



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104056248 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 24

(21) 申请号 201410319216. 4

(22) 申请日 2009. 02. 25

(30) 优先权数据

61/031, 585 2008. 02. 26 US

(62) 分案原申请数据

200980106215. 9 2009. 02. 25

(71) 申请人 康奈尔大学

地址 美国纽约州

(72) 发明人 黑兹尔·H·塞托 迪亚娜·费尔森

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

代理人 余刚 张英

(51) Int. Cl.

A61K 38/07(2006. 01)

A61P 13/12(2006. 01)

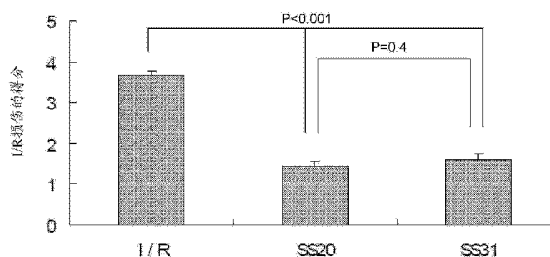
权利要求书1页 说明书47页 附图28页

(54) 发明名称

用于防止和治疗急性肾损伤的方法

(57) 摘要

本发明提供用于防止和治疗急性肾损伤的方法。本披露涉及一种用于保护肾脏免于肾损伤的方法。例如,急性肾损伤可以与受试者的肾脏中血流的降低或阻滞、或暴露于一种肾毒性剂(如一种放射性对比染料)相关联。这些方法包括对于一位有需要的受试者给予该受试者有效量的一种芳香族阳离子肽。



1. 选自下组的一种肽在制备用于在有需要的受试者体内保护肾脏免于急性肾损伤的药物中的应用,该组的组成为:Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-20)和D-Arg-2'6'Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31)。
2. 如权利要求1所述的应用,其中该急性肾损伤与该受试者暴露于一种肾毒性剂相关联。
3. 如权利要求2所述的应用,其中在该受试者暴露于该肾毒性剂之前或同时给予这种肽。
4. 如权利要求2所述的应用,其中该肾毒性剂是一种放射性对比染料。
5. 如权利要求4所述的应用,其中该放射性对比染料是选自下组,其组成为:醋碘苯酸盐;泛影酸盐;碘达胺;碘格利酸盐;碘酞酸盐;碘羟拉酸盐;甲泛影酸盐;甲泛葡胺;碘海醇;碘帕醇;碘喷托;碘普胺;以及碘佛醇。
6. 如权利要求2所述的应用,其中该肾毒性剂是一种药物或化学品。
7. 如权利要求6所述的应用,其中该药物或化学品是选自下组的化合物中的一种或多种,该组的组成为:顺铂;庆大霉素;头孢噻啶;环孢霉素;两性霉素;四氯化碳;三氯乙烯;以及二氯代乙炔。
8. 选自下组的一种肽在制备用于在有需要的受试者体内治疗肾损伤的药物中的应用,该组的组成为:Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-20)和D-Arg-2'6'Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31)。
9. 根据权利要求8所述的应用,其中该肾损伤与该受试者暴露于一种肾毒性剂相关联。
10. 如权利要求9所述的应用,其中在该受试者暴露于一种肾毒性剂之后给予这种肽。

用于防止和治疗急性肾损伤的方法

[0001] 本申请是申请日为 2009 年 2 月 25 日的题为“用于防止和治疗急性肾损伤的方法”的中国专利申请 No. 200980106215.9 的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求于 2008 年 2 月 26 日提交的美国临时申请号 61/031,585 的优先权益,其全文通过引用将结合在此。

技术领域

[0004] 本发明涉及一种用于保护肾脏免于肾损伤的方法。

背景技术

[0005] 急性肾损伤 (ARI), 也被称为急性肾衰竭 (ARF) 或急性肾脏损伤 (AKI), 是一种严重的急性肾脏医学病况。ARI 的特征是肾小球滤过率、尿产量的下降或这两者均下降。ARI 伴随着一种炎性应答, 这种炎性应答若未加抑制可以导致肾纤维化和慢性肾衰竭。ARI 通常存在数小时或数天的期间并且是潜在性可逆的。ARI 在住院患者中是一种常见并发症, 并且它的发生率在过去 15 年中已经显著增长。一种特殊类型的 ARI, 对比物诱导的 (contrast-induced) 肾病, 是由一些放射性对比剂 (radiocontrast agent) 的毒性效应所引起的。

发明内容

[0006] 本发明提供了一种用于在有需要的受试者体内保护肾脏免于急性肾损伤的方法。该方法包括给予该受试者有效量的一种芳香族阳离子肽。这种芳香族阳离子肽具有: (a) 至少一个净正电荷; (b) 最少三个氨基酸; (c) 最多约二十个氨基酸; (d) 在净正电荷的最少数目 (p_m) 与氨基酸残基的总数 (r) 之间的一种关系, 其中 $3p_m$ 是小于或等于 $r+1$ 的最大数目; 以及 (e) 在芳基基团的最少数目 (a) 与净正电荷的总数 (p_t) 之间的一种关系, 其中 $3a$ 是小于或等于 p_t+1 的最大数目, 除外当 a 是 1 时 p_t 也可以是 1。

[0007] 在一个实施方案中, 肽是在使用一种放射性对比剂之前或同时给予至受试者, 以防止或改善对比物诱导的肾病的发病率。在一个实施方案中, 这种肽是选自下组, 其组成为: Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20) 或 D-Arg-2' 6' Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31)。

[0008] 在一个实施方案中, 这种急性肾损伤与受试者暴露于一种肾毒性剂相关联。在一个实施方案中, 在受试者暴露于该肾毒性剂之前或同时给予这种肽。

[0009] 在一个实施方案中, 该肾毒性剂是一种放射性对比染料 (radiocontrast dye), 例如: 醋碘苯酸盐; 泛影酸盐; 碘达胺; 碘格利酸盐 (iogliclate); 碘酞酸盐 (iothalamate); 碘羟拉酸盐 (ioxithalamate); 甲泛影酸盐; 甲泛葡胺; 碘海醇; 碘帕醇; 碘喷托; 碘普胺; 以及碘佛醇。

[0010] 在一个实施方案中, 该肾毒性剂是一种药物或化学品。在说明性的实施方案中, 这种药物或化学品是选自下组的化合物中的一种或多种, 该组的组成为: 顺铂; 庆大霉素; 头

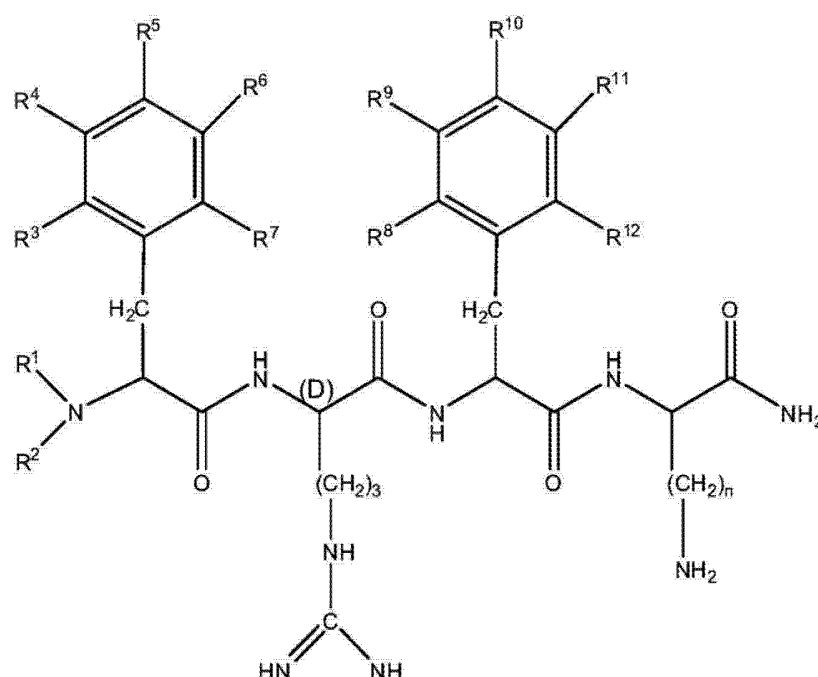
孢噻啉 ; 环孢霉素 ; 两性霉素 ; 四氯化碳 ; 三氯乙烯 ; 以及二氯代乙炔。

[0011] 在另一方面, 本发明提供了一种在有需要的受试者体内治疗急性或慢性肾损伤的方法。该方法包括对该受试者给予有效量的一种芳香族阳离子肽。这些芳香族阳离子肽具有 : (a) 至少一个净正电荷 ; (b) 最少三个氨基酸 ; (c) 最多约二十个氨基酸 ; (d) 在净正电荷的最少数目 (p_m) 与氨基酸残基的总数 (r) 之间的一种关系, 其中 $3p_m$ 是小于或等于 $r+1$ 的最大数目 ; 以及 (e) 在芳基基团的最少数目 (a) 与净正电荷的总数 (p_t) 之间的一种关系, 其中 $3a$ 是小于或等于 p_t+1 的最大数目, 除外当 a 是 1 时 p_t 也可以是 1。在一个实施方案中, 在该受试者暴露于一种肾毒性剂之后给予这种肽。

[0012] 在一个实施方案中, 这种肽是选自下组, 其组成为 : Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20) 和 D-Arg-2' 6' Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31)。

[0013] 在一个实施方案中, 这种肽是由化学式 I 限定的 :

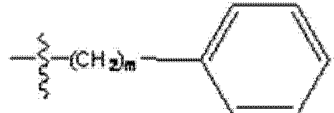
[0014]

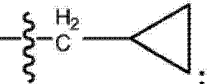


[0015] 其中 R^1 和 R^2 是各自独立地选自 :

[0016] (i) 氢 ;

[0017] (ii) 直链的或支链的 C_1 - C_6 烷基 ;

[0018] (iii)  其中 $m = 1-3$;

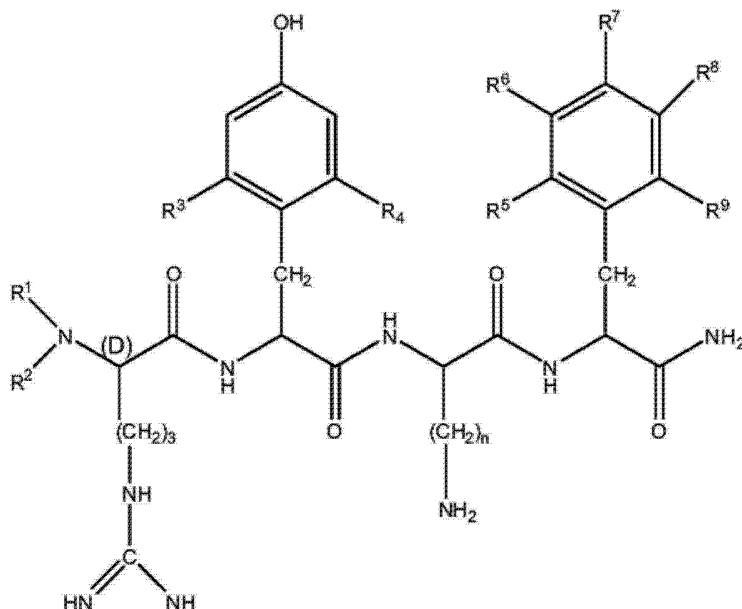
[0019] (iv)  ;

[0020] (v)  ;

[0021] R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 以及 R^{12} 是各自独立地选自 :

[0022] (i) 氢 ;

- [0023] (ii) 直链的或支链的 C_1-C_6 烷基；
- [0024] (iii) C_1-C_6 烷氧基；
- [0025] (iv) 氨基；
- [0026] (v) C_1-C_4 烷氨基；
- [0027] (vi) C_1-C_4 二烷氨基；
- [0028] (vii) 硝基；
- [0029] (viii) 羟基；
- [0030] (ix) 卤素，其中“卤素”涵盖了氯、氟、溴、以及碘；并且 n 是从 1 至 5 的整数。
- [0031] 在一个具体的实施方案中， R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 以及 R^{12} 全部是氢；并且 n 是 4。在另一个实施方案中， R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、以及 R^{11} 全部是氢； R^8 和 R^{12} 是甲基； R^{10} 是羟基；并且 n 是 4。
- [0032] 在一个实施方案中，这种肽是由化学式 II 限定的：
- [0033]



- [0034] 其中 R^1 和 R^2 是各自独立地选自：
- [0035] (i) 氢；
- [0036] (ii) 直链的或支链的 C_1-C_6 烷基；
- [0037] (iii) $-(CH_2)_m-$ 其中 $m = 1-3$;

- [0038] (iv) $-(CH_2)-C-$ 连接一个三元环；

- [0039] (v) $-(CH_2)-C-$ 连接一个 $-CH=CH_2$ 基团；

- [0040] R^3 和 R^4 是各自独立地选自：
- [0041] (i) 氢；

- [0042] (ii) 直链的或支链的 C_1-C_6 烷基；
- [0043] (iii) C_1-C_6 烷氧基；
- [0044] (iv) 氨基；
- [0045] (v) C_1-C_4 烷氨基；
- [0046] (vi) C_1-C_4 二烷氨基；
- [0047] (vii) 硝基；
- [0048] (viii) 羟基；
- [0049] (ix) 卤素，其中“卤素”涵盖了氯、氟、溴、以及碘； R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、以及 R^9 各自是独立地选自：
- [0050] (i) 氢；
- [0051] (ii) 直链的或支链的 C_1-C_6 烷基；
- [0052] (iii) C_1-C_6 烷氧基；
- [0053] (iv) 氨基；
- [0054] (v) C_1-C_4 烷氨基；
- [0055] (vi) C_1-C_4 二烷氨基；
- [0056] (vii) 硝基；
- [0057] (viii) 羟基；
- [0058] (ix) 卤素，其中“卤素”涵盖了氯、氟、溴、以及碘；并且 n 是从 1 至 5 的整数。
- [0059] 在一个具体的实施方案中， R^1 和 R^2 是氢； R^3 和 R^4 是甲基； R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 以及 R^9 全部是氢；并且 n 是 4。
- [0060] 在一方面，本披露提供了一种用于在有需要的受试者体内保护肾脏免于慢性肾损伤的方法，该方法包括对该受试者给予有效量的一种肽，这种肽选自下组，其组成为：Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20) 和 D-Arg-2' 6' Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31)。在一个实施方案中，这种慢性肾损伤与给予或暴露于一种肾毒性试剂相关联，例如一种能够引起慢性肾损伤的药物或化学品。在一个具体的实施方案中，该药物或化学品是四氯化碳。
- [0061] 在一些实施方案中，这些肽对于防止和 / 或治疗由局部缺血、药物（对乙酰氨基酚、酒精）、病毒、肥胖症（非酒精性脂肪性肝炎）、以及阻塞（胆管阻塞、肿瘤）所引起的急性肝损伤是有用的。在一些实施方案中，将本发明的这些芳香族阳离子肽给予受试者以防止或治疗急性肝衰竭 (ALF)。

附图说明

- [0062] 图 1(a-d) 显示了使用 TUNEL 对凋亡细胞进行染色的肾切片的显微图像。
- [0063] 图 2 显示了用 H&E (图 2a-2d) 以及 PAS (图 2e-2h) 进行染色的肾切片的显微图像。
- [0064] 图 3 是一个图示，显示了用 SS-20 或 SS-31 进行治疗显著地改进了由于局部缺血 45 分钟以及再灌注 24 小时所引起的组织病理学的得分。
- [0065] 图 4a 和 4b 呈现了以下图示，这些图示显示用 SS-20 或 SS-31 进行治疗显著地增加了在再灌注之后 ATP 产生的速率。图 4a 显示在 15 分钟局部缺血结束时在肾组织中的 ATP 含量。图 4b 显示在局部缺血 45 分钟之后的 1 小时再灌注以后在肾组织中的 ATP 含量。
- [0066] 图 5 是一个图示，显示用 SS-20 或 SS-31 进行预处理在局部缺血 45 分钟之后显著

地改进了肾线粒体呼吸。

[0067] 图 6a-6d 呈现了以下数据,这些数据显示了在 14 天单侧输尿管梗阻 (UUO) 模型中 SS-1 减少髓质的纤维化。图 6a-6c 对应地显示了对侧未梗阻的肾脏 (CK)、梗阻的肾脏 (OK)、或 SS-31 处理的肾脏的肾小管、肾小球、或间质组织中炎症或纤维化。图 6d 是一个图示,显示了在 CK、OK、以及 SS-31 处理的肾脏中的间质。

[0068] 图 7 是一个图示,显示在 14 天 UUO 模型中 SS-31 减少了成纤维细胞的表达。

[0069] 图 8 是一个图示,显示在 14 天 UUO 模型中 SS-31 减少了肾小管的凋亡。

[0070] 图 9 是一个图示,显示在 14 天 UUO 模型中 SS-31 减少了巨噬细胞的表达。

[0071] 图 10 是一个图示,显示在 14 天 UUO 模型中 SS-31 增加了肾小管的增殖。

[0072] 图 11a-11c 呈现了以下数据,这些数据显示在 14 天 UUO 模型中 SS-31 减少了氧化损害。图 11a 是 RT-PCR 的结果以便分析 HO-1 表达的照片。图 11b 和图 11c 是在被梗阻的肾脏的肾小管和间质性隔区这二者中 8-OH dG 染色结果的显微图像。

[0073] 图 12 是一个图示,显示出 SS-31 降低了由放射性对比染料引起的肾脏功能障碍。

[0074] 图 13 是一系列显微图像,显示出 SS-31 保护肾小管免于放射性对比染料的损伤。PAS 染色示出了对照大鼠的肾脏具有正常的形态学,由在近端小管上完整的刷状缘所证明 (图 13a)。染料处理导致在近端小管细胞中特征性肾刷状缘的损失、这些上皮细胞变平、连同一些空泡形成 (图 13b)。用 SS-31 处理缓解了这些效应。在这些样品中 PAS 染色示出了完整的刷状缘和正常的肾小球 (图 13c)。

[0075] 图 14 是一系列显微图像,显示出 SS-31 防止了由放射性对比染料损伤所诱导的肾小管凋亡。使用 TUNEL 染色以便将凋亡的肾小管可视化。对照肾脏显示出少量的凋亡细胞/hpf (图 14a)。运载体处理的、注射染料的肾脏在每个高倍视野下 (hpf) 具有许多凋亡细胞 (图 14b)。这种效应在 SS-31 处理的、注射染料的肾脏中被大大地缓解 (图 14c)。

[0076] 图 15 是一个图示,显示出用于在实例 3、实验 2 中所呈现的研究的科学试验方案和给药计划。

[0077] 图 16a-16c 是一系列 PAS- 染色的显微图像,显示出染料处理导致了在近端小管细胞中特征性肾刷状缘的损失、连同一些空泡形成 (图 16a)。用 SS-31 处理缓解了这些效应,在这些样品中 PAS 染色示出了完整的刷状缘以及正常的肾小球 (图 16b)。图 16c 显示:对照大鼠的肾脏具有正常的形态学,由在近端小管上完整的刷状缘所证明。

[0078] 图 17a 是一个图示,显示出在给予放射性对比染料之后在对照物以及 SS-31 处理的大鼠中血清半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C (Cystatin C) 方面的变化。图 17b 是一个图示,显示出在给予放射性对比染料之后在对照物以及 SS-31 处理的大鼠中 GFR 方面的变化。

[0079] 图 18 是一个图示,显示出在给予放射性对比染料之前和之后在对照物以及 SS-31 处理的大鼠中的肌酐清除率。

[0080] 图 19 是一个图示,显示出用于在实例 4、实验 3 中所呈现的研究的科学试验方案和给药计划。

[0081] 图 20 是一个图示,显示出用于在实例 5、实验 1 中所呈现的研究的科学试验方案和给药计划。

[0082] 图 21a 是一个图示,显示出在给予放射性对比染料之前和之后、在 CIN 的一种甘油模型中在对照物以及 SS-31 处理的大鼠中的 GFR。图 21b 是一个图示,显示出在给予放射性

对比染料之前和之后、在 CIN 的一种甘油模型中在对照物以及 SS-31 处理的大鼠中的尿蛋白。

[0083] 图 22a 显示了来自用甘油、泛影酸盐以及一种对照物 (PBS) 处理的大鼠的肾切片 PAS 染色的一系列显微图像。图 22b 显示了来自用甘油、泛影酸盐以及 SS-31 处理的大鼠的肾切片 PAS 染色的一系列显微图像。

[0084] 图 23 是一个图示, 显示出用于在实例 5、实验 2 中所呈现的研究的科学试验方案和给药计划。

[0085] 图 24 是一个图示, 显示出在给予放射性对比染料之前和之后在 CIN 的一种甘油模型中在对照物以及 SS-31 处理的大鼠中的 GFR。

[0086] 图 25 是一个图示, 显示出在给予放射性对比染料之前和之后在 CIN 的一种甘油模型中在对照物以及 SS-31 处理的大鼠中的尿蛋白。

[0087] 图 26a 显示了来自用甘油、泛影酸盐以及一种对照物 (PBS) 处理的大鼠的肾切片 PAS 染色的一系列显微图像。图 26b 显示了来自用甘油、泛影酸盐以及 SS-31 处理的大鼠的肾切片 PAS 染色的一系列显微图像。

[0088] 图 27 是一个流程图, 显示了用于在实例 5、实验 3 中所呈现的研究的科学试验方案和给药计划。

[0089] 图 28 是一个图示, 显示了在给予放射性对比染料之前和之后、在 CIN 的一种甘油模型中在对照物以及 SS-31 处理的大鼠中的 GFR。

[0090] 图 29 是一个图示, 显示了在给予放射性对比染料之前和之后、在 CIN 的一种甘油模型中在对照物以及 SS-31 处理的大鼠中的尿蛋白。

[0091] 图 30a 显示了来自用甘油、泛影酸盐以及一种对照物 (PBS) 处理的大鼠的肾切片 PAS 染色的一系列显微图像。图 30b 显示了来自用甘油、泛影酸盐以及 SS-31 处理的大鼠的肾切片 PAS 染色的一系列显微图像。

[0092] 图 31a-31c 是一系列显微图像, 显示出 CCl_4 对照组 (图 31a)、SS-31 处理组 (图 31b)、以及首次接受实验的对照组 (图 31c) 的 H&E 染色。

[0093] 图 32a-32e 是一系列图示, 显示了在给予顺铂这种肾毒性剂的大鼠中本发明的这些芳香族阳离子肽对总体重 (图 32a)、肾脏重量 (图 32b)、血清肌酐 (图 32c)、BUN (图 32d)、以及肌酐清除率 (图 32e) 的影响。

具体实施方式

[0094] 本发明是基于诸位发明家的出乎意料的新发现: 即某些芳香族阳离子肽可以防止和 / 或治疗急性器官衰竭, 例如在受试者体内急性肾损伤或急性肝衰竭。在一些方面, 芳香族阳离子肽可以防止和 / 或治疗慢性器官损害, 例如慢性肾损伤。应当理解的是, 本发明的某些方面、方式、实施方案、变体以及特征在以下以不同的详细水平中进行了描述以便提供对本发明的实质上的理解。

[0095] 在本发明的实践中, 使用了许多在分子生物学、蛋白生物化学、细胞生物学、免疫学、微生物学、以及重组 DNA 方面的常规方法。这些技术是熟知的, 并且对应地在以下文献中进行了解释, 例如 Current Protocols in Molecular Biology, Vols. I-III, Ausubel, Ed. (1997); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Labaty Manual, Second Ed. (Cold

Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989); DNA Cloning: A Practical Approach, Vols. I and II, Glover, Ed. (1985); Oligonucleotide Synthesis, Gait, Ed. (1984); Nucleic Acid Hybridization, Hames & Higgins, Eds. (1985); Transcription and Translation, Hames & Higgins, Eds. (1984); Animal Cell Culture, Freshney, Ed. (1986); Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press, 1986); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning; the series, Meth. Enzymol., (Academic Press, Inc., 1984); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells, Miller & Calos, Eds. (Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1987); and Meth. Enzymol., Vols. 154 and 155, Wu & Grossman, and Wu, Eds. 在此引用的所有参考文献均通过引用以其全文并且出于所有的目的都结合在此, 其程度如同每份单独的公开文件、专利、或专利申请出于所有的目的以其全文被特别地并且个别地通过引用被结合一样。

[0096] 以下提供了在本说明书中所使用的某些术语的定义。除非另有限定, 在此所使用的所有技术术语以及科学术语通常具有与本发明所属的技术领域内的普通技术人员一般所理解的相同的意义。

[0097] 除非上下文另有清楚地指示, 如在本说明书以及所附的权利要求中所使用的, “一个 / 一种” (“a”, “an”)、以及“该”这些单数形式包括了复数指代物。例如, 提及“一种细胞”包括两种或多种细胞、以及类似情况。

[0098] 如在此所使用的, 短语例如因素 A 是“与因素 B 相关联”意思是指这两种因素均存在, 但不应该解释为是指一个因素必需与另一个因素是因果性联系的。

[0099] 如在此所使用的, 对受试者“给予”一种试剂、药物、或肽包括向受试者引入或递送一种化合物来执行其预期的功能的任何途径。可以通过任何适当的途径进行给药, 包括通过口服、鼻内、非肠道 (通过静脉内、肌内、腹膜内、或皮下)、经直肠、或局部地进行给药。给药包括自我给药以及由另一个人进行给药。

[0100] 如在此所使用的, 术语“氨基酸”包括自然发生的氨基酸以及合成的氨基酸、连同氨基酸类似物以及氨基酸模拟物 (它们以与这些自然发生的氨基酸相类似的方式发挥作用)。自然发生的氨基酸是由遗传密码子所编码的氨基酸、连同随后被修饰的那些氨基酸, 例如羟基脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸酯、以及 O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指具有与自然发生的氨基酸相同的基本化学结构的化合物, 即, 一种 α -碳, 这种碳结合到一个氢、一个羧基基团、一个氨基基团、以及一个 R 基团上, 如同型丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷。这些类似物具有经修饰的 R 基团 (例如, 正亮氨酸) 或经修饰的肽骨架, 但仍保留与自然发生的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指以下化学化合物, 这些化合物具有与氨基酸的通常化学结构不同的结构, 但却按照与自然发生的氨基酸相类似的方式发挥作用。在此提及氨基酸是可以利用它们通常已知的三字母符号或利用由 IUPAC-IUB 生物化学命名法委员会所推荐的一个字母符号。

[0101] 一种“分离的”或“纯化的”多肽或肽是基本上不含来自衍生出该试剂的细胞或组织来源的细胞物质、或其他污染性多肽, 或者在化学合成的情况下基本上不含化学前体或其他化学品。例如, 一种分离的芳香族阳离子肽将不含可能会妨碍该试剂的诊断性或治疗性用途的材料。此类干扰性物质可能包括酶类、激素以及其他蛋白质的以及非蛋白质的溶质。

[0102] 如在此所使用的,术语“医学病况”包括但不限于:表现为一种或多种生理的和/或心理学的症状的任何病况或疾病(对于这些症状,治疗和/或防止是所希望的),并且包括之前以及最近鉴定的疾病以及其他紊乱。例如,一种医学病况可能是急性肾损伤、或急性肝衰竭、或任何相关联的症状或并发症。在一个实施方案中,该医学病况是与给予放射性对比染料相关联的急性肾损伤。

[0103] 如在此所使用的,术语“多肽”、“肽”以及“蛋白”在此是可以互换使用的,以便是指一种聚合物,该聚合物包括通过肽键或经修饰的肽键彼此结合的两种或多种氨基酸,即肽等排体。多肽是指短链(通常是指肽类、糖肽类或寡聚体类)、以及较长的链(通常被称为蛋白质)二者。多肽可以包含除这些 20 个基因编码的氨基酸之外的多个氨基酸。多肽包括通过自然过程(例如,翻译后的加工)、或通过本领域内熟知的化学修饰技术所修饰的氨基酸序列。此类修饰在基础文献中进行了很好地说明,并且在专题论文连同在篇幅浩大的研究文献中更详细地做了说明。

[0104] 如在此所使用的,词语“保护”或“进行保护”是指减少用本发明的一种肽进行治疗的受试者发展成一种给定的疾病或紊乱(例如,急性肾损伤或急性肝衰竭)的可能性和/或风险。典型地,发展成这种疾病或紊乱的可能性被认为得到降低,条件是与未用本发明的一种肽进行治疗的相同的受试者发展成组织损伤(例如,急性肾损伤或急性肝衰竭)的可能性和/或风险相比,这种可能性降低了至少约 10%、优选至少约 25%、更优选至少约 50%、甚至更优选至少约 75%、并且最优选至少约 90%。在具体的实施方案中,当在使用该对比剂之前或同时给予这些肽时,这些肽保护受试者免于由一种对比剂所引起的急性肾损伤(即,对比物诱导的肾病)。

[0105] 如在此所使用的,术语“受试者”是指任何脊椎动物物种中的一员。在此所披露的主题的方法对于恒温脊椎动物是特别有用的。在此提供的是对于哺乳动物(例如,人类)、连同由于濒临灭绝而尤为重要的哺乳动物、在经济上对人类重要的哺乳动物(用于人类消耗的、在农场喂养的动物)和/或在社会上对人类重要的哺乳动物(作为宠物或在动物园中保存的动物)。在具体的实施方案中,该受试者是人类。

[0106] 如在此所使用的,术语“进行治疗”或“治疗”或“改善”是指治疗性治疗、以及预防性或防止性的措施这两者,其中目标是防止或减缓(缩小)所靶向的病理状况或紊乱。一位受试者针对一种疾病或病况得到了成功地“治疗”,条件是根据本发明的这些方法在接受了治疗量的这些芳香族阳离子肽之后,该受试者显示出一种具体疾病或病况的一种或多种征象的可观察和/或可测量的下降或缺失。例如,对于急性肾损伤,治疗或防止可以包括在代谢性酸中毒、高血钾、少尿或无尿方面的下降、体液平衡的恢复、以及对其他器官系统的改进的作用。肾功能还可以通过测量血清肌酐水平、血清肌酐清除率、或血液尿素氮水平来进行评定。还应当理解的是,如所说明的治疗或防止医学病况的不同方式是旨在意味着是“实质性的”,这不仅包括完全的但还包括小于完全的治疗或防止,并且其中实现了一些生物学或医学上相关的结果。

[0107] 肽

[0108] 在本发明中有用的这些芳香族阳离子肽是水溶性的,并且是高度极性的。尽管具有这些特性,这些肽能够很容易穿过细胞膜。

[0109] 本发明中有用的这些芳香族阳离子肽包括最少 3 个氨基酸(并且优选包括最少 4

个氨基酸),这些氨基酸是通过肽键共价连接的。

[0110] 本发明的芳香族阳离子肽中所存在的氨基酸最大数目是通过肽键共价连接的大约 20 个氨基酸。优选地,氨基酸的最大数目是大约 12 个,更优选是大约 9 个,并且最优选是约 6 个。最佳的情况是,在这种肽中所存在的氨基酸数目是 4。

[0111] 在本发明中有用的芳香族阳离子肽的氨基酸可以是任何氨基酸。如在此所使用的,术语“氨基酸”用来是指含有至少一个氨基基团以及至少一个羧基基团的任何有机分子。优选地,至少一个氨基基团位于相对于羧基基团的 α 位。

[0112] 这些氨基酸可以是自然发生的。自然发生的氨基酸包括,例如通常情况下在哺乳动物蛋白质中发现的 20 种最为常见的左旋 (L) 氨基酸,即丙氨酸 (Ala)、精氨酸 (Arg)、天冬酰胺 (Asn)、天冬氨酸 (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)、甲硫氨酸 (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)、以及缬氨酸 (Val)。

