

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-507559

(P2004-507559A)

(43) 公表日 平成16年3月11日(2004.3.11)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	2 G O 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	4 B O 6 4
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 39/395	4 C O 8 4
A 6 1 P 9/00	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 151 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2002-523958 (P2002-523958)
 (86) (22) 出願日 平成13年8月29日 (2001.8.29)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年2月27日 (2003.2.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/026984
 (87) 国際公開番号 W02002/018444
 (87) 国際公開日 平成14年3月7日 (2002.3.7)
 (31) 優先権主張番号 60/229, 679
 (32) 優先日 平成12年9月1日 (2000.9.1)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/265, 516
 (32) 優先日 平成13年1月31日 (2001.1.31)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 09/940, 101
 (32) 優先日 平成13年8月27日 (2001.8.27)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

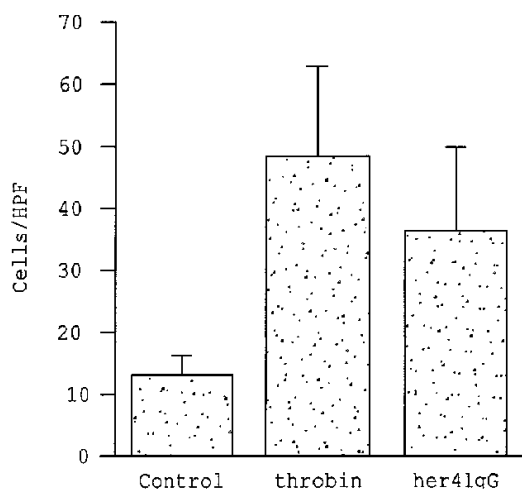
(71) 出願人 596168317
 ジェネンテック・インコーポレーテッド
 GENENTECH, INC.
 アメリカ合衆国カリフォルニア・9408
 0-4990・サウス・サン・フランシス
 コ・ディーエヌエー・ウェイ・1
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 E r b B 4 アンタゴニスト

(57) 【要約】

本発明は、ネイティブな E r b B 4 レセプターのアンタゴニストを使用することによって、平滑筋細胞の過剰な増殖および/または移動を制御するため、詳細には、狭窄を処置するための方法および手段に関する。本発明はさらに、平滑筋細胞の増殖および移動を阻害または増強し得る E r b B 4 のアゴニストおよびアンタゴニストを同定するための方法に関する。1つの実施形態において、平滑筋細胞は、膀胱平滑筋細胞であり、別の実施形態において、平滑筋細胞は、気道経路の平滑筋細胞である。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

平滑筋細胞の過剰な増殖または移動を制御するための方法であって、該方法は、ネイティブな E r b B 4 レセプターのアンタゴニストの有効量で該平滑筋細胞を処理する工程を包含する、方法。

【請求項 2】

前記制御が、平滑筋細胞の過剰な増殖または移動の予防である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記制御が、平滑筋細胞の過剰な増殖または移動の阻害である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記阻害が完全な阻害である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記平滑筋細胞が幽門平滑筋細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記平滑筋細胞が膀胱平滑筋細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記平滑筋細胞が気道経路の平滑筋細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記平滑筋細胞の前記過剰な増殖または移動が、狭窄を生じる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記平滑筋細胞が血管平滑筋細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記血管平滑筋細胞がヒトのものである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記血管平滑筋細胞が、ヒト大動脈平滑筋細胞である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

前記平滑筋細胞の前記過剰な増殖または移動が血管狭窄を生じる、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 13】

前記血管狭窄が、内皮細胞の過剰な増殖または移動によってさらに特徴付けられる、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記狭窄が再狭窄である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記 E r b B 4 レセプターアンタゴニストが免疫付着因子である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

前記免疫付着因子が、ネイティブな E r b B 4 レセプターの細胞外ドメイン配列を含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記ネイティブな E r b B 4 レセプターがヒトのものである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記ネイティブなヒト E r b B 4 レセプター細胞外ドメイン配列が、免疫グロブリン重鎖定常領域配列に融合される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記免疫グロブリンが I g G アイソタイプの免疫グロブリンである、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記免疫グロブリンが、I g G 1 アイソタイプ、I g G 2 アイソタイプまたは I g G 3 アイソタイプの免疫グロブリンである、請求項 19 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 2 1】

前記免疫付着因子が、少なくとも 1 つの I g G 免疫グロブリン軽鎖を含む、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記アンタゴニストが抗体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記抗体がネイティブな E r b B 4 レセプターに対する中和抗体である、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記抗体が、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体である、請求項 2 3 に記載の方法 10

【請求項 2 5】

前記抗体がグリコシル化されている、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 6】

請求項 2 3 に記載の方法であって、前記抗体が、H E R 4 . 1 0 H 1 . 1 A 1 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 8)、H E R 4 . 1 C 6 . A 1 1 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 9)、H E R 4 . 3 B 9 . 2 C 9 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 6)、H E R 4 . 1 A 6 . 5 B 3 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 7) および H E R 4 . 8 B 1 . 2 H 2 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 5) からなる群より選択されるハイブリドーマによって産生される抗体と本質的に同じエピトープを結合する、方法。 20

【請求項 2 7】

請求項 2 3 に記載の方法であって、前記抗体が、H E R 4 . 1 0 H 1 . 1 A 1 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 8)、H E R 4 . 1 C 6 . A 1 1 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 9)、H E R 4 . 3 B 9 . 2 C 9 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 6)、H E R 4 . 1 A 6 . 5 B 3 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 7) および H E R 4 . 8 B 1 . 2 H 2 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 5) からなる群より選択されるハイブリドーマによって産生される抗体由来の相補性決定領域 (C D R) の残基を有する、方法。

【請求項 2 8】

哺乳動物患者における狭窄を処置するための方法であって、該方法は、ネイティブな哺乳動物 E r b B 4 レセプターのアンタゴニストの有効量を該患者に投与する工程を包含する 30、方法。

【請求項 2 9】

前記患者がヒトである、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記狭窄が血管狭窄である、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記血管狭窄が再狭窄である、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記アンタゴニストが免疫付着因子である、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記免疫付着因子が、ネイティブな E r b B 4 レセプターの細胞外ドメイン配列を含む、請求項 3 2 に記載の方法。 40

【請求項 3 4】

前記細胞外ドメイン配列が、免疫グロブリン重鎖定常領域配列に融合される、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記免疫グロブリンが I g G アイソタイプの免疫グロブリンである、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記アンタゴニストが抗体である、請求項 2 8 に記載の方法。 50

【請求項 37】

前記抗体がネイティブなヒト E r b B 4 レセプターに対する中和抗体である、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

請求項 36 に記載の方法であって、前記抗体が、H E R 4 . 1 0 H 1 . 1 A 1 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 8)、H E R 4 . 1 C 6 . A 1 1 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 9)、H E R 4 . 3 B 9 . 2 C 9 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 6)、H E R 4 . 1 A 6 . 5 B 3 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 7) および H E R 4 . 8 B 1 . 2 H 2 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 5) からなる群より選択されるハイブリドーマによって産生される抗体と本質的に同じエピトープを結合する、方法。

10

【請求項 39】

請求項 36 に記載の方法であって、前記抗体が、H E R 4 . 1 0 H 1 . 1 A 1 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 8)、H E R 4 . 1 C 6 . A 1 1 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 9)、H E R 4 . 3 B 9 . 2 C 9 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 6)、H E R 4 . 1 A 6 . 5 B 3 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 7) および H E R 4 . 8 B 1 . 2 H 2 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 5) からなる群より選択されるハイブリドーマによって産生される抗体由来の相補性決定領域 (C D R) の残基を有する、方法。

【請求項 40】

前記アゴニストが注射または注入として投与される、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 41】

前記処置が、前記狭窄に関連する高血圧をさらに低減する、請求項 28 に記載の方法。

20

【請求項 42】

前記処置が予防である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 43】

前記狭窄が幽門狭窄である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 44】

前記狭窄が膀胱壁の肥厚である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 45】

前記狭窄が閉塞性気道疾患の一部である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 46】

哺乳動物患者における狭窄を処置するための方法であって、該方法は、E r b B 4 レセプターのアンタゴニストをコードする核酸を、該患者の細胞に導入する工程を包含する、方法。

30

【請求項 47】

前記患者がヒトである、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】

前記アンタゴニストが免疫付着因子である、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

前記免疫付着因子が、免疫グロブリン重鎖定常領域配列に融合されたネイティブなヒト E r b B 4 レセプターの細胞外ドメイン配列を含む、請求項 48 に記載の方法。

40

【請求項 50】

前記アンタゴニストが抗体である、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 51】

前記抗体がネイティブな E r b B 4 レセプターに対する中和抗体である、請求項 50 に記載の方法。

【請求項 52】

前記抗体が、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体である、請求項 51 に記載の方法。

【請求項 53】

請求項 51 に記載の方法であって、前記抗体が、H E R 4 . 1 0 H 1 . 1 A 1 (A T C C

50

登録番号 P T A - 2 8 2 8)、H E R 4 . 1 C 6 . A 1 1 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 9)、H E R 4 . 3 B 9 . 2 C 9 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 6)、H E R 4 . 1 A 6 . 5 B 3 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 7) および H E R 4 . 8 B 1 . 2 H 2 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 5) からなる群より選択されるハイブリドーマによって産生される抗体と本質的に同じエピトープを結合する、方法。

【請求項 5 4】

請求項 5 1 に記載の方法であって、前記抗体が、H E R 4 . 1 0 H 1 . 1 A 1 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 8)、H E R 4 . 1 C 6 . A 1 1 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 9)、H E R 4 . 3 B 9 . 2 C 9 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 6)、H E R 4 . 1 A 6 . 5 B 3 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 7) および H E R 4 . 8 B 1 . 2 H 2 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 5) からなる群より選択されるハイブリドーマによって産生される抗体由来の相補性決定領域 (C D R) の残基を有する、方法。

10

【請求項 5 5】

前記核酸がインビボで導入される、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記核酸がエキソビボで導入される、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 5 7】

哺乳動物患者における血管狭窄に関連する高血圧を処置するための方法であって、ネイティブな哺乳動物 E r b B 4 レセプターのアンタゴニストの有効量を、該患者に投与する工程を包含する、方法。

20

【請求項 5 8】

前記アンタゴニストが低分子である、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

哺乳動物患者における狭窄の処置のための薬学的組成物であって、該薬学的組成物は、薬学的に受容可能なキャリアと混合して、ネイティブな哺乳動物 E r b B 4 レセプターのアンタゴニストの有効量を含む、薬学的組成物。

【請求項 6 0】

平滑筋細胞の増殖または移動を阻害または増強する分子を同定するための方法であって、該方法は、以下：

(a) ポリペプチドを候補分子と接触させる工程であって、該ポリペプチドは、ネイティブな E r b B 4 レセプターの細胞外ドメインのアミノ酸配列と少なくとも 8 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ平滑筋細胞の過剰な増殖または移動を制御する能力を保持する、工程；および

30

(b) 該候補分子が、平滑筋細胞の過剰な増殖または移動を制御する該ポリペプチドの能力を阻害または増強するか否かを決定する工程、を包含する、方法。

【請求項 6 1】

前記ポリペプチドが、ネイティブな E r b B 4 レセプターの細胞外ドメインを含む、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記レセプターがヒトのものである、請求項 6 1 に記載の方法。

40

【請求項 6 3】

前記ポリペプチドが免疫付着因子である、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記分子が、平滑筋細胞の過剰な増殖または移動を制御する前記ポリペプチドの能力を増強する、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記分子が、抗体および低分子からなる群より選択される、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

H E R 4 . 1 0 H 1 . 1 A 1 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 8)、H E R 4 . 1 C 6

50

． A 1 1 (A T C C 登 録 番 号 P T A - 2 8 2 9) 、 H E R 4 . 3 B 9 . 2 C 9 (A T C C 登 録 番 号 P T A - 2 8 2 6) 、 H E R 4 . 1 A 6 . 5 B 3 (A T C C 登 録 番 号 P T A - 2 8 2 7) お よ び H E R 4 . 8 B 1 . 2 H 2 (A T C C 登 録 番 号 P T A - 2 8 2 5) か ら な る 群 より 選 択 さ れ る ハ イ ブ リ ド マ に よ っ て 産 生 さ れ る 抗 体 と 本 質 的 に 同 じ E r b B 4 エ ピ ト ー プ を 結 合 す る 、 抗 体 。

【請求項 67】

H E R 4 . 1 0 H 1 . 1 A 1 (A T C C 登 録 番 号 P T A - 2 8 2 8) 、 H E R 4 . 1 C 6 . A 1 1 (A T C C 登 録 番 号 P T A - 2 8 2 9) 、 H E R 4 . 3 B 9 . 2 C 9 (A T C C 登 録 番 号 P T A - 2 8 2 6) 、 H E R 4 . 1 A 6 . 5 B 3 (A T C C 登 録 番 号 P T A - 2 8 2 7) お よ び H E R 4 . 8 B 1 . 2 H 2 (A T C C 登 録 番 号 P T A - 2 8 2 5) か ら な る 群 より 選 択 さ れ る ハ イ ブ リ ド マ に よ っ て 産 生 さ れ る 抗 体 由 来 の 相 補 性 決 定 領 域 (C D R) の 残 基 を 有 す る 、 抗 体 。

【請求項 68】

H E R 4 . 1 0 H 1 . 1 A 1 (A T C C 登 録 番 号 P T A - 2 8 2 8) 、 H E R 4 . 1 C 6 . A 1 1 (A T C C 登 録 番 号 P T A - 2 8 2 9) 、 H E R 4 . 3 B 9 . 2 C 9 (A T C C 登 録 番 号 P T A - 2 8 2 6) 、 H E R 4 . 1 A 6 . 5 B 3 (A T C C 登 録 番 号 P T A - 2 8 2 7) お よ び H E R 4 . 8 B 1 . 2 H 2 (A T C C 登 録 番 号 P T A - 2 8 2 5) か ら な る 群 より 選 択 さ れ る ハ イ ブ リ ド マ に よ っ て 産 生 さ れ る 抗 体 か ら な る 群 より 選 択 さ れ る 、 抗 体 。

【請求項 69】

抗 E r b B 4 モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 4 - 1 4 4 0 、 4 - 1 4 6 0 、 4 - 1 4 7 3 、 4 - 1 4 9 2 お よ び 4 - 1 4 6 4 か ら な る 群 より 選 択 さ れ る 抗 体 に よ っ て 結 合 さ れ る E r b B 4 エ ピ ト ー プ と 本 質 的 に 同 じ E r b B 4 エ ピ ト ー プ を 結 合 す る 、 抗 体 。

【請求項 70】

抗 E r b B 4 モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 4 - 1 4 4 0 、 4 - 1 4 6 0 、 4 - 1 4 7 3 、 4 - 1 4 9 2 お よ び 4 - 1 4 6 4 か ら な る 群 より 選 択 さ れ る 抗 体 由 来 の 相 補 性 決 定 領 域 (C D R) の 残 基 を 有 す る 、 抗 体 。

【請求項 71】

高 親 和 性 で E r b B 4 と 結 合 す る 、 抗 体 。

【請求項 72】

1 0 0 n M 未 満 の K d で E r b B 4 と 結 合 す る 、 請 求 抗 7 1 に 記 載 の 抗 体 。

【請求項 73】

5 0 n M 未 満 の K d で E r b B 4 と 結 合 す る 、 請 求 抗 7 1 に 記 載 の 抗 体 。

【請求項 74】

1 0 n M 未 満 の K d で E r b B 4 と 結 合 す る 、 請 求 抗 7 1 に 記 載 の 抗 体 。

【請求項 75】

ヒ ト 化 抗 体 で あ る 、 請 求 項 7 1 に 記 載 の 抗 体 。

【請求項 76】

ヒ ト 抗 体 で あ る 、 請 求 項 7 1 に 記 載 の 抗 体 。

【請求項 77】

抗 体 フ ラ グ メ ン ト で あ る 、 請 求 項 7 1 に 記 載 の 抗 体 。

【請求項 78】

E r b B 4 お よ び E r b B 3 の 両 方 に 結 合 し 得 る 、 抗 体 。

【請求項 79】

高 親 和 性 で E r b B 4 を 結 合 す る 、 請 求 項 7 8 に 記 載 の 抗 体 。

【請求項 80】

高 親 和 性 で E r b B 4 お よ び E r b B 3 の 両 方 を 結 合 す る 請 求 項 7 8 に 記 載 の 抗 体 。

【請求項 81】

E r b B 4 に 結 合 し 、 か つ 該 E r b B 4 に 結 合 す る ヒ レ グ リ ン を 減 少 さ せ る 、 抗 体 。

【請求項 82】

10

20

30

40

50

高親和性でE r b B 4を結合する、請求項 8 1に記載の抗体。

【請求項 8 3】

E r b B 4に結合し、かつ該E r b B 4ヒレグリン誘導性チロシンリン酸化を減少させる、抗体。

【請求項 8 4】

高親和性でE r b B 4を結合する、請求項 8 3の抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の背景)

(発明の分野)

本発明は、ネイティブなE r b B 4レセプターのアンタゴニストを使用することによって、平滑筋細胞の過剰な増殖および/または移動を制御するための、詳細には、狭窄を処置するための方法および手段に関する。本発明はさらに、平滑筋細胞の増殖または移動を阻害または増強し得るE r b B 4のアゴニストおよびアンタゴニストの同定のための方法に関する。

【0002】

(関連技術の説明)

(1. E r b Bレセプターチロシンキナーゼ)

細胞増殖および細胞分化を調節するシグナルの伝達は、種々の細胞タンパク質のリン酸化によって部分的に調節される。タンパク質チロシンキナーゼは、このプロセスを触媒する酵素である。レセプタータンパク質チロシンキナーゼは、細胞内基質のリガンド刺激チロシンリン酸化を介して細胞増殖を指向すると考えられている。

【0003】

HER4/E r b 4は、E r b Bファミリーに属するレセプタータンパク質チロシンキナーゼである。増加したE r b B 4発現は、胸部の腺癌を含む、上皮起源の特定の癌腫に密接に関連する(P l o w m a nら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 90:1746-1750[1993]; P l o w m a nら、N a t u r e 366:473-475[1993])。E r b B 4発現を評価するヒト新生物状態(特に、乳癌)の検出のための診断方法が、E P特許出願番号599,274において記載される。

【0004】

レセプターチロシンキナーゼのE r b Bファミリーの他のメンバーとしては、以下が挙げられる:上皮増殖因子レセプター(E G F R)、E r b B 2(H E R 2/n e u)、およびE r b B 3(H E R 3)。e r b B 1遺伝子は、ヒト悪性腫瘍に原因として関与している170kDaの上皮増殖因子レセプター(E G F R)をコードする。詳細には、この遺伝子の増加した発現は、乳房、膀胱、肺および胃のより侵略的な癌において観察されている(M o d j t a h e d i, H.およびD e a n, C.(1994)I n t . J . O n c o l . 4:277-296)。H E R 4は、H E R 2の非存在下で、ヒト乳癌細胞株における抗増殖応答および分化応答の媒介物として作用する(S a r t o r ら、M o l . C e l l B i o l . 21:4265-75(2001))。

【0005】

n e u遺伝子(e r b B 2およびH E R 2とも呼ばれる)は、化学的に処置されたラットの神経芽細胞腫由来のトランスフォーミング遺伝子の産物として本来同定された185kDaのレセプタータンパク質チロシンキナーゼをコードする。ヒトH E R 2遺伝子の増幅および/または過剰発現は、乳癌および卵巣癌における不十分な予後と相関する(S l a m o n, D . J . ら、S c i e n c e 235:177:182(1987); S l a m o n ら、S c i e n c e 244:707-712(1989);および米国特許第4,968,603号)。H E R 2の過剰発現(頻繁であるが、遺伝子増幅に起因して均一でない)はまた、胃、子宮内膜、唾液腺、肺、腎臓、結腸、甲状腺、膵臓および膀胱の癌腫を含む、他の癌腫において観察されている。

【0006】

さらなる関連遺伝子 (e r b B 3 または H E R 3 と呼ばれる) が記載されている。米国特許第 5, 183, 884 号; K r a u s ら、P r o c . N a t . A c a d . S c i . U S A 86: 9193 - 9197 (1989); 欧州特許出願番号 444, 961 A1; および K r a u s ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 90: 2900 - 2904 (1993) を参照のこと。K r a u s ら (1989) は、顕著に上昇したレベルの e r b B 3 m R N A が特定のヒト乳腺癌細胞株に存在することを発見し、このことは、e r b B 1 および e r b B 2 と同様に、e r b B 3 が、ヒト悪性腫瘍において役割を果たし得ることを示す。彼らはまた、キメラ E G F R / E r b B 3 レセプターの E r b B 3 触媒ドメインの E G F 独立性活性化が、トランスフェクトされた N I H - 3 T 3 細胞において増殖性応答を生じることを示した。さらに、これらの研究者らは、いくつかのヒト
10
乳腺癌細胞株が、定常状態の E r b B 3 チロシンリン酸化の有意な上昇を示すことを実証し、このことは、さらに、このレセプターがヒト悪性腫瘍において役割を果たし得ることを示す。癌における e r b B 3 の役割は、他者によって探索されている。e r b B 3 は、乳癌 (L e m o i n e ら、B r . J . C a n c e r 66: 1116 - 1121 (1992))、胃腸の癌 (P o l l e r ら、J . P a t h o l . 168: 275 - 280 (1992))、R a j k u m e r ら、J . P a t h o l . 170: 271 - 278 (1993)、および S a n i d a s ら、I n t . J . C a n c e r 54: 935 - 940 (1993))、ならびに膵臓癌 (L e m o i n e ら、J . P a t h o l . 168: 269 - 273 (1992))、および F r i e s s ら、C l i n i c a l C a n c e r R e s e a r c h 1: 1413 - 1420 (1995)) において過剰発現されることが見出され
20
ている。E r b B 3 は、内因性チロシンキナーゼ活性をほとんどまたは全く有さないという点で、E r b B レセプターファミリーのなかで固有である (G u y ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 91: 8132 - 8136 (1994)) および K i m ら、J . B i o l . C h e m . 269: 24747 - 55 (1994))。

【0007】

E r b B レセプターは一般に、細胞において種々の組み合わせで見出され、そしてヘテロダイマー形成は、種々の E r b B リガンドに対する細胞応答の多様性を増加させると考えられる (E a r p ら、B r e a s t C a n c e r R e s e a r c h a n d T r e a t m e n t 35: 115 - 132 (1995))。E G F R は、以下の 6 つの異なる
30
リガンドによって結合される：上皮増殖因子 (E G F)、トランスフォーミング増殖因子 (T G F -)、アンフィレグリン (a m p h i r e g u l i n)、ヘパリン結合性上皮増殖因子 (H B - E G F)、ベータセルリン (b e t a c e l l u l i n) およびエピレグリン (e p i r e g u l i n) (G r o e n e n ら、G r o w t h F a c t o r s 11: 235 - 257 (1994))。単一の遺伝子の選択的スプライシングから生じるヒレグリンタンパク質のファミリーは、E r b B 3 および E r b B 4 についてのリガンドである。ヒレグリンファミリーは、ヒレグリン、ヒレグリンおよびヒレグリン (H o l m e s ら、S c i e n c e , 256: 1205 - 1210 (1992))；米国特許第 5, 641, 869；ならびに S c h a e f e r ら、O n c o g e n e 15: 1385 - 1394 (1997))；n e u 分化因子 (N D F)、グリア増殖因子 (G G F)；
40
アセチルコリンレセプター誘導活性 (A R I A)；ならびに感覚ニューロンおよび運動ニューロン由来因子 (S M D F) を含む。概説について、G r o e n e n ら、G r o w t h F a c t o r s 11: 235 - 257 (1994)；L e m k e , G . M o l e c . & C e l l . N e u r o s c i . 7: 247 - 262 (1996) および L e e ら、P h a r m . R e v . 47: 51 - 85 (1995) を参照のこと。近年、3 つのさらなる E r b B リガンドが同定された；E r b B 3 または E r b B 4 のいずれかに結合することが報告されている (C h a n g ら、N a t u r e 387 509 - 512 (1997)) および C a r r a w a y ら、N a t u r e 387: 512 - 516 (1997))、ニューレグリン - 2 (N R G - 2)；E r b B 4 に結合するニューレグリン - 3 (Z h a n g ら、P N A S (U S A) 94 (18): 9562 - 7 (1997))；ならびに E r b B 4 に結合するニューレグリン - 4 (H a r a r i ら、O n c o g e n e 18: 268
50

1 - 2689 (1999))。HB - EGF、 - セルリンおよびエピレグリンもまた ErbB4 に結合する。

【0008】

EGF および TGF は ErbB2 に結合しないとはいえ、EGF は、EGFR および ErbB2 を刺激してヘテロダイマーを形成し、これは、EGFR を活性化し、そしてヘテロダイマーにおける ErbB2 のトランスリン酸化をもたらす。ダイマー形成および/またはトランスリン酸化は、ErbB2 チロシンキナーゼを活性化するようである。Earp ら、前出を参照のこと。同様に、ErbB3 が ErbB2 と同時発現された場合、活性なシグナル伝達複合体が形成され、そして ErbB2 に対して指向された抗体はこの複合体を破壊し得る (Sliwkowski ら、J. Biol. Chem., 269 (20): 14661 - 14665 (1994))。さらに、ヒレグリン (HRG) に対する ErbB3 の親和性は、ErbB2 と同時に発現された場合、より高い親和性状態へと上昇する。ErbB2 - ErbB3 タンパク質複合体に関して、Levi ら、Journal of Neuroscience 15: 1329 - 1340 (1995); Morrissey ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 1431 - 1435 (1995); および Lewis ら、Cancer Res., 56: 1457 - 1465 (1996) もまた参照のこと。ErbB4 は、ErbB3 と同様に、ErbB2 と共に活性なシグナル伝達複合体を形成する (Carraway および Cantley, Cell 78: 5 - 8 (1994))。

10

【0009】

生理学的重要性に起因して、レセプターチロシンキナーゼの ErbB ファミリーのメンバーは、しばしば、治療剤の開発のための標的化される。例えば、Hudziak ら、Mol. Cell. Biol. 9 (3): 1165 - 1172 (1989) は、抗 ErbB2 抗体のパネルの生成を記載し、そのうちの1つ (4D5 と呼ばれる) は、細胞増殖を56% 阻害した。マウス抗 ErbB2 抗体4D5の組換えヒト化バージョン (huMAb4D5 - 8、rhumaB HER2 または HERCEPTIN (登録商標); 米国特許第5, 821, 337号) は、広範な先の抗癌治療を受けた ErbB2 過剰発現転移性乳癌を有する患者において、臨床的に活性である (Baselga ら、J. Clin. Oncol. 14: 737 - 744 (1996))。HERCEPTIN (登録商標) は、腫瘍が ErbB2 / HER2 タンパク質を過剰発現する転移性乳癌を有する患者の処置のために、1998年9月25日に食品医薬品局から販売許可を得た。HER2 はまた、乳癌に加えて、他の癌においても過剰発現されるので、HERCEPTIN (登録商標) は、このような他の癌の処置においても同様に、大きい可能性を有する。

20

30

【0010】

(2. 平滑筋細胞増殖)

平滑筋細胞は、血管、胃腸管、気道経路 (肺における気管および気管支)、尿路系 (膀胱および尿管) などを含む、身体における多数の中空経路の非常に重要な構造的かつ機能的な成分である。平滑筋細胞は、これらの器官の正常な機能のために非常に重要に必要とされる弾性を担う。平滑筋細胞は、例えば、これらの器官によって運搬される体液の流れを調節するために、必要な場合、収縮および拡張によって種々の生理学的刺激に応答する。平滑筋細胞は、化学的刺激 (例えば、増殖因子およびサイトカイン) だけでなく、物理的刺激 (例えば、圧力および伸展) にも応答する。平滑筋細胞の過剰な増殖は、種々の障害において「狭窄」として公知の器官の壁の肥厚および器官の管腔の狭小化を生じる。

40

【0011】

多数の増殖因子およびサイトカインが、平滑筋細胞の増殖に関与している。このような重要な分子の1つのカテゴリーは、EGF 関連リガンドである。例えば、種々のこのような器官由来の平滑筋細胞は、EGF レセプターを保有することが実証され、そしてこれらのいくつかは、HB - EGF のような EGF リガンドを合成および分泌さえし、従って、オートクラインループを設定する。種々の EGF リガンドは、強力な分裂促進因子として作用し、そして平滑筋細胞の増殖を刺激し、しばしば、壁の肥厚および最終的な狭窄を生じ

50

る。例えば、血管平滑筋細胞 (VSMC) の過剰な増殖は、血管狭窄、血管形成または手術またはステント移植から生じる再狭窄、アテローム性動脈硬化症、移植アテローム性動脈硬化症、および高血圧の病状に關与する (Casterella および Teirstein, Cardio. Rev. 7: 219 - 231 [1999]; Andres, Int. J. Mol. Med. 2: 81 - 89 [1998]; ならびに Rosanio ら、Thromb. Haemost. 82 [補遺1]: 164 - 170 [1999] において論評される)。血管の肥厚は、血流に対する抵抗を増加させ、そして最終的に高血圧を生じる。さらに、組織への減少した血液供給はまた、壊死を引き起こし、そして炎症応答を誘導し、重篤な損傷を生じる。例えば、心筋梗塞は、酸素の欠乏および心筋組織の局所的死滅の結果として生じる。

10

【0012】

乳児肥厚性幽門狭窄 (IHPS) (これは、幽門管の機能的閉塞を引き起こす) はまた、幽門平滑筋細胞の肥厚および過形成を含む (Oue および Puri, Pediatr. Res. 45: 853 - 857 [1999])。さらに、EGF、EGF レセプターおよび HB-EGF は、幽門狭窄の病因に關与している (Shima ら、Pediatr. Res. 47: 201 - 207 [2000])。

【0013】

同様に、下部尿路に影響する閉塞性症候群に應答して生じる膀胱壁肥厚は、膀胱平滑筋細胞の増殖を含む。HB-EGF の膜結合前駆形態は、膀胱平滑筋細胞において発現され、そして HB-EGF は、膀胱 SMC 増殖についての強力な分裂促進因子である (Freeman ら、J. Clin. Invest. 99: 1028 - 1036 [1997]; Kafer ら、J. Urol. 163: 580 - 584 [2000]; Borer ら、Lab Invest. 79: 1335 - 1345 [1999])。

20

【0014】

閉塞性気道疾患は、平滑筋細胞増殖に關与する潜在的な病状を伴う疾患のなお別の群である。この群の1つの例は、気道炎症および気管支収縮において明らかな喘息である。EGF は、閉塞性気道疾患における気道 SMC の病理学的増殖に關与する (Cerutis ら、Am. J. Physiol. 273: L10 - 15 [1997]; Cohen ら、Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 16: 85 - 90 [1997])。

【0015】

本発明は、平滑筋細胞の過剰な移動および/または増殖を制御するための、特に、狭窄の処置のための ErbB4 レセプターアンタゴニストの使用を開示する。

30

【0016】

(発明の要旨)

1つの局面において、本発明は、ネイティブな ErbB4 レセプターのアンタゴニストの有効量で平滑筋細胞を処理することによって、平滑筋細胞の過剰な増殖または移動を制御するための方法に關する。この制御は、平滑筋細胞の過剰な増殖または移動の予防または阻害 (完全な阻害を含む) である。1つの実施形態において、平滑筋細胞は、膀胱平滑筋細胞であり、別の実施形態において、平滑筋細胞は、気道経路の平滑筋細胞である。

【0017】

血管平滑筋細胞のような平滑筋細胞の過剰な増殖または移動は、血管狭窄および再狭窄を含む、狭窄を生じ得る。1つの実施形態において、平滑筋細胞はヒトのものである。狭窄は、内皮細胞の過剰な増殖または移動によってさらに特徴付けられ得る。

40

【0018】

1つの実施形態において、ErbB4 レセプターアンタゴニストは、免疫付着因子である。別の実施形態において、ErbB4 レセプターアンタゴニストは、抗体 (例えば、ネイティブな ErbB4 レセプターに対する中和抗体) である。

【0019】

別の局面において、本発明は、ヒトを含む、哺乳動物患者における狭窄を処置するための方法に關し、この方法は、ネイティブな哺乳動物 ErbB4 レセプターのアンタゴニスト

50

の有効量を患者に投与する工程を包含する。この処置は、狭窄の予防を含む。狭窄は、再狭窄を含む血管狭窄であり得る。アンタゴニストは、注射または注入として投与され得る。処置はまた、狭窄に関連する高血圧を低減するために使用され得る。狭窄は、再狭窄含む血管狭窄、幽門狭窄、膀胱壁の肥厚をまたは閉塞性気道疾患の一部であり得る。

【 0 0 2 0 】

1つの実施形態において、アンタゴニストは、免疫付着因子であり、これは、ネイティブなヒト E r b B 4 レセプターの細胞外領域を含み得る。別の実施形態において、アンタゴニストは抗体（例えば、ネイティブなヒト E r b B 4 レセプターに対する中和抗体）である。

【 0 0 2 1 】

さらなる局面において、本発明は、哺乳動物患者（例えば、ヒト）における狭窄を処置するための方法に関し、この方法は、E r b B 4 レセプターのアンタゴニストをコードする核酸を患者の細胞に導入する工程を包含する。この核酸は、インビボまたはエキソビボで導入され得、そしてレトロウイルスベクターのようなベクターまたは脂質ベースの送達系の補助で導入され得る。本発明の方法は、血管狭窄および再狭窄の処置（予防を含む）のために特に有用である。

【 0 0 2 2 】

アンタゴニストは、免疫付着因子であり得る。アンタゴニストはまた、抗体（例えば、ネイティブなヒト E r b B 4 レセプターに対する中和抗体）であり得る。

【 0 0 2 3 】

別の局面において、本発明は、哺乳動物患者における血管狭窄に関連する高血圧を処置するための方法に関し、この方法は、ネイティブな E r b B 4 レセプターのアンタゴニストの有効量を患者に投与する工程を包含する。このアンタゴニストは、低分子であり得る。

【 0 0 2 4 】

なおさらなる局面において、本発明は、哺乳動物患者における狭窄の処置のための薬学的組成物に関し、この組成物は、薬学的に受容可能なキャリアと混合して、ネイティブな哺乳動物 E r b B 4 レセプターのアンタゴニストの有効量を含む。

【 0 0 2 5 】

全ての局面において、好ましい E r b B 4 アンタゴニストは、免疫付着因子を含み、これは、好ましくは、免疫グロブリン定常領域配列に融合されたネイティブなヒト E r b B 4 レセプター細胞外ドメイン配列を含む。この免疫グロブリン配列は、好ましくは、I g G 1、I g G 2 または I g G 3 免疫グロブリンの重鎖定常領域の配列であり、そして免疫グロブリン重鎖定常領域を含む融合分子に共有結合された免疫グロブリン軽鎖配列をさらに含み得る。

【 0 0 2 6 】

別の好ましいクラスの E r b B 4 アンタゴニストは、ネイティブな E r b B 4 レセプターを特異的に結合する中和抗体を含む。この抗体は、好ましくは、ヒト抗体またはヒト化抗体である。1つの実施形態において、抗体は、H E R 4 . 1 0 H 1 . 1 A 1 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 8)、H E R 4 . 1 C 6 . A 1 1 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 9)、H E R 4 . 3 B 9 . 2 C 9 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 6)、H E R 4 . 1 A 6 . 5 B 3 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 7) および H E R 4 . 8 B 1 . 2 H 2 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 5) からなる群より選択されるハイブリドーマによって産生される抗体と本質的に同じエピトープを結合する。この抗体はまた、H E R 4 . 1 0 H 1 . 1 A 1 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 8)、H E R 4 . 1 C 6 . A 1 1 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 9)、H E R 4 . 3 B 9 . 2 C 9 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 6)、H E R 4 . 1 A 6 . 5 B 3 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 7) および H E R 4 . 8 B 1 . 2 H 2 (A T C C 登録番号 P T A - 2 8 2 5) からなる群より選択されるハイブリドーマによって産生される抗体由来の相補性決定領域 (C D R) の残基を有し得る。

【 0 0 2 7 】

10

20

30

40

50

平滑筋細胞は、例えば、幽門もしくは膀胱の平滑筋細胞、または気道経路の平滑筋細胞であり得る。好ましくは、平滑筋細胞は、血管平滑筋細胞である。

【0028】

なおさらなる局面において、本発明は、平滑筋細胞の増殖または移動を阻害または増強する分子を同定するための方法に関し、この方法は、以下：(a)ポリペプチドを候補分子と接触させる工程であって、該ポリペプチドは、ネイティブなErbB4レセプターの細胞外ドメインのアミノ酸配列と少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ平滑筋細胞の過剰な増殖または移動を制御する能力を保持する、工程；および(b)この候補分子が、平滑筋細胞の過剰な増殖または移動を制御するこのポリペプチドの能力を阻害または増強するか否かを決定する工程、を包含する。このポリペプチドは、ネイティブなErbB4レセプターの細胞外ドメインを含み得る。1つの実施形態において、このポリペプチドは、免疫付着因子である。特定の実施形態において、この分子は、平滑筋細胞の過剰な増殖または移動を制御するためのポリペプチドの能力を増強し、そしてこの分子は、抗体または低分子である。

10

【0029】

なおさらなる局面において、本発明は、HER4.10H1.1A1(ATCC登録番号PTA-2828)、HER4.1C6.A11(ATCC登録番号PTA-2829)、HER4.3B9.2C9(ATCC登録番号PTA-2826)、HER4.1A6.5B3(ATCC登録番号PTA-2827)およびHER4.8B1.2H2(ATCC登録番号PTA-2825)からなる群より選択されるハイブリドーマによって産生される抗体のErbB4エピトープと本質的に同じErbB4エピトープに結合する抗体に関する。上記の方法に加え、そしてその開示の全体にわたり、これらの抗体は、乳癌を含む種々の癌の処置に有用であると考えられる。

20

【0030】

なおさらなる局面において、本発明は、HER4.10H1.1A1(ATCC登録番号PTA-2828)、HER4.1C6.A11(ATCC登録番号PTA-2829)、HER4.3B9.2C9(ATCC登録番号PTA-2826)、HER4.1A6.5B3(ATCC登録番号PTA-2827)およびHER4.8B1.2H2(ATCC登録番号PTA-2825)からなる群より選択されるハイブリドーマによって産生される抗体由来の相補性決定領域(CDR)の残基を有する抗体に関する。

30

【0031】

さらなる局面において、本発明は、HER4.10H1.1A1(ATCC登録番号PTA-2828)、HER4.1C6.A11(ATCC登録番号PTA-2829)、HER4.3B9.2C9(ATCC登録番号PTA-2826)、HER4.1A6.5B3(ATCC登録番号PTA-2827)およびHER4.8B1.2H2(ATCC登録番号PTA-2825)からなる群より選択されるハイブリドーマによって産生される抗体からなる群より選択される抗体に関する。

【0032】

本発明はまた、抗ErbB4モノクローナル抗体4-1440、4-1460、4-1473、4-1492および4-1464からなる群より選択される抗体によって結合されるErbB4の本質的に同じエピトープに結合する抗体に関する。

40

【0033】

さらに、本発明は、抗ErbB4モノクローナル抗体4-1440、4-1460、4-1473、4-1492および4-1464からなる群より選択される抗体由来の相補性決定領域(CDR)の残基を有する抗体に関する。

【0034】

本発明はまた、高い親和性でErbB4に結合する抗体に関する。この抗体は、好ましくは100nM未満のKd、より好ましくは50nM未満のKd、なおより好ましくは25nM未満のKd、そして最も好ましくは10nM未満のKdでErbB4に結合する。1つの実施形態において、この抗体は、ヒト抗体であり、別の実施形態において、この抗体

50

はヒト化抗体である。なお別の実施形態において、この抗体は、抗体フラグメントである。

【0035】

本発明はさらに、E r b B 4およびE r b B 3の両方に結合し得る抗体に関する。1つの実施形態において、この抗体は、高い親和性でE r b B 4に結合し得、そして別の実施形態において、この抗体は、高い親和性でE r b B 4およびE r b B 4の両方に結合する。

【0036】

別の局面において、本発明は、E r b B 4に結合し、かつE r b B 4に対するヒレグリン結合を減少させる抗体に関する。この抗体は、高い親和性でE r b B 4に結合し得る。

10

【0037】

最後に、本発明は、E r b B 4に結合し、かつE r b B 4のヒレグリン誘導チロシンリン酸化を減少させる抗体に関する。この抗体はまた、高い親和性でE r b B 4に結合し得る。

【0038】

(好ましい実施形態の詳細な説明)

(A. 定義)

他に規定されない限り、本明細書中に使用される技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって一般的に理解される意味と同じ意味を有する。例えば、S i n g l e t o n ら、D i c t i o n a r y o f M i c r o b i o l o g y a n d M o l e c u l a r B i o l o g y、第2版、J . W i l e y & S o n s (N e w Y o r k , N . Y . 1 9 9 4) ; S a m b r o o k ら、M o l e c u l a r C l o n i n g , A L a b o r a t o r y M a n u a l , C o l d S p r i n g s H a r b o r P r e s s (C o l d S p r i n g s H a r b o r , N . Y . 1 9 8 9) を参照のこと。本発明の目的のために、以下の用語が以下に規定される。

20

【0039】

他に示されない限り、本明細書中に使用される場合、用語「E r b B」は、哺乳動物E r b B レセプター(すなわち、E r b B 1 レセプターまたは表皮増殖因子(E G F)レセプター; E r b B 2 レセプターまたはH E R 2 レセプター; E r b B 3 レセプターまたはH E R 3 レセプター; E r b B 4 レセプターまたはH E R 4 レセプター; ならびに、将来同定されるであろうこのI型チロシンキナーゼファミリーの任意の他のメンバー)のうちの任意の1つ以上をいい、そして「e r b B」は、これらのレセプターをコードする哺乳動物e r b B 遺伝子をいう。

30

【0040】

用語「E r b B 4」および「H E R 4」は、交換可能に使用され、そして、例えば、欧州特許出願(E P)第599,274号; P l o w m a n ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 9 0 : 1 7 4 6 - 1 7 5 0 (1 9 9 3) ; およびP l o w m a n ら、N a t u r e , 3 6 6 : 4 7 3 - 4 7 5 (1 9 9 3) に開示されるネイティブ配列のE r b B 4 レセプターポリペプチド、ならびにそのアミノ酸配列改変体を含む機能的誘導体をいう。

40

【0041】

「ネイティブ」または「ネイティブ配列」のE r b B 4 レセプターまたはH E R 4 レセプターは、任意の哺乳動物(ヒトを含む)種における天然に存在するE r b B 4 レセプターのアミノ酸配列を有する(その調製様式に関わらない)。従って、ネイティブまたはネイティブ配列のE r b B 4 レセプターは、天然から単離され得るか、組換えDNA技術の技術によって産生され得るか、化学合成され得るか、またはこれらの方法もしくは類似の方法の任意の組合わせによって産生され得る。ネイティブのE r b B 4 レセプターとしては、詳細には、当該分野において公知であるかまたは本明細書中の以後に認められる、E r b B 4 の天然に存在する対立遺伝子改変体、アイソフォーム、またはスプライス改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドが挙げられる。ネイティブ配列のE r b B 4 レセプタ

50

ーは、例えば、EP 599, 274 (前出) および2件のPlowmanらによる論文 (前出) に開示される。Eleniusら、J. Biol. Chem. 272: 26761-26768 (1997) は、マウス組織およびヒト組織の両方におけるErbb4の2つの選択的スプライシングされたアイソフォーム (これらは、細胞外膜近接 (juxtamembrane) (JM) 領域中の選択的な23 (HER4 JM-a) アミノ酸または13 (HER4 JM-b) アミノ酸のいずれかの挿入が異なる) の同定を報告する。Eleniusら、Oncogene 18: 2607-2615 (1999) は、細胞質ドメイン配列の欠失が、PI3-K細胞内シグナル伝達経路の活性化に必要とされる、Erbb4の別の天然に存在するアイソフォーム (Erbb4 CYT-2として示される) の同定および特徴づけを報告する。HER4アイソフォームはまた、WO 99/19488に開示される。Erbb4をコードするヌクレオチド配列 (配列番号1) は、図1に示され、そして対応する推定アミノ酸配列 (配列番号2) が、図2に示される。

10

【0042】

用語「Erbb4細胞外ドメイン」または「Erbb4 ECD」は、シグナル配列と最初の推定膜貫通領域との間に位置するアミノ酸を含むErbb4の可溶性フラグメントをいう。1つの実施形態において、この「Erbb4 ECD」は、図2に示されるヒトErbb4配列 (配列番号2) のアミノ酸26~640 (配列番号4) を含むポリペプチドである。

【0043】

用語「哺乳動物」は、ヒト、家庭用動物および家畜用動物、ならびに動物園の動物、競技用動物、または愛玩動物 (例えば、ヒツジ、イヌ、ウマ、ネコ、ウシなど) を含むがこれらに限定されない哺乳動物として分類される任意の動物をいうために本明細書中に使用される。好ましくは、本明細書中において哺乳動物はヒトである。

20

【0044】

「機能的誘導体」は、対応するネイティブポリペプチドの定性的な生物学的活性を保持する限り、そのネイティブポリペプチドのアミノ酸配列改変体および共有結合誘導体を含む。アミノ酸配列改変体は、一般的に、ネイティブアミノ酸配列内のいずれかにおける1つ以上のアミノ酸の置換、欠失および/または挿入がネイティブ配列と異なる。欠失改変体としては、ネイティブポリペプチドのフラグメント、ならびにN末端短縮および/またはC末端短縮を有する改変体が挙げられる。通常、アミノ酸配列改変体は、ネイティブポリペプチドと少なくとも約70%の相同性、好ましくは少なくとも約80%の相同性、より好ましくは少なくとも約90%の相同性を保有する。

30

【0045】

「相同性」は、最大の相同性パーセントを達成するように配列を整列させ、そして必要である場合、ギャップを導入した後に、アミノ酸配列改変体中の同一である残基のパーセンテージとして規定される。整列のための方法およびコンピュータプログラムは、当該分野で周知である。1つのこのようなコンピュータプログラムは、Genentech, Inc. により作製された「Align 2」である (これは、United States Copyright Office, Washington, DC 20559に1991年12月10日にユーザードキュメンテーションと共に提出された)。

40

【0046】

Erbb「アンタゴニスト」は、Erbbエフェクター機能を妨害または干渉する分子であり、例えば、リガンドによるネイティブ配列のErbbレセプターの結合および/もしくは活性化、ならびに/またはネイティブ配列のErbbレセプターによって使用される下流の経路を妨害または干渉する分子である。このような分子は、例えば、チロシンリン酸化アッセイにおいてリガンドによるErbbレセプター活性化を競合的に阻害するそれらの分子の能力に基づいて、スクリーニングされ得る。同様に、ネイティブ配列のErbb4 (HER4) レセプターのアンタゴニストは、Erbb4エフェクター機能を妨害または干渉する分子であり、例えば、リガンドによるネイティブ配列のErbb4レセプターの結合および/もしくは活性化、ならびに/またはErbb4レセプターによって使用

50

される下流の経路を妨害または干渉する分子である。このような分子は、例えば、チロシンリン酸化アッセイにおいてリガンドによる E r b B 4 レセプター活性化を競合的に阻害するそれらの分子の能力に基づいて、スクリーニングされ得る。E r b B 4 アンタゴニストの例としては、可溶性 E r b B 4 レセプター（例えば、ネイティブ配列の E r b B 4 レセプターの細胞外ドメイン（E C D）および改変体 E r b B 4 レセプターの細胞外ドメイン（E C D））、ネイティブ配列の E r b B 4 レセプターに対する中和抗体、ネイティブ配列の E r b B 4 レセプターのリガンドに対する中和抗体（例えば、抗 H B - E G F 抗体）、E r b B 4 - I g 免疫付着因子（キメラヘテロ付着因子を含む）および低分子が挙げられるが、これらに限定されない。

【0047】

10

「E r b B 4 リガンド」は、E r b B 4 レセプターに結合し、そして／または E r b B 4 レセプターを活性化するポリペプチドを意味する。E r b B 4 リガンドとしては、セルリン、エピレグリン（e p i r e g u l i n）、H B - E G F、N R G - 2、N R G - 3 およびヒレグリンが挙げられる。

【0048】

本発明の方法において、用語「制御」およびその文法上の変形は、所望されない事象（例えば、平滑筋細胞および／または他の細胞型（例えば、内皮細胞）の過剰な増殖および／または移動のような生理学的状態）の予防、部分的阻害もしくは完全な阻害、減少、遅延または減速をいうために使用される。

【0049】

20

用語「過剰な増殖および／または移動」は、処置されない場合に、所望されない生理学的状態または疾患（例えば、狭窄（血管狭窄、再狭窄、および幽門狭窄を含む）；膀胱壁肥厚、および閉塞性気道疾患など）の発生を生じるか、またはおそらくこれらを生じる、正常レベルを超えた増殖および／または移動を意味する。

【0050】

「処置」は、治療的な処置および予防（p r o p h y l a c t i c）手段または予防（p r e v e n t a t i v e）手段の両方をいう。処置が必要なものとしては、その障害を既に有するもの、ならびにその障害を有する傾向があるもの、またはその障害が予防されるべきもの挙げられる。本発明の目的に関して、有益な臨床結果または所望される臨床結果としては、検出可能であるか検出不可能であるかに関わらず、症状の緩和、疾患の程度の減少、安定した（すなわち、悪化しない）疾患状態、疾患の進行の遅延または減速、疾患状態の改善または緩和、ならびに寛解（部分的であるか、全体的であるかに関わらず）が挙げられるが、これらに限定されない。「処置」はまた、処置を受けなかった場合に予想される生存と比較して、生存を延長させることを意味し得る。処置が必要なものとしては、その状態または障害を既に有するもの、ならびにその状態または障害を有する傾向があるもの、またはその状態または障害が予防されるべきもの挙げられる。

30

【0051】

用語「単離された」分子は、同定され、かつその分子の天然の供給源中でその分子が通常会合している少なくとも1つの夾雑分子と分離されている分子として、広範に規定される。好ましくは、単離された分子は、天然ではその分子が会合しているすべての成分と会合していない。

40

【0052】

本明細書中に使用される場合、用語「免疫付着因子（i m m u n o a d h e s i n）」は、タンパク質の結合ドメインを組合わせた抗体様分子（例えば、免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能を有する細胞表面レセプターの細胞外ドメイン（付着因子部分））をいう。用語「免疫付着因子」は、詳細には、ネイティブの E r b B 4 レセプター配列または改変体の E r b B 4 レセプター配列を含む。E r b B 4 - I g G 免疫付着因子の核酸配列を、図3に示す（配列番号3）。免疫付着因子は、ヒト抗体の多数の価値のある化学的特性および生物学的特性を保有し得る。免疫付着因子は、適切なヒト免疫グロブリンのヒンジおよび定常ドメイン（F c）配列に連結された、所望の特異性を有するヒトタン

50

バク質配列から構築され得るので、目的の結合特異性は、完全にヒトの成分を用いて達成され得る。このような免疫付着因子は、患者に対して最小限に免疫原性であり、そして慢性的な使用または反復した使用に対して安全である。用語「単離された免疫付着因子」は、供給源から精製されるかまたは組換え方法もしくは合成方法によって調製され、かつ他のペプチドもしくはタンパク質を十分に含まない免疫付着因子をいう。

【0053】

文献に報告されている免疫付着因子としては、以下が挙げられる：T細胞レセプターの融合物（Gascogneら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84：2936-2940（1987））；CD4（Caponら、Nature 337：525-531（1989））；Traunekerら、Nature 339：68-70（1989）；Zettmeisslら、DNA Cell Biol. USA 9：347-353（1990）；およびByrnら、Nature 344：667-670（1990）；L-セレクチンもしくはホーミングレセプター（Watsonら、J. Cell. Biol. 110：2221-2229（1990））；およびWatsonら、Nature 349：164-167（1991））；CD44（Aruffoら、Cell 61：1303-1313（1990））；CD28およびB7（Linsleyら、J. Exp. Med. 173：721-730（1991））；CTLA-4（Lisleyら、J. Exp. Med. 174：561-569（1991））；CD22（Stamenkovicら、Cell 66：1133-1144（1991））；TNFレセプター（Ashkenaziら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88：10535-10539（1991））；Lesslauerら、Eur. J. Immunol. 27：2883-2886（1991））；ならびにPeppelら、J. Exp. Med. 174：1483-1489（1991））；NPレセプター（Bennettら、J. Biol. Chem. 266：23060-23067（1991））；インターフェロンレセプター（Kurschnerら、J. Biol. Chem. 267：9354-9360（1992））；4-1BB（Chalupnyら、PNAS USA 89：10360-10364（1992））；ならびにIgEレセプター（RidgwayおよびGorman、J. Cell. Biol. 115、Abstr. No. 1448（1991））。

【0054】

治療的使用のために記載されたホモマルチマー免疫付着因子の例としては、細胞表面CD40へのHIVの結合をブロックするためのCD4-IgG免疫付着因子が挙げられる。第1相臨床試験（ここで、CD4-IgGが妊娠女性に分娩の直前に投与された）得られたデータは、この免疫グロブリンが、HIVの母親-胎児転移の予防に有用であり得ることを示唆する（Ashkenaziら、Intern. Rev. Immunol. 10：219-227（1993））。腫瘍壊死因子（TNF）に結合する免疫付着因子もまた、開発された。TNFは、敗血症性ショックの主要な媒介因子であることが示された炎症誘発性サイトカインである。敗血症性ショックのマウスモデルに基づいて、TNFレセプター免疫付着因子は、敗血症性ショックを処置する際の臨床的使用のための候補として、見込みを示している（Ashkenazi, A.ら（1991）PNAS USA 88：10535-10539）。ENBREX（登録商標）（エタナーセプト（etanercept）、IgG Fc領域に融合したTNFレセプター配列を含む免疫付着因子）は、慢性関節リウマチの処置に対して、1998年11月2日に米国食品医薬品局（FDA）によって承認されている。慢性関節リウマチの処置におけるENBREX（登録商標）の拡大された新規の用途は、近年、2000年6月6日にFDAによって承認された。TNFブロッカー（ENBREX（登録商標）を含む）に関する最近の情報は、Love11ら、N. Engl. J. Med. 342：763-769（2000）、および付随の論説（p810-811）；ならびにWeinblattら、N. Engl. J. Med. 340：253-259（1999）；MainiおよびTaylorの総説、Ann. Rev. Med. 51：207-229（2000）を参照のこと。免疫付着因子

はまた、非治療的用途を有する。例えば、L - セレクチンレセプター免疫付着因子は、末梢リンパ節の高内皮性小静脈 (H E V) の組織学的染色のための試薬として使用された。この試薬はまた、L - セレクチンリガンドを単離および特徴付けるために使用された (A s h k e n a z i ら、前出)。

【0055】

免疫付着因子構造の2つのアームが異なる特異性を有する場合、その免疫付着因子は、二重特異的抗体に対する類似により「二重特異的免疫付着因子」と称される。D i e t s c h ら、J . I m m u n o l . M e t h o d s 162:123 (1993) は、接着分子であるE - セレクチンおよびP - セレクチンの細胞外ドメインを含むこのような二重特異的免疫付着因子を記載し、この各セレクチンは、天然では異なる細胞型において発現される。結合研究によって、このように形成された二重特異的免疫グロブリン融合タンパク質が、その二重特異的免疫グロブリン融合タンパク質が誘導された一重特異的免疫付着因子と比較して、骨髓性細胞株に対する増強された結合能力を有することが示された。

10

【0056】

用語「ヘテロ付着因子」は、表現「キメラヘテロマルチマー付着因子」と交換可能に使用され、そしてこの用語は各キメラ分子が生物学的に活性な部分 (例えば、ヘテロマルチマー化レセプターモノマーの各々の細胞外ドメイン) をマルチマー化ドメインと結合しているキメラ分子 (アミノ酸配列) の複合体をいう。「マルチマー化ドメイン」は、ヘテロマルチマー複合体内のキメラ分子の安定な相互作用を促進する。このマルチマー化ドメインは、免疫グロブリン配列、ロイシンジッパー、疎水性領域、親水性領域、またはキメラヘテロマルチマーのキメラ分子間の分子間ジスルフィド結合を形成する遊離のチオールを介して、相互作用し得る。このマルチマー化ドメインは、免疫グロブリン定常領域を含み得る。さらに、マルチマー化領域は、立体相互作用が安定な相互作用を促進するのみでなく、モノマー混合物由来のホモダイマーよりもヘテロダイマーの形成をさらに促進するようにも操作され得る。「突起」は、第1のポリペプチドの界面からの小さいアミノ酸側鎖をより大きな側鎖 (例えば、チロシンまたはトリプトファン) で置換することによって構築される。この突出に対して同一の大きさまたは同様の大きさである補償的な「空洞」が、必要に応じて、大きいアミノ酸側鎖をより小さいアミノ酸側鎖 (例えば、アラニンまたはスレオニン) と置換することによって、第2のポリペプチドの界面上に作製される。免疫グロブリン配列は、好ましくは、免疫グロブリン定常ドメインであるが、必ずしもそうである必要はない。本発明のキメラ中の免疫グロブリン部分は、I g G₁、I g G₂、I g G₃ または I g G₄ のサブタイプ、I g A、I g E、I g D または I g M から獲得され得るが、好ましくは I g G₁ または I g G₃ から獲得され得る。

