



(21)申請案號：112109408 (22)申請日：中華民國 112 (2023) 年 03 月 14 日

(51)Int. Cl. : *A61K38/18 (2006.01)* *A61K39/395 (2006.01)*
C07K14/475 (2006.01) *C07K16/28 (2006.01)*
A61P9/00 (2006.01)

(30)優先權：2022/03/15 美國 63/319,886
 2022/12/01 美國 63/385,705

(71)申請人：美商信立泰生物醫藥公司(美國) SALUBRIS BIOTHERAPEUTICS, INC. (US)
 美國

(72)發明人：凡佛雷恩霍夫 詹斯 VAN FRAEYENHOVE, JENS G.R. (BE)；墨菲 山繆爾
 MURPHY, SAMUEL L. (US)；塞格斯 文森 SEGERS, VINCENT F.M. (BE)；德
 庫利納爾 吉爾斯 DE KEULENAER, GILLES W. (BE)；圖比克斯 米契爾
 TUBEECKX, MICHIEL RENE LISETTE (BE)；李 月華 LI, JOHN (US)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：27 項 圖式數：26 共 161 頁

(54)名稱

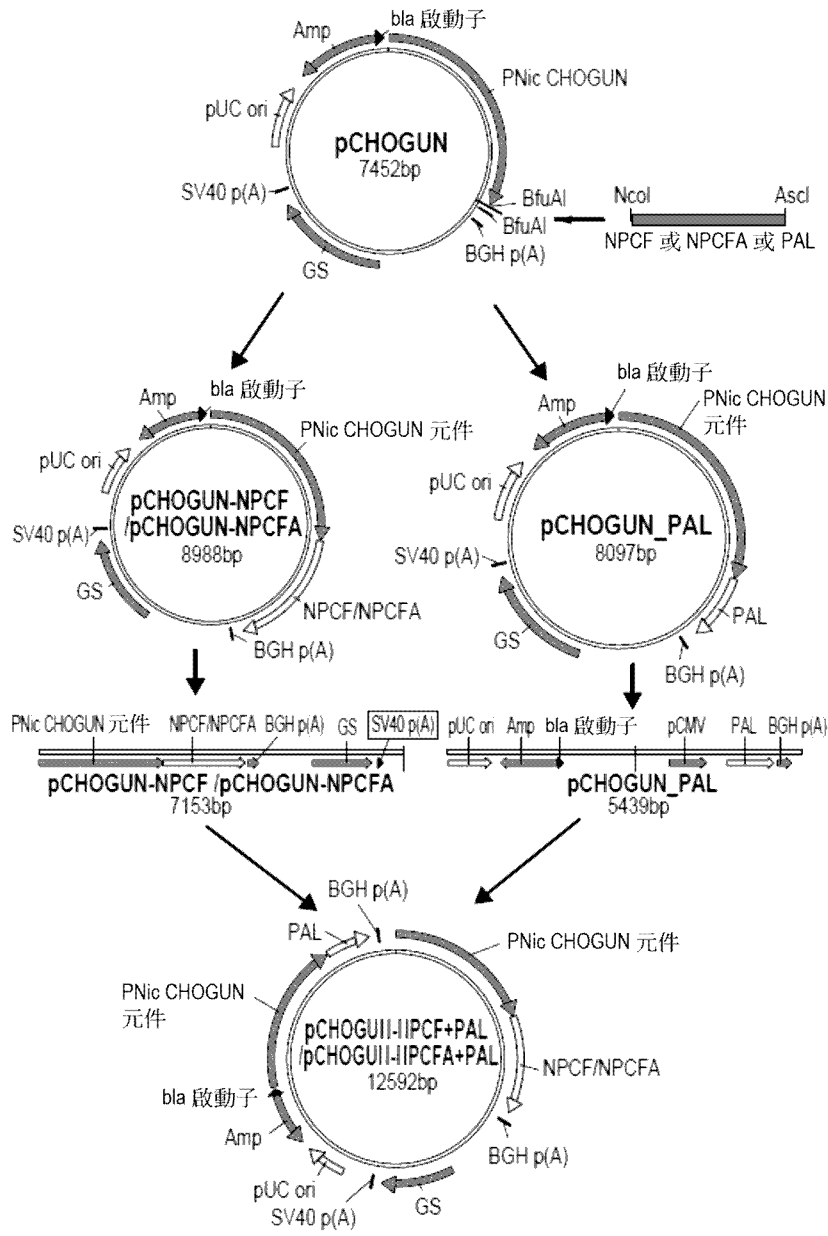
用神經調節蛋白-1 融合蛋白治療纖維化及心律不整的方法

(57)摘要

本發明係關於一種重組融合蛋白，其包含與 HER3 單株抗體(mAb)主鏈融合之心臟保護蛋白神經調節蛋白-1 (NRG-1)片段，且關於一種治療有需要之個體之心房震顫及/或心臟纖維化的方法，其包含投與治療有效量之本文所揭示之重組融合蛋白或包含重組融合蛋白之醫藥組成物。

The present invention relates to a recombinant fusion protein comprising a fragment of the cardioprotective protein neuregulin-1 (NRG-1) fused to a HER3 monoclonal antibody (mAb) backbone and to a method of treating atrial fibrillation and/or cardiac fibrosis 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：



【圖 1】



【發明摘要】

【中文發明名稱】

用神經調節蛋白－1融合蛋白治療纖維化及心律不整的方法

【英文發明名稱】

METHODS OF TREATING FIBROSIS AND ARRHYTHMIA WITH A NEUREGULIN-1 FUSION PROTEIN

【中文】

本發明係關於一種重組融合蛋白，其包含與HER3單株抗體(mAb)主鏈融合之心臟保護蛋白神經調節蛋白-1(NRG-1)片段，且關於一種治療有需要之個體之心房震顫及/或心臟纖維化的方法，其包含投與治療有效量之本文所揭示之重組融合蛋白或包含重組融合蛋白之醫藥組成物。

【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 HER3 monoclonal antibody (mAb) backbone and to a method of treating atrial fibrillation and/or cardiac fibrosis 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】圖 1

【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】

用神經調節蛋白 - 1 融合蛋白治療纖維化及心律不整的方法

【英文發明名稱】

METHODS OF TREATING FIBROSIS AND ARRHYTHMIA WITH A NEUREGULIN-1 FUSION PROTEIN

【技術領域】

【0001】本發明為關於用神經調節蛋白 -1 融合蛋白治療纖維化及心律不整的方法。

相關申請案之交叉參考

【0002】本申請案主張於 2022 年 3 月 15 日提交之美國臨時申請案第 63/319,886 號及於 2022 年 12 月 1 日提交之美國臨時申請案第 63/385,705 號之優先權及權益，該等臨時申請案各自的內容以全文引用之方式併入本文中。

序列表以引用之方式併入

【0003】本申請案含有序列表，其已經由 EFS-Web 以 XML 格式提交且特此以全文引用之方式併入。該 XML 複本創建於 2023 年 3 月 12 日，命名為 SBTI-003-001WO_SeqList_ST26.; xml，大小為 24,646 位元組。

【 先前技術 】

【 0004 】 神經調節蛋白 (NRG；調蛋白，HRG)，亦稱為神經膠質生長因子 (GGF) 及新分化因子 (NDF)，係一類糖蛋白，分子量為 44 KD。NRG 蛋白家族有四個成員：NRG-1、NRG-2、NRG-3 及 NRG-4。NRG (包括 NRG-1) 在心臟發育中發揮特別重要的作用。作為 ErbB 家族酪胺酸激酶受體的配體，NRG-1 直接與膜結合型 ErbB3 或 ErbB4 結合，誘導二聚化產生 ErbB2/ErbB4、ErbB2/ErbB3、ErbB3/ErbB3 及 ErbB4/ErbB4 複合物，以及後續細胞內信號傳導。在動物模型中，NRG 之表現誘導旁分泌信號傳導，以在胚胎發生期間促進心臟組織的生長及分化，而缺失 ErbB2、ErbB4 或 NRG-1 中之任一者均會導致胚胎致死。此外，阻斷 ErbB2 受體信號傳導之癌症療法已被證明具有顯著的心臟毒性副作用，表明在人類中 ErbB2 介導之信號傳導不僅對於發育至關重要，且對於健康心臟組織之穩態亦為至關重要的。

【 0005 】 證據亦顯示，NRG-1 信號轉導在其他器官系統之發育及功能以及人類疾病 (包括精神分裂症及頭頸癌) 之發病機制中發揮作用。NRG-1 有許多異構體。對基因突變小鼠 (基因剔除小鼠) 之研究表明，具有不同 N 端區或 EGF 樣域之異構體具有不同的活體內功能。本發明係基於 NRG-1 β a2 同功異型物。

【 0006 】 內源性 NRG-1 結合於 ErbB3 (HER3) 及 ErbB4

(HER4)且經由兩者誘導信號傳導。許多臨床前及臨床研究已顯示NRG-1在各種心血管適應症中之治療潛力，主要經由其與心肌細胞表現之ErbB4 (HER4)的相互作用。然而，三個關鍵因素限制重組人類NRG-1 (rhNRG-1)之臨床應用及效用。第一，NRG-1經由HER3之信號傳導可能會促進癌症的發展及/或進展，從而引起對需要長期投藥或無嚴重心血管(CV)風險因素之應用的重大關注。第二，NRG-1過度活化HER3可能會破壞胃腸道(GI)上皮完整性及穩態，導致嚴重的GI毒性，從而失去NRG-1之治療窗口。第三，rhNRG-1之兩個臨床階段活性蛋白片段均顯示短半衰期，表明可能需要繁重的給藥及投藥方案來達成所需的治療暴露水準。因此，需要提供一種基於NRG-1之治療劑，其在各種心血管適應症中保持臨床上顯著的治療潛力，但具有較低的腫瘤形成或促進癌症進展之風險、較佳的GI耐受性及更有利的藥物動力學(PK)概況。

【0007】 本發明藉由提供一種包含rhNRG-1活性域與HER3特異性拮抗劑抗體之融合物的重組蛋白來解決此等需求：HER3信號傳導以減輕rhNRG-1之致癌風險及GI毒性的方式經阻斷，同時抗體主鏈型式賦予典型單株抗體之分子半衰期，使產品之給藥及投藥更加方便。

【發明內容】

【0008】 本發明提供治療個體之心房震顫及/或心臟纖維化的方法，其包含向該個體投與包含與單特異性

ErbB3 (HER3)單株抗體 (mAb)融合之神經調節蛋白 -1 (NRG-1)片段的重組融合蛋白。在一些具體例中，心臟纖維化包含心房纖維化。

【0009】 本發明提供治療個體之心房震顫的方法，其包含向該個體投與包含與單特異性ErbB3 (HER3)單株抗體 (mAb)融合之神經調節蛋白 -1 (NRG-1)片段的重組融合蛋白。在一些具體例中，心房震顫與心房纖維化相關聯。

【0010】 本發明提供治療個體之心房纖維化的方法，其包含向該個體投與包含與單特異性ErbB3 (HER3)單株抗體 (mAb)融合之神經調節蛋白 -1 (NRG-1)片段的重組融合蛋白。

【0011】 本發明提供一種重組融合蛋白，其包含與單特異性ErbB3 (HER3)單株抗體 (mAb)融合之神經調節蛋白 -1 (NRG -1)片段，用於治療心房震顫及/或心臟纖維化的方法中。在一些具體例中，心臟纖維化包含心房纖維化。

【0012】 在本發明使用之方法或重組融合蛋白的一些具體例中，NRG-1片段包含NRG-1之活性域。在一些具體例中，NRG-1片段包含ERBB3/4結合域。在一些具體例中，NRG-1片段結合於ErbB4 (HER4)且經由其誘導信號傳導。在一些具體例中，mAb抑制經由ErbB3 (HER3)之NRG-1信號傳導。在一些具體例中，NRG-1片段包含NRG-1 β 2a同功異型物。

【0013】 在本發明使用之方法或重組融合蛋白的一些具體例中，NRG-1片段經由其N端胺基酸與抗體重鏈之C端

使用連接子融合。在一些具體例中，連接子包含SEQ ID NO: 5中所列之Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser連接子的至少一個複本。在一些具體例中，抗體重鏈之C端包含抗體之Fc域。在一些具體例中，單株抗體經醣基化。

【0014】 在本發明使用之方法或重組融合蛋白的一些具體例中，NRG-1片段包含SEQ ID NO: 4之胺基酸序列。在一些具體例中，mAb包含SEQ ID NO: 2之重鏈胺基酸序列。在一些具體例中，mAb包含SEQ ID NO: 3之輕鏈胺基酸序列。在一些具體例中，mAb包含SEQ ID NO: 2之胺基酸234、239及434中之至少一者的取代突變。在一些具體例中，至少一個取代突變包含L234F突變、S239A突變、N434A突變或其組合。在一些具體例中，重組融合蛋白包含SEQ ID NO: 3及SEQ ID NO: 14之胺基酸序列。

【0015】 在本發明使用之方法或重組融合蛋白的一些具體例中，相對於重組NRG-1之信號誘導潛力，重組融合蛋白促進HER2/4信號傳導超過HER2/3信號傳導。在一些具體例中，重組融合蛋白促進個體之心肌細胞或心臟組織的增殖、分化及存活。在一些具體例中，相對於重組NRG-1，重組融合蛋白減弱腫瘤或癌症細胞之增殖。

【0016】 在本發明使用之方法或重組融合蛋白的一些具體例中，投與重組融合蛋白減少心房震顫發作的持續時間，或降低心房震顫發生的頻率。在一些具體例中，投與重組融合蛋白減少心房震顫或心房纖維化之徵象或症狀。

在一些具體例中，心房震顫之症狀包含心跳不規則、心悸、頭暈、極度疲勞、呼吸短促、胸痛或其組合。在一些具體例中，心房纖維化之徵象包含膠原蛋白沉積，而投與重組融合蛋白減少心房組織中之膠原蛋白沉積。

【0017】 在一些具體例中，NRG-1結合於ErbB4 (HER4)且經由其誘導信號傳導。在一些具體例中，mAb抑制經由ErbB3 (HER3)之NRG-1信號傳導。

【0018】 本發明提供一種套組，其包含有效量之本發明之重組融合蛋白或包含本發明之重組融合蛋白之醫藥組成物。

【0019】 本發明提供一種重組融合蛋白，其包含與單特異性ErbB3 (HER3)單株抗體(mAb)融合之神經調節蛋白-1 (NRG-1)片段，用於製造用於治療心房震顫及/或心臟纖維化之藥物。

【0020】 本發明之其他特徵及優點將自以下實施方式之實例及圖式變得顯而易見。然而，應理解，實施方式及具體實施例在指示本發明之具體例的同時僅以說明的方式給出，因為本發明之精神及範疇內的各種變化及修飾對於熟悉本技藝者而言將自此實施方式變得顯而易見。

【圖式簡單說明】

【0021】 當結合隨附圖式時，參考以下實施方式及隨附申請專利範圍，對本發明之各種目標及優點以及更完整理解顯而易見且更易於瞭解，其中：

【0022】[圖1]顯示用於表現本文所揭示之重組融合蛋白之表現質體的構築。

【0023】[圖2A]繪示本發明之抗HER3 mAb/NRG-1融合蛋白的分子示意圖。

【0024】[圖2B]顯示SDS-PAGE分析生成的代表性資料。

【0025】[圖2C]顯示藉由對NRG-1(「NRG-1」, R&D Systems, Minneapolis, MN)之包含HER3/4結合域之61個胺基酸的活性片段具有特異性之初級抗體偵測到的西方墨點法結果。

【0026】[圖2D]顯示藉由對IgG具有特異性之初級抗體偵測到的西方墨點法結果。

【0027】[圖3]繪示結合分析，顯示本文所揭示之重組融合蛋白結合於HER3蛋白(曲線1，步驟2)且可同時結合抗NRG-1抗體(曲線1，步驟3)。請注意，Fc突變被引入本文所揭示之重組融合蛋白中，以剔除編碼HER3特異性抗體之親本抗體序列的Fc效應功能，其可能會減輕對表現HER3受體之正常組織的不期望的細胞毒性。

【0028】[圖4A至4D]顯示的代表圖顯示用抗HER3 mAb/NRG-1融合蛋白或對照處理之不同癌細胞株的平均相對生長率 \pm SEM (n=3)。圖4A顯示NCI-N87胃癌細胞株之平均相對生長率。圖4B顯示MCF-7乳癌細胞株之平均相對生長率。圖4C顯示RT-112膀胱癌細胞株之平均相對生長率。圖4D顯示T47D乳癌細胞株之平均相對生長率。與對

照 NRG-1 肽及 GP120 mAb/NRG-1 融合蛋白相比，本文提供之重組融合蛋白在促進癌細胞增殖方面表現出明顯較低的活性。

【0029】 [圖 5A 至 5B] 繪示儘管癌細胞生長潛力降低，但本文提供之重組融合蛋白完全保留在心肌細胞中誘導 PI3K/AKT 信號傳導之能力 - 顯示與重組 NRG-1 及 GP120 mAb/NRG-1 融合蛋白之活性相當。圖 5A 為顯示用本發明之重組融合蛋白及對照處理之人類心肌細胞中磷酸-AKT (pAKT) 與總 AKT (tAKT) 之相對比率相對於抗體濃度 (nM) 的圖。圖 5B 為用本發明之重組融合蛋白及對照處理之人類心肌細胞中 AKT 磷酸化的西方墨點分析。

【0030】 [圖 6A 至 6C] 顯示在本文所揭示之重組融合蛋白及對照存在下 HER2/4 及 HER2/3 二聚化的直接比較。圖 6A 顯示用於偵測配體誘導之二聚化的分析原理。由 Eurofins DiscoverX (Fremont, CA) 開發之 PathHunter Dimerization Assay 用於偵測配體誘導之受體-二聚體對之兩個次單元的二聚化。 β -gal 酶分成兩個片段，亦即 ProLink (PK) 及酶受體 (EA)。細胞已經工程改造以共表現與酶供體 PK 融合之目標蛋白 1 及與酶受體 EA 融合之目標蛋白 2。配體與一個目標蛋白之結合誘導其與另一個目標蛋白相互作用，迫使兩個酶片段互補且導致酶反應釋放化學發光信號，該信號以相對螢光單位或 RFU 偵測。圖 6B 為繪示本文提供之重組融合蛋白可與 NRG-1 效力相當地誘導 HER2/HER4 二聚化的圖。圖 6C 為繪示本文提供之重組融

合蛋白誘導HER2/HER3二聚化之效力顯著低於NRG-1的圖。此等發現進一步驗證本文提供之重組融合蛋白保留NRG-1之全部HER2/4信號傳導潛力，同時顯著減少HER2/3信號傳導誘導。

【0031】[圖7]繪示本發明之抗HER3 mAb/NRG-1融合蛋白對包括人類、猴、大鼠及小鼠之不同物種之HER3抗原的結合親和力。藉由BIAcore分析確定之平衡解離速率(KD)分別為 3.13×10^{-10} (人類)、 3.97×10^{-10} (猴)、 2.68×10^{-9} (大鼠)及 2.77×10^{-9} (小鼠)。此等資料表明，本發明之重組融合蛋白對人類及猴HER3具有相似的結合親和力，而其對啮齒類動物(大鼠及小鼠)HER3之親和力降低大約一個數量級。

【0032】[圖8]為繪示重組融合蛋白對由冠狀動脈結紮誘導之收縮性心臟衰竭大鼠模型的射血分數(EF)之影響的圖。

【0033】[圖9A至9F]為一系列6張影像，顯示由冠狀動脈結紮誘導之收縮性心臟衰竭大鼠模型中心肌結構的組織病理學變化。收集手術部位附近的心臟組織且在4%甲醛中固定，隨後製備石蠟切片且用H&E染色。圖9A顯示假手術對照大鼠之心臟組織。圖9B顯示用媒劑對照處理之收縮性心臟衰竭模型大鼠的心臟組織。圖9C顯示用GP120 mAb/NRG-1 (10 mg/kg)處理之收縮性心臟衰竭模型大鼠的心臟組織。圖9D顯示用抗HER3 mAb/NRG-1 (1 mg/kg)處理之收縮性心臟衰竭模型大鼠的心臟組織。圖9E顯示用抗

HER3 mAb/NRG-1 (3 mg/kg)處理之收縮性心臟衰竭模型大鼠的心臟組織。圖 9F 顯示用抗 HER3 mAb/NRG-1 (10 mg/kg)處理之收縮性心臟衰竭模型大鼠的心臟組織。

【0034】[圖 10]為繪示使用 NOD/SCID 小鼠皮下 FaDu 癌異種移植模型評估活體內抗腫瘤活性的圖。

【0035】[圖 11]為繪示用本發明之重組融合蛋白及對照處理之腫瘤小鼠之體重變化的圖。

【0036】[圖 12]為繪示重組融合蛋白在食蟹獼猴(獼猴)中之藥物動力學概況的圖。

【0037】[圖 13A]顯示描繪活體外誘導大鼠心房組織樣本纖維化之纖維化分析的圖。

【0038】[圖 13B]顯示描繪在圖 13A 中所描繪之分析中不存在例示性 NRG-1/HER3 抗體融合蛋白的情況下誘導 I 型膠原蛋白的圖。x 軸描繪取樣日。y 軸描繪 I 型膠原蛋白之 mRNA 表現 (I 型膠原蛋白 $\alpha 1$ 鏈或 *Colla1*, mRNA), 表示為存在的 *Colla1* mRNA 相較於在分析第 1 天存在的 *Colla1* mRNA 水準的倍數變化。

【0039】[圖 13C]顯示描繪在圖 13A 中所描繪之分析中不存在例示性 NRG-1/HER3 抗體融合蛋白的情況下誘導 III 型膠原蛋白的圖。x 軸描繪取樣日。y 軸描繪 III 型膠原蛋白之 mRNA 表現 (III 型膠原蛋白 $\alpha 1$ 鏈 1 或 *Col3a1*, mRNA), 表示為存在的 *Col3a1* mRNA 相較於在分析第 1 天存在的 *Col3a1* mRNA 水準的倍數變化。

【0040】[圖 14A]顯示描繪在圖 13A 中所描繪之分析中

NRG-1/HER3 抗體融合蛋白 (NRG-1/HER3) 對 I 型膠原蛋白誘導之影響的圖。x 軸描繪取樣日。y 軸描繪在不存在 NRG-1/HER3 之情況下 I 型膠原蛋白之 mRNA 表現，表示為存在的 *Colla1* mRNA 相較於在分析第 2 天存在的 *Colla1* mRNA 水準的倍數變化。

【0041】 [圖 14B] 顯示描繪在圖 13A 中所描繪之分析中 NRG-1/HER3 抗體融合蛋白 (NRG-1/HER3) 對 III 型膠原蛋白誘導之影響的圖。x 軸描繪取樣日。y 軸描繪在不存在 NRG-1/HER3 之情況下 III 型膠原蛋白之 mRNA 表現，表示為存在的 *Col3a1* mRNA 相較於在分析第 2 天存在的 *Col3a1* mRNA 水準的倍數變化。

【0042】 [圖 15] 顯示描繪在圖 16 及圖 18 中所描繪之活體內實驗模型中使用經頸靜脈八極導管之程式化電刺激 (PES) 量測心房震顫 (AF) 誘導性的圖。

【0043】 [圖 16] 顯示描繪量測活體內心房震顫之血管收縮素 II (Ang-II) 誘導之高血壓小鼠模型的圖。

【0044】 [圖 17A] 顯示描繪 NRG-1/HER3 抗體融合蛋白對圖 16 中所描繪之模型中總 AF 持續時間之影響的圖。x 軸描繪處理條件：CTRL，假處理對照；ANG II + 媒劑，僅媒劑對照，ANG II + NRG-1/HER3，用 NRG-1/HER3 抗體融合蛋白處理之具有 ANG II 誘導之高血壓的動物。y 軸描繪以秒 (s) 為單位之時間。

【0045】 [圖 17B] 顯示描繪 NRG-1/HER3 抗體融合蛋白對圖 16 中所描繪之模型中 AF 誘導性之影響的圖。x 軸描繪

處理。y軸描繪具有AF之小鼠的百分比。

【0046】[圖18]顯示描繪第二心房震顫(AF)模型的圖，其中小鼠不飼餵高脂肪飲食。

【0047】[圖19A]顯示描繪圖18中所描繪之模型中三組小鼠隨時間推移之體重的圖。x軸描繪以週(W)為單位之時間。y軸描繪體重。CTRL：未飼餵高脂肪飲食且用單獨媒劑對照處理之小鼠；HFD+媒劑：飼餵高脂肪飲食且用單獨媒劑對照之小鼠；HFD+NRG-1/HER3，飼餵高脂肪飲食且用NRG-1/HER3抗體融合蛋白處理之小鼠。

【0048】[圖19B]顯示描繪NRG-1/HER3抗體融合蛋白對圖18中所描繪之代謝症候群模型隨時間推移之總體重之影響的圖。x軸描繪以週(W)為單位之時間。y軸描繪體重的變化。

【0049】[圖19C]顯示描繪NRG-1/HER3抗體融合蛋白對圖18中所描繪之模型中葡萄糖耐量之影響的圖。x軸描繪注射20%葡萄糖後的時間。y軸描繪以mg/dL為單位之血糖濃度。

【0050】[圖20A]顯示描繪NRG-1/HER3抗體融合蛋白對圖18中所描繪之代謝症候群模型中不規則房性心律失常之總持續時間之影響的圖。x軸描繪處理條件：WT，野生型，無高脂肪飲食且僅注射媒劑；HFD+媒劑：飼餵高脂肪飲食且用單獨媒劑對照之小鼠；HFD+NRG-1/HER3，飼餵高脂肪飲食且用NRG-1/HER3抗體融合蛋白處理之小鼠。y軸描繪以秒(s)為單位之時間。

【0051】 [圖 20B]顯示描繪 NRG-1/HER3 抗體融合蛋白對圖 18 中所描繪之代謝症候群模型中心律不整誘導性之影響的圖。x 軸描繪處理條件：CTRL：未飼餵高脂肪飲食且用單獨媒劑對照處理之小鼠；HFD+媒劑：飼餵高脂肪飲食且用單獨媒劑對照之小鼠；HFD+NRG-1/HER3，飼餵高脂肪飲食且用 NRG-1/HER3 抗體融合蛋白處理之小鼠。y 軸描繪具有經誘導之 AF 之小鼠的百分比。

【0052】 [圖 21A 至 21F] 為一系列影像，顯示來自收縮性心臟衰竭 (或射血分數降低的心臟衰竭，HFrEF) 模型大鼠之心臟組織的膠原蛋白 I 免疫組織化學染色 (實施例 7)。大鼠用假手術 (圖 21A) 處理，或用手術及單獨的媒劑 (圖 21B)、GP120-NRG-1 抗體融合蛋白 (圖 21C)、1 mg/kg NRG-1/HER3 抗體融合蛋白 (圖 21D)、3 mg/kg NRG-1/HER3 抗體融合蛋白 (圖 21E) 或 10 mg/kg NRG-1/HER3 抗體融合蛋白 (圖 21F) 處理。

【0053】 [圖 22] 為顯示用於測試 NRG-1/HER3 抗體融合蛋白在乙酸去氧皮質固酮 (醛固酮促效劑) 誘導之高血壓及心房纖維化 Aachener 小型豬模型中之效果的實驗設計的圖。

【0054】 [圖 23] 顯示來自 DOCA 模型小型豬之一對心電圖 (ECG) 及一個方程式。頂部 ECG 為代表性 ECG，其中 50 Hz 短陣快速起搏誘導心房震顫。底部 ECG 為代表性 ECG，其中 50 Hz 短陣快速起搏未誘導心房震顫。該方程式顯示 ECG 資料如何用於計算心房震顫誘導性。

【0055】[圖 24]為顯示對照、DOCA+媒劑(VEH)及 DOCA+NRG-1/HER3 小型豬之平均心房壓力(以 mmHg 為單位，y 軸)的圖。

【0056】[圖 25]為顯示對照、DOCA+媒劑及 DOCA+NRG-1/HER3 小型豬之心房震顫(AF)誘導性的圖。AF 誘導性如圖 23 中所示計算。

【0057】[圖 26]為顯示對照、DOCA+媒劑及 DOCA+NRG-1/HER3 小型豬之心房纖維化程度的圖(左)及三個代表性影像(右)。

【實施方式】

【0058】本發明利用一種重組融合蛋白，其包含單株抗體與神經調節蛋白-1 蛋白同功異型物之活性片段融合的融合物，適用於多種心血管及中樞神經系統(CNS)適應症。

定義

【0059】除非另外定義，否則本文中所用之技術及科學術語具有與本發明所屬領域之一般熟悉本技藝者通常理解的相同含義。

【0060】為了解釋本說明書，以下定義將適用，且只要適當，單數使用的術語亦包括複數，反之亦然。若下述任何定義與以引用之方式併入本文的任何文件相衝突，則以下列定義為準。

【0061】「神經調節蛋白或神經調節蛋白類似物」為可活化 ErbB2/ErbB4 或 ErbB2/ErbB3 異二聚體蛋白質酪胺酸激酶之分子，諸如所有神經調節蛋白同功異型物、單獨的神經調節蛋白 EGF 域、神經調節蛋白突變體及亦活化上述受體之任何種類的神經調節蛋白樣基因產物。本發明中使用之較佳「神經調節蛋白」為含有 EGF 樣域及受體結合域之人類神經調節蛋白 1 β2 同功異型物的多肽片段。在一個具體例中，神經調節蛋白片段為活性片段。神經調節蛋白-1 (NRG-1) 及其同功異型物在此項技術中亦稱為神經調節蛋白 1 (NRG1)、神經膠質生長因子 (GGF)、調蛋白 (HGL)、HRG、新分化因子 (NDF)、ARIA、GGF2、HRG1、HRGA、SMDF、MST131、MSTP131 及 NRG1 內含子轉錄物 2 (NRG1-IT2)。

【0062】術語「ErbB3」、「ErbB3 (HER3)」、「HER3」係指相同蛋白質(或在提及時指相同基因)且在本文中可互換使用。在一些具體例中，重組融合物包含對 ErbB3 具有特異性之單株抗體部分。ErbB3 (erb-b2 受體酪胺酸激酶 3) 在此項技術中亦稱為 FERLK、LCCS2、ErbB-3、c-erbB3、erbB3-S、MDA-BF-1、c-erbB-3、p180-ErbB3、p45-sErbB3 及 p85-sErbB3。

【0063】在一個具體例中，術語「ErbB4」、「ErbB4 (HER4)」、「HER4」係指相同蛋白質(或在提及時指相同基因)且在本文中可互換使用。ErbB4 (erb-b2 受體酪胺酸激酶 4) 在此項技術中亦稱為 ALS19 及 p180erbB4。

【0064】在一個具體例中，術語「ErbB2」、「ErbB2 (HER2)」、「HER2」係指相同蛋白質(或在提及時指相同基因)且在本文中可互換使用。ErbB2 (erb-b2受體酪胺酸激酶2)在此項技術中亦稱為NEU、NGL、TKR1、CD340、HER-2、MLN 19及HER-2/neu。

【0065】如本文所用，術語「活性」係指具有生物活性或生物功能之片段。在一些具體例中，活性等於或接近於野生型蛋白質之活性。

【0066】如本文所用，術語「個體」包括但不限於哺乳動物，包括例如人類、非人類靈長類動物(例如猴)、小鼠、豬、牛、山羊、兔、大鼠、天竺鼠、倉鼠、馬、猴、羊或其他非人類哺乳動物；非哺乳動物，包括例如非哺乳動物脊椎動物，諸如鳥(例如雞或鴨)或魚類；及非哺乳動物無脊椎動物。在一些具體例中，本發明之方法及組成物用於治療(預防性及/或治療性)非人類動物。術語「個體」亦可指患者，亦即等待或接受醫療護理之個體。

【0067】本文中之術語「醫藥組成物」意指適用於個體(包括動物或人類)之醫藥用途的組成物。醫藥組成物一般包含有效量之活性劑(例如本發明之重組融合蛋白)及醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑(例如緩衝劑、佐劑或其類似物)。

【0068】術語「有效量」意指足以產生期望結果之劑量或量。期望結果可包含該劑量或量之接受者的客觀或主觀改善(例如長期存活、腫瘤之數目及/或尺寸減少、疾病

狀態之有效預防等)。

【0069】「預防性治療」為向未顯示疾病、病理或醫學病症之徵象或症狀或僅顯示疾病、病理或病症之早期徵象或症狀的個體投與的治療，使得治療係出於減少、預防或降低罹患疾病、病理或醫學病症之風險之目的投與。預防性治療起針對疾病或病症之預防性治療的作用。「預防活性」為藥劑(諸如本發明之重組融合蛋白或其組成物)之活性，當向未顯示病理、疾病或病症之徵象或症狀(或僅顯示病理、疾病或病症之早期徵象或症狀)的個體投與時，減少、預防或降低個體罹患病理、疾病或病症之風險。「預防上有用的」藥劑或化合物(例如本發明之重組融合蛋白)係指可用於減少、預防、治療或降低病理、疾病或病症之發展的藥劑或化合物。

【0070】「治療性治療」為向顯示病理、疾病或病症之症狀或徵象之個體投與的治療，其中向個體投與治療之目的為減少或消除彼等病理、疾病或病症之徵象或症狀。「治療活性」為藥劑(諸如本發明之重組融合蛋白或其組成物)之活性，當向罹患病理、疾病或病症之徵象或症狀之個體投與時，消除或減輕此類徵象或症狀。「治療上有用的」藥劑或化合物(例如本發明之重組融合蛋白)指示藥劑或化合物可用於減輕、治療或消除病理、疾病或病症之此類徵象或症狀。

【0071】除非另外指明，否則如本文所用，術語「治療癌症」意指部分或完全逆轉、緩解、抑制進展或防止個

體之腫瘤生長、腫瘤轉移或其他致癌或贅生性細胞。除非另外指明，否則如本文所用，術語「治療」係指治療之行為。

【0072】 除非另外指明，否則如本文所用，術語「治療心血管疾病」意指部分或完全預防、抑制、遏制、延遲、逆轉或緩解個體之心血管疾病或病況的發作，或個體預先存在的心血管疾病或病況或其症狀的進展。可藉由本發明方法治療之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相關之再灌注損傷、化學療法誘導之心臟毒性(成人或兒童)、輻射誘發之心臟毒性、小兒先天性心臟病手術干預之輔助治療及心房纖維化。心血管疾病症狀之非限制性實例包括呼吸短促、咳嗽、體重迅速增加、腿部、踝部及腹部腫脹、頭暈、疲勞、虛弱、眩暈、胸痛、昏厥(暈厥)、心搏過速、心搏過緩及心律不整，諸如心房震顫。判定心血管疾病進展及治療有效性之方法對與一般熟悉本技藝者將為顯而易見的。例如，各種心血管疾病之進展可藉由射血分數、心電圖(ECG)、動態心電圖、心動回聲圖、壓力測試、心臟導管插入術、心臟電腦化斷層掃描(CT)掃描及心臟磁共振成像(MRI)來判定。

【0073】 如本文所用，「纖維化」係指細胞外基質(ECM)組分例如膠原蛋白之不適度形成及沉積。ECM通常圍繞實質細胞，且支持其遷移、分化、增殖及正常功能。

纖維化ECM會損害組織穩態，且可能由於結構完整性的喪失及異常重塑而導致器官功能障礙。纖維化之特徵在於纖維母細胞的增殖，其可分化為分泌ECM蛋白之肌纖維母細胞。「心臟纖維化」一般係指心臟的纖維化，且包括心房纖維化，以及影響心臟其他區域之纖維化，諸如但不限於心室、心肌、心包、心內膜及瓣膜。

【0074】在心臟中，置換性或修復性纖維化發生在心臟損傷後，且與心肌細胞死亡及用纖維化疤痕組織置換壞死性心肌區域相關。在反應性纖維化中，膠原蛋白及其他ECM蛋白在圍繞心臟細胞及血管之間質空間中的沉積增加，導致此空間擴大，而沒有置換受傷或死亡的心肌細胞。

