

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-77716

(P2009-77716A)

(43) 公開日 平成21年4月16日(2009.4.16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 14/475 (2006.01)	C O 7 K 14/475	4 B O 6 3
C O 7 K 16/22 (2006.01)	C O 7 K 16/22	4 B O 6 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 B	4 B O 6 5
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 H	4 C O 8 4

審査請求 有 請求項の数 38 O L 外国語出願 (全 147 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-246657 (P2008-246657)	(71) 出願人	596168317
(22) 出願日	平成20年9月25日 (2008. 9. 25)		ジェネンテック・インコーポレーテッド
(62) 分割の表示	特願2000-502177 (P2000-502177)		GENENTECH, INC.
	の分割		アメリカ合衆国カリフォルニア・9408
原出願日	平成10年6月30日 (1998. 6. 30)		0-4990・サウス・サン・フランシス
(31) 優先権主張番号	60/052, 019		コ・ディーエヌエー・ウェイ・1
(32) 優先日	平成9年7月9日 (1997. 7. 9)	(74) 代理人	100064908
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 志賀 正武
(31) 優先権主張番号	08/899, 437	(74) 代理人	100089037
(32) 優先日	平成9年7月24日 (1997. 7. 24)		弁理士 渡邊 隆
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100108453
			弁理士 村山 靖彦
		(74) 代理人	100110364
			弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 E r b B 4 レセプター特異的ニューレグリン関連リガンド及びその使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 N R G 1 及び N R G 2 の E G F 様ドメインとは異なる E G F 様ドメインを有する新規なポリペプチドである N R G 3 を提供する。

【解決手段】 ニューレグリン (N R G 1) ファミリーの新たな成員の同定、組み換え製造、及び特徴付けに基づく、 E r b B 4 レセプター特異的な新規タンパク質。該タンパク質は細胞増殖及び分化、上皮発達、心臓発達、神経発達に含まれるとともに、グリア細胞マイトジェン、並びに間葉及びニューロン因子として作用する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

E G F 様ドメインをコードするアミノ酸配列を含み、当該アミノ酸配列が N R G 3 結合特性を有するポリペプチド。

【請求項 2】

N R G 3 結合特性が、(a) 実験的に類似する条件下で、E r b B 4 レセプターには結合するが E r b B 2 レセプターまたは E r b B 3 レセプターには結合しないこと；及び (b) E r b B 4 レセプターのチロシンリン酸化を活性化することを含む請求項 1 記載のポリペプチド。

【請求項 3】

アミノ酸配列が、アミノ酸配列 S E Q I D N O : 4 と少なくとも 7 5 % のアミノ酸配列相同性を有する請求項 1 記載のポリペプチド。

【請求項 4】

ポリペプチドが E r b B 4 レセプターに結合し、E r b B 4 レセプターのチロシンリン酸化を刺激する請求項 1 記載のポリペプチド。

【請求項 5】

E r b B 4 レセプターに結合し、(a) N R G 3 の細胞外ドメイン (S E Q I D N O : 3 または 7) と少なくとも 7 5 % の相同性を持つアミノ酸配列を含むポリペプチド；(b) S E Q I D N O : 2 または S E Q I D N O : 6 と少なくとも 7 5 % の相同性を持つアミノ酸配列を含むポリペプチド；(c) ポリペプチド (a) または (b) のさらなる哺乳類相同体；(d) ポリペプチドを細胞膜に固定できない膜貫通ドメインを持つ、ポリペプチド (a) - (c) の可溶化形態；及び (e) N R G 3 の結合特性を持つ、ポリペプチド (a) - (d) の誘導体からなる群から選択されるポリペプチド。

【請求項 6】

A T C C 寄託番号 2 0 9 1 5 6 (p L X S N . m N R G 3) の N R G 3 核酸オープンリーディングフレーム配列によってコードされる請求項 1 記載のポリペプチド。

【請求項 7】

A T C C 寄託番号 2 0 9 1 5 7 (p R K 5 . t k . n e o . h N R G 3 B 1) の N R G 3 核酸オープンリーディングフレーム配列によってコードされる請求項 1 記載のポリペプチド。

【請求項 8】

A T C C 寄託番号 2 0 9 2 9 7 (p R K 5 . t k . n e o . h N R G 3 B 2) の N R G 3 核酸オープンリーディングフレーム配列によってコードされる請求項 1 記載のポリペプチド。

【請求項 9】

細胞質ドメインを欠く、またはポリペプチドを細胞膜に固定できない膜貫通ドメインを欠く、あるいはその両方を欠く請求項 1 記載のポリペプチド。

【請求項 1 0】

天然のグリコシル化を伴わない請求項 1 記載のポリペプチド。

【請求項 1 1】

変異体グリコシル化を持つ請求項 1 記載のポリペプチド。

【請求項 1 2】

請求項 1 記載のポリペプチドのアンタゴニスト。

【請求項 1 3】

請求項 1 記載のポリペプチドのアゴニスト。

【請求項 1 4】

請求項 1 記載のポリペプチドをコードする単離された核酸分子。

【請求項 1 5】

哺乳類 N R G 3 の細胞外ドメインをさらにコードする請求項 1 4 記載の核酸分子。

【請求項 1 6】

10

20

30

40

50

コードされる細胞外ドメインが、SEQ ID NO: 3またはSEQ ID NO: 7のアミノ酸配列と少なくとも75%が同一のアミノ酸配列を有する請求項15記載の核酸分子。

【請求項17】

コードされるアミノ酸配列が、細胞質ドメイン、またはポリペプチドを細胞膜に固定できない膜貫通ドメイン、あるいはその両方を欠く請求項14記載の核酸分子。

【請求項18】

ベクターで形質転換される宿主細胞によって認識されるコントロール配列に操作可能に結合した請求項14記載の核酸分子を含む発現ベクター。

【請求項19】

ATCC209156 (pLXSN, mNRG3)として入手可能な請求項18記載の発現ベクター。

【請求項20】

ATCC209157 (pRK5, tk, neo, hNRG3B1)として入手可能な請求項18記載の発現ベクター。

【請求項21】

ATCC209297 (pRK5, tk, neo, hNRG3B2)として入手可能な請求項18記載の発現ベクター。

【請求項22】

請求項18記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項23】

哺乳類細胞である請求項22記載の宿主細胞。

【請求項24】

チャイニーズハムスター卵巢細胞系である請求項23記載の宿主細胞。

【請求項25】

ErbB4レセプターに結合するEGF-様ドメインをコードするアミノ酸配列を生成する方法において、当該方法が、a) 請求項14記載の核酸を含む細胞を培養し；そしてb) 細胞培地からポリペプチド回収することを含んでなる方法。

【請求項26】

ポリペプチドが培養媒質中に分泌され、培養媒質から回収される請求項25記載の方法。

【請求項27】

請求項1記載のポリペプチドに特異的に結合する抗体。

【請求項28】

請求項27記載の抗体を生成するハイブリドーマ細胞系。

【請求項29】

免疫グロブリン配列に融合された請求項1記載のポリペプチドのイムノアドヘンシ。

【請求項30】

SEQ ID NO: 4のEGF-様ドメインをさらに含む請求項29記載のイムノアドヘンシ。

【請求項31】

免疫グロブリン配列が、免疫グロブリン重鎖定常ドメイン配列である請求項29記載のイムノアドヘンシ。

【請求項32】

免疫グロブリン配列が、IgG-1、IgG-2またはIgG-3の定常ドメイン配列である請求項31記載のイムノアドヘンシ。

【請求項33】

サンプル中のNRG3を検出する方法において、当該方法が、a) 請求項27記載の抗体をサンプルに接触させ；b) サンプル中でのポリペプチドへの抗体の結合を検出することを含んでなり、前記ポリペプチドがNRG3である方法。

10

20

30

40

50

【請求項 3 4】

サンプル中の E r b B 4 レセプターを検出する方法において、当該方法が、 a) 請求項 1 記載のポリペプチドをサンプルに接触させ；そして b) サンプル中でのタンパク質へのアミノ酸配列の結合を検出することを含んでなる方法。

【請求項 3 5】

サンプルが、E r b B 4 レセプターを表面に発現した細胞を含有する請求項 3 4 記載の方法。

【請求項 3 6】

サンプルが、哺乳類組織サンプルである請求項 3 5 記載の方法。

【請求項 3 7】

N R G 3 ポリペプチドを、N R G 3 で治療可能な疾患に罹患している哺乳類に投与する方法において、当該方法が、請求項 1 4 記載の核酸を含む細胞を哺乳類に導入することを含んでなり、そして N R G 3 ポリペプチドが当該細胞によって分泌される方法。

10

【請求項 3 8】

細胞が、多孔性マトリクス内に包含され、当該マトリクスが哺乳類に投与される請求項 3 7 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、新規なニューレグリン(neuregulin)関連リガンドに関する。より詳細には、本発明は、ニューレグリンファミリーの新たな成員及び新規なポリペプチドの機能的な誘導体に関する。

20

【背景技術】

【0 0 0 2】

細胞成長及び分化に影響するシグナルトランスダクションは、部分的に種々の細胞性タンパク質のリン酸化によって調節されている。タンパク質チロシンキナーゼは、この過程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-刺激性チロシンリン酸化を介して細胞成長を命令すると考えられている。クラス I サブファミリーの成長因子レセプタータンパク質チロシンキナーゼは、e r b B 1 遺伝子によってコードされる 1 7 0 k D a の表皮成長因子レセプター (E G F R) を含む。e r b B 1 は、ヒト悪性疾患の原因に関係している。特に、この遺伝子の発現は、乳、膀胱、肺及び胃のガンが進行するにつれて増加することが観察されている。クラス I サブファミリーの第 2 の成員、p 1 8 5 neu は、最初は、化学的に処理されたラットの神経芽細胞腫からの形質転換遺伝子の産物として同定されていた。n e u 遺伝子 (e r b B 2 及び H E R 2 と呼ばれる) は、1 8 5 k D a 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 遺伝子の増幅及び / または過発現は、乳及び卵巣ガンにおける予後の貧弱性と関連している (Slamon 等, (1987) Science 235: 177-182; 及び Slamon 等, (1987) Science 244: 707-712)。H E R 2 の過発現は、胃、子宮内膜、唾液腺、肺、腎臓、結腸及び膀胱のガンを含む他のガンと関係している。e r b B 3 または H E R 3 と呼ばれる、さらに関連する遺伝子も記載されている (Kraus 等, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9193-9197)。Kraus 等 (1989) は、ある種のヒト哺乳類中庸細胞系に e r b B 3 m R N A の顕著に上昇したレベルが存在し、e r b B 3 が e r b B 1 及び e r b B 2 と同様にヒト悪性疾患における役割を果たしていることを示していることを発見した。e r b B 3 遺伝子は、乳ガン (Lemoine 等, (1992) Br. J. Cancer 66: 1116-1121)、胃腸管ガン (Pol ler 等, (1992) J. Pathol. 168: 275-280, Rajkumer 等, (1993) J. Pathol. 170: 271-278, 及び Sanidas 等, (1993) Int. J. Cancer 54: 935-940)、及び膵臓ガン (Lemoine 等, (1992) J. Pathol. 168: 269-273 及び Friess 等, (1995) Clinical Cancer Research 1: 1413-1420) において過発現されることがわかっている。

30

40

【0 0 0 3】

成長因子レセプタータンパク質チロシンキナーゼのクラス I サブファミリーは、H E R

50

4 / E r b B 4 レセプターを包含するまでさらに拡張された (欧州特許出願第599,274号、Plowman等, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 1746-1750; 及びPlowman等, (1993) Nature 366: 473-475)。Plowman等は、H E R 4 発現の増加が、乳腺癌を含むある種の表皮起源のガンと密接に関係していることを見出した。H E R 4 発現を評価するヒトの腫瘍性状態 (特に乳ガン) 検出のための診断方法が、欧州特許出願第599,274号に記載されている。

【 0 0 0 4 】

H E R 2 オンコジーンの活性化剤の探求により、ポリペプチドのファミリーが発見され、集合的にニューレグリン (N R G 1) と呼ばれている。Orr-Urtreger等(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 1867-1871 により、これらのタンパク質が、ヒト染色体 8 の短腕(short arm)にマッピングされた単一の遺伝子の交互スプライシングからもたらされることがわかった。 10

【 0 0 0 5 】

Holmes等は、ヘレグリン- α (H R G - α)、ヘレグリン- β 1 (H R G - β 1)、ヘレグリン- β 2 (H E R G - β 2)、及びヘレグリン- β 3 (H E G - β 3) と呼ばれる H E R 2 レセプターのポリペプチド活性化剤のファミリーを単離及びクローン化した。Holmes等, (1992) Science 256: 1205-1210; WO 92/20798; 及び米国特許第5,367,060号参照。4 5 k D a ポリペプチド、H R G - α は、M D A - M B - 2 3 1 ヒト乳ガン細胞系の条件を整えた媒質から精製した。これらの研究者は、精製したヘレグリンポリペプチドが、M C F 7 乳腫瘍細胞における H E R 2 レセプターのチロシンリン酸化を活性する可能性を示した。さらに、ヘレグリンポリペプチドの (高レベルの H E R 2 レセプターを発現する) S K - B R - 3 細胞に対するマイトジェン活性も示されている。F G R ファミリーに属する他の成長因子と同様に、可溶性 H R G ポリペプチドは、膜結合前駆体 (プロ-H R G と呼ばれる) から誘導され、タンパク質分解的に処理されて 4 5 k D a の可溶性形態を放出することがわかる。これらのプロ-H R G 類は、N-末端シグナルペプチドを欠いている。 20

【 0 0 0 6 】

ヘレグリン類は、最初の 2 1 3 アミノ酸残基において実質的に一致しているが、それらは、C-末端部分において相違する 2 つの変異体 E G F 様ドメインに基づいて、2 つの大きな型、 α 及び β に分類される。それにも関わらず、これら E G F 様ドメインは、そこに含まれる 6 つのシステイン残基の間隔において一致している。アミノ酸配列の比較に基づいて、Holmes等は、E G F 様ドメインにおける第 1 及び第 6 のシステインの間で、H R G 類は、ヘパリン結合 E G F 様成長因子 (H B - E G F) と 4 5 % 類似であり、アンフィレグリン (amphiregulin) (A R) と 3 5 % 同一であり、T G F - α と 3 2 % 同一であり、E G F と 2 7 % 同一であることを見出した。 30

【 0 0 0 7 】

4 4 k D a の n e u 分化因子 (N D F) は、ヒト H R G のラット等価体であるが、Pelees等, (1992) Cell 69: 205-216; 及びWen等, (1992) Cell 69: 559-572 によって最初に発見された。H R G ポリペプチドと同様に、N D F は、免疫グロブリン (I g) 相同ドメインを有し、それに E G F 様ドメインが続き、N-末端シグナルペプチドは持たない。従って、Wen等, (1994) Mol. Cell. Biol. 14(3): 1909-1919 は、N D F 類のファミリーを拡張するためのクローニング実験を行った。この研究は、6 つの異なる線維芽細胞的プロ-N D F 類を明らかにした。Holmes等の命名法を用いて、これらの N D F 類は、E G F 様ドメインの配列に基づいて α または β の何れかに分類された。アイソフォーム (isoform) 1 から 4 は、E G F 様ドメインと膜貫通ドメインとの間の領域に基づいて特徴付けされる。また、種々の長さの細胞質ドメインを有するアイソフォーム a、b 及び c も記載されている。これらの研究者らは、異なる N D F アイソフォームは、交互スプライシングによって生成され、異なる組織特異的機能を発揮すると結論づけた。N D F については、EP 505,148 ; WO 93/22424 及び WO 94/28133 も参照。 40

【 0 0 0 8 】

Falls等, (1993) Cell 72: 801-815 は、ヘレグリンファミリーの他の成員を記載し、ア 50

セチルコリンレセプター含有活性 (A R I A) ポリペプチドと呼んでいる。キチン由来の A R I A ポリペプチドは、筋肉アセチルコリンレセプターの合成を刺激する。WO 94/08007も参照。A R I A は β -型のヘレグリンであり、H R G アルが、及び H R G β 1 - β 3 の I g 様ドメインと E G F 様ドメインの間のグリコシル化部位の豊富な全スパーサー領域を欠いている。

【 0 0 0 9 】

Marchionni等は、数種のウシ由来タンパク質を同定し、グリア成長因子 (G G F) と呼んでいる (Marchionni等, (1993) Nature 362: 312-318)。これらの G G F 類は、上記の他のヘレグリンタンパク質とともに I g 様ドメイン及び E G F 様ドメインを有するが、アミノ末端クリングルドメインも有する。G G F 類は一般に、I g 様ドメインと E G F 様ドメインの間に競合的なグリコシル化スパーサー領域を持たない。一つの G G F、G G F I I のみが、N-末端シグナルペプチドを有する。G G F 及びその使用に関する WO 92/18627 ; WO 94/00140 ; WO 94/04560 ; WO 94/26298 及び WO 95/32724 も参照。

【 0 0 1 0 】

Ho等は、(1995) J. Biol. Chem. 270(4): 14523-14532において、感覚及び運動ニューロン由来因子 (S M D F) と呼ばれる、ヘレグリンファミリーの他の成員を記載している。このタンパク質は、他の全てのヘレグリンポリペプチドの特徴を持つ E G F 様ドメインを有するが、異なる N-末端ドメインを有する。S M D F と他のヘレグリンポリペプチドとの主な構造的相違点は、S M D F が I g 様ドメイン及び他の全てのヘレグリンポリペプチドに特徴的な " 糖 " スパーサーを欠くことである。S M D F の他の特徴は、N-末端近傍に疎水性アミノ酸の 2 つストレッチ (stretch) が存在することである。

【 0 0 1 1 】

ヘレグリンポリペプチドは、H E R 2 レセプターを活性化する能力に基づいて最初に同定されたが (Holmes等、上記参照)、n e u 及び n e u でトランスフェクトした線維芽細胞を発現するある種の卵巣細胞は、N D F に結合も架橋もせず、N D F に反応してチロシンリン酸化を受けることが見出された (Peles等, (1993) EMBO J. 12: 961-971)。このことは、全部のヘレグリン反応性を確実にするには他の細胞性成分が必要であることを示している。従って Carraway 等は、非トランスフェクトおや細胞ではなく、N I H - 3 T 3 線維芽細胞に結合した 125 I - r H R G β 1₁₇₇₋₂₄₄ が、ウシ e r b B 3 で安定にトランスフェクトされることを示した。従って、彼らは、E r b B 3 が H R G のレセプターであり、内在性チロシン残基のリン酸化、並びに両方のレセプターを発現する細胞の E r b B 2 レセプターのリン酸化を仲介すると結論した。Caraway等, (1994) J. Biol. Chem. 269(19): 14303-14306。Sliwkowski等, (1994) J. Biol. Chem. 269(20): 14661-14665は、H E R 3 のみでトランスフェクトされた細胞はヘレグリンに低い親和性を示すが、H E R 2 及び H E r 3 の両方でトランスフェクトされた細胞は高い親和性を示すことを見出した。

【 0 0 1 2 】

この観察は、Kokai等, Cell 58: 287-292 (1989); Stern等, (1988) EMBO J. 7: 995-1001; 及び King等, 4: 13-18 (1989) に既に記載されている " レセプタークロストキング " に関係する。これらの研究者らは、E G F の E G F R への結合が E G F R キナーゼドメインの活性化及び p 1 8 5^{HER2} の交差-リン酸化をもたらすことを見出した。このことは、リガンド誘発性レセプターヘテロ二量体化、及び二量体内におけるレセプターの交差-リン酸化の結果であると思われる (Wada等, (1990) Cell 61: 1339-1347)。

【 0 0 1 3 】

Plowman 及び共同研究者は、同様に p 1 8 5^{HER4} / p 1 8 5^{HER2} の活性化を研修した。彼らは、p 1 8 5^{HER4} 単独、p 1 8 5^{HER2} 単独、または 2 つのレセプターを共にヒト T リンパ球で発現させ、ヘレグリンが p 1 8 5^{HER4} のリン酸化を刺激できるが、p 1 8 5^{HER2} はのリン酸化は両方のレセプターを発現する細胞においてのみ刺激できることを示した。Plowman等, Nature 336: 473-475 (1993)。従って、ヘレグリンは、E G F 成長因子ファミリーの数種のレセプターと相互作用できる唯一の知られた成員である。Carraway 及び Cantley (1994) Cell 78: 5-8。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 4 】

ヘレグリンの生物学的役割は、幾つかのグループによって研究されている。例えば、Falls等(上記)は、A R I A が筋管分化における役割を果たす、即ち、運動ニューロンのシナプス後の筋肉細胞において神経伝達物質レセプターの合成及び濃縮に影響することを見出した。Corfas及びFischbachは、A R I A が、チキン筋肉におけるナトリウムチャンネルの数を増加させることも示した。Corfas及びFischbach, (1993) J. neuroscience 13(5): 2118-2125。また、G G F I I が、サブコンフルエント(subconfluent)な静態のヒト筋芽細胞にマイトジェニックであり、G G F I I が連続的に存在するクローナルヒト筋芽細胞の分化が、分化の6日後に筋管数の増加をもたらすことも示された(Sklar等, (1994) J. Cell Biochem., Abst. W462, 18D, 540)。1994年11月24日に発行されたWO 94/26298も参照。

【 0 0 1 5 】

Holmes等、上記、は、H R G が哺乳類細胞系(S K - B R - 3 及びM C F - 7 等)にマイトジェンの効果を及ぼすことを見出した。G G F のシュワン細胞へのマイトジェンの効果も報告されている。例えば、Brookes等, (1980) J. Biol. Chem. 255(18): 8374-8377; Lemke及びBrookes (1984) J. Neurosci. 4: 75-83; Brookes等, (1984) J. Neuroscience 4(1): 75-83; Brookes等, (1986) Ann. Neurol. 20(3): 317-322; Brookes, J. (1987) Methods in Enzym. 147: 217-225 及びMarchionni等, 上記も参照。シュワン細胞は、ニューロンの軸索の周囲を被うミエリンを提供する重要なグリア細胞を構成し、それにより、個々の神経繊維を形成する。よって、シュワン細胞は、末梢神経の発達、機能及び再生において重要な役割を果たすことは明らかである。このことの治療的見地からの意味付けは、Levi等, (1994) J. Neuroscience 14(3): 1309-1319によってなされている。Levi等は、損傷した脊髄の領域に移植できる、シュワン細胞を含む細胞性プロテゼの構築の可能性を議論している。シュワン細胞の生体外での培養方法が記載されている。WO 94/00140及びLi等, (1996) J. Neuroscience 16(6): 2012-2019参照。

【 0 0 1 6 】

Pinkas-Kramarski等は、胚芽及び成人のラット脳及びラット脳細胞の一次培地におけるニューロン及びグリア細胞でN D F が発現されることを見出し、それが星状細胞の生存及び突然変異因子として作用することを示唆した(Pinkas-Kramarski等, (1994) PNAS, USA 91: 9387-9391)。Mayer及びBrichmeir (1994) PNAS, USA 91: 1061-1068は、マウス胚形成中及び周産期の動物におけるヘレグリンの発現を、in situハイブリダイゼーション及びR Nアーゼ保護実験を用いて分析した。これらの著者らは、この分子の発現に基づいて、ヘレグリンがインビボで間葉及びニューロン因子として振る舞うと結論した。また、彼らの発見は、ヘレグリンが上皮の発達において機能することを意味する。同様に、Danilenko等, (1994) Abstract 3101, FASEB 8(4-5): A535 は、N D F とH E R 2 レセプターとの相互作用が、傷修復中の上皮移動及び分化の制御において重要であることを見出した。

【 0 0 1 7 】

N R G 1 は最初、レセプターチロシンキナーゼE r b B 2 のリガンドであると提唱されたが、さらなる研究により、E r b B 2 の活性化は、N R G 1 のE r b B 3 (Sliwkowski, M.X.等, (1994) J. Biol. Chem. 269: 14661-14665)またはE r b B 4 (Ploeman, G.D.等, (1993) Nature 366: 473-475;及びCarraway, K.L.及びCarraway, L.C. (1994) Cell 78: 5-8)レセプターへの結合の結果としてしばしば起こることが示された。最近の研究は、心臓の発達におけるN R G 1、E r b B 2 及びE r b B 4 レセプターの役割に集中し始めている。E r b B 4 レセプター、E r b B 2 レセプター、またはN R G 1 を欠くマウスは、心室の心筋小柱の発達が停止してから胚形成中期(10.5日胚)に死亡する(Meyer及びBirchmeier (1995) Nature 378: 386-90; Gassmann等, (1995) Nature 378: 390-4; 及びLee等, (1995) Nature 378: 394-8)。これらの結果は、心内膜で発現されたN R G 1 が、心内膜におけるE r b B 2 及びE r b B 4 レセプターの活性化に必要な重要なリガンドであるという見方と一致する。

【 0 0 1 8 】

これらの研究は同時に、N R G 1 及び E r b B 2 レセプターが、後脳(hind brain)の発達において、E r b B 4 レセプターとは異なる役割を果たしうること示唆している。N R G 1 は、神経上皮及び菱脳の神経小片 2 , 4 及び 6 から生ずる細胞において発現するが、E r b B 4 レセプターは菱脳の神経小片 3 及び 5 において発現する。N R G 1 及び E r b B 2 ノックアウトマウスは、頭側の感覚神経節の細胞及び軸索の喪失を示した。対照的に、E r b B 4 レセプター欠失マウスは、頭側の神経節に細胞性の喪失を示さなかった。むしろ、これらの神経節の中樞神経系へ及びからの神経支配の構成、離間及びパターンが破壊される(Gassmann等、上記)。N R G 1 及び E r b B 4 レセプターノックアウトマウスの後脳発現型(フェノタイプ)におけるこの相違の理由となりうるのは、N R G 1 とは異なる付加的なリガンド(類)がC N SにおいてE r b B 4 に認識されることである(Gassmann等、上記)。

10

【非特許文献 1】Slamon等,(1987) Science 235: 177-182

【非特許文献 2】Slamon等,(1987) Science 244: 707-712

【非特許文献 3】Kraus等,(1989) Proc.Natl. Acad. Sci. USA 86: 9193-9197

【非特許文献 4】Lemoine等,(1992) Br. J. Cancer 66: 1116-1121

【非特許文献 5】Poller等,(1992) J. Pathol. 168: 275-280

【非特許文献 6】Rajkumer等,(1993) J. Pathol. 170: 271-278

【非特許文献 7】Sanidas等,(1993) Int. J. Cancer 54: 935-940

【非特許文献 8】Lemoine等,(1992) J. Pathol. 168: 269-273

20

【非特許文献 9】Friess等,(1995) Clinical Cancer Research 1: 1413-1420

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 9 】

本発明は、ニューレグリン(N R G 1)ファミリーの新たな成員の同定、組み換え製造、及び特徴付けに基づく。より詳細には、本発明は、N R G 1 及び N R G 2 の E G F 様ドメインとは異なる E G F 様ドメインを有する新規なポリペプチドである N R G 3 に関する。さらに、ここに開示する N R G 3 は、他のニューレグリン様ポリペプチドに比較して異なるレセプター結合特性を示す。

【 0 0 2 0 】

30

相同配列モチーフの分析において、N R G 1 の E G F 様ドメインの相同性は、ほとんどのニューレグリンに保持されているアミノ酸のサブセットに観察された。この観察及び観察された E r b B 4 レセプター結合特性に基づいて、新規なタンパク質である N R G 3 が、ニューレグリンファミリーの新たな成員として同定された。この新規なタンパク質は、N R G 1 ファミリーの他の成員に見られるものとは、かすかに関係しているが相違している。さらに、それは中枢神経系の胚及び成人の組織において主に発現する。N R G 3 は、ニューレグリンファミリーの化合物の新たな成員を表現し、そのファミリーの成員は、細胞増殖及び分化、上皮発達、心臓発達、神経発達に含まれるとともに、グリア細胞マイトジェン、並びに間葉及びニューロン因子として作用する。

【 0 0 2 1 】

40

一実施態様において、本発明は、E G F 様ドメインを有する新規な単離された哺乳類 N R G 3 ポリペプチド、及びこの新規な N R G 3 の機能的誘導体に関し、当該ポリペプチドは E r b B 4 レセプターに結合する。本発明の範囲内の天然ポリペプチドは、E G F 様ドメインを含む細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞質ドメインを含むことを特徴としている。本発明は特に、本発明の新規な N R G 3 リガンド分子の可溶性形態を包含し、それは、細胞膜に結合できない膜貫通ドメインを有し、任意に、細胞質ドメインの全部又は一部を欠いている。「膜貫通(transmembrane)ドメイン」とは、ポリペプチドのドメインを意味し、当該ポリペプチドを細胞膜に挿入及び固定(anchor)するのに十分な数の疎水性アミノ酸を含む。「細胞膜に結合できない膜貫通ドメイン」とは、細胞膜への挿入又は他の結合を可能とするには不十分な疎水性となるように、突然変異又は欠失によって変化

50

した膜貫通ドメインを意味する。このような膜貫通ドメインは、例えば、本は爪のNRG3の融合体、またはそのフラグメントを排除するものではなく、細胞からのポリペプチドの分泌に有用な分泌シグナル配列を持ち、活性な膜貫通ドメインを欠いて存在する不十分な数の疎水性アミノ酸側鎖は細胞膜に挿入しない。活性な膜貫通ドメインを達成するのに有用なアミノ酸配列の突然変異または変化は、膜貫通ドメイン内での欠失または置換を含むが、これらに限られない。

【0022】

特別な実施態様において、本発明は、単離されたポリペプチド、好ましくはNRG3リガンドに関し、それは以下の群から選択されるポリペプチドを少なくとも75%のアミノ酸の同一性を有する：(1)図3に示すEGF様ドメインをコードするアミノ酸配列を含むポリペプチド(SEQ ID NO:4)；(2)図3に示すマウスまたはヒトのNRG3細胞外ドメインをコードするアミノ酸配列を含むポリペプチド(各々、SEQ ID NO:3またはSEQ ID NO:7)；(3)図3に示すマウスまたはヒトのNRG3天然ポリペプチドをコードするアミノ酸配列を含むポリペプチド(各々、SEQ ID NO:2及びSEQ ID NO:6)；(4)ポリペプチド(1)-(3)のさらなる哺乳類相同体；(5)ポリペプチド(1)-(4)のいずれかの、膜貫通ドメインを欠く可溶性形態；(6)ポリペプチド(1)-(5)のいずれかの、EGF様ドメインの性質及びポリペプチド(1)-(5)のNRG3レセプター結合特性を保持する誘導体。

10

【0023】

本発明の天然NRG3ポリペプチドは糖タンパク質であるが、本発明は、天然のグリコシル化を伴わない、または変異体グリコシル化パターンを有する変異体分子も包含する。好ましくは、NRG3ポリペプチドのEGF様ドメインは、非グリコシル化のものである。

20

【0024】

さらなる実施態様では、本発明は、本発明に係る新規なNRG3のアンタゴニストも包含する。本発明のアンタゴニストは、抗-NRG3抗体またはその結合性フラグメントなどのNRG3に結合するペプチドであってよい。好ましくは、本発明のNRG3アンタゴニストは、NRG3などの天然Erbb4レセプターリガンドのNRG3レセプターへの結合を実質的に低下させ、それによりレセプターの活性化を防止または抑制する。好ましい実施態様では、アンタゴニストは、NRG3のそのレセプターへの結合性を、類似条件下でのNRG3の結合性の50%未満、好ましくは20%未満、最も好ましくは10%未満に低下させる。

30

【0025】

さらに他の実施態様では、本発明は、本発明の新規なNRG3のアゴニストを包含する。本発明のアゴニストは、NRG3でもよく、または抗-NRG3レセプター抗体またはそのレセプター結合性フラグメントでもよい。本発明のNRG3アゴニストは、天然NRG3コード遺伝子の交互にスプライスされた形態にコードされるポリペプチドでもよく、好ましくは、ここに述べたNRG3 EGF様ドメインを含む。本発明のアゴニストの一実施態様では、NRG3アゴニストは、抗-Erbb4レセプター抗体であり、その抗体はErbb4レセプターに結合して活性化する。好ましくは、アゴニストの結合親和性は、天然リガンドの親和性の少なくとも25%、より好ましくは少なくとも50%、最も好ましくは天然リガンドの親和性の少なくとも90%である。同様に、本発明のアゴニストは、Erbb4レセプターを、天然NRG3の活性化の少なくとも25%、より好ましくは50%、最も好ましくは90%のレベルで活性化する。

40

【0026】

さらに本発明は、本発明の新規なNRG3をコードする核酸分子、その核酸を含むベクター、及びそのベクターで形質転換された宿主細胞に関する。核酸は、好ましくは少なくとも本発明の天然または変異体Erbb4レセプター特異的なNRG3のEGF様ドメインをコードする。本発明はさらに、緊縮条件下で本発明の天然Erbb4レセプター特異

50

的なNRG3をコードする核酸の補体にハイブリダイズし、ここに開示した天然NRG3のErbb4レセプター特異的結合特性の性質を保持するタンパク質をコードする核酸を含む。さらに、本発明は、American Type Culture Collection にATCC209156 (pLXSN.mNRG3)として寄託された核酸を含み、その核酸は、マウスNRG3オープンリーディングフレームをコードする核酸を含む発現ベクターである(SEQ ID NO: 1)。また本発明は、American Type Culture Collection にATCC209157 (pRK5.tk.neo.hNRG3B1)として寄託された核酸も含み、その核酸は、ヒトNRG3核酸をコードする核酸を含む発現ベクターである(SEQ ID NO: 5)。また本発明は、American Type Culture Collection にATCC209297 (pRK5.tk.neo.hNRG3B2)として寄託された核酸も含み、その核酸は、ヒトNRG3核酸の交互にスプライスされた形態をコードする核酸を含む発現ベクターであり(SEQ ID NO: 22)、SEQ ID NO: 5の核酸1585から1656を欠いている。交互にスプライスされたヒトNRG3B2の演繹されたアミノ酸配列はSEQ ID NO: 23に見られ、それは、SEQ ID NO: 6のアミノ酸529から552を欠く。hNRG3B1とhNRG3B2アミノ酸配列の比較を図6及び7に示す。さらに本発明は、寄託されたベクターによってコードされる、マウス及びヒトNRG3、その交互にスプライスされた形態またはそのフラグメントのNRG3アミノ酸配列を含む。

10

【0027】

他の実施態様では、本発明は、本発明のNRG3を製造する方法にも関し、この方法は、宿主細胞を所望のNRG3をコードする核酸で形質転換し、形質転換した宿主細胞を培養し、宿主細胞または宿主細胞培地から産生されたNRG3を回収することを含む。

20

【0028】

形質転換細胞でのNRG3の製造に換えて、本発明は、(a)内因性NRG3遺伝子を含む細胞を、増幅可能な遺伝子及び少なくとも150塩基対のフランキング配列であって、前記内因性NRG3遺伝子の内部または近傍のDNA配列を持つ相同体である配列を含む相同体DNAで形質転換し、それにより相同体DNAを組み換えにより細胞ゲノムに導入し；(b)当該細胞を、増幅可能な遺伝子の増幅のために選択する条件下で培養し、それによりNRG3遺伝子も増幅し；その後(c)細胞からNRG3を回収することを含んでなるNRG3の製造方法を提供する。

30

【0029】

さらなる態様において、本発明は、本発明のNRG3に特異的に結合する抗体、及びそのような抗体を産生するハイブリドーマ細胞系に関する。

【0030】

さらに他の態様では、本発明は、免疫グロブリン配列に融合した、ここに述べたような新規なNRG3配列を含むイムノアドヘシン(immunoadhesin)に関する。NRG3配列は、好ましくは免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合した天然または変異体ポリペプチドの膜貫通ドメインを欠く形態であり、少なくとも本発明の天然NRG3の細胞外ドメインのEGF様ドメインを含む。他の好ましい実施態様では、イムノアドヘシンに存在するNRG3配列は、各々マウスまたはヒトNRG3についてのSEQ ID NO: 3のNRG3またはSEQ ID NO: 7に示した配列の細胞外ドメインと、少なくとも80%の配列の相同性を示す。免疫グロブリン定常ドメイン配列は、好ましくはIgG-1、IgG-2またはIgG-3分子のものであるが、IgAまたはIgM分子であってもよい。

40

【0031】

さらなる態様において、本発明は、変化したNRG3遺伝子を持つトランスジェニック動物を包含し、この変化した遺伝子によってコードされるポリペプチドが生物学的に活性ではなく(非機能的)、そのポリペプチドを欠いており、または野生型活性の70%以下、好ましくは天然NRG3ポリペプチドの50%以下、最も好ましくは25%以下の活性を持つ。さらに、本発明のトランスジェニック動物は、天然NRG3、あるいはNRG3のスプライスされた形態またはそのフラグメントまたは変異体を含み発現するトランスジェニック動物を包含する。このようなトランスジェニック動物は、潜在的なNRG3アゴ

50

ニスト及びアンタゴニストをスクリーニングするのに有用である。

【 0 0 3 2 】

さらに本発明は、上に定義した N R G 3 に加えて製薬的に許容されるキャリアを含有する製薬組成物に関する。製薬組成物における N R G 3 の量及び投与は、臨床薬理学または薬物動態学の当業者によって決定されるであろう（例えば、Mordenti, J. 及び Rescigno, A. (1992) *Pharmaceutical Research* 9: 17-25; Moreni, J. 等 (1991) *Pharmaceutical Research* 8: 1351-1359; 及び Mordenti, J. 及び Chappell, W. (1989) "The use of interspecies scaling in toxicokinetics" in *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi 等 (eds), Pergamon Press, NY, pp.42-96 参照、これら各々は、その全体を参考文献としてここに取り入れる）。

10

【 0 0 3 3 】

本発明の一態様では、本発明の N R G 3、またはそのフラグメントをコードする単離された核酸も、インビボまたはエクスピボ（生体外）の遺伝子治療に用いられる。

【 0 0 3 4 】

本発明の一実施態様では、N R G 3、またはそのフラグメントまたは変異体をコードする核酸配列が、動物の細胞に発現カセットの一部として導入され、N R G 3 コード核酸配列が細胞で発現される。好ましくは、N R G 3 コード核酸配列は、細胞内での N R G 3 発現の制御のための配列（プロモーター配列など）を含む。好ましくは、発現カセットは、核酸配列を動物の細胞に送達するためのレトロウイルスベクターを含む。

20

【 0 0 3 5 】

本発明のさらなる実施態様では、N R G 3 または N R G 3 アゴニストを発現する宿主細胞が動物、好ましくはヒトに導入され、宿主細胞で産生された N R G 3 または N R G 3 アゴニストが、増加した局所的または全身の N R G 3 投与に敏感な疾患の治療に有効とされる。N R G 3、そのフラグメントまたは変異体を発現するように遺伝子的に加工された細胞は、宿主細胞に移植して有効レベルの因子を与えることができる。細胞は、例えば米国特許第 4,892,538 号及び第 5,011,472 号、WO 92/19195、WO 95/05452 または Aebischer 等 (1996), *Medicine* 2: 696-699 に提示されているように調製、カプセル化、及び移植することができ、これらの文献は、参考としてここに取り入れる。

【 0 0 3 6 】

本発明は、E r b B 4 レセプターを含む細胞のインビボ及びインビトロでの生存、増殖または分化を促進する方法を含む。通常は、細胞は N R G 3 ポリペプチドまたはそのフラグメント又は変異体で処理される。しかしながら、この分野での遺伝子治療方法が記載され、それも本発明に包含される。これらの技術は、アデノウイルスである herpes Simplex I ウイルス及びアデノ関連ウイルス並びに脂質ベースのデリバリーシステム（例えばリポソーム）を用いた細胞への遺伝子送達を含む。従って、N R G 3 をコードする核酸の投与が可能であり、その結果、N R G 3 ポリペプチド、そのフラグメントまたは変異体が患者または組織培地に発現される。遺伝子治療の例は、WO 93/25673 及びそこに挙げられた参考文献に見られる。

30

【 0 0 3 7 】

本発明の一態様は、哺乳類に N R G 3 またはそのフラグメント、あるいは、疾患の治療の要求に応じて N R G 3 のアゴニストまたはアンタゴニストをコードする細胞を投与し、その細胞が本発明の N R G 3 を分泌することによる疾患の治療方法である。

40

【 0 0 3 8 】

本発明の一実施態様は、神経に対する損傷、あるいは他の N R G 3 発現性または N R G 3 反応性細胞、例えば脳、心臓又は腎臓細胞に対する損傷を予防または治療する方法であり、その方法は、N R G 3、またはそのフラグメント又はアゴニスト、あるいは、特定の条件で必要ならばアンタゴニストを分泌する細胞を、それを必要とする患者の身体に移植することを含む。

【 0 0 3 9 】

本発明のさらなる実施態様は、神経損傷又はここに教示した他の細胞に対する損傷を予

50

防または治療するための移植装置を含み、当該装置は、半透膜及びNRG3、またはそのフラグメント又はアゴニスト（または特定の条件で必要ならばアンタゴニスト）を含み、それらが前記膜内にカプセル化され、当該膜がNRG3、またはそのフラグメントアゴニスト透過性であり、患者からの細胞に有害な因子は不透過性である。

【0040】

本発明のインビトロの方法では、Erbb4レセプターを含む細胞は、細胞培養媒質中に配置される。Erbb4含有細胞の例は、神経細胞、例えば脳細胞（新皮質、小脳及び海馬のニューロン、）；心臓細胞；骨格細胞及び平滑筋細胞；及び組み換えNRG3で形質転換された培養細胞を含む。

【0041】

この分野で知られた適当な培養媒質は、Minimal Essential Medium (MEM)、RPMI-1640、及びDulbeccoの変性イーグル媒質(DMEM)を含むが、これらに限られない。これらの組織培養媒質は、Sigma Chemical Company (St. Louis, MO)及びGIBCO (Grand Island, NY)から商業的に入手可能である。次いで細胞は、有効量のNRG3の存在下で、細胞の生存及び成長のために十分な条件下、細胞培養媒質中で培養される。細胞は、クロット、寒天、液体媒質を含む種々の方法で培養できる。

【0042】

細胞は、例えば37℃といった生理的に許容される温度で、有効量のNRG3、そのフラグメントまたは変異体の存在下で培養される。NRG3の量は変化してよいが、好ましくは約0.1 ng/mlから約1 mg/ml、好ましくは約0.1 ng/mlから約0.1 mg/mlの範囲内である。NRG3は、当然のことながら、当業者が過度の実験をすることなく経験的に決定した投与量で培地に添加することができる。培地におけるNRG3の濃度は、細胞及びNRG3が培養される条件などの種々の要因に応じて変動する。インキュベーションの特定の温度及び時間、並びに他の条件は、それらの要因、例えばNRG3濃度、及び細胞及び媒質のタイプに応じて変化する。当業者は、有効かつ最適な培養条件を、過度の実験をすることなく決定できるであろう。培地における細胞（例えばニューロン）の増殖、分化及び/または生存は、上述したような当該分野で知られた種々のアッセイ法によって測定することができる。

【0043】

インビトロでの細胞生存、成長及び/または分化を促進するためにNRG3を用いることは、種々の用途で有効であると考えられる。例えば、NRG3の存在下でインビトロで培養された神経細胞は、その細胞のレベルが低下した哺乳類に注入(infuse)することができる。好適なインビトロ培地は、細胞特異的因子の単離のため、及び内因性または組み換えで導入されたタンパク質の細胞での発現のためにも用いることができる。また、NRG3、そのフラグメントまたは変異体は、細胞培地で他の細胞の成長及び/または分化を支持する細胞の生存、増殖及び/または分化を促進するために用いることもできる。

【0044】

また本発明は、NRG3のインビボでの用途も提供する。NRG3のニューロン細胞発現パターンに基づいて、この分子は、脱髄、またはグリア細胞の損傷又は欠損（多発性硬化症等）などの神経細胞成長を含む疾患の治療に特に有用であると思われる。

【0045】

さらに本発明は、治療的有效量のNRG3、NRG3フラグメント、又はNRG3アゴニストを哺乳類に投与することを含んでなる哺乳類の治療方法を提供する。例えば、この哺乳類は、神経学的または筋肉疾患を罹患していてもよい。疾患が神経学的疾患である場合、NRG3は、中枢（脳及び脊髄）、末梢（交感、副交感、感覚及び内臓ニューロン）及び運動ニューロンを含むインビボでのニューロンの発達、維持、及び/または再生を促進することにおいて有用であると思われる。従って、NRG3は、種々の神経学的疾患またはヒト等の哺乳類の神経系に影響する疾患の診断及び/または治療のための方法において利用することができる。

【0046】

このような疾患は、その神経系が、例えば外傷、手術、発作、虚血、乾癱、代謝異常、神経障害、栄養障害、悪性疾患、または毒性薬によって損傷された患者に発症する。例えば、NRG3は、外傷または手術によって損傷した運動ニューロンの生存または成長を促進するために使用できる。また、NRG3は、筋萎縮性側索硬化症（ルー・ゲーリグ病）、ベル麻痺、及び脊髄筋萎縮、または麻痺を含む種々の病状の治療に使用できる。NRG3は、アルツハイマー病、パーキンソン病、てんかん、多発性硬化症、ハンティングトン舞蹈病、ダウン症、神経難聴、及びメニエール病といったヒトの「神経変性疾患(neurodegenerative disorders)」の治療に用いることができる。

【0047】

さらに、NRG3は、神経障害、特に末梢神経障害の治療に使用できる。「魔性神経障害」とは、末梢神経系に影響する疾患を意味し、運動、感覚、感覚運動、または自律神経の機能障害の一つまたはこれらの組み合わせで現れることが多い。末梢神経障害によって現れる広範なモルホロジは、同様に多数の原因に帰することができる。例えば、末梢神経障害は、遺伝的に獲得され、全身性疾患によってもたらされ、あるいは毒性薬によって誘発される。これらの例は、遠位感覚運動神経障害、または自律神経障害、例えば胃腸管の運動性低下や尿囊アトニーを含むがこれらに限られない。全身性疾患に伴う神経障害の例は、ポスト-ポリオ症候群を含み；遺伝的神経障害の例は、シャルコー-マリー-トゥース病、レフサム病、無 β -リポ蛋白血症、タンジアー病、異染性白質萎縮症、ファブリー病、及びドゥジュリーヌ-ソッタ病を含み；毒性薬によって生ずる神経障害は、ピンクリスチン、シスプラチン、メトトレキサート、または3'-アジド-3'-デオキシチミジン等の化学治療薬による処理で生ずるものを含む。

10

20

【0048】

さらに本発明は、治療的有効量のNRG3アンタゴニストを哺乳類に投与することを含んでなる哺乳類の治療方法を提供する。この後者の場合の哺乳類は、NRG3レベル/生物学的活性の低下が有利となるものである。

【0049】

本発明のこれら及び他の目的、利点及び特徴は、以下に示す構造、合成、及び用途のより詳細な説明を読むことにより当業者に明らかになるであろう。ここに挙げた各引用文献は、それら引用文献の内容における主題事項の記載に特に注意して、それら全体をここに参考として取り入れるものとする。

30

【0050】

本発明のポリペプチド、核酸、ベクター、及び宿主細胞、並びにそれらの製造方法を記載する前に、この発明が記載した特定の物質の組成物及び方法に限定されることなく、それらの組成物及び方法が当然変化しうると解するものとする。また、ここに用いる用語は特定の実施態様を記載するのみに用いられ、何ら限定を目的とするものではなく、本発明の範囲は特許請求の範囲によってのみ特定されると解するものとする。

【発明を実施するための最良の形態】

【0051】

(定義)

「新規なニューレグリン関連リガンド」、「新規なNRG3」、「新規なErbb4レセプター特異的NRG3」なる用語は互換的に使用され、胎児及び成人の脳及び神経系で特異的に発現されるニューレグリンのファミリーの新たな成員を指し、さらに上記天然のポリペプチドの機能的な誘導体を指す。

40

【0052】

「NRG3」または「ニューレグリン関連リガンド」なる用語は、SEQ ID NO: 2または6（それぞれマウスまたはヒト）の天然のアミノ酸配列NRG3の少なくとも一つの生物学的特性（以下に定義される）を有し、さらにSEQ ID NO: 23のアミノ酸配列を有するヒトNRG3の選択的スプライシング形態を含む、何れかのポリペプチド配列であるとここに定義する。この定義は、ヒトMDA-MB-175細胞のような天然のNRG3供給源または別の動物種のような別の供給源から単離されたポリペプチド若し

50

くはNRG3の選択的スプライシング形態だけでなく、組換えまたは合成法によって調製されたポリペプチドをも包含する。それはまた、機能的誘導体、対立遺伝子変異体、天然で生じるアイソフォーム、及びそれらの類似体を含む、変異体形態を含む。場合により該NRG3は、哺乳動物から単離された内因性NRG3ポリペプチドを指す「天然のNRG3」である。NRG3は、天然のNRG3（例えば図4及び5に示されたマウス（SEQ ID NO: 2）またはヒト（SEQ ID NO: 6またはSEQ ID NO: 23）NRG3）と同じアミノ酸配列を有する限りで、「天然配列NRG3」であり得る。しかしながら、「天然配列NRG3」は、組換えまたは合成法によって生産されたポリペプチドを包含する。「成熟NRG3」は、細胞から放出された可溶性または分泌NRG3である（即ち、N末端疎水性配列を欠いている）。この文脈において、NRG3は、天然のシグナル配列の有無に関わらず、細胞外ドメイン内のEGF様ドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインを含む新規なNRG3を指し、そして開始メチオニンの有無に関わらず、上記NRG3の天然で生じる可溶性形態を指し、天然の供給源から精製されたもの、組換え法によって若しくはこれら及び/または他の方法の何れかの組み合わせによって生産されたものを含む。本発明の天然のNRG3は、図4～7（SEQ ID NO: 2）に示されたアミノ酸配列を有するネズミNRG3、図4～7（SEQ ID NO: 6またはSEQ ID NO: 23）に示されたアミノ酸配列を有するヒトNRG3、及びこれらの天然のリガンドのフラグメント、または哺乳動物相同体、または選択的スプライシング形態を含む。本発明の新規な天然のネズミ及びヒトNRG3は、それぞれ約713及び720アミノ酸の長さであり、EGF様ドメイン、N末端疎水性部分、セリン/トレオニン豊富部分、予想される膜貫通ドメイン、及び予想される細胞内ドメインを含む。これらのドメインの境界は、新規なネズミ及びヒトNRG3配列について図4～7で示されている。

10

20

【0053】

場合により、NRG3は、天然のグリコシル化を伴わない。「天然のグリコシル化」は、天然のNRG3が得られた哺乳動物細胞において生産された場合、天然のNRG3に共有結合した炭化水素部分を指す。従って、非ヒトにおいて生産されたヒトNRG3は、天然のグリコシル化を伴わないものとして記載され得、例えばそれは天然のグリコシル化以外のグリコシル化を受ける。場合により、NRG3は、（例えば原核生物において組換え的に生産された結果として）何れのグリコシル化も伴わない。

30

【0054】

「EGF様ドメイン」なる用語は、ポリペプチド、好ましくは本発明のNRG3ポリペプチドの細胞外上皮増殖因子（EGF）様ドメインを指す。EGF様ドメインは、ニューレグリンレセプターを結合する能力を有し、細胞応答を刺激する（Holmes, W. E. 等（1992）Science 256: 1205-1210）。好ましくは、本発明のNRG3のEGF様ドメインは、SEQ ID NO: 4（ネズミまたはヒトNRG3 EGF様ドメイン）に示されたNRG3のアミノ酸配列を有し、そこで該EGF様ドメインは、ヒトNRG3の約アミノ酸284から約アミノ酸332まで、ネズミNRG3の約アミノ酸286から約アミノ酸334までである。本発明のNRG3は、選択的スプライシング形態NRG3コード遺伝子によってコードされるポリペプチドを包含し、該選択的スプライシング形態は、NRG3 EGF様ドメインを含む。

40

【0055】

ここで使用される用語、「Erbb」は、哺乳動物Erbbレセプター（即ち、Erbb2または上皮増殖因子（EGF）レセプター；Erbb2またはHER2レセプター；Erbb3またはHER3レセプター；Erbb4またはHER4レセプター；及び将来同定されるこのクラスIチロシンキナーゼファミリーの何れかの他の成員）の何れか一つ以上を指し、「erbb」は、これらのレセプターをコードする哺乳動物erbb遺伝子を指す。

【0056】

用語、「可溶性形態」、「可溶性レセプター」、「可溶性NRG3」、「可溶性NRG3」、及びそれらの文法的な変異型は、機能的な膜貫通ドメインを含まない本発明の天然

50

のまたは変異体 N R G 3 の変異体を指す。可溶性レセプターにおいては、膜貫通ドメインは、該レセプターが細胞膜に固定できないように、欠失され、切り詰められ、またはさもなければ不活性化されても良い。もし望ましければ、本発明の N R G 3 の上記可溶性形態は、さらに完全にまたは部分的に欠失、さもなければ不活性化された細胞質ドメインを有しても良い。

【 0 0 5 7 】

ポリペプチドの「機能的誘導体」は、天然のポリペプチドと共通の質的生物学的活性を有する化合物である。それ故、本発明の天然の新規な N R G 3 の機能的誘導体は、上記天然の N R G 3 と共通の質的生物学的活性を有する化合物である。「機能的誘導体」は、それぞれの天然のポリペプチドと共通の生物学的活性を有する限り、何れかの動物種（ヒトを含む）から得た天然のポリペプチドのフラグメント、天然の（ヒト及び非ヒト）ポリペプチドの誘導体及びそのフラグメント、並びに天然のポリペプチドのペプチド及び非ペプチド類似体を制限することなく含む。

10

【 0 0 5 8 】

ここで使用される用語、「フラグメント」は、成熟天然ポリペプチドの配列内の領域を指す。好ましくは N R G 3 フラグメントは、N R G 3 の E G F 様ドメインの少なくとも 20、より好ましくは少なくとも 50 個のアミノ酸残基の一連の配列を有するであろう。好ましいフラグメントは、S E Q I D N O : 2（マウス由来）若しくは S E Q I D N O : 6 または S E Q I D N O : 2 3（ヒト由来）中の N R G 3 の配列の一部に等しい約 30 - 150 アミノ酸残基を有する。用語、「誘導体」は、天然のポリペプチドのアミノ酸配列及びグリコシル化変異体、及び共有結合修飾体を定義するために使用される。「非ペプチド類似体」は、天然のポリペプチドのペプチド類似体と実質的に同じ表面を表示する有機化合物である。それ故、本発明の天然の新規な N R G 3 の非ペプチド類似体は、天然の N R G 3 のペプチド類似体と実質的に同じ表面を表示する有機化合物である。上記化合物は、ペプチド類似体と同じ態様で他の分子と相互作用し、本発明の天然の N R G 3 の生物学的活性を模倣する。好ましくは、本発明のアミノ酸配列変異体は、天然の N R G 3 の少なくとも一つのドメイン、好ましくは E G F 様ドメインを維持し、本発明の天然の N R G 3 のドメインと、少なくとも約 60 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約 75 % のアミノ酸配列同一性、最も好ましくは少なくとも約 90 % のアミノ酸配列同一性を有する。アミノ酸配列変異体は好ましくは、本発明の天然の N R G 3 の E G F 様ドメインと最も高い程度のアミノ酸配列相同性を示す。これらは、本発明の新規な N R G 3 と、N R G 3 ファミリーの他の成員の間で最も高いパーセントのアミノ酸保存を示すドメインである（図 4 ~ 7 参照）。

20

30

【 0 0 5 9 】

「単離された」または「実質的に純粋」なる用語は、他のポリペプチドまたは核酸、並びに脂質、炭化水素、または天然で会合する他の物質を含んでいないポリペプチドまたは核酸を指す。本発明の N R G 3 ポリペプチドのアミノ酸に共有結合した糖部分であるグリコシル化部分は除外される。当業者は、各分子型に対する適切な標準法を使用して、N R G 3 ポリペプチドまたは該ポリペプチドをコードする核酸を精製可能である。

40

【 0 0 6 0 】

N R G 3 配列に関する用語、「パーセントアミノ酸配列同一性」は、配列を並べ、もし必要であれば、最大のパーセント配列同一性を得るためにギャップを導入した後に、配列同一性の一部としての何れかの保存的置換を考慮せずに、図 1 に記載された推定のアミノ酸配列を有する N R G 3 配列中の残基と同一である候補の配列中のアミノ酸残基のパーセントとしてここで定義される。N R G 3 配列中の N 末端、C 末端、または内部伸長、欠失または挿入は、配列同一性または相同性に影響を与えるものとして説明されるであろう。

【 0 0 6 1 】

別の型の N R G 3 変異体は、「キメラ N R G 3」であり、その用語は、異種ポリペプチドに融合または結合された全長 N R G 3 またはそのフラグメントを含むポリペプチドを包含する。該キメラは、N R G 3 と少なくとも一つの生物学的特性を共有する。キメラ N R

50

G 3 の例は、イムノアドヘシン及びエピトープタグ化 N R G 3 を含む。別の実施態様として、該異種ポリペプチドは、チオレドキシン、サルベージレセプター結合エピトープ、細胞毒性ポリペプチドまたは酵素（例えばプロドラッグを活性薬剤に変換するもの）である。

【 0 0 6 2 】

「共有結合修飾」及び「共有結合誘導体」なる用語は互換的に使用され、有機タンパク質性または非タンパク質性誘導化薬剤での天然のポリペプチドまたはそのフラグメントの修飾、異種ポリペプチド配列に対する融合、及び翻訳後修飾を制限することなく含む。共有結合修飾は、選択された残基または末端残基と反応可能な有機誘導化薬剤と、標的化アミノ酸残基を反応することによって、または選択された組換え宿主細胞中で機能する翻訳後修飾の機構を利用することによって伝統的に導入される。特定の翻訳後修飾は、発現されたポリペプチドに対する組換え宿主細胞の機能の結果である。グルタミル及びアスパラギン残基は、相当するグルタミル及びアスパルチル残基にしばしば翻訳後脱アミド化される。別法として、これらの残基は、穏やかな酸性条件下で脱アミド化される。他の翻訳後修飾は、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリル、チロシルまたはトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン及びヒスチジン側鎖の α アミノ基のメチル化を含む (T. E. Creighton (1983) *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86)。共有結合誘導体 / 修飾は特に、本発明の天然の N R G 3 配列を含む融合タンパク質、及びイムノアドヘシンのようなこれらのアミノ酸配列変異体、及び異種シグナル配列に対する N 末端融合物を含む。

10

20

【 0 0 6 3 】

本発明の内容における用語、「生物学的活性」は、天然のポリペプチドと質的に共通する少なくとも一つのアドヘシン、調節またはエフェクター機能を有するものとして定義される。本発明の範囲内にある好ましい機能的誘導体は、本発明の天然の N R G 3 の E G F 様ドメイン及び E r b B 4 レセプター特異的結合を維持することによって一体化される。

【 0 0 6 4 】

「E r b B レセプターを活性化する」なる用語は、E r b B レセプターの細胞内キナーゼドメインが、チロシン残基リン酸化させる機能を指す。概して、これは E r b B 4 レセプターまたは E r b B 4 レセプターホモダイマーに対する N R G 3 の結合を含み、その結合は一つ以上のレセプターのキナーゼドメインを活性化し、それによって一つ以上のレセプター中のチロシン残基のリン酸化、及び / またはさらなる基質ポリペプチド中のチロシン残基のリン酸化を導く。E r b B レセプターリン酸化は、以下に記載されるチロシンリン酸化アッセイを使用して定量可能である。本発明の N R G 3 は、N R G 3 の細胞内ドメインを経て E r b B レセプターと相互作用することによってそれ自身活性化されると解される。それ故、N R G 3 に結合する（好ましくは細胞外ドメイン、より好ましくは E G F 様ドメインに結合する）N R G 3 活性化リガンドは、リガンド、抗体またはレセプターを制限することなく含む。N R G 3 の活性化は、細胞内ドメインのリン酸化を通じて、またはレセプター / リガンド介在性細胞シグナリングに共通な他の同様な現象を通じてなされても良い。細胞シグナリングのメディエーターとして、本発明の N R G 3 は、アポトーシス、代謝シグナリング、分化または細胞増殖と関連していると予測される。