20

30

【0057】

本明細書中に使用される場合、用語「エピトープタグ化」は、「タグポリペプチド」に融合されたキメラ付着因子全体を含むキメラポリペプチド、またはそのフラグメントをいう。タグポリペプチドは、抗体が作製され得るエピトープを提供するのに十分な残基を有するが、なおもキメラヘテロ付着因子の活性を妨害しないのに十分な長さである。タグポリペプチドは、好ましくは、そのタグポリペプチドに対する抗体が他のエピトープと実質的に交差反応しないように十分に特徴的である。適切なタグポリペプチドは、一般的に、少なくとも6アミノ酸残基を有し、通常約8個~50個の間のアミノ酸残基 (好ましくは約9個~30個の間の残基) を有する。本発明の実施形態は、エピトープタグに連結されるキメラヘテロ付着因子を含み、このタグは、サンプル中のその付着因子を検出するためか、またはサンプルからその付着因子を回収するために使用される。

40

【0058】

「単離された / 高度に精製された / 実質的に均質の免疫付着因子」、「単離された / 高度に精製された / 実質的に均質のヘテロ付着因子」、および「単離された / 高度に精製された / 実質的に均質のキメラヘテロマルチマー付着因子」は、交換可能に使用され、そしてこの用語は、供給源から精製されるかまたは組換え方法もしくは合成方法によって調製された付着因子であって、かつ、クロマトグラフィー技術または他の精製技術 (例えば、ク

50

マシーブルー染色または好ましくは銀染色を用いた非還元条件または還元条件下でのSDS-PAGE)による均質性の程度まで、他のペプチドまたはタンパク質を実質的に含まない付着因子を意味する。本明細書中において均質性は、約5%未満の他の供給源タンパク質の夾雑を意味する。本発明のErbbB2/4-IgGキメラヘテロ付着因子は、は、ホモダイマーと比較して十分に高い親和性で結合するので、ホモダイマーおよびヘテロダイマーの混合物の使用もまた、本発明の有用な実施形態と考えられる。用語「キメラヘテロマルチマー付着因子」、「キメラヘテロ付着因子」および「CHA」は、本明細書中において交換可能に使用される。

【0059】

用語「抗体」は、最も広い意味で使用され、そして詳細には、ネイティブなErbbB4レセプターを認識する抗体に及ぶ。「高い親和性」の結合を示す抗体は、約100nM未満のKd、好ましくは約50未満、より好ましくは約25未満、最も好ましくは約10未満のKdを有する。

10

【0060】

本明細書中に使用される場合、用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均質な抗体集団から得られる抗体をいい、すなわち、その集団を含む個々の抗体が、少量で存在し得る可能性のある天然に存在する変異体以外は、同一である。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原性部位に対して指向されている。さらに、異なる決定基(エピトープ)に対して指向される異なる抗体を代表的に含む通常の(ポリクローナル)抗体調製物と比較して、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一決定基に対して指向される。

20

【0061】

本明細書中においてモノクローナル抗体は、起源の種または免疫グロブリンのクラスもしくはサブクラスの指定ならびに抗体フラグメント(例えば、Fab、F(ab)₂、およびFv)に関わらず(これらが所望の生物学的活性を示す限り)、抗キメラヘテロ付着因子抗体の可変ドメイン(超可変ドメインを含む)を定常ドメインと連結することによって(例えば、「ヒト化」抗体)、または軽鎖を重鎖と連結することによって、またはある種由来の鎖を別の種由来の鎖と連結することによって、または融合物を異種タンパク質と連結することによって産生される、ハイブリッド抗体および組換え抗体を含む(例えば、米国特許第4,816,567号およびMageおよびLamoyi、Monoclonal Antibody Production Techniques and App 30
lications、79-97頁(Marcel Dekker, Inc.)、New York(1987)を参照のこと)。

30

【0062】

従って、修飾成句「モノクローナル」は、実質的に均質の抗体集団から得られるような抗体の特徴を示し、そして修飾成句「モノクローナル」は、いなかの特定の方法による抗体の産生を必要するものとしても解釈されるべきではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、KohlerおよびMilstein、Nature 256:495(1975)によって最初に記載されたハイブリドーマ方法によって作製され得るか、または組換えDNA方法(米国特許第4,816,567号)によって作製され得る。「モノクローナル抗体」はまた、例えば、McCaffertyら、Nature 348:552-554(1990)に記載される技術を使用して作製されるファージライブラリーから単離され得る。

40

【0063】

非ヒト(例えば、マウス)抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリン由来の最小の配列を含む、特定のキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそのフラグメント(例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab)₂または抗体の他の抗原結合部分配列)である。たいてい、ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)であり、そのヒト免疫グロブリンにおいて、レシピエント抗体の相補性決定領域(CDR)由来の残基が、所望の特異性、親和性および能力を有する非ヒト種(ドナー抗体(例えば、マウス、ラット、またはウサギ))のCDR由来の残基によって置換されている。いくつかの例に 50

において、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域(FR)の残基は、対応する非ヒトFR残基によって置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたCDR配列もしくはFR配列のいずれにも見出されない残基を含み得る。これらの改変は、抗体の性能を高め、そして最適化されるようになされる。一般的に、ヒト化抗体は、少なくとも1つの可変ドメイン、代表的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含み、ここで、CDRの全領域またはCDRの実質的に全体の領域は、非ヒト免疫グロブリンのCDR領域に対応し、そしてFRの全残基またはFRの実質的に全体の残基は、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列の残基である。ヒト化抗体はまた、最適には、免疫グロブリン定常領域(Fc)(代表的には、ヒト免疫グロブリンの免疫グロブリン定常領域(Fc))の少なくとも一部を含む。

10

【0064】

「筋細胞」は、骨格筋組織の細胞、心筋組織の細胞、平滑筋組織の細胞を含む。この用語は、より分化された筋細胞(例えば、筋芽細胞)を形成するように分化する細胞を含む。血管平滑筋細胞は、血管の中間の弾性膜(中膜)に存在する平滑筋細胞をいう。

【0065】

用語「狭窄」は、身体中の中空の通路(例えば、管路または管)が狭くなることまたは狭窄をいう。用語「血管狭窄」は、血管の閉塞または血管が狭くなることをいう。血管狭窄は、しばしば、脂肪の沈着(アテローム性動脈硬化症の場合)または血管平滑筋細胞および内皮細胞の過剰な移動および増殖から生じる。動脈は、特に狭窄を受け易い。本明細書中に使用される場合、用語「狭窄」は、詳細には、最初の狭窄および再狭窄を含む。

20

【0066】

用語「再狭窄」は、明らかに成功した最初の狭窄の処置後の、狭窄の再発をいう。例えば、血管狭窄の状況における「再狭窄」は、例えば、バルーン血管形成術による脂肪沈着の除去によって明らかな成功を伴って処置された後の、血管狭窄の再発をいう。再狭窄の寄与因子のうちの1つは、内膜過形成である。「新内膜(neointimal)過形成」および「新最内膜(neointima)形成」と交換可能に使用される用語「内膜過形成」は、血管平滑筋および内皮細胞の過剰な増殖および移動の結果としての、血管の最も内部の層(最内膜)の肥厚化をいう。再狭窄の間に生じる多数の変化は、しばしば、総称して「血管壁リモデリング」と称される。

【0067】

用語「バルーン血管形成術」および「経皮的経管的冠状動脈形成術(PTCA)」は、しばしば交換可能に使用され、そしてこの用語は、冠状動脈からのプラーク除去のための非外科的なカテーテルに基づく処置をいう。狭窄または再狭窄は、しばしば、血流に対する増大した抵抗の結果として、高血圧を導く。

30

【0068】

用語「幽門狭窄」は、幽門(十二指腸へと開く胃の最も下の端にある通路)が狭まることをいう。

【0069】

用語「高血圧」は、異常に高い血圧、すなわち、正常範囲の上限値を超えた血圧をいう。

【0070】

「中和抗体」は、Erbbレセプターのエフェクター機能をブロックし得るかまたはこの機能を有意に減少させ得る、本明細書中に規定されるような抗体分子を意味する。従って、「中和」抗Erbb4抗体は、Erbb4のエフェクター機能(例えば、リガンド結合および/または細胞応答の誘発)をブロックし得るかまたはこれらの機能を有意に減少させ得る。本発明の目的に関して、Erbb4に対するErbb4リガンド(ヒレグリン、HRG)の結合を中和する抗Erbb4抗体の能力は、例えば、候補抗Erbb4抗体の存在下および非存在下において、検出可能に標識されたHRGが、精製されたErbb4またはErbb4を発現する細胞株もしくはErbb4を発現するように改変された細胞株に対して結合することを測定することによって、モニターされ得る。このようなアッセイは、以下の実施例4に記載される。本発明のために、Erbb4による細胞応答の誘発

40

50

を中和する抗 E r b B 4 抗体の能力は、好ましくは、ヒレグリン (H R G) による E r b B 4 のチロシンリン酸化の阻害をモニタリングすることによってか、または細胞増殖アッセイにおいて、試験される。代表的なアッセイは、以下の実施例 4 に開示される。「有意」な減少は、標的抗原 (例えば、E r b B 4) のエフェクター機能 (例えば、リガンド (例えば、H R G) 結合および/または細胞応答の誘発) の、少なくとも約 60% の減少、または少なくとも約 70% の減少、好ましくは少なくとも約 75% の減少、より好ましくは少なくとも約 80% の減少、なおより好ましくは少なくとも約 85% の減少、さらにより好ましくは少なくとも約 90% の減少、さらにより好ましくは少なくとも約 95% の減少、最も好ましくは少なくとも約 99% の減少を意味する。好ましくは、本明細書中に規定される「中和」抗体は、実施例 4 に記載のアッセイによって決定した場合に、H R G による E r b B 4 のチロシンリン酸化の、少なくとも約 60%、または少なくとも約 70%、好ましくは少なくとも約 75%、より好ましくは少なくとも約 80% ; なおより好ましくは少なくとも約 85%、さらにより好ましくは少なくとも約 90%、さらにより好ましくは少なくとも約 95%、最も好ましくは少なくとも約 99% を中和し得る。

10

【0071】

「単離された」抗体は、同定され、かつその天然の環境の成分から分離および/または回収された抗体である。その天然の環境の夾雑成分は、その抗体についての診断的用途または治療的用途を妨害する物質であり、そしてこれらとしては、酵素、ホルモン、および他のタンパク質様または非タンパク質様の溶質が挙げられ得る。好ましい実施形態において、抗体は、(1) Lowry 法によって決定した場合に、95 重量%を超える抗体にまで、そして最も好ましくは、99 重量%を超えるまでに精製されるか、(2) スピニングカップ (spinning cup) 配列決定装置の使用により、少なくとも 15 残基の N 末端アミノ酸配列または内部アミノ酸配列を得るに十分な程度に精製されるか、または(3) クマシーブルー染色または好ましくは銀染色を使用する、還元条件下または非還元条件下での SDS - PAGE によって均質なまでに精製される。単離された抗体は、組換え細胞内のインサイチュでのその抗体を含む。なぜなら、その抗体の天然環境の少なくとも 1 つの成分が存在していないからである。しかし、通常には、単離された抗体は、少なくとも 1 回の精製工程によって調製される。

20

【0072】

用語「エピトープ」は、タンパク質抗原上の (モノクローナルまたはポリクローナル) 抗体に対する結合部位をいうために使用される。

30

【0073】

特定のエピトープに対して結合する抗体は、「エピトープマッピング」によって同定され得る。タンパク質上のエピトープの位置をマッピングおよび特徴付けるための当該分野で公知の多数の方法が存在し、これらとしては、例えば、Harlow および Lane、Using Antibodies、a Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor, New York, 1999 の第 11 章に記載されるような、抗体 - 抗原複合体の結晶構造の解明、競合アッセイ、遺伝子フラグメント発現アッセイ、および合成ペプチドに基づくアッセイが挙げられる。競合アッセイは、以下に議論される。遺伝子フラグメント発現アッセイに従って、タンパク質をコードするオープンリーディングフレームが、無作為にかまたは特定の遺伝子構築物のいずれかによって断片化され、そしてその発現されたタンパク質フラグメントと試験されるべき抗体との反応性が決定される。例えば、遺伝子フラグメントは、PCR によって生成され得、次いで、放射性アミノ酸の存在下でインビトロで転写され得、そしてタンパク質に翻訳され得る。次いで、放射性標識タンパク質フラグメントに対する抗体の結合が、免疫沈降およびゲル電気泳動によって決定される。特定のエピトープがまた、ファージ粒子の表面上に提示されたランダムペプチド配列の大きなライブラリー (ファージライブラリー) を使用することによって同定され得る。あるいは、重複するペプチドフラグメントの規定されたライブラリーが、簡単な結合アッセイにおいて試験抗体に対する結合について試験され得る。後者の手法は、

40

50

約 5 ～ 15 アミノ酸の線状エピトープを規定するのに適している。

【0074】

抗体は、その抗体と参照抗体の 2 つが同一のエピトープまたは立体的に重複するエピトープを認識する場合、参照抗体と「本質的に同じエピトープ」に結合する。2 つの抗体が同一のエピトープまたは立体的に重複するエピトープに結合するか否かを決定するための、最も広範囲で使用され、かつ迅速な方法は、競合アッセイであり、この競合アッセイは、標識抗原または標識抗体のいずれかを用いて、全ての数の異なる形式で形成され得る。通常、抗原は、96 ウェルプレート上に固定化され、そして標識抗体の結合をブロックする非標識抗体の能力が、放射性標識または酵素標識を用いて測定される。

【0075】

成句「Er b B 4 (HER4) レセプターを阻害する」とは、例えば、Er b B 4 レセプターに対するリガンドの結合をブロックすることによって、Er b B 4 レセプターの活性化を阻害または妨害する Er b B 4 アンタゴニストの能力をいう。Er b B 4 レセプターの「活性化」は、チロシンリン酸化アッセイを用いて定量され得るレセプターのリン酸化、および結合リガンドによるシグナル伝達の誘導を構成する下流の事象をいう。「阻害」は、これらのアッセイのうちのいずれかが、少なくとも約 60 %、または少なくとも約 70 %、好ましくは少なくとも約 75 %、より好ましくは少なくとも約 80 %；なおより好ましくは少なくとも約 85 %、さらにより好ましくは少なくとも約 90 %、さらにより好ましくは少なくとも約 95 %、最も好ましくは少なくとも約 99 %であることをいう。

【0076】

表現「細胞の生存を低減させる」は、インビトロまたはインビボのいずれかでの、Er b B 4 アンタゴニストに対して曝露されていない未処理細胞と比較して、細胞の存在期間を低減させる作用をいう。表現「減少された細胞増殖」は、未処理細胞と比較して、インビトロまたはインビボにいずれかで Er b B 4 アンタゴニストに対して曝露された集団中の細胞数の減少をいう。

【0077】

Er b B 4 アンタゴニストに関連して使用される場合、「生物学的活性」は、関連するインビトロアッセイまたはインビボアッセイ（本明細書中の以下の実施例に記載される PDGF 刺激された平滑筋細胞の増殖およびヒト大動脈平滑筋細胞移動アッセイ、動物モデルおよびヒト臨床試験を含む）において決定された場合に、基にある機構に関係なく、平滑筋細胞の過剰な増殖または移動を制御する Er b B 4 アンタゴニストの能力をいう。従って、Er b B 4 アンタゴニストの生物学的活性としては、リガンド結合のインヒビターとしてか、もしくはネイティブ Er b B 4 レセプターの活性化のインヒビターとして機能すること、あるいは / またはその表面上に Er b B 4 レセプターを発現する平滑筋細胞の増殖および / もしくは移動の阻害が挙げられるが、これらに限定されない。

【0078】

用語「疾患状態」は、細胞の機能系もしくは身体の機能系または器官の妨害、停止、または障害が生じている、細胞または哺乳動物全体の生理学的状態をいう。

【0079】

用語「有効量」は、哺乳動物において疾患、障害または所望されない生理学的状態を処置（予防を含む）するのに有効な薬物の量をいう。本発明において、「有効量」の Er b B 4 アンタゴニストは、平滑筋細胞の増殖を低下、減速または遅延させ得；平滑筋細胞の移動を低下、減速または遅延させ得；狭窄または再狭窄の発生を予防または阻害（すなわち、いくらか遅延させ、そして好ましくは停止させる）し得；そして / あるいは、狭窄または再狭窄と関連する症状の 1 つ以上をいくらか緩和し、特に、狭窄または再狭窄と関連する上昇した血圧の発生を予防または阻害（すなわち、いくらか減速させ、そして好ましくは停止させる）し得る。

【0080】

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係に配置される場合、「作動可能に連結している」。例えば、ブレ配列または分泌リーダーについての DNA は、この DNA がポリペプチドの

10

20

30

40

50

分泌に関与するプレタンパク質として発現される場合、そのポリペプチドのDNAに作動可能に連結されており；プロモーターまたはエンハンサーは、コード配列の転写に影響を与える場合、そのコード配列に作動可能に連結されており；あるいは、リボソーム結合部位は、このリボソーム結合部位が翻訳を促進するように配置される場合、コード配列に作動可能に連結されている。一般的に、「作動可能に連結された」とは、連続して連結されたDNA配列を意味し、そして分泌リーダの場合は、連続しかつ読み取りの相で連結されたDNA配列を意味する。しかし、エンハンサーは、連続的である必要はない。連結は、簡便な制限部位での連結によって達成される。このような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドのアダプターまたはリンカーが、従来の実施に従って使用される。

【0081】

「薬学的に受容可能な」キャリア、賦形剤、または安定剤は、使用される投与量および濃度ではそれらに曝露された細胞または哺乳動物に対して非毒性である。しばしば、この薬学的に受容可能なキャリアは、水性pH緩衝溶液である。生理学的に受容可能なキャリアの例としては、以下が挙げられる：リン酸塩、クエン酸塩、および他の有機酸のような、緩衝液；アスコルビン酸を含む、抗酸化剤；低分子量（およそ10残基未満）のポリペプチド；タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン）；親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）；アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、またはリジン）；モノサッカライド、ジサッカライド、および他の糖質（グルコース、マンノース、またはデキストリンを含む）；キレート化剤（例えば、EDTA）；糖アルコール（例えば、マンニトール、またはソルビトール）；塩を形成する対イオン（例えば、ナトリウム）；および/あるいは非イオン性の界面活性剤（例えば、Tween、ポリエチレングリコール（PEG）およびPluronic）。

【0082】

（B．本発明を実行するための方法）

本発明は、ネイティブErbb4レセプターのアンタゴニストによる狭窄症の処置に関する。本発明は、そのように限定されるわけではないが、好ましい実施形態において、そのアンタゴニストが、免疫付着因子（immunoadhesion）またはキメラヘテロマルチマー接着因子である。免疫付着因子（ハイブリッド免疫グロブリンと呼ばれる）（その構造および調製を含む）は、例えば、WO 91/08298；および米国特許第5,428,130号および同第5,116,964号（これらの開示は、本明細書によって参考として明示的に援用される）に記載される。

【0083】

（1．免疫付着因子またはキメラヘテロマルチマー接着因子の生成）

以下の記載は、免疫付着因子核酸を含むベクターで形質転換またはトランスフェクションした細胞を培養することによる、免疫付着因子の生成に主に関する。当然、当該分野で周知である別の方法が、免疫付着因子を調製するために使用され得ることが、意図される。例えば、免疫付着因子配列またはその一部は、固相技術[例えば、Stewartら、Solid-Phase Peptide Synthesis、W.H. Freeman Co., San Francisco、CA(1969)；Merrifield、J. Am. Chem. Soc. 85:2149~2154(1963)を参照のこと]を使用して、直接ペプチド合成により生成され得る。インビトロタンパク質合成は、手動技術を使用しても、または自動化によっても、実施され得る。自動合成は、例えば、Applied Biosystems Peptide Synthesizer（Foster City、CA）を製造業者の指示を使用して用いて、達成され得る。免疫付着因子の種々の部分が、別個に化学合成され得、そして化学的方法または酵素的方法を使用して、全長免疫付着因子を生成するように組合され得る。

【0084】

ネイティブ配列Erbb4レセプターをコードする核酸は、例えば、そのErbb4レセプターを発現することが既知の細胞（例えば、上記EP 599,274に記載される細

10

20

30

40

50

胞、および上記 P l o w m a n らの参考文献全体に記載される細胞) から単離され得るか、または合成され得る。

【0085】

免疫グロブリンの軽鎖定常領域または重鎖定常領域をコードするDNAは、公知であるか、またはcDNAライブラリーから容易に入手可能であるか、または合成される。例えば、A d a m s ら、B i o c h e m i s t r y 19:2711~2719(1980); G o u g h ら、B i o c h e m i s t r y 19:2702~2710(1980); D o l b y ら、P . N . A . S . U S A 77:6027~6031(1980); R i c e ら、P . N . A . S . U S A 79:7862~7865(1982); F a l k n e r ら、N a t u r e 298:286~288(1982); および M o r r i s o n ら、A n n . R e v . I m m u n o l . 2:239~256(1984)を参照のこと。

10

【0086】

本発明の免疫付着因子またはキメラヘテロ接着因子は、好ましくは、宿主細胞における発現により生成され、そしてそれらから単離される。宿主細胞は、一般的には、本発明の核酸で形質転換される。好ましくは、この核酸は、発現ベクター中に組み込まれる。本明細書中のベクターをクローニングまたは発現するための適切な宿主細胞は、原核生物宿主細胞(例えば、E . c o l i、B a c i l l u s 株、P s e u d o m o n a s および他の細菌)、酵母、および他の真核生物微生物、および高等真核細胞(例えば、チャイニーズハムスター卵巣(C H O)細胞および哺乳動物細胞)である。これらの細胞はまた、生きて

20

いる動物(例えば、ウシ、ヤギ、またはヒツジ)中に存在し得る。昆虫細胞もまた、使用され得る。クローニング方法および発現方法は、当該分野で周知である。

【0087】

免疫付着因子(例えば、キメラE r b B 4 - I g G 分子)の発現を得るために、1つ以上の発現ベクターが、形質転換またはトランスフェクションによって宿主細胞中に導入され、そして生じた組換え宿主細胞が、プロモーターを誘導するために適切に改変された従来の栄養培地中で培養され、組換え細胞を選択するか、またはE r b B 4 - I g G DNAを増幅する。一般に、インビトロでの哺乳動物細胞培養の生産性を最大にする原理、プロトコル、および実際の技術は、M a m m a l i a n C e l l B i o t e c h n o l o g y : a P r a c t i c a l A p p r o a c h、M . B u t l e r 編(I R L P r e s s、1991)に見出され得る。

30

【0088】

((i)免疫付着因子をコードする核酸の構築)

本発明の免疫付着因子を調製する場合、好ましくは、天然のレセプターの細胞外ドメインをコードする核酸が、免疫グロブリンの定常ドメイン配列のN末端をコードする核酸にC末端側で融合されるが、N末端融合物もまた可能である。代表的には、このような融合物においては、コードされるキメラポリペプチドは、免疫グロブリンの重鎖の定常領域の少なくとも機能的に活性なヒンジ、C H 2ドメインおよびC H 3ドメインを保持している。融合はまた、定常ドメインのF c部分のC末端になされるか、または重鎖のC H 1もしくは軽鎖の対応する領域に、すぐN末端側でなされる。生じるDNA融合構築物は、適切な宿主細胞中で発現される。

40

【0089】

所望の免疫付着因子を調製するために使用されるネイティブ配列細胞外ドメイン(例えば、E r b B 4由来)のアミノ酸配列改変体および/または抗体配列をコードする核酸分子は、当該分野で公知の種々の方法によって調製される。これらの方法としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない:天然の供給源からの単離(天然に存在するアミノ酸配列改変体(例えば、E r b B 4に関連した上記されたもの)の場合)、またはオリゴヌクレオチド媒介(または部位特異的)変異誘発、P C R変異誘発、およびネイティブ配列E r b B 4の先に調製された改変体もしくは非改変体バージョンのカセット変異誘発による調製。

【0090】

50

キメラヘテロ接着因子に含まれるネイティブ細胞外ドメインのアミノ酸配列改変体は、適切なヌクレオチド変化を、そのネイティブ細胞外ドメインDNA配列中に導入することによってか、または所望のキメラヘテロ接着因子モノマーポリペプチドのインビトロ合成によって、調製される。そのような改変体は、例えば、免疫付着因子のアミノ酸配列またはキメラヘテロ接着因子のアミノ酸配列中の残基からの欠失、またはそのような残基の挿入もしくは置換を含む。

【0091】

上記のようなネイティブ配列における変動は、表1に示される保存的変異および非保存的変異のための技術および指針のいずれかを使用して、なされ得る。

【0092】

好ましい実施形態において、その核酸は、ErbbB4レセプター細胞外ドメイン配列が抗体（特に、Fcドメイン）のC末端部分のN末端に融合したキメラ分子（免疫グロブリン（例えば、IgG1）のエフェクター機能を含む）をコードする。ErbbB4レセプター細胞外ドメイン配列に重鎖定常領域全体を融合することが、可能である。しかし、より好ましくは、（IgGFcを化学的に定義する）パパイン切断部位（すなわち、重鎖の定常領域の最初の残基を114とした場合の残基216[Kobettら、前出]）または他の免疫グロブリンの同様の部位のすぐ上流のヒンジ領域で開始する配列が、その融合において使用される。特に好ましい実施形態においては、ErbbB4レセプター細胞外ドメイン配列は、IgG1重鎖、IgG2重鎖、またはIgG3重鎖の、ヒンジ領域、およびCH2、およびCH3、またはCH1、ヒンジ、CH2、およびCH3ドメインに、融合される。融合がなされる正確な部位は重要でなく、最適な部位は、慣用的実験によって決定され得る。

【0093】

ヒト免疫付着因子のために、ヒトIgG1免疫グロブリン配列およびIgG3免疫グロブリン配列の使用が、好ましい。IgG1を使用する主な利点は、IgG1免疫付着因子が、固定されたプロテインAにより効率的に精製され得ることである。対照的に、IgG3の精製は、プロテインGを必要とし、このプロテインGは、かなり汎用性が低い媒体である。しかし、特定の免疫付着因子構築のためのIg融合パートナーを選択する場合、免疫グロブリンの他の構造特性および機能特性が、考慮されるべきである。例えば、IgG3ヒンジはもっと長くかつもっと可撓性であるので、このIgG3ヒンジは、IgG1に融合した場合に適切に折り畳まないか機能しないかもしれないもっと大きな「接着因子」ドメインに、適合し得る。別の考慮事項は、結合価であり得る：IgG免疫付着因子は二価ホモダイマーであるが、IgAおよびIgMのようなIgサブタイプは、それぞれ、基本Igホモダイマー単位のダイマー構造またはペンタマー構造を生じ得る。

【0094】

インビボ適用のために設計されるErbbB4-Ig免疫付着因子について、Fc領域により特定される薬物動態特性およびエフェクター機能も、同様に重要である。IgG1、IgG2およびIgG4はすべてインビボ半減期21日を有するが、その補体系を活性化する際のそれらの相対的能力は、異なる。Ig4は、補体を活性化せず、そしてIgG2は、補体活性化の際に、IgG1よりも有意に弱い。さらに、IgG1と異なり、IgG2は、単核細胞または好中球上のFcレセプターに結合しない。IgG3は補体活性化のために最適であるが、そのインビボ半減期は、他のIgGアイソタイプの約3分の1である。

【0095】

ヒト治療剤として使用されるように設計される免疫付着因子について別の重要な考慮事項は、特定のアイソタイプのアロタイプ改変体の数である。一般に、血清学的に規定されるアロタイプが少ないIgGアイソタイプが、好ましい。例えば、IgG1は、たった4つしか血清学的に規定されるアロタイプ部位を有さず、そのうち2つ（G1m1およびG1m2）はFc領域中に位置し、そしてこれらの部位のうちの1つG1m1は非免疫原性である。対照的に、IgG3中には、血清学的に規定される12個のアロタイプが存在し、

10

20

30

40

50

そのすべてが F c 領域中に存在し、これらの部位のうちの 3 つだけ (G 3 m 5、G 3 m 1 1、および G 3 m 2 1) が、非免疫原性である 1 つのアロタイプを有する。従って、I g G 3 免疫付着因子の潜在的免疫原性は、I g G 1 免疫付着因子の潜在的免疫原性よりも大きい。

【 0 0 9 6 】

E r b B 4 レセプター配列 (例えば、細胞外ドメイン配列) をコードする c D N A および免疫付着因子の I g 部分をコードする c D N A が、選択された宿主細胞中での効率的発現を指向するプラスミドベクター中に、直列して挿入される。哺乳動物細胞における発現のために、p R K 5 ベースのベクター [S c h a l l ら、C e l l 6 1、3 6 1 ~ 3 7 0 (1 9 9 0)] および C D M 8 ベースのベクター [S e e d、N a t u r e 3 2 9、8 4 0 (1 9 8 9)] が、例えば、使用され得る。正確な接合部は、オリゴヌクレオチド指向性欠失変異誘発 [Z o l l e r および S m i t h、N u c l e i c A c i d s R e s . 1 0、6 4 8 7 (1 9 8 2) ; C a p o n ら、N a t u r e 3 3 7、5 2 5 ~ 5 3 1 (1 9 8 9)] を使用して、指定された接合部コドン間の余分な配列を除去することによって、作製され得る。各半分が所望の接合部のいずれかの側の配列と相補的な、合成オリゴヌクレオチドが、使用され得、理想的には、これらは、3 6 マー ~ 4 8 マーである。あるいは、P C R 技術が、適切なベクターとインフレーションでその分子の 2 つの部分の接合するために使用され得る。

10

【 0 0 9 7 】

免疫グロブリン軽鎖の存在は、本発明の免疫付着因子において必要ではないが、免疫グロブリン軽鎖が、t r k レセプター - 免疫グロブリン重鎖融合ポリペプチドに共有結合してか、または t r k レセプター細胞外ドメインに直接融合してのいずれかで、存在し得る。前者の場合、免疫グロブリン軽鎖をコードする D N A が、代表的には、E r b B 4 レセプター - 免疫グロブリン重鎖融合タンパク質をコードする D N A と共発現される。分泌の際、そのハイブリッド重鎖および軽鎖は、2 つにジスルフィド結合した免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖対を含む免疫グロブリン様構造を提供するように、共有結合される。このような構造の調製に適切な方法は、例えば、1 9 8 9 年 3 月 2 8 日発行の米国特許第 4 , 8 1 6 , 5 6 7 号に開示される。

20

【 0 0 9 8 】

本明細書中のキメラ E r b B 4 アンタゴニストの別の好ましい型は、異種ポリペプチド (例えば、マルチマー化ドメイン) に結合した、細胞外ドメイン (例えば、E r b B 4 モノマー由来) を含む、融合タンパク質である。このような配列は、組換え D N A 技術を使用して、構築され得る。あるいは、この異種ポリペプチドは、当該分野で周知の技術 (例えば、異種二官能性架橋剤の使用) により、細胞外ドメインポリペプチドに共有結合され得る。例示的カップリング剤としては、N - スクシンイミジル - 3 - (2 - ピリジルジチオール) プロピオネート (S P D P)、イミノチオラン (I T)、イミドエステルの二官能誘導体 (例えば、ジメチルアジピミデート H C L)、活性エステル (例えば、ジスクシンイミジルスベレート)、アルデヒド (例えば、グルタルアルデヒド)、ビス - アジド化合物 (例えば、ビス (p - アジドベンゾイル) ヘキサンジアミン)、ビス - ジアゾニウム誘導体 (例えば、ビス - (p - ジアゾニウムベンゾイル) - エチレンジアミン)、ジイソシアネート (例えば、トリエン 2 , 6 - ジイソシアネート)、およびビス活性フッ素化合物 (例えば、1 , 5 - ジフルオロ - 2 , 4 - ジニトロベンゼン) が、挙げられる。

30

40

【 0 0 9 9 】

1 つの実施形態において、キメラヘテロ付着因子ポリペプチドは、抗タグ抗体が選択的に結合し得るエピトープを提供するタグポリペプチドと、キメラヘテロ付着因子のモノマーの融合物を含む。キメラヘテロ付着因子のこのようなエピトープタグ化形態が有用である。なぜなら、その存在は、タグポリペプチドに対する標識抗体を使用して検出され得るからである。また、エピトープ t a g を提供すると、抗タグ抗体を使用するアフィニティ精製によって、キメラヘテロ付着因子を容易に精製し得る。タグポリペプチドおよびその各抗体は、当該分野で周知である。例としては、f l u H A t a g ポリペプチドおよび

50

その抗体 12CA5 (Fieldら、Mol. Cell. Biol. 8: 2159~2165 (1988)); c-myc タグおよびそれに対する 8F9 抗体、3C7 抗体、6E10 抗体、G4 抗体、B7 抗体、および 9E10 抗体 (Evanら、Molecular and Cellular Biology 5 (12): 3610~3616 (1985)); および単純ヘルペスウイルス糖タンパク質 D (gD) タグおよびその抗体 (Paborskyら、Protein Engineering 3 (6): 547~553 (1990)) が、挙げられる。

【0100】

キメラヘテロマルチマーの共有結合改変の別の型は、そのヘテロマルチマーのモノマーポリペプチドを、種々の非タンパク質性ポリマー (例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリオキシアルキレン、またはポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールのコポリマー) のうちの 1 つに結合することを包含する。キメラヘテロマルチマーはまた、例えば、コアセルベーション技術によってかまたは界面ポリマー化によって (例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン微小カプセルおよびポリ- (メチルメタクリレート) 微小カプセル)、コロイド薬物送達系 (例えば、リボソーム、アルブミンミクロスフェア、ミクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル) 中でか、またはマクロエマルジョン中で、調製された微小カプセル中に捕捉され得る。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences、第 16 版、Oslo, A 編 (1980) に開示される。

【0101】

((ii) 宿主細胞の選択および形質転換)

宿主細胞は、免疫付着因子生成のための本明細書中に記載される発現ベクターまたはクローニングベクターで、トランスフェクトまたは形質転換され、そしてプロモーターを誘導するための適切なように改変された従来の栄養培地中で培養され、形質転換体を選択するか、または所望の配列をコードする遺伝子を増幅する。その培養条件 (例えば、培地、温度、pH など) は、過度の実験を伴うことなく、当業者によって選択され得る。一般に、細胞培養の生産性を最大にするための原理、プロトコル、および実施技術は、Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach、M. Butler 編 (IRL Press, 1991) および Sambrook (上記) にて見出され得る。

【0102】

用語「形質転換」および「トランスフェクション」は、本明細書中で互換可能に使用され、そして DNA を細胞中に導入するプロセスをいう。形質転換またはトランスフェクションの後、本発明の核酸は、宿主細胞のゲノム中に組み込み得るし、または染色体外エレメントとして存在し得る。真核生物細胞のトランスフェクションの方法および原核生物細胞の形質転換の方法は、当業者に公知であり、例えば、 CaCl_2 、 CaPO_4 、リボソーム媒介およびエレクトロポレーションがある。使用される宿主細胞に依存して、そのような細胞に適切な標準技術を使用して、形質転換が実施される。Sambrook (前出) に記載されるような、塩化カルシウムを使用するカルシウム処理、またはエレクトロポレーションが、原核生物に一般的に使用される。Shawら、Gene 23: 315 (1983) および WO 89/05859 (1989 年 6 月 29 日公開) に記載されるような、Agrobacterium tumefaciens による感染が、特定の植物細胞の形質転換のために使用される。そのような細胞壁を有さない哺乳動物細胞について、Graham および van der Eb、Virology 52: 456~457 (1978) のリン酸カルシウム沈殿法が、使用され得る。哺乳動物細胞宿主系トランスフェクションの一般的局面は、米国特許第 4,399,216 号に記載されている。酵母中への形質転換は、代表的には、Van Solingenら、J. Bact. 130: 946 (1977) および Hsiaoら、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76: 3829 (1979) の方法に従って、実行される。しかし、細胞中に DNA を導入するための他の方法 (例えば、核マイクロインジェクション、エレクトロポレーシ

10

20

30

40

50

ョン、インタクトな細胞との細菌プロトプラスト融合、またはポリカチオン（例えば、ポリブレン、ポリオルニチン）もまた、使用され得る。哺乳動物細胞を形質転換するための種々の技術について、Keownら、Methods in Enzymology 185:527~537(1990)およびMansourら、Nature 336:348~352(1988)を参照のこと。

【0103】

本明細書中のベクターにおいてDNAをクローニングまたは発現するために適切な宿主細胞としては、原核生物細胞、酵母細胞、または高等真核生物細胞が、挙げられる。適切な原核生物としては、真正細菌（例えば、グラム陰性生物またはグラム陽性生物（例えば、*E. coli*のような、腸内細菌科））が挙げられるが、これらに限定されない。種々の
10 *E. coli*株が、公に利用可能であり、そのような株は、例えば、*E. coli* K12株MM294(ATCC 31,446); *E. coli* X1776(ATCC 31,537); *E. coli*株W3110(ATCC 27,325)および*E. coli*株K5 772(ATCC 53,635)である。他の適切な原核生物宿主細胞としては、腸内細菌科（例えば、*Escherichia*（例えば、*E. coli*））、*Enterobacter*、*Erwinia*、*Klebsiella*、*Proteus*、*Salmonella*（例えば、*Salmonella typhimurium*）、*Serratia*（例えば、*Serratia marcescans*）および*Shigella*、ならびに*Bacillus*（例えば、*B. subtilis*および*B. licheniformis*（例えば、1989年4月12日公開のDD 266,710号に開
20 示される、*B. licheniformis* 41P））、*Pseudomonas*（例えば、*P. aeruginosa*）および*Streptomyces*が、挙げられる。これらの例は、限定ではなく、例示である。W3110株は、特に好ましい1つの宿主または特に好ましい1つの親宿主である。なぜなら、この株は、組換えDNA生成物発酵のための一般的宿主株であるからである。好ましくは、その宿主細胞は、最小量のタンパク質分解酵素を分泌する。例えば、W3110株は、宿主に対して内因性であるタンパク質をコードする遺伝子において遺伝子変異をもたらすように改変され得、そのような宿主の例としては、*E. coli* W3110株1A2（これは、完全遺伝子型tonAを有する）；*E. coli* W3110株9E4（これは、完全遺伝子型tonA ptr3を有する）；*E. coli* W3110株27C7(ATCC 55,244)（これは、完
30 全遺伝子型tonA ptr3 phoA E15(argF-lac)169 deg P ompT kan^rを有する）；*E. coli* W3110株37D6（これは、完全遺伝子型tonA ptr3 phoA E15(argF-lac)169 deg P ompT rbs7 ilvG kan^rを有する）；*E. coli* W3110株40B4（これは、非カナマイシン耐性deg P欠失変異を有する37D6株である）；および1990年8月7日発行の米国特許第4,946,783号に開示される変異体ペリプラズムプロテアーゼを有する*E. coli*株が挙げられる。あるいは、インビトロクローニング方法（例えば、PCRおよびポリメラーゼ反応）が、適切である。

【0104】

原核生物に加えて、真核生物微生物（例えば、糸状真菌または酵母）が、免疫付着因子を
40 コードするベクターのための適切なクローニング宿主または発現宿主である。*Saccharomyces cerevisiae*は、一般的に使用される下等真核生物宿主微生物である。他としては、*Schizosaccharomyces pombe*（BeachおよびNurse、Nature 290:140[1981]；EP 139,383(1985年5月2日公開)；Kluyveromyces宿主（米国特許第4,943,529号；Fleerら、Bio/Technology 9:968~975(1991)）（例えば、*K. lactis*（MW98-8C、CBS683、CBS4574；Louvencouttrら、J. Bacteriol. 154(2):737~1742[1983]）、*K. fragilis*（ATCC 12,424）、*K. bulgaricus*（ATCC 16,045）、*K. wickerhamii*（ATCC
50

24, 178)、*K. waltii* (ATCC 56, 500)、*K. drosophil*
larum (ATCC 36, 906; Van den Bergら、Bio/Tech
 nology 8:135 (1990))、*K. thermotolerans*、および
K. marxianus; *yarrowia* (EP 402, 226)); *Pichia*
pastoris (EP 183, 070; Sreekrishnaら、J. Basic
 Microbiol. 28:265~278 [1998]); *Candida*; *Tr*
ichoderma reesia (EP 244, 234); *Neurospora*
crassa (Caseら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:5
 259~5263 [1979]); *Schwanniomyces* (例えば、*Schwa*
nniomyces occidentalis (1990年10月31日公開のEP 10
 394, 538)); ならびに糸状真菌 (例えば、*Neurospora*、*Penici*
llium、*Tolypocladium* (1991年1月10日公開のWO 91/0
 0357)); および *Aspergillus* 宿主 (例えば、*A. nidulans* (Ba
 llanceら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 112:2
 84~289 [1983]; Tilburnら、Gene 26:205~221 [19
 83]; Yeltonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:14
 70~1474 [1984]) および *A. niger* (Kelly および Hynes、E
 MBO J. 4:475~479 [1985]) が、挙げられる。メチロトロフ酵母が
 、本明細書中で適切であり、そしてこのメチロトロフ酵母としては、*Hansenul*
a 属、*Candida* 属、*Kloeckera* 属、*Pichia* 属、*Saccharom*
yc 属、*Torulopsis* 属、および *Rhodotorula* 属からなる群より 20
 選択される、メタノール上で増殖可能な酵母が挙げられるが、これらに限定されない。こ
 の種類の酵母の例示である特定の種のリストが、C. Anthony、The Biochem
 istry of Methylo trophs 269 (1982) に見出され
 得る。

【0105】

グリコシル化免疫付着因子の発現のために適切な宿主細胞は、多細胞生物に由来する。無
 脊椎動物細胞の例としては、昆虫細胞 (例えば、*Drosophila* S2 および *Sp*
odoptera Sf9)、および植物細胞が挙げられる。有用な哺乳動物宿主細胞株
 の例としては、チャニースハムスター卵巣 (CHO) 細胞および COS 細胞が挙げられ 30
 る。より特定の例としては、SV40 により形質転換されたサル腎臓 CV1 系統 (COS
 -7、ATCC CRL 1651); ヒト胚腎臓株 (293細胞、または懸濁培養中での増殖のためにサブクローニングされた293細胞) (Grahamら、J. Gen. V
 irol. 36:59 (1977)); チャニースハムスター卵巣細胞 / -DHFR (CHO、Urlaub および Chasin、Proc. Natl. Acad. Sci. U
 SA 77:4216 (1980)); マウスセルトリー細胞 (TM4、Mather、
 Biol. Reprod. 23:243~251 (1980)); ヒト肺細胞 (W138
 、ATCC CCL 75); ヒト肝臓細胞 (Hep G2、HB 8065); および
 マウス乳房腫瘍 (MMT 060562、ATCC CCL 51) が挙げられる。適切な
 宿主細胞の選択は、当業者に範囲内にある。 40

【0106】

一般に、ErbB4-Ig 免疫付着因子の発現のための哺乳動物宿主細胞株の選択は、発
 現ベクターに主に依存する (下記を参照のこと)。別の考慮事項は、必要なタンパク質の
 量である。ミリグラム量が、一過性トランスフェクションからしばしば産生され得る。例
 えば、アデノウイルス EIA 形質転換 293 ヒト胚腎細胞株が、効率的な免疫付着因子発
 現を可能にするようなリン酸カルシウム法の改変法によって、pRK5 ベースのベクター
 で一過性トランスフェクトされ得る。CDM8 ベースのベクターが、DEAE-デキスト
 ラン法 (Aruffoら、Cell 61、1303~1313 (1990); Zett
 meis 1ら、DNA Cell Biol. (US) 9、347~353 (1990
)) により COS 細胞をトランスフェクトするために使用され得る。より多量のタンパク 50

質が望まれる場合、宿主細胞株の安定なトランスフェクションの後に、免疫付着因子が発現され得る。例えば、p R K 5 ベースのベクターが、ジヒドロ葉酸還元酵素 (D H F R) をコードしかつ G 4 1 8 に対する耐性を付与するさらなるプラスミドの存在下で、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞中に導入され得る。G 4 1 8 に耐性であるクローンが、培養において選択され得、これらのクローンが、漸増レベルの D H F R インヒビターメトロレキサートの存在下で、増殖され、D H F R 配列および免疫付着因子配列をコードする遺伝子コピーの数が同時に増幅されるクローンが、選択される。免疫付着因子が、N 末端に疎水性リーダー配列を含む場合、その免疫付着因子は、トランスフェクトされた細胞によりプロセッシングされそして分泌されるようである。より複雑な構造を有する免疫付着因子の発現は、特異的に適切な宿主細胞を必要とし得る。例えば、軽鎖または J 鎖のような構成成分が、特定の骨髓種細胞宿主またはハイブリドーマ細胞宿主によって提供され得る [G a s c o i g n e ら、1987、前出 ; M a r t i n ら、J , V i r o l . 67 : 3561 ~ 3568 (1993)]。

10

【 0 1 0 7 】

((i i i) 複製可能ベクターの選択および使用)

免疫付着因子をコードする核酸は、クローニング (D N A の増幅) 用または発現用に、複製可能ベクター中に挿入され得る。種々のベクターが、公に利用可能である。そのベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子、またはファージの形態であり得る。適切な核酸配列が、種々の手順によりそのベクター中に挿入され得る。一般に、D N A は、当該分野で公知の技術を使用して、適切な制限エンドヌクレアーゼ部位中に挿入される。ベクターの構成成分として、一般的には、1つ以上のシグナル配列、複製起点、1つ以上のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、および転写終結配列が挙げられるが、これらに限定されない。これらの構成成分のうちの1つ以上を含む適切なベクターの構築は、当業者に公知な標準的連結技術を使用する。

20

【 0 1 0 8 】

免疫付着因子は、直接的に組換え生成され得るだけでなく、異種ポリペプチド (これは、成熟タンパク質またはポリペプチドの N 末端にある特定の切断部位を有する、シグナル配列または他のポリペプチドであり得る) との融合ポリペプチドとしても組換え生成され得る。一般に、このシグナル配列は、そのベクターの構成成分であり得るし、またはそのベクター中に挿入される免疫付着因子コード D N A の一部でもあり得る。このシグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼリーダー、ペニシリナーゼリーダー、l p p リーダー、または耐熱性エンテロトキシン I I リーダーの群から選択される、原核生物シグナル配列であり得る。酵母の分泌のために、このシグナル配列は、例えば、酵母インベルターゼリーダー、因子リーダー (S a c c h a r o m y c e s 因子リーダーおよび K l u y v e r o m y c e s 因子リーダー (後者は、米国特許第 5 , 0 1 0 , 1 8 2 号に記載される) を含む)、または酸性ホスファターゼリーダー、C . a l b i c a n s グルコアミラーゼリーダー (1990 年 4 月 4 日公開の E P 3 6 2 , 1 7 9)、または 1990 年 1 1 月 1 5 日公開の W O 9 0 / 1 3 6 4 6 に記載されるシグナルであり得る。哺乳動物細胞発現において、哺乳動物シグナル配列 (例えば、同じ種または関連する種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列) ならびにウイルス分泌リーダーが、タンパク質の分泌を指向するために使用され得る。

30

40

【 0 1 0 9 】

発現ベクターおよびクローニングベクターの両方が、選択された 1 つ以上の宿主細胞においてそのベクターを複製可能にする核酸配列を含む。そのような配列は、種々の細菌、酵母、およびウイルスに関して、周知である。プラスミド p B R 3 2 2 由来の複製起点が、ほとんどのグラム陰性細菌のために適切であり、2 μ プラスミド起点が、酵母のために適切であり、そして種々のウイルス起点 (S V 4 0 起点、ポリオーマ起点、アデノウイルス起点、または B P V 起点) が、哺乳動物細胞におけるクローニングベクターのために有用である。

【 0 1 1 0 】

50

発現ベクターおよびクローニングベクターは、代表的には、選択遺伝子（選択マーカーとも呼ぶ）を含む。代表的選択遺伝子は、（a）抗生物質または他の毒素（例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサート、またはテトラサイクリン）に対する耐性を付与するタンパク質をコードするか、（b）栄養要求性欠損を補うタンパク質をコードするか、または（c）複合培地から利用可能でない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする（例えば、*Bacillus* について D - アラニンラセマーゼをコードする遺伝子）。

【0111】

哺乳動物細胞に適切な選択マーカーの例は、免疫付着因子をコードする核酸を取り込むためにコンピテントな細胞を同定することを可能にする、選択マーカー（例えば、DHFR またはチミジンキナーゼ）である。野生型 DHFR が使用される場合に適切な宿主細胞は、DHFR 活性が欠損した CHO 細胞であり、このような細胞は、Urlauら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980) により記載されるように調製されそして増殖される。酵母における使用のための適切な選択遺伝子は、酵母プラスミド YRp7 中に存在する *trp1* 遺伝子 [Stinchcombら、*Nature* 282:39 (1979); Kingmanら、*Gene* 7:141 (1979); Tschemperら、*Gene* 10:157 (1980)] である。この *trp1* 遺伝子は、トリプトファン中で増殖する能力を欠く酵母変異株（例えば、ATCC No. 44076 または PEP4-1 [Jones、*Genetics* 85:12 (1977)]）についての選択マーカーを提供する。

【0112】

発現ベクターおよびクローニングベクターは、mRNA 合成を指向するように、免疫付着因子コード核酸配列に作動可能に連結されたプロモーターを通常含む。種々の可能な宿主細胞により認識されるプロモーターが、周知である。原核生物宿主と使用するために適切なプロモーターとしては、 λ -ラクターゼプロモーター系およびラクトースプロモーター系 [Changら、*Nature* 275:615 (1978); Goeddelら、*Nature* 281:544 (1979)]、アルカリホスファターゼ、トリプトファン (*trp*) プロモーター系 [Goeddel、*Nucleic Acids Res.* 8:4057 (1980); Ep 36, 776]、およびハイブリッドプロモーター（例えば、*tac* プロモーター [deBoerら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:21~25 (1983)]）が挙げられる。細菌系における使用のためのプロモーターはまた、免疫付着因子をコードする DNA に作動可能に連結された、シャイン-ダルガーノ (S.D.) 配列を含む。

【0113】

酵母宿主との使用のために適切なプロモーター配列の例としては、3 - ホスホグリセレートキナーゼのプロモーター [Hitzemanら、*J. Biol. Chem.* 255:2073 (1980)]、または他の解糖酵素 [Hessら、*J. Adv. Enzyme Reg.* 7:149 (1968); Holland、*Biochemistry* 17:4900 (1978)]（例えば、エノラーゼ、グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース - 6 - リン酸イソメラーゼ、3 - ホスホグリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、およびグルコキナーゼ）のプロモーターが、挙げられる。

【0114】

他の酵母プロモーター（増殖条件により制御される転写というさらなる利点を有する誘導性プロモーターである）は、アルコールデヒドロゲナーゼ 2 のプロモーター領域、イソシトクロム C のプロモーター領域、酸性ホスファターゼのプロモーター領域、窒素代謝に関連する分解酵素のプロモーター領域、メタロチオネインのプロモーター領域、グリセルアルデヒド - 3 リン酸デヒドロゲナーゼのプロモーター領域、ならびにマルトース利用を担う酵素のプロモーター領域、およびガラクトース利用を担う酵素のプロモーター領域であ

10

20

30

40

50

る。酵母発現における使用に適切なベクターおよびプロモーターは、E P 73, 657 にさらに記載される。

【0115】

哺乳動物宿主細胞におけるベクターからの免疫付着因子の転写は、例えば、ウイルス（例えば、ポリオマウイルス、鶏痘ウイルス（1989年7月5日公開のUK 2, 211, 504）、アデノウイルス（例えば、アデノウイルス2）、ウシパピローマウイルス、レトロウイルス（例えば、鳥類肉腫ウイルス）、サイトメガロウイルス、B型肝炎ウイルスおよびシミアンウイルス40（SV40））のゲノムから得られるプロモーターによってか、異種哺乳動物プロモーター（例えば、アクチンプロモーターまたは免疫グロブリンプロモーター）から得られたプロモーターによってか、または熱ショックプロモーターから得られるプロモーターによって、制御される。ただし、これは、このようなプロモーターが宿主細胞系と適合性である場合である。

10

【0116】

免疫付着因子をコードするDNAの高等真核生物による転写は、そのベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって、増加され得る。エンハンサーは、DNAのシス作用性エレメントであり、通常約10～300bpであり、その転写を増加するようにプロモーターに対して作用する。哺乳動物遺伝子（グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテイン、およびインスリン）由来の多くのエンハンサー配列が、現在公知である。しかし、代表的には、当業者は、真核生物細胞ウイルス由来のエンハンサーを使用する。例としては、複製起点の後期側上（100～270まで）のSV40エンハンサー、サイトメガロウイルス早期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側上のポリオマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。このエンハンサーは、免疫付着因子コード配列の5'位または3'位にて、このベクター中に接続され得るが、好ましくは、そのプロモーターの5'側の部位に位置する。

20

【0117】

真核生物宿主細胞（酵母細胞、真菌細胞、昆虫細胞、植物細胞、動物細胞、ヒト細胞または他の多細胞生物由来の有核細胞）において使用される発現ベクターはまた、転写の終結に必要な配列、およびmRNAを安定にするために必要な配列を含む。このような配列は、真核生物またはウイルスのDNAもしくはcDNAの3'非翻訳領域から一般的に利用可能である。これらの領域は、免疫付着因子をコードするmRNAの非翻訳部分において

30

【0118】

組換え脊椎動物細胞培養において免疫付着因子の合成に適合するために適切な、さらに他の方法、ベクター、および宿主細胞が、Gethingら、Nature 293: 620～625（1981）；Manteiら、Nature 281: 40～46（1979）；E P 117, 060；およびE P 117, 058に記載されている。

【0119】

（（iv）免疫付着因子の精製）

免疫付着因子またはキメラヘテロ付着因子は、好ましくは、分泌ポリペプチドとして培養培地から回収されるが、これらはまた、宿主細胞溶解物から回収され得る。第1工程として、粒子状破片（宿主細胞または溶解フラグメントのいずれか）が、例えば、遠心分離または限外濾過によって除去され、必要に応じて、そのタンパク質は、市販のタンパク質濃縮フィルターを用いて濃縮され得、その後、以下から選択される1つ以上の精製手順によって、他の不純物からそのキメラヘテロ付着因子が分離され得る：免疫アフィニティークラムによる分画；イオン交換カラムによる分画；硫酸アンモニウム沈殿またはエタノール沈殿；逆相HPLC；シリカによるクロマトグラフィー；ヘパリンセファロースによるクロマトグラフィー；カチオン交換樹脂によるクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；SDS-PAGE；およびゲル濾過。

40

【0120】

免疫付着因子を精製する特に有利な方法は、アフィニティークロマトグラフィーである。

50

アフィニティーリガンドの選択は、そのキメラにおいて使用される免疫グロブリンFcドメインの種およびアイソタイプに依存する。プロテインAが、ヒトIgG1重鎖、IgG2重鎖またはIgG4重鎖に基づく免疫付着因子を精製するために、使用され得る[Lindmarkら、J. Immunol. Meth. 62: 1~13 (1983)]。プロテインGが、すべてのマウスアイソタイプおよびヒトIgG3のために推奨される[Gussら、EMBO J. 5, 1567-1575 (1986)]。アフィニティーリガンドが結合するマトリックスは、最もしばしばアガロースであるが、他のマトリックスもまた、利用可能である。機械的に安定なマトリックス(例えば、制御された孔隙のガラスまたはポリ(スチレンジビニル)ベンゼン)により、アガロースを用いて達成され得るよりも早い流速および短い処理回数が可能になる。プロテインAアフィニティークラムまたはプロテインGアフィニティークラムに免疫付着因子を結合するための条件は、Fcドメインの特徴(すなわち、その種およびアイソタイプ)によりもっぱら影響される。一般に、適切なリガンドが選択される場合、効率的な結合が、非馴化培養流体から直接生じる。免疫付着因子の1つの識別的特徴は、ヒトIgG1分子について、プロテインAに対する結合能力が、同じFc型の抗体と比較していくらか減少していることである。結合した免疫付着因子は、酸性pH(3.0以上)でか、または穏やかにカオトロピックな塩を含む中性pH緩衝液中のいずれかで、効率的に溶出され得る。このアフィニティークロマトグラフィー工程は、95%を超える純度である免疫付着因子調製物を生じ得る。

10

【0121】

当該分野で公知である他の方法が、免疫付着因子を精製するために、プロテインAまたはプロテインGによるアフィニティークロマトグラフィーに代えてか、またはこのアフィニティークロマトグラフィーに加えて、使用され得る。免疫付着因子は、親硫黄性(thiophilic)ゲルクロマトグラフィー[HutchensおよびPorath、Anal. Biochem. 159, 217~226 (1986)]および固定金属キレートクロマトグラフィー[Al-MashinkおよびMakai、J. Dairy Sci. 71, 1756~1763 (1988)]中で抗体と同様に挙動する。しかし、抗体とは対照的に、イオン交換カラムにおけるそれらの免疫付着因子の挙動は、その等電点によってのみではなく、そのキメラ性質に起因して分子中に存在し得る電荷双極子によってもまた、影響される。

20

【0122】

エピトープタグ化免疫付着因子(例えば、Erbb4-IgG)の調製により、その融合ポリペプチドを吸着するためにそのエピトープに対する抗体を含む免疫親和性カラムを使用する精製が、容易になる。免疫親和性カラム(例えば、ウサギポリクローナル抗Erbb4カラム)が、Erbb4-IgGをErbb4免疫エピトープに結合することによってそのErbb4-IgGを吸着するために使用され得る。

