

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C07K 14/475

C12N 5/08 A61K 38/18

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99107175.1

[43]公开日 2000年12月13日

[11]公开号 CN 1276381A

[22]申请日 1999.6.4 [21]申请号 99107175.1
[71]申请人 邱列群
地址 200051 上海市长宁区天山二村 113 号 304 室
共同申请人 周明东
[72]发明人 邱列群 周明东

[74]专利代理机构 上海专利商标事务所
代理人 陈文青

权利要求书 1 页 说明书 17 页 附图页数 9 页

[54]发明名称 生长因子神经调节蛋白及其类似物的新应用

[57]摘要

本发明涉及生长因子神经调节蛋白及其类似物在体外促进心肌细胞分化,诱导心肌细胞内肌原纤维节和细胞骨架结构重建或细胞间粘合,识别能抑制神经调节蛋白刺激心肌细胞分化的多肽或化合物,以及制备治疗心脏病和心力衰竭药物中的新的应用。

ISSN 1008-4274

知识产权出版社出版

1. 神经调节蛋白在体外促使心肌细胞分化中的应用, 该应用包括用有效量的神经调节蛋白处理心肌细胞。
- 5 2. 神经调节蛋白在体外诱导心肌细胞内肌原纤维节与细胞骨架结构重新构建或细胞间粘合的应用, 该应用包括用有效量的神经调节蛋白处理心肌细胞。
3. 神经调节蛋白在识别能抑制神经调节蛋白刺激心肌细胞分化的多肽或化合物中的应用, 该应用包括在神经调节蛋白存在下使待识别的多肽或化合物在体外与心肌细胞接触, 并测定它们对神经调节蛋白刺激心肌细胞分化的抑制作用。
- 10 4. 根据权利要求 3 所述的应用, 其中细胞分化的测定包括 DNA 合成的增减。
5. 神经调节蛋白在制备用于治疗心脏病和心力衰竭的药物中的应用。
6. 根据权利要求 5 所述的应用, 其中所述药物还可任选地与 ACE 抑制剂、CT-1 抑制剂、人生长因子和/或 IGF-1 结合使用。



说明书

生长因子神经调节蛋白及其类似物的新应用

5 本发明涉及影响心肌收缩单位组合的多肽类的应用，尤其是生长因子神经调节蛋白及其类似物在改进心脏患者心肌功能中的应用。

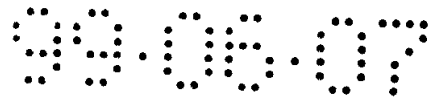
心力衰竭影响 1.5%的人口，美国约有 300 万人患有心脏病，并以每年 40 万人的速度在增加。目前对心力衰竭的治疗主要是用血管紧张肽转换酶(ACE)抑制剂与利尿药。ACE 抑制剂对晚期心力衰竭显示缓慢的改进，仅有少于 60%病人的症状得到减轻，死亡率仅降低 15-20%。心脏移植由于缺乏供体心脏而受到限制。除了异羟基毛地黄毒苷外，其他有效药物的长期应用都会产生副作用，包括心律不齐与猝死。

15 在心脏发育期间，心肌细胞的生长从增殖转为肥大。前者为增加心肌细胞的数量，后者则增大细胞，不合成 DNA，细胞也不再分裂。这种转换在心脏发育期间伴随着心肌细胞的终极分化。转换开始于胚胎晚期，终止于出生几星期后。在这期间，基因的表达，特别涉及到细胞周期及信号被重新编制，细胞的表型也被改变成为细胞-细胞粘合，终极分化的心肌细胞中的收缩蛋白也被更有序地组合。

20 当各种病理的刺激导致心肌受损后，或在心肌工作需求增加时，成人的心脏肥大是一种适应性的生理反应。正常的肥大细胞形体大，具有增加的并组合完好的收缩单位与强的细胞间粘合，而病态的肥大细胞中收缩蛋白组合无序，细胞间的粘合不好。

25 肌纤维与肌原纤维的排列错误是心肌病的重要特征。前者是细胞间结合的混乱，后者是心肌内收缩蛋白的无序组合。它们受特殊细胞信号的影响。这样，一些如生长因子和激素的信号将改变细胞间粘合与肌原纤维节的结构。没有这些信号刺激，显示出细胞骨架和肌原纤维节结构的错误排列及细胞间相互作用的分离。因为心肌细胞的分化与心脏细胞的重新构建，粘合和收缩蛋白的组合紧密相关，这些刺激心肌细胞分化的因子可能对增强成熟的心肌细胞内肌原纤维节结构的装配起决定性的作用。

30 心肌细胞离体模型系统的研究证实，一些物理、激素、生长因子和病理上的刺激能激发一些心肌肥大的独立的表型特征(Chien 等(1991) FASEBJ. 5: 3037-3046; Zhou 等,(1995) PNAS,USA,92: 7391-7395)。目前，在这些离体模型中，



至少存在三种信号传递途径，涉及到 ras-,rho,和 Gq 蛋白依赖型的下游效应物。

5 当对激发心肌细胞肥大反应的信号途径的研究取得重大进展时，相对关于特别刺激心肌细胞的终极分化和与之相联的收缩蛋白的装配机制却知道得很少。能够影响这些过程的化合物可能成为用于处理各种心脏疾病的一类主要的新治疗剂。

10 神经调节蛋白(neuregulin)是一种表皮生长因子(EGF)类的生长因子。它能激活 EGF 受体族中 erbB 受体，并涉及到其他的一些生物反应：如刺激乳房癌细胞分化和乳蛋白的分泌；诱导神经脊细胞分化为 Schwann 细胞；刺激骨骼肌细胞内乙酰胆碱受体的合成；以及促进心肌细胞成活和 DNA 合成。用神经调节蛋白基因严重缺陷的小鼠胚胎做的活体研究证明神经调节蛋白对于心脏和神经发育是必需的。然而，关于神经调节蛋白如何控制细胞分化和其下游信号途径的信息是有限的。

15 在早期发育的心脏中，神经调节蛋白和 ErbB 受体各自在心内膜衬里和心脏肌肉内表达。因为这二层分开很宽，神经调节蛋白必须穿过二层细胞中的空间，再激活 ErbB 受体。激活这些心肌细胞中的受体对于促进肌肉细胞生长或迁移到心内膜，从而在二层细胞中形成手指型结构是必须的。以前尚不清楚是否神经调节蛋白刺激了心肌细胞的分化。

20 本发明基于发现神经调节蛋白增强心肌细胞的分化，肌原纤维节和细胞骨架的组合与细胞间的粘合。神经调节蛋白，神经调节蛋白多肽，神经调节蛋白衍生物，或那些有类似神经调节蛋白作用的化合物，在本发明中缩写为 NRG。发明者现在发现神经调节蛋白与它的细胞作用可能适用于探测，诊断与处理心脏疾病。

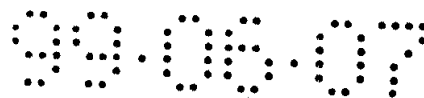
因此，本发明的目的是提供神经调节蛋白在体外促进心肌细胞分化中的新应用。

25 本发明的另一个目的是提供神经调节蛋白在诱导心肌细胞内肌原纤维节和细胞骨架结构重建或细胞间粘合中的新的应用。

本发明还有一个目的是提供神经调节蛋白在识别能抑制神经调节蛋白刺激心肌细胞分化的多肽或化合物中的新的应用。

30 本发明还有一个目的是提供神经调节蛋白在制备治疗心脏病和心力衰竭药物中的新的应用。

本发明包括一种在体外促使心肌细胞分化的方法。该方法包括用有效量的神经调节蛋白处理心肌细胞，从而激活 MAP 激酶途径并引起心肌细胞分化。



本发明还包括一种在体外诱导心肌细胞内肌原纤维节与细胞骨架结构重建或细胞间粘合的方法。该方法包括用有效量的神经调节蛋白处理细胞，从而激活 MAP 激酶途径，引起细胞结构的重新构建或细胞间粘合。

5 神经调节蛋白可以直接提供给细胞，也可间接地由诱导那些涉及神经调节蛋白合成的基因表达来产生。神经调节蛋白可通过自身细胞或由其他细胞中基因表达来产生。

10 本发明包含识别能刺激心肌细胞分化的多肽或化合物的方法。此方法包括：在心肌细胞分化的诱导物神经调节蛋白存在时，用其他多肽或化合物接触心肌，并测定心肌细胞分化的发展。将心肌细胞分别暴露在神经调节蛋白，其他多肽，或神经调节蛋白与某种多肽的混合物下，测定细胞的分化。细胞的分化测定包括 DNA 合成的增减、心肌细胞内 MAP 激酶在不同时间的磷酸化分析、细胞周期的抑制物-p21^{CIP1} 的表达数值、收缩单位的表型组合、收缩单位的堆积、细胞骨架中肌动蛋白纤维的表型转变、以及细胞间粘合的表型的测定。

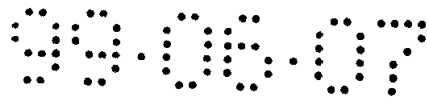
15 在识别能刺激心肌细胞分化的多肽或化合物的方法中，第一个例子是将细胞用不同浓度的多肽或化合物培养，测定各种对心肌细胞分化的影响。

第二个例子是：识别这些多肽或化合物诱导细胞分化的作用是否强于心肌细胞增殖的强诱导物—胰岛素类生长因子(IGF-1)的作用。将细胞在单独加 IGF-1 或 IGF-1 及其他多肽或化合物的培养液中培养，测定这些多肽或化合物抑制 IGF-1 诱导 DNA 合成的能力，并测定肌原纤维节结构的装配与细胞间的粘合。

