在某些實施方式中，抗體特異性結合蛋白質上的表位，表位在來自不同物種的蛋白質中是保守的。在另一個實施方式中，特異性結合可以包括但不需要排他性結合。

【0050】如本說明書中所使用的，單數形式「一(a)」、「一(an)」和「該(the)」包括複數參考物，除非上下文另有明確說明。因此，例如，提及「神經調節蛋白」或「神經調節蛋白肽」包括這些神經調節蛋白，神經調節蛋白同功型和/或神經調節蛋白樣多肽的混合物。提及「調配物」或「方法」包括本文類型的一種或多種調配物、方法和/或步驟和/或對於本領域技術人員在閱讀本揭露後將變得顯而易見。

【0051】術語「多肽」是指胺基酸的聚合物及其等同物，並不是指特定長度的產物；因此，「肽」和「蛋白質」包括在多肽的定義內。多肽定義中還包括如本文所定義的「抗體」。「多肽區」是指多肽的區段，該區段可以包含例如一個或多個結構域或模體(例如，抗體的多肽區可以包含例如一個或多個互補決定區(CDR))。術語「片段」是指多肽的一部分，較佳地具有多肽的至少20個連續或至少50個連續胺基酸。

【0052】除非上下文另有說明，否則「衍生物」是相

對於第二多肽(也稱為「變體」)具有一個或多個非保守或保守胺基酸取代的多肽或其片段；或通過共價連接第二分子(例如通過連接異源多肽)或通過糖化、乙醯化、磷酸化等修飾的多肽或其片段。「衍生物」定義中還包括，例如，含有一種或多種胺基酸類似物的多肽(例如，非天然胺基酸等)、具有未取代鍵的多肽、以及本領域已知的其他修飾，自然和非自然發生。

【0053】「單離的」多肽是已經從其天然環境的組分中鑒定和分離和/或回收的多肽。其天然環境的污染組分是會干擾多肽的診斷或治療用途的物質，並且可包括酶，激素和其他蛋白質或非蛋白質溶質。單離的多肽包括單離的抗體或其片段或衍生物。

【0054】本文所用的術語「約」是指在定量態樣中加或減5%，或在另一個實施方式中加或減10%，或在另一個實施方式中加或減15%，或在另一個實施方式中加或減20%。

【0055】除非另外定義，否則本文使用的所有技術和科學術語具有與本發明所屬領域的普通技術人員通常理解的含義相同的含義。儘管與本文描述的那些類似或等同的任何方法和材料可用于本發明的實踐或測試，但現在描述較佳的方法和材料。本文提及的所有出版物均以引用的方式併入本文中，以用於揭露和描述與所引用的參考文獻有關的材料。

[重組融合蛋白-抗體]

【0056】本發明利用重組融合蛋白，其包含與神經調節蛋白-1蛋白同功型片段融合的單株抗體之間的融合物，用於各種心血管和神經系統適應症。在典型的實施方式中，抗體對ERBB3(HER3)具有特異性。

【0057】如本文所用，「抗體」是指包含一種或多種基本上或部分由免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因片段編碼的多肽的蛋白質。公認的免疫球蛋白基因包括κ、λ、α、γ、δ、ε和μ恒定區基因、以及無數免疫球蛋白可變區基因。輕鏈分類為κ或λ。重鏈分為γ、μ、α、δ或ε，其分別定義免疫球蛋白類別，IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。典型的免疫球蛋白(例如抗體)結構單元包含四聚體。每個四聚體由兩對相同的多肽鏈組成，每對具有一個「輕」(約25kD)和一個「重」鏈(約50-70kD)。每條鏈的N-端限定了約100-110或更多胺基酸的可變區，主要負責抗原識別。術語可變輕鏈(VL)和可變重鏈(VH)分別指這些輕鏈和重鏈。

【0058】抗體以完整的免疫球蛋白或通過用各種肽酶消化產生的許多充分表徵的片段存在。因此，例如，胃蛋白酶消化鉸鏈區中二硫鍵以下的抗體以產生$F(ab')_2$，Fab的二聚體，其本身是通過二硫鍵與VH-CH1連接的輕鏈。可以在溫和條件下還原$F(ab')_2$以破壞鉸鏈區中的二硫鍵，從而將$F(ab')_2$二聚體轉化為Fab'單體。Fab'單體基本上是具有部分鉸鏈區的Fab(參見Fundamental Immunology，

W.E.Paul，ed., Raven Press，New York(1999)，其他抗體片段的更詳細描述)。雖然根據完整抗體的消化定義了各種抗體片段，但是技術人員將理解，可以化學地或通過利用重組DNA方法從頭合成這樣的Fab'片段等。因此，如本文所用的術語抗體還包括通過修飾完整抗體產生的抗體片段或使用重組DNA方法從頭合成的抗體片段。抗體包括單鏈抗體，包括單鏈Fv(sFv或scFv)抗體，其中可變重鏈和可變輕鏈連接在一起(直接或通過肽連接子)以形成連續多肽。抗體包括單結構域抗體，其包含由能夠選擇性結合抗原結構域的單個單體可變抗體結構域組成的抗體片段。示例性單結構域抗體包括VHH片段，其最初從駱駝科動物中分離。

【0059】融合蛋白的抗體結構域任選地包含全部或部分免疫球蛋白分子，並任選地包含免疫球蛋白可變區的全部或部分(即，疾病相關抗原的特異性區域)，並且任選地包含由V基因和/或D基因和/或J基因編碼的區域。

【0060】如上所述(參見上文定義)，本文使用的抗體任選地包含$F(ab)_2$，$F(ab')_2$，Fab，Fab'，scFv，單結構域抗體等，這取決於實施方式的具體要求。一些實施方式利用包含IgG結構域的融合蛋然而，其他實施方式包括替代的免疫球蛋白，例如IgM，IgA，IgD和IgE。此外，各種免疫球蛋白的所有可能的同功型也包括在當前實施方式中。因此，IgG1，IgG2，IgG3等是本發明中使用的抗體-免疫刺激性融合蛋白的抗體結構域中的所有可能分子。除

了選擇免疫球蛋白和同功型的選擇之外，本發明的不同實施方式包括各種鉸鏈區(或其功能等同物)。這種鉸鏈區在抗體-免疫刺激性融合蛋白的不同結構域之間提供靈活性。參見，例如，Penichet等人，2001，「用於治療癌症的抗體-細胞因子融合蛋白」J Immunol Methods 248：91-101。

【0061】在一些實施方式中，本發明的重組融合蛋白包含的mAb對於ErbB3(HER3)是單特異性的。

【0062】人HER3(ErbB-3，ERBB3，c-erbB-3，c-erbB3，受體酪胺酸蛋白激酶erbB-3)編碼表皮生長因子受體(EGFR)受體酪胺酸激酶家族的成員，其也包括HER1(也稱為EGFR)、HER2和HER4(Kraus，MH等，PNAS 86(1989)9193-9197；Plowman，GD等，PNAS 87(1990)4905-4909；Kraus，MH等，PNAS 90(1993)2900-2904)。與原型表皮生長因子受體一樣，跨膜受體HER3由細胞外配體結合結構域(ECD)，ECD內的二聚合結構域，跨膜結構域，細胞內蛋白酪胺酸激酶結構域(TKD)和C端磷酸化組成。域。這種膜結合的HER3蛋白在細胞外結構域內具有調蛋白(HRG)結合結構域，但不具有活性激酶結構域。因此它可以結合該配體但不通過蛋白質磷酸化將訊息傳遞到細胞中。然而，它確實與其他具有激酶活性的HER家族成員形成異二聚體。異二聚合導致受體介導的訊息傳導途徑的啟動和其細胞內結構域的轉磷酸化。HER家族成員之間的二聚體形成擴展了HER3的訊息傳導潛力，並且不僅

是訊息多樣化的手段，而且是訊息放大的手段。例如，HER2/HER3異二聚體通過HER家族成員中的PI3K和AKT途徑誘導最重要的促有絲分裂訊息之一(Sliwkowski MX等，J.Biol.Chem.269(1994)14661-14665；Alimandi M，et al，Oncogene.10(1995)1813-1821；Hellyer, N, J. Biol. Chem. 276 (2001) 42153-4261；Singer，E., J.Biol)。

【0063】在一個實施方式中，人ERBB3蛋白包含GenBank AAH02706.1中提供的並且在SEQ ID NO：1中列出的以下胺基酸序列：

【0064】MRANDALQVLGLLFSLARGSEVGNSQAVCPGTLNGLSVTGDAENQYQTLYKLYERCEVVMGNLEIVLTGHNADLSFLQWIREVTGYVLVAMNEFSTLPLPNLRVVRGTQVYDGKFAIFVMLNYNTNSSHALRQLRLTQLTEILSGGVYIEKNDKLCHMDTIDWRDIVRDRDAEIVVKDNGRSCPPCHEVCKGRCWGPGSEDCQTLTKTICAPQCNGHCFGPNPNQCCHDECAGGCSGPQDTDCFACRHFNDSGACVPRCPQPLVYNKLTFQLEPNPHTKYQYGGVCVASCPHNFVVDQTSCVRACPPDKMEVDKNGLKMCEPCGGLCPKAF(SEQ ID NO：1)。應理解，本發明方法和組成物的抗體靶向的ERBB3(HER3)序列可以是SEQ ID NO：1的異構體、同源物或變體。

【0065】在一個實施方式中，本文提供的重組融合蛋白的mAb是抗Her3 mAb，其通過ErbB3(HER3)抑制NRG-1訊息傳導。

【0066】在一個具體實施方式中，本發明的重組融合

蛋白包含的mAb包含抗HER3mAb。此類抗HER3抗體可包括但不限於以下：帕圖單抗(patritumab)、塞里班單抗(seribantumab)(完全人mAb)、LJM716、KTN3379、AV-203、REGN1400、GSK2849330或MM-141。此類抗體還可以選自以下任何形式，包括嵌合、雙特異性、非人、完全人或人源化形式、只要它們結合並抑制來自人ERBB3(HER3)的訊息傳導即可。在一些實施方式中，抗HER3抗體是人源的。

【0067】在一些實施方式中，術語「抗體」包括各種形式的抗體結構，包括但不限於完整抗體和抗體片段。根據本發明的抗體較佳是人抗體，人源化抗體，嵌合抗體或其他基因工程抗體，只要保留根據本發明的特徵性質即可。「抗體片段」包含全長抗體的一部分，較佳其可變結構域，或至少其抗原結合位點。抗體片段的實例包括雙抗體、單鏈抗體分子和由抗體片段形成的多特異性抗體。scFv抗體例如描述於Huston，J.S., Methods in Enzymol. 203(1991)46-88。另外，抗體片段包含具有V_H結構域特徵的單鏈多肽，即能夠與V_L結構域組裝在一起，或者能夠與相應抗原結合的V_L結構域能夠與V_H結構域一起組裝成功能性。抗原結合位元點，從而提供根據本發明的抗體的特性。如本文所用的術語「單株抗體」或「單株抗體組成物」是指單一胺基酸組成物的抗體分子的調配物。

【0068】在一些實施方式中，嵌合抗體可用于本文提供的組成物和方法中。在一個實施方式中，術語「嵌合抗

體」是指單株抗體，其包含來自小鼠的可變區，即結合區，和來自不同來源或物種的恒定區的至少一部分，通常通過重組DNA技術製備。包含小鼠可變區和人恒定區的嵌合抗體是特別較佳的。這種大鼠/人嵌合抗體是表現的免疫球蛋白基因的產物，其包含編碼大鼠免疫球蛋白可變區的DNA區段和編碼人免疫球蛋白恒定區的DNA區段。本發明包括的其他形式的「嵌合抗體」是其中類或亞類已經從原始抗體的類別或亞類修飾或改變的那些。這種「嵌合」抗體也稱為「類別轉換抗體」。產生嵌合抗體的方法係關於現有技術中熟知的常規重組DNA和基因轉染技術。參見，例如，Morrison，S.L等，Proc. Natl. Acad Sci. USA 81(1984)6851-6855；US 5,202,238和US 5,204,244。

【0069】在一個實施方式中，人源化抗體可用于本文提供的組成物和方法中。在一些實施方式中，術語「人源化抗體」或「人源化形式的抗體」是指其中框架或「互補決定區」(CDR)已經被修飾以包含與親本免疫球蛋白的CDR相比具有不同特異性的免疫球蛋白的CDR的抗體。在其他實施方式中，將VH和VL的CDR移植到人抗體的框架區中以製備「人源化抗體」。參見例如Riechmann，L., et al, Nature 332(1988)323-327；和Neuberger，M.S.等，Nature 314(1985)268-270。重鏈和輕鏈可變框架區可以衍生自相同或不同的人抗體序列。人抗體序列可以是天然存在的人抗體的序列。例如，列出了人重鏈和輕鏈可變框架區。在Lefranc，M.-P., Current Protocols in Immunology

(2000)-附錄IP A.1P.1-A.1P.37中，可通過IMGT，國際ImMunoGeneTics資訊系統®(http://imgt.cines.fr)或通過http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk。任選地，框架區可以通過進一步的突變來修飾。特別較佳的CDR對應于代表識別上述抗嵌合抗體的抗原的序列的CDR。如本文所用的術語「人源化抗體」還包含在恒定區中修飾以產生根據本發明的性質的此類抗體，尤其是關於補體成分1q(C1q)結合和/或Fc受體(FcR)結合，例如通過「類別轉換」即Fc部分的改變或突變(例如從IgG1到IgG4和/或IgG1/IgG4突變)。如本文所用，術語「人抗體」旨在包括具有衍生自人種系免疫球蛋白序列的可變區和恒定區的抗體。人抗體在現有技術中是眾所周知的(van Dijk，M.A.和van de Winkel，J.G., Curr.Opin.Chem.Biol.5(2001)368-374)。人抗體也可以在轉基因動物(例如小鼠)中產生，轉基因動物在免疫後能夠在不存在內源性免疫球蛋白產生的情況下產生完整的全集或選擇的人抗體。在這種種系突變小鼠中轉移人種系免疫球蛋白基因陣列將導致在抗原攻擊後產生人抗體(參見，例如，Jakobovits，A.等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993)2551-2555；Jakobovits, A.等，Nature 362(1993)255-258；Brueggemann，MD等，Year Immunol. 7(1993)33-40)。人抗體也可以在噬菌體展示文庫中產生(Hoogenboom，HR，和Winter，G., J. Mol. Biol.227(1992)381-388；Marks，JD，等，J. Mol. Biol.222(1991)581-597)。Cole，A.等和Boerner，P.等的技術也可用于製備人單株抗體(Cole，

A.等，Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Liss, AL, p.77(1985)；和Boerner，P.等，J. Immunol. 147 (1991) 86-95)。如已經提到的根據本發明的人源化抗體，如本文所用的術語「人抗體」還包括在恒定區中被修飾以產生根據本發明的性質的此類抗體。

【0070】在本發明的一個具體實施方式中，本文提供的重組融合蛋白包含的mAb在Fc結構域或Fc區中包含至少一個突變。

【0071】如本文所用，術語「重組人抗體」旨在包括通過重組方法製備，表現、產生或單離的所有人抗體，例如從宿主細胞分離的抗體，例如NS0或CHO細胞或來自動物(例如小鼠)，其是人免疫球蛋白基因的轉基因或使用轉染到宿主細胞中的重組表現載體表現的抗體。這種重組人抗體具有重排形式的可變區和恒定區。根據本發明的重組人抗體已經進行體內體細胞超突變。因此，重組抗體的VH和VL區的胺基酸序列是衍生自人種系VH和VL序列並且與其相關的序列，其在體內可能不天然存在於人抗體種系庫中。

【0072】在一些實施方式中，術語「與人HER3結合」，「其特異性結合人HER3」或「抗HER3抗體」是可互換的，並且是指以具有KD值的特異性結合人HER3抗原的抗體，在25℃下約為4.81×10^{-10}mol/L或更低。用標準結合測定法在25℃下測定結合親和力，例如表面等離子體共振技術(BIAcore®，GE-Healthcare Uppsala，Sweden)。因

此，如本文所用的「與人HER3結合的抗體」是指特異性結合人HER3抗原的抗體或其部分，其結合親和力在25℃下在KD 1.0×10^{-8}mol/L-1.0×10^{-13}mol/L的範圍內，較佳在25℃下KD值為4.81×10^{-10}mol/L或更低。

【0073】另一態樣中，本文揭露的重組融合蛋白包含的抗HER3抗體包含可變區重鏈(VH)和可變區輕鏈(VL)。在一個實施方式中，抗體分別包含SEQ ID NO：2和SEQ ID NO：3中的VH和VL序列；具有以下一種或多種性質：抑制腫瘤細胞中的HER3磷酸化，抑制腫瘤細胞中的AKT磷酸化，抑制通過ErbB3(HER3)的訊息傳導，以及抑制腫瘤細胞的增生。

【0074】在一個實施方式中，本文提供的抗HER3mAb包含SEQ ID NO：2中所示的VH胺基酸序列：

重鏈：

【0075】QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSFS GYYWSWIRQP PGKGLEWIGE INHSGSTNYN PSLKSRVTIS VETSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDKW TWYFDLWGRG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKTHTCPPCP APEFLGGPAV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK

CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHAHYTQKS LSLSPGK(SEQ ID NO：2)。

【0076】在一個實施方式中，本文提供的抗HER3mAb包含SEQ ID NO：3的VL胺基酸序列：

輕鏈：

【0077】DIEMTQSPDS LAVSLGERAT INCRSSQSVL YSSSNRNYLA WYQQNPGQPP KLLIYWASTR ESGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCQQYYST PRTFGQGTKV EIKRTVAAPS VFIFPPSDEQ LKSGTASVVC LLNNFYPREA KVQWKVDNAL QSGNSQESVT EQDSKDSTYS LSSTLTLSKA DYEKHKVYAC EVTHQGLSSP VTKSFNRGEC(SEQ ID NO：3)。

【0078】在一個實施方式中，本發明的抗HER3抗體在Fc區中包含至少一個突變。在另一個實施方式中，本發明的成熟抗HER3抗體(即缺乏訊息肽)包含胺基酸234、239、434或其組合中的至少一個突變，其中在其他實施方式中，胺基酸突變包含至少一種下列取代突變：L234F，S239A，N434A或其組合。在另一個實施方式中，胺基酸234和/或239的突變敲低了抗HER3抗體的效應子功能。在另一個實施方式中，胺基酸434的突變延長了受試者中抗體的半衰期。

【0079】在一些實施方式中，Fc區中的一個或多個突變降低了效應子功能。在一些實施方式中，降低的效應子功能包括抗HER3抗體對一種或多種Fc受體的親和力降低。FcR可以是FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa(158F)、FcγRIIIa(158V)和C1q。在一些實施方式中、降低的親和力包括解離常數增加約1個數量級或更大。在一些實施方式中，引入一個或多個Fc突變使包含抗HER3抗體的融合蛋白對FcγRI的KD從2.81×10^{-9}M增加至1.03×10^{-8}M。在一些實施方式中，引入一個或多個Fc突變使包含抗HER3抗體的融合蛋白對FcγRIIa的KD從3.95×10^{-7}M增加至1.35×10^{-6}M。在一些實施方式中，引入一個或多個Fc突變使包含抗HER3抗體的融合蛋白對FcγRIIb的KD從1.03×10^{-7}M增加至1.52×10^{-6}M。在一些實施方式中，引入一個或多個Fc突變使包含抗HER3抗體的融合蛋白對FcγRIIIa(158F)的KD從6.37×10^{-8}M增加至1.18×10^{-7}M。在一些實施方式中，引入一個或多個Fc突變使包含抗HER3抗體的融合蛋白對FcγRIIIa(158V)的KD從3.41×10^{-8}M增加至9.10×10^{-8}M。

【0080】在一些實施方式中，抗HER3抗體或包含其的重組融合蛋白以高於或等於1.03×10^{-8}M的平衡解離常數(KD)結合FcγRI。在一些實施方式中，抗HER3抗體或包含其的重組融合蛋白包含一個或多個Fc突變、並以高於或等於1.35×10^{-6}M的KD結合FcγRIIa。在一些實施方式中，抗HER3抗體或包含其的重組融合蛋白包含一個或多個Fc突

變、並以高於或等於1.5×10^{-6}M的KD結合FcγRIIb。在一些實施方式中，抗-HER3抗體或包含其的重組融合蛋白包含一個或多個Fc 突變、並以高於或等於1.18×10^{-7}M的KD結合FcγRIIIa(158F)。在一些實施方式中，抗-HER3抗體或包含其的重組融合蛋白包含一個或多個Fc 突變、並以高於或等於9.10×10^{-8}M的KD結合FcγRIIIa(158V)。

【0081】如本文所用的術語「抗體效應子功能」是指由Ig的Fc區貢獻的功能。這種功能可以受到例如Fc效應區與具有吞噬或溶解活性的免疫細胞上的Fc受體的結合或通過Fc效應區與補體系統的組分結合的影響。

【0082】在一個實施方式中，抗HER3抗體不誘導抗體依賴性細胞毒性(ADCC)。術語「抗體依賴性細胞毒性(ADCC)」是指在效應細胞存在下通過根據本發明的抗體溶解人靶細胞。

【0083】在本發明的一個實施方式中，根據本發明的抗體是糖化的。在一些實施方式中，糖化是N-糖化。在其他實施方式中，糖化是O-糖化。

【0084】在本文提供的和根據本發明的重組融合蛋白的背景下，重組融合蛋白包含的抗體可以通過重組方法產生。此類方法在現有技術中是眾所周知的，並且包括在原核和真核細胞中的蛋白質表現，隨後分離抗體多肽並通常純化至醫藥上可接受的純度。對於蛋白質表現，通過標準方法將編碼輕鏈和重鏈或其片段的核酸插入表現載體中。表現在適當的原核或真核宿主細胞中進行，例如CHO細

胞，NS0細胞，SP2/0細胞，HEK293細胞，COS細胞，酵母或大腸桿菌(*E. coli*)細胞，並從細胞(從上清液或在細胞溶解後)回收抗體。抗體的重組產生在現有技術中是眾所周知的，並且描述於例如Makrides，S.C., Protein Expr. Purif. 17(1999)183-202；Geisse，S., et al，Protein Expr. Purif. 8(1996)271-282；Kaufman，R.J., Mol. Biotechnol. 16(2000)151-161；Werner，R.G., Drug Res. 48(1998)870-880的綜述文章中。抗體可以存在于全細胞，細胞溶解物中，或以部分純化的或基本上純的形式存在。進行純化以通過標準技術消除其他細胞組分或其他污染物，例如其他細胞核酸或蛋白質，包括柱色譜和本領域熟知的其它細菌(參見Ausubel，F., et al. Current Protocols in Molecular Biology，Greene Publishing and Wiley Interscience，New York(1987))。NSO細胞中的表現描述於例如Barnes，L.M.等，Cytotechnology 32(2000)109-123；Barnes，L.M.等，Biotech. Bioeng. 73(2001)261-270。暫態表現描述於例如Durocher，Y.等，Nucl. Acids. Res. 30(2002)E9。可變結構域的克隆描述於Orlandi，R.等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA，86(1989)3833-3837；Carter，P., et al，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89(1992)4285-4289；Norderhaug，L., et al，J. Immunol. Methods 204(1997)77-87。較佳的暫態表現系統(HEK 293)描述於Schlaeger，E.-J.和Christensen，K., Cytotechnology 30(1999)71-83，以及Schlaeger，E.-J., J. Immunol. Methods 194(1996)191-199。通過常規的免疫

