

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 38/08 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680030230.6

[43] 公开日 2008 年 8 月 20 日

[11] 公开号 CN 101247818A

[22] 申请日 2006.6.28

[21] 申请号 200680030230.6

[30] 优先权

[32] 2005.6.28 [33] BR [31] PI0502497-8

[86] 国际申请 PCT/BR2006/000125 2006.6.28

[87] 国际公布 WO2007/000036 英 2007.1.4

[85] 进入国家阶段日期 2008.2.19

[71] 申请人 米纳斯吉拉斯联合大学

地址 巴西米纳斯吉拉斯

[72] 发明人 R·A·苏扎道斯桑图斯

S·韦罗索布朗特皮恩黑罗

R·德法里亚厄希尔瓦

I·希尔瓦鲁拉 F·巴罗斯德苏萨

F·J·G·弗里扎德

A·M·道斯莱斯

L·R·德弗朗卡 A·J·费里拉

R·D·西尼斯特拉

M·J·卡姆帕格诺尔-桑图斯

W·N·德奥利维拉萨姆帕伊奥

M·德卡斯特罗利奥

L·卡佩斯贝克

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 陈铁兰

权利要求书 9 页 说明书 17 页 附图 15 页

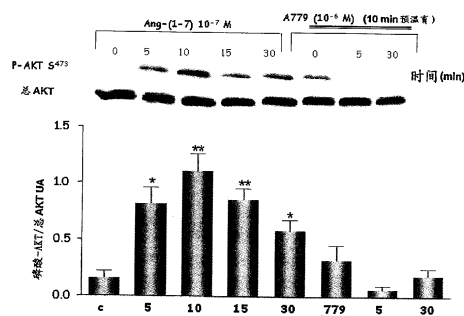
[54] 发明名称

MAS G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂作为凋
亡活性调节剂用于预防和治疗疾病的用途

[57] 摘要

本发明的特征在于 Mas G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂作为凋亡活性调节剂用于研究、预防和治疗疾病的用途。进一步的特征在于 MasG-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂的用途，用于调节涉及蛋白激酶 B/Akt 活性改变的凋亡活性。本发明的另一个特征是 Mas G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂的用途，包括 Ang-(1-7) 肽及其肽或非肽的类似物、激动剂和拮抗剂，作为凋亡活性的调节剂，用于研究、预防和治疗器官和系统的变性疾病，作为辅助措施，用于器官移植，用胚胎干细胞、非胚胎干细胞的治疗，器官和组织的再植和需要暂时或长期降低凋亡活性的其他治疗，这些是非限制性的。本发明进一步要求保护 Mas G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂的用途，包括血管紧张素-(1-7) 肽

及其肽或非肽的类似物、激动剂和拮抗剂，与药物学和药理学上可接受的赋形剂或载体一起配制，作为凋亡活性的调节剂。



1. Mas G-蛋白偶联受体拮抗剂和激动剂的用途, 其特征在于对涉及蛋白激酶 B/Akt 活性改变的凋亡活性的调节。

2. Mas G-蛋白偶联受体拮抗剂和激动剂的用途, 其特征在于对活性氧产生的调节。

3. Mas G-蛋白偶联受体拮抗剂和激动剂的用途, 其特征在于血管紧张素-(1-7)肽及其肽或非肽的类似物、激动剂和拮抗剂, 作为凋亡活性的调节剂在预防和治疗疾病中的用途。

4. Mas G-蛋白偶联受体拮抗剂和激动剂的用途, 其特征在于血管紧张素-(1-7)肽及其肽或非肽的类似物、激动剂和拮抗剂, 作为凋亡活性的调节剂, 用于预防或治疗由老化产生的器官改变的用途。

5. Mas G-蛋白偶联受体拮抗剂和激动剂的用途, 其特征在于 Mas G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂包括肽血管紧张素-(1-7)及其肽或非肽的类似物、激动剂和拮抗剂与药物学上和药理学上可接受的赋形剂或载体的制剂, 作为凋亡活性的调节剂的用途。

6. 根据权利要求 1, 2, 3, 4, 5 的 Mas G-蛋白偶联受体拮抗剂和激动剂的用途, 其特征在于使用至少一种其它药理学活性化合物和/或药物学上可接受的载体和/或赋形剂, 包括水, 盐水溶液, 缓冲溶液, Ringer 溶液, 葡萄糖溶液, Hank 溶液, 生物相容盐水溶液, 含有或不含有聚乙二醇; 非水性载体, 非挥发油如芝麻油, 油酸乙酯或甘油三酸酯, 羧甲基纤维素钠, 山梨糖醇或葡聚糖, 硫柳汞, 间甲酚或邻甲酚, 福尔马林和苯甲醇, 人血清白蛋白, 环糊精, 脂质体, 环状或非环状寡糖。

7. 根据权利要求 1, 2, 3, 4, 5, 6 的 Mas G-蛋白偶联受体拮抗剂和激动剂的用途, 其特征在于 Mas G-蛋白偶联受体拮抗剂和激动剂包括血管紧张素-(1-7)肽及其肽或非肽的类似物、激动剂和拮抗剂的制剂的可植入或可注射微粒或纳米颗粒装置, 作为凋亡活性的调节剂的用途。

8. 根据权利要求 7 的 Mas G-蛋白偶联受体拮抗剂和激动剂的用途, 其特征在于使用生物可降解聚合物, 如 PLGA, PLA, PGA, 己内酯, 这些聚合物的组合和脂质体。

9. 根据权利要求 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 的 Mas G-蛋白偶联受体拮抗剂和激动剂的用途, 其特征在于 Mas G-蛋白偶联受体拮抗剂和激动剂包括血管紧张素-(1-7)肽及其肽或非肽的类似物、激动剂和拮抗剂的用途, 作为疾病预防和治疗中凋亡活性的调节剂, 这些疾病涉及肌萎缩中肌肉分化、成熟和再生的改变, 如恶病质, 癌症, AIDS, 由于多种因素引起的长期卧床, 糖尿病, 类皮质激素的长期应用和各种神经综合征, 创伤病和导致肌萎缩的变性疾病, 以及用于预防或治疗由老化产生的器官改变和作为生力辅助 (ergogenic aid)。

10. 根据权利要求 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 的 Mas G-蛋白偶联受体拮抗剂和激动剂的用途, 其特征在于编码对应于血管紧张素-(1-7)及其类似物、激动剂和拮抗剂的肽序列的 cDNA 作为凋亡活性调节剂, 用于疾病以及老化产生的器官改变的基因治疗中的用途。

11. 根据权利要求 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 的 Mas G-蛋白偶联受体拮抗剂和激动剂的用途, 用于疾病以及由老化产生的器官改变的基因治疗中, 其特征在于 Mas G-蛋白偶联受体拮抗剂和激动剂, 包括血管紧张素-(1-7)肽及其肽或非肽的类似物、激动剂和拮抗剂, 作为凋亡活性的调节剂的用途。

12. 根据权利要求 1 至 6 的 Mas G-蛋白偶联受体拮抗剂和激动剂的用途, 其特征在于 Mas G-蛋白偶联受体拮抗剂和激动剂, 包括血管紧张素-(1-7)肽及其肽或非肽的类似物、激动剂和拮抗剂, 作为凋亡活性的调节剂, 用于疾病以及由老化产生的器官改变的基因治疗中的用途。

13. 根据权利要求 8 的 Mas G-蛋白偶联受体拮抗剂和激动剂的用途, 其特征在于 Mas G-蛋白偶联受体拮抗剂和激动剂, 包括血管紧张素-(1-7)肽及其肽或非肽的类似物、激动剂和拮抗剂, 作为凋亡活性调节剂在研究、预防和治疗以下疾病中的用途: 心血管疾病及其并发

症，自身免疫疾病，遗传多态性引起的疾病，如 DD 型血管紧张素转化酶，与 Mas 受体表达降低以及 Mas 受体激动剂的血浆和组织水平降低有关，与器官和组织中的缺血事件如心肌梗塞相关的并发症，创伤，烧伤，红斑，肿瘤，I-型和 II-型糖尿病及其并发症，雄性生殖系统障碍（精子发生，精子活力，勃起功能障碍）和雌性生殖系统障碍和胚胎发生障碍，呼吸系统疾病，肾病，胃肠道疾病，妇科疾病，血管生成，脱发，血液疾病和血管成形术（腔内假体和血管成形术后再狭窄），血液体质障碍例如放疗后，记忆和学习障碍以及中枢和外周变性神经病变，以及用于研究、预防或治疗温血动物中由老化产生的器官改变。

14. 根据权利要求 2 至 6 的 Mas G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂的用途，其特征在于 Mas G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂，包括血管紧张素-(1-7)肽及其肽或非肽的类似物、激动剂和拮抗剂，在研究、预防和治疗疾病中的用途，这些疾病涉及活性氧降低和所引起的内皮功能障碍，例如，但不限于，心血管疾病（高血压，动脉粥样硬化，血栓形成，心肌梗塞，心力衰竭等等），肾病，多代谢综合征，勃起功能障碍和中枢神经系统疾病等等。

15. Mas G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂在预防和治疗疾病中的用途，这些疾病涉及活性氧降低和所引起的内皮功能障碍，例如，但不限于，心血管疾病（高血压，动脉粥样硬化，血栓形成，心肌梗塞，心力衰竭），肾病，多代谢综合征，勃起功能障碍和中枢神经系统疾病等等，其特征在于使用 Mas G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂，包括血管紧张素-(1-7)肽及其肽或非肽的类似物、激动剂和拮抗剂，及其制剂。

16. 根据权利要求 1, 2, 3, 4, 5 的 Mas G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂的用途，包括血管紧张素-(1-7)肽及其类似物、激动剂和拮抗剂，其特征在于使用编码对应于血管紧张素-(1-7)及其类似物、激动剂和拮抗剂的肽序列的 cDNA 用于疾病的基因治疗中，其中涉及活性氧降低和所引起的内皮功能障碍改善，其中疾病有心血管疾病（全身

性和肺部高血压，妊娠期高血压疾病，动脉粥样硬化，血栓形成，心肌梗塞，心力衰竭等等），肾病，多代谢综合征，勃起功能障碍，中枢神经系统的疾病，血管炎。

17. Mas G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂的用途，用于预防和治疗心血管疾病及其并发症，自身免疫疾病，遗传多态性引起的疾病，如 DD 型血管紧张素转化酶，与 Mas 受体表达降低以及 Mas 受体激动剂的血浆和组织水平降低有关，与器官和组织中缺血事件如心肌梗塞相关的并发症，创伤，烧伤，红斑，肿瘤，I-型和 II-型糖尿病及其并发症，雄性生殖系统障碍（精子发生，精子活力，勃起功能障碍）和雌性生殖系统障碍和胚胎发生障碍，呼吸系统疾病，肾病，胃肠道疾病，妇科疾病，血管生成，脱发，血液疾病和血管成形术（腔内假体和血管成形术后再狭窄），血液体质障碍例如放疗后，记忆和学习障碍以及中枢和外周变性神经病变，以及用于研究、预防或治疗温血动物中由老化产生的器官改变，其特征在于 Mas G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂，包括血管紧张素-(1-7)肽及其肽或非肽的类似物、激动剂和拮抗剂，与药物学上或药理学上可接受的赋形剂或载体配制，作为凋亡活性的调节剂的用途。

18. Mas G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂的用途，其特征在于使用 Mas G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂，包括血管紧张素-(1-7)肽及其肽或非肽的类似物、激动剂和拮抗剂，及其制剂，通过口服，肌内，静脉内，皮下，局部，经皮，肛门，吸入（肺，鼻内，颊内）给药途径或作为可植入或注射的装置来使用，用于研究、预防和治疗心血管疾病及其并发症，自身免疫疾病，遗传多态性引起的疾病，如 DD 型血管紧张素转化酶，与 Mas 受体表达降低以及 Mas 受体激动剂的血浆和组织水平降低有关，与器官和组织中缺血事件相关的并发症，创伤，烧伤，红斑，肿瘤，I-型和 II-型糖尿病及其并发症，雄性生殖系统障碍（精子发生，精子活力，勃起功能障碍）和雌性生殖系统障碍和胚胎发生障碍，呼吸系统疾病，肾病，胃肠道疾病，妇科疾病，血管生成，脱发，血液疾病和血管成形术（腔内假体和血管成形术后再狭

窄)，血液体质障碍例如放疗后，记忆和学习障碍以及中枢和外周变性神经病变，以及用于研究、预防或治疗温血动物中由老化产生的器官改变。

19. Mas G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂的用途，用于预防和治疗心血管疾病及其并发症，自身免疫疾病，遗传多态性引起的疾病，如 DD 型引起的疾病，与 Mas 受体表达降低以及 Mas 受体激动剂的血浆和组织水平降低有关，与器官和创伤组织中缺血事件相关的并发症，烧伤，红斑，肿瘤，I-型和 II-型糖尿病及其并发症，雄性生殖系统障碍（精子发生，精子活力，勃起功能障碍）和雌性生殖系统障碍和胚胎发生障碍，呼吸系统疾病，肾病，胃肠道疾病，妇科疾病，血管生成，脱发，血液疾病和血管成形术（腔内假体和血管成形术后再次狭窄），血液体质障碍例如放疗后，记忆和学习障碍以及中枢和外周变性神经病变，以及用于研究、预防或治疗温血动物中由老化产生的器官改变，其特征在于使用 Mas G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂，包括血管紧张素-(1-7)肽及其肽或非肽的类似物、激动剂和拮抗剂，及其制剂，通过口服，肌内，静脉内，皮下，局部，经皮，肛门，吸入（肺，鼻内，颊内）应用途径或作为可植入或注射的装置来使用。

20. Mas G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂的用途，包括血管紧张素-(1-7)肽及其肽或非肽的类似物、激动剂和拮抗剂，及其制剂，通过口服，肌内，静脉内，皮下，局部，经皮，肛门，吸入（肺，鼻内，颊内）给药途径或作为可植入或注射的装置来使用，在温血动物中，用于研究、预防和治疗皮肤损伤，创伤，烧伤，红斑，肿瘤，作为辅助措施，用于器官移植，用胚胎干细胞、非胚胎干细胞的治疗，器官和其他组织的再植和需要暂时或长期降低凋亡活性的其他治疗，生殖系统的障碍（精子发生，精子活力，勃起功能障碍），支气管疾病，肾病，胃肠道和妇科疾病，血管生成，脱发，血液疾病和血管成形术（腔内假体和血管成形术后再次狭窄），放疗后血液体质障碍，记忆和学习障碍，以及预防或治疗由老化产生的器官改变，其特征在于使用 Mas G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂，包括血管紧张素-(1-17)肽及其