30

【0123】

いくつかの実施形態において、Erbb4レセプター-免疫グロブリンキメラ(免疫付着因子)は、モノマーとしてかまたはヘテロマルチマーもしくはホモマルチマーとして、WO 91/08298に特に示されるように、特にダイマーまたはテトラマーとしてアセンブルされる。一般に、アセンブルされたこれらの免疫グロブリンは、既知の単位構造を有する。基本4鎖構造単位が、IgG、IgD、およびIgEが存在する形態である。4単位構造が、そのより高分子量の免疫グロブリンにおいて反復され、IgMは、一般に、ジスルフィド結合によって保持された基本4単位のペンタマーとして存在する。IgAグロブリン、および時にはIgGグロブリンは、血清中にマルチマー形態でも存在し得る。マルチマーの場合、各4単位は、同じであってもよいし、または異なってもよい。

40

【0124】

先に示したように、本発明の免疫付着因子は、二特異性にされ得、そして例えば、2つの異なるErbb4レセプター(少なくとも一方がErbb4である)由来の結合領域を含み得る。従って、本発明の免疫付着因子は、2つの別々のErbb4リガンドに対する結合特異性を有し得る。二重特異的分子について、それらの抗体様構造の一方のアームがキメラ抗

50

体重鎖およびもう一方のアームがキメラ抗体重鎖 - 軽鎖対から構成される、トリマー分子が、精製の容易性に起因して有利である。10個のテトラマーの混合物を生じる、二重特異的免疫付着因子の産生に從來使用される抗体産生クアドローマとは対照的に、トリマー免疫付着因子構造の3つの鎖をコードする核酸を用いてトランスフェクトした細胞は、3つの分子のみの混合物を産生し、そしてそれに応じて、これらの混合物からの所望の産物の精製が、より容易である。

【0125】

((v) 免疫付着因子の特徴付け)

一般に、本発明の E r b B 4 キメラヘテロマルチマーは、以下の特性の任意の1以上を有する：(a) H B - E G F のようなリガンドへの結合について、天然のヘテロマルチマーレセプターと競合する能力；(b) E r b B 2 - I g G / E r b B 4 - I g G 複合体を形成する能力；および(c)天然のヘテロマルチマーレセプターの環境からリガンドを枯渇することによって、その天然のレセプターの活性化を阻害し、それによって、E r b B 2 レセプターおよびE r b B 4 レセプターを発現する細胞の増殖を阻害する能力。

10

【0126】

特性(a)についてスクリーニングするために、キメラE r b B 4 ヘテロマルチマー接着因子がリガンドに結合する能力は、インビトロで容易に決定され得る。例えば、これらのレセプターの免疫付着因子形態を生成し得、そしてE r b B 2 / 4 - I g ヘテロ免疫付着因子を固相上(例えば、ヤギ抗ヒト抗体をコートしたアッセイプレート上)に固定化し得る。次いで、その固定化された免疫付着因子に結合するリガンドの能力を決定し得る。より詳細については、以下の実施例に記載の^{1 2 5} I - H R G 結合アッセイを参照のこと。

20

【0127】

特性(c)に関して、M C F 7 細胞を使用するチロシンリン酸化アッセイが、E r b B 4 レセプターの活性化についてスクリーニングする手段を提供する。本発明の代替的な実施形態において、W O 9 5 / 1 4 9 3 0 に記載のK I R A - E L I S A を使用して、H E R 4 キメラヘテロ接着因子がH E R 4 レセプターの活性化を阻害する能力を定性的かつ定量的に測定し得る。

【0128】

本発明の免疫付着因子、キメラヘテロ接着因子(例えば、E r b B 2 / 4 - I g)または他の分子がE r b B 2 レセプターおよびE r b B 4 レセプターを発現する細胞の増殖を阻害する能力は、標準的な手順によって細胞培養物中で容易に決定される。この実験に有用な細胞としては、A T C C から入手可能なM C F 7 細胞およびS K - B R - 3 細胞ならびにシュワン細胞が挙げられる(例えば、L i ら、J . N e u r o s c i e n c e 1 6 (6) : 2 0 1 2 - 2 0 1 9 (1 9 9 6) を参照のこと)。これらの腫瘍細胞株を、細胞培養プレート中にプレートし、そのプレートに接着させ得る。潜在的なE r b B 4 アンタゴニスト(例えば、E r b B 4 キメラヘテロ接着因子)の存在下および非存在下において、H R G リガンドを、添加する。単層を洗浄しそしてクリスタルバイオレットで染色/固定し、そして細胞増殖阻害を定量する。

30

【0129】

(2 . 抗体調製)

E r b B 4 アンタゴニストの別の好ましいクラスは、このレセプターに対する中和抗体を含む。

40

【0130】

((i) ポリクローナル抗体)

ポリクローナル抗体を調製する方法は、当該分野で公知である。ポリクローナル抗体は、例えば、免疫因子(および所望の場合にはアジュバント)の1回以上の注射によって、哺乳動物において惹起され得る。代表的には、免疫因子および/またはアジュバントは、複数回の皮下注射または腹腔内注射によって哺乳動物中に注射される。免疫因子を、免疫される哺乳動物において免疫原性であることが公知のタンパク質(例えば、血清アルブミン)またはダイズトリプシンインヒビターと結合体化することが、有用であり得る。使用さ

50

れ得るアジュバントの例としては、フロイント完全アジュバントおよびM P L - T D M が挙げられる。

【0131】

((i i) モノクローナル抗体)

モノクローナル抗体は、K o h l e r ら、N a t u r e 、 2 5 6 : 4 9 5 (1 9 7 5) により最初に記載されたハイブリドーマ方法を使用して作製され得るか、または組換えD N A 方法 (米国特許第 4 , 8 1 6 , 5 6 7 号) によって作製され得る。

【0132】

ハイブリドーマ方法において、マウスまたは他の適切な宿主動物 (例えば、ハムスターまたはマカクザル) を本明細書中上記のように免疫して、免疫に使用されたタンパク質に特異的に結合する抗体を産生するかまたは産生し得る、リンパ球を誘発する。あるいは、リンパ球をインビトロで免疫し得る。次いで、リンパ球を、適切な融合剤 (例えば、ポリエチレングリコール) を使用して骨髓腫細胞と融合して、ハイブリドーマ細胞を形成する (G o d i n g 、 M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s : P r i n c i p l e s a n d P r a c t i c e 、 5 9 - 1 0 3 頁 (A c a d e m i c P r e s s 、 1 9 8 6)) 。

【0133】

このように調製されたハイブリドーマ細胞を、適切な培養培地 (好ましくは、融合されていない親骨髓腫細胞の増殖または生存を阻害する 1 以上の物質を含む) に播種しそして増殖させる。例えば、親骨髓腫細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (H G P R T または H P R T) を欠損している場合、ハイブリドーマのための培養培地は、代表的に、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含み (H A T 培地) 、これらの物質は、H G P R T 欠損細胞の増殖を妨げる。

【0134】

好ましい骨髓腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定な高レベルの産生を支持し、そして培地 (例えば、H A T 培地) に対して感受性である、骨髓腫細胞である。これらの中でも、好ましい骨髓腫細胞株は、マウス骨髓腫細胞株 (例えば、M O P - 2 1 マウス腫瘍および M C - 1 1 マウス腫瘍に由来する骨髓腫細胞株 (S a l k I n s t i t u t e C e l l D i s t r i b u t i o n C e n t e r 、 S a n D i e g o 、 C a l i f o r n i a U S A から入手可能) 、ならびに S P - 2 細胞または X 6 3 - A g 8 - 6 5 3 細胞 (A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n 、 R o c k v i l l e 、 M a r y l a n d U S A より入手可能)) である。ヒト骨髓腫細胞株およびマウス - ヒトヘテロ骨髓腫細胞株もまた、ヒトモノクローナル抗体の産生のために記載されている (K o z b o r 、 J . I m m u n o l . 、 1 3 3 : 3 0 0 1 (1 9 8 4) ; および B r o d e u r ら、M o n o c l o n a l A n t i b o d y P r o d u c t i o n T e c h n i q u e s a n d A p p l i c a t i o n s 、 5 1 - 6 3 頁、M a r c e l D e k k e r , I n c . 、 N e w Y o r k 、 [1 9 8 7]) 。

【0135】

ハイブリドーマ細胞が増殖する培養培地を、抗原に対するモノクローナル抗体の産生についてアッセイする。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されたモノクローナル抗体の結合特異性を、免疫沈降またはインビトロ結合アッセイ (例えば、放射免疫アッセイ (R I A) または酵素連結イムノソルベントアッセイ (E L I S A)) によって決定する。

【0136】

モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、M u n s o n ら、A n a l . B i o c h e m . 、 1 0 7 : 2 2 0 (1 9 8 0) のスキッチャード分析により決定され得る。

【0137】

所望の特異性、親和性および / または活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞を同定した後、これらの細胞を限界希釈手順によってサブクローン化し、そして標準的な方法によ

10

20

30

40

50

り増殖させ得る (Goding、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice、59-103頁 (Academic Press、1986))。この目的のための適切な培養培地としては、例えば、DMEM培地またはRPMI-1640培地が挙げられる。さらに、これらのハイブリドーマ細胞を、動物の腹水腫瘍としてインビボで増殖させ得る。

【0138】

これらのサブクローンにより分泌されるモノクローナル抗体は、従来の免疫グロブリン精製手順 (例えば、プロテインA-Sepharose、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析またはアフィニティークロマトグラフィーなど) によって、培養培地、腹水または血清から適切に分離される。

10

【0139】

モノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を使用して (例えば、モノクローナル抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって)、容易に単離されそして配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの好ましい供給源として働く。一旦単離されると、そのDNAを、発現ベクター中に配置し得、次いで、その発現ベクターを、宿主細胞 (例えば、E. coli細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、またはさもなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しない骨髓腫細胞) にトランスフェクトし、その組換え宿主細胞においてモノクローナル抗体の合成を獲得する。このDNAはまた、例えば、相同なマウス配列の代わりにヒト重鎖および軽鎖定常ドメインのコード配列を置換することによって (Morrissonら、Proc. Nat. Acad. Sci. 81、6851 (1984)、または、非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全てまたは一部を免疫グロブリンコード配列に共有結合連結することによって、改変され得る。この様式で、本明細書中の抗Erbb4レセプターモノクローナル抗体の結合特異性を有する「キメラ」抗体または「ハイブリッド」抗体が、調製される。

20

【0140】

代表的には、そのような非免疫グロブリンポリペプチドを本発明の抗体の定常ドメインと置換して、またはこれらを本発明の抗体の1つの抗原結合部位の可変ドメインと置換して、Erbb4レセプターに対する特異性を有する1つの抗原結合部位および異なる抗原に対する特性を有する別の抗原結合部位を含む、キメラ二価抗体を作製する。

30

【0141】

キメラ抗体またはハイブリッド抗体はまた、合成タンパク質化学 (架橋剤が関与する合成タンパク質化学を含む) において公知の方法を使用して、インビトロで調製され得る。例えば、イムノトキシンは、ジスルフィド交換反応を使用してかまたはチオエーテル結合の形成によって構築され得る。この目的のための適切な試薬の例としては、イミノチオレートおよびメチル-4-メルカプトブチルイミデートが挙げられる。

【0142】

抗体の組換え産生は、以下により詳細に記載される。

【0143】

((iii) ヒト化抗体)

40

一般に、ヒト化抗体は、非ヒト供給源からその抗体に導入された、1以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、「移入 (import)」残基と呼ばれ、これらは、代表的には、「移入」可変ドメインから得られる。ヒト化は、本質的には、Winterおよび共同研究者ら [Jonesら、Nature、321:521-525 (1986); Riechmannら、Nature、332:323-327 (1988); Verhoeyenら、Science、239:1534-1536 (1988)] の方法に従って、げっ歯類のCDRまたはCDR配列で、そのヒト抗体の対応する配列を置換することによって行われ得る。

【0144】

従って、このような「ヒト化」抗体は、実質的にインタクトでないヒト可変ドメインが非

50

ヒト種由来の対応する配列によって置換されている、キメラ抗体である (C a b i l l y、前出)。実際には、ヒト化抗体は、代表的には、いくつかの C D R 残基および可能にはいくつかの F R 残基がげっ歯類抗体中の相同部位由来の残基によって置換されている、ヒト抗体である。

【 0 1 4 5 】

抗体は、抗原に対する高い特異性および他の好ましい生物学的特性を維持しながらヒト化されることが重要である。この目標を達成するために、好ましい方法に従って、ヒト化抗体は、親配列およびヒト化配列の 3 次元モデルを使用して、親配列および種々の概念上のヒト化産物の分析プロセスによって調製される。3 次元免疫グロブリンモデルは、一般的に利用可能であり、そして当業者によく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推定 3 次元コンホメーション構造を例示および表示する、コンピュータプログラムが利用可能である。これらの表示の調査は、候補免疫グロブリン配列の機能化における残基の潜在的な役割の分析 (すなわち、候補免疫グロブリンがその抗原を結合する能力に影響する残基の分析) を可能にする。このようにして、F R 残基は、コンセンサスの移入配列から選択され得、そして組み合わせられ得、その結果、所望の抗体特性 (例えば、標的抗原に対する増加した親和性) が達成される。一般に、C D R 残基は、抗原結合への影響に直接かつほぼ実質的に関与する。さらなる詳細については、米国特許第 5, 8 2 1, 3 3 7 号を参照のこと。

10

【 0 1 4 6 】

((i v) ヒト抗体)

20

ヒトモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ方法によって作製され得る。ヒトモノクローナル抗体の産生のためのヒト骨髓腫細胞株およびマウス - ヒトヘテロ骨髓腫細胞株は、例えば、K o z b o r、J . I m m u n o l .、1 3 3 : 3 0 0 1 (1 9 8 4)、および B r o d e u r、M o n o c l o n a l A n t i b o d y P r o d u c t i o n T e c h n i q u e s a n d A p p l i c a t i o n s、5 1 - 6 3 頁 (M a r c e l D e k k e r、I n c .、N e w Y o r k、1 9 8 7) によって記載されている。

【 0 1 4 7 】

免疫に際して内因性免疫グロブリン産生の非存在下でヒト抗体のレパートリーを産生し得るトランスジェニック動物 (例えば、マウス) を産生することが、現在可能である。例えば、キメラの生殖系列変異体マウスにおける抗体重鎖結合領域 (J_H) 遺伝子のホモ接合性欠失が、内因性の抗体産生の完全な阻害を生じることが記載されている。このような生殖系列変異体マウスにおけるヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイの移入は、抗原チャレンジに際してヒト抗体の産生を生じる。例えば、J a k o b o v i t s、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、9 0 : 2 5 5 1 - 2 5 5 (1 9 9 3) ; J a k o b o v i t s、N a t u r e 3 6 2 : 2 5 5 - 2 5 8 (1 9 9 3) を参照のこと。

30

【 0 1 4 8 】

M e n d e z、N a t u r e G e n e t i c s 1 5 : 1 4 6 - 1 5 6 [1 9 9 7] は、この技術をさらに改善し、そして「キセノマウス I I (X e n o m o u s e I I) 」と名付けられたトランスジェニックマウス系統を生成した。このマウスは、抗原でチャレンジした場合、高い親和性完全ヒト抗体を生成する。これは、上記のような内因性 J_H セグメントに欠失を有するマウスへの、メガベースのヒト重鎖および軽鎖の遺伝子座の生殖系列組み込みによって達成される。キセノマウス I I は、約 6 6 個の V_H 遺伝子、完全な D_H 領域および J_H 領域、ならびに 3 つの異なる定常領域 (μ、および) を含む、1, 0 2 0 k b のヒト重鎖遺伝子座を保有し、そしてまた、3 2 個の V 遺伝子、J セグメントおよび C 遺伝子を含む、8 0 0 k b のヒト 遺伝子座を保有する。これらのマウスにおいて産生された抗体は、ヒトにおいて見られる抗体と全ての点 (遺伝子の再編成、アセンブリおよびレパートリーを含む) において非常に類似する。ヒト抗体は、好ましくは、マウス遺伝子座における遺伝子再編成を妨げる内因性 J_H セグメントの欠失に起因して、内因性の抗体以上に発現される。

40

【 0 1 4 9 】

50

あるいは、ファージディスプレイ技術 (McCafertryら、Nature 348、552-553 [1990]) を使用して、免疫されていないドナー由来の免疫グロブリン可変 (V) ドメイン遺伝子レパートリーから、ヒト抗体および抗体フラグメントをインビトロで産生し得る。この技術に従って、抗体Vドメイン遺伝子を、糸状バクテリオファージ (例えば、M13またはfd) のメジャーコートタンパク質遺伝子またはマイナーコートタンパク質遺伝子のいずれかにインフレームでクローニングし、そしてファージ粒子の表面上に機能的な抗体フラグメントとして提示する。その糸状粒子はファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含むので、その抗体の機能的特性に基づく選択は、それらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択をも生じる。従って、そのファージは、B細胞の特性のいくつかを模倣する。ファージディスプレイは、種々の形式で行われ得る; それらの概説については、例えば、Johnson、Kevin S. およびChiswell、David J.、Current Opinion in Structural Biology 3、564-571 (1993) を参照のこと。V遺伝子セグメントのいくつかの供給源が、ファージディスプレイのために使用され得る。Clacksonら、Nature 352、624-628 (1991) は、免疫されたマウスの脾臓に由来するV遺伝子の小さなランダムコンビナトリアルライブラリーからの、抗オキサゾロン抗体の多様なアレイを単離した。Marksら、J. Mol. Biol. 222、581-597 (1991) またはGriffithsら、EMBO J. 12、725-734 (1993) によって記載される技術に本質的に従って、免疫されていないヒトドナー由来のV遺伝子のレパートリーが構築され得、そして抗原 (自己抗原を含む) の多様なアレイに対する抗体が単離され得る。天然の免疫応答において、抗体遺伝子は、高い割合で変異を蓄積する (体細胞性過剰変異)。導入された変化のいくつかは、高い親和性を付与し、そして高親和性表面の免疫グロブリンを提示するB細胞が、その後の抗原チャレンジの間に優先的に複製および分化される。この天然のプロセスは、「鎖シャッフリング」 (Marksら、Bio/Technol. 10: 779-783 [1992]) として公知の技術を使用することによって模倣され得る。この方法において、ファージディスプレイによって得られた「一次」ヒト抗体の親和性は、重鎖および軽鎖のV領域遺伝子を、免疫されていないドナーから得られたVドメイン遺伝子の天然に存在する改変体 (レパートリー) のレパートリーと連続的に置換することによって、改善され得る。この技術は、nM範囲の親和性を有する抗体および抗体フラグメントの産生を可能にする。非常に大きいファージ抗体レパートリー (「the mother-of-all libraries (全てのライブラリーの母)」) としても公知) を作製するための戦略は、Waterhouseら、Nucleic Acids Res. 21: 2265-2266 (1993) によって記載され、そしてこのような大きいファージライブラリーからの高親和性ヒト抗体の直接の単離が、Griffithsら、EMBO J. 13: 3245-3260 (1994) によって報告されている。遺伝子シャッフリングもまた、げっ歯類抗体からヒト抗体を誘導するために使用され得、このヒト抗体は、開始げっ歯類抗体と類似の親和性および特異性を有する。「エピトープインプリンティング」とも呼ばれる、この方法に従って、ファージディスプレイ技術によって得られたげっ歯類抗体の重鎖または軽鎖のVドメイン遺伝子を、ヒトVドメイン遺伝子のレパートリーと置換し、げっ歯類-ヒトキメラを作製する。抗原に対する選択は、機能的な抗原結合部位を回復し得るヒト可変ドメインの単離を生じる (すなわち、エピトープが、パートナーの選択を支配 (インプリント) する)。残りのげっ歯類Vドメインを置換するためにこのプロセスを繰り返す場合、ヒト抗体が得られる (PCT特許出願WO93/06213 (1993年4月1日公開) を参照のこと。CDRグラフティングによるげっ歯類抗体の従来からのヒト化と異なり、この技術は、げっ歯類起源のフレームワーク残基もCDR残基も有さない、完全なヒト抗体を提供する。

10

20

30

40

【0150】

((v) 二重特異的抗体)

二重特異的抗体は、少なくとも2つの異なる抗原に対する結合特異性を有する、モノクロ

50

ーナル（好ましくは、ヒトまたはヒト化）抗体である。本発明の場合、この結合特異性の一方は、アンタゴニスト抗体を提供するための E r b B 4 レセプターに対するものであり、もう一方の結合特異性は、任意の他の抗原、そして好ましくは、別のレセプターまたはレセプターサブユニットに対するものである。

【0151】

二重特異的抗体を作製するための方法は、当該分野で公知である。従来では、二重特異的抗体の組換え産生は、2つの免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖対の同時発現に基づき、ここで、2つの重鎖が異なる特異性を有する（M i l l s t e i n および C u e l l o、N a t u r e 305、537 - 539（1983））。免疫グロブリン重鎖および軽鎖のランダムな組み合わせに起因して、これらのハイブリドーマ（クアドローマ）は、10個の異なる抗体分子の可能性のある混合物を産生し、そのうちの1つのみしか、正確な二特異性構造を有さない。通常、アフィニティークロマトグラフィー工程によって行われる、その正確な分子の精製は、むしろ煩わしく、そして産物の収率は、低い。類似の手順は、P C T 出願公開番号 W O 9 3 / 0 8 8 2 9（1993年5月13日公開）および T r a u n e c k e r ら、E M B O 10、3655 - 3659（1991）に開示される。

10

【0152】

異なるより好ましいアプローチに従って、所望の結合特異性（抗体 - 抗原結合部位）を有する抗体可変ドメインは、免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合される。融合体は、好ましくは、免疫グロブリン重鎖定常ドメインを用い、これは、少なくともヒンジ領域、C H 2 領域および C H 3 領域の一部を含む。軽鎖結合に必要な部位を含む第1の重鎖定常領域（C H 1）を有することが好ましく、これは、これらの融合体の少なくとも一方に存在する。免疫グロブリン重鎖融合体、および所望の場合、免疫グロブリン軽鎖をコードする D N A が、別々の発現ベクターに挿入され、そして適切な宿主生物に同時トランスフェクトされる。このことは、その構築物において使用される等しくない比の3つのポリペプチド鎖が最適な収率を提供する実施形態では、その3つのポリペプチドフラグメントの変異の割合の調整において高い柔軟性を提供する。しかし、等しい比の少なくとも2つのポリペプチド鎖の発現が高い収率を生じるか、またはそれらの比が特に有意ではない場合、1つの発現ベクターに2つまたは3つ全てのポリペプチド鎖のコード配列を挿入することが可能である。このアプローチの好ましい実施形態において、二重特異的抗体は、一方のアームにおいて、第1の結合特異性を有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖、そして他方

20

30

【0153】

二重特異的抗体の生成のさらなる詳細については、例えば、S u r e s h ら、M e t h o d s i n E n z y m o l o g y 121、210（1986）を参照のこと。

【0154】

（（v i）ヘテロ結合体抗体）

40

ヘテロ結合体抗体もまた、本発明の範囲内にある。ヘテロ結合体抗体は、2つの共有結合された抗体から構成される。このような抗体は、例えば、所望でない細胞へ免疫系の細胞を標的化するために（米国特許第4,676,980号）およびH I V 感染の処置のために（P C T 出願公開番号 W O 9 1 / 0 0 3 6 0 および W O 9 2 / 2 0 0 3 7 3 ; E P 0 3 0 8 9）推奨されている。ヘテロ結合体抗体は、任意の簡便な架橋方法を使用して作製され得る。適切な架橋剤は、当該分野で周知であり、そして米国特許第4,676,980号において多くの架橋技術と共に開示されている。

【0155】

（（v i i）抗体フラグメント）

特定の実施形態において、E r b B 4 アンタゴニスト抗体（マウス抗体、ヒト抗体および

50

ヒト化抗体、ならびに抗体改変体を含む)は、抗体フラグメントである。種々の技術が、抗体フラグメントの産生について開発されている。従来は、これらのフラグメントは、インタクトな抗体のタンパク質分解消化によって得られてきた(例えば、Morimotoら、J. Biochem. Biophys. Methods 24:107-117(1992)およびBrennanら、Science 229:81(1985)を参照のこと)。しかし、現在、これらのフラグメントは、組換え宿主細胞によって直接産生され得る。例えば、Fab'-SHフラグメントを、直接E. coliから回収し得、そして化学的に結合してF(ab')₂フラグメントを形成し得る(Carterら、Bio/Technology 10:163-167(1992))。別の実施形態において、F(ab')₂は、ロイシンジッパーGCN4を使用して形成され、F(ab')₂分子のアセンブリを促進する。別のアプローチに従って、Fvフラグメント、Fabフラグメント、またはF(ab')₂フラグメントが、組換え宿主細胞培養物から直接単離され得る。抗体フラグメントの産生のための他の技術は、当業者に対して明らかである。

10

【0156】

((viii)抗体のアミノ酸配列改変体)

Erbb4アンタゴニスト抗体のアミノ酸配列改変体は、適切なヌクレオチド変化をErbb4アンタゴニスト抗体DNAに導入することによるか、またはペプチド合成により調製される。このような改変としては、例えば、本明細書中に示される例のErbb4アンタゴニスト抗体のアミノ酸配列内の残基の欠失、および/または挿入および/または置換が挙げられる。欠失、挿入および置換の任意の組み合わせが、最終構築物に達するようになされ、そこで、その最終構築物は、所望の特性を有する。アミノ酸変化はまた、ヒト化または改変体Erbb4アンタゴニスト抗体の翻訳後プロセッシングを変更し得る(例えば、グリコシル化部位の数または位置の変化)。

20

【0157】

変異誘発についての好ましい位置である、Erbb4レセプター抗体の特定の残基または領域の同定のための有用な方法は、「アラニンスキャニング変異誘発」と呼ばれ、これは、CunninghamおよびWells Science、244:1081-1085(1989)に記載される。ここで、標的残基の残基または群(例えば、荷電された残基(例えば、arg、asp、his、lysおよびglu)が同定され、そして中性または負に荷電したアミノ酸(最も好ましくは、アラニンまたはポリアラニン)によって置換され、Erbb4レセプター抗原とのそれらのアミノ酸との相互作用に影響を与える。次いで、置換に対して機能的感受性を示すこれらのアミノ酸位置が、その置換部位にかまたは置換部位に代えて、さらなる改変または他の改変を導入することによって、再度調整される。従って、アミノ酸配列バリエーションを導入するための部位は、予め決定されるが、その変異自体の性質は、予め決定される必要はない。例えば、所定の部位での変異の性能を分析するために、alaスキャニングまたはランダム変異誘発が標的のコドンまたは領域において行われ、そして発現されたErbb4抗体改変体が、所望の活性についてスクリーニングされる。

30

【0158】

アミノ酸配列挿入としては、1残基から100以上の残基を有するポリペプチドまでの長さの範囲のアミノ末端融合および/またはカルボキシ末端融合、ならびに単一または複数のアミノ酸残基の配列内挿入が挙げられる。末端挿入の例としては、N末端メチオニル残基を有するErbb4アンタゴニスト抗体、またはエピトープタグに融合された抗体が挙げられる。Erbb4アンタゴニスト抗体分子の他の挿入改変体としては、酵素、または抗体の血清半減期を増加させるポリペプチドの、Erbb4アンタゴニスト抗体のN末端もしくはC末端への融合物が挙げられる。

40

【0159】

改変体の別の型は、アミノ酸置換改変体である。これらの改変体は、Erbb4アンタゴニスト抗体分子における少なくとも1つのアミノ酸残基が除去され、そしてその位置に異なる残基が挿入されている。置換変異誘発のために最も関心ある部位としては、超可変領

50

域が挙げられるが、FR 改変もまた企図される。保存的置換は、「好ましい置換」との見出しの表 1 に示される。このような置換が生物学的活性における変化を生じる場合、より実質的な変化（表 1 において「例示的置換」と称されるか、またはアミノ酸クラスに関して以下にさらに記載されるような）が導入され得、そしてその産物がスクリーニングされ得る。

【 0 1 6 0 】

【 表 1 】

表 1

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucine	leu
Leu (L)	norleucine; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	Tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	Trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	Ile; leu; met; phe; ala; ユロイシン	leu

抗体の生物学的特性における実質的な改変は、（ a ）置換の領域におけるポリペプチド骨格の構造（例えば、シートまたはヘリックスコンホメーション）、（ b ）標的部位における分子の電荷または疎水性、あるいは（ c ）側鎖の嵩高さの維持に対するそれらの効果において有意に異なる置換を選択することによって達成される。天然に存在する残基は、共通の側鎖特性に基づいて以下のような群に分類される：

10

20

30

40

50

- (1) 疎水性 : ノルロイシン、m e t、a l a、v a l、l e u、i l e ;
- (2) 中性親水性 : c y s、s e r、t h r ;
- (3) 酸性 : a s p、g l u ;
- (4) 塩基性 : a s n、g l n、h i s、l y s、a r g ;
- (5) 鎖方向に影響を与える残基 : g l y、p r o ; および
- (6) 芳香族性 : t r p、t y r、p h e。

【 0 1 6 1 】

非保存的置換は、これらのクラスのうちの 1 つのメンバーを別のクラスのものに交換することを包含する。

【 0 1 6 2 】

E r b B 4 アンタゴニスト抗体の適切なコンホメーションの維持に関与しない任意のシステイン残基はまた、一般にセリンに置換されて、その分子の酸化に対する安定性を改善し得、そして異常な架橋を妨害し得る。逆に、システイン結合が、その抗体に付加されて、その安定性を改善し得る (特に、その抗体が F v フラグメントのような抗体フラグメントである場合) 。

【 0 1 6 3 】

特に好ましい型の置換改変体は、親の抗体 (例えば、ヒト化抗体またはヒト抗体) の 1 以上の超可変領域残基を置換することを包含する。一般に、さらなる開発のために選択された、これらの得られた改変体は、それらが生成される親抗体に比較して改善された生物学的特性を有する。このような置換改変体を生成するための簡便な方法は、ファージディスプレイを使用する、親和性成熟である。手短には、いくつかの超可変領域部位 (例えば、6 ~ 7 個の部位) を変異させて、各部位に全ての可能なアミノ置換を生成する。このように生成された抗体改変体は、糸状ファージ粒子から一価の様式で、各粒子内にパッケージングされた M 1 3 の遺伝子 I I I 産物に対する融合物として提示される。次いで、ファージディスプレイされた改変体を、本明細書において開示されるような、それらの生物学的活性 (例えば、アンタゴニスト活性) についてスクリーニングする。改変についての候補超可変領域部位を同定するために、アラニンスキャニング変異誘発を行って、抗原結合に有意に寄与する超可変領域残基を同定し得る。あるいは、またはさらに、抗原 - 抗体複合体の結晶構造を分析し、抗体と E r b B レセプターとの間の接触点を同定することも有利であり得る。このような接触残基および隣接する残基は、本明細書において説明される技術に従う置換のための候補である。一旦そのような改変体が生成されると、その改変体のパネルを本明細書において記載されるようなスクリーニングに供し、そして 1 以上の関連するアッセイにおいて優れた特性を有する抗体を、さらなる開発のために選択し得る。

【 0 1 6 4 】

その抗体の別の型のアミノ酸改変体は、抗体の元のグリコシル化パターンを変化させる。変化させることは、その抗体で見出される 1 以上の炭水化物部分を除去すること、および / または、その抗体に存在しない 1 以上のグリコシル化部位を付加すること、を意味する。

【 0 1 6 5 】

抗体のグリコシル化は、代表的には、N 結合型または O 結合型のいずれかである。N 結合型とは、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の結合をいう。トリペプチド配列アスパラギン - X - セリンおよびアスパラギン - X - トレオニン (ここで、X は、プロリンを除く任意のアミノ酸である) は、アスパラギン側鎖への炭水化物部分の酵素的結合のための認識配列である。従って、ポリペプチド中のこれらのトリペプチド配列のいずれかの存在は、潜在的なグリコシル化部位を生じる。O 結合型グリコシル化とは、ヒドロキシアミノ酸 (最も一般的には、セリンまたはトレオニンであるが、5 - ヒドロキシプロリンまたは 5 - ヒドロキシリジンもまた使用され得る) への、N - アセチルガラクトサミン、ガラクトースまたはキシロースのうちの 1 つの糖の結合をいう。

【 0 1 6 6 】

抗体へのグリコシル化部位の付加は、アミノ酸配列が 1 以上の上記のトリペプチド配列を

10

20

30

40

50

含むように（N結合型グリコシル化部位について）、そのアミノ酸配列を変化させることによって都合よく達成される。この変化はまた、元の抗体の配列への1以上のセリン残基またはトレオニン残基の付加または置換によって、なされ得る（O結合型グリコシル化部位について）。

【0167】

Er b B 4 アンタゴニスト抗体のアミノ酸配列改変体をコードする核酸分子は、当該分野で公知の種々の方法によって調製される。これらの方法としては、天然の供給源（天然に存在するアミノ酸配列改変体の場合）からの単離、あるいはEr b B 4 アンタゴニスト抗体の先に調製された改変体または非改変体バージョンのオリゴヌクレオチド媒介（または部位特異的）変異誘発、PCR変異誘発、およびカセット変異誘発による調製が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0168】

（ix）抗体の他の改変

本明細書中に開示されるEr b B 4 アンタゴニスト抗体はまた、免疫リポソームとして処方され得る。この抗体を含むリポソームは、Epsteinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688(1985); Hwangら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030(1980); ならびに米国特許第4,485,045号および同4,544,545号に記載されるような、当該分野において公知の方法によって調製される。増強された循環時間を有するリポソームが、米国特許第5,013,556号に開示される。

20

【0169】

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロールおよびPEG誘導体化ホスファチジルエタノールアミン（PEG-PE）を含む脂質組成物を用いる逆相蒸発（evaporation）法によって生成され得る。リポソームは、所望の直径を有するリポソームを得るために、規定されたポアサイズのフィルターを通して押し出される。本発明の抗体のFab'フラグメントは、ジスルフィド交換反応を介して、Martinら、J. Biol. Chem., 257:286-288(1982)に記載されるようなリポソームに結合体化され得る。化学療法剤（例えば、ドキソルピシン）は、必要に応じてこのリポソーム内に含まれる。Gabizonら、J. National Cancer Inst. 81(19):1484(1989)を参照のこと。

30

【0170】

本発明の抗体はまた、プロドラッグを抗癌薬物に変換させるプロドラッグ活性化酵素（例えば、ペプチジル化学療法剤（WO81/01145を参照のこと））にこの抗体を結合体化することによってADEPTにおいて使用され得る。例えば、WO88/07378および米国特許第4,975,278号を参照のこと。

【0171】

ADEPTに有用な免疫結合体の酵素成分は、プロドラッグをより活性で細胞傷害性の形態に変換するような様式でプロドラッグに作用し得る任意の酵素を含む。

【0172】

本発明の方法において有用な酵素としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：リン含有プロドラッグを遊離薬物に変換するに有用なアルカリホスファターゼ；スルフェイト含有プロドラッグを遊離薬物に変換するに有用なアリールスルファターゼ；非毒性5-フルオロシトシンを抗癌薬物5-フルオロウラシルに変換するに有用なシトシンデアミナーゼ；ペプチド含有プロドラッグを遊離薬物に変換するに有用な、プロテアーゼ（例えば、セラチアプロテアーゼ）、サーモリシン、サブチリシン、カルボキシペプチダーゼおよびカテプシン（例えば、カテプシンBおよびL）；D-アミノ酸置換基を含むプロドラッグを変換するに有用なD-アラニルカルボキシペプチダーゼ；グリコシル化したプロドラッグを遊離薬物に変換するに有用な炭水化物切断酵素（例えば、 α -ガラクトシダーゼおよびノイラミニダーゼ）； β -ラクタムで誘導体化されたプロドラッグを遊離薬物に変換するに有用な β -ラクタマーゼ；ならびに、そのアミン窒素においてそれぞれフェノ

40

50

キシアセチル基またはフェニルアセチル基で誘導体化されたプロドラッグを遊離薬物に変換するに有用なペニシリンアミダーゼ（例えば、ペニシリンVアミダーゼまたはペニシリンGアミダーゼ）。あるいは、「アブザイム」として当該分野において公知である酵素活性を有する抗体をまた使用して、本発明のプロドラッグを遊離活性薬物に変換し得る（例えば、Massey, Nature 328: 457-458 (1987)を参照のこと）。抗体-アブザイム結合体は、このアブザイムを腫瘍細胞集団に送達するために、本明細書中に記載のように調製され得る。

【0173】

本発明の酵素は、当該分野において周知の技術（例えば、上記の、ヘテロ二官能性架橋剤の使用）によってEr b B 4アンタゴニスト抗体に共有結合され得る。あるいは、本発明の酵素の少なくとも機能的に活性な部分に連結された、本発明の抗体の少なくとも抗原結合領域を含む融合タンパク質は、当該分野において周知の組換えDNA技術（例えば、Neubergerら、Nature 312: 604-608 (1984)）を使用して構築され得る。

10

【0174】

本発明の特定の実施形態において、インタクトな抗体よりも抗体フラグメントを使用することが所望され得る。この場合、その血清半減期を増加させるために、抗体フラグメントを改変することが所望され得る。これは、例えば、サルベージレセプター結合エピトープをこの抗体フラグメントに組み込むことによって（例えば、抗体フラグメント中の適切な領域の変異によって、またはこのエピトープを、抗体フラグメントのいずれかの末端もしくはその間で融合されるペプチドタグに組み込むことによって（例えば、DNA合成またはペプチド合成によって））達成され得る。1996年10月17日に公開されたWO 96/32478を参照のこと。

20

【0175】

サルベージレセプター結合エピトープは、一般に、F_Cドメインの1つまたは2つのループ由来の任意の1以上のアミノ酸残基がその抗体フラグメントの類似した位置に移入される。さらにより好ましくは、F_Cドメインの1つまたは2つのループ由来の3以上の残基が移入される。なおより好ましくは、このエピトープは、（例えば、IgGの）F_C領域のCH₂ドメインから獲得され、そして抗体のCH₁領域、CH₃領域もしくはV_H領域、または1より多くのこのような領域に移入される。あるいは、このエピトープは、F_C領域のCH₂ドメインから獲得され、そして抗体フラグメントのC_L領域もしくはV_L領域、またはこれらの両方に移入される。

30

【0176】

Er b B 4アンタゴニスト抗体の共有結合性改変はまた、本発明の範囲内に含まれる。これらは、適用可能な場合、抗体の化学合成または酵素的もしくは化学的な切断によってなされ得る。他の型の抗体の共有結合性改変は、選択された側鎖またはN末端残基もしくはC末端残基と反応し得る有機誘導剤を用いて抗体の標的化されたアミノ酸残基を反応させることによって、分子内に導入される。ポリペプチドの例示的共有結合性改変は、米国特許第5,534,615号（特に、本明細書中に参考として詳細に援用される）に記載される。好ましい型の抗体の共有結合性改変は、種々の非タンパク質ポリマーの1つ（例えば、米国特許第4,640,835号；同4,496,689号；同4,301,144号；同4,670,417号；同4,791,192号または同4,179,337号に記載される様式でのポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールまたはポリオキシアルキレン）への抗体連結を含む。

40

【0177】

（3．可溶性Er b B 4レセプターの調製）

可溶性Er b B 4レセプター（例えば、Er b B 4細胞外ドメイン）は、コード核酸を含むベクターを用いて形質転換またはトランスフェクトされた細胞を培養することによって調製され得る。もちろん、当該分野において周知である代替の方法がこのような可溶性レセプターを調製するために使用され得ることが意図される。例えば、可溶性レセプターの

50

配列、またはその一部は、固相技術（例えば、Stewartら、前出；およびMerrifield、前出を参照のこと）を使用する直接ペプチド合成によって生成され得る。インビトロタンパク質合成は、手動技術を使用してかまたは自動化によって実施され得る。自動化合成は、例えば、Applied Biosystems Peptide Synthesizer（Foster City, CA）を製造業者の手引書を用いて使用して達成され得る。可溶性レセプターの種々の部分は、別々に化学合成され得、そして、全長可溶性レセプターを生成するために化学法または酵素法を使用して連結され得る。

【0178】

可溶性Erbb4レセプターの組換え生成は、本質的に本明細書中上記のように、免疫付着因子（immunoadhesin）と組合わせて実施される。

10

【0179】

可溶性Erbb4レセプターの大規模生産のための最も簡便な方法は、Erbb4-Ig免疫付着因子からの切断によるものである。免疫付着因子と抗体との間の構造的類似性は、パバインのようなタンパク質分解酵素によって免疫付着因子を切断して「免疫付着」部分を含むFd様フラグメントを生成することが可能であり得ることを示唆する。免疫付着因子の切断のためのより一般的な手法を提供するために、標的配列に高度に特異的であるタンパク質分解酵素が使用されるべきである。この目的に適したタンパク質分解酵素は、配列AAHYTLを認識しかつ切断するサブチリシンBPNの操作された変異体である。Erbb4-IgG（例えば、IgG1）免疫付着因子の支持ヒンジ領域へのこの標的配列の導入は、Fcドメインとtrkドメインとの間の高度に特異的な切断を容易にする。IgG1免疫付着因子は、プロテインAクロマトグラフィーによって精製され、そしてこの酵素の固定化形態を用いて切断される。切断によって、2つの産物が生じる：Fc領域およびErbb4領域（これは、好ましくは、Erbb4細胞外ドメインである）。これらのフラグメントは、Fcを保持しそして通過した画分中に精製されたErbb4フラグメントを得るためのプロテインAカラムを通す第二の通過によって容易に分離され得る。同様の手法を使用して、下部のヒンジでの切断可能な配列を置換することによって、ダイマーErbb4部分を生成し得る。

20

【0180】

（4．治療組成物および治療方法）

Erbbファミリーのレセプターおよび対応するリガンドのメンバーは、種々の器官における平滑筋細胞増殖に関与する。従って、Erbb4レセプターアンタゴニストは、哺乳動物（例えば、ヒト）における平滑筋細胞増殖を含む種々の「疾患または障害」の処置のために利用され得る。

30

【0181】

好ましい実施形態において、本発明は、血管平滑筋細胞（VSMC）の増殖を含みそして内膜の過形成（例えば、血管狭窄、血管形成術（angioplasty）もしくは手術（surgery）またはステント移植片により生じる再狭窄）、アテローム硬化症および高血圧を導く心疾患（CasterellaおよびTeirstein、Cardiol. Rev. 7: 219 - 231（1999）；Andres、Int. J. Mol. Med. 2: 81 - 89（1998）；ならびにRosanioら、Thromb. Haemost. 82（suppl 1）: 164 - 170（1999）に総説される）の処置のためのErbb4レセプターアンタゴニストの使用に関する。種々の細胞および放出されたサイトカイン（これは、オートクライン様式、パラクリン様式またはジャクスタクリン様式で作用し、培地中での正常な位置から損傷した内膜へのVSMCの移動を生じる）の複雑な相互作用が存在する。移動したVSMCは、過剰に増殖し、そして内膜の肥厚を導き、これは、血管の狭窄または閉塞を生じる。損傷部での血小板の凝集および沈着によって、問題が重なり合う。多機能性セリントタンパク質分解酵素である - トロンピンは、血管損傷部で濃縮されそしてVSMC増殖を刺激する。このレセプターの活性化に続いて、VSMCは、種々のオートクライン増殖因子（PDGF-AA、HB-EGFおよびTGF-を含む）を生成かつ分泌する（StoufferおよびRunge、Semin.

40

50

Thromb. Hemost. 24: 145 - 150 (1998) に総説される)。

【0182】

EGFファミリーの種々のメンバーは、正常な増殖および血管の維持ならびに病的状態において重要な役割を担う。例えば、ヘパリン結合EGF様増殖因子(HB-EGF)は、強力なミトジェンであり、そして繊維芽細胞およびVSMC(内皮細胞ではない)についての走化性因子である(RaabおよびKlagsbrun、Biochim. Biophys. Acta 1333: F179 - 199 (1997) に総説される)。強力な脈管形成因子である血管内皮増殖因子(VEGF)は、血管内皮細胞におけるHB-EGFの発現を誘導する(Arkonaćら、J. Biol. Chem., 273: 4400 - 4405 (1998))。HB-EGFは、最終的には繊維芽細胞およびVSMCの移動および増殖を生じるシグナル伝達カスケードを開始するHER1レセプターおよびErbB4レセプターに結合しかつ活性化する。HB-EGFはまた、VSMCを刺激して、内皮細胞に対してミトジェンの種々の因子を分泌する(Abramovitchら、FEBS Lett. 425: 441 - 447 (1998))。さらに、これはまた、内皮細胞において走化性応答を誘導する。同様に、EGFレセプターを活性化する別のリガンドであるエピレグリン(epiregulin)は、アンギオテンシンII、エンドセリン-1およびトロニンを用いて刺激されたVSMCによって分泌され、またVSMCの増殖についての強力なミトジェンとして作用する(Taylorら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 1633 - 1638 (1999))。

10

【0183】

血管狭窄は、血流に対する増加した抵抗の結果として高血圧を生じる。さらに、組織に供給される血液の減少はまた、壊死を生じ、そして重篤な損傷を導く炎症性応答を誘導する。例えば、心筋梗塞は、酸素欠乏および心筋組織の局所的死亡の結果として生じる。経皮的透過性冠動脈血管形成術(PTCA)(単に、バルーン血管形成術という)は、閉塞性冠状動脈疾患についての非外科的カテーテルベースの処置である。この方法では、カテーテルは血管に導入され、そしてバルーンは、斑を機械的に除くためにこの斑の部位で膨らませられる。あるいは、ステントは、滑らかな血流を回復させるために移植される。しかし、新たな内膜の形成は、移植されたステント内でさえ生じる(ステント内(in-stent)再狭窄として既知である)。例えば、ステントの配置は、初期の血栓沈着および急性の炎症、肉芽組織の発達、ならびに最終的には平滑筋細胞増殖および細胞外マトリクス合成を生じる(VirmaníおよびFarb、Curr. Opin. Lipidol. 10: 499 - 506 (1999) に総説される)。バイパス手術は、重篤な場合においてのみ罹患した血管を回避するために実施され、通常は、複数回の血管形成術が、血流を回復しそこなった後にのみ実施される。

20

30

【0184】

バルーン血管形成術が狭窄の処置のために広く使用されているが、その長期の成功は、再狭窄によって制限される。再狭窄は、PTCA後に血管開存性の維持における制限因子として持続し、30~50%の患者に生じそして顕著な罹患率および健康管理の経費の原因となる。再狭窄の潜在的な機構は、血管の反動、消極的な血管再モデル化、血栓形成および新たな内膜の過形成からの影響の組み合わせから構成される。重要なことには、これらの事象は、相互連絡している。例えば、新たな過形成は、増殖因子によって刺激され、これは、局所の血栓および損傷した動脈セグメント自体によって放出され、そして急性の増殖性応答および炎症性応答を生じる他の増殖刺激タンパク質の発現を増強するように作用する。例えば、内皮損傷は、VSMCにおけるEGF、EGF様因子およびEGFRの発現を誘導し、これらは、内膜の肥厚および再狭窄を導く増殖を刺激するようにオートクライン様式で作用する。血管壁における細胞外マトリクス(ECM)の形成および蓄積は、バルーン血管形成術後に発達する再狭窄損傷の別の重要な構成要素である。

40

【0185】

再狭窄を防止する目的で多数の薬理学的試験が行われてきたが、そのほとんどが利点を示さなかった。種々の血管再生術装置、抗血小板薬物、抗血栓薬物および抗炎症薬物を使用

50

する再狭窄予防における初期の臨床試験は、一様に陰性であった (Casterella および Teirstein、Cardiol. Rev. 7: 219 - 231 (1999) ; Andres、Int. J. Mol. Med. 2: 81 - 89 (1998) ; ならびに Rosanioら、Thromb. Haemost. 82 (suppl 1): 164 - 170 (1999) に総説される)。近年のあらゆる進歩にもかかわらず、狭窄、またはバルーン血管形成術もしくはステント移植の後の再狭窄の予防のために十分な処置はなお存在しない。限定された成功がささいな無作為試験において達成されたが、狭窄、特に再狭窄は、主要な臨床問題である。本発明は、血管平滑筋細胞の増殖を制御することによる狭窄または再狭窄の処置のための ErbB4 レセプターアンタゴニストを開示する。

【0186】

10

しかし、本発明の範囲は、血管平滑筋細胞の障害に限定されない。本発明の範囲は特に、任意の器官における平滑筋細胞の増殖から生じる任意の障害ならびに ErbB4 レセプターおよび / または対応するリガンドの活性な役割を含む任意の障害を含む。

【0187】

乳児肥厚性幽門狭窄 (IHPS) は、最初に乳児を冒す比較的一般的な疾患である。潜在的な狭窄は、幽門管の機能的閉塞を生じる。従って、乳のない胃は、ひどく荒れている。IHPS は、幽門平滑筋の塊の肥厚および過形成を含み、そして幽門狭窄を生じる (Oue および Puri、Pediatr. Res. 45: 853 - 857 (1999))。さらに、EGF、EGF レセプターおよび HB-EGF の増加した発現は、コントロール組織と比較して、IHPS 患者由来の幽門の環状かつ長軸方向の筋肉中の SMC において報告されている (Shimara、Pediatr. Res. 47: 201 - 207 (2000))。本明細書中に開示される ErbB4 アンタゴニストは、幽門平滑筋細胞の増殖の制御における使用を見出し得、従って、幽門狭窄の処置における使用を見出し得る。

20

【0188】

平滑筋細胞の収縮性の特性および種々の因子による平滑筋細胞の収縮の調節は、膀胱、尿管および尿道を含む尿収集系において重大な役割を担う。HB-EGF の膜結合前駆体形態は、膀胱平滑筋細胞および上皮細胞において発現される (Freemanら、J. Clin. Invest. 99: 1028 - 1036 (1997) ; Kaeflerら、J. Urol. 163: 580 - 584 (2000))。さらに、膜結合 HB-EGF をレセプターとして利用することが公知であるジフテリア毒素を用いる膀胱 SMC の処置は、これらの細胞の増殖を阻害した (Kaeflerら、前記)。HB-EGF は、膀胱 SMC 増殖のための強力なミトジェンであり、そして、これらの細胞によって発現される ErbB1 (HER1) レセプターに結合することによって作用し、従って、オートクライン増殖因子として作用する (Borerら、Lab Invest. 79: 1335 - 1345 (1999))。この筆者らはまた、膀胱 SMC 上に ErbB4 レセプターではない ErbB2 レセプターおよび ErbB3 レセプターの発現を実証した。これらの知見は、HB-EGF が下部尿路を冒す閉塞症候群に応じて生じる膀胱壁肥厚において役割を担う可能性を提起する。従って、本発明の ErbB4 アンタゴニスト、特に ErbB4 免疫付着因子は、膀胱平滑筋細胞の増殖を制御する際の有用性を証明し得、従って、尿閉塞症候群の予防または処置の際の有用性を証明し得る。

30

40

【0189】

閉塞性気道疾患は、平滑筋細胞増殖を含む潜在的病理学を有するさらに別の疾患群である。この群の1つの例は、喘息であり、これは、気道の炎症および気管支収縮において顕著である。EGF は、ヒト気道 SMC の増殖を刺激することが示され、そして閉塞性気道疾患における気道 SMC の病理学的増殖に関連する因子の1つであるようである (Cerutiら、Am. J. Physiol. 273: L10 - 15 (1997) ; Cohenら、Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 16: 85 - 90 (1997))。従って、本発明の ErbB4 アンタゴニストは、閉塞性気道疾患の処置のために使用され得る。

【0190】

50

患者の細胞にインビボおよびエキソビボで核酸（必要に応じて、ベクターに含まれる）を導入するための2つの主要な手法が存在する。インビボ送達のために、核酸は、一般にはキメラなヘテロ付着因子が要求される部位で患者に直接注入される。エキソビボ処置のために、患者の細胞は取り出され、核酸はこれらの単離された細胞に導入され、そしてこの改変された細胞は直接にか、または例えば、患者内に移植される多孔性膜内にカプセル化されるかのいずれかで患者に投与される（例えば、米国特許第4,892,538号および同第5,283,187号を参照のこと）。

【0191】

生存細胞に核酸を導入するために利用可能な種々の技術が存在する。これらの技術は、培養細胞内にインビトロで移入されるか、または意図された宿主の細胞内にインビボで移入されるかに依存して変化する。インビトロでの哺乳動物細胞への核酸移入に適切な技術としては、リボソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、DEAE-デキストラン、リン酸カルシウム沈殿法などの使用が挙げられる。

10

【0192】

遺伝子のエキソビボ送達のために一般的に使用されるベクターは、レトロウイルスウイルスである。現在好ましいインビボ核酸移入技術としては、ウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルスI、またはアデノ随伴ウイルス）を用いるトランスフェクション、および脂質ベース系（遺伝子の脂質媒介移入に有用な脂質は、例えば、DOTMA、DOPEおよびDC-Cholである）が挙げられる。いくつかの状況において、標的細胞を標的化する因子（例えば、細胞表面膜タンパク質または標的細胞に特異的な抗体、標的細胞上のレセプターに対するリガンドなど）とともに核酸供給源を提供することが所望される。リボソームが使用される場合、エンドサイトーシスに関連する細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質は、例えば、特定の細胞型を指向するカプシドタンパク質またはそのフラグメント、循環における内部移行を行うタンパク質に対する抗体、ならびに細胞内局在を標的化しかつ細胞内半減期を増強するタンパク質を標的化するために、ならびに/または取り込みを容易にするために使用され得る。レセプター媒介エンドサイトーシスの技術は、例えば、Wuら、J. Biol. Chem., 262: 4429-4432 (1987)、およびWagnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 3410-3414 (1990)によって記載される。現在公知の遺伝子標識（marking）プロトコルおよび遺伝子治療プロトコルの総説については、Andersonら、Science 256: 808-813 (1992)を参照のこと。また、WO93/25673およびその中に引用される参考文献を参照のこと。

20

30

【0193】

治療的処方物は、凍結乾燥した塊または水溶液の形態で、所望の程度の純度を有するErbb4アンタゴニストを、最適な生理学的に受容可能なキャリア、賦形剤または安定化剤と混合することによる貯蔵のために調製される（Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition, Osol., A., Ed., (1980)）。薬学的に受容可能なキャリア、賦形剤または安定化剤は、使用される投与量および濃度でレシipientに対して非毒性であり、そしてこれらとしては以下が挙げられる：リン酸、クエン酸、および他の有機酸のような緩衝液；アスコルビン酸を含む抗酸化剤；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリンのようなタンパク質；ポリビニルピロリドンのような親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンもしくはリジンのようなアミノ酸；グルコース、マンノースまたはデキストリンを含む、モノサッカリド、ジサッカリドおよび他の炭水化物；EDTAのようなキレート剤；マンニトールまたはソルビトールのような糖アルコール；ナトリウムのような塩形成対イオン；ならびに/あるいはTween、プルロニクス（Pluronic）またはポリエチレングリコール（PEG）のような非イオン性界面活性剤。

40

【0194】

インビボ投与のために使用される抗体または免疫付着因子は、滅菌されなければならない

50

。これは、凍結乾燥および再構成の前または後に滅菌濾過膜を通す濾過によって容易に達成される。この処方物は、通常は凍結乾燥形態または溶液で貯蔵される。

【0195】

治療組成物は、一般に滅菌アクセス口を有する容器（例えば、皮下注入針によって貫通可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグまたは瓶）内に置かれる。

【0196】

抗体、免疫付着因子またはキメラヘテロ付着因子の投与経路（例えば、静脈、腹腔内、脳内、筋肉内、眼内、動脈内もしくは病巣内の経路、または下記のような徐放系の注射または注入）は、公知の方法に従う。ヘテロ付着因子または抗体は、注入または多孔性注射によって連続的に投与される。

10

【0197】

徐放性調製物の適切な例としては、マトリクスが造形品の形態（例えば、フィルムまたはマイクロカプセル）であるタンパク質を含む固体疎水性ポリマーの半透過性マトリクスが挙げられる。徐放性マトリクスの例としては、以下が挙げられる：ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、Langerら、J. Biomed. Mater. Res., 15: 167 - 277 (1981) および Langer, Chem. Tech., 12: 98 - 105 (1982) によって記載されるようなポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)、またはポリ(ビニルアルコール)、ポリラクチド(米国特許第3,773,919号、EP 58,481)、L-グルタミン酸およびエチル-L-グルタミン酸のコポリマー(Sidmanら、Biopolymers, 22: 547 - 556 (1983))、非分解性エチレン-酢酸ビニル(Langerら、前出)、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー(例えば、ルプロンディポット(Lupron Depot)(乳酸-グリコール酸コポリマーおよびロイプロリド(leuprolide)酢酸からなる注入可能なミクロスフィア))、およびポリ-D-()-3-ヒドロキシ酪酸(EP 133,988)。

20

【0198】

徐放性Erbb4アンタゴニストとしてはまた、リポソームで包まれた薬物が挙げられる。Erbb4アンタゴニストを含むリポソームは、それ自体公知の方法によって調製される：Epsteinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3688 - 3692 (1985)；Hwangら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4030 - 4034 (1980)；EP 52,322；EP 36,676；EP 88,046；EP 143,949；EP 142,641；日本国特許出願83-118008；米国特許第4,485,045号および同第4,544,545；ならびにEP 102,324。通常、リポソームは、小さい(約200~800オングストローム)単層型であり、ここで、その脂質含量は、約30モル%コレステロールより多く、選択された割合は、最適な治療のために調整される。特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロールおよびPEG誘導体化ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含む脂質組成物を用いる逆相エバポレーション法によって生成され得る。リポソームは、所望の直径を有するリポソームを得るために規定されたポアサイズのフィルターを通して押し出される。化学療法剤(例えば、ドキソルピシン)は、必要に応じてリポソーム内に含まれる。Gabizonら、J. National Cancer Inst. 81(19): 1484 (1989)を参照のこと。

