

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680053626.2

[51] Int. Cl.

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

C07K 14/475 (2006.01)

[43] 公开日 2009年3月25日

[11] 公开号 CN 101394861A

[22] 申请日 2006.12.29

[21] 申请号 200680053626.2

[30] 优先权

[32] 2005.12.30 [33] US [31] 60/755,124

[32] 2006.1.13 [33] US [31] 60/758,626

[86] 国际申请 PCT/CN2006/003694 2006.12.29

[87] 国际公布 WO2007/076701 英 2007.7.12

[85] 进入国家阶段日期 2008.9.1

[71] 申请人 上海泽生科技开发有限公司

地址 201203 中国上海市浦东张江高科技园
区碧波路328号

[72] 发明人 周明东

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 赵蓉民 路小龙

权利要求书 10 页 说明书 56 页 序列表 1 页
附图 3 页

[54] 发明名称

纽兰格林持续给药能改善心脏功能

[57] 摘要

本发明提供含有纽兰格林的持续释放组合物以预防、治疗或延迟各种疾病或紊乱。本发明还提供了通过纽兰格林持续给药来预防、治疗或延迟各种疾病或紊乱的方法。

1. 一种预防、治疗、或延迟哺乳动物疾病或不适的方法，该方法包括给哺乳动物持续施用纽兰格林。
2. 权利要求 1 中的方法，其中给哺乳动物持续施用纽兰格林诱导心脏细胞 ERK 信号传导途径的持续活化。
3. 权利要求 1 中的方法，其中给哺乳动物持续施用纽兰格林诱导心脏细胞 AKT 信号传导途径的持续活化。
4. 权利要求 1 中的方法，其中的疾病是指心力衰竭。
5. 权利要求 1 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 提高该哺乳动物的 EF 值。
6. 权利要求 5 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 提高该哺乳动物的 FS 值。
7. 权利要求 6 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 能预防心脏肥大。
8. 权利要求 1 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 是通过使用渗透压泵或注射器泵来完成的。
9. 权利要求 1 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 是通过将一种多聚物耦联到纽兰格林上来完成的。
10. 权利要求 9 中的方法，其中的多聚物是聚乙二醇。
11. 权利要求 9 中的方法，其中的多聚物是聚乙二醇衍生物。

-
12. 权利要求 1 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 是通过使用脂质体来完成的。
 13. 权利要求 1 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 是通过使用微球体来完成的。
 14. 一种活化心脏中 AKT 信号传导途径的方法包括给哺乳动物持续施用 NRG。
 15. 权利要求 14 中的方法，其中给哺乳动物持续施用纽兰格林也能诱导心脏细胞 ERK 信号传导途径的持续活化。
 16. 权利要求 14 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 能提高该哺乳动物的 EF 值。
 17. 权利要求 14 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 能提高该哺乳动物的 FS 值。
 18. 权利要求 14 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 能预防心脏肥大。
 19. 权利要求 14 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 是通过使用渗透压泵或注射器泵来完成的。
 20. 权利要求 14 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 是通过将一种多聚物耦联到纽兰格林上来完成的。
 21. 权利要求 20 中的方法，其中的多聚物是聚乙二醇。
 22. 权利要求 20 中的方法，其中的多聚物是聚乙二醇衍生物。
 23. 权利要求 14 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 是通过使

用脂质体来完成的。

24. 权利要求 14 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 是通过使用微球体来完成的。

25. 一种活化心脏中 ERK 信号传导途径的方法包括给哺乳动物持续施用 NRG。

26. 权利要求 25 中的方法，其中给哺乳动物持续施用纽兰格林也能诱导心脏细胞 AKT 信号传导途径的持续活化。

27. 权利要求 25 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 能提高该哺乳动物的 EF 值。

28. 权利要求 25 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 能提高该哺乳动物的 FS 值。

29. 权利要求 25 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 能预防心脏肥大。

30. 权利要求 25 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 是通过使用渗透压泵或注射器泵来完成的。

31. 权利要求 25 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 是通过将一种多聚物耦联到纽兰格林上来完成的。

32. 权利要求 31 中的方法，其中的多聚物是聚乙二醇。

33. 权利要求 31 中的方法，其中的多聚物是聚乙二醇衍生物。

34. 权利要求 25 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 是通过使用脂质体来完成的。

-
35. 权利要求 25 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 是通过使用微球体来完成的。
36. 一种提高哺乳动物 EF 值的方法包括给哺乳动物持续施用 NRG。
37. 权利要求 36 中的方法，其中给哺乳动物持续施用纽兰格林能诱导心脏细胞 ERK 信号传导途径的持续活化。
38. 权利要求 36 中的方法，其中给哺乳动物持续施用纽兰格林能诱导心脏细胞 AKT 信号传导途径的持续活化。
39. 权利要求 36 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 能提高该哺乳动物的 FS 值。
40. 权利要求 36 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 能预防心脏肥大。
41. 权利要求 36 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 是通过使用渗透压泵或注射器泵来完成的。
42. 权利要求 36 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 是通过将一种多聚物耦联到纽兰格林上来完成的。
43. 权利要求 42 中的方法，其中的多聚物是聚乙二醇。
44. 权利要求 42 中的方法，其中的多聚物是聚乙二醇衍生物。
45. 权利要求 36 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 是通过使用脂质体来完成的。
46. 权利要求 36 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 是通过使

用微球体来完成的。

47. 一种提高哺乳动物 FS 值的方法包括给哺乳动物持续施用 NRG。

48. 权利要求 47 中的方法，其中给哺乳动物持续施用纽兰格林能诱导心脏细胞 ERK 信号传导途径的持续活化。

49. 权利要求 47 中的方法，其中给哺乳动物持续施用纽兰格林能诱导心脏细胞 AKT 信号传导途径的持续活化。

50. 权利要求 47 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 能提高该哺乳动物的 EF 值。

51. 权利要求 47 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 能预防心脏肥大。

52. 权利要求 47 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 是通过使用渗透压泵或注射器泵来完成的。

53. 权利要求 47 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 是通过将一种多聚物耦联到纽兰格林上来完成的。

54. 权利要求 53 中的方法，其中的多聚物是聚乙二醇。

55. 权利要求 53 中的方法，其中的多聚物是聚乙二醇衍生物。

56. 权利要求 47 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 是通过使用脂质体来完成的。

57. 权利要求 47 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 是通过使用微球体来完成的。

-
58. 一种预防心脏肥大的方法包括给哺乳动物持续施用恒定的低剂量 NRG。
59. 权利要求 58 中的方法，其中给哺乳动物持续施用恒定的低剂量纽兰格林能诱导心脏细胞 ERK 信号传导途径的持续活化。
60. 权利要求 58 中的方法，其中给哺乳动物持续施用恒定的低剂量纽兰格林能诱导心脏细胞 AKT 信号传导途径的持续活化。
61. 权利要求 58 中的方法，其中给哺乳动物持续施用恒定的低剂量 NRG 能提高该哺乳动物的 FS 值。
62. 权利要求 58 中的方法，其中给哺乳动物持续施用恒定的低剂量 NRG 能提高该哺乳动物的 EF 值。
63. 权利要求 58 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 是通过使用渗透压泵或注射器泵来完成的。
64. 权利要求 58 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 是通过将一种多聚物耦联到纽兰格林上来完成的。
65. 权利要求 64 中的方法，其中的多聚物是聚乙二醇。
66. 权利要求 64 中的方法，其中的多聚物是聚乙二醇衍生物。
67. 权利要求 58 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 是通过使用脂质体来完成的。
68. 权利要求 58 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 是通过使用微球体来完成的。
69. 一种促进心肌细胞生长和分化的方法，该方法包括给哺乳动物持

续施用恒定的低剂量 NRG 而活化心脏细胞中的 MAP 激酶途径进而促进心肌细胞的生长和/或分化。

70. 一种促进心肌细胞生长和分化的方法，该方法包括给哺乳动物持续施用恒定的低剂量 NRG 而活化心脏细胞中的 ERK 途径并促进心肌细胞的生长和分化。
71. 一种促进心肌细胞生长和分化的方法，该方法包括给哺乳动物持续施用恒定的低剂量 NRG 而活化心脏细胞中的 AKT 途径并促进心肌细胞的生长和分化。
72. 一种减小左心室内径的方法，该方法包括给哺乳动物持续施用 NRG。
73. 权利要求 72 中的方法，其中给哺乳动物持续施用纽兰格林能诱导心脏细胞 ERK 信号传导途径的持续活化。
74. 权利要求 72 中的方法，其中给哺乳动物持续施用纽兰格林能诱导心脏细胞 AKT 信号传导途径的持续活化。
75. 权利要求 72 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 能提高该哺乳动物的 EF 值。
76. 权利要求 72 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 能提高该哺乳动物的 FS 值。
77. 权利要求 72 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 能预防心脏肥大。
78. 权利要求 72 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 是通过使用渗透压泵或注射器泵来完成的。

-
79. 权利要求 72 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 是通过将一种多聚物耦联到纽兰格林上来完成的。
80. 权利要求 79 中的方法，其中的多聚物是聚乙二醇。
81. 权利要求 80 中的方法，其中的多聚物是聚乙二醇衍生物。
82. 权利要求 72 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 是通过使用脂质体来完成的。
83. 权利要求 72 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 是通过使用微球体来完成的。
84. 权利要求 1 中的方法，其中的疾病或不选自：心血管疾病、肿瘤、神经系统疾病、肌肉疾病、肌营养不良（如，杜氏肌营养不良、肢节型肌营养不良）、多发性硬化症、脊髓损伤、中风、眼及耳部疾患、糖尿病、精神分裂症和阿尔茨海默症。
85. 权利要求 1 中的方法，其中的纽兰格林选自 NRG1、NRG2、NRG3 和 NRG4。
86. 权利要求 1 中的方法，其中的纽兰格林含有表皮生长因子类似(EGF 类似)区，其中 EGF 类似区是由纽兰格林 1 基因编码的。
87. 权利要求 1 中的方法，其中纽兰格林持续给药包括每天连续注射或输注纽兰格林 1 分钟到 24 小时。
88. 权利要求 1 中的方法，其中纽兰格林持续给药包括每天连续静脉输注或注射纽兰格林 4 小时或更长。
89. 权利要求 1 中的方法，其中纽兰格林持续给药包括每天连续皮下输注或注射纽兰格林 6 小时或更长。

90. 一种预防、治疗或延迟哺乳动物疾病或不适的持续释放药物组合物，该药物组合物包含一个渗透压泵和有效治疗剂量的纽兰格林。
91. 一种预防、治疗或延迟哺乳动物疾病或不适的持续释放药物组合物，该药物组合物包含 PEG 和有效治疗剂量的纽兰格林。
92. 一种预防、治疗或延迟哺乳动物疾病或不适的持续释放药物组合物，该药物组合物包含脂质体和有效治疗剂量的纽兰格林。
93. 一种预防、治疗或延迟哺乳动物疾病或不适的持续释放药物组合物，该药物组合物包含微球体和有效治疗剂量的纽兰格林。
94. 一种预防、治疗、或延迟哺乳动物心衰的方法，该方法包括给哺乳动物持续施用纽兰格林。
95. 权利要求 94 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 能提高该哺乳动物的 EF 值。
96. 权利要求 95 中的方法，其中哺乳动物 EF 值提高的百分数选自：大于约 20%、大于约 30%、大于约 40%、对于约 50%、以及大于约 60%。
97. 权利要求 94 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 能提高该哺乳动物的 FS 值。
98. 权利要求 97 中的方法，其中哺乳动物 FS 值提高的百分数选自：大于约 20%、大于约 30%、大于约 40%、对于约 50%、以及大于约 60%。
99. 权利要求 94 中的方法，其中给哺乳动物持续施用 NRG 能减小左心室内径（LVEDD 或 LVESD）。

100. 权利要求 99 中的方法，其中 LVEDD 值减小的百分数选自：大于约 2%、大于约 5%、大于约 10%、以及大于约 15%。

101. 权利要求 99 中的方法，其中 LVESD 值减小的百分数选自：大于约 2%、大于约 5%、大于约 10%、大于约 15%、以及大于约 20%。

102. 一种减少哺乳动物接受纽兰格林治疗的副作用的方法，该方法包括给哺乳动物持续施用纽兰格林。

103. 权利要求 102 中的方法，其中的副作用是指胃肠道不适或心包积液。

纽兰格林持续给药能改善心脏功能

与相关申请的交叉引用

本申请要求了 2005 年 12 月 30 日申请的序列号为 11/755,124 的美国临时申请以及 2006 年 1 月 13 日申请的序列号为 60/758,626 的美国临时申请的优先权。

发明领域

本发明涉及持续施用纽兰格林给哺乳动物以预防、治疗或延迟各种心脏疾病或紊乱的组合物和方法。

发明背景

心脏（心室）肥大是对增大的心脏工作压力或需求的一种重要的适应性生理反应。肥大刺激因素作用后发生的早期细胞变化之一是线粒体合成以及伴随单个细胞大小成比例增加的肌原纤维扩增（室壁增厚），但细胞数量没有（或极少）增加。

当心室受到压力时，最初的反应是肌小节长度的增加。随后是总体肌肉量的增加。当负荷过于严重时，心肌收缩力将减弱。在最轻微的状态，这种减弱体现为无负荷心肌收缩速度的减小或等长收缩时力量发展速率的减小。当心肌收缩力进一步减弱时，出现无负荷心肌缩短速度的更广泛性下降，并伴随等长收缩肌肉力量发展及收缩长度下降。此时，循环补偿仍可由心脏扩大以及心肌质量的增加提供，它倾向于维持心室壁应力在正常水平。当收缩力继续下降时，会出现明显的充血性心衰，表现为心输出量或工作力的下降，和/或心室舒张末期容积和舒张压的上升。

从肥大到心衰的过渡以几个细胞组织的变化为特征。例如，正常的

肥大的细胞有较大的尺寸，伴有增强的且有序的收缩单位以及较强的细胞-细胞粘连。反之，病理状态的肥大的细胞，其尺寸亦较大并有蛋白聚集，表现出收缩蛋白的无序化（肌小节结构紊乱）以及较差的细胞-细胞粘附（肌纤维紊乱）。因此，在病理状态的肥大中，细胞尺寸的增加以及收缩蛋白的聚集与肌小节结构的无序组装和牢固的细胞-细胞相互作用的缺失相关联。

大约有 5 百万美国人患有心衰，并且每年新增病人在 55 万以上。当前治疗心衰的药物主要集中于血管紧张素转化酶（ACE）抑制剂，这些血管舒张剂引起血管扩张、降低血压并减少心脏的工作量。虽然死亡率的百分数下降是显著的，但使用 ACE 抑制剂后实际的死亡率下降平均仅为 3%-4%，并且还有几种潜在的副作用。

ACE 抑制剂也与其他药物联用，比如洋地黄，能增加心脏收缩的力量；和/或某种利尿剂，通过引起肾脏排除血液中更多的钠和水从而有助于减轻心脏的工作量。然而，至少有一项研究证明在 II-III 级心衰病人使用洋地黄与安慰剂相比，其生存率没有什么差异。此外，利尿剂能改善心衰的某些症状，但不适宜用来单独治疗。

预防或治疗心衰的其他选择亦有相应的局限。比如，心脏移植显然比药物治疗更昂贵及更具侵入性，并且还进一步受有无供体心脏的限制。使用机械装置，比如双心室心脏起搏器，同样是侵入性的并且较昂贵。因此，由于当前治疗手段的不足，需要有新的治疗措施。

一种很有前途的新的治疗手段包括给心衰患者或有心衰风险的患者施用纽兰格林（此后称为“NRG”）。NRGs 由一个结构上相关的生长和分化因子家族组成，包括 NRG1、NRG2、NRG3、和 NRG4 及异构体。例如，已鉴定的 NRG1 的异构体超过 15 个，可以根据它们基本的表皮生长因子（EGF）类似区的差异分成 α 和 β 两大类。

NRG 与 EGF 受体家族的成员结合，该受体家族包括 EGFR、ErbB2、

ErbB3 和 ErbB4，其中每一个受体在多种细胞功能中都发挥重要的作用，包括细胞生长、分化和存活。它们都是蛋白酪氨酸激酶受体，由一个细胞外配体结合结构域、跨膜结构域和细胞质酪氨酸激酶结构域组成。NRG 结合至 ErbB3 或 ErbB4 的细胞外结构域后，能够诱导构象改变从而引起 ErbB3 或 ErbB4 与 ErbB2 形成异二聚体，或者 ErbB4 自身形成同源二聚体，这样就会导致受体细胞内 C-末端结构域的磷酸化。然后磷酸化的细胞内结构域与细胞内其他的信号蛋白结合，活化相应的下游 AKT 或 ERK 信号传导途径，并诱导一系列的细胞反应，比如刺激或抑制细胞增殖、细胞分化、细胞凋亡、细胞迁移或细胞粘附。在这些受体中，主要是 ErbB2 和 ErbB4 在心脏表达。

已有研究表明 NRG1 的 EGF 类似区，约 50 至 64 个氨基酸，足以结合并活化这些受体。以前的研究表明纽兰格林-1 β (NRG-1 β) 能以高亲和力直接结合 ErbB3 和 ErbB4。孤儿受体 ErbB2 能与 ErbB3 或 ErbB4 形成异源二聚体并且其亲和力比 ErbB3 或 ErbB4 同源二聚体要高。神经发育的研究结果提示交感神经系统的形成需要完整的 NRG-1 β 、ErbB2 和 ErbB3 信号传导系统。靶向破坏 NRG-1 β 、或 ErbB2 或 ErbB4 后由于心脏发育缺陷而导致胚胎致死。最近的研究也突显了 NRG-1 β 、ErbB2 和 ErbB4 在心血管发育以及维持成年正常心脏功能方面具有重要作用。研究表明 NRG-1 β 能增强成年心肌细胞的肌小节的组织结构。短期施用一种重组的 NRG-1 β EGF 类似区能显著改善或防止三种不同心衰动物模型的心肌功能的恶化。更重要的是，NRG-1 β 能显著延长心衰动物的存活。这些效应使得 NRG-1 β 有望成为一种治疗多种普通疾病导致的心衰的广谱治疗物或先导化合物。然而，仍然需要一种应用 NRG 的更有效的方法，可以在临床上用来预防、治疗或延迟心衰和/或心脏肥大。

