(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 103249423 A
(43)申请公布日 2013.08.14

(21)申请号 201180042936.5
(22)申请日 2011.07.08
(30)优先权数据
61/363,133 2010.07.09 US
61/363,129 2010.07.09 US
61/412,655 2010.11.11 US
(85)PCT申请进入国家阶段日
2013.03.06
(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2011/043424 2011.07.08
(87)PCT申请的公布数据
WO2012/006569 EN 2012.01.12
(71)申请人 康肽德生物医药技术有限公司
地址 摩纳哥摩纳哥城
申请人 心脏学会慈善医院
(72)发明人 肯尼斯·博罗
D·特拉维斯·威尔逊
罗伯特·A·科鲁纳 莎伦·黑勒
(74)专利代理机构 北京同达信恒知识产权代理有限公司 11291
代理人 杨黎峰
(51)Int.Cl.
A61K 38/07(2006.01)
A61P 9/10(2006.01)

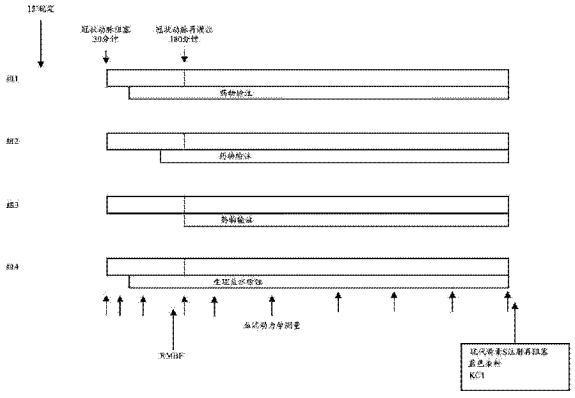
权利要求书1页 说明书50页 附图10页

(54)发明名称

预防或治疗缺血/再灌注损伤之后无复流的方法

(57)摘要

本发明提供了预防或治疗哺乳动物对象中的心脏缺血-再灌注损伤的方法。所述方法提供了给药有效量的芳香族阳离子肽以预防或治疗所述哺乳动物对象中的解剖无复流区。所述方法包括将有效量的芳香族阳离子肽给药至有需要的对象。



CN 103249423 A

1. 一种用于预防或治疗有需要的哺乳动物对象中的解剖无复流区的方法，所述方法包括将治疗有效量的肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 或其药学上可接受的盐给药至所述对象，从而预防或治疗所述对象中的解剖无复流区。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，还包括对所述对象执行血管重建术的步骤。

3. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述解剖无复流区具有所述对象的微血管的破坏或堵塞。

4. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述对象存在解剖无复流区的风险或者患有解剖无复流区，该解剖无复流区与选自心血管组织、骨骼肌组织、脑组织和肾组织的组织有关。

5. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，在所述解剖无复流区形成之前或在所述解剖无复流区形成之后，将所述肽给药至所述对象。

6. 根据权利要求 2 所述的方法，其中，在所述血管重建术之前、在所述血管重建术之后、或者在所述血管重建术期间和所述血管重建术之后将所述肽给药至所述对象，或者在所述血管重建术之前、在所述血管重建术期间和所述血管重建术之后，将所述肽持续给药至所述对象。

7. 根据权利要求 6 所述的方法，其中，在所述血管重建术之后，将所述肽给药至所述对象至少 3 小时、至少 5 小时、至少 8 小时、至少 12 小时或至少 24 小时。

8. 根据权利要求 6 所述的方法，其中，在所述血管重建术之前的至少 8 小时时、在所述血管重建术之前的至少 4 小时时、在所述血管重建术之前的至少 2 小时时、在所述血管重建术之前的至少 1 小时时、或者在所述血管重建术之前的至少 10 分钟时，开始将所述肽给药至所述对象。

9. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述对象患有心肌梗塞或者中风，或者需要血管成形术。

10. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述血管重建术选自气囊血管成形术、旁路移植物插入、支架插入、经皮腔内冠状动脉成形术或定向性冠状动脉斑块旋切术。

11. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述血管重建术为消除阻塞。

12. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述血管重建术为给药一种或多种血栓溶解剂。

13. 根据权利要求 12 所述的方法，其中，所述一种或多种血栓溶解剂选自组织型纤溶酶原激活剂、尿激酶、尿激酶原、链激酶、血纤维蛋白溶酶原的酰化形式、血纤维蛋白溶酶的酰化形式和酰化的链激酶 - 血纤维蛋白溶酶原复合物。

14. 根据权利要求 4 所述的方法，其中，所述对象存在与脑组织有关的解剖无复流区的风险或者患有与脑组织有关的解剖无复流区，其中，所述解剖无复流区具有所述对象的微血管堵塞，所述微血管堵塞包括毛细管阻塞或微栓子。

预防或治疗缺血 / 再灌注损伤之后无复流的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2010 年 7 月 9 日提交的第 61/363129 号、2010 年 7 月 9 日提交的第 61/363133 号、和 2010 年 11 月 11 日提交的第 61/412655 号美国临时专利申请的优先权，这些临时专利申请的全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本发明总体涉及预防或治疗缺血 / 再灌注组织损伤的组合物和方法。具体地，本发明的实施方式涉及给药有效量的芳香族阳离子肽，来预防或治疗存在缺血 / 再灌注组织损伤风险的或患有缺血 / 再灌注组织损伤的哺乳动物对象中的解剖无复流区。

背景技术

[0004] 提供以下描述来便于读者理解。所提供的信息或所引用的参考文献都不能被认为是现有技术。

[0005] 在急性心肌梗塞（AMI）后，直接的治疗目标是形成梗塞相关动脉的通畅。然而，成功恢复心外膜冠状动脉通畅并不一定使组织灌注得到改善。微血管系统的结构破坏或堵塞，即所谓的“无复流”现象，可在经皮冠状动脉介入治疗术（PCI）之前发生或者由于经皮冠状动脉介入治疗术（PCI）而发生并且能够损伤冠状动脉血流。具有无复流现象的患者具有不良的临床预后。无复流现象通常与组织中的解剖无复流区的存在相关。成像模式的发展已经增强了无复流的可视化，其证明了无复流的发生率高于只通过临床判断而估计的无复流的发生率。这一现象是重要的，因为无复流与梗塞面积相关且提供有用的预后信息。无复流与左心室射血分数减小、左心室重构以及不良的临床结果有关，这使具有该无复流现象的患者成为再灌注患者中的高危人群。因此，已将注意力从仅仅实现心外膜冠状动脉通畅转向可导致解剖无复流区的微血管系统状况上。

发明内容

[0006] 本发明的技术涉及通过将治疗有效量的芳香族阳离子肽（例如 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2）或其药学上可接受的盐（例如醋酸盐或三氟醋酸盐）给药至有需要的对象来治疗或预防哺乳动物中的心脏缺血 - 再灌注损伤。在一些实施方式中，本发明的技术涉及在治疗或预防缺血 / 再灌注之后的解剖无复流区、出血区和梗塞面积中可使用的方法。

[0007] 在一些方面中，本申请提供了一种治疗或预防解剖无复流区的方法，其包括将治疗有效量的芳香族阳离子肽（例如 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2）或其药学上可接受的盐（例如醋酸盐或三氟醋酸盐）给药至有需要的对象。在一些实施方式中，该方法还包括对所述对象执行血管重建术。在一些实施方式中，芳香族阳离子肽是具有以下特点的肽：

[0008] 至少一个净正电荷；

[0009] 最少四个氨基酸；

[0010] 最多约 20 个氨基酸；

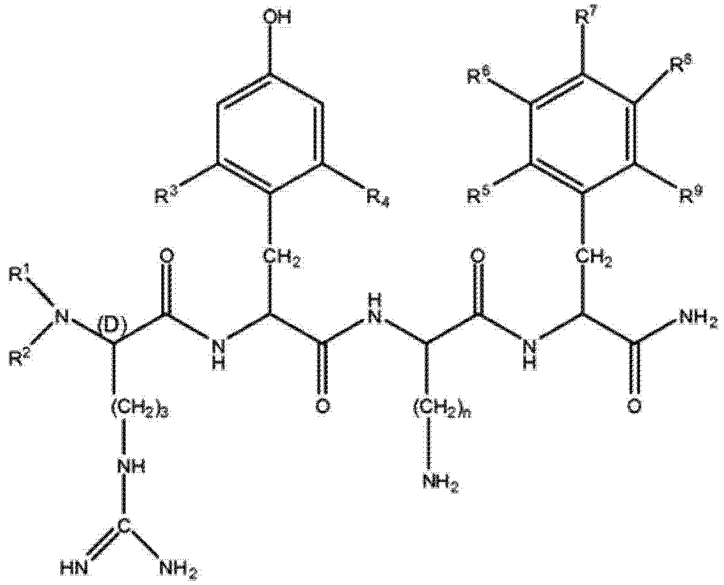
[0011] 净正电荷的最小数目（p_m）和氨基酸残基的总数目（r）之间的关系为：其中，$3p_m$ 是小于或等于 r+1 的最大数；以及芳香族基团的最小数目（a）和净正电荷的总数目（p_t）之间的关系为：其中，除了当 a 为 1 时，p_t 也可为 1 之外，2a 是小于或等于 p_t+1 的最大数。在特定的实施方式中，所述对象是人类。

[0012] 在一些实施方式中，$2p_m$ 是小于或等于 r+1 的最大数，且 a 可以等于 p_t。所述芳香族阳离子肽可以是具有最少两个正电荷或最少三个正电荷的可溶于水的肽。在一些实施方式中，所述肽包括一种或多种非天然存在的氨基酸，例如一种或多种 D 型氨基酸。在一些实施方式中，氨基酸的在 C- 末端的 C- 末端羧基被酰胺化。在某些实施方式中，所述肽最少具有 4 个氨基酸。肽可以有最多约 6 个、最多约 9 个或者最多约 12 个氨基酸。

[0013] 在一些实施方式中，所述肽在 N- 末端包括酪氨酸或 2',6'- 二甲基酪氨酸（Dmt）残基。例如，所述肽可具有式 Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH_2 或 2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH_2。在另一实施方式中，所述肽在 N- 末端包括苯丙氨酸或 2',6'- 二甲基苯丙氨酸残基。例如，所述肽可具有式 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH_2 或 2',6'-Dmp-D-Arg-Phe-Lys-NH_2。在特定的实施方式中，芳香族阳离子肽具有式 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 或其药学上可接受的盐（例如醋酸盐或三氟醋酸盐）。

[0014] 在一个实施方式中，所述肽由下式 I 所定义：

[0015]

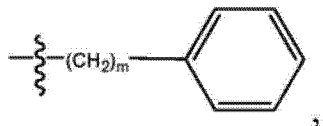


[0016] 其中，R^1 和 R^2 各独立地选自：

[0017] （i）氢；

[0018] （ii）直链的或支链的 C_1-C_6 的烷基；

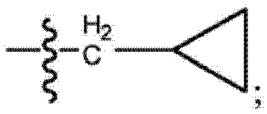
[0019] （iii）

[0020] 

其中 m=1-3；

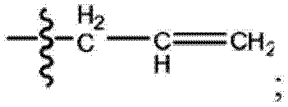
[0021] （iv）

[0022]



[0023] （v）

[0024]



[0025] R^3 和 R^4 各独立地选自：

[0026] （i）氢；

[0027] （ii）直链的或支链的 C_1-C_6 的烷基；

[0028] （iii）C_1-C_6 的烷氧基；

[0029] （iv）氨基；

[0030] （v）C_1-C_4 的烷基氨基；

[0031] （vi）C_1-C_4 的二烷基氨基；

[0032] （vii）硝基；

[0033] （viii）羟基；

[0034] （ix）卤素，其中“卤素”包括氯、氟、溴和碘；

[0035] R^5、R^6、R^7、R^8 和 R^9 各独立地选自：

[0036] （i）氢；

[0037] （ii）直链的或支链的 C_1-C_6 的烷基；

[0038] （iii）C_1-C_6 的烷氧基；

[0039] （iv）氨基；

[0040] （v）C_1-C_4 的烷基氨基；

[0041] （vi）C_1-C_4 的二烷基氨基；

[0042] （vii）硝基；

[0043] （viii）羟基；

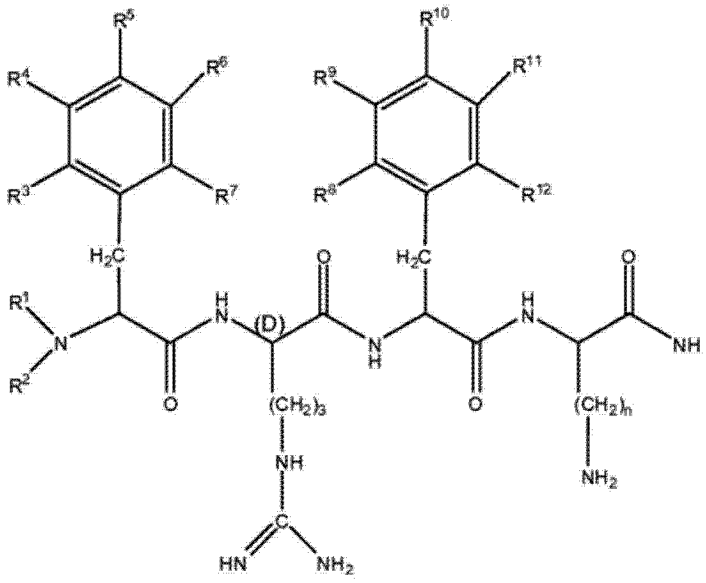
[0044] （ix）卤素，其中“卤素”包括氯、氟、溴和碘；且

[0045] n 为 1 到 5 的整数。

[0046] 在特定的实施方式中，R^1 和 R^2 是氢；R^3 和 R^4 是甲基；R^5、R^6、R^7、R^8 和 R^9 都是氢；且 n 为 4。

[0047] 在一个实施方式中，肽由下式 II 所定义：

[0048]

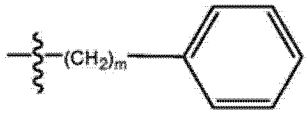


[0049] 其中，R^1 和 R^2 各独立地选自：

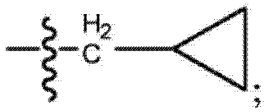
[0050] （i）氢；

[0051] （ii）直链的或支链的 C_1-C_6 的烷基；

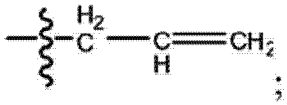
[0052] （iii）

[0053]  其中 m=1-3；

[0054] （iv）

[0055] 

[0056] （v）

[0057] 

[0058] R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^9、R^{10}、R^{11} 和 R^{12} 各独立地选自：

[0059] （i）氢；

[0060] （ii）直链的或支链的 C_1-C_6 的烷基；

[0061] （iii）C_1-C_6 的烷氧基；

[0062] （iv）氨基；

[0063] （v）C_1-C_4 的烷基氨基；

[0064] （vi）C_1-C_4 的二烷基氨基；

[0065] （vii）硝基；

[0066] （viii）羟基；

[0067] （ix）卤素，其中“卤素”包括氯、氟、溴和碘；以及

[0068] n 为 1 到 5 的整数。

[0069] 在特定的实施方式中，R^1、R^2、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^9、R^{10}、R^{11} 和 R^{12} 均为氢；且 n 为 4。在另一实施方式中，R^1、R^2、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^9 和 R^{11} 均为氢；R^8 和 R^{12} 为甲基；R^{10} 为羟基；且 n 为 4。

[0070] 可以以各种方式将芳香族阳离子肽给药。在一些实施方式中，肽可以口服给药、局部给药、鼻内给药、腹腔内给药、静脉内给药、皮下给药或经皮肤（例如离子电渗疗法）给药。在一些实施方式中，通过冠状动脉内途径或动脉内途径进行给药芳香族阳离子肽。

[0071] 在一个实施方式中，本发明的技术提供一种用于预防或治疗需要预防或治疗的哺乳动物对象中的解剖无复流区的方法，该方法包括将治疗有效量的肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 或其药学上可接受的盐（例如醋酸盐或三氟醋酸盐）给药至对象，从而预防或治疗对象中的微血管损伤。在一个实施方式中，该方法还包括对所述对象执行血管重建术的步骤。在一个实施方式中，解剖无复流区指对象的微血管破坏或堵塞。在一个实施方式中，所述哺乳动物对象存在解剖无复流区的风险或患有解剖无复流区疾病。在一个实施方式中，所述对象存在与心血管组织相关的或者在心血管组织中的解剖无复流区的风险，或患有与心血管组织相关的或者在心血管组织中的解剖无复流区疾病。在一个实施方式中，所述对象存在与脑组织相关的或者在脑组织中的解剖无复流区的风险，或患有与脑组织相关的或者在脑组织中的解剖无复流区疾病。在一个实施方式中，所述对象存在与肾脏组织相关的或者在肾脏组织中的解剖无复流区的风险，或患有与肾脏组织相关的或者在肾脏组织中的解剖无复流区疾病。在一个实施方式中，所述对象存在与骨骼组织相关的或者在骨骼组织中的解剖无复流区的风险，或患有与骨骼组织相关的或者在骨骼组织中的解剖无复流区疾病。在一个实施方式中，解剖无复流区包括所述对象的微血管的破坏或堵塞。在一个实施方式中，在形成解剖无复流区之前将所述肽给药至所述对象。在一个实施方式中，在形成解剖无复流区之后将所述肽给药至所述对象。

[0072] 在一个实施方式中，在血管重建术之前将所述肽给药至所述对象。在另一实施方式中，在血管重建术之后，将所述肽给药至所述对象。在另一实施方式中，在血管重建术期间和血管重建术之后将所述肽给药至对象。在另一实施方式中，在血管重建术之前、血管重建术期间和血管重建术之后，将所述肽连续给药至所述对象。

[0073] 在一个实施方式中，在血管重建术之后，将所述肽给药至所述对象至少 3 小时、至少 5 小时、至少 8 小时、至少 12 小时或至少 24 小时。在一个实施方式中，在血管重建术之前至少 8 小时时、至少 4 小时时、至少 2 小时时、至少 1 小时时、或至少 10 分钟时开始将所述肽给药至对象。

[0074] 在各个实施方式中，所述对象患有心肌梗塞、中风、或需要血管成形术。在一个实施方式中，血管重建术选自：气囊血管成形术、旁路移植物插入、支架插入、经皮腔内冠状动脉成形术、或定向性冠状动脉斑块旋切术。在一个实施方式中，血管重建术指消除阻塞。在一个实施方式中，血管重建术指给药一种或多种血栓溶解剂。在一个实施方式中，所述一种或多种血栓溶解剂选自：组织型纤溶酶原激活剂、尿激酶、尿激酶原、链激酶、纤溶酶原的酰化形式、纤溶酶的酰化形式、和酰化的链激酶－纤溶酶原复合物。

[0075] 在一些实施方式中，血管阻塞选自：深静脉血栓、外周血栓、栓塞性血栓、肝静脉血栓、窦血栓、静脉血栓、阻塞的动静脉短路、和阻塞的导管装置。

[0076] 在一个方面，本发明提供一种冠状动脉血管重建的方法，该方法包括：(a)将治疗有效量的肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 或其药学上可接受的盐(例如醋酸盐或三氟醋酸盐)给药至哺乳动物对象；和(b)对所述对象执行冠状动脉旁路移植手术。

附图说明

[0077] 图 1 示出用在实施例中的动物的研究设计；

[0078] 图 2A 和图 2B 分别为说明体内研究步骤的研究流程图和病理学测量的研究流程图；

[0079] 图 3 示出使用组织学染色技术评估来自使用实施例 1 中所描述的模型进行心脏缺血 / 再灌注的对照兔子的心脏组织。画面 A 至画面 C 示出来自一个代表性对照兔子的示例性心脏切片。画面 A：示出缺血风险区域的照片。在再灌注时间段结束时冠状动脉再次阻塞，且通过左心房导管注入 Unisperse 蓝。蓝色区域为心脏内的灌注区域，而缺乏蓝色染料的区域没有进行灌注。画面 B：无复流区域(硫代黄素 S 染色且在紫外光下进行拍照)。在再阻塞动脉之前，在再灌注时间段结束时通过左心房导管注入硫代黄素 S。未受损伤的血管的区域呈现荧光，而无复流区域发暗。画面 C：在 TTC(氯化三苯基四氮唑)中培养后的心脏切片。坏死组织区域呈现白色，而非坏死组织染成红色；

[0080] 图 4 为示出包含在风险区内的出血区域的示例性实施方式的照片；

[0081] 图 5 为示出 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 对 AMI 兔子模型中的 IA/AR 平均值的作用的图；