肽或非肽的类似物、激动剂和拮抗剂，与药物学上或药理学上可接受的赋形剂或载体一起配制，作为凋亡活性的调节剂。

21. 根据权利要求1, 2, 3, 4, 5的Mas G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂的用途，其特征在于用于在温血动物中治疗皮肤损伤，创伤，红斑，肿瘤和其他需要暂时或长期降低凋亡活性的治疗，生殖系统的障碍（精子发生，精子活力，勃起功能障碍），支气管疾病，肾病，胃肠道和妇科疾病，血管生成，脱发，血液疾病和血管成形术（腔内假体和血管成形术后再狭窄），放疗后的血液体质障碍，记忆和学习障碍，以及预防或治疗由老化产生的器官改变。

22. 根据权利要求1, 2, 3, 4, 5, 6的Mas G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂的用途，其特征在于在温血动物中用作辅助措施，用于器官移植，用胚胎或非胚胎干细胞的治疗，器官和其他组织的再植，和其他需要暂时或长期降低凋亡活性的治疗，以及用于预防或治疗由老化产生的器官改变。

23. Mas G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂的用途，在温血动物中，用作辅助措施，用于器官移植，用胚胎或非胚胎干细胞的治疗，器官和其他组织的再植，和其他需要暂时或长期降低凋亡活性的治疗，以及用于预防或治疗由老化产生的器官改变，其特征在于使用Mas G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂，包括血管紧张素-(1-7)肽及其肽或非肽的类似物、激动剂和拮抗剂，及其制剂，通过口服，肌内，静脉内，皮下，局部，经皮，肛门，吸入（肺，鼻内，颊内）给药途径或作为可植入或注射的装置来使用。

24. Mas G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂的用途，在温血动物中，用于研究、预防和治疗皮肤损伤，创伤，烧伤，红斑，肿瘤；用作辅助措施，用于器官移植，用胚胎干细胞、非胚胎干细胞的治疗，器官和组织的再植，和其他需要暂时或长期降低凋亡活性的治疗；生殖系统的障碍（精子发生，精子活力，勃起功能障碍），支气管疾病，肾病，胃肠道和妇科疾病，血管生成，脱发，血液疾病和血管成形术（腔内假体和血管成形术后再狭窄），放疗后的血液体质障碍，记忆和学

习障碍,以及预防或治疗由老化产生的器官改变,其特征在于是 Mas G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂,包括血管紧张素-(1-7)肽及其肽或非肽的类似物、激动剂和拮抗剂,与药物学上或药理学上可接受的赋形剂或载体一起配制,作为凋亡活性的调节剂的用途。

25. Mas G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂的用途,其特征在于使用 Mas G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂,包括血管紧张素-(1-7)肽及其肽或非肽的类似物、激动剂和拮抗剂,及其制剂,通过口服,肌内,静脉内,皮下,局部,经皮,肛门,吸入(肺,鼻内,颊内)给药途径或作为可植入或注射的装置来使用,在温血动物中,用于研究、预防和治疗皮肤损伤,创伤,烧伤,红斑,肿瘤;用作辅助措施,用于器官移植,用胚胎干细胞、非胚胎干细胞的治疗,器官和组织的再植,和其他需要暂时或长期降低凋亡活性的治疗;生殖系统的障碍(精子发生,精子活力,勃起功能障碍),支气管疾病,肾病,胃肠道和妇科疾病,血管生成,脱发,血液疾病和血管成形术(腔内假体和血管成形术后再狭窄),放疗后的血液体质障碍,记忆和学习障碍,以及预防或治疗由老化产生的器官改变。

26. Mas G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂的用途,其特征在于使用 Mas G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂,包括血管紧张素-(1-7)肽及其肽或非肽的类似物、激动剂和拮抗剂,及其制剂,通过口服,肌内,静脉内,皮下,局部,经皮,肛门,吸入(肺,鼻内,颊内)给药途径或作为可植入或注射的装置来使用,用于研究、预防和治疗涉及肌萎缩中肌肉分化、成熟和再生改变的疾病,如恶病质,癌症, AIDS, 由于多种因素引起的长期卧床,糖尿病,类皮质激素的长期应用和各种神经综合征,创伤病和导致肌萎缩的变性疾病,以及用于预防或治疗由老化产生的器官改变和作为生力辅助。

27. Mas G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂的用途,用于预防和治疗涉及肌萎缩中肌肉分化、成熟和再生改变的疾病,如恶病质,癌症, AIDS, 由于多种因素引起的长期卧床,糖尿病,类皮质激素的长期应用和各种神经综合征,创伤病和导致肌萎缩的变性疾病,以及用于预

防或治疗由老化产生的器官改变和作为生力辅助，其特征在于使用 Mas G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂，包括血管紧张素-(1-7)肽及其肽或非肽的类似物、激动剂和拮抗剂，及其制剂，通过口服，肌内，静脉内，皮下，局部，经皮，肛门，吸入（肺，鼻内，颊内）给药途径或作为可植入或注射的装置来使用。

28. Mas G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂用于预防和治疗疾病的用途，其中涉及活性氧降低和所引起的内皮机能障碍改善，其中疾病有心血管疾病（全身性和肺部高血压，妊娠期高血压疾病，动脉粥样硬化，血栓形成，心肌梗塞，心力衰竭等等），肾病，多代谢综合征，勃起功能障碍，中枢神经系统的疾病，血管炎，其特征在于使用 Mas G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂，包括血管紧张素-(1-7)肽及其肽或非肽的类似物、激动剂和拮抗剂，通过口服，肌内，静脉内，皮下，局部，经皮，肛门，吸入（肺，鼻内，颊内）给药途径或作为可植入或注射的装置来使用。

29. Mas G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂的用途，其特征在于使用 Mas G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂，包括血管紧张素-(1-7)肽及其肽或非肽的类似物、激动剂和拮抗剂，及其制剂，通过口服，肌内，静脉内，皮下，局部，经皮，肛门，吸入（肺，鼻内，颊内）给药途径或作为可植入或注射的装置来使用，用于研究、预防和治疗疾病，其中涉及活性氧降低和所引起的内皮功能障碍改善，其中疾病有心血管疾病（全身性和肺部高血压，妊娠期高血压疾病，动脉粥样硬化，血栓形成，心肌梗塞，心力衰竭等等），肾病，多代谢综合征，勃起功能障碍，中枢神经系统的疾病，血管炎。

30. Mas G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂的用途，用于研究、预防和治疗涉及肌萎缩中肌肉分化、成熟和再生改变的疾病，如恶病质，癌症，AIDS，由于多种因素引起的长期卧床，糖尿病，类皮质激素的长期应用和各种神经综合征，创伤病和导致肌萎缩的变性疾病，以及用于预防或治疗由老化产生的器官改变和作为生力辅助，其特征在于使用 Mas G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂，肽或非肽的，包括血管紧

张素-(1-7)肽及其肽或非肽的类似物、激动剂和拮抗剂，与药物学上或药理学上可接受的赋形剂或载体一起配制。

31. Mas G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂的用途，用于研究、预防或治疗疾病，其中涉及活性氧降低和所引起的内皮功能障碍改善，其中疾病有心血管疾病（全身性和肺部高血压，妊娠期高血压疾病，动脉粥样硬化，血栓形成，心肌梗塞，心力衰竭等等），肾病，多代谢综合征，勃起功能障碍，中枢神经系统的疾病，血管炎，其特征在于使用 Mas G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂，包括血管紧张素-(1-7)肽及其肽或非肽的类似物、激动剂和拮抗剂，与药物学上或药理学上可接受的赋形剂或载体一起配制。

MAS G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂作为凋亡活性调节剂 用于预防和治疗疾病的用途

本发明的特征在于 Mas, G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂的用途, 作为凋亡活性调节剂, 用于疾病的研究、预防和治疗。

本发明进一步的特征在于 Mas, G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂的用途, 用于调节涉及 B/Akt 激酶蛋白活性改变的凋亡活性。

本发明的另一个特征是 Mas, G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂, 包括血管紧张素-(1-7)肽及其类似物、激动剂和拮抗剂, 肽或非肽的, 作为凋亡活性调节剂用于疾病的研究、预防和治疗用途。

本发明进一步要求保护 Mas, G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂, 与药理学或药理学上可接受的载体一起配制, 和 Mas, G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂, 包括血管紧张素-(1-7)肽及其类似物、激动剂和拮抗剂, 肽或非肽的, 作为凋亡活性调节剂的用途。

另一个要求保护的特征是 Mas, G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂包括血管紧张素-(1-7)肽及其类似物、激动剂和拮抗剂(肽或非肽的)的制剂的微粒和纳米颗粒、可植入或可注射装置, 作为凋亡活性调节剂的用途。

本发明描述的给药形式包含但不限于使用 Mas, G-蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂, 包括血管紧张素-(1-7)肽及其类似物、激动剂和拮抗剂, 肽或非肽的, 及其制剂, 通过口服, 肌内, 静脉内, 皮下, 局部, 经皮, 肛门, 吸入(肺, 鼻内, 颊内)给药途径或作为可植入或注射的装置来使用, 用于疾病的研究、预防和治疗。

肾素-血管紧张素-系统(RAS)作为体液和血压体内稳态调节剂的作用是公知的。RAS 负责生理和病理情况中的血压、心血管体内稳态和水电解质平衡的调节(Santos, R. A. S.; Campagnole-Santos, M. J.; Andrade, S. P. Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept.* 91:

45-62, 2000)。最近发现除了在血液循环中产生 Ang II 的系统以外, 不同的组织也可以在局部产生该系统的各种生物活性肽(组织 RAS)。在多种器官和组织包括心脏, 血管, 肾脏, 雄性和雌性生殖系统, 内分泌腺, 骨髓和脑中, 发现了组织 RAS 的成分。这些 RAS 在不同组织中的功能仍然没有得到完全阐明(Santos, RAS, Campagnole-Santos, MJ, Andrade, SP, Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept.* 91: 45-62, 2000; Yoshimura, Y. The ovarian rennin-angiotensin system in reproductive physiology. *Front Neuroendocrinol.* ; 18: 247-291, 1997)。

经典 RAS 的主要成分是: 肾素-催化血管紧张素原蛋白水解转化成血管紧张素 I (Ang I) 的酶; 血管紧张素原-肾素的主要底物和血管紧张素 II (AngII) 的前体; 血管紧张素转化酶 (ACE), 其通过水解两个羧基末端氨基酸将 Ang I 转化成 Ang II; 血管紧张素 II-该系统的主要生物活性肽; 以及 AT₁ 和 AT₂ 受体, 负责 AngII 的细胞效应的启动。向该公知系统中, 已经加入了其它肽, 如血管紧张素 III (Ang III), 血管紧张素 IV (Ang IV), 和血管紧张素-(1-7) [Ang-(1-7)]。Ang-(1-7) 可以通过组织内肽酶从 Ang I 或 Ang II 产生 (Santos, R. A., Brosnihan, K. B., Cappel, M. C., Pesquero, J., Chernicky, C. L., Greene, L. J.; Ferrario, C. M. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem, *Hypertension* (11 (2-Pt2): I153-I1537, 1988)。

已经在血浆和多种人和动物器官和组织中鉴定出 Ang-(1-7) (Santos, R. A. S.; Campagnole-Santos, M. J.; Andrade, SP. Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept.* 91: 45-62, 2000), 包括雌性大鼠卵巢 (Costa APR, Fagundes-Moura CR, Pereira VM, Silva LF, Vieira MA, Santos RA, Reis AM), Angiotensin-(1-7): a novel peptide in the ovary. *Endocrinology.* 144: 1942-1948, 2003)。Santos 等 1988 已证明了其不依赖于 ACE 的产生 (Santos, R. A., Brosnihan, K. B., Cappel, M. C, Pesquero, J., Chernicky,

CL., Greene, L. J.; Ferrario, C. M. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. *Hypertension*. 11 (2-Pt 2): I153-I153-I1537, 1988) 并且 Santos 等 1994 (Santos, RAS, Campagnole-Santos, M. J., Baracho, N. C, Fontes, M. A., Silva, L. C, Neves, L. A., Oliveira, D. R., Caligiorne, S. M., Rodrigues, A. R., Groppen Junior, C. Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1-7): evidence that the actions of angiotensin-(1-7) are mediated by specific angiotensin receptors. *Brain Res Bull*. 35 (4):293-298, 1994) 和 Tallant 等 1997 (Tallant, E. A, Lu, X., Weiss, R.B., Cappell, M. C; Ferrario, C. M. Bovine aortic endothelial cells contain an angiotensin-(1-7) receptor. *Hypertension* 29:388-393, 1997) 提出其附着于特定受体。已经获得这些发现, 尤其是作为可以得到 Ang(1-7) 的选择性拮抗剂 A-779 的结果, (Asp¹-Arg²-Val³-Tir⁴-Lle⁵-His⁶-D-Ala⁷; Santos, R.A., Campagnole-Santos, M. J. Barracho, N. C, Fontes, M. A, Silva, L. C, Neves, L. A, Oliveira, D. R., Caligione, S. M., Rodrigues, A.R., Groppen Junior, C. Characterization of a new angiotensin-antagonist selective for angiotensin-(1-7): evidence that the actions of angiotensin-(1-7) are mediated by specific angiotensin receptors. *Brain Res Bull*. 35 (4):293-298, 1994; Ambuhl, P, Felix, D. Khosla, M. C. [7-D-ALA]-Angiotensin-(1-7): selective antagonism of angiotensin-(1-7) in the rat paraventricular nucleus. *Brain Res Bull*. 1994; 35 (4):289-91)。

多种酶参与 RAS 级联的几个步骤, 在其中它们负责一些肽片段的降解, 以及负责其他肽片段的产生。ACE 负责将 Ang I 转化成 Ang II; PEP (脯氨酰内肽酶) 从 Ang I 和 Ang II 产生 Ang-(1-7), 而 NEP (中性内肽酶) 催化 Ang I 转化成 An-(1-7)。ACE 还水解 Ang-(1-7), 产

生 Ang-(1-5) (Chappell MC, Pirro NT, Sykes, A, Ferrario CM. Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin-converting enzyme. *Hypertension*. 31 :362-367, 1998)。因此, ACE 途径对循环和组织 RAS 生物活性肽的产生和降解都是重要的。最近, 描述了另一种酶 ACE2, 其对于 Ang-(1-7) 的形成是重要的 (SR Tipnis, NM Hooper, R Hyde, E Karran 和 G Christie. The human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J. Biol Chem*. 275(43):33238-33243, 2000)。这种酶形成 Ang-(1-7), 尤其是从 Ang II。

血管紧张素-(1-7)和血管紧张素 II 是主要的 RAS 效应物。两个重要的特征将 Ang-(1-7)与 Ang II 区分开来: 首先, Ang-(1-7)具有高度特异性的生物作用, 并且根据 Ang-(1-7)形成的途径, 可完全不依赖于 ACE (Santos, R. A. S.; Campagnole-Santos, M. J.; Andrade, S. P. Angiotensin-(1-7): an update. *Regulatory Peptides*. 91 :45-62, 2000)。

由于其在体内的弱致癌活性, 最初将 Mas 调节基因描述为原癌基因 (Young D. Waitches G, Birchmeier C. Fasano O. Wigler M. Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell*.1986; 45:711-71)。

在哺乳动物中, 主要在睾丸和不同的脑区域包括海马和扁桃体中检测到其基因的表达, 在肾脏和心脏中不那么强烈但仍以显著水平 (Bunnemann B, Fuxe K, Metzger R, Mullins J, Jackson TR, Hanley MR, Ganten D. Autoradiographic localization of Mas proto-oncogene mRNA in adult rat brain using in situ hybridization. *Neurosci Lett*. 114:147-153,1990; Alenina N, Bader M, Walther T. Imprinting of the murine MAS proto-oncogene is restricted to its antisense RNA. *Biochem Biophys Res Commun*.