发明概述

在治疗心衰和心脏肥大时，与纽兰格林的其他给药方式相比，NRG 持续给药能极大地提高 NRG 的效果。与其他给药方式相比，NRG 持续给药还有一个好处是能减少 NRG 的不利副作用。因此，本发明涉及

通过持续释放 NRG 蛋白或其功能片段、或编码 NRG 蛋白的一种核酸或其功能片段、或能增强上述 NRG 产量和/或功能的试剂来预防、治疗或延迟哺乳动物尤其是人的各种心脏疾病或紊乱的化合物与方法。

在本发明的第一种情况中，提供了一种预防、治疗或延迟哺乳动物心衰的方法，该方法包括对需要这种处理的哺乳动物持续释放 NRG。

在预防、治疗或延迟哺乳动物心衰的方法的一个例子中，给哺乳动物持续释放 NRG 导致心脏细胞中 ERK 信号途径持续活化。

在预防、治疗或延迟哺乳动物心衰的方法的另一个例子中，给哺乳动物持续释放 NRG 导致心脏细胞中 AKT 信号途径持续活化。

在预防、治疗或延迟哺乳动物心衰的方法的另一个例子中，给哺乳动物持续释放 NRG 增强了哺乳动物左心室的 EF 和/或 FS 值。

在预防、治疗或延迟哺乳动物心衰的方法的另一个例子中，给哺乳动物持续释放 NRG 能防止心脏肥大。

本领域已知的任何缓释技术，包括（但不限于）：渗透压泵或注射器泵、聚乙二醇（PEG）偶联、和/或脂质体或微球体包装均可用于本发明。

在本发明的第二种情况中，提供了一种减小左心室内径的方法，该方法包括对需要治疗的哺乳动物持续释放 NRG。在一个优选的例子中，给哺乳动物持续释放 NRG 使 LVEDD 值减少大于 2%。更优选的，给哺乳动物持续释放 NRG 使 LVEDD 值减少大于 5%。进一步优选的，给哺乳动物持续释放 NRG 使 LVEDD 值减少大于 10%。更优选的，给哺乳动物持续释放 NRG 使 LVEDD 值减少大于 15%。最优选的，给哺乳动物持续释放 NRG 使 LVEDD 值减少大于 20%。

在另一个优选例子中，给哺乳动物持续释放 NRG 使 LVESD 值减少

大于 2%。更优选的，给哺乳动物持续释放 NRG 使 LVESD 值减少大于 5%。进一步优选的，给哺乳动物持续释放 NRG 使 LVESD 值减少大于 10%。更优选的，给哺乳动物持续释放 NRG 使 LVESD 值减少大于 15%。最优选的，给哺乳动物持续释放 NRG 使 LVESD 值减少大于 20%。

在本发明的第三种情况中，提供了一种使心肌细胞生长和/或分化的方法，该方法包括对需要治疗的哺乳动物持续释放 NRG 从而活化心肌细胞中的 MAP 激酶途径并引起心肌细胞的生长和/或分化。

在本发明的第四种情况中，提供了一种诱导肌细胞肌小节和细胞骨架结构重构、或细胞-细胞粘联的方法，该方法包括对需要治疗的哺乳动物持续释放 NRG 从而活化心肌细胞中的 MAP 激酶途径而引起细胞结构的重构或细胞-细胞粘联。

在本发明的第五种情况中，提供了一种治疗或防止需要治疗的哺乳动物的心肌细胞-细胞粘联解离和/或肌小节结构紊乱的方法，该方法包括给哺乳动物持续释放 NRG。

此外，因为 NRG 与 ErbB 受体的相互作用也牵涉到其他疾病和紊乱，与其他给药方式相比 NRG 持续给药也能极大地提高 NRG 治疗这些其他疾病和紊乱的效果。因此，本发明也涉及通过持续释放 NRG 蛋白或其功能片段、或编码 NRG 蛋白的核酸或其功能片段、或能增强上述 NRG 产量和/或功能的试剂来预防、治疗或延迟哺乳动物特别是人的各种疾病或紊乱的化合物和方法。这些疾病和紊乱一般包括中枢和外周神经系统疾病。其他疾病和紊乱的例子包括：各种心血管疾病、肿瘤、神经系统疾病和/或肌肉疾病，包括肌营养不良（例如，杜兴肌营养不良（Duchenne）、肢节型肌营养不良（Limb-girdle）以及多发性硬化症、脊髓损伤、眼睛和耳朵疾患、糖尿病、精神分裂症和阿尔茨海默病（Alzheimer's）。

本发明还提供了一种预防、治疗或延迟哺乳动物心衰的 NRG 持续

释放混合物或制剂。在一个例子中，该混合物或制剂能持续活化心脏细胞中的 ERK 信号传导途径。在另一个例子中，该混合物或制剂能持续活化心脏细胞中的 AKT 信号传导途径。在另一个例子中，该混合物或制剂能提高哺乳动物的 EF 和/或 FS 值。在另一个例子中，该混合物或制剂能防止心脏肥大。该混合物或制剂可以结合本领域已知的任何持续释放技术，包括（但不局限于），渗透压泵或注射器泵、聚乙二醇（PEG）偶联、和/或脂质体或微球体包装。

本发明还提供了一种包含 NRG 混合物或制剂以及本领域已知的持续释放技术的试剂盒，持续释放技术包括（但不局限于）渗透压泵或注射器泵、聚乙二醇（PEG）偶联、和/或脂质体或微球体包装。在一些例子中，该试剂盒进一步含有用 NRG 混合物或制剂和/或持续释放技术来预防、治疗或延迟哺乳动物心衰；预防、治疗或延迟哺乳动物心脏肥大；或减小哺乳动物左心室内径的说明书。

通过阅读更完整地记载于下的本发明的说明书，本领域的技术人员将容易理解本发明的更多例子、目的、优点和特征。

图片简要说明

图 1 显示肌肉注射、静脉注射和静脉滴注 NRG 后大鼠左心室 AKT 和 ERK 磷酸化随时间变化的情况。“P-AKT”、“P-ERK”和“NRG”分别代表磷酸化的 AKT、磷酸化的 ERK 和纽兰格林。“im”、“iv”和“ivgtt”分别代表肌肉注射、静脉注射和静脉滴注。

图 2 显示了用 BaI_2 染色检测 PEG 的凝胶。在图中，“混合物”表示 PEG 和 NRG 混合物反应后的溶液。“M”、“峰 1”、“峰 2”和“峰 3”分别代表蛋白分子量标准以及混合物经 S100 柱子后的洗脱峰 1、2 和 3。“NRG-mono-PEG”、“NRG-di-PEG”和“NRG-poly-PEG”分布代表与一个、两个和多个（至少 3 个）PEG 偶联的 NRG。

图 3 显示了考马氏染色检测 NRG 蛋白的凝胶。缩写同图 2。在 M

泳道，每一条带（从底部向上）的分子量分别是 14.4 kD、20.1 kD、31.0 kD、43.0kD、66.2 kD 和 97.4 kD。

发明详述

尽管任何与此处所描述的方法相似或相当的方法均可用于本发明的实施，在此描述的是优选的方法和材料。

本发明提供了通过持续释放恒量或变量 NRG 治疗或预防哺乳动物心衰或心脏肥大的方法。优选的，哺乳动物是有心衰或有心衰风险的人。

为了简洁，而非限制，此处对本发明的详述分成下面几个部分。此处所提及的所有出版物均通过引用合并于此以揭示和描述与所引出版物相关的方法和/或材料。

A. 定义

除非另外定义，此处所使用的所有技术及科学术语与本发明所属领域里普通技术人员通常理解的含义相同。此处所提到的所有专利、申请、公开的申请以及其他出版物都通过引用完整的合并于此。如果本部分所提出的定义与通过引用合并于此的专利、申请、公开的申请以及其他出版物中提出的定义相反或不一致时，则以本部分提出的定义为准。

此处所用的单数形式“一”、“一个”和“某一个”的意思是“至少一个”或“一个或多个”，除非文中另有明确说明。

此处所用的本发明所说的“纽兰格林”或“NRG”是指能结合并活化 ErbB2、ErbB3、ErbB4 或其组合的蛋白质或多肽，包括但不限于所有的纽兰格林异构体、单独的纽兰格林 EGF 结构域、含有纽兰格林 EGF 类似区的多肽、纽兰格林突变体或衍生物、以及也能如下面详述方式

活化上述受体的任何类型的纽兰格林样基因产物。在优先的例子中，本发明所用的纽兰格林结合并活化 ErbB2/ErbB4 或 ErbB2/ErbB3 异二聚体。纽兰格林也包括 NRG-1、NRG-2、NRG-3 和 NRG-4 蛋白、肽、片段以及能模拟纽兰格林活性的化合物。本发明所用的纽兰格林能活化上述 ErbB 受体并调节其生物反应，例如，刺激乳腺癌细胞的分化以及乳蛋白的分泌；诱导神经嵴细胞分化为雪旺细胞（Schwann cell）；刺激骨骼肌细胞中乙酰胆碱受体的合成；和/或促进心肌细胞的分化、存活与 DNA 合成。纽兰格林还包括那些带有保守性氨基酸突变而未显著改变其生物活性的突变体。适宜的保守性氨基酸突变为本领域的技术人员所知并可普遍实施而不改变所得分子的生物活性。本领域的技术人员知道，一般说来，对一个多肽的非必需区域的单个氨基酸进行替换不会显著改变其生物活性（参见，如：Watson 等所著的《基因的分子生物学》，第 224 页，1987 年第 4 版，Bejacmin/Cummings 出版公司）。

纽兰格林蛋白包括纽兰格林蛋白和多肽。纽兰格林核酸包括纽兰格林核酸以及纽兰格林寡核苷酸。

此处所用的“表皮生长因子类似区”或“EGF 类似区”是指由纽兰格林基因编码的一个多肽结构域，该结构域能结合并活化 ErbB2、ErbB3、ErbB4 或其组合，并与下列专利或出版物中所公布的 EGF 受体-结合结构域结构相似：WO 00/64400；Holmes et al., *Science*, 256:1205-1210 (1992)；美国专利号 5,530,109 和 5,716,930；Hijazi et al., *Int. J. Oncol.*, 13:1601-1067 (1998)；Chang et al., *Nature*, 387:509-512 (1997)；Carraway et al., *Nature*, 387:512-516 (1997)；Higashiyama et al., *J. Biochem.*, 122:675-680 (1997)；以及 WO 97/09425，它们的内容都通过引用合并于此。在一些例子中，EGF-类似区结合并活化 ErbB2/ErbB4 或 ErbB2/ErbB3 异二聚体。在一些例子中，EGF 类似区含有 NRG-1 受体结合区的氨基酸序列。在一些例子中，EGF 类似区含有与 NRG-1 的 177-226、177-237 或 177-240 位氨基酸残基对应的氨基酸序列。在一些例子中，EGF 类似区含有 NRG-2 受体结合区的氨基酸序列。在一些例子中，EGF 类似区含有 NRG-3 受体结合区的氨基酸序列。在一些例子中，EGF 类似区

含有 NRG-4 受体结合区的氨基酸序列。在一些例子中，EGF 类似区含有如下氨基酸序列：Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro，如专利号为 5,834,229 的美国专利所描述的。

此处所用的治疗特定疾病的活性试剂的“有效剂量”是足以改善、或以某种方式减少与该疾病相关症状的剂量。这一剂量也许能治愈疾病，但典型的情况下是用来改善疾病的症状。

此处所用的“活性制剂”是用来诊断、治愈、缓解、治疗或预防人或其他动物所患疾病，或者增强身体或心理健康的任何物质。

此处所用的特定紊乱症状的“改善”是指通过施用特定的活性试剂而永久的或暂时地、持续或瞬时地减轻症状，而这一减轻能归因于或与施用该试剂有关。

此处所用的“治疗”或“处理”是指可以使不适、紊乱或疾病的症状改善或向好的方向改变的任何方式。其效果可以是预防性的，比如完全或部分防止某一疾病或其症状发生，也可以是治疗性的，比如部分或完全治愈某一疾病和/或该疾病引起的不利影响。治疗还包括将此处所述组合物的任何药物用途。

此处所用的“载体（或质粒）”是指用来将异源 DNA 引入细胞以在其中表达或复制的分散组件。选择并使用这些载体对技术人员来说非常熟悉。表达载体包括能表达与调控序列连接之 DNA 的载体，调控序列如启动子区能影响这些 DNA 片段的表达。因此，表达载体指重组的 DNA 或 RNA 组件，比如质粒、噬菌体、重组病毒或其他载体，当被引入适当的宿主细胞就导致克隆的 DNA 表达。适当的表达载体是本领域的技术人员广知的，包括那些在真核细胞和/或原核细胞复制的载体以及那些保持游离的或那些整合到宿主细胞基因组的载体。

此处所用的“心肌细胞分化”是指以如下情况为特征的状态，DNA

合成减少 10%以上、抑制其他因素刺激的 DNA 合成大于 10%、有序的肌小节结构和细胞-细胞粘联、MAP 激酶的持续活化、以及 p21^{Cip1} 的增强表达。进一步的讨论参见 WO00/37095，其内容通过引用完整地合并于此。

此处所用的“射血分数 (ejection fraction)”或“EF”是指一次心搏从充满的左心室泵出的血液的比例。可用下列公式来定义： $(LV \text{ 舒张末期容积} - LV \text{ 收缩末期容积}) / LV \text{ 舒张末期容积}$

此处所用的“收缩分数 (fractional shortening)”或“FS”是指左心室收缩状态和舒张状态直径变化的比值。可用下列公式来定义： $(LV \text{ 舒张末期内径} - LV \text{ 收缩末期内径}) / LV \text{ 舒张末期内径}$ 。

此处所用的“心衰”是指心脏不能以代谢的组织需要的速度泵血的心功能异常。心衰包括多种疾病状态如充血性心衰、心肌梗死、快速性心律不齐、家族性心肌肥大症、缺血性心脏病、先天性扩张性心肌症、心肌炎等等。心衰可以由多种因素引起，包括，但不限于：缺血的、先天的、风湿的、或原发形式。慢性心脏肥大是一种明显的疾病状态，是充血性心衰和心脏停跳的前兆。

此处所用的“心肌梗死”是指冠状动脉阻断或血流中断导致的严重而持续的缺血引起的部分心肌的斑块性坏死。

此处所用的“持续释放”是指在一段时间持续提供治疗水平的某种活性制剂（比如，纽兰格林）。持续释放包括，但不限于，多种释放形式，比如连续的释放、控制的释放、延迟的释放、贮存、逐渐释放、长期释放、程序化释放、延长的释放、成比例的释放、拖延的释放、储存、滞留、慢慢释放、分段的释放、持续释放、定时涂抹、定时释放、延迟作用、缓慢作用、分段作用、长期作用、延长作用、重复作用、慢慢作用、持续作用、持续作用药物、以及控制性释放。用普通技术人员可获得的广为人知的步骤和方法进行缓慢释放、控制释放、

定时释放、持续释放、延迟释放、长期作用、脉冲给药、或立即释放。

活性试剂连续释放的时间依赖于活性试剂的特性以及所用的持续释放技术，但在所有情况下，都长于不用持续释放技术施用该活性试剂的时间。

此处所用的“微球体”与“微粒”、“微型胶囊”、“纳米球体”、“纳米颗粒”和“纳米胶囊”含义相同，除非文中另有明确说明。

此处所用的“PEG 耦联 (pegylate)”是指至少一个 PEG 分子或其衍生物与活性试剂或其它分子连接。

此处所用的“肌小节或肌小节结构的有序的、增强的排列”是指通过心肌细胞中 α -辅肌动蛋白免疫荧光染色展示的以收缩蛋白的整齐排列为特征的状态。细胞中的 α -辅肌动蛋白的整齐排列可以通过显微镜及其相连的照相设备来识别。此处所用的“肌小节或肌小节结构的紊乱或不整齐”是与“肌小节或肌小节结构的有序的、增强的排列”相反的情况。

此处所用的“细胞骨架结构的有序的或增强的排列”是指心肌细胞中经鬼笔环肽 (phalloidin) 染色显示的以肌动蛋白纤维有序排列为特征的状态。细胞中肌动蛋白纤维的整齐排列可以通过显微镜及其相连的照相设备来识别，如本发明图片中的例示。此处所用的“细胞骨架结构的紊乱或不整齐”是指与“细胞骨架结构的有序的，或增强的排列”相反的情况。

此处所用的“蛋白”与“多肽”或“肽”的含义相同，除非文中另有明确说明。

此处所用的“MAP 激酶的持续活化”是指细胞中 MAP 激酶——p42/44 的磷酸化状态维持至少 21 小时。WO00/37095 里面有进一步的讨论，其内容通过引用合并于此。

“协同的”，“协同效应”或类似术语在此是用来描述通过联合一种或多种治疗试剂和一种或多种维甲酸化合物而获得的改善的治疗效果。尽管在某些领域里面协同效应意味着大于加和的效果（例如， $1+1=3$ ），但在医疗领域，一种加和（ $1+1=2$ ）或小于加和（ $1+1=1.6$ ）效应也可以是协同的。比如，如果两种药物之一单独施用可抑制 50%的心室肌细胞肥大的扩展，就不能指望两种药物联用可完全停止心室肌细胞肥大的发展。在许多情况下，由于不能接受的副作用，两种药物不能一起施用。在其他情况下，药物之间相互拮抗，在联合用使用时减缓心室肌细胞肥大的发展小于 50%。因此，如果两种药物合用减缓心室肌细胞肥大的发展大于 50%且不增加不能接受的副作用，就获得了协同效应。

此处所用的“心脏肥大”是指特征如下的状况：单个心室肌细胞大小的增加，细胞大小的增加足以导致对病人作出临床诊断或足以认定细胞变大（例如，比非肥大细胞大两倍或更多）。它可能伴随着单个心肌细胞中收缩蛋白的积聚和胚胎基因表达的激活。