【0075】如本文所用，「心房纖維化」係指心房的纖維化。心房纖維化與心房震顫(AF)密切相關，心房震顫係人類最常見的心律失常之一在不希望受理論束縛的情況下，認為心房纖維化會導致通過心房的異常電傳導，從而導致心房震顫。纖維化可藉由此項技術中已知的任何適合手段偵測，包括但不限於DE-MR成像(MRI)、循環生物標誌物(例如泌乳素-3、MMP-3、MMP-9、高敏心肌肌鈣蛋白T、骨橋蛋白、抑制致瘤性2、結締組織生長因子(CTGF)、抵抗素(RETN)、骨膜蛋白及中段心房利鈉肽前體，以及微RNA，諸如miRNA-15、miR-21、miR-29c、miR-328、miR-30a、miR-214、miR-503及miR-133a)及電解剖電壓圖。

【0076】如本文所用，「心律不整」係指不規則的心跳，且包括心搏過速(異常快速的心跳)及心搏過緩(異常緩慢的心跳)。心房震顫(AF)為一種不規則且通常非常快速的心律，可導致心臟血栓。在AF中，心房的正常跳動為不規則的，阻礙自心房至心室的血液流動。AF可為急性或慢性的。AF可依據AF發作之持續時間及在給定單位時間內發生的發作次數(例如AF/發作/天、週或月)來評定。陣發性AF突然開始且在7天內自發結束。相反，持續性AF發生超過7天，且自發或藉由治療結束。長期持續性AF係指一年以上不間斷的AF。永久性AF係指儘管進行恢復正常竇性心律的治療，但AF仍持續存在。AF之症狀包括心跳不規則、心悸、頭暈、極度疲勞、呼吸短促及胸痛。

【0077】除非另外指明，否則如本文所用，術語「治療中樞神經系統(CNS)相關疾病」意指部分或完全預防、抑制、遏制、延遲、逆轉或緩解個體之CNS相關疾病或病況發作的方法。術語「治療CNS相關疾病」亦可意指逆轉、減緩或以其他方式緩解預先存在的CNS相關疾病或病況或其症狀。可用本發明方法治療之CNS相關疾病或病況的例示性但非限制性實例包括肌萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)、帕金森氏病(Parkinson's disease)、阿茲海默氏病(Alzheimer's Disease)、貝爾氏麻痺(Bell's Palsy)、癲癇及癲癇發作、格林-巴利症候群(Guillain-Barre Syndrome)、中風、創傷性腦損傷、多發性硬化症或組合。治療CNS相關疾病可改善或預防症狀，諸如震顫、運動徐緩、肌肉僵

硬、失去平衡、姿勢受損、語言改變、運動控制喪失、癱瘓、吞嚥困難、肌肉痙攣、癲癇發作、記憶喪失及意識模糊。

【0078】術語「一致」或「一致性百分比」在兩個或更多個核酸或多肽序列之上下文中，係指兩個或更多個序列或子序列在比較及比對以獲得最大對應關係時相同或具有特定百分比的核苷酸或胺基酸殘基相同。為了確定一致性百分比，為了最佳比較目的對序列進行比對(例如，可在第一胺基酸或核酸序列之序列中引入空位以與第二胺基酸或核酸序列進行最佳比對)。隨後比較相應的胺基酸位置或核苷酸位置的胺基酸殘基或核苷酸。當第一序列中之位置被與第二序列中之對應位置相同的胺基酸殘基或核苷酸佔據時，則分子在該位置處一致。兩個序列之間的一致性百分比為序列共享的相同位置數的函數(亦即一致性% = 一致位置數/總位置數(例如重疊位置)×100)。在一些具體例中，兩個序列長度相同。

【0079】術語「實質上一致」在兩個核酸或多肽之上下文中，係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%一致性或至少99%一致性(例如，使用下文所述方法之一判定)。

【0080】如本文所用，術語「結合」、「特異性結合於」或「對……具有特異性」係指可量測及可再現的相互作用，諸如目標與抗體之間的結合，其決定在包括生物分

子在內的異質分子群體存在下存在目標。例如，特異性結合於目標(其可為抗原決定基)之抗體為與結合其他目標相比以更大的親和力、親合力、更容易及/或更長的持續時間結合此目標的抗體。在一個具體例中，抗體與不相關目標的結合程度小於該抗體與目標之結合的約10%，例如藉由放射免疫分析法(RIA)所量測。在某些具體例中，特異性結合於目標之抗體的解離常數(Kd) < 1 μ M、< 100 nM、< 10 nM、< 1 nM或< 0.1 nM。

【0081】 在某些具體例中，抗體特異性結合於蛋白質上之抗原決定基，該抗原決定基在來自不同物種的蛋白質中為保守的。在另一個具體例中，特異性結合可包括但不要求排他性結合。

【0082】 如在本說明書中所用，單數形式「一(a)」、「一(an)」及「該」包括複數個提及物，除非上下文另外明確規定。因此，例如，提及「神經調節蛋白」或「神經調節蛋白肽」包括此類神經調節蛋白、神經調節蛋白同功異型物及/或神經調節蛋白樣多肽之混合物。提及「調配物」或「方法」包括本文所述類型之一或多個調配物、方法及/或步驟，及/或在熟悉本技藝者閱讀本發明後將變得顯而易見。

【0083】 術語「多肽」係指胺基酸之聚合物及其等效物，而非指特定長度的產物；因此，「肽」及「蛋白質」均包括在多肽的定義內。多肽之定義中亦包括如本文所定義之「抗體」。「多肽區」係指多肽之區段，該區段可含

有例如一或多個域或模體(例如，抗體之多肽區可含有例如一或多個互補決定區(CDR))。術語「片段」係指多肽之一部分，較佳具有多肽之至少20個連續的或至少50個連續的胺基酸。

【0084】除非上下文另外指明，否則「衍生物」為相對於第二多肽具有一或多個非保守或保守胺基酸取代的多肽或其片段(亦稱為「變異體」)；或藉由共價連接第二分子，例如藉由連接異源多肽，或藉由醮基化、乙醮化、磷酸化及其類似物而經修飾之多肽或其片段。「衍生物」之定義中進一步包括例如含有一或多個胺基酸類似物(例如非天然胺基酸及其類似物)之多肽、具有未取代鍵聯以及此項技術中已知的天然及非天然存在之其他修飾之多肽。

【0085】「經分離」多肽為已經鑑別且自其自然環境之組分中分離及/或回收的多肽。其自然環境之污染組分為會干擾多肽之診斷或治療用途的材料，且可包括酶、激素及其他蛋白質或非蛋白質溶質。經分離多肽包括經分離抗體或其片段或衍生物。

【0086】如本文所用，術語「約」在數量上意指加或減5%，或在另一個具體例中，加或減10%，或在另一個具體例中，加或減15%，或在另一個具體例中，加或減20%。

【0087】除非另外定義，否則本文所用之所有技術及科學術語具有與本發明所屬領域之一般熟悉本技藝者通常理解的相同含義。雖然類似或等效於本文所述之彼等方法

及材料之任何方法及材料可用於本發明之實踐或測試中，但現在描述較佳方法及材料。本文提及之所有出版物均以引用之方式併入本文中，以揭示及描述參考文獻所引用的材料。

重組融合蛋白-抗體

【0088】 本發明利用一種重組融合蛋白，其包含單株抗體與神經調節蛋白-1蛋白質同功異型物之片段融合的融合物，用於多種心血管及神經適應症。在典型具體例中，抗體對ERBB3 (HER3)具有特異性。

【0089】 如本文所用，「抗體」係指包含一或多個實質上或部分由免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因之片段編碼之多肽的蛋白質。公認的免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 及 μ 恆定區基因，以及無數免疫球蛋白可變區基因。輕鏈分類為 κ 或 λ 。重鏈分類為 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ，其繼而分別定義免疫球蛋白類別IgG、IgM、IgA、IgD及IgE。典型的免疫球蛋白(例如抗體)結構單元包含四聚體。各四聚體由兩對相同的多肽鏈構成，各對具有一條「輕」鏈(約25 kD)及一條「重」鏈(約50-70 kD)。各鏈之N端定義約100至110個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)及可變重鏈(VH)分別係指此等輕鏈及重鏈。

【0090】 抗體以完整免疫球蛋白之形式存在，或以各種肽酶消化產生之許多特徵明確的片段形式存在。因此，

例如，胃蛋白酶消化鉸鏈區二硫鍵以下的抗體，產生 $F(ab')_2$ ，亦即 Fab 之二聚體，其本身為藉由二硫鍵接合至 $VH-CH1$ 之輕鏈。 $F(ab')_2$ 可在溫和條件下還原以破壞鉸鏈區中之二硫鍵，從而將 $F(ab')_2$ 二聚體轉化為 Fab' 單體。 Fab' 單體本質上為具有鉸鏈區之一部分的 Fab (參見 *Fundamental Immunology*, W. E. Paul 編, Raven Press, New York (1999), 關於其他抗體片段之更詳細描述)。儘管各種抗體片段係根據完整抗體之消化而定義，但熟悉本技藝者應瞭解，此類 Fab' 片段等可以化學方式或藉由使用重組 DNA 方法來從頭合成。因此，如本文所用，術語抗體亦包括藉由修飾全抗體產生或使用重組 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，其中可變重鏈及可變輕鏈接合在一起 (直接或經由肽連接子) 以形成連續多肽。抗體包括單域抗體，其包含由能夠選擇性地結合於抗原域之單個單體可變抗體域組成的抗體片段。例示性單域抗體包括 VHH 片段，其最初係自駱駝科分離。

【0091】 融合蛋白之抗體域可選地包含免疫球蛋白分子之全部或一部分，且可選地含有免疫球蛋白可變區 (亦即，疾病相關抗原之特異性區域) 之全部或一部分，且可選地包含由 V 基因及 / 或 D 基因及 / 或 J 基因編碼之區。

【0092】 如上文所闡述 (參見上文定義)，本文所用之抗體可選地包含 $F(ab)_2$ 、 $F(ab')_2$ 、 Fab 、 Fab' 、 $scFv$ 、單域抗體等，視具體例之具體要求而定。一些具體例利用包含

IgG域之融合蛋白。然而，其他具體例包含替代性免疫球蛋白，諸如IgM、IgA、IgD及IgE。此外，各種免疫球蛋白之所有可能的同型亦涵蓋在當前具體例內。因此，IgG1、IgG2、IgG3等均為本發明中使用之抗體-免疫刺激劑融合蛋白之抗體域中的所有可能分子。除了在選擇免疫球蛋白之類型及同型方面的選擇之外，本發明之不同具體例包含各種鉸鏈區(或其功能等效物)。此類鉸鏈區提供抗體-免疫刺激劑融合蛋白之不同域之間的可撓性。參見例如 Penichet 等人 2001 「Antibody-cytokine fusion proteins for the therapy of cancer」 J Immunol Methods 248:91-101。

【0093】 在一些具體例中，本發明之重組融合蛋白所包含的mAb對ErbB3 (HER3))具有單特異性。

【0094】 人類HER3 (ErbB-3、ERBB3、c-erbB-3、c-erbB3、受體酪胺酸蛋白激酶erbB-3)編碼受體酪胺酸激酶表皮生長因子受體(EGFR)家族的成員，其亦包括HER1 (亦稱為EGFR)、HER2及HER4 (Kraus, M.H.等人, PNAS 86 (1989) 9193-9197; Plowman, G.D.等人, PNAS 87 (1990) 4905-4909; Kraus, M.H.等人, PNAS 90 (1993) 2900-2904)。與原型表皮生長因子受體一樣，跨膜受體HER3由細胞外配體結合域(ECD)、ECD內之二聚化域、跨膜域、細胞內蛋白酪胺酸激酶域(TKD)及C端磷酸化域組成。此膜結合之HER3蛋白在細胞外域內具有調蛋白(HRG)結合域，但沒有活性激酶域。因此，其可結合此配體，但不能

經由蛋白質磷酸化將信號傳送至細胞中。然而，其確實與其他具有激酶活性之HER家族成員形成異二聚體。異二聚化導致受體介導之信號傳導路徑的活化及其細胞內域的轉磷酸化。HER家族成員之間的二聚體形成擴大HER3之信號傳導潛力，不僅為信號多樣化的手段，且亦為信號放大的手段。例如，HER2/HER3異二聚體經由HER家族成員中之PI3K及AKT路徑誘導最重要的細胞分裂信號之一 (Sliwkowski M.X.等人, J. Biol. Chem. 269 (1994) 14661-14665 ; Alimandi M等人, Oncogene. 10 (1995) 1813-1821 ; Hellyer, N.J., J. Biol. Chem. 276 (2001) 42153-4261 ; Singer, E., J. Biol.

【0095】在一個具體例中，人類ERBB3蛋白包含GenBank AAH02706.1中提供且在SEQ ID NO: 1中所列之以下胺基酸序列：

【0096】

MRANDALQVLGLLFSLARGSEVGN SQAVCPGTLNGLSVT
GDAENQYQTLYKLYERCEVVMGNLEIVLTGHNADLSFLQ
WIREVTGYVLVAMNEFSTLPLPNLRVVRGTQVYDGKFAIF
VMLNYNTNSSHALRQLRLTQLTEILSGGVYIEKNDKLCHM
DTIDWRDIVRDRDAEIVVKDNGRSCPPCHEVCKGRCWGPG
SEDCQTLTKTICAPQCNGHCFGPNPQCCHDECAGGCSGP
QDTDCFACRHFND SGACVPRCPQPLVYNKLT FQLEPNPHT
KYQYGGVCVASCPHNFVVDQTSCVRACPPDKMEVDKNGL
KMCEPCGGLCPKAF (SEQ ID NO: 1)。應理解，本發明方

或具有結合於各別抗原之 V_L 域的特徵，亦即能夠與 V_H 域組裝在一起形成功能性抗原結合位點，從而提供根據本發明之抗體的性質。如本文所用，術語「單株抗體」或「單株抗體組成物」係指具有單一胺基酸組成之抗體分子的製劑。

【0100】 在一些具體例中，嵌合抗體可用於本文提供之組成物及方法中。在一個具體例中，術語「嵌合抗體」係指包含來自小鼠之可變區(亦即，結合區)及來源於不同來源或物種之恆定區之至少一部分的單株抗體，通常藉由重組DNA技術製備。包含小鼠可變區及人類恆定區之嵌合抗體尤其較佳。此類大鼠/人類嵌合抗體為包含編碼大鼠免疫球蛋白可變區之DNA區段及編碼人類免疫球蛋白恆定區之DNA區段的免疫球蛋白基因之表現產物。本發明所涵蓋之其他形式的「嵌合抗體」為類別或子類別已自原始抗體修飾或改變的抗體。此類「嵌合」抗體亦稱為「類別轉換抗體」。用於產生嵌合抗體之方法涉及本技藝目前熟知的習知重組DNA及基因轉染技術。參見例如Morrison, S.L. 等人, Proc. Natl. Acad Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; US 5,202,238及US 5,204,244。

【0101】 在一個具體例中，人類化抗體可用於本文提供之組成物及方法中。在一些具體例中，術語「人類化抗體」或「抗體之人類化形式」係指構架或「互補決定區」(CDR)已經修飾以包含與親代免疫球蛋白相比具有不同特異性之免疫球蛋白之CDR的抗體。在其他具體例中，將

VH及VL之CDR移植至人類抗體之構架區中以製備「人類化抗體」。參見例如Riechmann, L.等人, *Nature* 332 (1988) 323-327; 及Neuberger, M.S.等人, *Nature* 314 (1985) 268-270。重鏈及輕鏈可變構架區可來源於相同或不同的人類抗體序列。人類抗體序列可為天然存在之人類抗體序列。人類重鏈及輕鏈可變構架區列於例如Lefranc, M.-P., *Current Protocols in Immunology* (2000) - Appendix IP A.1P.1-A.1P.37中, 且可經由IMGT, 亦即international ImMunoGeneTics information system® (<http://imgt.cines.fr>) 或經由<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk>獲得。構架區可選擇地藉由其他突變來修飾。特別較佳的CDR對應於代表識別上文關於嵌合抗體提及之抗原的序列。如本文所用, 術語「人類化抗體」亦包含此類在恆定區中經修飾以產生根據本發明之性質的抗體, 尤其在補體組分1q (C1q)結合及/或Fc受體 (FcR)結合方面, 例如藉由「類別轉換」, 亦即Fc部分之變化或突變 (例如IgG1至IgG4及/或IgG1/IgG4突變)。如本文所用, 術語「人類抗體」意欲包括具有來源於人類生殖系免疫球蛋白序列之可變區及恆定區的抗體。人類抗體為目前先進技術中眾所周知的(van Dijk, M.A.及van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 368-374)。人類抗體亦可在轉殖基因動物(例如小鼠)中產生, 該等動物在免疫時能夠在不存在內源性免疫球蛋白產生之情況下產生全譜系或精選的人類抗體。將人類生殖系免疫球蛋白基因陣列轉移至此類生殖系突變小鼠體內將導致在

抗原攻擊時產生人類抗體(參見例如Jakobovits, A.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555 ; Jakobovits, A. 等人, Nature 362 (1993) 255-258 ; Brueggemann, M.D.等人, Year Immunol. 7 (1993) 33-40)。人類抗體亦可在噬菌體呈現庫中產生(Hoogenboom, H.R.及 Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388 ; Marks, J.D. 等人, J. Mol. Biol. 222 (1991) 581- 597)。Cole, A.等人及 Boerner, P.等人之技術亦可用於製備人類單株抗體(Cole, A.等人, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Liss, A.L., 第77頁 (1985) ; 及 Boerner, P.等人, J. Immunol. 147 (1991) 86-95)。如已關於根據本發明之人類化抗體所提及, 如本文所用之術語「人類抗體」亦包含此類在恆定區中經修飾以產生根據本發明之性質的抗體。

【0102】 在本發明之一個特定具體例中, 本文提供之重組融合蛋白所包含的 mAb 在 Fc 域或區中包含至少一個突變。

【0103】 如本文所用, 術語「重組人類抗體」意欲包括藉由重組手段製備、表現、建立或分離的所有人類抗體, 諸如自宿主細胞例如 NS0 或 CHO 細胞或自轉殖人類免疫球蛋白基因之動物(例如小鼠)分離之抗體, 或使用轉染至宿主細胞中之重組表現載體表現的抗體。此類重組人類抗體具有呈重排形式之可變區及恆定區。根據本發明之重組人類抗體已經歷活體內體細胞超突變。因此, 重組抗體之 VH 及 VL 區之胺基酸序列為來源於人類生殖系 VH 及 VL

序列且與其相關之序列，但可能並非天然存在於活體內人類抗體生殖系譜系中。

【0104】 在一些具體例中，術語「結合於人類HER3」、「特異性結合於人類HER3」或「抗HER3抗體」可互換，且係指特異性結合於人類HER3抗原之抗體，其在25°C下之KD值為約 4.81×10^{-10} mol/L或更低。結合親和力係在25°C下用標準結合分析確定，諸如表面電漿子共振技術(BIAcore®, GE-Healthcare Uppsala, Sweden)。因此，如本文所用之「結合於人類HER3之抗體」係指特異性結合於人類HER3抗原之抗體或其部分，其在25°C下之結合親和力在KD 1.0×10^{-8} mol/L - 1.0×10^{-13} mol/L)範圍內，且較佳在25°C下之KD值為 4.81×10^{-10} mol/L或更低。

【0105】 在另一態樣中，本文所揭示之重組融合蛋白所包含的抗HER3抗體包含可變區重(VH)鏈及可變區輕(VL)鏈。在一個具體例中，該抗體包含分別為SEQ ID NO: 2及SEQ ID NO: 3之VH及VL序列；且具有以下特性中之一或多者：抑制腫瘤細胞中之HER3磷酸化、抑制腫瘤細胞中之AKT磷酸化、抑制經由ErbB3 (HER3)之信號傳導及抑制腫瘤細胞之增殖。

【0106】 在一個具體例中，本文提供之抗HER3 mAb包含SEQ ID NO: 2中所列之VH胺基酸序列：

重鏈：

QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSF
 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
 YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
 NVFSCSVMHE ALHAHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO:
 2) 。

【0107】在一個具體例中，本文提供之抗HER3 mAb
 包含SEQ ID NO: 3之VL胺基酸序列：

輕鏈：

DIEMTQSPDS LAVSLGERAT INCRSSQSVL
 YSSSNRNYLA WYQQNPGQPP KLLIYWASTR
 ESGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA
 VYYCQQYYST PRTEFGQGTKV EIKRTVAAPS
 VFIFPPSDEQ LKSGTASVVC LLNMFYPREA
 KVQWKVDNAL QSGNSQESVT EQDSKDSTYS
 LSSTLTLSKA DYEKHKVYAC EVTHQGLSSP

VTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 3)。

【0108】在一個具體例中，本發明之抗HER3抗體包含Fc區中之至少一個突變。在另一個具體例中，本發明之成熟抗HER3抗體(亦即缺乏信號肽)包含胺基酸234、239、434或其組合中之至少一個突變，其中在其他具體例中，胺基酸突變包含以下取代突變中之至少一者：L234F、S239A、N434A或其組合。在另一個具體例中，胺基酸234及/或239之突變減弱抗HER3抗體之效應功能。在另一個具體例中，胺基酸434之突變延長抗體在個體體內之半衰期。

【0109】在一些具體例中，Fc區中之一或多個突變降低效應功能。在一些具體例中，效應功能降低包含抗HER3抗體對一或多個Fc受體之親和力降低。FcR可為FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa (158F)、FcγRIIIa (158V)及C1q。在一些具體例中，親和力降低包含解離常數增加約1個數量級或更大。在一些具體例中，引入一或多個Fc突變使包含其之融合蛋白之抗HER3抗體對FcγRI的KD自 2.81×10^{-9} M增加至 1.03×10^{-8} M。在一些具體例中，引入一或多個Fc突變使包含其之融合蛋白之抗HER3抗體對FcγRIIa的KD自 3.95×10^{-7} M增加至 1.35×10^{-6} M。在一些具體例中，引入一或多個Fc突變使包含其之融合蛋白之抗HER3抗體對FcγRIIb的KD自 1.03×10^{-7} M增加至 1.52×10^{-6} M。在一些具體例中，引入一或多個Fc突變使包含其之融合蛋白之抗HER3抗體對FcγRIIIa (158F)的KD自 6.37×10^{-8}

M增加至 1.18×10^{-7} M。在一些具體例中，引入一或多個Fc突變使包含其之融合蛋白之抗HER3抗體對Fc γ RIIIa (158V)的KD自 3.41×10^{-8} M增加至 9.10×10^{-8} M。

【0110】在一些具體例中，抗HER3抗體或包含其之重組融合蛋白結合於Fc γ RI，平衡解離常數(KD)高於或等於 1.03×10^{-8} M。在一些具體例中，抗HER3抗體或包含其之重組融合蛋白包含一或多個Fc突變且結合於Fc γ RIIa，KD高於或等於 1.35×10^{-6} M。在一些具體例中，抗HER3抗體或包含其之重組融合蛋白包含一或多個Fc突變且結合於Fc γ RIIb，KD高於或等於 1.5×10^{-6} M。在一些具體例中，抗HER3抗體或包含其之重組融合蛋白包含一或多個Fc突變且結合於Fc γ RIIIa (158F)，KD高於或等於 1.18×10^{-7} M。在一些具體例中，抗HER3抗體或包含其之重組融合蛋白包含一或多個Fc突變且結合於Fc γ RIIIa (158V)，KD高於或等於 9.10×10^{-8} M。

【0111】如本文所用，術語「抗體效應功能」係指由Ig之Fc區貢獻的功能。此類功能可藉由例如Fc效應區與具有吞噬或溶解活性之免疫細胞上之Fc受體結合或藉由Fc效應區與補體系統之組分結合來實現。

【0112】在一個具體例中，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)」係指根據本發明之抗體在效應細胞存在下對人類目標細胞的溶解。

【0113】在本發明之一個具體例中，根據本發明之抗

體經醮基化。在一些具體例中，醮基化為N-醮基化。在其他具體例中，醮基化為O-醮基化。

【0114】 在本文提供且根據本發明之重組融合蛋白的上下文中，重組融合蛋白所包含的抗體可經由重組手段產生。此類方法在目前先進技術中廣泛已知且包含在原核及真核細胞中之蛋白質表現，隨後分離抗體多肽且通常純化至醫藥學上可接受之純度。對於蛋白質表現，編碼輕鏈及重鏈之核酸或其片段藉由標準方法插入表現載體中。在適當的原核或真核宿主細胞中進行表現，諸如CHO細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、HEK293細胞、COS細胞、酵母或大腸桿菌細胞，且自細胞(上清液或細胞溶解後)回收抗體。抗體之重組產生為目前先進技術中熟知的且描述於例如綜述論文Makrides, S.C., *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 183-202；Geisse, S.等人, *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中。抗體可存在於全細胞、細胞溶解物中或以部分純化或實質上純形式存在。進行純化以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，藉由標準技術，包括管柱層析及其他此項技術中熟知的(參見Ausubel, F.等人編, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987))。NS0細胞中之表現由例如Barnes, L.M.等人, *Cytotechnology* 32 (2000) 109-123；Barnes, L.M.等人, *Biotech. Bioeng.* 73 (2001) 261-270

描述。短暫表現由例如 Durocher, Y. 等人, Nucl. Acids. Res. 30 (2002) E9 描述。可變域之選殖由 Orlandi, R. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 3833- 3837 ; Carter, P. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289 ; Norderhaug, L. 等人, J. Immunol. Methods 204 (1997) 77-87 描述。較佳的短暫表現系統 (HEK 293) 由 Schlaeger, E.-J. 及 Christensen, K., 在 Cytotechnology 30 (1999) 71-83 中及由 Schlaeger, E.-J., 在 J. Immunol. Methods 194 (1996) 191-199 中描述。單株抗體適合藉由習知免疫球蛋白純化程序自培養基中分離, 諸如蛋白質 A-瓊脂糖、羥磷灰石層析、凝膠電泳、透析或親和層析。編碼單株抗體之 DNA 及 RNA 易於分離且使用習知程序定序。融合瘤細胞可充當此類 DNA 及 RNA 之來源。一旦分離, DNA 可插入表現載體中, 隨後轉染至不另外產生免疫球蛋白蛋白質的宿主細胞中, 諸如 HEK 293 細胞、CHO 細胞或骨髓瘤細胞, 以在宿主細胞中獲得重組單株抗體之合成。

【0115】 根據本發明之重鏈及輕鏈可變域與啟動子序列、轉譯起始序列、恆定區序列、3'非轉譯區序列、多腺苷酸化序列及轉錄終止序列組合以形成表現載體構築體。重鏈及輕鏈表現結構可組合成單個載體, 共轉染、串聯轉染或分別地轉染至宿主細胞, 其隨後融合形成表現重鏈及輕鏈二者之單個宿主細胞。

【0116】 不言而喻, 抗體以治療有效量向個體投與, 治療有效量為引發研究人員、獸醫、醫師或其他臨床醫師

所尋求的組織、系統、動物或人類之生物或醫學反應的本發明化合物或組合的量。

重組融合蛋白-神經調節蛋白

【0117】在一個具體例中，本文提供之重組融合蛋白包含NRG-1蛋白之片段。NRG蛋白可結合於心肌細胞表面上之ErbB4受體，持續活化細胞中之PI3K/AKT信號通路，且改變心肌細胞之結構，從而改善心肌細胞的功能。

【0118】如本文所用，「神經調節蛋白」或「NRG」係指可結合且活化ErbB3、ErbB4或其異二聚體或同二聚體之蛋白質或肽，包括神經調節蛋白同功異型物、神經調節蛋白EGF樣域、包含神經調節蛋白EGF樣域之多肽、神經調節蛋白突變體或衍生物，以及可活化上述受體之任何種類的神經調節蛋白樣基因產物。神經調節蛋白亦包括NRG-1、NRG-2、NRG-3及NRG-4蛋白、具有神經調節蛋白功能之肽、片段及化合物。在較佳具體例中，神經調節蛋白為一種可結合且活化ErbB2/ErbB4或ErbB2/ErbB3異二聚體之蛋白質或肽，例如但並非出於限制目的，本發明之肽包括NRG-1 β 2同功異型物之片段，亦即177-237個胺基酸的片段，其含有具有以下胺基酸序列之EGF樣域：
SHLVKCAEKEKTFCVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEF
TGDRCQNYVMASFYKAEELYQ (SEQ ID NO: 4)。本發明之NRG蛋白可活化上述受體且調節其生物功能，例如刺激骨骼肌細胞中乙醯膽鹼受體之合成、促進心肌細胞之分化

及存活以及DNA合成。熟悉本技藝者熟知，非關鍵區域中單個胺基酸的突變一般不會改變所得蛋白質或多肽的生物活性(參見例如Watson等人，*Molecular Biology of the Gene*，第4版，1987，The Bejacmin/Cummings Pub.co.，第224頁)。本發明之NRG蛋白可自天然來源分離，可經由重組技術、人工合成或其他手段修飾。

【0119】如本文所用，「表皮生長因子樣域」或「EGF樣域」係指由神經調節蛋白基因編碼之多肽片段，該片段結合且活化ErbB3、ErbB4或其異二聚體或同二聚體且包括與ErbB2之異二聚體，且結構上類似於EGF受體結合區，如WO 00/64400，Holmes等人，*Science*，256:1205-1210 (1992)；美國專利第5,530,109號及第5,716,930號；Hijazi等人，*Int. J. Oncol.*，13:1061-1067 (1998)；Chang等人，*Nature*，387:509-512 (1997)；Carraway等人，*Nature*，387:512-516 (1997)；Higashiyama等人，*J. Biochem.*，122:675-680 (1997)；及WO 97/09425中所述，其內容全部以引用之方式併入本文中。在某些具體例中，EGF樣域結合且活化ErbB2/ErbB4或ErbB2/ErbB3異二聚體。在某些具體例中，EGF樣域包含NRG-1之受體結合域的胺基酸序列。在一些具體例中，EGF樣域係指NRG-1之胺基酸殘基177-226、177-237或177-240。在某些具體例中，EGF樣域包含神經調節蛋白-2 (NRG-2，在此項技術中亦稱為DON1、HRG2及NTAK)之受體結合域的胺基酸序列。在某些具體例中，NRG-2之EGF樣域包含

HARKCNETAKSYCVNGGVCYYIEGINQLSCKCPNGFFGQR
CL (SEQ ID NO: 15)之序列。在某些具體例中，EGF樣域
包含神經調節蛋白3 (NRG-3，在此項技術中亦稱為HRG3
及pro-NRG3)之受體結合域的胺基酸序列。在某些具體例
中，NRG-3之EGF樣域包含

HFKPCRDKDLAYCLNDGECFVIETLTGSHKHCRCKEGYQG
VRCD (SEQ ID NO: 16)之序列。在某些具體例中，EGF樣
域包含神經調節蛋白4 (NRG-4，在此項技術中亦稱為
HER4)之受體結合域的胺基酸序列。在某些具體例中，
NRG-4之EGF樣域包含

HEEPCGPSHKSFCLNGGLCYVIPTIPSPFCRCVENYTGARC
E (SEQ ID NO: 17)之序列。在某些具體例中，EGF樣域包
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)之胺
基酸序列，如美國專利第5,834,229號中所述。

【0120】在一個具體例中，本文所揭示之重組融合蛋
白中提供的NRG-1蛋白為NRG-1 β 2a同功異型物。

【0121】在一些具體例中，活性NRG-1片段包含
ERBB3/4結合域。在另一相關具體例中，NRG-1結合於
ErbB4 (HER4)且經由其誘導信號傳導。在其他具體例中，
mAb抑制經由ErbB3 (HER3)之NRG-1信號傳導。在一些具
體例中，NRG-1之活性蛋白質片段包含NRG-1之活性域。

【0122】在一些具體例中，NRG-1片段包含SEQ ID
NO: 4或與其具有至少70%、至少80%、至少90%或至少

95%一致性之序列，能夠結合於 ErbB4 且經由其誘導信號傳導。

重組融合蛋白-組成物

【0123】在一個具體例中，在本文所揭示之重組融合蛋白中，NRG-1 使用連接子與抗 HER3 抗體重鏈之 C 端融合。在另一相關態樣中，NRG-1 經由 NRG-1 之 N 端上的第一個(1st)胺基酸連接至連接子，該胺基酸在一個具體例中為絲胺酸(S或 Ser)胺基酸。本發明中所用之特定重組融合蛋白可選擇地藉由此項技術中已知之任何方法(包括自市售來源購買)獲得或形成。例如，編碼適當抗體構架之核酸序列可選地選殖且接合至適當載體(例如用於例如原核或真核生物體之表現載體)。此外，編碼 NRG-1 β 2a 同功異型物分子之核酸序列可選地以適當的方向及位置選殖至同一載體中，以便自載體表現產生抗體-NRG-1 β 2a 同功異型物融合蛋白。一些可選擇的具體例亦需要表現後修飾，例如抗體次單元之組裝等。上述(及類似)操作之技術及技藝為熟悉本技藝者熟知的。相關說明可見於例如 Sambrook 等人，Molecular Cloning-A Laboratory Manual (第2版)，第 1-3 卷，Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989 及 Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel 等人編，Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc. (增補至 1999)。在一些替代具體例中，抗體域及 NRG-

1 β 2a同功異型物經由例如化學手段在表現後組裝。在一個具體例中，本發明提供一種組成物，例如包含本發明之重組融合蛋白的醫藥組成物。

【0124】 在一個具體例中，重組融合蛋白減少心房震顫發作之持續時間。在一個具體例中，重組融合蛋白降低心房震顫發生的頻率。心房震顫之症狀包括但不限於心跳不規則、心悸、頭暈、極度疲勞、呼吸短促、胸痛及其組合。在一個具體例中，重組融合蛋白減少心臟組織中之膠原蛋白含量或沉積。

【0125】 在一個具體例中，重組融合蛋白促進心肌細胞增殖、分化及存活。在另一個具體例中，重組融合蛋白促進心臟組織之增殖、分化及存活。在一個具體例中，重組融合蛋白促進心肌細胞增殖、分化及存活而不促進癌症及/或腫瘤生長。在另一個具體例中，重組融合蛋白促進心臟組織之增殖、分化及存活而不促進癌症或腫瘤生長。

【0126】 在一個具體例中，癌症為腎上腺皮質癌、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)、膽道癌、肝外膽管癌、肝內膽管癌、膀胱癌、膀胱癌、骨關節癌、骨肉瘤及惡性纖維組織細胞瘤、腦癌、腦瘤、腦幹神經膠質瘤、小腦星形細胞瘤、腦星形細胞瘤/惡性神經膠質瘤、室管膜瘤、髓母細胞瘤、幕上原始神經外胚層腫瘤、視覺路徑及下丘腦神經膠質瘤、乳癌、支氣管腺瘤/類癌、類

癌瘤、胃腸道癌、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、子宮頸癌、兒童癌症、慢性淋巴細胞性白血病、慢性骨髓性白血病、慢性骨髓增生病、結腸癌、結腸直腸癌、皮膚T細胞淋巴瘤、淋巴贅瘤、蕈狀肉芽腫、塞紮里氏症候群(Seziary Syndrome)、子宮內膜癌、食道癌、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、胃腸道類癌瘤、胃腸道間質瘤(GIST)、生殖細胞腫瘤、卵巢生殖細胞腫瘤、妊娠滋養細胞腫瘤神經膠質瘤、頭頸癌、肝細胞(肝)癌、霍奇金淋巴瘤(Hodgkin lymphoma)、下咽癌、眼內黑色素瘤、眼癌、胰島細胞瘤(內分泌胰臟)、卡波西肉瘤(Kaposi Sarcoma)、腎癌、腎癌、腎癌、喉癌、急性淋巴母細胞性白血病、急性骨髓性白血病、慢性淋巴細胞性白血病、慢性骨髓性白血病、毛細胞白血病、唇及口腔癌、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、華氏巨球蛋白血症(Waldenstroem macroglobulinemia)、神經管胚細胞瘤、黑色素瘤、眼內(眼睛)黑色素瘤、梅克爾細胞癌(merkel cell carcinoma)、惡性間皮瘤、間皮瘤、轉移性鱗狀頸癌、口腔癌、舌癌、多發性內分泌瘤症候群、蕈狀肉芽腫、骨髓發育不良症候群、骨髓發育不良/骨髓增生性疾病、慢性骨髓性白血病、急性骨髓性白血病、多發性骨髓瘤、慢性骨髓增生病、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、卵巢低度惡性潛能腫瘤、胰臟癌、胰島細胞胰臟癌、副鼻竇及鼻腔癌症、甲狀旁腺癌、陰莖癌、咽癌、嗜鉻細胞瘤、松果體母細胞瘤及幕上原始神經外胚層腫瘤、垂體腫瘤、漿細胞瘤/多發性骨髓瘤、胸膜肺母細胞瘤、前列腺癌、直腸癌、腎盂及輸尿管癌、移行細胞癌、視網膜母細胞瘤、橫紋肌肉瘤、唾液腺癌、尤文氏肉瘤家族腫瘤 (Ewing family of sarcoma tumor)、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)、梅克爾細胞皮膚癌、小腸癌、軟組織肉瘤、鱗狀細胞癌、胃癌、幕上原始神經外胚層腫瘤、睪丸癌、咽喉癌、胸腺瘤、胸腺瘤及胸腺癌、甲狀腺癌、腎盂及輸尿管及其他泌尿器官之移行細胞癌、妊娠滋養細胞腫瘤、尿道癌、子宮內膜子宮癌、子宮肉瘤、子宮體癌、陰道癌、外陰癌或威爾姆氏腫瘤(Wilm's Tumor)。