290:1072-1078, 2002)。

其基因修饰具有 7 个跨膜结构域的蛋白质, 所述蛋白质具有 I 类 G-蛋白偶联受体的特征。在最初的研究中, 提出该基因作为八肽血管紧张素 II 的受体的编码者 (codifier) (Jackson TR, Blair LA, Marshall J, Goedert M, Hanley MR. The Mas oncogene encodes an angiotensin receptor. *Nature* 335: 437-440, 1988)。然而, Ambroz 和同事以及后来 Ardaillou 显示了在 Mas 转染的细胞中 Ang II 所致的胞内钙升高, 只发生在内源表达 Ang II 的 AT1 受体的细胞中 (Ambroz C, Clark A, Catt KJ. The Mas oncogene enhances angiotensin-induced $[Ca^{2+}]_i$ responses in cells with pre-existing angiotensin II receptors. *Biochem Biophys Acta*. 1133: 107-111, 1991; Ardaillou R. Angiotensin II receptors. *J Am Soc Nephrol*. 10: S30-S39, 1999)。最近观察到, 事实上, Mas 是 Ang-(1-7) 的受体 (Santos, R. A., Simões e Silva A C, Marie, C, Silva, D.M., Machado, R. P., de Buhr, I., Heringer-Walther, S., Pinheiro, S. V., Lopes, M. T., Bader, M., Mendes, E. P., Lemos, V. S., Campagnole-Santos, M. J., Schultheiss, H. P., Speth, R.; Walther, T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas *Proc Natl. Acad Sci USA*, 100 (14): 8258-8263, 2003)。

内皮功能障碍是与靶器官 (其中特别是, 心脏, 肾脏, 脑, 血管, 生殖器官) 损伤相关的各种病理情况的建立和发展时更早发生的事件 (Goligorsky MS. Endothelial cell dysfunction: can't live with it, how to live without it. *Am J. Physiol Renal Physiol*. 288(5): F871-80, 2005)。一氧化氮生物利用率的降低是内皮功能障碍开始的关键因素, 因为该分子具有血管舒张, 抗增殖, 抗血栓形成, 抗动脉粥样硬化的特性并中和活性氧产生 (Ogita H, Liao J. Endothelial function and oxidative stress. *Endothelium*. 11(2): 123-32, 2004)。最近证明了除了依赖于钙的经典途径外, 通

过经由 B/Akt 激酶蛋白直接磷酸化内皮一氧化氮合酶 (eNOS) 的位点如 1177 丝氨酸也可以形成一氧化氮,该机理大大促成内皮完整性的维持。Akt 的激活,通过磷酸化 eNOS,参与人内皮中 Ang-(1-7) 刺激的一氧化氮释放,结果参与内皮功能性改善,这是本发明的一个特征。本发明的另一个特征是证明 Ang-(1-7) 负向调节 Ang II 在人内皮中的作用,通过抑制涉及活性氧产生的近端胞内途径如 c-SRC。此外,Ang-(1-7) 抑制 NAD(P)H 氧化酶的活性,后者是血管壁中产生活性氧的最大来源 (Touyz RM. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells - implications in cardiovascular disease. *Braz J Med Bio Res.* 37(8): 1263-73, 2004)。通过 Ang II 激活 NAD(P)H (氧化酶) 需要 c-SRC 的存在,以发生该酶的亚基 p47phox 的磷酸化和迁移至膜。此外,以 Ang II 慢性刺激中, c-SRC 参与 NAD(P)H 氧化酶的亚基 gp91phox, p22phox 和 p47phox 的蛋白表达的增加 (Touyz RM, Yao G, Schiffrin EL. c-Src induces phosphorylation and translocation of p47pho role in super oxide generation by angiotensin II in human vascular smooth muscles cells. *Arterioscler Thromb Vase Biol* 23(6):981-7, 2003)。该事实是特别重要的,因为促氧化和抗氧化因素之间的失衡是内皮功能障碍开始的决定因素之一。因此,除了通过释放一氧化氮直接促进维持内皮完整性外, Ang-(1-7) 还中和氧化自由基的产生。活性氧的产生又与凋亡活性具有密切关联,因为其刺激信号转导级联,包括 MAPK 类,胱天蛋白酶类和其他-细胞死亡的决定因素(Matuzawa, A., Ichijo, H. Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling. *Antioxid Redox Signal* 7(3-4):472-81 ; 2005)。然而,在现有技术中不存在涉及以下内容的发明,即 Ang-(1-7) 或其肽或非肽的类似物的制剂的用途,所述 Ang-(1-7) 或其类似物通过 Mas 受体激活级联 PI3K/Akt/eNOS 以及灭活 NAD(P)H 氧化酶和降低参与活性氧产生和内皮凋亡的机理,用于预防和治疗涉及内皮功能障碍的病理情况,例如,但不限于,心血管疾病,肾病,多代谢综合征,

勃起功能障碍，中枢神经系统疾病等等。

Ant-(1-7) 提高探究行为并有助于记忆 (Santos, RA, Campagnole-Santos, MJ. Central and Peripheral actions of Angiotensin-(1-7). *Braz J Med Bio Res.* 27(4): 1033-47, 1994; Hellner, K., Walther, T., Schubert, M., Albrecht, D. Angiotensin-(1-7) enhances LTP in the hippocampus through the G-protein-coupled receptor Mas. *Mol Cell Neurosci.* 29(3): 427-35, 2005)。Mas 受体定位于涉及这些功能的大脑区域中，包括海马，扁桃体和脑皮层 (K. A Martin, S. G. Grant, S. Hockfield. The Mas proto-oncogene is developmentally regulated in the rat central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 68(1): 75-82, 1992)。Mas 受体与 Ang-(1-7) 的相互作用激活了具有抗凋亡特征的信号转导途径，更具体的是 PKI3/Akt 的途径。通过 Ang-(1-7) 提高的 B (Akt) 激酶蛋白的磷酸化，减少了细胞凋亡 (Z.-Z. Yang, O. Tschopp, A. Baudry, B. Dümmler, D. Hynx 和 B. A Hemmings. Physiological functions of protein kinase B Akt *Biochem Soc Trans.* 32: 350-354, 2004)。Akt 的大脑亚型 Akt γ 敲除小鼠，呈现出大脑重量的显著减轻 (Z.-Z. Yang, O. Tschopp, A. Baudry, B. Dümmler, D. Hynx 和 B. A Hemmings. Physiological functions of protein kinase B Akt *Biochem Soc Trans.* 32: 350-354, 2004)。脑中 Akt 表达的一些部位是海马和大脑皮层，所述区域还富含 RNAM (对于 Mas 受体)。然而，现有技术中不存在涉及血管紧张素-(1-7) 制剂用于控制或预防变性脑疾病或记忆或学习障碍的发明，所述发明基于通过 Ang-(1-7) 与 Mas 受体的相互作用诱导的对 Akt 介导的抗凋亡活性的刺激。相似地，不存在涉及 Mas 受体激动剂或拮抗剂用于研究、预防或治疗变性脑疾病或记忆或学习障碍的用途的发明，所述用途基于通过肽或非肽 Mas 受体激动剂与该受体的相互作用诱导的对 Akt 介导的抗凋亡活性的刺激。

本发明的特征在于含有 Ang-(1-7)、Ang-(1-7) 的类似物或衍生物

的控释系统的应用,其有助于接入以与 Mas G 蛋白偶联受体相互作用。G 蛋白, Mas 和 Ang-(1-7)、类似物或衍生物之间的这种相互作用,使得能够控制或预防特征在于凋亡活性提高的变性脑疾病,包括变性脑障碍,如阿尔茨海默氏病,帕金森病,亨廷顿病等。令人满意的控释系统包括但不限于环糊精,生物相容性聚合物,生物可降解聚合物,其他聚合基质,胶囊,微胶囊,微粒,推注(bolus)制剂,渗透泵,扩散装置,脂质体, lipospheres 和经皮给药系统。

最近,多篇论文表明 IP3k/AKT 途径对介导胰岛素受体与其底物信号转导起关键作用(Zdychova J, Komers R. Emerging role of Akt kinase/protein kinase B signaling in pathophysiology of diabetes and its complications. *Physiol Res*; 54(1):1-16, 2005)。改变该级联的介质,如生长因子,血管紧张素 II,活性氧,皮质类固醇,雌激素,和血糖状态的改变自身,将促进增殖性细胞改变,由于 PI3K/Akt 途径实质上是抗凋亡途径,这将导致从糖尿病中固有的内皮功能障碍到糖尿病怀孕妇女中胚胎产生畸形改变(Reece EA, Ma XD, Zhao Z, Wu YK, Dhanasekaran D. Aberrant patterns of cellular communication in diabetes-induced embryopathy in rats: II, apoptotic pathways *Am J. Obstet Gynecol.* 192(3):967-972, 2005)。Akt 可受到指导该途径介导的信号转导的各种因素的调节。例如, D-葡萄糖调节 Akt 的磷酸化,并且高血糖已与糖尿病中的内皮功能障碍相关(Varma S, Lal BK, Zhen R, Breslin JW, Saito S, Pappas PJ, Hobson Ii RW, Duran WN. Hyperglycemia Alters PI3k and Akt Signaling and Leads to Endothelial Cell Proliferative Dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 印刷中)。此外,丝氨酸的磷酸化与 e-NOS 的激活相关(Kobayashi T, Taguchi K, Yasuhiro T, Matsumoto T, Kamata K. Impairment of PI3-K/Akt pathway underlies attenuated endothelial function in aorta of type 2 diabetic mouse model. *Hypertension.* 44(6):956-962, 2004), 并可以通过提高脂质水平来抑制,表明除了内皮保存和活化

循环内皮祖细胞(EPC)外, Akt可能还与动脉粥样硬化保护效果相关。在骨骼肌中, Akt磷酸化的改变与2型糖尿病中通过GLUT4的运输中的改变相关(Karlsson HK, Zierath JR, Kane S, Krook A, Lienhard GE, Wallberg-Henriksson H. Insulin-Stimulated Phosphorylation of the Akt Substrate AS160 Is Impaired in Skeletal Muscle of Type 2 Diabetic Subjects. *Diabetes*. 54(6): 1692-7, 2005)。另一个令人感兴趣的方面是该级联似乎涉及 β 细胞自身的增殖和存活, 并且其被神经酰胺激活的磷酸酶(CAPP)灭活可能引起I型糖尿病中胰岛素分泌的改变(Kowluru A. Novel regulatory roles for protein phosphatase-2A in the islet beta cell. *Biochem Pharmacol*. 69(12): 1681-1691, 2005)。指出通过PI3K/Akt/TOR途径介导的负反馈过程的存在作为胰岛素抵抗和肿瘤发生的关键事件(Manning BD, Balancing Akt with S6K: implications for both metabolic diseases and tumorigenesis, *J. Cell Biol*, 167(3): 399-403, 2004)。因此, Akt途径在成因因素和由糖尿病引起的并发症如血管病变中的参与是明显的。

在肾素-血管紧张素系统和胰岛素受体信号转导之间似乎存在着密切的关联。已经证明了Ang II抑制胰岛素受体介导的Akt的磷酸化。此外, 通过Ang II刺激的氧化应激也改变胰岛素激活的胞内级联的多个步骤(Taniyama Y, Hitomi H, Shah A, Alexander RW, Griending KK. Mechanisms of reactive oxygen species-dependent downregulation of insulin receptor substrate - 1 by angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc. Biol*. 25 (6):1142-1147, 2005)。这部分解释了为什么Ang II抑制剂的应用可改善胰岛素抵抗, 并因此改善与糖尿病相关的共发病, 如微血管损伤。Ang-(1-7)是有效的生物学Ang II拮抗剂并具有各种与内皮功能改善相关的作用。其水平在该系统药理性阻断过程中升高, 表明Ang-(1-7)是ACE抑制剂和AT1受体拮抗剂的有益效果的重要介质。如以上已经提及的, Ang-(1-7)附着于Mas受体导致Akt的强磷酸化。然而, 在现有技术中不存在涉及血

管紧张素-(1-7)或其肽或非肽的类似物的制剂用于研究、预防或治疗胰岛素抵抗或该激素产生不足的结果的用途的发明。

血管紧张素-(1-7)存在于心脏中并具有重要的心脏作用,如提高收缩性和减轻心律不齐 (Ferreira, AJ 和 Santos, RAS. Cardiovascular actions of Angiotensin-(1-7). *Braz. J. Med. Biol Res.* 38(4):499-507, 2005)。Mas 受体也在心脏中表达并且其缺乏使得心功能显著降低 (Ferreira, AJ Santos, RAS. Cardiovascular actions of Angiotensin-(1-7). *Braz. J. Med. Biol Res.* 38(4):499-507, 2005)。激酶 Akt 蛋白也在心脏中表达,尤其是在心肌细胞中。在这些细胞中, Akt 也通过 PIK3 磷酸化,提高心肌收缩性和减轻再灌注心律不齐。心脏中 Akt 表达提高的小鼠呈现出糖酵解途径中涉及的蛋白的合成的改变,如“胰岛素样生长因子结合蛋白 5”的增加,其最终升高该途径的活性 (Latronico, MG, Costinean, S., Lavitrano, M. L. Peschle, C, Condorelli, G. Regulation of Cell Size and Contractile Function by AKT in Cardiomyocytes, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1015: 250 -260, 2004; Cook, S. A. Matsui, T., Li, L., Rosenzweig, A. Transcriptional Effects of Chronic Akt Activation in the Heart. *J Biol Chem.* 277(25): 22528-22533, 2002)。Ang-(1-7)的给药保护了心脏对抗心肌梗塞的结果 (Loot A. E., Roks A. J., HENNING, R.H., Tio, R. A. , Suurmeijer, A. J., Boomsma, F, van Gilst, W.H.. Angiotensin-(1-7) attenuates the development of heart failure after myocardial infarction in rats. *Circulation.* 2002;105 (13):1548-50)。表达产生 Ang-(1-7)的融合蛋白的转基因大鼠应答异丙肾上腺素处理具有较低的心脏肥大,且再灌注心律不齐的持续时间和发生较短 (Santos, R. A., Ferreira, A. J., Nadu, A. P., Braga, A. N., de Almeida, A. P., Campagnole-Santos, M. J., Baltatu. O., Iliescu, R., Reudelhuber, T. L., Bader, M. Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats.