用来检测心室肌细胞肥大的方法有体外法和体内法两种。体外检测心室肌细胞肥大的方法包括 WO00/37095 中所描述的那些方法，比如细胞尺寸的增加以及心钠素（ANP）表达的增加。细胞尺寸的改变被用于一种评分系统来测定肥大的程度。可用倒置相差显微镜来观察这些改变，肥大的程度用人造的 7-0 的评分尺度来衡量，7 分表示完全肥大的细胞，3 分表示未刺激的细胞。3 分和 7 分所代表的状态可分别参见 Simpson 等（1982）*Circulation Res.*51: 787-801 中的图 2A 和 B。肥大评分与细胞表面积（ μm^2 ）的关系被发现呈线性（相关系数=0.99）。在苯肾上腺素诱导的肥大中，未暴露（正常）细胞的肥大评分为 3，细胞表面积为 $581\mu\text{m}^2$ ；而完全肥大细胞的肥大评分为 7，表面积为 $1811\mu\text{m}^2$ ，或约为正常值的 200%。肥大评分为 4 的细胞的表面积为 $771\mu\text{m}^2$ ，或比未暴露细胞大约 30%；肥大评分为 5 的细胞的表面积为 $1109\mu\text{m}^2$ ，或比未暴露细胞大约 90%；肥大评分为 6 的细胞的表面积为

1366 μm^2 ，或比未暴露细胞大约 135%。存在心室肌细胞肥大主要包括细胞表现出约 15%的尺寸增加（肥大评分 3.5）或更多。通过上述分析方法评分可反映肥大诱导剂诱导最大肥大反应能力的不同。例如，内皮素（endothelin）诱导的细胞尺寸增加的最大值大约为肥大评分 5 分。

此处所用的“心脏肥大抑制”是指表征肥大的参数之一相对于肥大情况下有减小，或阻止表征肥大的参数之一相对于正常情况增大。例如，心室肌细胞肥大的抑制可通过测量细胞尺寸相对于肥大情况下的减小来显示。心室肌细胞肥大的抑制是指相对于肥大状况下所观察到的大小细胞尺寸要减小 10%或更多。优选的条件下，肥大的抑制意味着细胞尺寸减少 30%或更多；最优选的条件下，肥大的抑制意味着细胞尺寸的减少在 50%或以上。参照用苯肾上腺素为诱导剂时的肥大分析计分法，这些减少分别相当于肥大计分约 6.5 或更小、5.0-5.5、和 4.0-5.0。当使用不同的诱导剂时，通过测量相对于诱导剂存在时的最大细胞尺寸（或肥大评分）的评分值来显示抑制。

防止心室肌细胞肥大是通过阻止细胞尺寸在足以诱导肥大的诱导剂浓度下相对于正常细胞增加来确定的。例如，防止肥大是指在最大刺激浓度的诱导剂存在时细胞尺寸相对于未诱导细胞增加不到 200%。优选的条件下，防止肥大意味着细胞尺寸相对于未诱导细胞增加小于 135%；最优选的条件下，防止肥大意味着细胞尺寸相对于未诱导细胞增加小于 90%。相对于用苯肾上腺素为诱导剂时肥大计分分析法，在最大刺激浓度的苯肾上腺素存在时，防止肥大的肥大计分分别为约 6.0-6.5、5.0-5.5、和 4.0-5.0。

肥大的体内测定包括测量心血管参数比如血压、心率、体循环阻力、收缩力、心跳力量、向心性肥大或扩张性肥大、左心室收缩压、左心室平均压、左心室舒张末期压、心输出量、每搏指数（stroke index）、组织学参数、以及心室大小和室壁厚度。用来测定体内心室肌细胞肥大的发展和抑制的动物模型包括压力过载的老鼠模型、RV 老鼠功能紊乱模型、转基因老鼠模型、以及心肌梗死后老鼠模型。用来评估病人

心室肌细胞肥大的存在、发展及抑制的医学方法已广为人知，包括测量舒张和收缩参数、评估心室重量以及肺静脉流量。

肥大可来自任何对维甲酸有反应的因素包括先天性病毒的、先天的、心脏营养性的、肌肉营养性的因素，或者作为缺血或缺血性损伤比如心肌梗死的结果。典型的情况是，进行治疗以阻止或减缓肥大的进程，尤其是在心脏损伤后，比如缺血发生后。优选的，为治疗心肌梗死，试剂在心肌梗死后立即给予，以预防或减轻肥大。

此处所用的“活性单位”或“1U”是指能引起 50%最大反应的标准产品的用量。换句话说，为了测定某一活性制剂的活性单位，必须测定 EC50。例如，如果某一批产品的 EC50 是 0.067 $\mu\text{g/ml}$ ，则这个量就是 1 个单位。进一步来说，如果使用了 1 μg 该产品，就是使用了 14.93U (1/0.067)。可以用本领域已知的任何方法来测定 EC50，包括下面的实施例中发明人所使用的方法。活性单位的测定对于遗传工程产品和临床使用药物的质量控制是重要的，这样可以使不同医药品和/或不同批号的产品以同样的标准来定量。

在某些例子中，纽兰格林的单位是通过用激酶受体活化酶联免疫吸附法 (KIRA-ELISA) 测量纽兰格林的活性而确定的，如下面的实施例 6 中及 WO03/099300 和 Sadick et al., 1996, *Analytical Biochemistry*, 235: 207-14 中详细描述，其内容通过引用而完整地合并于此。简言之，该方法测量了纽兰格林诱导的贴壁的乳腺癌细胞系 MCF-7 的 ErbB2 活化和磷酸化。用 Triton X-100 裂解液来溶解膜蛋白，其中的受体被包被在 ELISA 孔中的与 ErbB3 或 ErbB4 无交叉反应的 ErbB2 特异性抗体 (如 H4) 捕获。受体的磷酸化程度通过抗磷酸化酪氨酸抗体 ELISA 测定。

B. 纽兰格林

本发明提供了通过持续释放等量或不同量的 NRG 来治疗或预防哺

乳动物心衰或心脏肥大的方法。任何 NRG（例如，NRG-1、NRG-2、NRG-3、和 NRG-4 及它们的异构体）蛋白、肽或片段可用于本发明的实际使用。

纽兰格林或 NRG 是指能结合并活化 ErbB2、ErbB3、ErbB4 或其组合的蛋白质或多肽，包括（但不局限于这些）：所有的纽兰格林异构体、单独的纽兰格林 EGF 结构域、含有纽兰格林 EGF 类似区的多肽、纽兰格林突变体或衍生物、以及也能按照下面详述的方式活化上述受体的任何类型的纽兰格林样基因产物。在优选的例子中，本发明所用的纽兰格林结合并活化 ErbB2/ErbB4 或 ErbB2/ErbB3 异源二聚体。本发明所用的纽兰格林能活化上述 ErbB 受体并调节其生物反应，例如，刺激乳腺癌细胞的分化以及乳蛋白的分泌；诱导神经嵴细胞分化为雪旺细胞（Schwann cell）；刺激骨骼肌细胞中乙酰胆碱受体的合成；和/或促进心肌细胞的分化、存活与 DNA 合成。测量受体结合活性的方法在本领域广为人知。例如，可以用转染了 ErbB2 和 ErbB4 的细胞进行。在受体表达细胞与过量的放射性标记的纽兰格林孵育后，收集细胞，将含有未结合的放射性标记的纽兰格林的溶液移去，然后向细胞中加入含有未标记的纽兰格林的溶液来与放射性标记的纽兰格林竞争。可用本领域已知的方法来测量 EC50。EC50 是能将 50% 的结合的放射性标记的配体从受体复合物中竞争下来的配体浓度。EC50 值越高，则受体结合亲和力越低。

本发明所用的纽兰格林包括已知的任何纽兰格林及其异构体，包括（但不局限于这些）：纽兰格林-1（“NRG-1”）、纽兰格林-2（“NRG-2”）、纽兰格林-3（“NRG-3”）、和纽兰格林-4（“NRG-4”）。有关 NRG-1 的描述可以参见：美国专利号 5,530,109、5,716,930、和 7,037,888；Lemke, *Mol. Cell Neurosci.* 1996, 7:247-262；Peles 和 yarden, 1993, *BioEssays* 15:815-824；Peles 等 1992, *Cell* 69, 205-216；Wen 等 1992, *Cell* 69, 559-572；Holmes 等 1992, *Science* 256: 1205-1210；Falls 等 1993, *Cell* 72: 801-815；Marchionni 等 1993, *Nature* 362: 312-8，上述出版物的内容通过引用完整地合并于此。有关 NRG-2 的描述可以参见：Chang

等, 1997, *Nature* 387: 509-512; Carraway 等, 1997, *Nature* 387: 512-516; Higashiyama 等, *J.Biochem.*122:675-680; Busfield 等, 1997, *Mol.Cell.Biol.*17:4007-4014; 以及国际专利公告号 WO 97/09425, 上述出版物的内容通过引用完整地合并于此。有关 NRG-3 的描述可以参见: Hijazi 等, 1998, *Int.J.Oncol.*13:1061-1067, 其内容通过引用完整地合并于此。。有关 NRG-4 的描述可以参见: Harari 等, 1999, *Oncogene.*18:2681-89, 其内容通过引用完整地合并于此。

本发明所用的纽兰格林包括纽兰格林突变体或其衍生物: 含有一个或多个氨基酸替换、缺失、和/或插入, 这些氨基酸在天然产生的纽兰格林中并不存在。优先的情况下, 氨基酸替换、缺失、或插入的位置是 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 位的氨基酸。在一个例子中, 这类衍生物在肽的氨基和/或羧基端含有一个或多个氨基酸缺失、替换、或插入。在另一个例子中, 这类衍生物在肽的任何位置含有一个或多个氨基酸缺失、替换、或插入。

在一些例子中, 氨基酸替换可以是保守性或非保守性替换。保守性氨基酸替换是指涉及的氨基酸在极性、电荷、可溶性、疏水性、亲水性、和/或两亲性等性质上是相似的。例如, 非极性(疏水性)氨基酸包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和蛋氨酸; 极性中性氨基酸包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺; 带正电荷(碱性)氨基酸包括精氨酸、赖氨酸、和组氨酸; 以及带负电荷(酸性)氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。此外, 甘氨酸和脯氨酸残基能影响肽链的走向。非保守性替换是指上述某类氨基酸中的一个成员与另一类氨基酸中某个成员交换。

在一些具体情况下, 本发明所用的纽兰格林还包括那些带有保守性氨基酸替换而未显著改变其生物活性的衍生物。适宜的保守性氨基酸替换对那些本领域的技术人员来说是公知的并且可以在不改变最终所得分子的生物活性的情况下普遍实施。那些本领域的技术人员知道,

一般说来, 对一个多肽的非必需区域的单个氨基酸进行替换不会显著改变其生物活性(参见, 如: Watson 等所著的《基因的分子生物学》, 第 224 页, 1987 年第 4 版, Bejacmin/Cummings 出版公司)。

在某些具体情况下, 本发明所用的纽兰格林包括纽兰格林突变体或衍生物, 其所含的氨基酸替换是非经典氨基酸或化学性的氨基酸模拟物。非经典氨基酸包括(但不局限于这些): 普通氨基酸的 D-型异构体、 α -氨基异丁酸、4-氨基丁酸、2-氨基丁酸 (Abu)、6-氨基己酸 (Ahx)、2-氨基异丁酸 (Aib)、3-氨基丙酸、鸟氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、羟脯氨酸、肌氨酸、瓜氨酸、磺基丙氨酸、t-丁基甘氨酸、t-丁基丙氨酸、苯基甘氨酸、环己基丙氨酸、 β -丙氨酸、氟氨基酸、用户自行设计的氨基酸比如 β -甲基氨基酸、C α -甲基氨基酸、N α -甲基氨基酸、以及一般的氨基酸模拟物。

本发明所用的纽兰格林包括纽兰格林同源物, 即某种多肽的氨基酸序列与纽兰格林同源和/或结构上与纽兰格林相似, 或与纽兰格林的某一个相互作用结构域相似, 这样它就能结合并活化 ErbB2/ErbB4 或 ErbB2/ErbB3 异二聚体蛋白激酶。典型的情况是, 某一天然蛋白的蛋白同源物的氨基酸序列与该天然蛋白的一致性至少有 50%、好的情况下至少是 75%、更好的情况下至少是 80%、85%、86%、87%、88%、或 89%、进一步更好的情况下至少是 90%、91%、92%、93%、或 94%、以及最好的情况下是 95%、96%、97%、98%、或 99%。

上文中的同源百分数是指将候选序列与对应序列进行比对, 并且为了获得最大的序列同源百分数, 必要情况下, 比对时可以引入空隙, 比对完后, 两序列在相应位置上的氨基酸是完全相同(即在给定的比对位置上两个序列具有相同残基)或相似(即在给定的比对位置上两个序列的残基为上面讨论的保守性替换)的氨基酸残基的百分数。在一些具体情况下, 纽兰格林同源物的特征是以其与天然产生的纽兰格林序列的一致性 or 相似性百分数来体现的。序列同源性包括序列一致性和序列相似性百分数, 是用本领域众所周知的序列比对技术来进行

测定的，优先选择的是为这一目的设计的计算机算法，使用所述的计算机算法或含有此算法的软件包的默认参数即可。

计算机算法以及含有这些算法的软件包的例子包括（但不局限于这些）下面所列的这些。BLAST 家族的程序是进行两序列比较时的一种优先选择的数学算法的代表例子（例如，Karlin 和 Altschul, 1990, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 87:2264-2268（修改版本, Karlin 和 Altschul, 1993, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90:5873-5877）、Altschul 等, 1990, *J.Mol.Biol.* 215:403-410（描述 NBLAST 和 XBLAST）、Altschul 等, 1997, *Nucleic.Acids.Res.* 25:3389-3402（描述 Gapped NBLAST 和 PSI-BLAST）。另一个优选的例子是 Myers 和 Miller 的算法（1988 *CABIOS* 4:11-17），该算法被引入 ALIGN 程序（2.0 版）以及作为 GCG 序列比对软件包的一部分。还有 FASTA 程序（Pearson W.R. 和 Lipman D.J., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85:2444-2448, 1988），作为 Wisconsin 序列分析软件包的一部分使用。其他的例子还有 BESTFIT，该软件使用 Smith 和 Waterman 的“局部同源”算法（*Advances in Applied Mathematics*, 2: 482-489, 1981）来寻找两个序列之间最相似的单个区域，尤其适用于两个序列的长度不同时的比对；还有 GAP 软件，该软件是根据 Needleman 和 Wunsch 算法（*J.Mol.Biol.* 48:443-354, 1970）通过寻找“最大相似性”来进行两序列比对，尤其适用于两个序列的长度差不多且希望进行全序列的比对时。

同源物可以是别的物种中对应的蛋白，这些物种包括动物、植物、酵母、细菌等等。同源物也可以通过对其天然蛋白进行突变筛选而得。例如，联合应用定点突变和蛋白-蛋白相互作用检测方法来鉴定同源物。其他的方法，例如蛋白亲和层析、亲和印迹、体外结合实验等等，对于本发明相关的熟练技术人员而言这些方法是显而易见的。

在本说明书中，为了比较两个不同的核酸或多肽序列，其中一个序列（测试序列）被描述为相对于另一个序列（参照序列）具有特定的“一致性百分数”。就此而言，当测试序列的长度比参照序列长度的 90% 还

要短时，一致性百分数是用 Myers 和 Miller, *Bull.Math.Biol.*, 51:5-37 (1989)和 Myers 和 Miller, *Comput.Appl.Biosci.*,4 (1):11-17 (1988)的算法来测定的。特别的，一致性通过 ALIGN 程序来测定。测定可以使用默认参数。

当测试序列的长度至少是参照序列长度的 90%时，一致性百分数是用 Karlin 和 Altschul, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90:5873-5877 (1993) 的算法来测定的，该算法被引入各种 BLAST 程序。特定情况下，是用“BLAST 2 序列”工具来测定一致性。参见 Tatusova 和 Madden, *FEMS Microbiol.Lett.*, 174 (2): 247-250 (1999)。对于配对 DNA-DNA 比对，可用 BLASTN 2.1.2 程序及其默认参数进行 (Match: 1; Mismatch: 2; Open gap: 5 penalties; extension gap: 2 penalties; gap x_dropoff: 50; expect: 10; and word size: 11; with filter)。对于配对蛋白-蛋白序列比对，可用 BLASTP 2.1.2 程序及其默认参数进行 (Matrix: BLSOUM 62; gap open: 11; gap extension: 1; x_dropoff: 50; expect: 15; and word size: 3; with filter)。

本发明所用的纽兰格林还包括纽兰格林单独的 EGF 结构域、由纽兰格林 EGF 结构域组成的多肽或纽兰格林样基因产物，这些能模拟纽兰格林的活性并结合和活化 ErbB2、ErbB3、ErbB4 及其组合。此处所用的“表皮生长因子类似区”或“EGF 类似区”是指由纽兰格林基因编码的一种多肽结构域，该结构域能结合并活化 ErbB2、ErbB3、ErbB4 或其组合，并且在结构上与 EGF 受体结合结构域是相似的，如同下列文献所描述：WO 00/64400, Holmes 等, *Science*, 256: 1205-1210 (1992); 美国专利号 5,530,109 和 5,716,930; Hijazi 等, *Int.J.Oncol.*, 13: 1061-1067 (1998); Chang 等, *Nature*, 387: 509-512 (1997); Carraway 等, *Nature*, 387: 512-516 (1997); Higashiyama 等, *J.Biochem.*, 122: 675-680 (1997); 以及 WO 97/09425, 其内容通过引用完整地合并于此。

