



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101014356 B

(45) 授权公告日 2012.06.13

(21) 申请号 200580012079.9

A61K 38/08 (2006.01)

(22) 申请日 2005.04.08

A61P 13/12 (2006.01)

(30) 优先权数据

10/821,256 2004.04.08 US

(56) 对比文件

US 2003220261 A1, 2003.11.27, 全文.

US 2003220258 A1, 2003.11.27, 全文.

US 2004013661 A1, 2004.01.22, 全文.

WO 0168113 A, 2001.09.20, 全文.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006.10.08

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2005/003707 2005.04.08

审查员 李娟娟

(87) PCT申请的公布数据

W02005/097163 EN 2005.10.20

(73) 专利权人 比奥滕普特公司

地址 荷兰库康厄

(72) 发明人 尼萨尔·艾哈迈德·可汉

罗伯特·本纳

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 林晓红

(51) Int. Cl.

A61K 38/06 (2006.01)

A61K 38/07 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 3 页

(54) 发明名称

用于降低升高的血尿素浓度的寡肽

(57) 摘要

本发明涉及一种降低对象血清中的尿素浓度的方法。该方法包括给对象(例如哺乳动物例如人)施用包含一种(或多种)寡肽的组合物,所述寡肽具有如小鼠肾脏再灌注试验所确定的降低对象血清中的尿素浓度的活性,其中所述寡肽包含序列 QGV 或 MTRV (SEQ ID NO :1) (例如 AQGV (SEQ ID NO :2) 或 MTRV (SEQ ID NO :1))。

1. 寡肽在制备用于降低对象血清中的血尿素氮浓度的组合物中的用途,所述寡肽由 MTRV (SEQ ID NO :1) 或 AQGV (SEQ ID NO :2) 组成。
2. 权利要求 1 的用途,其中所述对象正在遭受急性肾功能衰竭。
3. 权利要求 1 的用途,其中将所述组合物用于肠胃外施用。
4. 权利要求 1 的用途,其中将所述组合物用于口服施用。
5. 权利要求 1 的用途,其中所述组合物包括所述寡肽和 PBS。
6. 权利要求 1 的用途,其中所述寡肽是合成来源的寡肽。
7. 权利要求 3 的用途,其中以每 kg 对象体重 0.25mg 至 10mg 的量给患者静脉内施用所述组合物的寡肽。
8. 权利要求 1 的用途,其中所述组合物包括 1 或 2 种不同的寡肽。
9. 权利要求 1 的用途,其中所述对象正在遭受持续性少尿。
10. 权利要求 1 的用途,其中所述对象的肾脏每小时产生的尿液不超过每 kg 对象体重 1/2ml。
11. 权利要求 9 的用途,其中所述对象具有超过每升血清 6.5mmol 的血清钾水平。

用于降低升高的血尿素浓度的寡肽

技术领域

[0001] 本发明一般性地涉及生物技术,更具体地涉及具有免疫调节活性的组合物,所述组合物包括源自人绒毛膜促性腺激素(hCG)的特殊寡肽。

背景技术

[0002] Herron 的美国专利 5,380,668(1995.1.10)(在此通过引用将其全部内容并入本申请)公开了各种具有 hCG 的抗原结合活性的化合物。其中所公开的寡肽通常被描述为用于诊断方法中。

[0003] Gallo 等的多个专利和专利申请(例如美国专利 5,677,275(对应于 WO 96/04008A1)、美国专利 5,877,148(也对应于 WO96/04008A1)、WO 97/49721A1、美国专利 6,319,504(对应于 WO97/49373)、美国专利申请 2003/0049273A1(也对应于 WO97/49373)、美国专利 5,968,513(对应于 WO 97/49418)、美国专利 5,997,871(对应于 WO 97/49432)、美国专利 6,620,416、美国专利 6,596,688、WO 01/11048A2、WO 01/10907A2 和美国专利 6,583,109)涉及多种寡肽以及它们在“抑制 HIV 感染”、“治疗或预防 HIV 感染”、“治疗或预防癌症”、“治疗或预防以体细胞量丢失为特征的病变”、“治疗或预防与病理性血管发生相关的病变”、“治疗或预防造血缺陷”、“离体基因治疗”、“体外扩增血细胞”和/或“给对象提供血细胞”中的用途。

发明内容

[0004] 与本申请人在 PCT 国际申请 WO 03/029292A2(2003 年 4 月 10 日公开)、PCT 国际申请 WO 01/72831A2(2001 年 10 月 4 日公开)和美国专利申请 20020064501A1(2002 年 5 月 30 日公开)、20030119720A1(2003 年 6 月 26 日公开)、20030113733A1(2003 年 6 月 19 日公开)和 20030166556A1(2003 年 9 月 4 日公开)中所述的那样(在此通过引用将其全部内容并入本申请),含有本申请所述的寡肽中的其中一些的组合具有适用于例如治疗脓毒症和其他疾病状态及病变的免疫调节活性。

