(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107496899 A
(43)申请公布日 2017.12.22

(21)申请号 201710610548.1

(22)申请日 2012.09.28

(30)优先权数据
61/540,910 2011.09.29 US
61/558,177 2011.11.10 US
61/596,455 2012.02.08 US
61/642,282 2012.05.03 US
61/681,444 2012.08.09 US

(62)分案原申请数据
201280058908.7 2012.09.28

(71)申请人 梅约医学教育与研究基金会
地址 美国明尼苏达州
申请人 康德生物医疗技术公司

(72)发明人 D·特拉维斯·威尔逊
利拉奇·O·莱尔曼
斯蒂芬·C·特克斯托尔

(74)专利代理机构 北京同达信恒知识产权代理有限公司 11291
代理人 黄志华 石磊

(51)Int.Cl.
A61K 38/06(2006.01)
A61P 9/10(2006.01)
A61P 13/12(2006.01)

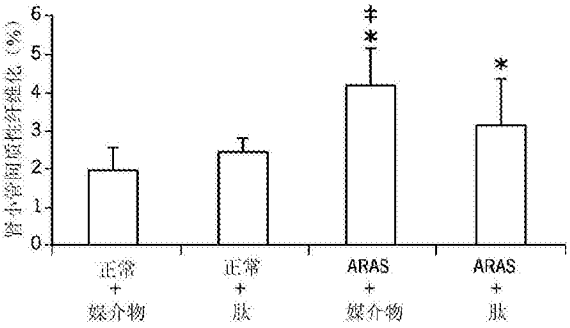
权利要求书1页 说明书53页 附图28页

(54)发明名称

芳族阳离子肽和使用它们的方法

(57)摘要

本发明公开了一种芳族阳离子肽和使用它们的方法。本发明提供了一种用于治疗有此需要的受试者的动脉粥样硬化性肾动脉狭窄的方法，所述方法包括:给所述受试者施用治疗有效量的肽D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2或其药学上可接受的盐。



CN 107496899 A

1.一种用于治疗有此需要的受试者的动脉粥样硬化性肾动脉狭窄的方法，所述方法包括：给所述受试者施用治疗有效量的肽D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2或其药学上可接受的盐。

芳族阳离子肽和使用它们的方法

[0001] 本申请是申请日为2012年9月28日、申请号为“201280058908.7”、发明名称为“芳族阳离子肽和使用它们的方法”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2011年9月29日提交的美国临时申请号61/540,910、2012年2月8日提交的美国临时申请号61/596,455、2011年11月10日提交的美国临时申请号61/558,177、2012年5月3日提交的美国临时申请号61/642,282和2012年8月9日提交的美国临时申请号61/681,444的权益和优先权，它们都通过引用整体并入本文。

技术领域

[0004] 本发明技术一般地涉及用于预防或治疗肾缺血/再灌注组织损害的组合物和方法。具体地，本发明技术的实施方案涉及施用有效量的芳族阳离子肽来预防或治疗与肾动脉通畅恢复有关的缺血/再灌注损伤，所述肾动脉通畅恢复用于治疗肾动脉狭窄和用于长期治疗动脉粥样硬化性肾血管疾病(ARVD)。

背景技术

[0005] 提供以下描述来辅助读者的理解。提供的信息或引用的参考文献不被承认为现有技术。

[0006] 肾动脉狭窄(RAS)最常见地由动脉粥样硬化造成，在超过65岁的成年人中具有几乎7％的发病率。具有动脉粥样硬化性RAS或(ARVD)的患者经常发展高血压或肾血管性高血压，其显著增加冠状动脉疾病、中风、外周血管病和进展至末期肾病的风险。此外，肾功能本身的下降与增加的心血管发病率和死亡率有关。

[0007] 在治疗动脉粥样硬化性肾动脉狭窄(ARAS)时，即效治疗目标是恢复肾动脉的通畅。经皮腔内肾血管成形术(PTRA)经常是推荐的疗程。但是，肾动脉通畅的成功恢复不一定转化为组织灌注的恢复。

[0008] 肾微脉管系统的稀薄化和再灌注损伤可以造成减少的肾灌注和长期肾功能不全。减轻这些效应的方法会改善经历PTRA疗法的患者和具有ARVD的患者的长期预后。

发明内容

[0009] 本发明技术涉及通过给有此需要的受试者施用治疗有效量的芳族阳离子肽(诸如D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2)或其药学上可接受的盐(诸如乙酸盐或三氟乙酸盐)来治疗或预防哺乳动物的肾缺血-再灌注损伤和ARVD。在某些实施方案中，本发明技术涉及可用于治疗或预防肾微脉管系统稀薄化的方法。在某些方面，本发明技术涉及通过给有此需要的受试者施用治疗有效量的芳族阳离子肽(诸如D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2)或其药学上可接受的盐(诸如乙酸盐或三氟乙酸盐)来长期治疗具有ARVD的受试者。

[0010] 在某些方面，本公开内容提供了治疗或预防肾缺血/再灌注损伤、肾微脉管系统稀薄化和/或长期治疗动脉粥样硬化性肾血管疾病(ARVD)的方法，所述方法包括：给有此需要

的受试者施用治疗有效量的芳族阳离子肽或其药学上可接受的盐，例如，D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2，或其药学上可接受的盐，诸如乙酸盐或三氟乙酸盐。在某些实施方案中，所述方法进一步包括：对所述受试者执行血运重建手术。在某些实施方案中，所述芳族阳离子肽是这样的肽，其具有：

[0011] 至少一个净正电荷；

[0012] 最少4个氨基酸；

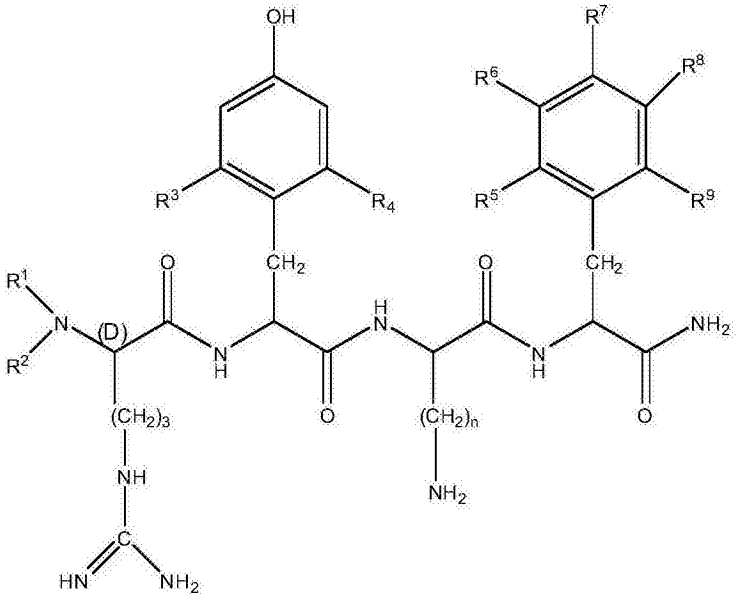
[0013] 最多约20个氨基酸；

[0014] 净正电荷的最小数目(p_m)和氨基酸残基的总数(r)之间的关联，其中$3p_m$是小于或等于r+1的最大数字；和芳族基团的最小数目(a)和净正电荷的总数(p_t)之间的关联，其中2a是小于或等于p_t+1的最大数字，例外是，当a是1时，p_t也可以是1。在特定实施方案中，所述受试者是人。

[0015] 在某些实施方案中，$2p_m$是小于或等于r+1的最大数字，且可以等于p_t。所述芳族阳离子肽可以是具有最少2个或最少3个正电荷的水溶性肽。在某些实施方案中，所述肽包含一个或多个非天然存在的氨基酸，例如，一个或多个D-氨基酸。在某些实施方案中，所述氨基酸的C-端羧基在C-端处被酰胺化。在某些实施方案中，所述肽具有最少4个氨基酸。所述肽可以具有最多约6个、最多约9个、或最多约12个氨基酸。

[0016] 在某些实施方案中，所述肽包含在N-端处的酪氨酸或2′,6′-二甲基酪氨酸(Dmt)残基。例如，所述肽可以具有式Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH_2或2′,6′-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH_2。在另一个实施方案中，所述肽包含在N-端处的苯丙氨酸或2′,6′-二甲基苯丙氨酸残基。例如，所述肽可以具有式Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH_2或2′,6′-Dmp-D-Arg-Phe-Lys-NH_2。在一个特定实施方案中，所述芳族阳离子肽具有式D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2或其药学上可接受的盐诸如乙酸盐或三氟乙酸盐。

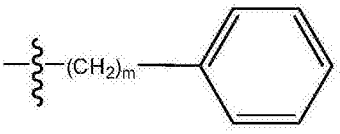
[0017] 在一个实施方案中，所述肽由式I定义：

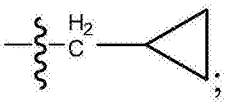
[0018] 

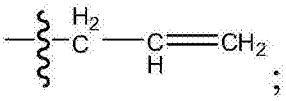
[0019] 其中R^1和R^2各自独立地选自

[0020] (i)氢；

[0021] (ii)直链或支链C_1-C_6烷基；

[0022] (iii)  其中m＝1-3；

[0023] (iv) ；

[0024] (v) ；

[0025] R^3和R^4各自独立地选自

[0026] (i)氢；

[0027] (ii)直链或支链C_1-C_6烷基；

[0028] (iii)C_1-C_6烷氧基；

[0029] (iv)氨基；

[0030] (v)C_1-C_4烷基氨基；

[0031] (vi)C_1-C_4二烷基氨基；

[0032] (vii)硝基；

[0033] (viii)羟基；

[0034] (ix)卤素，其中“卤素”包括氯代、氟代、溴代和碘代；

[0035] R^5、R^6、R^7、R^8和R^9各自独立地选自

[0036] (i)氢；

[0037] (ii)直链或支链C_1-C_6烷基；

[0038] (iii)C_1-C_6烷氧基；

[0039] (iv)氨基；

[0040] (v)C_1-C_4烷基氨基；

[0041] (vi)C_1-C_4二烷基氨基；

[0042] (vii)硝基；

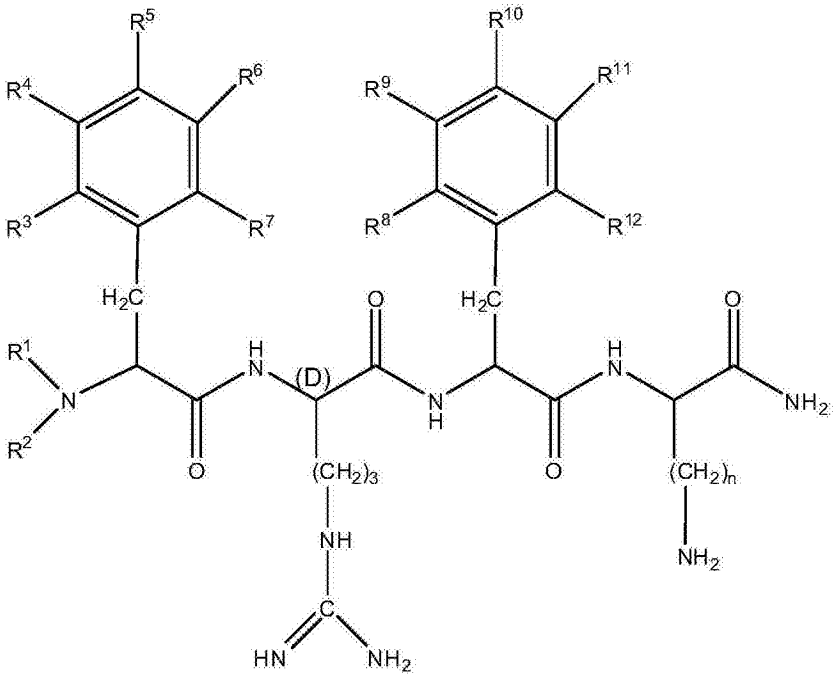
[0043] (viii)羟基；

[0044] (ix)卤素，其中“卤素”包括氯代、氟代、溴代和碘代；且

[0045] n是1-5的整数。

[0046] 在一个特定实施方案中，R^1和R^2是氢；R^3和R^4是甲基；R^5、R^6、R^7、R^8和R^9都是氢；且n是4。

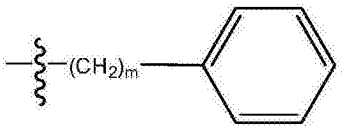
[0047] 在一个实施方案中，所述肽由式II定义：

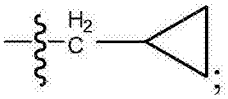
[0048] 

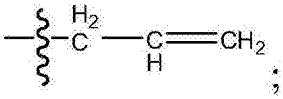
[0049] 其中R^1和R^2各自独立地选自

[0050] (i)氢；

[0051] (ii)直链或支链C_1-C_6烷基；

[0052] (iii)  其中m＝1-3；

[0053] (iv) ；

[0054] (v) ；

[0055] R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^9、R^{10}、R^{11}和R^{12}各自独立地选自(i)氢；

[0056] (ii)直链或支链C_1-C_6烷基；

[0057] (iii)C_1-C_6烷氧基；

[0058] (iv)氨基；

[0059] (v)C_1-C_4烷基氨基；

[0060] (vi)C_1-C_4二烷基氨基；

[0061] (vii)硝基；

[0062] (viii)羟基；

[0063] (ix)卤素，其中“卤素”包括氯代、氟代、溴代和碘代；且

[0064] n是1-5的整数。

[0065] 在一个特定实施方案中，R^1、R^2、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^9、R^{10}、R^{11}和R^{12}都是氢；且n是4。在另一个实施方案中，R^1、R^2、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^9和R^{11}都是氢；R^8和R^{12}是甲基；R^{10}是羟基；且n是4。

[0066] 所述芳族阳离子肽可以以多种方式施用。在某些实施方案中，可以口服地、局部

地、鼻内地、腹膜内地、静脉内地、皮下地或透皮地(例如,通过离子透入法)施用所述肽。在某些实施方案中,通过动脉内途径施用所述芳族阳离子肽。

[0067] 在一个方面,本公开内容提供了一种用于治疗有此需要的受试者的动脉粥样硬化性肾动脉狭窄的方法,所述方法包括:给所述受试者施用治疗有效量的肽D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2或其药学上可接受的盐。

[0068] 在某些实施方案中,所述方法进一步包括对所述受试者执行血运重建手术的步骤。在某些实施方案中,所述血运重建手术包括经皮腔内肾血管成形术。在某些实施方案中,所述动脉粥样硬化性肾动脉狭窄包括受试者的肾微脉管系统的破裂或阻塞。在某些实施方案中,所述受试者处于肾微脉管系统稀薄化的风险中或者正在遭受肾微脉管系统稀薄化。在某些实施方案中,在肾微脉管系统稀薄化开始之前,给所述受试者施用所述肽。

[0069] 在某些实施方案中,在血运重建手术之前,在血运重建手术之后,在血运重建手术过程中和之后,或在血运重建手术之前、过程中和之后连续地,给所述受试者施用所述肽。

[0070] 在某些实施方案中,在血运重建手术之后给所述受试者施用所述肽至少3小时,在血运重建手术之后给所述受试者施用所述肽至少5小时,在血运重建手术之后给所述受试者施用所述肽至少8小时,在血运重建手术之后给所述受试者施用所述肽至少12小时,或在血运重建手术之后给所述受试者施用所述肽至少24小时。

[0071] 在某些实施方案中,从血运重建手术之前至少8小时开始,从血运重建手术之前至少4小时开始,从血运重建手术之前至少2小时开始,从血运重建手术之前至少1小时开始,或从血运重建手术之前至少10分钟开始,给所述受试者施用所述肽。

[0072] 在某些实施方案中,所述血运重建手术包括除去肾动脉阻塞。在某些实施方案中,所述血运重建手术包括施用一种或多种血栓溶解剂。在某些实施方案中,所述一种或多种血栓溶解剂选自:组织型纤溶酶原激活物、尿激酶、尿激酶原、链激酶、酰化形式的纤溶酶原、酰化形式的纤溶酶和酰化的链激酶-纤溶酶原复合物。

[0073] 在另一个方面,本公开内容提供了一种用于治疗有此需要的受试者的动脉粥样硬化性肾动脉狭窄的方法,所述方法包括:对所述受试者执行经皮腔内肾血管成形术,和给所述受试者施用治疗有效量的肽D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2或其药学上可接受的盐。

[0074] 在某些实施方案中,所述受试者处于肾微脉管系统稀薄化的风险中或者正在遭受肾微脉管系统稀薄化。在某些实施方案中,在肾微脉管系统稀薄化开始之前,给所述受试者施用所述肽。

[0075] 在某些实施方案中,在血管成形术之前,在血管成形术之后,在血管成形术过程中和之后,或在血管成形术之前、过程中和之后连续地,给所述受试者施用所述肽。

[0076] 在某些实施方案中,在血管成形术之后给所述受试者施用所述肽至少3小时,在血管成形术之后给所述受试者施用所述肽至少5小时,在血管成形术之后给所述受试者施用所述肽至少8小时,在血管成形术之后给所述受试者施用所述肽至少12小时,或在血管成形术之后给所述受试者施用所述肽至少24小时。

[0077] 在某些实施方案中,从血管成形术之前至少8小时开始,从血管成形术之前至少4小时开始,从血管成形术之前至少2小时开始,从血管成形术之前至少1小时开始,或从血管成形术之前至少10分钟开始,给所述受试者施用所述肽。

[0078] 在某些实施方案中,用于治疗有此需要的受试者的动脉粥样硬化性肾动脉狭窄的

方法(其包括对所述受试者执行经皮腔内肾血管成形术,和给所述受试者施用治疗有效量的肽D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2或其药学上可接受的盐)包括:给所述受试者施用一种或多种血栓溶解剂。在某些实施方案中,所述一种或多种血栓溶解剂选自:组织型纤溶酶原激活物、尿激酶、尿激酶原、链激酶、酰化形式的纤溶酶原、酰化形式的纤溶酶和酰化的链激酶-纤溶酶原复合物。

[0079] 在某些方面,本公开内容提供了一种用于治疗有此需要的受试者中与单侧或两侧动脉粥样硬化性肾动脉狭窄有关的对侧肾损伤的方法,所述方法包括:给所述受试者施用治疗有效量的肽D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2或其药学上可接受的盐。