【0127】在另一個具體例中，重組融合蛋白促進中樞神經系統(CNS)細胞之增殖、分化及存活。在另一個具體例中，重組融合蛋白促進中樞神經系統(CNS)細胞之增殖、分化及存活而不促進癌症及/或腫瘤生長。在另一個具體例中，重組融合蛋白具有降低的誘導抗體依賴性細胞毒性(ADCC)之能力。

【0128】在一些具體例中，相對於重組NRG-1之信號誘導潛力，重組融合蛋白促進HER2/4信號傳導超過HER2/3信號傳導。

【0129】在本發明之一特定具體例中，重組融合蛋白包含與SEQ ID NO: 4之NRG-1 β 2a同功異型物融合或經由GGGGSGGGGS (G4S)連接子(SEQ ID NO: 5)可操作地連接於抗體重鏈C端之抗HER3mAb。在一些具體例中，可使用連接子之一或多個複本。在其他具體例中，本文中可使用G4S連接子或此項技術中已知適用於本文所揭示之組成物之任何其他連接子的2、3、4或5個複本。

【0130】術語「連接子」為此項技術中公認的且係指連接兩個化合物，諸如兩個多肽之分子(包括但不限於未經修飾或經修飾之核酸或胺基酸)或分子群(例如2個或更多，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)。連接子可由單個連接分子構成，或可包含連接分子及至少一個間隔子分子，其意欲使該連接分子及化合物分開特定距離。

【0131】核酸在與另一核酸序列處於功能關係時為「可操作地連接的」。舉例而言，若核酸前序列或分泌性前導序列表現為參與多肽分泌之前蛋白，則其與編碼該多肽之核酸可操作地連接；若啟動子或強化子影響編碼序列之轉錄，則其與該序列可操作地連接；或若核糖體結合位點經定位以便有助於轉譯，則其與編碼序列可操作地連接。一般而言，「可操作地連接」意謂連接之核酸序列相鄰，且在分泌性前導序列之情況下，相鄰且在閱讀框中。然而，強化子可選地為相鄰的。連接可例如藉由在適宜限

制性位點處接合來實現。若此類位點不存在，則可使用合成寡核苷酸接附子、連接子或此項技術中已知之其他方法。在另一個具體例中，「可操作地連接」亦指不同胺基酸序列、肽或蛋白質之功能配對，如本文所述之抗體及NRG-1片段經由本文亦描述之連接子序列的配對。

【0132】在另一個具體例中，本文提供之重組融合蛋白所包含的抗HER3 mAb重鏈係由SEQ ID NO: 6編碼：

```
ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTTCCTTGTTGCTATA
ATAAAAGGTGTCCAGTGTCAGGTGCAGCTGCAGCAGTG
GGGAGCTGGACTGCTGAAGCCAAGCGAGACCCTGTCTCT
GACATGCGCCGTGTACGGAGGATCCTTCAGCGGATACTA
TTGGTCTTGGATCAGGCAGCCACCTGGCAAGGGACTGGA
GTGGATCGGCGAGATCAACCACTCTGGCTCCACCAACTA
CAATCCCTCTCTGAAGTCCCGGGTGACCATCTCCGTGGA
GACAAGCAAGAATCAGTTTTCCCTGAAGCTGTCCAGCGT
GACCGCCGCTGACACAGCCGTGTACTATTGCGCTAGGGA
CAAGTGGACCTGGTATTTTCGATCTGTGGGGAAGGGGCAC
CCTGGTGACAGTGTCTTCCGCCTCTACAAAGGGCCCCTC
CGTGTTTCCTCTGGCTCCAAGCTCTAAGAGCACCTCTGG
AGGAACAGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGATTA CTT
CCCTGAGCCAGTGACCGTGAGCTGGAACTCTGGCGCCCT
GACCTCCGGAGTGCATACATTTCCCGCTGTGCTGCAGTC
CAGCGGCCTGTATAGCCTGTCTTCCGTGGTGACCGTGCC
TAGCTCTTCCCTGGGACACCAGACATACATCTGCAACGT
```

GAATCACAAGCCCTCCAATACAAAGGTGGACAAGAGAG
TGGAGCCTAAGAGCTGTGATAAGACCCATACATGCCCAC
CATGTCCAGCTCCTGAGCTGCTGGGAGGACCTTCCGTGT
TCCTGTTTCCTCCAAAGCCAAAGGACACCCTGATGATCT
CTCGCACCCCTGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGACGTGT
CCCACGAGGATCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTG
GATGGCGTGGAGGTGCATAATGCTAAGACCAAGCCTAG
GGAGGAGCAGTACAACAGCACCTATCGGGTGGTGTCTG
TGCTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAG
GAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAATAAGGCCCTGCCAGC
TCCCATCGAGAAGACCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAGC
CCAGAGAGCCTCAGGTGTATACTGCCCCCTAGCCGCG
AGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGTCTG
GTGAAGGGCTTCTACCCATCTGACATCGCTGTGGAGTGG
GAGTCCAATGGCCAGCCCGAGAACAATTATAAGACCAC
ACCACCCGTGCTGGACTCCGATGGCAGCTTCTTTCTGTA
CTCCAAGCTGACCGTGGATAAGAGCAGGTGGCAGCAGG
GCAACGTGTTTTCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGC
ACAATCATTATACACAGAAATCTCTGTCCCTGAGCCCAG
GCAAGGGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGCAGCTCT
CATCTGGTGAAGTGTGCTGAGAAGGAGAAGACCTTCTGC
GTGAACGGCGGCGAGTGTTTTATGGTGAAGGACCTGTCT
AATCCATCCAGATACCTGTGCAAGTGTCCCAACGAGTTC
ACAGGCGATCGCTGCCAGAATTACGTGATGGCCTCTTTT

TATAAGGCTGAGGAGCTGTACCAGTAA (SEQ ID NO: 6)。

在一個具體例中，SEQ ID NO: 6中所示之序列不包含Fc突變。在一個具體例中，SEQ ID NO: 6亦稱為「NPCF」。

【0133】在一個具體例中，本文提供之重組融合蛋白包含抗HER3 mAb之重鏈。在另一個具體例中，抗HER3 mAb重鏈係由SEQ ID NO: 7編碼：

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTTCCTTGTTGCTATA
ATAAAAGGTGTCCAGTGTCAGGTGCAGCTGCAGCAGTG
GGGAGCTGGACTGCTGAAGCCAAGCGAGACCCTGTCTCT
GACATGCGCCGTGTACGGAGGATCCTTCAGCGGATACTA
TTGGTCTTGGATCAGGCAGCCACCTGGCAAGGGACTGGA
GTGGATCGGCGAGATCAACCACTCTGGCTCCACCAACTA
CAATCCCTCTCTGAAGTCCCGGGTGACCATCTCCGTGGA
GACAAGCAAGAATCAGTTTTCCCTGAAGCTGTCCAGCGT
GACCGCCGCTGACACAGCCGTGTACTATTGCGCTAGGGA
CAAGTGGACCTGGTATTTTCGATCTGTGGGGAAGGGGCAC
CCTGGTGACAGTGTCTTCCGCCTCTACAAAGGGCCCCTC
CGTGTTTCCTCTGGCTCCAAGCTCTAAGAGCACCTCTGG
AGGAACAGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGATTA
CTTCCCTGAGCCAGTGACCGTGAGCTGGAACTCTGGCGCCCT
GACCTCTGGAGTGCATACATTTCCCGCTGTGCTGCAGTC
CAGCGGCCTGTATAGCCTGTCTTCCGTGGTGACCGTGCC
TAGCTCTTCCCTGGGCACCCAGACATACATCTGCAACGT
GAATCACAAGCCCTCCAATACAAAGGTGGACAAGAGAG

TGGAGCCTAAGAGCTGTGATAAGACCCATACATGCCAC
CATGTCCAGCTCCTGAGTTCCTGGGAGGACCTGCCGTGT
TCCTGTTTCCTCCAAAGCCAAAGGACACCCTGATGATCT
CTCGCACCCCTGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGACGTGT
CCCACGAGGATCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTG
GATGGCGTGGAGGTGCATAATGCTAAGACCAAGCCTAG
GGAGGAGCAGTACAACAGCACCTATCGGGTGGTGTCTG
TGCTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAG
GAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAATAAGGCCCTGCCAGC
TCCCATCGAGAAGACCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAGC
CCAGAGAGCCTCAGGTGTATACACTGCCCCCTAGCCGCG
AGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACCTGTCTGG
TGAAGGGCTTCTACCCATCTGACATCGCTGTGGAGTGGG
AGTCCAATGGCCAGCCCGAGAACAATTATAAGACCACA
CCACCCGTGCTGGACTCCGATGGCAGCTTCTTTCTGTAC
TCCAAGCTGACCGTGGATAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG
CAACGTGTTTTCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCA
CGCTCATTATACACAGAAATCTCTGTCCCTGAGCCCAGG
CAAGGGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGCAGCTCTC
ATCTGGTGAAGTGTGCTGAGAAGGAGAAGACCTTCTGC
GTGAACGGCGGCGAGTGTTTTATGGTGAAGGACCTGTCT
AATCCATCCAGATACCTGTGCAAGTGTCCCAACGAGTTC
ACAGGCGATCGCTGCCAGAATTACGTGATGGCCTCTTTT
TATAAGGCTGAGGAGCTGTACCAGTAA (SEQ ID NO: 7)。

在一個具體例中，SEQ ID NO: 7亦稱為「NPCFA」。在一個具體例中，SEQ ID NO: 7包含編碼本文提供之抗HER3 mAb之恆定(Fc)區中之一或多個突變的一或多個突變。在一個具體例中，本發明之成熟抗HER3抗體包含胺基酸234、239、434或其組合中之至少一個突變。在另一個具體例中，胺基酸突變包含以下取代突變中之至少一者：L234F、S239A、N434A或其組合。

【0134】在一個具體例中，本文提供之重組融合蛋白包含抗HER3 mAb之輕鏈序列。在另一個具體例中，輕鏈序列係由(SEQ ID NO: 8)編碼：

```
ATGGTGTTGCAGACCCAGGTCTTCATTTCTCTGTTGCTCT
GGATCTCTGGTGCCTACGGGGACATCGAGATGACCCAGT
CTCCAGATTCCCTGGCCGTGAGCCTGGGAGAGAGGGCTA
CAATCAACTGCCGGTCCAGCCAGTCTGTGCTGTACTCTT
CCAGCAACAGGAATTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAATC
CCGGCCAGCCCCCTAAGCTGCTGATCTATTGGGCTAGCA
CCAGAGAGTCTGGAGTGCCTGACCGCTTCTCTGGATCCG
GAAGCGGCACAGACTTCACCCTGACAATCTCTTCCCTGC
AGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTATTGCCAGCAGTATT
ACTTACCCCTAGGACATTCGGCCAGGGCACCAAGGTGG
AGATCAAGCGGACAGTGGCCGCTCCATCCGTGTTTCATCT
TTCCACCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGAACCGCTA
GCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCAAGAGAGG
CCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGATAACGCTCTGCAGAGC
```

GGCAATTCTCAGGAGTCCGTGACCGAGCAGGACAGCAA
 GGATTCTACATATTCCCTGAGCTCTACCCTGACACTGTC
 CAAGGCCGATTACGAGAAGCACAAAGGTGTATGCTTGCG
 AGGTGACCCATCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACAAAG
 AGCTTCAACCGCGGGCGAGTGTTAA(SEQ ID NO: 8)。在一個具體例中，SEQ ID NO: 8亦稱為「PAL」。

【0135】在一個具體例中，本文提供之重組融合蛋白所包含的抗HER3抗體之重鏈包含以下胺基酸序列：

MEFGLSWVFLVAIIKGVQCQVQLQQWGAGLLKPSETLSLT
 CAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNP
 SLKSRVTISVETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWT
 WYFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
 LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
 LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD
 KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSSHLV
 KCAEKEKTFVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDR
 CQNYVMASFYKAEELYQ (SEQ ID NO: 9)。

【0136】在一個具體例中，本文提供之重組融合蛋白所包含的抗HER3抗體之重鏈包含以下胺基酸序列：

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

【0137】在一個具體例中，抗HER3 mAb重鏈序列包含信號肽序列。在另一個具體例中，抗HER3 mAb重鏈信號肽序列包含MEFGLSWVFLVAIIKGVQC (SEQ ID NO: 11) 之胺基酸序列。

【0138】在一個具體例中，重組融合蛋白所包含的抗HER3抗體之輕鏈包含以下胺基酸序列：

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIEMTQSPDSLAVSLGERATI
NCRSSQSVLYSSSNRNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRE
SGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSTPR
TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN

NFYBREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS
 TLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
 (SEQ ID NO: 12)。

【0139】在一個具體例中，抗HER3 mAb輕鏈序列包含信號肽序列。在另一個具體例中，抗HER3 mAb輕鏈信號肽序列包含MVLQTQVFISLLWISGAYG (SEQ ID NO: 13)之胺基酸序列。在一個具體例中，本文所揭示之成熟多肽諸如抗體重鏈或輕鏈胺基酸序列缺乏信號肽。

【0140】在一個具體例中，重組融合蛋白包含以下胺基酸序列：

重鏈

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVYGGSFSGYYWSWIRQ
 PPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRTISVETSKNQFSL
 KLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLVTVSSAS
 TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC
 NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFLGGPAV
 FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHAHYTQK
 SLSLSPGKGGGGSGGGGSSHLVKCAEKEKTFCVNGGECF
 MVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQNYVMASFYKAEEL

YQ (SEQ ID NO: 14, 其中粗斜體指示連接子, 且粗體指示NRG-1片段); 及

輕鏈

DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSNRNYLAW
YQQNPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS
SLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFGQGKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 3)。

【0141】在一個具體例中, 成熟重組融合蛋白中之重鏈序列及輕鏈序列中之各者缺乏信號肽胺基酸序列。

【0142】在本發明之一特定具體例中, 本文提供之抗HER3抗體的重鏈經由C端連接子序列與本文提供之NRG-1 β 2a同功異型物融合。在另一個具體例中, 抗體重鏈之C端包含抗體之Fc域。

【0143】在一些具體例中, 提供醫藥組成物, 其包含與醫藥載劑一起調配的本文所揭示之重組融合蛋白。

【0144】在一些具體例中, 本文所述之抗HER3抗體及NRG-1片段經由連接子以重組方式或以化學方式融合/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」係指包含來自至少兩個不同多肽之多肽部分的混合多肽。如本文所定義之「融合蛋白」為包含例如本發明之NRG-1 β 2a同功異型物之第一胺基酸序列(蛋白質)經由連接子與包含特異性結合

於ERBB3 (HER3)之抗體重鏈之第二胺基酸序列的C端接合的融合物。

【0145】在一個具體例中，融合蛋白以重組方式編碼及產生。在一些具體例中，重組融合蛋白由編碼本發明抗體之核酸序列編碼，該核酸序列經由編碼連接子之核酸序列可操作地連接至編碼本發明之NRG-1 β 2a同功異型物的核酸序列。

【0146】在一個具體例中，重組融合蛋白胺基酸序列與SEQ ID NO: 14融合至SEQ ID NO: 3同源。術語「同源性」可指與重組融合蛋白序列(例如SEQ ID NO: 1-18中之任一者)之一致性大於70%。在另一個具體例中，「同源性」係指與SEQ ID NO: 1-18中之任一者之一致性大於72%。在另一個具體例中，「同源性」係指與SEQ ID NO: 1-18中之任一者之一致性大於75%。在另一個具體例中，「同源性」係指與SEQ ID NO: 1-18中之任一者之一致性大於78%。在另一個具體例中，「同源性」係指與SEQ ID NO: 1-18中之任一者之一致性大於80%。在另一個具體例中，「同源性」係指與SEQ ID NO: 1-18中之任一者之一致性大於82%。在另一個具體例中，「同源性」係指與SEQ ID NO: 1-18中之任一者之一致性大於83%。在另一個具體例中，「同源性」係指與SEQ ID NO: 1-18中之任一者之一致性大於85%。在另一個具體例中，「同源性」係指與SEQ ID NO: 1-18中之任一者之一致性大於87%。在另一個具體例中，「同源性」係指與SEQ ID NO: 1-18中之任一者

之一致性大於88%。在另一個具體例中，「同源性」係指與SEQ ID NO: 1-18中之任一者之一致性大於90%。在另一個具體例中，「同源性」係指與SEQ ID NO: 1-18中之任一者之一致性大於92%。在另一個具體例中，「同源性」係指與SEQ ID NO: 1-18中之任一者之一致性大於93%。在另一個具體例中，「同源性」係指與SEQ ID NO: 1-18中之任一者之一致性大於95%。在另一個具體例中，「同源性」係指與SEQ ID NO: 1-18中之任一者之一致性大於96%。在另一個具體例中，「同源性」係指與SEQ ID NO: 1-18中之任一者之一致性大於97%。在另一個具體例中，「同源性」係指與SEQ ID NO: 1-18中之任一者之一致性大於98%。在另一個具體例中，「同源性」係指與SEQ ID NO: 1-18中之任一者之一致性大於99%。在另一個具體例中，「同源性」係指與SEQ ID NO: 1-18中之任一者之一致性為100%。

【0147】兩個序列之間的一致性百分比的確定可使用數學算法來實現。用於比較兩個序列之數學演算法之非限制性實例為Karlin及Altschul, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268中之演算法，如Karlin and Altschul, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*90:5873-5877中進行修改。此類演算法併入Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410之NBLAST及XBLAST程式中。BLAST核苷酸檢索可用NBLAST程式(得分=100，字長=12)執行以獲得與編碼所關注蛋白質之核酸同源之核苷酸序列。BLAST蛋白質檢索可

用 XBLAST 程式 (得分 = 50, 字長 = 3) 執行以獲得與所關注蛋白質同源之胺基酸序列。為了獲得用於比較目的之空隙比對, 可如 Altschul 等人, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 中所述使用空隙 BLAST。或者, 可使用 PSI-Blast 進行迭代搜尋, 偵測分子間的遠端關係 (同上)。當利用 BLAST、空隙 BLAST 及 PSI-BLAST 程式時, 可使用各自程式 (例如 XBLAST 及 NBLAST) 之預設參數。用於序列比較之數學演算法的另一個非限制性實例為 Myers 及 Miller, CABIOS (1989) 之演算法。此類演算法併入 ALIGN 程式 (版本 2.0) 中, 該程式為 GCG 序列比對套裝軟體之一部分。當利用 ALIGN 程式來比較胺基酸序列時, 可使用 PAM120 權重殘基表、間隙長度罰分 12 及間隙罰分 4。用於序列分析之額外演算法為此項技術中已知的且包括如 Torellis 及 Robotti, 1994, *Comput. Appl. Biosci.* 10:3-5 中所述之 ADVANCE 及 ADAM; 以及 Pearson 及 Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-8 中所述之 FASTA。在 FASTA 中, ktup 係設定搜尋敏感度和速度的控制選項。若 ktup=2, 則藉由觀察成對的比對殘基發現所比較之兩個序列中之相似區域; 若 ktup=1, 則檢查單一比對胺基酸。ktup 對於蛋白質序列可設定為 2 或 1, 或對於 DNA 序列可設定為 1 至 6。若未指定 ktup, 則預設值對於蛋白質為 2 且對於 DNA 為 6。或者, 可使用 CLUSTAL W 演算法進行蛋白質序列比對, 如 Higgins 等人, 1996, *Methods Enzymol.* 266:383-402 所述。

【0148】 在一些具體例中，本發明之多核苷酸係使用PCR技術，使用熟悉本技藝者已知的程序及方法製備。在一些具體例中，該程序涉及兩個不同DNA序列之接合(參見例如「*Current Protocols in Molecular Biology*」，Ausubel等人編，John Wiley & Sons, 1992)。

【0149】 在一個具體例中，將本發明之多核苷酸插入表現載體(亦即核酸構築體)中，以促成重組多肽的表現。在一個具體例中，本發明之表現載體包括額外序列，其使得此載體適合在原核生物中複製及整合。在一個具體例中，本發明之表現載體包括額外序列，其使得此載體適合在真核生物中複製及整合。在一個具體例中，本發明之表現載體包括穿梭載體，其使得此載體適合在原核生物及真核生物中複製及整合。在一些具體例中，選殖載體包含轉錄及轉譯起始序列(例如啟動子、強化子)以及轉錄及轉譯終止子(例如多腺苷酸化信號)。

【0150】 在一個具體例中，多種原核或真核細胞可用作宿主表現系統，以表現本發明之多肽。在一些具體例中，此等包括但不限於微生物，諸如用含有多肽編碼序列之重組噬菌體DNA、質體DNA或黏質體DNA表現載體轉型的細菌；用含有多肽編碼序列之重組酵母表現載體轉型的酵母。

【0151】 在一些具體例中，使用非細菌表現系統(例如哺乳動物表現系統，諸如CHO細胞)來表現本發明之多肽。在一個具體例中，用於在哺乳動物細胞中表現本發明

之多核苷酸的表現載體為包含CMV啟動子及新黴素抗性基因之pCI-DHFR載體。

【0152】在一些具體例中，在本發明之細菌系統中，可根據所表現多肽之預期用途有利地選擇多種表現載體。在一個具體例中，需要大量多肽。在一個具體例中，需要載體引導蛋白質產物高水準之表現，可能表現成與疏水性信號序列之融合物，該疏水性信號序列引導所表現之產物至其中蛋白質產物容易純化之細菌胞外質或培養基中。在一個具體例中，某些融合蛋白經工程改造以具有特定裂解位點，從而幫助回收多肽。在一個具體例中，可適應於此類操作之載體包括但不限於pET系列之大腸桿菌表現載體 [Studier等人, *Methods in Enzymol.* 185:60-89 (1990)]。

【0153】在一個具體例中，使用酵母表現系統。在一個具體例中，許多含有組成型或誘導型啟動子之載體可用於酵母中，如美國專利第5,932,447號中所揭示。在另一個具體例中，使用促進外來DNA序列整合至酵母染色體中之載體。

【0154】在一個具體例中，本發明之表現載體可進一步包括額外多核苷酸序列，允許例如自單個mRNA轉譯數種蛋白質，諸如內部核糖體進入位點(IRES)及用於啟動子嵌合多肽之基因體整合的序列。

【0155】在一些具體例中，本發明之表現載體包括增加本發明之重組融合蛋白之表現的元件。此類特徵包括但不限於啟動子及多腺苷酸化之選擇。在一些具體例中，多

腺苷酸化序列為牛生長激素(BGH)多腺苷酸化序列。在一些具體例中，啟動子包含組成型活性啟動子。在一些具體例中，啟動子包含巨細胞病毒啟動子(pCMV)。

【0156】在一些具體例中，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，其可購自Invitrogen；pCI，其可購自Promega；pMbac、pPbac、pBK-RSV及pBK-CMV，其可購自Stratagene；pTRES，其可購自Clontech；及其衍生物。

【0157】在一些具體例中，本發明使用含有來自真核病毒諸如反轉錄病毒之調控元件的表現載體。SV40載體包括pSVT7及pMT2。在一些具體例中，來源於牛乳頭狀瘤病毒之載體包括pBV-1MTHA，且來源於埃-巴二氏病毒(Epstein Barr virus)之載體包括pHEBO及p205。其他例示性載體包含pMSG、pAV009/A⁺、pMTO10/A⁺、pMAMneo-5、桿狀病毒pDSVE以及允許蛋白在SV-40早期啟動子、SV-40晚期啟動子、金屬硫蛋白啟動子、鼠乳房腫瘤病毒啟動子、勞斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus)啟動子、多角體蛋白啟動子或顯示為對於在真核細胞中之表現有效的其他啟動子的指導下表現的任何其他載體。

【0158】在一些具體例中，重組病毒載體可用於本發明之多肽的活體內表現，因為其提供諸如橫向感染及靶向特異性之優點。在一個具體例中，橫向感染為例如反轉錄

病毒之生命週期中所固有的，且為單個受感染細胞產生許多後代病毒粒子的過程，該等病毒粒子萌發且感染鄰近的細胞。在一個具體例中，結果為大片區域被迅速感染，其中大部分區域最初未被原始病毒粒子感染。在一個具體例中，產生不能橫向傳播的病毒載體。在一個具體例中，若期望目的是將特定基因僅引入局部數目之目標細胞中，則此特徵可為有用的。

【0159】 在一個具體例中，可使用各種方法將編碼本發明之重組融合蛋白的表現載體引入細胞中。此類方法一般描述於 Sambrook 等人，*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992)；Ausubel 等人，*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989)；Chang 等人，*Somatic Gene Therapy*, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995)；Vega 等人，*Gene Targeting*, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Butterworths, Boston Mass. (1988) 及 Gilboa 等人 [*Biotechniques* 4 (6): 504-512, 1986] 中，且包括例如穩定或短暫轉染、脂轉染、電穿孔及用重組病毒載體感染。另外，關於正向-負向選擇方法，參見美國專利第 5,464,764 號及第 5,487,992 號。

【0160】 在一些具體例中，藉由病毒感染引入核酸提供相較於其他方法，諸如脂質體轉染及電穿孔之若干優點，因為可由於病毒之感染性質而獲得較高轉染效率。

【0161】在一個具體例中，應瞭解，本發明之多肽亦可由採用上文所描述之任何適合的投與模式向個體投與之核酸構築體表現(亦即活體內基因療法)。在一個具體例中，核酸構築體經由適當的基因運載工具/方法(轉染、轉導、同源重組等)及表現系統(視需要)引入適合的細胞中，且隨後將經修飾之細胞在培養中擴增且返回至個體(亦即活體外基因療法)。

【0162】應瞭解，除含有所插入編碼序列(編碼多肽)之轉錄及轉譯所必需的元件以外，本發明之表現構築體亦可包括經工程改造以使所表現多肽之穩定性、產生、純化、產量或活性最佳化的序列。

【0163】在一些具體例中，經轉型細胞係在允許表現大量重組融合蛋白或多肽之有效條件下培養。在一些具體例中，有效培養條件包括但不限於允許蛋白質產生之有效培養基、生物反應器、溫度、pH及氧氣條件。在一個具體例中，有效培養基係指其中培養細胞以產生本發明之重組多肽的任何培養基。在一些具體例中，培養基通常包括具有可同化的碳、氮及磷酸根來源以及適當鹽、礦物質、金屬及其他營養素諸如維生素之水溶液。在一些具體例中，本發明之細胞可在習知醱酵生物反應器、搖瓶、試管、微量滴定盤及培養皿中培養。在一些具體例中，培養在適於重組細胞之溫度、pH及氧氣含量下進行。在一些具體例中，培養條件在一般熟悉本技藝者之專業知識內。

【0164】在一些具體例中，視用於生產之載體及宿主

系統而定，本發明之所得多肽保留在重組細胞內、分泌至醱酵培養基中、分泌至兩個細胞膜之間的空間(諸如大腸桿菌之周質空間)中；或保留在細胞或病毒膜之外表面。

【0165】 在一個具體例中，在預定的培養時間後，實現重組多肽的回收。

【0166】 在一個具體例中，本文所用之片語「回收重組多肽」係指收集含有多肽之整個醱酵培養基，且無需暗示額外的分離或純化步驟。

【0167】 在一個具體例中，本發明之多肽使用多種標準蛋白純化技術純化，諸如但不限於親和層析、離子交換層析、過濾、電泳、疏水性相互作用層析、凝膠過濾層析、逆相層析、刀豆球蛋白 A 層析、層析聚焦及差異溶解。

【0168】 在一個具體例中，為了促進回收，所表現之編碼序列可經工程改造以編碼本發明之多肽及融合可裂解部分。在一個具體例中，融合蛋白可經設計以使得多肽可容易地藉由親和層析分離；例如，藉由固定於對可裂解部分具有特異性之管柱上。在一個具體例中，裂解位點經工程改造在多肽與可裂解部分之間，且多肽可藉由用在此位點特異性裂解融合蛋白之適當酶或藥劑處理而自層析管柱釋放 [例如參見 Booth 等人，*Immunol. Lett.* 19:65-70 (1988)；及 Gardella 等人，*J. Biol. Chem.* 265:15854-15859 (1990)]。

【0169】 在一個具體例中，本發明之多肽以「實質上

純」的形式取回。

【0170】在一個具體例中，片語「實質上純」係指允許蛋白質在本文所述之應用中有效使用的純度。

【0171】在一個具體例中，本發明之多肽亦可使用活體外表現系統合成。在一個具體例中，活體外合成方法為此項技術中所熟知，且系統之組分為可商購的。

【0172】在一些具體例中，重組多肽經合成及純化；其治療功效可在活體內或活體外加以分析。

【0173】在一個具體例中，包含本發明之重組融合蛋白的本文提供之醫藥組成物與醫藥載劑一起進一步調配。如本文所用，「醫藥載劑」包括生理學上相容之任何及所有溶劑、分散介質、包衣、抗細菌劑及抗真菌劑、等張劑及吸收延遲劑及其類似物。較佳地，載劑適用於靜脈內、肌肉內、皮下、非經腸、脊椎或表皮投與(例如藉由注射或輸注)。

治療方法

【0174】在一個具體例中，本發明提供一種治療有需要之個體之疾病或病況的方法，該方法包含投與治療有效量之重組融合蛋白或包含本文所揭示之重組融合蛋白的醫藥組成物。

【0175】在一個具體例中，本發明提供一種治療有需要個體之心血管疾病或病況的方法，該方法包含投與治療有效量之重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物。

【0176】在一個具體例中，本發明提供一種預防、抑制、遏制或延遲個體之心血管疾病或病況發作的方法，該方法包含投與有效量之本文所述之重組融合蛋白或醫藥組成物。

【0177】在一些具體例中，心血管疾病或病況包含心房震顫。

【0178】在一些具體例中，心血管疾病或病況包含心臟纖維化。

【0179】在一些具體例中，心血管疾病或病況包含心房震顫及心臟纖維化。

【0180】在一些具體例中，心血管疾病包含慢性心臟衰竭/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相關之再灌注損傷、化學療法誘導之心臟毒性(成人或小兒)、輻射誘導之心臟毒性、小兒先天性心臟病之手術干預的輔助治療。

【0181】在一些具體例中，其中化學療法誘導之心臟毒性由接受蔥環黴素、烷基化劑、抗微管劑及用作化學療法之抗代謝物藥劑的個體產生。

【0182】在一些具體例中，心血管病況係由於個體接受癌症療法而導致的心臟毒性。在其他具體例中，癌症療法為HER-2靶向療法。在其他具體例中，HER-2靶向療法包含使用曲妥珠單抗、阿多曲妥珠單抗、恩他新、拉帕替尼、來那替尼及帕妥珠單抗、任何抗HER2抗體、任何抗HER2劑或其組合。

【0183】在另一態樣中，本發明係關於一種誘導肌細胞肌節及細胞骨架結構重塑或細胞-細胞黏附的方法，該方法包含用本文所揭示之重組融合蛋白處理細胞。

【0184】在一個具體例中，治療方法係針對治療由哺乳動物中心肌細胞-細胞黏附的解離及/或肌節結構紊亂引起的心臟衰竭。

【0185】在另一態樣中，本發明提供一種用於預防、治療或延遲人類之射出分率正常型心臟衰竭的方法，該方法包含投與包含本文所揭示之重組融合蛋白的醫藥組成物。

【0186】如本文所用，術語「射血分數」係指射血分數(EF)，亦即左心室在每次收縮時泵出多少血液的量測值，通常表示為百分比。例如，50%的射血分數意味著左心室中50%的血液總量在每次心跳時被推出。

【0187】本發明係關於治療患有或有風險罹患心臟病及相關病況例如心臟衰竭之個體。

【0188】術語「心臟衰竭」意謂心臟功能異常，其中心臟不能以代謝組織要求所需的速率泵血。心臟衰竭包括各種疾病狀態，諸如充血性心臟衰竭、心肌梗塞、心搏過速、家族性肥厚性心肌病、缺血性心臟病、特發性擴張型心肌病及心肌炎。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。慢性心臟肥大為一種嚴重的患病狀態，其為充血性心臟衰竭及心跳驟停的先兆。

【0189】 在一個具體例中，「治療」係指治療性治療及預防性或防治性措施，其中目標為預防或減緩(減輕)心臟肥大。需要治療者包括已患有病症者以及易於患有病症者或待預防病症者。心臟肥大可來自對視黃酸起反應之任何病因，包括先天性、病毒性、特發性、心臟營養性或肌營養性病因，或由於局部缺血或局部缺血傷害，諸如心肌梗塞。通常，進行治療以阻止或減緩肥大進展，尤其在已發生諸如來自局部缺血之心臟損傷之後。較佳地，對於治療心肌梗塞，本文提供之醫藥組成物在心肌梗塞後立即給予以預防或減輕肥大。

【0190】 在一些具體例中，用本文所述之重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物治療患有心房震顫或心臟纖維化之個體可導致減少心房震顫或纖維化之徵象或症狀。舉例而言，用重組融合蛋白治療個體可減少心房震顫之持續時間及/或頻率，或減少心房震顫之徵象或症狀，諸如減少心跳不規則、心悸、頭暈、極度疲勞、呼吸短促、胸痛或其組合。在一些具體例中，用重組融合蛋白治療個體減少心臟組織，例如心房組織中之膠原蛋白含量或沉積。

【0191】 在一些具體例中，相較於接受非本發明化合物之藥物或其醫藥學上可接受之鹽、溶劑合物、類似物或衍生物的單一療法的群體，用包含本文提供之重組融合蛋白之醫藥組成物治療個體可使得經治療之個體群體之平均存活時間增加。較佳地，在用本文所提供之策略、治療模態、方法、組合及組成物治療後，平均存活時間增加超過

30天；更佳超過60天；更佳超過90、120或365天；更佳超過365天。群體平均存活時間的增加可藉由任何可再現的手段來量測。群體平均存活時間的增加可例如藉由計算群體在開始用活性化合物治療後的平均存活時間長度來量測。群體平均存活時間的增加亦可例如藉由計算群體在完成本文所揭示之醫藥組成物之第一輪治療後的平均存活時間長度來量測。

【0192】 在一些具體例中，用包含本文提供之重組融合蛋白的醫藥組成物治療個體相比於僅接受載劑之群體可使得經治療之個體群體之死亡率降低。治療癌症可使得經治療之個體群體與未治療的群體相比死亡率降低。與接受非本發明化合物之藥物或其醫藥學上可接受之鹽、溶劑合物、類似物或衍生物的單一療法的群體相比，治療癌症可導致經治療之個體群體的死亡率降低。較佳地，在用本文所提供之策略、治療模態、方法、組合及組成物治療後，死亡率降低超過2%；更佳超過5%；更佳超過10%；且最佳超過25%。經治療之個體群體的死亡率降低可藉由任何可再現的手段來量測。群體死亡率的降低可例如藉由計算群體在開始用活性化合物治療後每單位時間的疾病相關的平均死亡數來量測。群體死亡率的降低亦可例如藉由計算群體在完成本文所揭示之醫藥組成物的第一輪治療後每單位時間的疾病相關的平均死亡數來量測。

