(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 102791280 A
(43)申请公布日 2012.11.21

(21)申请号 201080065018.X
(22)申请日 2010.12.30
(30)优先权数据
61/291,699 2009.12.31 US
61/363,138 2010.07.09 US
(85)PCT申请进入国家阶段日
2012.08.30
(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2010/062538 2010.12.30
(87)PCT申请的公布数据
WO2011/082324 EN 2011.07.07
(71)申请人 康肽德生物医药技术有限公司
地址 摩纳哥摩纳哥市
(72)发明人 肯尼斯·博罗
D·特拉维斯·威尔逊
(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 李中奎
(51)Int.Cl.
A61K 38/07(2006.01)
A61P 9/10(2006.01)
A61P 13/12(2006.01)

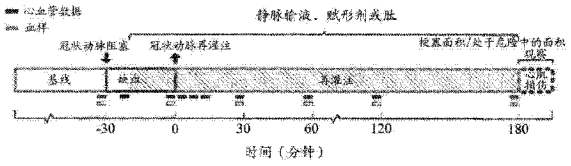
权利要求书 2 页 说明书 32 页 附图 6 页

(54)发明名称

用于预防或治疗血管阻塞损伤的方法

(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。所述方法包括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所述对象，其中所述肽为D-Arg-26-Dmt-Lys-Phe-NH_2（SS-31）。



CN 102791280 A

1. 一种用于治疗哺乳动物对象中的血管阻塞损伤的方法，所述方法包括：

(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给药至所述对象；和

(b)对所述对象进行血管重建步骤。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，在所述血管重建步骤之前将所述肽给药至所述对象。

3. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，在所述血管重建步骤之后将所述肽给药至所述对象。

4. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，在所述血管重建步骤期间和所述血管重建步骤之后将所述肽给药至所述对象。

5. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，在所述血管重建步骤之前、所述血管重建步骤期间和所述血管重建步骤之后将所述肽连续地给药至所述对象。

6. 根据权利要求 5 所述的方法，其中，在所述血管重建步骤之后将所述肽给药至所述对象至少 3 小时。

7. 根据权利要求 5 所述的方法，其中，在所述血管重建步骤之前大约 1 小时时，开始将所述肽给药至所述对象。

8. 根据权利要求 5 所述的方法，其中，在所述血管重建步骤之前大约 30 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。

10. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述对象患有 ST 段抬高心肌梗塞或非 ST 段抬高心肌梗塞。

11. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述对象需要血管成形术。

12. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述血管重建步骤选自：气囊血管成形术、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。

13. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述血管重建步骤是消除阻塞。

14. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述血管重建步骤是给药一种或多种血栓溶解剂。

15. 根据权利要求 14 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、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。

16. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述血管阻塞为心脏血管阻塞。

17. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述血管阻塞为颅内血管阻塞。

18. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述血管阻塞为肾血管阻塞。

19. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述血管阻塞选自：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。

20. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，与经受血管重建步骤但没有给药所述肽的可对比的对象相比，在给药所述肽的对象中，CK-MB、肌钙蛋白、N- 末端脑钠肽前体、葡萄糖和估算的肾小球滤过率中的一个或多个的水平下降。

21. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，医院中，与经受血管重建步骤但没有给药所述

肽的可对比的对象相比，在给药所述肽的对象中，在所述血管重建步骤之后的再梗塞、充血性心力衰竭、再次进行血管重建步骤、肾衰竭、或死亡的发生率下降。

22. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，与经受血管重建步骤但没有给药所述肽的可对比的对象相比，在给药所述肽的对象中，在所述血管重建步骤之后 6 个月之内的主要不良心血管事件、死亡、心脏死亡、或充血性心力衰竭发展的发生率下降。

用于预防或治疗血管阻塞损伤的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2009 年 12 月 31 日提交的第 61/291699 号美国临时专利申请和 2009 年 7 月 9 日提交的第 61/363138 号美国临时专利申请的优先权。这些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血管阻塞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哺乳动物对象中的急性心肌梗塞损伤。

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本发明的现有技术。

[0005] 通常通过促进受影响的血管中的血液流动来治疗血管阻塞。多年来已经研制出了多种外科或非外科介入步骤来打开病人中由于血管壁上的血小板或其他物质的堆积而导致的变窄的或阻塞的血管。这类步骤通常涉及将介入装置通常通过导管经皮肤导入动脉内腔中。这些血管重建步骤涉及例如气囊、血管内刀(旋切术)和血管内钻的装置。这些外科方法伴随有相当大的发病率和甚至死亡率，同时在许多情况下血管成形术类型的方法由于再发狭窄而复杂化。

[0006] 由于血液恢复流至缺血组织，而引起另外的并发症。这种现象通常被称作再灌注损伤，且可能比缺血更损害组织。具体地，通常由血液所传递给缺血组织区域的氧气和养分的缺乏，产生这样的情况：循环的恢复导致炎症和氧化损害，而非恢复正常功能。这种在细胞内形成的新的氧气供给，可能损害细胞蛋白、DNA 和细胞质膜。这反过来引起另外的自由基的释放，导致进一步的细胞损害。

发明内容

[0007] 本发明的技术总体上涉及通过将治疗有效量的芳香族阳离子肽给药至需要治疗或预防的对象来治疗或预防哺乳动物中的血管阻塞损伤。本发明技术还涉及通过将治疗有效量的芳香族阳离子肽给药至需要治疗或预防的对象来治疗或预防哺乳动物中的心脏血管阻塞损伤。

[0008] 在一个方面中，本发明提供了(a)一种用于治疗或预防血管阻塞损伤的方法，所述方法包括将治疗有效量的芳香族阳离子肽或其药学上可接受的盐给药至所述对象；和(b)对所述对象执行血管重建步骤。在一些实施方式中，所述芳香族阳离子肽是具有以下特点的肽：

[0009] 至少一个净正电荷；

[0010] 最少四个氨基酸；

[0011] 最多约 20 个氨基酸；

[0012] 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：$3p_m$ 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：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，哺乳动物对象是人类。

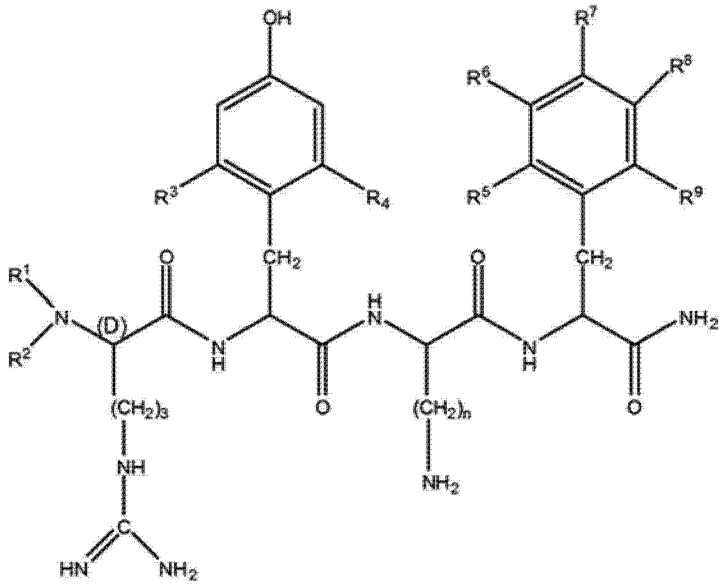
[0013] 在一个实施方式中，$2p_m$ 是小于或等于 r+1 的最大数，且 a 可以等于 p_t。所述芳香族阳离子肽可以是具有最少两个正电荷或最少三个正电荷的可溶于水的肽。

[0014] 在一个实施方式中，所述肽包括一种或多种非自然存在的氨基酸，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。肽可以最多有约 6 个、最多约 9 个或者最多约 12 个氨基酸。

[0015] 在一个实施方式中，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（也被称为 SS-31）。

[0016] 在一个实施方式中，所述肽由下式 I 所定义：

[0017]

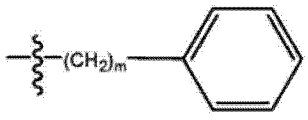


[0018] 其中 R^1 和 R^2 各独立地选自：

[0019] （i）氢；

[0020] （ii）线性或支链的 C_1-C_6 的烷基；

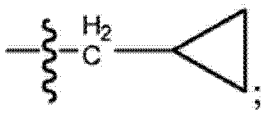
（iii）

[0021] 

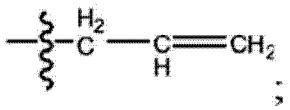
其中 m=1-3；

[0022]

(iv)



(v)



[0023] R^3 和 R^4 各独立地选自：

[0024] (i)氢；

[0025] (ii)线性或支链的 C_1-C_6 的烷基；

[0026] (iii)C_1-C_6 的烷氧基；

[0027] (iv)氨基；

[0028] (v)C_1-C_4 的烷基氨基；

[0029] (vi)C_1-C_4 的二烷基氨基；

[0030] (vii)硝基；

[0031] (viii)羟基；

[0032] (ix)卤素，其中“卤素”包括氯、氟、溴和碘；

[0033] R^5、R^6、R^7、R^8 和 R^9 各独立地选自：

[0034] (i)氢；

[0035] (ii)线性或支链的 C_1-C_6 的烷基；

[0036] (iii)C_1-C_6 的烷氧基；

[0037] (iv)氨基；

[0038] (v)C_1-C_4 的烷基氨基；

[0039] (vi)C_1-C_4 的二烷基氨基；

[0040] (vii)硝基；

[0041] (viii)羟基；

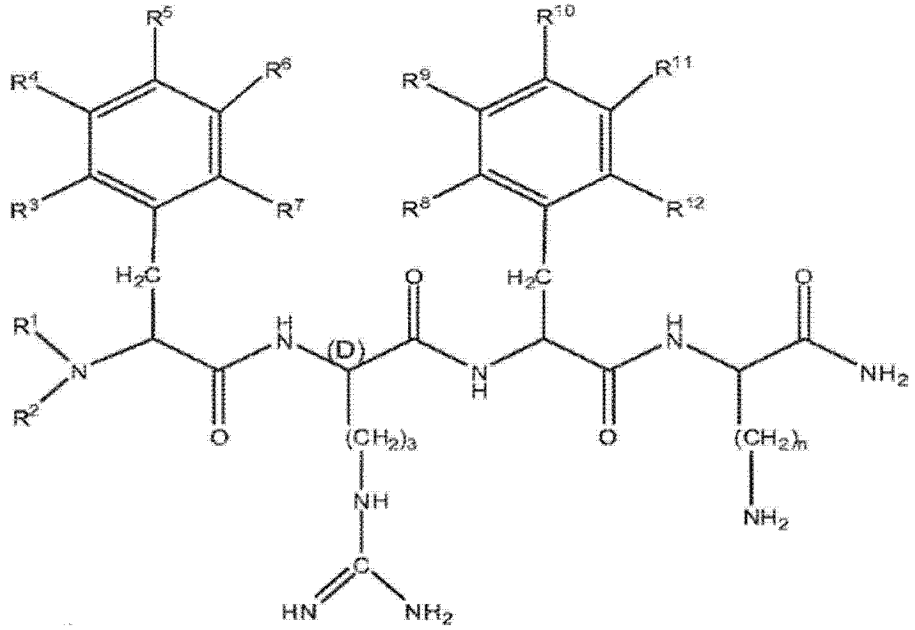
[0042] (ix)卤素，其中“卤素”包括氯、氟、溴和碘；且

[0043] n 为 1 到 5 的整数。

[0044] 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、R^9 都是氢；且 n 为 4。

[0045] 在一个实施方式中，肽由下式 II 所定义：

[0046]