20 第三个例子是：将细胞放入单独加脱羟肾上腺素(PE)或再加试验用多肽或化合物的培养液培养。这些多肽或化合物增加由 PE 引起的心肌细胞分化的能力被确定。一个能刺激心肌细胞分化的多肽可刺激肌原纤维节的装配，从而以多种方式增强心脏功能，包括激活神经调节蛋白的专一受体如 ErbB2， ErbB3 和 ErbB4。

25 本发明还包含了一种识别能抑制神经调节蛋白刺激心肌细胞分化的多肽或化合物的方法。该方法包括在神经调节蛋白存在下，使试验的多肽或化合物接触心肌细胞，并测定它们对神经调节蛋白刺激的抑制作用。一种化合物可以通过阻断，压制，逆转或拮抗神经调节蛋白刺激心肌细胞分化的作用。具体步骤为测定心肌细胞的 DNA 合成。

30 本发明还包含了一种在哺乳动物内防止心肌细胞间粘合的分离和/或肌原纤维节错误排列的治疗方法。该方法包含对哺乳动物施用有效剂量的神经调节蛋白或化合物。治疗方法为直接处理由心肌细胞间粘合分离和/或肌原纤维节结构排列错误引起的心力衰竭。



本发明还包含了一种防止或降低哺乳动物心脏病发病率的方法。该方法包含防止或降低某些多肽或化合物对神经调节蛋白及其受体作用的干扰或影响，这些影响产生心力衰竭。

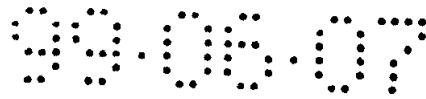
5 在另一具体例子中，用一种酷似神经调节蛋白作用的治疗剂来处理或防止 PE 或 IGF-1 传递的心肌细胞的功能障碍。

另外，本发明还包含了一种确定受治疗者心脏病或心力衰竭的素质的方法。该方法包含测定受治疗者的心肌细胞或相关细胞能否表达正常或足够水平的神经调节蛋白或其 ErbB 受体的能力。无此能力者预示具心脏疾病或心力衰竭的素质。

10 本发明包括用神经调节蛋白，神经调节蛋白多肽，神经调节蛋白衍生物或具有类似神经调节蛋白作用的化合物来制备用于处理或治疗心脏病与心力衰竭的药物。由神经调节蛋白制得的该药物还可选择与某种能抑制不同的肥大诱导途径的化合物结合长期使用。其他可选择的成分包括用于充血性心力衰竭病例中的心脏营养抑制剂(如 Ct-1 对抗剂)、ACE 抑制剂如卡托普利(captopril)、人生长因子
15 及 IGF-1，或另一些用于其他心力衰竭或心脏紊乱的病例中的抗肥大的，心肌营养的，抗心律不齐的，或影响肌收缩力的因子。

本发明还包括生产重组人神经调节蛋白的方法。

通过培养心肌细胞作为模型，本发明者评估了心肌细胞分化成熟与肌原纤维节和细胞骨架结构的装配或维持中的神经调节蛋白信号。用纯化的重组人神经调节蛋白(rhNRGB2)培养胚胎心肌细胞，测定神经调节蛋白对细胞信号的影响。
20 $10^{-8}M$ 神经调节蛋白产生至少 21 小时长的 MAP 激酶持久激活，而 $10^{-10}M$ 的 rhNRGB2 仅能产生短暂的激活作用。Cdk 的抑制物 $p21^{CIP1}$ 的表达在 $10^{-8}M$ 浓度时增加，在 $10^{-10}M$ 时不增加。增高 NRG 浓度，伴随 $p21^{CIP1}$ 表达的增加，产生 DNA 合成减少导致终极分化。而在低浓度时，则观察到 DNA 合成增加与细胞增殖的继续。此外，当 rhNRGB2 以 $10^{-8}M$ ，或 $10^{-10}M$ 浓度与 IGF-1 混合时，未见 DNA
25 合成的负影响，并显著地阻断了 IGF-1 所刺激的心肌细胞增殖。为了进一步评估 NRG 刺激的心肌细胞分化，培养的新生大鼠心肌细胞的肌原纤维节和细胞骨架结构被用鬼笔毒环肽染色与免疫荧光染色(用抗辅肌动蛋白的抗体)来测定。NRG 显著地改进了肌原纤维节和细胞骨架结构与细胞间的粘合。用 IGF-1 或 PE 处理
30 则没有上述的作用。当用 rhNRGB2 与 IGF-1 或 PE 混合时，rhNRGB2 改进了细胞结构。 $10^{-8}M$ 浓度的 rhNRGB2 显示了对肌原纤维节与细胞间粘合改进的最大效应。此外，神经调节蛋白重叠了由 PE 刺激传递的 MHC- α 的负调节。这些发现



指出 NRG 的功能通过二种不同的途径：一种途径在低浓度时引起心肌细胞生长，而另一种途径在高浓度时通过持久地激活 MAP 激酶途径传递，并引起终极分化与成熟。

5 本发明可通过给予有效量的神经调节蛋白来处理及防止哺乳动物心力衰竭或心肌细胞肥大。更可取的是可用于处理一个已患有或将要患心力衰竭的患者。

本发明还可用于防止那些患者由于使用某种药物而引起心脏肥大或充血性心力衰竭。在发明的方法中，神经调节蛋白多肽可在使用该种引起心脏疾病的药物之前、同时或之后施用。

10 在发明的治疗方法中，神经调节蛋白多肽可长期或急性地注射入病人的静脉。

本发明可与现今的治疗方法结合用于心力衰竭的处理，如与 ACE 抑制剂处理结合。ACE 抑制剂是血管紧张素转换酶抑制药物，它能防止血管紧张素 I 转换为血管紧张素 II。ACE 抑制剂可通过降低全身血管抵抗及减轻循环的充血使充血心力衰竭者受益。ACE 抑制剂包括那些商标为 Accupril®(喹那普利)，
15 Altace®(雷米普利)，Capoten®(卡托普利)，Lotensin®(benazepril)，Monopril®(福辛普利)，Prinivil®(赖诺普利)，Vasotec®(依那普利)，及 Zestril®(赖诺普利)。

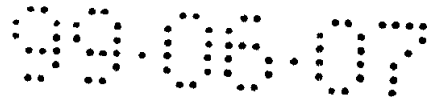
20 本发明可与处理心脏疾病如高血压的药物结合。例如，神经调节蛋白多肽可与内皮因子受体抵抗剂一起施用，如内皮因子受体的抗体，肽类与小分子抵抗剂； β -肾上腺受体抵抗剂如卡维地洛； α_1 -肾上腺受体抵抗剂；抗氧化剂；多种作用的化合物(如 β -封闭剂/ α -封闭剂/抗氧化剂)；卡维地洛-类化合物或在卡维地洛中具多种功能的化合物组合；及生长因子等。

神经调节蛋白类似物单独或与其他肥大压制剂途径促进剂或抵抗已知的肥大诱导途径的分子结合用，能作为处理哺乳动物心力衰竭的药物。

25 下面将参照下列附图作进一步详细描述。

图 1 表示神经调节蛋白在不同浓度下减少胚胎心肌细胞中 DNA 合成的情况。纯化的心肌细胞在胶原蛋白涂层的 96 孔板里培养。加载体作为对照(X)，rhNRGB2(▲)，或 IGF-1(◆)，在不同的浓度。细胞经培养 24 小时后用 $[^3\text{H}]$ 胸苷合并法($[^3\text{H}]$ thymidine incorporation)测定 DNA。数据从 5 个培养皿中数据的平均值
30 加上标准误差所得。

图 2 表示神经调节蛋白刺激引起心肌细胞内 MAP 激酶的持久激活。(a)细胞用无血清培养液培养，加载体(-)，或加 10^{-8}M ，或 10^{-10}M 的 rhNRGb2(+)，时间



如表上所示. 收集被处理的细胞并用特殊的 Phospo-Mark 抗体做 Western 印迹法. 用抗 erbB2 抗体的 Western 印迹法来标准化. (b)条带强度用密度计定量, 二条时间曲线: MAP 激酶对 $10^{-8}M$ 配体(\blacktriangle), 和 $10^{-10}M$ 配体(O)的反应.

5 图 3 表示神经调节蛋白刺激增加了心肌细胞内 $p21^{CIP1}$ 的表达. (a)在血清 (5%FBS)存在或不存在的条件下用 $10^{-8}M$, 或 $10^{-10}M$ 的 rhNRGb2 刺激培养心肌细胞 24 小时. 将细胞用电泳加样缓冲液裂解后做 Western 印迹法分析. $p21^{CIP1}$ 用抗 $p21^{CIP1}$ 的单克隆抗体测定. 加样的蛋白含量通过测定 erbB2 表达来标准化. (b)在第一行条带的密度分析结果中, 白色或水平条纹棒为不经配体刺激的 $p21^{CIP1}$ 表达, 灰色或垂直条纹棒为经低浓度配体刺激, 及黑色或斜纹棒为经高浓度刺激.

10

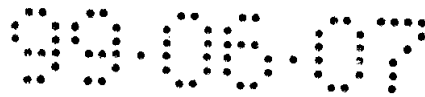
图 4 表示神经调节蛋白抑制 IGF-1 刺激心肌细胞中的 DNA 合成. 用最佳浓度($10^{-9}M$)的 IGF-1, 在 $10^{-8}M$, 或 $10^{-10}M$ 的 rhNRGb2 存在或不存在下刺激 96 孔培养皿中的细胞. 24 小时后用 $[^3H]$ 胸苷合并法测定 DNA 合成. 图中的棒显示了 5 孔测定的平均值加标准误差, 结果来自至少三次的重复实验.