球蛋白純化方法，例如蛋白A-Sepharose，羥磷灰石層析，凝膠電泳，透析或親和層析，適當地將單株抗體與培養基分離。編碼單株抗體的DNA和RNA易於分離並使用常規方法測序。雜交瘤細胞可以作為這種DNA和RNA的來源。一旦分離，可將DNA插入表現載體中，然後將其轉染到宿主細胞中，例如HEK 293細胞，CHO細胞或不產生免疫球蛋白的骨髓瘤細胞，以在宿主細胞中獲得重組單株抗體的合成。

【0085】根據本發明的重鏈和輕鏈可變結構域與啟動子，轉譯起始，恒定區，3'非轉譯區，多腺苷酸化和轉錄終止的序列組合以形成表現載體構築體。重鏈和輕鏈表現構築體可以組合成單一載體，共轉染，連續轉染或分別轉染到宿主細胞中，然後融合宿主細胞以形成表現兩條鏈的單一宿主細胞。

【0086】不言而喻的是，抗體以治療有效量施用於受試者，治療有效量是研究員，獸醫，醫生或其他臨床醫生尋求的引起組織，系統，動物或人的生物或醫學反應的主題化合物或組合的量。

[重組融合蛋白-神經調節蛋白]

【0087】在一個實施方式中，本文提供的重組融合蛋白包含NRG-1蛋白的片段。NRG蛋白可以與心肌細胞表面的ErbB4受體結合，不斷啟動細胞內的PI3K/AKT訊息通路，改變心肌細胞的結構，從而改善心肌細胞的功能。

【0088】如本文所用，「神經調節蛋白」或「NRG」是指可結合並啟動ErbB3、ErbB4或其異二聚體或同型二聚體的蛋白質或肽，包括神經調節蛋白同功型，神經調節蛋白EGF樣結構域，包含神經調節蛋白EGF樣結構域的多肽，神經調節蛋白突變體或衍生物，以及可以啟動上述受體的任何種類的神經調節蛋白樣基因產物。神經調節蛋白還包括具有神經調節蛋白功能的NRG-1，NRG-2，NRG-3和NRG-4蛋白，肽，片段和化合物。在較佳的實施方式中，神經調節蛋白是可以結合並啟動ErbB2/ErbB4或ErbB2/ErbB3異二聚體的蛋白質或肽，例如，但不是為了限制的目的，本發明的肽包括NRG-1β2同功型的片段，即177-237胺基酸片段，其含有具有以下胺基酸序列的EGF樣結構域：SHLVKCAEKEKTFCVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQNYVMASFYKAEELYQ(SEQ ID NO：4)。本發明的NRG蛋白可以啟動上述受體、並調節其生物學功能，例如，刺激骨骼肌細胞中乙醯膽鹼受體的合成，促進心肌細胞的分化和存活以及DNA合成。本領域技術人員熟知，非關鍵區域中單個胺基酸的突變通常不會改變所得蛋白質或多肽的生物活性(參見，例如，Watson等，Molecular Biology)。The Gene，4th Edition，1987，The Bejacmin/Cummings Pub.co., p.224)。本發明的NRG蛋白質可以從天然來源分離，可以通過重組技術，人工合成或其他方法進行修飾。

【0089】如本文所用，「表皮生長因子樣結構域」或

「EGF樣結構域」是指由神經調節蛋白基因編碼的多肽片段，其結合並啟動ErbB3、ErbB4或其異二聚體或同型二聚體，並包括具有ErbB2的異二聚體，和結構類似於WO 00/64400，Holmes等，Science，256：1205-1210(1992)中描述的EGF受體結合區；美國專利第5,530,109號和第5,716,930號；Hijazi等，Int. J. Oncol., 13：1061-1067(1998)；Chang等，Nature，387：509-512(1997)；Carraway等，Nature，387：512-516(1997)；Higashiyama等，J.Biochem., 122：675-680(1997)；和WO 97/09425，其內容全部引入本文作為參考。在某些實施方式中，EGF樣結構域結合並啟動ErbB2/ErbB4或ErbB2/ErbB3異二聚體。在某些實施方式中，EGF樣結構域包含NRG-1的受體結合結構域的胺基酸序列。在一些實施方式中，EGF樣結構域是指NRG-1的胺基酸殘基177-226、177-237或177-240。在某些實施方式中，EGF樣結構域包含神經調節蛋白-2的受體結合結構域的胺基酸序列(NRG-2，在本領域中也稱為DON1，HRG2和NTAK)。在某些實施方式中，NRG-2的EGF樣結構域包含HARKCNETAKSYCVNGGVCYYIEGINQLSCKCPNGFFGQRCL(SEQ ID NO：15)的序列。在某些實施方式中，EGF樣結構域包含神經調節蛋白3的受體結合結構域的胺基酸序列(NRG-3，在本領域中也稱為HRG3和pro-NRG3)。在某些實施方式中，NRG-3的EGF樣結構域包含HFKPCRDKDLAYCLNDGECFVIETLTGSHKHCRCKEGYQGVRCD(SEQ ID NO：16)的序列。在某些實

施方式中，EGF樣結構域包含神經調節蛋白4的受體結合結構域的胺基酸序列(NRG-4，在本領域中也稱為HER4)。在某些實施方式中，NRG-4的EGF樣結構域包含HEEPCGPSHKSFCLNGGLCYVIPTIPSPFCRCVENYTGARCE(SEQ ID NO：17)的序列。在某些實施方式中，EGF樣結構域包含Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro(SEQ ID NO：18)的胺基酸序列，如美國專利號5,834,229中。

【0090】在一個實施方式中，本文揭露的重組融合蛋白中提供的NRG-1蛋白是NRG-1β2a同功型。

【0091】在一些實施方式中，活性NRG-1片段包含ERBB3/4結合結構域。在另一個相關的實施方式中，NRG-1結合ErbB4(HER4)，並通過ErbB4(HER4)誘導訊息傳導。在其他實施方式中，mAb通過ErbB3(HER3)抑制NRG-1訊息傳導。在一些實施方式中，NRG-1的活性蛋白片段包含NRG-1的活性結構域。

[重組融合蛋白-組成]

【0092】在一個實施方式中，在本文揭露的重組融合蛋白中，使用連接子將NRG-1與抗HER3抗體重鏈的C端融合。在另一個相關態樣中，NRG-1通過NRG-1的N-端上的第一(第1)胺基酸(在一個實施方式中，其是絲胺酸(S或Ser)胺基酸)連接到連接子。用於本發明的特定重組融合蛋白可任選地通過本領域已知的任何方法獲得或產生(包括

從商業來源購買)。例如，任選克隆編碼適當抗體框架的核酸序列並連接到合適的載體(例如，用於例如原核生物或真核生物的表現載體)中。另外，編碼NRG-1β2a同功型分子的核酸序列任選地以適當的方向和位置克隆到相同的載體中，使得來自載體的表現產生抗體-NRG-1β2a同功型融合蛋白。一些任選的實施方式還需要表現後修飾，例如抗體亞單元的組裝等。用於上述(和類似)操作的技術和技藝是本領域技術人員公知的。相關說明見於例如Sambrook等，Molecular Cloning-A Laboratory Manual(第2版)，Vols. 1-3，Cold Spring Harbor Laboratory，Cold Spring Harbor，NY，1989和Current Protocols in Molecular Biology，FM Ausubel et al., eds., Current Protocols，Greene Publishing Associates，Inc.和John Wiley & Sons，Inc.的合資企業(1999年補充)。在一些備選實施方式中，抗體結構域和NRG-1β2a同功型通過例如化學方法在表現後組裝。在一個實施方式中，本發明提供了一種組成物，例包含本發明的重組融合蛋白的醫藥組成物。

【0093】在一個實施方式中，重組融合蛋白促進心肌細胞增生、分化和存活。在另一個實施方式中，重組融合蛋白促進心臟組織的增生、分化和存活。在一個實施方式中，重組融合蛋白促進心肌細胞增生、分化和存活，而不促進癌症和/或腫瘤生長。在另一個實施方式中，重組融合蛋白促進心臟組織的增生、分化和存活，而不促進癌症或腫瘤生長。

【0094】在一個實施方式中，癌症是腎上腺皮質癌、AIDS相關癌症、AIDS相關淋巴瘤、肛門癌、肛門直腸癌、肛管癌、闌尾癌、兒童小腦星形細胞瘤、兒童腦星形細胞瘤、基底細胞癌、皮膚癌(非黑色素瘤)、膽管癌、肝外膽管癌、肝內膽管癌、膀胱癌、膀胱癌、骨關節癌、骨肉瘤和惡性纖維組織細胞瘤、腦癌、腦腫瘤、腦幹膠質瘤、小腦星形細胞瘤、腦星形細胞瘤/惡性神經膠質瘤、室管膜瘤、成神經管細胞瘤、幕上原始神經外胚層腫瘤、視覺通路和下丘腦神經膠質瘤、乳癌、支氣管腺瘤/類癌、類癌、胃腸道、神經系統癌、神經系統淋巴瘤、中樞神經系統癌、中樞神經系統淋巴瘤、宮頸癌、兒童癌症、慢性淋巴細胞白血病、慢性粒細胞白血病、慢性骨髓增生性疾病、結腸癌、結直腸癌、皮膚T細胞淋巴瘤、淋巴腫瘤、蕈樣真菌病、Seziary綜合徵、子宮內膜癌、食管癌、顱外生殖細胞腫瘤、性腺外生殖細胞腫瘤、肝外膽管癌、眼癌、眼內黑色素瘤、視網膜母細胞瘤、膽囊癌、胃癌(胃癌)、胃腸道類癌、胃腸道間質瘤(GIST)、生殖細胞腫瘤、卵巢生殖細胞瘤、妊娠滋養細胞腫瘤膠質瘤、頭頸癌、肝細胞癌(肝癌)、霍奇金淋巴瘤、下嘴癌、眼內黑色素瘤、眼癌、胰島細胞瘤(內分泌胰腺)、卡波西肉瘤、腎癌、腎癌、腎癌、喉癌、急性淋巴細胞白血病、急性髓性白血病、慢性淋巴細胞白血病、慢性粒細胞白血病、毛細胞白血病、唇癌和口腔癌、肝癌、肺癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、AIDS相關淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、原發

性中樞神經系統淋巴瘤、Waldenstroem巨球蛋白血症、成神經管細胞瘤、黑色素瘤、眼內(眼)黑色素瘤、默克爾細胞癌、間皮瘤惡性、間皮瘤、轉移性鱗癌、口腔癌症、舌癌、多發性內分泌腫瘤綜合徵、蕈樣真菌病、骨髓增生異常綜合徵、骨髓增生異常/骨髓增生性疾病、慢性粒細胞白血病、急性髓性白血病、多發性骨髓瘤、慢性骨髓增生性疾病、鼻咽癌、神經母細胞瘤、口腔癌、口腔癌、口咽癌、卵巢癌、卵巢上皮癌、卵巢低惡性潛能腫瘤、胰腺癌、胰島細胞胰腺癌、鼻竇和鼻腔癌、甲狀旁腺癌、陰莖癌、咽癌、嗜鉻細胞瘤、松質母細胞瘤和幕上原始神經外胚層腫瘤、垂體腫瘤、血漿腫瘤/多發性骨髓瘤、胸膜肺母細胞瘤、前列腺癌、直腸癌、腎盂和輸尿管、移行細胞癌、視網膜母細胞瘤、橫紋肌肉瘤、唾液腺癌、尤文氏肉瘤、卡波西肉瘤、軟組織肉瘤、上皮樣肉瘤、滑膜肉瘤、子宮癌、子宮肉瘤、皮膚癌(非黑色素瘤)、皮膚癌(黑色素瘤)、默克爾細胞皮膚癌、小腸癌、軟組織肉瘤、鱗狀細胞癌、胃癌(胃癌)、幕上原始神經外胚層腫瘤、睾丸癌、咽喉癌、胸腺瘤、胸腺瘤和胸腺癌、甲狀腺癌、腎盂和輸尿管移行細胞癌等泌尿器官、妊娠滋養細胞腫瘤、尿道癌、子宮內膜癌、子宮肉瘤、子宮體癌、陰道癌、外陰癌、或威爾姆氏腫瘤。

【0095】在另一個實施方式中，重組融合蛋白促進中樞神經系統(CNS)細胞的增生、分化和存活。在另一個實施方式中，重組融合蛋白促進中樞神經系統(CNS)細胞的

增生、分化和存活，而不促進癌症和/或腫瘤生長。在另一個實施方式中，重組融合蛋白具有降低的誘導抗體依賴性細胞毒性(ADCC)的能力。

【0096】在一些實施方式中，相對於重組NRG-1的訊息誘導潛力，重組融合蛋白相對於HER2/3訊息傳導而促進HER2/4訊息傳導。

【0097】在本發明的一個具體實施方式中，重組融合蛋白包含通過GGGGSGGGGS(G4S)連接子(SEQ ID NO：5)與SEQ ID NO：4的NRG-1β2a同功型融合或可操作地連接到抗體重鏈C端的抗HER3mAb。在一些實施方式中，可以使用連接子的一個或多個複製(copy)。在其他實施方式中，本文可使用2、3、4或5個複製(copy)的G4S連接子或本領域已知的適合於本文揭露的組成物的任何其他連接子。

【0098】術語「連接子」是本領域公認的並且是指分子(包括但不限於未修飾或修飾的核酸或胺基酸)或分子組(例如，2個或更多個，例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100個或更多)連接兩種化合物，例如兩種多肽。連接子可以由單個連接分子組成，或者可以包含連接分子和至少一個間隔分子，用於將連接分子和化合物分開特定距離。

【0099】當核酸序列與另一核酸序列處於功能關係時，它是「可操作地連接的」。例如，如果核酸前序列或

分泌前導序列表現為參與多肽分泌的前蛋白，則它與編碼多肽的核酸可操作地連接。如果啟動子或增強子影響序列的轉錄，則它與編碼序列可操作地連接；或者如果核糖體結合位點被定位以便於轉譯，則它與編碼序列可操作地連接。通常，「可操作地連接」是指連接的核酸序列是連續的，並且在分泌前導序列的情況下，是連續的並且在閱讀框中。然而，增強子任選地是連續的。例如，可以通過在方便的限制性位點連接來完成連接。如果不存在這樣的位點，可以使用合成的寡核苷酸銜接子，連接子或本領域已知的其他方法。在另一個實施方式中，「可操作地連接」還指不同胺基酸序列，肽或蛋白質的功能配對，如本文的抗體和NRG-1片段通過本文也描述的連接子序列配對。

【0100】在另一個實施方式中，本文提供的重組融合蛋白包含的抗HER3mAb重鏈由SEQ ID NO：6編碼：

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCCTTGTTGCTATA
ATAAAAGGTGTCCAGTGTCAGGTGCAGCTGCAGCAGTG
GGGAGCTGGACTGCTGAAGCCAAGCGAGACCCTGTCTCT
GACATGCGCCGTGTACGGAGGATCCTTCAGCGGATACTA
TTGGTCTTGGATCAGGCAGCCACCTGGCAAGGGACTGGA
GTGGATCGGCGAGATCAACCACTCTGGCTCCACCAACTA
CAATCCCTCTCTGAAGTCCCGGGTGACCATCTCCGTGGA
GACAAGCAAGAATCAGTTTTCCCTGAAGCTGTCCAGCGT
GACCGCCGCTGACACAGCCGTGTACTATTGCGCTAGGGA
CAAGTGGACCTGGTATTTCGATCTGTGGGGAAGGGGCAC

CCTGGTGACAGTGTCTTCCGCCTCTACAAAGGGCCCCTC

CGTGTTTCCTCTGGCTCCAAGCTCTAAGAGCACCTCTGG

AGGAACAGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGATTACTT

CCCTGAGCCAGTGACCGTGAGCTGGAACTCTGGCGCCCT

GACCTCCGGAGTGCATACATTTCCCGCTGTGCTGCAGTC

CAGCGGCCTGTATAGCCTGTCTTCCGTGGTGACCGTGCC

TAGCTCTTCCCTGGGCACCCAGACATACATCTGCAACGT

GAATCACAAGCCCTCCAATACAAAGGTGGACAAGAGAG

TGGAGCCTAAGAGCTGTGATAAGACCCATACATGCCCAC

CATGTCCAGCTCCTGAGCTGCTGGGAGGACCTTCCGTGT

TCCTGTTTCCTCCAAAGCCAAAGGACACCCTGATGATCT

CTCGCACCCCTGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGACGTGT

CCCACGAGGATCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTG

GATGGCGTGGAGGTGCATAATGCTAAGACCAAGCCTAG

GGAGGAGCAGTACAACAGCACCTATCGGGTGGTGTCTG

TGCTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAG

GAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAATAAGGCCCTGCCAGC

TCCCATCGAGAAGACCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAGC

CCAGAGAGCCTCAGGTGTATACACTGCCCCCTAGCCGCG

AGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGTCTG

GTGAAGGGCTTCTACCCATCTGACATCGCTGTGGAGTGG

GAGTCCAATGGCCAGCCCGAGAACAATTATAAGACCAC

ACCACCCGTGCTGGACTCCGATGGCAGCTTCTTTCTGTA

CTCCAAGCTGACCGTGGATAAGAGCAGGTGGCAGCAGG

GCAACGTGTTTTCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGC
ACAATCATTATACACAGAAATCTCTGTCCCTGAGCCCAG
GCAAGGGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGCAGCTCT
CATCTGGTGAAGTGTGCTGAGAAGGAGAAGACCTTCTGC
GTGAACGGCGGCGAGTGTTTTATGGTGAAGGACCTGTCT
AATCCATCCAGATACCTGTGCAAGTGTCCCAACGAGTTC
ACAGGCGATCGCTGCCAGAATTACGTGATGGCCTCTTTT
TATAAGGCTGAGGAGCTGTACCAGTAA (SEQ ID NO: 6)。

在一個實施方式中，SEQ ID NO：6中所示的序列不包含Fc突變。在一個實施方式中，SEQ ID NO：6也稱為「NPCF」。

【0101】在一個實施方式中，本文提供的重組融合蛋白包含抗HER3mAb的重鏈。在另一個實施方式中，抗HER3mAb重鏈由SEQ ID NO：7編碼：

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCCTTGTTGCTATA
ATAAAAGGTGTCCAGTGTCAGGTGCAGCTGCAGCAGTG
GGGAGCTGGACTGCTGAAGCCAAGCGAGACCCTGTCTCT
GACATGCGCCGTGTACGGAGGATCCTTCAGCGGATACTA
TTGGTCTTGGATCAGGCAGCCACCTGGCAAGGGACTGGA
GTGGATCGGCGAGATCAACCACTCTGGCTCCACCAACTA
CAATCCCTCTCTGAAGTCCCGGGTGACCATCTCCGTGGA
GACAAGCAAGAATCAGTTTTCCCTGAAGCTGTCCAGCGT
GACCGCCGCTGACACAGCCGTGTACTATTGCGCTAGGGA
CAAGTGGACCTGGTATTTCGATCTGTGGGGAAGGGGCAC

CCTGGTGACAGTGTCTTCCGCCTCTACAAAGGGCCCCTC

CGTGTTTCCTCTGGCTCCAAGCTCTAAGAGCACCTCTGG

AGGAACAGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGATTACTT

CCCTGAGCCAGTGACCGTGAGCTGGAACTCTGGCGCCCT

GACCTCTGGAGTGCATACATTTCCCGCTGTGCTGCAGTC

CAGCGGCCTGTATAGCCTGTCTTCCGTGGTGACCGTGCC

TAGCTCTTCCCTGGGCACCCAGACATACATCTGCAACGT

GAATCACAAGCCCTCCAATACAAAGGTGGACAAGAGAG

TGGAGCCTAAGAGCTGTGATAAGACCCATACATGCCCAC

CATGTCCAGCTCCTGAGTTCCTGGGAGGACCTGCCGTGT

TCCTGTTTCCTCCAAAGCCAAAGGACACCCTGATGATCT

CTCGCACCCCTGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGACGTGT

CCCACGAGGATCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTG

GATGGCGTGGAGGTGCATAATGCTAAGACCAAGCCTAG

GGAGGAGCAGTACAACAGCACCTATCGGGTGGTGTCTG

TGCTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAG

GAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAATAAGGCCCTGCCAGC

TCCCATCGAGAAGACCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAGC

CCAGAGAGCCTCAGGTGTATACACTGCCCCCTAGCCGCG

AGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACCTGTCTGG

TGAAGGGCTTCTACCCATCTGACATCGCTGTGGAGTGGG

AGTCCAATGGCCAGCCCGAGAACAATTATAAGACCACA

CCACCCGTGCTGGACTCCGATGGCAGCTTCTTTCTGTAC

TCCAAGCTGACCGTGGATAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG

CAACGTGTTTTCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCA
CGCTCATTATACACAGAAATCTCTGTCCCTGAGCCCAGG
CAAGGGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGCAGCTCTC
ATCTGGTGAAGTGTGCTGAGAAGGAGAAGACCTTCTGC
GTGAACGGCGGCGAGTGTTTTATGGTGAAGGACCTGTCT
AATCCATCCAGATACCTGTGCAAGTGTCCCAACGAGTTC
ACAGGCGATCGCTGCCAGAATTACGTGATGGCCTCTTTT
TATAAGGCTGAGGAGCTGTACCAGTAA (SEQ ID NO: 7)。

在一個實施方式中，SEQ ID NO：7也稱為「NPCFA」。在一個實施方式中，SEQ ID NO：7包含一個或多個突變，其編碼本文提供的抗HER3mAb的恒定(Fc)區域中的一個或多個突變。在一個實施方式中，本發明的成熟抗HER3抗體包含胺基酸234、239、434或其組合中的至少一個突變。在另一個實施方式中，胺基酸突變包含至少一種下列取代突變：L234F，S239A，N434A或其組合。

【0102】在一個實施方式中，本文提供的重組融合蛋白包含抗HER3mAb的輕鏈序列。在另一個實施方式中，輕鏈序列是由SEQ ID NO：8編碼：

ATGGTGTTGCAGACCCAGGTCTTCATTTCTCTGTTGCTCT
GGATCTCTGGTGCCTACGGGGACATCGAGATGACCCAGT
CTCCAGATTCCCTGGCCGTGAGCCTGGGAGAGAGGGCTA
CAATCAACTGCCGGTCCAGCCAGTCTGTGCTGTACTCTT
CCAGCAACAGGAATTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAATC
CCGGCCAGCCCCCTAAGCTGCTGATCTATTGGGCTAGCA