30

40

【 0 0 6 5 】

天然のポリペプチドおよびその機能的誘導体に関して「同一性」または「相同性」なる語は、配列を並べ、もし必要であれば最大のパーセント同一性を達成するためにギャップを導入し、そして配列同一性の部分としていかなる保存的置換をも考慮することなく、相当する天然のポリペプチドの残基と同一である候補の配列中のアミノ酸残基のパーセントとしてここで定義される。N または C 末端伸長または挿入のいずれも、同一性または相同性を減少するものとして解釈されない。整列についての方法およびコンピュータープログラムは本分野で周知である。例えば、ここで開示される配列は、Sequence Analysis Programs, Gnetech, Inc, Inc を使用して分析された。

【 0 0 6 6 】

50

「アゴニスト」なる用語は、天然のNRG3の少なくとも一つの生物学的活性を維持するという条件で、本発明の天然のNRG3のペプチド及び非ペプチド類似体、および天然のNRG3を特異的に結合する抗体を指すために使用される。好ましくは、本発明のアゴニストは、天然のNRG3ポリペプチドの質的なEGF様ドメイン結合認識特性を維持する。

【0067】

「アンタゴニスト」なる用語は、本発明の天然のNRG3の生物学的活性を阻害する分子を指すために使用される。好ましくは、ここでのアンタゴニストは、本発明の天然のNRG3の結合を阻害する。好ましいアンタゴニストは、さもなければ結合するErbb4レセプターに対する天然のNRG3の結合を本質的に完全にブロックする。NRG3「アンタゴニスト」は、NRG3エフェクター機能を妨害または妨げる分子である（例えばNRG3によるErbb4レセプターの結合及び/または活性化を妨害または妨げる分子）。上記分子は、例えばここで開示されるチロシンリン酸化アッセイにおいて、NRG3によるErbb4レセプター活性化を競合的に阻害する能力に対してスクリーニング可能である。好ましいアンタゴニストは、Erbb4レセプターとその他のヒレグリンポリペプチドの相互作用を実質的に妨げないものである。NRG3アンタゴニストの例は、NRG3に対する中和抗体、及びNRG3遺伝子に対するアンチセンスポリヌクレオチドを含む。

【0068】

一般的に、「アミノ酸」なる用語は、全ての天然で生じるL- α -アミノ酸を指す。しかしながら、ある実施態様として、D-アミノ酸が、構造的制限を容易にするために本発明のポリペプチドまたはペプチド内に存在しても良い。例えば、ジスルフィド結合形成および安定性を容易にするために、Dアミノ酸システインが、本発明の天然のNRG3のペプチド機能的誘導体またはペプチドアンタゴニストの一つまたは両末端に提供されても良い。アミノ酸は、一文字または三文字表記にそれぞれによって示される：

【0069】

Asp D アスパラギン酸
 Ile I イソロイシン
 Thr T トレオニン
 Leu L ロイシン
 Ser S セリン
 Tyr Y チロシン
 Glu E グルタミン酸
 Phe F フェニルアラニン
 Pro P プロリン
 His H ヒスチジン
 Gly G グリシン
 Lys K リシン
 Ala A アラニン
 Arg R アルギニン
 Cys C システイン
 Trp W トリプトファン
 Val V バリン
 Gln Q グルタミン
 Met M メチオニン
 Asn N アスパラギン

【0070】

「アミノ酸配列変異体」なる用語は、天然のアミノ酸配列と比較してそのアミノ酸配列におけるいくつかの差異を有する分子を指す。

置換変異体は、除去された天然配列中の少なくとも一つのアミノ酸残基、および同じ位置でのその場所に挿入された異なるアミノ酸を有するものである。

挿入変異体は、天然配列中の特定の位置で一つのアミノ酸とすぐ近接して挿入された、一つ以上のアミノ酸を有するものである。一つのアミノ酸にすぐ近接するということは、該アミノ酸の α -カルボキシまたは α -アミノ官能基の何れかと結合していることを意味する。

欠失変異体は、天然アミノ酸配列中の一つ以上のアミノ酸が除去されたものをいう。

【0071】

「抗体」(Abs)及び「免疫グロブリン」(Igs)は、同じ構造的性質を有する糖タンパク質である。抗体が特異的な抗原に対する結合特異性を示す一方で、免疫グロブリンは、抗体、及び抗原特異性を欠く他の抗体様分子の両者を含む。後者の種類のポリペプチドは、例えば、リンパ系によって低レベルで、及びミエローマによって高レベルで生産される。

10

【0072】

天然の抗体及び天然の免疫グロブリンは、通常、2の相同な軽(L)鎖及び2の相同な重(H)鎖より成る約150,000ドルトンの異種テトラマー糖タンパク質である。各軽鎖は、一つの共有ジスルフィド結合によって重鎖に結合し、一方でジスルフィド結合の数は、異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖の間で変化する。重鎖及び軽鎖のそれぞれはまた、規則的な間隔の鎖内ジスルフィド結合を有する。各重鎖は、数多くの定常ドメインが引き続く一つの変域ドメイン(V_H)を一端で有する。各軽鎖は、一端で一つの変域ドメインを有し(V_L)、他の一端で一つの定常ドメインを有する；軽鎖の定常ドメインは、重鎖の第一の定常ドメインと並んでおり、軽鎖変域ドメインは、重鎖の変域ドメインと並んでいる。特定のアミノ酸残基が、軽鎖と重鎖の変域ドメインの間で界面を形成していると解される(Clothia等, (1985) J. Mol. Biol. 186: 651-663並びにNovotnyおよびHaber, (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4592-4596)。

20

【0073】

何れかの脊椎動物種から得た抗体(免疫グロブリン)の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ(κ)及びラムダ(λ)と呼ばれる二つの明らかに区別されるタイプの一つに分類され得る。

【0074】

その重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に依存して、免疫グロブリンは、異なるクラスに分類可能である。免疫グロブリンには5の主要なクラス：IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMが存在し、これらのいくつかはさらにサブクラス(アイソタイプ)に分割される、例えばIgG-1、IgG-2、IgG-3、及びIgG-4；IgA-1及びIgA-2。免疫グロブリンの異なるクラスに相当する重鎖定常ドメインは、それぞれ α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及び μ と呼ばれる。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造及び三次元構造は、周知である。

30

【0075】

「抗体」なる用語は最も広義で使用され、単一のモノクローナル抗体(アゴニストおよびアンタゴニスト抗体を含む)、ポリエピトープ特異性を有する抗体組成物、同様に抗体フラグメント(例えばFab、 $F(ab')_2$ 及びFv)を、所望の生物学的活性を示す範囲で含む。

40

【0076】

ここで使用される用語、「モノクローナル抗体」は、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体を指し、即ち該集団を含むそれぞれの抗体が、わずかに存在してもよい天然に生じ得る変異を除いて同等である。「モノクローナル」なる修飾語は、実質的に均質な抗体の集団から得られ、いずれかの特定方法による生産を要求するものとは解されない抗体の特徴を示す。例えば、本発明に従って使用されるべきモノクローナル抗体は、Kohler等, (1975) Nature 256: 495により最初に記述されたハイブリドーマ法により調製されも良く、あるいは組換えDNA法(米国特許第4,816,567号(Cabilly等)、並びにMage及びLamoyi (1987) in Monoclonal Antibody Production Techniques and Application, pp. 79-97, Marcel Dekker, Inc., New York参照)により調製されても良い。該モノクローナル抗体

50

はまた、例えば、McCafferty等 (1990) Nature 348: 552-554に記載された方法を使用して生産された、ファージライブラリーから単離されても良い。

【0077】

非ヒト (例えばネズミ) 抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリンから得られた最小の配列を含む特異的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 (Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂ 若しくは抗体の他の抗原結合配列等) である。ほとんどの部分について、ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン (受容者抗体) であり、そのレセプターの相補性決定領域 (CDR) の残基は、所望の特異性、親和性、及び能力を有するマウス、ラットまたはウサギ等の非ヒト種 (ドナー抗体) の CDR から得た残基により置換されている。ある例においては、ヒト免疫グロブリンの FV フレームワーク領域 (FR) は、対応する非ヒト FR 残基により置換されている。更に、ヒト化抗体は、受容者抗体にも、あるいは導入された CDR または FR 配列にも見出されない残基を含んでもよい。これらの修飾は、抗体の性能を更に洗練または最適化させるために行われる。一般的に、ヒト化抗体は実質的に全て、または少なくとも 1 つ、典型的には 2 つの可変領域を有し、全てまたは実質的に全ての CDR 領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、また全てまたは実質的に全ての FR 領域がヒト免疫グロブリンのものである。ヒト化抗体は、最適には免疫グロブリンの定常領域 (Fc)、典型的にはヒト免疫グロブリンの少なくとも一部をも含んでよい。更に詳細には、Jones 等, (1986) Nature 321: 522-525; Reichmann 等, (1988) Nature 332: 323-329; 1987年9月30日に印刷された EP-B-239 400; Presta, (1992) Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 ; および 1996年1月24日に印刷された EP-B-451 216 参照、これらの参考文献は、完全に参考としてここに含まれる。ヒト化抗体は、該抗体の抗原結合領域が、興味ある抗原でマーカーサルを免疫化することによって生産された抗体から得られる、PrimatizedTM抗体を含む。

10

20

【0078】

ここで定義される「中和抗体」は、天然配列 NRG3 のエフェクター機能をブロックまたは顕著に減少可能な抗体分子を意味する。例えば中和抗体は、ここに記載されるチロシンリン酸化アッセイにおいて、Erbb レセプター、好ましくは Erbb4 レセプターを活性化する NRG3 の能力を阻害または減少できる。中和抗体は、ここで開示される細胞増殖アッセイにおいて、NRG3 のマイトジェン活性をブロックしても良い。

【0079】

ここでのモノクローナル抗体は、特に「キメラ」抗体 (免疫グロブリン) を含み、その重鎖及び/または軽鎖の一部は、特定の種から得られた抗体の対応する配列に同等、若しくは相同であるか、または特定の抗体種若しくは亜種に属するものであり、その一方で、鎖の残る部分は、他の種から得られた抗体の対応する配列に同等、若しくは相同的であるか、または他の抗体種若しくは亜種に属するものであり、加えて、それらが所望の生物学的活性を示す限りこのような抗体のフラグメントも含む (米国特許第 4,816,567 号 (Cabill y 等); Morrison 等, (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855)。

30

【0080】

本発明の内容において、「細胞」、「細胞系」及び「細胞培養物」及び「宿主細胞」なる用語は互換的に使用され、全てのこのような表記は、子孫の細胞も含む。また全ての子孫は、計画的または不慮の変異のために、DNA 含量において正確に同等である必要はないものと解される。元の形質転換細胞についてスクリーニングしたのと同様な機能及び生物学的活性を有する変異子孫細胞が含まれる。外来 DNA を宿主中で継続的に維持することを意味する、安定な転移の方法は、本分野で周知である。

40

【0081】

「複製可能発現ベクター」、「発現ベクター」及び「ベクター」なる用語は、外来 DNA のフラグメント内に挿入された通常二本鎖の DNA のフラグメントを指す。外来 DNA は、宿主細胞において通常見出されない DNA である、異種 DNA として定義される。該ベクターは、適切な宿主細胞内に外来または異種 DNA を輸送するために使用される。一度宿主細胞に入ると、該ベクターは、宿主細胞染色体 DNA と非独立に複製でき、該ベク

50

ターおよびその挿入された（外来）DNAのいくつかのコピーが生産される。さらに、該ベクターは、外来DNAをポリペプチドに翻訳することを許容するのに必要なエレメントを含む。かくして、外来DNAによってコードされたポリペプチドの多くの分子は、急速に合成される。

【0082】

「コントロール配列」なる用語は、特定の宿主中で機能的に連結されたコード配列を発現するために必要なDNA配列を指す。原核生物に好適なコントロール配列は、例えばプロモータ、場合によりオペレータ配列、リボソーム結合部位、および可能性としては他のまだほとんど理解されていない配列を含む。真核細胞は、プロモータ、ポリアデニル化シグナル、及びエンハンサーを使用することが周知である。

10

【0083】

核酸は、他の核酸配列と機能的に関連して配置される場合に、「機能的に連結している」。例えば、プレ配列または分泌リーダーに対するDNAは、それがポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現される場合にポリペプチドのDNAに機能的に連結し；またプロモーター若しくはエンハンサーは、それが配列の転写に影響する場合にコード配列に対して機能的に連結し；またリボソーム結合部位は、それが翻訳を促進するように位置する場合にコード配列に機能的に連結している。一般的に、「機能的に連結」とは、DNA配列が連続し、分泌リーダーの場合には連続かつ読み取りの枠内に連結されることを意味する。しかしながら、エンハンサーは連続する必要はない。連結は、慣用の制限部位においての連結により達成される。そのような部位が存在しない場合には、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーが慣用の方法により使用される。

20

【0084】

「オリゴヌクレオチド」とは、1988年5月4日に発行されたEP 266,032に記載されたような固相法を使用して、またはFroehler等、(1986) Nucl. Acids Res. 14: 5399に記載されたデオキシヌクレオシドH-ホスファナート中間体を介して、ホスホトリエステル、ホスフィット、またはホスホルアミダイト化学のような周知の方法によって化学的に合成された、短い長さの一本鎖または二本鎖ポリデオキシヌクレオチドである。次いでそれらはポリアクリルアミドゲル上で精製される。

【0085】

「固相」なる用語は、興味ある物質（例えばNRG3またはそれに対する抗体）が付着可能な非水性のマトリックスを意味する。ここで包含される固相の例は、部分的または全体的にガラスで形成されたもの（例えば制御孔ガラス）、ポリサッカリド（例えばアガロース）、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコール及びシリコンを含む。特定の実施態様として、本文脈において、固相はアッセイプレートのウェルを含む；他の実施態様として、それは精製カラムである（例えば、アフィニティークロマトグラフィーカラム）。この用語はまた、米国特許第4,275,149号に記載されたもののような分離した粒子の非継続的な固相を含み、該文献はその全体を参考としてここに取り入れる。

30

【0086】

「形質転換」及び「形質導入」なる用語は、ここで互換的に使用され、細胞内にDNAを導入する工程を意味する。形質転換または形質導入に引き続き、NRG3 DNAは、宿主細胞ゲノム内に挿入され、または染色体外成分として存在しても良い。もし実質的な細胞壁構築物を含む原核生物細胞が宿主として使用されたならば、DNAでの細胞の形質導入の好ましい方法は、Cohen等、(1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69: 2110-2114に記載されたカルシウム処理法、またはChung等、(1988) Nuc. Acids. Res. 16: 3580のポリエチレングリコール法である。もし酵母が宿主として使用されたならば、形質導入は、Hinnen (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 1929-1933に教示されるポリエチレングリコールを使用して一般的に達成される。もし哺乳動物細胞が宿主細胞として使用されたならば、形質導入は一般的に、Graham等、(1978) Virology 52: 546, Gorman等 (1990) DNA and Protein Eng. Tech. 2: 3-10のリン酸カルシウム沈降法によって実施される。しかしながら、核注射、電気穿孔法、またはプロトプラスト融合のような、原核生物

40

50

及び真核生物細胞内にDNAを導入する他の周知の方法も、本発明における使用に適している。

【0087】

NRG3をコードするDNAの哺乳動物における一過的発現を提供する発現ベクターは、本発明において特に有用である。一般的に、一過的発現は、宿主細胞が多コピーの発現ベクターを蓄積し、次いで発現ベクターによってコードされた高レベルの所望のポリペプチドを合成するように、宿主細胞において効率的に複製可能な発現ベクターの使用を含む。適切な発現ベクター及び宿主細胞を含む一過的な発現系は、クローン化DNAによってコードされるポリペプチドの簡便な陽性の同定、並びに所望の生物学的または生理学的特性に対する上記ポリペプチドの迅速なスクリーニングを可能にする。

10

【0088】

本発明のNRG3は、1991年5月16日に発行された国際特許出願WO 91/06667に提供されたような、相同的組換えによって生産できることもさらに考慮される。略記すると、本方法は、内因性NRG3遺伝子を含む細胞を、相同的DNAで形質転換することを含み、該相同的DNAは、(a)増幅可能遺伝子(例えばジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR))をコードする遺伝子)及び(b)NRG3をコードする遺伝子内またはそれに近接した細胞ゲノム中のヌクレオチド配列と相同的である、少なくとも約150ベースペアの長さを有する少なくとも一つの横側の配列を含む。形質導入は、組換えによって細胞ゲノム中に相同的DNAが挿入されるような条件下で実施される。相同的DNAが挿入されたものを有する細胞は、次いで増幅可能遺伝子の増幅について選択する条件を受けさせられ、それによって該NRG3遺伝子は付随して増幅される。生成細胞は次いで、所望の量のNRG3の生産についてスクリーニングされる。NRG3をコードする遺伝子に近接した横側の配列は、例えば出発地点として図1(SEQ ID NO: 1)のマウスNRG3,あるいは図2(SEQ ID NO: 5)または図3(SEQ ID NO: 22)のヒトNRG3のヌクレオチド配列またはそのフラグメントを使用して、ゲノムウォーキングの方法によって容易に同定される。マウス及びヒトNRG3ポリペプチドをコードするDNAは、ATCC 209156(マウス; pLXSN.mNRG3), ATCC 209157 (ヒト; pRK5.tk.neo.hNRG3B1)またはATCC 209157(ヒト; pRK5.tk.neo.hNRG3B2)としてAmerican Type Culture Collectionに寄託される。

20

【0089】

「細胞の生存を延長すること」なる表現は、インビトロまたはインビボの何れかで、NRG3にさらされていない非処理細胞に対して細胞の存在する期間が増大する機能を指す。

30

【0090】

「細胞の増殖を促進すること」なる用語は、インビトロまたはインビボの何れかで、非処理細胞に対して細胞の成長及び/または再生産の量を増大する工程を包含する。細胞培養物中の細胞増殖の増大は、NRG3にさらす前後の細胞の数を計測することによって検出可能である(以下の実施例参照)。増殖の程度は、顕微鏡下での集合の度合いの査察を介して定量可能である。細胞増殖はまた、細胞による3H取り込みを測定することによって定量可能である。

40

【0091】

「細胞の分化を促進すること」なる用語は、元の細胞のものとは異なる一つ以上の特徴または機能を獲得するまたは有する程度を増大する機能を意味する(即ち細胞特異化)。これは、細胞の表現型の変化をスクリーニングすることによって検出可能である(例えば細胞における形態的变化を同定すること)。

「筋細胞」は、骨格筋、心筋または平滑筋組織細胞を含む。この用語は、より特異化した筋細胞(例えば筋芽細胞)を形成するために分化した細胞を包含する。

【0092】

「単離したNRG3核酸」は、天然の供給源において通常会合している少なくとも一つの混在した供給源の核酸を含んでいない、好ましくは他の何れかの哺乳動物RNAまたは

50

DNAを実質的に含んでいないRNAまたはDNAである。「通常会合している少なくとも一つの混在した供給源の核酸を含んでいない」なる用語は、核酸が供給源のまたは天然の細胞において存在しているが、異なる染色体位置にある、またはさもない供給源の細胞において通常見出されない核酸配列によって横に並んでいる場合を含む。単離されたNRG3核酸の例は、図1 (SEQ ID NO: 1) に示されたマウスNRG3、若しくは図2 (SEQ ID NO: 4) または図3 (SEQ ID NO: 22) に示されたヒトNRG3と、少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは90%、最も好ましくは95%の配列同一性を有する生物学的に活性なNRG3をコードするRNAまたはDNAである。

【0093】

核酸は、他の核酸配列と機能的に関連して配置される場合に、「機能的に連結している」。例えば、プレ配列または分泌リーダーのDNAは、それがポリペプチドの分泌に關与するプレタンパク質として発現される場合にポリペプチドのDNAに機能的に連結し；またプロモータ若しくはエンハンサーは、それが配列の転写に影響する場合にコード配列に対して機能的に連結し；またリボソーム結合部位は、それが翻訳を促進するように位置する場合にコード配列に機能的に連結している。一般的に、「機能的に連結」とは、DNA配列が連続し、分泌リーダーの場合には連続かつ読み取りの枠内に連結されることを意味する。しかしながら、エンハンサーは連続する必要はない。連結は、慣用の制限部位においての連結により達成される。そのような部位が存在しない場合には、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーが慣用の方法により使用される。

【0094】

ハイブリダイゼーションは好ましくは「緊縮条件」下で実施され、これは、(1) 例えば50 で0.015M塩化ナトリウム/0.0015Mクエン酸ナトリウム/0.1%ドデシル硫酸ナトリウムといった、低イオン強度および高温での洗浄を使用し、または(2) 例えば42 で0.1%ウシ血清アルブミン/0.1% Ficoll / 0.1% ポリビニルピロリドン / 750 mM 塩化ナトリウム、75 mM クエン酸ナトリウムを含む50 mM リン酸ナトリウム、pH 6.5を含む50% (vol/vol) ホルムアミドといった、ホルムアミドのような変性試薬をハイブリダイゼーションの間に使用することを意味する。もう一つの例としては、42 で50%ホルムアミド、5×SSC (0.75M NaCl、0.075Mクエン酸ナトリウム)、50 mM リン酸ナトリウム (pH 6/8)、0.1%ピロリン酸ナトリウム、5×デンハルト溶液、ソニケートされたサケ精子DNA (50 µg/ml)、0.1% SDS、および10%硫酸デキストランを使用し、42 で0.2×SSCおよび0.1% SDS中で洗浄する。またもう一つの例は、55 で10%硫酸デキストラン、2×SSC (塩酸ナトリウム/クエン酸ナトリウム) および50%ホルムアミドを使用してハイブリダイゼーションし、引き続き55 でEDTAを含む0.1×SSCより成る強緊縮洗浄を実施する。

【0095】

「イムノアドヘシン」または「NRG3-イムノアドヘシンキメラ」とは、免疫グロブリン配列と結合タンパク質の機能的ドメイン (通常リセプター、細胞接着分子またはリガンド) を組み合わせたキメラ抗体様分子である。このタイプの融合タンパク質の最も一般的な例は、特異的なリガンドを認識する細胞表面レセプターのドメインと、免疫グロブリン (Ig) のヒンジ及びFc領域を組み合わせる。このタイプの分子は、「免疫」および「接着」機能を組み合わせるために、「イムノアドヘシン」と呼ばれる；他のしばしば使用される名前としては、「Ig-キメラ」、「Ig-」または「Fc融合タンパク質」、あるいは「レセプター-グロブリン」である。

【0096】

「治療」は、治療的処理及び予防的または防止的手段の両者を指す。治療を必要とするものは、すでに疾患を有するもの並びに疾患が防止されなければならないものを含む。治療のための「哺乳動物」は、ヒトを含む哺乳動物、ヒツジ、イヌ、ウマ、ネコ、ウシ等の家庭及び農場の動物、及び動物園、スポーツまたはペット用の動物として分類される何

10

20

30

40

50

れかの動物を指す。好ましくは哺乳動物はヒトである。

【0097】

ここで使用される「キャリア」は、使用される投与量及び濃度でさらされる細胞または哺乳動物に対して非毒性である製薬学的に許容可能なキャリア、賦形剤、または安定剤を含む。しばしば、製薬学的に許容可能なキャリアは、水性pH緩衝溶液である。生理学的に許容可能なキャリアの例は、リン酸、クエン酸、及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残基以下）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、アスパラギンまたはリシ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ランを含むモノサッカリド、ジサッカリド、及び他の炭化水素；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；及び/またはTweenTM、ポリエチレングリコール（PEG）、及びPluronicTMのような非イオン性界面活性剤を含む。

10

【0098】

（組換えDNA法によるNRG3の生産のための一般的方法）

A．新規なニューレグリン関連リガンド、NRG3をコードする核酸の同定及び単離

本発明の天然のNRG3は、cDNAまたはゲノムライブラリーから単離できる。例えば、適切なcDNAライブラリーは、所望のNRG3を発現することが周知の細胞からポリアデニル化mRNAを得、二本鎖cDNAを合成するための鋳型として該mRNAを使用することによって構築できる。mRNAの適切な供給源は、胎児及び成人哺乳動物組織である。本発明の天然のNRG3をコードするmRNAは、例えば成人哺乳動物、脳、神経系、心臓、筋肉、及び精巣において発現される。本発明の新規なNRG3をコードする遺伝子はまた、ヒトゲノムコスミドライブラリー、またはマウス由来胚幹細胞（ES）ゲノムライブラリーのようなゲノムライブラリーから得ることができる。

20

【0099】

cDNAまたはゲノムのいずれかのライブラリーは、興味ある遺伝子またはそれによってコードされるタンパク質を同定するようにデザインされたプローブを使用してスクリーニングされる。cDNA発現ライブラリーのための適切なプローブは、本発明のNRG3を認識し特異的に結合するモノクローナル及びポリクローナル抗体を含む。cDNAライブラリーのための適切なプローブは、同種または異種から得たNRG3ポリペプチドの周知のまたは可能性のある部分をコードする注意深く選択されたオリゴヌクレオチドプローブ（通常約20 - 80ベースの長さ）、相補的なまたは相同的なcDNA、または同種または異種の遺伝子をコードするフラグメントを含む。ゲノムDNAライブラリーのための適切なプローブは、同じまたは同様な遺伝子をコードするオリゴヌクレオチド、cDNA、またはフラグメント、及び/または相同的なゲノムDNAまたはそのフラグメントを制限することなく含む。選択されたプローブでcDNAまたはゲノムライブラリーをスクリーニングすることは、Sambrook等、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989の第10 - 12章に記載されたような標準法を使用して実施され、その内容は完全に参考としてここに取り入れる。

30

40

【0100】

本発明のNRG3をコードするDNAが、各種の組織から得たcDNAライブラリーをスクリーニングするために注意深く選択されたオリゴヌクレオチド配列を使用することによって単離されたならば、プローブとして選択されたオリゴヌクレオチド配列は、偽の陽性選択を最小化するのに十分な長さで十分に明確であるべきである。真のヌクレオチド配列は、一つ以上の位置で縮重しているかもしれない。縮重したオリゴヌクレオチドの使用は、好ましいコドンの使用が周知ではない種から得たライブラリーがスクリーニングされる場合、特に重要である。

【0101】

該オリゴヌクレオチドは、スクリーニングされているライブラリーにおいてDNAにハ

50

イブリダイズした際に検出できるように標識されなければならない。好ましい標識化の方法は、該オリゴヌクレオチドの 5' 末端に放射性標識するために、ATP (例えば $\gamma^{32}\text{P}$) 及びポリヌクレオチドキナーゼを使用することである。しかしながら、ピオチン化または酵素標識化を制限することなく含む他の方法も、該オリゴヌクレオチドを標識するために使用され得る。

【0102】

新規な NRG3 をコードする cDNA はまた、直接的発現クローニング、または 1987 年 7 月 28 日に印刷された米国特許第 4,683,195 号、Sambrook 等、上記参照の第 14 章、Ausubel 等編、Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience 1991, Current Protocols in Molecular Biology の第 15 章に記載されたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を使用することのような、組換え DNA 法の他の周知の方法によって同定し単離することができ、上記文献は完全に参考としてここに含まれる。

10

【0103】

一種から新規な天然の ErbB4 レセプター特異的 NRG3 をコードする cDNA がひとたび単離されると、他種からの cDNA は、種間交差ハイブリダイゼーションによって得ることができる。このアプローチに従って、ヒトまたは他の哺乳動物の cDNA またはゲノムライブラリーは、周知の基準に従って周知の NRG3 配列 (ネズミまたはヒト配列のような) から選択された標識化オリゴヌクレオチド配列によってプローブされる。好ましくは、プローブ配列は、偽の陽性を最小化するのに十分な長さで十分に明確であるべきである。典型的には、特にもし該オリゴヌクレオチドが、メチオニンまたはトリプトファンに対する一つ以上のコドンを含むのであれば、約 30 から 50 ベースを有する ^{32}P 標識化オリゴヌクレオチドで十分である。単離された核酸は、核酸の供給源から得た他のポリペプチドをコードする混在した核酸から同定され分離される DNA であろう。ハイブリダイゼーションは、ここで定義される「緊縮条件」の下で好ましくは実施される。

20

【0104】

一度配列が解明されると、特定の NRG3 をコードする遺伝子もまた、化学的合成、及び Engels 及び Uhlmann, Agnew (1989) Chem. Int. Ed. Engl. 28: 716 に記載された以下の方法の一つで得ることができ、該文献は完全に参考としてここに含まれる。これらの方法は、トリエステル、垂リン酸塩、ホスホロアミダイト及び H-ホスホナート法、PCR 及び他の自動プライマー法、及び固相上でのオリゴヌクレオチド合成を含む。

30

【0105】

B. 新規な NRG3 をコードする核酸のクローニング及び発現

新規な NRG3 をコードする核酸がひとたび入手可能になると、一般的にさらなるクローニング (DNA の増幅) または発現のための複製可能発現ベクター内に連結される。発現およびクローニングベクターは本分野で周知であり、ベクターを一つ以上の選択された宿主細胞において複製可能にする核酸配列を含む。適切なベクターの選択は、1) それらが DNA 増幅または DNA 発現のいずれのために使用されるものが、2) ベクター内に挿入される DNA のサイズ、および 3) 該ベクターを使用してトランスフォームされる宿主細胞に依存するであろう。核ベクターは、その機能 (DNA の増幅または DNA の発現) およびそれが適合可能である宿主細胞に依存して様々な構成要素を含む。ベクター構成要素は一般的に、以下のものの一つ以上を制限することなく含む: シグナル配列、複製オリジン、一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。所望のコードおよびコントロール配列という上記記載の構成要素の一つ以上を含む適切なベクターの構築は、標準的な連結法を使用する。単離されたプラスミドまたは DNA フラグメントは、切断され、加工され、そして必要とされるプラスミドを生産するために望ましい形態に再連結される。構築されたプラスミドにおける正確な配列を確認するための分析として、連結混合物は、例えば大腸菌 K12 株 294 (ATCC 31,446) といった大腸菌細胞を形質転換するために一般的に使用され、適切であるかどうかアンピシリンまたはテトラサイクリン耐性によって成功した形質転換体を選択する。該形質転換体からプラスミドを調製し、制限エンドヌクレアーゼ切断によって分析し、および / または Me

40

50

ssing等, (1981) *Nucleic Acids Res.* 9: 309 の方法、またはMaxam等, (1980) *Methods in Enzymology* 65: 499 の方法によって配列決定する。

【 0 1 0 6 】

本発明のポリペプチドは、様々な原核生物および真核生物宿主細胞において発現される。適切な原核生物は、例えば大腸菌またはバチルスといったグラム陰性またはグラム陽性生物が含まれる。好ましいクローニング宿主は、大腸菌 2 9 4 (ATCC 31,446) であるが、大腸菌 B、大腸菌 X 1 7 7 6 (ATCC 31,537)、大腸菌 W 3 1 1 0 (ATCC 27,325)、シュードモナス種、または *Serratia Marcesans* のような他のグラム陰性またはグラム陽性原核生物が適している。

【 0 1 0 7 】

原核生物に加えて、糸状菌または酵母等の真核微生物も、ここでのベクターの好適な宿主である。*Saccharomyces cerevisiae* または通常のパン酵母は、下等真核性宿主微生物の内では最も通常に使用されている。しかしながら、*S. pombe* (BeachおよびNurce, (1981) *Nature* 290:140)、*Kluyveromyces lactis* (Lourencourt等, (1983) *J. Bacteriol.* 737) ; *yarrowia* (EP 402,226) ; *Pichia pastoris* (EP 183,070) ; *Trichoderma reesia* (EP 24 4,234) ; *Neurospora crassa* (Case等, (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5259-52 63) および *A. nidulans* (Ballance等, (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112:284- 289; Tilburn等, (1983) *Gene* 26: 205-221 ; Yelton等, (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1470-1474) 及び *A. niger* (Kelly等, (1985) *EMBO J.* 4: 475-479) 等の *Aspergillus* 宿主等、多くの他の属、種及び株が一般的に入手可能であり、また有用である。

【 0 1 0 8 】

好適な宿主細胞はまた、多細胞生物から導かれる。このような宿主細胞は、複雑な処理及びグリコシル化活性が可能である。原理的には、脊椎動物または無脊椎動物のいずれから導かれようが、任意の高等真核細胞培養物が利用可能であるが、ヒトのような哺乳動物由来の細胞が好ましい。無脊椎動物細胞の例は、植物及び昆虫細胞である。多くのバキュロウイルス株及び変異体、並びに対応する許容可能な昆虫宿主細胞が、*Spodoptera frugiperda* (イモ虫)、*Aedes aegypti* (蚊)、*Aedes albopictus* (蚊)、*Drosophila melanogaster* (ショウジョウバエ) 及び *Bombyx mori* 宿主細胞から同定されている。例えば、Luckow et al., *Bio/Technology* 6:47-55 (1988); Miller et al., in *Genetic Engineering*, Setlow et al., eds. Vol. 8 (Plenum Publishing, 1986), pp.277-279; 及び Maeda等, (1985) *Nature* 315:592-594 参照。例えば *Autographa californica* NPV の L-1 変異体等の形質導入のための多くのウイルス株が一般に入手可能であり、このようなウイルスは本発明におけるウイルスとして特に *Spodoptera frugiperda* 細胞の形質導入のために使用され得る。

【 0 1 0 9 】

綿、トウモロコシ、ポテト、ダイズ、ペチュニア、トマト及びタバコの植物細胞培養物は、宿主として使用され得る。典型的には、植物細胞は、予め N R G 3 D N A を含むように操作された細菌のある種の株、*Agrobacterium tumefaciens* と共に培養することにより形質導入される。植物細胞培養物と *A. tumefaciens* との培養の間に、N R G 3 をコードする D N A が植物細胞宿主に移動し、それが形質導入されて適当な条件下で N R G 3 D N A を発現するであろう。加えて、ノパリン合成酵素プロモーター及びポリアデニル化シグナル配列等の植物細胞に適合性の調節及びシグナル配列も入手可能である。Depicker等, (1982) *J. Mol. Appl. Gen.* 1:561。加えて、T-DNA 780 遺伝子の上流領域から単離された D N A フラグメントは、組換え D N A 含有植物組織において、植物が発現可能な遺伝子の転写レベルを活性化及び増大可能である。1989年6月21日発行の EP 321,196。

【 0 1 1 0 】

しかしながら、最も興味あるのは脊椎動物細胞であり、培養物 (組織培養物) 中での脊椎動物細胞の増殖は、本質的に周知である (例えば、*Tissue Culture*, Academic Press K ruse and Patterson, 編 (1973) 参照)。有用な哺乳動物細胞系の例は、S V 4 0 により形質転換されたサル腎臓 C V 1 系 (COS-7, ATCC CRL 1651) ; ヒト胚腎細胞系 (2 9 3 また

10

20

30

40

50

は懸濁培養中の生育についてサブクロ - ンされた 2 9 3 細胞、Graham等,(1977) J. Gen. Virol. 36:59) ; 仔ハムスター腎細胞9BHK, ATCC CCL 10) ; モルモット卵巣細胞 / - D H F R (CHO, Urlaub等, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216) ; マウスセルトリ細胞 (TM4, Mather, (1980) Biol. Reprod. 23:243-251) ; サル腎細胞 (CV1 ATCC CCL 70) ; アフリカミドリザル腎細胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587) ; ヒト頸部腫瘍細胞 (H ELA, ATCC CCL 2) ; イヌ腎細胞 (MDCK, ATCC CCL 34) ; バッファローラット肝細胞 (BR L 3A, ATCC CRL 1442) ; ヒト肺細胞 (W138, ATCC CCL 75) ; ヒト肝細胞 (Hep G2, HB 8 065) ; マウス乳癌 (MMT 060562, ATCC CCL 51) ; T R I 細胞 (Mather等, (1982) Annal . N. Y. Acad. Sci. 383:44-68) ; M R C 5 細胞 ; F S 4 細胞 ; 並びにヒト肝癌系 (Hep G2) である。好ましい宿主細胞は、ヒト胚腎 2 9 3 およびチャイニーズハムスター卵巣細胞である。

10

【 0 1 1 1 】

本発明の実施において特に有用な発現ベクターは、ここでの新規な N R G 3 をコードする D N A の哺乳動物細胞における一過的発現を提供する。一過的発現が好ましい場合、発現は、宿主細胞が発現ベクターの多コピーを蓄積し、そして該発現ベクターによってコードされる所望のポリペプチドの高レベルを合成するような、宿主細胞において効率的に複製可能である発現ベクターの使用を含む。適切な発現ベクターおよび宿主細胞を含む一過的系は、クローン D N A によってコードされるポリペプチドの簡便な陽性の同定を許容し、同様に所望の生物学的または生理学的性質についての上記ポリペプチドの急速なスクリーニングを許容する。それ故、一過的発現系は、本発明の天然の N R G 3 の類似体および変異体を同定する目的のために、本発明において特に有用である。

20

【 0 1 1 2 】

組換え脊椎動物細胞培養物における N R G 3 の合成の適用に適した他の方法、ベクター、および宿主細胞は、Gettling等, (1981) Nature 293: 620-625; Mantel等, (1979) Nature 281: 40-46; Levinson等; EP 117,058に記載されている。N R G 3 ポリペプチドの哺乳動物細胞培養物発現のための特に有用なプラスミドは、p R K 5 (EP307,247) または p S V 1 6 B (P C T 出願番号WO 91/08291) である。

【 0 1 1 3 】

様々な宿主細胞における本発明の N R G 3 の発現に適した他のクローニングおよび発現ベクターは、例えば1991年11月27日に印刷されたEP 457,758に記載されている。数多くの様々な発現ベクターが、現在商業的に入手可能である。例示的な商業的な酵母発現ベクターは、p P I C . 9 (Invitrogen) であり、大腸菌細胞の形質転換に適した商業的に入手可能な発現ベクターは P E T 1 5 b (Novagen) である。

30

【 0 1 1 4 】

C . 宿主細胞の培養

本発明の N R G 3 の生産に使用される原核細胞は、一般にSambrook et al., 前出文献に記述されるように適当な培地中で培養される。

哺乳動物細胞は、様々な培地で培養することができる。商業的に入手可能な、例えばHam's F10(Sigma)、最小必須培地 (MEM, Sigma)、R P M I - 1 6 4 0 (Sigma) 及び、ダルベッコ修飾イーグル培地 (DMEM, Sigma) が、宿主細胞の培養に好適である。加えて、HamおよびWallance., (1979) Meth. Enz. 58:44, BarnsおよびSato., (1980) Anal. Biochem. 102:255, 米国特許第4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; または4,560,655; WO90/03430; WO87/00195; 及び米国再審査特許30,985に記述されている何れかの培地も宿主細胞の培養培地として使用され得る。これらのいずれの培地も、必要に応じてホルモン類及び/または多の成長因子 (インスリン、トランスフェリン、または表皮成長因子等)、塩類 (塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸等)、緩衝剤 (HEPES等)、ヌクレオシド (アデノシン及びチミジン等)、抗生物質 (ゲンタマイシンTM等)、微量元素 (通常マイクロモルの最終濃度で存在する無機化合物として定義される)、並びにグルコースまたは他の同等なエネルギー源が補充されてもよい。その他の必要な補充物が、当業者に周知である適当な濃度をもって含まれてもよい。温度、p H等の培養条件は、クロー

40

50

ーニングまたは発現のために選択された宿主について従来使用されている通りで、当業者には明らかであろう。

【 0 1 1 5 】

この開示において引用される宿主細胞は、インビトロ細胞培養物、並びに宿主動物または植物内にある細胞を含む。

本発明の N R G 3 は、相同的組換え、または特定の N R G 3 をコードする D N A を既に含む細胞内に導入された制御要素を利用する組換え生産法を使用して生産されることは、さらに考慮されている。

【 0 1 1 6 】

D . 遺伝子増幅及び / または発現の検出

遺伝子増幅及び / または発現は、試料中において例えば慣用のサザンブロッティング、m R N A の転写を定量するノーサンブロッティング (Thomas, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5201-5205)、ドットブロッティング (D N A 分析)、またはインシトゥー (in situ) ・ハイブリダイゼーションにより、ここに提供される配列に基づいた適当な標識プローブを使用して直接に測定され得る。種々の標識が使用され得、最も普通には放射性同位体、特に³²Pである。しかしながら、ポリヌクレオチドに導入するためのビオチン修飾ヌクレオチドの使用等、他の技術も採用され得る。次いでビオチンは、放射性核種、蛍光体、酵素等の広範囲の種々の標識により標識されたアビジンまたは抗体に対する結合部位として作用する。別法として、D N A 二重体、R N A 二重体、D N A - R N A ハイブリッド二重体またはD N A - タンパク質二重体等の特定の二重体を認識する抗体が採用され得る。次いで抗体は、標識され、またアッセイが実行され、ここにおいて二重体は表面に結合され、該表面の二重体形成により該二重体に結合する抗体が検出され得る。

【 0 1 1 7 】

別法として、遺伝子発現は組織断面の免疫組織化学的染色、及び細胞培養物または体液のアッセイ等の免疫学的方法により、遺伝子生成物の発現を直接に定量して測定され得る。免疫組織化学的染色技術によれば、細胞試料が典型的には脱水及び固定化により調製され、次いで結合される遺伝子生成物に対して特異的な標識抗体が反応に付され、ここにおいて標識は、一般に酵素標識、蛍光標識、発光性標識等の目視検出可能なものである。本発明に使用するために好適な特に高感度の染色技術は、Hse等、(1980) Am. J. Clin. Pathol. 75:734-738に記述されている。

【 0 1 1 8 】

免疫組織化学的染色及び / または試料液体のアッセイのために有用な抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルのいずれでもよく、いかなる動物においても調製され得る。簡便には、該抗体は、天然 N R G 3 ポリペプチドに対して、または以下に開示される D N A 配列に基づいた合成ペプチドに対して調製される。

【 0 1 1 9 】

E . 天然 N R G 3 のアミノ酸配列変異体

天然 N R G 3 のアミノ酸配列変異体は、天然の N R G 3 D N A 内へ適切なヌクレオチド変化を導入することによって、または所望のポリペプチドのインビトロ合成によって、本分野で周知の方法により調製される。アミノ酸配列変異体の構築においては、二つの主要な変数が存在する：突然変異部位の位置および突然変異の性質である。天然の N R G 3 をコードする D N A 配列の操作を必要としない天然で生じる対立遺伝子を除いて、N R G 3 のアミノ酸配列変異体は、対立遺伝子に到達するものであれ、天然で生じないアミノ酸配列に到達するものであれ、D N A を突然変異することによって好ましくは構築される。

【 0 1 2 0 】

突然変異の一つの群は、本発明の新規な天然のマウスまたはヒト N R G 3 の細胞該ドメインまたは E G F 様ドメイン内で作製されるであろう (ヒトまたはマウス N R G 3 アミノ酸配列内のそれぞれの細胞外ドメイン (S E Q I D N O : 3 または S E Q I D N O : 7) 及び E G F 様ドメイン (S E Q I D N O : 4) の図式については図 3 参照)。これらのドメインは、機能的に重要であると解されるので、これらの領域における非保守的置

10

20

30

40

50

換、挿入及び／または欠失のような改変は、E r b B 4 レセプター結合及び活性化のような天然のレセプター分子の特性における本当の変化を導くことが予測される。従って、この領域におけるアミノ酸改変はまた、相当する天然のポリペプチドとは顕著に異なる特性を有する変異体を導くものと解される。これらの機能的に重要なドメイン内の非保存的置換は、天然の相当するもののE r b B 4 レセプター認識及び結合能力を失い、または相当する天然のタンパク質と比較して増大したE r b B 4 レセプター認識特性、増大した選択性、または増大した活性化特性を有する変異体を導くかもしれない。

【 0 1 2 1 】

その代わりに、またはそれに加えて、アミノ酸改変は、達成すべき目的に依存して、様々な種から得た新規なN R G 3において、または高く保存された領域において、異なる部位を作製することができる。上記部位での位置は、例えば(1) 保存された選択を使用した最初の置換、それから達成する結果に依存したさらなる徹底的な選択を使用した置換、(2) ターゲット残基の欠失、または(3) 位置された部位に隣接した同じまたは異なるクラスの残基の挿入、あるいは1 - 3 のケースの組み合わせといった一連の修飾を典型的に受けるであろう。一つの役立つ方法は、「アラニンスキャニング」と呼ばれるものである(CunninghamおよびWells, (1989) Science 244, 1081-1085)。

【 0 1 2 2 】

本発明の変異体N R G 3のまた別の群において、一つ以上の機能的により重要ではないドメインが、欠失または不活性化されても良い。例えば、膜貫通ドメインの欠失または不活性化は、天然のタンパク質の可溶性形態を生ずる。代わりに、または加えて、細胞内ドメインが欠失、切り詰め、さもなければ改変されても良い。天然で生じるアミノ酸は、共通な側鎖の性質に基づいて群に分けられる：

- (1) 疎水性：ノルロイシン、met、ala、val、leu、ile；
- (2) 中性疎水性：cys、ser、thr；
- (3) 酸性：asp、glu；
- (4) 塩基性：asn、gln、his、lys、arg；
- (5) 鎖の伸長に影響する残基：gly、pro；および
- (6) 芳香族：trp、tyr、phe。

【 0 1 2 3 】

保存的置換は、一つの群の一つの成員を同じ群のもう一つの成員と交換することを含む一方、非保存的置換は、一つの群の成員をもう一つのこれらのクラスと交換することを含む。機能または免疫学的同一性における実質的な変化は、より保存的でないN R G 3の置換によってなされる、すなわち(a) 例えばシートまたはヘリックス構造といった置換の領域でのポリペプチド骨格の構造、(b) ターゲット部位での分子の電荷または疎水性度、(c) 側鎖の大きさを有することにおける効果において顕著に異なるものでなされる。本発明の新規な天然のN R G 3の性質における最大の変化を生産することが一般的に期待される置換は、(a) 例えばセリルまたはスレオニルといった親水性残基を、ロイシル、イソロイシル、フェニルアラニル、バリルまたはアラニルといった疎水性残基に置換すること；(b) システインまたはプロリンを他の残基に置換すること；(c) 例えばリシル、アルギニル、またはヒスチジルといった塩基性の側鎖を有する残基を、例えばグルタミルまたはアスパラチルといった酸性の残基で置換すること；あるいは例えばフェニルアラニンといった大きな側鎖を有する残基を、例えばグリシンといった側鎖を有しないものに置換することであろう。上記置換は、E G F 様ドメインのような細胞外ドメイン内でなされた場合、より顕著な効果を有すると予測される。

【 0 1 2 4 】

本発明の新規なN R G 3の置換変異体は、他のタンパク質の機能的に相同な(少なくとも約40% - 50%の相同性を有する) ドメインが、細胞外ドメインまたはE G F 様ドメインのような、新規なN R G 3構築物内の上述のドメインの一つ以上について、通常の方法によって置換された変異体を含む。

【 0 1 2 5 】

アミノ酸配列欠失は、通常約 1 から 30 残基、好ましくは約 1 から 10 残基の範囲であり、典型的には連続している。典型的には、膜貫通ドメイン及び細胞内ドメイン、または膜貫通ドメインのみが欠失される。しかしながら、天然の NRG3 の生物学的活性及び免疫学的交差反応性を保存する膜貫通領域の C 末端から N 末端の何れかの適切なアミノ酸までの欠失が適している。ヒト及びマウス NRG3 コンセンサス配列のそれぞれの膜貫通領域 (TM) が、約アミノ酸 362 から約アミノ酸 384 まで (ヒト SEQ ID NO: 6 及び SEQ ID NO: 23)、及び約アミノ酸 360 から約アミノ酸 382 まで (マウス SEQ ID NO: 2) の範囲で図 4 及び 5 に示されている。

【0126】

本発明の好ましいクラスの置換及び/または欠失変異体は、新規な NRG3 分子の膜貫通領域を含むものである。膜貫通領域は、細胞膜の脂質二重相を打ち抜くのに正確なサイズである非常に疎水性または親油性のドメインである。それらは、NRG3 を細胞膜に固定し、ホモまたはヘテロポリマー複合体形成を可能にすると解される。典型的に、膜貫通ドメインヒドロキシル化残基の欠失または置換による、膜貫通ドメインの不活性化は、細胞または膜脂質親和性を減少し、水性溶解性を増大することによって、回収及び製剤化を容易にするであろう。もし膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインが欠失されたならば、さもないければ体内で異物として認識される細胞内ポリペプチドをさらすことによって、または潜在的に免疫原性である異種ポリペプチドの挿入によっての何れかで、潜在的に免疫原性のエピトープを導入することを避けなければならない。膜挿入機能の不活性化は、膜貫通において実質的に親水性の疎水性度のプロフィールを提供するのに十分な残基を欠失することによって、または同じ結果を生ずる異種残基で置換することによって達成される。

【0127】

本発明の NRG3 の膜貫通不活性化変異体の主な利点は、それらが組換え宿主の培養培地中に分泌されることである。これらの変異体は、血液のような体液に可溶性であり、細胞膜脂質に対する適切な親和性を有さず、かくして組換え細胞培養物からの回収が簡素化される。一般論として、上記可溶性変異体は、機能的細胞外ドメインまたはそのフラグメントを維持するが、機能的膜貫通ドメインを有さず、好ましくは機能的細胞質ドメインをも有さないであろう。

【0128】

例えば、膜貫通ドメインは、約 5 から 50 個のセリン、トレオニン、リシン、アルギニン、グルタミン、アスパラギン酸等の親水性残基のランダムなまたは所定の配列といった、何れかのアミノ酸配列によって置換されても良く、上記の残基は全て親水性の疎水性度のプロフィールを示す。欠失 (切り詰め) 可溶性変異体と同様に、これらの変異体は、組換え宿主の培養培地内に分泌される。

【0129】

アミノ酸挿入は、1 残基から 100 以上の残基を含むポリペプチドの範囲の長さのアミノ酸および/またはカルボキシ末端融合物を含み、同様に単一または複数のアミノ酸残基の配列内挿入を含む。配列内挿入 (すなわち新規な NRG3 アミノ酸内への挿入) は、約 1 から 10 残基、より好ましくは 1 から 5 残基、さらにより好ましくは 1 から 3 残基の範囲が一般的である。末端挿入の例は、組換え宿主細胞からの成熟 NRG3 またはそのフラグメントの分泌を容易にするための、NRG3 分子の N 末端に対する異種 N 末端シグナル配列の融合物を含む。上記シグナル配列は一般的に、企図された宿主種のシグナル配列から得られ、それ故それと同種である。適切な配列は、大腸菌について STII または Ipp、酵母について アルファファクター、哺乳動物細胞について ヘルペス gD のようなウイルスシグナルを含む。

【0130】

天然の NRG3 分子の他の挿入変異体は、例えばベータラクタマーゼまたは大腸菌 trp プロカスにコードされる酵素のような細菌ポリペプチド、または酵母タンパク質といった免疫原性ポリペプチドに対する NRG3 分子の N または C 末端の融合物、および 1989 年 4 月 6 日に発行された WO 89/02922 に記載されている免疫グロブリン領域 (好ましくは免疫

10

20

30

40

50

グロブリン定常領域)、アルブミン、またはフェリチンのような長い半減期を有するタンパク質とのC末端融合物を含む。

【0131】

さらなる挿入変異体は、新規なNRG3の免疫学的に活性な誘導体であり、それはEGF様ドメイン、および免疫学的に競合的な外因性のポリペプチドのエピトープを含むポリペプチド、すなわち融合物が投与され、または外因性ポリペプチドに対して生じた抗体によって結合可能な、動物において免疫応答を引き出すことが可能であるポリペプチドを含む。上記免疫学的に競合的なポリペプチドの典型的な例として、アレルゲン、自己免疫エピトープ、または他の潜在的な免疫原、あるいはtrpLE、 β -ガラクトシダーゼ、またはヘルペスgDタンパク質のようなウイルスポリペプチド等のような細菌ポリペプチドを含む、融合物受容者において抗体を前もって存在することによって認識される抗原が挙げられる。

10

【0132】

免疫原性融合物は、インビトロでの交差反応、または免疫原性ポリペプチドをコードする組換えDNAで形質転換された細胞培養物によって生産される。免疫原性融合物は、免疫原性配列がペプチド結合によって新規なNRG3分子またはそのフラグメントに結合されたまたはその中に挿入されたものであることが好ましい。それ故これらの産物は、NRG3エピトープおよび少なくとも一つのNRG3とは外来のエピトープを含む直鎖状ポリペプチド鎖より成る。本発明のNRG3分子またはそのフラグメント内のどこかに該エピトープを導入することが、本発明の範囲内にあることは理解されよう。これらの免疫原性挿入物は、製薬学的に許容可能なキャリア内に製剤化され、NRG3分子に対する抗体を生産するために患者へ投与される場合に特に有用であり、次に該抗体は、診断薬として、組織分類において、または標準的なイムノアフィニティー法によって新規なNRG3の精製において有用である。代わりに、本発明のNRG3の精製において、例えば抗体、レセプターまたはリガンドといった融合された外因性ポリペプチドに対する結合パートナーが、不純物を含む混合物から該融合物を吸着するために使用され、その後融合物が溶出され、必要であれば、酵素学的な切断によって、新規なNRG3が該融合物から回収される。

20

【0133】

変異体NRG3の特徴を前もって予測することはしばしば困難であるので、いくつかのスクリーニングが、最適な変異体を選択するために必要であろうことは予測されよう。上記スクリーニングは、ErbB4レセプター結合のアッセイを制限することなく含む。

30

【0134】

所望のミューテーションを同定した後、NRG3変異体をコードする遺伝子は、例えば周知の方法を使用して化学的合成によって得ることが可能である。より特には、NRG3アミノ酸配列変異体をコードするDNAは、NRG3の以前に調製された変異体または非変異体バージョンをコードするDNAの部位特異的突然変異誘発によって調製される。部位特異的突然変異誘発は、横側のプライマー結合部の両側で安定な二本鎖を形成するための十分なサイズおよび配列複雑性を有するプライマー配列を提供するために、所望のミューテーション、同様に十分な数の隣接ヌクレオチドのDNA配列をコードする特異的なオリゴヌクレオチド配列の使用を通じてNRG3変異体の生産を許容する。典型的には、改変される配列の結合部の両側の約5から10残基を有する約20から25ヌクレオチドの長さのプライマーが好ましい。一般的に、部位特異的突然変異誘発の方法は、Edelman等(1983)、DNA 2:183のような文献によって例示されているように、本分野で周知である。予測されるであろうように、部位特異的突然変異誘発の方法は典型的に、一本鎖および二本鎖形態の両方で存在するファージベクターを使用する。部位特異的突然変異誘発で有用である典型的なベクターは、例えばMessing等、Third Cleveland Symposium on Macromolecules and Recombinant DNA, A.Walton, 編, Amsterdam (1981)に開示されているようなM13ファージのようなベクターを含む。これおよび他のファージベクターは商業的に入手可能であり、その使用は当業者に周知である。M13由来ベクターを使用したDNAフラ

40

50

グメントにおける部位特異的突然変異誘発に向けたオリゴデオキシリボヌクレオチドの構築についての万能で効率的な方法は、Zoller等 (1982), *Nucleic Acids Res.* 10: 6487-6500 に印刷された。また、複製の一本鎖ファージオリジンを含むプラスミドベクター (Vera等, (1987) *Meth. Enzymol.* 153: 3) は、一本鎖 DNA を得るために使用される。代わりに、ヌクレオチド置換をインビトロで適切な DNA フラグメントを合成するために導入し、本分野で周知の PCR 法によってそれを増幅する。

【0135】

PCR 増幅法はまた、新規な NRG3 のアミノ酸配列変異体を作製するために使用される。PCR ミュタジェネシスの特異的な例として、テンプレートプラスミド DNA (1 μ g) を、増幅される領域の外側のプラスミド DNA における独特の制限部位を有する制限エンドヌクレアーゼを使用して切断することによって直線化する。この物質の 100 ng を、4 つのデオキシリボヌクレオチドを含む PCR バッファーを含む PCR 混合物に加え、GENE AMPR キット (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT and Emeryville, CA から得られる)、および 25 ピコモルの各オリゴヌクレオチドプライマー内に、50 μ l の最終容量に含ませる。該反応混合物を、35 μ l の鉱油を使用して層状にする。該反応物を 100 で 5 分変性させ、一瞬氷上におき、それから 1 μ l の *Thermus aquaticus* (Taq) DNA ポリメラーゼ ((5 ユニット / μ l) Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT and Emeryville, CA から購入される) を、鉱油層の下に加える。それから該反応混合物を、以下のようにプログラムされた DNA Thermal Cycler (Perkin-Elmer Cetus から購入された) 内に挿入する: (例として)

55 、 2 分、
72 、 30 秒、次いで以下の 19 サイクル:
94 、 30 秒、
55 、 30 秒、そして
72 、 30 秒。

【0136】

プログラムの最後に、反応バイアルをサーマルサイクラーから取り出し、水相を新しいバイアルに移し、フェノール/クロロホルム (50:50 vol) で抽出し、エタノール沈降し、そして DNA を標準的な方法で回収する。この物質を、ベクターに挿入するための適切な処理に受けさせる。

カセットミュタジェネシスは、変異体を調製するために有用な別法であり、Well 等, (1985) *Gene* 34: 315 に記載された方法に基づく。

【0137】

さらに、ファージミッドディスプレイ法と呼ばれるものが、天然のまたは変異体 NRG3 またはそのフラグメントのアミノ酸配列変異体を作製するのに有用である。この方法には、1) 突然変異されるレセプターをコードする第一の遺伝子、天然のまたは野生型ファージコートタンパク質の少なくとも一部分をコードする第二の遺伝子で、その場合第一および第二の遺伝子は異種であり、そして第一および第二の遺伝子に機能的に連結した転写調節エレメントを含む複製可能発現ベクターを構築し、それによって融合タンパク質をコードする遺伝子融合物を形成し; 2) 第一の遺伝子内の一つ以上の選択された位置でベクターを突然変異し、それによって関連するプラスミドのファミリーを形成し; 3) 該プラスミドで適切な宿主細胞を形質転換し; 4) ファージコートタンパク質をコードする遺伝子を有するヘルパーファージで形質転換された宿主細胞を感染し; 5) 少なくとも該プラスミドの一部を含む、宿主を形質転換可能である組換えファージミッド粒子を形成するために適した条件下で形質転換された感染宿主細胞を培養し、該条件は、ファージミッド粒子の少なからぬ量が、該粒子の表面に融合タンパク質の一コピーより多くを展示するように調節し; (f) ファージミッド粒子の少なくとも一部が抗原を結合するように適切な抗原とファージミッド粒子を接触させ; そして (g) 結合しないものから結合するファージミッド粒子を分離することを含む。工程 (d) から (g) を一度以上繰り返す。好ましくはこの方法において、プラスミドは転写調節エレメントの制御の下におき、培養条件を該粒子の表面に

融合タンパク質の一つより多いコピーを展示するファージミド粒子の量または数が約 1 % より少なくなるように調節する。また好ましくは、融合タンパク質の一コピーより多くを展示するファージミド粒子の量は、融合タンパク質の単一コピーを展示するファージミド粒子の量の 10 % より小さい。最も好ましくは、該量は 20 % より小さい。典型的にこの方法においては、発現ベクターはさらに、該ポリペプチドの各サブユニットをコードする DNA に融合された分泌シグナル配列を含み、該転写調節エレメントはプロモーター系であろう。好ましいプロモーター系は、lacZ、 λ_{pL} 、tac、T7 ポリメラーゼ、トリプトファン、およびアルカリホスファターゼプロモーター、並びにそれらの組み合わせを使用するであろう。また通常該方法は、M13K07、M13R408、M13-VCS および Phix174 から選択されるヘルパーファージを使用するであろう。好ましいヘルパーファージは M13K07 であり、好ましいコートタンパク質は M13 ファージ遺伝子 III コートタンパク質である。好ましい宿主は、大腸菌および大腸菌のプロテアーゼ欠損株である。上記および同様な突然変異誘発法のさらなる詳細は、例えば Sambrook 等、上記参照および Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel 等、編、上記参照のような一般的な教科書に見出される。