【0193】 在一個具體例中，本發明提供一種治療有需要之個體之中樞神經系統(CNS)相關疾病或病況的方法，

該方法包含投與治療有效量之本文所述之重組融合蛋白或醫藥組成物。

【0194】 在一個具體例中，本發明提供一種預防、抑制、遏制或延遲個體之CNS相關疾病或病況發作的方法，該方法包含投與有效量之本文所述之重組融合蛋白或醫藥組成物。

【0195】 在一些具體例中，CNS相關疾病或病況為肌萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)、帕金森氏病、阿茲海默氏病、貝爾氏麻痺、癲癇及癲癇發作、格林-巴利症候群、中風、創傷性腦損傷、多發性硬化症或組合。

投藥、給藥

【0196】 本發明之組成物可非經腸投與有需要之個體，或可藉由此項技術中已知之各種方法投與。如熟悉本技藝者所瞭解，投與途徑及/或模式將視所要結果而變化。為了藉由某些投與途徑投與本發明化合物，可能需要用防止其失活之材料包覆該化合物或將該化合物與該材料共投與。舉例而言，化合物可於適當載劑(例如脂質體或稀釋劑)中向個體投與。醫藥學上可接受之稀釋劑包括鹽水及水性緩衝溶液。醫藥載劑包括無菌水溶液或分散液及用於臨時製備無菌可注射溶液或分散液之無菌散劑。此類介質及藥劑用於醫藥活性物質之用途為此項技術中已知的。

【0197】 在典型具體例中，向個體投與之製劑包括無

菌水性或非水性溶液、懸浮液及乳液。一些具體例包括非水性溶劑，諸如丙二醇、聚乙二醇、植物油(例如橄欖油)、有機酯(例如油酸乙酯)及熟悉本技藝者已知的其他溶劑。生理學上可接受之載劑(或賦形劑)可選地用於本發明之某些具體例中。此類之實例包括例如生理鹽水、PBS、林格氏溶液、乳酸林格氏溶液等。另外，防腐劑及添加劑可選地添加至組成物中，以幫助確保穩定性及無菌性。舉例而言，抗生素及其他殺細菌劑、抗氧化劑、螯合劑及其類似物可選地均存在於本文組成物之各種具體例中。

【0198】如本文所用，片語「非經腸投藥」及「非經腸投與」意謂除經腸及局部投藥以外的投藥模式，通常藉由注射，且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、表皮下、關節內、囊下、蛛膜下、脊柱內、硬膜外及胸骨內注射及輸注。

【0199】無論選擇何種投藥途徑，可以適合之水合形式使用之本發明化合物及/或本發明之醫藥組成物係藉由熟悉本技藝者已知的習知方法調配成醫藥學上可接受之劑型。

【0200】重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物可選地在任何適當的無菌醫藥載劑中向需要治療(治療性或預防性)之個體投與。此類醫藥載劑用以維持融合蛋白之可溶性及作用。在一些具體例中，可能需要結合融合蛋白投與額外組分。舉例而言，在一些治療方案中，化學治療劑、

抗生素、包含本發明之重組融合蛋白之額外調配物及一或多種護理標準劑等全部可選地包括在本發明之組成物中。

【0201】如本文所用，術語「組合治療」、「組合療法」及「共同療法」可互換使用，且一般係指以重組融合蛋白或包含本文提供之重組融合蛋白及額外治療劑的醫藥組成物為特徵的治療模態。通常，組合治療模態為意欲自治療劑組合之並行作用提供有益作用的特定治療方案之一部分。組合之有益效果可包括但不限於由治療劑組合產生之藥物動力學或藥力學共同作用。組合投與此等治療劑通常在規定時間段(視所選組合而定，通常數分鐘、數小時、數天或數週)內進行。在一些具體例中，組合治療包含以依序方式投與兩種或更多種治療劑，其中各治療劑在不同時間投與，以及以實質上同時的方式投與此等治療劑或至少兩種治療劑。實質上同時投與可例如藉由向個體投與具有固定比率之各治療劑的單一劑型或治療劑之多種各別劑型來實現。依序或實質上同時投與各治療劑可藉由任何適當途徑實現，包括但不限於經口途徑、靜脈內途徑、肌肉內途徑及經由黏膜組織直接吸收。治療劑可藉由相同途徑或藉由不同途徑投與。治療劑可按照相同或不同的投藥時間間隔投與。例如，所選擇之組合之第一治療劑可藉由經腸注射投與，而該組合之其他治療劑可經口投與。或者，例如，所有治療劑可經口投與或所有治療劑可藉由靜脈內注射投與。

【0202】在一些具體例中，組合療法亦涵蓋如上文所

述之治療劑與其他生物活性成分及非藥物療法(例如手術或放射治療)進一步組合投與。在組合療法進一步包含非藥物療法的情況下，非藥物療法可在任何適合之時間執行，只要治療劑與非藥物療法之組合之協同作用達成有益的效果。舉例而言，在適當情況下，當非藥物治療暫時自治療劑投與中移除(可能隔數天或甚至數週)時，仍達成有益效果。

【0203】 在一些具體例中，額外治療劑為化學治療劑(亦稱為抗腫瘤劑或抗增殖劑)，例如，烷基化劑；抗生素；抗代謝物；解毒劑；干擾素；多株或單株抗體；EGFR抑制劑；HER2抑制劑；組蛋白去乙酰酶抑制劑；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、蔥環黴素、微管靶向藥物、拓樸異構酶毒藥、分子目標或酶之抑制劑(例如激酶或蛋白質甲基轉移酶)、胞苷類似物藥物或任何化學治療劑、免疫檢查點抑制劑、基於鉑之抗贅生劑、CDK抑制劑、PARP抑制劑或熟悉本技藝者已知的任何抗贅生劑或抗增殖劑。

【0204】 適合根據本文提供之組合治療模態使用的例示性烷基化劑包括但不限於環磷醯胺(Cytosan；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)；達卡巴仁(DTIC-Dome)；奧沙利鉑(Eloxatin)；卡莫司汀

(Gliadel)；異環磷醯胺 (Ifex)；二氯甲基二乙胺 (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)；或鏈佐星 (Zanosar)。

【0205】例示性適合的蔥環黴素包括但不限於阿黴素 (Adriamycin)；阿黴素脂質體 (Doxil)；米托蔥醌 (Novantrone)；博萊黴素 (Blenoxane)；道諾黴素 (Cerubidine)；道諾黴素脂質體 (DaunoXome)；更生黴素 (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)。

【0206】例示性抗代謝物包括但不限於氟尿嘧啶 (Aducil)；卡培他濱 (Xeloda)；羥基脲 (Hydrea)；巯基嘌呤 (Purinethol)；培美曲塞 (Alimta)；氟達拉濱 (Fludara)；奈拉濱 (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)；甲胺喋呤 (MTX；Rheumatrex)；甲胺喋呤 (Trexall)；硫鳥嘌呤 (Tabloid)；TS-1或阿糖胞苷 (Tarabine PFS)。

【0207】例示性解毒劑包括但不限於阿米福汀 (Ethyol)或美司鈉 (Mesnex)。

【0208】例示性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)。

【0209】例示性多株或單株抗體包括但不限於曲妥珠單抗 (Herceptin)；奧法木單抗 (Arzerra)；貝伐單抗 (Avastin)；利妥昔單抗 (Rituxan)；西妥昔單抗 (Erbix)；帕尼單抗 (Vectibix)；托西莫單抗 / 碘 -131 托西莫單抗 (Bexxar)；阿倫單抗 (Campath)；替伊莫單抗 (Zevalin；In-111；Y-90 Zevalin)；吉妥珠單抗 (Mylotarg)；依庫珠單抗 (Soliris)或德諾單抗。

【0210】例示性 EGFR 抑制劑包括但不限於吉非替尼 (Iressa)；拉帕替尼 (Tykerb)；西妥昔單抗 (Erbix)；厄洛替尼 (Tarceva)；帕尼單抗 (Vectibix)；PKI-166；卡奈替尼 (CI-1033)；馬妥珠單抗 (EMD 72000)或 EKB-569。

【0211】例示性 HER2 抑制劑包括但不限於曲妥珠單抗 (Herceptin)；拉帕替尼 (Tykerb)或 AC-480。

【0212】組蛋白去乙醯酶抑制劑包括但不限於伏立諾他 (Zolinza)。

【0213】例示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)；尼魯胺(Nilandron)；阿巴瑞克(Plenaxis)；或舉內酯(Teslac)。

【0214】例示性有絲分裂抑制劑包括但不限於紫杉醇(Taxol；Onxol；Abraxane)；多西他賽(Taxotere)；長春新鹼(Oncovin；Vincasar PFS)；長春鹼(Velban)；依託泊昔(Toposar；Etopophos；VePesid)；替尼泊昔(Vumon)；伊沙匹隆(Ixempra)；諾考達唑；埃博黴素；長春瑞賓(Navelbine)；喜樹鹼(CPT)；伊立替康(Camptosar)；拓樸替康(Hycamtin)；安吡啶或片螺素D (LAM-D)。

【0215】例示性MTOR抑制劑包括但不限於依維莫司(Afinitor)或替西羅莫司(Torisel)；雷帕嗚、地磷莫司；或AP23573。

【0216】例示性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；莫替沙尼；或AP24534。

【0217】例示性絲胺酸/蘇胺酸激酶抑制劑包括但不限於魯伯斯塔；厄瑞爾/法舒地爾鹽酸鹽；夫拉平度；塞利希布(CYC202；Roscovitine)；SNS-032 (BMS-387032)；Pkc412；苔蘚蟲素；KAI-9803；SF1126；VX-680；Azd1152；Arry-142886 (AZD-6244)；SCIO-469；GW681323；CC-401；CEP-1347或PD 332991。

【0218】例示性酪胺酸激酶抑制劑包括但不限於厄洛替尼(Tarceva)；吉非替尼(Iressa)；伊馬替尼(Gleevec)；

索拉非尼 (Nexavar) ; 舒尼替尼 (Sutent) ; 曲妥珠單抗 (Herceptin) ; 貝伐單抗 (Avastin) ; 利妥昔單抗 (Rituxan) ; 拉帕替尼 (Tykerb) ; 西妥昔單抗 (Erbix) ; 帕尼單抗 (Vectibix) ; 依維莫司 (Afinitor) ; 阿侖單抗 (Campath) ; 吉妥珠單抗 (Mylotarg) ; 替西羅莫司 (Torisel) ; 帕啞帕尼 (Votrient) ; 達沙替尼 (Sprycel) ; 尼羅替尼 (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 。

【0219】 例示性 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) 、蘭尼單抗、派加替尼或凡德替尼。

【0220】 例示性微管靶向藥物包括但不限於紫杉醇、多西他賽、長春新鹼、長春鹼、諾考達啞、埃博黴素及溫諾平。

【0221】 例示性拓樸異構酶毒藥包括但不限於替尼泊昔、依託泊昔、阿黴素、喜樹鹼、道諾黴素、更生黴素、米托蒽醌、安吡啶、表柔比星及伊達比星。

【0222】 例示性紫杉烷或紫杉烷衍生物包括但不限於紫杉醇及多烯紫杉醇。

【0223】 例示性免疫檢查點抑制劑包括計劃性細胞死亡 1 (PD-1) 、CD274 分子 (PD-L1) 及細胞毒性 T 淋巴細胞相關蛋白 4 (CTLA4) 抑制劑。例示性 PD-1 抑制劑包括派姆單

抗、納武單抗及西米普利單抗。例示性PD-L1抑制劑包括阿特珠單抗、阿維魯單抗及德瓦魯單抗。例示性CLTA4抑制劑包括伊匹單抗。

【0224】例示性基於鉑之抗腫瘤劑包括順鉑及卡鉑。

【0225】例示性週期蛋白依賴性激酶(CDK)抑制劑包括阿貝西尼、帕博西尼及瑞博西尼。

【0226】例示性聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)抑制劑包括塔拉佐帕瑞、奧拉帕尼、盧卡帕尼、尼拉帕尼及維利帕尼。

【0227】例示性通用化學治療劑、抗贅生劑、抗增殖劑包括但不限於六甲蜜胺(Hexalen)；異維甲酸(Accutane；Amnesteem；Claravis；Sotret)；維甲酸(Vesanoid)；阿紮胞昔(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)；培門冬酶(Oncaspar)；地尼白介素(Ontak)；卞吩姆(Photofrin)；阿地介白素(Proleukin)；來那度胺(Revlimid)；貝沙羅汀(Targretin)；沙利度胺(Thalomid)；替西羅莫司(Torisel)；三氧化二砷(Trisenox)；維替泊芬(Visudyne)；含羞草鹼(Leucenol)；(1 M喃氟啶-0.4 M 5-氯-2,4-二羥基吡啶-1 M氧嗪酸鉀)或洛伐他汀。

【0228】在一些具體例中，提供組合治療模態，其中額外治療劑為細胞介素，例如G-CSF(顆粒球群落刺激因子)。在另一態樣中，本文所提供之醫藥組成物可與放射

療法組合投與。放射療法亦可與本文所提供之醫藥組成物及本文中描述為多藥劑療法之一部分的另一化學治療劑組合投與。在另一態樣中，本文所提供之醫藥組成物可與標準化學療法組合組合投與，諸如但不限於CMF（環磷醯胺、甲胺喋呤及5-氟尿嘧啶）、CAF（環磷醯胺、阿黴素及5-氟尿嘧啶）、AC（阿黴素及環磷醯胺）、FEC（5-氟尿嘧啶、表柔比星及環磷醯胺）、ACT或ATC（阿黴素、環磷醯胺及紫杉醇）、利妥昔單抗、Xeloda（卡培他濱）、順鉑（CDDP）、卡鉑、TS-1（喃氟啶、吉美司特及奧他司特鉀，莫耳比為1:0.4:1）、喜樹鹼-11（CPT-11、伊立替康或Camptosar™）、CHOP（環磷醯胺、羥基道諾黴素、安可平及普賴松或普賴蘇穠）、R-CHOP（利妥昔單抗、環磷醯胺、羥基道諾黴素、安可平、普賴松或普賴蘇穠）或CMFP（環磷醯胺、甲胺喋呤、5-氟尿嘧啶及普賴松）。

【0229】在一些較佳具體例中，本文所提供之醫藥組成物可與酶（諸如受體或非受體激酶）之抑制劑一起投與。受體及非受體激酶為例如酪胺酸激酶或絲胺酸/蘇胺酸激酶。本文所述之激酶抑制劑為小分子、多核酸、多肽或抗體。

【0230】例示性激酶抑制劑包括但不限於貝伐單抗（靶向VEGF）、BIBW 2992（靶向EGFR及Erb2）、西妥昔單抗/Erbitux（靶向Erb1）、伊馬替尼/Gleevec（靶向Bcr-Abl）、曲妥珠單抗（靶向Erb2）、吉非替尼/Iressa（靶向EGFR）、蘭尼單抗（靶向VEGF）、派加替尼（靶向VEGF）、

厄洛替尼/Tarceva (靶向 Erb1)、尼羅替尼(靶向 Bcr-Abl)、拉帕替尼(靶向 Erb1及 Erb2/Her2)、GW-572016/二甲苯磺酸拉帕替尼(靶向 HER2/Erb2)、帕尼單抗/Vectibix (靶向 EGFR)、凡德替尼(靶向 RET/VEGFR)、E7080 (多目標，包括 RET及 VEGFR)、Herceptin (靶向 HER2/Erb2)、PKI-166 (靶向 EGFR)、卡奈替尼/CI-1033 (靶向 EGFR)、舒尼替尼/SU-11464/Sutent (靶向 EGFR 及 FLT3)、馬妥珠單抗/Emd7200 (靶向 EGFR)、EKB-569 (靶向 EGFR)、Zd6474 (靶向 EGFR及 VEGFR)、PKC-412 (靶向 VEGFR及 FLT3)、瓦他拉尼/Ptk787/ZK222584 (靶向 VEGFR)、CEP-701 (靶向 FLT3)、SU5614 (靶向 FLT3)、MLN518 (靶向 FLT3)、XL999 (靶向 FLT3)、VX-322 (靶向 FLT3)、Azd0530 (靶向 SRC)、BMS-354825 (靶向 SRC)、SKI-606 (靶向 SRC)、CP-690 (靶向 JAK)、AG-490 (靶向 JAK)、WHI-P154 (靶向 JAK)、WHI-P131 (靶向 JAK)、索拉非尼/Nexavar (靶向 RAF激酶、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、PDGFR- β 、KIT、FLT-3及 RET)、達沙替尼/Sprycel (BCR/ABL及 Src)、AC-220 (靶向 Flt3)、AC-480 (靶向所有HER蛋白，「panHER」)、二磷酸莫替沙尼(靶向 VEGF1-3、PDGFR及 c-kit)、德諾單抗(靶向 RANKL，抑制 SRC)、AMG888 (靶向 HER3)及 AP24534 (多目標，包括 Flt3)。

【0231】在一些具體例中，例如投與重組融合蛋白以治療心房震顫之彼等具體例，組合療法可包括投與 β 阻斷劑(例如比索洛爾或琥珀酸美托洛爾)、鈣通道阻斷劑(例如

地爾硫卓或維拉帕米)、地高辛、抗心律不整藥物(例如普羅帕酮、氟卡尼、索他洛爾、多非利特、胺碘酮及屈奈達隆)或血液稀釋劑(例如華法林、阿哌沙布、達比加群、依度沙班或利伐沙班)。在一些具體例中，組合療法可包括心臟復律療法，以重置心臟竇性心律(例如電氣或藥物心臟復律)。在一些具體例中，組合療法可包括消融(ablation)，例如AV結節消融或Maze手術。消融使用手術刀，或熱或冷，在心臟上形成小疤痕，阻斷錯誤的電信號，恢復正常的心律。

【0232】 在另一個具體例中，包含本文所揭示之相同多肽的重組融合蛋白或醫藥組成物每天向個體投與一次。在一些具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物每兩天向個體投與一次。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物每三天向個體投與一次。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物每四天向個體投與一次。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物每五天向個體投與一次。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物每六天向個體投與一次。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物每週向個體投與一次。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物每7-14天向個體投與一次。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物每10-20天向個體投與一次。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物每5-15天向個體投與一

次。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物每15-30天向個體投與一次。

【0233】 在一個具體例中，本發明之重組融合蛋白之劑量在可注射溶液中包含0.005至0.1 mg/kg。在另一個具體例中，劑量包含0.005至0.5 mg/kg重組融合蛋白。在另一個具體例中，劑量包含0.05至0.1微克重組融合蛋白。在另一個具體例中，劑量包含0.005至0.1 mg/kg之可注射溶液中的重組融合蛋白。

【0234】 在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物以0.0001 mg至0.6 mg範圍內之劑量向個體投與。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物以0.001 mg至0.005 mg範圍內之劑量向個體投與。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物以0.005 mg至0.01 mg範圍內之劑量向個體投與。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物以0.01 mg至0.3 mg範圍內之劑量向個體投與。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物以0.2 mg至0.6 mg範圍內之劑量向個體投與。

【0235】 在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物以1-100 mcg/kg範圍內之劑量向個體投與。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物以10-80 mcg/kg範圍內之劑量向個體投與。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物以20-60 mcg/kg範圍內之劑量向個體投與。在另一個具體例中，重

組融合蛋白或包含其之醫藥組成物以 10-50 mcg/kg 範圍內之劑量向個體投與。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物以 40-80 mcg/kg 範圍內之劑量向個體投與。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物以 10-30 mcg/kg 範圍內之劑量向個體投與。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物以 30-60 mcg/kg 範圍內之劑量向個體投與。

【0236】 在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物以 0.1 mcg/kg 至 100 mg/kg 範圍內之劑量向個體投與。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物以 0.1 mcg/kg 至 50 mg/kg 範圍內之劑量向個體投與。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物以 0.1 mcg/kg 至 25 mg/kg 範圍內之劑量向個體投與。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物以 0.1 mcg/kg 至 10 mg/kg 範圍內之劑量向個體投與。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物以 0.1 mcg/kg 至 5 mg/kg 範圍內之劑量向個體投與。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物以 0.1 mcg/kg 至 1 mg/kg 範圍內之劑量向個體投與。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物以 0.1 mcg/kg 至 0.1 mg/kg 範圍內之劑量向個體投與。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物以 10 mg/kg 至 60 mg/kg 範圍內之劑量向個體投與。

【0237】 在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其

之醫藥組成物以約0.1 mg/kg、0.2 mg/kg、0.3 mg/kg、0.4 mg/kg、0.5 mg/kg、約1 mg/kg、約2 mg/kg、約3 mg/kg、約4 mg/kg、約5 mg/kg、約6 mg/kg、約7 mg/kg、約8 mg/kg、約9 mg/kg、約10 mg/kg、約20 mg/kg、約30 mg/kg、約40 mg/kg、約50 mg/kg、約60 mg/kg或約70 mg/kg之劑量向個體投與。在一些具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物以約0.1 mg/kg、0.2 mg/kg、0.3 mg/kg、0.4 mg/kg、0.5 mg/kg、0.6 mg/kg、0.7 mg/kg、0.8 mg/kg、0.9 mg/kg或1 mg/kg之劑量向個體投與。

【0238】在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物以0.2 mg至2 mg範圍內之劑量向個體投與。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物以2 mg至6 mg範圍內之劑量向個體投與。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物以4 mg至10 mg範圍內之劑量向個體投與。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物以5 mg至15 mg範圍內之劑量向個體投與。

【0239】在一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物以10 µg/kg-1000 µg/kg範圍內之劑量向個體投與。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物以25 µg/kg-600 µg/kg範圍內之劑量向個體投與。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物以50 µg/kg-400 µg/kg範圍內之劑量向個體投與。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物以約25 µg/kg

之劑量向個體投與。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物以約 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之劑量向個體投與。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物以約 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之劑量向個體投與。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物以約 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之劑量向個體投與。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物以約 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之劑量向個體投與。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物以約 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之劑量向個體投與。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物以約 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之劑量向個體投與。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物以約 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之劑量向個體投與。

【0240】 在一個具體例中，向個體投與單次劑量之重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物。在另一個具體例中，向個體投與總共兩次劑量。在另一個具體例中，向個體投與總共兩次或更多次劑量。

【0241】 在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物之劑量至少每天向個體投與一次。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物之劑量至少每兩天向個體投與一次。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物之劑量至少每兩天或更多天向個體投與一次。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物之劑量每週、每兩週或每三週向個體投與。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組

成物之劑量至少每週向個體投與一次。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物之劑量至少每兩週向個體投與一次。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物之劑量至少每三週向個體投與一次。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物之劑量至少每三週或更多週向個體投與一次。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物之劑量每週向個體投與兩次或更多次。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物之劑量每月向個體投與兩次或更多次。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物之劑量每年向個體投與兩次或更多次。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物之劑量每兩年向個體投與兩次或更多次。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物之劑量每兩年或更多年向個體投與兩次或更多次。

【0242】 在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物之劑量至少每36小時投與一次。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物之劑量至少每48小時投與一次。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物之劑量至少每60小時投與一次。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物之劑量至少每72小時投與一次。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物之劑量至少每84小時投與一次。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組

成物之劑量至少每96小時投與一次。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物之劑量至少每5天投與一次。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物之劑量至少每6天投與一次。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物之劑量至少每7天投與一次。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物之劑量至少每8-10天投與一次。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物之劑量至少每10-12天投與一次。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物之劑量至少每12-15天投與一次。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物之劑量至少每15-25天投與一次。在另一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物之劑量至少每20-30天投與一次。

【0243】 在一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物之劑量至少每1個月向個體投與一次。在一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物之劑量至少每2個月投與一次。在一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物之劑量至少每3個月投與一次。在一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物之劑量至少每4個月投與一次。在一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物之劑量至少每5個月投與一次。在一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物之劑量至少每6個月投與一次。在一個具體例中，重組融合蛋

白或包含其之醫藥組成物之劑量至少每6-12個月投與一次。在一個具體例中，重組融合蛋白或包含其之醫藥組成物之劑量係每季投與。在另一個具體例中，劑量係每日、每週、每兩週、每月或每年投與。在另一個具體例中，劑量係一天、一週、一個月或一年投與一次、兩次或兩次或更多次。在另一個具體例中，劑量係每兩年、三年、四年或至少五年投與。

【0244】 在一個具體例中，本發明之組成物的重複投與(給藥)可在第一個療程後立即進行，或在間隔數天、數週或數年後進行，以達到本文進一步提供的期望效果(例如預防或治療心血管疾病或病況，或CNS相關疾病或病況)。

【0245】 在一個具體例中，醫藥組成物藉由靜脈內、動脈內、皮下或肌肉內注射液體製劑來投與。在另一個具體例中，液體調配物包括溶液、懸浮液、分散液、乳液、油及其類似物。在一個具體例中，醫藥組成物係靜脈內投與，且因此以適用於靜脈內投與之形式調配。在另一個具體例中，醫藥組成物係動脈內投與，且因此以適用於動脈內投與之形式調配。

【0246】 在一些具體例中，用於本文所揭示之方法的組成物包含溶液或乳液，其在一些具體例中為包含安全且有效量之本文所揭示之化合物及可選地其他化合物的水溶液或乳液，意欲用於靜脈內或皮下投與。

【0247】 在一些具體例中，組成物之各種成分係預量

測及/或預封裝及/或無需額外測量即使用等。本發明亦可選地包含用於進行/使用本發明之方法及/或組成物的套組。特別地，此等套組可選地包括例如適當的重組融合蛋白(及可選地若干此類蛋白質之混合物，用於進行協同治療，參見上文)以及可選地適當的疾病相關抗原)。另外，此類套組亦可包含適當的賦形劑(例如醫藥學上可接受之賦形劑)，用於進行本發明之治療性及/或預防性治療。此類套組可選地含有用於組裝及/或使用本發明之組成物的額外組分，包括但不限於例如稀釋劑等。

【0248】 本文所述之組成物可選地封裝成包括用於進行本發明之方法或用於使用本發明之組成物的所有(或幾乎所有)必要組分(可選地包括例如本發明之方法/組成物之使用的書面說明)。舉例而言，套組可選地包括諸如緩衝液、試劑、血清蛋白、抗體、受質等之組分。在預封裝試劑之情況下，套組可選地包括預量測或預給藥的量，無需量測即可併入方法中，例如預量測的流體等分試樣；或預稱重或預量測的固體試劑，其可容易由套組之最終使用者復原。

【0249】 此類套組通常亦包括執行本發明之方法及/或使用本發明之組成物的適當說明書。在一些具體例中，套組/封裝之組分係以穩定形式提供，以便防止在長期儲存期間發生降解或其他損失，例如滲漏。多種穩定方法/藥劑廣泛用於待儲存之試劑等，諸如包括化學穩定劑(亦即酶抑制劑、殺微生物劑/抑菌劑、抗凝血劑)等。本發明

之醫藥組成物中活性成分之實際劑量濃度可變化，以便獲得能有效達成特定個體、組成物及投與模式之所要治療反應而對個體無毒的一定量之活性成分。所選劑量濃度將視多種藥物動力學因素而定，包括所用本發明之特定組成物之活性；投藥途徑；投藥時間；所採用之特定化合物之排泄速率；治療持續時間；與所採用之特定組成物組合使用之其他藥物、化合物及/或物質；所治療之個體之年齡、性別、體重、病狀、一般健康狀況及先前病史；及醫學技術中熟知之類似因素。

【0250】 組成物必須為無菌的，且流動性達到組成物可藉由注射器遞送的程度。除水之外，載劑較佳為等張緩衝鹽水溶液。舉例而言，可藉由使用諸如卵磷脂之包衣、藉由在分散液之情況下維持所需粒度及藉由使用界面活性劑來維持適當流動性。在許多情況下，組成物中較佳包括等張劑，例如糖、多元醇(諸如甘露糖醇或山梨糖醇)及氯化鈉。

【0251】 本發明之醫藥組成物中活性成分之實際劑量濃度可變化，以便獲得能有效達成特定個體、組成物及投與模式之所要治療反應而對個體無毒的一定量之活性成分。所選劑量濃度將視多種藥物動力學因素而定，包括所用本發明之特定組成物之活性；投藥途徑；投藥時間；所採用之特定化合物之排泄速率；治療持續時間；與所採用之特定組成物組合使用之其他藥物、化合物及/或物質；所治療之個體之年齡、性別、體重、病狀、一般健康狀況

及先前病史；及醫學技術中熟知之類似因素。

【0252】 儘管本文已描述及繪示若干本發明具體例，一般熟悉本技藝者將容易設想到各種其他方法及/或結構以執行功能及/或獲得本文所述之結果及/或該等優點之一或多者，且此類變化及/或修飾中之每一者被視為處於本文所述之本發明具體例之範疇中。更一般而言，熟悉本技藝者將容易理解，本文所述之所有參數、尺寸、材料及組態系意欲為例示性，且實際參數、尺寸、材料及/或組態將視本發明教示所使用/所使用特定應用或應用而定。熟悉本技藝者將瞭解或能確定使用不超過常規實驗，許多等同於本文所述之特定本發明具體例。因此，應理解，前述具體例僅作為實施例且在其所附申請專利範圍及其等效申請專利範圍之範疇中呈現，本發明具體例可不如具體描述及主張來實施。本發明之發明具體例係關於本文中描述各個特徵、系統、物品、材料、套組及/或方法。此外，當此等特徵、系統、物品、材料、套組及/或方法之任一組合不相互不一致時，將兩種或更多種此類特徵、系統、材料、套組及/或方法之任何組合納入本發明本發明之本發明範疇中。

【0253】 如本文所定義及使用之所有定義應理解為控制在辭典定義、以引用之方式併入的文獻中的定義及/或所定義術語之普通含義內。

【0254】 本文所揭示之全部參考文獻、專利及專利申請案根據各自所引述之主題、以引用之方式併入，在一些

情況下可涵蓋整個文獻。

【0255】 除非明確相反指示，否則如在本文說明書及申請專利範圍中使用之不定冠詞「一(a)」及「一(an)」應理解為意謂「至少一」。

【0256】 如本文在說明書及申請專利範圍中所用之片語「及/或」應理解為意謂如此結合之要素(亦即，在一些情況下結合存在且在其他情況下分離存在之要素)中之「任一者或兩者」。使用「及/或」列出的多個要素應以相同方式解釋，亦即，如此結合之「一或多個」要素。除由「及/或」條款具體識別之要素外，可可選地存在其他要素，無論與具體識別之彼等要素相關抑或不相關。因此，作為非限制性實例，指代「A及/或B」在結合諸如「包含」等開放式措辭使用時，在一個具體例中，可僅指A(可選地包括除了B以外之要素)；在另一個具體例中，可僅指B(可選地包括除了A以外之要素)；在另一個具體例中，可指A及B兩者(可選地包括其他要素)；等。

【0257】 如說明書及申請專利範圍中所用，片語「至少一個」在提及一或多個元件之清單時，應該理解為意謂選自元件清單之任一或多個元件中的至少一個元件，但不一定包括元件清單內具體所列之每一個元件中之至少一者且不排除元件清單中之任何元件組合。此定義亦允許可可選地存在除片語「至少一個」所指的要素之清單內具體識別的要素之外的要素，而無論與具體識別的彼等要素相關抑或不相關。由此，作為非限制性實例，「至少一個A及

B」(或等效地「至少一個A或B」或等效地「至少一個A及/或B」)可在一個具體例中指至少一個(可選地包括超過一個)A而不存在B(且可選地包括除B以外的要素);在另一具體例中,指至少一個(可選地包括超過一個)B而不存在A(且可選地包括除A之外的要素);在又一具體例中,指至少一個(可選地包括超過一個)A及至少一個(可選地包括超過一個)B(且可選地包括其他要素);等等。

【0258】本發明進一步提供一種用於預防、治療或延遲人類之心血管疾病或病況的套組,其中該套組包含一或多個劑量之包含本文所揭示之重組融合蛋白的醫藥組成物,用於預防、治療或延遲心血管疾病或病況,及如何使用醫藥製劑或組成物的說明書。

【0259】本發明進一步提供一種用於預防、治療或延遲人類之CNS相關疾病或病況的套組,其中該套組包含一或多個劑量之包含本文所揭示之重組融合蛋白的醫藥組成物,用於預防、治療或延遲心血管疾病或病況,及如何使用醫藥製劑或組成物的說明書。

【0260】本發明進一步提供一種用於預防、治療或延遲人類之射出分率正常型心臟衰竭的套組,其中該套組包含一或多個劑量之包含本文所揭示之重組融合蛋白的醫藥組成物,用於預防、治療或延遲射出分率正常型心臟衰竭,及如何使用醫藥製劑或組成物的說明書。

【0261】提供以下實施例以更充分地例示本發明之較佳具體例。然而,不應以任何方式將其解釋為限制本發明

的廣泛範圍。

實施例

實施例 1-表現質體之選殖及構築

【 0262 】 編碼重組融合蛋白之重鏈(分別命名為 NPCFA及 NPCF，表示有或沒有 Fc突變之序列)及輕鏈(命名為 PAL)的 DNA序列由 GENEWIZ (Suzhou, China)合成。表現載體 pCHOGUN係根據授權合約自 Horizon Discovery (Cambridge, UK)獲得。表現質體之構築如圖 1中所概述進行。簡言之，pCHOGUN載體藉由限制酶 BfuAI線性化，且在藉由 NcoI及 AscI進行雙重限制酶消化後純化基因插入片段，諸如 NPCF、NPCFA及 PAL。經線性化之 pCHOGUN/BfuAI及經純化之基因插入片段根據標準方案連接，且隨後轉型至大腸桿菌 DH5 α 勝任細胞中。將 DH5 α 細胞接種且在 37 $^{\circ}$ C 下培育隔夜。分離出質體 pCHOGUN-NPCF、pCHOGUN-NPCFA及 pCHOGUN-PAL，且藉由限制酶消化或 PCR確認。含有重鏈插入物之質體(pCHOGUN-NPCF或 pCHOGUN-NPCFA)用限制酶 BspEI及 PciI消化，而含有輕鏈插入物之質體(pCHOGUN-PAL)用限制酶 NgoMIV及 PciI消化。在限制酶消化後，將具有重鏈或輕鏈插入物之片段純化，連接且隨後轉型到 DH5 α 細胞中。含有重鏈及輕鏈插入物之質體構築體(pCHOGUN-NPCF+PAL或 pCHOGUN-NPCFA+PAL)藉由限制酶消化及 DNA定序加以鑑別及確認。

實施例 2-抗體產生、純化及表徵

【0263】 HD-BIOP3，一種衍生自 CHO K1 細胞之麩醯胺酸合成酶剔除式 (GS^{-/-}) 細胞株，係根據授權合約自 Horizon Discovery (Cambridge, UK) 獲得。質體 DNA 係使用市售 Qiagen 質體套組分離。質體 DNA 轉染至 HD-BIOP3 細胞中係使用來自 Lonza 之市售電穿孔系統來進行。將經轉染細胞接種於 96 孔盤中，且使用標準程序進行池選擇。來自選定池之細胞在 125-mL 搖瓶中培養 10-14 天，且收穫培養基進行抗體純化。抗體蛋白質藉由蛋白質-A 親和層析，接著進行尺寸排阻層析純化，且隨後根據標準方案用 SDS-PAGE 及西方墨點法分析。

【0264】 圖 2A 繪示本文所揭示之重組融合蛋白的示意性結構。圖 2B 顯示 SDS-PAGE 分析生成的代表性資料。藉由對 NRG-1 (「NRG-1」，R&D Systems, Minneapolis, MN) 之包含 HER3/4 結合域之 61 個胺基酸的活性片段具有特異性的初級抗體或 IgG 偵測到的西方墨點法結果分別顯示於圖 2C 及 2D 中。

實施例 3-藉由基於 SPR 之結合分析評定分子完整性

【0265】 本文所揭示之重組融合蛋白的分子結構完整性係藉由評估其與 HER3 蛋白及抗 NRG-1 抗體之同時結合能力來評定。帶 His 標籤之 HER3 重組蛋白 (Sino Biological, Beijing, China) 被捕捉在固定有抗 His 抗體 (Thermo Fisher,