Physiol Genomics. 2004; 19(7):292-9)。另一方面,通过腺病毒冠状动脉内给药 Akt 基因,产生了大鼠中梗塞面积大小的减少(W. Miao, Z. Luo, R. N. Kitsis 和 K. Walsh. Intracoronary, Adenovirus-mediated Akt Gene Transfer in Heart Limits Infarct Size Following Ischemia-reperfusion Injury in vivo. *J. Mol Cell Cardiol*. 32:2397-2402, 2000)。在大鼠中用 Akt 修饰的干细胞防止梗塞心脏的重塑并恢复梗塞心脏的心功能(Mangi, A. A, Noiseux, N., Kong, D., He, H., rezvani, M., Ingwall, J. S. , Dzau, V. J. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts *Nat Med*. 9:1195-1201, 2003)。然而,在现有技术中不存在涉及血管紧张素-(1-7)或其肽或非肽的类似物的制剂的以下用途的发明,用于提高心脏性能或控制或预防心肌变性疾病,提高心脏内给药后干细胞的生存力,或降低心脏重塑或心脏的电生理障碍,这是基于通过 Ang-(1-7)与 Mas 受体的相互作用,对胞内转导途径的刺激,如通过刺激 PIK3/Akt 途径产生的抗凋亡活性。

肌萎缩是由多种病症如恶病质,癌症, AIDS, 由于多种因素引起的长期卧床(restriction to bed), 糖尿病, 类皮质激素的长期应用和各种神经综合征和创伤病引起的严重病态(Lai KM, Gonzalez M. Poueymirou WT, Kline WO, Na E, Zlotchenko E, Stitt tN, Ecomonides An, Yancopoulos GD. Glass DJ. Conditional activation of act in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy. *Mol Cell Biol*. (21):9295-304, 2004)。最近,已经研究了可激活骨骼肌中能够恢复肌肉向性的信号转导途径的策略。在这些途径中, Akt 值得强调,因为它能够激活合成代谢途径且同时和主要地能够抑制分解代谢途径(Stitt TN, Duran D., Clarke BA, Planar F, Timofeyva Y, Kline WO, Gonzalez M, Yancopoulos GD, Glass DJ. *Mol Cell*. 14(3):395-403, 2004)。The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy induced ubiquitin ligases by

inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell*; 14(3): 395-403, 2004)。Ang-(1-7)在外周肌肉组织中的作用包括增加骨骼肌中的血流 (Sampaio WO, Nascimento AAS, Santos RAS, Systemic and regional hemodynamic effects of angiotensin-(1-7) in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 284(6):H1985-94, 2003) 和突触易化 (Bevilaqua ER, Kushmerick C, Beirao PS, Naves LA. Angiotensin 1-7 increases quantal content and facilitation at the frog neuromuscular junction. *Brain Res.*; 927(2)208-11, 2002)。此外, Ang-(1-7)激活 Akt。然而,在现有技术中不存在涉及 Ang-(1-7)或其肽或非肽的类似物的制剂的以下用途的发明,其激活 Ang-(1-7)/Mas/Akt 轴,用于预防和治疗涉及肌肉分化、成熟和再生中的改变的病状,以及用作生力(ergogenic)源。

基于通过 Ang-(1-7)或其他激动剂与 Mas 受体的相互作用介导的 Akt 激活的抗凋亡活性的激活也可以发生在其他组织和器官中,包括,皮肤,内分泌腺,肝脏,肾脏,胃肠道和泌尿生殖道等等。

借助以下非限制性的实施例和详述可以更好地理解本发明。

实施例 1

该实施例描述了涉及生理功能中枢控制的大脑区域中 MAS 受体的鉴定。

用三溴乙醇(0.25g/Kg)将动物麻醉,然后用 PBS(0.02M pH7.4)经心脏(transcardially)灌注2分钟,然后用 PBS 中 10%低聚甲醛溶液灌注15分钟。取出脑并置入相同固定溶液中2h。然后将组织在 PBS 溶液中洗涤3次,此后置入蔗糖溶液(PBS 中 30%)中过夜。在-18℃温度的冷冻切片机中以额面制备 30 μm 脑切片。通过“自由飘浮”方法将延髓(bulb)和海马的切片在 PBS, 0.5%吐温和 5%BSA 中各温育15分钟,然后将切片与 Mas 一抗(1:500)在 4℃温育48小时。在与由 Mas 蛋白预吸收的一抗温育的邻近切片中进行阴性对照。48小时后,将切片在 PBS 溶液中洗涤3次5分钟,然后与缀合荧光化合物的

二抗在室温温育 60 分钟。在该阶段后,将切片在 PBS 中洗涤 3 次 5 分钟并保持在干凝胶化的载玻片上并分别在含有 1:3 甘油和 PBS 的封固溶液中覆盖载玻片。在共焦显微镜下分析切片,使用对于每种使用的荧光化合物特定的激发和发射滤光器。通过中性红方法将含有接受免疫荧光测定的邻近切片的载玻片染色,用于组织的结构分析和不同区域的鉴定。使用了 Atlas de G. Paxinos, C. Watson, The rat brain in stereotaxic coordinates, 第二版, Academic Press, New York, 1986, 用于定义脑中观察到的区域。图 1 显示了,在海马的额切片中,在多个区域中(图 1A)和用于不同区域的组织学鉴定的中性红染色的邻近切片中(图 1B),通过免疫反应性显示的 Mas Ang-(1-7)受体的存在。图 2 显示了在室旁核(PVN,图 2A)和外侧视前区(LP0,图 2C)和对照的邻近切片(图 2B 和 2D)中,通过免疫反应性显示的 Mas Ang(1-7)受体的存在,进行用合成 Mas 蛋白预吸收抗体时,显示出标记的消失。在图 3 中,箭头显示在视上核(CS0,图 3A)中通过免疫反应性显示的 Mas, Ang-(1-7)受体的存在。进行用合成 Mas 蛋白预吸收抗体时,邻近切片(图 3B 和 3D)显示出标记的消失。图 4 显示了在扁桃体(图 4A)和丘脑的前背侧核中(图 4C)和邻近切片对照中(图 4B 和 4D)通过免疫反应性显示的 Mas Ang-(1-7)受体的存在,当进行用 Mas 合成蛋白预吸收抗体时显示出标记的消失。图 5 显示了在皮层(HL,图 5A)和海马(HC,图 5C)及其邻近切片对照中(图 5B 和 5D)通过免疫反应性显示的 Mas Ang-(1-7)受体的存在,进行用 Mas 合成蛋白预吸收抗体时显示出标记的消失。图 6 显示了(A 中)延髓的额切片,图示了多个区域中 Mas Ang-(1-7)受体的免疫反应性。在 B 和邻近切片中,使用中性红染色,用于不同区域的组织学鉴定。图 7 显示了延髓的尾腹外侧区(CVLM,图 7A)和头腹外侧区(RVLM,图 7C)及其对照邻近切片(图 7B 和 7D)中 Mas Ang-(1-7)受体的免疫反应性,显示出进行用 Mas 合成蛋白预吸收抗体时标记的消失。图 8 通过免疫反应性显示出在孤束中(NTS,图 8A)和下橄榄核(IO,图 8C)和对照邻近切片中(图 8B 和 8D) Mas Ang-(1-7)受体的存在,显示出进行

用 Mas 合成蛋白预吸收抗体时标记的消失。图 9 通过免疫反应性显示出在舌下神经 (12, 图 9A) 和对照邻近切片 (图 9B) 中 Mas Ang-(1-7) 受体的存在, 显示出进行用 Mas 合成蛋白预吸收抗体时标记的消失。图 9C 显示了延髓的头腹外侧区中 Mas 受体和 AKT 的免疫共定位, 表明在该区域的神经调节中受体 Mas 和 AKT 之间可能的相互作用。

实施例 2

该实施例描述了 Ang-(1-7) 与其 Mas 受体的相互作用激活 PIK3/Akt 途径的鉴定。

培养用 Mas 受体转染的 CHO 细胞 (CHO-Mas) 和人胸主动脉内皮细胞 (HAEC) 直至大约 80% 汇合并用裂解缓冲液处理, 用于蛋白质印迹。处理后, 测定蛋白质浓度并将裂解产物接受聚丙烯酰胺/SDS 凝胶电泳, 然后转移至硝酸纤维素膜。用特异性抗体 (抗-磷酸-Akt, 抗-Akt, 抗-磷酸-eNOS 和抗- β -肌动蛋白) 温育膜。通过化学发光显现后观察条带。图 10 显示出 CHO-Mas 细胞中激酶 B (Akt) 磷酸化中 Ang-(1-7) 产生的刺激。Ang-(1-7) 拮抗剂 A-779 阻断了该作用。图 11 显示出 Akt 参与 CHO-Mas 细胞中 Ang-(1-7) 刺激的内皮一氧化氮合酶刺激位点 (S1177) 的磷酸化。磷脂酰肌醇 3 激酶拮抗剂 (PI3K) 阻断了该作用。图 12 显示出 Ang-(1-7) 对人内皮细胞 (HAEC) 在激酶 B (Akt) 磷酸化中的刺激作用。Ang-(1-7) 拮抗剂 A-779 阻断了该作用。图 13 显示 Akt 参与人内皮细胞 (HAEC) 中 Ang (1-7) 刺激的 eNOS 刺激位点 (S1177) 的磷酸化。PI3K 拮抗剂渥曼青霉素阻断了该作用。

实施例 3

该实施例描述了清醒大鼠中 PIK3/Akt 途径参与 Ang-(1-7) 刺激的内皮功能改善 (经由 Mas 受体) 的鉴定。

在实验前 24 小时, 将 Wistar 大鼠接受手术植入导管至股动脉 (用于分析血压和心率), 股静脉 (用于注射和输注药物) 和左颈动脉 (用于注射药物)。通过连接微型计算机的数据获取系统 (BIOPAC System,

INc.) 获得血压和心率的记录。图 14A 显示了在清醒的 Wistar 大鼠 ($n=7$) 中, 乙酰胆碱 (ACh) 的血管舒张作用不受到静脉内输注盐水 (NaCl 0.9%, 0.4mL/h) 改变。然而, 静脉内输注 Ang-(1-7) (7.0pmol/min) 增强了清醒 Wistar 大鼠 ($n=9$) 中乙酰胆碱 (ACh) 的血管舒张作用(图 14B)。图 14C 显示了静脉内推注渥曼青霉素(10^{-6}M) (PI3k 抑制剂), 接着静脉内输注渥曼青霉素(10^{-6}M) 伴随 Ang-(1-7) (7.0pmol/min), 阻断了清醒 Wistar 大鼠 ($n=7$) 中 Ang-(1-7) 对乙酰胆碱 (ACh) 的血管舒张作用的增强。我们观察到没有一个组的压力反射有任何改变。

实施例 4

该实施例描述了在 NADPH 氧化酶的活性中通过 Ang-(1-7) 与 Mas 受体的相互作用而激活 PIK3/Akt 途径的鉴定。

为了定量 NAD(P)H 氧化酶的活性, 用血管紧张素 II (10^{-7}M) 刺激人主动脉内皮细胞 (HAEC) 10 分钟。在一些实验中, 将细胞预先暴露于 AT_1 受体拮抗剂 Ibesartan (10^{-5}M) 30 分钟或 Ang-(1-7) (10^{-7}M) 15 分钟。将源自光泽精 (lucigenin) 的化学发光用来测定细胞匀浆中的 NAD(P)H 氧化酶的活性。为了定量 Ang-(1-7) 在 c-SRC 磷酸化中的调节作用, 培养 HAEC 直至达到约 80% 汇合并用裂解缓冲液处理, 用于蛋白质印迹。处理后, 测定蛋白质浓度并将裂解产物接受聚丙烯酰胺/SDS 凝胶电泳, 然后转移至硝酸纤维素膜。用特异性抗体 (抗-磷酸-c-SRC, 抗-c-SRC) 温育膜。通过化学发光显现后观察条带。图 15 显示了人内皮细胞 (HAEC) 中 Ang II 刺激的 c-SRC 磷酸化中 Ang-(1-7) 的调节作用。柱状图显示了 4 个实验的平均值 $\pm$ EPM。* $P<0.05$ 和 ** $P<0.001$ 相对于对照。图 16 显示出 Ang-(1-7) (10^{-7}M , 预温育 15 分钟) 对 Ang II (10^{-7}M , 10min) 刺激的 HAEC 中 NAD(P)H 氧化酶活性的作用。在一些实验中, 用 Ibesartan (10^{-5}M , 30min) 预温育细胞。用 4 个实验的平均值 $\pm$ EPM 来呈现数据。* $p<0.05$ 相对于对照。+ $p<0.05$ 相对于 Ang II+Ang (1-7)。