[0005] 本发明包括降低对象血清中的血尿素氮(BUN)浓度(在本申请中也称作尿素浓度)的方法。该方法包括给对象(例如哺乳动物,例如人)施用包含一种(或多种)寡肽的组合物,所述寡肽具有如小鼠肾脏再灌注试验所确定的降低对象血清中的尿素浓度的活性,其中所述寡肽包含序列 QGV 或 MTRV(SEQ ID NO:1)(例如 AQGV(SEQ ID NO:2)或 MTRV(SEQ ID NO:1))。另一种被认为具有所述活性的寡肽是 LQGV(SEQ ID NO:3)。

[0006] 所述组合物的寡肽的长度典型地是 3 到 12 个氨基酸。对于仅仅包括寡肽 AQGV(SEQ ID NO:2)的组合物而言,可以口服施用该组合物。所述寡肽将优选地是合成来源的寡肽(例如通过 Merrifield 合成所制备的寡肽)。当给对象肠外施用所述组合物时,所述组合物典型地将基本上由寡肽和 PBS 组成(例如以每 kg 对象体重约 0.25 到约 10mg 的量)。

[0007] 例如当患者正在遭受急性肾功能衰竭时,特别是当对象正在遭受持续性少尿时,对象每小时产生的尿量不超过每千克体重 1/2ml,和/或对象的血清钾水平超过每升血清

6. 5mmol 时, 本发明被认为是有用的。

[0008] 在一个优选的实施方式中, 本发明包括施用由 AQGV (SEQ IDNO :2) 组成的纯化的、合成的或分离的肽或其酸加成盐。

[0009] 本发明还提供了本发明的组合物在制备用于治疗疾病例如急性肾功能衰竭的药物组合物或药物中的用途。

附图说明

[0010] 图 1 : 图示了实施例的结果, 其显示了用肽 A 至 F 处理后或不处理 (对照) 的各个时间点的 BUN (尿素) 值。

[0011] 发明详述

[0012] 在本申请中, “纯化的、合成的或分离的” 肽是指已经从自然界来源或生物技术来源纯化的肽, 或者更优选地是如本申请所述合成的肽。

[0013] 本申请所使用的“组合物”是指含有或由所述寡肽组成的化合物。优选地, 所述寡肽在纳入所述组合物之前是分离的。最优选地, 所述寡肽由 3 到 6 个氨基酸组成。

[0014] 例如, 在一个实施方式中, 先前所描述的优选的化合物可以是

[0015] NT A Q G V CT

[0016] 其中位于 N 末端的 NT 选自 H—、CH₃—、和酰基、或常规的保护性基团; 位于 C 末端的 CT 选自小肽 (例如 1 到 5 个氨基酸)、—OH、—OR₁、—NH₂、—NHR₁、—NR₁ R₂、或 —N(CH₂)₁₋₆NR₁ R₂, 其中当存在 R₁ 和 R₂ 时, 其独立地选自 H、烷基、芳香基、(芳) 烷基, 并且其中的 R₁ 和 R₂ 可以彼此环状结合。

[0017] 本申请所使用的“烷基”优选地是具有 1 到 6 个碳原子的饱和的支链或非支链烃, 例如甲基、乙基和异戊基。

[0018] 本申请所使用的“芳香基”是一种芳香烃基, 其优选地具有 6 到 10 个碳原子, 例如苯基或萘基。

[0019] 本申请所使用的“(芳) 烷基”是指芳烃基 (同时具有脂肪族和芳香族部分), 其优选地具有 7 到 13 个碳原子例如苯甲基、苯乙基、n- 苯丙基和苯异丁基。

[0020] 本申请所使用的“寡肽”是指具有经肽键彼此连接在一起的 3 到 12 个氨基酸的肽。寡肽的等价物是具有与寡肽中所用的特定氨基酸相同或等价的侧链的化合物, 所述氨基酸以与肽相同的顺序次序排列但经非肽键 (例如通过同电子排列体连接如酮同电子排列体、羟基同电子排列体、二酮同电子排列体或酮 - 二氟亚甲基同电子排列体) 连接在一起。

[0021] “组合物”还包括例如所述寡肽的可接受的盐或标记的寡肽。本申请中, “可接受的盐”是指保留了所述寡肽或其等价化合物的所期望的活性, 但优选地不会负面影响所述寡肽的活性或使用所述寡肽的系统中的其他成分的活性的盐。这种盐的例子有与无机酸 (例如盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、硝酸等) 形成的酸加成盐。也可以与有机酸 (例如乙酸、草酸、酒石酸、琥珀酸、马来酸、延胡羧酸、葡萄糖酸、柠檬酸、苹果酸、抗坏血酸、苯甲酸、丹宁酸、双羟萘酸、海藻酸、多聚谷氨酸等) 形成盐。可以与多价金属阳离子 (例如锌、钙、铋、钡、镁、铝、铜、钴、镍等) 或与有机阳离子 (例如 N, N' - 二苄乙二胺或乙二胺) 或其组合 (例如丹宁酸锌盐) 形成盐。