Waltham, MA)之感測器晶片上(步驟1)，之後注入樣品(包括本文所揭示之重組融合蛋白、無Fc突變之本文所揭示之重組融合蛋白、抗HER3 mAb (步驟2)及抗NRG-1抗體(R&D Systems, Minneapolis, MN) (步驟3)。His-HER3在感測器晶片上之附接可經由步驟1中所有6個通道上的信號增加來可視化。本文所揭示之重組融合蛋白及無Fc突變之本文所揭示之重組融合蛋白均在步驟2藉由結合於HER3及在步驟3藉由結合於注入的抗NRG-1抗體產生顯著反應(Ch1, 3)，表明在本文所揭示之重組融合蛋白上存在HER3結合抗原決定基及NRG-1。相反，抗HER3 mAb在步驟2僅與His-HER3結合，而不與抗NRG-1抗體及緩衝液(步驟3)結合(Ch 4, 5)，從而驗證抗HER3 mAb分子沒有NRG-1結合活性。緩衝液在步驟2及3被注入作為空白對照。因此，HER3結合抗原決定基及NRG-1均存在於本發明之重組融合蛋白中。

【0266】結合感測器圖及樣品注入順序顯示於圖3中。

實施例4-對活體外腫瘤細胞株增殖之影響

【0267】腫瘤細胞以每孔2,500-20,000個細胞接種於96孔盤中，視各細胞株之生長動力學而定。細胞隨後用本文所揭示之重組融合蛋白、抗體或對照蛋白以逐步1:4連續稀釋系列處理5天。細胞活力係使用來自Dojindo Molecular Technologies之細胞計數套組-8 (Kumamoto,

Japan)根據製造商說明書來評定。用 GraphPad Prism 軟體分析資料，且以相對於未處理對照之生長率表示。

【0268】圖4包括顯示不同癌細胞株之平均相對生長率 \pm SEM (n = 3)的代表圖：(A) NCI-N87，胃；(B) MCF-7，乳房；(C) RT-112，膀胱；及(D) T47D，乳房。與對照 NRG-1及 GP120 mAb/NRG-1融合蛋白相比，本文所揭示之重組融合蛋白在促進癌細胞增殖方面表現出明顯較低的活性。

實施例5-人類心肌細胞中 PI3K/AKT信號傳導路徑之活化

【0269】將自 Cellular Dynamics (Madison, WI)獲得之人類心肌細胞接種於經 0.1%明膠塗佈之 96孔盤中，且在鋪板培養基 (Cellular Dynamics)中恢復 4小時。隨後將細胞在維持培養基 (Cellular Dynamics)中培養 96小時，之後用於實驗。為了檢驗本發明之重組融合蛋白活化心肌細胞中 HER2:HER4信號傳導路徑之能力，細胞首先在無血清培養基中饑餓 4小時，且隨後用重組融合蛋白或對照劑 (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，溶解細胞且使用 Abcam 之磷酸 -AKT/總 AKT ELISA 套組 (Cambridge, MA)根據製造商說明書分析 AKT磷酸化。用 GraphPad Prism 軟體分析資料，且以相對於未處理對照之磷酸 -AKT與總 AKT之比率表示。

【0270】對於西方墨點分析，將細胞接種於 6孔盤中

且用 16 nM 單一濃度之本發明之重組融合蛋白或對照劑處理。在處理結束時，將細胞溶解於含有蛋白酶及磷酸酶抑制劑之 RIPA 溶解緩衝液中。SDS-PAGE 及西方墨點法係根據標準方案進行。總 AKT 及磷酸-AKT 分別用 AKT 兔抗體及 p-AKT (S473) 兔抗體 (Cell Signaling; Danvers, MA) 進行墨點法。

【0271】圖 5 顯示人類心肌細胞中回應於刺激之 AKT 磷酸化。結果表明，本文所揭示之重組融合蛋白可活化心肌細胞中之 HER2:HER4 信號傳導路徑，其效力與 NRG-1 相當。

實施例 6：HER2:HER3 二聚化與 HER2:HER4 二聚化之誘導

【0272】由 Eurofins DiscoverX (Fremont, CA) 開發之 PathHunter Dimerization Assay 偵測配體誘導之受體-二聚體對之兩個次單元的二聚化。分析原理繪示於圖 6A 中。 β -gal 酶分成兩個片段，亦即 ProLink (PK) 及酶受體 (EA)。細胞已經工程改造以共表現與酶供體 PK 融合之目標蛋白 1 及與酶受體 EA 融合之目標蛋白 2。配體與一個目標蛋白之結合誘導其與另一個目標蛋白相互作用，迫使兩個酶片段互補且導致酶反應釋放化學發光信號，該信號以相對螢光單位或 RFU 偵測。

【0273】PathHunter U2OS ErbB2/ErbB4 二聚化細胞株及 ErbB2/ErbB3 二聚化細胞株係獲自 Eurofins DiscoverX。

細胞以 4,000 個細胞 / 孔 接種於 384 孔盤中，且在 37°C / 5% CO₂ 下培育隔夜。測試劑自 28.8 nM 開始以逐步 1:4 連續稀釋系列製備，且隨後添加至 384 孔盤中之細胞。培育 4 小時後，根據製造商說明書分析細胞的受體二聚化。用 GraphPad Prism 軟體分析資料，且以平均 RFU ± SEM (n=3) 表示。

【0274】如圖 6B 及 6C 所示，本文所揭示之重組融合蛋白可誘導 HER2/HER4 二聚化，其效力與 NRG-1 相當；而其誘導 HER2/HER3 二聚化的能力則弱得多。作為研究的陰性對照，同型對照抗體 GP120 mAb 及抗 HER3 mAb 均不誘導受體二聚化。

【0275】在藉由參考隨附圖式描述本發明之具體例後，應理解本發明不限於精確具體例，且熟悉本技藝者可在其中進行各種改變及修改，而不偏離如隨附申請專利範圍中所定義之本發明範疇或精神。

實施例 7：重組融合蛋白在收縮性心臟衰竭大鼠模型中之活體內功效

【0276】為了評估重組融合蛋白在疾病模型中再生心臟功能的能力，採用心肌梗塞及收縮性心臟衰竭之史泊格多利大鼠模型。為了建立疾病模型，在外科手術中使用 6-0 絲質縫合線結紮左心耳下方 3-4 mm 的左前降支冠狀動脈 (LAD)。結紮後四週，藉由 M 型超音波心動描記術 (ECG) 都卜勒超音波記錄射血分數 (EF)，以相對於手術前的基線 EF

量測心臟功能。納入後續研究時，使用最低下降30%的EF閾值。假性對照動物進行相同的手術，但沒有進行LAD結紮。

【0277】建立疾病模型後，將動物分為五組，每組十一隻大鼠，另外十隻假手術大鼠包括在第六組。研究設計為各組每週接受兩次尾部靜脈注射，為期四週，或總共八次注射。假手術組及陰性對照媒劑組均接受生理鹽水，三組接受1、3或10 mg/kg之重組融合蛋白，且最終組接受GP120 mAb/NRG-1融合蛋白(10 mg/kg)之陽性對照。

【0278】由於在研究期間觀察到的體重減輕，在接受3 mg/kg及10 mg/kg之重組融合蛋白組中進行完整順序之八次注射之前停止治療，彼等組分別僅接受六次及三次注射。所有其他組則接受全套八次注射。

【0279】第一次處理後四週，再次藉由M型ECG量測EF。如圖8所示，相對於基線，重組融合蛋白顯著增加所有三個劑量組的EF。具體而言，1、3及10 mg/kg組分別觀察到14.7% ($P<0.001$)、26.9% ($P<0.001$)及36.6% ($P<0.001$)的增加。GP120 mAb/NRG-1陽性對照在匹配的時間點使EF增加28.8% ($P<0.001$)。生理鹽水在假性對照組或媒劑對照組中均未顯示效果。

【0280】在處理後28天收集ECG值後，對小鼠進行安樂死，收集手術部位旁的心臟組織，在4%甲醛中固定且包埋於石蠟中。用蘇木精及伊紅染料對心臟組織之五微米厚的石蠟切片進行染色，且在光學顯微鏡下觀察組織病理

學變化。如圖 9A-9F 所示，在假手術組中，心肌細胞以有序方式排列，且細胞質及心肌纖維被均勻染色。在間質空間中未觀察到發炎性細胞浸潤，且未發現心肌壞死。相比之下，在媒劑對照組中，心肌梗塞邊緣區展現心肌細胞之間間隙變寬；細胞核被縮合並碎裂，且心肌纖維排列失去其有序結構；細胞大小增大且注意到間質水腫。用重組融合蛋白進行的處理部分緩解心肌梗塞區的病理變化，包括壞死細胞顯著減少、心肌細胞之間間質空間狹窄及心肌纖維排列恢復至正常結構。

實施例 8：重組融合蛋白減弱 NOD/SCID 小鼠皮下 FaDu 癌異種移植模型之腫瘤生長

【0281】 為了評估重組融合蛋白促進腫瘤生長的潛在風險，在 FaDu 癌異種移植模型中進行活體內研究。NOD/SCID 小鼠 (Beijing AK Bio-Technology Co. Ltd.) 根據機構指南在 CrownBio 國際研發中心 (中國北京) 之 SPF 設施中飼養。所有實驗均按照實驗室動物護理評定及認證協會 (AAALAC) 的要求及在 CrownBio IACUC 委員會的許可下進行。

【0282】 7-10 週齡的雌性 NOD/SCID 小鼠在右腹皮下接種懸浮於 0.1 ml PBS 中之 FaDu 腫瘤細胞 (3×10^6)。當腫瘤達到約 150 mm³ 時，將小鼠隨機分為 6 個研究組，每組 8 隻動物。測試樣品藉由尾部靜脈注射靜脈內投與，一週兩次，連續三週，共 6 次處理。藉由測徑規量測來監測腫瘤

生長。研究在處理後21天終止。

【0283】回應於不同處理之腫瘤生長彙總於圖10中。10 mg/kg之抗HER3 mAb顯示出顯著的抗腫瘤活性，在研究結束時腫瘤生長抑制(TGI)為93.5% (與媒劑組相比 $p<0.001$)。重組融合蛋白在研究結束時亦表現出統計學上顯著的TGI：在1 mg/kg劑量下為19.2% (與媒劑組相比 $p=0.048$)及在10 mg/kg劑量下為56.2% (與媒劑組相比 $p<0.001$)。對照分子GP120 mAb/NRG-1融合蛋白在高或低劑量下均未顯示出抗腫瘤活性。研究期間未發生動物死亡。腫瘤小鼠對所有測試劑的耐受性良好。在任何實驗組中均未觀察到顯著的體重減輕(圖11)。此等資料表明，在活體內腫瘤生長活躍的條件下，重組融合蛋白以劑量依賴性方式表現出腫瘤生長抑制，且表明重組融合蛋白活體內增強或加速腫瘤生長的風險低於原生NRG-1蛋白。

實施例9：在投與重組融合蛋白之食蟹獼猴中未觀察到顯著的胃腸道毒性

【0284】先前報告指出，在一項一期臨床研究(NCT01258387)中，個體接受安慰劑或單劑量投與之西馬格勒明(cimaglermin) (全長重組NRG-1β3)，噁心及腹瀉為第二及第四常見的治療突發不良事件，分別發生在40%及27%的合計高劑量群組中(Lenihan等人 J Am Coll Cardiol Basic Trans Science. 2016;1(7):576-86)。同樣，在重組NRG-1肽片段(紐卡定(neucardin))之二期研究中，噁心為

最常觀察到的治療相關不良事件，見於20%的研究個體中 (Jabbour等人 *European Journal of Heart Failure* (2011) 13: 83-92)。最後，在紐卡定之第二個二期研究 (ChiCTR-TRC-00000414) 中，公佈的結果顯示，觀察到的48.4%的不良事件是胃腸道性質的，是本研究中最常觀察到的不良事件類型且與劑量水準相關 (Gao等人 *J Am Coll Cardiol* 2010; 55:1907-14)。

【0285】進行兩項研究，以評估重組融合蛋白在石蟹獼猴 (*Macaca fascicularis*) 中之安全性及耐受性：一項單劑量非GLP (良好實驗室規範) 研究及一項重複劑量GLP研究。密切監測胃腸道毒性。在單劑量研究中，在10、30及60 mg/kg之劑量下，與媒劑對照相比評估重組融合蛋白之安全性及耐受性，各群組中包括一隻雄性及一隻雌性動物。在此單劑量研究中，在整個兩週的處理後評估期間，沒有出現與測試劑有關的對體重或食物定性評估的影響，亦未觀察到嘔吐或腹瀉。在重複劑量GLP研究中，在以3、10及30 mg/kg之劑量連續每週四次投與後，與媒劑對照相比評估重組融合蛋白之安全性及耐受性，在主要的28天研究期間，各群組中包括三隻雄性和三隻雌性，在隨後的28天恢復期後，評估30 mg/kg及媒劑對照群組中之另外兩隻雄性及兩隻雌性。在此重複劑量研究中未觀察到與測試劑有關的對攝食量的影響。雖然在此重複劑量研究中觀察到與測試劑有關的嘔吐，但臨床觀察到的嘔吐僅與輸注反應相關，僅在10 mg/kg群組之一隻動物(17%)及30 mg/kg

群組之兩隻動物(20%)中觀察到，且為暫時性的。腹瀉僅在媒劑對照群組及30 mg/kg重組融合蛋白群組中觀察到，分別在僅一隻(10%)及三隻(30%)動物中觀察到，且被視為此類型程序的正常現象，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及30 mg/kg劑量下，平均體重相對於基線減少>10%，且僅在10 mg/kg群組之第四劑量及30 mg/kg群組之第三及第四劑量之後。總之，除了在急性輸注反應期間以外，用重組融合蛋白處理沒有導致任何與食物攝入、嘔吐或腹瀉有關的臨床上顯著的發現，且胃腸道發現對兩個研究中無不良事件程度的判定沒有影響。此等結果表明，重組融合蛋白之設計減輕NRG-1重組蛋白對胃腸道之不良影響。

【0286】 在單劑量投與60 mg/kg之重組融合蛋白後的不同時間點自食蟹獼猴採集血液樣本(~1 ml)，提取血清且儲存於-80°C下直至測試。血清樣本中重組融合蛋白之濃度係藉由根據標準程序捕捉ELISA來分析。簡言之，96孔盤塗佈有重組人類HER3蛋白(R&D System)，用BSA阻斷且與測試樣品一起培育。在多次洗滌之後，將盤與HRP結合之抗人類IgG Fc抗體一起培育，且隨後用TMB受質偵測。圖12顯示，重組融合蛋白之藥物動力學概況與IgG抗體相似。

實施例10：Fc受體結合之動力學常數之總結

【0287】 使用無標記SPR技術來量測重組抗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突變之重組融合蛋白及抗HER3抗體分析總共六種Fc受體(各自與His標籤融合)，包括Fc γ RI (Abcam)、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa (158F)、Fc γ RIIIa (158V)及C1q (Sino Biological)。所有Fc受體及測試樣品均藉由親和層析純化。所有實驗均在Biacore 8K系統(GE Healthcare)上進行，使用HBS-EP+ (10 mM HEPES、150 mM NaCl、3 mM EDTA及0.05% v/v Surfactant P20)作為運行緩衝液。具體而言，抗His抗體係藉由胺偶合方法在CM5感測器晶片之活性及參考流動槽中偶合。經純化之帶His標籤的Fc受體經由與固定的抗His抗體結合而在各單個通道之活性流動槽上被捕捉。各Fc受體之捕捉水準維持在80-120RU之間。對於動力學分析，將重組融合蛋白及所有其他樣品連續稀釋總共6個濃度，在0.3 nM至30 nM範圍內，且連續稀釋液依次經由各通道之兩個流動槽注入。藉由在多個通道上同時注入樣品，在同一次運行中完成多項分析。

【0288】使用Biacore 8K評估軟體，用兩態結合模型擬合所得感測器圖譜以提取動力學常數。所有分析之平衡解離率(KD)彙總於下表1中。重組融合蛋白與Fc γ RI、Fc γ RIIa及Fc γ RIIb結合之動力學推導的KD值比無Fc突變之重組融合蛋白及抗HER3抗體的KD值高10倍以上，表明由於重組融合蛋白之Fc區內的特定突變而使親和力低得多。對於Fc γ RIIIa (158F)及Fc γ RIIIa (158V)，Fc突變分別導致

重組融合蛋白之結合親和力下降2至3倍。與C1q的結合太弱，無法在所有樣品中偵測到。

【0289】 為了證實重組融合蛋白具有有限的Fc效應功能，使用來自Promega (Madison, WI)之ADCC Reporter Bioassay檢查抗體依賴性細胞毒性(ADCC)。該分析使用經工程改造之Jurkat細胞株作為效應細胞，其穩定表現FcγRIIIa (V158)受體及驅動螢火蟲螢光素酶表現之NFAT反應元件。利妥昔單抗作為該分析之陽性對照，顯示出針對CD20陽性Raji細胞之強ADCC活性；而重組融合蛋白沒有可偵測到的針對HER3陽性目標細胞(MCF7或BT474)之ADCC(資料未展示)。

表 1：Fc 受體結合之動力學常數總結

Fc 受體	KD (M)		
	抗 HER3 mAb/NRG-1	抗 HER3 mAb/NRG-1 (無 Fc 突變)	抗 HER3 mAb
FcγRI	1.03E-08	2.81E-09	4.56E-09
FcγRIIIa	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 - 由於弱結合而低於偵測極限(LOD)

實施例 11：NRG-1-HER3重組融合蛋白在活體外心房組織及活體內AF預防作用小鼠模型中顯示出抗纖維化作用

【0290】 簡介。心房震顫(AF)係由心房之電性和結構

性重塑所造成，炎症及纖維化在其中發揮作用。目前的療法限於抗心律不整藥物及消融術，但並不針對結構性問題。最近的研究表明，神經調節蛋白-1 (NRG1)，一種表皮生長因子家族成員，在心肌中具有抗纖維化及抗炎作用。

【0291】目的。測試例示性NRG-1/HER3抗體融合蛋白對心房纖維化及AF誘導性之影響。NRG-1/HER3抗體融合蛋白包含NRG-1活性片段及拮抗性HER3 (ERBB3)抗體，且選擇性地經由ERBB4優先於ERBB3傳導信號。

【0292】方法。如圖13A中所描繪之活體外纖維化分析用於活體外誘導大鼠組織樣本之纖維化。自雄性大鼠(Wistar Han，10週齡)收穫心房樣本，切成小塊(1-2 mm²)且在NRG-1/HER3融合蛋白(5 nM濃度)存在或不存在之情況下保存在低血清培養基中。24-72小時後對*Colla1*及*Col3a1* mRNA進行量化，分別如圖14A及14B中所描繪。

【0293】在兩個模型中測試AF誘導性。在第一AF模型中，雄性小鼠(C57BL/6N，12-15週齡)用血管收縮素-II (Ang-II，4週，滲透微型泵，3000 ng/kg/min)處理，其實驗大綱描繪於圖16中。在圖18中所描繪之第二AF模型中，給小鼠餵食高脂肪飲食(HFD，8週，60% Kcal脂肪)，誘導體重嚴重增加(增加56±3%，相較於常規飲食增加23±4%)，如圖19A中所示。在兩個模型中，AF誘導性係藉由用經頸靜脈八極導管進行5次程式化電刺激(PES)來測試，如圖15中所描繪。記錄AF誘導性(藉由≥3次PES誘導

之小鼠%)及PES誘導之AF的持續時間(AF持續時間)。將小鼠隨機分組以用媒劑或例示性NRG-1/HER3融合蛋白處理(2次/週, 1 mg/kg, IV, n=5-7/組)。

【0294】結果. 在培養的心房樣本中, *Colla1*及*Col3a1* mRNA表現經3天逐漸增加至2-3倍, 分別如圖13A及13B中所示。NRG-1/HER3融合蛋白將此效應有力地減弱 $59\pm 17\%$ ($p<0.05$), 如圖14A及14B中所示。在小鼠中, Ang-II及HFD均顯著增加AF誘導性及AF持續時間。在Ang-II小鼠中, NRG-1/HER3融合蛋白減弱AF誘導性(自57%至20%), 如圖17B中所示, 及AF持續時間(自 33.3 ± 15.1 至 1.5 ± 1 s), 如圖17A中所示。在HFD小鼠中, NRG-1/HER3融合蛋白顯著減弱AF誘導性(自57%至0%), 如圖20B中所示, 及AF持續時間(自 10.9 ± 3.2 s至 0.76 ± 0.5 s, $p<0.05$), 如圖20A中所示。

【0295】結論. 此等結果顯示活體外用NRG-1/HER3融合蛋白對心房組織進行選擇性ERBB4刺激的抗纖維化作用, 以及在兩個不相關小鼠模型中的AF預防作用。

實施例12: NRG-1/HER3抗體融合蛋白減少與心肌僵硬相關之I型膠原蛋白

【0296】實施例7中採用的心肌梗塞及收縮性心臟衰竭(亦稱為射血分數降低之心臟衰竭, 或HFrEF)之史泊格多利大鼠模型用於分析I型膠原蛋白及III型膠原蛋白表現。處理後四週, 如實施例7中所述移出心臟組織樣本,

固定及切片，且使用免疫組織化學對I型膠原蛋白或III型膠原蛋白蛋白質表現進行染色。

【0297】I型膠原蛋白之代表性結果顯示於圖21A至21F中。如圖21A至21F中可見，NRG-1/HER3抗體融合蛋白以1 mg/kg、3 mg/kg及10 mg/kg投與，與媒劑對照相比，分別使I型膠原蛋白之表現下調6.6%、37.1%及40.5%。此外，如下表2所示，相對於媒劑對照，膠原蛋白I/III比率分別降低4.7%、40.8%及36.6%。

【0298】

表2. 心肌膠原蛋白的變化

處理	膠原蛋白 I (%)	膠原蛋白 III (%)	膠原蛋白 I/III 比率
假	0.9±0.29	1.18±0.24	0.78±0.28
媒劑	10.09±2.18△△△	5.44±1.1△△△	1.91±0.52△△△
Gp120 Ab/NRG-1	6.41±0.14**	5.43±1.19	1.22±0.29*
NRG-1/HER3 1 mg/kg	9.42±0.81	5.5±1.56	1.82±0.48
NRG-1/HER3 3 mg/kg	6.35±3.25*	5.15±2.39	1.13±0.29*
NRG-1/HER3 10 mg/kg	6.00±1.22**	5.13±1.95	1.21±0.23*

△△△ $p < 0.01$ 表示與假對照相比之統計顯著性

* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ 表示與媒劑對照相比之統計顯著性

實施例 13：NRG-1/HER3 抗體融合蛋白預防豬 DOCA 模型之心房纖維化及心房震顫誘導性

【0299】心房纖維化為再進入心房震顫(AF)的基質，且較高的纖維化負擔與對療法之抗性及較差的預後相關。纖維化程度預測預後及療法難治性。目前，不存在靶向心

房纖維化之療法。NRG-1/HER3融合蛋白為一種長效的神經調節蛋白融合蛋白，已被證明在心臟衰竭動物模型中經由選擇性刺激ErbB4受體來減少心室纖維化(亦即，具有抗纖維化特性)。在此實施例中，測試NRG-1/HER3融合蛋白在乙酸去氧皮質固酮(DOCA，一種醛固酮促效劑)誘導之高血壓的小型豬模型中減少心房纖維化及AF誘導性的能力。

【 0300 】 方法： 18隻Aachener小型豬被隨機分為3組：對照(CTRL)、DOCA+媒劑(DOCA+VEH)及DOCA+NRG-1/HER3融合蛋白。對照組並未進行治療性干預。實驗的圖顯示於圖22中。為了誘導高血壓及心房纖維化，將經60天之時段釋放10 mg/kg DOCA的顆粒植入DOCA+VEH及DOCA+NRG-1/HER3融合蛋白組之小型豬中。植入DOCA之動物自植入當天開始每週用NRG-1/HER3融合蛋白(0.3 mg/kg；DOCA+NRG-1/HER3融合蛋白)或其媒劑(DOCA+VEH)進行處理(共9次投與)。60天後，侵入性量測動脈血壓，且將十極導管置於右心房中。AF誘導性係藉由進行50次短陣快速起搏發作來測試，且量化為50次嘗試中「成功」發作之百分比，其中在短陣快速起搏後可誘導AF運行 ≥ 5 秒。AF誘導性測試之例示性結果顯示於圖23中。使用ImageJ軟體對動物安樂死後分離的左心房標本的Masson三色染色進行心房纖維化的量化。

【 0301 】 結果： DOCA+VEH (142 ± 10 mmHg)及DOCA+NRG-1/HER3融合蛋白(132 ± 15 mmHg)組之平均動

脈壓顯著高於 CTRL 組 (105 ± 8 mmHg, $p < 0.01$), 而無 NRG-1/HER3 融合蛋白之影響 (圖 24)。

【0302】如圖 25 中可見, DOCA+VEH 組之 AF 誘導性顯著高於 CTRL 組 (66/250 對比 9/300, $p < 0.001$) 及 DOCA + NRG-1/HER3 融合蛋白組 (66/250 對比 8/300, $p < 0.001$)。同樣, 與 CTRL (14.18 ± 1.81 對比 8.30 ± 2.52 , $p < 0.001$) 相比及與 DOCA+ NRG-1/HER3 融合蛋白 (14.18 ± 1.81 對比 10.65 ± 1.59 , $p = 0.0049$) 相比, DOCA+VEH 組之心房纖維化程度顯著較高, 如圖 26 中可見。

【0303】結論: NRG-1/HER3 融合蛋白預防豬 DOCA 模型之心房纖維化及 AF 誘導性。NRG-1/HER3 融合蛋白之作用與對血壓的影響無關, 但可能與減少心房纖維化有關。

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing originalFreeTextLanguageCode="en" dtdVersion="V1_3"
fileName="895252序列表.xml" softwareName="WIPO Sequence" softwareVersion="2.3.0"
productionDate="2023-07-13">
  <ApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>TW</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>112109408</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2023-03-14</FilingDate>
  </ApplicationIdentification>
  <ApplicantFileReference>SBTI-003/001TW 332030-2041</ApplicantFileReference>
  <EarliestPriorityApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>US</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>63/319, 886</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2022-03-15</FilingDate>
  </EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <ApplicantName languageCode="zh">美商信立泰生物醫藥公司</ApplicantName>
  <ApplicantNameLatin>Salubris Biotherapeutics, Inc.</ApplicantNameLatin>
  <InventorName languageCode="zh">凡佛雷恩霍夫 詹斯</InventorName>
  <InventorNameLatin>van Fraeyenhove, Jens G.R.</InventorNameLatin>
  <InventionTitle languageCode="zh">用神經調節蛋白-1融合蛋白治療纖維化及心律不整
的方法</InventionTitle>
  <InventionTitle languageCode="en">Methods of treating fibrosis and arrhythmia
with a neuregulin-1 fusion protein</InventionTitle>
  <SequenceTotalQuantity>18</SequenceTotalQuantity>
  <SequenceData sequenceIDNumber="1">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>331</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
          <INSDFeature_location>1..331</INSDFeature_location>
          <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier>
              <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
```

```

</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q1">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MRANDALQVLGLLFLSLARGSEVGNLSQAVCPGTLNGLSVTGAENQYQTLTKLYERCEVVMGN
LEIVLTGHNADLSFLQWIREVTGYVLVAMNEFSTLPLPNLRVVRGTQVYDGFKFAIFVMLNYNTNSSHALRQLRLTQLTEI
LSGGVYIEKNDKLCHMDTIDWRDVRDRDAEIVVKDNGRSCPPCHEVCKGRCWGPSEDCQTLTKTICAPQCNGHCFGPN
PNQCCHDECAGGCSGPQDTCFACRHFNDSGACVPRCPQLVYNKLTQLEPNPHTKYQYGGVVCVASCPHNFVVDQTSVCV
RACPPDKMEVDKNGLKMCEPCGGLCPKAF</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="2">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>447</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..447</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q2">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPS
LKSRTVTSVETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDK
THTCPPCPAPEFLGGPAVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV

```

```

VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLYKSLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHAHYTQKLSLSLSPGK</INSDSeq_seque
nce>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 3" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>220</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..220</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q3">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSNRNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRES
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</
INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 4" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>61</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>

```

```

<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..61</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q4">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>SHLVKCAEKEKTFCVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQNYVMASFYKAEELYQ<
/INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="5">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q5">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Glycine-Serine linker</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>

```

```

    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q6">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GGGSGGGGS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="6">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>1614</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..1614</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q7">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>atggagtttgggctgagctgggttttcttgttgctataataaaaagggtgtccagtgtcaggt
    gcagctgcagcagtgaggagctggactgctgaagccaagcgagaccctgtctctgacatgcccgtgtacggaggatcct
    tcagcggatactattggtcttggatcaggcagccacctggcaagggactggagtggatcggcgagatcaaccactctggc
    tccaccaactacaatccctctctgaagtcccgggtgaccatctccgtggagacaagcaagaatcagttttccctgaagct
    gtccagcgtgaccgccgctgacacagccgtgtactattgcgctagggacaagtggacctggatatttcgatctgtggggaa
    ggggcaccctggtgacagtgtcttccgcctctacaaagggccccctccgtgtttctcttggtccaagctctaagagcacc

```

```
tctggaggaacagccgctctgggatgtctggtgaaggattacttccctgagccagtgaccgtgagctggaactctggcgc
cctgacctccggagtgcatacatttcccgtgtgctgcagtcagcggcctgtatagcctgtcttccgtggtgaccgtgc
ctagctcttccctgggcacccagacatacatctgcaacgtgaatcacaagccctccaatacaaaaggtggacaagagagtg
gagcctaagagctgtgataagaccatacatgcccacatgtccagctcctgagctgctgggaggaccttccgtgttccct
gtttcctccaaagccaaaggacaccctgatgatctctcgcacccctgaggtgacatgcgtgggtggacgtgtcccacg
aggatccagaggtgaagttcaactggtacgtggatggcgtggaggtgcataatgctaagaccaagcctagggaggagcag
tacaacagcacctatcgggtggtgtctgtgctgacagtgtgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtcaa
ggtgagcaataaggccctgccagctccccatcgagaagaccatctctaaggccaagggccagcccagagagcctcaggtgt
atacactgccccctagccgcgaggagatgaccaagaaccaggtgtctctgacatgtctggtgaagggtcttaccatct
gacatcgctgtggagtgggagtccaatggccagcccgagaacaattataagaccacaccacccgtgctggactccgatgg
cagcttctttctgtactccaagctgaccgtggataagagcaggtggcagcagggcaacgtgttttctgcagcgtgatgc
acgaggccctgcacaatcattatacacagaaatctctgtccctgagcccaggcaagggaggaggaggaagcggaggagga
ggcagctctcatctggtgaagtgtgctgagaaggagaagaccttctgcgtgaacggcggcgagtgttttatggtgaagga
cctgtctaataccatccagatacctgtgcaagtgtccaacgagttcacaggcgatcgctgccagaattacgtgatggcct
cttttataaggctgaggagctgtaccagtaa</INSDSeq_sequence>
```

```
</INSDSeq>
```

```
</SequenceData>
```

```
<SequenceData sequenceIDNumber="7">
```

```
<INSDSeq>
```

```
<INSDSeq_length>1614</INSDSeq_length>
```

```
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
```

```
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
<INSDSeq_feature-table>
```

```
<INSDFeature>
```

```
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
```

```
<INSDFeature_location>1..1614</INSDFeature_location>
```

```
<INSDFeature_qual>
```

```
<INSDQualifier>
```

```
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
```

```
</INSDQualifier>
```

```
<INSDQualifier id="q8">
```

```
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
<INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
```

```
</INSDQualifier>
```

```
</INSDFeature_qual>
```

```
</INSDFeature>
```

```
</INSDSeq_feature-table>
```

```
<INSDSeq_sequence>atggagtttgggctgagctgggttttcttgttgctataataaaaaggtgtccagtgctcaggt
gcagctgcagcagtgaggagctggactgctgaagccaagcgagacctgtctctgacatgcgccgtgtacggaggatcct
```

```

tcagcggatactattggtcttggatcaggcagccacctggcaagggactggagtggatcggcgagatcaaccactctggc
tccaccaactacaatccctctctgaagtcccgggtgaccatctccgtggagacaagcaagaatcagtttccctgaagct
gtccagcgtgaccgccgctgacacagccgtgtactattgcgctagggacaagtggacctggatatttcgatctgtggggaa
ggggcaccctggtgacagtgtcttccgcctctacaaagggccctccgtgtttcctctggctccaagctctaagagcacc
tctggaggaacagccgctctgggatgtctggtgaaggattacttccctgagccagtgaccgtgagctggaactctggcgc
cctgacctctggagtgcatacatttcccgtgtgctgcagtccagcggcctgtatagcctgtcttccgtgggtgaccgtgc
ctagctcttccctgggcaccagacatacatctgcaacgtgaatcacaagccctccaatacaaaggtggacaagagagtg
gagcctaagagctgtgataagaccatacatgcccaccatgtccagctcctgagttcctgggaggacctgccgtgttct
gtttcctccaaagccaaaggacaccctgatgatctctcgcaccctgaggtgacatgcgtggtgggtggacgtgtcccacg
aggatccagaggtgaagttcaactggtacgtggatggcgtggaggtgcataatgctaagaccaagcctagggaggagcag
tacaacagcacctatcgggtggtgtctgtgctgacagtgtgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgcaa
ggtgagcaataaggccctgccagctcccacgagaagaccatctctaaggccaagggccagcccagagagcctcaggtgt
atacactgccccctagccgcgaggagatgaccaagaaccaggtgtctctgacctgtctggtgaagggtcttaccatct
gacatcgctgtggagtgggagtccaatggccagcccgagaacaattataagaccacaccaccctgtctggactccgatgg
cagcttcttctgtactccaagctgaccgtggataagagcaggtggcagcagggcaacgtgttttctgcagcgtgatgc
acgaggccctgcacgctcattatacacagaaatctctgtccctgagcccaggcaagggaggaggaggaagcggaggagga
ggcagctctcatctggtgaagtgtgctgagaaggagaagaccttctgcgtgaacggcggcgagtgttttatggtgaagga
cctgtctaataccatccagatacctgtgcaagtgtccaacgagttcacaggcgatcgctgccagaattacgtgatggcct
cttttataaggctgaggagctgtaccagtaa</INSDSeq_sequence>

```

```
</INSDSeq>
```

```
</SequenceData>
```

```
<SequenceData sequenceIDNumber=" 8" >
```

```
<INSDSeq>
```

```
<INSDSeq_length>723</INSDSeq_length>
```

```
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
```

```
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
<INSDSeq_feature-table>
```

```
<INSDFeature>
```

```
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
```

```
<INSDFeature_location>1..723</INSDFeature_location>
```

```
<INSDFeature_qual>
```

```
<INSDQualifier>
```

```
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
```

```
</INSDQualifier>
```

```
<INSDQualifier id="q9">
```

```
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
<INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
```

```
</INSDQualifier>
```

```

    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggtgttgacagaccaggtcttcatttctctgtttgctctggatctctggtgacctacgggga
catcgagatgaccagctctccagattccctggccgtgagcctgggagagagggctacaatcaactgccggtccagccagt
ctgtgctgtactctccagcaacaggaattacctggcctgggtatcagcagaatcccggccagccccctaagctgctgac
tattgggctagcaccagagagtctggagtgcctgaccgcttctctggatccggaagcggcacagacttcacctgacaat
ctcttccctgcaggccgaggacgtggccgtgtactattgccagcagttactctacccttaggacattcggccagggca
ccaaggtggagatcaagcggacagtggccgctccatccgtgttcatcttccacctccgacgagcagctgaagtcgga
accgctagcgtgggtgtgcctgctgaacaacttctacccaagagaggccaaggtgcagtggaaggtggataacgctctgca
gagcggcaattctcaggagtccgtgaccgagcaggacagcaaggattctacatattccctgagctctaccctgacactgt
ccaagggcattacgagaagcacaaggtgtatgcttgcgaggtgacctatcagggcctgtccagccccgtgacaaagagc
ttcaaccgcgcgagtgttaa</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="9">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>537</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..537</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q10">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>MEFGLSWVFLVAI IKGVQCQVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGFSFGYYWSWIRQPPGK
GLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKRVTISVETSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE

```