30

40

【0199】

本発明のErbb4アンタゴニストを使用して、Erbb4リガンドを結合および分離するか、またはErbb4レセプターをブロックし、これにより細胞におけるErbb4活性化および細胞増殖を阻害し得る。本発明のErbb4アンタゴニストは、化学療法剤のような他の治療とともに患者に投与され得る。このような化学療法剤についての調製および投薬スケジュールは、製造業者の指示書に従ってかまたは当業者によって経験的に決定されたように使用され得る。このような化学療法剤についての調製および投薬スケジュールはまた、Chemotherapy Service Ed., M. C. Perry,

50

Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)に記載される。化学療法剤は、アンタゴニスト投与前または後に行われ得るか、あるいは同時に与えられ得る。

【0200】

治療的に使用されるべきアンタゴニストの有効量は、例えば、治療の目的、投与経路、および患者の状態に依存する。従って、最大治療効果を得るために必要とされる場合、投薬量を滴定し (titer) そして投与経路を改変することは、療法士にとって必要である。代表的な投薬量は、患者の体重あたり約 $1 \text{ g/kg} \sim 100 \text{ mg/kg}$ までの範囲、好ましくは $10 \text{ g/kg} \sim 10 \text{ mg/kg}$ であり得る。代表的には、臨床医は、上記の障害の処置について所望の効果を達成する投薬量に届くまでアンタゴニストを投与する。

10

【0201】

(5. 平滑筋細胞の増殖または移動を阻害または増強する分子を同定するための方法)
本発明は、平滑筋細胞の増殖を阻害または増強し得る分子を同定するためのスクリーニング方法を開示する。例えば、候補分子を、Erbb4レセプターの細胞外ドメインを含むポリペプチドとともにインキュベートし、続いて、平滑筋細胞の培養物に添加し、そして細胞の増殖に対する効果を決定する。Erbb4レセプターは、ネイティブなErbb4レセプター (例えば、ヒトErbb4レセプター) であってもネイティブなErbb4レセプターのアミノ酸配列と少なくとも85%の配列同一性を有するポリペプチドであってもよい。細胞増殖は、多くの方法でモニターおよび定量され得る。例えば、 ^3H -チミジンのDNAへの取り込みは、細胞増殖を示す細胞内DNA合成をモニターするための十分確立された方法である。 ^3H -チミジンのDNAへの取り込みは、オートラジオグラフィーにおける銀粒子の数の顕微鏡的な計数、または生化学的に液体シンチレーション計数のいずれかによってモニターされる。同様に、5-ブromo 2'-デオキシウリジン (BrdU) の細胞DNAへの取り込みは、顕微鏡的または免疫学的のいずれかによってモニターされ得る。両方のアッセイは、DNAに取り込まれたBrdUを認識する高度に特異的なモノクローナル抗体を使用する。顕微鏡アッセイにおいて、細胞を、透過性にし、BrdU特異的なモノクローナル抗体と反応させ、続いて、二次抗体で標識する。二次抗体は、蛍光色素 (フルオレセインイソチオシアネート (FITC)、ローダミン、テキサスレッドなど) または酵素標識 (アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼなど) のような付着した標識によって検出される。次いで、酵素反応の際に不溶性産物を生成する適切な基質を使用して、酵素標識二次抗体を示しかつ定量する。酵素アッセイは、適切な免疫アッセイ (例えば、ELISA) によってBrdU特異的なモノクローナル抗体の量をモニターする。BrdUに対して特異的なモノクローナル抗体、ならびにこのような抗体を備えるELISAキットは、多くの供給源 (Boehringer Mannheimを含む) から市販されている。フローサイトメトリーをまた使用して、細胞増殖をモニターし得る。この方法において、細胞は、細胞あたりの核DNA含量に基づいて分画される。核DNA含量が細胞周期の相 (G1期で2n、G2+M期で4nおよびS期で中間の値、ここで、nは、ハプロイド核DNA含量の値) に依存して分裂する細胞の間で変動するので、細胞増殖は、この手法を用いてS期とG2+M期とにおいて細胞の画分を見積もることによって迅速にモニターされ得る。

20

30

40

【0202】

平滑筋細胞のErbb4依存的な増殖がErbb4レセプターを利用するリガンド媒介シグナル伝達経路を含むので、この経路における任意の工程は、モニターされ得、そして細胞増殖の基準として使用され得る。このような工程の1つは、Erbb4レセプターのリガンド誘導性チロシン自己リン酸化であり、ここで、WO 95/14930に記載されるようなキナーゼレセプター活性化 (KIRA) アッセイによってモニターされ得る。このELISA型アッセイは、Erbb4のようなレセプタータンパク質チロシンキナーゼのキナーゼドメインの自己リン酸化を測定することによって、キナーゼ活性化の定性的測定または定量的測定に適切である。このアッセイの第1段階は、平滑筋細胞の細胞膜に存在するErbb4レセプターのキナーゼドメインのリン酸化である。代表的には、第1固相 (

50

例えば、第1アッセイプレート(ウェル)は、平滑筋細胞の実質的に均一な集団でコートされる。接着細胞であるので、平滑筋細胞は、第1固相に自然と接着する。キナーゼレセプターおよびflagポリペプチドの融合物を含む「レセプター構築物」でトランスフェクトされた平滑筋細胞もまた、使用され得る。flagポリペプチドに特異的な抗体を、アッセイのELISA部分において使用して、flagポリペプチドを用いてレセプターを捕獲し得る。次いで、候補分子、およびネイティブなErbb4レセプターの細胞外ドメインを含むポリペプチドを、平滑筋細胞を含むウェルに添加し、続いて、KIRAアッセイによってErbb4レセプターのチロシン自己リン酸化をモニターする。Erbb4レセプターの細胞外ドメインのアミノ酸配列と少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドもまた、このアッセイにおいて使用され得る。暴露に続いて平滑筋細胞を、溶解緩衝液(この中に可溶化する界面活性剤を有する)を使用して可溶化し、穏やかに攪拌し、これにより、細胞融解物の濃縮または清澄化の必要なく、このアッセイのELISA部分に直接供され得る細胞融解物を放出する。

10

【0203】

次いで、調製した細胞溶解物は、アッセイの第2(ELISA)段階に供される。ELISA段階での第1工程のように、第2固相(通常、ELISAマイクロタイタープレートのウェル)は、捕獲因子(しばしば捕獲抗体)でコートされる。これは、Erbb4レセプターに、レセプター構築物の場合、flagポリペプチドに特異的に結合する。第2固相のコーティングは、この捕獲因子が第2固相に接着するように実施される。この捕獲因子は、一般にモノクローナル抗体であるが、ポリクローナルもまた使用され得る。次いで、得られた細胞溶解物は、接着する捕獲因子に暴露されるか、または接触させられる。その結果、レセプターまたはレセプター構築物は、第2固相に接着する(または捕獲される)。次いで、洗浄工程が、非結合の細胞溶解物を除いて捕獲したレセプターまたはレセプター構築物を残すように実施される。次いで、接着するかまたは捕獲されたレセプターまたはレセプター構築物は、チロシンキナーゼレセプター中のリン酸化したチロシン残基を同定する抗ホスホチロシン抗体に暴露されるかまたは接触させられる。好ましい実施形態において、抗ホスホチロシン抗体は、非放射性の着色試薬の変色を触媒する酵素に(直接的または間接的に)結合体化される。従って、レセプターのリン酸化は、次に起こるこの試薬の変色によって測定され得る。この酵素は、抗ホスホチロシン抗体に直接的に結合され得るか、または結合体化分子(例えば、ビオチン)が抗ホスホチロシン抗体に結合体化され得、続いてこの酵素は、結合体化した分子を介して抗ホスホチロシン抗体に結合され得る。最終的に、抗ホスホチロシン抗体の、捕獲されたレセプターまたはレセプター構築物への結合は、例えば、着色試薬の変色によって測定される。市販の抗ホスホチロシン抗体は、このアッセイに使用され得る。

20

30

【0204】

本発明はまた、平滑筋細胞の移動を阻害または増強し得る分子をスクリーニングする方法を提供する。この型の1つは、区画化された走化性細胞培養物チャンバー(例えば、Neuroprobe Inc., Gaithersburg, MDから入手可能なNeuroprobe ChemoTX走化性チャンバー)を利用する。この方法において、多孔性フィルターは、化学誘引物質(例えば、トロニピン)を含む下部チャンバー内の培地から上部チャンバー内の平滑筋細胞を分離する。平滑筋細胞は、候補分子、およびErbb4レセプターの細胞外ドメインを含むポリペプチドとともにインキュベートされる。インキュベーション期間の終わりに、フィルターを染色し、そしてフィルターの底に移動した平滑筋細胞を、倒立顕微鏡を使用して計数する。

40

【0205】

化合物の従来のライブラリーまたはコンビナトリアルライブラリーは、スクリーニング目的に使用され得る。高スループットに適用される自動化手法は、このアッセイについて簡便に使用され得る。しかし、スクリーニングアッセイは、低分子のみに限定されず、抗体のような巨大分子でさえも、このスクリーニングに使用され得る。

【0206】

50

(実施例)

以下の実施例は、例示の目的で示され、そして限定の目的ではない。これらの実施例は、本発明の化合物、組成物および方法をどのように作製しそしてどのように使用するかについての完全な開示および記載を当業者に提供するように提供され、そして本発明者らが本発明としてみなすものの範囲を限定することを意図しない。使用した数（例えば、量、温度など）に関して精度を保障するように努力がなされたが、いくつかの実験的誤差および偏差は、考慮されるべきである。他で示されない限り、部は、重量部であり、温度は、摂氏であり、そして圧力は、大気圧またはほぼ大気圧である。本明細書中の引用全ての開示は、本明細書中に参考として明確に援用される。

【0207】

10

(実施例1：免疫付着因子およびキメラヘテロマルチマー免疫付着因子の構築、単離および生化学的特徴付け)

独特なM1uI部位を、免疫グロブリンのヒンジドメインをコードする領域でヒトIgG重鎖を発現するプラスミド(pDR、J. RidgewayおよびP. Carter, Genentech, Inc. から供与)中に操作した。M1uI部位もまた、これらのレセプターのECD/TM連結部をコードする領域でErbB4発現プラスミドのセット中に操作した。全ての変異誘発を、Kunkel法(Kunkel, T., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488(1985))を使用して実施した。このM1uI部位を利用して、適切なErbB4-IgG融合構築物を作製した。ErbB4-IgGキメラの融合連結は： $G^{640}_{ErbB4}-(TR)-DKTH^{224}_{VH}$ 、ここで、ErbB4ポリペプチドのアミノ酸番号付けは、Plowmanら(Plowman, G. D. ら(1993a)PNAS USA 90:1746-1750)に記載される。保存されたTR配列は、このM1uI部位に由来する。この融合構築物の調製において使用したFc領域の配列は、Ellison, J. W. ら(Ellison, J. W. ら、(1982)NAR 10:4071-4079)に見出される。最終発現構築物は、pRK型プラスミド骨格中であつた。ここで、真核生物発現を、CMVプロモーター(Gormanら、DNA Prot. Eng. Tech. 2:3-10(1990))によって駆動する。

20

【0208】

インビトロ実験のためのタンパク質を得るために、接着HEK-293細胞(ATCC番号CRL-1573)を、標準リン酸カルシウム法(Gorman、前出、およびHuangら、Nucleic Acids Res. 18:937-947(1990))を使用して、発現プラスミドを用いてトランスフェクトした。血清含有培地を、トランスフェクションの15時間後に血清のない培地と置換し、そしてトランスフェクトした細胞を、5~7日間インキュベートした。生じた馴化培地を回収し、そしてプロテインAカラム(1mL Pharmacia HiTrap)を通した。精製したIgG融合物を、0.1Mクエン酸(pH4.2)を用いて1M Tris(pH9.0)を含むチューブ中に溶出した。溶出したタンパク質を、続いてPBSに対して透析し、そしてCentri-prep-30フィルター(Amicon)を使用して濃縮した。25%の最終濃度までグリセロールを添加し、そしてこの物質を、-20で貯蔵した。物質の濃度を、Fc-ELISAを介して決定した。

30

40

【0209】

(^{125}I -HRG結合アッセイ)

HRG 1(177-244)のEGF様ドメインを、以前に記載されたように(Sliwowski, M. ら、J. Biol. Chem. 269:14661-14665(1994))、E. coliにおいて発現させ、精製し、そして放射性ヨウ素標識した。チャイニーズハムスター卵巣細胞において発現された全長rHRG 1を、ウェスタンブロット分析に使用した。結合アッセイを、Nuncブレイクアパートイムノモジュール(break apart immuno-module)プレートにおいて実施した。プレートのウェルを、4で一晩、50mMカルボネート緩衝液(pH9.6)中の5g/m

50

lヤギ抗ヒト抗体 (Boehringer Mannheim) 100 l でコーティングした。プレートを、200 l の洗浄緩衝液 (PBS / 0.05% Tween-20) で2回リンスし、次いで、100 l の1% BSA / PBS と共に30分間室温にて短期間インキュベートした。緩衝液を除去し、そして各ウェルを、1% BSA / PBS 中のIgG融合タンパク質100 l と共に、激しい側方 (side-to-side) 回転下で1時間インキュベートした。プレートを、洗浄緩衝液で3回リンスし、そして種々の量の冷却競合物-HRGおよび¹²⁵I-HRG 1を添加し、そして激しい側方回転と共に2~3時間室温にてインキュベートすることによって、競合的結合を実施した。ウェルを、洗浄緩衝液で迅速に3回リンスし、排出し、そして個々のウェルを、100 Series Iso Data 計数器を使用してカウントした。スキッチャード分析を、改変されたリガンドプログラム (Munson, P. および Robard, D. (1980) Analytical Biochemistry 107: 220-239) を使用して実施した。

10

【0210】

(³H-チミジン取り込みアッセイ)

トリチウム化チミジン取り込みアッセイを、96ウェル様式で実施した。MCF7細胞を、50:50のF12 / DMEM (高グルコース) 0.1% 胎仔ウシ血清 (100 ml) 中において10,000細胞 / ウェルでプレATINGした。細胞を3時間静置させ、その後、ErbB4-IgG融合タンパク質および / またはヒレグリンをこのウェルに添加し (200 ml の最終容量)、そしてこのプレートを、37 °C の組織培養インキュベーター内において15時間インキュベートした。トリチウム化チミジンを、このウェルに添加し (20 ml の1/20希釈トリチウム化チミジンストック: Amersham TRA 120 B363、1 mCi / ml)、そしてこのプレートをさらに3時間インキュベートした。次いで、トリチウム化物質を、Packard Filtermate 196 ハーベスターを使用して、GF / Cユニフィルター (unifilter) (96ウェル様式) 上に収集した。フィルターを、Packard Topcount 装置を使用して計数した。

20

【0211】

(実施例2: ヒト大動脈平滑筋細胞の増殖に対するErbB4-IgG免疫付着因子 (Immuno adhesion) の効果)

30

ヒト大動脈平滑筋細胞 (Clonetics) を、96ウェル組織培養プレートにおいて約50%コンフルエント密度 (5000細胞 / ウェル) で播種し、そしてSM2培地 (Clonetics) 中で一晩インキュベートした。翌日、この培地を、ITS (1x)、2 mM L-グルタミン、50 µg / ml アスコルビン酸、26.5 mM NaHCO₃、100 U / ml ペニシリン、100 U / ml ストレプトマイシンおよび0.1% (v/v) 胎仔ウシ血清を補充した、M199に交換した。この細胞を、さらに16時間インキュベートした。次いで、この細胞を、Her4-IgG (400 nM) または緩衝液のいずれかで1時間処理し、次いで、PDGF (100 ng / ml) で40時間処理した。コントロール細胞を未処理のままにして、細胞増殖の基底レベルを推定した。BrdU (PBS中で調製された5-ブromo-2'-デオキシウリジンの10 µM溶液の10 µl / ウェル) のアリコートを追加し、そしてこの細胞を、さらに2時間インキュベートした。細胞増殖を、付着細胞についての製造業者の指示書に従ってBrdU ELISA (Cell proliferationキット, Boehringer mannheim, カタログ番号 1647 229) を使用してBrdU取り込みを定量することによってモニターした。

40

【0212】

図5に示されるように、PDGFは、以前の報告 (Rossら、, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 12: 155-169 [1990]) と一致して、大動脈平滑筋細胞の増殖を刺激した。ErbB4-IgG免疫付着因子での細胞の前処理は、PDGFによって刺激される細胞増殖の程度を低下させた。Erb

50

B 4 - I g G の代わりに緩衝液で処理されたコントロール細胞は、細胞増殖に対していかなる有意な影響をも示さなかった。これらのデータにより、平滑筋細胞の有糸分裂応答の少なくとも一部は E r b B 4 レセプターの活性化によって媒介されること、および E r b B 4 免疫付着分子を用いて、E r b B 4 レセプターを活性化するリガンドを除去することにより、P D G F への応答における平滑筋細胞増殖が低下されることが示される。

【 0 2 1 3 】

(実施例 3 : ヒト大動脈平滑筋細胞の移動に対する E r b B 4 - I g G 免疫付着因子の効果)

ヒト大動脈平滑筋細胞をトリプシン処理し、そして 1 0 % F B S を含む D M E 中に 5×10^5 細胞 / m l の濃度で再懸濁した。細胞を、H e r 4 - I g G (4 0 0 n M) または緩衝液と共に 1 5 分間プレインキュベートした。C h e m o T X 走化性チャンパー (N e u r o p r o b e I n c . , C a t 1 1 6 - 8) の下部のウェルに、3 0 0 μ l の 2 U / m l ヒトトロンピンまたは緩衝液 (P B S) ネガティブコントロールの溶液を満たした。フィルターをチャンパーの頂部にマウントし、そして平滑筋細胞 (緩衝液または E r b B 4 処理) を、5 0 μ l の容量の上部ウェルに添加した。このプレートおよびフィルターを、透明なプラスチックのフタで覆い、そして 5 % C O ₂ を有する加湿空気中において 3 7 °C で 3 時間インキュベートした。このインキュベーションの終了時に、フィルターを取り除き、そしてその上面を Q - t i p で拭いて、残存するすべての細胞を取り除いた。このフィルターを、D i f - Q u i c k 染色溶液で染色し、そしてフィルターの下部に移動した細胞の数を、倒立位相差顕微鏡を用いて計数した。各群における 6 つのウェルおよび各ウェルにおける 4 0 箇所の視野を計数した。

【 0 2 1 4 】

図 6 に示されるように、トロンピンは、走化性刺激として作用し、そして大動脈平滑筋細胞の移動を誘導した。E r b B 4 - I g G 免疫付着因子は、トロンピンによって刺激される細胞の移動を阻害した。これらのデータにより、トロンピンが、平滑筋細胞の移動を刺激する能力の少なくとも一部分は、E r b B 4 レセプターに対するリガンドの放出によって媒介されること、および E r b B 4 免疫付着分子を用いて、これらのリガンドを除去することにより、トロンピンへの走化性応答が低下されることが示される。

【 0 2 1 5 】

(実施例 4 : 抗 E r b B 4 モノクローナル抗体の産生および特徴付け)

(抗 E r b B 4 M a b の生成)

E r b B 4 の細胞外ドメインに特異的に結合する 3 4 個のマウスモノクローナル抗体のパネルを、従来のハイブリドーマ技術を使用して作製した (表 2)。総細胞性 R N A を、M D A - M B - 4 5 3 細胞から抽出し、そして R T - P C R におけるテンプレートとして使用して、ヒト E r b B 4 細胞外ドメイン (E C D) コード配列を生成した。R T - P C R 反応に使用される特定のオリゴヌクレオチドを、E r b B 4 の D N A 配列に基づいて合成した。g D E r b B 4 - E C D 融合タンパク質を、ヒト E r b B 4 のアミノ酸 2 6 ~ 6 4 0 をコードする配列に対して単純ヘルペスウイルス 1 型糖タンパク質 D のアミノ酸 1 ~ 5 2 のコード配列を連結することによって構築した。g D E r b B 4 - E C D - c D N A を、サイトメガロウイルスに基づく発現ベクター p R K 5 に挿入した。この構築物を、標準的なリン酸カルシウム沈降プロトコルを使用して、ヒト胚腎臓 2 9 3 細胞中に一過的にトランスフェクトした。

【 0 2 1 6 】

アフィニティカラムを、C N B R セファローズ (P h a r m a c i a L K B B i o t e c h n o l o g y , U p p s a l a S w e d e n) に抗 g D モノクローナル 5 B 6 を連結することによって調製した。g D E r b B 4 - E C D をトランスフェクトした 2 9 3 細胞からの上清を、y m 3 0 メンブラン (A m i c o n , B e v e r l y , M A) 上で 2 0 ~ 4 0 倍濃縮し、そしてアフィニティ樹脂上にロードした。このカラムを P B S で洗浄し、そしてレセプターを、1 0 0 m M 酢酸 / 5 0 0 m M N a C l (p H 2 . 4) で溶出した。E r b B 4 - E C D を、P B S 中に緩衝液交換し、そして濃縮した。タンパク質濃

度を、OD 280により決定した。

【0217】

Balb/cマウスに、0週間目、1週間目、2週間目および3週間目にその臀部フットパットにおいて、RIBI MPL+TDM+CWSエマルジョン(RIBI Immunochem Research Inc., Hamilton, MT)中のErbb4 ECD(約5g)で免疫した。免疫したマウスを、ELISAによって、抗体応答について試験した。最高力価を有するマウスは、4週間目の間、RIBI中のErbb4 ECD(約5g)を与えられた。3日後、膝窩および単径部節由来のリンパ球をマウスメラノーマ株X63-Ag8.653と融合した。融合細胞を、96ウェル組織培養プレート中において200,000細胞/ウェルの密度でプレーティングし、そしてHAT培地補充物(Sigma, St. Louis, MO)を使用するハイブリドーマ選択を、融合の1日後に開始した。10日目を開始して、下記のような放射性捕捉アッセイを使用して、Erbb4特異的抗体の存在について、ハイブリドーマ上清をスクリーニングした。安定して抗体を産生するクローンを、限外希釈によって得た。そして多量の特異的Mabを、腹水中で産生した。抗体を、プロテインA-セファロースカラム(Fermentech, Inc., Edinburgh, Scotland)上で精製し、そして滅菌PBS中において4℃で保存した。

10

【0218】

放射性捕捉アッセイにおいて、Maxisorpブレイクアパートモジュール(break apart modules)(Nunc, Roskilde, Denmark)を、100lの2g/mlヤギ抗マウスIgG(Boehringer Mannheim)で、4℃にて一晚コーティングした。このプレートを、PBS/0.5%Tween 20(PBST)で洗浄し、ELISA希釈液(PBS/0.5%BSA/0.05%Tween 20)でブロックし、そしてモノクローナル上清と共に2時間にわたり周囲温度でインキュベートした。このプレートを洗浄し、そして40,000カウント/ウェルの $[^{125}\text{I}]$ Erbb4 ECDと共にさらに1時間インキュベートした。洗浄後、この抗体に結合したErbb4の量を、Wallac 1277 Gamma Master(Wallac Inc, Gaithersburg, MD)においてウェルを計数することによって決定した。

20

【0219】

この方法によって産生された34個の抗Erbb4モノクローナル抗体(表2)は、レセプターに対して高い親和性を有し、アイソタイプの多様性を示し、そしてこれらは、Erbb4 ECDにおける18個の異なるエピトープに指向する。抗体のアイソタイプを、ZymedからのMouse MonoAb ID/SPアイソタイプングキット(So. San Francisco, CA)を製造業者の指示書に従って使用して決定した。

30

【0220】

(抗Erbb4抗体の特異性試験)

Mabの特異性を、固定されたHER2、HER3およびErbb4の細胞外ドメイン(それぞれ、アミノ酸1~645、1~617および1~640)に結合するその能力を測定するELISAにおいて決定した。ECDを、1g/mlの濃度でELISAプレートにコーティングし、そしてビオチン化された抗Erbb4 Mabと共にインキュベートした。結合したMabを、ストレプトアビジンペルオキシダーゼ(Sigma, St. Louis, MO)およびその基質OPD(Sigma, St. Louis, MO)を使用して検出した。表2において見られ得るように、産生されたほぼすべての抗体が、Erbb4に対して高度に特異的であった(「特異性(Specificity)」と表示された欄において、「4」により示される)。この抗体のうちの4つは、HER3に対して幾分かの結合を示した(「特異性(Specificity)」と表示された欄において、「3」により示される)。

40

【0221】

(エピトープマッピングおよび特徴付け)

50

各モノクローナル抗体により結合されたErbB4エピトープを、競合結合分析(Fendlyら、Cancer Research 50:1550-1558(1990))により決定した。抗ErbB4 Mabを、ELISA希釈液中において25g/mlの濃度まで希釈し、そして50lを、上記のようにしてgDErB4 ECDでプレコーティングされたELISAプレートに添加した。このプレートを、室温で2時間インキュベートし、そしてPBSTで洗浄した。ビオチン化された抗ErbB4抗体の希釈物(1:1,000~1:10,000の範囲)を調製し、そして50lを、アッセイプレートに添加した。室温での1時間のインキュベーション後、このプレートを洗浄し、そしてストレプトアビジンペルオキシダーゼ(Sigma)の1:5000希釈物50lを添加した。このプレートを、OPD(Sigma)を用いて顕色化した。抗ErbB4 Mabを、無関係のMabコントロールとの比較において50%以上、他の結合をブロックするその能力に基づいて、エピトープに分類した。関連のエピトープマッピングにより、17個の異なるエピトープが同定された(表2においてA~Qとして同定される)。

10

【0222】

9つの個々の抗体の活性を、さらに研究した。

【0223】

表2 抗ErbB4モノクローナルに関してまとめた表

【0224】

【表2】

Mab	$\gamma 1 \gamma 2 \gamma 1^0$	$\epsilon 1^0 - \gamma^0$	特異性
4-1440	IgG2b, κ	B	4
4-1441	IgG1, κ	J	4
4-1459	IgG2a, κ	D	4
4-1460	IgG1, κ	C	4
4-1461	IgG2a, κ	E	4
4-1462	IgG1, κ	C	4
4-1463	IgG2a, κ	D	4
4-1464	IgG2b, κ	C	4
4-1465	IgG2a, κ	L	3, 4
4-1472	IgG2a, κ	M	4
4-1473	IgG2a, κ	F	4
4-1474	IgG2b, κ	G	4
4-1475	IgG2b, κ	P	4
4-1476	IgG2a, κ	K	4
4-1477	IgG2a, κ	Q	4
4-1478	IgG2a, κ	I	4
4-1479	IgG2a, κ	D	4
4-1481	IgG2a, κ	H	3, 4
4-1482	IgG2b, κ	H	4
4-1483	IgG1, κ	R	3, 4
4-1484	IgG1, κ	E	4
4-1485	IgG2a, κ	F	4
4-1491	IgG2a, κ	G	4
4-1492	IgG2b, κ	A	4
4-1493	IgG2B, κ	A	4
4-1494	IgG2b, κ	B	4
4-1495	IgG2b, κ	A	4
4-1496	IgG1, κ	A	3, 4
4-1497	IgG1, κ	N	4
4-1498	IgG2b, κ	E	4
4-1535	IgG2b, κ	B	4
4-1536	IgG2b, κ	A	4
4-1537	IgG2b, κ	B	4
4-1543	IgG2a, κ	O	4

10

20

30

(結合親和性の決定)

抗 ErbB4 Mab の相対的親和性を、Friguet ら (J Immunol Methods, 77 (2) : 305 - 19 (1985)) に記載された方法に従って決定した。種々の濃度の ErbB4 ECD ($1.1 \times 10^{-7} \text{ M} \sim 1.08 \times 10^{-10} \text{ M}$) を、一定濃度の抗 ErbB4 Mab ($2.08 \times 10^{-10} \text{ M}$) と混合し、そして4

で一晩インキュベートした。インキュベーション後、結合していない Mab を、gDErbB4 ECD で予めコーティング (0.05 M カルボネート緩衝液 ($\text{pH} 9.6$) 中において 1 g/ml の濃度で 100 l / ウェル、4 で 16 時間) されたマイクロタイタープレート (Nunc) に二連で 100 l の反応混合物を添加することによってアッセイし、そして 1 時間室温でインキュベートした。PBST での洗浄後、結合した Mab を、ヤギ抗マウス F(ab')₂ ペルオキシダーゼ (Boehringer Mannheim) の $1:5000$ 希釈物 100 l / ウェルを室温で 1 時間添加することによって検出した。このプレートを、o-フェニレンジアミンジヒドロクロリド基質 (OPD, Sigma, St. Louis, MO) を使用して顕色化し、そしてプレートリーダーで読み取った。

50

【0225】

M a b はすべて高い結合親和性を示した。K d は、表 3 に提示されるように、0 . 4 ~ 1 2 n m の範囲である。

【0226】

(非還元イムノプロット)

抗 E r b B 4 M a b が、還元型 E r b B 4 E C D および非還元型 E r b B 4 E C D に結合する能力を、イムノプロット分析によって試験した。E r b B 4 E C D を、B M E と共におよび B M E を伴わずに、トリシン (t r i c i n e) サンプル緩衝液に添加し、そして 1 0 ~ 2 0 % N o v e x トリシングル (N o v e x , S a n D i e g o , C A) に適用した。このゲルを、1 0 0 V で泳動し、そして P V D F , I m m o b i l o n P , メンブラン (M i l l i p o r e , B e d f o r d , M A) 上に 0 . 5 アンペアで 6 0 分間エレクトロプロットした。このメンブランを P B S T で洗浄し、そして P B S / 0 . 5 % B S A / 0 . 1 % T w e e n 2 0 で一晩ブロックし、そして 1 g / m l のモノクローナル抗体と共に、周囲温度で 1 . 5 時間インキュベートした。このメンブランを洗浄し、そしてラット抗マウス I g G ペルオキシダーゼ (B o e h r i n g e r M a n n h e i m) の 1 : 1 0 , 0 0 0 希釈物と共に、さらに 1 時間インキュベートした。このメンブランを徹底的に洗浄し、そして A m e r s h a m E C L 化学発光システム (c h e m i l u m i n e s c e n c e s y s t e m) (A m e r s h a m L i f e S c i e n c e I n c . , A r l i n g t o n H e i g h t s , I I I) を使用して現像した。

10

20

【0227】

M a b はいずれも、還元型 E r b B 4 E C D を認識し得なかった (データは示さず) 。このことは、これらが立体エピトープ (c o n f o r m a t i o n a l e p i t o p e) に指向されていることを示唆する。表 3 において陽性として同定された M a b は、低濃度の非還元型 E r b B 4 E C D を認識し得た M a b である。M a b 4 - 1 4 5 9 、 4 - 1 4 6 0 、 4 - 1 4 6 1 、 4 - 1 4 6 2 、 4 - 1 4 9 2 および 4 - 1 4 9 7 は、高レベルの免疫反応性を示し、そして 0 . 3 n g まで低いレベルで、非還元型 E r b B 4 E C D に結合し得た。

【0228】

(H R G 結合の阻害)

いかなる E G F R 様レセプターをも発現しない K 5 6 2 細胞株を使用して、抗 E r b B 4 モノクローナル抗体をさらに特徴付けた。E r b B 4 でトランスフェクトされた K 5 6 2 細胞株 (1 E 1 0 . 1 H 4) を産生し、そして 2 m M L - グルタミン (G I B C O / B R L) 、 1 0 % F B S (H y c l o n e) および 8 0 0 g / m l G e n e t i c i n 、 G 4 1 8 (G i b c o / B R L) を有する、R P M I 1 6 4 0 中において培養した。アッセイの前に少なくとも 2 0 時間、1 E 1 0 . 1 H 4 を、1 0 n m ホルボール - 1 2 - ミリステート、1 3 - アセテート (P M A , C a l b i o c h e m , L a J o l l a , C A) で刺激した。抗 E r b B 4 M a b を、この細胞株への H R G の結合をブロックするその能力について評価した。

30

【0229】

1 0 m M H E P E S および 0 . 1 % B S A (結合緩衝液) を有する 2 0 0 l の R P M I 1 6 4 0 中に再懸濁された $1 . 0 \times 10^5$ の K 5 6 2 E r b B 4 細胞を含む四連のサンプルを、1 0 0 n M 抗 E r b B 4 M a b の存在下において、氷上にて一晩、 1.32×10^5 I] H R G 1 (1 7 7 - 2 4 4) と共にインキュベートした。インキュベーション後、この細胞を、M u l t i s c r e e n ろ過デバイス (f i l t r a t i o n d e v i c e) (M i l l i p o r e) を用いて収集し、そして 2 0 0 l の氷冷結合緩衝液で 2 回洗浄した。細胞に関連したカウントを、計数器で測定した。結合 % を、M a b を全く含まないコントロールサンプルに対して算出した。非特異的な結合を、5 0 0 n M の未標識 (c o l d) H R G 1 (1 7 7 - 2 4 4) の存在下でサンプルをインキュベートすることによって決定した。M a b が、9 0 % 以上の結合をブロックした場合に、その M

40

50

a bをHRGブロッキングについて陽性とみなした。表3に見られ得るように、試験された9つの抗Er b B 4抗体のうちの6つは、このレベルで^{1 2 5}I - HRG結合を阻害し得た。Ma b 4 - 1 4 6 1は、結合を7%阻害した。そして1 4 5 9は、全くHRGブロッキングを示さなかった。抗Er b B 4 Ma b 4 - 1 4 9 7は結合を阻害せず、HRGの結合を26%増強するようであった。

【0230】

(ヒト乳癌細胞株におけるHRG結合の阻害)

多数の抗Er b B 4 Ma bが、トランスフェクトされたK 5 6 2細胞へのHRGの結合をブロックし得たので、いくつかのヒト乳房癌腫細胞株へのHRG結合をブロックするその能力を試験した。細胞株MDA - MB - 4 5 3、T 4 7 DおよびBT 4 7 4 (ATCC, Rockville, MD)を、 1×10^5 細胞/ウェルの密度で24ウェル組織培養プレートにプレATINGし、そして一晚付着させた。抗Er b B 4 Ma bまたは抗HER2コントロールMa b 2 C 4および4 D 5を、10 mM HEPESおよび0.1% BSA (結合緩衝液)を有するHam's F - 12およびDulbecco's 10 改変Eagle培地(1:1, v/v)中において100 nMの濃度まで希釈し、そして三連でプレートに添加した。氷上での30分間のインキュベーション後、 1.5×10^5 カウ ントの^{1 2 5}I] HRG 1 (1 4 4 - 2 7 7)を添加した。このプレートを、4時間氷上でインキュベートし、そして氷冷結合緩衝液で2回洗浄した。細胞を、8 M尿素/3 M酢酸で可溶化し、そして細胞に関連したカウントを、Wallac 1277 Gam 20 ma Masterで測定した。結合%を、上記のように算出した。非特異的な結合を、100 nMの未標識(cold)HRG 1 (1 4 4 - 2 7 7)の存在下においてサンプルをインキュベートすることによって決定した。

【0231】

抗Er b B 4 Ma bはいずれも、試験された癌腫株への^{1 2 5}I - HRG結合の有意な阻害を引き起こさなかった。対照的に、抗HER2コントロールMa b 2 C 4および4 D 5は、それぞれ、MDA - MB - 4 5 3細胞において84%および29%結合をブロックし、T 4 7 D細胞において70%および48%結合をブロックし、そしてBT 4 7 4細胞において57%および12%結合をブロックした。未標識HRGコントロールは、100 nMの濃度で、MDA - MB - 4 5 3細胞において99%結合をブロックし、T 4 7 D細胞において98%結合をブロックし、そしてBT 4 7 4細胞において96%結合をブロッ 30 クした。このデータは、これらの細胞株においてEr b B 4レセプターが、HRG応答を媒介するにおいて、さほど重要ではない役割を果たし得ることを示唆する。

【0232】

(チロシンリン酸化の阻害)

ヒレグリンは、Er b B 4のチロシンリン酸化を誘導することが示された。従って、抗Er b B 4 Ma bが、K 5 6 2 Er b B 4細胞株において、HRG 1 (1 7 7 - 2 4 4)により刺激されるレセプターのリン酸化に影響を及ぼし得るか否かを決定することに 関心をもたれた。

【0233】

Er b B 4をトランスフェクトしたK 5 6 2細胞株(1E10.1H4)を、 1×10^6 細胞/mlの密度まで、RPMI 1640組織培地中において増殖させた。次いで、この細胞を、PMA(アッセイ緩衝液)を含まない無血清培地に交換し、そして37 で2 ~ 6時間インキュベートした。この細胞を、アッセイ緩衝液で洗浄し、そして0.1% BSAを有するアッセイ緩衝液中において 2.5×10^5 細胞を含む二連のサンプルを、25 μgの抗Er b B 4 Ma bまたはコントロールMa bと共に室温において30分間インキュベートした。インキュベーション後、1セットのサンプルを、15 mMのHRG 1 (1 7 7 - 2 4 4)で、室温で8分間刺激した。上清を取り除き、そして細胞を、50 1/mlのメルカプトエタノールを含む100 lのSDSサンプル緩衝液中において100 で5分間溶解した。各サンプルの30 lのアリコート、4 ~ 12%ポリアクリルア 40 ミドゲル(Novex)中で電気泳動し、そしてPVDFメンブラン(Millipor 50

e) にエレクトロブロットした。このメンブランを、0.05% Tween-20を含む Tris 緩衝化生理食塩水中において、2% BSA で4 で一晩ブロックし、そして組換え抗ホスホチロシンペルオキシダーゼモノクローナル RC20H (Transduction Laboratories, Lexington, Kentucky) の1:1000 希釈物と共に、室温で4 時間インキュベートした。結合した抗ホスホチロシン Ab を、Amersham ECL システム (Amersham Life Science Inc.) を用いて可視化し、そしてデンシトメトリーで定量した。

【0234】

試験した9つのモノクローナル抗体のうちの6つが、HRG に誘導されるチロシンリン酸化シグナルの生成を阻害した(表3)。残りの3つは阻害性ではなく、抗 ErbB4 Mab はいずれも、ErbB4 レセプターのリン酸化を阻害し得なかった。

【0235】

(免疫組織化学)

抗 ErbB4 Mab は、診断試薬として有用であり得るので、標準的な免疫組織化学技術を使用して凍結細胞ペレットを染色するその能力を研究した。ErbB4 をトランスフェクトした K562 細胞 (1E10.1H4) およびヒト乳癌株 MDA-MB-453、T47D および BT474 (ATCC, Rockville, MD) をペレットにし、そして OCT 化合物 (Miles Inc., Elkhart, IN) 中で凍結した。凍結ペレットを、クリオスタット (cryostat) において厚さ5ミクロンに切り出し、スライドにマウントし、冷却アセトン (-4℃) 中において3~5分間固定し、そして風乾した。内因性のペルオキシダーゼ活性を、グルコースオキシダーゼ方法の改変法を使用してクエンチした。このスライドを PBS でリンスし、そして細胞を、Vector Biotin ブロッキングキット (blocking kit) (Vector, Burlingame, CA) を使用して、内因性のビオチン活性をブロックした。内因性の免疫グロブリン結合部位を、10% 正常ウマ血清 (Vector) でブロックした。次いで、この細胞を、10g/ml の抗 ErbB4 Mab と共に RT で1時間インキュベートし、次いで、ビオチン化ウマ抗マウス IgG (Vector) の1:200 希釈物と共に30分間インキュベートした。このスライドを、ABC Elite Reagent (Vector) と共に30分間インキュベートし、そして、DAB (Pierce, Rockford, IL) を使用して、ErbB4 レセプターを可視化した。Mayer のヘマトキシリン (Rowley Biomedical Institute, Rowley, MA) を使用して、細胞を対比染色した。

【0236】

多くの抗 ErbB4 Mab が、ErbB4 をトランスフェクトした K562 細胞を染色し得た。この染色は様々な強度であり、そしてほとんどまたは全くバックグラウンド染色は存在しなかった(表3)。数値は、無関係のコントロールと比較した染色強度を表す。Mab はいずれも、試験された凍結ヒト乳癌細胞を染色し得た(データは示さず)。

【0237】

表3 モノクローナル抗体の活性に関してまとめた表

【0238】

【表3】

Mab	アイソタイプ	Epitope	Kd(nM)	非還元 1217°ロット	HRG ブロッキング	P-Tyr ブロッキング	組織化学
4-1440	IgG2b, κ	B	1.9	-	+	+	3+
4-1459	IgG2a, κ	D	0.7	+	-	-	4+
4-1460	IgG1, κ	C	1.2	+	+	+	3+
4-1461	IgG2a, κ	E	2.3	+	-	-	4+
4-1462	IgG1, κ	C	0.4	+	+	+	2+
4-1464	IgG2b, κ	C	1.0	-	+	+	2+
4-1473	IgG2a, κ	F	6.0	+	+	+	2-3+
4-1492	IgG2b, κ	A	2.1	-	+	+	-
4-1497	IgG1, κ	N	12.0	+	-	-	-

10

(F A C S 分析)

抗 E r b B 4 M a b が、生存可能な細胞の表面上の E r b B 4 に結合し得るか否かを決定するため、E r b B 4 をトランスフェクトした K 5 6 2 細胞株および乳癌株 M D A - M B - 4 5 3、T 4 7 D および B T - 4 7 4 を使用して、F A C S 分析を実施した。付着細胞を、P B S 中の 1 0 m M E D T A を使用して、組織培養フラスコから剥離し、1 4 0 0 r p m で 5 分間遠心分離し、そして 1 % 胎仔ウシ血清を有する P B S (F A C S 希釈液) 中に再懸濁した。この細胞を計数し、 10^7 細胞 / m l に調整し、そして 0 . 1 m l の細胞を、1 0 0 l の F A C S 希釈液中の各 M a b 1 0 g / m l と共に、4 で 3 0 分間インキュベートした。サンプルを洗浄し、0 . 1 m l の希釈液中に再懸濁し、そしてヤギ抗マウス I g G (B o e h r i n g e r M a n n h e i m) の F I T C 結合体化 F (a b ')₂ フラグメント 1 g と共に、4 で 3 0 分間インキュベートした。この細胞を洗浄し、0 . 5 m l の F A C S 希釈液中に再懸濁し、そして F A C S c a n セルソーター (B e c t o n D i c k i n s o n , M t . V i e w , C A) を使用して分析した。データを、前方散乱光および側方散乱光、ならびにヨウ化プロピジウム蛍光によってゲート制御して、細片、重複 (d o u b l e t)、および死滅した細胞を排除した。

20

【 0 2 3 9 】

すべての M a b が、E r b B 4 でトランスフェクトされた K 5 6 2 細胞株上の E r b B 4 レセプター (これは、約 2×10^5 レセプター / 細胞で発現される) に結合した。E r b B 4 でトランスフェクトされた K 5 6 2 細胞で観察された細胞蛍光における 2 ~ 5 0 倍の増加が、アイソタイプコントロールと比較した場合に観察された。いくつかのより弱い結合は、インタクトな細胞上に配列した E r b B 4 E C D エピトープを反映し得る。対照的に、トランスフェクトされた細胞株において最高の蛍光強度を与えた、抗 E r b B 4 抗体 4 - 1 4 4 0、4 - 1 4 6 4 および 4 - 1 4 9 2 は、乳癌株 M D A - M B - 4 5 3、T 4 7 D および B T - 4 7 4 への最少の結合を示した。ポジティブコントロール抗 H E R 2 M a b 2 - 2 C 4 は、H E R 2 発現レベルと比例して、腫瘍株への結合を示した。これらの結果は、このアッセイの検出限界を下回る、M D A - M B - 4 5 3 細胞、T 4 7 D 細胞および B T - 4 7 4 細胞における E r b B 4 発現レベルを示す。

30

【 0 2 4 0 】

(E r b B 4 免疫付着因子へのヒレグリン結合の阻害)

40

図 7 は、示された濃度の抗 E r b B 4 M a b 4 - 1 4 4 0、4 - 1 4 6 0 および 4 - 1 4 6 4 を用いた、ブレイクアパートモジュールにおいて捕捉された E r b B 4 免疫付着因子への 125 I - H R G 結合の置換曲線を示す。M a x i s o r p ブレイクアパートモジュール (N u n c) を、5 0 m M のカルボネート緩衝液 (p H 9 . 6) 中のヤギ抗ヒト I g (B o e h r i n g e r M a n n h e i m) の 1 : 2 0 0 希釈物 1 0 0 l を用いて、4 で一晚コーティングした。このプレートを、P B S T で洗浄し、E L I S A 希釈液でブロックし、そして 2 0 0 n g / m l の E r b B 4 免疫付着因子 1 0 0 l と共に、周囲温度で 2 時間インキュベートした。このプレートを洗浄し、そして 5 0 l の希釈 M a b (0 . 1 ~ 1 0 0 n M 最終) および 1 3 2 p M の最終濃度を与えるように希釈された 5 0 l の 125 I - H R G 1 (1 7 7 - 2 4 4) を、このプレートに添加した。周囲温度での 1

50

．5時間のインキュベーション後、このプレートを洗浄し、そしてレセプターに結合した¹²⁵I-HRGの量を、Wallac 1277 Gamma Masterにおいてウェルを計数することによって決定した。

【0241】

図7は、Mabが、用量依存様式で免疫付着因子へのヒレグリン結合を阻害したことを示す。ここで、ED₅₀値は、0.7～1.1 nMの範囲であった。これは、Mabが、高い程度のブロッキング能力を有することを示す。

【0242】

(材料の寄託)

以下のハイブリドーマを、American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA. 20110-2209, USA (ATCC) に寄託した。

【0243】

【表4】

<u>ハイブリドーマ</u>	<u>ATCC 登録番号</u>	<u>寄託日</u>
HER4.10H1.1A1	PTA-2828	2000年12月19日
HER4.1C6.A11	PTA-2829	2000年12月19日
HER4.3B9.2C9	PTA-2826	2000年12月19日
HER4.1A6.5B3	PTA-2827	2000年12月19日
HER4.8B1.2H2	PTA-2825	2000年12月19日

この寄託されたハイブリドーマの各々は、表2において同定される抗ErbB4モノクローナル抗体の1つを産生する。HER4.10H1.1A1はmAb 4-1464を産生し、HER4.1C6.A11はmAb 4-1440を産生し、HER4.3B9.2C9はmAb 4-1460を産生し、HER4.1A6.5B3はmAb 4-1492を産生し、そしてHER4.8B1.2H2はmAb 4-1473を産生する。

【0244】

ATCCでのハイブリドーマの寄託は、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約およびそれに基づく規則(ブダペスト条約)の規定のもとでなされた。これは、寄託の日から30年間にわたり寄託物の生存培養物の維持を保証する。この寄託物は、ブダペスト条約の規約のもとで、ATCCにより利用可能となされ、そしてGene Tech, Inc. とATCCとの間の同意を必要とし、これは関連する米国特許の発行または米国特許出願もしくは外国特許出願のいずれかの公開のいずれか早い方に際して、公へのこの寄託物の培養物の子孫の永続的かつ非制限的な利用可能性を保証し、そして、米国特許法第122条およびそれに準ずる長官の定める規定(米国特許法施行規則第1.14条を含む(886 OG 638を特に参照))に従って、それに権利を与えられた米国特許商標局長官により指名されたものに対するこの子孫の利用可能性を保証する。

【0245】

本願の譲渡人は、寄託された材料の培養物が、適切な条件下で培養されて死滅するか、または損失するか、または破壊された場合に、通知に基づき、この材料を同一の別のもので速やかに交換することに同意した。寄託材料の利用可能性は、その特許法に従って任意の官庁の権限のもとで付与される権利に反して本発明を実施するための認可と解釈されるべきではない。

【0246】

前述に記載した明細書は、当業者が本発明を実施するのを可能にするに十分であると考えられる。本発明は、寄託された構築物により範囲を限定されるべきではない。なぜなら、

寄託された実施形態は、本発明の特定の局面の一つの例示として意図され、そして機能的に等価な任意の構築物が本発明の範囲内である。本明細書中の材料の寄託は、本明細書中に含まれる書面による記載が、本発明の最良の態様を含む本発明の任意の局面の実施を可能にするに不十分であるという承認を構成するのではなく、また、特許請求の範囲を、それが表す特定の例示に限定するとして解釈されるべきでもない。実際に、本明細書中に示されそして記載されたものに加えて本発明の種々の改変物が、前述の記載から当業者に明らかであり、そして添付の特許請求の範囲に含まれる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、ヒト E r b B 4 のヌクレオチド配列（配列番号 1）を示す。

10

【図 2】

図 2 は、ヒト E r b B 4 の推定アミノ酸配列（配列番号 2）を示す。

【図 3】

図 3 は、E r b B 4 - I g G 免疫付着因子のヌクレオチド配列（配列番号 3）を示す。

【図 4】

図 4 は、図 2 に示される E r b B 4 アミノ酸配列（配列番号 2）のアミノ酸 26 ~ 640（配列番号 4）を含む E r b B 4 細胞外ドメイン（E C D）のアミノ酸配列を示す。

【図 5】

図 5 は、ヒト大動脈平滑筋細胞の P D G F 刺激増殖に対する、E r b B 4 - I g G 免疫付着因子の効果を示す。

20

【図 6】

図 6 は、ヒト大動脈平滑筋細胞のトロニンに対する走化性応答に対する、E r b B 4 - I g G 免疫付着因子の効果を示す。

【図 7】

図 7 は、抗 H E R 4 モノクローナル抗体による、H E R 4 免疫付着因子へのヒレグリン結合の阻害を示す。

【 図 5 】

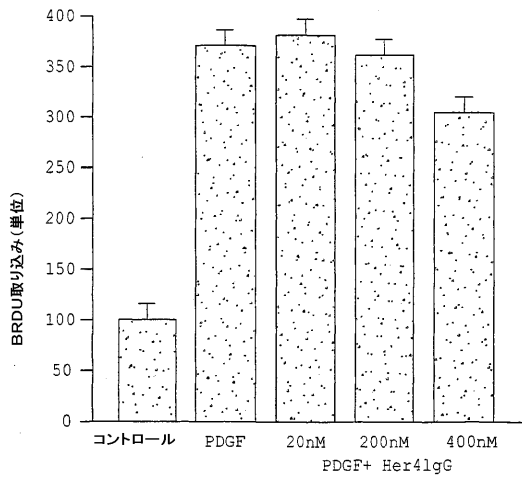


FIG. 5

【 図 6 】

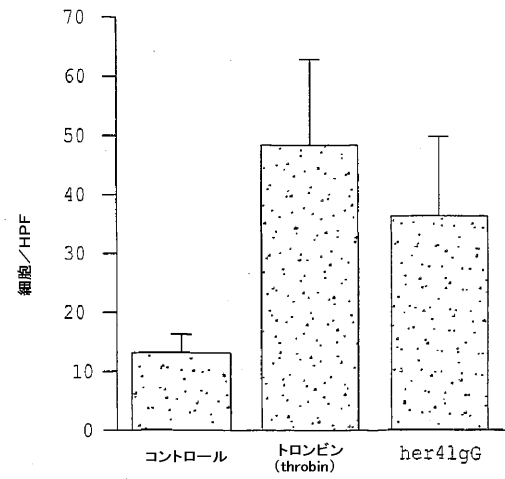


FIG. 6

【 図 7 】

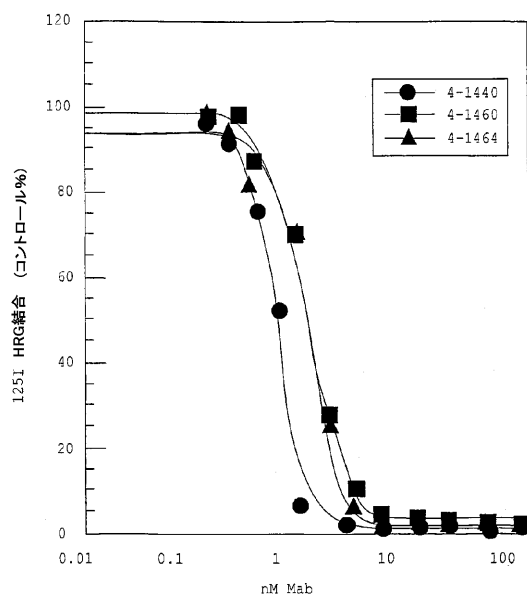


FIG. 7

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
7 March 2002 (07.03.2002)

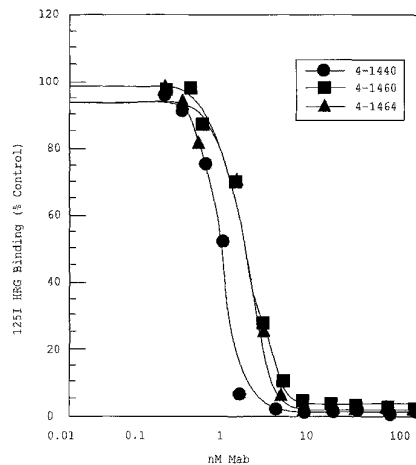
PCT

(10) International Publication Number
WO 02/18444 A2

- (51) International Patent Classification: C07K 16/00 (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): GERRITSEN, Mary, E. [US/US]; 541 Parrott Drive, San Mateo, CA 94402 (US). SLIWKOWSKI, Mark, X. [US/US]; 42 Oak Creek Lane, San Carlos, CA 94070 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/26984
- (22) International Filing Date: 29 August 2001 (29.08.2001)
- (25) Filing Language: English (74) Agent: ALTMAN, Daniel, E.; Knobbe, Martens, Olson & Bear, LLP, 16th floor, 620 Newport Center Drive, Newport Beach, CA 92660 (US).
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/229,679 1 September 2000 (01.09.2000) US
60/265,516 31 January 2001 (31.01.2001) US
09/940,101 27 August 2001 (27.08.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): GENENTECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, CZ (utility model), DE, DE (utility model), DK, DK (utility model), DM, DZ, EC, EE, EE (utility model), ES, FI, FI (utility model), GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SK (utility

[Continued on next page]

(54) Title: ERBB4 ANTAGONISTS



(57) Abstract: The present invention concerns methods and means for controlling excessive proliferation and/or migration of smooth muscle cells, and in particular for treating stenosis, by using antagonists of a native ErbB4 receptor. The invention further concerns a method for the identification of ErbB4 agonists and antagonists capable of inhibiting or enhancing the proliferation or migration of smooth muscle cells.

WO 02/18444 A2

WO 02/18444 A2



model), SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

(84) **Designated States (regional):** ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/18444

PCT/US01/26984

ErbB4 ANTAGONISTSBackground of the Invention5 Field of the Invention

The present invention concerns methods and means for controlling excessive proliferation and/or migration of smooth muscle cells, and in particular for treating stenosis, by using antagonists of a native ErbB4 receptor. The invention further concerns a method for the identification of ErbB4 agonists and antagonists capable of inhibiting or enhancing the proliferation or migration of smooth muscle cells.

10

Description of the Related Art1. ErbB receptor tyrosine kinases

15 Transduction of signals that regulate cell growth and differentiation is regulated in part by phosphorylation of various cellular proteins. Protein tyrosine kinases are enzymes that catalyze this process. Receptor protein tyrosine kinases are believed to direct cellular growth via ligand-stimulated tyrosine phosphorylation of intracellular substrates.

HER4/Erb4 is a receptor protein tyrosine kinase belonging to the ErbB family. Increased ErbB4 expression closely correlates with certain carcinomas of epithelial origin, including breast adenocarcinomas (Plewnan *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:1746-1750 [1993]; Plewnan *et al.*, Nature 366:473-475 [1993]). Diagnostic methods for detection of human neoplastic conditions (especially breast cancers) which evaluate ErbB4 expression are described in EP Pat Appln No. 599,274.

20 Other members of the ErbB family of receptor tyrosine kinases include: epidermal growth factor receptor (EGFR), ErbB2 (HER2/neu), and ErbB3 (HER3). The *erbB1* gene encodes the 170 kDa epidermal growth factor receptor (EGFR) that has been causally implicated in human malignancy. In particular, increased expression of this gene has been observed in more aggressive carcinomas of the breast, bladder, lung and stomach (Modjtahedi, H. and Dean, C. (1994) Int. J. Oncol. 4:277-296). HER4 acts, in the absence of HER2, as a mediator of antiproliferative and differentiative response in human breast cancer cell lines. (Sartor *et al.*, Mol. Cell Biol. 21:4265-75 (2001)).

25 The *neu* gene (also called *erbB2* and HER2) encodes a 185 kDa receptor protein tyrosine kinase that was originally identified as the product of the transforming gene from neuroblastomas of chemically treated rats. Amplification and/or overexpression of the human *HER2* gene correlates with a poor prognosis in breast and ovarian cancers (Slamon, D.J. *et al.*, Science 235:177-182 (1987); Slamon *et al.*, Science 244:707-712 (1989); and US Pat No. 4,968,603). Overexpression of *HER2* (frequently but not uniformly due to gene amplification) has also been observed in other carcinomas including carcinomas of the stomach, endometrium, salivary gland, lung, kidney, colon, thyroid, pancreas and bladder.