10

【0138】

F. グリコシル化変異体

グリコシル化変異体は、本発明の範囲に含まれる。それらは、グリコシル化を完全に欠失した変異体（非グリコシル化）、天然形態よりも少なくとも一つの少ないグリコシル化部位を有する変異体、同様にグリコシル化が変化している変異体を含む。脱グリコシル化及び非グリコシル化アミノ酸配列変異体、脱グリコシル化及び非グリコシル化天然 NRG3 またはそのフラグメント、および他のグリコシル化変異体が含まれる。例えば、置換または欠失ミュータジェネシスが、本発明の天然または変異体 NRG3 における N または O 結合グリコシル化部位を除去するために使用され、例えばアスパラギン残基が欠失またはリシンまたはヒスチジンのようなもう一つの塩基性残基に置換される。代わりに、グリコシル化認識部位を除去することによってグリコシル化を妨げるために、たとえアスパラギン残基を変化させないのであっても、グリコシル化部位を形成する隣の残基が置換または欠失される。好ましい NRL 変異体が、NRG3 の EGF 様ドメインである場合、外フラグメントは好ましくはグリコシル化されない。

20

【0139】

さらに、天然分子のグリコシル化部位を有する非グリコシル化 NRG3 は、原核生物はポリペプチド内にグリコシル化を導入できないために、組換え原核生物細胞培養物において生産される。

30

【0140】

グリコシル化変異体は、適切な宿主細胞によって、またはインビトロの方法によって生産される。例えば酵母および昆虫細胞は、哺乳動物系のものとは有意に変化しているグリコシル化を導入する。同様に、NRG3 の供給源とは異なる種（例えばハムスター、ネズミ、ブタ、ウシまたはヒツジ）、または組織起源（例えば肺、肝、リンパ、間葉または表皮）を有する哺乳動物細胞は、例えばマンノースの上昇したレベルまたはマンノース、フコース、シアル酸、および哺乳動物糖タンパク質において典型的に見出される他の糖について特徴付けられるような変異体グリコシル化を導入する能力について一般的にスクリーニングされる。NRG3 のインビトロでのプロセッシングは、例えばノイラミニダーゼ切断といった酵素的な加水分解によって典型的に成し遂げられる。

40

【0141】

G. 共有結合修飾

本発明の新規な NRG3 の共有結合修飾は、本発明の範囲に含まれる。上記修飾は、選択されたアミノ酸側鎖または末端残基と反応可能な有機誘導化試薬と、NRG3 のターゲット化アミノ酸残基を反応することによって、または選択された組換え宿主細胞において機能する翻訳後修飾のメカニズムを利用することによって、伝統的に導入される。生成共有結合誘導体は、生物学的活性、NRG3 のイムノアッセイ、または組換え体のイムノア

50

フィニティー精製のための抗NRG3抗体の調製において重要である残基の同定に向けたプログラムにおいて有用である。例えば、ニンヒドリンとの反応の後の該タンパク質の生物学的活性の完全な不活性化は、少なくとも一つのアルギニルまたはリシル残基がその活性に重要であることを示唆し、その後、選択された条件下で修飾された個々の残基は、修飾アミノ酸残基を含むペプチドフラグメントの単離によって同定される。上記修飾は当業者の範囲内にあり、過度の実験なく実施される。

【0142】

二官能試薬を使用した誘導体化は、ポリペプチドとNRG3の分子内凝集を調製するために、同様にアッセイまたはアフィニティー精製での使用のための水不溶性支持マトリックスまたは表面に対するNRG3ポリペプチドを架橋するために有用である。さらに、鎖内架橋の研究は、形態学的な構造に対する直接的な情報を提供するであろう。一般的に使用される架橋試薬は、1, 1 - ビス(ジアゾアセチル) - 2 - フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、ホモ二官能性イミドエステルおよび二官能性マレイミドを含む。メチル - 3 - [(p-アジドフェニル)ジチオ]プロピオイミダートのような融合化試薬は、光の存在下で架橋を形成することが可能な光活性化可能中間体を産する。代わりに、臭化シアン活性化炭化水素、および米国特許第3,959,642; 3,969,287; 3,691,016; 4,195,128; 4,247,642; 4,229,537; 4,055,635; および4,330,440号に記載されているシステム反応性基質のような反応性水不溶性マトリックスが、タンパク質固定化および架橋のために使用される。

10

【0143】

ある種の翻訳後修飾は、発現されたポリペプチド上での組換え宿主細胞の機能の結果である。グルタミルおよびアスパラギン残基は、相当するグルタミンおよびアスパルチル残基にしばしば翻訳後で脱アミド化される。代わりにこれらの残基は、穏やかな酸性条件下で脱アミド化される。これらの残基の各形態は、本発明の範囲に含まれる。

20

【0144】

他の翻訳後修飾は、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリル、トレオニルまたはチロシル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖の α -アミノ基のメチル化を含む(T. E. Creighton (1983) *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86)。

30

【0145】

ここでのNRG3のさらなる誘導体は、「イムノアドヘシン」と称されるものであり、それは結合タンパク質(通常レセプター、細胞接着分子またはリガンド)の機能的ドメインを、免疫グロブリン配列と組み合わせたキメラ抗体様分子である。この型の融合タンパク質の最も一般的な例は、免疫グロブリン(Ig)のヒンジ及びFc領域を、特異的なリガンドを認識する細胞表面レセプターのドメインと組み合わせる。この型の分子は、「免疫」及び「接着」機能を組み合わせたものであるため、「イムノアドヘシン」と称される; 他のしばしば使用される名前は、「Ig-キメラ」、「Ig-」または「Fc-融合タンパク質」、または「レセプター-グロブリン」である。

【0146】

文献中に報告されたイムノアドヘシンは、例えばT細胞レセプター(Gascoigne等, (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:2936-2940); CD4(Capon等, (1980) *Nature* 337:525-531; Traunecker等, (1980) *Nature* 339:68-70; Zetmeissl等, (1990) *DNA Cell Biol.* USA 9: 347-353; Byrn等, (1990) *Nature* 344:667-670); L-seNRG3(ホーミングレセプター)(Watson等, (1990) *J. Cell. Biol.* 110:2221-2229; Watson等, (1991) *Nature* 349:164-167); E-seNRG3(Mulligan等, (1993) *J. Immunol.* 151: 6410-17; Jacob等, (1995) *Biochemistry* 34: 1210-1217); P-seNRG3(Mulligan等, 上記参照; Hollenbaugh等, (1995) *Biochemistry* 34: 5678-84); ICAM-1(Sauton等, (1992) *J. Exp. Med.* 176: 1471-1476; Martin等, (1993) *J. Virol.* 67: 3561-68; Roep等, (1994) *Lancet* 343: 1590-93); ICAM-2(Damle等, (1992) *J. Immunol.* 148: 665-71); ICAM-3(Holness等, (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 870-84); LFA-3(Kanner等

40

50

, (1992) J. Immunol. 148: 223-229); L 1 グリコプロテイン (Doherty等, (1995) Neuron 14: 57-66); T N F - R 1 (Ashkenazi等, (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535-539; Lesslauer等, (1991) Eur. J. Immunol. 21: 2883-86; Peppel等, (1991) J. Exp. Med. 174: 1483-1489); T N F - R 2 (Zack等, (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2335-39; Wooley等, (1993) J. Immunol. 151: 6602-07); C D 4 4 (Aruffo等, (1990) Cell 61: 1303-1313); C D 2 8 および B 7 (Linsley等, (1991) J. Exp. Med. 173: 721-730); C T L A - 4 (Linsley等, (1991) J. Exp. Med. 174: 651-659); C D 2 2 (Stamenkovic等, (1991) Cell 66: 1133-1144); N P レセプター (Bennett等, (1991) J. Biol. Chem. 266: 23060-23067); I g E レセプター α (Ridgway and Gorman, (1991) J. Cell. Biol. 115, abstr. 1448); I F N - γ R α および β 鎖 (Marsters等, (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 5401-05); t r k - A、- B および - C (Shelton等, (1995) J. Neurosci. 15: 477-91); I L - 2 (Landolfi, (1991) J. Immunol. 146: 915-19); I L - 1 0 (Zheng等, (1995) J. Immunol. 154: 5590-5600)を含む。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 7 】

最も単純で最も容易なイムノアドヘシンデザインは、免疫グロブリン重鎖のヒンジ及び F c 領域と、「アドヘシン」タンパク質の結合領域(類)を組み合わせる。一般的に、本発明の N R G 3 - 免疫グロブリンキメラを調製する場合、所望の N R G 3 ポリペプチドをコードする核酸を、免疫グロブリン定常ドメイン配列の N 末端をコードする核酸の N 末端に、所望の配列の C 末端で融合するが、所望の N R G 3 配列の N 末端での融合もまた可能である。典型的には、上記融合物中でコードされるキメラポリペプチドは、少なくとも機能的に活性な免疫グロブリン重鎖の定常領域のヒンジ、C H 2 および C H 3 ドメインを維持している。融合物はまた、定常ドメインの F c 部分の C 末端で、または重鎖の C H 1 または軽鎖の相当する領域に対してすぐ N 末端で作製される。融合物が作製される正確な部位は重要ではない；特定の部位が周知であり、N R G 3 - 免疫グロブリンキメラの生物学的活性、分泌または結合特性を最適化するために選択される。

【 0 1 4 8 】

好ましい実施態様において、天然の成熟 N R G 3 ポリペプチド、あるいはその(膜貫通ドメイン - 不活性化または E G F 様ドメインポリペプチド)形態のような可溶性形態の配列は、例えば I g G 1 等の免疫グロブリンのエフェクター機能を含む抗体の C - 末端部分(特に F c 領域)の N - 末端に融合される。重鎖定常領域の全体を、N R G 3 配列に融合することも可能である。しかしながら、より好ましくはバイン切断部位の直ぐ上流のヒンジ領域から始まる配列(I g G の F c を化学的に定義し；重鎖定常領域の最初の残基を 1 1 4 位として、残基 2 1 6、または他の免疫グロブリンの類似する部位)が、融合に使用される。特に好適な実施態様において、N R G 3 配列(全長または可溶性)は、I g G 1、I g G 2、または I g G 3 重鎖のヒンジ領域、C H 2 及び C H 3、または C H 1、ヒンジ、C H 2 及び C H 3 領域に対して融合される。融合が行われる厳密な部位は重要ではなく、至適部位は常法の実験により決定され得る。

【 0 1 4 9 】

いくつかの実施態様において、N R G 3 - 免疫グロブリンキメラは、マルチマーとして、及び特にはホモダイマーまたはテトラマーとして集合する(WO 91/08298)。一般的にはこれらの集合体免疫グロブリンは、既知の単位構造を有するであろう。基本的な 4 本鎖構造単位は、I g G、I g D 及び I g E が存在する形態である。4 本単位は、より高分子量の免疫グロブリンにおいて反復され；I g M は、ジスルフィド結合により互いに保持される基本的 4 本単位のペンタマーとして一般には存在する。I g A グロブリン及び場合によっては I g G グロブリンは、血清中においてマルチマーとしても存在し得る。マルチマーの場合、各 4 本単位は、同じであるかまたは異なってもよい。

【 0 1 5 0 】

本発明の範囲にある種々の典型的な集合 P S T P I P - 免疫グロブリンキメラは、下記に模式的に図表化される：

(a) AC_L-AC_L；

- (b) $AC_H - [AC_H, AC_L - AC_H, AC_L - V_H C_H, \text{または} V_L C_L - AC_H]$;
 (c) $AC_L - AC_H - [AC_L - AC_H, AC_L - V_H C_H, V_L C_L - AC_H, \text{または} V_L C_L - V_H C_H]$;
 (d) $AC_L - V_H C_H - [AC_H, \text{または} AC_L - V_H C_H, \text{または} V_L C_L - AC_H]$;
 (e) $V_L C_L - AC_H - [AC_L - V_H C_H, \text{または} V_L C_L - AC_H]$; 及び
 (f) $(A-Y)_n - [V_L C_L - V_H C_H]_2$,

式中、

各Aは、同じまたは異なったNRG3ポリペプチドのアミノ酸配列を表し；

V_L は、免疫グロブリン軽鎖可変領域であり；

V_H は、免疫グロブリン重鎖可変領域であり；

C_L は、免疫グロブリン軽鎖の定常領域であり；

C_H は、免疫グロブリン重鎖の定常領域であり；

nは、1より大きい整数であり；

Yは、共有的交差結合試薬の残基を示す。

【0151】

簡素化するために前述の構造は、基本的特徴のみを示し；それらは免疫グロブリンの連結部(J)または他の領域は示されず、またジスルフィド結合も示されない。しかしながら、そのような領域が結合活性のために必要な場合には、それらは免疫グロブリン分子に占める通常の位置に存在するように構築されるであろう。

【0152】

免疫グロブリン軽鎖の存在は、本発明のイムノアドヘシンにおいては必要とされないが、免疫グロブリン軽鎖は、NRG3-免疫グロブリン重鎖融合ポリペプチドに共有的に結合するか、あるいは、NRG3ポリペプチドに直接に融合するかの何れかで存在するであろう。前者の場合、免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAは、典型的にはNRG3-免疫グロブリン重鎖融合タンパク質をコードするDNAと共に発現される。分泌に際して、ハイブリッド重鎖及び軽鎖は共有的に結合して、2個のジスルフィド結合した免疫グロブリン重鎖-軽鎖対を有する免疫グロブリン様構造を与えるであろう。このような構造の調製のための好適な方法は、例えば1989年3月28日発行の米国特許第4,816,567号に開示されている。

【0153】

好適な実施態様において、本発明のイムノアドヘシンの構築に使用される免疫グロブリン配列は、IgG免疫グロブリン重鎖定常領域に由来する。ヒトイムノアドヘシンについては、ヒトIgG1及びIgG3免疫グロブリン配列の使用が好ましい。IgG1を使用することの主な優位点は、IgG1イムノアドヘシンが固定化プロテインAにて効率的に精製され得ることである。対照的に、IgG3の精製には顕著により不安定な媒体であるプロテインGを必要とする。しかしながら、特定のイムノアドヘシン構造のためのIg融合の相手を選択する際には、免疫グロブリンの他の構造的及び機能的性質を考慮しなければならない、例えば、IgG3のヒンジはより長く、より柔軟性であって、それはIgG1と融合させた場合に、適切に畳み込みまたは機能しないであろうより大きいアドヘシン領域を適合させ得る。IgGイムノアドヘシンは典型的に一価または二価である一方、IgAおよびIgMのような他のIgサブタイプは、基本的Igホモダイマー単位のそれぞれ二量体または五量体構造を生ずる。マルチマーイムノアドヘシンは、そのIgGベースカウンターパートよりも大きな親和性を有してそれぞれのターゲットを結合できる点で有利である。上記構造物の報告された例は、CD4-IgM(Truncker等、上記参照)；ICCAM-IgM(Martin等(1983), J.Virol. 67: 3561-68)；およびCD2-IgM(Arunanandam等、(1993) J.Exp.Med. 177: 1439-50)。

【0154】

インビボの応用のためにデザインされたNRG3-Igイムノアドヘシンについて、Fc領域によって特定される薬物速度論的性質およびエフェクター機能は、同様に重要である。IgG-1, IgG-2およびIgG-4は全て21日のインビボ半減期を有するが、補体系を活性化するその相対的能力は異なる。IgG-4は補体を活性化せず、IgG

10

20

30

40

50

- 2 は I g G - 1 より補体活性化について有意に弱い。さらに I g G - 1 とは異なり、I g G - 2 は、単核細胞または好中球上の F c レセプターに結合しない。I g G - 3 は補体活性化に最適である一方、そのインビボ半減期は他の I g G アイソタイプのおよそ三分の一である。ヒトの治療薬として使用されるようにデザインされたイムノアドヘシンに対するもう一つの重要な考慮は、特定のアイソタイプのアロタイプ変異体の数である。一般的に、より小さく血清学的に定義されたアロタイプを有する I g G アイソタイプが好ましい。例えば、I g G - 1 は、4 つのみの血清学的に定義されたアロタイプ部位を有し、そのうちの二つ (G 1 m および 2) は、F c 領域中に位置する；これらの部位の一つ、G 1 m 1 は非免疫原性である。対照的に、I g G - 3 には 1 2 個の血清学的に定義されたアロタイプが存在し、その全てが F c 領域中に存在する；これらの部位の三つだけが (G 3 m 5 , 1 1 および 2 1)、非免疫原性である一つのアロタイプを有する。それ故、 γ 3 イムノアドヘシンの潜在的な免疫原性は、 γ 1 イムノアドヘシンのものより大きい。

10

【 0 1 5 5 】

N R G 3 - I g イムノアドヘシンは、I g c D N A 配列にフレーム中で N R G 3 部分をコードする c D N A 配列を融合することによって最も簡便に構築される。しかしながら、ゲノム I g フラグメントへの融合もまた使用される (例えば Gascoigne 等, (1987) Proc . Natl . Acad . Sci . USA 84: 2936-2940; Aruffo 等, (1990) Cell 61: 1303-1313; Stamenkov ic 等, (1991) Cell 66: 1133-1144)。融合物の後者のタイプは、発現のための I g 調節配列の存在を必要とする。I g G 重鎖定常領域をコードする c D N A を、ハイブリダイゼーションまたはポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 技術によって、脾臓または抹消血液リンパ球から由来する c D N A ライブラリーから、印刷された配列に基づいて単離することができる。

20

【 0 1 5 6 】

天然分子より長い半減期を有する、本発明の新規な N R G 3 の他の誘導体は、非蛋白性ポリマーに共有的に結合された N R G 3、N R G 3 フラグメント (E G F 様ドメインのような) または N R G 3 - 免疫グロブリンキメラを含む。非蛋白性ポリマーは、通常は親水性合成ポリマー、即ち天然には他に見出されないポリマーである。しかしながら、天然の供給源から単離されるポリマーのように、天然に存在し、また組換え若しくはインビトロの方法により生産されるポリマーは有用である。親水性ポリビニルポリマー、例えばポリビニルアルコール及びポリビニルピロリドンは、本発明の範囲内にある。特に有用なものは、ポリエチレングリコール (P E G) 等のポリアルキレンエステル；ポリオキシエチレン、ポリオキシプロピレン、及びポリオキシエチレンとポリオキシプロピレンとのブロックコポリマー (Pluronic) 等のポリエルキレン；ポリメタクリレート；カルボマー；ラクトース、アミロプクチン、デンプン、ヒドロキシエチルデンプン、アミロース、デキストランサルフェート、デキストラン、デキストリン、グリコーゲン、若しくは例えばヒアルロン酸等の酸ムコポリサッカリドのポリサッカリドサブユニット等の、ホモポリサッカリドまたはヘテロポリサッカリドを含む、サッカリド単量体、D - マンノース、D - および L - ガラクトース、フコース、フラクトース、D - キシロース、L - アラビノース、D - グルクロン酸、シアル酸、D - ガラクツロン酸、D - マンニユロン酸 (例えば、ポリマンニユロン酸またはアルギン酸)、D - グルコサミン、D - ガラクトサミン、D - グルコース、及びノイラミン酸からなる分枝鎖また非分枝鎖のポリサッカリド；ポリソルビトール及びポリマンニトール等の糖アルコールのポリマー；ヘパリン若しくはヘパロンを含む。該ポリマーは、好ましくは水溶性であるが、交差結合の前にはそうである必要はなく、しかしながら接合体は水溶性でなければならない。更に、該ポリマーは、接合体形態で高度に免疫原性であってはならず、また血管内輸液または注射により投与されるべき場合には、このような経路に適合しないような粘性を有してはならない。

30

40

【 0 1 5 7 】

好ましくは該ポリマーは、反応性の単一の基のみを有する。このことは、タンパク質分子の交差結合の防止を助ける。しかしながら、交差結合を低減すべく反応条件を至適化すること、または実質的に均質な誘導体を回収するために、ゲル濾過またはクロマトグラフ

50

ィー的ふるいを通して反応生成物を精製することは、ここにおける権利範囲内にある。

【0158】

該ポリマーの分子量は、望ましくは約100～500,000の範囲にあり、好ましくは約1,000～20,000である。選択される分子量は、ポリマーの性質及び置換の程度に依存するであろう。一般的には、ポリマーの親水性がより大きく、かつ置換の程度が大きいほど、採用される分子量はより小さい。至適分子量は、常法の実験により決定されるであろう。

【0159】

該ポリマーは、該ポリマー及び結合されるべき新規なNRG3、NRG3フラグメントまたはNRG3-免疫グロブリンキメラの1個以上のアミノ酸または糖残基と反応する多官能性交差結合試薬を介して、NRG3またはNRG3-免疫グロブリンキメラに共有的に結合される。しかしながら、誘導化ポリマーをハイブリッドと直接結合させることにより、該ポリマーを直接に交差結合させること、またはその逆も、本発明の範囲にある。

10

【0160】

NRG3またはNRG3-免疫グロブリンキメラの共有的交差結合部位は、N-末端アミノ基及びリジン残基に見出されるイプシロンアミノ基、並びに他のアミノ、イミノ、カルボキシル、スルヒドリル、ヒドロキシまたは他の親水性基を含む。該ポリマーは、多官能性(通常二官能性)交差結合試薬を使用することなくハイブリッドに直接に共有的に結合され得る。アミノ基に対する共有結合は、塩化シアヌル酸、カルボニルジイミダゾール、アルデヒド反応基(PEGアルコキシドとプロモアセトアルデヒドのジエチルアセタール; PEGとDHSO及び無水酢酸; PEGと4-ヒドロキシベンズアルデヒドのフェノキシド、スクシンイミジル活性化エステル、活性化ジチオカルボネートPEG、2,4,5-トリクロロフェニルクロロホルメートまたはP-ニトロフェニルクロロホルメート活性化PEG)に基づく既知の化学によりなされる。カルボキシル基は、カルボジイミドを使用してPEG-アミン結合により誘導される。

20

【0161】

ポリマーは、化学試薬、例えばメタ過ヨウ素酸または酵素、例えばグルコース若しくはガラクトースオキシダーゼ(何れかが炭水化物のアルデヒド誘導体を生成する)を使用する酸化により、次いでオリゴサッカリドのビオチンまたはアビジンにより標識に関するHeitzmann等, (1974) P. N. A. S. 71:3537-41またはBayer等, (1979) Methods in Enzymology 62:310により記述されるのと同様な方法でヒドラジンまたはアミノ誘導体ポリマーとの反応により、オリゴサッカリドの基に接合される。更に、オリゴサッカリドを結合するために使用された他の化学的または酵素的方法は、一般に誘導のためのアミノ酸部位よりも少ない置換が存在し、従ってオリゴサッカリド生成物はより均質であるため、特に有利である。オリゴサッカリド置換基は、場合により酵素消化、例えばノイラミニダーゼ消化により、ポリマー誘導に先立って修飾されてもよい。

30

【0162】

該ポリマーは、結合されるポリペプチドのアミノ酸側鎖、またはN-若しくはC-末端に対して直接に反応性を有するか、または多官能性交差結合試薬と反応性の基を有する。一般的に、このような反応性基を有するポリマーは、固定化タンパク質の調製について知られている。ここにおいてこのような化学を使用するためには、タンパク質固定化のために従来使用された不溶性ポリマーと同様な様式で誘導するのでなければ、水溶性ポリマーを採用しなければならない。シュウ化シアン活性化は、ポリサッカリドの交差結合において採用するために、特に有用な手法である。

40

【0163】

出発ポリマーについて称される「水溶性」とは、接合のために使用される該ポリマーまたは反応性中間体が、誘導反応に関与するために十分に水溶性であることを意味する。ポリマー接合体について称される「水溶性」とは、該接合体が血液糖の生理学的液体に可溶性であることを意味する。

【0164】

50

このようなポリマーによる置換の程度は、タンパク質上の反応部位の数、タンパク質の全てまたはフラグメントが使用されるか、該タンパク質が異種タンパク質との融合物であるか否か（例えばNRG3-免疫グロブリンキメラ）、分子量、親水性、及びポリマーの他の性質、並びに選択される特定のタンパク質誘導部位等に依存して変化するであろう。一般的に、接合体は1～10個のポリマー分子を有し、一方で任意の異種配列は、所望の活性が有意に悪影響を受けない限り、基本的には限定されない個数のポリマー分子により置換されてもよい。交差結合の至適な程度は、所望の提要にて機能する接合体の能力が決定された後には、置換の程度を変化させるための時間、温度及び他の反応条件が変化する実験的マトリクスにより容易に決定される。

【0165】

例えばPEG等のポリマーは、PEG等の非蛋白ポリマーによるタンパク質の共有結合修飾について、それ自体既知の広範囲の方法により交差結合される。しかしながら、これらの方法のいくつかは、ここにおける目的に対しては好ましくない。塩化シアヌル酸化学は、タンパク質交差結合を含む多くの副反応を招く。更に、それは特にスルヒドリル基を含むタンパク質の不活性化を導く恐れが大きい。カルボニルジイミダゾール化学（Beauchamp等, (1983) Anal. Biochem., 131:25-33）は、高いpH（>8.5）を必要とし、これはタンパク質を不活性化し得る。更に、「活性化PEG」中間体は水と反応し得る為、タンパク質に対して大過剰モルの「活性化PEG」が必要とされる。カルボニルジイミダゾール化学に要求される高濃度のPEGは、ゲル濾過クロマトグラフィー及び親水性クロマトグラフィーの両者に対して悪影響を与えるため、精製において問題を生じる。加えて、高濃度の「活性化PEG」は、タンパク質を沈殿させ得、これはそれ自体既に指摘されている問題点である（Davis, 米国特許第4,179,337）。他方において、アルデヒド化学（Royer, 米国特許第4,002,531）は、わずかに40倍のモル過剰量のPEG及び1-2時間のインキュベーションを必要とすることから、より効率的である。しかしながら、「断言されているPEGの金属ベース酸化剤と複合体を形成する傾向の為に」（Harris等, (1984) J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed. 22:341-52）、PEGアルデヒドの調製についてRoyerにより示唆された二酸化マンガンは問題である。DMSO及び無水酢酸を使用するMoffatt酸化の使用は、この問題を取り除く。更にRoyerにより示唆されたナトリウムボロヒドリドは高いpHにおいて使用されなければならない、ジスルフィド結合を還元する顕著な傾向を有する。対照的に、ナトリウムシアノボロヒドリドは、中性pHにおいて有効であり、ジスルフィド結合を還元する極めてわずかな傾向のみを有するため、好ましい。

【0166】

本発明の長半減期接合体は、未反応原料からゲル濾過により分離できる。接合体の異種の分子種は、同様な方法で他から精製される。該ポリマーは疎水性ゲルとして水不溶性であってもよい。

新規なNRG3は、コロイド状薬剤輸送系（例えばリボソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）、またはマイクロエマルジョンにおいて、コアセルベーション法または界面重合によって調製されたマイクロカプセルに封入されても良い。上記方法は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版, Osol, A. 編, (1980)に開示されている。

【0167】

H. 抗体調製

(i) ポリクローナル抗体

一般に本発明のNRG3, またはそのフラグメント（EGF様ドメインのような）に対するポリクローナル抗体は、NRG3およびアジュバントの複数回の経皮的（sc）または腹腔内的（ip）注射により、動物に生じさせ得る。NRG3またはタンパク質に対するターゲットアミノ酸配列を含むフラグメントを、免疫されるべき種に対して免疫原性のタンパク質、例えばキーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシチログロブリンまたはダイズトリプシンインヒビタ等と、二官能性または誘導化試薬、例えばマレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル（システイン残基を介しての接合）、N

10

20

30

40

50

- ヒドロキシスクシンイミド（リジン残基を介して）、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、 SOCl_2 、または R 及び R1 が異なるアルキル基である $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ を使用して接合させることは有用であろう。

【0168】

動物は、1 mg または $1\ \mu\text{g}$ のペプチドまたは接合体（それぞれウサギまたはマウス）を 3 体積のフロイント完全アジュバントと合わせ、該溶液を複数部位に皮内的に注射することにより、抗原、免疫原性接合体または誘導体に対して免疫される。1 ヶ月後に動物は、フロイント完全アジュバント中のペプチドまたは接合体の基の量の $1/5$ ないし $1/10$ を用い、複数部位の経皮注射により追加免疫される。7 ~ 14 日後に、動物は採血され、血清が抗 NRG3 抗体力価についてアッセイされる。動物は力価がプラトーに入るまで追加免疫される。好ましくは動物は、同じ NRG3 ポリペプチドの接合体であるが、異なるタンパク質に接合するか及び / または異なった交差結合試薬を介して接合する接合体にて追加免疫される。接合体は、タンパク質融合体として組み換え細胞培養においても調製され得る。アルム等の凝集剤も、免疫応答を向上するために好適に使用される。

【0169】

(ii) モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、実質的に均質な抗体の母集団、即ち母集団に含まれる個々の抗体は、少量存在し得る自然に起こる可能性のある変異を除いて同等である母集団から得られる。従って、修飾語「モノクローナル」は、異なる抗体の混合物ではないものとしての抗体の特徴を示す。例えば本発明の抗 NRG3 モノクローナル抗体は、Kohler & Milstein, (1975) Nature 256:495 によって最初に記述されたハイブリドーマ法を使用して作製されるか、または組換え DNA 法（Cabilly 等、米国特許第 4,816,567）によって作製されてもよい。

【0170】

本発明のモノクローナル抗体をコードする DNA は、慣用方法により容易に単離され、配列決定される（例えばネズミ抗体の重鎖及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の使用により）。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。一旦単離されれば、DNA は発現ベクターに入れられ、これは次いで、E. coli 細胞、霊長類 COS 細胞、モルモット卵巣（CHO）細胞、または免疫グロブリンタンパク質を別途生産しないミエローマ細胞にトランスフェクトさせ、組換え宿主細胞においてモノクローナル抗体の合成を得る。DNA はまた、例えば、同種ネズミ配列の位置にヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインに対するコード配列を置換することによって修飾され、Morrison 等、(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 6851、または非免疫グロブリンポリペプチドに対する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することによって修飾される。この方法において、ここで抗 PSTPIP モノクローナル抗体の結合特異性を有する「キメラ」または「ハイブリッド」抗体が調製される。

【0171】

典型的なこのような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常領域を置換するか、またはそれらは抗体の一方の抗原結合部位の可変領域を置換して、NRG3 に対して特異性を有する一つの抗原結合部位及び異なる抗原に特異性を有する他の抗原結合部位を有するキメラ性二価抗体を創生する。

【0172】

キメラまたはハイブリッド抗体は、交差結合試薬を含む合成タンパク質化学における貴地方法を使用してインビトロにて調製されてもよい。例えば、イムノトキシンは、ジスルフィド交換反応またはチオエーテル結合形成により使用して構築される。この目的に好適な試薬の例は、イミノチオレート及びメチル - 4 - メルカプトブチルイミド - トを含む。

【0173】

診断的応用のために、抗体は、典型的には検出可能な部分でラベルされる。検出可能部分は、直接的又は間接的に検出可能なシグナルを生ずることのできる任意のものである。

例えば、検出可能な部分は、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 又は ^{125}I などの放射性同位元素；フルオレセインイソチオシアナート、ローダミンまたはルシフェリンなどの蛍光又は化学発光化合物；ビオチン；例えば ^{125}I 、 ^{32}P 、 ^{14}C または ^3H のような放射性活性同位元素標識、または、アルカリホスファターゼ、ベータ-ガラクトシダーゼまたはセイヨウワサビペルオキシダーゼ等の酵素である。

【0174】

ポリペプチド変異体の検出可能な部分への分離可能な結合のためにこの分野で知られた任意の方法が採用され、Hunter 等，(1962) *Nature*, 144: 945; David 等，(1974) *Biochemistry*, 13: 1014; Pain 等，(1981) *J. Immunol. Meth.*, 40: 219; 及び Nygren, (1982) *J. Histochem. and Cytochem.*, 30: 407に記載されたものも含む。

10

【0175】

本発明の抗体は、競合結合アッセイ、直接及び間接サンドウィッチアッセイ、及び免疫沈降アッセイ等の周知の検定方法に採用することができる。Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp.147-158 (CRC Press, Inc., 1987)。

【0176】

(iii) ヒト化抗体

非ヒト抗体をヒト化する方法はこの分野で周知である。一般に、ヒト化抗体は、非-ヒトである供給源から導入される1個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「輸入」残基と称され、これは典型的には「輸入」可変領域から採られる。ヒト化は、基本的にはネズミCDRまたはCDR配列を、対応するヒト抗体配列で置換することにより、Winter及び共同研究者の方法に従って行われ得る (Jones et al., *Nature* 321:522-525(1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-327 (1985); Verhoeven et al., *Science* 239: 1534-1536(1988))。従って、このようなヒト化抗体は、キメラ抗体 (Cabilliet et al. 前出文献) であり、実質的に身障の可変領域より少ない部分が非-ヒト種からの対応する配列により置換されている。実際には、ヒト化抗体は典型的にはCDR残基の幾分か及び、おそらくFRの幾分か、ネズミ抗体の類似部位からの残基により置換されている。

20

【0177】

抗体が、抗原に対する高い親和性及び他の好ましい生物学的性質を保ってヒト化されることは重要である。この目的を達成するために、好ましい方法に従えば、ヒト化抗体は親及びヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列及び種々の概念的ヒト化生成物の分析工程により調製される。三次元免疫グロブリンモデルは、一般に利用可能であり当業者にはなじみがある。選択された候補の免疫グロブリン配列の可能な三次元配置構造を描いて映し出すコンピュータプログラムが利用可能である。これらのディスプレイを見ることは、候補の免疫グロブリン配列の機能における残基のそれらしい役割の分析、即ち候補の免疫グロブリンの抗原に対する結合能力に影響を与える残基の分析を可能とする。このようにして、FR残基が、標的抗原に対する増大した親和性等の所望の抗体特性が達成される様に、共通及び輸入配列から選択され、組み合わせられる。一般的に、CDR残基は、抗原結合への影響において、直接的かつ最も実質的に関与するものである。さらなる詳細は、PCT/US93/07832を参照し、それはPCT/US92/05216の一部継続出願であり、該文献は完全に参考としてここに取り入れる。

30

40

【0178】

別法として、免疫により、内因性免疫グロブリン生産を伴わずに完全量のヒト抗体を生産し得るトランスジェニック動物 (例えばマウス) の作成が可能である。例えば、キメラ及び生殖系列変異マウスにおける抗体重鎖結合領域 (J_H) 遺伝子の同型接合的削除が、内因性抗体の生産を完全に阻害することが記述されている。このような生殖系列変異マウスへのヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子の並びの移送は、抗原の攻撃に対してヒト抗体の生産を生じるであろう。例えば、Jakobovits等，(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551; Jakobovits等，(1993) *Nature* 362:255-258参照。

【0179】

50

(i v) 二重特異性抗体

二重特異性抗体とは、少なくとも二つの異なる抗原に対する結合特異性を有するモノクローナルの、好ましくはヒトまたはヒト化された抗体である。この場合においては、結合特異性の一つは本発明の N R G 3 に対するものであり、他のものは、例えば N R G 3 ファミリーの別の成員といった何れかの他の抗原に対するものであってもよい。上記構築物は、二重特異性イムノアドヘンシとも称される。

【 0 1 8 0 】

従来から、二重特異性抗体の組換え生産は、2種の免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖対の同時発現に基づいて2本の鎖は異なる特異性を有している (Milstein and Cuello, (1983) Nature 305:537-539)。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の無作為の収集のために、これらのハイブリドーマ (クオドローマ: Quadromas) は、1種のみが正しい二重特異性構造を有する10種の異なる抗体分子の可能な混合物を生じる。通常アフィニティークロマトグラフィー工程により行われる正しい分子の精製は、かなり煩雑であり、また生成物の収率も低い。同様な手法は、1993年5月13日発行のPCT出願公報WO 93/08829及びTraunecker等, (1991) EMBO J. 10:3655-3659に開示されている。この問題は、1997年5月5日に印刷された米国出願番号08/850058に開示されているように、各抗体の結合特異性を維持するように、二重特異性抗体の各腕に対して共通な軽鎖を選択することによって解消され得る。

【 0 1 8 1 】

別のより好ましい方法に従うと、所望の結合特異性を持った抗体可変領域 (抗体 - 抗原結合部位) は、免疫グロブリン定常領域配列に融合される。融合物は、好ましくは少なくともヒンジの一部、及び免疫グロブリン重鎖の第二と第三の定常領域 (C H 2 及び C H 3) を有する免疫グロブリン重鎖定常領域を伴う。軽鎖結合に必要な部位を含む、融合物の少なくとも一つに存在する第一の重鎖定常領域を有することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合物、及び所望により免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAが、別個の発現ベクターに挿入され、適当な宿主生物に同時導入する。これは、構築に使用される3種のポリペプチドの異なる比が至適収率を与える場合に、実施態様において3種のポリペプチドフラグメントの相対比の調節に大きな柔軟性を与える。しかしながら、少なくとも2種のポリペプチド鎖の同じ比率での発現が高収率をもたらす場合、または比率が重要でない場合には、2種または3種全てのポリペプチド鎖のコード配列を1個の発現ベクター中に挿入することも可能である。この方法の好ましい実施態様において、二重特異的抗体は、第一の結合特異性を一つのアームに有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖、及び他方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖対 (第二の結合特異性を与える) からなる。この非対称構造は、二重特異的分子の半分のみに免疫グロブリン軽鎖が存在することが分離に容易な方法を提供するため、所望の二重特異的化合物を望まれない免疫グロブリン鎖の組み合わせから分離することを容易にする。この方法は、1994年3月3日発行のWO 94/04690に開示されている。

二重特異的抗体の生成の更なる詳細は、例えば、Suresh等, (1986) Methods in Enzymology 121:210参照。

【 0 1 8 2 】

(v) 異種接合抗体

異種接合抗体もまた、本発明の範囲に含まれる。異種接合抗体は、二つの共有結合した抗体より成る。上記抗体は例えば、非所望の細胞に対して免疫系をターゲット化するために (米国特許第4,676,980号)、およびH I V 感染の治療のために (P C T 出願公報WO 91/00360およびWO 92/200373; EP 03089) 提案されている。異種接合抗体は、いかなる簡便な架橋法にもっても作製される。適切な架橋試薬は本分野で周知であり、数多くの架橋法と共に米国特許第4,676,980号に開示されている。

【 0 1 8 3 】

I . 診断キットおよび製造品 (Article of Manufacture)

本発明は、便宜上、診断アッセイ (すなわち、神経学的疾患の検出用および抗体またはDNAマーカーを用いたサンプル中のN R G 3の存在の検出用) を提供し、これらのアッ

10

20

30

40

50

セイ用試薬は、キットで、すなわち、試験するサンプルと組合せるために、パッケージ化された試薬の組合せで提供できる。キットの成分は通常、前以て決定した比率で提供される。従って、キットは、適当な標識で直接的または間接的に標識された抗体またはNRG3(DNAまたはポリペプチドまたはそのフラグメント)を含み得る。検出可能な標識が酵素である場合、キットは酵素が必要とする基質および補因子を含む(例えば、検出可能な発色団または発蛍光団を提供する基質前駆体)。さらに、安定化剤、緩衝剤等の他の添加剤も含み得る。種々の試薬の相対量は、アッセイの感度を十分に最適化する試薬の溶液中濃度が得られるように、大きく変化し得る。特に、試薬は、賦形剤を含む、通常凍結乾燥した乾燥粉末として提供され得、これを溶解すると適当な濃度を有する試薬溶液が得られる。キットはまた、適当には、生体アッセイを実施する説明書も含む。

10

【0184】

本発明の別の実施形態において、本明細書に記載の神経学的疾患の処置に有用な物質を含む製造品が提供される。製造品は、容器およびラベルを含む。適当な容器は、例えば、瓶、バイアル、シリンジおよび試験管を含む。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの種々の物質からなる。容器は、症状の処置に効果的な組成物を保持し、および無菌開閉口を有し得る(例えば容器は、静脈内溶液バッグまたは皮下注射針により貫通可能なストッパーを有するバイアルを含み得る)。組成物中の有効成分はNRG3またはそのアゴニストまたはアンタゴニストである。容器上またはそれに付いたラベルは、組成物を選択した症状の処置に使用することを示す。製造品は、さらに、医薬的に許容される緩衝剤、例えばリン酸緩衝溶液、リンガー溶液およびデキストロース溶液を含む第二の容器を含み得る。それは、他の緩衝剤、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、およびパッケージインサートを含む、商業的および使用者の立場から望ましい他の材料を使用説明書と共にさらに含み得る。

20

【0185】

J. ペプチドおよび非-ペプチド類似体

本発明のNRG3のペプチド類似体は、天然ポリペプチドの三次元構造を基本として型作られている。ペプチドは、初めにMerrifield(1963)J. Am. Chem. Soc. 15:2149-2154に記載の固相合成技術などのよく知られた技術により合成され得る。他のペプチド合成技術は、例えば、Bodanszky等, Peptide Synthesis, John Wiley & Sons、第二版、1976並びに当業者により容易に入手可能な他の参考本に記載されている。ペプチド合成の要約は、Stuart及びYoung, Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Company, Rockford, IL (1984)に認められ得る。ペプチドはまた、所望のペプチドをコードするDNA配列を用いて組換えDNA技術により製造され得る。

30

ペプチド類似体に加えて、本発明はまた、本発明のペプチド類似体と実質的に同一の表面を示し、ゆえに同様の形式で他の分子と相互作用する非-ペプチド(例えば有機)化合物にも関する。

【0186】

K. NRG3の使用

本発明の天然NRG3のアミノ酸変異体は、治療に使用し得、これはそのレセプターであるErbb4への天然タンパク質の正常な結合と競合する。NRG3アミノ酸配列変異体は、ゆえに、天然NRG3の生物学的活性の競合的阻害剤として有用である。

40

【0187】

天然NRG3およびそのアミノ酸配列変異体は、天然Erbb4レセプターの同定および精製に有用である。精製は、好ましくは、本発明の天然NRG3と、その天然Erbb4レセプターの認識において同等の能力を保持するNRG3アミノ酸配列を含む免疫吸着により実施する。

本発明の天然NRG3はさらに、Erbb4レセプターが発現される組織の分子マーカーとして有用である。

【0188】

さらに、NRG3、好ましくは本発明のNRG3のEGF様ドメインは、他の天然のN

50

R G 3 ファミリー分子の成員、例えばヘレグリン (heregulin) に挿入または置換できる価値ある配列モチーフを提供する。本発明の新規 N R G 3 由来の配列を置換または挿入してこれらの天然タンパク質を変化させることにより、生物学的特性 (例えばレセプター結合親和性またはレセプター特異性) の変化した変異分子を産生できる。例えば、N R G 3 ファミリーの別の成員の 1 つ以上の N R G 3 ドメインは、本発明の N R G 3 由来の N R G 3 ドメイン配列により全体的または部分的に置換され得る。同様に、本明細書の N R G 3 の E G F 様ドメイン配列は、他の N R G 3 のアミノ酸配列に置換または挿入され得る。

【0189】

本発明の N R G 3 をコードする核酸もまた、c D N A の探索用ハイブリダイゼーションプローブおよび他の N R G 3 のコード配列のゲノムライブラリーの提供に有用である。

さらに、本発明の N R G 3 は、N R G 3 に関連した疾病の診断、および本明細書に記載した、体液などのサンプル中の N R G 3 の存在または非存在についての検出法のキットに有用である。

【0190】

N R G 3 による E r b B 4 レセプターの結合および活性化は、E r b B 4 レセプターを発現する細胞において、特に神経組織における、細胞成長、細胞増殖、および細胞分化などの生理学的応答を仲介することが期待される。結果として、哺乳動物 N R G 3、またはその E r b B 4 レセプター結合および活性化フラグメントは、神経細胞成長、増殖および/または分化が疾病の症候を軽減する疾病の処置に有用である。N R G 3 は、ネズミ N R G 3 (S E Q I D N O : 2) またはヒト N R G 3 (S E Q I D N O : 6 または S E Q I D N O : 2 3) の全長アミノ酸配列であり得；別の哺乳動物種由来の全長アミノ酸配列は、アミノ酸レベルで、ネズミおよびヒト N R G 3 に少なくとも約 7 5 % の相同性、好ましくは E G F 様結合ドメインにおいて約 9 0 % のアミノ酸配列相同性を有する；およびアミノ酸配列は N R G 3 の E G F 様ドメインを含み、この配列が E r b B 4 レセプターに結合する。N R G 3 または E r b B 4 レセプター結合フラグメントがアゴニストである場合、N R G 3 またはフラグメントは、E r b B 4 レセプターに結合し活性化する。N R G 3 またはフラグメントがアンタゴニストである場合、N R G 3 またはフラグメントは E r b B 4 レセプターに結合するが活性化せず、よって天然に存在する N R G 3 またはアゴニストによる活性化を阻害する。

【0191】

N R G 3 またはそのアゴニスト (例えば N R G 3 E G F 様ドメインを含むポリペプチド) の投与により処置可能な疾病は、神経系が、例えばトラウマ、手術、卒中、虚血、感染、代謝性疾患、栄養不足、悪性腫瘍、または毒薬により傷害を受けた患者に生じ得る疾病；運動ニューロン疾患、例えば筋萎縮性側索硬化症 (ロウ・ゲーリヒ病)、ベル麻痺、および背骨筋肉萎縮、または完全麻痺を含む種々の症状；ヒト「神経変性疾患」、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、癲癇、多発性硬化症、ハンチントン舞蹈病、ダウン症候群、神経性難聴およびメニエール病；ニューロパシー、および特に末梢の、末梢神経系に影響を与える疾患で、最も頻繁に運動、感覚、感覚・運動、または自律神経機能不全の 1 つまたは組合せとして顕現し、例えば、遠位感覚・運動ニューロパシーまたは胃腸管の運動性低下または膀胱弛緩症を含む、自律性ニューロパシーを含むがこれに限定されない。全身性疾病に関連したニューロパシーの例は、ポリオ後症候群を含み；遺伝性ニューロパシーの例は、シャルコー・マリー・トゥース病、レフサム病、無βリポタンパク血症、タンジール病、クラッペ病、黒染性白質ジストロフィ、ファブリー病、およびデジュリン・ソッタス症候群を含み；毒薬により生じるニューロパシーの例は、ピンクリスチン、シスプラチン、メトトレキサート、または 3' - アジド - 3' - デオキシチミジンなどの化学療法剤での処置により生じたものを含む。また、N R G 3 またはその生物学的に活性なフラグメント (例えば N R G 3 の E G F 様ドメイン) は、筋ジストロフィなどの骨格筋、平滑筋の疾病または平滑筋消耗により生じた疾病の処置に使用され得る。

【0192】

半透過性のインプラント可能な膜装置は、ある環境における薬物輸送手段として有用で

ある。例えば、可溶性 N R G 3、またはそのアゴニスト、またはキメラを分泌する細胞をカプセル化することができ、かかる装置は、患者に、例えば、パーキンソン病罹患患者の脳にインプラントできる。米国特許第4,892,538号、Aebischerら；米国特許第5,011,472号、Aebischerら；米国特許第5,106,627号、Aebischerら；P C T 出願W091/10425；P C T 出願W091/10470；Winnら（1991）Exper.Neurology 113:322-329；Aebischerら（1991）Exper.Neurology 111:269-275；およびTrescoら（1992）ASAIO 38:17-23参照。従って、本明細書で教示したように、神経に対する傷害または他の N R G 3 発現または N R G 3 応答細胞、例えば脳、心臓、または腎臓細胞に対する傷害を予防または処置する方法も含まれ、該法は、N R G 3、またはそのフラグメントまたはアゴニスト、または特定の状態において必要とされ得るアンタゴニストを分泌する細胞を、それを必要とする患者の身体にインプラントすることを含む。最後に、本発明は、半透膜（膜は、N R G 3、またはそのフラグメントまたはアゴニストに透過性であり、細胞に有害な患者の因子には不透過である）および膜内にカプセル化された N R G 3、またはそのフラグメントまたはアゴニスト、（または特定の状態において必要とされ得るアンタゴニスト）を分泌する細胞を含む、本明細書で教示したように神経傷害または他の細胞への傷害を予防または処置するためのインプラント装置を含む。N R G 3 をエキスピボ(ex vivo)で産生するように形質転換した患者自身の細胞は、所望によりかかるカプセル化を施さずに、直接患者にインプラントできる。天然細胞の膜カプセル化の方法は、当業者にはよく知られており、カプセル化細胞の調製および患者へのインプラントは当分野で公知のように容易に実施し得る。本発明は、ゆえに、細胞を、必要とする患者の身体にインプラントすることにより、細胞傷害、好ましくは神経傷害を予防または処置する方法を含み、ここで細胞は、自然に N R G 3、またはそのフラグメントまたはアゴニストを産生するもの、または工学操作により N R G 3、またはそのフラグメントまたはアゴニストを分泌するものを選択する。好ましくは、患者がヒトである場合、分泌 N R G 3 は可溶性ヒト N R G 3 である。インプラントは、好ましくは非 - 免疫原性でありおよび / または免疫原性インプラント細胞が免疫系により認識されるのを防止する。C N S 輸送において、好ましいインプラント部位は脊髄の脳脊髄液である。

【 0 1 9 3 】

本発明の N R G 3、そのフラグメントまたは変異体の投与は、種々の方法で、例えば、皮下、静脈内、大脳内、鼻腔内、経皮内、腹腔内、筋肉内、肺内、腔内、直腸内、動脈内、病巣内、心室内、脳内、または眼球内を含むがこれに限定されない、特殊な適用で公知の経路で実施できる。N R G 3 は C N S の液体リザーバーに注入することにより連続投与し得るが、当業者に公知の技術、例えばポンプまたはインプラントを用いた濃縮塊注入も許容できる。持続放出システムも使用できる。疾患に適合すれば、部位特異的輸送に N R G 3 変異体を製剤化および投薬し得る。投与は連続的または周期的であり得る。投与は、流度が一定またはプログラム化されたインプラント可能なポンプにより、または周期的注射により実施できる。

【 0 1 9 4 】

半透過性インプラント可能な膜装置は、ある環境における薬物輸送手段として有用である。例えば、可溶性 N G F 変異体を分泌する細胞をカプセル化することができ、かかる装置は、患者に、例えば、パーキンソン病罹患患者の脳または脊髄（C S F）にインプラントできる。米国特許第4,892,538号、Aebischerら；米国特許第5,011,472号、Aebischerら；米国特許第5,106,627号、Aebischerら；P C T 出願W091/10425；P C T 出願W091/10470；Winnら（1991）Expr.Neurology 113:322-329；Aebischerら（1991）Expr.Neurology 111:269-275；およびTrescoら（192）ASAIO 38:17-23参照。最後に、本発明は、半透膜および N R G 3 を分泌する細胞を含む、本明細書で教示したように神経傷害または他の細胞への傷害の予防または処置のためのインプラント装置を含み、前記膜は、N R G 3 に透過性であり、細胞に有害な患者の因子には不透過性であり、細胞は当該膜内にカプセル化される。N R G 3 をエキスピボで産生するように形質転換した患者自身の細胞は、所望によりかかるカプセル化を施さずに、直接患者にインプラントできる。天然細胞の膜カプセル化

の方法は、当業者にはよく知られており、カプセル化細胞の調製およびその患者へのインプラントは当分野で公知であるように容易に実施し得る。好ましくは、患者がヒトである場合、分泌NRG3、そのフラグメントまたは変異体は可溶性ヒトNRG3である。インプラントは、好ましくは非-免疫原性でありおよび/または免疫原性インプラント細胞が免疫系により認識されるのを防ぐ。CNS輸送において、好ましいインプラント部位は脊髄の脳脊髄液である。

【0195】

本発明の医薬組成物は、患者への投与に適した形のNRG3を含む。好ましい実施形態において、医薬組成物は水溶性であり、キャリア、賦形剤、安定化剤、緩衝剤、塩、抗酸化剤、親水性ポリマー、アミノ酸、炭水化物、イオン性または非イオン性界面活性剤、およびポリエチレングリコールまたはプロピレングリコールなどの生理学的に許容される物質を含み得る。NRG3はインプラント用時間放出形であるか、または当業者に公知の技術を用いてマイクロカプセル中にトラップし得る。

10

【0196】

治療に使用する効果量のNRG3またはNRG3アゴニストまたはアンタゴニストは、例えば、治療客体、投与経路、患者の状態に依存する。従って、治療専門家は投与量の力価を測定し、最適な治療効果を得るに必要な投与経路を修飾することが必要である。典型的な1日量は、1日あたり患者の体重の約10ng/kgから100mg/kgまで又はそれ以上、好ましくは約1μg/kg/日から10mg/kg/日の範囲である。典型的には、医療者は、上記の疾患の処置に所望の効果が得られる用量までNRG3またはNRG3アゴニストまたはアンタゴニストを投与する。

20

【0197】

L. トランスジェニックおよびノックアウト動物

非-ヒト種からの新規NRG3をコードする核酸、例えばネズミNRG3は、トランスジェニック動物または「ノックアウト」動物のいずれかを産生するために使用でき、これはまた、治療に有用な薬剤の開発およびスクリーニングに有用である。トランスジェニック動物(例えばマウス)は、形質転換遺伝子を含む細胞を有する動物であり、この形質転換遺伝子は、動物または動物の祖先に、胎児期、例えば胚段階で導入した。形質転換遺伝子は、細胞のゲノムに組み込まれたDNAであり、これからトランスジェニック動物が発生する。1つの実施形態において、NRG3またはその適当な配列をコードするネズミcDNAを用いて、確立された技術に従って、NRG3をコードするゲノムDNAをクローン化し、ゲノム配列を使用してNRG3をコードするDNAを発現する細胞を含むトランスジェニック動物を産生する。トランスジェニック動物、特にネズミなどの動物を産生する方法は、当分野で慣用的となり、例えば米国特許第4,736,866号および4,870,009号に記載されている。典型的には、ニューロン細胞などの特定の細胞は、組織特異的エンハンサーと共に、NRG3形質転換遺伝子を取り込む標的となり、これにより、細胞分化、細胞増殖、または細胞アポトーシスの変化が、発現ポリペプチドとのリガンド相互作用に依存してもたらされる。胚段階で動物の生殖細胞に導入された、NRG3をコードする形質転換遺伝子のコピーを含むトランスジェニック動物を用いて、NRG3をコードするDNAを増加発現した効果について調べる。かかる動物は、例えば異常神経分化および神経細胞増殖などに関連した疾病から保護すると考えられる薬剤の試験動物として使用できる。本発明のこのファセットにより、動物を薬剤で処置すると、形質転換遺伝子を有する非処置の動物に比較して疾患の頻度が低いことにより、疾患への治療的介入が示唆される。

30

40

【0198】

また、NRG3の非-ヒト相同体を用いて、NRG3「ノックアウト」動物を構築でき、NRG3をコードする内因性遺伝子および動物の胚細胞に導入したNRG3をコードする変化したゲノムDNA間での相同的組換えの結果、NRG3をコードする遺伝子が欠損または変化している。例えば、NRG3をコードするネズミcDNAを用いて、確立された技術に従って、NRG3をコードするゲノムDNAをクローン化することができる。NRG3をコードするゲノムDNAの一部は、欠失、または、例えば組み込みを監視するた

50

めに使用可能な選択マーカーをコードする遺伝子などの他の遺伝子で置換できる。典型的には、数千ベースの非変性フランキンゲンDNA（5'および3'末端の両方）がベクターに含まれる（例えば、ThomasおよびCapecchi、Cell 51:503(1987)、相同的組換えベクターの記載参照）。ベクターを、胚幹細胞系に導入し（例えば電気穿孔により）、導入されたDNAが内因性DNAで相同的に組換えられた細胞を選択する（例えば、Liら、Cell 69:915(1992)参照）。次いで、選択した細胞を動物（例えばマウス）の胚盤胞に注射し、凝集キメラを形成する（例えば、Bradley、Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach、E.J.Robertson編(IRL、Oxford、1987)pp.113-152参照）。次いで、キメラ胚は、適当な偽妊娠雌飼育動物にインプラントでき、胚から「ロックアウト」動物が作製される。相同的組換えDNAをその生殖細胞に有する子孫は、標準的な技術により同定でき、全ての動物細胞が相同的組換えDNAを含む動物を産生することができる。ロックアウト動物は、天然NRG3により開始または維持される細胞プロセスを回復する効果的治療薬、例えばNRG3アゴニストの選択に使用でき；またはロックアウト動物はnr g 3変異の効果の研究にも使用できる。

【0199】

本発明は、最も実地的で好ましい実施形態であると考えられるものに関して本明細書で示し記載されている。しかし、本発明の範囲内で変形させ得、明らかな修飾がこの開示を読んだ当業者により施されると解される。

【実施例】

【0200】

以下の実施例は、当業者に、本発明の化合物および組成物の製造法および本発明の方法の実施法に関する完全な開示および記載を提供するために提供され、発明者が発明であると考える範囲を制限するためではない。使用した数値（例えば、量、温度等）に関して正確さを保証するため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。特記しない限り、部は重量部であり、温度は摂氏温度Cであり、圧力は大気圧または大気圧近傍である。

【0201】

（実施例1：マウスおよびヒトの新規なNRG3の分子クローニング）

新規NRG3 cDNAは以下で示される発現配列タグを用いて同定した：

A A T T T C T G C C G A A A A C T G A T T C C A T C T T A T C G G A T C C A A C
A G A C C A C T T G G G G A T T G A A T T C A T G G A G A G T G A A G A A G T T
T A T C A A A G G C A G G T G C T G T C A A T T T C A T G T A T C A T C T T T G
G A A T T G T C A T C G T G G G C A T G T T C T G T G C A G C A T T C T A C T T
C A A A A G C A A G A A A C A A G C T A A A C A A A T C C A A G A G C A G C T G
A A A G T G C C A C A A A A T G G T A A A A G C T A C A G T C T C A A A G C A T
C C A G C A C A A T G G C A A A G T C A G A G A A C T T G G T G A A G A G C C A
T G T C C A G C T G C A A A A T A A A A T G T C A G G C T T C T G A G C C C A A
G C T A A G C C A T C A T A T C C C C T G T N G A C C T G C A C G T G C A C A T
C C N G A T G G C C C G T T T C C T G C C T T T T N T G A T G A C A T T T N C A
C C A C A A A T G N A G T G A A A A T G G G N C T T T T C N T G C C T T A A C T
G G T T G A C N T T T T T N C C C C A A A A G G A G (E S T ; S E Q I D N O :
2 1 ; Genbank登録H23651) これは、E S TのNational Center for Biotechnology Infor
mation (N C B I) データベースからのものである。ヒト脳cDNAライブラリーからの
このE S Tは、ヘレグリン - β 1（またニューレグリン - β 1、すなわちNRG1とも指
称される）のアミノ酸232 - 316に対して約62%同一なアミノ酸配列をコードする
。

【0202】

部分的ヒトcDNAクローンを得るために、50塩基の一本鎖オリゴヌクレオチドプロ
ープ（5' - T G G T A A A A G C T A C A G T C T C A A A G C A T C C A G C A C A
A T G G C A A A G T C A G A G A - 3' ; S E Q I D N O : 1 8 ）をE S T配列に基

10

20

30

40

50

づいて合成した。このプローブを用いて、Godowskiら (Godowski, P.J. ら, (1989) PNAS USA 86:8083-8087、その全体を引用によりここに援用する) に記載されているように、ヒト胎児脳RNA (HL3003a, Clontech) から調製した λ gt10 cDNAライブラリーから 1.5×10^6 プラークをスクリーニングした。9つの陽性クローンを得、最も大きいインサートの両鎖の配列を標準的なシーケンス技術により決定した。これらのクローン化重複配列から、ヒトNRG3の部分的cDNA配列を得た。

【0203】

追加の5'ヒトNRG3配列を、ヒト海馬RNAのアンカーPCR (Clontech) により得た。hNRG3B1cDNAの直接的シーケンスから推定される完全なヒトオープンリーディングフレーム核酸配列を図2 (SEQ ID NO: 5) に示す。ATCC209157は、発現ベクターおよびヒトNRG3B1オープンリーディングフレームのヌクレオチド配列を含む核酸である。

10

【0204】

ヒトNRG3の任意スプライシング形は、SEQ ID NO: 23の推定アミノ酸配列をコードするpRK5.tk.neo.hNRG3B2 (SEQ ID NO: 22) としてクローン化され、このアミノ酸配列はSEQ ID NO: 6のアミノ酸529-552を欠失する (図6及び7参照)。ヒトNRG3のこの任意スプライシング形は、他のNRGのEGF様ドメイン並びに高いアミノ酸配列相同性を含み、本明細書に開示したNRG3の生物学的特性を示すことが期待される。