[0082] 图 6 为示出 AMI 兔子模型中的处理组和对照组中的坏死区和风险区之间的关系的图；

[0083] 图 7 为示出 AMI 兔子模型中的处理组和对照组中的风险区和无复流区之间的关系的图；

[0084] 图 8 为示出 AMI 兔子模型中的处理组和对照组中的风险区和无复流区之间的关系的图；和

[0085] 图 9A 和图 9B 为示出 AMI 兔子模型中的对照组和处理组中的梗塞面积和无复流区的图。

具体实施方式

[0086] 应当理解，为了提供对本发明的实质性理解，在下文中以不同的详细程度描述了本发明的某些方面、模式、实施方式、变型和特征。

[0087] 在实施本发明中，使用在分子生物学、蛋白质生物化学、细胞生物学、免疫学、微生物学和重组 DNA 方面的许多常规技术。这些技术是公知的且分别在以下文献中进行解释：例如 Ausubel 编(1997)的 Current Protocols in Molecular Biology，第 I-III 卷；Sambrook 等，Molecular Cloning:A Laboratory Manual，第二版(冷泉港实验室出版社，冷泉港，纽约，1989)；Glover 编(1985)的 DNA Cloning:A Practical Approach，第 I 和 II 卷；Gait 编(1984)的 Oligonucleotide Synthesis；Hames&Higgins 编(1985)的 Nucleic Acid Hybridization；Hames&Higgins 编(1984)的 Transcription and Translation；Freshney 编(1986)的 Animal Cell Culture；Immobilized Cells and Enzymes(IRL 出版社，1986)；

PerbaL, A Practical Guide to Molecular Cloning ;Meth.Enzymol. 系列(学术出版社, Inc., 1984) ;Miller&Calos 编的 Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (冷泉港实验室,纽约,1987) ;和 Wu&Grossman 和 Wu 编的 Meth.Enzymol.,第 154 和第 155 卷。

[0088] 下文提供了本说明书中使用的一些术语的定义。除非另有说明,本文中使用的所有技术和科学用语通常具有和本发明所属领域的普通技术人员通常理解的意思相同的意思。

[0089] 除非内容清楚指明,否则本说明书和所附的权利要求中使用的单数形式“一”和“该”包括复数的引用对象。例如,所提及的“一个细胞”包括两个细胞或更多细胞的组合等。

[0090] 文中使用的将制剂、药物或肽“给药”至对象包括将化合物引入到或给送至对象以执行其预期功能的任何途径。可以通过任何合适的途径来执行“给药”,包括口服、鼻内、肠胃外(通过静脉内、肌内、腹腔内或皮下)或者局部给药。在一些实施方式中,通过冠状动脉内途径或动脉内途径给药芳香族阳离子肽。“给药”包括自己给药和由其他人给药。

[0091] 本文中使用的术语“氨基酸”包括天然存在的氨基酸和合成的氨基酸以及氨基酸类似物和以类似于天然存在的氨基酸的形式作用的氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是通过遗传密码编码的氨基酸以及后来被改性的那些氨基酸,比如羟(基)脯氨酸、γ-羧基谷氨酸和 O- 磷酸丝氨酸。氨基酸类似物指的是具有和天然存在的氨基酸相同的基本化学结构的化合物,例如,所述的基本化学结构即结合至氢的 α-碳、羧基、氨基和 R 基,所述氨基酸类似物比如为高丝氨酸、正亮氨酸、蛋氨酸亚砜、蛋氨酸甲基锍。这样的类似物具有改性的 R 基(例如正亮氨酸)或改性的肽主链,但保持与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物指的是具有与氨基酸的通用化学结构不同的结构、但以类似于天然存在的氨基酸的方式作用的化学化合物。本文中按照 IUPAC-IUB 生化命名委员会建议的通常已知的三字母符号或者一字母符号可指代氨基酸。

[0092] 本文中使用的术语“有效量”指的是足以获得所需的治疗和/或预防效果的量,例如引起预防或减轻心脏缺血再灌注损伤或与心脏缺血再灌注损伤关联的一种或多种病症的量。在治疗应用或预防应用的背景下,给药至对象的组合物的量将取决于疾病的类型和严重性以及个体的性质,比如平常健康情况、年龄、性别、体重和对药物的耐受力。所述量还取决于疾病的程度、严重性和类型。专业的技术人员能够根据这些因素和其他因素来确定合适的剂量。所述组合物还可结合一种或多种其他的治疗化合物来给药。在本文描述的方法中,芳香族的阳离子肽可以给药至具有无复流区的一种或多种症状或症候的对象。在其它实施方式中,哺乳动物具有心肌梗塞的一种或多种症状或症候,比如描述为胸腔中部内的压觉、胀满或挤压的胸痛 ;胸痛放射至下巴或牙齿、肩膀、手臂和/或背部 ;呼吸困难或气促 ;伴随或不伴随恶心呕吐的上腹部不适 ;以及发汗或出汗。例如,芳香族阳离子肽的“治疗有效量”是指最小程度地减轻解剖无复流区损伤的生理作用的平均水平。

[0093] 本文中使用的术语“缺血再灌注损伤”指的是由以下引起的损害 :首先限制血液供应到组织,之后再突然供应血液并伴随产生自由基。缺血是供应到组织的血液减少且缺血之后再灌注、氧突然灌注入缺血的组织。

[0094] “分离的”或“纯化的”多肽或肽基本上不具有源自细胞或组织的源(试剂来自于该源)的细胞材料或其它受污染的多肽,或者当化学合成时基本上不具有化学前体或其它的化学物质。例如,分离的芳香族的阳离子肽将不具有会干扰试剂的诊断用途或治疗用途的

材料。这样的干扰材料可以包括酶、激素和其他蛋白质的和非蛋白质的溶解物。

[0095] 本文中使用的术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中是可互换的，以表示包括通过肽键或改性的肽键而互相连接的两个或更多个氨基酸的聚合物，例如肽电子等排体。多肽指的是短链(通常称为肽、糖肽或低聚物)以及较长的链(通常称为蛋白质)。多肽可以包括与 20 个基因编码的氨基酸不同的氨基酸。多肽包括通过诸如翻译后加工的天然进程或本领域熟知的化学改性技术改性的氨基酸序列。

[0096] 本文中使用的术语“治疗”或“减轻”指的是治疗处理措施和预防或防止措施，其中，目的是防止或减缓(减轻)目标病症或失调。如果在接受了根据本文所述的方法的治疗量的芳香族的阳离子肽后，对象显示出解剖无复流区的尺寸的可以观察到的和 / 或测定到的减少，则对象的无复流损伤得到成功地“治疗”。还应当理解，本文描述的治疗或预防医学病症的各种模式意在表示“显著”，其包括完全治疗或者预防以及小于完全治疗或者预防，其中达到了某种生物学相关或医学相关的结果。

[0097] 本文中使用的“预防”失调或病症指的是 :在统计学样本中，化合物相对于未治疗的对照样本降低治疗的样本的失调或病症的发生，或者相对于未治疗的对照样本延迟失调或病症的一种或多种症候的发生或者减轻失调或病症的一种或多种症候的严重程度。如本文中所使用的，预防缺血再灌注损伤包括预防氧化伤害或预防线粒体通透性转换，从而预防或减轻流入心脏的血液的减少以及随后恢复的有害效应。

[0098] 无复流损伤的预防方法或治疗方法

[0099] 在急性心肌梗塞后，快速恢复到受损心肌的冠状动脉血流是治疗的重要部分。尽管开通了梗塞相关动脉，但是冠状微血管的损害或阻塞可显著地减小进入到梗塞区的血流，这导致形成解剖无复流区。这种效应被称为无复流现象。无复流现象发生在相当大比例的具有 AMI 的患者中(即使积极进行再灌注治疗)且该现象与不良预后相关。参见 :Ito H. 的 No-reflow phenomenon and prognosis in patients with acute myocardial infarction, Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine(2006),3,499-506。此外，无复流的程度是 AMI 患者治疗效果的良好预示因子。在梗塞后，微血管阻塞预示更频繁的心血管并发症且与 AMI 患者的长期预后(梗塞扩展、住院治疗、死亡率、主要不良心脏事件等)直接相关。参见 :Wu 等的 Prognostic significance of microvascular obstruction by magnetic resonance imaging in patients with acute myocardial infarction. Circulation,1998,97 :765-772 ;Ndrepapa 等的 5-year prognostic value of no-reflow phenomenon after percutaneous coronary intervention in patients with acute myocardial infarction. J Am Coll Cardiology,2010,55(21) :2383-2389 ;Bolognese 等的 Impact of microvascular dysfunction on left ventricular remodeling and long-term clinical outcome after primary coronary angioplasty for acute myocardial infarction. Circulation,2004,109 :1121-1126 ; 以及，Reffelmann 等的 No-reflow phenomenon persists long-term after ischemia/reperfusion in the rat and predicts infarct expansion. Circulation,2003,108 :2911-2917。

[0100] 无复流现象也可发生在除了心脏外的其它器官中，例如肝脏、肾脏、脑、皮肤等。在脑缺血中首次提出无复流概念。经受简短的 2.5 分钟缺血的兔脑在缺血解除时具有正常的血液流动。当兔子遭受较长的缺血时间段时，即使在解除血管阻塞后，进入到脑组织的流动

不能恢复正常。持久性缺血导致微血管发生显著变化，该显著变化妨碍进入到脑细胞的正常流动。在多种具有脑缺血的动物模型中证实了这种现象的存在。在多种其它器官(诸如皮肤、骨骼肌和肾脏)中，也出现了这种现象。此外，微循环变化可调节在器官移植期间缺血再灌注损伤所引起的器官损害。参见：Majno 等的 No-reflow after cerebral ischaemia. Lancet，1967，2：569-570；Ames 等的 Cerebral ischemia，II：the no-reflow phenomenon. Am J Pathol，1968，52：437-447；Cerisoli 等的 Experimental cerebral "no-reflow phenomenon"：response to intracarotid injection of dexamethasone，furosemide and escina. J Neurosurg Sci，1981，25：7-12；Ito 等的 Transient appearance of"no-reflow"phenomenon in Mongolian gerbils. Stroke，1980，11：517-521；Asano T 和 Sano K 的 Pathogenetic role of no-reflow phenomenon in experimental subarachnoid hemorrhage in dogs. J Neurosurg，1977，46：454-466；Chait 等的 The effects of the perfusion of various solutions on the no-reflow phenomenon in experimental free flaps. P last Reconstr Surg，1978，61：421-430；Allen 等的 Pathophysiology and related studies of the no-reflow phenomenon in skeletal muscle. Clin Orthop，1995，314：122-133；Summers WK 和 Jamison RL 的 The no-reflow phenomenon in renal ischemia. Lab Invest，1971，25：635-643；Johnston WH 和 Latta H 的 Glomerular mesangial and endothelial cell swelling following temporary renal ischemia and its role in the no-reflow phenomenon. Am J Pathol，1977，89：153-166。

[0101] 本发明的技术涉及通过将治疗有效量的芳香族阳离子肽(诸如 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2)或者其药学上可接受的盐(诸如醋酸盐或三氟醋酸盐)给药至有需要的对象来治疗或预防哺乳动物中的缺血－再灌注损伤。在一个方面，本发明的技术涉及用于治疗或预防在缺血／再灌注之后的解剖无复流区、出血区和梗塞面积的方法。在一个实施方式中，治疗解剖无复流区包括使对象中的组织灌注的量或面积与没有给药芳香族阳离子肽的类似对象相比增大。在一个实施方式中，预防解剖无复流区包括使对象中由再灌注导致的微血管损害的量或面积与没有给药芳香族阳离子肽的类似对象相比减小。在一些实施方式中，治疗或预防解剖无复流区包括与没有给药芳香族阳离子肽的类似对象相比，减小对象中再灌注时对受影响的血管的损伤、减小对象中血细胞堵塞的影响和／或减小对象中内皮细胞的肿胀。可通过现有技术中已知的任何技术来测量预防的程度或治疗的程度，包括但不限于核磁共振成像(MRI)以评估微血管损害。复流现象也可使用心肌声学造影、冠状动脉血管造影术、心肌呈色、冠状动脉多普勒成像、心电图、使用铊或锝-99m 的核成像单光子发射 CT、和正电子发射计算机断层扫描(PET)来进行评估。成功的预防或治疗可通过将利用这些成像技术中的任一种技术所观察到的对象中的无复流程度与没有给药芳香族阳离子肽的对照对象或一群对照对象相比较而确定。

[0102] 在一个方面中，本发明的技术涉及通过将某些芳香族阳离子肽(诸如 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2)或者其药学上可接受的盐(诸如醋酸盐或三氟醋酸盐)给药至有需要的对象来治疗或预防解剖无复流区。在一个实施方式中，在形成解剖无复流区之前，将芳香族阳离子肽给药至对象。在另一实施方式中，在形成解剖无复流区之后，将芳香族阳离子肽给药至对象。在一个实施方式中，结合血管重建术来执行本方法。还提供了一种用于治疗或预防心脏缺血／再灌注损伤的方法。还提供了一种治疗对象中的心肌梗塞以

预防再灌注时对心脏造成损伤的方法。在一个方面中，本发明的技术涉及一种冠状动脉血管重建方法，其包括将治疗有效量的芳香族阳离子肽给药至哺乳动物对象以及对该对象执行冠状动脉旁路移植（CABG）手术。

[0103] 在一个实施方式中，在血管重建术之前将所述肽（诸如D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2）或者其药学上可接受的盐（诸如醋酸盐或三氟醋酸盐）给药至所述对象。在另一实施方式中，在血管重建术之后将所述肽给药至所述对象。在另一实施方式中，在血管重建术期间和血管重建术之后，将所述肽给药至所述对象。在另一实施方式中，在血管重建术之前、血管重建术期间和血管重建术之后连续将所述肽给药至所述对象。在另一实施方式中，在AMI和/或血管重建术或CABG手术之后将所述肽定期地（即长期地）给药至所述对象。

[0104] 在一些实施方式中，在血管重建术之后将所述肽给药至所述对象。在一个实施方式中，在血管重建术之后，将所述肽给药至所述对象至少3小时、至少5小时、至少8小时、至少12小时或至少24小时。在一些实施方式中，在血管重建术之前将所述肽给药至所述对象。在一个实施方式中，在血管重建术之前至少8小时时、至少4小时时、至少2小时时、至少1小时时、或至少10分钟时开始将所述肽给药至对象。在一个实施方式中，在血管重建术之后，将所述肽给药至所述对象至少一周、至少一个月或至少一年。在一些实施方式中，在血管重建术之前和血管重建术之后将所述肽给药至所述对象。在一些实施方式中，在特定的时期内将所述肽作为输液剂给药至所述对象。在一些实施方式中，将所述肽作为丸剂给药至所述对象。

[0105] 芳香族阳离子肽为水溶性且具有强极性。尽管这些属性，但该肽仍可以容易穿透细胞膜。该芳香族阳离子肽通常包括由肽键共价连接的至少3个氨基酸或至少4个氨基酸。在该芳香族阳离子肽中存在的氨基酸的最大数目为通过肽键而共价连接的大约20个氨基酸。合适地，氨基酸的最大数目为大约12个、更优选地大约9个、且最优选地大约6个。

[0106] 芳香族阳离子肽的氨基酸可以是任何氨基酸。本文中使用的术语“氨基酸”用来指包括至少一个氨基和至少一个羧基的任何有机分子。通常，至少一个氨基是相对于羧基在α位。所述氨基酸可以是天然存在的。例如，天然存在的氨基酸包括诸如通常在哺乳动物蛋白中发现的二十种最常见的左旋（L）氨基酸，即丙氨酸（Ala），精氨酸（Arg），天门冬酰胺（Asn），天门冬氨酸（Asp），半胱氨酸（Cys），谷氨酰胺（Gln），谷氨酸（Glu），甘氨酸（Gly），组氨酸（His），异亮氨酸（Ile），亮氨酸（Leu），赖氨酸（Lys），蛋氨酸（Met），苯丙氨酸（Phe），脯氨酸（Pro），丝氨酸（Ser），苏氨酸（Thr），色氨酸（Trp），酪氨酸（Tyr），和缬氨酸（Val）。其它天然存在的氨基酸包括诸如与蛋白质合成无关的代谢过程中合成的氨基酸。例如，氨基酸—鸟氨酸和瓜氨酸是在哺乳动物新陈代谢的产生尿素期间合成的。天然存在的氨基酸的另一示例包括羟（基）脯氨酸（Hyp）。

[0107] 所述肽可选地包括一种或多种非天然存在的氨基酸。在一些实施方式中，所述肽不具有天然存在的氨基酸。所述非天然存在的氨基酸可以是左旋（L-）氨基酸、右旋（D-）氨基酸或其混合物。非天然存在的氨基酸是这样的氨基酸：通常不是在生物体的天然代谢过程中合成的，且非天然地出现在蛋白质中。此外，非天然存在的氨基酸合适地也不会由普通的蛋白酶识别。非天然存在的氨基酸可以存在于肽的任何位置中。例如，非天然存在的氨基酸可以在N-末端、C-末端或者在N-末端和C-末端之间的任何位置。

[0108] 例如，非天然的氨基酸可以包括天然氨基酸中不存在的烷基、芳基或烷基芳基。非天然烷基氨基酸的一些示例包括 β－氨基丁酸，β－氨基丁酸，γ－氨基丁酸，δ－氨基戊酸和 ε－氨基己酸。非天然的芳基氨基酸的一些示例包括邻氨基苯甲酸、间氨基苯甲酸和对氨基苯甲酸。非天然的烷基芳基氨基酸的一些示例包括邻氨基苯乙酸、间氨基苯乙酸和对氨基苯乙酸、以及 γ－苯基－β－氨基丁酸。非天然存在的氨基酸包括天然存在的氨基酸的衍生物。所述天然存在的氨基酸的衍生物可以包括诸如对天然存在的氨基酸添加一种或多种化学基团。

[0109] 例如，可以将一种或多种化学基团添加至苯基丙氨酸残基或酪氨酸残基的芳香环的 2’、3’、4’、5’ 或 6’ 位置或者至色氨酸残基的苯并环的 4’、5’、6’ 或 7’ 位置。所述基团可以是可以添加到芳香环的任何化学基团。这样的基团的一些示例包括支链的或者无支链的 C_1-C_4 的烷基，比如甲基、乙基、正丙基、异丙基、丁基、异丁基、或叔丁基；C_1-C_4 的烷氧基(即烷氧基)；氨基；C_1-C_4 的烷基氨基和 C_1-C_4 的二烷基氨基(例如，甲氨基、二甲氨基)；硝基；羟基；卤素(即氟、氯、溴或碘)。天然存在的氨基酸的非天然存在的衍生物的一些特定示例包括正缬氨酸(Nva)和正亮氨酸(Nle)。

[0110] 肽中氨基酸的改性另一示例是将肽中的天冬氨酸或谷氨酸残基的羧基衍生化。衍生化的一个示例是与氨或伯胺或仲胺(例如甲胺、乙胺、二甲胺或二乙胺)的酰胺化。衍生化的另一示例包括与诸如甲醇或乙醇进行酯化。另一种这样的改性包括赖氨酸、精氨酸或组氨酸残基的氨基的衍生化。例如，这些氨基可以被酰化。例如，一些合适的酰基包括苯甲酰基或者包括以上提及的 C_1-C_4 的烷基中的任一烷基的烷酰基，比如乙酰基或丙酰基。

[0111] 非天然存在的氨基酸对常见的蛋白酶优选地为抵抗性的、且更优选地为不敏感的。对蛋白酶抵抗性的或者不敏感的非天然存在的氨基酸的示例包括以上提及的任一种自然存在的左旋(L-)氨基酸的右旋(D-)形式以及左旋和 / 或右旋的非天然存在的氨基酸。尽管右旋氨基酸存在于通过与细胞的常规的核糖体蛋白合成方法不同的方法而合成的某些肽抗生素中，但右旋氨基酸通常不存在于蛋白质中。本文中使用的右旋氨基酸被认为是非天然存在的氨基酸。

[0112] 为了使蛋白酶灵敏度最小，肽应当具有小于 5 个、优选地小于 4 个、更优选地小于 3 个、且最优选地小于 2 个的由普通蛋白酶识别的连续左旋氨基酸，而与氨基酸是否为天然存在无关。在一些实施方式中，肽仅具有右旋氨基酸，而不具有左旋氨基酸。如果肽具有蛋白酶敏感的氨基酸序列，则所述氨基酸中的至少一个氨基酸优选地为非天然存在的右旋氨基酸，由此提供蛋白酶抗性。蛋白酶敏感序列的示例包括可以由常见的蛋白酶(比如肽链内切酶和胰蛋白酶)容易地切割的两个或更多个连续的碱性氨基酸。碱性氨基酸的示例包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。

[0113] 与肽中的氨基酸残基的总数目相比，在生理 pH 条件下，芳香族阳离子肽应当具有最小数目的净正电荷。生理 pH 条件下的净正电荷的最小数目在下文称为(p_m)。肽中的氨基酸残基的总数目在下文称为(r)。下文讨论的净正电荷的最小数目都是在生理 pH 条件下。本文中使用的术语“生理 pH”指的是哺乳动物体的组织和器官的细胞中的正常 pH。例如，人的生理 pH 通常为约 7.4，而哺乳动物中的正常生理 pH 可以为由约 7.0 至约 7.8 的任一 pH。