[0080] 在某些方面,本公开内容提供了一种用于治疗有此需要的受试者中与高血压或肾血管性高血压有关的靶器官损伤(诸如肾脏或心脏)的方法,所述方法包括:给所述受试者施用治疗有效量的肽D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2或其药学上可接受的盐。

[0081] 在某些实施方案中,所述方法进一步包括对所述受试者执行肾血运重建手术的步骤。在某些实施方案中,所述血运重建手术包括经皮腔内肾血管成形术。在某些实施方案中,所述动脉粥样硬化性肾动脉狭窄包括受试者的肾微脉管系统的破裂或阻塞。在某些实施方案中,所述受试者处于肾微脉管系统稀薄化的风险中或者正在遭受肾微脉管系统稀薄化。在某些实施方案中,在肾微脉管系统稀薄化开始之前,给所述受试者施用所述肽。

[0082] 在某些实施方案中,在血运重建手术之前,在血运重建手术之后,在血运重建手术过程中和之后,或在血运重建手术之前、过程中和之后连续地,给所述受试者施用所述肽。

[0083] 在某些实施方案中,在血运重建手术之后给所述受试者施用所述肽至少3小时,在血运重建手术之后给所述受试者施用所述肽至少5小时,在血运重建手术之后给所述受试者施用所述肽至少8小时,在血运重建手术之后给所述受试者施用所述肽至少12小时,或在血运重建手术之后给所述受试者施用所述肽至少24小时。

[0084] 在某些实施方案中,从血运重建手术之前至少8小时开始,从血运重建手术之前至少4小时开始,从血运重建手术之前至少2小时开始,从血运重建手术之前至少1小时开始,或从血运重建手术之前至少10分钟开始,给所述受试者施用所述肽。

[0085] 在某些实施方案中,所述血运重建手术包括除去肾动脉阻塞。在某些实施方案中,所述血运重建手术包括施用一种或多种血栓溶解剂。在某些实施方案中,所述一种或多种血栓溶解剂选自:组织型纤溶酶原激活物、尿激酶、尿激酶原、链激酶、酰化形式的纤溶酶原、酰化形式的纤溶酶和酰化的链激酶-纤溶酶原复合物。

[0086] 在某些方面,本公开内容提供了一种用于治疗有此需要的受试者中与动脉粥样硬化性肾动脉狭窄有关的充血性心力衰竭的方法,所述方法包括:给所述受试者施用治疗有效量的肽D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2或其药学上可接受的盐。

[0087] 在某些实施方案中,所述方法进一步包括对所述受试者执行肾血运重建手术的步骤。

[0088] 在某些实施方案中,所述血运重建手术包括经皮腔内肾血管成形术。在某些实施方案中,所述动脉粥样硬化性肾动脉狭窄包括受试者的肾微脉管系统的破裂或阻塞。在某些实施方案中,所述受试者处于肾微脉管系统稀薄化的风险中或者正在遭受肾微脉管系统稀薄化。在某些实施方案中,在肾微脉管系统稀薄化开始之前,给所述受试者施用所述肽。

[0089] 在某些实施方案中,在血运重建手术之前,在血运重建手术之后,在血运重建手术

过程中和之后，或在血运重建手术之前、过程中和之后连续地，给所述受试者施用所述肽。

[0090] 在某些实施方案中，在血运重建手术之后给所述受试者施用所述肽至少3小时，在血运重建手术之后给所述受试者施用所述肽至少5小时，在血运重建手术之后给所述受试者施用所述肽至少8小时，在血运重建手术之后给所述受试者施用所述肽至少12小时，或在血运重建手术之后给所述受试者施用所述肽至少24小时。

[0091] 在某些实施方案中，从血运重建手术之前至少8小时开始，从血运重建手术之前至少4小时开始，从血运重建手术之前至少2小时开始，从血运重建手术之前至少33小时开始，或从血运重建手术之前至少10分钟开始，给所述受试者施用所述肽。

[0092] 在某些实施方案中，所述血运重建手术包括除去肾动脉阻塞。在某些实施方案中，所述血运重建手术包括施用一种或多种血栓溶解剂。在某些实施方案中，所述一种或多种血栓溶解剂选自：组织型纤溶酶原激活物、尿激酶、尿激酶原、链激酶、酰化形式的纤溶酶原、酰化形式的纤溶酶和酰化的链激酶-纤溶酶原复合物。

[0093] 在一个方面，本公开内容提供了一种用于治疗有此需要的受试者的ARVD的方法，所述方法包括：给所述受试者施用治疗有效量的肽D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2或其药学上可接受的盐。

[0094] 在某些实施方案中，所述ARVD包含动脉粥样硬化性肾动脉狭窄(ARAS)。在某些实施方案中，所述ARVD包含与正常对照相比受损的肾血液动力学。

[0095] 在某些实施方案中，所述受损的肾血液动力学包括增加的平均肾动脉血压。在某些实施方案中，所述受损的肾血液动力学包括减小的肾容量。在某些实施方案中，所述受损的肾血液动力学包括减小的皮质灌注。在某些实施方案中，所述受损的肾血液动力学包括减小的肾血流量(RBF)。在某些实施方案中，所述受损的肾血液动力学包括降低的肾小球滤过率(GFR)。在某些实施方案中，受损的肾血液动力学包括减少的皮质血液氧合。在某些实施方案中，所述ARVD包括肾小管间质性纤维化。

[0096] 在某些实施方案中，治疗包括长期施用肽D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2或其药学上可接受的盐。在某些实施方案中，长期施用包括：施用肽D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2或其药学上可接受的盐大于1周的时段。在某些实施方案中，长期施用包括：施用肽D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2或其药学上可接受的盐大于1年的时段。

[0097] 在另一个方面，本公开内容提供了一种用于治疗由动脉粥样硬化性肾动脉狭窄(ARAS)造成的受损的肾血液动力学的方法，所述方法包括：给所述受试者施用治疗有效量的肽D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2或其药学上可接受的盐。

[0098] 在某些实施方案中，所述ARAS包括与正常对照相比受损的肾血液动力学。在某些实施方案中，所述受损的肾血液动力学包括增加的平均肾动脉血压。在某些实施方案中，所述受损的肾血液动力学包括减小的肾容量。在某些实施方案中，所述受损的肾血液动力学包括减小的皮质灌注。在某些实施方案中，所述受损的肾血液动力学包括减小的肾血流量(RBF)。在某些实施方案中，所述受损的肾血液动力学包括降低的肾小球滤过率(GFR)。在某些实施方案中，所述受损的肾血液动力学包括减少的皮质血液氧合。在某些实施方案中，所述ARAS包括肾小管间质性纤维化。

[0099] 在某些实施方案中，治疗包括长期施用肽D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2或其药学上可接受的盐。在某些实施方案中，长期施用包括：施用肽D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-

NH_2或其药学上可接受的盐大于1周的时段。在某些实施方案中，长期施用包括：施用肽D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2或其药学上可接受的盐大于1年的时段。

[0100] 在另一个方面，本公开内容提供了一种用于治疗由动脉粥样硬化性肾动脉狭窄(ARAS)造成的受损的肾血液动力学的方法，所述方法包括：与一种或多种抗高血压剂联合地给所述受试者施用治疗有效量的肽D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2或其药学上可接受的盐。

[0101] 在某些实施方案中，所述一种或多种抗高血压剂包括利尿剂、肾上腺素能受体拮抗剂、钙通道阻滞剂、肾素抑制剂、血管紧张素转换酶(ACE)抑制剂、血管紧张素II受体拮抗剂、醛固酮拮抗剂、血管扩张剂或α-2激动剂。

[0102] 在某些实施方案中，所述利尿剂包括袢利尿剂、噻嗪利尿剂、噻嗪类利尿剂或保钾利尿剂。在某些实施方案中，所述利尿剂包括布美他尼、依他尼酸、呋塞米、托拉塞米、依匹噻嗪、氢氯噻嗪、氯噻嗪、苄氟噻嗪、吲达帕胺、氯噻酮、美托拉宗、阿米洛利、氨苯蝶啶或螺内酯。

[0103] 在某些实施方案中，所述肾上腺素能受体拮抗剂包括β阻滞剂、α阻滞剂或混合的α和β阻滞剂。在某些实施方案中，所述肾上腺素能受体拮抗剂包括阿替洛尔、美托洛尔、纳多洛尔、氧烯洛尔、吲哚洛尔、普萘洛尔、噻吗洛尔、多沙唑嗪、酚妥拉明、吲哚拉明、酚苄明、哌唑嗪、特拉唑嗪、妥拉唑林、布新洛尔、卡维地洛或拉贝洛尔。

[0104] 在某些实施方案中，所述钙通道阻滞剂包括二氢吡啶或非二氢吡啶。在某些实施方案中，所述钙通道阻滞剂包括氨氯地平、非洛地平、伊拉地平、乐卡地平、尼卡地平、硝苯地平、尼莫地平、尼群地平、地尔硫卓或维拉帕米。

[0105] 在某些实施方案中，所述肾素抑制剂包括阿利吉仑®。在某些实施方案中，所述血管紧张素转换酶(ACE)抑制剂包括卡托普利、依那普利、福辛普利、赖诺普利、培哚普利、喹那普利、雷米普利、群多普利或贝那普利。在某些实施方案中，所述血管紧张素II受体拮抗剂包括厄贝沙坦®。在某些实施方案中，所述醛固酮拮抗剂包括依普利酮或螺内酯。在某些实施方案中，所述血管扩张剂拮抗剂包括硝普钠或肼屈嗪。在某些实施方案中，所述α-2激动剂拮抗剂包括可乐定、胍那苄、甲基多巴、莫索尼定、胍乙啶或利舍平。

附图说明

[0106] 图1A是显示了时间点和具体干预的实验方案的示意图。图1B-图1G的图显示了在基线(肽输注之前)、PTRA后30分钟和PTRA后180分钟时，在ARAS+PTRA+媒介物和ARAS+PTRA+D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2肽猪中的单核细胞趋化蛋白(MCP-1)(B)、肿瘤坏死因子(TNF)-α(C)、白介素(IL)-1β(D)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)(E)、转化生长因子(TGF)-β(F)和血清肌酸酐(Scr)(G)的下腔静脉水平。*相对于基线，$p<0.05$；#相对于ARAS+PTRA+媒介物，$p<0.05$。

[0107] 图2A-图2B的图显示了在基线和PTRA后210min时，在ARAS+PTRA+媒介物和ARAS+PTRA+D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2肽受试者中的8-异前列腺素(A)和尿蛋白(B)的尿水平。#相对于ARAS+PTRA+媒介物，$p<0.05$。图2C和2D的图解释了在分离的肾动脉环中没有观察到响应于肽的血管收缩效应(C)或血管扩张效应(D)。#相对于ARAS+PTRA+媒介物，$p<0.05$。

[0108] 图3A的图显示了通过遥测测得的实验受试者在71天时段内的平均动脉压。图3B-图3E显示了在正常、ARAS、ARAS+PTRA+媒介物和ARAS+PTRA+D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2肽受试者中的肾皮质(黑色)和髓质(灰色)体积(B)、灌注(C)、肾血流量(RBF)(D)和肾小球滤过率(GFR)(E)。肽的施用改善了狭窄的血运重建的肾的肾功能。*相对于正常,$p<0.05$;‡相对于ARAS+PTRA+D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2肽,$p<0.05$。

[0109] 图4A显示了在正常、ARAS、ARAS+PTRA+媒介物、和ARAS+PTRA+D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2肽受试者中的代表性的末端脱氧核苷酸转移酶dUTP切口末端标记(TUNEL)(上图)和半胱氨酰天冬氨酸特异性蛋白酶-3染色(下图)。图4B显示了在正常、ARAS、ARAS+PTRA+媒介物和ARAS+PTRA+D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2肽受试者中的TUNEL(黑色)和半胱氨酰天冬氨酸特异性蛋白酶-3染色(灰色)的定量。图4C的蛋白质印迹显示了B-细胞淋巴瘤(Bcl)-2、Bcl-2-相关的X蛋白(Bax)、过氧化物酶体增殖子活化的受体γ辅激活因子(PGC)-1α、核呼吸因子(NRF)-1、GA-结合蛋白(GABP)、过氧化物酶体增殖子活化的受体(PPAR)α、PPAR-δ、血红素加氧酶(HO)-1和sirtuin(SIRT)-1在得自正常、ARAS、ARAS+PTRA+媒介物和ARAS+PTRA+D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2肽受试者的肾组织中的表达。图4D显示了这些蛋白相对于GAPDH的定量。

[0110] 图5A显示了正常、ARAS、ARAS+PTRA+媒介物和ARAS+PTRA+D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2肽受试者中的代表性的三维微-CT图像(上图)和皮质微血管的透壁空间密度的定量(下图)。图5B显示了皮质微血管的平均血管直径和血管迂曲度的定量。图5C显示了在正常、ARAS、ARAS+PTRA+媒介物和ARAS+PTRA+D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2肽受试者中的血管内皮生长因子(VEGF)和它的受体(VEGFR-1和VEGFR2)的肾表达水平。*相对于正常,$p<0.05$;‡相对于ARAS+PTRA+D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2肽,$p<0.05$。

[0111] 图6A显示了得自正常、ARAS、ARAS+PTRA+媒介物和ARAS+PTRA+D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2肽受试者的肾组织中的荧光二氢溴化乙啶(DHE)和DAPI染色(上图)以及信号的定量(下图)。图6B显示了得自正常、ARAS、ARAS+PTRA+媒介物和ARAS+PTRA+D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2肽受试者的肾组织中的p47和硝基酪氨酸(NT)的水平。*相对于正常,$p<0.05$;‡相对于ARAS+PTRA+D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2肽,$p<0.05$。

[0112] 图7A显示了得自正常、ARAS、ARAS+PTRA+媒介物和ARAS+PTRA+D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2肽受试者的肾组织中的代表性的MCP-1(上图)和CD163(下图)染色。图7B显示了得自正常、ARAS、ARAS+PTRA+媒介物和ARAS+PTRA+D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2肽受试者的肾组织中的MCP-1和CD163的定量。图7C显示了得自正常、ARAS、ARAS+PTRA+媒介物和ARAS+PTRA+D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2肽受试者的肾组织中的TNF-α的蛋白质印迹,以及TNF-α水平相对于GAPDH的定量。*相对于正常,$p<0.05$;‡相对于ARAS+PTRA+D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2肽,$p<0.05$。

[0113] 图8A显示了得自正常、ARAS、ARAS+PTRA+媒介物和ARAS+PTRA+D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2肽受试者的肾组织的代表性过碘酸-希夫(PAS)染色,以及肾小管损伤的定量。图8B显示了得自正常、ARAS、ARAS+PTRA+媒介物和ARAS+PTRA+D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2肽受试者的肾组织中的代表性纤连蛋白(上图)和胶原IV(下图)。图8C显示了得自正常、ARAS、ARAS+PTRA+媒介物和ARAS+PTRA+D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2肽受试者的肾组织

中的纤连蛋白和胶原IV染色的定量，作为总面积的百分比。*相对于正常，$p<0.05$；‡相对于ARAS+PTRA+D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2肽，$p<0.05$。

[0114] 图9A显示了得自正常、ARAS、ARAS+PTRA+媒介物和ARAS+PTRA+D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2肽受试者的肾小球周围(上图)和管间质(下图)肾组织的代表性三色染色。图9B显示了正常、ARAS、ARAS+PTRA+媒介物和ARAS+PTRA+D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2肽受试者中的管间质纤维化和肾小球评分的定量。图9C显示了得自正常、ARAS、ARAS+PTRA+媒介物和ARAS+PTRA+D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2肽受试者的肾组织的PAI-1和TGFβ-1蛋白的蛋白质印迹，以及PAI-1和TGFβ-1水平相对于GAPDH的定量。*相对于正常，$p<0.05$；‡相对于ARAS+PTRA+D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2肽，$p<0.05$。

[0115] 图10显示了得自正常+媒介物、正常+肽、ARVD+媒介物和ARVD+肽受试者的肾组织切片的代表性三色染色(蓝色；40倍放大率)。

[0116] 图11显示了在图10中描绘的正常+媒介物、正常+肽、ARAS+媒介物和ARAS+肽受试者的三色染色的定量。*相对于正常，$p<0.05$；‡相对于ARVD+肽，$p<0.05$。

[0117] 图12显示了正常+媒介物、正常+肽、ARAS+媒介物和ARAS+肽受试者的代表性BOLD MRI图像。

[0118] 图13显示了在图10中描绘的正常+媒介物、正常+肽、ARAS+媒介物和ARAS+肽受试者的皮质血液氧合指数(R2*)的定量。*相对于正常，$p<0.05$；‡相对于ARVD+肽，$p<0.05$。

[0119] 图14显示了在正常+肽、ARAS+媒介物和ARAS+肽受试者中响应于Ach输注的肾血流量变化(ΔRBF)的量级。*相对于正常，$p<0.05$；#相对于ARVD+肽，$p<0.05$。

[0120] 图15显示了在正常+肽，ARAS+媒介物，和ARAS+肽受试者中响应于Ach输注的肾小球滤过率的变化(ΔGFR)的量级。*相对于正常，$p<0.05$；#相对于ARVD+肽，$p<0.05$。

具体实施方式

[0121] 应当理解，在下面以不同的详细水平描述了本公开内容的某些方面、模式、实施方案、变化和特征，以便提供本发明技术的实质理解。

[0122] 在实践本发明方法时，使用分子生物学、蛋白生物化学、细胞生物学、免疫学、微生物学和重组DNA中的许多常规技术。这些技术是众所周知的，且在例如以下文献中进行了解释：Current Protocols in Molecular Biology，第I-III卷，Ausubel编(1997)；Sambrook等人，Molecular Cloning:A Laboratory Manual，第2版(Cold Spring Harbor Laboratory Press，Cold Spring Harbor，NY，1989)；DNA Cloning:A Practical Approach，第I和II卷，Glover编(1985)；Oligonucleotide Synthesis，Gait编(1984)；Nucleic Acid Hybridization，Hames和Higgins编(1985)；Transcription and Translation，Hames和Higgins编(1984)；Animal Cell Culture，Freshney编(1986)；Immobilized Cells and Enzymes(IRL Press，1986)；Perbal，A Practical Guide to Molecular Cloning；Meth.Enzymol.系列(Academic Press，Inc.，1984)；Gene Transfer Vectors forMammalian Cells，Miller和Calos编(Cold Spring Harbor Laboratory，NY，1987)；和Meth.Enzymol.，第154和155卷，分别由Wu和Grossman、以及Wu编。