实施例 5

该实施例描述了 Mas, G-蛋白偶联受体拮抗剂在精子发生中的作用。

在用三溴乙醇 (2.5%, 1ml/100g 体重) 麻醉下, 将含有 Mas G-蛋白偶联受体拮抗剂 A-779 (2.5 μ g/h, 14 天, n=5) 或载体 (NaCl 0.9%, 1 μ l/h, 14 天, n=6) 的渗透迷你泵 (ALZET, 模型 2002) 皮下植入 C57 小鼠的背部区域中。该阶段之后, 将动物称重, 然后通过腹膜内途径注射 125 UI/kg 体重浓度的肝素。十五分钟后, 用硫喷妥钠使这些动物镇静 (50mg/kg 体重) 并通过左心室灌注。在第一个步骤中, 在大约 80mmHg 压力下, 在室温用 0.9% 生理盐水进行血管床清洗大约 5 分钟。在该操作后立即给动物灌注在磷酸盐缓冲液 (0.05M, pH 7.2-7.4) 中的 4% 戊二醛固定溶液约 25 分钟。该步骤后, 取出睾丸并与各自的附睾分离并称重。从睾丸重量和体重, 估算每只动物的性腺躯体指数 (睾丸重量和体重之间的百分比关系)。为了显微镜分析, 收集至多约 3mm 厚的睾丸碎片, 将其浸入 4% 缓冲的戊二醛中二至四小时 (4 $^{\circ}$ C)。然后, 将碎片储存于 4 $^{\circ}$ C 的磷酸盐缓冲液中, 直至将它们处理用于组织学分析 (凋亡的存在)。将这些睾丸碎片在递增浓度的乙醇 (70 $^{\circ}$, 80 $^{\circ}$, 90 $^{\circ}$, 100 $^{\circ}$, 每三十分钟更换) 中脱水。脱水后, 将碎片包括于乙二醇甲基丙烯酸酯 (metacrylate glycol) 中 (Leica Historesin Embedding Kit, Leica Instrumnts), 随后在切片机中用玻璃保险刀片切成 4 μ m 厚。用 1% 甲苯胺硼酸钠蓝将获得的切片染色, 用 Entellan (Merck) 封固, 并在 Olympus 显微镜下分析。图 17 显示了用 Mas G-蛋白偶联受体拮抗剂 A-779 处理的动物, 相对于对照组, 每个横切片呈现出更大数目的凋亡, 但是性腺躯体指数不存在差异。

实施例 6

该实施例描述了 Mas-KO 小鼠卵巢中的形态学改变。

通过去头将未成熟雌性小鼠（30天，11-14g）WT（野生型；n=4）和 Mas-KO（n=3）处死。取出卵巢，固定于 PBS 0.1m 中的 4% 戊二醛中，并包括于乙二醇甲基丙烯酸酯（glycolmethacrylate）中。将每第 5 个切片（5 μ m）收集在组织学载玻片上并用甲苯胺蓝染色。将形态学分析用于建立生长、窦性和闭锁初级卵泡的数量。KO 的卵巢呈现出显著低于 WT 的卵泡总数（1494 相对于 3332），尤其是原始卵泡（418 相对于 1930）。此外，与 WT 小鼠相比较时，KO 雌性小鼠闭锁卵泡的百分比约 50% 更高。这些数据表明作为 Mas 受体缺失的结果，卵巢凋亡活性的提高。

