



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103889438 B

(45)授权公告日 2016.08.24

(21)申请号 201280050843.1

A61K 9/22(2006.01)

(22)申请日 2012.08.17

A61K 9/20(2006.01)

A61P 9/00(2006.01)

(30)优先权数据

61/525,140 2011.08.18 US

(56)对比文件

US 2005171021 A1,2005.08.04,说明书第14段倒数第4行.

WO 2008030122 A1,2008.03.13,全文.

WO 0117617 A1,2001.02.01,序列5、权利要求5.

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.04.16

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2012/002117 2012.08.17

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2013/024362 EN 2013.02.21

(73)专利权人 奥塔哥创新有限公司

地址 新西兰,达尼丁

STADLBAUER,S,et al.《Utilizing reversible copper(II) peptide coordination in a sequence-selective luminescent receptor》.《Chemistry: A European Journal》.2008,第14卷2536-2541.

SAITO,K. et al.《Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinattorial chemistry》.《Journal of agricultrual and food chemistry》.2003,第51卷3668-3674.

(72)发明人 C·J·彭伯顿 A·M·理查德

C·J·查尔斯 M·西里瓦德纳

(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

代理人 程伟 韩文华

审查员 袁实

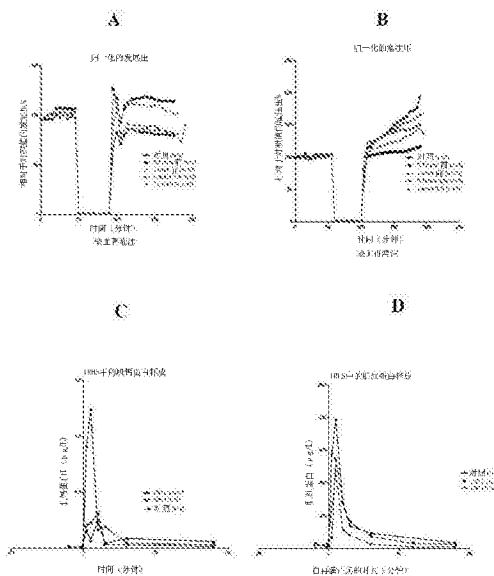
权利要求书2页 说明书51页 附图13页

(54)发明名称

心血管疗法

(57)摘要

本发明提供了包含B型利尿钠信号肽片段剂的化合物和组合物、及其使用方法,用于治疗或预防心血管疾病、病症和病况。



1. 一种用于预防和/或治疗心血管疾病的药物组合物,其包含治疗有效量的B型利尿钠信号肽片段剂和药学上可接受的载体。

2. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述B型利尿钠信号肽片段剂是BNP_{sp}(17-26)(SEQ ID NO:1)。

3. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述B型利尿钠信号肽片段剂包含选自SEQ.ID.NO:2至8的序列。

4. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述组合物适于肠胃外施用。

5. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述肠胃外施用是输注。

6. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述组合物适于缓慢、延迟或控释施用。

7. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述心血管疾病是急性冠状动脉综合征。

8. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述心血管疾病是心力衰竭或缺血性心脏病。

9. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述B型利尿钠信号肽片段剂包含B型利尿钠信号肽片段类似物。

10. B型利尿钠信号肽片段或B型利尿钠信号肽片段类似物在制备用于治疗患有或处于发展为心血管疾病风险的受试者的药物中的用途。

11. 根据权利要求10所述的用途,其中所述B型利尿钠信号肽片段包含选自SEQ.ID.NO:1至8的序列。

12. 根据权利要求10所述的用途,其中心血管疾病是选自ST段抬高心肌梗塞、非ST段抬高心肌梗塞和不稳定型心绞痛的急性冠状动脉综合征。

13. 根据权利要求10所述的用途,其中药物包含约0.01至约100毫克所述B型利尿钠信号肽片段或B型利尿钠信号肽片段类似物。

14. B型利尿钠信号肽片段或B型利尿钠信号肽片段类似物在制备用于治疗患有或处于发展为急性冠状动脉综合征风险的受试者的药物中的用途。

15. 根据权利要求14所述的用途,其中所述B型利尿钠信号肽片段包含选自SEQ.ID.NO:1至8的序列。

16. 根据权利要求14所述的用途,其中组合物包含约0.01至约100毫克所述B型利尿钠信号肽片段或B型利尿钠信号肽片段类似物。

17. 根据权利要求10或权利要求14所述的用途,其中所述受试者是哺乳动物。

18. 根据权利要求17所述的用途,其中所述哺乳动物是人。

19. 一种包含包装材料的制品,其中包装材料包含根据权利要求1-9任一项所述的药物组合物,连同用于在受试者中预防和/或治疗心血管疾病的使用说明书。

20. 一种制备用于预防或治疗心血管疾病的药物的方法,所述方法包括将治疗有效量的B型利尿钠信号肽片段或B型利尿钠信号肽片段类似物以及药学上可接受的载体合并到一起。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中所述B型利尿钠信号肽片段包含选自SEQ.ID.NO:1至8的序列。

22. 根据权利要求20所述的方法,其中所述药物配制成用于肠胃外施用。

23. 根据权利要求20所述的方法,其中所述药物配制成用于通过输注施用。

-
24. 根据权利要求20所述的方法,其中所述药物配制成用于缓慢、延迟或控释施用。
 25. 根据权利要求20-24任一项所述的方法,其中所述心血管疾病是急性冠状动脉综合征。

心血管疗法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于治疗、预防和减轻心血管疾病、病症和病况作用的药物、组合物和方法,以及包含这种化合物和组合物的物品和试剂盒。

背景技术

[0002] 以下包括可用于理解本发明的信息。并非承认此处具体或含蓄引用的任何信息、出版物或文件是现有技术,或对于正在描述或要求保护的发明是必不可少的。此处提到的所有出版物和专利其整个并入此处作为参考。

[0003] 心脏病包括缺血性心脏病、心肌梗塞和其它急性冠状动脉综合征、以及心力衰竭,心脏病是全世界主要的健康问题。

[0004] 例如,应当理解,心肌梗塞是那些患有心脏病的个体中重要的死亡缘由。心肌梗塞(MI)或急性心肌梗塞(AMI),俗称心脏发作,是供应到心脏一部分的血液中断,引起心脏细胞死亡。这最通常是因为,脆弱的动脉粥样硬化斑块破裂之后,冠状动脉的堵塞(阻断),其中斑块是脂质和白血细胞(特别是巨噬细胞)在动脉壁上不稳定的聚集。所导致的缺血和氧不足,如果足够长时间不作处理的话,可造成心脏肌肉组织即心肌的损伤或坏死(梗塞)。急性心肌梗塞的典型症状包括突发的胸痛(通常放射至左臂或颈部的左侧)、气短、恶心、呕吐、心悸、出汗和焦虑。然而,约四分之一的心肌梗塞是“沉默”的,即,没有胸痛或其它症状。对疑似急性心肌梗塞的即刻治疗包括氧气、阿司匹林和舌下服硝酸甘油。ST段抬高的MI(STEMI,有时也被称为透壁性心肌梗塞、或Q波心肌梗塞)的大多数情况用溶栓或经皮冠状动脉介入(PCI)进行治疗。NSTEMI(非ST段抬高的心肌梗塞,有时也被称为非透壁心肌梗塞、或者非Q波心肌梗塞)采用药物进行管理,虽然在住院期间通常进行PCI。心脏发作是导致全球男性和女性死亡的主要原因。

[0005] 心力衰竭(HF),通常被称为充血性心力衰竭(CHF),是一种临床综合征,其特征为由于心泵功能受损以至于全身性灌注不足,不能满足身体的代谢需要,即一般被定义为心脏无法提供足够的血流以满足身体的需要。心力衰竭是一种常见的、昂贵的、致残的(disabling)且潜在致命的疾病。McMurray JJ,Pfeffer MA(2005)“Heart failure”.Lancet365(9474):1877-89。在发达国家,大约2%的成年人患心力衰竭,而在那些65岁以上的人中,这增加至6-10%。目前,据估计超过500万美国人患有心力衰竭,约人群的2%。美国心脏协会Heart Disease and Stroke Statistics-2008更新。Dallas:美国心脏协会,2008。<http://circ.ahajournals.org>。患有HF的人以及与HF相关的财政负担是巨大的。每年约100万患有心力衰竭的患者住院,另有200万患者次级诊断(secondary diagnosis)为心力衰竭。这些患者中有三分之一由于复发性代偿不全(recurrent decompensation)而在90天内再次入院治疗。心力衰竭的常见原因包括心肌梗塞和其它形式的缺血性心脏病、高血压、心脏瓣膜病和心肌病。McMurray JJ,Pfeffer MA(2005)“Heart failure”.Lancet365(9474):1877-89。

[0006] 心力衰竭可进一步细分为收缩性或舒张性心力衰竭。在收缩性心力衰竭中,心肌

收缩性降低,而在舒张性心力衰竭中,心脏舒张(relaxation)受损并且心室充盈异常。心力衰竭的最常见原因是左心室(LV)收缩功能障碍(约60%的患者)。在此类别中,大多数情况是末期冠状动脉疾病的结果,或者是有心肌梗塞病史、或者有慢性灌注不足(underperfused)但心肌仍存活(viable)。在许多患者中,这两个过程同时存在。LV收缩性功能障碍的其它常见原因包括特发性扩张型心肌病、心脏瓣膜病、高血压性心脏病、毒素诱导的心肌病(如阿霉素、赫赛汀、酒精)以及先天性心脏病。心力衰竭也可由右心室梗塞、肺动脉高压、慢性重度三尖瓣关闭不全或致心律失常型右心室发育不良(Arrhythmogenic right ventricular dysplasia)发展而来。心力衰竭一个较不常见的原因是甲状腺功能亢进、动静脉内瘘(arteriovenous fistulae)、佩吉特氏病、妊娠或严重的慢性贫血引起的高输出量衰竭。LV舒张性功能障碍(舒张受损)通常与慢性高血压或缺血性心脏病有关。其它原因包括限制性、浸润性和肥厚性心肌病。心包缩窄或心脏压塞(cardiac tamponade)可导致右心室充盈不足。处于发展为心力衰竭的高风险患者是有高血压、冠状动脉疾病、糖尿病、心肌病家族史、用心脏毒素以及肥胖的那些。心力衰竭是一种常见综合征,尤其在年长的成人中。尽管越来越多的患者因再灌注疗法从急性心肌梗塞中存活,大多数至少有一些残留的LV收缩性功能障碍,这可导致心力衰竭。目前,心力衰竭不能治愈。尽管治疗(如药物和生活方式的改变)可以帮助人们活得更长,更积极地生活,研究人员继续寻找新的方法来治疗心力衰竭及其并发症。

[0007] 胸痛是一种非特异性症状,可以是心脏的原因,并且术语心绞痛通常是指推测的心肌缺血所引起的疼痛综合征。术语不稳定型心绞痛最早用来表示心肌梗塞和稳定型心绞痛的更慢性状态之间的中间状态。早期术语,梗塞前心绞痛,表示干预以减轻心肌梗塞或死亡风险的临床意图。患有这种病况的患者,也已经根据他们的表现、诊断测试结果或随着时间的过程被分类;这些类别包括新发作的心绞痛、恶化型心绞痛(accelerating angina)、静息心绞痛、早期梗塞后心绞痛(early postinfarct angina)和早期血管再生后(postrevascularization)心绞痛。不稳定型心绞痛被认为是急性冠状动脉综合征,其中没有释放心肌坏死的酶和生物标志物。尽管不稳定型心绞痛的病因和定义可以是广泛的,破裂的动脉粥样硬化斑块和血栓覆盖之间的相互关系存在于不稳定型心绞痛的许多情况,随之而来的是血液动力学不足或微栓塞(microembolization)。这区别于稳定型心绞痛,稳定型心绞痛中典型的根本原因是固定的冠状动脉狭窄,伴有血流受损和缓慢、渐进的斑块生长,从而允许偶然形成侧支血流。

[0008] “急性冠状动脉综合征”(ACS)已经应用到一组缺血性心脏损伤所导致的冠状动脉疾病。ACS包括已经患有MI的患者或处于发展为MI高风险的患者。呈现在内科医生面前的ACS患者涉及多种病况,这涵盖了一个连续体(continuum),其中包括不稳定型心绞痛、STEMI、NSTEMI和透壁性(Q波)MI。ACS也包括心肌缺血,并且被认为主要由在一个或多个冠状动脉中的血栓沉积以及生长所致,导致动脉的部分或完全堵塞,并且经常涉及斑块破裂,导致缺血性损伤。ACS也可以由冠状血管痉挛或增加的心肌需求而促成。综述参见,例如Davies, Clin. Cardiol. 20(Supp. I):1217(1997)。缺血性损伤后的发病率和死亡率突显出ACS的严重程度。例如,工作人员估计ACS出现的四到六周内,死亡或继发MI的风险是8-14%,以及MI或顽固性缺血的死亡比是15-25%。Theroux和Fuster, Circulation 97:1195-1206(1998)。考虑到在美国因急性MI死亡的总数约为600,000,就可以理解本领域中对ACS治疗

管理信息的检索已非常广泛。

[0009] B型利尿钠肽(BNP或BNP-32)是一种32个氨基酸的神经激素,其在心室心肌中合成并释放到循环中以响应心室舒张和压力负荷。CHR患者当中BNP的血浆浓度升高,并且与左心室功能障碍程度和CHF症状的严重程度成比例地增加。综述参见,例如Wiese等人,Circulation102:30749(2000);Yasue等人,Circulation90:195203(1994);Yoshimura等人,Circulation87:4649(1993);Stein和Levin,Am.Heart J.135:91423(1998);以及Omland等人,Heart76:2327(1996)。BNP的前体被合成为134个氨基酸的前体分子称为“前体BNP原(pre pro BNP)”,它被切割成一个包含氨基酸1-26的信号肽和由氨基酸27-134组成的一个108个氨基酸的分子,称作“BNP原(pro BNP)”。BNP原被蛋白水解加工成一个76个氨基酸的N端肽(氨基酸1-76),称为“NT BNP原”,以及32个氨基酸的成熟激素,称为BNP或BNP32(氨基酸77-108)。已经报道NT BNP原、BNP-32以及前体BNP原可以在人血浆中循环。参见,例如,Tateyama等人,Biochem.Biophys.Res.Commun.185:7607(1992);Hunt等人,Biochem.Biophys.Res.Commun.214:117583(1995)。

[0010] 2001年8月,hBNP(天然肽)被FDA批准,商品名为Natrecor(奈西立肽(nesiritide))用于治疗急性充血性心力衰竭。在十二年来,Natrecor是第一个被批准用于治疗CHF的药物。在静息或轻微活动时具有呼吸困难的急性代偿不全或晚期CHF患者中,通过静脉持续输注48小时的时间进行施用。由于药物昂贵,需要住院,Natrecor只用于最急性的情况。此外,内肽酶降解以及利尿钠肽清除受体(NPR-C)介导的内化,导致这些蛋白在体内半衰期相当短,限制了BNP的治疗性用途。例如,BNP的血浆半衰期估计为约20分钟(Potter等人,Endocrine Reviews27(1):42-72(2006)),这些肽以往的治疗施用限于耗时的静脉输注,通常在医院或其它医疗护理机构。

[0011] 本领域中仍然需要新的疗法,用于治疗患有或处于发展为心血管疾病、病症和病况风险的患者,包括缺血性心脏病、急性冠状动脉综合征和心力衰竭。特别需要新的疗法,其覆盖缺血和/或氧化应激(stress)相关的心血管疾病、病症和病况的整个范围。基于令人惊讶的发现,此处描述并要求了这样的疗法,例如发现表明BNP的信号肽片段是新的心脏保护和治疗剂。

发明内容

[0012] 此处描述并要求的本发明具有很多特征和实施方式,包括但不限于在本发明内容中所述或描述或引用的那些。并非旨在包括一切,且此处描述并要求的本发明并不限于或受限于本发明内容中确定的特征或实施方式,包括这些仅是为了说明的目的,而不是限制。

[0013] 在一个方面中,此处提供的本发明包括化合物。化合物用于治疗心血管疾病。在另一方面中,本发明包括包含或基本上由一种或多种这种化合物组成的组合物。

[0014] 本发明的化合物,在非限制性优选实施方式中是分离的或基本上是纯的,包含如下肽:LHLAFLGGRS(SEQ.ID.NO:1)、LHLAFLGGR(SEQ.ID.NO:2)、LHLAFLGG(SEQ.ID.NO:3)、LHLAFLG(SEQ.ID.NO:4)、LHLAFL(SEQ.ID.NO:5)和LHLAF(SEQ.ID.NO:6)、LHLA(SEQ.ID.NO:7)、LHL(SEQ.ID.NO:8)、LH(SEQ.ID.NO:9)。在以上如SEQ.ID.NO:1-9所示的肽中,任一个或多个亮氨酸(L)可被取代之为异亮氨酸(I)、D-亮氨酸或D-异亮氨酸、或叔-亮氨酸、正亮氨酸、L-别-异亮氨酸、D-别-异亮氨酸、D-叔-亮氨酸和D-正亮氨酸,和/或组氨酸可被取代之为具有

或经制备而具有以咪唑环结尾的侧链的任何非天然存在的氨基酸,所有这些是SEQ. ID. NO: 1-9的类似物。

[0015] 本发明的化合物,在非限制性优选实施方式中是分离的或基本上是纯的,还包含根据下式I的肽:

[0016] L H X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈

[0017] 其中X₁是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly;X₂是Val、Leu、Ile或Gly;X₃是Leu、Val、Ile、Ala、Tyr或Gly;X₄是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly;X₅是Pro、Ala、Arg或Ser;X₆是Pro、Ala、Arg或Ser;X₇是Arg、Gln、Asn或Gly;以及X₈是Thr或Gly。

[0018] 本发明的化合物,在非限制性优选实施方式中是分离的或基本上是纯的,还包含根据下式II的肽:

[0019] L H X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇

[0020] 其中X₁是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly;X₂是Val、Leu、Ile或Gly;X₃是Leu、Val、Ile、Ala、Tyr或Gly;X₄是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly;X₅是Pro、Ala、Arg或Ser;X₆是Pro、Ala、Arg或Ser;以及X₇是Arg、Gln、Asn或Gly;倘若

[0021] 当X₁是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly时,X₂也可以是Ala,X₃也可以是Phe,X₄也可以是Leu,X₅也可以是Gly,X₆也可以是Gly,以及X₇也可以是Arg;

[0022] 当X₂是Val、Leu或Ile或Gly时,X₁也可以是Leu,X₃也可以是Phe,X₄也可以是Leu,X₅也可以是Gly,X₆也可以是Gly,以及X₇也可以是Arg;

[0023] 当X₃是Leu、Val、Ile、Ala、Tyr或Gly时,X₁也可以是Leu,X₂也可以是Ala,X₄也可以是Leu,X₅也可以是Gly,X₆也可以是Gly,以及X₇也可以是Arg;

[0024] 当X₄是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly时,X₁也可以是Leu,X₂也可以是Ala,X₃也可以是Phe,X₅也可以是Gly,X₆也可以是Gly,以及X₇也可以是Arg;

[0025] 当X₅是Pro、Ala、Arg或Ser时,X₁也可以是Leu,X₂也可以是Ala,X₃也可以是Phe,X₄也可以是Leu,X₆也可以是Gly,以及X₇也可以是Arg;

[0026] 当X₆是Pro、Ala、Arg或Ser时,X₁也可以是Leu,X₂也可以是Ala,X₃也可以是Phe,X₄也可以是Leu,X₅也可以是Gly,以及X₇也可以是Arg;

[0027] 当X₇是Lys、Gln、Asn或Gly时,X₁也可以是Leu,X₂也可以是Ala,X₃也可以是Phe,X₄也可以是Leu,X₅也可以是Gly,以及X₆也可以是Gly。

[0028] 本发明的化合物,在非限制性优选实施方式中是分离的或基本上是纯的,还包含根据下式III的肽:

[0029] L H X₁X₂X₃X₄X₅X₆

[0030] 其中X₁是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly;X₂是Val、Leu、Ile或Gly;X₃是Leu、Val、Ile、Ala、Tyr或Gly;X₄是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly;X₅是Pro、Ala、Arg或Ser;以及X₆是Pro、Ala、Arg或Ser;倘若

[0031] 当X₁是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly时,X₂也可以是Ala,X₃也可以是Phe,X₄也可以是Leu,X₅也可以是Gly,X₆也可以是Gly,以及X₇也可以是Arg;

[0032] 当X₂是Val、Leu或Ile或Gly时,X₁也可以是Leu,X₃也可以是Phe,X₄也可以是Leu,X₅也可以是Gly,X₆也可以是Gly,以及X₇也可以是Arg;

[0033] 当X₃是Leu、Val、Ile、Ala、Tyr或Gly时,X₁也可以是Leu,X₂也可以是Ala,X₄也可以

是Leu, X₅也可以是Gly, X₆也可以是Gly, 以及X₇也可以是Arg;

[0034] 当X₄是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly时, X₁也可以是Leu, X₂也可以是Ala, X₃也可以是Phe, X₅也可以是Gly, X₆也可以是Gly, 以及X₇也可以是Arg;

[0035] 当X₅是Pro、Ala、Arg或Ser时, X₁也可以是Leu, X₂也可以是Ala, X₃也可以是Phe, X₄也可以是Leu, X₆也可以是Gly, 以及X₇也可以是Arg;

[0036] 当X₆是Pro、Ala、Arg或Ser时, X₁也可以是Leu, X₂也可以是Ala, X₃也可以是Phe, X₄也可以是Leu, X₅也可以是Gly, 以及X₇也可以是Arg。

[0037] 本发明的化合物, 在非限制性优选实施方式中是分离的或基本上是纯的, 还包含根据下式IV的肽:

[0038] L H X₁X₂X₃X₄X₅

[0039] 其中X₁是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly; X₂是Val、Leu、Ile或Gly; X₃是Leu、Val、Ile、Ala、Tyr或Gly; X₄是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly; 以及X₅是Pro、Ala、Arg或Ser; 倘若

[0040] 当X₁是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly时, X₂也可以是Ala, X₃也可以是Phe, X₄也可以是Leu, X₅也可以是Gly, X₆也可以是Gly, 以及X₇也可以是Arg;

[0041] 当X₂是Val、Leu或Ile或Gly时, X₁也可以是Leu, X₃也可以是Phe, X₄也可以是Leu, X₅也可以是Gly, X₆也可以是Gly, 以及X₇也可以是Arg;

[0042] 当X₃是Leu、Val、Ile、Ala、Tyr或Gly时, X₁也可以是Leu, X₂也可以是Ala, X₄也可以是Leu, X₅也可以是Gly, X₆也可以是Gly, 以及X₇也可以是Arg;

[0043] 当X₄是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly时, X₁也可以是Leu, X₂也可以是Ala, X₃也可以是Phe, X₅也可以是Gly, X₆也可以是Gly, 以及X₇也可以是Arg;

[0044] 当X₅是Pro、Ala、Arg或Ser时, X₁也可以是Leu, X₂也可以是Ala, X₃也可以是Phe, X₄也可以是Leu, X₆也可以是Gly, 以及X₇也可以是Arg。

[0045] 本发明的化合物, 在非限制性优选实施方式中是分离的或基本上是纯的, 还包含根据下式V的肽:

[0046] L H X₁X₂X₃X₄

[0047] 其中X₁是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly; X₂是Val、Leu、Ile或Gly; X₃是Leu、Val、Ile、Ala、Tyr或Gly; 以及X₄是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly; 倘若

[0048] 当X₁是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly时, X₂也可以是Ala, X₃也可以是Phe, X₄也可以是Leu, X₅也可以是Gly, X₆也可以是Gly, 以及X₇也可以是Arg;

[0049] 当X₂是Val、Leu或Ile或Gly时, X₁也可以是Leu, X₃也可以是Phe, X₄也可以是Leu, X₅也可以是Gly, X₆也可以是Gly, 以及X₇也可以是Arg;

[0050] 当X₃是Leu、Val、Ile、Ala、Tyr或Gly时, X₁也可以是Leu, X₂也可以是Ala, X₄也可以是Leu, X₅也可以是Gly, X₆也可以是Gly, 以及X₇也可以是Arg;

[0051] 当X₄是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly时, X₁也可以是Leu, X₂也可以是Ala, X₃也可以是Phe, X₅也可以是Gly, X₆也可以是Gly, 以及X₇也可以是Arg。

[0052] 本发明的化合物, 在非限制性优选实施方式中是分离的或基本上是纯的, 还包含根据下式VI的肽:

[0053] L H X₁X₂X₃

[0054] 其中X₁是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly；X₂是Val、Leu、Ile或Gly；以及X₃是Leu、Val、Ile、Ala、Tyr或Gly；倘若

[0055] 当X₁是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly时；X₂也可以是Ala，以及X₃也可以是Phe；

[0056] 当X₂是Val、Leu或Ile或Gly时，X₁也可以是Leu，以及X₃也可以是Phe；以及

[0057] 当X₃是Leu、Val、Ile、Ala、Tyr或Gly时，X₁也可以是Leu，以及X₂也可以是Ala。

[0058] 本发明的化合物，在非限制性优选实施方式中是分离的或基本上是纯的，还包含根据下式VII的肽：

[0059] L H X₁X₂

[0060] 其中X₁是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly；以及X₂是Val、Leu、Ile或Gly；倘若

[0061] 当X₁是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly时，X₂也可以是Ala；以及；

[0062] 当X₂是Val、Leu或Ile或Gly时，X₁也可以是Leu。

[0063] 本发明的化合物，在非限制性优选实施方式中是分离的或基本上是纯的，还包含根据下式VIII的肽：

[0064] L H X₁

[0065] 其中X₁是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly。

[0066] 这些化合物的活性类似物和保守变体包括在本发明范围内，包括其截短，优选C端截短。此外，例如，在式I-VIII中所示的肽中，任一个或多个亮氨酸(L)可被取代为异亮氨酸(I)、D-亮氨酸或D-异亮氨酸、或叔-亮氨酸、正亮氨酸、L-别-异亮氨酸、D-别-异亮氨酸、D-叔-亮氨酸和D-正亮氨酸，和/或组氨酸可被取代为具有或经制备而具有以咪唑环结尾的侧链的任何非天然存在的氨基酸，所有这些也是其类似物。

[0067] 在一个非限制性实施方式中，本发明范围内的肽(包括SEQ. ID. NO: 1-9和式I-VIII中的序列)的一个或多个氨基酸是L或D构型。在其它实施方式中，在本发明范围内的肽的一个或多个氨基酸是天然存在的非遗传编码的氨基酸。在其它实施方式中，在本发明范围内肽的一个或多个氨基酸是氨基酸类似物或合成氨基酸。

[0068] 在另一个非限制性实施方式中，本发明范围内的肽(包括SEQ. ID. NO: 1-9和式I-VIII中的序列)的N端亮氨酸(或异亮氨酸D-亮氨酸、D-异亮氨酸、叔-亮氨酸、正亮氨酸、L-别-异亮氨酸、D-别-异亮氨酸、D-叔-亮氨酸和D-正亮氨酸)可以经修饰而含有甲酰基、包含甲酰基的基团、羧酸酯(优选醛酯，如羧乙基、羧甲基等)、或包含羧酸酯的基团。此处优选用甲酰基、羧乙基以及羧甲基进行的修饰。

[0069] 在另一实施方式中，本发明范围内的化合物(包括SEQ. ID. NO: 1-9和式I-VIII中的序列)中一个或多个氨基酸，主要基于氨基酸侧链化学和物理性质，被取代为来自相似氨基酸类别或亚类的另一氨基酸。例如，一个或多个亲水性或极性氨基酸可以取代为另一亲水性或极性氨基酸。同样地，一个或多个疏水性或非极性氨基酸可取代为另一疏水性或非极性氨基酸。在进行这种取代时，极性氨基酸可以进一步细分成具有酸性、碱性或亲水性侧链的氨基酸，以及非极性氨基酸可以进一步细分成具有芳香族或疏水性侧链的氨基酸。此外，非极性氨基酸可以进一步细分以包括脂肪族氨基酸。

[0070] 经修饰以改善其生物药学特性的本发明的化合物也包括在本发明范围内。在具体

的实施方式中,例如本发明的化合物经过修饰以提供增加的稳定性、增加的对蛋白水解失活的抗性、降低至不存在的免疫原性、延长的循环寿命(包括改变的血清半衰期和改变的治疗半衰期)、和低毒性。本发明的化合物的修饰形式包括前药形式,在此处其它地方描述了其代表性实例。可以修饰本发明的化合物的方法也包括例如通过聚乙二醇化、通过化学衍生化、以及通过与肽或脂质进行融合或缀合。修饰的化合物包括修饰的B型利尿钠信号肽片段剂,包括例如修饰的BNP_{sp}(17-26)(SEQ ID NO:1)及其修饰的类似物、变体(如,保守的变体)和截短形式。其它实施方式包括选自经修饰的SEQ. ID. NO:2至9的肽、以及经修饰的根据式I、式II、式III、式IV、式V、式VI、式VII和/或式VIII的肽,及其经修饰的活性类似物、变体(如,保守的变体)和截短形式。

[0071] 其它实施方式包括本发明的化合物的拟肽。

[0072] 本发明还包括包含或基本上由B型利尿钠信号肽片段剂和药学上可接受的载体组成的药物组合物。在一个实施方式中,药物组合物包含或基本上由BNP_{sp}(17-26)(SEQ ID NO:1)组成。在另一个实施方式中,所述药物组合物包含或基本上由选自SEQ. ID. NO:2至9的序列组成。在另一个实施方式中,所述药物组合物包含或基本上由选自式I、式II、式III、式IV、式V、式VI、式VII和/或式VIII的序列组成。包含这些化合物的一种或多种活性类似物和保守变体(包括其截短,优选C端截短)的药物组合物包括在本发明的范围内。在一个实施方式中,本发明包括药物组合物,所述药物组合物包含或基本上由B型利尿钠信号肽片段或其治疗活性类似物或变体或截短组成。

[0073] 在另一个实施方式中,本发明包括药物组合物,所述药物组合物包含或基本上由本发明的化合物组成,本发明的化合物包括经修饰以改善其生物药学特性的类似物、变体、截短等。在某些实施方式中,例如,本发明的化合物经修饰以提供增加的稳定性、增加的对蛋白水解失活的抗性、降低至不存在的免疫原性、延长的半衰期或循环寿命和低毒性。可以修饰本发明的化合物的方法包括例如通过聚乙二醇化、通过化学衍生化、以及通过与肽或脂质进行融合或缀合。