30

WO 02/18444

PCT/US01/26984

A further related gene, called *erbB3* or *HER3*, has been described. See US Pat. No. 5,183,884; Kraus *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9193-9197 (1989); EP Pat Appln No 444,961A1; and Kraus *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2900-2904 (1993). Kraus *et al.* (1989) discovered that markedly elevated levels of *erbB3* mRNA were present in certain human mammary tumor cell lines indicating that *erbB3*, like *erbB1* and *erbB2*, may play a role in human malignancies. They also showed that EGF-dependent activation of the ErbB3 catalytic domain of a chimeric EGFR/ErbB3 receptor resulted in a proliferative response in transfected NIH-3T3 cells. Furthermore, these researchers demonstrated that some human mammary tumor cell lines display a significant elevation of steady-state ErbB3 tyrosine phosphorylation further indicating that this receptor may play a role in human malignancies. The role of *erbB3* in cancer has been explored by others. It has been found to be overexpressed in breast (Lemoine *et al.*, Br. J. Cancer 68:1116-1121 (1992)), gastrointestinal (Poller *et al.*, J. Pathol. 168:275-280 (1992); Rajkumar *et al.*, J. Pathol. 170:271-278 (1993), and Sanidas *et al.*, Int. J. Cancer 54:935-940 (1993)), and pancreatic cancers (Lemoine *et al.*, J. Pathol. 168:269-273 (1992), and Friess *et al.*, Clinical Cancer Research 1:1413-1420 (1995)). ErbB3 is unique among the ErbB receptor family in that it possesses little or no intrinsic tyrosine kinase activity (Guy *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:8132-8136 (1994) and Kim *et al.*, J. Biol. Chem. 269:24747-55 (1994)).

The ErbB receptors are generally found in various combinations in cells and heterodimerization is thought to increase the diversity of cellular responses to a variety of ErbB ligands (Earp *et al.*, *Breast Cancer Research and Treatment* 35: 115-132 (1995)). EGFR is bound by six different ligands; epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor alpha (TGF- α), amphiregulin, heparin binding epidermal growth factor (HB-EGF), β -cellulin and ephregulin (Groenen *et al.*, *Growth Factors* 11:235-257 (1994)). A family of heregulin proteins resulting from alternative splicing of a single gene are ligands for ErbB3 and ErbB4. The heregulin family includes α , β and γ heregulins (Holmes *et al.*, *Science*, 258:1205-1210 (1992); U.S. Patent No. 5,641,869; and Schaefer *et al.*, *Oncogene* 15:1385-1394 (1997)); neu differentiation factors (NDFs), glial growth factors (GGFs); acetylcholine receptor inducing activity (ARIA); and sensory and motor neuron derived factor (SMDF). For a review, see Groenen *et al.*, *Growth Factors* 11:235-257 (1994); Lemke, G. *Molec. & Cell. Neurosci.* 7:247-262 (1996) and Lee *et al.*, *Pharm. Rev.* 47:51-85 (1995). Recently three additional ErbB ligands were identified; neuregulin-2 (NRG-2) which is reported to bind either ErbB3 or ErbB4 (Chang *et al.*, *Nature* 387:509-512 (1997); and Carraway *et al.*, *Nature* 387:512-516 (1997)); neuregulin-3 which binds ErbB4 (Zhang *et al.*, *PNAS* (USA) 94(18):9582-7 (1997)); and neuregulin-4 which binds ErbB4 (Harari *et al.*, *Oncogene* 18:2681-89 (1999)). HB-EGF, β -cellulin and ephregulin also bind to ErbB4.

While EGF and TGF do not bind ErbB2, EGF stimulates EGFR and ErbB2 to form a heterodimer, which activates EGFR and results in transphosphorylation of ErbB2 in the heterodimer. Dimerization and/or transphosphorylation appear to activate the ErbB2 tyrosine kinase. See Earp *et al.*, *supra*. Likewise, when ErbB3 is co-expressed with ErbB2, an active signaling complex is formed and antibodies directed against ErbB2 are capable of disrupting this complex (Slivkowski *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269(20):14661-14665 (1994)). Additionally, the affinity of ErbB3 for heregulin (HRG) is increased to a higher affinity state when co-expressed with ErbB2. See also, Levi *et al.*, *Journal of Neuroscience* 15: 1329-1340 (1995); Morrissey *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1431-1435 (1995);

WO 02/18444

PCT/US01/26984

and Lewis *et al.*, *Cancer Res.*, 56:1457-1465 (1996) with respect to the ErbB2-ErbB3 protein complex. ErbB4, like ErbB3, forms an active signaling complex with ErbB2 (Carraway and Cantley, *Cell* 78:5-8 (1994)).

Because of the physiological importance, members of the ErbB family of receptor tyrosine kinases have often been targeted for therapeutic development. For example, Hudziak *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 9(3):1165-1172 (1989) describe the generation of a panel of anti-ErbB2 antibodies one of which, called 4D5, inhibited cellular proliferation by 58%. A recombinant humanized version of the murine anti-ErbB2 antibody 4D5 (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2 or HERCEPTIN®; U.S. Patent No. 5,821,337) is clinically active in patients with ErbB2-overexpressing metastatic breast cancers that have received extensive prior anti-cancer therapy (Baselga *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 14:737-744 (1996)). HERCEPTIN® received marketing approval from the Food and Drug Administration September 25, 1998 for the treatment of patients with metastatic breast cancer whose tumors overexpress the ErbB2/HER2 protein. Since HER2 is also overexpressed in other cancers, in addition to breast cancer, HERCEPTIN® holds a great potential in the treatment of such other cancers as well.

2. Smooth muscle cell proliferation

Smooth muscle cells are very important structural and functional components of many hollow passages in the body, including blood vessels, gastrointestinal tract, airway passage (trachea and bronchi in lungs), urinary tract system (bladder and ureters) etc. They are responsible for elasticity that is so crucially required for normal functioning of these organs. They respond to a variety of physiological stimuli by constriction or dilation as needed, for example, for regulating the flow of fluids carried by them. They respond not only to chemical stimuli, such as growth factors and cytokines, but also to physical stimuli, such as pressure and stretch. Excessive proliferation of smooth muscle cells results in thickening of the wall and narrowing the lumen of the organs known as "stenosis" in a variety of disorders.

A number of growth factors and cytokines are implicated in the proliferation of smooth muscle cells. One category of such important molecules are EGF related ligands. For example, smooth muscle cells from a variety of such organs have been demonstrated to possess EGF receptors, and some of them even synthesize and secrete EGF ligands such as HB-EGF, thus setting up autocrine loop. Various EGF ligands act as potent mitogens and stimulate proliferation of smooth muscle cells often resulting in thickening of the wall and ultimately stenosis. For example, excessive proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) is involved in pathology of vascular stenosis, restenosis resulting from angioplasty or surgery or stent implants, atherosclerosis, transplant atherosclerosis and hypertension (reviewed in Casterella and Teirstein, *Cardiol. Rev.* 7: 219-231 [1999]; Andros, *Int. J. Mol. Med.* 2: 81-89 [1998]; and Rosario *et al.*, *Thromb. Haemost.* 82 (suppl 1): 164-170 [1999]). The thickening of blood vessels increases resistance to blood flow and ultimately leads to hypertension. Moreover, decreased blood supply to the tissue may also cause necrosis and induce inflammatory response leading to severe damage. For example, myocardial infarction occurs as a result of lack of oxygen and local death of heart muscle tissues.

Infantile hypertrophic pyloric stenosis (IHPS), which causes functional obstruction of the pyloric canal also involves hypertrophy and hyperplasia of the pyloric smooth muscle cells (Due and Puri, *Pediatr. Res.* 45: 853-857

WO 02/18444

PCT/US01/26984

[1999]). Furthermore, EGF, EGF receptor and HB-EGF are implicated in pathogenesis of pyloric stenosis (Shima *et al.*, *Pediatr. Res.* 47: 201-207 [2000]).

Similarly, the urinary bladder wall thickening that occurs in response to obstructive syndromes affecting the lower urinary tract involves proliferation of urinary bladder smooth muscle cells. A membrane-bound precursor form of HB-EGF is expressed in urinary bladder smooth muscle cells and HB-EGF is a potent mitogen for bladder SMC proliferation (Freeman *et al.*, *J. Clin. Invest.* 99: 1028-1036 [1997]; Kaefer *et al.*, *J. Urol.* 163: 580-584 [2000]; Borer *et al.*, *Lab Invest.* 79: 1335-1345 [1999]).

The obstructive airway diseases are yet another group of diseases with underlying pathology involving smooth muscle cell proliferation. One example of this group is asthma which manifests in airway inflammation and bronchoconstriction. EGF is implicated in the pathological proliferation of airway SMCs in obstructive airway diseases (Cerutis *et al.*, *Am. J. Physiol.* 273: L10-15 [1997]; Cohen *et al.*, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 18: 85-90 [1997]).

The instant invention discloses the use of ErbB4 receptor antagonists for controlling excessive migration and/or proliferation of smooth muscle cells and, in particular, for the treatment of stenosis.

Summary of the Invention

In one aspect, the invention concerns a method for controlling excessive proliferation or migration of smooth muscle cells by treating the smooth muscle cells with an effective amount of an antagonist of a native ErbB4 receptor. The control is prevention or inhibition, including total inhibition, of excessive proliferation or migration of smooth muscle cells. In one embodiment the smooth muscle cells are urinary bladder smooth muscle cells, and in another embodiment they are the smooth muscle cells of an airway passage.

The excessive proliferation or migration of smooth muscle cells such as vascular smooth muscle cells may result in stenosis including vascular stenosis and restenosis. In one embodiment the smooth muscle cells are human. The stenosis may be further characterized by excessive proliferation or migration of endothelial cells.

In one embodiment the ErbB4 receptor antagonist is an immunoadhesin. In another embodiment the ErbB4 receptor antagonist is an antibody, such as a neutralizing antibody against a native ErbB4 receptor.

In another aspect, the invention concerns a method for treating stenosis in a mammalian patient, including a human, comprising administering to the patient an effective amount of an antagonist of a native mammalian ErbB4 receptor. The treatment includes prevention of stenosis. The stenosis may be vascular stenosis including restenosis. The antagonist may be administered as an injection or infusion. The treatment may also be used to reduce hypertension associated with the stenosis. The stenosis may be vascular stenosis including restenosis, pyloric stenosis, thickening of the urinary bladder wall or part of an obstructive airway disease.

In one embodiment the antagonist is an immunoadhesin, which may comprise the extracellular region of a native human ErbB4 receptor. In another embodiment the antagonist is an antibody, such as a neutralizing antibody against a native human ErbB4 receptor.

WO 02/18444

PCT/US01/26984

In a further aspect, the invention concerns a method for treating stenosis in a mammalian patient, such as a human, comprising introducing into a cell of the patient a nucleic acid encoding an antagonist of an ErbB4 receptor. The nucleic acid may be introduced *in vivo* or *ex vivo*, and with the aid of a vector such as retroviral vector or a lipid-based delivery system. The method of the present invention is particularly useful for the treatment (including prevention) of vascular stenosis and restenosis.

The antagonist may be an immunoadhesin. The antagonist may also be an antibody, such as a neutralizing antibody against a native human ErbB4 receptor.

In another aspect, the invention concern a method for treating hypertension associated with vascular stenosis in a mammalian patient, comprising administering to the patient an effective amount of an antagonist of a native ErbB4 receptor. The antagonist may be a small molecule.

In a still further aspect, the invention concerns a pharmaceutical composition for the treatment of stenosis in a mammalian patient comprising an effective amount of an antagonist of a native mammalian ErbB4 receptor, in admixture with a pharmaceutically acceptable carrier.

In all aspects, preferred ErbB4 antagonists include immunoadhesins, preferably comprising a native human ErbB4 receptor extracellular domain sequence fused to an immunoglobulin constant region sequence. The immunoglobulin sequence preferably is that of a heavy chain constant region of an IgG1, IgG2 or IgG3 immunoglobulin and may additionally comprise an immunoglobulin light chain sequence covalently attached to the fusion molecule comprising the immunoglobulin heavy chain constant region.

Another preferred class of ErbB4 antagonists comprises neutralizing antibodies specifically binding a native ErbB4 receptor. The antibodies preferably are human or humanized. In one embodiment the antibodies bind essentially the same epitope as an antibody produced by a hybridoma selected from the group consisting of HER4.10H1.1A1 (ATCC Accession Number PTA-2828), HER4.1C6.A11 (ATCC Accession Number PTA-2829), HER4.3B9.2C9 (ATCC Accession Number PTA-2826), HER4.1A6.5B3 (ATCC Accession Number PTA-2827) and HER4.8B1.2H2 (ATCC Accession Number PTA-2825). The antibodies may also have complementarity determining region (CDR) residues from an antibody produced by a hybridoma selected from the group consisting of HER4.10H1.1A1 (ATCC Accession Number PTA-2828), HER4.1C6.A11 (ATCC Accession Number PTA-2829), HER4.3B9.2C9 (ATCC Accession Number PTA-2826), HER4.1A6.5B3 (ATCC Accession Number PTA-2827) and HER4.8B1.2H2 (ATCC Accession Number PTA-2825).

The smooth muscle cells may, for example, be pyloric or urinary bladder smooth muscle cells, or smooth muscle cells of an airway passage. Preferably, the smooth muscle cells are vascular smooth muscle cells.

In a still further aspect, the invention concerns a method for identifying a molecule that inhibits or enhances the proliferation or migration of smooth muscle cells, comprising the steps of: (a) contacting a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 85 % sequence identity with the amino acid sequence of the extracellular domain of a native ErbB4 receptor and retaining the ability to control excessive proliferation or migration of smooth muscle cells, with a candidate molecule; and (b) determining whether the candidate molecule inhibits or enhances the

WO 02/18444

PCT/US01/26984

ability of the polypeptide to control excessive proliferation or migration of smooth muscle cells. The polypeptide may comprise the extracellular domain of a native ErbB4 receptor. The polypeptide is an immunoadhesin in one embodiment. In a particular embodiment, the molecule enhances the ability of the polypeptide to control excessive proliferation or migration of smooth muscle cells, and is an antibody or a small molecule.

In a yet further aspect the invention concerns an antibody that binds essentially the same epitope of ErbB4 as an antibody produced by a hybridoma selected from the group consisting of HER4.10H1.1A1 (ATCC Accession Number PTA-2828), HER4.1C6.A11 (ATCC Accession Number PTA-2829), HER4.3B9.2C9 (ATCC Accession Number PTA-2826), HER4.1A6.5B3 (ATCC Accession Number PTA-2827) and HER4.8B1.2H2 (ATCC Accession Number PTA-2825). In addition to the methods set forth above and throughout the disclosure, these antibodies are believed to be useful in the treatment of various cancers, including breast cancer.

In a still further aspect the invention concerns an antibody that has complementarity determining region (CDR) residues from an antibody produced by a hybridoma selected from the group consisting of HER4.10H1.1A1 (ATCC Accession Number PTA-2828), HER4.1C6.A11 (ATCC Accession Number PTA-2829), HER4.3B9.2C9 (ATCC Accession Number PTA-2826), HER4.1A6.5B3 (ATCC Accession Number PTA-2827) and HER4.8B1.2H2 (ATCC Accession Number PTA-2825).

In a further aspect the invention concerns an antibody selected from the group consisting of an antibody produced by a hybridoma selected from the group consisting of HER4.10H1.1A1 (ATCC Accession Number PTA-2828), HER4.1C6.A11 (ATCC Accession Number PTA-2829), HER4.3B9.2C9 (ATCC Accession Number PTA-2826), HER4.1A6.5B3 (ATCC Accession Number PTA-2827) and HER4.8B1.2H2 (ATCC Accession Number PTA-2825).

The invention also concerns an antibody that binds essentially the same epitope of ErbB4 bound by an antibody selected from the group consisting of anti-ErbB4 monoclonal antibodies 4-1440, 4-1460, 4-1473, 4-1492 and 4-1464.

Further, the invention concerns an antibody that has complementarity determining region (CDR) residues from an antibody selected from the group consisting of anti-ErbB4 monoclonal antibodies 4-1440, 4-1460, 4-1473, 4-1492 and 4-1464.

The invention also concerns an antibody that binds ErbB4 with high affinity. This antibody preferably binds to ErbB4 with a K_d of less than 100 nM, more preferably with a K_d of less than 50 nM, even more preferably with a K_d of less than 25 nM and most preferably with a K_d less than 10 nM. In one embodiment this antibody is a human antibody and in another embodiment it is a humanized antibody. In yet another embodiment the antibody is an antibody fragment.

The invention further concerns an antibody which is capable of binding to both ErbB4 and ErbB3. In one embodiment the antibody is capable of binding ErbB4 with high affinity and in another embodiment the antibody binds both ErbB4 and ErbB3 with high affinity.

In another aspect the invention concerns an antibody which binds to ErbB4 and reduces heregulin binding thereto. This antibody may bind ErbB4 with high affinity.

WO 02/18444

PCT/US01/26984

Finally, the invention concerns an antibody which binds to ErbB4 and reduces heregulin-induced tyrosine phosphorylation thereof. This antibody may also bind ErbB4 with high affinity.

Brief Description of the Drawings

Figure 1 shows the nucleotide sequence of human ErbB4 (SEQ ID NO: 1).

Figure 2 shows the deduced amino acid sequence of human ErbB4 (SEQ ID NO: 2).

Figure 3 shows the nucleotide sequence of an ErbB4-IgG immunoadhesin (SEQ ID NO: 3).

Figure 4 shows the amino acid sequence of the ErbB4 extracellular domain (ECD), which comprises amino acids 26 through 840 (SEQ ID NO: 4) of the ErbB4 amino acid sequence presented in Figure 2 (SEQ ID NO: 2).

Figure 5 shows the effect of ErbB4-IgG immunoadhesin on PDGF-stimulated proliferation of human aortic smooth muscle cells.

Figure 6 shows the effect of ErbB4-IgG immunoadhesin on the chemotactic response of human aortic smooth muscle cells to thrombin.

Figure 7 shows the inhibition of heregulin binding to HER4 immunoadhesin by anti-HER4 monoclonal antibodies.

Detailed Description of the Preferred Embodiment

A. Definitions

Unless defined otherwise, technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. See, e.g. Singleton *et al.*, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed.*, J. Wiley & Sons (New York, NY 1994); Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1999). For purposes of the present invention, the following terms are defined below.

Unless indicated otherwise, the term "ErbB" when used herein refers to any one or more of the mammalian ErbB receptors (*i.e.* ErbB1 or epidermal growth factor (EGF) receptor; ErbB2 or HER2 receptor; ErbB3 or HER3 receptor; ErbB4 or HER4 receptor; and any other member(s) of this class I tyrosine kinase family to be identified in the future) and "erbB" refers to the mammalian *erbB* genes encoding these receptors.

The terms "ErbB4" and "HER4" are used interchangeably and refer to a native sequence ErbB4 receptor polypeptide as disclosed, for example, in European Patent Application No. (EP) 599,274; Ploewman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750 (1993); and Ploewman *et al.*, *Nature*, 368:473-475 (1993), and functional derivatives, including amino acid sequence variants thereof.

A "native" or "native sequence" ErbB4 or HER4 receptor has the amino acid sequence of a naturally occurring ErbB4 receptor in any mammalian (including humans) species, irrespective of its mode of preparation. Accordingly, a native or native sequence ErbB4 receptor may be isolated from nature, produced by techniques of recombinant DNA technology, chemically synthesized, or produced by any combinations of these or similar methods. Native ErbB4 receptors specifically include polypeptides having the amino acid sequence of naturally occurring allelic variants,

WO 02/18444

PCT/US01/26984

isoforms or spliced variants of ErbB4, known in the art or hereinafter discovered. Native sequence ErbB4 receptors are disclosed, for example, in EP 599,274, *supra*, and in the two Plowman *et al.* papers, *supra*. Elenius *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272:26761-26768 (1997) report the identification of two alternatively spliced isoforms of ErbB4 both in mouse and human tissues, that differ by the insertion of either 23 (HER4 JM-a) or 13 (HER4 JM-b) alternative amino acids in the extracellular juxtamembrane (JM) region. Elenius *et al.*, *Oncogene* 18:2607-2615 (1999) report the identification and characterization of another naturally occurring isoform of ErbB4 (designated as ErbB4 CYT-2), with a deletion of the cytoplasmic domain sequence required for the activation of the PI3-K intracellular signal transduction pathway. HER4 isoforms are also disclosed in WO 99/19488. A nucleotide sequence encoding ErbB4 is presented in Figure 1 (SEQ ID NO: 1) and the corresponding deduced amino acid sequence is depicted in Figure 2 (SEQ ID NO: 2).

The term "ErbB4 extracellular domain" or "ErbB4 ECD" refers to a soluble fragment of ErbB4 comprising the amino acids located between the signal sequence and the first predicted transmembrane region. In one embodiment, the "ErbB4 ECD" is a polypeptide comprising amino acids 26-640 (SEQ ID NO: 4) of the human ErbB4 sequence presented in Figure 2 (SEQ ID NO: 2).

The term "mammal" is used herein to refer to any animal classified as a mammal, including, without limitation, humans, domestic and farm animals, and zoo, sports, or pet animals, such as sheep, dogs, horses, cats, cows, *etc.* Preferably, the mammal herein is human.

"Functional derivatives" include amino acid sequence variants, and covalent derivatives of the native polypeptides as long as they retain a qualitative biological activity of the corresponding native polypeptide. Amino acid sequence variants generally differ from a native sequence in the substitution, deletion and/or insertion of one or more amino acids anywhere within a native amino acid sequence. Deletional variants include fragments of the native polypeptides, and variants having N- and/or C-terminal truncations. Ordinarily, amino acid sequence variants will possess at least about 70% homology, preferably at least about 80%, more preferably at least about 90% homology with a native polypeptide.

"Homology" is defined as the percentage of residues in the amino acid sequence variant that are identical after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent homology. Methods and computer programs for the alignment are well known in the art. One such computer program is "Align 2", authored by Genentech, Inc., which was filed with user documentation in the United States Copyright Office, Washington, DC 20559, on December 10, 1991.

An ErbB "antagonist" is a molecule, which prevents or interferes with an ErbB effector function, *e.g.* a molecule, which prevents or interferes with binding and/or activation of a native sequence ErbB receptor by a ligand, and/or downstream pathways used by the native sequence ErbB receptor. Such molecules can be screened, for example, based upon their ability to competitively inhibit ErbB receptor activation by ligand in the tyrosine phosphorylation assay. Similarly, an antagonist of a native sequence ErbB4 (HER4) receptor is a molecule which prevents or interferes with an ErbB4 effector function, *e.g.* a molecule which prevents or interferes with binding and/or activation of a native sequence ErbB4 receptor by a ligand, and/or downstream pathways used by the ErbB4 receptor.

WO 02/18444

PCT/US01/26984

Such molecules can be screened, for example, based upon their ability to competitively inhibit ErbB4 receptor activation by ligand in the tyrosine phosphorylation assay. Examples of ErbB4 antagonists include, without limitation, soluble ErbB4 receptors (such as extracellular domains (ECD) of native sequence and variant ErbB4 receptors), neutralizing antibodies against native sequence ErbB4 receptors, neutralizing antibodies to ligands of native sequence ErbB4 receptors (e.g. anti-HB-EGF antibodies), ErbB4-Ig immunoadhesins (including chimeric heteroadhesins) and small molecules.

By "ErbB4 ligand" is meant a polypeptide which binds to and/or activates an ErbB4 receptor. ErbB4 ligands include betacellulin, epiregulin, HB-EGF, NRG-2, NRG-3 and heregulins.

In the methods of the present invention, the term "control" and grammatical variants thereof, are used to refer to the prevention, partial or complete inhibition, reduction, delay or slowing down of an unwanted event, e.g. physiological condition, such as the excessive proliferation and/or migration of smooth muscle cells and/or other cell types, e.g. endothelial cells.

The term "excessive proliferation and/or migration" means proliferation and/or migration beyond normal levels that results or is likely to result, if untreated, in the development of an unwanted physiological condition or disease, such as, for example, stenosis, including vascular stenosis, restenosis, and pyloric stenosis; urinary bladder wall thickening, and obstructive airway disease.

"Treatment" refers to both therapeutic treatment and prophylactic or preventative measures. Those in need of treatment include those already with the disorder as well as those prone to have the disorder or those in which the disorder is to be prevented. For purposes of this invention, beneficial or desired clinical results include, but are not limited to, alleviation of symptoms, diminishment of extent of disease, stabilized (i.e., not worsening) state of disease, delay or slowing of disease progression, amelioration or palliation of the disease state, and remission (whether partial or total), whether detectable or undetectable. "Treatment" can also mean prolonging survival as compared to expected survival if not receiving treatment. Those in need of treatment include those already with the condition or disorder as well as those prone to have the condition or disorder or those in which the condition or disorder is to be prevented.

The term "isolated" molecule is defined broadly as a molecule that is identified and separated from at least one contaminant molecule with which it is ordinarily associated in the natural source of the molecule. Preferably, the isolated molecule is free of association with all components with which it is naturally associated.

The term "immunoadhesin" as used herein refers to antibody-like molecules that combine the binding domain of a protein such as an extracellular domain (the adhesin portion) of a cell-surface receptor with the effector functions of an immunoglobulin constant domain. The term "immunoadhesin" specifically includes native or variant ErbB4 receptor sequences. The nucleic acid sequence of an ErbB4-IgG immunoadhesin is presented in Figure 3 (SEQ ID NO: 3). Immunoadhesins can possess many of the valuable chemical and biological properties of human antibodies. Since immunoadhesins can be constructed from a human protein sequence with a desired specificity linked to an appropriate human immunoglobulin hinge and constant domain (Fc) sequence, the binding specificity of interest can be achieved using entirely human components. Such immunoadhesins are minimally immunogenic to the patient, and are safe for

WO 02/18444

PCT/US01/26984

chronic or repeated use. The term "isolated immunoadhesin" refers to an immunoadhesin that has been purified from a source or has been prepared by recombinant or synthetic methods and is sufficiently free of other peptides or proteins.

Immunoadhesins reported in the literature include fusions of the T cell receptor (Bascoigne *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**:2936-2940 (1987)); CD4 (Capon *et al.*, Nature **337**:525-531 (1989); Trautner *et al.*, Nature **339**:68-70 (1989); Zettmeissl *et al.*, DNA Cell Biol. USA **9**:347-353 (1990); and Byrn *et al.*, Nature **344**:667-670 (1990)); L-selectin or homing receptor (Watson *et al.*, J. Cell. Biol. **110**:2221-2229 (1990); and Watson *et al.*, Nature **349**:164-167 (1991)); CD44 (Aruffo *et al.*, Cell **61**:1303-1313 (1990)); CD28 and B7 (Linsley *et al.*, J. Exp. Med. **173**:721-730 (1991)); CTLA-4 (Lisley *et al.*, J. Exp. Med. **174**:561-569 (1991)); CD22 (Stamenkovic *et al.*, Cell **66**:1133-1144 (1991)); TNF receptor (Ashkenazi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**:10535-10539 (1991); Lesslauer *et al.*, Eur. J. Immunol. **27**:2883-2886 (1991); and Poppel *et al.*, J. Exp. Med. **174**:1483-1489 (1991)); NP receptors (Bennett *et al.*, J. Biol. Chem. **266**:23060-23067 (1991)); interferon receptor (Kurschner *et al.*, J. Biol. Chem. **267**:9354-9360 (1992)); 4-1BB (Chalupny *et al.*, PNAS USA **89**:10360-10364 (1992)) and IgE receptor (Ridgway and Gorman, J. Cell. Biol. **115**, Abstract No. 1448 (1991)).

Examples of homomultimeric immunoadhesins which have been described for therapeutic use include the CD4-IgG immunoadhesin for blocking the binding of HIV to cell-surface CD4. Data obtained from Phase I clinical trials, in which CD4-IgG was administered to pregnant women just before delivery, suggests that this immunoadhesin may be useful in the prevention of maternal-fetal transfer of HIV (Ashkenazi *et al.*, Intern. Rev. Immunol. **10**:219-227 (1993)). An immunoadhesin which binds tumor necrosis factor (TNF) has also been developed. TNF is a proinflammatory cytokine which has been shown to be a major mediator of septic shock. Based on a mouse model of septic shock, a TNF receptor immunoadhesin has shown promise as a candidate for clinical use in treating septic shock (Ashkenazi, A. *et al.* (1991) PNAS USA **88**:10535-10539). ENBREL® (etanercept), an immunoadhesin comprising a TNF receptor sequence fused to an IgG Fc region, was approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA), on November 2, 1998, for the treatment of rheumatoid arthritis. The new expanded use of ENBREL® in the treatment of rheumatoid arthritis has recently been approved by FDA on June 6, 2000. For recent information on TNF blockers, including ENBREL®, see Lovell *et al.*, N. Engl. J. Med. **342**: 763-169 (2000), and accompanying editorial on p810-811; and Weinblatt *et al.*, N. Engl. J. Med. **340**: 253-259 (1999); reviewed in Maini and Taylor, Annu. Rev. Med. **51**: 207-229 (2000). Immunoadhesins also have non-therapeutic uses. For example, the L-selectin receptor immunoadhesin was used as a reagent for histochemical staining of peripheral lymph node high endothelial venules (HEV). This reagent was also used to isolate and characterize the L-selectin ligand (Ashkenazi *et al.*, *supra*).

If the two arms of the immunoadhesin structure have different specificities, the immunoadhesin is called a "bispecific immunoadhesin" by analogy to bispecific antibodies. Dietsch *et al.*, J. Immunol. Methods **162**:123 (1993) describe such a bispecific immunoadhesin combining the extracellular domains of the adhesion molecules, E-selectin and P-selectin, each of which selectins is expressed in a different cell type in nature. Binding studies indicated that the bispecific immunoglobulin fusion protein so formed had an enhanced ability to bind to a myeloid cell line compared to the monospecific immunoadhesins from which it was derived.

WO 02/18444

PCT/US01/26984

The term "heteroadhesin" is used interchangeably with the expression "chimeric heteromultimer adhesin" and refers to a complex of chimeric molecules (amino acid sequences) in which each chimeric molecule combines a biologically active portion, such as the extracellular domain of each of the heteromultimeric receptor monomers, with a multimerization domain. The "multimerization domain" promotes stable interaction of the chimeric molecules within the heteromultimer complex. The multimerization domains may interact via an immunoglobulin sequence, leucine zipper, a hydrophobic region, a hydrophilic region, or a free thiol which forms an intermolecular disulfide bond between the chimeric molecules of the chimeric heteromultimer. The multimerization domain may comprise an immunoglobulin constant region. In addition a multimerization region may be engineered such that steric interactions not only promote stable interaction, but further promote the formation of heterodimers over homodimers from a mixture of monomers. "Protuberances" are constructed by replacing small amino acid side chains from the interface of the first polypeptide with larger side chains (e.g. tyrosine or tryptophan). Compensatory "cavities" of identical or similar size to the protuberances are optionally created on the interface of the second polypeptide by replacing large amino acid side chains with smaller ones (e.g. alanine or threonine). The immunoglobulin sequence preferably, but not necessarily, is an immunoglobulin constant domain. The immunoglobulin moiety in the chimeras of the present invention may be obtained from IgG, IgG₂, IgG₃ or IgG₄ subtypes, IgA, IgE, IgD or IgM, but preferably IgG, or IgG₃.

The term "epitope tagged" when used herein refers to a chimeric polypeptide comprising the entire chimeric heteroadhesin, or a fragment thereof, fused to a "tag polypeptide". The tag polypeptide has enough residues to provide an epitope against which an antibody can be made, yet is short enough such that it does not interfere with activity of the chimeric heteroadhesin. The tag polypeptide preferably is fairly unique so that the antibody thereagainst does not substantially cross-react with other epitopes. Suitable tag polypeptides generally have at least 6 amino acid residues and usually between about 8-50 amino acid residues (preferably between about 9-30 residues). An embodiment of the invention encompasses a chimeric heteroadhesin linked to an epitope tag, which tag is used to detect the adhesin in a sample or recover the adhesin from a sample.

"Isolated/highly purified/substantially homogenous immunoadhesin", "isolated/highly purified/substantially homogenous heteroadhesin", and "isolated/highly purified/substantially homogenous chimeric heteromultimer adhesin", are used interchangeably and mean the adhesin that has been purified from a source or has been prepared by recombinant or synthetic methods and is sufficiently free of other peptides or proteins to homogeneity by chromatographic techniques or other purification techniques, such as SDS-PAGE under non-reducing or reducing conditions using Coomassie blue or, preferably, silver stain. Homogeneity here means less than about 5% contamination with other source proteins. The ErbB2/4-IgG chimeric heteroadhesins of the invention bind with sufficiently greater affinity relative to the homodimers that the use of a mixture of homodimers and heterodimers is also considered a useful embodiment of the invention. The terms "chimeric heteromultimer adhesin", "chimeric heteroadhesin" and "CHA" are used interchangeably herein.

WO 02/18444

PCT/US01/26984

The term "antibody" is used in the broadest sense and specifically covers antibodies that recognize native ErbB4 receptors. An antibody that shows "high affinity" binding has a K_d of less than about 100 nM, preferably less than about 50, more preferably less than about 25, most preferably less than about 10.

The term "monoclonal antibody" as used herein refers to an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, *i.e.*, the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally-occurring mutations that may be present in minor amounts. Monoclonal antibodies are highly specific, being directed against a single antigenic site. Furthermore, in contrast to conventional (polyclonal) antibody preparations which typically include different antibodies directed against different determinants (epitopes), each monoclonal antibody is directed against a single determinant on the antigen.

The monoclonal antibodies herein include hybrid and recombinant antibodies produced by splicing a variable (including hypervariable) domain of an anti-chimeric heteroadhesin antibody with a constant domain (*e.g.* "humanized" antibodies), or a light chain with a heavy chain, or a chain from one species with a chain from another species, or fusions with heterologous proteins, regardless of species of origin or immunoglobulin class or subclass designation, as well as antibody fragments (*e.g.*, Fab, Fab₂, and Fv), so long as they exhibit the desired biological activity. (See, *e.g.*, US Pat No 4,816,567 and Mage & Lamoyi, in *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp.79-87 (Marcel Dekker, Inc.), New York (1987)).

Thus, the modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as being obtained from a substantially homogeneous population of antibodies, and is not to be construed as requiring production of the antibody by any particular method. For example, the monoclonal antibodies to be used in accordance with the present invention may be made by the hybridoma method first described by Kohler & Milstein, *Nature* 256:495 (1975), or may be made by recombinant DNA methods (U.S. Patent No. 4,816,567). The "monoclonal antibodies" may also be isolated from phage libraries generated using the techniques described in McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554 (1990), for example.

"Humanized" forms of non-human (*e.g.* murine) antibodies are specific chimeric immunoglobulins, immunoglobulin chains or fragments thereof (such as Fv, Fab, Fab', Fab₂ or other antigen-binding subsequences of antibodies) which contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. For the most part, humanized antibodies are human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from the complementarity determining regions (CDRs) of the recipient antibody are replaced by residues from the CDRs of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat or rabbit having the desired specificity, affinity and capacity. In some instances, Fv framework region (FR) residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human FR residues. Furthermore, the humanized antibody may comprise residues which are found neither in the recipient antibody nor in the imported CDR or FR sequences. These modifications are made to further refine and optimize antibody performance. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the CDR regions correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FR residues are those of a human immunoglobulin consensus

WO 02/18444

PCT/US01/26984

sequence. The humanized antibody optimally also will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin.

"Muscle cells" include skeletal, cardiac or smooth muscle tissue cells. This term encompasses those cells which differentiate to form more specialized muscle cells (*e.g.* myoblasts). Vascular smooth muscle cells refer to smooth muscle cells present in a middle elastic layer, media, of blood vessels.

The term "stenosis" refers to narrowing or stricture of a hollow passage (*e.g.*, a duct or canal) in the body. The term "vascular stenosis" refers to occlusion or narrowing of blood vessels. Vascular stenosis often results from fatty deposit (as in the case of atherosclerosis) or excessive migration and proliferation of vascular smooth muscle cells and endothelial cells. Arteries are particularly susceptible to stenosis. The term "stenosis" as used herein specifically includes initial stenosis and restenosis.

The term "restenosis" refers to recurrence of stenosis after treatment of initial stenosis with apparent success. For example, "restenosis" in the context of vascular stenosis, refers to the reoccurrence of vascular stenosis after it has been treated with apparent success, *e.g.*, by removal of fatty deposit by balloon angioplasty. One of the contributing factors in restenosis is intimal hyperplasia. The term "intimal hyperplasia", used interchangeably with "neointimal hyperplasia" and "neointima formation", refers to thickening of the inner most layer of blood vessels, intima, as a consequence of excessive proliferation and migration of vascular smooth muscle cells and endothelial cells. The various changes taking place during restenosis are often collectively referred to as "vascular wall remodeling."

The terms "balloon angioplasty" and "percutaneous transluminal coronary angioplasty" (PTCA) are often used interchangeably, and refer to a non-surgical catheter-based treatment for removal of plaque from the coronary artery. Stenosis or restenosis often lead to hypertension as a result of increased resistance to blood flow.

The term "pyloric stenosis" refers to narrowing of pylorus, the passage at the lower end of the stomach that opens into the duodenum.

The term "hypertension" refers to abnormally high blood pressure, *i.e.* beyond the upper value of the normal range.

By "neutralizing antibody" is meant an antibody molecule as herein defined which is able to block or significantly reduce an effector function of ErbB receptors. Accordingly, a "neutralizing" anti-ErbB4 antibody is capable of blocking or significantly reducing an effector function, such as ligand binding and/or elicitation of a cellular response, of ErbB4. For the purpose of the present invention, the ability of an anti-ErbB4 antibody to neutralize the binding of an ErbB4 ligand (heregulin, HRG) to ErbB4 can be monitored, for example, by measuring the binding of detectably labeled HRG to purified ErbB4 or to a cell line expressing or modified to express ErbB4 in the presence and absence of a candidate anti-ErbB4 antibody. Such assays are described in Example 4 below. For the purpose of the present invention, the ability of the anti-ErbB4 antibodies to neutralize the elicitation of a cellular response by ErbB4 is preferably tested by monitoring the inhibition of tyrosine phosphorylation of ErbB4 by heregulin (HRG), or in a cell proliferation assay. Representative assays are disclosed in Example 4 below. "Significant" reduction means at least about 60%, or at least about 70%, preferably at least about 75%, more preferably at least about 80%, even more

WO 02/18444

PCT/US01/26984

preferably at least about 85%, still more preferably at least about 90%, still more preferably at least about 95%, most preferably at least about 99% reduction of an effector function of the target antigen (e.g. ErbB4), such as ligand (e.g. HRG) binding and/or elicitation of a cellular response. Preferably, the "neutralizing" antibodies as defined herein will be capable of neutralizing at least about 60%, or at least about 70%, preferably at least about 75%, more preferably at least about 80%; even more preferably at least about 85%, still more preferably at least about 90%, still more preferably at least about 95%, most preferably at least about 99% of the tyrosine phosphorylation of ErbB4 by HRG, as determined by the assay described in Example 4.

An "isolated" antibody is one that has been identified and separated and/or recovered from a component of its natural environment. Contaminant components of its natural environment are materials that would interfere with diagnostic or therapeutic uses for the antibody, and may include enzymes, hormones, and other proteinaceous or non-proteinaceous solutes. In preferred embodiments, the antibody will be purified (1) to greater than 95% by weight of antibody as determined by the Lowry method, and most preferably more than 99% by weight, (2) to a degree sufficient to obtain at least 15 residues of N-terminal or internal amino acid sequence by use of a spinning cup sequenator, or (3) to homogeneity by SDS-PAGE under reducing or non-reducing conditions using Coomassie blue or, preferably, silver stain. Isolated antibody includes the antibody *in situ* within recombinant cells since at least one component of the antibody's natural environment will not be present. Ordinarily, however, isolated antibody will be prepared by at least one purification step.

The term "epitope" is used to refer to binding sites for (monoclonal or polyclonal) antibodies on protein antigens.

Antibodies which bind to a particular epitope can be identified by "epitope mapping." There are many methods known in the art for mapping and characterizing the location of epitopes on proteins, including solving the crystal structure of an antibody-antigen complex, competition assays, gene fragment expression assays, and synthetic peptide-based assays, as described, for example, in Chapter 11 of Harlow and Lane, *Using Antibodies*, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1998. Competition assays are discussed below. According to the gene fragment expression assays, the open reading frame encoding the protein is fragmented either randomly or by specific genetic constructions and the reactivity of the expressed fragments of the protein with the antibody to be tested is determined. The gene fragments may, for example, be produced by PCR and then transcribed and translated into protein *in vitro*, in the presence of radioactive amino acids. The binding of the antibody to the radioactively labeled protein fragments is then determined by immunoprecipitation and gel electrophoresis. Certain epitopes can also be identified by using large libraries of random peptide sequences displayed on the surface of phage particles (phage libraries). Alternatively, a defined library of overlapping peptide fragments can be tested for binding to the test antibody in simple binding assays. The latter approach is suitable to define linear epitopes of about 5 to 15 amino acids.

An antibody binds "essentially the same epitope" as a reference antibody, when the two antibodies recognize identical or sterically overlapping epitopes. The most widely used and rapid methods for determining whether two

WO 02/18444

PCT/US01/26984

epitopes bind to identical or sterically overlapping epitopes are competition assays, which can be configured in all number of different formats, using either labeled antigen or labeled antibody. Usually, the antigen is immobilized on a 96-well plate, and the ability of unlabeled antibodies to block the binding of labeled antibodies is measured using radioactive or enzyme labels.

The phrase "inhibiting an ErbB4 (HER4) receptor" refers to the ability of an ErbB4 antagonist to inhibit or prevent activation of an ErbB4 receptor, for example, by blocking the binding of a ligand to the ErbB4 receptor. The "activation" of an ErbB4 receptor refers to receptor phosphorylation, which can be quantified using the tyrosine phosphorylation assays, and downstream events that constitute induction of signal transduction by the bound ligand. "Inhibition" is any of these assays is at least about 60%, or at least about 70%, preferably at least about 75%, more preferably at least about 80%; even more preferably at least about 85%, still more preferably at least about 90%, still more preferably at least about 95%, most preferably at least about 99%.

The expression "decreasing survival of a cell" refers to the act of decreasing the period of existence of a cell, relative to an untreated cell which has not been exposed to a ErbB4 antagonist either *in vitro* or *in vivo*. The expression "decreased cell proliferation" refers to a decrease in the number of cells in a population exposed to an ErbB4 antagonist either *in vitro* or *in vivo*, relative to an untreated cell.

"Biological activity" where used in conjunction with an ErbB4 antagonist refers to the ability of an ErbB4 antagonist to control the excessive proliferation or migration of smooth muscle cells, as determined in a relevant *in vitro* or *in vivo* assay, including the PDGF-stimulated smooth muscle cell proliferation and human aortic smooth muscle cell migration assays described in the Examples hereinbelow, animal models and human clinical trials, irrespective of the underlying mechanism. Thus, the biological activity of an ErbB4 antagonist includes, without limitation, functioning as an inhibitor of the binding of a ligand or activation of a native ErbB4 receptor, and/or inhibition of growth and/or migration of smooth muscle cells expressing an ErbB4 receptor on their surface.

The term "disease state" refers to a physiological state of a cell or of a whole mammal in which an interruption, cessation, or disorder of cellular or body functions systems, or organs has occurred.

The term "effective amount" refers to an amount of a drug effective to treat (including prevention) a disease, disorder or unwanted physiological conditions in a mammal. In the present invention, an "effective amount" of an ErbB4 antagonist may reduce, slow down or delay the proliferation of smooth muscle cells; reduce, slow down or delay the migration of smooth muscle cells; prevent or inhibit (*i.e.*, slow to some extent and preferably stop) the development of stenosis or restenosis; and/or relieve to some extent one or more of the symptoms associated with stenosis or restenosis, in particular, prevent or inhibit (*i.e.*, slow to some extent and preferably stop) the development of elevated blood pressure associated with stenosis or restenosis.

Nucleic acid is "operably linked" when it is placed into a functional relationship with another nucleic acid sequence. For example, DNA for a presequence or secretory leader is operably linked to DNA for a polypeptide if it is expressed as a preprotein that participates in the secretion of the polypeptide; a promoter or enhancer is operably linked to a coding sequence if it affects the transcription of the sequence; or a ribosome binding site is operably linked

WO 02/18444

PCT/US01/26984

to a coding sequence if it is positioned so as to facilitate translation. Generally, "operably linked" means that the DNA sequences being linked are contiguous, and, in the case of a secretory leader, contiguous and in reading phase. However, enhancers do not have to be contiguous. Linking is accomplished by ligation at convenient restriction sites. If such sites do not exist, the synthetic oligonucleotide adapters or linkers are used in accordance with conventional practice.

"Pharmaceutically acceptable" carriers, excipients, or stabilizers are ones which are nontoxic to the cell or mammal being exposed thereto at the dosages and concentrations employed. Often the physiologically acceptable carrier is an aqueous pH buffered solution. Examples of physiologically acceptable carriers include buffers such as phosphate, citrate, and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid; low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, arginine or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrins; chelating agents such as EDTA; sugar alcohols such as mannitol or sorbitol; salt-forming counterions such as sodium; and/or nonionic surfactants such as Tween, polyethylene glycol (PEG), and Pluronic.

B. Methods for carrying out the invention

The invention concerns the treatment of stenosis by antagonists of native ErbB4 receptors. Although the invention is not so limited, in a preferred embodiment, the antagonist is an immunoadhesin or a chimeric heteromultimer adhesin. Immunoadhesins (referred to as hybrid immunoglobulins), including their structure and preparation, are described, e.g. in WO 91/08298; and in U.S. Patent Nos. 5,428,130 and 5,116,964, the disclosures of which are hereby expressly incorporated by reference.

1. Production of an immunoadhesin or chimeric heteromultimer adhesin.

The description below relates primarily to production of immunoadhesin by culturing cells transformed or transfected with a vector containing immunoadhesin nucleic acid. It is, of course, contemplated that alternative methods, which are well known in the art, may be employed to prepare immunoadhesin. For instance, the immunoadhesin sequence, or portions thereof, may be produced by direct peptide synthesis using solid-phase techniques [see, e.g., Stewart et al., *Solid-Phase Peptide Synthesis*, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**:2149-2154 (1963)]. *In vitro* protein synthesis may be performed using manual techniques or by automation. Automated synthesis may be accomplished, for instance, using an Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) using manufacturer's instructions. Various portions of the immunoadhesin may be chemically synthesized separately and combined using chemical or enzymatic methods to produce the full-length immunoadhesin.

WO 02/18444

PCT/US01/26984

Nucleic acid encoding a native sequence ErbB4 receptor can, for example, be isolated from cells known to express the ErbB4 receptor, such as those described in EP 599,274, *supra*, and in the collective Plowman *et al.* references, *supra* or is synthesized.

DNA encoding immunoglobulin light or heavy chain constant regions is known or readily available from cDNA libraries or is synthesized. See for example, Adams *et al.*, *Biochemistry* 19:2711-2719 (1980); Gough *et al.*, *Biochemistry* 19:2702-2710 (1980); Dolby *et al.*, *P.N.A.S. USA*, 77:6027-6031 (1980); Rice *et al.* *P.N.A.S. USA* 79:7862-7865 (1982); Falkner *et al.* *Nature* 298:286-288 (1982); and Morrison *et al.* *Ann. Rev. Immunol.* 2:239-256 (1984).

An immunoadhesin or a chimeric heteroadhesin of the invention is preferably produced by expression in a host cell and isolated therefrom. A host cell is generally transformed with the nucleic acid of the invention. Preferably the nucleic acid is incorporated into an expression vector. Suitable host cells for cloning or expressing the vectors herein are prokaryote host cells (such as *E. coli*, strains of *Bacillus*, *Pseudomonas* and other bacteria), yeast and other eukaryotic microbes, and higher eukaryote cells (such as Chinese hamster ovary (CHO) cells and other mammalian cells). The cells may also be present in live animals (for example, in cows, goats or sheep). Insect cells may also be used. Cloning and expression methodologies are well known in the art.

To obtain expression of an immunoadhesin such as a chimeric ErbB4-IgG molecule, one or more expression vector(s) are introduced into host cells by transformation or transfection and the resulting recombinant host cells are cultured in conventional nutrient media, modified as appropriate for inducing promoters, selecting recombinant cells, or amplifying the ErbB4-IgG DNA. In general, principles, protocols, and practical techniques for maximizing the productivity of *in vitro* mammalian cell cultures can be found in *Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991).

(i) *Construction of nucleic acid encoding immunoadhesin*

When preparing the immunoadhesins of the present invention, preferably nucleic acid encoding an extracellular domain of a natural receptor is fused C-terminally to nucleic acid encoding the N-terminus of an immunoglobulin constant domain sequence, however N-terminal fusions are also possible. Typically, in such fusions the encoded chimeric polypeptide will retain at least functionally active hinge, CH2 and CH3 domains of the constant region of an immunoglobulin heavy chain. Fusions are also made to the C-terminus of the Fc portion of a constant domain, or immediately N-terminal to the CH1 of the heavy chain or the corresponding region of the light chain. The resultant DNA fusion construct is expressed in appropriate host cells.

Nucleic acid molecules encoding amino acid sequence variants of native sequence extracellular domains (such as from ErbB4) and/or the antibody sequences used to prepare the desired immunoadhesin, are prepared by a variety of methods known in the art. These methods include, but are not limited to, isolation from a natural source (in the case of naturally occurring amino acid sequence variants, such as those mentioned above in connection with ErbB4) or preparation by oligonucleotide-mediated (or site-directed) mutagenesis, PCR mutagenesis, and cassette mutagenesis of an earlier prepared variant or a non-variant version of native sequence ErbB4.

WO 02/18444

PCT/US01/26984

Amino acid sequence variants of native sequence extracellular domain included in the chimeric heteroadhesin are prepared by introducing appropriate nucleotide changes into the native extracellular domain DNA sequence, or by *in vitro* synthesis of the desired chimeric heteroadhesin monomer polypeptide. Such variants include, for example, deletions from, or insertions or substitutions of, residues in the amino acid sequence of the immunoadhesin or chimeric heteroadhesin.

Variations in the native sequence as described above can be made using any of the techniques and guidelines for conservative and non-conservative mutations set forth in Table 1.

In a preferred embodiment, the nucleic acid encodes a chimeric molecule in which the ErbB4 receptor extracellular domain sequence is fused to the N-terminus of the C-terminal portion of an antibody (in particular the Fc domain), containing the effector functions of an immunoglobulin, e.g. IgG1. It is possible to fuse the entire heavy chain constant region to the ErbB4 receptor extracellular domain sequence. However, more preferably, a sequence beginning in the hinge region just upstream of the papain cleavage site (which defines IgG Fc chemically; residue 216, taking the first residue of heavy chain constant region to be 114 (Kabat et al., supra), or analogous sites of other immunoglobulins) is used in the fusion. In a particularly preferred embodiment, the ErbB4 receptor extracellular domain sequence is fused to the hinge region and CH2 and CH3 or CH1, hinge, CH2 and CH3 domains of an IgG1, IgG2, or IgG3 heavy chain. The precise site at which the fusion is made is not critical, and the optimal site can be determined by routine experimentation.

For human immunoadhesins, the use of human IgG1 and IgG3 immunoglobulin sequences is preferred. A major advantage of using IgG1 is that IgG1 immunoadhesins can be purified efficiently on immobilized protein A. In contrast, purification of IgG3 requires protein G, a significantly less versatile medium. However, other structural and functional properties of immunoglobulins should be considered when choosing the Ig fusion partner for a particular immunoadhesin construction. For example, the IgG3 hinge is longer and more flexible, so it can accommodate larger "adhesin" domains that may not fold or function properly when fused to IgG1. Another consideration may be valency; IgG immunoadhesins are bivalent homodimers, whereas Ig subtypes like IgA and IgM may give rise to dimeric or pentameric structures, respectively, of the basic Ig homodimer unit.

For ErbB4-Ig immunoadhesins designed for *in vivo* application, the pharmacokinetic properties and the effector functions specified by the Fc region are important as well. Although IgG1, IgG2 and IgG4 all have *in vivo* half-lives of 21 days, their relative potencies at activating the complement system are different. IgG4 does not activate complement, and IgG2 is significantly weaker at complement activation than IgG1. Moreover, unlike IgG1, IgG2 does not bind to Fc receptors on mononuclear cells or neutrophils. While IgG3 is optimal for complement activation, its *in vivo* half-life is approximately one third of the other IgG isotypes.

Another important consideration for immunoadhesins designed to be used as human therapeutics is the number of allotypic variants of the particular isotype. In general, IgG isotypes with fewer serologically-defined allotypes are preferred. For example, IgG1 has only four serologically-defined allotypic sites, two of which (G1m and 2) are located in the Fc region; and one of these sites G1m1, is non-immunogenic. In contrast, there are 12

WO 02/18444

PCT/US01/26984

serologically-defined allotypes in IgG3, all of which are in the Fc region; only three of these sites (G3m5, 11 and 21) have one allotype which is nonimmunogenic. Thus, the potential immunogenicity of an IgG3 immunoadhesin is greater than that of an IgG1 immunoadhesin.

The cDNAs encoding the ErbB4 receptor sequence (e.g. an extracellular domain sequence) and the Ig parts of the immunoadhesin are inserted in tandem into a plasmid vector that directs efficient expression in the chosen host cells. For expression in mammalian cells pRK5-based vectors [Schell et al., Cell 61, 361-370 (1990)] and CDM8-based vectors [Seed, Nature 329, 840 (1989)] may, for example, be used. The exact junction can be created by removing the extra sequences between the designed junction codons using oligonucleotide-directed deletional mutagenesis [Zoller and Smith, Nucleic Acids Res. 10, 6487 (1982); Capon et al., Nature 337, 525-531 (1989)]. Synthetic oligonucleotides can be used, in which each half is complementary to the sequence on either side of the desired junction; ideally, these are 36 to 48-mers. Alternatively, PCR techniques can be used to join the two parts of the molecule in-frame with an appropriate vector.

Although the presence of an immunoglobulin light chain is not required in the immunoadhesins of the present invention, an immunoglobulin light chain might be present either covalently associated to an trk receptor-immunoglobulin heavy chain fusion polypeptide, or directly fused to the trk receptor extracellular domain. In the former case, DNA encoding an immunoglobulin light chain is typically coexpressed with the DNA encoding the ErbB4 receptor-immunoglobulin heavy chain fusion protein. Upon secretion, the hybrid heavy chain and the light chain will be covalently associated to provide an immunoglobulin-like structure comprising two disulfide-linked immunoglobulin heavy chain-light chain pairs. Method suitable for the preparation of such structures are, for example, disclosed in U.S. Pat. No. 4,816,567 issued Mar. 28, 1989.

Another preferred type of chimeric ErbB4 antagonist herein is a fusion protein comprising an extracellular domain, such as from a ErbB4 monomer, linked to a heterologous polypeptide, such as a multimerization domain. Such a sequence can be constructed using recombinant DNA techniques. Alternatively, the heterologous polypeptide can be covalently bound to the extracellular domain polypeptide by techniques well known in the art such as the use of the heterobifunctional crosslinking reagents. Exemplary coupling agents include N-succinimidyl-3-(2-pyridylthiol) propionate (SPDP), iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCL), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as glutaraldehyde), bis-azido compounds (such as bis (p-azidobenzoyl) hexanediamine), bis-diazonium derivatives (such as bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (such as tolyene 2,6-diisocyanate), and bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene).

In one embodiment, a chimeric heteroadhesin polypeptide comprises a fusion of a monomer of the chimeric heteroadhesin with a tag polypeptide which provides an epitope to which an anti-tag antibody can selectively bind. Such epitope tagged forms of the chimeric heteroadhesin are useful, as the presence thereof can be detected using a labeled antibody against the tag polypeptide. Also, provision of the epitope tag enables the chimeric heteroadhesin to be readily purified by affinity purification using the anti-tag antibody. Tag polypeptides and their respective antibodies

WO 02/18444

PCT/US01/26984

are well known in the art. Examples include the flu HA tag polypeptide and its antibody 12CA5, (Field *et al.*, Mol. Cell. Biol. 9:2159-2165 (1989)); the c-myc tag and the 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 and 9E10 antibodies thereto (Evan *et al.*, Molecular and Cellular Biology 5(12):3610-3616 (1985)); and the Herpes Simplex virus glycoprotein D (gD) tag and its antibody (Paborsky *et al.*, Protein Engineering 3(6):547-553 (1990)).

Another type of covalent modification of a chimeric heteromultimer comprises linking a monomer polypeptide of the heteromultimer to one of a variety of non-proteinaceous polymers, *e.g.*, polyethylene glycol, polypropylene glycol, polyoxyalkylenes, or copolymers of polyethylene glycol and polypropylene glycol. A chimeric heteromultimer also may be entrapped in microcapsules prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization (for example, hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsules and poly(methylmethacrylate) microcapsules, respectively), in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles and nanocapsules), or in macroemulsions. Such techniques are disclosed in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980).

(ii) *Selection and Transformation of Host Cells*

Host cells are transfected or transformed with expression or cloning vectors described herein for immunoadhesin production and cultured in conventional nutrient media modified as appropriate for inducing promoters, selecting transformants, or amplifying the genes encoding the desired sequences. The culture conditions, such as media, temperature, pH and the like, can be selected by the skilled artisan without undue experimentation. In general, principles, protocols, and practical techniques for maximizing the productivity of cell cultures can be found in *Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) and Sambrook *et al.*, *supra*.