[0114] 本文中使用的“净电荷”指的是存在于肽中的氨基酸所携带的正电荷的数目和负

电荷的数目的之间的相抵余数。在本说明书中，应当理解，净电荷是在生理 pH 条件下测定的。在生理 pH 条件下带正电的天然存在的氨基酸包括左旋赖氨酸、左旋精氨酸和左旋组氨酸。在生理 pH 条件下带负电的天然存在的氨基酸包括左旋天冬氨酸和左旋谷氨酸。

[0115] 通常地，肽具有带正电的 N- 末端氨基和带负电的 C- 末端羧基。所述电荷在生理 pH 条件下相互抵消。作为计算净电荷的实例，肽 Tyr-D-Arg-Phe-Lys-Glu-His-Trp-D-Arg 具有一个带负电的氨基酸（即 Glu）和四个带正电的氨基酸（即，两个 Arg 残基、一个 Lys 和一个 His）。因此，以上的肽具有 3 个净正电荷。

[0116] 在一个实施方式中，芳香族阳离子肽的在生理 pH 条件下的净正电荷的最小数目（p_m）和氨基酸残基的总数目（r）之间具有如下关系：其中，$3p_m$ 是小于或等于 r+1 的最大数。在该实施方式中，净正电荷的最小数目（p_m）和氨基酸残基的总数目（r）之间的关系如下：

[0117] 表 1. 氨基酸数目和净正电荷（$3p_m \leqslant p+1$）

[0118]

(r)	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
(p_m)	1	1	2	2	2	3	3	3	4	4	4	5	5	5	6	6	6	7

[0119] 在另一实施方式中，芳香族阳离子肽的净正电荷的最小数目（p_m）和氨基酸残基的总数目（r）之间具有如下关系：其中，$2p_m$ 是小于或等于 r+1 的最大数。在该实施方式中，净正电荷的最小数目（p_m）和氨基酸残基的总数目（r）之间的关系如下：

[0120] 表 2. 氨基酸数目和净正电荷（$2p_m \leqslant p+1$）

[0121]

(r)	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
(p_m)	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10

[0122] 在一个实施方式中，净正电荷的最小数目（p_m）和氨基酸残基的总数目（r）相等。在另一实施方式中，肽具有三个或四个氨基酸残基，其净正电荷的最小数目为 1、合适地净正电荷的最小数目为 2 且更优选地净正电荷的最小数目为 3。

[0123] 还重要的是，芳香族阳离子肽相比于净正电荷的总数目（p_t）具有最小数目的芳香基团。芳香基团的最小数目在下文称为（a）。具有芳香基团的天然存在的氨基酸包括氨基酸 - 组氨酸、色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸。例如，六肽 Lys-Gln-Tyr-D-Arg-Phe-Trp 具有 2 个净正电荷（由赖氨酸残基和精氨酸残基提供）以及三个芳香基团（由酪氨酸残基、苯丙氨酸残基和色氨酸残基提供）。

[0124] 芳香族阳离子肽还应当在芳香基团的最小数目（a）和在生理 pH 条件下的净正电荷的总数目（p_t）之间具有如下关系：其中，除了当 p_t 为 1 时 a 也可为 1 之外，3a 是小于或等于 p_t+1 的最大数。在该实施方式中，芳香基团的最小数目（a）和净正电荷的总数目（p_t）之间的关系如下：

[0125] 表 3. 芳香基团和净正电荷（$3a \leqslant p_t+1$ 或 $a=p_t=1$）

[0126]

(p_t)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20

(a)	1	1	1	1	2	2	2	3	3	3	4	4	4	5	5	5	6	6	6	7

[0127] 在另一实施方式中，芳香族阳离子肽在芳香基团的最小数目(a)和净正电荷的总数目(p_t)之间具有如下关系：其中，2a 是小于或者等于 p_t+1 的最大数。在该实施方式中，芳香氨基酸残基的最小数目(a)和净正电荷的总数目(p_t)之间的关系如下：

[0128] 表 4. 芳香基团和净正电荷(2a ≤ p_t+1 或 a=p_t=1)

[0129]

(p_t)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
(a)	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10

[0130] 在另一实施方式中，芳香基团的数目(a)和净正电荷的总数目(p_t)相等。

[0131] 羧基且尤其是 C- 末端氨基酸的末端羧基合适地与诸如氨进行酰胺化，以形成 C- 端酰胺。可选地，C- 端氨基酸的末端羧基可以与任一伯胺或仲胺进行酰胺化。所述伯胺或仲胺可以是诸如烷基、尤其是支链的或无支链的 C_1-C_4 的烷基或者芳香胺。因此，在肽的 C 末端的氨基酸可以转化为酰胺基、N- 甲基酰胺基、N- 乙基酰胺基、N,N- 二甲基酰胺基、N,N- 二乙基酰胺基、N- 甲基 -N- 乙基酰胺基、N- 苯基酰胺基或 N- 苯基 -N- 乙基酰胺基。未出现在芳香族阳离子肽的 C- 末端的天冬酰胺残基、谷氨酰胺残基和天冬氨酸残基和谷氨基酸残基的游离的羧酸基也可被酰胺化，不论它们是否存在于肽内。这些内部位置的酰胺化可以与氨或以上所述伯胺或仲胺中的任何一者进行。

[0132] 在一个实施方式中，芳香族阳离子肽是具有两个净正电荷以及至少一个芳香族氨基酸的三肽。在特定的实施方式中，所述芳香族阳离子肽是具有两个净正电荷和两个芳香族氨基酸的三肽。

[0133] 芳香族阳离子肽包括但不限于以下肽的示例：

[0134]

2',6'-Dmp-D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-NH_2
2',6'-Dmp-D-Arg-Phe-Lys-NH_2
2',6'-Dmt-D-Arg-PheOrn-NH_2
2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Ahp(2- 氨基庚酸)-NH_2
2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH_2
2',6'-Dmt-D-Cit-PheLys-NH_2

[0135]

Ala-D-Phe-D-Arg-Tyr-Lys-D-Trp-His-D-Tyr-Gly-Phe
Arg-D-Leu-D-Tyr-Phe-Lys-Glu-D-Lys-Arg-D-Trp-Lys-D-Phe-Tyr-D-Arg-Gly
Asp-Arg-D-Phe-Cys-Phe-D-Arg-D-Lys-Tyr-Arg-D-Tyr-Trp-D-His-Tyr-D-Phe-Lys-Phe
Asp-D-Trp-Lys-Tyr-D-His-Phe-Arg-D-Gly-Lys-NH_2
D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2
D-Glu-Asp-Lys-D-Arg-D-His-Phe-Phe-D-Val-Tyr-Arg-Tyr-D-Tyr-Arg-His-Phe-NH_2
D-His-Glu-Lys-Tyr-D-Phe-Arg
D-His-Lys-Tyr-D-Phe-Glu-D-Asp-D-Asp-D-His-D-Lys-Arg-Trp-NH_2
D-Tyr-Trp-Lys-NH_2
Glu-Arg-D-Lys-Tyr-D-Val-Phe-D-His-Trp-Arg-D-Gly-Tyr-Arg-D-Met-NH_2
Gly-Ala-Lys-Phe-D-Lys-Glu-Arg-Tyr-His-D-Arg-D-Arg-Asp-Tyr-Trp-D-His-Trp-His-D-Lys-Asp
Gly-D-Phe-Lys-His-D-Arg-Tyr-NH_2
His-Tyr-D-Arg-Trp-Lys-Phe-D-Asp-Ala-Arg-Cys-D-Tyr-His-Phe-D-Lys-Tyr-His-Ser-NH_2
Lys-D-Arg-Tyr-NH_2
Lys-D-Gln-Tyr-Arg-D-Phe-Trp-NH_2

Lys-Trp-D-Tyr-Arg-Asn-Phe-Tyr-D-His-NH_2
Met-Tyr-D-Arg-Phe-Arg-NH_2
Met-Tyr-D-Lys-Phe-Arg
Phe-Arg-D-His-Asp
Phe-D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-NH_2
Phe-D-Arg-His
Phe-D-Arg-Lys-Trp-Tyr-D-Arg-His
Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH_2
Phe-Phe-D-Tyr-Arg-Glu-Asp-D-Lys-Arg-D-Arg-His-Phe-NH_2
Phe-Tyr-Lys-D-Arg-Trp-His-D-Lys-D-Lys-Glu-Arg-D-Tyr-Thr
Thr-Gly-Tyr-Arg-D-His-Phe-Trp-D-His-Lys
Thr-Tyr-Arg-D-Lys-Trp-Tyr-Glu-Asp-D-Lys-D-Arg-His-Phe-D-Tyr-Gly-Val-Ile-D-His-Arg-Tyr-Lys-NH_2
Trp-D-Lys-Tyr-Arg-NH_2
Trp-Lys-Phe-D-Asp-Arg-Tyr-D-His-Lys
Tyr-Asp-D-Lys-Tyr-Phe-D-Lys-D-Arg-Phe-Pro-D-Tyr-His-Lys

Tyr-D-Arg-Phe-Lys-Glu-NH_2
Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH_2
Tyr-D-His-Phe-D-Arg-Asp-Lys-D-Arg-His-Trp-D-His-Phe
Tyr-His-D-Gly-Met
Val-D-Lys-His-Tyr-D-Phe-Ser-Tyr-Arg-NH_2

[0136] 在一个实施方式中，肽具有 μ 型阿片（mu-opioid）受体激动剂活性（即肽激活 μ 型阿片受体）。可通过与克隆的 μ 型阿片受体连接的放射性配体或通过使用豚鼠回肠的生物测定来评估 μ 型阿片活性（Schiller 等，Eur J Med Chem，35:895-901，2000；Zhao 等，J Pharmacol Exp Ther，307:947-954，2003）。μ 型阿片受体的激活通常引起止痛效应。在某些情况下，具有 μ 型阿片受体激动剂活性的芳香族阳离子肽是优选地。例如，在诸如急性疾病或病症的短期治疗期间，使用激活 μ 型阿片受体的芳香族阳离子肽可能是有利的。这类急性疾病和病症经常与中度疼痛或剧烈疼痛相关。在这些情况下，在人类患者或其他哺乳动物的治疗方案中该芳香族阳离子肽的止痛效应是有利的。然而，根据临床的需要，不激活 μ 型阿片受体的芳香族阳离子肽也可以与或不与止痛剂一起使用。

[0137] 可选地，在其他情况下，不具有 μ 型阿片受体激动剂活性的芳香族阳离子肽是优选地。例如，在长期治疗中，例如慢性疾病状况或病症，使用激活 μ 型阿片受体的芳香族阳离子肽可能是不可取的。在这些情况下，该芳香族阳离子肽潜在不利的或令人上瘾的效应可排除在人类患者或其他哺乳动物的治疗方案中的使用激活 μ 型阿片受体的芳香族阳离子肽。潜在不利的效应可包括镇静、便秘和呼吸抑制。在这类情况下，不激活 μ 型阿片受体的芳香族阳离子肽可能是合适的治疗。

[0138] 具有 μ 型阿片受体激动剂活性的肽通常为那些在 N- 末端（即在第一氨基酸位置）具有酪氨酸残基或具有酪氨酸衍生物的肽。酪氨酸的合适的衍生物包括 2’- 甲基酪氨酸（Mmt）、2’，6’- 二甲基酪氨酸（2’6’-Dmt）、3’，5’- 二甲基酪氨酸（3’5’-Dmt）、N，2’，6’- 三甲基酪氨酸（Tmt）和 2’- 羟基 -6’- 甲基酪氨酸（Hmt）。

[0139] 在一个实施方式中，具有 μ 型阿片受体激动剂活性的肽具有式 Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH_2。该肽具有氨基酸酪氨酸、精氨酸和赖氨酸所贡献的三个净正电荷，和氨基酸苯丙氨酸和酪氨酸所贡献的两个芳香基。酪氨酸可以为酪氨酸的改性衍生物，例如 2’，6’- 二甲基酪氨酸，以制备具有式 2’，6’-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH_2 的化合物。该肽具有 640 的分子量，且在生理 pH 条件下携带三个净正电荷。该肽以能量非依存的方式易于穿过若干哺乳动物细胞类型的原生质膜（Zhao 等，J Pharmacol Exp Ther.，304:425-432，2003）。

[0140] 不具有 μ 型阿片受体激动剂活性的肽通常在 N- 末端（即氨基酸位置 1）上不具有酪氨酸残基或不具有酪氨酸衍生物。在 N- 末端上的氨基酸可以为不同于酪氨酸的任何天然存在的或非天然存在的氨基酸。在一个实施方式中，N- 末端上的氨基酸为苯丙氨酸或苯丙氨酸的衍生物。苯丙氨酸的示例性衍生物包括 2’- 甲基苯丙氨酸（Mmp）、2’，6’- 二甲基苯丙氨酸（2’，6’-Dmp）、N，2’，6’- 三甲基苯丙氨酸（Tmp）和 2’- 羟基 -6’- 甲基苯丙氨酸（Hmp）。

[0141] 不具有 μ 型阿片受体激动剂活性的芳香族阳离子肽的示例具有式 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH_2。可选地，N- 末端的苯丙氨酸可为苯丙氨酸的衍生物，例如 2’，6’- 二甲基苯丙氨酸（2’6’-Dmp）。在一个实施方式中，在氨基酸位置 1 处具有 2’，6’- 二甲基苯丙氨酸的肽具有式 2’，6’-Dmp-D-Arg-Phe-Lys-NH_2。在一个实施方式中，氨基酸序列重排使得 Dmt 不在 N- 末端。这类不具有 μ 型阿片受体激动剂活性的芳香族阳离子肽的示例具有式 D-Arg-2’6’-Dmt-Lys-Phe-NH_2。

[0142] 本文提到的肽和它们的衍生物还可包括功能类似物。如果类似物具有与所列举的

肽相同的功能，则肽被认为功能类似物。例如，该类似物可以为肽的取代变型，其中一个或多个氨基酸被另一氨基酸所取代。该肽合适的取代变型包括保守的氨基酸取代物。氨基酸可以根据其物理化学性质而进行如下分组：

[0143] (a)非极性氨基酸：Ala(A)Ser(S)Thr(T)Pro(P)Gly(G)Cys(C)；

[0144] (b)酸性氨基酸：Asn(N)Asp(D)Glu(E)Gln(Q)；

[0145] (c)碱性氨基酸：His(H)Arg(R)Lys(K)；

[0146] (d)疏水性氨基酸：Met(M)Leu(L)Ile(I)Val(V)；以及

[0147] (e)芳香族氨基酸：Phe(F)Tyr(Y)Trp(W)His(H)。

[0148] 肽中的氨基酸被同一组中的另一种氨基酸取代称为保守取代，且可以保留原始肽的物理化学性质。相反，肽中的氨基酸被不同组中的另一种氨基酸取代通常更有可能改变原始肽的物理化学性质。

[0149] 激活 μ 型阿片受体的肽的示例包括但不限于表 5 中所示的芳香族阳离子肽。

[0150] 表 5 具有 μ 型阿片活性的肽类似物

[0151]

氨基酸位置 1	氨基酸位置 2	氨基酸位置 3	氨基酸位置 4	C- 末端改性
Tyr	D-Arg	Phe	Lys	NH_2
Tyr	D-Arg	Phe	Orn	NH_2
Tyr	D-Arg	Phe	Dab	NH_2
Tyr	D-Arg	Phe	Dap	NH_2
2’6’Dmt	D-Arg	Phe	Lys	NH_2
2’6’Dmt	D-Arg	Phe	Lys-NH$(CH_2)_2$-NH-dns	NH_2
2’6’Dmt	D-Arg	Phe	Lys-NH$(CH_2)_2$-NH-atn	NH_2
2’6’Dmt	D-Arg	Phe	dnsLys	NH_2
2’6’Dmt	D-Cit	Phe	Lys	NH_2
2’6’Dmt	D-Cit	Phe	Ahp	NH_2
2’6’Dmt	D-Arg	Phe	Orn	NH_2
2’6’Dmt	D-Arg	Phe	Dab	NH_2
2’6’Dmt	D-Arg	Phe	Dap	NH_2
2’6’Dmt	D-Arg	Phe	Ahp(2- 氨基庚酸)	NH_2

Bio-2’6’Dmt	D-Arg	Phe	Lys	NH_2
3’5’Dmt	D-Arg	Phe	Lys	NH_2
3’5’Dmt	D-Arg	Phe	Orn	NH_2
3’5’Dmt	D-Arg	Phe	Dab	NH_2
3’5’Dmt	D-Arg	Phe	Dap	NH_2
Tyr	D-Arg	Tyr	Lys	NH_2
Tyr	D-Arg	Tyr	Orn	NH_2
Tyr	D-Arg	Tyr	Dab	NH_2
Tyr	D-Arg	Tyr	Dap	NH_2
2’6’Dmt	D-Arg	Tyr	Lys	NH_2
2’6’Dmt	D-Arg	Tyr	Orn	NH_2
2’6’Dmt	D-Arg	Tyr	Dab	NH_2
2’6’Dmt	D-Arg	Tyr	Dap	NH_2
2’6’Dmt	D-Arg	2’6’Dmt	Lys	NH_2
2’6’Dmt	D-Arg	2’6’Dmt	Orn	NH_2
2’6’Dmt	D-Arg	2’6’Dmt	Dab	NH_2
2’6’Dmt	D-Arg	2’6’Dmt	Dap	NH_2
3’5’Dmt	D-Arg	3’5’Dmt	Arg	NH_2
3’5’Dmt	D-Arg	3’5’Dmt	Lys	NH_2
3’5’Dmt	D-Arg	3’5’Dmt	Orn	NH_2
3’5’Dmt	D-Arg	3’5’Dmt	Dab	NH_2
Tyr	D-Lys	Phe	Dap	NH_2
Tyr	D-Lys	Phe	Arg	NH_2
Tyr	D-Lys	Phe	Lys	NH_2

Tyr	D-Lys	Phe	Orn	NH_2
2’6’Dmt	D-Lys	Phe	Dab	NH_2
2’6’Dmt	D-Lys	Phe	Dap	NH_2

[0152]

2’6’Dmt	D-Lys	Phe	Arg	NH_2
2’6’Dmt	D-Lys	Phe	Lys	NH_2
3’5’Dmt	D-Lys	Phe	Orn	NH_2
3’5’Dmt	D-Lys	Phe	Dab	NH_2
3’5’Dmt	D-Lys	Phe	Dap	NH_2
3’5’Dmt	D-Lys	Phe	Arg	NH_2
Tyr	D-Lys	Tyr	Lys	NH_2
Tyr	D-Lys	Tyr	Orn	NH_2
Tyr	D-Lys	Tyr	Dab	NH_2
Tyr	D-Lys	Tyr	Dap	NH_2
2’6’Dmt	D-Lys	Tyr	Lys	NH_2
2’6’Dmt	D-Lys	Tyr	Orn	NH_2
2’6’Dmt	D-Lys	Tyr	Dab	NH_2
2’6’Dmt	D-Lys	Tyr	Dap	NH_2
2’6’Dmt	D-Lys	2’6’Dmt	Lys	NH_2
2’6’Dmt	D-Lys	2’6’Dmt	Orn	NH_2
2’6’Dmt	D-Lys	2’6’Dmt	Dab	NH_2
2’6’Dmt	D-Lys	2’6’Dmt	Dap	NH_2
2’6’Dmt	D-Arg	Phe	dnsDap	NH_2
2’6’Dmt	D-Arg	Phe	atnDap	NH_2

3’5’Dmt	D-Lys	3’5’Dmt	Lys	NH_2
3’5’Dmt	D-Lys	3’5’Dmt	Orn	NH_2
3’5’Dmt	D-Lys	3’5’Dmt	Dab	NH_2
3’5’Dmt	D-Lys	3’5’Dmt	Dap	NH_2
Tyr	D-Lys	Phe	Arg	NH_2
Tyr	D-Orn	Phe	Arg	NH_2
Tyr	D-Dab	Phe	Arg	NH_2
Tyr	D-Dap	Phe	Arg	NH_2
2’6’Dmt	D-Arg	Phe	Arg	NH_2
2’6’Dmt	D-Lys	Phe	Arg	NH_2
2’6’Dmt	D-Orn	Phe	Arg	NH_2
2’6’Dmt	D-Dab	Phe	Arg	NH_2
3’5’Dmt	D-Dap	Phe	Arg	NH_2
3’5’Dmt	D-Arg	Phe	Arg	NH_2
3’5’Dmt	D-Lys	Phe	Arg	NH_2
3’5’Dmt	D-Orn	Phe	Arg	NH_2
Tyr	D-Lys	Tyr	Arg	NH_2
Tyr	D-Orn	Tyr	Arg	NH_2
Tyr	D-Dab	Tyr	Arg	NH_2
Tyr	D-Dap	Tyr	Arg	NH_2
2’6’Dmt	D-Arg	2’6’Dmt	Arg	NH_2
2’6’Dmt	D-Lys	2’6’Dmt	Arg	NH_2

[0153]