【0205】

ネズミNRG3cDNA配列をクローン化するために、2つの変性プライマーを、アミノ酸配列NDGECFVI (SEQ ID NO: 19) およびEFMESEEVY (SEQ ID NO: 20) をコードする部分的ヒトcDNAの膜貫通ドメインに隣接する領域に基づいて設計した。マウス脳cDNAライブラリー (Clontech, ML1042a) をスクリーニングし、部分的ネズミNRG3cDNAを含むクローン (C5a) を標準的技術により得た。C5a配列由来のプローブを用いて、2つの追加のマウス脳cDNAライブラリー (ML1034h, Clontech; および936309, Stratagene) をスクリーニングした。2つの重複ネズミ部分的NRG3クローン (SWAJ-3およびZAP-1) の両鎖をシーケンスし、共に、DNA配列SEQ ID NO: 1および図4及び5で示される推定アミノ酸配列SEQ ID NO: 2を有する2139bpの全オープンリーディングフレーム (ORF) をコードすることが判明した。発現ベクターにクローン化されたネズミNRG3オープンリーディングフレームを含む核酸は、pLXSN.mNRG3 (ATCC209156) と指称する。

20

30

【0206】

ヒトNRG3の染色体位置は、体細胞ハイブリッドDNAのPCR解析により10q22と位置づけられ、一方、NRG1遺伝子は8p11-22に位置する (Lee, J. およびWood, W.I. (1993) Genomics 16:790-791; およびOrr-Urtreger, A. ら, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:1867-1871)。従って、NRG3はタンパク質リガンドのEGF様ファミリーの新規な成員である。

【0207】

(実施例2: マウスおよびヒトNRG3推定アミノ酸配列の特徴づけ)

ヒトおよびネズミNRG3のcDNAは、それぞれ、720および713アミノ酸の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を含み、ヒトNRG3の推定分子量は77,901DaでありネズミNRG3は77,370Daである (図4~7)。この2種のNRG3はアミノ酸配列が93%同一である。

【0208】

ヒトNRG3のアミノ酸配列の解析により、それはNRG1ファミリー成員に対して相同性を含むことが判明した (すなわち、SMDF (Ho, W.H. ら, (1995) J. Biol. Chem. 270:14523-32) およびヘレグリン- β 1 (Holmes, W.E. ら, (1992) Science 256:1205-10) に対して各々23%および19%の配列相同性)。ヒドロパシー (hydropathy) 分析により、

40

50

2つの疎水性セグメントが示された：W⁶⁶ - V⁹¹およびL³⁶² - F³⁸³（ヒトNRG3によるアミノ酸番号）。NRG1と同様に、C - 末端疎水性セグメントは膜貫通ドメインとしての役割を果たし得、N - 末端領域は内部シグナル配列として作用し得る（Wickner, W.T. およびLodish, H.F. (1985) Science 230:400-7 ; Sabatini, D.D. ら, (1982) J. Cell Biol. 92 :1-22 ; およびBlobel, G. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:1496-500）。多くのニューレグリンファミリーの成員とは対照的に、NRG3の細胞外ドメインは、Ig様またはクリングル(kringle)ドメインが欠損している。その代わりに、NRG3は、N - 末端におけるユニークなAla / Glyに富むセグメント、O - 結合グリコシル化の豊富な部位を含むムチン様Ser / Thrに富む領域、およびEGFモチーフを含む。N - 結合グリコシル化の推定部位は全くない。NRG3のEGF様ドメインは、NRG1（ニューレグリン - β1 EFG様ドメインと比較して31%相同性）およびNRG2（ニューレグリン - β1 EFG様ドメインと比較して39%相同性）によりコードされるものとは別個であり、このことはNRG3は任意にスプライシングされたNRG1アイソフォームではないことを示唆する。EGF様ドメインとEGFファミリー成員との図による比較を図8に示す。NRG3の推定細胞内ドメインは、NRG1の細胞内ドメインとわずかに約13%の配列相同性を含む。EGFファミリー成員のEGF様ドメインは、以下の起源から得、各参考文献はその全体を引用によりここに援用する。図8に比較した配列は、ヒトNRG3（hNRG3 . e g f ; S E Q I D N O : 4 ; 本明細書に開示）；チキンARIA（cARIA . e g f ; S E Q I D N O : 9）（Fall, D.L. ら, (1993) Cell 72:801-815）、ヒトアンフィレグリン（hAR . e g f ; S E Q I D N O : 10）（Plowman, G.D. ら, (1990) Mol. Cell. Biol. 10:1969-81）；ヒトベータセルリン(betacellulin)（hBTC . e g f ; S E Q I D N O : 11）（Sasada, R. ら, (1993) Biochem. Biophys. Res. Com. 190:1173-9）；ヒトEGF（hEGF . e g f ; S E Q I D N O : 12）（Nagai, M. ら, (1985) Gene 36:183-8）；ヒトヘパリン結合EGF様成長因子（hHB - EGF . e g f ; S E Q I D N O : 13）（Higashiyama, S. ら, (1991) Science 251:936-9）；ヒトヘレグリン - α（hHRGα ; S E Q I D N O : 14）；ヒトヘレグリン - β（hHRGβ . e g f ; S E Q I D N O : 15）（Holmes, W.E. ら, (1992) Science 256:1205-1210）；ヒトTGF - α（hTGFα . e g f ; S E Q I D N O : 16）（Derynck, R. ら, (1984) Cell 38:287-97）；およびマウスエプレグリン（mEPR . e g f ; S E Q I D N O : 17）（Toyoda, H. ら, (1995) FEBS Lett. 377:403-7）のEGF様ドメインを含む。

10

20

30

【0209】

（実施例3：ネズミおよびヒトNRG3の発現）

A．ヒト組織のノーザンブロット解析

ヒトNRG3の組織発現プロファイルは、ノーザンブロット解析により検証した。ヒト組織由来の各2 μgのポリ(A)⁺RNAを含む多組織RNAブロットをClontechから購入した。アミノ酸394 - 536をコードするヒトNRG3核酸配列の領域を用いて、PCR増幅によりDNAハイブリダイゼーションプローブを作製した。DNAプローブは、ランダムプライミングによりα - ³²P - dCTPで標識した（Promega）。RNAブロットを50%ホルムアミド、5×SSC、50mMリン酸カリウム（pH7.0）、5×デンハード溶液、10%硫酸デキストランを用いて42℃で20時間ハイブリダイズした。ブロットを0.1×SSC、0.1%SDSで、50℃で30分間洗浄し、Phospho ImagerTMにあてた。組織の混合物におけるNRG3の発現を指標として用いてin situハイブリダイゼーションにより特定の組織における発現を決定した。

40

【0210】

B．マウス組織のin situ ハイブリダイゼーション解析

ホルマリンで固定しパラフィンで包埋したマウス胚（胚13、14、16日目）およびグルタルアルデヒドで固定しパラフィンで包埋した、またはパラホルムアルデヒドで固定した凍結成熟マウス脳、卵巣、空腸、腎臓、副腎、肺、胃、脾臓、骨格筋、肝臓および結腸を薄片化し、LuおよびGillettの方法（Lu, L.H. およびGillett, N.A. (1994) Cell Vision 1:169-176）に修正を加えて、in situ ハイブリダイゼーション用に処理した。簡潔には

50

、in situ ハイブリダイゼーションプローブは、記載したようにプラスミドDNAではなくPCRフラグメントから直接的にインビトロでの転写により作製した。³²P-UTP-標識センスおよびアンチセンスリボプローブは、ネズミNRG3のアミノ酸C²⁹²-N⁴⁸²をコードするcDNAフラグメントのPCR産物を標識することにより作製した。

【0211】

C. ノーザンブロットおよびin situ ハイブリダイゼーション解析によりNRG3の神経発現パターンが明らかになる。

ヒトNRG3のアミノ酸394-536由来のプローブにハイブリダイズする4.4 kbのmRNA転写物が脳で高度に発現された。種々の脳組織のノーザンブロットにおいて、NRG3発現が、脳梁以外の脳のほとんどの領域で高いレベルで検出された。1.9 kb転写物の低レベルの発現が精巣で検出された。1.9 kb転写物ではなく、4.4 kb転写物がNRG3をコードするに十分なサイズであり、このことはより小さい方の転写物は、NRG3の任意スプライシング形をコードし得ることを示唆する。類似したNRG3発現形式が、EGF様ドメインと重複するネズミNRG3の領域から誘導したプローブを用いて、ネズミ組織由来のRNAブロットにおいて観察された。

【0212】

NRG3発現の組織分布は、胚および成熟マウスの組織を用いたin situ ハイブリダイゼーションにより特徴づけられた。胚13日目(E13)(検証した最も早い時間点)において、NRG3 mRNAは神経系に限定された。胚16日目(E16)のマウスの脳、脊髄、三叉神経、前庭-蝸牛および脊髄神経節において、強力なNRG3 mRNAのシグナルがまた実証された。分化している細胞を含む端脳領域(例えば皮質板)は、強力なNRG3シグナルを示したが、一方、増殖または移動細胞を含む根底にある領域(脳室および脳室下領域)はほとんど発現を示さなかった。従って、NRG3は胚マウスの神経系に主に発現されているようである。成体動物において、NRG3アンチセンスプローブは、脊髄および数多くの脳領域(小脳核、前庭核、大脳皮質、梨状皮質、腹側嗅覚神経核、内側手綱、海馬、視床下部および視床を含む)においてmRNAとハイブリダイズした。

【0213】

(実施例4: NRG3フラグメントの結合特性の特徴づけ)

A. 哺乳動物細胞におけるNRG3 EGF融合タンパク質の発現および精製

NRG3 EGF様ドメインの結合特性を検証するため、並びに、本発明のNRG3フラグメントの機能を実証するために、EGF様ドメイン(このドメインはマウスおよびヒトNRG3において同一のアミノ酸配列を有する)の配列を含む可溶性融合タンパク質を調製した。

【0214】

ネズミNRG3₂₈₄₋₃₄₄のEGF様ドメインを含む分泌されたエピトープ標識ポリペプチドを、N末端からC末端方向に発現させた、1) gDシグナル配列のコード配列およびエピトープ標識(Mark, M.R. ら, (1994) J. Biol. Chem. 269, 10720-10728); 2) ネズミNRG3のアミノ酸284-344をコードする配列(ヒトNRG3アミノ酸282-342と同一); および3) ヒトIgG₁のFc部分のコード配列をpS.A. SD5ベクター(A. Shen, Genentech, Inc. からのpsar.SD5)において連結することにより構築した。これらの配列をコードするプラスミドは、NRG3^{EGF}. Fcと指称した。NRG3^{EGF}. Fc発現プラスミドは、LipofectAMINE(GIBCO/BRL, Bethesda, MD)を用いて、DHF R-チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO/DP12; ATT C指称CCL9096)にトランスフェクトした。クローンをグリシン/ヒポキサンチン/チミジンマイナス培地で選択し、例えば(Sambrook, J. ら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) 参照)、プールの、増殖させた。コードされた融合タンパク質は選択したクローンの培養物中で発現していた。これらの細胞のならし培地を回収し、組換えタンパク質をハイトラップ(Hitrap)・プロテインAアフィニティーカラム(Pharmacia)により精製した。

【0215】

N R G 3^{EGF}、H 6 融合タンパク質と指称される単量体の融合タンパク質はF c 融合タンパク質と同一系で産生し、コバルトアフィニティーカラムを通して精製した。N R G 3^{EGF}、H 6 は、N 末端 g D 標識、ネズミN R G 3₂₈₄₋₃₄₄、および6つのヒスチジン残基のコード配列を含む。精製はコバルトアフィニティーカラム（コバルトアフィニティーカラム、R.Vandlen、Genentech, Inc.）を用いて固定コバルトに対するヒスチジン側鎖の親和性を基本とした。タンパク質濃度は、バイオラド・プロテイン・アッセイ（BioRad、Richmond、CA）により決定した。

【0216】

B . K 5 6 2^{erbB}細胞系の産生

ヒトE r b B 2、E r b B 3またはE r b B 4 レセプターを発現する安定な細胞系をK 5 6 2 細胞から誘導した（K 5 6 2 細胞はA T C C 指称C C L 2 4 3を有する）。

ヒトe r b B 2、e r b B 3およびe r b B 4 のc D N A は、L.BaldおよびG.Scoffer、Genentech(Sliwowski,M.ら、(1994)、J.Biol.Chem.269:14661-14665)から得た。これらのc D N A をC M V - 基本発現ベクターにサブクローニングし、K 5 6 2 ヒト骨髄白血球細胞系に電気穿孔により導入した（1180 mF、350 V）。トランスフェクション体を、10%ウシ胎児血清、2 mM グルタミン、100 U / m l ペニシリン、100 mg / m l ストレプトマイシン、および0.8 mg / m l G 4 1 8 含有の10 mM H E P E S を補足したR P M I 1 6 4 0 中で培養した。耐性クローンを限界希釈法により得、レセプター発現をウエスタンブロットおよびN R G 結合アッセイにより確認した。レセプター発現は各E r b B レセプターの抗体を用いたウエスタンブロット解析により確認された（抗体はGenentech, Inc.で製造）。ホルボールエステル刺激は、E r b B 3 およびE r b B 4 トランスフェクション体の両方においてレセプター発現を顕著に亢進することが判明し、安定にトランスフェクトしたK 5 6 2 細胞系を10 ng / m l ホルボール、12 - ミリスレート、12 - アセテート - (P M A) を含む培地中で使用前に一晩培養した。

【0217】

C . F A C S 解析

各結合反応において、 5×10^5 の安定にトランスフェクトしたK 5 6 2 細胞を、P B S / 2 % B S A 中に、4 で30分間懸濁し、次いで5 μ g の単離精製したN R G 3^{EGF}・F c（分子量90 k D a）と共に、容積0.25 m l 中氷上で60分間インキュベートした。1 μ g の一次抗体（抗 - g D または抗 - E r b B レセプター）および二次P E - 複合体（CALTAG、CA、ヤギ抗 - マウス、1 : 100 希釈）抗体を連続的に30 - 60 分間のインキュベート時間に加え、各添加前には十分に洗浄した。F A C S 解析は、Becton&Dickson のF A C S 装置で実施した。抗 - g D（5 B 6）、抗 - E r b B 2 レセプター（4 D 5）、抗 - E r b B 3 レセプター（2 F 9）および抗 - E r b B 4 レセプター（3 B 9）モノクローナル抗体を、モノクローナル抗体グループ、Genentech, Inc.により標準的な方法を用いて調製した

【0218】

D . N R G 3 のE G F 様ドメインは特異的にE r b B 4 レセプターチロシンキナーゼに結合する。

N R G 3 のレセプターを同定するために、任意の公知のニューレグリンレセプターへのN R G 3 の結合能について調査した。レセプターE r b B 2、E r b B 3またはE r b B 4 を発現する安定な細胞系を作製した。親細胞系K 5 6 2 は検出可能なレベルのE r b B レセプターを発現しない（図9）。K 5 6 2^{erbB2}、K 5 6 2^{erbB3}およびK 5 6 2^{erbB4}細胞は、対応するレセプターのみを発現した（図9）。

【0219】

E G F 様ドメインは、N R G 1 のそのレセプターへの結合特異性を決定するので、ヒトI g G のF c 部分に融合したN R G 3 のE G F 様ドメインのエピトープ標識型を含むタンパク質を発現および精製した。F A C S アッセイを用いて、N R G 3^{EGF}・F c はE r b B 4 レセプターを発現する細胞に結合することが観察された（図10）。結合はN R G 3^{EGF}・F c は親K 5 6 2 細胞にも、またE r b B 2、E r b B 3 のいずれかを発現する細

胞にも結合しないという点で特異的であった(図10)。対照融合タンパク質である R S E . F c は、これらの細胞系のいずれにも結合しなかった。この N R G 3^{EGF} . F c の K 5 6 2^{erb4}細胞への結合は、用量依存的にヘレグリン - β 1 の E G F 様ドメイン (N R G 1^{EGF}) と競合するが、R S E . F c によっては競合せず、これは N R G 3^{EGF} . F c は細胞表面上で直接 E r b B 4 と相互作用することが示唆された。

【0220】

E r b B 4 レセプターの可溶形態はインビトロにおいて N R G 3^{EGF} . F c により共免疫沈降し、さらに N R G 3^{EGF} . F c の E r b B 4 レセプターへの結合が示唆された。

N R G 3^{EGF} . F c の E r b B 4 レセプターへの結合は、さらに、¹²⁵I - 標識 N R G 3^{EGF} . F c を用いた直接的競合結合アッセイにより解析した。精製 N R G 3^{EGF} . F c は、Sliwowskiら (Sliwowski, M. X. ら, (1994) J. Biol. Chem. 269, 14661-5) により記載のラクトペルオキシダーゼを用いて放射性ヨウ素化した。放射標識タンパク質の平均比活性は、300 μ Ci / μ g であった。¹²⁵I - N R G 3^{EGF} . F c の固定 E r b B 4 . F c への結合は、濃度依存的に、N R G 3^{EGF} . F c または N R G 1^{EGF} の E G F ドメイン (r H R G β 1₁₇₇₋₂₄₄) のいずれかと競合した。

【0221】

置換結合アッセイは、Maxisorp C96 ウエル (Nunc, Naperville, Illinois) 中で実施した。ヤギ抗 - ヒト抗体 (Boehringer Mannheim, Germany) を、4 で一晚、100 μ l の 50 mM 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.6) 中、0.2 μ g / ウエルの濃度でプレート上に被覆した。プレートを、T B S T 緩衝液 (25 mM トリス、pH 7.5、150 mM N a C l、0.02% T w e e n 20) 中 1% B S A により 30 分間室温 (R T) で遮断した。E r b B 4 レセプターの可溶形態を、1% B S A / T B S T 中、15 ng / ウエルで添加し、1.5 時間室温でインキュベートした。放射標識タンパク質が残留ヤギ抗 - ヒト抗体と相互作用するのを防ぐために、1 μ M のヒト化モノクローナル抗体 (r h u M A B H E R 2 ; Carter, P. ら, (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-9) を、プレートに 20 分間に加え、その後の結合反応に含めた。

【0222】

次いで、競合的結合アッセイを、80 pM (200,000 cpm) の ¹²⁵I - N R G 3^{EGF} . F c を、種々の濃度の非標識 N R G 3^{EGF} . F c または N R G 1^{EGF} (大腸菌発現、F c 無し) と共に添加することにより開始した。N R G 1^{EGF} は、N R G 1 の E G F ドメインであり、ニューレグリン - β 1 アイソフォーム (Holmes, W. E. ら, (1992) Science 256:1205-10) のアミノ酸 177 - 244 に対応し、J. A. Lofgren, Genentech, Inc. から得られる。最終インキュベート容量は結合緩衝液中 100 μ l であり (F - 12 / D M E M 培地、50 mM H E P E S、pH 7.5、2% B S A)、反応は室温で 1.5 時間進行させた。非結合物質は T B S T で十分に洗浄し、結合放射活性は Beckman Iso ガンマ - カウンター (Smith-Kline Beckmann, PA) で計測した。データは非線形回帰コンピュータープログラムを用いて解析した。

【0223】

図9及び10に示される結合実験の結果に基づいて、N R G 3^{EGF} . F c の E r b B 4 . F c に対する結合推定親和性 (K_i) は、9 $\pm$ 4 nM (n = 4) と決定され、N R G 1^{EGF} の見かけの K_i は約 1 nM であった。N R G 3^{EGF} . F c の置換曲線の浅さは、N R G 3^{EGF} . F c が二価 F c 融合タンパク質として発現される事実に起因し得る(図11)。対照実験の結果により、¹²⁵I - N R G 3^{EGF} . F c は、同実験において対照レセプター R S E . F c には結合せず、R S E . F c は E r b B 4 . F c に対する結合に関して ¹²⁵I - N R G 3^{EGF} . F c と競合しないことが示された。

【0224】

E . チロシンリン酸化アッセイ

N R G 1 は E r b B 2、E r b B 3 および E r b B 4 レセプターに結合および活性化し、その結果、チロシンリン酸化および下流シグナリング事象を引き起こす (Sliwowski, M. X. ら, (1994) 上記; Plowman, G. D. ら, (1993) 上記; および Carraway, K. L. および Cantley,

L.C.(1994)上記)。先行実施例で実証されたように、NRG3はErbb4レセプターに結合するが、Erbb2またはErbb3レセプターには検出可能なレベルで結合しない。NRG3(NRG3EGF)のEGF様ドメインのErbb4レセプター、K562^{erbB4}細胞の活性化能を検証した。

【0225】

K562^{erbB4}細胞またはMDA-MB-453細胞(ネガティブコントロール;ATCC名称HB131)を、血清を欠失した培地中で12時間培養し、次いで、NRG3^{EGF}・Fc、NRG^{EGF}・H6またはNRG1^{EGF}で刺激した。K562^{erbB4}細胞を、2.5nMまたは25nMのNRG3^{EGF}・Fcで3分間または8分間処理した。ポジティブコントロールとしては、細胞を、同様にNRG1^{EGF}で処理した。

10

【0226】

Erbb4レセプターチロシンリン酸化は、以下の方法に従って、免疫沈降およびウェスタンブロットにより検出した。細胞を溶解緩衝液(20mMトリス、pH7.5、100mM NaCl、30mM NaF、2mM EDTA、2mM EGTA、0.1%SDS、1%Triton X-100、2mMバナジン酸ナトリウム、2mMモリブデン酸ナトリウム、2mM PMSF)で溶解した。遠心により細胞破片を除去した後、1μgの抗-Erbb4レセプターモノクローナル抗体(C-18、Santa Cruz Biotechnology、Santa Cruz、CA)を20μlのプロテインA-アガローススラリーと共に添加した(Sigma、St. Louis、MO)。4で一晩免疫沈降し、複合体を遠心により回収し、3回1mlの溶解緩衝液で洗浄した。タンパク質を、ノベックス(Novex)4%-12%ミニゲル上での還元SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)により分離し、ニトロセルロースに転写した。ブロットをペルオキシダーゼ複合抗-ホスホチロシン抗体(Transduction Laboratory)でプローブした。ブロットを剥がし、抗-Erbb4レセプター抗体で、次いで、ペルオキシダーゼコンジュゲートヤギ抗-ウサギIgG抗体(Sigma)で再プローブし、Erbb4レセプタータンパク質を可視化した。

20

これらの実験に基づき、NRG3^{EGF}・FcはErbb4レセプターチロシンリン酸化を、同時および用量依存的に刺激することが示された。

【0227】

NRG3^{EGF}のErbb4レセプターチロシンリン酸化活性化能を確認するために、ヒト乳癌細胞系MDA-MB-453におけるレセプター活性化を検証した。この細胞系は高レベルのErbb2およびErbb3レセプターを発現するが、Erbb4レセプターの発現は低い。MDA-MB-453細胞を、NRG3^{EGF}・Fcまたは単量体形のEGFドメイン(NRG3^{EGF}・H6)で処理すると、Erbb4レセプターのチロシンリン酸化がかなり増加する結果となった。

30

【0228】

NRGファミリー成員およびEGFファミリー成員の他の成員は、複雑なレセプター結合形式を示す。ほとんどの場合、1つのリガンドは、いくつかのレセプターホモ-およびヘテロダイマーの組合せに結合できる(Karunakaran,D.ら,(1996)EMBO J 15:254-264、Beerli,R.R.およびHynes,N.E.(1996)J.Biol.Chem.271:6071-6076)。例えば、NRGはErbb2/Erbb3レセプターヘテロダイマーおよびErbb4/Erbb4レセプターホモダイマーと高い親和性で結合するが、Erbb3/Erbb3レセプターホモダイマーとは親和性が低い(Sliwkowski,M.X.ら,(1994)J.Biol.Chem.269、14661-5、Carraway,K.L.およびCantley,L.C.(1994)Cell 78、5-8、Tzahar,E.ら,(1994)J.Biol.Chem.269、25226-33、Carraway,K.L.ら,(1994)J.Biol.Chem.269、14303-6、およびKita,Y.A.ら,(1994)FEBS Lett.349、139-43)。ベータセルリンはEGFRおよびErbb4ホモダイマーの両方に結合する(Riese,D.J.ら,(1995)Mol.Cell.Biol.15:5770-6)。EGFおよびNRG1ファミリー成員のEGF様ドメインによりレセプター活性化の特異性が決まる(Barbacci,E.G.ら,(1995)J.Biol.Chem.270:9585-9589)。NRG3およびNRG1のEGF様ドメインにおける限られたアミノ酸相同性により、NRG3はNRGファミリーの成員と比較して異なるスペクトルのレセプター相互作用を有し得ることが示

40

50

唆されるが、重複した結合部位を有する。なぜなら、NRG3のEGF様ドメインのErbbB4への結合はNRG1のEGF様ドメインにより競合できるからである。

【0229】

NRG3^{EGF}・Fcは、ErbbB2またはErbbB3のいずれかを発現するK562細胞に(図10)、または高レベルのEGFRを発現するMDA-MB-486細胞には結合しなかった。NRG3で処理したMDA-MB-453細胞におけるEGFR、ErbbB2またはErbbB3のリン酸化の増加もまた観察されなかった。

【0230】

SMDFの神経特異的形以外のほとんどのNRG変異体は、とりわけ脳、心臓、骨格筋、乳房、肝臓、肺を含む多くの組織に広範に発現されている。EGFRおよびErbbB4の両方のリガンドであるベータセルリンもまた、広範な組織発現形式を示す(Shing,Y.ら,(1993) Science 259、1804-7; Sasada,R.ら,(1993) Biochem.Biophys.Res.Com.190、1173-9)。対照的に、NRG3の発現はノーザン解析およびin situ ハイブリダイゼーションにより本明細書で開示されるように神経組織に極端に限られている。さらに、NRG3 mRNAは、ノーザンプロットにより判定したところマウスにおいて早くもE11(E4ではない)で、in situ ハイブリダイゼーションによりE13で検出できる(検証された最も早い年齢)。ErbbB4は優先的に脳、心臓および骨格筋において発現される(Plowman,G.D.ら,(1993) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90、1746-50)。ErbbB4はまた、ヒヨコ胚の脳(E14、E17、ニューロンに優先的に)(Francoeur,J.R.ら,(1995) J.Neur.Res.41、836-45)、ラット網膜培養物(Birmingham-McDonogh,O.ら,(1996) Development 122、1427-38)において神経筋シナプス(Zhu,X.ら,(1995) EMBO J.14、5842-8)で広範に分布していることが示されたが、培養ヒトおよびラットシュワン細胞(Grinspan,J.B.ら,(1996) J.Neuroscience 16、6107-6118、Levi,A.D.ら,(1995) J.Neuroscience 15、1329-40)では示されなかった。近年、ErbbB4はGABA+細胞と共局在していることが判明した(Weber,J.ら,(1996) Soc Neurosci Abstr 22、1579)。従って、同一レセプターが、対応する組織特異的リガンドと相互作用する時に異なる組織または細胞型において異なる生物学的機能を仲介し得る。例えば、NRG1は心臓発達中にErbbB4のリガンドとしての役割を果たし、ベータセルリンは種々の細胞型においてErbbB4の有糸分裂誘発リガンドとして作用し得るが、一方、神経特異的リガンド(例えばNRG3)は中枢または末梢神経系においてErbbB4レセプター発現細胞上で栄養または指導分子として機能し得る。

【0231】

(実施例5:全長マウスおよびヒトNRG3による結合およびErbbB4レセプターチロシンキナーゼ活性化)

全長ネズミNRG3またはヒトNRG3は、それぞれネズミおよびヒト共通核酸配列SEQ ID NO:1およびSEQ ID NO:5に基づき合成し、NRG3はアミノ酸配列として表現した。NRG3-EGFの結合およびErbbB4レセプター活性化の特徴づけで本明細書に記載した実験に基づき、類似の実験を、マウスおよびヒト起源の全長共通NRG3で実施する。pH、溶質およびその濃度、および全長共通NRG3のErbbB4レセプター結合およびErbbB4レセプター活性化を可能とする他の相関するパラメーターを最適化するために反応条件の調節を行う。

【0232】

また、EGF様ドメインを有するが、膜貫通ドメインを欠失するネズミまたはヒトNRG3ポリペプチドフラグメントを合成し、本明細書に記載のようにErbbB4レセプター結合および活性化について試験する。かかるNRG3フラグメントは、例えば、NRG3の細胞外ドメインを含み、この細胞外ドメインはEGF様ドメインを含む。

NRG3細胞外ドメインは所望により、NRG3-EGF-Fc融合タンパク質として本明細書に記載のように、免疫グロブリン定常領域に融合させ得る。Fc融合タンパク質、すなわちNRG3細胞外ドメインFcタンパク質はダイマーを形成することが期待される。免疫グロブリン定常領域は好ましくはIgG由来であるが、またIgM、IgAおよ

10

20

30

40

50

び I g E から取り得、これは本発明の範囲内である。

【0233】

結合活性または結合および活性化能を保持する単量体融合タンパク質を所望する場合、細胞外ドメインは、例えば、NRG3 - EGF - H6 免疫癒着として本明細書に開示したように一連のヒスチジン残基に融合させる。

pH、溶質およびその濃度およびNRG3フラグメントのErbb4レセプター結合およびErbb4レセプター活性化を可能とする他の相関するパラメーターを最適化するために結合反応条件の調節を行う。

【0234】

(実施例6：細胞増殖の促進)

細胞増殖の促進は、表面上にErbb4レセプターを発現する細胞をNRG3で処理する、以下のアッセイにより例示される。本発明により、細胞をNRG3フラグメント(例えばNRG3EGF様ドメイン)またはNRG3変異体で処理し得ると理解される

例として、天然にErbb4レセプターを発現するラット網膜細胞(Birmingham-McDonogh, O.ら, (1996) Development 122, 1427-38)を標準的技術により培養する。培養した細胞を用量依存的にNRG3と接触させ、細胞数増加(例えば48時間で30%増加)およびEC50を決定する。

【0235】

NRG3処理は、これらの細胞の形態を変化させ得る；非処理細胞は数多くの分枝プロセスを有し多極性であり、一方、NRG3-処理細胞は紡錘型で潤滑なプロセスとなりおよび/またはそれらは平行な配列で並び得る。

NRG3は用量依存的にニューロン細胞成長を刺激すると考えられている。単独のNRG3は、対照培地と比較し、ニューロン細胞数を顕著に増加させることが期待される。他のニューロン増殖エンハンサー、例えばgas6(成長停止特異的遺伝子；例えば、Schneiderら、Cell 54:787-793(1988)；及びManfiolettiら、Molec. Cell Biol.13(8):4976-4985(1993)参照)および/またはヘレグリンの間に相乗効果が観察され得る。NRG3は細胞数および細胞増殖の指標であるチミジン取り込みの両方を増加させることが期待される。

【0236】

NRG3は、NRG3単独またはNRG3と他の細胞増殖強化化合物、例えばヘレグリン、gas6、ウシ胎児血清等を含む種々の培地で成育させたErbb4レセプター発現ニューロン細胞の位相差顕微鏡を観察して決定したところ細胞形態に効果を及ぼすことが期待される。顕微鏡写真は培養96時間後にとる。NRG3の存在下で成育した細胞はNRG3の非存在下で成育した細胞には観察されないプロセスを有することが予想される。

【0237】

細胞を培養したニューロン細胞に特異的なマーカーで、免疫蛍光して染色する。簡潔には、通過したErbb4レセプター発現ニューロン細胞をNRG3と接触させ、24時間ラミニンで被覆したチャンバースライド上で培養し、PBS中10%ホルマリンで固定する。固定した細胞を、10%ヤギ血清で遮断し、ウサギ由来抗-マーカー抗体と共に頒布者の推薦する希釈度でインキュベートする。一次抗体の特異的結合が、ヤギ抗-ウサギIgG(Fab')₂-FITC複合体による染色により観察される。細胞を、DNA染料ヨウ化プロピジウムで対比染色した。ネガティブコントロールを、染色が陰性であるWI-38細胞上で実施する。これらの条件下で成育した細胞は、細胞マーカーに対して100%の免疫蛍光染色を示すことが予想される。

【0238】

Erbb4レセプター発現ニューロン細胞におけるErbb4チロシンキナーゼレセプターを介するNRG3の増殖刺激能は、以下のように調査し得る。細胞を種々の量のNRG3(例えば0-200nM)で15分間37℃インキュベーター中で刺激する。細胞溶解物を調製し、抗-Erbb4レセプター抗体で免疫沈降する。Erbb4レセプターのチロシンリン酸化は、4G10抗リン酸化抗体で検出する。約106の細胞を成育させ、

10

20

30

40

50

一定の培地においてほぼ集密的とする。細胞を15分間37℃インキュベーター中NRG3で処理し、1mlの溶解緩衝液(20mM HEPES、pH7.4、135mM NaCl、50mM NaF、1mM パナジン酸ナトリウムおよび1mM モリブデン酸ナトリウム、2mM EDTAおよび2mM EGTA、10%グリセロール、1%NP40、1μM オカダイック(okadaic)酸、1mM PMSFおよび1mM AEBSF)を用いて氷上で溶解する。細胞溶解物は4℃で10分間14000×gで遠心して清澄にする。免疫沈降は、約1μgのウサギ抗-ErbB4レセプター抗体または2μlのウサギ抗-ErbB4レセプター抗血清を用いて実施する。免疫複合体は、10μlのプロテインAセファロースCL-4Bビーズで回収する。タンパク質を、ノベックス4-12%勾配ゲルで分離し、ニトロセルロース膜に転写する。抗-ホスホチロシンイムノブロットを、4G10マウス抗-ホスホチロシン抗体(UBI)、ヤギ抗-マウスセイヨウワサビペルオキシダーゼコンジュゲートおよびECL発達キット(Amersham)を用いて実施する。NRG3のErbB4レセプター発現ニューロン細胞への添加は、ErbB4レセプターチロシン残基の自己リン酸化を引き起こすことが予想される。

【0239】

末梢神経傷害の修復を助け、中断された中心軸索の再生に影響を与えるために、傷害脊髄領域に移植する細胞プロテゼとして、および複数の自己移植片の代価物として使用する哺乳動物ニューロン細胞(好ましくはヒト細胞)集合を有することが有益である。Leviら、J.Neuroscience 14(3):1309-1319(1994)参照。小生検から豊富な自己移植片源を得るための細胞培養技術の使用は、広範な火傷を覆うヒト表皮細胞を提供することにすでに臨床的に成功している(Gallicoら、N.Eng J.Med.311:338-451(1984))。従って、上記の試みはヒトを含む哺乳動物において成功裏に適応することが期待される。

【0240】

本明細書全体で記載した全ての文献並びにその中で引用された参考文献は、その全体を参考としてここに援用する。本発明は特定の実施形態について記載されているが、本発明はこれに限定されない。さらなる修飾および変形を本発明の全体の概念から逸脱することなくし得ることを理解されたい。かかる全ての修飾は本発明の範囲内であると考えられる。

【0241】

物質の寄託 以下の物質は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、12301 Parkway Drive、Rockville、MD、USA(ATCC)に寄託されている：

物質	ATCC 寄託番号	寄託日
マウスNRG3 pLXSN.mNRG3	209156	1997年7月22日
ヒトNRG3B1 pRK5.tk.neo.hNRG3B1	209157	1997年7月22日
ヒトNRG3B2 pRK5.tk.neo.hNRG3B2	209297	1997年9月23日

【0242】

これらの寄託はブダペスト条約の特許手続およびその下での規則を目的とする微生物寄託の国際的承認の規定下でなされる(ブダペスト条約)。これにより、寄託日から30年間、生存可能な寄託培養物を維持することが保証される。寄託はブダペスト条約の項目下でATCCにより利用でき、ジェネンテック・インクとATCCの間の合意をとり、適切な米国特許の発行時にまたは米国または外国特許出願の公共への開示時のどちらか先の時に、公共に利用可能となり、永久的および非制限的な寄託後代培養物の利用が保証され、35USC § 122およびそれに準ずる長官の規則(特に886OG 638に関連した37CFR § 1.14を含む)に従って特許および登録商標庁の米国長官により権利を与えると決定した者に後代の利用を保証する。

【0243】

欧州特許が求める指令に関して、寄託微生物のサンプルは、欧州特許の認可の記載の公示まで、または出願が拒絶または取り下げまたは取り下げられると考えられる日まで利用でき、サンプルを要求した人により指定された専門家にかかるサンプルが供給される。(規則28(4)EPC)

【0244】

10

20

30

40

50

本出願の譲受人は、寄託物質の微生物が、適当な条件下における培養時に、死滅または紛失または破壊されれば、届け時に直ちに物質を別の同一物と置換することに合意した。寄託物質の利用は、特許法に従って任意の政府の権力下に認可された権利に違反して本発明を実施する許可として解釈しない。

【 0 2 4 5 】

前記の明細書は、当業者が本発明を実施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が制限されない。なぜなら、寄託した実施形態は本発明のある態様の単なる説明であると考えられ、機能的に等価な任意の構築物は本発明の範囲内である。本明細書の物質の寄託は、本明細書に含む記載は、本発明の任意の態様（その最良の形態を含む）の実施を可能とするには不適切であることを認めず、またそれが示す特別な説明に対する本特許請求の範囲を制限するものとは考えない。実際、本明細書で示されおよび記載されたものに加えて、本発明の種々の修飾は、前記から当業者には明らかであり、添付の特許請求の範囲内である。

【図面の簡単な説明】

【 0 2 4 6 】

【図 1】マウスNRG3 cDNA (mNRG3、SEQ ID NO: 1) の配列をコードする核酸を示す図である。コード配列の開始 (ATG) 及び停止 (TGA) コドンは下線によって示した。

【図 2】ヒトNRG3 cDNA (hNRG3 B1、SEQ ID NO: 5) の配列をコードする核酸を示す図である。コード配列の開始 (ATG) 及び停止 (TGA) コドンは下線によって示した。

【図 3】NRG3 cDNA の交互にスプライスされた形態 (hNRG3 B2、SEQ ID NO: 22) の配列をコードする核酸を示す図である。コード配列の開始 (ATG) 及び停止 (TGA) コドンは下線によって示した。

【図 4】図 1 及び 2 に示したマウス (mNRG3) 及びヒト (hNRG3 B1) cDNA から演繹されたアミノ酸配列を示す図である。マウスNRG3の演繹されたアミノ酸配列はSEQ ID NO: 2で示し、ヒトhNRG3 B1の演繹されたアミノ酸配列はSEQ ID NO: 6で示した。アミノ酸配列内の種々の推定ドメインを示した。EGF様ドメイン、N-末端疎水性セグメント (二重下線)、セリン/スレオニン-豊富な部分、及び予想される膜貫通ドメイン (一重下線) を目立たせた。

【図 5】図 1 及び 2 に示したマウス (mNRG3) 及びヒト (hNRG3 B1) cDNA から演繹されたアミノ酸配列を示す図である。マウスNRG3の演繹されたアミノ酸配列はSEQ ID NO: 2で示し、ヒトhNRG3 B1の演繹されたアミノ酸配列はSEQ ID NO: 6で示した。アミノ酸配列内の種々の推定ドメインを示した。EGF様ドメイン、N-末端疎水性セグメント (二重下線)、セリン/スレオニン-豊富な部分、及び予想される膜貫通ドメイン (一重下線) を目立たせた。

【図 6】図 2 及び 3 に示したhNRG3 B1 及びhNRG3 B2 cDNA から演繹されたアミノ酸配列を示す図である。ヒトNRG3 B1の演繹されたアミノ酸配列はSEQ ID NO: 6で示し、ヒトhNRG3 B2の演繹されたアミノ酸配列はSEQ ID NO: 23で示した。2つのヒト配列の間で相違するNRG3アミノ酸配列の領域を示した。

【図 7】図 2 及び 3 に示したhNRG3 B1 及びhNRG3 B2 cDNA から演繹されたアミノ酸配列を示す図である。ヒトNRG3 B1の演繹されたアミノ酸配列はSEQ ID NO: 6で示し、ヒトhNRG3 B2の演繹されたアミノ酸配列はSEQ ID NO: 23で示した。2つのヒト配列の間で相違するNRG3アミノ酸配列の領域を示した。

【図 8】ヒトNRG3 B1 (hNRG3 . egf ; SEQ ID NO: 4) ; チキンARIA (cARIA . egf ; SEQ ID NO: 9) ; ヒトアンフィレグリン (hAR . egf ; SEQ ID NO: 10) ; ヒトベータセルリン (hBTC . egf ; SEQ ID NO: 11) ; ヒトEGF (hEGF . egf ; SEQ ID の: 12) ; ヒトヘパリン結合EGF様成長因子 (hHB-EGF . egf ; SEQ ID NO: 13) ; ヒトヘレグリン- α (hHRG α . egf ; SEQ ID NO: 14) ; 及びマウスエピレ

10

20

30

40

50

グリン (mEPR, egf; SEQ ID NO: 17) のEGF様ドメインの配列アライメントを示す図である。配列は、配列分析プログラム、Genentech社を用いて分析した。

【図9】NRG3^{EGF}・Fcの細胞表面に表現されたErbbB4レセプターへの結合を示すFACSプロットを示す図である。親K562細胞(A)、または、ErbbB2レセプター(K562^{erbB2}細胞、B)、ErbbB3レセプター(K562^{erbB3}細胞、C)またはErbbB4レセプター(K562^{erbB4}細胞、D)を発現するK562細胞を、対応するレセプターの発現について試験した。PE-複合二次抗体を添加する前に、細胞を、表示したように抗-ErbbB2レセプター、抗-ErbbB3レセプターまたは抗-ErbbB4レセプター抗体とともにインキュベートした。「LOG PE」は相対蛍光強度を表し、「カウント」は細胞数を表す。

【図10】NRG3^{EGF}・Fcの細胞表面に表現されたErbbB4レセプターへの結合を示すFACSプロットを示す図である。NRG3^{EGF}・Fcは、ErbbB4レセプター表現細胞への結合のFACS分析で示した。親K562細胞(E)、K562^{erbB2}細胞(F)、K562^{erbB3}細胞(G)及びK562^{erbB4}細胞(H)を、(gDタグを含む)NRG3^{EGF}・Fc有無で1時間、次いで抗-gDタグ一次抗体及びPE複合二次抗体とともにインキュベートした。

【図11】NRG3^{EGF}・Fc又はNRG^{EGF}による、¹²⁵I-NRG3^{EGF}・Fcの固定化された可溶性ErbbB4レセプターへの結合の競合的阻害を示すグラフである。可溶性ErbbB4レセプターは、96-ウェルプレート上に固定化し、種々の濃度の非ラベルNRG3^{EGF}・FcまたはNRG^{EGF}、および一定量の¹²⁵I-NRG3^{EGF}・Fcとともに15時間室温でインキュベートした。¹²⁵I-NRG3^{EGF}・Fcインプット全体に渡って結合した放射性画分を、競合相手の濃度に対してプロットした。4つの独立したアッセイからの代表的な実験データを示した。エラーバーは4つのサンプルの標準偏差である。

【図1】

```
CTGACCGGCGGGGGGCGGGCGGGCTCTGCGCCCTCTACCGAGCGGCTCGCGGCC  
CCCTCCCGGGCGCGGCTCCCTCCCGGCTCTCTCTCCCGCGCGCGCGCGCTCTC  
GGGGGGAGGGGGGGGGGGGAGGAGCGCAATTGCATGCGCGCGCGCGCGCGCTG  
CTGAGCGCGAGCGCGCGCGCGGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG  
CGGCGCGCAATGCTTTGGCGCGCGCGCGGGGGGGGGAAGGTGAAGATCGGCTCTAG  
GATGAGTGAAGGGGGCGGGGCGGCTCGCGCAACCTGGTGGCGCTTCGJACGCGCGCG  
CTGAGCGCAAGGAGGAGCGCGGGGCTCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG  
CGGAGCGCGCGGAGGAGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG  
GCATCGTGTGGAAGCGCGAGCGAGAGCTGGTGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT  
CATCGCGCTGGGGCTCAGCGCTCATGTCTGCTAAATGGATCGTGGTAGGCGTCCGCAAG  
GAGTACGTGCCACGGAGCTGGTGGAGCTCCAGGGGAATGGGCGAGGACCGCTTCTCC  
TCTCCAGCGCAAGCTTCTCCCAAGGCTATGGAACCAACCAACCAACCACTTCTACC  
ACGTCCCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTTCTCCAGGAGCGCTAACCGGA  
TTAGCACCGCTTGAACCACTACACGCGGAGCGCGCGCGCTTCCCTGGGACCGCGGT  
TCCCATCGCGCTTACCGCGCTTCTACAGCGAGCGAGACATGTCTCGCGCTCCGAG  
GTCTGTCCACCAAGCGCGCTTCTTCAAGTACAGCGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCG  
GCCAGGAGCGCGCGAGTACCGAGCGAGTGGCTTCTGGCGCGCGCGCGGTATGTACCT  
TCTCTACTCTCCAGCAATTCACCTCCCTCTGAGCGCTGTACCGCTTTCAGGATGTGC  
TGGCGCGCTTCTCTCTCTCAGCGCTTCTCCAGCGCTTCCAGTACCGCGCGCGGAGAACTA  
GCACCGCGCGCGCAAAATTTACTACACATCTCACTCACTGAAAGTCTGAGCACTTCAA  
ACCGCTGTGAGAGCAAGGAGCGCGGTATGTCTCAATGATGGTGAATGTCTTGTGAT  
GAGCGCTGACAGGATGCCAAGCACTGTGGGTGCGAGGAAAGGCTACCAAGGAGTCT  
CGTTGTGTGATCAATTTCTGCGGAAAGGAGTCCATCTTACGATCCAGAGCACTTCA  
GGGATGTGAATTCAGGAGAGTGAAGAGCTTATCAAGGCGAGGTGCTGCAATTTCA  
TGTATCATCTTTGGAATTTGATCTGGTGGGATGTCTGTGAGCACTTCTACTTCAAAAG  
CAAGAAACAGGCTAAACAAATTCAGGAGGAGCTGAAAGAGTCAAGAAATGGGAGAA  
CTACAGCGCTCAAGGCAATGCGAGCAAAATCTGAGAGCTTGTGAAGAGCAATGTCCAT  
CTACAAATTTATCAAGGCGGATAGGAGTCTGTGAGTCTGCGTGGAGAAATATGTG  
AGTCAAGTTTTCAGCTTCCGAGTGGTTCCAGAGAGTCACTTCTGACCGAGGAAG  
CAAGCTATCAAGCAACAGCGCGAGGAGCAAGAGAGTGTGCGATAGGAATAC  
TTTCAGAGGCGACCACTCTACCGCGAGTGCAGTGGGTGGTATTTGAGGACCACTA  
TATCAACAACTTGAAGAAATCAAGAAATTCAGAGACGAGTACGATACCTTGCAGAGGA  
TAGAGGTCAAGGAGCTATATCCAGCTGGCTATACAGCTGTGGTGTGTGAAAGACC  
CCTGGACTTAAAGTATGTGTCAATGGCTTAAAGAGCGCAACAAATGCAATCAATAAT  
ATGCACTGCGCTTCAAGAGAGCAAAACCGCTATTTAATAGCTTGGATCAAGAGGAC  
TGGTGGGTATTTATCCCAAGGGCGCAATCTGTGCGCATCACTCCGCTGATGGGTCTA  
GAAGAAACCTGCATGCAATTCGAGGAGTATCTGAGCTCAAAAGCAATTAATGTGCA  
AAAGCTCTCTCTCGCTGACATTTGCAACCGAGATGCACTGCAAGTATGTCTCTTA  
GAAGAACAGAGGAATGAAATATTAAGTACGAGCTGTGACGAGCAAGCATCGGAT  
CTGACTGTATGCGAGCGTGAAGAGCTTGAAGTGGCGAGCATGGAAATCGAGGAC  
AGTGGGAGCGGAAACACAGAGCTTCTCCCGCTGAGTCCGCGCGCGCAATCGAGAAC  
AGGCAACAATTTGTCTTAAAGAAATGAAATCAAGAGAGTCTGTGTCTAACCAAGTACT  
GGAAATGTAGGAATCTGTGATTAATGCTTGTCAACAGGAGGAGAGGAAATTA  
AATACAAATTAATTAATGCAATTAATTAAGGAGCATCTACTAGAAAGCC
```

【図2】

```
TCACCGACCTAGTGGAGTCACTAGTGGTGGGCGAGTACTCTTGAAGGAGCGCAC  
CAGCATCTATTTGAAAGCATGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG  
GGGCGAGGCTGAAAGCGCGCTCTAGGATGATGAAAGGGCGCGCGCGCGCGCGCG  
CCTGGTGGCGCTTCGCGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG  
GGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG  
CGCGCGCGGAGTACGCTGTAGCGACTGCACTGTGTGGAACCGCGAGCAGAGCTGGCT  
GTGCGTGTGACTCTGTTCATCGGCTTCACTGGCGTGGGCGTCAAGCTATGCTTCTCA  
AATGGATCGTGGTGGGCTCGCTCAAGGAGTACGTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG  
GGGATGGGCGAGGAGCGCGCTTCTCTCTCAAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG  
GAGGACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG  
CGCGCTCTCTCAAGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG  
GGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG  
GGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG  
GCACCGGAGACTGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG  
GCACCGGAGACTGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG  
GAGCGGAGTCCGAGCACTTCAAAACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG  
GATGGCGAGTGTCTTGTGATCGAAACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG  
AAGAGCGCTACCAAGGAGTCCGCTGTGATCAATTTCTGCGCGCGCGCGCGCGCGCG  
ATCGGATCCAGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG  
AGGACGCTGCTGTCAATTTCAATGATCACTTTGGAATTTGCACTGCTGGGATGTCTG  
TGCAGCATCTCTCTTCAAGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG  
AGTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG  
AGGAGACTTGTGTAAGAGCAATGTGTCAGCGTCAAAATTTCAAGAGTGGAAAGGCA  
TCTCTGAGTGTGATGAGGAGAAATGAGAGTCAAGTGTGTGCGCGCGCGCGCGCGCG  
CCTGAGTGTCTCTCTGACGAGGAGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG  
CTCTTGTGTCGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG  
GACACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG  
ACTCGAGAGTCAAGGAGTCCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG  
CAGGAGACTATATCCCACTGGCTATACAGCTGTGGTGTGTGAAAGCGCGCGCGCG  
TTAAAGTATTTCACTGAGTGTGTGAAAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG  
TGCGTTCAAGGAGGAGCAACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG  
AATTTGTCTTAAAGAAATGAAATCAAGAGAGTGTGCAATGAGCAAGTGGTGTGAGT  
GTAGGAGTGTGTCATTTATGCTTCTCTGAGGAGTCTTCTGAGGAGAAACCAATGCTCTCGC  
CTCTATATCATAGTGTGTTTTTAAACAAATATTTTTTAAAGGAGGAGGAGTGTTCAGGAG  
GGGATAAGCTT
```

【 図 5 】

[illegible]

【 图 4 】

[illegible]

【圖 7】

```

      351  HEESEVYQAGVLYEISCIIFBIVYQMFCAAPPYKXKKOAKGIQGLRVPO
      351  HEESEVYQAGVLYEISCIIFBIVYQMFCAAPPYKXKKOAKGIQGLRVPO

      401  HCKSYLCAESTMAKSENLYKSHYQLONTSKVEVRHPYTALEKNHSESFYQ
      401  HCKSYLCAESTMAKSENLYKSHYQLONTSKVEVRHPYTALEKNHSESFYQ

      451  PQSPFPYFPYFDGQSGSVHKNHLEBCCSPQGRGMLHKNHAFATFPFSPB
      451  PQSPFPYFPYFDGQSGSVHKNHLEBCCSPQGRGMLHKNHAFATFPFSPB

      501  LGGIVGPAYQGOLEERIFPDOTIPCOIIEVRCITIEHLPIQLWCVEPLD
      501  LGGIVGPAYQGOLEERIFPDOTIPCOIIEVRCITIEHLPIQLWCVEPLD

      551  LKIEESLTKQGHSSIHMLPDRNTPPYHNLQGLDGLVGYETAAASVPI
      529  LKIEESLTKQGHSSIHMLPDRNTPPYHNLQGLDGLVGYETAAASVPI

      601  PSVQLEETCLQMPGISEVSEIKWCKNNTSADYVYHVSIPYSDCLIAEQGE
      577  PSVQLEETCLQMPGISEVSEIKWCKNNTSADYVYHVSIPYSDCLIAEQGE

      651  KILLGTVQGIINILTDARRRDEYELASVETEDQASBENTAFLLPSPTAK
      527  KILLGTVQGIINILTDARRRDEYELASVETEDQASBENTAFLLPSPTAK

      701  HRAQFVLYAREIQDSALTA
      577  HRAQFVLYAREIQDSALTA

```

【 図 8 】

[illegible]

【 図 5 】

hNR3B1 348 FMSES VTQGVQLSICIIPIGVIVQMFCAAFFRKSKKQAKQIOE LV
 hNR3B1 361 FMSES VTQGVQLSICIIPIGVIVQMFCAAFFRKSKKQAKQIOE LV

hNR3B1 386 PNGK YFSLKASTYIAKSEN VKSHVQ QNVSEY ERHPVYALEK HWESF
 hNR3B1 401 PNGK YFSLKASTYIAKSEN VKSHVQ QNVSEY ERHPVYALEK HWESF

hNR3B1 448 VQGSFFPEV SPDQSGD YVKNR RLSSCC SPQDQSGULHNN FR APPSP
 hNR3B1 464 VQGSFFPEV SPDQSGD YVKNR RLSSCC SPQDQSGULHNN FR APPSP

hNR3B1 498 LRSGG IGVSPAYQQLSESR PDQIT PCQIEVKKTI SHLP QLWCVERP
 hNR3B1 508 LRSGG IGVSPAYQQLSESR PDQIT PCQIEVKKTI SHLP QLWCVERP

hNR3B1 540 CLKYV IS EL Q FA RI IN KL PF RE TP PF NS DK LV Q Y IS FA IN V
 hNR3B1 542 CLKYV IS EL Q FA RI IN KL PF RE TP PF NS DK LV Q Y IS FA IN V

hNR3B1 586 FIPIS V GLETC Q DP GIS PKS KWCKN SYSD IVN IS IV SO CL PA ED
 hNR3B1 592 FIPIS V GLETC Q DP GIS PKS KWCKN SYSD IVN IS IV SO CL PA ED

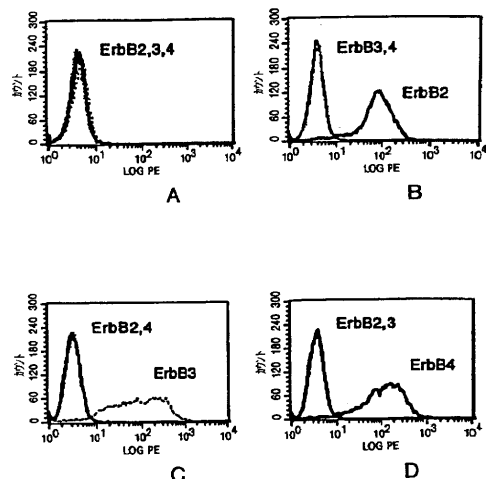
hNR3B1 640 DEVKILLET VQEO QIRIL TDARSED ELAS IV ET ED AS ENT AP L PL S TA
 hNR3B1 642 DEVKILLET VQEO QIRIL TDARSED ELAS IV ET ED AS ENT AP L PL S TA

hNR3B1 680 KSERFA QV CLN CI Q DS LA TK
 hNR3B1 692 KSERFA QV CLN CI Q DS LA TK

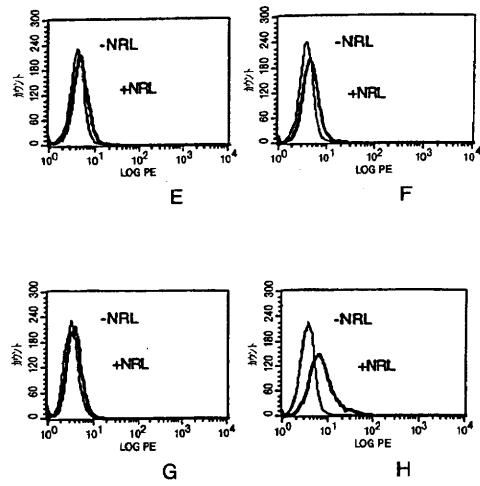
【 图 6 】

[illegible]

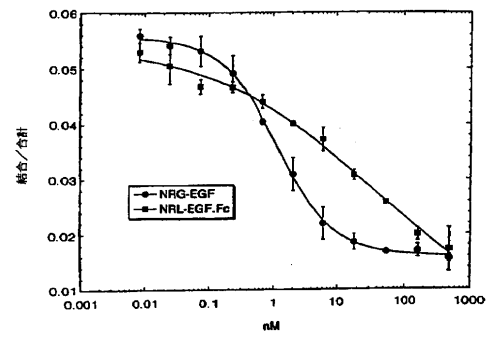
【 图 9 】



【図 10】



【図 11】



【配列表】

2009077716000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	4 C 0 8 5
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 25/02 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	1 0 1
A 6 1 P 25/08 (2006.01)	A 6 1 P 25/02	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/08	
A 6 1 P 25/14 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 21/04 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 27/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 27/16	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
	A 6 1 P 3/00	
	A 6 1 P 43/00	1 1 1

(72)発明者 ポール・ジェイ・ゴドウスキ
アメリカ合衆国・カリフォルニア・9 4 0 1 0・バーリンゲイム・イーストン・ドライブ・2 6 2
7

(72)発明者 メラニー・アール・マーク
アメリカ合衆国・カリフォルニア・9 4 0 1 0・バーリンゲイム・チュラ・ヴィスタ・アヴェニュー
・9 5 8 ビー

(72)発明者 ドン・シャオ・チャン
アメリカ合衆国・カリフォルニア・9 4 0 1 0・バーリンゲイム・トラウスデイル・ドライブ・#
1 1 1・2 0 0 1

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA21 BA56 CA04 CA07 DA02 EA04 FA02 GA01
GA11 HA03 HA11
4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ13 QR33 QR77 QR80 QS05 QS36 QX02
4B064 AG13 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01 DA13
4B065 AA90X AA93Y AB01 AB02 BA02 BA08 CA24 CA25 CA44 CA46
4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 AA17 BA01 BA08 BA22 BA23 CA17
MA01 NA14 ZA012 ZA022 ZA062 ZA162 ZA182 ZA202 ZA342 ZA402
ZA892 ZA942 ZB262 ZC412
4C085 AA13 AA14 BB11 CC21 DD88 EE01 GG01
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA01 DA20 DA76 EA20
EA50 FA72 FA74

【外国語明細書】

ERBB4 RECEPTOR-SPECIFIC NEUREGULIN RELATED LIGANDS
AND USES THEREFOR

FIELD OF THE INVENTION

The present invention concerns novel neuregulin related ligands. More particularly, the invention relates to a new member of the neuregulin family and functional derivatives of the novel polypeptide.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Signal transduction affecting 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. Growth factor receptor protein tyrosine kinases of the class I subfamily include the 170 kDa epidermal growth factor receptor (EGFR) encoded by the *erbB1* gene. *erbB1* 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. The second member of the class I subfamily, p185^{neu}, was originally identified as the product of the transforming gene from neuroblastomas of chemically treated rats. The *neu* gene (also called *erbB2* and HER2) encodes a 185 kDa receptor protein tyrosine kinase. Amplification and/or overexpression of the human HER2 gene correlates with a poor prognosis in breast and ovarian cancers (Slamon *et al.*, (1987) *Science* 235:177-182; and Slamon *et al.*, (1989) *Science* 244:707-712). Overexpression of HER2 has been correlated with other carcinomas including carcinomas of the stomach, endometrium, salivary gland, lung, kidney, colon and bladder. A further related gene, called *erbB3* or HER3, has also been described (Kraus *et al.*, (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9193-9197). 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. The *erbB3* gene has been found to be overexpressed in breast (Lemoine *et al.* (1992) *Br. J. Cancer* 66:1116-1121), gastrointestinal (Poller *et al.* (1992) *J. Pathol.* 168:275-280, Rajkumar *et al.* (1993) *J. Pathol.* 170:271-278, and Sanidas *et al.* (1993) *Int. J. Cancer* 54:935-940, and pancreatic cancers (Lemoine *et al.* (1992) *J. Pathol.* 168:269-273, and Friess *et al.* (1995) *Clinical Cancer Research* 1:1413-1420).