实施例 7

该实施例通过 RT-PCR 证明了，Mas 受体在多种组织中的表达，在其中这些受体的存在可有助于凋亡活性的调节（图 18）。

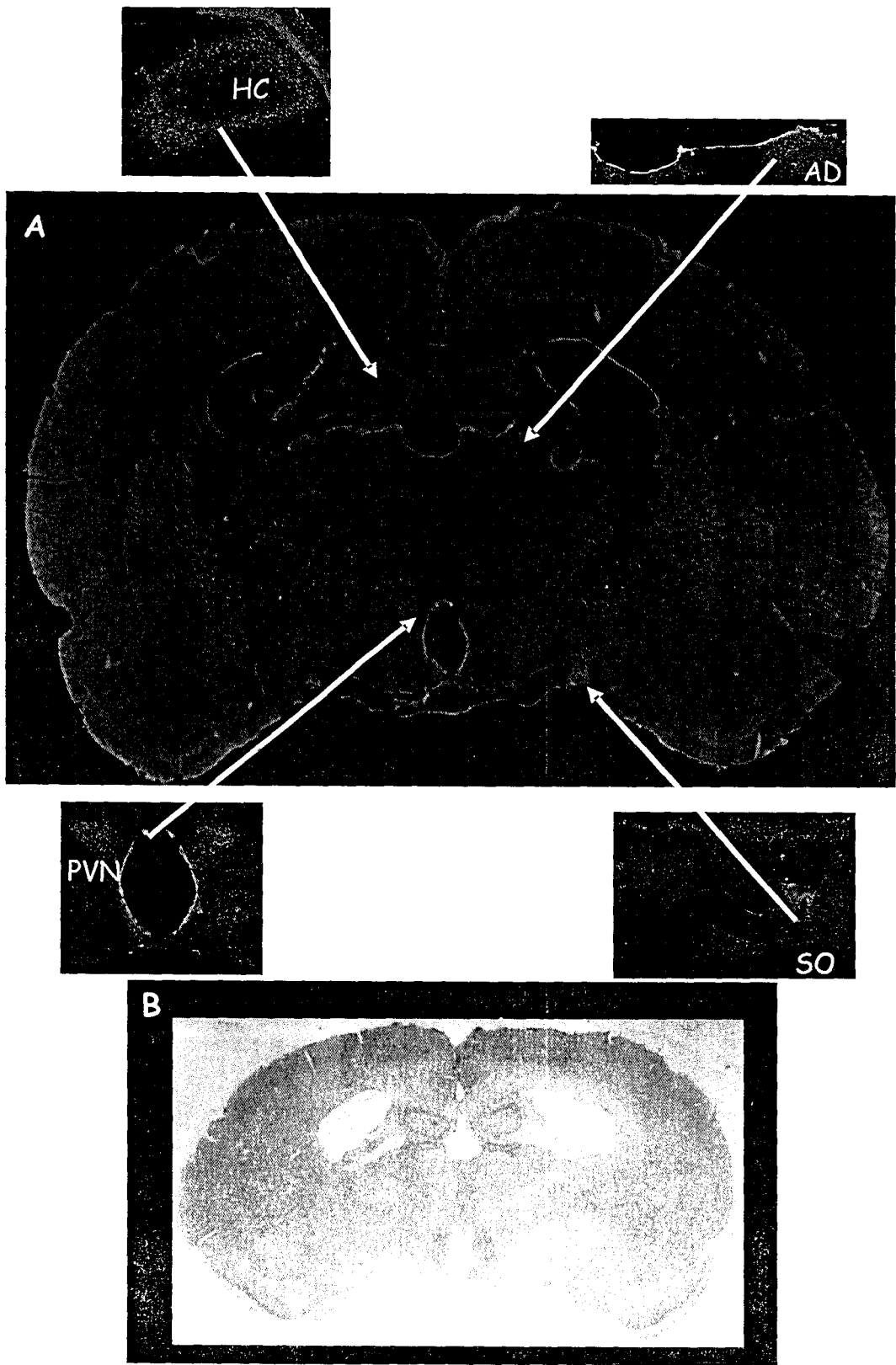


图1

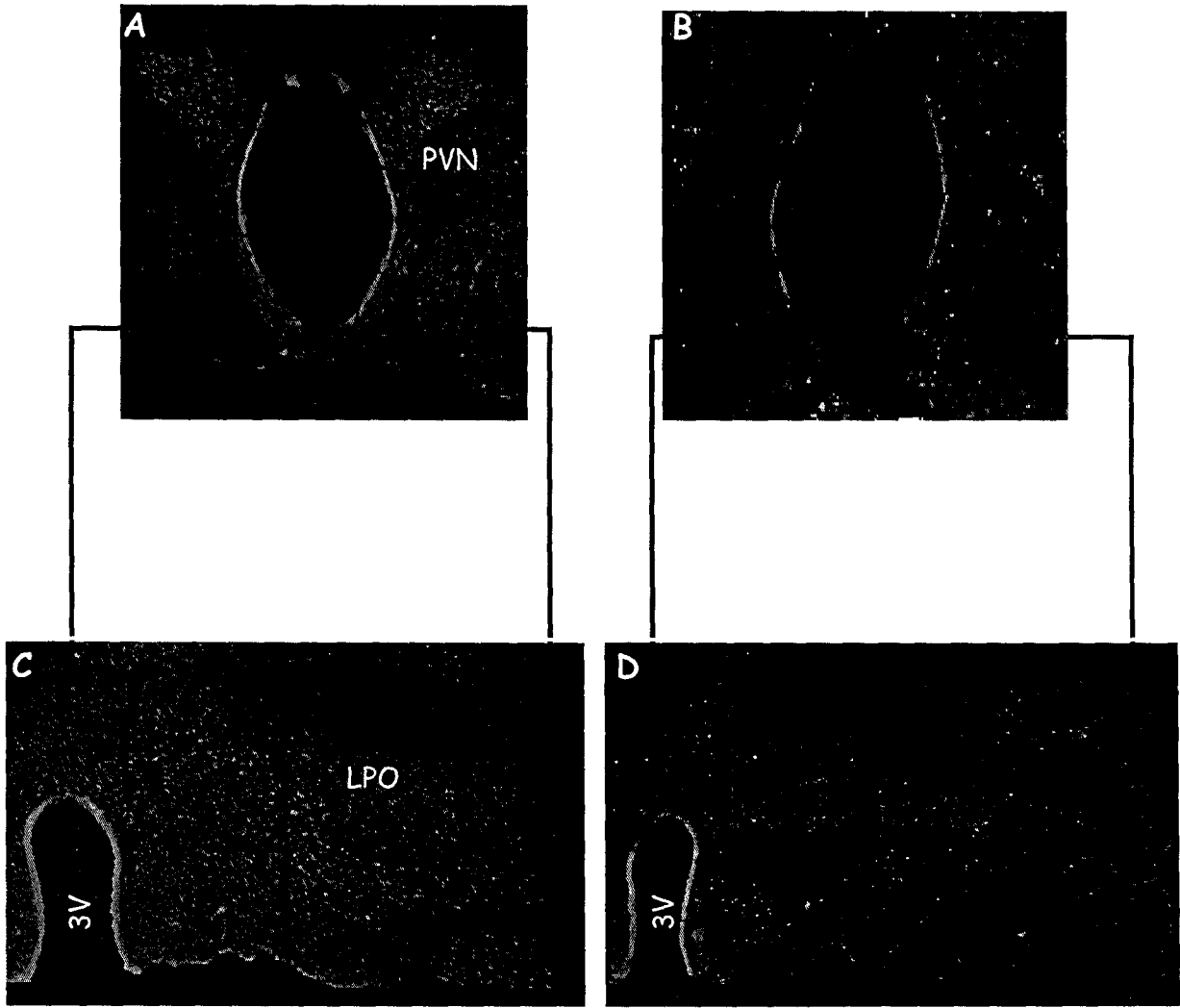


图 2

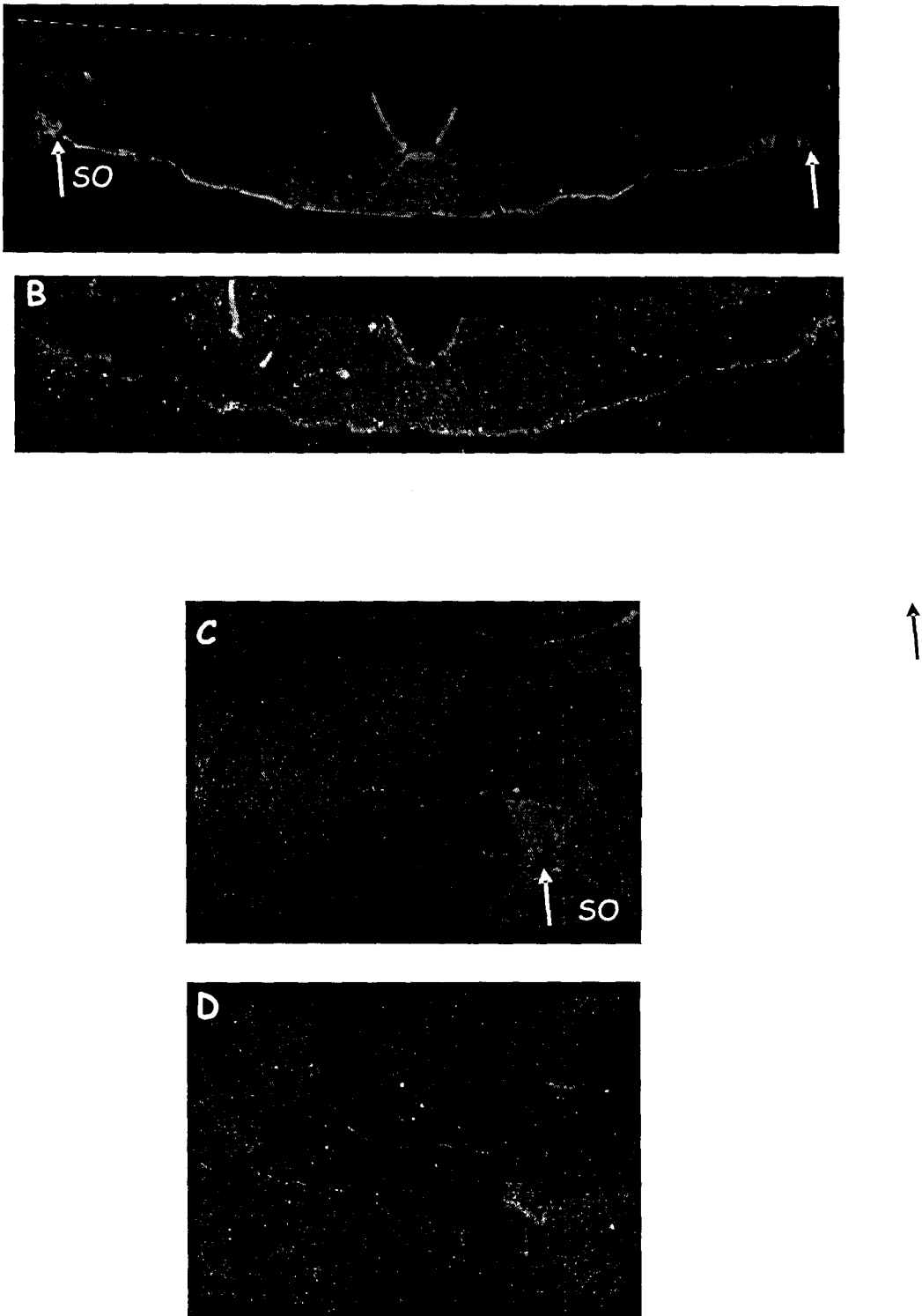


图 3

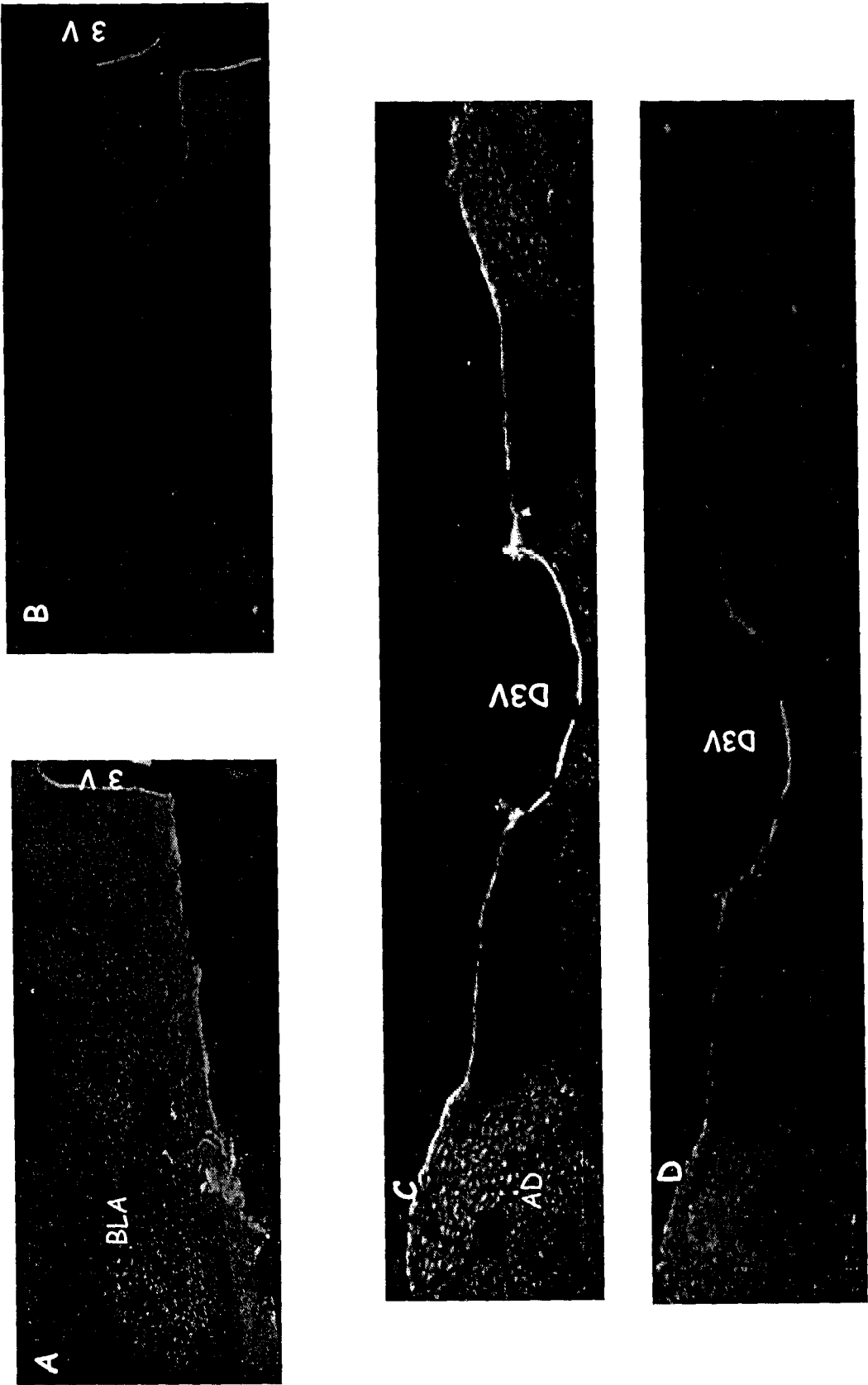


图4

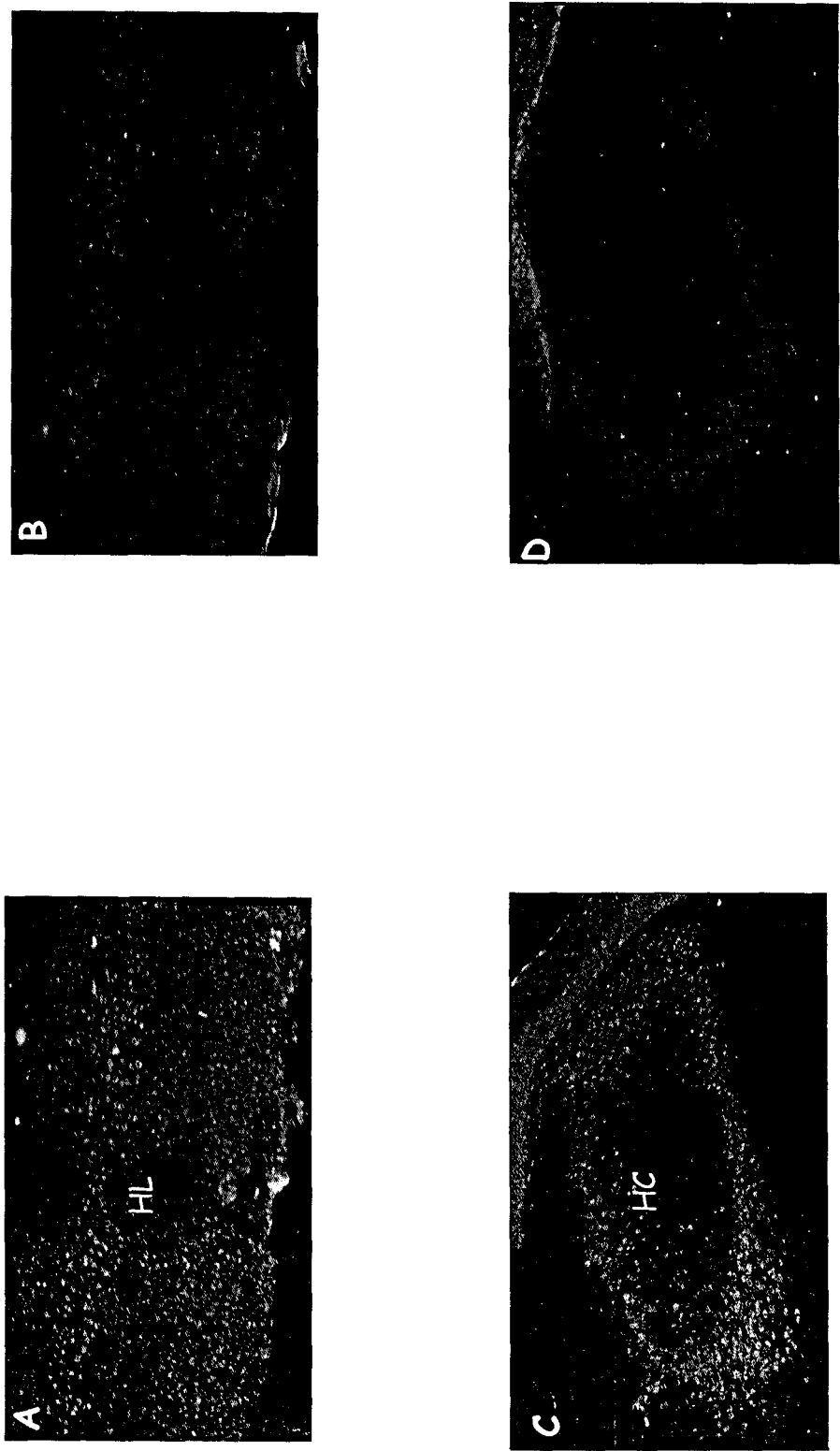


图5