```
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGKGGGGSGGGSSHLVKCAEKEKTFVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQNYVMASFYKAEELYQ</INS
DSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="10">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>537</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..537</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q11">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>MEFGLSWVFLVAI IKGVQCQVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGK
GLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRTVTSVETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFLGGPAVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHAHYTQKSLSL
SPGKGGGGSGGGSSHLVKCAEKEKTFVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQNYVMASFYKAEELYQ</INS
DSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="11">
  <INSDSeq>
```

```

<INSDSeq_length>19</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..19</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q12">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MEFGLSWVFLVAIIKGVQC</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="12">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>240</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..240</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q13">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MVLQTQVFI SLLLWISGAYGDIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSNRNYLAWY
QQNPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFGGQTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="13">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q14">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>MVLQTQVFI SLLLWISGAYG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="14">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>518</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>

```

```

<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..518</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier id="q15">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Heavy chain component of the recombinant fusion
protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..518</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q16">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLQQWAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPS
LKSRTVISVETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDK
THTCPPCPAPEFLGGPAVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHAHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSSHLVK
CAEKEKTFVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQNYVMASFYKAEELYQ</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="15">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>42</INSDSeq_length>

```

```
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..42</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q17">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>HARKCNETAKSYCVNGGVCYYIEGINQLSCKCPNGFFGQRCL</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="16">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>44</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..44</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q18">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```

    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>HFKPCRDKLAYCLNDGECFVIETLTGSHKHCRCKEGYQGVRC</INSDSeq_sequence
>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="17">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>42</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..42</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q19">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>HEEPCGSPSHKSFCLNGGLCYVIPTIPSPFCRCVENYTGARCE</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="18">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>

```

```
<INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier id="q20">
    <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>EGF like domain consensus
sequence</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q21">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>AEKEKTFCVNGECFMVKDLSNP</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種治療個體之心房震顫及/或心臟纖維化的方法，其包含向該個體投與重組融合蛋白，該重組融合蛋白包含與單特異性ErbB3 (HER3)單株抗體(mAb)融合之神經調節蛋白-1 (NRG-1)片段。

【請求項2】一種重組融合蛋白，其包含與單特異性ErbB3 (HER3)單株抗體(mAb)融合之神經調節蛋白-1 (NRG-1)片段，用於治療個體之心房震顫及/或心臟纖維化的方法中。

【請求項3】如請求項1之方法或請求項1或2所用之重組融合蛋白，其中，該心臟纖維化包含心房纖維化。

【請求項4】如請求項1至3中任一項之方法或所用之重組融合蛋白，其中，該NRG-1片段包含NRG-1之活性域。

【請求項5】如請求項1至4中任一項之方法或所用之重組融合蛋白，其中，該NRG-1片段包含ERBB3/4結合域。

【請求項6】如請求項1至5中任一項之方法或所用之重組融合蛋白，其中，該NRG-1片段結合於ErbB4 (HER4)且經由其誘導信號傳導。

【請求項7】如請求項1至6中任一項之方法或所用之重組融合蛋白，其中，該mAb抑制經由ErbB3 (HER3)之NRG-1信號傳導。

【請求項8】如請求項1至7中任一項之方法或所用之

重組融合蛋白，其中，該 NRG-1 片段包含 NRG-1 β 2a 同功異型物。

【請求項 9】 如請求項 1 至 8 中任一項之方法或所用之重組融合蛋白，其中，該 NRG-1 片段係使用連接子經由其 N 端胺基酸融合至該抗體重鏈之 C 端。

【請求項 10】 如請求項 9 之方法或所用之重組融合蛋白，其中，該連接子包含 SEQ ID NO: 5 中所列之 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser 連接子之至少一個複本。

【請求項 11】 如請求項 1 至 10 中任一項之方法或所用之重組融合蛋白，其中，該抗體重鏈之 C 端包含該抗體之 Fc 域。

【請求項 12】 如請求項 1 至 11 中任一項之方法或所用之重組融合蛋白，其中，該單株抗體經醣基化。

【請求項 13】 如請求項 1 至 12 中任一項之方法或所用之重組融合蛋白，其中，該 NRG-1 片段包含 SEQ ID NO: 4 之胺基酸序列。

【請求項 14】 如請求項 1 至 13 中任一項之方法或所用之重組融合蛋白，其中，該 mAb 包含 SEQ ID NO: 2 之重鏈胺基酸序列。

【請求項 15】 如請求項 1 至 14 中任一項之方法或所用之重組融合蛋白，其中，該 mAb 包含 SEQ ID NO: 3 之輕鏈胺基酸序列。

【請求項 16】 如請求項 15 之方法或所用之重組融合蛋

白，其中，該 mAb 包含 SEQ ID NO: 2 之胺基酸 234、239 及 434 中之至少一者的取代突變。

【請求項 17】如請求項 16 之方法或所用之重組融合蛋白，其中，該至少一個取代突變包含 L234F 突變、S239A 突變、N434A 突變或其組合。

【請求項 18】如請求項 1 至 8 中任一項之方法或所用之重組融合蛋白，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 19】如請求項 1 至 18 中任一項之方法或所用之重組融合蛋白，其中，相對於重組 NRG-1 之信號誘導潛力，該重組融合蛋白促進 HER2/4 信號傳導超過 HER2/3 信號傳導。

【請求項 20】如請求項 1 至 19 中任一項之方法或所用之重組融合蛋白，其中，該重組融合蛋白促進該個體之心肌細胞或心臟組織的增殖、分化及存活。

【請求項 21】如請求項 1 至 20 中任一項之方法或所用之重組融合蛋白，其中，該重組融合蛋白相對於重組 NRG-1 減弱腫瘤或癌症細胞之增殖。

【請求項 22】如請求項 1 至 21 中任一項之方法或所用之重組融合蛋白，其中，投與該重組融合蛋白減少心房震顫發作的持續時間，或降低心房震顫發生的頻率。

【請求項 23】如請求項 1 至 22 中任一項之方法或所用之重組融合蛋白，其中，投與該重組融合蛋白減少心房震顫或心臟纖維化之徵象或症狀。

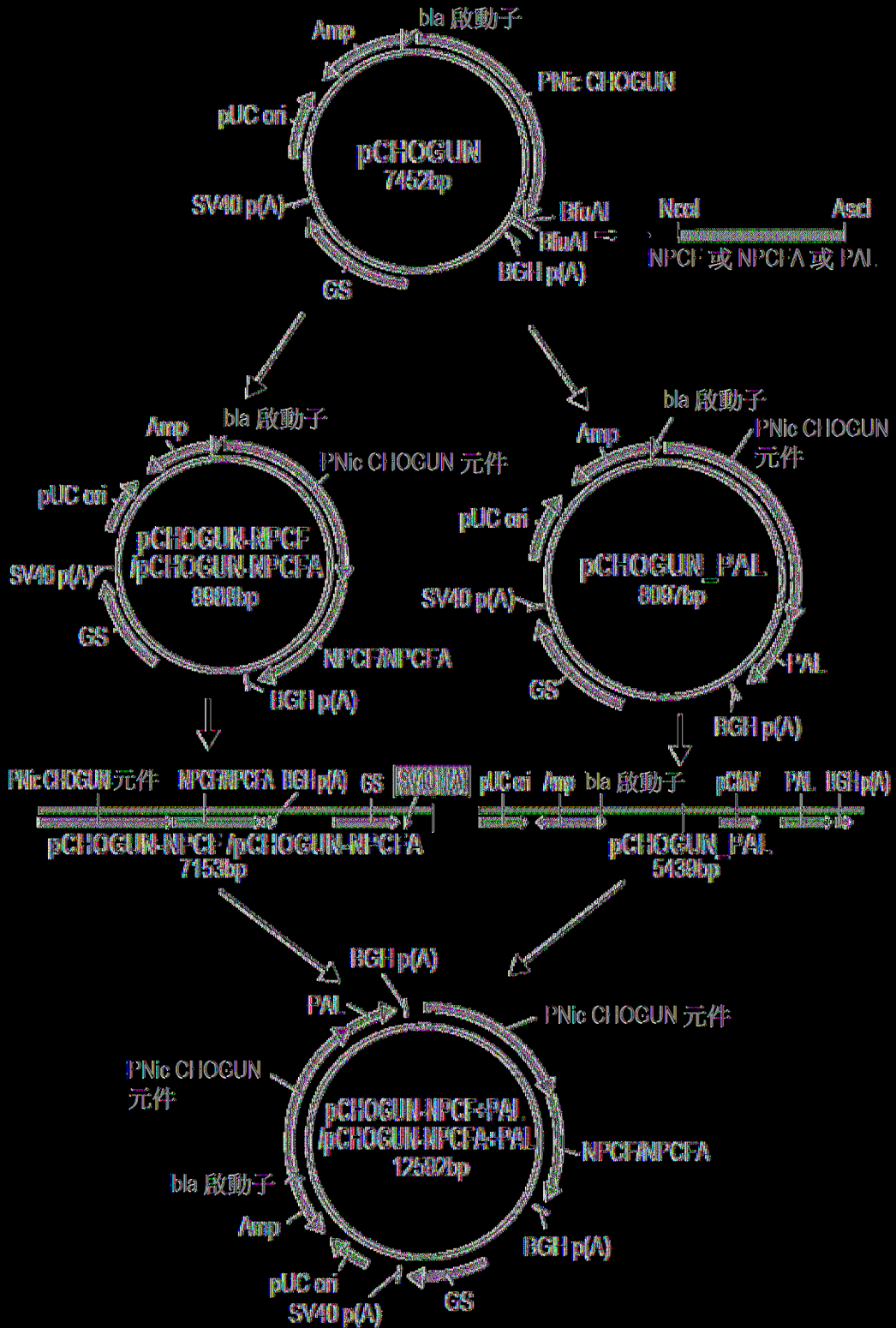
【請求項24】如請求項23之方法或所用之重組融合蛋白，其中，該心房震顫之症狀包含心跳不規則、心悸、頭暈、極度疲勞、呼吸短促、胸痛或其組合。

【請求項25】如請求項23之方法或所用之重組融合蛋白，其中，該心臟纖維化之徵象包含膠原蛋白含量或沉積，且其中投與該重組融合蛋白減少心臟組織之膠原蛋白含量或沉積。

【請求項26】如請求項1至25中任一項之方法或所用之重組融合蛋白，其包含向該個體投與0.1 mcg/kg至5 mg/kg之該重組融合蛋白。

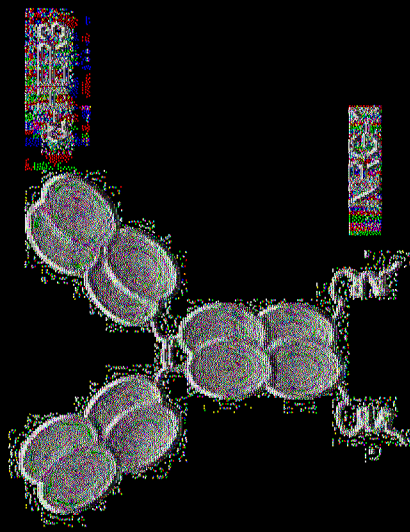
【請求項27】一種套組，其包含治療有效量之重組融合蛋白，該重組融合蛋白包含與單特異性ErbB3 (HER3)單株抗體(mAb)融合之神經調節蛋白-1 (NRG-1)片段，用於治療個體之心房震顫及/或心臟纖維化。

(發明圖式)



(圖 1)

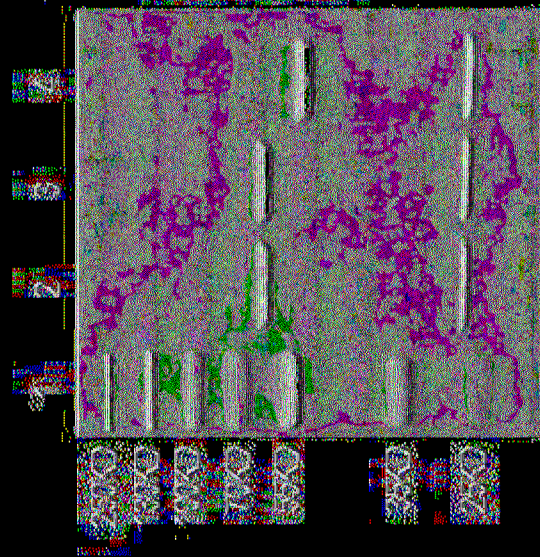
抗 HER3 mAb/NGR-1 融合蛋白之
顯示微圖



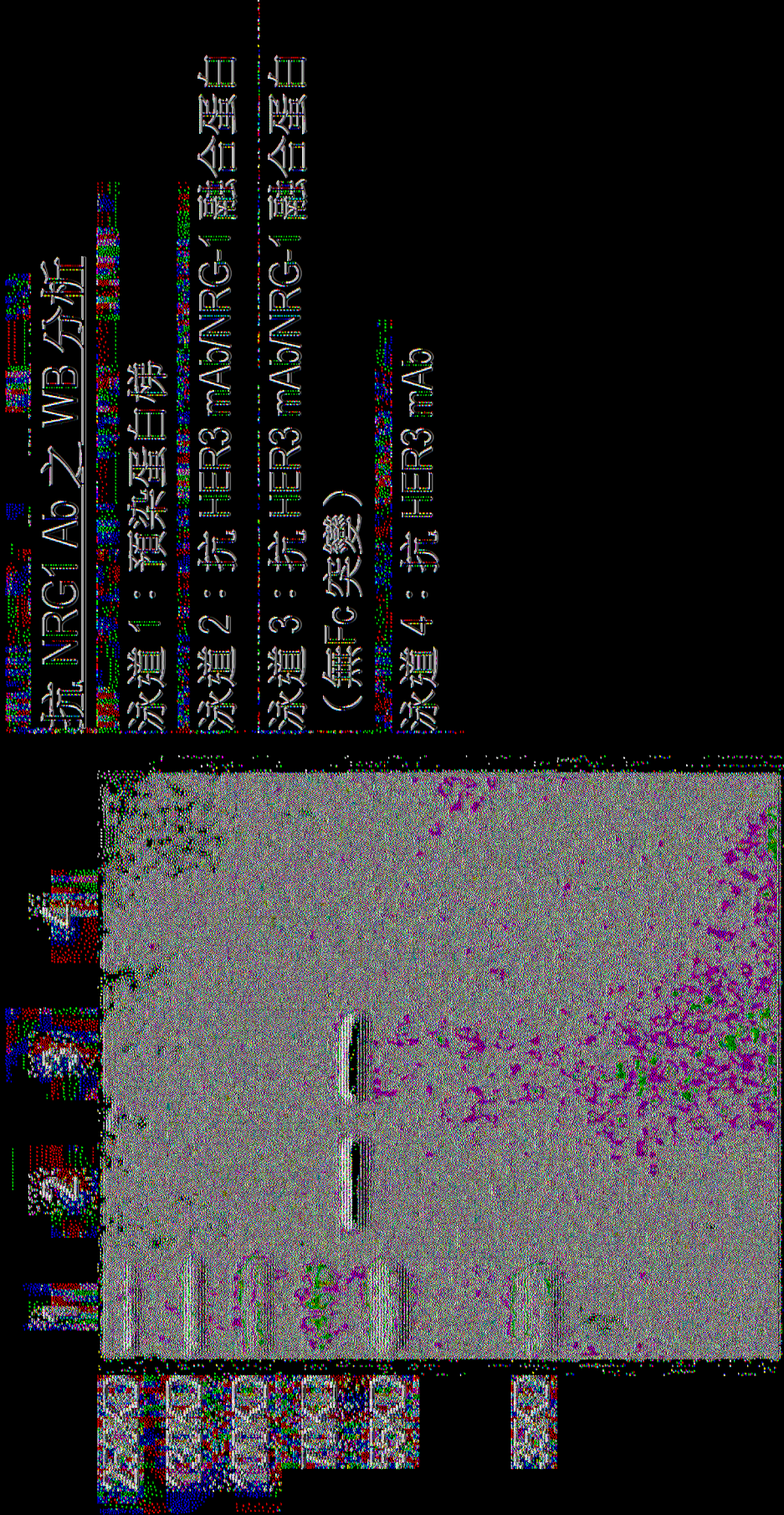
[圖 2A]

抗 HER3 mAb/NGR-1 融合蛋白之
SDS-PAGE分析

泳道 1: 預染蛋白梯
泳道 2: 抗 HER3 mAb/NGR-1 融合蛋白
泳道 3: 抗 HER3 mAb/NGR-1 融合蛋白
(無 Fc 架變)
泳道 4: 抗 HER3 mAb



[圖 2B]



抗 NRG1 Ab 之 WB 分析

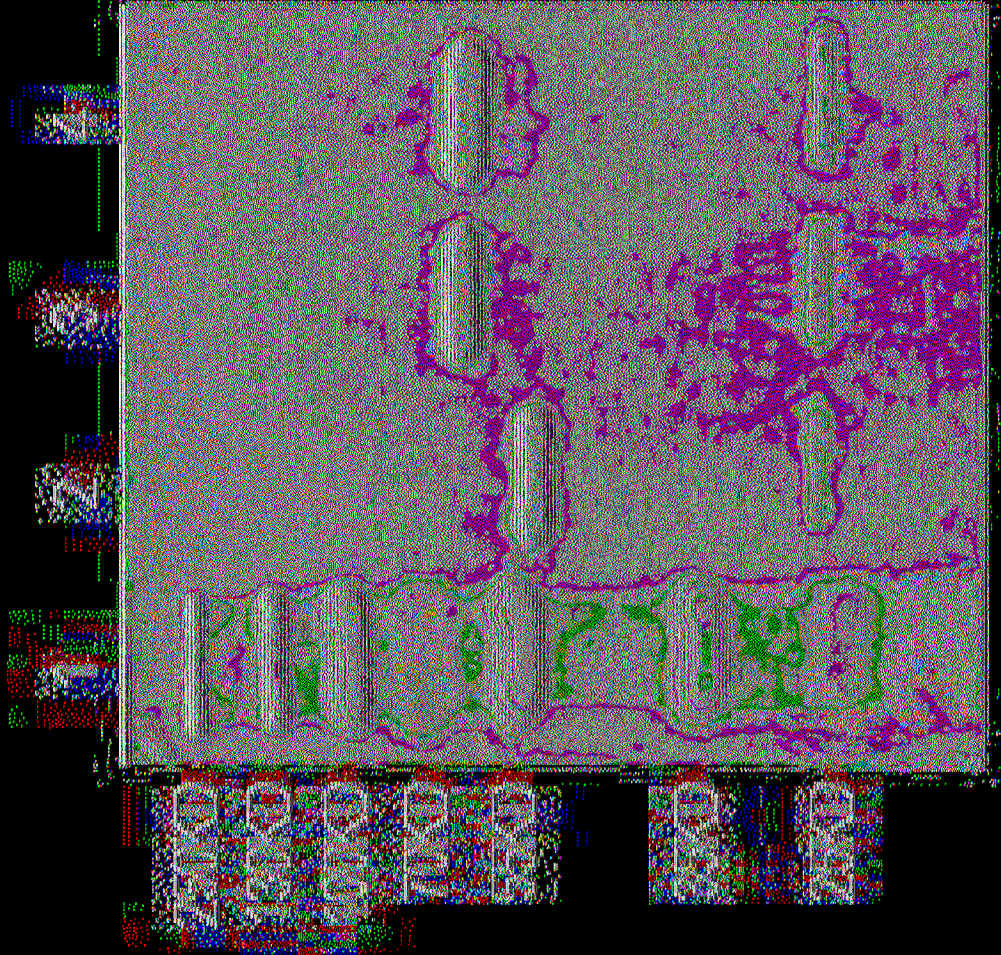
泳道 1：預染蛋白梯

泳道 2：抗 HER3 mAb/NERG-1 融合蛋白

泳道 3：抗 HER3 mAb/NERG-1 融合蛋白
(無Fc突變)

泳道 4：抗 HER3 mAb

[圖 2C]



抗 IgG Ab 之 WB 分析

泳道 1：預染蛋白梯

泳道 2：抗 HER3 mAb

泳道 3：抗 HER3 mAb/NRG-1 融合蛋白
(無 FC 突變)

泳道 4：抗 HER3 mAb/NRG-1
融合蛋白

[圖 2D]

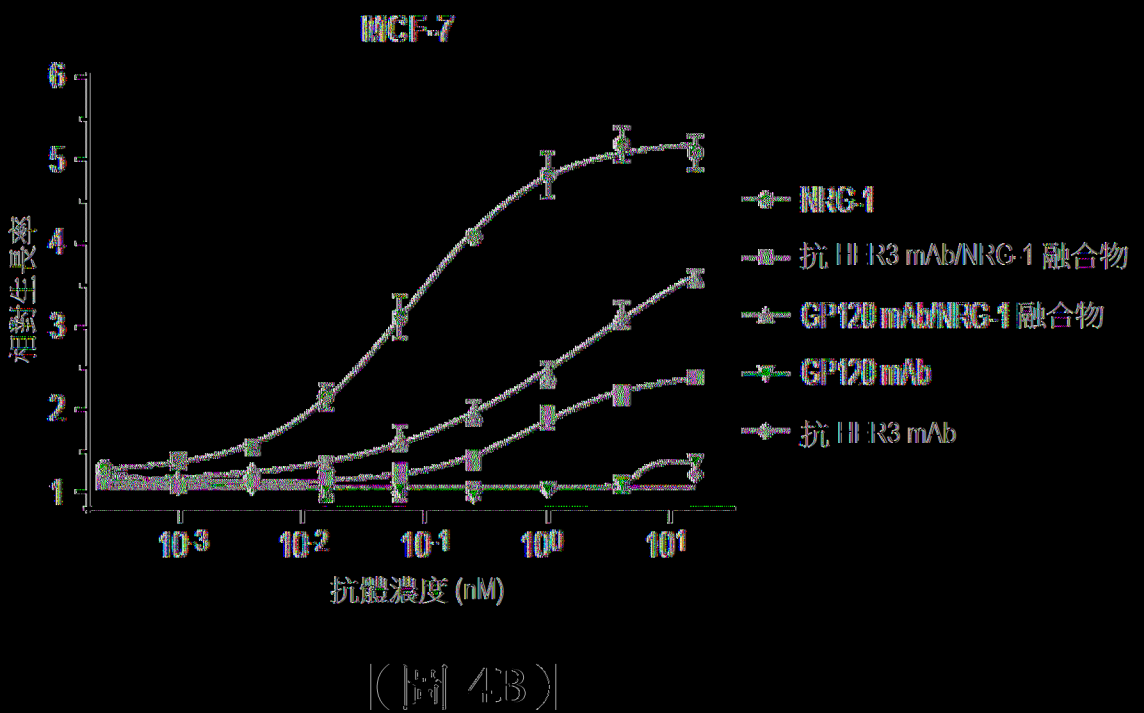
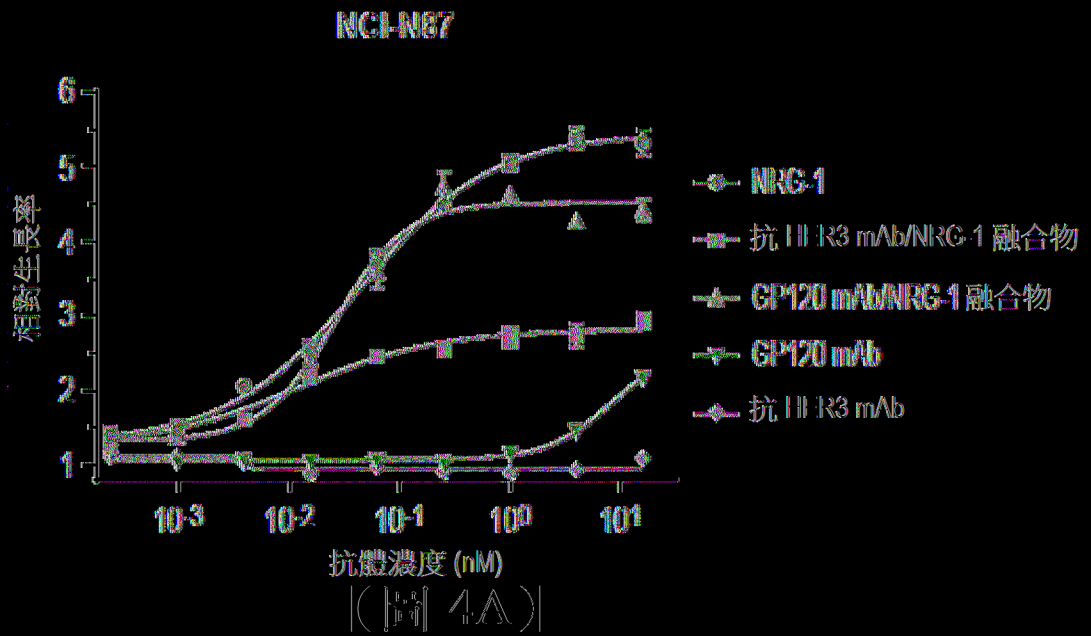
結合感氣器圍圈

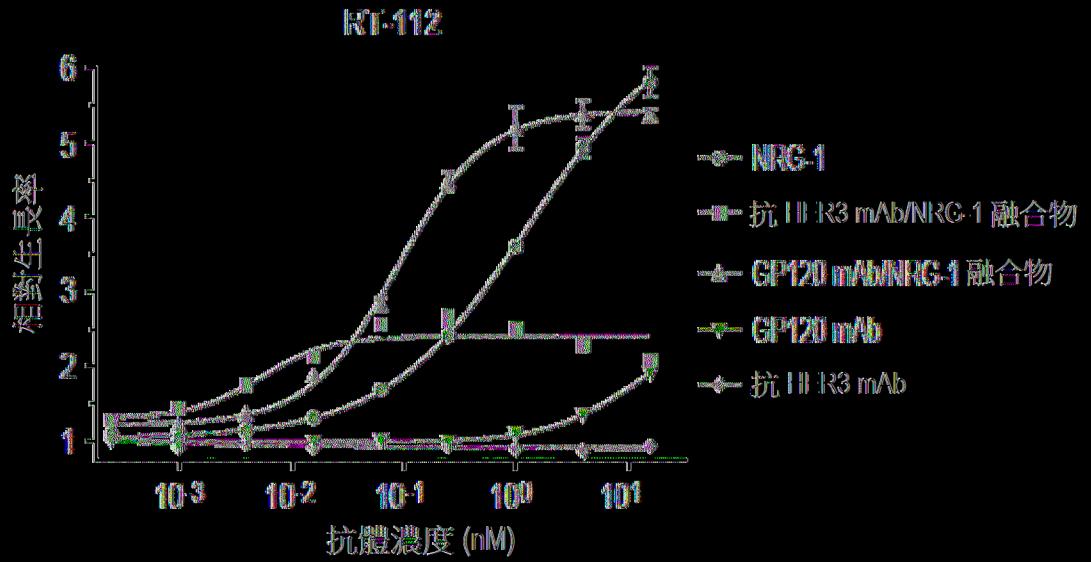


[圖 3]

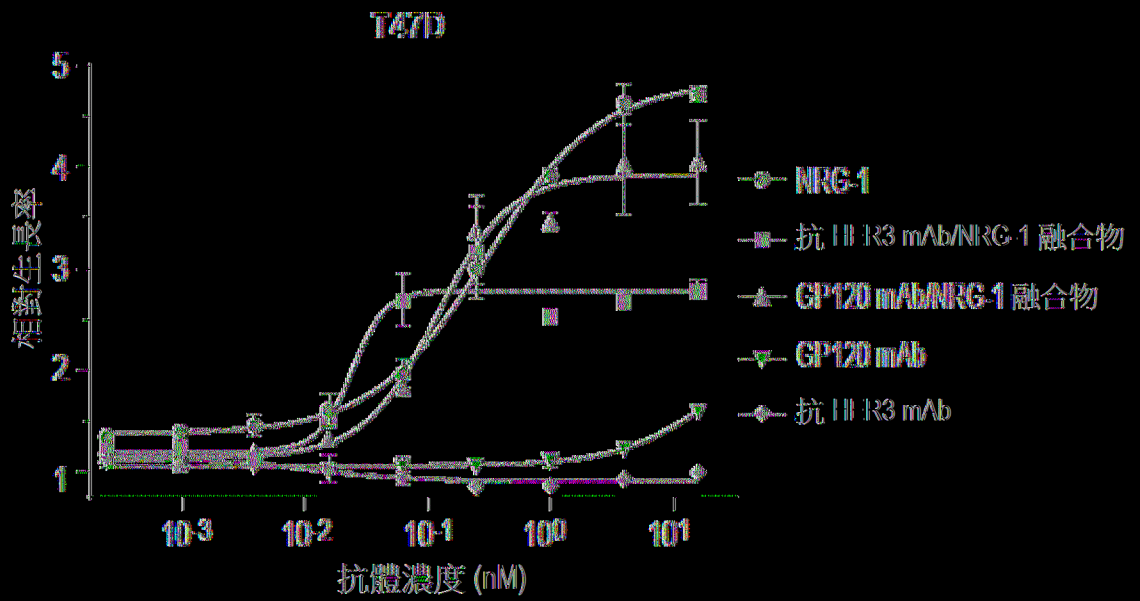
樣品描述

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

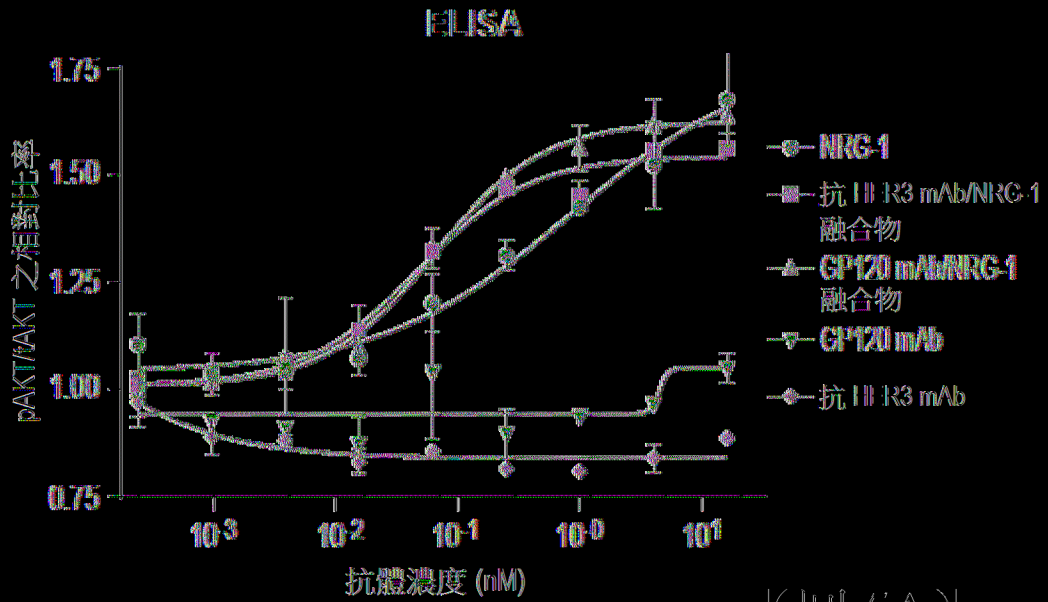




|(圖 4C)|

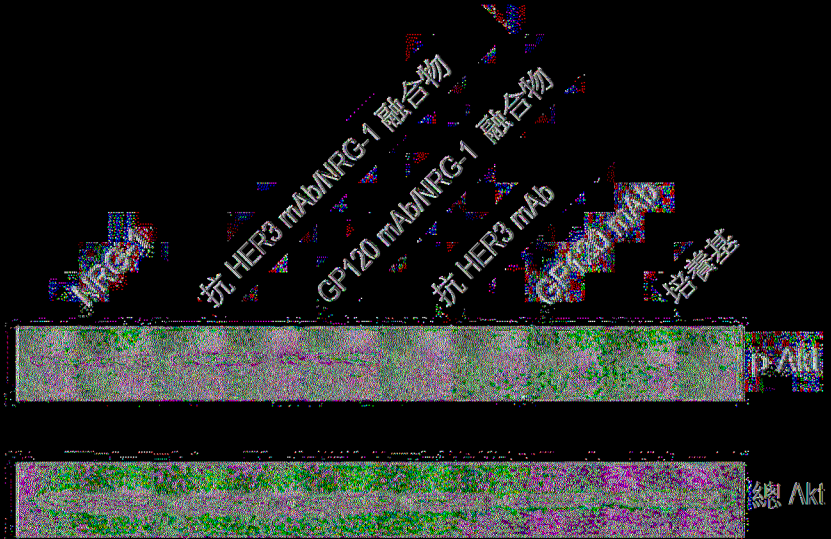


|(圖 4D)|

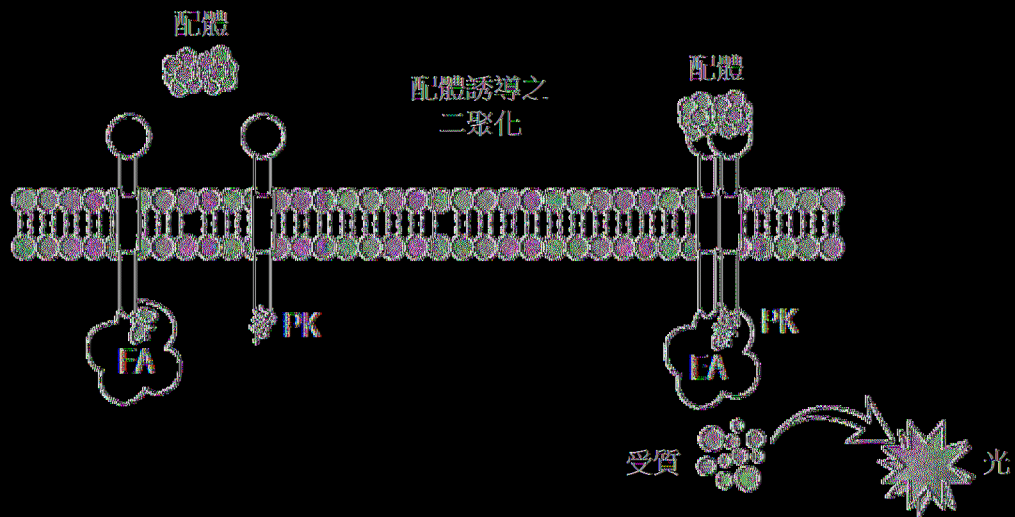


(圖 5A)

AKT 磷酸化之 WB 分析

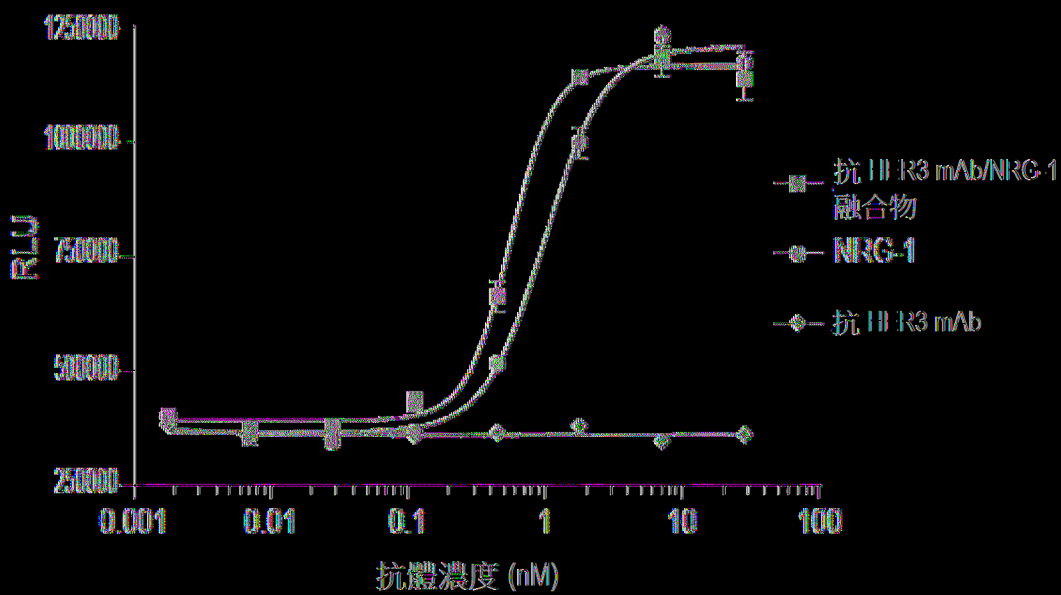


(圖 5B)