[0123] 下面提供了在本说明书中使用的某些术语的定义。除非另外定义，在本文中使用

的所有技术和科学术语通常具有与本技术所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。

[0124] 在本说明书和所附权利要求中使用的单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数指示物，除非上下文另外清楚地指示。例如，所提及的“一个细胞“包括两个或更多个细胞的组合等。

[0125] 本文中使用的将试剂、药物或肽“施用”给受试者包括给受试者引入或递送化合物以执行其预期功能的任何途径。可以通过任何合适的途径来实现施用，包括口服地、鼻内地、胃肠外地(静脉内、肌肉内、腹膜内或皮下)或者局部地。在某些实施方案中，通过动脉内途径施用所述芳族阳离子肽。施用包括自身施用和/或由其他人施用。

[0126] 本文中使用的术语“氨基酸”包括天然存在的氨基酸和合成的氨基酸以及氨基酸类似物和以类似于天然存在的氨基酸的形式起作用的氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些氨基酸以及后来被改性的那些氨基酸，例如，羟脯氨酸、γ-羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物表示具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构(即结合至氢的α-碳、羧基、氨基和R基)的化合物，例如，高丝氨酸、正亮氨酸、蛋氨酸亚砜、蛋氨酸甲基锍。这样的类似物具有改性的R基(例如正亮氨酸)或改性的肽主链，但是保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物表示具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构、但以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用的化学化合物。在本文中可以通过它们的通常已知的三字母符号或者通过IUPAC-IUB生物化学命名委员会(Biochemical Nomenclature Commission)推荐的单字母符号表示氨基酸。

[0127] 本文中使用的术语“有效量”表示足以获得期望的治疗和/或预防效果的量，例如，导致以下病症的预防或减轻的量：肾缺血-再灌注损伤，或与肾缺血、缺血-再灌注损伤或动脉粥样硬化性肾动脉狭窄(ARAS)有关的一种或多种征状。在治疗或预防应用的背景下，施用给受试者的组合物的量将取决于疾病的类型和严重程度以及诸如平常健康情况、年龄、性别、体重和对药物的耐受性等个体特性。所述量还取决于疾病的程度、严重程度和类型。技术人员能够根据这些因素和其它因素来确定合适的剂量。还可以与一种或多种其它的治疗化合物联合施用所述组合物。在本文所述的方法中，可以将芳族阳离子肽施用给具有肾缺血损伤、肾缺血-再灌注损伤、高血压、ARAS或肾血管性高血压的一种或多种征象或征状的受试者。在其它实施方案中，所述哺乳动物具有肾功能不全的一种或多种征象或征状，诸如疲倦或疲劳、组织肿胀、背痛、食欲变化、消化不良、血清肌酸酐升高、肾高血压或排尿的总颜色或频率的变化。例如，芳族阳离子肽的“治疗有效量”是指，至少改善肾缺血-再灌注损伤或ARAS的生理效应的水平。

[0128] 本文中使用的术语“缺血再灌注损伤”表示如下造成的损伤：首先限制向组织的血液供给，随后突然再供给血液并伴随地产生自由基。缺血是向组织的血液供给的减少，且跟随着再灌注，即氧向被剥夺的组织的突然灌注。缺血性损伤是由向组织的血液供给的限制造成的损伤。缺血性损伤可以是由于急性缺血或慢性缺血。

[0129] “分离的”或“纯化的”多肽或肽基本上不具有源自细胞或组织源(从该源衍生出所述试剂)的细胞材料或其它污染性多肽，或者当化学合成时基本上不具有化学前体或其它化学物质。例如，分离的芳族阳离子肽将不具有会干扰试剂的诊断用途或治疗用途的材料。这样的干扰材料可以包括酶、激素和其它蛋白质类的和非蛋白质类的溶质。

[0130] 本文中使用的术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中互换地用于表示，包括通过肽键或改性的肽键而互相连接的两个或更多个氨基酸的聚合物，即，肽电子等排体。多肽既指短链(通常称为肽、糖肽或寡聚体)也指较长的链(通常称为蛋白质)。多肽可以含有与20种基因编码的氨基酸不同的氨基酸。多肽包括通过天然过程(诸如翻译后加工)或本领域众所周知的化学修饰技术修饰的氨基酸序列。

[0131] 本文中使用的术语“治疗”或“减轻”表示治疗性处理和预防性的或防止性的措施，其中，目的是防止或减缓(减轻)目标病理性的病症或障碍。例如，如果在根据本文所述的方法接受治疗量的芳族阳离子肽以后，受试者显示出可观察的和/或可测量的与ARAS有关的肾缺血-再灌注损伤的减少，则成功地“治疗”受试者的与ARAS有关的肾缺血/再灌注损伤。还应当理解，描述的治疗或预防医学病症的各种模式旨在表示“显著的”，其包括完全治疗或者预防以及小于完全治疗或者预防，且其中实现某种生物学上或医学上相关的结果。

[0132] 本文中使用的术语“长期治疗”表示，施用超过单次施用的治疗模式。在某些实施方案中，给受试者施用治疗超过1次。在某些实施方案中，给受试者施用治疗超过5次。在某些实施方案中，给受试者施用治疗超过10次、超过20次、超过30次、超过40次、超过50次、超过60次、超过70次、超过80次、超过90次或超过100次。在某些实施方案中，给受试者施用治疗大于约1周、大于约2周、大于约3周、大于约4周、大于约5周、大于约6周、大于约7周、大于约8周、大于约9周、大于约10周、大于约11周、大于约12周、大于约13周、大于约14周或大于约15周的时段。在某些实施方案中，给受试者施用治疗大于1年、大于5年、大于10年或大于20年的时段。

[0133] 本文中使用的“预防”或“防止”障碍或病症表示，在统计样品中的化合物相对于未治疗的对照样品降低治疗的样品的障碍或病症的发生率，或者相对于未治疗的对照样品延迟障碍或病症的发作或者减轻障碍或病症的一种或多种征状的严重程度。本文中使用的“预防缺血-再灌注损伤”包括：预防氧化性损伤或预防线粒体的通透性转变，由此预防或改善通向肾的血流量的损失和随后恢复的有害作用。

[0134] Ⅰ.预防或治疗与高血压和/或肾动脉狭窄有关的肾和心脏损伤的方法

[0135] 通向肾的血流量的恢复是治疗肾狭窄的一个重要部分。血流量的快速恢复可以损伤肾微血管，导致降低的肾功能和长期预后不良。该效应被称作缺血/再灌注损伤。

[0136] 再灌注损伤可以发生在肾脏以外的器官，诸如心脏、肝脏、肾脏、脑、皮肤等。首先在脑缺血中提出再灌注后的组织损伤。遭受2次短暂的1/2分钟缺血的兔脑在缺血解除后具有正常血流量。当兔暴露于更长缺血时段时，不会恢复通向脑组织的正常流量，即使在解除血管阻塞以后。长期缺血会导致微脉管系统的显著变化，所述变化会干扰通向脑细胞的正常流量。在脑缺血的多种动物模型中证实了该现象的存在。这也在多种其它器官(包括皮肤、骨骼肌和肾)中得到证实。此外，微循环改变可以调控在器官移植过程中由缺血-再灌注损伤诱导的器官损伤。

[0137] 本发明技术涉及通过给有此需要的受试者施用治疗有效量的芳族阳离子肽(诸如D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2)或其药学上可接受的盐(诸如乙酸盐或三氟乙酸盐)来治疗或预防哺乳动物中的缺血损伤和/或缺血-再灌注损伤。在一个方面，本发明技术涉及可用于治疗或预防具有肾动脉狭窄的受试者中与肾血运重建有关的肾损伤的方法。

[0138] 在一个方面，本发明技术涉及ARVD的治疗，其包括：给有此需要的受试者施用治疗

有效量的肽D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2或其药学上可接受的盐诸如乙酸盐或三氟乙酸盐。在某些实施方案中,所述治疗是施用时段大于1周的长期治疗。

[0139] 在另一个方面,本发明技术涉及治疗或预防在没有组织再灌注存在下的缺血性损伤。例如,可以将肽施用给经历一个或多个组织或器官中的急性缺血的患者,例如,所述患者不是血运重建手术的合适候选人,或不可为其容易地获得血运重建手术。额外地或可替换地,可以将所述肽施用给具有一个或多个组织的慢性缺血的患者,以便抢先于对血运重建手术的需求。根据本文所述的方法,在血运重建手术之前、过程中和之后,可以给被施用芳族阳离子肽来治疗或预防在没有组织再灌注存在下的缺血性损伤的患者额外施用肽。

[0140] 在一个实施方案中,肾再灌注损伤的治疗包括:与没有施用芳族阳离子肽的类似受试者相比,在受试者中增加组织灌注的量或面积。在一个实施方案中,肾再灌注损伤的预防包括:与没有施用芳族阳离子肽的类似受试者相比,在受试者中减少由再灌注造成的微血管损伤的量或面积。在某些实施方案中,肾再灌注损伤的治疗或预防包括:与没有施用芳族阳离子肽的类似受试者相比,在受试者中减少对再灌注后受影响的血管的损伤、减少血细胞的栓塞效应、和/或减少内皮细胞膨胀。通过本领域已知的任意技术,包括、但不限于测量肾容量、肾动脉压、肾血流量(RBF)和肾小球滤过率(GFR),以及通过本领域已知的成像技术,包括、但不限于CT和微-CT,可以测量预防或治疗的程度。通过将由这些成像技术中的任一种观察到的受试者中的肾再灌注损伤的程度相对于没有施用芳族阳离子肽的对照受试者或对照受试者群体进行对比,可以确定成功预防或治疗。

[0141] 在一个方面,本发明技术涉及通过给有此需要的受试者施用某些芳族阳离子肽(诸如D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2)或其药学上可接受的盐(诸如乙酸盐或三氟乙酸盐)来治疗或预防与肾血运重建有关的肾再灌注损伤。也提供了一种治疗受试者的肾狭窄以预防在所述器官的再灌注以后对肾的损伤的方法。

[0142] 在一个实施方案中,在发生肾再灌注损伤之前给受试者施用芳族阳离子肽。例如,在某些实施方案中,施用所述肽以抑制、预防或治疗有此需要的受试者中的缺血性损伤,和/或抢先于再灌注治疗和/或减轻或改善再灌注损伤。额外地或可替换地,在某些实施方案中,在发生肾再灌注损伤之后给受试者施用芳族阳离子肽。在一个实施方案中,与血运重建手术结合地执行所述方法。在一个实施方案中,所述血运重建手术是经皮腔内肾血管成形术(PTRA)。在一个方面,本发明技术涉及一种肾血运重建方法,所述方法包括:给哺乳动物受试者施用治疗有效量的芳族阳离子肽,和对所述受试者执行PTRA。

[0143] 在一个实施方案中,在血运重建手术之前,给所述受试者施用肽诸如D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2或其药学上可接受的盐诸如乙酸盐或三氟乙酸盐。在另一个实施方案中,在血运重建手术之后,给所述受试者施用所述肽。在另一个实施方案中,在血运重建手术过程中和之后,给所述受试者施用所述肽。在另一个实施方案中,在血运重建手术之前、过程中和之后连续地给所述受试者施用所述肽。在另一个实施方案中,在肾动脉狭窄和/或肾血运重建手术以后,定期地(即,长期地)给所述受试者施用所述肽。

[0144] 在某些实施方案中,在血运重建手术之后,给所述受试者施用所述肽。在一个实施方案中,在血运重建手术之后,给所述受试者施用所述肽至少3小时、至少5小时、至少8小时、至少12小时或至少24小时。在某些实施方案中,在血运重建手术之前,给所述受试者施用所述肽。在一个实施方案中,从血运重建手术之前至少8小时、至少4小时、至少2小时、至

少1小时或至少10分钟开始，给所述受试者施用所述肽。在一个实施方案中，在血运重建手术之后，给所述受试者施用至少1周、至少1个月或至少1年。在某些实施方案中，在血运重建手术之前和之后，给所述受试者施用所述肽。在某些实施方案中，在指定的时间段内给所述受试者施用所述肽作为输注。在某些实施方案中，给所述受试者施用所述肽作为推注。

[0145] 在某些实施方案中，本发明方法包括，与一种或多种血栓溶解剂结合施用芳族阳离子肽。在某些实施方案中，所述一种或多种血栓溶解剂选自：组织型纤溶酶原激活物、尿激酶、尿激酶原、链激酶、酰化形式的纤溶酶原、酰化形式的纤溶酶和酰化的链激酶-纤溶酶原复合物。

[0146] 本文还提供了用于在具有高血压、肾血管性高血压或单侧肾动脉狭窄的患者中预防或治疗狭窄肾和/或对侧肾损伤的方法。在这样的患者中，对侧肾的损伤是对肾动脉狭窄的代偿性生物应答的结果。响应于肾微动脉中降低的脉搏压，从狭窄肾释放出增加的量的肾素。例如，肾灌注压力的50％下降会导致来自缺血肾的肾素分泌的立即和持续增加以及伴随的来自对侧肾的分泌的抑制。这对钠排泄、交感神经活动、肾内前列腺素浓度和一氧化氮产生具有直接影响；且因此造成肾血管性高血压。当肾血管性高血压持续时，血浆肾素活性降低(被称作“反向快速耐受”)。具有持续多年的肾血管性高血压的患者会遭受对侧肾的广泛肾硬化。

[0147] 本文还提供了在具有高血压、单侧肾动脉狭窄或肾血管性高血压的患者中预防或治疗心脏损伤的方法。在这样的患者中，心脏损伤是对肾动脉狭窄和高血压的代偿性生物应答的结果。如上所述，响应于肾微动脉中降低的脉搏压，从狭窄肾释放出增加的量的肾素，而来自对侧肾的肾素水平下降。这会导致血浆肾素水平和/或活性的总体下降。这伴有扩大的体液体积和增加的心输出量。心输出量的持续增加会导致充血性心力衰竭的发展。此外，动脉压的增加会增加后负荷和导致心脏肥大。在某些实施方案中，与第二种活性剂(例如，抗高血压剂)结合施用所述肽。示例性的试剂包括、但不限于，利尿剂、肾上腺素能受体激动剂、钙通道阻滞剂、肾素抑制剂、ACE抑制剂、血管紧张素II受体激动剂、醛固酮拮抗剂、血管扩张剂和/或作用于中枢神经系统的肾上腺素能药。

[0148] 因而，在某些方面，本公开内容提供了一种用于治疗有此需要的受试者中与单侧肾动脉狭窄有关的对侧肾损伤的方法，所述方法包括：给所述受试者施用治疗有效量的肽D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2或其药学上可接受的盐。

[0149] 在某些实施方案中，所述方法进一步包括对所述受试者执行肾血运重建手术的步骤。在某些实施方案中，所述血运重建手术包括经皮腔内肾血管成形术。在某些实施方案中，所述动脉粥样硬化性肾动脉狭窄包括受试者的肾微脉管系统的破裂或阻塞。在某些实施方案中，所述受试者处于肾微脉管系统稀薄化的风险中或者正在遭受肾微脉管系统稀薄化。在某些实施方案中，在肾微脉管系统稀薄化开始之前，给所述受试者施用所述肽。

[0150] 在某些实施方案中，在血运重建手术之前，在血运重建手术之后，在血运重建手术过程中和之后，或在血运重建手术之前、过程中和之后连续地，给所述受试者施用所述肽。

[0151] 在某些实施方案中，在血运重建手术之后给所述受试者施用所述肽至少3小时，在血运重建手术之后给所述受试者施用所述肽至少5小时，在血运重建手术之后给所述受试者施用所述肽至少8小时，在血运重建手术之后给所述受试者施用所述肽至少12小时，或在血运重建手术之后给所述受试者施用所述肽至少24小时。

[0152] 在某些实施方案中，从血运重建手术之前至少8小时开始，从血运重建手术之前至少4小时开始，从血运重建手术之前至少2小时开始，从血运重建手术之前至少1小时开始，或从血运重建手术之前至少10分钟开始，给所述受试者施用所述肽。

[0153] 在某些实施方案中，所述血运重建手术包括除去肾动脉阻塞。在某些实施方案中，所述血运重建手术包括施用一种或多种血栓溶解剂。在某些实施方案中，所述一种或多种血栓溶解剂选自：组织型纤溶酶原激活物、尿激酶、尿激酶原、链激酶、酰化形式的纤溶酶原、酰化形式的纤溶酶和酰化的链激酶-纤溶酶原复合物。

[0154] 在某些方面，本公开内容提供了一种用于治疗有此需要的受试者中与动脉粥样硬化性肾动脉狭窄有关的充血性心力衰竭或心脏肥大的方法，所述方法包括：给所述受试者施用治疗有效量的肽D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2或其药学上可接受的盐。

[0155] 在某些实施方案中，所述方法进一步包括对所述受试者执行肾血运重建手术的步骤。

[0156] 在某些实施方案中，所述血运重建手术包括经皮腔内肾血管成形术。在某些实施方案中，所述动脉粥样硬化性肾动脉狭窄包括受试者的肾微脉管系统的破裂或阻塞。在某些实施方案中，所述受试者处于肾微脉管系统稀薄化的风险中或者正在遭受肾微脉管系统稀薄化。在某些实施方案中，在肾微脉管系统稀薄化开始之前，给所述受试者施用所述肽。

[0157] 在某些实施方案中，在血运重建手术之前，在血运重建手术之后，在血运重建手术过程中和之后，或在血运重建手术之前、过程中和之后连续地，给所述受试者施用所述肽。

[0158] 在某些实施方案中，在血运重建手术之后给所述受试者施用所述肽至少3小时，在血运重建手术之后给所述受试者施用所述肽至少5小时，在血运重建手术之后给所述受试者施用所述肽至少8小时，在血运重建手术之后给所述受试者施用所述肽至少12小时，或在血运重建手术之后给所述受试者施用所述肽至少24小时。

[0159] 在某些实施方案中，从血运重建手术之前至少8小时开始，从血运重建手术之前至少4小时开始，从血运重建手术之前至少2小时开始，从血运重建手术之前至少33小时开始，或从血运重建手术之前至少10分钟开始，给所述受试者施用所述肽。