CCAGAGAGTCTGGAGTGCCTGACCGCTTCTCTGGATCCG
GAAGCGGCACAGACTTCACCCTGACAATCTCTTCCCTGC
AGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTATTGCCAGCAGTATT
ACTCTACCCCTAGGACATTCGGCCAGGGCACCAAGGTGG
AGATCAAGCGGACAGTGGCCGCTCCATCCGTGTTCATCT
TTCCACCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGAACCGCTA
GCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCAAGAGAGG
CCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGATAACGCTCTGCAGAGC
GGCAATTCTCAGGAGTCCGTGACCGAGCAGGACAGCAA
GGATTCTACATATTCCCTGAGCTCTACCCTGACACTGTC
CAAGGCCGATTACGAGAAGCACAAGGTGTATGCTTGCG
AGGTGACCCATCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACAAAG
AGCTTCAACCGCGGCGAGTGTTAA (SEQ ID NO: 8)。

在一個實施方式中，SEQ ID NO：8也稱為「PAL」。

【0103】在一個實施方式中，本文提供的重組融合蛋白包含的抗HER3抗體的重鏈包含以下胺基酸序列：

【0104】MEFGLSWVFLVAIIKGVQCQVQLQQWGAGL
LKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIN
HSGSTNYNPSLKSRVTISVETSKNQFSLKLSSVTAADTAVY
YCARDKWTWYFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE

EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGG
SGGGGSSHLVKCAEKEKTFCVNGGECFMVKDLSNPSRYLC
KCPNEFTGDRCQNYVMASFYKAEELYQ(SEQ ID NO：9)。

【0105】在一個實施方式中，本文提供的重組融合蛋白包含的抗HER3抗體的重鏈包含以下胺基酸序列：

MEFGLSWVFLVAIIKGVQCQVQLQQWGAGLLKPSETLSLT
CAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNP
SLKSRVTISVETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWT
WYFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD
KTHTCPPCPAPEFLGGPAVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHAHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSSHLV
KCAEKEKTFCVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDR
CQNYVMASFYKAEELYQ (SEQ ID NO: 10)。

【0106】在一個實施方式中，抗HER3mAb重鏈序列包含訊息肽序列。在另一個實施方式中，抗HER3mAb重

鏈訊息肽序列包含MEFGLSWVFLVAIIKGVQC(SEQ ID NO：11)的胺基酸序列。

【0107】在一個實施方式中，重組融合蛋白包含的抗HER3抗體的輕鏈包含以下胺基酸序列：

【0108】MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSNRNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO：12)。

【0109】在一個實施方式中，抗HER3mAb輕鏈序列包含訊息肽序列。在另一個實施方式中，抗HER3mAb輕鏈訊息肽序列包含MVLQTQVFISLLLWISGAYG(SEQ ID NO：13)的胺基酸序列。在一個實施方式中，本文揭露的成熟多肽例如抗體重鏈或輕鏈胺基酸序列缺乏訊息肽。

【0110】在一個實施方式中，重組融合蛋白包含以下胺基酸序列：

[重鏈]

【0111】QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRVTISVETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP

EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAP
E**F**LGGP**A**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
H**A**HYTQKSLSLSPGK***GGGGSGGGGS*****SHLVKCAEKEKTFC**
VNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQNYVMA
SFYKAEELYQ (SEQ ID NO：14，其中粗斜體表示連接基團，和粗體表示NRG-1片段)；和

[輕鏈]

DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSNRNY
LAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFT
LTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFGQGTKVEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 3)。

【0112】在一個實施方式中，成熟重組融合蛋白中的每個重鏈序列和輕鏈序列缺少訊息肽胺基酸序列。

【0113】在本發明的一個具體實施方式中，本文提供的抗HER3抗體的重鏈通過C端連接子序列與本文提供的NRG-1β2a同功型融合。在另一個實施方式中，抗體重鏈

的C端包含抗體的Fc結構域。

【0114】在一些實施方式中，提供了醫藥組成物，其包含與藥物載體一起配製的本文揭露的重組融合蛋白。

【0115】在一些實施方式中，本文的抗HER3抗體和NRG-1片段通過連接子重組或化學融合/可操作地連接以形成融合蛋白。「融合蛋白」，「融合多肽」，「重組融合蛋白」或「重組多肽」是指包含來自至少兩種不同多肽的多肽部分的雜合多肽。如本文所定義的「融合蛋白」是第一胺基酸序列(蛋白質)通過連接子與第二胺基酸序列的C-端連接的融合物，第一胺基酸序列包含例如本發明的NRG-1β2a同功型，第二胺基酸序列包含與ERBB3(HER3)特異性結合的抗體重鏈。

【0116】在一個實施方式中，融合蛋白被重組編碼和產生。在一些實施方式中，重組融合蛋白由編碼本發明抗體的核酸序列編碼，核酸序列通過編碼連接子的核酸序列與編碼本發明的NRG-1β2a同功型的核酸序列可操作地連接。

【0117】在一個實施方式中，重組融合蛋白胺基酸序列與SEQ ID NO：14和SEQ ID NO：3融合的同源。術語「同源性」可以指與重組融合蛋白序列的同一性(例如與SEQ ID NO：1至18中任一個的同一性)大於70%。在另一個實施方式中，「同源性」是指與SEQ ID NO：1至18中任一個的同一性大於72%。在另一個實施方式中，「同源性」是指與SEQ ID NO：1至18中任一個的同一性大於

75%。在另一個實施方式中，「同源性」是指與SEQ ID NO：1至18中任一個的同一性大於78%。在另一個實施方式中，「同源性」是指與SEQ ID NO：1至18中任一個的同一性大於80%。在另一個實施方式中，「同源性」是指與SEQ ID NO：1至18中任一個的同一性大於82%。在另一個實施方式中，「同源性」是指與SEQ ID NO：1至18中任一個的同一性大於83%。在另一個實施方式中，「同源性」是指與SEQ ID NO：1至18中任一個的同一性大於85%。在另一個實施方式中，「同源性」是指與SEQ ID NO：1至18中任一個的同一性大於87%。在另一個實施方式中，「同源性」是指與SEQ ID NO：1至18中任一個的同一性大於88%。在另一個實施方式中，「同源性」是指與SEQ ID NO：1至18中任一個的同一性大於90%。在另一個實施方式中，「同源性」是指與SEQ ID NO：1至18中任一個的同一性大於92%。在另一個實施方式中，「同源性」是指與SEQ ID NO：1至18中任一個的同一性大於93%。在另一個實施方式中，「同源性」是指與SEQ ID NO：1至18中任一個的同一性大於95%。在另一個實施方式中，「同源性」是指與SEQ ID NO：1至18中任一個的同一性大於96%。在另一個實施方式中，「同源性」是指與SEQ ID NO：1至18中任一個的同一性大於97%。在另一個實施方式中，「同源性」是指與SEQ ID NO：1至18中任一個的同一性大於98%。在另一個實施方式中，「同源性」是指與SEQ ID NO：1至18中任一個的同一性大於99%。在另一個實施方

式中，「同源性」是指與SEQ ID NO：1至18中的任一個具有100%的同一性。

【0118】可以使用數學演算法來確定兩個序列之間的百分比同一性。用於比較兩個序列的數學演算法的非限制性實例是Karlin和Altschul的演算法，1990，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87：2264-2268，如在Karlin和Altschul，1993，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90：5873-5877中修改。這種演算法被併入Altschul等，1990，J. Mol. Biol. 215：403-410的NBLAST和XBLAST程式中。可以用NBLAST程式進行BLAST核苷酸搜索，得分= 100，字長= 12，以獲得與編碼目的蛋白質的核酸同源的核苷酸序列。可以用XBLAST程式進行BLAST蛋白質搜索，得分= 50，字長= 3，以獲得與目的蛋白質同源的胺基酸序列。為了獲得用於比較目的的空位比對，可以如Altschul等，1997，Nucleic Acids Res. 25：3389-3402中使用空位BLAST。或者，PSI-Blast可用於執行反覆運算搜索，其檢測分子之間的遠距離關係(id.)。當使用BLAST，Gapped BLAST和PSI-BLAST程式時，可以使用各個程式(例如，XBLAST和NBLAST)的默認參數。用於比較序列的數學演算法的另一個非限制性實例是Myers和Miller，CABIOS(1989)的演算法。這種演算法被合併到ALIGN程式(版本2.0)中，該程式是GCG序列比對套裝軟體的一部分。當利用ALIGN程式比較胺基酸序列時，可以使用PAM120加權殘基表，空位長度罰分為12，空位罰分為4。用於序列分析的其他演算法

是本領域已知的，包括如Torellis和Robotti，1994，Comput. Appl. Biosci.10：3-5中的ADVANCE和ADAM和在Pearson和Lipman，1988，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85：2444-8中的FASTA。在FASTA中，ktup是一個控制選項，用於設置搜索的靈敏度和速度。如果ktup = 2，則通過觀察對齊的殘基對找到被比較的兩個序列中的相似區域；如果ktup = 1，則檢查單個比對的胺基酸。對於蛋白質序列，ktup可以設置為2或1，對於DNA序列，可以設置為1至6。如果沒有指定ktup，預設值對於蛋白質是2和對於DNA是6。或者，可以使用CLUSTAL W演算法進行蛋白質序列比對，如Higgins等，1996，Methods Enzymol. 266：383-402。

【0119】在一些實施方式中，使用PCR技術使用本領域技術人員已知的程式和方法製備本發明的多核苷酸。在一些實施方式中，該方法包括連接兩種不同的DNA序列(參見，例如，「Current Protocols in Molecular Biology」，eds.Ausubel et al., John Wiley & Sons，1992)。

【0120】在一個實施方式中，將本發明的多核苷酸插入表現載體(即核酸構築體)中以使重組多肽能夠表現。在一個實施方式中，本發明的表現載體包括使該載體適於在原核生物中複製和整合的其他序列。在一個實施方式中，本發明的表現載體包括使該載體適於在真核生物中複製和整合的額外序列。在一個實施方式中，本發明的表現載體包括穿梭載體，其使得該載體適於在原核生物和真核生物

中複製和整合。在一些實施方式中，克隆載體包含轉錄和轉譯起始序列(例如，啟動子，增強子)和轉錄和轉譯終止子(例如，多腺苷酸化訊息)。

【0121】在一個實施方式中，多種原核或真核細胞可用作宿主表現系統以表現本發明的多肽。在一些實施方式中，這些包括但不限於微生物，例如用重組噬菌體DNA轉形的細菌，含有多肽編碼序列的質體DNA或黏接質體DNA表現載體；用含有多肽編碼序列的重組酵母表現載體轉形酵母。

【0122】在一些實施方式中，使用非細菌表現系統(例如，哺乳動物表現系統，例如CHO細胞)來表現本發明的多肽。在一個實施方式中，用於在哺乳動物細胞中表現本發明多核苷酸的表現載體是包含CMV啟動子和新黴素抗性基因的pCI-DHFR載體。

【0123】在一些實施方式中，在本發明的細菌系統中，可以有利地選擇許多表現載體，這取決於表現的多肽的用途。在一個實施方式中，需要大量多肽。在一個實施方式中，指導高水準蛋白質產物表現的載體，可能作為與疏水訊息序列的融合，其將表現的產物導入細菌的周質或蛋白質產物易於純化的培養基中，期望。在一個實施方式中，某些融合蛋白用特異性切割位點改造以幫助回收多肽。在一個實施方式中，適合於此類操作的載體包括但不限於pET系列的大腸桿菌表現載體[Studier等，Methods in Enzymol. 185：60-89(1990)]。

【0124】在一個實施方式中，使用酵母表現系統。在一個實施方式中，許多含有組成型或誘導型啟動子的載體可用於酵母中，如美國專利號5,932,447中所揭露的。在另一個實施方式中，使用促進外源DNA序列整合到酵母染色體中的載體。

【0125】在一個實施方式中，本發明的表現載體可以進一步包括額外的多核苷酸序列，其允許例如來自單個mRNA的幾種蛋白質的轉譯，例如內部核糖體進入位點(IRES)和用於啟動子-嵌合多肽的基因組整合的序列。

【0126】在一些實施方式中，本發明的表現載體包括增加本發明的重組融合蛋白的表現的元件。這些特徵包括但不限於啟動子和多腺苷酸化的選擇。在一些實施方式中，多腺苷酸化序列是牛生長激素(BGH)多腺苷酸化序列。在一些實施方式中，啟動子包含組成型活性啟動子。在一些實施方式中，啟動子包含巨細胞病毒啟動子(pCMV)。

【0127】在一些實施方式中，哺乳動物表現載體包括但不限於pcDNA3，pcDNA3.1(+/-)，pGL3，pZeoSV2 (+/-)，pSecTag2，pDisplay，pEF/myc/cyto，pCMV/myc/ cyto，pCR3.1，pSinRep5，DH26S，DHBB，pNMT1，pNMT41，pNMT81，可購自Invitrogen，pCI，其可購自Promega，pMbac，pPbac，pBK-RSV和pBK-CMV，其可購自Strategene，pTRES，其是可從Clontech獲得，以及他們的衍生產品。

【0128】在一些實施方式中，本發明使用含有來自真

核病毒如逆轉錄病毒的調節元件的表現載體。SV40載體包括pSVT7和pMT2。在一些實施方式中，衍生自牛乳頭瘤病毒的載體包括pBV-1MTHA，衍生自Epstein Barr病毒的載體包括pHEBO和p205。其他示例性載體包括pMSG，pAV009/A$^+$，pMTO10/A$^+$，pMAMneo-5，杆狀病毒pDSVE，以及允許在SV-40早期啟動子，SV-40後期啟動子，金屬硫蛋白啟動子，鼠乳腺腫瘤病毒啟動子，勞氏肉瘤病毒啟動子，多角體蛋白啟動子或其他顯示有效在真核細胞中表現的啟動子的指導下表現蛋白質的任何其他載體。

【0129】在一些實施方式中，重組病毒載體可用於體內表現本發明的多肽，因為它們提供諸如側向感染和靶向特異性的優點。在一個實施方式中，側向感染是例如逆轉錄病毒的生命週期中固有的，並且是單個感染細胞產生許多後代並且感染相鄰細胞的後代病毒粒子的過程。在一個實施方式中，結果是大面積迅速被感染，其中大部分最初未被原始病毒顆粒感染。在一個實施方式中，產生不能橫向擴散的病毒載體。在一個實施方式中，如果所需目的是僅將特定基因引入局部數目的靶細胞中，則該特徵可能是有用的。

【0130】在一個實施方式中，可以使用各種方法將編碼本發明的重組融合蛋白的表現載體導入細胞中。這些方法一般描述於Sambrook等，Molecular Cloning：A Laboratory Manual，Cold Springs Harbor Laboratory，New York(1989、1992)，Ausubel等，Current Protocols in

Molecular Biology，John Wiley and Sons，Baltimore，Md.(1989)，Chang等，Somatic Gene Therapy，CRC Press，Ann Arbor，Mich.(1995)，Vega et al., Gene Targeting，CRC Press，Ann Arbor Mich.(1995)，Vectors：A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses，Butterworths，Boston Mass.(1988)和Gilboa等，[Biotechniques 4(6)：504-512、1986] 並且包括，例如，穩定或暫態轉染，脂質轉染，電穿孔和用重組病毒載體感染。另外，參見美國專利號5,464,764和5,487,992用於陽性-陰性選擇方法的。

【0131】在一些實施方式中，通過病毒感染引入核酸提供了優於其他方法(例如脂質轉染和電穿孔)的若干優點，因為由於病毒的感染性質可以獲得更高的轉染效率。

【0132】在一個實施方式中，應當理解，本發明的多肽也可以從使用上文的任何合適的給藥方式(即，體內基因治療)投予個體的核酸構築體表現。在一個實施方式中，根據需要通過適當的基因遞送載體/方法(轉染、轉導、同源重組等)和表現系統將核酸構築體引入合適的細胞中，然後將修飾的細胞在培養物中擴增並返回個體(即離體基因治療)。

【0133】應當理解，除了含有插入的編碼序列(編碼多肽)的轉錄和轉譯所必需的元件之外，本發明的表現構築體還可以包括工程化以優化表現的多肽的穩定性，產生，純化，產量或活性的序列。

【0134】在一些實施方式中，在有效條件下培養轉形

細胞，其允許表現大量重組融合蛋白或多肽。在一些實施方式中，有效培養條件包括但不限於允許蛋白質產生的有效培養基，生物反應器，溫度，pH和氧條件。在一個實施方式中，有效培養基是指培養細胞以產生本發明的重組多肽的任何培養基。在一些實施方式中，培養基通常包括具有可同化的碳、氮和磷酸鹽源的水溶液，以及適當的鹽、礦物質、金屬和其他營養素，例如維生素。在一些實施方式中，本發明的細胞可以在常規發酵生物反應器、搖瓶、試管、微量滴定皿和培養皿中培養。在一些實施方式中，培養在適合重組細胞的溫度、pH和氧含量下進行。在一些實施方式中，培養條件在本領域普通技術人員的專業知識範圍內。

【0135】在一些實施方式中，取決於用於生產的載體和宿主系統，本發明的所得多肽保留在重組細胞內，分泌到發酵培養基中，分泌到兩個細胞膜之間的空間中，例如大腸桿菌(*E. coli*)中的周質空間，或保留在細胞或病毒膜的外表面上。

【0136】在一個實施方式中，在培養的預定時間後，實現重組多肽的回收。

【0137】在一個實施方式中，本文使用的短語「回收重組多肽」是指收集含有多肽的完整發酵培養基，並且不需要暗示額外的分離或純化步驟。

【0138】在一個實施方式中，使用多種標準蛋白質純化技術純化本發明的多肽，例如但不限於親和層析，離子

交換層析，過濾，電泳，疏水相互作用層析，凝膠過濾層析，反相色譜法，刀豆球蛋白A層析，色譜聚焦和差異溶解。

【0139】在一個實施方式中，為了促進恢復，可以改造表現的編碼序列以編碼本發明的多肽和融合的可切割部分。在一個實施方式中，可以設計融合蛋白，使得可以通過親和層析容易地分離多肽；例如，通過固定在對可切割部分特異的柱上。在一個實施方式中，在多肽和可切割部分之間工程化切割位元點，並且通過用在該位點特異性切割融合蛋白的適當酶或試劑處理，可以從色譜柱釋放多肽，參見Booth.等，Immunol. Lett. 19：65-70(1988)；和Gardella等人，J. Biol. Chem. 265：15854-15859(1990)]。

【0140】在一個實施方式中，以「基本上純的」形式回收本發明的多肽。

【0141】在一個實施方式中，短語「基本上純的」是指允許在本文的應用中有效使用蛋白質的純度。

【0142】在一個實施方式中，還可以使用體外表現系統合成本發明的多肽。在一個實施方式中，體外合成方法是本領域熟知的，並且該系統的組分是可商購的。

【0143】在一些實施方式中，合成和純化重組多肽；它們的治療功效可以在體內或體外測定。

【0144】在一個實施方式中，本文提供的包含本發明的重組融合蛋白的醫藥組成物進一步用藥物載體配製。如本文所用，「藥物載體」包括生理上相容的任何和所有溶

劑，分散介質，包衣，抗細菌和抗真菌劑，等滲和吸收延遲劑等。較佳地，載體適用於靜脈內，肌肉內，皮下，腸胃外，脊柱或表皮施用(例如通過注射或輸注)。

[治療方法]

【0145】在一個實施方式中，本發明提供治療有需要的受試者的疾病或病症的方法，該方法包括投予治療有效量的本文揭露的重組融合蛋白或包含重組融合蛋白的醫藥組成物。

【0146】在一個實施方式中，本發明提供了治療有需要的受試者的心血管疾病或病症的方法，該方法包括投予治療有效量的重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物。

【0147】在一個實施方式中，本發明提供預防、抑制、遏制或延遲受試者心血管疾病或病症發作的方法，該方法包括投予有效量的本文的重組融合蛋白或醫藥組成物。

【0148】在一些實施方式中、心血管疾病包括慢性心臟衰竭/充血性心臟衰竭(CHF)、急性心臟衰竭/心肌梗塞(MI)、左心室收縮功能障礙、與MI相關的再灌注損傷、化學療法誘導的心臟毒性(成人或小兒)、輻射誘發的心臟毒性、小兒先天性心臟病的手術干預附屬病。

【0149】在一些實施方式中，其中化學療法誘導的心臟毒性由接受蒽環黴素、烷化劑、抗微管劑和抗代謝物作為化學療法的受試者引起。

【0150】在一些實施方式中，心血管病症是受試者接受癌症治療的心臟毒性。在其他實施方式中，癌症療法是HER-2靶向療法。在其他實施方式中，HER-2靶向療法包括使用曲妥珠單抗、ado-曲妥珠單抗、恩他新(emtansine)、拉帕替尼、奈拉替尼和帕妥珠單抗，任何抗HER2抗體，任何抗HER2劑或其組合。

【0151】另一態樣中，本發明係關於誘導肌細胞肌節和細胞骨架結構或細胞-細胞黏附的重塑的方法，該方法包括用本文揭露的重組融合蛋白處理細胞。

【0152】在一個實施方式中，治療方法係關於治療由心肌細胞-細胞黏附的解離和/或哺乳動物中的肌節結構的混亂引起的心臟衰竭。

【0153】另一態樣中，本發明提供了一種用於預防、治療或延遲人體內保留射出率的心臟衰竭的方法，該方法包括投予包含本文揭露的重組融合蛋白的醫藥組成物。

【0154】如本文所用，術語「射出率」是指射出率(EF)，通常表示為每次收縮時左心室泵出多少血液的測量值。例如，50%的射出率意味著每次心跳時左心室血液總量的50%被推出。

【0155】本發明係關於治療患有心臟病和相關病症(例如心臟衰竭)或有發展風險的受試者。

【0156】術語「心臟衰竭」是指心臟功能的異常，其中心臟不以代謝組織的需要所需的速率泵送血液。心臟衰竭包括多種疾病狀態，例如充血性心臟衰竭，心肌梗塞，

快速性心律失常，家族性肥厚性心肌病，缺血性心臟病，特發性擴張型心肌病和心肌炎。心臟衰竭可由多種因素引起，包括缺血性，先天性，風濕性或特發性形式。慢性心臟肥大是一種顯著疾病狀態，是充血性心臟衰竭和心臟驟停的前兆。

【0157】在一個實施方式中，「治療」是指治療性治療和預防性或預防性措施，其中目的是預防或減緩(減輕)心臟肥大。需要治療的患者包括那些已患有該疾病的患者以及易患該疾病的患者或需要預防該疾病的患者。心臟肥大可以來自對視黃酸有反應的任何原因，包括先天性，病毒性，特發性，心肌營養性或肌營養性原因，或者由於局部缺血或缺血性損傷如心肌梗塞。通常，進行治療以停止或減緩肥大的進展，尤其是在發生心臟損傷(例如來自缺血)之後。較佳地，為了治療心肌梗塞，在心肌梗塞後立即投予本文提供的醫藥組成物，以預防或減輕肥大。

【0158】在一些實施方式中，與接受不是本揭露化合物，或其醫藥上可接受的鹽，溶劑化物，類似物或衍生物的藥物的單一療法的群體相比，用包含本文提供的重組融合蛋白的醫藥組成物治療受試者可導致受試者群體的平均存活時間增加。較佳地，在用本文提供的策略，治療方式，方法，組合和組成物治療後，平均存活時間增加超過30天；更較佳地，超過60天；更較佳地，超過90、120或365天；更較佳地，超過365天。可以通過任何可再現的手段來測量群體的平均存活時間的增加。例如，可以通過計