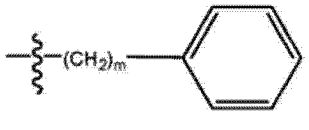


[0047] 其中，R^1 和 R^2 各独立地选自：

[0048] （i）氢；

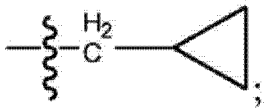
[0049] （ii）线性或支链的 C_1-C_6 的烷基；

（iii）

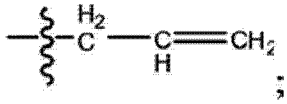
[0050]  其中 m=1-3；

[0051]

（iv）



（v）



[0052] 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：

[0053] （i）氢；

[0054] （ii）线性或支链的 C_1-C_6 的烷基；

[0055] （iii）C_1-C_6 的烷氧基；

[0056] （iv）氨基；

[0057] （v）C_1-C_4 的烷基氨基；

[0058] （vi）C_1-C_4 的二烷基氨基；

[0059] （vii）硝基；

[0060] （viii）羟基；

[0061] (ix)卤素,其中“卤素”包括氯、氟、溴和碘;以及

[0062] n为1到5的整数。

[0063] 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。

[0064] 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。

[0065] 在一个实施方式中,在缺血之前将所述肽给药至对象。在一个实施方式中,在再灌注缺血组织之前,将所述肽给药至对象。在一个实施方式中,大约在再灌注缺血组织时将所述肽给药至对象。在一个实施方式中,在再灌注缺血组织之后将所述肽给药至对象。

[0066] 在一个实施方式中,在血管重建步骤之前将所述肽给药至所述对象。在另一实施方式中,在血管重建步骤之后,将所述肽给药至所述对象。在另一实施方式中,在血管重建步骤期间和血管重建步骤之后将所述肽给药至对象。在另一实施方式中,在血管重建步骤之前、血管重建步骤期间和血管重建步骤之后,将所述肽连续给药至所述对象。

[0067] 在一个实施方式中,在血管重建(即再灌注缺血组织)之前至少5分钟时、至少10分钟时、至少30分钟时、至少1小时时、至少3小时时、至少5小时时、至少8小时时、至少12小时时或至少24小时时开始将所述肽给药至对象。在一实施方式中,在血管重建步骤之前约5-30分钟时、约10-60分钟时、约10-90分钟时或约10-120分钟时,将所述肽给药至对象。在一个实施方式中,将所述肽给药至对象直至在血管重建步骤之后约5-30分钟时、约10-60分钟时、约10-90分钟时或约10-120分钟时或者约10-180分钟时。

[0068] 在一个实施方式中,在血管重建步骤(即再灌注缺血组织)之后,将所述肽给药至所述对象至少30分钟、至少1小时、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,在血管重建步骤(即再灌注缺血组织)之后,给药肽的持续时间为约30分钟、约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约8小时、约12小时或约24小时。

[0069] 在一个实施方式中,在再灌注之前约1分钟到30分钟(即,再灌注之前约5分钟、约10分钟、约20分钟或约30分钟)时开始将所述肽以静脉输注的方式给药至所述对象,且在再灌注之后持续约1小时到24小时(即,再灌注之后约1小时、约2小时、约3小时、或约4小时)。在一个实施方式中,在再灌注组织之前,所述对象接受静脉推注。在一个实施方式中,所述对象在再灌注期之后继续持久地接受肽,即在再灌注期之后持续约1-7天、约1-14天、约1-30天。在该时间段期间,可以通过任何途径将所述肽给药,例如皮下给药或静脉给药。

[0070] 在各种实施方式中,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,血管重建步骤选自:气囊血管成形术、支架插入、经皮冠状动脉介入(PCI)、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,血管重建步骤指消除阻塞。在一个实施方式中,血管重建步骤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。

[0071] 在一个实施方式中,血管阻塞为心脏血管阻塞。在另一实施方式中,血管阻塞为颅

内血管阻塞。在另一实施方式中，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。

附图说明

[0072] 图 1 示出用在实施例中的动物的研究设计；

[0073] 图 2A 和图 2B 示出了表示采用假手术处理（应用结扎线，但未上紧）的兔子的梗塞大小的数据。图 2A 为利用安慰剂治疗的假手术兔子的心脏切片的照片以及突出显示了梗塞大小的计算机生成图像。图 2B 为利用肽治疗的假手术兔子的心脏切片的照片以及突出显示了梗塞大小的计算机生成图像；

[0074] 图 3A 和图 3B 示出了表示诱导心肌缺血且利用安慰剂治疗的两个不同的对照兔子的梗塞大小的数据。每个图示出了心脏切片的照片和突出显示了梗塞大小的计算机生成图像；

[0075] 图 4A、4B、4C、4D 和 4E 示出了表示诱导心肌缺血且利用示例性的芳香族阳离子肽治疗的五个不同的兔子的梗塞大小的数据。每个图示出了心脏切片的照片和突出显示了梗塞大小的计算机生成图像；

[0076] 图 5 为示出关于对照组兔子和测试组兔子的梗塞面积与左心室面积的比率的图表；

[0077] 图 6 为示出关于对照组兔子和测试组兔子的梗塞面积与危险面积的比率的图表。

具体实施方式

[0078] 应当明白，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。

[0079] 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。

[0080] 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。

[0081] 本文中使用的将制剂、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。“给药”包括自己给药和由其他人给药。

[0082] 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。

[0083] 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。专业的技术人员将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血管阻塞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血管阻塞损伤和血管重建的生理作用的平均水平。

[0084] 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。

[0085] “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。

[0086] 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。

[0087] 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，对象显示出血管阻塞损伤的一种或多种症状和症候的可以观察到的和 / 或测定到的减少和消失，则对象的血管阻塞损伤得到成功地“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。

[0088] 本文中使用的“预防”失调或病症指的是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受伤的器官的血液的减少以及随后的恢复的有害效应。预防并不意味着对象在以后的生活中不再形成病症，仅仅指发生的可能性减小。

[0089] 预防方法或治疗方法

[0090] 本发明涉及通过将给药某芳香族阳离子肽与血管重建步骤联合来治疗或预防血

管阻塞损伤。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。还提供了一种用于治疗对象的心肌梗塞以预防再灌注对心脏的损伤的方法。

[0091] 在另一实施方式中，在缺血期间和缺血之后将所述肽给药至所述对象。在另一实施方式中，在缺血之前、缺血期间和缺血之后将所述肽连续给药至所述对象。在另一实施方式中，在再灌注期间和再灌注之后将所述肽给药至所述对象。在另一实施方式中，在再灌注之前、再灌注期间和再灌注之后将所述肽连续给药至所述对象。在一实施方式中，从再灌注前那一刻开始至再灌注后 1-3 小时将所述肽以连续的静脉输注的方式给药至所述对象。在此之后，可通过任何给药途径将所述肽长期给药至所述对象。

[0092] 在一个实施方式中，在血管重建步骤之前将所述肽给药至所述对象。在另一实施方式中，在血管重建步骤之后将所述肽给药至所述对象。在另一实施方式中，在血管重建步骤期间和血管重建步骤之后将所述肽给药至所述对象。在另一实施方式中，在血管重建步骤之前、血管重建步骤期间和血管重建步骤之后将所述肽连续给药至所述对象。在另一实施方式中，在 AMI 和 / 或血管重建步骤之后将所述肽定期地（即长期地）给药至所述对象。在一实施方式中，在血管重建步骤之后，将所述肽持续至少一周、至少一个月或至少一年地给药至所述对象。

[0093] 可使用各种方法来评估芳香族阳离子肽的功效，包括心脏 MRI（磁共振成像）。生物标记物包括肌钙蛋白、肌酸激酶（CK）、乳酸脱氢酶（LDH）、和糖原磷酸化酶同功酶 BB。肌钙蛋白是对于心肌损害最为敏感且特异性的标记物。它的血浆峰浓度在损害后 12 小时处，且具有长达 7 天的延迟释放。用于肌钙蛋白 I 和肌钙蛋白 T 的市售试剂盒是可用的。当骨骼肌损害不存在时，肌酸激酶（CK）是特异性的心脏标记物。它的峰值出现在损害后 10-14 小时时，且 2-3 天回复正常。

[0094] 所述芳香族阳离子肽可溶于水并且强极性。除了这些性质之外，所述肽能够容易地穿过细胞膜。芳香族阳离子肽通常最少包括通过肽键而共价键连接的三个氨基酸或最少包括通过肽键而共价键连接的四个氨基酸。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键连接的大约二十个氨基酸。合适地，氨基酸的最大数目为约 12 个、更优选地为约 9 个且最优选地为约 6 个。

[0095] 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）。

[0096] 所述肽可选地包括一种或多种非天然存在的氨基酸。最适宜地，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。

[0097] 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 α - 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。

[0098] 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)。

[0099] 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。

[0100] 非天然存在的氨基酸对常见的蛋白酶适宜地为抵抗性的，和 / 或为不敏感的。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。

[0101] 为了使蛋白酶灵敏度最小，肽可具有小于 5 个、小于 4 个、小于 3 个、或小于 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。最适宜地，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适宜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。

[0102] 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将在下文称为(p_m)。肽中的氨基酸残基的总数目将在下文称为(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。

[0103] 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。

[0104] 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 相互抵消。作为计算净电荷的示例，肽 Tyr-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。

[0105] 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：

[0106] 表 1. 氨基酸数目和净正电荷($3p_m \leqslant p+1$)

[0107]

(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

[0108] 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：

[0109] 表 2. 氨基酸数目和净正电荷($2p_m \leqslant p+1$)

[0110]

(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

[0111] 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、适宜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。

[0112] 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将称为(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)。

[0113] 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：

[0114] 表 3. 芳香基团和净正电荷($3a \leqslant p_t+1$ 或 $a=p_t=1$)

[0115]