[0022] 本发明还提供了具有如小鼠肾脏再灌注试验所确定的降低对象血清中的尿素浓

度的活性的寡肽在制备用于降低对象（特别是当所述对象正在遭受急性肾功能衰竭时）血清中的尿素浓度的药物组合物中的用途，所述寡肽优选地包含序列 QGV 或 MTRV (SEQ IDNO : 1)。优选地，用于制备所述药物组合物的寡肽由 A QGV (SEQID NO :2) 组成。

[0023] 可以给对象肠外或口服施用这种药物组合物。这种药物组合物可以基本上由寡肽和 PBS 组成。优选所述寡肽是合成来源的。合适的治疗例如是给患者静脉内施用每 kg 对象体重约 0.25- 约 10mg 的量的于药物组合物中的寡肽。基本上由 1 到 3 种不同寡肽组成的药物组合物可能是有用的。

[0024] 当对象正在遭受持续性少尿时，例如当对象的肾脏每小时产生的尿量不超过每千克对象体重 1/2ml 时，或当对象的血清钾水平超过每升血清 6.5mmol 时，该治疗是特别优选的。

[0025] 可以将如此开发出的化合物本体全身地、局部地或局灶地 (locally) 施用或导入体内。所述肽或其修饰物或衍生物同样可以作为化合物本体施用，或作为通过与无机酸（例如盐酸、氢溴酸、高氯酸、硝酸、硫氰酸、硫酸和磷酸）或与有机酸（例如甲酸、乙酸、丙酸、羟基乙酸、乳酸、丙酮酸、oxalic 酸、丙二酸、琥珀酸、马来酸和延胡羧酸）的反应、或通过与无机碱（例如氢氧化钠、氢氧化铵、氢氧化钾）或与有机碱（例如单-、二-、三烷基和芳香胺和取代的乙醇胺）的反应所形成的药学上可接受的酸或碱加成盐施用。所选的肽和任一衍生的化合物本体也都可以与糖、脂质、其他多肽、核酸和 PNA 缀合，并在到达靶组织或器官后作为缀合物原位发挥作用或在局部释放后发挥作用。

[0026] 对于各种氨基酸而言，“取代”通常涉及用基团例如烷氧基、卤素、羟基、硝基或较小的烷基取代芳香环上通常存在的氢。也可以在连接芳香部分至肽骨架的烷基链上进行取代，例如用较小的烷基取代氢。在氨基酸的 α 位点上仍然也可以用烷基进行进一步取代。

[0027] 优选的取代包括以氟或氯作为卤素，以及以甲氧基作为烷氧基。对于烷基和较小的烷基而言，通常优选具有更少（1 到 3 个）碳原子的烷基。

[0028] 可以以用于这些化合物的常用方式制备通式化合物。至今为止，经适当的 N α 保护的（如果存在反应性侧链，则保护侧链）氨基酸衍生物或肽被活化，并将其与溶液中的或固体支持物上的经适当的羧基保护的氨基酸或肽衍生物结合。一般通过氨基甲酸酯功能性例如酸不稳定的叔丁氧羰基（“Boc”）、苄氧羰基（“Z”）和取代类似物或碱不稳定的 9- 芴甲氧羰基（“Fmoc”）对 α -氨基功能性进行保护。通过催化氢化作用也可以去除 Z 基团。其他合适的保护性基团包括 Nps、Bmv、Bpoc、Aloc、MSC 等。在 *The peptides, Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 3E. Gross and J. Meienhofer, eds. (Academic Press, New York, 1981) 中给出了较好的对氨基保护性基团的综述。通过酯的形成可以对羧基基团进行保护，例如碱不稳定的酯如甲酯或乙酯、酸不稳定的酯（例如叔丁酯或取代的苯甲酯）或氢裂解 (hydrogenolytically) 的酯。利用前面提及的基团可以对侧链功能性例如赖氨酸和谷氨酸或天冬氨酸的功能性进行保护。利用各种试剂（例如在 *The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology*, id 或在 *Pure and Applied Chemistry*, 59(3), 331-344(1987) 中所述的那些试剂）可以对硫醇基（尽管并非总需要）、胍基、醇和咪唑基团进行保护。用叠氮化合物、混和酐、活性酯或碳化二酰亚胺方法，特别是通过添加催化化合物和抑制外消旋作用的化合物例如 1-N-N'- 羟基苯并三唑、N'- 羟基琥珀酰亚胺、3- 羟基 -4- 氧 -3,4- 二氢 -1,2,3- 苯并三唑、N'- 羟基 -5 降冰片烯 -2,3- 二羧基酰亚胺 (N-hydroxy-5norbornene-2,

