



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113166218 B

(45) 授权公告日 2024.08.13

(21) 申请号 201980025049.3

(22) 申请日 2019.04.11

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113166218 A

(43) 申请公布日 2021.07.23

(30) 优先权数据
62/656246 2018.04.11 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.10.10

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/026889 2019.04.11

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/200033 EN 2019.10.17

(73) 专利权人 信立泰生物医药公司
地址 美国马里兰州
专利权人 信立泰(成都)生物技术有限公司

(72) 发明人 约翰·李 李生伟 罗弟祥
邬怡然 周明 庄晓蕾 华亮
雒蓬轶 王杨

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001
专利代理师 初明明 彭昶

(51) Int.Cl.
C07K 14/475 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 101491670 A, 2009.07.29
CN 105561298 A, 2016.05.11
审查员 张华

权利要求书2页 说明书39页
序列表13页 附图12页

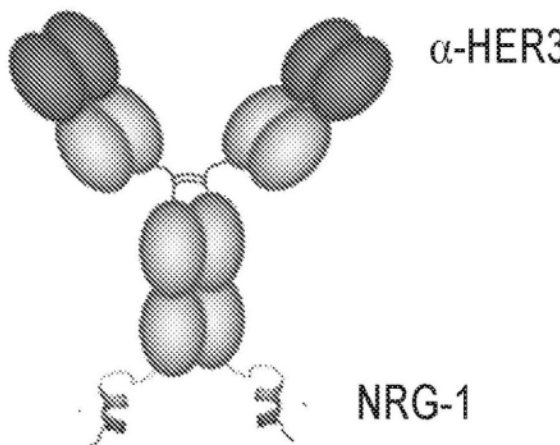
(54) 发明名称

人神经调节蛋白-1 (NRG-1) 重组融合蛋白组合物和其使用方法

(57) 摘要

本发明涉及一种重组融合蛋白,所述重组融合蛋白包括心脏保护蛋白神经调节蛋白-1 (NRG-1) 片段,所述片段与单克隆抗体 (mAb) 主链融合,并且本发明涉及治疗有需要的受试者的疾病或病状的方法,所述方法包括施用治疗有效量的本文公开的所述重组融合蛋白或包括所述重组融合蛋白的药物组合物。

抗HER3 mAb/NRG-1
融合蛋白的分子示意图



1. 一种重组融合蛋白,其包括心脏保护蛋白神经调节蛋白-1 (NRG-1) 的活性片段,所述片段与单特异性ErbB3 (HER3) 单克隆抗体 (mAb) 主链融合,其中所述NRG-1活性片段由SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成,并且所述mAb包括由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成的重链和由SEQ ID NO:3的氨基酸序列组成的轻链。

2. 根据权利要求1所述的重组融合蛋白,其中所述NRG-1活性片段与ErbB4 (HER4) 结合并通过所述ErbB4 (HER4) 诱导信号传导。

3. 根据权利要求2所述的重组融合蛋白,其中所述mAb通过ErbB3 (HER3) 抑制NRG-1信号传导。

4. 根据权利要求1所述的重组融合蛋白,其中所述NRG-1活性片段包括NRG-1 β 2a同种型。

5. 根据权利要求1所述的重组融合蛋白,其中所述NRG-1活性片段通过其N端氨基酸使用连接子与抗体重链的C端融合。

6. 根据权利要求5所述的重组融合蛋白,其中所述连接子包括SEQ ID NO:5所示的Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser连接子的至少一个拷贝。

7. 根据权利要求6所述的重组融合蛋白,其中所述抗体重链的所述C端包括所述抗体的Fc结构域。

8. 根据权利要求1所述的重组融合蛋白,其中所述单克隆抗体是经过糖基化的。

9. 根据权利要求8所述的重组融合蛋白,其中糖基化是N-糖基化或O-糖基化。

10. 根据权利要求3所述的重组融合蛋白,其中所述重组融合蛋白由SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:14的氨基酸序列组成。

11. 根据权利要求1所述的重组融合蛋白,其中相对于重组NRG-1,所述重组融合蛋白减弱了肿瘤或癌细胞的增殖。

12. 根据权利要求1所述的重组融合蛋白,其中所述重组融合蛋白促进心肌细胞增殖、分化和存活。

13. 根据权利要求1所述的重组融合蛋白,其中所述重组融合蛋白促进心脏组织的增殖、分化和存活。

14. 根据权利要求1所述的重组融合蛋白,其中所述重组融合蛋白诱导抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 的能力降低。

15. 根据权利要求1所述的重组融合蛋白,其中相对于重组NRG-1的信号诱导潜力,所述重组融合蛋白优先于HER2/3信号传导促进HER2/4信号传导。

16. 一种重组核酸分子,其对根据权利要求1到15中任一项所述的重组融合蛋白进行编码。

17. 一种重组载体,其包括根据权利要求16所述的核酸分子。

18. 一种重组细胞,其包括根据权利要求17所述的重组载体。

19. 一种药物组合物,其包括根据权利要求1到15中任一项所述的重组融合蛋白。

20. 根据权利要求1到15中任一项所述的重组融合蛋白在制备用于治疗、预防、抑制、阻止有需要的受试者的心血管疾病或延迟其发作的药物中的用途,其中所述心血管疾病是收缩性心力衰竭。

21. 根据权利要求20所述的用途,其中所述治疗减轻所述受试者的所述心血管疾病的

体征或症状。

22. 一种试剂盒,其包括有效量的根据权利要求1到15中任一项所述的重组融合蛋白。

23. 一种试剂盒,其包括有效量的根据权利要求19所述的药物组合物。

24. 根据权利要求19所述的药物组合物在制备用于治疗、预防、抑制、阻止有需要的受试者的心血管疾病或延迟其发作的药物中的用途,其中所述心血管疾病是收缩性心力衰竭。

25. 根据权利要求24所述的用途,其中所述治疗减轻所述受试者的所述心血管疾病的体征或症状。

人神经调节蛋白-1 (NRG-1) 重组融合蛋白组合物和其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2018年4月11日提交的美国临时申请第62/656,246号的优先权和权益,所述美国临时申请的内容通过全文引用的方式并入本文。

[0003] 通过引用并入序列表

[0004] 本申请含有经由EFS-Web以ASCII格式提交并特此通过引用以其整体并入的序列表。创建于2019年3月16日的所述ASCII副本命名为SBTI-001-001WO_SeqList.txt,并且大小为31,328字节。

背景技术

[0005] 神经调节蛋白 (NRG; 调蛋白, HRG), 也称为胶质细胞生长因子 (GGF) 和新分化因子 (NDF), 是一种分子量为44KD的糖蛋白。NRG蛋白家族具有四个成员: NRG-1、NRG-2、NRG-3以及NRG-4。NRG (包含NRG-1) 在心脏的发育中起着特别重要的作用。作为ErbB家族的酪氨酸激酶受体的配体, NRG-1直接与膜结合的ErbB3或ErbB4结合, 从而诱导二聚化以产生ErbB2/ErbB4、ErbB2/ErbB3、ErbB3/ErbB3和ErbB4/ErbB4复合物以及随后的细胞内信号传导。在动物模型中, NRG的表达诱导旁分泌信号传导以促进胚胎发生期间心脏组织的生长和分化, 其中ErbB2、ErbB4或NRG-1中任何一个的缺失会导致胚胎致死。进一步地, 已经表明阻断ErbB2受体信号传导的癌症疗法具有显著的心脏毒性副作用, 这证明人体内ErbB2介导的信号传导不仅对发育而且对健康心脏组织的体内平衡均至关重要。

[0006] 证据还表明, NRG-1信号转导在其它器官系统的发育和功能以及人类疾病 (包含精神分裂症和头颈癌) 的发病机理中起一定作用。NRG-1有许多异构体。对基因突变小鼠 (基因敲除小鼠) 的研究指示, 具有不同N端区域或EGF样结构域的异构体具有不同的体内功能。本发明基于NRG-1 β a2同种型。

[0007] 内源性NRG-1与ErbB3 (HER3) 和ErbB4 (HER4) 两者结合并通过所述两者诱导信号传导。许多临床前和临床研究已表明, NRG-1主要通过其与心肌细胞表达的ErbB4 (HER4) 的相互作用而在多种心血管适应症中具有治疗潜力。然而, 三个关键因素限制了重组人NRG-1 (rhNRG-1) 的临床应用和效用。首先, NRG-1通过HER3的信号传导可能会促进癌症的发展和/或进展, 这引起了对任何需要长期施用或没有严重心血管 (CV) 风险因素的应用的明显担忧。第二, NRG-1对HER3的过度激活可能会破坏胃肠 (GI) 上皮完整性和体内平衡, 从而导致严重的GI毒性, 并且因此导致NRG-1的治疗窗的丧失。第三, rhNRG-1的两个临床阶段活性蛋白片段均显示出较短的半衰期, 这指示可能需要繁重的给药和施用方案来达到期望的治疗暴露水平。因此, 需要提供一种基于NRG-1的治疗剂, 所述基于NRG-1的治疗剂保留了对各种心血管适应症的临床上显著的治疗潜力, 但肿瘤发生或促进癌症进展的风险更低, GI耐受性更好并且药代动力学 (PK) 分布更有利。

[0008] 本发明通过提供一种重组蛋白来满足这些需求, 所述重组蛋白包括rhNRG-1活性结构域与HER3特异性拮抗剂抗体的融合物: HER3信号传导以减轻rhNRG-1的致癌风险和GI

毒性的方式被阻断,同时抗体主链形式赋予典型单克隆抗体的分子半衰期,从而使产品的给药和施用能够更加方便。

发明内容

[0009] 在一方面,本发明涉及一种重组融合蛋白,所述重组融合蛋白包括心脏保护蛋白神经调节蛋白-1 (NRG-1) 的片段,所述片段与单克隆抗体 (mAb) 主链融合。在相关方面, NRG-1 片段通过连接子与抗体重链的C端融合。在另一个相关方面, NRG-1 通过NRG-1的N端上的第一(第1)氨基酸连接到所述连接子,在一个实施例中,所述第一氨基酸为丝氨酸(S或Ser) 氨基酸。在相关方面,片段是包括NRG-1的活性结构域的活性片段。在另一个相关方面, mAb对 ErbB3 (HER3) 具有单特异性。在另一个相关方面, NRG-1是NRG-1 β 2a同种型。

[0010] 在另一个方面,本发明涉及一种药物组合物,所述药物组合物包括重组融合蛋白和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂,所述重组融合蛋白包括心脏保护蛋白神经调节蛋白-1 (NRG-1) 的片段,所述片段与抗HER3单克隆抗体主链融合。

[0011] 在另一个方面,本发明涉及治疗有需要的受试者的疾病或病状的方法,所述方法包括施用治疗有效量的重组融合蛋白或本文公开的包括所述重组融合蛋白的药物组合物。

[0012] 在另一个方面,本发明涉及一种预防、抑制、阻止或延迟受试者的心血管疾病或病状的发作的方法,所述方法包括施用有效量的本文公开的重组融合蛋白。

[0013] 在另一个方面,本发明涉及一种治疗有需要的受试者的CNS相关疾病或病状的方法,所述方法包括施用治疗有效量的重组融合蛋白。

[0014] 在另一个方面,本发明涉及一种预防、抑制、阻止或延迟受试者的CNS相关疾病或病状的发作的方法,所述方法包括施用有效量的重组融合蛋白。

[0015] 在另一个相关方面, NRG-1与ErbB4 (HER4) 结合并通过ErbB4 (HER4) 诱导信号传导。在另一个相关方面, mAb通过ErbB3 (HER3) 抑制NRG-1信号传导。

[0016] 在另一个方面,本发明涉及一种试剂盒,所述试剂盒包括有效量的本发明的重组融合蛋白或包括本发明的重组融合蛋白的药物组合物。

[0017] 根据以下详细实例和附图,本发明的其他特征和优点将是显而易见的。然而,应当理解尽管详细描述和具体实例表示本发明的实施例,然而它们仅以说明的方式给出,因为处于本发明的精神和范围内的不同变化和修改对于本领域技术人员从此详细说明将是显而易见的。

附图说明

[0018] 当结合附图时,通过参考以下具体实施方式和所附权利要求,本发明的各种目的和优点以及更完整的理解是显而易见的,并且更容易理解,其中:

[0019] 图1示出了用于表达本文公开的重组融合蛋白的表达质粒的构建。

[0020] 图2A-D展示了本文公开的重组融合蛋白的示意性结构。图2A展示了本公开的抗HER3 mAb/NRG-1融合蛋白的分子示意图。图2B示出了通过SDS-PAGE分析产生的代表性数据。图2C示出了通过对包括HER3/4结合结构域的NRG-1的61-氨基酸活性片段具有特异性的一级抗体(“NRG-1”,明尼苏达州明尼阿波里斯的R&D系统公司(R&D Systems, Minneapolis, MN))检测的蛋白质印迹结果。图2D示出了通过对IgG具有特异性的一级抗体检测的蛋白质

印迹结果。

[0021] 图3展示了结合分析,其示出了本文公开的重组融合蛋白结合到HER3蛋白(曲线1,步骤2)并且可以同时结合抗NRG-1抗体(曲线1,步骤3)。值得注意的是,Fc突变被引入本文公开的重组融合蛋白中,以敲除对HER3特异性抗体进行编码的亲本抗体序列的Fc效应子功能,这可以减轻对表达HER3受体的正常组织的不良细胞毒性。

[0022] 图4A-D示出代表性图示,其示出了用抗HER3 mAb/NRG-1融合蛋白或对照处理的不同癌细胞系的平均相对生长率 \pm SEM(n=3)。图4A示出了NCI-N87胃癌细胞系中的平均相对生长率。图4B示出了MCF-7乳腺癌细胞系中的平均相对生长率。图4C示出了RT-112膀胱癌细胞系中的平均相对生长速率。图4D示出了T47D乳腺癌细胞系中的平均相对生长率。与对照NRG-1肽和GP120 mAb/NRG-1融合蛋白相比,本文提供的重组融合蛋白在促进癌细胞增殖方面展现出明显较低的活性。

[0023] 图5A-B展示了,尽管癌细胞生长潜力降低,但本文提供的重组融合蛋白完全保留了在心肌细胞中诱导PI3K/AKT信号传导的能力,从而展现出与重组NRG-1和GP120mAb/NRG-1融合蛋白相当的活性。图5A示出了用本公开的重组融合蛋白和对照处理的人心肌细胞中磷酸-AKT(pAKT)与总AKT(tAKT)的相对比率对抗体浓度(以nM为单位)的绘图。图5B是用本公开的重组融合蛋白和对照处理的人心肌细胞中AKT磷酸化的蛋白质印迹法分析。

[0024] 图6A-C示出了在本文公开的重组融合蛋白和对照的存在下HER2/4和HER2/3二聚化的直接比较。图6A示出了用于检测配体诱导的二聚化的测定原理。由Eurofins DiscoverX(加利福尼亚州菲蒙市(Fremont,CA))开发的PathHunter二聚化测定用于检测对受体-二聚体对的两个亚单位进行的配体诱导的二聚化。 β -gal酶分裂成两个片段:ProLink(PK)和酶受体(EA)。细胞已经被工程设计,以共表达与酶供体PK融合的靶蛋白1和与酶受体EA融合的靶蛋白2。配体与一种靶蛋白的结合诱导配体与另一种靶蛋白相互作用,从而迫使两种酶片段互补并且使酶反应释放化学发光信号,所述化学发光信号以相对荧光单位或RFU形式得到检测。图6B是展示了本文提供的重组融合蛋白可以以与NRG-1相当的效力诱导HER2/HER4二聚化的绘图。图6C是展示本文提供的重组融合蛋白在诱导HER2/HER3二聚化方面的效力明显低于NRG-1的绘图。这些发现进一步证实了本文提供的重组融合蛋白保留了NRG-1的全部HER2/4信号传导潜力,同时显著降低了HER2/3信号传导诱导。

[0025] 图7展示了本发明的抗HER3 mAb/NRG-1融合蛋白对不同物种(包含人、猴、大鼠和小鼠)的HER3抗原的结合亲和力。通过BIAcore分析确定的平衡解离速率(KD)分别为 3.13×10^{-10} (人)、 3.97×10^{-10} (猴)、 2.68×10^{-9} (大鼠)和 2.77×10^{-9} (小鼠)。这些数据表明,本发明的重组融合蛋白对人和猴HER3具有相似的结合亲和力,而其对啮齿动物(大鼠和小鼠)HER3的亲和力低大约一个数量级。

[0026] 图8是展示了在由冠状动脉结扎诱导的收缩性心力衰竭的大鼠模型中重组融合蛋白对射血分数(EF)的影响的绘图。

[0027] 图9A-F是一系列6幅图像,其示出了在由冠状动脉结扎诱导的收缩性心力衰竭的大鼠模型中心肌结构的组织病理学变化。收集手术部位附近的心脏组织并将其固定在4%甲醛中,然后制备石蜡切片并用H&E染色。图9A示出了来自假手术对照大鼠的心脏组织。图9B示出了来自用媒剂对照处理的收缩性心力衰竭模型大鼠的心脏组织。图9C示出了来自用GP120 mAb/NRG-1(10mg/kg)处理的收缩性心力衰竭模型大鼠的心脏组织。图9D示出了来自

用抗HER3 mAb/NGR-1(1mg/kg)处理的收缩性心力衰竭模型大鼠的心脏组织。图9E示出了来自用抗HER3 mAb/NGR-1(3mg/kg)处理的收缩性心力衰竭模型大鼠的心脏组织。图9F示出了来自用抗HER3 mAb/NGR-1(10mg/kg)处理的收缩性心力衰竭模型大鼠的心脏组织。

[0028] 图10是展示了在NOD/SCID小鼠中使用皮下FaDu癌异种移植模型评价体内抗肿瘤活性的图示。

[0029] 图11是展示了用本公开的重组融合蛋白和对照处理的荷瘤小鼠的体重变化的图示。

[0030] 图12是展示了在食蟹猴(猕猴)中重组融合蛋白的药代动力学分布的图示。

具体实施方式

[0031] 本发明将包括单克隆抗体与神经调节蛋白-1蛋白同种型的活性片段融合的融合物的重组融合蛋白用于多种心血管和中枢神经系统(CNS)适应症。

[0032] 定义

[0033] 除非另外定义,否则本文使用的技术术语和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。

[0034] 出于解释本说明书的目的,以下定义将适用并且每当适当时,以单数形式使用的术语还将包含复数形式,并且反之亦然。如果以下阐述的任何定义与通过引用并入本文的任何文件相冲突,则以以下阐述的定义为准。

[0035] “神经调节蛋白或神经调节蛋白类似物”是可以激活ErbB2/ErbB4或ErbB2/ErbB3异二聚体蛋白酪氨酸激酶的分子,如所有神经调节蛋白同种型、单独的神经调节蛋白EGF结构域、神经调节蛋白突变体以及任何种类的还激活上述受体的神经调节蛋白样基因产物。用于本发明的优选的“神经调节蛋白”是含有EGF样结构域和受体结合结构域的人神经调节蛋白1 β 2同种型的多肽片段。在一个实施例中,神经调节蛋白片段是活性片段。神经调节蛋白-1(NGR-1)及其同种型在本领域中还称为神经调节蛋白1(NGR1)、胶质细胞生长因子(GGF)、调蛋白(HGL)、HRG、新分化因子(NDF)、ARIA、GGF2、HRG1、HRGA、SMDF、MST131、MSTP131和NGR1内含子转录物2(NGR1-IT2)。

[0036] 术语“ErbB3”、“ErbB3(HER3)”、“HER3”是指相同的蛋白质(或当提及时为相同的基因),并且在本文中可互换地使用。在一些实施例中,重组融合物包括对ErbB3具有特异性的单克隆抗体部分。ErbB3(erb-b2受体酪氨酸激酶3)在本领域中还称为FERLK、LCCS2、ErbB-3、c-erbB3、erbB3-S、MDA-BF-1、c-erbB-3、p180-ErbB3、p45-sErbB3和p85-sErbB3。

[0037] 在一个实施例中,术语“ErbB4”、“ErbB4(HER4)”、“HER4”是指相同的蛋白质(或当提及时为相同的基因),并且在本文中可互换地使用。ErbB4(erb-b2受体酪氨酸激酶4)在本领域中还称为ALS19和p180erbB4。

[0038] 在一个实施例中,术语“ErbB2”、“ErbB2(HER2)”、“HER2”是指相同的蛋白质(或当提及时为相同的基因),并且在本文中可互换地使用。ErbB2(erb-b2受体酪氨酸激酶2)在本领域中还称为NEU、NGL、TKR1、CD340、HER-2、MLN 19和HER-2/neu。

[0039] 如本文所用,术语“活性的”是指具有生物学活性或生物学功能的片段。在一些实施例中,活性等于或接近野生型蛋白的活性。

[0040] 本文所用的术语“受试者”包含但不限于:哺乳动物,包含例如人、非人灵长类动物

(例如,猴)、小鼠、猪、牛、山羊、兔、大鼠、豚鼠、仓鼠、马、猴、绵羊或其它非人类哺乳动物;非哺乳动物,包含例如非哺乳类脊椎动物,如鸟(例如,鸡或鸭)或鱼;以及非哺乳类无脊椎动物。在一些实施例中,本发明的方法和组合物用于(预防性地和/或治疗性地)治疗非人类动物。术语“受试者”还可以是指患者,即等待或接受医疗护理的个体。

[0041] 本文中的术语“药物组合物”意指适用于在包含动物或人的受试者中用于药物用途的组合物。药物组合物通常包括有效量的活性剂(例如,本发明的重组融合蛋白)和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂(例如,缓冲剂、佐剂等)。

[0042] 术语“有效量”意指足以产生期望结果的剂量或量。期望的结果可以包括剂量或量的接受者的客观或主观的改善(例如,长期存活、肿瘤的数量和/或大小的减少、疾病状态的有效预防等)。

[0043] “预防性治疗”是施用于不显示疾病、病状或医学病症的体征或症状或仅显示疾病、病状或病症的早期体征或症状的受试者的治疗,使得为了减少、预防或降低患有疾病、病状或医学病症的风险而施用治疗。预防性治疗用作针对疾病或病症的预防性治疗。“预防性活性”是当施用于不显示病状、疾病或病症的体征或症状(或仅显示病状、疾病或病症的早期体征或症状)的受试者时减少、预防或降低受试者患有病状、疾病或病症的风险的如本发明的重组融合蛋白或其组合物等药剂的活性。“预防上有用的”药剂或化合物(例如,本发明的重组融合蛋白)是指可用于减少、预防、治疗或降低病状、疾病或病症的发展的药剂或化合物。

[0044] “治疗性处理”是向显示出病状、疾病或病症的症状或体征的受试者施用的治疗,其中向受试者施用治疗是为了减少或消除病状、疾病或病症的体征或症状。“治疗性活性”是当向患有此类体征或症状的受试者施用药剂时消除或减少病状、疾病或病症的体征或症状的本发明的重组融合蛋白或其组合物的药剂的活性。“治疗上有用的”药剂或化合物(例如,本发明的重组融合蛋白)指示药剂或化合物可用于减少、治疗或消除病状、疾病或病症的此类体征或症状。

[0045] 除非另有指示,否则本文所用的术语“治疗癌症”是指部分地或完全地逆转、缓解、抑制或预防受试者的肿瘤生长、肿瘤转移或其它致癌或赘生性细胞的进展。除非另有指示,否则本文所用的术语“治疗”是指治疗的行为。

[0046] 除非另有指示,否则本文所用的术语“治疗心血管疾病”是指部分地或完全地预防、抑制、阻止、延迟、逆转或缓解受试者的心血管疾病或病状的发作或受试者先前存在的心血管疾病或病状或其症状的进展。可以通过本公开的方法治疗的心血管疾病的非限制性实例包含慢性心力衰竭/充血性心力衰竭(CHF)、急性心力衰竭/心肌梗塞(MI)、左心室收缩功能障碍、与MI有关的再灌注损伤、化疗诱导的心脏毒性(成人或小儿)、放射诱导的心脏毒性、小儿先天性心脏病的外科手术干预的附加物。心血管疾病的症状的非限制性实例包含呼吸急促、咳嗽、体重迅速增加、腿、踝和腹部肿胀、头晕、疲劳、虚弱、头晕、胸痛、昏厥(晕厥)、心动过速和心动过缓。确定心血管疾病的进展和治疗效果的方法对于本领域普通技术人员将是显而易见的。例如,可以通过射血分数、心电图(ECG)、动态心电图监测、超声心动图、压力测试、心脏导管检查、心脏计算机断层摄影(CT)扫描和心脏磁共振成像(MRI)来确定各种心血管疾病的进展。

[0047] 除非另有指示,否则本文所用的术语“治疗中枢神经系统(CNS)相关疾病”是指部

分地或完全地预防、抑制、阻止、延迟、逆转或缓解受试者的CNS相关疾病或病状的发作的方法。术语“治疗CNS相关疾病”还可以意指逆转、减慢或以其它方式减轻先前存在的CNS相关疾病或病状或其症状。可以用本公开的方法治疗的CNS相关疾病或病状的示例性但非限制性实例包含肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS)、帕金森氏病、阿尔茨海默氏病、贝尔氏麻痹、癫痫和癫痫发作、格林-巴利综合征、中风、创伤性脑损伤、多发性硬化症或组合。治疗CNS相关疾病可以改善或预防如震颤、运动迟缓、僵硬的肌肉、丧失平衡、姿势受损、言语改变、丧失运动控制能力、瘫痪、吞咽困难、肌肉痉挛、癫痫发作、记忆力减退和混乱等症状。