在一些具体情况下，本发明所用的纽兰格林包含 NRG-1 编码的 EGF 类似区。在某些具体情况下，EGF 类似区含有 NRG-1 的受体结合结构

域的氨基酸序列。在某些具体情况下，EGF 类似区含有对应于 NRG-1 的 177-226、177-237 或 177-240 位氨基酸残基的氨基酸序列。

在优选的例子中，本发明所用的纽兰格林含有如下氨基酸序列：

Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gln (SEQ ID NO:1), 对应于人 NRG-1 的 177-237 位氨基酸。编码这一片段的人的核酸序列如下：

agccatcttg taaatgtgc ggagaaggag aaaactttct gtgtgaatgg aggggagtgc ttcatggtga aagaccttc aaaccctcg agatacttgt gcaagtgcc aaatgagttt actggtgatc gctgcaaaa ctacgtaatg gcgagcttct acaaggcgga ggagctgtac cag (SEQ ID NO:2)。

在一些具体情况下，本发明所用的纽兰格林是由 NRG-2 编码的 EGF 类似区组成。在某些具体情况下，本发明所用的纽兰格林是由 NRG-3 编码的 EGF 类似区组成。在某些具体情况下，本发明所用的纽兰格林是由 NRG-4 编码的 EGF 类似区组成。在某些具体情况下，本发明所用的纽兰格林含有如下氨基酸序列：Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro，如同美国专利号 5,834,229 中所描述。

C. 常用的缓释技术

本发明提供纽兰格林缓释药物合剂以及预防、治疗或延迟多种疾病比如心衰的方法。纽兰格林缓释剂简化了给药程序，提高了临床效果并且减轻了副作用比如与血中高浓度的纽兰格林相关的副作用。推测在一段时间段内持续释放纽兰格林能诱导或维持某些基因的表达，这些基因与心肌细胞生长和/或分化、肌小节和细胞骨架重构、或细胞-细胞粘附有关。

纽兰格林持续给药可以根据本领域的熟练技术人员的判断以任何途径施行，包括（但不局限于这些）：口服、吸入、注射（比如静脉、肌肉、皮下或皮内注射）。在某些具体情况下，纽兰格林经口服给药。在某些具体情况下，纽兰格林经静脉给药。在某些具体情况下，纽兰格林经肌肉给药。在优先选择的情况下，纽兰格林经缓慢释放到哺乳动物的血中。

纽兰格林可以用本领域的普通技术人员所知道的任何持续给药方式或任何给药装置进行施用。特别是本领域已知的任何持续给药方式或给药装置均能用于本发明。这方面的例子包括（但不局限于这些）下面这些美国专利号中所描述的方法：3,845,770、3,916,899、3,536,809、3,598,123、4,008,719、5,674,533、5,059,595、5,591,767、5,120,548、5,073,543、5,639,476、5,354,556、5,639,480、5,733,566、5,739,108、5,891,474、5,922,356、5,972,891、5,980,945、5,993,855、6,045,830、6,087,324、6,113,943、6,197,350、6,248,363、6,264,970、6,267,981、6,376,461、6,419,961、6,589,548、6,613,358、6,699,500、6,740,634、6,838,076、6,866,866、7,087,246，其中每一项都通过引用合并于此。下述剂型可以用来持续施用纽兰格林，例如，氢化丙基甲基纤维素、其他多聚物基质、凝胶、透性膜、渗透系统、多层包被、微粒体、脂质体、微球体、或其各种比例的组合来提供预期的药物释放模式。本发明也包含适用于口服给药的单一的单位量剂型，比如（但不局限于这些）：片剂、胶囊、凝胶囊、和囊片，这些剂型适于可控制释放。

纽兰格林持续给药能在某一时间段内持续提供治疗水平用量的纽兰格林。在一些具体情况下，纽兰格林释放的时间段为1小时、2小时、4小时、8小时、10小时、12小时、14小时、16小时、20小时、24小时、或更长。在某些具体情况下，纽兰格林释放的时间段为1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、或更长。在另一些具体情况下，纽兰格林释放的时间段为1周、2周、3周、4周、或更长。在某些具体情况下，纽兰格林释放的时间段为1月、2月、4月、8月、12月、或更长。在另一些具体情况下，纽兰格林释放的时

间段为1年、2年、3年、4年、或更长。在某些具体情况下，纽兰格林释放的时间段介于1小时与2周之间、2小时与2周之间、4小时与24小时之间、4天与10天之间。纽兰格林持续给药的时间段取决于多种因素，比如所采用的缓释技术。

纽兰格林持续给药能将血液中的纽兰格林浓度维持在一个期望的范围内，特别是在一段时间内维持在发挥治疗效果的最低浓度或其以上，同时低于最低毒性浓度。可以将接受纽兰格林药物合剂持续给药的病人与接受纽兰格林药物合剂非持续给药（比如静脉注射）的病人的纽兰格林的最大血清浓度（ C_{max} ）进行比较。在适宜的具体情况下，接受纽兰格林药物合剂持续给药的病人的纽兰格林的最大血清浓度（ C_{max} ）要低于接受纽兰格林药物合剂非持续给药的病人的相应浓度。适宜的情况下，接受纽兰格林药物合剂持续给药的病人的 C_{max} 低至接受纽兰格林药物合剂非持续给药的病人的 C_{max} 的约90%、80%、70%或60%。更适宜的情况下，接受纽兰格林药物合剂持续给药的病人的 C_{max} 低至接受纽兰格林药物合剂非持续给药的病人的 C_{max} 的约50%、40%或30%。最适宜的情况下，接受纽兰格林药物合剂持续给药的病人的 C_{max} 低至接受纽兰格林药物合剂非持续给药的病人的 C_{max} 的约20%、10%或更低。

测定血清中纽兰格林浓度的方法在本领域是人所皆知的。例如，可以使用表达 ErbB2 和 ErbB3 受体的细胞，如 SKBR-3 乳腺癌细胞系。将含有细胞的试管放置在冰上，向不同的试管中加入下列量的纽兰格林：10、5、2.5、1.25、0.625、0.312、0.156、0.078、0.039、0.019 和 0.0079ng；然后加入放射性标记的纽兰格林（50,000 cpm）。将样品溶液混匀并于 4°C 放置过夜。次日晨，离心收集细胞，测量放射性活性之前将上清吸去。用放射性活性对未标记的纽兰格林量作一条标准曲线。当测定血清中纽兰格林的浓度时，将一定量的血清加入放置在冰上的含有细胞的试管里，然后加入放射性标记的纽兰格林（50,000 cpm），将样品溶液混匀并于 4°C 放置过夜。测定放射活性，纽兰格林的量可以根据标准曲线计算得出。

依照本发明可以提供多种缓释模式。“缓释模式”是指在植入/插入过程中或纽兰格林的其他给药方式给药后的第一个 24 小时内，所释放的纽兰格林少于纽兰格林总释放量的 50%。本发明在优先选择的情况下，缓释模式是从下列组群中选出来的：(a) 50%释放时间点发生在植入/插入后或其他给药方式给药后的 24 小时与 48 小时之间，(b) 50%释放时间点发生在植入/插入后或其他给药方式给药后的 48 小时与 96 小时之间，(c) 50%释放时间点发生在植入/插入后或其他给药方式给药后的 96 小时与 168 小时（1 周）之间，(d) 50%释放时间点发生在植入/插入后或其他给药方式给药后的 1 周与 2 周之间，(e) 50%释放时间点发生在植入/插入后或其他给药方式给药后的 2 周与 4 周之间，(f) 50%释放时间点发生在植入/插入后或其他给药方式给药后的 4 周与 8 周之间，(g) 50%释放时间点发生在植入/插入后或其他给药方式给药后的 8 周与 16 周之间，(h) 50%释放时间点发生在植入/插入后或其他给药方式给药后的 16 周与 52 周（1 年）之间，以及 (i) 50%释放时间点发生在植入/插入后或其他给药方式给药后的 52 周与 104 周之间。

此外，使用本发明的方法可以减少某种制剂血浆浓度的波动幅度（“DFL”，the degree of fluctuation）。DFL 是测量某种药物在两次给药期间其血浆浓度变化的程度。DFL 越接近 0，则两次给药期间其血浆浓度变化越小。因此，DFL 的减小意味着峰值差异以及整个期间血浆浓度的变化也减小。适宜的情况下，接受纽兰格林药物合剂持续给药的病人的 DFL 是接受纽兰格林药物合剂非持续给药的病人的 DFL 的约 90%、80%、70%或 60%。更适宜的情况下，接受纽兰格林药物合剂持续给药的病人的 DFL 是接受纽兰格林药物合剂非持续给药的病人的 DFL 的约 50%、40%或 30%。最适宜的情况下，接受纽兰格林药物合剂持续给药的病人的 DFL 是接受纽兰格林药物合剂非持续给药的病人的 DFL 的约 20%、10%或更低。

本领域任何已知的生物分子缓释技术都可用于本发明。一般说来，给药量和给药频率取决于所用活性制剂的药效学和药代动力学特性。

吸收率越慢，两次给药期间的血药浓度的波动就越小。这样就可以用高剂量低频率给药。然而，许多活性制剂在体内很容易溶解，常常能迅速吸收并引起可用药物在量上的突然爆发。例如，病人服用快速释放的硝苯地平 (Nifedipine) 产品所致的低血压。使用缓释产品避免了起始高血药浓度及其所引起的血压的突然下降和其他的明显的血液动力学改变比如反射性心动过速。

此外，某些活性制剂在体内被靶向去除或破坏，比如通过机体的免疫系统和蛋白酶。由于这样那样的原因，某些药物的半衰期较短，为了将其血药浓度维持在治疗范围内，常常需要频繁给药。给药频率与病人依从度呈反比。对于这类半衰期较短的活性制剂，使用缓释产品可以在较长的时间段内将血药浓度维持在治疗水平。因此，通过使用缓释产品而减少每天的用药次数具有改善病人依从性的潜力。尽管此处描述了一些特定的缓释技术，本发明比任何缓释技术涵盖的范围要广。这包括发现以低剂量 NRG 持续给药能出人意料地改善梗死心脏的功能。而且，当前在本领域有很多已知的药物缓释技术。在下面对其几个技术作为优先选择的缓释技术进行了一般讨论，但这些技术在此仅是作为说明的目的，而不是限制本发明。本领域已知的许多其他相关和不相关的技术也可用于本发明的实际应用。此外，将此处所讨论的缓释技术和/或本领域已知的其他缓释技术联合后也可用于本发明的实际应用。例如，许多在持续给药技术方面有特殊专长的公司——如：Alza Corp., Durect Corp., Gilead Sciences, Baxter Pharmaceuticals, Brookwood Pharmaceuticals 和 OctoPlus——提供的产品和服务也可以用于本发明的实际应用。另外，专利检索、公开的专利申请、以及相关的出版物也能给熟悉本领域的人员提供明显可用的缓释技术。因此，本领域熟练的技术人员能够选择所期望的缓释技术来用于本发明的实际应用。

C.1. 渗透压泵

在本发明中的某一具体情况下，是用渗透压泵来将 NRG 缓释至血

液中。已经证明渗透设备能有效的在较长的时间段内将有益的活性制剂以可控制的方式释放到目标区域。已知的这类设备包括药片、药丸、胶囊和可植入的设备。药片和药丸可以口服，而其他的泵是植入皮下或腹腔内，或附着于静脉内、脑内或动脉内输液导管。

一般说来，在渗透压泵系统中，一个核心体被包裹在至少有一个开口的半透性膜中。半透性膜对水是可通透的，但对活性制剂是不可通透的。当该系统暴露于体液时，水穿透半透膜进入含有渗透性赋形剂和活性制剂的核心体。核心体内的渗透压增加并导致活性制剂通过半透膜的开口以一种可控制的、预定速率转移。

在许多渗透压泵中，其核心体含有多个内部区室。例如，第一个区室含有活性制剂。第二个区室含有某种渗透性制剂和/或“驱动组分”。参见，如：美国专利号 5,573,776，其内容通过引用合并于此。该区室可以具有高渗透性，这样就可以使得水通过半透膜进入泵内。进入的水挤压第一个区室。这可以通过在第二个区室中使用某种多聚物来完成，该多聚物与液体接触后发生肿胀。因此，活性制剂就能以预定的速率转移出去。

在另一种具体情况下，渗透压泵可能由多个含有活性制剂的区室构成，其中每一个区室含有相同或不同的活性制剂。每一个区室中的活性制剂的浓度以及释放速率可以相同或不同。

释放速率通常是由半透膜对水的通透性来控制的。因此，渗透压泵的药物释放模式不依赖于所用的活性制剂，活性制剂的分子量或其理化特性通常与释放速率没有关系。关于渗透压泵的操作原理、设计标准、以及释放速率的进一步讨论可以参见 Theeuwes 和 Yum, *Annals of Biomedical Engineering*, Vol.4, No.4 (1976) 以及 Urquhart 等, *Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 24:199-236 (1984), 其内容通过引用合并于此。

在本领域内，渗透压泵已广为人知，而且对于本领域的普通技术人员而言可以很容易地从那些提供用于药物缓释的渗透压泵的有经验的公司那里获得。例如，ALZA's DRUGS[®]技术是一种可以移植的、非生物降解的渗透性驱动系统，可以用来传递小分子药物、肽、蛋白、DNA和其他生物活性大分子长达一年；ALZA'OROS[®]技术是采用药片式通过渗透性提供精确的、可控制的药物传递，时间可长达24小时；Osmotica Pharmaceutical's Osmodex[®]系统含有一种药片，该药片具有多层，每一层有相同或不同的药物释放模式；Shire Laboratories' EnSoTrol[®]系统将药物溶解于核心体内并通过激光打孔形成的小洞利用渗透性将溶解的药物释放；Alzet[®] Osmotic 泵是微型可植入泵，用于小鼠、大鼠和其他实验室动物的研究用。

专利检索、公开的专利申请、以及相关的出版物也能给熟悉本领域且参阅本发明的人员提供明显可用的渗透压泵技术。比如，美国专利号6,890,918、6,838,093、6,814,979、6,713,086、6,534,090、6,514,532、6,361,796、6,352,721、6,294,201、6,284,276、6,110,498、5,573,776、4,200,0984和4,088,864，其内容通过引用合并于此，这些专利描述了渗透压泵及其制造方法。本领域的熟练技术人员，综合参考本发明及上述其他发明的内容后能够生产出一种适用于NRG持续给药的渗透压泵。

用于半透性膜的典型材料包括本领域已知的作为渗透性和反向渗透性膜的半渗透性多聚物，比如酰化纤维素、二酰化纤维素、三酰化纤维素、醋酸纤维素、双乙酸纤维素、三乙酸纤维素、乙酸琼脂、三乙酸淀粉、乙酸- β -葡聚糖、乙醛二甲基乙酸、氨基甲酸乙酯醋酸纤维素、聚酰胺、聚氨酯、磺化聚苯乙烯、邻苯二甲酸酯醋酸纤维素、氨基甲酸甲酯纤维素、琥珀酸酯醋酸纤维素、二甲基氨基乙酸酯醋酸纤维素、氨基甲酸乙酯醋酸纤维素、氯乙酸醋酸纤维素、二桐酸酯纤维素、二辛酸酯纤维素、二戊酸酯纤维素、戊酸酯醋酸纤维素、丙酸酯纤维素、甲基纤维素、对甲苯磺酸醋酸纤维素、丁酸酯醋酸纤维素、由多聚阳离子和多聚阴离子共沉淀形成的选择性交联半透性多聚物、

半透性多聚物、轻度交联聚苯乙烯衍生物、交联的多聚苯乙烯磺酸钠、乙烯三甲基苯氯化铵的多聚物、替换度为 1 且乙酰基含量为 50%的醋酸纤维素、替换度为 1-2 且乙酰基含量为 21-35%的双醋酸纤维素、替换度为 2-3 且乙酰基含量为 35-44.8%的三醋酸纤维素，如同美国专利号 6,713,086 中所述，其内容通过引用合并于此。

泵中的渗透性制剂可以是任何具有渗透性效应的复合物，能够相对外部液体跨越半透性膜产生渗透压梯度。有用的制剂包括（但不局限于这些）：硫酸镁、硫酸钙、氯化镁、氯化钠、氯化锂、硫酸钾、碳酸钠、亚硫酸钠、硫酸锂、氯化钾、硫酸钠、d-甘露醇、尿素、山梨醇、纤维醇、棉子糖、果糖、亲水多聚物比如纤维素多聚物、以及上述这些的混合物等等，如同美国专利号 6,713,086 中所述，其内容通过引用合并于此。

典型的“驱动组分”是一种亲水多聚物，能与生物体液相互作用并发生肿胀或扩展。这些多聚物具有在水中发生肿胀的能力并且能在多聚物结构内部滞留大量的已吸收的水分子。这些多聚物能够高度肿胀或扩展，通常能使其体积增加 2-50 倍。这些多聚物可以是非交联的或交联的。适用于本发明的亲水多聚物在本领域是广为人知。

半透膜上的孔可由适宜于从系统中将活性制剂释放出去的任何方式或方法形成。渗透压泵可以含有一个或多个小孔，这些孔是用本领域已知的机械步骤在半透膜上打孔形成的，这些程序包括（但不局限于这些）：美国专利号 4,088,864 中所描述的激光法。或者，可以通过引入某种易腐蚀的成分来形成这些小孔，比如在半透膜上引入凝胶塞。

尽管上面讨论了渗透压泵的一些特定实例，本发明比任何缓释技术涵盖的范围要广。这包括发现 NRG 持续给药能改善梗死心脏的功能并减小左室内径。当前在本领域有很多已知的不同类型的渗透压泵均能用于本发明的实际应用。

C.2. 聚乙二醇偶联

在本发明中的某一具体情况下，是将 NRG 活性制剂耦合至一种多聚物比如聚乙二醇（此后称为“PEG”）来将 NRG 缓释至血液中。已经证明将 PEG 耦合至生物活性制剂能有效的在较长的时间段内将活性制剂以可控制的方式释放到目标区域。尤其是，用 PEG 修饰蛋白已经广泛用于生物技术产业来减少治疗性活性制剂的抗原性并延长它们在体内的存在。例如，用氰尿酸氯将 PEG 耦合至牛腺苷脱氨酶导致其免疫原性的消失。相似的，人生长因子与大肠杆菌的 L-天冬酰胺酶的 PEG 耦合物被证明有较长的循环半衰期。