[0160] 在某些实施方案中，所述血运重建手术包括除去肾动脉阻塞。在某些实施方案中，所述血运重建手术包括施用一种或多种血栓溶解剂。在某些实施方案中，所述一种或多种血栓溶解剂选自：组织型纤溶酶原激活物、尿激酶、尿激酶原、链激酶、酰化形式的纤溶酶原、酰化形式的纤溶酶和酰化的链激酶-纤溶酶原复合物。

[0161] 在某些实施方案中，本文中公开的方法包括：给有此需要的受试者施用一种或多种芳族阳离子肽，以治疗或预防在没有组织再灌注存在下的缺血性损伤。在某些实施方案中，所述方法包括：给经历一个或多个组织的急性缺血的患者施用一种或多种肽诸如D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2或其药学上可接受的盐诸如乙酸盐或三氟乙酸盐，所述患者不是血运重建手术的合适候选人，或不可为其容易地获得血运重建手术。在某些实施方案中，所述方法包括：给具有一个或多个组织的慢性缺血的患者施用一种或多种肽，以便抢先于对血运重建手术的需求。在某些实施方案中，在血运重建手术之前、过程中和之后，给被施用芳族阳离子肽来治疗或预防在没有组织再灌注存在下的缺血性损伤的患者额外施用肽。

[0162] II.本发明技术的芳族阳离子肽的制备

[0163] 本发明技术的芳族阳离子肽是水溶性的和高极性的。尽管所述肽具有这些特性，但是所述肽可以容易地穿透细胞膜。所述芳族阳离子肽通常包括通过肽键共价连接的最少3个氨基酸或最少4个氨基酸。所述芳族阳离子肽中存在的氨基酸的最大数目为通过肽键共价连接的约20个氨基酸。适当地，氨基酸的最大数目为约12个、更优选约9个和最优选约6个。

[0164] 芳族阳离子肽的氨基酸可以是任何氨基酸。本文中使用的术语“氨基酸”用来指包括至少一个氨基和至少一个羧基的任何有机分子。通常，至少一个氨基是相对于羧基在α位。所述氨基酸可以是天然存在的。天然存在的氨基酸包括例如在哺乳动物蛋白中常见的二十种最常见的左旋(L)氨基酸，即，丙氨酸(Ala)、精氨酸(Arg)、天冬酰胺(Asn)、天冬氨酸(Asp)、半胱氨酸(Cys)、谷氨酰胺(Gln)、谷氨酸(Glu)、甘氨酸(Gly)、组氨酸(His)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、赖氨酸(Lys)、蛋氨酸(Met)、苯丙氨酸(Phe)、脯氨酸(Pro)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)、色氨酸、(Trp)、酪氨酸(Tyr)和缬氨酸(Val)。其它天然存在的氨基酸包括例如在代谢过程中合成的与蛋白质合成无关的氨基酸。例如，在哺乳动物代谢中产生尿素期间合成氨基酸鸟氨酸和瓜氨酸。天然存在的氨基酸的另一个例子包括羟脯氨酸(Hyp)。

[0165] 所述肽任选地含有一个或多个非天然存在的氨基酸。在某些实施方案中，所述肽不具有天然存在的氨基酸。所述非天然存在的氨基酸可以是左旋(L-)氨基酸、右旋(D-)氨基酸或其混合物。非天然存在的氨基酸是这样的氨基酸：其通常不是在活生物体的正常代谢过程中合成，且非天然地出现在蛋白质中。此外，非天然存在的氨基酸适当地也不会被普通的蛋白酶识别。非天然存在的氨基酸可以存在于肽的任何位置。例如，非天然存在的氨基酸可以是在N末端、C末端或者在N末端和C末端之间的任何位置。

[0166] 例如，非天然的氨基酸可以包含在天然氨基酸中不存在的烷基、芳基或烷基芳基。非天然烷基氨基酸的一些例子包括β-氨基丁酸、β-氨基丁酸、γ-氨基丁酸、δ-氨基戊酸和ε-氨基己酸。非天然的芳基氨基酸的一些例子包括邻-、间-和对-氨基苯甲酸。非天然的烷基芳基氨基酸的一些例子包括邻-、间-和对-氨基苯乙酸以及γ-苯基-β-氨基丁酸。非天然存在的氨基酸包括天然存在的氨基酸的衍生物。所述天然存在的氨基酸的衍生物可以例如包括一个或多个化学基团向天然存在的氨基酸的添加。

[0167] 例如，可以将一个或多个化学基团添加至苯丙氨酸或酪氨酸残基的芳族环的2′、3′、4′、5′或6′位置或者色氨酸残基的苯并环的4′、5′、6′或7′位置中的一个或多个。所述基团可以是可添加到芳族环的任何化学基团。这样的基团的一些例子包括：支链或直链C_1-C_4烷基，诸如甲基、乙基、正丙基、异丙基、丁基、异丁基或叔丁基、C_1-C_4烷氧基(即，烷氧基)、氨基、C_1-C_4烷基氨基和C_1-C_4二烷基氨基(例如，甲基氨基、二甲基氨基)、硝基、羟基、卤代(即，氟代、氯代、溴代或碘代)。天然存在的氨基酸的非天然存在的衍生物的一些具体例子包括正缬氨酸(Nva)和正亮氨酸(Nle)。

[0168] 肽中氨基酸的修饰的另一个例子是，将肽中的天冬氨酸或谷氨酸残基的羧基衍生化。衍生化的一个例子是与氨或与伯胺或仲胺(例如甲胺、乙胺、二甲胺或二乙胺)的酰胺化。衍生化的另一个例子包括与诸如甲醇或乙醇酯化。另一种这样的修饰包括赖氨酸、精氨酸或组氨酸残基的氨基的衍生化。例如，这样的氨基可以被酰化。一些合适的酰基包括例如苯甲酰基或者包含以上提及的C_1-C_4的烷基中的任一个的烷酰基，诸如乙酰基或丙酰基。

[0169] 非天然存在的氨基酸对常见蛋白酶优选地为耐受性的且更优选地为不敏感的。对蛋白酶耐受性的或者不敏感的非天然存在的氨基酸的例子包括上述天然存在的L-氨基酸中的任一种的右旋(D-)形式以及L-和/或D-非天然存在的氨基酸。尽管D-氨基酸存在于通过与细胞的正常核糖体蛋白合成机制不同的方法而合成的某些肽抗生素中，但是所述D-氨基酸通常不存在于蛋白质中。本文中使用的D-氨基酸被认为是非天然存在的氨基酸。

[0170] 为了使蛋白酶敏感性最小化，所述肽应当具有小于5个、优选地小于4个、更优选地小于3个、且最优选地小于2个由普通蛋白酶识别的连续L-氨基酸，不论所述氨基酸是天然存在的还是非天然存在的。在某些实施方案中，所述肽仅具有D-氨基酸，且不具有L-氨基酸。如果所述肽含有蛋白酶敏感的氨基酸序列，则所述氨基酸中的至少一个优选地为非天然存在的D-氨基酸，由此提供蛋白酶抗性。蛋白酶敏感序列的一个例子包括可以由常见蛋白酶(诸如内肽酶和胰蛋白酶)容易地切割的两个或更多个连续的碱性氨基酸。碱性氨基酸的例子包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。

[0171] 与肽中的氨基酸残基的总数相比，在生理pH，所述芳族阳离子肽应当具有最小数目的净正电荷。在生理pH的净正电荷的最小数目在下文称为(p_m)。肽中的氨基酸残基的总数在下文称为(r)。下文讨论的净正电荷的最小数目都是在生理pH。本文中使用的术语“生理pH”表示哺乳动物体的组织和器官的细胞中的正常pH。例如，人的生理pH通常为约7.4，而哺乳动物中的正常生理pH可以为从约7.0至约7.8的任意pH。

[0172] 本文中使用的“净电荷”表示存在于肽中的氨基酸所携带的正电荷的数目和负电荷的数目之间的平衡。在本说明书中，应当理解，在生理pH测量净电荷。在生理pH带正电荷的天然存在的氨基酸包括L-赖氨酸、L-精氨酸和L-组氨酸。在生理pH带负电荷的天然存在的氨基酸包括L-天冬氨酸和L-谷氨酸。

[0173] 通常，肽具有带正电荷的N-端氨基和带负电荷的C-端羧基。所述电荷在生理pH相互抵消。作为计算净电荷的一个例子，肽Tyr-D-Arg-Phe-Lys-Glu-His-Trp-D-Arg具有1个带负电荷的氨基酸(即，Glu)和4个带正电荷的氨基酸(即，两个Arg残基、一个Lys和一个His)。因此，以上的肽具有3个净正电荷。

[0174] 在一个实施方案中，所述芳族阳离子肽具有在生理pH的净正电荷的最小数目(p_m)和氨基酸残基的总数(r)之间的关联，其中$3p_m$是小于或等于r+1的最大数字。在该实施方案中，净正电荷的最小数目(p_m)和氨基酸残基的总数(r)之间的关联如下：

[0175] 表1.氨基酸数目和净正电荷($3p_m \leq p+1$)

[0176]

(r)	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
(p_m)	1	1	2	2	2	3	3	3	4	4	4	5	5	5	6	6	6	7

[0177] 在另一个实施方案中，所述芳族阳离子肽具有净正电荷的最小数目(p_m)和氨基酸残基的总数(r)之间的关联，其中$2p_m$是小于或等于r+1的最大数字。在该实施方案中，净正电荷的最小数目(p_m)和氨基酸残基的总数(r)之间的关联如下：

[0178] 表2.氨基酸数目和净正电荷($2p_m \leq p+1$)

[0179]

(r)	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
(p_m)	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10

[0180] 在一个实施方案中，所述净正电荷的最小数目(p_m)和氨基酸残基的总数(r)是相

等的。在另一个实施方案中，所述肽具有3或4个氨基酸残基和最少1个净正电荷，适当地，最少2个净正电荷和更优选地最少3个净正电荷。

[0181] 还重要的是，与净正电荷的总数(p_t)相比，芳族阳离子肽具有最小数目的芳族基团。芳族基团的最小数目在下文称为(a)。具有芳族基团的天然存在的氨基酸包括氨基酸组氨酸、色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸。例如，六肽Lys-Gln-Tyr-D-Arg-Phe-Trp具有2的净正电荷(由赖氨酸残基和精氨酸残基提供)以及3个芳族基团(由酪氨酸残基、苯丙氨酸残基和色氨酸残基提供)。

[0182] 所述芳族阳离子肽还应当具有芳族基团的最小数目(a)和生理pH的净正电荷的总数(p_t)之间的关联，其中3a是小于或等于p_t+1的最大数字，例外是，当p_t是1时，a也可以是1。在该实施方案中，芳族基团的最小数目(a)和净正电荷的总数(p_t)之间的关联如下：

[0183] 表3.芳族基团和净正电荷($3a \leq p_t+1$或$a=p_t=1$)

[0184]

(p_t)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
(a)	1	1	1	1	2	2	2	3	3	3	4	4	4	5	5	5	6	6	6	7

[0185] 在另一个实施方案中，所述芳族阳离子肽具有芳族基团的最小数目(a)和净正电荷的总数(p_t)之间的关联，其中2a是小于或等于p_t+1的最大数字。在该实施方案中，芳族氨基酸残基的最小数目(a)和净正电荷的总数(p_t)之间的关联如下：

[0186] 表4.芳族基团和净正电荷($2a \leq p_t+1$或$a=p_t=1$)

[0187]

(p_t)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
(a)	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10

[0188] 在另一个实施方案中，芳族基团的数目(a)和净正电荷的总数(p_t)是相等的。

[0189] 羧基，尤其是C-端氨基酸的末端羧基，适当地用例如氨酰胺化，以形成C-端酰胺。可替换地，C-端氨基酸的末端羧基可以用任意伯胺或仲胺酰胺化。所述伯胺或仲胺可以是例如烷基、尤其是支链或直链C_1-C_4烷基或者芳基胺。因此，在肽的C末端的氨基酸可以转化为酰氨基、N-甲基酰氨基、N-乙基酰氨基、N,N-二甲基酰氨基、N,N-二乙基酰氨基、N-甲基-N-乙基酰氨基、N-苯基酰氨基或N-苯基-N-乙基酰氨基。未出现在芳族阳离子肽的C末端的天冬酰胺、谷氨酰胺、天冬氨酸和谷氨酸残基的游离的羧酸酯基也可被酰胺化，不论它们是否存在于肽内。这些内部位置的酰胺化可以用氨或以上所述伯胺或仲胺中的任一种进行。

[0190] 在一个实施方案中，所述芳族阳离子肽是具有两个净正电荷以及至少一个芳族氨基酸的三肽。在一个特定实施方案中，所述芳族阳离子肽是具有两个净正电荷和两个芳族氨基酸的三肽。

[0191] 芳族阳离子肽包括、但不限于：下述肽实施例：

[0192]

2′,6′-Dmp-D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-NH_2
2′,6′-Dmp-D-Arg-Phe-Lys-NH_2
2′,6′-Dmt-D-Arg-Phe-Orn-NH_2
2′,6′-Dmt-D-Arg-Phe-Ahp(2-氨基庚烷 oicacid)-NH_2
2′,6′-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH_2
2′,6′-Dmt-D-Cit-Phe-Lys-NH_2
Ala-D-Phe-D-Arg-Tyr-Lys-D-Trp-His-D-Tyr-Gly-Phe
Arg-D-Leu-D-Tyr-Phe-Lys-Glu-D-Lys-Arg-D-Trp-Lys-D-Phe-Tyr-D-Arg-Gly
Asp-Arg-D-Phe-Cys-Phe-D-Arg-D-Lys-Tyr-Arg-D-Tyr-Trp-D-His-Tyr-D-Phe-Lys-Phe

[0193]

Asp-D-Trp-Lys-Tyr-D-His-Phe-Arg-D-Gly-Lys-NH_2
D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2
D-Glu-Asp-Lys-D-Arg-D-His-Phe-Phe-D-Val-Tyr-Arg-Tyr-D-Tyr-Arg-His-Phe-NH_2
D-His-Glu-Lys-Tyr-D-Phe-Arg
D-His-Lys-Tyr-D-Phe-Glu-D-Asp-D-Asp-D-His-D-Lys-Arg-Trp-NH_2
D-Tyr-Trp-Lys-NH_2
Glu-Arg-D-Lys-Tyr-D-Val-Phe-D-His-Trp-Arg-D-Gly-Tyr-Arg-D-Met-NH_2
Gly-Ala-Lys-Phe-D-Lys-Glu-Arg-Tyr-His-D-Arg-D-Arg-Asp-Tyr-Trp-D-His-Trp-His-D-Lys-Asp.
Gly-D-Phe-Lys-His-D-Arg-Tyr-NH_2
His-Tyr-D-Arg-Trp-Lys-Phe-D-Asp-Ala-Arg-Cys-D-Tyr-His-Phe-D-Lys-Tyr-His-Ser-NH_2
Lys-D-Arg-Tyr-NH_2
Lys-D-Gln-Tyr-Arg-D-Phe-Trp-NH_2
Lys-Trp-D-Tyr-Arg-Asn-Phe-Tyr-D-His-NH_2
Met-Tyr-D-Arg-Phe-Arg-NH_2
Met-Tyr-D-Lys-Phe-Arg
Phe-Arg-D-His-Asp
Phe-D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-NH_2
Phe-D-Arg-His
Phe-D-Arg-Lys-Trp-Tyr-D-Arg-His
Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH_2
Phe-Phe-D-Tyr-Arg-Glu-Asp-D-Lys-Arg-D-Arg-His-Phe-NH_2
Phe-Tyr-Lys-D-Arg-Trp-His-D-Lys-D-Lys-Glu-Arg-D-Tyr-Thr
Thr-Gly-Tyr-Arg-D-His-Phe-Trp-D-His-Lys
Thr-Tyr-Arg-D-Lys-Trp-Tyr-Glu-Asp-D-Lys-D-Arg-His-Phe-D-Tyr-Gly-Val-Ile-D-His-Arg-Tyr-Lys-NH_2
Trp-D-Lys-Tyr-Arg-NH_2
Trp-Lys-Phe-D-Asp-Arg-Tyr-D-His-Lys
Tyr-Asp-D-Lys-Tyr-Phe-D-Lys-D-Arg-Phe-Pro-D-Tyr-His-Lys
Tyr-D-Arg-Phe-Lys-Glu-NH_2
Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH_2
Tyr-D-His-Phe-D-Arg-Asp-Lys-D-Arg-His-Trp-D-His-Phe
Tyr-His-D-Gly-Met
Val-D-Lys-His-Tyr-D-Phe-Ser-Tyr-Arg-NH_2

[0194] 在一个实施方案中，所述肽具有μ-阿片(mu-opioid)受体激动剂活性(即，它们活化μ-阿片受体)。通过与克隆的μ-阿片受体的放射性配体结合或通过利用豚鼠回肠的生物测定，可以评估μ-阿片活性(Schiller等人，Eur.J.Med.Chem.，35:895-901，2000；Zhao等人，J.Pharmacol.Exp.Ther.，307:947-954，2003)。μ-阿片受体的活化通常引起镇痛作用。在某些情况下，具有μ-阿片受体激动剂活性的芳族阳离子肽为优选的。例如，在短期治疗期间，诸如在急性疾病或病症中，可能有益的是，使用活化μ-阿片受体的芳族阳离子肽。这样的急性疾病和病症经常与中等疼痛或严重疼痛有关。在这些情况下，芳族阳离子肽的镇痛作用在人患者或其它哺乳动物的治疗方案中可能是有益的。但是，也可以根据临床需要与镇痛药一起使用或不与镇痛药一起使用不活化μ-阿片受体的芳族阳离子肽。

[0195] 可替换地，在其它情况下，不具有μ-阿片受体激动剂活性的芳族阳离子肽为优选的。例如，在长期治疗期间，例如慢性疾病状态或病症中，可能禁忌使用活化μ-阿片受体的

芳族阳离子肽。在这些情况下，芳族阳离子肽的潜在不利作用或上瘾作用可能排除活化μ-阿片受体的芳族阳离子肽在人患者或其它哺乳动物的治疗方案中的应用。潜在不良作用可以包括镇静、便秘和呼吸抑制。在这样的情况下，不活化μ-阿片受体的芳族阳离子肽可以是适当的治疗。