The terms "transformation" and "transfection" are used interchangeably herein and refer to the process of introducing DNA into a cell. Following transformation or transfection, the nucleic acid of the invention may integrate into the host cell genome, or may exist as an extrachromosomal element. Methods of eukaryotic cell transfection and prokaryotic cell transformation are known to the ordinarily skilled artisan, for example, CaCl_2 , CaPO_4 , liposome-mediated and electroporation. Depending on the host cell used, transformation is performed using standard techniques appropriate to such cells. The calcium treatment employing calcium chloride, as described in Sambrook *et al.*, *supra*, or electroporation is generally used for prokaryotes. Infection with *Agrobacterium tumefaciens* is used for transformation of certain plant cells, as described by Shaw *et al.*, *Gene*, 23:315 (1983) and WO 89/05859 published 29 June 1989. For mammalian cells without such cell walls, the calcium phosphate precipitation method of Graham and van der Eb, *Virology*, 52:456-457 (1978) can be employed. General aspects of mammalian cell host system transfections have been described in U.S. Patent No. 4,389,216. Transformations into yeast are typically carried out according to the method of Van Solingen *et al.*, *J. Bact.*, 130:946 (1977) and Hsiao *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76:3829 (1979). However, other methods for introducing DNA into cells, such as by nuclear microinjection, electroporation, bacterial protoplast fusion with intact cells, or polycations, *e.g.*, polybrene, polyornithine, may also be used. For various techniques for transforming mammalian cells, see Keown *et al.*, *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990) and Mansour *et al.*, *Nature*, 336:348-352 (1988).

WO 02/18444

PCT/US01/26984

Suitable host cells for cloning or expressing the DNA in the vectors herein include prokaryote, yeast, or higher eukaryote cells. Suitable prokaryotes include but are not limited to eubacteria, such as Gram-negative or Gram-positive organisms, for example, Enterobacteriaceae such as *E. coli*. Various *E. coli* strains are publicly available, such as *E. coli* K12 strain MM294 (ATCC 31,446); *E. coli* X1776 (ATCC 31,537); *E. coli* strain W3110 (ATCC 27,325) and K5 772 (ATCC 53,635). Other suitable prokaryotic host cells include Enterobacteriaceae such as *Escherichia*, e.g., *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, e.g., *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, e.g., *Serratia marcescens*, and *Shigella*, as well as *Bacilli* such as *B. subtilis* and *B. licheniformis* (e.g., *B. licheniformis* 41P disclosed in DD 266,710 published 12 April 1989), *Pseudomonas* such as *P. aeruginosa*, and *Streptomyces*. These examples are illustrative rather than limiting. Strain W3110 is one particularly preferred host or parent host because it is a common host strain for recombinant DNA product fermentation. Preferably, the host cell secretes minimal amounts of proteolytic enzymes. For example, strain W3110 may be modified to effect a genetic mutation in the genes encoding proteins endogenous to the host, with examples of such hosts including *E. coli* W3110 strain 1A2, which has the complete genotype *tonA*; *E. coli* W3110 strain 9E4, which has the complete genotype *tonA ptr3*; *E. coli* W3110 strain 27C7 (ATCC 55,244), which has the complete genotype *tonA ptr3 phaA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan*; *E. coli* W3110 strain 37D6, which has the complete genotype *tonA ptr3 phaA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan*; *E. coli* W3110 strain 40B4, which is strain 37D6 with a non-kanamycin resistant *degP* deletion mutation; and an *E. coli* strain having mutant periplasmic protease disclosed in U.S. Patent No. 4,946,783 issued 7 August 1990. Alternatively, *in vitro* methods of cloning, e.g., PCR or other nucleic acid polymerase reactions, are suitable.

In addition to prokaryotes, eukaryotic microbes such as filamentous fungi or yeast are suitable cloning or expression hosts for immunoadhesin-encoding vectors. *Saccharomyces cerevisiae* is a commonly used lower eukaryotic host microorganism. Others include *Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse, *Nature*, 290: 140 (1981); EP 139,383 published 2 May 1995); *Kluyveromyces* hosts (U.S. Patent No. 4,943,529; Fleer et al., *BioTechnology*, 9:968-975 (1991)) such as, e.g., *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt et al., *J. Bacteriol.*, 154(2): 737-742 (1983)), *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilae* (ATCC 36,906; Van den Berg et al., *BioTechnology*, 8:135 (1990)), *K. thermotolerans*, and *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070; Sreekrishna et al., *J. Basic Microbiol.*, 28:265-278 (1988)); *Candida*; *Trichoderma reesei* (EP 244,234); *Neurospora crassa* (Case et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:5258-5263 (1979)); *Schwanniomyces* such as *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394,538 published 31 October 1990); and filamentous fungi such as, e.g., *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357 published 10 January 1991), and *Aspergillus* hosts such as *A. nidulans* (Ballance et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112:284-289 (1983); Tilburn et al., *Gene*, 26:205-221 (1983); Yelton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1470-1474 (1984)) and *A. niger* (Kelly and Hynes, *EMBO J.*, 4:475-479 (1985)). Methylophilic yeasts are suitable herein and include, but are not limited to, yeast capable of growth on methanol selected from the genera consisting of *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, and *Rhodotorula*. A list of specific

WO 02/18444

PCT/US01/26984

species that are exemplary of this class of yeasts may be found in C. Anthony, The Biochemistry of Methylophilic, 269 (1982).

Suitable host cells for the expression of glycosylated immunoadhesins are derived from multicellular organisms. Examples of invertebrate cells include insect cells such as *Drosophila* S2 and *Spodoptera* Sf9, as well as plant cells. Examples of useful mammalian host cell lines include Chinese hamster ovary (CHO) and COS cells. More specific examples include monkey kidney CV1 line transformed by SV40 (COS-7, ATCC CRL 1851); human embryonic kidney line (293 or 293 cells subcloned for growth in suspension culture, Graham et al., *J. Gen. Virol.*, 36:59 (1977)); Chinese hamster ovary cells/DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)); mouse sertoli cells (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)); human lung cells (W138, ATCC CCL 75); human liver cells (Hep G2, HB 8085); and mouse mammary tumor (MMT 060562, ATCC CCL51). The selection of the appropriate host cell is deemed to be within the skill in the art.

In general, the choice of a mammalian host cell line for the expression of ErbB4-Ig immunoadhesins depends mainly on the expression vector (see below). Another consideration is the amount of protein that is required. Milligram quantities often can be produced by transient transfections. For example, the adenovirus EIA-transformed 293 human embryonic kidney cell line can be transfected transiently with pRK5-based vectors by a modification of the calcium phosphate method to allow efficient immunoadhesin expression. COM8-based vectors can be used to transfect COS cells by the DEAE-dextran method (Auffo et al., *Cell* 61, 1303-1313 (1980)); Zettmeissl et al., *DNA Cell Biol.* (US) 9, 347-353 (1990). If larger amounts of protein are desired, the immunoadhesin can be expressed after stable transfection of a host cell line. For example, a pRK5-based vector can be introduced into Chinese hamster ovary (CHO) cells in the presence of an additional plasmid encoding dihydrofolate reductase (DHFR) and conferring resistance to G418. Clones resistant to G418 can be selected in culture; these clones are grown in the presence of increasing levels of DHFR inhibitor methotrexate; clones are selected, in which the number of gene copies encoding the DHFR and immunoadhesin sequences is co-amplified. If the immunoadhesin contains a hydrophobic leader sequence at its N-terminus, it is likely to be processed and secreted by the transfected cells. The expression of immunoadhesins with more complex structures may require uniquely suited host cells; for example, components such as light chain or J chain may be provided by certain myeloma or hybridoma cell hosts (Gascoigne et al., 1987, *supra*; Martin et al., *J. Virol.* 67, 3561-3568 (1993)).

(iii) Selection and Use of a Replicable Vector

The nucleic acid encoding immunoadhesin may be inserted into a replicable vector for cloning (amplification of the DNA) or for expression. Various vectors are publicly available. The vector may, for example, be in the form of a plasmid, cosmid, viral particle, or phage. The appropriate nucleic acid sequence may be inserted into the vector by a variety of procedures. In general, DNA is inserted into an appropriate restriction endonuclease site(s) using techniques known in the art. Vector components generally include, but are not limited to, one or more of a signal sequence, an origin of replication, one or more marker genes, an enhancer element, a promoter, and a transcription termination

WO 02/18444

PCT/US01/26984

sequence. Construction of suitable vectors containing one or more of these components employs standard ligation techniques which are known to the skilled artisan.

The immunoadhesin may be produced recombinantly not only directly, but also as a fusion polypeptide with a heterologous polypeptide, which may be a signal sequence or other polypeptide having a specific cleavage site at the N-terminus of the mature protein or polypeptide. In general, the signal sequence may be a component of the vector, or it may be a part of the immunoadhesin-encoding DNA that is inserted into the vector. The signal sequence may be a prokaryotic signal sequence selected, for example, from the group of the alkaline phosphatase, penicillinase, lpp, or heat-stable enterotoxin II leaders. For yeast secretion the signal sequence may be, e.g., the yeast invertase leader, alpha factor leader (including *Saccharomyces* and *Kluyveromyces* α -factor leaders, the latter described in U.S. Patent No. 5,010,182), or acid phosphatase leader, the *C. albicans* glucoamylase leader (EP 362,179 published 4 April 1990), or the signal described in WO 90/13646 published 15 November 1990. In mammalian cell expression, mammalian signal sequences may be used to direct secretion of the protein, such as signal sequences from secreted polypeptides of the same or related species, as well as viral secretory leaders.

Both expression and cloning vectors contain a nucleic acid sequence that enables the vector to replicate in one or more selected host cells. Such sequences are well known for a variety of bacteria, yeast, and viruses. The origin of replication from the plasmid pBR322 is suitable for most Gram-negative bacteria, the 2 μ plasmid origin is suitable for yeast, and various viral origins (SV40, polyoma, adenovirus or BPV) are useful for cloning vectors in mammalian cells.

Expression and cloning vectors will typically contain a selection gene, also termed a selectable marker. Typical selection genes encode proteins that (a) confer resistance to antibiotics or other toxins, e.g., ampicillin, neomycin, methotrexate, or tetracycline, (b) complement auxotrophic deficiencies, or (c) supply critical nutrients not available from complex media, e.g., the gene encoding D-alanine racemase for *Bacilli*.

An example of suitable selectable markers for mammalian cells are those that enable the identification of cells competent to take up the immunoadhesin-encoding nucleic acid, such as DHFR or thymidine kinase. An appropriate host cell when wild-type DHFR is employed is the CHO cell line deficient in DHFR activity, prepared and propagated as described by Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4218 (1980). A suitable selection gene for use in yeast is the *trp1* gene present in the yeast plasmid YRp7 [Stinchcomb et al., *Nature*, 282:39 (1979); Kingsman et al., *Gene*, 7:141 (1979); Tschenper et al., *Gene*, 10:157 (1980)]. The *trp1* gene provides a selection marker for a mutant strain of yeast lacking the ability to grow in tryptophan, for example, ATCC No. 44078 or PEP4-1 [Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)].

Expression and cloning vectors usually contain a promoter operably linked to the immunoadhesin-encoding nucleic acid sequence to direct mRNA synthesis. Promoters recognized by a variety of potential host cells are well known. Promoters suitable for use with prokaryotic hosts include the β -lactamase and lactose promoter systems [Chang et al., *Nature*, 275:615 (1978); Goeddel et al., *Nature*, 281:544 (1979)], alkaline phosphatase, a tryptophan (trp) promoter system [Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980); EP 36,776], and hybrid promoters such as the tac

WO 02/18444

PCT/US01/26984

promoter [deBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:21-25 (1983)]. Promoters for use in bacterial systems also will contain a Shine-Dalgarno (S.D.) sequence operably linked to the DNA encoding immunoadhesin.

Examples of suitable promoter sequences for use with yeast hosts include the promoters for 3-phosphoglycerate kinase [Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.*, 255:2073 (1980)] or other glycolytic enzymes [Hess et al., *J. Adv. Enzyme Res.*, 7:149 (1968); Holland, *Biochemistry*, 17:4900 (1978)], such as enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, hexokinase, pyruvate decarboxylase, phosphofructokinase, glucose-6-phosphate isomerase, 3-phosphoglycerate mutase, pyruvate kinase, triosephosphate isomerase, phosphoglucose isomerase, and glucokinase.

Other yeast promoters, which are inducible promoters having the additional advantage of transcription controlled by growth conditions, are the promoter regions for alcohol dehydrogenase 2, isocytochrome C, acid phosphatase, degradative enzymes associated with nitrogen metabolism, metallothionein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and enzymes responsible for maltose and galactose utilization. Suitable vectors and promoters for use in yeast expression are further described in EP 73,657.

The transcription of immunoadhesin from vectors in mammalian host cells is controlled, for example, by promoters obtained from the genomes of viruses such as polyoma virus, fowlpox virus (UK 2,211,504 published 5 July 1989), adenovirus (such as Adenovirus 2), bovine papilloma virus, retrovirus (such as avian sarcoma virus), cytomegalovirus, hepatitis-B virus and Simian Virus 40 (SV40); from heterologous mammalian promoters, e.g., the actin promoter or an immunoglobulin promoter, or from heat-shock promoters, provided such promoters are compatible with the host cell systems.

Transcription of a DNA encoding the immunoadhesin by higher eukaryotes may be increased by inserting an enhancer sequence into the vector. Enhancers are *cis*-acting elements of DNA, usually about from 10 to 300 bp, that act on a promoter to increase its transcription. Many enhancer sequences are now known from mammalian genes (globin, elastase, albumin, α -fetoprotein, and insulin). Typically, however, one will use an enhancer from a eukaryotic cell virus. Examples include the SV40 enhancer on the late side of the replication origin (by 100-270), the cytomegalovirus early promoter enhancer, the polyoma enhancer on the late side of the replication origin, and adenovirus enhancers. The enhancer may be spliced into the vector at a position 5' or 3' to the immunoadhesin coding sequence, but is preferably located at a site 5' from the promoter.

Expression vectors used in eukaryotic host cells (yeast, fungi, insect, plant, animal, human, or nucleated cells from other multicellular organisms) will also contain sequences necessary for the termination of transcription and for stabilizing the mRNA. Such sequences are commonly available from the 3' untranslated regions of eukaryotic or viral DNAs or cDNAs. These regions contain nucleotide segments transcribed as polyadenylated fragments in the untranslated portion of the mRNA encoding immunoadhesin.

Still other methods, vectors, and host cells suitable for adaptation to the synthesis of immunoadhesin in recombinant vertebrate cell culture are described in Gething et al., *Nature*, 293:620-625 (1981); Mantei et al., *Nature*, 281:40-46 (1979); EP 117,060; and EP 117,058.

WO 02/18444

PCT/US01/26984

(iv) Purification of immunoadhesin

An immunoadhesin or a chimeric heteroadhesin preferably is recovered from the culture medium as a secreted polypeptide, although it also may be recovered from host cell lysates. As a first step, the particulate debris, either host cells or lysed fragments, is removed, for example, by centrifugation or ultrafiltration; optionally, the protein may be concentrated with a commercially available protein concentration filter, followed by separating the chimeric heteroadhesin from other impurities by one or more purification procedures selected from: fractionation on an immunoaffinity column; fractionation on an ion-exchange column; ammonium sulphate or ethanol precipitation; reverse phase HPLC; chromatography on silica; chromatography on heparin Sepharose; chromatography on a cation exchange resin; chromatofocusing; SDS-PAGE; and gel filtration.

A particularly advantageous method of purifying immunoadhesins is affinity chromatography. The choice of affinity ligand depends on the species and isotype of the immunoglobulin Fc domain that is used in the chimera. Protein A can be used to purify immunoadhesins that are based on human IgG1, IgG2, or IgG4 heavy chains [Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62, 1-13 (1983)]. Protein G is recommended for all mouse isotypes and for human IgG3 [Guss et al., EMBO J. 5, 1567-1575 (1986)]. The matrix to which the affinity ligand is attached is most often agarose, but other matrices are also available. Mechanically stable matrices such as controlled pore glass or poly(styrenedivinyl)benzene allow for faster flow rates and shorter processing times than can be achieved with agarose. The conditions for binding an immunoadhesin to the protein A or G affinity column are dictated entirely by the characteristics of the Fc domain; that is, its species and isotype. Generally, when the proper ligand is chosen, efficient binding occurs directly from unconditioned culture fluid. One distinguishing feature of immunoadhesins is that, for human IgG1 molecules, the binding capacity for protein A is somewhat diminished relative to an antibody of the same Fc type. Bound immunoadhesin can be efficiently eluted either at acidic pH (at or above 3.0), or in a neutral pH buffer containing a mildly chaotropic salt. This affinity chromatography step can result in an immunoadhesin preparation that is >95% pure.

Other methods known in the art can be used in place of, or in addition to, affinity chromatography on protein A or G to purify immunoadhesins. Immunoadhesins behave similarly to antibodies in thiophilic gel chromatography [Hutchens and Porath, Anal. Biochem. 159, 217-226 (1986)] and immobilized metal chelate chromatography [Al-Mashikhi and Makai, J. Dairy Sci. 71, 1756-1763 (1988)]. In contrast to antibodies, however, their behavior on ion exchange columns is dictated not only by their isoelectric points, but also by a charge dipole that may exist in the molecules due to their chimeric nature.

Preparation of epitope tagged immunoadhesin, such as ErbB4-IgG, facilitates purification using an immunoaffinity column containing antibody to the epitope to adsorb the fusion polypeptide. Immunoaffinity columns such as a rabbit polyclonal anti-ErbB4 column can be employed to absorb the ErbB4-IgG by binding it to an ErbB4 immune epitope.

In some embodiments, the ErbB4 receptor-immunoglobulin chimeras (immunoadhesins) are assembled as monomers, or hetero- or homo-multimers, and particularly as dimers or tetramers, essentially as illustrated in WO

WO 02/18444

PCT/US01/26984

91/08298. Generally, these assembled immunoglobulins will have known unit structures. A basic four chain structural unit is the form in which IgG, IgD, and IgE exist. A four-unit structure is repeated in the higher molecular weight immunoglobulins; IgM generally exists as a pentamer of basic four units held together by disulfide bonds. IgA globulin, and occasionally IgG globulin, may also exist in multimeric form in serum. In the case of multimer, each four unit may be the same or different.

As noted earlier, the immunoadhesins of the present invention can be made bispecific, and may, for example, include binding regions from two different ErbB receptors, at least one of which is ErbB4. Thus, the immunoadhesins of the present invention may have binding specificities for two distinct ErbB ligands. For bispecific molecules, trimeric molecules, composed of a chimeric antibody heavy chain in one arm and a chimeric antibody heavy chain-light chain pair in the other arm of their antibody-like structure are advantageous, due to ease of purification. In contrast to antibody-producing quadromas traditionally used for the production of bispecific immunoadhesins, which produce a mixture of ten tetramers, cells transfected with nucleic acid encoding the three chains of a trimeric immunoadhesin structure produce a mixture of only three molecules, and purification of the desired product from this mixture is correspondingly easier.

(v) *Characterization of immunoadhesin*

Generally, the ErbB4 chimeric heteromultimers of the invention will have any one or more of the following properties: (a) the ability to compete with a natural heteromultimeric receptor for binding to a ligand such as HB-EGF; (b) the ability to form ErbB2-IgG/ErbB4-IgG complexes; and (c) the ability to inhibit activation of a natural heteromultimeric receptor by depleting ligand from the environment of the natural receptor, thereby inhibiting proliferation of cells that express the ErbB2 and ErbB4 receptor.

To screen for property (a), the ability of the chimeric ErbB4 heteromultimer adhesin to bind to a ligand can be readily determined *in vitro*. For example, immunoadhesin forms of these receptors can be generated and the ErbB2/4-Ig heteroimmunoadhesin can be immobilized on a solid phase (e.g. on assay plates coated with goat-anti-human antibody). The ability of a ligand to bind to the immobilized immunoadhesin can then be determined. For more details, see the ¹²⁵I-HRG binding assay described in the Example below.

As to property (c), the tyrosine phosphorylation assay using MCF7 cells provides a means for screening for activation of ErbB4 receptors. In an alternative embodiment of the invention, the KIRA-ELISA described in WO 95/14930 can be used to qualitatively and quantitatively measure the ability of an HER4 chimeric heteroadhesin to inhibit activation of a HER4 receptor.

The ability of an immunoadhesin, chimeric heteroadhesin such as ErbB2/4-Ig, or other molecule of the present invention to inhibit proliferation of a cell that expresses the ErbB2 and ErbB4 receptor is readily determined in cell culture by standard procedures. Useful cells for this experiment include MCF7 and SK-BR-3 cells obtainable from the ATCC and Schwann cells (see, for example, Li *et al.*, J. Neuroscience 16(6):2012-2019 (1996)). These tumor cell lines may be plated in cell culture plates and allowed to adhere thereto. The HRG ligand in the presence and absence of a

WO 02/18444

PCT/US01/26984

potential ErbB4 antagonist such as an ErbB4 chimeric heteroadhesin is added. Monolayers are washed and stained/fixed with crystal violet and cell growth inhibition is quantified.

2. Antibody preparation

5 Another preferred class of ErbB4 antagonists comprises neutralizing antibodies to this receptor.

(i) Polyclonal antibodies

10 Methods of preparing polyclonal antibodies are known in the art. Polyclonal antibodies can be raised in a mammal, for example, by one or more injections of an immunizing agent and, if desired, an adjuvant. Typically, the immunizing agent and/or adjuvant will be injected in the mammal by multiple subcutaneous or intraperitoneal injections. It may be useful to conjugate the immunizing agent to a protein known to be immunogenic in the mammal being immunized, such as serum albumin, or soybean trypsin inhibitor. Examples of adjuvants which may be employed include Freund's complete adjuvant and MPL-TDM.

(ii) Monoclonal antibodies

15 Monoclonal antibodies may be made using the hybridoma method first described by Kohler *et al.*, *Nature*, 258:495 (1975), or may be made by recombinant DNA methods (U.S. Patent No. 4,816,567).

In the hybridoma method, a mouse or other appropriate host animal, such as a hamster or macaque monkey, is immunized as hereinabove described to elicit lymphocytes that produce or are capable of producing antibodies that will specifically bind to the protein used for immunization. Alternatively, lymphocytes may be immunized *in vitro*. 20 Lymphocytes then are fused with myeloma cells using a suitable fusing agent, such as polyethylene glycol, to form a hybridoma cell (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103, [Academic Press, 1986]).

The hybridoma cells thus prepared are seeded and grown in a suitable culture medium that preferably contains one or more substances that inhibit the growth or survival of the unfused, parental myeloma cells. For example, if the parental myeloma cells lack the enzyme hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT or HPRT), the culture medium for the hybridomas typically will include hypoxanthine, aminopterin, and thymidine (HAT medium), which substances prevent the growth of HGPRT-deficient cells. 25

Preferred myeloma cells are those that fuse efficiently, support stable high-level production of antibody by the selected antibody-producing cells, and are sensitive to a medium such as HAT medium. Among these, preferred myeloma cell lines are murine myeloma lines, such as those derived from MOP-21 and MC-11 mouse tumors available from the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, and SP-2 or X63-Ag8-653 cells available from the American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA. Human myeloma and mouse-human heteromyeloma cell lines also have been described for the production of human monoclonal antibodies (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York, [1987]). 30

WO 02/18444

PCT/US01/26984

Culture medium in which hybridoma cells are growing is assayed for production of monoclonal antibodies directed against the antigen. Preferably, the binding specificity of monoclonal antibodies produced by hybridoma cells is determined by immunoprecipitation or by an *in vitro* binding assay, such as radioimmunoassay (RIA) or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

The binding affinity of the monoclonal antibody can, for example, be determined by the Scatchard analysis of Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

After hybridoma cells are identified that produce antibodies of the desired specificity, affinity, and/or activity, the cells may be subcloned by limiting dilution procedures and grown by standard methods (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Suitable culture media for this purpose include, for example, DMEM or RPMI-1640 medium. In addition, the hybridoma cells may be grown *in vivo* as ascites tumors in an animal.

The monoclonal antibodies secreted by the subclones are suitably separated from the culture medium, ascites fluid, or serum by conventional immunoglobulin purification procedures such as, for example, protein A-Sepharose, hydroxylapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis, or affinity chromatography.

DNA encoding the monoclonal antibodies is readily isolated and sequenced using conventional procedures (*a.g.*, by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes encoding the heavy and light chains of the monoclonal antibodies). The hybridoma cells serve as a preferred source of such DNA. Once isolated, the DNA may be placed into expression vectors, which are then transfected into host cells such as *E. coli* cells, simian COS cells, Chinese hamster ovary (CHO) cells, or myeloma cells that do not otherwise produce immunoglobulin protein, to obtain the synthesis of monoclonal antibodies in the recombinant host cells. The DNA also may be modified, for example, by substituting the coding sequence for human heavy and light chain constant domains in place of the homologous murine sequences, Morrison, *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **81**, 6851 (1984), or by covalently joining to the immunoglobulin coding sequence all or part of the coding sequence for a non-immunoglobulin polypeptide. In that manner, "chimeric" or "hybrid" antibodies are prepared that have the binding specificity of an anti-ErbB4 receptor monoclonal antibody herein.

Typically such non-immunoglobulin polypeptides are substituted for the constant domains of an antibody of the invention, or they are substituted for the variable domains of one antigen-combining site of an antibody of the invention to create a chimeric bivalent antibody comprising one antigen-combining site having specificity for a ErbB4 receptor and another antigen-combining site having specificity for a different antigen.

Chimeric or hybrid antibodies also may be prepared *in vitro* using known methods in synthetic protein chemistry, including those involving crosslinking agents. For example, immunotoxins may be constructed using a disulfide exchange reaction or by forming a thioether bond. Examples of suitable reagents for this purpose include iminothiolate and methyl-4-mercaptobutyrimidate.

Recombinant production of antibodies will be described in more detail below.

WO 02/18444

PCT/US01/26984

(iii) *Humanized antibodies*

Generally, a humanized antibody has one or more amino acid residues introduced into it from a non-human source. These non-human amino acid residues are often referred to as "import" residues, which are typically taken from an "import" variable domain. Humanization can be essentially performed following the method of Winter and co-workers [Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)], by substituting rodent CDRs or CDR sequences for the corresponding sequences of a human antibody.

Accordingly, such "humanized" antibodies are chimeric antibodies (Cabilly, *supra*), wherein substantially less than an intact human variable domain has been substituted by the corresponding sequence from a non-human species. In practice, humanized antibodies are typically human antibodies in which some CDR residues and possibly some FR residues are substituted by residues from analogous sites in rodent antibodies.

It is important that antibodies be humanized with retention of high affinity for the antigen and other favorable biological properties. To achieve this goal, according to a preferred method, humanized antibodies are prepared by a process of analysis of the parental sequences and various conceptual humanized products using three-dimensional models of the parental and humanized sequences. Three dimensional immunoglobulin models are commonly available and are familiar to those skilled in the art. Computer programs are available which illustrate and display probable three-dimensional conformational structures of selected candidate immunoglobulin sequences. Inspection of these displays permits analysis of the likely role of the residues in the functioning of the candidate immunoglobulin sequence, i.e. the analysis of residues that influence the ability of the candidate immunoglobulin to bind its antigen. In this way, FR residues can be selected and combined from the consensus and import sequence so that the desired antibody characteristic, such as increased affinity for the target antigen(s), is achieved. In general, the CDR residues are directly and most substantially involved in influencing antigen binding. For further details, see U.S. patent No. 5,821,337.

(iv) *Human antibodies*

Human monoclonal antibodies can be made by the hybridoma method. Human myeloma and mouse-human heteromyeloma cell lines for the production of human monoclonal antibodies have been described, for example, by Kozbor, *J. Immunol.*, 133, 3001 (1984), and Brodeur, *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp.51-83 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987).

It is now possible to produce transgenic animals (e.g. mice) that are capable, upon immunization, of producing a repertoire of human antibodies in the absence of endogenous immunoglobulin production. For example, it has been described that the homozygous deletion of the antibody heavy chain joining region (J_H) gene in chimeric and germ-line mutant mice results in complete inhibition of endogenous antibody production. Transfer of the human germ-line immunoglobulin gene array in such germ-line mutant mice will result in the production of human antibodies upon

WO 02/18444

PCT/US01/26984

antigen challenge. See, e.g. Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 2551-255 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature* **362**, 255-258 (1993).

Mendez *et al.* (*Nature Genetics* **15**: 146-156 [1997]) have further improved the technology and have generated a line of transgenic mice designated as "Xenomouse II" that, when challenged with an antigen, generates high affinity fully human antibodies. This was achieved by germ-line integration of megabase human heavy chain and light chain loci into mice with deletion into endogenous J_H segment as described above. The Xenomouse II harbors 1,020 kb of human heavy chain locus containing approximately 66 V_H genes, complete D_H and J_H regions and three different constant regions (μ , δ and γ), and also harbors 800 kb of human κ locus containing 32 V_K genes, J_K segments and C_K genes. The antibodies produced in these mice closely resemble that seen in humans in all respects, including gene rearrangement, assembly, and repertoire. The human antibodies are preferentially expressed over endogenous antibodies due to deletion in endogenous J_H segment that prevents gene rearrangement in the murine locus.

Alternatively, the phage display technology (McCafferty *et al.*, *Nature* **348**, 552-553 (1990)) can be used to produce human antibodies and antibody fragments *in vitro*, from immunoglobulin variable (V) domain gene repertoires from unimmunized donors. According to this technique, antibody V domain genes are cloned in-frame into either a major or minor coat protein gene of a filamentous bacteriophage, such as M13 or fd, and displayed as functional antibody fragments on the surface of the phage particle. Because the filamentous particle contains a single-stranded DNA copy of the phage genome, selections based on the functional properties of the antibody also result in selection of the gene encoding the antibody exhibiting those properties. Thus, the phage mimics some of the properties of the B-cell. Phage display can be performed in a variety of formats; for their review see, e.g. Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* **3**, 564-571 (1993). Several sources of V-gene segments can be used for phage display. Clackson *et al.*, *Nature* **352**, 624-628 (1991) isolated a diverse array of anti-oxazolone antibodies from a small random combinatorial library of V genes derived from the spleens of immunized mice. A repertoire of V genes from unimmunized human donors can be constructed and antibodies to a diverse array of antigens (including self-antigens) can be isolated essentially following the techniques described by Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **222**, 581-597 (1991), or Griffiths *et al.*, *EMBO J.*, **12**, 725-734 (1993). In a natural immune response, antibody genes accumulate mutations at a high rate (somatic hypermutation). Some of the changes introduced will confer higher affinity, and B cells displaying high-affinity surface immunoglobulin are preferentially replicated and differentiated during subsequent antigen challenge. This natural process can be mimicked by employing the technique known as "chain shuffling" (Marks *et al.*, *Bio/Technol.* **10**, 779-783 (1992)). In this method, the affinity of "primary" human antibodies obtained by phage display can be improved by sequentially replacing the heavy and light chain V region genes with repertoires of naturally occurring variants (repertoires) of V domain genes obtained from unimmunized donors. This technique allows the production of antibodies and antibody fragments with affinities in the nM range. A strategy for making very large phage antibody repertoires (also known as "the mother-of-all libraries") has been described by Waterhouse *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, **21**, 2265-2266 (1993), and the isolation of a high affinity human antibody directly from such large phage library is reported by Griffiths *et al.*, *EMBO J.*, **13**: 3245-3260 (1994). Gene shuffling can also be used to derive

WO 02/18444

PCT/US01/26984

human antibodies from rodent antibodies, where the human antibody has similar affinities and specificities to the starting rodent antibody. According to this method, which is also referred to as "epitope imprinting", the heavy or light chain V domain gene of rodent antibodies obtained by phage display technique is replaced with a repertoire of human V domain genes, creating rodent-human chimeras. Selection on antigen results in isolation of human variable domains capable of restoring a functional antigen-binding site, i.e. the epitope governs (imprints) the choice of partner. When the process is repeated in order to replace the remaining rodent V domain, a human antibody is obtained (see PCT patent application WO 93/06213, published 1 April 1993). Unlike traditional humanization of rodent antibodies by CDR grafting, this technique provides completely human antibodies, which have no framework or CDR residues of rodent origin.

(v) *Bispecific antibodies*

Bispecific antibodies are monoclonal, preferably human or humanized, antibodies that have binding specificities for at least two different antigens. In the present case, one of the binding specificities is for the ErbB4 receptor to provide an antagonist antibody, the other one is for any other antigen, and preferably for another receptor or receptor subunit.

Methods for making bispecific antibodies are known in the art. Traditionally, the recombinant production of bispecific antibodies is based on the co-expression of two immunoglobulin heavy chain-light chain pairs, where the two heavy chains have different specificities (Millstein and Cuello, *Nature* 305, 537-539 (1983)). Because of the random assortment of immunoglobulin heavy and light chains, these hybridomas (quadromas) produce a potential mixture of 10 different antibody molecules, of which only one has the correct bispecific structure. The purification of the correct molecule, which is usually done by affinity chromatography steps, is rather cumbersome, and the product yields are low. Similar procedures are disclosed in PCT application publication No. WO 93/08829 (published 13 May 1993), and in Trautnecker *et al.*, *EMBO* 10, 3655-3659 (1991).

According to a different and more preferred approach, antibody variable domains with the desired binding specificities (antibody-antigen combining sites) are fused to immunoglobulin constant domain sequences. The fusion preferably is with an immunoglobulin heavy chain constant domain, comprising at least part of the hinge, CH2 and CH3 regions. It is preferred to have the first heavy chain constant region (CH1) containing the site necessary for light chain binding, present in at least one of the fusions. DNAs encoding the immunoglobulin heavy chain fusions and, if desired, the immunoglobulin light chain, are inserted into separate expression vectors, and are co-transfected into a suitable host organism. This provides for great flexibility in adjusting the mutual proportions of the three polypeptide fragments in embodiments when unequal ratios of the three polypeptide chains used in the construction provide the optimum yields. It is, however, possible to insert the coding sequences for two or all three polypeptide chains in one expression vector when the expression of at least two polypeptide chains in equal ratios results in high yields or when the ratios are of no particular significance. In a preferred embodiment of this approach, the bispecific antibodies are composed of a hybrid immunoglobulin heavy chain with a first binding specificity in one arm, and a hybrid

WO 02/18444

PCT/US01/26984

immunoglobulin heavy chain-light chain pair (providing a second binding specificity) in the other arm. It was found that this asymmetric structure facilitates the separation of the desired bispecific compound from unwanted immunoglobulin chain combinations, as the presence of an immunoglobulin light chain in only one half of the bispecific molecule provides for a facile way of separation.

5 For further details of generating bispecific antibodies see, for example, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology* 121, 210 (1986).

(vi) *Heteroconjugate antibodies*

10 Heteroconjugate antibodies are also within the scope of the present invention. Heteroconjugate antibodies are composed of two covalently joined antibodies. Such antibodies have, for example, been proposed to target immune system cells to unwanted cells (U.S. Patent No. 4,676,980), and for treatment of HIV infection (PCT application publication Nos. WO 91/00360 and WO 92/200373; EP 03089). Heteroconjugate antibodies may be made using any convenient cross-linking methods. Suitable cross-linking agents are well known in the art, and are disclosed in U.S. Patent No. 4,676,980, along with a number of cross-linking techniques.

15 (vii) *Antibody fragments*

In certain embodiments, the ErbB4 antagonist antibody (including murine, human and humanized antibodies, and antibody variants) is an antibody fragment. Various techniques have been developed for the production of antibody fragments. Traditionally, these fragments were derived via proteolytic digestion of intact antibodies (see, *e.g.*, Morimoto *et al.*, *J. Biochem. Biophys. Methods* 24:107-117 (1992) and Brennan *et al.*, *Science* 228:81 (1985)).
20 However, these fragments can now be produced directly by recombinant host cells. For example, Fab'-SH fragments can be directly recovered from *E. coli* and chemically coupled to form F(ab')₂ fragments (Carter *et al.*, *BioTechnology* 10:163-167 (1992)). In another embodiment, the F(ab')₂ is formed using the leucine zipper GCN4 to promote assembly of the F(ab')₂ molecule. According to another approach, Fv, Fab or F(ab')₂ fragments can be isolated directly from recombinant host cell culture. Other techniques for the production of antibody fragments will be apparent to the
25 skilled practitioner.

(viii) *Amino acid sequence variants of antibodies*

Amino acid sequence variants of the ErbB4 antagonist antibodies are prepared by introducing appropriate nucleotide changes into the ErbB4 antagonist antibody DNA, or by peptide synthesis. Such variants include, for
30 example, deletions from, and/or insertions into and/or substitutions of, residues within the amino acid sequences of the ErbB4 antagonist antibodies of the examples shown herein. Any combination of deletion, insertion, and substitution is made to arrive at the final construct, provided that the final construct possesses the desired characteristics. The amino acid changes also may alter post-translational processes of the humanized or variant ErbB4 antagonist antibody, such as changing the number or position of glycosylation sites.

WO 02/18444

PCT/US01/26984

A useful method for identification of certain residues or regions of the ErbB4 receptor antibody that are preferred locations for mutagenesis is called "alanine scanning mutagenesis," as described by Cunningham and Wells *Science*, 244:1081-1085 (1989). Here, a residue or group of target residues are identified (*e.g.*, charged residues such as arg, asp, his, lys, and glu) and replaced by a neutral or negatively charged amino acid (most preferably alanine or polyalanine) to affect the interaction of the amino acids with ErbB4 receptor antigen. Those amino acid locations demonstrating functional sensitivity to the substitutions then are refined by introducing further or other variants at, or for, the sites of substitution. Thus, while the site for introducing an amino acid sequence variation is predetermined, the nature of the mutation *per se* need not be predetermined. For example, to analyze the performance of a mutation at a given site, ala scanning or random mutagenesis is conducted at the target codon or region and the expressed ErbB4 antibody variants are screened for the desired activity.

Amino acid sequence insertions include amino- and/or carboxyl-terminal fusions ranging in length from one residue to polypeptides containing a hundred or more residues, as well as intrasequence insertions of single or multiple amino acid residues. Examples of terminal insertions include a ErbB4 antagonist antibody with an N-terminal methionyl residue or the antibody fused to an epitope tag. Other insertional variants of the ErbB4 antagonist antibody molecule include the fusion to the N- or C-terminus of the ErbB4 antagonist antibody of an enzyme or a polypeptide which increases the serum half-life of the antibody.

Another type of variant is an amino acid substitution variant. These variants have at least one amino acid residue in the ErbB4 antagonist antibody molecule removed and a different residue inserted in its place. The sites of greatest interest for substitution mutagenesis include the hypervariable regions, but FR alterations are also contemplated. Conservative substitutions are shown in Table 1 under the heading of "preferred substitutions". If such substitutions result in a change in biological activity, then more substantial changes, denominated "exemplary substitutions" in Table 1, or as further described below in reference to amino acid classes, may be introduced and the products screened.

Table 1

Original Residue	Exemplary Substitutions	Preferred Substitutions
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn

WO 02/18444

PCT/US01/26984

Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucine	leu
Leu (L)	norleucine; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	Tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	Trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	Ile; leu; met; phe; ala; norleucine	leu

Substantial modifications in the biological properties of the antibody are accomplished by selecting substitutions that differ significantly in their effect on maintaining (a) the structure of the polypeptide backbone in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain. Naturally occurring residues are divided into groups based on common side-chain properties:

- (1) hydrophobic: norleucine, met, ala, val, leu, ile;
- (2) neutral hydrophilic: cys, ser, thr;
- (3) acidic: asp, glu;
- (4) basic: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) residues that influence chain orientation: gly, pro; and
- (6) aromatic: trp, tyr, phe.

Non-conservative substitutions will entail exchanging a member of one of these classes for another class.

WO 02/18444

PCT/US01/26984

Any cysteine residue not involved in maintaining the proper conformation of the ErbB4 antagonist antibody also may be substituted, generally with serine, to improve the oxidative stability of the molecule and prevent aberrant crosslinking. Conversely, cysteine bond(s) may be added to the antibody to improve its stability (particularly where the antibody is an antibody fragment such as a Fv fragment).

A particularly preferred type of substitution variant involves substituting one or more hypervariable region residues of a parent antibody (*e.g.* a humanized or human antibody). Generally, the resulting variant(s) selected for further development will have improved biological properties relative to the parent antibody from which they are generated. A convenient way for generating such substitution variants is affinity maturation using phage display. Briefly, several hypervariable region sites (*e.g.* 6-7 sites) are mutated to generate all possible amino substitutions at each site. The antibody variants thus generated are displayed in a monovalent fashion from filamentous phage particles as fusions to the gene III product of M13 packaged within each particle. The phage-displayed variants are then screened for their biological activity (*e.g.* antagonist activity) as herein disclosed. In order to identify candidate hypervariable region sites for modification, alanine scanning mutagenesis can be performed to identify hypervariable region residues contributing significantly to antigen binding. Alternatively, or in addition, it may be beneficial to analyze a crystal structure of the antigen-antibody complex to identify contact points between the antibody and ErbB receptor. Such contact residues and neighboring residues are candidates for substitution according to the techniques elaborated herein. Once such variants are generated, the panel of variants is subjected to screening as described herein and antibodies with superior properties in one or more relevant assays may be selected for further development.

Another type of amino acid variant of the antibody alters the original glycosylation pattern of the antibody. By altering is meant deleting one or more carbohydrate moieties found in the antibody, and/or adding one or more glycosylation sites that are not present in the antibody.

Glycosylation of antibodies is typically either N-linked or O-linked. N-linked refers to the attachment of the carbohydrate moiety to the side chain of an asparagine residue. The tripeptide sequences asparagine-X-serine and asparagine-X-threonine, where X is any amino acid except proline, are the recognition sequences for enzymatic attachment of the carbohydrate moiety to the asparagine side chain. Thus, the presence of either of these tripeptide sequences in a polypeptide creates a potential glycosylation site. O-linked glycosylation refers to the attachment of one of the sugars N-acetylgalactosamine, galactose, or xylose to a hydroxyamino acid, most commonly serine or threonine, although 5-hydroxyproline or 5-hydroxylysine may also be used.

Addition of glycosylation sites to the antibody is conveniently accomplished by altering the amino acid sequence such that it contains one or more of the above-described tripeptide sequences (for N-linked glycosylation sites). The alteration may also be made by the addition of, or substitution by, one or more serine or threonine residues to the sequence of the original antibody (for O-linked glycosylation sites).

Nucleic acid molecules encoding amino acid sequence variants of the ErbB4 antagonist antibodies are prepared by a variety of methods known in the art. These methods include, but are not limited to, isolation from a

WO 02/18444

PCT/US01/26984

natural source (in the case of naturally occurring amino acid sequence variants) or preparation by oligonucleotide-mediated (or site-directed) mutagenesis, PCR mutagenesis, and cassette mutagenesis of an earlier prepared variant or a non-variant version of the ErbB4 antagonist antibody.

5

(ix) *Other modifications of antibodies*

The ErbB4 antagonist antibodies disclosed herein may also be formulated as immunoliposomes. Liposomes containing the antibody are prepared by methods known in the art, such as described in Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4030 (1980); and U.S. Pat. Nos. 4,485,045 and 4,544,545. Liposomes with enhanced circulation time are disclosed in U.S. Patent No. 5,013,558.

10

Particularly useful liposomes can be generated by the reverse phase evaporation method with a lipid composition comprising phosphatidylcholine, cholesterol and PEG-derivatized phosphatidylethanolamine (PEG-PE). Liposomes are extruded through filters of defined pore size to yield liposomes with the desired diameter. Fab' fragments of the antibody of the present invention can be conjugated to the liposomes as described in Martin *et al.*, *J. Biol. Chem.* 257:286-288 (1982) via a disulfide interchange reaction. A chemotherapeutic agent (such as Doxorubicin) is optionally contained within the liposome. See Gabizon *et al.*, *J. National Cancer Inst.* 81(19):1484 (1989).

15

The antibody of the present invention may also be used in ADEPT by conjugating the antibody to a prodrug-activating enzyme which converts a prodrug (*e.g.*, a peptidyl chemotherapeutic agent, see WO81/01145) to an active anti-cancer drug. See, for example, WO 88/07378 and U.S. Patent No. 4,975,278.

20

The enzyme component of the immunoconjugate useful for ADEPT includes any enzyme capable of acting on a prodrug in such a way so as to convert it into its more active, cytotoxic form.

25

Enzymes that are useful in the method of this invention include, but are not limited to, alkaline phosphatase useful for converting phosphate-containing prodrugs into free drugs; arylsulfatase useful for converting sulfate-containing prodrugs into free drugs; cytosine deaminase useful for converting non-toxic 5-fluorocytosine into the anti-cancer drug, 5-fluorouracil; proteases, such as serratio protease, thermolysin, subtilisin, carboxypeptidases and cathepsins (such as cathepsins B and L), that are useful for converting peptide-containing prodrugs into free drugs; D-alanylcarboxypeptidases, useful for converting prodrugs that contain D-amino acid substituents; carbohydrate-cleaving enzymes such as α -galactosidase and neuraminidase useful for converting glycosylated prodrugs into free drugs; β -lactamase useful for converting drugs derivatized with β -lactams into free drugs; and penicillin amidases, such as penicillin V amidase or penicillin G amidase, useful for converting drugs derivatized at their amine nitrogens with phenoxyacetyl or phenylacetyl groups, respectively, into free drugs. Alternatively, antibodies with enzymatic activity, also known in the art as "abzymes", can be used to convert the prodrugs of the invention into free active drugs (see, *e.g.*, Massey, *Nature* 328:457-458 (1987)). Antibody-abzyme conjugates can be prepared as described herein for delivery of the abzyme to a tumor cell population.

30

35

WO 02/18444

PCT/US01/26984

The enzymes of this invention can be covalently bound to the ErbB4 antagonist antibodies by techniques well known in the art such as the use of the heterobifunctional crosslinking reagents discussed above. Alternatively, fusion proteins comprising at least the antigen binding region of an antibody of the invention linked to at least a functionally active portion of an enzyme of the invention can be constructed using recombinant DNA techniques well known in the art (see, *e.g.*, Neuberger *et al.*, *Nature* 312:604-608 [1984]).

In certain embodiments of the invention, it may be desirable to use an antibody fragment, rather than an intact antibody. In this case, it may be desirable to modify the antibody fragment in order to increase its serum half-life. This may be achieved, for example, by incorporation of a salvage receptor binding epitope into the antibody fragment (*e.g.*, by mutation of the appropriate region in the antibody fragment or by incorporating the epitope into a peptide tag that is then fused to the antibody fragment at either end or in the middle, *e.g.*, by DNA or peptide synthesis). See W096/32478 published October 17, 1996.

The salvage receptor binding epitope generally constitutes a region wherein any one or more amino acid residues from one or two loops of a Fc domain are transferred to an analogous position of the antibody fragment. Even more preferably, three or more residues from one or two loops of the Fc domain are transferred. Still more preferred, the epitope is taken from the CH2 domain of the Fc region (*e.g.*, of an IgG) and transferred to the CH1, CH3, or V_H region, or more than one such region, of the antibody. Alternatively, the epitope is taken from the CH2 domain of the Fc region and transferred to the C₁ region or V_L region, or both, of the antibody fragment.

Covalent modifications of the ErbB4 antagonist antibodies are also included within the scope of this invention. They may be made by chemical synthesis or by enzymatic or chemical cleavage of the antibody, if applicable. Other types of covalent modifications of the antibody are introduced into the molecule by reacting targeted amino acid residues of the antibody with an organic derivatizing agent that is capable of reacting with selected side chains or the N- or C-terminal residues. Exemplary covalent modifications of polypeptides are described in US Patent 5,534,615, specifically incorporated herein by reference. A preferred type of covalent modification of the antibody comprises linking the antibody to one of a variety of nonproteinaceous polymers, *e.g.*, polyethylene glycol, polypropylene glycol, or polyoxyalkylenes, in the manner set forth in U.S. Patent Nos. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 or 4,179,337.

3. Preparation of soluble ErbB4 receptors

Soluble ErbB4 receptors, such as an ErbB4 extracellular domain, can be prepared by culturing cells transformed or transfected with a vector containing the encoding nucleic acid. It is, of course, contemplated that alternative methods, which are well known in the art, may be employed to prepare such soluble receptors. For instance, the soluble receptor sequence, or portions thereof, may be produced by direct peptide synthesis using solid-phase techniques (see, *e.g.*, Stewart *et al.*, *supra*; and Merrifield, *supra*). *In vitro* protein synthesis may be performed using manual techniques or by automation. Automated synthesis may be accomplished, for instance, using an Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) using manufacturer's instructions. Various portions of the soluble

WO 02/18444

PCT/US01/26984

receptor may be chemically synthesized separately and combined using chemical or enzymatic methods to produce the full-length soluble receptor.

Recombinant production of soluble ErbB4 receptors is performed essentially as described hereinabove in connection with immunoadhesins.

The most convenient method for the large-scale production of soluble ErbB4 receptors is by cleavage from an ErbB4-Ig immunoadhesin. The structural similarity between immunoadhesins and antibodies suggested that it might be possible to cleave immunoadhesins by proteolytic enzymes such as papain, to generate Fd-like fragments containing the "adhesin" portion. In order to provide a more generic approach for cleavage of immunoadhesins, proteases which are highly specific for their target sequence are to be used. A protease suitable for this purpose is an engineered mutant of subtilisin BPN, which recognizes and cleaves the sequence AAHYTL. Introduction of this target sequence into the support hinge region of an ErbB4-IgG (e.g. IgG1) immunoadhesin facilitates highly specific cleavage between the Fc and trk domains. The IgG1 immunoadhesin is purified by protein A chromatography and cleaved with an immobilized form of the enzyme. Cleavage results in two products; the Fc region and the ErbB4 region, which is preferably an ErbB4 extracellular domain. These fragments can be separated easily by a second passage over a protein A column to retain the Fc and obtain the purified ErbB4 fragment in the flow-through fractions. A similar approach can be used to generate a dimeric ErbB4 portion, by placing the cleavable sequence at the lower hinge.

4. Therapeutic Compositions and Methods

The members of the ErbB family of receptors and corresponding ligands are involved in smooth muscle cell proliferation in various organs. Accordingly, an ErbB4 receptor antagonist may be utilized for the treatment of a variety of "diseases or disorders" involving smooth muscle cell proliferation in a mammal, such as a human.

In a preferred embodiment, the present invention concerns the use of ErbB4 receptor antagonists for the treatment of cardiac diseases involving proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) and leading to intimal hyperplasia such as vascular stenosis, restenosis resulting from angioplasty or surgery or stent implants, atherosclerosis and hypertension (reviewed in Casterella and Teirstein, *Cardiol. Rev.* 7: 219-231 [1999]; Andres, *Int. J. Mol. Med.* 2: 81-89 [1998]; and Rosanio *et al.*, *Thromb. Haemost.* 82 [suppl 1]: 164-170 [1999]). There is an intricate interplay of various cells and cytokines released that act in autocrine, paracrine or juxtacrine manner, which result in migration of VSMCs from their normal location in media to the damaged intima. The migrated VSMCs proliferate excessively and lead to thickening of intima, which results in stenosis or occlusion of blood vessels. The problem is compounded by platelet aggregation and deposition at the site of lesion. α -thrombin, a multifunctional serine protease, is concentrated at site of vascular injury and stimulates VSMCs proliferation. Following activation of this receptor, VSMCs produce and secrete various autocrine growth factors, including PDGF-AA, HB-EGF and TGF- β (reviewed in Stouffer and Runge, *Semin. Thromb. Hemost.* 24: 145-150 [1998]).

Various members of the EGF family play important roles in the normal growth and maintenance of blood vessels as well as in pathological conditions. For example, heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) is a potent

WO 02/18444

PCT/US01/26984

mitogen and a chemotactic factor for fibroblasts as well as VSMCs but not endothelial cells (reviewed in Raab and Klagsbrun, *Biochim. Biophys. Acta* 1333: F179-199 [1997]). Vascular endothelial growth factor (VEGF), a powerful angiogenic factor, induces the expression of HB-EGF in vascular endothelial cells (Arkonac *et al.*, *J. Biol. Chem.* 273: 4400-4406 [1998]). HB-EGF binds to and activates HER1 and ErbB4 receptors initiating a signal transduction cascade that ultimately results in migration and proliferation of fibroblasts and VSMCs. HB-EGF also stimulates VSMCs to secrete various factors that are mitogenic for endothelial cells (Abramovitch *et al.*, *FEBS Lett.* 425: 441-447 [1998]). Moreover, it also induces chemotactic response in endothelial cells. Similarly, another ligand that activates EGF receptors, epiregulin, is secreted by VSMCs stimulated with angiotensin II, endothelin-1 and thrombin, and also acts as a powerful mitogen for proliferation of VSMCs (Taylor *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 1633-1638 [1999]).

Vascular stenosis gives rise to hypertension as a result of increased resistance to blood flow. Moreover, decreased blood supply to the tissue may also cause necrosis and induce inflammatory response leading to severe damage. For example, myocardial infarction occurs as a result of lack of oxygen and local death of heart muscle tissues. Percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA), simply referred to as balloon angioplasty, is a non-surgical catheter-based treatment for obstructive coronary artery disease. In this method, a catheter is introduced in the blood vessel and a balloon is inflated at the site of plaque in order to mechanically dislodge the plaque. Alternatively, stent is implanted to restore smooth blood flow. However, neointimal formation takes place even within the implanted stent, known as "in-stent restenosis." For example, stent deployment results in early thrombus deposition and acute inflammation, granulation tissue development, and ultimately smooth muscle cell proliferation and extracellular matrix synthesis (reviewed in Virmani and Farb, *Curr. Opin. Lipidol.* 10: 499-506 [1999]). Bypass surgery is performed to get around the affected blood vessel only in severe cases, and usually only after multiple rounds of angioplasty have failed in restoring blood flow.

Although balloon angioplasty has been used widely for the treatment of stenosis, its long-term success is limited by restenosis. Restenosis persists as the limiting factor in the maintenance of vessel patency after PTCA, occurring in 30-50% of patients and accounting for significant morbidity and health care expenditure. The underlying mechanisms of restenosis are comprised of a combination of effects from vessel recoil, negative vascular remodeling, thrombus formation and neointimal hyperplasia. Importantly, these events are interconnected. For example, neointimal hyperplasia is stimulated by growth factors, which are released by local thrombi and the injured arterial segment itself, and act to enhance the expression of other growth-stimulating proteins resulting in acute proliferative and inflammatory responses. For instance, endothelial injury induces expression of EGF, EGF-like factors and EGFR in VSMCs, which act upon them in an autocrine manner to stimulate their proliferation leading to intimal thickening and restenosis. Extracellular matrix (ECM) formation and accumulation in the vessel wall is another important component of the restenosis lesion that develops after balloon angioplasty.

A multitude of pharmacological trials have been conducted in an attempt to prevent restenosis, but must have demonstrated little benefits. Early clinical trials in restenosis prevention using various revascularization devices, anti-platelet drugs, anti-thrombotic drugs and anti-inflammatory drugs were uniformly negative (reviewed in Casterella

WO 02/18444

PCT/US01/26984

and Teirstein, *Cardiol. Rev.* 7: 219-231 [1999]; Andres, *Int. J. Mol. Med.* 2: 81-89 [1998]; and Rosanio *et al.*, *Thromb. Haemost.* 82 (suppl 1): 164-170 [1999]. In spite of all the recent progress, there is still no satisfactory treatment for stenosis or prevention of restenosis after balloon angioplasty or stent implantation. Although limited success has been achieved in small randomized trials, stenosis, and particularly restenosis, remains a major clinical problem. The instant invention discloses the use of ErbB4 receptor antagonists for the treatment of stenosis or restenosis by controlling the proliferation of vascular smooth muscle cells.

The scope of the present invention, however, is not restricted to the disorders of the vascular smooth muscle cells. The scope specifically includes any disorder that results from proliferation of smooth muscle cells in any organ and that involves an active role of ErbB4 receptors and/or corresponding ligands.

Infantile hypertrophic pyloric stenosis (IHPS) is a relatively common disease that primarily affects young infants. The underlying stenosis causes functional obstruction of the pyloric canal. Consequently, gastric emptying of milk is disturbed severely. IHPS involves hypertrophy and hyperplasia of the pyloric smooth muscle mass and results in pyloric stenosis (Oue and Puri, *Pediatr. Res.* 45: 853-857 [1999]). Furthermore, increased expression of EGF, EGF receptor and HB-EGF has been reported in SMCs in pyloric circular and longitudinal muscle from IHPS patients as compared to control tissues (Shima *et al.*, *Pediatr. Res.* 47: 201-207 [2000]). The antagonists of ErbB4 disclosed herein may find use in the control of pyloric smooth muscle cell proliferation and therefore in the treatment of pyloric stenosis.

The contractile nature of smooth muscle cells and regulation of their contraction by various factors play a crucial role in the urinary collecting system including bladder, ureters and urethra. A membrane-bound precursor form of HB-EGF is expressed in urinary bladder smooth muscle cells and epithelial cells (Freeman *et al.*, *J. Clin. Invest.* 99: 1028-1036 [1997]; Kaefer *et al.*, *J. Urol.* 163: 580-584 [2000]). Moreover, treatment of bladder SMCs with diphtheria toxin, which is known to utilize membrane-bound HB-EGF as a receptor, inhibited their proliferation (Kaefer *et al.*, *ibid.*). HB-EGF is a potent mitogen for bladder SMC proliferation, and it acts by binding to ErbB1 (HER1) receptors expressed by these cells, thus acting as an autocrine growth factor (Borer *et al.*, *Lab Invest.* 79: 1335-1345 [1999]). The authors also demonstrated the expression of ErbB2 and ErbB3 but not ErbB4 receptors on bladder SMCs. These findings raise the possibility that HB-EGF plays a role in the bladder wall thickening that occurs in response to obstructive syndromes affecting the lower urinary tract. Therefore, ErbB4 antagonists of the instant invention, particularly ErbB4 immunoadhesin, may prove useful in controlling proliferation of bladder smooth muscle cells, and consequently in the prevention or treatment of urinary obstructive syndromes.