[0048] 在两个或更多个核酸或多肽序列的上下文中,术语“相同的”或“同一性百分比”是指当针对最大对应性进行比较和比对时,相同的或具有指定百分比的相同的核苷酸或氨基酸残基的两个或更多个序列或子序列。为了确定同一性百分比,对序列进行比对以用于最佳比较的目的(例如,可以在第一个氨基酸序列或核酸序列中引入空位,以与第二个氨基酸或核酸序列进行最佳比对)。然后比较在相应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置被与在第二序列中的相应位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据时,则这些分子在那个位置是相同的。两个序列之间的同一性百分比是序列共有的相同位置的数量的函数(即,同一性% = 相同的位置的数量/位置(例如,重叠位置)的总数 × 100)。在一些实施例中,两个序列长度相同。

[0049] 在两种核酸或多肽的上下文中,术语“基本相同的”是指两种或更多种序列或子序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性(例如,如使用下文所示方法中的一种方法所确定的)。

[0050] 如本文所用,术语“结合”、“特异性地结合到”或“对...具有特异性”是指如在存在包含生物分子的分子的异质群体的情况下确定靶是否存在的靶与抗体之间的结合的可测量和可再现的相互作用。例如,与靶(其可以是表位)特异性结合的抗体是相比于其与其它靶结合,结合此靶时具有更大亲和力、活动性、更容易和/或持续时间更长的抗体。在一个实施例中,抗体与不相关的靶结合的程度小于例如通过放射免疫测定法(RIA)测量的抗体与靶结合的程度约10%。在某些实施例中,与靶特异性结合的抗体的解离常数(Kd)为<1μM、<100nM、<10nM、<1nM或<0.1nM。

[0051] 在某些实施例中,抗体与在来自不同物种的蛋白质中保守的蛋白质上的表位特异性结合。在另一个实施例中,特异性结合可以包含但不要求排它性结合。

[0052] 如本说明书中所用,除非上下文另外明确说明,否则单数形式“一个/一种(a/an)”和“所述”包含复数参考物。因此,例如,对“神经调节蛋白”或“神经调节蛋白肽”的提及包含此类神经调节蛋白、神经调节蛋白同种型和/或神经调节蛋白样多肽的混合物。对“调配物”或“方法”的提及包含本文所述的类型和/或在阅读本公开后对于本领域技术人员而言将变得显而易见的一种或多种调配物、方法和/或步骤。

[0053] 术语“多肽”是指氨基酸及其等同物的聚合物,而不是指产物的具体长度;因此,“肽”和“蛋白质”包含在多肽的定义内。多肽的定义内还包含本文定义的“抗体”。“多肽区”是指多肽的区段,所述区段可以含有例如一个或多个结构域或基序(例如,抗体的多肽区可以含有例如一个或多个互补决定区(CDR))。术语“片段”是指优选地具有多肽的至少20个连续的或至少50个连续的氨基酸的多肽的一部分。

[0054] 除非上下文另外指示,否则“衍生物”是相对于第二多肽(也称为“变体”)具有一个

或多个非保守或保守氨基酸取代的多肽或其片段；或通过共价连接第二分子，例如通过连接异源多肽，或通过糖基化、乙酰化、磷酸化等修饰的多肽或其片段。“衍生物”的定义进一步包含例如含有一种或多种氨基酸（例如，非天然氨基酸等）的类似物的多肽、具有未经取代的连接的多肽以及本领域已知的（天然的和非天然存在的）其它修饰。

[0055] “分离的”多肽是已经从其天然环境的组分中识别、分离和/或回收的多肽。其自然环境中的污染物组分是会干扰多肽诊断或治疗用途的材料，并且可以包含酶、激素和其它蛋白质或非蛋白质溶质。分离的多肽包含分离的抗体或其片段或衍生物。

[0056] 如本文所用，术语“约”意指在定量术语上为正或负5%，或在另一个实施例中为正或负10%，或在另一个实施例中为正或负15%，或在另一个实施例中为正或负20%。

[0057] 除非另外定义，否则本文使用的所有技术术语和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。尽管在本公开的实践或测试中可以使用类似于或等同于本文所述的方法和材料的任何方法和材料，但现在描述了优选的方法和材料。出于公开和描述参考文献与其结合而被引用的材料的目的是，本文提及的所有出版物通过引用并入本文。

[0058] 重组融合蛋白-抗体

[0059] 本发明将包括单克隆抗体与神经调节蛋白-1蛋白同种型的片段融合的融合物的重组融合蛋白用于多种心血管和神经系统适应症。在典型的实施例中，抗体对ERBB3 (HER3) 具有特异性。

[0060] 如本文所用，“抗体”是指包括一种或多种基本上或部分地由免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因的片段编码的多肽的蛋白质。公认的免疫球蛋白基因包含 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因，以及无数的免疫球蛋白可变区基因。轻链被分类为 κ 或 λ 。重链被分类为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ，这些进而分别定义了免疫球蛋白类别IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。典型的免疫球蛋白（例如抗体）结构单元包括四聚体。每个四聚体由相同的两对多肽链构成，每对具有一条“轻”链（约25kD）和一条“重”链（约50-70kD）。每条链的N端定义了主要负责抗原识别的具有约100个到110个或更多个氨基酸的可变区。术语可变轻链（VL）和可变重链（VH）分别是指这些轻链和重链。

[0061] 抗体以完整的免疫球蛋白形式存在，或以各种由肽酶的消化产生的许多充分表征的片段形式存在。因此，例如，胃蛋白酶消化铰链区中二硫键下的抗体从而产生Fab二聚体F(ab')₂，其本身是通过二硫键与VH-CH1连接的轻链。可以在温和条件下减少F(ab')₂以打破铰链区中的二硫键，从而将F(ab')₂二聚体转变为Fab'单体。Fab'单体本质上是具有铰链区一部分的Fab（关于其它抗体片段的更详细描述，参见《基础免疫学 (Fundamental Immunology)》，W.E. Paul编辑，纽约Raven出版社 (Raven Press, New York) (1999)）。尽管根据完整抗体的消化定义了各种抗体片段，但是本领域技术人员将理解，可以通过化学或利用重组DNA方法从头合成此类Fab'片段等。因此，如本文所使用的，术语抗体还包含通过修饰整个抗体产生的或通过重组DNA方法从头合成的抗体片段。抗体包含单链抗体，所述单链抗体包含单链Fv (sFv或scFv) 抗体，其中可变重链和可变轻链（直接或通过肽连接子）连接在一起形成连续多肽。抗体包含单结构域抗体，所述单结构域抗体包括由能够选择性地与抗原结构域结合的单个单体可变抗体结构域组成的抗体片段。示例性单结构域抗体包含最初从骆驼科动物中分离的VHH片段。

[0062] 融合蛋白的抗体结构域任选地包括免疫球蛋白分子的全部或部分,并且任选地含有免疫球蛋白可变区(即,疾病相关抗原的特异性区域)的全部或部分,并任选地包括由V基因和/或D基因和/或J基因编码的一个或多个区。

[0063] 如上文所述(参见上文的定义),取决于实施例的具体要求,本文使用的抗体任选地包括F(ab)₂、F(ab')₂、Fab、Fab'、scFv、单结构域抗体等。一些实施例利用包括IgG结构域的融合蛋白。然而,其它实施例包括如IgM、IgA、IgD和IgE等替代性免疫球蛋白。此外,各种免疫球蛋白的所有可能的同种型还涵盖在当前的实施例中。因此,IgG1、IgG2、IgG3等在本发明中使用的抗体-免疫刺激融合蛋白的抗体结构域中都是可能的分子。除了选择免疫球蛋白和同种型的类型外,本发明的不同实施例包括各种铰链区(或其功能等同物)。此类铰链区在抗体-免疫刺激融合蛋白的不同结构域之间提供柔性。参见例如,Penichet等人,2001“用于癌症疗法的抗体-细胞因子融合蛋白(Antibody-cytokine fusion proteins for the therapy of cancer)”《免疫学方法杂志(J Immunol Methods)》248:91-101。

[0064] 在一些实施例中,本发明的重组融合蛋白所包括的mAb对ErbB3(HER3)是特异性的。

[0065] 人HER3(ErbB-3、ERBB3、c-erbB-3、c-erbB3、受体酪氨酸蛋白激酶erbB-3)编码还包含HER1(也称为EGFR)、HER2和HER4的受体酪氨酸激酶的表皮生长因子受体(EGFR)家族的成员(Kraus, M.H.等人,《美国国家科学院院刊(PNAS)》86(1989)9193-9197; Plowman, G.D.等人,《美国国家科学院院刊》87(1990)4905-4909; Kraus, M.H.等人,《美国国家科学院院刊》90(1993)2900-2904)。如原型表皮生长因子受体一样,跨膜受体HER3由细胞外配体结合结构域(ECD)、ECD中的二聚化结构域、跨膜结构域、细胞内蛋白酪氨酸激酶结构域(TKD)和C端磷酸化结构域组成。此膜结合的HER3蛋白在细胞外结构域中具有调蛋白(HRG)结合结构域,但没有活性激酶结构域。因此,所述蛋白可以结合此配体,但不通过蛋白质磷酸化将信号传达到细胞中。然而,所述蛋白确实与其它具有激酶活性的HER家族成员形成异二聚体。异二聚化导致受体介导的信号传导途径的活化和其细胞内结构域的转磷酸化。HER家族成员之间的二聚体形成扩展了HER3的信号传导潜力,并且不仅是信号多样化的手段,而且还是信号放大的手段。例如,HER2/HER3异二聚体通过HER家族成员中的PI3K和AKT途径诱导最重要的促有丝分裂信号之一(Sliwkowski M.X.等人,《生物化学杂志(J.Biol.Chem.)》,269(1994)14661-14665; Alimandi M等人,《肿瘤基因(Oncogene)》10(1995)1813-1821; Hellyer, N.J.,《生物化学杂志(J.Biol.Chem.)》276(2001)42153-4261; Singer, E.,《生物学杂志(J.Biol.)》)。

[0066] 在一个实施例中,人ERBB3蛋白包括GenBank AAH02706.1中提供的并在SEQ ID NO:1中所示的以下氨基酸序列:

[0067] MRANDALQVLGLLFSLARGSEVGN SQAVCPGTLNGLSVTGDAENQYQTL YKLYERCEVVMGNLEIVLT GHNADLSFLQWIREVTGYVLVAMNEFSTLPLPNLRVVRGTQVYD GKF AIFVMLN YNTSSHALRQLRLTQLTEILS GGVYIEKNDKLCHMDTIDWRDIVRDRDAEIVVKDNGRSCPPCHEVCKGRCWGP GSEDCQTLTKTICAPQCNGHCFG PNPNQCHDECAGGCSGPQDTDCFACRHFND SGACVPRCPQLVYNKLT FQLEPNPHTKYQYGGVCVASC PHNFVV DQTSCVRACPPDKMEVDKNGLKMCEPCGGLCPKAF (SEQ ID NO:1)。应当理解,由本发明方法和组合物的抗体靶向的ERBB3(HER3)序列可以是SEQ ID NO:1的异构体、同系物或变体。

[0068] 在一个实施例中,本文提供的重组融合蛋白的mAb是通过ErbB3(HER3)抑制NRG-1

信号传导的抗Her3 mAb。

[0069] 在特定实施例中,本发明的重组融合蛋白所包括的mAb包括抗HER3 mAb。此类抗HER3抗体可以包含但不限于以下:帕曲妥单抗(patritumab)、seribantumab(完全人mAb)、LJM716、KTN3379、AV-203、REGN1400、GSK2849330或MM-141。此类抗体还可以选自以下形式,包含嵌合形式、双特异性形式、非人形式、完全人形式或人源化形式中的任何形式,只要所述形式与人ERBB3 (HER3) 结合并抑制来自人ERBB3 (HER3) 的信号传导。在一些实施例中,抗HER3抗体是人来源的。

[0070] 在一些实施例中,术语“抗体”涵盖包含但不限于完整抗体和抗体片段的抗体结构的各种形式。根据本发明的抗体优选地为人抗体、人源化抗体、嵌合抗体或另外的基因工程抗体,只要保留根据本发明的特性即可。“抗体片段”包括全长抗体的一部分,优选地其可变结构域或至少其抗原结合位点。抗体片段的实例包含由抗体片段形成的双抗体、单链抗体分子和多特异性抗体。scFv抗体在例如Huston, J.S., 《酶学方法 (Methods in Enzymol.)》203 (1991) 46-88中描述。另外,抗体片段包括单链多肽,所述单链多肽具有V_H结构域的特性,即能够与V_L结构域组装在一起,或者具有与能够与V_H结构域一起组装到功能性抗原结合位点的相应抗原结合的V_L结构域的特性,从而提供根据本发明的抗体的性质。如本文所用,术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指单一氨基酸组合物的抗体分子的制剂。

[0071] 在一些实施例中,嵌合抗体可以用于本文提供的组合物和方法。在一个实施例中,术语“嵌合抗体”是包括指来自小鼠的可变区,即结合区,和衍生自不同来源或物种的恒定区的至少一部分的单克隆抗体,所述单克隆抗体通常通过重组DNA技术制备。包括小鼠可变区和人恒定区的嵌合抗体是特别优选的。此类大鼠/人嵌合抗体是包括编码大鼠免疫球蛋白可变区的DNA区段和编码人免疫球蛋白恒定区的DNA区段的表达的免疫球蛋白基因的产物。本发明涵盖的其它形式的“嵌合抗体”是已经从原始抗体的类别或子类修饰或改变类别或子类的那些形式。此类“嵌合”抗体还称为“类别转换抗体”。用于产生嵌合抗体的方法涉及本领域中目前众所周知的常规重组DNA和基因转染技术。参见例如Morrison, S.L. 等人,《美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)》81 (1984) 6851-6855; US 5,202,238和US 5,204,244。

[0072] 在一个实施例中,人源化抗体可用于本文提供的组合物和方法中。在一些实施例中,术语“人源化抗体”或“抗体的人源化形式”是指其中框架或“互补决定区”(CDR) 已被修饰成包括与亲本免疫球蛋白相比具有不同特异性的免疫球蛋白的CDR的抗体。在其它实施例中,将V_H和V_L的CDR嫁接到人抗体的框架区中以制备“人源化抗体”。参见例如Riechmann, L. 等人,《自然 (Nature)》332 (1988) 323-327; 和Neuberger, M.S. 等人,《自然》314 (1985) 268-270。重链和轻链可变框架区可以衍生自相同或不同的人抗体序列。人抗体序列可以是天然存在的人抗体的序列。人重链和轻链可变框架区例如在Lefranc, M.-P., 《免疫学实验指南 (Current Protocols in Immunology)》(2000) -附录IP A.1P.1-A.1P.37中列出,并可通过IMGT (国际免疫遗传学信息系统® (international ImMunoGeneTics information system®)) (<http://imgt.cines.fr>) 或通过<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk> 访问。任选地,可以通过进一步的突变来修饰框架区。特别优选的CDR对应于表示识别上文用于嵌合抗体的抗原的序列的CDR。如本文所用,术语“人源化抗体”还包括在恒定区中修饰以产生根据本发明的性质的抗体,尤其是关于例如通过“类别转换”,即Fc部分的改变或突变(例如从

IgG1到IgG4和/或IgG1/IgG4突变),进行补体组分1q(C1q)结合和/或Fc受体(FcR)结合的抗体。如本文所用,术语“人抗体”旨在包含具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。人抗体在现有技术中是众所周知的(van Dijk,M.A.和van de Winkel,J.G.,《化学生物学时论(Curr.Opin.Chem.Biol.)》5(2001)368-374)。人抗体还可以在转基因动物(例如,小鼠)中产生,所述转基因动物在免疫时能够在不存在内源性免疫球蛋白的情况下产生人抗体的完整库或选择。人种系免疫球蛋白基因阵列在此类种系突变小鼠中的转移将导致在抗原激发时产生人抗体(参见例如Jakobovits,A.等人,《美国国家科学院院刊》90(1993)2551-2555;Jakobovits,A.等人,《自然》362(1993)255-258;Brueggemann,M.D.等人,《免疫学年度(Year in Immunol.)》7(1993)33-40)。人抗体还可以在噬菌体展示文库中产生(Hoogenboom,H.R.和Winter,G.,《分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)》227(1992)381-388;Marks,J.D.,等人,《分子生物学杂志》222(1991)581-597)。Cole,A.等人和Boerner,P.等人的技术还可用于制备人单克隆抗体(Cole,A.,等人,《单克隆抗体与癌症疗法(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy)》,Liss,A.L.,第77页(1985);和Boerner,P.等人,《免疫学杂志(J.Immunol.)》147(1991)86-95)。如已经针对根据本发明的人源化抗体所提及的,本文所用的术语“人抗体”还包括在恒定区中修饰以产生根据本发明的性质的此类抗体。

[0073] 在本发明的一个特定实施例中,本文提供的重组融合蛋白包括的mAb在Fc结构域或区中包括至少一个突变。

[0074] 如本文所用,术语“重组人抗体”旨在包含通过重组手段制备、表达、产生或分离的所有人抗体,如从宿主细胞,例如NS0或CHO细胞,或从用于人免疫球蛋白基因的转基因的动物(例如小鼠)中分离的抗体,或使用转染到宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体。此类重组人抗体具有重排形式的可变区和恒定区。已经使根据本发明的重组人抗体经受体体内细胞超突变。因此,重组抗体的VH和VL区的氨基酸序列是虽然衍生自人种系VH和VL序列并与之有关,但在体内人抗体种系库中可能天然不存在的序列。

[0075] 在一些实施例中,术语“与人HER3结合”、“与人HER3特异性结合”或“抗HER3抗体”是可互换的,并且是指指在25°C下以约 4.81×10^{-10} mol/L或更低的KD值与人HER3抗原特异性结合的抗体。用如表面等离子共振技术(BIAcore®,瑞典乌普萨拉市的通用电气医疗公司(GE-Healthcare Uppsala,Sweden))等标准结合测定法在25°C下测定结合亲和力。因此,本文所用的“与人HER3结合的抗体”是指指在25°C下以在 1.0×10^{-8} mol/L到 1.0×10^{-13} mol/L的KD范围内的结合亲和力,并且优选地在25°C下以 4.81×10^{-10} mol/L或更低的KD值与人HER3抗原特异性结合的抗体或其部分。

[0076] 在另一方面,本文公开的重组融合蛋白所包括的抗HER3抗体包括可变区重(VH)链和可变区轻(VL)链。在一个实施例中,抗体包括SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3中相应的VH序列和VL序列;并具有以下性质中的一种或多种性质:对肿瘤细胞中HER3磷酸化的抑制;对肿瘤细胞中AKT磷酸化的抑制;对通过ErbB3(HER3)进行信号传导的抑制;以及对肿瘤细胞的增殖的抑制。

[0077] 在一个实施例中,本文提供的抗HER3 mAb包括SEQ ID NO:2中所示的VH氨基酸序列:

[0078] 重链:

[0079] QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSF S GYYWSWIRQP PGKGLEWIGE
 INHSGSTNYN PSLKSRVTIS VETSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDKW
 TWYFDLWGRG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF
 PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGTQTYIC
 NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKTHTCPPCP APEFLGGPAV FLFPPKPKDT

[0080] LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSV MHE ALHAHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO:
 2)。

[0081] 在一个实施例中,本文提供的抗HER3 mAb包括SEQ ID NO:3的VL氨基酸序列:

[0082] 轻链:

DIEMTQSPDS LAVSLGERAT INCRSSQSVL YSSSNRNYLA WYQQNPGQPP
 KLLIYWASTR ESGVPDRFSG SGS GTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCQYYST

[0083] PRTFGQGTKV EIKRTVAAPS VFIFPPSDEQ LKSGTASVVC LLNMFYPREA
 KVQWKVDNAL QSGNSQESVT EQDSKDSTYS LSSTLTLSKA DYEKHKVYAC
 EVTHQGLSSP VTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 3)。

[0084] 在一个实施例中,本发明的抗HER3抗体在Fc区中包括至少一个突变。在另一个实施例中,本发明的成熟抗HER3抗体(即,缺乏信号肽)包括在氨基酸234、239、434或其组合中的至少一个突变,其中在其它实施例中,氨基酸突变包括以下取代突变中的至少一个取代突变:L234F、S239A、N434A或其组合。在另一个实施例中,氨基酸234和/或239的突变敲除了抗HER3抗体的效应子功能。在另一个实施例中,氨基酸434的突变延长了抗体在受试者中的半衰期。

[0085] 在一些实施例中,Fc区中的一个或多个突变降低了效应子功能。在一些实施例中,降低的效应子功能包括抗HER3抗体对一个或多个Fc受体的降低的亲和力。FcR可以是Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa (158F)、Fc γ RIIIa (158V) 和C1q。在一些实施例中,降低的亲和力包括解离常数增加约1个数量级或更大。在一些实施例中,引入一个或多个Fc突变将包括抗HER3抗体的融合蛋白的抗HER3抗体针对Fc γ RI的KD从 2.81×10^{-9} M增加到 1.03×10^{-8} M。在一些实施例中,引入一个或多个Fc突变将包括抗HER3抗体的融合蛋白的抗HER3抗体针对Fc γ RIIa的KD从 3.95×10^{-7} M增加到 1.35×10^{-6} M。在一些实施例中,引入一个或多个Fc突变将包括抗HER3抗体的融合蛋白的抗HER3抗体针对Fc γ RIIb的KD从 1.03×10^{-7} M增加到 1.52×10^{-6} M。在一些实施例中,引入一个或多个Fc突变将包括抗HER3抗体的融合蛋白的抗HER3抗体针对Fc γ RIIIa (158F)的KD从 6.37×10^{-8} M增加到 1.18×10^{-7} M。在一些实施例中,引入一个或多个Fc突变将包括抗HER3抗体的融合蛋白的抗HER3抗体针对Fc γ RIIIa (158V)的KD从 3.41×10^{-8} M增加到 9.10×10^{-8} M。

[0086] 在一些实施例中,抗HER3抗体或包括所述抗体的重组融合蛋白以大于或等于 1.03×10^{-8} M的平衡解离常数(KD)与Fc γ RI结合。在一些实施例中,抗HER3抗体或包括所述抗体的重组融合蛋白包括一个或多个Fc突变,并以大于或等于 1.35×10^{-6} M的KD与Fc γ RIIa结

合。在一些实施例中,抗HER3抗体或包括所述抗体的重组融合蛋白包括一个或多个Fc突变,并以大于或等于 1.5×10^{-6} M的KD与Fc γ RIIb结合。在一些实施例中,抗HER3抗体或包括所述抗体的重组融合蛋白包括一个或多个Fc突变,并以大于或等于 1.18×10^{-7} M的KD与Fc γ RIIIa (158F) 结合。在一些实施例中,抗HER3抗体或包括所述抗体的重组融合蛋白包括一个或多个Fc突变,并以大于或等于 9.10×10^{-8} M的KD与Fc γ RIIIa (158V) 结合。

[0087] 如本文所用,术语“一个或多个抗体效应子功能”是指由Ig的一个或多个Fc区贡献的功能。可以通过例如一个或多个Fc效应子区与具有吞噬或裂解活性的免疫细胞上的Fc受体的结合或通过一个或多个Fc效应子区与互补系统的组分的结合来影响此类功能。

[0088] 在一个实施例中,抗HER3抗体不诱导抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。术语“抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)”是指在效应子细胞存在的情况下根据本发明的抗体对人靶细胞的裂解。