算開始用活性化合物治療後的平均存活長度來測量群體的平均存活時間的增加。還可以測量群體的平均存活時間的增加，例如，通過計算群體在用本文揭露的醫藥組成物完成第一輪治療後的平均存活長度。

【0159】在一些實施方式中，與僅接受載體的群體相比，用包含本文提供的重組融合蛋白的醫藥組成物治療受試者可導致受治療的受試者群體的死亡率降低。與未治療的群體相比，治療癌症可導致受治療的受試者群體的死亡率降低。與接受不是本揭露化合物的藥物或其醫藥上可接受的鹽，溶劑化物，類似物或衍生物的單一療法的群體相比，治療癌症可導致受治療群體的死亡率降低。較佳地，在用本文提供的策略，治療方式，方法，組合和組成物治療後，死亡率降低超過2%；更較佳地，超過5%；更較佳地，超過10%；最較佳地，超過25%。可以通過任何可再現的手段測量受治療的受試者群體的死亡率的降低。例如，通過計算開始用活性化合物治療後每單位時間疾病相關死亡的平均數量，可以測量群體死亡率的降低。例如，通過計算用本文揭露的醫藥組成物完成第一輪治療後每單位時間疾病相關死亡的平均數量，也可以測量群體死亡率的降低。

【0160】在一個實施方式中，本發明提供了治療有需要的受試者的中樞神經系統(CNS)相關疾病或病症的方法，該方法包括投予治療有效量的本文的重組融合蛋白或醫藥組成物。

【0161】在一個實施方式中，本發明提供預防、抑制、遏制或延遲受試者中CNS相關疾病或病症發作的方法，該方法包括施用有效量的本文的重組融合蛋白或醫藥組成物。

【0162】在一些實施方式中，CNS相關疾病或病症是肌萎縮側索硬化症(ALS)、帕金森氏病、阿茲海默症、貝爾氏麻痺、癲癇和癲癇發作、格巴二氏症候群、中風、創傷性腦損傷、多發性硬化或組合。

[投予，給藥]

【0163】本發明的組成物可以腸胃外投予有需要的受試者，或者可以通過本領域已知的各種方法投予。如本領域技術人員所理解的，給藥途徑和/或方式將根據所需結果而變化。為了通過某些給藥途徑投予本發明化合物，可能需要用化合物包被化合物或與化合物共同給藥以防止其失活。例如，化合物可以在合適的載體中施用於受試者，例如脂質體或稀釋劑。醫藥上可接受的稀釋劑包括鹽水和水性緩衝溶液。藥物載體包括無菌水溶液或分散液和用於臨時製備無菌可注射溶液或分散液的無菌粉末。這種介質和試劑用於藥物活性物質的用途是本領域已知的。

【0164】在典型的實施方式中，投予受試者的製劑包括無菌水溶液或非水溶液，懸浮液和乳液。一些實施方式包括非水溶劑，例如丙二醇、聚乙二醇、植物油(例如橄欖油)、有機酯(例如油酸乙酯)和本領域技術人員已知的其

他溶劑。在本發明的某些實施方式中任選使用生理學上可接受的載體(或賦形劑)。這樣的實例包括例如鹽水、PBS、林格氏溶液、乳酸林格氏溶液等。另外、任選地將防腐劑和添加劑加入組成物中以説明確保穩定性和無菌性。例如，抗生素和其他殺菌劑，抗氧化劑，螯合劑等都任選地存在于本文組成物的各種實施方式中。

【0165】本文所用的短語「腸胃外投予」和「腸胃外地投予」是指除腸內和局部投予以外的投予方式，通常通過注射給藥，包括但不限於靜脈內、肌肉內、動脈內、鞘內、囊內、眶內、心內、皮內、腹膜內、經氣管、皮下、皮下、關節內、包膜下、蛛網膜下、脊柱內、硬膜外和胸骨內注射和輸注。

【0166】無論選擇何種給藥途徑，可以以合適的水合形式使用的本發明化合物和/或本發明的醫藥組成物通過本領域技術人員已知的常規方法配製成醫藥上可接受的劑型。

【0167】將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物任選地在任何合適的無菌藥物載體中施用於需要治療(治療或預防)的受試者。這種藥物載體起到維持融合蛋白的溶解性和作用的作用。在一些實施方式中，可能需要與融合蛋白一起施用另外的組分。例如，在一些治療方案中，化學治療劑，抗生素，包含本發明的重組融合蛋白和一種或多種護理劑標準的其他調配物等都包括在本發明的組成物中。

【0168】如本文所用，術語「組合治療」，「聯合治療」和「聯合治療」可互換使用，並且通常是指以重組融合蛋白或包含與本文提供的相同的醫藥組成物和另外的治療劑為特徵的治療方式。通常，組合治療方式是特定治療方案的一部分，旨在通過治療劑組合的同時作用提供有益效果。組合的有益效果可包括但不限於由治療劑組合產生的藥代動力學或藥效學共同作用。組合施用這些治療劑通常在限定的時間段內進行(通常數分鐘、數小時、數天或數周，取決於所選的組合)。在一些實施方式中，組合治療包括順序施用兩種或更多種治療劑，其中每種治療劑在不同時間施用，以及基本上同時施用這些治療劑，或至少兩種治療劑。基本上同時給藥可以通過例如給受試者施用具有固定比例的每種治療劑的單一劑型或者用於治療劑的多個單獨劑型來實現。每種治療劑的順序或基本上同時給藥可以通過任何合適的途徑實現，包括但不限於口服途徑，靜脈內途徑，肌肉內途徑和通過黏膜組織的直接吸收。治療劑可以通過相同途徑或不同途徑給藥。治療劑可以根據相同或不同的給藥間隔給藥。例如，所選組合的第一種治療劑可以通過靜脈內注射給藥，而該組合的其他治療劑可以口服給藥。或者，例如，所有治療劑可以口服給藥，或者所有治療劑可以通過靜脈內注射給藥。

【0169】在一些實施方式中，組合療法還包括如上的治療劑的施用以及其他生物活性成分和非藥物療法(例如，手術或放射治療)的進一步組合。當組合療法還包括

非藥物治療時，非藥物治療可以在任何合適的時間進行，只要實現治療劑和非藥物治療的組合的共同作用的有益效果即可。例如，在適當的情況下，當非藥物治療暫時從治療劑的施用中去除時，可能持續數天或甚至數周，仍然實現有益效果。

【0170】在一些實施方式中，另外的治療劑是化學治療劑(也稱為抗腫瘤劑或抗增生劑)，例如烷化劑；抗生素；一種抗代謝物；解毒劑；干擾素；多克隆或單株抗體；EGFR抑制劑；HER2抑制劑；組蛋白去乙醯化酶抑制劑；激素；有絲分裂抑制劑；MTOR抑制劑；多激酶抑制劑；絲胺酸/蘇胺酸激酶抑制劑；酪胺酸激酶抑制劑；VEGF/VEGFR抑制劑；紫杉烷或紫杉烷衍生物，芳香酶抑制劑，蒽環黴素，微管靶向藥物，拓撲異構酶毒物，分子靶標或酶的抑制劑(如激酶或蛋白質甲基轉移酶)，胞苷類似物藥物或任何化學療法藥物，免疫檢查點抑制劑，鉑基抗腫瘤劑，CDK抑制劑，PARP抑制劑或本領域技術人員已知的任何抗腫瘤或抗增生劑。

【0171】適合根據本文提供的組合治療方式使用的示例性烷化劑包括但不限於環磷醯胺(Cytoxan；Neosar)；苯丁酸氮芥(Leukeran)；美法侖(Alkeran)；卡莫司汀(BiCNU)；白消安(Busulfex)；洛莫司汀(CeeNU)；達卡巴嗪(DTIC-Dome)；奧沙利鉑(Eloxatin)；卡莫司汀(Gliadel)；異環磷醯胺(Ifex)；氮芥(Mustargen)；白消安(Myleran)；卡鉑(Paraplatin)；順鉑(CDDP；Platinol)；替

莫唑胺(Temodar)；噻替派(Thioplex)；苯達莫司汀(Treanda)；或鏈脲佐菌素(Zanosar)。

【0172】示例性的合適的蒽環黴素包括但不限於多柔比星(阿黴素)；多柔比星脂質體(Doxil)；米托蒽醌(Novantrone)；博萊黴素(Blenoxane)；柔紅黴素(Cerubidine)；柔紅黴素脂質體(DaunoXome)；放線菌素(Cosmegen)；表柔比星(Ellence)；伊達比星(Idamycin)；普卡黴素(Mithracin)；絲裂黴素(Mutamycin)；噴司他丁(Nipent)；或戊柔比星(Valstar)。

【0173】示例性的抗代謝物包括但不限於氟尿嘧啶(Adrucil)；卡培他濱(希羅達)；羥基脲(Hydrea)；巯基嘌呤(Purinethol)；培美曲塞(Alimta)；氟達拉濱(Fludara)；尼拉賓(Arranon)；克拉屈濱(Cladribine Novaplus)；氯法拉濱(Clolar)；阿糖胞苷(Cytosar-U)；地西他濱(Dacogen)；阿糖胞苷脂質體(DepoCyt)；羥基脲(Droxia)；普拉曲沙(Folotyn)；氟尿苷(FUDR)；吉西他濱(Gemzar)；克拉屈濱(Leustatin)；氟達拉濱(Oforta)；甲氨蝶呤(MTX；Rheumatrex)；甲氨蝶呤(Trexall)；硫鳥嘌呤(Tabloid)；TS-1或阿糖胞苷(Tarabine PFS)。

【0174】示例性的解毒劑包括但不限於氨磷汀(Ethyol)或美司鈉(Mesnex)。

【0175】示例性的干擾素包括但不限於干擾素α-2b(內含子A)或干擾素α-2a(Roferon-A)。

【0176】示例性多克隆或單株抗體包括但不限於曲妥

珠單抗(赫賽汀)；奧法木單抗(Arzerra)；貝伐單抗(阿瓦斯汀)；利妥昔單抗(Rituxan)；西妥昔單抗(Erbitux)；帕尼單抗(Vectibix)；托西莫單抗/碘-131托西莫單抗(Bexxar)；阿侖珠單抗(Campath)；替伊莫單抗(Zevalin；In-111；Y-90 Zevalin)；吉妥珠單抗(Mylotarg)；依庫珠單抗(Soliris)或地舒單抗。

【0177】示例性EGFR抑制劑包括但不限於吉非替尼(易瑞沙)；拉帕替尼(Tykerb)；西妥昔單抗(Erbitux)；厄洛替尼(特羅凱)；帕尼單抗(Vectibix)；PKI-166；卡紐替尼(CI-1033)；馬妥珠單抗(EMD 72000)或EKB-569。

【0178】示例性HER2抑制劑包括但不限於曲妥珠單抗(赫賽汀)；拉帕替尼(Tykerb)或AC-480。

【0179】組蛋白脫乙醯酶抑制劑包括但不限於伏立諾他(Zolinza)。

【0180】示例性激素包括但不限於他莫昔芬(Soltamox；Nolvadex)；雷洛昔芬(Evista)；甲地孕酮(Megace)；亮丙瑞林(Lupron；Lupron Depot；Eligard；Viadur)；氟維司群(Faslodex)；來曲唑(Femara)；曲普瑞林(Trelstar LA；Trelstar Depot)；依西美坦(Aromasin)；戈舍瑞林(Zoladex)；比卡魯胺(Casodex)；阿那曲唑(Arimidex)；氟甲睾酮(Androxy；Halotestin)；甲羥孕酮(Provera；Depo-Provera)；雌莫司汀(Emcyt)；氟他胺(Eulexin)；托瑞米芬(Fareston)；地加瑞克(Firmagon)；尼魯米特(Nilandron)；阿巴瑞克(Plenaxis)；或睾內酯

(Teslac)。

【0181】示例性的有絲分裂抑制劑包括但不限於紫杉醇(紫杉醇；Onxol；Abraxane)；多西紫杉醇(Taxotere)；長春新堿(Oncovin；Vincasar PFS)；長春堿(Velban)；依託泊苷(Toposar；Etopophos；VePesid)；替尼泊苷(Vumon)；伊沙匹隆(Ixempra)；諾考達唑；埃博黴素；長春瑞濱(Navelbine)；喜樹堿(CPT)；伊立替康(Camptosar)；拓撲替康(Hycamtin)；安吖啶或片螺素D(LAM-D)。

【0182】示例性MTOR抑制劑包括但不限於依維莫司(Afinitor)或替西羅莫司(Torisel)；雷帕鳴，地磷莫司；或AP23573。

【0183】示例性的多激酶抑制劑包括但不限於索拉非尼(Nexavar)；舒尼替尼(Sutent)；BIBW 2992；E7080；Zd6474；PKC-412；莫特塞尼；或AP24534。

【0184】示例性的絲胺酸/蘇胺酸激酶抑制劑包括但不限於魯伯斯塔(ruboxistaurin)；依立盧/法舒地爾鹽酸鹽；黃酮類抗腫瘤藥；希利昔布(seliciclib)(CYC202；Roscovitine)；SNS-032(BMS-387032)；Pkc412；抑素；KAI-9803；SF1126；VX-680；Azd1152；Arry-142886(AZD-6244)；SCIO-469；GW681323；CC-401；CEP-1347或PD 332991。

【0185】示例性的酪胺酸激酶抑制劑包括但不限於厄洛替尼(特羅凱)；吉非替尼(易瑞沙)；伊馬替尼(格列衛)；索拉非尼(Nexavar)；舒尼替尼(Sutent)；曲妥珠單抗

(赫賽汀)；貝伐單抗(阿瓦斯汀)；利妥昔單抗(Rituxan)；拉帕替尼(Tykerb)；西妥昔單抗(Erbitux)；帕尼單抗(Vectibix)；依維莫司(Afinitor)；阿侖珠單抗(Campath)；吉妥珠單抗(Mylotarg)；坦羅莫司(Torisel)；帕唑帕尼(Votrient)；達沙替尼(Sprycel)；尼祿替尼(Tasigna)；瓦他拉尼(Ptk787；ZK222584)；CEP-701；SU5614；MLN518；XL999；VX-322；Azd0530；BMS-354825；SKI-606 CP-690；AG-490；WHI-P154；WHI-P131；AC-220；或AMG888。

【0186】示例性VEGF/VEGFR抑制劑包括但不限於貝伐單抗(Avastin)、索拉非尼(Nexavar)、舒尼替尼(Sutent)、雷珠單抗、培加他尼或凡德替尼。

【0187】示例性微管靶向藥物包括但不限於紫杉醇、多西紫杉醇、長春新堿、長春堿、諾考達唑、埃坡黴素和長春瑞濱。

【0188】示例性拓撲異構酶毒物藥物包括但不限於替尼泊苷、依託泊苷、阿黴素、喜樹堿、柔紅黴素、放線菌素、米托蒽醌、安吖啶、表柔比星和伊達比星。

【0189】示例性的紫杉烷或紫杉烷衍生物包括但不限於紫杉醇和多西紫杉醇。

【0190】示例性免疫檢查點抑制劑包括程式性細胞死亡1(PD-1)、CD274分子(PD-L1)和細胞毒性T-淋巴細胞相關蛋白4(CTLA4)抑制劑。示例性的PD-1抑制劑包括派姆單抗，納武單抗和塞米匹單抗(Cemiplimab)。示例性的

PD-L1抑制劑包括阿替珠單抗(Atezolizumab)，阿維魯單抗和德瓦魯單抗。示例性CLTA4抑制劑包括伊匹單抗。

【0191】示例性的鉑基抗腫瘤劑包括順鉑和卡鉑。

【0192】示例性的細胞週期蛋白依賴性激酶(CDK)抑制劑包括玻瑪西尼，帕博西尼和瑞博西尼。

【0193】示例性的聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)抑制劑包括他拉唑帕尼，奧拉帕尼，魯卡帕尼，尼拉帕尼和維利帕尼。

【0194】示例性的一般化學治療，抗腫瘤，抗增生劑包括但不限於：六甲蜜胺(Hexalen)；異維A酸(Accutane；Amnesteem；Claravis；Sotret)；維甲酸(Vesanoid)；阿紮胞苷(Vidaza)；硼替佐米(Velcade)天冬醯胺酶(Elspar)；左旋咪唑(Ergamisol)；米托坦(Lysodren)；丙卡巴肼(Matulane)；培天冬酶(Oncaspar)；地尼白介素-毒素連接物(Ontak)；卟菲爾鈉(Photofrin)；阿地白介素(Proleukin)；來那度胺(Revlimid)；貝沙羅汀(Targretin)；沙利度胺(Thalomid)；坦羅莫司(Torisel)；三氧化二砷(Trisenox)；維替泊芬(Visudyne)；含羞草堿(Leucenol)；(1M替加氟--0.4M 5-氯-2,4-二羥基嘧啶-1M氧羰酸鉀)或洛伐他汀。

【0195】在一些實施方式中，提供組合治療方式，其中另外的治療劑是細胞因子，例如G-CSF(粒細胞集落刺激因子)。在另一態樣中，本文提供的醫藥組成物可以與放射療法組合施用。放射療法還可以與本文提供的醫藥組成

物和本文的另一種化學治療劑組合施用，作為多藥物療法的一部分。在另一個態樣中，本文提供的醫藥組成物可以與標準化學療法組合施用，例如但不限於CMF(環磷醯胺、甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶)、CAF(環磷醯胺、阿黴素和5-氟尿嘧啶)、AC(阿黴素和環磷醯胺)、FEC(5-氟尿嘧啶、表柔比星和環磷醯胺)、ACT或ATC(阿黴素、環磷醯胺和紫杉醇)、利妥昔單抗、希羅達(卡培他濱)、順鉑(CDDP)、卡鉑、TS-1(替加氟、gimestat和otastat鉀的摩爾比為1：0.4：1)、喜樹堿-11(CPT-11、伊立替康或Camptosar™)、CHOP(環磷醯胺、羥基柔紅黴素、oncovin和潑尼松或潑尼松龍)、R-CHOP(利妥昔單抗、環磷醯胺、羥基柔紅黴素、oncovin、潑尼松或潑尼松龍)、或CMFP(環磷醯胺、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶和潑尼松)。

【0196】在一些較佳的實施方式中，本文提供的醫藥組成物可以與酶的抑制劑一起施用，例如受體或非受體激酶。受體和非受體激酶是例如酪胺酸激酶或絲胺酸/蘇胺酸激酶。本文描述的激酶抑制劑是小分子，多核酸，多肽或抗體。

【0197】示例性激酶抑制劑包括但不限於貝伐單抗(靶VEGF)、BIBW 2992(靶向EGFR和Erb2)、西妥昔單抗/愛必妥(靶標Erb1)、伊馬替尼/格列衛(靶Bcr-Abl)、曲妥珠單抗(靶標Erb2)、吉非替尼/易瑞沙(靶向EGFR)、蘭尼單抗(靶向VEGF)、培加他尼(靶向VEGF)、厄洛替尼/塔西法(靶向Erb1)、尼洛替尼(靶向Bcr-Abl)、拉帕替尼(靶向Erb1和

Erb2/Her2)、GW-572016/拉帕替尼二甲苯磺酸鹽(靶向HER2/Erb2)、帕尼單抗/Vectibix(靶向EGFR)、凡德替尼(靶向RET/VEGFR)、E7080(多個靶標包括RET和VEGFR)、赫賽汀(靶向HER2/Erb2)、PKI-166(靶向EGFR)、卡紐替尼/CI-1033(靶向EGFR)、舒尼替尼/SU-11464/Sutent(靶向EGFR和FLT3)、馬妥珠單抗/Emd7200 (靶向EGFR)、EKB-569(靶向EGFR)、Zd6474(靶向EGFR和VEGFR)、PKC-412(靶向VEGR和FLT3)、瓦他拉尼/Ptk787/ZK222584(靶向VEGR)、CEP-701(靶向FLT3)、SU5614(靶向FLT3)、MLN518(靶向FLT3)、XL999(靶向FLT3)、VX-322(靶標)FLT3)、Azd0530(目標SRC)、BMS-354825(目標SRC)、SKI-606(目標SRC)、CP-690(目標JAK)、AG-490(目標JAK)、WHI-P154(目標JAK)、WHI-P131(靶向JAK)、索拉非尼/多吉美(靶向RAF激酶、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、PDGFR-β、KIT、FLT-3和RET)、達沙替尼/Sprycel(BCR/ABL和Src)、AC-220(靶向Flt3)、AC-480(靶向所有HER蛋白、「panHER」)、莫特沙尼二磷酸(靶向VEGF1-3、PDGFR和c-kit)、地舒單抗(靶向RANKL、抑制SRC)、AMG888(目標HER3)和AP24534(多個目標包括Flt3)。

【0198】在另一個實施方式中，將包含本文揭露的相同多肽的重組融合蛋白或醫藥組成物每天一次施用於受試者。在一些實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物每兩天一次施用於受試者。在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物每三天一次施用於

受試者。在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物每四天一次施用於受試者。在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物每五天一次施用於受試者。在另一個實施方式中，將包含相同多肽的重組融合蛋白或醫藥組成物每六天一次施用於受試者。在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物每週一次施用於受試者。在另一個實施方式中，重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物每7-14天一次施用於受試者。在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物每10-20天一次施用於受試者。在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物每5-15天一次施用於受試者。在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物每15-30天一次施用於受試者。

【0199】在一個實施方式中，劑量在可注射溶液中包含0.005至0.1毫克/千克本發明的重組融合蛋白。在另一個實施方式中，劑量包含0.005至0.5毫克/千克重組融合蛋白。在另一個實施方式中，劑量包含0.05至0.1微克的重組融合蛋白。在另一個實施方式中，劑量在可注射溶液中包含0.005至0.1毫克/千克重組融合蛋白。

【0200】在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物以0.0001mg至0.6mg的劑量施用於受試者。在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物以0.001mg至0.005mg的劑量施用於受試者。在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物

以0.005mg至0.01mg的劑量施用於受試者。在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物以0.01mg至0.3mg的劑量施用於受試者。在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物以0.2mg至0.6mg的劑量施用於受試者。

【0201】在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物以1-100mcg/kg的劑量施用於受試者。在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物以10-80mcg/kg的劑量施用於受試者。在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物以20-60mcg/kg的劑量施用於受試者。在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物以10-50mcg/kg的劑量施用於受試者。在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物以40-80mcg/kg的劑量施用於受試者。在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物以10-30mcg/kg的劑量施用於受試者。在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物以30-60mcg/kg的劑量施用於受試者。

【0202】在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物以0.1mcg/kg至100mg/kg的劑量施用於受試者。在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物以0.1mcg/kg至50mg/kg的劑量施用於受試者。在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物以0.1mcg/kg至25mg/kg的劑量施用於受試者。在

另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物以0.1mcg/kg至10mg/kg的劑量施用於受試者。在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物以0.1mcg/kg至5mg/kg的劑量施用於受試者。在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物以0.1mcg/kg至1mg/kg的劑量施用於受試者。在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物以0.1mcg/kg至0.1mg/kg的劑量施用於受試者。在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物以10mg/kg至60mg/kg的劑量施用於受試者。