(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

[0116] 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：

[0117] 表 4. 芳香基团和净正电荷($2a \leqslant p_t+1$ 或 $a=p_t=1$)

[0118]

(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

[0119] 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。

[0120] 羧基且尤其是 C- 末端氨基酸的末端羧基优选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。

[0121] 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。

[0122] 芳香族阳离子肽包括但不限于以下肽的示例：

[0123] Lys-D-Arg-Tyr-NH_2

[0124] Phe-D-Arg-His

[0125] D-Tyr-Trp-Lys-NH_2

[0126] Trp-D-Lys-Tyr-Arg-NH_2

[0127] Tyr-His-D-Gly-Met

[0128] Phe-Arg-D-His-Asp

[0129] Tyr-D-Arg-Phe-Lys-Glu-NH_2

[0130] Met-Tyr-D-Lys-Phe-Arg

[0131] D-His-Glu-Lys-Tyr-D-Phe-Arg

[0132] Lys-D-Gln-Tyr-Arg-D-Phe-Trp-NH_2

[0133] Phe-D-Arg-Lys-Trp-Tyr-D-Arg-His

[0134] Gly-D-Phe-Lys-Tyr-His-D-Arg-Tyr-NH_2

[0135] Val-D-Lys-His-Tyr-D-Phe-Ser-Tyr-Arg-NH_2

[0136] Trp-Lys-Phe-D-Asp-Arg-Tyr-D-His-Lys

[0137] Lys-Trp-D-Tyr-Arg-Asn-Phe-Tyr-D-His-NH_2

[0138] Thr-Gly-Tyr-Arg-D-His-Phe-Trp-D-His-Lys

[0139] Asp-D-Trp-Lys-Tyr-D-His-Phe-Arg-D-Gly-Lys-NH_2

[0140] D-His-Lys-Tyr-D-Phe-Glu-D-Asp-D-His-D-Lys-Arg-Trp-NH_2

[0141] Ala-D-Phe-D-Arg-Tyr-Lys-D-Trp-His-D-Tyr-Gly-Phe

[0142] Tyr-D-His-Phe-D-Arg-Asp-Lys-D-Arg-His-Trp-D-His-Phe

[0143] Phe-Phe-D-Tyr-Arg-Glu-Asp-D-Lys-Arg-D-Arg-His-Phe-NH_2

[0144] Phe-Try-Lys-D-Arg-Trp-His-D-Lys-D-Lys-Glu-Arg-D-Tyr-Thr

[0145] Tyr-Asp-D-Lys-Tyr-Phe-D-Lys-D-Arg-Phe-Pro-D-Tyr-His-Lys

[0146] Glu-Arg-D-Lys-Tyr-D-Val-Phe-D-His-Trp-Arg-D-Gly-Tyr-Arg-D-Met-NH_2

[0147] Arg-D-Leu-D-Tyr-Phe-Lys-Glu-D-Lys-Arg-D-Trp-Lys-D-Phe-Tyr-D-Arg-Gly

[0148] D-Glu-Asp-Lys-D-Arg-D-His-Phe-Phe-D-Val-Tyr-Arg-Tyr-D-Tyr-Arg-His-Phe-NH_2

[0149] Asp-Arg-D-Phe-Cys-Phe-D-Arg-D-Lys-Tyr-Arg-D-Tyr-Trp-D-His-Tyr-D-Phe-Lys-Phe

[0150] His-Tyr-D-Arg-Trp-Lys-Phe-D-Asp-Ala-Arg-Cys-D-Tyr-His-Phe-D-Lys-Tyr-His-Ser-NH_2

[0151] Gly-Ala-Lys-Phe-D-Lys-Glu-Arg-Tyr-His-D-Arg-D-Arg-Asp-Tyr-Trp-D-His-Trp-His-D-Lys-Asp

[0152] 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

[0153] 在一实施方式中，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的。例如，在短期治疗期间，例如急性疾病或病症，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。

[0154] 可替选地，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当的。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。

[0155] 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)。

[0156] 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细胞质膜(Zhao等,J Pharmacol Exp Ther.,304:425-432,2003)

[0157] 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)。

[0158] 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。

[0159] 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:

[0160] (a)非极性氨基酸:Ala(A)Ser(S)Thr(T)Pro(P)Gly(G)Cys(C);

[0161] (b)酸性氨基酸:Asn(N)Asp(D)Glu(E)Gln(Q);

[0162] (c)碱性氨基酸:His(H)Arg(R)Lys(K);

[0163] (d)疏水性氨基酸:Met(M)Leu(L)Ile(I)Val(V);以及

[0164] (e)芳香族氨基酸:Phe(F)Tyr(Y)Trp(W)His(H)。

[0165] 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。

[0166] 在一些实施方式中,在芳香族阳离子肽中一个或多个天然产生的氨基酸被氨基酸类似物所取代。肽的示例包括但不限于表5中所示的芳香族阳离子肽。

[0167] 表5 具有μ型阿片活性的肽类似物

[0168]

[0169]

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

17

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
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

[0170]

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
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	NH2
Mmt	D-Arg	Phe	Orn	NH2
Mmt	D-Arg	Phe	Dab	NH2
Mmt	D-Arg	Phe	Dap	NH2
Tmt	D-Arg	Phe	Lys	NH2

Tmt	D-Arg	Phe	Orn	NH2
Tmt	D-Arg	Phe	Dab	NH2
Tmt	D-Arg	Phe	Dap	NH2
Hmt	D-Arg	Phe	Lys	NH2
Hmt	D-Arg	Phe	Orn	NH2
Hmt	D-Arg	Phe	Dab	NH2
Hmt	D-Arg	Phe	Dap	NH2
Mmt	D-Lys	Phe	Lys	NH2
Mmt	D-Lys	Phe	Orn	NH2
Mmt	D-Lys	Phe	Dab	NH2
Mmt	D-Lys	Phe	Dap	NH2
Mmt	D-Lys	Phe	Arg	NH2
Tmt	D-Lys	Phe	Lys	NH2
Tmt	D-Lys	Phe	Orn	NH2
Tmt	D-Lys	Phe	Dab	NH2
Tmt	D-Lys	Phe	Dap	NH2
Tmt	D-Lys	Phe	Arg	NH2
Hmt	D-Lys	Phe	Lys	NH2
Hmt	D-Lys	Phe	Orn	NH2
Hmt	D-Lys	Phe	Dab	NH2
Hmt	D-Lys	Phe	Dap	NH2
Hmt	D-Lys	Phe	Arg	NH2
Mmt	D-Lys	Phe	Arg	NH2
Mmt	D-Orn	Phe	Arg	NH2

Mmt	D-Dab	Phe	Arg	NH2
Mmt	D-Dap	Phe	Arg	NH2
Mmt	D-Arg	Phe	Arg	NH2
Tmt	D-Lys	Phe	Arg	NH2
Tmt	D-Orn	Phe	Arg	NH2
Tmt	D-Dab	Phe	Arg	NH2
Tmt	D-Dap	Phe	Arg	NH2
Tmt	D-Arg	Phe	Arg	NH2
Hmt	D-Lys	Phe	Arg	NH2
Hmt	D-Orn	Phe	Arg	NH2
Hmt	D-Dab	Phe	Arg	NH2
Hmt	D-Dap	Phe	Arg	NH2
Hmt	D-Arg	Phe	Arg	NH2

[0171]

[0172] Dab= 二氨丁基

[0173] Dap= 二氨基丙酸

[0174] Dmt= 二甲基酪氨酸

[0175] Mmt=2’- 甲基酪氨酸

[0176] Tmt=N,2’,6’- 三甲基酪氨酸

[0177] Hmt=2’- 羟基 -6’- 甲基酪氨酸

[0178] dnsDap=β- 丹磺酰 -L-α,β- 二氨基丙酸

[0179] atnDap=β- 邻氨基苯甲酰 -L-α,β- 二氨基丙酸

[0180] Bio= 生物素

[0181] 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。

[0182] 表 6. 缺少 μ 型阿片活性的肽类似物

[0183]

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	NH2
Cha	D-Arg	Phe	Lys	NH2
Ala	D-Arg	Phe	Lys	NH2

[0184]

[0185] Cha= 环己基丙氨酸

[0186] 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。

[0187] 还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)。

[0188] 芳香族阳离子肽的预防用途和治疗用途

[0189] 概述。本文中描述的芳香族阳离子肽可用于预防或治疗疾病。具体地，本发明提供了用于治疗处于血管阻塞损伤或缺血再灌注损伤的危险中(或易得血管阻塞损伤或缺血再灌注损伤)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缺血再灌注损伤。

[0190] 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是否需要给药该芳香族阳离子肽以用于治疗。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缺血再灌注损伤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。

[0191] 预防方法。一方面，本发明提供了一种通过将预防血管阻塞损伤发生或发展的芳香族阳离子肽给药至对象，来预防对象的血管阻塞损伤的方法。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血管阻塞损伤的风险中的对象。在预防性应用中，将有

效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的风险、降低该疾病的严重程度或延迟该疾病发病，包括疾病的生物化学的、组织学的和 / 或行为学的病症、该疾病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。

[0192] 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或缺血再灌注损伤的方法。在治疗性应用中，将一定量的组合物或药物给药至疑似患上这样的疾病的对象或者已患有这样的疾病的对象，来充分消除或者至少部分地抑制所述疾病的病症，包括其并发症和该疾病发展中的中间病理表现型。就这点而论，本发明提供了治疗患有缺血再灌注损伤的个体的方法。

[0193] 给药模式和有效剂量

[0194] 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。

[0195] 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测定有效量。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。

[0196] 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。

[0197] 本文描述的芳香族阳离子肽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。所述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。

[0198] 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。

[0199] 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。

[0200] 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,将优选的是,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。

[0201] 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中,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。

[0202] 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。

[0203] 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。

[0204] 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。

[0205] 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。

[0206] 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)）。

[0207] 高分子微球持续释放剂的示例在 PCT 公布 WO 99/15154（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 WO 96/40073(Zale 等)和 PCT 公布 WO 00/38651 (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 WO 96/40073 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。

[0208] 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。

[0209] 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 Biotechnology 6:698-708(1995);Weiner 的“Liposomes for Protein Delivery:Selecting Manufacture and Development Processes”, Immunomethods 4(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)。

[0210] 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/ED 50。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。

[0211] 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。

[0212] 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。

[0213] 在一示例实施方式中，通过以约 0.001 至约 1mg/kg/hr，即约 0.005、约 0.01、约 0.025、约 0.05、约 0.10、约 0.25 或约 0.5mg/kg/hr 的静脉输液将肽给药至对象。静脉输液可以在组织再灌注之前或组织再灌注之后开始。在一些实施方式中，对象可在组织再灌注之前接受静脉推注。