[0089] 在本发明的一个实施例中,根据本发明的抗体是经过糖基化的。在一些实施例中,糖基化是N-糖基化。在其它实施例中,糖基化是O-糖基化。

[0090] 在本文提供的并且根据本发明的重组融合蛋白的背景下,可以通过重组手段产生重组融合蛋白所包括的抗体。此类方法在现有技术中是众所周知的,并且包括在原核和真核细胞中的蛋白质表达,随后分离抗体多肽并且通常纯化到药学上可接受的纯度。对于蛋白质表达,通过标准方法将编码轻链和重链的核酸或其片段插入表达载体。在如CHO细胞、NS0细胞、SP2/0细胞、HEK293细胞、COS细胞、酵母或大肠杆菌细胞等合适的原核或真核宿主细胞中执行表达,并从细胞中(从上清液中或在细胞裂解后)回收抗体。抗体的重组产生在现有技术中是众所周知的,并且例如在以下评论文章中描述: Makrides, S.C., 《蛋白质表达与纯化 (Protein Expr. Purif.)》17 (1999) 183-202; Geisse, S. 等人, 《蛋白质表达与纯化》8 (1996) 271-282; Kaufman, R. J., 《分子生物技术 (Mol. Biotechnol.)》16 (2000) 151-161; Werner, R. G., 《药物研究 (Drug Res.)》48 (1998) 870-880。抗体可以以完整细胞、细胞裂解物或部分纯化或基本上纯的形式存在。通过标准技术,包含柱色谱法和本领域已知的其它技术执行纯化以消除其它细胞组分或其它污染物,例如其它细胞核酸或蛋白质(参见 Ausubel, F., 等人编辑,《分子生物学实验室指南 (Current Protocols in Molecular Biology)》, 纽约格林出版社和威利国际科学出版社 (Greene Publishing and Wiley Interscience, New York) (1987))。NS0细胞中的表达通过例如 Barnes, L.M. 等人, 《细胞技术学 (Cytotechnology)》32 (2000) 109-123; Barnes, L.M. 等人, 《生物技术与生物工程 (Biotech. Bioeng.)》73 (2001) 261-270 描述。瞬时表达通过例如 Durocher, Y. 等人, 《核酸研究 (Nucl. Acids. Res.)》30 (2002) E9 描述。可变结构域的克隆通过 Orlandi, R. 等人, 《美国国家科学院院刊》86 (1989) 3833-3837; Carter, P. 等人, 《美国国家科学院院刊》89 (1992) 4285-4289; Norderhaug, L. 等人, 《免疫学方法杂志 (J. Immunol. Methods)》204 (1997) 77-87。优选的瞬时表达系统 (HEK 293) 通过 Schlaeger, E.-J. 和 Christensen, K., 《细胞技术学 (Cytotechnology)》30 (1999) 71-83 并且通过 Schlaeger, E.-J., 《免疫学方法杂志》194 (1996) 191-199 描述。通过常规的免疫球蛋白纯化程序,例如蛋白A-琼脂糖凝胶、羟磷灰石色谱、凝胶电泳、透析或亲和色谱,从培养基中适当地分离单克隆抗体。易于使用常规的程序对编码单克隆抗体的DNA和RNA进行分离和测序。杂交瘤细胞可以用作此类DNA和RNA的来源。分离后,可将DNA插入表达载体中,然后将其转染到宿主细胞,如HEK 293细胞、CHO细胞

或不以其它方式产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞中,以在宿主细胞中获得重组单克隆抗体的合成。

[0091] 将根据本发明的重链和轻链可变结构域与启动子、翻译起始、恒定区、3'非翻译区、聚腺苷酸化和转录终止的序列组合以形成表达载体构建体。可以将重链表达构建体和轻链表达构建体组合成共转染、连续转染或单独转染到宿主细胞中的单个载体,然后将所述宿主细胞融合以形成表达两条链的单个宿主细胞。

[0092] 不言而喻,抗体以治疗有效量施用于受试者,所述治疗有效量是将引起由研究人员、兽医、医生或其它临床医生寻求的组织、系统、动物或人的生物学或医学响应的主题化合物或组合的量。

[0093] 重组融合蛋白-神经调节蛋白

[0094] 在一个实施例中,本文提供的重组融合蛋白包括NRG-1蛋白的片段。NRG蛋白可以与心肌细胞的表面上的ErbB4受体结合,连续激活细胞中的PI3K/AKT信号途径,并改变心肌细胞的结构,从而改善心肌细胞的功能。

[0095] 如本文所用,“神经调节蛋白”或“NRG”是指可以结合并激活ErbB3、ErbB4或其异二聚体或同二聚体的蛋白或肽,包含神经调节蛋白同种型、神经调节蛋白EGF样结构域、包括神经调节蛋白EGF样结构域的多肽、神经调节蛋白突变体或衍生物,或可激活上述受体的任何种类的神经调节蛋白样基因产物。神经调节蛋白还包含具有神经调节蛋白功能的NRG-1、NRG-2、NRG-3和NRG-4蛋白、肽、片段和化合物。在优选的实施例中,神经调节蛋白是可以与ErbB2/ErbB4或ErbB2/ErbB3异二聚体结合并激活所述异二聚体的蛋白质或肽,例如但非出于限制的目的,本发明的肽包含NRG-1 β 2同种型的片段,即177-237个氨基酸的片段,所述片段含有具有以下氨基酸序列的EGF样结构域:SHLVKCAEKEKTFCVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPN EFTGDRCQNYVMASFYKAE ELYQ(SEQ ID NO:4)。本发明的NRG蛋白可以激活上述受体并调节其生物学功能,例如,刺激骨骼肌细胞中乙酰胆碱受体的合成,促进心肌细胞的分化和存活以及DNA合成。本领域技术人员众所周知,非关键区中单个氨基酸的突变通常不会改变所得蛋白质或多肽的生物学活性(参见,例如,Watson等人,《基因分子生物学(Molecular Biology of the Gene)》,第4版,1987,本杰明-卡明斯出版公司(Bejacmin/Cummings Pub.co.),第224页)。本发明的NRG蛋白可以从天然来源分离,可以通过重组技术、人工合成或其它手段进行修饰。

[0096] 如本文所用,“表皮生长因子样结构域”或“EGF样结构域”是指由结合到并激活ErbB3、ErbB4或其异二聚体或同二聚体(包含具有ErbB2的异二聚体)的神经调节蛋白基因编码并且在结构上类似于以下中描述的EGF受体结合区的多肽片段:W000/64400,Holmes等人,《科学(Science)》,256:1205-1210(1992);美国专利第5,530,109号和第5,716,930号;Hijazi等人,《国际肿瘤学杂志(Int J.Oncol.)》,13:1061-1067(1998);Chang等人,《自然》,387:509-512(1997);Carraway等人,《自然》,387:512-516(1997);Higashiyama等人,《生物化学杂志(J.Biochem.)》,122:675-680(1997);和WO 97/09425,所述文献的全部内容通过引用并入本文。在一些实施例中,EGF样结构域结合到并激活ErbB2/ErbB4或ErbB2/ErbB3异二聚体。在一些实施例中,EGF样结构域包括NRG-1的受体结合结构域的氨基酸序列。在一些实施例中,EGF样结构域是指NRG-1的氨基酸残基177-226、177-237或177-240。在某些实施例中,EGF样结构域包括神经调节蛋白-2(NRG-2,在本领域中还称为DON1、HRG2和

NTAK)的受体结合结构域的氨基酸序列。在某些实施例中,NRG-2的EGF样结构域包括HARKCNETAKSYCVNNGVCYYIEGINQLSCKCPNGFFGQRCL的序列(SEQ ID NO:15)。在某些实施例中,EGF样结构域包括神经调节蛋白3(NRG-3,在本领域中还称为HRG3和pro-NRG3)的受体结合结构域的氨基酸序列。在某些实施例中,NRG-3的EGF样结构域包括HFKPCRDKDLAYCLNDGECFVIETLTGSHKHCRCKEGYQGVRCDD的序列(SEQ ID NO:16)。在某些实施例中,EGF样结构域包括神经调节蛋白4(NRG-4,在本领域中还称为HER4)的受体结合结构域的氨基酸序列。在某些实施例中,NRG-4的EGF样结构域包括HEEPCGPSHKSFCLNGGLCYVIPTIPSPFCRCVENYTGARCE的序列(SEQ ID NO:17)。在某些实施例中,EGF样结构域包括如美国专利第5,834,229号中描述的Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro(SEQ ID NO:18)的氨基酸序列。

[0097] 在一个实施例中,本文公开的重组融合蛋白中提供的NRG-1蛋白是NRG-1 β 2a同种型。

[0098] 在一些实施例中,活性NRG-1片段包括ERBB3/4结合结构域。在另一个相关实施例中,NRG-1与ErbB4(HER4)结合并通过ErbB4(HER4)诱导信号传导。在其它实施例中,mAb通过ErbB3(HER3)抑制NRG-1信号传导。在一些实施例中,NRG-1的活性蛋白片段包括NRG-1的活性结构域。

[0099] 重组融合蛋白-组合物

[0100] 在一个实施例中,在本文公开的重组融合蛋白中,使用连接子将NRG-1融合到抗HER3抗体重链的C端。在另一个相关方面,NRG-1通过NRG-1的N端上的第一(第1)氨基酸连接到所述连接子,在一个实施例中,所述第一氨基酸为丝氨酸(S或Ser)氨基酸。可以通过本领域已知的任何方法(包含从商业来源购买)任选地获得或产生用于本发明的特异性重组融合蛋白。例如,任选地克隆编码合适的抗体框架的核酸序列,并将所述核算序列连接到合适的载体(例如用于例如原核或真核生物的表达载体)中。另外,以适当的朝向和位置将编码NRG-1 β 2a同种型分子的核酸序列任选地克隆到相同载体中,使得来自所述载体的表达产生抗体-NRG-1 β 2a同种型融合蛋白。一些任选的实施例还需要表达后修饰,例如抗体亚基的组装等。用于上述(和类似的)操作的技术和技艺是本领域技术人员众所周知的。相关说明见于以下:例如,Sambrook等人,《分子克隆—实验室手册(Molecular Cloning-A Laboratory Manual)》(第2版),第1-3卷,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory),纽约冷泉港(Cold Spring Harbor,N.Y.),1989和《分子生物学实验室指南》,F.M.Ausubel等人编辑,《实验室指南(Current Protocols)》,格林出版协会公司(Greene Publishing Associates,Inc.)与约翰威立父子公司(John Wiley&Sons,Inc.)合资企业(1999年补充版)。在一些替代性实施例中,在表达后通过例如化学手段组装抗体结构域和NRG-1 β 2a同种型。在一个实施例中,本发明提供了一种组合物,例如包括本发明的重组融合蛋白的药物组合物。

[0101] 在一个实施例中,重组融合蛋白促进心肌细胞增殖、分化和存活。在另一个实施例中,重组融合蛋白促进心脏组织的增殖、分化和存活。在一个实施例中,重组融合蛋白在不促进癌症和/或肿瘤生长的情况下促进心肌细胞增殖、分化和存活。在另一个实施例中,重组融合蛋白在不促进癌症或肿瘤生长的情况下促进心脏组织的增殖、分化和存活。

[0102] 在一个实施例中,所述癌症是肾上腺皮质癌、AIDS相关癌症、AIDS相关淋巴瘤、肛

门癌、肛门直肠癌、肛管癌、阑尾癌、儿童小脑星形细胞瘤、儿童脑星形细胞瘤、基底细胞癌、皮肤癌(非黑色素瘤)、胆道癌、肝外胆管癌、肝内胆管癌、膀胱癌、尿膀胱癌、骨和关节癌、骨肉瘤和恶性纤维组织细胞瘤、脑癌、脑瘤、脑干神经胶质瘤、小脑星形细胞瘤、脑癌星形细胞瘤/恶性神经胶质瘤、室管膜瘤、髓母细胞瘤、幕上原始神经外胚层肿瘤、视觉通路和下丘脑胶质瘤、乳腺癌、支气管腺瘤/类癌、类癌瘤、胃肠道、神经系统癌、神经系统淋巴瘤、中枢神经系统癌、中枢神经系统淋巴瘤、子宫颈癌、儿童期癌症、慢性淋巴细胞性白血病、慢性粒细胞性白血病、慢性骨髓增生性疾病、结肠癌、大肠癌、皮肤T细胞淋巴瘤、淋巴样肿瘤、真菌病真菌、西泽里综合征(Seziary Syndrome)、子宫内膜癌、食道癌、颅外生殖细胞瘤、生殖腺外生殖细胞瘤、肝外胆管癌、眼癌、眼内黑色素瘤、视网膜母细胞瘤、胆囊癌、胃(gastric, stomach)癌、胃肠道类癌瘤、胃肠道间质瘤(GIST)、生殖细胞瘤、卵巢生殖细胞瘤、妊娠滋养细胞肿瘤神经胶质瘤、头颈癌、肝细胞(肝)癌、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、眼内黑色素瘤、眼癌、胰岛细胞瘤(内分泌胰腺)、卡波济肉瘤、肾癌(kidney cancer)、肾癌(renal cancer)、肾癌、喉癌、急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、慢性粒细胞性白血病、毛细胞白血病、唇和口腔癌、肝癌、肺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、AIDS相关淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、沃尔登梭菌巨球蛋白血症、髓母细胞瘤、黑素瘤、眼内(眼)黑素瘤、默克尔细胞癌、恶性间皮瘤、间皮瘤、转移性鳞状颈癌、口腔癌症、舌癌、多发性内分泌肿瘤综合征、蕈样肉芽肿、骨髓增生异常综合征、骨髓增生异常/骨髓增生性疾病、慢性骨髓性白血病、急性髓性白血病、多发性骨髓瘤、慢性骨髓增生性疾病、鼻咽癌、神经母细胞瘤、口腔癌、口内腔癌、口咽癌、卵巢癌、卵巢上皮癌、卵巢低度恶性潜能肿瘤、胰腺癌、胰岛细胞胰腺癌、鼻窦和鼻腔癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、咽癌、嗜铬细胞瘤、成胚细胞瘤和幕上原始性神经上皮细胞瘤肿瘤、浆细胞瘤/多发性骨髓瘤、胸膜肺母细胞瘤、前列腺癌、直肠癌、肾盂和输尿管癌、移行细胞癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、尤文氏肉瘤家族、卡波西肉瘤、软组织肉瘤、上皮样肉瘤、子宫癌、子宫肉瘤、皮肤癌(非黑色素瘤)、皮肤癌(黑色素瘤)、默克尔细胞皮肤癌、小肠癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、胃癌、幕上原始神经外胚层肿瘤、睾丸癌、喉癌、胸腺瘤、胸腺瘤和胸腺癌、甲状腺癌、肾盂和输尿管等泌尿器官的移行细胞癌、妊娠滋养细胞肿瘤、尿道癌、子宫内膜子宫癌、子宫肉瘤、子宫体癌、阴道癌、外阴癌或威尔姆氏瘤。

[0103] 在另一个实施例中,重组融合蛋白促进中枢神经系统(CNS)细胞的增殖、分化和存活。在另一个实施例中,重组融合蛋白在不促进癌症和/或肿瘤生长的情况下促进中枢神经系统(CNS)细胞的增殖、分化和存活。在另一个实施例中,重组融合蛋白诱导抗体依赖性细胞细胞毒性(ADCC)的能力降低。

[0104] 在一些实施例中,相对于重组NRG-1的信号诱导潜力,重组融合蛋白优先于HER2/3信号传导促进HER2/4信号传导。

[0105] 在本发明的一个特定实施例中,重组融合蛋白包括通过连接到SEQ ID NO:4的NRG-1 β 2a同种型的GGGGSGGGGS(G4S)连接子SEQ(SEQ ID NO:5)融合到或可操作地连接到抗体重链的C端的抗HER3 mAb。在一些实施例中,可以使用连接子的一个或多个拷贝。在其它实施例中,可以在本文中使用G4S连接子或本领域已知的任何其它适合于本文公开的组合物的连接子的2、3、4或5个拷贝。

[0106] 术语“连接子”是本领域公认的,并且是指连接两个化合物,如两个多肽的分子(包

含但不限于未修饰或经修饰的核酸或氨基酸)或分子(例如2个或更多个,例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100个或更多个)的组。连接子可以由单个连接分子构成,或者可以包括连接分子和至少一个旨在将连接分子和化合物分开特定距离的间隔区分子。

[0107] 当核酸序列与另一核酸序列处于功能关系时,所述核酸序列被“可操作地连接”。例如,如果将核酸预序列或分泌前导表达为参与多肽分泌的前蛋白,则将核酸预序列或分泌前导与编码多肽的核酸可操作地连接;如果启动子或增强子影响序列的转录,则启动子或增强子可操作地连接到编码序列;或者如果核糖体结合位点被定位以便于翻译,则将核糖体结合位点可操作地连接到编码序列。通常,“可操作地连接”意指被连接的核酸序列是连续的,并且在分泌前导的情况下是连续的并且处于阅读框中。然而,增强子任选地是连续的。可以例如通过在方便的限制性位点处的连接来完成连接。如果不存在此类位点,则可以使用合成的寡核苷酸接头、连接子或本领域已知的其它方法。在另一个实施例中,“可操作地连接”还是指独特的氨基酸序列、肽或蛋白质的功能配对,如还通过本文所述的连接子序列的进行抗体和NRG-1片段的配对。

[0108] 在另一个实施例中,本文提供的重组融合蛋白包括的抗HER3 mAb重链由SEQ ID NO:6编码:

[0109] ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCCCTTGTTGCTATAATAAAAAGGTGTCCAGTGTCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTGGGGAGCTGGACTGCTGAAGCCAAGCGAGACCCTGTCTCTGACATGCGCCGTGTACGGAGGATCCTTCAGCGGATACTATTGGTCTTGATCAGGCAGCCACCTGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGCGAGATCAACCACTCTGGCTCCACCAACTACAATCCCTCTCTGAAGTCCCGGGTGACCATCTCCGTGGAGACAAGCAAGAATCAGTTTTCCCTGAAGCTGTCCAGCGTGACCGCCGCTGACACAGCCGTGTACTATTGCGCTAGGGACAAGTGGACCTGGTATTTTCGATCTGTGGGGAAGGGGCACCCTGGTGACAGTGTCTTCCGCCTCTACAAAGGGCCCTCCGTGTTTCCCTCTGGCTCCAA GCTCTAAGAGCACCTCTGGAGGAACAGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGATTACTTCCCTGAGCCAGTGACCGT GAGCTGGA ACTCTGGCGCCCTGACCTCCGGAGTGCATACATTTCCCGCTGTGCTGCAGTCCAGCGCCTGTATAGC CTGTCTTCCGTGGTGACCGTGCCTAGCTCTTCCCTGGGCACCCAGACATACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCT CCAATACAAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCTAAGAGCTGTGATAAGACCATAACATGCCCACCATGTCCAGCTCC TGAGCTGCTGGGAGGACCTTCCGTGTTCCCTGTTTCCCTCCAAAGCCAAAGGACACCCTGATGATCTCTCGCACCCCT GAGGTGACATGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGATCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGG AGGTGCATAATGCTAAGACCAAGCCTAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTATCGGGTGGTGTCTGTGCTGACAGT GCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTGAGCAATAAGGCCCTGCCAGCTCCCATCGAG AAGACCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGGTGTATACACTGCCCCCTAGCCGCGAGGAGATGA CCAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCATCTGACATCGCTGTGGAGTGGGAGTCCAA TGGCCAGCCCGAGAACAATTATAAGACCACACCACCCGTGCTGGACTCCGATGGCAGCTTCTTTTGTACTCCAAG CTGACCGTGGATAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTTTCCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATC ATTATACACAGAAATCTCTGTCCCTGAGCCCAGGCAAGGGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGCAGCTCTCATCT GGTGAAGTGTGCTGAGAAGGAGAAGACCTTCTGCGTGAACGGCGGCGAGTGTTTTATGGTGAAGGACCTGTCTAAT CCATCCAGATACCTGTGCAAGTGTCCAACGAGTTCACAGGCGATCGCTGCCAGAATTACGTGATGGCCTCTTTTT ATAAGGCTGAGGAGCTGTACCAGTAA (SEQ ID NO:6)。在一个实施例中,SEQ ID NO:6中所示的序 列不包括Fc突变。在一个实施例中,SEQ ID NO:6还称为“NPCF”。

GCCTGTCCAGCCCCGTGACAAAGAGCTTCAACCGCGGCGAGTGTTAA (SEQ ID NO:8)。在一个实施例中, SEQ ID NO:8还称为“PAL”。

[0114] 在一个实施例中,本文提供的重组融合蛋白所包括的抗HER3抗体的重链包括以下氨基酸序列:

[0115] MEFGLSWVFLVAIIKGVQCQVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG
EINHSGSTNYPNPSLKSRVTISVETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSSHLVKCAEKEKTFVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQNY
VMASFYKAEELYQ (SEQ ID NO:9)。

[0116] 在一个实施例中,本文提供的重组融合蛋白所包括的抗HER3抗体的重链包括以下氨基酸序列:

[0117] MEFGLSWVFLVAIIKGVQCQVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG
EINHSGSTNYPNPSLKSRVTISVETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPEFLGGPAVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH
EALHAHYTQKSLSLSPGKGGGGSSHLVKCAEKEKTFVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQNY
VMASFYKAEELYQ (SEQ ID NO:10)。

[0118] 在一个实施例中,抗HER3 mAb重链序列包括信号肽序列。在另一个实施例中,抗HER3 mAb重链信号肽序列包括MEFGLSWVFLVAIIKGVQC (SEQ ID NO:11)的氨基酸序列。

[0119] 在一个实施例中,重组融合蛋白包括的抗HER3抗体的轻链包括以下氨基酸序列:

[0120] MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSNRNLYAWYQQNPGQ
PPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYLSSTLTLSKADYEKHKVYAC
EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:12)。

[0121] 在一个实施例中,抗HER3 mAb轻链序列包括信号肽序列。在另一个实施例中,抗HER3 mAb轻链信号肽序列包括MVLQTQVFISLLLWISGAYG (SEQ ID NO:13)的氨基酸序列。在一个实施例中,如本文公开的抗体重链或轻链氨基酸序列等成熟多肽缺少信号肽。

[0122] 在一个实施例中,重组融合蛋白包括以下氨基酸序列:

[0123] 重链

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSG
 STNYPNPSLKSRTISVETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGLTV
 TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA
 [0124] PEFLGGPAVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
 VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHAHYTQKSLSLSPGK**GGGGSGGGGSSHLVK**
CAEKEKTFCVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQNYVMASFYKAEEL
YQ (SEQ ID NO:14,其中粗斜体指示连接子,并且粗体指示NRG-1片段);以及

[0125] 轻链

[0126] DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSNRNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRF
 SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNN
 FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
 (SEQ ID NO:3)。

[0127] 在一个实施例中,成熟重组融合蛋白中的重链序列和轻链序列中的每个缺乏信号肽氨基酸序列。

[0128] 在本发明的特定实施例中,本文提供的抗HER3抗体的重链通过C端连接子序列融合到本文提供的NRG-1 β 2a同种型。在另一个实施例中,抗体重链的C端包括抗体的Fc结构域。

[0129] 在一些实施例中,提供了包括与药物载体一起调配的本文公开的重组融合蛋白的药物组合物。

[0130] 在一些实施例中,将本文所述的抗HER3抗体和NRG-1片段通过连接子重组地或化学地融合/可操作地连接以形成融合蛋白。“融合蛋白”、“融合多肽”、“重组融合蛋白”或“重组多肽”是指包括来自至少两个不同多肽的多肽部分的杂交多肽。如本文所定义,“融合蛋白”是包括例如本发明的NRG-1 β 2a同种型的第一氨基酸序列(蛋白)通过连接子连接到包括与ERBB3(HER3)特异性结合的抗体的重链的第二氨基酸序列的C端的融合物。

[0131] 在一个实施例中,重组地编码和产生融合蛋白。在一些实施例中,重组融合蛋白由通过编码连接子的核酸序列可操作地连接到编码本发明的NRG-1 β 2a同种型的核酸序列的编码本发明的抗体的核酸序列编码。

[0132] 在一个实施例中,重组融合蛋白氨基酸序列与融合到SEQ ID NO:3的SEQ ID NO:14同源。术语“同源性”可以是指与重组融合蛋白序列(例如SEQ ID NO:1-18中的任何一个)的同源性大于70%。在另一个实施例中,“同源性”是指与SEQ ID NO:1-18中的任何一个的同源性大于72%。在另一个实施例中,“同源性”是指与SEQ ID NO:1-18中的任何一个的同源性大于75%。在另一个实施例中,“同源性”是指与SEQ ID NO:1-18中的任何一个的同源性大于78%。在另一个实施例中,“同源性”是指与SEQ ID NO:1-18中的任何一个的同源性大于80%。在另一个实施例中,“同源性”是指与SEQ ID NO:1-18中的任何一个的同源性大于82%。在另一个实施例中,“同源性”是指与SEQ ID NO:1-18中的任何一个的同源性大于83%。在另一个实施例中,“同源性”是指与SEQ ID NO:1-18中的任何一个的同源性大于

85%。在另一个实施例中，“同源性”是指与SEQ ID NO:1-18中的任何一个的同一性大于87%。在另一个实施例中，“同源性”是指与SEQ ID NO:1-18中的任何一个的同一性大于88%。在另一个实施例中，“同源性”是指与SEQ ID NO:1-18中的任何一个的同一性大于90%。在另一个实施例中，“同源性”是指与SEQ ID NO:1-18中的任何一个的同一性大于92%。在另一个实施例中，“同源性”是指与SEQ ID NO:1-18中的任何一个的同一性大于93%。在另一个实施例中，“同源性”是指与SEQ ID NO:1-18中的任何一个的同一性大于95%。在另一个实施例中，“同源性”是指与SEQ ID NO:1-18中的任何一个的同一性大于96%。在另一个实施例中，“同源性”是指与SEQ ID NO:1-18中的任何一个的同一性大于97%。在另一个实施例中，“同源性”是指与SEQ ID NO:1-18中的任何一个的同一性大于98%。在另一个实施例中，“同源性”是指与SEQ ID NO:1-18中的任何一个的同一性大于99%。在另一个实施例中，“同源性”是指与SEQ ID NO:1-18中的任何一个的同一性为100%。