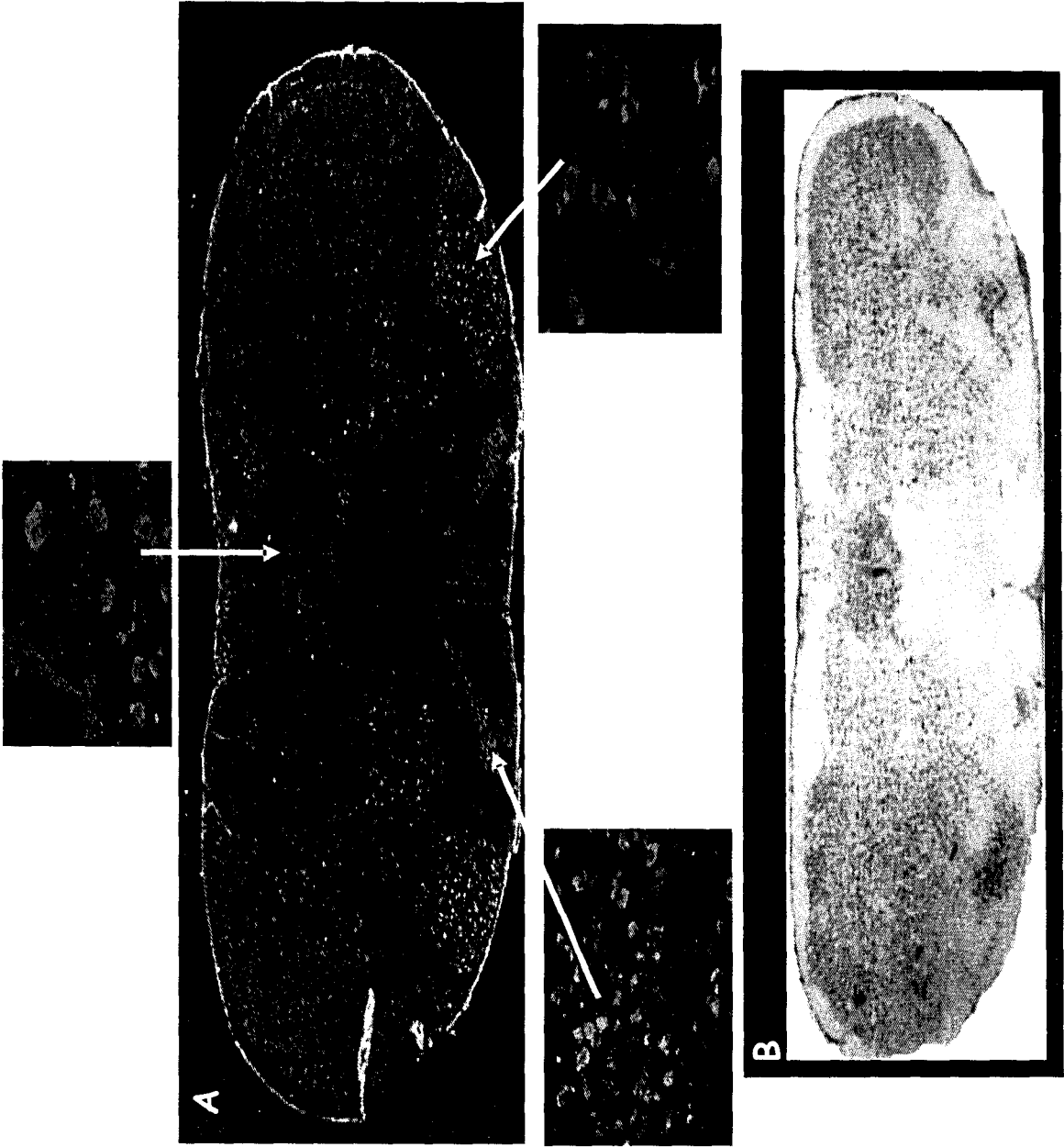


图6

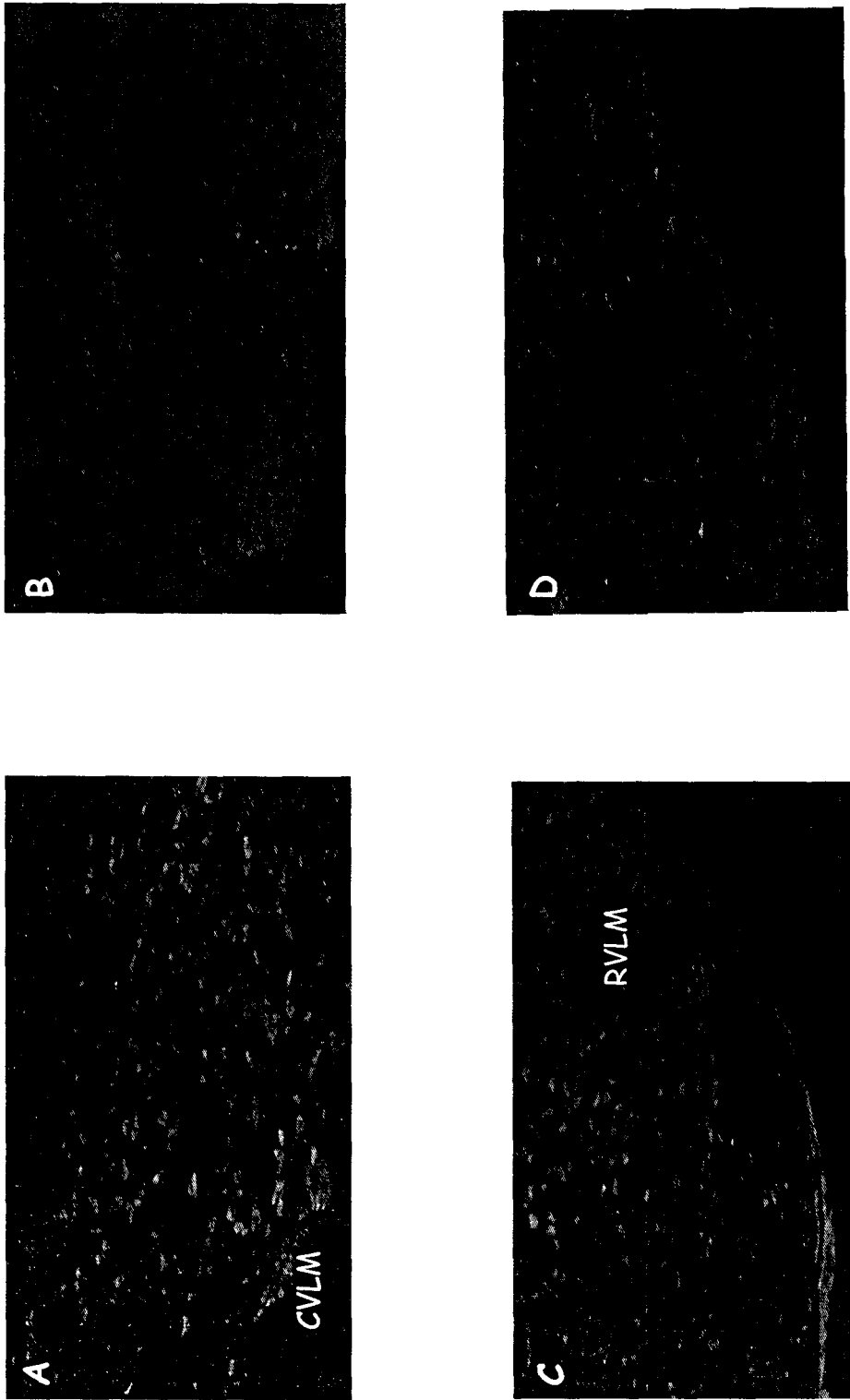


图7

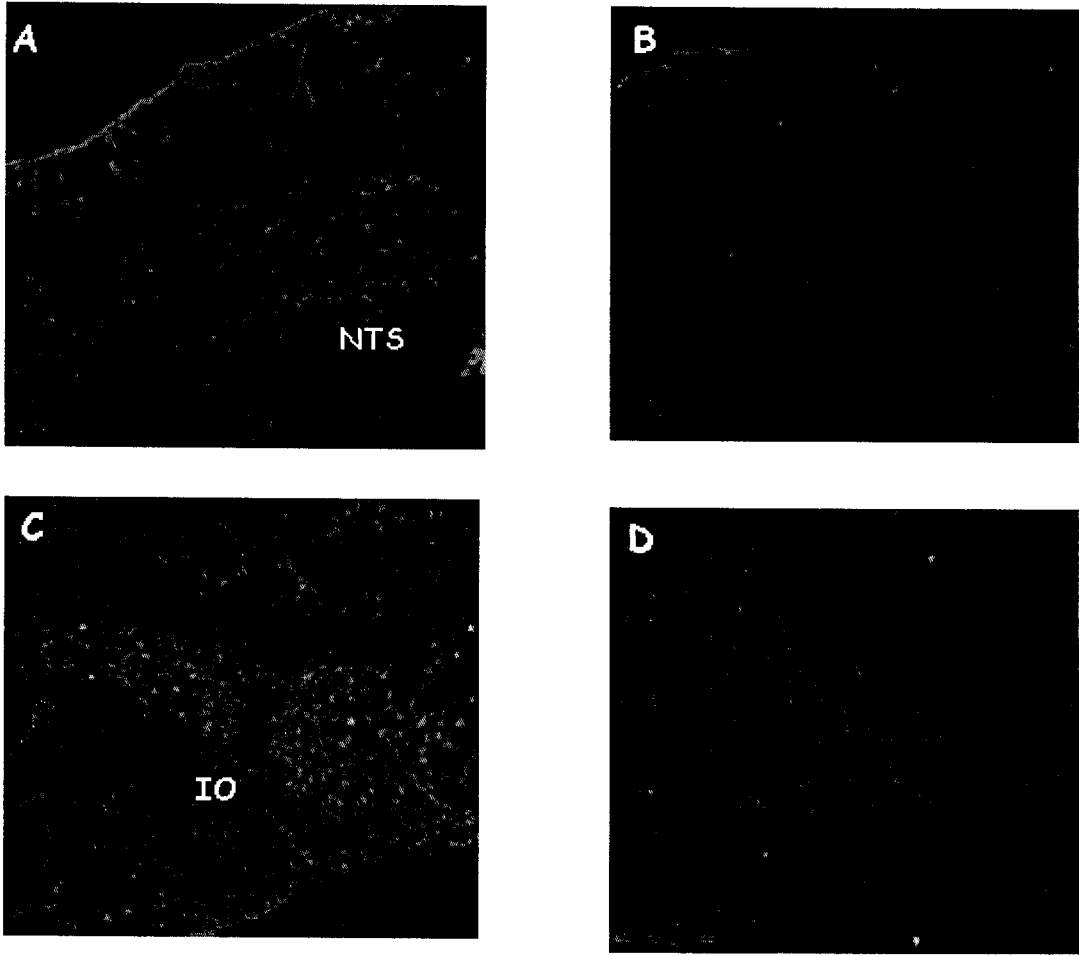


图 8

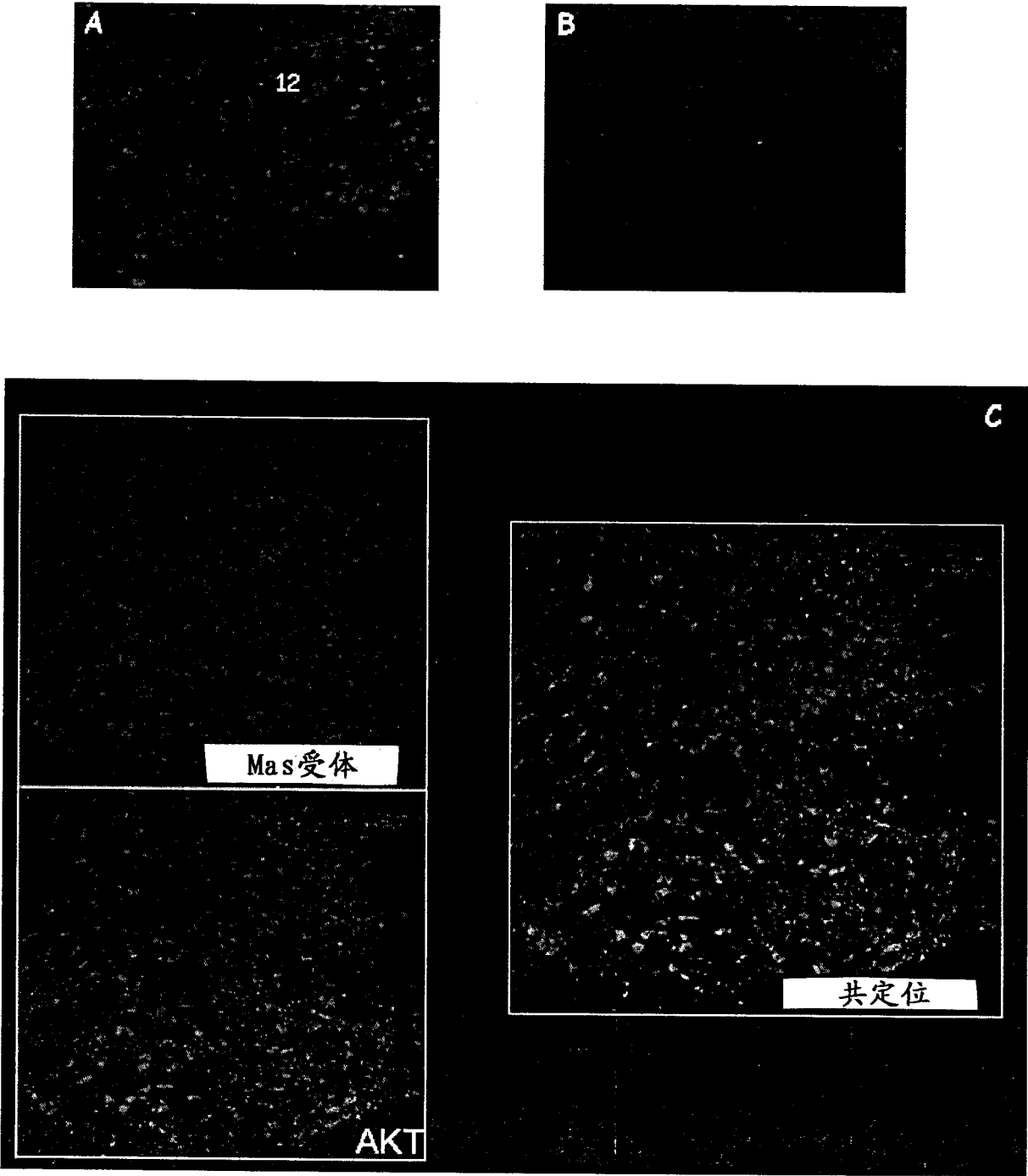


图9

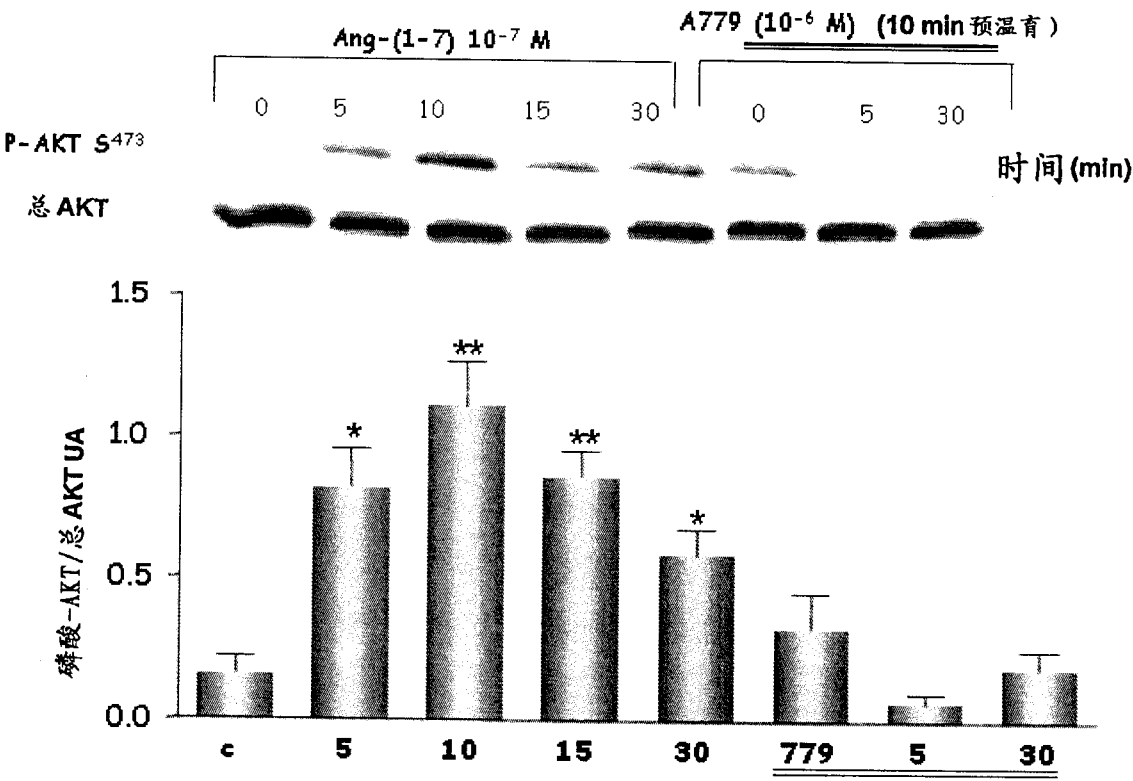


图10

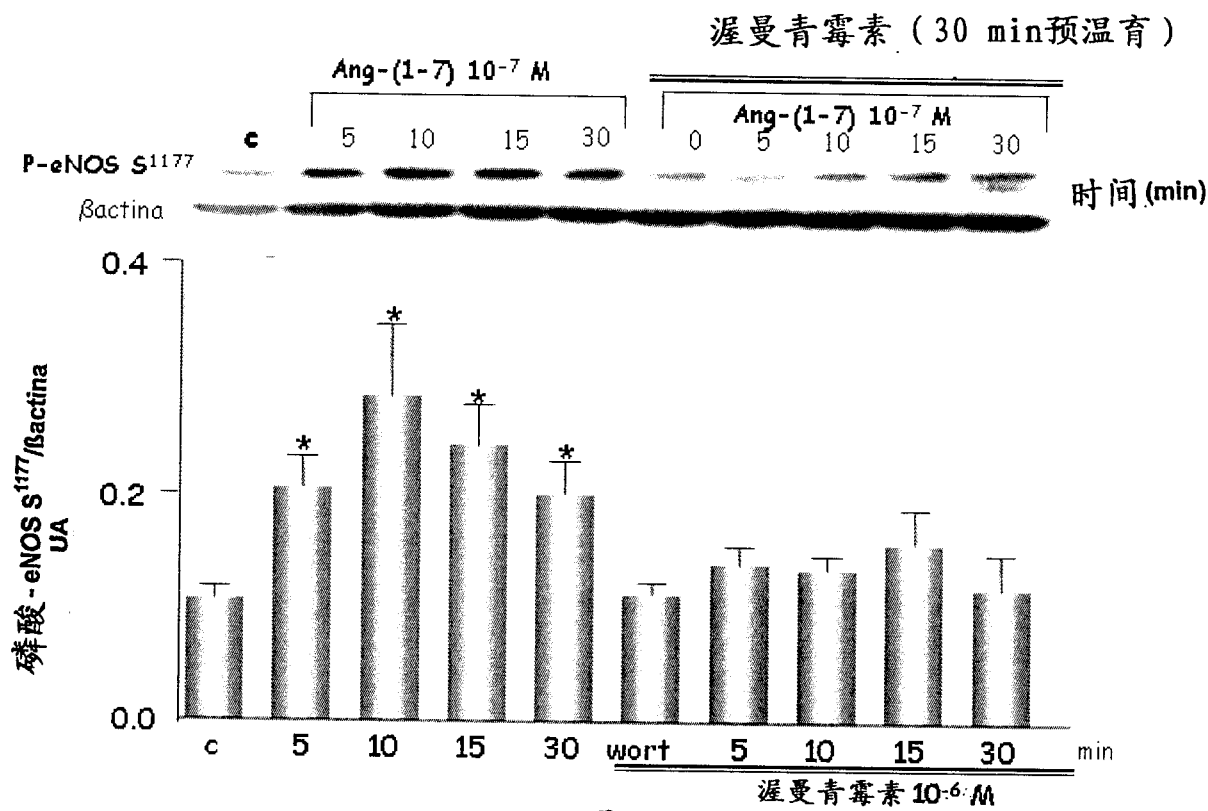


图 11

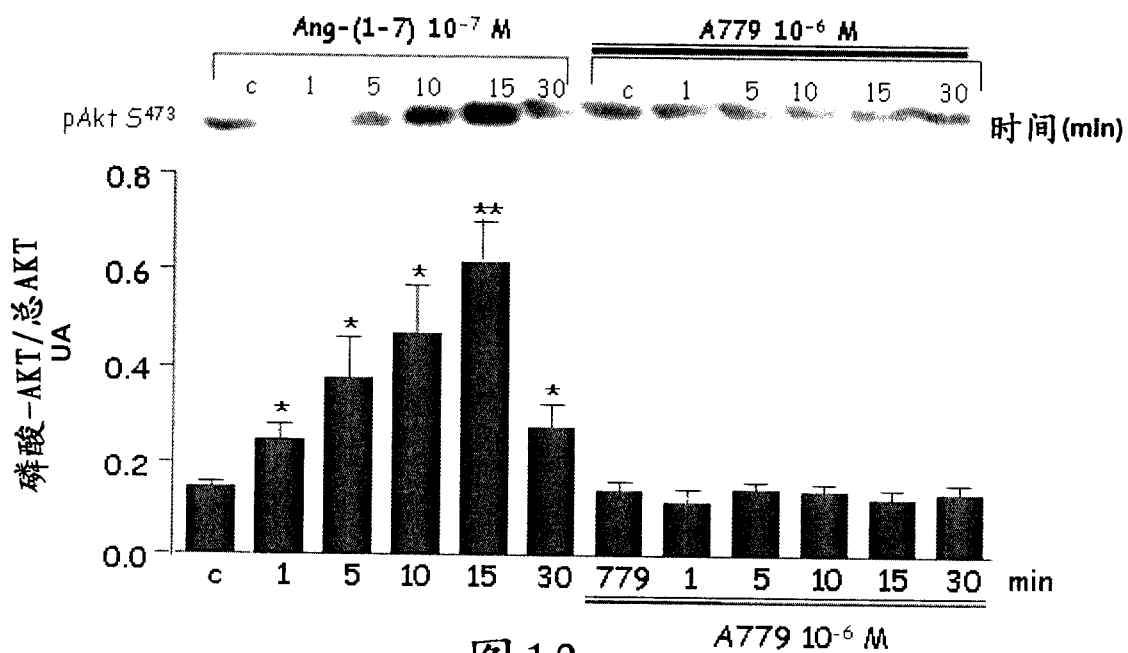