[0214] 在一些实施方式中，芳香族阳离子肽的治疗有效的量可以限定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。

[0215] 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 0.001mg/kg/h 到约 0.5mg/kg/h、合适地从约 0.01mg/kg/h 到约 0.1mg/kg/h。在一个实施方式中，中剂量提供为从约 0.1mg/kg/h 到约 1.0mg/kg/h，合适地从约 0.1mg/kg/h 到约 0.5mg/kg/h。在一个实施方式中，高剂量提供为从约 0.5mg/kg/h 到约 10mg/kg/h，合适地从约 0.5mg/kg/h 到约 2mg/kg/h。

[0216] 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。

[0217] 根据本发明的方法治疗的哺乳动物可以是任何动物，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。

[0218] 实施例

[0219] 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。

[0220] 实施例 1. 芳香族阳离子肽在保护兔模型免受血管阻塞损伤中的作用。

[0221] 研究了芳香族阳离子肽在保护兔模型免受血管阻塞损伤中的作用。通过该实施例证实了肽 D-Arg-2’6’-Dmt-Lys-Phe-NH_2 的心肌保护作用。

[0222] 实验方法

[0223] 在该研究中使用新西兰白兔。该兔是雄性的且大于 10 周龄。设置动物房间的环境控制以保持 61° F 到 72° F 的温度和在 30% 与 70% 之间的相对湿度。每小时记录且每天监控室温和湿度。动物房间内每小时约 10-15 次换气。光周期为 12 小时光照 /12 小时黑暗（借助于荧光照明），必要的调节剂量和数据收集期间除外。进行常规地日常观察。从到达实验室开始，每天提供大约 180 克的兔食，即经过认证的食物 Harlan Teklad(2030C)。此外，每周三次地将新鲜水果和蔬菜提供给兔子。

[0224] 肽 D-Arg-2’6’-Dmt-Lys-Phe-NH_2（无菌冻干粉）用作试验药品。将给药溶液配制

成不大于 1mg/ml，且以恒定的速率（例如，50μL/Kg/min）通过持续输注（IV）输送。生理盐水（0.9% 的 NaCl）用作对照。

[0225] 在全身麻醉的情况下将试验药品 / 赋形剂药品通过静脉提供，以模拟 AMI 和 PTCA 的临床环境中所期望的给药途径。利用 Kd Scientific 输液泵（Holliston，MA 01746）以恒定量（例如，50μL/Kg/min）通过外周静脉进行静脉输液。

[0226] 该研究接着是预定的安慰剂和假对照设计。简言之，将 10-20 个健康的、驯化的雄性兔子分配给三个研究组中的一个（每组大约有 2-10 个动物）。组 A（n=10，CTRL/PLAC）包括以赋形剂治疗的动物（赋形剂；VEH，IV）；组 B（n=10，被治疗的）包括以肽治疗的动物；组 C（n=2，假手术）包括利用赋形剂（赋形剂；VEH，IV）或肽治疗的假手术时间对照。

[0227] 表 7. 研究设计 .

[0228]

组	研究组	缺血时间	再灌注时间
A	对照/安慰剂	30 分钟 （最后 20 分钟采用安慰剂）	安慰剂，180 分钟
B	肽	30 分钟 （最后 20 分钟采用肽）	肽，180 分钟
C	假手术组 （没有缺血的手术）	0 分钟 （最后 20 分钟采用安慰剂）	安慰剂（赋形剂） 或肽，180 分钟

[0229] 在所有情况下，在 30 分钟的缺血性损伤（冠状动脉闭塞）开始之后的大约 10 分钟时开始进行治疗且持续至再灌注之后 3 小时。在所有情况下，在缺血之前和缺血期间，以及再灌注后至 180 分钟（3 小时）监控心血管功能。在再灌注之后 3 小时时终止试验（研究结束）；评估该时间点时的不可逆的心肌损伤（通过组织形态计量学获得梗塞面积），并且该不可逆的心肌损伤是该研究的主要终点。该研究设计概括在表 7 和图 1 中。

[0230] 麻醉 / 手术准备。通过肌肉注射（IM）氯胺酮（~35mg/kg-50mg/kg）/ 甲苯噻嗪（~5mg/kg-10mg/kg）混合物来引起全身麻醉。将静脉导管置于外周静脉（例如，耳朵）中以给药麻醉剂。为了保留自主神经功能，通过持续注入异丙酚（~8mg/kg/ 小时 -30mg/kg/ 小时）与氯胺酮（~1.2mg/kg/ 小时 -2.4mg/kg/ 小时）来维持麻醉。通过气管切开术（下腹正中切口）来放置有囊气管导管，且该有囊气管导管用来通过容量转换型动物呼吸机（~40 次呼吸 / 分钟，呼吸容量为 ~12.5ml/kg）以机械方式向肺通有 95% 的 O_2/5% 的 CO_2 的混合物，以将 $PaCO_2$ 值主要维持在生理范围内。

[0231] 当达到麻醉的手术平面时，放置形成两个标准心电图（ECG）导联（例如，导联 II，aVF，V2）的经胸廓的电极或针状电极。颈部的切开使颈动脉暴露，该颈动脉被与周围组织分开、从周围组织分离出来且插有双传感器高保真度微压计导管（Millar Instruments）；将该导管的顶端逆行地经过主动脉瓣推入左心室（LV），以同时确定主动脉（根，近端传感器）和左心室（远端传感器）的压力。颈部的切开还使颈静脉暴露，该颈静脉插有空注射导管（用于采血）。最后，将另外的静脉导管放置在外周静脉（例如，耳朵）中以给药赋形剂药品 / 试验药品。

[0232] 随后，以右侧卧的方式放置动物，且通过中线胸廓切开术和心包切开术使心脏暴露出来。将心脏搁置在心包支架上以露出左回旋支（LCX）冠状动脉和左前降支（LAD）冠状动脉。将结扎丝线围绕近端 LAD 松散地放置（利用锥形尖端的针），且取决于每个动物的冠

状动脉，必要的话，围绕 LCX 边缘冠状动脉的一个或多个分支放置。上紧这些勒除器（通过小段的聚乙烯管）使得左心室心肌的一部分暂时缺血。

[0233] 一旦完成仪器测试，则检验 / 确保持续至少 30 分钟的血液动力学稳定以及合适的麻醉深度。随后，利用阿曲库铵（~0.1mg/kg/hr 到 0.2mg/kg/hr，静脉注射）麻痹动物，以促进血液动力学稳定 / 呼吸稳定。在阿曲库铵给药之后，使用自发性多动症的症状和 / 或 BIS 值的变化来评估麻醉深度和 / 或用来加量滴定静脉麻醉药。

[0234] 试验方案 / 心血管数据收集。紧接着手术准备之后，对动物进行肝素化 (100 单位的肝素 /kg/h，静脉推注)，在血液动力学稳定（持续约 30 分钟）之后，收集基线数据，基线数据包括用于评估心肌酶 / 生物标志物以及试验药品浓度的静脉血。

[0235] 在血液动力学稳定以及基线测量之后，通过上紧 LAD/LCX 冠状动脉勒除器，使所述动物经受 30 分钟的急性的缺血性损伤。通过 LAD/LCX 的远端分布的颜色（即，青紫）变化以及通过心电图变化的开始来可视地证实心肌缺血。大约在 10 分钟的缺血之后，所述动物接受持续灌注赋形剂（生理盐水）或肽；在开始治疗后，使缺血再持续 20 分钟（即，总共 30 分钟）。随后（即，在 30 分钟的缺血之后，其中在该 30 分钟中，最后 20 分钟同时进行治疗），松开冠状动脉勒除器，且使先前缺血的心肌被再灌注 3 小时。在整个再灌注时间段中继续进行利用赋形剂或肽的治疗。应当注意到，在假手术（sham-operated）的动物中，在缺血 / 再灌注开始时，操控血管勒除器，但并不上紧也不放松。

[0236] 在 11 个预定的时间点处进行心血管数据收集：仪器测试 / 稳定之后（即，基线）、10 分钟的缺血之后、和 30 分钟的缺血之后、以及再灌注后的 5 分钟时、再灌注后的 15 分钟时、再灌注后的 30 分钟时、再灌注后的 60 分钟时、再灌注后的 120 分钟时、以及再灌注后的 180 分钟时。在整个试验中，利用数据采集系统（IOX；EMKA Technologies）持续地对模拟信号进行数字采样（1000Hz）并记录，且在以上提及的时间点确定下列参数：（1）来自双极经胸心电图（例如，导联 II，aVF）：心律（心律不齐量化 / 等级化）、RR、PQ、QRS、QT、QTc、短期 QT 不稳定性以及 QT:TQ（整复性）；（2）来自主动脉中的固态压力计（Millar）：动脉 / 主动脉压力（AoP）；以及（3）来自 LV 中的固态压力计（Millar）：左心室压力（ESP，EDP）以及衍生指数（dP/dtmax、dP/dtmin、Vmax 以及 tau）。此外，为了确定 / 量化在具有肽治疗以及不具有肽治疗的情况下的由 I/R 损伤导致的不可逆的心肌损伤（即，梗塞）的程度，评估心脏生物标记物以及梗塞面积。

[0237] 血液样本。在以下六个数据收集时间点，针对药物动力学（PK）分析以及针对通过心脏生物标记物分析评估心肌损伤来收集静脉的全血样本（<3mL）：基线、缺血 30 分钟时、再灌注后的 30 分钟时、再灌注后的 60 分钟时、再灌注后的 120 分钟时以及再灌注后的 180 分钟时。此外，在基线、缺血 60 分钟时、和再灌注后的 60 分钟时以及再灌注后的 180 分钟时收集三个动脉的全血样本（~0.5mL）以确定血气，将所述动脉样本收集入血气注射器中，且所述动脉样本用来通过 I-Stat 分析器 / 片匣 (CG4+) 测量血气。

[0238] 组织病理学 / 组织形态测量学。在完成方案之后，评估由 I/R 损伤导致的不可逆的心肌损伤（即，梗塞）。简言之，重新上紧冠状动脉勒除器，且静脉注射 Evan 的蓝色染料（1mL/kg，Sigma，St.Louis，MO）以描记缺血期间处于危险中的心肌区域（AR）。在大约 5 分钟后，心脏停止（通过将氯化钾注入到左心房），新鲜地切除该心脏。将左心室沿垂直于其纵轴线（从顶点到底部）的方向切成 3mm 厚的切片。随后，将所述切片在 2% 的三苯基四氮唑