15 图 5 表示神经调节蛋白所增强的心肌细胞中肌动蛋白纤维组合. 新生大鼠心肌细胞用加或不加 $10^{-8}M$ rhNRGb2 的无血清培养液培养后, 用鬼笔毒环肽固定, 染色. 在紫外荧光显微镜下,心肌肌动蛋白在细胞显露出红色的纤维, 用 40 倍镜拍照.

20 图 6 表示神经调节蛋白所增强的肌原纤维节蛋白的装配与组合及细胞间粘合. 新生大鼠心肌细胞用无血清培养液(a), 加 $10^{-10}M$ 的 rhNRGb2(b), 加 $10^{-8}M$ 的 rhNRGb2(c)培养 48 小时. 然后用抗 α -辅肌动蛋白的抗体进行免疫-荧光染色. 在紫外荧光显微镜下, 肌原纤维节中的心脏辅肌动蛋白显露出绿色的纤维. 用 40 倍镜拍照.

25 图 7 表示神经调节蛋白所改进的经 IGF-1 刺激的心肌细胞中的肌原纤维节结构与细胞间粘合. 心肌细胞用无血清培养液(a)加 $10^{-9}M$ 的 IGF-1, (b)(或)加 $10^{-9}M$ 的 IGF-1 与 $10^{-8}M$ 的 rhNRGb2 培养 48 小时. 然后将细胞固定并用抗 α -辅肌动蛋白的抗体进行免疫-荧光染色. 在紫外荧光显微镜下, 肌原纤维节中的心脏辅肌动蛋白显露出绿色的纤维. 用 40 倍镜拍照.

30 图 8 表示神经调节蛋白所改进的经 PE 刺激的心肌细胞中的肌原纤维节结构与细胞间粘合. 将心肌细胞用无血清培养液(a)加 $10^{-4}M$ 的 PE(b)(或)加 $10^{-4}M$ 的 PE 与 $10^{-8}M$ 的 rhNRGb2 培养 48 小时. 然后将细胞固定并用抗 α -辅肌动蛋白的抗体进行免疫-荧光染色. 在紫外荧光显微镜下, 肌原纤维节中的心脏辅肌动蛋白显



露出绿色的纤维。用 40 倍镜拍照。二种细胞表型由 PE 单独刺激被观察并标记为 A 和 B。

5 图 9 表示神经调节蛋白诱导 PE-压制的肌球蛋白重链 α 异构体(MHC- α)的表达。心肌细胞用无血清培养液培养并分别添加 PE, NRG, 或 PE 与 NRG。相关的 MHC- α 和 MHC- β 的表达水平用较低周期(20 个周期)的 PT-PCR 测定。PCR 产量代表这两个基因相对的表达水平。

10 利用心肌细胞分化的离体系统, 与二个已确定的由 α -肾上腺素促进剂及 IGF-1 产生的激素与生长因子的刺激作比较, 神经调节蛋白刺激分化反应的功能得到确认。本发明已证实了神经调节蛋白分化途径存在于心肌细胞中, 且神经调节蛋白多肽能激活这些途径。由于心肌细胞的分化包括肌原纤维节结构的组合及细胞间粘合的过程, 因此本发明提供了一个处理和防止心肌细胞中肌原纤维节结构的组合及细胞间粘合错误组合的有用方法, 该方法亦能增强心肌病的心脏功能, 识别激活心肌细胞分化途径的多肽或化合物。

本文中所用的术语如下:

15 “神经调节蛋白或神经调节蛋白类似物”是一些能激活 ErbB2/ErbB4 或 ErbB2/ErbB3 异二联蛋白酪氨酸激酶的分子, 如神经调节蛋白异构体, 神经调节蛋白中的 EGF 区域, 神经调节蛋白突变体, 和任何能激活上述受体的神经调节蛋白类的基因产物。本发明中用的“神经调节蛋白”是以下的多肽, 该多肽系人神经调节蛋白 β 2 异构体的一个片段, 其中包含了受体结合区 EGF-类区。

20 cDNA 的顺序为:

AGC CAT CTT GTA AAA TGT GCG GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT
GTG AAT GGA GGG GAG TGC TTC ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAC CCC
TCG AGA TAC TTG TGC AAG TGC CCA AAT GAG TTT ACT GGT GAT CGC
TGC CAA AAC TAC GTA ATG GCC AGC TTC TAC AAG GCG GAG GAG CTG
25 TAC CAG

根据上述 cDNA 顺序编码的氨基酸顺序为:

SHLVKCAEKEKTFCVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQNYV
MASFYKAEELYQ

30 “心肌细胞分化”是一种状态, 其特征为 DNA 合成的降低大于 10%, DNA 合成被其他因子刺激的抑制大于 10%, 充分组合的肌原纤维节结构与细胞间的粘合, 对 MAP 激酶的持久激活, 与 p21^{CIP1} 表达增加。

“有序的肌原纤维节或肌原纤维节结构的增强”是一种状态, 其特征为心肌细胞中收缩蛋白通过 α -辅肌动蛋白的免疫-荧光染色显出直排列。细胞中 α -辅肌动蛋

白的直排列在图表中可用显微镜检查及相连的摄影来区别。

“肌原纤维节或肌原纤维节结构的错误组合或排列”与上述定义意义相反。

5 “细胞骨架结构的组合或增强的组合”是一种状态，其特征为通过对心肌细胞的鬼笔毒环肽染色所显示的直的肌动蛋白纤维。细胞中直的肌动蛋白纤维在图表中可用显微镜检查及相连的摄影来区别。

“细胞骨架结构的无序组合或排列”与上述定义意义相反。

“MAP 激酶的持久激活”是指 MAP 激酶的磷酸化状态 P42/44 在细胞中维持至少 24 小时。

10 “p21^{CIP1} 表达增加”是指 p21^{CIP1} 表达至少增加 50%并在细胞中维持至少 24 小时。

15 “心脏疾病的处理”包括所有合适的方法，如静脉注射神经调节蛋白多肽，基因治疗方法，用编码神经调节蛋白或衍生物的基因植入心脏或其他细胞去处理心脏疾病。例如，用腺病毒或与腺病毒结合的病毒作为载体运送神经调节蛋白基因进入心脏或其他细胞，然后被转染的细胞能表达并分泌神经调节蛋白多肽，从而激活心肌细胞内的 ErbB(受体)。

术语“处理”与类似词用于此通常指一个计划获得的药理及/或生理的效应。该效应可以是预防：完全或部分地防止一种疾病或症状；也可以是治疗：完全或部分地治疗一种疾病及/或提供对此疾病相反的作用。“处理”在此覆盖了对哺乳动物疾病的处理，特别对人类的疾病的处理。并包括：

20 防止该疾病在那些尚未被诊断但被预处理的受治疗者中发作。

控制该种疾病。如控制疾病发展或减轻该疾病,使疾病退化等。

本发明直接处理那些具有心脏疾病和相关条件如心力衰竭发展危险的病人。

25 “心力衰竭”是指心脏功能不正常，心脏不能以适合的速度泵出足够的血液以满足代谢的组织。心力衰竭的范围包括充血的心力衰竭，心肌梗塞，心动过速(快速心律不齐)，家族肥大型心肌病，局部缺血心脏病，自发扩大的心脏病，及心肌炎。局部缺血，充血，风湿性，及自发形式中任何一种因素都能引起心力衰竭。慢性的心肌肥大是充血性心力衰竭与心脏停搏的前体的一种显著病态。

30 “处理”涉及治疗处理与预防或防止的测定。已具紊乱或具紊乱倾向的病人需处理。肥大可由任何对视黄酸应答的原因所引起，包括先天性的，病毒的，自发的,心脏或肌肉营养的原因，或因局部缺血或局部缺血造成的损害如心肌梗塞所引起。处理被用于终止或减缓肥大的进程，特别当心脏局部缺血造成损害心肌梗塞

后。这些药剂应立即施用，可防止或减小肥大。

在下列实施例中采用了下述这些试剂与抗体：

IGF(*Boehringer*)；胶原酶(*Worthington*)；胰酶(*Gibco BRL*)；MEK1(MAPKK)抑制剂(PD98059)(*New England*)；[甲基-³H]胸苷(*Amersham*)；抗-erbB2单克隆抗体(*Novocastra*)；单克隆IgG2b；p21^{CIP1}(F-5)(*Santa Cruz*)；抗-磷酸酪氨酸辣根过氧化物酶(HRPO)偶联的单克隆抗体，RC20(*Transduction Laboratories*)；抗- α -sacromeric actin单克隆抗体(clone 5c5)，HRPO-偶联的抗兔Ig，和抗-小鼠Ig(*Sigma*)；PhosphoPlus p44/42MAP激酶(Thr202/Tyr204)抗体盒(*New England*)；抗-FLAG M1亲和凝胶和抗-FLAG M2单克隆抗体(*Eastman Kodak*)。

10 实施例1 重组NRGb2的表达与纯化

A. 编码人NRGb2 cDNA的扩增

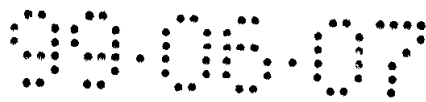
用Rneasy Mini试剂盒从能高表达NGR的人乳腺癌细胞株MDAMB-231中分离全部RNA。合成第一链DNA，NRG的cDNA片断通过PCR扩增，正向引物(GATCAAGCTTAGCCATCTTGTA^{AAA}ATGTGCG)包含一个四种核苷酸的引导序列及一个Hind III位点(加下划线者)，与NRGb2反向的引物(5-GATCAAGCTTCTACTGGTACAGCTCCTCCGC-3)，含有一个引导序列，一个Hind III位点(加下划线者)，与一个读框内的终止密码子(黑体与加下划线者)。