将 PEG 耦合至一种活性制剂或其它分子，比如脂质体的外层膜，能提高这些活性制剂或其它分子的效力和半衰期，同时也能降低其毒性。特别是在水性介质中，PEG 分子被水化并快速运动，这样就引起 PEG 肿胀至很大的体积并阻止其他分子的接近和干扰，比如免疫细胞和蛋白酶。因此，当耦合至 PEG 后，PEG 多聚物链能使附着的分子避开免疫反应和其他的清除机制，维持活性试剂的存在。

通常，聚乙二醇分子是通过蛋白中的反应性基团来偶联到该蛋白上的。常常是氨基，比如赖氨酸残基或 N-末端的氨基，被用来附着 PEG。美国专利号 5,824,784 和 4,002,5312 描述了通过还原性烃化反应来将 PEG 附着到一种酶上的方法。可以用赖氨酸残基代替其他氨基酸或将其插入到多肽序列中以提供额外的附着位点，如同美国专利号 4,904,584 中所描述的。本领域已知的用来将分支的或“多臂”PEG 衍生物偶联至蛋白的其他方法可以参见美国专利号 5,932,462。本领域还有多种已知的附着方法来将多聚物附着到半胱氨酸残基、羧基、糖基和其他基团上。例如，美国专利号 5,900,461 所述的 PEG 衍生物和其他多聚物具有多个活性砷基团，这些基团能高选择性偶联至分子中的巯基而不是氨基上。

PEG 也能用于将大分子偶联至目的配体或基团上，这样能将大分子

导向至特定的目标区。美国专利号 6,436,386 描述了活性制剂-多聚物偶联物附着至羟磷灰石靶向的基团用来将活性制剂，比如骨生长因子，传递至羟磷灰石表面，比如骨骼。

有许多 PEG 衍生物可以使用并且适合于制备 PEG-耦合物。例如，NOF Corp's SUNBRIGHT® 系列提供多种 PEG 衍生物，包括甲氧基聚乙二醇以及活化的 PEG 衍生物，比如，甲氧基-PEG 胺、马来酰亚胺和羧酸，通过各种方法偶联至药物、酶、磷脂和其他生物材料；Nektar Therapeutics's Advanced PEGylation 也提供多种 PEG-偶联技术来提高治疗制剂的安全性和效力。

专利检索、公开的专利申请、以及相关的出版物也能给熟悉本领域且参阅本发明的人员提供明显可用的 PEG 偶联技术以及 PEG-衍生物。比如，美国专利号 6,436,386、5,932,462、5,900,461、5,824,784 和 4,002,531，其内容通过引用完整地合并于此，这些专利描述了这些技术、衍生物及其制造方法。本领域的熟练技术人员，综合参考本发明及上述其他发明的内容后能够将 PEG、某种 PEG 衍生物或其他多聚物偶联至 NRG 以达到持续给药。

PEG 是一种为人熟知的多聚物，具有可溶于水及许多有机溶剂的特性，无毒，无免疫原性，并且透明，无色，无臭且稳定。PEG 的用途之一是将多聚物共价附着至不溶性分子以使得最终的 PEG-分子偶联物是可溶的。由于这些及别的原因，PEG 被作为进行多聚物附着的优先考虑之选择，但这里只是选择其来进行说明阐述相关问题而不是局限于此。用其他的水溶性多聚物也能获得相似的产品，包括（但不局限于这些）：乙烯醇多聚物、其他环氧烷烃多聚物比如丙二醇多聚物等等、乙氧基化多羟基化合物多聚体比如乙氧基化甘油多聚物等等、羧甲基纤维素、右旋糖苷、多聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、多聚 1,3-二氧戊环、多聚 1,3,6-三氧杂环己烷、乙烯/马来酐、以及多聚氨基酸。本领域的熟练技术人员可以根据预期的剂量、循环时间、对蛋白降解的抗性以及其他的考虑来选择所期望的多聚物。

C.3.脂质体包裹

在本发明中的另一种具体情况下，是将 NRG 包裹于脂质体中来将 NRG 缓释至血液中，已经证明这样可以将有益的活性制剂在延长的时间段内以可控制的方式释放。

脂质体是内部含水的完全封闭的双层膜结构。脂质体可以是具有单一膜双层的单层囊泡或有多个膜双层的多层囊泡，每一层与相邻层是由一个水相层分开。最终的膜双层结构是这样的：脂质的疏水（非极性）尾部朝向膜双层的中心，而亲水（极性）头部朝向水相。

一般说来，在脂质体-药物传递系统中，活性制剂是包裹在脂质体中然后再给予待治的病人。然而，如果所用的活性制剂是亲脂性的，则该活性制剂可位于脂双层中。

免疫系统可能会将常规的脂质体识别为外来物并在大量活性制剂达到病灶前将脂质体摧毁掉。因此，在某种具体情况下，用一种弹性水溶性多聚物将脂质体包被以避免其被机体的单核吞噬细胞系统（主要是肝脏和脾脏内）摄取。用来包裹脂质体的适宜的亲水多聚物包括（但不局限于这些）：PEG、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯甲醚、聚甲基唑啉、聚乙基唑啉、聚羟丙基唑啉、聚羟丙基甲基丙烯酰胺、聚甲基丙烯酰胺、聚二甲基丙烯酰胺、聚羟丙基甲基丙烯酸、聚羟丙基乙基丙烯酸、羟甲基纤维素、羟乙基纤维素、聚乙烯醇、聚天冬酰氨基酸、以及亲水性肽，如同美国专利号 6,316,024、6,126,966、6,056,973、6,043,094 中所描述的，其内容通过引用完整地合并于此。

脂质体可以由本领域已知的任何脂质或脂质混合物构成。例如，形成囊泡的脂质可以是天然的或合成的脂质，包括磷脂，比如卵磷脂、磷脂酰乙醇胺、磷脂酸、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇、以及鞘磷脂，如同美国专利号 6,056,937 和 5,874,104 中所描述。形成囊泡的脂质也可以是糖脂、脑苷脂、或阳离子脂质比如 1,2-二油酰-

3-(三甲氨基)丙烷 (DOTAP)、N-[1-(2,3-双十四烷基)丙基]-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵 (DMRIE)、N-[1-(2,3-二油酰)丙基]-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵 (DORIE)、N-[1-(2,3-二油酰)丙基]-N,N-三甲基氯化铵 (DOTMA)、3[N-(N',N'-二甲氨基乙烷) 氨基甲酰]胆固醇 (DC-Chol)、或二甲基双十八烷基胺(DDAB), 在美国专利号 6,056,937 中也有描述。如同美国专利号 5,916,588 和 5,874,104 中所述, 为了赋予囊泡稳定性, 胆固醇的含量应该在一个适当的范围内。

在另一种具体情况下, 脂质体通过附着至靶向配体或基团上可以靶向定位至哺乳动物体内的特定部位。靶向配体被认为是可以被靶细胞表面的受体或其他复合物识别。典型的靶向配体包括抗体或抗体片段、细胞受体的配体、凝集素等等。进一步的讨论参见美国专利号 6,316,024 和 6,294,191, 其内容通过引用完整地合并于此。

这些靶向配体可以用本领域已知的任何方法将其共价或非共价附着至脂质体上。例如, 多聚物包被的脂质体经过修饰可以进行活性制剂的位点专一性传递, 这些修饰包括将靶向配体附着至脂质体的极性头部基团的残基上或脂质体包被表面上的多聚链的游离末端上, 如同美国专利号 6,316,024 和 6,043,094 所述, 其内容通过引用完整地合并于此。这些附着可以通过下列方式来完成, 比如, 通过使用含有至少一个马来酰亚胺基团和一个还原性胺功能团的交联剂来将蛋白偶联至脂质体, 如同美国专利号 5,399,331 所述; 使用糖蛋白链霉亲和素来将蛋白偶联至脂质体, 如同美国专利号 4,885,172、5,059,421 和 5,171,578 所述; 用多聚糖包被靶向脂质体; 或者能形成囊泡的脂质衍生出某种亲水多聚链, 其链末端是功能性活化的酰肼或联胺基团, 可以通过与醛基发生反应来偶联抗体, 如同美国专利号 6,126,966 所述。链末端功能性活化基团也可以是 2-吡啶二巯基-丙酰胺, 通过二硫键来将抗体或其它分子偶联到脂质体上。

本发明中的脂质体可以用本领域的熟练技术人员所知道的标准技术来进行生产。例如, 在某种具体情况下, 如同美国专利号 5,916,588

所述，先准备缓冲的活性制剂溶液。然后，某种合适的脂质，比如氢化大豆卵磷脂和胆固醇，两者均为粉末形式，将其溶于氯仿或类似的溶剂并通过旋转蒸发使其干燥。再将形成的脂质膜片重新溶于二乙醚或类似溶剂中并置于烧瓶内，然后在水浴中一边超声一边加入缓冲的活性制剂溶液。一旦醚蒸发掉，就停止超声并用氮气流将残余的醚去除。其他的标准生产程序在美国专利号 6,352,716、6,294,191、6,126,966、6,056,973、5,965,156 和 5,874,104 中有描述。本发明中的脂质体可以用本领域任何普遍接受的制造脂质体的方法来生产，包括（但不局限于这些）上面引用的文献中的方法（其内容通过引用合并于此）。

在本领域内，脂质体已广为人知，而且可以很容易地从那些提供用于药物缓释的脂质体的有经验的公司那里获得。例如，ALZA's（以前称为 Sequus Pharmaceutical's）STEALTH[®]脂质体技术是用于静脉内药物传递，通过聚乙二醇包被脂质体来避开免疫系统的识别；Gilead Sciences（以前称为 Nexstar's）脂质体技术被 AmBisome[®]采用，并通过 FDA 批准用于治疗真菌感染；以及 NOF Corp. 提供多种 GMP 级的磷脂、磷脂衍生物和 PEG-磷脂，其商品名为 COATSOME[®]和 SUNBRIGHT[®]。

专利检索、公开的专利申请、以及相关的出版物也能给熟悉本领域且参阅本发明的人员提供明显可用的脂质体技术。美国专利号 6,759,057、6,406,713、6,352,716、6,316,024、6,294,191、6,126,966、6,056,973、6,043,094、5,965,156、5,916,588、5,874,104、5,215,680 和 4,684,479，其内容通过引用合并于此，上述专利描述了脂质体和脂质包被的微球及其生产方法。因此，本领域的熟练技术人员，综合参考本发明及上述其他专利的内容后能够生产出用于 NRG 持续给药的脂质体。

尽管上面讨论了脂质体的一些特定实例，本发明比任何特定的缓释技术涵盖的范围要广。这包括发现 NRG 持续给药能改善梗死心脏的功能并减小左心室内径。当前在本领域有很多已知的不同类型的脂质体均能用于本发明的实际应用。

C.4.微球包裹

在本发明中的另一种具体情况下，是将 NRG 包裹于微球中来将 NRG 缓释至血液中。已经证明微球可以将有益的活性制剂在延长的时间段内以可控制的方式释放至目标区域。微球一般是生物可降解的并能用于皮下、肌肉和静脉注射。

一般而言，一个微球是由一种活性制剂和多聚物分子构成。如同美国专利号 6,268,053 所述，活性制剂可以位于由多聚物分子形成的膜的中心，或者，分散分布于微球，因其内部结构是由活性制剂基质和多聚物赋形剂组成。典型的情况下，微球外表面对于水是可通透的，这样可以使得水溶液进入微球，从而溶解活性制剂和多聚物以便从微球排出。

在一种具体情况下，多聚物膜是由交联的多聚物构成的，如同美国专利号 6,395,302 中所述。当交联多聚物的孔径等于或小于活性制剂的水合直径时，则只有当多聚物降解后活性制剂才能被释放出来。反之，如果交联多聚物的孔径大于活性制剂的尺寸时，则活性制剂至少可以通过扩散而部分地释放出来。

本领域已知的且在使用中的其他制造微球膜的方法可以用于本发明的实际应用。用于外层膜的典型的材料包括下列类型的多聚物：（1）基于碳水化合物的多聚物，比如甲基纤维素、基于羧甲基纤维素的多聚物、右旋糖苷、多聚葡萄糖、几丁质、聚氨基葡萄糖、和淀粉（包括羟乙基淀粉）及其衍生物；（2）多脂肪族乙醇，比如聚环氧乙烷及其衍生物包括聚乙二醇（PEG）、PEG-丙烯酸酯、聚吡丙啶、聚乙烯醋酸酯、及其衍生物；（3）聚乙烯多聚物比如聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯磷酸酯、磷酸聚乙烯及其衍生物；（4）聚丙烯酸及其衍生物；（5）多聚有机酸，比如多聚马来酸及其衍生物；（6）多聚氨基酸，比如多聚赖氨酸，和多聚亚氨基酸，比如多聚亚氨基酪氨酸及其衍生

物；(7) 共聚物和模块共聚物，比如泊洛纱姆 407 (poloxamer 407) 或普卢兰尼克 (Pluronic) L-101TM 多聚物及其衍生物；(8) 三-多聚物及其衍生物；(9) 聚醚，比如四亚甲基醚乙二醇及其衍生物；(10) 天然产生的多聚物，比如玉米蛋白、聚氨基葡萄糖、普鲁兰多糖 (pullulan) 及其衍生物；(11) 聚酰亚胺，比如多聚 n-tris (羟甲基) 甲基异丁烯酸酯及其衍生物；(12) 表面活性剂，比如聚氧乙烯山梨聚糖及其衍生物；(13) 聚酯比如聚 (乙二醇) (n) 单甲基醚单 (琥珀酰亚胺琥珀酰) 酯，及其衍生物；(14) 分枝的和环形多聚物，比如，分枝的 PEG 和环式糊精及其衍生物；(15) 多聚醛，比如多聚 (全氟丙烯氧化-b-全氟甲醛) 及其衍生物，如同美国专利号 6,268,053 中所述，其内容通过引用合并于此。本领域的普通技术人员已知的其他典型多聚物还包括多聚丙交酯共乙交酯、多聚丙交酯同聚物、多聚乙交酯同聚物、聚己酸内酯、多聚羟丁基-多聚戊酸酯共聚物、多聚 (丙交酯-co-己酸内酯)、多聚酯氨基、多聚原酸酯、多聚 13-羟丁基酸、以及多聚酐，如同美国专利号 6,517,859 所述，其内容通过引用合并于此。

在一种具体情况下，本发明中的微球附着有或包被有另外的分子。这些分子有助于微球的靶向定位，及增强受体介导和避开内吞和破坏。典型的分子包括磷脂、受体、抗体、激素和多糖。此外，一种或多种可切割的分子可以附着到微球的外表面以便将其靶向至预定的部位。然后，在适当的生物条件下，附着的分子被切割下来引起微球释放。

本发明中的微球是用标准技术进行生产的。例如，在一种具体情况下，体积排除法是通过将溶液中的活性制剂与一种多聚物或多聚物混合体溶液混合并施以能源以及足够长的时间使其形成颗粒，如同美国专利号 6,268,053 中所述。调节溶液的 pH 值使其接近大分子的等电点 (pI)。接下来，将溶液暴露于某一能源，比如热能源、放射能源、或电离能源，可以单独暴露于这些能源，也可以同时进行超声、漩涡振荡、混匀或搅拌，以使其形成微粒。然后将最终形成的微粒从任何未掺入的溶液组分中分离出来，可以用本领域的熟练技术人员所知道的物理分离法，然后可以进行洗涤。其他的标准生产程序可以参见美

国专利号 6,669,961、6,517,859、6,458,387、6,395,302、6,303,148、6,268,053、6,090,925、6,024,983、5,942,252、5,981,719、5,578,709、5,554,730、5,407,609、4,897,268 和 4,542,025，其内容通过引用完整地合并于此。

微球已广为人知，而且本领域的普通技术人员可以很容易地从那些提供有经验的这类用于药物缓释技术的公司那里获得。例如，Epi Therapeutics，是 Baxter Healthcare Corp. 一个子公司，开发出了 PROMAXX[®]，一种蛋白-基质药物传递系统，以完全水基的过程产生一种生物可降解的蛋白微球；OctoPlus 开发出了 OctoDEX[®]，交联的右旋糖苷微球，是基于批量降解基质而不是基于表面腐蚀来释放活性组分；以及 Brookwood Pharmaceuticals 打广告说其微粒技术具有传递药物的能力。

专利检索、公开的专利申请、以及相关的出版物也能给熟悉本领域且参阅本发明的人员提供明显可用的微球技术。例如，美国专利号 6,669,961、6,517,859、6,458,387、6,395,302、6,303,148、6,268,053、6,090,925、6,024,983、5,942,252、5,981,719、5,578,709、5,554,730、5,407,609、4,897,268 和 4,542,025，其内容通过引用完整地合并于此，上述专利描述了微球及其生产方法。本领域的熟练技术人员，综合参考本发明及上述其他专利的内容后能够制作并使用微球来持续施用 NRG。

D. 给药剂量和频率

本发明中的纽兰格林的用量将随着疾病或不适状况的性质和严重程度的不同、以及活性组分的给药途径的不同而变化。给药频率和剂量也将随着每一个病人的特殊因素而变化，取决于特定的治疗（例如，治疗性或预防性制剂）、机能紊乱、疾病、或不适的严重程度、给药途径、以及年龄、体重、反应情况、还有病人的既往用药史。可以从体外或动物模型测试系统获得的剂量-反应曲线来推测有效剂量。

纽兰格林的可效仿的使用剂量包括给药对象每公斤体重用多少毫克或微克的纽兰格林（如，每公斤约 1 微克至每公斤约 500 毫克、每公斤至约 100 微克每公斤约 5 毫克、或每公斤约 1 微克至每公斤约 50 微克）。对于本发明中所用的纽兰格林缓释剂，给病人的用药剂量，典型情况下是病人每公斤体重所用的活性肽的重量为 0.001 mg/kg-15 mg/kg。适宜的用量还有：0.001 mg/kg-15 mg/kg、0.005 mg/kg-10 mg/kg、0.01 mg/kg-5 mg/kg、0.001 mg/kg-4 mg/kg、0.005 mg/kg-3 mg/kg、0.01 mg/kg-2 mg/kg、0.001 mg/kg-1 mg/kg、0.005 mg/kg-0.5 mg/kg、0.010 mg/kg-0.2 mg/kg、0.005 mg/kg-0.050 mg/kg。