The class I subfamily of growth factor receptor protein tyrosine kinases has been further extended to include the HER4/Erb4 receptor (EP Pat Appln No 599,274; Plowman *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:1746-1750; and Plowman *et al.* (1993) *Nature* 366:473-475. Plowman *et al.* found that increased HER4 expression closely correlated with certain carcinomas of epithelial origin, including breast adenocarcinomas. Diagnostic methods for detection of human neoplastic conditions (especially breast cancers) which evaluate HER4 expression are described in EP Pat Appln No. 599,274.

The quest for the activator of the HER2 oncogene has lead to the discovery of a family of polypeptides, collectively called neuregulins (NRG1). These proteins appear to result from alternate splicing of a single gene which was mapped to the short arm of human chromosome 8 by Ott-Urtreger *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:1867-1871.

Holmes *et al.* isolated and cloned a family of polypeptide activators for the HER2 receptor which they called heregulin- α (HRG- α), heregulin- β 1 (HRG- β 1), heregulin- β 2 (HRG- β 2), heregulin- β 2-like (HRG- β 2-like), and heregulin- β 3 (HRG- β 3). See Holmes *et al.* (1992) *Science* 256:1205-1210; WO 92/20798; and U.S.

Patent 5,367,060. The 45 kDa polypeptide, HRG- α , was purified from the conditioned medium of the MDA-MB-231 human breast cancer cell line. These researchers demonstrated the ability of the purified heregulin polypeptides to activate tyrosine phosphorylation of the HER2 receptor in MCF7 breast tumor cells. Furthermore, the mitogenic activity of the heregulin polypeptides on SK-BR-3 cells (which express high levels of the HER2 receptor) was illustrated. Like other growth factors which belong to the EGF family, soluble HRG polypeptides appear to be derived from a membrane bound precursor (called pro-HRG) which is proteolytically processed to release the 45 kDa soluble form. These pro-HRGs lack a N-terminal signal peptide.

While heregulins are substantially identical in the first 213 amino acid residues, they are classified into two major types, α and β , based on two variant EGF-like domains which differ in their C-terminal portions. Nevertheless, these EGF-like domains are identical in the spacing of six cysteine residues contained therein. Based on an amino acid sequence comparison, Holmes *et al.* found that between the first and sixth cysteines in the EGF-like domain, HRGs were 45% similar to heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF), 35% identical to amphiregulin (AR), 32% identical to TGF- α , and 27% identical to EGF.

The 44 kDa *neu* differentiation factor (NDF), which is the rat equivalent of human HRG, was first described by Peles *et al.* (1992) Cell 69:205-216; and Wen *et al.* (1992) Cell 69:559-572. Like the HRG polypeptides, NDF has an immunoglobulin (Ig) homology domain followed by an EGF-like domain and lacks a N-terminal signal peptide. Subsequently, Wen *et al.* (1994) Mol. Cell. Biol. 14(3):1909-1919 carried out cloning experiments to extend the family of NDFs. This work revealed six distinct fibroblastic pro-NDFs. Adopting the nomenclature of Holmes *et al.*, the NDFs are classified as either α or β polypeptides based on the sequences of the EGF-like domains. Isoforms 1 to 4 are characterized on the basis of the region between the EGF-like domain and transmembrane domain. Also, isoforms a, b and c are described which have variable length cytoplasmic domains. These researchers conclude that different NDF isoforms are generated by alternative splicing and perform distinct tissue-specific functions. See also EP 505 148; WO 93/22424; and WO 94/28133 concerning NDF.

Falls *et al.* (1993) Cell 72:801-815 describe another member of the heregulin family which they call acetylcholine receptor inducing activity (ARIA) polypeptide. The chicken-derived ARIA polypeptide stimulates synthesis of muscle acetylcholine receptors. See also WO 94/08007. ARIA is a β -type heregulin and lacks the entire spacer region rich in glycosylation sites between the Ig-like domain and EGF-like domain of HRG α , and HRG β 1- β 3.

Marchionni *et al.* identified several bovine-derived proteins which they call glial growth factors (GGFs) (Marchionni *et al.* (1993) Nature 362:312-318). These GGFs share the Ig-like domain and EGF-like domain with the other heregulin proteins described above, but also have an amino-terminal kringle domain. GGFs generally do not have the complete glycosylated spacer region between the Ig-like domain and EGF-like domain. Only one of the GGFs, GGFII, possessed a N-terminal signal peptide. See also WO 92/18627; WO 94/00140; WO 94/04560; WO 94/26298; and WO 95/32724 which refer to GGFs and uses thereof.

Ho *et al.* in (1995) J. Biol. Chem. 270(4):14523-14532 describe another member of the heregulin family called sensory and motor neuron-derived factor (SMDF). This protein has an EGF-like domain characteristic of all other heregulin polypeptides but a distinct N-terminal domain. The major structural difference between SMDF and the other heregulin polypeptides is the lack in SMDF of the Ig-like domain and

the "glyco" spacer characteristic of all the other heregulin polypeptides. Another feature of SMDF is the presence of two stretches of hydrophobic amino acids near the N-terminus.

While the heregulin polypeptides were first identified based on their ability to activate the HER2 receptor (see Holmes *et al.*, *supra*), it was discovered that certain ovarian cells expressing *neu* and *neu*-transfected fibroblasts did not bind or crosslink to NDF, nor did they respond to NDF to undergo tyrosine phosphorylation (Peles *et al.* (1993) *EMBO J.* 12:961-971). This indicated that another cellular component was necessary for conferring full heregulin responsiveness. Caraway *et al.* subsequently demonstrated that ^{125}I -rHRG β ₁₇₇₋₂₄₄ bound to NIH-3T3 fibroblasts stably transfected with bovine *erbB3* but not to non-transfected parental cells. Accordingly, they conclude that ErbB3 is a receptor for HRG and mediates phosphorylation of intrinsic tyrosine residues as well as phosphorylation of ErbB2 receptor in cells which express both receptors. Caraway *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269(19):14303-14306. Sliwkowski *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269(20):14661-14665 found that cells transfected with HER3 alone show low affinities for heregulin, whereas cells transfected with both HER2 and HER3 show higher affinities.

This observation correlates with the "receptor cross-talking" described previously by Kokai *et al.*, *Cell* 58:287-292 (1989); Stern *et al.* (1988) *EMBO J.* 7:995-1001; and King *et al.*, 4:13-18 (1989). These researchers found that binding of EGF to the EGFR resulted in activation of the EGFR kinase domain and cross-phosphorylation of p185^{HER2}. This is believed to be a result of ligand-induced receptor heterodimerization and the concomitant cross-phosphorylation of the receptors within the heterodimer (Wada *et al.* (1990) *Cell* 61:1339-1347).

Plowman and his colleagues have similarly studied p185^{HER4}/p185^{HER2} activation. They expressed p185^{HER2} alone, p185^{HER4} alone, or the two receptors together in human T lymphocytes and demonstrated that heregulin is capable of stimulating tyrosine phosphorylation of p185^{HER4}, but could only stimulate p185^{HER2} phosphorylation in cells expressing both receptors. Plowman *et al.*, *Nature* 336:473-475 (1993). Thus, heregulin is the only known example of a member of the EGF growth factor family that can interact with several receptors. Caraway and Cantley (1994) *Cell* 78:5-8.

The biological role of heregulin has been investigated by several groups. For example, Falls *et al.*, (discussed above) found that ARIA plays a role in myotube differentiation, namely affecting the synthesis and concentration of neurotransmitter receptors in the postsynaptic muscle cells of motor neurons. Corfas and Fischbach demonstrated that ARIA also increases the number of sodium channels in chick muscle. Corfas and Fischbach (1993) *J. Neuroscience* 13(5): 2118-2125. It has also been shown that GGFII is mitogenic for subconfluent quiescent human myoblasts and that differentiation of clonal human myoblasts in the continuous presence of GGFII results in greater numbers of myotubes after six days of differentiation (Sklar *et al.* (1994) *J. Cell Biochem.*, Abst. W462, 18D, 540). See also WO 94/26298 published November 24, 1994.

Holmes *et al.*, *supra*, found that HRG exerted a mitogenic effect on mammary cell lines (such as SK-BR-3 and MCF-7). The mitogenic activity of GGFs on Schwann cells has also been reported. See, e.g., Brookes *et al.* (1980) *J. Biol. Chem.* 255(18):8374-8377; Lemke and Brookes (1984) *J. Neurosci.* 4:75-83; Brookes *et al.* (1984) *J. Neuroscience* 4(1):75-83; Brookes *et al.* (1986) *Ann. Neurol.* 20(3):317-322; Brookes, J. (1987) *Methods in Enzym.* 147:217-225 and Marchionni *et al.*, *supra*. Schwann cells constitute important glial cells which provide myelin sheathing around the axons of neurons, thereby forming individual nerve fibers. Thus, it is apparent that Schwann cells play an important role in the development, function and

regeneration of peripheral nerves. The implications of this from a therapeutic standpoint have been addressed by Levi *et al.* (1994) *J. Neuroscience* 14(3):1309-1319. Levi *et al.* discuss the potential for construction of a cellular prosthesis comprising human Schwann cells which could be transplanted into areas of damaged spinal cord. Methods for culturing Schwann cells *ex vivo* have been described. See WO 94/00140 and Li *et al.* (1996) *J. Neuroscience* 16(6):2012-2019.

Pinkas-Kramarski *et al.* found that NDF seems to be expressed in neurons and glial cells in embryonic and adult rat brain and primary cultures of rat brain cells, and suggested that it may act as a survival and maturation factor for astrocytes (Pinkas-Kramarski *et al.* (1994) *PNAS, USA* 91:9387-9391). Meyer and Birchmeier (1994) *PNAS, USA* 91:1064-1068 analyzed expression of heregulin during mouse embryogenesis and in the perinatal animal using *in situ* hybridization and RNase protection experiments. These authors conclude that, based on expression of this molecule, heregulin plays a role *in vivo* as a mesenchymal and neuronal factor. Also, their findings imply that heregulin functions in the development of epithelia. Similarly, Danilenko *et al.* (1994) Abstract 3101, *FASEB* 8(4-5):A535, found that the interaction of NDF and the HER2 receptor is important in directing epidermal migration and differentiation during wound repair.

Although NRG1 was initially proposed to be the ligand for the receptor tyrosine kinase ErbB2, further studies have demonstrated that activation of ErbB2 frequently occurred as a result of NRG1 binding to ErbB3 (Sliwkowski, M.X., *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:14661-14665) or ErbB4 (Plowman, G.D. *et al.* (1993) *Nature* 366:473-475; and Carraway, K.L. and Cantley, L.C. (1994) *Cell* 78:5-8) receptors. Recent studies have begun to highlight the roles of NRG1, ErbB2 receptor and ErbB4 receptor in the development of the heart. Mice lacking ErbB4 receptor, ErbB2 receptor or NRG1 die during mid-embryogenesis (embryonic day 10.5) from the aborted development of myocardial trabeculae in the ventricle (Meyer & Birchmeier (1995) *Nature* 378:386-90; Gassmann *et al.* (1995) *Nature* 378:390-4; and Lee *et al.* (1995) *Nature* 378:394-8). These results are consistent with the view that NRG1, expressed in the endocardium, is an important ligand required for the activation of ErbB2 and ErbB4 receptors in the myocardium.

These same studies suggest that NRG1 and ErbB2 receptor may play a different role than ErbB4 receptor in the development of the hind brain. NRG1 is expressed in the neuroepithelium and cells arising from rhombomeres 2, 4 and 6, while ErbB4 receptor is expressed in rhombomeres 3 and 5. NRG1 and ErbB2 receptor knockout mice exhibit a loss of cells and axons of the cranial sensory ganglia. In contrast, ErbB4 receptor deficient mice do not exhibit a loss of cellularity in the cranial ganglia. Rather, the organization, spacing and pattern of innervation of these ganglia to and from the central nervous system is disrupted (Gassmann *et al.*, *supra*). One possible reason for this difference in hindbrain phenotypes of NRG1 and ErbB4 receptor knockout mice is that additional ligand(s) distinct from NRG1 may be recognized by ErbB4 in the CNS (Gassmann *et al.*, *supra*).

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention is based on the identification, recombinant production and characterization of a novel member of the family of neuregulins (NRG1). More specifically, the invention concerns a novel polypeptide, NRG3, comprising an EGF-like domain distinct from EGF-like domains of NRG1 and NRG2. In addition, the NRG3 disclosed herein displays distinct receptor binding characteristics relative to other neuregulin-like polypeptides.

In analyzing the homologous sequence motif, homology to the EGF-like domain of NRG1 was observed in the subset of amino acids that are conserved in most neuregulins. Based upon this observation and the observed ErbB4 receptor binding characteristics, the novel protein, NRG3, has been identified as a new member of the family of neuregulins. The novel protein contains domains that are distantly related to, but distinct from, those found in the other members of the NRG1 family. In addition, it is expressed primarily in embryonic and adult tissues of the central nervous system. NRG3 represents a novel member of the neuregulin family of compounds, members of which are involved in cell proliferation and differentiation, epithelial development, cardiac development, neurological development, as well as acting as glial cell mitogens, and as mesenchymal and neuronal factors.

In one aspect, the present invention concerns a novel isolated mammalian NRG3 polypeptide having an EGF-like domain, and functional derivatives of the novel NRG3, which polypeptides bind the ErbB4 receptor. The native polypeptides within the scope of the present invention are characterized as containing an extracellular domain including an EGF-like domain, a transmembrane domain and a cytoplasmic domain. The present invention specifically includes the soluble forms of the novel NRG3 ligand molecules of the invention, which have a transmembrane domain that cannot associate with a cell membrane, and optionally devoid of all or part of the cytoplasmic domain. By "transmembrane domain" is meant a domain of the polypeptide that contains a sufficient number of hydrophobic amino acids to allow the polypeptide to insert and anchor in a cell membrane. By "transmembrane domain that cannot associate with a cell membrane" is meant a transmembrane domain that has been altered by mutation or deletion such that is insufficiently hydrophobic to allow insertion or other association with a cell membrane. Such a transmembrane domain does not preclude, for example, the fusion of the NRG3 of the invention, or fragment thereof, with a secretion signal sequence useful for secretion of the polypeptide from the cell, an insufficient number of hydrophobic amino acid side chains are present devoid of an active transmembrane domain does not insert into a cell membrane. Mutations or alterations of the amino acid sequence useful to achieve an inactive transmembrane domain include, but are not limited to, deletion or substitution of amino acids within the transmembrane domain.

In a particular embodiment, the invention concerns isolated polypeptides, preferably NRG3 ligands, having at least 75% amino acid identity to polypeptides selected from the group consisting of

- (1) a polypeptide comprising the amino acid sequence encoding the EGF-like domain shown in Figure 3 (SEQ ID NO:4);
- (2) a polypeptide comprising the amino acid sequence encoding the extracellular domain of mouse or human NRG3 shown in Figure 3 (SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO:7, respectively);
- (3) a polypeptide comprising the amino acid sequence of the native mouse or human NRG3 polypeptide shown in Figure 3 (SEQ ID NO: 2 and SEQ ID NO:6, respectfully);
- (4) a further mammalian homologue of polypeptide (1) - (3);
- (5) a soluble form of any of the polypeptides (1) - (4) devoid of an active transmembrane domain; and
- (6) a derivative of any of the polypeptides (1) - (5), retaining the qualitative EGF-like domain and NRG3 receptor binding properties of a polypeptide (1) - (5).

While the native NRG3 polypeptides of the present invention are glycoproteins, the present invention also encompasses variant molecules unaccompanied by native glycosylation or having a variant glycosylation pattern. Preferably, the EGF-like domain of the NRG3 polypeptide is unglycosylated.

In a further embodiment, the invention includes an antagonist of a novel NRG3 of the present invention. The antagonist of the invention may be a peptide that binds an NRG3 such as an anti-NRG3 antibody or binding fragment thereof. Preferably, the NRG3 antagonist of the invention substantially reduces binding of a natural ErbB4 receptor ligand, such as an NRG3, to the ErbB4 receptor, thereby preventing or limiting activation of the receptor. In a preferred embodiment, the antagonist reduces NRG3 binding to its receptor to less than 50%, preferably less than 20%, most preferably less than 10% of the binding of an NRG3 under like conditions.

In yet another embodiment, the invention includes an agonist of a novel NRG3 of the present invention. The agonist of the invention may be a NRG3, or it may be an anti-NRG3 receptor antibody or receptor binding fragment. An agonist NRG3 of the invention may also be a polypeptide encoded by an alternatively spliced form of the native NRG3-encoding gene, preferably comprising the NRG3 EGF-like domain disclosed herein. In an embodiment of the agonist of the invention, the NRG3 agonist is an anti-ErbB4 receptor antibody, which antibody binds to and activates the ErbB4 receptor. Preferably, the binding affinity of the agonist is at least 25% of the affinity of the native ligand, more preferably at least 50%, and most preferably at least 90% of the affinity of the native ligand. Similarly, it is preferred that the agonist of the invention activate the ErbB4 receptor at the level of at least 25%, more preferably at least 50%, most preferably at least 90% of activation of the native NRG3.

The invention further concerns a nucleic acid molecule encoding a novel NRG3 of the present invention, vectors containing such nucleic acid, and host cells transformed with the vectors. The nucleic acid preferably encodes at least the EGF-like domain of a native or variant ErbB4 receptor-specific NRG3 of the present invention. The invention further includes nucleic acids hybridizing under stringent conditions to the complement of a nucleic acid encoding a native ErbB4 receptor-specific NRG3 of the present invention, and encoding a protein retaining the qualitative ErbB4 receptor-specific binding properties of a native NRG3 disclosed herein. In addition, the invention includes a nucleic acid deposited with the American Type Culture Collection as ATCC 209156 (pLXSN.mNRG3), which nucleic acid is an expression vector comprising nucleic acid encoding the mouse NRG3 open reading frame (SEQ ID NO:1). The invention also includes a nucleic acid deposited with the American Type Culture Collection as ATCC 209157 (pRK5.tk.neo.hNRG3B1), which nucleic acid is an expression vector comprising nucleic acid encoding a human NRG3 nucleic acid (SEQ ID NO:5). The invention also includes a nucleic acid deposited with the American Type Culture Collection as ATCC 209297 (pRK5.tk.neo.hNRG3B2), which nucleic acid is an expression vector comprising nucleic acid encoding an alternatively spliced form of human NRG3 nucleic acid (SEQ ID NO:22) lacking nucleic acids 1585 to 1656 of SEQ ID NO:5. The deduced amino acid sequence of the alternatively spliced human NRG3B2 is found in SEQ ID NO:23 which lacks amino acids 529 to 552 of SEQ ID NO:6. A comparison of the hNRG3B1 and hNRG3B2 amino acid sequences is shown in Fig. 4B. The invention further includes NRG3 amino acid sequences of mouse and human NRG3, alternatively spliced forms or fragments thereof, encoded by the deposited expression vectors.

In another aspect, the invention concerns a process for producing a NRG3 of the invention, which process comprises transforming a host cell with nucleic acid encoding the desired NRG3, culturing the transformed host cell and recovering the NRG3 produced from the host cell or host cell culture.

As an alternative to production of the NRG3 in a transformed host cell, the invention provides a method for producing NRG3 comprising: (a) transforming a cell containing an endogenous NRG3 gene with a homologous DNA comprising an amplifiable gene and a flanking sequence of at least about 150 base pairs that is homologous with a DNA sequence within or in proximity to the endogenous NRG3 gene, whereby the homologous DNA integrates into the cell genome by recombination; (b) culturing the cell under conditions that select for amplification of the amplifiable gene, whereby the NRG3 gene is also amplified; and thereafter (c) recovering NRG3 from the cell.

In a further aspect, the invention concerns an antibody that binds specifically to a NRG3 of the present invention, and to a hybridoma cell line producing such an antibody.

In a still further aspect, the invention concerns an immunoadhesin comprising a novel NRG3 sequence, as disclosed herein, fused to an immunoglobulin sequence. The NRG3 sequence is preferably a transmembrane-domain-deleted form of a native or variant polypeptide fused to an immunoglobulin constant domain sequence, and comprises at least the EGF-like domain of the extracellular domain of a native NRG3 of the present invention. In another preferred embodiment, the NRG3 sequence present in the immunoadhesin shows at least about 80% sequence homology with the extracellular domain of the sequence shown in SEQ ID NO:3 NRG3 or SEQ ID NO:7 for mouse or human NRG3, respectively. The immunoglobulin constant domain sequence preferably is that of an IgG-1, IgG-2 or IgG-3 molecule, but may also be an IgA or IgM molecule.

In a further aspect, the invention encompasses a transgenic animal comprising an altered NRG3 gene in which the polypeptide encoded by the altered gene is not biologically active (non-functional), deleted, or has no more than 70% wild type activity, preferably no more than 50% activity and more preferably no more than 25% activity of the native NRG3 polypeptide. In addition, a transgenic animal of the invention includes a transgenic animal comprising and expressing a native NRG3, alternatively spliced form of NRG3, or a fragment or variant thereof. Such transgenic animals are useful for the screening of potential NRG3 agonists and antagonists.

The invention further concerns pharmaceutical compositions comprising a NRG3 as hereinabove defined in admixture with a pharmaceutically acceptable carrier. Dosages and administration of NRG3 in a pharmaceutical composition may be determined by one of ordinary skill in the art of clinical pharmacology or pharmacokinetics (see, for example, Mordenti, J. and Rescigno, A. (1992) *Pharmaceutical Research* 9:17-25; Morenti, J. *et al.* (1991) *Pharmaceutical Research* 8:1351-1359; and Mordenti, J. and Chappell, W. (1989) "The use of interspecies scaling in toxicokinetics" in Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobi *et al.* (eds), Pergamon Press, NY, pp. 42-96, each of which references are herein incorporated by reference in its entirety).

In an aspect of the invention, the isolated nucleic acid encoding the NRG3 of the invention, or fragment thereof, may also be used for *in vivo* or *ex vivo* gene therapy.

In an embodiment of the invention, a nucleic acid sequence encoding an NRG3, or fragment or variant thereof, is introduced into a cell of an animal as part of an expression cassette such that the NRG3-encoding nucleic acid sequence is expressed in the cell. Preferably, the NRG3 encoding nucleic acid sequence comprises

sequences (such as a promotor sequence) for the control of NRG3 expression within the cell. Preferably, the expression cassette comprises a retroviral vector for delivery of the nucleic acid sequence to a cell of the animal.

In a further embodiment of the invention, a host cell expressing an NRG3 or NRG3 agonist is introduced into an animal, preferably a human, such that NRG3 or NRG3 agonist produced by the host cell is effective in treating a disorder responsive to increased local or systemic NRG3 administration. Cells genetically engineered to express an NRG3, fragment or variant thereof, can be implanted in the host to provide effective levels of factor or factors. The cells can be prepared, encapsulated, and implanted as provided in U.S. Patents 4,892,538, and 5,011,472, WO 92/19195, WO 95/05452, or Aebischer *et al.* (1996) Medicine 2:696-699, for example, which references are herein incorporated by reference in their entirety.

The present invention includes methods of enhancing survival, proliferation or differentiation of cells comprising the ErbB4 receptor *in vivo* and *in vitro*. Normally, the cells will be treated with the NRG3 polypeptide or fragment or variant thereof. However, gene therapy approaches have been described in the art and are encompassed by the present invention. These techniques include gene delivery to a cell using adenovirus, herpes simplex I virus or adeno-associated virus as well as lipid-based delivery systems (e.g. liposomes). Retroviruses are useful for *ex vivo* gene therapy approaches. Accordingly, it is possible to administer the nucleic acid encoding NRG3, resulting in expression of the NRG3 polypeptide, fragment or variant in the patient or in tissue culture. For exemplary gene therapy techniques see WO 93/25673 and the references cited therein.

An aspect of the invention is a method of treating a disorder by administering to a mammal a cell encoding an NRG3 or fragment thereof, or agonist or antagonist of the NRG3 as necessary to treat the disorder, which cell secretes the NRG3 of the invention.

An embodiment of the invention is a method for preventing or treating damage to a nerve or damage to other NRG3-expressing or NRG3-responsive cells, e.g. brain, heart, or kidney cells, which method comprises implanting cells that secrete NRG3, or fragment or agonist thereof, or antagonist as may be required for the particular condition, into the body of patients in need thereof.

A further embodiment of the invention includes an implantation device, for preventing or treating nerve damage or damage to other cells as taught herein, containing a semipermeable membrane and a cell that secretes NRG3, or fragment or agonist thereof, (or antagonist as may be required for the particular condition) encapsulated within the membrane, the membrane being permeable to NRG3, or fragment agonist thereof, and impermeable to factors from the patient detrimental to the cells. The patient's own cells, transformed to produce NRG3 *ex vivo*, could be implanted directly into the patient, optionally without such encapsulation. The methodology for the membrane encapsulation of living cells is familiar to those of ordinary skill in the art, and the preparation of the encapsulated cells and their implantation in patients may be accomplished readily as is known in the art.

In accordance with the *in vitro* methods of the invention, cells comprising the ErbB4 receptor are placed in a cell culture medium. Examples of ErbB4-receptor-containing cells include neural cells, e.g., brain cells (such as neurons of the neocortex, cerebellum and hippocampus); cardiac cells; skeletal and smooth muscle cells; and cultured cells transformed with a recombinant NRG3.

Suitable tissue culture media are well known to persons skilled in the art and include, but are not limited to, Minimal Essential Medium (MEM), RPMI-1640, and Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM). These tissue culture medias are commercially available from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO) and GIBCO (Grand Island, NY). The cells are then cultured in the cell culture medium under conditions sufficient for the cells to remain viable and grow in the presence of an effective amount of NRG3. The cells can be cultured in a variety of ways, including culturing in a clot, agar, or liquid culture.

The cells are cultured at a physiologically acceptable temperature such as 37°C, for example, in the presence of an effective amount of NRG3, fragment or variant. The amount of NRG3 may vary, but preferably is in the range of about 0.1 ng/ml to about 1 mg/ml preferably about 0.1 ng/ml to about 0.1 ng/ml. The NRG3 can of course be added to the culture at a dose determined empirically by those in the art without undue experimentation. The concentration of NRG3 in the culture will depend on various factors, such as the conditions under which the cells and NRG3 are cultured. The specific temperature and duration of incubation, as well as other culture conditions, can be varied depending on such factors as, *e.g.*, the concentration of the NRG3, and the type of cells and medium. Those skilled in the art will be able to determine operative and optimal culture conditions without undue experimentation. Proliferation, differentiation and/or survival of the cells (*e.g.* neurons) in the cultures can be determined by various assays known in the art such as those described above.

It is contemplated that using NRG3 to enhance cell survival, growth and/or differentiation *in vitro* will be useful in a variety of ways. For instance, neural cells cultured *in vitro* in the presence of NRG3 can be infused into a mammal suffering from reduced levels of the cells. Stable *in vitro* cultures can also be used for isolating cell-specific factors and for expression of endogenous or recombinantly introduced proteins in the cell. NRG3, fragments or variants thereof may also be used to enhance cell survival, proliferation and/or differentiation of cells which support the growth and/or differentiation of other cells in cell culture.

The invention also provides *in vivo* uses for NRG3. Based on the neuronal cell expression pattern of NRG3, it is believed that this molecule will be particularly useful for treating diseases which involve neural cell growth such as demyelination, or damage or loss of glial cells (*e.g.* multiple sclerosis).

The invention further provides a method for treating a mammal comprising administering a therapeutically effective amount of NRG3, NRG3 fragment, or NRG3 agonist to the mammal. For example, the mammal may be suffering from a neurological or muscular disorder. Where the disorder is a neurological disorder, NRG3 is believed to be useful in promoting the development, maintenance, and/or regeneration of neurons *in vivo*, including central (brain and spinal chord), peripheral (sympathetic, parasympathetic, sensory, and enteric neurons), and motoneurons. Accordingly, NRG3 may be utilized in methods for the diagnosis and/or treatment of a variety of neurologic diseases or disorders which affect the nervous system of a mammal, such as a human.

Such diseases or disorders may arise in a patient in whom the nervous system has been damaged by, *e.g.*, trauma, surgery, stroke, ischemia, infection, metabolic disease, nutritional deficiency, malignancy, or toxic agents. The agent is designed to promote the survival or growth of neurons. For example, NRG3 can be used to promote the survival or growth of motoneurons that are damaged by trauma or surgery. Also, NRG3 can be used to treat motoneuron disorders, such as amyotrophic lateral sclerosis (Lou Gehrig's disease), Bell's palsy, and various conditions involving spinal muscular atrophy, or paralysis. NRG3 can be used to treat

human "neurodegenerative disorders", such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, epilepsy, multiple sclerosis, Huntington's chorea, Down's Syndrome, nerve deafness, and Meniere's disease.

Further, NRG3 can be used to treat neuropathy, and especially peripheral neuropathy. "Peripheral neuropathy" refers to a disorder affecting the peripheral nervous system, most often manifested as one or a combination of motor, sensory, sensorimotor, or autonomic neural dysfunction. The wide variety of morphologies exhibited by peripheral neuropathies can each be attributed uniquely to an equally wide number of causes. For example, peripheral neuropathies can be genetically acquired, can result from a systemic disease, or can be induced by a toxic agent. Examples include but are not limited to distal sensorimotor neuropathy, or autonomic neuropathies such as reduced motility of the gastrointestinal tract or atony of the urinary bladder. Examples of neuropathies associated with systemic disease include post-polio syndrome; examples of hereditary neuropathies include Charcot-Marie-Tooth disease, Refsum's disease, Abetalipoproteinemia, Tangier disease, Krabbe's disease, Metachromatic leukodystrophy, Fabry's disease, and Dejerine-Sottas syndrome; and examples of neuropathies caused by a toxic agent include those caused by treatment with a chemotherapeutic agent such as vincristine, cisplatin, methotrexate, or 3'-azido-3'-deoxythymidine.

The invention further provides a method for treating a mammal comprising administering a therapeutically effective amount of a NRG3 antagonist to the mammal. The mammal in this latter case is one which could benefit from a reduction in NRG3 levels/biological activity.

These and other objects, advantages and features of the present invention will become apparent to those persons skilled in the art upon reading the details of the structure, synthesis, and usage as more fully set forth below. Each reference cited herein is herein incorporated by reference in its entirety with particular attention to the description of subject matter associated with the context of the citation.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Fig. 1 shows the nucleic acid coding sequence of mouse NRG3 cDNA (mNRG3, SEQ ID NO:1) in which the start (ATG) and stop (TGA) codons of the coding sequence are indicated by underlining.

Fig. 2 shows the nucleic acid coding sequence of human NRG3 cDNA (hNRG3B1, SEQ ID NO:5) in which the start (ATG) and stop (TGA) codons of the coding sequence are indicated by underlining.

Fig. 3 shows the nucleic acid coding sequence of an alternatively spliced form of human NRG3 cDNA (hNRG3B2; SEQ ID NO:22) in which the start (ATG) and stop (TGA) codons of the coding sequence are indicated by underlining.

Figs. 4A - 4B. Fig. 4A shows the deduced amino acid sequences from mouse (mNRG3) and human (hNRG3B1) cDNA as shown in Figs. 1 and 2. Mouse NRG3 deduced amino acid sequence is depicted by SEQ ID NO:2 and human NRG3B1 deduced amino acid sequence is depicted by SEQ ID NO:6. Various putative domains within the amino acid sequences are shown. The EGF-like domain, the N-terminal hydrophobic segment (double underline), the serine/threonine-rich portion, and a predicted transmembrane domain (single underline) are highlighted. Fig. 4B shows the deduced amino acid sequences from hNRG3B1 and hNRG3B2 cDNA as shown in Figs. 2 and 3. Human NRG3B1 deduced amino acid sequence is depicted by SEQ ID NO:6 and human NRG3B2 deduced amino acid sequence is depicted by SEQ ID NO:23. The region of the NRG3 amino acid sequence that differs between the two human sequences is illustrated.

Fig. 5 shows a sequence alignment of the EGF-like domains of human NRG3B1 (hNRG3_{egf}; SEQ ID NO:4); chicken ARIA (cARIA_{egf}; SEQ ID NO:9); human amphiregulin (hAR_{egf}; SEQ ID NO:10); human betacellulin (hBTC_{egf}; SEQ ID NO:11); human EGF (hEGF_{egf}; SEQ ID NO:12); human heparin-binding EGF-like growth factor (hHB-EGF_{egf}; SEQ ID NO:13); human heregulin- α (hHRG α ; SEQ ID NO:14); human heregulin- β (hHRG β _{egf}; SEQ ID NO:15); human TGF- α (hTGF α _{egf}; SEQ ID NO:16); and mouse epiregulin (mEPR_{egf}; SEQ ID NO:17). The sequences were analyzed using Sequence Analysis Programs, Genentech, Inc.

Fig. 6A - 6H are FACS plots demonstrating binding of NRG3^{EGF}.Fc to ErbB4 receptor expressed on the surface of cells. In Figs. 6A-6D, parental K562 cells (Fig. 6A) or K562 cells expressing either ErbB2 receptor (K562^{erbB2} cells; Fig. 6B), ErbB3 receptor (K562^{erbB3} cells; Fig. 6C) or ErbB4 receptor (K562^{erbB4} cells; Fig. 6D) were examined for the expression of corresponding receptors. Cells were incubated with anti-ErbB2 receptor, anti-ErbB3 receptor or anti-ErbB4 receptor antibodies as indicated before PE-conjugated secondary antibody was added. "LOG PE" represents relative fluorescent intensity and "Counts" represents cell numbers. In Figs. 6E-6H, NRG3^{EGF}.Fc is shown by FACS analysis to bind to ErbB4 receptor expressing cells. Parental K562 cells (Fig. 6E), K562^{erbB2} cells (Fig. 6F), K562^{erbB3} cells (Fig. 6G) and K562^{erbB4} cells (Fig. 6H) were incubated with or without NRG3^{EGF}.Fc (containing gD tag) for 1 hour, followed by anti-gD-tag primary antibody and PE-conjugated secondary antibody.

Fig. 7 is a graphical analysis showing competitive inhibition of ¹²⁵I-NRG3^{EGF}.Fc binding to immobilized soluble ErbB4 receptor by NRG3^{EGF}.Fc or NRG^{EGF}. Soluble ErbB4 receptor was immobilized on 96-well plates, and was incubated with various concentrations of unlabeled NRG3^{EGF}.Fc or NRG^{EGF} and constant amount of ¹²⁵I-labeled NRG3^{EGF}.Fc for 1.5 hour at room temperature. The fraction of radioactivity bound over total ¹²⁵I-NRG3^{EGF}.Fc input is plotted against the concentration of competitor. Data of a representative experiment from four independent assays is shown. Error bars indicate standard deviation of quadruplicate samples.

Before the present polypeptides, nucleic acids, vectors, and host cells and processes for making such are described, it is to be understood that this invention is not limited to the particular compositions of matter and processes described, as such compounds and methods may, of course, vary. It is also to be understood that the terminology used herein is for the purpose of describing particular embodiments only, and is not intended to be limiting since the scope of the present invention will be limited only by the appended claims.

DESCRIPTION OF THE EMBODIMENTS

Definitions

The phrases "novel neuregulin related ligand", "novel NRG3", "novel ErbB4 receptor-specific NRG3" are used interchangeably and refer to a new member of the family of neuregulins, which NRG3 is expressed specifically in the brain and nervous system of the embryo and adults, and to functional derivatives of such native polypeptides.

The term "NRG3" or "neuregulin related ligand" is defined herein to be any polypeptide sequence that possesses at least one biological property (as defined below) of native amino acid sequence NRG3 of SEQ ID NO:2 or 6 (mouse or human, respectively) and additionally includes an alternatively spliced form of human NRG3 having the amino acid sequence of SEQ ID NO:23. This definition encompasses not only the

polypeptide isolated from a native NRG3 source such as human MDA-MB-175 cells or from another source, such as another animal species or alternatively spliced forms of NRG3, but also the polypeptide prepared by recombinant or synthetic methods. It also includes variant forms including functional derivatives, allelic variants, naturally occurring isoforms and analogues thereof. Sometimes the NRG3 is "native NRG3" which refers to endogenous NRG3 polypeptide which has been isolated from a mammal. The NRG3 can also be "native sequence NRG3" insofar as it has the same amino acid sequence as a native NRG3 (e.g. mouse (SEQ ID NO:2) or human (SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:23) NRG3 shown in Figs. 4A and 4B). However, "native sequence NRG3" encompasses the polypeptide produced by recombinant or synthetic means. "Mature NRG3" is soluble or secreted NRG3 released from the cell (i.e. lacking an N-terminal hydrophobic sequence). In this context, NRG3 refers to novel NRG3s comprising an EGF-like domain within an extracellular domain, a transmembrane domain and a cytoplasmic domain, with or without a native signal sequence, and naturally occurring soluble forms of such NRG3s, with or without the initiating methionine, whether purified from native source, synthesized, produced by recombinant DNA technology or by any combination of these and/or other methods. The native NRG3s of the present invention specifically include the murine NRG3, the amino acid sequence of which is shown in Fig. 4 (SEQ. ID. NO:2), and the human NRG3s having the amino acid sequences shown in Fig. 4 (SEQ. ID. NO:6 or SEQ ID NO:23), and fragments or mammalian homologues or alternatively spliced forms of these native ligands. The novel native murine and human NRG3s of the present invention are about 713 and 720 amino acids in length, respectively, and comprise an EGF-like domain, the N-terminal hydrophobic segment, the serine/threonine-rich portion, a predicted transmembrane domain, and a predicted intracellular domain. The boundaries of these domain are indicated in Fig. 4 for the novel murine and human NRG3 sequences.

Optionally, the NRG3 is not associated with native glycosylation. "Native glycosylation" refers to the carbohydrate moieties which are covalently attached to native NRG3 when it is produced in the mammalian cell from which the native NRG3 is derived. Accordingly, human NRG3 produced in a non-human could be described as not being associated with native glycosylation, for example it may be glycosylated other than the native glycosylation. Sometimes, the NRG3 is not associated with any glycosylation whatsoever (e.g. as a result of being produced recombinantly in a prokaryote).

The term "EGF-like domain" refers to an extracellular epidermal growth factor (EGF)-like domain of a polypeptide, preferably a NRG3 polypeptide of the invention. The EGF-like domain is sufficient to bind neuregulin receptors and stimulate cellular responses (Holmes, W.E., et al. (1992) *Science* 256:1205-1210). Preferably, an EGF-like domain of the NRG3 of the invention has the amino acid sequence of the NRG3s shown in SEQ ID NO:4 (mouse or human NRG3 EGF-like domain), where the EGF-like domain is from about amino acid 284 to about amino acid 332 of human NRG3, and from about amino acid 286 to about amino acid 334 of mouse NRG3. The NRG3 of the invention encompasses a polypeptide encoded by an alternatively spliced form the NRG3 encoding gene, which alternatively spliced form comprises the NRG3 EGF-like domain.

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 "soluble form", "soluble receptor", "soluble NRG3", "soluble NRG3", and grammatical variants thereof, refer to variants of the native or variant NRG3s of the present invention which are devoid of a functional transmembrane domain. In the soluble receptors the transmembrane domain may be deleted, truncated or otherwise inactivated such that they are not capable of cell membrane anchorage. If desired, such soluble forms of the NRG3s of the present invention might additionally have their cytoplasmic domains fully or partially deleted or otherwise inactivated.

A "functional derivative" of a polypeptide is a compound having a qualitative biological activity in common with the native polypeptide. Thus, a functional derivative of a native novel NRG3 of the present invention is a compound that has a qualitative biological activity in common with such native NRG3. "Functional derivatives" include, but are not limited to, fragments of native polypeptides from any animal species (including humans), derivatives of native (human and non-human) polypeptides and their fragments, and peptide and non-peptide analogs of native polypeptides, provided that they have a biological activity in common with a respective native polypeptide.

As used herein, the term "fragments" refers to regions within the sequence of a mature native polypeptide. Preferably NRG3 fragments will have a consecutive sequence of at least 20, and more preferably at least 50, amino acid residues of the EGF-like domain of NRG3. The preferred fragments have about 30-150 amino acid residues which are identical to a portion of the sequence of NRG3 in SEQ ID NO:2 (from mouse), or in SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:23 (from human). The term "derivative" is used to define amino acid sequence and glycosylation variants, and covalent modifications of a native polypeptide. "Non-peptide analogs" are organic compounds which display substantially the same surface as peptide analogs of the native polypeptides. Thus, the non-peptide analogs of the native novel NRG3s of the present invention are organic compounds which display substantially the same surface as peptide analogs of the native NRG3s. Such compounds interact with other molecules in a similar fashion as the peptide analogs, and mimic a biological activity of a native NRG3 of the present invention. Preferably, amino acid sequence variants of the present invention retain at least one domain of a native NRG3, preferably an EGF-like domain, or have at least about 60% amino acid sequence identity, more preferably at least about 75% amino acid sequence identity, and most preferably at least about 90% amino acid sequence identity with a domain of a native NRG3 of the present invention. The amino acid sequence variants preferably show the highest degree of amino acid sequence homology with the EGF-like domain of native NRG3s of the present invention. These are the domains which show the highest percentage amino acid conservation between the novel NRG3s of the present invention and other members of the NRG3 family (see Fig. 4).

The terms "isolated" or "substantially pure" refer to a polypeptide or nucleic acid which is free of other polypeptides or nucleic acids as well as lipids, carbohydrates or other materials with which it is naturally associated. An exception is made for glycosylation wherein sugar moieties are covalently attached to amino acids of the NRG3 polypeptide of the invention. One of ordinary skill in the art can purify a NRG3 polypeptide or nucleic acid encoding the polypeptide using standard techniques appropriate for each type of molecule.

The term "percent amino acid sequence identity" with respect to the NRG3 sequence is defined herein as the percentage of amino acid residues in the candidate sequence that are identical with the residues in the NRG3 sequence having the deduced amino acid sequence described in Fig. 1, after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity, and not considering any

conservative substitutions as part of the sequence identity. N-terminal, C-terminal, or internal extensions, deletions, or insertions into the NRG3 sequence shall be construed as affecting sequence identity or homology.

Another type of NRG3 variant is "chimeric NRG3", which term encompasses a polypeptide comprising full-length NRG3 or a fragment thereof fused or bonded to a heterologous polypeptide. The chimera will normally share at least one biological property with NRG3. Examples of chimeric NRG3s include immunoadhesins and epitope tagged NRG3. In another embodiment, the heterologous polypeptide is thioredoxin, a salvage receptor binding epitope, cytotoxic polypeptide or enzyme (e.g., one which converts a prodrug to an active drug).

The terms "covalent modification" and "covalent derivatives" are used interchangeably and include, but are not limited to, modifications of a native polypeptide or a fragment thereof with an organic proteinaceous or non-proteinaceous derivatizing agent, fusions to heterologous polypeptide sequences, and post-translational modifications. Covalent modifications are traditionally introduced by reacting targeted amino acid residues with an organic derivatizing agent that is capable of reacting with selected sides or terminal residues, or by harnessing mechanisms of post-translational modifications that function in selected recombinant host cells. Certain post-translational modifications are the result of the action of recombinant host cells on the expressed polypeptide. Glutaminyl and asparaginyl residues are frequently post-translationally deamidated to the corresponding glutamyl and aspartyl residues. Alternatively, these residues are deamidated under mildly acidic conditions. Other post-translational modifications include hydroxylation of proline and lysine, phosphorylation of hydroxyl groups of seryl, tyrosyl or threonyl residues, methylation of the α -amino groups of lysine, arginine, and histidine side chains (T.E. Creighton (1983) Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86). Covalent derivatives/modifications specifically include fusion proteins comprising native NRG3 sequences of the present invention and their amino acid sequence variants, such as immunoadhesins, and N-terminal fusions to heterologous signal sequences.

The term "biological activity" in the context of the present invention is defined as the possession of at least one adhesive, regulatory or effector function qualitatively in common with a native polypeptide. Preferred functional derivatives within the scope of the present invention are unified by retaining an EGF-like domain and ErbB4 receptor-specific binding of a native NRG3 of the present invention.

The phrase "activating an ErbB receptor" refers to the act of causing the intracellular kinase domain of an ErbB receptor to phosphorylate tyrosine residues. Generally, this will involve binding of NRG3 to an ErbB4 receptor or ErbB4 receptor homodimer, which binding activates a kinase domain of one or more of the receptors and thereby results in phosphorylation of tyrosine residues in one or more of the receptors, and/or phosphorylation of tyrosine residues in additional substrate polypeptide(s). ErbB receptor phosphorylation can be quantified using the tyrosine phosphorylation assays described below. It is understood that the NRG3 of the invention may itself be activated by interaction with an ErbB receptor via the intracellular domain of NRG3. Thus, an NRG3-activating ligand that binds to the NRG3 (preferably binding to the extracellular domain, more preferably the EGF-like domain) includes, but is not limited to, a ligand, an antibody, or a receptor. Activation of the NRG3 may be through phosphorylation of the intracellular domain or other like event common to receptor/ligand mediated cell signaling. As a mediator of cell signaling, the NRG3 of the invention is expected to be associated with apoptosis, metabolic signaling, differentiation or cell proliferation.

"Identity" or "homology" with respect to a native polypeptide and its functional derivative is defined herein as the percentage of amino acid residues in the candidate sequence that are identical with the residues of a corresponding native polypeptide, after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent homology, and not considering any conservative substitutions as part of the sequence identity. Neither N- or C-terminal extensions nor insertions shall be construed as reducing identity or homology. Methods and computer programs for the alignment are well known in the art. For example, the sequences disclosed herein were analyzed using Sequence Analysis Programs, Genentech, Inc, Inc.

The term "agonist" is used to refer to peptide and non-peptide analogs of the native NRG3s of the present invention and to antibodies specifically binding such native NRG3s provided that they retain at least one biological activity of a native NRG3. Preferably, the agonists of the present invention retain the qualitative EGF-like domain binding recognition properties of the native NRG3 polypeptides.

The term "antagonist" is used to refer to a molecule inhibiting a biological activity of a native NRG3 of the present invention. Preferably, the antagonists herein inhibit the binding of a native NRG3 of the present invention. Preferred antagonists essentially completely block the binding of a native NRG3 to an ErbB4 receptor to which it otherwise binds. A NRG3 "antagonist" is a molecule which prevents, or interferes with, a NRG3 effector function (*e.g.* a molecule which prevents or interferes with binding and/or activation of an ErbB4 receptor by NRG3). Such molecules can be screened for their ability to competitively inhibit ErbB receptor activation by NRG3 in the tyrosine phosphorylation assay disclosed herein, for example. Preferred antagonists are those which do not substantially interfere with the interaction of other heregulin polypeptides with ErbB receptor(s). Examples of NRG3 antagonists include neutralizing antibodies against NRG3 and antisense polynucleotides against the NRG3 gene.

Ordinarily, the terms "amino acid" and "amino acids" refer to all naturally occurring L- α -amino acids. In some embodiments, however, D-amino acids may be present in the polypeptides or peptides of the present invention in order to facilitate conformational restriction. For example, in order to facilitate disulfide bond formation and stability, a D amino acid cysteine may be provided at one or both termini of a peptide functional derivative or peptide antagonist of the native NRG3s of the present invention. The amino acids are identified by either the single-letter or three-letter designations:

Asp	D	aspartic acid	Ile	I	isoleucine
Thr	T	threonine	Leu	L	leucine
Ser	S	serine	Tyr	Y	tyrosine
Glu	E	glutamic acid	Phe	F	phenylalanine
Pro	P	proline	His	H	histidine
Gly	G	glycine	Lys	K	lysine
Ala	A	alanine	Arg	R	arginine
Cys	C	cysteine	Trp	W	tryptophan
Val	V	valine	Gln	Q	glutamine
Met	M	methionine	Asn	N	asparagine

The term "amino acid sequence variant" refers to molecules with some differences in their amino acid sequences as compared to a native amino acid sequence.

Substitutional variants are those that have at least one amino acid residue in a native sequence removed and a different amino acid inserted in its place at the same position.

Insertional variants are those with one or more amino acids inserted immediately adjacent to an amino acid at a particular position in a native sequence. Immediately adjacent to an amino acid means connected to either the α -carboxy or α -amino functional group of the amino acid.

Deletional variants are those with one or more amino acids in the native amino acid sequence removed.

"Antibodies (Abs)" and "immunoglobulins (Igs)" are glycoproteins having the same structural characteristics. While antibodies exhibit binding specificity to a specific antigen, immunoglobulins include both antibodies and other antibody-like molecules which lack antigen specificity. Polypeptides of the latter kind are, for example, produced at low levels by the lymph system and at increased levels by myelomas.

Native antibodies and immunoglobulins are usually heterotetrameric glycoproteins of about 150,000 Daltons, composed of two identical light (L) chains and two identical heavy (H) chains. Each light chain is linked to a heavy chain by one covalent disulfide bond, while the number of disulfide linkages varies between the heavy chains of different immunoglobulin isotypes. Each heavy and light chain also has regularly spaced intrachain disulfide bridges. Each heavy chain has at one end a variable domain (V_H) followed by a number of constant domains. Each light chain has a variable domain at one end (V_L) and a constant domain at its other end; the constant domain of the light chain is aligned with the first constant domain of the heavy chain, and the light chain variable domain is aligned with the variable domain of the heavy chain. Particular amino acid residues are believed to form an interface between the light and heavy chain variable domains (Clothia *et al.* (1985) *J. Mol. Biol.* **186**, 651-663; Novotny and Haber (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:4592-4596).

The light chains of antibodies (immunoglobulins) from any vertebrate species can be assigned to one of two clearly distinct types, called kappa and lambda (λ), based on the amino acid sequences of their constant domains.

Depending on the amino acid sequence of the constant domain of their heavy chains, immunoglobulins can be assigned to different classes. There are five major classes of immunoglobulins: IgA, IgD, IgE, IgG and IgM, and several of these may be further divided into subclasses (isotypes), e.g. IgG-1, IgG-2, IgG-3, and IgG-4; IgA-1 and IgA-2. The heavy chain constant domains that correspond to the different classes of immunoglobulins are called α , delta, epsilon, γ , and μ , respectively. The subunit structures and three-dimensional configurations of different classes of immunoglobulins are well known.

The term "antibody" is used in the broadest sense and specifically covers single monoclonal antibodies (including agonist and antagonist antibodies), antibody compositions with polypepitopic specificity, as well as antibody fragments (e.g., Fab, F(ab')₂, and Fv), so long as they exhibit the desired biological activity.

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. 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 and Milstein (1975) *Nature* 256:495, or may be made by recombinant DNA methods (see, e.g. U.S. Patent No. 4,816,567 (Cabilly *et al.*) and Mage and Lamoyi (1987) in *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 79-97, Marcel Dekker, Inc., New York). The monoclonal antibodies may also be isolated from phage libraries generated using the techniques described in McCafferty *et al.* (1990) *Nature* 348:552-554, 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', F(ab)₂ 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 sequence. The humanized antibody optimally also will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin. For further details see: Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Reichmann *et al.* (1988) *Nature* 332:323-329; EP-B-239 400 published 30 September 1987; Presta (1992) *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596; and EP-B-451 216 published 24 January 1996), which references are herein incorporated by reference in their entirety. The humanized antibody includes a Primatized™ antibody wherein the antigen-binding region of the antibody is derived from an antibody produced by immunizing macaque monkeys with the antigen of interest.

By "neutralizing antibody" is meant an antibody molecule as herein defined which is able to block or significantly reduce an effector function of native sequence NRG3. For example, a neutralizing antibody may inhibit or reduce the ability of NRG3 to activate an ErbB receptor, preferably an ErbB4 receptor, in the tyrosine phosphorylation assay described herein. The neutralizing antibody may also block the mitogenic activity of NRG3 in the cell proliferation assay disclosed herein.

The monoclonal antibodies herein specifically include "chimeric" antibodies (immunoglobulins) in which a portion of the heavy and/or light chain is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from a particular species or belonging to a particular antibody class or subclass, while the remainder of the chain(s) is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from another species or belonging to another antibody class or subclass, as well as fragments of such antibodies, so long as they exhibit the desired biological activity (U.S. Patent No. 4,816,567 (Cabilly *et al.*; Morrison *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855).

In the context of the present invention the expressions "cell", "cell line", and "cell culture" and "host cell" are used interchangeably, and all such designations include progeny. It is also understood that all progeny

may not be precisely identical in DNA content, due to deliberate or inadvertent mutations. Mutant progeny that have the same function or biological property, as screened for in the originally transformed cell, are included. Methods of stable transfer, meaning that the foreign DNA is continuously maintained in the host, are known in the art.

The terms "replicable expression vector", "expression vector" and "vector" refer to a piece of DNA, usually double-stranded, which may have inserted into it a piece of foreign DNA. Foreign DNA is defined as heterologous DNA, which is DNA not naturally found in the host cell. The vector is used to transport the foreign or heterologous DNA into a suitable host cell. Once in the host cell, the vector can replicate independently of the host chromosomal DNA, and several copies of the vector and its inserted (foreign) DNA may be generated. In addition, the vector contains the necessary elements that permit translating the foreign DNA into a polypeptide. Many molecules of the polypeptide encoded by the foreign DNA can thus be rapidly synthesized.

The term "control sequences" refers to DNA sequences necessary for the expression of an operably linked coding sequence in a particular host organism. The control sequences that are suitable for prokaryotes, for example, include a promoter, optionally an operator sequence, a ribosome binding site, and possibly, other as yet poorly understood sequences. Eukaryotic cells are known to utilize promoters, polyadenylation signals, and enhancer.

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 a 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 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, then synthetic oligonucleotide adaptors or linkers are used in accord with conventional practice.

"Oligonucleotides" are short-length, single- or double-stranded polydeoxynucleotides that are chemically synthesized by known methods, such as phosphotriester, phosphite, or phosphoramidite chemistry, using solid phase techniques such as those described in EP 266,032, published 4 May 1988, or via deoxynucleoside H-phosphanate intermediates as described by Froehler *et al.* (1986) *Nucl. Acids Res.* 14:5399. They are then purified on polyacrylamide gels.

By "solid phase" is meant a non-aqueous matrix to which a reagent of interest (e.g., NRG3 or an antibody thereto) can adhere. Examples of solid phases encompassed herein include those formed partially or entirely of glass (e.g., controlled pore glass), polysaccharides (e.g., agarose), polyacrylamides, polystyrene, polyvinyl alcohol and silicones. In certain embodiments, depending on the context, the solid phase can comprise the well of an assay plate; in others it is a purification column (e.g., an affinity chromatography column). This term also includes a discontinuous solid phase of discrete particles, such as those described in U.S. Patent No. 4,275,149, herein incorporated by reference in its entirety.

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 NRG3 DNA may integrate into

the host cell genome, or may exist as an extrachromosomal element. If prokaryotic cells or cells that contain substantial cell wall constructions are used as hosts, the preferred methods of transfection of the cells with DNA is the calcium treatment method described by Cohen *et al.* (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 69:2110-2114 or the polyethylene glycol method of Chung *et al.* (1988) *Nuc. Acids. Res.* 16:3580. If yeast are used as the host, transfection is generally accomplished using polyethylene glycol, as taught by Hinnen (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:1929-1933. If mammalian cells are used as host cells, transfection generally is carried out by the calcium phosphate precipitation method, Graham *et al.* (1978) *Virology* 52:546, Gorman *et al.* (1990) *DNA and Protein Eng. Tech.* 2:3-10. However, other known methods for introducing DNA into prokaryotic and eukaryotic cells, such as nuclear injection, electroporation, or protoplast fusion also are suitable for use in this invention.

Particularly useful in this invention are expression vectors that provide for the transient expression in mammalian cells of DNA encoding NRG3. In general, transient expression involves the use of an expression vector that is able to efficiently replicate in a host cell, such that the host cell accumulates many copies of the expression vector and, in turn, synthesizes high levels of a desired polypeptide encoded by the expression vector. Transient expression systems, comprising a suitable expression vector and a host cell, allow for the convenient positive identification of polypeptides encoded by cloned DNAs, as well as for the rapid screening of such polypeptides for desired biological or physiological properties.

It is further envisioned that the NRG3 of this invention may be produced by homologous recombination, as provided for in WO 91/06667, published 16 May 1991. Briefly, this method involves transforming a cell containing an endogenous NRG3 gene with a homologous DNA, which homologous DNA comprises (a) an amplifiable gene (*e.g.* a gene encoding dihydrofolate reductase (DHFR)), and (b) at least one flanking sequence, having a length of at least about 150 base pairs, which is homologous with a nucleotide sequence in the cell genome that is within or in proximity to the gene encoding NRG3. The transformation is carried out under conditions such that the homologous DNA integrates into the cell genome by recombination. Cells having integrated the homologous DNA are then subjected to conditions which select for amplification of the amplifiable gene, whereby the NRG3 gene is amplified concomitantly. The resulting cells are then screened for production of desired amounts of NRG3. Flanking sequences that are in proximity to a gene encoding NRG3 are readily identified, for example, by the method of genomic walking, using as a starting point the nucleotide sequence, or fragment thereof, of mouse NRG3 of Fig. 1 (SEQ ID NO:1), or human NRG3 of Fig. 2 (SEQ ID NO:5) or Fig. 3 (SEQ ID NO:22). DNA encoding the mouse and human NRG3 polypeptides is deposited with the American Type Culture Collection as ATCC 209156 (mouse; pLXSN.mNRG3), ATCC 209157 (human; pRK5.tk.neo.hNRG3B1), or ATCC 209157 (human; pRK5.tk.neo.hNRG3B2).

The expression "enhancing survival of a cell" refers to the act of increasing the period of existence of a cell, relative to an untreated cell which has not been exposed to NRG3, either *in vitro* or *in vivo*.

The phrase "enhancing proliferation of a cell" encompasses the step of increasing the extent of growth and/or reproduction of the cell, relative to an untreated cell, either *in vitro* or *in vivo*. An increase in cell proliferation in cell culture can be detected by counting the number of cells before and after exposure to NRG3 (see the Example below). The extent of proliferation can be quantified via microscopic examination of the degree of confluency. Cell proliferation can also be quantified by measuring ³H uptake by the cells.

By "enhancing differentiation of a cell" is meant the act of increasing the extent of the acquisition or possession of one or more characteristics or functions which differ from that of the original cell (*i.e.* cell specialization). This can be detected by screening for a change in the phenotype of the cell (*e.g.* identifying morphological changes in the cell).

"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).

"Isolated NRG3 nucleic acid" is RNA or DNA free from at least one contaminating source nucleic acid with which it is normally associated in the natural source and preferably substantially free of any other mammalian RNA or DNA. The phrase "free from at least one contaminating source nucleic acid with which it is normally associated" includes the case where the nucleic acid is present in the source or natural cell but is in a different chromosomal location or is otherwise flanked by nucleic acid sequences not normally found in the source cell. An example of isolated NRG3 nucleic acid is RNA or DNA that encodes a biologically active NRG3 sharing at least 75%, more preferably at least 80%, still more preferably at least 85%, even more preferably 90%, and most preferably 95% sequence identity with the mouse NRG3 shown in Fig. 1 (SEQ ID NO:1), or human NRG3 shown in Fig. 2 (SEQ ID NO:4) or Fig. 3 (SEQ ID NO:22).

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 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 adaptors or linkers are used in accordance with conventional practice.

Hybridization is preferably performed under "stringent conditions" which means (1) employing low ionic strength and high temperature for washing, for example, 0.015 sodium chloride/0.0015 M sodium citrate/0.1% sodium dodecyl sulfate at 50°C, or (2) employing during hybridization a denaturing agent, such as formamide, for example, 50% (vol/vol) formamide with 0.1% bovine serum albumin/0.1% Ficoll/0.1% polyvinylpyrrolidone/50 mM sodium phosphate buffer at pH 6.5 with 750 mM sodium chloride, 75 mM sodium citrate at 42°C. Another example is use of 50% formamide, 5 x SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M sodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 6/8), 0.1% sodium pyrophosphate, 5 x Denhardt's solution, sonicated salmon sperm DNA (50 µg/ml), 0.1% SDS, and 10% dextran sulfate at 42°C, with washes at 42°C in 0.2 x SSC and 0.1% SDS. Yet another example is hybridization using a buffer of 10% dextran sulfate, 2 x SSC (sodium chloride/sodium citrate) and 50% formamide at 55 °C, followed by a high-stringency wash consisting of 0.1 x SSC containing EDTA at 55 °C.