2’6’Dmt	D-Orn	2’6’Dmt	Arg	NH_2

2’6’Dmt	D-Dab	2’6’Dmt	Arg	NH_2
3’5’Dmt	D-Dap	3’5’Dmt	Arg	NH_2
3’5’Dmt	D-Arg	3’5’Dmt	Arg	NH_2
3’5’Dmt	D-Lys	3’5’Dmt	Arg	NH_2
3’5’Dmt	D-Orn	3’5’Dmt	Arg	NH_2
Mmt	D-Arg	Phe	Lys	NH_2
Mmt	D-Arg	Phe	Orn	NH_2
Mmt	D-Arg	Phe	Dab	NH_2
Mmt	D-Arg	Phe	Dap	NH_2
Tmt	D-Arg	Phe	Lys	NH_2
Tmt	D-Arg	Phe	Orn	NH_2
Tmt	D-Arg	Phe	Dab	NH_2
Tmt	D-Arg	Phe	Dap	NH_2
Hmt	D-Arg	Phe	Lys	NH_2
Hmt	D-Arg	Phe	Orn	NH_2
Hmt	D-Arg	Phe	Dab	NH_2
Hmt	D-Arg	Phe	Dap	NH_2
Mmt	D-Lys	Phe	Lys	NH_2
Mmt	D-Lys	Phe	Orn	NH_2
Mmt	D-Lys	Phe	Dab	NH_2
Mmt	D-Lys	Phe	Dap	NH_2
Mmt	D-Lys	Phe	Arg	NH_2
Tmt	D-Lys	Phe	Lys	NH_2
Tmt	D-Lys	Phe	Orn	NH_2

Tmt	D-Lys	Phe	Dab	NH_2
Tmt	D-Lys	Phe	Dap	NH_2
Tmt	D-Lys	Phe	Arg	NH_2
Hmt	D-Lys	Phe	Lys	NH_2
Hmt	D-Lys	Phe	Orn	NH_2
Hmt	D-Lys	Phe	Dab	NH_2
Hmt	D-Lys	Phe	Dap	NH_2
Hmt	D-Lys	Phe	Arg	NH_2
Mmt	D-Lys	Phe	Arg	NH_2
Mmt	D-Orn	Phe	Arg	NH_2
Mmt	D-Dab	Phe	Arg	NH_2
Mmt	D-Dap	Phe	Arg	NH_2
Mmt	D-Arg	Phe	Arg	NH_2
Tmt	D-Lys	Phe	Arg	NH_2
Tmt	D-Orn	Phe	Arg	NH_2
Tmt	D-Dab	Phe	Arg	NH_2
Tmt	D-Dap	Phe	Arg	NH_2
Tmt	D-Arg	Phe	Arg	NH_2
Hmt	D-Lys	Phe	Arg	NH_2
Hmt	D-Orn	Phe	Arg	NH_2
Hmt	D-Dab	Phe	Arg	NH_2
Hmt	D-Dap	Phe	Arg	NH_2
Hmt	D-Arg	Phe	Arg	NH_2

[0154]

[0155] Dab= 二氨丁基

[0156] Dap= 二氨基丙酸

[0157] Dmt= 二甲基酪氨酸

[0158] Mmt=2' - 甲基酪氨酸

[0159] Tmt=N,2',6' - 三甲基酪氨酸

[0160] Hmt=2' - 羟基 -6' - 甲基酪氨酸

[0161] dnsDap= β - 丹磺酰 -L- α , β - 二氨基丙酸

[0162] atnDap= β - 邻氨基苯甲酰 -L- α , β - 二氨基丙酸

[0163] Bio= 生物素

[0164] 不激活 μ 型阿片受体的类似物的示例包括但不限于表 6 中所示的芳香族阳离子肽。

[0165] 表 6. 缺少 μ 型阿片活性的肽类似物

[0166]

氨基酸位置 1	氨基酸位置 2	氨基酸位置 3	氨基酸位置 4	C- 末端改性
D-Arg	Dmt	Lys	Phe	NH_2
D-Arg	Dmt	Phe	Lys	NH_2
D-Arg	Phe	Lys	Dmt	NH_2
D-Arg	Phe	Dmt	Lys	NH_2
D-Arg	Lys	Dmt	Phe	NH_2
D-Arg	Lys	Phe	Dmt	NH_2
Phe	Lys	Dmt	D-Arg	NH_2
Phe	Lys	D-Arg	Dmt	NH_2
Phe	D-Arg	Phe	Lys	NH_2
Phe	D-Arg	Dmt	Lys	NH_2
Phe	D-Arg	Lys	Dmt	NH_2
Phe	Dmt	D-Arg	Lys	NH_2
Phe	Dmt	Lys	D-Arg	NH_2
Lys	Phe	D-Arg	Dmt	NH_2
Lys	Phe	Dmt	D-Arg	NH_2

Lys	Dmt	D-Arg	Phe	NH_2
Lys	Dmt	Phe	D-Arg	NH_2
Lys	D-Arg	Phe	Dmt	NH_2
Lys	D-Arg	Dmt	Phe	NH_2
D-Arg	Dmt	D-Arg	Phe	NH_2
D-Arg	Dmt	D-Arg	Dmt	NH_2
D-Arg	Dmt	D-Arg	Tyr	NH_2
D-Arg	Dmt	D-Arg	Trp	NH_2
Trp	D-Arg	Phe	Lys	NH_2
Trp	D-Arg	Tyr	Lys	NH_2
Trp	D-Arg	Trp	Lys	NH_2
Trp	D-Arg	Dmt	Lys	NH_2
D-Arg	Trp	Lys	Phe	NH_2
D-Arg	Trp	Phe	Lys	NH_2
D-Arg	Trp	Lys	Dmt	NH_2
D-Arg	Trp	Dmt	Lys	NH_2
D-Arg	Lys	Trp	Phe	NH_2
D-Arg	Lys	Trp	Dmt	NH_2
Cha	D-Arg	Phe	Lys	NH_2
Ala	D-Arg	Phe	Lys	NH_2

[0167]

[0168] Cha= 环己基丙氨酸

[0169] 表 5 和表 6 中显示的肽的氨基酸可以是左旋结构或右旋结构。

[0170] 可通过本领域熟知的任何方法来合成肽。例如，用于以化学方式合成肽的合适方法包括诸如 Stuart 和 Young 在以下文献中描述的方法 :Solid Phase Peptide Synthesis, 第二版，Pierce Chemical Company(1984) ;以及 Methods Enzymol.289,Academic Press 公司，纽约 (1997)。

[0171] 芳香族阳离子肽的预防用途和治疗用途

[0172] 概述。本文中描述的芳香族阳离子肽(诸如 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH2)或者其药学上可接受的盐(诸如醋酸盐或三氟醋酸盐)可用于预防或治疗疾病或病症。具体地,本发明提供了用于治疗存在血管阻塞损伤、解剖无复流区或心脏缺血再灌注损伤的风险(或易得血管阻塞损伤、解剖无复流区或心脏缺血再灌注损伤)的对象的预防和治疗方法。因此,本方法提供了通过将有效量的芳香族阳离子肽给药至需要该芳香族阳离子肽的对象来预防和/或治疗对象中的血管阻塞损伤或心脏缺血再灌注损伤或解剖无复流区。

[0173] 基于芳香族阳离子肽的治疗法的生物学效果的确定。在各种实施方式中,进行合适的体外或体内分析来确定基于特定的芳香族阳离子肽的治疗的效果和该芳香族阳离子肽的给药是否适用于治疗。在各种实施方式中,可采用代表性动物模型进行体外分析,以确定给定的基于芳香族阳离子肽的治疗是否在预防或治疗解剖无复流区中起到了所期望的效果。在人类对象中测试之前,治疗中所用的化合物可以在合适的动物模型系统中进行测试,所述动物模型系统包括但不局限于大鼠、小鼠、鸡、猪、牛、猴子、兔子、羊、豚鼠等。类似地,对于体内测试而言,在给药至人类对象之前,可以使用本领域所知的任何动物模型系统。

[0174] 预防方法。一方面,本发明提供了一种通过将预防解剖无复流区发生或发展的芳香族阳离子肽给药至对象,来预防对象的解剖无复流区的方法。例如,可以通过本文描述的诊断分析或预兆性分析来确定处于解剖无复流区的风险中的对象。在预防性应用中,将足够量的芳香族阳离子肽的药物组合物或药剂给药至易得疾病或病症或者处于疾病或病症的风险中的对象以消除或降低该疾病或病症的风险、降低该疾病或病症的严重程度或延迟该疾病或病症发病,包括该疾病或病症的生物化学的、组织学的和/或行为学的症状、该疾病或病症的并发症和该疾病的发展期间存在的中间病理表型。将预防性的芳香族阳离子肽进行给药可以发生在异常的病症特点表现出来之前,使得疾病或障碍得到防止,或者选择性地其发展得到延迟。适当的化合物可以基于以上描述的筛选试验确定。

[0175] 治疗性方法。本发明的另一方面包括出于治疗目的来治疗对象中的血管阻塞损伤、解剖无复流区或心脏缺血再灌注损伤的方法。在治疗性应用中,将足够量的组合物或药物给药至疑似患上这样的疾病或病症的对象或者已患有这样的疾病或病症的对象,来充分消除或者至少部分地抑制所述疾病或病症的症状,包括该疾病或病症的并发症和该疾病或病症发展中的中间病理表现型。因此,本发明提供了治疗患有解剖无复流区的个体的方法。

[0176] 给药模式和有效剂量

[0177] 可以使用本领域的技术人员所知的任何方法来将细胞、器官或组织与肽接触。适当的方法包括体外法、间接体内法或体内法。体内法通常包括将芳香族阳离子肽(比如上文描述的芳香族阳离子肽)给药至哺乳动物、优选地给药至人。当用在体内以治疗时,芳香族阳离子肽可以以有效的量(即具有期望的治疗效果的量)给药至对象。剂量和给药方案将取决于对象中的损伤的程度、所使用的特定的芳香族阳离子肽的性质(例如其治疗指数)、该对象以及该对象的病史。

[0178] 可以在临床前试验和临床试验期间利用内科医生和临床医生熟悉的方法来确定有效量。在该方法中有用的肽的有效量可以通过用于给药药物组合物的多种已知方法中的任一方法来给药至需要该肽的哺乳动物。肽可以以全身给药或局部给药。

[0179] 该肽可被表达为药学上可接受的盐。术语“药学上可接受的盐”意味着由碱或酸制得的、对给药至患者(例如哺乳动物)而言可接受的盐(例如,对于给定的给药方案具有可接受的哺乳动物安全性的盐)。然而,应该理解,盐没有必须为药学上可接受的盐,例如不用于给药病患的中间化合物的盐。药学上可接受的盐可以从药学上可接受的无机碱或有机碱、以及从药学上可接受的无机酸或有机酸得到。此外,当肽含有碱性部分,例如胺、嘧啶或咪唑,和酸性部分例如羧酸或四唑时,可形成两性离子且该两性离子包括在本文使用的术语“盐”的范围之内。从药学上可接受的无机碱衍生得出的盐包括铵盐、钙盐、铜盐、正铁盐、亚铁盐、锂盐、镁盐、锰盐、亚锰盐、钾盐、钠盐和锌盐等。从药学上可接受的有机碱衍生得出的盐包括伯胺盐、仲胺盐和叔胺盐,该盐包括取代胺、环胺、天然存在的胺等,例如精氨酸、甜菜碱、咖啡因、胆碱、N,N’-二苄基乙二胺、二乙胺、2-二乙氨基乙醇、2-二甲氨基乙醇、乙醇胺、乙二胺、N-乙基吗啉、N-乙基哌啶、还原葡糖胺、葡糖胺、组氨酸、海巴明(hydrabamine)、异丙胺、赖氨酸、甲基葡糖胺、吗啉、哌嗪、哌啶(piperadine)、聚胺树酯、普鲁卡因、嘌呤、可可碱、三乙胺、三甲胺、三丙胺、缓血酸胺等。从药学上可接受的无机酸衍生得出的盐包括硼酸盐、碳酸盐、氢卤酸盐(氢溴酸盐、盐酸盐、氢氟酸盐或氢碘酸盐)、硝酸盐、磷酸盐、氨基磺酸盐和硫酸盐。从药学上可接受的有机酸衍生得出的盐包括脂肪族羟基酸盐(例如柠檬酸盐、葡糖酸盐、乙醇酸盐、乳酸盐、乳糖酸盐、苹果酸盐和酒石酸盐)、脂肪族单羧酸盐(例如醋酸盐、丁酸盐、甲酸盐、丙酸盐和三氟醋酸盐)、氨基酸盐(例如天冬氨酸盐和谷氨酸盐)、芳香族羧酸盐(例如苯甲酸盐、对-氯苯甲酸盐、二苯基乙酸盐、龙胆酸盐、马尿酸盐和三苯基乙酸盐)、芳香族羟酸(例如邻-羟基苯甲酸盐、对-羟基苯甲酸盐、1-羟基萘-2-羧酸盐和3-羟基萘-2-羧酸盐)、抗坏血酸盐、二羧酸盐(例如富马酸盐、马来酸盐、草酸盐和琥珀酸盐)、葡糖糖醛酸盐、苦杏仁酸盐、粘酸盐、烟酸盐、乳清酸盐、帕莫酸盐、泛酸盐、磺酸盐(苯磺酸盐、樟脑磺酸盐、乙二磺酸盐(edisylic)、乙磺酸盐、羟乙基磺酸盐、甲磺酸盐、萘磺酸盐、萘-1,5-二磺酸盐、萘-2,6-二磺酸盐和对-甲苯磺酸盐)、辛那酸(xinafoic acid)盐等。在一些实施方式中,盐为醋酸盐或三氟醋酸盐。

[0180] 本文描述的芳香族阳离子肽(诸如D-Arg-2’,6’-Dmt-Lys-Phe-NH_2)或者其药学上可接受的盐(诸如醋酸盐或三氟醋酸盐)可以单独地或组合地加入到药物组合物以给药至对象来治疗或预防本文中描述的疾病。这类组合物通常包括活性剂和药学上可接受的载体。本文中使用的术语“药学上可接受的载体”包括与给药药物相符合的生理盐水、溶剂、分散介质、涂层、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延缓剂等。辅助性的活性化合物可以加入到所述组合物中。

[0181] 通常将药物组合物配制成与其计划给药途径相符。给药途径的示例包括注射(例如,静脉注射、皮内、腹腔或皮下)、口服、吸入、经皮肤(局部)、眼内、离子电渗疗法和经粘膜给药。用于肠胃外、皮内或皮下应用的溶液或悬浮液可以包括以下成分:诸如注射用水的消毒稀释液、生理盐水、不挥发油、聚乙二醇、丙三醇、丙二醇或其它合成溶剂;抗菌剂,比如苯甲醇或苯甲酸甲脂防腐剂;抗氧化剂,比如抗坏血酸或亚硫酸氢纳;络合剂,比如乙二胺四乙酸;缓冲液,比如醋酸盐、柠檬酸盐和磷酸盐;以及用于调节渗透压的溶剂,比如氯化钠或左旋糖。可以用酸或碱来调节pH,比如盐酸或氢氧化钠。肠胃外制剂可以装在玻璃或塑料制的安瓿瓶、一次性注射器或多剂量瓶中。为了患者或治疗医师的方便,可以以包括治疗过程(例如,治疗7天)所需的所有用具(例如,药瓶、稀释液瓶、注射器和针头)的试剂盒的

形式提供剂量制剂。

[0182] 适于注射用途的药物组合物可以包括无菌水溶液(在水溶性的情况下)或者用于临时制备无菌注射液或分散液的分散剂或无菌粉末。为了静脉注射,合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™ (BASF,帕西波尼,N.J.)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况下,用于肠胃外给药的组合物必须无菌且应当是达到易于注射的程度的存在的液体。用于肠胃外给药的组合物在制造和存储条件下必须稳定且应当被保存同时防止诸如细菌和真菌的微生物的污染行为。

[0183] 所述芳香族阳离子肽组合物可以包括载体,该载体可以是包括诸如水、乙醇、多元醇(例如,丙三醇、丙二醇以及液态聚乙二醇等)及其合适的组合物的溶剂或分散介质。可以通过例如以下的方式来保持适当的流体性:利用比如卵磷脂的涂层;在分散质的情况下,通过保持所需的颗粒尺寸;和通过利用表面活性剂。可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂来实现防止微生物的行为,例如尼泊金、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等。可以包括谷胱甘肽和其他的抗氧化剂以防止氧化。在很多情况下,优选的是,在该组合物中包括等渗剂,比如糖、多元醇(比如甘露醇、山梨醇)或氯化钠。可以通过在该组合物中包括延迟吸收的制剂来引起可注射组合物的延长吸收,所述延迟吸收的制剂例如为单硬脂酸铝或药用胶。

[0184] 可以通过将所需量的活性化合物加入具有以上列出的一种成分或多种成分的组合的适当的溶剂中、根据需要然后进行过滤灭菌来制备注射用无菌溶液。通常,通过将活性化合物加入在包括基本分散介质以及以上列出的所需的其它成分的无菌载体中来制备分散质。在用来制备注射用无菌溶液的无菌粉末的情况下,典型的制备方法包括真空干燥和冷冻干燥,这可以产出活性成分以及来自于先前灭菌过滤的溶液中的任何其他所需成分的粉末。

[0185] 口服组合物通常包括惰性稀释剂或可食用的载体。为了口服治疗给药,活性化合物可以与赋形剂混合并以片剂、锭剂或胶囊(例如明胶胶囊)的形式使用。还可利用用作洗口剂的液态载体来制备口服组合物。药学上相容的粘合剂和/或辅助材料可以被包括为该组合物的一部分。所述片剂、丸剂、胶囊剂或锭剂等可以包括具有相似性质的以下成分或化合物中的任一种:粘合剂,比如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶;赋形剂,比如淀粉或乳糖;分裂剂,比如褐藻酸、羧甲淀粉钠、或玉米淀粉;润滑剂,比如硬脂酸镁或 Sterotes;助流剂,比如胶态二氧化硅;甜味剂,比如蔗糖或糖精;或者增味剂,比如薄荷、水杨酸甲酯或桔子调味品。

[0186] 关于通过吸入法给药,所述化合物可以以喷雾剂的形式从包括合适的推进物(例如,比如二氧化碳的气体)的加压容器或分配器或者喷雾器喷洒而递送。这样的方法包括第6468798号美国专利中描述的方法。

[0187] 本文中描述的治疗化合物的全身给药还可以通过经粘膜方法或经皮肤方法来进行。对于经粘膜给药或经皮肤给药,适合于待渗透的屏障的渗透剂用在该配方中。这样的渗透剂通常是本技术领域已知的,例如,对于经粘膜给药而言,这样的渗透剂包括洗涤剂、胆汁盐类或梭链孢酸衍生物。可以通过使用鼻喷入法来完成经粘膜给药。对于经皮肤给药而言,活性化合物配制成本领域普遍知道的药膏、软膏、凝胶、乳液。在一个实施方式中,经皮肤给药可以通过电离子渗透法来进行。

[0188] 治疗性蛋白质或肽可以在载体体系中配制而成。该载体可以是胶态体系。该胶

态体系可以是脂质体、磷脂双分子层媒介物。在一个实施方式中，在脂质体中该治疗肽被胶囊化，同时保持肽完整性。本领域的本领域技术人员理解，有各种方法来制备脂质体。(参见：Lichtenberg 等的 Methods Biochem. Anal., 33:337-462(1988)；Anselem 等的 Liposome Technology, CRC Press(1993))。脂质体制剂可以延迟排出并增强细胞摄取(参见 Reddy, Ann. Pharmacother., 34(7-8):915-923(2000))。活性剂还可以载入到由医学上可接受的成分制备成的颗粒中，所述医学上可接受的成分包括但不限于可溶解的、不可溶解的、可渗透的、不可渗透的、可生物降解的或胃内滞留的聚合物或脂质体。这样的颗粒包括但不限于纳米颗粒、可生物降解的纳米颗粒、微颗粒、可生物降解的微颗粒、纳米球、可生物降解的纳米球、微球、可生物降解的微球、胶囊剂、乳剂、脂质体、胶粒以及病毒载体体系。

[0189] 该载体还可以是聚合物，比如可生物降解的、可生物相容的聚合物基质。在一个实施方式中，治疗性肽可以嵌入到聚合物基质中，同时保持蛋白质完整性。所述聚合物可以是天然的，比如多肽、蛋白质或多糖；或者可以是合成的，比如聚 α-羟酸。示例包括由例如以下物质制成的载体：胶原蛋白、纤连蛋白、弹性蛋白、乙酸纤维素、硝酸纤维素、多糖、纤维蛋白、明胶及其组合。在一个实施方式中，所述聚合物是聚乳酸(PLA)或乳酸羟基乙酸共聚物(PGLA)。可以以各种形式和尺寸来制备并分离聚合物基体，包括微球和纳米球。聚合物制剂可以引起治疗作用的期间的延长(参见：Reddy, Ann. Pharmacother., 34(7-8):915-923(2000))。用于人类生长激素(hGH)的聚合物制剂已用在临床试验中(参见：Kozarich 和 Rich, Chemical Biology, 2:548-552(1998))。