[0133] 可以使用数学算法完成两个序列之间的同一性百分比的确定。用于比较两个序列的数学算法的非限制性实例是Karlin和Altschul,1990,《美国国家科学院院刊》87:2264-2268的算法,所述算法如Karlin和Altschul,1993,《美国国家科学院院刊》90:5873-5877中那样进行修改。将此类算法并入Altschul等人,1990,《分子生物学杂志》215:403-410的NBLAST和XBLAST程序。可以用NBLAST程序(评分=100,字长=12)执行BLAST核苷酸搜索,以获得与编码感兴趣的蛋白质的核酸同源的核苷酸序列。可以用XBLAST程序(评分=50,字长=3)来执行BLAST蛋白质检索以获得与感兴趣的蛋白质同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的有空位的比对,可以利用如Altschul et等人,1997,《核酸研究》25:3389-3402中所述的有空位的BLAST。可替代地,可以使用PSI-Blast执行检测分子(同上)之间的远距离关系的迭代搜索。当利用BLAST、有空位的BLAST和PSI-BLAST程序时,可以使用各个程序(例如,XBLAST和NBLAST)的默认参数。用于序列比较的数学算法的另一个非限制性实例是Myers和Miller,《计算机在生物科学中的应用(CABIOS)》(1989)的算法。此类算法并入ALIGN程序(第2.0版)中,所述程序是GCG序列比对软件包的一部分。当利用ALIGN程序比较氨基酸序列时,可以使用PAM120权重残基表、空位长度罚分12以及空位罚分4。用于序列分析的其它算法是本领域已知的,并且包含Torellis和Robotti,1994,《计算机应用生物科学(Comput. Appl. Biosci.)》10:3-5中所述的ADVANCE和ADAM;以及Pearson和Lipman,1988,《美国国家科学院院刊》85:2444-8中所述的FASTA。在FASTA中,ktup是设置搜索的灵敏度和速度的控制选项。如果ktup=2,则通过查看成对的比对残基发现在两个被比较的序列中的相似区;如果ktup=1,则检查单个比对的氨基酸。对于蛋白质序列,可以将ktup设置为2或1,或者对于DNA序列,可以将ktup设置为1到6。如果未指定ktup,则蛋白质的默认值为2,并且DNA的默认值为6。可替代地,可以使用如Higgins等人,1996,《酶学方法(Methods Enzymol.)》266:383-402中所述的CLUSTAL W算法进行蛋白质序列比对。

[0134] 在一些实施例中,使用本领域技术人员已知的程序和方法,使用PCR技术制备本发明的多核苷酸。在一些实施例中,所述程序涉及两个不同DNA序列的连接(参见例如“《分子生物学实验室指南》”,编辑Ausubel等人,约翰·威立父子公司,1992)。

[0135] 在一个实施例中,将本发明的多核苷酸插入表达载体(即,核酸构建体)中,以使得能够表达重组多肽。在一个实施例中,本发明的表达载体包含使此载体适合于在原核生物

中复制和整合的另外的序列。在一个实施例中,本发明的表达载体包含使此载体适合于在真核生物中复制和整合的另外的序列。在一个实施例中,本发明的表达载体包含使此载体适合于在原核生物和真核生物中复制和整合的穿梭载体。在一些实施例中,克隆载体包括转录和翻译起始序列(例如,启动子、增强子)以及转录和翻译终止子(例如,聚腺苷酸化信号)。

[0136] 在一个实施例中,各种原核细胞或真核细胞可以用作表达本发明的多肽的宿主表达系统。在一些实施例中,这些细胞包含但不限于微生物,如用含有多肽编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载体转化的细菌;用含有多肽编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母。

[0137] 在一些实施例中,使用非细菌表达系统(例如,哺乳动物表达系统,如CHO细胞)来表达本发明的多肽。在一个实施例中,用于在哺乳动物细胞中表达本发明的多核苷酸的表达载体是包括CMV启动子和新霉素抗性基因的pCI-DHFR载体。

[0138] 在一些实施例中,在本发明的细菌系统中,可以取决于旨在用于表达的多肽的用途来有利地选择许多表达载体。在一个实施例中,期望大量的多肽。在一个实施例中,期望引导可能作为与疏水信号序列的融合物的蛋白产物的高水平表达的载体,所述载体将表达的产物引导到易于纯化蛋白产物的细菌或培养基的周质中。在一个实施例中,某个融合蛋白被工程设计成具有特定切割位点以帮助多肽的回收。在一个实施例中,适于此类操纵的载体包含但不限于pET系列的大肠杆菌表达载体[Studier等人,《酶学方法》185:60-89(1990)]。

[0139] 在一个实施例中,使用酵母表达系统。在一个实施例中,如美国专利第5,932,447号中所公开的,可以在酵母中使用许多含有组成型或诱导型启动子的载体。在另一个实施例中,使用促进外源DNA序列整合到酵母染色体中的载体。

[0140] 在一个实施例中,本发明的表达载体可以进一步包含另外的多核苷酸序列,所述另外的多核苷酸序列允许例如从单个mRNA,如内部核糖体进入位点(IRES)和用于启动子-嵌合多肽的基因组整合的序列,翻译若干个蛋白质。

[0141] 在一些实施例中,本发明的表达载体包含增加本发明的重组融合蛋白的表达的元件。此类特征包含但不限于启动子和聚腺苷酸化的选择。在一些实施例中,聚腺苷酸化序列是牛生长激素(BGH)聚腺苷酸化序列。在一些实施例中,启动子包括组成型活性启动子。在一些实施例中,启动子包括巨细胞病毒启动子(pCMV)。

[0142] 在一些实施例中,哺乳动物表达载体包含但不限于可购自Invitrogen的pcDNA3、pcDNA3.1(+/-)、pGL3、pZeoSV2(+/-)、pSecTag2、pDisplay、pEF/myc/cyto、pCMV/myc/cyto、pCR3.1、pSinRep5、DH26S、DHBB、pNMT1、pNMT41、pNMT81、可购自普洛麦格(Promega)的pCI、可购自Stratagene的pMbac、pPbac、pBK-RSV和pBK-CMV、可购自Clontech的pTRES及其衍生物。

[0143] 在一些实施例中,本发明使用了含有来自如逆转录病毒等真核病毒的调节元件的表达载体。SV40载体包含pSVT7和pMT2。在一些实施例中,衍生自牛乳头瘤病毒的载体包含pBV-1MTHA,并且衍生自爱泼斯坦巴尔病毒的载体包含pHEB0和p205。其它示例性载体包含pMSG、pAV009/A⁺、pMT010/A⁺、pMAMneo-5、杆状病毒pDSVE和任何其它在SV-40早期启动子、SV-40晚期启动子、金属硫蛋白启动子、鼠乳腺肿瘤病毒启动子、劳斯肉瘤病毒启动子、多角

体蛋白启动子或其它在真核细胞中表达有效的启动子的引导下允许蛋白质表达的载体。

[0144] 在一些实施例中,重组病毒载体可用于体内表达本发明的多肽,因为其提供如侧向感染和靶向特异性等优点。在一个实施例中,侧向感染是例如逆转录病毒的生命周期中固有的,并且是单个感染细胞产生许多发芽并感染相邻细胞的子代病毒体的过程。在一个实施例中,结果是大量被快速感染,其中大部分最初未被原始病毒颗粒感染。在一个实施例中,产生不能侧向扩散的病毒载体。在一个实施例中,如果期望的目的是仅将特定基因引入局部数量的靶细胞中,则此特性可能是有用的。

[0145] 在一个实施例中,可以使用各种方法将编码本发明的重组融合蛋白的表达载体引入细胞中。此类方法通常在以下中描述: Sambrook等人,《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》,冷泉港实验室,纽约(1989,1992); Ausubel等人,《分子生物学实验室指南》,约翰威利父子公司,马里兰州巴尔的摩(Baltimore, Md.) (1989); Chang等人,《体细胞基因治疗(Somatic Gene Therapy)》,CRC出版社(CRC Press),密歇根州安阿伯市(Ann Arbor, Mich.) (1995); Vega等人,《基因靶向(Gene Targeting)》,CRC出版社,密歇根州安阿伯市(1995),载体:分子克隆载体及其用途的研究(Vectors:A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses), Butterworths出版社,马萨诸塞州波士顿市(Boston Mass.) (1988); 以及Gilboa等人[生物技术(Biotechniques)4(6):504-512, 1986],并且包含具有重组病毒载体的稳定的或瞬时转染、脂转染、电穿孔和感染。另外,对于阳性-阴性选择方法,参见美国专利第5,464,764号和第5,487,992号。

[0146] 在一些实施例中,由于病毒的感染性可以获得更高的转染效率,所以通过病毒感染引入核酸提供了优于如脂转染和电穿孔等其它方法的多个优点。

[0147] 在一个实施例中,应当理解,本发明的多肽还可以由上文所述的采用任何合适的施用方式(即,体内基因疗法)施用于个体的核酸构建体表达。在一个实施例中,将核酸构建体通过合适的基因递送载体/方法(转染、转导、同源重组等)和根据需要的表达系统引入合适的细胞中,并且然后将经修饰的细胞在培养物中扩增并返回给个体(即,离体基因疗法)。

[0148] 应当理解,除了含有用于插入的编码序列(编码多肽)的转录和翻译的必需元件之外,本发明的表达构建体还可以包含被工程设计成优化表达的多肽的稳定性、生产、纯化、产率或活性的序列。

[0149] 在一些实施例中,在允许表达大量的重组融合蛋白或多肽的有效条件下培养转化的细胞。在一些实施例中,有效的培养条件包含但不限于允许蛋白质产生的有效培养基、生物反应器、温度、pH和氧气条件。在一个实施例中,有效培养基是指在其中培养细胞以产生本发明的重组多肽的任何培养基。在一些实施例中,培养基通常包含具有可吸收的碳、氮和磷酸盐源,以及合适的盐、矿物质、金属和其它如维生素等营养物的水溶液。在一些实施例中,可以在常规发酵生物反应器、摇瓶、测试管、微量滴定皿和培养皿中培养本发明的细胞。在一些实施例中,在适于重组细胞的温度、pH和氧含量下进行培养。在一些实施例中,培养条件在本领域普通技术人员的专业知识范围内。

[0150] 在一些实施例中,取决于用于生产的载体和宿主系统,本发明的所得多肽保留在重组细胞内,分泌到发酵培养基中,分泌到两个细胞膜之间的空间(如大肠杆菌中的周质空间)中,或保留在细胞或病毒膜的外表面上。

[0151] 在一个实施例中,在培养的预定时间之后,实现重组多肽的回收。

[0152] 在一个实施例中,本文所用的短语“回收重组多肽”是指收集含有所述多肽的整个发酵培养基,并且不需暗示分离或纯化的另外的步骤。

[0153] 在一个实施例中,使用多种标准蛋白质纯化技术来纯化本发明的多肽,如但不限于亲和色谱、离子交换色谱、过滤、电泳、疏水相互作用色谱、凝胶过滤色谱、反相色谱、伴刀豆球蛋白A色谱、色谱聚焦和差异增溶。

[0154] 在一个实施例中,为了便于回收,可以将表达的编码序列工程设计成编码本发明的多肽和融合的可切割部分。在一个实施例中,可以设计融合蛋白,使得可以通过亲和色谱,例如,通过对可切割部分具有特异性的柱上的固定来容易地分离多肽。在一个实施例中,在多肽与可切割部分之间工程设计了可切割位点,并且可以通过在此位点处用特异性切割融合蛋白的合适的酶或药剂进行处理,将多肽从色谱柱中释放出来[例如,参见Booth等人,《免疫学快报(Immunol.Lett.)》19:65-70(1988);和Gardella等人,《生物化学杂志》265:15854-15859(1990)]。

[0155] 在一个实施例中,以“基本上纯的”形式回收本发明的多肽。

[0156] 在一个实施例中,短语“基本上纯的”是指允许在本文所述的应用中蛋白质的有效使用的纯度。

[0157] 在一个实施例中,还可以使用体外表达系统合成本发明的多肽。在一个实施例中,体外合成方法是本领域公知的,并且系统的组分是可商购的。

[0158] 在一些实施例中,合成和纯化重组多肽;可以在体内或体外测定其治疗功效。

[0159] 在一个实施例中,进一步与药物载体一起调配本文提供的包括本发明的重组融合蛋白的药物组合物。如本文所使用的,“药物载体”包含生理上相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。优选地,所述载体适合于静脉内施用、肌肉施用、皮下施用、肠胃外施用、脊髓施用或表皮施用(例如,通过注射或输注)。

[0160] 治疗方法

[0161] 在一个实施例中,本发明提供一种治疗有需要的受试者的疾病或病状的方法,所述方法包括施用治疗有效量的重组融合蛋白或包括本文公开的重组融合蛋白的药物组合物。

[0162] 在一个实施例中,本发明提供了一种治疗有需要的受试者的心血管疾病或病状的方法,所述方法包括施用治疗有效量的重组融合蛋白或包括所述重组融合蛋白的药物组合物。

[0163] 在一个实施例中,本发明提供了一种预防、抑制、阻止或延迟受试者的心血管疾病或病状的发作的方法,所述方法包括施用有效量的本文所述的重组融合蛋白或药物组合物。

[0164] 在一些实施例中,心血管疾病包括慢性心力衰竭/充血性心力衰竭(CHF)、急性心力衰竭/心肌梗塞(MI)、左心室收缩功能障碍、与MI有关的再灌注损伤、化疗诱导的心脏毒性(成人或小儿)、辐射诱导的心脏毒性、小儿先天性心脏病的外科手术干预的附加物。

[0165] 在一些实施例中,化疗诱导的心脏毒性是由于受试者接受用作化疗的蒽环类药物、烷化剂、抗微管剂和抗代谢药剂引起的。

[0166] 在一些实施例中,心血管病状是由于受试者接受癌症疗法而引起的心脏毒性。在其它实施例中,癌症疗法是HER-2靶向疗法。在其它实施例中,HER-2靶向疗法包括使用曲妥

珠单抗、ado-曲妥珠单抗、美坦新、拉帕替尼、来那替尼和帕妥珠单抗、任何抗HER2抗体、任何抗HER2药剂或其组合。

[0167] 在另一方面,本发明涉及一种诱导肌肉细胞肌节和细胞骨架结构或细胞-细胞粘附的重塑的方法,所述方法包括用本文公开的重组融合蛋白处理细胞。

[0168] 在一个实施例中,所述治疗方法涉及治疗哺乳动物的由于心肌细胞-细胞粘附的分离和/或肌节结构的混乱而引起的心力衰竭。

[0169] 在另一方面,本发明提供了一种用于预防、治疗或延迟人体内射血分数保留的心力衰竭(heart failure with preserved ejection fraction)的方法,所述方法包括施用包括本文公开的重组融合蛋白的药物组合物。

[0170] 如本文所用,术语“射血分数”是指每次收缩时左心室泵出多少血液的测量值的射血分数(EF),所述测量值通常表示为百分数。例如,射血分数为50%意指每次心跳都会将左心室血液总量的50%推出。

[0171] 本发明涉及治疗患有心脏病和相关病状,例如心力衰竭,或处于心脏病和相关病状发展的风险中的受试者。

[0172] 术语“心力衰竭”是指心脏功能的异常,其中心脏不以代谢组织要求的速率泵送血液。心力衰竭包含多种疾病状态,如充血性心力衰竭、心肌梗塞、心律失常、家族性肥厚性心肌病、缺血性心脏病、特发性扩张型心肌病和心肌炎。心力衰竭可能由包含缺血性、先天性、风湿性或特发性形式的任何数量的因素引起。慢性心脏肥大是作为充血性心力衰竭和心脏骤停的先兆的一种严重的疾病状态。

[0173] 在一个实施例中,“治疗”是指治疗性处理和预防性或防止性措施两者,其中目标是预防或减慢(减轻)心脏肥大。需要治疗的受试者包含已经患有所述病症的受试者以及易于患所述病症的受试者或待预防所述病症的受试者。心脏肥大可能来自对视黄酸有反应的任何原因,包含先天性、病毒性、特发性、心脏营养性或肌营养性原因,或者是缺血或缺血性损伤(如心肌梗塞)引起的。通常,为了停止或减慢肥大的进展,特别是在发生如由于缺血引起的心脏损伤后执行治疗。优选地,为了治疗心肌梗塞,在心肌梗塞后立即给予本文提供的药物组合物,以预防或减轻肥大。

[0174] 在一些实施例中,与接受采用不是本公开的化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物、类似物或衍生物的药物单一疗法的群体相比,用包括本文提供的重组融合蛋白的药物组合物治疗受试者可以使所治疗的受试者的群体的平均存活时间增加。优选地,在用本文提供的策略、治疗形式、方法、组合和组合物治疗之后,平均存活时间增加超过30天;更优选地,超过60天;更优选地,超过约90天、120天或365天;更优选地,超过365天。可以通过任何可重复的方式来测量群体的平均存活时间的增加。可以例如通过用活性化合物的治疗开始后计算群体的平均存活长度来测量群体的平均存活时间的增加。还可以例如通过以下方法来测量群体的平均存活时间的增加:通过计算用本文公开的化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物、类似物或衍生物)的群体,治疗

[0175] 在一些实施例中,与仅接受载体的群体相比,用包括本文提供的重组融合蛋白的药物组合物治疗受试者可以导致所治疗的受试者群体的死亡率降低。相比于未经治疗的群体,治疗癌症可以导致经治疗的受试者群体的死亡率降低。相比于接受单一疗法(使用的药物不是本披露的化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物、类似物或衍生物)的群体,治疗

癌症可以导致经治疗的受试者群体的死亡率降低。优选地,在用本文提供的策略、治疗形式、方法、组合和组合物治疗之后,死亡率降低超过2%;更优选地,超过5%;更优选地,超过10%;并且最优选地,超过25%。可以通过任何可重复的方式来测量经治疗的受试者群体的死亡率的降低。可以例如通过用活性化合物治疗开始后计算每个单位时间内群体的疾病相关死亡的平均数量来测量群体的死亡率的降低。还可以例如通过以下来测量群体的死亡率降低:在用本文公开的药物组合物完成第一轮治疗后,计算每单位时间内群体的与疾病相关的死亡的平均数。

[0176] 在一个实施例中,本发明提供了一种治疗有需要的受试者的中枢神经系统(CNS)相关疾病或病状的方法,所述方法包括施用治疗有效量的本文所述的重组融合蛋白或药物组合物。

[0177] 在一个实施例中,本发明提供了一种预防、抑制、阻止或延迟受试者的CNS相关的疾病或病状的发作的方法,所述方法包括施用有效量的本文所述的重组融合蛋白或药物组合物。

[0178] 在一些实施例中,CNS相关的疾病或病状是肌萎缩性脊髓侧索硬化(ALS)、帕金森氏病、阿尔茨海默氏病、贝尔氏麻痹、癫痫和癫痫发作、格林-巴利综合症、中风、创伤性脑损伤、多发性硬化症或组合。

[0179] 施用、给药

[0180] 可以向有需要的受试者肠胃外施用,或者可以通过本领域已知的多种方法施用本发明的组合物。如本领域技术人员将理解的,施用的途径和/或模式将取决于所期望的结果而变化。为了通过某些施用途施用本发明的化合物,可能有必要用防止其失活的材料包被所述化合物或与所述化合物共同施用。例如,可以在合适的载体,例如脂质体或稀释剂中向受试者施用化合物。药学上可接受的稀释剂包含盐水和水性缓冲溶液。药物载体包含无菌水溶液或分散液和用于临时制备无菌注射溶液或分散液的无菌粉剂。此类培养基和药剂用于药物活性物质的用途是本领域已知的。

[0181] 在典型的实施例中,用于向受试者施用的制剂包含无菌水性或非水性溶液、悬浮液和乳剂。一些实施例包含非水性溶剂,如丙二醇、聚乙二醇、植物油(例如,橄榄油)、有机酯(例如,油酸乙酯)和本领域技术人员已知的其它溶剂。在本发明的某些实施例中任选地使用生理上可接受的载体(或赋形剂)。此类实例包含例如盐水、PBS、林格氏溶液、乳酸林格氏溶液等。另外,将防腐剂和添加剂任选地添加到组合物中以帮助确保稳定性和无菌性。例如,抗生素和其它杀菌剂、抗氧化剂、螯合剂等都任选地存在于本文组合物的各个实施例中。

[0182] 如本文所用,短语“肠胃外施用(parenteral administration)”和“肠胃外施用(administered parenterally)”是指除肠内和局部施用以外的施用方式,通常通过注射,并且包含但不限于静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、包膜下、蛛网膜下腔、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。

[0183] 无论选择哪种施用途,可以将以适当的水合形式使用的本发明的化合物和/或本发明的药物组合物通过本领域的技术人员已知的其它常规方法都配制成药学上可接受的剂型。

[0184] 在任何合适的无菌药物载体中向需要治疗(治疗上或预防上)的受试者任选地施

用重组融合蛋白或包括所述重组融合蛋白的药物组合物。此类药物载体的作用是维持融合蛋白的溶解性和作用。在一些实施例中,可能期望与融合蛋白一起施用另外的组分。例如,在一些治疗方案中,化学治疗剂、抗生素、包括本发明的重组融合蛋白和一种或多种标准护理剂的另外的调配物等都全部任选地包含在本发明的组合物中。

[0185] 如本文所用,术语“组合治疗”、“组合疗法”和“共同疗法”可互换地使用,并且通常是指特征为本文提供的重组融合蛋白或包括所述重组融合蛋白的药物组合物和另外的治疗剂的治疗方式。典型地,组合治疗形式是旨在提供来自治疗剂组合的并行作用有益效果的特定治疗方案的一部分。组合的有益效果可以包含但不限于由治疗剂的组合产生的药代动力学或药效动力学共同作用。通常在限定的时间段(通常数分钟、数小时、数天或数周,这取决于选择的组合)内进行这些治疗剂的组合施用。在一些实施例中,组合治疗包括以依序方式施用两种或更多种治疗剂,其中在不同时间施用每种治疗剂,以及以基本上同时的方式施用这些治疗剂或这些治疗剂中的至少两种。可以例如通过向受试者施用具有固定比率的每种治疗剂的单一剂型或以针对治疗剂的多个独立剂型来完成基本上同时的施用。可以通过任何适当的途径来实现每个治疗剂的顺序施用或基本上同时施用,这些途径包含但不限于口服途径、静脉内途径、肌肉内途径、和通过粘膜组织的直接吸收。可以通过相同途径或通过不同途径施用这些治疗剂。可以根据相同或不同的施用间隔施用治疗剂。例如,可以通过静脉内注射施用选择的组合的第一治疗剂,同时可以口服施用所述组合中的其它治疗剂。可替代地,例如,可以口服施用所有治疗剂或可以通过静脉内注射施用所有治疗剂。

[0186] 在一些实施例中,组合疗法还包括与其它生物活性成分和非药物治疗法(例如,手术或放射疗法)进一步组合的上述治疗剂的施用。当组合疗法进一步包括非药物治疗时,可在任何合适的时间进行非药物治疗,只要从治疗剂与非药物治疗的组合的共同作用中实现有益作用即可。例如,在适当的情况下,当从治疗剂的施用中暂时去除非药物治疗时(也许是数天甚至数周),仍然实现有益作用。

[0187] 在一些实施例中,另外的治疗剂是化学治疗剂(还称为抗肿瘤剂或抗增生剂),例如烷基化剂;抗生素;抗代谢药;解毒剂;干扰素;多克隆或单克隆抗体;EGFR抑制剂;HER2抑制剂;组蛋白脱乙酰酶抑制剂;激素;有丝分裂抑制剂;MTOR抑制剂;多激酶抑制剂;丝氨酸/苏氨酸激酶抑制剂;酪氨酸激酶抑制剂;VEGF/VEGFR抑制剂;紫杉烷或紫杉烷衍生物、芳香酶抑制剂、蒽环类药物、微管靶向药物、拓扑异构酶中毒药物、分子靶标或酶(例如激酶或蛋白质甲基转移酶)的抑制剂、胞苷类似物药物或任何化学治疗剂、免疫检查点抑制剂、铂类抗肿瘤药、CDK抑制剂、PARP抑制剂或本领域技术人员已知的任何抗肿瘤或抗增殖剂。

[0188] 适于根据本文提供的组合治疗形式使用的示例性烷基化剂包含但不限于环磷酰胺(Cytosan;Neosar);苯丁酸氮芥(Leukeran);美法仑(Alkeran);卡莫司汀(BiCNU);白消安(Busulfex);洛莫司汀(CeeNU);达卡巴嗪(DTIC-Dome);奥沙利铂(Eloxatin);卡莫司汀(Gliadel);异环磷酰胺(Ifex);氮芥(Mustargen);白消安(Myleran);卡铂(Paraplatin);顺铂(CDDP;Platinol);替莫唑胺(Temodar);噻替哌(Thioplex);苯达莫司汀(Treanda);或链佐星(Zanosar)。

[0189] 示例性合适的蒽环类药物包含但不限于多柔比星(阿霉素);多柔比星脂质体(Doxil);米托蒽醌(Novantrone);博来霉素(Blenoxane);柔红霉素(Cerubidine);柔红霉素脂质体(DaunoXome);更生霉素(Cosmegen);表柔比星(Ellence);伊达比星(Idamycin);