[0113] 其他自然发生的氨基酸包括例如在与蛋白质合成无关的代谢过程中合成的氨基酸。例如,鸟氨酸和瓜氨酸这些氨基酸是在哺乳动物代谢合成中在脲产生过程中合成的。

[0114] 在本发明中有用的这些肽可含有一种或多种非自然发生的氨基酸。这些非自然发生的氨基酸可以是左旋 (L)、右旋 (D)、或它们的混合物。这种肽可能没有自然发生的氨基酸。

[0115] 非自然发生的氨基酸是典型地在活生物体内在正常的代谢过程中未合成的、并且并未在蛋白质中自然发生的氨基酸。额外地,在本发明中有用的非自然发生的氨基酸优选地也不被通常的蛋白酶识别。

[0116] 这些非自然发生的氨基酸可以存在于这种肽的任何位置。例如,这种非自然发生的氨基酸可以位于 N-端、C-端、或在 N-端与 C-端之间的任何位置。

[0117] 例如,这些非自然发生的氨基酸可以包括烷基、芳基、或烷芳基基团。烷基氨基酸的一些实例包括: α -氨基丁酸、 β -氨基丁酸、 γ -氨基丁酸、 δ -氨基戊酸、以及 ϵ -氨基己酸。芳基氨基酸的一些实例包括邻-、间-、以及对-氨基苯甲酸。烷芳基氨基酸的一些实例包括邻-、间-、以及对-氨基苯乙酸、以及 γ -苯基- β -氨基丁酸。

[0118] 非自然发生的氨基酸还包括自然发生的氨基酸的衍生物。自然发生的氨基酸的衍生物可以例如包括向自然发生的氨基酸上添加一个或多个化学基团。

[0119] 例如,可以将一个或多个化学基团添加到苯丙氨酸或酪氨酸残基的芳香环的 2'、3'、4'、5'、或 6' 位中的一个或多个位置上,或者色氨酸残基的苯并环的 4'、5'、6'、或 7' 位中的一个或多个位置上。该基团可以是能够添加到芳香环上的任何化学基团。此类基团的一些实例包括支链或直链的 C_1 - C_4 烷基,如甲基、乙基、正丙基、异丙基、丁基、异丁基、或叔丁基, C_1 - C_4 烷氧基 (即,烷氧基),氨基, C_1 - C_4 烷氨基、以及 C_1 - C_4 二烷氨基 (例如,甲氨基、二甲氨基),硝基,羟基,卤素 (即,氟、氯、溴、或碘)。自然发生的氨基酸的非自然发生衍生物的一些具体实例包括正缬氨酸 (Nva)、正亮氨酸 (Nle)、以及羟基脯氨酸 (Hyp)。

[0120] 在本发明的这些方法中有用的肽中的氨基酸修饰的另一个实例是这种肽的天冬氨酸或谷氨酸残基的羧基基团衍生化。衍生化作用的一个实例是酰胺化作用,这是使用氨或使用一种伯胺或仲胺 (例如,甲胺、乙胺、二甲胺或二乙胺) 来进行的。衍生化作用的另

一个实例包括用例如甲醇或乙醇进行酯化。

[0121] 另一种这样的修饰包括赖氨酸、精氨酸、或组氨酸残基的氨基基团的衍生化作用。例如,此类氨基基团可以被酰化。一些适合的酰基基团包括,例如包括以上提及的 C_1 - C_4 烷基基团中任何一种的苯甲酰基基团以及链烷酰基基团,如乙酰基以及丙酰基基团。

[0122] 这些非自然发生的氨基酸对于通常的蛋白酶是优选抵抗的、并且更优选地是不敏感的。对于蛋白酶抵抗或不敏感的非自然发生的氨基酸的实例包括以上所提及的自然发生的 L- 氨基酸中的右旋 (D-) 形式、连同 L- 和 / 或 D- 非自然发生的氨基酸。D- 氨基酸在正常情况下并非在蛋白质中发生,尽管在某些抗生素肽中发现了它们,这些抗生素肽是通过除了细胞的正常核糖体蛋白合成机制之外的手段进行合成的。如在此所使用的,这些 D- 氨基酸可以认为是非自然发生的氨基酸。

[0123] 为了使蛋白酶的敏感性最小化,本发明的方法中有用的肽应该具有小于五个、优选小于四个、更优选小于三个、并且最优选小于两个邻近的由通常的蛋白酶所识别的 L- 氨基酸,无论这些氨基酸是否是自然发生的或非自然发生的。最佳的情况是,这种肽仅含有 D- 氨基酸,而不含有 L- 氨基酸。

[0124] 如果这种肽含有蛋白酶敏感的氨基酸序列,则在这些氨基酸中至少有一种优选是非自然发生的 D- 氨基酸,由此赋予了蛋白酶抗性。蛋白酶敏感序列的一个实例包括容易被通常的蛋白酶(例如,肽链内切酶以及胰蛋白酶)剪切的两个或多个邻近的碱性氨基酸。碱性氨基酸的实例包括精氨酸、赖氨酸以及组氨酸。

[0125] 在适合的实施方案中,与在这种肽中的氨基酸残基总数相比,这些芳香族阳离子肽在生理 pH 下具有最小数目的净正电荷。在生理 pH 下净正电荷的最小数目在下文中表示为 (p_m)。在这种肽中氨基酸残基的总数在下文中表示为 (r)。

[0126] 下文所讨论的净正电荷的最小数目都是在生理 pH 条件下。如在此所使用的,术语“生理 pH”是指哺乳动物身体的组织和器官的细胞中的正常 pH。例如,人的生理 pH 在正常情况下大约为 7.4,但是在哺乳动物中正常的生理 pH 可以从约 7.0 至约 7.8 的任何一种 pH。

[0127] 如在此所使用的,“净电荷”是指由存在于这种肽中的氨基酸所携带的正电荷的数目与负电荷的数目的差值。在本说明书中,应当理解的是净电荷是在生理 pH 下测量的。在生理 pH 下带有正电荷的自然发生的氨基酸包括 L- 赖氨酸、L- 精氨酸、以及 L- 组氨酸。在生理 pH 下带有负电荷的自然发生的氨基酸包括 L- 天冬氨酸以及 L- 谷氨酸。

[0128] 典型地,一种肽具有一个带有正电荷的 N- 端氨基基团以及一个带有负电荷的 C- 端羧基基团。在生理 pH 下这些电荷彼此抵消。

[0129] 在本发明的一个实施方案中,这些芳香族阳离子肽在生理 pH 下的净正电荷的最小数目 (p_m) 与氨基酸残基的总数 (r) 之间具有一种关系,其中 $3p_m$ 是小于或等于 $r+1$ 的最大数。在这个实施方案中,在净正电荷的最小数目 (p_m) 与氨基酸残基的总数 (r) 之间的关系如下:

[0130] 表 1. 氨基酸数目与净正电荷 ($3p_m \leq r+1$)

[0131]

(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

[0132] 在另一个实施方案中,这些芳香族阳离子肽在净正电荷的最小数目 (p_m) 与氨基酸残基的总数 (r) 之间具有一种关系,其中 $2p_m$ 是小于或等于 $r+1$ 的最大数。在这种实施方案中,在净正电荷的最小数目 (p_m) 与氨基酸残基的总数 (r) 之间的关系如下:

[0133] 表 2. 氨基酸数目与净正电荷 ($2p_m \leq p+1$)

[0134]

(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

[0135] 在一种实施方案中,净正电荷的最小数目 (p_m) 与氨基酸残基的总数 (r) 是相等的。在另一实施方案中,这些肽具有三个或四个氨基酸残基、以及最少一个净正电荷,优选是最少两个净正电荷,并且更优选为最少三个净正电荷。

[0136] 在适合的实施方案中,与净正电荷的总数 (p_t) 相比这些芳香族阳离子肽具有最少量的芳香基团。芳香基团的最小数目在下文中表示为 (a)。

[0137] 具有一种芳香基团的自然发生的氨基酸包括组氨酸、色氨酸、酪氨酸、以及苯丙氨酸。例如,六肽 Lys-Gln-Tyr-D-Arg-Phe-Trp 具有 2 个芳香基团 (由赖氨酸和精氨酸残基贡献)、以及 3 个芳香基团 (由酪氨酸、苯丙氨酸、以及色氨酸残基贡献) 的净正电荷。

[0138] 在本发明的一个实施方案中,在本发明的这些方法中有用的芳香族阳离子肽在生理 pH 下在芳香基团的最小数目 (a) 与净正电荷的总数 (p_t) 之间具有一种关系,其中 $3a$ 是小于或等于 p_t+1 的最大数目,除外当 p_t 是 1 时 a 也可以是 1。在这种实施方案中,在氨基酸残基的最小数目 (a) 与净正电荷的最小数目 (p_t) 之间的关系如下:

[0139] 表 3. 芳香基团与净正电荷 ($3a \leq p+1$ 或 $a = p_t = 1$)

[0140]

(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

[0141] 在另一个实施方案中,这些芳香族阳离子肽在芳香基团的最小数目 (a) 与净正电荷的总数 (p_t) 之间具有一种关系,其中 $2a$ 是小于或等于 p_t+1 的最大数。在这种实施方案中,在氨基酸残基的最小数目 (a) 与净正电荷的总数目 (p_t) 之间的关系如下:

[0142] 表 4. 芳香基团与净正电荷 ($3a \leq p+1$ 或 $a = p_t = 1$)

[0143]

(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

[0144] 在另一个实施方案中,芳香基团的数目 (a) 与净正电荷的总数 (p_t) 是相等的。

[0145] 羧基基团、尤其是 C- 端氨基酸的末端羧基基团, 可以用例如氨进行酰胺化以形成 C- 端酰胺。可替代地, C- 端氨基酸的末端羧基可以用任何伯胺或仲胺进行酰胺化。这种伯胺或仲胺可以是例如一种烷基 (尤其是一种支链或无支链的 C₁-C₄ 烷基)、或一种芳基胺。相应地, 这种肽 C- 端的氨基酸可以被转化成酰胺基、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- 苯胺基、或 N- 苯基 -N- 乙基酰胺基基团。

[0146] 并未发生在本发明的芳香族阳离子肽的 C- 端的天冬酰胺残基、谷氨酰胺残基、天冬氨酸残基、以及谷氨酸残基的游离羧基基团也被酰胺化, 不论它们发生在这种肽的什么位置上。这些内部位置上的酰胺化作用可以使用氨或以上所说明的伯胺或仲胺中的任何一种来进行。

[0147] 在一个实施方案中, 在本发明的方法中有用的芳香族阳离子肽是具有两个净正电荷以及至少一种芳香族氨基酸的肽。在一个具体的实施方案中, 在本发明的方法中有用的芳香族阳离子肽是具有两个净正电荷以及两种芳香族氨基酸的三肽。

[0148] 在本发明的方法中有用的芳香族阳离子肽包括但不限于以下的肽的实例:

[0149] Lys-D-Arg-Tyr-NH₂,

[0150] D-Tyr-Trp-Lys-NH₂,

[0151] Trp-D-Lys-Tyr-Arg-NH₂,

[0152] Tyr-His-D-Gly-Met,

[0153] Tyr-D-Arg-Phe-Lys-Glu-NH₂,

[0154] Met-Tyr-D-Lys-Phe-Arg,

[0155] D-His-Glu-Lys-Tyr-D-Phe-Arg,

[0156] Lys-D-Gln-Tyr-Arg-D-Phe-Trp-NH₂,

[0157] Phe-D-Arg-Lys-Trp-Tyr-D-Arg-His,

[0158] Gly-D-Phe-Lys-Tyr-His-D-Arg-Tyr-NH₂,

[0159] Val-D-Lys-His-Tyr-D-Phe-Ser-Tyr-Arg-NH₂,

[0160] Trp-Lys-Phe-D-Asp-Arg-Tyr-D-His-Lys,

[0161] Lys-Trp-D-Tyr-Arg-Asn-Phe-Tyr-D-His-NH₂,

[0162] Thr-Gly-Tyr-Arg-D-His-Phe-Trp-D-His-Lys,

[0163] Asp-D-Trp-Lys-Tyr-D-His-Phe-Arg-D-Gly-Lys-NH₂,

[0164] D-His-Lys-Tyr-D-Phe-Glu-D-Asp-D-His-D-Lys-Arg-Trp-NH₂,

[0165] Ala-D-Phe-D-Arg-Tyr-Lys-D-Trp-His-D-Tyr-Gly-Phe,

[0166] Tyr-D-His-Phe-D-Arg-Asp-Lys-D-Arg-His-Trp-D-His-Phe,

[0167] Phe-Phe-D-Tyr-Arg-Glu-Asp-D-Lys-Arg-D-Arg-His-Phe-NH₂,

[0168] Phe-Tyr-Lys-D-Arg-Trp-His-D-Lys-D-Lys-Glu-Arg-D-Tyr-Thr,

[0169] Tyr-Asp-D-Lys-Tyr-Phe-D-Lys-D-Arg-Phe-Pro-D-Tyr-His-Lys,

[0170] Glu-Arg-D-Lys-Tyr-D-Val-Phe-D-His-Trp-Arg-D-Gly-Tyr-Arg-D-Met-NH₂,

[0171] Arg-D-Leu-D-Tyr-Phe-Lys-Glu-D-Lys-Arg-D-Trp-Lys-D-Phe-Tyr-D-Arg-Gly,

[0172] D-Glu-Asp-Lys-D-Arg-D-His-Phe-Phe-D-Val-Tyr-Arg-Tyr-D-Tyr-Arg-His-Phe-NH₂,

[0173] Asp-Arg-D-Phe-Cys-Phe-D-Arg-D-Lys-Tyr-Arg-D-Tyr-Trp-D-His-Tyr-D-Phe-Lys-Phe,

[0174] His-Tyr-D-Arg-Trp-Lys-Phe-D-Asp-Ala-Arg-Cys-D-Tyr-His-Phe-D-Lys-Tyr-His-Ser-NH₂,

[0175] Gly-Ala-Lys-Phe-D-Lys-Glu-Arg-Tyr-His-D-Arg-D-Arg-Asp-Tyr-Trp-D-His-Trp-His-D-Lys-Asp,

[0176] 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-NH₂.

[0177] 在一些实施方案中,在本发明的方法中有用的肽是具有一种酪氨酸残基或一种酪氨酸衍生物的那些肽类。优选的酪氨酸衍生物包括: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);以及2'-羟基-6'-甲基酪氨酸(Hmt)。

[0178] 在一个实施方案中,这种肽具有化学式 Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(在此被称作 SS-01)。SS-01 具有三个芳香基团(由酪氨酸、精氨酸、以及赖氨酸这些氨基酸所贡献)、并且具有两个芳香基团(由苯丙氨酸和酪氨酸这些氨基酸所贡献)的净正电荷。SS-01 的酪氨酸可以是一种经修饰的酪氨酸衍生物(例如在 2',6'-二甲基酪氨酸中),从而产生具有化学式 2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ 的化合物(在此被称作 SS-02)。

[0179] 在一个适当的实施方案中,N-端的氨基酸是精氨酸。这种肽的一个实例是 D-Arg-2' 6' Dmt-Lys-Phe-NH₂(在此被称作 SS-31)。

[0180] 在另一个实施方案中,N-端的氨基酸是苯丙氨酸或其衍生物。优选的苯丙氨酸衍生物包括:2'-甲基苯丙氨酸(Mmp)、2',6'-二甲基苯丙氨酸(Dmp)、N,2',6'-三甲基苯丙氨酸(Tmp)、以及2'-羟基-6'-甲基苯丙氨酸(Hmp)。这种肽的一个实例是 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(在此被称作 SS-20)。在一个实施方案中,SS-02 的氨基酸序列被重新安排,这种使得 Dmt 并不位于 N-端。这种芳香族阳离子肽的一种实例具有化学式 D-Arg-2' 6' Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31)。

[0181] 在又一个实施方案中,这种芳香族阳离子肽具有化学式 Phe-D-Arg-Dmt-Lys-NH₂(在此称作 SS-30)。可替代地,这种 N-端的苯丙氨酸可以是苯丙氨酸的衍生物,如 2',6'-二甲基苯丙氨酸(2' 6' Dmp)。在氨基酸位置 1 上含有 2',6'-二甲基苯丙氨酸的 SS-01 具有化学式 2',6'-Dmp-D-Arg-Dmt-Lys-NH₂。

[0182] SS-20、SS-31、以及它们的衍生物可以进一步包括功能类似物。这种肽被认为是 SS-20 或 SS-31 的功能类似物,条件是该类似物具有与 SS-20 或 SS-31 类似的功能。例如,这种类似物可以是 SS-01 或 SS-31 的一种取代变体,其中一种或多种氨基酸被另一种氨基酸取代。

[0183] SS-20 或 SS-31 的适合的取代变体包括保守的氨基酸取代。氨基酸根据它们的物理化学性质可以进行如下的分组:

[0184] (a) 非极性氨基酸:Ala(A) Ser(S) Thr(T) Pro(P) Gly(G) Cys(C);

[0185] (b) 酸性氨基酸:Asn(N) Asp(D) Glu(E) Gln(Q);

[0186] (c) 碱性氨基酸:His(H) Arg(R) Lys(K);

[0187] (d) 疏水性氨基酸:Met(M) Leu(L) Ile(I) Val(V);以及

[0188] (e) 芳香族氨基酸 :Phe (F) Tyr (Y) Trp (W) His (H)。

[0189] 肽中的一个氨基酸被同一组的另一个氨基酸取代被称作一种保守取代,并且可以保留起始肽的物理化学性质。相比之下,肽中的一个氨基酸被不同组的另一个氨基酸取代总体上更有可能改变起始肽的性质。在本发明的实践中有用的类似物的实例包括但不限于:在表 5 中所示的这些芳香族阳离子肽。

[0190] 表 5. 肽类似物的实例

[0191]

氨基酸 位置 1	氨基酸 位置 2	氨基酸 位置 3	氨基酸 位置 4	氨基酸 位置 5	氨基酸 位置 6	氨基酸 位置 7	C-端修饰
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
D-Arg	Dmt	Lys	Phe	Cys			NH ₂
D-Arg	Dmt	Lys	Phe	Glu	Cys	Gly	NH ₂
D-Arg	Dmt	Lys	Phe	Ser	Cys		NH ₂
D-Arg	Dmt	Lys	Phe	Gly	Cys		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	Phe	Lys	Cys			NH ₂
Phe	D-Arg	Phe	Lys	Glu	Cys	Gly	NH ₂
Phe	D-Arg	Phe	Lys	Ser	Cys		NH ₂
Phe	D-Arg	Phe	Lys	Gly	Cys		NH ₂
Phe	D-Arg	Dmt	Lys				NH ₂
Phe	D-Arg	Dmt	Lys	Cys			NH ₂
Phe	D-Arg	Dmt	Lys	Glu	Cys	Gly	NH ₂
Phe	D-Arg	Dmt	Lys	Ser	Cys		NH ₂
Phe	D-Arg	Dmt	Lys	Gly	Cys		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

[0192]

氨基酸位置 1	氨基酸位置 2	氨基酸位置 3	氨基酸位置 4	氨基酸位置 5	氨基酸位置 6	氨基酸位置 7	C-端修饰
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

[0193] Cha = 环己基

[0194] 在某种情况下,可能有利的是使用一种还具有阿片样物质受体激动剂活性的肽。在本发明的实践中有用的类似物的实例包括但不限于:在表 6 中所示的这些芳香族阳离子肽。

[0195] 表 6 具有阿片样物质受体激动剂活性的肽类似物

[0196]

氨基酸位置 1	氨基酸位置 2	氨基酸位置 3	氨基酸位置 4	氨基酸位置 5 (若存在)	C-端修饰
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
Tyr	D-Arg	Phe	Lys	Cys	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Lys		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Lys	Cys	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	Lys	Cys	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

[0197]

氨基酸位置 1	氨基酸位置 2	氨基酸位置 3	氨基酸位置 4	氨基酸位置 5 (若存在)	C-端修饰
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
2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Lys	Cys	NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Dap		NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Arg	Cys	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
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Arg	Cys	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

[0198]

氨基酸位置 1	氨基酸位置 2	氨基酸位置 3	氨基酸位置 4	氨基酸位置 5 (若存在)	C-端修饰
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		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

[0199]

氨基酸位置 1	氨基酸位置 2	氨基酸位置 3	氨基酸位置 4	氨基酸位置 5 (若存在)	C-端修饰
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

[0200] Dab = 二氨基丁酸

[0201] Dap = 二氨基丙酸

[0202] Dmt = 二甲基酪氨酸

[0203] Mmt = 2'-甲基酪氨酸

[0204] Tmt = N, 2', 6'-三甲基酪氨酸

[0205] Hmt = 2'-羟基, 6'-甲基酪氨酸

[0206] dnsDap = β -丹磺酰基-L- α , β -二氨基丙酸

[0207] dnsDap = β -氨基萘酰基-L- α , β -二氨基丙酸

[0208] Bio = 生物素

[0209] 在表 5 和 6 中显示的这些肽的氨基酸可能是 L- 或 D- 构形。

[0210] 肽的合成

[0211] 在本发明的方法中有用的这些肽可以通过本领域内所熟知的任何方法来进行化学合成。用于合成这种蛋白的适合的方法包括例如由 Stuart 和 Young 在 "Solid Phase Peptide Synthesis," Second Edition, Pierce Chemical Company (1984) 以及在 "Solid Phase Peptide Synthesis," Methods Enzymol. 289, Academic Press, Inc, New Yk (1997) 中所描述的那些方法。

[0212] 保护并且治疗受试者体内肾损伤的方法

[0213] 总体上。在此所说明的这些芳香族阳离子肽在保护受试者的肾脏免于肾损伤方面是有用的。急性肾损伤 (ARI) 是指从患者的血液中排泄废物的肾脏功能的下降。典型地, ARI 的特征在于包括: 肾小球滤过率 (GFR) 的下降到一定水平, 该水平如此之低以至于很少有尿形成、或不形成尿。因此, 通常由肾脏消除的物质保留在体内。

[0214] ARI 的原因是多方面的, 但是它们可以被分为三个种类: (1) 肾前的 ARI, 其中肾脏未接收到充分的血液供给, 例如由于体循环血压下降 (正如在休克 / 心搏停止时、或在出血之后); (2) 内在的 ARI, 其中衰竭发生在肾脏内, 例如由于药物诱导的毒性; 以及 (3) 肾后的 ARI, 由肾脏尿流出的损伤所引起的, 正如在由于肾结石或膀胱 / 前列腺癌引起的输尿管梗阻中。ARI 可以与这些种类中的任何一种或一种组合相关联。

[0215] 急性肾损伤的早期诊断和治疗在一些情况下可以防止急性肾损伤发展成慢性肾衰竭。ARI 伴随着一种炎性应答, 该应答若未加抑制可以导致肾纤维化和慢性肾衰竭。慢性肾衰竭 (CRF) 是指肾功能的一种进行性损失以及不可逆的肾脏受损。

[0216] 用于评价肾功能的方法在本领域内是熟知的, 并且包括但不限于: 全身性血压和肾小球毛细血管压的测量、蛋白尿 (例如, 白蛋白尿)、微量血尿和大量血尿、血清肌酐水平 (例如, 用于在人类中估计肾功能的一个公式使 2.0mg/dl 的肌酐水平等同于正常肾功能的 50%, 并且 4.0mg/dl 等同于正常肾功能的 25%)、肾小球滤过率 (GFR) 方面的下降 (例如, 肌酐清除率)、以及肾小管受损的程度。例如, 这类评估可以包括使用生物学和 / 或生理参数 (如血清肌酐水平、肌酐清除率、24 小时尿蛋白分泌、肾小球滤过率 (GFR)、尿白蛋白肌酐比率、白蛋白排泄率、以及肾脏活组织检查) 来评价至少一种肾功能。

[0217] 用于评估肾脏结构退化的方法也是熟知的。在实例中说明了说明性的方法。此类方法包括肾成像 (例如, MRI、超声)、或肾脏活组织检查的组织学评价。在一些实施方案中, 本发明的这些方法减少了肾结构的退化, 正如例如通过肾小管间质或肾小球受害的程度和 / 或肾纤维化的程度 (例如, 胶原和纤连蛋白的沉积) 所判定。

[0218] 对于肾功能和疾病状况的详细综述, 见 *The Kidney Physiology and Pathophysiology*, eds. Seldin et al, 3rd ed., Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2000。在正常情况下, 每 24 小时期间小于 0.15g 的蛋白质被排泄到尿中。几乎所有类型的肾病都引起轻度 (每天达到 500mg) 至中等 (每天达到 4g) 的蛋白质渗漏进入到尿中。在尿中白蛋白的正常浓度是小于 1.0mg/dl。总体上, 30-300mg/dl 的尿白蛋白被认为是微量白蛋白尿 (microalbuminuria), 并且 300mg/dl 以及更高被认为是大量白蛋白尿 (macroalbuminuria)。血清肌酐的正常值对于男性是 0.6-1.5mg/dl, 并且对于女性是 0.6-1.1mg/dl。

[0219] 防止或治疗由局部缺血所引起的 ARI 的方法。肾脏未接受对于该肾脏而言充分的血液供给的病况的一种实例是局部缺血。局部缺血是 ARI 的一个主要原因。一个或两个肾都局部缺血是在主动脉手术、肾脏移植、或在心血管的麻醉过程中所经历的一个共同的问题。涉及到将主动脉和 / 或肾动脉夹紧的手术操作 (例如, 用于肾上和近肾腹主动脉瘤以及肾脏移植的手术) 也特别容易产生肾脏局部缺血, 导致显著的手术后并发症以及早期的同种异体移植排斥。在经历这些手术形式的高危患者中, 肾功能障碍的发生率已经报告为高达 50%。

[0220] 局部缺血可以是由失血、液体从体内丧失（作为严重腹泻或烧伤的结果）、休克、以及与在移植之前供体肾脏的存储相关联的局部缺血造成的。在这些情况中，流向肾脏的血流可以被降低到一个危险的低水平，该水平持续一段时期，足以引起针对肾小管上皮细胞的局部缺血性损伤、这些上皮细胞脱落下来进入到肾小管腔中、肾小管流量的阻塞（这种阻塞导致肾小球滤过作用的损失以及急性肾损伤）。

[0221] 受试者在接受麻醉、手术、或 α -肾上腺素能激动剂之后，由于相关的全身性或肾血管收缩，还可能变得易受 ARI 伤害。额外地，由过敏反应、以及抗高血压的药物、脓毒症、或药物过量所引起的全身性血管舒张也可以引起 ARI，因为身体的自然防卫将关闭，即非重要的器官（例如，肾脏）的血管收缩。

[0222] 因此，在一个实施方案中，处于 ARI 危险的受试者可以是经历了该肾脏的血液供给或血压的干扰或降低的受试者。可以在使用此类干扰或降低少血液供给之前或同时对这些受试者给予本发明的这些芳香族阳离子肽。类似地，芳香族阳离子肽可以在该治疗剂之后进行给药以治疗局部缺血。

[0223] 防止或治疗由药物诱导的毒性所引起的 ARI 的方法。ARI 的另一个原因包括药物诱导的毒性。例如，肾毒素可以引起对于肾小管上皮细胞的直接毒性。肾毒素包括但不限于：治疗性药物，例如顺铂、庆大霉素、头孢噻啶、环孢素、两性霉素、放射性对比染料（以下进一步详细说明）；杀虫剂（例如，百草枯）；以及环境污染物（例如，三氯乙烯和二氯代乙炔）。其他实例包括：嘌呤霉素氨基核苷（PAN）；氨基糖苷类，如庆大霉素；头孢霉素类，如头孢噻啶；钙调神经磷酸酶抑制剂，如他克莫司或西罗莫司。药物诱导的肾毒性还可能由非甾体抗炎性物质、抗逆转录病毒、抗细胞因子、免疫抑制素、肿瘤药物（oncological drug）、或 ACE 抑制剂所引起的。药物诱导的肾毒性可以进一步是由以下各项引起的：镇痛药（nalgesic）滥用、环丙沙星、氯吡格雷、可卡因、cox-2 抑制剂、利尿剂、膦甲酸（foscamet）、金、异环磷酰胺、免疫球蛋白、中草药、干扰素、锂、甘露醇、美沙拉秦、丝裂霉素、亚硝基脲类、青霉胺、青霉素类、喷他咪、奎宁、利福平、链佐星、磺胺类药、噻氯匹定、氨苯喋啶、丙戊酸、阿霉素、甘油、西多福韦、托普霉素、硫酸新霉素、多粘菌素、万古霉素、阿米卡星、头孢噻肟、顺铂、阿昔洛韦、锂、白细胞介素-2、环孢素、或茚地那韦。

[0224] 除了对肾小管上皮细胞的直接毒性之外，一些肾毒素还降低了肾灌注、引起对已知具有限制性氧利用率区域（内部髓质区域）的损伤。这类肾毒素包括两性霉素和放射性对比染料。肾衰竭甚至可以由这些药物在临床上的相关剂量当与局部缺血、容积耗尽、阻塞、或感染相组合时所引起的。一种实例是在具有受损的肾功能的患者体内使用放射性对比染料。在正常的患者中对比染料（contrast-dye）肾病（CIN）的发病率是 3% -8%，但对于患有糖尿病的患者增加至 25%。大多数 ARI 病例发生在患有素因性并存疾病（predisposing combidities）的患者中（McCombs, P. R. & Roberts, B. Surg Gynecol Obstet, 148:175-178(1979)）。

[0225] 因此，在一个实施方案中，处于 ARI 危险的受试者可能接受了具有肾毒性作用的一种或多种治疗性药物。在使用此类治疗剂之前或同时可以对这些受试者给予本发明的这些芳香族阳离子肽。类似地，可以在该治疗剂之后给予芳香族阳离子肽以治疗肾毒性。

[0226] 防止或治疗由放射性对比剂所引起的 ARI 的方法。在一个实施方案中，将本发明的这些芳香族阳离子肽给予处于对比物诱导肾病（CIN）危险的受试者，以便保护该受试者

免于这种病况。CIN 是急性肾衰竭的一个重要病因。CIN 被定义为在暴露于血管内放射造影对比材料 48 小时之内发生的急性肾衰竭。CIN 仍然是放射显影操作的一种共同的并发症。

[0227] 当受试者暴露于放射性对比染料时（例如，在冠状血管造影、心脏血管造影、或神经-血管造影操作过程中）出现了 CIN。对比染料对于许多诊断性和介入性操作是必需的，因为它使医生能够看见梗阻的身体组织。处于 CIN 最大风险的受试者是老年人、以及那些患有糖尿病、慢性肾病、或晚期心力衰竭的人群。血清肌酐测试可用于监测 CIN 的发作、监测治疗、连同监测本发明的这些肽在保护受试者免于 CIN 发作方面的有效性。

[0228] 在一些实施方案中，在给予一种对比剂之前或同时给予受试者本发明的这些芳香族阳离子肽，以便提供保护防止 CIN。例如，该受试者可以在接受该对比剂之前从约 1 至 2 小时、约 1 至 6 小时、约 1 至 12 小时、约 1 至 24 小时、或约 1 至 48 小时接受这些肽。类似地，该受试者可以在大约与该对比剂相同的时间给予了这些肽。此外，将这些肽给予该受试者可以在给予这种对比剂之后继续。在一些实施方案中，该受试者可以在给予该对比剂之后以大约 1、2、3、4、5、6、7、8、12、24、以及 48 小时的间隔继续接受这种肽，以便提供一种保护性的或预防性的作用对抗 CIN。

[0229] 在一些实施方案中，本发明的这些芳香族阳离子肽是在给予一种对比剂之后进行给药的，以便治疗 CIN。例如，该受试者可以在接受该对比剂之后从约 1 至 2 小时、约 1 至 6 小时、约 1 至 12 小时、约 1 至 24 小时、约 1 至 48 小时、或约 1 至 72 小时接受这些肽。例如，该受试者可以在接受本发明的这些肽之前显示出 CIN 的一种或多种迹象或症状，例如，增加的血清肌酐水平和 / 或减少的尿量。与未给予这些肽的一种对照受试者相比，给予本发明的这些肽在该受试者中改进了肾功能的这些指示物中一个或多个指示物。