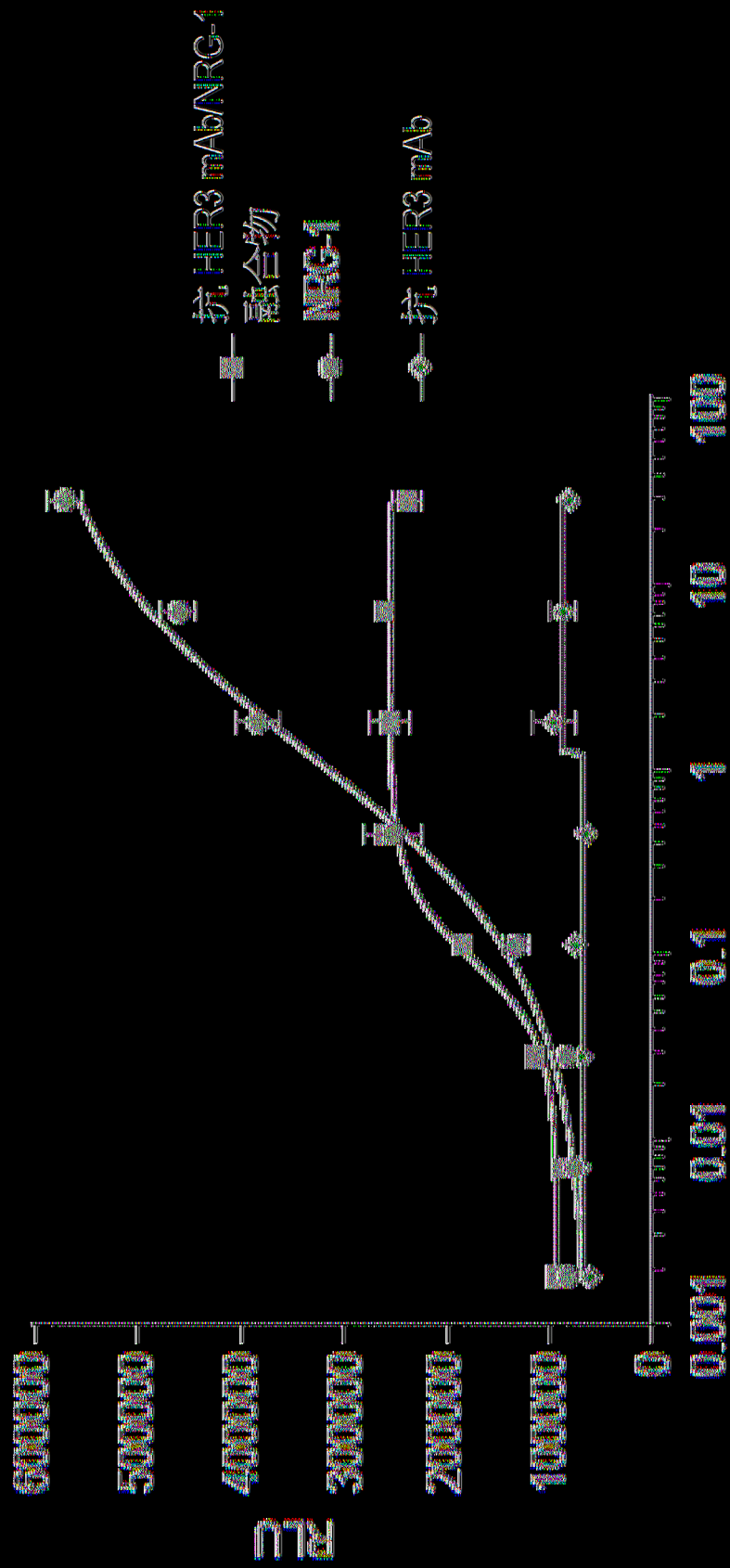
(圖 6A)

HER2 : HER4 二聚化



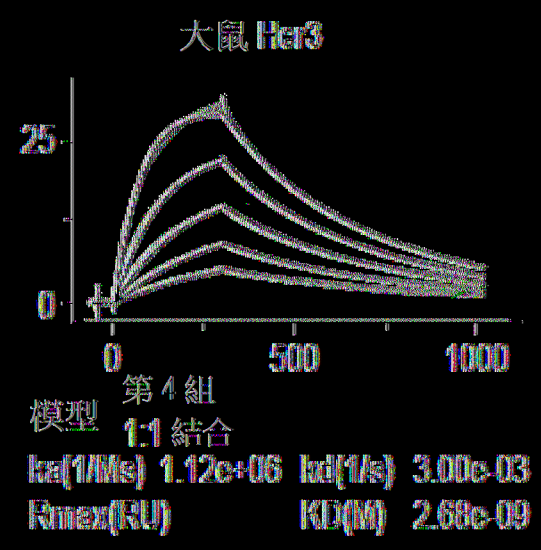
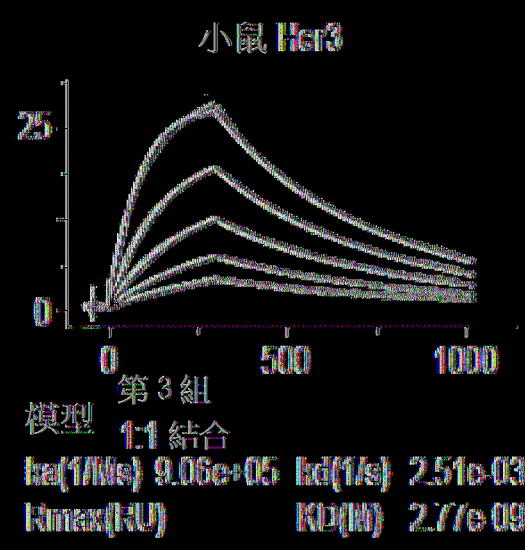
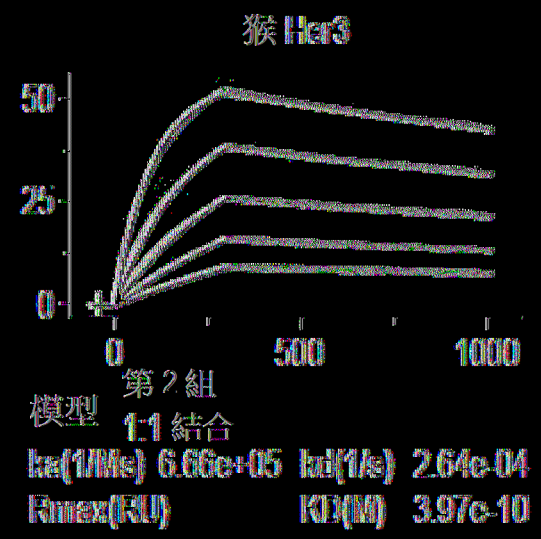
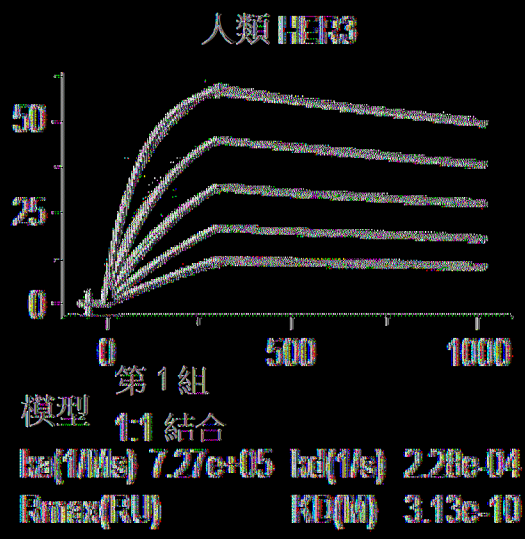
(圖 6B)

HER2:HER3二聚化

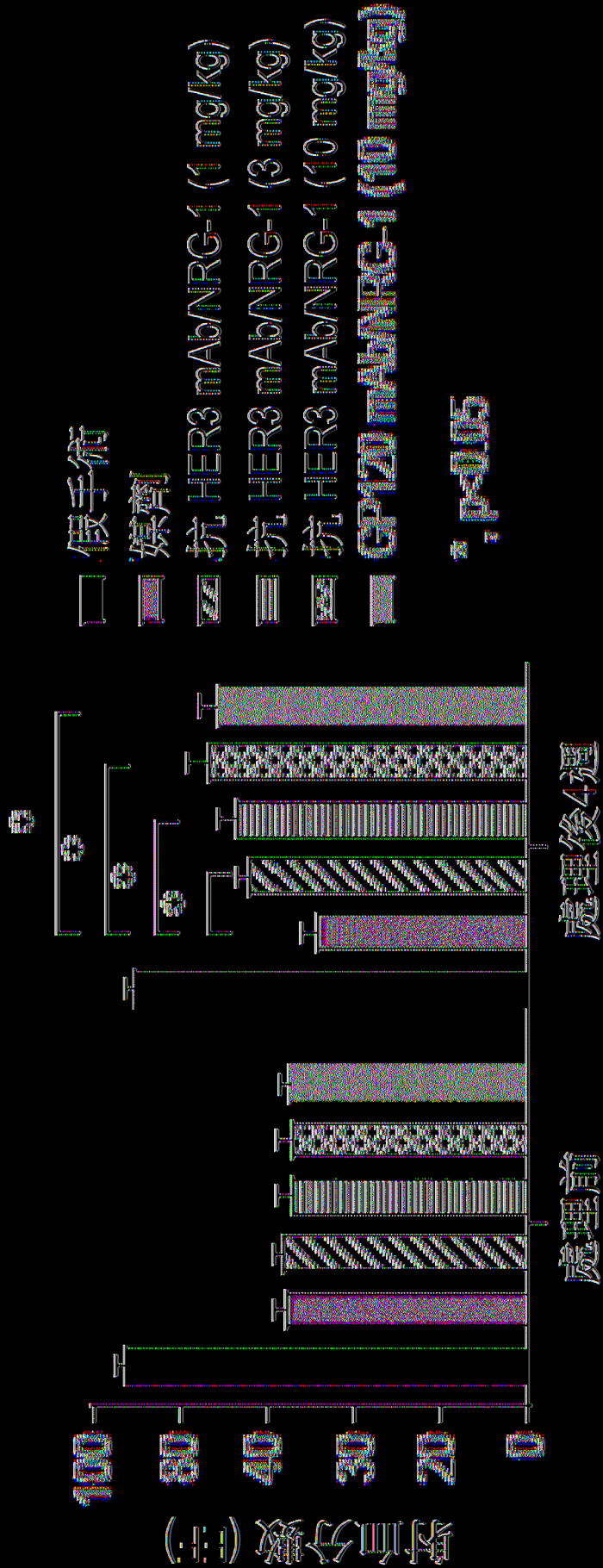


抗體濃度 (nM)

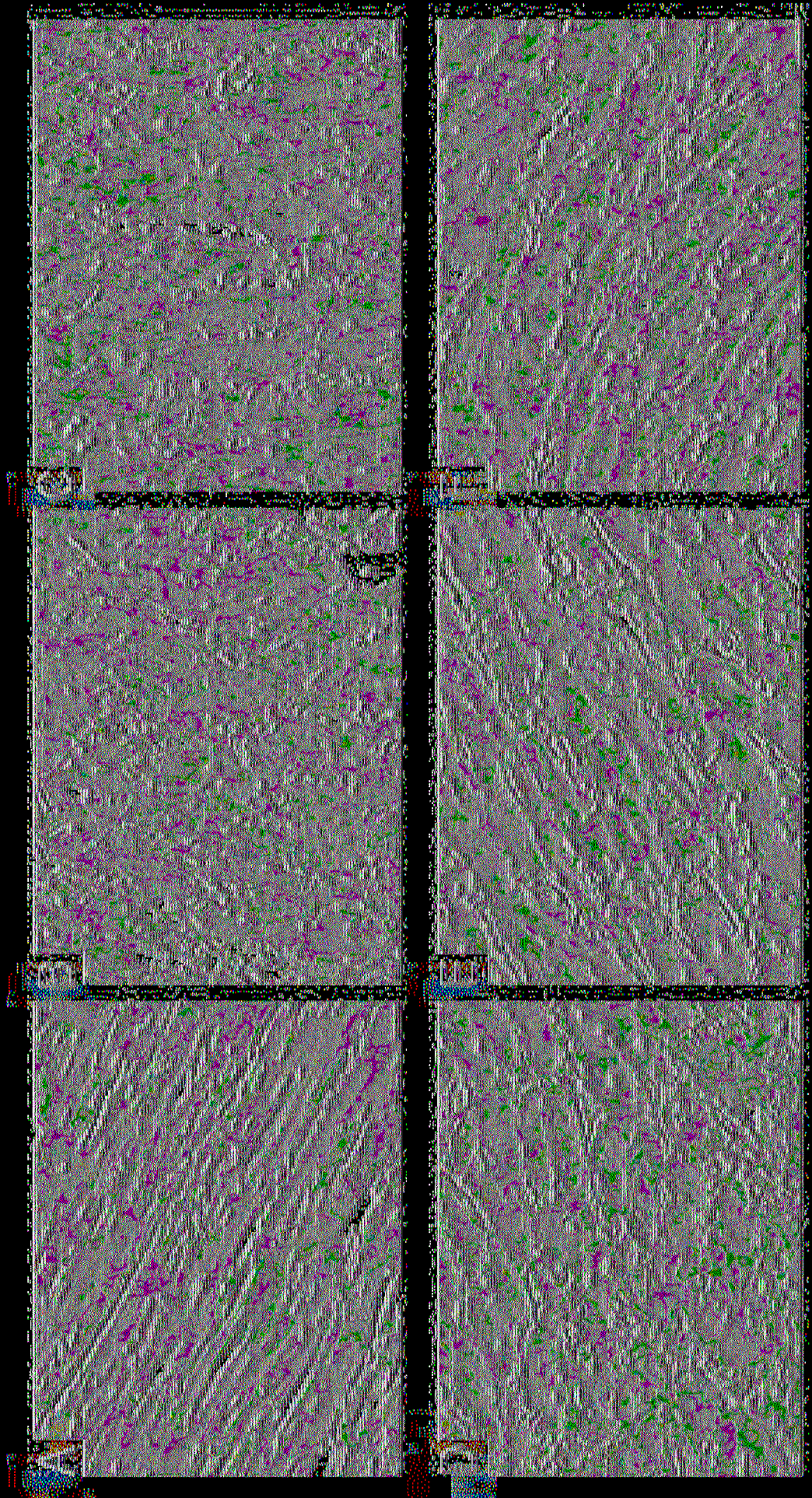
[頁 60]



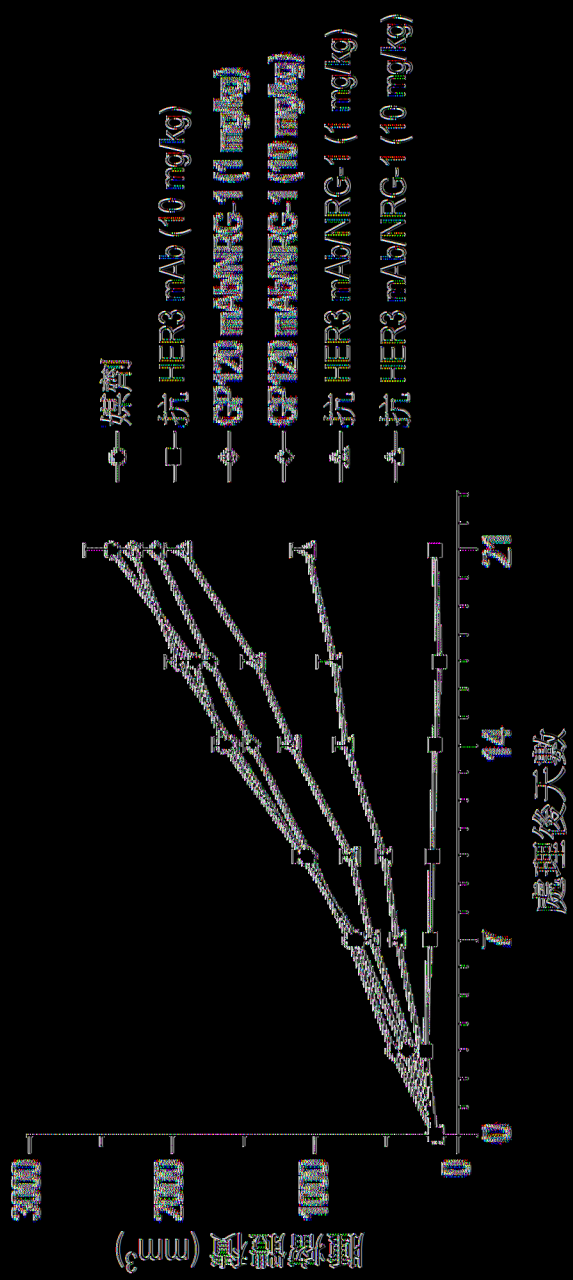
(圖 7)



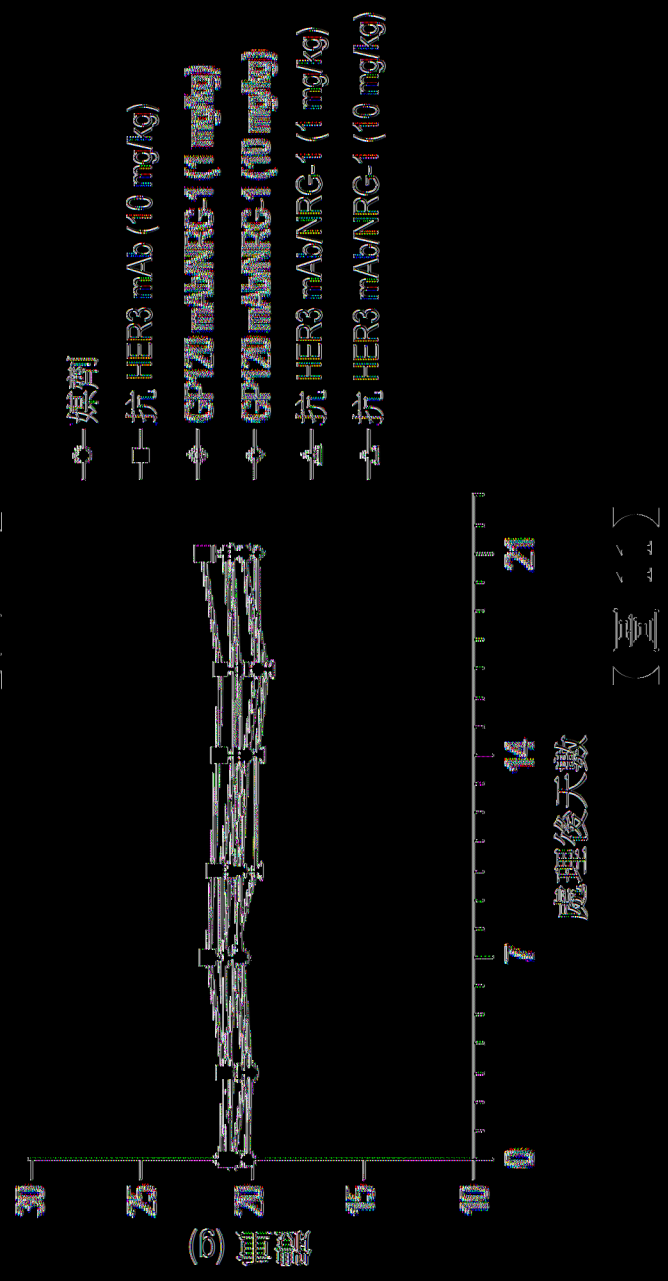
(圖 8)



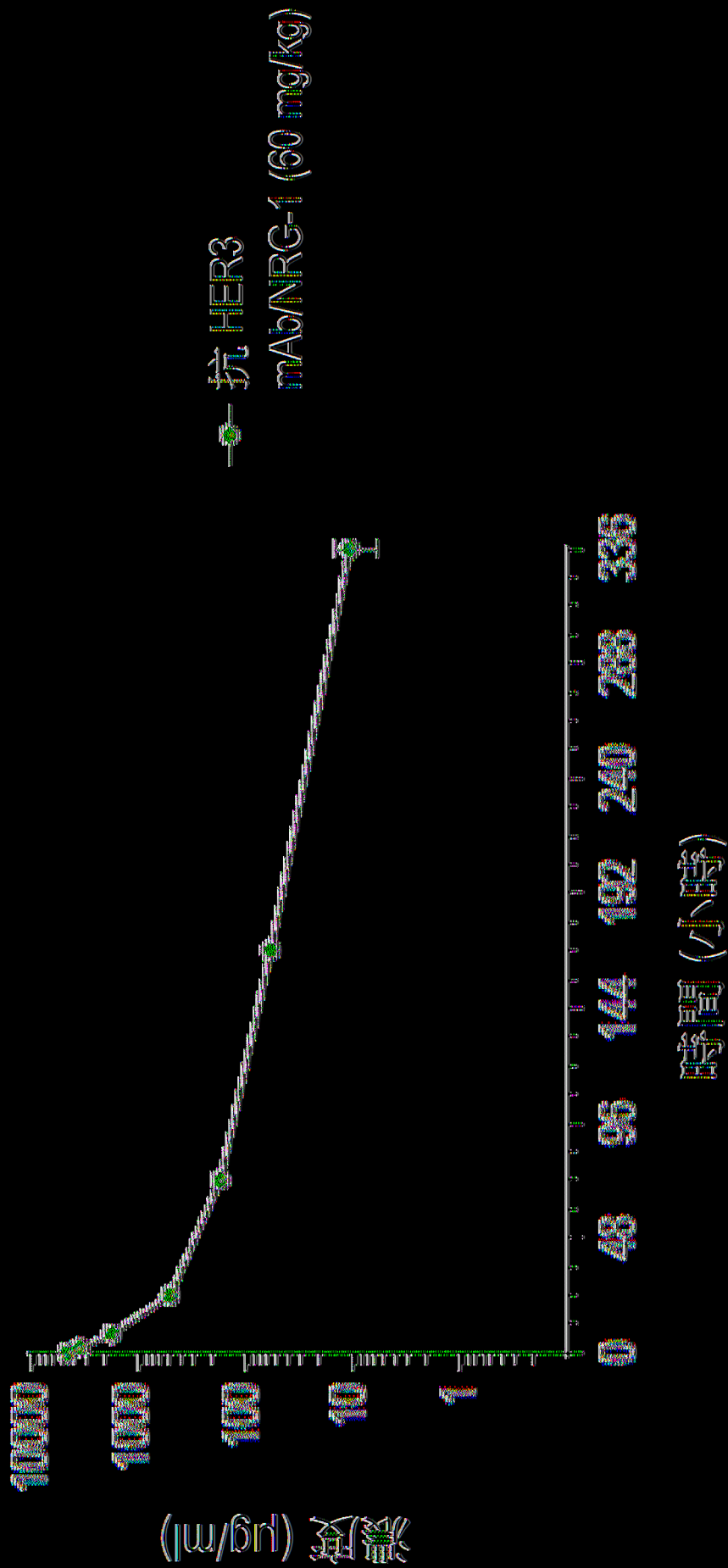
[E 9A-9E]



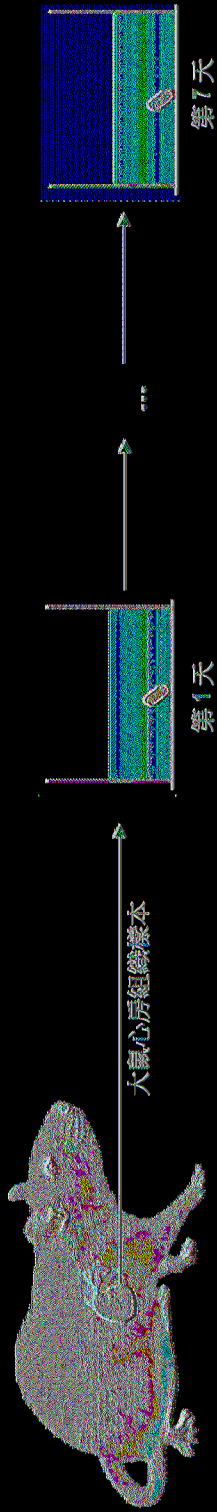
【圖 10】



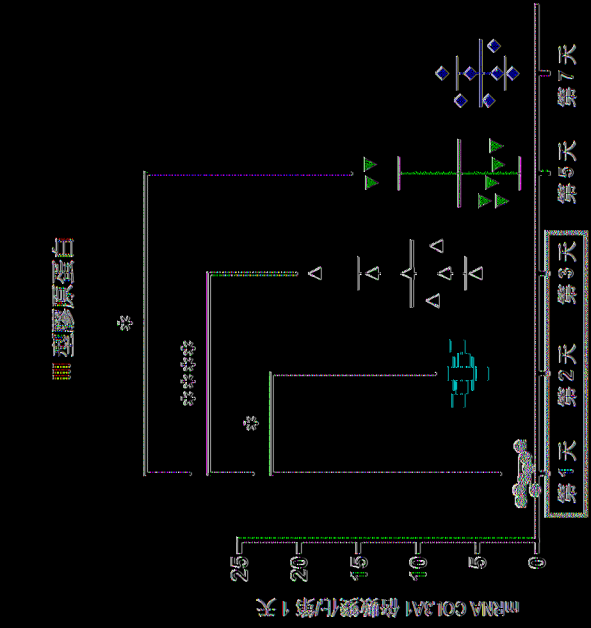
【圖 11】



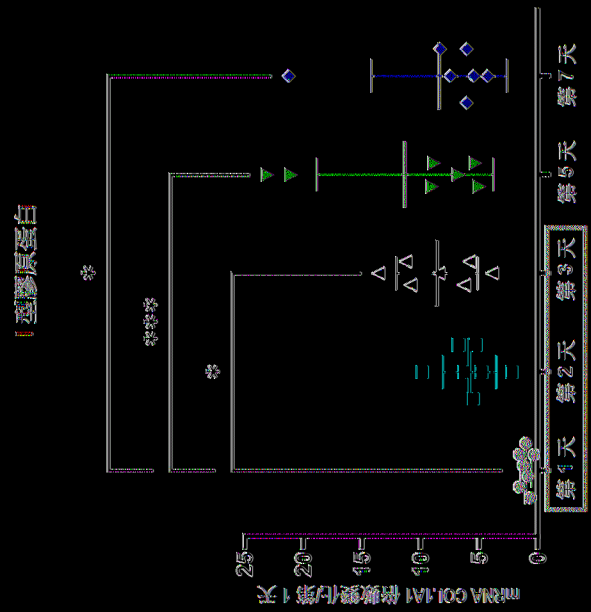
[圖 2]



[圖 3A]

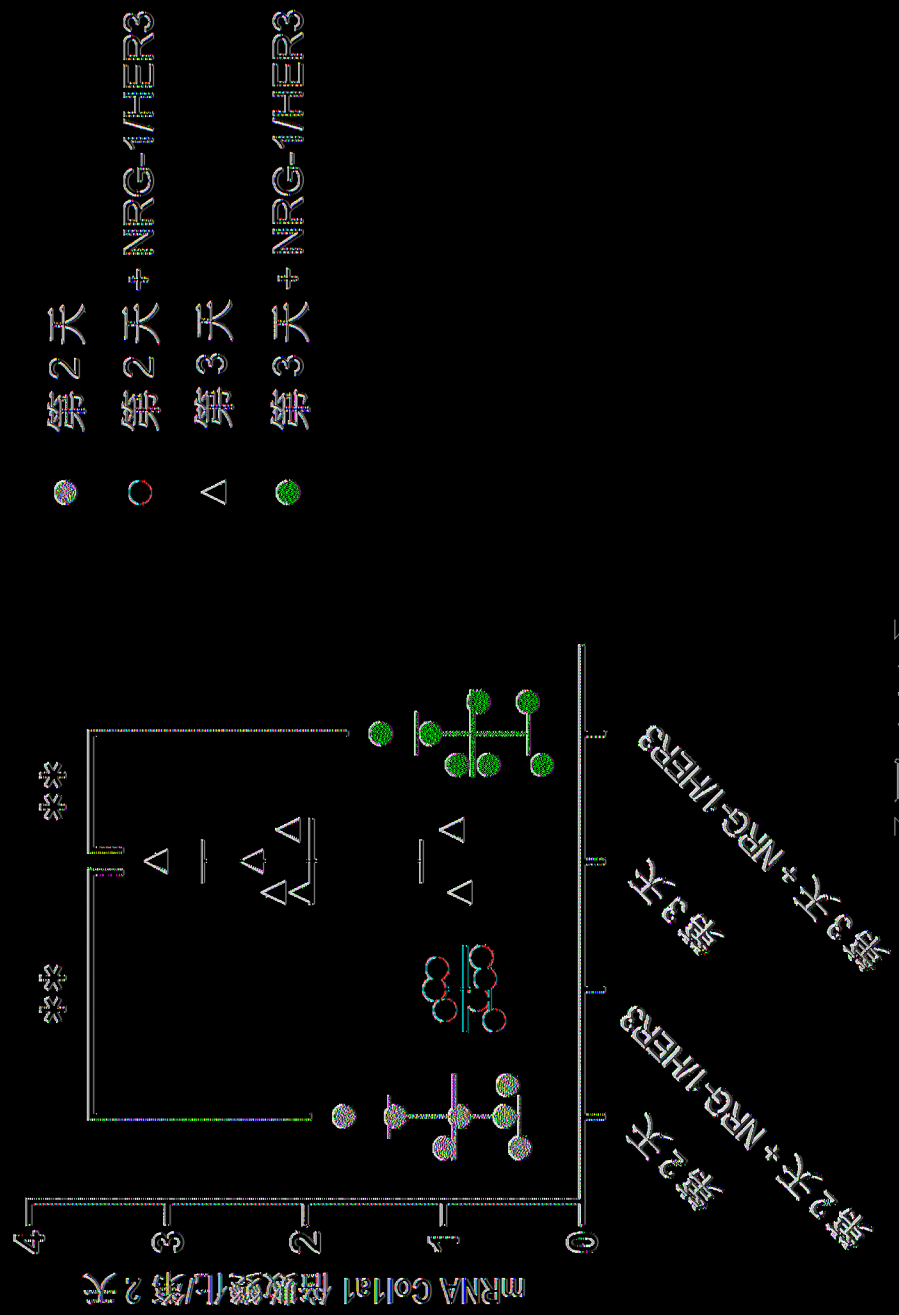


[圖 3C]



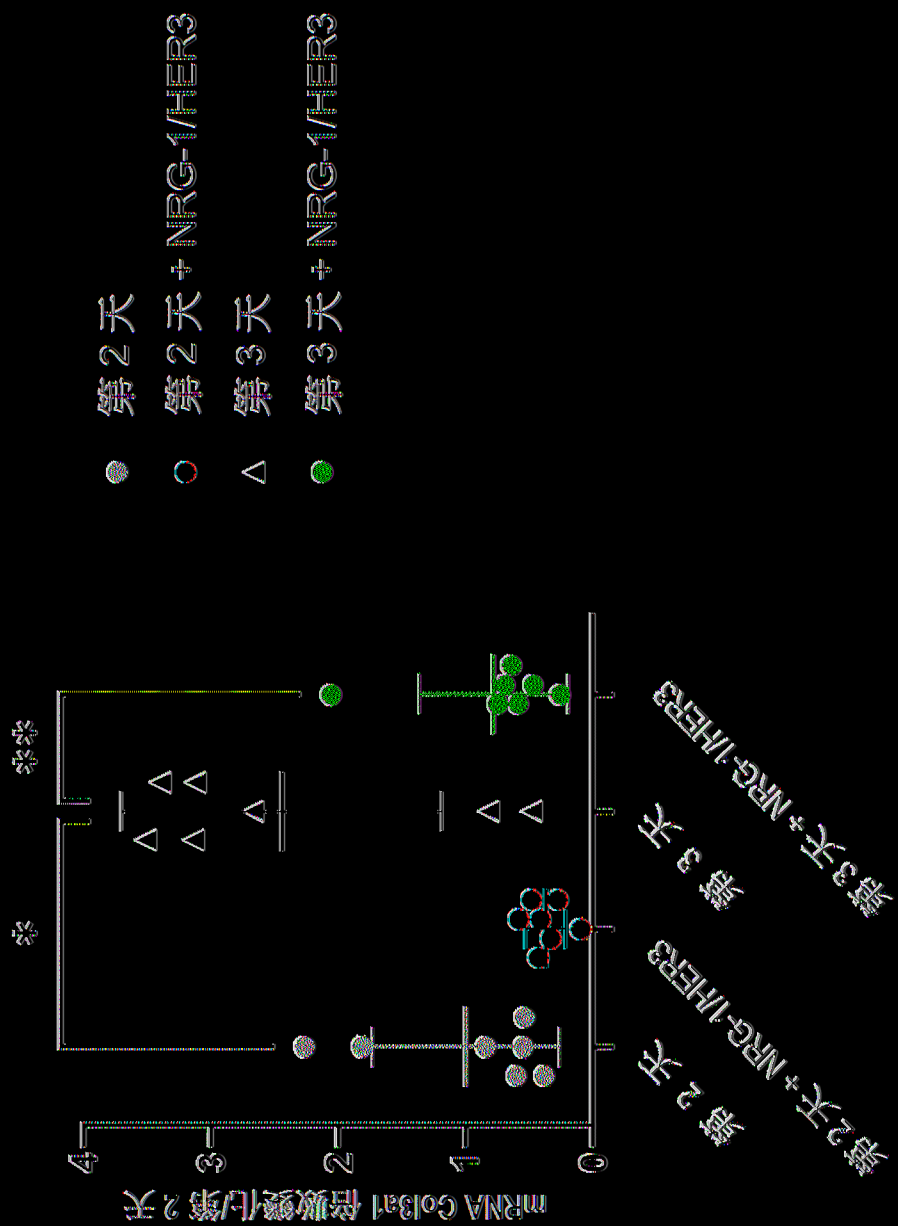
[圖 3B]