"Immuno adhesins" or "NRG3 - immunoglobulin chimeras" are chimeric antibody-like molecules that combine the functional domain(s) of a binding protein (usually a receptor, a cell-adhesion molecule or a ligand) with the an immunoglobulin sequence. The most common example of this type of fusion protein combines the hinge and Fc regions of an immunoglobulin (Ig) with domains of a cell-surface receptor that recognizes a specific ligand. This type of molecule is called an "immuno adhesin", because it combines "immune" and

"adhesion" functions; other frequently used names are "Ig-chimera", "Ig-" or "Fc-fusion protein", or "receptor-globulin."

"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.

"Mammal" for purposes of treatment refers to any animal classified as a mammal, including humans, domestic and farm animals, and zoo, sports, or pet animals, such as sheep, dogs, horses, cats, cows, and the like. Preferably, the mammal herein is a human.

"Carriers" as used herein include pharmaceutically acceptable carriers, excipients, or stabilizers 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™.

General Procedures for the Production of an NRG3 by recombinant DNA technology

A. Identification and isolation of nucleic acid encoding novel neuregulin related ligand, NRG3.

The native NRG3s of the present invention may be isolated from cDNA or genomic libraries. For example, a suitable cDNA library can be constructed by obtaining polyadenylated mRNA from cells known to express the desired NRG3, and using the mRNA as a template to synthesize double stranded cDNA. Suitable sources of the mRNA are embryonic and adult mammalian tissues. mRNA encoding native NRG3s of the present invention is expressed, for example, in adult mammalian, brain, nervous system, heart, muscle, and testis. The gene encoding the novel NRG3s of the present invention can also be obtained from a genomic library, such as a human genomic cosmid library, or a mouse-derived embryonic stem cell (ES) genomic library.

Libraries, either cDNA or genomic, are screened with probes designed to identify the gene of interest or the protein encoded by it. For cDNA expression libraries, suitable probes include monoclonal and polyclonal antibodies that recognize and specifically bind to a NRG3 of the invention. For cDNA libraries, suitable probes include carefully selected oligonucleotide probes (usually of about 20-80 bases in length) that encode known or suspected portions of a NRG3 polypeptide from the same or different species, and/or complementary or homologous cDNAs or fragments thereof that encode the same or a similar gene. Appropriate probes for screening genomic DNA libraries include, without limitation, oligonucleotides, cDNAs, or fragments thereof that encode the same or a similar gene, and/or homologous genomic DNAs or fragments thereof. Screening the cDNA or genomic library with the selected probe may be conducted using standard procedures as described in Chapters 10-12 of Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, herein incorporated by reference in its entirety.

If DNA encoding a NRG3 of the present invention is isolated by using carefully selected oligonucleotide sequences to screen cDNA libraries from various tissues, the oligonucleotide sequences selected as probes should be sufficient in length and sufficiently unambiguous that false positive selections are minimized. The actual nucleotide sequence(s) is/are usually designed based on regions that have the least codon redundancy. The oligonucleotides may be degenerate at one or more positions. The use of degenerate oligonucleotides is of particular importance where a library is screened from a species in which preferential codon usage is not known.

The oligonucleotide must be labeled such that it can be detected upon hybridization to DNA in the library being screened. The preferred method of labeling is to use ATP (e.g., $\gamma^{32}\text{P}$) and polynucleotide kinase to radiolabel the 5' end of the oligonucleotide. However, other methods may be used to label the oligonucleotide, including, but not limited to, biotinylation or enzyme labeling.

cDNAs encoding the novel NRG3s can also be identified and isolated by other known techniques of recombinant DNA technology, such as by direct expression cloning, or by using the polymerase chain reaction (PCR) as described in U.S. Patent No. 4,683,195, issued 28 July 1987, in section 14 of Sambrook *et al.*, *supra*, or in Chapter 15 of Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel *et al.* eds., Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience 1991, which references are herein incorporated by reference in their entirety.

Once cDNA encoding a new native ErbB4 receptor-specific NRG3 from one species has been isolated, cDNAs from other species can also be obtained by cross-species hybridization. According to this approach, human or other mammalian cDNA or genomic libraries are probed by labeled oligonucleotide sequences selected from known NRG3 sequences (such as murine or human sequences) in accord with known criteria. Preferably, the probe sequence should be sufficient in length and sufficiently unambiguous that false positives are minimized. Typically, a ^{32}P -labeled oligonucleotide having about 30 to 50 bases is sufficient, particularly if the oligonucleotide contains one or more codons for methionine or tryptophan. Isolated nucleic acid will be DNA that is identified and separated from contaminant nucleic acid encoding other polypeptides from the source of nucleic acid. Hybridization is preferably performed under "stringent conditions", as defined herein.

Once the sequence is known, the gene encoding a particular NRG3 can also be obtained by chemical synthesis, following one of the methods described in Engels and Uhlmann, *Agnew (1989) Chem. Int. Ed. Engl.* 28:716, herein incorporated by reference in its entirety. These methods include triester, phosphite, phosphoramidite and H-phosphonate methods, PCR and other autoprimer methods, and oligonucleotide syntheses on solid supports.

B. Cloning and expression of nucleic acid encoding the novel NRG3s.

Once the nucleic acid encoding a novel NRG3 is available, it is generally ligated into a replicable expression vector for further cloning (amplification of the DNA), or for expression.

Expression and cloning vectors are well known in the art and contain a nucleic acid sequence that enables the vector to replicate in one or more selected host cells. The selection of the appropriate vector will depend on 1) whether it is to be used for DNA amplification or for DNA expression, 2) the size of the DNA to be inserted into the vector, and 3) the host cell to be transformed with the vector. Each vector contains various components depending on its function (amplification of DNA or expression of DNA) and the host cell for which it is compatible. The vector components generally include, but are not limited to, one or more of the

following: a signal sequence, an origin of replication, one or more marker genes, an enhancer element, a promoter, and a transcription termination sequence. Construction of suitable vectors containing one or more of the above listed components, the desired coding and control sequences, employs standard ligation techniques. Isolated plasmids or DNA fragments are cleaved, tailored, and religated in the form desired to generate the plasmids required. For analysis to confirm correct sequences in plasmids constructed, the ligation mixtures are commonly used to transform *E. coli* cells, e.g. *E. coli* K12 strain 294 (ATCC 31,446) and successful transformants selected by ampicillin or tetracycline resistance where appropriate. Plasmids from the transformants are prepared, analyzed by restriction endonuclease digestion, and/or sequenced by the method of Messing *et al.* (1981) *Nucleic Acids Res.* **9**:309 or by the method of Maxam *et al.* (1980) *Methods in Enzymology* **65**:499.

The polypeptides of the present invention may be expressed in a variety of prokaryotic and eukaryotic host cells. Suitable prokaryotes include gram negative or gram positive organisms, for example *E. coli* or bacilli. A preferred cloning host is *E. coli* 294 (ATCC 31,446) although other gram negative or gram positive prokaryotes such as *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31,537), *E. coli* W3110 (ATCC 27,325), *Pseudomonas* species, or *Serratia Marcesans* are suitable.

In addition to prokaryotes, eukaryotic microbes such as filamentous fungi or yeast are suitable hosts for vectors herein. *Saccharomyces cerevisiae*, or common baker's yeast, is the most commonly used among lower eukaryotic host microorganisms. However, a number of other genera, species and strains are commonly available and useful herein, such as *S. pombe* (Beach and Nurse (1981) *Nature* **290**:140), *Kluyveromyces lactis* (Lourencourt *et al.* (1983) *J. Bacteriol.* **73**:7); *yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070), *Trichoderma reesei* (EP 244,234), *Neurospora crassa* (Case *et al.* (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:5259-5263); and *Aspergillus* hosts such as *A. nidulans* (Ballance *et al.* (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **112**:284-289; Tilburn *et al.* (1983) *Gene* **26**:205-221; Yelton *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:1470-1474) and *A. niger* (Kelly and Hynes (1985) *EMBO J.* **4**:475-479).

Suitable host cells may also derive from multicellular organisms. Such host cells are capable of complex processing and glycosylation activities. In principle, any higher eukaryotic cell culture is workable, whether from vertebrate or invertebrate culture, although cells from mammals such as humans are preferred. Examples of invertebrate cells include plants and insect cells. Numerous baculoviral strains and variants and corresponding permissive insect host cells from hosts such as *Spodoptera frugiperda* (caterpillar), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (fruitfly), and *Bombyx mori* host cells have been identified. See, e.g. Luckow *et al.* (1988) *Bio/Technology* **6**:47-55; Miller *et al.*, in *Genetic Engineering*, Setlow, J.K. *et al.*, eds., Vol. 8 (Plenum Publishing, 1986), pp. 277-279; and Maeda *et al.* (1985) *Nature* **315**:592-594. A variety of such viral strains are publicly available, e.g. the L-1 variant of *Autographa californica* NPV, and such viruses may be used as the virus herein according to the present invention, particularly for transfection of *Spodoptera frugiperda* cells.

Plant cell cultures of cotton, corn, potato, soybean, petunia, tomato, and tobacco can be utilized as hosts. Typically, plant cells are transfected by incubation with certain strains of the bacterium *Agrobacterium tumefaciens*, which has been previously manipulated to contain the NRG3 DNA. During incubation of the plant cell culture with *A. tumefaciens*, the DNA encoding a NRG3 is transferred to the plant cell host such that it is transfected, and will, under appropriate conditions, express the NRG3 DNA. In addition, regulatory and

signal sequences compatible with plant cells are available, such as the nopaline synthase promoter and polyadenylation signal sequences. Depicker *et al.* (1982) J. Mol. Appl. Gen. 1:561. In addition, DNA segments isolated from the upstream region of the T-DNA 780 gene are capable of activating or increasing transcription levels of plant-expressible genes in recombinant DNA-containing plant tissue. See EP 321,196 published 21 June 1989.

However, interest has been greatest in vertebrate cells, and propagation of vertebrate cells in culture (tissue culture) is *per se* well known (see for example, Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Patterson, editors (1973)). Examples of useful mammalian host cell lines are monkey kidney CV1 line transformed by SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); human embryonic kidney cell line (293 or 293 cells subcloned for growth in suspension culture, Graham *et al.* (1977) J. Gen. Virol. 36:59); baby hamster kidney cells (BHK, ATCC CCL 10); Chinese hamster ovary cells/-DHFR (CHO, Urlaub and Chasin (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216); mouse sertoli cells (TM4, Mather (1980) Biol. Reprod. 23:243-251); monkey kidney cells (CV1 ATCC CCL 70); African green monkey kidney cells (VERO-76, ATCC CRL-1587); human cervical carcinoma cells (HELA, ATCC CCL 2); canine kidney cells (MDCK, ATCC CCL 34); buffalo rat liver cells (BRL 3A, ATCC CRL 1442); human lung cells (W138, ATCC CCL75); human liver cells (Hep G2, HB 8065); mouse mammary tumor (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI cells (Mather *et al.* (1982) Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44068); MRC 5 cells; FS4 cells; and a human hepatoma cell line (Hep G2). Preferred host cells are human embryonic kidney 293 and Chinese hamster ovary cells.

Particularly useful in the practice of this invention are expression vectors that provide for the expression in mammalian cells of DNA encoding a novel NRG3 herein. Where transient expression is preferred, expression involves the use of an expression vector that is able to replicate efficiently in a host cell, such that the host cell accumulates many copies of the expression vector and, in turn, synthesizes high levels of a desired polypeptide encoded by the expression vector. Transient systems, comprising a suitable expression vector and a host cell, allow for the convenient positive identification of polypeptides encoded by cloned DNAs, as well as for the rapid screening of such polypeptides for desired biological or physiological properties. Thus, transient expression systems are particularly useful in the invention for purposes of identifying analogs and variants of a native NRG3 of the invention.

Other methods, vectors, and host cells suitable for adaptation to the synthesis of the NRG3s in recombinant vertebrate cell culture are described for example, in Getting *et al.* (1981) Nature 293:620-625; Mantel *et al.* (1979) Nature 281:40-46; Levinson *et al.*; EP 117,060 and EP 117,058. Particularly useful plasmids for mammalian cell culture expression of the NRG3 polypeptides are pRK5 (EP 307,247), or pSVI6B (PCT Publication No. WO 91/08291).

Other cloning and expression vectors suitable for the expression of the NRG3s of the present invention in a variety of host cells are, for example, described in EP 457,758 published 27 November 1991. A large variety of expression vectors is now commercially available. An exemplary commercial yeast expression vector is pPIC.9 (Invitrogen), while an commercially available expression vector suitable for transformation of *E. coli* cells is PET15b (Novagen).

C. Culturing the Host Cells.

Prokaryote cells used to produced the NRG3s of this invention are cultured in suitable media as describe generally in Sambrook *et al.*, supra.

Mammalian cells can be cultured in a variety of media. Commercially available media such as Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma), and Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma) are suitable for culturing the host cells. In addition, any of the media described in Ham and Wallace (1979) *Meth. Enzymol.* 58:44; Barnes and Sato (1980) *Anal. Biochem.* 102:255, US 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; or 4,560,655; WO 90/03430; WO 87/00195 or US Pat. Re. 30,985 may be used as culture media for the host cells. Any of these media may be supplemented as necessary with hormones and/or other growth factors (such as insulin, transferrin, or epidermal growth factor), salts (such as sodium chloride, calcium, magnesium, and phosphate), buffers (such as HEPES), nucleosides (such as adenosine and thymidine), antibiotics (such as GentamycinTM drug) trace elements (defined as inorganic compounds usually present at final concentrations in the micromolar range), and glucose or an equivalent energy source. Any other necessary supplements may also be included at appropriate concentrations that would be known to those skilled in the art. The culture conditions, such as temperature, pH and the like, suitably are those previously used with the host cell selected for cloning or expression, as the case may be, and will be apparent to the ordinary artisan.

The host cells referred to in this disclosure encompass cells in *in vitro* cell culture as well as cells that are within a host animal or plant.

It is further envisioned that the NRG3s of this invention may be produced by homologous recombination, or with recombinant production methods utilizing control elements introduced into cells already containing DNA encoding the particular NRG3.

D. Detecting Gene Amplification and/or Expression.

Gene amplification and/or expression may be measured in a sample directly, for example, by conventional Southern blotting, Northern blotting to quantitate the transcription of mRNA (Thomas (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:5201-5205), dot blotting (DNA analysis), or *in situ* hybridization, using an appropriately labeled probe, based on the sequences provided herein. Various labels may be employed, most commonly radioisotopes, particularly ³²P. However, other techniques may also be employed, such as using biotin-modified nucleotides for introduction into a polynucleotide. The biotin then serves as a site for binding to avidin or antibodies, which may be labeled with a wide variety of labels, such as radionuclides, fluorescers, enzymes, or the like. Alternatively, antibodies may be employed that can recognize specific duplexes, including DNA duplexes, RNA duplexes, and DNA-RNA hybrid duplexes or DNA-protein duplexes. The antibodies in turn may be labeled and the assay may be carried out where the duplex is bound to the surface, so that upon the formation of duplex on the surface, the presence of antibody bound to the duplex can be detected.

Gene expression, alternatively, may be measured by immunological methods, such as immunohistochemical staining of tissue sections and assay of cell culture or body fluids, to quantitate directly the expression of gene product. A particularly sensitive staining technique suitable for use in the present invention is described by Hse *et al.* (1980) *Am. J. Clin. Pharm.* 75:734-738.

Antibodies useful for immunohistochemical staining and/or assay of sample fluids may be either monoclonal or polyclonal, and may be prepared in any animal. Conveniently, the antibodies may be prepared against a native NRG3 polypeptide, or against a synthetic peptide based on the DNA sequence disclosed herein.

E. Amino Acid Sequence Variants of a Native NRG3.

Amino acid sequence variants of native NRG3s are prepared by methods known in the art by introducing appropriate nucleotide changes into a native NRG3 DNA, or by *in vitro* synthesis of the desired polypeptide. There are two principal variables in the construction of amino acid sequence variants: the location of the mutation site and the nature of the mutation. With the exception of naturally-occurring alleles, which do not require the manipulation of the DNA sequence encoding the native NRG3, the amino acid sequence variants of NRG3s are preferably constructed by mutating the DNA, either to arrive at an allele or an amino acid sequence variant that does not occur in nature.

One group of mutations will be created within the extracellular domain or within the EGF-like domain of a novel native mouse or human NRG3 of the present invention (see figure 3 for the delineation of the extracellular domain (SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:7) and EGF-like domain (SEQ ID NO:4) within human or mouse NRG3 amino acid sequences, respectively. Since these domains are believed to be functionally important, alterations such as non-conservative substitutions, insertions and/or deletions in these regions are expected to result in genuine changes in the properties of the native receptor molecules such as in ErbB4 receptor binding and activation. Accordingly, amino acid alterations in this region are also believed to result in variants with properties significantly different from the corresponding native polypeptides. Non-conservative substitutions within these functionally important domains may result in variants which lose the ErbB4 receptor recognition and binding ability of their native counterparts, or have increased ErbB4 receptor recognition properties, enhanced selectivity, or enhanced activation properties as compared to the corresponding native proteins.

Alternatively or in addition, amino acid alterations can be made at sites that differ in novel NRG3s from various species, or in highly conserved regions, depending on the goal to be achieved. Sites at such locations will typically be modified in series, e.g. by (1) substituting first with conservative choices and then with more radical selections depending upon the results achieved, (2) deleting the target residue or residues, or (3) inserting residues of the same or different class adjacent to the located site, or combinations of options 1-3. One helpful technique for such modifications is called "alanine scanning" (Cunningham and Wells (1989) *Science* 244:1081-1085).

In yet another group of the variant NRG3s of the present invention, one or more of the functionally less significant domains may be deleted or inactivated. For example, the deletion or inactivation of the transmembrane domain yields soluble variants of the native proteins. Alternatively, or in addition, the cytoplasmic domain may be deleted, truncated or otherwise altered. Naturally-occurring amino acids are divided into groups based on common side chain properties:

- (1) hydrophobic: norleucine, met, ala, val, leu, ile;
- (2) neutral hydrophobic: 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.

Conservative substitutions involve exchanging a member within one group for another member within the same group, whereas non-conservative substitutions will entail exchanging a member of one of these classes

for another. Substantial changes in function or immunological identity are made by NRG3 substitutions that are less conservative, i.e. differ more significantly in their effect on maintaining (a) the structure of the polypeptide backbone in the area of 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. The substitutions which in general are expected to produce the greatest changes in the properties of the novel native NRG3s of the present invention will be those in which (a) a hydrophilic residue, e.g. seryl or threonyl, is substituted for (or by) a hydrophobic residue, e.g. leucyl, isoleucyl, phenylalanyl, valyl or alanyl; (b) a cysteine or proline is substituted for (or by) any other residue; (c) a residue having an electropositive side chain, e.g. lysyl, arginyl, or histidyl, is substituted for (or by) an electronegative residue, e.g., glutamyl or aspartyl; or (d) a residue having a bulky side chain, e.g., phenylalanine, is substituted for (or by) one not having a side chain, e.g. glycine. Such substitutions are expected to have their most significant effect when made within the extracellular domain, such as in the EGF-like domain.

Substitutional variants of the novel NRG3s of the present invention also include variants where functionally homologous (having at least about 40%-50% homology) domains of other proteins are substituted by routine methods for one or more of the above-identified domains within the novel NRG3 structure, such as the extracellular domain or EGF-like domain.

Amino acid sequence deletions generally range from about 1 to 30 residues, more preferably about 1 to 10 residues, and typically are contiguous. Typically, the transmembrane and cytoplasmic domains, or only the transmembrane domains are deleted. However, deletion from the C-terminus to any suitable amino acid N-terminal to the transmembrane region which preserves the biological activity or immunological cross-reactivity of a native NRG3 is suitable. The transmembrane region (TM) of each of the human and mouse NRG3 consensus sequences is shown in Figs. 4A and 4B to range from about amino acid 362 to about amino acid 384 (human SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:23), and about amino acid 360 to about amino acid 382 (mouse SEQ ID NO:2).

A preferred class of substitutional and/or deletional variants of the present invention are those involving a transmembrane region of a novel NRG3 molecule. Transmembrane regions are highly hydrophobic or lipophilic domains that are the proper size to span the lipid bilayer of the cellular membrane. They are believed to anchor the NRG3 in the cell membrane, and allow for homo- or heteropolymeric complex formation. Inactivation of the transmembrane domain, typically by deletion or substitution of transmembrane domain hydroxylation residues, will facilitate recovery and formulation by reducing its cellular or membrane lipid affinity and improving its aqueous solubility. If the transmembrane and cytoplasmic domains are deleted one avoids the introduction of potentially immunogenic epitopes, whether by exposure of otherwise intracellular polypeptides that might be recognized by the body as foreign or by insertion of heterologous polypeptides that are potentially immunogenic. Inactivation of the membrane insertion function is accomplished by deletion of sufficient residues to produce a substantially hydrophilic hydropathy profile in the transmembrane or by substituting with heterologous residues which accomplish the same result.

A principle advantage of the transmembrane inactivated variants of the NRG3s of the present invention is that they may be secreted into the culture medium of recombinant hosts. These variants are soluble in body fluids such as blood and do not have an appreciable affinity for cell membrane lipids, thus considerably simplifying their recovery from recombinant cell culture. As a general proposition, such soluble variants will

retain a functional extracellular domain or fragment thereof, will not have a functional transmembrane domain, and preferably will not have a functional cytoplasmic domain.

For example, the transmembrane domain may be substituted by any amino acid sequence, e.g. a random or predetermined sequences of about 5 to 50 serine, threonine, lysine, arginine, glutamine, aspartic acid and like hydrophilic residues, which altogether exhibit a hydrophilic hydropathy profile. Like the deletional (truncated) soluble variants, these variants are secreted into the culture medium of recombinant hosts.

Amino acid 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. Intrasequence insertions (i.e. insertions within the novel NRG3 amino acid sequence) may range generally from about 1 to 10 residues, more preferably 1 to 5 residues, more preferably 1 to 3 residues. An example of a terminal insertion includes fusion of a heterologous N-terminal signal sequence to the N-terminus of the NRG3 molecule to facilitate the secretion of the mature NRG3 or a fragment thereof from recombinant host cells. Such signal sequences will generally be obtained from, and thus be homologous to, a signal sequence of the intended host cell species. Suitable sequences include STII or lpp for *E. coli*, alpha factor for yeast, and viral signals such as herpes gD for mammalian cells.

Other insertional variants of the native NRG3 molecules include the fusion of the N- or C-terminus of the NRG3 molecule to immunogenic polypeptides, e.g. bacterial polypeptides such as beta-lactamase or an enzyme encoded by the *E. coli* trp locus, or yeast protein, and C-terminal fusions with proteins having a long half-life such as immunoglobulin regions (preferably immunoglobulin constant regions), albumin, or ferritin, as described in WO 89/02922 published on 6 April 1989.

Further insertional variants are immunologically active derivatives of the novel NRG3s, which comprise the EGF-like domain and a polypeptide containing an epitope of an immunologically competent extraneous polypeptide, i.e. a polypeptide which is capable of eliciting an immune response in the animal to which the fusion is to be administered or which is capable of being bound by an antibody raised against an extraneous polypeptide. Typical examples of such immunologically competent polypeptides are allergens, autoimmune epitopes, or other potent immunogens or antigens recognized by pre-existing antibodies in the fusion recipient, including bacterial polypeptides such as trpLE, β -galactosidase, viral polypeptides such as herpes gD protein, and the like.

Immunogenic fusions are produced by cross-linking *in vitro* or by culture of cells transformed with recombinant DNA encoding an immunogenic polypeptide. It is preferable that the immunogenic fusion be one in which the immunogenic sequence is joined to or inserted into a novel NRG3 molecule or fragment thereof by one or more peptide bonds. These products therefore consist of a linear polypeptide chain containing the NRG3 epitope and at least one epitope foreign to the NRG3. It will be understood that it is within the scope of this invention to introduce the epitopes anywhere within a NRG3 molecule of the present invention or a fragment thereof. These immunogenic insertions are particularly useful when formulated into a pharmacologically acceptable carrier and administered to a subject in order to raise antibodies against the NRG3 molecule, which antibodies in turn are useful as diagnostics, in tissue-typing, or in purification of the novel NRG3s by standard immunoaffinity techniques. Alternatively, in the purification of the NRG3s of the present invention, binding partners for the fused extraneous polypeptide, e.g. antibodies, receptors or ligands,

are used to adsorb the fusion from impure admixtures, after which the fusion is eluted and, if desired, the novel NRG3 is recovered from the fusion, e.g. by enzymatic cleavage.

Since it is often difficult to predict in advance the characteristics of a variant NRG3, it will be appreciated that some screening will be needed to select the optimum variant. Such screening includes, but is not limited to, arrays of ErbB4 receptor binding.

After identifying the desired mutation(s), the gene encoding a NRG3 variant can, for example, be obtained by chemical synthesis as described herein. More preferably, DNA encoding a NRG3 amino acid sequence variant is prepared by site-directed mutagenesis of DNA that encodes an earlier prepared variant or a nonvariant version of the NRG3. Site-directed (site-specific) mutagenesis allows the production of NRG3 variants through the use of specific oligonucleotide sequences that encode the DNA sequence of the desired mutation, as well as a sufficient number of adjacent nucleotides, to provide a primer sequence of sufficient size and sequence complexity to form a stable duplex on both sides of the deletion junction being traversed. Typically, a primer of about 20 to 25 nucleotides in length is preferred, with about 5 to 10 residues on both sides of the junction of the sequence being altered. In general, the techniques of site-specific mutagenesis are well known in the art, as exemplified by publications such as, Edelman *et al.* (1983) DNA 2:183. As will be appreciated, the site-specific mutagenesis technique typically employs a phage vector that exists in both a single-stranded and double-stranded form. Typical vectors useful in site-directed mutagenesis include vectors such as the M13 phage, for example, as disclosed by Messing *et al.*, Third Cleveland Symposium on Macromolecules and Recombinant DNA, A. Walton, ed., Elsevier, Amsterdam (1981). This and other phage vectors are commercially available and their use is well known to those skilled in the art. A versatile and efficient procedure for the construction of oligodeoxyribonucleotide directed site-specific mutations in DNA fragments using M13-derived vectors was published by Zoller, M.J. and Smith, M. (1982) Nucleic Acids Res. 10:6487-6500. Also, plasmid vectors that contain a single-stranded phage origin of replication (Veira *et al.* (1987) Meth. Enzymol. 153:3) may be employed to obtain single-stranded DNA. Alternatively, nucleotide substitutions are introduced by synthesizing the appropriate DNA fragment *in vitro*, and amplifying it by PCR procedures known in the art.

The PCR amplification technique may also be used to create amino acid sequence variants of a novel NRG3. In a specific example of PCR mutagenesis, template plasmid DNA (1 µg) is linearized by digestion with a restriction endonuclease that has a unique recognition site in the plasmid DNA outside of the region to be amplified. Of this material, 100 ng is added to a PCR mixture containing PCR buffer, which contains the four deoxynucleotide triphosphates and is included in the GeneAmp^R kits (obtained from Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT and Emeryville, CA), and 25 pmole of each oligonucleotide primer, to a final volume of 50 µl. The reaction mixture is overlaid with 35 µl mineral oil. The reaction is denatured for 5 minutes at 100°C, placed briefly on ice, and then 1 µl *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polymerase (5 units/ l), purchased from Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT and Emeryville, CA) is added below the mineral oil layer. The reaction mixture is then inserted into a DNA Thermal Cycler (Perkin-Elmer Cetus) programmed as follows: (as an example)

2 min. 55°C,
30 sec. 72°C, then 19 cycles of the following:
30 sec. 94°C,

30 sec. 55°C, and

30 sec. 72°C.

At the end of the program, the reaction vial is removed from the thermal cycler and the aqueous phase transferred to a new vial, extracted with phenol/chloroform (50:50 vol), and ethanol precipitated, and the DNA is recovered by standard procedures. This material is subsequently subjected to appropriate treatments for insertion into a vector.

Cassette mutagenesis is another method useful for preparing variants and is based on the technique described by Wells *et al.* (1985) *Gene* 34:315.

Additionally, the so-called phagemid display method may be useful in making amino acid sequence variants of native or variant NRG3s or their fragments. This method involves 1) constructing a replicable expression vector comprising a first gene encoding a receptor to be mutated, a second gene encoding at least a portion of a natural or wild-type phage coat protein wherein the first and second genes are heterologous, and a transcription regulatory element operably linked to the first and second genes, thereby forming a gene fusion encoding a fusion protein; 2) mutating the vector at one or more selected positions within the first gene thereby forming a family of related plasmids; 3) transforming suitable host cells with the plasmids; 4) infecting the transformed host cells with a helper phage having a gene encoding the phage coat protein; 5) culturing the transformed infected host cells under conditions suitable for forming recombinant phagemid particles containing at least a portion of the plasmid and capable of transforming the host, the conditions adjusted so that no more than a minor amount of phagemid particles display more than one copy of the fusion protein on the surface of the particle; 6) contacting the phagemid particles with a suitable antigen so that at least a portion of the phagemid particles bind to the antigen; and 7) separating the phagemid particles that bind from those that do not. Steps 4 through 7 can be repeated one or more times. Preferably in this method the plasmid is under tight control of the transcription regulatory element, and the culturing conditions are adjusted so that the amount or number of phagemid particles displaying more than one copy of the fusion protein on the surface of the particle is less than about 1%. Also, preferably, the amount of phagemid particles displaying more than one copy of the fusion protein is less than 10% of the amount of phagemid particles displaying a single copy of the fusion protein. Most preferably, the amount is less than 20%. Typically in this method, the expression vector will further contain a secretory signal sequence fused to the DNA encoding each subunit of the polypeptide and the transcription regulatory element will be a promoter system. Preferred promoter systems are selected from *lac Z*, λ_{PL} , *tac*, T7 polymerase, tryptophan, and alkaline phosphatase promoters and combinations thereof. Also, normally the method will employ a helper phage selected from M13K07, M13R408, M13-VCS, and Phi X 174. The preferred helper phage is M13K07, and the preferred coat protein is the M13 Phage gene III coat protein. The preferred host is *E. coli*, and protease-deficient strains of *E. coli*.

Further details of the foregoing and similar mutagenesis techniques are found in general textbooks, such as, for example, Sambrook *et al.*, *supra*, and Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel *et al.* eds., *supra*.

F. Glycosylation variants.

Glycosylation variants are included within the scope of the present invention. They include variants completely lacking in glycosylation (unglycosylated), variants having at least one less glycosylated site than the native form (deglycosylated) as well as variants in which the glycosylation has been changed. Included are

deglycosylated and unglycosylated amino acid sequences variants, deglycosylated and unglycosylated native NRG3s or fragments thereof and other glycosylation variants. For example, substitutional or deletional mutagenesis may be employed to eliminate the N- or O-linked glycosylation sites in the a native or variant NRG3 of the present invention, e.g. the asparagine residue may be deleted or substituted for another basic residue such as lysine or histidine. Alternatively, flanking residues making up the glycosylation site may be substituted or deleted, even though the asparagine residues remain unchanged, in order to prevent glycosylation by eliminating the glycosylation recognition site. Where the preferred NRL variant is the EGF-like domain of NRG3, the fragment is preferably unglycosylated.

Additionally, unglycosylated NRG3s which have the glycosylation sites of a native molecule may be produced in recombinant prokaryotic cell culture because prokaryotes are incapable of introducing glycosylation into polypeptides.

Glycosylation variants may be produced by appropriate host cells or by *in vitro* methods. Yeast and insect cells, for example, introduce glycosylation which varies significantly from that of mammalian systems. Similarly, mammalian cells having a different species (e.g. hamster, murine, porcine, bovine or ovine), or tissue origin (e.g. lung, liver, lymphoid, mesenchymal or epidermal) than the source of the NRG3 are routinely screened for the ability to introduce variant glycosylation as characterized for example by elevated levels of mannose or variant ratios of mannose, fucose, sialic acid, and other sugars typically found in mammalian glycoproteins. *In vitro* processing of the NRG3 typically is accomplished by enzymatic hydrolysis, e.g. neuraminidase digestion.

G. Covalent Modifications.

Covalent modifications of the novel NRG3s of the present invention are included within the scope of the invention. Such modifications are traditionally introduced by reacting targeted amino acid residues of the NRG3s with an organic derivatizing agent that is capable of reacting with selected amino acid side chains or terminal residues, or by harnessing mechanisms of post-translational modifications that function in selected recombinant host cells. The resultant covalent derivatives are useful in programs directed at identifying residues important for biological activity, for immunoassays of the NRG3, or for the preparation of anti-NRG3 antibodies for immunoaffinity purification of the recombinant. For example, complete inactivation of the biological activity of the protein after reaction with ninhydrin would suggest that at least one arginyl or lysyl residue is critical for its activity, whereafter the individual residues which were modified under the conditions selected are identified by isolation of a peptide fragment containing the modified amino acid residue. Such modifications are within the ordinary skill in the art and are performed without undue experimentation.

Derivatization with bifunctional agents is useful for preparing intramolecular aggregates of the NRG3s with polypeptides as well as for cross-linking the NRG3 polypeptide to a water insoluble support matrix or surface for use in assays or affinity purification. In addition, a study of interchain cross-links will provide direct information on conformational structure. Commonly used cross-linking agents include 1,1-bis(diazoacetyl)-2-phenylethane, glutaraldehyde, N-hydroxysuccinimide esters, homobifunctional imidoesters, and bifunctional maleimides. Derivatizing agents such as methyl-3-[(p-azidophenyl)dithio]propioimide yield photoactivatable intermediates which are capable of forming cross-links in the presence of light. Alternatively, reactive water insoluble matrices such as cyanogen bromide activated carbohydrates and the systems reactive

substrates described in U.S. Patent Nos. 3,959,642; 3,969,287; 3,691,016; 4,195,128; 4,247,642; 4,229,537; 4,055,635; and 4,330,440 are employed for protein immobilization and cross-linking.

Certain post-translational modifications are the result of the action of recombinant host cells on the expressed polypeptide. Glutaminyl and aspariginyl residues are frequently post-translationally deamidated to the corresponding glutamyl and aspartyl residues. Alternatively, these residues are deamidated under mildly acidic conditions. Either form of these residues falls within the scope of this invention.

Other post-translational modifications include hydroxylation of proline and lysine, phosphorylation of hydroxyl groups of seryl, threonyl or tyrosyl residues, methylation of the α -amino groups of lysine, arginine, and histidine side chains (T.E. Creighton (1983) *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86).

Further derivatives of the NRG3s herein are the so called "immunoadhesins", which are chimeric antibody-like molecules combining the functional domain(s) of a binding protein (usually a receptor, a cell-adhesion molecule or a ligand) with the an immunoglobulin sequence. The most common example of this type of fusion protein combines the hinge and Fc regions of an immunoglobulin (Ig) with domains of a cell-surface receptor that recognizes a specific ligand. This type of molecule is called an "immunoadhesin", because it combines "immune" and "adhesion" functions; other frequently used names are "Ig-chimera", "Ig-" or "Fc-fusion protein", or "receptor-globulin."

Immunoadhesins reported in the literature include, for example, fusions of the T cell receptor (Gascoigne *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:2936-2940); CD4 (Capon *et al.* (1989) *Nature* 337:525-531; Traunecker *et al.* (1989) *Nature* 339:68-70; Zettmeissl *et al.* (1990) *DNA Cell Biol. USA* 9:347-353; Bym *et al.* (1990) *Nature* 344:667-670); L-seNRG3 (homing receptor) (Watson *et al.* (1990) *J. Cell. Biol.* 110:2221-2229); Watson *et al.* (1991) *Nature* 349:164-167); E-seNRG3 (Mulligan *et al.* (1993) *J. Immunol.* 151:6410-17; Jacob *et al.* (1995) *Biochemistry* 34:1210-1217); P-seNRG3 (Mulligan *et al.*, *supra*; Hollenbaugh *et al.* (1995) *Biochemistry* 34:5678-84); ICAM-1 (Stauton *et al.* (1992) *J. Exp. Med.* 176:1471-1476; Martin *et al.* (1993) *J. Virol.* 67:3561-68; Roep *et al.* (1994) *Lancet* 343:1590-93); ICAM-2 (Damle *et al.* (1992) *J. Immunol.* 148:665-71); ICAM-3 (Holness *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* 270:877-84); LFA-3 (Kanner *et al.* (1992) *J. Immunol.* 148:23-29); L1 glycoprotein (Doherty *et al.* (1995) *Neuron* 14:57-66); TNF-R1 (Ashkenazi *et al.*, (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10535-539); Lesslauer *et al.* (1991) *Eur. J. Immunol.* 21:2883-86; Peppel *et al.* (1991) *J. Exp. Med.* 174:1483-1489); TNF-R2 (Zack *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2335-39; Wooley *et al.* (1993) *J. Immunol.* 151:6602-07); CD44 (Aruffo *et al.* (1990) *Cell* 61:1303-1313); CD28 and B7 (Linsley *et al.* (1991) *J. Exp. Med.* 173:721-730); CTLA-4 (Lisley *et al.* (1991) *J. Exp. Med.* 174:561-569); CD22 (Stamenkovic *et al.* (1991) *Cell* 66:1133-1144); NP receptors (Bennett *et al.* (1991) *J. Biol. Chem.* 266:23060-23067); IgE receptor α (Ridgway and Gorman (1991) *J. Cell. Biol.* 115:1448 abstr.); IFN- γ α - and β -chain (Marsters *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:5401-05); trk-A, -B, and -C (Shelton *et al.* (1995) *J. Neurosci.* 15:477-91); IL-2 (Landolfi (1991) *J. Immunol.* 146:915-19); IL-10 (Zheng *et al.* (1995) *J. Immunol.* 154:5590-5600).

The simplest and most straightforward immunoadhesin design combines the binding region(s) of the 'adhesin' protein with the hinge and Fc regions of an immunoglobulin heavy chain. Ordinarily, when preparing the NRG3-immunoglobulin chimeras of the present invention, nucleic acid encoding the desired NRG3 polypeptide will be fused at the C-terminus of the desired sequence to the N-terminus of a nucleic acid

sequence encoding an immunoglobulin constant domain sequence, however fusion to the N-terminus of the desired NRG3 sequence is 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 precise site at which the fusion is made is not critical; particular sites are well known and may be selected in order to optimize the biological activity, secretion or binding characteristics of the NRG3-immunoglobulin chimeras.

In a preferred embodiment, the sequence of a native, mature NRG3 polypeptide, or a soluble form thereof such as a (transmembrane domain-inactivated or EGF-like domain polypeptide) form thereof, 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. IgG-1. It is possible to fuse the entire heavy chain constant region to the NRG3 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 (Kobet *et al.*, *supra*), or analogous sites of other immunoglobulins) is used in the fusion. In a particularly preferred embodiment, the NRG3 sequence (full length or soluble) is fused to the hinge region and CH2 and CH3 or CH1, hinge, CH2 and CH3 domains of an IgG-1, IgG-2, or IgG-3 heavy chain. The precise site at which the fusion is made is not critical, and the optimal site can be determined by routine experimentation.

In some embodiments, the NRG3-immunoglobulin chimeras are assembled as multimers, and particularly as homo-dimers or -tetramers (WO 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 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.

Various exemplary assembled NRG3-immunoglobulin chimeras within the scope of the invention are schematically diagrammed below:

- (a) AC_L-AC_L ;
- (b) $AC_H-[AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_HC_H, \text{ or } V_LC_L-AC_H]$;
- (c) $AC_L-AC_H-[AC_L-AC_H, AC_L-V_HC_H, V_LC_L-AC_H, \text{ or } V_LC_L-V_HC_H]$;
- (d) $AC_L-V_HC_H-[AC_H, \text{ or } AC_L-V_HC_H, \text{ or } V_LC_L-AC_H]$;
- (e) $V_LC_L-AC_H-[AC_L-V_HC_H, \text{ or } V_LC_L-AC_H]$; and
- (f) $[A-Y]_n-[V_LC_L-V_HC_H]_2$,

wherein

each A represents identical or different novel NRG3 polypeptide amino acid sequences;

V_L is an immunoglobulin light chain variable domain;

V_H is an immunoglobulin heavy chain variable domain;

C_L is an immunoglobulin light chain constant domain;

C_H is an immunoglobulin heavy chain constant domain;

n is an integer greater than 1;

Y designates the residue of a covalent cross-linking agent.

In the interest of brevity, the foregoing structures only show key features; they do not indicate joining (J) or other domains of the immunoglobulins, nor are disulfide bonds shown. However, where such domains are required for binding activity, they shall be constructed as being present in the ordinary locations which they occupy in the immunoglobulin molecules.

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 NRG3-immunoglobulin heavy chain fusion polypeptide, or directly fused to the NRG3 polypeptide. In the former case, DNA encoding an immunoglobulin light chain is typically coexpressed with the DNA encoding the NRG3-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. Methods suitable for the preparation of such structures are, for example, disclosed in U.S. Patent No. 4,816,567 issued 28 March 1989.

In a preferred embodiment, the immunoglobulin sequences used in the construction of the immunoadhesins of the present invention are from an IgG immunoglobulin heavy chain constant domain. For human immunoadhesins, the use of human IgG-1 and IgG-3 immunoglobulin sequences is preferred. A major advantage of using IgG-1 is that IgG-1 immunoadhesins can be purified efficiently on immobilized protein A. In contrast, purification of IgG-3 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 IgG-3 hinge is longer and more flexible, so it can accommodate larger 'adhesin' domains that may not fold or function properly when fused to IgG-1. While IgG immunoadhesins are typically mono- or bivalent, other Ig subtypes like IgA and IgM may give rise to dimeric or pentameric structures, respectively, of the basic Ig homodimer unit. Multimeric immunoadhesins are advantageous in that they can bind their respective targets with greater avidity than their IgG-based counterparts. Reported examples of such structures are CD4-IgM (Traunecker *et al.*, supra); ICAM-IgM (Martin *et al.* (1993) *J. Virol.* 67:3561-68); and CD2-IgM (Arulanandam *et al.* (1993) *J. Exp. Med.* 177:1439-50).

For NRG3-Ig immunoadhesins, which are designed for *in vivo* application, the pharmacokinetic properties and the effector functions specified by the Fc region are important as well. Although IgG-1, IgG-2 and IgG-4 all have *in vivo* half-lives of 21 days, their relative potencies at activating the complement system are different. IgG-4 does not activate complement, and IgG-2 is significantly weaker at complement activation than IgG-1. Moreover, unlike IgG-1, IgG-2 does not bind to Fc receptors on mononuclear cells or neutrophils. While IgG-3 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, IgG-1 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 serologically-defined allotypes in IgG-3, 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 a γ 3 immunoadhesin is greater than that of a γ 1 immunoadhesin.

NRG3-Ig immunoadhesins are most conveniently constructed by fusing the cDNA sequence encoding the NRG3 portion in-frame to an Ig cDNA sequence. However, fusion to genomic Ig fragments can also be used (see, e.g. Gascoigne *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:2936-2940; Aruffo *et al.* (1990) *Cell* **61**:1303-1313; Stamenkovic *et al.* (1991) *Cell* **66**:1133-1144). The latter type of fusion requires the presence of Ig regulatory sequences for expression. cDNAs encoding IgG heavy-chain constant regions can be isolated based on published sequence from cDNA libraries derived from spleen or peripheral blood lymphocytes, by hybridization or by polymerase chain reaction (PCR) techniques.

Other derivatives of the novel NRG3s of the present invention, which possess a longer half-life than the native molecules comprise the NRG3, NRG3 fragment (such as the EGF-like domain) or a NRG3-immunoglobulin chimera, covalently bonded to a nonproteinaceous polymer. The nonproteinaceous polymer ordinarily is a hydrophilic synthetic polymer, i.e., a polymer not otherwise found in nature. However, polymers which exist in nature and are produced by recombinant or *in vitro* methods are useful, as are polymers which are isolated from native sources. Hydrophilic polyvinyl polymers fall within the scope of this invention, e.g. polyvinylalcohol and polyvinylpyrrolidone. Particularly useful are polyalkylene ethers such as polyethylene glycol (PEG); polyelkylenes such as polyoxyethylene, polyoxypropylene, and block copolymers of polyoxyethylene and polyoxypropylene (Pluronic); polymethacrylates; carbomers; branched or unbranched polysaccharides which comprise the saccharide monomers D-mannose, D- and L-galactose, fucose, fructose, D-xylose, L-arabinose, D-glucuronic acid, sialic acid, D-galacturonic acid, D-mannuronic acid (e.g. polymannuronic acid, or alginic acid), D-glucosamine, D-galactosamine, D-glucose and neuraminic acid including homopolysaccharides and heteropolysaccharides such as lactose, amylopectin, starch, hydroxyethyl starch, amylose, dextran sulfate, dextran, dextrans, glycogen, or the polysaccharide subunit of acid mucopolysaccharides, e.g. hyaluronic acid; polymers of sugar alcohols such as polysorbitol and polymannitol; heparin or heparon. The polymer prior to cross-linking need not be, but preferably is, water soluble, but the final conjugate must be water soluble. In addition, the polymer should not be highly immunogenic in the conjugate form, nor should it possess viscosity that is incompatible with intravenous infusion or injection if it is intended to be administered by such routes.

Preferably the polymer contains only a single group which is reactive. This helps to avoid cross-linking of protein molecules. However, it is within the scope herein to optimize reaction conditions to reduce cross-linking, or to purify the reaction products through gel filtration or chromatographic sieves to recover substantially homogenous derivatives.

The molecular weight of the polymer may desirably range from about 100 to 500,000, and preferably is from about 1,000 to 20,000. The molecular weight chosen will depend upon the nature of the polymer and the degree of substitution. In general, the greater the hydrophilicity of the polymer and the greater the degree of substitution, the lower the molecular weight that can be employed. Optimal molecular weights will be determined by routine experimentation.

The polymer generally is covalently linked to the novel NRG3, NRG3 fragment or to the NRG3-immunoglobulin chimeras through a multifunctional crosslinking agent which reacts with the polymer and one or more amino acid or sugar residues of the NRG3 or NRG3-immunoglobulin chimera to be linked. However, it is within the scope of the invention to directly crosslink the polymer by reacting a derivatized polymer with the hybrid, or *vice versa*.

The covalent crosslinking site on the NRG3 or NRG3-Ig includes the N-terminal amino group and epsilon amino groups found on lysine residues, as well as other amino, imino, carboxyl, sulfhydryl, hydroxyl or other hydrophilic groups. The polymer may be covalently bonded directly to the hybrid without the use of a multifunctional (ordinarily bifunctional) crosslinking agent. Covalent binding to amino groups is accomplished by known chemistries based upon cyanuric chloride, carbonyl diimidazole, aldehyde reactive groups (PEG alkoxide plus diethyl acetal of bromoacetaldehyde; PEG plus DMSO and acetic anhydride, or PEG chloride plus the phenoxide of 4-hydroxybenzaldehyde, succinimidyl active esters, activated dithiocarbonate PEG, 2,4,5-trichlorophenylchloroformate or P-nitrophenylchloroformate activated PEG.) Carboxyl groups are derivatized by coupling PEG-amine using carbodiimide.

Polymers are conjugated to oligosaccharide groups by oxidation using chemicals, e.g. metaperiodate, or enzymes, e.g. glucose or galactose oxidase, (either of which produces the aldehyde derivative of the carbohydrate), followed by reaction with hydrazide or amino derivatized polymers, in the same fashion as is described by Heitzmann *et al.* (1974) P.N.A.S. 71:3537-41 or Bayer *et al.* (1979) Methods in Enzymology 62:310, for the labeling of oligosaccharides with biotin or avidin. Further, other chemical or enzymatic methods which have been used heretofore to link oligosaccharides are particularly advantageous because, in general, there are fewer substitutions than amino acid sites for derivatization, and the oligosaccharide products thus will be more homogenous. The oligosaccharide substituents also are optionally modified by enzyme digestion to remove sugars, e.g. by neuraminidase digestion, prior to polymer derivatization.

The polymer will bear a group which is directly reactive with an amino acid side chain, or the N- or C-terminus of the polypeptide linked, or which is reactive with the multifunctional cross-linking agent. In general, polymers bearing such reactive groups are known for the preparation of immobilized proteins. In order to use such chemistries here, one should employ a water soluble polymer otherwise derivatized in the same fashion as insoluble polymers heretofore employed for protein immobilization. Cyanogen bromide activation is a particularly useful procedure to employ in crosslinking polysaccharides.

"Water soluble" in reference to the starting polymer means that the polymer or its reactive intermediate used for conjugation is sufficiently water soluble to participate in a derivatization reaction. "Water soluble" in reference to the polymer conjugate means that the conjugate is soluble in physiological fluids such as blood.

The degree of substitution with such a polymer will vary depending upon the number of reactive sites on the protein, whether all or a fragment of the protein is used, whether the protein is a fusion with a heterologous protein (e.g. a NRG3-immunoglobulin chimera), the molecular weight, hydrophilicity and other characteristics of the polymer, and the particular protein derivatization sites chosen. In general, the conjugate contains about from 1 to 10 polymer molecules, while any heterologous sequence may be substituted with an essentially unlimited number of polymer molecules so long as the desired activity is not significantly adversely affected. The optimal degree of cross-linking is easily determined by an experimental matrix in which the time, temperature and other reaction conditions are varied to change the degree of substitution, after which the ability of the conjugates to function in the desired fashion is determined.

The polymer, e.g. PEG, is cross-linked by a wide variety of methods known *per se* for the covalent modification of proteins with nonproteinaceous polymers such as PEG. Certain of these methods, however, are not preferred for the purposes herein. Cyanuronic chloride chemistry leads to many side reactions,

including protein cross-linking. In addition, it may be particularly likely to lead to inactivation of proteins containing sulfhydryl groups. Carbonyl diimidazole chemistry (Beauchamp *et al.* (1983) *Anal Biochem.* 131:25-33) requires high pH (>8.5), which can inactivate proteins. Moreover, since the "activated PEG" intermediate can react with water, a very large molar excess of "activated PEG" over protein is required. The high concentrations of PEG required for the carbonyl diimidazole chemistry also led to problems in purification, as both gel filtration chromatography and hydrophilic interaction chromatography are adversely affected. In addition, the high concentrations of "activated PEG" may precipitate protein, a problem that *per se* has been noted previously (Davis, U.S. Patent No. 4,179,337). On the other hand, aldehyde chemistry (Royer, U.S. Patent No. 4,002,531) is more efficient since it requires only a 40-fold molar excess of PEG and a 1-2 hr incubation. However, the manganese dioxide suggested by Royer for preparation of the PEG aldehyde is problematic "because of the pronounced tendency of PEG to form complexes with metal-based oxidizing agents" (Harris *et al.* (1984) *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* 22:341-52). The use of a Moffatt oxidation, utilizing DMSO and acetic anhydride, obviates this problem. In addition, the sodium borohydride suggested by Royer must be used at high pH and has a significant tendency to reduce disulfide bonds. In contrast, sodium cyanoborohydride, which is effective at neutral pH and has very little tendency to reduce disulfide bonds is preferred.

The long half-life conjugates of this invention are separated from the unreacted starting materials by gel filtration. Heterologous species of the conjugates are purified from one another in the same fashion. The polymer also may be water-insoluble, as a hydrophilic gel.

The novel NRG3s may be entrapped in microcapsules prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, in colloidal drug delivery systems (e.g. liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles and nanocapsules), or in macroemulsions. Such techniques are disclosed in Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition, Osol, A., Ed. (1980).

H. Antibody preparation.

(i) Polyclonal antibodies

Polyclonal antibodies to a NRG3, or fragment thereof (such as the EGF-like domain) of the present invention generally are raised in animals by multiple subcutaneous (sc) or intraperitoneal (ip) injections of the NRG3 and an adjuvant. It may be useful to conjugate the NRG3 or a fragment containing the target amino acid sequence to a protein that is immunogenic in the species to be immunized, e.g. keyhole limpet hemocyanin, serum albumin, bovine thyroglobulin, or soybean trypsin inhibitor using a bifunctional or derivatizing agent, for example maleimidobenzoyl sulfosuccinimide ester (conjugation through cysteine residues), N-hydroxysuccinimide (through lysine residues), glutaraldehyde, succinic anhydride, SOCl_2 , or $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, where R and R^1 are different alkyl groups.

Animals are immunized against the immunogenic conjugates or derivatives by combining 1 mg or 1 μg of conjugate (for rabbits or mice, respectively) with 3 volumes of Freud's complete adjuvant and injecting the solution intradermally at multiple sites. One month later the animals are boosted with 1/5 to 1/10 the original amount of conjugate in Freud's complete adjuvant by subcutaneous injection at multiple sites. 7 to 14 days later the animals are bled and the serum is assayed for anti-NRG3 antibody titer. Animals are boosted until the titer plateaus. Preferably, the animal boosted with the conjugate of the same NRG3, but conjugated to a different protein and/or through a different cross-linking reagent. Conjugates also can be made in

recombinant cell culture as protein fusions. Also, aggregating agents such as alum are used to enhance the immune response.

(ii) Monoclonal antibodies

Monoclonal antibodies are 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. Thus, the modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as not being a mixture of discrete antibodies. For example, the anti-NRG3 monoclonal antibodies of the invention may be made using the hybridoma method first described by Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256:495, or may be made by recombinant DNA methods (Cabilly, *et al.*, U.S. Pat. No. 4,816,567).

DNA encoding the monoclonal antibodies of the invention is readily isolated and sequenced using conventional procedures (e.g., by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes encoding the heavy and light chains of murine antibodies). The hybridoma cells of the invention 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 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.* (1984) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81:6851, 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 a NRG3 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 NRG3 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.

For diagnostic applications, the antibodies of the invention typically will be labeled with a detectable moiety. The detectable moiety can be any one which is capable of producing, either directly or indirectly, a detectable signal. For example, the detectable moiety may be a radioisotope, such as ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , or ^{125}I , a fluorescent or chemiluminescent compound, such as fluorescein isothiocyanate, rhodamine, or luciferin; biotin; radioactive isotopic labels, such as, e.g., ^{125}I , ^{32}P , ^{14}C , or ^3H , or an enzyme, such as alkaline phosphatase, beta-galactosidase or horseradish peroxidase.

Any method known in the art for separately conjugating the antibody to the detectable moiety may be employed, including those methods described by Hunter, *et al.* (1962) *Nature* 144:945; David, *et al.* (1974) *Biochemistry* 13:1014; Pain, *et al.* (1981) *J. Immunol. Meth.* 40:219; and Nygren (1982) *J. Histochem. and Cytochem.* 30:407.

The antibodies of the present invention may be employed in any known assay method, such as competitive binding assays, direct and indirect sandwich assays, and immunoprecipitation assays. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp.147-158 (CRC Press, Inc., 1987).

(iii) Humanized antibodies

Methods for humanizing non-human antibodies are well known in the art. Generally, a humanized antibody has one or more amino acid residues introduced into it from a source which is non-human. 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.* (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann *et al.* (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeven *et al.* (1988) *Science* 239:1534-1536), 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 PCT/US93/07832, which is a continuation-in-part of PCT/US92/05126, which references are herein incorporated by reference in their entirety.

Alternatively, it is now possible to produce transgenic animals (e.g. mice) that are capable, upon immunization, of producing a full 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 antigen challenge. See, e.g. Jakobovits *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551-2555; Jakobovits *et al.* (1993) *Nature* 362:255-258.

(iv) 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 a NRG3 of the present invention the other one is for any other antigen, for example, another member of the NRG3 family. Such constructs can also be referred to as bispecific immunoadhesins.

Traditionally, the recombinant production of bispecific antibodies is based on the coexpression of two immunoglobulin heavy chain-light chain pairs, where the two heavy chains have different specificities (Millstein and Cuello (1983) *Nature* 305:537-539). 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 Traunecker *et al.* (1991) *EMBO* 10:3655-3659. This problem may be overcome by selecting a common light chain for each arm of the bispecific antibody such that binding specificity of each antibody is maintained, as disclosed in US Application Serial No. 08/850058, filed May 5, 1997.

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, and second and third constant regions of an immunoglobulin heavy chain (CH2 and CH3). 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 cotransfected 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 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. This approach is disclosed in PCT application WO 94/04690 published 3 March 1994.

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

(v) Heteroconjugate antibodies

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.

I. Diagnostic Kits and Articles of Manufacture.

Since the invention provides a diagnostic assay (*i.e.* for detecting neurological disorders and for detecting the presence of NRG3 in a sample using antibodies or DNA markers) as a matter of convenience, the reagents for these assays can be provided in a kit, *i.e.*, a packaged combination of reagents, for combination with the sample to be tested. The components of the kit will normally be provided in predetermined ratios. Thus, a kit may comprise the antibody or NRG3 (DNA or polypeptide or fragment thereof) labeled directly or indirectly with a suitable label. Where the detectable label is an enzyme, the kit will include substrates and cofactors required by the enzyme (*e.g.* a substrate precursor which provides the detectable chromophore or fluorophore). In addition, other additives may be included such as stabilizers, buffers and the like. The relative amounts of the various reagents may be varied widely to provide for concentrations in solution of the reagents which substantially optimize the sensitivity of the assay. Particularly, the reagents may be provided as dry powders, usually lyophilized, including excipients which on dissolution will provide a reagent solution having the appropriate concentration. The kit also suitably includes instructions for carrying out the bioassay.

In another embodiment of the invention, an article of manufacture containing materials useful for the treatment of the neurological disorders described herein is provided. The article of manufacture comprises a container and a label. Suitable containers include, for example, bottles, vials, syringes, and test tubes. The containers may be formed from a variety of materials such as glass or plastic. The container holds a composition which is effective for treating the condition and may have a sterile access port (for example the container may be an intravenous solution bag or a vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle). The active agent in the composition is NRG3 or an agonist or antagonist thereof. The label on, or associated with, the container indicates that the composition is used for treating the condition of choice. The article of manufacture may further comprise a second container comprising a pharmaceutically-acceptable buffer, such as phosphate-buffered saline, Ringer's solution and dextrose solution. It may further include other materials desirable from a commercial and user standpoint, including other buffers, diluents, filters, needles, syringes, and package inserts with instructions for use.

J. Peptide and non-peptide analogs.

Peptide analogs of the NRG3s of the present invention are modeled based upon the three-dimensional structure of the native polypeptides. Peptides may be synthesized by well known techniques such as the solid-phase synthetic techniques initially described in Merrifield (1963) *J. Am. Chem. Soc.* 15:2149-2154. Other peptide synthesis techniques are, for examples, described in Bodanszky *et al.*, *Peptide Synthesis*, John Wiley & Sons, 2nd Ed., 1976, as well as in other reference books readily available for those skilled in the art. A summary of peptide synthesis techniques may be found in Stuart and Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical Company, Rockford, IL (1984). Peptides may also be prepared by recombinant DNA technology, using a DNA sequence encoding the desired peptide.

In addition to peptide analogs, the present invention also contemplates non-peptide (*e.g.* organic) compounds which display substantially the same surface as the peptide analogs of the present invention, and therefore interact with other molecules in a similar fashion.

K. Uses of the NRG3s.

Amino acid sequence variants of the native NRG3s of the present invention may be employed therapeutically to compete with the normal binding of the native proteins to their receptor, ErbB4. The NRG3

amino acid sequence variants are, therefore, useful as competitive inhibitors of the biological activity of native NRG3s.

Native NRG3s and their amino acid sequence variants are useful in the identification and purification of the native ErbB4 receptor. The purification is preferably performed by immunoadhesins comprising a NRG3 amino acid sequence retaining the qualitative ability of a native NRG3 of the present invention to recognize its native ErbB4 receptor.

The native NRG3s of the present invention are further useful as molecular markers of the tissues in which the ErbB4 receptor is expressed.

Furthermore, the NRG3s, preferably the EGF-like domain of the NRG3 of the present invention, provide valuable sequence motifs which can be inserted or substituted into other native members of the NRG3 family of molecules, such as the heregulins. The alteration of these native proteins by the substitution or insertion of sequences from the novel NRG3s of the present invention can yield variant molecules with altered biological properties, such as receptor binding affinity or receptor specificity. For example, one or more NRG3 domains of another member of the NRG3 family may be entirely or partially replaced by NRG3 domain sequences derived from the NRG3s of the present invention. Similarly, EGF-like domain sequences from the NRG3s herein may be substituted or inserted into the amino acid sequences of other NRG3s.

Nucleic acid encoding the NRG3s of the present invention is also useful in providing hybridization probes for searching cDNA and genomic libraries for the coding sequence of other NRG3s.