纽兰格林的可效仿的使用剂量还包括给药对象每公斤体重用多少单位(U)或单位量的纽兰格林（如，每公斤约 1 U 至每公斤约 5000 U、每公斤约 10 U 至每公斤约 1000 U、或每公斤约 100 U 至每公斤约 500 U）。对于本发明中所用的纽兰格林缓释剂，给病人的用药剂量，典型情况下是病人每公斤体重所用的活性肽的单位为 10 U/kg-1000 U/kg。适宜的用量还有：1 U/kg-10,000 U/kg、1 U/kg-5000 U/kg、10 U/kg-5000 U/kg、10 U/kg-1000 U/kg、50 U/kg-2000 U/kg、50 U/kg-1000 U/kg、100 U/kg-1000 U/kg、100 U/kg-500 U/kg、100 U/kg-200 U/kg。

一般而言，对于此处所描述的多种疾病，本发明的方法中所推荐的纽兰格林每天的用量范围为：每天约 0.001 mg 至 1000 mg。特定情况下，每天的用药总量的范围可为：0.001 mg-15 mg、0.005 mg-10 mg、0.01 mg-5 mg、0.001 mg-4 mg、0.005 mg-3 mg、0.01 mg-2 mg、0.001 mg-1 mg、0.005 mg-0.5 mg、0.010 mg-0.2 mg。给病人安排治疗时，开始可以用低剂量，比如每天约 0.1 μ g-1 μ g，如果必要的话可以增至每天约 20 μ g- 1000 μ g，可以单剂量使用也可以分次使用，取决于病人的整体反应。在某些情况下，所用活性组分的剂量有必要超出此处所讲的范围，这对于本领域的普通技术人员来说是显而易见的。此外，应该指出的是临床医生或治疗医师应该知道根据病人个体的反应情况从而怎样以及何时中断、调整或终止治疗。在一些具体情况下，纽兰格林的

使用量为约 1 U/天-10,000 U/天。在某些具体情况下，纽兰格林的使用量为约 1 U/天-5000 U/天。在某些具体情况下，纽兰格林的使用量为约 10 U/天-2000 U/天。在某些具体情况下，纽兰格林的使用量为约 10 U/天-1000 U/天。在某些具体情况下，纽兰格林的使用量为约 100 U/天-200 U/天。

纽兰格林还可以通过剂量计划表或“治疗周期”来给药。治疗周期内每天的剂量在上面已经详细列出。治疗周期可以持续 2 天、5 天、7 天、10 天、2 周、3 周、4 周、5 周或 6 周。

在一些具体情况下，在治疗周期内每天都使用纽兰格林。在某些具体情况下，在一个治疗周期内纽兰格林的连续用药时间为 3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 天。

在一些具体情况下，在一个治疗周期的第一天给予纽兰格林，在治疗周期余下的一天或数天则不给予纽兰格林。在某些具体情况下，在一个治疗周期内，每天给予纽兰格林并持续 3、5、7、或 10 天，该周期内余下的时间则不给药。

E. 联合治疗

在一种具体情况下，某些治疗药物比如醋酸氟氢可的松或赫赛汀 (herceptin) 能引起心脏肥大或心衰，本发明可以用于有效预防正在接受这些药物治疗的病人发生心衰和心肌症。可以在使用这些引起这类心脏疾病的药物之前、同时、或之后给病人使用 NRG。

在本发明的另一种具体情况下，NRG 与某一有效剂量的一种化合物联用，该化合物的作用是抑制一种与 NRG 不同诱导途径的心肌肥大。在另一种具体情况下，NRG 与这类肥大抑制因子和/或另外的组分联用，这些因子包括(但不局限于这些)：心肌肥大抑制因子比如 Ct-1 (心肌营养因子-1) 拮抗剂、某种 ACE 抑制剂比如卡托普利(Captopril, Capoten[®])、和/或人生长激素和/或 IGF-1 (胰岛素样生长因子 1) 用于

充血性心衰时、或者另一种抗-肥大、心肌肥大因子、抗-心律不齐、或影响肌肉收缩力的因子用于其他类型的心衰或心脏疾病时。

在本发明的另一种具体情况下, NRG 是与当前治疗心衰的某种药物联用, 这些药物包括(但不局限于这些): ACE 抑制剂和其他血管扩张剂、利尿剂、洋地黄制剂、 β -阻滞剂、抗凝血剂、血管紧张素 II 受体阻滞剂、钙通道阻滞剂或钾。

ACE 抑制剂, 能阻止血管紧张素 I 转化为血管紧张素 II, 是血管扩张剂, 能引起血管的扩张, 降低血压并降低心脏的负荷。适用于本发明的具体情况下的血管扩张剂包括(但不局限于这些)下列药物: 喹那普利(quinapril, Accupril[®])、雷米普利(ramipril, Altace[®])、卡托普利(Captopril, Capoten[®])、贝拉普利(benazepril, Lotensin[®])、福辛普利(fosinopril, Monopril[®])、赖诺普利(lisinopril, Prinivil[®]或 Zestril[®])、依那普利(enalapril, Vasotec[®])、莫西普利(moexipril, Univasc[®])、群多普利(trandolapril)和培哌普利(perindopril)。在本发明中有用的其他血管扩张剂还包括(但不局限于这些): 硝酸异山梨酯(isosorbide dinitrate, Isordil[®])、奈西立肽(nesiritide, Natrecor[®])、肼苯哒嗪(hydralazine, Apresoline[®])、硝酸盐和米诺地尔(minoxidil)。

利尿剂引起肾脏从血流中排除钠和水, 从而减少心脏的负荷, 包括下列药物(但不局限于这些): 二氢氯噻(hydrochlorothiazide, HydroDIURIL[®])、氯噻(chlorothiazide, Diuril[®])、速尿(furosemide, Lasix[®])、布美他尼(bumetanide, Bumex[®])、安体舒通(spironolactone, Aldactone[®])、氨苯蝶啶(triamterene, Dyrenium[®])、美托拉宗(metolazone, Zaroxolyn[®])、托拉塞米(torseamide)、吲哒帕胺(indapamide)、泊利噻嗪(polythiazide)、阿米洛利(amiloride)、以及联合剂(Dyazide[®])。

洋地黄制剂增加心脏收缩的力量, 包括(但不局限于这些): 异羟洋地黄毒苷(Lanoxin[®])和洋地黄毒苷。

β -阻滞剂能减少心跳加速的趋势，包括下列药物（但不局限于这些）：卡维地洛(carvedilol, Coreg[®])、美托洛尔(metoprolol, Lopressor[®]或 Toprol XL[®])、阿替洛尔(atenolol)、比索洛尔(bisoprolol)、拉贝洛尔(labetalol)、普萘洛尔(propranolol)、索他洛尔(sotalol)、吲哚洛尔(pindolol)、醋丁洛尔(acebutolol)、噻吗洛尔(timolol)、纳多洛尔(nadolol)、和倍他洛尔(betaxolol)。

本发明的具体情况下使用的抗凝血剂包括（但不局限于这些）：华法林(warfarin, Coumadin[®])和肝素。

本发明的某些具体情况下也可以使用血管紧张素 II 受体阻滞剂，这些阻滞剂不是降低血管紧张素 II 的水平（如 ACE 抑制剂就是降低其水平），而阻止血管紧张素 II 对心脏和血管起作用。适用于本发明的血管紧张素 II 受体阻滞剂包括（但不局限于这些）：氯沙坦(losartan, Cozaar[®])、缬沙坦(valsartan, Diovan[®])、厄贝沙坦(irbesartan, Avapro[®])、坎地沙坦(candesartan)、依普罗沙坦(eprosartan)、替米沙坦(telmisartan)和奥美沙坦(olmesartan)。

钙通道阻滞剂常常是用来治疗与心衰相关的高血压。适用于本发明的钙通道阻滞剂包括（但不局限于这些）：氨氯地平(amlodipine, Norvasc[®])。

在本发明的另一种具体情况下，NRG 缓释剂也可以与用来治疗心脏病诸如高血压的药物联用。例如，NRG 可以与内皮素拮抗剂联用，比如抗内皮素受体的抗体、多肽或其他这类小分子拮抗剂；3-肾上腺素受体拮抗剂比如卡维地洛； α -肾上腺素受体拮抗剂；抗氧化剂；有多种活性的复合物（比如，3-阻滞剂/ α -阻滞剂/抗氧化剂）；卡维地洛样化合物或提供在卡维地洛中发现的多种功能的复合物的混合物；生长激素等等。

单独的纽兰格林激动剂、或与其他肥大抑制途径的激动剂联用、或

与那些已知能拮抗肥大诱导途径的分子联用，可以用做哺乳动物心衰体内治疗的有用的药物，以预防或减轻心衰的后果。

用于治疗心脏疾病的激动剂的治疗剂型可以通过将具有所需纯度的激动剂与可选的且生理上可接受的载体、赋形剂或稳定剂（见：Oslo, A., 编著的 1980 年出版的第 16 版 Remington's Pharmaceutical Sciences）混合，以冻干或水溶液的形式制备以贮存。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所用剂量和浓度下对受者是无毒性的，还包括缓冲液比如磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、和其他有机酸；抗氧化剂包括抗坏血酸、低分子量（约小于 10 个残基）多肽；蛋白比如血清白蛋白、明胶、或免疫球蛋白；亲水多聚物比如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸比如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸；单糖、双糖、和其他碳水化合物包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂比如 EDTA；糖醇比如甘露醇或山梨(糖)醇；成盐反离子比如钠离子；和/或非离子性表面活性剂比如吐温（Tween）、普朗尼克类(Pluronic)或聚乙二醇（PEG）。拮抗剂也适于偶联至多种非蛋白多聚物之一，比如，聚乙二醇、聚丙二醇、或聚链烷，可以按照美国专利号 4,640,835、4,496,689、4,301,144、4,670,417、4,791,192、或 4,179,337 中所述的方式进行。合剂中载体的用量以重量计可以是约 1-99%、适宜的情况下是约 80-99%、最佳的情况下是 90-99%。

用于体内给药的激动剂应该是无菌的。这可以通过本领域已知的方法很容易做到，例如，在冻干和重新溶解之前或之后通过无菌滤膜过滤。常规情况下，激动剂可以冻干形式或溶液形式储存。

治疗性激动剂药物合剂常常被置于某一容器中，该容器含有一个无菌的取用口，例如，静脉用溶液袋或带塞子的小瓶其塞子可被皮下注射针穿透。激动剂用药只能以一种慢性的方式给予，例如，下列途径之一：静脉、腹腔、脑内、肌肉、眼内、动脉、或微创途径；口服或上述的缓释系统给药。

如同上面所讨论的，缓释制剂的合适的例子包括由含有该蛋白的固相疏水多聚物构成的半通透性基质，基质可以是确定形状的物体，比如膜片型或微型胶囊。缓释基质的例子包括聚酯、水凝胶（如，多聚（2-羟乙基）甲基丙烯酸酯）如同 Langer 等（1981）*J.Biomed.Mater.Res.*15: 167-277 和 Langer（1982）*Chem.Tech.*12: 98-105 中所述，或聚乙烯醇、聚交酯（美国专利号 3,773,919、EP58,481）、L-谷氨酸和 γ -乙基-L-谷氨酰胺共聚物（Sidman 等（1983）*Biopolymers* 22: 547-556）、非降解性乙烯基乙二醇二乙酸酯（Langer 等（1981）见上）、可降解的乳酸羟基乙酸共聚物比如柳培林迪波（Lupron DepotTM，由乳酸羟基乙酸共聚物和醋酸亮丙瑞林组成的可注射微球）、以及多聚-D-(-)-3-羟基丁酸（EP 133,988）。

激动剂也可以包裹于微型胶囊制品中，例如，通过凝聚技术或界面聚合反应（比如，羟甲基纤维素或明胶-微型胶囊和聚甲基丙烯酸甲酯微型胶囊）；或者包裹于胶体药物释放系统中（比如，脂质体、白蛋白微球、微乳液球、纳米颗粒和纳米胶囊）；或者包裹于较大的乳液球中。这些技术可以参见上面提及过的 Remington's Pharmaceutical Sciences。

乙烯基乙二醇二乙酸酯和乳酸羟基乙酸这一类的多聚物释放药物分子的时间可以超过 100 天，而某些水凝胶释放药物分子的时间则较短。当封装于胶囊内的分子在体内长时间滞留后，这些分子可能会由于暴露于 37°C 的潮湿环境而发生变性或聚集，从而导致生物活性的丢失以及免疫原性的可能改变。可以设计出合理的策略来使其稳定，这取决于所涉及的机制，比如使用适当的添加剂以及开发出特定的多聚物基质混合物。

缓释的激动剂药物合剂还包括脂质体包裹的激动剂。含有激动剂的脂质体可以用本领域已知的方法来制备，例如，下列文献中所述的方法：DE 3,218,121、Epstein 等（1985）*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 82: 3688-3692、Hwang 等（1980）*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 77: 4030-4034、EP 52,322、EP 36,676、EP 88,046、EP 143,949、EP 142,641、日本专利

申请 83-118008、美国专利号 4,485,045 和 4,544,545、以及 EP 102,324。一个合适的缓释剂型的特定例子见于 EP 647,499。

在本发明的另一种具体情况下，NRG 与用于治疗充血性心衰的其它制剂联用或协同给药，其它制剂包括 ACE 抑制剂（如同上面所讨论的）、CT-1 抑制剂、人生长激素、和/或 IGF-I。这些制剂的有效用量将取决于临床医师的判断力。给药剂量及其调整可以通过本领域的熟练技术人员所知道的方法而定，以便达到对充血性心衰的最佳处理并充分考虑利尿剂或洋地黄的使用、以及低血压和肾脏损伤等情况。所用剂量还将取决于诸如药物种类和正在治疗的特定病人等因素。典型情况下，这些药物的剂量可以与不使用激动剂时的用量相同，然而，如果总量的制剂对所治疗的疾病是有效剂量，基于所治疗的疾病会出现副作用，病人的种类，激动剂和药物的种类等因素，可能会使用较低的剂量。

本领域的熟练技术人员知道可进行大量如特定的例子所示的改变或修改而不背离广泛描述的本发明的精神和范围。因此，这些具体的例子从各方面被认为是描述性的而非限定性的。

F. 试剂盒

本发明还提供了实施本发明的治疗方案的试剂盒。这些试剂盒含有一个或多个容器，其中含治疗上有效量的所述 NRG，单独或与其它试剂一起，以制药中可接受的形式而且结合了此处所述的缓释技术。有的还有说明书，指导医生或病人持续释放 NRG 混合物的施用。

G. 实施例

正如在这些例子中所显示的，本发明是建立在下列发现的基础之上：NRG 缓释同其它传递方式一样能有效活化 AKT 或 ERK 信号传导途径，并且 NRG 缓释改善梗死心脏功能的效果要优于其它传递方式。

然而，本发明还可以广泛用于其它疾病和不适的治疗，因为 NRG 与 ErbB 受体的相互作用也与其它疾病和不适相关，例如，中枢和外周神经系统的疾病。其它疾病和不适的例子包括各种心血管疾病、神经系统疾病和/或肌肉疾病，包括肌营养不良（如杜氏肌营养不良和肢带型肌营养不良）以及多发性硬化症、脊髓损伤、眼和耳部疾病、糖尿病、精神分裂症和阿尔茨海默症。

本发明将通过下面这些例子来进一步阐述说明。这些例子是用来给本领域的普通技术人员提供怎样使用本发明的一个完整的说明和描述，而不是用来限制发明人所认为的其发明的范围，也不是用来说明下面的实验是做过的所有的或唯一的实验。当涉及到所用数字时，已经尽力来保证其准确性，但应考虑到某些实验误差和偏差。

实施例 1

用不同方法输注 NRG 后，正常大鼠左心室的 AKT 和 ERK 的磷酸化情况

为了比较不同给药方法时 NRG 对左心室心肌细胞信号传导的影响，我们采用静脉注射（此后称为“IV”）、肌肉注射（此后称为“IM”）和静脉滴注（此后称为“IVGTT”）来输注 NRG。

Wistar 雄性大鼠（中国科学院上海试验动物中心），体重为 180 ± 20 g，将其编号并称重后分组。每一组含三只大鼠。一组大鼠接受 IV 注射 4ml/kg（体积/体重）赋形剂（10mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$, 150 mM NaCl, 0.2% 人血清白蛋白（HSA），5% 甘露醇，pH 6.0）作为对照组。其它四组大鼠接受 IM 注射 4ml/kg（体积/体重）溶于上述赋形剂中的 NRG（37.3U /ml 重组人 NRG 片段（人 NRG1 β 2 的第 177-237 位氨基酸序列，泽生科技有限公司生产——批号 200503002）），另外四组大鼠接受 IV 注射 4ml/kg（体积/体重）上述 NRG。另外五组大鼠接受静脉滴注（IVGTT）20 $\mu\text{l}/\text{min}$ NRG 2 小时。这样，每只大鼠施用的 NRG 总量为 149.3 U/kg 体重（赋形剂组除外）。

分别在 20 min、1 hr、2 hr、4 hr 和 6 hr 时间点处死大鼠。将每一组大鼠的左心室合并、用冷冻 PBS 洗后在冷冻裂解缓冲液（50 mM Tris pH7.4、5 mM EDTA, 150 mM NaCl、1% Triton X-100, 2 mM Na₂VO₄、50 mM NaF、2 mM PMSF、蛋白酶抑制剂混合物（无 EDTA, Roche））中剪碎。然后将剪碎的左心室在冰水中匀浆并于 1.5 ml 离心管（Eppendorf）中在 4°C 以 12,000 rpm 离心 5 min（Kendro Biofuge）。收集上清再离心一次，然后冻存于 -80°C。样品使用前需解冻并再次离心。用 BCA 蛋白检测法（Pierce BCA protein assay kit）测定每一个样品的蛋白浓度。每个样品取一定量与 2×上样缓冲液（0.125 M Tris pH 6.8、20%甘油、4% SDS、0.2 M DTT、0.012% 溴酚兰）混匀并煮沸以备电泳后再转印到 PVDF 膜（Millipore）。每一个样品中磷酸化的 AKT 和 ERK 的量、以及 AKT 和 ERK 的量是用抗体来进行检测（ERK 抗体和磷酸化 ERK 抗体（Santa Cruz Biotechnology）；AKT 抗体和磷酸化 AKT 抗体（Cell Signaling））。