[0196] 具有μ-阿片受体激动剂活性的肽通常是具有在N末端(即，第一氨基酸位置)处的酪氨酸残基或酪氨酸衍生物的那些肽。适合的酪氨酸衍生物包括2′-甲基酪氨酸(Mmt)；2′,6′-二甲基酪氨酸(2′,6′-Dmt)；3′,5′-二甲基酪氨酸(3′5′Dmt)；N,2′,6′-三甲基酪氨酸(Tmt)；和2′-羟基-6′-甲基酪氨酸(Hmt)。

[0197] 在一个实施方案中，具有μ-阿片受体激动剂活性的肽具有式Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH_2。该肽具有3个净正电荷(由氨基酸酪氨酸、精氨酸和赖氨酸提供)，且具有2个芳族基团(由氨基酸苯丙氨酸和酪氨酸提供)。所述酪氨酸可以是经修饰的酪氨酸衍生物(诸如在2′,6′-二甲基酪氨酸中)，以产生具有式2′,6′-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH_2的化合物。该肽具有640的分子量，且在生理pH携带3个净正电荷。所述肽可以以独立于能量的方式容易地穿透几种哺乳动物细胞类型的质膜(Zhao等人，J.Pharmacol Exp Ther.，304:425-432，2003)。

[0198] 不具有μ-阿片受体激动剂活性的肽通常不具有在N-端(即，氨基酸位置1)处的酪氨酸残基或酪氨酸衍生物。在N-端处的氨基酸可以是除了酪氨酸以外的任意天然存在的或非天然存在的氨基酸。在一个实施方案中，在N-端处的氨基酸是苯丙氨酸或它的衍生物。示例性的苯丙氨酸衍生物包括2′-甲基苯丙氨酸(Mmp)、2′,6′-二甲基苯丙氨酸(2′,6′-Dmp)、N,2′,6′-三甲基苯丙氨酸(Tmp)和2′-羟基-6′-甲基苯丙氨酸(Hmp)。

[0199] 不具有μ-阿片受体激动剂活性的芳族阳离子肽的一个例子具有式Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH_2。可替换地，所述N-端苯丙氨酸可以是苯丙氨酸衍生物诸如2′,6′-二甲基苯丙氨酸(2′,6′-Dmp)。在一个实施方案中，具有在氨基酸位置1处的2′,6′-二甲基苯丙氨酸的肽具有式2′,6′-Dmp-D-Arg-Phe-Lys-NH_2。在一个实施方案中，将所述氨基酸序列重排，使得Dmt不是在N-端处。这样的不具有μ-阿片受体激动剂活性的芳族阳离子肽的一个例子具有式D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2。

[0200] 本文提到的肽和它们的衍生物可以进一步包括功能类似物。如果一种肽具有与所描述的肽相同的功能，则将所述肽看作功能类似物。例如，该类似物可以是肽的替代变体，其中，一个或多个氨基酸被另一种氨基酸替代。肽的合适的替代变体包括保守氨基酸置换。根据氨基酸的物理化学性质，可以将氨基酸如下分组：

[0201] (a)非极性氨基酸：Ala(A)Ser(S)Thr(T)Pro(P)Gly(G)Cys(C)；

[0202] (b)酸性氨基酸：Asn(N)Asp(D)Glu(E)Gln(Q)；

[0203] (c)碱性氨基酸：His(H)Arg(R)Lys(K)；

[0204] (d)疏水性氨基酸：Met(M)Leu(L)Ile(I)Val(V)；和

[0205] (e)芳族氨基酸：Phe(F)Tyr(Y)Trp(W)His(H)。

[0206] 肽中的氨基酸被同一组中的另一种氨基酸替代，称为保守置换，且可以保留原始肽的物理化学性质。相反，肽中的氨基酸被不同组中的另一种氨基酸替代，通常更可能改变原始肽的性质。

[0207] 活化μ-阿片受体的肽的例子包括、但不限于在表5中显示的芳族阳离子肽。

[0208]

表 5. 具有 μ-阿片活性的肽类似物

氨基酸位置 1	氨基酸位置 2	氨基酸位置 3	氨基酸位置 4	C-端修饰
Tyr	D-Arg	Phe	Lys	NH_2
Tyr	D-Arg	Phe	Orn	NH_2
Tyr	D-Arg	Phe	Dab	NH_2
Tyr	D-Arg	Phe	Dap	NH_2
2′6′Dmt	D-Arg	Phe	Lys	NH_2
2′6′Dmt	D-Arg	Phe	Lys-$NH(CH_2)_2$-NH-dns	NH_2
2′6′Dmt	D-Arg	Phe	Lys-$NH(CH_2)_2$-NH-atn	NH_2
2′6′Dmt	D-Arg	Phe	dnsLys	NH_2
2′6′Dmt	D-Cit	Phe	Lys	NH_2
2′6′Dmt	D-Cit	Phe	Ahp	NH_2
2′6′Dmt	D-Arg	Phe	Orn	NH_2
2′6′Dmt	D-Arg	Phe	Dab	NH_2
2′6′Dmt	D-Arg	Phe	Dap	NH_2
2′6′Dmt	D-Arg	Phe	Ahp(2-氨基庚酸)	NH_2
Bio-2′6′Dmt	D-Arg	Phe	Lys	NH_2
3′5′Dmt	D-Arg	Phe	Lys	NH_2
3′5′Dmt	D-Arg	Phe	Orn	NH_2
3′5′Dmt	D-Arg	Phe	Dab	NH_2
3′5′Dmt	D-Arg	Phe	Dap	NH_2

[0209]

表 5. 具有 μ-阿片活性的肽类似物

氨基酸位置 1	氨基酸位置 2	氨基酸位置 3	氨基酸位置 4	C-端修饰
Tyr	D-Arg	Tyr	Lys	NH_2
Tyr	D-Arg	Tyr	Orn	NH_2
Tyr	D-Arg	Tyr	Dab	NH_2
Tyr	D-Arg	Tyr	Dap	NH_2
2′6′Dmt	D-Arg	Tyr	Lys	NH_2
2′6′Dmt	D-Arg	Tyr	Orn	NH_2
2′6′Dmt	D-Arg	Tyr	Dab	NH_2
2′6′Dmt	D-Arg	Tyr	Dap	NH_2
2′6′Dmt	D-Arg	2′6′Dmt	Lys	NH_2
2′6′Dmt	D-Arg	2′6′Dmt	Orn	NH_2
2′6′Dmt	D-Arg	2′6′Dmt	Dab	NH_2
2′6′Dmt	D-Arg	2′6′Dmt	Dap	NH_2
3′5′Dmt	D-Arg	3′5′Dmt	Arg	NH_2
3′5′Dmt	D-Arg	3′5′Dmt	Lys	NH_2
3′5′Dmt	D-Arg	3′5′Dmt	Orn	NH_2
3′5′Dmt	D-Arg	3′5′Dmt	Dab	NH_2
Tyr	D-Lys	Phe	Dap	NH_2
Tyr	D-Lys	Phe	Arg	NH_2
Tyr	D-Lys	Phe	Lys	NH_2
Tyr	D-Lys	Phe	Orn	NH_2
2′6′Dmt	D-Lys	Phe	Dab	NH_2
2′6′Dmt	D-Lys	Phe	Dap	NH_2
2′6′Dmt	D-Lys	Phe	Arg	NH_2
2′6′Dmt	D-Lys	Phe	Lys	NH_2
3′5′Dmt	D-Lys	Phe	Orn	NH_2
3′5′Dmt	D-Lys	Phe	Dab	NH_2
3′5′Dmt	D-Lys	Phe	Dap	NH_2
3′5′Dmt	D-Lys	Phe	Arg	NH_2
Tyr	D-Lys	Tyr	Lys	NH_2
Tyr	D-Lys	Tyr	Orn	NH_2
Tyr	D-Lys	Tyr	Dab	NH_2
Tyr	D-Lys	Tyr	Dap	NH_2
2′6′Dmt	D-Lys	Tyr	Lys	NH_2
2′6′Dmt	D-Lys	Tyr	Orn	NH_2
2′6′Dmt	D-Lys	Tyr	Dab	NH_2
2′6′Dmt	D-Lys	Tyr	Dap	NH_2
2′6′Dmt	D-Lys	2′6′Dmt	Lys	NH_2
2′6′Dmt	D-Lys	2′6′Dmt	Orn	NH_2
2′6′Dmt	D-Lys	2′6′Dmt	Dab	NH_2
2′6′Dmt	D-Lys	2′6′Dmt	Dap	NH_2
2′6′Dmt	D-Arg	Phe	dnsDap	NH_2
2′6′Dmt	D-Arg	Phe	atnDap	NH_2
3′5′Dmt	D-Lys	3′5′Dmt	Lys	NH_2
3′5′Dmt	D-Lys	3′5′Dmt	Orn	NH_2
3′5′Dmt	D-Lys	3′5′Dmt	Dab	NH_2
3′5′Dmt	D-Lys	3′5′Dmt	Dap	NH_2
Tyr	D-Lys	Phe	Arg	NH_2
Tyr	D-Orn	Phe	Arg	NH_2
Tyr	D-Dab	Phe	Arg	NH_2
Tyr	D-Dap	Phe	Arg	NH_2

[0210]

表 5. 具有 μ-阿片活性的肽类似物

氨基酸位置 1	氨基酸位置 2	氨基酸位置 3	氨基酸位置 4	C-端修饰
2′6′Dmt	D-Arg	Phe	Arg	NH_2
2′6′Dmt	D-Lys	Phe	Arg	NH_2
2′6′Dmt	D-Orn	Phe	Arg	NH_2
2′6′Dmt	D-Dab	Phe	Arg	NH_2
3′5′Dmt	D-Dap	Phe	Arg	NH_2
3′5′Dmt	D-Arg	Phe	Arg	NH_2
3′5′Dmt	D-Lys	Phe	Arg	NH_2
3′5′Dmt	D-Orn	Phe	Arg	NH_2
Tyr	D-Lys	Tyr	Arg	NH_2
Tyr	D-Orn	Tyr	Arg	NH_2
Tyr	D-Dab	Tyr	Arg	NH_2
Tyr	D-Dap	Tyr	Arg	NH_2
2′6′Dmt	D-Arg	2′6′Dmt	Arg	NH_2
2′6′Dmt	D-Lys	2′6′Dmt	Arg	NH_2
2′6′Dmt	D-Orn	2′6′Dmt	Arg	NH_2
2′6′Dmt	D-Dab	2′6′Dmt	Arg	NH_2
3′5′Dmt	D-Dap	3′5′Dmt	Arg	NH_2
3′5′Dmt	D-Arg	3′5′Dmt	Arg	NH_2
3′5′Dmt	D-Lys	3′5′Dmt	Arg	NH_2
3′5′Dmt	D-Orn	3′5′Dmt	Arg	NH_2
Mmt	D-Arg	Phe	Lys	NH_2
Mmt	D-Arg	Phe	Orn	NH_2
Mmt	D-Arg	Phe	Dab	NH_2
Mmt	D-Arg	Phe	Dap	NH_2
Tmt	D-Arg	Phe	Lys	NH_2
Tmt	D-Arg	Phe	Orn	NH_2
Tmt	D-Arg	Phe	Dab	NH_2
Tmt	D-Arg	Phe	Dap	NH_2
Hmt	D-Arg	Phe	Lys	NH_2
Hmt	D-Arg	Phe	Orn	NH_2
Hmt	D-Arg	Phe	Dab	NH_2
Hmt	D-Arg	Phe	Dap	NH_2
Mmt	D-Lys	Phe	Lys	NH_2
Mmt	D-Lys	Phe	Orn	NH_2
Mmt	D-Lys	Phe	Dab	NH_2
Mmt	D-Lys	Phe	Dap	NH_2
Mmt	D-Lys	Phe	Arg	NH_2
Tmt	D-Lys	Phe	Lys	NH_2
Tmt	D-Lys	Phe	Orn	NH_2
Tmt	D-Lys	Phe	Dab	NH_2
Tmt	D-Lys	Phe	Dap	NH_2
Tmt	D-Lys	Phe	Arg	NH_2
Hmt	D-Lys	Phe	Lys	NH_2
Hmt	D-Lys	Phe	Orn	NH_2
Hmt	D-Lys	Phe	Dab	NH_2
Hmt	D-Lys	Phe	Dap	NH_2
Hmt	D-Lys	Phe	Arg	NH_2
Mmt	D-Lys	Phe	Arg	NH_2
Mmt	D-Orn	Phe	Arg	NH_2
Mmt	D-Dab	Phe	Arg	NH_2

[0211]

表 5. 具有 μ-阿片活性的肽类似物

氨基酸位置 1	氨基酸位置 2	氨基酸位置 3	氨基酸位置 4	C-端修饰
Mmt	D-Dap	Phe	Arg	NH_2
Mmt	D-Arg	Phe	Arg	NH_2
Tmt	D-Lys	Phe	Arg	NH_2
Tmt	D-Orn	Phe	Arg	NH_2
Tmt	D-Dab	Phe	Arg	NH_2
Tmt	D-Dap	Phe	Arg	NH_2
Tmt	D-Arg	Phe	Arg	NH_2
Hmt	D-Lys	Phe	Arg	NH_2
Hmt	D-Orn	Phe	Arg	NH_2
Hmt	D-Dab	Phe	Arg	NH_2
Hmt	D-Dap	Phe	Arg	NH_2
Hmt	D-Arg	Phe	Arg	NH_2

[0212] Dab＝二氨基丁酸

[0213] Dap＝二氨基丙酸

[0214] Dmt＝二甲基酪氨酸

[0215] Mmt＝2'-甲基酪氨酸

[0216] Tmt＝N,2',6'-三甲基酪氨酸

[0217] Hmt＝2'-羟基,6'-甲基酪氨酸

[0218] dnsDap＝β-丹磺酰基-L-α,β-二氨基丙酸

[0219] atnDap＝β-氨茴酰基-L-α,β-二氨基丙酸

[0220] Bio＝生物素

[0221] 不活化μ-阿片受体的类似物的例子包括、但不限于在表6中显示的芳族阳离子肽。

[0222]

表 6. 缺乏 μ-阿片活性的肽类似物

氨基酸位置 1	氨基酸位置 2	氨基酸位置 3	氨基酸位置 4	C-端稀释
D-Arg	Dmt	Lys	Phe	NH_2
D-Arg	Dmt	Phe	Lys	NH_2
D-Arg	Phe	Lys	Dmt	NH_2
D-Arg	Phe	Dmt	Lys	NH_2
D-Arg	Lys	Dmt	Phe	NH_2
D-Arg	Lys	Phe	Dmt	NH_2
Phe	Lys	Dmt	D-Arg	NH_2
Phe	Lys	D-Arg	Dmt	NH_2
Phe	D-Arg	Phe	Lys	NH_2
Phe	D-Arg	Dmt	Lys	NH_2
Phe	D-Arg	Lys	Dmt	NH_2
Phe	Dmt	D-Arg	Lys	NH_2
Phe	Dmt	Lys	D-Arg	NH_2

表 6. 缺乏 μ-阿片活性的肽类似物

Lys	Phe	D-Arg	Dmt	NH_2
Lys	Phe	Dmt	D-Arg	NH_2
Lys	Dmt	D-Arg	Phe	NH_2
Lys	Dmt	Phe	D-Arg	NH_2
Lys	D-Arg	Phe	Dmt	NH_2
Lys	D-Arg	Dmt	Phe	NH_2
D-Arg	Dmt	D-Arg	Phe	NH_2
D-Arg	Dmt	D-Arg	Dmt	NH_2
D-Arg	Dmt	D-Arg	Tyr	NH_2
D-Arg	Dmt	D-Arg	Trp	NH_2
Trp	D-Arg	Phe	Lys	NH_2
Trp	D-Arg	Tyr	Lys	NH_2
Trp	D-Arg	Trp	Lys	NH_2
Trp	D-Arg	Dmt	Lys	NH_2
D-Arg	Trp	Lys	Phe	NH_2
D-Arg	Trp	Phe	Lys	NH_2
D-Arg	Trp	Lys	Dmt	NH_2
D-Arg	Trp	Dmt	Lys	NH_2
D-Arg	Lys	Trp	Phe	NH_2
D-Arg	Lys	Trp	Dmt	NH_2
Cha	D-Arg	Phe	Lys	NH_2
Ala	D-Arg	Phe	Lys	NH_2

[0223]

[0224] Cha＝环己基丙氨酸

[0225] 在表5和6中显示的肽的氨基酸可以是处于L-或D-构型。

[0226] 通过本领域众所周知的任何方法，可以合成所述肽。用于化学合成蛋白的合适方法包括例如Stuart和Young在以下文献中描述的那些方法：Solid Phase Peptide Synthesis，第2版，Pierce Chemical Company(1984)，和Methods Enzymol.，289，Academic Press，Inc，New York(1997)。

[0227] III.本发明技术的芳族阳离子肽的预防和治疗用途

[0228] 概述.本文描述的芳族阳离子肽(诸如D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2)或其药学上可接受的盐(诸如乙酸盐或三氟乙酸盐)可用于预防或治疗疾病或病症。具体地，本公开内容提供了治疗处于肾损伤风险(或易感肾损伤)的受试者的预防性和治疗性方法，所述肾损伤与肾动脉狭窄有关或与肾动脉狭窄的治疗有关。在某些实施方案中，所述方法包括：对有此需要的受试者执行血运重建手术。在某些实施方案中，所述血运重建手术包括经皮腔内肾血管成形术(PTRA)。因此，本发明方法提供了通过施用有效量的芳族阳离子肽来预防和/或治疗有此需要的受试者中的肾再灌注损伤。

[0229] 基于芳族阳离子肽的治疗剂的生物学效应的确定.在不同的实施方案中，进行合适的体外测定或体内测定来确定特定的基于芳族阳离子肽的治疗剂的效果以及其施用是否适于治疗。在不同的实施方案中，可以用代表性的动物模型进行体外测定，以确定给定的基于芳族阳离子肽的治疗剂是否在预防或治疗肾再灌注损伤中发挥期望的效果。在人受试者中试验之前，可以在合适的动物模型系统中试验治疗中所用的化合物，所述动物模型系统包括、但不限于大鼠、小鼠、鸡、猪、牛、猴、兔、绵羊、豚鼠等。类似地，对于体内试验，在施用给人受试者之前，可以使用本领域已知的任意动物模型系统。