[0074] 本发明包括药物组合物,所述药物组合物包含一种或多种药学上可接受的B型利尿钠信号肽剂,其用于治疗心血管疾病,例如急性冠状动脉综合征、心力衰竭、缺血性心脏病等以及至少部分特征在于缺血和/或氧化应激的相关心血管疾病、病症和病况,以及相关的病症和病况。在此处某些优选的B型利尿钠信号肽剂被确定为SEQ. ID. NO:1至9。BNP_{sp}(17-26)(SEQ ID NO:1)是最优选的。其它B型利尿钠信号肽剂在式I、式II、式III、式IV、式V、式VI、式VII和式VIII范围内。其它实施方式包括上述的活性类似物、变体(例如保守的变体)和截短,以及药学上可接受的载体。因此,本发明包括适于或经调整而适于治疗受试者的心血管疾病、病症或病况的形式的药物组合物。在一个实施方式中,心血管疾病、病症或病况与缺血和/或氧化应激相关。在某些实施方式中,心血管疾病、病症或病况是急性冠状动脉综合征。例如,急性冠状动脉综合征选自ST段抬高心肌梗塞、非ST段抬高心肌梗塞和不稳定型心绞痛。在其它实施方式中,心血管疾病、病症或病况是缺血性心脏病。在其它实施方式中,心血管疾病、病症或病况是心力衰竭(任何形式)。例如,心力衰竭可以是收缩性或舒张性心力衰竭。左心室收缩性功能障碍可导致心力衰竭。心力衰竭也可能是右心室梗塞、肺动脉高压、慢性重度三尖瓣关闭不全或致心律失常型右心室发育不良的结果。心力衰竭也可能是LV舒张性功能障碍的结果。在另一实施方式中,心血管疾病、病症或病况是缺血性

心脏病。

[0075] 在一个方面中,本发明包括用于在受试者中预防和/或治疗心血管疾病如急性冠状动脉综合征、心力衰竭、缺血性心脏病等,以及涉及缺血和/或氧化应激的相关心血管疾病、病症或病况,以及相关的病症和病况的药物组合物,包括胃肠外递送形式和制剂,以及其它递送形式,包括通过输注、注射和滴注的递送形式,以及延迟的、缓慢的、延长的或控释的组合物、装置和基质(matrices),包含或基本上由治疗有效量的B型利尿钠信号肽片段剂和药学上可接受的载体组成,B型利尿钠信号肽片段剂可以是单独的、或与另一种心血管治疗剂组合。在某些优选实施方式中,所述药物组合物经过配制用于静脉内施用,包括通过输注或作为推注。用于其它施用途径的其它制剂也在本发明范围之内,包括例如用于鼻、肺、颊、直肠、经皮和口服递送的制剂。

[0076] 在另一个方面中,本发明的组合物包含约0.01至约100毫克,约100至约500毫克,或约500至约1000毫克或更多的本发明的化合物,例如B型利尿钠信号肽片段或B型利尿钠信号肽片段类似物,所述信号肽片段或其类似物包括一个或多个SEQ. ID. NO:1-9以及根据式I至VIII的肽。在此处中描述了其它剂量并包括范围为至少约100纳克的剂量,包括例如至少约200纳克、600纳克、2000纳克、6000纳克和至少约10,000纳克或以上的剂量。剂量浓度包括至少约0.1摩尔每升,包括例如至少约0.3、1.0、3.0和10.0纳摩尔/L的浓度。剂量浓度还包括0.1纳摩尔/L、0.3纳摩尔/L、1.0纳摩尔/L、3.0纳摩尔/L和10.0纳摩尔/L的浓度。这些剂量浓度相当于0.1、0.3、1、3、11 $\mu\text{g}/\text{L}$,且可施用的重量剂量为0.4、1.0、4.0、10和39 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)。范围从0.1至5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以及从0.1至10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的其它剂量也在本发明范围内。此外,约0.4、1.0、4.0、10和39 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的剂量在本发明范围内。至少约0.4、1.0、4.0、10和39 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的剂量也在本发明范围内。可以作为单一或多次剂量提供这些组合物和量。

[0077] 本发明还包括治疗受试者的方法,所述受试者患有或处于发展为心血管疾病、病症或病况的风险,方法包括向所述受试者施用治疗有效量的一种或多种此处所述的化合物或药物组合物。在一个非限制性的实施方式中,心血管疾病、病症或病况和缺血和/或氧化应激相关。在一个实施方式中,心血管疾病、病症或病况是急性冠状动脉综合征,例如,ST段抬高心肌梗塞、非ST段抬高心肌梗塞或不稳定型心绞痛。在另一个实施方式中,心血管疾病、病症或病况是心力衰竭。在其它实施方式中,心血管疾病、病症或病况是缺血性心脏病。在另一个实施方式中,心血管疾病、病症或病况是稳定型心绞痛。

[0078] 本发明包括治疗受试者的方法,所述受试者患有或处于发展为心血管疾病、病症或病况的风险,方法包括治疗有效量的B型利尿钠信号肽片段剂和药学上可接受的载体。在一个实施方式中,药物组合物中的B型利尿钠信号肽片段剂是BNPsp(17-26)(SEQ ID NO:1)。在另一个实施方式中,药物组合物中的B型利尿钠信号肽片段包含或基本上由选自SEQ. ID. NO:2至9的序列组成。在另一个实施方式中,药物组合物中的B型利尿钠信号肽片段剂包含或基本上由选自式I、式II、式III、式IV、式V、式VI、式VII或式VIII的序列组成。B型利尿钠信号肽片段剂也包括此处所述B型利尿钠信号肽片段剂的活性类似物、变体、截短和修饰的形式。

[0079] 在另一方面中,本发明包括通过提高受试者中B型利尿钠信号肽片段的活性,在受试者中治疗和/或预防与缺血和/或氧化应激相关的心血管疾病、病症或病况的方法。这可以通过例如向受试者施用组合物而实现,所述组合物包含治疗有效量的B型利尿钠信号肽

片段剂,例如B型利尿钠信号肽片段或B型利尿钠信号肽片段,这包括包含或基本上由选自SEQ. ID. NO: 1-9的序列组成的BNP_{sp}片段,或包含或基本上由根据式I到VIII任一个的肽组成的肽,或其类似物、变体、截短或修饰。在某些实施方式中,例如以单一或分开的剂量或通过持续输注,每天施用约0.01至约100、500或1000纳克或毫克或更多(例如,至少约100纳克或毫克,至少约500纳克或毫克,或至少约1000纳克或毫克)的BNP_{sp}片段或B型利尿钠信号肽片段类似物,例如包含或基本上由选自SEQ. ID. NO: 1-9的序列组成的BNP_{sp}片段,或包含或基本上由根据式I到VIII任一个的肽组成的肽。

[0080] 在另一个方面中,本发明包括治疗患者的方法,所述患者患有任何原因引起的胸痛,包括急性冠状动脉综合征,方法包括向患者施用治疗有效量的B型利尿钠信号肽片段剂,其中所述患者未患有Q波MI或STEMI。在该方法的某些实施方式中,患者患有不稳定型心绞痛。在该方法的另一实施方式中,患者患有非Q波心肌梗死。在此方法的另一个实施方式中,患者具有不大于0.4ng/ml的血液肌钙蛋白I水平。在此方法的另一个实施方式中,患者具有不大于0.1ng/ml的血液肌钙蛋白T水平。在此方法的另一个实施方式中,患者不具有升高的血液肌酸激酶。在此方法的另一个实施方式中,患者没有ST段抬高。在此方法的另一个实施方式中,患者不表现出病理性的Q波。在该方法的另一个实施方式中,患者表现出以下症状中的一种或多种:持续时间大于15分钟的胸痛、静息时胸痛、或最轻微活动后的胸痛,所述胸痛对舌下硝酸盐响应不良。

[0081] 在一个实施方式中,以单剂量施用B型利尿钠信号肽片段剂。在另一个实施方式中,以一个以上的剂量施用B型利尿钠信号肽片段剂。在又一个实施方式中,持续一段时间,例如预定的时间段,持续施用B型利尿钠信号肽片段剂。在又一个实施方式中,B型利尿钠信号肽片段剂,同葡萄糖或钾盐或其组合共施用。

[0082] 在另一个方面中,本发明包括治疗患者的方法,包括向个体施用治疗有效量的B型利尿钠信号肽片段剂,其中是在以下一种或多种症状的发作之后施用:持续时间大于15分钟的胸痛、静息时胸痛、或最轻微活动后的胸痛、恶心、气短、心悸或眩晕。在其它实施方式中,症状发作前患者未患有Q波MI或STEMI;患者患有不稳定型心绞痛;患者患有非Q波心肌梗死;患者具有不大于0.4ng/ml的血液肌钙蛋白I水平;患者具有不大于0.1ng/ml的血液肌钙蛋白T水平;患者不具有升高的血液肌酸激酶心肌同工酶;患者没有ST段抬高;患者不表现出病理性的Q波;在一种或多种症状发作和患者遭受Q波MI或STEMI的时间之间进行施用。在另一个实施方式中,方法还包括在患者遭受Q波MI或STEMI期间持续施用B型利尿钠信号肽片段剂的步骤。在另一实施方式中,方法还包括在患者遭受Q波MI或STEMI之后持续施用B型利尿钠信号肽片段剂的步骤。在此方法的其它实施方式中,患者患有缺血性心脏病、或处于发展为缺血性心脏病的风险。在方法的另一个实施方式中,患者具有下列一种或多种心脏异常:充血性心力衰竭、由于二尖瓣关闭不全导致的心脏杂音恶化、或心脏传导障碍的迹象。在其它实施方式中,患者具有正常的ECG。在该方法的另一个实施方式中,患者患有稳定型心绞痛。在方法的其它实施方式中,以单剂量、或一个以上的剂量、或持续施用B型利尿钠信号肽片段剂。在该方法其它实施方式中,B型利尿钠信号肽片段剂,同葡萄糖或钾盐或其组合共施用。

[0083] 本发明还包括治疗患有稳定型心绞痛患者的方法,包括施用B型利尿钠信号肽片段剂。在进一步的实施方式中,持续一段时间,包括预定的时间段,持续施用。

[0084] 本发明还提供用于在有需要的患者上进行血管成形术的方法,包括在血管成形术操作过程中向患者施用B型利尿钠信号肽片段剂。在进一步的实施方式中,所述方法包括或进一步包括在血管成形术操作前向患者施用B型利尿钠信号肽片段剂。在进一步的实施方式中,所述方法包括或进一步包括在血管成形术操作后向患者施用B型利尿钠信号肽片段剂。在其它实施方式中,在血管成形术操作之前、期间和/或之后,以任何组合,向患者施用B型利尿钠信号肽片段剂。

[0085] 本发明还包括用于治疗患者的方法,所述患者患有缺血性心脏病、或处于发展为缺血性心脏病风险的患者,包括表现出以下一种或多种症状的患者:恶心、气短、心悸或头晕,并且其中患者不表现出胸痛,方法包括向患者施用治疗有效量的B型利尿钠信号肽片段剂,其中所述患者未患Q波MI或STEMI。在该方法的另一个实施方式中,患者具有正常的ECG。

[0086] 本发明还提供用于在第一次心脏窘迫(distress)症状之后延长溶栓疗法有效时间的方法,包括在以下一种或多种症状发作后施用治疗有效量的B型利尿钠信号肽片段剂:持续时间大于15分钟的胸痛、静息时胸痛、最轻微活动后的胸痛、恶心、气短、心悸或眩晕。

[0087] 在另一个方面中,被治疗的受试者是哺乳动物,优选人。其它哺乳动物包括家养动物和农场动物,以及动物园、运动或宠物动物,如狗、马和猫。

[0088] 本发明还包括含有包装材料的制品,其中包装材料包含一种或多种此处所述的化合物或药物组合物。然后发明还包括含有包装材料的制品,其中包装材料包含一种或多种此处所述的化合物或药物组合物,连同用于在受试者中或上预防和/或治疗心血管疾病、病症或病况的使用说明书。在一个实施方式中,说明书中提到的心血管疾病、病症或病况与缺血和/或氧化应激相关。在另一个实施方式中,说明书中提到的心血管疾病、病症或病况是缺血性心脏病。在一个实施方式中,说明书中提到的心血管疾病、病症或病况是急性冠状动脉综合征,例如不稳定型心绞痛、STEMI和/或NSTEMI。在另一个实施方式中,说明书中提到的心血管疾病、病症或病况是心力衰竭(任何形式)。说明书可以是电子的和/或与网站相关联。

[0089] 本发明还包括制备用于预防或治疗一种或多种此处所述心血管疾病、病症或病况的药物的方法,包括例如急性冠状动脉综合征、心力衰竭等,方法包括将治疗有效量的此处所述化合物如B型利尿钠信号肽片段或B型利尿钠信号肽片段类似物或变体,以及药学上可接受的载体合并到一起。在一个实施方式中,B型利尿钠信号肽片段包含选自SEQ. ID. NO:1至9的序列。在另一个实施方式中,B型利尿钠信号肽片段类似物是选自式I-VIII中一种或多种的化合物。在一个实施方式中,药物配制成用于肠胃外施用。

[0090] 本发明的组合物和方法用于预防和/或治疗心血管疾病,例如急性冠状动脉综合征、心力衰竭、缺血性心脏病等,以及涉及缺血和/或氧化应激的相关心血管疾病、病症和病况,本发明的组合物和方法还包括B型利尿钠信号肽片段剂同一种或多种其它心血管治疗剂的先后或者组合(例如物理组合,作为组合制剂而提供)施用。此类其它心血管治疗剂包括硝酸盐、 β -阻断剂、钙通道阻断剂(特别用于稳定或不稳定型心绞痛,但也用于 β -阻断剂情况下的心力衰竭)、利尿剂、血管扩张剂、正性肌力药(positive inotropes)、ACE抑制剂和醛固酮拮抗剂如安体舒通(特别用于心力衰竭)、血液稀释疗法(如阿斯匹林、肝素、华法林)和硝酸甘油(特别用于MI)。

[0091] 本发明的组合物和方法用于预防和/或治疗心血管疾病,例如急性冠状动脉综合

征、心力衰竭、缺血性心脏病等,以及涉及缺血和/或氧化应激的相关心血管疾病、病症和病况,本发明的组合物和方法还包括B型利尿钠信号肽片段剂同一种或多种抗血栓溶解疗法(例如链激酶抑制剂、抗血小板疗法如,例如氯吡格雷)的先后或者组合(例如物理组合,作为组合制剂而提供)施用。

[0092] 本发明的组合物和方法用于预防和/或治疗心血管疾病,例如急性冠状动脉综合征、心力衰竭、缺血性心脏病等,以及涉及缺血和/或氧化应激的相关心血管疾病、病症和病况,本发明的组合物和方法还包括B型利尿钠信号肽片段剂同B型利尿钠肽包括例如奈西立肽(是B型利尿钠肽的一种重组形式)的先后或者组合(例如物理组合,作为组合制剂而提供)施用。

[0093] 在用于预防和/或治疗心血管疾病,例如急性冠状动脉综合征、心力衰竭、缺血性心脏病等,以及涉及缺血和/或氧化应激的相关心血管疾病、病症和病况的本发明的某些方法和组合物(包括药物组合物、制剂、制品和试剂盒)中,使用或提供亚治疗有效量的B型利尿钠信号肽片段剂以及一种或多种其它心血管治疗剂用于组合施用(分开地、或作为组合制剂联合地)以提供治疗有效的组合作用。

[0094] 因此,可以理解,公开了用于治疗心血管疾病,例如急性冠状动脉综合征、心力衰竭、缺血性心脏病等,以及涉及缺血和/或氧化应激的相关心血管疾病、病症和病况的本发明的组合物和方法,本发明的组合物和方法采用B型利尿钠信号肽片段剂(包括其活性类似物)以及另一种心血管治疗剂。B型利尿钠信号肽片段剂,例如可选自BNPsp(17-26)(SEQ ID NO:1)、BNPsp(17-25)(SEQ ID NO:2)、BNPsp(17-24)(SEQ ID NO:3)、BNPsp(17-23)(SEQ ID NO:4)、BNPsp(17-22)(SEQ ID NO:5)、BNPsp(17-21)(SEQ ID NO:6)、BNPsp(17-20)(SEQ ID NO:7)、BNPsp(17-19)(SEQ ID NO:8)和BNPsp(17-18)(SEQ ID NO:9),及其活性类似物。在另一个实施方式中,B型利尿钠信号肽剂可选自根据式I、式II、式III、式IV、式V、式VI、式VII和式VIII任一个的序列、及其活性类似物。任选地,心血管剂例如选自包含如下或基本上由如下组成的组:硝酸盐、 β -阻断剂、钙通道阻断剂、利尿剂,血管扩张剂、正性肌力药、ACE抑制剂、醛固酮拮抗剂、硝酸甘油、血液稀释剂、抗血栓溶解剂和B型利尿钠肽。

[0095] 此处所提供的使用一种或多种此处所述的化合物或药物组合物对受试者的治疗可以包括它们的同时、分开、先后或持续施用。

[0096] 用于预防和/或治疗心血管疾病,例如急性冠状动脉综合征、心力衰竭、缺血性心脏病等,以及涉及缺血和/或氧化应激的相关心血管疾病、病症和病况的药物组合物,还以组合制剂的形式提供,例如作为两种或多种B型利尿钠信号肽片段剂的混合物。

[0097] 术语“组合制剂”不仅包括化合物的物理组合,还包括作为“试剂盒组件”提供的化合物,从这种意义上说,如上所定义的组合伙伴(partner)可以独立地给药(dosed)、或采用不同量的组合伙伴(a)以及(b)的不同固定组合施用,即同时、分开或先后施用。然后,试剂盒的组件可以,例如同时施用或按时间顺序交错施用,所述交错施用即试剂盒组件中的任何组件在不同的时间点以相等或不等的的时间间隔施用。

[0098] 在一个实施方式中,本发明包括试剂盒,所述试剂盒包含一种或多种剂量的B型利尿钠信号肽片段剂,试剂盒包含一个或多个注射器、递送计量剂量的“笔式”注射器、无针注射器、液体制剂、用于重新配制的冻干粉和无菌液体、干粉吸入剂、含片和舌下片。

[0099] 在一个实施方式中,施用组合制剂,其中向受试者施用两种或多种分开的组合物,

其中第一组合物包含治疗有效量的B型利尿钠信号肽片段剂,第二组合物包含治疗有效量的另一种心血管治疗剂。在另一个实施方式中,施用第三组合物,其包含B型利尿钠信号肽片段剂或另一种心血管治疗剂。

[0100] 因此,用于预防和/或治疗心血管疾病,例如急性冠状动脉综合征、心力衰竭、缺血性心脏病等,以及涉及缺血和/或氧化应激的相关心血管疾病、病症和病况的药物组合物,被提供用于组合、同时、先后分开或持续施用。在一个实施方式中,在和另一心血管治疗剂相同或大约相同的时间施用包含或基本上由B型利尿钠信号肽片段剂组成的组合物。在一个实施方式中,在另一心血管治疗剂的至少约三十分钟内施用包含B型利尿钠信号肽片段剂的组合物。在一个实施方式中,在另一心血管治疗剂的至少约1小时内施用包含B型利尿钠信号肽片段剂的组合物。在一个实施方式中,在另一心血管治疗剂的至少约2-12或12-24小时内施用包含B型利尿钠信号肽片段剂的组合物。在一个实施方式中,在另一心血管治疗剂的至少约24-48小时内施用包含B型利尿钠信号肽片段剂的组合物。在另一个实施方式中,B型利尿钠信号肽片段剂和另一心血管治疗剂在彼此的约1-8小时内、在彼此的约1天内、或在彼此的约1周内施用。

[0101] 在另一个方面中,本发明包括用于单独地或与另一心血管治疗剂组合地,配制成延迟释放制剂、缓慢释放制剂、延长释放制剂、控释制剂和/或重复操作制剂,向患有或处于发展为心血管疾病例如急性冠状动脉综合征、心力衰竭、缺血性心脏病等,以及涉及缺血和/或氧化应激的相关心血管疾病、病症和病况风险或相关病症或病况的受试者,施用治疗有效量的B型利尿钠信号肽片段剂的方法。

[0102] 在某些其它方面中,本发明还涉及使用这种组合物来治疗患有或处于心血管疾病例如急性冠状动脉综合征、心力衰竭、缺血性心脏病等,以及涉及缺血和/或氧化应激的相关心血管疾病、病症和病况、和相关病症和病况风险的受试者的方法。

[0103] 在其它方面中,本发明包括用于预防和/或治疗患有或疑似患有或易感于、或处于任何特征全部或部分在于心绞痛的疾病、病症和/或病况风险的受试者的方法和组合物。

[0104] 根据一个方面中,本发明涉及阻止或降低或缓解心血管疾病例如急性冠状动脉综合征、心力衰竭、缺血性心脏病等,以及涉及缺血和/或氧化应激的相关心血管疾病、病症和病况的症状的方法。

[0105] 在另一个方面中,本发明提供预防和/或治疗心血管疾病例如急性冠状动脉综合征、心力衰竭、缺血性心脏病等,以及涉及缺血和/或氧化应激的相关心血管疾病、病症和病况的方法,其包括向有需要的受试者,单独地或与另一心血管治疗剂一起组合地,施用包含治疗有效量的B型利尿钠信号肽片段剂的组合物,其中所述第一剂选自BNPsp(17-26)(SEQ ID NO:1)、BNPsp(17-25)(SEQ ID NO:2)、BNPsp(17-24)(SEQ ID NO:3)、BNPsp(17-23)(SEQ ID NO:4)、BNPsp(17-22)(SEQ ID NO:5)、BNPsp(17-21)(SEQ ID NO:6)、BNPsp(17-20)(SEQ ID NO:7)、BNPsp(17-19)(SEQ ID NO:8)和BNPsp(17-18)(SEQ ID NO:9),以及根据式I、式II、式III、式IV、式V、式VI、式VII和式VIII任一个的序列、及其活性类似物,其中第二心血管剂选自包含如下或基本上由如下组成的组:硝酸盐、 β -阻断剂、钙通道阻断剂、利尿剂,血管扩张剂、正性肌力药、ACE抑制剂、醛固酮拮抗剂、硝酸甘油、血液稀释剂、抗血栓溶解剂和B型利尿钠肽。

[0106] 本发明的方法包括先后或同时施用此处所述的第一剂和第二剂,按照比其单独施

用时(即当它们不组合施用时)所用的量或剂量更少的量或剂量,提供试剂任一个或两者。所施用的试剂更少的量通常是从单独施用时试剂量的约二十分之一至约十分之一,并且可以是单独施用时约八分之一的量、约六分之一的量、约五分之一的量、约四分之一的量、约三分之一的量和约一半的量。

[0107] 在另一个方面中,本发明包括包含容器的制品,其中容器含有治疗有效量的B型利尿钠信号肽片段剂如,例如BNPsp(17-26)(SEQ ID NO:1)、BNPsp(17-25)(SEQ ID NO:2)、BNPsp(17-24)(SEQ ID NO:3)、BNPsp(17-23)(SEQ ID NO:4)、BNPsp(17-22)(SEQ ID NO:5)、BNPsp(17-21)(SEQ ID NO:6)、BNPsp(17-20)(SEQ ID NO:7)、BNPsp(17-19)(SEQ ID NO:8)和BNPsp(17-18)(SEQ ID NO:9),以及选自式I、式II、式III、式IV、式V、式VI、式VII和式VIII任一个的化合物、及其活性类似物,与第二心血管剂一起或物理组合,如一种或多种硝酸盐、 β -阻断剂、钙通道阻断剂、利尿剂,血管扩张剂、正性肌力药、ACE抑制剂、醛固酮拮抗剂、硝酸甘油、血液稀释剂、抗血栓溶解剂和/或B型利尿钠肽,以及使用说明书,包括此处所述的治疗受试者的用途。

[0108] 本发明包括包含包装材料的制品,包装材料包含一种或多种如此处所述的剂型,其中该包装材料有标签,标签表明剂型可用于患有或疑似患有或易患任何此处描述或引用的疾病、病症和/或病况,包括急性冠状动脉综合征、缺血性心脏病、心绞痛和心力衰竭。

[0109] 本发明包括制备用于预防和/或治疗心血管疾病例如急性冠状动脉综合征、心力衰竭、缺血性心脏病等,以及涉及缺血和/或氧化应激的相关心血管疾病、病症和病况的药物的方法,方法包括将一定量的B型利尿钠信号肽片段剂和药学上可接受的载体以及一种或多种其它心血管剂合并到一起,用于预防和/或治疗心血管疾病例如急性冠状动脉综合征、心力衰竭、缺血性心脏病等,以及涉及缺血和/或氧化应激的相关心血管疾病、病症和病况。

[0110] 本发明包括这样的方法,其包括治疗有效量的B型利尿钠信号肽片段剂在制备用于预防和/或治疗心血管疾病如急性冠状动脉综合征、心力衰竭、缺血性心脏病等,以及涉及缺血和/或氧化应激的相关心血管疾病、病症或病况,以及相关疾病和病症的剂型中的用途。这种剂型包括,例如口服递送形式和制剂,以及其它递送形式,包括用于通过输注、注射和滴注的递送的形式,并且组合物和装置包括例如缓慢释放、延长释放和延迟释放的组合物、储库剂型(depot)和基质。这样的剂型包括此处所公开的用于治疗受试者的那些。

[0111] 在某些其它方面中,本发明提供用于预防和/或治疗心血管疾病如急性冠状动脉综合征、心力衰竭、缺血性心脏病等,以及涉及缺血和/或氧化应激的相关心血管疾病、病症或病况,以及相关疾病和病症的包含B型利尿钠信号肽片段剂连同使用说明书的包装,其中B型利尿钠信号肽片段剂单独或与一种或多种其它心血管治疗剂组合。

[0112] 在其它方面中,本发明提供一种或多种此处所述的化合物和组合物在制备药物中的用途。在其它方面中,本发明提供一种或多种此处所述的化合物和组合物在制备用于治疗一种或多种此处所述的疾病、病症和病况的药物中的用途。在其它方面中,本发明提供一种或多种此处所述和要求的化合物、组合物和药物在治疗受试者的一种或多种此处所述的疾病、病症和病况中的用途。

[0113] 下面提供本发明的这些和其它方面,其不限于或受限于本发明内容中的信息。

附图说明

[0114] 本申请包含至少一个以颜色表示的图。根据要求并支付必要的费用提供本申请带有颜色附图的拷贝。下面提供每个图的简要概述。

[0115] 图1表示在缺血再灌注损伤的分离大鼠心脏模型中施用人BNPsp(17-26)的有益效果。图1(A)显示,如通过发展压(developed pressure)所评价的,在40分钟的缺血期之前(前)或之后(IDR)施用0.3nMol和1nMol人BNPsp(17-26)改善左心室的收缩功能。这些作用在0.3nMol前和1nMol IDR时最明显。图1(B)表明血管反应性,在和图1A相同的心脏中通过灌注压所评价的。通过前或IDR用BNPsp(17-26)治疗有益地降低了缺血后再灌注期的灌注压。图1(C)显示由于人BNPsp(17-26)的IDR施用导致的再灌注期间肌钙蛋白I(一种心脏细胞坏死的生物标志物)释放的显著减少。图1(D)显示在与图1C中所述相同样本中再灌注肌红蛋白水平的共同改进。

[0116] 图2显示在正常健康的羊中对人BNPsp(17-26)施用的体内耐受以及对人BNPsp(17-26)施用缺乏血液动力学影响。图2(A)显示当以10ng/kg/min和100ng/kg/min给定恒定的输注人BNPsp(17-26)时,和对照输注(生理盐水)相比,羊1中缺乏心输出量响应。这样的响应是良好的耐受剂的指示。图2(B)显示当施用和图2A相同的BNPsp(17-26)剂量时,羊2中同样缺乏心输出量响应。

[0117] 图3显示在使用合成的人BNPsp(17-26)和对照缓冲液预处理的分离心脏中,归一化的收缩功能(发展压)。剂量和组的大小如图所示。

[0118] 图4显示在使用合成的人BNPsp(17-26)和对照缓冲液预处理的分离心脏中,归一化的血管功能(灌注压)。剂量和组的大小如所示。

[0119] 图5显示在使用合成的人BNPsp(17-26)和对照缓冲液预处理的心脏中,肌钙蛋白I的累积释放(AUC)。剂量和组的大小如各图3和4所示。*= $P < 0.01$ 相对于对照。

[0120] 图6显示缺血后再灌注期间给予BNPsp(17-26),分离的心脏中的发展压。剂量和样本的大小如所示。

[0121] 图7显示缺血后再灌注期间给予BNPsp(17-26),分离的心脏中的灌注压(上图)和累积的肌钙蛋白释放(下图)。

[0122] 图8显示苏木精和伊红(HE)染色,表明在对照心脏中,相较于BNPsp(17-26)治疗的心脏,更大程度的心肌细胞肿胀和肌原纤维排列紊乱。

[0123] 图9显示左心室游离壁(free wall)心肌细胞玻片的半胱天冬酶-3染色。棕色着色来表示半胱天冬酶-3活性。再灌注时用1nmol/L BNPsp(17-26)输注的心脏几乎不存在着色,并且在用0.3nmol/L BNPsp(17-26)预处理的心脏中与对照相比显著降低。

[0124] 图10显示用BNPsp(17-26)输注的心脏中TUNEL阳性细胞的显著降低。在用BNPsp(17-26)输注的所有心脏中TUNEL阳性核(红棕色着色)显著降低。

[0125] 图11显示在4只正常的羊中以100和1000ug/kg.min输注人BNPsp(17-26),对静脉压、心率、平均动脉压或心输出量没有影响。对于激素和肾的指标(indices)发现相似的结果。

[0126] 图12显示在经历心肌缺血的羊和接受人BNPsp(17-26)的羊中,累积的肌钙蛋白I释放。与对照组相比,治疗的羊具有显著更低的累积肌钙蛋白I释放($P < 0.01$)。

[0127] 图13显示流经缺血分离的大鼠心脏或在经历心脏冠状动脉结扎(ligation)的羊体内的蛋白水解切割的人BNPsp(18-26)的洗脱谱。由向下的箭头表示的,比合成的人BNPsp(17-26)早四个馏分的洗脱位置(馏分34)。

[0128] 图14显示在接受了0.3nmol/L改变的BNPsp序列的分离的灌注大鼠心脏中的发展压(每组n=3)。

具体实施方式

[0129] 实施本发明可包括或采用各种常规分子生物学(包括重组技术)、微生物、细胞生物学、生化、核酸化学、和免疫学的技术,属于本领域技术范围内。这种技术在文献中有充分的阐述,包括但不限于,仅通过实例Molecular Cloning:A Laboratory Manual第二版(Sambrook等人1989)以及Molecular Cloning:A Laboratory Manual第3版(Sambrook和Russel,2001),此处合并以及各自称作“Sambrook”;Oligonucleotide Synthesis(M.J.Gait,ed.,1984);Animal Cell Culture(R.I.Freshney,ed.,1987);Handbook of Experimental Immunology(D.M.Weir&C.C.Blackwell,eds.);Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(J.M.Miller&M.P.Calos,eds.,1987);Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel等人eds.,1987,包括2001年以来的增订本);PCR:The Polymerase Chain Reaction,(Mullis等人eds.,1994);Current Protocols in Immunology(J.E.Coligan等人eds.,1991);The Immunoassay Handbook(D.Wild,ed.,Stockton Press NY,1994);Bioconjugate Techniques(Greg T.Hermanson,ed.,Academic Press,1996);Methods of Immunological Analysis(R.Masseyeff,W.H.Albert和N.A.Staines,eds.,Weinheim:VCH Verlags gesellschaft mbH,1993),Harlow和Lane(1988)Antibodies,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Publications,New York,以及Harlow和Lane(1999)Using Antibodies:A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY(此处合并以及各自称作Harlow和Lane),Beaucage等人eds.,Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry John Wiley&Sons,Inc.,New York,2000);以及Agrawal,ed.,Protocols for Oligonucleotides and Analogs,Synthesis and Properties Humana Press Inc.,New Jersey,1993)。