当 NRG 用上述不同方法输注后，正常大鼠左心室 AKT 和 ERK 磷酸化的时间进程显示于图 1。与赋形剂相比，NRG 经过 IM、IV 和 IVGTT 输注后均能激活 ERK 的持续磷酸化。每种方法诱导的 AKT 磷酸化在 20min 时到达峰值，1 hr 时有所下降，但在 2 hr 时又有所增加，从 4 hr 到 6 hr 维持在高水平。因此，就其维持 ERK 和 AKT 磷酸化的能力而言，NRG 的不同输注方法之间没有明显的差异。这提示 NRG 的持续灌注与 NRG 注射具有相同的效应。因此，IVGTT 输注是治疗心脏疾病的潜在方法。

实施例 2

用不同方法进行 NRG 治疗后，左心室冠状动脉结扎大鼠的心脏的功能情况

因为渗透压泵是一种持续释放 NRG 的方法（如同 IVGTT），我们检测了在恢复心肌梗死（MI）心脏的功能方面用渗透压泵来灌注 NRG

是否如传统的 IV 注射有效。

A. 大鼠左心室冠状动脉结扎及超声

Wistar 雄性大鼠（中国科学院上海试验动物中心），体重为 200 ± 20 g，通过腹腔注射克他命 100 mg/kg（药物/体重）进行麻醉。颈部和胸部去毛并消毒。在颈的前面中部位置做一切口以暴露气管。将一个 18G 的外套管穿刺针（catherter overneedle）从气管的第 3 与第 5 软骨之间插入到气管中。当针拔出后，将一个塑料导管推入气管内 1-2 cm 并固定以连接到啮齿动物呼吸机（Rodent Ventilator, SAR-830/P ventilator- 吸气流速为 1 ml/100 g/呼吸；呼吸率为 60 呼吸/min）。在左前胸做另一切口。将皮肤钝性分离以暴露第 4 和第 5 肋骨，然后用弯头蚊式止血钳剪断第 4 肋骨。将呼吸机（上面所述）连接至导管并打开，并暴露心脏以检查肺脏和心脏的状况。将心脏从切口外翻后撕开心包膜以找到左心耳和肺动脉圆锥。将其中的左冠状动脉前降支用 6/0 医用无损伤缝合线结扎，然后将心脏重新放回胸腔。缝合胸壁。阻断呼吸机以使肺脏充满。当胸腔的空气被柔和地排出后，再缝合胸部肌肉和皮肤。当大鼠恢复持续自主呼吸后，拿掉呼吸机。

结扎后第 14 天用超声仪（Philips Sonos7500 S4 probe）检查大鼠的心脏功能。选择射血分数（此后称为“EF”）值在 30% - 50% 的大鼠并将其分组（每组 15 只大鼠）。

B. 用纽兰格林治疗结扎的大鼠

左室冠状动脉结扎后第 15 天称量大鼠体重以决定所需的 NRG 用量。赋形剂组大鼠通过 IV 注射接受 0.4 ml/100 g（体积/体重）的赋形剂。赋形剂每天注射 1 次，连续注射 5 天，停 2 天，然后再注射 5 天。

IM 和 IV 组大鼠分别接受 IM 和 IV 注射 NRG (NRG 的用量为 149.3 U/kg（蛋白/体重），体积为 0.4 ml/100 g)。NRG 每天注射 1 次，连续注射 5 天，停 2 天，然后再注射 5 天。

正如下面的进一步讨论, IVGTT 组在分组后第 5 天植入渗透压泵 (ALZET osmotic pump 2ML1)。每一个泵含有 2 ml NRG 溶液, 其中含有 933.1 U NRG (因为一只大鼠现在重约 250 g), 其输注速度约为 18.7 U/kg/h。因此, 最大药物浓度相当于 IV 注射的 2.67 U/kg。

7 天后, 所有大鼠的心脏功能用超声进行检测 (Philips Sonos 7500 S4 probe)。次日, 检测血液动力学参数并进行解剖以进一步确证大鼠的心脏功能。

B. 1. 将渗透压泵植入大鼠 (所有步骤必须无菌)

在无菌操作台内相继将 1 ml 无菌水和 1 ml 0.9 % 的无菌生理盐水注入含有 NRG (993.1 U, 62.5 μ g) 的小瓶中。将 NRG 溶液吸入无菌注射器内。将注射器换上平头的针并将注射器内的气泡排除。将泵保持竖直位, 从竖直泵的顶端的小开口处插入注射针直到不能再往前为止。缓慢推动活塞将 NRG 溶液推入泵中直到溶液开始从泵中溢出。取出注射针并将泵擦拭干净。取下液流控制器 (flow moderator) 的透明帽以便暴露出一个短的不锈钢小管。然后将钢管插入一支 5 cm PE60 管的一端。推动活塞将 NRG 溶液推入液流控制器中直到装满为止。然后将液流控制器的长管插入泵中直到其白色的边缘接触到泵。将注射针从液流控制器抽出, 然后将泵在 0.9 % 的无菌生理盐水中于 37 $^{\circ}$ C 浸泡过夜。

将大鼠用克他命麻醉 (如上所述)。将大鼠颈部与肩部的区域去毛并消毒。用一条无菌的湿布将大鼠身体覆盖。然后在肩胛之间的皮肤上仔细做一个切口以定位并分离外颈静脉。将静脉的远心端结扎。用眼科剪在外颈静脉的壁上开一小洞并用微型外科镊将洞扩大。通过这一小洞将连接到渗透压泵的 PE60 管插入到静脉内 2 cm。将静脉的近心端与 PE60 管捆绑以固定管子。将包围 PE60 管的静脉远心端绑紧以进一步固定管子。将切口至肩胛骨的皮肤用止血钳进行钝性分离以形

成一个隧道。通过进一步分离皮肤，最终在大鼠后背的肩胛中部形成一个口袋。将泵通过隧道滑入口袋中，使液流控制器背离切口。然后将切口处的皮肤缝合。大鼠苏醒后放回动物房并照常饲养。

C. 实验结果

经过 IVGTT 和 IV 输注 NRG 后, MI 心脏的功能显示在下面的表 1。在表 1 中, “IVS”、“LVEDD”、“PW”、“LVESD”、“EF”、“FS”和“CC”分别代表室间隔、左心室舒张末期内径、室后壁厚度、左心室收缩末期内径、射血分数、收缩分数、心动周期。此处的 EF 和 FS 反映心脏收缩力, 尤其是左心室。

$$EF = (\text{舒张末期容积} - \text{收缩末期容积}) / \text{舒张末期容积}$$

$$FS = (\text{舒张末期内径} - \text{收缩末期内径}) / \text{舒张末期内径}$$

在表 1 中, IVGTT 或 IV 组与赋形剂组相比, 对应的 LVEDD、LVESD、EF 和 FS 的 $P < 0.01$, 提示有高度显著差异。

表 1. 经过 IVGTT 和 IV 输注 NRG 后, MI 大鼠心脏的功能

	IVS	LVEDD	PW	LVESD	EF	FS	CC
	cm	cm	cm	cm	%	%	ms
赋形剂	0.168 ± 0.005	0.952 ± 0.082	0.173 ± 0.009	0.819 ± 0.107	34.3 ± 5.0	14.5 ± 2.4	162.5 ± 23.1
IVGTT	0.169 ± 0.005	0.857 ± 0.093	0.190 ± 0.013	0.644 ± 0.061	54.6 ± 5.4	25.2 ± 3.0	173.1 ± 22.5
IV	0.177 ± 0.027	0.912 ± 0.081	0.189 ± 0.013	0.759 ± 0.099	40.5 ± 8.9	17.5 ± 4.6	164.5 ± 18.2

与 IV 组相比, 用渗透压泵输注 NRG 显著增加 MI 大鼠的心脏功能。尤其是, EF 值——心脏泵血效率的一项测量指标, 可以用来评估左心

室的功能——IVGTT 组的 EF 值比赋形剂组的 EF 值要高 59.18%，比 IV 组的 EF 值要高 34.81%。而且，FS 值——也是左心室性能的一项测量指标——IVGTT 组的 FS 值比赋形剂组的 FS 值高 73.79%，比 IV 组的 FS 值要高 44.0%。这些结果表明 NRG 持续给药比传统的 IV 注射能更有效地改善心脏功能。

令人吃惊的是，与 IV 相比，用渗透压泵输注 NRG 不仅极大地提高 MI 大鼠心脏功能，而且也能减少左心室内径。特别的，IVGTT 组的平均左心室舒张末期内径（此后称为“LVEDD”）比赋形剂组的对应值要小 9.98%，比 IV 组的对应值要小 6.03%。此外，IVGTT 组的平均左心室收缩末期内径（此后称为“LVESD”）比赋形剂组的对应值要小 21.37%，比 IV 组的对应值要小 15.15%。这些结果表明 NRG 持续给药能减少左心室的容积和质量，因此提高左心室的健康状态和功能。

实施例 3

心肌梗死大鼠用注射器泵（浙江大学医疗仪器有限公司，WZS 50-F2）进行持续静脉输注纽兰格林后的心脏功能

在本例中，注射器泵被用来给病人持续施用纽兰格林。注射器泵通过插入大鼠尾静脉的针能将溶液以一定的速度连续地泵入血流中。对注射器泵而言，很容易控制输注的时间和速度。通过注射器泵每天将纽兰格林以不同的速度和不同的时间进行静脉输注到 MI 大鼠，来优化治疗的时间周期和输注速度。

分组的大鼠通过静脉注射 4 ml/kg（体积/体重）赋形剂，每天注射，共 10 天（A 组）、或静脉注射 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 纽兰格林（2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ），每天注射，共 10 天（B 组）、或注射器泵静脉输注纽兰格林（0.625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ），1.25 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ ，每天输注 4 小时，共 10 天（C 组）、或注射器泵静脉输注纽兰格林（1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ），2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ ，每天输注 4 小时，共 10 天（D 组）、或注射器泵静脉输注纽兰格林（0.625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ），0.625 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ ，每天输注 8 小时，共 10 天（E 组）、或注射器泵静脉输注纽兰格林（1.25

µg/ml), 1.25 µg/kg/h, 每天输注 8 小时, 共 10 天 (F 组)。然后对所有分组进行超声检查心脏功能。

表 2. MI 大鼠经过注射器泵静脉输注 (ISPI) 或 IV 注射 NRG 后的超声数据

		IVS	LVEDD	PW	LVESD	EF	FS	HR
		cm	cm	cm	cm	%	%	/min
A	赋形剂	0.057±0.003	0.947±0.041	0.142±0.013	0.811±0.047	34.5±3.3	14.4±1.6	418±51
B	IV	0.060±0.005	0.924±0.060	0.164±0.016	0.770±0.057	41.5±2.6	17.8±1.6	382±52
C	ISPI 1.25 µg/kg/h 4h/天	0.059±0.005	0.935±0.050	0.156±0.013	0.779±0.067	41.2±5.7	17.7±2.8	395±30
D	ISPI 2.5 µg/kg/h 4h/天	0.061±0.004	0.943±0.058	0.160±0.015	0.762±0.055	43.7±5.4	19.0±2.9	391±41
E	ISPI 0.625 µg/kg/h 8h/天	0.062±0.006	0.941±0.061	0.164±0.011	0.742±0.079	47.4±8.6	21.1±4.5	391±48
F	ISPI 1.25 µg/kg/h 8h/天	0.061±0.004	0.966±0.038	0.166±0.019	0.766±0.045	47.2±4.2	20.8±2.5	364±33

与赋形剂组的对应值相比, 任何 ISPI 组或 IV 组的 LVEDD、LVESD、EF 和 FS 的 $P < 0.01$, 提示有高度地显著性差异。HR 是心率。

如表 2 中所示, 与赋形剂组相比, IV 输注组兰格林 (B 组) 能使 MI 大鼠的 EF 值增加 20.29%, 注射器泵静脉输注 4h/天 (C、D 组) 的效果与 IV 相同, 而注射器泵静脉输注 8h/天 (E、F 组) 能使 EF 值增加约 37.10%。同时, 与赋形剂组相比, IV 输注组兰格林 (B 组) 能使 MI 大鼠的 FS 值增加 23.61%, 注射器泵静脉输注 4h/天 (C、D 组) 的效果与 IV 相同, 而注射器泵静脉输注 8h/天 (E、F 组) 能使 EF 值增加约 45.49%。令人吃惊的是, 尽管 E 组的 MI 大鼠所获得的兰格林的量仅为 F 组的一半, 而 EF 值或 FS 值却几乎是一样的。这一结果表

明经过注射器泵进行 8 小时或更长的连续静脉输注纽兰格林后能增强心脏功能。

实施例 4

MI 大鼠用渗透压泵进行皮下持续输注纽兰格林后的心脏功能

大鼠左室冠状动脉结扎及渗透压泵的植入操作均按照例 2 的方式进行，不同之处是注入泵中的 NRG 量为 1791.3 U (125 μ g)，而且植入的泵没有管子连接静脉，是通过皮下进行 NRG 输注。输注速度为 37.33 U/kg/h。

IV 输注与皮下缓释输注同时开始，因此 IV 组用 NRG 治疗 7 天。IV 组的 NRG 用量也改为 223.95 U/kg。

经过皮下缓释和 IV 输注 NRG 后，MI 大鼠心脏的功能显示于表 3。在表 3 中，IVGTT 或 IV 组与赋形剂组相比，对应的 LVEDD、LVESD、EF 和 FS 的 $P < 0.01$ ，提示有高度显著性差异。

表 3. 皮下缓释 (EHI) 和 IV 输注 NRG 后，MI 大鼠心脏的功能

	IVS	LVEDD	PW	LVESD	EF	FS	CC
	cm	cm	cm	cm	%	%	ms
赋形剂	0.174 \pm 0.005	1.02 \pm 0.077	0.185 \pm 0.012	0.876 \pm 0.098	33.9 \pm 7.9	14.3 \pm 3.8	153 \pm 19
EHI	0.177 \pm 0.006	0.908 \pm 0.079	0.209 \pm 0.023	0.712 \pm 0.091	48.4 \pm 9.3	21.7 \pm 5.1	153 \pm 11
IV	0.171 \pm 0.007	1.013 \pm 0.111	0.188 \pm 0.010	0.874 \pm 0.124	33.9 \pm 6.8	14.3 \pm 3.3	157 \pm 15

表 3 显示，与 IV 组和赋形剂组相比，皮下缓释输注 NRG 显著增强 MI 大鼠心脏功能。与赋形剂组相比，皮下缓释输注 NRG 使 MI 大鼠

心脏的 EF 值增加 42.77%，FS 值增加 51.74%。正如上面所讨论的，EF 值和 FS 值是心脏泵血效率的测量指标并能用于评估左心室的功能。因此，这些结果表明 NRG 持续给药比传统的 IV 注射能更有效地改善心脏功能。

皮下缓释输注 NRG 也能减少左心室内径。特别的是，与赋形剂组相比，MI 心脏的 LVEDD 减少了 10.98%，而 LVESD 减少了 18.72%。在本实验中，与赋形剂相比，IV 注射 NRG 没有明显改善 MI 心脏的功能。这些结果表明 NRG 皮下持续给药能减少左心室的容积和质量，因此提高左心室的健康状态和性能，提示这样也可以用来治疗心衰。

实施例 5

心肌梗死大鼠用注射器泵进行皮下持续输注纽兰格林后的心脏功能

进一步通过注射器泵每天将纽兰格林以不同的速度和不同的时间输注到 MI 大鼠。

分组的大鼠通过静脉注射 4 ml/kg（体积/体重）赋形剂，每天注射，共 10 天（A 组）、或静脉注射 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 纽兰格林（2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ），每天注射，共 10 天（B 组）、或皮下注射（HI）10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 纽兰格林（2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ），每天注射，共 10 天（C 组）、注射器泵皮下输注纽兰格林（1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ），2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ ，每天输注 4 小时，共 10 天（D 组）、或注射器泵皮下输注纽兰格林（1.11 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ），1.67 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ ，每天输注 6 小时，共 10 天（E 组）、或注射器泵皮下输注纽兰格林（1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ），1.25 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ ，每天输注 8 小时，共 10 天（F 组）。然后对所有分组进行超声检查心脏功能。

表 4. MI 大鼠经过注射器泵皮下输注（HSPI）或 IV 注射 NRG 后的超声数据

		IVS	LVEDD	PW	LVESD	EF	FS	HR
		cm	cm	cm	cm	%	%	/min
A	赋形剂	0.060±0.007	0.906±0.107	0.151±0.027	0.757±0.130	39.3±10.8	16.9±6.1	388±33
B	IV	0.063±0.004	0.812±0.045	0.159±0.010	0.726±0.047	43.4±2.8	18.8±1.4	385±33
C	HI	0.063±0.003	0.909±0.054	0.163±0.011	0.744±0.048	42.1±3.7	18.1±1.9	390±40
D	HSPI 2.5 μg/kg/h 4h/天	0.065±0.007	0.933±0.055	0.160±0.016	0.754±0.069	44.2±6.5	19.3±3.4	385±32
E	HSPI 1.67 μg/kg/h 6h/天	0.067±0.003	0.880±0.073	0.168±0.019	0.693±0.076	48.3±6.0	21.4±3.5	404±38
F	HSPI 1.25 μg/kg/h 8h/天	0.066±0.005	0.899±0.056	0.168±0.014	0.709±0.098	47.2±11.8	21.3±8.2	377±44

与赋形剂组的对应值相比,任何 HSPI 组、HI 组或 IV 组的 LVEDD、LVESD、EF 和 FS 的 $P < 0.01$, 提示有高度地显著性差异。HR 是心率。