[0190] 高分子微球持续释放剂的示例在 PCT 公布 WO99/15154 (Tracy 等)、第 5674534 号美国专利以及第 5716644 号美国专利(都属于 Zale 等)、PCT 公布 WO96/40073 (Zale 等)和 PCT 公布 WO00/38651 (Shah 等)中予以描述。第 5674534 号美国专利以及第 5716644 号美国专利以及 PCT 公布 WO96/40073 描述了包括含红细胞生成素的颗粒的聚合物基体，所述红细胞生成素的颗粒用盐来防止凝聚而稳定。

[0191] 在一些实施方式中，治疗性化合物与将保护所述治疗化合物以防止其从身体中快速排出的载体一起制备，所述载体比如控释剂，包括植入体和微胶囊化的输送体系。可以使用可生物降解的、生物相容的聚合物，比如乙烯醋酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原质、聚原酸酯和聚乳酸。可以利用已知的技术来制备这样的制剂。还可以在市场上获得所述材料，例如从 Alza Corporation 和 Nova Pharmaceuticals, Inc. 买到的脂质体悬浮液(包括针对具有细胞特异性抗原的单细胞克隆抗体的特定细胞的脂质体)也可用作医学上可以接受的载体。所述胶质体悬浮液可以利用本领域技术人员知道的方法来制备，比如，第 4522811 号美国专利中描述的方法。

[0192] 还可以配制所述治疗性化合物以增强细胞内传递。例如，本领域已知脂质体传递系统例如，参见：Chonn 和 Cullis 的“Recent Advances in Liposome Drug Delivery Systems”, Current Opinion in Biotechnology6:698-708(1995); Weiner 的“Liposomes for Protein Delivery:Selecting Manufacture and Development Processes”, Immunomethods4(3)201-9(1994); 和 Gregoriadis 的“Engineering Liposomes for Drug Delivery:Progress and Problems”Trends Biotechnol. 13(12):527-37(1995)。以下文献描述了利用融合脂质体在体内或在体外将蛋白质传递至细胞：Mizguchi 等的 Cancer Lett. 100:63-69(1996)。

[0193] 可以通过细胞培养或试验动物中的标准药学过程来确定治疗性药物的用量、毒性和治疗效率，例如，用于确定 LD50（总数 50% 的致命剂量）和 ED50（总数 50% 中有效治疗的剂量）。毒性和治疗效果之间的剂量比是治疗指数，且其可以表示为比率 LD50/ED50。表现出高治疗指数的化合物是优选的。尽管具有毒性副作用的化合物可以使用，但应当考虑设计传递系统，该传递系统将这样的化合物靶向组织的受影响的位置，以将对未感染的细胞的可能损伤最小化，且由此降低副作用。

[0194] 从细胞培养试验和动物研究获取的数据可以用在配制人类中使用的剂量范围中。这样的化合物的剂量优选地位于包括毒性很小或无毒的 ED50 的循环浓度的范围中。根据使用的剂量类型和利用的给药途径，剂量可以在该范围内变化。对于该方法中使用的任何化合物而言，可以最初根据细胞培养试验来计算出治疗有效的剂量。可以在动物模型中制定一剂量来获得包括细菌培养中确定的 IC50（即，测试化合物的获得最大抑制病症的一半的浓度）的循环血药浓度范围。这样的制剂可以用来更准确地确定人类中的有用剂量。可以例如通过高效液相色谱法测定血药浓度。

[0195] 通常，芳香族阳离子肽的足以获得治疗效果或预防效果的有效量的范围为约 0.000001 毫克 / 千克体重 / 天到约 10000 毫克 / 千克体重 / 天。优选地，剂量范围从约 0.0001 毫克 / 千克体重 / 天到约 100 毫克 / 千克体重 / 天。例如，剂量可以是每天、每两天或每三天 1 毫克 / 千克体重或者 10 毫克 / 千克体重，或者在每周、每两周或每三周的 1 毫克 / 千克体重到 10 毫克 / 千克体重的范围中。在一个实施方式中，肽的单剂量的范围从 0.1 毫克 / 千克体重到 10000 毫克 / 千克体重。在一个实施方式中，芳香族阳离子肽在载体中的浓度的范围从 0.2 毫克 / 每毫升到 2000 毫克 / 每毫升。示例性的治疗方法每天或每周提供一次给药。在治疗应用中，在相对短的时间间隔中有相对高的剂量有时是需要的，直到疾病的进程减缓或终止为止，且优选地直到对象显示出部分或完全地改善了疾病的病症。其后，可以对患者实行预防性的给药方式。

[0196] 在一些实施方式中，芳香族阳离子肽的治疗有效的量可以定义为目标组织中的肽的浓度为 10^{-12} 摩尔到 10^{-6} 摩尔，例如约 10^{-7} 摩尔。可以以 0.01 毫克 / 千克到 100 毫克 / 千克的全身剂量或身体表面面积的等效剂量来给予前述浓度。优化剂量的时间表，以保持目标组织的治疗浓度，最优选地通过每天或每周给药，但也包括连续给药（例如，输液或经皮肤施药）来进行。

[0197] 在一些实施方式中，芳香族阳离子肽的剂量提供为“低”、“中”或“高”剂量水平。在一个实施方式中，低剂量提供为从约 0.01mg/kg/h 到约 0.5mg/kg/h、合适地从约 0.0001mg/kg/h 到约 0.1mg/kg/h。在一个实施方式中，中剂量提供为从约 0.001mg/kg/h 到约 1.0mg/kg/h，合适地从约 0.01mg/kg/h 到约 0.5mg/kg/h。在一个实施方式中，高剂量提供为从约 0.005mg/kg/h 到约 10mg/kg/h，合适地从约 0.01mg/kg/h 到约 2mg/kg/h。

[0198] 本领域技术人员将认识到，某些因素可以影响有效地治疗一对象的剂量和时间，包括但不限于疾病或失调的严重程度、先前的治疗、健康情况和 / 或对象的年龄以及存在的其它疾病。而且，利用本文描述的治疗有效量的治疗组合物来治疗一对象可以包括单次治疗或一系列治疗。

[0199] 根据本发明的方法治疗的哺乳动物可以是任何动哺乳物，例如，包括农场动物，如羊、猪、牛和马；宠物动物，如狗和猫；实验室里的动物，如大鼠、小鼠和兔。在优选的实施方

式中，所述哺乳动物是人。

[0200] 解剖无复流区的测量

[0201] 成像技术可用于评估本发明技术的肽对解剖无复流区的作用。(通常参见参考文献 1-51)。无复流现象可使用心肌声学造影、冠状动脉血管造影术、心肌呈色、冠状动脉多普勒成像、心电图、使用铊或锝 -99m 的核成像单光子发射 CT、和正电子发射计算机断层扫描(PET)来进行评估。对比增强 MRI 可评估造影剂首过期间的心肌灌注。可替选地，在造影剂注射之后的 20 分钟时，延迟的对比增强 MRI 可用于检测坏死。在首过灌注 MRI 中检测到低增强区(这表示无复流)与随访的永久性功能失调相关。在一些实施方式中，可使用心脏 MRI 评估微血管堵塞。例如，1.5T 的身体 MRI 扫描仪可用于执行心脏 MRI 以评估心室功能、心肌水肿(处于风险中的区域)、微血管堵塞和梗塞面积。

[0202] 实施例

[0203] 通过以下实施例进一步说明本发明，所述实施例不应当被看作以任何方式限制本发明。

[0204] 如上所述，缺血可导致微血管发生显著变化，该变化干扰进入到许多组织 / 器官的正常血流。因而，无复流现象可发生在多种组织 / 器官中，包括心脏、肝脏、脑、皮肤、骨骼肌、肾脏等。预测到，本发明的芳香族阳离子肽可用在预防或治疗多种组织 / 器官中的解剖无复流区的方法中。

[0205] 实施例 1 在兔心脏经受缺血 / 再灌注损伤后，D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 对解剖无复流区、出血区和梗塞面积的作用

[0206] 概述。研究了在局部心肌缺血(大约 30 分钟)和再灌注(大约 3 小时)之后 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 对梗塞面积和无复流的作用。通过多个实验程序来评估研究药品(即赋形剂 / 安慰剂和 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 (醋酸盐))的功效，这些实验程序在研究药品的给药时间点上是不同的，该给药时间点是相对于缺血和随后的心肌再灌注的开始而言的。

[0207] 给药的路径和持续时间。通过静脉输液给药赋形剂 / 安慰剂和 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 (醋酸盐)。在图 1 中给出关于输液和输液的持续时间的细节。

[0208] 测试动物。在表 7 中详述了在本研究中所利用的动物。根据 USDA 和 NIH 所制定的标准，将动物饲养在动物设施中。在随机引入到试验方案之前，由专业人员检查兔子且使兔子适应环境至少 2 天时间。每天观察所有的兔子是否出现腹泻、食欲不振、不适等症状。如果看到这些症状中任一症状，该兔子不被包括在研究群体内。在要进行动物试验前，使所有的动物禁食(移走食物)整晚。所有的动物没有明显的临床疾病。在进行动物实验的前一天或者在进行动物实验的当天记录每一只兔子的体重，以用于剂量配方计算和麻醉目的。在完成每一实验后，对动物(已经完全麻醉)实施安乐死和适当处置。

[0209]

表 7：测试动物的描述	
物种	兔
品种	新西兰白兔
性别	雄性
动物数目	大约 30-50 只
研究开始时的年龄	大约 4-7 个月
研究开始时的重量	大约 2.0-3.75 千克

[0210] 研究药品(D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2(醋酸盐)和赋形剂/安慰剂)。记录下面描述的研究药品的批号、供应商名称、肽含量、有效期和储存条件。按照下面所述的赋形剂中的混合物的重量体积比来制备用于 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2(醋酸盐)的研究药品制剂。

[0211] 用在这些研究中的 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2(醋酸盐)(无菌冻干粉末)由 Stealth Peptides 有限公司提供。将 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2(醋酸盐)研究药品溶解在无菌生理盐水(0.9% 的 NaCl)中以制备 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2(醋酸盐)研究药品原液。在利用生理盐水稀释之后,使用具有小于 0.22μm 的膜(PES 膜或 PVDF 膜)的无菌过滤装置过滤该 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2(醋酸盐)研究药品的原液,然后在使用之前将其储存在 -20℃下。

[0212] 在每一 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2(醋酸盐)实验的早上,在将 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2(醋酸盐)研究药品原液与无菌生理盐水(0.9%NaCl)混合之前,在室温下解冻等分的冷冻的 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2(醋酸盐)研究药品原液。针对剂量溶液制备和输液速率,表 8- 表 11 总结了要用在研究中的 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2(醋酸盐)的浓度/剂量。

[0213]

表 8: D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 的剂量制备		
测试药品	D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2（醋酸盐）	
赋形剂	无菌生理盐水（0.9%的 NaCl）	
研究组	组 1:以 **0.05mg/kg/hr** 的 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2（醋酸盐）输液完整的 **200 分钟**（**20 分钟缺血+180 分钟再灌注**）	
	组 2:首先以 **0.075mg/kg/hr** 的 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2（醋酸盐）输液 **20 分钟**；然后改变到 **0.05mg/kg/hr** 的 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2（醋酸盐）输液 **170 分钟**。总共输液时间=**190 分钟**（10 分钟缺血+180 分钟再灌注）	
	组 3:首先以 **0.10mg/kg/hr** 的 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2(醋酸盐）输液 **20 分钟**；然后转换到 **0.05mg/kg/hr** 的 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2（醋酸盐）输液 **160 分钟**。总共输液时间等于 **180 分钟**（只进行 180 分钟再灌注）	

[0214]

表 9：对于组 1（0.05mg/kg/hr 输液 200 分钟）的 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 的剂量制备

输液时间表	剂量	肽浓度	体重	输液速率		总共输液体积
	（mg/kg/hr）	（mg/mL）	（kg）	（mL/min）	（mL/hr）	（mL）
从 0 分钟至 200 分钟	0.050	0.10	2.0	0.017	1.00	3.3
	0.050	0.10	2.5	0.021	1.25	4.2
	0.050	0.10	3.0	0.025	1.50	5.0
	0.050	0.10	3.5	0.029	1.75	5.8
	0.050	0.10	4.0	0.033	2.00	6.7

[0215]

表 10: 对于组 2(以 0.075mg/kg/hr 输液 20 分钟; 转换到以 0.05mg/kg/hr 输液 170 分钟; 总共输液时间=190 分钟)的 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 的剂量制备

输液时间表	剂量	肽浓度	体重	输液速率		输液体积	总共输液体积
	(mg/kg/hr)	(mg/mL)	(kg)	(mL/min)	(mL/hr)	(mL)	(mL)
从 0 分钟至 20 分钟	0.075	0.10	2.0	0.025	1.50	0.50	3.3
从 21 分钟至 190 分钟	0.050	0.10	2.0	0.017	1.00	2.83	
从 0 分钟至 20 分钟	0.075	0.10	2.5	0.031	1.88	0.63	4.2
从 21 分钟至 190 分钟	0.050	0.10	2.5	0.021	1.25	3.54	
从 0 分钟至 20 分钟	0.075	0.10	3.0	0.038	2.25	0.75	5.0
从 21 分钟至 190 分钟	0.050	0.10	3.0	0.025	1.50	4.25	
从 0 分钟至 20 分钟	0.075	0.10	3.5	0.044	2.63	0.88	5.8
从 21 分钟至 190 分钟	0.050	0.10	3.5	0.029	1.75	4.96	
从 0 分钟至 20 分钟	0.075	0.10	4.0	0.050	3.00	1.00	6.7
从 21 分钟至 190 分钟	0.050	0.10	4.0	0.033	2.00	5.67	

[0216]

表 11：对于组 3（以 0.10 mg/kg/hr 输液 20 分钟；转换到以 0.05mg/kg/hr 输液 160 分钟；总共输液时间=180 分钟（仅再灌注 180 分钟））的 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 的剂量制备

输液时间表	剂量	肽浓度	体重	输液速率		输液体积	总共输液体积
	（mg/kg/hr）	（mg/mL）	（kg）	（mL/min）	（mL/hr）	（mL）	（mL）
从 0 分钟至 20 分钟	0.100	0.10	2.0	0.033	2.00	0.67	3.3
从 21 分钟至 190 分钟	0.050	0.10	2.0	0.017	1.00	2.67	
从 0 分钟至 20 分钟	0.100	0.10	2.5	0.042	2.50	0.83	4.2
从 21 分钟至 190 分钟	0.050	0.10	2.5	0.021	1.25	3.33	
从 0 分钟至 20 分钟	0.100	0.10	3.0	0.050	3.00	1.00	5.0
从 21 分钟至 190 分钟	0.050	0.10	3.0	0.025	1.50	4.00	
从 0 分钟至 20 分钟	0.100	0.10	3.5	0.058	3.50	1.17	5.8
从 21 分钟至 190 分钟	0.050	0.10	3.5	0.029	1.75	4.67	
从 0 分钟至 20 分钟	0.100	0.10	4.0	0.067	4.00	1.33	6.7
从 21 分钟至 190 分钟	0.050	0.10	4.0	0.033	2.00	5.33	

[0217] 研究设计。利用适应性设计模型设计本研究。因此，合适的话，在大约 32 只兔子的第一组（同期组群 1）中收集的数据用于修正其余研究（例如随后的同期组群）。在稳定大约 15-30 分钟后，得到基线血液动力学参数和温度。此外，这些兔子被随机分配到下面

四组之一中(参见图 1):组 1,研究药品 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2(醋酸盐):在冠状动脉阻塞(CAO)后大约 10 分钟时开始输液 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2(醋酸盐),且在大约 180 分钟的再灌注期间持续输液 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2(醋酸盐),n=8(待确定的剂量 / 体积),D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2(醋酸盐)输液时间约等于 200 分钟;组 2,研究药品 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2(醋酸盐):在冠状动脉阻塞(CAO)后大约 20 分钟时(在再灌注之前的 10 分钟时)开始输液 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2(醋酸盐),且在大约 180 分钟的再灌注期间持续输液 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2(醋酸盐),n=8(待确定的剂量 / 体积),D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2(醋酸盐)输液时间约等于 190 分钟;组 3,研究药品 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2(醋酸盐):在冠状动脉再灌注开始之前立即开始进行输液 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2(醋酸盐)且在大约 180 分钟的再灌注期间持续进行输液 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2(醋酸盐),n=8(待确定的剂量 / 体积),D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2(醋酸盐)输液时间约等于 180 分钟;和组 4:研究药品(对照)为相对于 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2(醋酸盐)等体积的赋形剂 / 安慰剂,在 CAO 后大约 10 分钟时开始输液研究药品(对照),且在大约 180 分钟的再灌注期间持续输液研究药品(对照)。赋形剂 / 安慰剂输液时间大约等于 200 分钟。

[0218] 对于特定的时间点(例如在再灌注时、开始再灌注后 15 分钟时以及大约稳定状态时),为了关于 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 实现期望的血药浓度,用于组 1、组 2 和组 3 中每一组的剂量设计应如下:

[0219] 组 1:0.05mg/kg/hr 的 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2(醋酸盐),组 1 的输液时间整整 200 分钟;

[0220] 组 2:以 0.075mg/kg/hr 的 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2(醋酸盐)首先输液 20 分钟,然后改变到以 0.05mg/kg/hr 的 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2(醋酸盐)输液 170 分钟;和

[0221] 组 3:以 0.10mg/kg/hr 的 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2(醋酸盐)首先输液 20 分钟,然后改变到以 0.05mg/kg/hr 的 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2(醋酸盐)输液 160 分钟。

[0222] 手术准备(参见图 2A:研究流程图 - 体内步骤以及图 2B:研究流程图 - 病理学测量)。通过肌肉注射氯胺酮(大约 75mg/kg)和甲苯噻嗪(大约 5mg/kg)的混合物来麻醉雄性新西兰白兔。在研究期间按照需要通过静脉输注进行戊巴比妥麻醉以维持深度麻醉。给兔子插入管子且以机械方式通入富氧的空气。将充满液体的导管插入左颈静脉中以给药研究药品,将充满液体的导管插入右颈静脉中以进行麻醉,将充满液体的导管插入左颈动脉中以评估血流动力学且在局部心肌血流测量期间采集参考血液样品。穿过左边第四肋间隙打开胸腔,切开心包膜,露出心脏。在心脏的基部附近,旋动脉的第一大前侧分支或者旋动脉本身被 4-0 丝线所环绕。在该区域中的 CAO 通常导致前侧心室壁和顶端心室壁的大面积缺血。缝合末端穿过一段管,形成可以勒紧以封堵动脉的勒紧器。将导管置入左心耳中以在研究结束时注射放射性微球体和染料。将温度探针插入直肠中,利用加热板维持体温。所有的兔子将经受大约 30 分钟的 CAO 和大约 3 小时的再灌注。使用放射性微球体技术,测量在 CAO 的大约 20-30 分钟时的局部心肌血流以确保风险区中缺血以及确保四组中的缺血程度相同。

[0223] 研究药品的途径和持续时间。在研究开始之前校准泵注入速率和注入体积。采用输液泵以所确定的速率通过颈内导管给药研究药品。在适合于具体组的时间点进行输液且在大约 180 分钟的再灌注期间持续输液。

[0224] 数据步骤、采集和测量。监测心率、心脏收缩压、心脏舒张压和直肠温度，且在大约基线时、阻塞 5 分钟时、阻塞 15 分钟时和阻塞 29 分钟时、以及再灌注大约 5 分钟时、再灌注大约 15 分钟时、再灌注大约 30 分钟时、再灌注大约 60 分钟时、再灌注大约 90 分钟时、再灌注大约 120 分钟时、再灌注大约 150 分钟时和再灌注大约 180 分钟时进行记录。这些时间点可稍微变化以考虑动物的稳定性或不稳定性。

[0225] 在大约 180 分钟时，通过左心房导管将大约 1ml/kg 的～ 4% 的硫代黄素 S 溶液注入心脏中以限定无复流区域。硫代黄素 S 是绿黄荧光染料，使内皮着色，用作灌注的标记物。硫代黄素 S 用作标准标记物以识别无复流区域（参见图 3）。再阻塞冠状动脉，通过将大约 4 毫升的～ 50% 的 Unisperse 蓝染料溶液（供应商 Ciba Geigy）注射进入左心房中，勾画出缺血风险区域。

[0226] 局部心肌血流技术（RMBF）。在缺血大约 25 分钟时采用大约 2×10^6 的放射性微球体（供应商 PerkinElmer Life Sciences）测量 RMBF。通过左心房导管将该微球体注射进入左心房中，以大约 2.06ml/min 的速率从颈动脉中获取参考血液样品。在方案结束时，从风险区（通过没有蓝色染料而确定）和非缺血区切取样品。称重样品且与参考血液样品一起在计算机化的 γ－井型计数仪（供应商 Canberra, 系统 S100）中计数。在适当减去背景和针对同位素之间的重叠放射性进行修正后，计算 RMBF 且结果表达为 ml/min/g （参见图 3）。