[0230] 预防方法.在一个方面,本公开内容提供了一种通过将预防病症的起始或进展的芳族阳离子肽施用给受试者来预防所述受试者中的肾缺血性或再灌注性损伤的方法。例如,通过如本文中所述的或如本领域已知的诊断或预后测定中的任一种或组合,可以鉴别处于肾再灌注损伤风险中的受试者。在预防应用中,将芳族阳离子肽的药物组合物或药物以足够的量施用给易感疾病或病症或者以其它方式处于疾病或病症风险中的受试者,以消除或降低疾病或病症的风险、减轻疾病或病症的严重程度或延迟疾病或病症的发作,包括疾病或病症的生物化学的、组织学的和/或行为的征状,所述疾病或病症的并发症和所述疾病或病症发展期间的中间病理表型呈现。预防性的芳族阳离子肽的施用可在反常的征状特点显现之前进行,使得疾病或障碍得到预防或可替换地使其进展得到延迟。可以基于上文描述的筛选测定确定合适的化合物。

[0231] 在某些实施方案中,预防方法包括:与一种或多种血栓溶解剂结合施用芳族阳离子肽。在某些实施方案中,所述一种或多种血栓溶解剂选自:组织型纤溶酶原激活物、尿激酶、尿激酶原、链激酶、酰化形式的纤溶酶原、酰化形式的纤溶酶和酰化的链激酶-纤溶酶原复合物。

[0232] 治疗方法.本发明技术的另一个方面包括,出于治疗目的通过给受试者施用芳族阳离子肽来治疗所述受试者中的肾再灌注损伤的方法。在治疗性应用中,将足够量的组合物或药物施用给疑似或已经罹患这样的疾病或病症的受试者,以治愈或者至少部分地抑制所述疾病或病症的征状,包括其并发症和所述疾病或病症发展中的中间病理表型。这样,所述技术提供了治疗罹患肾再灌注损伤的个体的方法。

[0233] 在某些实施方案中,所述治疗方法包括,与一种或多种活性剂结合施用芳族阳离子肽。在某些实施方案中,肽施用是长期的。

[0234] 在某些实施方案中,与一种或多种血栓溶解剂结合施用所述肽。在某些实施方案中,所述一种或多种血栓溶解剂选自:组织型纤溶酶原激活物、尿激酶、尿激酶原、链激酶、酰化形式的纤溶酶原、酰化形式的纤溶酶和酰化的链激酶-纤溶酶原复合物。

[0235] 在某些实施方案中,所述治疗方法包括,与一种或多种抗高血压剂联合地施用芳族阳离子肽。在某些实施方案中,所述一种或多种抗高血压剂包括利尿剂、肾上腺素能受体拮抗剂、钙通道阻滞剂、肾素抑制剂、血管紧张素转换酶(ACE)抑制剂、血管紧张素II受体拮抗剂、醛固酮拮抗剂、血管扩张剂或α-2激动剂。

[0236] 在某些实施方案中,所述利尿剂包括袢利尿剂、噻嗪利尿剂、噻嗪类利尿剂或保钾利尿剂。在某些实施方案中,所述利尿剂包括布美他尼、依他尼酸、呋塞米、托拉塞米、依匹噻嗪、氢氯噻嗪、氯噻嗪、苄氟噻嗪、吲达帕胺、氯噻酮、美托拉宗、阿米洛利、氨苯蝶啶或螺内酯。

[0237] 在某些实施方案中,所述肾上腺素能受体拮抗剂包括β阻滞剂、α阻滞剂或混合的α和β阻滞剂。在某些实施方案中,所述肾上腺素能受体拮抗剂包括阿替洛尔、美托洛尔、纳多洛尔、氧烯洛尔、吲哚洛尔、普萘洛尔、噻吗洛尔、多沙唑嗪、酚妥拉明、吲哚拉明、酚苄明、哌唑嗪、特拉唑嗪、妥拉唑林、布新洛尔、卡维地洛或拉贝洛尔。

[0238] 在某些实施方案中,所述钙通道阻滞剂包括二氢吡啶或非二氢吡啶。在某些实施方案中,所述钙通道阻滞剂包括氨氯地平、非洛地平、伊拉地平、乐卡地平、尼卡地平、硝苯地平、尼莫地平、尼群地平、地尔硫卓或维拉帕米。

[0239] 在某些实施方案中,所述肾素抑制剂包括阿利吉仑®。

[0240] 在某些实施方案中，所述血管紧张素转换酶(ACE)抑制剂包括卡托普利、依那普利、福辛普利、赖诺普利、培哚普利、喹那普利、雷米普利、群多普利或贝那普利。

[0241] 在某些实施方案中，所述血管紧张素II受体拮抗剂包括厄贝沙坦®。

[0242] 在某些实施方案中，所述醛固酮拮抗剂包括依普利酮或螺内酯。

[0243] 在某些实施方案中，所述血管扩张剂拮抗剂包括硝普钠或肼屈嗪。

[0244] 在某些实施方案中，所述α-2激动剂拮抗剂包括可乐定、胍那苄、甲基多巴、莫索尼定、胍乙啶或利舍平。

[0245] V.施用模式和有效剂量

[0246] 可以使用本领域技术人员已知的用于使细胞、器官或组织与肽接触的任何方法。适当的方法包括体外法、离体法或体内法。体内法通常包括将芳族阳离子肽(诸如上文描述的那些)施用给哺乳动物，所述哺乳动物适当地为人。当在体内用于治疗时，可以将芳族阳离子肽以有效量(即具有期望的治疗效果的量)施用给受试者。剂量和施用方案将取决于受试者中的损伤的程度、所使用的特定芳族阳离子肽的性质(例如其治疗指数)、受试者以及受试者的病史。

[0247] 可以在临床前试验和临床试验期间通过内科医师和临床医师熟悉的方法确定有效量。通过用于施用药物化合物的许多众所周知的方法中的任一种方法，可以将有效量的在所述方法中有用的肽施用给有此需要的哺乳动物。可以全身性地或局部地施用所述肽。

[0248] 所述肽可以配制成药学上可接受的盐。术语“药学上可接受的盐”是指由可接受用于施用给诸如患者(诸如哺乳动物)的碱或酸制备成的盐(例如，对于给定的剂量方案，具有可接受的哺乳动物安全性的盐)。但是，应当理解，不要求所述盐是药学上可接受的盐，例如不意图施用给患者的中间化合物的盐。药学上可接受的盐可以从药学上可接受的无机碱或有机碱以及从药学上可接受的无机酸和有机酸衍生出。此外，当肽包含碱性部分(诸如胺、吡啶或咪唑)和酸性部分(诸如羧酸或四唑)时，可以形成两性离子，且所述两性离子被包括在本文中所用的术语“盐”中。从药学上可接受的无机碱衍生出的盐包括铵盐、钙盐、铜盐、铁盐、亚铁盐、锂盐、镁盐、三价锰盐、二价锰盐、钾盐、钠盐和锌盐等。从药学上可接受的有机碱衍生出的盐包括伯胺盐、仲胺盐和叔胺盐，包括被取代的胺、环胺、天然存在的胺等，诸如精氨酸、甜菜碱、咖啡因、胆碱、N,N'-二苄基乙二胺、二乙胺、2-二乙基氨基乙醇、2-二甲基氨基乙醇、乙醇胺、乙二胺、N-乙基吗啉、N-乙基哌啶、还原葡糖胺、葡糖胺、组氨酸、哈胺(hydrabamine)、异丙胺、赖氨酸、甲基还原葡糖胺、吗啉、哌嗪、哌啶(piperadine)、多胺树脂、普鲁卡因、嘌呤、可可碱、三乙胺、三甲胺、三丙胺、氨丁三醇等。从药学上可接受的无机酸衍生出的盐包括硼酸、碳酸、氢卤酸(氢溴酸、盐酸、氢氟酸或氢碘酸)、硝酸、磷酸、氨基磺酸和硫酸的盐。从药学上可接受的有机酸衍生出的盐包括脂族羟基酸(例如，柠檬酸、葡糖酸、羟乙酸、乳酸、乳糖酸、苹果酸和酒石酸)的盐、脂族单羧酸(例如，乙酸、丁酸、甲酸、丙酸和三氟乙酸)的盐、氨基酸(例如，天冬氨酸、谷氨基酸)的盐、芳族羧酸(例如，苯甲酸、对氯苯甲酸、二苯乙酸、龙胆酸、马尿酸和三苯基乙酸)的盐、芳族羟基酸(例如，邻羟基苯甲酸、对羟基苯甲酸、1-羟基萘-2-甲酸和3-羟基萘-2-甲酸)的盐、抗坏血酸盐、二羧酸(例如，富马酸、马来酸、草酸和琥珀酸)的盐、葡萄糖醛酸盐、扁桃酸盐、粘酸盐、烟酸盐、乳清酸盐、扑酸盐、泛酸盐、磺酸(例如，苯磺酸、樟脑磺酸、乙二磺酸、乙磺酸、羟乙磺酸、甲磺酸、萘磺酸、萘-1,5-二磺酸、萘-2,6-二磺酸和对甲苯磺酸)的盐、羟萘甲酸的盐等。在某些实施方案中，

所述盐是乙酸盐或三氟乙酸盐。

[0249] 本文描述的芳族阳离子肽(诸如D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2)或其药学上可接受的盐(诸如乙酸盐或三氟乙酸盐)可以掺入到药物组合物中用于单独地或联合地施用给受试者,以治疗或预防本文中描述的障碍。这样的组合物通常包括活性剂和药学上可接受的载体。本文中使用的术语“药学上可接受的载体”包括与药物施用相容的盐水、溶剂、分散介质、包衣剂、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。还可将补充性活性化合物掺入所述组合物中。

[0250] 通常将药物组合物配制成与其预期施用途径相容。施用途径的例子包括胃肠外的(例如,静脉内的、真皮内的、腹膜内的或皮下的)、口服的、吸入、透皮的(局部的)、眼内的、离子电渗疗法和透粘膜的施用。用于胃肠外、真皮内或皮下应用的溶液或混悬液可以包括以下组分:无菌稀释剂诸如注射用水、盐水溶液、不挥发性油、聚乙二醇、丙三醇、丙二醇或其它合成溶剂;抗细菌剂诸如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂诸如乙二胺四乙酸;缓冲剂诸如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;以及用于调节张度的试剂,诸如氯化钠或葡萄糖。可以用酸或碱(诸如盐酸或氢氧化钠)调节pH。可以将胃肠外制剂包封在由玻璃或塑料制成的安瓿瓶、一次性注射器或多次剂量瓶中。为了患者或治疗医师的方便,可以在含有疗程(例如治疗7天)所需的所有必要设备(例如,药物瓶、稀释剂瓶、注射器和针头)的试剂盒中提供定量给药制剂。

[0251] 适合于注射应用的药物组合物可以包括无菌水溶液(在水溶性的情况下)或者用于即时制备无菌注射液或分散液的分散体和无菌粉剂。就静脉内施用而言,合适的载体包括生理盐水、抑制细菌的水、Cremophor EL™(BASF,Parsippany,N.J.)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况下,用于胃肠外施用的组合物必须是无菌的,并且应当是达到易于注射的程度的流体。它应当在制备和贮存条件下是稳定的,且必须被保存免于微生物(诸如细菌和真菌)的污染作用。

[0252] 所述芳族阳离子肽组合物可以包括载体,所述载体可以是溶剂或分散介质,其包括例如水、乙醇、多元醇(例如,丙三醇、丙二醇以及液态聚乙二醇等)及其合适的组合物。可以维持适当的流动性,例如,通过使用包衣剂诸如卵磷脂通过维持所需的粒度(在分散系的情况下)和通过使用表面活性剂。通过各种抗细菌剂和抗真菌剂(例如,对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等)可以实现微生物作用的预防。可以包括谷胱甘肽和其它抗氧化剂以防止氧化。在很多情况下,优选的是,在所述组合物中包括等渗剂,例如,糖、多元醇诸如甘露醇、山梨醇或氯化钠。通过在组合物中包括延迟吸收的试剂(例如,单硬脂酸铝或明胶),可以实现可注射组合物的延长吸收。

[0253] 可以如下制备无菌可注射溶液:将所需量的活性化合物掺入到含有一种或多种以上列出的成分的适当溶剂中,根据需要然后过滤除菌。通常,如下制备分散体:将活性化合物掺入到无菌媒介物中,后者含有基本分散介质以及所需的以上列出的其它成分。就用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末而言,典型的制备方法包括真空干燥和冷冻干燥,这可以产生活性成分以及来自于先前无菌过滤的其溶液的任何额外期望成分的粉末。

[0254] 口服组合物一般包括惰性稀释剂或可食用的载体。为了口服治疗施用的目的,可以将活性化合物与赋形剂掺合,并以片剂、糖锭或胶囊剂(例如明胶胶囊剂)的形式使用。还可以使用流体载体来制备口服组合物,以用作漱口液。可以包括药学上适合的粘合剂和/或

辅料，作为组合物的一部分。片剂、丸剂、胶囊剂、锭剂等可含有任意下述成分或相似性质的化合物：粘合剂诸如微晶纤维素、黄蓍树胶或明胶；赋形剂诸如淀粉或乳糖；崩解剂诸如海藻酸、Primogel或玉米淀粉；润滑剂诸如硬脂酸镁或或Sterotes；助流剂诸如胶体二氧化硅；甜味剂诸如蔗糖或糖精；或矫味剂诸如薄荷、水杨酸甲酯或橙味矫味剂。

[0255] 对于吸入给药，可以以来自含有合适推进剂(例如，诸如二氧化碳等气体)的加压容器或分配器或者喷雾器的气溶胶喷雾的形式递送所述化合物。这样的方法包括在美国专利号6,468,798中描述的方法。

[0256] 本文中描述的治疗化合物的全身施用还可以是通过透粘膜或透皮方式。关于透粘膜或透皮给药，在制剂中使用适合要渗透的屏障的穿透剂。该穿透剂是本领域中普遍已知的，并且对于透粘膜给药而言，包括例如去污剂、胆汁盐和夫西地酸衍生物。通过使用鼻腔喷雾剂，可以完成透粘膜施用。对于透皮给药，将活性化合物配制成本领域普遍已知的软膏剂、油膏剂、凝胶或乳膏剂。在一个实施方案中，透皮施用可以通过离子透入法来进行。

[0257] 可以将治疗性蛋白质或肽配制在载体系统中。所述载体可以是胶体系统。所述胶体系统可以是脂质体，即磷脂双层媒介物。在一个实施方案中，将治疗性肽包囊在脂质体中，同时保持肽完整性。本领域技术人员会理解，存在多种制备脂质体的方法(参见Lichtenberg等人，Methods Biochem.Anal.，33:337-462(1988)；Anselem等人，Liposome Technology，CRC Press(1993))。脂质体制剂可以延迟清除并增加细胞摄取(参见Reddy，Ann.Pharmacother.，34(7-8):915-923(2000))。还可以将活性剂载入到由药学上可接受的成分制成的颗粒中，所述成分包括、但不限于可溶性的、不溶性的、可渗透的、不可渗透的、可生物降解的或胃滞留的聚合物或脂质体。这样的颗粒包括、但不限于：纳米颗粒、可生物降解的纳米颗粒、微粒、可生物降解的微粒、纳米球、可生物降解的纳米球、微球、可生物降解的微球、胶囊剂、乳剂、脂质体、胶束和病毒载体系统。

[0258] 所述载体还可以是聚合物，例如，可生物降解的、生物相容的聚合物基质。在一个实施方案中，可以将治疗性肽嵌入到聚合物基质中，同时保持蛋白质完整性。所述聚合物可以是天然的(诸如多肽、蛋白或多糖)或合成的(诸如聚α-羟酸)。例子包括由例如以下物质制成的载体：胶原、纤连蛋白、弹性蛋白、醋酸纤维素、硝酸纤维素、多糖、纤维蛋白、明胶和它们的组合。在一个实施方案中，所述聚合物是聚乳酸(PLA)或乳酸/羟乙酸共聚物(PGLA)。可以以各种形式和尺寸(包括微球和纳米球)来制备并分离聚合物基体。聚合物制剂可以导致延长的治疗效果持续时间(参见Reddy，Ann.Pharmacother.，34(7-8):915-923(2000))。人生长激素(hGH)的聚合物制剂已用在临床试验中(参见Kozarich and Rich，Chemical Biology，2:548-552(1998))。

[0259] 聚合物微球持续释放制剂的例子描述在以下文献中：PCT公开WO99/15154(Tracy等人.)，美国专利号5,674,534和5,716,644(都授权给Zale等人)，PCT公开WO 96/40073(Zale等人)，和PCT公开WO 00/38651(Shah等人)。美国专利号5,674,534和5,716,644和PCT公开WO 96/40073描述了含有促红细胞生成素颗粒的聚合物基质，所述颗粒用盐来稳定以防聚集。

[0260] 在某些实施方案中，与载体一起制备治疗化合物，所述载体将保护所述治疗化合物以防止其从身体快速清除，诸如控释制剂，其包括植入物和微囊化的递送系统。可以使用可生物降解的、生物相容的聚合物，诸如乙烯醋酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸

酯和聚乳酸。可以使用已知的技术制备这样的制剂。还可以商业获得所述材料，例如从Alza Corporation和Nova Pharmaceuticals,Inc.。脂质体混悬液(包括靶向具有针对细胞特异性抗原的单克隆抗体的特定细胞的脂质体)也可用作药学上可接受的载体。这些可以根据本领域技术人员已知的方法来制备，例如在美国专利号4,522,811中描述的方法。

[0261] 还可以配制所述治疗性化合物以增强细胞内递送。例如，脂质体递送系统是本领域已知的，参见，例如，Chonn和Cullis，“Recent Advances in Liposome Drug Delivery Systems,”Current Opinion in Biotechnology6:698-708(1995)；Weiner，“Liposomes for Protein Delivery:Selecting Manufacture and Development Processes,”Immunomethods,4(3):201-9(1994)；和Gregoriadis，“Engineering Liposomes for Drug Delivery:Progress and Problems,”Trends Biotechnol.,13(12):527-37(1995)。Mizguchi等人,Cancer Lett.,100:63-69(1996)描述了融合脂质体在体内和在体外将蛋白质递送给细胞的用途。

[0262] 通过细胞培养物或实验动物中的标准药学规程，可以确定治疗剂的剂量、毒性和治疗效果，例如，用于确定LD50(对群体中的50％致命的剂量)和ED50(对群体中的50％治疗上有效的剂量)。毒性和疗效之间的剂量比是治疗指数，且它可以表示为比率LD50/ED50。表现出高治疗指数的化合物是优选的。尽管可以使用具有毒性副作用的化合物，但应当小心地设计将这样的化合物靶向受影响的组织部位的递送系统，以便使对未受感染的细胞的潜在损伤最小化，且由此减少副作用。