[0230] 对比剂的类型。CIN 的发病率是由化学结构影响的，并且特别是由所使用的对比剂的渗透性和离子性（或非离子性）结构影响的（见 Ziropiannis et al, "Contrast media induced nephropathy in patients undergoing cardiac catheterization." *Hellenic J Cardiol*, 45:07-113(2004)）。如在此所使用的，一种“对比剂”是指一种化合物，该化合物被用来改进内在身体结构在图像中（例如，CT 或 MRI 扫描）的可见性。术语“对比剂”在此还被称为一种“成像剂”（“imaging agent”）。成像剂包括在本领域内所已知的那些，如染料、荧光染料、金颗粒、氧化铁颗粒、以及其他对比剂（包括顺磁性分子、X 射线衰减化合物（用于 CT 或 X 射线）、用于超声的对比剂、 γ -射线发射同位素（闪烁扫描术）、以及正电子发射同位素（PET））。对比剂可以通过例如胃肠外注射（例如，静脉内、动脉内、鞘内、腹内、皮下地、肌内）、口服的（例如，作为一种片剂或饮料）、经直肠、或经由吸入来给予受试者的。

[0231] 例如，一种 X 射线对比剂可以包括硫酸钡、或可以在一种有机（非离子性）化合物中或在一种离子化合物中包括碘。碘对比剂的实例包括在表 7 中所示的那些。

[0232] 表 7. 示例性碘化对比剂

[0233]

名称	类型	碘含量	重量克分子渗透压浓度	水平
泛影酸盐 (Hypaque 50)	离子性单体	300	1550	高渗
甲泛影酸盐 (Isopaque Coronar 370)	离子性	370	2100	高渗
碘克沙酸盐 (Hexabrix)	离子性二聚物	320	580	低渗
碘帕醇 (Isovue 370)	非离子性单体	370	796	低渗
碘海醇 (Omnipaque 350)	非离子性	350	884	低渗
碘昔兰 (Oxilan)	非离子性			低渗
碘普胺	非离子性			低渗
碘克沙醇 (Visipaque 320)	非离子性二聚物	320	290	等渗

[0234] 一种 MRI 对比剂可以包括一种顺磁性对比剂 (如, 一种钆化合物)、一种超顺磁性对比剂 (如, 氧化铁纳米颗粒)、一种抗磁性剂 (如, 硫酸钡)、以及它们的组合物。对于 MRI 优选的金属离子包括具有原子序数 21-29、39-47、或 57-83 的那些离子, 并且更优选具有原子序数 21-29、42、44、或 57-83 的一种顺磁性的金属离子形式。特别优选的顺磁性金属离子是选自下组, 该组的组成为: Gd(III)、Fe(III)、Mn(II 和 III)、Cr(III)、Cu(II)、Dy(III)、Tb(III 和 IV)、Ho(III)、Er(III)、Pr(III)、以及 Eu(II 和 III)。Gd(III) 是特别有用的。注意到如在此所使用的, 术语“Gd”是指传送离子形式的金属钆; 这种离子形式可以被写为 Gd(III)、Gd³⁺、等等, 而没有考虑离子形式的差异。一种 CT 对比剂可以包括碘 (离子性或非离子性配制品)、钡、硫酸钡、泛影钠-泛影葡胺合剂 (泛影葡胺与泛影酸钠的溶液)、以及它们的组合。在另一个实施方案中, 一种 PET 或 SPECT 对比剂可以包括一种金属螯合物。

[0235] 如以上所述, 对比剂包括但不局限于带有一个或多个碘部分 (moieties) 的分子。碘可以结合到一种有机化合物或离子化合物中。最早的对比剂是离子性的, 包含从水性溶液中的碘所解离的钠原子。有机化合物具有少量的副作用, 因为它们不解离成组分分子。

[0236] 碘化的对比介质可以被分成水溶性的、不溶于水的、以及油性的对比介质。不溶于水的对比介质包括在支气管造影术中使用的丙碘酮 (Dionosil®) 的水性悬浮液。油性对比介质包括: Lipiodol (在含 40% 碘的罂粟子油中的一种稳定化合物)、以及 Lipiodol Ultra® Fluid 以及 Ethiodol® (对应地包含 48% 和 37% 碘的罂粟子油的碘化脂肪酸的乙基酯)。这些油用于淋巴造影术, 并且一些还用于子宫输卵管造影术。碘代苯基十一烷酸 (碘苯酯) 是一种用于油性脊髓造影术的对比介质 (商标名称: Pantopaque®, Myodil®)。

[0237] 到目前为止, 这种水溶性的对比介质代表了最大组的碘化对比介质。这些对比介质可以被分为: 高重量克分子渗透压浓度、低重量克分子渗透压浓度、以及等重量克分子渗透压浓度的对比介质。重量克分子渗透压浓度与这些对比介质的一些不良事件有关。单体离子性对比介质由两个主要的组所组成: 口服的胆系对比介质以及尿路 /

血管造影介质。这些介质的实例包括：醋碘苯酸盐（**Diaginal®**、**Urokon®**）；泛影酸盐（**Angiografin®**、**Hypaque®**、**Renografin®**、**Urografin®**、**Urovison®**）；碘达胺（**Uromiro®**）；碘格利酸盐（**Rayvist®**）；碘酞酸盐（**Conray®**）；碘羟拉酸盐（**Telebrix®**）；以及甲泛影酸盐（**Isopaque®**、**Triosil®**）。

[0238] 这些尿/血管造影介质都是三碘化苯甲酸衍生物的盐类，并且仅在侧链位置3和5中有所不同。这些盐的阳离子主要是钠或甲基葡胺、或这二者的混合物。与甲基葡胺相比，钠盐总体上对血管内皮以及对血-脑屏障和神经组织更具有毒性。与单独使用任一种盐相比，钠和甲基葡胺的混合物具有更低的心脏毒性。一些制造商已经用钙和镁部分地置换了钠以降低毒性。

[0239] 用于血管内用途的这些离子性单体对比介质是所谓的高渗透性对比介质（HOCM），在通常的临床使用中具有七至八倍于血浆的重量克分子渗透压浓度。这种高渗透性决定了几种主观的和客观的副作用，如疼痛、内皮受损、血栓形成以及血栓性静脉炎、血-脑屏障的紊乱、心血管造影中的心动过缓、以及肺循环中增加的压力。低渗透性对比介质（LOCM）的引入基本上已经降低了这些副作用。重量克分子渗透压浓度依赖于每体积单位溶液的分子数目。这些离子性单体药剂是解离为两种分子的盐类：由于三个碘原子而具有不透射线特性的一种阴离子、以及没有不透射线特性的一种阳离子。这些药剂还被称为：3:2或比率为1.5的药剂（每两分子中具有三个碘原子）。存在着三个策略以获得具有更低的重量克分子渗透压浓度、而没有X射线吸收损失的对比介质：1) 非离子性单体的产物、2) 离子性二聚物的产物、或3) 非离子性二聚物的产物。非离子性对比介质并未离解，并且它们的水溶解度总体上是通过几个亲水性羟基基团而达到的。三碘化的非离子性单体具有离子性单体（它们是3:1或比率为3的药剂）的大约一半的重量克分子渗透压浓度。已经出现了几种可供使用的、处于非离子性单体对比介质的方便的立即使用的溶液中的药剂，并且这些药剂包括：甲泛葡胺（**Amipaque®**）；碘海醇（**Omnipaque®**）；碘帕醇（**Iopamiro®**、**Isovue®**、**Niopam®**、**Solutrast®**）；碘喷托（**Imagopaque®**）；碘普胺（**Ultravist®**）；以及碘佛醇（**Optiray®**）。

[0240] 这些对比介质具有附接到所有三条侧链上的亲水性羟基基团，一种还已经促成了它们毒性减少的特征。除了重量克分子渗透压浓度之外，毒性还取决于化学结构（有时被称为化学毒性的一种内在毒性）。尽管对比介质的毒性的机制没有得到完全理解，据信化学毒性是与该介质的蛋白结合能力有关的，该能力是由在这种对比介质与围绕的生物分子（例如，酶类）之间的非特异性弱相互作用所引起的。这种交互作用是通过电力（它们仅对于离子性药剂是存在的）介导的，并且通过在该分子（对于对比介质而言它主要是苯环）的多个疏水性部分之间的交互作用介导的。这些第二代的非离子性单体的许多亲水性侧基基团保护内部的疏水性苯环免于交互作用，由此降低了化学毒性。这种分子的相对疏水性/亲水性被称作它的分配系数；低分配系数是有利的，因为高亲水性有助于低蛋白结合。

[0241] 具有两个三-碘化的苯环的二聚体性对比介质由三个主要的组所组成：离子性静脉内的胆系对比介质、一价的离子性对比介质、以及非离子性对比介质。后两组均属于所谓

的低渗透对比介质。仅存在着一种一价的离子性二聚物：碘克沙酸葡胺钠（Hexabrix®）。这种二聚体性阴离子具有一个羧基基团，其他已经被一种非离子化的侧基基团替换。这样每两个颗粒给出六个碘原子；对比介质是一种 6:2（= 3:1）或比率为 3 的药剂（类似于这些非-离子性单体）。部分地由于其离子的特性、部分地由于其少量羟基基团的缘故，与具有相类似的重量克分子渗透压浓度的这些非离子性单体相比碘克沙酸盐是更具有毒性的（但是由于重量克分子渗透压浓度更低，与这些离子性单体相比毒性更低）。

[0242] 这些非离子性二聚物每分子产生六个碘原子（比率为 6 的药剂）。非离子性二聚物对比介质的实例包括：碘曲仑（Isovist®）和碘克沙醇（Visipaque®）。碘曲仑是与血浆（0.32osm/kg H₂O）接近等渗透的，而碘克沙醇实际是比血浆低渗透的。与血浆（0.29osm/kg H₂O）的等渗透性是在任何碘浓度下通过加入适当量的盐水而获得的。这些药剂具有非常低的毒性，这是部分地由于它们的等渗透性、部分地由于它们的非离子特性、并且部分地由于它们具有非常多的羟基基团（低分配系数）这一事实的缘故。

[0243] 用于尿路造影术和血管造影术（离子性和非离子性的单体、非离子性二聚物）的不同的水溶性对比介质都是细胞外对比介质，并且是通过肾小球滤过作用、未经代谢而排出的。在第一个 6 小时之内，所注射的剂量中大约 85% -90% 在尿中发现；在第一个 24 小时之内 95% -100% 在尿中发现。总体上，小于 2% 可以在粪便中发现。

[0244] 与离子性对比剂（在它们的分子中包含 3 个碘阴离子）相比，非离子性对比剂（在它们的分子中包含 6 个碘阴离子）被认为是肾毒性较小的。然而，在一项最近的研究中，其中 443 位患者被随机分配一种非离子性对比剂（碘帕醇）以及一种离子性对比剂（泛影酸盐），CIN 的发病率没有统计差异（对应地 8.2% 和 10.2%）(Zirotgiannis et al., "Contrast media induced nephropathy in patients undergoing cardiac catheterization." Hellenic J Cardiol 145:107-113(2004))。此外，最近的证据还指出：在 MRI 研究过程中在暴露于一种含钆对比剂与患有晚期肾病的患者中肾源性纤维性皮肤病（nephrogenic fibrosing dermopathy）的发病率之间的一种相关性 (Agahtehrani and Moussa, Vascular Disease Management, 4:49-59(2007))。因此，无论对比剂的类型如何，对于肾衰竭的机制似乎是相同的，并且本发明的这些芳香族阳离子肽在防止或治疗由这些药剂所引起的 ARI 中是有用的。

[0245] 在 ARI 中对于芳香族阳离子肽的额外应用。在一种另外的实施方案中，一位有需要的受试者可能是患有尿流受损的受试者。尿流阻塞可以发生在尿路的任何地方，并且具有许多不同的可能原因。此类原因包括肾结石或膀胱 / 前列腺癌。单侧输尿管梗阻（UUO）是与尿流阻塞相关联的一种常见的临床紊乱。它还与肾小管细胞凋亡、巨噬细胞浸润、以及间质性纤维化相关联。间质性纤维化导致了低氧环境并且有助于在肾功能方面的进行性降低，尽管有手术矫正。因此，可以对具有或处于 UUO 危险的受试者给予本发明的这些芳香族阳离子肽以保护或治疗该受试者免于 ARI。

[0246] 在本发明的又一个方面，提供了在一种具需要的哺乳动物中用于保护肾脏免于肾纤维化的一种方法。该方法包括给予该哺乳动物如以上所说明的有效量的一种芳香族阳离子肽。以上所说明的这些肽可以如以上所说明、通过本领域内的普通技术人员所已知的任何方法给予需要它们的一种哺乳动物。

[0247] 术语“纤维化”是指纤维组织的异常进程、或类纤维化或纤维退化。纤维化可以由不同的损伤或疾病造成,并且经常可以由与不同器官的移植有关的慢性移植排斥造成。纤维化典型地涉及细胞外基质组分的异常产生、积累、或沉淀,包括例如胶原和纤连蛋白的过量产生以及增加的沉淀。如在此所使用的,术语“肾纤维化”是指肾脏的纤维化。例如,肾纤维化与细胞外基质组分(特别是胶原)的过量产生或异常沉淀相关联,导致肾功能的退化或损伤。

[0248] 在本发明的另一方面,提供了用于在一种有需要的哺乳动物体内治疗急性肾损伤的一种方法。该方法包括给予该哺乳动物如以上说明的有效量的一种芳香族阳离子肽。如以上所说明的这些肽可以如以上所说明、通过本领域内的普通技术人员所已知的任何方法给予需要它们的一种哺乳动物。

[0249] 本发明的这些方法可能在患有肾功能不全、肾衰竭、或肾病末期(可至少部分地归因于一种药物或化学品的肾毒性)是特别有用的。其他适应症可包括具有低于 97(男性)以及 88(女性)ml/min 的肌酐清除率水平,20-25mg/dl 或更高的血尿素。此外,该治疗在以下患者中时有用的,这些患者每 24 小时期间具有超过 1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10g 或更高的微量白蛋白尿、大量白蛋白尿、和 / 或尿蛋白水平、和 / 或大约 1.0、1.5、2.0、2.5、3、3.5、4.0、4.5、5.5、5.6、7、8、9、10mg/dl、或更高的血清肌酐水平。

[0250] 本发明的这些方法可用于减缓或逆转以下患者的肾病进展,相对于对照受试者而言这些患者的肾功能比正常低 25%、40%、50%、60%、75%、80%、90%、或更多。在一些实施方案中,相对于对照受试者而言本发明的这些方法使肾功能的损失减缓了至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、或更多。在一些实施方案中,相对于对照受试者而言本发明的这些方法将这些患者的血清肌酐水平、蛋白尿、和 / 或尿白蛋白排泄物改进了至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、或更多。用于评估肾功能的非限制性说明性的方法在此进行了说明,并且例如在 W001/66140 中。

[0251] 在另一个实施方案中,在本发明中有用的这些肽还可以用来保护受试者的肾脏在移植之前免于急性肾损伤。例如,可以将一个移出的肾脏置于包含以上所说明的这些肽的溶液中。在标准的缓冲溶液中肽的浓度是可以由本领域内的普通技术人员容易确定的。这类浓度可以是,例如在约 0.01nM 至约 10 μ M、约 0.1nM 至约 10 μ M、约 1 μ M 至约 5 μ M、或约 1nM 至约 100nM 之间。

[0252] 治疗 ARI 的方法在本发明的另一方面,本发明提供了用于在有需要的受试者体内治疗急性肾损伤的一种方法。该方法包括给予该受试者如以上说明的有效量的一种芳香族阳离子肽。这些肽可以如以上所说明、通过本领域内的普通技术人员所已知的任何方法给予需要它们的受试者。

[0253] 需要保护免于或治疗急性肾损伤或急性肾损伤的受试者还包括经受与氧化损伤相关联的一种疾病、病况、或治疗的受试者。典型地,这种氧化损伤是由自由基(例如,活性氧(ROS)和 / 或活性氮(RNS))引起的。ROS 和 RNS 的实例包括羟基($\text{HO}\cdot$)、超氧阴离子基($\text{O}_2\cdot^-$)、一氧化氮($\text{NO}\cdot$)、过氧化氢(H_2O_2)、次氯酸(HOCl)、以及过氧化亚硝酸盐阴离子(ONOO^-)。

[0254] 局部缺血或毒性损伤可以导致一种急性的二次病况、被称为急性肾小管坏死(ATN)的肾功能的常见可逆性损失,它是 ARI 的另一个常见的原因。ATN 的过程是三个时期

的 (triphasic)。ATN 的起始期的特征是肾小球滤过率 (GFR) 的突然下降,这是由局部缺血以及相关血液动力学改变所触发的、并且伴随亚致死性的或致死性的肾小管上皮细胞损伤。ATN 的形成期或持续期的特征是 GFR 的持续下降。亚致死性的肾小管损伤包括刷状缘损失、空泡形成、以及近端小管的变平、以及肾小管的舒张。在近端小管可以看到细胞坏死。肾间质组织可能是水肿的,而在髓质中可以观测到白细胞的浸润。远端肾小管腔可能被管型封闭,并且远端 (而非近端) 的肾小管上皮细胞更容易涉及到凋亡。在回收期或利尿期过程中解决了此类结构和功能的紊乱,其中修复性和再生性响应修复了肾结构并且使 GFR 正常化。

[0255] 由局部缺血和肾毒素所引起的 ARI 的常见机制涉及:线粒体功能障碍和 ATP 不足,它们导致肾脏近端肾小管细胞 (RPTC) 损伤并且坏死。就形态学与功能这二者而言,RPTC 是高度特异性的,允许将水、离子、以及大分子经由特殊的转运机制进行有效转运。RPTC 包含非常高密度的线粒体,并且氧被用来维持氧化磷酸化以及 ATP 的合成,这需要大量的 ATP 用于肾脏肾小管运输过程。在局部缺血过程中,由于细胞内 ATP 损失这些运输过程被严重破坏。血流的恢复将会有助于限制细胞死亡,但是线粒体功能的恢复取决于局部缺血的持续时间。延长局部缺血,有证据显示氧化磷酸化的速率持续恶化,尽管进行了再灌注。进行性局部缺血导致线粒体电子传递链中几个组分 (包括复合物 I、复合物 V、以及腺嘌呤核苷酸转运蛋白) 的抑制、以及 ATP 产物的下降。此外,局部缺血降低了心脏线粒体中的心磷脂和细胞色素 c 的含量,这两者均会抑制细胞色素 c 氧化酶的活性。因此,线粒体在局部缺血过程中可以遭受损伤,这将在用再灌注来恢复氧和底物时限制它们产生 ATP 的能力。

[0256] 此外,在再灌注过程中受损的线粒体产生了大量的 ROS,并且作为局部缺血之后铁过载的结果存在着过量的羟基。线粒体在正常情况下由线粒体抗氧化剂体系的多层网络进行保护免于氧化损伤,但是当 ROS 产物超过线粒体的抗氧化剂能力时它们可以经受氧化损伤。ROS 可以启动对线粒体中的核酸、蛋白、以及脂质的损害。蛋白质的氧化作用和硝化作用在线粒体电子传递链中导致了多种酶的功能改变,而腺嘌呤核苷酸转运蛋白的氧化作用削弱了 ADP 进入基质用于 ATP 合成的注入量。通过增强膜通透性、降低 F_0F_1 ATP 酶活性、并减少 ATP 产物,ROS 已经显示损害了肾脏的线粒体。

[0257] 因此,线粒体功能障碍可以导致坏死或凋亡。坏死的特征是细胞膨胀和细胞膜的破裂,导致细胞内容物的释出、尤其是蛋白水解酶类,这些酶可以导致相邻细胞的破坏。另一方面,凋亡被定义为编程性细胞死亡,其中有机体消除了衰老的异常细胞、而没有影响周围的细胞,并且被认为对于该生物体的存活是优选的,因为它通过吞噬作用除去即将死亡的细胞。在通过凋亡或坏死而死亡之间的决定性步骤似乎取决于细胞内 ATP 的含量。凋亡涉及要求能量的步骤,特别是在 Apaf-1 与细胞色素 c 之间凋亡体复合物的形成。因此,当细胞 ATP 显著地耗尽时,死亡只得通过坏死发生。

[0258] 存在着不断积累的证据,表明线粒体 ROS 由于肾毒素在急性肾毒性中的作用 (Baliga et al. Drug Metab Rev, 31:971-997 (1999))。顺铂诱导的线粒体氧化应激,降低的 ATP 和谷胱甘肽、心磷脂过氧化反应和凋亡,以及顺铂的肾毒性可以用羟基清除剂进行改善 (N.A., et al., Cancer Chemother Pharmacol, 61:145-155 (2008))。放射性对比染料增加了体内 (Beeri, R., et al. Rapid DNA fragmentation from hypoxia along the thick ascending limb of rat kidneys. Kidney Int, 47:1806-1810 (1995))、以

及体外 (Hizoh et al., Nephrol Dial Transplant, 13:911-918(1998); Heinrich et al., Radiology, 235:843-849(2005)) 的肾小管细胞凋亡的速率。然而,放射性对比染料介质的肾毒性 (nephrotoxicity) 不能仅仅通过氧化应激来解释,并且线粒体膜学和完整性似乎也发挥一种重要的作用 (Zager et al., Radiographic contrast media-induced tubular injury: evaluation of oxidant stress and plasma membrane integrity. Kidney Int, 64:128-139(2003); Humes et al., Am J Physiol, 252:F246-255(1987))。氧化损伤还已经涉及到肾后阻塞性 ARI, 并且有证据显示内在的线粒体介导的凋亡通路参与了牵张诱导的肾小管细胞凋亡 (Zhang, G., et al., Exp Nephrol, 9:71-80(2001))。

[0259] 在上皮细胞被损害时,它们释放炎症介导体 (包括 IL-1 β 和 TNF α), 它们导致了由白细胞的浸润以及促炎性细胞因子、趋化因子、以及 ROS 的释放所启动的一种强烈的炎症应答。观察到了白细胞浸润以及肾脏的局部缺血再灌注、输尿管梗阻、以及肾毒素, 并且该炎症过程促进了 ARI。浸润性淋巴细胞巨噬细胞被激活并且开始分泌促纤维化 (profibrotic) 细胞因子以及生长因子 (如 TGF β 、IL-13、以及 PDGF), 它们进一步激活巨噬细胞和成纤维细胞。TGF β 通过下调 E-钙粘素并且上调 α -SMA 表达、以及增加胶原产物、在上皮的-间充质转变 (EMT) 中发挥一种中枢作用。当肌纤维母细胞合成新胶原超过其降解的速率时发生纤维化, 这样使得胶原的总量随着时间增加。这些趋化因子 (如 MCP-1) 还通过将巨噬细胞和肌纤维母细胞招募到损伤位点上而在纤维化方面发挥作用。胶原周转和 ECM 重新塑造是由不同的基质金属蛋白酶 (MMP) 调节的。

[0260] 保护或治疗受试者免于组织损伤或器官衰竭的方法

[0261] 本发明的这些芳香族阳离子肽在防止或治疗 ARI 方面是有用的这一发现还适用于包括肾脏在内的其他系统中的组织损伤和器官衰竭。例如, 本发明的这些芳香族阳离子肽预计使线粒体功能障碍、细胞死亡、炎症、以及纤维化最小化。在一些实施方案中, 本发明提供了治疗受试者的方法, 该受试者患有一种组织损伤, 例如非感染性的病理学病况, 如胰腺炎、局部缺血、多重创伤、出血性休克、以及免疫介导的器官损伤。

[0262] 这种组织损伤可以与例如主动脉瘤修复、多重创伤、外周血管疾病、肾血管疾病、心肌梗塞、中风、脓毒症、以及多重器官衰竭相关联。在一个方面, 本发明涉及治疗受试者的方法, 该受试者具有一种组织, 例如来自经历一种损伤和 / 或局部缺血事件的心脏、脑、脉管系统、肠、肝脏、肾脏、以及眼睛。这种方法包括给予受试者治疗有效量的一种芳香族阳离子肽以提供一种治疗性或预防性的作用。本发明的另一个实施方案提供了给予本发明的这些肽以改进选自下组的一种或多种器官的功能, 该组的组成为: 肾脏、肺、心脏、肝脏、脑、胰、等等。在一种具体的实施方案中, 肺功能方面的改进是选自下组, 其组成为: 降低水平的水肿、改进的组织学损伤得分、以及降低水平的炎症。

[0263] 在一些实施方案中, 这些肽对于防止和 / 或治疗由局部缺血、药物 (对乙酰氨基酚、酒精)、病毒、肥胖症 (非酒精性脂肪性肝炎)、以及阻塞 (胆管阻塞、肿瘤) 所引起的急性肝损伤是有用的。在一些实施方案中, 将本发明的这些芳香族阳离子肽给予受试者以防止或治疗急性肝衰竭 (ALF)。ALF 是一种临床病况, 该病况是由肝细胞的严重且广泛的损伤而引起的, 导致在正常情况下发挥作用的肝脏发生衰竭。ALF 由于肝细胞大范围坏死而产生, 导致肝性脑病和严重的肝功能损伤。它是由不同种类的疾病所引起的, 如病毒性肝炎 (甲型、乙型、丙型)、药物毒性、频繁的酒精中毒、以及自身免疫性肝炎。ALF 是一种高死亡

率的非常严重的临床病况。在美国,药物相关的肝细胞毒性是 ALF 的主导原因。

[0264] 在一些实施方案中,在使用已知的或怀疑为诱导肝细胞毒性的一种药物或药剂(例如,对乙酰氨基酚)进行给药之前或同时将本发明的这些芳香族阳离子肽给予受试者以便提供针保护免受 ALF。例如,该受试者可以在接受该药物或药剂之前从约 1 至 2 小时、约 1 至 6 小时、约 1 至 12 小时、约 1 至 24 小时、或约 1 至 48 小时接受这些肽。。类似地,可以在与该药物或药剂相同的时间将这些肽给予该受试者以提供一种预防性的作用来对抗针由这种药物或药剂所引起的 ALF。此外,可以在给予这种药物或药剂之后继续将这些肽给予该受试者。在一些实施方案中,该受试者可以在给予这种药物或药剂之后以大约 1、2、3、4、5、6、7、8、12、24、以及 48 小时的间隔继续接受这种肽,以便提供一种保护性或预防性的作用。

[0265] 在一些实施方案中,将本发明的这些芳香族阳离子肽给予受试者,该受试者展示了 ALF 的一种或多种迹象或症状,包括但不限于:升高水平的肝酶类(转氨酶、碱性磷酸酶)、升高的血清胆红素、升高的血清氨、升高的血清葡萄糖、升高的血清乳酸盐、或升高的血清肌酐。与未给予这些肽的对照受试者相比,给予本发明的这些肽在该受试者中改进了肝功能的这些指示物中一个或多个指示物。该受试者可以在 ALF 的第一个迹象或症状之后从约 1 至 2 小时、约 1 至 6 小时、约 1 至 12 小时、约 1 至 24 小时、约 1 至 48 小时、或约 1 至 72 小时接受这些肽。

[0266] 给药方式

[0267] 在本发明的这些方法中有用的这些肽可以按照一个量值给予受试者,该量值对于在有需要的受试者体内保护受试者免于急性肾损伤或急性肝衰竭是有效的。同样,在本发明的这些方法中有用的这些肽还可以按照一个量值给予受试者,该量值对于在有需要的受试者体内治疗急性肾损伤或急性肝衰竭是有效的。

[0268] 如在此所使用的,术语“有效量”或“药学上有效的量”或“治疗有效量”的一种组合物是一个量值,该量值足以达到一种令人希望的治疗性和/或预防性的效果,例如导致与 ARI 或 ALF 相关联的症状的防止或减少的一个量值。给予该受试者的本发明的一种组合物的量值将取决于这种疾病的类型和严重程度以及该个体的特征,如总体健康状态、年龄、性别、体重、以及对药物的耐受性。它还将取决于疾病的程度、严重程度和类型。熟练的行家将能够根据这些及其他因素来确定适当的剂量。本发明的这些组合物还可以与一种或多种额外的治疗性化合物进行联合给药。在本发明的这些方法中,可以将这些芳香族阳离子肽给予一位受试者,该受试者患有由一种疾病或病况所引起的 ARI 的一种或多种迹象。给予有效量的这些芳香族阳离子肽可以改进该受试者体内的 ARI 的至少一种迹象或症状,例如代谢性酸中毒(血液酸化)、高钾血症(hyperkalaemia)(升高的钾水平)、少尿或无尿(尿产生减少或停止)、体液平衡的改变、以及对其他器官系统的作用。例如,“治疗有效量”的芳香族阳离子肽是指以下水平,其中急性肾衰竭的生理效应在最小程度上是得到了改善。典型地,与未给予这些肽的受试者或一类受试者相比,测量了这种生物效应的效力。

[0269] 这种有效量是在临床前试验和临床试验过程中、通过内科医师和临床医生所熟悉的方法来进行确定的。在本发明的这些方法中有用的有效量的一种肽(优选在一种药物组合物中)可以通过对于给予药物化合物所熟知的多种方法来给予有需要的受试者。

[0270] 在一个优选的实施方案中,这种肽可以进行系统给药或局部给药。在一个实施方

案中,这种肽是经静脉内给药的。例如,在本发明的这些方法中有用的这些芳香族阳离子肽可以是经由快速静脉内弹丸注射来进行给药。然而,优选地是这种肽作为一种恒速的静脉内输注来进行给药。

[0271] 这种肽还可以通过口服、局部、鼻内、肌内、腹膜内、皮下、或经皮进行给药。

[0272] 在本发明的这些方法中有用的这些肽还可以通过持续释放对受试者进行给药,如在本领域中所已知。持续释放给药是递送药物以便在一个特定的时间段达到该药物某一水平的方法。这种水平典型地是通过血清或血浆浓度而测量的。用于通过控制释放来递送一种化合物的方法的说明可以见于 PCT 申请号 W002/083106 中。

[0273] 在药学领域中已知的任何配制品是适合于给予在本发明的这些方法中有用的这些芳香族阳离子肽的。为了进行口服给药,可以使用液体或固体的配制品。配制品的一些实例包括:片剂、明胶胶囊、丸剂、锭剂、酏剂、悬浮液、糖浆、晶片、口香糖、以及类似剂型。这些肽可以与一种适当的药用载体(运载体)或赋形剂进行混合,如本领域内的专业人员所理解。载体和赋形剂的实例包括:淀粉、奶、糖、某些类型的粘土、明胶、乳酸、它们的硬脂酸或其盐类(包括硬脂酸镁或硬脂酸钙、滑石、植物油或脂油、胶质、以及乙二醇)。

[0274] 为了进行全身、口服、腹膜内、局部、鼻内、皮下、或经皮给药,在本发明的这些方法中有用的这些芳香族阳离子肽的配制品可以使用如在本领域中已知的常规的稀释剂、载体、或赋形剂、等等以递送这些肽。例如,这些配制品可以包括以下各项中的一种或多种:一种稳定剂、一种表面活性剂(优选一种非离子型表面活性剂)、以及可任选的一种盐和/或一种缓冲剂。这种肽可以按照一种水性溶液的形式、或按照一种冻干的形式进行递送。

[0275] 例如,该稳定剂可以是一种氨基酸,例如像甘氨酸;或一种寡糖,例如像蔗糖、丁糖(tetralose)、乳糖、或一种葡聚糖。可替代地,该稳定剂可以是一种糖醇,例如像甘露醇;或它们的一种组合。优选地,该稳定剂或稳定剂的组合构成了这种肽重量的从约 0.1% 至约 10% 的重量。

[0276] 该表面活性剂优选地是一种非离子型表面活性剂,如一种聚山梨酸酯。适当的表面活性剂的一些实例包括:Tween20、Tween80;一种聚乙二醇或一种聚氧乙烯聚氧化丙烯二醇,如从约 0.001% (重量/体积) 至约 10% (重量/体积) 的普流尼克 F-68。