[0227] 血流动力学测量。使用插入到颈动脉中的充满液体的导管来测量心率和血压。采用 ADI （供应商 Advanced Digital Instruments）系统数字化数据和记录数据。对于每一时间点，取三次心跳的平均值。

[0228] 无复流区、风险区、出血区和坏死的分析。将心脏横切成 6-8 片。在紫外光下对切片进行拍照以识别无复流区（参见图 3，画面 B），在卤素照明下对切片拍照识别风险区（参见图 3，画面 A）和出血区（参见图 4）。然后，在～ 1% 的氯化三苯基四唑（TTC）溶液中培养切片大约 15 分钟，浸泡在福尔马林中，再次拍照以显现梗塞（参见图 3，画面 C）。坏死组织不能进行 TTC 染色且呈现白色到浅黄色。无梗塞的组织染有砖红色。在计算机监视器上观察数码相片。每一切片中的无复流区、出血区、缺血区和通常灌注的区域的面积以及坏死区和非坏死区的面积使用 Image J（供应商 Rasband WS, Image J, 美国国立卫生研究院（National Institutes of Health）http://rsb.info.nih.gov/ij/）进行数字化。将每一切片上的面积乘以切片的重量，所得到的结果汇总以得到无复流区的、风险区的和梗塞区的量。

[0229] 来自含有坏死区和正常区的梗塞区域的中央的一个切片通过组织学进行检查，对任一水肿进行半定量化评分（0-3+ 的分数）。由不知道该研究方案的专业人员进行全部的照片测量。

[0230] 样品大小、排除标准和数据分析。每一组的初始样品大小将由 n=8 的动物组成。排除标准包括：在再灌注之前发生死亡且研究结束，或者左心室的缺血风险区 <10%。数据分析包括将每一组中的在 CAO 期间在风险区内的局部心肌血流大于 0.2ml/min/g 的动物排除在外以及将每一组中的在 CAO 期间在风险区内的局部心肌血流大于 0.2ml/min/g 的动物包括在内。

[0231] 血液样品采集和处理。采集静脉全血样品用于药物动力学(PK)分析。表 12 汇总了采集时间点。在下面规定的时间点采集静脉全血样品用于 PK 分析。对于 PK 分析,在下面的时间点,使用预冷却的注射器将 1 毫升的静脉全血采集到预冷却的含有(喷涂的) K_2EDTA 的 BD Vacutainer® 血浆分离管(lavender top)中 :对于组 1、组 2 和组 4,大约基线时、缺血 29 分钟至 30 分钟时(在再灌注开始前)和再灌注后大约 30 分钟时、再灌注后大约 60 分钟时和再灌注后大约 180 分钟时 ;对于组 3,在再灌注后大约 15 分钟时、再灌注后大约大约 30 分钟时、再灌注后大约大约 90 分钟时和再灌注后大约大约 180 分钟时。

[0232] 表 12. 采集时间点的汇总

[0233]

	手术准备和稳定	缺血(30 分钟)				再灌注(180 分钟)							
		0	5	15	29 至 30	5	15	30	60	90	120	150	180
对于组 1、组 2 和组 4,抽取静脉血用于 PK 分析(采集~1 毫升血浆)	x				x			x	x				x
对于组 3,抽取静脉血用于 PK 分析(采集~1 毫升血浆)	x						x	x		x			x
温度*	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
HR*	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
血流动力学数据*(ABP)	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

[0234] 使 PK 血管充分地且轻柔地混合、并将其立即放入冰中。采集 30 分钟内,在~ 4° C 下,以大约 1500×G、优选地高达 2000×G 对样品离心 15 分钟,离心后移走两份等分的血浆(每一份血浆大约 0.25 毫升)且将其立即放入贴有标签的螺帽聚丙烯管中。各个血浆样品在干冰上快速冷冻,在设定成维持 -70℃ ±15℃的条件下冷冻储存,直到进一步分析。

[0235] 统计分析计划。全部数据进行汇总且利用 SAS (版本 9.3)进行统计分析。使用方差分析比较左心室重量、梗塞面积、风险面积、无复流面积、出血面积、和血流。通过 Tukey 测试来确定组间差异。通过方差分析来分析血流动力学变量随时间的变化(重复测量)。对于动物模型,如果 f 值小于 0.05,则通过对比方法来确定平均值之间的差异。还将使用协方差分析(ANCOVA)来测试关于具有风险区、无复流区和出血区的坏死心肌与侧支血流的回归模型的组效应。数据表示为平均值 ±SEM。

[0236] 终点。该研究的终点可包括但不限于心率、心脏收缩动脉压 / 心脏舒张动脉压、病理学样本面积及其各自比率、风险区面积、梗塞质量、左心室质量、风险区、无复流区、出血区、坏死面积 / 梗塞面积和水肿。

[0237] 其他芳香族阳离子肽(例如 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH_2)或其药学上可接受的盐(例如醋酸盐或三氟醋酸盐)可以类似的方式进行测试。

[0238] 实施例 2D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 对具有 AMI 的兔模型中的 IA/AR 平均值的作用

[0239] 按照实施例 1 中所描述的,进行研究以评估 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 对具有 AMI 的兔模型中的 IA/AR 平均值的作用。对 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 (醋酸盐)

的输注时间选择的作用进行评估。对低剂量的(从约 0.01mg/kg/h 到约 0.5mg/kg/h)的 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2(醋酸盐)的输注时间选择的作用进行评估。在表 13 和图 5 中示出结果。根据给药 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2(醋酸盐)的对象中的 IA/AR 比率与接受安慰剂的对象相比较降低判断出,D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 在治疗缺血性损伤以及预防和治疗心脏中的再灌注损伤中是有效的。在一些实验中,梗塞面积平均减少 11%(未示出)。在一些实验中,梗塞面积减少高达 44.7%(表 13 ;图 5)。

[0240]

表 13: D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 对具有 AMI 的兔模型中的 IA/AR 平均值的作用

处理	IA/AR 平均值	结果
安慰剂	37.4%	NA
D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2(醋酸盐)(在 30 分钟的缺血中的缺血 10 分钟时开始)	20.7%	与安慰剂比,下降 44.7%
D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2(醋酸盐)(在 30 分钟的缺血中的缺血 20 分钟时开始)	27.9%	与安慰剂比,下降 25.5%
D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2(醋酸盐)(在紧靠着再灌注之前,在缺血 30 分钟时开始)	26.7%	与安慰剂比,下降 25.5%

[0241] 其他芳香族阳离子肽(诸如 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH_2)或其药学上可接受的盐(诸如醋酸盐或三氟醋酸盐)可以以类似的方式进行测试。可以预测到,使用可替选的肽可得到类似的结果。

[0242] 实施例 3. 在兔子心脏缺血 / 再灌注损害后,D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 对解剖无复流区、出血区和梗塞面积的作用

[0243] 按照在实施例 1 所描述的,进行研究以评估 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 对具有 AMI 的兔子模型中的解剖无复流区、出血区和梗塞面积的作用。结果示出,D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 在治疗缺血损伤以及预防和治疗心脏再灌注损伤(包括解剖无复流区)上是有效的。

[0244] 包括实施例 2 中详细描述的动物在内的 66 只兔子加入本方案。基于缺血风险区面积的预期的排除标准(AR< 左心室的 10%),来自两个心脏的数据被排除在外。对剩余的 64 个心脏记录了最终数据 :组 1,n=15(在冠状动脉阻塞(CAO)后的 10 分钟时开始输注 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2(醋酸盐));组 2,n=17(在 CAO 后的 20 分钟时开始输注 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2(醋酸盐));组 3,n=17(在 CAO 后的 29 分钟时开始输注 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2(醋酸盐));组 4,n=15(在 CAO 后的 10 分钟时开始输注生理盐水)。在 CAO 期间,三个心脏的缺血区中的 RMBF>0.20ml/min/g ;由于利用输液泵进行流出,3 只兔子可具有升高的 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 血清浓度。这些心脏包含在本文示出的数据分析中。

[0245] 在表 14 中示出 4 组的缺血风险区、无复流区、出血区和梗塞面积。给出了 4 组中的这些变量的平均值和标准误差值。通过方差分析分析了这些变量间的潜在差异。

[0246] 表 14. AR> 左心室的 10% 的所有心脏

[0247]

	组 1 N=15，D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2（醋酸盐）10 分钟 occl	组 2 N=17，D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2（醋酸盐）20 分钟 occl	组 3 N=17，D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2（醋酸盐）29 分钟 occl	组 4 N=15，生理盐水
风险面积/左心室	0.30±0.02	0.32±0.02	0.31±0.02	0.30±0.02
无复流面积/风险面积	0.23±0.02	0.21±0.03	0.21±0.03	0.28±0.03
无复流面积/坏死面积	0.74±0.04	0.63±0.05	0.70±0.09	0.80±0.05

[0248] Occl：冠状动脉阻塞

[0249] 协方差分析用于测试类变量“组”对以克表示的风险区的程度（AR/LV）和坏死程度（AN/LV）之间的关系的作用（图 6）以及对风险区的程度和无复流区域的程度之间的关系的作用（图 7）。组对无复流区和风险区之间的关系具有显著的作用。处理组的回归线位于对照组的回归线之下。对 AR/LV>15% 的兔子的坏死面积除以风险面积 (AN/AR) 的分析，示出利用 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 处理引起梗塞面积在统计学上显著下降了高于 20%（参见表 15）。

[0250] 表 15. 对于 AR/LV>15% 的兔子的坏死面积除以风险面积

[0251]

对于组合的全部有效组	
总和	15.245
N	48
平均值	0.318
与使用安慰剂相比，使用 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 的 AN/AR 的下降	20.2%

[0252] 基于组合的组数据进行组效应的 ANCOVA 测试。在无复流区和风险区之间的关系上存在显著的组效应（p=0.0085）（图 8）。

[0253] 4 个处理组中的局部心肌血流（RMBF）数据。在冠状动脉堵塞 25 分钟时，测量

了缺血区和非缺血区的 RMBF。在原始数据中，3 只兔子在缺血风险区中呈现出非缺血值（>0.2ml/min/g）。这可能是由于在阻塞过程中夹子逐渐变松。在研究的第二部分中，使用双重夹紧方法，没有心脏在缺血区中具有 >0.2ml/min/g 的血流。表 16 示出 RMBF 值。

[0254] 表 16. RMBF（ml/min/g），其中缺血区血流 >0.20ml/min/g 的 3 个心脏被排除

[0255]

	缺血区	非缺血区
组 1	0.02±0.01	2.13±0.12
组 2	0.03±0.01	2.63±0.29
组 3	0.05±0.03	2.43±0.19
对照	0.02±0.01	2.32±0.16

[0256] D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 处理获得无复流程度与对照心脏相比下降 21% 的趋势。变量“组”对无复流区程度和风险区程度之间的关系具有显著的作用。当处理组组合且与对照比较时，该信号甚至更强（p=0.0085）。

[0257] 总之，对于任意特定的风险区大小，D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 使无复流显著下降，该发现具有重要的临床暗示。近来研究表明，更恶化的无复流预示着在梗塞的慢性阶段中有更恶化的 LV 扩张和 LV 重构，且更恶化的无复流与更坏的预后相关，而与梗塞面积的变化无关。参见：Reffelmann T 等，Circulation，2003，108：2911-17；Wu K 等，Circulation，1998，97：765-72；Ndrepepa 等，J Am Coll Cardiol，2010，55：2383-89；和 Bolognese 等，Circulation，2004，109：1121-26。由于对于平均的给定风险区大小，D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 减小无复流，因此我们预测，D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 会促进康复（更好地消除坏死碎屑和更好地使用康复所需要的血液元素），从而减小 LV 重构（包括减少 LV 扩张和 LV 离心性肥大）。此外，可能长期存活。

[0258] 本文所公开的其他芳香族阳离子肽（例如 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH_2）或其药学上可接受的盐（诸如醋酸盐或三氟醋酸盐）可以以类似的方式测试和使用，预测会得到类似的结果。

[0259] 实施例 4. 在脑中缺血 / 再灌注损伤后，D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 对解剖无复流区的影响

[0260] 在脑缺血 - 再灌注损伤的动物模型中对本发明的芳香族阳离子肽在保护对象以免存在缺血再灌注引起的解剖无复流区中的作用进行了探讨。

[0261] 脑缺血引发导致脑损害的大量细胞事件和分子事件。一种这样的事件是解剖无复流区。脑缺血由右中大脑动脉堵塞 30 分钟而引起。在缺血后 0 小时时、6h 时、24h 时、48h 时，对野生型（WT）小鼠给予生理盐水赋形剂（Veh）（腹腔给药）或 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2（醋酸盐）（2-5mg/kg）。在缺血后 3 天时杀死小鼠。将脑横切成 6-8 片。在紫外光下对切片进行拍照以识别无复流区。每一切片中的无复流面积使用 Image J（供应商 Rasband WS，Image J，美国国立卫生研究院（National Institutes of Health），http://rsb.info.nih.gov/ij7）进行数字化。每一切片中的无复流面积乘以切

片的重量，结果汇总以得到所述无复流面积的量。

[0262] 使用脑缺血－再灌注(大脑中动脉阻塞 20 分钟)的小鼠模型，预测到利用 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 治疗野生型小鼠会使梗塞体积的显著降低且预防或减少解剖无复流区。因此，D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 对于减少脑缺血－再灌注引起的无复流的发病率是有效的。

[0263] 本文所公开的其他芳香族阳离子肽(例如 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH_2)或其药学上可接受的盐(诸如醋酸盐或三氟醋酸盐)，可以以类似的方式被测试和使用。预测通过可选的芳香族阳离子肽会得到类似的结果。

[0264] 实施例 5. 在肾脏缺血／再灌注损伤后，D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 对解剖无复流区的作用

[0265] 在肾脏损伤的动物模型中对本发明的芳香族阳离子肽在保护对象以免存在缺血再灌注引起的解剖无复流区中的作用进行了探讨。

[0266] 将 Sprague Dawley 大鼠(250-300g)分成 3 组：(1)没有 I/R 的假手术组；(2)I/R+ 生理盐水赋形剂处理；(3)I/R+D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2(醋酸盐)处理。在缺血之前以及紧靠着再灌注开始之前，将 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 (醋酸盐)(3mg/kg，溶解在生理盐水中)给药大鼠 30 分钟。按照相同的时间表仅给予对照大鼠生理盐水。通过氯胺酮(90mg/kg，腹腔给药)和甲苯噻嗪(4mg/kg，腹腔给药)的混合物麻醉大鼠。使用微夹使左肾血管蒂暂时堵塞 30 分钟或 45 分钟。在缺血时间段结束时，通过去除夹子而建立再灌注。在那时，去除对侧的右肾。在 24 小时的再灌注后，处死动物，且通过心脏穿刺得到血样。通过血尿素氮(BUN)和血清肌酸酐确定肾功能(生物测量系统(BioAssay Systems)DIUR-500 和生物测定系统 DICT-500)。

[0267] 无复流区和坏死的分析。将肾横切成 6-8 片。在紫外光下对切片进行拍照以识别无复流区。每一切片中的无复流面积使用 Image J (供应商 Rasband WS, Image J, 美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)，http://rsb.info.nih.gov/ij/)行数字化。每一切片中的无复流面积乘以切片的重量，结果汇总以得到所述无复流面积的量。

[0268] 预测到，在 45 分钟的缺血和 24 小时的再灌注之后，利用 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 治疗预防或减少解剖无复流区。例如，预测到，与没有接受肽治疗的对象相比，在利用芳香族阳离子肽进行治疗的对象中，BUN、血清肌酸酐和肾小球滤过率中的一个或多个会得到改善。因此，肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 对于减少肾缺血－再灌注引起的无复流的发病率是有效的。

[0269] 其他芳香族阳离子肽(例如 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH_2)或其药学上可接受的盐(诸如醋酸盐或三氟醋酸盐)可以以类似的方式被测试和使用。预测到利用可选的芳香族阳离子肽会得到类似的结果。

[0270] 实施例 6- 芳香族阳离子肽对保护人类以免存在无复流现象的作用

[0271] 这些研究将确定在血管重建的同时给药 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 是否会限制在再灌注时发生的解剖无复流区的大小。为了治疗 AMI，在多于 90% 的患者中对罪犯动脉使用机械再通使到缺血心肌的心外膜冠状动脉血流得到恢复(TIMI 血流 3 级)。然而，这些再灌注努力没有解决下游的在毛细血管床级别的血流恢复的重要辅助问题。在直接 PCI 期间或在直接 PCI 之后，在 20-40% 的患者中观察到微循环功能障碍。在利用支架进行血管

成形术后，ST 段抬高回落幅度的不足是微血管问题的标记，且与不良的临床预后有关。在 STEMI 中，尽管存在通畅的冠状动脉但仍不能实现心肌再灌注已经被称为“无复流”现象。

[0272] 研究组。在胸痛发作之后的 6 小时内且两个连续导联中 ST 段抬高超过 0.1mV 并且临床决策为对其进行经皮冠状动脉介入（PCI）治疗的 18 岁的或更年长的男性和女性适合于入选。无论患者是进行直接 PCI 还是补救 PCI，患者适合于该研究。在入院时存在罪犯冠状动脉堵塞（心肌梗死溶栓 [TIMI] 血流 0 级）也是一纳入标准。

[0273] 血管造影术和血管重建。在血管重建之前，利用标准的技术来执行左心室造影和冠状动脉造影。利用直接支架术通过 PCI 执行血管重建。可替选的血管重建手术包括但不局限于气囊血管成形术、旁路移植物插入、经皮腔内冠状动脉成形术和定向性冠状动脉斑块旋切术。

[0274] 实验方案。在执行冠状动脉造影术之后且在植入支架之前，满足入选标准的患者被随机地指定到对照组或肽组。使用计算机生成的随机序列来执行随机分组。在直接支架术之前的小于 10 分钟时，肽组中的患者接受静脉推注 D-Arg-2’6’-Dmt-Lys-Phe-NH_2（醋酸盐）。肽溶解于生理盐水中（最终浓度，25 毫克 / 毫升）且通过位于肘前静脉中的导管注入。对照组中的患者接受等体积的生理盐水。

[0275] 无复流区。主要终点是通过一种或多种成像技术评估的解剖无复流区的大小。使用心肌声学造影、冠状动脉血管造影术、心肌呈色、冠状动脉多普勒成像、心电图、使用铊或锝 -99m 的核成像单光子发射 CT 或正电子发射计算机断层扫描（PET）来评估无复流现象。1.5T 身体 MRI 扫描仪用于执行心脏 MRI 以评估心室功能、心肌水肿（处于危险中的区域）、微血管堵塞和梗塞面积。在成功的 PCI 和支架术后的第 4±1 天、第 30±3 天和第 6±1.5 个月时，使用造影后延迟增强以量化梗塞的心肌。这通过心肌造影后信号的强度定量地限定，所述强度比同一切片内的远端的非梗塞心肌的参考区域中的信号强度高多于 2SD。标准的细胞外钆型造影剂的使用剂量为 0.2mmol/kg。在以下时间点使用二维反转恢复制备的快速梯度回波序列：（1）早期（在造影剂注射后的大约 2 分钟时），以评估微血管堵塞，如果可以的话可考虑单次激发技术；和（2）后期（在造影剂注射后的大约 10 分钟时），以评估梗塞面积。

[0276] 预测到，在再灌注时给药 D-Arg-2’,6’-Dmt-Lys-Phe-NH_2（醋酸盐）将与和利用安慰剂所看到解剖无复流区相比而言较小的解剖无复流区相关。因此，肽 D-Arg-2’,6’-Dmt-Lys-Phe-NH_2 对于减小心脏缺血 / 再灌注引起的无复流的发生率是有效的。

[0277] 其他芳香族阳离子肽（例如 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH_2）或其药学上可接受的盐（诸如醋酸盐或三氟醋酸盐）可以以类似的方式被测试和使用。预测到，会得到类似的结果。

[0278] 参考文献

[0279] 1.Ito H 等 .(1996).Clinical implications of the’no re-flow’phenomenon. A predictor of complications and left ventricular remodeling in reperfused anterior wall myocardial infarction.Circulation,93:223-228.

[0280] 2.Kloner RA 等 .(1974).The″no-reflow″phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog.J Clin Invest,54:1496-1508.

[0281] 3.Kloner RA 等 .(1980).Ultrastructural evidence of microvascular

damage and myocardial cell injury after coronary artery occlusion:which comes first?Circulation,62:945-952.

[0282] 4.Komamura K 等 .(1994).Progressive decreases in coronary vein flow during reperfusion in acute myocardial infarction:clinical documentation of the no re-flow phenomenon after successful thrombolysis.J Am Coll Cardiol,24:370-377.