(TTC)中在37℃下培养20分钟,并固定在10%的非缓冲福尔马林溶液(NBF)中。

[0239] 在固定之后,以数字方式描记/测量梗死和处于危险中的区域。为此,利用数字式测微计测量每个切片的厚度且之后拍照/扫描。将所有的照片输入到图像分析程序(Image J;美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)),且进行计算机辅助式测平法来确定梗塞(I)区域和处于危险中(AR)的区域的总大小。对于每一切片,将AR(即,未染上蓝色)表示为LV面积的百分比,且梗塞大小(I,未染色的组织)表示为AR的百分比(I/AR)。在所有的情况下,由不了解处理分配/研究设计的人员进行定量组织形态测量。

[0240] 动物观察。在EMKA的IOX系统上利用用于分析的心电图(ECG)自动软件获取数据(EMKA技术)。从(数字)示波图手动地或自动地进行所有生理参数的测量。使用从每一目标时间点始60s的数据的平均值(如果可能的话);然而,如上所述,在整个试验中连续地记录信号/示波图,以允许(如果需要的话)更精确的/详细的时态数据分析(通过修正)。利用Microsoft Excel进行其他的计算。数据表达为具有标准误差的平均值。

[0241] 结果

[0242] 图2到图6示出了来自经受30分钟的缺血和3小时的再灌注的心脏的梗塞大小。图2A和图2B示出了表示用于利用安慰剂或肽治疗的假手术(应用结扎线,但未上紧)的兔子的梗塞大小的数据。垂直于LV的纵轴线(从顶部到底部)来将LV切片成3mm厚的切片。图2A是利用安慰剂治疗的假手术兔子的心脏切片的照片以及突出显示了梗塞大小的计算机生成图片。图2B是利用肽治疗的假手术兔子的心脏切片的照片以及突出显示了梗塞大小的计算机生成图片。

[0243] 图3A和图3B示出了表示诱导心肌缺血且利用安慰剂治疗的两个不同的对照兔子的梗塞大小的数据。每个图示出了心脏切片的照片和突出显示了梗塞大小的计算机生成图像。

[0244] 图4A、图4B、图4C、图4D和图4E示出了表示诱导心肌缺血且利用肽治疗的五个不同的兔子的梗塞大小的数据。与对照相比,给药肽导致梗塞大小减小。表8示出表示在该研究所使用的动物中的每一动物的危险面积与左心室面积的比率、梗塞面积与左心室面积的比率以及梗塞面积与危险面积的比率的数据。图5到图6示出了表示用肽治疗的对象和对照对象中的梗塞面积与左心室面积的比率、梗塞面积与左心室面积的比率以及梗塞面积与危险面积的比率的其他数据。

[0245] 表8. 研究动物的组织病理学结果

[0246]

组	心肌面积(%)		
	AR/LV	IA/LV	IA/AR
假手术(n=2)	56.0±0.4	1.7±0.2	2.8±0.3
肽(n=10)	58.2±1.9	16.2±3.4	24.7±4.7
% 相对于安慰剂	*6±3*	*-24±16*	*-32±13*
安慰剂(n=10)	55.1±2.4	21.5±1.7	36.1±1.9
p值(肽vs.安慰剂)		p<0.05	p<0.05

[0247] 这些结果显示出,在急性的心肌缺血和再灌注的标准兔模型中,在缺血时间段10分钟时开始直到30分钟通过IV持续输注给药肽且接着在再灌注之后通过IV持续输注给

药肽 180 分钟，相对于对照组能够减小心肌梗塞大小。在对治疗有可确定的反应的兔中，心肌梗塞区域的大小相对于对照组中标注的梗塞大小减小。在再灌注之后小于 3 小时(即 30 分钟)的治疗提供类似的心肌挽救(未示出数据)。这些结果表明，肽治疗预防了急性的心肌缺血再灌注损伤的症状的出现。就这一点而言，芳香族阳离子肽在预防和治疗哺乳动物对象中的血管阻塞损伤的方法中是有用的。

[0248] 实施例 2. 肽在保护人类免受血管阻塞损伤中的作用

[0249] 该实施例将确定在血管重建时给药 D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 是否会限制急性心肌梗塞期间的梗塞大小。

[0250] 研究组。在胸痛发作后出现在医院且临床决策对其利用血管重建(例如，PCI 或溶栓)治疗的 18 岁或更年长的男性和女性适合于入选。患者可以是 STEMI（ST 段抬高心肌梗塞）或非 STEMI。STEMI 患者将具有以下症状暗示：向心肌供血的切断并且患者的 ECG 显示 ST 段抬高的典型心脏病发作模式。因此，仅基于症状、临床检查以及 ECG 变化来进行诊断。在非 ST 段抬高的心脏病发作的情况下，胸痛的症状可以与 STEMI 的症状相同，但重要的不同之处在于患者的 ECG 并不显示出通常与心脏病发关联的典型 ST 段抬高变化。患者通常具有经历心绞痛的病史，但疑似发作时的 ECG 可以显示出没有任何反常。对病史和症状的诊断是可疑的且通过显示出血液中的被称为心肌酶的物质的浓度升高的血液测试确认该诊断。

[0251] 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。可替选的血管重建方法包括但不局限于气囊血管成形术、经皮腔内冠状动脉成形术和定向性冠状动脉斑块旋切术。

[0252] 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。肽溶解于生理盐水中且通过位于肘前静脉中的导管注入。将患者等量地随机分至以下治疗组(例如，0mg/kg/ 小时、0.001mg/kg/ 小时、0.005mg/kg/ 小时、0.01mg/kg/ 小时、0.025mg/kg/ 小时、0.05mg/kg/ 小时、0.10mg/kg/ 小时、0.25mg/kg/ 小时、0.5mg/kg/ 小时以及 1.0mg/kg/ 小时)中的任一组。自再灌注前大约 10 分钟到 PCI 后大约 3 小时，将肽以 IV 输注的方式给药。在再灌注时间段之后，通过任何给药方式(例如，皮下或静脉注射)将肽长期给药至所述对象。

[0253] 梗塞大小。主要终点是通过测量心脏生物标记物来评估的梗塞大小。在住院时获取血液样本并且在之后的 3 天中重复获取血液样本。在每个患者中测量冠状动脉生物标记物。例如，在每个患者中通过计算机化测面法来测量肌酸激酶和肌钙蛋白 I 释放(Beckman 试剂盒)的曲线下面积(AUC)(以任意单位表示)。主要第二终点是通过在梗塞后的第 5 天评估的、在心脏核磁共振成像(MRI)上观察到的延迟超增强技术的区域测量的梗塞的大小。对于后期增强分析，0.2mmol 钆 - 四氮杂环十二烷四乙酸(DOTA)/ 千克以每秒 4ml 的速率注入并对其注入 15ml 的生理盐水。在注入钆 -DOTA 后的 10 分钟时，利用三维反转恢复梯度回波序列评估延迟超增强术。在覆盖整个左心室的短轴切片上分析图像。

[0254] 心肌梗塞通过在心肌内的延迟超增强技术识别，通过心肌对比后信号的强度定量地限定，该心肌对比后信号的强度比同一薄片内的远端的非梗塞心肌的参考区域中的信号

强度高 2SD。对于所有切片，梗塞区域的绝对质量根据以下公式计算：梗塞质量(以组织的克计)= Σ(超增强区域 [以平方厘米计]) × 切片厚度(以厘米计) × 心肌比重(1.05g/ 立方厘米)。

[0255] 确定的危险因素的生物标记物。测量 N- 末端脑钠肽前体(NT-proBNP)和葡萄糖的浓度以及估算的肾小球滤过率(eGFR)。这些生物标记物都通过大约两年半的平均随访来显著地预测全因死亡率。基于这三种生物标记物计算风险分数可以在随访期间识别处于高死亡风险的患者。预测到，与经受 PCI 的没有接受肽的患者相比，肽将降低经受 PCI 的患者中的这些生物标记物的风险分数。可以取血液样本以确定 CK-MB 和肌钙蛋白 I。在每个患者中可以通过计算机化测面法来测量 CK-MB 和肌钙蛋白 I 释放的曲线下面积(AUC)(以任意单位表示)。

[0256] 其他终点。肽的全血浓度是 PCI 之前的那一刻以及 PCI 之后的 1 小时时、2 小时时、4 小时时、8 小时时以及 12 小时时。在入院时、PCI 之后的 24 小时时、48 小时时、72 小时时测量血压以及肌酸酐和钾的血清浓度。在入院时以及 PCI 后的 24 小时时测量胆红素、γ- 谷氨酰基转移酶和碱性磷酸酶以及白血球数的血清浓度。

[0257] 记录再灌注之后的第一个 48 小时内发生的主要不良事件的累积发生率，包括死亡、心力衰竭、急性的心肌梗塞、中风、缺血复发、需要再次血管重建、肾功能不全或肝功能不全、血管并发症以及出血。评估与梗塞相关的不良事件，包括心力衰竭和心室纤维性颤动。此外，在急性的心肌梗塞的 3 个月后，记录心脏事件，通过超声波心动描记术来评估整体的左心室功能(Vivid 7 systems;GEVingmed)。

[0258] 预测到，通过一些测量，与采用安慰剂所观察到的梗塞相比，在再灌注时给药肽将与更小的梗塞相关。

[0259] 实施例 3. 肽在保护人类免受血管阻塞损伤中的作用

[0260] 该实施例将确定在血管重建时给药 D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2 是否会限制急性的心肌梗塞期间的梗塞大小。

[0261] 研究组。具有 AMI 的临床症状、需要血管重建步骤的 18 岁或更年长的男性和女性适合于入选。符合入选标准的患者随机分配到对照组或肽组。在直接支架术前不到 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。该肽溶解在生理盐水中，通过位于肘前静脉内的导管注入。将患者等量随机分至任一个下列治疗组(0mg/kg/h、0.001mg/kg/h、0.005mg/kg/h、0.01mg/kg/h、0.025mg/kg/h、0.05mg/kg/h、0.10mg/kg/h、0.25mg/kg/h、0.5mg/kg/h 和 1.0mg/kg/h)。自再灌注前约 10 分钟到血管重建后约 3h，将肽以静脉输注的方式给药。在再灌注期之后，可以通过任何给药方式将肽长期给药至对象，例如皮下注射或静脉注射。

[0262] 终点和生物标记物。终点和生物标记物将按照实施例 2 中的描述进行测定。预测到，通过一些测量，与采用安慰剂所观察到的梗塞相比，在再灌注之前给药肽将与更小的梗塞相关。

[0263] 参考文献

[0264] Leshnower BG, Kanemoto S, Matsubara M, Sakamoto H, Hinmon R, Gorman JH 3rd, Gorman RC. Cyclosporine preserves mitochondrial morphology after myocardial ischemia/reperfusion independent of calcineurin inhibition. Ann Thorac

Surg.,2008Oct,86(4):1286-92.