- 普卡霉素(Mithracin);丝裂霉素(Mutamycin);喷司他丁(Nipent);或戊柔比星(Valstar)。
- [0190] 示例性抗代谢药包含但不限于氟尿嘧啶(Adrucil);卡培他滨(Xeloda);羟基脲(Hydrea);巯基嘌呤(Purinethol);培美曲塞(Alimta);氟达拉滨(Fludara);奈拉滨(Arranon);克拉屈滨(Cladribine Novaplus);氯法拉滨(Clolar);阿糖胞苷(Cytosar-U);地西他滨(Dacogen);阿糖胞苷脂质体(DepoCyt);羟基脲(Droxia);普拉曲沙(Folotylin);氟尿苷(FUDR);吉西他滨(健择);克拉屈滨(Leustatin);氟达拉滨(Oforta);甲氨蝶呤(MTX;Rheumatrex);甲氨蝶呤(Trexall);硫鸟嘌呤(Tablod);TS-1或阿糖胞苷(Tarabine PFS)。
- [0191] 示例性解毒剂包含但不限于氨磷汀(Ethyol)或美司钠(Mesnex)。
- [0192] 示例性干扰素包含但不限于干扰素 α -2b(内含子A)或干扰素 α -2a(Roferon-A)。
- [0193] 示例性多克隆或单克隆抗体包含但不限于曲妥珠单抗(Herceptin);奥法木单抗(Arzerra);贝伐单抗(安维汀);利妥昔单抗(瑞图宣);西妥昔单抗(爱必妥);帕尼单抗(维克替比);托西莫单抗/碘-131托西莫单抗(Bexxar);阿仑单抗(坎帕斯);替伊莫单抗(泽娃灵;In-111;Y-90泽娃灵);吉妥珠单抗(米罗他);依库丽单抗(Soliris)或狄诺塞麦。
- [0194] 示例性EGFR抑制剂包含但不限于吉非替尼(易瑞沙);拉帕替尼(泰克博);西妥昔单抗(爱必妥);厄洛替尼(特罗凯);帕尼单抗(维克替比);PKI-166;卡纳替尼(CI-1033);马妥珠单抗(EMD 72000)或EKB-569。
- [0195] 示例性HER2抑制剂包含但不限于曲妥珠单抗(赫赛汀);拉帕替尼(泰立沙)或AC-480。
- [0196] 组蛋白脱乙酰基酶抑制剂包含但不限于伏立诺他(Zolinza)。
- [0197] 示例性激素包含但不限于它莫西芬(Soltamox;诺瓦得士);雷洛昔芬(易维特);甲地孕酮(梅格施);亮丙瑞林(利普安;Lupron Depot;癌立佳(Eligard);Viadur);氟维司群(法洛德);来曲唑(复乳纳);曲普瑞林(Trelstar LA;Trelstar Depot);依西美坦(阿诺新);戈舍瑞林(诺雷得);比卡鲁胺(康士得);阿那曲唑(瑞宁得);氟甲睾酮(Androxy;Halotestin);甲羟孕酮(Provera;Depo-Provera);雌氮芥(Emcyt);氟他胺(Eulexin);托瑞米芬(Fareston);地加瑞克(Firmagon);尼鲁米特(Nilandron);阿巴瑞克(普来纳西);或睾内酯(Teslac)。
- [0198] 示例性有丝分裂抑制剂包含但不限于紫杉醇(Taxol;Onxol;白蛋白结合型紫杉醇);多西他赛(泰素帝);长春新碱(Oncovin;Vincasar PFS);长春碱(Velban);依托泊苷(Toposar;Etopophos;VePesid);替尼泊苷(Vumon);伊沙匹隆(Ixempra);诺考达唑;埃博霉素;长春瑞滨(诺维本);喜树碱(CPT);伊立替康(Camptosar);托泊替康(Hycamtin);安吡啶或片螺素D(LAM-D)。
- [0199] 示例性MTOR抑制剂包含但不限于依维莫司(癌伏妥)或替西罗莫司(馱瑞塞尔);雷帕鸣、地磷莫司;或AP23573。
- [0200] 示例性多激酶抑制剂包含但不限于索拉非尼(Nexavar);舒尼替尼(索坦);BIBW2992;E7080;Zd6474;PKC-412;莫特沙尼(motesanib);或AP24534。
- [0201] 示例性丝氨酸/苏氨酸激酶抑制剂包含但不限于鲁伯斯塔(ruboxistaurin);依立卢/盐酸法舒地尔;夫拉平度(flavopiridol);塞利西利(seliciclib)(CYC202;Roscovitine);SNS-032(BMS-387032);Pkc412;苔藓抑素;KAI-9803;SF1126;VX-680;Azd1152;Arry-142886(AZD-6244);SCIO-469;GW681323;CC-401;CEP-1347或PD 332991。

[0202] 示例性酪氨酸激酶抑制剂包含但不限于埃罗替尼(它赛瓦);吉非替尼(易瑞沙);伊马替尼(格列卫);索拉非尼(Nexavar);舒尼替尼(索坦);曲妥珠单抗(赫赛汀);贝伐单抗(安维汀);利妥昔单抗(瑞图宣);拉帕替尼(泰克博);西妥昔单抗(爱必妥);帕尼单抗(维克替比);依维莫司(癌伏妥);阿仑单抗(坎帕斯);吉妥珠单抗(米罗他);坦西莫司(驮瑞塞尔);帕唑帕尼(Votrient);达沙替尼(施达赛);尼罗替尼(泰息安);伐他拉尼(Ptk787; ZK222584);CEP-701;SU5614;MLN518;XL999;VX-322;Azd0530;BMS-354825;SKI-606CP-690;AG-490;WHI-P154;WHI-P131;AC-220;或AMG888。

[0203] 示例性VEGF/VEGFR抑制剂包含但不限于贝伐单抗(安维汀)、索拉非尼(Nexavar)、舒尼替尼(索坦)、兰尼单抗、哌加他尼或凡德他尼。

[0204] 示例性微管靶向药物包含但不限于紫杉醇、多西他赛、长春新碱、长春碱、诺考达唑、埃博霉素和诺维本。

[0205] 示例性拓扑异构酶有毒药物包含但不限于替尼泊苷、依托泊苷、阿霉素、喜树碱、柔红霉素、更生霉素、米托蒽醌、安吡啶、表柔比星和伊达比星。

[0206] 示例性紫杉烷或紫杉烷衍生物包含但不限于紫杉醇和多西他赛。

[0207] 示例性免疫检查点抑制剂包含程序性细胞死亡1(PD-1)、CD274分子(PD-L1)和细胞毒性T淋巴细胞相关联的蛋白4(CTLA4)抑制剂。示例性PD-1抑制剂包含派姆单抗、纳武单抗和西米普利单抗。示例性PD-L1抑制剂包含阿特朱单抗、阿维鲁单抗和度伐利尤单抗。示例性CTLA4抑制剂包含易普利姆玛。

[0208] 示例性基于铂的抗肿瘤药剂包含顺铂和卡铂。

[0209] 示例性细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)抑制剂包含玻玛西尼、帕博西尼和瑞博西尼。

[0210] 示例性聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)抑制剂包含他拉唑帕尼、奥拉帕尼、卢卡帕尼、尼拉帕尼和维利帕尼。

[0211] 示例性一般化学治疗剂、抗肿瘤剂、抗增生剂包含但不限于六甲蜜胺(克瘤灵);异维甲酸(Accutane;Amnesteem;Claravis;Sotret);维甲酸(Vesanoid);阿扎胞苷(Vidaza);硼替佐米(Velcade);天冬酰胺酶(Elspar);左旋咪唑(Ergamisol);米托坦(Lysodren);甲基苄肼(Matulane);培门冬酶(Oncaspar);地尼白介素(Ontak);卟吩姆钠(porfimer)(Photofrin);阿地白介素(Proleukin);来那度胺(Revlimid);贝沙罗汀(Targretin);沙利度胺(Thalomid);坦西莫司(驮瑞塞尔);三氧化二砷(Trisenox);维替泊芬(Visudyne);含羞草氨酸(Leucenol);(1M替加氟-0.4M 5-氯-2,4-二羟基嘧啶-1M氧喹酸钾)、或洛伐他汀。

[0212] 在一些实施例中,提供了组合治疗形式,其中另外的治疗剂是例如G-CSF(粒细胞集落刺激因子)的细胞因子。在另一方面,本文提供的药物组合物可以与放射疗法组合施用。放射疗法还可以与本文提供的药物组合物和本文所述的另一种化学治疗剂组合施用,作为多药剂疗法的一部分。在另一方面,本文提供的药物组合物可以与如下标准化学疗法组合施用:例如但不限于CMF(环磷酰胺、甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶)、CAF(环磷酰胺、阿霉素和5-氟尿嘧啶)、AC(阿霉素和环磷酰胺)、FEC(5-氟尿嘧啶、表柔比星和环磷酰胺)、ACT或ATC(阿霉素、环磷酰胺和紫杉醇)、利妥昔单抗、希罗达(卡培他滨)、顺铂(CDDP)、卡铂、TS-1(摩尔比为1:0.4:1的替加氟、吉莫斯特和奥斯他特钾)、喜树碱11(CPT-11、伊立替康或CamptosarTM)、CHOP(环磷酰胺、羟基柔红霉素、长春新碱和泼尼松或泼尼松龙)、R-CHOP(利

妥昔单抗、环磷酰胺、羟基柔红霉素、长春新碱、泼尼松或泼尼松龙)或CMFP(环磷酰胺、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶和泼尼松)。

[0213] 在一些优选的实施例中,本文提供的药物组合物可以与如受体激酶或非受体激酶的酶的抑制剂一起施用。受体激酶或非受体激酶是例如,酪氨酸激酶或丝氨酸/苏氨酸激酶。本文所述的激酶抑制剂是小分子、多核酸、多肽、或抗体。

[0214] 示例性激酶抑制剂包含但不限于贝伐单抗(靶VEGF)、BIBW 2992(靶EGFR和Erb2)、西妥昔单抗/爱必妥(靶Erb1)、伊马替尼/格列卫(靶Bcr-Ab1)、曲妥珠单抗(靶Erb2)、吉非替尼/伊列斯塔(靶EGFR)、雷尼单抗(靶VEGF)、培加他尼(靶VEGF)、厄洛替尼/特罗凯(靶Erb1)、尼洛替尼(靶Bcr-Ab1)、拉帕替尼(靶Erb1和Erb2/Her2)、GW-572016/拉帕替尼二甲苯磺酸盐(靶HER2/Erb2)、帕尼单抗/维克替比(靶EGFR)、凡德替尼(靶RET/VEGFR)、E7080(包含RET和VEGFR的多个靶)、赫赛汀(靶HER2/Erb2)、PKI-166(靶EGFR)、卡奈替尼/CI-1033(靶EGFR)、舒尼替尼/SU-11464/索坦(靶EGFR和FLT3)、马妥珠单抗/Emd7200(靶EGFR)、EKB-569(靶EGFR)、Zd6474(靶EGFR和VEGFR)、PKC-412(靶VEGR和FLT3)、瓦他拉尼碱/Ptk787/ZK222584(靶VEGR)、CEP-701(靶FLT3)、SU5614(靶FLT3)、MLN518(靶FLT3)、XL999(靶FLT3)、VX-322(靶FLT3)、Azd0530(靶SRC)、BMS-354825(靶SRC)、SKI-606(靶SRC)、CP-690(靶JAK)、AG-490(靶JAK)、WHI-P154(靶JAK)、WHI-P131(靶JAK)、索拉非尼/Nexavar(靶RAF激酶、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、PDGFR- β 、KIT、FLT-3和RET)、达沙替尼/施达赛(BCR/ABL和Src)、AC-220(靶F1t3)、AC-480(靶所有HER蛋白、“panHER”)、二磷酸莫他沙尼(靶VEGF1-3、PDGFR和c-试剂盒)、地诺单抗(抑制SRC的靶RANKL)、AMG888(靶HER3)和AP24534(包含F1t3的多个靶)。

[0215] 在另一个实施例中,一天一次向受试者施用重组融合蛋白或包括相同的多肽的药物组合物。在一些实施例中,每两天一次向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每三天一次向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每四天一次向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每五天一次向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每六天一次向受试者施用重组融合蛋白或包括相同的多肽的药物组合物。在另一个实施例中,每周一次向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每7-14天一次向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每10-20天一次向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每5-15天一次向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每15-30天一次向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。

[0216] 在一个实施例中,本发明的重组融合蛋白的剂量包括可注射溶液中的0.005mg/kg到0.1mg/kg。在另一个实施例中,所述剂量包括0.005mg/kg到0.5mg/kg的重组融合蛋白。在另一个实施例中,所述剂量包括0.05微克到0.1微克的重组融合蛋白。在另一个实施例中,所述剂量包括可注射溶液中0.005mg/kg到0.1mg/kg的重组融合蛋白。

[0217] 在另一个实施例中,以0.0001mg到0.6mg范围的剂量向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,以0.001mg到0.005mg范围的剂量向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,以0.005mg到0.01mg范围的剂量向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,以0.01mg到

0.3mg范围的剂量向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中，以0.2mg到0.6mg范围的剂量向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。

[0218] 在另一个实施例中，以1-100mcg/kg范围的剂量向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中，以10-80mcg/kg范围的剂量向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中，以20-60mcg/kg范围的剂量向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中，以10-50mcg/kg范围的剂量向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中，以40-80mcg/kg范围的剂量向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中，以10-30mcg/kg范围的剂量向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中，以30-60mcg/kg范围的剂量向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。

[0219] 在另一个实施例中，以0.1mcg/kg到100mg/kg范围的剂量向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中，以0.1mcg/kg到50mg/kg范围的剂量向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中，以0.1mcg/kg到25mg/kg范围的剂量向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中，以0.1mcg/kg到10mg/kg范围的剂量向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中，以0.1mcg/kg到5mg/kg范围的剂量向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中，以0.1mcg/kg到1mg/kg范围的剂量向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中，以0.1mcg/kg到0.1mg/kg范围的剂量向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中，以10mg/kg到60mg/kg范围的剂量向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。

[0220] 在另一个实施例中，以约0.5mg/kg、约1mg/kg、约2mg/kg、约3mg/kg、约4mg/kg、约5mg/kg、约6mg/kg、约7mg/kg、约8mg/kg、约9mg/kg、约10mg/kg、约20mg/kg、约30mg/kg、约40mg/kg、约50mg/kg、约60mg/kg或约70mg/kg的剂量向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。

[0221] 在另一个实施例中，以0.2mg到2mg范围的剂量向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中，以2mg到6mg范围的剂量向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中，以4mg到10mg范围的剂量向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中，以5mg到15mg范围的剂量向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。

[0222] 在一个实施例中，以10 μ g/kg-1000 μ g/kg范围的剂量向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中，以25 μ g/kg-600 μ g/kg范围的剂量向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中，以50 μ g/kg-400 μ g/kg范围的剂量向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中，以约25 μ g/kg的剂量向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中，以约50 μ g/kg的剂量向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中，以约100 μ g/kg的剂量向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中，以约200 μ g/kg的剂量向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中，以约300 μ g/kg的剂量向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中，以约400 μ g/kg的剂量向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实

施例中,以约500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的剂量向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,以约600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的剂量向受试者施用重组融合蛋白或包括其的药物组合物。

[0223] 在一个实施例中,向受试者施用单次剂量的重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,向受试者施用总计两种剂量。在另一个实施例中,向受试者施用总计两种或更多种剂量。

[0224] 在另一个实施例中,每天至少一次向受试者施用一剂重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每两天至少一次向受试者施用一剂重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每两天或更多天至少一次向受试者施用一剂重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每两天、每两周或每三周向受试者施用一剂重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每周至少一次向受试者施用一剂重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每两周至少一次向受试者施用一剂重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每三周至少一次向受试者施用一剂重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每三周或更多周至少一次向受试者施用一剂重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每周两次或更多次向受试者施用一剂重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每月两次或更多次向受试者施用一剂重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,一年两次或更多次向受试者施用一剂重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每两年两次或更多次向受试者施用一剂重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每两年或更多年两次或更多次向受试者施用一剂重组融合蛋白或包括其的药物组合物。

[0225] 在另一个实施例中,每36小时至少一次施用一剂重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每48小时至少一次施用一剂重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每60小时至少一次施用一剂重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每72小时至少一次施用一剂重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每84小时至少一次施用一剂重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每96小时至少一次施用一剂重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每5天至少一次施用一剂重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每6天至少一次施用一剂重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每7天至少一次施用一剂重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每8-10天至少一次施用一剂重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每10-12天至少一次施用一剂重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每12-15天至少一次施用一剂重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每15-25天至少一次施用一剂重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每20-30天至少一次施用一剂重组融合蛋白或包括其的药物组合物。

[0226] 在另一个实施例中,每1个月至少一次向受试者施用一剂重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每2个月至少一次施用一剂重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每3个月至少一次施用一剂重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每4个月至少一次施用一剂重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每5个月至少一次施用一剂重组融合蛋白或包括其的药物组合物。

在另一个实施例中,每6个月至少一次施用一剂重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每6-12个月至少一次施用一剂重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每季度施用一剂重组融合蛋白或包括其的药物组合物。在另一个实施例中,每天、每周、每两周、每月或每年施用所述剂量。在另一个实施例中,每天、每周、每月或每年一次、两次或两次或更多次施用所述剂量。在另一个实施例中,每两年、每三年、每四年或每至少五年施用所述剂量。

[0227] 在一个实施例中,可以在第一个治疗过程之后或在几天、几周或几年的间隔之后立即进行本发明的组合物的重复施用(剂量),以实现如本文进一步提供的所期望的效果(例如预防或治疗心血管疾病或病状,或与CNS相关的疾病或病状)。

[0228] 在一个实施例中,通过静脉内、动脉内、皮下或肌内注射液体制剂施用药物组合物。在另一个实施例中,液体调配物包含溶液、悬浮液、分散液、乳液、油等。在一个实施例中,药物组合物在静脉内施用,并且因此将药物组合物配制成适于静脉内施用的形式。在另一个实施例中,药物组合物在动脉内施用,并且因此将药物组合物配制成适合于动脉内施用的形式。

[0229] 在一些实施例中,用于本文公开的方法的组合物包括溶液或乳剂,溶液或乳剂在一些实施例中是包括本文公开的安全和有效量的化合物以及任选地旨在用于静脉内或皮下施用的其它化合物的水溶液或乳剂。

[0230] 在一些实施例中,所述组合物的各种组分是预先测量的和/或预先包装的和/或无需另外的测量即可准备使用的等。本发明还任选地包括用于进行/使用本发明的方法和/或组合物的试剂盒。具体地,这些试剂盒任选地包含,例如,适当的重组融合蛋白(以及用于执行协同治疗的许多此类蛋白的任选的混合物,参见上文),以及一个或多个任选地适当的疾病相关抗原)。另外,此类试剂盒还可以包括用于执行本发明的治疗性和/或预防性处理的适当的赋形剂(例如药物上可接受的赋形剂)。此类试剂盒任选地含有用于组装和/或使用本发明的组合物(包含但不限于稀释剂等)的另外的组分。

[0231] 将本文所述的组合物任选地包装为包含用于执行本发明的方法或使用本发明(任选地包含例如本发明的方法/组合物使用的书面说明)的组合物所有(或几乎所有)必需的组分。例如,试剂盒可以任选地包含如缓冲液、试剂、血清蛋白、抗体、底物等的组分。在预包装的试剂的情况下,试剂盒任选地包含无需测量即可准备并入方法的预测量的或预给量,例如,预测量的液体粘度,或可由试剂盒的终端用户容易地重组的预称或预测量的固体试剂。

[0232] 此类试剂盒还通常包含用于执行本发明的方法和/或使用本发明的组合物的适当说明。在一些实施例中,以稳定的形式提供试剂盒/包装的组分,以防止在延期存储期间的降解或其它损失,例如防止泄漏。许多稳定化工工艺/药剂广泛用于如包含化学稳定剂(即酶抑制剂、杀菌剂/抑菌剂、抗凝剂)等的待存储的试剂等。可以改变本发明的药物组合物中活性成分的实际剂量水平,以便获得对于特定受试者有效实现期望治疗应答的活性成分的量、组合物和施用模式,而对受试者无毒性。所选择的剂量水平将取决于各种药代动力学因素,包含所采用的本发明的特定组合物的活性;施用途径;施用时间;所采用的特定化合物的排泄速率;治疗持续时间;与所采用的特定化合物组合使用的其它药物、化合物和/或材料;所治疗的受试者的年龄、性别、体重、病状、一般健康状况以及先前病史;以及医学领域

中熟知的类似因素。

[0233] 组合物必须是无菌的和流动的,使组合物通过注射器可输送。除了水以外,载体优选地为等渗缓冲盐溶液。可以例如通过使用包衣,如卵磷脂、在分散液的情况下通过维持所需的粒径、以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。在许多情况下,优选地,将等渗剂,例如糖、如甘露醇或山梨醇等多元醇以及氯化钠包含在组合物中。

[0234] 可以改变本发明的药物组合物中活性成分的实际剂量水平以获得对于特定受试者有效实现期望治疗应答的活性成分的量、组合物和施用模式,而对受试者无毒性。所选择的剂量水平将取决于各种药代动力学因素,包含所采用的本发明的特定组合物的活性;施用途径;施用时间;所采用的特定化合物的排泄速率;治疗持续时间;与所采用的特定化合物组合使用的其它药物、化合物和/或材料;所治疗的受试者的年龄、性别、体重、病状、一般健康状况以及先前病史;以及医学领域中熟知的类似因素。

[0235] 尽管本文已经描述和展示了若干个发明实施例,但本领域普通技术人员将容易想到用于执行本文描述的功能和/或获得这些结果和/或这些优点中的一个或多个优点的各种其它装置和/或结构,并且此类变型和/或修改中的每个被认为是在本文所述的发明实施例的范围内。更通常地,本领域的技术人员将容易认识到,本文所述的所有参数、尺寸、材料以及配置意味着是示例性的,并且实际参数、尺寸、材料和/或配置将取决于本发明传授内容所用于的一种或多种具体应用。仅仅使用常规实验,本领域的技术人员将认识到或能够确认本文所述的具体发明实施例的许多等效物。因此,应当理解,前述实施例是仅通过实例方式来介绍的,并且在所附权利要求和其等效物的范围内,本发明实施例可以以与具体描述和要求不同的方式来实践。本公开的发明实施例涉及本文所述的每个单独的特征、系统、物品、材料、试剂盒和/或方法。另外,如果此类特征、系统、物品、材料、试剂盒和/或方法并不相互矛盾,则两个或更多个此类特征、系统、物品、材料、试剂盒和/或方法的任何组合包含在本公开的发明范围内。

[0236] 本文中定义和使用的的所有定义都应当理解为对字典定义的控制、通过引用并入的文档中的定义和/或定义术语的普通含义。

[0237] 本文所公开的所有参考文献、专利和专利申请相对于其各自被引用的主题通过引用并入,在一些情况下,可以涵盖文档的整体。

[0238] 如本文在说明书中使用的,不定冠词“一(a)”和“一个(an)”除非明确作出相反指示,否则应当理解为意指“至少一个”。

[0239] 如本文在说明书中使用的,短语“和/或”应当理解为意指这样联合的要素中的“任一个或两个”,即,要素在一些情况下共同存在而在其它情况下分开存在。用“和/或”列出的多个要素应以相同的方式解释,即,如此连接的要素中的“一个或多个”。除了通过“和/或”从句具体指明的要素之外,还可以任选地存在其它要素,而无论是与具体指出的那些要素相关还是不相关。因此,作为非限制性实例,当结合如“包括”等开放式语言使用时,对“A和/或B”的引用可以:在一个实施例中,仅指A(任选地包含除了B之外的要素);在另一个实施例中,仅指B(任选地包含除了A之外的要素);在又一个实施例中,指A和B两者(任选地包含其它要素);等。

[0240] 如在本说明书和权利要求中所使用的,关于一个或多个要素的清单的短语“至少一个”应当被理解为意指选自要素清单中的任一个或多个要素的至少一个要素、但不一定

包含要素清单内具体列出的每一个要素中的至少一个,并且不排除要素清单中要素的任何组合。此定义还允许可以任选地存在除了在短语“至少一个”所指的要素清单内具体标识的要素之外的要素,而无论是否与具体标识的那些元素相关还是不相关。因此,作为非限制性实例,“A和B中的至少一个”(或等效地,“A或B中的至少一个”,或等效地“A和/或B中的至少一个”)在一个实施例中可以是指至少一个、任选地包含多于一个A,而不存在B(并且任选地包含除了B的要素);在另一个实施例中,可以是指至少一个、任选地包含多于一个B,而不存在A(并且任选地包含除了A的要素);在又一个实施例中,可以是指至少一个、任选地包含多于一个A,以及至少一个、任选地包含多于一个B(并且任选地包含其它要素);等。

[0241] 本发明进一步提供了用于预防、治疗或延迟人的心血管疾病或病状的试剂盒,其中所述试剂盒包括一剂或多剂包括本文公开的用于预防、治疗或延迟心血管疾病或病状的重组融合蛋白的药物组合物,以及如何使用药物制剂或组合物的说明。

[0242] 本发明进一步提供了用于预防、治疗或延迟人的CNS相关的疾病或病状的试剂盒,其中所述试剂盒包括一剂或多剂包括本文公开的用于预防、治疗或延迟心血管疾病或病状的重组融合蛋白的药物组合物,以及如何使用药物制剂或组合物的说明。