将编码人NRGb2异构体(rhNRGb2)的EGF区(氨基酸残基177-237)插入pFLAG1表达载体(ABI)。rhNRGb2与1FLAG-多肽在它的N-末端相连。在大肠杆菌DH5 α 的胞质中表达。用抗FLAGM1的单克隆抗体的亲和层析纯化。纯化后的rhNRGb2纯度超过90%。

B. 重组NRGb2的表达

编码NRGb2的PCR产物用Hind III降解并克隆到PFLAG.1表达载体(International Biotechnologies)。转化到E.coli DH5 α 后，测定含有NRGb2编码的cDNA克隆的菌落储藏在甘油中。pFLAG.1原核表达载体被设计为产生一个可溶的重组蛋白，该蛋白在转化细菌的胞质内表达，其中掺入了8个氨基酸残基pFLAG.1及21个氨基酸残基的引导顺序(ompA)，引导顺序将溶合蛋白易位至胞质空间，ompA顺序在易位过程中被切除。重组的溶合蛋白可用M1抗-FLAG单克隆抗体的亲和层析来纯化。

30 转化的E.coli在37°C振荡培养直至OD600值达到0.8,然后加入500 μ M的异丙基-1-硫- β -D吡喃(型)半乳糖苷孵化2小时。在初始实验中决定每一个E.coli细胞成分的表达水平，将异丙基-1-硫- β -D吡喃(型)半乳糖苷诱导的100ml培养



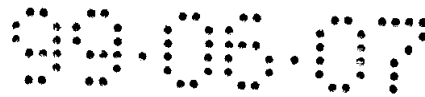
液分成 3 份，离心收集细胞。将一份细胞沉淀重新悬浮在 SDS-PAGE 加样缓冲液中，分离出全部细胞成分。通过加 5ml 抽提缓冲液 A[50 mM Tris-HCl (pH8.0), 5mM EDTA, 0.25mg/ml 溶菌酶, 50 μ g/ml NaN₃], 再加 0.5ml 抽提缓冲液 B[1.5M NaCl, 0.1M CaCl₂, 0.1M MgCl₂, 0.02 μ g/ml DNase I, 0.2mM NaVO₃, 0.2mM 5 苯甲基磺酰氟, 0.2mM 亮抑酶肽, 0.2mM 抑蛋白酶肽], 第二份沉淀被用于将全部细胞沉淀分级成可溶与不溶成分。产生的悬浮液用 18000 x g 离心 1 小时, 分出溶解与不溶的成分。不溶成分用 SDS-PAGE 加样缓冲液重新悬浮, 而可溶成分用 2X 的加样缓冲液等体积混合。最后, 第三份细胞沉淀重悬于 8ml 的 OS 缓冲液[0.5M 蔗糖, 0.03M Tris-HCl(pH8.0), 和 1mM EDTA]并用 3500 x g 在 10°C 离 10 心 10 分钟。细胞立刻用 5ml 冰水重新悬浮以释放胞质蛋白。然后在 10°C 用 3500xg 离心 10 分钟, 收集上清液, 将 10 μ l 上清液与同体积的 SDS-PAGE 加样缓冲液混合, 电泳及转移后, 蛋白用抗-FLAGM2 单克隆抗体及增强的化学发光法(ECL, Amersham)检测。M2 抗体的检测含有 ompA-切除与非切除形式的 FLAG 蛋白。

C. 重组蛋白的纯化

15 在胞质空间表达的 NRGb2 用仅与 ompA-切除 FLAG 溶合蛋白结合的抗-FLAG M1 单克隆的亲和层析分离纯化。这种抗体仅在钙离子存在时与 FLAG 多肽结合; 因此, 胞质细胞组分用含 2mM CaCl₂ 的 TBS(150mM NaCl 和 50mM Tris-HCl, pH7.5)并过柱。结合在柱上的蛋白用含 2mM EDTA 的 TBS 洗脱, 然后用 M2 抗-FLAG 的抗体做 Western 印迹法及考马氏蓝 SDS-PAGE 胶染色分析纯 20 度。

实施例 2 小鼠心肌细胞的初级培养

小鼠胚胎(E11.5-12.5)被用于准备初级的心肌细胞。心脏组织在无菌条件下从胚胎中分离如前所述。用 5ml 磷酸缓冲液(PBS, pH7.4)洗三次。组织用 0.05%胰蛋白酶/0.57mM EDTA 在 37°C 降解 15 分钟。丢弃分离的细胞, 留下的组织用含 25 0.41mg/ml 胶原酶和 0.6mg/ml 胰酶的 PBS 在 37°C 震荡(100rpm)15-30 分钟。将第二步处理所分离的细胞与相同体积的冷小牛血清(FBS)混合, 终止降解反应, 在室温下 1500rpm 离心 5 分钟。去除上清液, 沉淀用 Dulbecco 改进的 Eagle 培养基(DMEM)(Gibco BRL)加 10%FBS, 10mM 谷氨酰胺, 100 单位/ml 青霉素和链霉素重新悬浮。通过预涂在培养皿 3-5 次(1 小时/次), 心肌细胞被浓缩。再将细胞 30 在明胶预处理的 6 孔或 96 孔的培养皿中, 最终密度分别为 2.5 x 10⁵ 细胞/孔或 2x 10³ 细胞/孔培养 20 小时。在用 NRG 或其他生长因子在无血清培养液(DMEM)37°C 处理前撤除血清。



用此方法,本发明者可常规地得到大于 90%的心肌细胞(数据未提供)。用单克隆抗 α -肌原纤维节肌动蛋白的抗体(克隆 5c5)(*Sigma*)对细胞进行免疫-荧光染色。在显微镜下观察评定。

实施例 3 心肌细胞的免疫细胞化学

5 培养的心肌细胞用 PBS 洗后,用 4%多聚甲醛加 0.1% Triton X-100 在室温固定 30 分钟。固定的细胞用含 5%脱脂牛奶的 PBS 阻断 30 分钟,然后用抗- α -辅肌动蛋白(actinine)抗体(*SIGMA*)在室温下孵育 45 分钟。用 PBS 洗后,用抗-小鼠 IgG 与 FITC(*Silenus Laboratory, Australia*)偶联的抗体(*SIGMA*)在室温下孵育 30 分钟。用 PBS 洗后,将细胞用含 1%对苯二胺(1mg/ml, *Sigma*)的甘油,装盖,封闭。用 40 倍镜的紫外荧光显微镜检查并拍照。对于鬼笔毒环肽染色,细胞在室温下用 4%甲醛固定 1 小时。用 PBS 洗二次后,细胞用鬼笔毒环肽在暗处染色小时。细胞用 PBS 洗五次后将细胞用含 1%对苯二胺(1mg/ml, *Sigma*)的甘油制标本,在紫外荧光显微镜下检查。

p185^{neu}与MAP激酶的磷酸化

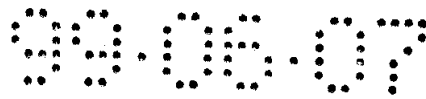
15 在6孔板中无血清培养的心肌细胞用rhNRGb2处理不同时间去激活erbB受体与MAP激酶。使细胞立即在200ml冷裂解缓冲液(50mM HEPES, pH7.5, 150mM NaCl, 10%甘油, 1%(v/v) Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM 乙二醇四乙胺(EGTA), 10 mM焦磷酸钠, 10 mM NaF, 2 mM 原钒酸钠, 1 mM 苯甲基磺酰氟(PMSF), 10 mg/ml抑蛋白酶肽及10mg/ml 亮抑酶肽)中裂解。产生的裂解物用 20 HRPO-偶联的单抗RC20(1: 2,000)探测erbB受体,用磷酸专一的p44/42 MAP激酶抗体(1:1000)探测磷酸化的MAP激酶,用加强的化学发光(ECL)免疫印迹探测系统(*Amersham*)。抗erbB受体被用于标准化加样蛋白。荧光标记的蛋白在薄膜上产生的条带用密度计来定量。

p21^{CIP1}蛋白的表达

25 用不同浓度的rhNRGb2单独或加MEK抑制剂PD98059刺激用无血清培养的细胞24小时,用加样缓冲液(50 mM Tris-Cl, pH6.8, 100mM DTT, 2%SDS, 0.1%溴酚蓝与10%甘油)裂解,并用p21^{CIP1}抗体(1: 1,000)做免疫印迹分析。用HRPO-偶联抗小鼠Ig(1: 3,000), p21^{CIP1}被用ECL免疫印迹系统测定。加样的蛋白含量通过测定erbB2受体来标准化。免疫斑用密度计来定量。

30 胸苷合并法

无血清24小时后,细胞用rhNRGb2或IGF-I在无血清的DMEM培养12小时,然后加入[甲基-³H]胸苷(0.5m Ci/孔)用冰的5%三氯醋酸洗二次,及冰的PBS洗5次。



用100ml 1%SDS溶解细胞，液闪记数计记数。所有的数据用平均数加标准误差表达。

5 初级小鼠胚胎心肌细胞(E11.5-12.5)中的DNA合成在经过rhNRGb2刺激后被评估，研究细胞生长对NRG的反应。在图1中， 10^{-10} M浓度的rhNRGb2使DNA合成增加约2倍。然而当配体浓度增加时，DNA合成显著地减少。与对rhNRGb2的反应相反，重组人IGF-1仅引起细胞增殖反应，该反应与施用的生长因子浓度无关。高浓度的NRG对DNA合成的抑制不是因为rhNRGb2试剂中的*E.coli*蛋白所引起的，因为这些蛋白从用FLAG载体转染的细菌中提纯后，并没有显示对心肌细胞增殖的负作用。