[0265] Zhao L,Roche BM,Wessale JL,Kijtawornrat A,Lolly JL,Shemanski D,Hamlin RL.Chronic xanthine oxidase inhibition following myocardial infarction in rabbits:effects of early versus delayed treatment.Life Sci.2008 Feb 27;82(9-10):495-502.Epub 2008 Jan 24.PubMed PMID:18215719.

[0266] Hamlin RL,Kijtawornrat A.Use of the rabbit with a failing heart to test for torsadogenicity.Pharmacol Ther,2008 8 Aug,119(2):179-85.Epub 2008 Apr 20.

[0267] 等同物

[0268] 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。

[0269] 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。

[0270] 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。

[0271] 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。

[0272] 在以下的权利要求范围内提出其他的实施方式。

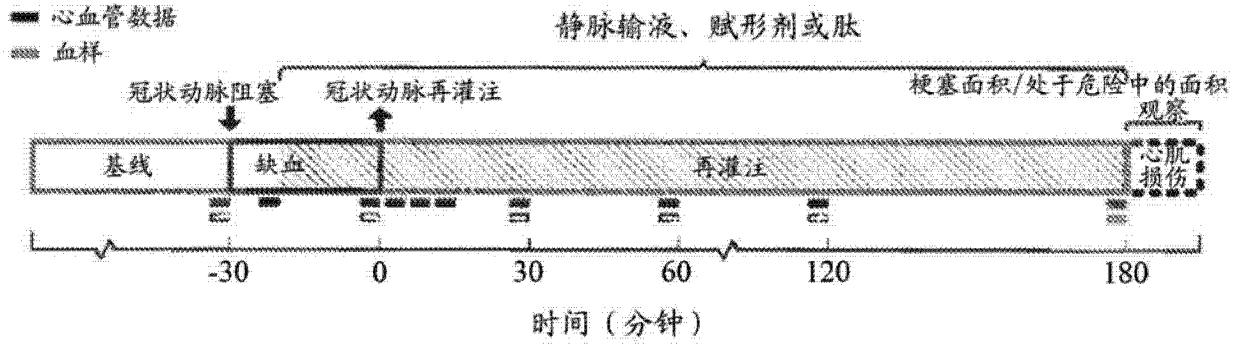

心血管数据
血样
静脉输液、赋形剂或肽
冠状动脉阻塞
冠状动脉再灌注
梗塞面积/处于危险中的面积观察
基线
缺血
再灌注
心肌损伤
-30
0
30
60
120
180
时间（分钟）