3-dicarboxyimide), 可以对受合适保护的氨基酸或肽的羧基进行活化。同样, 可以使用基于酸的磷酐。参见例如 *The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, supra and Pure and Applied Chemistry*, 59(3), 331-344(1987)。

[0029] 通过 Merrifield 的固相方法制备所述化合物也是可能的。不同的固相支持物和不同的策略是已知的, 参见例如 Barany and Merrifield, *The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 2, E. Gross 和 J. Meienhofer, eds. (Acad. Press, New York, 1980)、Kneib-Cordonier and Mullen *Int. J. Peptide Protein Res.*, 30, 705-739(1987) 和 Fields and Noble *Int. J. Peptide Protein Res.*, 35, 161-214(1990)。利用先前所描述的保护性基团和活化工艺通常可以实现化合物的合成, 其中所述化合物中的肽键被同电子排列体所取代。在文献中描述了合成修饰的同电子排列体的工艺, 例如用于合成 $\text{CH}_2\text{-NH-}$ 同电子排列体和 $\text{CO-CH}_2\text{-}$ 同电子排列体的工艺。

[0030] 用不同的方法可以去除保护性基团, 并且对于固相肽合成而言可以从固相支持物中解离出保护性基团, 这依赖于这些保护性基团的特性以及固相支持物的接头的类型。通常在酸性条件下以及存在清除剂时进行去保护作用。参见例如 *The Peptides Analysis, Synthesis, Biology, supra* 系列中的第 3、5 和 9 卷。

[0031] 另一种可能性在这些化合物合成中应用酶, 关于这方面的综述可参见例如 H. D. Jakubke, *The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 9, S. Udenfriend and J. Meienhofer, eds. (Acad. Press, New York, 1987)。

[0032] 尽管从经济学的角度而言, 并不需要这种可能性, 但是根据重组 DNA 方法也能制备本发明的寡肽。这些方法包括通过在作为宿主的合适的微生物中表达编码一种或多种所述寡肽的重组核苷酸序列制备所需的寡肽。所述方法通常包括将编码一种或对种特定寡肽的 DNA 序列导入克隆载体内 (例如质粒、噬菌体 DNA、或其他能在宿主细胞中进行复制的 DNA 序列), 将所述克隆载体导入合适的真核或原核宿主细胞内, 和培养由此所转化的宿主细胞。当使用真核宿主细胞时, 所述化合物可以包括糖蛋白部分。

[0033] 在本申请中, 肽的“功能类似物”或“衍生物”包括氨基酸序列或其他序列单体, 所述序列或序列单体已经被改变使得序列的功能特性在性质上基本相同, 但在量上并不必相同。可以用多种方法提供类似物或衍生物, 例如通过“保守氨基酸取代”。也可以设计出模拟肽的化合物, 它们在功能上或结构上与作为起点的原始肽相似, 但是它们由例如非天然存在的氨基酸或聚酰胺构成。对于“保守氨基酸取代”, 是将一种氨基酸残基用另一种具有普遍相似特性 (大小、疏水性) 的残基进行取代, 使得总体的功能不会受到严重影响。但是, 常常更需要提高特异的功能。也可以通过系统地提高氨基酸序列的至少一种所需的特性提供衍生物。例如可以通过 Ala-scan 和 / 或取代净测绘 (replacement net mapping) 方法实现。通过这些方法, 根据原始的氨基酸序列可以生成多种不同的肽, 但每种肽都含有至少一种氨基酸残基的取代。可以用丙氨酸 (Ala-scan) 或用任一种其他的氨基酸残基 (取代净测绘) 取代氨基酸残基。用这种方法合成了原始氨基酸序列的多种位点变体。筛选每一位点变体的特异活性。用所生成的数据设计出确定的氨基酸序列的改良的肽衍生物。

[0034] 例如通过 D-氨基酸残基对 L-氨基酸残基的取代也可以生成衍生物或类似物。这种取代 (生成了在自然界中非天然存在的肽) 能改善氨基酸序列的特性。例如, 用于提供具有所有逆向反转形式 (retro inversion format) 的 D-氨基酸的已知活性的肽序列, 从

而容许保留活性并增加半衰期值。通过生成原始氨基酸序列的多个位点变体并筛选其特异活性,可以设计出具有进一步改善的特性的包括这种 D-氨基酸的改善的肽衍生物。

[0035] 本领域技术人员能生成氨基酸序列的类似化合物。例如通过筛选肽文库进行。这种类似物基本上与等价序列具有相同的功能特性,但是在量上并非必须相同。同样,肽或类似物可以例如通过给它们提供(末端的)半胱氨酸进行环化、例如通过侧链与赖氨酸或半胱氨酸连接进行二聚体化或多聚体化以容许连接或多聚体化、生成串连的或重复的构型、与本领域已知的载体缀合或连接(如果仅仅通过不稳定连接则容许解离)。