10 erbB受体族的活化激发了一个分子相互作用的链锁反应，最终导致MAP激酶的刺激。如前报道，MAP激酶活化的持久对细胞分化是决定性的(Traverse等(1994) Current Biology 4: 694-701)。在用 10^{-8} M或 10^{-10} M的rhNRGb2处理后，通过用能识别被激活的p42/p44 MAP激酶专一的磷酸-MAP激酶抗体来研究MAP激酶活化的时间过程。如图2所示，在高用量rhNRGb2时，p42/p44 MAP激酶的活化能持久至少21小时，而在低浓度时，MAP激酶的活化短暂并在不到3小时内回落到基础水平。

15 由于MAP激酶的短暂激活与p21^{CIP1}的短暂表达直接有关，并且p21^{CIP1}的积累导致细胞周期停留在G1期，发明者提出是否MAP激酶的持久激活导致一个高水平p21^{CIP1}表达的问题。图3中显示，p21^{CIP1}表达的增加仅在用高浓度的rhNRGb2时被观察到。这个对p21^{CIP1}表达的效应独立于细胞培养条件，因为在使用无血清及含血清培养液时，均观察到相似的效应。 10^{-8} M rhNRGb2增加p21^{CIP1}表达能持久至少24小时。这样在NRG刺激的心肌细胞中，p21^{CIP1}表达的持久对DNA合成的抑制是决定性的。

20 通过混合rhNRGb2与IGF-I后测定心肌细胞的DNA合成，评价NRG传递的心肌细胞分化是否对抗由其他生长因子所刺激的增殖。这个问题非常重要，因为在体内，心肌细胞暴露在多种多肽激素与生长因子下。在此实验中，IGF-1的最佳浓度(10^{-9} M)与 10^{-8} M，或 10^{-10} M的NRG结合用。如图4所示，与单用NRG不同，低浓度的NRG对DNA合成产生很小的负效应，而高浓度的NRG显著地阻断了心肌细胞对IGF-1刺激的反应。后一结果支持以上的数据：一个特殊的细胞内的途径是由高浓度的NRG激活的。

30 通过用专一性抗肌原纤维节或肌原纤维蛋白 α -辅肌动蛋白抗体的免疫-荧光染色与对肌动蛋白纤维的鬼笔毒环肽染色，评估培养的新生大鼠心肌细胞的表

型。

在无血清培养液中的细胞显示出细胞骨架无序组合(图 5), 而加 NRG 培养的细胞具有有序组合的肌动蛋白纤维(图 5)。图 6 显示, 在用抗 α -辅肌动蛋白抗体的免疫-荧光染色的细胞中, 与不加 NRG 的细胞相比, NRG 显著地改进了肌原纤维节的装配。NRG 的浓度也扮演了一个重要角色: 高浓度的 NRG(10^{-8} M)产生了更有组织的肌原纤维节(图 6)。细胞间的粘合也被 NRG, 特别在高浓度时的刺激所增强。由 NRG 处理的细胞结构也与 IGF-1 或 PE 刺激的细胞进行了比较。IGF-1 对细胞肌原纤维节与细胞间的粘合不具有明显的效应(图 7), 然而, PE 的刺激产生了二种类型的细胞: A 型细胞与 NRG 刺激的细胞相似, 具充分分化及很有组织的肌原纤维节结构; B 型细胞有一个大的细胞表面积与相对较差的肌原纤维节结构与细胞间的粘合(图 8)。重要地是, 当细胞被 NRG(10^{-8} M)与 IGF-1 同时刺激时, 与单独用 IGF-1 刺激的细胞相比, 它们显示了改进的肌原纤维节结构(图 7)。当 NRG(10^{-8} M)与 PE 一起用于刺激细胞时, 仅 A 型细胞被观察到(图 8)。心肌细胞的分化与成熟伴随着 MHC- α 表达的增加与 MHC- β 表达的减少。PE 作为一个强力的肥大因子, 抑制了 MHC- α 的表达(图 9)。然而, NRG 单独具有对 MHC- α 表达确认的正效应, 并能抵消 PE-传递的对 MHC- α 表达的负效应(图 9)。

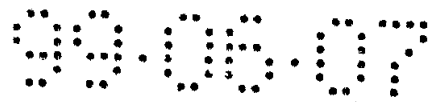
提供的证据表明, NRG 的浓度是决定 MAP 激酶的短暂或持久的激活状态的一个重要因素。MAP 激酶的持久激活状态产生了胚胎心肌细胞内 Cdk 抑制剂 $p21^{CIP1}$ 的表达水平的增加, 并伴随 DNA 合成的减少。这个发现对于配体浓度梯度决定细胞分化与胚胎发育的结局提供了明确的证据, 并进一步提供了细胞内信号途径如何区分基于配体浓度的信号强度的分子观察。

配体浓度在细胞分化中的重要性被猜想基于以下的观察:

- 1) 胚胎发育的模式与配体的梯度联系。
- 2) 离体时, 配体浓度对细胞分化是关键。
- 3) 细胞中受体的过多表达改变了它们响应配体刺激的结局。

考虑这些观察, 胚胎心肌细胞中 NRG 浓度依赖的 MAP 激酶激活建立了一个对进一步描述 erbB 受体相连的细胞信号对配体浓度改变的反应机制的模型。

NRG 是心肌细胞分化因子的概念被 NRG 诱导胚胎心肌细胞中的 $p21^{CIP1}$ 表达的发现所支持。由于 $p21^{CIP1}$ 被完全确定为 Cdk 的抑制物, 而 Cdk 能促进细胞周期中的 G1 进入 S 期, 因此 $p21^{CIP1}$ 表达的增加对起始终极分化是关键。这个概念也被以前发现的活体内心肌细胞终极分化(Parker 等(1995)Science 267: 1024-1027)与骨骼肌细胞分化发生时(Dias 等(1994)Semin. Diagn Pathol. 11:3-14)



p21^{CIP1} 表达增加所支持。在后一过程中， p21^{CIP1} 表达增加最终导致退出细胞周期开始分化。因为 p21^{CIP1} 表达增加的发生早于其他细胞周期调节子，它可作为骨骼肌分化的早期标志。如这里所证实的，在 NRG 刺激的心肌细胞中， p21^{CIP1} 表达伴随着 DNA 合成的减少，暗示 NRG-刺激的 p21^{CIP1} 表达的生理角色。此外，由 ERK 激酶抑制剂对 MAP 激酶与 p21^{CIP1} 的抑制评定 NRG-刺激的 p21^{CIP1} 表达是 MAP 激酶激活的一个直接结果。

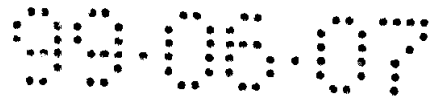
培养的心肌细胞中持久的 MAP 激酶激活是诱导 p21^{CIP1} 组成型表达所必需的，反之短暂的 MAP 激酶激活导致短暂的 p21^{CIP1} 表达。后者不足以调节 Cdk 的活性，因为 p21^{CIP1} 将很快地降解而组成型表达对阻断细胞周期蛋白/Cdk 复合物是必需的。在 PC12 细胞中，持久的 MAP 激酶途径被局限于应答来自 NGF 受体的特殊信号。持久的 MAP 激酶激活使 PC12 细胞分化成神经细胞。然而，这个途径在心肌细胞中能区别地应答 NRG 基于浓度的信号强度。

进一步支持 NRG 是一个分化因子的证据是当心肌前体细胞分化成心肌细胞时， NRG 刺激肌原纤维节和细胞骨架结构的装配。以前的观察也指出分化程度高的细胞具有更有序的肌原纤维节(Rumynatsev, P.P.(1977)International Review Cytology 51, p.187-273)。与 PE 或 IGF-1 刺激的细胞比较， NRG 刺激的细胞有组合最好的肌原纤维节。更重要的是，当 NGF 与 PE 或 IGF-1 混合时， NRG 极大地改进了肌原纤维节，指出当其他细胞信号存在时 NRG 刺激肌原纤维节装配占优势。 NRG 重叠 PE-传达的对 MHC-a 表达的负调节，这表明 NRG 涉及维持收缩蛋白的成年型。如以前的研究指出， NRG、 ErbB2 和 ErbB4 在成年心脏中表达， NRG 应在维持心肌细胞分化状态中起重要作用。

伴有心肌病的心力衰竭患者体内有两个非常重要的特征：它们是肌原纤维与肌原纤维节的错误排列。前者是细胞间粘合的松弛，后者是肌原纤维节组合的松弛。这些病理的状态广泛地存在于从充血的心力衰竭到扩大的心肌病中，并严重地影响心脏功能。现今没有处理细胞间粘合及肌原纤维节装配的办法。 NRG 已被确认在装配与维持细胞间粘合及肌原纤维节结构的过程中扮演一个角色。 NRG 刺激心肌细胞分化与装配肌原纤维节结构的结果指出心肌细胞分化与其细胞结构重新构建相联系。此结论与对心肌细胞分化在心脏发育期间总的观察相符：分化的心肌细胞总是具有充分组合的肌原纤维节。

概括地说， NRG 是心肌细胞的分化因子被下列证据所支持：

- 1) NRG 刺激持久的 MAP 激酶激活；
- 2) NRG 增加 p21^{CIP1} 表达；



- 3) NRG 抑制 IGF-1 传达的 DNA 合成; 及
- 4) NRG 刺激心肌细胞装配肌原纤维节与细胞骨架结构;
- 5) NRG 刺激成熟型 MHC 基因的表达。