图 1

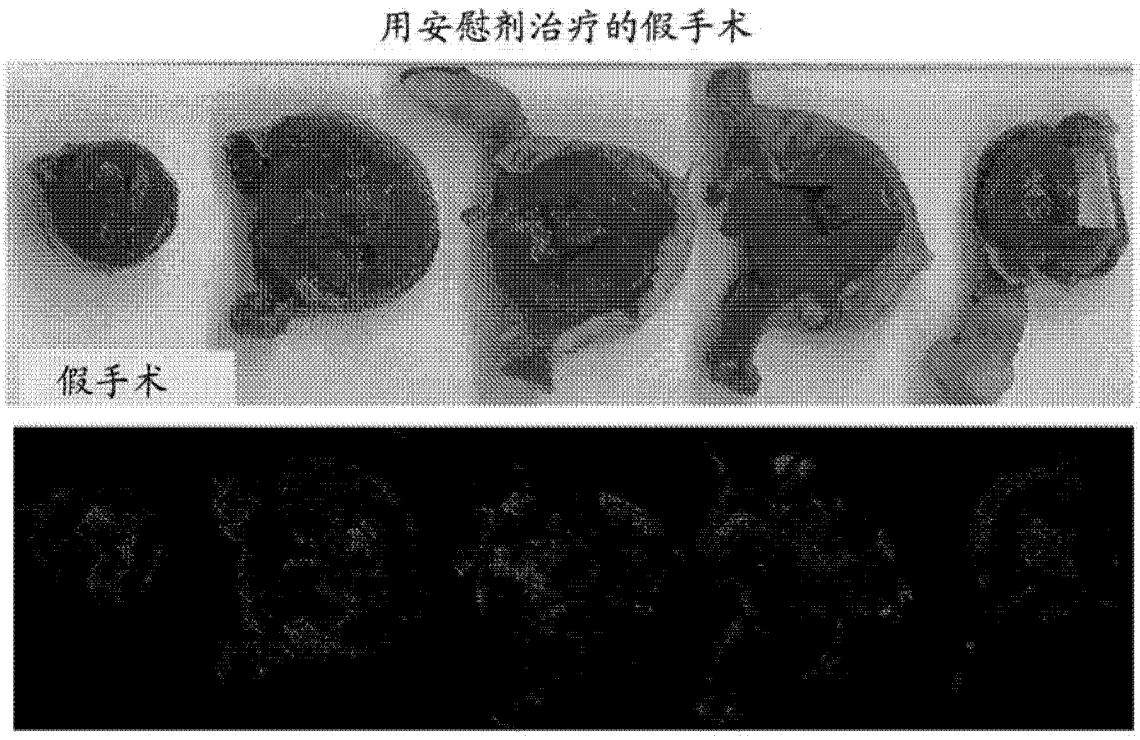

用安慰剂治疗的假手术
假手术

图 2A

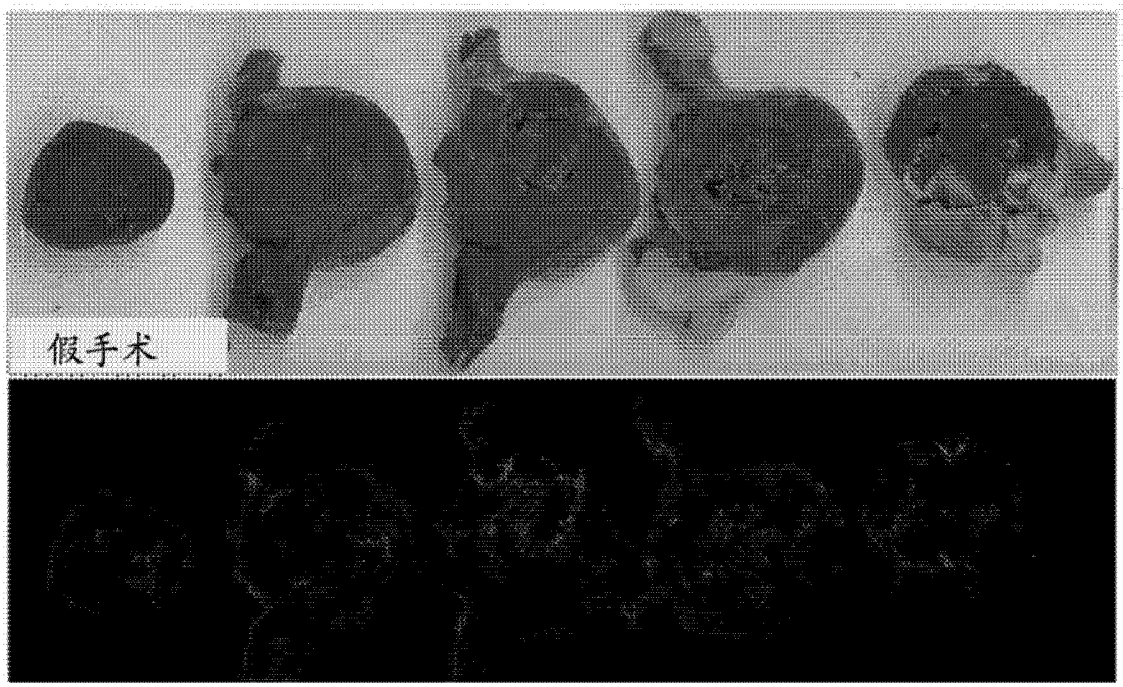


图 2B

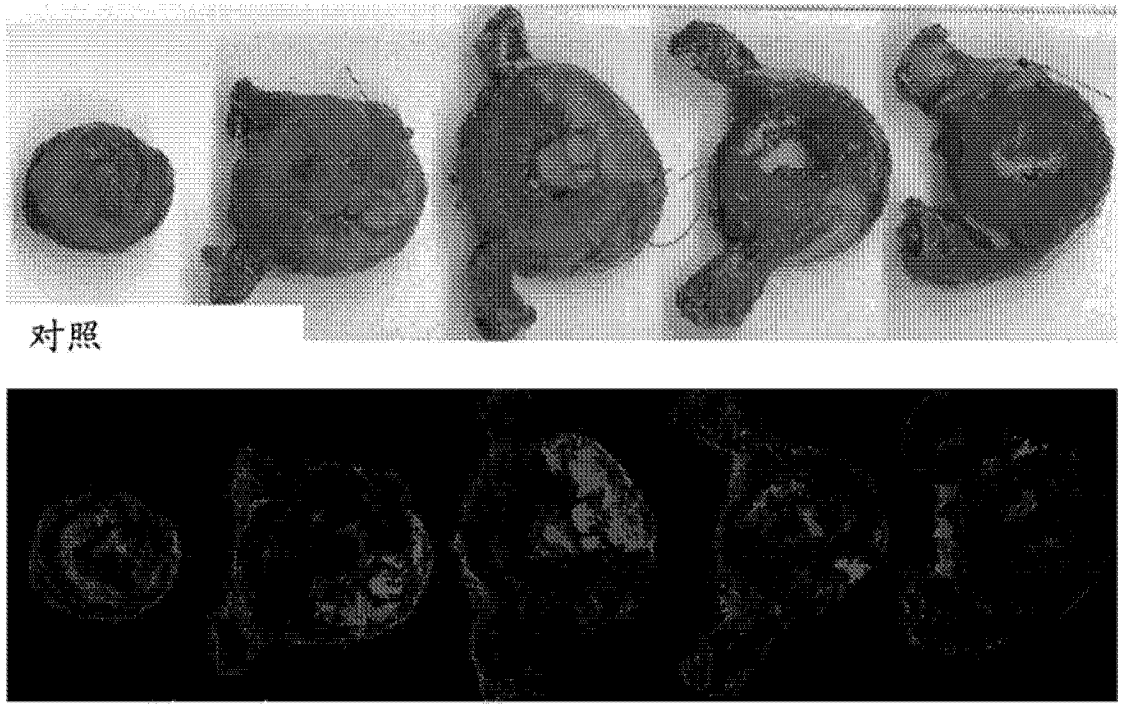


图 3A

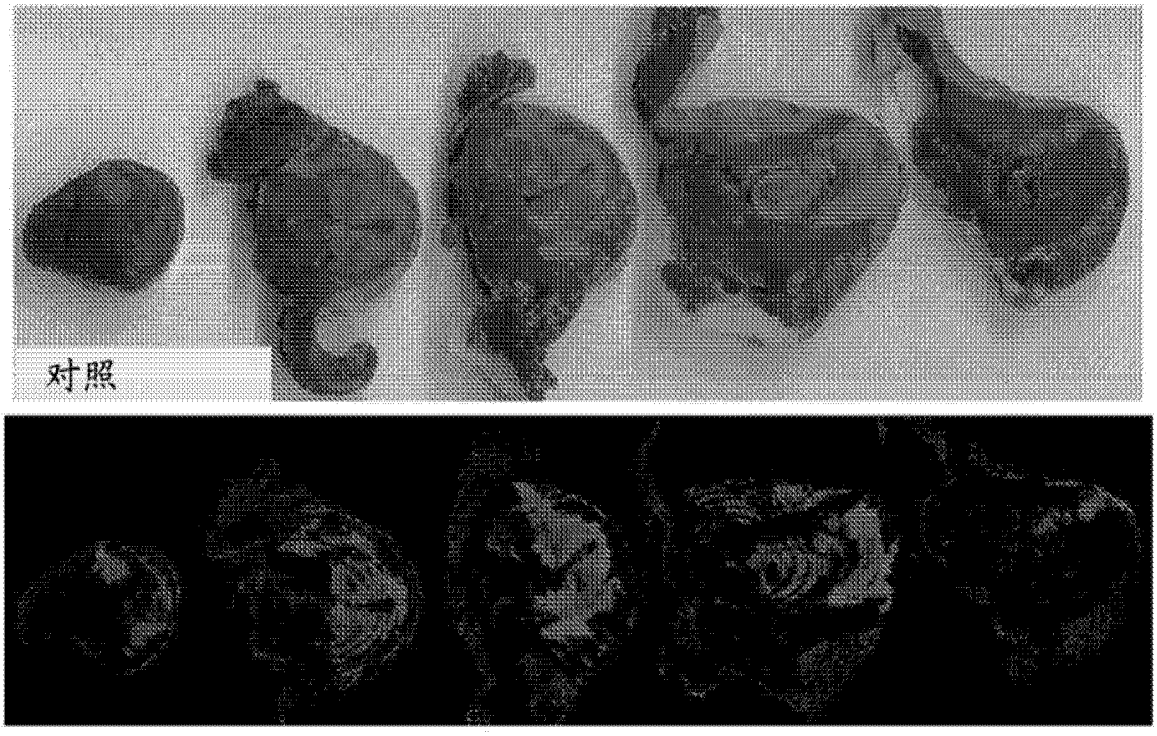


图 3B

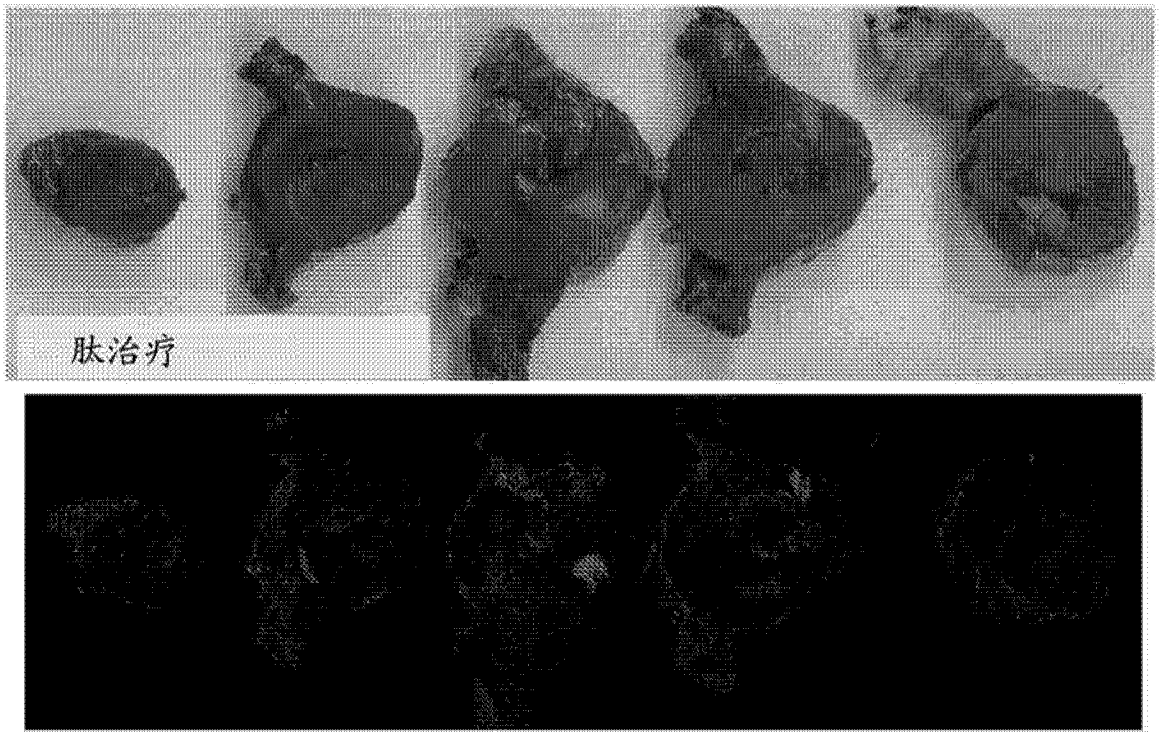


图 4A

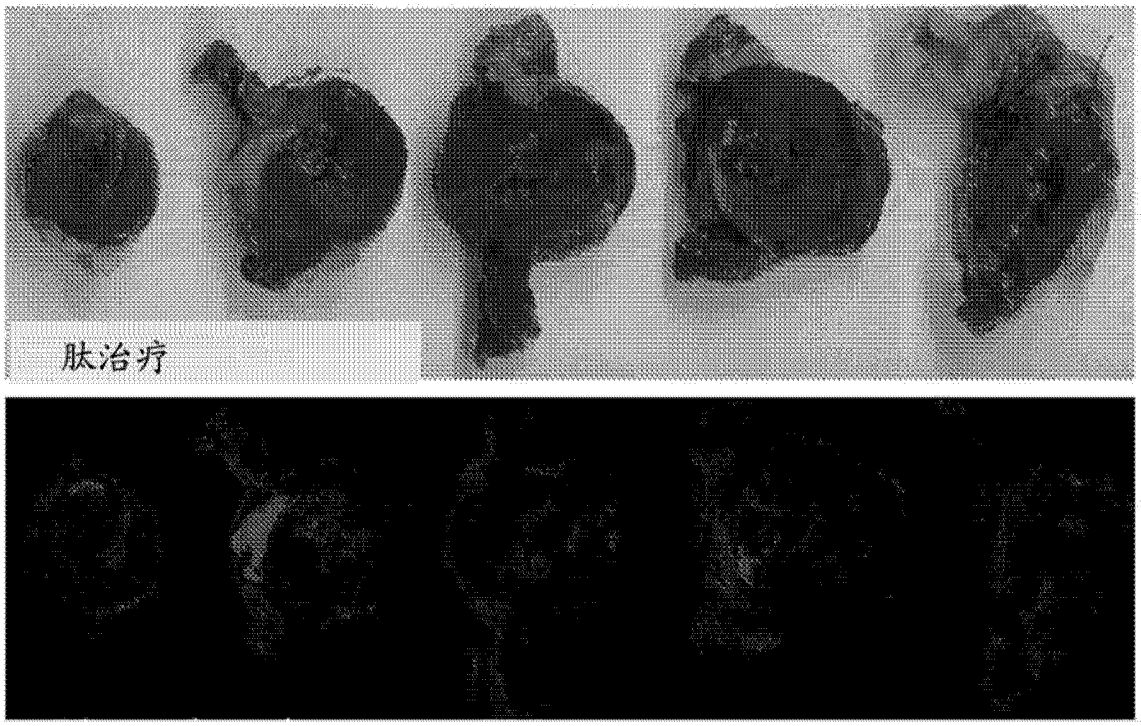


图 4B

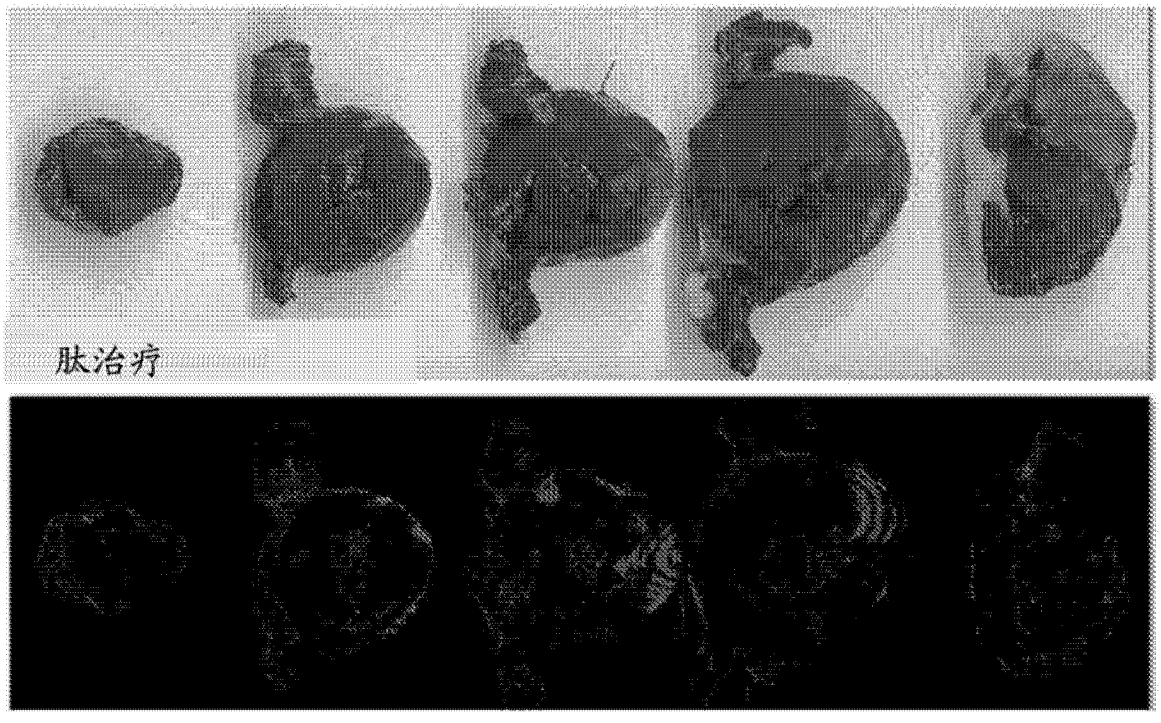


图 4C