[0036] 本发明提供了如上述的这些寡肽的合成形式以及这些降解产物的功能性类似物或衍生物,以降低用于疾病治疗方法中所用的 BUN 浓度。

[0037] 术语“药物组合物”在本申请中被用于单独包括本发明的活性组合物或含有本发明的组合物以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂的组合物。在发明详述中所述的可接受的寡肽的稀释剂例如是生理盐水或磷酸盐缓冲液。在一个实施方式中,例如通过静脉内、肌肉内或腹腔内以有效浓度给动物或人全身施用信号分子。另一种施用方式包括用包含本发明的信号分子的灌注液在体内或离体对器官或组织进行的灌注。可以单剂量施用,多剂量的不连续次序施用、或连续施用一段足以容许对基因表达进行实质调控的时间。对于连续施用而言,施用的持续时间可以有所不同,这依赖于本领域人员所容易意识到的多种因素。

[0038] 活性分子的施用剂量可以在相当广的范围内有所不同。化合物在下限时的效率以及化合物在上限时的溶解性将限制可施用的活性分子的浓度。考虑到已知的相关因素例如病变、患者的体重和年龄等,医生或医学专家应当并能确定出用于特定患者的最佳剂量。

[0039] 可以在合适的载体中直接施用活性分子,所述载体例如是磷酸缓冲液(“PBS”)或乙醇溶液或 DMSO 溶液。但是,依照本发明的优选的实施方式,利用药物运输系统单剂量施用所述活性分子。合适的药物运输系统应当是药理学上无活性的或至少是可耐受的。优选地,其应当是无免疫原性的或者不会引起炎症反应的,并且应当允许释放所述活性分子以使得在所需的时期内保持其有效水平。适用于恒定释放目的其它方法在本领域是已知的,并被预期落入本发明的范围内。合适的运输载体包括,但不限于以下载体:微胶囊或微球体、脂质体和其它基于脂质的释放系统、粘性滴注剂、可吸收的和/或生物可降解的机械屏障和植入物、以及多聚体运输材料例如聚乙烯氧化物/聚丙烯氧化物嵌段共聚物、聚酯、交联的聚乙烯醇、聚酐、聚甲基丙烯酸酯和聚甲基丙稀酰胺水凝胶、阴离子碳水化合物聚合物等。有用的输送系统在本领域是公知的。

[0040] 能实现活性分子释放的一种剂型包含由生物可降解的聚合物(例如聚(dl-丙交酯)、聚(dl-丙交酯-共-乙交酯)、聚己酸内酯、聚乙烯醇交酯、聚乳酸-共-乙交酯、聚(羟丁酸)、聚酯或聚缩醛树脂)制成的可注射的微胶囊或微球体。包括直径为约 50 到 500 微米的微胶囊或微球体的可注射系统提供了不同于其它运输系统的优点。例如,它们通常使用更低活性的分子并且可以由医疗辅助人员施用。此外,在分离的药物释放的持续时间和速度的设计中,通过选择微胶囊或微球体的大小、药物负载和施用剂量,使得这些系统是天然可变的。另外,通过 γ 射线照射可以对它们成功地进行灭菌。

[0041] 微胶囊和微球体的设计、制备和使用都是在本领域技术人员的能力范围之内,在文献中可以找到关于这些内容的详细信息。生物可降解的聚合物(例如丙交酯、乙交酯和

己酸内酯聚合物)也可以被用于不同于微胶囊和微球体的剂型中,例如含有所述活性分子的这些聚合物的预制膜和喷射膜(spray-on films)都将适用于本发明。预期包含所述活性分子的纤维或纤丝也都落入本发明的范围之内。

[0042] 用于单剂量运输本发明的活性分子的另一种非常适合的剂型包括脂质体。将活性分子用脂质体或多层载体封装是公知的用于靶向药物运输并延长药物停留的技术。负载药物的脂质体的制备和使用是在本领域技术人员的能力范围之内,并且在文献中有充分的阐述。

[0043] 用于单剂量运输本发明的活性分子的另一种合适的方法包括使用粘性滴注液(viscous installates)。在这一技术中,将高分子量的载体与活性分子混合,生成了能产生高粘性的溶液的结构。合适的高分子量载体包括,但不限于以下载体:葡聚糖和环糊精(cyclodextrans)、水凝胶、(交联的)粘性材料(包括(交联的)粘弹性物(viscoelastics))、羧甲基纤维素、透明质酸和硫酸软骨素。负载药物的粘性滴注液的制备和使用对于本领域人员是公知的。

[0044] 依照另一种方法,可以联合可吸收的机械屏障例如氧化再生纤维素施用所述活性分子。所述活性分子可以与一种屏障共价地或非共价地(例如离子地)结合,或者其可以被简单地分散于屏障中。