[0243] 本发明进一步提供了用于预防、治疗或延迟人体内射血分数保留的心力衰竭的试剂盒,其中所述试剂盒包括一剂或多剂包括本文公开的用于预防、治疗或延迟射血分数保留的心力衰竭的重组融合蛋白的药物组合物,以及如何使用药物制剂或药物组合物的说明。

[0244] 描述以下实例是为了更全面地展示本发明的优选实施例。然而,所述实例决不应该被解释为限制本发明的广泛范围。

[0245] 实例

[0246] 实例1-表达质粒的克隆和构建

[0247] 苏州金唯智生物科技有限公司(GENEWIZ)(中国苏州(Suzhou,China))合成了编码重组融合蛋白的重链(分别命名为具有或不具有Fc突变的序列的NPCFA和NPCF)和轻链(命名为PAL)的DNA序列。根据许可协议从Horizon Discovery(英国剑桥(Cambridge,UK))获得表达载体pCHOGUN。表达质粒的构建如图1所示的那样进行。简而言之,通过限制性酶BfuAI线性化pCHOGUN载体,并在通过NcoI和AscI进行双限制性酶消化后纯化如NPCF、NPCFA和PAL等基因插入片段。按照标准方案连接线性化的pCHOGUN/BfuAI和纯化的基因插入片段,并且然后将其转化到大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中。将DH5 α 细胞铺板并在37°C下过夜孵育。分离并通过限制性酶消化或PCR确认质粒pCHOGUN-NPCF、pCHOGUN-NPCFA和pCHOGUN-PAL。用限制性酶BspEI和PciI消化含有重链插入的质粒(pCHOGUN-NPCF或pCHOGUN-NPCFA),而用限制性酶NgoMIV和PciI消化含有轻链插入的质粒(pCHOGUN-PAL)。在限制性酶消化后,将具有重链插入或轻链插入的片段纯化、连接,并且然后转化到DH5 α 细胞中。通过限制性酶消化和DNA测序识别并确认含有重链插入和轻链插入两者的质粒构建体(pCHOGUN-NPCF+PAL或pCHOGUN-NPCFA+PAL)。

[0248] 实例2-抗体产生、纯化和表征

[0249] 根据许可协议从Horizon Discovery(英国剑桥)获得HD-BIOP3:衍生自CHO K1细胞的谷氨酰胺合成酶无效(GS^{-/-})细胞系。使用可商购的凯杰(Qiagen)质粒试剂盒分离质粒DNA。使用从龙沙集团(Lonza)可商购的电穿孔系统将质粒DNA转染到HD-BIOP3细胞中。将转

染的细胞铺在96孔板中,并使用标准程序使转染的细胞经历池选择。将来自所选池的细胞在125mL摇瓶中培养10-14天,并收集培养基用于抗体纯化。通过蛋白A亲和色谱,之后通过尺寸排阻色谱纯化抗体蛋白,并且然后根据标准方案用SDS-PAGE和蛋白质印迹分析抗体蛋白。

[0250] 图2A展示了本文公开的重组融合蛋白的示意性结构。图2B示出了通过SDS-PAGE分析产生的代表性数据。图2C和2D分别示出了通过对包括HER3/4结合结构域的NRG-1的61-氨基酸活性片段具有特异性的一级抗体(“NRG-1”,明尼苏达州明尼阿波里斯的R&D系统公司)或IgG检测的蛋白质印迹结果。

[0251] 实例3-通过基于SPR的结合测定评定的分子完整性

[0252] 通过评估与HER3蛋白和抗NRG-1抗体的同时结合能力来评定本文公开的重组融合蛋白的分子结构完整性。在用抗His抗体(马萨诸塞州沃尔瑟姆市的赛默飞世尔公司(Thermo Fisher, Waltham, MA)(步骤1)固定,随后注射样品(包含本文公开的重组融合蛋白、本文公开的无Fc突变的重组融合蛋白、抗HER3 mAb(步骤2),以及抗NRG-1抗体(明尼苏达州明尼阿波里斯的R&D系统公司)(步骤3)的传感器芯片上捕获带His标签的HER3重组蛋白(中国北京的义翘神州生物技术有限公司(Sino Biological, Beijing, China))。在步骤1中,通过增加所有6个通道上的信号,可以使His-HER3连接在传感器芯片上可视化。本文公开的重组融合蛋白和无Fc突变的本文公开的重组融合蛋白两者在步骤2中通过与HER3结合并在步骤3中通过与注射的抗NRG-1抗体(Ch1、3)结合产生了明显的应答,从而指示在本文公开的重组融合蛋白上存在HER3结合表位和NRG-1。相比之下,抗HER3 mAb仅与步骤2中的His-HER3结合,而不与抗NRG-1抗体和缓冲液结合(步骤3)(Ch4、5),从而验证了不存在抗HER3 mAb分子的NRG-1结合活性。在步骤2和3注射缓冲液作为空白对照。因此,HER3结合表位和NRG-1两者存在于本发明的重组融合蛋白中。

[0253] 图3中示出了结合传感图和样品注射序列。

[0254] 实例4-体外肿瘤细胞系增殖的影响

[0255] 取决于每个细胞系的生长动力学,将肿瘤细胞以每孔2,500-20,000个细胞接种到96孔板中。然后用本文公开的重组融合蛋白、抗体或对照蛋白以逐步的1:4连续稀释系列处理细胞5天。根据制造商的说明书,使用来自Dojindo Molecular Technologies(日本熊本市(Kumamoto, Japan))的细胞计数试剂盒-8评定细胞活力。用GraphPad Prism软件分析数据,并将数据表示为相对于未经处理的对照的生长速率。

[0256] 图4包含示出了以下不同癌细胞系的平均相对生长速率 \pm SEM($n=3$)的代表性图示:(A)NCI-N87,胃;(B)MCF-7,胸部;(C)RT-112,膀胱;和(D)T47D,胸部。与对照NRG-1和GP120 mAb/NRG-1融合蛋白相比,本文公开的重组融合蛋白在促进癌细胞增殖方面展现出明显较低的活性。

[0257] 实例5-人心肌细胞中PI3K/AKT信号传导途径的激活

[0258] 将来自细胞动力公司(Cellular Dynamics)(威斯康星州麦迪逊市(Madison, WI))的人心肌细胞接种在0.1%明胶包被的96孔板中,并在平板培养基(细胞动力公司)中回收4小时。然后在用于实验之前,将细胞在维持培养基(细胞动力公司)中培养96小时。为了检查本发明的重组融合蛋白激活心肌细胞中HER2:HER4信号传导途径的能力,首先使细胞在无血清培养基中挨饿4小时,并且然后用重组融合蛋白或对照药剂(NRG-1、GP120 mAb/NRG-1、

抗HER3 mAb或GP120 mAb)以逐步1:4连续稀释系列处理15分钟。在处理结束时,将细胞裂解并遵循制造商的说明书,使用艾博抗(Abcam)的磷酸-AKT/总AKT ELISA试剂盒(马萨诸塞州剑桥(Cambridge,MA))分析其AKT磷酸化。用GraphPad Prism软件分析数据,并将数据表示为相对于未经处理的对照的磷酸-AKT与总AKT的比率。

[0259] 为了进行蛋白质印迹分析,将细胞接种在6孔板中并用本发明的重组融合蛋白或对照药剂以16nM的单一浓度处理。在处理结束时,将细胞在含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解缓冲液中裂解。根据标准方案进行SDS-PAGE和蛋白质印迹。分别用AKT抗体和p-AKT(S473)兔抗体(马萨诸塞州丹佛市的Cell Signaling公司(Cell Signaling;Danvers,MA))印迹总AKT和磷酸-AKT。

[0260] 图5示出了对人心肌细胞中的刺激应答的AKT磷酸化。结果表明,本文公开的重组融合蛋白可以以与NRG-1相当的效力激活心肌细胞中的HER2:HER4信号传导途径。

[0261] 实例6:HER2:HER3二聚化和HER2:HER4二聚化的诱导

[0262] 由Eurofins DiscoverX(加利福尼亚州菲蒙市)开发的PathHunter二聚化测定检测对受体-二聚体对的两个亚基进行的配体诱导的二聚化。图6A中展示了测定原理。 β -gal酶分裂成两个片段:ProLink(PK)和酶受体(EA)。细胞已经被工程设计,以共表达与酶供体PK融合的靶蛋白1和与酶受体EA融合的靶蛋白2。配体与一种靶蛋白的结合诱导配体与另一种靶蛋白相互作用,从而迫使两种酶片段互补并且使酶反应释放化学发光信号,所述化学发光信号以相对荧光单位或RFU形式得到检测。

[0263] 从Eurofins DiscoverX获得PathHunter U2OS ErbB2/ErbB4二聚化细胞系和ErbB2/ErbB3二聚化细胞系。将细胞以4,000个细胞/孔接种在384孔板中,并在37°C/5%CO₂下孵育过夜。从28.8nM开始,以逐步的1:4连续稀释系列制备测试剂,并且然后将测试剂添加到384孔板中的细胞中。在孵育4小时后,根据制造商的说明书对细胞进行受体二聚化测定。用GraphPad Prism软件分析数据,并将数据表示为平均RFU \pm SEM(n=3)。

[0264] 如图6B和6C所示,本文公开的重组融合蛋白可以以与NRG-1相当的效力诱导HER2/HER4二聚化;然而,所述重组融合蛋白诱导HER2/HER3二聚化的能力弱得多。作为研究的阴性对照,同种型对照抗体GP120 mAb和抗HER3 mAb都不诱导受体二聚化。

[0265] 已经参考附图描述了本发明的实施例,应当理解,本发明不限于精确的实施例,并且本领域技术人员可以在不脱离所附权利要求书中所定义的本发明的范围或精神的情况下,在其中实现各种改变和修改。

[0266] 实例7:收缩性心力衰竭的大鼠模型中重组融合蛋白的体内功效

[0267] 为了评估重组融合蛋白在疾病模型中再生心脏功能的能力,采用了心肌梗塞和收缩性心力衰竭的Sprague Dawley大鼠模型。为了建立疾病模型,在外科手术中使用6-0丝缝线结扎左心耳下方3-4mm的左前降支冠状动脉(LAD)。在结扎后四周,在手术前通过M型超声心动图(ECG)多普勒超声记录射血分数(EF),以测量针对基线EF的心脏功能。EF最低降低30%的阈值用于包含在随后的研究中。假对照动物在没有LAD结扎的情况下经历了相同的手术。

[0268] 在建立疾病模型后,将动物分为五组,每组十一只大鼠,其中第六组包含另外的十只假手术大鼠。设计所述研究用于使每组接受为期四周每周两次的尾静脉注射,或总计八次注射。假手术组和媒剂组的阴性对照两者均接受了生理盐水,三个组接受了1mg/kg、3mg/

kg或10mg/kg的重组融合蛋白,并且最后一组接受了GP120 mAb/NRG-1融合蛋白(10mg/kg)的阳性对照。

[0269] 由于在研究期间观察到体重减轻,因此在重组融合蛋白组接受3mg/kg和10mg/kg的八次注射的完整序列之前中断处理,其中那些组分别仅接受了六次和三次注射。所有其它组接受了全套八次注射。

[0270] 在首次处理后四周,通过M型ECG再次测量EF。如图8所示,相对于基线,重组融合蛋白在所有三个剂量组中均显著地增加了EF。具体地,在1mg/kg、3mg/kg和10mg/kg组中分别观察到增加了14.7% ($P<0.001$)、26.9% ($P<0.001$)和36.6% ($P<0.001$)。在匹配的时间点,GP120 mAb/NRG-1阳性对照将EF增加了28.8% ($P<0.001$)。盐水在假对照组或媒剂对照组中均无作用。

[0271] 在处理28天后收集ECG值后,对小鼠实施安乐死并收集手术部位附近的心脏组织,将心脏组织固定在4%甲醛中并且包埋在石蜡中。用苏木精和曙红染料对心脏组织的5 μ m厚石蜡切片染色,并在光学显微镜下观察组织病理学变化。如图9所示,在假手术组中,将心肌细胞以有序方式排列,并将细胞质和心肌纤维均匀染色。在间质间隙中未观察到炎性细胞浸润,并且未发现心肌坏死。相比之下,在媒剂对照组中,心肌梗塞边缘区的心肌细胞之间表现出间隙变宽;细胞核被压缩和破碎,并且心肌纤维排列失去了其有序的结构;细胞大小增大,并注意到间质水肿。用重组融合蛋白进行的处理部分地减轻了心肌梗塞区的病理变化,包含坏死细胞的显著减少、心肌细胞之间间质间隙的变窄以及心肌纤维排列朝正常结构恢复。

[0272] 实例8:在NOD/SCID小鼠中的皮下FaDu癌异种移植模型中重组融合蛋白减弱了肿瘤生长

[0273] 为了评估重组融合蛋白在促进肿瘤生长方面的潜在风险,在FaDu癌异种移植模型中进行了体内研究。根据机构指南,在中美冠科国际研发中心(CrownBio international R&D center)(中国北京(Beijing,China))的SPF设施中保持NOD/SCID小鼠(北京AK生物技术有限公司(Beijing AK Bio-Technology Co.Ltd.))。根据实验室动物护理评定和鉴定委员会(AAALAC)的要求并且在获得CrownBio IACUC委员会的许可的情况下执行所有实验。

[0274] 将7-10周的雌性NOD/SCID小鼠的右腹在皮下接种悬浮在0.1ml PBS中的FaDu肿瘤细胞(3×10^6)。当肿瘤达到大约150mm³时,将小鼠随机化并分为6个研究组,其中每组8只动物。连续三周每周两次通过尾静脉注射静脉内施用测试样品,总计6次处理。通过卡尺测量监测肿瘤生长。在处理21天后终止研究。

[0275] 图10总结了对不同处理应答的肿瘤生长。10mg/kg的抗HER3 mAb示出了显著的抗肿瘤活性,其中在研究结束时的肿瘤生长抑制(TGI)为93.5% (相对于媒剂组, $p<0.001$)。在研究结束时,重组融合蛋白还展现出统计学上显著的TGI:在1mg/kg剂量时,为19.2% (相对于媒剂组, $p=0.048$),并且在10mg/kg剂量时,为56.2% (相对于媒剂组, $p<0.001$)。对照分子GP120 mAb/NRG-1融合蛋白在高剂量或低剂量下均未示出抗肿瘤活性。在研究期间未发生动物死亡。荷瘤小鼠对所有测试剂良好耐受。在任何实验组中均未观察到明显的体重减轻(图11)。这些数据示出,在体内活性肿瘤生长的条件下,重组融合蛋白以剂量依赖的方式表现出肿瘤生长抑制,并表明重组融合蛋白增强或加速体内肿瘤生长的风险低于天然NRG-1蛋白增强或加速体内肿瘤生长的风险。

[0276] 实例9:在施用重组融合蛋白的食蟹猴中未观察到明显的胃肠毒性

[0277] 先前有报道称,在受试者接受了安慰剂或单剂量的cimaglermin(全长重组NRG-1 β 3)的施用的第一阶段临床研究(NCT01258387)中,恶心和腹泻是第二和第四大最常见的治疗中突出的不良事件,在合计的高剂量组群中发生率分别为40%和27%(Lenihan等人《美国心脏病学会杂志:基础与转化科学(J Am Coll Cardiol Basic Trans Science)》2016;1(7):576-86)。类似地,在重组NRG-1肽片段(纽卡定(neucardin))的第二阶段研究中,恶心是最常观察到的治疗相不良事件,在20%的研究受试者中可见(Jabbour等人《欧洲心力衰竭杂志(European Journal of Heart Failure)》(2011)13:83-92)。最后,在纽卡定(ChiCTR-TRC-00000414)的第二个第二阶段研究中,已发表的结果表明,观察到48.4%的不良事件中本质上是胃肠不良事件,是此研究中最常观察到的不良事件类型,并且与剂量水平相关(Gao等人《美国心脏病学会杂志(J Am Coll Cardiol)》2010;55:1907-14)。

[0278] 进行了两项研究以评估重组融合蛋白在食蟹猴(食蟹猕猴(Macaca fascicularis))中的安全性和耐受性:单剂量非GLP(良好实验室实践)研究和重复剂量GLP研究。密切监测胃肠毒性。在单剂量研究中,与媒介剂对照相比,以10mg/kg、30mg/kg和60mg/kg的剂量水平评估了重组融合蛋白的安全性和耐受性,其中每个组群中包含一只雄性动物和一只雌性动物。在此单剂量研究中,在整个处理后的两周评估期内,无对体重或定性的食物评估的测试剂相关的影响,并且未观察到呕吐或腹泻。在重复剂量GLP研究中,与媒介剂对照相比,在连续四周每周一次以3mg/kg、10mg/kg和30mg/kg的剂量水平进行施用后,评估了重组融合蛋白的安全性和耐受性,其中在主要的28天研究期内,每个组群中包含三只雄性和三只雌性,并且在30mg/kg中包含另外的两只雄性和两只雌性,并在随后的28天恢复期后评估了媒介剂对照组群。在此重复剂量研究中未观察到对食物消耗的测试剂相关的影响。尽管在此重复剂量研究中观察到测试剂相关的呕吐,但呕吐的临床观察仅与注射反应相关联,仅在10mg/kg组群中的一只动物(17%)和在30mg/kg组群中的两只动物(20%)中观察到呕吐,并且呕吐本质上是暂时的。仅在媒介剂对照组群和30mg/kg重组融合蛋白组群中观察到腹泻,分别在一只动物(10%)和三只动物(30%)动物中观察到腹泻,并且认为对于这种类型的程序,腹泻是正常的并且与重组融合蛋白无关。最后,在此重复剂量研究中,仅在10mg/kg和30mg/kg剂量水平下并且仅在10mg/kg组群中的第四剂量和30mg/kg组群中的第三剂量和第四剂量之后,使平均体重相对于基线降低了>10%。综上所述,除了在急性输注反应期间以外,用重组融合蛋白进行的处理没有导致与食物摄入有关的任何临床上有意义的发现、呕吐或腹泻,并且胃肠发现在任一研究中对确定非不良事件水平没有影响。这些结果指示重组融合蛋白的设计减轻了NRG-1重组蛋白对胃肠道的不利影响。

[0279] 在不同时间点施用60mg/kg单剂量的重组融合蛋白后,从食蟹猴收集血液样品(~1ml),并提取血清并储存在-80°C下直到进行测试。根据标准程序,通过捕获ELISA测定了血清样品中重组融合蛋白的浓度。简而言之,将96孔板用重组人HER3蛋白(R&D系统公司)包被,用BSA封闭并与测试样品一起孵育。在多次清洗后,将板与结合了HRP的抗人IgG Fc抗体孵育,并且然后用TMB底物进行检测。图12示出了重组融合蛋白的药代动力学分布类似于IgG抗体。

[0280] 实例10:Fc受体结合的动力学常数的总结

[0281] 使用无标记SPR技术测量重组抗HER3 mAb/NRG-1融合蛋白与Fc受体之间的结合亲

和力。分别针对重组融合蛋白、无Fc突变的重组融合蛋白和抗HER3抗体分析了总计六个Fc受体(每个受体均与His标签融合),包含Fc γ RI(艾博抗)、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa(158F)、Fc γ RIIIa(158V)和C1q(义翘神州生物技术有限公司)。通过亲和色谱法纯化所有Fc受体和测试样品。用HBS-EP+(10mM HEPES,150mM NaCl,3mM EDTA和0.05%v/v表面活性剂P20)作为运行缓冲液在Biacore 8K系统(通用电气医疗公司)上执行所有实验。具体地,通过氨基偶联法将抗His抗体偶联在CM5传感器芯片的活性流动池和参考流动池中。通过与固定的抗His抗体结合,在每个单独的通道的活性流动池上捕获纯化的带His标签的Fc受体。每个Fc受体的捕获水平维持在80-120RU之间。为了进行动力学分析,将重组融合蛋白和所有其它样品连续稀释到在0.3nM到30nM范围内的总计6种浓度,并依次通过每个通道中的两个流动池注入系列稀释液。通过在多个通道上同时注入样品,在同一运行中完成多次分析。

[0282] 使用Biacore 8K评估软件将所得传感图用二态结合模型拟合,以提取动力学常数。下表1总结了所有分析的平衡解离速率(KD)。与Fc γ RI、Fc γ RIIa和Fc γ RIIb结合的重组融合蛋白的动力学衍生KD值比无Fc突变的重组融合蛋白和抗HER3抗体的值大10倍以上,这指示重组融合蛋白的Fc区内的特定突变使亲和力低得多。在Fc γ RIIIa(158F)和Fc γ RIIIa(158V)的情况下,Fc突变使重组融合蛋白的结合亲和力降低2到3倍。对于所有样品,与C1q的结合太弱,以致于无法检测。

[0283] 为了确认重组融合蛋白具有有限的Fc效应子功能,使用来自普洛麦格(威斯康星州麦迪逊市)的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)报告基因生物测定检查ADCC。所述测定使用工程设计的Jurkat细胞系作为效应子细胞,所述效应子细胞稳定地表达Fc γ RIIIa(V158)受体和驱动萤火虫荧光素酶表达的NFAT应答元件。利妥昔单抗作为测定的阳性对照示出了对CD20阳性Raji细胞的强ADCC活性;然而,重组融合蛋白不具有针对HER3阳性靶细胞(MCF7或BT474)的可检测ADCC(数据未示出)。

[0284] 表1:关于Fc受体结合的动力学常数的总结

Fc 受体	KD (M)		
	抗 HER3 mAb/NRG-1	抗 HER3 mAb/NRG-1 (无 Fc 突变)	抗 HER3 mAb
[0285] Fc γ RI	1.03E-08	2.81E-09	4.56E-09
Fc γ RIIa	1.35E-06	3.95E-07	1.50E-07
Fc γ RIIb	1.52E-06	1.03E-07	1.04E-08
Fc γ RIIIa (158F)	1.18E-07	6.37E-08	1.66E-07
Fc γ RIIIa (158V)	9.10E-08	3.41E-08	3.80E-08
C1q	< LOD*	< LOD*	< LOD*

[0286] *<LOD-由于弱结合而低于检测极限(LOD)。

245 250 255
 Pro Arg Cys Pro Gln Pro Leu Val Tyr Asn Lys Leu Thr Phe Gln Leu
 260 265 270
 Glu Pro Asn Pro His Thr Lys Tyr Gln Tyr Gly Gly Val Cys Val Ala
 275 280 285
 Ser Cys Pro His Asn Phe Val Val Asp Gln Thr Ser Cys Val Arg Ala
 290 295 300
 Cys Pro Pro Asp Lys Met Glu Val Asp Lys Asn Gly Leu Lys Met Cys
 305 310 315 320
 Glu Pro Cys Gly Gly Leu Cys Pro Lys Ala Phe
 325 330
 <210> 2
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 2
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 [0002] Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Glu Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Lys Trp Thr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ala Val