[0277] 这种盐或缓冲剂可以是任何盐或缓冲剂,例如对应地像:氯化钠、或磷酸钠/磷酸钾。优选地,该缓冲剂将这种药物组合物的 pH 维持在约 5.5 至约 7.5 的范围内。这种盐和/或缓冲剂对于将重量克分子渗透压浓度维持在一个适合于给予人类或动物的水平上是有用的。这种盐和/或缓冲剂可以按照大约 150mM 至大约 300mM 的大致等渗浓度而存在。

[0278] 在本发明的这些方法中有用的这些肽的配制品可以额外地包含一种或多种常规的添加剂。此类添加剂的一些实例包括:一种增溶剂,例如像甘油;一种抗氧化剂,例如像氯化苄烷铵(季铵化合物的混合物,被称为“季铵化合物”)、苯甲醇、氯丁醇或三氯叔丁醇;麻醉剂,例如像一种吗啡衍生物;或一种等渗剂、等等,如以上所说明。作为针对氧化作用或其他酸败的一种进一步的预防措施,这些药物组合物可以在氮气下储存在用不可渗透的塞子密封在小瓶中。

[0279] 实例

[0280] 实例 1. 保护免受由局部缺血-再灌注(I/R)所引起的肾前性 ARI

[0281] 在由 I/R 所引起的一种动物模型中研究了本发明的这些芳香族阳离子肽在保护

受试者免于由局部缺血 - 再灌注所引起的 ARI 中的作用。

[0282] 将斯普拉 - 道来氏大鼠 (约 250 至 300g) 分配为四组 : (1) 假手术组, 没有 I/R ; (2) I/R+ 盐水运载体处理 ; (3) I/R+SS-20 处理 ; (4) I/R+SS-31 处理。每个实验组由 8 只大鼠组成。在局部缺血之前 30 分钟并且在再灌注发作之前立即将 SS-20 和 SS-31 (3mg/kg, 溶解在盐水中) 给予大鼠。按相同的计划将盐水单独给予这些对照大鼠。

[0283] 用氯胺酮 (90mg/kg, 腹腔注射) 与赛拉嗪 (4mg/kg, 腹腔注射) 的混合物使大鼠麻醉。使用显微夹具将左侧的肾血管蒂暂时封闭 30 或 45 分钟。在局部缺血期结束时, 通过去除该夹具建立再灌注。在那时, 将对侧右肾去除。在再灌注 24 小时之后, 将动物杀死并且通过心脏穿刺获得血液样品。通过血尿素氮 (BUN) 和血清肌酐 (BioAssay Systems DIUR-500and 和 DICT-500) 来测定肾功能。

[0284] 肾脏形态学检验 : 肾脏被固定在 10% 的中性缓冲的福尔马林中, 并且被包埋在石蜡中。将三微米的切片用苏木精 - 曙红 (H&E) 以及高碘酸 - 希夫 (PAS) 进行染色, 并且通过光学显微观察进行分析。使用以下指标来对损害评分 : [1] 单个细胞的有丝分裂以及坏死 ; [2] 在相邻的近曲小管中全部细胞的坏死, 伴随有周围肾小管的存活 ; [3] 限定于该近曲小管的远端三分之一的坏死, 伴随有在内部皮质延伸的坏死带 ; 以及 [4] 影响该近曲小管全部三个区段的坏死。

[0285] 用于凋亡的 TUNEL 测定 : 将肾组织切片脱蜡并且由二甲苯、梯度乙醇系列、以及去离子 H₂O 再水化, 并接着在 RT 下在 20 μ g/ml 的蛋白酶 K 中孵育 20 分钟。根据制造商的说明、使用原位细胞死亡检测 POD 试剂盒 (Roche, IN, USA)。简言之, 通过用在甲醇中的 0.3% H₂O₂ 孵育 10 分钟将在肾切片中的内源性过氧化物酶活性阻断。然后, 在 37°C 下将这些切片在一个潮湿容器中、在黑暗中、用 TUNEL 反应混合物孵育 30 分钟。洗涤之后, 将这些载玻片用 50-100 μ l Converter-POD 在一个潮湿容器中在 RT 下孵育 30 分钟。将这些载玻片在 DAB 溶液中进行孵育 (1-3 分钟)、并且用苏木精进行复染、通过一种梯度系列的乙醇进行干燥、并且在 Permount 中封固用于显微观察。

[0286] 免疫组织化学 : 将肾切片从石蜡块切下, 并且在载玻片上封固。在用二甲苯去除石蜡之后, 使用梯度乙醇系列以及去离子 H₂O 将这些载玻片再水化。在柠檬酸盐缓冲液 (10mM 柠檬酸、0.05% Tween20、pH6.0) 中对抗原修复 (Antigen Retrieval) 加热。使用在甲醇中的 0.3% 过氧化氢对内源性过氧化物酶进行封闭。然后, 使用针对血红素加氧酶 -1 (HO-1) 的第一抗体 (大鼠抗 -HO-1/HMOX1/HSP32 单克隆抗体 (R&D Systems, MN, USA), 在 1:200 稀释下)) 以及第二抗体 (HRP- 偶联的山羊抗 - 大鼠 IgG, VECTASTAIN ABC (VECTOR Lab Inc. MI, USA) 进行免疫组织化学。底物试剂 3- 氨基 -9- 乙基咔唑 (AEC, Sigma, MO, USA) 用于显现红颜色。苏木精用于进行复染。

[0287] 蛋白质印迹法 : 将肾组织在冰上在 2ml 的 RIPA 裂解缓冲液 (Santa Cruz, CA, USA) 中匀浆, 并且以 500x g 离心 30 分钟以去除细胞碎片。将这些上清液的等分部分储存在 -80°C。将每种样品的三十 (30) μ g 的蛋白质悬浮在加样缓冲液中并且煮沸 5 分钟, 然后使每个样品经受 10% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳。将经分辨的蛋白质转移到 PVDF 膜上。在将这种膜在 5% 的脱脂奶粉以及 1% 的牛血清白蛋白中封闭 1 小时之后, 将这种硝酸纤维素印迹与一种 1:2000 稀释的抗 -HO-1/HMOX1/HSP32 或一种 1:1000 稀释的抗 -AMPK α -1 单克隆抗体 (R&D Systems, MN, USA) 进行孵育, 然后与辣根过氧化物酶 - 偶联的第二抗体进行孵育。使

用 Enhanced Chemi Luminescence 检测系统 (Cell Signaling, MA, USA) 和 X 射线胶片将在该印迹中的蛋白质条带检测出。相对密度测量值提供了量化。

[0288] ATP 含量测定:将肾组织立即放入 10ml 的 5% 三氯乙酸中 (具有 10mM DTT、2mM EDTA), 并且切成小块。将该组织在冰上匀浆、再孵育 10 分钟、以 2000x g 离心 10 分钟、并且用 10N KOH 中和至 pH7.6。在以 2000×g 离心 10 分钟之后,将所得到的上清液的等分部分储存在 -80℃。通过生物发光 (ATP 生物发光试剂盒, Sigma, MO, USA) 来测量 ATP。

[0289] 结果:在此研究了本发明的这些芳香族阳离子肽对由局部缺血-再灌注所引起的 ARI 模型的作用。按照以上所说明的这些操作将肾线粒体分离,并且测量了氧耗量。结果如下。

[0290] 表 8. BUN 和血清肌酐值

[0291]

	假	I/R+ 盐水	I/R+SS-20	I/R+SS-31
BUN(mg/ml)	40.8±4.6	170±1.7*	130.7±5.5#	113.8±11.4#
血清肌酐 (mg/ml)	0.56±0.04	1.73±0.12*	1.06±0.11#	1.05±0.16#

[0292] 以上表格显示了在局部缺血 45 分钟并且再灌注 24 小时之后用 SS-20 或 SS-31 进行治疗改进大鼠中的 BUN 和血清肌酐值。使用来自生物测定系统 (BioAssay Systems, DIUR-500 和 DICT-500) 的试剂盒测定了 BUN 和血清肌酐。* 指示与该假组相比, $p < 0.05$ 。# 指示与 IR = 盐水组相比, $p < 0.05$ 。

[0293] 图 1 显示:在 30 分钟局部缺血并且再灌注 24 小时之后用 SS-20 或 SS-31 进行治疗防止肾小管细胞的凋亡。使用 TUNEL 针对凋亡细胞将肾切片进行染色。在未经受 I/R 的动物髓质区域中观察到非常少的 TUNEL 阳性细胞 (图 1a)。在局部缺血 30 分钟并且再灌注 24 小时之后的动物髓质中观察到了大量的 TUNEL 阳性上皮细胞 (图 1b)。在局部缺血 30 分钟开始之前、并且刚好在再灌注之前用 SS-20 (3mg/kg) 或 SS-31 (3mg/kg) 处理 30 分钟,在髓质中显著地阻止了 TUNEL 阳性细胞 (图 1c 和图 1d)。

[0294] 图 2 显示:在局部缺血 45 分钟并且再灌注 24 小时之后用 SS-20 或 SS-31 进行治疗防止肾小管细胞损伤。将肾切片用 H&E (图 2a-2d) 和 PAS (图 2e-2h) 染色。局部缺血-再灌注导致了在髓质内部的近端小管中刷状缘损失、空泡形成以及坏死,并且这些远端小管是由管型封闭的 (图 2b)。用 SS-20 或 SS-31 进行预处理在这些近端小管中保护了刷状缘并且防止坏死 (图 2c 和图 2d)。

[0295] 图 3 显示:用 SS-20 或 SS-31 进行治疗显著地改进了由于局部缺血 45 分钟并且再灌注 24 小时所导致的组织病理学得分。数据显示为平均数 ± SD。单因素方差分析 (one-way ANOVA) 和 Scheffe's 检验用于多个成对的比较。

[0296] 图 4a 和 4b 显示:用 SS-20 或 SS-31 进行治疗在再灌注之后显著地增加了 ATP 产生的速率。在局部缺血 15 分钟结束时 (图 4a)、并且在局部缺血 45 分钟之后再灌注 1 小时以后 (图 4b) 测定在肾组织中的 ATP 含量。在局部缺血 15 分钟之后 ATP 被显著降低,并且这没有通过用 SS-20 或 SS-31 进行预处理而被改变。在运载体对照组中在再灌注 1 小时之后 ATP 的含量仍然是非常低的,但是在用 SS-20 或 SS31 处理的动物中是显著地更高的。

[0297] 图 5 显示 :用 SS-20 或 SS-31 进行预处理在局部缺血 45 分钟之后显著地改进了肾线粒体的呼吸。加入 ADP 来启动呼吸状态 3。在局部缺血 45 分钟之后从大鼠分离的线粒体中氧耗量是显著降低的。用 SS-20 或 SS-31 进行预处理显著地改进了氧耗量,这样使得局部缺血的线粒体与非局部缺血性对照没有不同。

[0298] 总之,这些结果表明 :这种肽 SS-31 和 SS-20 在减低由局部缺血 - 再灌注所引起的 ARI 的发病率中是有效的。这样,本发明的这些芳香族阳离子肽在保护受试者免于由局部缺血所引起的 ARI 的方法中是有用的。

[0299] 实例 2. 保护免受由输尿管梗阻所引起的 ARI

[0300] 在一种输尿管梗阻的动物模型中,研究了本发明的这些芳香族阳离子肽在保护受试者免于由输尿管梗阻所引起的 ARI 方面的作用。这个实例说明了此类实验的结果。

[0301] 经历了在无菌条件下用 4-0 丝线经由中线剖腹术对斯普拉 - 道来氏大鼠进行单侧输尿管结扎 (UUO)。通过在下部输尿管的末端 (正好在输尿管膀胱接点以上) 结扎左侧输尿管实施输尿管梗阻。

[0302] 在 UUO 的前一天经腹膜内给予 SS-31 (1mg/kg 或 3mg/kg ;n = 8), 并且持续 14 天。对一个分开的动物组供给盐水,作为一种运载体对照物 (n = 16)。

[0303] 肾组织学 :由通过专业资格认证的病理学家 (SVS, 肾病理学专家) 检验石蜡包埋的标本的三色切片,并且按照 0-+++ 的等级对纤维化进行评分。

[0304] 免疫组织化学分析 :使用针对 ED-1 (Serotec) 的单克隆抗体对巨噬细胞进行免疫组织化学染色,如以前所说明。由两位不同的独立的调查者以一种盲法方式在 10 个高倍视野中 (x400) 对巨噬细胞进行计数。如在实例 1 中所说明进行 TUNEL 测定。使用免疫组织化学来检验成纤维细胞的存在,如在实例 1 中所说明。所使用的抗体是 DAKO#S100-A4 (1:100 稀释)。S100-A4 抗原也被称为 FSP-1 (成纤维细胞特异性蛋白)。通过在烘箱中将细胞与蛋白酶 K 孵育达 20 分钟使抗原修复。根据常规操作进行剩余的免疫过氧化物酶的科学试验方案。在纺锤形间质细胞中、并且还在圆形的且由病理学家鉴定为炎症细胞的细胞中发现了针对 S100-A4 的染色。仅仅将纺锤形细胞归入这些计数中。未用与第一抗体进行孵育的样品没有显示出染色。使用蛋白酶 K 用于抗原修复来进行 8-OHdG 染色。所使用的抗体来自日本衰老控制研究所 (The Japan Institute Control of Aging), 并且将其以 1:200-1:500 的稀释进行使用。

[0305] 聚合酶链反应分析 :以下对从肾脏分离的血红素加氧酶 -1 (HO-1) 进行 PCR。收获大鼠的肾脏,并且将其保存在 -80℃ 直到使用。使用 Trizol[®] - 氯仿提取操作来提取总 RNA。根据制造商的说明书,使用 Oligotex mRNA 提取试剂盒来纯化 mRNA (Qiagen, Valencia, California)。通过在 260nm 测量吸光度来确定 mRNA 的浓度和纯度。使用 Qiagen 的一步法 PCR 试剂盒 (Qiagen, Valencia, California) 进行 RT-PCR。PCR 是在自动化的热循环器 ThermoHybrid, PX2 中进行的,其中起始活化步骤在 95℃ 下持续 15 分钟、之后跟随在 94℃ 下变性作用 45 秒循环 35 次、在 60℃ 下退火 30 秒、在 72℃ 下延伸 60 秒。通过 2% 的琼脂糖凝胶电泳使 PCR 产物分离。通过溴化乙锭使在凝胶上的条带可视化,并且使用 Image J 光密度分析软件对其进行分析。对于 HO-1 的引物是 :CTG AAG AAG ATT GCG CAG AA (SEQ ID NO:1) 和 ATG GCA TAA ATT CCC ACT GC (SEQ ID NO:2) [427bp]。GAPDH 作为对照物来使用。

[0306] 结果。依照刚才所说明的这些操作,在一种输尿管梗阻的动物模型中研究了本发明的这些芳香族阳离子肽在保护受试者免于由输尿管梗阻所引起的 ARI 方面的作用。UUO(14 天)在肾脏中产生了一组特征性的变化,包括增加的间质性纤维化、肾小管凋亡、巨噬细胞浸润、以及肾小管增殖。在 UUO 的前一天用 SS-31 将动物预处理,并且每日一次持续 14 天。对照动物在整个 UUO 期间仅接受盐水。

[0307] 对侧未梗阻的肾脏(图 6a, CK)在肾小管、肾小球、或间质组织中显示出极少的(若有的话)炎症或纤维化(数据未显示)。对照运载体处理组的梗阻肾脏(图 6b, OK)显示出中等的(1-2+)髓质三色染色、同时局灶肾盂(peripelvic)的区域具有 1+ 染色。比髓质相比,皮质显示出较少的纤维化。OK 还可以显示出中等的炎症,总体上在皮质中得分为 1+ 并且在髓质中为 2+。SS-31 处理的肾脏(图 6c)显著地显示出较低三色染色,在皮质为 0-痕量并且在髓质中为 tr-1+。在测量间质体积时,与 CK 中的 $0.5\% \pm 0.1\%$ 相比,在对照 OK 中髓质间质的体积是 $69.2\% \pm 2.1\%$ (图 6d)。用 1mg/kg SS-31 处理将间质体积方面的增加调整至 $54.9\% \pm 2.3\%$;更高剂量的 SS-31 也是有效的。因此,在 14 天 UUO 模型中 SS-31 减少了髓质的纤维化。

[0308] 通过针对成纤维细胞特异性蛋白质(FSP-1)的免疫过氧化物酶使成纤维细胞可视化。在 OK 组中发现了 FSP-1 的增加的表达(16.9 ± 2.3 细胞/HPF),在对照 CK 组中仅存在少量的间质成纤维细胞(1.1 ± 0.3 FSP+ 细胞/HPF)(图 7)。SS-31(1mg/kg)将 OK 中成纤维细胞浸润的量值显著地降低至对照物的 43.4%;SS-31(3mg/kg)处理将 OK 中成纤维细胞浸润的量值进一步降低至未经处理的 OK 的 28.0%。因此,在 14 天 UUO 模型中 SS-31 减少了成纤维细胞的表达。

[0309] 在未经处理的 OK 中,与 CK 相比 2 周 UUO 导致凋亡的肾小管细胞显著增加。通过使用 TUNEL 测定使凋亡的细胞可视化。 1mg/kg 的 SS-31 将肾小管的凋亡从 15.1 ± 3.1 凋亡细胞/HPF 显著地降低至 5.1 ± 0.5 细胞/HPF($p < 0.05$); 3mg/kg 的 SS-31 造成了肾小管凋亡的进一步显著减少(3.0 ± 0.3 凋亡细胞/HPF)(图 8)。因此,在 14 天 UUO 模型中 SS-31 减少了肾小管的凋亡。

[0310] 与 CK 相比较,在 2 周 UUO 之后在巨噬细胞浸润进入 OK 方面存在着显著的增加(0.04 ± 0.03 细胞/HPF 对比 33.8 ± 6.3 细胞/HPF)。通过针对 ED-1 的免疫过氧化物酶使巨噬细胞可视化。 1mg/kg 和 3mg/kg 的 SS-31 这两者均显著地降低巨噬细胞浸润进入 OK 中(图 9)。因此,在 14 天 UUO 模型中 SS-31 减少了巨噬细胞的表达。

[0311] 被梗阻的肾脏与肾小管细胞增加的增殖相关联,如通过针对 PCNA 的免疫过氧化物酶进行可视化。SS-31 在 OK 中造成肾小管增殖的显著增加。在 1mg/kg 的剂量下肾小管的增殖增加 2 倍,并且在 3mg/kg 、在 3mg/kg 的剂量下增加 3.5 倍(图 10)。因此,在 14 天 UUO 模型中 SS-31 增加了肾小管的增殖。

[0312] 被梗阻的肾脏(OK)显示出升高的氧化损伤,正如通过血红素加氧酶-1(HO-1)以及 8-OH dG 的增加的表达所评定。RT-PCR 用于 HO-1 表达。UUO 与 HO-1 增加的表达相关联(HO-1/GADPH1.09 对比在未梗阻的对照物中的 0.07)(图 11a)。在被梗阻的肾脏中用 SS-31 处理降低了 HO-1 表达。在被梗阻的肾脏的肾小管和间质性隔区这两者中均检出了 8-OH dG 染色(图 11b)。与 CK 相比,在 OK 中 8-OH dG 阳性细胞的数目/HPF 显著增加(5.0 ± 1.4 细胞/HPF 对比 1.4 ± 0.1 细胞/HPF),并且用 SS-31 处理使其显著降低(图 11c)。因此,在 14

天 UUO 模型中 SS-31 减少了氧化损伤。

[0313] 总之,这些结果表明:在由输尿管梗阻所引起的 ARI 动物模型中肽 SS-31 在降低间质性纤维化、肾小管凋亡、巨噬细胞浸润、以及肾小管增殖方面是有效的。这样,本发明的这些芳香族阳离子肽在保护受试者免于由输尿管梗阻所引起的急性肾损伤的方法中是有用的。

[0314] 实例 3. 在 Indo/L-NAME 动物模型中治疗和防止 CIN

[0315] 在由给予放射性对比染料所引起的 ARI 动物模型中,研究了本发明的这些芳香族阳离子肽在保护受试者免于 CIN 方面的作用。这个实例说明了此类实验的结果。

[0316] 实验 1

[0317] 动物模型:一种放射性对比染料诱导的肾衰竭的模型,如在这种实例中由 Agmon et al. J Clin Invest 94:1069-1075 (1994) 所说明。正如在人类中,放射性对比染料当给予具有正常肾功能的动物时总体上是无毒的。然而,放射性对比染料在具有受损肾功能的动物中可以诱导 ARI。在这种模型中,通过给予吲哚美辛 (10mg/kg) 和 L-NAME (10mg/kg) 诱导了受损的肾功能。这些动物被分成 3 组:

[0318] 1. (1) 组对照物 (n = 8)

[0319] 2. (2) 组吲哚美辛 /L-NAME (分别供给 15 分钟),之后跟随碘酞酸盐 (AngioConray 6ml/kg) (n = 7)。

[0320] 3. ((3) 组在给予吲哚美辛 /L-NAME/ 碘酞酸盐之前供给 SS-31 (3mg/kg, 腹腔注射) 15 分钟,并且在药物暴露之后立即重复第二剂量的 SS-31 (3mg/kg) (n = 9)。

[0321] 实验性的科学试验计划:大鼠被放在代谢笼中 (Nalge Co, Rochester, NY), 自由获取水以及标准的大鼠食物。在收集基线 24 小时尿之后,用氯胺酮 (90mg/kg, 腹腔注射) 与赛拉嗪 (4mg/kg, 腹腔注射) 的混合物使这些大鼠麻醉。将导管插入左侧股静脉和动脉,并且提取基线血液样品 (1ml) 用于肌酐水平的测量。然后,这些动物接受不同的药物治疗,如以上所指出。然后,将碘酞葡胺 60% (对比染料; AngioConray 6ml/kg) 经由动脉插管进行注射。然后,将左侧股动脉结扎并且将插管移出。然后,使大鼠返回至代谢笼中用于收集另一个 24 小时尿。在这一时期结束时,从尾部静脉提取血液样品 (1ml)。在此之后,将这些动物麻醉,将肾脏移出并且使这些动物安乐死。

[0322] 肾功能:通过确定基线处以及给予染料 24 小时之后的 GFR 来评定肾功能。通过在给予染料之前和之后的 24 小时内所估计的肌酐清除率来测定 GFR。通过测量血浆肌酐 (Pcr)、尿肌酐 (Ucr) 的水平 (Bioassay Systems; DICT-500) 以及尿量来分析肌酐清除率。

[0323] 肾组织学:肾脏被固定在 10% 的中性缓冲的福尔马林中并且被包埋在石蜡中。将三微米的切片用苏木精-曙红 (H&E) 以及高碘酸-希夫 (PAS) 染色,并且由经专业资格认证的病理学家通过光学显微观察进行分析。

[0324] 结果:依照刚才所说明的这些操作,在由给予放射性对比染料所引起的 ARI 动物模型中研究了本发明的这些芳香族阳离子肽在保护受试者免于 CIN 方面的作用。这些结果如下。

[0325] 在这些对照大鼠中,在第一个 24 小时期间 ($235.0 \pm 30.5 \mu\text{l/min/g}$) 与第二个 24 小时期间 ($223.7 \pm 44.0 \mu\text{l/min/g}$) 之间 GFR 没有显著差异 (图 12)。在将对比染料给予用吲哚美辛和 L-NAME 预处理的动物时,GFR 在 24 小时内从 $230.8 \pm 21.0 \mu\text{l/min/g}$ 减少至

87.6±10.6 μl/min/g。在给予染料之前和之后用 SS-31 治疗降低了肾功能的下降,并且 GFR 仅仅从 247.9±20.4 μl/min/g 下降至 157.9±26.6 μl/min/g。SS-31 对染料注射之后的 GFR 的作用是显著的(当与运载体处理组相比时 P<0.05)。九只 SS-31 治疗的大鼠中有六只几乎受到完全地保护免于染料的作用。因此,SS-31 降低了由放射性对比染料所引起的肾功能障碍。

[0326] PAS 染色示出了对照大鼠肾具有正常形态学,这是通过近端小管上完整的刷状缘所证明的(图 13a)。染料处理导致了近端小管细胞中特征性肾刷状缘的损失、连同一些空泡形成(图 13b)。用 SS-31 处理缓解了这些效应,在这些样品中 PAS 染色示出了完整的刷状缘以及正常的肾小球(图 13c)。因此,SS-31 保护肾小管免于放射性对比染料损伤。

[0327] TUNEL 染色用于是凋亡的肾小管可视化。对照肾脏显示出少量的凋亡细胞/hpf(图 14a)。运载体处理的、注射染料的肾脏具有大量的凋亡细胞/hpf(图 14b)。这种效应在 SS-31 处理的、注射染料的肾脏中被大大地缓解(图 14c)。因此,SS-31 防止了由放射性对比染料损伤所诱导的肾小管凋亡。

[0328] 总之,这些结果表明肽 SS-31 在减低肾功能障碍、保护肾小管免于放射性对比染料损伤方面是有效的。这样,本发明的这些芳香族阳离子肽在保护受试者免于由对比剂所引起的急性肾损伤的方法方面是有用的。

[0329] 实验 2

[0330] 动物模型:在本实验中使用了如以上所说明的相同的吲哚美辛和 L-NAME 模型。在这种模型中,通过给予吲哚美辛(8mg/kg)和 L-NAME(10mg/kg)诱导了受损的肾功能。这些动物被分成 2 组,使用了在图 15 中所呈现的给药计划以及科学研究试验方案。

[0331] 肾功能:使用来自 Bioassays Systems 的 DICT 试剂盒(Hayward,CA)、通过确定基线处的以及给予染料 26 小时之后的血清和尿肌酐来评定肾功能。通过 BCA 蛋白测定试剂盒(Thermo Scientific, Rockford, IL)还确定了基线处的和给予染料 26 小时之后的尿蛋白浓度。通过 T 检验分析样品,并且差异在 p<0.05 被认为是显著的。

[0332] 肾组织学:肾脏被固定在 10%的中性缓冲的福尔马林中,并且被包埋在石蜡中。将三微米的切片用苏木精-曙红(H&E)以及高碘酸-希夫(PAS)染色,并且由专业资格认证的病理学家通过光学显微观察进行分析。

[0333] 结果:依照刚才所说明的这些操作,在由放射性对比染料给药所引起的 ARI 动物模型中研究了本发明的这些芳香族阳离子肽在保护受试者免于 CIN 方面的作用。这些结果如下。

[0334] 表 9. 肾功能分析的结果

[0335]

	基线	1 天
A: Indo/L-Name/ 染料 /PBS		
动物的数目	9	7
体重 (g)	278±2.5	263±2.2

SCr(mg/dL)	0.61±0.02	0.85±0.07
Ucr(mg/dL)	11.88±3.11	58.97±11.62
尿量 (ml)	N. A.	N. A.
尿蛋白 (mg/ml)Bradford	N. A.	N. A.
尿蛋白 (mg/ml)BCA	4.32±1.65	21.72±4.63
B: Indo/L-Name/ 染料 /SS-31		
动物的数目	9	7
体重 (g)	278±5	258±5
SCr(mg/dL)	0.67±0.09	0.73±0.04
Ucr(mg/dL)	15.54±3.87	38.12±8.19
尿量 (ml)	N. A.	N. A.
尿蛋白 (mg/ml)Bradford	N. A.	N. A.
尿蛋白 (mg/ml)BCA	4.28±1.15	11.76±2.71

[0336] 数据表示为平均数 ±SEM

[0337] 对于用吲哚美辛和 L-NAME 预处理的大鼠, 给予对比染料将血清肌酐从基线水平 0.61 ± 0.02 (mg/dL) 诱导增加至 0.85 ± 0.07 (mg/dL); 并且尿蛋白浓度在 26h 时从 4.32 ± 1.65 (mg/ml) 增加至 21.72 ± 4.63 (mg/ml)。这代表在给予对比染料 26 小时之后 Scr 增加 40% 并且蛋白浓度增加 4 倍。相比之下, 在给予染料之前和之后用 SS-31 处理降低了肾功能的下降, 并且血清肌酐仅仅从基线水平 0.67 ± 0.09 (mg/dL) 增加至 0.73 ± 0.04 (mg/dL); 并且尿蛋白浓度从 4.28 ± 1.15 (mg/ml) 增加至 11.76 ± 2.71 (mg/ml)。这代表在给予对比染料 26 小时之后 Scr 仅仅增加 9% 并且蛋白浓度增加 1.7 倍。七只 SS-31 处理的大鼠中有五只受到保护免于对比染料诱导的肾病 (即, 在用染料 26 小时之后 Scr 增加小于 25%)。

[0338] PAS 染色示出了染料处理导致近端小管细胞中特征性肾刷状缘的损失、连同一些空泡形成 (图 16a)。用 SS-31 处理使这些效应得到缓解, 在这些样品中 PAS 染色示出了完整的刷状缘以及正常的肾小球 (图 16b)。图 16c 显示对照大鼠的肾脏具有正常的形态学, 这是由近端小管上完整的刷状缘所证明的。因此, SS-31 防止了由放射性对比染料损伤所诱导的肾小管凋亡。

[0339] 总之、这些结果表明肽 SS-31 在减低肾功能障碍、保护肾小管免于放射性对比染料损伤方面是有效的。这样, 本发明的这些芳香族阳离子肽在保护受试者免于由对比剂所引起的急性肾损伤的方法方面是有用的。

[0340] 实例 4. 在糖尿病动物模型中治疗和防止 CIN

[0341] 实验 1

[0342] 动物模型：由糖尿病所引起的肾功能损害是针对对比物诱导的肾病的主要诱病因素 (pre-disposing factor) 之一 (McCullough, P et al., J. Am. College of Cardiology, 2008, 51, 1419-1428)。在这种实验中, 用高脂饮食饲喂总共 57 只 SD 大鼠达 6 周, 随后注射低剂量的链脲菌素 (30mg/kg)。在 9 周多之后, 测量血糖、血清肌酐、以及半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C。基于以下选择指标: Scr>250 μ M、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C>750ng/ml、以及血糖 $\geq$ 16.7uM, 选择 20 只大鼠来进行对比物诱导的肾病研究。

[0343] 这些动物被分成 2 组。对组 1 的大鼠饲喂给予碘海醇和 SS-31; 对组 2 的大鼠给予碘海醇以及一种对照运载体。第 1 天, 从在每组大鼠收集血清样品, 并且使用 Bradford 测定来测量尿中的总蛋白。第 2 天和第 3 天, 在染料注射 (6mL/kg, 尾静脉注射) 之前 30 分钟, 皮下给予 3mg/kg SS-31 (组 1) 或一种运载体 (组 2)。在给予染料 2 小时和 24 小时之后, 重复给予 SS-31 (组 1) 或 PBS (组 2)。在第 4 天和第 5 天收集血清和尿样品。第 5 天, 将这些大鼠安乐死来收获肾脏以及重要的器官。通过 T 检验来分析样品, 并且差异在 $p<0.05$ 被认为是显著的。

[0344] 肾功能: 使用 Jiancheng Cr 试剂盒 (Nanjing, P. R. C)、通过确定基线处的以及给予染料 48 小时和 72 小时之后的血清和尿肌酐来评定肾功能。基于 Scr、Ucr、以及尿量来计算肌酐清除率。通过 Bradford 蛋白测定试剂盒 (Sigma, St. Louis, MO) 来确定尿蛋白浓度。用 Westang 大鼠半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 试剂盒 (Shanghai, P. R. C) 来测量半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C。

[0345] 结果: 依照刚才所说明的这些操作, 在一种糖尿病动物模型中研究了本发明的这些芳香族阳离子肽在缓解 CIN 方面的作用。这些结果概括于表 10 以及图 17a 和图 17b 中。