[0283] 5.Manciet LH 等 .(1994).Microvascular compression during myocardial ischemia:mechanistic basis for no-reflow phenomenon.Am J Physiol,266:H1541-H1550.

[0284] 6.Topol EJ等.(2000).Recognition of the importance of embolization in atherosclerotic vascular disease.Circulation,101:570-580.

[0285] 7.Fuster V等.(1992).The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes(1).N Engl J Med,326:242-250.

[0286] 8.Iwakura K 等 .(2001).Predictive factors for development of the no-reflow phenomenon in patients with reperfused anterior wall acute myocardial infarction.J Am Coll Cardiol,38:472-477.

[0287] 9.Coggins MP等.(2001).Noninvasive prediction of ultimate infarct size at the time of acute coronary occlusion based on the extent and magnitude of collateral-derived myocardial blood flow.Circulation,104:2471-2477.

[0288] 10.Iwakura K 等 .(2003).Association between hyperglycemia and the no-reflow phenomenon in patients with acute myocardial infarction.J Am Coll Cardiol,41:1-7.

[0289] 11.Malmberg K 等 .(1999).Glycometabolic state at admission:important risk marker of mortality in conventionally treated patients with diabetes mellitus and acute myocardial infarction:long-term results from the Diabetes and Insulin-Glucose Infusion in Acute Myocardial Infarction(DIGAMI)study.Circulation,99:2626-2632.

[0290] 12.Tanaka A 等 .(2002).No-reflow phenomenon and lesion morphology in patients with acute myocardial infarction.Circulation,105:2148-2152.

[0291] 13.Kotani J 等 .(2002).Plaque gruel of atheromatous coronary lesion may contribute to the no-reflow phenomenon in patients with acute coronary syndrome.Circulation,106:1672-1677.

[0292] 14.Hori M等.(1986).Role of adenosine in hyperemic response of coronary blood flow in microembolization.Am J Physiol,250:H509-H518.

[0293] 15.Okamura A等.(2005).Detection of embolic particles with the Doppler guide wire during coronary intervention in patients with acute myocardial infarction:efficacy of distal protection device.J Am Coll Cardiol,45:212-215.

[0294] 16.Ito H 等 .(1992).Lack of myocardial perfusion immediately after successful thrombolysis.A predictor of poor recovery of left ventricular

function in anterior myocardial infarction.Circulation,85:1699-1705.

[0295] 17.Villanueva FS 等 .(1993).Characterization of spatial patterns of flow within the reperfused myocardium by myocardial contrast echocardiography.Implication in determining extent of myocardial salvage. Circulation,88:2596-2606.

[0296] 18.Yano A 等 .(2004).Myocardial contrast echocardiography with a new calibration method can estimate myocardial viability in patients with myocardial infarction.J Am Coll Cardiol,43:1799-1806.

[0297] 19.Zijlstra F等.(1993).A comparison of immediate coronary angioplasty with intravenous streptokinase in acute myocardial infarction.N Engl J Med,328:680-684.

[0298] 20.Simes RJ 等 .(1995).Link between the angiographic substudy and mortality outcomes in a large randomized trial of myocardial reperfusion. Importance of early and complete infarct artery reperfusion.GUSTO-I Investigators.Circulation,91:1923-1928.

[0299] 21.Ito H 等 .(1996).Myocardial perfusion patterns related to thrombolysis in myocardial infarction perfusion grades after coronary angioplasty in patients with acute anterior wall myocardial infarction. Circulation,93:1993-1999.

[0300] 22.Grines CL 等 .(1999).Coronary angioplasty with or without stent implantation for acute myocardial infarction.Stent Primary Angioplasty in Myocardial Infarction Study Group.N EnglJ Med,341:1949-1956.

[0301] 23.Gibson CM 等 .(2000).Relationship of TIMI myocardial perfusion grade to mortality after administration of thrombolytic drugs. Circulation,101:125-130.

[0302] 24.Iwakura K等.(1996).Alternation in the coronary blood flow velocity pattern in patients with no re-flow and reperfused acute myocardial infarction. Circulation,94:1269-1275.

[0303] 25.Akasaka T 等 .(2000).Relation of phasic coronary flow velocity characteristics with TIMI perfusion grade and myocardial recovery after primary percutaneous transluminal coronary angioplasty and rescue stenting. Circulation,101:2361-2367.

[0304] 26.Yamamoto K 等 .(2002).Two different coronary blood flow velocity patterns in thrombolysis in myocardial infarction flow grade2in acute myocardial infarction:insight into mechanisms of microvascular dysfunction.J Am Coll Cardiol,40:1755-1760.

[0305] 27.Wehrens X 等 .(2000).A comparison of electrocardiographic changes during reperfusion of acute myocardial infarction by thrombolysis or percutaneous transluminal coronary angioplasty.Am Heart J,139:430-436.

[0306] 28.Claeys MJ 等 .(1999).Determinants and prognostic implications of persistent ST-segment elevation after primary angioplasty for acute myocardial infarction:importance of microvascular reperfusion injury on clinical outcome. Circulation,99:1972-1977.

[0307] 29.Wu KC等.(1998).Prognostic significance of microvascular obstruction by magnetic resonance imaging in patients with acute myocardial infarction. Circulation,97:765-772.

[0308] 30.Taylor AJ 等 .(2004).Detection of acutely impaired microvascular reperfusion after infarct angioplasty with magnetic resonance imaging. Circulation,109:2080-2085.

[0309] 31.Ito H等(1996).Clinical implications of the'no re-flow'phenomenon. A predictor of complications and left ventricular remodeling in reperfused anterior wall myocardial infarction.Circulation,93:223-228.

[0310] 32.Morishima I 等 .(2000).Angiographic no-reflow phenomenon as a predictor of adverse long-term outcome in patients treated with percutaneous transluminal coronary angioplasty for first acute myocardial infarction.J Am Coll Cardiol,36:1202-1209.

[0311] 33.Kocher AA.(2001).Neovascularization of ischemic myocardium by human bone marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis,reduces remodeling and improves cardiac function.Nat Med,7:430-436.

[0312] 34.Kunichika H等.(2004).Effects of glycoprotein IIb/IIIa inhibition on microvascular flow after coronary reperfusion.A quantitative myocardial contrast echocardiography study.J Am Coll Cardiol,43:276-283.

[0313] 35.Montalescot G 等 .(2001).Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibition with coronary stenting for acute myocardial infarction.N Engl J Med,344:1895-1903.

[0314] 36.Stone GW 等 .(2005).Distal microcirculatory protection during percutaneous coronary intervention in acute ST-segment elevation myocardial infarction:a randomized controlled trial.JAMA,293:1063-1072.

[0315] 37.Gick M 等 .(2005).Randomized evaluation of the effects of filter-based distal protection on myocardial perfusion and infarct size after primary percutaneous catheter intervention in myocardial infarction with and without ST-segment elevation.Circulation,112:1462-1469.

[0316] 38.Mizote I 等 .(2005).Distal protection improved reperfusion and reduced left ventricular dysfunction in patients with acute myocardial infarction who had angioscopically defined ruptured plaque. Circulation,112:1001-1007.

[0317] 39.Makaryus AN等.(2006).Efficacy of rheolytic thrombectomy in early versus late myocardial infarction.J Interv Cardiol,19:135-140.

[0318] 40. Ali A. (2004). Rheo lytic thrombectomy in patients with acute MI did not result in a reduction in myocardial infarct size. Presented at Transcatheter Cardiovascular Therapeutics: 2004September27to October1; Washington, DC.

[0319] 41. Tsang A 等 . (2004). Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol3-kinase-Akt pathway. Circ Res, 95: 230-232.

[0320] 42. Staat P 等 . (2005). Postconditioning the human heart. Circulation, 112: 2143-2148.

[0321] 43. Marzilli M 等 . (2000). Beneficial effects of intracoronary adenosine as an adjunct to primary angioplasty in acute myocardial infarction. Circulation, 101: 2154-2159.

[0322] 44. Ross AM 等 . (2005). A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial of adenosine as an adjunct to reperfusion in the treatment of acute myocardial infarction (AMISTAD-II). J Am Coll Cardiol, 45: 1775-1780.

[0323] 45. Ito H 等 . (1999). Intravenous nicorandil can preserve microvascular integrity and myocardial viability in patients with reperfused anterior wall myocardial infarction. J Am Coll Cardiol, 33: 654-660.

[0324] 46. Ishii H 等 . (2005). Impact of a single intravenous administration of nicorandil before reperfusion in patients with ST-segment-elevation myocardial infarction. Circulation, 112: 1284-1288.

[0325] 47. Taniyama Y. (1997). Beneficial effect of intracoronary verapamil on microvascular and myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction. J Am Coll Cardiol, 30: 1193-1199.

[0326] 48. Umemura S. (2006). The effect of verapamil on the restoration of myocardial perfusion and functional recovery in patients with angiographic no-reflow after primary percutaneous coronary intervention. Nucl Med Commun, 27: 247-254.

[0327] 49. Pasceri V. (2005). Effects of the nitric oxide donor nitroprusside on no-reflow phenomenon during coronary interventions for acute myocardial infarction. Am J Cardiol, 95: 1358-1361.

[0328] 50. Theroux P. (2000). Myocardial cell protection: a challenging time for action and a challenging time for clinical research. Circulation, 101: 2874-2876.

[0329] 51. Theroux P 等 . (2000). Inhibition of the sodium-hydrogen exchanger with cariporide to prevent myocardial infarction in high-risk ischemic situations. Main results of the GUARDIAN trial. Guard during ischemia against necrosis (GUARDIAN) Investigators. Circulation, 102: 3032-3038.

[0330] 52. Zeymer U 等 . (2001). The Na+/H+exchange inhibitor eniporide as an adjunct to early reperfusion therapy for acute myocardial infarction. Results of the evaluation of the safety and cardioprotective effects of eniporide in acute

myocardial infarction (ESCAMI)trial.J Am Coll Cardiol,38:1644-1650.

[0331] 53.Cai Z 和 Semenza GL.(2004).Phosphatidylinositol-3-kinase signaling is required for erythropoietin-mediated acute protection against myocardial ischemia/reperfusion injury.Circulation,109:2050-2053.

[0332] 等同物

[0333] 本发明不限于在本申请中描述的特定实施方式，用作本发明的单独的方面的单一说明。本领域技术人员将理解，可以不脱离本申请的精神和范围的情况下进行各种修改和改动。根据以上描述，除了本文中列举的以外，本公开的范围内的功能上等同的方法和装置对于本领域的本领域技术人员而言是明显的。这样的改动和修改意欲落在所附权利要求的范围内。本公开仅受所附权利要求以及与这样的权利要求的范围所等同的全部范围限制。应当理解，本公开不限于特定的方法、试剂、组合物和生物系统，当然，所述方法、试剂、组合物和生物系统可以变化。还可理解，本文中使用的术语仅用于描述特定的实施方式，不用来是限制性的。

[0334] 此外，在以马库什组的方式描述本公开的特征或方面的情况下，本领域的本领域技术人员将意识到，本公开也是以马库什组中的任一单个成员或亚组成员的方式所描述的。

[0335] 本领域的本领域技术人员将理解，为了任何或所有目的，尤其是提供说明书支持方面，本文中描述的所有范围还可涵盖任何且所有的可能子范围及其子范围的组合。任何列出的范围可以容易地看作充分公开并使其能够同一范围分成至少等半、三分之一、四分之一、五分之一份、十分之一等的子范围。作为非限制性实施例，本文中描述的每一范围可以容易地分成下三分之一、中三分之一和上三分之一等。本领域技术人员还将理解，所有的语言比如“上至”“至少”、“大于“、”小于“等包括所本数且适用于可以随后被分成以上上述所提及子范围的范围。最后，本领域技术人员将理解，范围包括每一单个成员。因此，例如，具有 1 到 3 个单元的组指的是具有 1 个单元、2 个单元或 3 个单元的组。类似地，具有 1 到 5 个单元的组指的是具有 1 个单元、2 个单元、3 个单元、4 个单元或 5 个单元的组，等等。

[0336] 本文所参考的或引用的所有专利、专利申请、在先申请和出版物通过引用而全文并入本文，包括所有的附图和表格，使得它们不与本说明书的明确教导相矛盾。

[0337] 在以下的权利要求范围内提出其他的实施方式。

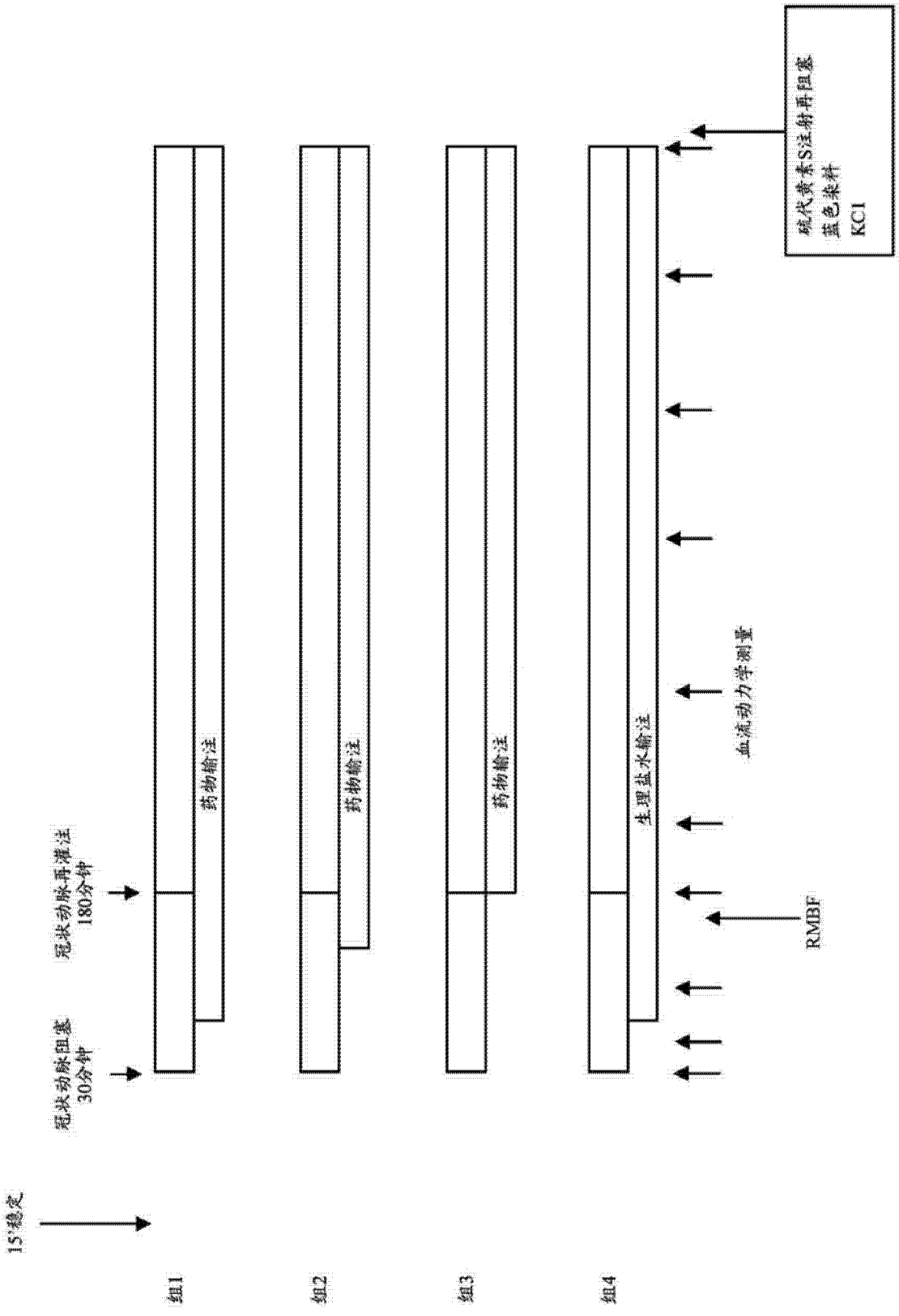

15'稳定
冠状动脉阻塞
30分钟
冠状动脉再灌注
180分钟
药物输注
药物输注
药物输注
生理盐水输注
血流动力学测量
RMBF
硫代黄素S注射再阻塞
蓝色染料
KCl
组1
组2
组3
组4

图 1

研究流程图-体内步骤						
兔子#		体重(kg)		日期		组
剂量=		剂量		输注速率		
时钟时间	方案时间			事件		
				结束手术		
	-15			随机分到处理组		
	-1			出血		
	0	阻塞				
	5' occl			出血		
	10' occl					如果组1或4，则处理
	15' occl			出血		
	20' occl					如果组2，则处理
	25' occl		RMBF			
	29' occl			出血		
	30 'occl	再灌注				如果组3，则处理
	5 ' rep					
	30'rep			出血		
	60'rep			出血		
	90' rep			出血		
	120'rep			出血		
	150' rep			出血		
	180' rep			出血		结束对全部组的输注
	结束		硫代黄素S			
		再阻塞-蓝色颜料 KCl				
		去除心脏				

图 2A

研究流程图-病理学测量							
心脏重量(g)				RMBF			
顶部				样品	区域	重量(g)	
2				1	缺血	0.	
3				2	缺血	0.	
4				3	正常	0.	
5				4	正常	0.	
6							
7				组1	在阻塞之后的10分钟时开始 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH2（醋酸盐）输注		
8				组2	在阻塞之后的20分钟时开始 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH2（醋酸盐）输注		
				组3	在紧靠再灌注之前开始 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH2（醋酸盐）输注		
				组4	在阻塞之后的10分钟时开始赋形剂输注		