[0130] 应当理解,本发明不限于此处所述的具体方法、规程、构建体和试剂,这些可以发生变化。还应当理解,此处所用的术语仅用于描述特定实施方法的目的,而不意图限制本发明的范围,其仅由所附权利要求所限定。如此处和所附权利要求中所用,除非上下文另有明确说明,单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数参考。因此,例如,提及“B型利尿钠信号肽片段”时是指一个或多个这样的肽,并包括目前已知的或以后开发出来的其等同物。除非另有定义,此处所用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域普通技术人员通常所理解的相同的含义。虽然任何类似或等同于此处描述的方法、装置和材料可用于实施或测试本发明,优选当前描述的方法、装置和材料。意图提及此处所公开的数字范围(例如1至12),还将范围内的所有相关数字(例如,1、1.1、2、3、3.9、4、5、6、6.5、7、8、9.5、10、11和12)以及范围内的任何有理数范围(例如2至8、1.5至5.5和3.1至4.7)并入,因此,此处所明确公开的所有范围的所有子范围得以明确公开。这些仅仅是具体意图的示例,所列举的最低值和最高值之间的数值的所有可能组合应被认为在本申请中以类似的方式被明确地陈述。当此处使用

时,以下术语具有以下涵义。

[0131] 此处提供的化合物(例如肽和蛋白)中所用的氨基酸可以是遗传编码的氨基酸、天然存在的非遗传编码的氨基酸或合成的氨基酸。上述任何L和D对映体可用于化合物中。下列缩写此处可用于下列遗传编码的氨基酸(及其残基):丙氨酸(Ala,A);精氨酸(Arg,R);天冬酰胺(Asn,N);天冬氨酸(Asp,D);半胱氨酸(Cys,C);甘氨酸(Gly,G);谷氨酸(Glu,E);谷氨酰胺(Gln,Q);组氨酸(His,H);异亮氨酸(Ile,I);亮氨酸(Leu,L);赖氨酸(Lys,K);甲硫氨酸(Met,M);苯丙氨酸(Phe,F);脯氨酸(Pro,P);丝氨酸(Ser,S);苏氨酸(Thr,T);色氨酸(Trp,W);酪氨酸(Tyr,Y);以及缬氨酸(Val,V)。

[0132] 不是遗传编码的并且可以存在于本发明活性化合物中某些常见氨基酸,包括但不限于 β -丙氨酸(β -Ala)和其它 ω -氨基酸如3-氨基丙酸(Dap)、2,3-二氨基丙酸(Dpr,Z)、4-氨基丁酸等; α -氨基异丁酸(Aib); ϵ -氨基己酸(Aha); δ -氨基戊酸(Ava);甲基甘氨酸(MeGly);鸟氨酸(Orn);瓜氨酸(Cit);叔丁胺(t -BuA); t -丁基甘氨酸(t -BuG);N-甲基异亮氨酸(MeIle);苯基甘氨酸(Phg);环己基丙氨酸(Cha);正亮氨酸(Nle,J);2-萘基丙氨酸(2-Nal);4-氯苯丙氨酸(Phe(4-Cl));2-氟苯丙氨酸(Phe(2-F));3-氟苯丙氨酸(Phe(3-F));4-氟苯丙氨酸(Phe(4-F));青霉素(Pen);1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸(Tic); β -2-噻吩基丙氨酸(Thi);甲硫氨酸亚砷(MSO);高精氨酸(hArg);N-乙酰基赖氨酸(AcLys);2,3-二氨基丁酸(Dab);2,3-二氨基丁酸(Dbu);对-氨基苯丙氨酸(Phe(p NH₂));N-甲基缬氨酸(MeVal);高半胱氨酸(hCys);3-苯并噻唑-2-基-丙氨酸(BztAla,B)和高丝氨酸(hSer)。其它考虑的氨基酸类似物包括磷酸丝氨酸、磷酸苏氨酸、磷酸酪氨酸、羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸、马尿酸、八氢吡啶-2-羧酸、抑胃酶氨酸(statine)、 α -甲基-丙氨酸、对-苯甲酰基-苯基丙氨酸、炔丙基甘氨酸、和肌氨酸。包括在本发明范围内的肽可以具有任何上述L或D构型氨基酸,或此处描述或本领域中已知的(无论是目前还是将来)同时保留生物学活性的任何其它氨基酸。

[0133] 可以彼此取代的氨基酸通常属于相似的类或子类中。如本领域技术人员已知的,主要依赖于氨基酸侧链的化学和物理性质,氨基酸可被分到不同的类中。例如,一些氨基酸通常被认为是亲水性或极性氨基酸,其它被认为是疏水性或非极性氨基酸。极性氨基酸包括具有酸性、碱性或亲水性侧链的氨基酸,非极性氨基酸包括具有芳香族或疏水性侧链的氨基酸。非极性氨基酸可以进一步细分为,包括除其他之外的脂肪族氨基酸。此处所用氨基酸的类的定义如下:

[0134] “非极性氨基酸”是指,具有生理pH下不带电荷的侧链的氨基酸,这不是极性的并且一般被水溶液排斥。遗传编码的疏水性氨基酸的实例包括Ala、Ile、Leu、Met、Trp、Tyr和Val。非遗传编码的非极性氨基酸的实例包括 t -BuA、Cha和Nle。

[0135] “芳香氨基酸”是指具有含至少一个环的侧链的非极性氨基酸,其中环具有共轭 π 电子体系(芳香基团)。芳香基团可以进一步被取代基所取代,如烷基、烯基,炔基、羟基、磺酰基、硝基和氨基基团,以及其它。遗传编码的芳香氨基酸的实例包括苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸。通常遇到的非遗传编码的芳香氨基酸包括苯基甘氨酸、2-萘基丙氨酸、 β -2-噻吩丙氨酸、3-苯并噻唑-2-基-丙氨酸、1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸、4-氯苯丙氨酸、2-氟苯丙氨酸、3-氟苯丙氨酸和4-氟苯丙氨酸。

[0136] “脂肪族氨基酸”指具有饱和或不饱和的直链、支链或环状烃侧链的非极性氨基酸。遗传编码的脂肪族氨基酸的实例包括Ala、Leu、Val和Ile。非编码的脂肪族氨基酸的实

例包括N1e。

[0137] “极性氨基酸”是指这样的亲水性氨基酸,其具有在生理pH下带电或不带电的侧链,且侧链具有这样的键,在键当中两个原子共有的一对电子更靠近其中一个原子。极性氨基酸通常是亲水性的,这意味着它们具有含有被水溶液吸引的侧链的氨基酸。遗传编码的极性氨基酸的实例包括天冬酰胺、半胱氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸和丝氨酸。非遗传编码的极性氨基酸的实例包括瓜氨酸、高半胱氨酸、N-乙酰赖氨酸和甲硫氨酸亚砷。

[0138] “酸性氨基酸”指具有小于7的侧链pK值的亲水性氨基酸。酸性氨基酸通常具有在生理pH下由于丧失氢离子而带负电的侧链。遗传编码的酸性氨基酸的实例包括天冬氨酸(天冬氨酸)和谷氨酸(谷氨酸)。

[0139] “碱性氨基酸”指具有大于7的侧链pK值的亲水性氨基酸。碱性氨基酸通常具有在生理pH下由于结合水合氢离子而带正电的侧链。遗传编码的碱性氨基酸的实例包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。非遗传编码的碱性氨基酸的实例包括鸟氨酸、2,3-二氨基丙酸、2,4-二氨基丁酸和高精氨酸。

[0140] “可电离的氨基酸”是指这样一种氨基酸,其在生理pH下可以带电。这样可电离的氨基酸包括酸性和碱性氨基酸,例如,D-天冬氨酸、D-谷氨酸、D-组氨酸、D-精氨酸、D-赖氨酸、D-羟基赖氨酸、D-鸟氨酸、L-天冬氨酸、L-谷氨酸、L-组氨酸、L-精氨酸、L-赖氨酸、L-羟基赖氨酸或L-鸟氨酸。

[0141] 正如本领域技术人员可以理解的,上述分类不是绝对的。一些氨基酸表现出一个以上的特征属性,并且因此可被包含在一个以上的类别中。例如,酪氨酸同时具有非极性芳香环和极性羟基。因此,酪氨酸具有可以被描述为是非极性、芳香和极性的几个特征。然而,非极性环占主导,因此酪氨酸被普遍认为是非极性的。同样地,除了能够形成二硫键,半胱氨酸也具有非极性特征。因此,虽然没有严格划分为疏水性或非极性氨基酸,在许多情况下,半胱氨酸可用于给肽赋予疏水性或非极性。

[0142] 在一些实施方式中,在本发明涵盖的极性氨基酸包括,例如精氨酸、天冬酰胺,天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、组氨酸、高半胱氨酸、赖氨酸、羟基赖氨酸、鸟氨酸、丝氨酸、苏氨酸、和结构相关的氨基酸。在一个实施方式中,极性氨基酸是可电离的氨基酸如精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、组氨酸、羟基赖氨酸、赖氨酸、或鸟氨酸。

[0143] 可利用的极性或非极性氨基酸残基的实例包括,例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸等。

[0144] 如此处所用“心血管疾病”是任何涉及或者至少部分特征在于氧化应激和/或缺血的心血管疾病、病症或病况。

[0145] 在生理期间,分子经历涉及还原和氧化反应的化学变化。有未配对电子的分子可以与能够提供一个电子的分子结合。提供电子被称为氧化,而获得电子被称为还原。还原和氧化可使被还原的分子不稳定,并使其自由地与其它分子反应而导致细胞和亚细胞组分(如细胞膜,蛋白和DNA)的损害。如此处所用“氧化应激”是指过度产生导致氧化应激/氮化(nitrosative)应激的活性氧物质(ROS),这一过程是细胞损伤的重要介导(mediator)。氧化还原失衡的重要方面是触发一些信号转导通路活性(包括转录因子活性),例如,这一过程是缺血/再灌注损伤相关的心血管疾病所特有的。活性氧物质可以来自多种来源,例如一氧化氮(NO)合酶(NOS)、黄嘌呤氧化酶(XO)、环加氧酶、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NAD(P)

H)氧化酶同种型和金属催化反应。这些包括自由基如超氧阴离子(O_2^-)、羟基自由基($HO\cdot$)、脂质自由基($ROO\cdot$)和一氧化氮(NO)。其它活性氧物质,例如过氧化氢(H_2O_2)、过氧化亚硝酸盐($ONOO^-$)和次氯酸($HOCl$),虽然不是自由基,但具有促使氧化应激的氧化作用。

[0146] “缺血”是当血流和氧在身体的特定部位减少时所发生的情况。当针对的身体部分是心脏时,这种情况命名为心肌缺血。缺血性心脏病是涵盖动脉狭窄所导致的心脏问题的一个术语。动脉变窄时,更少的血和氧气到达心脏肌肉。这也被称为冠状动脉疾病和冠心病,并可能最终导致心脏发作。缺血往往会造成胸部疼痛或称为心绞痛的不适。有心绞痛的人可能还有未确诊的无症状的缺血期。

[0147] 心血管疾病包括,例如心力衰竭(包括充血性心力衰竭和此处其它地方所指出的其它形式的心力衰竭)和急性冠状动脉综合征(包括Q波MI、STEMI、非Q波MI、NSTEMI和不稳定型心绞痛)及缺血性心脏病。心血管疾病还包括涉及心脏或血管中B型利尿钠肽在临床相关时间表中升高的疾病、病症和病况。心血管疾病还包括涉及心脏或血管中心肌钙蛋白I、肌钙蛋白T、肌酸激酶-MB、A型和/或B型利尿钠信号肽或信号肽片段、尿酸、C-反应蛋白和/或骨保护素中的一种或多种在临床相关时间表中出现提高的水平的疾病、病症和病况。其它心血管疾病包括非Q波心脏坏死。

[0148] 如此处所用,患有“不稳定型心绞痛”的患者表示有以下一种或多种症状和体征的患者:(1)ST段压低,如ECG测量的;(2)轻度升高的肌钙蛋白T水平,不超过0.1ng/ml;或(3)轻度升高的肌钙蛋白I水平不超过0.4ng/ml。与Q波MI相比,CK-MB和LDH水平通常不会在不稳定型心绞痛期间升高。此外,不同于Q波MI,不稳定型心绞痛患者通常没有ST段抬高或任何病理性Q波。最后,不稳定型心绞痛可仅仅基于胸痛进行诊断,通常胸痛持续超过15分钟、静息时胸痛、或最轻微活动后的胸痛,所述胸痛对舌下硝酸盐响应不良。或者,即使没有胸痛,如果以前诊断为缺血性心脏病或者被认为处于发展为缺血性心脏病高风险的患者以及伴有恶心、气短、心悸或头晕的患者可诊断为不稳定型心绞痛。此外,本领域技术人员将会理解不稳定型心绞痛的诊断是医学判断之一。

[0149] 如此处所用,“缺血性心脏病”表示由于冠状动脉的血流减少导致的对心脏组织的氧气供应减少所致的心脏组织疾病。通常情况下,供给心脏的血管被部分或完全堵塞导致这种血流减少。缺血性心脏病的诊断可基于存在舌下含服硝酸盐可以缓解的运动所引起的慢性、稳定型心绞痛(也被称为“劳力型心绞痛”)。缺血性心脏病的诊断也可以基于与缺血性心脏病一致的ECG读取,比如呈现ST段偏离(deviation)和/或T波倒置。

[0150] 如此处所用“B型利尿钠信号肽片段剂”在一个方面中是指来自任何物种(包括鼠、牛、羊、猪、马、禽且优选人的)、以天然序列或遗传工程改造的形式、来自任何来源(无论是天然的、合成的或重组产生的)、具有一种或多种此处描述的生物或治疗活性的B型利尿钠信号肽的片段。术语“B型利尿钠信号肽片段剂”还包括药学上可接受的盐和前药、以及盐的前药、多晶型、水合物、溶剂化物、生物活性片段、天然存在的任何B型利尿钠信号肽片段的生物活性变体和立体异构体、以及任何天然存在的B型利尿钠信号肽片段的激动剂和模拟变体及其活性类似物(例如,含有例如保持生物活性的特定删除或其它修饰肽)和多肽融合体。在氨基端、羧基端或二者包含额外氨基酸的融合体包括在术语“B型利尿钠信号肽片段剂”内。优选,在B型利尿钠信号肽片段或其它B型利尿钠信号肽片段剂(包括,例如,B型利尿钠信号肽片段的变体和类似物)的羧基端包括额外氨基酸的融合体。示例性B型利尿钠信号

肽片段剂包括BNPsp(17-26)(SEQ ID NO:1)、BNPsp(17-25)(SEQ ID NO:2)、BNPsp(17-24)(SEQ ID NO:3)、BNPsp(17-23)(SEQ ID NO:4)、BNPsp(17-22)(SEQ ID NO:5)、BNPsp(17-21)(SEQ ID NO:6)、BNPsp(17-20)(SEQ ID NO:7)、BNPsp(17-19)(SEQ ID NO:8)和BNPsp(17-18)(SEQ ID NO:9)。其它B型利尿钠信号肽片段剂包括根据式I、式II、式III、式IV、式V、式VI、式VII和式VIII肽任一个的肽。

[0151] 本领域熟知肽的修饰,例如,通过聚合物缀合或糖基化的肽的修饰。术语“B型利尿钠信号肽片段剂”包括修饰的肽,其包括缀合至聚合物例如PEG的肽,并且可以包括一个或多个半胱氨酸、赖氨酸或其它残基的额外衍生化。此外,B型利尿钠信号肽片段剂可包含接头或聚合物,其中接头或聚合物所缀合的氨基酸可以是根据本发明的非天然氨基酸,或者利用本领域已知技术(例如偶联至赖氨酸或半胱氨酸)被缀合至天然编码的氨基酸。

[0152] 参考本发明的化合物,例如SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8、9或例如在式I、式II、式III、式IV、式V、式VI、式VII和式VIII中所定义的其他肽,此处所述的氨基酸的取代、删除、修饰或添加,意图还涉及融合体、变体、片段、缀合物等中对应位置上的取代、删除、修饰或添加。

[0153] 术语“B型利尿钠信号肽片段剂”也包括相连的同二聚体、异二聚体、同多聚体和异多聚体,其包括但不限于通过非天然编码的氨基酸侧链直接连接至相同或不同非天然编码的氨基酸侧链、或连接至天然编码的氨基酸侧链、或间接通过接头所连接的那些。示例性的接头包括小的有机化物、各种长度的水溶性聚合物,比如聚(乙二醇)或葡聚糖或各种长度的多肽。

[0154] 术语“接头”在此处用于指通常由于化学反应所导致的形成的基团或键,通常是共价键。水解稳定的键表示该键在水中实质上是稳定的,在有用的pH值下和水不反应,包括但不限于生理条件下在延长的时期下,或许甚至无限长的时间。水解不稳定或可降解的键是指在水或水溶液(包括例如血液)中可降解的键。酶促不稳定或可降解的键是指通过一种或多种酶可降解的键。如本领域理解的,PEG和相关聚合物可在聚合物的主链中或在聚合物主链和一个或多个聚合物分子的末端官能团之间的接头基团中包括可降解的键。例如,PEG羧酸或活性PEG羧酸与生物活性剂上的醇基发生反应形成的酯键,通常在生理条件下经水解以释放试剂。其它水解可降解的键包括但不限于碳酸酯键;由胺和醛反应产生的亚胺键;通过醇与磷酸基团反应而形成的磷酸酯键;作为酰肼和醛的反应产物的腙键;作为醛和醇的反应产物的缩醛键;作为甲酸盐与醇的反应产物的原酸酯键;位于包括但不限于聚合物(如PEG)末端的氨基和肽的羧基形成的肽键;以及位于包括但不限于聚合物末端的亚磷酰胺基团和寡核苷酸5'羟基形成的寡核苷酸键。

[0155] 此处所用术语“活性”、“生物活性”或“生物活性剂”是指能够影响生物系统、通路、分子或生物体相关相互作用的任何物理或生物化学性质的任何物质,包括但不限于病毒、细菌、噬菌体、转座子、朊病毒、昆虫、真菌、植物、动物和人类。特别地,如此处所用,生物活性分子包括但不限于预期用于在人或其它动物中治愈、缓解、治疗或预防心血管疾病,或者增强人或动物身体或精神健康状况的任何物质。

[0156] 如此处所用术语“水溶性聚合物”是指可溶于水溶剂的任何聚合物。水溶性聚合物和B型利尿钠信号肽片段剂(例如B型利尿钠信号肽片段)的键可导致变化,包括但不限于,相对于未修饰的形式,增加或调节血清半衰期、或增加或调节治疗半衰期、调节免疫原性、

调节物理结合特征如聚集和多聚体的形成、改变的受体结合、以及改变的受体二聚化或多聚化。水溶性聚合物可具有或不具有其自身的生物活性,并且可以用作接头用于将B型利尿钠信号肽片段剂如B型利尿钠信号肽片段附着至其它物质,包括但不限于一个或多个B型利尿钠信号肽片段剂,如B型利尿钠信号肽片段,或一个或多个生物活性分子。合适的聚合物包括但不限于聚乙二醇、聚乙二醇丙醛、单C1-C10烷氧基或其芳氧基衍生物(描述于美国专利号5,252,714)、单甲氧基-聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、聚氨基酸、二乙烯基醚马来酸酐、N-(2-羟丙基)-甲基丙烯酰胺、葡聚糖、葡聚糖衍生物(包括葡聚糖硫酸酯)、聚丙二醇、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯化多元醇、肝素、肝素片段、多糖、寡糖、聚糖、纤维素和纤维素衍生物(包括但不限于甲基纤维素和羧甲基纤维素)、淀粉和淀粉衍生物、多肽、聚亚烷基二醇(polyalkylene glycol)及其衍生物、聚亚烷基二醇及其衍生物的共聚物、聚乙烯基乙基醚和 α - β -聚[(2-羟乙基)-DL-天冬酰胺等,或它们的混合物。这样的水溶性聚合物的实例包括但不限于聚乙二醇和血清白蛋白。

[0157] 如此处所用,术语“聚亚烷基二醇”或“聚(烯醇)(poly(alkene glycol))”是指聚乙二醇(聚(乙二醇))、聚丙二醇、聚丁二醇以及它们的衍生物。术语“聚亚烷基二醇”和/或“聚乙二醇”包括直链和支链聚合物,平均分子量在0.1kDa至100kDa或更大之间。其它示范性实施方式列于例如商业供应商目录中,如Shearwater Corporation的目录“Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications”(2001)。

[0158] 如此处所用,术语“改变的血清半衰期”是指修饰的B型利尿钠信号肽片段剂如B型利尿钠信号肽片段,相对于其未修饰的形式,增加的循环半衰期。通过在B型利尿钠信号肽片段剂如B型利尿钠信号肽片段施用后,采取不同时间点的血液样本测量血清半衰期,并确定分子在各样本中的浓度。血清浓度与时间的相关性允许计算血清半衰期。理想地,增加的血清半衰期是至少约2倍,但更少的增加可能是有用的,例如使得能够获得令人满意的给药方案或避免毒性作用。在一些实施方式中,所述增加是至少约3倍,至少约5倍,或至少约10-倍或更多。

[0159] 如此处所用,术语“改变的治疗半衰期”是指治疗有效量的修饰的B型利尿钠信号肽片段剂如B型利尿钠信号肽片段,相对于其未修饰的形式,半衰期增加。通过测量施用后不同时间点分子的药代动力学和/或药效学性质测量治疗半衰期。理想地,增加的治疗半衰期使得能够获得特别有利的给药方案、特别有利的总剂量、或避免不期望的作用。在一些实施方式中,增加的能力、增加或减少的修饰分子对其靶的结合,增加或减少的酶(如蛋白酶)对分子的降解、或者未修饰的分子的另一参数或作用机制的增加或减少的,导致了增加的治疗半衰期。

[0160] 当应用于肽时,术语“分离的”是指肽不含有至少一些在天然状态下与其相关的细胞的或其它生物组分,或者肽已被浓缩到超过其在体内或体外生产的浓度的水平。它可以是均匀的或基本均匀的状态。分离的物质可以是干燥或半干燥状态,或在溶液中包括但不限于水溶液。它可以是另外包含药学上可接受的载体和/或赋形剂的药物组合物的组分。通常使用分析化学技术(例如,如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱法)确定纯度和同质性。

[0161] “基本上纯的(substantially pure)”是指总的B型利尿钠信号肽剂(例如BNPsp(17-26)(SEQ ID NO:1))相对于总蛋白的纯度程度,其中至少70%的B型利尿钠信号肽剂,更

优选至少80%，甚至更优选提高到至少90%、95%或99%。特别优选的纯度为至少95%。“实质上纯的(essentially pure)”是指该组合物对于预期的B型利尿钠信号肽剂而言是至少90%或更纯。存在于制剂中主要物质的肽也基本上是纯化的。

[0162] 如此处所用术语“有效量”是指将一定程度减轻一种或多种待治疗的疾病、病况和病症的症状所施用的B型利尿钠信号肽片段剂的量。此处所述的含有B型利尿钠信号肽片段剂的组合物可施用用于预防、增强和/或治疗性治疗。

[0163] 如此处所用“受试者”是指任何哺乳动物，包括人、家养和农场动物、及动物园、运动或宠物动物，如狗、马、猫、羊、猪、牛等。此处优选的哺乳动物是人，包括成人、儿童以及老年人。优选的运动动物是马和狗。优选的宠物动物是狗和猫。

[0164] 如此处所用“预防”是指全部或部分预防、改善或控制、减少、减轻、或降低、或延缓或停止。

[0165] 如此处所用，在提及本发明的化合物或组合物时，“治疗有效量”是指足以诱导期望的生物、药物、或治疗结果的量。结果可以是一种或多种疾病或病症或病况的体征、症状或原因的减轻，或者生物系统任何其它期望的改变。在本发明中，结果将涉及治疗、预防和/或减少一种或多种心血管病症的症状，包括例如急性冠状动脉综合征、心力衰竭、缺血性心脏病和心绞痛，以及任何涉及缺血和/或氧化应激的心血管病症、疾病或病况。

[0166] 如此处所用，术语“治”和“治疗”是指治疗性处理和预防性或防范性措施。

[0167] “类似物”或“肽类似物”是指性质类似于模板肽的性质的化合物，并且可以是非肽类药物。“拟肽”(也称为“模拟肽”)包括基于肽的化合物，也包括这种基于非肽的化合物如肽类似物。在结构上和治疗有用的肽相似的拟肽，可以用来产生等价的或增强的治疗或预防作用。通常，拟肽和范例(paradigm)多肽(即具有生物或药理功能或活性的多肽)在结构上相同或类似，且还可以使得一个或多个肽键任选地被选自如下的键取代：例如-CH₂NH-、-CH₂S-、-CH₂-CH₂-、-CH=CH-(顺式和反式)、-COCH₂-、-CH(OH)CH₂-和-CH₂SO-。模拟物可以完全由天然氨基酸、或氨基酸的非天然类似物组成、或是部分天然肽氨基酸与部分氨基酸的非天然类似物的嵌合分子组成。模拟物也可包括任何量的天然氨基酸保守性取代，只要这样的取代基本上也不改变模拟物的活性。

[0168] 一般而言，术语“肽”是指两个或多个单独的氨基酸(不论是否是天然存在的)通过肽键连接的任何聚合物，其在当结合到一个氨基酸(或氨基酸残基) α -碳的羧基碳原子开始共价结合到氨基基团的氨基氮原子时发生，其中氨基基团结合到相邻氨基酸 α -碳上。这些肽结合键，以及包含它们的原子(即 α -碳原子、羧基碳原子(及其取代的氧原子)、和氨基氮原子(及其取代的氢原子))形成蛋白的“多肽骨架”。此外，如此出所用，术语“多肽”和“肽”可以互换使用。相似地，蛋白片段、类似物、衍生物和变体此处可称为“肽”或“肽剂”。术语肽的“片段”是指包含少于肽的所有氨基酸残基的多肽。

[0169] 如此处所用，“同时”用于表示一种或多种本发明的试剂同时时间地施用，而术语“组合”用于表示，如果不是同时或物理上的组合施用，那么其在时间表内“先后”施用，且两者均可用于发挥治疗上的作用。因此“先后”施用允许施用一种试剂后，在若干分钟(例如1、2、3、4、5、10、15、20、25、30分钟)或小时、天、周或月内施用另一种试剂，只要B型利尿钠信号肽片段剂和另一种心血管治疗剂例如同时以有效量存在。组分施用之间的时间延迟将随着组分的具体性质、之间的相互作用及其各自的半衰期而变化。

[0170] B型利尿钠信号肽片段剂

[0171] 此处所述的本发明的B型利尿钠信号肽片段剂能够调节心血管疾病的一种或多种症状。优选,心血管疾病是急性冠状动脉综合征,但是如此处所述也意图涉及其它。

[0172] 本发明的化合物,在非限制性优选实施方式中是分离的或基本上纯的,包括如下肽:

[0173]

LHLAFLGGRS	(SEQ. ID. NO: 1)
LHLAFLGGR	(SEQ. ID. NO: 2)
LHLAFLGG	(SEQ. ID. NO: 3)
LHLAFLG	(SEQ. ID. NO: 4)
LHLAFL	(SEQ. ID. NO: 5)
LHLAF	(SEQ. ID. NO: 6)
LHLA	(SEQ. ID. NO: 7)
LHL	(SEQ. ID. NO: 8)
LH	(SEQ. ID. NO: 9)

[0174] 本发明的化合物,在非限制性优选实施方式中是分离的或基本上纯的,还包括根据下式I的肽:

[0175] L H X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈

[0176] 其中X₁是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly;X₂是Val、Leu、Ile或Gly;X₃是Leu、Val、Ile、Ala、Tyr或Gly;X₄是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly;X₅是Pro、Ala、Arg或Ser;X₆是Pro、Ala、Arg或Ser;X₇是Arg、Gln、Asn或Gly;以及X₈是Thr或Gly。

[0177] 本发明的化合物,在非限制性优选实施方式中是分离的或基本上纯的,还包括根据下式II的肽:

[0178] L H X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇

[0179] 其中X₁是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly;X₂是Val、Leu、Ile或Gly;X₃是Leu、Val、Ile、Ala、Tyr或Gly;X₄是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly;X₅是Pro、Ala、Arg或Ser;X₆是Pro、Ala、Arg或Ser;以及X₇是Arg、Gln、Asn或Gly;倘若

[0180] 当X₁是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly时,X₂也可以是Ala,X₃也可以是Phe,X₄也可以是Leu,X₅也可以是Gly,X₆也可以是Gly,以及X₇也可以是Arg;

[0181] 当X₂是Val、Leu或Ile或Gly时,X₁也可以是Leu,X₃也可以是Phe,X₄也可以是Leu,X₅也可以是Gly,X₆也可以是Gly,以及X₇也可以是Arg;

[0182] 当X₃是Leu、Val、Ile、Ala、Tyr或Gly时,X₁也可以是Leu,X₂也可以是Ala,X₄也可以是Leu,X₅也可以是Gly,X₆也可以是Gly,以及X₇也可以是Arg;

[0183] 当X₄是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly时,X₁也可以是Leu,X₂也可以是Ala,X₃也可以是Phe,X₅也可以是Gly,X₆也可以是Gly,以及X₇也可以是Arg;

[0184] 当X₅是Pro、Ala、Arg或Ser时,X₁也可以是Leu,X₂也可以是Ala,X₃也可以是Phe,X₄也可以是Leu,X₆也可以是Gly,以及X₇也可以是Arg;

[0185] 当X₆是Pro、Ala、Arg或Ser时,X₁也可以是Leu,X₂也可以是Ala,X₃也可以是Phe,X₄也可以是Leu,X₅也可以是Gly,以及X₇也可以是Arg;

[0186] 当X₇是Lys、Gln、Asn或Gly时,X₁也可以是Leu,X₂也可以是Ala,X₃也可以是Phe,X₄也可以是Leu,X₅也可以是Gly,以及X₆也可以是Gly。

[0187] 本发明的化合物,在非限制性优选实施方式中是分离的或基本上纯的,还包括根据下式III的肽:

[0188] L H X₁X₂X₃X₄X₅X₆

[0189] 其中X₁是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly;X₂是Val、Leu、Ile或Gly;X₃是Leu、Val、Ile、Ala、Tyr或Gly;X₄是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly;X₅是Pro、Ala、Arg或Ser;以及X₆是Pro、Ala、Arg或Ser;倘若

[0190] 当X₁是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly时,X₂也可以是Ala,X₃也可以是Phe,X₄也可以是Leu,X₅也可以是Gly,X₆也可以是Gly,以及X₇也可以是Arg;

[0191] 当X₂是Val、Leu或Ile或Gly时,X₁也可以是Leu,X₃也可以是Phe,X₄也可以是Leu,X₅也可以是Gly,X₆也可以是Gly,以及X₇也可以是Arg;

[0192] 当X₃是Leu、Val、Ile、Ala、Tyr或Gly时,X₁也可以是Leu,X₂也可以是Ala,X₄也可以是Leu,X₅也可以是Gly,X₆也可以是Gly,以及X₇也可以是Arg;

[0193] 当X₄是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly时,X₁也可以是Leu,X₂也可以是Ala,X₃也可以是Phe,X₅也可以是Gly,X₆也可以是Gly,以及X₇也可以是Arg;

[0194] 当X₅是Pro、Ala、Arg或Ser时,X₁也可以是Leu,X₂也可以是Ala,X₃也可以是Phe,X₄也可以是Leu,X₆也可以是Gly,以及X₇也可以是Arg;

[0195] 当X₆是Pro、Ala、Arg或Ser时,X₁也可以是Leu,X₂也可以是Ala,X₃也可以是Phe,X₄也可以是Leu,X₅也可以是Gly,以及X₇也可以是Arg。

[0196] 本发明的化合物,在非限制性优选实施方式中是分离的或基本上纯的,还包括根据下式IV的肽:

[0197] L H X₁X₂X₃X₄X₅

[0198] 其中X₁是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly;X₂是Val、Leu、Ile或Gly;X₃是Leu、Val、Ile、Ala、Tyr或Gly;X₄是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly;以及X₅是Pro、Ala、Arg或Ser;倘若

[0199] 当X₁是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly时,X₂也可以是Ala,X₃也可以是Phe,X₄也可以是Leu,X₅也可以是Gly,X₆也可以是Gly,以及X₇也可以是Arg;

[0200] 当X₂是Val、Leu或Ile或Gly时,X₁也可以是Leu,X₃也可以是Phe,X₄也可以是Leu,X₅也可以是Gly,X₆也可以是Gly,以及X₇也可以是Arg;

[0201] 当X₃是Leu、Val、Ile、Ala、Tyr或Gly时,X₁也可以是Leu,X₂也可以是Ala,X₄也可以是Leu,X₅也可以是Gly,X₆也可以是Gly,以及X₇也可以是Arg;

[0202] 当X₄是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly时,X₁也可以是Leu,X₂也可以是Ala,X₃也可以是Phe,X₅也可以是Gly,X₆也可以是Gly,以及X₇也可以是Arg;

[0203] 当X₅是Pro、Ala、Arg或Ser时,X₁也可以是Leu,X₂也可以是Ala,X₃也可以是Phe,X₄也可以是Leu,X₆也可以是Gly,以及X₇也可以是Arg。

[0204] 本发明的化合物,在非限制性优选实施方式中是分离的或基本上纯的,还包含根据下式V的肽:

[0205] L H X₁X₂X₃X₄

[0206] 其中X₁是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly；X₂是Val、Leu、Ile或Gly；X₃是Leu、Val、Ile、Ala、Tyr或Gly；以及X₄是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly；倘若

[0207] 当X₁是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly时，X₂也可以是Ala，X₃也可以是Phe，X₄也可以是Leu，X₅也可以是Gly，X₆也可以是Gly，以及X₇也可以是Arg；

[0208] 当X₂是Val、Leu或Ile或Gly时，X₁也可以是Leu，X₃也可以是Phe，X₄也可以是Leu，X₅也可以是Gly，X₆也可以是Gly，以及X₇也可以是Arg；

[0209] 当X₃是Leu、Val、Ile、Ala、Tyr或Gly时，X₁也可以是Leu，X₂也可以是Ala，X₄也可以是Leu，X₅也可以是Gly，X₆也可以是Gly，以及X₇也可以是Arg；

[0210] 当X₄是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly时，X₁也可以是Leu，X₂也可以是Ala，X₃也可以是Phe，X₅也可以是Gly，X₆也可以是Gly，以及X₇也可以是Arg。

[0211] 本发明的化合物，在非限制性优选实施方式中是分离的或基本上纯的，还包含根据下式VI的肽：

[0212] L H X₁X₂X₃

[0213] 其中X₁是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly；X₂是Val、Leu、Ile或Gly；以及X₃是Leu、Val、Ile、Ala、Tyr或Gly；倘若

[0214] 当X₁是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly时；X₂也可以是Ala，以及X₃也可以是Phe；

[0215] 当X₂是Val、Leu或Ile或Gly时，X₁也可以是Leu，以及X₃也可以是Phe；以及

[0216] 当X₃是Leu、Val、Ile、Ala、Tyr或Gly时，X₁也可以是Leu，以及X₂也可以是Ala。

[0217] 本发明的化合物，在非限制性优选实施方式中是分离的或基本上是纯的，还包含根据下式VII的肽：

[0218] L H X₁X₂

[0219] 其中X₁是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly；以及X₂是Val、Leu、Ile或Gly；倘若

[0220] 当X₁是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly时，X₂也可以是Ala；以及；

[0221] 当X₂是Val、Leu或Ile或Gly时，X₁也可以是Leu。

[0222] 本发明的化合物，在非限制性优选实施方式中是分离的或基本上纯的，还包含根据下式VIII的肽：

[0223] L H X₁

[0224] 其中X₁是正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe或Gly。

[0225] 包括在本发明范围内的是这些化合物的生物和/或治疗活性类似物和保守变体，包括其截短，优选C端截短。例如，在SEQ. ID. NO:1-9和式I-VIII中所示的上述肽中，任一个或多个亮氨酸(L)可被取代为异亮氨酸(I)、D-亮氨酸或D-异亮氨酸、或叔-亮氨酸、正亮氨酸、L-别-异亮氨酸、D-别-异亮氨酸、D-叔-亮氨酸和D-正亮氨酸，和/或组氨酸可被取代为具有或经制备而具有以咪唑环结尾的侧链的任何非天然存在的氨基酸。

[0226] 在一个非限制性实施方式中，本发明范围内的肽(包括SEQ. ID. NO:1-9和式I-VIII中的序列)的一个或多个氨基酸是L或D构型。在其它实施方式中，在本发明范围内肽的一个或多个氨基酸是天然存在的非遗传编码的氨基酸。在其它实施方式中，在本发明范围内肽的一个或多个氨基酸是氨基酸类似物或合成氨基酸。

[0227] 在另一个非限制性实施方式中,本发明范围内的肽(包括SEQ. ID. NO: 1-9和式I-VIII中的序列)的N端亮氨酸(或异亮氨酸D-亮氨酸、D-异亮氨酸、叔-亮氨酸、正亮氨酸、L-别-异亮氨酸、D-别-异亮氨酸、D-叔-亮氨酸和D-正亮氨酸)可以经修饰而含有甲酰基、包含甲酰基的基团、羧酸酯(优选醛酯,如羧乙基、羧甲基等)、或包含羧酸酯的基团。此处优选用甲酰基、羧乙基以及羧甲基进行的修饰。

[0228] 在另一实施方式中,本发明范围内的化合物(包括SEQ. ID. NO: 1-9和式I-VIII中的序列)中一个或多个氨基酸,主要基于氨基酸侧链化学和物理性质,被取代为来自相似氨基酸类别或亚类的另一氨基酸。例如,一个或多个亲水性或极性氨基酸可以取代为另一亲水性或极性氨基酸。同样地,一个或多个疏水性或非极性氨基酸可取代为另一疏水性或非极性氨基酸。在进行这种取代时,极性氨基酸可以进一步细分成具有酸性、碱性或亲水性侧链的氨基酸,以及非极性氨基酸可以进一步细分成具有芳香族或疏水性侧链的氨基酸。此外,非极性氨基酸可以进一步细分以包括脂肪族氨基酸。

[0229] 经修饰以改善其生物药理学特性的本发明的化合物也包括在本发明范围内。在具体的实施方式中,例如本发明的化合物经过修饰以提供增加的稳定性、增加的对蛋白水解失活的抗性、降低至不存在的免疫原性、延长的循环寿命(包括改变的血清半衰期和改变的治疗半衰期)、和低毒性。可修饰本发明的化合物的方法包括例如通过聚乙二醇化、通过化学衍生化、以及通过与肽或脂质进行融合或缀合。修饰的化合物包括修饰的B型利尿钠信号肽片段剂,包括例如修饰的BNPsp(17-26)(SEQ ID NO: 1)及其修饰的类似物、变体(如,保守的变体)和截短形式。其它实施方式包括选自经修饰的SEQ. ID. NO: 2至9的肽、以及经修饰的根据式I、式II、式III、式IV、式V、式VI、式VII和/或式VIII的肽,及其经修饰的活性类似物、变体(如,保守变体)和截短形式。

[0230] 本发明设想本发明的治疗性肽的前药形式。“前药”是治疗性肽的一种修饰形式,其包括可逆的化学修饰,在递送至患者后可逆的化学修饰在生理条件下通过酶促或非酶促催化反应可以被可靠地除去从而将前药转化为母体肽。这样的修饰能增强化学稳定性、改变水溶性、延长生物半衰期、拓宽治疗指数、改善药效学和/或改善生物利用度,例如同时保留母体治疗性肽的药理学性质。在到达可以发挥期望作用的生物部位(compartment)后,这样的修饰也可以允许母体肽被释放。“前药”是一种可包括一个或多个专门的无毒保护性基团的化合物,所述保护性基团以瞬时方式用于改变或消除母体肽的某些限制性特性,其中可以通过酶促或化学切割去除保护性基团。任何合适的保护性基团可被用来产生本发明的肽前药。这种专门的修饰包括在母体肽氨基和/或羧基端的一端或两端加入一个或多个氨基酸残基。允许有效在体内去除额外的N或C端氨基酸或氨基酸序列的切割位点,优选包括在这种前药分子中。也可以设想除了添加一个或多个N和/或C端氨基酸残基之外的其它修饰。例如,可以使用二酮哌嗪和二酮吗啉(DKP和DMP)策略用于前药转化(见,例如Application of Peptide-Based Prodrug Chemistry in Drug Development, Springer, Ed. De, Arnab(2012)),其中通过化合物固有的化学不稳定性的驱动,前药在生理条件下慢慢转化成母体药物,而无需任何酶促切割。为了改善稳定性,通过生物可逆的掩蔽N和/或C端氨基酸,本发明的母体肽可以被保护免受外肽酶介导的水解。

[0231] 本发明前药的实例是其中母体肽包含附着至母体肽N和/或C端的一个或多个额外氨基酸残基的那些。本发明的化合物也包括本发明试剂的前药形式。例如,前药形式包括,

具有附着至例如肽BNP_{sp}(17-26)(SEQ ID NO:1)N端的1至16个氨基酸残基的那些。这种前药形式的实例包括具有表1所列一个或多个氨基酸通过合适的键连接至母体肽的那些。代表性前药的实施方式包括连接到例如BNP_{sp}(17-26)、或来自SEQ.ID.NO:2至9的任何其它肽、以及根据式I、式II、式III、式IV、式V、式VI、式VII和/或式VIII的肽、以及上述的活性类似物和变体(例如,保守的变体)N端的残基1-16、2-16、3-16、4-16、5-16、6-16、7-16、8-16、9-16、10-16、11-16、12-16、13-16、14-16和15-16。

[0232]

BNP _{sp} 氨基酸残基位置	残基位置的氨基酸
1	M
2	D(或G或E)
3	P(或L)
4	Q(或K或R或C或L)
5	T(或K或M或A)
6	A(或V)
7	P(或L)
8	S(或L或P)
9	R(或Q)
10	A(或T或M)
11	L(或I或V)
12	L
13	L(或F)
14	L
15	L
16	F
17	L

[0233]

18	H(或N或Y)
19	L
20	A(或S)
21	F(或P或L)
22	L
23	G
24	G(或C)
25	R(或H)
26	S(或P)

[0234] 根据本发明前药的其它实例包括其中母体肽的氨基被酰化、烷基化、磷酸化、二十烷酰化(eicosanoylated)、丙氨酰化(alanylated)、戊基氨基羰基化、(5-甲基-2-氧代-1,3-二氧杂环戊烯(dioxolen)-4-基)甲氧基羰基化、四氢呋喃化、吡咯烷基甲基化、新戊酰氧基甲基化(pivaloyloxymethylated)、或叔丁基化等的那些;其中母体肽的羟基被酰化、烷

基化、磷酸化、乙酰化、棕榈酰化、丙酰化(propanoylated)、新戊酰化、琥珀酰化、富马酰化、丙氨酰化或二甲基氨基甲基羰基化等的化合物;以及其中母体肽的羧基被酯化或酰胺化(例如乙基酯化、苯基酯化、羧甲基酯化、二甲基氨基甲基酯化、新戊酰甲基酯化、乙氧羰基氧乙基酯化、酞基酯化、(5-甲基-2-氧代-1,3-二氧杂环戊烯(dioxolen)-4-基)甲基酯化、环己氧基羰基乙基酯化或甲基酰胺化等)的化合物等。

[0235] 其它的前药形式也是可以预见的,包括含有对一个或多个不位于母体肽N或C端的氨基酸残基的化学修饰的那些。如本领域技术人员将会理解,在生理条件下可被除去而得到本发明化合物的药学上活性形式的任何合适的化学修饰可以使用。

[0236] 其它实施方式包括本发明化合物的拟肽。

[0237] 目前优选的B型利尿钠信号肽片段剂是BNPsp(17-26)(SEQ ID NO:1)。

[0238] 下面实施例中提供B型利尿钠信号肽片段剂的心脏保护活性的说明。实施例1显示通过在分离的大鼠心脏制备物全缺血之前和之后45分钟施用BNPsp(17-26)(SEQ ID NO:1),B型利尿钠信号肽片段剂改善心脏收缩性的能力。在实施例2体内羊实验中,表明心脏收缩功能和肌钙蛋白释放、心肌损伤的诊断标志物,通过施用B型利尿钠信号肽片段剂BNPsp(17-26)(SEQ ID NO:1)得以改善。如实施例1所观察到的和实施例2中所提到的,实施例3描述评价各种长度的BNPsp片段肽及其生物活性的实验。

[0239] 使用本领域中已知的方法进行B型利尿钠信号肽片段剂以及修饰的B型利尿钠信号肽片段剂的合成。肽,例如SEQ. ID. NO:1-9的本发明的化合物,可以通过固相化学肽合成制备。其它化合物,如融合肽,也可以通过使用例如Sambrook和Maniatis中所述标准程序的常规重组技术来制备。本发明的肽和其它化合物可以被化学修饰。这可以增强它们对肽酶和其它酶的抗性,限制被肾的清除,等。制备这样的修饰化合物的方法是本领域已知的。

[0240] 所用B型利尿钠信号肽片段剂的精确序列将取决于它改善心血管疾病一种或多种症状或作用的能力。用于确定这种作用的手段在实施例1和2中提供。用于评价B型利尿钠信号肽片段剂用于治疗或预防心血管疾病的用途的其它手段包括使用心肌细胞和非心肌细胞的细胞系的体外细胞培养实验,以及先天性心脏病和毒性模型的体内和离体实验。

[0241] 用于制备本发明药物组合物的合适B型利尿钠信号肽片段剂包括LHLAFLGGRS(SEQ. ID. NO:1)、LHLAFLGGR(SEQ. ID. NO:2)、LHLAFLGG(SEQ. ID. NO:3)、LHLAFLG(SEQ. ID. NO:4)、LHLAFL(SEQ. ID. NO:5)、LHLAF(SEQ. ID. NO:6)、LHLA(SEQ. ID. NO:7)、LHL(SEQ. ID. NO:8)和LH(SEQ. ID. NO:9)。用于制备本发明药物组合物的其它合适B型利尿钠信号肽片段剂包括式I-VIII中的肽。此处描述用于制备本发明药物组合物的其它合适B型利尿钠信号肽片段剂,并且包括例如前述化合物的类似物、变体、截短和修饰(包括融合体)。

[0242] 通过包括例如下文实施例中所述的任何方便且常规的方法,根据序列和期望的活性可以选择B型利尿钠信号肽片段剂的活性。

[0243] 此处讨论B型利尿钠信号肽片段剂的同源性和同源物,例如B型利尿钠信号肽片段。这种B型利尿钠信号肽片段通常具有和相关序列至少约70%的同源性,优选至少约80%,至少约90%,至少约95%,至少约97%,或至少约99%的同源性。

[0244] 可以基于本领域中的任何方法来计算同源性。例如UWGCG软件包提供可用于计算同源性的BESTFIT程序(例如以其默认设置使用)。PILEUP和BLAST算法可以用来计算同源性或排列(line up)序列(通常以它们的默认设置),如Altschul S.F.(1993)J Mol Evol 36:

290-300;Altschul,S,F等人(1990)J Mol Biol215:403-10中所述。

[0245] 进行BLAST分析的软件,公众可通过国家生物技术信息中心(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)获得。这种算法包括,当和数据库序列中相同长度的词比对时,首先通过鉴定查询序列中匹配或满足一些正值阈值分数T的长度为W的短词来鉴定高分序列对(HSP)。T被称作邻近词分数阈值(Altschul等人,同上)。这些初始邻近词的命中作为起始搜索的种子以发现包含它们的HSP。沿着每个序列的两个方向延伸词的命中,尽可能增加累积比对分数。在以下情况下停止在各方向上对词的命中的延伸:当累积比对分数从其最大获得值下降了量X时;当由于累积一个或多个负分数的残留比对,累积比对分数变成零或以下时;或达到各序列结尾时。。

[0246] BLAST算法参数W、T和X决定了比对的灵敏度和速度。BLAST程序使用默认的词长(W)、BLOSUM62评分矩阵(参见Henikoff和Henikoff(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA89:10915-10919)、50的比对(B)、10的期望值(E)、M=5、N=4以及两条链的比较。

[0247] BLAST算法进行两个序列之间相似性的统计分析;参见例如Karlin和Altschul(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA90:5873-5787。BLAST算法提供了一种相似性度量是最小总和概率(P(N)),其提供了概率的指示,通过它两条氨基酸序列之间的匹配将随机发生。例如,如果第一序列对第二序列比较的最小总和概率小于约1,优选小于约0.1,更优选小于约0.01,且最优选小于约0.001,则一条序列被认为相似于另一条序列。

[0248] 同源序列通常以至少约(或不超过约)2、5、10、15、20多个突变区别于相关序列(其可以是取代、删除或插入)。关于同源性计算,可以在上面提到的任何区域中测量这些突变。

[0249] 心血管治疗剂

[0250] 用于预防和/或治疗心血管疾病,例如急性冠状动脉综合征、心力衰竭、缺血性心脏病等,以及涉及缺血和/或氧化应激的相关心血管疾病、病症和病况的本发明的组合物和方法,还包括B型利尿钠信号肽片段剂同一种或多种其它心血管治疗剂的连续地或者组合(例如物理组合,作为组合制剂而提供)施用。心血管治疗剂包括硝酸盐、 β -阻断剂、钙通道阻断剂(特别用于稳定或不稳定型心绞痛,但也用于 β -阻断剂情况下的心力衰竭)、利尿剂、血管扩张剂、正性肌力药、ACE抑制剂和醛固酮拮抗剂如安体舒通(特别用于心力衰竭)、血液稀释疗法(如阿斯匹林、肝素、华法林)和硝酸甘油(特别用于MI)。

[0251] 用于预防和/或治疗心血管疾病,例如急性冠状动脉综合征、心力衰竭、缺血性心脏病等,以及涉及缺血和/或氧化应激的相关心血管疾病、病症和病况的本发明的组合物和方法,还可以包括B型利尿钠信号肽片段剂同一种或多种抗血栓溶解疗法(例如链激酶抑制剂、抗血小板疗法如,例如氯吡格雷)的连续地或者组合(例如物理组合,作为组合制剂而提供)施用。

[0252] 用于预防和/或治疗心血管疾病,例如急性冠状动脉综合征、心力衰竭、缺血性心脏病等,以及涉及缺血和/或氧化应激的相关心血管疾病、病症和病况的本发明的组合物和方法,还可以包括B型利尿钠信号肽片段剂同B型利尿钠肽包括例如奈西立肽(是B型利尿钠肽的一种重组形式)的连续地或者组合(例如物理组合,作为组合制剂而提供)施用。

[0253] 在用于预防和/或治疗心血管疾病,例如急性冠状动脉综合征、心力衰竭、缺血性心脏病等,以及涉及缺血和/或氧化应激的相关心血管疾病、病症和病况的本发明的某些方法和组合物(包括药物组合物、制剂、制品和试剂盒)中,使用或提供亚治疗有效量的B型利

尿钠信号肽片段剂以及一种或多种其它心血管治疗剂用于组合施用(分开地、或作为组合制剂联合地)以提供治疗有效的组合作用。

[0254] 因此,可以理解,公开了用于治疗心血管疾病,例如急性冠状动脉综合征、心力衰竭、缺血性心脏病等,以及涉及缺血和/或氧化应激的相关心血管疾病、病症和病况的本发明的组合物和方法,其中本发明的组合物和方法采用B型利尿钠信号肽片段剂以及另一种心血管治疗剂。B型利尿钠信号肽片段剂,例如可选自BNPsp(17-26)(SEQ ID NO:1)、BNPsp(17-25)(SEQ ID NO:2)、BNPsp(17-24)(SEQ ID NO:3)、BNPsp(17-23)(SEQ ID NO:4)、BNPsp(17-22)(SEQ ID NO:5)、BNPsp(17-21)(SEQ ID NO:6)、BNPsp(17-20)(SEQ ID NO:7)、BNPsp(17-19)(SEQ ID NO:8)和BNPsp(17-18)(SEQ ID NO:9)。在另一个实施方式中,B型利尿钠信号肽剂可选自根据式I、式II、式III、式IV、式V、式VI、式VII和式VIII任一个的序列。任选地,心血管剂例如选自包含如下或基本上由如下组成的组:硝酸盐、 β -阻断剂、钙通道阻断剂、利尿剂,血管扩张剂、正性肌力药、ACE抑制剂、醛固酮拮抗剂、硝酸甘油、血液稀释剂、抗血栓溶解剂和B型利尿钠肽。

[0255] 此处所提供的使用一种或多种此处所述的化合物或药物组合物对受试者的治疗可以包括其急性或持续施用以及,在组合的情况下其同时、分开、或先后施用,如此处进一步所述。

[0256] 可向有治疗需求的受试者施用本发明的试剂,比如患有此处提及的任一疾病、病症或病况的受试者。受试者的情况可因此而改善。试剂可用于制造治疗此处提及的任一疾病、病症或病况的药物。因此,根据本发明,提供了可治疗心血管疾病的制剂。

[0257] 各组合伙伴(如B型利尿钠信号肽片段剂以及另一种心血管治疗剂)的治疗有效量可以同时、分开或先后以及按照任何顺序施用。可以分开或作为固定组合施用试剂。当不作为固定组合施用时,优选的方法包括先后施用B型利尿钠信号肽片段剂以及另一种心血管治疗剂,比所述试剂单独施用时(即当它们不组合施用)使用更少的量或剂量提供一种或二种试剂,无论是物理上(physically)还是在治疗过程中。所施用制剂的更少量通常从单独施用时试剂量的约二十分之一至约十分之一,并且可以是单独施用时约八分之一的量、约六分之一的量、约五分之一的量、约四分之一的量、约三分之一的量和约一半的量。优选,彼此在至少约半小时内先后施用所述剂。也可以彼此在约1小时内,彼此约1天至约一周内,或者认为适当时,施用所述试剂。

[0258] 可向有治疗需求的受试者施用本发明的试剂,比如患有急性冠状动脉综合征或此处提及的任一疾病或病况的受试者。受试者的情况可因此而改善。化合物可因此通过疗法用于治疗受试者的身体。其可用于制造治疗此处提及的任一疾病的药物。因此,根据本发明,提供了可专门引起心脏疗法和心脏保护的制剂。

[0259] 剂型和制剂和施用

[0260] 本发明的化合物可存在于分离的或基本上或实质上纯的形式。可以理解产品可以与不干扰产品预期用途的载体或稀释剂混合,且仍然被认为是分离的或基本上纯的。本发明的产品也可以是基本上或实质上纯的形式,优选包含或基本上由约80%、85%、或90%,例如至少约95%、至少约98%或至少约99%的化合物或制剂的干物质组成。

[0261] 根据预期的施用途径,本发明的药物产品、药物组合物、组合制剂和药物可以,例如采取溶液、悬液、滴注、持续释放制剂或粉末的形式,且通常包含约0.1%-95%的活性成

分,优选约0.2%-70%的活性成分。其它合适的制剂包括注射和输注为基础的制剂。其它有用的制剂包括持续释放制剂,包括例如控制、缓慢或延迟释放制剂。

[0262] 本发明的各方面包括含有一种或多种B型利尿钠信号肽片段剂的受控的或其它剂量、剂型、制剂、组合物和/或装置,其中B型利尿钠信号肽片段剂是,例如一种或多种B型利尿钠信号肽片段。本发明包括,例如至少用于口服施用、经皮递送、局部施用、栓剂递送、经粘膜递送、注射(包括皮下施用、真皮下施用、肌肉施用、储库(depot)施用和静脉内施用,包括通过推注的递送、缓慢静脉注射以及静脉滴注)、输注装置(包括可植入输注装置、主动和被动)、通过吸入或吹入的施用、颊施用和舌下施用的剂量和剂型。应当理解,适用或期望时,此处所述的尤其用于静脉内施用的任何剂型、组合物、制剂或装置,可以以适于通过此处考虑或通常采用的任何其它途径施用的剂型、组合物、制剂或装置使用。例如,使用适合肠胃外施用的剂型通过胃肠外给予剂量,其中可并入适于口服施用的剂型方面描述的特征或组合物,或者以持续剂型进行递送,如改变的释放、延长释放、延迟释放、缓慢释放或重复操作剂型。

[0263] 优选地,本发明的B型利尿钠信号肽片段剂和药学上可接受的载体或稀释剂组合以产生药物组合物。合适的载体和稀释剂包括等渗盐溶液,例如磷酸盐缓冲盐。合适的稀释剂和赋形剂还包括,例如水、盐水、葡聚糖、甘油等,及其组合。此外,如果需要的话,如润湿剂或乳化剂、稳定剂或pH缓冲剂的物质也可以存在。

[0264] 术语“药学上可接受的载体”指任何有用的载体、赋形剂或稳定剂,在所采用的剂量和浓度下它们对所接触的细胞或哺乳动物是无毒的,并且包括不诱导产生对接受组合物的个体有害的抗体的药物载体。合适的载体可以是大的、代谢缓慢的大分子,如蛋白、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、聚氨基酸、以及氨基酸共聚物。通常,生理上可接受的载体是pH缓冲水溶液。生理上可接受的载体的其它实例包括缓冲剂如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂包括抗坏血酸;低分子量(小于约10个残基)的多肽;蛋白,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂如EDTA;糖醇如甘露醇或山梨醇;成盐反离子如钠;和/或非离子表面活性剂如吐温、聚乙二醇(PEG)和普朗尼克(pluronic)。

[0265] 也可以存在药学上可接受的盐,例如无机酸盐,如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐等;以及有机酸的盐,如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐、苯甲酸等。

[0266] 合适的载体材料包括通常用作局部施用的霜剂、洗剂、凝胶剂、乳剂、或涂剂的基质(base)的任何载体或载体(vehicle)。实例包括乳化剂、包括烃类基质、乳化基质、非毒性溶剂或水溶性基质的惰性载体。特别合适的实例包括普朗尼克、HPMC、CMC以及其它基于纤维素的成分、羊毛脂、硬石蜡、液体石蜡、软黄石蜡或软白石蜡、白蜂蜡、黄蜂蜡、鲸蜡硬脂醇、鲸蜡醇、二甲基硅氧烷、乳化蜡、异丙基酸肉豆蔻酯、微晶蜡、油醇以及硬脂醇。

[0267] 辅助剂如酪蛋白、明胶、白蛋白、胶、藻酸钠、羧甲基纤维素、甲基纤维素、羟乙基纤维素或聚乙烯醇也可以包括在本发明的制剂中。

[0268] 本发明的剂型、制剂、装置和/或组合物可以经配制以优化生物利用度,并使血浆浓度维持在治疗范围内,包括延长期限。例如,持续递送制剂(例如受控的递送制剂)也优化了作用部位的药物浓度,并尽量缩短药物治疗中和治疗经历的期间(period of under and

over medication)。

[0269] 可用于本发明的剂型、装置和/或组合物可提供用于定期施用,包括每日一次施用,用于低剂量的控制和/或低剂量的长效体内释放B型利尿钠信号肽片段剂。

[0270] 适于口服施用的剂型的实例包括但不限于能够提供治疗有效量的B型利尿钠信号肽片段剂的片剂、胶囊、锭剂或相似的形式,或任何液体形式如糖浆剂、水性溶液、乳剂等。

[0271] 适于经皮施用的剂型包括但不限于,经皮贴剂、经皮绷带等。可用于本发明的化合物和制剂的局部施用剂型的实例是任何洗剂、粘贴、喷雾剂、膏、糊剂、霜剂、凝胶剂等,不论是直接用到皮肤上或通过中间物(intermed)用到皮肤上。

[0272] 适于本发明的化合物和制剂的栓剂施用的剂型实例包括插入身体孔道的任何固体剂型,特别是插入直肠、阴道和尿道的那些。

[0273] 适于本发明的经粘膜递送化合物和制剂的剂型实例包括灌肠储液、阴道栓、棉条、霜剂、凝胶剂、糊剂、泡沫剂、雾化溶液、粉剂和含有除活性成分以外的在本领域中已知是适当的如载体的相似制剂。

[0274] 适于本发明的注射化合物和制剂的剂型的实例包括推注的递送,比如通过静脉注射、皮下、真皮下和肌肉施用或口服施用的单次或多次施用。

[0275] 适于本发明化合物和制剂的储库施用的剂型的实例包括活性剂的丸剂或小圆柱体或固体形式,其中活性剂被截留在生物可降解聚合物、微乳剂、脂质体的基质中或在微胶囊中。

[0276] 用于本发明化合物和制剂的输注装置的实例包括,包含一种或多种B型利尿钠信号肽片段剂和/或预先复合的B型利尿钠信号肽片段剂的输注泵,并包括可植入药物泵,其中B型利尿钠信号肽片段剂的输注泵以实现所需施用的剂量数或稳态的所需量设置。