	100	105	110	
	Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp			
	115	120	125	
	Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn			
	130	135	140	
	Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu			
	145	150	155	160
	Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp			
	165	170	175	
	Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr			
	180	185	190	
	Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser			
	195	200	205	
	Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
	210	215	220	
	<210> 4			
	<211> 61			
	<212> PRT			
	<213> 智人 (Homo sapiens)			
	<400> 4			
	Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn			
	1	5	10	15
[0004]	Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr			
	20	25	30	
	Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr			
	35	40	45	
	Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gln			
	50	55	60	
	<210> 5			
	<211> 10			
	<212> PRT			
	<213> 人工 (Artificial)			
	<220>			
	<223> 甘氨酸-丝氨酸连接子			
	<400> 5			
	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser			
	1	5	10	
	<210> 6			
	<211> 1614			
	<212> DNA			
	<213> 智人 (Homo sapiens)			
	<400> 6			
	atggagtttg ggctgagctg ggttttcctt gttgctataa taaaagggtgt ccagtgtcag		60	
	gtgcagctgc agcagtgagg agctggactg ctgaagccaa gcgagaccct gtctctgaca		120	
	tgcgccgtgt acggaggatc ctccagcgga tactattggt cttggatcag gcagccacct		180	

ggcaagggac tggagtggat cggcgagatc aaccactctg gctccaccaa ctacaatccc	240
tctctgaagt cccgggtgac catctccgtg gagacaagca agaatcagtt ttcctgaag	300
ctgtccagcg tgaccgcegc tgacacagcc gtgtactatt gcgctaggga caagtggacc	360
tggatattcg atctgtgggg aaggggcacc ctggtgacag tgtcttccgc ctctacaag	420
ggcccccccg tgtttctct ggtccaage tctaagagca cctctggagg aacagccgct	480
ctgggatgtc tggngaagga ttacttccct gagccagtga ccgtgagctg gaactctggc	540
gccctgacct cggagtgca tacatttccc gctgtgctgc agtccagcgg cctgtatagc	600
ctgtcttccg tggtagccgt gcctagctct tccctgggca cccagacata catctgcaac	660
gtgaatcaca agccctcaa tacaagggtg gacaagagag tggagcctaa gagctgtgat	720
aagaccata catgcccacc atgtccagct cctgagctgc tgggaggacc ttccgtgttc	780
ctgtttctc caaagccaaa ggacaccctg atgatctctc gcaccctga ggtgacatgc	840
gtggtggtgg acgtgtccca cgaggatcca gaggtgaagt tcaactggta cgtggatggc	900
gtggaggtgc ataatgctaa gaccaagcct agggaggagc agtacaacag cacctatcgg	960
gtggtgtctg tgetgacagt gctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc	1020
aaggtgagca ataagccct gccagctccc atcgagaaga ccatctctaa ggccaagggc	1080
cagcccagag agcctcaggt gtataactg cccctagcc gcgaggagat gaccaagaac	1140
caggtgtctc tgacatgtct ggtgaaggc ttctaccat ctgacatcgc tgtggagtgg	1200
gagccaatg gccagcccga gaacaattat aagaccacac caccctgct ggactccgat	1260
ggcagcttct ttctgtact caagetgacc gtggataaga gcaggtggca gcaggccaac	1320
gtgttttct gcagcgtgat gcacaggcc ctgcacaate attatacaca gaaatctctg	1380
tcctgagcc caggcaaggg aggaggagga agcggaggag gaggcagctc tcctctggtg	1440
aagtgtctg agaaggagaa gaccttctgc gtgaacggcg gcgagtgttt tatggtgaag	1500
[0005] gacctgtcta atccatccag atacctgtgc aagtgtccca acgagttcac aggcgatcgc	1560
tgccagaatt acgtgatgac ctctttttat aaggctgagg agctgtacca gtaa	1614
<210> 7	
<211> 1614	
<212> DNA	
<213> 智人 (Homo sapiens)	
<400> 7	
atggagtttg ggctgagctg ggttttctt gttgctataa taaaagggtg ccagtgtcag	60
gtcagctgc agcagtgggg agctggactg ctgaagccaa gcgagaccct gtctctgaca	120
tgcccgctgt acggaggatc cttcagcggg tactattggt cttggatcag gcagccacct	180
ggcaagggac tggagtggat cggcgagatc aaccactctg gctccaccaa ctacaatccc	240
tctctgaagt cccgggtgac catctccgtg gagacaagca agaatcagtt ttcctgaag	300
ctgtccagcg tgaccgcegc tgacacagcc gtgtactatt gcgctaggga caagtggacc	360
tggatattcg atctgtgggg aaggggcacc ctggtgacag tgtcttccgc ctctacaag	420
ggcccccccg tgtttctct ggtccaage tctaagagca cctctggagg aacagccgct	480
ctgggatgtc tggngaagga ttacttccct gagccagtga ccgtgagctg gaactctggc	540
gccctgacct ctggagtgca tacatttccc gctgtgctgc agtccagcgg cctgtatagc	600
ctgtcttccg tggtagccgt gcctagctct tccctgggca cccagacata catctgcaac	660
gtgaatcaca agccctcaa tacaagggtg gacaagagag tggagcctaa gagctgtgat	720
aagaccata catgcccacc atgtccagct cctgagttcc tgggaggacc tgcctgttcc	780
ctgtttctc caaagccaaa ggacaccctg atgatctctc gcaccctga ggtgacatgc	840
gtggtggtgg acgtgtccca cgaggatcca gaggtgaagt tcaactggta cgtggatggc	900
gtggaggtgc ataatgctaa gaccaagcct agggaggagc agtacaacag cacctatcgg	960

gtgggtgtctg tgctgacagt gctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc	1020
aaggtgagca ataagggcct gccagctccc atcgagaaga ccatctctaa ggccaagggc	1080
cagcccagag agcctcaggt gtatacactg ccccctagcc gcgaggagat gaccaagaac	1140
caggtgtctc tgacctgtct ggtgaagggc ttctacccat ctgacatcgc tgtggagtgg	1200
gagtccaatg gccagcccga gaacaattat aagaccacac caccctgtct ggactccgat	1260
ggcagcttct ttctgtactc caagctgacc gtggataaga gcaggtggca gcagggcaac	1320
gtgttttct gcagcgtgat gcacgaggcc ctgcacgctc attatacaca gaaatctctg	1380
tcctgagcc caggcaaggg aggaggagga agcggaggag gaggcagctc tcatctggtg	1440
aagtgtgctg agaaggagaa gacctctgc gtgaacggcg gcgagtgtt tatggtgaag	1500
gacctgtcta atccatccag atacctgtgc aagtgtccca acgagttcac aggcgatcgc	1560
tgccagaatt acgtgatggc ctctttttat aaggctgagg agctgtacca gtaa	1614
<210> 8	
<211> 723	
<212> DNA	
<213> 智人 (Homo sapiens)	
<400> 8	
atggtgttgc agaccaggt cttcatttct ctgttctct ggatctctgg tgcctacggg	60
gacatcgaga tgaccagtc tccagattcc ctggcctga gcctgggaga gagggctaca	120
atcaactgcc ggtccagcca gtctgtgctg tactcttcca gcaacaggaa ttacctggcc	180
tggtatcagc agaatcccgg ccagcccct aagctgctga tctattgggc tagcaccaga	240
gagtctggag tgcctgaccg cttctctgga tccggaagcg gcacagactt caccctgaca	300
atctcttccc tgcaggccga ggacgtggcc gtgtactatt gccagcagta ttactctacc	360
[0006] cctaggacat tgggccaggg caccaagtg gagatcaagc ggacagtggc cgctccatcc	420
gtgttcatct ttccaccctc cgacgagcag ctgaagtccg gaaccgctag cgtgggtgtc	480
ctgctgaaca acttctacce aagagaggcc aaggtgcagt ggaagtgga taacgctctg	540
cagagcggca attctcagga gtccgtgacc gagcaggaca gcaaggattc tacatattcc	600
ctgactcta ccctgacct gtccaaggcc gattacgaga agcacaaggt gtatgcttgc	660
gaggtgacc atcagggcct gtccagcccc gtgacaaaga gttcaaccg cggcgagtgt	720
taa	723
<210> 9	
<211> 537	
<212> PRT	
<213> 智人 (Homo sapiens)	
<400> 9	
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Ile Lys Gly	
1 5 10 15	
Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys	
20 25 30	
Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe	
35 40 45	
Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu	
50 55 60	
Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro	
65 70 75 80	
Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Glu Thr Ser Lys Asn Gln	

				85					90				95					
	Phe	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr		
				100					105				110					
	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Lys	Trp	Thr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Leu	Trp	Gly	Arg		
				115					120				125					
	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val		
				130					135				140					
	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala		
	145							150				155			160			
	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser		
								165				170			175			
	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val		
				180					185				190					
	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro		
				195					200				205					
	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys			
				210					215				220					
	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp		
	225							230				235			240			
	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly		
								245				250			255			
	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile		
[0007]				260					265				270					
	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu		
				275					280				285					
	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His		
				290					295				300					
	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg		
	305							310				315			320			
	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys		
								325				330			335			
	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu		
				340					345				350					
	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr		
				355					360				365					
	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu		
				370					375				380					
	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp		
	385							390				395			400			
	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val		
								405				410			415			
	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp		
				420					425				430					
	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His		
				435					440				445					

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455 460
 Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser His Leu Val
 465 470 475 480
 Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys
 485 490 495
 Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys
 500 505 510
 Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser
 515 520 525
 Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gln
 530 535
 <210> 10
 <211> 537
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 10
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Ile Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys
 20 25 30
 Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe
 [0008] 35 40 45
 Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Glu Thr Ser Lys Asn Gln
 85 90 95
 Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Ala Arg Asp Lys Trp Thr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg
 115 120 125
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 130 135 140
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 145 150 155 160
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 165 170 175
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 180 185 190
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 195 200 205
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 210 215 220

<213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 16
 His Phe Lys Pro Cys Arg Asp Lys Asp Leu Ala Tyr Cys Leu Asn Asp
 1 5 10 15
 Gly Glu Cys Phe Val Ile Glu Thr Leu Thr Gly Ser His Lys His Cys
 20 25 30
 Arg Cys Lys Glu Gly Tyr Gln Gly Val Arg Cys Asp
 35 40
 <210> 17
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 17
 His Glu Glu Pro Cys Gly Pro Ser His Lys Ser Phe Cys Leu Asn Gly
 1 5 10 15
 Gly Leu Cys Tyr Val Ile Pro Thr Ile Pro Ser Pro Phe Cys Arg Cys
 20 25 30
 Val Glu Asn Tyr Thr Gly Ala Arg Cys Glu
 35 40
 <210> 18
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> EGF 样结构域共有序列
 <400> 18
 Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Glu Cys Phe Met Val
 1 5 10 15
 Lys Asp Leu Ser Asn Pro
 20

[0013]

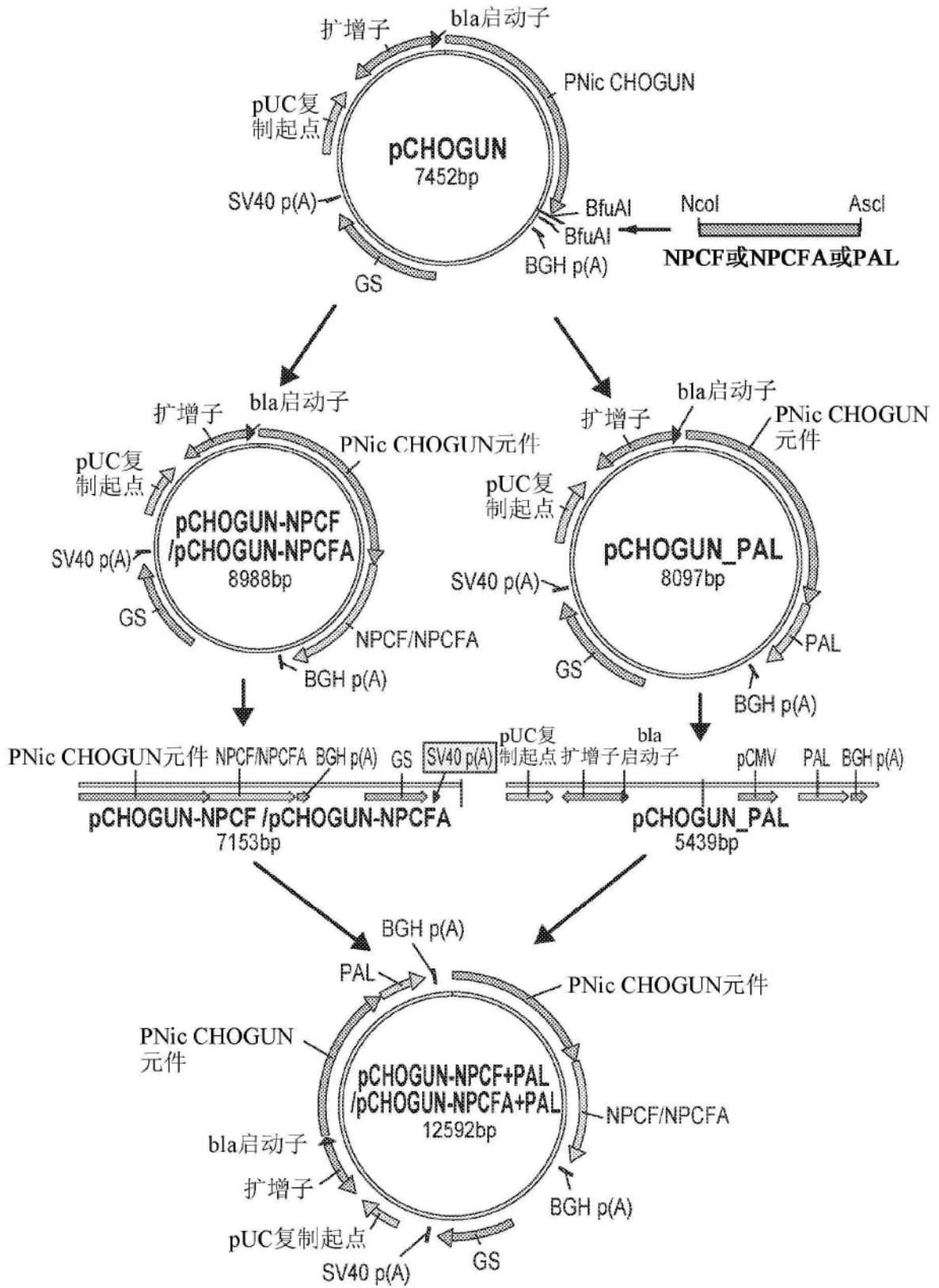


图1

抗HER3 mAb/NRG-1
融合蛋白的分子示意图

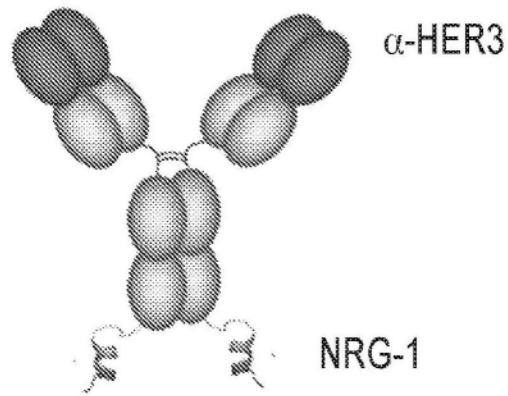


图2A

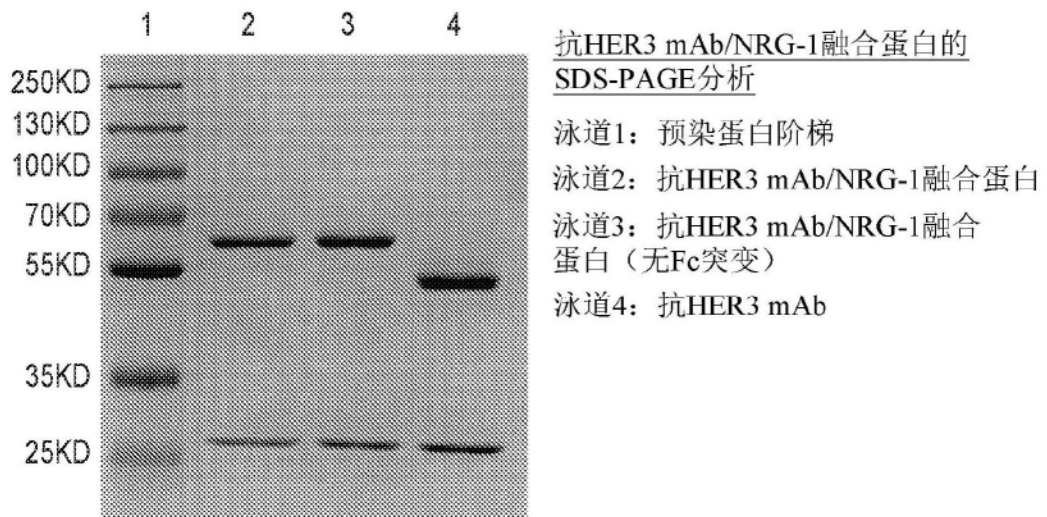


图2B

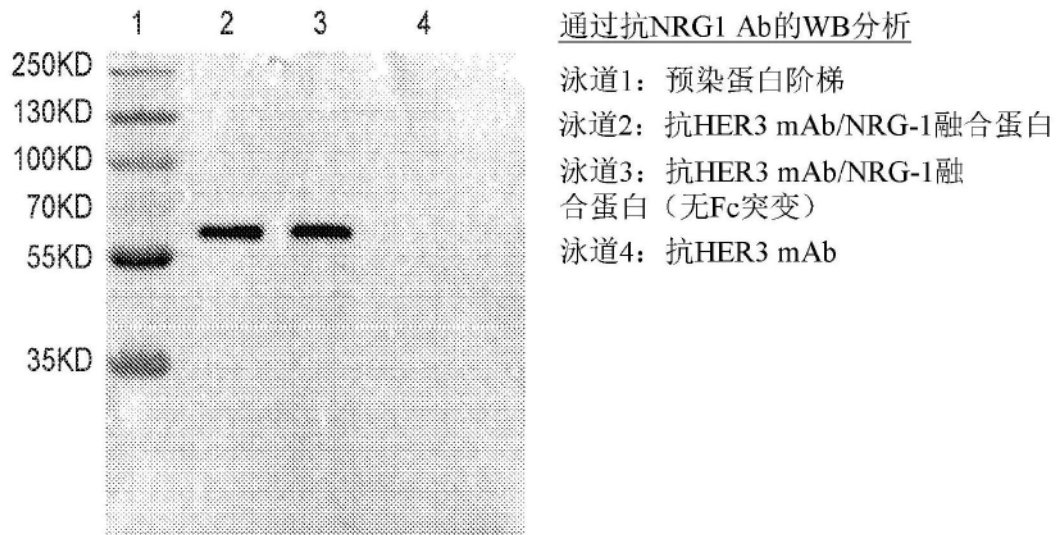


图2C

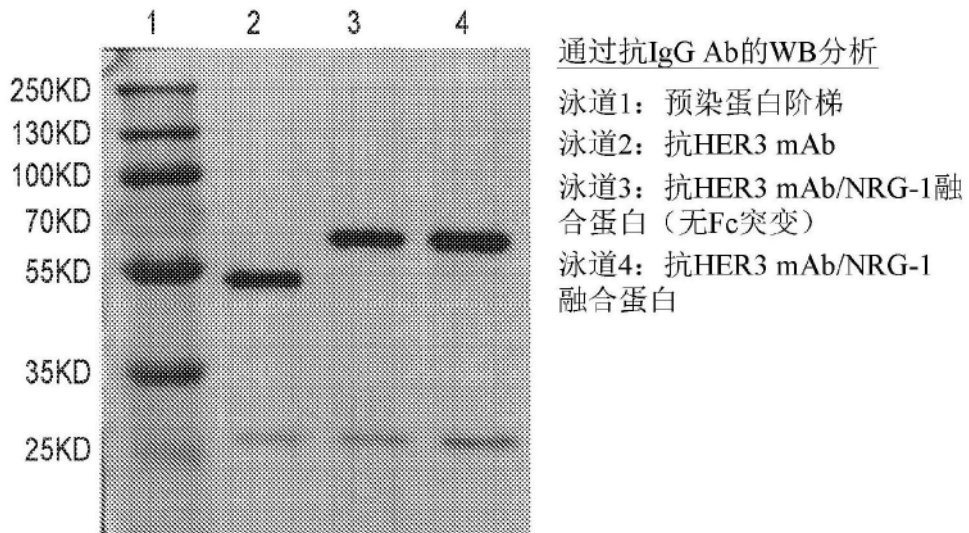
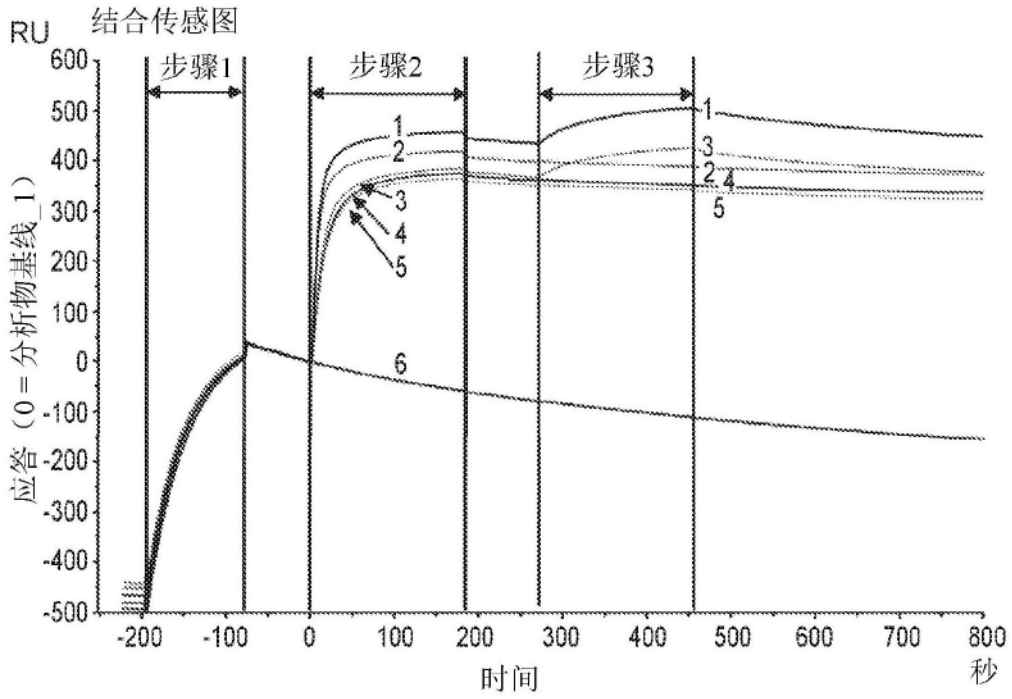


图2D



样品描述

曲线	样品		
	步骤1	步骤2	步骤3
1	HER3	抗HER3 mAb/NRG-1融合物	抗NRG1 mAb
2	HER3	抗HER3 mAb/NRG-1融合物	缓冲液
3	HER3	抗HER3 mAb/NRG-1融合物 (无Fc突变)	抗NRG1 mAb
4	HER3	抗HER3 mAb	抗NRG1 mAb
5	HER3	抗HER3 mAb	缓冲液
6	HER3	缓冲液	缓冲液