The obstructive airway diseases are yet another group of diseases with underlying pathology involving smooth muscle cell proliferation. One example of this group is asthma which manifests in airway inflammation and bronchoconstriction. EGF has been shown to stimulate proliferation of human airway SMCs and is likely to be one of the factors involved in the pathological proliferation of airway SMCs in obstructive airway diseases (Cerutis *et al.*, *Am. J. Physiol.* 273: L10-15 [1997]; Cohen *et al.*, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 16: 85-90 [1997]). Accordingly, the ErbB4 antagonists of the present invention may be used for the treatment of obstructive airway diseases.

WO 02/18444

PCT/US01/26984

There are two major approaches to introducing the nucleic acid (optionally contained in a vector) into the patient's cells; *in vivo* and *ex vivo*. For *in vivo* delivery the nucleic acid is injected directly into the patient, usually at the site where the chimeric heteroadhesin is required. For *ex vivo* treatment, the patient's cells are removed, the nucleic acid is introduced into these isolated cells and the modified cells are administered to the patient either directly or, for example, encapsulated within porous membranes which are implanted into the patient (see, e.g. U.S. Patent Nos. 4,892,538 and 5,283,187).

There are a variety of techniques available for introducing nucleic acids into viable cells. The techniques vary depending upon whether the nucleic acid is transferred into cultured cells *in vitro*, or *in vivo* in the cells of the intended host. Techniques suitable for the transfer of nucleic acid into mammalian cells *in vitro* include the use of liposomes, electroporation, microinjection, cell fusion, DEAE-dextran, the calcium phosphate precipitation method, etc.

A commonly used vector for *ex vivo* delivery of the gene is a retrovirus. The currently preferred *in vivo* nucleic acid transfer techniques include transfection with viral vectors (such as adenovirus, Herpes simplex I virus, or adeno-associated virus) and lipid-based systems (useful lipids for lipid-mediated transfer of the gene are DOTMA, DOPE and DC-Chol, for example). In some situations it is desirable to provide the nucleic acid source with an agent that targets the target cells, such as an antibody specific for a cell surface membrane protein or the target cell, a ligand for a receptor on the target cell, etc. Where liposomes are employed, proteins which bind to a cell surface membrane protein associated with endocytosis may be used for targeting and/or to facilitate uptake, e.g. capsid proteins or fragments thereof tropic for a particular cell type, antibodies for proteins which undergo internalization in cycling, and proteins that target intracellular localization and enhance intracellular half-life. The technique of receptor-mediated endocytosis is described, for example, by Wu *et al.*, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987); and Wagner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3410-3414 (1990). For review of the currently known gene marking and gene therapy protocols see Anderson *et al.*, Science 256:808-813 (1992). See also WO 93/25673 and the references cited therein.

Therapeutic formulations are prepared for storage by mixing the ErbB4 antagonist having the desired degree of purity with optional physiologically acceptable carriers, excipients, or stabilizers (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition, Osol, A., Ed., (1980)), in the form of lyophilized cake or aqueous solutions. Pharmaceutically acceptable carriers, excipients, or stabilizers are non-toxic to recipients at the dosages and concentrations employed, and include buffers such as phosphate, citrate, and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid; low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, arginine or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrans; chelating agents such as EDTA; sugar alcohols such as mannitol or sorbitol; salt-forming counterions such as sodium; and/or nonionic surfactants such as Tween, Plurionics, or polyethylene glycol (PEG).

An antibody or an immunoadhesin to be used for *in vivo* administration must be sterile. This is readily accomplished by filtration through sterile filtration membranes, prior to or following lyophilization and reconstitution. The formulation ordinarily will be stored in lyophilized form or in solution.

WO 02/18444

PCT/US01/26984

Therapeutic compositions are generally placed into a container having a sterile access port, for example, an intravenous solution bag or vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle.

The route of antibody, immunoadhesin or chimeric heteroadhesin administration is in accord with known methods, e.g., injection or infusion by intravenous, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial, or intralesional routes, or by sustained-release systems as noted below. The heteroadhesin or antibody is administered continuously by infusion or by bolus injection.

Suitable examples of sustained-release preparations include semipermeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the protein, which matrices are in the form of shaped articles, e.g., films, or microcapsules. Examples of sustained-release matrices include polyesters, hydrogels (e.g., poly(2-hydroxyethyl-methacrylate) as described by Langer *et al.*, J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277 (1981) and Langer, Chem. Tech., 12:98-105 (1982) or poly(vinylalcohol)), polylactides (U.S. Patent No. 3,773,919, EP 58,481), copolymers of L-glutamic acid and gamma ethyl-L-glutamate (Sidman *et al.*, Biopolymers, 22:547-556 (1983)), non-degradable ethylene-vinyl acetate (Langer *et al.*, *supra*), degradable lactic acid-glycolic acid copolymers such as the Lupron Depot (injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and leuprolide acetate), and poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid (EP 133,988).

Sustained-release ErbB4 antagonist also include liposomally entrapped drug. Liposomes containing ErbB4 antagonist are prepared by methods known per se: Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-3692 (1985); Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030-4034 (1980); EP 52,322; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949; EP 142,841; Japanese patent application 83-118008; U.S. Patent Nos. 4,485,045 and 4,544,545; and EP 102,324. Ordinarily the liposomes are of the small (about 200-800 Angstroms) unilamellar type in which the lipid content is greater than about 30 mol. % cholesterol, the selected proportion being adjusted for the optimal therapy. Particularly useful liposomes can be generated by the reverse phase evaporation method with a lipid composition comprising phosphatidylcholine, cholesterol and PEG-derivatized phosphatidylethanolamine (PEG-PE). Liposomes are extruded through filters of defined pore size to yield liposomes with the desired diameter. A chemotherapeutic agent (such as Doxorubicin) is optionally contained within the liposome. See Gabizon *et al.* J. National Cancer Inst. 81(19):1484 (1989).

The ErbB4 antagonist of the invention may be used to bind and sequester ErbB4 ligand or block ErbB4 receptor thereby inhibiting ErbB4 activation in the cell and inhibit cell proliferation. The ErbB4 antagonist of the invention may be administered to a patient along with other therapy such as a chemotherapeutic agent. Preparation and dosing schedules for such chemotherapeutic agents may be used according to manufacturers' instructions or as determined empirically by the skilled practitioner. Preparation and dosing schedules for such chemotherapy are also described in Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992). The chemotherapeutic agent may precede, or follow administration of the antagonist or may be given simultaneously therewith.

An effective amount of antagonist to be employed therapeutically will depend, for example, upon the therapeutic objectives, the route of administration, and the condition of the patient. Accordingly, it will be necessary

WO 02/18444

PCT/US01/26984

for the therapist to titer the dosage and modify the route of administration as required to obtain the maximum therapeutic effect. A typical dosage might range from about 1 g/kg to up to 100 mg/kg of patient body weight, preferably about 10 g/kg to 10 mg/kg. Typically, the clinician will administer antagonist until a dosage is reached that achieves the desired effect for treatment of the above mentioned disorders.

5

5. Methods for identification of molecules that inhibit or enhance the proliferation or migration of smooth muscle cells

The present invention discloses a method of screening to identify molecules that can inhibit or enhance the proliferation of smooth muscle cells. For example, a candidate molecule is incubated with a polypeptide comprising the extracellular domain of an ErbB4 receptor, followed by adding to a culture of smooth muscle cells and determining the effect on the proliferation of cells. The ErbB4 receptor may be a native ErbB4 receptor such as a human ErbB4 receptor, or may be a polypeptide having at least 85% sequence identity with the amino acid sequence of a native ErbB4 receptor. The cell proliferation can be monitored and quantitated in a number of ways. For instance, incorporation of ³H-thymidine into DNA is a well-established method to monitor cellular DNA synthesis indicative of cell proliferation. The incorporation of ³H-thymidine into DNA is monitored either microscopically by counting the number of silver grains in an autoradiograph or biochemically by liquid scintillation counting. Similarly, incorporation of 5-bromo 2'-deoxyuridine (BrdU) into cellular DNA can be monitored either microscopically or immunologically. Both assays utilize highly specific monoclonal antibodies that recognize BrdU incorporated into DNA. In the microscopic assay, the cells are permeabilized, reacted with BrdU specific monoclonal antibodies followed by labeled secondary antibodies. The secondary antibodies are detected by virtue of an attached label such as a fluorescent dye (fluorescein isothiocyanate (FITC), rhodamine, Texas Red etc) or an enzymatic label (alkaline phosphatase, horseradish peroxidase etc). A suitable substrate that produces an insoluble product upon enzymatic action is then used to reveal and quantitate the enzyme labeled secondary antibodies. An enzymatic assay monitors the amount of BrdU specific monoclonal antibodies by a suitable immunoassay such as ELISA. The monoclonal antibodies specific for BrdU as well as ELISA kits containing such antibodies are available commercially from a number of sources including Boehringer Mannheim. A flow cytometry can also be used to monitor cell proliferation. In this method, cells are fractionated based on the nuclear DNA content per cell. Since the nuclear DNA content varies among cells undergoing division depending on the phase of cell cycle (2n in G1 phase, 4n in G2+M phase and intermediate value in S phase, wherein n is the value of haploid nuclear DNA content), cell proliferation can be rapidly monitored by estimating the fraction of cells in S and G2+M phases using this approach.

Since ErbB4-dependent proliferation of smooth muscle cells involves ligand-mediated signal transduction pathway utilizing ErbB4 receptor, any step in this pathway can be monitored and used as a measure of cell proliferation. One such step is a ligand-induced tyrosine autophosphorylation of ErbB4 receptor, which can be monitored by the kinase receptor activation (KIRA) assay as described in W095/14930. This ELISA-type assay is suitable for qualitative or quantitative measurement of kinase activation by measuring the autophosphorylation of the kinase domain of a receptor

35

WO 02/18444

PCT/US01/26984

protein tyrosine kinase such as ErbB4. The first stage of the assay involves phosphorylation of the kinase domain of ErbB4 receptor present in the cell membrane of a smooth muscle cell. Typically, a first solid phase (*e.g.*, a well of a first assay plate) is coated with a substantially homogeneous population of smooth muscle cells. Being adherent cells, the smooth muscle cells adhere naturally to the first solid phase. One can also use smooth muscle cells transfected with a "receptor construct" that comprises a fusion of a kinase receptor and a flag polypeptide. Antibodies specific for flag polypeptide are used in the ELISA part of the assay to capture the receptor with flag peptide. A candidate molecule and a polypeptide comprising the extracellular domain of a native ErbB4 receptor are then added to the wells containing smooth muscle cells, followed by monitoring tyrosine autophosphorylation of ErbB4 receptor by the KIRA assay. A polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 85% sequence identity with the amino acid sequence of the extracellular domain of ErbB4 receptor can also be used in the assay. Following exposure, the smooth muscle cells are solubilized using a lysis buffer (which has a solubilizing detergent therein) and gentle agitation, thereby releasing cell lysate which can be subjected to the ELISA part of the assay directly, without the need for concentration or clarification of the cell lysate.

The cell lysate thus prepared is then subjected to the second (ELISA) stage of the assay. As a first step in the ELISA stage, a second solid phase (usually a well of an ELISA microtiter plate) is coated with a capture agent (often a capture antibody) which binds specifically to ErbB4 receptor or, in the case of a receptor construct, to the flag polypeptide. Coating of the second solid phase is carried out so that the capture agent adheres to the second solid phase. The capture agent is generally a monoclonal antibody but polyclonal antibodies may also be used. The cell lysate obtained is then exposed to, or contacted with, the adhering capture agent so that the receptor or receptor construct adheres to (or is captured in) the second solid phase. A washing step is then carried out, so as to remove unbound cell lysate, leaving the captured receptor or receptor construct. The adhering or captured receptor or receptor construct is then exposed to, or contacted with, an anti-phosphotyrosine antibody which identifies phosphorylated tyrosine residues in the tyrosine kinase receptor. In the preferred embodiment, the anti-phosphotyrosine antibody is conjugated (directly or indirectly) to an enzyme which catalyzes a color change of a non-radioactive color reagent. Accordingly, phosphorylation of the receptor can be measured by a subsequent color change of the reagent. The enzyme can be bound to the anti-phosphotyrosine antibody directly, or a conjugating molecule (*e.g.*, biotin) can be conjugated to the anti-phosphotyrosine antibody and the enzyme can be subsequently bound to the anti-phosphotyrosine antibody via the conjugating molecule. Finally, binding of the anti-phosphotyrosine antibody to the captured receptor or receptor construct is measured, *e.g.*, by a color change in the color reagent. Anti-phosphotyrosine antibodies that are commercially available can be used for the assay.

The instant invention also provides for a method for screening of molecules which can inhibit or enhance migration of smooth muscle cells. One of the formats utilizes a compartmentalized chemotaxis cell culture chambers such as Neuroprobe ChemoTX chemotaxis chambers available from (Neuroprobe Inc., Gaithersburg, MD). In this method, a porous filter separates smooth muscle cells in the upper chamber from a medium containing a chemoattractant (*e.g.*, thrombin) in the lower chamber. Smooth muscle cells are incubated with a candidate molecule and a polypeptide

WO 02/18444

PCT/US01/26984

comprising the extracellular domain of an ErbB4 receptor. At the end of incubation period, the filters are stained and smooth muscle cells that have migrated to the bottom of the filter are counted using an inverted microscope.

A conventional library or a combinatorial library of chemical compounds can be used for screening purpose. An automated approach adapted for high throughput can be conveniently used for the assay. However, the screening assays are not restricted only to small molecules, even macromolecules such as antibodies can be used for the screening.

EXAMPLES

The following examples are offered by way of illustration and not by way of limitation. The examples are provided so as to provide those of ordinary skill in the art with a complete disclosure and description of how to make and use the compounds, compositions, and methods of the invention and are not intended to limit the scope of what the inventors regard as their invention. Efforts have been made to insure accuracy with respect to numbers used (e.g. amounts, temperature, etc.) but some experimental errors and deviation should be accounted for. Unless indicated otherwise, parts are parts by weight, temperature is in degrees C, and pressure is at or near atmospheric. The disclosures of all citations in the specification are expressly incorporated herein by reference.

Example 1: Construction, isolation and biochemical characterization of immunoadhesins and chimeric heteromultimer immunoadhesins

A unique Mlu I site was engineered into a plasmid expressing human IgG heavy chain (pDR, a gift from J. Ridgeway and P. Carter, Genentech, Inc.) at the region encoding the hinge domain of the immunoglobulin. Mlu I sites were also engineered into a set of ErbB4 expression plasmids at the region encoding the ECD/TM junctions of these receptors. All mutagenesis were performed using the Kunkel method (Kunkel, T., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:488 (1985)). The Mlu I sites were utilized to make the appropriate ErbB4-IgG fusion constructs. The fusion junction of the ErbB-IgG chimera was: G⁶¹⁰_{ERB4}-(TR)-DKTH¹²⁴_{IG}, where the amino acid numbering of the ErbB4 polypeptide is described in Plowman *et al.* (Plowman, G.D. *et al.*, (1993a) PNAS USA 90:1746-1750). The conserved TR sequence is derived from the Mlu I site. The sequence of the Fc region used in the preparation of the fusion constructs is found in Ellison, J.W. *et al.* (Ellison, J.W. *et al.* (1982) NAR 10:4071-4079). The final expression constructs were in a pRK-type plasmid backbone wherein eukaryotic expression is driven by a CMV promoter (Gorman *et al.*, DNA Prot. Eng. Tech. 2:3-10 (1990)).

To obtain protein for *in vitro* experiments, adherent HEK-293 cells (ATCC No. CRL-1573) were transfected with the expression plasmid using standard calcium phosphate methods (Gorman *et al.*, *supra* and Huang *et al.*, Nucleic Acids Res. 18:937-947 (1990)). Serum-containing media was replaced with serum-free media 15 hours post-transfection and the transfected cells incubated for 5-7 days. The resulting conditioned media was harvested and passed through Protein A columns (1 ml. Pharmacia HiTrap). Purified IgG fusions were eluted with 0.1 M citric acid

WO 02/18444

PCT/US01/26984

(pH 4.2) into tubes containing 1 M Tris pH 9.0. The eluted proteins were subsequently dialyzed against PBS and concentrated using Centri-prep-30 filters (Amicon). Glycerol was added to a final concentration of 25% and the material stored at -20 C. Concentrations of material were determined via a Fo-ELISA

¹²⁵I-HRG Binding Assay

The EGF-like domain of HRG 1₍₁₇₇₋₂₄₆₎ was expressed in *E. coli*, purified and radiolabeled as described previously (Sliwkowski, M. *et al.* J. Biol. Chem. 269:14681-14685 (1994)). Full-length rHRG 1, which was expressed in Chinese hamster ovary cells, was used in Western blot analysis. Binding assays were performed in Nunc breakapart immune-module plates. Plate wells were coated at 4 C overnight with 100 μ l of 5 μ g/ml goat-anti-human antibody (Boehringer Mannheim) in 50 mM carbonate buffer (pH 9.8). Plates were rinsed twice with 200 μ l wash buffer (PBS/0.05% Tween-20) followed by a brief incubation with 100 μ l 1% BSA/PBS for 30 min at room temperature. Buffer was removed and each well was incubated with 100 μ l IgG fusion protein in 1% BSA/PBS under vigorous side-to-side rotation for 1 hour. Plates were rinsed three times with wash buffer and competitive binding was carried out by adding various amounts of cold competitor -HRG and ¹²⁵I-HRG 1 and incubating at room temperature for 2-3 hours with vigorous side-to-side rotation. Wells were quickly rinsed three times with wash buffer, drained and individual wells were counted using a 100 Series Iso Data γ -counter. Scatchard analysis was performed using a modified Ligand program (Munson, P. and Robard, D. (1980) Analytical Biochemistry 107:220-239).

³H-Thymidine incorporation assay

Tritiated thymidine incorporation assays were performed in a 96-well format. MCF7 cells were plated at 10,000 cells/well in 50:50 F12/DMEM (high glucose) 0.1% fetal calf serum (100 μ l). Cells were allowed to settle for 3 hours, after which ErbB4-IgG fusion proteins and/or heregulin were added to the wells (final volume of 200 μ l) and the plates incubated for 15 hours in a 37 $^{\circ}$ C tissue culture incubator. Tritiated thymidine was added to the wells (20 μ l of 1/20 diluted tritiated thymidine stock: Amersham TRA 120 B363, 1 mCi/ml) and the plates incubated a further 3 hours. Tritiated material was then harvested onto GF/C unifilters (96 well format) using a Packard Filtermate 196 harvester. Filters were counted using a Packard Topcount apparatus.

Example 2: Effect of ErbB4-IgG immunoadhesin on human aortic smooth muscle cell proliferation

Human aortic smooth muscle cells (Clonetics) were seeded at about 50% confluent density (5000 cells/well) in 96 well tissue culture plates and incubated overnight in SM2 media (Clonetics). Next day, the media was changed to M199 supplemented with ITS (1X), 2 mM L-glutamine, 50 μ g/ml ascorbic acid, 26.5 mM NaHCO₃, 100 U/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin and 0.1% (v/v) fetal bovine serum. The cells were further incubated for 16 h. The cells were then treated with either Her4-IgG (400 nM) or buffer for 1 h, followed by treatment with PDGF (100 ng/ml) for 40 h. Control cells were left untreated to estimate the basal level of cell growth. An aliquot of BrdU (10 μ l/well of a 10 μ M solution of 5-bromo 2'-deoxyuridine prepared in PBS) was added and the cells were incubated for an additional 2 h. Cell proliferation was monitored by quantitating BrdU incorporation using BrdU ELISA (Cell proliferation kit, Boehringer mannheim, Catalog No 1 647 229) following manufacturer's instructions for adherent cells.

WO 02/18444

PCT/US01/26984

As shown in Figure 5, PDGF stimulated growth of aortic smooth muscle cells in agreement with earlier reports (Ross *et al.*, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 12: 155-189 [1990]). Pre-treatment of cells with ErbB4-IgG immunoadhesin reduced the extent of PDGF-stimulated proliferation of cells. Control cells treated with buffer in place of ErbB4-IgG did not show any significant effect on cell proliferation. These data indicate that at least part of the mitotic response of smooth muscle cells is mediated by the activation of the ErbB4 receptor, and removal of ligands which would activate the ErbB4 receptor with the ErbB4 immunoadhesin reduces smooth muscle cell proliferation in response to PDGF.

Example 3: Effect of ErbB4-IgG immunoadhesin on human aortic smooth muscle cell migration

Human aortic smooth muscle cells were trypsinized and resuspended at a concentration of 5×10^5 cells per ml in DME containing 10% FBS. Cells were pre-incubated with Her4-IgG (400 nM) or buffer for 15 min. The lower wells of ChemoTX chemotaxis chambers (Neuroprobe Inc., Cat 116-8) were filled with 300 μ l of a solution of 2 U/ml human thrombin or buffer (PBS) negative control. A filter was mounted on top of the chamber and the smooth muscle cells (buffer or ErbB4 treated) were added to the top wells in a volume of 50 μ l. The plate and filter were covered with the clear plastic lid and incubated for 3 h at 37° C in humidified air with 5% CO₂. At the end of the incubation, filters were removed and the top sides were wiped with a Q-tip to remove any remaining cells. The filters were stained with Dif-Quick staining solution and the number of cells migrated to the bottom of the filter were counted using an inverted phase microscope. Six wells in each group and 40 fields in each well were counted.

As shown in Figure 6, thrombin acted as a chemotactic stimulus and induced migration of aortic smooth muscle cells. ErbB4-IgG immunoadhesin inhibited thrombin-stimulated cell migration. These data indicate that at least part of thrombin's ability to stimulate smooth muscle cell migration is mediated by the release of ligand(s) for the ErbB4 receptor, and that the removal of these ligands with the ErbB4 immunoadhesin reduces the chemotactic response to thrombin

Example 4: Production and Characterization of Anti-ErbB4 Monoclonal Antibodies

Generation of anti-ErbB4 Mabs

A panel of 34 murine monoclonal antibodies which specifically bind the extracellular domain of ErbB4 were produced using conventional hybridoma technology (Table 2). Total cellular RNA was extracted from MDA-MB-453 cells and used as a template in RT PCR to generate the human ErbB4 extracellular domain (ECD) coding sequence. Specific oligonucleotides used in the RT PCR reactions were synthesized on the basis of the ErbB4 DNA sequence. A gDErbB4 ECD fusion protein was constructed by ligating the coding sequences for amino acids 1-52 of herpes simplex virus type 1 glycoprotein D to the sequences encoding amino acids 26-640 of human ErbB4. The gDErbB4 ECD cDNA was inserted into the cytomegalovirus-based expression vector pRK5. This construct was transiently transfected into human embryonic kidney 293 cells using a standard calcium phosphate precipitation protocol.

WO 02/18444

PCT/US01/26984

An affinity column was prepared by coupling the anti-gD monoclonal 5B6 to CNBR sepharose (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala Sweden). Supernatant from gErbB4 ECD transfected 293 cells was concentrated 20-40 fold on a ym30 membrane (Amicon, Beverly MA) and loaded onto the affinity resin. The column was washed with PBS and the receptor was eluted with 100 mM acetic acid/500 mM NaCl pH 2.4. The ErbB4 ECD was buffer exchanged into PBS and concentrated. Protein concentration was determined by OD280.

Balb/c mice were immunized with approximately 5 g of ErbB4 ECD in RIBI MPL + TDM + CWS Emulsion (RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, MT) in their rear footpads on weeks 0, 1, 2 and 3. The immunized mice were tested for an antibody response by ELISA. The mice with the highest titers were given an additional 5 g of ErbB4 ECD in RIBI during week 4. Three days later, the lymphocytes from the popliteal and inguinal nodes were fused with mouse myeloma line X63-Ag8.653. Fused cells were plated at a density of 200,000 cells per well in 96-well tissue culture plates and hybridoma selection using HAT media supplement (Sigma, St. Louis, MO) began one day post fusion. Beginning on day 10, the hybridoma supernatants were screened for the presence of ErbB4 specific antibodies using a radioactive capture assay as described below. Stable antibody producing clones were obtained by limiting dilution and large quantities of specific Mabs were produced in ascites. The antibodies were purified on protein A-Sepharose columns (Fermentech, Inc., Edinburgh, Scotland) and stored sterile in PBS at 4°C.

In the radioactive capture assay, Maxisorp breakapart modules (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with 100 l of 2 g/ml goat anti-mouse IgG (Boehringer Mannheim) overnight at 4°C. The plates were washed with PBS/0.5% Tween 20 (PBST), blocked with ELISA diluent (PBS/0.5%BSA/0.05% Tween 20) and incubated with monoclonal supernatants for 2 hr at ambient temperature. The plates were washed and incubated for an additional hour with 40,000 counts/ well of [¹²⁵I]ErbB4 ECD. After washing, the amount of ErbB4 bound to the antibodies was determined by counting the wells on a Wallac 1277 GammaMaster (Wallac Inc, Gaithersburg, MD).

The 34 anti-ErbB4 monoclonal antibodies produced by this method (Table 2) have a high affinity for the receptor, exhibit a diversity of isotypes and are directed to 18 distinct epitopes on the ErbB4 ECD. Isotypes of the antibodies were determined using a Mouse MonoAb ID/SP isotyping kit from Zymed (So. San Francisco, CA), following supplier's instructions.

Testing the specificity of anti-ErbB4 antibodies

The specificity of the Mabs was determined in an ELISA measuring their ability to bind immobilized HER2, HER3 and ErbB4 extracellular domains (amino acids 1-645, 1-617 and 1-640 respectively). ECDs were coated on ELISA plates at a concentration of 1 g/ml and incubated with biotinylated anti-ErbB4 Mabs. Bound Mabs were detected using streptavidin peroxidase (Sigma, St. Louis, MO) and the substrate OPD (Sigma, St. Louis, MO). As can be seen in Table 2, nearly all of the antibodies produced were highly specific for ErbB4 (indicated by a '4' in the column labeled 'Specificity'). Four of the antibodies showed some binding to HER3 (indicated by a '3' in the column labeled 'Specificity').

WO 02/18444

PCT/US01/26984

Epitope mapping and characterization

The ErbB4 epitope bound by each of the monoclonal antibodies was determined by competitive binding analysis (Fendly *et al. Cancer Research* 50:1550-1558 (1990)). The anti-ErbB4 Mabs were diluted to a concentration of 25 μ l in ELISA diluent and 50 μ l was added to an ELISA plate pre-coated with gDErbB4 ECD as above. The plates were incubated at room temperature for 2 hours and washed with PBST. Dilutions of biotinylated anti-ErbB4 antibodies ranging from 1:1,000 to 1:10,000 were prepared and 50 μ l was added to the assay plate. Following a one-hour room temperature incubation, the plates were washed and 50 μ l of a 1:5000 dilution of streptavidin peroxidase (Sigma) was added. The plates were developed using OPD (Sigma). The anti-ErbB4 Mabs were grouped into epitopes based on their ability to block binding of the others by 50% or greater in comparison to an irrelevant Mab control. The relative epitope mapping identified 17 distinct epitopes, identified in Table 2 as A - Q.

The activities of nine representative antibodies were investigated further.

Table 2 Summary table of anti-ErbB4 monoclonals

Mab	Isotype	Epitope	Specificity
4-1440	IgG2b, κ	B	4
4-1441	IgG1, κ	J	4
4-1459	IgG2a, κ	D	4
4-1460	IgG1, κ	C	4
4-1461	IgG2a, κ	E	4
4-1462	IgG1, κ	C	4
4-1463	IgG2a, κ	D	4
4-1464	IgG2b, κ	C	4
4-1465	IgG2a, κ	L	3, 4
4-1472	IgG2a, κ	M	4
4-1473	IgG2a, κ	F	4
4-1474	IgG2b, κ	G	4
4-1475	IgG2b, κ	P	4
4-1476	IgG2a, κ	K	4
4-1477	IgG2a, κ	Q	4
4-1478	IgG2a, κ	I	4
4-1479	IgG2a, κ	D	4
4-1481	IgG2a, κ	H	3, 4
4-1482	IgG2b, κ	H	4
4-1483	IgG1, κ	R	3, 4
4-1484	IgG1, κ	E	4
4-1485	IgG2a, κ	F	4
4-1491	IgG2a, κ	G	4
4-1492	IgG2b, κ	A	4
4-1493	IgG2B, κ	A	4
4-1494	IgG2b, κ	B	4
4-1495	IgG2b, κ	A	4
4-1496	IgG1, κ	A	3, 4
4-1497	IgG1, κ	N	4
4-1498	IgG2b, κ	E	4
4-1535	IgG2b, κ	B	4

WO 02/18444

PCT/US01/26984

4-1536	IgG2b, κ	A	4
4-1537	IgG2b, κ	B	4
4-1543	IgG2a, κ	O	4

Determination of Binding Affinity

The relative affinities of the anti-ErbB4 Mabs were determined according to the method described by Friguier *et al.* (J Immunol Methods. 77(2):305-19 (1985)). Various concentrations of the ErbB4 ECD (1.1×10^{-7} M to 1.08×10^{-10} M) were mixed with a constant concentration of anti-ErbB4 Mab (2.08×10^{-10} M) and incubated overnight at 4°C. Following incubation, the unbound Mabs were assayed by adding 100 μ l of the reaction mixture in duplicate to microtiter plates (Nunc) previously coated with pErbB4 ECD (100 μ l/well at a concentration of 1 μ g/ml in 0.05M carbonate buffer, pH 9.6 for 16 hr at 4°C) and incubated for 1 hour at room temperature. After washing with PBST, the bound Mabs were detected by adding 100 μ l/well of a 1:5000 dilution of goat anti-mouse F(ab')₂ peroxidase (Boehringer Mannheim) for one hour at room temperature. The plates were developed using o-phenylenediamine dihydrochloride substrate (OPD, Sigma, St. Louis, MO) and read on a platereader.

The Mabs all showed high affinity binding, with K_d's ranging from 0.4 to 12 nM as presented in Table 3.

Non-reducing Immunoblot

The ability of the anti-ErbB4 Mabs to bind reduced and non-reduced ErbB4 ECD was tested by immunoblot analysis. ErbB4 ECD was added to tricine sample buffer, with and without BME, and applied to a 10-20% Novex tricine gel (Novex, San Diego, CA). The gel was run at 100V and electroblotted for 60 min. at 0.5 amp onto a PVDF, Immobilon P, membrane (Millipore, Bedford MA). The membrane was washed with PBST and blocked overnight with PBS/0.5% BSA/0.1% Tween 20, and incubated with 1 μ g/ml monoclonal antibody for 1.5 hour at ambient temperature. The membrane was washed and incubated for an additional hour with a 1:10,000 dilution of rat anti-mouse IgG peroxidase (Boehringer Mannheim). The membrane was washed thoroughly and developed using the Amersham ECL chemiluminescence system (Amersham Life Science Inc., Arlington Heights, Ill).

None of the Mabs were able to recognize reduced ErbB4 ECD (data not shown), suggesting that they are directed to conformational epitopes. Mabs identified as positive in Table 3 are those that are able to recognize low concentrations of non-reduced ErbB4 ECD. Mabs 4-1459, 4-1460, 4-1461, 4-1462, 4-1492 and 4-1497 demonstrated a high level of immunoreactivity and were able to bind non-reduced ErbB4 ECD at levels down to 0.3 ng.

WO 02/18444

PCT/US01/26984

Inhibition of HRG binding

A K562 cell line that does not express any EGFR-like receptors was used to further characterize the anti-ErbB4 monoclonal antibodies. A K562 cell line transfected with ErbB4 (1E10.1H4) was produced and cultured in RPMI 1640 with 2mM L-glutamine (GIBCO/BRL), 10% FBS (Hyclone) and 800 g/ml Geneticin, G418 (Gibco/BRL). At least 20 hr prior to assay, 1E10.1H4 was stimulated with 10 nM phorbol-12-myristate, 13-acetate (PMA, Calbiochem, La Jolla CA). The anti-ErbB4 Mabs were evaluated for their ability to block the binding of HRG to this cell line.

Quadruplicate samples containing 1.0×10^5 K562 ErbB4 cells resuspended in 200 μ l of RPMI 1640 with 10 mM HEPES and 0.1% BSA (binding buffer) were incubated with 132 pM [125 I]HRG 1 (177-244), in the presence of 100 nM anti-ErbB4 Mabs, overnight on ice. Following incubation, the cells were collected using a Multiscreen filtration device (Millipore), and washed twice with 200 μ l ice cold binding buffer. Cell associated counts were measured on a gamma counter. The percent binding was calculated against a control sample containing no Mab. The nonspecific binding was determined by incubation of a sample in the presence of 500 nM cold HRG 1 (177-244). Mabs were considered positive for HRG blocking if they blocked 90% or greater binding. As can be seen in Table 3, six of the nine anti-ErbB4 antibodies tested were able to inhibit 125 I-HRG binding at this level. Mab 4-1481 inhibited binding by 7% and 1459 exhibited no HRG blocking. The anti-ErbB4 Mab 4-1497 did not inhibit binding but rather appeared to enhance HRG binding by 26%.

Inhibition of HRG Binding in Human Breast Cancer Cell Lines

Since a number of the anti-ErbB4 Mabs were able to block binding of HRG to transfected K562 cells, their ability to block HRG binding to several human mammary carcinoma cell lines was tested. The cell lines MDA-MB-453, T47D and BT474 (ATCC, Rockville, MD) were plated into 24 well tissue culture plates at a density of 1×10^5 cells per well and allowed to adhere overnight. The anti-ErbB4 Mabs or anti-HER-2 control Mabs 2C4 and 4D5 were diluted to a concentration of 100 nM in Ham's F-12 plus Dulbecco's modified Eagle medium (1:1, v/v) with 10 mM HEPES and 0.1% BSA (binding buffer) and added in triplicate to the plates. Following a 30 minute incubation on ice, 1.5×10^5 counts of [125 I] HRG 1(144-277) was added. The plates were incubated on ice for four hours and washed twice with ice cold binding buffer. The cells were solubilized with 8 M urea/3 M acetic acid and cell associated counts were measured on a Wallac 1277 GammaMaster. The percent binding was calculated as above. The nonspecific binding was determined by incubation of a sample in the presence of 100 nM cold HRG 1(144-277).

None of the anti-ErbB4 Mabs caused significant inhibition of 125 I-HRG binding to the carcinoma lines tested. In contrast, the anti-HER-2 control Mabs 2C4 and 4D5 blocked binding by 84% and 29% respectively in MDA-MB-453 cells, 70% and 48% in T47D cells and 57% and 12% in BT474 cells. The unlabeled HRG control blocked 99% binding in MDA-MB 453 cells, 98% binding in T47D cells and 96% binding in BT474 cells at a concentration of 100 nM. This data suggests that in these cell lines the ErbB4 receptor may play a minor role in mediating the HRG responses.

WO 02/18444

PCT/US01/26984

Inhibition of Tyrosine Phosphorylation

Heregulin has been shown to induce the tyrosine phosphorylation of ErbB4. Therefore it was of interest to determine if the anti-ErbB4 Mabs were able to affect HRG β ₁₍₁₇₇₋₂₄₀₎ stimulated phosphorylation of the receptor in the K562 ErbB4 cell line.

The ErbB4 transfected K562 cell line (1E10.1H4) was grown in RPMI 1640 culture media to a density of 1×10^6 cells/ml. The cells were then changed to serum-free media without PMA (assay buffer) and incubated at 37°C for 2-6 hours. The cells were washed with assay buffer and duplicate samples containing 2.5×10^5 cells in assay buffer with 0.1% BSA, were incubated with 25 μ g of anti-ErbB4 Mabs or a control Mab for 30 min. at room temperature. Following incubation, one set of the samples was stimulated with 15 mM HRG 1(177-244) for 8 minutes at room temperature. The supernatants were removed and the cells lysed for 5 minutes at 100°C in 100 μ l of SDS sample buffer containing 50 μ l/ml β -mercaptoethanol. A 30 μ l aliquot of each sample was electrophoresed in a 4-12% polyacrylamide gel (Novex) and electroblotted onto a PVDF membrane (Millipore). The membranes were blocked with 2% BSA in tris-buffered saline containing 0.05% Tween-20 overnight at 4°C and incubated with a 1:1000 dilution of recombinant anti-phosphotyrosine peroxidase monoclonal RC20H (Transduction Laboratories, Lexington Kentucky) for 4 hours at room temperature. Bound anti-phosphotyrosine Ab was visualized using the Amersham ECL system (Amersham Life Science Inc.) and quantified by densitometry.

Six of nine monoclonal antibodies tested inhibited the generation of an HRG-induced tyrosine phosphorylation signal (Table 3). The remaining three were not inhibitory and none of the anti-ErbB4 Mabs was able to stimulate phosphorylation of the ErbB4 receptor.

Immunohistochemistry

Since anti-ErbB4 Mabs may be useful as diagnostic reagents, their ability to stain frozen cell pellets using standard immunocytochemical techniques was investigated. ErbB4 transfected K562 cells (1E10.1H4) and the human breast carcinoma lines MDA-MB-453, T47D, and BT474 (ATCC, Rockville, MD) were pelleted and frozen in OCT compound (Miles Inc., Elkhart, IN). The frozen pellets were sectioned on a cryostat to a thickness of 5 microns, mounted on slides, fixed in cold acetone (4°C) for 3-5 min. and air-dried. Endogenous peroxidase activity was quenched using a modification of the glucose oxidase method. The slides were rinsed with PBS and the cells were blocked for endogenous biotin activity using a Vector Biotin blocking kit (Vector, Burlingame, CA). Endogenous immunoglobulin binding sites were blocked with 10% normal horse serum (Vector). The cells were then incubated with 10 μ g/ml anti-ErbB4 Mabs for one hour at RT, followed by a 30 minute incubation with a 1:200 dilution of biotinylated horse anti-mouse IgG (Vector). The slides were incubated with ABC Elite Reagent (Vector) for 30 min. and the ErbB4 receptors visualized using DAB (Pierce, Rockford, IL). Mayer's hematoxylin (Rowley Biomedical Institute, Rowley, MA) was used to counterstain the cells.

Many of the anti-ErbB4 Mabs were able to stain the ErbB4 transfected K562 cells with varying intensity and little or no background staining (Table 3). Numbers represent the intensity of staining compared to an irrelevant

WO 02/18444

PCT/US01/26984

control. None of the Mabs was able to stain the frozen human mammary carcinoma cells that were tested (data not shown).

5 Table 3 Summary table of monoclonal antibody activity

Mab	Isotype	Epitope	K _d (nM)	Non-Reducing Immunoblot	HRG Blocking	P-Tyr Blocking	Histo- chemistry
4-1440	IgG2b, κ	B	1.9	-	+	+	3+
4-1459	IgG2a, κ	D	0.7	+	-	-	4+
4-1460	IgG1, κ	C	1.2	+	+	+	3+
4-1461	IgG2a, κ	E	2.3	+	-	-	4+
4-1462	IgG1, κ	C	0.4	+	+	+	2+
4-1464	IgG2b, κ	C	1.0	-	+	+	2+
4-1473	IgG2a, κ	F	6.0	-	+	+	2-3+
4-1492	IgG2b, κ	A	2.1	+	+	+	-
4-1497	IgG1, κ	N	12.0	+	-	-	-

FACS Analysis

To determine whether the anti-ErbB4 Mabs could bind to ErbB4 on the surface of viable cells, FACS analysis was done using the ErbB4 transfected K562 cell line and the mammary carcinoma lines MDA-MB-453, T47D and BT-474. Adherent cells were detached from tissue culture flasks using 10 mM EDTA in PBS, centrifuged at 1400 rpm for 5 min. and resuspended in PBS with 1% fetal bovine serum (FACS diluent). The cells were counted, adjusted to 10⁷ cells/ml and 0.1 ml of cells was incubated with 10 μl of each Mab in 100 μl FACS diluent for 30 min. at 4°C. The samples were washed, resuspended in 0.1 ml diluent and incubated with 1 μg of FITC conjugated F(ab')₂ fragment of goat anti-mouse IgG (Boehringer Mannheim) for 30 min at 4°C. The cells were washed, resuspended in 0.5 ml FACS diluent and analyzed using a FACScan cell sorter (Becton Dickinson, Mt. View, CA). Data was gated by forward and side scatter and propidium iodide fluorescence to exclude debris, doublets and dead cells.

All of the Mabs bound to the ErbB4 receptor on the ErbB4 transfected K562 cell line, which is expressed at approximately 2 X 10⁵ receptors/cell. An increase in observed cellular fluorescence of the ErbB4 transfected K562 cells from 2 to 50 fold was observed when compared to the isotype controls. Some of the weaker binding may reflect a ErbB4 ECD epitope that is sequestered on the intact cells. In contrast, the anti-ErbB4 antibodies 4-1440, 4-1464 and 4-1492, which give the highest fluorescence intensity on the transfected cell line, showed minimal binding to the breast carcinoma lines MDA-MB-453, T47D and BT-474. The positive control anti-HER2 Mab 2-2C4 showed binding to the tumor lines in proportion to the level of HER-2 expression. These results indicate a level of ErbB4 expression on the MDA-MB-453, T47D and BT-474 cells which is below the detection limit of this assay.

WO 02/18444

PCT/US01/26984

Inhibition of Heregulin binding to ErbB4 Immunoadhesin

Figure 7 shows a displacement curve of ^{125}I -HRG binding to a ErbB4 immunoadhesin captured on breakapart modules using the indicated concentrations of the anti-ErbB4 Mabs 4-1440, 4-1460, and 4-1464. Maxisorp breakapart modules (Nunc) were coated with 100 μl of a 1:200 dilution of goat anti-human Ig (Boehringer Mannheim) in 50 mM carbonate buffer pH 9.6 overnight at 4 $^{\circ}\text{C}$. The plates were washed with PBST, blocked with ELISA diluent and incubated with 100 μl of 200 ng/ml ErbB4 immunoadhesin for 2 hr at ambient temperature. The plates were washed and 50 μl of diluted Mabs (0.1 to 100 nM final) and 50 μl of ^{125}I -HRG 1(177-244) diluted to give a final concentration of 132 pM were added to the plate. Following a 1.5 hr incubation at ambient temperature, the plates were washed and the amount of ^{125}I -HRG bound to the receptor was determined by counting the wells on a Wallac 1277 GammaMaster.

Figure 7 demonstrates that the Mabs inhibited heregulin binding to the immunoadhesin in a dose dependent manner with ED₅₀ values ranging from 0.7 to 1.1 nM. This indicates that the Mabs possess a high degree of blocking ability.

Deposit of Material

The following hybridomas have been deposited with the American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC):

<u>Hybridoma</u>	<u>ATCC Dep. No.</u>	<u>Deposit Date</u>
HER4.10H1.1A1	PTA-2828	December 19, 2000
HER4.1C6.A11	PTA-2829	December 19, 2000
HER4.3B9.2C9	PTA-2826	December 19, 2000
HER4.1A6.5B3	PTA-2827	December 19, 2000
HER4.8B1.2H2	PTA-2825	December 19, 2000

Each of the deposited hybridomas produces one of the anti-ErbB4 monoclonal antibodies identified in Table 2. HER4.10H1.1A1 produces mAb 4-1464, HER4.1C6.A11 produces mAb 4-1440, HER4.3B9.2C9 produces mAb 4-1460, HER4.1A6.5B3 produces mAb 4-1492 and HER4.8B1.2H2 produces mAb 4-1473

The deposit of the hybridomas with the ATCC was made under the provisions of the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure and the Regulations thereunder (Budapest Treaty). This assures maintenance of a viable culture of the deposit for 30 years from the date of deposit. The deposit will be made available by ATCC under the terms of the Budapest Treaty, and subject to an

WO 02/18444

PCT/US01/26984

agreement between Genentech, Inc. and ATCC, which assures permanent and unrestricted availability of the progeny of the culture of the deposit to the public upon issuance of the pertinent U.S. patent or upon laying open to the public of any U.S. or foreign patent application, whichever comes first, and assures availability of the progeny to one determined by the U.S. Commissioner of Patents and Trademarks to be entitled thereto according to 35 U.S.C. § 122 and the Commissioner's rules pursuant thereto (including 37 C.F.R. § 1.14 with particular reference to 886 OG 638).

The assignee of the present application has agreed that if a culture of the materials on deposit should die or be lost or destroyed when cultivated under suitable conditions, the materials will be promptly replaced on notification with another of the same. Availability of the deposited material is not to be construed as a license to practice the invention in contravention of the rights granted under the authority of any government in accordance with its patent laws.

The foregoing written specification is considered sufficient to enable one skilled in the art to practice the invention. The present invention is not to be limited in scope by the construct deposited, since the deposited embodiment is intended as a single illustration of certain aspects of the invention and any constructs that are functionally equivalent are within the scope of this invention. The deposit of material herein does not constitute an admission that the written description herein contained is inadequate to enable the practice of any aspect of the invention, including the best mode thereof, nor is it to be construed as limiting the scope of the claims to the specific illustrations that it represents. Indeed, various modifications of the invention in addition to those shown and described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description and fall within the scope of the appended claims.

WO 02/18444

PCT/US01/26984

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method for controlling excessive proliferation or migration of smooth muscle cells comprising treating said smooth muscle cells with an effective amount of an antagonist of a native ErbB4 receptor.
2. The method of claim 1 wherein the control is prevention of excessive proliferation or migration of smooth muscle cells.
3. The method of claim 1 wherein the control is inhibition of excessive proliferation or migration of smooth muscle cells.
4. The method of claim 3 wherein said inhibition is total inhibition.
5. The method of claim 1 wherein said smooth muscle cells are pyloric smooth muscle cells.
6. The method of claim 1 wherein said smooth muscle cells are urinary bladder smooth muscle cells.
7. The method of claim 1 wherein said smooth muscle cells are those of an airway passage.
8. The method of claim 1 wherein said excessive proliferation or migration of smooth muscle cells results in stenosis.
9. The method of claim 1 wherein said smooth muscle cells are vascular smooth muscle cells.
10. The method of claim 9 wherein said vascular smooth muscle cells are human.
11. The method of claim 9 wherein said vascular smooth muscle cells are human aortic smooth muscle cells.
12. The method of claim 9 wherein said excessive proliferation or migration of smooth muscle cells results in vascular stenosis.
13. The method of claim 12 wherein said vascular stenosis is further characterized by excessive proliferation or migration of endothelial cells.
14. The method of claim 13 wherein said stenosis is restenosis.
15. The method of claim 1 wherein the ErbB4 receptor antagonist is an immunoadhesin.
16. The method of claim 15 wherein said immunoadhesin comprises an extracellular domain sequence of a native ErbB4 receptor.
17. The method of claim 16 wherein said native ErbB4 receptor is human.
18. The method of claim 17 wherein the native human ErbB4 receptor extracellular domain sequence is fused to an immunoglobulin heavy chain constant region sequence.
19. The method of claim 18 wherein said immunoglobulin is of IgG isotype.
20. The method of claim 19 wherein said immunoglobulin is of IgG1, IgG2 or IgG3 isotype.
21. The method of claim 19 wherein said immunoadhesin comprises at least one IgG immunoglobulin light chain.
22. The method of claim 1 wherein said antagonist is an antibody.
23. The method of claim 22 wherein said antibody is a neutralizing antibody against a native ErbB4 receptor.

WO 02/18444

PCT/US01/26984

24. The method of claim 23 wherein said antibody is a chimeric, humanized or human antibody.
25. The method of claim 23 wherein said antibody is glycosylated.
26. The method of claim 23 wherein said antibody binds essentially the same epitope as an antibody produced by a hybridoma selected from the group consisting of HER4.10H1.1A1 (ATCC Accession Number PTA-2828), HER4.1C6.A11 (ATCC Accession Number PTA-2829), HER4.3B9.2C9 (ATCC Accession Number PTA-2826), HER4.1A6.5B3 (ATCC Accession Number PTA-2827) and HER4.8B1.2H2 (ATCC Accession Number PTA-2825).
27. The method of claim 23 wherein said antibody has complementarity determining region (CDR) residues from an antibody produced by a hybridoma selected from the group consisting of HER4.10H1.1A1 (ATCC Accession Number PTA-2828), HER4.1C6.A11 (ATCC Accession Number PTA-2829), HER4.3B9.2C9 (ATCC Accession Number PTA-2826), HER4.1A6.5B3 (ATCC Accession Number PTA-2827) and HER4.8B1.2H2 (ATCC Accession Number PTA-2825).
28. A method for treating stenosis in a mammalian patient comprising administering to said patient an effective amount of an antagonist of a native mammalian ErbB4 receptor.
29. The method of claim 28 wherein said patient is human.
30. The method of claim 29 wherein said stenosis is vascular stenosis.
31. The method of claim 30 wherein said vascular stenosis is restenosis.
32. The method of claim 28 wherein said antagonist is an immunoadhesin.
33. The method of claim 32 wherein said immunoadhesin comprises an extracellular domain sequence of a native human ErbB4 receptor.
34. The method of claim 33 wherein said extracellular domain sequence is fused to an immunoglobulin heavy chain constant region sequence.
35. The method of claim 34 wherein said immunoglobulin is of IgG isotype.
36. The method of claim 28 wherein said antagonist is an antibody.
37. The method of claim 36 wherein said antibody is a neutralizing antibody against a native human ErbB4 receptor.
38. The method of claim 36 wherein said antibody binds essentially the same epitope as an antibody produced by a hybridoma selected from the group consisting of HER4.10H1.1A1 (ATCC Accession Number PTA-2828), HER4.1C6.A11 (ATCC Accession Number PTA-2829), HER4.3B9.2C9 (ATCC Accession Number PTA-2826), HER4.1A6.5B3 (ATCC Accession Number PTA-2827) and HER4.8B1.2H2 (ATCC Accession Number PTA-2825).
39. The method of claim 36 wherein said antibody has complementarity determining region (CDR) residues from an antibody produced by a hybridoma selected from the group consisting of HER4.10H1.1A1 (ATCC Accession Number PTA-2828), HER4.1C6.A11 (ATCC Accession Number PTA-2829), HER4.3B9.2C9 (ATCC Accession Number PTA-2826), HER4.1A6.5B3 (ATCC Accession Number PTA-2827) and HER4.8B1.2H2 (ATCC Accession Number PTA-2825).
40. The method of claim 28 wherein said antagonist is administered as an injection or infusion.

WO 02/18444

PCT/US01/26984

41. The method of claim 28 wherein said treatment additionally reduces hypertension associated with said stenosis.
42. The method of claim 28 wherein said treatment is prevention.
43. The method of claim 28 wherein said stenosis is pyloric stenosis.
- 5 44. The method of claim 28 wherein said stenosis is thickening of the urinary bladder wall.
45. The method of claim 28 wherein said stenosis is part of an obstructive airway disease.
46. A method for treating stenosis in a mammalian patient comprising introducing into a cell of said patient a nucleic acid encoding an antagonist of an ErbB4 receptor.
47. The method of claim 46 wherein said patient is human.
- 10 48. The method of claim 47 wherein said antagonist is an immunoadhesin.
49. The method of claim 48 wherein said immunoadhesin comprises an extracellular domain sequence of a native human ErbB4 receptor fused to an immunoglobulin heavy chain constant region sequence.
50. The method of claim 47 wherein said antagonist is an antibody.
- 15 51. The method of claim 50 wherein said antibody is a neutralizing antibody against a native ErbB4 receptor.
52. The method of claim 51 wherein said antibody is a chimeric, humanized or human antibody.
53. The method of claim 51 wherein said antibody binds essentially the same epitope as an antibody produced by a hybridoma selected from the group consisting of HER4.10H1.1A1 (ATCC Accession Number PTA-2828), HER4.1C6.A11 (ATCC Accession Number PTA-2829), HER4.3B9.2C9 (ATCC Accession Number PTA-2826),
- 20 HER4.1A6.5B3 (ATCC Accession Number PTA-2827) and HER4.8B1.2H2 (ATCC Accession Number PTA-2825).
54. The method of claim 51 wherein said antibody has complementarity determining region (CDR) residues from an antibody produced by a hybridoma selected from the group consisting of HER4.10H1.1A1 (ATCC Accession Number PTA-2828), HER4.1C6.A11 (ATCC Accession Number PTA-2829), HER4.3B9.2C9 (ATCC Accession Number PTA-2826), HER4.1A6.5B3 (ATCC Accession Number PTA-2827) and HER4.8B1.2H2 (ATCC
- 25 Accession Number PTA-2825).
55. The method of claim 46 wherein said nucleic acid is introduced *in vivo*.
56. The method of claim 46 wherein said nucleic acid is introduced *ex vivo*.
57. A method for treating hypertension associated with vascular stenosis in a mammalian patient, comprising administering to said patient an effective amount of an antagonist of a native mammalian ErbB4 receptor.
- 30 58. The method of claim 57 wherein said antagonist is a small molecule.
59. A pharmaceutical composition for the treatment of stenosis in a mammalian patient comprising an effective amount of an antagonist of a native mammalian ErbB4 receptor, in admixture with a pharmaceutically acceptable carrier.
60. A method for identifying a molecule that inhibits or enhances the proliferation or migration of
- 35 smooth muscle cells, comprising the steps of:

WO 02/18444

PCT/US01/26984

- (a) contacting a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 85 % sequence identity with the amino acid sequence of the extracellular domain of a native ErbB4 receptor and retaining the ability to control excessive proliferation or migration of smooth muscle cells, with a candidate molecule; and
- (b) determining whether the candidate molecule inhibits or enhances the ability of said polypeptide to control excessive proliferation or migration of smooth muscle cells.
- 5 61. The method of claim 60 wherein said polypeptide comprises the extracellular domain of a native ErbB4 receptor.
62. The method of claim 61 wherein said receptor is human.
63. The method of claim 61 wherein said polypeptide is an immunoadhesin.
- 10 64. The method of claim 60 wherein said molecule enhances the ability of said polypeptide to control excessive proliferation or migration of smooth muscle cells.
65. The method of claim 64 wherein said molecule is selected from the group consisting of antibodies and small molecules.
66. An antibody that binds essentially the same epitope of ErbB4 as an antibody produced by a hybridoma selected from the group consisting of HER4.10H1.1A1 (ATCC Accession Number PTA-2828), HER4.1C6.A11 (ATCC Accession Number PTA-2829), HER4.3B9.2C9 (ATCC Accession Number PTA-2826), HER4.1A6.5B3 (ATCC Accession Number PTA-2827) and HER4.8B1.2H2 (ATCC Accession Number PTA-2825).
- 15 67. An antibody that has complementarity determining region (CDR) residues from an antibody produced by a hybridoma selected from the group consisting of HER4.10H1.1A1 (ATCC Accession Number PTA-2828), HER4.1C6.A11 (ATCC Accession Number PTA-2829), HER4.3B9.2C9 (ATCC Accession Number PTA-2826), HER4.1A6.5B3 (ATCC Accession Number PTA-2827) and HER4.8B1.2H2 (ATCC Accession Number PTA-2825).
- 20 68. An antibody selected from the group consisting of an antibody produced by a hybridoma selected from the group consisting of HER4.10H1.1A1 (ATCC Accession Number PTA-2828), HER4.1C6.A11 (ATCC Accession Number PTA-2829), HER4.3B9.2C9 (ATCC Accession Number PTA-2826), HER4.1A6.5B3 (ATCC Accession Number PTA-2827) and HER4.8B1.2H2 (ATCC Accession Number PTA-2825).
- 25 69. An antibody that binds essentially the same epitope of ErbB4 bound by an antibody selected from the group consisting of anti-ErbB4 monoclonal antibodies 4-1440, 4-1460, 4-1473, 4-1492 and 4-1464.
70. An antibody that has complementarity determining region (CDR) residues from an antibody selected from the group consisting of anti-ErbB4 monoclonal antibodies 4-1440, 4-1460, 4-1473, 4-1492 and 4-1464.
- 30 71. An antibody which binds to ErbB4 with high affinity.
72. The antibody of claim 71 which binds to ErbB4 with a K_d of less than 100 nM.
73. The antibody of claim 71 which binds to ErbB4 with a K_d of less than 50 nM.
74. The antibody of claim 71 which binds to ErbB4 with a K_d of less than 10 nM.
75. The antibody of claim 71 which is a humanized antibody.
- 35 76. The antibody of claim 71 which is a human antibody.

WO 02/18444

PCT/US01/26984

- 5
- 77. The antibody of claim 71 which is an antibody fragment.
 - 78. An antibody which is capable of binding to both ErbB4 and ErbB3.
 - 79. The antibody of claim 78 which binds ErbB4 with high affinity.
 - 80. The antibody of claim 78 which binds both ErbB4 and ErbB3 with high affinity.
 - 81. An antibody which binds to ErbB4 and reduces heregulin binding thereto.
 - 82. The antibody of claim 81 which binds ErbB4 with high affinity.
 - 83. An antibody which binds to ErbB4 and reduces heregulin-induced tyrosine phosphorylation thereof.
 - 84. The antibody of claim 83 which binds ErbB4 with high affinity.