[0277] 用于本发明化合物和制剂的可植入输注装置的实例包括任何固体形式,其中活性剂被包裹于或分散于整个生物可降解聚合物或合成的聚合物中,如硅氧烷(silicone)、硅橡胶、硅橡胶的或相似的聚合物。

[0278] 适于本发明化合物和制剂的吸入或吹入剂型的实例包括,包含药学上可接受的、水性或有机溶剂中的溶液和/或悬液、或其混合物和/或粉末的组合物。

[0279] 适于本发明化合物和制剂的颊施用的剂型的实例包括锭剂、片剂等,包含药学上可接受的、水性或有机溶剂中的溶液和/或悬液、或其混合物和/或粉末的组合物。

[0280] 适于本发明化合物和制剂的舌下施用的剂型的实例包括锭剂、片剂等,包含药学上可接受的、水性或有机溶剂中的溶液和/或悬液、或其混合物和/或粉末的组合物。

[0281] 用于递送本发明化合物和制剂的受控药物制剂的实例可见于,例如Sweetman, S.C.(编).Martindale.The Complete Drug Reference,33版,Pharmaceutical Press, Chicago,2002,2483pp.;Aulton,M.E.(编)Pharmaceutics.The Science of Dosage Form Design.Churchill Livingstone,Edinburgh,2000,734pp.;以及Ansel,H.C.,Allen,L.V.和Popovich,N.G.Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,7版., Lippincott1999,676pp.用于制造药物递送系统的赋形剂描述于本领域已知的各种出版物中,包括例如Kibbe,E.H.Handbook of Pharmaceutical Excipients,3版,American Pharmaceutical Association,Washington,2000,665pp.USP还提供改变的释放口服剂型的实例,包括配制成片剂或胶囊的那些。参见,例如美国药典23/国家处方集18,美国药典委

员会, Inc., Rockville MD, 1995(此后称为“USP”), 其也描述了确定延长释放和延迟释放片剂和胶囊的药物释放能力的具体测试。其它关于延长释放的剂型分析的指南已由FDA提供。参见工业指南《Extended release oral dosage forms: development, evaluation, and application of in vitro/in vivo correlations》Rockville, MD: 药监局药物评价和研究中心(1997)。

[0282] 在本发明的方法中 有用剂型的其它实例包括, 但不限于改变的释放(MR)剂型, 包括延迟释放(DR)的形式; 延长作用(PA)的形式; 受控释放(CR)的形式; 延长释放(ER)的形式; 定时释放(TR)的形式; 和长效(LA)的形式。在大多数情况下, 这些术语被用来描述口服施用的剂型, 但是这些术语可以适用于此处所述的任何剂型、制剂、组合物和/或装置。这些制剂在药物施用后将总药物释放延迟一段时间, 和/或施用后以小的等份间歇地药物释放, 和/或由递送系统控制以受控的速度缓慢释放药物, 和/或以不发生变化的恒定速度释放药物, 和/或比常规制剂显著更长的时间释放药物。

[0283] 本发明改变的释放剂型包括具有基于时间、过程和/或位置的 药物释放特征的剂型, 其设计用于实现常规或即刻释放形式所不能提供的治疗性或便利的目的。参见, 如 Bogner, R.H. U.S. Pharmacist 22(Suppl.): 3-12(1997); Scale-up of oral extended-release drug delivery systems: part I, an overview, Pharmaceutical Manufacturing 2: 23-27(1985)。本发明的延长剂型包括, 例如由美国食品和药物监督管理局(FDA)所定义的, 允许将给药频率减少至常规剂型(例如, 溶液或即刻释放剂型)所体现的给药频率的剂型。见, 例如 Bogner, R.H. (1997) 同上。本发明的重复操作的剂型包括, 例如包含两个药物单剂量的形式, 一个用于即刻释放, 另一个用于延迟释放。例如, 可以用一层用于即刻释放的药物以及设计用于稍后释放药物的另一层(无论是作为第二剂量还是以延长释放的方式)制备双层片剂。本发明的靶向释放剂型包括, 例如促进药物释放的制剂, 其旨在将药物分离并浓缩在针对药物吸收或作用的身体区域、组织或位点。

[0284] 此外, 在本发明中有用的包被的珠、颗粒或微球含有一种或多种B型利尿钠信号肽片段剂和/或预先复合的B型利尿钠信号肽片段剂, 通过将药物掺入包被的珠、颗粒、或微球, 可用于实现一种或多种B型利尿钠信号肽片段剂和/或预先复合的B型利尿钠信号肽片段剂的改变的释放。在这种系统中, B型利尿钠信号肽片段剂和/或预先复合的B型利尿钠信号肽片段剂分布到珠、小球、颗粒或其它颗粒系统上。见 Ansel, H.C., Allen, L.V and Popovich, N.G., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 第7版, Lippincott 1999, p. 232。

[0285] 用于制造适合于药物递送的微球的方法已被描述。参见, 例如 Arshady, R. Polymer Eng Sci 30: 1746-1758(1989); 也参见 Arshady, R., Polymer Eng Sci 30: 905-914(1990); 也参见 Arshady R., Polymer Eng Sci 30: 915-924(1990)。各种包被系统是可商购的。如 Aquacoat™ [FMC Corporation, Philadelphia] 和 Surerelease™ [Colorcon]; Aquacoat 水性聚合物分散体系。Philadelphia: FMC公司, 1991; Surerelease 水性受控释放包衣系统。West Point, PA: Colorcon, 1990; Butler, J., 等人 Pharm Tech 22: 122-138(1998); Yazici, E., 等人 Pharmaceut Dev Technol 1: 175-183(1996)。

[0286] 所用包衣厚度以及包衣材料类型的变化会影响体液能够渗透包衣以溶解B型利尿钠信号肽片段剂的速度。一般来说, 包衣越厚, 越抵抗渗透以及越延迟释放和溶解B型利尿

钠信号肽片段剂。见Madan, P.L.U.S. Pharmacist 15:39-50 (1990)。这提供了不同的所需持续或延长释放率,并将包被的珠靶向胃肠道所希望的部分。可用于不溶于水的延缓释放中间层(待应用到小球、球或片芯)的成膜聚合物的实例包括乙基纤维素、聚乙酸乙烯酯、Eudragit®RS、Eudragit®RL等(Eudragit®RS和Eudragit®RL各是甲基丙烯酸铵共聚物)。不仅可以通过掺入合适的水溶性成孔剂(如乳糖、甘露醇、山梨醇等)控制释放率,而且还可以通过利用包衣层的厚度控制释放率。可以配制包括小球状压缩迷你片的多片剂,压缩迷你片可以具有3-4mm的直径,并且可以放置在明胶胶囊壳中以提供所需的B型利尿钠信号肽片段剂的释放模式。各胶囊可含有8-10迷你片,一些未经包被的用于即刻释放,其它经过包被的用于B型利尿钠信号肽片段剂缓的延长释放。

[0287] 许多方法可用于产生适合口服施用到人或其它哺乳动物的一种或多种B型利尿钠信号肽片段剂的改变的释放剂型。实现改变的释放药物递送的两种可用基本机制包括改变药物和赋形剂的溶解或扩散。在此上下文中,例如四个过程都可以使用,无论是同时还是持续的。这些如下:(i)装置的水化(例如,基质的膨胀);(ii)水扩散到装置;(iii)控制或延迟药物的溶解;以及(iv)控制或延迟溶解的或可溶药物扩散出装置。

[0288] 为了制定剂量值范围,可以使用细胞培养分析和动物研究。优选地,这类化合物的剂量在对至少50%群体的有效治疗的剂量范围内,并在此水平处表现出很少或没有毒性。

[0289] 在本发明方法和组合物中所用的各B型利尿钠信号肽片段剂的有效剂量取决于许多因素,包括采用的具体B型利尿钠信号肽片段剂或试剂、心血管治疗的组合伙伴(如果存在)、施用方式、施用频率、所治疗的疾病、所治疗的疾病的严重程度、施用途径、待治疗的患者亚群的需要或个体患者的需要,其中不同的需要可因患者具体的年龄、性别、体重、有关医疗状况而变化。

[0290] 合适的剂量可从约0.001至约1、或至约10mg/kg体重,如约0.01至约0.5mg/kg体重。然而,合适的剂量可从约0.001至约0.1mg/kg体重,如约0.01至约0.05mg/kg体重。从约1至100、100-200、200-300、300-400、和400-500mg的剂量是适当的,是约500-750 μ g及约750-1000 μ g的剂量。其它有用的剂量包括从约300至约1000pmol每剂量,以及约0.05至约0.2nmol每剂量。其它剂量在以下权利要求范围内。

[0291] 例如,在某些实施方式中,以约0.01纳摩尔(mM)或者0.05nM至约200nM的终浓度施用B型利尿钠信号肽片段剂组合物。优选地,以约0.1nM至约150nM的终浓度施用B型利尿钠信号肽片段剂组合物,更优选地,以约1nM至约100nM的终浓度应用B型利尿钠信号肽片段剂组合物,以及更优选地,以约10-20nM至约100-150nM的终浓度施用B型利尿钠信号肽片段剂组合物。此外,B型利尿钠信号肽片段剂剂量的量包括,例如约0.1-1、1-2、2-3、3-4、或4-5mg(mg),从约5至约10mg,从约10至约15mg,从约15至约20mg,从约20至约30mg,从约30至约40mg,从约40至约50mg,从约50至约75mg,从约75至约100mg,从约100mg至约250mg,以及从250mg到约500mg。如上所述也提供从500至约1000mg或更多的剂量的量。其它剂量包括范围从至少约100ng的剂量,包括例如至少约200ng、600ng、2000ng、6000ng和至少约10,000ng以上。剂量浓度包括每升至少约0.1摩尔的浓度,包括例如至少约0.3、1.0、3.0和10.0nmol/L。剂量浓度还包括0.1nmol/L、0.3nmol/L、1.0nmol/L、3.0nmol/L和10.0nmol/L的浓度。这些剂量浓度相当于0.1、0.3、1、3、11 μ g/L以及0.4、1.0、4.0、10和39微克/kg(μ g/kg)的可施用剂量重量。范围从0.1至5.0 μ g/kg以及0.1至10.0 μ g/kg的其它剂量也在本发明范围内。此

外,约0.4、1.0、4.0、10和39 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的剂量在本发明的范围内。至少约0.4、1.0、4.0、10和39 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的剂量也在本发明范围内。

[0292] 此处所述各试剂的每天约1纳克(ng)/ kg 和约1 mg/kg 体重之间的其它剂量水平。在某些实施方式中,各受试化合物的剂量将通常在每 kg 体重约1 ng 至约1 μg 、每 kg 体重约1 ng 至约0.1 μg 、每 kg 体重约1 ng 至约10 ng 、每 kg 体重约10 ng 至约0.1 μg 、每 kg 体重约0.1 μg 至约1 μg 、每 kg 体重约20 ng 至约100 ng 、每 kg 体重约0.001 mg 至约0.01 mg 、每 kg 体重约0.01 mg 至约0.1 mg 、或每 kg 体重约0.1 mg 至约1 mg 的范围内。在某些实施方式中,各受试化合物的剂量将通常在每 kg 体重约0.001 mg 至约0.01 mg 、每 kg 体重约0.01 mg 至约0.1 mg 、每 kg 体重约0.1 mg 至约1 mg 的范围内。如果使用一种以上的B型利尿钠信号肽片段剂时,各B型利尿钠信号肽片段剂的剂量不必要彼此在相同的范围内。

[0293] 方便地,输注时,B型利尿钠信号肽片段剂施用至少约0.5至1小时,至少约1-2小时,至少约2-4小时,至少约4-6小时,至少约6-8小时,至少约8-10小时,至少约12小时或至少约24小时。

[0294] 如此处所指出的,例如组合施用B型利尿钠信号肽片段、肽或拟肽时、或与其它心血管治疗剂(一种或两种)组合施用时的剂量,可调整至低于单独给药时施用的剂量。

[0295] 组合使用多种试剂可以减少对任何单独试剂所需要的剂量,因为不同试剂作用的起始和持续时间可以互补。在优选的实施方式中,两种或多种B型利尿钠信号肽片段和/或心血管治疗剂的组合使用,具有附加的、协同或超加性作用。

[0296] 在某些情况下,B型利尿钠信号肽片段剂和心血管治疗剂或其它剂的组合(一种或两种)组合施用,具有叠加的作用。在其它情况下,组合可以具有大于叠加的作用。在此处这样的作用称为“超加性”作用,可能是由于协同或增效相互作用。

[0297] 在另一优选实施方式中,组合使用B型利尿钠信号肽片段剂和其它心血管治疗剂,相较于所述试剂单独施用时的频率,可减少所述试剂的施用频率。因此,这些组合允许各试剂使用比以前所需剂量较低的和/或更少的剂量以实现所需治疗目标。

[0298] 可以以单次或分开的应用施用剂量。可一次施用剂量、或重复应用。典型地,除了多个单次施用外、或代替多个单次施用,可通过输注进行施用。

[0299] 一种或多种B型利尿钠信号肽片段剂和其它心血管治疗剂,如果需要,可以通过相同或不同途径施用。本发明的各种剂可以在治疗过程中在不同时间分开施用、或在分开的或单个组合形式中同时施用。

[0300] 在本发明的一个方面,在一种组合物中施用B型利尿钠信号肽片段剂,而在第二组合物中施用另一种心血管治疗剂。在一个实施方式中,包含B型利尿钠信号肽片段剂的第一组合物的施用,先于包含另一种心血管治疗剂的第二组合物。在一个实施方式中,包含B型利尿钠信号肽片段剂的第一组合物的施用,晚于包含另一种心血管治疗剂的第二组合物。在一个优选的实施方式中,包含B型利尿钠信号肽片段剂的第一组合物的施用,先于和晚于包含另一种心血管治疗剂的第二组合物。在一个实施方式中,包含另一种心血管治疗剂的第二组合物的施用,先于和晚于包含B型利尿钠信号肽片段剂的第一组合物。在一个实施方式中,包含B型利尿钠信号肽片段剂的第一组合物与包含另一种心血管治疗剂的第二组合物几乎同时施用。

[0301] 也可以使用缓慢释放或储库试剂,例如以及经皮试剂和装置来实现持续一段时间

递送单独包含B型利尿钠信号肽片段剂、或包含B型利尿钠信号肽片段剂连同另一种心血管治疗剂的制剂,一些情况下,持续约1-2小时,约2-4小时、约4-6小时、约6-8,或约24小时或更长的时间。

[0302] 改善蛋白口服生物利用度的策略从通过亲脂性和酶敏感性的修饰改变蛋白的物理化学性质,到使用由胃肠道中内源性运送运载体系统所识别的运送载体分子添加新的功能和/或将其纳入专门改装的药物载体系统。在控制释放、靶向特定器官/组织以及递送蛋白和肽的能力方面,市售的基于聚合物的系统引起了相当大的关注。它们可以有效地将蛋白递送至靶位点从而增加治疗益处,同时最大限度地减少副作用。蛋白与基于聚合物的载体(例如聚合微粒、纳米颗粒、水凝胶或贴片)的结合,是一种改善口服蛋白生物利用度的有用方法。基于聚合物的载体可以保护蛋白免于胃肠道环境,并允许调节物理化学和蛋白释放特性,最终调节生物学行为。另外,从改善口服吸收的方面来看,载体的主要作用是增加上皮膜的渗透性,从而导致更高的生物利用度。

[0303] 本发明的化合物和制剂的剂型,可以通过影响B型利尿钠信号肽片段剂从剂型中释放的速度和/或通过减缓剂型通过胃肠道的运送时间实现B型利尿钠信号肽片段剂的作用延长(见Bogner, R.H., US Pharmacist 22(Suppl.): 3-12(1997))。药物从固体剂型中释放的速度可以通过下面描述的技术改变,一般情况下,基于以下几点:1)通过使用屏障包衣控制生物液体进入药物而改变药物溶解;2)控制药物从剂型中扩散的速度;以及3)药物物质或它的药物屏障与位点特异性生物液体之间的化学反应或和相互作用。此处还提供实现这些目标的系统。在一个方法中,采用消化作为释放机制,B型利尿钠信号肽片段剂经包被或者捕获到缓慢消化或扩散到肠道内的物质中。B型利尿钠信号肽片段剂的生物利用率是分散物质消化率的函数。因此,根据受试者消化物质的能力,B型利尿钠信号肽片段剂的释放速度以及有效性因受试者而不同。

[0304] 本发明的化合物和制剂的缓慢释放剂型的其它形式是任何合适的渗透系统,其中例如乙酸纤维素、乙酸丁酸纤维素、乙酸丙酸纤维素的半透膜用于控制B型利尿钠信号肽片段剂的释放。这些可以包被有不改变释放速度的肠溶漆水性分散体系。这样的渗透系统的一个实例是渗透泵装置,如Alza Inc.(U.S.A.)开发的Oros™装置。

[0305] 本发明方法中有用的其它装置利用单片基质包括,例如缓慢侵蚀或亲水性聚合物基质,其中压缩或嵌入一种或多种B型利尿钠信号肽片段剂。

[0306] 包括用于本发明的化合物和制剂的单片基质装置包括,例如使用B型利尿钠信号肽片段剂分散在可溶性基质中所形成的那些,其随着基质的溶解或溶胀而逐渐变得可用;实例包括亲水性胶体基质,如羟丙基纤维素(BP)或羟丙基纤维素(USP);羟丙基甲基纤维素(HPMC;BP,USP);甲基纤维素(MC;BP,USP);羧甲基纤维素钙(CMC钙;BP,USP);丙烯酸聚合物或聚亚甲基羧酸酯(卡波普(Carbopol))或卡波姆(BP,USP);或线性聚酏醛酸苷(glycuronan)聚合物如藻酸(BP,USP),例如配制成藻酸(藻酸盐)明胶水胶体团聚体系统微粒的那些,或其中脂质体被藻酸与聚-L-赖氨酸膜的包衣所包裹的那些。随着聚合物溶胀,发生B型利尿钠信号肽片段剂的释放,形成基质层来控制含水液体扩散到芯,从而控制B型利尿钠信号肽片段剂从系统中扩散的速度。

[0307] 在这种系统中,B型利尿钠信号肽片段剂释放的速度依赖于凝胶内通道的曲折性,以及所捕获的液体粘度,使得可以实现不同的释放动力学,例如零阶或一阶结合脉冲式释

放。当这种凝胶非交联时,聚合物链之间存在较弱的非永久结合,这依赖于二次键合。有了这样的装置,可以实现B型利尿钠信号肽片段剂的高载量,且有效混合频繁。装置可含有20-80%B型利尿钠信号肽片段剂(w/w)以及可增强B型利尿钠信号肽片段剂扩散的凝胶改性剂;这种改性剂的实例包括可以增强水合率的糖、可以影响交联含量的离子以及影响聚合物离子化水平的pH缓冲液。除B型利尿钠信号肽片段剂和亲水性基质以外,亲水性基质装置还可以含有一种或多种pH缓冲液、表面活性剂、反离子、润滑剂如硬脂酸镁(BP, USP)和助流剂如胶体二氧化硅(USP; 胶体无水二氧化硅, BP)。

[0308] 包括用于本发明的化合物和制剂的单片基质装置还包括,例如使用B型利尿钠信号肽片段剂溶解于不溶性基质中所形成的那些,从中随着溶剂进入(通常通过通道)基质并溶解B型利尿钠信号肽片段剂颗粒,B型利尿钠信号肽片段剂逐渐变得可用。实例包括与脂质基质、或不溶性聚合物基质(包括棕榈蜡(BP; USP); 中链甘油三酯如分馏椰子油(BP)或中链甘油三酯(triglycerida saturata media)(PhEur); 纤维素乙基醚或乙基纤维素(BP, USP)制成的制剂)形成的系统。脂质基质简单且容易制造,纳入粉状成分的下列混合:在释放过程中保持完整的脂质(20-40%疏水性固体w/w); B型利尿钠信号肽片段剂,如致通道剂(channeling agent)如氯化钠或糖,其从制剂中滤出而形成水性微通道(毛细管),溶剂进入这种通道并且B型利尿钠信号肽片段剂通过这种通道被释放。在这种系统中,B型利尿钠信号肽片段剂嵌入惰性不溶性聚合物,并通过水性液体滤出而释放,其通过颗粒之间形成的毛细管扩散到装置的核心,并且从中B型利尿钠信号肽片段剂扩散出装置。由压缩程度、粒径以及赋形剂性质和相对含量(w/w)控制释放的速度。这种装置的实例是Ferrous Gradumet(Martindale33版,1360.3)。合适的非溶性基质的其它实例是惰性塑料基质。通过这种方法,B型利尿钠信号肽片段剂与惰性塑料材料(如聚乙烯、聚乙烯乙酸酯或聚甲基丙烯酸酯)进行造粒,然后造粒的混合物压制成片剂。一经摄入,B型利尿钠信号肽片段剂通过扩散缓慢地从惰性塑料基质中释放。参见例如Bodmeier, R. & Paeratakul, O., J Pharm Sci 79:32-26(1990); Laghoueg, N. 等人 Int J Pharm 50:133-139(1989); Buckton, G. 等人 Int J Pharm 74:153-158(1991)。片剂的压缩产生在B型利尿钠信号肽片段剂滤出以及从胃肠道通过通道期间保持其形状的基质或塑料形式。B型利尿钠信号肽片段剂的即刻释放部分可被压缩到片剂的表面。惰性片剂基质,耗尽B型利尿钠信号肽片段剂后,会随排泄物排出。这种类型的成功剂型的实例是Gradumet (Abbott; 参见例如Ferro-Gradumet, Martindale33版p.1860.4)。

[0309] 本发明方法中有用的单片基质装置的其它实例包括纳入附着至聚合物基质的悬垂(pendent)附件中的本发明的组合物和制剂。见,例如Scholsky, K.M和Fitch, R.M., J Controlled Release 3:87-108(1986)。在这些装置中,通过酯键的方式,将B型利尿钠信号肽片段剂连接至水乳液聚合所制备的聚(丙烯酸)酯胶乳颗粒。本发明单片基质装置的其它实例包括这样的剂型,在其中B型利尿钠信号肽片段剂通过不稳定的化学键结合至生物相容的聚合物,不稳定的化学键如从取代酐制备而来的聚酐(其本身通过酰氯与药物反应而制备:甲基丙烯酰氯和甲氧基苯甲酸的钠盐)已被用来形成与第二聚合物的基质(Eudragit RL),当在胃液中水解时释放药物。见Chafi, N., 等人 Int J Pharm 67:265-274(1992)。

[0310] 一种或多种B型利尿钠信号肽片段剂改变的释放形式也可以由微胶囊化制备。微胶囊化是这样一个过程,通过在待包囊的物质周围形成“壁”材料的薄包衣,将固体、液体、

或甚至气体包囊到微观尺寸的颗粒中,例如在美国专利No.3,488,418;3,391,416和3,155,590中公开的。明胶(BP,USP)通常用作微胶囊制剂的壁形成材料,但也可以使用合成聚合物,如聚乙烯醇(USP)、乙基纤维素(BP,USP)、聚氯乙烯和其它材料。见,例如Zentner,G.M.,等人J Controlled Release2:217-229(1985);Fites,A.L等人J Pharm Sci59:610-613(1970);Samuelov,Y等人J Pharm Sci68:325-329(1979)。通过改变核-壁比(core-to-wall)、用于包衣的聚合物、或微胶囊化的方法可获得B型利尿钠信号肽片段剂释放的不同速度。见,例如Yazici,E.,Oner,等人Pharmaceut Dev Technol;1:175-183(1996)。

[0311] 其它有用的方法包括,B型利尿钠信号肽片段剂以储库和基质装置的形式并入聚合物胶体颗粒或微胶囊(微粒、微球或纳米颗粒)的那些。见Douglas,S.J.等人C.R.C.Crit Rev Therap Drug Carrier Syst3:233-261(1987);Oppenheim,R.C.,Int J Pharm8:217-234(1981);Higuchi,T.,J Pharm Sci52:1145-1149(1963)。

[0312] 适用于经皮递送的药物制剂是本领域技术人员已知的,以及在如Ansel等人(同上)的参考文献中描述。已知增强药物经皮途径递送的方法包括化学皮肤促渗剂,其通过可逆地破坏或改变角质层的物理化学性质降低对药物扩散的阻力而增加皮肤的渗透性。见Shah,V.,Peck,C.C和Williams,R.L.,Skin penetration enhancement:clinical pharmacological and regulatory considerations,In:Walters,K.A.和Hadgraft,J.(编)Pharmaceutical skin penetration enhancement.New York:Dekker,(1993)。适于和B型利尿钠信号肽片段剂一同配制于经皮药物递送系统中的皮肤促渗剂可选自以下列表:丙酮、月桂氮酮、二甲基乙酰胺、二甲基甲酰胺、二甲基亚砷、乙醇、油酸、聚乙二醇、丙二醇和十二烷基硫酸钠。其它皮肤促渗剂可在本领域技术人员已知的出版物中找到。参见,例如Osborne,D.W.,&Henke,J.J.,Pharm Tech21:50-66(1997);Rolf,D.,“Pharm Tech12:130-139(1988)。除化学方法,还有物理方法可增强本发明的化合物和制剂的经皮药物递送和渗透。这些包括离子导入和超声波导入。适于通过离子导入和超声波导入施用的制剂可以是凝胶、霜剂或洗剂的形式。

[0313] 本发明的经皮递送、方法或制剂,可以利用尤其是单片递送系统、药物浸渍的粘附递送系统(例如3M的Latitude™药物-粘附系统)、主动运送装置和膜控制系统。本发明的经皮递送剂型包括用B型利尿钠信号肽片段剂替代在例如美国专利号6,193,996和6,262,121中公开的经皮递送系统中的双氯芬酸或其它药学上可接受的盐的那些。

[0314] 其它剂型包括经调整适于栓剂或其它胃肠外使用的口服剂型变体。当以栓剂形式直肠施用,例如可通过将一种或多种本发明的化合物和制剂与合适的非刺激性赋形剂(如可可脂、合成甘油酯或聚乙二醇)相混合来制备这些组合物,在常温下赋形剂是固体的,但在直肠腔中液化和/或溶解以释放B型利尿钠信号肽片段剂。栓剂是通常用于插入人体孔道(包括直肠、阴道以及有时尿道)的固体剂型,并且可以是长效的或缓慢释放。栓剂包括基质(base),基质可包括但不限于如藻酸的衍生物的材料,这将药学上可接受的活性成分的释放延长几个小时(5-7)。

[0315] 可用于本发明的化合物和制剂的经粘膜施用可利用任何粘膜,但通常采用鼻、颊、阴道和直肠组织。适合于经鼻施用本发明的化合物和制剂的制剂可以液体形式施用,例如鼻喷雾剂、滴鼻剂、或者通过雾化器的气溶胶施用,包括B型信号肽片段的水性或油性溶液。用于经鼻施用的制剂,其中所述载体是固体,包括具有例如约100微米以内的颗粒尺寸,优

选小于100微米,最优选每天1或2次约50微米颗粒尺寸的粗粉,其以采用鼻烟的方式施用,即从靠近鼻子的盛粉的容器中经鼻道快速吸入。可以通过使用惰性气体雾化溶液中的组合物,这种雾化的溶液可以从雾化装置中直接吸入或将雾化装置接到面罩、氧气幕(tent)上或B型利尿钠信号肽片段剂以适当的方式从递送制剂的装置中间歇地口服或经鼻施用。制剂可以制备成水溶液,例如在盐水、采用苯甲醇或本领域中已知的其它合适防腐剂、提高生物利用率的吸收促进剂、碳氟化合物和/或其它增溶或分散剂的溶液中。

[0316] 按照常规方法,通过将一定量的B型利尿钠信号肽片段剂成分溶解或悬浮在稀释剂中制备组合物。B型利尿钠信号肽片段剂的量为每毫升稀释剂0.1mg至1000mg。在一些实施方式中,提供B型利尿钠信号肽片段剂的100mg至200mg的剂型。仅通过示例的方式,B型利尿钠信号肽片段剂的量范围可以从约1mg至约750mg或更多(例如,约1mg、约10mg、约25mg、约50mg、约100mg、约150mg、约200mg、约250mg、约400mg、约500mg、约600mg、约750mg、约800mg、约1000mg,以及约1200mg)。其它剂量包括范围从至少约100ng的剂量,包括例如至少约200ng、600ng、2000ng、6000ng和至少约10,000ng或以上。剂量浓度包括每升至少约0.1摩尔的浓度,包括例如至少约0.3、1.0、3.0和10.0nmol/L。剂量浓度还包括0.1nmol/L、0.3nmol/L、1.0nmol/L、3.0nmol/L和10.0nmol/L的浓度。这些剂量浓度相当于0.1、0.3、1、3、11 μ g/L以及0.4、1.0、4.0、10和39 μ g/kg的可施用剂量重量。范围从0.1至5.0 μ g/kg以及0.1至10.0 μ g/kg的其它剂量也在本发明范围内。此外,约0.4、1.0、4.0、10和39 μ g/kg的剂量在本发明的范围内。至少约0.4、1.0、4.0、10和39 μ g/kg的剂量也在本发明范围内。虽然没有明确列出其间的每个数,也可以使用并尤其考虑这些范围内的其它量。

[0317] 可按适于每日一次的剂量形式提供和施用B型利尿钠信号肽片段剂。可以添加醋酸盐、磷酸盐、柠檬酸盐或谷氨酸盐缓冲液,使得最终组合物的pH从约5.0至约9.5;任选地,也可以添加碳水化合物或多元醇等渗剂(tonicifier)和防腐剂,防腐剂选自间甲酚、苯甲醇、甲基、乙基、丙基和丁基苯甲酸酯(paraben)和酚。如果需要的话,也可以存在注射用水、等渗剂如氯化钠、以及其它赋形剂。用于肠胃外施用,制剂是等渗或基本上等渗的,以避免施用部位的刺激和疼痛。

[0318] 术语缓冲剂、缓冲溶液和缓冲的溶液,当参照氢离子浓度或pH使用时,是指加入酸或碱时、或用溶剂稀释时,系统(尤其是水溶液)抵抗pH变化的能力。加入酸或碱时,缓冲溶液经历pH微小变化的特点是存在弱酸和弱酸的盐,或弱碱和弱碱的盐。前者系统的一个实例是乙酸和乙酸钠。只要氢氧离子的加入量不超过该缓冲系统将其中和的能力,pH变化就是轻微的。

[0319] 保持制剂的pH在约5.0至约9.5的范围内,可以提高本发明肠胃外制剂的稳定性。其它pH范围例如包括约5.5至约9.0、或约6.0至约8.5、或约6.5至约8.0或优选约7.0至约7.5。

[0320] 所用的缓冲液可选自下列任意项,例如乙酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液或谷氨酸盐缓冲液,最优选的缓冲液是磷酸盐缓冲液。载体或赋形剂也可以被用于促进本发明组合物和制剂的施用。载体和赋形剂的实例包括碳酸钙、磷酸钙、各种糖如乳糖、葡萄糖或蔗糖、或各种类型的淀粉、纤维素衍生物、明胶、聚乙二醇和生理上相容的溶剂。可以包括稳定剂,但通常没有必要。但是,如果包括的话,本发明实践中有用的稳定剂的实例是碳水化合物或多元醇。多元醇包括这样的化合物如山梨醇、甘露醇、甘油、木糖醇和聚丙烯/乙二醇共聚物,