[0346] 表 10. 肾功能分析的结果

[0347]

	基线	T1	T2
组 1: HFD/STZ/碘海醇/SS-31			
动物的数目	10		
体重 (g)	478.5 ± 9.30	479.0 ± 8.5	474.9 ± 8.4
Scr (μmol/L)	305.7 ± 15.1	285.4 ± 12.0	295.7 ± 20.6
半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C (ng/ml)	708.6 ± 51.3	1008.1 ± 46.4	1303.6 ± 147.1
Ucr (μmol/L)	3187.0 ± 196.9	2816 ± 163.6	2675.4 ± 100.8
尿量 (ml)	15.4 ± 2.6	17.4 ± 1.6	20.5 ± 2.3
尿蛋白 (mg/4 h)	4.83 ± 1.03	4.71 ± 0.60	3.59 ± 1.0
GFR (μl/min/100g)	140.0 ± 11.1	149.3 ± 15.6	162.7 ± 18.7
尿白蛋白 (μg/ml)	15.9 ± 2	17.6 ± 2.8	9.6 ± 3.3
尿白蛋白 (μg/4 h)	241.5 ± 44.6	291.9 ± 46	187.2 ± 64.1
组 2: HFD/STZ/碘海醇/PBS			
动物的数目	10		
体重 (g)	489.3 ± 11.5	487.6 ± 11.5	482.2 ± 11.5
Scr (μmol/L)	260.0 ± 12.0	257.2 ± 21.9	249.5 ± 18.8
半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C (ng/ml)	655.9 ± 49.1	938.4 ± 57.9	1576.7 ± 149.9
Ucr (μmol/L)	3367.5 ± 376.0	3498.0 ± 691.0	3079.4 ± 381.3
尿量 (ml)	14.37 ± 2.0	13.2 ± 2.3	16.6 ± 2.8
尿蛋白 (mg/4 h)	3.44 ± 0.75	3.04 ± 0.32	4.52 ± 1.0
GFR (μl/min/100g)	158.5 ± 18.6	153.6 ± 17.3	177.3 ± 23.0
尿白蛋白 (μg/ml)	10.4 ± 1.4	22.4 ± 7.3	9 ± 2.2
尿白蛋白 (μg/4 h)	130.2 ± 15.6	184.7 ± 46.8	115.3 ± 17.7

[0348] 在将对比染料给予糖尿病大鼠时,对于运载体处理组而言,血清半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C(一种 AKI 生物标志物)的水平从 655.9 ± 49.1 (基线) 升高至 938.4 ± 57.9 (给予染料之后 48 小时) 以及 1576.7 ± 149.9 (ng/ml) (给予染料之后 72 小时);而对于 SS-31 处理组而言,半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 在相同的时间内仅仅从 708.6 ± 51.3 升高至 1008.1 ± 46.4 和 1303.6 ± 147.1 (ng/ml) (图 17a)。在 72 小时,SS-31 在对半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的增加进行缓解方面是统计学显著的 ($P < 0.05$)。

[0349] 在将对比染料给予糖尿病大鼠中时,对于运载体处理组而言,在染料注射之后 48 小时肌酐清除率降低了超过 20% (图 17b)。相比之下,对于 SS-31 处理组,在染料注射之前和之后在相同的时间内肌酐清除率没有发生显著变化。SS-31 在对由给予染料所诱导的肌酐清除率进行缓解方面是统计学显著的 ($P < 0.05$)。因此,在一种糖尿病动物模型中 SS-31 降低了由放射性对比染料所引起的肾功能障碍。这样,本发明的这些芳香族阳离子肽在保护受试者免于由对比剂所引起的急性肾损伤的方法方面是有用的。

[0350] 实验 2

[0351] 在本实验中,用高脂饮食饲喂 30 只 SD 大鼠达 6 周,随后注射低剂量的链脲菌素 (30mg/kg)。在 9 周多之后,将这些大鼠用于对比物诱导的肾病研究。这些动物被分成 2 组,使用以下的剂量、给药计划以及科学研究试验方案。第 0 天,确定这些动物的重量并且收集葡萄糖和血清样品。第 1 天,测定 Scr 并且进行定点尿的收集。第 2 天和第 3 天,在染料注射 (6mL/kg,尾静脉注射) 之前 30 分钟皮下给予 3mg/kg SS-31 (组 1) 或一种运载体 (组 2)。在给予染料之后 2 小时、1 天、2 天、3 天、4 天、以及 5 天重复给予 SS-31 (组 1) 或

PBS(组 2)。第 8 天,收集血清和尿样品并且将这些大鼠安乐死以收获肾脏和重要的器官。

[0352] 肾功能:使用 Jiancheng Cr 试剂盒(Nanjing, P. R. C) 通过确定基线处的以及给予对比染料之后 24 小时、3 天、以及 6 天的血清和尿肌酐来评定肾功能。基于 Scr、Ucr、以及尿量来计算肌酐清除率。通过 T 检验来分析样品,并且差异在 $p<0.05$ 被认为是显著的。

[0353] 结果:依照刚才所说明的这些操作,在一种糖尿病动物模型中研究了本发明的这些芳香族阳离子肽在缓解 CIN 方面的作用。这些结果呈现在表 11 和图 18 中。

[0354] 表 11. 肾功能分析的结果

[0355]

组 A: HFD/STZ/碘海醇/SS-31	基线	T1	T2	T3
动物的数目	15			
体重 (g)	541.9 ± 23.4	566.5 ± 20.3	565.6 ± 21	558.3 ± 20.1
Scr (μmol/L)	214.6 ± 15.4	168.6 ± 21.9	236.2 ± 26.6	175.3 ± 25.9
血糖 (mmol/L)	12.2 ± 2.4		19.9 ± 3.4	15.6 ± 2.4
Ucr (μmol/L)	4182.5 ± 699.8	4488.9 ± 861.6	4744.8 ± 1350.6	4030.7 ± 620
尿量 (ml)	18.1 ± 4.4	15.2 ± 4.3	12.8 ± 3.6	9.6 ± 2.3
尿蛋白 (mg/4 h)	5.4 ± 1.1	3.6 ± 0.8	4.3 ± 0.9	2.4 ± 0.4
GFR (μl/min/100 g)	159.2 ± 25.1	159.9 ± 9	100.9 ± 16.7	121.5 ± 9.1
组 B: HFD/STZ/碘海醇/PBS	基线	T1	T2	T3
动物的数目	15			
体重 (g)	545.5 ± 21.8	561.8 ± 18.4	561.1 ± 19.3	554.6 ± 18.5
Scr (μmol/L)	217.4 ± 12.1	214.7 ± 33.6	253.7 ± 33	183.4 ± 28.8
血糖 (mmol/L)	12.1 ± 2.2		19.1 ± 3.1	16.7 ± 2.3
Ucr (μmol/L)	4584.4 ± 1270.8	4596.2 ± 699.2	4619.8 ± 693	3468.7 ± 521.2
尿量 (ml)	20.5 ± 4.2	11.7 ± 3	8.8 ± 2	9.8 ± 2
尿蛋白 (mg/4 h)	6.5 ± 1.7	2.7 ± 0.4	2.8 ± 0.4	2.8 ± 0.6
GFR (μl/min/100 g)	172 ± 16.1	125.2 ± 7.3	83.8 ± 7.5	125.4 ± 15.4

[0356] 当将对对比染料给予糖尿病大鼠中时,对于运载体处理组而言,在染料注射之后 24 小时肌酐清除率降低了超过 27%,从 172 ± 16.1 降低至 $125.2 \pm 7.3 (\mu\text{l/min/100g})$ (图 18)。相比之下,对于 SS-31 处理组,在染料注射之前和之后在相同的时间中肌酐清除率没有发生显著变化, 159.2 ± 25.1 至 $159.9 \pm 9 (\mu\text{l/min/100g})$ 。SS-31 在对由给予染料所诱导的肌酐清除率进行缓解方面是统计学显著的 ($P<0.05$)。因此,在一种糖尿病动物模型中 SS-31 降低了由放射性对比染料所引起的肾功能障碍。这样,本发明的这些芳香族阳离子肽在保护受试者免于由对比剂所引起的急性肾损伤的方法方面是有用的。

[0357] 实验 3

[0358] 在本实验中,用高脂饮食饲喂 20 只 SD 大鼠达 6 周,随后注射低剂量的链脲菌素 (35mg/kg)。在 15 周多之后,使这些大鼠经历对比物诱导的肾病研究。这些 HFD/STZ 动物被分成 2 组,使用在图 19 中所呈现的剂量、给药计划、以及科学研究试验方案。此外,在此包括了一个正常的对照组,其中将该同样批次的、接受规则饮食的 9 只大鼠经历相同的科

学试验方案。

[0359] 肾功能 :使用 Jiancheng Cr 试剂盒 (Nanjing, P. R. C) 通过确定基线处的以及给予对比染料 (Iohexol) 之后 24 小时、3 天、以及 6 天的血清和尿肌酐来评定肾功能。基于 Scr、Ucr、以及尿量来计算肌酐清除率。通过 T 检验来分析样品,并且差异在 $p < 0.05$ 被认为是显著的。

[0360] 结果 :依照刚才所说明的这些操作,在一种糖尿病动物模型中研究了本发明的这些芳香族阳离子肽在缓解 CIN 方面的作用。这些结果呈现在表 12 中。

[0361] 表 12. 对于研究组的血清肌酐结果

[0362]

组	编号	Scr (μM)		%改变 T22
		Tb	T22h	
组 A:: NPD/PBS/染料/PBS	1	30	30	0%
	3	37	34	-8%
	4	38	34	-11%
	5	41	34	-17%
	6	35	35	0%
	7	37	33	-11%
	8	35	38	9%
	9	37	33	-11%
	13	23	32	39%
组 B: HFD/STZ/染料/PBS	20	21	27	29%
	28	31	35	13%
	30	21	27	29%
	33	26	24	-8%
	36	28	32	14%
	41	27	25	-7%
	46	24	29	21%
	55	26	25	-4%
	63	22	27	23%
组 C: HFD/STZ/SS-31/染料/SS-31	34	25	25	0%
	38	25	26	4%
	45	27	24	-11%
	60	23	25	9%
	64	29	27	-7%
	65	24	28	17%
	67	25	30	20%
	69	25	35	40%
	72	29	19	-34%

[0363] 从以上的表格中,可以看见对照动物 (组 A) 中 Scr 在任何这些动物中在对比染料染料损害之后 24 小时没有增加。对于 HFD/STZ 大鼠,在运载体处理组中,10 只动物中有 5 只在给予对比染料之后 24 小时具有升高的 Scr,超过 20%。相比之下,在相同的时间内用 SS-31 进行处理,9 只大鼠中仅有 2 只具有超过 20% 的 Scr 增加。因此,在一种糖尿病动物模型中 SS-31 降低了由放射性对比染料所引起的肾功能障碍。这样,本发明的这些芳香族阳离子肽在保护受试者免于由对比剂所引起的急性肾损伤的方法方面是有用的。

[0364] 实例 5. 在甘油诱导的横纹肌瘤动物模型中治疗和防止 CIN

[0365] 在一种由给予放射性对比染料所引起的甘油诱导的横纹肌瘤动物模型中研究了本发明的这些芳香族阳离子肽在保护和 / 或治疗受试者免于 CIN 方面的作用。该实例说明了此类实验的结果。

[0366] 实验 1

[0367] 动物模型：之前的研究表明：在具有由甘油诱导的横纹肌瘤所损害的肾脏的动物中给予对比染料可以引起 CIN(Parvez, Z et al. Investigative Radiology, 1989, 24, 698-702 ;Duan et al. Acta Radiologica, 2000, 41, 503 - 507)。在这种模型中,使体重为 300-400g 的 SD 大鼠脱水 24 小时,随后以 10ml/kg 的剂量通过肌肉注射 25% 的甘油溶液 (体积 / 体积)。二十四小时 (24 小时) 后,将这些大鼠分组并且经历如在图 20 中所详述的一种对比物诱导的肾病研究科学试验方案。通过将来自组 C 的动物的肾功能与来自组 B 的进行比较,可以检验 SS-31 对 ARI 的作用。通过 T- 检验来分析样品,并且差异在 $p < 0.05$ 被认为是显著的。

[0368] 肾功能：使用 Jiancheng Cr 试剂盒 (Nanjing, P. R. C) 通过确定基线处的、脱水之后 24 小时、以及给予对比染料之后 48 小时的血清和尿肌酐来评定肾功能。基于 Scr、Ucr、以及尿量来计算肌酐清除率。通过竞争性 ELISA 测定来确定尿微量白蛋白浓度。

[0369] 结果：依照刚才所说明的这些操作,在一种甘油诱导的横纹肌瘤动物模型中研究了本发明的这些芳香族阳离子肽在缓解 CIN 方面的作用。这些结果呈现在图 21a-21b 和图 22a-22b 中。

[0370] 当将对比染料给予甘油诱导的横纹肌瘤大鼠中时,对于运载体处理组而言,在染料注射之后 48 小时肌酐清除率降低 13% (图 21a-21b)。相比之下,对于 SS-31 处理组,在染料注射之前和之后在相同的时间内肌酐清除率没有发生显著变化 (图 21a)。

[0371] 白蛋白尿是肾小球膜的渗透性增加的一种指示物,并且它可以被对比染料诱导。在脱水 24 小时之后 (T0),对于 Gly/ 染料 /PBS 组而言尿微量白蛋白水平是 $385.1 \pm 59.8 (\mu\text{g}/24 \text{ 小时})$,并且对于 Gly/ 染料 /SS-31 组而言是 $757.7 \pm 462.9 (\mu\text{g}/24 \text{ 小时})$ (在这个时间点没有肽处理) (图 21b)。肌肉注射给予甘油,注射之后 24 小时 (T1),由于甘油诱导的横纹肌瘤在这两组中尿微量白蛋白的水平是实质上增加的。然而,在 T2 时间点,与运载体处理组相比,在 SS-31 处理组中总的白蛋白尿显著地降低,这提示 SS-31 对于在这种甘油诱导的横纹肌瘤模型中由对比染料所引起的肾小球基底膜的渗透性具有一种保护作用。

[0372] PAS 染色示出了以下染料处理,这种处理导致在近端小管细胞中特征性肾刷状缘的损失、膨胀的肾小球、以及在肾小管细胞中标记的蛋白管型沉淀 (图 22a)。用 SS-31 进行治疗缓解了这些效应,这是因为在这些样品中 PAS 染色示出了在这些肾小管细胞中完整的刷状缘、正常的肾小球、以及最小限度的蛋白管型 (图 22b)。因此,SS-31 保护肾小管免于放射性对比染料损伤。

[0373] 实验 2

[0374] 使体重为 300-400g 的 SD 大鼠脱水达 24 小时,随后以 10ml/kg 的剂量肌肉注射 25% 的甘油溶液 (体积 / 体积)。二十四小时后,将这些大鼠分组并且经历对比物诱导的肾病研究科学试验方案。将 16 只体重为 300-350g 的 SD 大鼠随机化分成三组,使用在图 23 中所呈现的剂量、给药计划、以及科学研究试验方案。通过将来自组 A 的动物的肾功能与来

自组 B 的进行比较,可以检验 SS-31 对 ARI 的作用。通过 T- 检验来分析样品,并且差异在 $p < 0.05$ 被认为是显著的。

[0375] 肾功能:使用 Jiancheng Cr 试剂盒 (Nanjing, P. R. C) 通过确定基线出的、脱水之后 24 小时、以及给予对比染料之后 48 小时的血清和尿肌酐来评定肾功能。基于 Scr、Ucr、以及尿量来计算肌酐清除率。通过 Bradford 蛋白测定试剂盒 (Sigma, St. Louis, MO) 来确定尿蛋白浓度。

[0376] 结果:依照刚才所说明的这些操作,在一种甘油诱导的横纹肌瘤动物模型中研究了本发明的这些芳香族阳离子肽在缓解 CIN 方面的作用。这些结果呈现在图 24、25、以及 26 中。

[0377] 当将对比染料给予甘油诱导的横纹肌瘤大鼠中时,对于运载体处理组而言,在染料注射之后 48 小时肌酐清除率降低 25% (图 24)。相比之下,对于 SS-31 处理组,在相同的时间内肌酐清除率的降低是 13%。因此,在一种甘油诱导的横纹肌瘤动物模型中 SS-31 降低了由放射性对比染料所引起的肾功能障碍。

[0378] 蛋白尿是肾损害的一种迹象,并且在尿中过量蛋白的存在指示了吸收的不足或受损的过滤。之前报告了甘油和对比介质可以增加肾小球膜的渗透性、并且引起过量的尿蛋白泄漏 (Thomsen H. S. et al., Acta Radiologica, 1989, 30, 217-222)。在运载体处理组中,在每个不同的时间点上 24 小时尿蛋白水平是: $T_b(\text{基线}) = 15.8 \pm 1.6\text{mg}$; $T_0(\text{用甘油之后 24 小时}) = 52.9 \pm 9.1\text{mg}$; $T_1(\text{用甘油之后 48 小时并且用染料之后 24 小时}) = 54.1 \pm 5.8\text{mg}$; $T_2(\text{用甘油之后 72 小时并且用染料之后 48 小时}) = 29.7 \pm 3.6\text{mg}$; 以及 $T_3(\text{用甘油之后 96 小时并且用染料之后 72 小时}) = 30.2 \pm 5.1\text{mg}$ (图 25)。

[0379] 在 SS-31 处理组中,在 $T_b(15.5 \pm 1.5\text{mg})$ 和 $T_0(50.2 \pm 8.6\text{mg})$ 时的 24 小时尿蛋白水平是可以与运载体对照组相比的,其中在这些时间点没有给予肽。然而,在 T_1 的时间点 (用甘油之后 48 小时并且用染料之后 24 小时),在 SS-31 处理组中 24 小时尿蛋白降至 $39.5 \pm 3.5\text{mg}$ (图 25)。与在相同的时间点运载体处理组相比,这种差异是统计学显著的 ($p \leq 0.05$)。这证明了在这种 CIN 动物模型中 SS-31 肽加速了肾小球基底膜渗透性功能障碍的恢复。这样,本发明的这些芳香族阳离子肽在用于治疗由放射性对比染料所引起的 ARI 方面是有用的。

[0380] PAS 染色示出了以下染料处理,这种处理导致在近端小管细胞中特征性肾刷状缘的损失、膨胀的肾小球、以及在肾小管细胞中经标记的蛋白管型沉淀 (图 26a)。用 SS-31 治疗缓解了这些效应,这是因为在这些样品中 PAS 染色示出了在这些肾小管细胞中完整的刷状缘、正常的肾小球、以及最小限度的蛋白管型 (图 26b)。因此,SS-31 保护肾小管免于放射性对比染料损伤。

[0381] 实验 3

[0382] 使体重为 300-400g 的 SD 大鼠脱水达 24 小时,随后以 10ml/kg 的剂量肌肉注射 25% 的甘油溶液 (体积 / 体积)。二十四小时 (24 小时) 后,将这些大鼠分组并且经历对比物诱导的肾病研究科学试验方案。将 18 只体重为 350-400g 的 SD 大鼠随机分成三组,使用在图 27 中所呈现的剂量、给药计划、以及研究科学试验方案。通过将来自组 A 的动物的肾功能与来自组 B 的进行比较,可以检验 SS-31 对 ARI 的作用。

[0383] 肾功能:使用 Jiancheng Cr 试剂盒 (Nanjing, P. R. C) 通过确定基线处的、脱水之

后 24 小时以及给予对比染料之后 48 小时的血清和尿肌酐来评定肾功能。基于 Scr、Ucr、以及尿量来计算肌酐清除率。通过 Bradford 蛋白测定试剂盒 (Sigma, U. S. A.) 来确定尿蛋白浓度。通过 T- 检验来分析样品, 并且差异在 $p < 0.05$ 被认为是显著的。

[0384] 结果: 依照刚才所说明的这些操作, 在一种甘油诱导的横纹肌瘤动物模型中研究了本发明的这些芳香族阳离子肽在缓解 CIN 方面的作用。这些结果呈现在图 28 和图 29 中。

[0385] 当将对比染料给予甘油诱导的横纹肌瘤大鼠时, 对于运载体处理组而言, 在染料注射之后 48 小时肌酐清除率降低 24% (图 28)。相比之下, 对于 SS-31 处理组, 在相同的时间内肌酐清除率没有发生显著变化 (图 28)。因此, 在一种甘油诱导的横纹肌瘤动物模型中 SS-31 降低了由放射性对比染料所引起的肾功能障碍。

[0386] 如以上所讨论的, 蛋白尿是肾损害的一种迹象, 并且在尿中过量蛋白的存在指示了吸收的不足或受损的过滤。将运载体处理组中不同时间点的蛋白水平与 SS-31 处理组进行比较, 这种肽处理组比运载体组恢复更快 (图 29)。这证明了在这种 CIN 动物模型中 SS-31 肽加速了肾小球基底膜渗透性功能障碍的恢复。这样, 本发明的这些芳香族阳离子肽在用于治疗由放射性对比染料所引起的 ARI 方面是有用的。

[0387] PAS 染色示出了以下染料处理, 这种处理导致在近端小管细胞中特征性肾刷状缘的损失、膨胀的肾小球、以及在肾小管细胞中经标记的蛋白管型沉淀 (图 30a)。用 SS-31 治疗缓解了这些效应, 这是因为在这些样品中 PAS 染色示出了在这些肾小管细胞中完整的刷状缘、正常的肾小球、以及最小限度的蛋白管型 (图 30b)。因此, SS-31 保护肾小管免于放射性对比染料损伤。

[0388] 总之, 来自以上实例的这些结果清楚地证明: 在几种动物模型中本发明的这些芳香族阳离子肽在保护受试者免于由对比剂所引起的急性肾损伤方面的有用性。此外, 在实验 7 和 8 中证明它加速了受损肾脏的恢复。

[0389] 实例 6: 在 CCl_4 慢性肾损伤模型中治疗和防止肾毒性

[0390] 动物模型: 反应基团的产生已经牵连到四氯化碳诱导的肾毒性, 这些基团参与了脂质过氧化作用、功能障碍性蛋白的积聚, 导致肾脏损伤 (Ozturk, F. et al. Urology, 2003, 62, 353-356)。该实例说明给予芳香族阳离子肽对于防止四氯化碳 (CCl_4) 诱导的慢性肾毒性的作用。

[0391] 研究设计和实验性的科学试验方案: 在这种模型中, 将体重为 250g 的 SD 大鼠用 0.35g/L 苯巴比妥溶液 (鲁米那水) 饲喂达两周, 然后分成三组并且处理如下。

[0392] 表 13. 处理组

[0393]

[0394]

组	大鼠的#	诱导药剂达7周	化合物	剂量体积 (mL/kg)	剂量 (mg/kg) *	计划	运载体
1 首次接受实验的对照	9	鲁米那水 + 橄榄油灌胃、1 ml/kg、每周两次	PBS, 仅皮下	2	N/A	每周 5 天, 每天四次, 达 7 周	PBS 2 ml/kg
2 CCl ₄ 对照	12	鲁米那水 + 50% CCl ₄ 灌胃、2 ml/kg、每周两次	PBS 仅皮下	2	N/A	每周 5 天, 每天四次, 达 7 周	PBS
3 SS-31	12	鲁米那水 + 50% CCl ₄ 灌胃、2 ml/kg、每周两次	SS-31 皮下	2	10 mg/kg	每周 5 天, 每天四次, 达 7 周	PBS

[0395] 在第五周结束时,将来自各组的四只大鼠杀死用于肝组织病理学切片和纤维化检验。在第 7 周结束时,将各组剩余的全部大鼠杀死,并且收获肾脏和肝组织用于组织病理学切片和检验。

[0396] 肾组织学:肾脏被固定在 10% 的中性缓冲的福尔马林中,并且被包埋在石蜡中。将三微米的切片用苏木精 - 曙红 (H&E) 染色,并且由经认证的病理学家通过光学显微观察进行分析。

[0397] 结果:依照如上说明的这些操作,在此研究了本发明的这些芳香族阳离子肽在保护对抗 CCl₄ 诱导的慢性肾毒性方面的作用。这些结果呈现在以下表 14 中。

[0398] 表 14. 肾组织学结果的概述

[0399]

	肾小球	肾小管上皮细胞退化	肾小管上皮细胞坏死
首次接受实验的组	5/5 -	5/5-	5/5 -
CCl ₄ 组	6/6 -	4/6 ++ 2/6 +	2/6 ++ 1/6 + 3/6 -
CCl ₄ 组 + SS-31	5/5 -	5/5-	5/5 -

[0400] 注释:“-”=没有异常发现;“±”=最小;“+”=轻度;“++”=中度;“+++”=重度。

[0401] SS-31 保护肾小管免于 CCl₄ 肾毒性。H&E 染色示出了 CCl₄ 处理导致肾小管上皮细胞退化和坏死 (图 31a);相比之下,SS-31 处理的动物的肾组织学 (图 31b) 没有显示出可观察到的组织病理学变化,并且几乎是与首次接受实验的对照动物一致的 (图 31c)。

[0402] 因此,来自以上实例的这些结果清楚地证明:本发明的这些芳香族阳离子肽在保护受试者免于由 CCl₄ 肾毒性所引起的慢性肾损伤方面的有用性。

[0403] 实例 7. 防止由顺铂所引起的 ARI

[0404] 在由顺铂所引起的 ARI 动物模型中研究了本发明的这些芳香族阳离子肽在保护受试者免于顺铂诱导的 ARI 方面的作用。

[0405] 第 1 天,对斯普拉-道来氏大鼠 (350-400g) 向腹膜内供给一个单一剂量的顺铂 (7mg/kg)。一组大鼠 ($n = 8$) 正好在给予顺铂之前皮下接受一个剂量的 SS-31 (3mg/kg), 并且每日重复一次再持续 3 天。第二组大鼠 ($n = 8$) 在给予顺铂当天接受了等体积的盐水, 并且此之后持续 3 天。

[0406] 实验性的科学试验方案:大鼠在给予顺铂之前自由获取自来水以及标准的大鼠食物。在给予顺铂之前从尾静脉获得对照血液样品。在顺铂注射之前对这些大鼠皮下给予盐水或 SS-31 (溶解在盐水中)。将顺铂 (溶解在盐水中) 以 7mg/kg 的剂量向腹膜内进行给药。然后,所有大鼠每日接受盐水或 SS-31 (3mg/kg) 持续 3 天。将大鼠置于代谢笼中直到最后 24 小时用于尿收集。在这一时期结束时,从尾静脉提取血液样品。在此之后,使这些动物麻醉,将肾脏移出并且将这些动物安乐死。

[0407] 肾功能:通过血尿素氮 (BUN)、血清肌酐、尿肌酐、以及尿蛋白 (Beckman ALX Chemical Analyzer) 来评估肾功能。从肌酐清除率估计 GFR,肌酐清除率是从尿肌酐、尿流率、以及血清肌酐确定的。

[0408] 肾组织学:肾脏被固定在 10% 的中性缓冲的福尔马林中,并且被包埋在石蜡中。将三微米的切片用高碘酸-希夫 (PAS) 染色,并且通过光学显微观察进行分析。

[0409] 结果:依照刚才所说明的这些操作,在由给予顺铂所引起的 ARI 动物模型中研究了本发明的这些芳香族阳离子肽在保护受试者免于顺铂肾毒性方面的作用。使用 T- 检验来确定在组别之间的比较。

[0410] 在这些盐水处理的大鼠中,当与给予顺铂之前的体重 ($378.4 \pm 8.2\text{g}$) 相比,在给予顺铂之后 3 天体重出现显著降低 ($333 \pm 12.6\text{g}$) ($p < 0.0001$) (图 32a)。在 SS-31 处理组中体重是与在顺铂处理之前的盐水组相似的 ($376.9 \pm 5.2\text{g}$; $p = 0.673$), 并且在顺铂处理之后 3 天体重没有发生变化 ($384 \pm 28\text{g}$; $p = 0.46$)。与盐水相比,在 SS-31 处理组中顺铂处理对体重的作用存在着显著的差异 ($p = 0.004$)。与盐水处理组 ($1.4 \pm 0.2\text{g}$) 相比,在 SS-31 处理组中肾脏的重量 ($1.6 \pm 0.2\text{g}$) 也是更高的 ($p = 0.036$) (图 32b)。

[0411] 在这些盐水处理的大鼠中,在顺铂处理之后 3 天血清肌酐从 $0.4 \pm 0.09\text{mg/dl}$ 增加至 $2.5 \pm 2.8\text{mg/dl}$ ($p = 0.065$) (图 32c)。相比之下,在 SS-31 处理组中血清肌酐仅仅从 $0.4 \pm 0.09\text{mg/dl}$ 增加至 $0.8 \pm 0.73\text{mg/dl}$ 。在大鼠中的变异非常大以至于不能达到统计学显著性。然而,在接受 SS-31 的 8 只大鼠中有 5 只在血清肌酐方面没有变化 ($< 0.4\text{mg/dl}$), 而这 8 只大鼠中仅仅有 1 只具有小于 1.0mg/dl 的血清肌酐。与盐水组 ($0.5 \pm 0.6\text{ml/分钟}$) 相比,在顺铂处理之后 3 天在 SS-31 处理的大鼠中肌酐清除率是显著更高的 ($2.2 \pm 1.3\text{ml/分钟}$) ($p = 0.024$) (图 32e)。

[0412] 在这些盐水处理的大鼠中,在顺铂处理之后 3 天 BUN 从 $17.3 \pm 1.5\text{mg/dl}$ 增加至 $114.4 \pm 105\text{mg/dl}$ ($p = 0.035$) (图 32d)。相比之下,在 SS-31 处理组中 BUN 仅从 $15.5 \pm 1.7\text{mg/dl}$ 增加至 $29.3 \pm 25\text{mg/dl}$ ($p = 0.167$)。在顺铂处理之后 3 天在 SS-31 处理组中 BUN 是显著较低的 ($p = 0.042$)。

[0413] 总之,SS-31 保护肾脏免于由顺铂所引起的损害。这样,本发明的这些芳香族阳离

子肽在保护受试者免于由肾毒性剂所引起的急性肾损伤方面是有用的。

[0414] 实例 8. 保护和治疗由芳香族阳离子肽引起的 ALF

[0415] 为了证明对防止和 / 或治疗 ALF 的作用, 在 ALF 动物模型上对本发明的这些芳香族阳离子肽进行了测试。适当的动物模型使用手术操作、毒性肝损伤、或这两者的组合在实验动物中诱导了 ALF (见 Belanger and Butterworth, “Acute Liver Failure: A Critical Appraisal of Available Animal Models.” *Metabolic Brain Disease*, 20:409-423 (2005)) 。

[0416] 为了测试本发明的这些芳香族阳离子肽对防止 ALF 的作用, 在用药物或手术损害之前或同时给予这些肽。在接受这些肽以及那些没有接受这些肽的受试者之间进行了损害之后肝功能的比较。使用一种或多种指示来评定肝功能, 如血清肝酶 (转氨酶、碱性磷酸酶) 的水平、血清胆红素、血清氨、血清葡萄糖、血清乳酸盐、或血清肌酐。与对照受试者相比, 本发明的这些芳香族阳离子肽在防止 ALF 方面的效力是由 ALF 的发生或严重程度的下降所指示的。

[0417] 为了测试本发明的这些芳香族的阳离子肽对治疗 ALF 的作用, 在该动物模型中在用于诱导 ALF 的药物或手术损害之后给予这些肽。在治疗过程之后 (在几小时至几天的范围内), 在接受这些肽以及那些没有接受这些肽的受试者之间进行了肝功能的比较。使用一种或多种指示物来评定肝功能, 如血清肝酶 (转氨酶、碱性磷酸酶)、血清胆红素、血清氨、血清葡萄糖、血清乳酸盐、或血清肌酐的水平。与对照受试者相比, 本发明的这些芳香族阳离子肽对治疗 ALF 的效力是通过 ALF 的一种或多种迹象或症状 (由以上这些标志物所指示) 的下降所指示的。