Additionally, NRG3s of the invention are useful in kits for the diagnosis of disease related to NRG3 and for methods of detecting the presence or absence of NRG3 in a sample, such as a body fluid, as described herein.

Binding and activation of the ErbB4 receptor by NRG3 is expected to mediate such physiological responses in cells expressing the ErbB4 receptor as cell growth, cell proliferation, and cell differentiation particularly in neural tissue. As a result, mammalian NRG3, or an ErbB4 receptor binding and activating fragment thereof, is useful in the treatment of diseases in which neural cell growth, proliferation and/or differentiation alleviate symptoms of the disease. The NRG3 may be the full length amino acid sequence of the murine NRG3 (SEQ ID NO:2) or the human NRG3s (SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:23); the full length amino acid sequence from another mammalian species having at least approximately 75% homology to the murine and human NRG3 at the amino acid level, preferably about 90% amino acid sequence homology in the EGF-like binding domain; and an amino acid sequence comprising the EGF-like domain of NRG3, which sequence binds to the ErbB4 receptor. Where the NRG3 or ErbB4 receptor binding fragment is agonist, the NRG3 or fragment binds to and activates ErbB4 receptor. Where the NRG3 or fragment is an antagonist, the NRG3 or fragment binds to but does not activate ErbB4 receptor, thereby preventing activation by the naturally occurring NRG3 or agonist.

Diseases treatable by administration of NRG3 or an agonist thereof (such as a polypeptide comprising an NRG3 EGF-like domain) include, but are not limited to, disorders that may arise in a patient in whom the nervous system has been damaged by, *e.g.*, trauma, surgery, stroke, ischemia, infection, metabolic disease, nutritional deficiency, malignancy, or toxic agents; motoneuron disorders, such as amyotrophic lateral sclerosis (Lou Gehrig's disease), Bell's palsy, and various conditions involving spinal muscular atrophy, or paralysis; human "neurodegenerative disorders", such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, epilepsy, multiple

sclerosis, Huntington's chorea, Down's Syndrome, nerve deafness, and Meniere's disease; neuropathy, and especially peripheral, referring to a disorder affecting the peripheral nervous system, most often manifested as one or a combination of motor, sensory, sensorimotor, or autonomic neural dysfunction, such as distal sensorimotor neuropathy, or autonomic neuropathies including reduced motility of the gastrointestinal tract or atony of the urinary bladder. Examples of neuropathies associated with systemic disease include post-polio syndrome; examples of hereditary neuropathies include Charcot-Marie-Tooth disease, Refsum's disease, Abetalipoproteinemia, Tangier disease, Krabbe's disease, Metachromatic leukodystrophy, Fabry's disease, and Dejerine-Sottas syndrome; and examples of neuropathies caused by a toxic agent include those caused by treatment with a chemotherapeutic agent such as vincristine, cisplatin, methotrexate, or 3'-azido-3'-deoxythymidine. Also, NRG3 or biologically active fragments thereof (such as an EGF-like domain of an NRG3) may be used to treat diseases of skeletal muscle or smooth muscle, such as muscular dystrophy or diseases caused by skeletal or smooth muscle wasting.

Semipermeable, implantable membrane devices are useful as means for delivering drugs in certain circumstances. For example, cells that secrete soluble NRG3, or agonist thereof, or chimeras can be encapsulated, and such devices can be implanted into a patient, for example, into the brain of patients suffering from Parkinson's Disease. See, U.S. Patent No. 4,892,538 of Aebischer et al.; U.S. Patent No. 5,011,472 of Aebischer et al.; U.S. Patent No. 5,106,627 of Aebischer et al.; PCT Application WO 91/10425; PCT Application WO 91/10470; Winn et al. (1991) *Exper. Neurology* 113:322-329; Aebischer et al. (1991) *Exper. Neurology* 111:269-275; and Tresco et al. (1992) *ASAIO* 38:17-23. Accordingly, also included is a method for preventing or treating damage to a nerve or damage to other NRG3-expressing or NRG3-responsive cells, e.g. brain, heart, or kidney cells, as taught herein, which method comprises implanting cells that secrete NRG3, or fragment or agonist thereof, or antagonist as may be required for the particular condition, into the body of patients in need thereof. Finally, the present invention includes an implantation device, for preventing or treating nerve damage or damage to other cells as taught herein, containing a semipermeable membrane and a cell that secretes NRG3, or fragment or agonist thereof, (or antagonist as may be required for the particular condition) encapsulated within the membrane, the membrane being permeable to NRG3, or fragment or agonist thereof, and impermeable to factors from the patient detrimental to the cells. The patient's own cells, transformed to produce NRG3 *ex vivo*, could be implanted directly into the patient, optionally without such encapsulation. The methodology for the membrane encapsulation of living cells is familiar to those of ordinary skill in the art, and the preparation of the encapsulated cells and their implantation in patients may be accomplished readily as is known in the art. The present invention includes, therefore, a method for preventing or treating cell damage, preferably nerve damage, by implanting cells into the body of a patient in need thereof, the cells either selected for their natural ability to generate NRG3, or fragment or agonist thereof, or engineered to secrete NRG3, or fragment or agonist thereof. Preferably, the secreted NRG3 is soluble, human NRG3 when the patient is human. The implants are preferably non-immunogenic and/or prevent immunogenic implanted cells from being recognized by the immune system. For CNS delivery, a preferred location for the implant is the cerebral spinal fluid of the spinal cord.

The administration of the NRG3, fragment or variant thereof, of the present invention can be done in a variety of ways, e.g., those routes known for specific indications, including, but not limited to, orally, subcutaneously, intravenously, intracerebrally, intranasally, transdermally, intraperitoneally, intramuscularly,

intrapulmonary, vaginally, rectally, intraarterially, intralesionally, intraventricularly in the brain, or intraocularly. The NRG3 may be administered continuously by infusion into the fluid reservoirs of the CNS, although bolus injection is acceptable, using techniques well known in the art, such as pumps or implantation. Sustained release systems can be used. Where the disorder permits, one may formulate and dose the NRG3 variant for site-specific delivery. Administration can be continuous or periodic. Administration can be accomplished by a constant- or programmable-flow implantable pump or by periodic injections.

Semipermeable, implantable membrane devices are useful as means for delivering drugs in certain circumstances. For example, cells that secrete soluble NGF variant can be encapsulated, and such devices can be implanted into a patient, for example, into the brain or spinal chord (CSF) of a patient suffering from Parkinson's Disease. See, U.S. Patent No. 4,892,538 of Aebischer et al.; U.S. Patent No. 5,011,472 of Aebischer et al.; U.S. Patent No. 5,106,627 of Aebischer et al.; PCT Application WO 91/10425; PCT Application WO 91/10470; Winn et al. (1991) *Exper. Neurology* 113:322-329; Aebischer et al. (1991) *Exper. Neurology* 111:269-275; and Tresco et al. (1992) *ASAIO* 38:17-23. Finally, the present invention includes an implantation device, for preventing or treating nerve damage or damage to other cells as taught herein, containing a semipermeable membrane and a cell that secretes an NRG3, the cell being encapsulated within the membrane, and the membrane being permeable to NRG3, but impermeable to factors from the patient detrimental to the cells. The patient's own cells, transformed to produce NRG3 *ex vivo*, optionally could be implanted directly into the patient without such encapsulation. The methodology for the membrane encapsulation of living cells is familiar to those of ordinary skill in the art, and the preparation of the encapsulated cells and their implantation in patients may be accomplished readily as is known in the art. Preferably, the secreted NRG3, fragment or variant thereof, is a human NRG3 when the patient is human. The implants are preferably non-immunogenic and/or prevent immunogenic implanted cells from being recognized by the immune system. For CNS delivery, a preferred location for the implant is the cerebral spinal fluid of the spinal cord.

The pharmaceutical compositions of the present invention comprise a NRG3 in a form suitable for administration to a patient. In the preferred embodiment, the pharmaceutical compositions are in a water soluble form, and may include such physiologically acceptable materials as carriers, excipients, stabilizers, buffers, salts, antioxidants, hydrophilic polymers, amino acids, carbohydrates, ionic or nonionic surfactants, and polyethylene or propylene glycol. The NRG3 may be in a time-release form for implantation, or may be entrapped in microcapsules using techniques well known in the art.

An effective amount of NRG3 or NRG3 agonist or 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 for the therapist to titer the dosage and modify the route of administration as required to obtain the optimal therapeutic effect. A typical daily dosage might range from about 10 ng/kg to up to 100 mg/kg of patient body weight or more per day, preferably about 1 µg/kg/day to 10 mg/kg/day. Typically, the clinician will administer NRG3 or NRG3 agonist or antagonist until a dosage is reached that achieves the desired effect for treatment of the above mentioned disorders.

L. Transgenic and Knockout Animals

Nucleic acids which encode novel NRG3 from non-human species, such as the murine NRG3, can be used to generate either transgenic animals or "knock out" animals which, in turn, are useful in the development and screening of therapeutically useful reagents. A transgenic animal (e.g., a mouse) is an animal having cells that contain a transgene, which transgene was introduced into the animal or an ancestor of the animal at a prenatal, e.g., an embryonic stage. A transgene is a DNA which is integrated into the genome of a cell from which a transgenic animal develops. In one embodiment, murine cDNA encoding NRG3 or an appropriate sequence thereof can be used to clone genomic DNA encoding NRG3 in accordance with established techniques and the genomic sequences used to generate transgenic animals that contain cells which express DNA encoding NRG3. Methods for generating transgenic animals, particularly animals such as mice, have become conventional in the art and are described, for example, in U.S. Patent Nos. 4,736,866 and 4,870,009. Typically, particular cells, such as neuronal cells, would be targeted for NRG3 transgene incorporation with tissue-specific enhancers, which could result in altered cell differentiation, cell proliferation, or cellular apoptosis, depending upon the ligand interaction with the expressed polypeptide. Transgenic animals that include a copy of a transgene encoding NRG3 introduced into the germ line of the animal at an embryonic stage can be used to examine the effect of increased expression of DNA encoding NRG3. Such animals can be used as tester animals for reagents thought to confer protection from, for example, diseases associated with abnormal neuronal differentiation and neuronal cell proliferation, for example. In accordance with this facet of the invention, an animal is treated with the reagent and a reduced incidence of the disease, compared to untreated animals bearing the transgene, would indicate a potential therapeutic intervention for the disease.

Alternatively, the non-human homologues of NRG3 can be used to construct a NRG3 "knock out" animal which has a defective or altered gene encoding NRG3 as a result of homologous recombination between the endogenous gene encoding NRG3 and altered genomic DNA encoding NRG3 introduced into an embryonic cell of the animal. For example, murine cDNA encoding NRG3 can be used to clone genomic DNA encoding NRG3 in accordance with established techniques. A portion of the genomic DNA encoding NRG3 can be deleted or replaced with another gene, such as a gene encoding a selectable marker which can be used to monitor integration. Typically, several kilobases of unaltered flanking DNA (both at the 5' and 3' ends) are included in the vector (see e.g., Thomas and Capecchi, *Cell* 51:503 (1987) for a description of homologous recombination vectors). The vector is introduced into an embryonic stem cell line (e.g., by electroporation) and cells in which the introduced DNA has homologously recombined with the endogenous DNA are selected (see, e.g., Li *et al.*, *Cell* 69: 915 (1992)). The selected cells are then injected into a blastocyst of an animal (e.g., a mouse) to form aggregation chimeras (see, e.g., Bradley, in *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152). A chimeric embryo can then be implanted into a suitable pseudopregnant female foster animal and the embryo brought to term to create a "knock out" animal. Progeny harboring the homologously recombined DNA in their germ cells can be identified by standard techniques and used to breed animals in which all cells of the animal contain the homologously recombined DNA. Knockout animals can be used in the selection of potential therapeutic agents, such as NRG3 agonists, that restore the cellular processes initiated or maintained by native NRG3; or the knockout animals can be used in the study of the effects of *nrg3* mutations.

The instant invention is shown and described herein in what is considered to be the most practical, and the preferred embodiments. It is recognized, however, that departures may be made therefrom which are within the scope of the invention, and that obvious modifications will occur to one skilled in the art upon reading this disclosure.

EXAMPLES

The following examples are provided so as to provide those of ordinary skill in the art with a complete disclosure and description of how to make the compounds and compositions of the invention and how to practice the 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.

Example 1: Molecular cloning of a mouse and human novel NRG3

Novel NRG3 cDNAs were identified using an expressed sequence tag shown below:

AATTTCTGCCGAAACTGATTCCATCTTATCGGATCCAACAGACCACTTGGGGATTGAATTC
ATGGAGAGTGAAGAAGTTTATCAAAGGCAGGTGCTGTCAATTTTCATGTATCATCTTTGGAAT
TGTCATCGTGGGCATGTTCTGTGCAGCATTCTACTTCAAAGCAAGAAACAAGCTAAACAAA
TCCAAGAGCAGCTGAAAGTGCCACAAAATGGTAAAGCTACAGTCTCAAAGCATCCAGCAC
AATGGCAAAGTCAGAGAACTTGGTGAAGAGCCATGTCCAGCTGCAAAATAAAATGTCAGGC
TTCTGAGCCCAAGCTAAGCCATCATATCCCTGTNGACCTGCACGTGCACATCCNGATGGCC
CGTTTCCTGCCCTTTTNTGATGACATTTNACCACAAATGNAGTGAAAATGGGNCTTTTCNTGC
CTTAAGTGGTTGACNTTTTNNCCCCAAAAGGAG (EST; SEQ ID NO:21; Genbank entry H23651) from
the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database of ESTs. This EST from a human brain
cDNA library, encodes an amino acid sequence having approximately 62% identity to amino acids 232-316
of heregulin- β 1 (also designated neuregulin- β 1, or NRG1).

To obtain a partial human cDNA clone, a 50-base single stranded oligonucleotide probe (5'-
TGGTAAAAGCTACAGTCTCAAAGCATCCAGCACAAATGGCAAAGTCAGAGA-3'; SEQ ID NO:18) was
synthesized based on the EST sequence. The probe was used to screen 1.5×10^6 plaques from a λ gt10 cDNA
library prepared from human fetal brain RNA (HL3003a, Clontech) as described by Godowski et al.
(Godowski, P.J. et al. (1989) PNAS USA 86:8083-8087, herein incorporated by reference in its entirety). Nine
positive plaques were obtained and the sequences of both strands of the largest inserts were determined by
standard sequencing techniques. From these cloned overlapping sequences, a partial cDNA sequence of the
human NRG3 was obtained.

Additional 5' human NRG3 sequence was obtained by anchored PCR of human hippocampus RNA
(Clontech). The complete human open reading frame nucleic acid sequence deduced from direct sequencing
of hNRG3B1 cDNA is shown in Fig. 2 (SEQ ID NO:5). ATCC 209157 is nucleic acid comprising an
expression vector and the nucleotide sequence of the human NRG3B1 open reading frame.

An alternatively spliced form of human NRG3 was cloned as pRK5.tk.neo.hNRG3B2 (SEQ ID
NO:22) encoding the deduced amino acid sequence of SEQ ID NO:23, which amino acid sequence lacks amino
acids 529 to 552 of SEQ ID NO:6 (see Fig. 4B). Since this alternatively spliced form of human NRG3

comprises the EGF-like domain of the other NRG3s as well as high amino acid sequence homology, it is expected to exhibit the biological properties of the NRG3s disclosed herein.

To clone murine NRG3 cDNA sequences, two degenerate primers were designed based on regions proximal to the transmembrane domain of the partial human cDNA, encoding the amino acid sequences NDGECEFVI (SEQ ID NO:19) and EFMESEEVY (SEQ ID NO:20). A mouse brain cDNA library (Clontech, ML1042a) was screened, and a clone (C5a) containing a partial murine NRG3 cDNA was obtained by standard techniques. Using a probe derived from the C5a sequence, two additional mouse brain cDNA libraries (ML1034h, Clontech; and 936309, Stratagene) were screened. Both strands of two overlapping murine partial NRG3 clones, SWAJ-3 and ZAP-1 were sequenced and, together were found to encode an entire open reading frame (ORF) of 2139 bp having the DNA sequence SEQ ID NO:1 and the deduced amino acid sequence SEQ ID NO:2 shown in Fig. 4A. Nucleic acid comprising the murine NRG3 open reading frame cloned into an expression vector is designated pLXSN.mNRG3 (ATCC 209156).

The chromosomal localization of human NRG3 was mapped to 10q22 by PCR analysis of somatic cell hybrid DNA, whereas the NRG1 gene is located at 8p11-22 (Lee, J. and Wood, W. I. (1993) *Genomics* **16**:790-791; and Orr-Urtreger, A. et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:1867-1871). Thus, NRG3 is a novel member of the EGF-like family of protein ligands.

Example 2: Characterization of the Mouse and Human NRG3 Deduced Amino Acid Sequences. The cDNAs of human and murine NRG3 contained open reading frames encoding proteins of 720 and 713 amino acids respectively, with predicted MW of 77,901 Da for human NRG3 and 77,370 Da for murine NRG3 (Fig. 4). The two species of NRG3 are 93% identical in amino acid sequence.

Analysis of the amino acid sequence of human NRG3 revealed that it contained homology to NRG1 family members (i.e. 23% and 19% sequence identity to SMDF (Ho, W. H. et al. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**:14523-32) and heregulin- β 1 (Holmes, W. E. et al. (1992) *Science* **256**:1205-10) respectively). A hydropathy analysis indicated two hydrophobic segments: W⁶⁶-V⁹¹ and L³⁶²-F³⁸³ (amino acid numbers according to human NRG3). Similar to NRG1, the C-terminal hydrophobic segment may serve as the transmembrane domain and the N-terminal region may act as internal signal sequence (Wickner, W. T. and Lodish, H. F. (1985) *Science* **230**:400-7; Sabatini, D. D. et al. (1982) *J. Cell Biol.* **92**:1-22; and Blobel, G. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:1496-500). In contrast to many neuregulin family members, the extracellular domain of NRG3 is devoid of Ig-like or kringle domains. Instead, NRG3 contains a unique Ala/Gly rich segment at the N-terminus, a mucin-like Ser/Thr rich region containing abundant sites for O-linked glycosylation, and an EGF motif. There are no predicted sites for N-linked glycosylation. The EGF-like domain of NRG3 is distinct from those encoded by the NRG1 (31% identity compared with neuregulin- β 1 EGF-like domain) and NRG2 (39% identity with neuregulin- β 1 EGF-like domain), suggesting that NRG3 is not an alternatively spliced NRG1 isoform. A diagrammatic comparison of EGF-like domains of EGF family members is shown in Fig. 5. The putative intracellular domain of NRG3 contains only approximately 13% sequence identity to the intracellular domain of NRG1. The EGF-like domains of the EGF family members were obtained from the following sources, each reference herein incorporated by reference in its entirety. The sequences compared in Fig. 5 include the EGF-like domain of human NRG3 (hNRG3.egf; SEQ ID NO:4; disclosed herein); chicken ARIA (cARIA.egf; SEQ ID NO:9) (Falls, D.L. et al. (1993) *Cell* **72**:801-815), human amphiregulin (hAR.egf; SEQ ID NO:10) (Plowman, G. D. et al. (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**:1969-81.);

human betacellulin (hBTC.egf; SEQ ID NO:11) (Sasada, R. et al. (1993) Biochem. Biophys. Res. Com. 190:1173-9); human EGF (hEGF.egf; SEQ ID NO:12)(Nagai, M. et al. (1985) Gene 36:183-8.); human heparin-binding EGF-like growth factor (hHB-EGF.egf; SEQ ID NO:13) (Higashiyama, S. et al. (1991) Science 251:936-9.); human heregulin- α (hHRG α ; SEQ ID NO:14); human heregulin- β (hHRG β .egf; SEQ ID NO:15)(Holmes, W.E. et al. (1992) Science 256:1205-1210); human TGF- α (hTGF α .egf; SEQ ID NO:16) (Derynck, R. et al. (1984) Cell 38:287-97.); and mouse epiregulin (mEPR.egf; SEQ ID NO:17) (Toyoda, H. et al. (1995) FEBS Lett. 377:403-7.).

Example 3: Expression of murine and human NRG3

A. Northern Blot Analysis of Human tissue. The tissue expression profile of the human NRG3 was examined by Northern blot analysis. A multi-tissue RNA blot containing 2 μ g each of poly(A)⁺ RNA from human tissues were purchased from Clontech. The region of the human NRG3 nucleic acid sequence encoding amino acids 394 to 536 was used to generate DNA hybridization probes by PCR amplification. The DNA probes were labeled with α -³²P-dCTP by random priming (Promega). The RNA blot was hybridized with 50% formamide, 5 x SSC, 50 mM potassium phosphate (pH 7.0), 5 x Denhardt's, 10% dextran sulfate at 42 °C for 20 hr. The blot was washed with 0.1 x SSC, 0.1%SDS at 50 °C for 30 min and exposed in PhosphoImagerTM. Expression of NRG3 in mixtures of tissues was used as a guide to determine expression in specific tissues by *in situ* hybridization.

B. *In situ* Hybridization Analysis of Mouse Tissues. Formalin-fixed, paraffin-embedded mouse embryos (embryonic days 13, 14, 16), and glutaraldehyde-fixed, paraffin-embedded or paraformaldehyde-fixed, frozen adult mouse brain, ovary, jejunum, kidney, adrenal, lung, stomach, spleen, skeletal muscle, liver and colon were sectioned and processed for *in situ* hybridization by the method of Lu and Gillett (Lu, L.H. and Gillett, N.A. (1994) Cell Vision 1:169-176) with modifications. Briefly, the *in situ* hybridization probe was generated by *in vitro* transcription directly from a PCR fragment, rather than from a plasmid DNA as described. ³²P-UTP-labeled sense and antisense riboprobes were generated by labeling PCR products of a cDNA fragment encoding amino acids C²⁹² to N⁴⁸² of murine NRG3.

C. Northern Blot And *In Situ* Hybridization Analyses Reveal a Neural Expression Pattern of NRG3. A 4.4 kb mRNA transcript that hybridized to the probe derived from amino acids 394 to 536 of human NRG3 was highly expressed in brain. In a Northern blot of various brain tissues, NRG3 expression was detected at high levels in most regions of the brain with the exception of corpus callosum. A lower level expression of a 1.9-kb transcript was detected in testis. The 4.4-kb transcript, but not the 1.9-kb transcript, is of sufficient size to encode NRG3, suggesting that the smaller transcript may encode an alternatively spliced form of NRG3. A similar pattern of expression of NRG3 was observed in RNA blots from murine tissues using a probe derived from the region of murine NRG3 that overlaps the EGF-like domain.

The tissue distribution of NRG3 expression was characterized by *in situ* hybridization using tissues of embryonic and adult mice. At embryonic day 13 (E13) (the earliest time point examined), NRG3 mRNA was confined to the nervous system. A strong signal for NRG3 mRNA in the brain, spinal cord, trigeminal, vestibular-cochlear and spinal ganglia of embryonic day 16 (E16) mice was also demonstrated. Regions of the telencephalon containing differentiating cells (e.g., the cortical plate) displayed an intense NRG3 signal, whereas the underlying regions containing proliferating or migrating cells (ventricular and subventricular zones), showed little expression. Thus, NRG3 appeared to be expressed mainly in the nervous system of

embryonic mice. In adult animals NRG3 antisense probes hybridized to mRNA in spinal cord and numerous brain regions including deep cerebellar nuclei, vestibular nuclei, cerebral cortex, piriform cortex, anterior olfactory nucleus, medial habenula, hippocampus, hypothalamus and thalamus.

Example 4: Characterization of the binding characteristics of NRG3 fragments

A. Expression and Purification of NRG3^{EGF} Fusion Protein in Mammalian Cells

To examine the binding characteristics of the NRG3 EGF-like domain as well as to demonstrate the functionality of an NRG3 fragment of the invention, a soluble fusion protein was prepared comprising a sequence of EGF-like domain, which domain has the same amino acid sequence in mouse and human NRG3.

A secreted, epitope tagged polypeptide comprising the EGF-like domain of murine NRG3₂₈₄₋₃₄₄ was constructed by linking in the expressed N-terminal to C-terminal direction 1) the coding sequence for the gD signal sequence and epitope tag (Mark, M. R. et al. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 10720-10728); 2) the sequences encoding amino acids 284-344 of murine NRG3 (identical to human NRG3 amino acids 282 to 342); and 3) the coding sequences of the Fc portion of human IgG₁ in pSAR.SD5 vector (psar.SD5, from A. Shen, Genentech, Inc.). The plasmid encoding these sequences was designated NRG3^{EGF}.Fc. The NRG3^{EGF}.Fc expression plasmid was transfected using LipofectAMINE (GIBCO/BRL, Bethesda, MD) into DHFR⁺ Chinese hamster ovary cells (CHO/DP12; ATCC designation CCL 9096). Clones were selected in glycine/hypoxanthine/thymidine minus medium see, for example, (Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989)), pooled, and expanded. The encoded fusion protein was expressed in cultures of the selected clones. Conditioned media from these cells were collected and the recombinant protein purified by a HiTrap protein A affinity column (Pharmacia).

A monomeric fusion protein designated NRG3^{EGF}.H6 fusion protein was produced in the same system as the Fc-fusion protein and purified through a cobalt affinity column. NRG3^{EGF}.H6 comprises the N-terminal gD tag, murine NRG3₂₈₄₋₃₄₄, and a coding sequence for six histidine residues. Purification was based on the affinity of the histidine side chains for immobilized cobalt using a cobalt affinity column (Cobalt affinity column, R. Vandlen, Genentech, Inc.). Protein concentration was determined by BioRad Protein Assay (BioRad, Richmond, CA).

B. Generation of K562^{erbB} Cell Lines. Stable cell lines that expressed human ErbB2, ErbB3 or ErbB4 receptors were derived from K562 cells (K562 cells have ATCC designation CCL 243). cDNAs of human *erbB2*, *erbB3* and *erbB4* were from L. Bald and G. Scoffer, Genentech (Sliwkowski, M. et al. (1994), *J. Biol. Chem.* **269**:14661-14665). These cDNAs were subcloned into CMV-based expression vectors and introduced into the K562 human myeloid leukemia cell line by electroporation (1180 mF, 350 V). The transfectants were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, and 10 mM HEPES containing 0.8 mg/ml G418. Resistant clones were obtained by limiting dilution, and receptor expression was confirmed by western blot and NRG binding assays. Receptor expression was confirmed by western blot analysis using antibodies for each of the ErbB receptors (antibodies prepared at Genentech, Inc.) Phorbol ester stimulation was found to significantly enhance receptor expression in both the ErbB3 and ErbB4 transfectants, and the stably transfected K562 cell lines were cultured in medium containing 10 ng/ml Phorbol, 12-Myristate, 12-Acetate- (PMA) overnight prior to use.

C. FACS Analysis. For each binding reaction, 5×10^4 stably transfected K562 cells were suspended in PBS/2%BSA at 4 °C for 30 min followed by incubation with 5 µg of isolated, purified NRG3^{EGF}.Fc (MW 90 kDa) in a volume of 0.25 ml on ice for 60 min. 1 µg of primary antibody (anti-gD or anti-ErbB receptor) and secondary PE-conjugated (CALTAG, CA., goat anti-mouse, 1:100 dilution) antibodies were added sequentially with 30-60 min incubation time and extensive washes before each addition. FACS analyses were performed on a Becton & Dickson FACS instrument. Anti-gD (5B6), anti-ErbB2 receptor (4D5), anti-ErbB3 receptor (2F9) and anti-ErbB4 receptor (3B9) monoclonal antibodies were prepared using standard techniques by the Monoclonal Antibody Group, Genentech, Inc.

D. The EGF-Like domain of NRG3 Binds Specifically to the ErbB4 Receptor Tyrosine Kinase. To identify the receptor(s) for NRG3, the ability of NRG3 to bind to any of the known neuregulin receptors was investigated. Stable cell lines were generated which expressed receptors ErbB2, ErbB3, or ErbB4. The parental cell line K562 does not express detectable levels of ErbB receptors (Fig. 6A). K562^{erb2}, K562^{erb3} and K562^{erb4} cells expressed only the corresponding receptors (Figs. 6B-6D).

Since the EGF-like domain determines the binding specificity of NRG1 to their receptors, a protein containing an epitope tagged version of the EGF-like domain of NRG3 fused to the Fc portion of human IgG was expressed and purified. Using a FACS assay, it was observed that NRG3^{EGF}.Fc bound to cells expressing ErbB4 receptor (Fig. 6H). Binding was specific in that NRG3^{EGF}.Fc did not bind to either the parental K562 cells, or cells expressing either ErbB2 or ErbB3 (Fig. 6E-6G). A control fusion protein, RSE.Fc, did not bind to any of these cell lines. This binding of NRG3^{EGF}.Fc to K562^{erb4} cells was competed in a dose-dependent fashion by the EGF-like domain of heregulin-β1 (NRG1^{EGF}), but not by RSE.Fc, suggesting that NRG3^{EGF}.Fc interacts directly with ErbB4 receptors on the cell surface.

A soluble form of the ErbB4 receptor was co-immunoprecipitated by NRG3^{EGF}.Fc *in vitro*, further demonstrating the binding of NRG3^{EGF}.Fc to ErbB4 receptor.

The binding of NRG3^{EGF}.Fc to ErbB4 receptor was further analyzed by direct competitive binding assays using ¹²⁵I-labeled NRG3^{EGF}.Fc. Purified NRG3^{EGF}.Fc was radio-iodinated using the lactoperoxidase method as described by Sliwkowski et al. (Sliwkowski, M. X. et al., (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 14661-5). The average specific activity of the radiolabeled protein was 300 µCi/µg. Binding of ¹²⁵I-NRG3^{EGF}.Fc to immobilized ErbB4.Fc was competed by either NRG3^{EGF}.Fc or EGF domain of NRG1^{EGF} (rHRGβ1₁₇₇₋₂₄₄) in a concentration dependent manner.

The displacement binding assays were performed in Maxisorp C 96-wells (Nunc, Naperville, Illinois). Goat anti-human antibody (Boehringer Mannheim, Germany) was coated on the plate at a concentration of 0.2 µg/well in 100 µl of 50 mM sodium carbonate buffer (pH 9.6) at 4 °C, overnight. The plate was blocked by 1%BSA in TBST buffer (25 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.02% Tween 20) for 30 min at room temperature (RT). A soluble form of ErbB4 receptor was added at 15 ng/well in 1%BSA/TBST and incubated for 1.5 hr at RT. To prevent radiolabeled protein from interacting with residual goat anti-human antibodies, 1 µM of a humanized monoclonal antibody (rhuMAB HER2; Carter, P. et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:4285-9) was added to the plate for 20 min and was included in the subsequent binding reaction.

The competitive binding assay was then initiated by the addition of 80 pM (200,000 cpm) of ^{125}I -NRG3^{EGF}.Fc along with various concentrations of unlabeled NRG3^{EGF}.Fc or NRG1^{EGF} (*E. coli*-expressed, without Fc). NRG1^{EGF} is the EGF domain of NRG1, corresponding to amino acids 177-244 of the neuregulin- β 1 isoform (Holmes, W. E. et al. (1992) *Science* 256:1205-10) and obtained from J. A. Lofgren, Genentech, Inc. The final incubation volume was 100 μ l in binding buffer (F-12/DMEM medium, 50 mM HEPES, pH 7.5, 2% BSA) and the reaction was allowed to proceed at RT for 1.5 hr. The unbound material was washed by TBST extensively, and the bound radioactivity was counted on a Beckman IsoData gamma-counter (Smith-Kline Beckman, PA). Data was analyzed using a nonlinear regression computer program.

Based on the results of the binding experiments as shown in Figs. 6A-6H, the estimated affinity (K_d) for NRG3^{EGF}.Fc for binding to ErbB4.Fc was determined to be 9 ± 4 nM ($n = 4$), and the apparent K_d of NRG1^{EGF} was approximately 1 nM. The shallowness of the displacement curve of NRG3^{EGF}.Fc may be due to the fact that the NRG3^{EGF}.Fc is expressed as a bivalent Fc fusion protein (Fig. 7). The results of the control experiments showed that ^{125}I -NRG3^{EGF}.Fc did not bind control receptor RSE.Fc in the same experiment, and RSE.Fc did not compete ^{125}I -NRG3^{EGF}.Fc bound to ErbB4.Fc.

E. Tyrosine Phosphorylation Assay. NRG1 binds and activates ErbB2, ErbB3 and ErbB4 receptor resulting in tyrosine phosphorylation and downstream signaling events (Sliwkowski, M.X., et al. (1994), *supra*; Plowman, G. D. et al. (1993) *supra*; and Carraway, K.L. and Cantley, L.C. (1994), *supra*). As demonstrated in the preceding example, NRG3 binds ErbB4 receptor, but not ErbB2 or ErbB3 receptors at a detectable level. The ability of the EGF-like domain of NRG3 (NRG3^{EGF}) to activate ErbB4 receptor, K562^{ErbB4} cells was examined.

K562^{ErbB4} cells or MDA-MB-453 cells (negative control; ATCC designation HB 131) were cultured in medium lacking serum for 12 hours and then stimulated with NRG3^{EGF}.Fc, NRG^{EGF}.H6 or NRG1^{EGF}. K562^{ErbB4} cells were treated with 2.5 nM or 25 nM of NRG3^{EGF}.Fc for 3 min or 8 min. As a positive control, the cells were similarly treated with NRG1^{EGF}.

ErbB4 receptor tyrosine phosphorylation was detected by immunoprecipitation and Western blot according to the following procedure. Cells were lysed with lysis buffer (20 mM Tris, pH 7.5, 100 mM NaCl, 30 mM NaF, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM sodium vanadate, 2 mM sodium molybdate, 2 mM of PMSF). After removing cell debris by centrifugation, 1 μ g of anti-ErbB4 receptor monoclonal antibody (C-18, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) was added together with 20 μ l of protein A-agarose slurry (Sigma, St. Louis, MO). Immunoprecipitation was performed at 4 °C overnight, complexes were collected by centrifugation and washed three times with 1 ml lysis buffer. Proteins were separated by reducing SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on Novex 4%-12% minigels and transferred to nitrocellulose. The blots were probed with peroxidase conjugated anti-phosphotyrosine antibody (Transduction Laboratory). The blot was stripped and reprobed with anti-ErbB4 receptor antibody followed by peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (Sigma) to visualize ErbB4 receptor proteins.

Based on these experiments, it was demonstrated that NRG3^{EGF}.Fc stimulated ErbB4 receptor tyrosine phosphorylation at both time points and in a dose dependent manner.

To confirm the ability of NRG3^{EGF} to activate the ErbB4 receptor tyrosine phosphorylation, receptor activation in the human breast cancer cell line MDA-MB-453 was examined. This cell line expresses high level of ErbB2 and ErbB3 receptors, and low levels of ErbB4 receptor. Treatment of MDA-MB-453 cells with NRG3^{EGF}.Fc or with a monomeric form of the EGF domain (NRG3^{EGF}.H6) resulted in substantial increase of tyrosine phosphorylation of ErbB4 receptor.

NRG family members and other members in the EGF family display a complex pattern of receptor binding. In most cases, one ligand is able to bind several combinations of receptor homo- and heterodimers (Karunakaran, D. et al. (1996) *EMBO J* **15**:254-264, Beerli, R. R. and Hynes, N. E. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**:6071-6076). For example, NRGs bind ErbB2/ErbB3 receptor heterodimers and ErbB4/ErbB4 receptor homodimers with high affinity but ErbB3/ErbB3 receptor homodimers with low affinity (Sliwkowski, M. X. et al. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 14661-5, Carraway, K. L. and Cantley, L. C. (1994) *Cell* **78**, 5-8, Tzahar, E. et al. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 25226-33, Carraway, K. L. et al. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 14303-6, and Kita, Y. A. et al. (1994) *FEBS Lett.* **349**, 139-43). Betacellulin binds both EGFR and ErbB4 homodimers (Riese, D. J. et al. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**:5770-6). The EGF-like domains of EGF and NRG1 family members determine the specificity of receptor activation (Barbacci, E. G. et al. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**:9585-9589). The limited amino acid sequence homology in the EGF-like domains of NRG3 and NRG1 suggests that NRG3 may have a different spectrum of receptor interactions relative to members of the NRG family, but with potentially overlapping binding sites, since binding of the EGF-like domain of NRG3 to ErbB4 can be competed by the EGF-like domain of NRG1.

NRG3^{EGF}.Fc did not bind to K562 cells that express either ErbB2 or ErbB3 (Fig. 6E-6G), or to MDA-MB-486 cells which express high levels of the EGFR. An increase in phosphorylation of either the EGFR, ErbB2 or ErbB3 in MDA-MB-453 cells treated with NRG3 also was not observed.

Most variants of NRGs, with the exception of the neural specific form of SMDF, are widely expressed in numerous tissues including brain, heart, skeletal muscle, breast, liver, lung, among others. Betacellulin, a ligand for both EGFR and ErbB4, also displays broad tissue expression patterns (Shing, Y. et al. (1993) *Science* **259**, 1604-7; Sasada, R. et al. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Com.* **190**, 1173-9). In contrast, the expression of NRG3 is strikingly restricted to neural tissues as disclosed herein by Northern analysis and *in situ* hybridization. Developmentally, NRG3 mRNA can be detected as early as E11 (but not E4) in mouse as judged by Northern blot and E13 by *in situ* hybridization (the earliest age examined). ErbB4 is predominantly expressed in brain, heart and skeletal muscle (Plowman, G. D. et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 1746-50). ErbB4 was also shown to be broadly distributed in the brains of chick embryos (E14, E17, predominantly in neurons) (Francoeur, J. R. et al. (1995) *J. Neur. Res.* **41**, 836-45), in rat retina cultures (Bermingham-McDonogh, O. et al. (1996) *Development* **122**, 1427-38.), at neuromuscular synapses (Zhu, X. et al. (1995) *EMBO J.* **14**, 5842-8.), but not in cultured human and rat Schwann cells (Grinspan, J. B. et al. (1996) *J. Neuroscience* **16**, 6107-6118, Levi, A. D. et al. (1995) *J. Neuroscience* **15**, 1329-40.). Recently, ErbB4 was found to co-localize with GABA⁺ cells (Weber, J. et al. (1996) *Soc Neurosci Abstr* **22**, 1579.). Thus, the same receptor may mediate distinct biological functions in different tissues or cell types when interacted with corresponding tissue-specific ligands. For example, NRG1 may serve as a ligand for ErbB4 during heart development, betacellulin may act as a mitogenic ligand for ErbB4 in variety of cell types, while

neural specific ligand(s) (such as NRG3) may function as trophic or guidance molecules on ErbB4 receptor-expressing cells in the central or peripheral nervous systems.

Example 5: Binding and ErbB4 receptor tyrosine kinase activation by full length mouse and human NRG3s.

A full length murine NRG3 or human NRG3 was synthesized based on the murine and human consensus nucleic acid sequences SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:5, respectively and the NRG3s were expressed as amino acid sequences. Based on the experiments described herein for the characterization of NRG3-EGF binding and ErbB4 receptor activation, analogous experiments are performed for the full length consensus NRG3 from mouse and human sources. Adjustments to the reaction conditions are made to optimize pH, solutes and their concentrations, and other relevant parameters to allow ErbB4 receptor-binding of the full length consensus NRG3 and ErbB4 receptor activation.

Alternatively, a murine or human NRG3 polypeptide fragment comprising the EGF-like domain but lacking the transmembrane domain is synthesized and tested for ErbB4 receptor binding and activation as described herein. Such a NRG3 fragment may, for example, include the extracellular domain of a NRG3, which extracellular domain contains the EGF-like domain.

A NRG3 extracellular domain may optionally be fused to an immunoglobulin constant region, as shown herein for the NRG3-EGF-Fc fusion proteins. As an Fc fusion protein, the NRG3 extracellular domain-Fc protein is expected to form a dimer. The immunoglobulin constant region is preferably from IgG, but may also be taken from IgM, IgA and IgE and remain within the scope of the invention.

Where a monomeric fusion protein is desired that retains binding activity or binding and activation ability, the extracellular domain is fused to, for example, a series of histidine residues as disclosed herein for the NRG3-EGF-H6 immunoadhesion.

Adjustments to the binding reaction conditions are made to optimize pH, solutes and their concentrations and other relevant parameters to allow ErbB4 receptor-binding of the NRG3 fragment and ErbB4 receptor activation.

Example 6: Enhancement of cellular proliferation

Enhancement of cellular proliferation is exemplified by the following assay in which cells expressing ErbB4 receptor on their surface are treated with NRG3. It is understood that according to the invention, the cells may be treated with a NRG3 fragment (such as the NRG3 EGF-like domain) or a NRG3 variant.

As an example, rat retina cells which naturally express ErbB4 receptor (Bermingham-McDonogh, O. et al. (1996) *Development* 122, 1427-38) are cultured by standard techniques. The cultured cells are contacted with NRG3 in a dose dependent manner and an increase in cell number (e.g. a 30% percent increase at 48 hours) and EC50 is determined.

NRG3 treatment may also alter the morphology of these cells; untreated cells were multipolar with numerous branched processes whereas NRG3-treated cells may become spindle-shaped smooth processes and/or align themselves in a parallel array.

NRG3 is believed to stimulate neuronal cell growth in a dose dependent manner. NRG3 alone is expected to produce a significant increase in neuronal cell number compared to control medium. A synergistic effect may be observed between other neuronal proliferation enhancers such as gas6 (growth arrest-specific gene; see, for example, Schneider *et al.*, *Cell* 54:787-793 (1988); and Manfioletti *et al.* in *Molec. Cell Biol.*

13(8):4976-4985 (1993) and/or heregulin. NRG3 is expected to increase both cell number and thymidine incorporation as measures of cell proliferation.

NRG3 is expected to have an effect on cell morphology as determined by viewing phase contrast micrographs of ErbB4 receptor-expressing neuronal cells grown in various media containing NRG3 alone or NRG3 plus other cell proliferation enhancing compounds such as heregulin, gas6, fetal bovine serum, and the like. Photomicrographs are taken after 96 hours of culture. The cells grown in the presence of NRG3 are expected to have processes which are not observed in cells grown in the absence of NRG3.

Cells are stained by immunofluorescence for markers specific for the cultured neuronal cells. Briefly, passaged ErbB4 receptor-expressing neuronal cells are contacted with NRG3 and cultured for 24 hours on laminin coated Chamber slides and fixed in 10% formalin in PBS. Fixed cells are blocked with 10% goat serum and incubated with rabbit derived anti-marker antibody at dilutions recommended by the distributor. Specific binding of the primary antibody is observed by staining with goat anti-rabbit IgG (Fab')₂-FITC conjugates. Cells are counter-stained with DNA dye propidium iodide. Negative controls are run on WI-38 cells which stain negative. Cells grown under these conditions are expected to show 100% immunofluorescent staining for the cell markers.

The ability of NRG3 to stimulate proliferation in ErbB4 receptor-expressing neuronal cells through the ErbB4 tyrosine kinase receptors may be investigated as follows. Cells are stimulated with various amounts of NRG3 (for example, 0 to 200 nM) for 15 min in a 37°C incubator. Cell lysates are prepared and immunoprecipitated with an anti-ErbB4 receptor antibody. Tyrosine phosphorylation of ErbB4 receptor is detected with 4G10 anti-phosphorylation antibody. Approximately 10⁶ cells are grown to near confluence in defined media. Cells are treated with NRG3 for 15 min in a 37°C incubator and lysed on ice with 1 ml of lysis buffer (20 mM HEPES, pH7.4, 135 mM NaCl, 50 mM NaF, 1 mM sodium vanadate and 1 mM sodium molybdate, 2 mM EDTA and 2 mM EGTA, 10% glycerol, 1%NP40, 1μM okadaic acid, 1 mM PMSF and 1 mM AEBSF). Cell lysates are clarified by centrifuging at 14000 x g at 4°C for 10 min. Immunoprecipitations are performed using approximately 1 μg of rabbit anti-ErbB4 receptor antibody or 2 μl of rabbit anti-ErbB4 receptor antiserum. Immunocomplexes are collected with 10 μl of Protein A Sepharose CL-4B beads. Proteins are separated on Novex 4-12% gradient gel and transferred onto nitrocellulose membrane. Anti-phosphotyrosine immunoblots are performed using 4G10 mouse anti-phosphotyrosine antibody (UBI), goat anti-mouse horseradish peroxidase conjugate and ECL developing kit (Amersham). Addition of NRG3 to ErbB4 receptor-expressing neuronal cells is expected to cause autophosphorylation of ErbB4 receptor tyrosine residue(s).

It is beneficial to have populations of mammalian neuronal cells (preferably human cells) for use as cellular prostheses for transplantation into areas of damaged spinal cord in an effort to influence regeneration of interrupted central axons, for assisting in the repair of peripheral nerve injuries and as alternatives to multiple autografts. See Levi *et al.*, J. Neuroscience 14(3):1309-1319 (1994). The use of cell culture techniques to obtain an abundant source of autologous graft material from a small biopsy has already met with clinical success in providing human epidermal cells to cover extensive burns (Gallico *et al.*, N. Eng J. Med. 311:338-451 (1984)). Accordingly, it is expected that the above approach will meet with success in mammals, including humans.

All documents cited throughout the specification as well as the references cited therein are hereby expressly incorporated by reference in their entirety. While the present invention is illustrated with reference to specific embodiments, the invention is not so limited. It will be understood that further modifications and variations are possible without diverting from the overall concept of the invention. All such modifications are intended to be within the scope of the present invention.

Deposit of Material

The following materials have been deposited with the American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, USA (ATCC):

<u>Material</u>	<u>ATCC Dep. No.</u>	<u>Deposit Date</u>
mouse NRG3 pLXSN.mNRG3	209156	22 July 1997
human NRG3B1 pRK5.tk.neo.hNRG3B1	209157	22 July 1997
human NRG3B2 pRK5.tk.neo.hNRG3B2	209297	23 September 1997

These deposits are 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 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 USC §122 and the Commissioner's rules pursuant thereto (including 37 CFR §1.14 with particular reference to 886 OG 638).

In respect of those designations in which a European patent is sought, a sample of the deposited microorganism will be made available until the publication of the mention of the grant of the European patent or until the date on which the application has been refused or withdrawn or is deemed to be withdrawn, only by the issue of such a sample to an expert nominated by the person requesting the sample. (Rule 28(4) EPC)

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 to be 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.

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

- (i) APPLICANT: Genentech, Inc.
 - (ii) TITLE OF INVENTION: ErbB Receptor-Specific Neuregulin Related Ligands and Uses Therefor
 - (iii) NUMBER OF SEQUENCES: 23
 - (iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:
 - (A) ADDRESSEE: Genentech, Inc.
 - (B) STREET: 1 DNA Way
 - (C) CITY: South San Francisco
 - (D) STATE: California
 - (E) COUNTRY: USA
 - (F) ZIP: 94080
 - (v) COMPUTER READABLE FORM:
 - (A) MEDIUM TYPE: 3.5 inch, 1.44 Mb floppy disk
 - (B) COMPUTER: IBM PC compatible
 - (C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: WinPatin (Genentech)
 - (vi) CURRENT APPLICATION DATA:
 - (A) APPLICATION NUMBER:
 - (B) FILING DATE:
 - (C) CLASSIFICATION:
 - (viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:
 - (A) NAME: Conley, Deirdre L.
 - (B) REGISTRATION NUMBER: 36,487
 - (C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: P1084R1PCT
 - (ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:
 - (A) TELEPHONE: 650/225-2066
 - (B) TELEFAX: 650/952-9881
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 2538 base pairs
 - (B) TYPE: Nucleic Acid
 - (C) STRANDEDNESS: Single
 - (D) TOPOLOGY: Linear
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: mouse NRG3 nucleic acid
 - (B) LOCATION: 1-2538
 - (C) IDENTIFICATION METHOD:
 - (D) OTHER INFORMATION:
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

CCTGACCGGC CGGCGGCGCC CGGGCCGGTC TCGCCCTCT ACCGAGCGCC 50

TCGCGCCCC CTCCCCGGCC CGCGTCCCCT CCCCCGTCT CTCCTCCCCG 100

CCCCCGCCCC GCCTCTCGGG GGGAGGGGCG TGGGGGCAGG GAGCCGATTT 150
GCATGCGGCC GCCGCGGCCG CTGCCTGAGC CGGAGCCCGC CGCCGCCGGA 200
GGCCGCGCCC GCGCCCGCGC CCGGCCCGCG CGGCCCATG CCTCTGGCGC 250
GGCCCTCGGG GGGGCGAAGG TGAAGATCGG CTCCTAGGAT GAGTGAAGGG 300
GCGGCCGGTG CCTCGCCACC TGGTGCCGCT TCGGCAGCCG CCGCCTCAGC 350
CGAGGAGGGC ACCGCGGCGG CTGCGGCGGC GCGGCGGCG GCGGGGGGCC 400
CGGACGGCGG CCGAGAAGGG GCGGCCGAAC CCCCCCGGA GTTACGCTGT 450
AGCGACTGCA TCGTGTGGAA CCGGCAGCAG ACGTGGTTGT GCGTGGTGCC 500
TCTGTTTCATC GGCTTCATCG GCCTGGGGCT CAGCCTCATG CTGCTTAAAT 550
GGATCGTGGT AGGCTCCGTC AAGGAGTACG TGCCACGGA CCTGGTGGAC 600
TCCAAGGGAA TGGGCCAGGA CCCCTTCTTC CTCTCCAAGC CCAGCTCTTT 650
CCCCAAGGCT ATGGAACCA CCACAACAAC CACTTCTACC ACGTCCCCCG 700
CCACCCCTC TGCCGGCGGC GCCGCTTCTT CCAGGACGCC TAACCGGATT 750
AGCACCCGCT TGACCACCAT CACACGGGCA CCCACCCGCT TCCCTGGGCA 800
CCGGGTTCCT ATCCGGGCTA GCGCGCGCTC TACCACAGCA CGGAACACTG 850
CTCCCCCTCC GACGGTCTTG TCCACCACGG CCCCTTTCTT CAGTAGCAGC 900
ACGCCCCGCT CCCGACCCC GATGCCAGGA GCCCCAGTA CGCAGGCGAT 950
GCCTTCCTGG CCCACTGCGG CGTATGCTAC CTCCTCCTAC CTCCACGATT 1000
CCACTCCCTC CTGGACCCTG TCACCCTTC AGGATGCTGC TGCCGCCTCT 1050
TCCTCCTCAC CCTCTTCAC CTCCTCCACT ACCACCACC CAGAACTAG 1100
CACCAGCCCC AAATTCATA CTACAACATA CTCCACTGAA CGATCTGAGC 1150
ACTTCAAACC CTGTCGAGAC AAGGACCTGG CGTATTGTCT CAATGATGGT 1200
GAATGCTTTG TGATTGAGAC CCTGACAGGA TCCATAAGC ACTGTCGGTG 1250
CAAGGAAGGC TACCAAGGAG TCCGTTGTGA TCAATTCTG CCGAAAACAG 1300
ACTCCATCTT ATCGGATCCA ACAGACCACT TGGGGATTGA ATTCATGGAG 1350
AGTGAAGACG TTTATCAAAG GCAGGTGCTG TCAATTTTCAT GTATCATCTT 1400
TGGAATTGTC ATCGTGGGCA TGTCTGTGC AGCATCTAC TTCAAAGCA 1450
AGAAACAAGC TAAACAAAT CAGGAGCACC TGAAAGAGTC ACAGAATGGG 1500
AAGAACTACA GCCTCAAGGC ATCCAGCACA AAGTCTGAGA GCTTGATGAA 1550

GAGCCATGTC CATCTACAAA ATTATTCAAA GGCGGATAGG CATCCTGTGA 1600
 CTGCGCTGGA GAAAATAATG GAGTCAAGTT TTTCAGCTCC CCAGTCGTTC 1650
 CCAGAAGTCA CTTCTCCTGA CCGAGGAAGC CAGCCTATCA AGCACCACAG 1700
 CCCAGGACAA AGGAGTGGGA TGTTCATAG GAATACTTTC AGAAGGGCAC 1750
 CACCCTCACC CCGAAGTCGA CTGGGTGGTA TTGTAGGACC AGCATATCAA 1800
 CAACTTGAAG AATCAAGAAT TCCAGACCAG GATACGATAC CTTGCCAAGG 1850
 GATAGAGGTC AGGAAGACTA TATCCACCT GCCTATACAG CTGTGGTGTG 1900
 TTGAAAGACC CCTGGACTTA AAGTATGTGT CCAATGGCTT AAGAACCCAA 1950
 CAAAATGCAT CAATAAATAT GCAACTGCCT TCAAGAGAGA CAAACCCCTA 2000
 TTTTAATAGC TTGGATCAAA AGGACCTGGT GGGTTATTTA TCCCAAGGG 2050
 CCAATTCTGT GCCCATCATC CCGTCGATGG GTCTAGAAGA AACCTGCATG 2100
 CAAATGCCAG GGATTTCTGA CGTCAAAAGC ATTAAATGGT GCAAAACTC 2150
 CTACTCCGCT GACATTGTCA ACGCGAGTAT GCCAGTCAGT GATTGTCTTC 2200
 TAGAAGAACA ACAGGAAGTG AAAATATTAC TAGAGACTGT GCAGGAACAG 2250
 ATCCGGATTC TGA CTGATGC CAGACGGTCA GAAGACTTCG AACTGGCCAG 2300
 CATGGAACT GAGGACAGTG CGAGCGAAAA CACAGCCTTT CTCCCCCTGA 2350
 GTCCACGGC CAAATCAGAA CGAGAGGCAC AATTGTCTT AAGAAATGAA 2400
 ATACAAAGAG ACTCTGTGCT AACCAAGTGA CTGGAAATGT AGGAATCTGT 2450
 GCATTATATG CTTTGCTAAA CAGGAAGGAG AGGAAATTAA ATACAAATTA 2500
 TTTATATGCA TTAATTTAAG AGCATCTACT TAGAAGCC 2538

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 713 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Mouse NRG3 (mNRG3)/amino acid seq.
- (B) LOCATION: 1-713
- (C) IDENTIFICATION METHOD:
- (D) OTHER INFORMATION:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

Met Ser Glu Gly Ala Ala Gly Ala Ser Pro Pro Gly Ala Ala Ser
 1 5 10 15

Ala Ala Ala Ala Ser Ala Glu Glu Gly Thr Ala Ala Ala Ala Ala	20	25	30
Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Pro Asp Gly Gly Gly Glu Gly Ala	35	40	45
Ala Glu Pro Pro Arg Glu Leu Arg Cys Ser Asp Cys Ile Val Trp	50	55	60
Asn Arg Gln Gln Thr Trp Leu Cys Val Val Pro Leu Phe Ile Gly	65	70	75
Phe Ile Gly Leu Gly Leu Ser Leu Met Leu Leu Lys Trp Ile Val	80	85	90
Val Gly Ser Val Lys Glu Tyr Val Pro Thr Asp Leu Val Asp Ser	95	100	105
Lys Gly Met Gly Gln Asp Pro Phe Phe Leu Ser Lys Pro Ser Ser	110	115	120
Phe Pro Lys Ala Met Glu Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ser Thr Thr	125	130	135
Ser Pro Ala Thr Pro Ser Ala Gly Gly Ala Ala Ser Ser Arg Thr	140	145	150
Pro Asn Arg Ile Ser Thr Arg Leu Thr Thr Ile Thr Arg Ala Pro	155	160	165
Thr Arg Phe Pro Gly His Arg Val Pro Ile Arg Ala Ser Pro Arg	170	175	180
Ser Thr Thr Ala Arg Asn Thr Ala Ala Pro Pro Thr Val Leu Ser	185	190	195
Thr Thr Ala Pro Phe Phe Ser Ser Ser Thr Pro Gly Ser Arg Pro	200	205	210
Pro Met Pro Gly Ala Pro Ser Thr Gln Ala Met Pro Ser Trp Pro	215	220	225
Thr Ala Ala Tyr Ala Thr Ser Ser Tyr Leu His Asp Ser Thr Pro	230	235	240
Ser Trp Thr Leu Ser Pro Phe Gln Asp Ala Ala Ala Ala Ser Ser	245	250	255
Ser Ser Pro Ser Ser Thr Ser Ser Thr Thr Thr Thr Pro Glu Thr	260	265	270
Ser Thr Ser Pro Lys Phe His Thr Thr Thr Tyr Ser Thr Glu Arg	275	280	285
Ser Glu His Phe Lys Pro Cys Arg Asp Lys Asp Leu Ala Tyr Cys	290	295	300
Leu Asn Asp Gly Glu Cys Phe Val Ile Glu Thr Leu Thr Gly Ser			

305	310	315
His Lys His Cys Arg Cys Lys Glu Gly Tyr Gln Gly Val Arg Cys		
320	325	330
Asp Gln Phe Leu Pro Lys Thr Asp Ser Ile Leu Ser Asp Pro Thr		
335	340	345
Asp His Leu Gly Ile Glu Phe Met Glu Ser Glu Asp Val Tyr Gln		
350	355	360
Arg Gln Val Leu Ser Ile Ser Cys Ile Ile Phe Gly Ile Val Ile		
365	370	375
Val Gly Met Phe Cys Ala Ala Phe Tyr Phe Lys Ser Lys Lys Gln		
380	385	390
Ala Lys Gln Ile Gln Glu His Leu Lys Glu Ser Gln Asn Gly Lys		
395	400	405
Asn Tyr Ser Leu Lys Ala Ser Ser Thr Lys Ser Glu Ser Leu Met		
410	415	420
Lys Ser His Val His Leu Gln Asn Tyr Ser Lys Ala Asp Arg His		
425	430	435
Pro Val Thr Ala Leu Glu Lys Ile Met Glu Ser Ser Phe Ser Ala		
440	445	450
Pro Gln Ser Phe Pro Glu Val Thr Ser Pro Asp Arg Gly Ser Gln		
455	460	465
Pro Ile Lys His His Ser Pro Gly Gln Arg Ser Gly Met Leu His		
470	475	480
Arg Asn Thr Phe Arg Arg Ala Pro Pro Ser Pro Arg Ser Arg Leu		
485	490	495
Gly Gly Ile Val Gly Pro Ala Tyr Gln Gln Leu Glu Glu Ser Arg		
500	505	510
Ile Pro Asp Gln Asp Thr Ile Pro Cys Gln Gly Ile Glu Val Arg		
515	520	525
Lys Thr Ile Ser His Leu Pro Ile Gln Leu Trp Cys Val Glu Arg		
530	535	540
Pro Leu Asp Leu Lys Tyr Val Ser Asn Gly Leu Arg Thr Gln Gln		
545	550	555
Asn Ala Ser Ile Asn Met Gln Leu Pro Ser Arg Glu Thr Asn Pro		
560	565	570
Tyr Phe Asn Ser Leu Asp Gln Lys Asp Leu Val Gly Tyr Leu Ser		
575	580	585
Pro Arg Ala Asn Ser Val Pro Ile Ile Pro Ser Met Gly Leu Glu		
590	595	600

Glu Thr Cys Met Gln Met Pro Gly Ile Ser Asp Val Lys Ser Ile
 605 610 615
 Lys Trp Cys Lys Asn Ser Tyr Ser Ala Asp Ile Val Asn Ala Ser
 620 625 630
 Met Pro Val Ser Asp Cys Leu Leu Glu Glu Gln Gln Glu Val Lys
 635 640 645
 Ile Leu Leu Glu Thr Val Gln Glu Gln Ile Arg Ile Leu Thr Asp
 650 655 660
 Ala Arg Arg Ser Glu Asp Phe Glu Leu Ala Ser Met Glu Thr Glu
 665 670 675
 Asp Ser Ala Ser Glu Asn Thr Ala Phe Leu Pro Leu Ser Pro Thr
 680 685 690
 Ala Lys Ser Glu Arg Glu Ala Gln Phe Val Leu Arg Asn Glu Ile
 695 700 705
 Gln Arg Asp Ser Val Leu Thr Lys
 710 713

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 362 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: mNRG3 extracellular domainAmino acid seq
- (B) LOCATION: 1-362
- (C) IDENTIFICATION METHOD:
- (D) OTHER INFORMATION:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