以及分子量200、400、1450、3350、4000、6000和8000的各种聚乙二醇(PEG)。碳水化合物包括,例如甘露糖、核糖、海藻糖、麦芽糖、肌醇、乳糖、半乳糖、阿拉伯糖、或乳糖。

[0321] 也可使用或包括维持渗透性的等渗剂或试剂。

[0322] 美国药典(USP)规定,抑细菌或抑真菌浓度的抗微生物剂必须添加到包含在多剂量容器的制剂中。使用时,它们必须以足够的浓度存在,以防止当用皮下针头和注射器吸取部分内容物的同时,或者使用其它用于递送的侵入性装置(如笔型注射器)时,无意间引入制剂的微生物的繁殖。应评估抗微生物剂以确保与制剂的所有其它成分相容,并且应评估它们在总制剂中的活性以确保特定的剂在一种制剂中是有效的,而在另一种中无效。常常发现,特定的试剂在一种制剂中是有效的,而在另一种制剂中无效。而适用于本发明实践中的防腐剂的范围可以从0.005到1.0%(w/v),各防腐剂优选的范围(单独或与其它组合)是:苯醇(0.1-1.0%)、或间甲酚(0.1-0.6%)或酚(0.1-0.8%)、或甲基(0.05-0.25%)和乙基或丙基或丁基(0.005%-0.03%)苯甲酸酯的组合。苯甲酸酯是对羟基苯甲酸的低级烷基酯。各防腐剂的详细说明载于“Remington's Pharmaceutical Sciences”以及Pharmaceutical Dosage Forms:Parenteral Medications,Vol.1,1992,Avis等人。为了这些目的,B型利尿钠信号肽片段剂可以肠胃外施用(包括皮下注射、静脉内、肌内、皮内注射或输注技术)或以含有常规无毒药学上可接受载体、佐剂和运载体(vehicle)的单位剂量制剂的形式通过吸入喷雾。

[0323] 如果需要,可利用增稠剂如甲基纤维素使肠胃外制剂增稠。该制剂可以以乳化形式制备,无论是油包水还是水包油。可以采用任何各种各样的药学上可接受的乳化剂,包括例如阿拉伯胶粉、非离子型表面活性剂或离子型表面活性剂。向药物制剂中添加合适的分散剂或混悬剂也是可取的。这些可包括例如水性混悬剂,例如合成和天然的胶,例如黄蓍胶、阿拉伯胶、藻酸盐、葡聚糖、羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮或明胶。

[0324] 其它成分可存在于用于本发明的肠胃外药物制剂中。这些额外的成分可以包括润湿剂、油(例如植物油如芝麻油、花生油或橄榄油)、止痛剂、乳化剂、抗氧化剂、填充剂、张力调节剂、金属离子、油性溶媒、蛋白(例如,人血清白蛋白、明胶或蛋白)和两性离子(例如,氨基酸例如甜菜碱、牛磺酸、精氨酸、甘氨酸、赖氨酸和组氨酸)。当然,这些额外的成分不应对本发明药物制剂的整体稳定性有负面影响。关于药物制剂,也见Pharmaceutical Dosage Forms:Parenteral Medications,Vol.1,2版,Avis等人编,Merckel Dekker,New York, N.Y.1992。

[0325] 合适的肠胃外施用途径包括肌内、静脉内、皮下、腹膜内、真皮下、皮内、关节内、鞘内等。粘膜递送也是允许的。剂量和给药方案将取决于受试者的体重和健康状况。

[0326] 除了达到延长药物作用的上述装置外,可以通过例如使用机械控制的药物输注泵控制B型利尿钠信号肽片段剂递送的速度和持续时间。

[0327] 可以储库注射的形式施用B型利尿钠信号肽片段剂,可以以这样的方式配制储库注射的形式以容许B型利尿钠信号肽片段剂的持续释放。B型利尿钠信号肽片段剂可以被压缩成小球或小圆柱体,并皮下或肌内植入。小球或小圆柱体可额外包被有合适的可生物降解的聚合物,经选择用于提供期望的释放谱。作为替代,B型利尿钠信号肽片段剂可以是微球粒(micropelleted)。使用生物可接受的聚合物的B型利尿钠信号肽片段剂微球粒可被设计成允许操作释放速度以提供期望的释放谱。可选地,可以通过形成B型利尿钠信号肽片段

剂在可生物降解聚合物(如聚丙交酯-聚乙交酯)中的微胶囊基质,制成可注射的储库形式。取决于B型利尿钠信号肽片段剂对聚合物的比例、和所用具体聚合物的性质,可以控制B型利尿钠信号肽片段剂释放的速度。也可以通过将B型利尿钠信号肽片段剂捕获在脂质体中制备储库的可注射制剂,其实例包括单层囊泡、大单层囊泡和多层囊泡。脂质体可由各种磷脂,如胆固醇、硬脂胺或磷脂酰胆碱形成。可以通过将B型利尿钠信号肽片段剂捕获在与身体组织相容的微乳中制备储库的可注射制剂。通过实例的方式,参考美国专利号6,410,041和6,362,190。

[0328] 可植入输注装置可以使用惰性材料,如上述所列的可生物降解聚合物或合成的硅树脂,例如cylastic(无对应中译文)、硅橡胶或由Dow-Corning公司生产的其它聚合物。聚合物可加载有B型利尿钠信号肽片段剂和任何赋形剂。可植入输注装置还可以包括医疗装置的包衣或部分,其中包衣包括加载有B型利尿钠信号肽片段剂和任何赋形剂的聚合物。可以按照美国专利号6,309,380中公开的,用体内生物相容和生物可降解或生物可吸收或生物可腐蚀的液体或凝胶溶液包被装置来制备这样的可植入输注装置,其中液体或凝胶溶液包含聚合物和含有所需剂量B型利尿钠信号肽片段剂和任何赋形剂的溶液。溶液转换为粘附至医疗装置的膜,从而形成可植入的B型利尿钠信号肽片段剂的可递送医疗装置。如美国专利号6,120,789所公开的,也可以通过原位形成含有固体基质的B型利尿钠信号肽片段剂制备可植入输注装置。如本领域已知的,可植入输注装置可以是被动的或主动的。

[0329] 此外,可用于本发明方法的是微乳液,即例如由亲水相、亲脂相、至少一种表面活性剂(SA)和至少一种助表面活性剂(CoSA)构成的液体和稳定的均匀溶液。合适的表面活性剂实例包括单-、双-和三酸甘油酯和聚乙二醇(PEG)的单-和二酯。助表面活性剂,有时也称为“共表面活性剂”,是一种具有疏水特性是化学化合物,其旨在使水相和油相在微乳液中相互溶解。合适的助表面活性剂的实例包括乙基二甘醇、丙二醇月桂酸酯、聚甘油油酸酯、和相关的化合物。

[0330] 通过增加对粘膜表面的粘附、通过降低水解或酶降解B型利尿钠信号肽片段剂的降解率、以及通过增加B型利尿钠信号肽片段剂相对于颗粒大小的表面积,还可以使用各种聚合物递送B型利尿钠信号肽片段剂以提高生物利用度。合适的聚合物可以是天然的或合成的,并且可以是可生物降解的或不可生物降解的。通过聚合物体系的扩散或降解,可以发生低分子量活性剂的递送,如例如B型利尿钠信号肽片段剂。代表性的天然聚合物包括蛋白如玉米蛋白、改性玉米蛋白、酪蛋白、明胶、谷蛋白、血清白蛋白、和胶原,多糖如纤维素、葡聚糖和聚透明质酸。由于降解和释放谱的更好表征,一般优选合成聚合物。代表性的合成聚合物包括聚磷腈、聚(乙烯醇)、聚酰胺、聚碳酸酯、聚丙烯酸酯、聚烯烃、聚丙烯酰胺、聚亚烷基二醇、聚亚烷基氧化物、聚亚烷基对苯二甲酸酯、聚乙烯醚、聚乙烯酯、聚卤乙烯、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙交酯、聚硅氧烷、聚氨酯以及它们的共聚物。合适的聚丙烯酸酯实例包括聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(甲基丙烯酸乙酯)、聚(甲基丙烯酸丁酯)、聚(甲基丙烯酸异丁酯)、聚(甲基丙烯酸己酯)、聚(甲基丙烯酸异癸酯)、聚(甲基丙烯酸月桂酯)、聚(甲基丙烯酸苯酯)、聚(甲基丙烯酸酯)、聚(丙烯酸异丙酯)、聚(丙烯酸异丁酯)和聚(丙烯酸十八酯)。合成修饰的天然聚合物包括纤维素衍生物如烷基纤维素、羟烷基纤维素、纤维素醚、纤维素酯和硝化纤维素。合适的纤维素衍生物实例包括甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟丁基甲基纤维素、乙酸纤维素、丙酸纤维素、乙酸丁酸纤维素、邻苯二甲酸

乙酸纤维素、羧甲基纤维素、三乙酸纤维素和硫酸纤维素的钠盐。上述各聚合物可获自商业来源,如Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., Polysciences, Warrenton, Pa., Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wis., Fluka, Ronkonkoma, N.Y. 和BioRad, Richmond, Calif, 或者可以使用标准技术从获自这些供应商的单体进行合成。

[0331] 上述聚合物可以单独描述为可生物降解的、不可生物降解的、和生物粘附性聚合物。代表性的合成的可降解聚合物包括聚羧基酸, 例如聚乳酸、聚乙交酯及其共聚物、聚(对苯二甲酸乙二醇酯)、聚(丁酸)、聚(戊酸)、聚(丙交酯-共-己内酯)、聚酞、聚原酸酯及其共混物和共聚物。代表性的天然生物可降解聚合物包括多糖例如藻酸盐、葡聚糖、纤维素、胶原及其化学衍生物(化学基团的取代、添加, 例如烷基、亚烷基、羟基化、氧化、以及本领域技术人员所常规进行的其它修饰)、以及蛋白如白蛋白、玉米蛋白及其共聚物和共混物, 无论是单独地或是与合成的聚合物组合。不可生物降解的聚合物实例包括乙烯醋酸乙烯酯、聚(甲基)丙烯酸、聚酰胺、聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚乙烯基苯酚、及其共聚物和混合物。亲水性聚合物和水凝胶趋向于具有生物粘附特性。含有羧酸基团(例如, 聚[丙烯酸])的亲水性聚合物趋向于表现出最佳的生物粘附特性。当在软组织上需要生物粘附性时, 优选具有最高浓度羧酸基团的聚合物。各种纤维素衍生物如藻酸钠、羧甲基纤维素、羟甲基纤维素和甲基纤维素也具有生物粘附特性。一些这些生物粘附性材料是水溶性的, 而另一些是水凝胶。聚合物如羟丙基甲基纤维素醋酸琥珀酸酯(HPMCAS)、纤维素乙酸酯偏苯三酸酯(CAT)、邻苯二甲酸醋酸纤维素(CAP)、羟丙基纤维素乙酸邻苯二甲酸酯(HPCAP)、羟丙基甲基纤维素乙酸邻苯二甲酸酯(HMPCAP)和甲基纤维素乙酸邻苯二甲酸酯(MCAP)可用于提高它们所复合的B型利尿钠信号肽片段剂的生物利用度。快速生物可腐蚀的聚合物, 例如聚(丙交酯-共-乙交酯)、聚酞和聚原酸酯(随着其光滑表面被腐蚀, 其羧酸基团暴露在外表面), 也可用于生物粘附性B型利尿钠信号肽片段剂的递送系统。另外, 众所周知, 含有不稳定键的聚合物(如聚酞和聚酯)具有水解反应性。其水解的降解率, 通常可因聚合物骨架上简单的改变而改变。降解时, 这些材料也将羧酸基团暴露在其外部表面上, 并且也可以用作B型利尿钠信号肽片段剂的递送系统。

[0332] 可提高一种或多种B型利尿钠信号肽片段剂的生物利用度或吸收的其它试剂, 可通过促进或抑制跨越肠粘膜的运送来发挥作用。例如, 增加血流的试剂(如血管扩张剂)可以通过增加向胃肠道的血流增加口服施用的B型利尿钠信号肽片段剂的吸收率。血管扩张剂构成提高B型利尿钠信号肽片段剂生物利用度的另一类试剂。

[0333] 增强可用于本发明的组合物和制剂的生物利用度的其它机制包括抑制反向主动运送机制。例如, 现在认为存在于肠上皮细胞的主动运送机制之一是促进物质逆运送的p-糖蛋白运送机制, 其中已经扩散或已被运送到上皮细胞内的物质被运回肠的内腔。抑制这种p-糖蛋白介导的主动运送系统将导致更少的药物被运回内腔, 从而将增加穿过内脏上皮的净药物运送, 并增加血液中最终可用的药物量。各种p-糖蛋白抑制剂是众所周知的, 并且本领域熟知的。这些包括水溶性维生素E; 聚乙二醇; 泊洛沙姆包括Pluronic F-68; 聚环氧乙烷; 聚氧乙烯蓖麻油衍生物包括Cremophor EL和Cremophor RH40; 白杨素、(+)-紫杉叶素; 柚皮素; 地奥司明; 槲皮素等。

[0334] 因此, 虽然递送期取决于条件和试剂以及所需的治疗效果, 提供持续约0.5-1小时、约1-2小时、约2-4小时、约4-6小时、约6-8或约24小时或更长时间的持续或缓慢释放递

送。根据本发明,这通过在连同药学上可接受的载体或运载体一起的制剂中,尤其是在用于持续或缓慢释放施用的制剂形式中,单独地或连同另一种心血管治疗剂一起并入B型利尿钠信号肽片段剂而得以实现。

[0335] 如所述,可以在受试者中或受试者上进行一项程序(例如血管成形术程序或其它物理干预,例如支架)之前、期间、之后立刻施用本发明的一种或多种试剂。例如,优选在例如一项程序之前和/或期间或在一项程序之后约24、约12、约10、约9、约8、约7、约6、约5、约4、约3、约2小时之内或约60、约45、约30、约15、约10、约5、约4、约3、约2、约1分钟之内施用。

[0336] 此处所述施用途径和剂量仅意图作为指导,因为熟练的医师会针对任何具体患者和条件考虑最佳施用途径和剂量。

[0337] 治疗患有或处于心血管疾病风险的受试者的任何方法,可利用此处所述的任何剂量、剂型、制剂、和/或组合物的施用。

[0338] 药物组合物

[0339] 本发明涉药物组合物及其用于预防和/或治疗心血管疾病的使用方法,其中所述组合物包含治疗有效量的B型利尿钠信号肽片段剂,无论是单独的还是连同另一种心血管治疗剂。

[0340] 因此,在一个方面中,本发明提供用于预防和/或治疗心血管疾病的组合物,其包括或基本上由至少一种B型利尿钠信号肽片段剂组成,无论是单独的还是连同另一种心血管治疗剂。在一个优选的实施方式中,所述组合物还包含药学上可接受的载体或运载体。

[0341] 在一个优选的形式中,所述组合物包含一种或多种B型利尿钠信号肽的片段肽剂。最优选地,所述片段肽剂是BNP_{sp}(17-26)(SEQ. ID. NO:1)。

[0342] 试剂盒、药物和制品

[0343] B型利尿钠信号肽片段剂也可用于制造用于预防和/或治疗心血管疾病和相关疾病和病况的药物。

[0344] 在一个方面中,本发明提供用于预防和/或治疗心血管疾病的试剂盒,包括所述一种或多种组合物或制剂。例如,本发明包括包含组合物的试剂盒,其中组合物含有治疗有效量的B型利尿钠信号肽片段剂,其单独的或与一种或多种心血管治疗剂组合。例如,试剂盒可包括组合物,其中组合物包含有效量的B型利尿钠信号肽片段剂和或以下多种:硝酸盐、 β -阻断剂、钙通道阻断剂(特别用于稳定或不稳定型心绞痛,但也用于 β -阻断剂情况下的心力衰竭);利尿剂、血管扩张剂、正性肌力药、ACE抑制剂和醛固酮拮抗剂如安体舒通(特别用于心力衰竭);血液稀释疗法(如阿斯匹林、肝素、华法林)和硝酸甘油(特别用于MI)。试剂盒可包括组合物,其中组合物包含或基本上由如下组成:B型利尿钠信号肽片段剂单独地或组合有(例如物理组合,作为组合制剂而提供)一种或多种抗血栓溶解疗法(例如链激酶抑制剂、抗血小板疗法如,例如氯吡格雷)。试剂盒还可包含B型利尿钠信号肽片段剂单独地或组合有(例如物理组合,作为组合制剂而提供)B型利尿钠肽,包括例如奈西立肽和/或B型利尿钠肽的重组形式。

[0345] 还提供了制品,其包含如此处所述的含有本发明组合物或制剂的容器(以任何剂量或剂型或装置)和用于受试者治疗的说明书。例如,另一个方面,本发明包括制品,制品包含含有治疗有效量B型利尿钠信号肽片段剂(无论是单独的还是同一种或多种其它心血管治疗剂组合)的容器。

[0346] 治疗

[0347] 本发明的组合物和制剂可用于预防和/或治疗心血管疾病和相关疾病和病况。

[0348] 本发明还包括治疗受试者的方法,其中受试者患有或处于发展为心血管疾病、病症或病况的风险,方法包括向所述受试者施用治疗有效量的此处所述一种或多种化合物或药物组合物。在一个非限制性实施方式中,心血管疾病、病症或病况与缺血和/或氧化应激相关。在一个实施方式中,心血管疾病、病症或病况是急性冠状动脉综合征,例如ST段抬高心肌梗塞、非ST段抬高心肌梗塞或不稳定型心绞痛。在另一实施方式中,心血管疾病、病症或病况是心力衰竭。在其它实施方式中,心血管疾病、病症或病况是缺血性心脏病。在另一实施方式中,心血管疾病、病症或病况是稳定型心绞痛。

[0349] 本发明包括治疗受试者的方法,其中受试者患有或处于发展为心血管疾病、病症或病况的风险,方法包括治疗有效量的B型利尿钠信号肽片段剂和药学上可接受的载体。在一个实施方式中,药物组合物中的B型利尿钠信号肽片段剂是BNP_{sp}(17-26)(SEQ ID NO: 1)。在另一个实施方式中,所述药物组合物中的B型利尿钠信号肽片段包括或基本上由选自SEQ. ID. NO: 2至9的序列组成。在另一个实施方式中,药物组合物中的B型利尿钠信号肽片段剂包含或基本上由选自式I、式II、式III、式IV、式V、式VI、式VII和/或式VIII的序列组成。B型利尿钠信号肽片段剂还包括此处所述B型利尿钠信号肽片段剂的活性类似物、变体、截短和修饰形式。

[0350] 在另一方面中,本发明包括通过提高受试者中B型利尿钠信号肽片段的活性,在受试者中治疗和/或预防与缺血和/或氧化应激相关的心血管疾病、病症或病况的方法。这可以通过例如向受试者施用组合物而实现,组合物包含治疗有效量的B型利尿钠信号肽片段剂,例如B型利尿钠信号肽片段或B型利尿钠信号肽片段,这包括包含或基本上由选自SEQ. ID. NO: 1-9的序列组成的BNP_{sp}片段,或包含或基本上由根据式I到VIII任一个的肽或其类似物、变体、截短或修饰组成的肽。在某些实施方式中,使用上述剂量。在其它实施方式中,例如以单一或分开的剂量或通过持续输注,每天施用约0.01至约100、500或1000毫克或更多(例如,至少约100毫克,至少约500毫克,或至少约1000毫克)的BNP_{sp}片段或B型利尿钠信号肽片段类似物,例如包含或基本上由选自SEQ. ID. NO: 1-9的序列组成的BNP_{sp}片段,或包含或基本上由根据式I到VIII任一个的肽组成的肽。

[0351] 在另一个方面中,本发明包括治疗患有急性冠状动脉综合征的患者的方法,方法包括向患者施用治疗有效量的B型利尿钠信号肽片段剂,其中所述患者未患有Q波MI或STEMI。在该方法的某实施方式中,患者患有不稳定型心绞痛。在该方法的另一实施方式中,患者患有非Q波心肌梗死。在此方法的另一个实施方式中,患者具有不大于0.4ng/ml的血液肌钙蛋白I水平。在此方法的另一个实施方式中,患者具有不大于0.1ng/ml的血液肌钙蛋白T水平。在此方法的另一个实施方式中,患者不具有升高的血液肌酸激酶。在此方法的另一个实施方式中,患者没有ST段抬高。在此方法的另一个实施方式中,患者不表现出病理性的Q波。在该方法的另一个实施方式中,患者表现出以下症状中的一种或多种:持续时间大于15分钟的胸痛、静息时胸痛、或最轻微活动后的胸痛,所述胸痛对舌下硝酸盐响应不良。

[0352] 在一个实施方式中,以单剂量施用B型利尿钠信号肽片段剂。在另一个实施方式中,以一个以上的剂量施用B型利尿钠信号肽片段剂。在又一个实施方式中,持续一段时间,例如预定的时间段,持续施用B型利尿钠信号肽片段剂。在又一个实施方式中,B型利尿钠信

号肽片段剂,同葡萄糖或钾盐或其组合共施用。

[0353] 在另一个方面中,本发明包括治疗患者的方法,包括向个体施用治疗有效量的B型利尿钠信号肽片段剂,其中是在以下一种或多种症状的发作之后施用:持续时间大于15分钟的胸痛、静息时胸痛、最轻微活动后的胸痛、恶心、气短、心悸或眩晕。在其它实施方式中,症状发作前患者未患有Q波MI或STEMI;患者患有不稳定型心绞痛;患者患有非Q波心肌梗死;患者具有不大于0.4ng/ml的血液肌钙蛋白I水平;患者具有不大于0.1ng/ml的血液肌钙蛋白T水平;患者不具有升高的血液肌酸激酶心肌同工酶;患者没有ST段抬高;患者不表现出病理性的Q波;在一种或多种症状发作和患者遭受Q波MI或STEMI的时间之间进行施用。在另一个实施方式中,方法还包括在患者遭受Q波MI或STEMI期间持续施用B型利尿钠信号肽片段剂的步骤。在另一实施方式中,方法还包括在患者遭受Q波MI或STEMI之后持续施用B型利尿钠信号肽片段剂的步骤。在此方法的其它实施方式中,患者患有缺血性心脏病、或处于发展为缺血性心脏病的风险。在方法的另一个实施方式中,患者具有下列一种或多种心脏异常:充血性心力衰竭、由于二尖瓣关闭不全导致的心脏杂音恶化、或心脏传导障碍的迹象。在其它实施方式中,患者具有正常的ECG。在该方法的另一个实施方式中,患者患有稳定型心绞痛。在方法的其它实施方式中,以单剂量、或一个以上的剂量、或持续施用B型利尿钠信号肽片段剂。在该方法其它实施方式中,B型利尿钠信号肽片段剂,同葡萄糖或钾盐或其组合共施用。

[0354] 本发明还包括治疗患有稳定型心绞痛患者的方法,包括施用B型利尿钠信号肽片段剂。在进一步的实施方式中,持续一段时间,包括预定的时间段,持续施用。

[0355] 本发明还提供用于在有需要的患者上进行血管成形术的方法,包括在血管成形术操作过程中向患者施用B型利尿钠信号肽片段剂。在进一步的实施方式中,所述方法包括或进一步包括在血管成形术操作前向患者施用B型利尿钠信号肽片段剂。在进一步的实施方式中,所述方法包括或进一步包括在血管成形术操作后向患者施用B型利尿钠信号肽片段剂。在其它实施方式中,在血管成形术操作之前、期间和/或之后,以任何组合,向患者施用B型利尿钠信号肽片段剂。

[0356] 本发明还包括用于治疗患者的方法,所述患者患有缺血性心脏病、或处于发展为缺血性心脏病风险的患者,包括表现出以下一种或多种症状的患者:恶心、气短、心悸或头晕,并且其中患者不表现出胸痛,方法包括向患者施用治疗有效量的B型利尿钠信号肽片段剂,其中所述患者未患Q波MI或STEMI。在该方法的另一个实施方式中,患者具有正常的ECG。

[0357] 本发明还提供用于在第一次心脏窘迫(distress)症状之后延长溶栓疗法有效时间的方法,包括在以下一种或多种症状发作后施用治疗有效量的B型利尿钠信号肽片段剂:持续时间大于15分钟的胸痛、静息时胸痛、最轻微活动后的胸痛、恶心、气短、心悸或眩晕。

[0358] 在另一个方面中,被治疗的受试者是哺乳动物,优选人。其它哺乳动物包括家养动物和农场动物,以及动物园、运动或宠物动物,如狗、马和猫。

[0359] 在一个方面,本发明涉及B型利尿钠信号肽片段剂和任选另一心血管治疗剂的持续施用。在一个实施方式中,所述试剂持续施用至少约0.5小时、约1-24小时、至少约2小时、至少约3小时、至少约4小时、至少约5小时、在至少约6小时、至少约7小时、至少约8小时、至少约9小时、至少约10小时、至少约11小时、至少约12小时或至少约24小时。

[0360] 治疗受试者的任何方法,可使用此处所述的任何剂量、剂型、制剂、组合物和/或装

置的施用,其中受试者患有或疑似患有或易患此处引用或所述的某种疾病、病症和/或病况。

[0361] 参考以下非限制性实验部分来更好地理解本发明,非限制性实验部分是说明性的,并非旨在以任何方式限制本发明或权利要求。如所述,描述了用于支持此处所述化合物和组合物用于治疗心血管疾病、病症和/或病况的用途的数据。

[0362] 实施例

[0363] 数据显示BNPsp(17-26)从循环中快速清除。然而,出乎意料且令人惊讶地发现,化合物如例如BNPsp(17-26),通过实施例的方式,在实验性心肌缺血和梗塞中可以作为保护/治疗剂发挥作用。

[0364] 动物模型可用于测试向个体施用本发明的化合物的效果,所述个体患有心血管疾病,如不稳定型心绞痛,例如ACS范围内的疾病,而无论其是否曾遭受过真正的梗塞。发现大鼠模型和羊模型尤其适用于这一目的。在大鼠中,40min缺血期的最后3分钟期间以及之后整个2小时再灌注期所施用的BNPsp(17-26)显著降低了梗塞大小(-30%),大鼠还显著改善了血液动力学。在羊中,亚临界缺血(subcritical ischemia)后的再灌注期间施用BNPsp(17-26)显著降低了顿抑期(stunning period)。

[0365] 提供了显示本发明化合物(如BNPsp(17-26)和例如其它BNPsp片段)的心脏保护特性的方法。实施例包括显示在体外分离的大鼠心肌缺血模型在、和在心肌梗塞体内羊模型中心脏保护的实验。

[0366] 实施例1

[0367] 大鼠心肌缺血模型

[0368] 分离的大鼠心脏。用戊巴比妥钠(50mg/kg i.p.)麻醉重250g-350g的雄性Sprague-Dawley大鼠,并颈椎脱臼处死。按照之前所述制备分离的、Langendorff灌注的大鼠心脏模型(set up)。Pemberton等人Ghrelin induces vasoconstriction in the rat coronary vasculature without altering cardiac peptide production. Am J. Physiol (Heart and Circ. Physiology) 2004;287:H1522-H1529; Piuhola等人Direct Cardiac actions of erythropoietin(EPO): effects on cardiac contractility, BNP secretion and ischemia-reperfusion injury. Clinical Science 2008;114:293-304。

[0369] 在左心室用充满液体的球囊测量左心室舒张末压(LVEDP)、发展压(DP)以及左室内压的最大和最小衍生(分别是 $+dP/dt_{\text{最大}}$ 和 $-dP/dt_{\text{最小}}$)。用主动脉根部上方的侧臂套管(cannula)监测灌注压。用蠕动泵(Gilson Minipuls, 型号MP-2)维持12mL/min的恒定流速。奥塔哥大学,基督城医学院的动物伦理委员会批准研究方案。研究符合美国国家卫生研究院发布的Guide for the Care and Use of Laboratory Animals(NIH公开号85-23,1996年修订)。

[0370] 缺血-再灌注规程。使用放置在右心房的电极(15V, 1ms, 300bpm)采用刺激器(Digitimer Ltd., 英国)产生节奏(paced)来制备缺血-再灌注实验。监测心脏所安置的湿润室中的温度,以便在整个实验期间保持在35-37°C之间。在这组实验中,评价了增加BNPsp(17-26)剂量(0.1、0.3、1.0、3.0和10.0nMol/L)的心脏保护作用。这些剂量相当于约0.1、0.3、1.0、3.0和10-11 $\mu\text{g/L}$,且可施用的重量剂量为约400、1000、4000、10000和39000ng/kg或约0.4、1.0、4.0、10和39微克/kg。在两种不同的策略下比较剂量:(1)在45分钟的全缺血

(“PRE”)之前的预处理作用,以及(2)在120分钟的再灌注(“IDR”)开始时给出的直接“实时”作用。在缺血前或再灌注开始时分别给予30分钟治疗。再灌注期间,重新开始冠状血流后35分钟,通过调节心室内球囊体积将LVEDP暂时设置为5mmHg,以获得和舒张末压可比性的收缩参数。

[0371] 灌注液cTnI和肌红蛋白的测量。在医院实验室高通量分析仪上(Abbott Architect, Canterbury Health Laboratories, Christchurch Hospital, New Zealand), 采用最新一代的cTnI分析测量分离的心脏灌注液中的心肌钙蛋白I(“cTnI”)水平。在 Abbott Architect i2000分析仪上使用化学发光微粒免疫分析(Canterbury Health Labs, Christchurch, New Zealand)测量肌红蛋白。

[0372] 还分析组织的凋亡标志物,即TUNEL染色和半胱天冬酶3鉴定。进行台盼蓝排除法(PBS中0.4%的台盼蓝)以提供坏死细胞的估计。分析梗塞范围内的三个区域。数表示为250个细胞中坏死细胞的百分比。

[0373] TUNEL染色。如先前所报道的,使用Chemicon International的试剂盒根据制造商的规程,检测福尔马林固定的LV游离壁切片的DNA片段化(末端脱氧核苷酸转移酶介导的UTP末端标记(TUNEL)分析)。Piuhola等人, Direct Cardiac actions of erythropoietin (EPO): effects on cardiac contractility, BNP secretion and ischemia-reperfusion injury. *Clinical Science* 2008 114: 293-304。针对每个心脏,中间心室水平处的横截面被用来染色,计数所有的TUNEL阳性细胞。用DAPI复染切片以确定细胞的总数。