[0418] 等效物

[0419] 本发明不应当就在本申请中说明的这些具体实施方案而言受到限制, 这些实施方案是旨在作为本发明的多个单独方面的单一的解说。可以对本发明做出许多修改和变体而不偏离本发明的精神和范围, 正如对于本领域的普通技术人员而言将是很清楚的。从以上的说明中, 除了在此已经列举的那些之外, 在本发明范围之内的功能等效的方法和组合物对于本领域内的普通技术人员而言将是清楚的。此类修改和变体旨在落入所附的权利要求书的范围之内。本发明将仅仅由所附的权利要求的条件、连同这些权利要求有权得到的等效物的全部范围所限制。应当理解, 本发明并非限于具体的方法、试剂、化合物组合物或生物系统, 当然它们可以发生变化。还应当理解, 在此所使用的术语仅仅是为了说明具体实施方案的目的, 并且并非旨在是限制性的。

[0420] 此外, 在本披露的特征或方面是用 Markush 组的术语来说明时, 本领域内的普通技术人员应认识到本披露同样就用 Markush 组的任何单个成员或多个成员的子组而言来进行说明的。

[0421] 如本领域内的普通技术人员所应当理解的, 对于任何和所有目的、特别是就提供一种书面说明书而言, 在此披露的所有范围同样涵盖了它们的任何以及所有可能的子范围以及多个子范围的组合。任何列出的范围可以被容易地认识到 (正如所充分说明的并且使之能够实现的) 该同一范围能够被分解为至少相等的半份、三分之一份、四分之一份、五分之一份、十分之一份、等等的缘故。作为一个非限制的实例, 在此讨论的每一个范围可以被容易地被分解为一个下三分之一、中三分之一、以及上三分之一、等等正如本领域内的普通

技术人员还应当理解的,所有语言(如“高达”、“至少”、“大于”、“小于”、以及类似语言)都包括所引叙的数目并且是指多个范围,这些范围随后可以被分解为正如以上讨论的多个子范围。最后,正如本领域内的普通技术人员应当理解的,一种范围包括每一个单个的成员。因此,例如,具有 1-3 个细胞的组是指具有 1、2、或 3 个细胞的那些组。类似地,具有 1-5 个细胞的组是指具有 1、2、3、4、或 5 个细胞的组,等等。

[0422] 在权利要求中列出了其他实施方案。

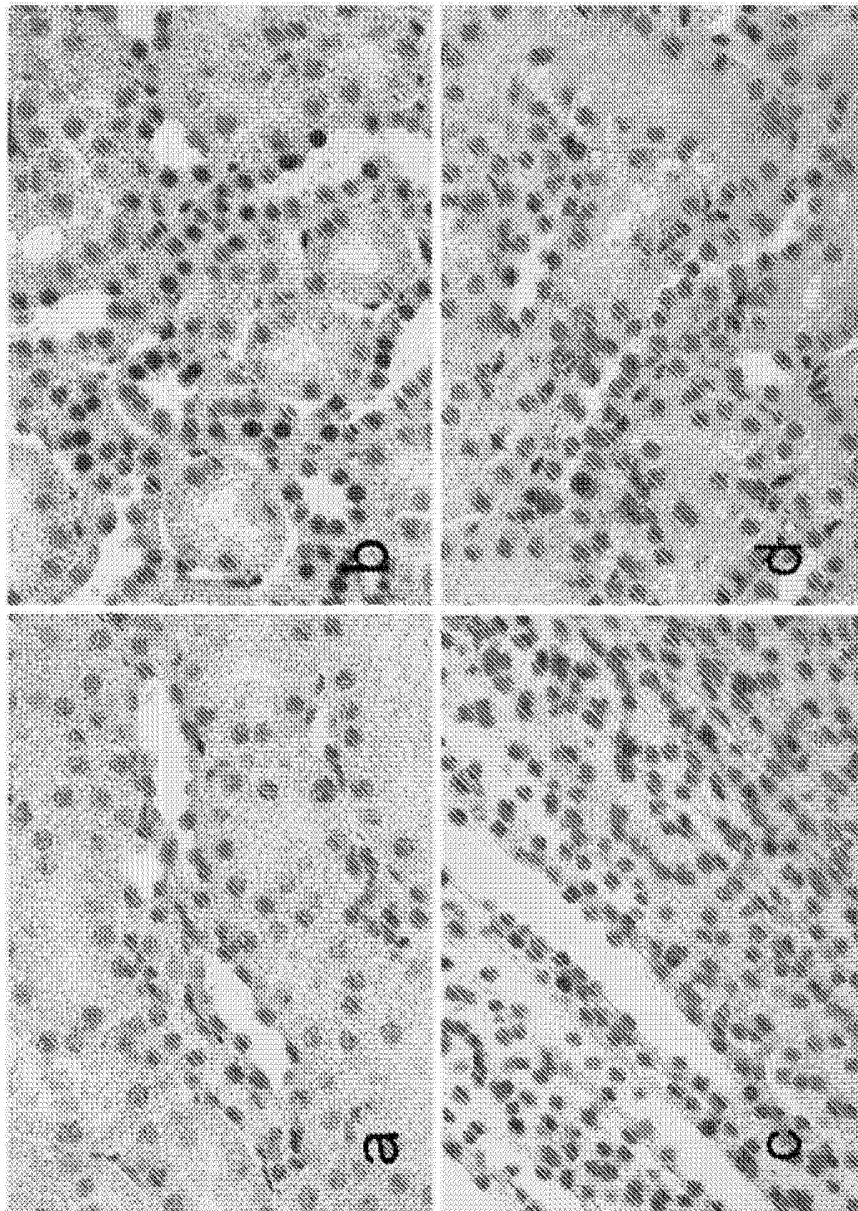


图 1

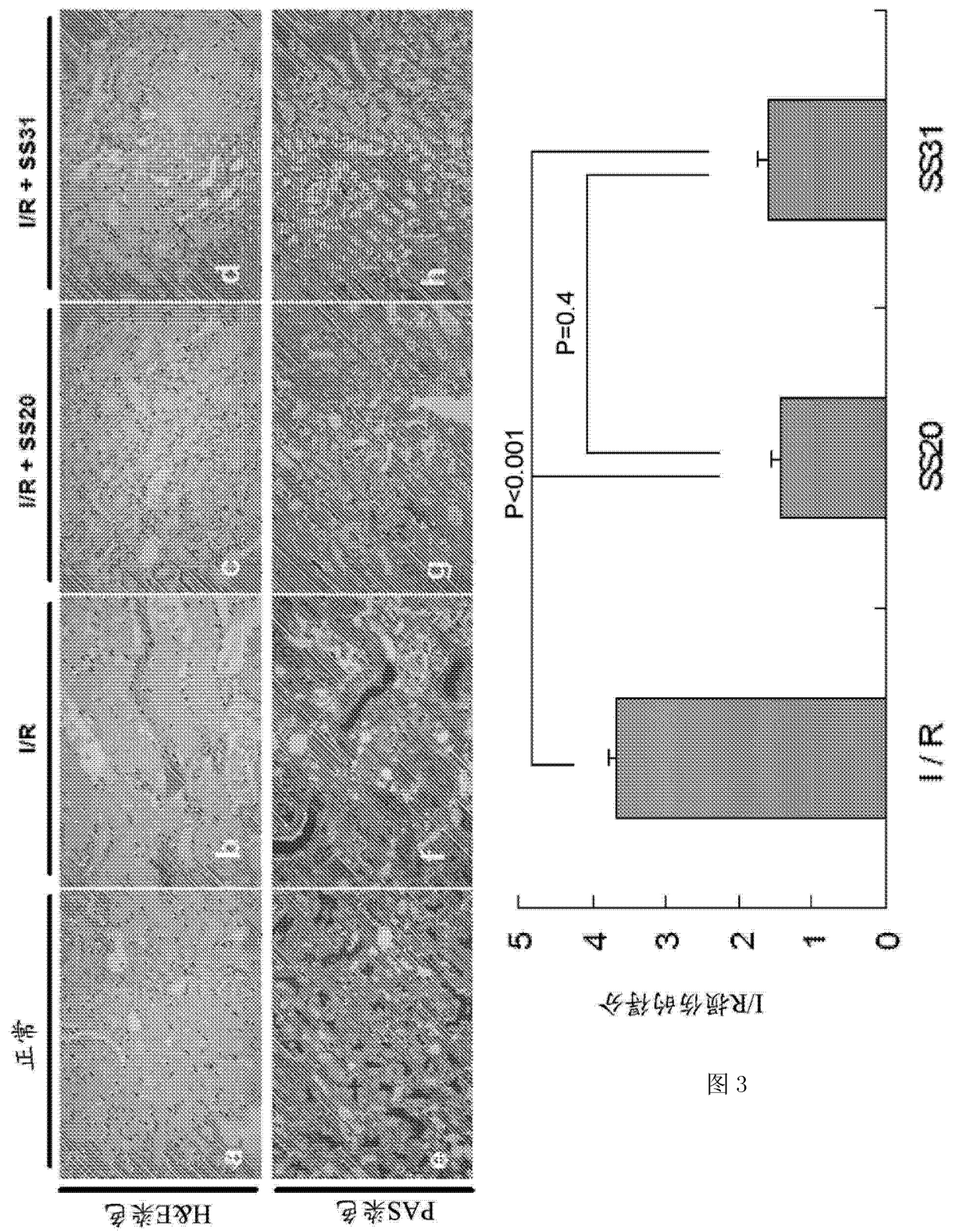


图 2

图 3

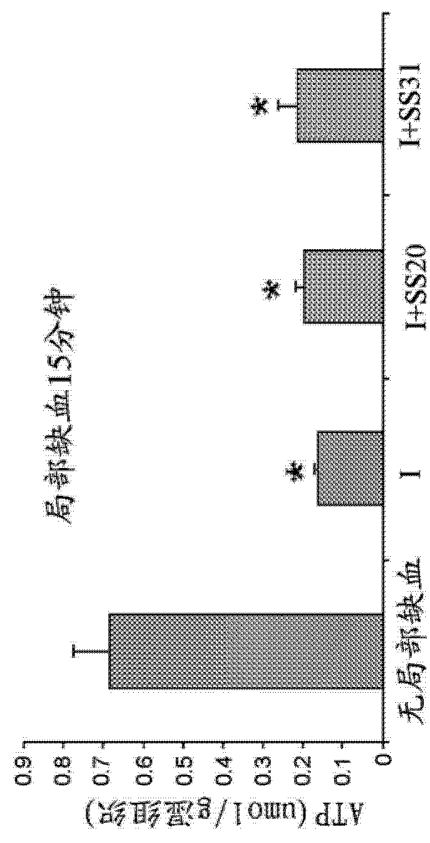


图 4a

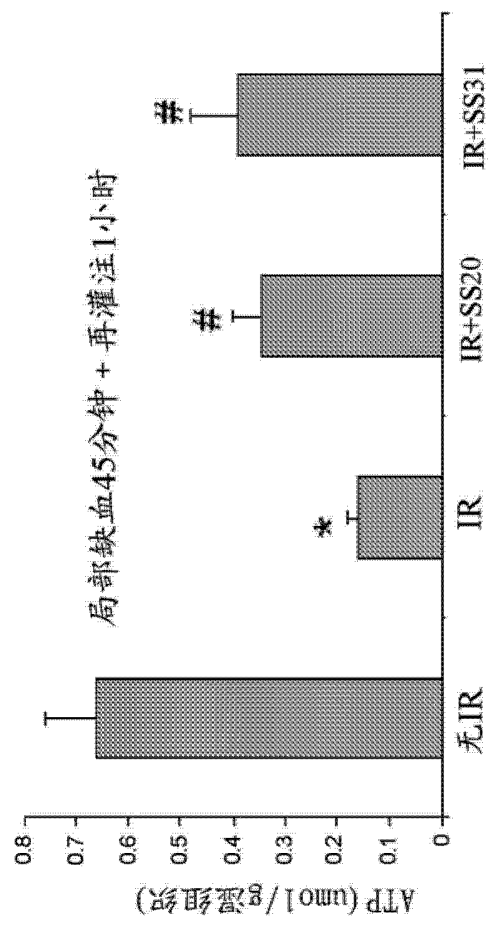


图 4b

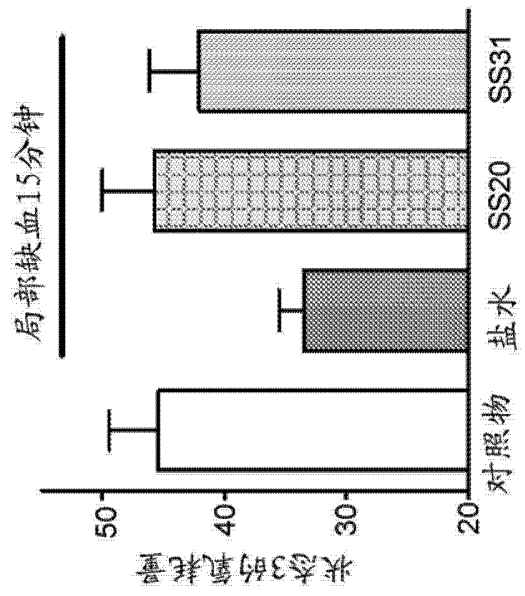


图 5

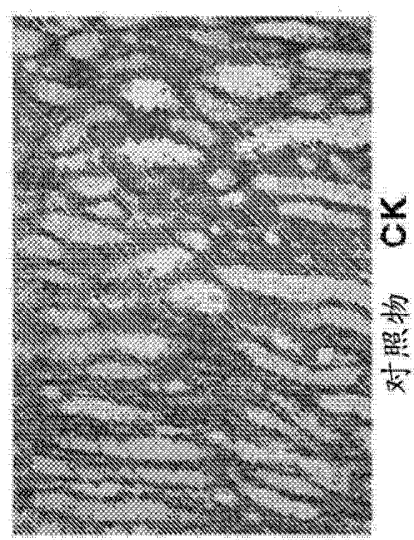


图 6a

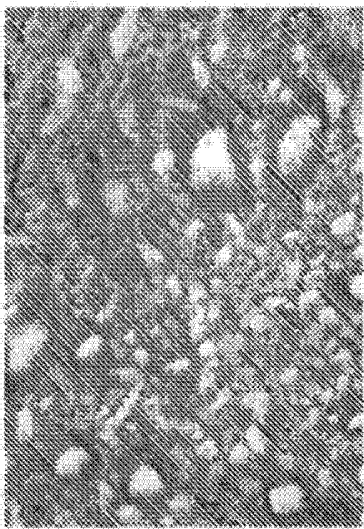


图 6b



图 6c

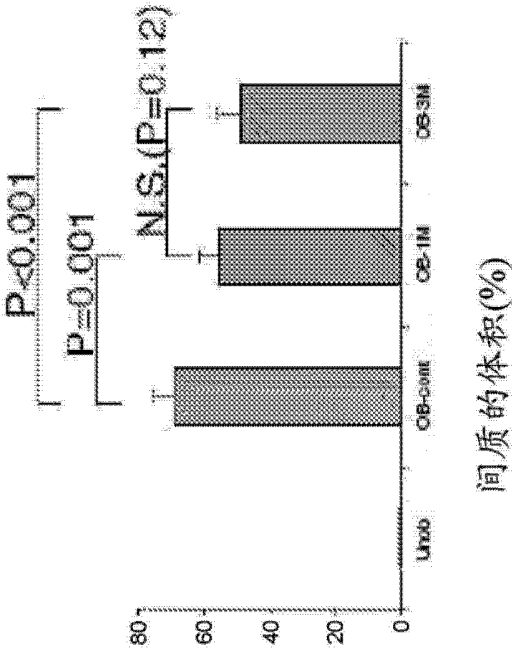


图 6d

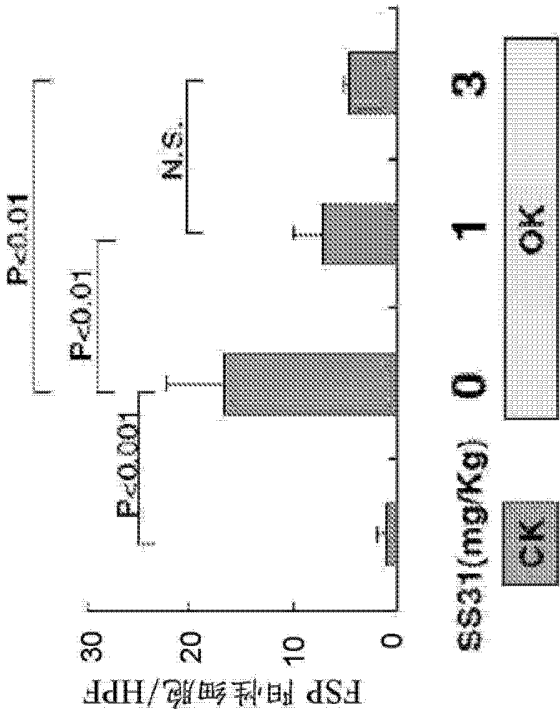


图 7

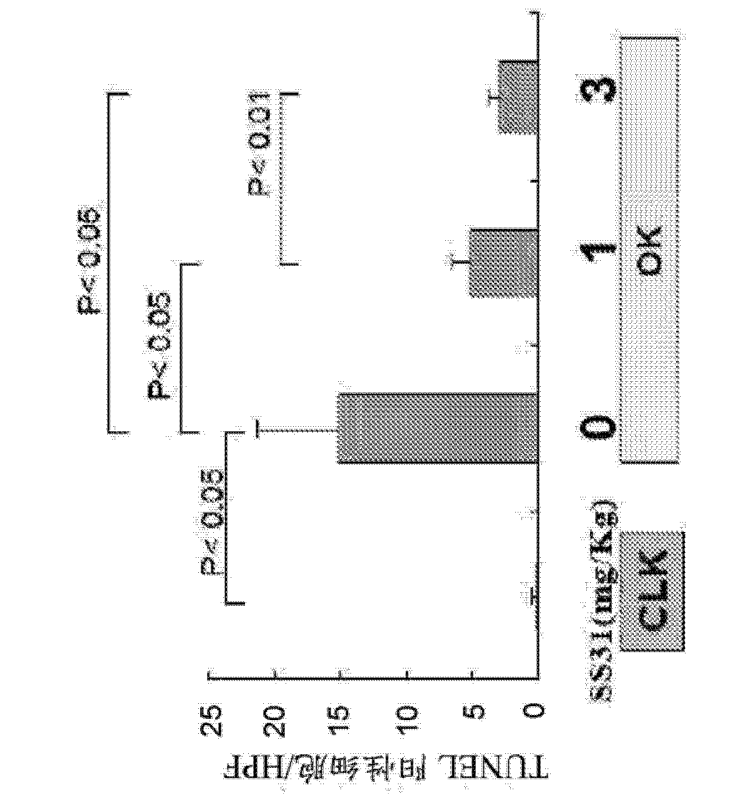


图 8

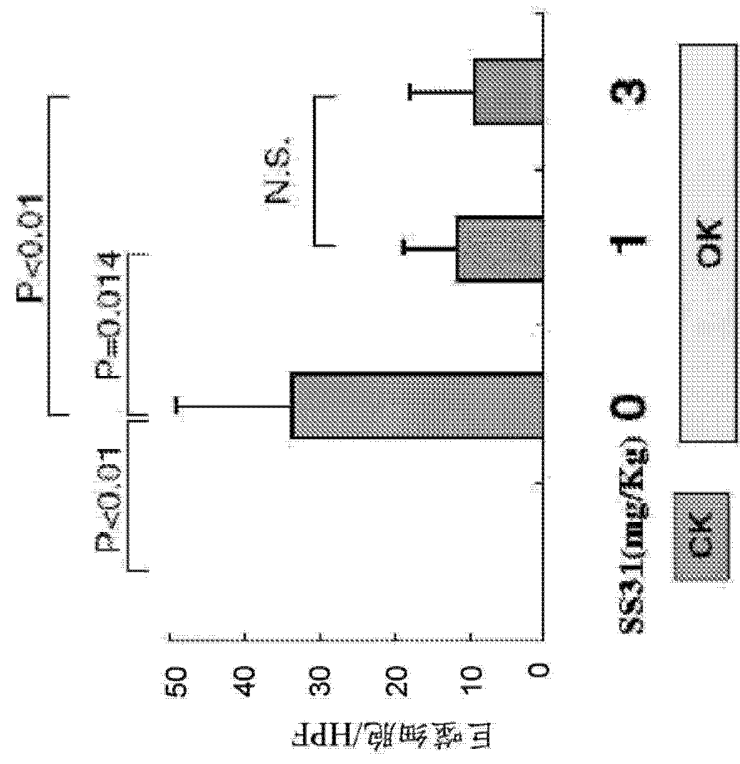


图 9

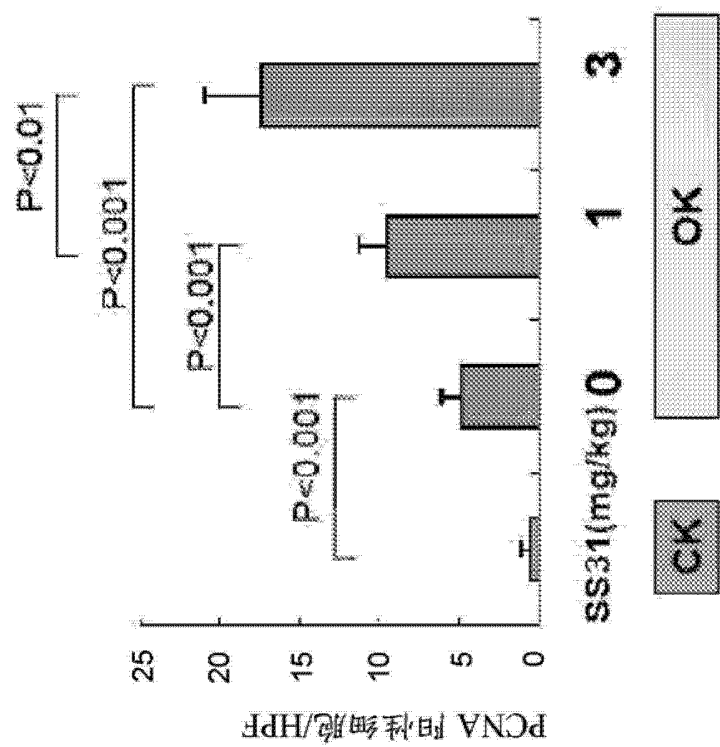


图 10

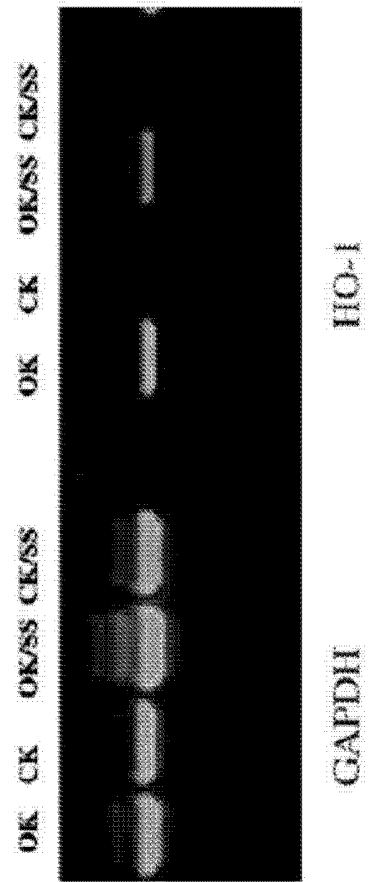


图 11a

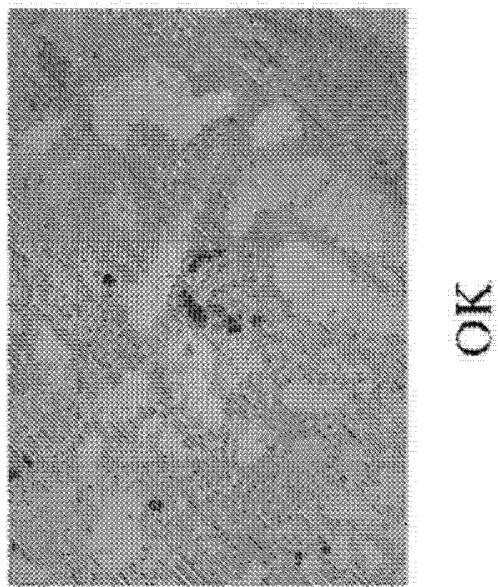


图 11b

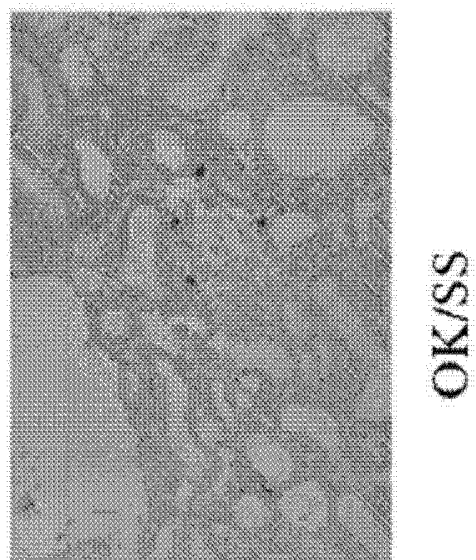


图 11c

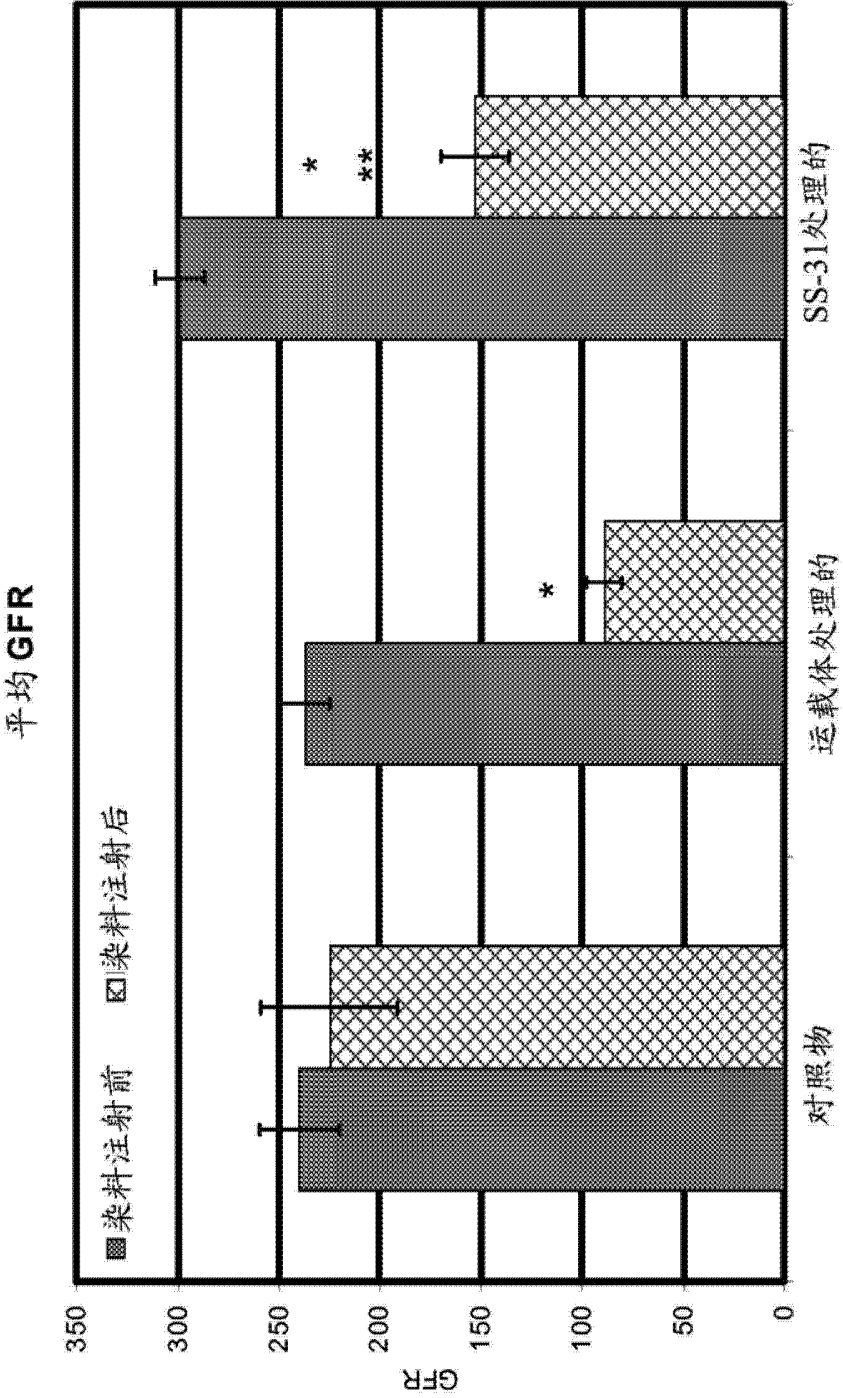


图 12

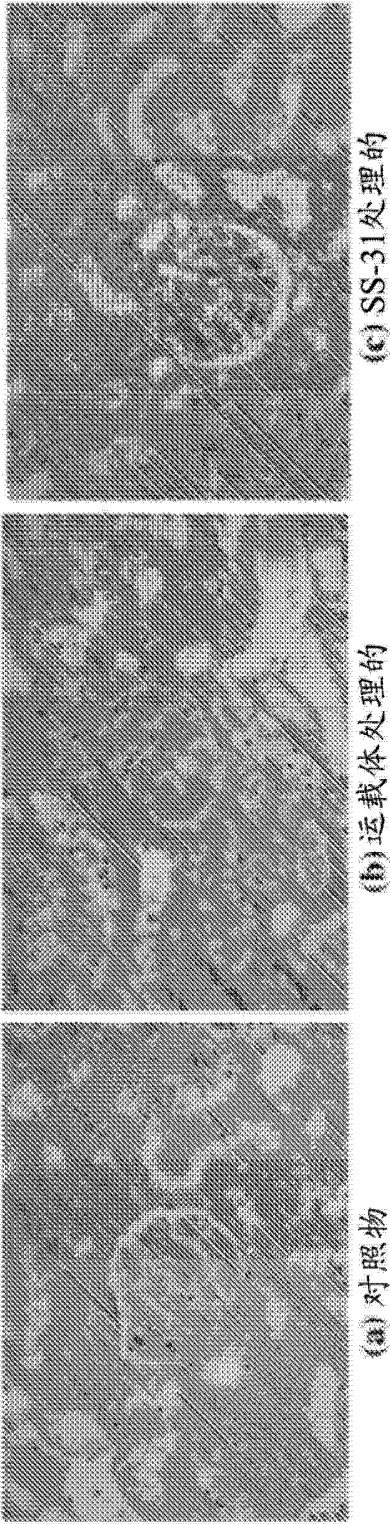


图 13

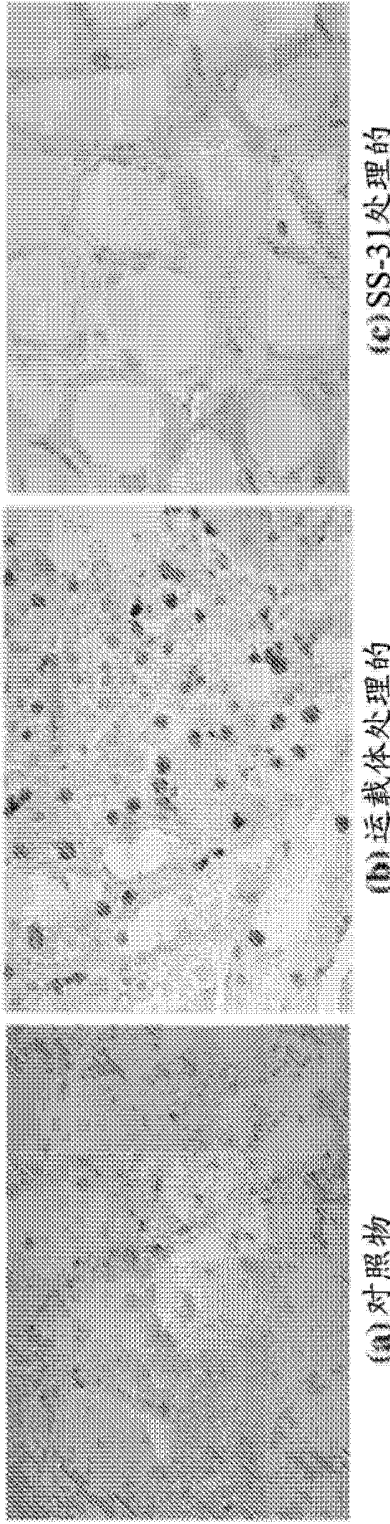
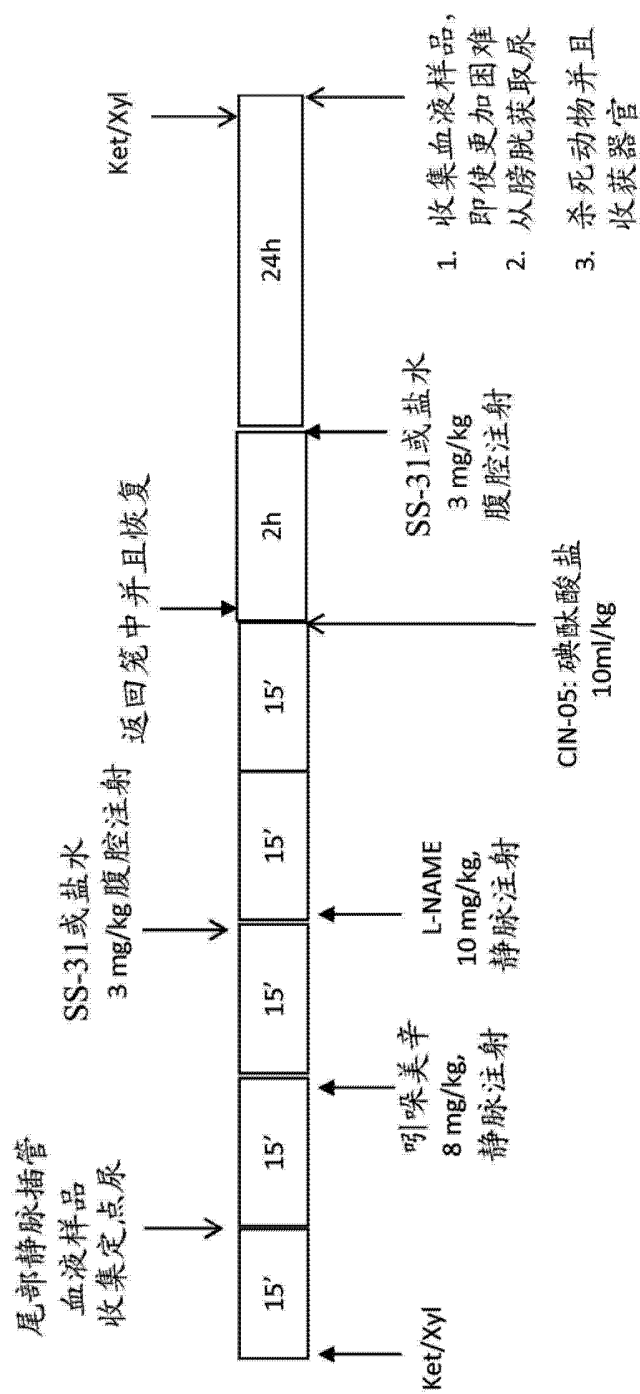