[0045] 以下例证性实施例用于帮助进一步解释本发明。

[0046] 实施例

[0047] 在双盲动物研究中,测试了6种寡肽(即A:{LAGV(SEQ ID NO:4)}、B:{AQGV(SEQ ID NO:2)}、C:{LAG}、D:{AQG}、E:{MTR}和F:{MTRV(SEQ ID NO:1)})中的每种肽帮助小鼠肾脏缺血再灌注试验中的小鼠肾脏康复的相对能力,并将其与PBS(对照)进行比较。在该试验中,将小鼠麻醉,从每只小鼠摘取一个肾脏。将另一个肾脏结扎25分钟,并容许增加血清尿素水平。在结扎之前和之后,都给30只不同的小鼠施用每种分离的肽(静脉内施用5mg寡肽/kg体重),随后在2小时、24小时和72小时确定出每种寡肽的小鼠死亡率以及BUN浓度。结果示于图1及以下。

[0048] 在吸入麻醉的条件下,分离左侧肾脏以及它们的动脉和静脉,并用微血管夹使其阻塞25分钟。在手术过程中,将动物放置在加热带上以保持体温在37℃。在放置微血管夹前5分钟以及在松开微血管夹前5分钟,静脉内施用溶解在0.1mL无菌盐水中的5mg/kg肽。再灌注左侧肾脏之后,摘取右侧肾脏。在放夹之前、以及再灌注后2、24和72小时,通过测量血尿素氮评价肾脏功能。

[0049] 结果

[0050] 再灌注后72小时的死亡率

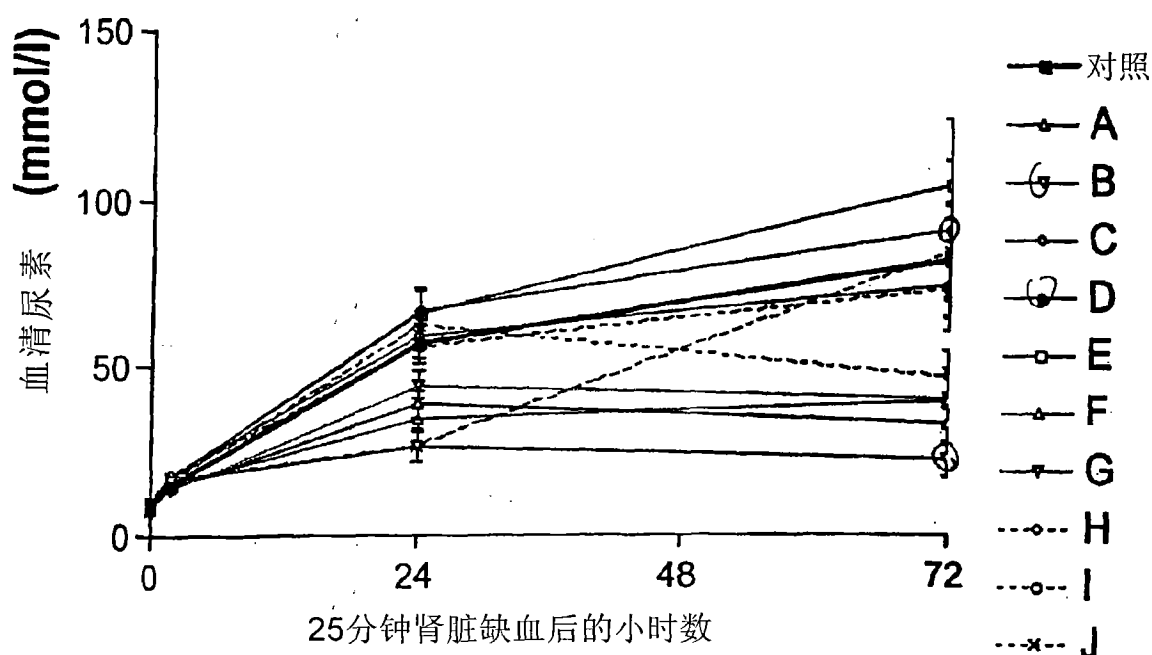
[0051]

PBS	A (LAGV)	B (AQGV)	C (LAG)	D (AQG)	E (MTR)	F (MTRV)
6/10	6/10	0/10	4/10	4/10	4/10	2/10
*P < (vs PBS)	NS	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

[0052] *2×2 卡方检验。df = 1

[0053] 肽 A 是在肾脏缺血再灌注试验中第一个被施用的肽。当用肽 A 进行研究时, 实施试验的人员仔细检查了学习曲线。在下腔静脉内施用所述肽的过程中, 一些动物从注射部位损失了中等量的血液, 而其它动物却没有损失。在手术后第一晚, 动物没有饮用笼内的水而不经意地恢复至稳定状态。同样, 因为失误, 打算在再灌注后 72 小时处死的动物在 48 小时时被处死。用肽 B-F 进行的试验中, 都没有碰到这些或其他的问题。综上所述, 本发明人发现用肽 A 得到的结果可能是不可靠的, 应当重新测试肽 A。