【0203】在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物以約0.5mg/kg、約1mg/kg、約2mg/kg、約3mg/kg、約4mg/kg、約5mg/kg、約6mg/kg、約7mg/kg、約8mg/kg、約9mg/kg、約10mg/kg、約20mg/kg、約30mg/kg約40mg/kg、約50mg/kg、約60mg/kg或約70mg/kg的劑量施用於受試者。

【0204】在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物以0.2mg至2mg的劑量施用於受試者。在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物以2mg至6mg的劑量施用於受試者。在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物以4mg至10mg的劑量施用於受試者。在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物以5mg-15mg的劑量施用於受試者。

【0205】在一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物以10μg/kg-1000μg/kg的劑量施用於受試者。在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物以25μg/kg-600μg/kg的劑量施用於受試者。在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物以50μg/kg-400μg/kg的劑量施用於受試者。在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物以約25μg/kg的劑量施用於受試者。在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物以約50μg/kg的劑量施用於受試者。在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物以約100μg/kg的劑量施用於受試者。在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物以約200μg/kg的劑量施用於受試者。在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物以約300μg/kg的劑量施用於受試者。在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物以約400μg/kg的劑量施用於受試者。在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物以約500μg/kg的劑量施用於受試者。在另一個實施方式中，將重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物以約600μg/kg的劑量施用於受試者。

【0206】在一個實施方式中，將單次一次劑量的重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物施用於受試者。在另一個實施方式中，向受試者施用總共兩個劑量。在另一個實施方式中，向受試者施用總共兩個或更多個劑量。

【0207】在另一個實施方式中，將一劑重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物每天至少一次施用於受試者。在另一個實施方式中，將劑量的重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物每兩天至少一次施用於受試者。在另一個實施方式中，將劑量的重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物每兩天或更多天至少一次施用於受試者。在另一個實施方式中，每週，每兩周或每三周向受試者施用一劑重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物。在另一個實施方式中，將一劑重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物每週至少一次施用於受試者。在另一個實施方式中，將劑量的重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物至少每兩周施用於受試者。在另一個實施方式中，將劑量的重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物至少每三周施用於受試者。在另一個實施方式中，將劑量的重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物至少每三周或更多周施用於受試者。在另一個實施方式中，將一劑重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物一周兩次或更多次施用於受試者。在另一個實施方式中，將一劑重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物每月兩次或更多次施用於受試者。在另一個實施方式中，將一劑重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物一年兩次或更多次施用於受試者。在另一個實施方式中，將一劑重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物每兩年施用於受試者兩次或更多次。在另一個實施方式中，將劑量的重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物每兩年或更多年兩次或更多次施用於受試者。

【0208】在另一個實施方式中，一劑量的重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物每36小時施用至少一次。在另一個實施方式中，重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物的劑量每48小時施用至少一次。在另一個實施方式中，一劑量的重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物每60小時施用至少一次。在另一個實施方式中，一劑量的重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物每72小時施用至少一次。在另一個實施方式中，重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物的劑量每84小時施用至少一次。在另一個實施方式中，一劑量的重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物每96小時施用至少一次。在另一個實施方式中，一劑量的重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物每5天施用至少一次。在另一個實施方式中，一劑量的重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物每6天施用至少一次。在另一個實施方式中，重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物的劑量每7天施用至少一次。在另一個實施方式中，一劑量的重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物每8-10天施用至少一次。在另一個實施方式中，重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物的劑量每10-12天施用至少一次。在另一個實施方式中，重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物的劑量每12-15天施用至少一次。在另一個實施方式中，重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物的劑量每15-25天施用至少一次。在另一個實施方式中，一劑量的重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物每20-30天施用至少一次。

【0209】在一個實施方式中，將一劑重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物每1個月至少一次施用於受試者。在一個實施方式中，一劑量的重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物每2個月施用至少一次。在一個實施方式中，一劑量的重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物每3個月施用至少一次。在一個實施方式中，一劑量的重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物每4個月施用至少一次。在一個實施方式中，一劑量的重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物每5個月施用至少一次。在一個實施方式中，一劑量的重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物每6個月施用至少一次。在一個實施方式中，一劑量的重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物每6-12個月施用至少一次。在另一個實施方式中，每季度施用一劑重組融合蛋白或包含其的醫藥組成物。在另一個實施方式中，劑量每日，每週，每兩周，每月或每年施用。在另一個實施方式中，劑量每天，一周，一個月或一年施用一次，兩次或兩次或更多次。在另一個實施方式中，劑量每兩年，三年，四年或至少五年施用。

【0210】在一個實施方式中，本發明組成物的重複給藥(劑量)可在第一療程後立即進行，或在數天，數周或數年的間隔後進行，以達到本文進一步提供的所需效果(例如預防或治療心血管疾病或病症，或CNS相關疾病或病症)。

【0211】在一個實施方式中，醫藥組成物通過靜脈內，動脈內，皮下或肌內注射液體製劑給藥。在另一個實

施方式中，液體製劑包括溶液，懸浮液，分散液，乳液，油等。在一個實施方式中，醫藥組成物是靜脈內施用的，因此配製成適於靜脈內施用的形式。在另一個實施方式中，醫藥組成物在動脈內給藥，因此配製成適於動脈內給藥的形式。

【0212】在一些實施方式中，用於本文揭露的方法的組成物包含溶液或乳液，其在一些實施方式中是包含安全有效量的本文揭露的化合物和任選的其他化合物的水溶液或乳液，用於靜脈內或皮下施用。

【0213】在一些實施方式中，組成物的各種成分預先測量和/或預先包裝和/或隨時可供使用而無需另外的測量等。本發明還任選地包含用於進行/使用本發明的方法和/或組成物的套組。特別地，這些套組任選地包括，例如，合適的重組融合蛋白(和任選的許多此類蛋白質的混合物，用於進行協同治療，參見上文)，以及任選的適當的疾病相關抗原。另外，此類套組還可包含適當的賦形劑(例如，醫藥上可接受的賦形劑)，用於進行本發明的治療和/或預防性治療。此類套組任選地含有用於組裝和/或使用本發明組成物的其他組分，包括但不限於例如稀釋劑等。

【0214】本文的組成物任選地包裝以包括用於實施本發明方法或使用本發明組成物的所有(或幾乎所有)必需組分(任選地包括例如使用本發明方法/組成物的書面說明書)。例如，套組可以任選地包括諸如緩衝液、試劑、血

清蛋白、抗體、基質等的組分。在預包裝試劑的情況下，套組任選地包括預先測量或預先給藥的量，其準備好在沒有測量的情況下結合到方法中，例如，預先測量的流體等分試樣，或預先稱重的或預先測量的固體試劑，其可以由套組的最終用戶容易地重構。

【0215】此類套組通常還包括用於實施本發明方法和/或使用本發明組成物的適當說明書。在一些實施方式中，套組/包裝的組分以穩定的形式提供，以防止在長期儲存期間例如由於洩漏而導致降解或其他損失。許多穩定方法/試劑廣泛用於待儲存的試劑等，例如包含化學穩定劑(即酶抑制劑，殺微生物劑/抑菌劑，抗凝血劑)等。活性成分的實際劑量水準在本發明的醫藥組成物中可以改變，以獲得有效實現特定受試者，組成物和給藥方式的所需治療反應的活性成分的量，而對受試者無毒。所選的劑量水準將取決於多種藥代動力學因素，包括所用本發明特定組成物的活性，給藥途徑，給藥時間，所用特定化合物的排泄速率，治療持續時間，與所用特定組成物組合使用的其他藥物，化合物和/或材料，所治療物件的年齡，性別，體重，狀況，一般健康狀況和既往病史，以及醫學領域中眾所周知的相似因素。

【0216】該組成物必須是無菌的和流動的，以使組成物可通過注射器輸送。除水之外，載體較佳是等滲緩衝鹽水溶液。例如，通過使用諸如卵磷脂的塗層，通過在分散的情況下維持所需的細微性和使用表面活性劑，可以保持

適當的流動性。在許多情況下，較佳在組成物中包含等滲劑，例如糖，多元醇如甘露醇或山梨糖醇和氯化鈉。

【0217】可改變本發明醫藥組成物中活性成分的實際劑量水準，以獲得有效實現特定受試者，組成物和給藥方式的所需治療反應的活性成分的量，對受試者有毒。所選的劑量水準將取決於多種藥代動力學因素，包括所用本發明特定組成物的活性，給藥途徑，給藥時間，所用特定化合物的排泄速率，治療持續時間，與所用特定組成物組合使用的其他藥物，化合物和/或材料，所治療物件的年齡，性別，體重，狀況，一般健康狀況和既往病史，以及醫學領域中眾所周知的相似因素。

【0218】雖然本文已經描述和說明了若干發明實施例，但是本領域普通技術人員將容易想到用於執行功能和/或獲得結果的各種其他裝置和/或結構和/或所描述的一個或多個優點，這些變化和/或修改中的每一個被認為是在本文描述的發明實施方式的範圍內。更一般地，本領域技術人員將容易理解，本文描述的所有參數，尺寸，材料和配置旨在是示例性的，並且實際參數，尺寸，材料和/或配置將取決於使用本發明的教導的具體應用。本領域技術人員將認識到或能夠使用不超過常規的實驗確定本文的具體發明實施方式的許多等同物。因此，應該理解，前述實施例僅作為示例呈現，並且在所附申請專利範圍及其等同物的範圍內，本發明的實施例可以不同於具體描述和要求保護的方式實施。本揭露的發明實施例係關於本文描述的

每個單獨的特徵，系統，物品，材料，套件和/或方法。此外，如果這些特徵，系統，物品，材料，套件和/或方法不相互矛盾，則兩個或更多個這樣的特徵，系統，物品，材料，套件和/或方法的任何組合包括在本發明的發明範圍。

【0219】如本文定義和使用的所有定義應理解為控制字典定義，通過引用併入的文獻中的定義，和/或定義的術語的普通含義。

【0220】本文揭露的所有參考文獻，專利和專利申請均通過引用併入本文所引用的主題，在某些情況下可涵蓋整個檔。

【0221】除非明確相反指出，否則本說明書和申請專利範圍中使用的不定冠詞「一(a)」和「一(an)」應理解為表示「至少一個」。

【0222】本說明書和申請專利範圍中使用的短語「和/或」應理解為表示如此結合的元件中的「一個或兩個」，即在某些情況下結合存在並且在其他情況下分離存在的元件。用「和/或」列出的多個元素應以相同的方式解釋，即，如此結合的「一個或多個」元素。除了與「和/或」子句具體標識的元素之外，可以可選地存在其他元素，無論是與具體標識的那些元素相關還是不相關。因此，作為非限制性示例，當與諸如「包括」的開放式語言結合使用時，對「A和/或B」的引用可以在一個實施例中僅指代A(可選地包括B之外的5個元素)；在另一個實施例

中，僅限於B(可選地包括除A之外的元素)；在又一個實施方式中，A和B兩者(任選地包括其他元素)等。

【0223】如本說明書和申請專利範圍中所使用的，關於一個或多個要素的列表，短語「至少一個」應理解為表示選自元素清單中的任何一個或多個要素中的至少一個要素，但不一定包括元素清單中具體列出的每個元素中的至少一個元素，並且不排除元素清單中元素的任何組合。該定義還允許除了在短語「至少一個」所指的元素清單內具體標識的元素之外，可選地存在元素，無論是與具體標識的那些元素相關還是不相關。因此，作為非限制性示例，「A和B中的至少一個」(或等效地，「A或B中的至少一個」，或等效地「A和/或B中的至少一個」)可以參考在一個實施方式中，至少一個，任選地包括多於一個，A，不存在B(並且任選地包括除B之外的元素)；在另一個實施方式中，至少一個，任選地包括多於一個，B，不存在A(並且任選地包括除A之外的元素)；在又一個實施方式中，至少一種，任選地包括多於一種，A，和至少一種，任選地包括多於一種，B(和任選地包括其他元素)；等等

【0224】本發明進一步提供用於預防、治療或延遲人類心血管疾病或病症的套組，其中套組包含一劑或多劑醫藥組成物，醫藥組成物包含本文揭露的用於預防、治療或延遲心血管疾病或病症的重組融合蛋白，以及如何使用醫藥製劑或組成物的說明。

【0225】本發明進一步提供了用於預防、治療或延遲

人類CNS相關疾病或病症的套組，其中套組包含一劑或多劑醫藥組成物，醫藥組成物包含本文揭露的用於預防、治療或延遲心血管疾病或病症的重組融合蛋白，以及如何使用醫藥製劑或組成物的說明。

【0226】本發明進一步提供了用於預防、治療或延遲患有人體內射出率的心臟衰竭的套組，其中套組包含一劑或多劑醫藥組成物，醫藥組成物包含本文揭露的用於預防、治療或延遲心臟衰竭(保留射出率)的重組融合蛋白，以及如何使用醫藥製劑或組成物的說明。

【0227】提供以下實施例是為了更全面地說明本發明的較佳實施方式。然而，它們決不應被解釋為限制本發明的廣泛範圍。

[實施例]

實施例1：表現質體的選殖和構建

【0228】編碼重組融合蛋白重鏈(對具有或不具有Fc突變的序列分別命名為NPCFA和NPCF)和輕鏈(命名為PAL)的DNA序列由GENEWIZ(中國蘇州)合成。表現載體pCHOGUN根據授權合約從Horizon Discovery(Cambridge，UK)獲得。表現質體的構建如圖1所示進行。簡言之，通過限制酶BfuAI使pCHOGUN載體線性化，並在NcoI和AscI雙限制酶切消化後純化基因插入片段如NPCF、NPCFA和PAL。按標準方案連接線性化的pCHOGUN/BfuAI和純化的基因插入片段，然後轉形到大腸桿菌(*E. coli*)DH5α勝任細

胞中。將DH5α細胞接種，並在37℃下培養過夜。單離質體pCHOGUN-NPCF、pCHOGUN-NPCFA和pCHOGUN-PAL，並通過限制酶消化或PCR確認。含有重鏈插入物(pCHOGUN-NPCF或pCHOGUN-NPCFA)的質體用限制酶BspEI和PciI消化，而含有輕鏈插入物(pCHOGUN-PAL)的質體用限制酶NgoMIV和PciI消化。在限制酶消化後，純化具有重鏈或輕鏈插入物的片段，連接，然後轉形到DH5α細胞中。通過限制酶消化和DNA定序鑒定並確認含有重鏈和輕鏈插入物(pCHOGUN-NPCF+PAL或pCHOGUN-NPCFA+PAL)二者的質體構築體。

實施例2：抗體產生、純化和特徵化

【0229】HD-BIOP3，一種源自CHO K1細胞的穀醯胺酸合成酶無效($GS^{-/-}$)細胞株，是根據授權合約從Horizon Discovery(Cambridge，UK)獲得的。使用市售的Qiagen Plasmid Kits單離質體DNA。使用來自Lonza的市售電穿孔系統將質體DNA轉染到HD-BIOP3細胞中。將轉染的細胞接種在96孔板中，並使用標準程式進行池選擇。將來自所選池的細胞在125mL搖瓶中培養10至14天，收穫培養基用於抗體純化。通過蛋白-A親和層析，然後粒徑篩析層析純化抗體蛋白，然後根據標準方案用SDS-PAGE和西方墨點轉漬法分析。

【0230】圖2A說明本文揭露的重組融合蛋白的示意性結構。圖2B顯示通過SDS-PAGE分析產生的代表性資料。

通過對包含HER3/4結合結構域(「NRG-1」，R&D Systems，Minneapolis，MN)或IgG的NRG-1的61個胺基酸活性片段特異性的第一抗體檢測到的西方墨點轉漬法結果分別顯示在圖2C和2D中。

實施例3：基於SPR的結合測定評估的分子完整性

【0231】通過評估其對HER3蛋白和抗NRG-1抗體的同時結合能力來評估本文揭露的重組融合蛋白的分子結構完整性。將His標記的HER3重組蛋白(Sino Biological，Beijing，China)捕獲在固定有抗His抗體的感測器晶片(Thermo Fisher，Waltham，MA)上(步驟1)，然後注射樣品(包括本文揭露的重組融合蛋白、本文揭露的無Fc突變的重組融合蛋白、抗HER3mAb)(步驟2)、和抗NRG-1抗體(R&D Systems，Minneapolis，MN)(步驟3)。通過在步驟1中增加所有6個通道上的訊息可以觀察到His-HER3附著在感測器晶片上。本文揭露的重組融合蛋白和本文揭露的沒有Fc突變的重組融合蛋白在步驟2中通過結合HER3和在步驟3中通過與注射的抗NRG-1抗體(Ch1,3)結合而產生顯著反應，表明在本文揭露的重組融合蛋白上存在HER3結合表位和NRG-1。相反，在步驟2中抗HER3 mAb僅與His-HER3結合，而非抗NRG-1抗體和緩衝液(步驟3)(Ch4,5)，證實抗HER3 mAb分子不存在NRG-1結合活性。在步驟2和3中注射緩衝液作為空白對照。因此，HER3結合表位和NRG-1都存在於本發明的重組融合蛋白中。

【0232】結合傳感圖和樣品注射順序如圖3所示。

實施例4：對體外腫瘤細胞株增生的影響

【0233】根據每種細胞株的生長動力學，將腫瘤細胞以每孔2,500至20,000個細胞接種在96孔板中。然後用本文揭露的重組融合蛋白、抗體或對照蛋白以逐步1:4連續稀釋系列處理細胞5天。使用來自Dojindo Molecular Technologies(Kumamoto，Japan)的細胞計數套組-8，根據製造商的說明評估細胞活力。用GraphPad Prism軟體分析資料，並表示為相對於未處理對照的生長速率。

【0234】圖4包括顯示不同癌細胞株的平均相對生長速率±SEM(n = 3)的代表性圖：(A)NCI-N87，胃；(B)MCF-7，乳房；(C)RT-112，膀胱；和(D)T47D，乳房。與對照NRG-1和GP120 mAb/NRG-1融合蛋白相比，本文揭露的重組融合蛋白在促進癌細胞增生中證實顯著較低的活性。

實施例5：人心肌細胞中PI3K/AKT訊息通路的活化

【0235】將從Cellular Dynamics(Madison，WI)獲得的人心肌細胞接種在0.1%明膠塗覆的96孔板中，並在平板培養基(Cellular Dynamics)中回收4小時。然後將細胞在維持培養基(Cellular Dynamics)中培養96小時，然後用於實驗。為了檢測本發明的重組融合蛋白在心肌細胞中活化HER2:HER4訊息傳導途徑的能力，首先將細胞在無血清培養基中饑餓4小時，然後用重組融合蛋白或對照試劑

(NRG-1、GP120 mAb/NRG-1、抗HER3 mAb或GP120 mAb)以逐步1:4連續稀釋系列處理15分鐘。在處理結束時，按照製造商的說明，使用Abcam的磷酸-AKT/總AKT ELISA套組(Cambridge，MA)溶解細胞並分析AKT磷酸化。用GraphPad Prism軟體分析資料，並表示為磷酸-AKT與總AKT相對於未處理對照的比率。

【0236】對於西方墨點轉漬法分析，將細胞接種在6孔板中，並用本發明的重組融合蛋白或對照試劑以16nM的單一濃度處理。在處理尾聲時，將細胞在含有蛋白酶和磷酸酶抑制劑的RIPA溶解緩衝液中溶解。按標準方案進行SDS-PAGE和西方墨點轉漬法。用AKT兔抗體和p-AKT(S473)兔抗體(Cell Signaling；Danvers，MA)分別墨點轉漬總AKT和磷酸-AKT。

【0237】圖5顯示回應於人心肌細胞中的刺激的AKT磷酸化。結果表明，本文揭露的重組融合蛋白可以活化心肌細胞中的HER2:HER4訊息傳導途徑，其效力與NRG-1相當。

實施例6：HER2:HER3二聚合和HER2:HER4二聚合的誘導

【0238】由Eurofins DiscoverX(Fremont，CA)開發的PathHunter二聚合分析檢測受體-二聚體對的兩個次單位的配體誘導的二聚合。測定原理如圖6A所示。β-gal酶分為兩個片段：ProLink(PK)和酶受體(EA)。已經將細胞工程化以共表現與酶供體PK融合的靶蛋白1及與酶受體EA融合

的靶蛋白2。配體與一種靶蛋白的結合誘導其與另一種靶蛋白相互作用，迫使兩種酶片段互補並導致酶反應釋放化學發光訊息，其被檢測為相對螢光單位或RFU。

【0239】PathHunter U2OS ErbB2/ErbB4二聚合細胞株和ErbB2/ErbB3二聚合細胞株獲自Eurofins DiscoverX。將細胞以4,000個細胞/孔接種在384孔板中，並在37℃/5%CO_2下溫育過夜。從28.8nM開始以逐步1:4連續稀釋系列製備測試劑，然後將其加入384孔板中的細胞中。溫育4小時後，根據製造商的說明測定細胞的受體二聚合。用GraphPad Prism軟體分析資料，並以平均RFU±SEM(n = 3)表示。

【0240】如圖6B和6C所示，本文揭露的重組融合蛋白可以誘導HER2/HER4二聚合，其效力與NRG-1相當；而其誘導HER2/HER3二聚合的能力要弱得多。作為該研究的陰性對照，同功型對照抗體GP120 mAb和抗HER3 mAb均未誘導受體二聚合。

【0241】已經參考附圖描述了本發明的實施例，應該理解，本發明不限於精確的實施例，並且本領域技術人員可以在其中實現各種改變和修改而不脫離本發明的範圍。或者如所附申請專利範圍中限定的本發明的精神。

實施例7：重組融合蛋白在收縮性心臟衰竭大鼠模式中的體內功效

【0242】為了評估重組融合蛋白在疾病模式中再生心

臟功能的能力，使用Sprague Dawley大鼠心肌梗塞和收縮性心臟衰竭模式。為了建立疾病模式，在手術過程中使用6-0絲線縫合連接左心耳下方3-4mm的左前降支冠狀動脈(LAD)。結紮後4周，通過M模式心臟超音波圖(ECG)都卜勒超音波記錄射出率(EF)，以在手術前測量針對基線EF的心臟功能。在隨後的研究中使用EF的最小降低30%的閾值含括。假對照動物在沒有LAD結紮的情況下進行相同的手術。

【0243】在建立疾病模式後，將動物分成5組，每組11隻大鼠，另外10隻假手術大鼠包括在第六組中。研究設計為每組接受每週兩次的尾靜脈注射，持續四周，或總共八次注射。假手術組和媒劑組陰性對照均接受生理鹽水，3組以1、3或10mg/kg接受重組融合蛋白，而最後一組接受GP120 mAb/NRG-1融合蛋白陽性對照(10 mg/kg)。

【0244】由於在研究期間觀察到體重減輕，在接受3mg/kg和10mg/kg的重組融合蛋白組中的8次注射的完整順序之前停止治療，這些組分別僅接受6次和3次注射。所有其他組都接受了全套八次注射。

【0245】在第一次治療後四周，再次通過M模式ECG測量EF。如圖8所示，相對於基線，重組融合蛋白在所有三個劑量組中顯著增加EF。具體地，1、3和10 mg/kg組分別觀察到增加14.7%(P＜0.001)，26.9%(P＜0.001)和36.6%(P＜0.001)。在匹配的時間點，GP120 mAb/NRG-1陽性對照使EF增加28.8%(P＜0.001)。鹽水對假手術組或媒劑對