图 14



组1: 吗啡美辛 / L-Name/碘酞酸盐/盐水(n=9)
组2: 吗啡美辛 / L-Name/碘酞酸盐/ SS-31 (n=9)

图 15

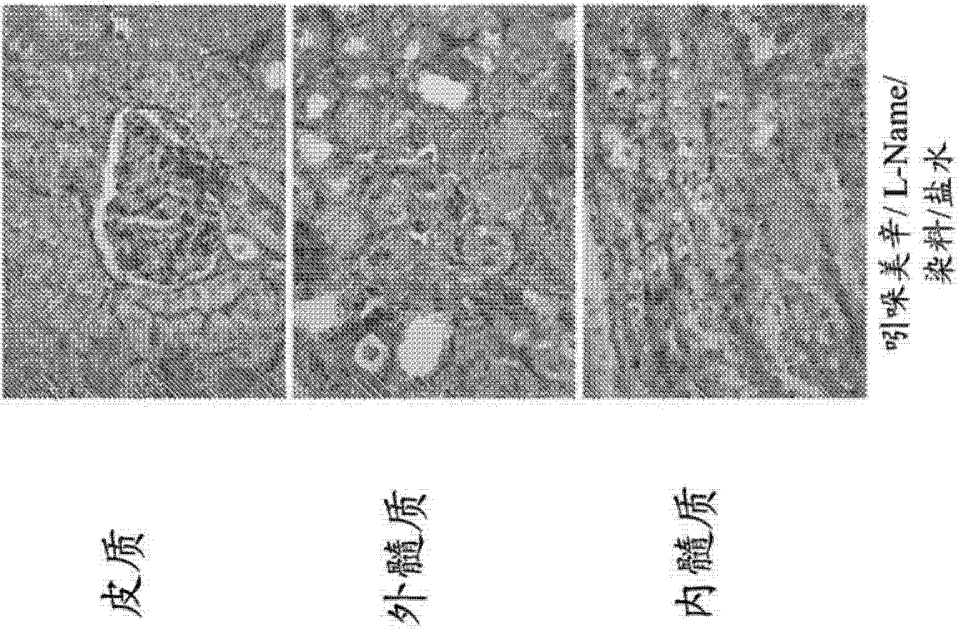


图 16a

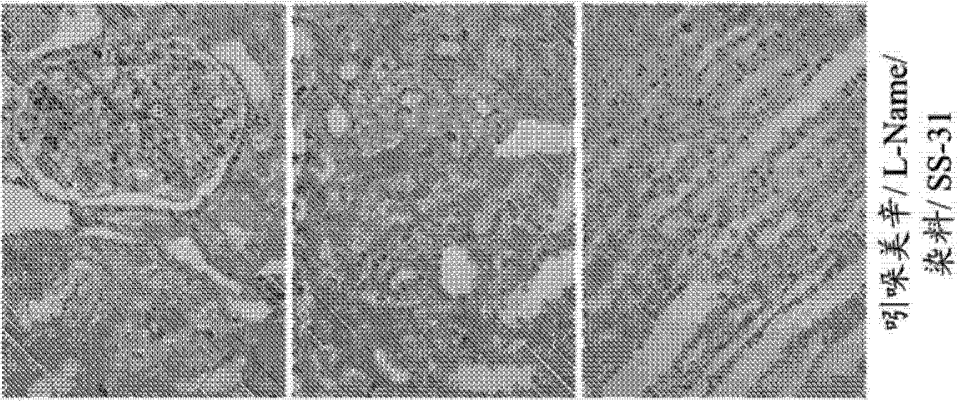


图 16b

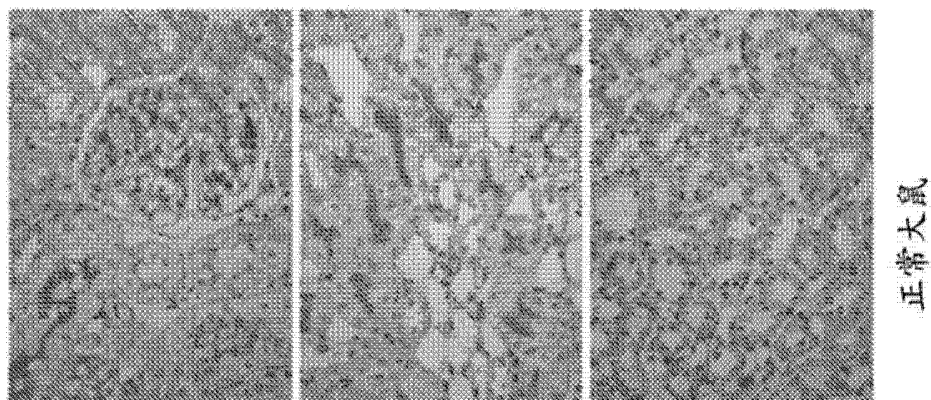


图 16c

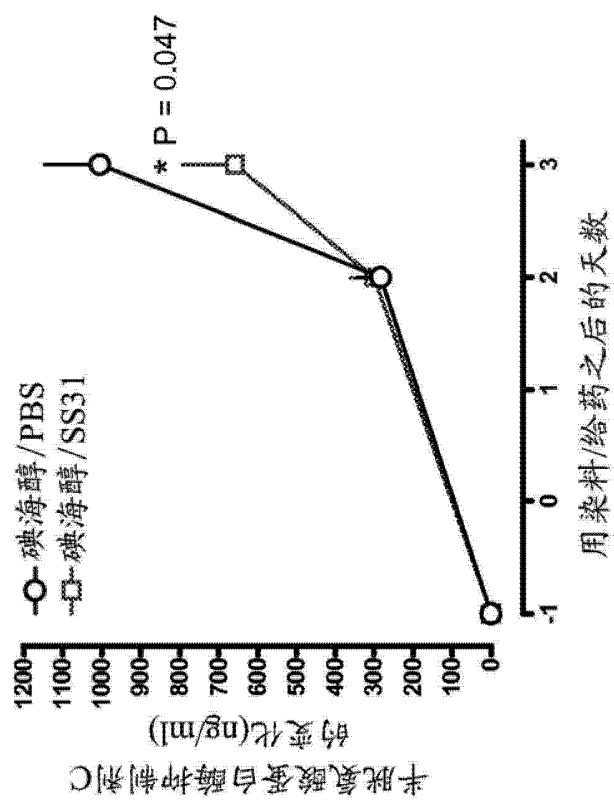


图 17a

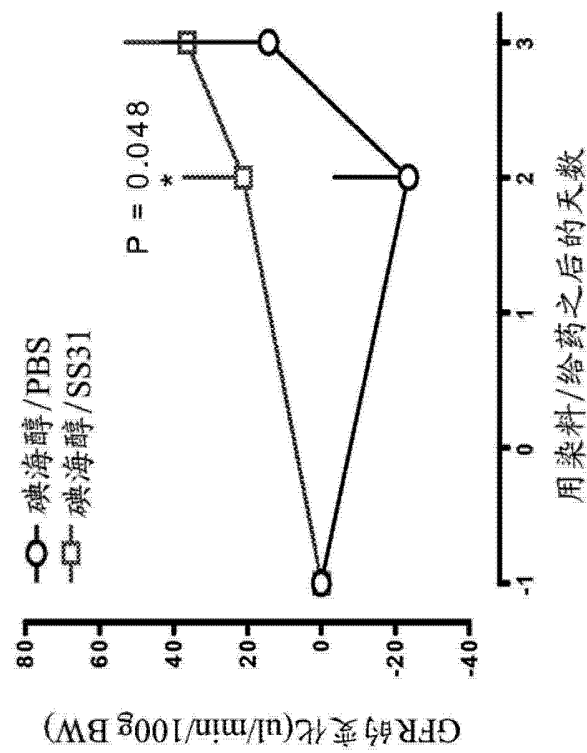


图 17b

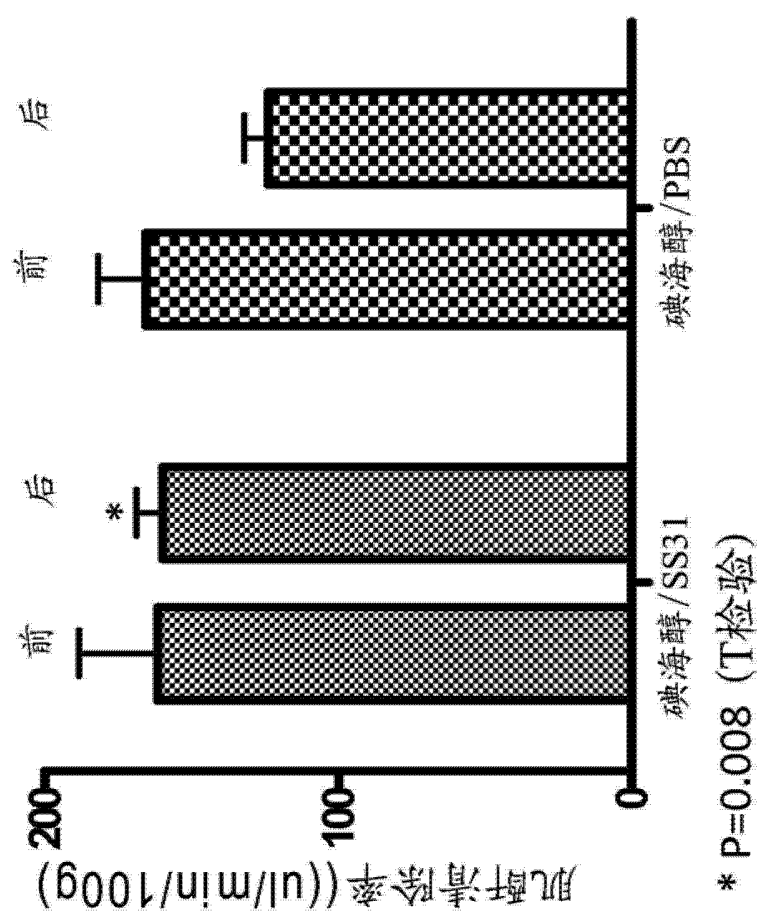
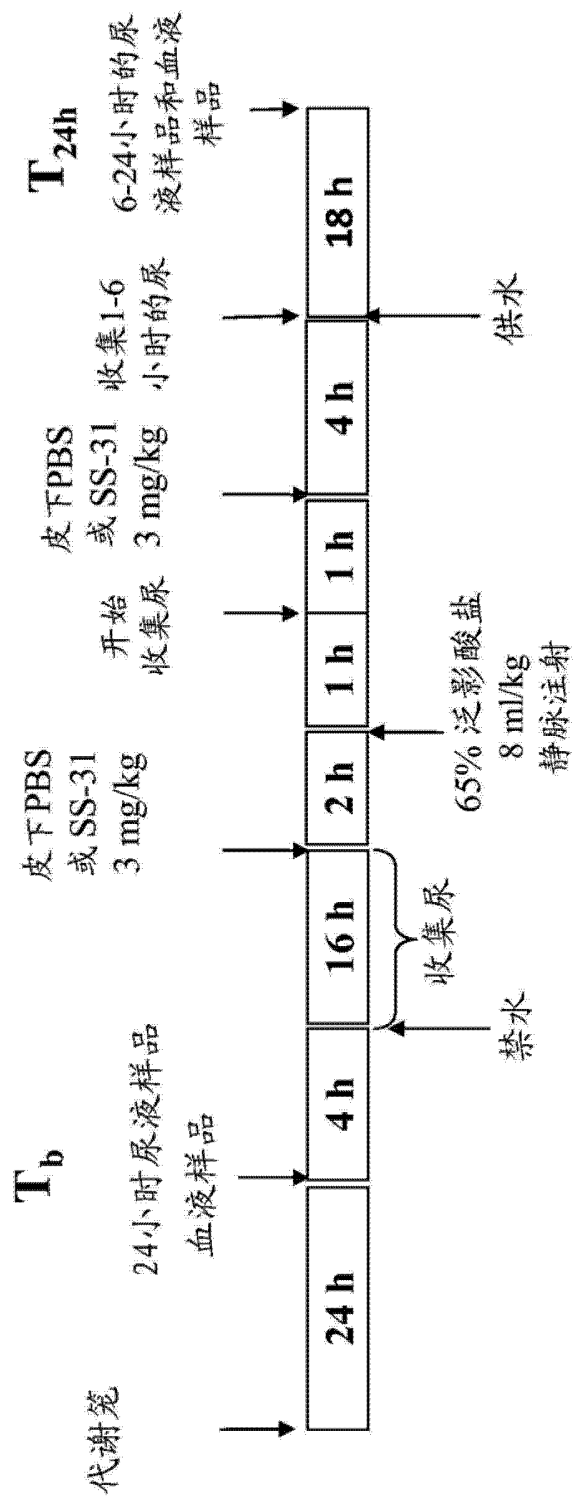


图 18



组A, HFD/STZ大鼠, PBS+染料+PBS,(N=10)
组B, HFD/STZ大鼠, SS-31+染料+SS-31 (N=9)
组C, NRC大鼠, PBS+染料+PBS (N=9)

图 19

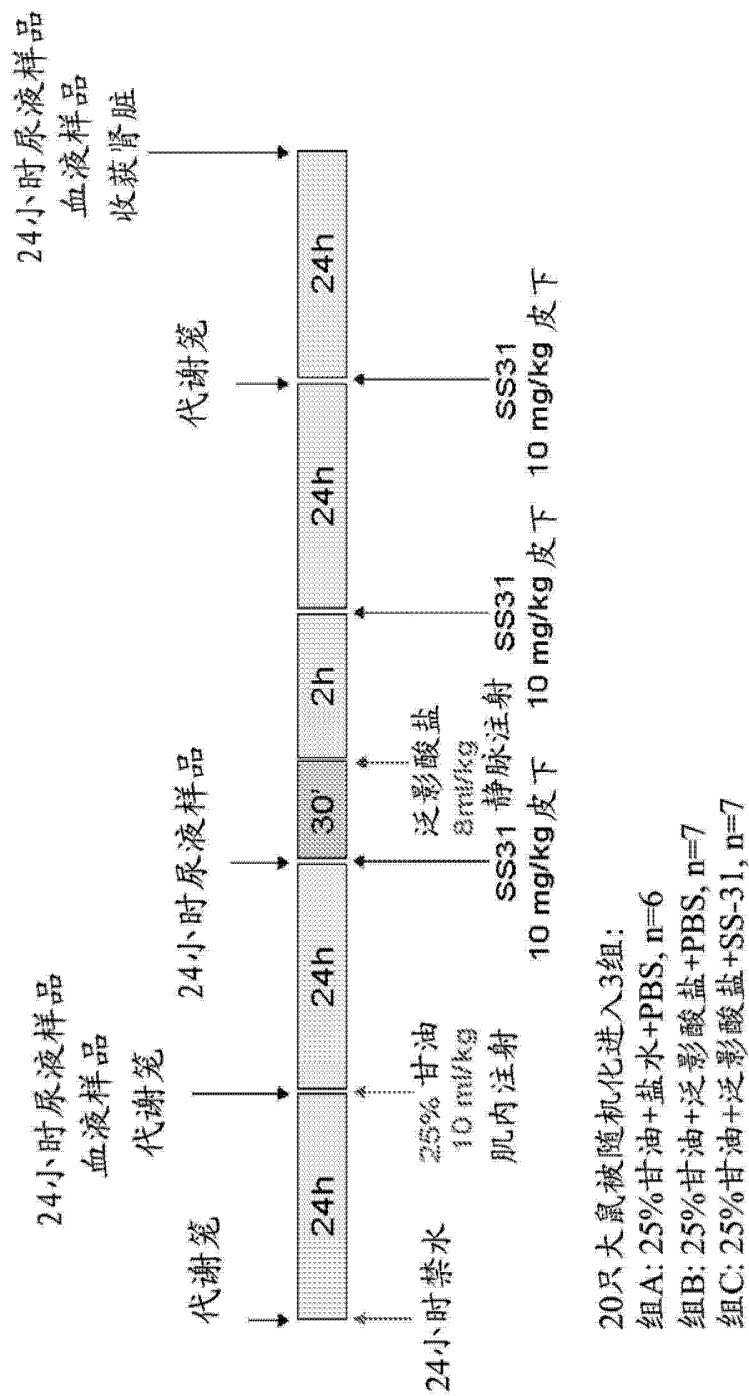


图 20

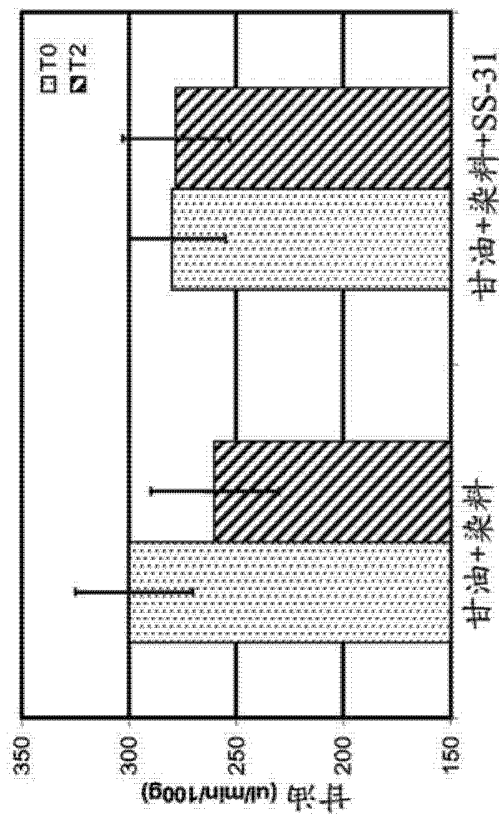


图 21a

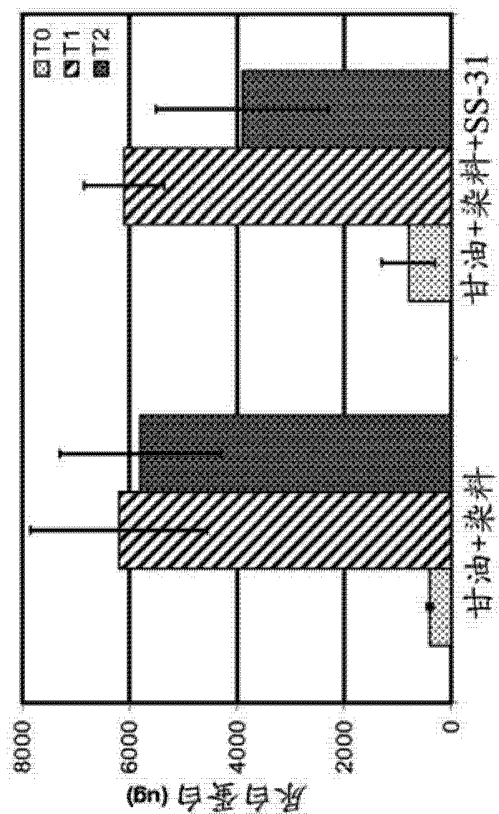


图 21b

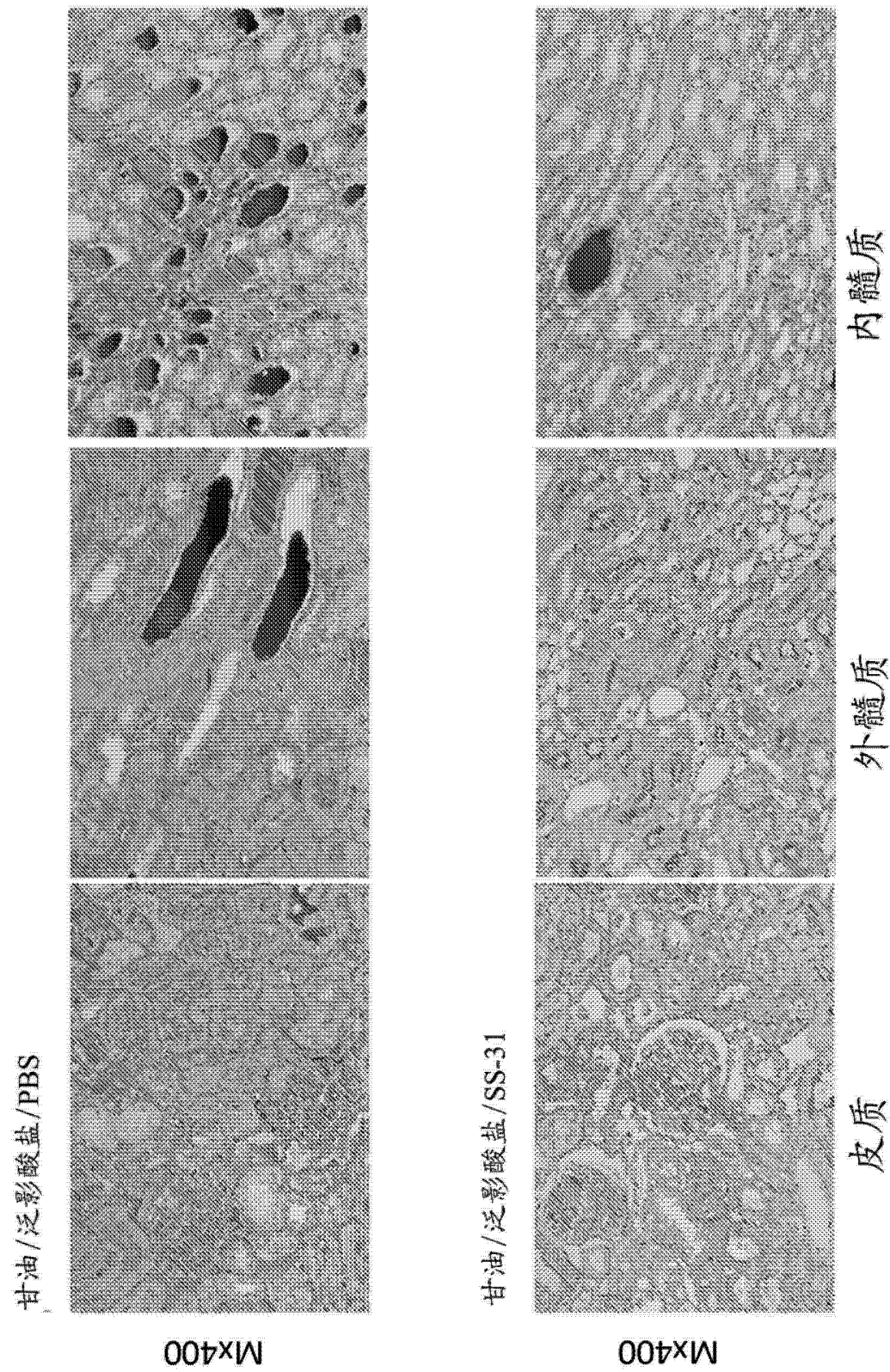
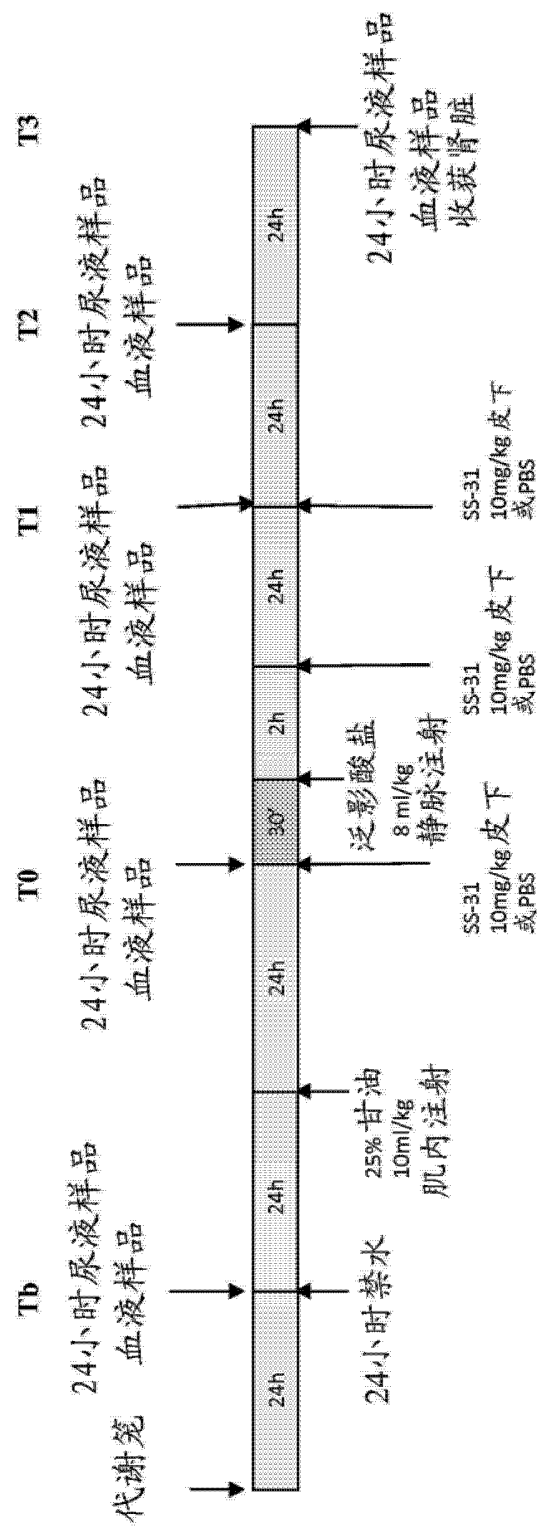