实施例4 治疗用促进剂配方的制备和应用

5 通过混合具有所需纯度的神经调节蛋白或其类似物与可选择生理可接受的载体、赋型剂、或稳定剂，可以制得治疗心脏紊乱的促进剂配方，并可以冻干或水溶液的形式保存。(Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Oslo, A., Ed., 1980)。可接受的载体、赋型剂、或稳定剂施用的剂量与浓度对接受者是无毒的，并含有：缓冲液，如磷酸，柠檬酸和其他的有机酸缓冲液；抗氧化剂，
10 包括维生素C；低分子量(少于10个氨基酸残基)肽；蛋白质，如血清白蛋白，明胶，或免疫球蛋白；亲水多聚物如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，如甘氨酸，谷氨酰胺，天冬酰胺，精氨酸或赖氨酸；单糖，双糖和其他糖包括葡萄糖，甘露糖，或糊精；螯合试剂，如EDTA；乙醇糖，如甘露糖醇或山梨糖醇；成盐离子，如钠；非离子表面活性剂，如Tween, Pluronic或聚乙烯醇(PEG)。拮抗剂也适合与一种非蛋
15 白多聚物(如聚乙二醇、聚丙二醇,或聚亚烷基类(polyalkylenes))连接。载体的用量可占总量的1-99%，最佳为重量的90-99%。

神经调节蛋白类似物在体内施用应该是无菌的。神经调节蛋白类似物一般将以冻干或溶液形式保存。在冻干及重构之前，类似物应通过无菌的过滤膜。

20 治疗用的神经调节蛋白类似物成分一般被置于有无菌入口处的容器，一个静脉内的溶液袋或有被注射针穿透的塞子的小瓶。神经调节蛋白类似物的施用仅以长期方式用下列途径中的一种进行：注射或灌注通过静脉内，腹膜内，大脑内，肌肉内，眼内，动脉内，或损害部位内，口服或用持久-释放系统如下所注。神经调节蛋白类似物可通过灌输来连续给药，或如果清除率足够低的话，采取阶段性浓缩注射，或给予血流或淋巴。更好的给药方式是把心脏作为直接目标，从而将
25 神经调节蛋白类似物的副作用减到最小。

持久-释放制剂的合适实例包括蛋白的疏水聚合物半透基质，如薄膜或微型胶囊。持久-释放基质的实例包括聚酯、水凝胶如聚丙烯酸2-羟乙基-甲酯树脂(Langer 等 (1981) J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277和Langer (1982) Chem. Tech. 12: 98-105)或聚乙烯醇、聚交酯(美国专利No 3,773,919, EP
30 58,481), L-谷氨酸和 γ -乙基-L-谷氨酰胺的共聚物(Sidman等(1983) Biopolymers 22: 547-556), 非降解的乙烯-乙酸乙烯酯共聚物(Langer等 (1981) 同上)、可降解的乳酸-羟基乙酸共聚物如Lupron Depot™(由乳酸-羟基乙酸共聚物和leuprolide



acetate组成的可注射中心体), 及聚-D-(-)-3-羟基丁酸(EP 133,988)。

5 神经调节蛋白类似物也可包在制备的微型胶囊内, 例如通过凝聚技术或通过界面聚合技术(羟甲基纤维素或明胶-微型胶囊与聚-[甲基丙烯酸甲酯树脂]微型胶囊, 在胶态的传送系统(例如, 脂质体、白蛋白中心体、微乳胶、小颗粒和小胶囊)中, 或在大乳胶中。这些技术发表在Remington's Pharmaceutical Sciences(同上)中。

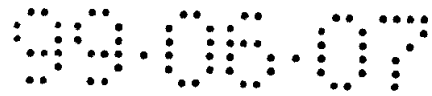
10 某些聚合物(如乙烯-乙酸乙烯酯和乳酸-羟基乙酸)能释放分子超过100天, 某些水凝胶则在短期内释放分子。当被包在胶囊中的分子长时间保留在体内, 作为暴露在37°C湿度中的结果它们可能变性或凝聚, 导致丧失生物活性。若采用合适的添加剂, 和发展特殊的聚合物基质成分等可设计出稳定的机制。

15 持久-释放的神经调节蛋白类似物的成分也包括脂质包裹的类似物。含有神经调节蛋白类似物的脂质体的制备方法是: 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No.4,485,045和4,544,545; 和EP 102,324。普通的脂质体体积很小(约200-800), 为单层型, 脂质成分含大于30%摩尔数的胆固醇,调节胆固醇的比例而获得最佳的治疗效果。一个适当的持久-释放配方的具体例子在EP647,449中。

20 用于治疗的NRG有效剂量将根据治疗对象、给药途径以及病人的状况来定。医生一般需要滴定剂量并根据需要调节给药途径以获得最佳的治疗效果。

25 NRG可选择与其他因子结合施用来处理充血的心力衰竭, 这些因子包括ACE抑制剂、CT-1抑制剂、人生长因子和/或IGF-1。如果被施用, 这些因子的有效用量将由医生决定。剂量的施用与调节用本领域技术人员已知的方法来确定, 以获得对充血心力衰竭的最佳治疗效果, 并理想地考虑到利尿药的使用及一些疾病(如低血压和肾脏损害)等。此外, 剂量还取决于诸如所用药物类型和待治疗患者具体情况之类的因素。一般来说, 如果药物不加促进剂, 用量将是相同的; 但应根据存在的副作用、处理状况、患者类型、促进剂及药物的种类及总量等因素, 来给出治疗的有效剂量。

30 例如ACE抑制剂, 试验用的依那普利为5mg,若病人能承受, 可增加到每天10-20mg, 每天一次。作为另一个例子, 病人初始试口服6.25mg的卡托普利, 然后逐级增加剂量, 当病人能承受至每天二次或三次总量为25mg时, 可滴定到50mg每天二次或三次。承受的水平通过测定是否血压下降或伴随低血压的症状来估



计。如有上述指征，剂量可增加到100mg每天二次或三次。卡托普利与氢氯噻嗪结合作为有效的成分被施用，并作为pH稳定的中心它有一个保护卡托普利的缓释的外壳直到卡托普利到达结肠。生产的卡托普利有片剂或胶囊。关于卡托普利与其他ACE抑制剂剂量的讨论、施用、指征和禁忌症在Physicians Desk Reference, 5 Medical Economics Data Production Co., Montvale, NJ. 2314-2320(1994)中可找到。

10 在一个神经调节蛋白的可注射治疗成分的例子中，配方包含 1%神经调节蛋白与 99%的盐水，其中神经调节蛋白是多肽。在另一个神经调节蛋白的可注射治疗成分的例子中，配方包含 5%的神经调节蛋白多肽， 1%的 ACE 抑制剂卡托普利，与 94%的盐水。

说明书附图

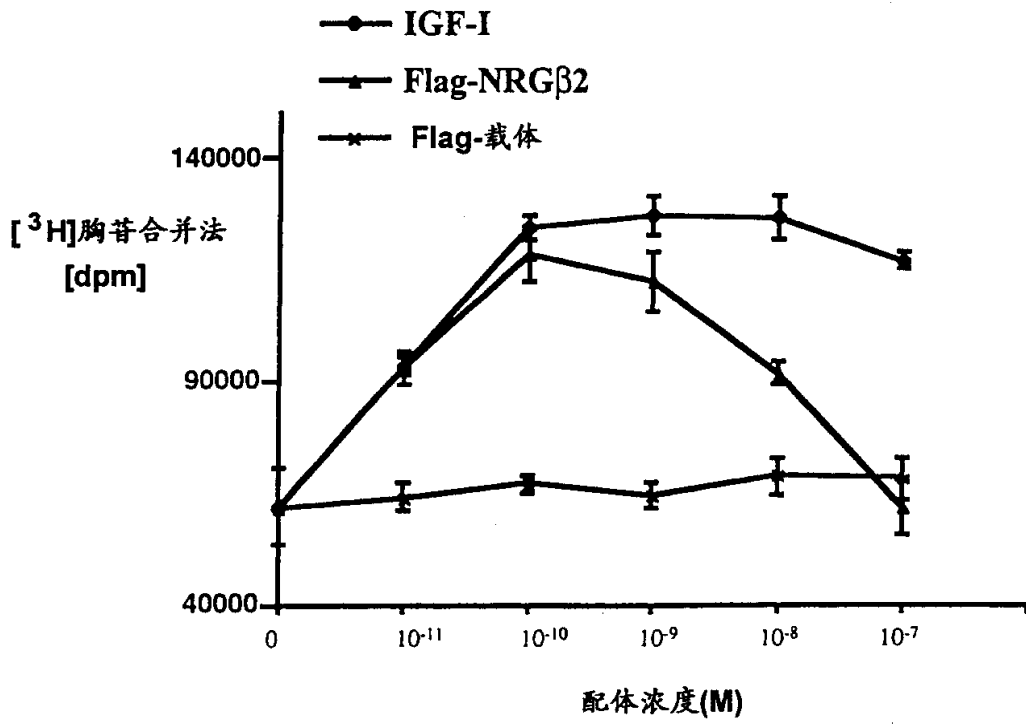
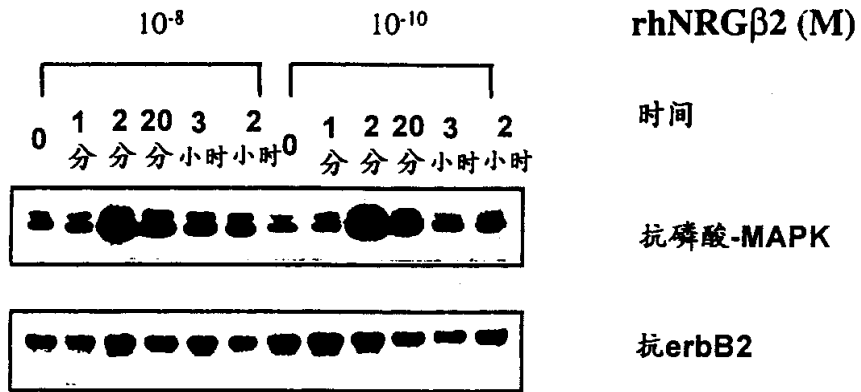