[0054] 从中可以看到, 施用了寡肽 MTRV (SEQ ID NO :1), 特别是施用了 AQGV (SEQ ID NO :2) 的小鼠在存活率 (与 PBS 对照组比较, 显著降低了死亡率) 和降低 BUN 浓度方面都要远优于对照组 (PBS) 或施用其它寡肽的组, 即与其它组比较有更多的小鼠存活且血清尿素水平远更低。但是, 与 PBS 对照相比较, 对 BUN 浓度没有影响的寡肽 LAG、AQG、和 MTR 每种都能引起死亡率的显著降低。



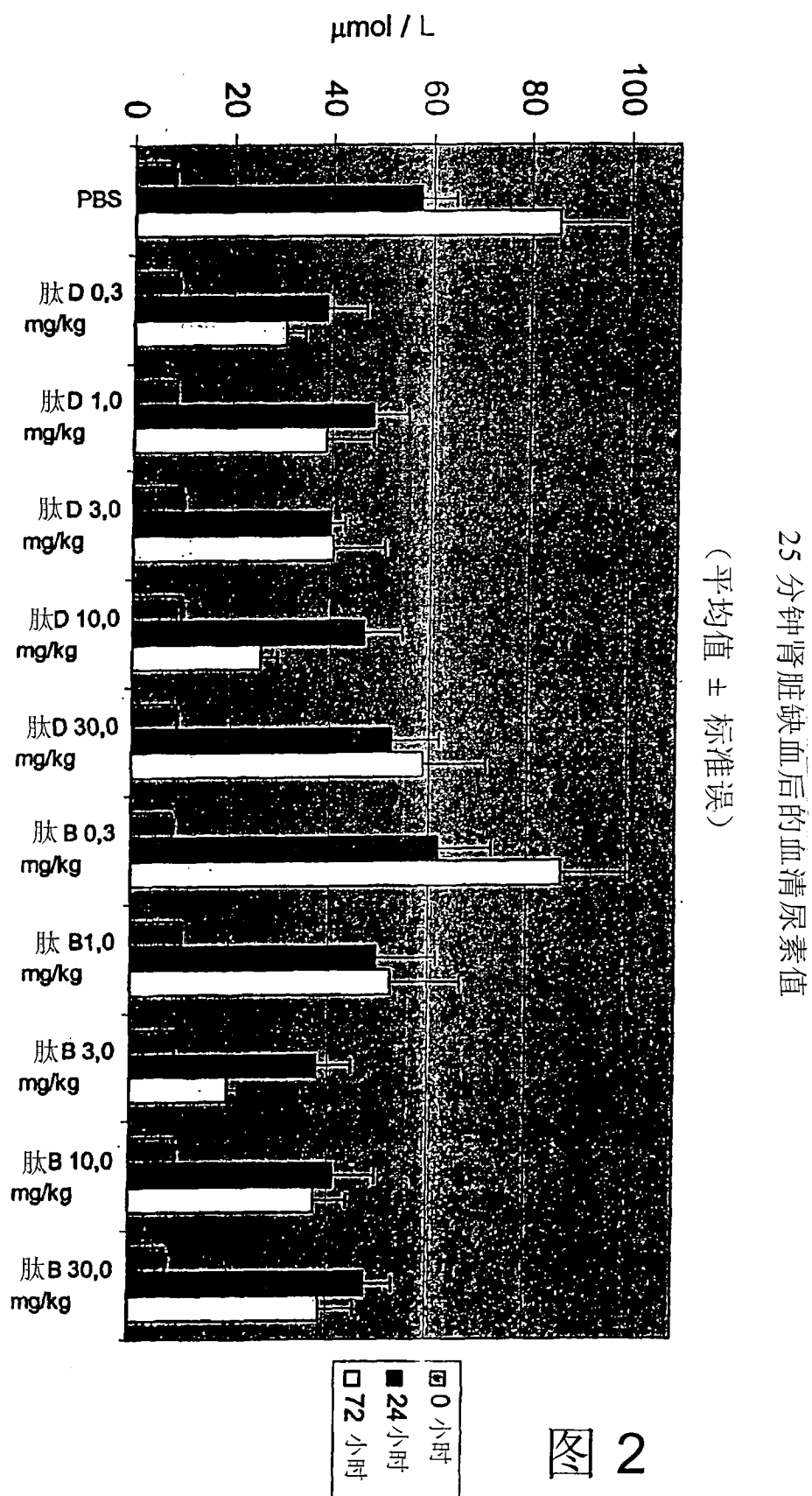
再灌注后24小时:

(C-末端:羧基 ; N-末端:游离)	
- A	p=0.0491 NMPF-47 <u>LAGV</u>
- B	p=0.0008 NMPF-46 <u>AQGV</u>
- C	p=0.9248 NMPF-44 LAG
- D	p=0.4043 NMPF-43 AQG
- E	p=0.1848 NMPF-12 MTR
- F	p=0.0106 NMPF-11 <u>MTRV</u>
- G	p=0.1389 NMPF-7 VLPALPQ
- H	p=0.5613 NMPF-6 VLPALP
- I	p=0.9301 NMPF-4 LQGV
- J	p=0.0030 NMPF-3 LQG