图3

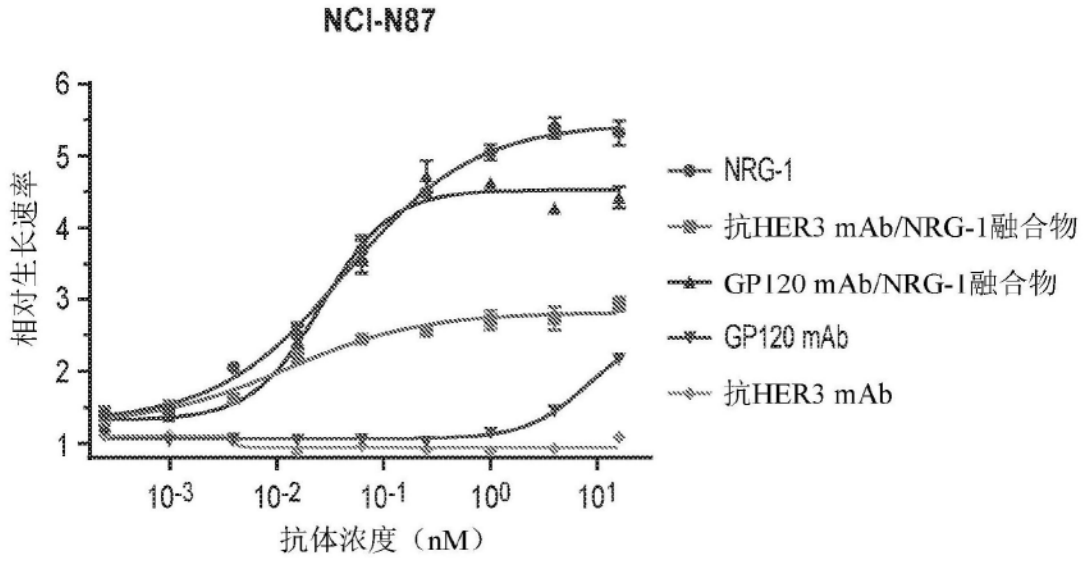


图4A

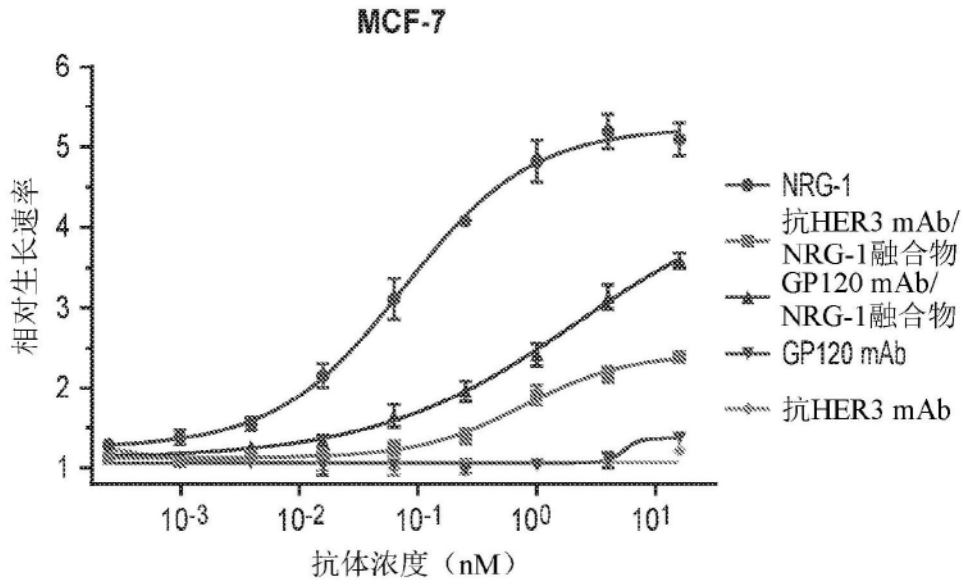


图4B

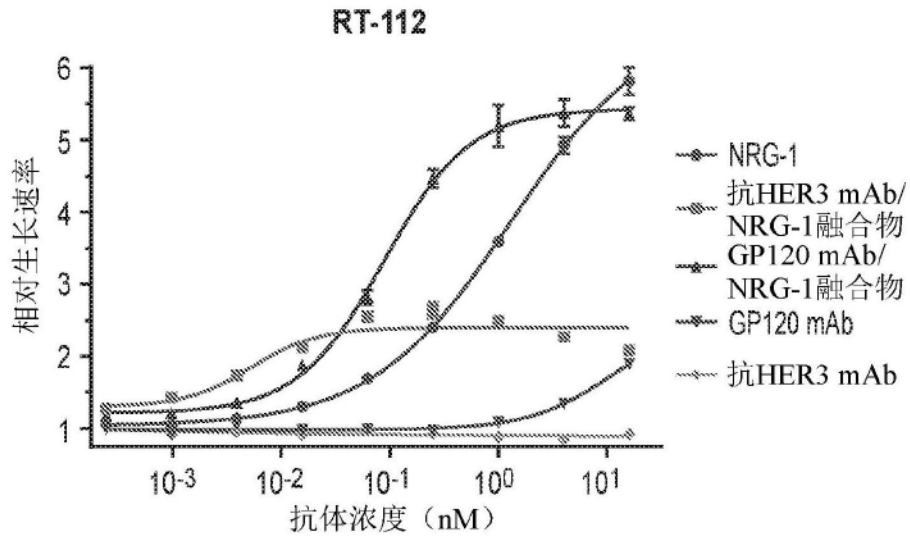


图4C

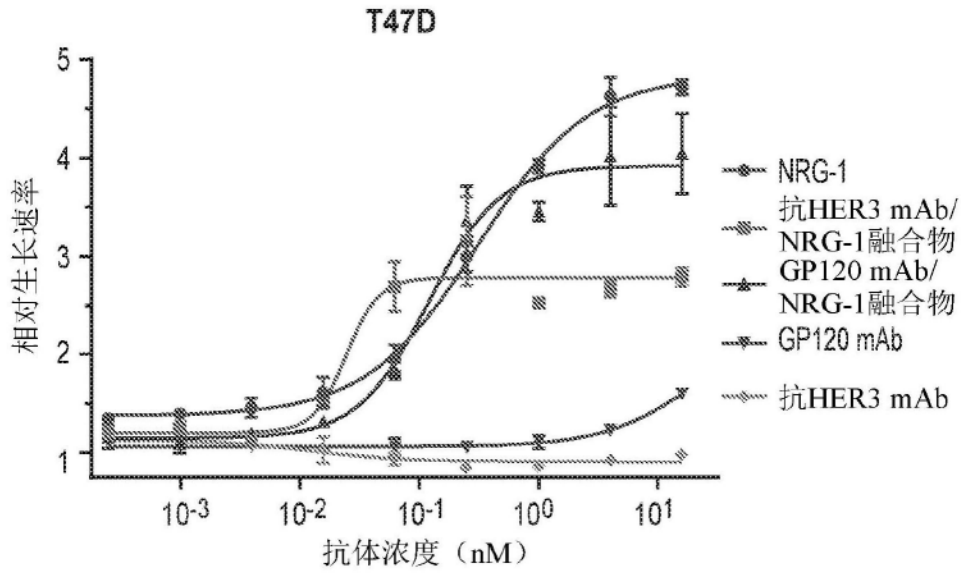


图4D

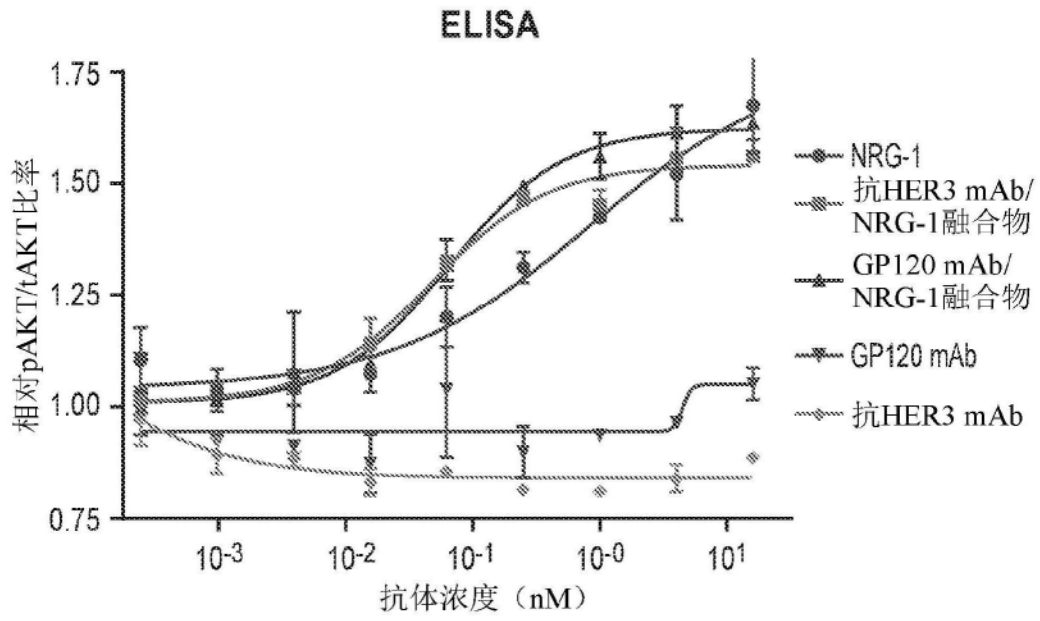


图5A

AKT磷酸化的WB分析

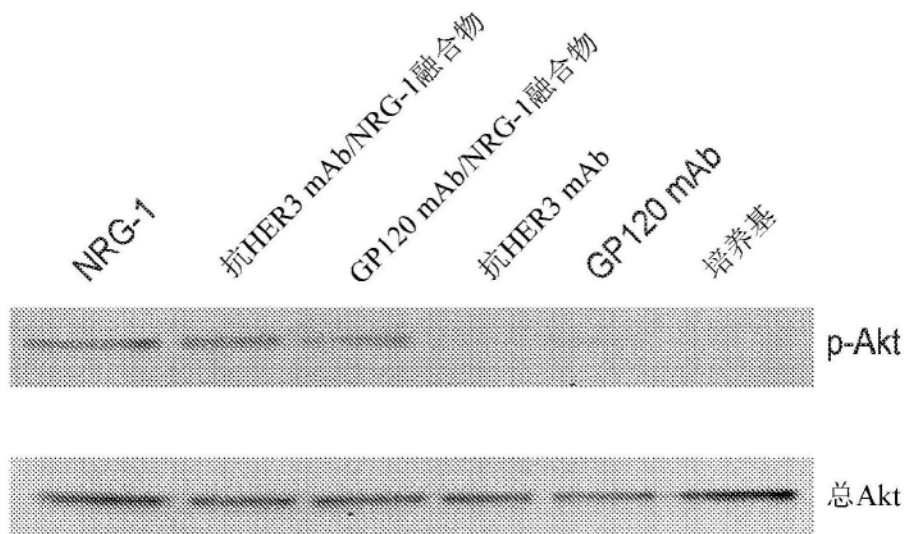


图5B

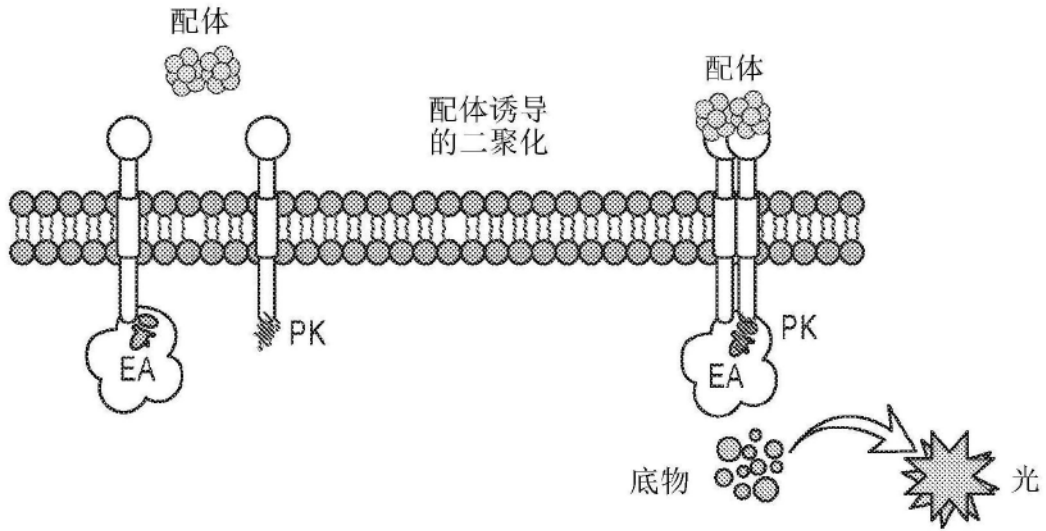


图6A

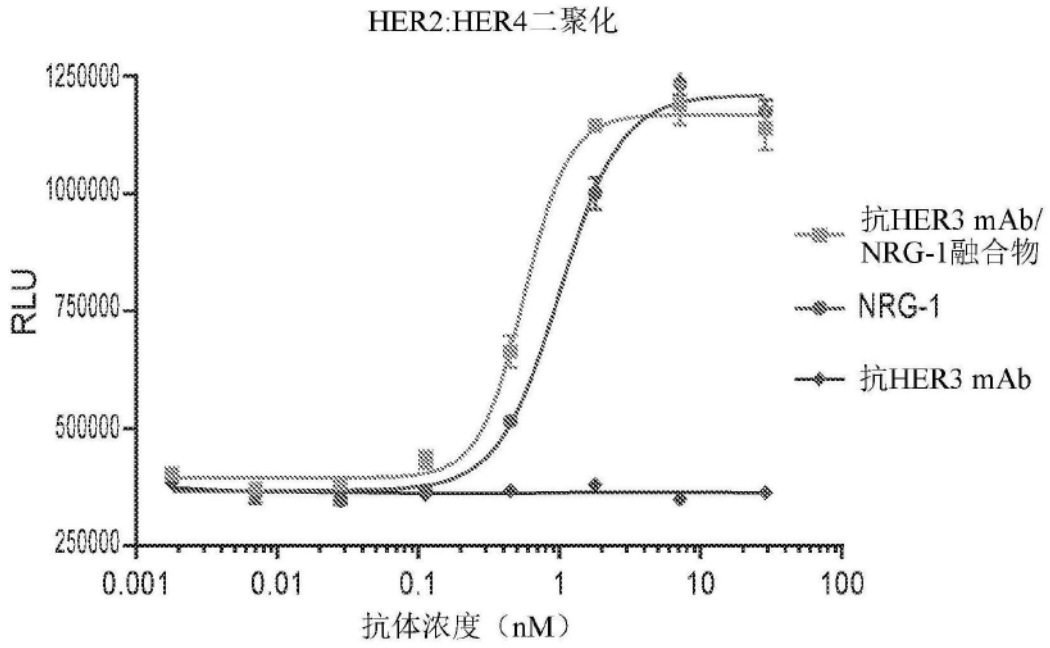


图6B

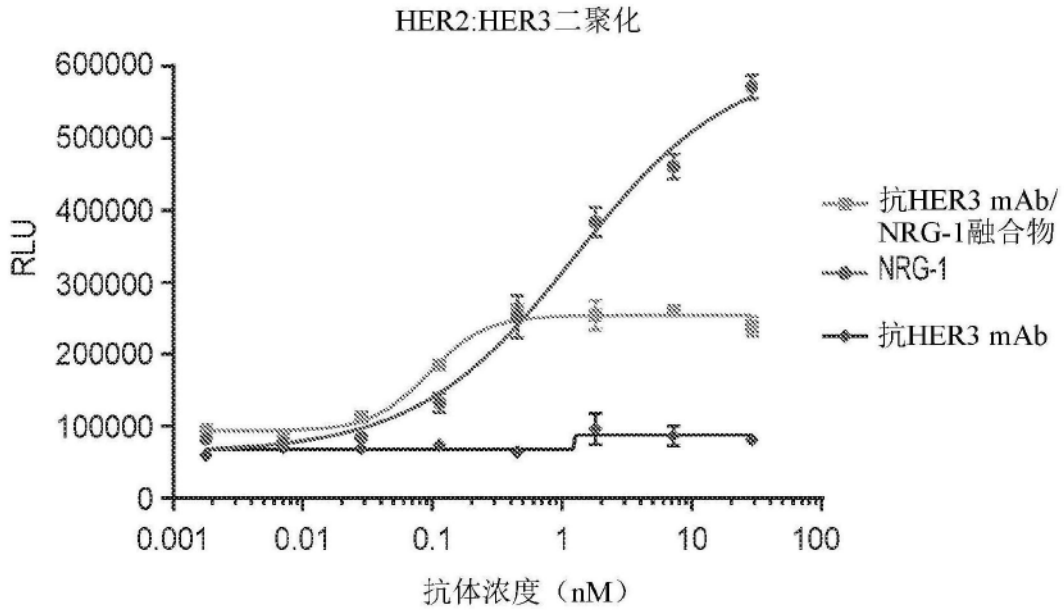


图6C

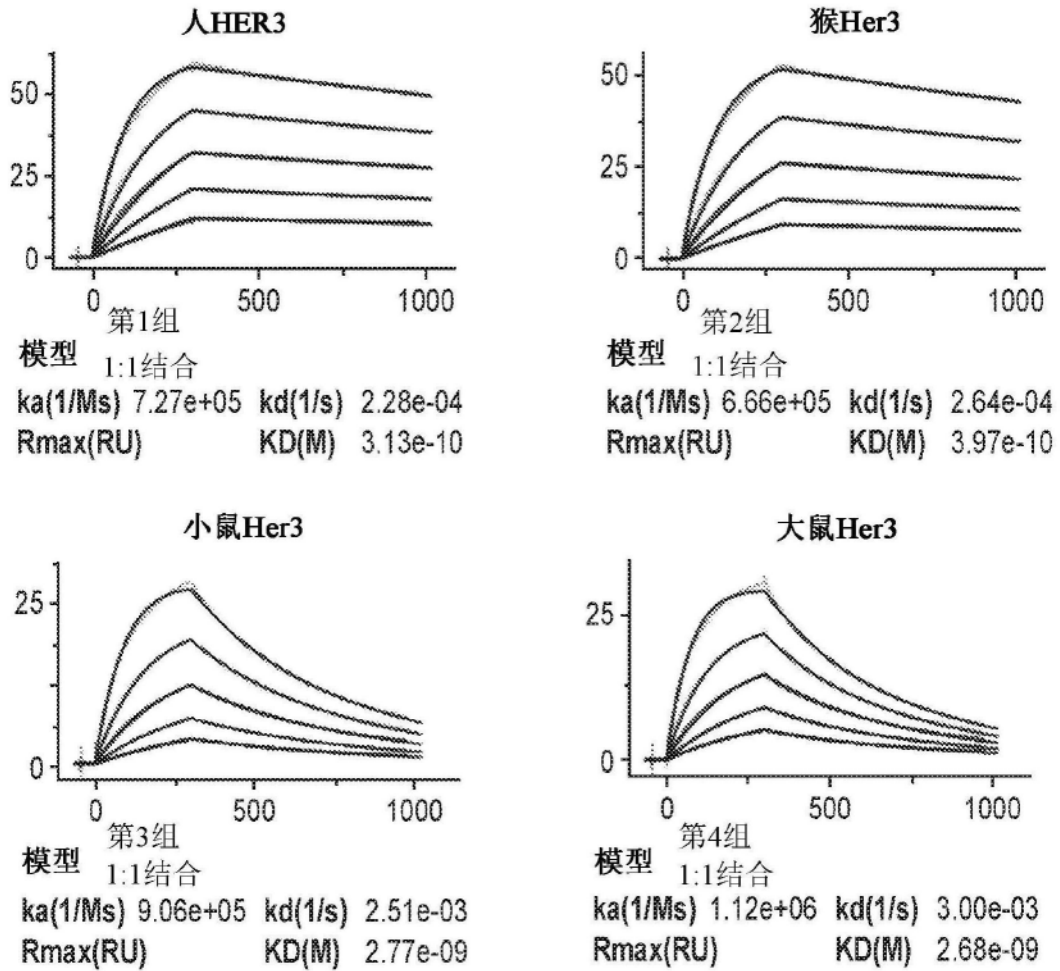


图7

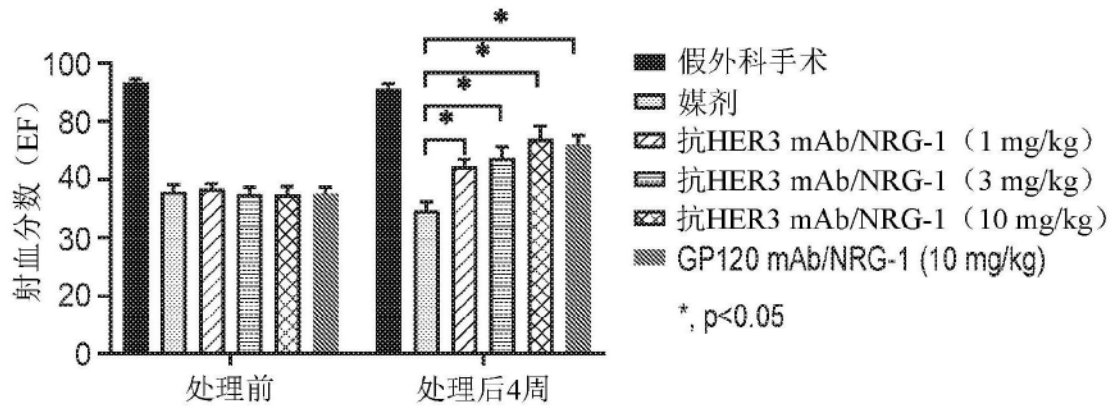


图8

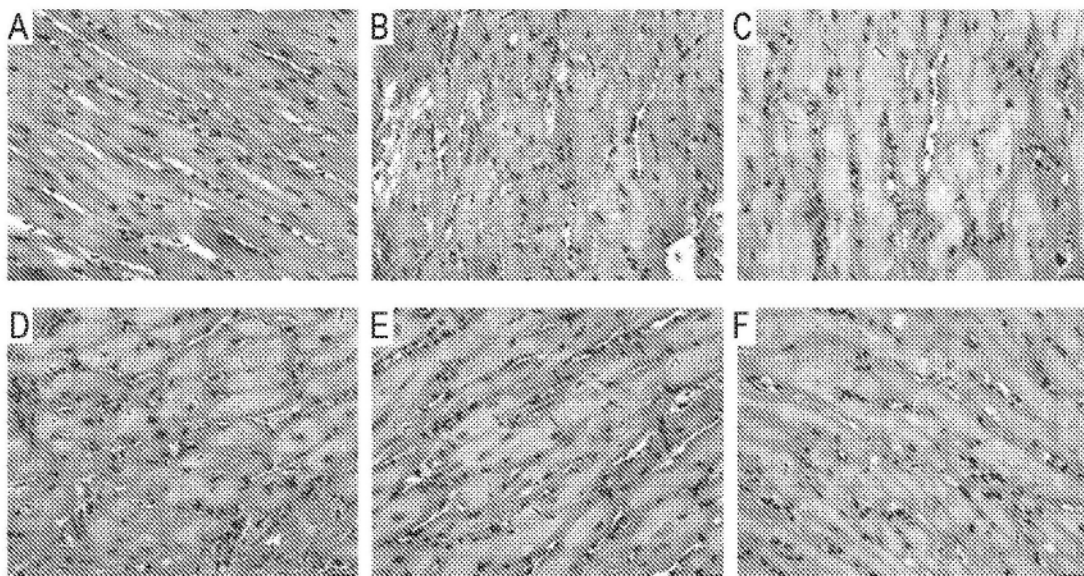


图9

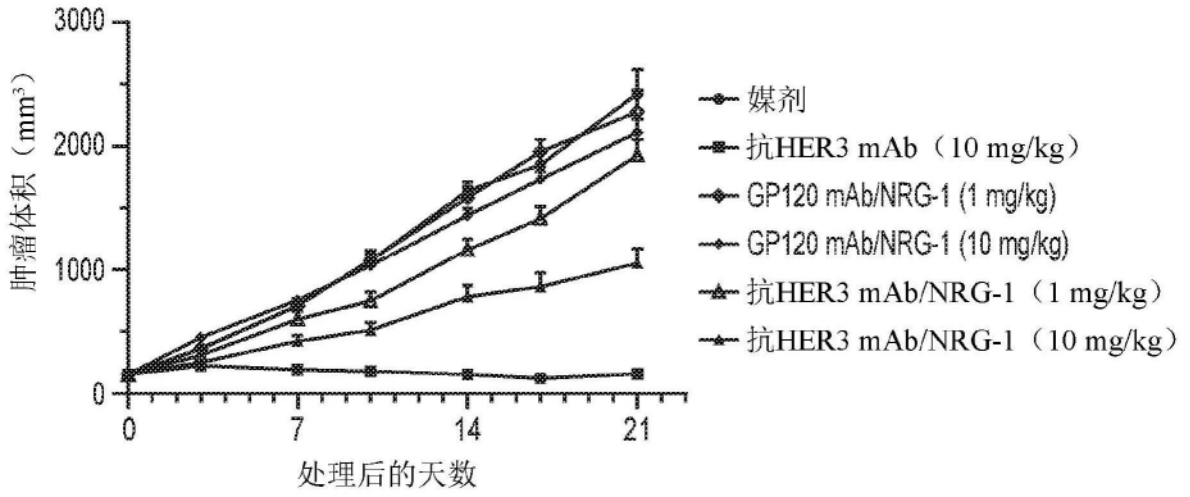


图10

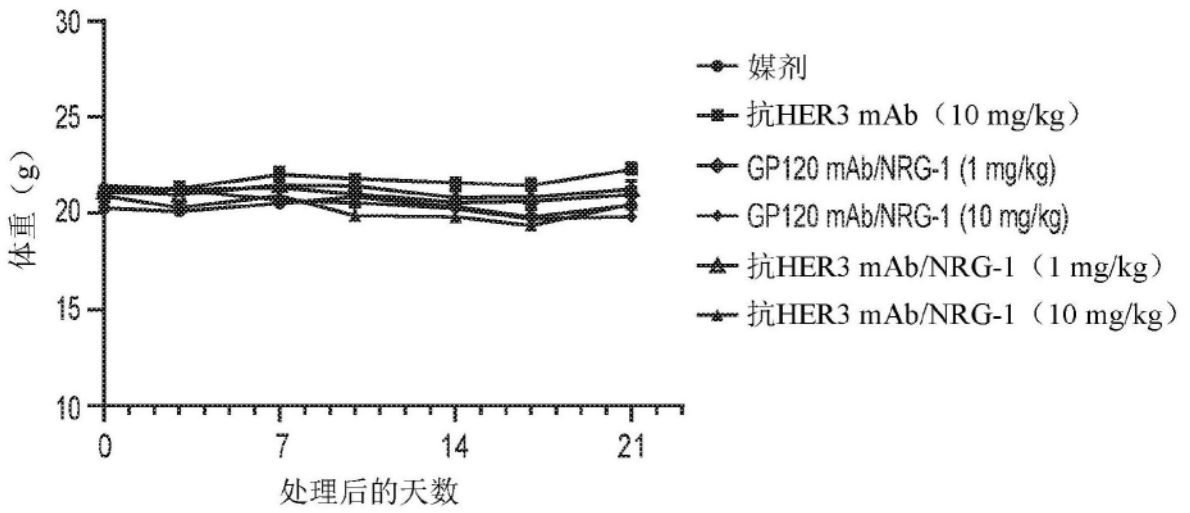


图11

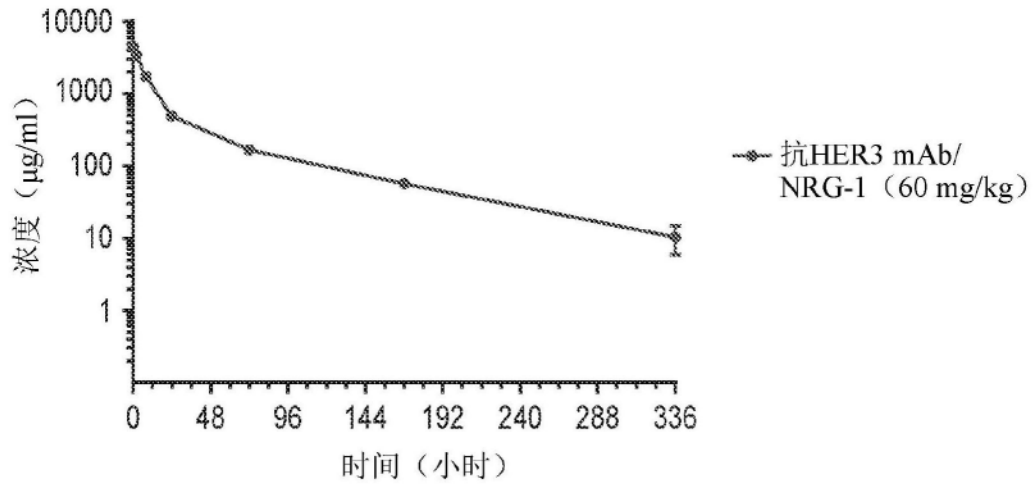


图12