WO 02/18444

PCT/US01/26984

1/10

1 aattgtcagc acgggatctg agacttccaa aa**atg**aagc ogcgacagc actttgggtc
 61 tgggtgagc ttctgtgc ggcgggacc gtccagccca gcgattctca gtccagtgtg
 121 gcaggaaagc agaataaact gacgtctctc tctgacctgg aacagcagta ccgagccttg
 181 cgcagtaact atgaataact tgggtgtgct atgggcaacc tggcgataac cagcttgag
 241 cacaacggg acctccctt cctgctgtct gtccgagaag tccagagcta cgtgttagtg
 301 gctcttaac agttctgta cctgctcttg gagaatttac gcatttatcg tgggacaaaa
 361 ctttatgag atcgatatgc cttgccaala ttlttaact acgaaaaaga tggaaacttt
 421 ggacttcaag aacttggaat aaagacttg acgaatcc taaatggtag agcttatgta
 10 481 gaccagaaca aattcccttg ttatcgagc accattcatt gccaagatat tgtcggaaac
 541 ccatggcctt ccaactgac tcttgtgca acaatggta gtccaggatg tggcgttgcc
 601 cataagtcct gtactggccg ttgtcgggga ccacagaaa atcattgcca gacttgaca
 661 aggaacggtg gtccagaaca atgtgacgac agatgcacg gaccttcact cagtgaatgc
 721 tgcctatcgag aatgtgcttg agctgctca ggaactaag acacagacty ctttgccctg
 15 781 atgaattca atgacagtgg gcaactgtt actcagtgtc cccaacctt tcttacaat
 841 ccaaccaact ttcaactgga gcaacttgc aatgcaaat acacatatgg agcatctgt
 901 gtcaagaaat gtccacataa ctttgtggta gattccagtt ctttgtgag tgcctgacct
 961 agttccaaga tggagtaga agaaatggg attaaatgt gtaaaccttg cactgacatt
 1021 tgcccaaaag cttgtgatgg cattggaca ggaatcattg tgcagctca gactgtggat
 1081 tccagtaaca ttgacaact cataaactgt accaagatca atgggaattt gatcttcta
 1141 gtcaactgta ttcatgggga ccttacaat gcaattgaag ccatagacc agagaactg
 1201 acgctcttc ggcagtcag agagataaca ggttccctga acatacagtc atggccacca
 1261 aacatgactg actcagtgt ttttctaac ctgtgacca ttgttggaag agtactctat
 1321 agtggcctgt cctgtctat cctcaagca cagggcata cctctctaca gtccagctc
 1381 ctgaaggaaa tcagcgagcagg aaactctat attactgaca acagcaacct gttgtattat
 1441 catacatta actggacaac actctcagc acaatcaac agagaatagt aatccgggac
 1501 aacagaaaag ctgaaaatg tactgtgaa ggaatgggt gcaacctat gttgtccagt
 1561 gatggctgt ggggaacctg gccagaccac tgtctgtcgt gtcgcgctt cagttagagg
 1621 aggatctgca tagagtcttg taacctctat gatgtggaat ttccgggagt tgaagaatgg
 1681 tccatctgtg tggagtgtga ccccaagtgt gagaagatgg aagatggcct cctcacatgc

FIG. 1A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18444

PCT/US01/26984

2/10

1 aattgtcagc acgggatctg agacttccaa aaatgaaagc cgggagacg actttgggtc
 61 tgggtgagcc ttctctgtgc ggcggggacc gtccagccca gcatctctea gtacgtgtgt
 121 gaggagcgg agaataaact gagctctctc ttgacctgtg aacagcagta ccgagctgt
 35 181 cgaagtaact atgaataact tgaagtgtc atgggcaacc tggagataac cagcattgag
 241 cacaacggg acctctctc cotgggtct gtccagaaag tcaaggeta cgtgttagtg
 301 gctttaatc agttctctta cotgctctct gagaatttac gcatattctg tgggacaaaa
 361 ctttatagg atcgatagc cttggcaata ttttaaaact acagaaaaga tggaaacttt
 421 ggaattcaag aacttggatt aaagaacttg acagaaatcc taaatgtgtg agtctatgta
 481 gacagaaca aattctcttg ttaatgcagc accttcatt ggaagatat tgttcggaac
 541 ccatggcttc ccaacttgac tctgtgtca acaatgtgta gtccagatg tggacgttgc
 601 cataagtcct gtactggcg ttgctgggga cccacagaaa atcattgcca gatttgaca
 661 aggaaggtgt gtgcagaaca atgtgacggc agatgctacg gaccttaact cagtgtctgc
 721 tggcatcgag aatgtgtctg agctgtctca ggaactaagg acacagactg ctttgcctgc
 45 781 atgaatttca atgacagtgg agcagtgtt actcagtgct cccaaacctt tgcctacaat
 841 ccacacacct ttcaactgga gcacatttc aatgcaaatg acatatatgg agcattctgt
 901 gtcaagaaat gtccacataa ctttgtgtga gtatccagtt cttgtgtggt tgcctgacct
 961 agttccaaga tggaaagtaga agaaaatggg attaaaatgt gtaaaccttg cactgacatt
 1021 tggccaaaag cttgtgtatgg caltggtgca ggaatcaga tgcagctca gactgtggat
 50 1081 tccagttaaca ttgacaaatt cataaactgt accaagatca atgggaatt gatctttcta
 1141 gtcactgtga ttcatgggga ccttacaat gcaattgaag ccatagacc agagaaactg
 1201 aacgtctttc ggaagtcag agagataaca ggttctctga acatacagtc atggccacca
 1261 aacatgactg acttcaagtgt ttttctaac ctggtgacca ttggtggaag agtaactctat
 1321 agtggcctgt cctgtcttat cctcaagcaa cagggtcatca cctcttaca gttccagttc
 55 1381 ctgaaggaaa tcaagcaggg aacatctat attactgaca acagcaacct gtgtattat
 1441 cataccatta acgggacaac actcttcagc acaatcaacc agagaatagt aatccgggac
 1501 aacagaaaag ctgaataattg tactgtgaa ggaatggigt gcaaccaact gtgttccagt
 1561 gatggcgtgt ggggacctgg gccagaccaa tgtctgtctg gtcccggtt cagttaggga
 1621 aggatctgca tagagtcttg taaccttat gatgtgaat ttoggagatt tggagaatggc
 60 1681 tccatctgtg tggagtgtga ccccaagtgt gagaagatgg aagatggcct cctcacatgc

FIG. 1B

WO 02/18444

PCT/US01/26984

3/10

FIG. 1C

3541 cctttgtttt ctggagaaa aatggagac cttaagcat tggataatcc cgaatcac
 3601 aatgcacca atgtccacc caagccgag gatgagtat tgaatgagcc atgtacatc
 3661 aacaccttg ccaacacct ggaaaagct gatlaccta agaacaacat actgtcaatg
 3721 ccagagaag ccaagaagc gttgacaac cctgactact ggaaccaag cctgcaact
 3781 cggagcacc ttacgaccc agactacct gaggagtaca gcacaaata ttttataaa
 3841 cagaatggc ggtccggcc tatgtggca gaaatcctg aatacctctc tgagtctcc
 3901 ctgaagccag gcactgtgt gcgcctcca ccttacagac accggaatcac tgtgggttaa
 3961 gctcagttg ggtttttag gtggagagc acactgtct caattcccc accocctct
 4021 ctctcttg ggtctctct tctacccaa ggcagtagt tttagacit cccagtggaa
 4081 gatacagaa tgcagtata gttatgtct tacctaactt gaacattaga gggaagact
 4141 gaaagagaa gatagagga acccaatgt tcttcattt cctgtcagg gtgtcagg
 4201 agaatgaac agctagaaa ggaacagaa atgtaagca atgtgcta ctatcaact
 4261 agctgtaact tttttctt tcttttct tcttttct tctttgtt cttctctct cttcttttt
 4321 tttttttt taaagagat ggttgaaca ccatgtctat cgtttctctat ctgcaggaa
 4381 tgalgtgtc atattagca tccctggaaa tcaataaaa gtttccatta gaacaaaaga
 4441 ataacttt ctatacata tgatagtc tgaatggag aatccagtt cttccocag
 4501 cagttctgt cctagcaagt agaatggcc aactcaact tcaataatta aaaaatcca
 4561 ttaagttat aactagtaat tatgtttca acacttttg gtittttca tttgtttg
 4621 cctgaccca tccittata ttgtccoc tattttggc ttaatttct aattgcaag
 4681 atgtttact caaagttct tcacagaatt taagcaagaa atattttaat atagtgaat
 4741 ggcactact ttaagratat aattttaaa ataagaaag gaggctaata ttttcagc
 4801 tatcaatta tctcacct catccttct attttcaac attttttt cccataaat
 4861 gacactact gataggcgt tgggtgtct gaggtagaa ggaaactaa gagacagttc
 4921 tctgtgttc aggaacta ctgatactt cagggtggc ccaatgagg aatccatga
 4981 actggaaga acacatgga ttgggtatg tcaactggc gatacaga atgtagttt
 5041 gcaactaag tgaatttta ttgttctt tctgaact catttggat ttgatacaa
 5101 gcaatatga agcaaccg aatttaacta atttaagtc attttataa aaagagctaa
 5161 gataagact gtggaatgc caaaccaagc aaattaggaa ccttgcaacg giatccagg
 5221 actatgata gaggcagca cattatctt atagtcaac ttgtctacg aggaaattt
 5281 gtccagttc taaacttgt aagaagat gcgagtaag ttgtgttga atccatgga
 5341 attctagta tgactatt tatatgaat agaagtaac tcttgcca taattgga
 5401 taataaaag aaaaacaa acattcaag cttaggata ggtcctggg tcaaaagt
 5461 taataaatg tgaacatct tctc

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18444

PCT/US01/26984

4/10

MKPATGLWVWSLLVAAGTVQPSQSVCACTENKLSLSLDLEQQVRLKRYKXVENCEVVMGNLE
 ITSIEHNRDSFELRSVREVTGIVLVALNQFRYLEPLENIRLIRGTALVEDRYALALFELNRYKDN
 FGLQELGLNITILNGGVYDQNKELCYADTIHQDIDIVNFWPSNITLVSTNGSSGGGRCHK
 CTGRGWPTENHCQTILRTVCAEQCDRCYGYVSDCHRECAQCGCPKDTDCFACMNFDSG
 ACVTQCPOTFVYNPTTFQLEHNFNKTYGAFCVKCPHNFVVDSSCVSRACPPSSKMEVEENG
 KMCKPCTDICPKACDGIETGSLMSAQTVDSNIDKFINCTKINGNLIELYTGILHGDYPNALEAI
 DPEKINVERIVREITGELNIOSEWPFNMTDFSVFSNLVTIGGRVLYSGLSLLILKQOGTSLQFO
 SLKEISAGNIYITDNSNLGYHTINWTLTFSTINQIRIVIRDNKKAENCTAEGMVNCHLCSDDG
 WFGPDQCLSCRRFSRGICIESCNLYDGEFFENGISICVFCDQCEKMGDGLTCHGCPDN
 CTKCSHFKDGNCVEKCPDGLQZANSFIKADPDRECHPHNCTQCGNPTSHDCIYYPWIG
 HSTLPQHARTELIAGVIGGLFILLVIGLTFVAVVREKSTIKKKRALRRFETELVEPTPSGTA
 PNQQRILIKETELKRVKVLGSGAFGYKGTWVPEGETVKIPVALKILNETTGPKANVEHDE
 ALIMASMDHPLVRLGLVCLSPFTLIQVTLQMPHGLLEYYHEHKNIGSOILLNWCVOIARGMM
 YLEERRLYVHRDLAARNVIVKSPNHVKITDFGLARLLEGEDEKEYNADGGKMPFKWMALECIIHAK
 FTHQSDVWSXGVTIWELMTFGGKEYDGIPTREIPOLLEKGERLPQPICTIDYVMVVKWMTD
 ADSRPFKELAARFESHWARDQRYLVIOGDDRMKLPSPNDKFFONLDEEDLEMDMAEYIV
 POAFNIPEPTYTSRARIKDSNRSEIGHSPAPVTPMSGNQVYVDGFFAEGQVSVYEPAPUSTI
 PEAPVAQGAETAFDDSCCGTLRKVPVPHVOEDSSQRYSDADPTVFAPERSPRGELDESGYMT
 PMRDKEQYINLFEVENFVSRKRGDQLALDNPEYHNASNGPFADEYVNEPFLYLTANTL
 GKAEYIKNNILSMPEKAKAFDNDYWNHSLPPRSTLQHPDYLOEYSTKYFYKQNGRIPTVAE
 NPEYLSSEFSIKPGTVLPPPPYRHNTVV

5

10

15

20

FIG. 2

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

ccaaatgatttcggggcaagacccttcggtcctgacacagctgtctggagcagtcagtggtcgaggaaa
ggagaaataacttgatctctctgagatggaacagcagtcagcagcgtctgcgaagctacttgaaaac
tgtgaggttgatcgtggcaacctggagataacacagatgagcaaacggcgacctctctctcggtg
ctgttcgaagatccacaggtacggtgtgtagtggtgctcttaateagtttcgttaactgcctcggaaatt
acgcattattctggacaaaaccttatgaggatcgatctggtgcgaatatttttaactacagaaaa
gagaaactttgggaactccagaacttggataaagaacttcagagaaacttaaatgtggagctctat
tagacagaaaactctttgtatgcagacacactatgcgaagattgtgcgaacccatgccc
ttccaactgactcttgtccaacaattggttagtcaggtgtggagctggcatgaagtcctactggc
cgtctcgtgggacacagaaaactatgccagatcttgacaagcgtgtgtgcagaacactgtgcy
ggagatgctcacacctcagctcagtgactgtgccatgcgaatgtgtggagctgtccagagactaa
ggacacagactgcttgctcgatgaattcaatgacgtggagcgtgtgtactcagtgctcccaaac
tttgtcaaatccaaaccttcctcggagcaaatccaatgcgaagtcacacatacggagactct
gtgcagaagatcccaactcttctgtgagatccagttctgtgtcgtgcgtgcctcagttccaa
gatggaagttagaaaaatgggatataaatgtgtaacctgcaatgacatttgcaccaaggttgtgat
ggagcatggcacaggtcattgatctcagctcagctggagctcagttccagtaacattgacaactataaact
gtaccaagatcaatgggaatttgaattcttagtcagtgattatcgtgggacacctacaatgcaattga
agcctaagaccagagaactgaaocdttttcggacagctcagagagataacaggtttcttgacatacag
tcaatggccaccaactgactcagttcagttttttaaactgtgacatttgggaagagtaactct
atatgtgcgtctcctgttatactcaagcaacagggtcacctctctacagttccagttccctgaaga
aaatcggcaggaacatctatatctgacagacagacctgtttatatcatcacttaactggaca
acaccttcagacaactcaacagagatagtaaatccgggacaaacagaagactgaaaattgtactgtg
aaagaaatgggtgtgcaaccaactctgtctccagtgatggctgtgtgggacctcgtggcagaccaatgtctgtc
tgtgtgcgctcttcagaggagag

FIG. 3A

25 gatctgcatagagtcttgttaacctctatgatggtggaatttogggagtttgagaaaggctccatctgtgtg
gagtgacccccagtgtagaagatggaagatggcctcctccacatgccatgacccgggtcctgacaaact
gtacaaagtctctctcattttaagatggcccaaaactgtgtggaataatgtccagatggcttacagggggc
aaacagttcattttcaagratgctgatccagatcggagtgccaccatgccatccaaactgcacccaa
gggttaacggtcccactagtcactgactgaattactaccatggacgggcacggtgacaaaactcaca
catgcccacggtcccagcacctgaactcctgggggacccgtcagttctctcttcccccaaaacccaa
ggacacctcatgatctccgggacccctgaggtcacatgctggtggtggaactgagccacgaagacccct
gaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgggagggagc
agtacaacagcacgtacccgggtggtcagcgtcctcacgtcctgcaccaggactggctgaatggaagga
gtacaagtcaaggtctccaaacaaagccctcccagcccccatcgagaaacccatctccaaagccaaagg
cagccccgagaacacaggtgtacacctgccccatccccgggaagagatgaccaagaaccaggtcagcc
tgacctgcctgggtcaaggcttctatcccagcacatcccggtgagtgaggagacaaaggcagccgga
gaacaaactggccccacccttggcttacaagacacacgctcccggtgctggactccgagcgtcctcttc
ctctacagcaagctcacccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtctctctcatgctccgtgatgc
40 atgaggctctgcacaacccactacacgcagaagagcctctcctgtctccgggtaaat

FIG. 3B

WO 02/18444

PCT/US01/26984

7/10

QSVCAETENKLSLSLEQQYRALRKYYENCEVVGNNLEITSIEHNRDLSFLASVREVTGYLV
ALNQFRYLPENRIIRGTYKLYEDRYALAIFTNVRKDGNGEGLQELGLNLTEILNGVYVDQNK
ELCYADITHQDIIVRNWPSNLTIIVTNGSSGCRCHKSGTGWGPTENHCOTLTRTVCAEOC
DGEPCYVSDCCCHREACGGSGEKKDDGACMAFNDSGACTQCPOFVYNETIFOLEHNFA
KTYTGAFVCVKCPHNEFVDSVRCVACPSRKNEVEENGINKCKPCTDLCFACADGIGTGSLSA
QVYDSSNIDKFTINCTKINGNLIFLVGTHGDEYNAIEADPEKUNFVTVREITGFELAQSWPP
NMTDFSVFSLVITIGGRVLYSGLSLILKQGTTSLOFQSLKEISAGNIYITDNLICYHTIN
WTLFTINQRIIVIRONRKAENCTAEGWVCHGSDGQWGPDPQCTISCRFSRGRICIESON
LYDGEFEFENGSLCYVEDPOCEKMRDGLTCHGGPDNCTKCSHEKDGPNVCVKCPDGLQGAN
SFIEXADPDRECHPCHNCYQCGNGPTSHDCIYYPWTG

5

10

15

20

FIG. 4

WO 02/18444

PCT/US01/26984

8/10

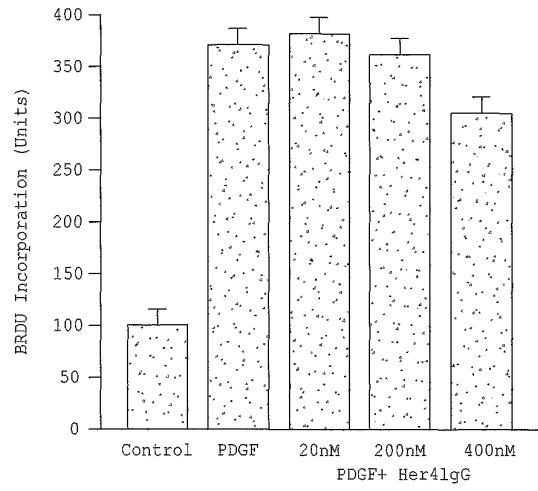


FIG. 5

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18444

PCT/US01/26984

9/10

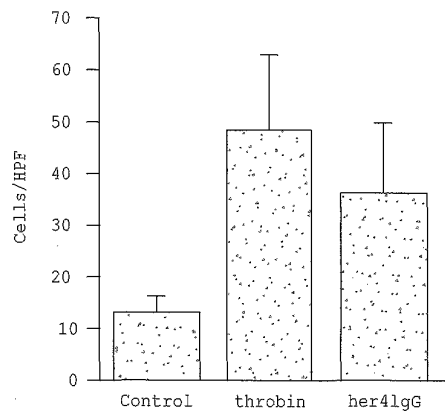


FIG. 6

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18444

PCT/US01/26984

10/10

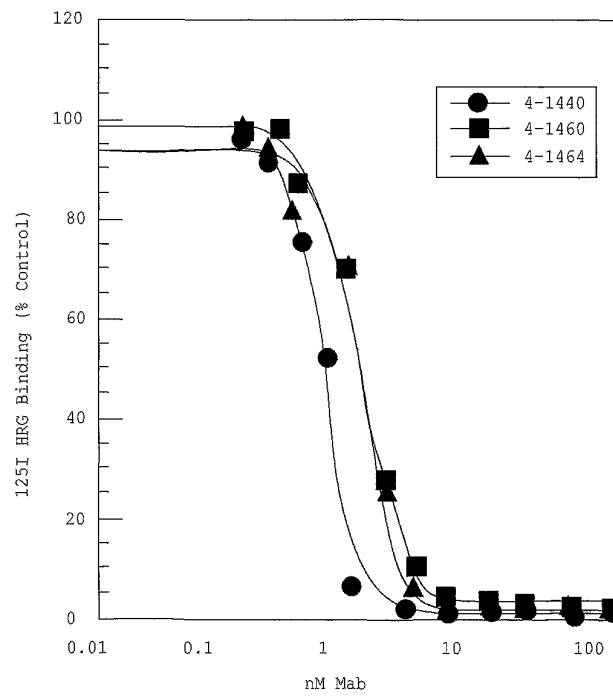


FIG. 7

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18444

PCT/US01/26984

SEQUENCE LISTING

<110> Genentech, Inc.
 Gerritsen, Mary
 Sliwkowski, Mark X.

<120> ErbB4 ANTAGONISTS

<130> GENENT.072VPC

<150> 60/229,679

<151> 2000-09-01

<150> 60/265,516

<151> 2001-01-31

<160> 4

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 5484

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1
 aattgtcagc acgggactctg agacttccaa aaaatgaagc cggcgacagg actttgggtc 60
 tgggtgagcc ttctcggtgc ggcggggacc gtccagccca gccattctca gtcagtgtgt 120
 gcagggaacgg agaataaact gagctctctc tctgacctgg aacagcagta ccgagccttg 180
 cgcgaagtact atgaaaactg tgaggtttgt atgggcaacc tggagataac cagcatttag 240
 cacaaccggg acctctcctt cctgcggtct gttagagaag tcaaggcta cgtgttagtg 300
 gctcttaact agtttctgta cctgcctctg gagaatttac gcattattcg tgggacaaaa 360
 ctttatgggg atcgatatgc cttggcaata tttttaact acagaaaaa tggaaacttt 420
 ggaactcaag aacttggaat aaagaacttg acagaatcc taatgggtg agtctatgta 480
 gaccagaaca aattcctttg ttatgcagac accattcatt ggcaagatat tgttcggaac 540
 caatggcctt ccaacttgac tctgtgtgca acaatggta gttcaggatg tggacgttgc 600
 cataagtcct gtaactggcg ttgctgggga cccacagaaa atcattgcca gactttgaca 660
 aggcaggtgt gtgcagaaca atgtgacggc agatgctac gacctacgt cagtgaactgc 720
 tgcactcgag aatgtgctgg aggtgtctca ggaactaagg acacagactg ctttgcctgc 780
 atgaatttca atgacatgg agcatgtgtt actcagtgtc cccaaacctt tgtctacaat 840
 ccaaccacct ttoactgga gcaaatctt aatgcaagt acacatagg agcattctgt 900
 gtcaagaaat gtccacataa ctttgtgta gattccagtt cttgtgtgcy tgcctgacct 960
 agttccaaaga tggagtaga agaaaatggg attaaatgt gtaaaccttg cactgaactt 1020
 tgcacaaag cttgtgatgg cattggcaca ggaatcattg tgcagctca gactgtggaat 1080
 tccagtaaca ttgacaaatt cataaactgt accaagatca atgggaattt gatctttcta 1140
 gtcactggtt ttcatgggga ccttaccat gcaattgaag ccatagacc agagaaactg 1200
 aactgtcttc ggacagtcag agagataaca ggtttctga acatagctc atggccacca 1260
 aacatgactg acttcagtgt ttttctaac ctggtgacca ttgtgggaag agtactctat 1320
 agtggcctgt ccttgcttat cctcaagcaa cagggcacat cctctctaca gttccagtcc 1380
 ctgaaggaaa tcagcgagg aaacatctat attactgaca acagcaacct ggtttattat 1440
 calaccatta actggacaac actcttcago acaatcaacc agagaatagt aatcggggac 1500
 aacagaaaag ctgaaaattg taactgtgaa ggaatgggtg gcaaccatct ggtgtccagt 1560
 gatggctgtt ggggacctgg gccagaccaa tgtctgtcgt gtgcgcgtt cagttagagg 1620
 aggatctgca tagagctctg taacctctat gatgtgaat ttoggggagt t'gagaatggc 1680
 tccatctgtg tggagtgtga cccocagtgt gagaagatgg aagatggcct cctcacatgc 1740
 catggaccgg gtccgtgaca cgtgacaaag tctctcatt ttaaaagtgg cccaaactgt 1800
 gtggaaaaat gtccagatgg cttacagggg gcaaacagtt caattttcaa gctatgctgt 1860
 ccagatggg agtgccaccc atgcatccca aactgcaccc aaggggtgaa cgttccact 1920
 agtcatgact gcatttacta cccatgggag ggccattcca cttaccaca acatgctaga 1980

WO 02/18444

PCT/US01/26984

```

actccctga ttgcagctgg agtaattggt gggctcttca ttctggctat tgtgggtctg 2040
acatttggctg tttatgttag aaggaagagc atcaaaaaga aaagagcctt gagaagattc 2100
ttggaacacag agttgggtgga accattaact cccagtgcca cagcacccaa tcaagctcaa 2160
cttctgatttt tgaagaagaa tgagctgaag agggtaaaag tcttggctc aggtgctttt 2220
ggaacgggttt ataaaggtat ttgggtacct gaaggagaaa ctgtgaagat tctgtggctt 2280
atgaagattc ttaatgagac aactggtccc aaggcaaatg tggagttcat ggaatgaagct 2340
ctgatcatgg caagtatgga tcatccacac ctagtccggt tgcctgggtgt ggtctcgagc 2400
ccaacctacc agctggttac tcaacttatg ccccatggct gctgtttgga gtatgtccac 2460
gagcaacaag ataacattgg atcaacaactg ctgttaactt ggtgtgtcca gatagctaa 2520
ggaatgatgt acctggaaga aagacgactc gttcatcggt atttggcagc cgttaatgtc 2580
ttagtgaaat ctccaaacca tgtgaaatc acagattttt ggttagccag actcttgaa 2640
ggagatgaaa aagagtacaa tgctgatgga ggaagatgc caattaaatg gatggtctg 2700
gagtgataac attacagaaa attcaacctc cagagtacg tttggagcta tggagtta 2760
atatgggaac tgatgacctt tggaggaaaa cctatgatg gaattccaac gcgagaaatc 2820
cctgatttat tagaagaagg agaactgttg cctcagcctc ccatctgcac tattgacgtt 2880
tacctggcca tggccaatg ttggatgatt gatgctgaca gtacacctaa atttaaggaa 2940
ctggctgctg agttttcaag gatggctcga gacctcaaa gatacctagt tattcaggtt 3000
gatgatcgta tgaagcttcc cagtccaaat tctttcagaa tctcttggat 3060
gaagagaggt tgaagatgat gatggatgct gaggagta 2990
atccacacct ccatctatcc tccagagaca agaattgact cgaataggag tgaattgga 3120
cagagccctc ctctcgacta ccccccatg tgaagaaacc agtttgtata cggagatgga 3180
gglttctgct ctgaacaagg agtgtctgtg cctacagag ccccaactag ccaattcca 3240
gaagctcctg tggcacaggg tgcactgtgt gagattttg atgactcctg ctgtaattgg 3300
acctacaga agccagtggt acccgtgtgt caagaggga gttagaccca gaggtaacgt 3360
gctgaccca cctgtgttgc cccagaacgg agccacagag gagagctgga tgaaggaggt 3420
tactgactc ctatgcgaga caaacccaaa caagaatcac tgaatccagt ggaggagaac 3480
cttttgttt ctccggagaaa aaatggagac cttcagcat tggataatcc cgaatatcac 3540
aatgcctcaa atggtccacc caaggccagat gatgagtat tgaatgagcc actgtacctc 3600
aacaccttgg ocaacacctt gggaaaagct gagtacctga agaacaacat actgtcaatg 3660
ccaagaagg ccaagaagcc gtttgaacac cctgactact ggaaccacag cctgccacct 3720
cggagccacc ttcagcaacc agactacctg caggagtaca goacaaaata tttttataaa 3780
cagaatggcc ggatccggcc tatttgtgca gagaatcctg aatacctctc tgaattctcc 3840
ctgaagccag gcaotgtgct gcccctcca ccttacagac accggaatac tgtgtgttaa 3900
gtcagttgtt ggttttttag gtggagagac acactgtctc caatttccc accccctct 3960
cttctctggt tggctcttct tctaccccaa ggcagtagt tttgacctt cccagtgga 4020
gatacagaga tgcaatgata gttatgtgct taactaactt gaacattaga ggaagagct 4080
gaaagagaaa gataggagga accacaatgt ttcttoattt ctctgcctgg gttgtcaagg 4140
agaatgaaa agctagagaa ggaacagaaa atgtaaggca atgtgcctca ctatcaaac 4200
agctgtcaact ttttttctt ttttttttct ttctttgtt ttcttctct ctctttttt 4260
tttttttttt taaagcagat ggttgaaca cccatgctat ctgttctat ctgcaggac 4320
tgatgtgtgc atatttagca tccctggaaa tcaataataa gtttccatta gaacaaaaga 4380
ataacatttt ctataacata tgatagtgtc tgaatttag aatccagitt ctctccocag 4440
cagtttctgt cctagcaagt aagaattggc aactcaactt tcaataatta aaaaatctca 4500
ttaaagtat aactagtaat tatgttttca acactttttg gtttttttca tttgttttg 4560
ctctgaccga tctcttata tttgtcccc tatttttggo ttttaattct aattgcaaa 4620
atgtttacat caaagcttct tccagaaatt taagcaagaa atattttaat atagtgaat 4680
ggcoactact ttaagtatac aatctttaa ataagaagg gaggtcaata tttttcatg 4740
tatcaaatat tottccacct catctttac atttttcaac atttttttt ctccataaat 4800
gacactactt gataggcgt tgggtgtctg aagagtagaa gggaaactaa gagaagttc 4860
tctgtggttc aggaaaacta ctgatacttt cagggttggc ccaatgagg aatccattg 4920
actggaagaa acacactgga ttgggtatgt ctacctggca gatactcaga aatgtagtt 5040
gcacttaagc tgtaatttta tttgtcttt ttctgaactc cattttgat tttgaatcaa 5100
gcaatatgga agcaaccagc aaattaaacta atttaagta attttataa aaagagctaa 5160
gataaagact gtggaaatgc caaaccaagc aaattaggaa ccttgcaacg gtatccagg 5220
actatgatga gggccagca cattatcttc atatgtcac ttgtctacg aaggaaat 5280
gttcagttcg tatacttctg aagaaggaa cggagtgaag attggtctga attccatgga 5340
atttctagta tgagactatt tatatgaagt agaaggtac tctttgaca taaattggta 5400
taataaaaag aaaaacacaa acattcaaa cttagggata ggtccttggg tcaaaagttg 5460
taataaatg tgaacatct tctc 5484

```

<210> 2

WO 02/18444

PCT/US01/26984

<211> 1308
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Lys Pro Ala Thr Gly Leu Trp Val Trp Val Ser Leu Leu Val Ala
 1 5 10 15
 Ala Gly Thr Val Gln Pro Ser Asp Ser Gln Ser Val Cys Ala Gly Thr
 20 25 30
 Glu Asn Lys Leu Ser Ser Leu Ser Asp Leu Glu Gln Gln Tyr Arg Ala
 35 40 45
 Leu Arg Lys Tyr Tyr Glu Asn Cys Glu Val Val Met Gly Asn Leu Glu
 50 55 60
 Ile Thr Ser Ile Glu His Asn Arg Asp Leu Ser Phe Leu Arg Ser Val
 65 70 75 80
 Arg Glu Val Thr Gly Tyr Val Leu Val Ala Leu Asn Gln Phe Arg Tyr
 85 90 95
 Leu Pro Leu Glu Asn Leu Arg Ile Ile Arg Gly Thr Lys Leu Tyr Glu
 100 105 110
 Asp Arg Tyr Ala Leu Ala Ile Phe Leu Asn Tyr Arg Lys Asp Gly Asn
 115 120 125
 Phe Gly Leu Gln Glu Leu Gly Leu Lys Asn Leu Thr Glu Ile Leu Asn
 130 135 140
 Gly Gly Val Tyr Val Asp Gln Asn Lys Phe Leu Cys Tyr Ala Asp Thr
 145 150 155 160
 Ile His Trp Gln Asp Ile Val Arg Asn Pro Trp Pro Ser Asn Leu Thr
 165 170 175
 Leu Val Ser Thr Asn Gly Ser Ser Gly Cys Gly Arg Cys His Lys Ser
 180 185 190
 Cys Thr Gly Arg Cys Trp Gly Pro Thr Glu Asn His Cys Gln Thr Leu
 195 200 205
 Thr Arg Thr Val Cys Ala Glu Gln Cys Asp Gly Arg Cys Tyr Gly Pro
 210 215 220
 Tyr Val Ser Asp Cys Cys His Arg Glu Cys Ala Gly Gly Cys Ser Gly
 225 230 235 240
 Pro Lys Asp Thr Asp Cys Phe Ala Cys Met Asn Phe Asn Asp Ser Gly
 245 250 255
 Ala Cys Val Thr Gln Cys Pro Gln Thr Phe Val Tyr Asn Pro Thr Thr
 260 265 270
 Phe Gln Leu Glu His Asn Phe Asn Ala Lys Tyr Thr Tyr Gly Ala Phe
 275 280 285
 Cys Val Lys Lys Cys Pro His Asn Phe Val Val Asp Ser Ser Cys
 290 295 300
 Val Arg Ala Cys Pro Ser Ser Lys Met Glu Val Glu Glu Asn Gly Ile
 305 310 315 320
 Lys Met Cys Lys Pro Cys Thr Asp Ile Cys Pro Lys Ala Cys Asp Gly
 325 330 335
 Ile Gly Thr Gly Ser Leu Met Ser Ala Gln Thr Val Asp Ser Ser Asn
 340 345 350
 Ile Asp Lys Phe Ile Asn Cys Thr Lys Ile Asn Gly Asn Leu Ile Phe
 355 360 365
 Leu Val Thr Gly Ile His Gly Asp Pro Tyr Asn Ala Ile Glu Ala Ile
 370 375 380
 Asp Pro Glu Lys Leu Asn Val Phe Arg Thr Val Arg Glu Ile Thr Gly
 385 390 395 400
 Phe Leu Asn Ile Gln Ser Trp Pro Pro Asn Met Thr Asp Phe Ser Val
 405 410 415
 Phe Ser Asn Leu Val Thr Ile Gly Gly Arg Val Leu Tyr Ser Gly Leu
 420 425 430
 Ser Leu Leu Ile Leu Lys Gln Gln Gly Ile Thr Ser Leu Gln Phe Gln
 435 440 445

WO 02/18444

PCT/US01/26984

```

Ser Leu Lys Glu Ile Ser Ala Gly Asn Ile Tyr Ile Thr Asp Asn Ser
450                               455                               460
Asn Leu Cys Tyr Tyr His Thr Ile Asn Trp Thr Thr Leu Phe Ser Thr
465                               470                               475                               480
Ile Asn Gln Arg Ile Val Ile Arg Asp Asn Arg Lys Ala Glu Asn Cys
485                               490                               495
Thr Ala Glu Gly Met Val Cys Asn His Leu Cys Ser Ser Asp Gly Cys
500                               505                               510
Trp Gly Pro Gly Pro Asp Gln Cys Leu Ser Cys Arg Arg Phe Ser Arg
515                               520                               525
Gly Arg Ile Cys Ile Glu Ser Cys Asn Leu Tyr Asp Gly Glu Phe Arg
530                               535                               540
Glu Phe Glu Asn Gly Ser Ile Cys Val Glu Cys Asp Pro Gln Cys Glu
545                               550                               555                               560
Lys Met Glu Asp Gly Leu Leu Thr Cys His Gly Pro Gly Pro Asp Asn
565                               570                               575
Cys Thr Lys Cys Ser His Phe Lys Asp Gly Pro Asn Cys Val Glu Lys
580                               585                               590
Cys Pro Asp Gly Leu Gln Gly Ala Asn Ser Phe Ile Phe Lys Tyr Ala
595                               600                               605
Asp Pro Asp Arg Glu Cys His Pro Cys His Pro Asn Cys Thr Gln Gly
610                               615                               620
Cys Asn Gly Pro Thr Ser His Asp Cys Ile Tyr Tyr Pro Trp Thr Gly
625                               630                               635                               640
His Ser Thr Leu Pro Gln His Ala Arg Thr Pro Leu Ile Ala Ala Gly
645                               650                               655
Val Ile Gly Gly Leu Phe Ile Leu Val Ile Val Gly Leu Thr Phe Ala
660                               665                               670
Val Tyr Val Arg Arg Lys Ser Ile Lys Lys Lys Arg Ala Leu Arg Arg
675                               680                               685
Phe Leu Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Thr Ala
690                               695                               700
Pro Asn Gln Ala Gln Leu Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu Lys Arg
705                               710                               715                               720
Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Ile
725                               730                               735
Trp Val Pro Glu Gly Glu Thr Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Ile
740                               745                               750
Leu Asn Glu Thr Thr Gly Pro Lys Ala Asn Val Glu Phe Met Asp Glu
755                               760                               765
Ala Leu Ile Met Ala Ser Met Asp His Pro His Leu Val Arg Leu Leu
770                               775                               780
Gly Val Cys Leu Ser Pro Thr Ile Gln Leu Val Thr Gln Leu Met Pro
785                               790                               795                               800
His Gly Cys Leu Leu Glu Tyr Val His Glu His Lys Asp Asn Ile Gly
805                               810                               815
Ser Gln Leu Leu Leu Asn Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Met
820                               825                               830
Tyr Leu Glu Glu Arg Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn
835                               840                               845
Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu
850                               855                               860
Ala Arg Leu Leu Glu Gly Asp Glu Lys Glu Tyr Asn Ala Asp Gly Gly
865                               870                               875                               880
Lys Met Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Cys Ile His Tyr Arg Lys
885                               890                               895
Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Ile Trp Glu
900                               905                               910
Leu Met Thr Phe Gly Gly Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Thr Arg Glu
915                               920                               925
Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile

```

WO 02/18444

PCT/US01/26984

```

      930      935      940
Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp
945      950      955      960
Ala Asp Ser Arg Pro Lys Phe Lys Glu Leu Ala Ala Glu Phe Ser Arg
      965      970      975
Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Asp Arg
      980      985      990
Met Lys Leu Pro Ser Pro Asn Asp Ser Lys Phe Phe Gln Asn Leu Leu
      995      1000      1005
Asp Glu Glu Asp Leu Glu Asp Met Met Asp Ala Glu Glu Tyr Leu Val
      1010      1015      1020
Pro Gln Ala Phe Asn Ile Pro Pro Ile Tyr Thr Ser Arg Ala Arg
      1025      1030      1035      1040
Ile Asp Ser Asn Arg Ser Glu Ile Gly His Ser Pro Pro Ala Tyr
      1045      1050      1055
Thr Pro Met Ser Gly Asn Gln Phe Val Tyr Arg Asp Gly Gly Phe Ala
      1060      1065      1070
Ala Glu Gln Gly Val Ser Val Pro Tyr Arg Ala Pro Thr Ser Thr Ile
      1075      1080      1085
Pro Glu Ala Pro Val Ala Gln Gly Ala Thr Ala Glu Ile Phe Asp Asp
      1090      1095      1100
Ser Cys Cys Asn Gly Thr Leu Arg Lys Pro Val Ala Pro His Val Gln
      1105      1110      1115      1120
Glu Asp Ser Ser Thr Gln Arg Tyr Ser Ala Asp Pro Thr Val Phe Ala
      1125      1130      1135
Pro Glu Arg Ser Pro Arg Gly Glu Leu Asp Glu Glu Gly Tyr Met Thr
      1140      1145      1150
Pro Met Arg Asp Lys Pro Lys Gln Glu Tyr Leu Asn Pro Val Glu Glu
      1155      1160      1165
Asn Pro Phe Val Ser Arg Arg Lys Asn Gly Asp Leu Gln Ala Leu Asp
      1170      1175      1180
Asn Pro Glu Tyr His Asn Ala Ser Asn Gly Pro Pro Lys Ala Glu Asp
      1185      1190      1195      1200
Glu Tyr Val Asn Glu Pro Leu Tyr Leu Asn Thr Phe Ala Asn Thr Leu
      1205      1210      1215
Gly Lys Ala Glu Tyr Leu Lys Asn Asn Ile Leu Ser Met Pro Glu Lys
      1220      1225      1230
Ala Lys Lys Ala Phe Asp Asn Pro Asp Tyr Trp Asn His Ser Leu Pro
      1235      1240      1245
Pro Arg Ser Thr Leu Gln His Pro Asp Tyr Leu Gln Glu Tyr Ser Thr
      1250      1255      1260
Lys Tyr Phe Tyr Lys Gln Asn Gly Arg Ile Arg Pro Ile Val Ala Glu
      1265      1270      1275      1280
Asn Pro Glu Tyr Leu Ser Glu Phe Ser Leu Lys Pro Gly Thr Val Leu
      1285      1290      1295
Pro Pro Pro Tyr Arg His Arg Asn Thr Val Val
      1300      1305

```

<210> 3
 <211> 2601
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

```

<400> 3
ccaatcgatt tcggcgcaaa gaccttcggy tctcggacca gctgctcgag cagtcagtgt 60
gtgcagggaac ggagaataaaa ctgagctctc tctctgacct ggaacagcag taccgagcct 120
tcgcgaagta ctatgaaaaac tctgaggttg toatgggcaa cctggagata accagatttg 180
agcaacaacg ggacctctcc ttcctgcggt ctgttcgaga agtcacaggc taccgtgttag 240
tggctcttaa tcagtttcgt tacctgcttc tggagaattt acgcatattt cgtgggacaa 300
aactttatga ggaatgatat gacttggcaa tatctttaaa ctacagaaaa gatggaaact 360

```

WO 02/18444

PCT/US01/26984

```

ttggacttca agaacttga ttaaagaact tgacagaaat cctaaatggt ggagtctatg 420
tagaccagaa caaatcctt tgttatgcag acaccattca ttggcaagat attgttcgga 480
accataagtc ttccaacttg actcttctgt caaccaatgg tagttcagga tgtggacgtt 540
gccataagtc ctgtactggc cgttctctgg gaccacaga aaatcattgc cagactttga 600
caaggacggt gtgtgcagaa caatgtgacg gcagatgcta cggaccttac gtcagtgcct 660
gctgccatcg agaattgtct ggaggctgct caggacctaa ggacacagac tgccttgcct 720
gcatagaatt caatgcagtg ggagcatgtg ttactcagtg tcccaaaccc tttgtctaca 780
atccaaccac ctttcaactg gagcacaatt tcaatgcaaa gtacacatat ggagcattct 840
gtgtcaagaa atgtccacat aactttgtgg tagattccag ttcttctgtg cgtgctgccc 900
atttcccaaa gatggagta gaagaaaatg ggattaaaat gtgtaaacct tgcactgaca 960
tttcccaaaa agcttctgat ggcattggca caggatcatt gatgtcagct cagactgtgg 1020
atttcccaaa cattgacaaa ttcataaact gtaccaagat caatgggaat ttgatctttc 1080
tagtcaactgg tattcattggg gaccttaca atgcaattga agccatagac ccagagaaaac 1140
tgaacgtctt ttggacagtc agagagataa caggtttctc gaacatacag tcatggccac 1200
caaacatgac tgaactcagt gtttttctca acctggtgac cactgttggg agagtactct 1260
atagtggcct gtccttctct atcctcaagc aacagggaat caactctcta cagtctcagt 1320
cctgaagga aatcagcgca ggaacatct atattactga caacagcaac ctgtgttatt 1380
atcataccat taactggaca acactcttca gcacaatcaa ccagagaaata gtaactccgg 1440
acaacagaaa agctgaaaaat tgtaoctgtg aaggaatggt gtgcaacat ctgtgttcca 1500
gtgatggctg ttggggacct ggccagagcc aatgtctgtc gtgtgcccgc ttcagttaga 1560
gaaggatctg catagagctct tgtaacctct atgatgggta atttcgggag ttgagaatg 1620
gtctcatctg tgtggaggtg gaccccaagt gtgagaagal ggaagatggc cctctcacat 1680
gcatgggacc gggtctgac aactgtacaa agtctctca tttaaaagat ggcccaact 1740
gtgtgaaaa atgtccagat ggcttacagg gggcaaacag tttaatttcc aagtatgtg 1800
atccagatcg ggaatgccc ccatgcacac caaactgcac caaagggtgt aacggtacca 1860
ctagtcatga ctgactttac taacctgaga cgggacgctg tgaacaaaat caacatgcc 1920
cacgctgccc agcaactgaa ctccgtgggg gacgtcagc ctctctctcc ccccaaaaac 1980
ccaagtcac cctcatgac tcccgagccc ctgagtgac atcggtggtg gtggacgtga 2040
gcacagacga cctcaggtgc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg 2100
ccaagcaaaa ccgcgaggag gagcagtaaa acagcacgta ccgggtggtc agcttctcca 2160
cgtctctgca ccaggaactg ctgaatggca aggagtaaaa gtgcaaggtc tccaacaaag 2220
ccctcccgcc ccccatcgag aaaaacctct ccaagccaaa agggcagccc cgagaaccac 2280
aggtgtacac cctgccccca tcccggaag agatgaccaa gaaccaggtc agcctgaact 2340
gcctgttcaa agctttctat cccagcgaca tcgocgtgga gtgggagagc aatgggcagc 2400
cggagaacaa ctggccccc cctctggctt acaagaccac gcctccgtg ctggactccg 2460
acgctcctct ctctctctac agcaagctca cgtgggcaaa gagcaggtgg cagcagggga 2520
agctctctct atgctcgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc 2580
ctctcctctc tccgggtaaa t 2601

```

<210> 4
 <211> 615
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Gln Ser Val Cys Ala Gly Thr Glu Asn Lys Leu Ser Ser Leu Ser Asp
 1 5 10 15
 Leu Glu Gln Gln Tyr Arg Ala Leu Arg Lys Tyr Tyr Glu Asn Cys Glu
 20 25 30
 Val Val Met Gly Asn Leu Glu Ile Thr Ser Ile Glu His Asn Arg Asp
 35 40 45
 Leu Ser Phe Leu Arg Ser Val Arg Glu Val Thr Gly Tyr Val Leu Val
 50 55 60
 Ala Leu Asn Gln Phe Arg Tyr Leu Pro Leu Glu Asn Leu Arg Ile Ile
 65 70 75 80
 Arg Gly Thr Lys Leu Tyr Glu Asp Arg Tyr Ala Leu Ala Ile Phe Leu
 85 90 95
 Asn Tyr Arg Lys Asp Gly Asn Phe Gly Leu Gln Glu Leu Gly Leu Lys
 100 105 110
 Asn Leu Thr Glu Ile Leu Asn Gly Gly Val Tyr Val Asp Gln Asn Lys
 115 120 125

WO 02/18444

PCT/US01/26984

Phe Leu Cys Tyr Ala Asp Thr Ile His Trp Gln Asp Ile Val Arg Asn
 130 135 140
 Pro Trp Pro Ser Asn Leu Thr Leu Val Ser Thr Asn Gly Ser Ser Gly
 145 150 155 160
 Cys Gly Arg Cys His Lys Ser Cys Thr Gly Arg Cys Trp Gly Pro Thr
 165 170 175
 Glu Asn His Cys Gln Thr Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Glu Gln Cys
 180 185 190
 Asp Gly Arg Cys Tyr Gly Pro Tyr Val Ser Asp Cys Cys His Arg Glu
 195 200 205
 Cys Ala Gly Gly Cys Ser Gly Pro Lys Asp Thr Asp Cys Phe Ala Cys
 210 215 220
 Met Asn Phe Asn Asp Ser Gly Ala Cys Val Thr Gln Cys Pro Gln Thr
 225 230 235 240
 Phe Val Tyr Asn Pro Thr Thr Phe Gln Leu Glu His Asn Phe Asn Ala
 245 250 255
 Lys Tyr Thr Tyr Gly Ala Phe Cys Val Lys Lys Cys Pro His Asn Phe
 260 265 270
 Val Val Asp Ser Ser Ser Cys Val Arg Ala Cys Pro Ser Ser Lys Met
 275 280 285
 Glu Val Glu Glu Asn Gly Ile Lys Met Cys Lys Pro Cys Thr Asp Ile
 290 295 300
 Cys Pro Lys Ala Cys Asp Gly Ile Gly Thr Gly Ser Leu Met Ser Ala
 305 310 315 320
 Gln Thr Val Asp Ser Ser Asn Ile Asp Lys Phe Ile Asn Cys Thr Lys
 325 330 335
 Ile Asn Gly Asn Leu Ile Phe Leu Val Thr Gly Ile His Gly Asp Pro
 340 345 350
 Tyr Asn Ala Ile Glu Ala Ile Asp Pro Glu Lys Leu Asn Val Phe Arg
 355 360 365
 Thr Val Arg Glu Ile Thr Gly Phe Leu Asn Ile Gln Ser Trp Pro Pro
 370 375 380
 Asn Met Thr Asp Phe Ser Val Phe Ser Asn Leu Val Thr Ile Gly Gly
 385 390 395 400
 Arg Val Leu Tyr Ser Gly Leu Ser Leu Leu Ile Leu Lys Gln Gln Gly
 405 410 415
 Ile Thr Ser Leu Gln Phe Gln Ser Leu Lys Glu Ile Ser Ala Gly Asn
 420 425 430
 Ile Tyr Ile Thr Asp Asn Ser Asn Leu Cys Tyr Tyr His Thr Ile Asn
 435 440 445
 Trp Thr Thr Leu Phe Ser Thr Ile Asn Gln Arg Ile Val Ile Arg Asp
 450 455 460
 Asn Arg Lys Ala Glu Asn Cys Thr Ala Glu Gly Met Val Cys Asn His
 465 470 475 480
 Leu Cys Ser Ser Asp Gly Cys Trp Gly Pro Gly Pro Asp Gln Cys Leu
 485 490 495
 Ser Cys Arg Arg Phe Ser Arg Gly Arg Ile Cys Ile Glu Ser Cys Asn
 500 505 510
 Leu Tyr Asp Gly Glu Phe Arg Glu Phe Glu Asn Gly Ser Ile Cys Val
 515 520 525
 Glu Cys Asp Pro Gln Cys Glu Lys Met Glu Asp Gly Leu Leu Thr Cys
 530 535 540
 His Gly Pro Gly Pro Asp Asn Cys Thr Lys Cys Ser His Phe Lys Asp
 545 550 555 560
 Gly Pro Asn Cys Val Glu Lys Cys Pro Asp Gly Leu Gln Gly Ala Asn
 565 570 575
 Ser Phe Ile Phe Lys Tyr Ala Asp Pro Asp Arg Glu Cys His Pro Cys
 580 585 590
 His Pro Asn Cys Thr Gln Gly Cys Asn Gly Pro Thr Ser His Asp Cys
 595 600 605
 Ile Tyr Tyr Pro Trp Thr Gly

WO 02/18444

PCT/US01/26984

610

615

1

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
7 March 2002 (07.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/018444 A3(51) International Patent Classification: A61P 21/00,
A61K 38/17, 39/395, 48/00, G01N 33/53, C07K 16/28Mary, E. [US/US]; 541 Parrott Drive, San Mateo, CA
94402 (US). **SLIWKOWSKI, Mark, X.** [US/US]; 42 Oak
Creek Lane, San Carlos, CA 94070 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/20984

(22) International Filing Date: 29 August 2001 (29.08.2001)

(74) Agent: **ALTMAN, Daniel, E.**; Knobbe, Martens, Olson &
Bear, LLP, 16th Floor, 620 Newport Center Drive, Newport
Beach, CA 92660 (US).

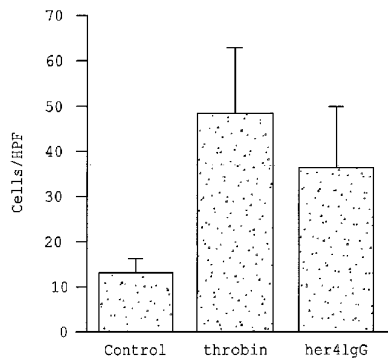
(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/229,679 1 September 2000 (01.09.2000) US
60/265,516 31 January 2001 (31.01.2001) US
09/040,101 27 August 2001 (27.08.2001) US(81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ (utility model), CZ, DE (utility model), DE, DK (utility
model), DK, DM, DZ, EC, EE (utility model), EE, ES, FI
(utility model), FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,
PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model),
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.(71) Applicant (for all designated States except US): **GENEN-
TECH, INC.** [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco,
CA 94080 (US).(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European

[Continued on next page]

(54) Title: URB4 ANTAGONISTS



(57) Abstract: The present invention concerns methods and means for controlling excessive proliferation and/or migration of smooth muscle cells, and in particular for treating stenosis, by using antagonists of a native URB4 receptor. The invention further concerns a method for the identification of URB4 agonists and antagonists capable of inhibiting or enhancing the proliferation or migration of smooth muscle cells.

WO 02/018444 A3

WO 02/018444 A3



patent (AF, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(88) Date of publication of the international search report:
31 July 2003

Published:

with international search report
with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/26984
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61P21/00 A61K38/17 A61K39/395 A61K48/00 G01N33/53 C07K16/28		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ, EPO-Internal, SEQUENCE SEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 31048 A (WARNER-LAMBERT COMPANY) 2 June 2000 (2000-06-02) page 2, line 27 -page 3, line 13 claims 1,7,10	1-14, 28-31, 40-45, 57-62, 64,65
X	WO 96 15128 A (WARNER-LAMBERT COMPANY) 23 May 1996 (1996-05-23) page 13, line 26 -page 14, line 13 claims 54,58,62,64-69 -/-	1-14, 28-31, 40-45, 57-62, 64,65
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *B* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *C* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *G* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
12 June 2002		25/06/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5010 Patentplan 2 NL - 2500 LV The Hague Tel. (+31-70) 340-2040, Tlx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Nooij, F

Form PCT/ISA210 (second sheet) (July 1993)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/26984
C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	C. BIANCO ET AL.: "Cripto-1 indirectly stimulates the tyrosine phosphorylation of erb B-4 through a novel receptor." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 274, no. 13, 26 March 1999 (1999-03-26), pages 8624-8629, XP002201894 Baltimore, MD, USA abstract	66,69,71
X	X. CHEN ET AL.: "An immunological approach reveals biological differences between the two MDF/heregulin receptors, ErbB-3 and ErbB-4." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 13, 29 March 1996 (1996-03-29), pages 7620-7629, XP002201895 Baltimore, MD, USA page 7623, left-hand column, line 8 -right-hand column, line 12 page 7626, right-hand column, line 30 - line 39	66,69, 71,81-84

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 01/26984
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1. <input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 1-27 (all partially, as far as an in vivo method is concerned) and claims 28-58 (all completely) are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.	
2. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:	
3. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:		
see additional sheet		
1. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. <input checked="" type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. <input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. <input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest		
<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.		
<input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.		

International Application No. PCT/US 01 26984

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-59

Method for controlling excessive proliferation or migration of smooth muscle cells by using an antagonist of a native ErbB4 receptor. Method for treating stenosis and hypertension by using a native ErbB4 antagonist. Pharmaceutical composition for treatment of stenosis comprising a native ErbB4 antagonist.

2. Claims: 60-65

Method for identifying a molecule that inhibits or enhances the proliferation or migration of smooth muscle cells, making use of a native ErbB4 receptor.

3. Claims: 66-84

Antibodies against ErbB4.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
 PCT/US 01/26984

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0031048	A	02-06-2000	AU 6261299 A
			13-06-2000
			BG 105608 A
			31-01-2002
			BR 9915487 A
			31-07-2001
			CN 1330642 T
			09-01-2002
			CZ 20011759 A3
			16-01-2002
WO 9615128	A	23-05-1996	EP 1131304 A1
			12-09-2001
			NO 20012465 A
			13-07-2001
			WO 0031048 A1
			02-06-2000
			US 6344455 B1
			05-02-2002
			US 5733913 A
			31-03-1998
WO 9615128	A	23-05-1996	AT 190978 T
			15-04-2000
			AU 711426 B2
			14-10-1999
			AU 4107896 A
			06-06-1996
			BG 63162 B1
			31-05-2001
			BG 101326 A
			30-04-1998
			CN 1169726 A ,B
			07-01-1998
			CZ 9701390 A3
			18-02-1998
			DE 69515898 D1
			27-04-2000
			DE 69515898 T2
			17-08-2000
			DK 790997 T3
			21-08-2000
			EP 0790997 A2
			27-08-1997
			ES 2146782 T3
			16-08-2000
			FI 971953 A
			12-05-1997
			GR 3033439 T3
			29-09-2000
			HU 76853 A2
			29-12-1997
			IL 115970 A
			20-06-1999
			JP 10509452 T
			14-09-1998
			MD 970187 A
			28-02-1999
			NO 972198 A
			13-05-1997
			NZ 296456 A
			29-09-1999
			PL 320169 A1
			15-09-1997
			PT 790997 T
			30-06-2000
			SI 790997 T1
			30-06-2000
			SK 60997 A3
			06-05-1998
			US 5952342 A
			14-09-1999
			WO 9615128 A2
			23-05-1996
			ZA 9509675 A
			29-05-1996
			CA 2199964 A1
			23-05-1996

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 9/12	A 6 1 P 9/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 13/10	A 6 1 P 9/12	
C 0 7 K 16/40	A 6 1 P 13/10	
G 0 1 N 33/15	C 0 7 K 16/40	Z N A
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/53	D
// C 1 2 N 15/02	G 0 1 N 33/53	M
C 1 2 P 21/08	G 0 1 N 33/566	
	A 6 1 K 37/02	
	C 1 2 N 15/00	C
	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 ゲリットセン, マリー イー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4 0 2, サン マテオ, パロット ドライブ 5 4 1

(72)発明者 スリウコウスキ, マーク エックス.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 7 0, サン カルロス, オーク クリーク レーン 4 2

F ターム(参考) 2G045 AA35 AA40 BA11 BB50 DA13 DA36 FB02 FB03
 4B024 AA01 AA11 BA10 BA44 GA01 HA15
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01
 4C084 AA02 AA07 AA13 AA17 BA35 MA66 NA14 ZA361 ZA421 ZA661
 ZA811 ZC611 ZC781
 4C085 AA13 AA14 AA16 AA33 BB11 CC05 DD22 DD23 DD33 DD35
 DD37 EE01 GG01
 4H045 AA10 AA11 BA10 BA41 CA40 DA76 DA86 EA20 EA50 FA72