图 12

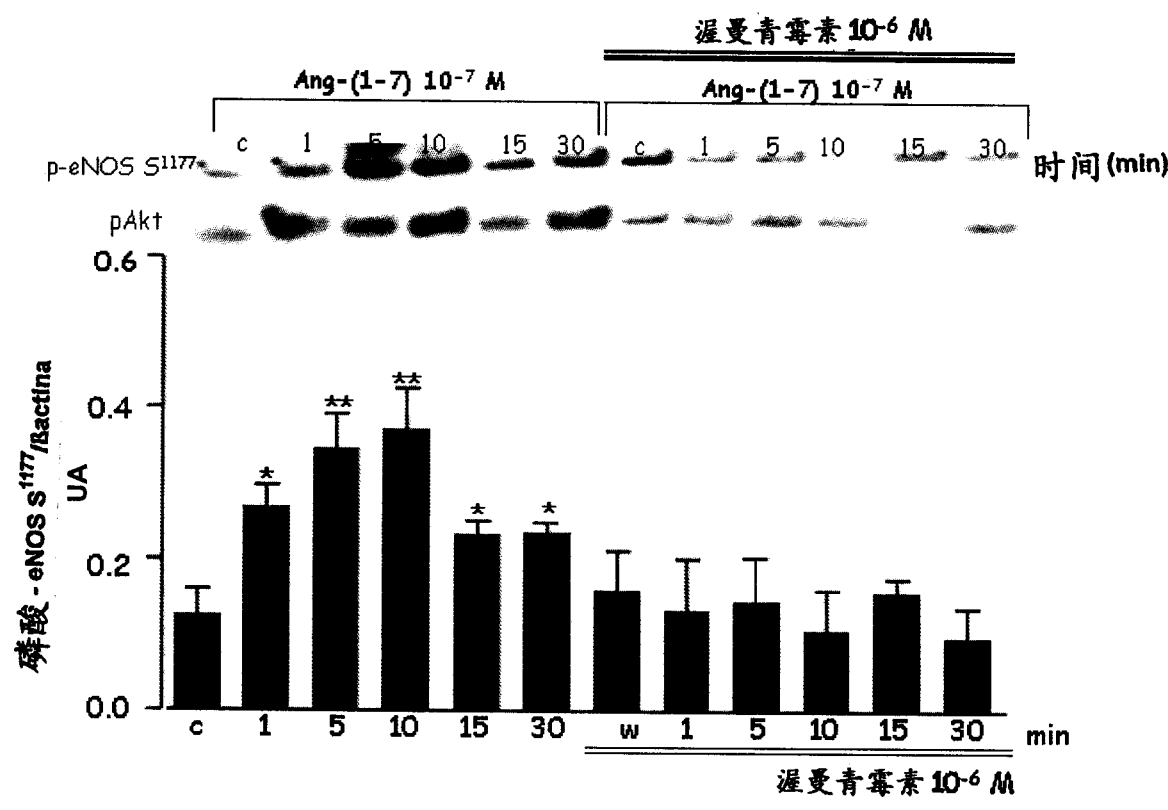


图13

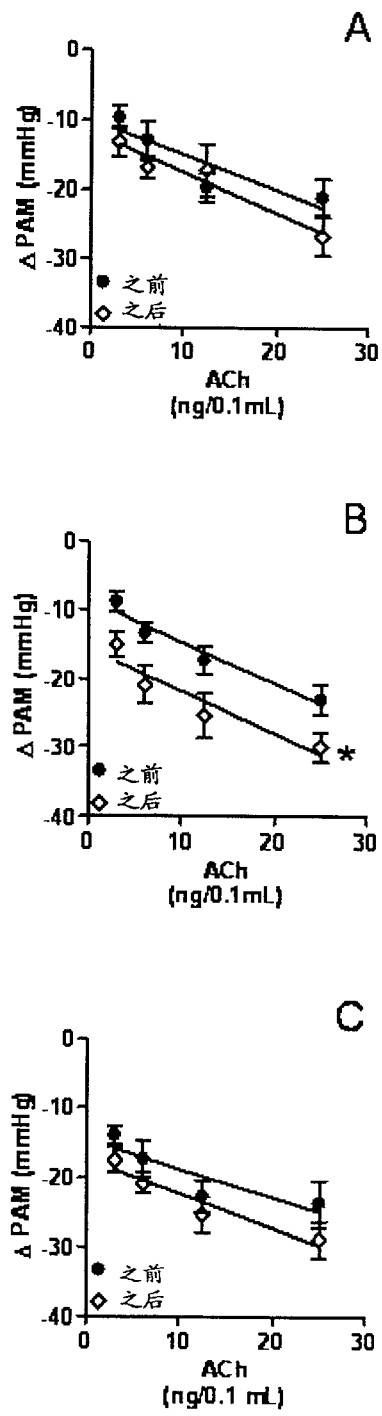


图 14

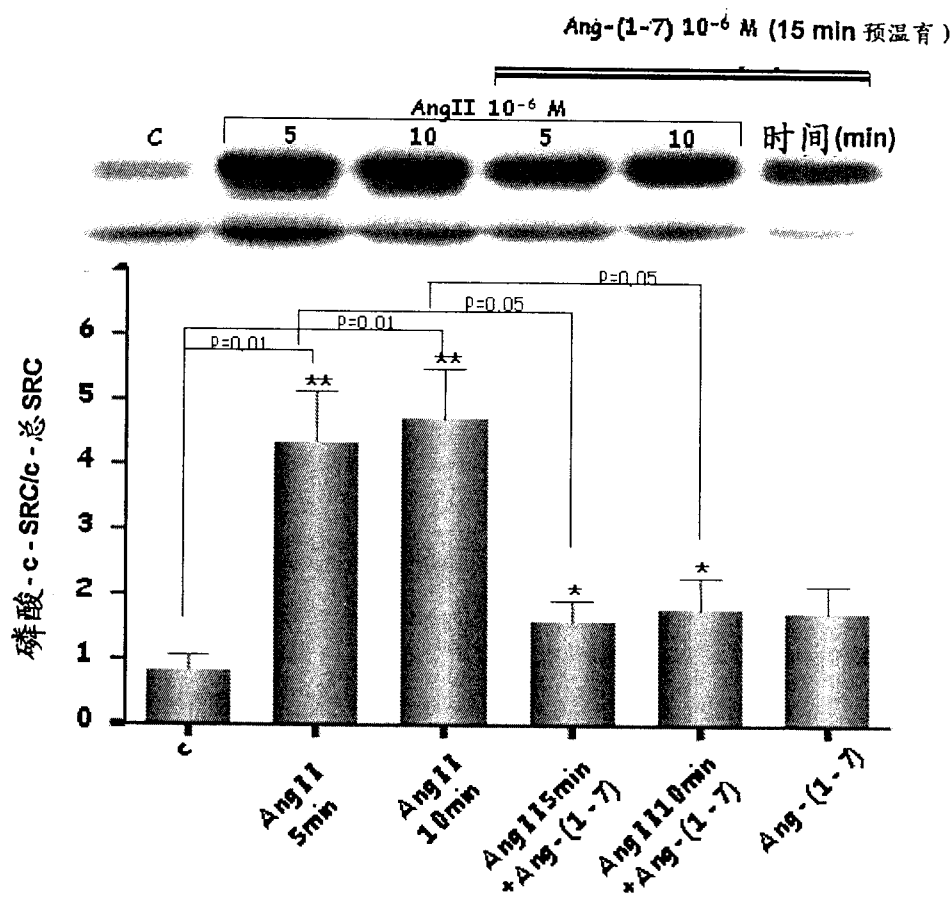


图 15

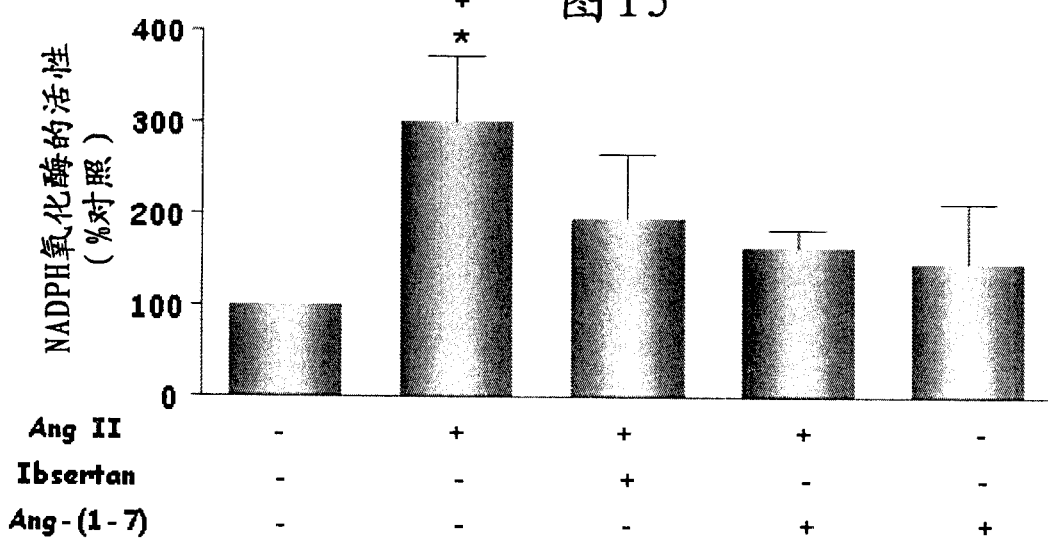


图 16

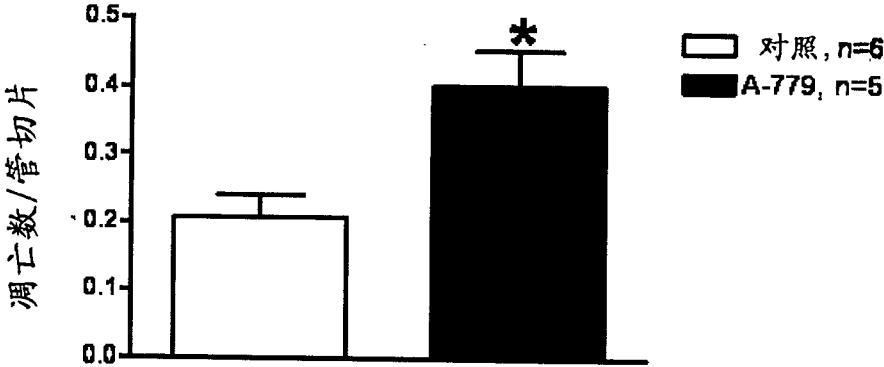


图17

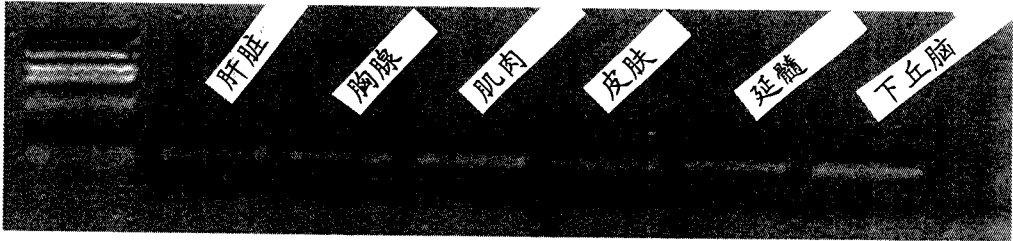


图18