图 22a

图 22b



16只大鼠被随机化进入2组:
组A: 25%甘油+泛影酸盐+PBS, n=8
组B: 25%甘油+泛影酸盐+SS-31, n=8

图 23

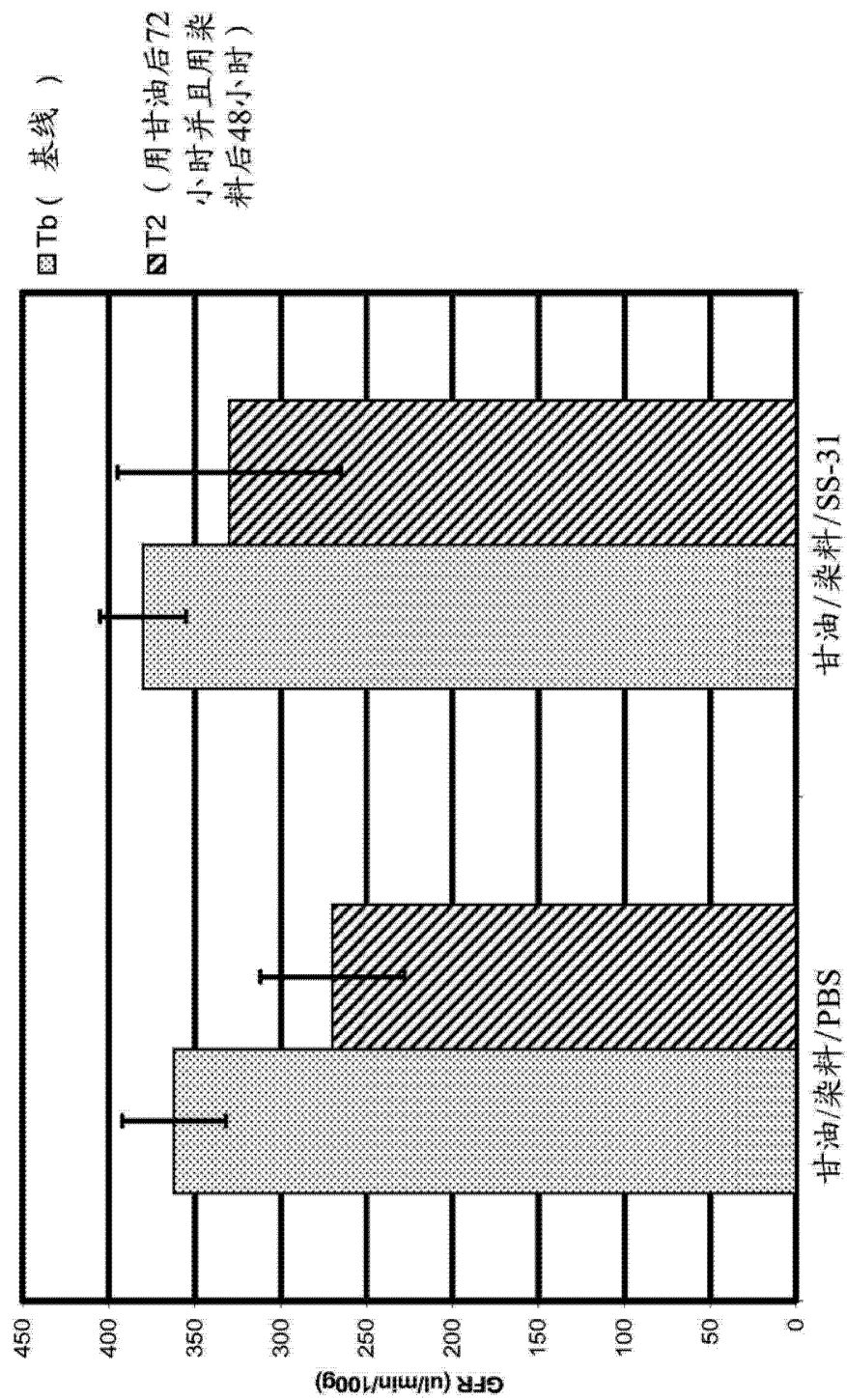


图 24

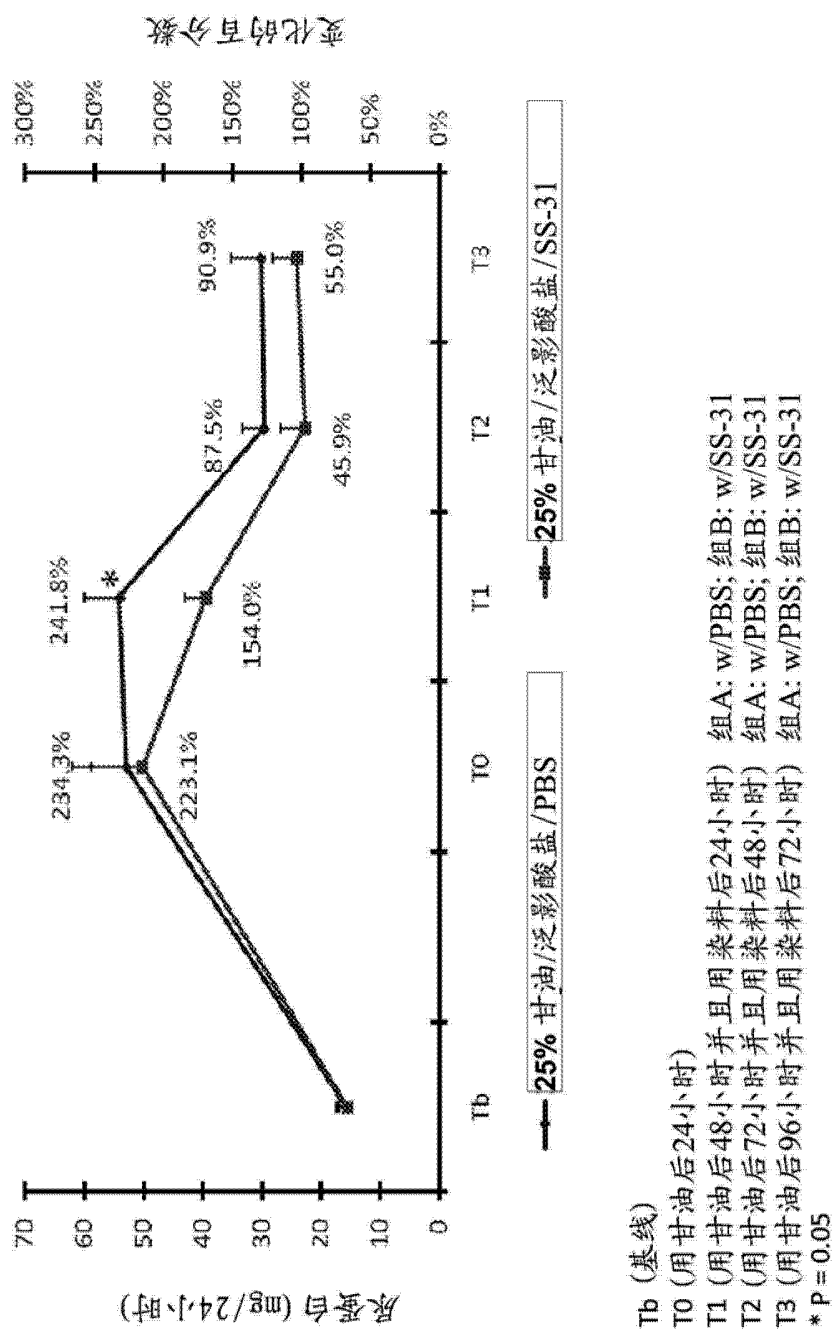


图 25

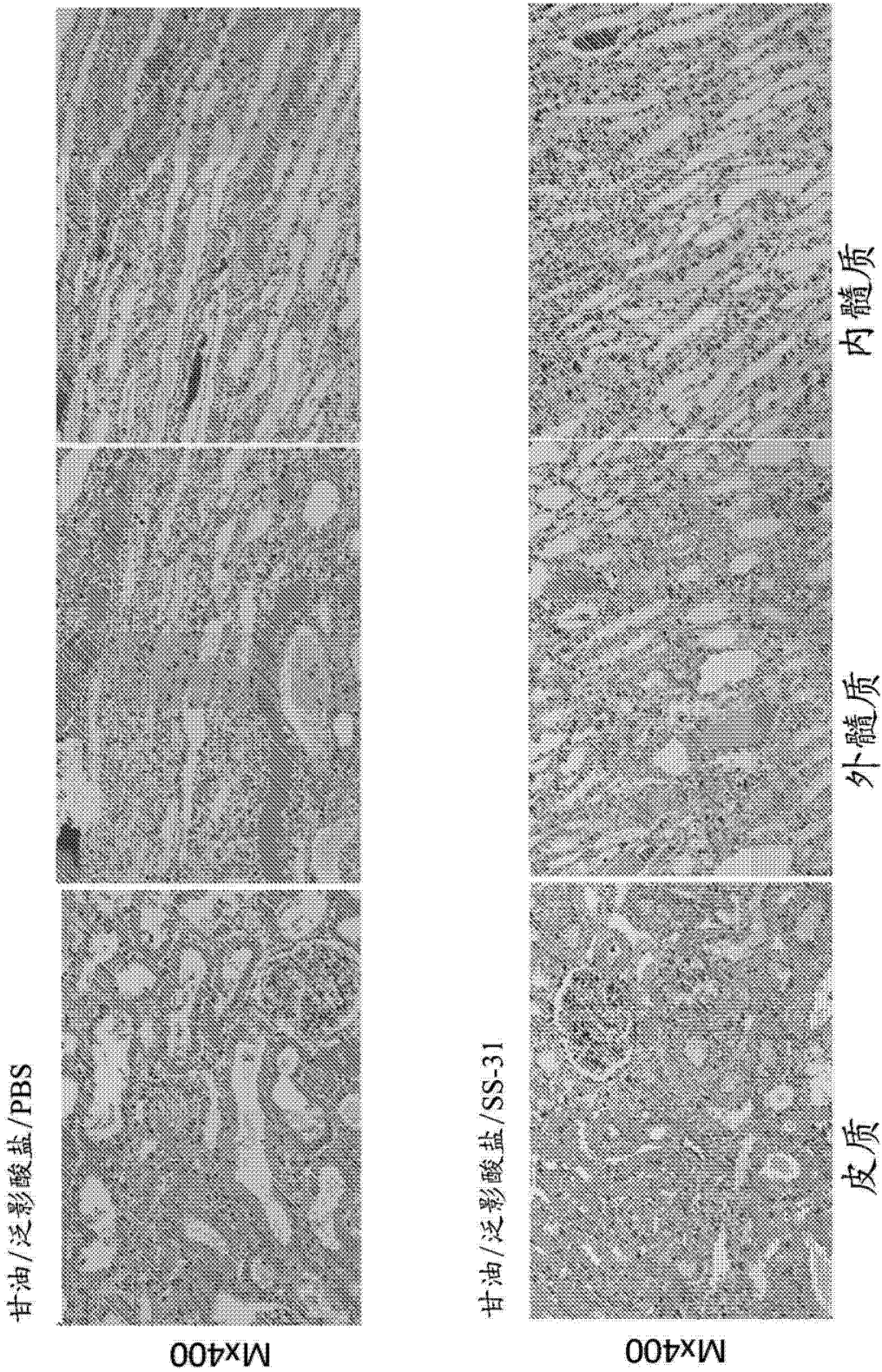
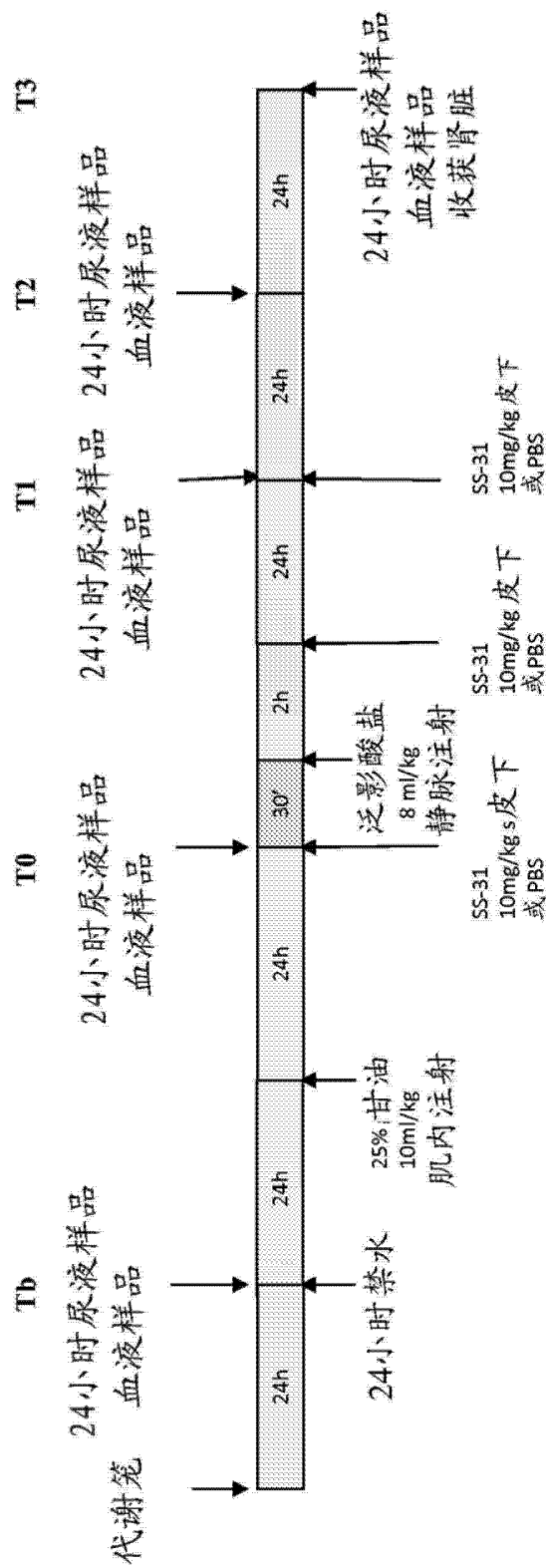


图 26a

图 26b



18只大鼠被随机化进入2组:
组A: 25%甘油+泛影酸盐+ PBS, n=9
组B: 25%甘油+泛影酸盐+ SS-31, n=9

图 27

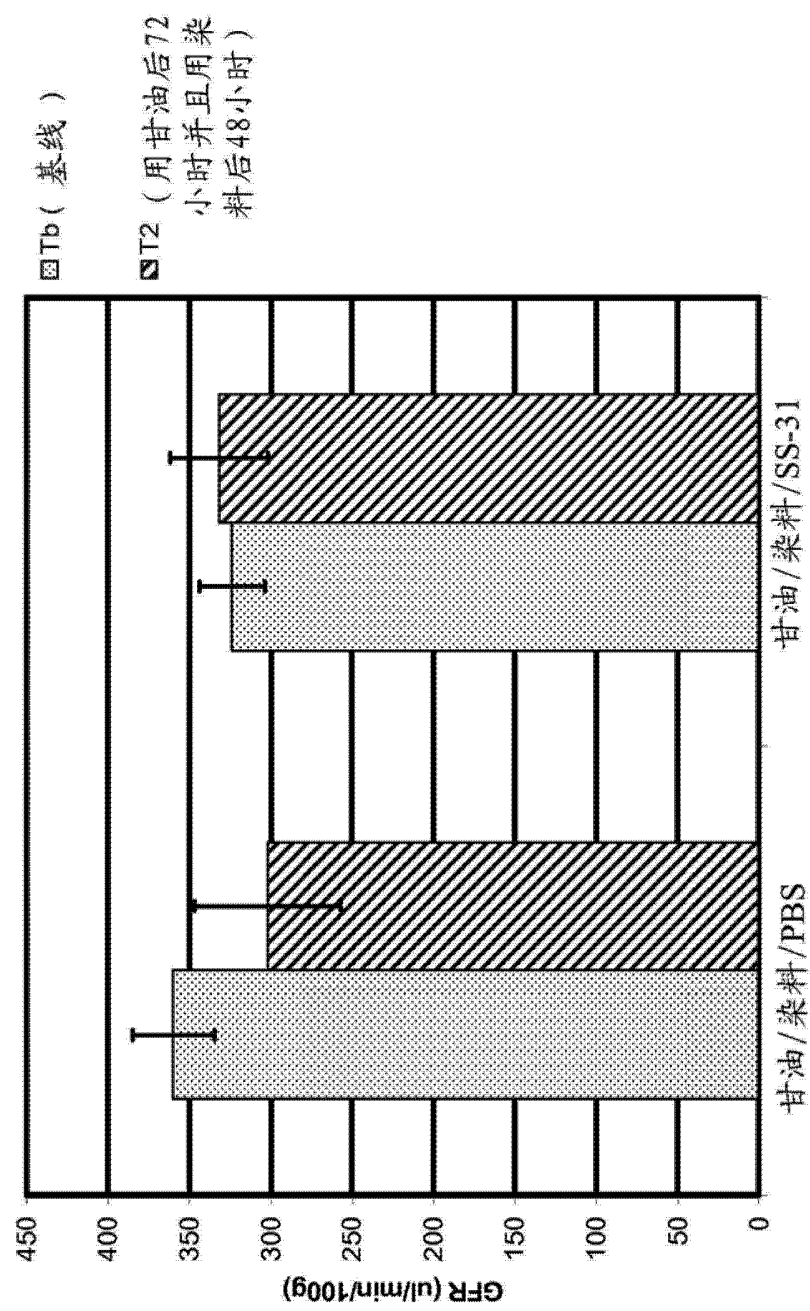


图 28

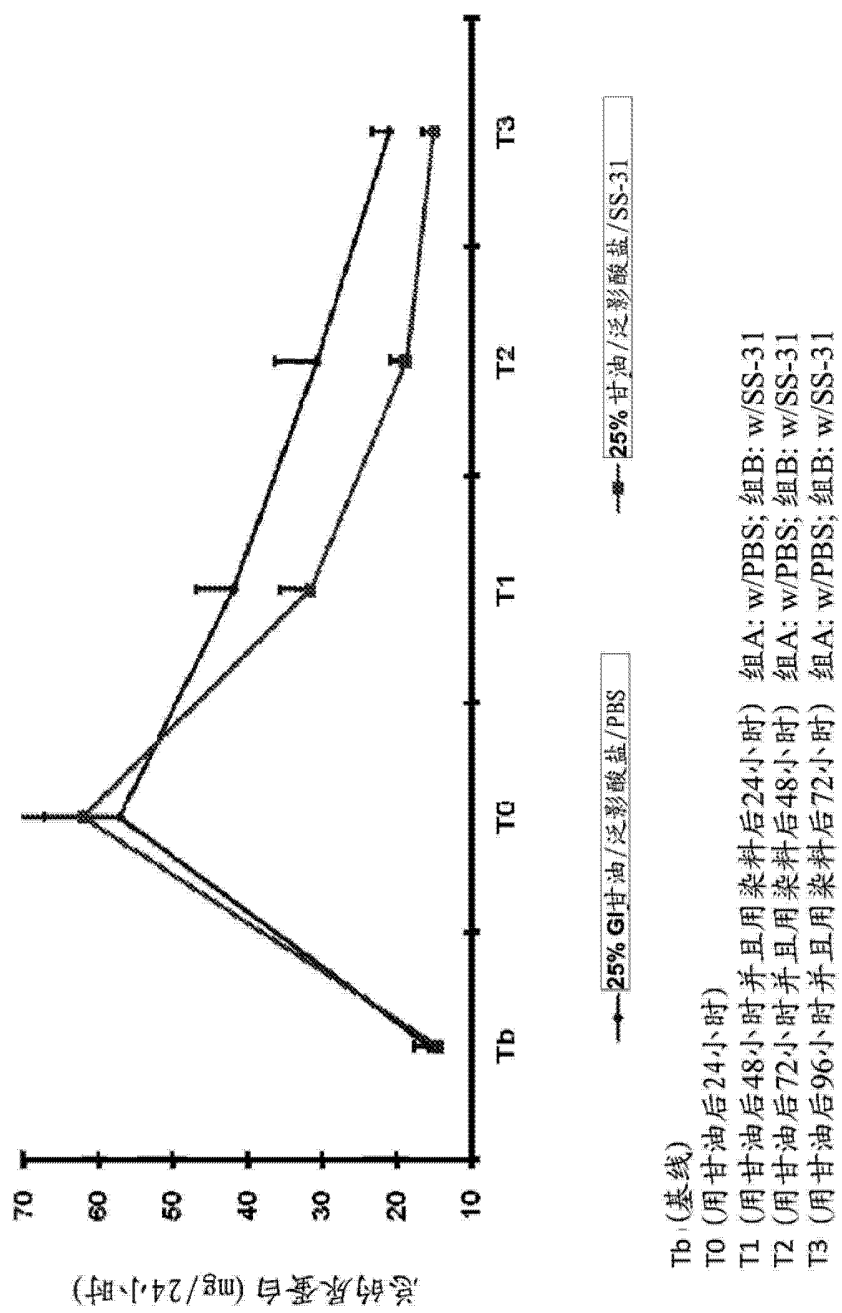


图 29

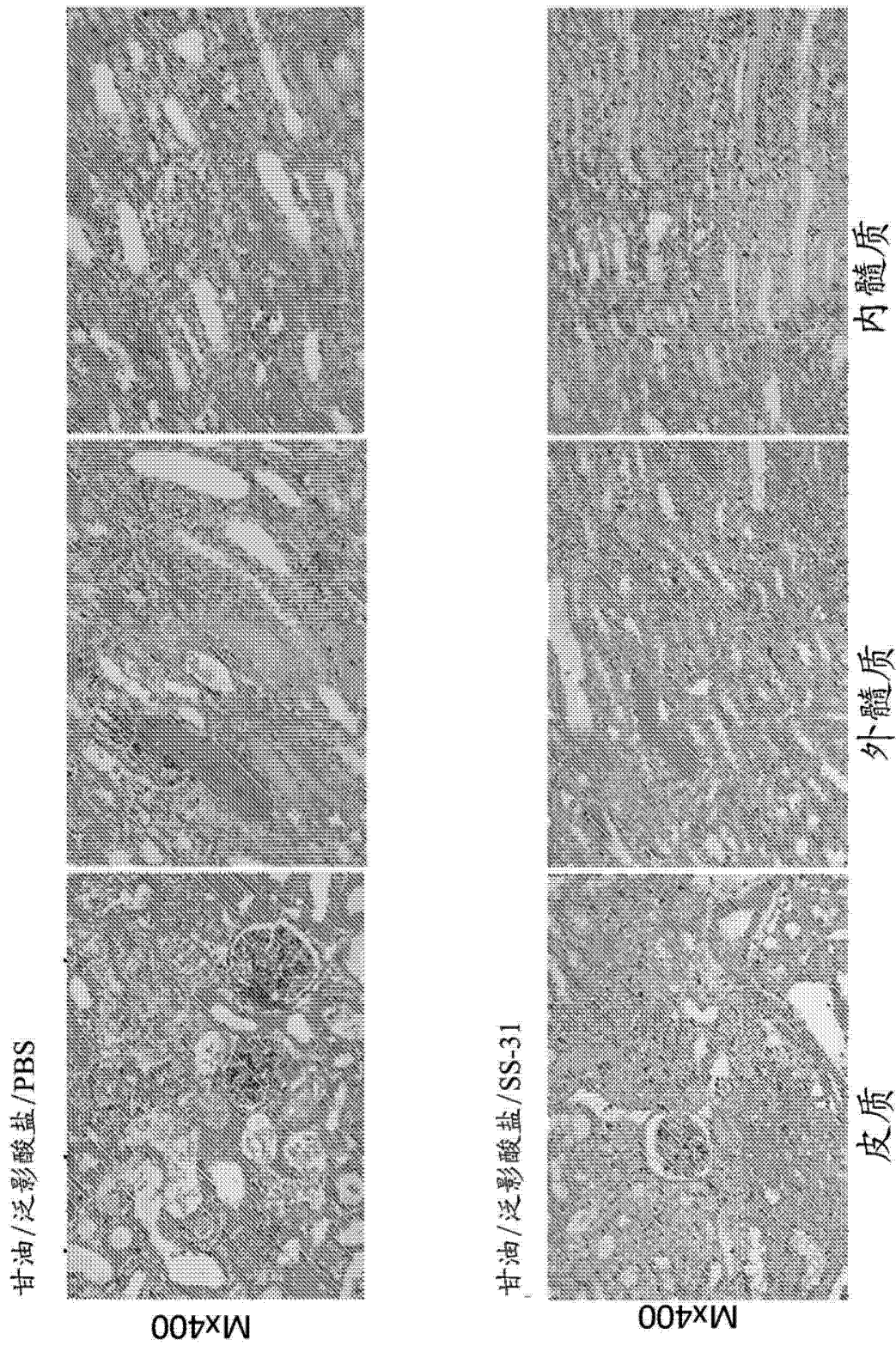


图 30a

图 30b

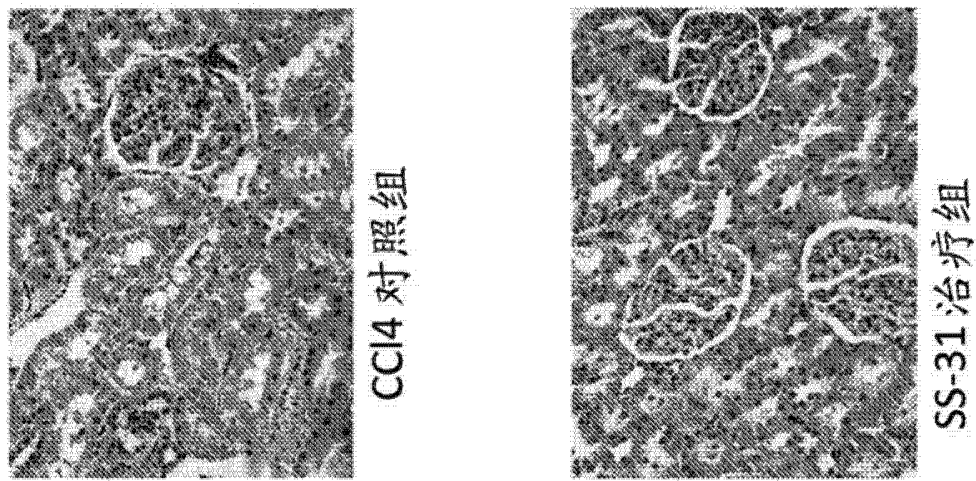


图 31a

图 31b

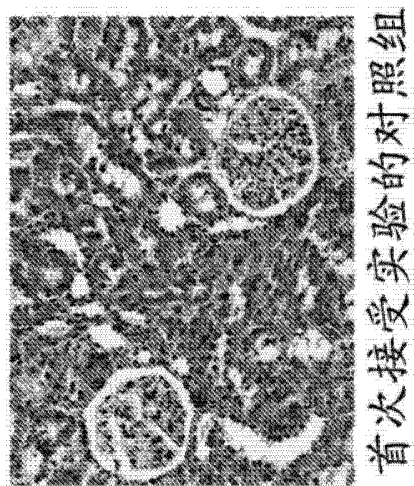


图 31c

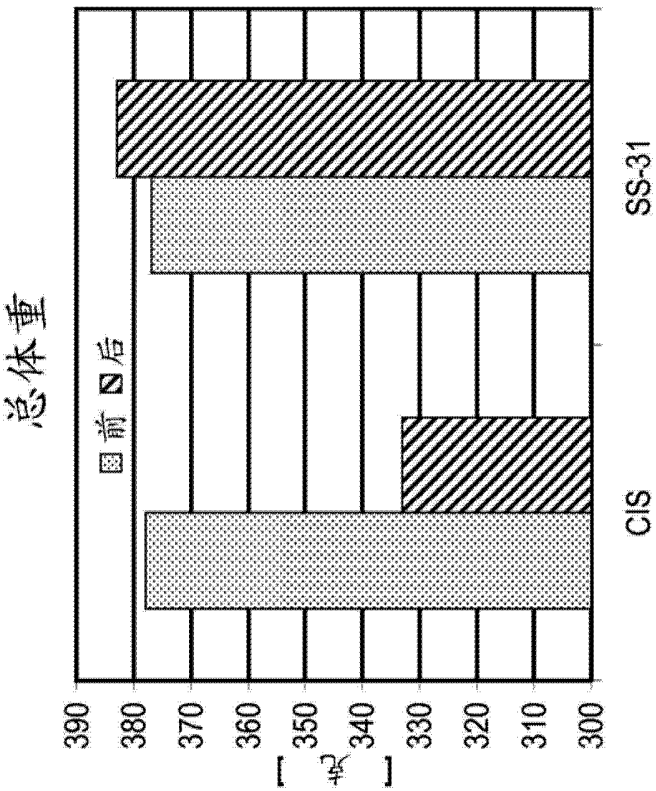


图 32a

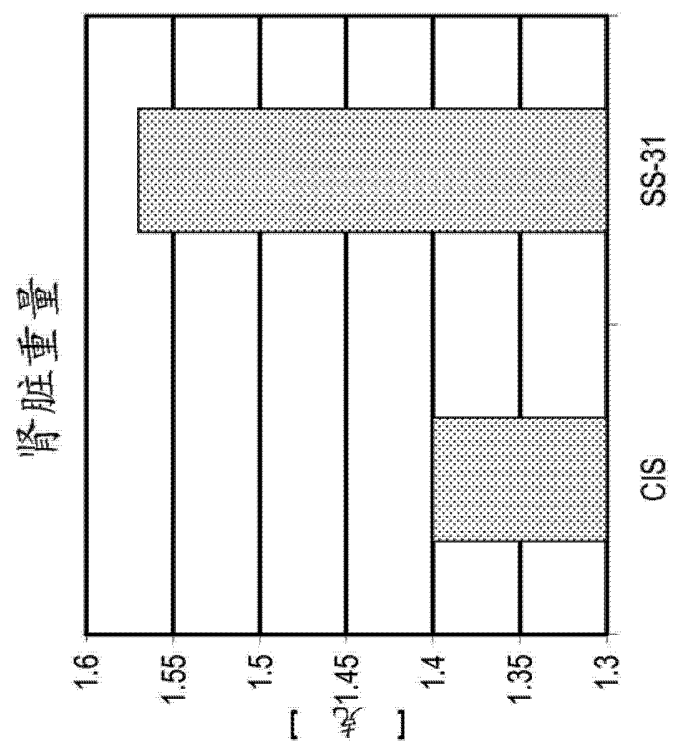


图 32b

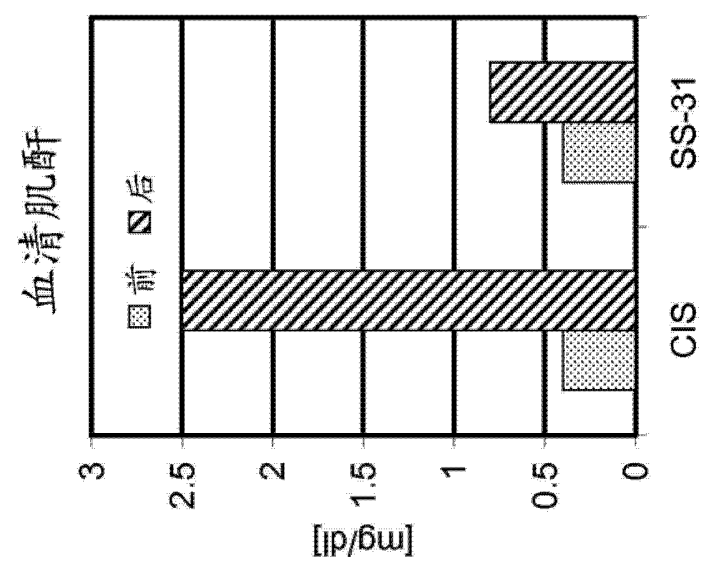


图 32c

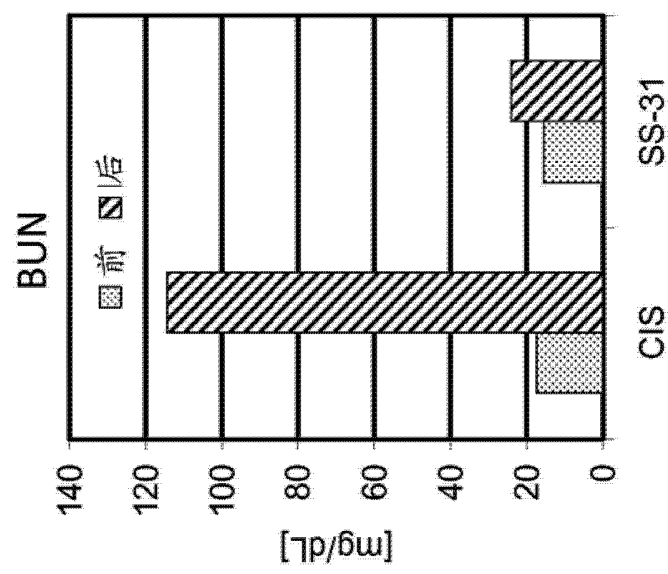


图 32d

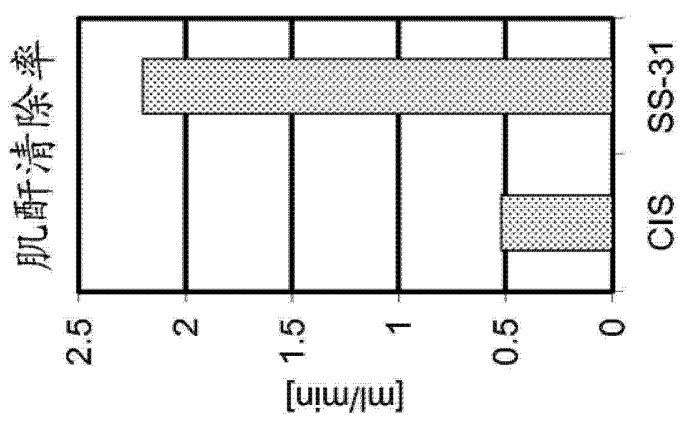


图 32e

Abstract

The invention provides methods for prevention and treatment of acute renal injury. The disclosure relates to a method for protecting a kidney from renal injury. For example, the acute renal injury may be associated with decreased or blocked blood flow in the subject's kidney or exposure to a nephrotoxic agent, such as a radiocontrast dye. The methods include administering to the subject an effective amount of an aromatic-cationic peptide to a subject in need thereof.