[0263] 从细胞培养测定和动物研究获取的数据可以用在配制人类使用的剂量范围中。这样的化合物的剂量优选地在包括ED50又几乎没有或没有毒性的循环浓度范围内。根据所用剂型和所用给药途径，剂量可以在此范围内变化。对于该方法中使用的任何化合物而言，可以首先从细胞培养测定估测治疗有效剂量。可以在动物模型中配制剂量来获得包括如在细胞培养物中确定的IC50(即，达到征状的半数最大抑制时的试验化合物浓度)的循环血浆浓度范围。这样的信息可以用来更准确地确定在人类中有用的剂量。可以例如通过高效液相色谱法来测量血浆的水平。

[0264] 通常，芳族阳离子肽的足以实现治疗或预防效果的有效量的范围为约0.000001mg/千克体重/天至约10,000mg/千克体重/天。优选地，剂量范围为约0.0001mg/千克体重/天至约100mg/千克体重/天。例如，剂量可以是每天、每两天或每三天1mg/kg体重或10mg/kg体重，或者在每周、每两周或每三周1-10mg/kg的范围内。在一个实施方案中，肽的单次剂量的范围为0.1-10,000微克/千克体重。在一个实施方案中，在载体中的芳族阳离子肽浓度的范围为每递送的1毫升中的0.2-2000微克。一个示例性的治疗方案需要每天1次或每周1次的施用。在治疗应用中，有时需要在相对较短的时间间隔中的相对较高的剂量，直到疾病的进程减缓或终止，且优选地直到受试者显示出疾病征状的部分或完全改善。此后，可以给患者施用预防性方案。

[0265] 在某些实施方案中，可以将芳族阳离子肽的治疗有效量定义为10^{-12}至10^{-6}摩尔(例如，约10^{-7}摩尔)的靶组织处的肽浓度。可以以0.01-100mg/kg的全身剂量或按体表面积计算的等效剂量来递送该浓度。可以优化剂量的时间表，以保持靶组织的治疗剂浓度，最优选地通过每天或每周单次施用，但也包括连续施用(例如，胃肠外输注或透皮应用)。

[0266] 在某些实施方案中，以“低”、“中”或“高”剂量水平提供所述芳族阳离子肽的剂量。

在一个实施方案中，提供约0.01至约0.5mg/kg/h、适当地约0.0001至约0.1mg/kg/h的低剂量。在一个实施方案中，提供约0.001至约1.0mg/kg/h、适当地约0.01至约0.5mg/kg/h的中剂量。在一个实施方案中，提供约0.005至约10mg/kg/h、适当地约0.01至约2mg/kg/h的高剂量。

[0267] 技术人员会明白，某些因素可能影响有效地治疗受试者所需的剂量和时机选择，包括、但不限于疾病或障碍的严重程度、先前的治疗、受试者的一般健康和/或年龄、以及存在的其它疾病。此外，用本文描述的治疗有效量的治疗组合物来治疗受试者可以包括单次治疗或一系列治疗。

[0268] 根据本发明方法治疗的哺乳动物可以是任何哺乳动物，包括、例如，家畜，诸如绵羊、猪、牛和马；宠物动物，诸如狗和猫；实验动物，诸如大鼠、小鼠和兔。在一个合适的实施方案中，所述哺乳动物是人。

[0269] V.与肾动脉狭窄有关的肾损伤的测量

[0270] 成像技术可用于评估本发明技术的肽对肾再灌注损伤的影响。例如，通过CT、微-CT或MRI，可以使肾微脉管系统体系结构显影。可替换地，使用与本文所述的方法相容的本领域已知的方法，可以评估肾微脉管系统体系结构。成像方法可用于评价肾微脉管系统密度和迂曲度以及平均血管直径。

[0271] 额外地或可替换地，通过测量肾功能的不同参数，包括、但不限于，动脉压、肾容量、肾血流量、肾氧合和肾小球滤过率，可以评价肾再灌注损伤。用于测量这些参数的方法是本领域已知的，包括、但不限于血氧水平依赖性的磁共振成像(BOLD-MRI)和多检测器计算机断层摄影术(MDCT)。

[0272] 额外地或可替换地，通过体外方法，包括、但不限于，测量细胞凋亡、肾形态学(包括炎症和纤维化)和肾氧化性应激，可以评估肾再灌注损伤。使用本领域已知的方法，例如，通过末端脱氧核苷酸转移酶dUTP切口末端标记(TUNEL)检测DNA片段化，检测半胱氨酰天冬氨酸特异性蛋白酶活化，和检测促细胞凋亡蛋白诸如Bcl-xL和Bax，可以评估细胞凋亡。使用本领域已知的方法，包括、但不限于，苏木精和伊红(H&E)染色、三色染色以及检测CD163、MMP-9、PAI-1、MCP-1、VEGF、TNF-α、TGF-β和VEGR1水平，可以检测肾形态学，包括炎症和纤维化。通过本领域已知的方法，包括、但不限于，测量异前列腺素、超氧化物、NAD(P)H氧化酶、DHE、MnCuZn-SOD、NO合酶、血红素加氧酶和血浆硝酸盐/亚硝酸盐水平，可以测量氧化性应激。

[0273] 实施例

[0274] 以下实施例进一步例证本发明技术，所述实施例不应以任何方式解释为限制的。

[0275] 如上面所指出的，缺血可以导致微脉管系统的显著变化，所述变化会干扰通向许多组织/器官的正常血流量。这样，缺血/再灌注现象可以发生在多种组织/器官中，包括心脏、肝脏、脑、皮肤、骨骼肌、肾脏等。预见到，本发明技术的芳族阳离子肽可用在预防或治疗多种组织/器官的缺血/再灌注损伤的方法中。另外预见到，本发明技术的芳族阳离子肽可用在ARVD的长期治疗方法中。

[0276] 实施例1通过施用D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH2来减轻猪肾动脉粥样硬化性动脉狭窄(ARAS)中的经皮腔内肾血管成形术(PTRA)以后的肾损伤.

[0277] A.简介

[0278] 本实施例证实了芳族阳离子肽D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2在预防和治疗与肾动脉粥样硬化性动脉狭窄(ARAS)有关的肾损伤中的用途。根据本发明方法，使动物受试者

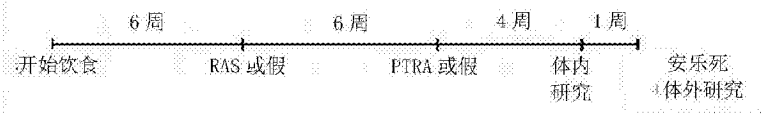
遭受一段时间的ARAS，随后通过经皮腔内肾血管成形术(PTRA)进行肾血运重建。与PTRA联合地将芳族阳离子肽施用给受试者，包括在血运重建手术之前和之后的确定时间段。对照动物要么接受输注，要么接受单独对照媒介物的输注。与对照受试者相比，在接受所述肽的受试者中肾功能的多个方面得到改善，包括肾容量、肾血流量、肾小球滤过率、肾微脉管系统密度、平均血管直径、血管迂曲度和肾氧合。所述肽的施用也减少了早期肾炎症、细胞凋亡、纤维化和氧化性应激。结果证实，肽D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2可用在用于治疗或预防与血运重建有关的肾损伤的方法中，所述血运重建在ARAS的治疗中通过PTRA实现。

[0279] B.实验设计概述

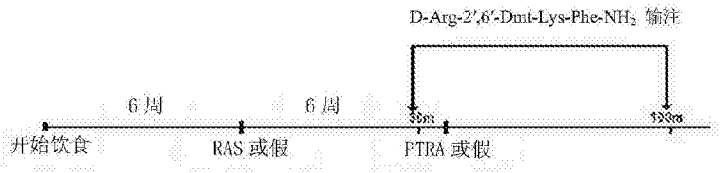
[0280] 实验时间线的总结显示在表7和图1中。所有实验根据指南进行，并得到动物实验管理小组(Institutional Animal Care and Use Committee，IACUC)的批准。受试者包括驯养的幼龄雌性受试者(Manthei Hog Farm，LLC，MN)，观察16周(图1)。在基线时，将动物随机化成正常组(n＝7)或ARAS组(n＝21)。给正常动物饲喂正常猪食，给ARAS受试者饲喂高胆固醇饮食(TD-93296，Harlan-Teklad，Indianapolis，IN，USA)，后者诱导弥散性早期动脉粥样硬化，其特征在于升高的胆固醇水平和肾功能损害、RAS肾中的炎症和纤维化，如前面所示。参见表8。

表 7. 干预和时间点

A. 实验时间线的概述

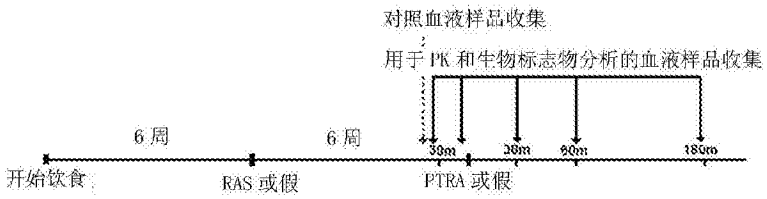


B. D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2 输注的时间线

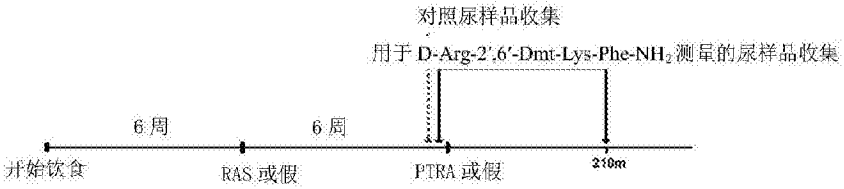


C. 血液样品收集的时间点

[0281]



D. 尿样品收集的时间点



[0282] 6周时段以后，ARAS受试者发生单侧RAS(通过将局部刺激线圈放入肾动脉主干中

来诱导)，而对正常动物假手术。为了麻醉，用肌肉内注射的氯胺酮和赛拉嗪(0.5g)诱导动物，并用静脉内的氯胺酮(0.2mg/kg/min)和赛拉嗪(0.03mg/kg/min)维持麻醉。将遥测系统(Data Sciences International,St Paul,Minnesota,USA)植入左股动脉中，以在接下来的10周中连续测量平均动脉压(MAP)。

[0283] 诱导RAS以后6周，类似地麻醉动物，通过血管造影术确定狭窄的程度，并用PTRA或假手术治疗受试者。在外科手术期间，加热垫维持动物的体温在约37℃，并如以前所述在荧光透视导引下进行PTRA和支架。另外，从PTRA或假手术之前30min至之后3.5小时，用肽0.050mg/kg或等体积的盐水媒介物的连续静脉内输注治疗ARAS受试者。在基线(即将肽输注之前)、再灌注后30分钟和再灌注后180分钟，收集下腔静脉(IVC)样品用于药代动力学分析以及用于炎症性生物标志物和损伤生物标志物。在肽输注之前和PTRA后210min，收集尿样品。

[0284] 4周后，再次类似地麻醉受试者，并通过血管造影术确定狭窄的程度。收集IVC样品用于PRA、肌酸酐和胆固醇测量。收集尿样品以定量白蛋白浓度(ELISA,Bethyl Laboratories,Texas)。使用多检测器计算机断层摄影术(MDCT)，评估每个肾中的肾血液动力学和功能。

[0285]

表8. 实验设计概述

组	治疗
ARAS + PTRA + 媒介物(媒介物对照)	高胆固醇饮食+ RAS + PTRA + 盐水
ARAS + PTRA + D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2	高胆固醇饮食+ RAS + PTRA + D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2
正常	正常饮食+ 假手术
正常+ D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2	正常饮食+ 假手术+ D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2
ARAS + PTRA (非输注对照)	高胆固醇饮食+ RAS + PTRA
正常(非输注对照)	正常饮食

[0286] 完成体内研究后3天，将动物用戊巴比妥钠(100mg/kg,Sleepaway®,Fort Dodge Laboratories,Fort Dodge,Iowa,USA)安乐死。取出肾脏，切开，并准备用于离体研究。从正常动物收获肾动脉，并将分离的环悬浮于装有Kreb氏溶液的器官室中，以评价响应于肽的血管反应性。离体评价线粒体生源说、微血管体系结构、细胞凋亡、血管生成、炎症、氧化性应激、肾小管损伤和纤维化。

[0287] 进行MDCT研究，用于评估单肾肾血液动力学和功能。在中央静脉注射碘帕醇(每2秒0.5mL/kg)以后，进行140次连续扫描。用Analyze™软件包(Biomedical Imaging Resource,Mayo Clinic,Rochester,MN)重构并分析横截面图像。如以前详细描述地评价皮质和髓质体积和灌注、RBF和GFR。

[0288] C.方法

[0289] 药代动力学分析

[0290] 在基线(即将肽输注之前)、即将PTRA之前以及再灌注后30和180min，从肽治疗的

动物收集4mL静脉全血样品。使用注射器，将静脉血抽入含有K2EDTA的BD Vacutainer® PST™Plasma Separation Tubes(淡紫色帽)中，10mL/管。将试管轻轻反转8次，并在离心之前保持在冰水浴中。在1小时内，将样品在摆动桶离心机中在4℃在1000-1300RCF(或约1500xG)离心15min。从各个血液试管收获血浆，放在单个聚丙烯瓶(或螺旋帽试管)中，并在测定之前在约-80℃保存。

[0291] 使用合格的LC/MS/MS测定，在K2-EDTA猪血浆中确定D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2的血浆浓度。所述测定采用氘标记的d_5-D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2作为分析内部标准品(IS)。简而言之，给样品掺入内部标准品，通过蛋白沉淀提取(回收率约90％)进行处理，并使用具有Turbo IonSpray®MS/MS检测的反相HPLC进行分析。以MRM模式监测D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2和IS(d_5-D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2)的阳$(M+2H)^{2+}$离子。使用标准品的药物与IS峰面积比建立在2.5-1000ng/mL范围内的线性校正曲线。测定精确度的天之间变动系数为小于10％，且准确度范围为3.6-11.8％。

[0292] 炎症性标志物和损伤标志物

[0293] 在基线(肽输注之前)和PTRA后30min和180min，通过酶联免疫吸附测定(ELISA)，测量肿瘤坏死因子-α(TNF-α)(Invitrogen，目录号KSC3011)、白介素-1β(IL-1β)(R&D systems DY681)、单核细胞趋化蛋白(MCP-1)(Kingfisher Biotech，目录号VS0081S-002)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)(NovaTein Bio.目录号BG-POR11157)和转化生长因子-β(TGF-β)的IVC水平。类似地，在基线和PTRA后210min时，通过标准规程测量血清肌酸酐水平(基线、PTRA后30min和180min)以及8-表-异前列腺素和蛋白的尿水平。

[0294] 血管反应性

[0295] 在如前所述的切开的肾动脉段(得自正常动物，悬浮于装有Kreb氏溶液的器官室中)中，评价针对肽(或媒介物)的血管收缩应答和血管扩张应答。在37℃(pH＝7.4、95％O_2和5％CO_2)，将切开的肾动脉段(2-3mm长，2段/动物)悬浮于装有Kreb氏溶液的25ml器官室中。通过悬浮肾动脉段(使用2个穿过它们的内腔连接至静止柱的不锈夹和应变规)，测量等长力。通过使用氯化钾(KCl，20mM)，逐渐拉伸血管环，以达到它们的长度-张力关联的最佳点。

[0296] 一旦确定最佳张力，在用控制溶液洗涤以后允许血管环平衡30分钟。在4个血管环中，施用递增剂量的肽(10^{-9}M至10^{-4}M)来试验血管收缩应答的存在。在其它4个环中，在用内皮缩血管肽-1(10^{-7}M)(Phoenix Pharmaceuticals，Mountain View，CA，USA)预收缩以后施用递增剂量的肽，以评价内皮松弛。使用WinDaq Acquisition Software(DATAQ Instruments，Inc.Akron，OH，USA)将数据量化。

[0297] 细胞凋亡和线粒体生源说

[0298] 在用TUNEL(Promega，Madison，WI，USA)和半胱氨酰天冬氨酸特异性蛋白酶-3(1:200，Santa Cruz Biotechnology，Santa Cruz，CA，USA)染色的肾组织切片中，评估细胞凋亡。另外，通过蛋白质印迹，评价细胞凋亡染色调节剂蛋白Bcl-2(Lifespan BioSciences，Seattle，WA，USA；1:1000)和Bax(Santa Cruz Biotechnology，1:200)的肾蛋白表达。通过PGC-1α(Abcam，1:1000)、NRF-1(Abcam，Cambridge，MA，USA；1:300)、GABP(Abcam，1:1000)、PPAR-α(Abcam，1:1000)、PPAR-δ(Abcam，1:300)、HO-1(Abcam，1:250)和SIRT-1(Abcam，1:1000)的肾表达，评价线粒体生源说。

[0299] 微血管体系结构和血管生成

[0300] 为了评价微血管体系结构，在生理灌注压力下给肾灌注不透射线的有机硅聚合物(Microfil MV122;Flow Tech,Carver,MA,USA)。使用微-CT扫描仪扫描经灌注的肾切片，并使用Analyze™显示重构的图像(18μm体素)。如前所述，计算肾皮质微血管(直径40-500μm)的空间密度、平均直径和迂曲度。另外，通过蛋白质印迹，测量VEGF和它的受体(VEGFR-1和2)(Santa Cruz Biotechnology;1:200)的肾蛋白表达。

[0301] 肾形态学和纤维化

[0302] 使用计算机辅助的图像分析程序AxioVision®4.8.2.0(Carl ZEISS SMT,Oberkochen,德国)，在用Masson氏三色染色的每个肾的5μm中肝门(mid-hilar)横截面中评估肾纤维化。在15-20个视野中定量管间质纤维化和肾小球评分(100个肾小球中发生硬化的百分比)。另外，以不知情方式在用过碘酸-希夫(PAS)染色的切片中对肾小管损伤评分。简而言之，将肾小管损伤(膨胀、萎缩、结石形成、细胞脱离或管基膜增厚)评分为1-5，0为正常肾小管，1:<10％的肾小管受损，2:10-25％的肾小管受损，3:26-50％的肾小管受损，4:51-75％的肾小管受损，5:>75％的肾小管受损。