[0374] 切割的半胱天冬酶-3的免疫组织化学检测。半胱天冬酶-3是凋亡级联末端效应物之一。它作为非活性的32kDa蛋白存在于细胞中,并在凋亡细胞中被切割成20/17kDa的活性形式。使用用于检测切割的半胱天冬酶-3的免疫组织化学技术。简言之,将福尔马林固定的切片进行脱蜡,再水化并在1%过氧化氢中孵育30分钟以猝灭内源性过氧化物酶。用热进行抗原回收后,将切片与识别半胱天冬酶-3切割形式的多克隆兔抗体(Cell Signaling Technology, Beverly, MA)在4℃孵育过夜。用缀合至羊抗兔免疫球蛋白的过氧化物酶标记的聚合物(DAKO Corporation, Carpinteria, CA)检测一抗结合,二氨基联苯胺溶液(DAKO)用作底物。用苏木精轻轻复染组织。PBS替代一抗作为这些实验的阴性对照。在每个样本中,计数每7个随机选择的40×物镜视野中半胱天冬酶-3阳性细胞的平均数。

[0375] 线粒体和胞质蛋白的分离。在含有250mM蔗糖、10mM Tris、1mM EDTA、蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的缓冲液中匀浆心脏LV游离壁。以1000g将裂解物离心5分钟以沉淀未破裂的细胞和细胞核。以13,000g将上清进一步离心20分钟以沉淀线粒体。将沉淀重悬于匀浆缓冲液中,并进一步用相同的缓冲液洗涤两次。最后,将线粒体沉淀重悬于由150mM NaCl、20mM Tris、10mM EDTA、1%NP-40、蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的溶解缓冲液中。在冰上孵育30分钟后,以13,000g将裂解物离心10分钟以沉淀不溶性物质。以100,000g将上清进一步离心60分钟以分离胞质馏分(上清)。

[0376] 在分离的灌注的大鼠心脏中评价BNPsp(17-26)的活性。质谱用来记录,在分离的大鼠心脏灌注液样本中,添加未修饰BNPsp(17-26)的氧化应激反应产物。对两个样本进行了分析:第一是,在分离的心脏灌注液中,没有流经缺血性心脏的10nmol/L未修饰的BNPsp(17-26);第二是,流经经历45分钟无血流的缺血大鼠心脏的10nmol/L BNPsp(17-26)。在再灌注时加入BNPsp(17-26),流动开始3分钟后收集样本。

[0377] 在固相柱(catridge)上提取灌注液样本(Pemberton等人,Ghrelin induces vasoconstriction in the rat coronary vasculature without altering cardiac peptide production.Am J.Physiol(Heart and Circ.Physiology)2004287:H1522-H1529)并且使用60%乙腈/0.1%三氟乙酸(TFA)的等梯度通过尺寸排阻高效液相色谱法(SE-HPLC)进一步纯化。通过免疫分析定量免疫反应性BNPsp(17-26)(Piiuhola等人,Direct Cardiac actions of erythropoietin(EPO):Effects on cardiac contractility,BNP secretion and ischemia-reperfusion injury.Clinical Science2008114:293-304)然后通过基质辅助激光解析/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)进行结构上的评价。在正离子模式下,以每个样本点800-1000激光脉冲获得所有的MS谱。每个样本点最多六个前体离子(precursor ion)被选择用于MS/MS碰撞诱导的片段化(CID)分析。通过LC-MS³LTQ-OrbitrapXL质谱仪(Thermo Scientific, San Jose, CA)分析BNPsp(17-26)结构上的修饰。使用线性离子阱从m/z400-1400的质量范围通过全面质量扫描监测洗脱肽。双电荷肽的预测m/z值选为触发后续扫描事件的独特前体质量。

[0378] 统计分析。结果显示为平均值±平均值的标准误差(SEM)。适时,采用单向(one-way)或重复测量ANOVA进行多组比较,随后通过事后检验(post hoc test)用于最小显著差异(least significant differences)。对于两组之间的比较,采用学生t检验。显著性指定于P<0.05处。所有的统计分析均采用SPSS进行(版本17)。

[0379] 结果

[0380] 制备分离的大鼠心脏。相较于仅使用空白缓冲液的对照输注,45分钟缺血的前30分钟(前)、或其后立即的30分钟(IDR)输注BNPsp(17-26)导致心收缩(发展压,图1,组A)和血管张力(灌注压,图1,组B)的显著改善。因此,对照发展压返回到只有缺血前数值的约75%,然而,缺血前输注0.3nmol/L或缺血后输注1nmol/L BNPsp(17-26)发展压返回到缺血前数值的110-120%之间(P<0.01)。观察剂量反应的部分,且预输注0.3nmol/L BNPsp(17-26)具有缺血前正性肌力作用的趋势。同样,通过缺血前输注0.3nmol/L BNPsp(17-26)(P<0.01)以及缺血后使用0.3和1nmol/L BNPsp(17-26)(P<0.05,图1,组B)很好地保持缺血后再灌注期间的血管张力。

[0381] 与血液动力学的的数据相符,当缺血前或缺血后给予BNPsp(17-26)时,心脏生物标志物分析显示缺血后再灌注期间明显且显著的TnI和肌红蛋白释放减少。缺血后再灌注(IDR)的示范性结果,示于图1,组C和D。因此,0.3和1nmol/LBNPsp(17-26)均导致约20%的对照输注TnI释放(组C,P<0.01)以及约60%的对照肌红蛋白释放(组D,P<0.05)。鉴于TnI和肌红蛋白释放都与心肌梗塞的面积和随后预后(死亡率,不良事件)关联,这些实质性BNPsp(17-26)引发的减少有有意义的临床应用。

[0382] 使用BNPsp降低的序列变体进一步的分析揭示心脏治疗和心脏保护作用。

[0383] 综上所述,这些结果支持了BNPsp信号肽片段剂在心脏疗法和心脏保护领域有利的临床应用(任何原因引起的缺血发作期之前和之后)。

[0384] 这些数据支持这样一个概念,人BNPsp(17-26)及其更短的羧基端截短版本以及其N端添加肽的变体是强大的、临床上有用的心脏治疗和心脏保护试剂。因此,在急性心脏冠状动脉综合征以及此处提到的其它疾病、病症和病况中使用这些肽序列的临床潜能是强大的。其它哺乳动物和低级脊椎动物形式的BNPsp序列、变体、衍生物和类似物也将具备这样

的治疗和保护特性。

[0385] 实施例2

[0386] 羊模型

[0387] 数据显示BNPsp(17-26)迅速从循环中清除。但是,意外和惊讶地发现,如此处所示,在实验性心肌缺血和梗塞中未修饰的BNPsp(17-26)可以作为新型保护/治疗剂。本实施例表明该化合物是安全的。

[0388] 在两个正常健康的羊中输注BNPsp(17-26)(在分离的大鼠心脏中达到发现有利生物活性的循环水平)不产生可检测的血液动力学、肾功能或循环生物标志物的变化(图2所示范例中的心输出量)。这在正常健康中是有利的情况(profile)。

[0389] 实施例3

[0390] 大鼠心肌缺血模型

[0391] 心肌缺血损伤心脏的离体分离灌注大鼠心脏模型。在本实施例中,使用超过100只雄性Sprague-Dawley大鼠,全部为雄性。全麻醉下取出心脏,放在我们的试验装置中,其设置如实施例1所述。用含葡萄糖和钙的标准常用缓冲液系统(含葡萄糖来提供能量以及含钙来确保保留心脏的内在跳动活性)灌注心脏。平衡后,我们进行两种类型的实验。首先,在40分钟的全缺血之前,我们用空白对照(缓冲液本身)或人BNPsp(17-26)输注心脏30分钟(简称:这被称为预处理)。第二,缺血后,我们用空白或人BNPsp(17-26)输注心脏(简称:这被称为再灌注处理),其更加贴近地模拟真实的临床情况(即,考虑到医生只能在心脏发作后启用Tx发生后疗法)。感兴趣的终点是改善缺血后心脏收缩、减少心肌钙蛋白释放、改善缺血后冠状血压、减少梗塞面积。在实验结束时,在左心室游离壁区进行活检用于随后确定凋亡标志物(TUNEL染色、半胱天冬酶3)和ERK1/2、PI3K、Akt和GSK-3 β .4的蛋白印迹。

[0392] 在过夜固定在10%甲醛中并且存放在石蜡中的左心室游离壁的样本上进行TUNEL染色。染色前,用盐水缓冲液进行切片再水化,用0.3%H₂O₂孵育阻断内源性过氧化物酶活性。按照制造商的规程(Chemicon International)进行TUNEL染色。计数TUNEL阳性细胞的平均数,并报告为每个样本中每10个随机选择的400 \times 物镜视野中全部细胞计数的比。

[0393] 在单独的玻片上,而不是为TUNEL染色所制备的玻片上进行半胱天冬酶3染色。染色前,玻片再水化并用1%(V/V)H₂O₂孵育。用针对半胱天冬酶3活化形式的多克隆兔抗体(Cell Signalling Technology)在4 $^{\circ}$ C孵育心脏若干小时。用缀合有羊抗兔IgG抗体的过氧化物酶标记的聚合物(DAKO)检测一抗结合。然后用苏木素轻轻复染玻片。在 \times 400放大处拍摄玻片。

[0394] 分离的大鼠心脏数据

[0395] 人BNPsp(17-26)降低缺血期间引起的对心脏组织的损伤。当接受空白的心脏经历40分钟的全缺血时,它们恢复到缺血前收缩功能的约70%(发展压)。对于预处理和再灌注治疗的心脏而言,这是真的。与此相反,用BNPsp(17-26)预处理或治疗的心脏恢复到其缺血前收缩功能的略超过100%(图3)。因此,当考虑对照相对于0.3nmol/L BNPsp(17-26)时,在输注0.3nmol/L浓度期间显著提高收缩性(+15.4%,与对照相比, $P=0.003$)。更重要的是,在缺血后的再灌注期间,在BNPsp(17-26)处理的心脏中(0.1-0.3nmol/L+21%与对照组相比, $P=0.007$),存在发展压的统计学显著改善。分析表明对照与0.1和0.3nmol/L之间的显著差异,这两个浓度在整个所有分析时间点均实现了改善的收缩性。

[0396] 伴随着发展压的改善,BNPsp(17-26)诱导冠状血管张力的改善,使得降低了缺血后的冠状血管收缩(图5)。再灌注阶段期间,各组间的灌注压存在显著变化。与对照值相比,使用post-hoc分析的重复测量ANOVA确定了0.1-0.3nmol/LBNPsp(17-26)剂量时再灌注血管压力的显著降低(-25至-50%, $P=0.008$)。再灌注后立即出现这些效果并一直持续到采样期结束。

[0397] 在此之后,在分离的大鼠心脏中仅进行再灌注实验。在再灌注时接受0.3-1.0nmol/L BNPsp(17-26)的大鼠心脏中,与对照值相比心脏收缩功能显著改善(图6)。再灌注阶段期间,在研究施用0.3和1nmol/L的BNPsp(17-26)的心脏中观察到改善的收缩性(分别为+7%和+26%相对于对照, $P=0.003$)。

[0398] 与此相应,再灌注的灌注压和心肌钙蛋白释放在接受BNPsp(17-26)的心脏中也得以改善(图5)。再灌注期间,与对照组相比,施用0.3和1nmol/L的BNPsp(17-26)的心脏具有较低的平均灌注压(-10%, $P<0.05$)。

[0399] 和这种积极的血液动力学情况(profile)相符,在接受BNPsp(17-26)的心脏中显著减少肌钙蛋白I从缺血心肌的释放。因此,与对照相比,在施用0.3nmol/L($P<0.05$)BNPsp(17-26)的心脏中累积肌钙蛋白I释放存在50%的减少,在接受1nmol/L BNPsp(17-26)的心脏中是66%的减少($P<0.01$)。

[0400] 我们还调查了BNPsp(17-26)对细胞凋亡和坏死标志物的影响。图8显示BNPsp(17-26)的细胞保护作用,如HE染色所确定的,如以BNPsp(17-26)治疗的肾脏形式中改善的完整性和更少的破坏所表明的。

[0401] 半胱天冬酶-3活性染色示于图9。在BNPsp(17-26)治疗的肾脏中半胱天冬酶-3阳性细胞显著减少(由棕色着色表示)。

[0402] 用TUNEL的染色揭示BNPsp(17-26)治疗的肾脏中更少的棕色着色核,这表明更大程度的DNA完整性和更少的细胞片段化。见图10。

[0403] 实施例4

[0404] 体内心肌梗塞的羊模型(健康的以及)

[0405] 在羊中体内心肌缺血期间输注人BNPsp(17-26)也会导致对心脏收缩功能的有益作用、显著减少坏死生物标志物(肌钙蛋白I,肌红蛋白)的释放、以及显著降低伴随缺血后重塑的心室壁应激异常。

[0406] 在这组实验中,以100-1000ug/kg.min⁻¹用人BNPsp(17-26)输注四只正常健康羊,来记录对正常血压、心率或肾功能的任何作用。进行这一实验以确定响应给定剂量时达到的BNPsp(17-26)循环水平,并记录对血液动力学、肾或激素指标的任何显著作用。

[0407] 在8个假(Sham)手术和7个实验羊中,进行实验性心肌梗塞。在麻醉下用颈静脉和颈动脉通路导管、ECG电极以及SwanGanz导管外科手术准备每只羊以测量心输出量。通过可释放的圈套器(snare),使得所有15只羊经历LAD冠状动脉第二斜角支(diagonal)的90分钟缺血。开始缺血前30分钟,每只羊接受(取决于它们的组)120分钟的生理盐水或500ng/kg/min BNPsp(17-26)。因此,这项研究是预处理和设计期间。麻醉前以及而后在-10、堵塞(0)、0+30、0+60、0+90,然后在120、150、240和360分钟以及5、24和48小时进行连续的血液动力学记录和静脉血取样。在堵塞之前、期间和之后30分钟,进行连续的超声心动图(在短轴平面的底、中和尖部区域)。

[0408] 以100-1000ug/kg.min⁻¹在四只正常的羊中输注人BNPsp(17-26)对血液动力学、肾或激素指标无显著作用(图11)。在羊中,BNPsp(17-26)从循环中的清除非常快,以分钟的量级计。这表明血浆半衰期小于1分钟,或非常快速地蛋白水解切割成非免疫反应性的形式。

[0409] 按照这种积极的安全/耐受情况(profile),之后我们向经历冠状结扎诱导的心肌缺血的7只羊施用500ng/kg.min的合成人BNPsp(17-26)。重要的是,当与对照生理盐水的输注相比,BNPsp(17-26)显著降低缺血后的累积心肌钙蛋白I(P<0.01)的释放(图12)。

[0410] 实施例5

[0411] 体内缺血期间形成的BNPsp(17-26)代谢物的分析

[0412] 在本实施例中,评价人BNPsp(17-26)降解成代谢物。使用两种方法。第一个实验中,使用离体设置,其中40分钟缺血后再灌注时,向分离的大鼠心脏输注1nm BNPsp(17-26)。设置系统使得含有缓冲液的BNPsp(17-26)再循环,从而肽不止一次地穿过心脏暴露于缺血组织。20分钟的再循环后,收集10ml灌注液样本,在Sep Pak C18柱上提取并通过免疫亲和纯化和反相HPLC进行纯化。然后这种纯化的物质进行串联MS/MS来进行精确鉴定。第二个实验在体内,其中心肌缺血期间接受500ng/kg.min BNPsp(17-26)的羊的3ml外周血浆进行纯化用作离体分离的大鼠心脏灌注液并在串联MS/MS上分析。

[0413] 这些实验评价,缺血期间当人BNPsp(17-26)穿过分离的大鼠心脏制备物或整个动物(羊)时降解成代谢产物。在两种设置中,由于氨基端亮氨酸的蛋白水解切割,合成的人BNPsp(17-26)被降解为较小的形式即BNPsp(18-26)。这示于图13。在RP-HPLC上分辨出单一尖峰,并通过串联MS/MS证实是人BNPsp(18-26)。这表明氨基末端对初始降解最为易感。

[0414] 实施例6

[0415] 修饰BNPsp(17-26)氨基酸序列的作用

[0416] 这组实验评价修饰的BNPsp(17-26)肽。这个实验重复了在分离的大鼠心脏模型实施例中的预处理工作,但使用的是BNPsp(17-26)C端切除(ablated)和N端延伸的版本。在40分钟的全缺血以及90分钟的再灌注之前,用0.3nmol/L剂量的BNPsp(16-26)和BNPsp(17-24)预处理心脏30分钟。记录心脏收缩和灌注压指数。

[0417] 在这些最初的实验中BNPsp(17-26)序列的修饰,或者是通过N端添加或者是C端切除,在分离的心脏中所观察到的对响应的作用示于图14。重要的是,在位置16上向N端添加苯丙氨酸(F)(从而产生BNPsp(16-26))给出和BNPsp(17-26)相同的血液动力学保护情况(profile)。删除两个C端氨基酸的修饰肽(即,BNPsp(17-24))也有保护作用。

[0418] ***

[0419] 此处引用或提及的所有专利、出版物、科学文章、网站、以及其它文献和材料指示着本发明所属领域技术人员的水平,每个这样的参考文献和材料通过参考并入以至于这样一种程度,就如同它已经通过参考其全部单独或如此处所述全部并入。申请人保留将来自任何这种专利、出版物、科学文章、网站、电子方式可获得的信息、以及其它参考材料或文献的任何或所有材料和信息实体(physically)并入本说明书的权利。

[0420] 此处描述的具体方法和组合物代表优选实施方式并且是示例性的,并不旨在限制本发明的范围。当考虑本说明书时,本领域技术人员将想到其它目的、方面和实施方式,并且涵盖在权利要求的范围所限定的本发明精神范围内。不脱离本发明的范围和精神对此处

公开的本发明所进行的不同替换和修饰,对于本领域技术人员而言是显而易见的。在缺少此处未具体披露为必不可少的任何要素、或限制时,可以适当地实施此处示例性所述的本发明。因此,例如,在此处每一个实例中,在本发明的实施方式或实施例中,任何术语“包括”、“基本上由.....组成”和“由.....组成”可以被替换为说明书中的其它两个术语的任一个。此外,术语“包括”、“包含”、“含有”等应得以广泛地解读而不受限制。此处示例性描述的方法和过程可以按不同的步骤顺序适当实施,它们不一定限于此处或权利要求中所指明的步骤顺序。如此处以及所附权利要求中所用,除非上下文另有指明,单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数参考。在任何情况下,专利不应被解释为限制于具体的实施例或实施方式或此处所具体公开的方法。在任何情况下,专利不应被解释为受到任何审查员或任何其它官员或专利和商标局工作人员的任何陈述的限制,除非这种陈述是申请人在答复性书面中专门地且毫无条件或保留地明确采纳的。

[0421] 已使用的术语和表达被用作术语描述而不是限制,未意图使用这些术语和表达以排除所示和所描述的任何等同特征或其部分,但是应认识到,各种变化在所要求的本发明范围之内是可行的。因此,将理解虽然通过优选实施方式和任选特征具体公开了本发明,此处公开的概念的变化和改变可诉诸于本领域技术人员,这样的变化和改变被认为属于所附权利要求所限定的本发明范围内。

[0422] 此处已经广泛且概括地描述本发明。落入上位(generic)公开内的每个更窄的种类和下位(subgeneric)分组也构成本发明的一部分。这包括本发明的上位描述以及从该类(genus)中除去任何主题的条件性或负面限制,而不管所排除的材料是否在此处被具体引用。

[0423] 其它实施方式在如下权利要求范围内。此外,当以马库什组的形式描述本发明的特征或方面时,本领域技术人员将认识到本发明,也由此从马库什组的任何个体成员或亚组成员的方面得以描述。

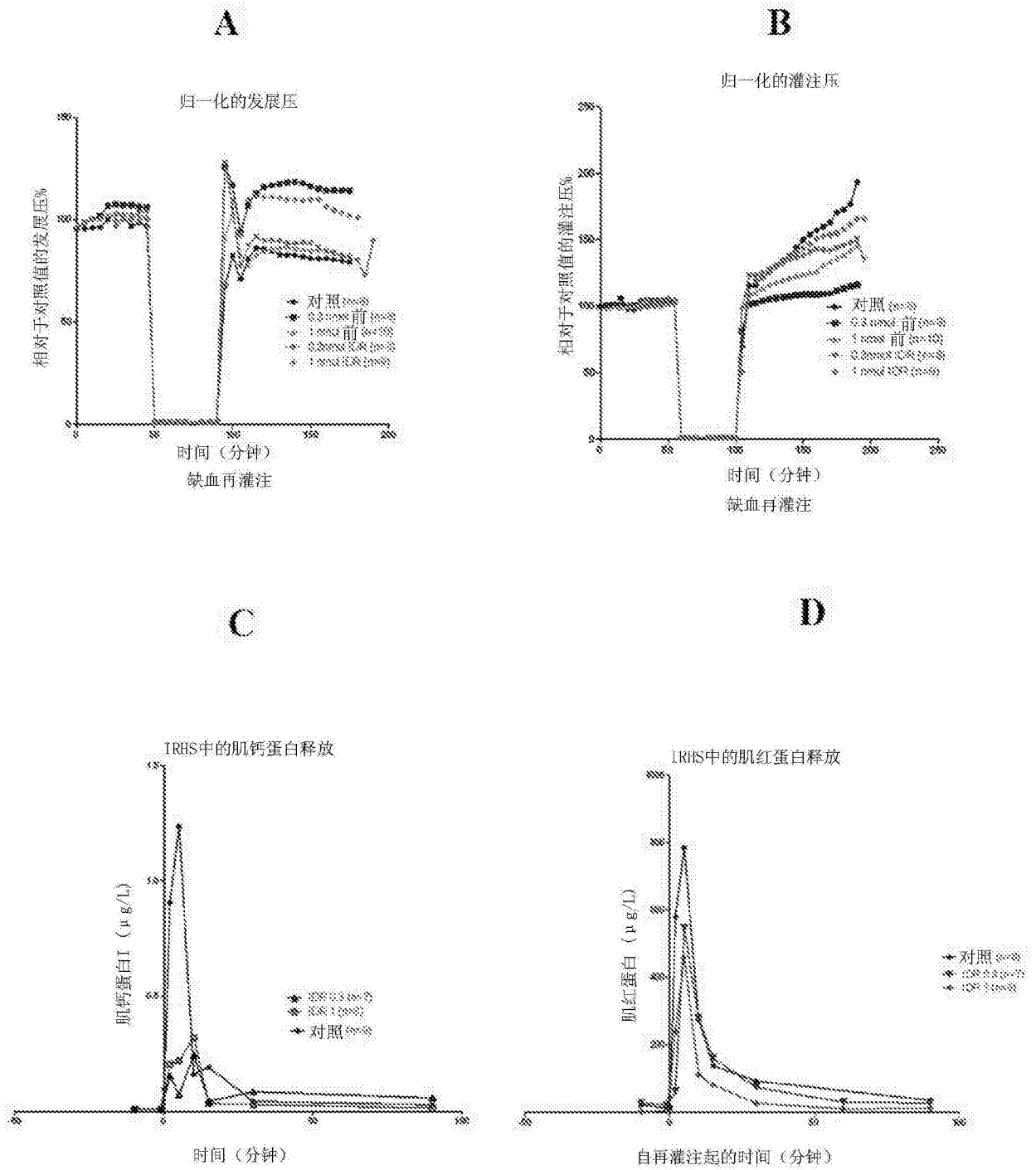


图1

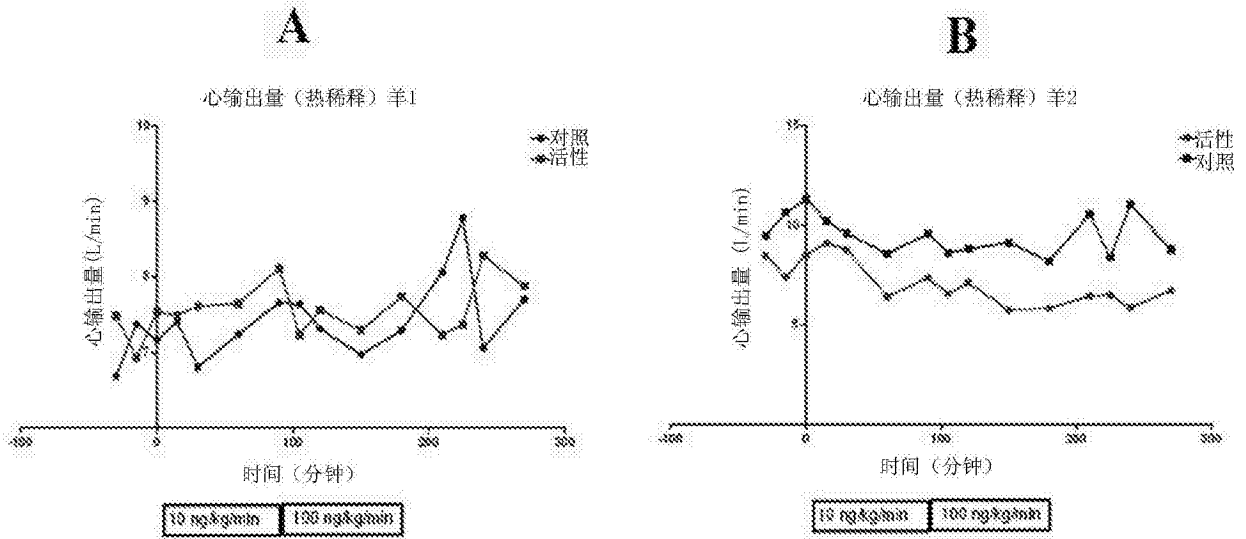
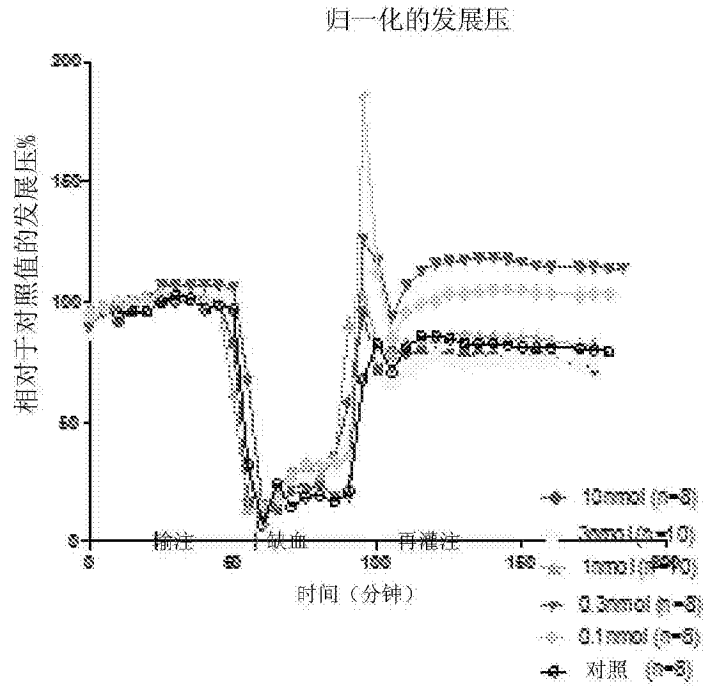


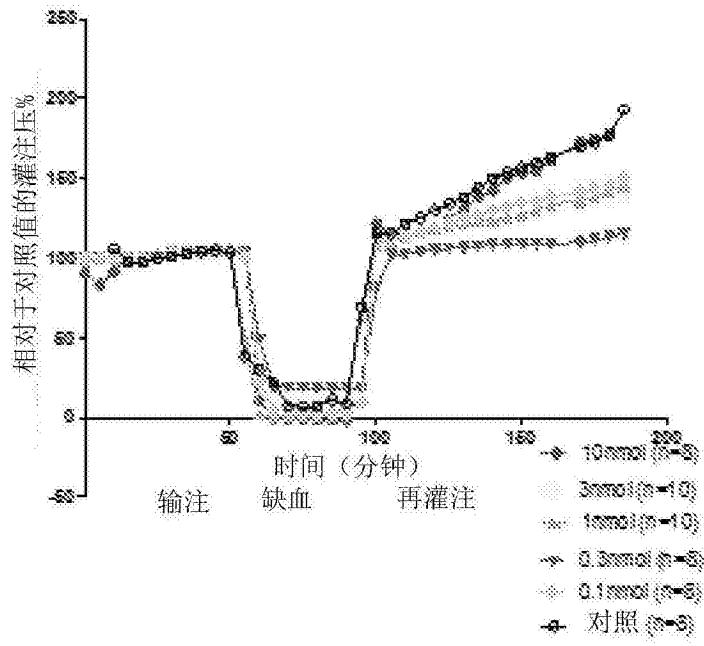
图2



预处理

图3

归一化的灌注压



预处理

图4

累积的肌钙蛋白I释放

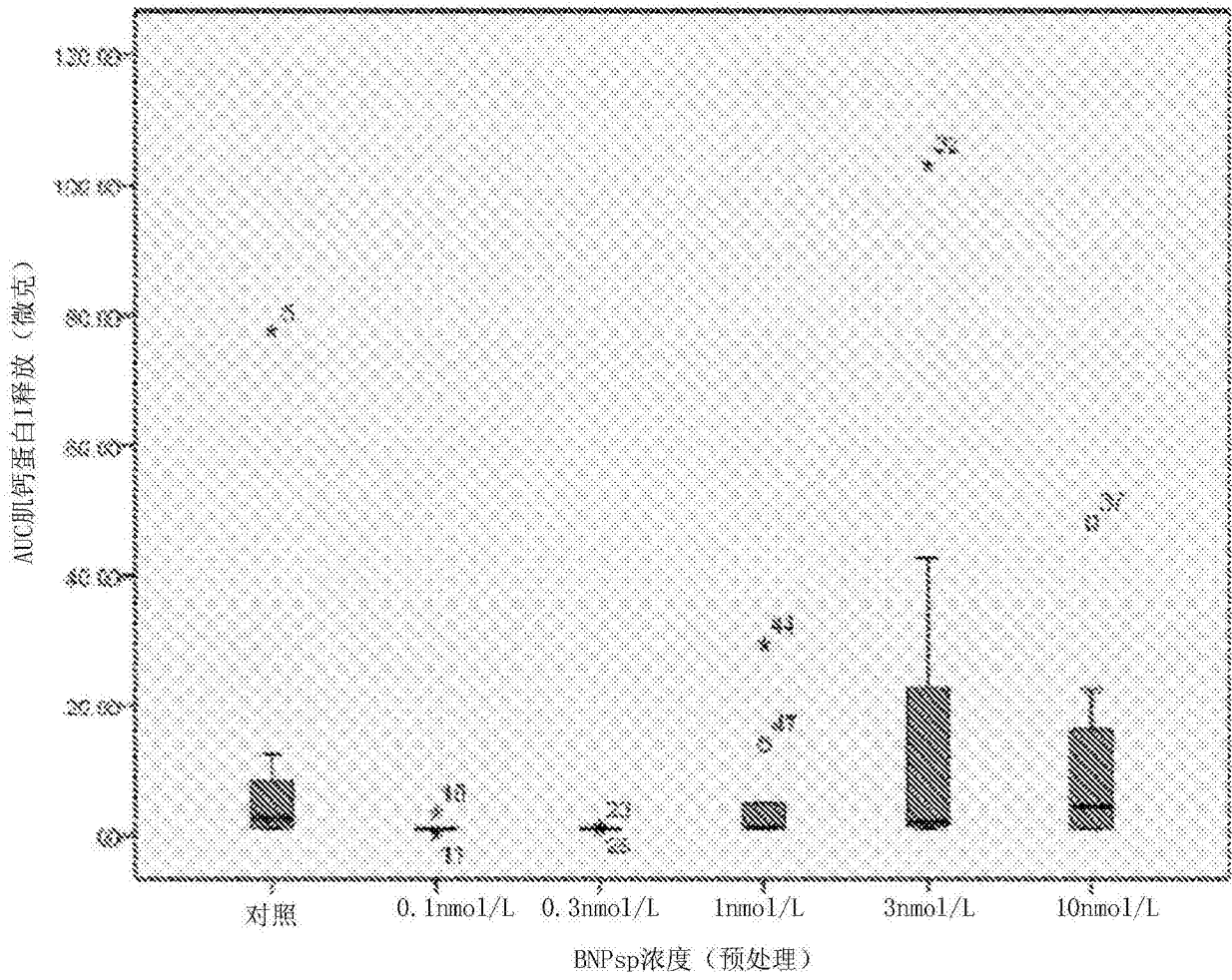
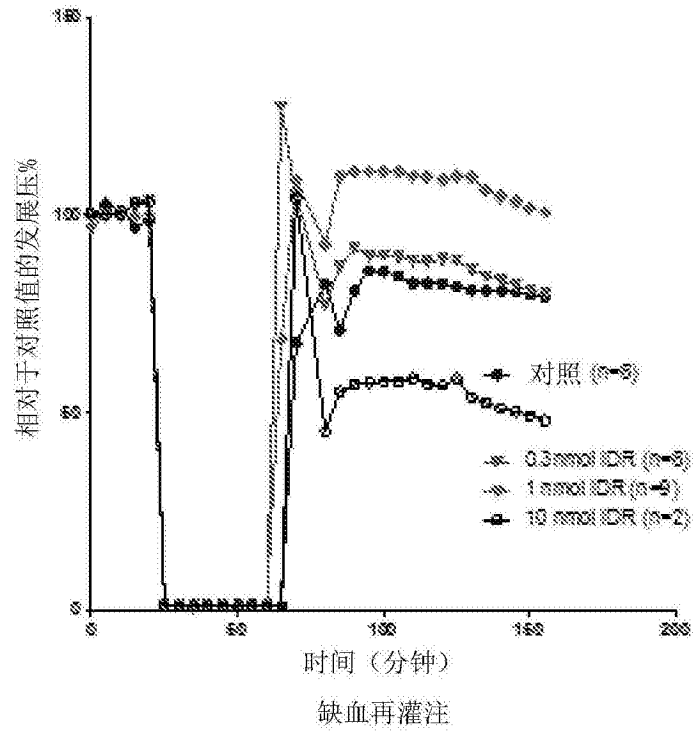