图 2B

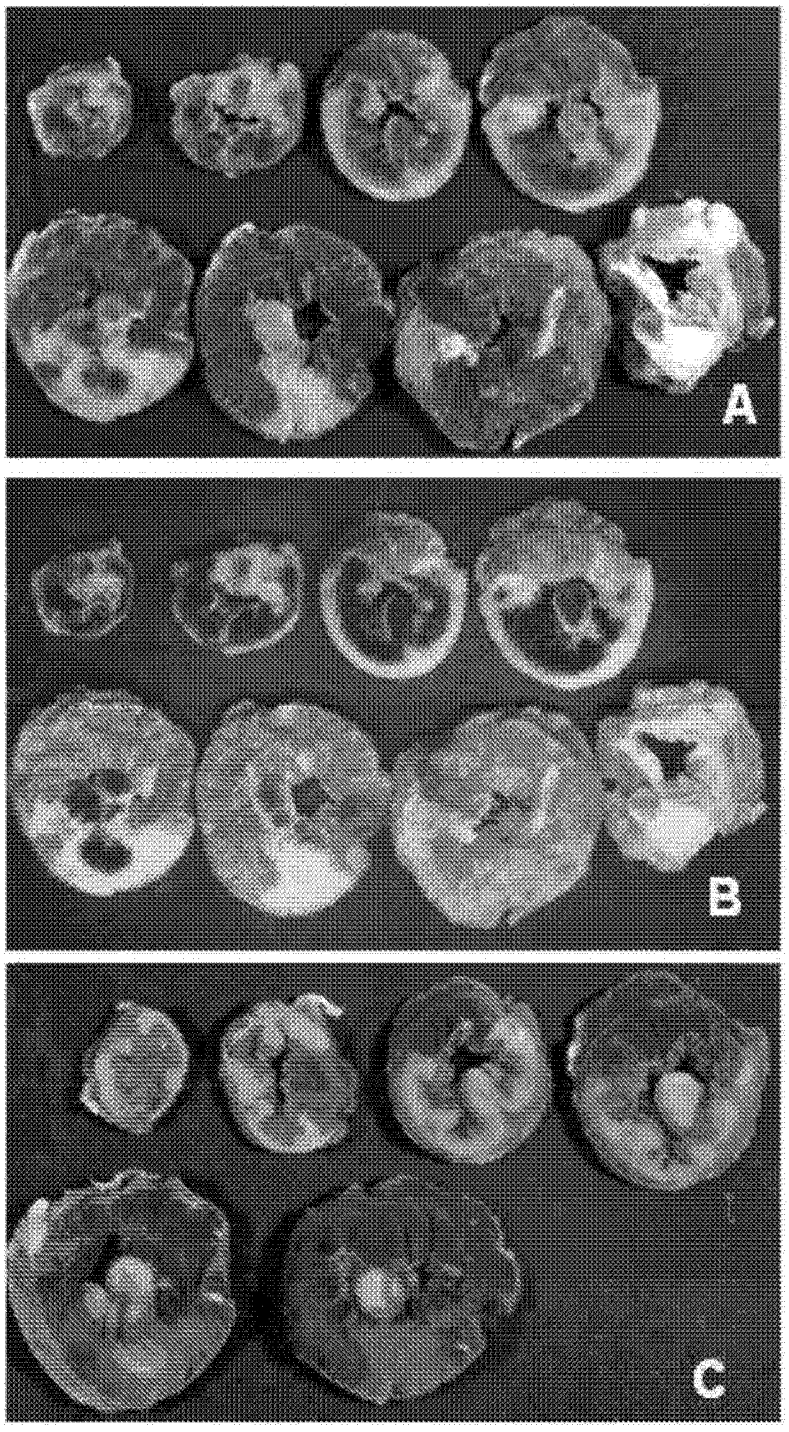


图 3

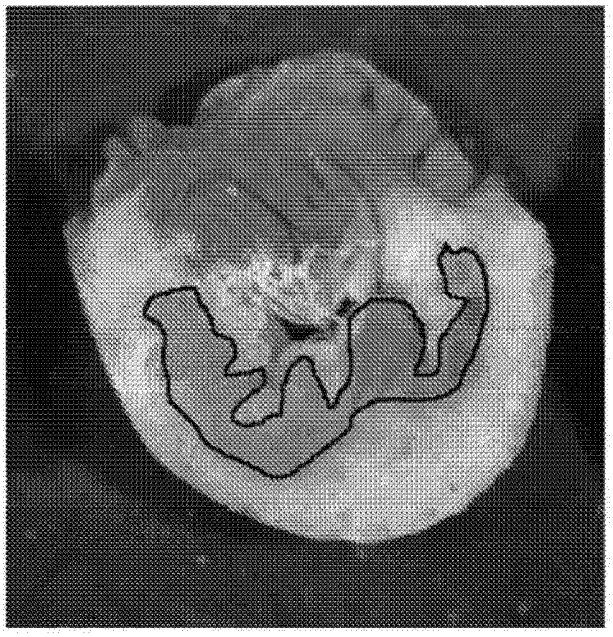


图 4

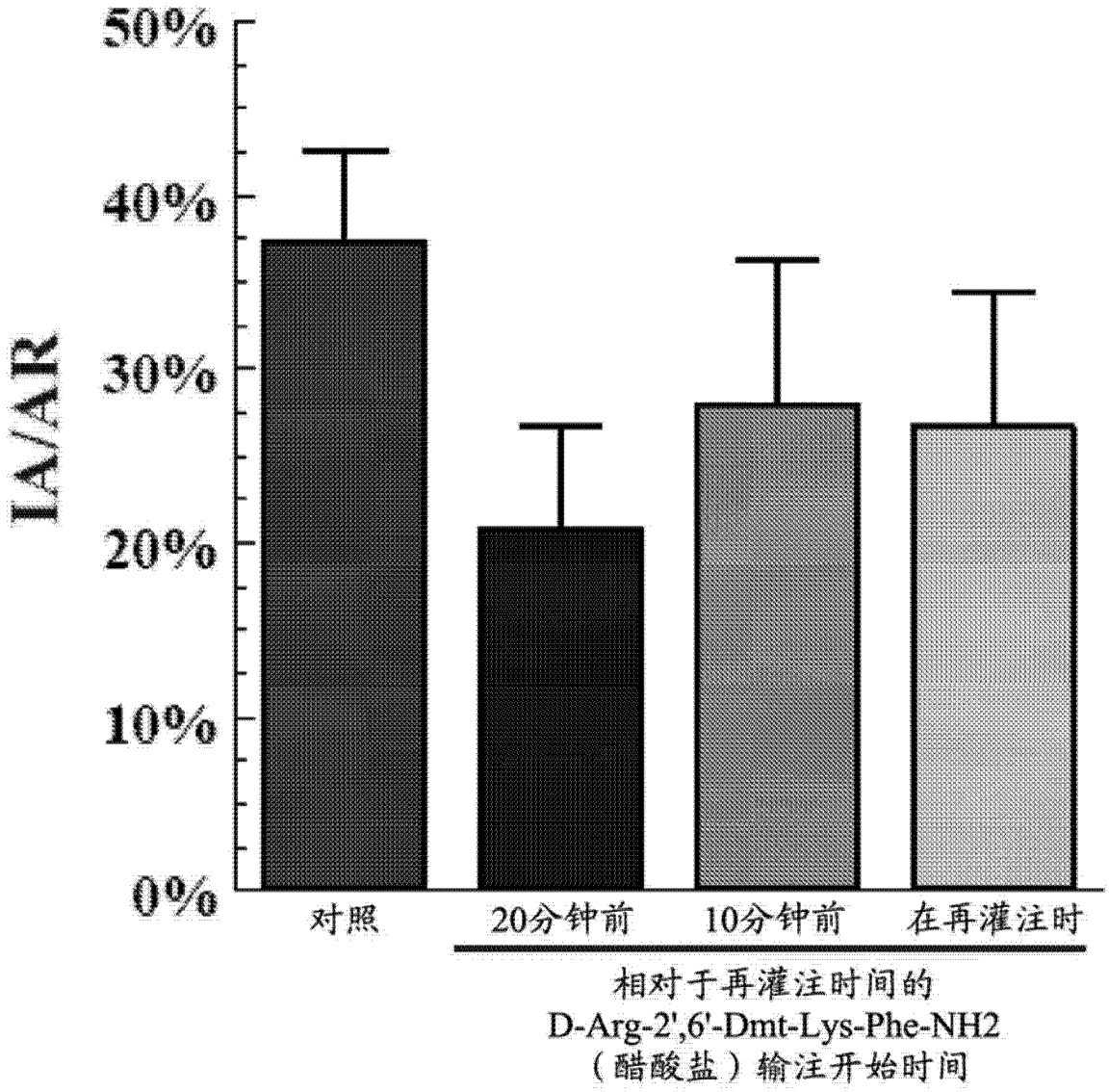

50%
40%
30%
20%
10%
0%
IA/AR
对照
20分钟前
10分钟前
在再灌注时
相对于再灌注时间的
D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH2
（醋酸盐）输注开始时间

图 5

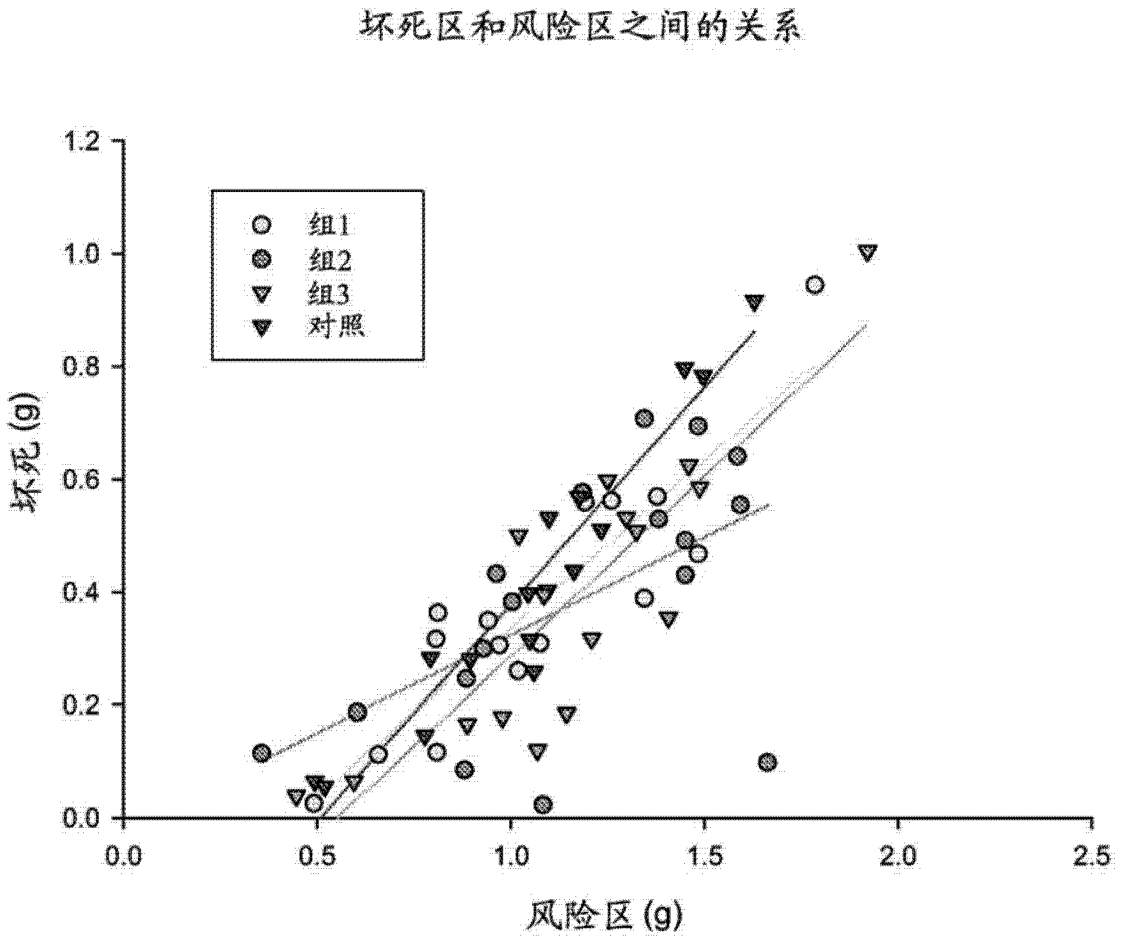

坏死区和风险区之间的关系
组1
组2
组3
对照
坏死 (g)
风险区 (g)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5

图 6

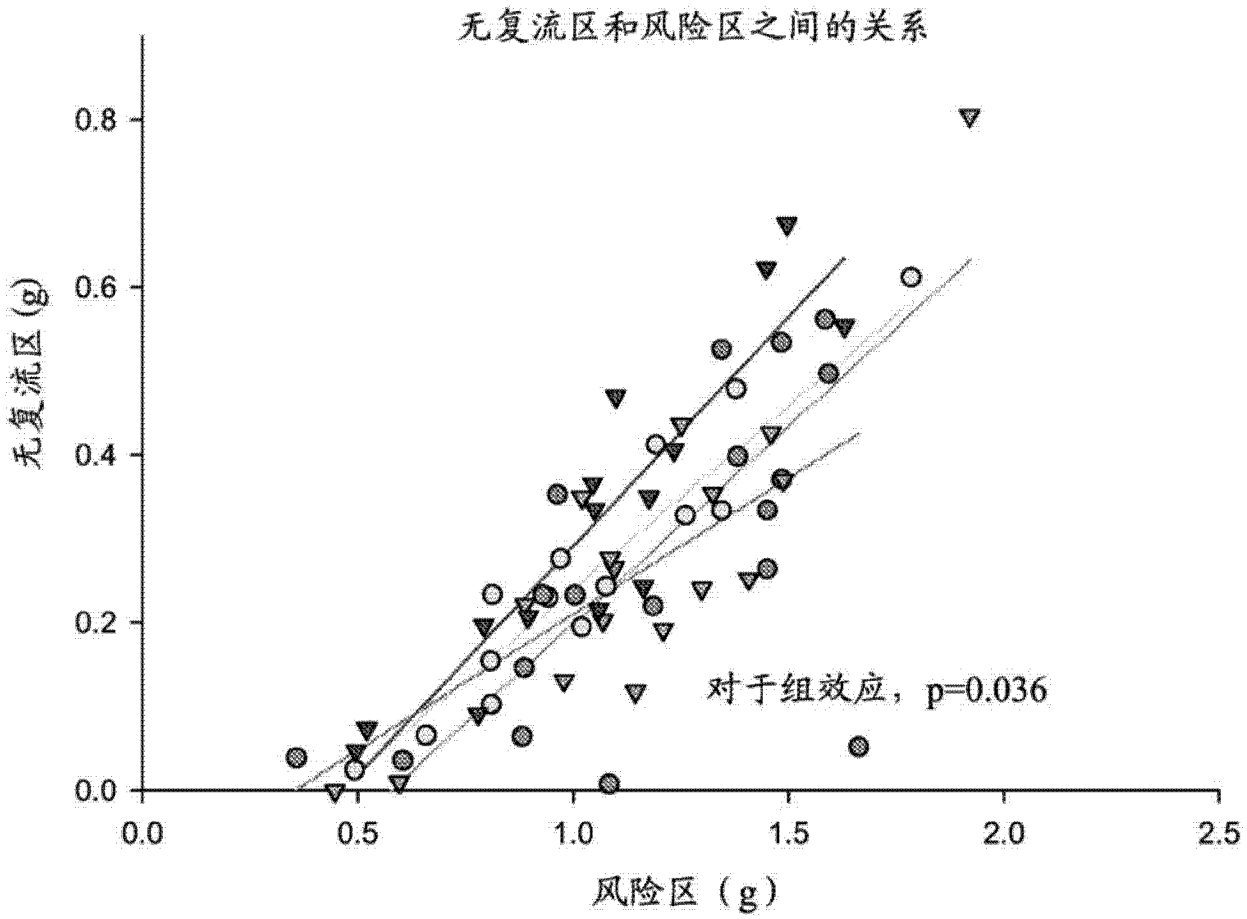

无复流区和风险区之间的关系
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
无复流区 (g)
对于组效应，p=0.036
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
风险区（g）

图 7

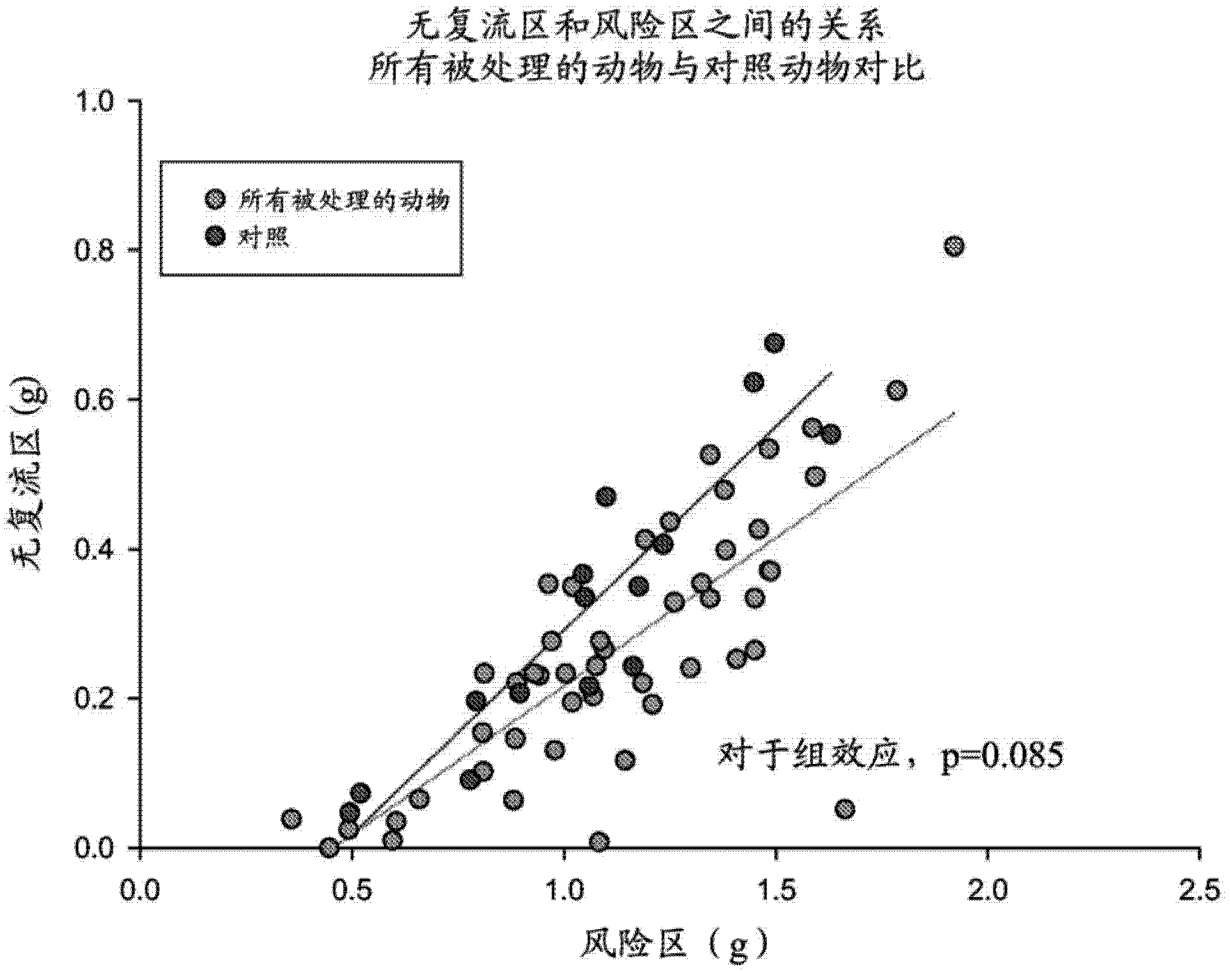

无复流区和风险区之间的关系
所有被处理的动物与对照动物对比
所有被处理的动物
对照
无复流区 (g)
风险区（g）
对于组效应，p=0.085
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5

图 8

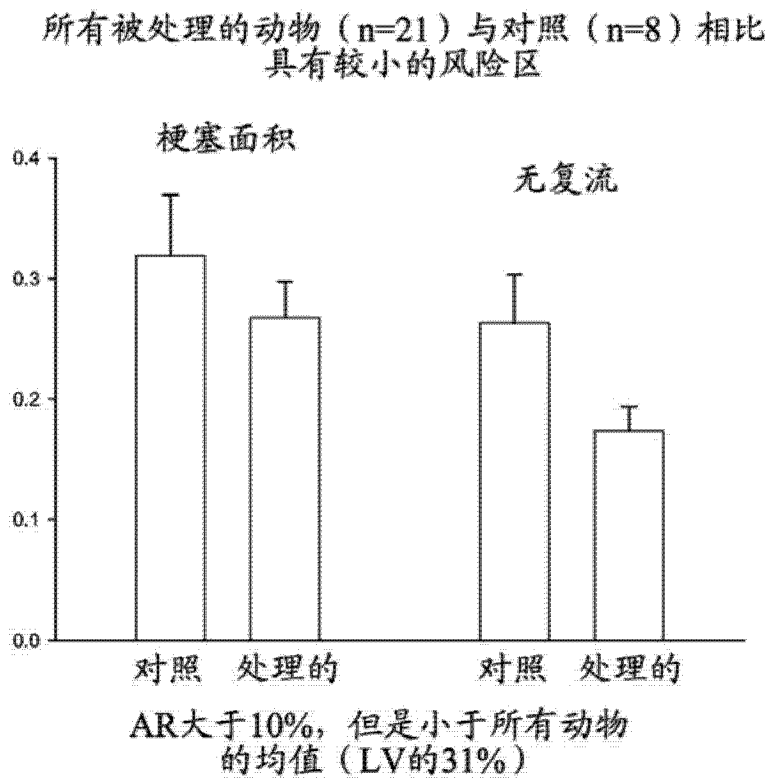

所有被处理的动物（n=21）与对照（n=8）相比
具有较小的风险区
梗塞面积
无复流
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
对照
处理的
对照
处理的
AR大于10%，但是小于所有动物
的均值（LV的31%）

图 9A

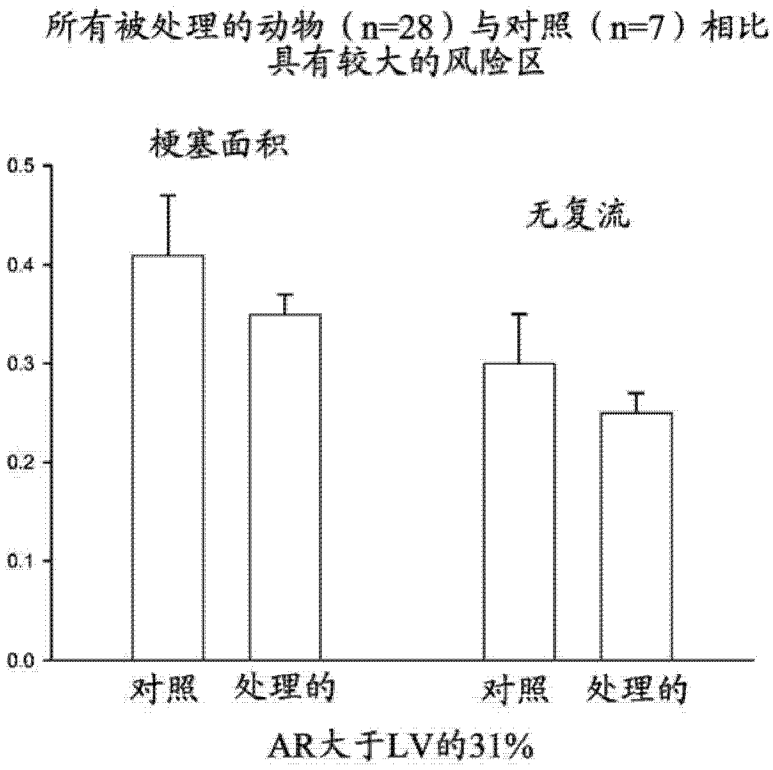

所有被处理的动物（n=28）与对照（n=7）相比
具有较大的风险区
梗塞面积
无复流
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
对照
处理的
对照
处理的
AR大于LV的31%

图 9B