如表 4 中所示, 与赋形剂组相比, IV 输注组兰格林 (B 组) 能使 MI 大鼠的 EF 值增加 10.43%, 皮下注射 (C 组) 能使 MI 大鼠的 EF 值增加 7.12%, 而注射器泵皮下输注 4h/天 (D 组) 能使 EF 值增加 12.47%, 注射器泵皮下输注 6h/天 (E 组) 能使 EF 值增加 22.90%, 注射器泵皮下输注 8h/天 (F 组) 能使 EF 值增加 20.10%。同时, 与赋形剂组相比, IV 输注组兰格林 (B 组) 能使 MI 大鼠的 FS 值增加 11.24%, 皮下注射 (C 组) 能使 MI 大鼠的 FS 值增加 7.10%, 而注射器泵皮下输注 4h/天 (D 组) 能使 FS 值增加 14.20%, 注射器泵皮下输注 6h/天 (E 组) 能使 FS 值跳至 26.63%, 注射器泵皮下输注 8h/天 (F 组) 也能使 FS 值增加 26.04%。这一结果表明经过注射器泵进行每天 6 小时或更长的皮下连续输注纽兰格林后能显著增强心脏功能。

实施例 6

PEG 偶联 NRG 以及 NRG-PEG 偶联物的活性

A. PEG 偶联以及 NRG-PEG 偶联物的分离

将 PEG (mPEG-SPA-5000, NEKTAR) 加入含有 1 mg/ml NRG 的 10 ml 20 mM PBS (pH8.0) 溶液中并快速混匀 (PEG: NRG=1:1, 摩尔比), 并在室温下温和地搅拌 30 分钟, 然后加入一定量的冰醋酸以终止反应。然后将混合物上样至一根凝胶过滤柱 (S100, Pharmacia) 以分离组分。将每一个峰部都收集下来, 并取少量进行 SDS-PAGE。电泳结束后, 凝胶依次用 BaI_2 和考马氏亮蓝染色以分别检测 PEG 和 NRG。

如图 2 中所示的 BaI_2 染色的凝胶, 混合物含有 PEG 单体、NRG-单分子 PEG、NRG-双分子 PEG 和 NRG-多分子 PEG。当混合物上样至 S100 凝胶过滤柱后, 其中组分被很好地分离为 NRG-多分子 PEG 和 NRG-双分子 PEG (峰 1)、NRG-单分子 PEG 和 PEG (峰 2)。

图 3 中的考马氏染色凝胶进一步证实了峰 1 和峰 2 含有 NRG 并且偶联至 PEG, 而峰 3 只含 NRG。

B. NRG-PEG 偶联物的活性检测

收集 MCF-7 细胞, 计数、离心并以 5×10^4 细胞/ml 的浓度重悬于 DMEM (含 10 %血清和 9 $\mu\text{g/ml}$ 胰岛素)。向 96 孔板的每一个孔中加入 100 μl 细胞悬液并将板子于 37 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜。然后用 PBS 将细胞洗 3 次, 并用无血清 DMEM 继续培养 24 小时。

用包被缓冲液 (50 mM Na_2CO_3 - NaHCO_3 , pH9.6) 将 ErbB2 抗体 H4 (泽生, 抗-ErbB2 单克隆抗体) 稀释至 6 $\mu\text{g/ml}$, 向 96 孔板的每一孔中加入 50 μl 。将板子于 4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜以包被抗体。

将经过饥饿的 MCF-7 细胞上的 DMEM 培养基吸走, 向每一孔中分别加入 100 μl 系列稀释的 NRG、NRG-单分子 PEG 或 NRG-双分子 PEG 的 DMEM 溶液。向 2 个孔中加入 DMEM 作为空白。将板子于 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 20 分钟。用 PBS 洗细胞 1 次, 然后每孔加入 100 μl 裂解缓冲液 (50 mM HEPES, pH8.0, 150 mM NaCl, 2 mM 正钒酸钠, 0.01 % 硫柳汞, 1 % Triton X-100 和 1 片蛋白酶抑制剂混合物药片 (每 25 ml 溶液用 1 片)) 并在 4

℃裂解 30 分钟。然后温和地晃动板子以便完全裂解并将细胞从板中取出以 15,000 rpm 离心 15 分钟。

抗体包被的板子用洗涤缓冲液洗涤 5 次 (10 mM PBS, pH7.4, 0.05% Tween 20), 然后加入用洗涤缓冲液配制的 5 %脱脂奶粉溶液, 200 μ l/孔。将板子于 37 °C 孵育 2 小时, 然后用洗涤缓冲液洗涤 3 次。

培养板各孔样品取 90 μ l 裂解的细胞溶液加入到包被板的对应孔中。然后在 37 °C 孵育 1 小时, 加过细胞裂解液的包被板用洗涤缓冲液洗涤 5 次, 并加入 100 μ l 适当浓度的辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联的抗酪氨酸单克隆抗体 (Santa Cruz Biotechnology) 在 37 °C 孵育 1 小时。用洗涤缓冲液洗涤板子 5 次, 向每一孔加入 100 μ l 新鲜配制的 HRP 底物液 [50 mM 柠檬酸, 100 mM Na₂PO₄, pH5.0, 0.2 mg/ml 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB), 0.003 %H₂O₂], 然后将板子于 37 °C 孵育 10 分钟。最后, 向每一孔中加入 50 μ l 2 N H₂SO₄ 以破坏 HRP 的活性。用微量板读测仪 (BIO-RAD Model 550) 在 450 nm 读取每一孔的 OD 值, EC₅₀ 是指能达到最大 OD 值的 50% 的 NRG 的浓度。EC₅₀ 越小, 则活性越高。

表 5 显示的是 NRG、NRG-单分子 PEG 和 NRG-双分子 PEG 的 EC₅₀。

表 5. NRG、NRG-单分子 PEG 和 NRG-双分子 PEG 的 EC₅₀

样品	EC ₅₀ (μ g/ml)
NRG	0.070
NRG-单分子 PEG	0.070
NRG-双分子 PEG	0.098

从表 5, 我们能清楚地看出 NRG-单分子 PEG 的 EC₅₀ 与 NRG 的 EC₅₀ 是相同的, 而 NRG-双分子 PEG 的 EC₅₀ 则要高 40 %。这意味着

在体外，NRG-单分子 PEG 与 NRG 具有相同的活性，但 NRG-双分子的活性要低 40 %。

实施例 7

纽兰格林持续给药能减小其副作用

本例显示与长期或高剂量给药，纽兰格林持续给药能减小副作用，比如与纽兰格林用药相关的胃肠道不适或心包积液。

用注射器泵经静脉对两组猴子进行 NRG-1 β 给药，每一组含有 24 个健康的恒河猴（12 只雄性和 12 只雌性，重约 5-7kg）。第 1 组输注 NRG-1 β ：每天 12 小时，共 14 天，速度为 1 μ g/kg/hr。在这一组没有观察到副作用。第 2 组输注 NRG-1 β ：每天 24 小时，共 14 天，速度为 1 μ g/kg/hr。在第 2 组，观察到心脏有约 3-5 ml 的心包积液。

两组健康个体每天给予同样量的 NRG-1 β ，共 10 天。第 1 组有 8 个成员，输注 NRG-1 β ：每天 4 小时，共 10 天，速度为 0.3 μ g/kg/hr。在这一组中，在 10 天的用药期间，每一个体平均经历 2 次胃肠道不适。第 2 组有 6 个成员，输注 NRG-1 β ：每天 2 小时，共 10 天，速度为 0.6 μ g/kg/hr。在第 2 组中，在 10 天的用药期间，每一个体平均经历 5 次胃肠道不适。

这些结果表明纽兰格林持续给药能减少与纽兰格林长期或高剂量用药相关的副作用。这些结果提示每天进行静脉或皮下输注较短时间或低剂量能减少 24 小时纽兰格林输注引起的副作用。

实施例 8

纽兰格林持续给药引起心肌梗死大鼠左心室的基因表达

在本例中，对心肌梗死大鼠进行 NRG-1 β 输注，用微阵列基因芯片分析这些大鼠左心室的基因表达谱。与输注赋形剂的心肌梗死大鼠相比，输注 NRG 的大鼠有不同的基因表达谱。NRG 持续给药后，胸腺

素 β 样蛋白的 mRNA 水平增加了 3.10 倍；防御素 $\beta 1$ 的 mRNA 水平增加了 2.87 倍；生长相关蛋白的 mRNA 水平增加了 2.16 倍；胸腺素 $\beta 4$ 、层粘蛋白 $\gamma 1$ 、心肌素 (myocardin)、PI3K γ 调节亚基的 mRNA 水平几乎翻番，而弹性蛋白和 PI3K γ 的 mRNA 水平几乎不变。这表明纽兰格林改变了心脏多种蛋白的表达水平。

本发明的范围并不局限于这些描述的例子。对本领域的熟练技术人员来说对本发明进行修改或变更是显而易见的，但这些修改或变更并没有脱离本发明的范围和精神。因此，此处特意指出本发明所包括的范围仅由下文所附带的权利要求来进行限定，而不是由这些特定的例子来限定，这些例子仅是用作举例说明而已。

<110> 上海泽生科技开发有限公司
周明东

<120> 纽兰格林持续给药能改善心脏功能

<130> 11748-009-228

<140> 待授予

<141> 2006-12-29

<150> US 60/755,124

<151> 2005-12-30

<150> US 60/758,626

<151> 2006-01-13

<160> 2

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 61

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

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

<210> 2

<211> 183

<212> DNA

<213> 智人

<400> 2

agccatcttg	taaaatgtgc	ggagaaggag	aaaactttct	gtgtgaatgg	aggggagtgc	60
ttcatggtga	aagacctttc	aaaccctcg	agatacttgt	gcaagtgcc	aatgagttt	120
actggtgatc	gctgcaaaa	ctacgtaatg	gccagcttct	acaaggcgga	ggagctgtac	180
cag						183

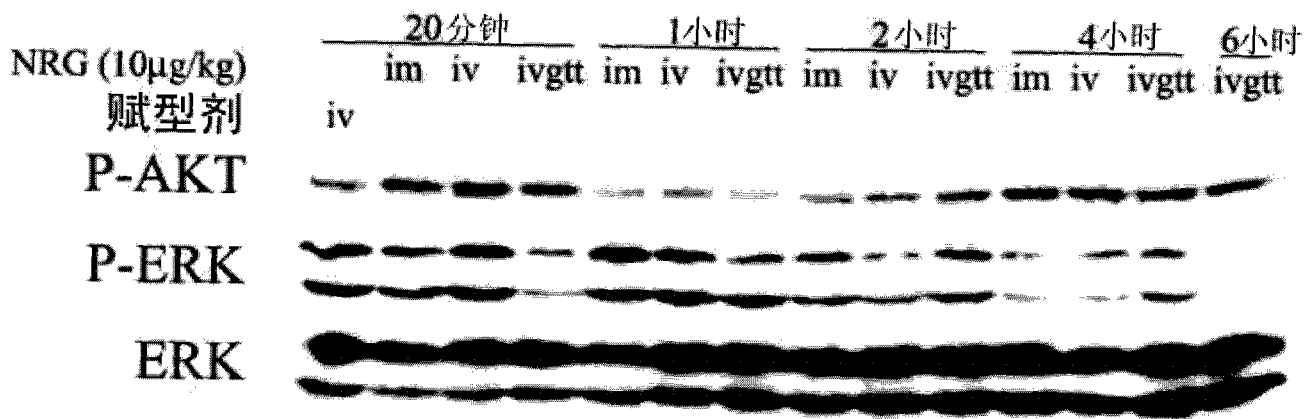


图 1

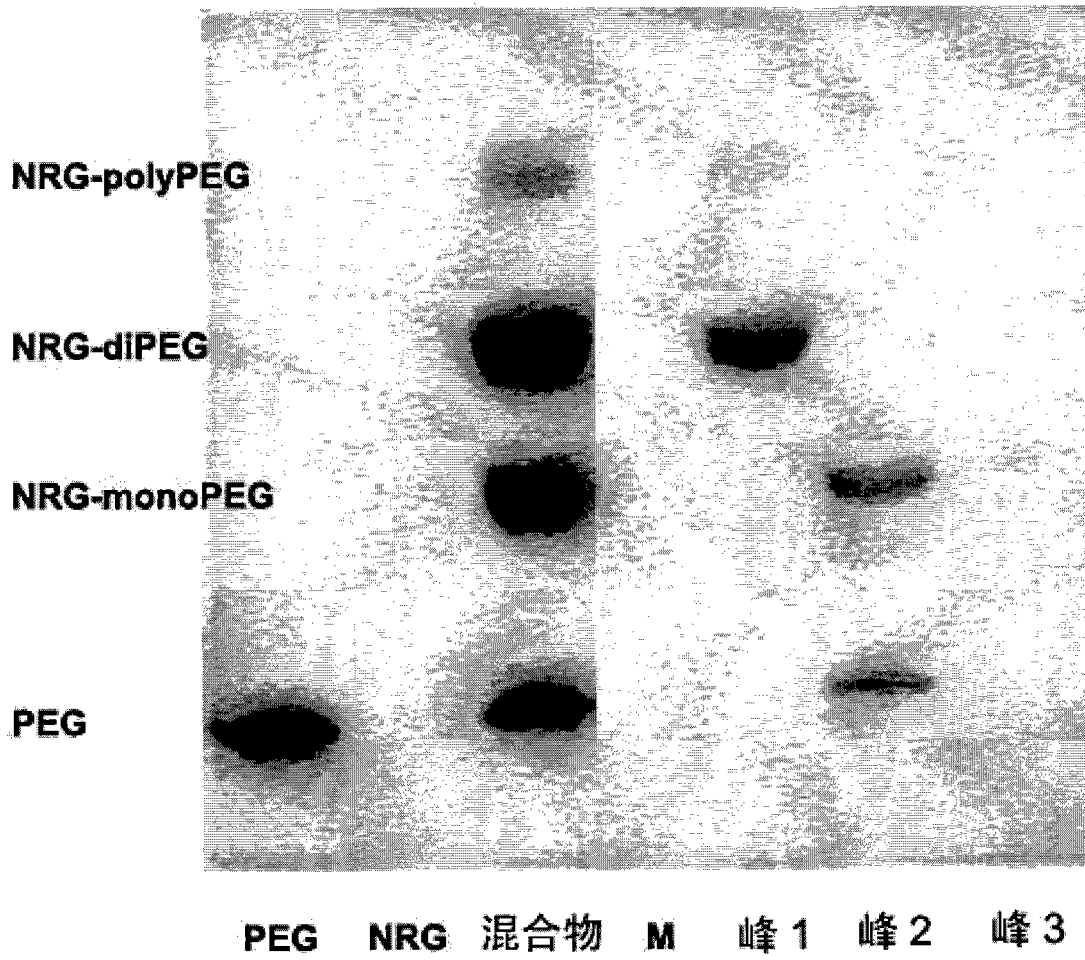


图 2

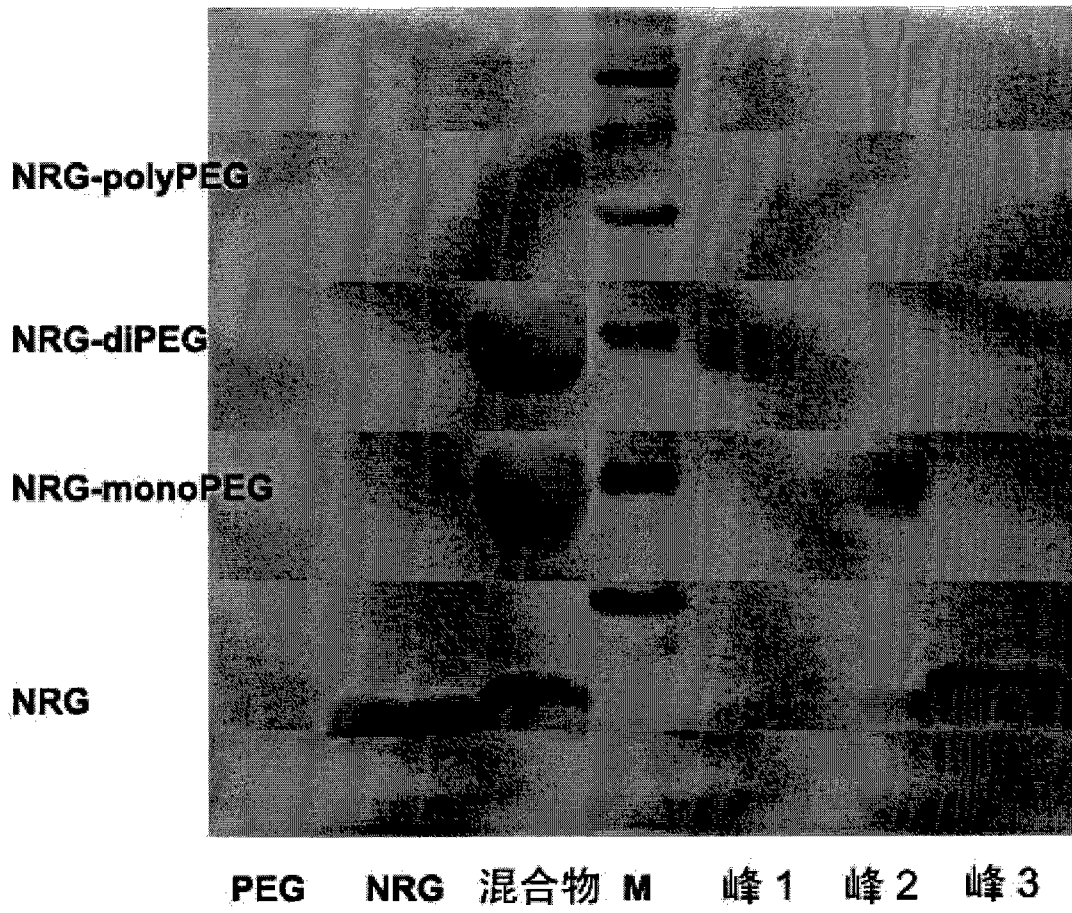


图 3