照組均無效果。

【0246】在治療後28天收集ECG值後，對小鼠實施安樂死，並收集手術部位旁邊的心臟組織，用4%甲醛固定，並包埋在石蠟中。用蘇木精和曙紅染料對心臟組織的5 μm厚的石蠟切片進行染色，並在光學顯微鏡下觀察組織病理學變化。如圖9所示，在假手術組中，心肌細胞以有序的方式排列，且細胞質和心肌纖維均勻染色。在間質空間中未觀察到炎性細胞浸潤，且未發現心肌壞死。相反，在媒劑對照組中，心肌梗塞邊緣區在心肌細胞之間表現出擴大的間隙；細胞核濃縮破碎，且心肌纖維排列失去其有序結構；細胞大小增大，並注意到間質水腫。用重組融合蛋白處理部分緩解心肌梗塞區的病理變化，包括壞死細胞的顯著減少、心肌細胞之間的間隙空間變窄、以及心肌纖維排列向正常結構的恢復。

實施例8：NOD/SCID小鼠皮下FaDu癌異種移植模式中重組融合蛋白弱化腫瘤生長

【0247】為了評估重組融合蛋白促進腫瘤生長的潛在風險，在FaDu癌異種移植模式中進行了體內研究。根據機構指南，NOD/SCID小鼠(北京AK生物科技有限公司)在CrownBio國際研發中心(中國北京)的SPF設施中維護。所有實驗均按照實驗動物管理評估和認可協會(AAALAC)的要求並經CrownBio IACUC委員會許可進行。

【0248】將7-10周齡的雌性NOD/SCID小鼠皮下接種

懸浮於0.1 ml PBS的FaDu腫瘤細胞(3×10^6)在右側腹中。當腫瘤達到約150 mm^3時，將小鼠隨機分組並分成6個研究組，每組8隻動物。通過尾靜脈注射靜脈內投予測試樣品，每週兩次，連續三周，總共6次治療。通過卡尺測量監測腫瘤生長。研究在治療後21天終止。

【0249】圖10總結了回應不同處理的腫瘤生長。10 mg/kg的抗HER3 mAb顯示出顯著的抗腫瘤活性，在研究尾聲時腫瘤生長抑制(TGI)為93.5%($p < 0.001$對比媒劑組)。重組融合蛋白在研究尾聲時也顯示出統計學上顯著的TGI：1 mg/kg劑量時19.2%(與媒劑組相比$p = 0.048$)和10 mg/kg劑量時56.2%(與媒劑組相比$p < 0.001$))。對照分子GP120 mAb/NRG-1融合蛋白在高劑量或低劑量下均未顯示出抗腫瘤活性。研究期間沒有發生動物死亡。所有測試劑都被荷瘤小鼠良好耐受。在任何實驗組中均未觀察到顯著的體重減輕(圖11)。這些資料表明，在體內活性腫瘤生長條件下，重組融合蛋白以劑量依賴性方式表現出腫瘤生長抑制，並表明重組融合蛋白增加或加速體內腫瘤生長的風險低於天然NRG-1蛋白。

實施例9：在用重組融合蛋白投予的石蟹獼猴中沒有觀察到顯著的胃腸道毒性

【0250】先前報導，在第一期臨床研究(NCT01258387)中，受試者接受安慰劑或單劑量投予Cimaglermin(全長重組NRG-1β3)，噁心和腹瀉是第二和第四最常見的治療引

起的不良事件，分別發生在40%和27%的聚集的高劑量組群中(Lenihan等人，J Am Coll Cardiol Basic Trans Science. 2016；1(7)：576-86)。類似地，在重組NRG-1肽片段(紐蘭格林(neucardin))的第二期研究中，噁心是最常觀察到的治療相關不良事件，在20%的研究受試者中觀察到(Jabbour等人European Journal of Heart Failure(2011)13：83-92)。最後，在第二個紐蘭格林(neucardin)的第二期研究(ChiCTR-TRC-00000414)中，已公佈的結果顯示，觀察到48.4%的不良事件為胃腸道性質，是本研究中最常觀察到的不良事件類型，並與劑量水準關聯(Gao等人，J Am Coll Cardiol 2010；55：1907-14)。

【0251】進行評估重組融合蛋白在石蟹獼猴(Macaca fascicularis)中的安全性和耐受性的兩項研究：單劑量非GLP(良好實驗室實踐)研究和重複劑量GLP研究。嚴密監測胃腸道毒性。在單劑量研究中，與媒劑對照相比，在10、30和60 mg/kg的劑量水準下評估重組融合蛋白的安全性和耐受性，每個群組中包括一隻雄性和一隻雌性動物。在這項單劑量研究中，在兩周的治療後評估期間，沒有與測試劑相關的體重影響或定性食物評估影響，也沒有觀察到嘔吐或腹瀉。在重複劑量GLP研究中，重組融合蛋白的安全性和耐受性在4次連續每週投予後評估，劑量水準為3、10和30mg/kg，與媒劑對照相比，包括3只雄性和3只雌性在主要28天研究期的每個組中，且在30 mg/kg和媒劑對照組中另外兩隻雄性和兩隻雌性在隨後的28天恢復期後評

估。在重複劑量研究中觀察到沒有與測試劑相關的食物消耗效應。雖然在重複劑量研究中觀察到與測試劑相關的嘔吐，但是嘔吐的臨床觀察僅與輸注反應相關，僅在10 mg/kg組中的一隻動物(17%)和30 mg/kg組中的兩隻動物(20%)中觀察到，並且是短暫性質。僅在媒劑對照組和30 mg/kg重組融合蛋白組中僅分別在一隻(10%)和三隻(30%)動物中觀察到腹瀉，並且對於這種類型的程序被認為是正常的並且與重組融合蛋白無關。最後，在此重複劑量研究中，僅在10 mg/kg和30 mg/kg劑量水準下，平均體重相對於基線降低＞10%，並且僅在10 mg/kg組中的第四劑量及30 mg/kg組中的第三和第四劑量之後。總之，除了在急性輸液反應期間，用重組融合蛋白治療沒有導致與食物攝入、嘔吐或腹瀉相關的任何臨床顯著發現，並且在任一研究中胃腸道發現對確定無不良事件水準沒有影響。這些結果表明重組融合蛋白的設計減輕NRG-1重組蛋白對胃腸道的不利影響。

【0252】在不同時間點單劑量投予60 mg/kg重組融合蛋白後，從石蟹獼猴中收集血液樣品(~1ml)，提取血清並儲存在-80℃直至測試。根據標準程式通過捕獲ELISA測定血清樣品中重組融合蛋白的濃度。簡而言之，用重組人HER3蛋白(R&D System)塗覆96孔板，用BSA阻斷，並與測試樣品一起溫育。多次洗滌後，將板與HRP共軛的抗人IgG Fc抗體溫育，然後用TMB基質檢測。圖12顯示重組融合蛋白的藥物動力學概況與IgG抗體相似。

實施例10：Fc受體結合的動力學常數的總結

【0253】使用無標記SPR技術測量重組抗HER3 mAb/NRG-1融合蛋白與Fc受體之間的結合親和力。分別針對重組融合蛋白、無Fc突變的重組融合蛋白和抗HER3抗體分析總共六種Fc受體(各自與His標籤融合)，包括FcγRI(Abcam)、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa(158F)、FcγRIIIa(158V)和C1q(Sino Biological)。通過親和層析純化所有Fc受體和測試樣品。所有實驗均在Biacore 8K系統(GE Healthcare)上進行，其中HBS-EP+(10 mM HEPES、150 mM NaCl、3 mM EDTA和0.05%v/v表面活性劑P20)作為運行緩衝液。具體地，通過胺偶聯方法將抗His抗體偶聯於CM5感測器晶片的活性和參考流動細胞中。通過與固定的抗His抗體結合，將純化的His標記的Fc受體捕獲在每個單獨通道的活性流動細胞上。每種Fc受體的捕獲水準保持在80-120RU之間。對於動力學分析，將重組融合蛋白和所有其他樣品連續稀釋至總共6個濃度，範圍為0.3 nM至30 nM，並且通過每個通道中的兩種流動細胞依次注射連續稀釋液。通過在多個通道上同時注射樣品，在同一運行中完成多個分析。

【0254】得到的傳感圖配有雙態結合模式，以使用Biacore 8K評估軟體提取動力學常數。所有分析的平衡解離速率(KD)總結在下表1中。與FcγRI、FcγRIIa和FcγRIIb結合的重組融合蛋白的動力學衍生的KD值比沒有Fc突變

的重組融合蛋白和抗HER3抗體的KD值高10倍以上，表示因為重組融合蛋白的Fc區內的特定突變所致低得多的親和力。對於FcγRIIIa(158F)和FcγRIIIa(158V)，Fc突變分別導致重組融合蛋白的結合親和力降低2至3倍。與C1q的結合太弱而不能檢測所有樣品。

【0255】為了確認重組融合蛋白具有有限的Fc效應子功能，使用來自Promega(Madison，WI)的ADCC Reporter Bioassay檢查抗體依賴性細胞毒性(ADCC)。測定使用工程改造的Jurkat細胞株作為效應子細胞，其穩定表現FcγRIIIa(V158)受體和驅動螢火蟲螢光素酶表現的NFAT反應元件。利妥昔單抗(Rituximab)作為該測定的陽性對照，顯示出對抗CD20陽性Raji細胞的強ADCC活性；而重組融合蛋白對HER3陽性靶細胞(MCF7或BT474)沒有可檢測的ADCC(資料未顯示)。

表1：Fc受體結合的動力學常數的總結

Fc受體	KD(M)		
	抗-HER3 mAb/NRG-1	抗-HER3 mAb/NRG-1 (w/o Fc突變)	抗-HER3 mAb
FcγRI	**1.03E-08**	**2.81E-09**	**4.56E-09**
FcγRIIa	**1.35E-06**	**3.95E-07**	**1.50E-07**
FcγRIIb	**1.52E-06**	**1.03E-07**	**1.04E-08**
FcγRIIIa(158F)	**1.18E-07**	**6.37E-08**	**1.66E-07**
FcγRIIIa(158V)	**9.10E-08**	**3.41E-08**	**3.80E-08**
C1q	**＜LOD***	**＜LOD***	**＜LOD***

*＜LOD：由於弱結合而低於檢測限值(LOD)

【序列表】

<110> 美商信立泰生物醫藥公司（SALUBRIS BIOTHERAPEUTICS, INC.）
大陸商信立泰（成都）生物技術有限公司 SALUBRIS (CHENGDU) BIOTECH CO., LTD.

<120> 人神經調節蛋白-1(NRG-1)重組融合蛋白組成物及其使用方法

<130> SBTI-001/001WO 332030-2002

<140>
<141> 2019-04-11

<150> US 62/656,246
<151> 2018-04-11

<160> 18
<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 331
<212> PRT
<213> 智人（Homo sapiens）
<400> 1

Met Arg Ala Asn Asp Ala Leu Gln Val Leu Gly Leu Leu Phe Ser Leu
1 5 10 15
Ala Arg Gly Ser Glu Val Gly Asn Ser Gln Ala Val Cys Pro Gly Thr
20 25 30
Leu Asn Gly Leu Ser Val Thr Gly Asp Ala Glu Asn Gln Tyr Gln Thr
35 40 45
Leu Tyr Lys Leu Tyr Glu Arg Cys Glu Val Val Met Gly Asn Leu Glu
50 55 60
Ile Val Leu Thr Gly His Asn Ala Asp Leu Ser Phe Leu Gln Trp Ile

65 70 75 80

Arg Glu Val Thr Gly Tyr Val Leu Val Ala Met Asn Glu Phe Ser Thr

85 90 95

Leu Pro Leu Pro Asn Leu Arg Val Val Arg Gly Thr Gln Val Tyr Asp

100 105 110

Gly Lys Phe Ala Ile Phe Val Met Leu Asn Tyr Asn Thr Asn Ser Ser

115 120 125

His Ala Leu Arg Gln Leu Arg Leu Thr Gln Leu Thr Glu Ile Leu Ser

130 135 140

Gly Gly Val Tyr Ile Glu Lys Asn Asp Lys Leu Cys His Met Asp Thr

145 150 155 160

Ile Asp Trp Arg Asp Ile Val Arg Asp Arg Asp Ala Glu Ile Val Val

165 170 175

Lys Asp Asn Gly Arg Ser Cys Pro Pro Cys His Glu Val Cys Lys Gly

180 185 190

Arg Cys Trp Gly Pro Gly Ser Glu Asp Cys Gln Thr Leu Thr Lys Thr

195 200 205

Ile Cys Ala Pro Gln Cys Asn Gly His Cys Phe Gly Pro Asn Pro Asn

210 215 220

Gln Cys Cys His Asp Glu Cys Ala Gly Gly Cys Ser Gly Pro Gln Asp

225 230 235 240

Thr Asp Cys Phe Ala Cys Arg His Phe Asn Asp Ser Gly Ala Cys Val

245 250 255

Pro Arg Cys Pro Gln Pro Leu Val Tyr Asn Lys Leu Thr Phe Gln Leu

260 265 270

Glu Pro Asn Pro His Thr Lys Tyr Gln Tyr Gly Gly Val Cys Val Ala

275 280 285

Ser Cys Pro His Asn Phe Val Val Asp Gln Thr Ser Cys Val Arg Ala

290 295 300

Cys Pro Pro Asp Lys Met Glu Val Asp Lys Asn Gly Leu Lys Met Cys
305 310 315 320
Glu Pro Cys Gly Gly Leu Cys Pro Lys Ala Phe
325 330

<210> 2
<211> 447
<212> PRT
<213> 智人（Homo sapiens）
<400> 2
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Glu Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Asp Lys Trp Thr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser

165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn

195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His

210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ala Val

225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu

260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile

325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

340 345 350

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 3
<211> 220
<212> PRT
<213> 智人（Homo sapiens）
<400> 3

Asp Ile Glu Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Ser Asn Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Asn Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145 150 155 160
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
195 200 205
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 4
<211> 61
<212> PRT
<213> 智人（Homo sapiens）
<400> 4
Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
1 5 10 15
Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
20 25 30
Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr
35 40 45
Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gln
50 55 60

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 甘胺酸-絲胺酸連接子

<400> 5

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 6

<211> 1614

<212> DNA

<213> 智人（Homo sapiens）

<400> 6

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctt gttgctataa taaaaggtgt ccagtgtcag 60

gtgcagctgc agcagtgggg agctggactg ctgaagccaa gcgagaccct gtctctgaca 120

tgcgccgtgt acggaggatc cttcagcgga tactattggt cttggatcag gcagccacct 180

ggcaagggac tggagtggat cggcgagatc aaccactctg gctccaccaa ctacaatccc 240

tctctgaagt cccgggtgac catctccgtg gagacaagca agaatcagtt ttccctgaag 300

ctgtccagcg tgaccgccgc tgacacagcc gtgtactatt gcgctaggga caagtggacc 360

tggtatttcg atctgtgggg aaggggcacc ctggtgacag tgtcttccgc ctctacaaag 420

ggcccctccg tgtttcctct ggctccaagc tctaagagca cctctggagg aacagccgct 480

ctgggatgtc tggtgaagga ttacttccct gagccagtga ccgtgagctg gaactctggc 540

gccctgacct ccggagtgca tacatttccc gctgtgctgc agtccagcgg cctgtatagc 600

ctgtcttccg tggtgaccgt gcctagctct tccctgggca cccagacata catctgcaac 660

gtgaatcaca agccctccaa tacaaaggtg gacaagagag tggagcctaa gagctgtgat 720

aagacccata catgcccacc atgtccagct cctgagctgc tgggaggacc ttccgtgttc 780

ctgtttcctc caaagccaaa ggacaccctg atgatctctc gcacccctga ggtgacatgc 840

gtggtggtgg acgtgtccca cgaggatcca gaggtgaagt tcaactggta cgtggatggc 900

gtggaggtgc ataatgctaa gaccaagcct agggaggagc agtacaacag cacctatcgg 960

gtggtgtctg tgctgacagt gctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 1020

aaggtgagca ataaggccct gccagctccc atcgagaaga ccatctctaa ggccaagggc 1080

cagcccagag agcctcaggt gtatacactg ccccctagcc gcgaggagat gaccaagaac 1140

caggtgtctc tgacatgtct ggtgaagggc ttctacccat ctgacatcgc tgtggagtgg 1200

gagtccaatg gccagcccga gaacaattat aagaccacac cacccgtgct ggactccgat 1260

ggcagcttct ttctgtactc caagctgacc gtggataaga gcaggtggca gcagggcaac 1320

gtgttttcct gcagcgtgat gcacgaggcc ctgcacaatc attatacaca gaaatctctg 1380

tccctgagcc caggcaaggg aggaggagga agcggaggag gaggcagctc tcatctggtg 1440

aagtgtgctg agaaggagaa gaccttctgc gtgaacggcg gcgagtgttt tatggtgaag 1500

gacctgtcta atccatccag atacctgtgc aagtgtccca acgagttcac aggcgatcgc 1560

tgccagaatt acgtgatggc ctcttttttat aaggctgagg agctgtacca gtaa 1614

<210> 7

<211> 1614

<212> DNA

<213> 智人（Homo sapiens）

<400> 7

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctt gttgctataa taaaaggtgt ccagtgtcag 60

gtgcagctgc agcagtgggg agctggactg ctgaagccaa gcgagaccct gtctctgaca 120

tgcgccgtgt acggaggatc cttcagcgga tactattggt cttggatcag gcagccacct 180

ggcaagggac tggagtggat cggcgagatc aaccactctg gctccaccaa ctacaatccc 240

tctctgaagt cccgggtgac catctccgtg gagacaagca agaatcagtt ttccctgaag 300

ctgtccagcg tgaccgccgc tgacacagcc gtgtactatt gcgctaggga caagtggacc 360

tggtatttcg atctgtgggg aaggggcacc ctggtgacag tgtcttccgc ctctacaaag 420

ggcccctccg tgtttcctct ggctccaagc tctaagagca cctctggagg aacagccgct 480

ctgggatgtc tggtgaagga ttacttccct gagccagtga ccgtgagctg gaactctggc 540

gccctgacct ctggagtgca tacatttccc gctgtgctgc agtccagcgg cctgtatagc 600

ctgtcttccg tggtgaccgt gcctagctct tccctgggca cccagacata catctgcaac 660

gtgaatcaca agccctccaa tacaaaggtg gacaagagag tggagcctaa gagctgtgat 720

aagacccata catgcccacc atgtccagct cctgagttcc tgggaggacc tgccgtgttc 780

ctgtttcctc caaagccaaa ggacaccctg atgatctctc gcacccctga ggtgacatgc 840

gtggtggtgg acgtgtccca cgaggatcca gaggtgaagt tcaactggta cgtggatggc 900

gtggaggtgc ataatgctaa gaccaagcct agggaggagc agtacaacag cacctatcgg 960

gtggtgtctg tgctgacagt gctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 1020

aaggtgagca ataaggccct gccagctccc atcgagaaga ccatctctaa ggccaagggc 1080

cagcccagag agcctcaggt gtatacactg ccccctagcc gcgaggagat gaccaagaac 1140

caggtgtctc tgacctgtct ggtgaagggc ttctacccat ctgacatcgc tgtggagtgg 1200

gagtccaatg gccagcccga gaacaattat aagaccacac cacccgtgct ggactccgat 1260

ggcagcttct ttctgtactc caagctgacc gtggataaga gcaggtggca gcagggcaac 1320

gtgttttcct gcagcgtgat gcacgaggcc ctgcacgctc attatacaca gaaatctctg 1380

tccctgagcc caggcaaggg aggaggagga agcggaggag gaggcagctc tcatctggtg 1440

aagtgtgctg agaaggagaa gaccttctgc gtgaacggcg gcgagtgttt tatggtgaag 1500

gacctgtcta atccatccag atacctgtgc aagtgtccca acgagttcac aggcgatcgc 1560

tgccagaatt acgtgatggc ctctttttat aaggctgagg agctgtacca gtaa 1614

<210> 8

<211> 723

<212> DNA

<213> 智人（Homo sapiens）

<400> 8

atggtgttgc agacccaggt cttcatttct ctgttgctct ggatctctgg tgcctacggg 60

gacatcgaga tgacccagtc tccagattcc ctggccgtga gcctgggaga gagggctaca 120

atcaactgcc ggtccagcca gtctgtgctg tactcttcca gcaacaggaa ttacctggcc 180

tggtatcagc agaatcccgg ccagcccct aagctgctga tctattgggc tagcaccaga 240

gagtctggag tgcctgaccg cttctctgga tccggaagcg gcacagactt caccctgaca 300

atctcttccc tgcaggccga ggacgtggcc gtgtactatt gccagcagta ttactctacc 360

cctaggacat tcggccaggg caccaaggtg gagatcaagc ggacagtggc cgctccatcc 420

gtgttcatct ttccaccctc cgacgagcag ctgaagtccg gaaccgctag cgtggtgtgc 480

ctgctgaaca acttctaccc aagagaggcc aaggtgcagt ggaaggtgga taacgctctg 540

cagagcggca attctcagga gtccgtgacc gagcaggaca gcaaggattc tacatattcc 600

ctgagctcta ccctgacact gtccaaggcc gattacgaga agcacaaggt gtatgcttgc 660

gaggtgaccc atcagggcct gtccagcccc gtgacaaaga gcttcaaccg cggcgagtgt 720

taa 723

<210> 9
<211> 537
<212> PRT
<213> 智人（Homo sapiens）
<400> 9

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Ile Lys Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys
20 25 30
Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe
35 40 45
Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro
65 70 75 80
Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Glu Thr Ser Lys Asn Gln
85 90 95
Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110
Tyr Cys Ala Arg Asp Lys Trp Thr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg
115 120 125
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
130 135 140
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
145 150 155 160
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
165 170 175
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
180 185 190

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
195 200 205
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
210 215 220
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
225 230 235 240
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
245 250 255
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
260 265 270
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
275 280 285
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
290 295 300
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
305 310 315 320
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
325 330 335
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
340 345 350
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
355 360 365
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
370 375 380
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385 390 395 400
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

450 455 460

Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser His Leu Val

465 470 475 480

Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys

485 490 495

Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys

500 505 510

Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser

515 520 525

Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gln

530 535

<210> 10

<211> 537

<212> PRT

<213> 智人（Homo sapiens）

<400> 10

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Ile Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys

20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe

35 40 45

Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro
65 70 75 80
Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Glu Thr Ser Lys Asn Gln
85 90 95
Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110
Tyr Cys Ala Arg Asp Lys Trp Thr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg
115 120 125
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
130 135 140
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
145 150 155 160
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
165 170 175
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
180 185 190
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
195 200 205
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
210 215 220
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
225 230 235 240
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly
245 250 255
Pro Ala Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
260 265 270
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

275 280 285

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

290 295 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

305 310 315 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

325 330 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

340 345 350

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

355 360 365

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

370 375 380

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

435 440 445

Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

450 455 460

Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser His Leu Val

465 470 475 480

Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys

485 490 495

Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys

500 505 510

Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser
515 520 525
Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gln
530 535

<210> 11
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人（Homo sapiens）
<400> 11
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Ile Lys Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys

<210> 12
<211> 240
<212> PRT
<213> 智人（Homo sapiens）
<400> 12
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15
Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Glu Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
20 25 30
Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ser Ser Gln Ser
35 40 45
Val Leu Tyr Ser Ser Ser Asn Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
50 55 60
Asn Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
65 70 75 80
Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
130 135 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
145 150 155 160

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
165 170 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
195 200 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
210 215 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235 240

<210> 13
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人（Homo sapiens）
<400> 13
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly
20

<210> 14
<211> 518

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重組融合蛋白的重鏈組分

<400> 14

```
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1               5                  10                  15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
            20                  25                  30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45
Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
    50                  55                  60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Glu Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65                  70                  75                  80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95
Arg Asp Lys Trp Thr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu
            100                 105                 110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
        115                 120                 125
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
    130                 135                 140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145                 150                 155                 160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
                165                 170                 175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
            180                 185                 190
```

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205
Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ala Val
225 230 235 240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350
Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430
His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly
435 440 445
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser His Leu Val Lys Cys Ala
450 455 460
Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val
465 470 475 480
Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu
485 490 495
Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys
500 505 510
Ala Glu Glu Leu Tyr Gln
515

<210> 15
<211> 42
<212> PRT
<213> 智人（Homo sapiens）
<400> 15
His Ala Arg Lys Cys Asn Glu Thr Ala Lys Ser Tyr Cys Val Asn Gly
1 5 10 15
Gly Val Cys Tyr Tyr Ile Glu Gly Ile Asn Gln Leu Ser Cys Lys Cys
20 25 30
Pro Asn Gly Phe Phe Gly Gln Arg Cys Leu
35 40

<210> 16
<211> 44
<212> PRT
<213> 智人（Homo sapiens）

<400> 16

His Phe Lys Pro Cys Arg Asp Lys Asp Leu Ala Tyr Cys Leu Asn Asp
1 5 10 15

Gly Glu Cys Phe Val Ile Glu Thr Leu Thr Gly Ser His Lys His Cys
20 25 30

Arg Cys Lys Glu Gly Tyr Gln Gly Val Arg Cys Asp
35 40

<210> 17
<211> 42
<212> PRT
<213> 智人（Homo sapiens）
<400> 17

His Glu Glu Pro Cys Gly Pro Ser His Lys Ser Phe Cys Leu Asn Gly
1 5 10 15

Gly Leu Cys Tyr Val Ile Pro Thr Ile Pro Ser Pro Phe Cys Arg Cys
20 25 30

Val Glu Asn Tyr Thr Gly Ala Arg Cys Glu
35 40

<210> 18
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> EGF 樣結構域共有序列
<400> 18

Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Glu Cys Phe Met Val
1 5 10 15

Lys Asp Leu Ser Asn Pro
20

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種包含與對於ErbB3(HER3)是單特異性的單株抗體(mAb)骨架融合的心臟保護蛋白神經調節蛋白-1(NRG-1)的活性片段之重組融合蛋白在製造用於治療有需要的受試者的心血管疾病或病症的藥劑之用途，其中該mAb包含包括SEQ ID NO：2的胺基酸序列的重鏈與包括SEQ ID NO：3的胺基酸序列的輕鏈，以及其中該NRG-1的活性片段包含NRG-1的表皮生長因子樣結構域，該用途包含投予該受試者治療有效量的該重組融合蛋白。

【請求項2】如請求項1之用途，其中該NRG-1片段結合ErbB4(HER4)，並通過ErbB4(HER4)誘導訊息傳導，以及其中該mAb通過ErbB3(HER3)抑制NRG-1訊息傳導。

【請求項3】如請求項1之用途，其中該NRG-1片段包含SEQ ID NO：4之胺基酸序列。

【請求項4】如請求項1之用途，其中使用連接子將該NRG-1片段通過其N-端胺基酸與該抗體重鏈的C-端融合。

【請求項5】如請求項4之用途，其中該連接子包含列於SEQ ID NO：5的Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser連接子的至少一個複製(copy)，或其中該抗體重鏈的C-端包含該抗體的Fc結構域。

【請求項6】如請求項1之用途，其中該單株抗體經糖化，且其中該糖化是N-糖化或O-糖化。

【請求項7】如請求項1之用途，其中該重組融合蛋白包含SEQ ID NO：3和SEQ ID NO：14的胺基酸序列。

【請求項8】如請求項1之用途，其中相對於包含SEQ ID NO：4之重組NRG-1，該重組融合蛋白減弱腫瘤或癌細胞的增生。

【請求項9】如請求項1之用途，其中該重組融合蛋白促進心肌細胞或心臟組織的增生、分化和存活。

【請求項10】如請求項1之用途，其中該重組融合蛋白具有降低的誘導抗體依賴性細胞毒性(ADCC)的能力。

【請求項11】如請求項1之用途，其中相對於包含SEQ ID NO：4之重組NRG-1的訊息誘導潛力，該重組融合蛋白促進HER2/4訊息傳導超過HER2/3訊息傳導。

【請求項12】如請求項1之用途，包括投予該受試者介於0.1 mcg/kg與5 mg/kg之間的該重組融合蛋白。

【請求項13】如請求項1之用途，其中該重組融合蛋白減輕該受試者中該心血管疾病或病症的徵象或症狀。

【請求項14】如請求項1之用途，包含該重組融合蛋白之靜脈內輸注。

【請求項15】如請求項1之用途，其中該心血管疾病或病症是保留射出率的心臟衰竭、慢性心臟衰竭/充血性心臟衰竭(CHF)、急性心臟衰竭/心肌梗塞(MI)、左心室收縮功能障礙、與MI相關的再灌注損傷、化學療法誘導的心臟毒性(成人或小兒)、放射誘導的心臟毒性、小兒先天性心臟病的手術干預附屬病、或由於該受試者接受癌症療法的心臟毒性。

【請求項16】如請求項15之用途，其中該化學療法誘

導的心臟毒性來自接受用作化學療法的蒽環黴素、烷化劑、抗微管劑或抗代謝物劑的受試者，且其中該癌症療法是HER-2靶向療法。

【請求項17】如請求項16之用途，其中該HER-2靶向療法包括使用曲妥珠單抗、ado-曲妥珠單抗、恩他新、拉帕替尼、奈拉替尼或帕妥珠單抗、任何抗HER2抗體、任何抗HER2劑或其組合。

【請求項18】一種製造包含與對於ErbB3(HER3)是單特異性的單株抗體(mAb)骨架融合的心臟保護蛋白神經調節蛋白-1(NRG-1)的活性片段之重組融合蛋白之方法，該方法包含：

(a) 以至少包含編碼該單株抗體骨架之輕鏈的序列及編碼該單株抗體骨架之重鏈的序列之第一載體轉形真核宿主細胞，該單株抗體骨架通過其C端與該NRG-1片段之N端融合，其中該輕鏈包含SEQ ID NO：3之胺基酸序列，該重鏈包含SEQ ID NO：2之胺基酸序列，以及該NRG-1片段包含SEQ ID NO：4之胺基酸序列；

(b) 在足以表現該重組融合蛋白的條件下培養該真核宿主細胞；以及

(c) 純化該重組融合蛋白。

【請求項19】如請求項18之方法，其中使用連接子將該NRG-1片段通過其N-端與該重鏈的C-端融合。

【請求項20】如請求項19之方法，其中該連接子包含Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(SEQ ID NO：5)

的至少一個複製(copy)。

【請求項21】如請求項18之方法，其中該抗體重鏈之該C-端包含該抗體之Fc結構域。

【請求項22】如請求項18之方法，其中該重組融合蛋白包含SEQ ID NO：3及SEQ ID NO：14之胺基酸序列。

【請求項23】如請求項18之方法，其中編碼該輕鏈之該序列包含SEQ ID NO：8。

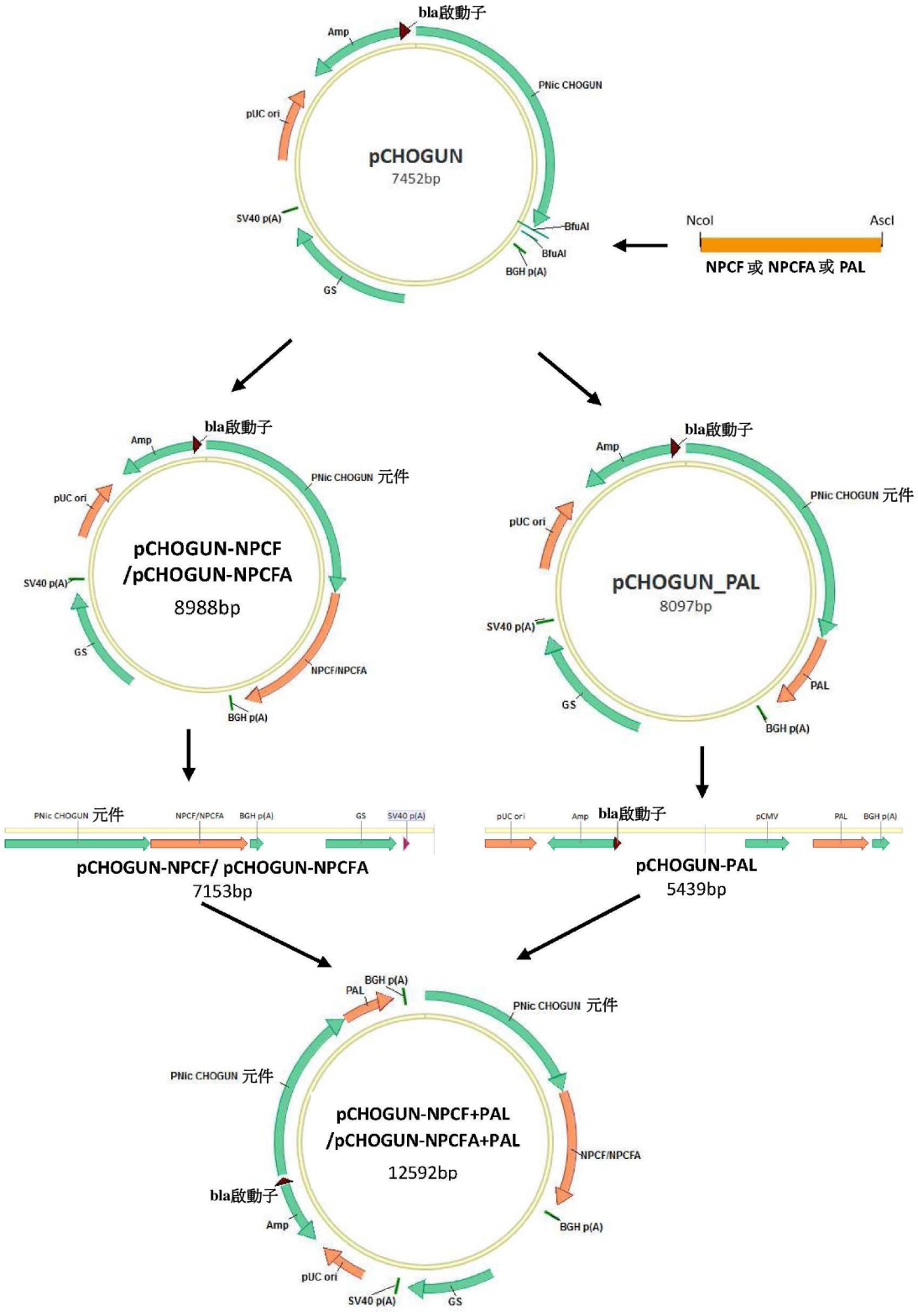
【請求項24】如請求項18之方法，其中編碼該重鏈之該序列包含SEQ ID NO：7。

【請求項25】如請求項18之方法，其中該真核宿主細胞包含CHO細胞。

【請求項26】如請求項25之方法，其中該CHO細胞包含CHO-K1細胞。

【請求項27】如請求項18之方法，其中該至少一載體包含編碼該輕鏈之第一載體與編碼該重鏈之第二載體，其與該NRG-1活性片段融合。

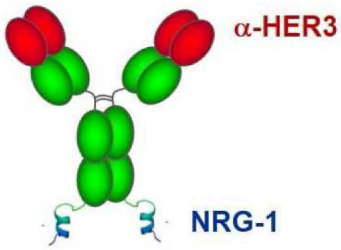
【發明圖式】



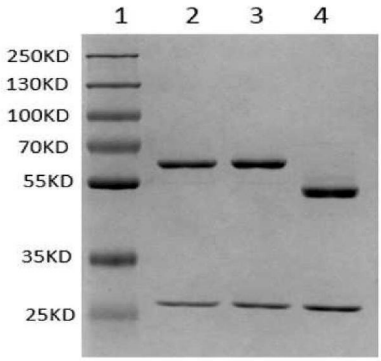
【圖 1】

890199-1

抗-HER3 mAb/NRG-1
融合蛋白的分子模式圖



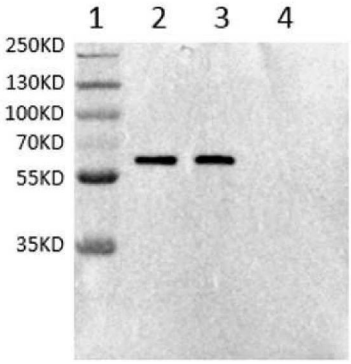
【圖 2A】



抗-HER3 mAb/ NRG-1 融合蛋白的
SDS-PAGE分析

道 1: 預染色的蛋白階梯
道 2: 抗-HER3 mAb/NRG-1融合蛋白
道 3: 抗-HER3 mAb/NRG-1融合蛋白
(無Fc突變)
道 4: 抗 -HER3 mAb

【圖 2B】



由抗-NRG1 Ab的WB分析

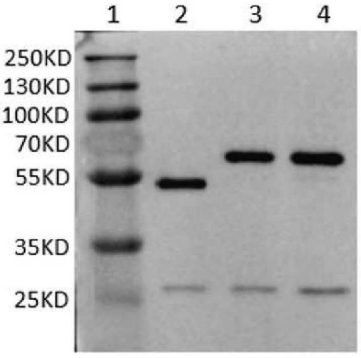
道 1: 預染色的蛋白階梯

道 2: 抗 -HER3 mAb/NRG-1 融合蛋白

道 3: 抗 -HER3 mAb/NRG-1 融合蛋白(無Fc突變)

道 4: 抗 -HER3 mAb

【圖 2C】



由抗-IgG Ab的WB分析

道 1: 預染色的蛋白階梯

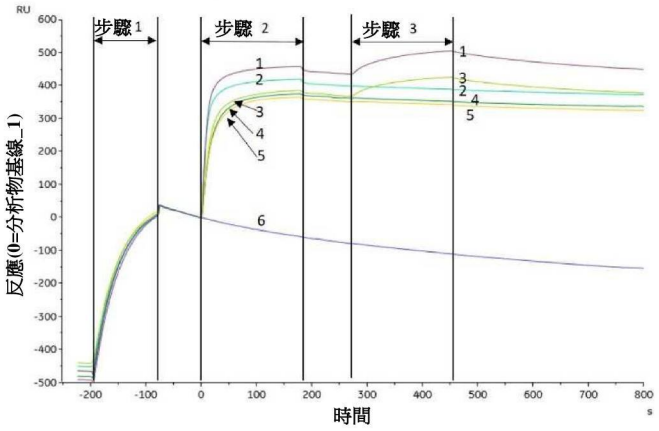
道 2: 抗 -HER3 mAb

道 3: 抗 -HER3 mAb/NRG-1 融合蛋白(無Fc突變)

道 4: 抗 -HER3 mAb/NRG-1 融合蛋白

【圖 2D】

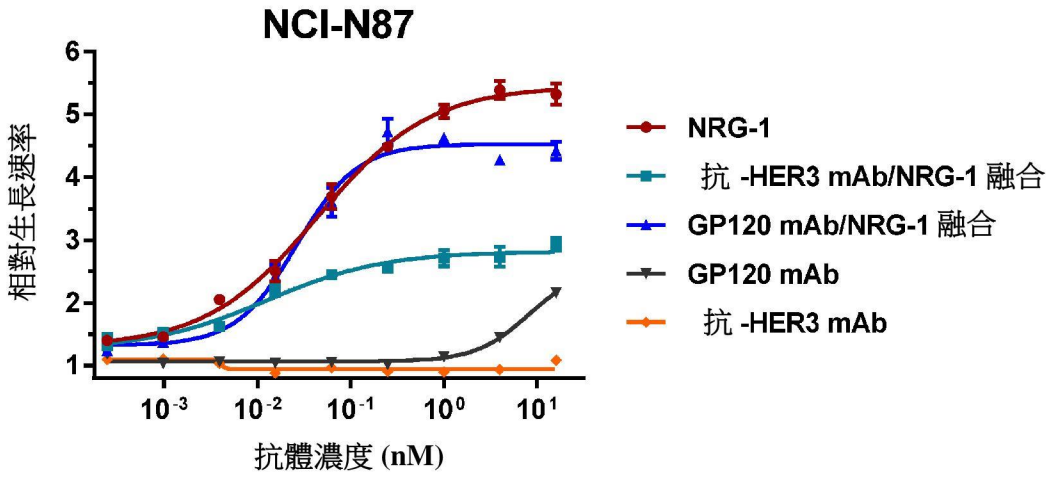
結合傳感圖



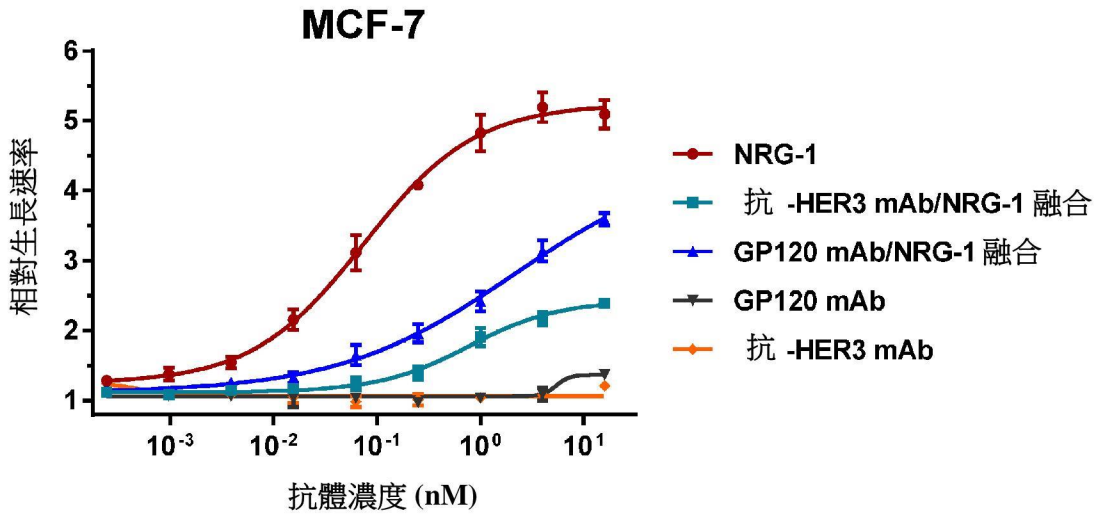
樣品描述

曲線	樣品		
	步驟1	步驟2	步驟3
1	HER3	抗 -HER3 mAb/NRG-1 融合	抗 -NRG1 mAb
2	HER3	抗 -HER3 mAb/NRG-1 融合	緩衝液
3	HER3	抗 -HER3 mAb/NRG-1 融合 (w/o Fc 突變)	抗 -NRG1 mAb
4	HER3	抗 -HER3 mAb	抗 -NRG1 mAb
5	HER3	抗 -HER3 mAb	緩衝液
6	HER3	緩衝液	緩衝液

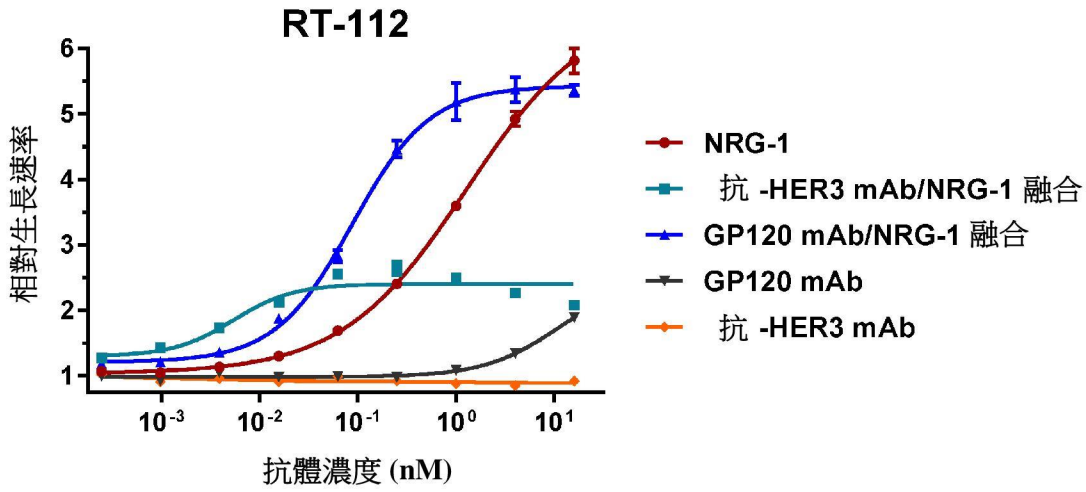
【圖 3】


NCI-N87
相對生長速率
抗體濃度 (nM)
NRG-1
抗 -HER3 mAb/NRG-1 融合
GP120 mAb/NRG-1 融合
GP120 mAb
抗 -HER3 mAb

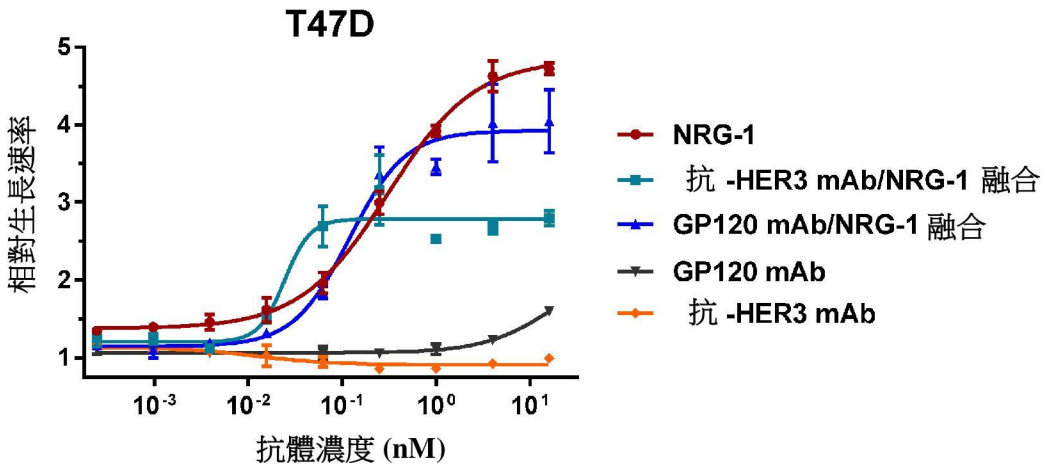
【圖 4A】


MCF-7
相對生長速率
抗體濃度 (nM)
NRG-1
抗 -HER3 mAb/NRG-1 融合
GP120 mAb/NRG-1 融合
GP120 mAb
抗 -HER3 mAb