Met Ser Glu Gly Ala Ala Gly Ala Ser Pro Pro Gly Ala Ala Ser
 1 5 10 15
 Ala Ala Ala Ala Ser Ala Glu Glu Gly Thr Ala Ala Ala Ala Ala
 20 25 30
 Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Pro Asp Gly Gly Gly Glu Gly Ala
 35 40 45
 Ala Glu Pro Pro Arg Glu Leu Arg Cys Ser Asp Cys Ile Val Trp
 50 55 60
 Asn Arg Gln Gln Thr Trp Leu Cys Val Val Pro Leu Phe Ile Gly
 65 70 75
 Phe Ile Gly Leu Gly Leu Ser Leu Met Leu Leu Lys Trp Ile Val
 80 85 90
 Val Gly Ser Val Lys Glu Tyr Val Pro Thr Asp Leu Val Asp Ser

95	100	105
Lys Gly Met Gly Gln Asp Pro Phe Phe	Leu Ser Lys Pro Ser Ser	
110	115	120
Phe Pro Lys Ala Met Glu Thr Thr Thr	Thr Thr Thr Ser Thr Thr	
125	130	135
Ser Pro Ala Thr Pro Ser Ala Gly Gly	Ala Ala Ser Ser Arg Thr	
140	145	150
Pro Asn Arg Ile Ser Thr Arg Leu Thr	Thr Ile Thr Arg Ala Pro	
155	160	165
Thr Arg Phe Pro Gly His Arg Val Pro	Ile Arg Ala Ser Pro Arg	
170	175	180
Ser Thr Thr Ala Arg Asn Thr Ala Ala	Pro Pro Thr Val Leu Ser	
185	190	195
Thr Thr Ala Pro Phe Phe Ser Ser Ser	Thr Pro Gly Ser Arg Pro	
200	205	210
Pro Met Pro Gly Ala Pro Ser Thr Gln	Ala Met Pro Ser Trp Pro	
215	220	225
Thr Ala Ala Tyr Ala Thr Ser Ser Tyr	Leu His Asp Ser Thr Pro	
230	235	240
Ser Trp Thr Leu Ser Pro Phe Gln Asp	Ala Ala Ala Ala Ser Ser	
245	250	255
Ser Ser Pro Ser Ser Thr Ser Ser Thr	Thr Thr Thr Pro Glu Thr	
260	265	270
Ser Thr Ser Pro Lys Phe His Thr Thr	Thr Tyr Ser Thr Glu Arg	
275	280	285
Ser Glu His Phe Lys Pro Cys Arg Asp	Lys Asp Leu Ala Tyr Cys	
290	295	300
Leu Asn Asp Gly Glu Cys Phe Val Ile	Glu Thr Leu Thr Gly Ser	
305	310	315
His Lys His Cys Arg Cys Lys Glu Gly	Tyr Gln Gly Val Arg Cys	
320	325	330
Asp Gln Phe Leu Pro Lys Thr Asp Ser	Ile Leu Ser Asp Pro Thr	
335	340	345
Asp His Leu Gly Ile Glu Phe Met Glu	Ser Glu Asp Val Tyr Gln	
350	355	360
Arg Gln		
362		

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 47 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: NRG3 EGF-like domain/amino acid seq.
- (B) LOCATION: 1-47
- (C) IDENTIFICATION METHOD:
- (D) OTHER INFORMATION:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

```

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

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

His Cys Arg Cys Lys Glu Gly Tyr Gln Gly Val Arg Cys Asp Gln
      35             40             45

Phe Leu
 47

```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 2502 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic Acid
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Human NRG3B1(hNRG3B1)/nucleic acid seq.
- (B) LOCATION: 1-2502
- (C) IDENTIFICATION METHOD:
- (D) OTHER INFORMATION:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

```

TCACCGACCT AGTGGACTCC ACTAGGTCGG TGGGCACGTA CTCCTTGACG 50
GAGCCCACCA CGATCCATTT GAGAAGCATG AGGCGCGGCC CCATGCCTCT 100
GCCGCGGCCC TCGGGGGGGC GAAGGTGAAN ACCGGCTCCT AGGATGAGTG 150
AAGGGGCGGC CGCTGCCTCG CCACCTGGTG CCGCTTCGGC AGCCGCCGCC 200
TCGGCCGAGG AGGGCACCGC GCGGCTGCG GCGGCGGCAG CGGCGGGCGG 250
GGGCCCCGAC GGCGGCGGCG AAGGGGCGGC CGAGCCCCCC CGGGAGTTAC 300
GCTGTAGCGA CTGCATCGTG TGGAACCGGC AGCAGACGTG GCTGTGCGTG 350
GTACCTCTGT TCATCGGCTT CATCGGCCTG GGGCTCAGCC TCATGCTTCT 400

```

CAAATGGATC GTGGTGGGCT CCGTCAAGGA GTACGTGCCC ACCGACCTAG 450
TGGACTCCAA GGGGATGGGC CAGGACCCCT TCTTCTCTC CAAGCCCAGC 500
TCTTTCCCCA AGGCCATGGA GACCACCACC ACTACCACTT CCACCACGTC 550
CCCCGCCACC CCCTCCGCCG GGGGTGCCGC CTCCTCCAGG ACGCCCAACC 600
GGATTAGCAC TCGCCTGACC ACCATCACGC GGGCGCCAC TCGCTTCCCC 650
GGGCACCGGG TGCCCATCCG GGCCAGCCCG CGCTCCACCA CAGCACGGAA 700
CACTGCGGCC CCTGCGACGG TCCCGTCCAC CACGGCCCCG TTCTTCAGTA 750
GCAGCACGCT GGGCTCCCGA CCCCCGGTGC CAGGAACTCC AAGTACCCAG 800
GCAATGCCCT CCTGGCCTAC TGCGGCATAC GCTACCTCCT CCTACCTTCA 850
CGATTCTACT CCCTCCTGGA CCCTGTCTCC CTTTCAGGAT GCTGCCTCCT 900
CTTCTTCCTC TTCTTCTCC TCCGCTACCA CCACCACACC AGAAACTAGC 950
ACCAGCCCCA AATTTCATAC GACGACATAT TCCACAGAGC GATCCGAGCA 1000
CTTCAAACCC TGCCGAGACA AGGACCTTGC ATACTGTCTC AATGATGGCG 1050
AGTGCTTTGT GATCGAAACC CTGACCGGAT CCCATAAACA CTGTGCGTGC 1100
AAAGAAGGCT ACCAAGGAGT CCGTTGTGAT CAATTTCTGC CGAAACTGA 1150
TTCCATCTTA TCGGATCCAA CAGACCACTT GGGGATTGAA TTCATGGAGA 1200
GTGAAGAAGT TTATCAAAGG CAGGTGCTGT CAATTTCATG TATCATCTTT 1250
GGAATTGTCA TCGTGGGCAT GTTCTGTGCA GCATTCTACT TCAAAGCAA 1300
GAAACAAGCT AAACAAATCC AAGAGCAGCT GAAAGTGCCA CAAAATGGTA 1350
AAAGCTACAG TCTCAAAGCA TCCAGCACAA TGGCAAAGTC AGAGAACTTG 1400
GTGAAGAGCC ATGTCCAGCT GCAAAATTAT TCAAAGGTGG AAAGGCATCC 1450
TGTGACTGCA TTGGAGAAAA TGATGGAGTC AAGTTTTGTC GGCCCCCAGT 1500
CATTCCTGA GGTCCCTTCT CCTGACAGAG GAAGCCAGTC TGTCAAACAC 1550
CACAGGAGTC TATCCTCTTG CTGCAGCCCA GGGCAAAGAA GTGGCATGCT 1600
CCATAGGAAT GCCTTCAGAA GGACACCCCC GTCACCCCGA AGTAGGCTAG 1650
GTGGAATTGT GGGACCAGCA TATCAGCAAC TCGAAGAATC AAGGATCCCA 1700
GACCAGGATA CGATACCTTG CCAAGGGATA GAGGTCAGGA AGACTATATC 1750
CCACCTGCCT ATACAGCTGT GGTGTGTTGA AAGACCCCTG GACTTAAAGT 1800
ATTTCATCCAG TGGTTTAAAA ACCCAACGAA ATACATCAAT AAATATGCAA 1850

CTGCCTTCAA GAGAGACAAA CCCCTATTTT AATAGCTTGG AGCAAAAGGA 1900
 CCTGGTGGGC TATTCATCCA CAAGGGCCAG TTCTGTGCCC ATCATCCCTT 1950
 CAGTGGGTTT AGAGGAAACC TGCCTGCAAA TGCCAGGGAT TTCTGAAGTC 2000
 AAAAGCATCA AATGGTGCAA AAACCTCTAT TCAGCTGACG TTGTCAATGT 2050
 GAGTATTCCA GTCAGCGATT GTCTTATAGC AGAACAACAA GAAGTGAAAA 2100
 TATTGCTAGA AACTGTCCAG GAGCAGATCC GAATTCTGAC TGATGCCAGA 2150
 CGGTCAGAAG ACTACGAACT GGCCAGCGTA GAAACCGAGG ACAGTGCAAG 2200
 CGAAAACACA GCCTTTCTCC CCCTGAGTCC CACAGCCAAA TCAGAACGAG 2250
 AGGCGCAATT TGTCTTAAGA AATGAAATAC AAAGAGACTC TGCATTGACC 2300
 AAGTGACTTG AGATGTAGGA ATCTGTGCAT TCTATGCTTT GCTCAACAGG 2350
 AAAGAGAGGA AATCAAATAC AAATTATTTA TATGCATTAA TTTAAGAGCA 2400
 TCTACTTAGA AGAAACCAAA TAGTCTATCG CCCTCATATC ATAGTGTTTT 2450
 TTAACAAAAT ATTTTTTTAA GGGAAAGAAA TGTTTCAGGA GGGATAAAGC 2500
 TT 2502

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 720 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: hNRG3B1 amino acid sequence
- (B) LOCATION: 1-720
- (C) IDENTIFICATION METHOD:
- (D) OTHER INFORMATION:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

Met	Ser	Glu	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Ser	Pro	Pro	Gly	Ala	Ala	Ser
1				5				10						15
Ala	Ala	Ala	Ala	Ser	Ala	Glu	Glu	Gly	Thr	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala
				20				25						30
Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Gly	Pro	Asp	Gly	Gly	Gly	Glu	Gly	Ala
				35				40						45
Ala	Glu	Pro	Pro	Arg	Glu	Leu	Arg	Cys	Ser	Asp	Cys	Ile	Val	Trp
				50				55						60
Asn	Arg	Gln	Gln	Thr	Trp	Leu	Cys	Val	Val	Pro	Leu	Phe	Ile	Gly
				65				70						75

Phe Ile Gly Leu Gly Leu Ser Leu Met Leu Leu Lys Trp Ile Val	80	85	90
Val Gly Ser Val Lys Glu Tyr Val Pro Thr Asp Leu Val Asp Ser	95	100	105
Lys Gly Met Gly Gln Asp Pro Phe Phe Leu Ser Lys Pro Ser Ser	110	115	120
Phe Pro Lys Ala Met Glu Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ser Thr Thr	125	130	135
Ser Pro Ala Thr Pro Ser Ala Gly Gly Ala Ala Ser Ser Arg Thr	140	145	150
Pro Asn Arg Ile Ser Thr Arg Leu Thr Thr Ile Thr Arg Ala Pro	155	160	165
Thr Arg Phe Pro Gly His Arg Val Pro Ile Arg Ala Ser Pro Arg	170	175	180
Ser Thr Thr Ala Arg Asn Thr Ala Ala Pro Ala Thr Val Pro Ser	185	190	195
Thr Thr Ala Pro Phe Phe Ser Ser Ser Thr Leu Gly Ser Arg Pro	200	205	210
Pro Val Pro Gly Thr Pro Ser Thr Gln Ala Met Pro Ser Trp Pro	215	220	225
Thr Ala Ala Tyr Ala Thr Ser Ser Tyr Leu His Asp Ser Thr Pro	230	235	240
Ser Trp Thr Leu Ser Pro Phe Gln Asp Ala Ala Ser Ser Ser Ser	245	250	255
Ser Ser Ser Ser Ser Ala Thr Thr Thr Thr Pro Glu Thr Ser Thr	260	265	270
Ser Pro Lys Phe His Thr Thr Thr Tyr Ser Thr Glu Arg Ser Glu	275	280	285
His Phe Lys Pro Cys Arg Asp Lys Asp Leu Ala Tyr Cys Leu Asn	290	295	300
Asp Gly Glu Cys Phe Val Ile Glu Thr Leu Thr Gly Ser His Lys	305	310	315
His Cys Arg Cys Lys Glu Gly Tyr Gln Gly Val Arg Cys Asp Gln	320	325	330
Phe Leu Pro Lys Thr Asp Ser Ile Leu Ser Asp Pro Thr Asp His	335	340	345
Leu Gly Ile Glu Phe Met Glu Ser Glu Glu Val Tyr Gln Arg Gln	350	355	360
Val Leu Ser Ile Ser Cys Ile Ile Phe Gly Ile Val Ile Val Gly			

365	370	375
Met Phe Cys Ala	Ala Phe Tyr Phe Lys Ser Lys Lys Gln Ala Lys	
380	385	390
Gln Ile Gln Glu	Gln Leu Lys Val Pro Gln Asn Gly Lys Ser Tyr	
395	400	405
Ser Leu Lys Ala	Ser Ser Thr Met Ala Lys Ser Glu Asn Leu Val	
410	415	420
Lys Ser His Val	Gln Leu Gln Asn Tyr Ser Lys Val Glu Arg His	
425	430	435
Pro Val Thr Ala	Leu Glu Lys Met Met Glu Ser Ser Phe Val Gly	
440	445	450
Pro Gln Ser Phe	Pro Glu Val Pro Ser Pro Asp Arg Gly Ser Gln	
455	460	465
Ser Val Lys His	His Arg Ser Leu Ser Ser Cys Cys Ser Pro Gly	
470	475	480
Gln Arg Ser Gly	Met Leu His Arg Asn Ala Phe Arg Arg Thr Pro	
485	490	495
Pro Ser Pro Arg	Ser Arg Leu Gly Gly Ile Val Gly Pro Ala Tyr	
500	505	510
Gln Gln Leu Glu	Glu Ser Arg Ile Pro Asp Gln Asp Thr Ile Pro	
515	520	525
Cys Gln Gly Ile	Glu Val Arg Lys Thr Ile Ser His Leu Pro Ile	
530	535	540
Gln Leu Trp Cys	Val Glu Arg Pro Leu Asp Leu Lys Tyr Ser Ser	
545	550	555
Ser Gly Leu Lys	Thr Gln Arg Asn Thr Ser Ile Asn Met Gln Leu	
560	565	570
Pro Ser Arg Glu	Thr Asn Pro Tyr Phe Asn Ser Leu Glu Gln Lys	
575	580	585
Asp Leu Val Gly	Tyr Ser Ser Thr Arg Ala Ser Ser Val Pro Ile	
590	595	600
Ile Pro Ser Val	Gly Leu Glu Glu Thr Cys Leu Gln Met Pro Gly	
605	610	615
Ile Ser Glu Val	Lys Ser Ile Lys Trp Cys Lys Asn Ser Tyr Ser	
620	625	630
Ala Asp Val Val	Asn Val Ser Ile Pro Val Ser Asp Cys Leu Ile	
635	640	645
Ala Glu Gln Gln	Glu Val Lys Ile Leu Leu Glu Thr Val Gln Glu	
650	655	660

```

Gln Ile Arg Ile Leu Thr Asp Ala Arg Arg Ser Glu Asp Tyr Glu
    665                      670                      675

Leu Ala Ser Val Glu Thr Glu Asp Ser Ala Ser Glu Asn Thr Ala
    680                      685                      690

Phe Leu Pro Leu Ser Pro Thr Ala Lys Ser Glu Arg Glu Ala Gln
    695                      700                      705

Phe Val Leu Arg Asn Glu Ile Gln Arg Asp Ser Ala Leu Thr Lys
    710                      715                      720

```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 360 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: hNRG3 extracellular domain/Amino AcidSeq
- (B) LOCATION: 1-360
- (C) IDENTIFICATION METHOD:
- (D) OTHER INFORMATION:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

```

Met Ser Glu Gly Ala Ala Ala Ala Ser Pro Pro Gly Ala Ala Ser
  1             5             10             15

Ala Ala Ala Ala Ser Ala Glu Glu Gly Thr Ala Ala Ala Ala Ala
    20             25             30

Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Pro Asp Gly Gly Gly Glu Gly Ala
    35             40             45

Ala Glu Pro Pro Arg Glu Leu Arg Cys Ser Asp Cys Ile Val Trp
    50             55             60

Asn Arg Gln Gln Thr Trp Leu Cys Val Val Pro Leu Phe Ile Gly
    65             70             75

Phe Ile Gly Leu Gly Leu Ser Leu Met Leu Leu Lys Trp Ile Val
    80             85             90

Val Gly Ser Val Lys Glu Tyr Val Pro Thr Asp Leu Val Asp Ser
    95             100            105

Lys Gly Met Gly Gln Asp Pro Phe Phe Leu Ser Lys Pro Ser Ser
    110            115            120

Phe Pro Lys Ala Met Glu Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ser Thr Thr
    125            130            135

Ser Pro Ala Thr Pro Ser Ala Gly Gly Ala Ala Ser Ser Arg Thr
    140            145            150

Pro Asn Arg Ile Ser Thr Arg Leu Thr Thr Ile Thr Arg Ala Pro

```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:

(A) LENGTH: 47 amino acids
(B) TYPE: Amino Acid
(D) TOPOLOGY: Linear

(A) NAME/KEY: NRG3 EGF-like domain/amino acid seq.
(B) LOCATION: 1-47
(C) IDENTIFICATION METHOD:
(D) OTHER INFORMATION:

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

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

His Cys Arg Cys Lys Glu Gly Tyr Gln Gly Val Arg Cys Asp Gln
 35 40 45

Phe Leu
 47

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 48 amino acids
 (B) TYPE: Amino Acid
 (D) TOPOLOGY: Linear

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: cARIA.egf
 (B) LOCATION: 1-48
 (C) IDENTIFICATION METHOD:
 (D) OTHER INFORMATION:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:9:

His Leu Thr Lys Cys Asp Ile Lys Gln Lys Ala Phe Cys Val Asn
 1 5 10 15

Gly Gly Glu Cys Tyr Met Val Lys Asp Leu Pro Asn Pro Pro Arg
 20 25 30

Tyr Leu Cys Arg Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln
 35 40 45

Asn Tyr Val
 48

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:10:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 45 amino acids
 (B) TYPE: Amino Acid
 (D) TOPOLOGY: Linear

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: hAR.egf
 (B) LOCATION: 1-45
 (C) IDENTIFICATION METHOD:
 (D) OTHER INFORMATION:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:10:

Lys Lys Asn Pro Cys Asn Ala Glu Phe Gln Asn Phe Cys Ile His
 1 5 10 15

Gly Glu Cys Lys Tyr Ile Glu His Leu Glu Ala Val Thr Cys Lys
 20 25 30

Cys Gln Gln Glu Tyr Phe Gly Glu Arg Cys Gly Glu Lys Ser Met

35

40

45

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:11:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 45 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: hBTC.efg
- (B) LOCATION: 1-45
- (C) IDENTIFICATION METHOD:
- (D) OTHER INFORMATION:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:11:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:12:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 46 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: hEGF.egf
- (B) LOCATION: 1-46
- (C) IDENTIFICATION METHOD:
- (D) OTHER INFORMATION:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:12:

Ser	Asp	Ser	Glu	Cys	Pro	Leu	Ser	His	Asp	Gly	Tyr	Cys	Leu	His
1				5					10					15
Asp	Gly	Val	Cys	Met	Tyr	Ile	Glu	Ala	Leu	Asp	Lys	Tyr	Ala	Cys
				20					25					30
Asn	Cys	Val	Val	Gly	Tyr	Ile	Gly	Glu	Arg	Cys	Gln	Tyr	Arg	Asp
				35					40					45
Leu														
46														

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:13:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 45 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid

(D) TOPOLOGY: Linear

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: hHB-EGF.egf
- (B) LOCATION: 1-45
- (C) IDENTIFICATION METHOD:
- (D) OTHER INFORMATION:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:13:

Lys	Arg	Asp	Pro	Cys	Leu	Arg	Lys	Tyr	Lys	Asp	Phe	Cys	Ile	His
1				5				10					15	
Gly	Glu	Cys	Lys	Tyr	Val	Lys	Glu	Leu	Arg	Ala	Pro	Ser	Cys	Ile
			20					25					30	
Cys	His	Pro	Gly	Tyr	His	Gly	Glu	Arg	Cys	His	Gly	Leu	Ser	Leu
			35					40					45	

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:14:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 49 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: hHRGalpha.egf
- (B) LOCATION: 1-49
- (C) IDENTIFICATION METHOD:
- (D) OTHER INFORMATION:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:14:

His	Leu	Val	Lys	Cys	Ala	Glu	Lys	Glu	Lys	Thr	Phe	Cys	Val	Asn
1				5				10					15	
Gly	Gly	Glu	Cys	Phe	Met	Val	Lys	Asp	Leu	Ser	Asn	Pro	Ser	Arg
			20					25					30	
Tyr	Leu	Cys	Lys	Cys	Gln	Pro	Gly	Phe	Thr	Gly	Ala	Arg	Cys	Thr
			35					40					45	
Glu	Asn	Tyr	Pro											
			49											

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:15:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 48 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: hHRGbeta.egf
- (B) LOCATION: 1-48
- (C) IDENTIFICATION METHOD:
- (D) OTHER INFORMATION:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:15:

His	Leu	Val	Lys	Cys	Ala	Glu	Lys	Glu	Lys	Thr	Phe	Cys	Val	Asn
1				5					10					15
Gly	Gly	Glu	Cys	Phe	Met	Val	Lys	Asp	Leu	Ser	Asn	Pro	Ser	Arg
				20					25					30
Tyr	Leu	Cys	Lys	Cys	Pro	Asn	Glu	Phe	Thr	Gly	Asp	Arg	Cys	Gln
				35					40					45
Asn	Tyr	Val												
				48										

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:16:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 45 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: htGFalpha.egf
- (B) LOCATION: 1-45
- (C) IDENTIFICATION METHOD:
- (D) OTHER INFORMATION:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:16:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:17:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 45 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: mEPR.egf
- (B) LOCATION: 1-45
- (C) IDENTIFICATION METHOD:
- (D) OTHER INFORMATION:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:17:

Gln	Ile	Thr	Lys	Cys	Ser	Ser	Asp	Met	Asp	Gly	Tyr	Cys	Leu	His
1				5					10					15
Gly	Gln	Cys	Ile	Tyr	Leu	Val	Asp	Met	Arg	Glu	Lys	Phe	Cys	Arg
				20					25					30

Cys Glu Val Gly Tyr Thr Gly Leu Arg Cys Glu His Phe Phe Leu
 35 40 45

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:18:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 50 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Oligonucleotide probe
- (B) LOCATION: 1-50
- (C) IDENTIFICATION METHOD:
- (D) OTHER INFORMATION:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:18:

Thr Gly Gly Thr Ala Ala Ala Ala Gly Cys Thr Ala Cys Ala Gly
 1 5 10 15
 Thr Cys Thr Cys Ala Ala Ala Gly Cys Ala Thr Cys Cys Ala Gly
 20 25 30
 Cys Ala Cys Ala Ala Thr Gly Gly Cys Ala Ala Ala Gly Thr Cys
 35 40 45
 Ala Gly Ala Gly Ala
 50

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:19:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 8 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: hNRG3B1 transmembrane proximal 1
- (B) LOCATION: 1-8
- (C) IDENTIFICATION METHOD:
- (D) OTHER INFORMATION:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:19:

Asn Asp Gly Glu Cys Phe Val Ile
 1 5 8

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:20:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 9 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: hNRG3B1 transmembrane proximal 2
- (B) LOCATION: 1-9

- (C) IDENTIFICATION METHOD:
- (D) OTHER INFORMATION:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:20:

Glu Phe Met Glu Ser Glu Glu Val Tyr
1 5 9

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:21:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 466 base pairs
 - (B) TYPE: Nucleic Acid
 - (C) STRANDEDNESS: Single
 - (D) TOPOLOGY: Linear

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: EST Genbank entry H23651
- (B) LOCATION: 1-466
- (C) IDENTIFICATION METHOD:
- (D) OTHER INFORMATION:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:21:

AATTTCTGCC GAAAACTGAT TCCATCTTAT CGGATCCAAC AGACCACTTG 50
GGGATTGAAT TCATGGAGAG TGAAGAAGTT TATCAAAGGC AGGTGCTGTC 100
AATTTTCATGT ATCATCTTTG GAATTGTTCAT CGTGGGCATG TTCTGTGCAG 150
CATTCTACTT CAAAAGCAAG AAACAAGCTA AACAAATCCA AGAGCAGCTG 200
AAAGTGCCAC AAAATGGTAA AAGCTACAGT CTCAAAGCAT CCAGCACAAT 250
GGCAAAGTCA GAGAACTTGG TGAAGAGCCA TGTCCAGCTG CAAAATAAAA 300
TGTCAGGCTT CTGAGCCCAA GCTAAGCCAT CATATCCCCT GTNGACCTGC 350
ACGTGCACAT CCNGATGGCC CGTTTCCTGC CTTTNTGAT GACATTNCA 400
CCACAAATGN AGTGAAATG GGNCTTTTCN TGCCTTAACT GGTGACNTT 450
TTTNCCCCAA AAGGAG 466

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:22:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 2091 base pairs
 - (B) TYPE: Nucleic Acid
 - (C) STRANDEDNESS: Single
 - (D) TOPOLOGY: Linear

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Human NRG3B2 (hNRGB2)
- (B) LOCATION: 1-2091
- (C) IDENTIFICATION METHOD:
- (D) OTHER INFORMATION:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:22:

```
ATGAGTGAAG GGGCGGCCGC TGCCTCGCCA CCTGGTGCCG CTTGGGCAGC 50
CGCCGCCTCG GCCGAGGAGG GCACCGCGGC GGCTGCGGCG GCGGCAGCGG 100
CGGGCGGGGG CCCGGACGGC GCGGCGGAAG GGGCGGCCGA GGGGGGGGG 150
GAGTTACGCT GTAGCGACTG CATCGTGTGG AACCGGCAGC AGACGTGGCT 200
GTGCGTGGTA CCTCTGTTCA TCGGCTTCAT CGGCCTGGGG CTCAGCCTCA 250
TGCTTCTCAA ATGGATCGTG GTGGGCTCCG TCAAGGAGTA CGTGCCCACT 300
GACCTAGTGG ACTCCAAGGG GATGGGCCAG GACCCCTTCT TCCTCTCCAA 350
GCCCAGCTCT TCCCCAAGG CCATGGAGAC CACCACCACT ACCACTTCCA 400
CCACGTCCCC CGCCACCCCC TCCGCCGGGG GTGCCGCCTC CTCCAGGACG 450
CCCAACCGGA TTAGCACTCG CCTGACCACC ATCACGCGGG CGCCCACTCG 500
CTTCCCCGGG CACCGGGTGC CCATCCGGGC CAGCCCGCGC TCCACCACAG 550
CACGGAACAC TGCGGGCCCT GCGACGGTCC CGTCCACCAC GGCCCCGTTC 600
TTCAGTAGCA GCACGCTGGG CTCCCGACCC CCGGTGCCAG GAACTCCAAG 650
TACCCAGGCA ATGCCCTCCT GGCCTACTGC GGCATACGCT ACCTCCTCCT 700
ACCTTCACGA TTCTACTCCC TCCTGGACCC TGTCTCCCTT TCAGGATGCT 750
GCCTCCTCCT TTCTCTCTTC TTCCTCCTCC GCTACCACCA CCACACCAGA 800
AACTAGCACC AGCCCCAAAT TTCATACGAC GACATATTCC ACAGAGCGAT 850
CCGAGCACTT CAAACCCTGC CGAGACAAGG ACCTTGATA CTGTCTCAAT 900
GATGGCGAGT GCTTTGTGAT CGAAACCCTG ACCGGATCCC ATAAACTG 950
TCGGTGCAAA GAAGGCTACC AAGGAGTCCG TTGTGATCAA TTTCTGCCGA 1000
AAACTGATTC CATCTTATCG GATCCAACAG ACCACTTGGG GATTGAATTC 1050
ATGGAGAGTG AAGAAGTTTA TCAAAGGCAG GTGCTGTCAA TTTCATGTAT 1100
CATCTTTGGA ATTGTCATCG TGGGCATGTT CTGTGCAGCA TTCTACTTCA 1150
AAAGCAAGAA ACAAGCTAAA CAAATCCAAG AGCAGCTGAA AGTGCCACAA 1200
AATGGTAAAA GCTACAGTCT CAAAGCATCC AGCACAATGG CAAAGTCAGA 1250
GAACTTGGTG AAGAGCCATG TCCAGCTGCA AAATTATTCA AAGGTGGAAA 1300
GGCATCCTGT GACTGCATTG GAGAAAATGA TGGAGTCAAG TTTTGTGGC 1350
CCCCAGTCAT TCCTGAGGT CCCTTCTCCT GACAGAGGAA GCCAGTCTGT 1400
```

CAAACACCAC AGGAGTCTAT CCTCTTGCTG CAGCCCAGGG CAAAGAAGTG 1450
 GCATGCTCCA TAGGAATGCC TTCAGAAGGA CACCCCCGTC ACCCCGAAGT 1500
 AGGCTAGGTG GAATTGTGGG ACCAGCATAT CAGCAACTCG AAGAATCAAG 1550
 GATCCCAGAC CAGGATACGA TACCTTGCCA AGGGTATTCA TCCAGTGGTT 1600
 TAAAAACCCA ACGAAATACA TCAATAAATA TGCAACTGCC TTCAAGAGAG 1650
 ACAAACCCCT ATTTTAATAG CTTGGAGCAA AAGGACCTGG TGGGCTATTC 1700
 ATCCACAAGG GCCAGTTCTG TGCCCATCAT CCCTTCAGTG GGTTTAGAGG 1750
 AAACCTGCCT GCAATGCCA GGGATTCTG AAGTCAAAG CATCAAATGG 1800
 TGCAAAACT CCTATTGAGC TGACGTTGTC AATGTGAGTA TTCCAGTCAG 1850
 CGATTGTCTT ATAGCAGAAC AACAAGAAGT GAAAATATTG CTAGAACTG 1900
 TCCAGGAGCA GATCCGAATT CTGACTGATG CCAGACGGTC AGAAGACTAC 1950
 GAACTGGCCA GCGTAGAAC CGAGGACAGT GCAAGTGAAA ACACAGCCTT 2000
 TCTCCCCCTG AGTCCCACAG CCAATCAGA ACGAGAGGCG CAATTTGTCT 2050
 TAAGAAATGA AATACAAAGA GACTCTGCAT TGACCAAGTG A 2091

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:23:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 696 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Human NRG3B2
- (B) LOCATION: 1-696
- (C) IDENTIFICATION METHOD:
- (D) OTHER INFORMATION:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:23:

Met	Ser	Glu	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Ser	Pro	Pro	Gly	Ala	Ala	Ser
1				5				10						15
Ala	Ala	Ala	Ala	Ser	Ala	Glu	Glu	Gly	Thr	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala
				20				25						30
Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Gly	Pro	Asp	Gly	Gly	Gly	Glu	Gly	Ala
				35				40						45
Ala	Glu	Pro	Pro	Arg	Glu	Leu	Arg	Cys	Ser	Asp	Cys	Ile	Val	Trp
				50				55						60
Asn	Arg	Gln	Gln	Thr	Trp	Leu	Cys	Val	Val	Pro	Leu	Phe	Ile	Gly
				65				70						75

Phe Ile Gly Leu Gly Leu Ser Leu Met Leu Leu Lys Trp Ile Val	80	85	90
Val Gly Ser Val Lys Glu Tyr Val Pro Thr Asp Leu Val Asp Ser	95	100	105
Lys Gly Met Gly Gln Asp Pro Phe Phe Leu Ser Lys Pro Ser Ser	110	115	120
Phe Pro Lys Ala Met Glu Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ser Thr Thr	125	130	135
Ser Pro Ala Thr Pro Ser Ala Gly Gly Ala Ala Ser Ser Arg Thr	140	145	150
Pro Asn Arg Ile Ser Thr Arg Leu Thr Thr Ile Thr Arg Ala Pro	155	160	165
Thr Arg Phe Pro Gly His Arg Val Pro Ile Arg Ala Ser Pro Arg	170	175	180
Ser Thr Thr Ala Arg Asn Thr Ala Ala Pro Ala Thr Val Pro Ser	185	190	195
Thr Thr Ala Pro Phe Phe Ser Ser Ser Thr Leu Gly Ser Arg Pro	200	205	210
Pro Val Pro Gly Thr Pro Ser Thr Gln Ala Met Pro Ser Trp Pro	215	220	225
Thr Ala Ala Tyr Ala Thr Ser Ser Tyr Leu His Asp Ser Thr Pro	230	235	240
Ser Trp Thr Leu Ser Pro Phe Gln Asp Ala Ala Ser Ser Ser Ser	245	250	255
Ser Ser Ser Ser Ser Ala Thr Thr Thr Thr Pro Glu Thr Ser Thr	260	265	270
Ser Pro Lys Phe His Thr Thr Thr Tyr Ser Thr Glu Arg Ser Glu	275	280	285
His Phe Lys Pro Cys Arg Asp Lys Asp Leu Ala Tyr Cys Leu Asn	290	295	300
Asp Gly Glu Cys Phe Val Ile Glu Thr Leu Thr Gly Ser His Lys	305	310	315
His Cys Arg Cys Lys Glu Gly Tyr Gln Gly Val Arg Cys Asp Gln	320	325	330
Phe Leu Pro Lys Thr Asp Ser Ile Leu Ser Asp Pro Thr Asp His	335	340	345
Leu Gly Ile Glu Phe Met Glu Ser Glu Glu Val Tyr Gln Arg Gln	350	355	360
Val Leu Ser Ile Ser Cys Ile Ile Phe Gly Ile Val Ile Val Gly			

365	370	375
Met Phe Cys Ala	Ala Phe Tyr Phe Lys Ser Lys Lys Gln Ala Lys	
380	385	390
Gln Ile Gln Glu	Gln Leu Lys Val Pro Gln Asn Gly Lys Ser Tyr	
395	400	405
Ser Leu Lys Ala	Ser Ser Thr Met Ala Lys Ser Glu Asn Leu Val	
410	415	420
Lys Ser His Val	Gln Leu Gln Asn Tyr Ser Lys Val Glu Arg His	
425	430	435
Pro Val Thr Ala	Leu Glu Lys Met Met Glu Ser Ser Phe Val Gly	
440	445	450
Pro Gln Ser Phe	Pro Glu Val Pro Ser Pro Asp Arg Gly Ser Gln	
455	460	465
Ser Val Lys His	His Arg Ser Leu Ser Ser Cys Cys Ser Pro Gly	
470	475	480
Gln Arg Ser Gly	Met Leu His Arg Asn Ala Phe Arg Arg Thr Pro	
485	490	495
Pro Ser Pro Arg	Ser Arg Leu Gly Gly Ile Val Gly Pro Ala Tyr	
500	505	510
Gln Gln Leu Glu	Glu Ser Arg Ile Pro Asp Gln Asp Thr Ile Pro	
515	520	525
Cys Gln Gly Tyr	Ser Ser Ser Gly Leu Lys Thr Gln Arg Asn Thr	
530	535	540
Ser Ile Asn Met	Gln Leu Pro Ser Arg Glu Thr Asn Pro Tyr Phe	
545	550	555
Asn Ser Leu Glu	Gln Lys Asp Leu Val Gly Tyr Ser Ser Thr Arg	
560	565	570
Ala Ser Ser Val	Pro Ile Ile Pro Ser Val Gly Leu Glu Glu Thr	
575	580	585
Cys Leu Gln Met	Pro Gly Ile Ser Glu Val Lys Ser Ile Lys Trp	
590	595	600
Cys Lys Asn Ser	Tyr Ser Ala Asp Val Val Asn Val Ser Ile Pro	
605	610	615
Val Ser Asp Cys	Leu Ile Ala Glu Gln Gln Glu Val Lys Ile Leu	
620	625	630
Leu Glu Thr Val	Gln Glu Gln Ile Arg Ile Leu Thr Asp Ala Arg	
635	640	645
Arg Ser Glu Asp	Tyr Glu Leu Ala Ser Val Glu Thr Glu Asp Ser	
650	655	660

Ala Ser Glu Asn Thr Ala Phe Leu Pro Leu Ser Pro Thr Ala Lys
665 670 675

Ser Glu Arg Glu Ala Gln Phe Val Leu Arg Asn Glu Ile Gln Arg
680 685 690

Asp Ser Ala Leu Thr Lys
695 696

1. A polypeptide comprising an amino acid sequence encoding an EGF-like domain, wherein the amino acid sequence has the binding characteristics of NRG3.
2. The polypeptide of claim 1 wherein the binding characteristics of NRG3 comprise
 - (a) binding to ErbB4 receptor but not to ErbB2 receptor or ErbB3 receptor under experimentally comparable conditions; and
 - (b) activation of ErbB4 receptor tyrosine phosphorylation.
3. The polypeptide of claim 1 wherein the amino acid sequence has at least 75% amino acid sequence homology to the amino acid sequence SEQ ID NO:4.
4. The polypeptide of claim 1, wherein the polypeptide binds to the ErbB4 receptor and stimulates tyrosine phosphorylation of the ErbB4 receptor.
5. A polypeptide that binds ErbB4 receptor, which polypeptide is selected from the group consisting of
 - (a) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 75% sequence homology to the extracellular domain NRG3 (SEQ ID NO:3 or 7).
 - (b) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 75% sequence homology to SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:6;
 - (c) a further mammalian homologue of polypeptide (a) or (b);
 - (d) a soluble form of any of the polypeptides (a) - (c) having a transmembrane domain that cannot anchor the polypeptide in a cell membrane; and
 - (e) a derivative of any of the polypeptides (a) - (d) having the binding characteristics of NRG3.
6. The polypeptide of claim 1 encoded by a NRG3 nucleic acid open reading frame sequence in ATCC deposit 209156 (pLXSN.mNRG3).
7. The polypeptide of claim 1 encoded by a NRG3 nucleic acid open reading frame sequence in ATCC deposit 209157 (pRK5.tk.neo.hNRG3B1).
8. The polypeptide of claim 1 encoded by a NRG3 nucleic acid open reading frame sequence in ATCC deposit 209297 (pRK5.tk.neo.hNRG3B2).
9. The polypeptide of claim 1 which is devoid of a cytoplasmic domain, or devoid of a transmembrane domain that can anchor the polypeptide in a cell membrane, or both.
10. The polypeptide of claim 1 unaccompanied by native glycosylation.
11. The polypeptide of claim 1 which has a variant glycosylation.
12. An antagonist of the polypeptide of claim 1.
13. An agonist of the polypeptide of claim 1.
14. An isolated nucleic acid molecule encoding the polypeptide of claim 1.
15. The nucleic acid molecule of claim 14 further encoding the extracellular domain of a mammalian NRG3.
16. The nucleic acid molecule of claim 15, wherein the encoded extracellular domain has at least 75% amino acid sequence identity to the amino acid sequence of SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:7.

17. The nucleic acid molecule of claim 14 wherein the encoded amino acid sequence is devoid of a cytoplasmic domain or a transmembrane domain that can anchor the polypeptide in a cell membrane, or both.
18. An expression vector comprising the nucleic acid molecule of claim 14 operably linked to control sequences recognized by a host cell transformed with the vector.
19. An expression vector according to claim 18 obtainable as ATCC 209156 (pLXSN.mNRG3).
20. An expression vector according to claim 18 obtainable as ATCC 209157 (pRK5.tk.neo.hNRG3B1).
21. An expression vector according to claim 18 obtainable as ATCC 209297 (pRK5.tk.neo.hNRG3B2).
22. A host cell comprising the vector of claim 18.
23. The host cell of claim 22 which is a mammalian cell.
24. The host cell of claim 23 which is a Chinese hamster ovary cell line.
25. A method for producing the amino acid sequence encoding an EGF-like domain that binds ErbB4 receptor, the method comprising:
 - a) culturing a cell comprising the nucleic acid of claim 14; and
 - b) recovering the polypeptide from the cell culture.
26. The method of claim 25 wherein the polypeptide is secreted into the culture medium and recovered from the culture medium.
27. An antibody that specifically binds to the polypeptide of claim 1.
28. A hybridoma cell line producing the antibody of claim 27.
29. An immunoadhesin comprising the polypeptide of claim 1 fused to an immunoglobulin sequence.
30. The immunoadhesin of claim 29, further comprising the EGF-like domain of SEQ ID NO:4.
31. The immunoadhesin of claim 29 wherein the immunoglobulin sequence is an immunoglobulin heavy chain constant domain sequence.
32. The immunoadhesin of claim 31 wherein the immunoglobulin sequence is a constant domain sequence of an IgG-1, IgG-2 or IgG-3.
33. A method of detecting an NRG3 in a sample, the method comprising:
 - a) contacting the antibody of claim 27 with the sample;
 - b) detecting binding of the antibody to a polypeptide in the sample, wherein the polypeptide is an NRG3.
34. A method of detecting ErbB4 receptor in a sample, the method comprising:
 - a) contacting the polypeptide of claim 1 with the sample; and
 - b) detecting binding of the amino acid sequence to a protein in the sample.
35. The method of claim 34 wherein the sample comprises a cell expressing ErbB4 receptor on its surface.
36. The method of claim 35 wherein the sample is a mammalian tissue sample.
37. A method of administering a NRG3 polypeptide to a mammal experiencing a disorder treatable with NRG3.

wherein the method comprises introducing into the mammal a cell comprising the nucleic acid of claim 1

14, and

wherein the NRG3 polypeptide is secreted by the cell.

38. The method of claim 37 wherein the cell is contained within a porous matrix and the matrix

is administered to the mammal.

1 Abstract

The invention concerns a novel neuregulin related ligand (NRG3) including fragments and variants thereof, as new members of the neuregulin family of compounds. The invention also concerns methods and means for producing NRG3. The native polypeptides of the invention are characterized by containing an extracellular domain including an EGF-like domain, a transmembrane domain and a cytoplasmic domain. Isolated nucleotide sequences encoding such polypeptides, expression vectors containing the nucleotide sequences, recombinant host cells transformed with vectors, and methods for the recombinant production for the novel NRG3s are also within the scope of the invention.

2 Representative Drawing

None

CTGACGGCGGGGGCGCCCGGGGCGGTCTGCCCTCTACCGAGGGCTCGGGCC
CCTCCGGGCGGGCTCCCTCCCGCTCTCTCTCCCGCGCGCGCGGCTCTC
GGGGGAAGGCTGGGGGAGGAGGACGATTGATCGGCGCGCGGGCGGCTC
CTGACGGGAGGCGCGCGCGCGGAGCGCGCCGCGCGCGCGCGCGCGCGC
CGGCGCATGCTCTGGCGGGGCTCGGGGGGGGAAGTGGAATCGGCTCTAG
GATAGTGAAGGGCGCGCGCTGCTCCGCAACTGTTGCGGCTTCGGCAGCGCGC
GTATCGGAGGAGGACGACGCGCGGCTCGCGCGCGCGCGCGCGCGGGGG
CGGACGGCGCGGGAAGGAGGGGCGGCGCAAGCGCGGAGTACGTTGATGGC
CAGTCGTTGGAAGCCGACAGACGAGTGTTGTCGTTGGTCTGTATCGGCT
CATGCGCTGGGGCTACGCTTACGTCCTTAAAGTATGCTGTAGGCTCCGTAAG
GAGGACTGGGACCGACGCACTGTTGGACTCAAGGAATGGGCGAGACCCCTTCTTC
TCCAAGCCAGCTCTTTCCCCAAGCTATGGAAGAACCAACAACCACTCTTACC
AGTCCCCCGGACCCCTCTCGCGCGCGCGCTTCTTCAGGACGCTAACCGA
TTAGCACCGGCTTGACCACTACACCGGACCAACCCGCTTCCCTGGGACCGGGT
TCCCATCGGGCTAGCGGGCTTCTACACGACGGAACGACTGTCGCCCTCCGAG
TGCTTGCCATCGCGGCTTCTTCTATAGCAGCAGCGCGGCTCCGACCCCGACT
GCCGAGGCGCCCAATCGACGCGGAGTGCCTTCTGGCCCACTCGCGGCTATGCC
TCTCCTCACTCAGATTCTCACTCCTCTGACCGCTTCACTCTTCAGATGGCTG
TGCGGCTCTCTCTCACTCTTCCACTCTCCCACTACACCCCAACCGAAGAACT
GACACCGGCAAACTTCTACTACAACTACTCACTCAAGCATGTAGACATCTAA
AGCCTTCGAGACAGGACCTGGCGTATGTTCTCAATGATGGTGAATGTTGTGAT
GAGACCTTCAGAGATCCCTAAGGACTCGGTGCGAGGAAGGAGCTACCAAGGAG
GTTTGTAATCTTTCGGGAAACAGACTCATCTTATCGGATCCAAACAGCAACT
GGGATGTGAATCTGAGAGTGGAAGCTTTAAAGGCGAGCTGTGCAATTTCA
TGATCATCTTTGGAATTGTACCTGGGGCATGTTCTGTGACGATCTGTCAAAG
CAAGAAACAGCTAAACAAATACGAGGACCTAGGAAGACGACAGAAATGGGA
CTACAGCTCAAGGCTACGACCAAAATCTGAGAGCTGTATGGAAGAGCACTGTCCAT
CTACAAATAATTCAGAGCGGATAGGCATCTGTGATCGGCTGGAGAAATAATG
AGTCAAGTTTTCAGGCTCCGATGTTTCCAGAAAGTCACTTCTCTCGACGGAAG
CCAGCTTCAACAGCACAGCCGAGCAAGGATGGGATGTGCATAGGAATTA
TTTCAAGAGGCGACCCCTCACCCGAAAGTCAGTGGTGGTTATGTAGGACAGA
TATCAACAACTTGAAGATTAACCAATTCGACAGGATACGATACGCTTGCAAGG
TAGAGGTCAGGAAGACTATAAGGACTCGGCTACAGGTTGTGTGTGTGTAAGAGC
CTTGAATTAAGATGTGTGCAATGGCTTAAGAACAGAAATGCATCAATAAT
GTGAACTGCCCTCAGAGAACAAACCCCTATTTAAAGCTTGAATCAAAAGG
TGGTGGGTTATTTATCCCAAGGGCAATTCTGTGCCCATCACTCCGCTCGATGGGTCA
GAAGAAAGCTCGATAGGAGTCGAGGAGTTCTGACGTCAAGCACTAAATGGTCA
AAAATCTCTACTCCGCTGACATTTGTCAACGGGAGTATGCCAGTCAGTTGATGTTCTA
GAAGAACACAGAGGTGAAATAATTTACTAGAGCTGTGACGAGAACAGATCCGGATT
CTGACTGATGCCAAGGCTGCAAGAACTGCAACTGGCCAGCATGGAATCTGAGGAC
AGTGGCGGCGAAACAGACGCTTTCTCCCCCTGAGTCCCGCCGCAATCAAGACGAG
AGGCACAATTTGTTTAAAGAAATGAATAACAAGAGCACTGTGCTGTACCAACTGACT
GGAATGTGATGAAGATCTGTCATTAATGTTTGTCTTGAACAGAGGAGGAAATTA
ATAACAAATTTATTAATGCTATTTTAAAGCTACTTCTAGAAAGC

TCAACGGCATATTGGAATCTCAACATGGCTGGTGGGACAGTACTCTTACGGAGCGCCAC
 CACGATTCATTGTAGGACATGAGGCGCGGCCCATGCTCTTCCGGCGGCGCTCGGGG
 GGGCGAAGGTGAANACCGGCTCCTAGGAAGTACTGAAGGGGCGGCGCTCGCCGCTGCA
 CCTGTGTCGGCTTTCGGCAGACCGCGGCTCGGCCGAGGAGGACCGCGGCTCGCTCGG
 GCGGCGGAGCGCGGCGGGCGGGGGCCGAGCGAGCGGCGGCGCAAGGGGCGCCGAGCC
 CCCCCGGGAGTATACGCTGTAGCAGATGCATCGTGTGGAAACCGGCACGACAGCTGGCT
 GTGCTGTGTACTCTTGTTATCGGCTTCACTGGCGTGGGGTCAAGCTCATGCTTCTTCA
 ATAGGATCGTGGTGGGTCGCTGACGAAGGATACGTGCCACCGACTATGTGAGTACCA
 GGGGATGGGCGAGGACCCCTTCTCTCTTCCAAGGACGCTCTTTCCEAAGGCGGCTG
 GAGACACCCACCACTACCACTTCCACACGTCCCCCGCAACCCCTCGCCGCGGGGTG
 CGGCTCTCTACGAGCGGCCAACCGGTAGTACGTGCGTGAACCACTACGAGGCGG
 GCCCATCGCTTCCCCGGGACCGGGTGCCCTTCCGGGCAACGCCCGCTCCACACA
 CACGGAACAACCTCGGCCCGCTGCGAGCGTGGCTTCCACACGCGCCGCTGTTCAGTA
 GCAGCAGCTCGGGCTCCGACCCCGCGGTGCCAGGAACCTCAAAGTACCCAGGAGATGCC
 CTCTCGGCTACTCGGGCATACGCTACGCTCTCTCTCTCTCTCAAGTTACTACTCCCTCT
 GGACCTTGTCTCTCTTTCAGAGTGTCTGCTCTCTTCTTCTCTTCTCTCTCTCGGTA
 CCACACACCAACGACAAATACAGCACCAGCCCCAAATTTATACAGGACGATATTTCC
 AGAGCGATCTCGAGCACTTCAACACGCTCGGACGAGCAAGGACTTGCACTGTCTCAAT
 GATGGCGAGTCTGTGTGATCGAAACGCGCCGGGATCCCAAAACACTGTTCGGTGCA
 AAGAAGGCTACCAAGGATCGGCTGTGTATCAATTCTCGGCCCAAACTGATTCATCTT
 ATCGGATCCAACGAGCACTTGGGATGTGAATCTATGGAGATGTGACGAAGTTATCA
 AGGCAGGTGCTGCTCAATTTCAATGTATCATCTTGTGAATGTGATCGTGGGAGTTCTG
 TGCAGCATTTACTTCAAAAGCAAGAACAGCAAGTAAACAAATCCAAGGACGCTGAA
 AGTGCCAAAAATGGTAAAGCTACGATGCTCAAAGCTACGACCAATGGCAAAATG
 AGAGAATCTGGTGAAGAGCCATGTCCAGCTGCAAAATTTGTCAAAGGTGGAAAGGCA
 TCTGTGACTGCATTTGGGAAAGAAATGATGAGGATCAAGTTTGTCCGCCCCGACGATTC
 CTGTAGGCTGCCCTTCTCTGACAGAGAGGACGACTGTGTAACACGCCACAGGATCTAT
 CTTCTTGTCTGACGCCCGGGCAAGAAGATGGCATGTCTCCATAGGAATGCTCTCAGAG
 GACACCCCGCTCACCCCGAAGTGGAGTGGTGAATTTGTGGACGAGCATATGACA
 ACTCGAAGATCAAGGATCCGACACGAGGATACGATACACTGCCACGGGATAGAGG
 CAGGAAGACTATTCCCACTGGCTATACAGTGTGGTGTGTGAAAGACCCCTGGAC
 TTAAGATTTATCTCCAGGTGTTTAAAAACCCAAAGAAATACATCAATAATATGCAAC
 TGCCTTTCAAGAGAGGAAACCCCTATTTTAATAGCTTGAGGACAAAGGACGTGGGG
 CTATTCTCAAAAGGGGCAAGTCTGTGCGGCATCATCCTTCTGAGTGGGTTTGGAGAA
 ACCTGCTCCGAATGTCCAGGAGATTTCTGAAGTCAAAGACTCAATGTGTGAAAACT
 CTATTACAGTGTAGCTTGTCAATGTGAGTATTCAGTCAGCGATGTCTTATAGCA
 ACAACAGAAGATGAAATATGTGTAGAAATCTGGACGAGGATCGATCCGATCTGACT
 GATGCCAGCGGTGACGAAGACTAGCAATGGCCAGCGTGAAGAACGAGGACGTGCA
 ACGGAAACCAACAGCCTTCTCCCCCTAGGTGCCACAGCCAAATCAAGACGAGAGCGGC
 AATTGTCTTAAGAAATAGAAATACAAAGAGACTCTGATTGACCAATGCACTGTAGAT
 GTGAGAACTGTGCATTTCTATGCTTGTCTCAACGAGAAAGAGAGCAAAATCAAATTCG
 ATTTATTTATGTGCATTAATTTAAGAGCATCTACTTGAAGAAACCAAAATGCTATCCG
 CTTCATATCATAGTGTGTTTTTAAACAAATATTTTTTAAGGGAAGAAATGTTTCAGGA
 GGGTAAAGCTTT

FIG. 1

FIG. 2

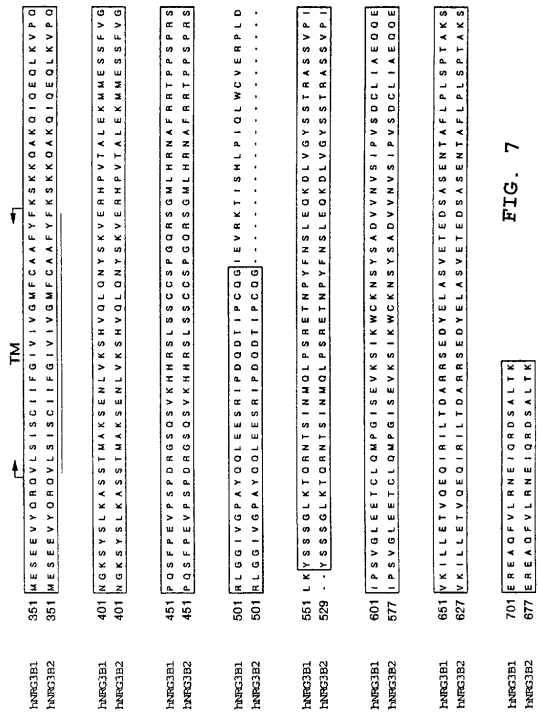


FIG. 7

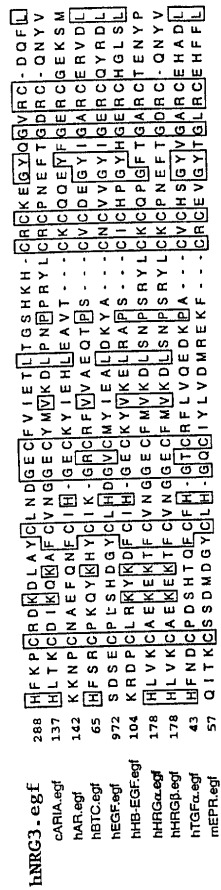


FIG. 8

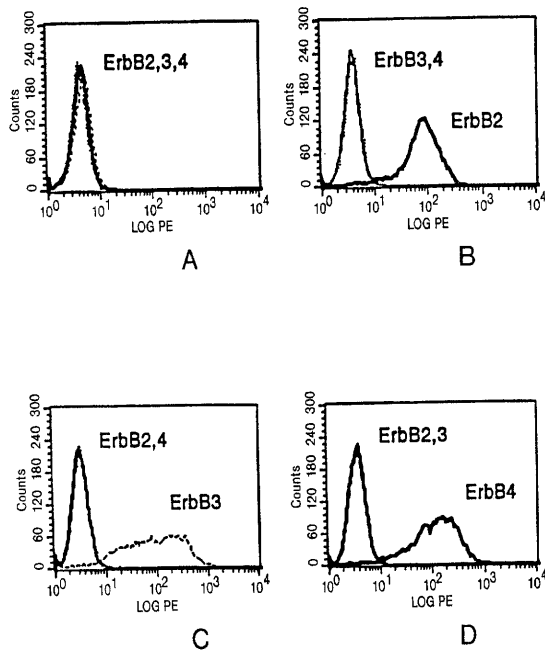


FIG. 9

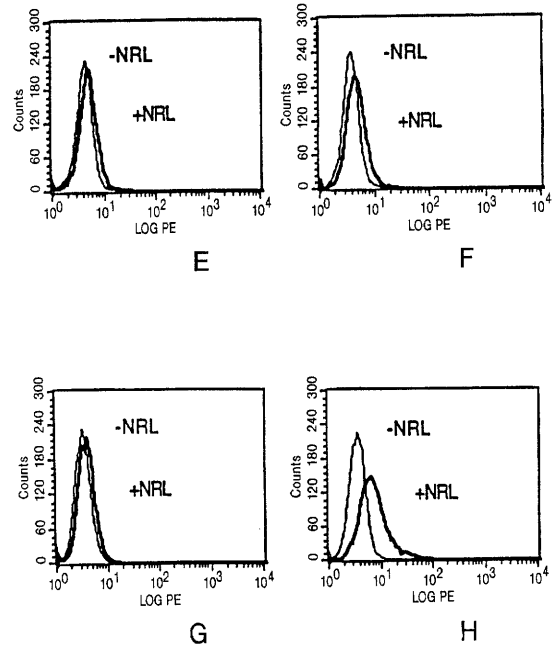


FIG. 10

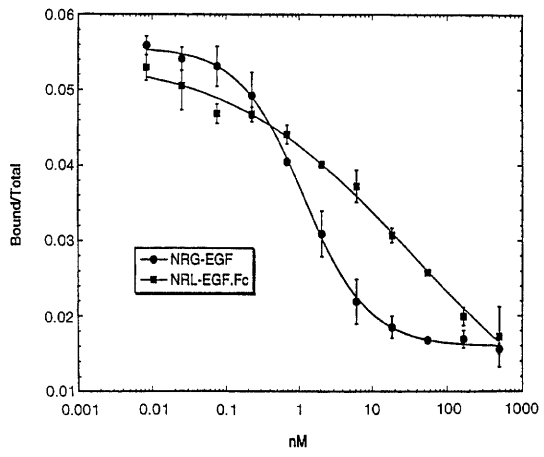


FIG. 11

专利名称(译)	ErbB4受体特异性神经调节蛋白相关配体及其用途		
公开(公告)号	JP2009077716A	公开(公告)日	2009-04-16
申请号	JP2008246657	申请日	2008-09-25
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	ポールジェイゴドウスキ メラニーアールマーク ドンシャオチャン		
发明人	ポール・ジェイ・ゴドウスキ メラニー・アール・マーク ドン・シャオ・チャン		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/475 C07K16/22 C12N5/10 C12P21/02 C07K19/00 C12Q1/02 G01N33/53 A61K38/00 A61K45/00 A61K48/00 A61K39/395 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/08 A61P25/16 A61P25/28 A61P25/14 A61P21/04 A61P27/16 A61P35/00 A61P17/06 A61P9/10 A61P3/00 A61P43/00 A61K38/22 C12N15/12 C12P21/08		
CPC分类号	A61K38/00 A61K2039/51 A61P3/00 A61P9/10 A61P17/06 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P27/16 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/4756 C07K2319/00 Y02A50/466		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/475 C07K16/22 C12N5/00.B C12P21/02.H C07K19/00 C12Q1/02 G01N33/53.D A61K37/02 A61K45/00 A61K48/00 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P25/00.101 A61P25/02 A61P25/00 A61P25/08 A61P25/16 A61P25/28 A61P25/14 A61P21/04 A61P27/16 A61P35/00 A61P17/06 A61P9/10 A61P3/00 A61P43/00.111 A61K38/00 A61K38/01 A61K38/16 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.102 C12N5/12		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA21 4B024/BA56 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QR33 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS05 4B063/QS36 4B063/QX02 4B064/AG13 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA17 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZA012 4C084/ZA022 4C084/ZA062 4C084/ZA162 4C084/ZA182 4C084/ZA202 4C084/ZA342 4C084/ZA402 4C084/ZA892 4C084/ZA942 4C084/ZB262 4C084/ZC412 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC21 4C085/DD88 4C085/EE01 4C085/GG01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/DA20 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	渡边 隆 村山彦		
优先权	60/052019 1997-07-09 US 08/899437 1997-07-24 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供NRG3，其是具有不同于NRG1和NRG2的EGF样结构域的EGF样结构域的新型多肽。一种新型的ErbB4受体特异性蛋白，基于神经调节蛋白（NRG1）家族的新成员的鉴定，重组产生和表征。该蛋白质参与细胞增殖和分化，上皮发育，心脏

发育，神经发育，并充当神经胶质有丝分裂原以及间充质和神经元因子。[选择图]无