再灌注后72小时:

(C-末端:羧基 ; N-末端:游离)	
- A	p=0.0017 NMPF-47 <u>LAGV</u>
- B	p<0.0001 NMPF-46 <u>AQGV</u>
- C	p=0.8186 NMPF-44 LAG
- D	p=0.2297 NMPF-43 AQG
- E	p=0.0242 NMPF-12 MTR
- F	p=0.0021 NMPF-11 <u>MTRV</u>
- G	p=0.0049 NMPF-7 VLPALPQ
- H	p=0.3297 NMPF-6 VLPALP
- I	p=0.8328 NMPF-4 LQGV
- J	p=0.9445 NMPF-3 LQG

图 1



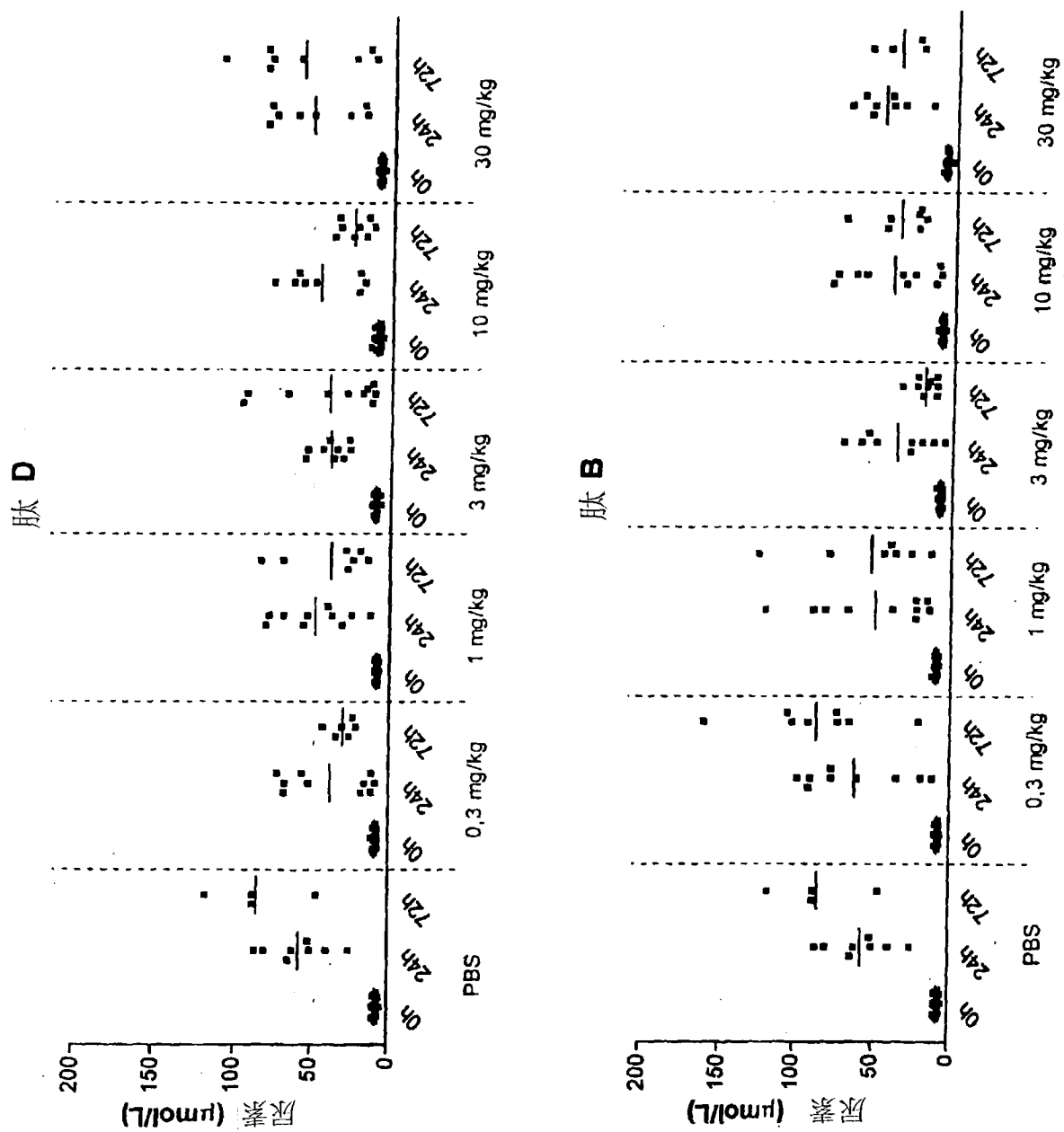


图 3