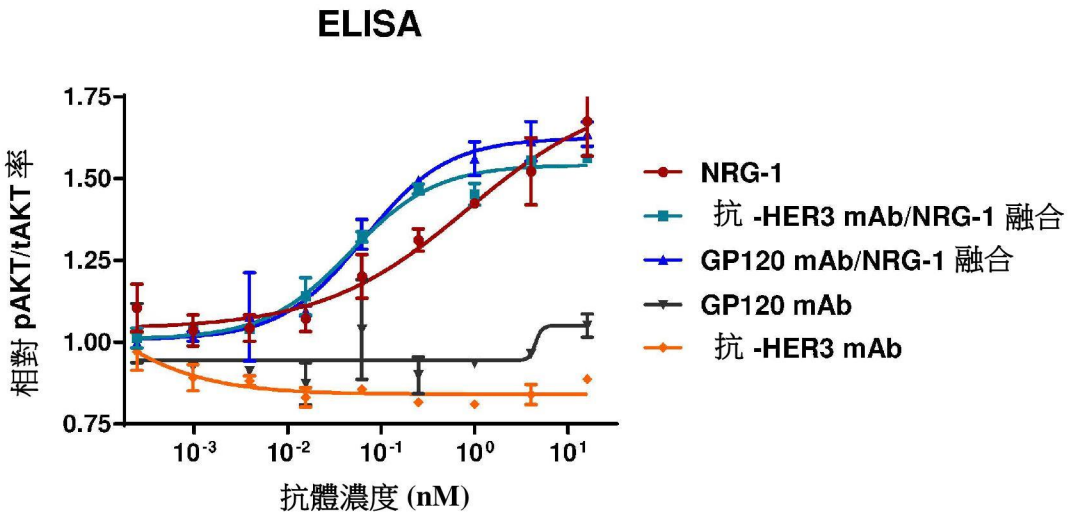
【圖 4B】


RT-112
相對生長速率
抗體濃度 (nM)
NRG-1
抗 -HER3 mAb/NRG-1 融合
GP120 mAb/NRG-1 融合
GP120 mAb
抗 -HER3 mAb

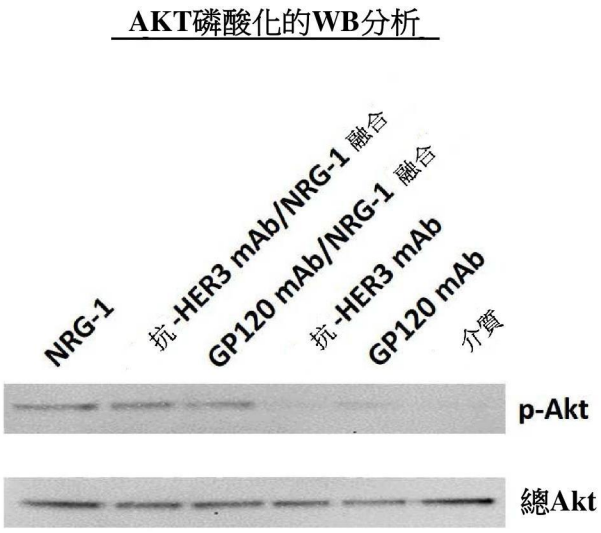
【圖 4C】


T47D
相對生長速率
抗體濃度 (nM)
NRG-1
抗 -HER3 mAb/NRG-1 融合
GP120 mAb/NRG-1 融合
GP120 mAb
抗 -HER3 mAb

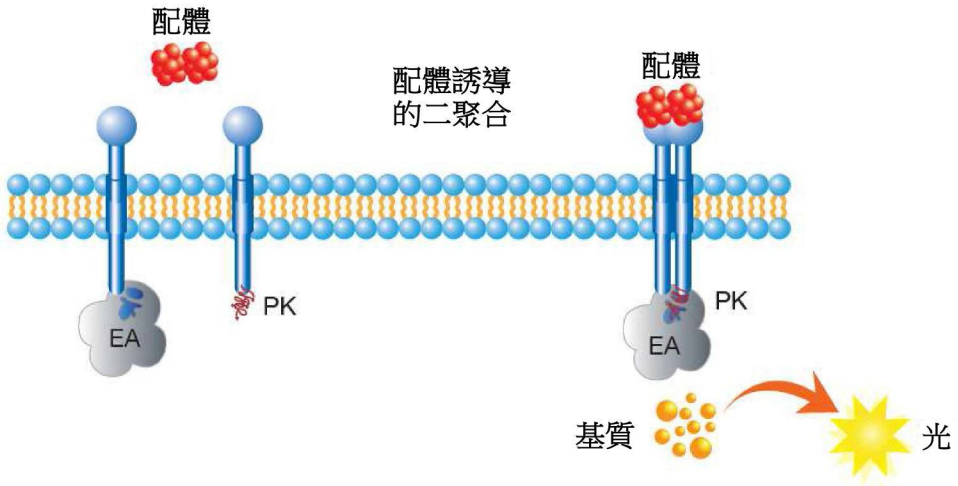
【圖 4D】


ELISA
相對 pAKT/tAKT 率
1.75
1.50
1.25
1.00
0.75
10-3
10-2
10-1
100
101
抗體濃度 (nM)
NRG-1
抗 -HER3 mAb/NRG-1 融合
GP120 mAb/NRG-1 融合
GP120 mAb
抗 -HER3 mAb

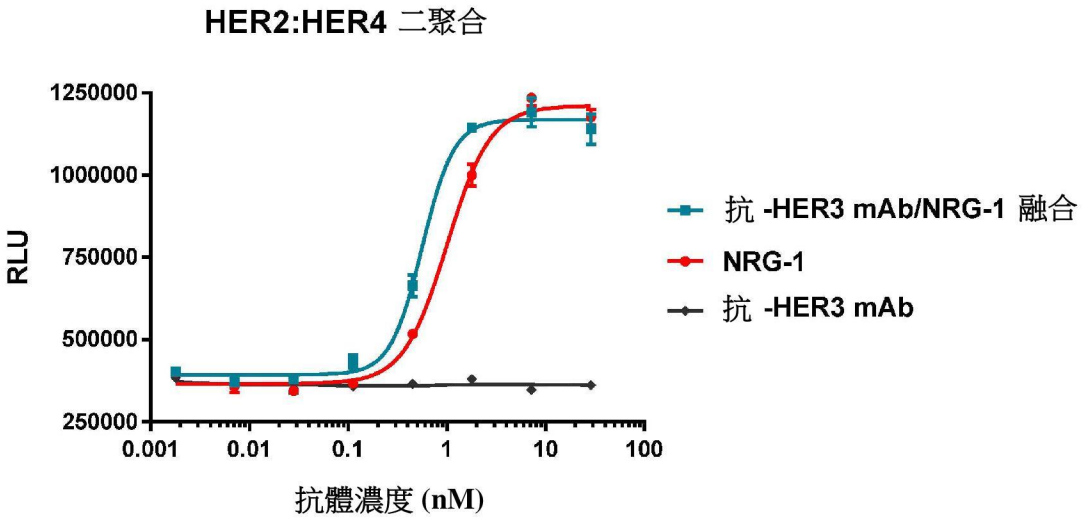
【圖 5A】


AKT磷酸化的WB分析
NRG-1
抗 -HER3 mAb/NRG-1 融合
GP120 mAb/NRG-1 融合
抗 -HER3 mAb
GP120 mAb
介質
p-Akt
總Akt

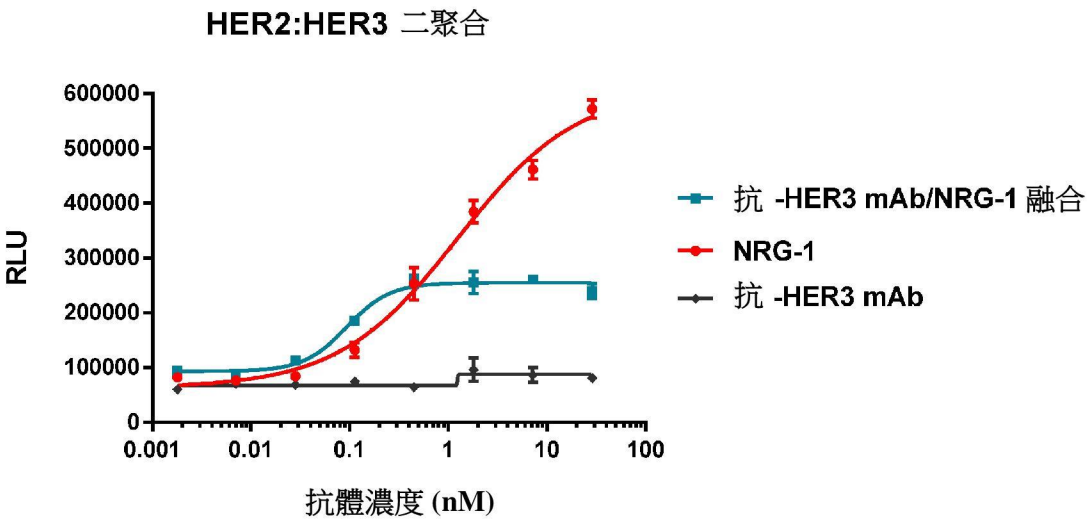
【圖 5B】


配體
配體誘導
的二聚合
配體
PK
EA
PK
EA
基質
光

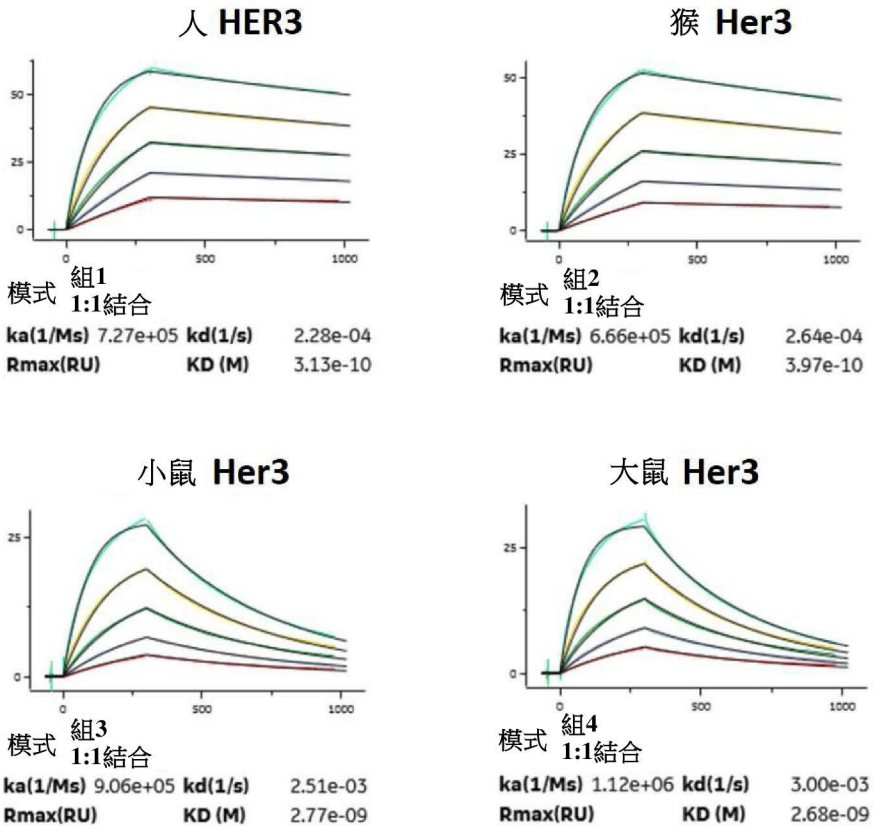
【圖 6A】


HER2:HER4 二聚合
RLU
1250000
1000000
750000
500000
250000
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗體濃度 (nM)
抗 -HER3 mAb/NRG-1 融合
NRG-1
抗 -HER3 mAb

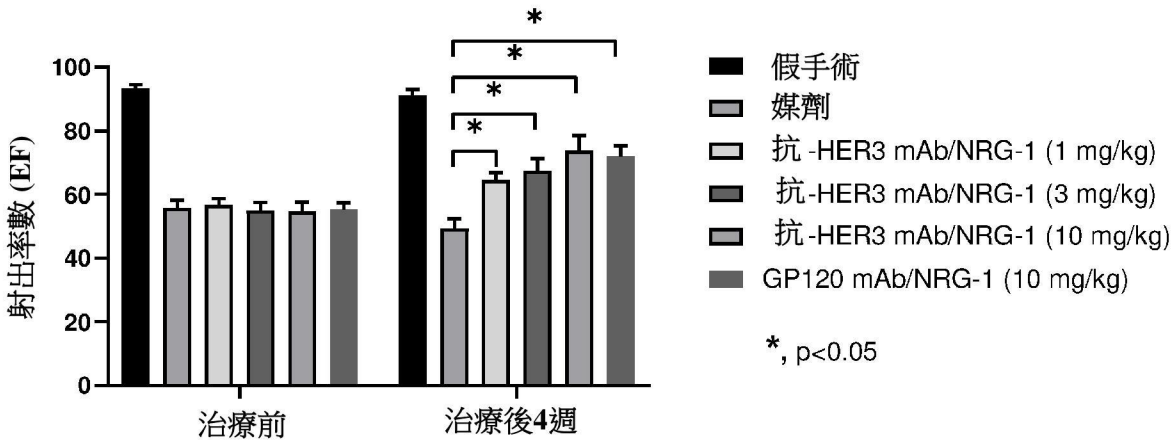
【圖 6B】


HER2:HER3 二聚合
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
RLU
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗體濃度 (nM)
抗 -HER3 mAb/NRG-1 融合
NRG-1
抗 -HER3 mAb

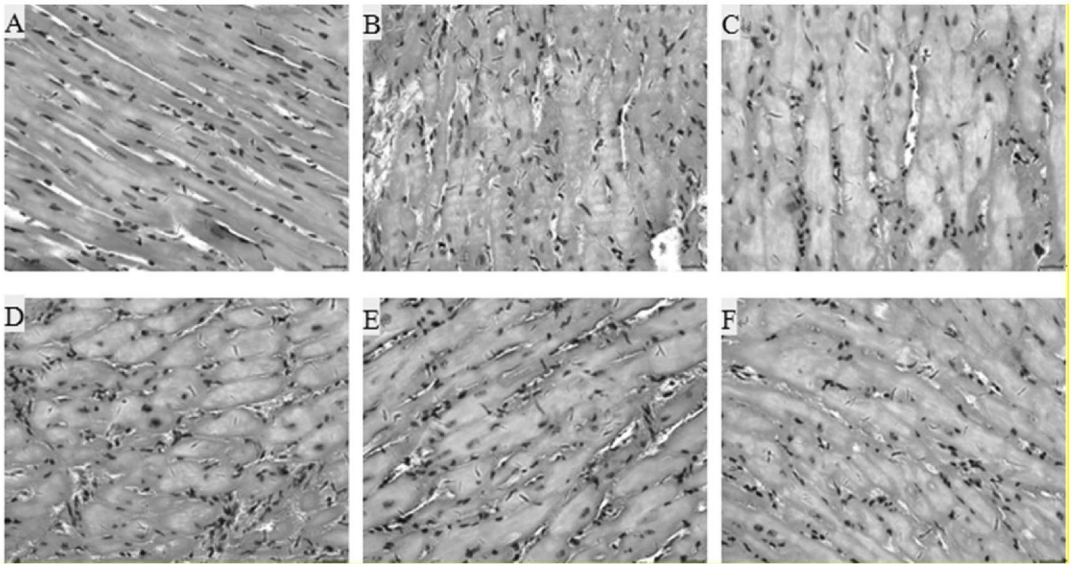
【圖 6C】


人 HER3
模式 組1 1:1結合
ka(1/Ms) 7.27e+05 kd(1/s) 2.28e-04
Rmax(RU) KD (M) 3.13e-10
猴 Her3
模式 組2 1:1結合
ka(1/Ms) 6.66e+05 kd(1/s) 2.64e-04
Rmax(RU) KD (M) 3.97e-10
小鼠 Her3
模式 組3 1:1結合
ka(1/Ms) 9.06e+05 kd(1/s) 2.51e-03
Rmax(RU) KD (M) 2.77e-09
大鼠 Her3
模式 組4 1:1結合
ka(1/Ms) 1.12e+06 kd(1/s) 3.00e-03
Rmax(RU) KD (M) 2.68e-09

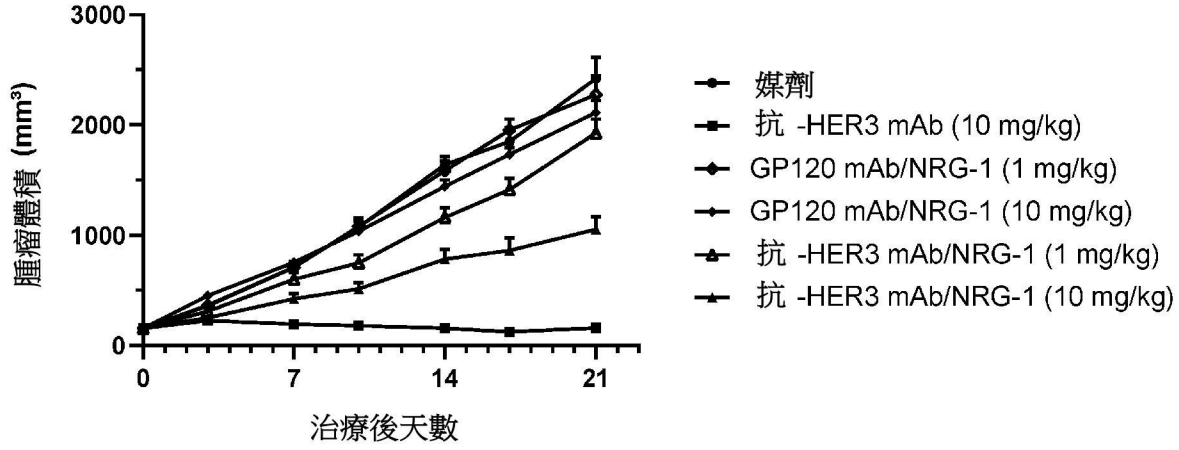
【圖 7】


射出率數 (EF)
100
80
60
40
20
0
治療前
治療後4週
*
*
*
*
假手術
媒劑
抗 -HER3 mAb/NRG-1 (1 mg/kg)
抗-HER3 mAb/NRG-1 (3 mg/kg)
抗-HER3 mAb/NRG-1 (10 mg/kg)
GP120 mAb/NRG-1 (10 mg/kg)
*, p<0.05

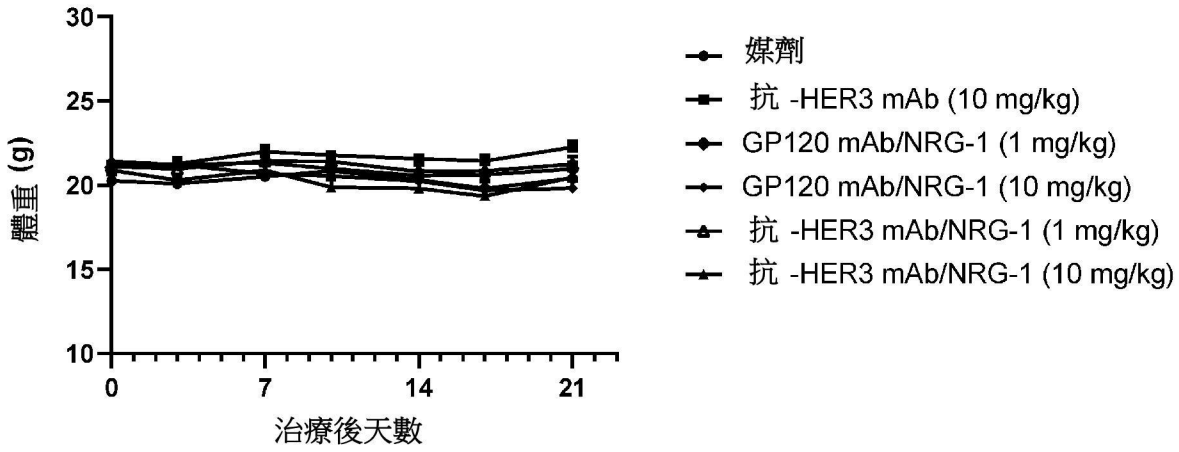
【圖 8】


A
B
C
D
E
F

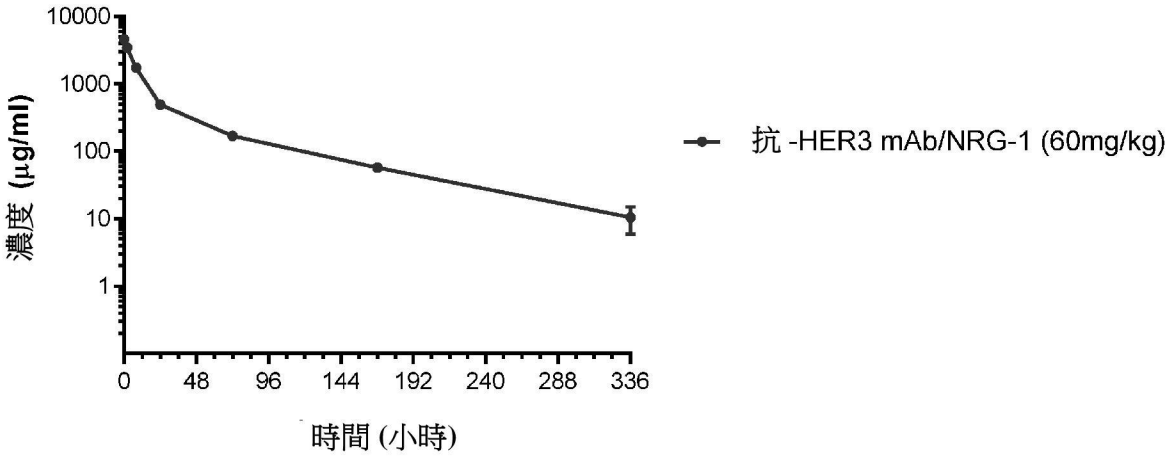
【圖 9】


腫瘤體積 (mm³)
3000
2000
1000
0
0
7
14
21
治療後天數
媒劑
抗 -HER3 mAb (10 mg/kg)
GP120 mAb/NRG-1 (1 mg/kg)
GP120 mAb/NRG-1 (10 mg/kg)
抗 -HER3 mAb/NRG-1 (1 mg/kg)
抗 -HER3 mAb/NRG-1 (10 mg/kg)

【圖 10】


體重 (g)
30
25
20
15
10
0
7
14
21
治療後天數
媒劑
抗 -HER3 mAb (10 mg/kg)
GP120 mAb/NRG-1 (1 mg/kg)
GP120 mAb/NRG-1 (10 mg/kg)
抗 -HER3 mAb/NRG-1 (1 mg/kg)
抗 -HER3 mAb/NRG-1 (10 mg/kg)

【圖 11】


10000
1000
100
10
1
濃度 (μg/ml)
0
48
96
144
192
240
288
336
時間 (小時)
抗 -HER3 mAb/NRG-1 (60mg/kg)

【圖 12】