III型膠原蛋白

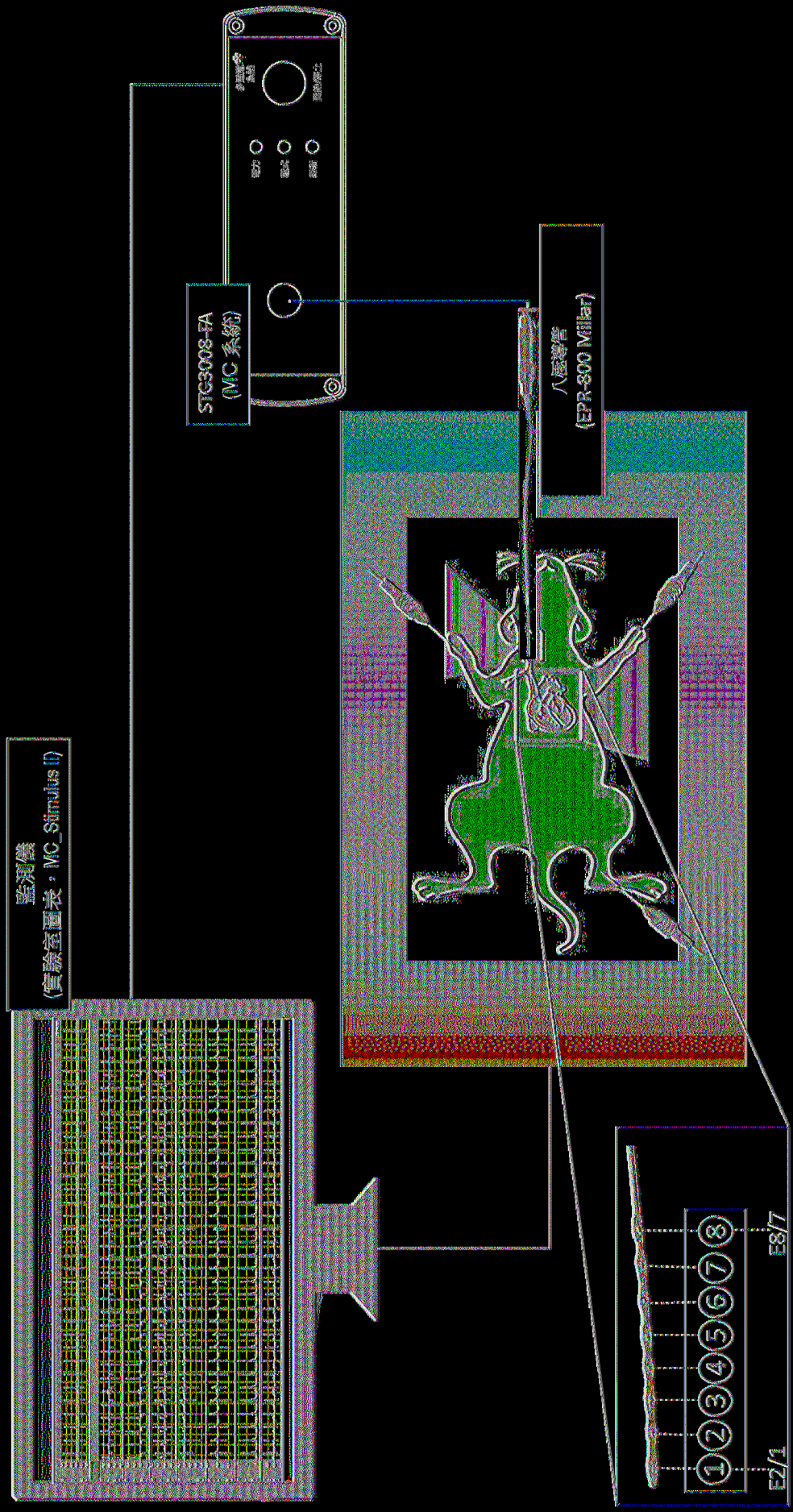


[圖 7A]

III型膠原蛋白



【Fig. 7】

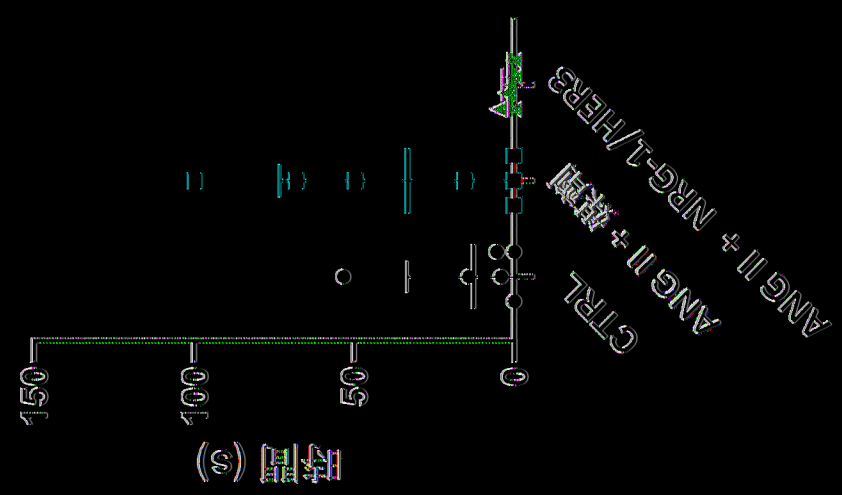


(圖 5)



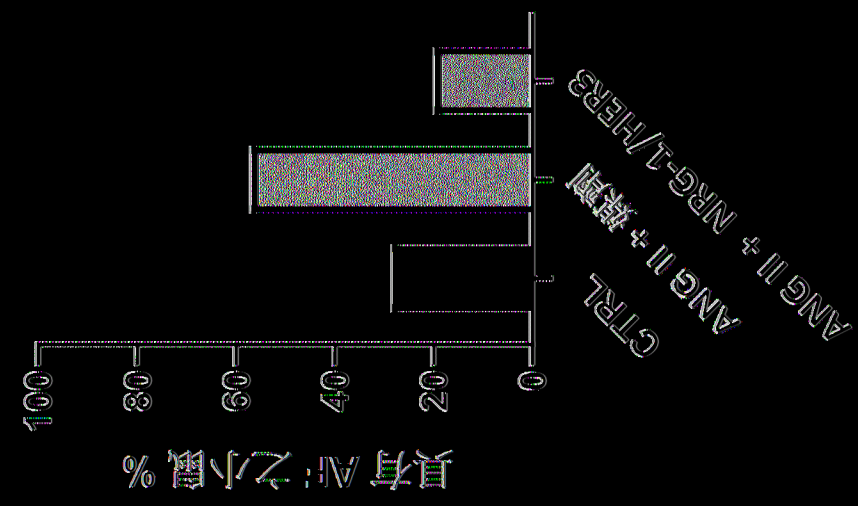
[圖 16]

不規則房性心律失常總持續時間



[圖 7A]

ANG II - 心律不整誘導性 3/5



[圖 7B]

高脂肪飲食

HFD (60%千卡脂肪)

8週

開始



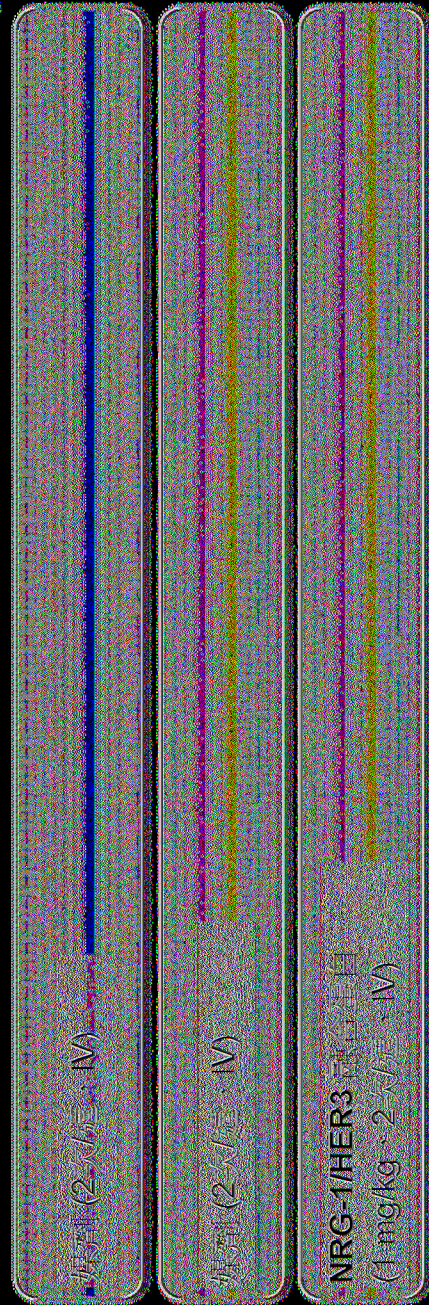
NC



HFD



HFD



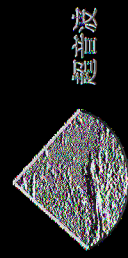
開始

8週

0週 (2.4h₂O, IV)

8週 (2.4h₂O, IV)

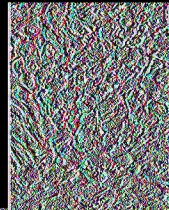
NRG-1/HER3 敲除生食
(1 mg/kg, 2.4h₂O, IV)



冠狀動脈



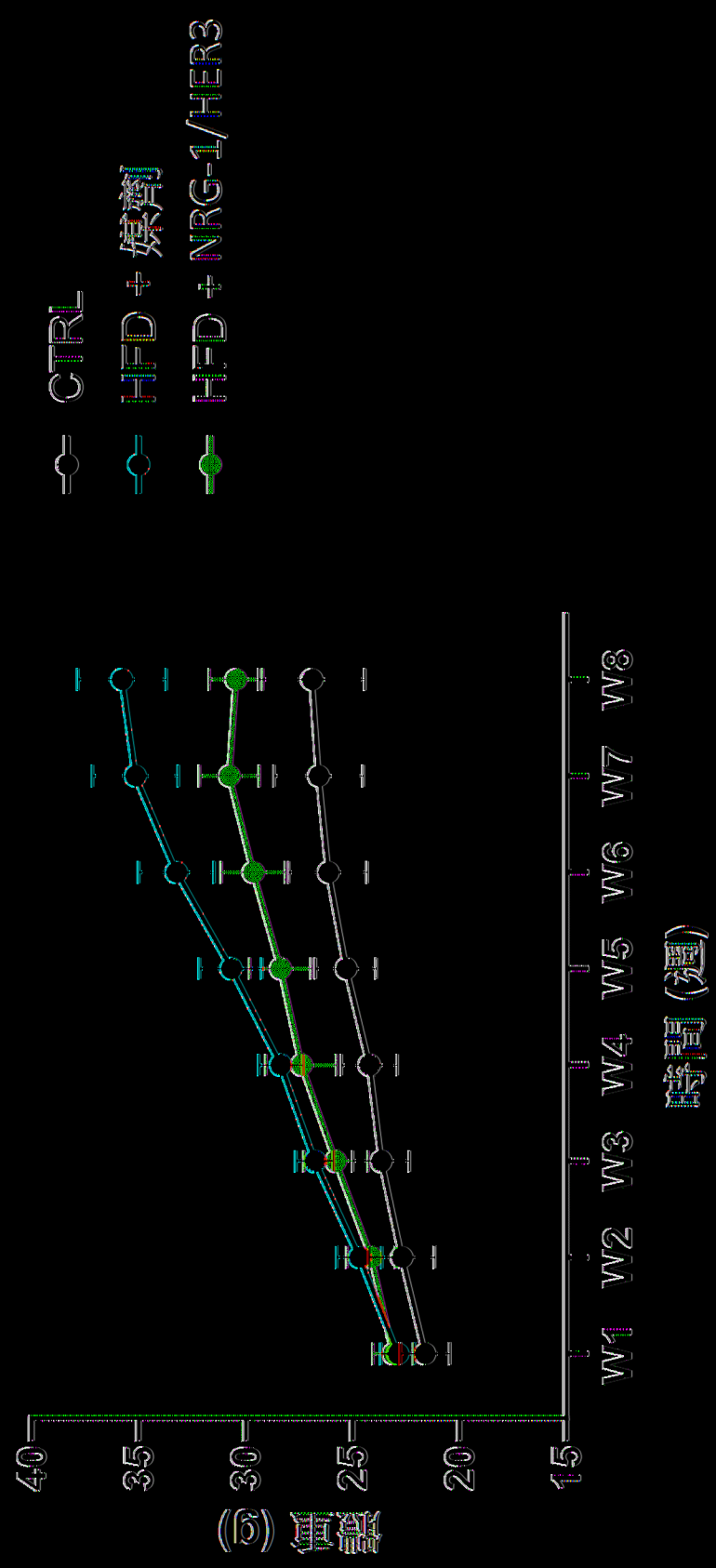
冠狀動脈



心導不整
誘發性

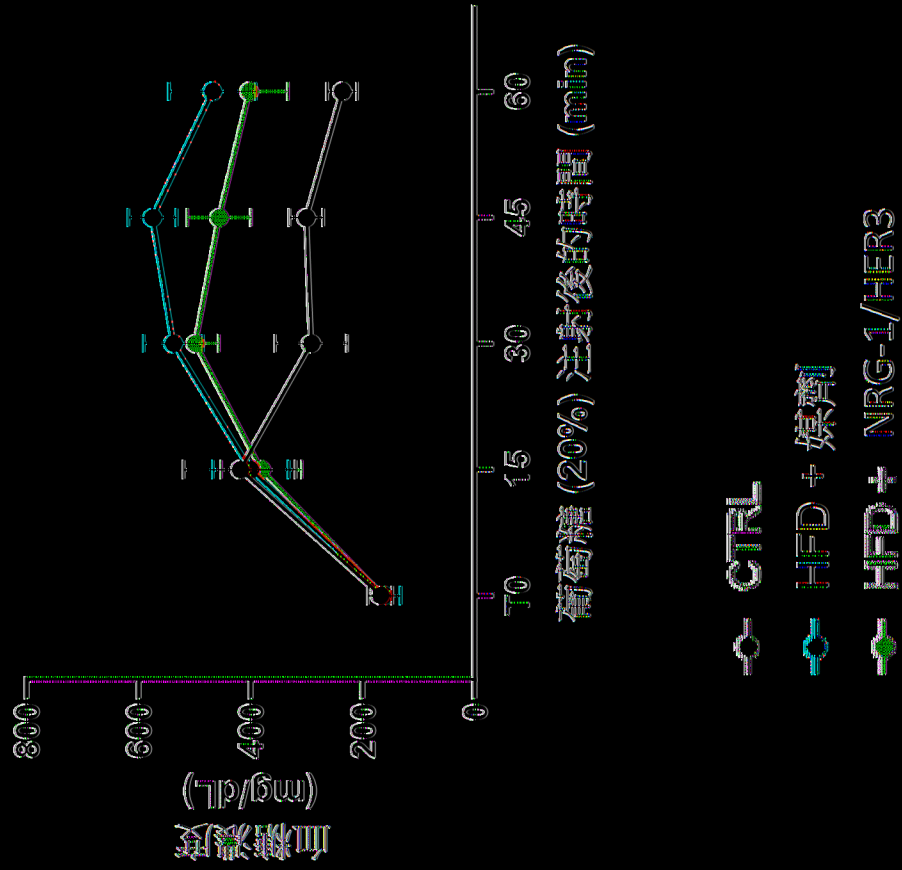
[圖 8]

隨時間推移的體重



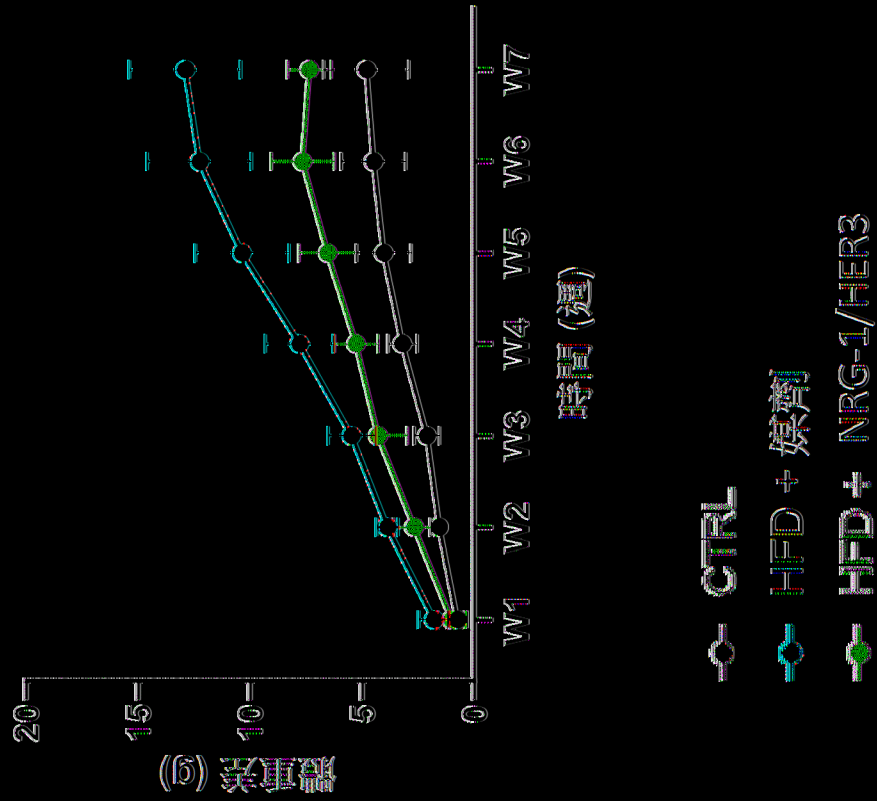
[圖 9A]

葡萄糖耐量測試



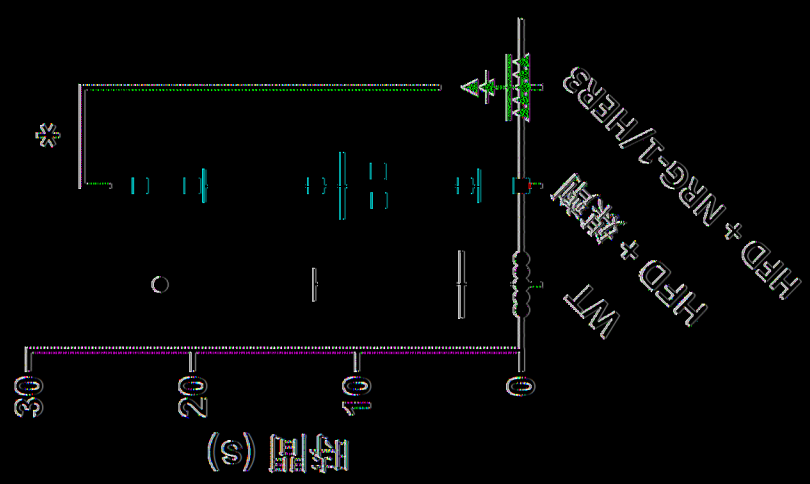
[圖 19C]

隨時間推移的體重增加(g)



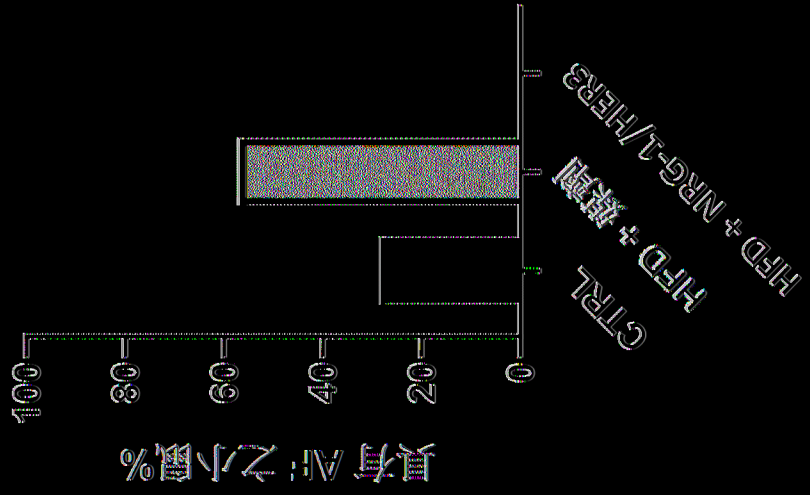
[圖 19B]

不規則房性心律失常總持續時間

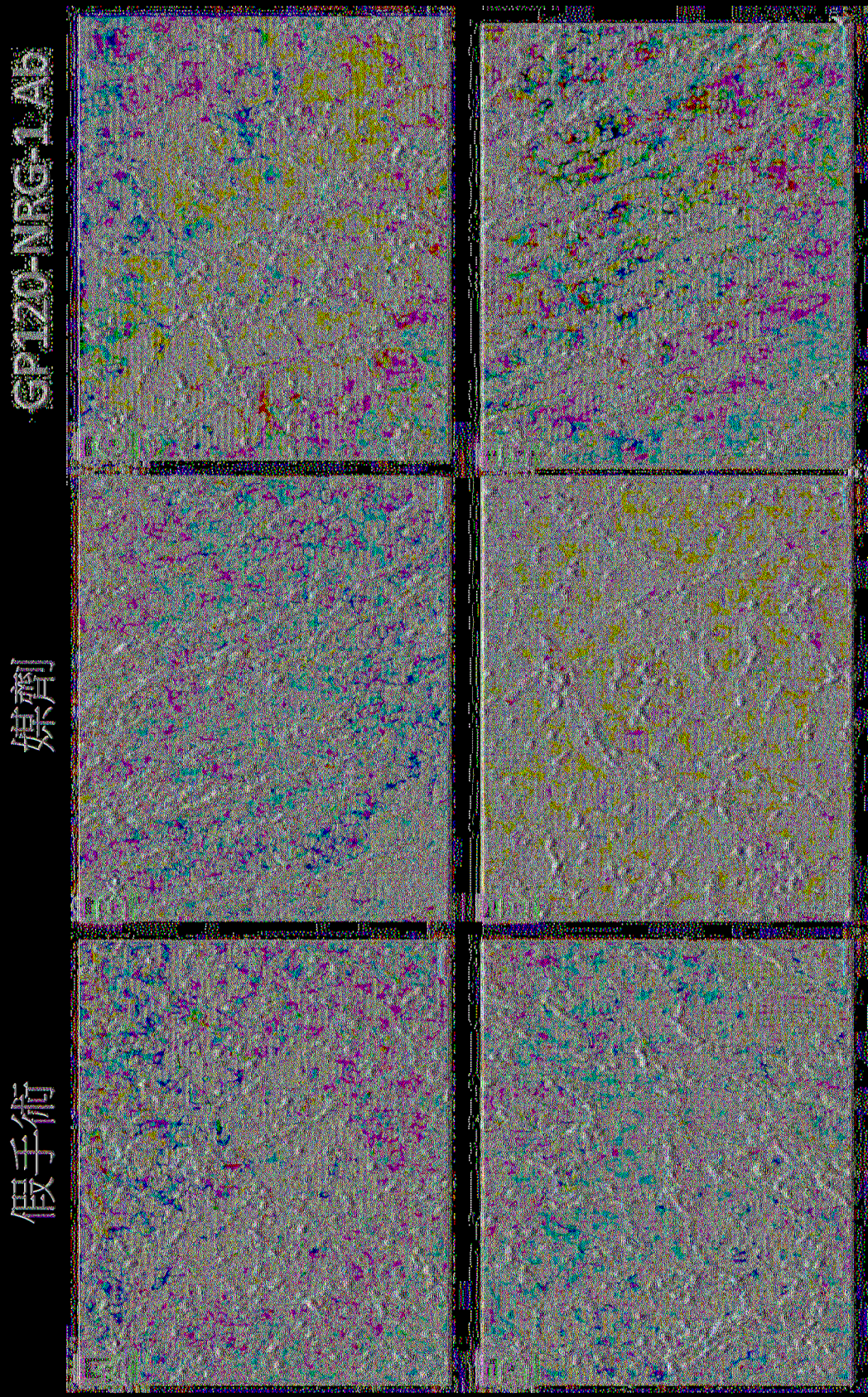


[圖 20A]

HFD - 心律不整誘導性3/5



[圖 20B]



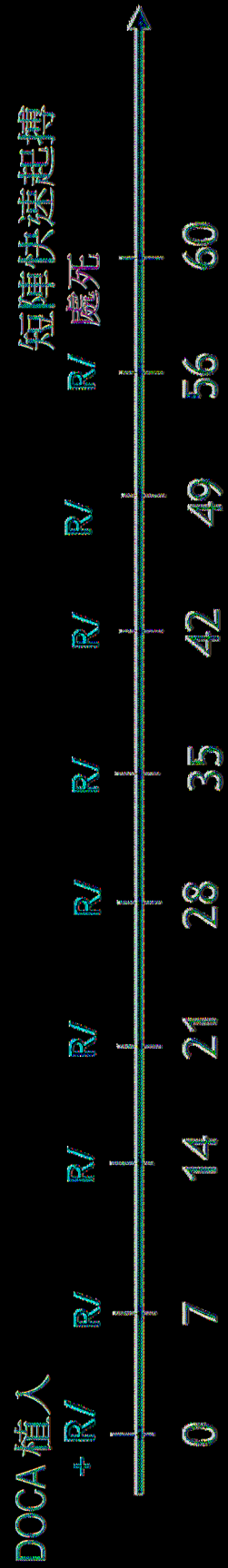
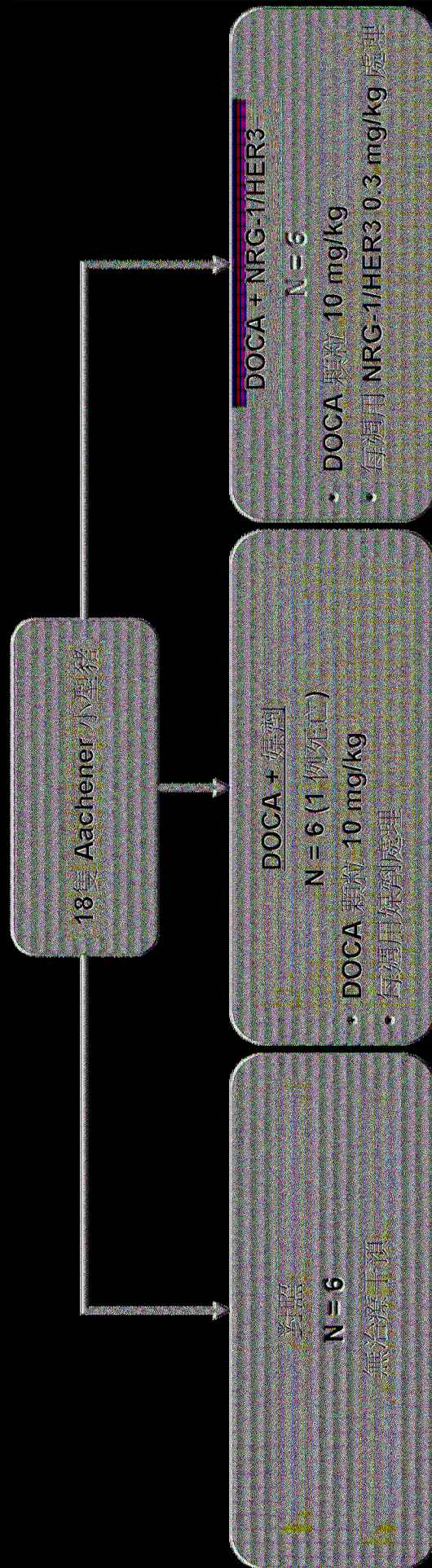
GPI20-NRG-1 Ab

媒劑

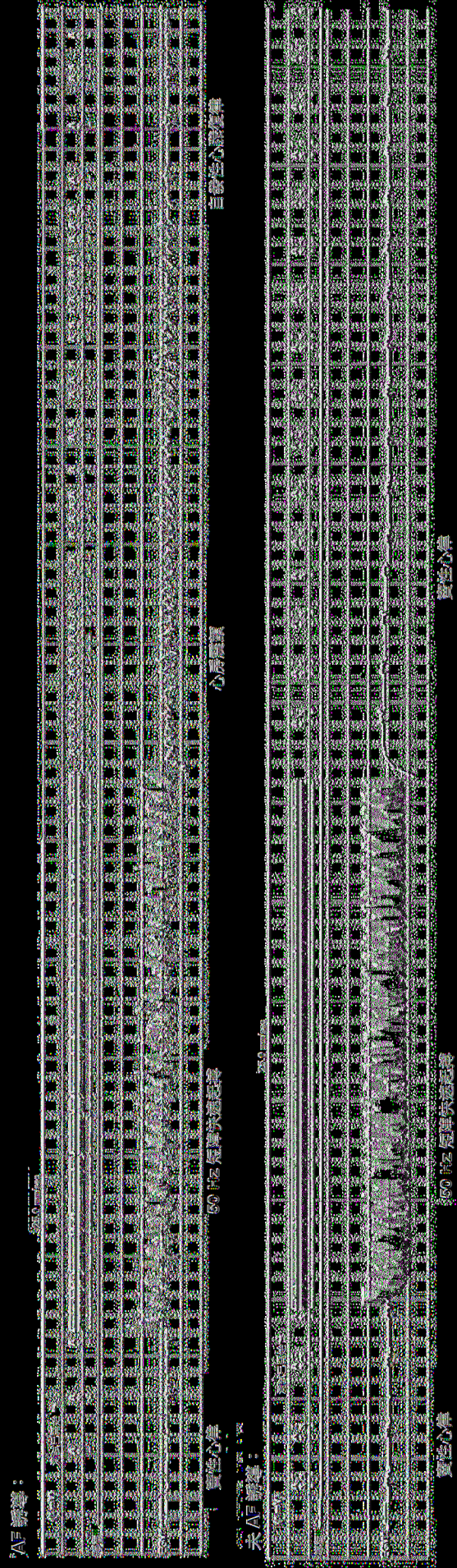
假手術

NRG-1/HER3 Ab 1 mg/kg NRG-1/HER3 Ab 3 mg/kg NRG-1/HER3 Ab 10 mg/kg

[圖 2(A)=2(B)]

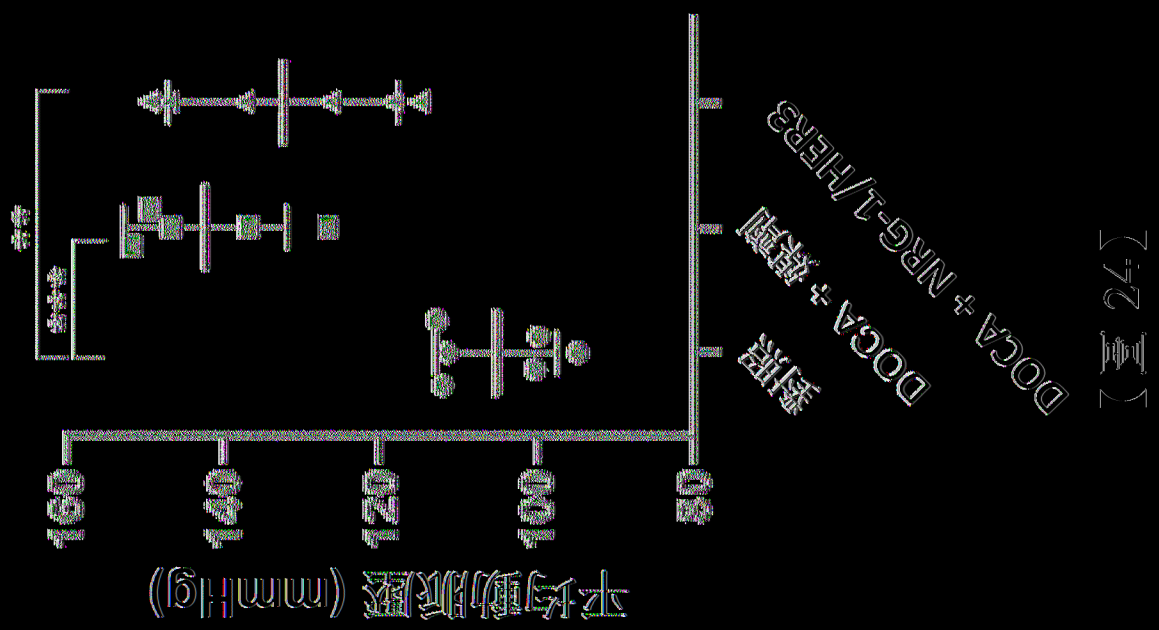
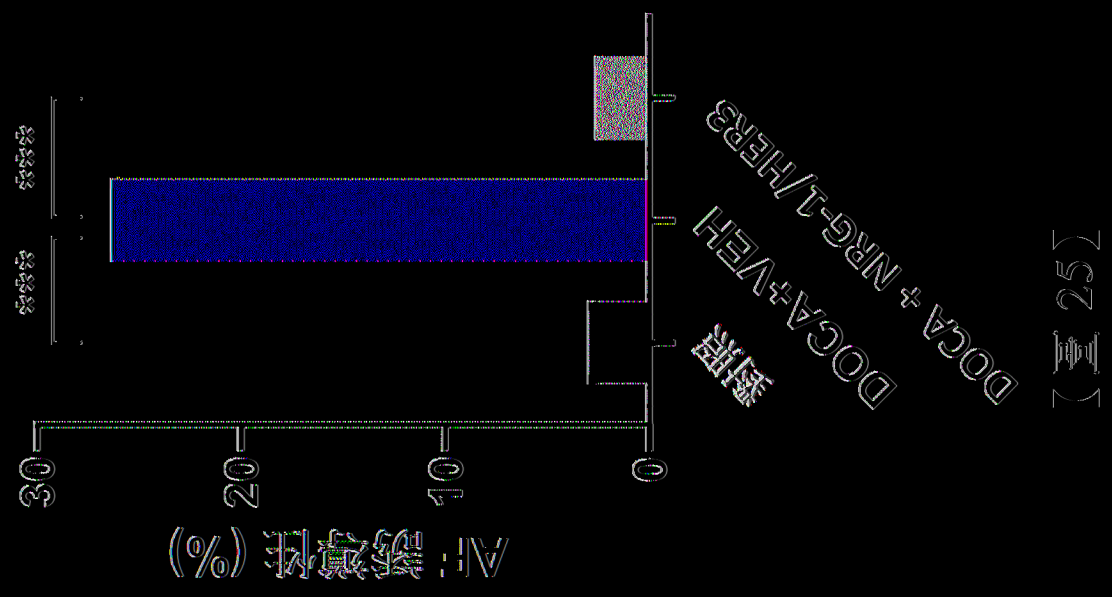


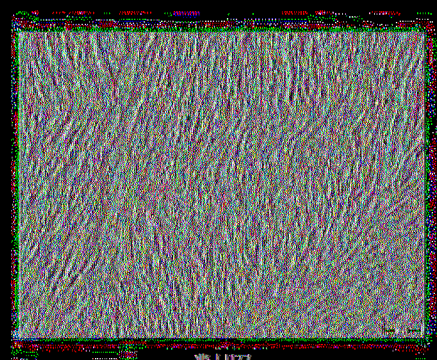
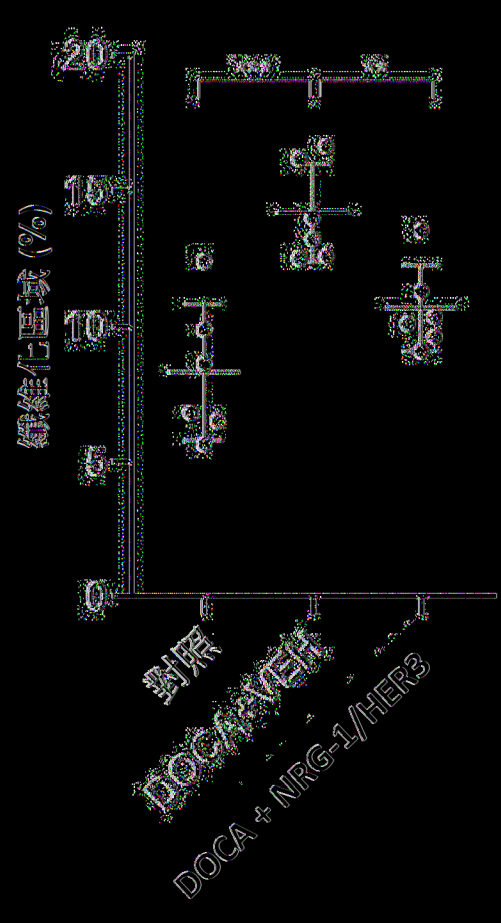
[圖 22]



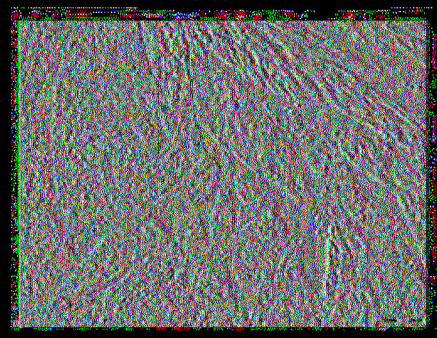
$$\text{AF誘導性} = \frac{\text{AF可誘導発作次数}}{\text{総発作次数}} \times 100\%$$

[頁 23]

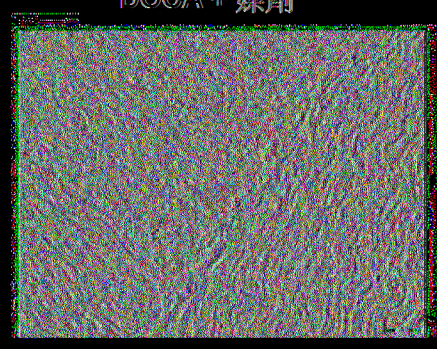




對照



DOCA + 媒劑



DOCA + NRG-1/HER3

(圖 2.6)