图 1

a



b

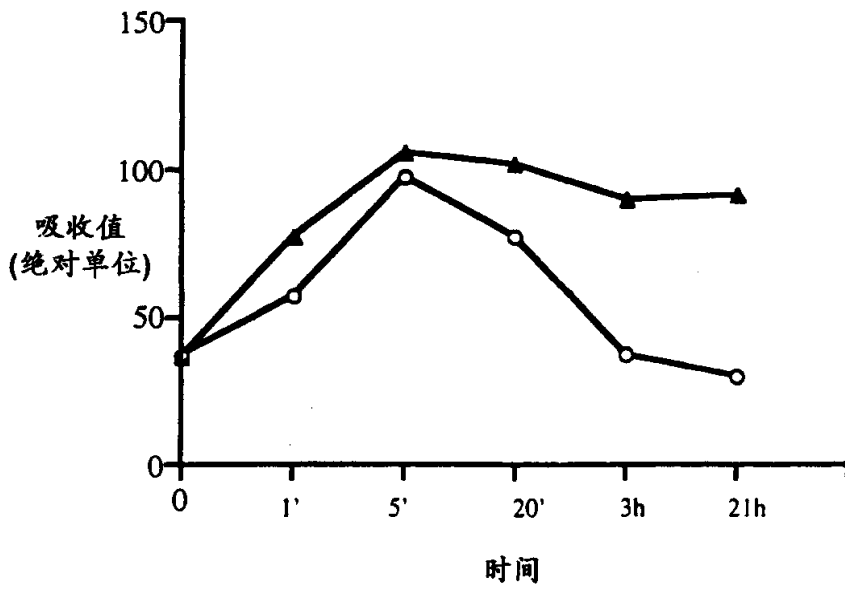


图 2

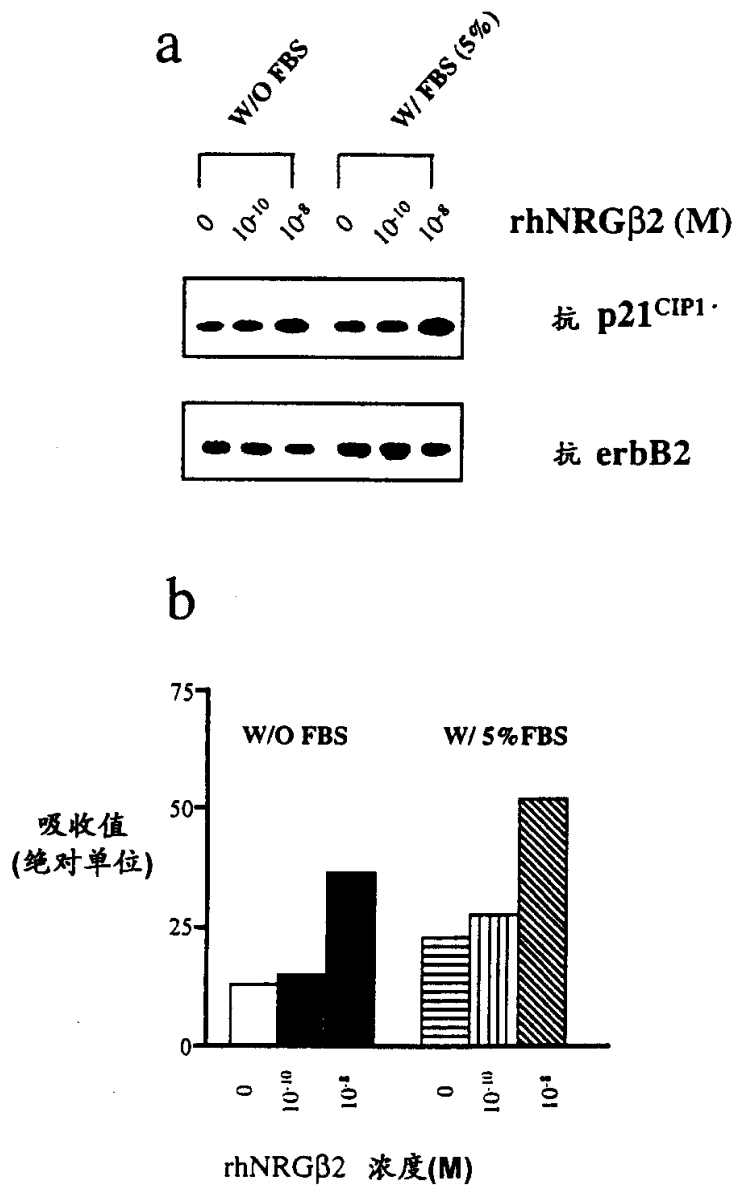


图 3

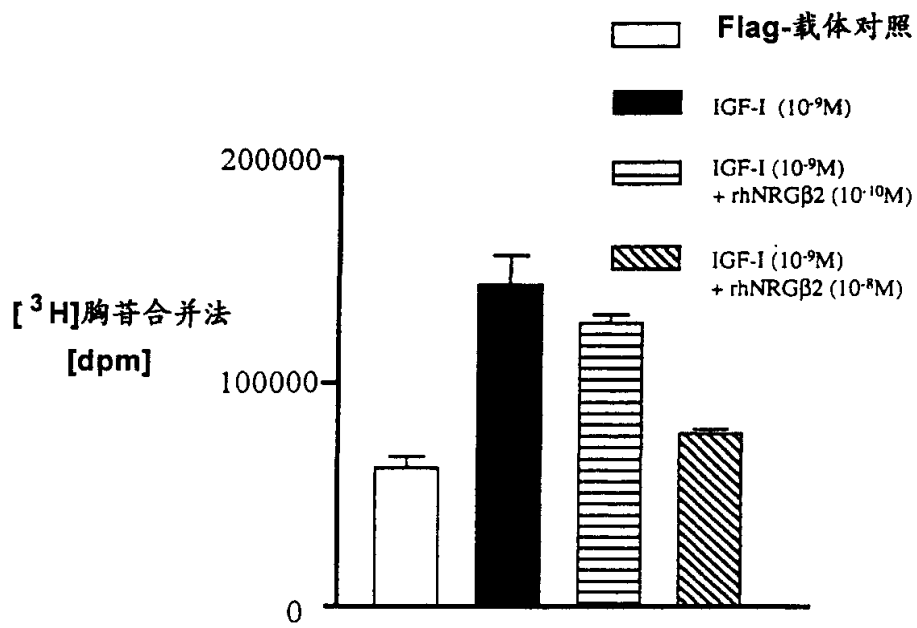


图 4

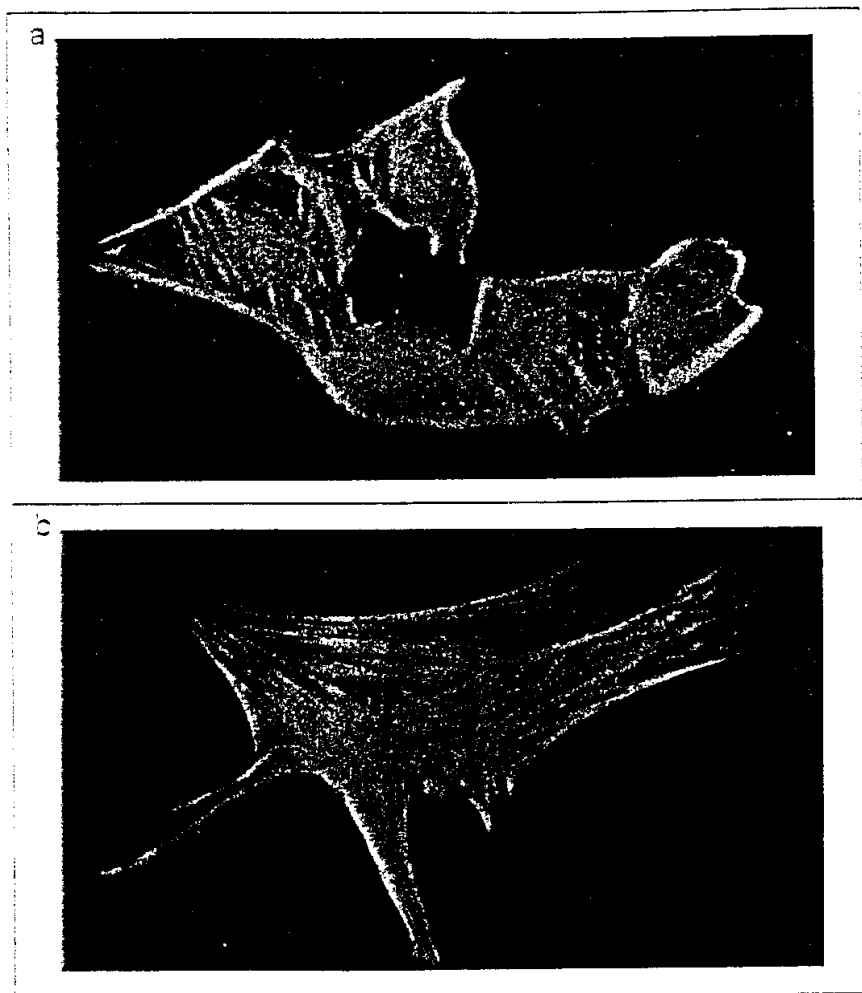