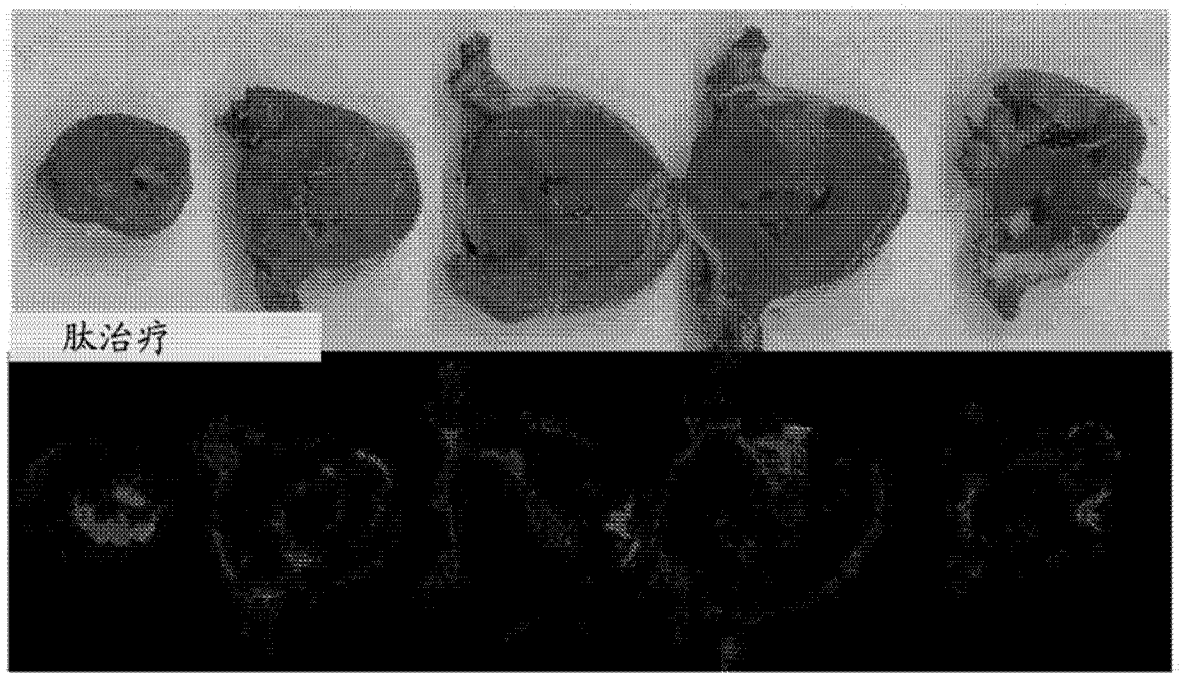


图 4D

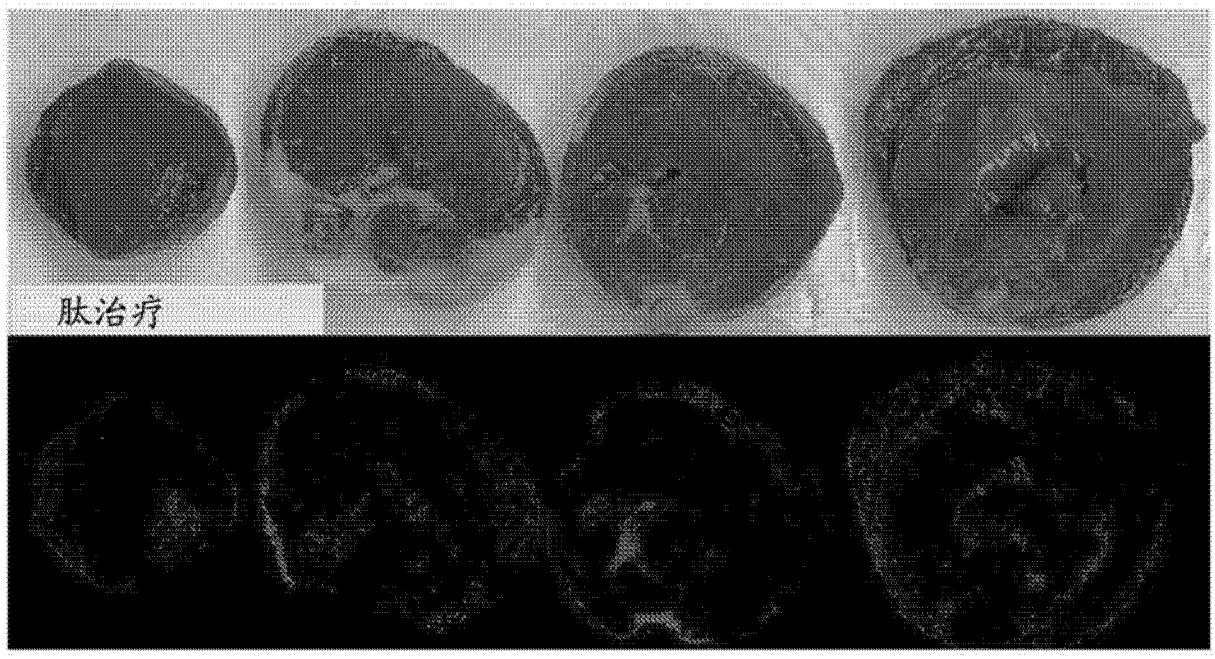


图 4E

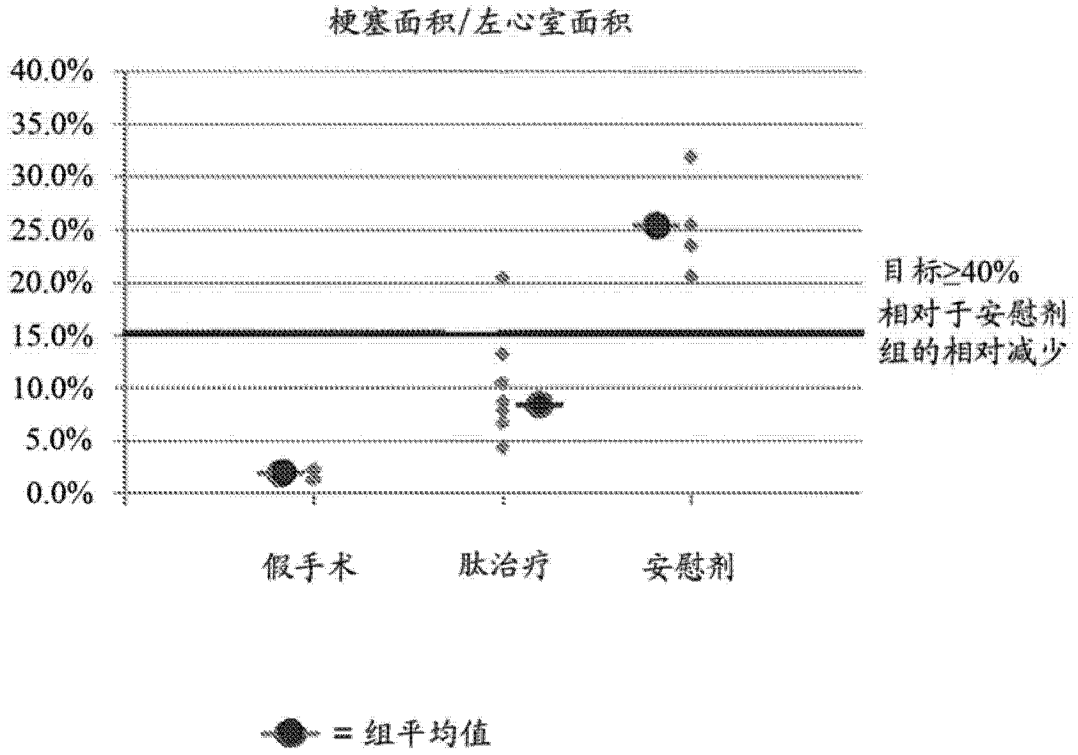

梗塞面积/左心室面积
40.0%
35.0%
30.0%
25.0%
20.0%
15.0%
10.0%
5.0%
0.0%
目标≥40%
相对于安慰剂
组的相对减少
假手术
肽治疗
安慰剂
= 组平均值

图 5

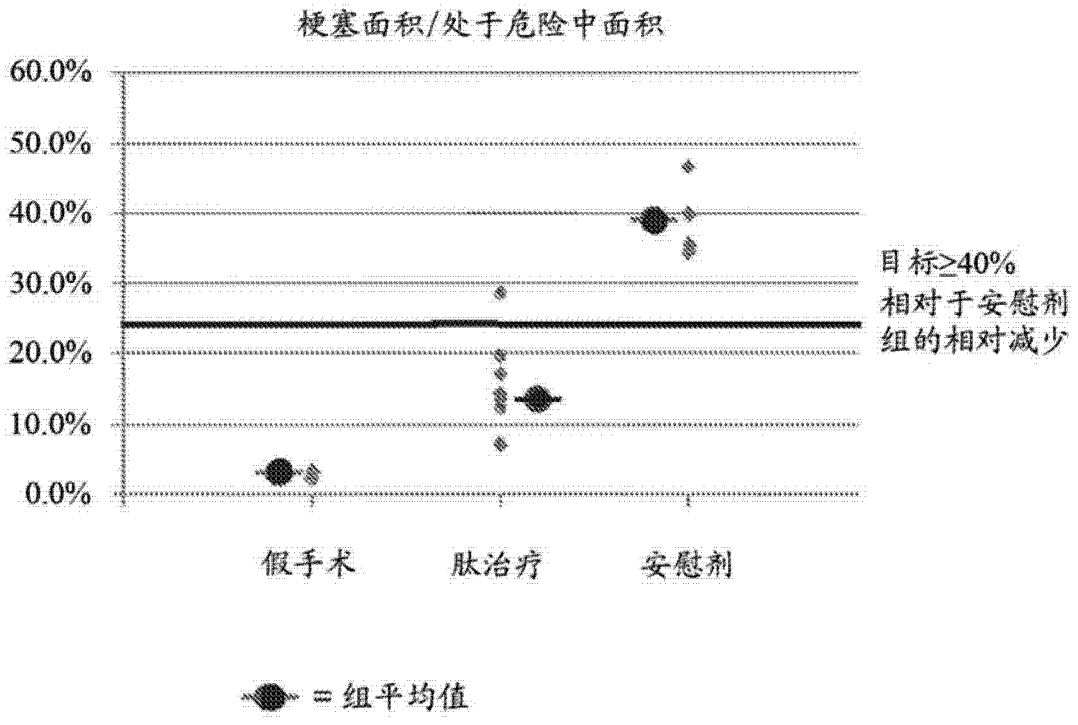

梗塞面积/处于危险中面积
60.0%
50.0%
40.0%
30.0%
20.0%
10.0%
0.0%
目标≥40%
相对于安慰剂
组的相对减少
假手术
肽治疗
安慰剂
= 组平均值

图 6