图5

归一化的发展压



再灌注期间输注：输注时间90-150分钟

图6

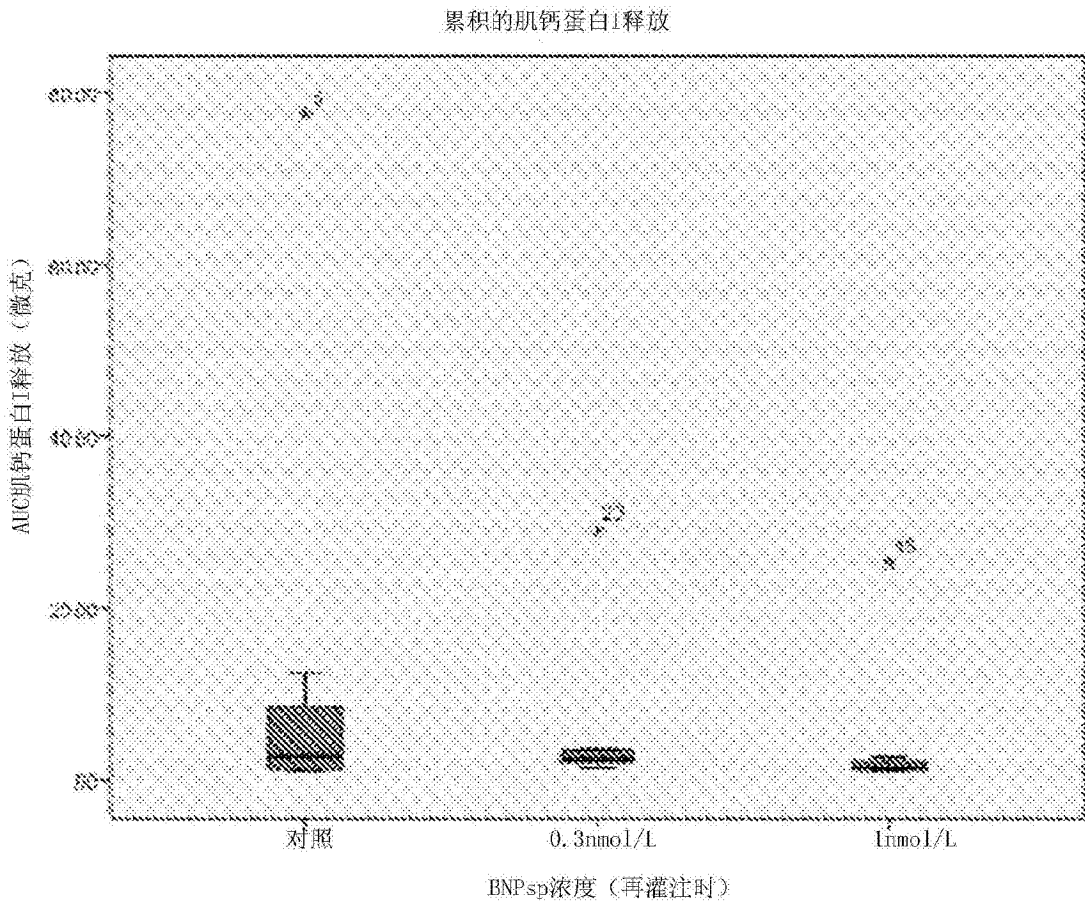
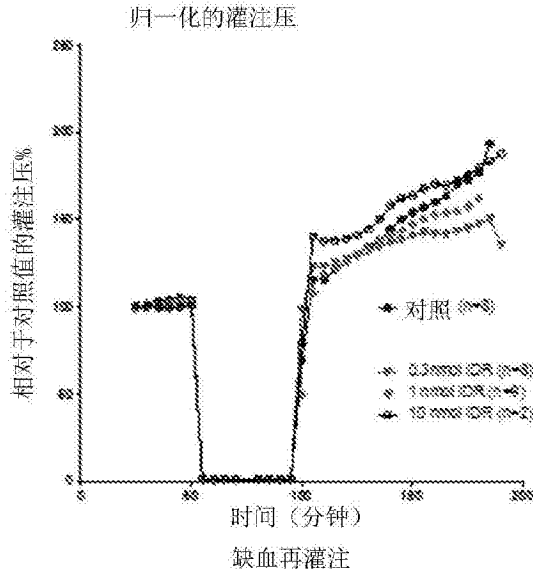


图7

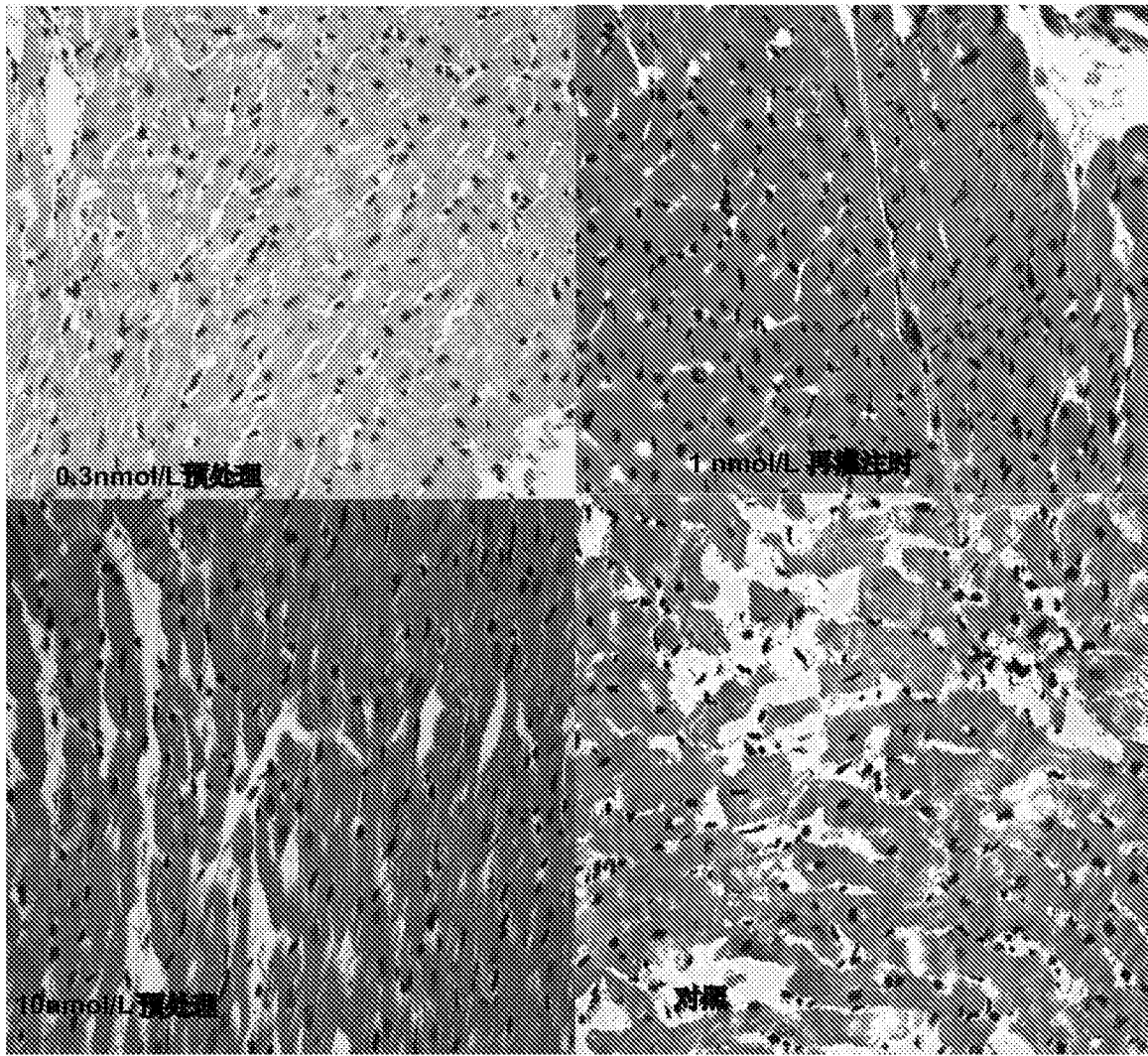


图8

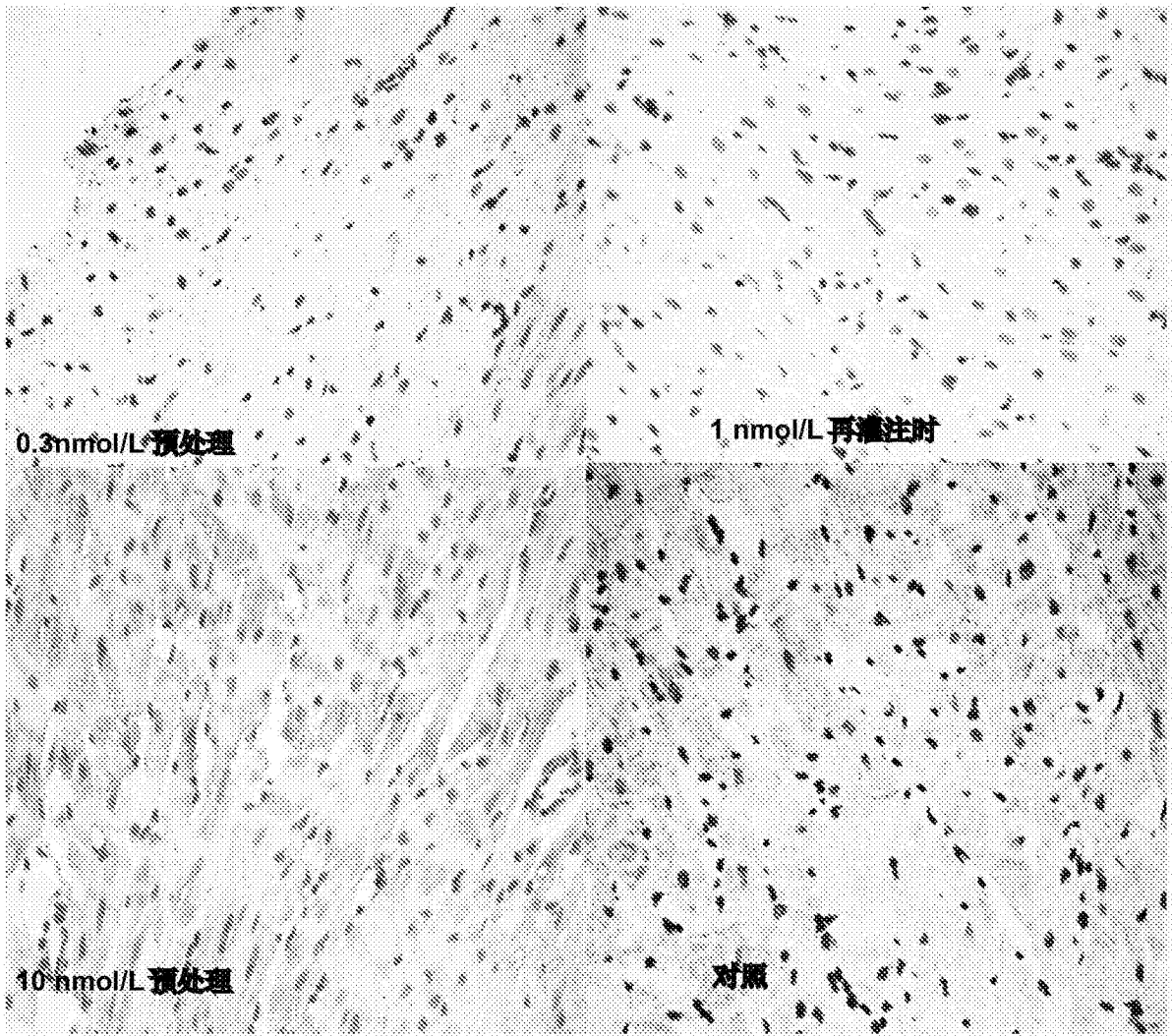


图9

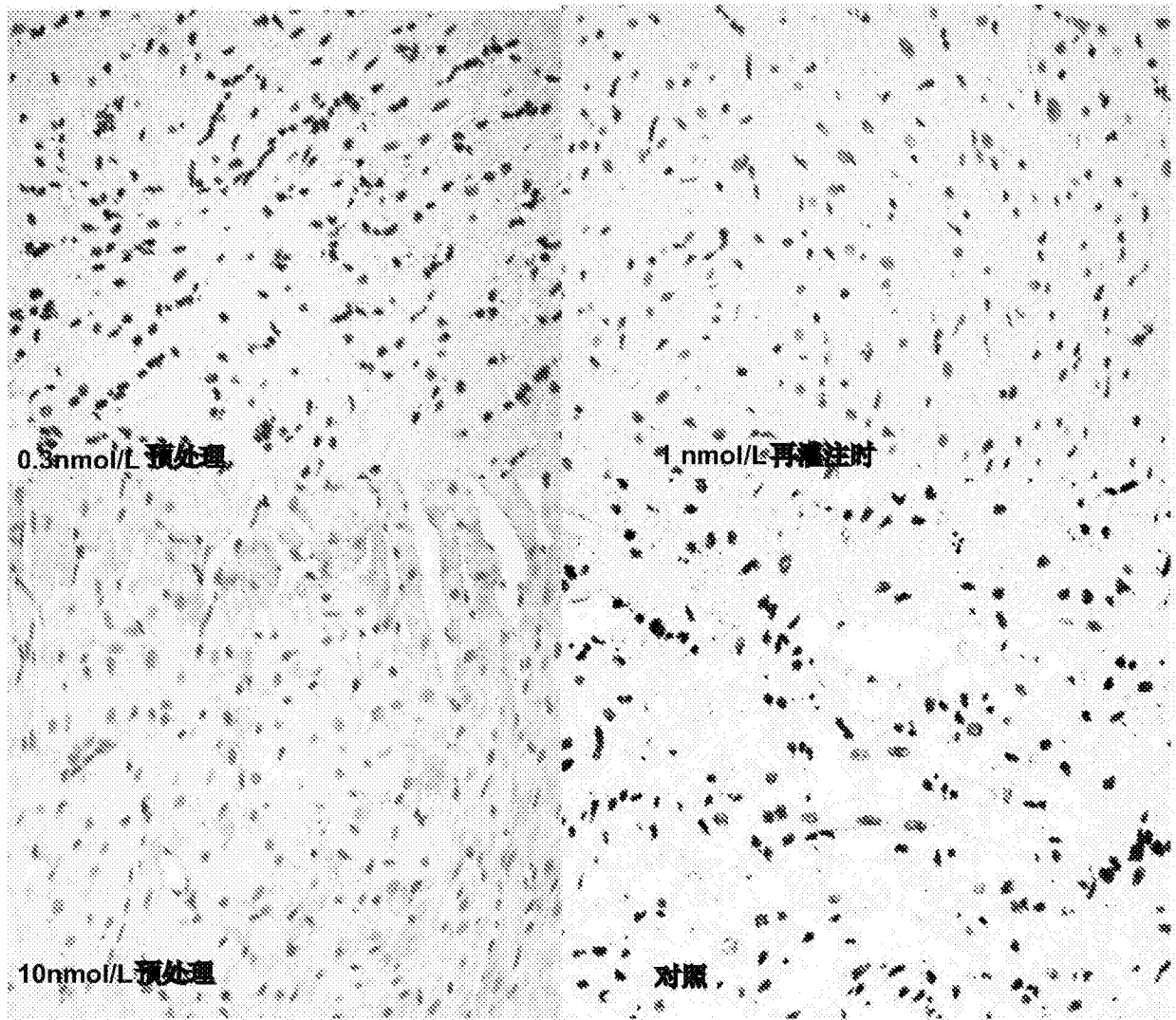


图10

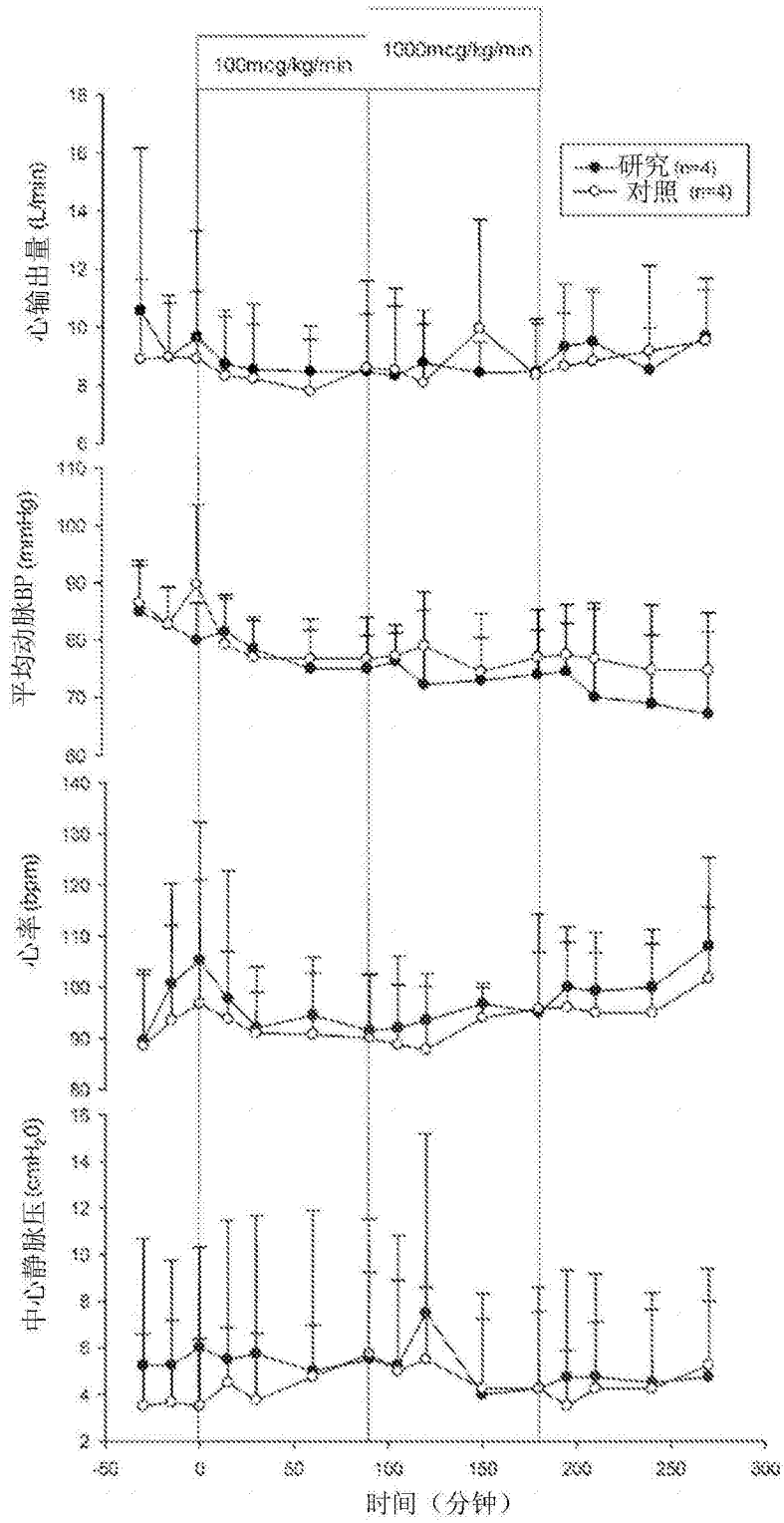


图11

累积的肌钙蛋白I释放 羊梗塞研究

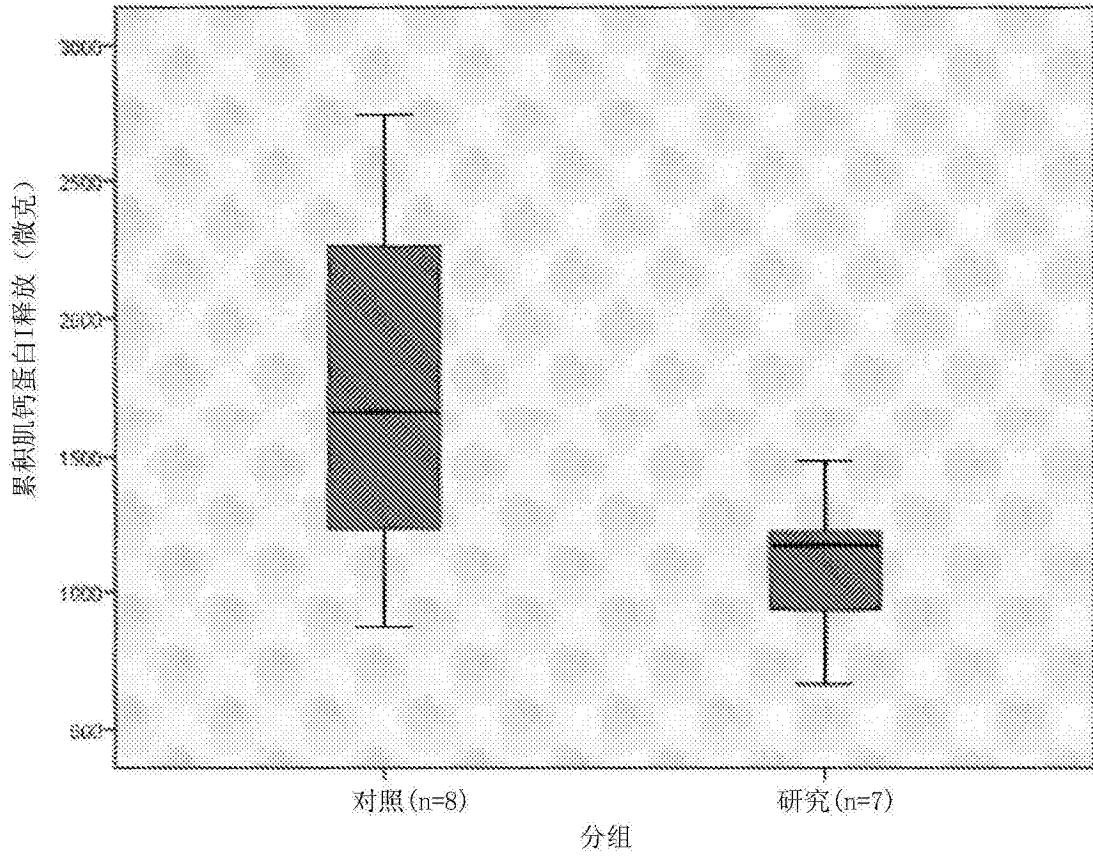


图12

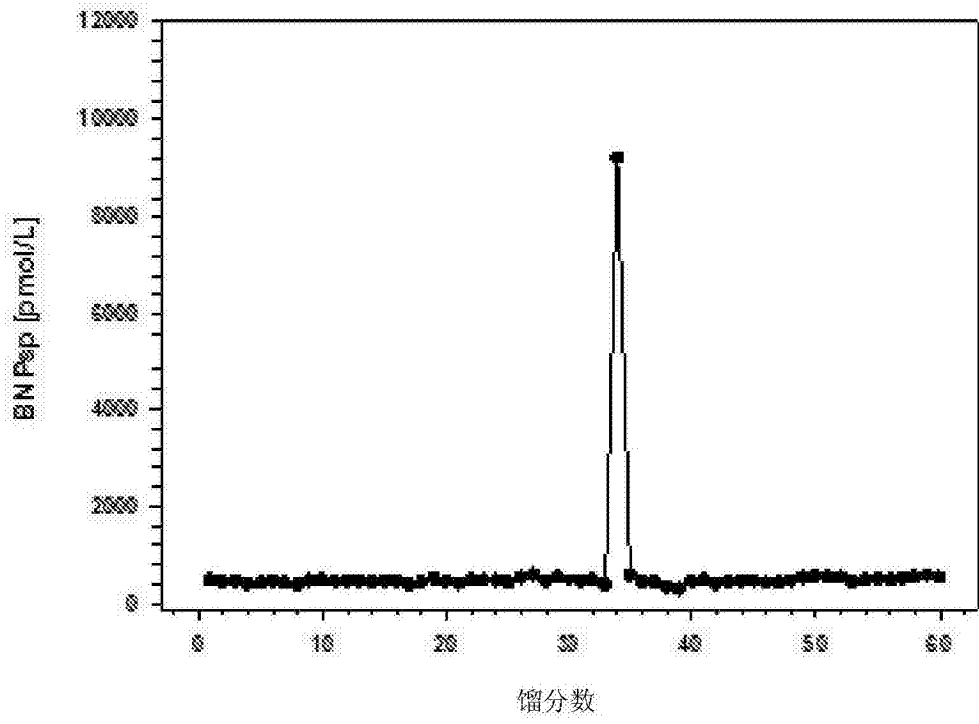


图13

在接受改变的BNP_{sp}序列的分离心脏中的发展压

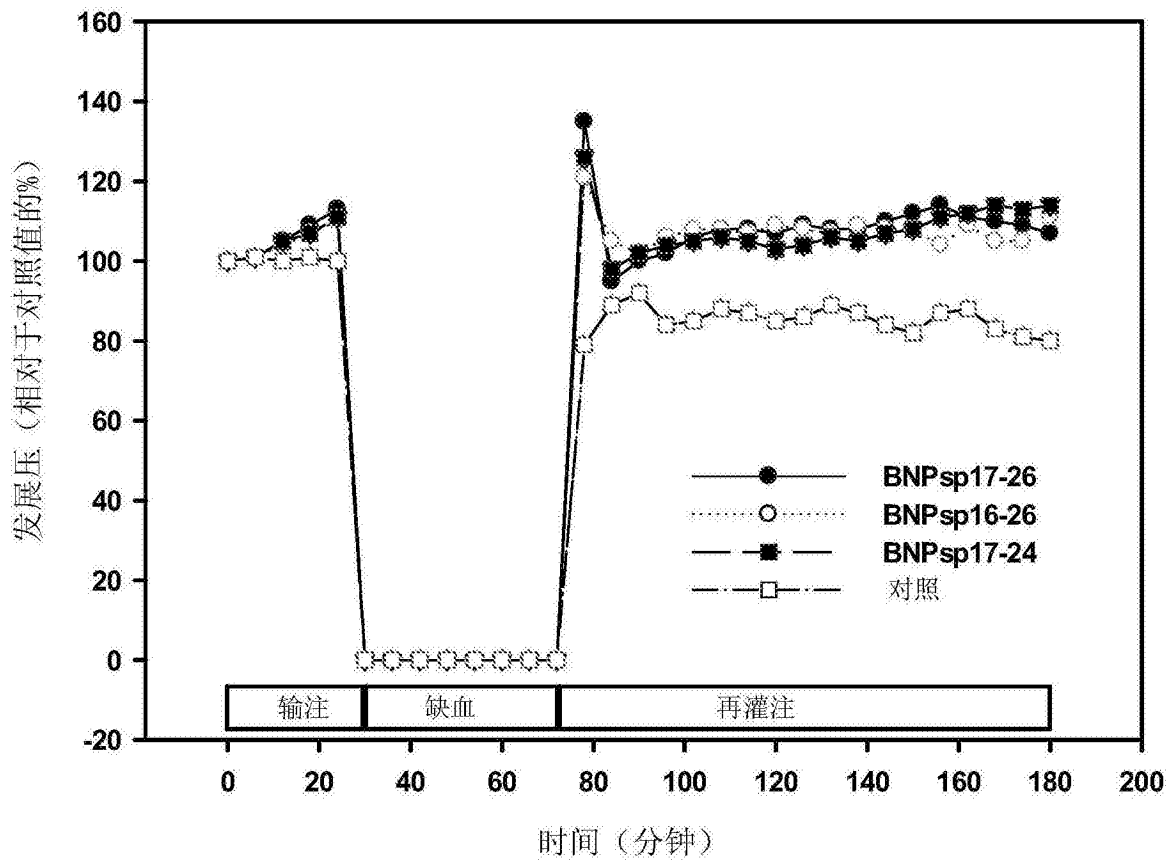


图14