图 5

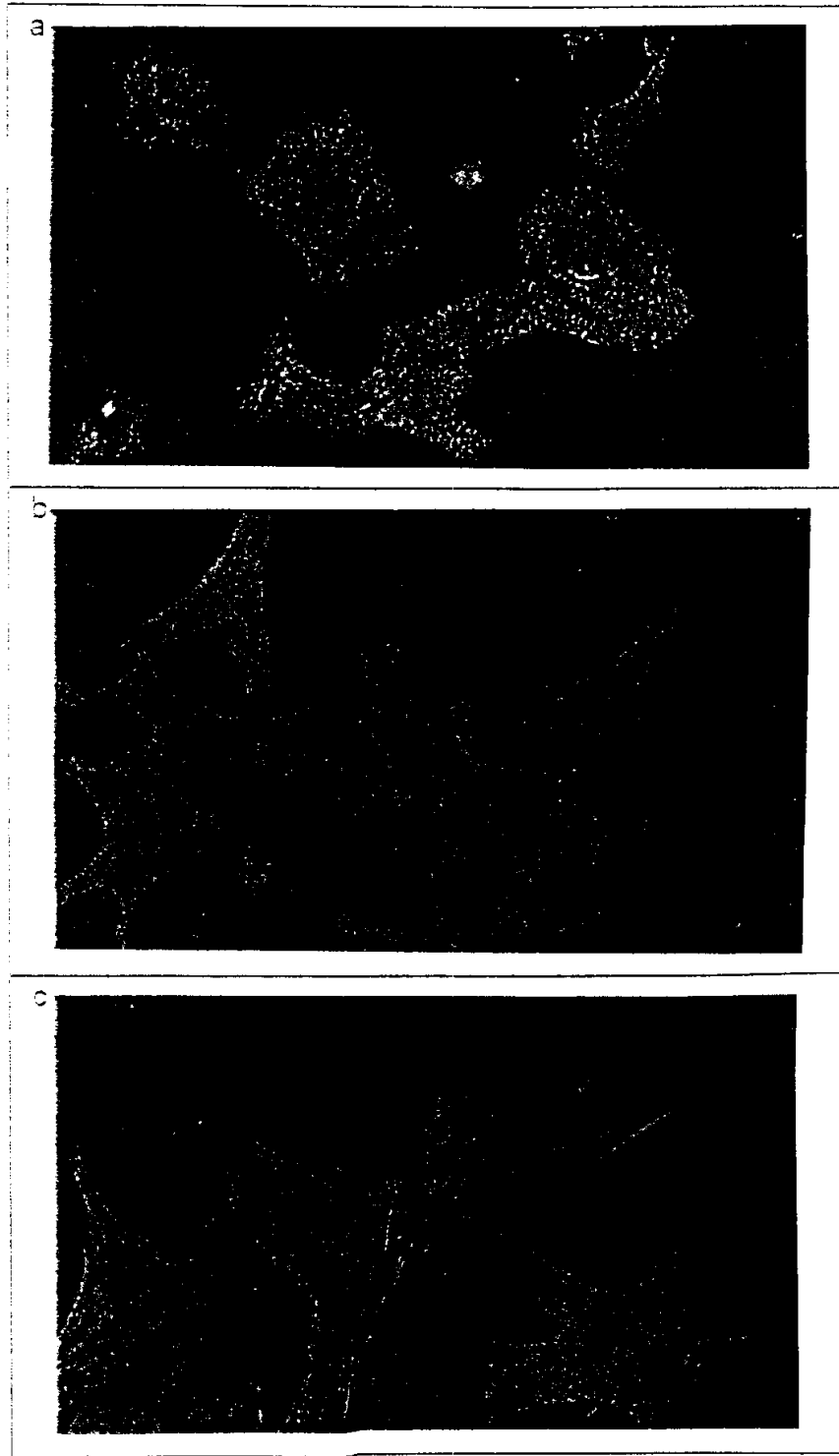


图 6

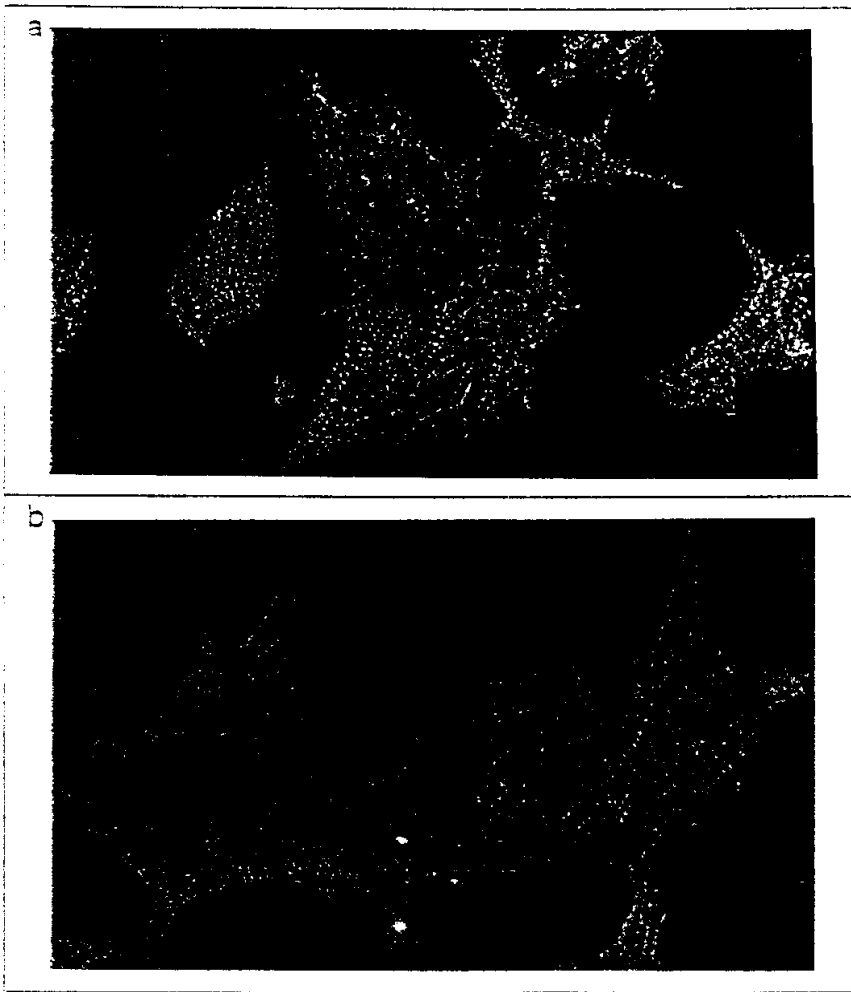


图 7

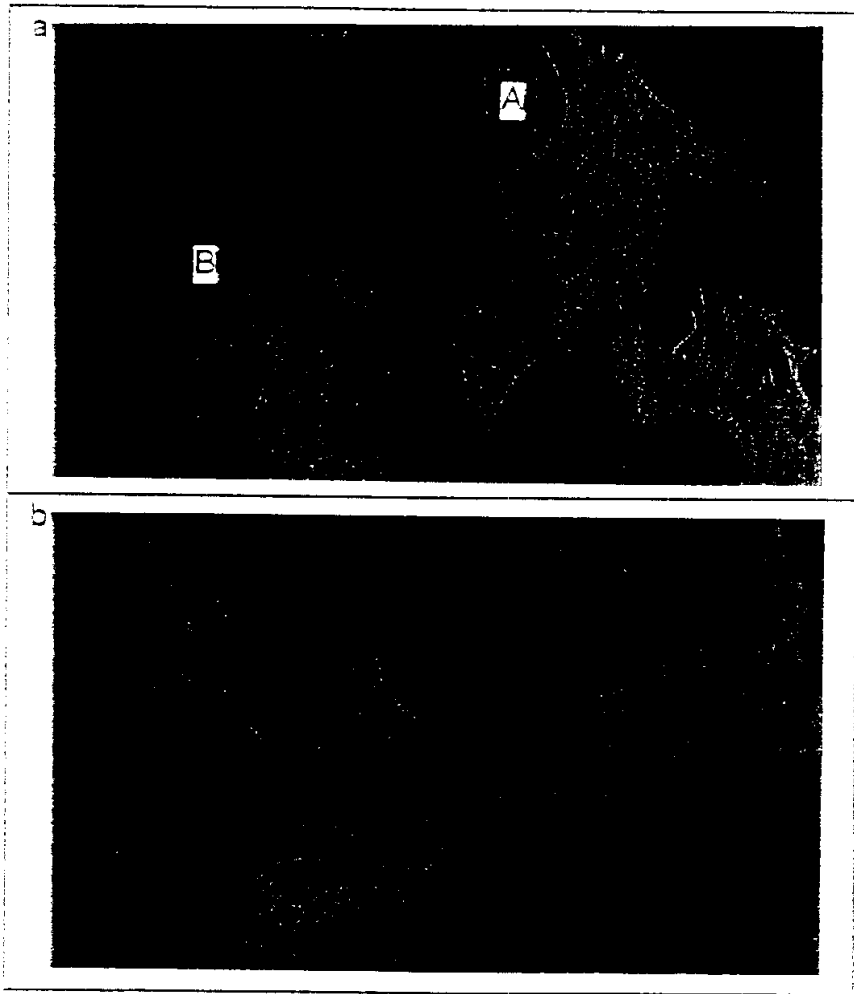


图 8

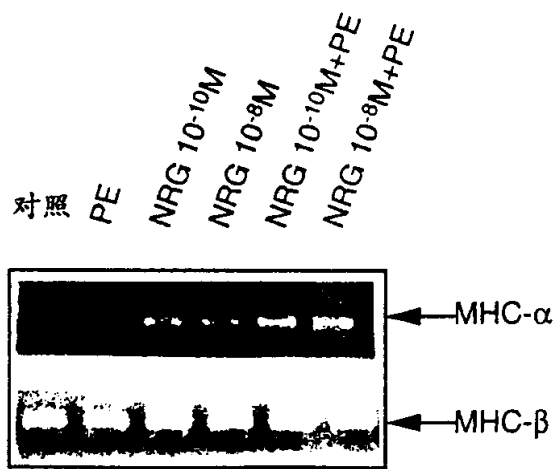


图 9