[0303] 炎症和氧化性应激

[0304] 在用MCP-1或CD163(肾巨噬细胞的定量)染色的组织切片中，并通过从蛋白质印迹测得的TNF-α(Santa Cruz Biotechnology;1:200)的蛋白表达，评估肾炎症。

[0305] 通过肾组织的二氢溴化乙啶(DHE)染色、8-表-异前列腺素(EIA试剂盒)、NADPH-氧化酶亚基p47的肾蛋白表达(Santa Cruz 1:200)和硝基酪氨酸(Cayman Chemical Co.,Ann Arbor,MI,USA;1:200)的全身水平，评估氧化性应激。

[0306] 统计方法

[0307] 使用JMP软件包8.0版(SAS Institute Inc.,Cary,NC,USA)，分析所有数据。使用Shapiro-Wilk检验来检验相对于正常性的偏差。对于正态分布的数据，将结果表达为平均值±标准差(SD)，对于非正态分布的数据，将结果表达为中间值(范围)。在适当时使用参数(ANOVA和不成对的Studentt-检验)和非参数(Wilcoxon和Kruskal Wallis)检验。认为$p \leq 0.05$的值是统计上显著的。

[0308] D.结果

[0309] RAS的诱导和减轻

[0310] 在诱导RAS以后6周和血运重建之前，在所有ARAS动物中达到了显著的狭窄程度(77.5％(65-95％))，并且平均动脉压(MAP)类似地升高(相对于正常，$p<0.05$)(图3A)。

[0311] 在PTRA过程中肽的循环水平和损伤信号

[0312] 在输注后30min之前，全身血浆肽浓度增加至治疗水平(约100ng/mL)，并随后在输注后60-90分钟达到表观稳态浓度直到输注结束(表9)。

[0313] 在ARAS+PTRA+媒介物和ARAS+PTRA+肽动物(图1B，相对于基线，二者$p<0.05$)中，单核细胞趋化蛋白(MCP-1)的全身血浆水平在血运重建以后类似地增加。肿瘤坏死因子(TNF)-α、白介素(IL)-1β、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、转化生长因子(TGF)-β和肌酸酐的全身水平在血运重建以后保持不变(图1C-G)，尿蛋白和8-表-异前列腺素水平也是如此(图2A-B)。

[0314] 药代动力学分析

[0315] 以0.05mg/kg/h，在PTRA手术之前30分钟开始肽静脉内输注，并持续210分钟。在输注30分钟时(即PTRA手术的时间)的平均血浆浓度为100.6ng/mL(表7)。血浆浓度继续增加，在约60-90分钟达到表观稳态浓度(约125ng/mL)，并维持稳态水平至输注结束。

[0316]

表9: 在3.5-h静脉内输注(0.05 mg/kg/h)过程中在动脉粥样硬化性肾动脉狭窄的猪模型中的平均血浆 D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2 浓度

从PTRA的时间 (min)	从肽输注的时间 (min)	平均肽浓度 (ng/ml)
-30	0	BQL
PTRA	30	100.6±36.2
30	60	118.4±23.7
60	90	125.1±21.4
180	210	111.3±42.0

PTRA: 经皮腔内肾血管成形术; BQL: 低于可计量限度(2.5 ng/mL)
NA: 不适用的.

[0317] 血管反应性

[0318] 暴露于递增剂量的D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2的分离的肾动脉环没有表现出直径的变化(图2C-D)。该结果提示，所述肽既不会诱导血管收缩也不会诱导血管舒张。

[0319] PTRA以后4周的肾功能和结构

[0320] 表8显示了PTRA或假手术以后4周所有组中的全身参数。在PTRA治疗的动物中没有观察到残余狭窄，且MAP下降至正常水平(图3B)。与正常相比(相对于正常，都$p<0.05$)，血清肌酸酐水平在所有ARAS中升高，但是血浆肾素活性(PRA)和尿白蛋白水平类似于正常受试者。与正常相比，所有ARAS中的总胆固醇水平、高密度脂蛋白(HDL)和低密度脂蛋白(LDL)更高。

[0321] D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2改善肾血液动力学和功能

[0322] 血运重建后4周，与正常动物相比，所有ARAS中的皮质和髓质体积类似地更低(图3B)。相比而言，在肽治疗的受试者中，在ARAS中显著下降且未被单独的PTRA改变的皮质和髓质灌注、RBF和GFR恢复至正常水平(图3C-E，相对于正常，都$p>0.05$)。

[0323] D-ARG-2′,6′-DMT-LYS-PHE-NH_2减少细胞凋亡和促进线粒体生源说

[0324] 与正常相比，在ARAS和ARAS+PTRA+媒介物中末端脱氧核苷酸转移酶dUTP切口末端标记(TUNEL)和半胱氨酰天冬氨酸特异性蛋白酶-3阳性的细胞凋亡细胞的数目升高，但是在ARAS+PTRA+肽受试者中下降(图4A-B)。B-细胞淋巴瘤(Bcl)-2的肾表达在各组之间没有差异，但是在PTRA期间的肽治疗显著减少了促细胞凋亡蛋白Bcl-2-相关的X蛋白(Bax，图4C-D)的随后表达。

[0325] D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2也增量调节PGC-1α、核呼吸因子(NRF)-1、GA-结合蛋白(GABP)和过氧化物酶体增殖子活化的受体(PPAR)-α的表达(图4C-D)。在所有ARAS组中，血红素加氧酶(HO)-1和PPAR-δ的肾表达类似地保持钝圆。血运重建(用或不用辅助肽)将在ARAS中观察到的减量调节的sirtuin(SIRT)-1表达恢复至正常水平(图4C-D，相对于正常，$p>0.05$)。

[0326] D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2改善微血管网络

[0327] 肾皮质微血管的空间密度在ARAS和ARAS+PTRA+媒介物动物中类似地较低，但是与

在PTRA期间用肽治疗的受试者中的正常水平没有差异(图5A)。另外,平均血管直径和迂曲度在ARAS和ARAS+PTRA+媒介物中类似地增加,但是在肽治疗的受试者中改善(图5B)。VEGF和它的受体(VEGFR-1和2)的肾表达在ARAS中低于正常,且在用PTRA+媒介物治疗的动物中保持降低。但是,用PTRA+肽治疗会将它们恢复至与正常类似(VEGFR-1和VEGFR-2)或高于正常(VEGF)的水平(图5C)。

[0328] 在用D-ARG-2′,6′-DMT-LYS-PHE-NH_2治疗的动物中的氧化性应激减少

[0329] 与正常相比,8-表-异前列腺素的全身水平在ARAS和ARAS+PTRA+媒介物中升高,但是在ARAS+PTRA+肽受试者中降低至正常水平(表8,相对于正常,$p>0.05$)。类似地,在ARAS和ARAS+PTRA+媒介物中,狭窄后肾中超氧化物阴离子的原位产生显著增加,但是在用肽治疗的动物中,下降至没有不同于正常的水平(图6A),p47和硝基酪氨酸的肾表达也是如此(图6B,相对于正常,二者$p>0.05$)。

[0330] 在肽治疗的受试者中消除炎症

[0331] 在ARAS和ARAS+PTRA+媒介物中同样增量调节MCP-1免疫反应性,但是在用肽治疗的受试者中改善,浸润肾的CD163+巨噬细胞的数目也是如此(图7A-B)。类似地,升高的TNF-α的肾表达仅在肽治疗的受试者中正常化(图7C)。

[0332] 在PTRA期间的炎症性标志物和损伤标志物

[0333] 在ARAS+PTRA+媒介物和ARAS+PTRA+肽动物(图1B,相对于基线,二者$p<0.05$)中,在血运重建以后单核细胞趋化蛋白(MCP-1)的血浆水平类似地增加。但是,肿瘤坏死因子(TNF)-α、白介素(IL)-1β、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、转化生长因子(TGF)-β的血浆水平或血清肌酸酐水平没有在血运重建以后立即变化(图1C-G)。

[0334] 蛋白尿以及8-异前列腺素和TGF-β的尿水平在PTRA以后保持不变(图2A-B)。

[0335] 肽治疗减少肾小管损伤和肾瘢痕形成

[0336] 在所有ARAS组中的肾小管损伤评分都高于正常(都$p<0.05$),但是在ARAS+PTRA+肽受试者中显著减小,尽管没有消除(图8A)。

[0337] 促纤维化标志物纤连蛋白和胶原IV的免疫染色在ARAS和ARAS+PTRA+媒介物中增加,但是在肽治疗的受试者中减少(图8B-C)。管间质纤维化和肾小球评分在所有ARAS中也高于正常,但是在ARAS+PTRA+肽受试者中显著减小(图9A-B)。纤溶酶原激活物抑制剂(PAI)-1的肾表达在两个PTRA组中类似地减弱(相对于正常,二者$p>0.05$),但是TGF-β1表达仅在肽治疗的受试者中恢复至正常水平(图9C)。

[0338] E.讨论

[0339] 本研究证实了mPTP开放涉入在动脉粥样硬化性肾血管疾病中针对血运重建的减弱肾应答。此外,它确立了线粒体靶向肽用于在猪ARAS的阻塞性肾动脉病变的血运重建以后保持肾结构和功能结果的新作用。在血运重建以后4周,在ARAS+PTRA+肽受试者中增量调节线粒体生源说,而在它们的狭窄后肾中改善了氧化性应激、细胞的细胞凋亡、微血管稀薄化和组织损害。此外,狭窄肾灌注、RBF和GFR在肽治疗的受试者中正常化,从而揭示了与PTRA结合的肽用于改善动脉粥样硬化性肾血管疾病中的肾功能结果的肾脏保护作用。这样,D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2可用于在具有狭窄后肾中的受试者中增量调节线粒体生源说、减少氧化性应激、细胞的细胞凋亡、微血管稀薄化和组织损害的方法中。此外,芳族阳离子肽D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2可用在与PTRA结合提供肾脏保护作用的方法中,

用于改善动脉粥样硬化性肾血管疾病中的肾功能结果。

[0340] ARAS会活化几个增加氧化性损伤、细胞凋亡、炎症和间质性纤维化的机制，从而导致肾功能衰退，并且阻塞的肾动脉的血运重建已经作为潜在确定的治疗选择而出现。Alas，即将支架+医学治疗与单独医学治疗进行对比的大型随机化受控临床试验，证实了肾动脉通畅的改善和血运重建以后的肾结果之间的无关联。以前已经证实，PTRA不能反转狭窄猪肾中的结构和功能衰退(其伴有持续的细胞凋亡和氧化性应激)，从而强调了对更有效策略的需求，所述策略与PTRA相组合以改善ARAS中的肾功能。

[0341] 在PTRA期间使肾组织损伤持续的机制之一是急性IRI，其涉及ROS的产生和炎症性机制的活化。此外，实验数据和临床数据支持mPTP形成在加速IRI以后的细胞死亡中的作用。ROS的过度产生会导致mPTP开放和细胞色素c向胞质溶胶中的释放，这不仅触发细胞凋亡(通过活化半胱氨酰天冬氨酸特异性蛋白酶3和9)，而且触发线粒体ROS释放进胞质溶胶中所引起的肾小管损伤。因此，选择性地靶向mPTP的治疗干预可能赋予细胞保护和减轻向肾衰竭的进展。

[0342] 以前在几个动物模型中的研究已经记载了线粒体靶向肽通过抑制细胞凋亡和减弱氧化性应激而产生的保护作用。与其它抗氧化疗法相比，除了抗细胞凋亡作用(通过抑制mPTP的开放而实现)以外，它们的清除ROS和集中在线粒体内膜(ROS产生的主要部位)处的能力，会给这些小肽提供超凡效能以抑制氧化性应激。实际上，在即将开始血运重建之前使用环孢菌素(mPTP的有效抑制剂)的治疗与具有急性心肌梗塞的患者中的较小梗塞面积有关，从而强调了这些治疗干预的临床重要性。但是，它的治疗潜力受限于显著的副作用。

[0343] D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2是一种细胞可透过的四肽，其在线粒体内膜中达到极高的浓度(500-5000倍)，从而发挥抗细胞凋亡和抗氧化性能。不同于其它mPTP抑制剂，本发明技术的肽不具有已知的免疫抑制作用。最近在实验性啮齿动物模型中的研究已经证实了本发明技术的肽在减小梗塞面积和减弱高血压心肌病中的有益效果。此外，它会在急性缺血再灌注损伤和单侧输尿管阻塞的大鼠模型中阻止间质性纤维化和有关的肾小管细胞再生，从而提示该药物用于维持受损肾的功能和结构的潜力。该研究首次证实了在PTRA期间用D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2治疗会恢复线粒体生源说和减弱细胞凋亡和氧化性应激，最终导致在慢性猪ARAS中改善的肾功能。

[0344] 在该研究中，通过减少的TUNEL+和半胱氨酰天冬氨酸特异性蛋白酶-3+细胞的数目，反映了D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2的有效抗细胞凋亡作用。此外，促细胞凋亡蛋白Bax的肾表达在肽治疗的受试者中大幅下埃及，从而强调了目的在于防止细胞凋亡起始的疗法的有效性。另外，使用PTRA+D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2的治疗会降低氧化性应激标志物8-异前列腺素以及肾氧化性应激的全身水平，如减少的ROS产生和NAD(P)H-氧化酶(p47phox)和硝基酪氨酸的表达所证实的。

[0345] 在D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2治疗以后这种全身性和肾氧化性应激的减少可能促进狭窄肾中微血管网络的维持。增强的或延长的ROS产生会损害肾微血管的完整性，从而导致重塑或稀薄化，即针对血运重建的肾损伤和应答的进展的一个重要决定因素。在当前的研究中，在ARAS+PTRA+D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2受试者中的微血管损失被钝化，如增加的空间密度和减小的皮质微血管平均直径所反映的，而反映微血管不成熟的迂曲度下降。不希望受理论约束，D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2也可能已经通过钝化血管细胞凋

亡和促进血管生成(由增加的血管生成因子VEGF及其受体的肾表达提示)来阻止微血管损失。

[0346] 肾炎症是ARAS中的疾病进展的一个关键决定因素。以前已经证实,增加的氧化性应激与巨噬细胞和淋巴细胞在狭窄猪肾中的浸润有关,所述浸润与针对血运重建的差肾应答有关,并会被长期抗氧化剂补充减弱。值得注意的是,在PTRA期间使用D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2的短期治疗会在4周以后消除肾炎症,如正常化的MCP-1管间质表达所证实的,这可能解释狭窄肾中减少的CD163巨噬细胞浸润。正常化的促炎细胞因子TNF-α的肾表达也支持它的有效抗炎效应。重要的是,在用D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2治疗以后减少的炎症、氧化性应激和细胞凋亡可能都已经减弱肾小管损伤,如减小的肾小管损伤评分所反映的。因此,D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2会通过维持肾小管刷状缘和使肾小管细胞脱离最小化而在大鼠中减弱急性缺血诱导的肾小管损伤。

[0347] 在用肽治疗的动物中促进了线粒体生源说(由恢复的PGC-1α、NFR-1、GABP和PPAR-α的水平公开),从而指示该途径在氧化性应激和炎症的改善中的活化。PGC-1α介导的NRF-1和GABP(也被称作NRF-2)的活化会通过结合人抗氧化应答元件(hARE)而调节在氧化性应激中涉及的许多基因的表达,所述人抗氧化应答元件调节解毒酶诸如NAD(P)H:醌氧化还原酶(NQO1)的表达。此外,肽诱导的线粒体生源说会增量调节PPAR-α的表达,所述PPAR-α是一种在肾中高度表达的转录因子,其通过增加HO-1酶活性而调节巨噬细胞和内皮细胞炎症应答,尽管HO-1表达在D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2-治疗组中保持受到抑制。类似地,PPAR-δ和SIRT-1的肾表达在肽治疗的受试者中保持减量调节,这与它们对D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2诱导的PTRA之后的炎症减弱的保护促进相矛盾。总之,这些观察结果表明,在PTRA期间D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2的辅助输注可能已经阻止线粒体生源说的急剧下降,这可能解释持续至4周以后的肾功能和结构改善。

[0348] 使用PTRA+D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2的治疗会在4周以后减少管间质和肾小球纤维化,这与减少的纤连蛋白和胶原IV含量有关。此外,纤维发生因子TGF-β和PAI-1的肾表达在肽治疗的动物中正常化,可能由降低的肾氧化性应激水平促进。这些又可能在肽治疗的受试者中促进改善的肾血液动力学和功能(由正常化的单肾灌注、RBF和GFR证实),从而强调肽减弱ARAS中的肾功能障碍的可行性。但是,鉴于在体外对肽的肾血管反应性应答的缺乏,这些作用不可能归因于血管紧张度的直接调节。尽管狭窄肾GFR、血清肌酸酐水平的改善保持轻微升高,可能归因于非狭窄肾中的一些残余损伤或高血压损伤或与高胆固醇血症有关的肾功能障碍,这可能需要更靶向的针对延续的血脂异常(dislipemia)的治疗。

[0349] 除了不受D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2影响的MCP-1的增加以外,在PTRA以后的3-小时时间范围内不存在炎症介质或氧化介质的可检测的剧烈变化。在PTRA期间暴露于D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2足以赋予持续至4周以后的有效保护作用。

[0350] 该ARAS猪模型会再现早期动脉粥样硬化的影响,并允许使用临床上适用的工具研究单肾功能和结构,从而提供评估肽用于改善肾功能、减少细胞凋亡和ARAS肾中的纤维化进展的潜在作用的机会。

[0351] 这些结果共同地强调了mPTP开放在动脉粥样硬化性肾血管疾病的血运重建中的重要性,从而揭示了与PTRA结合的D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2用于减少猪ARAS中的细胞凋亡、炎症和氧化性应激的肾脏保护作用。此外,使用PTRA+D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-

NH_2的治疗会增量调节线粒体生源说和改善血管生成，并最终改善在ARAS的血运重建以后的肾血液动力学和功能。这些结果揭示了D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2在慢性肾血管疾病中改善PTRA以后的应答中的独特作用。

[0352]

表 10. 在 PTRA 或假手术以后 4 周，正常、ARAS、ARAS+PTRA+媒介物和 ARAS+PTRA+D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2 受试者(各自 n=7)的全身特征(平均值±SD).

	正常	ARAS	ARAS+PTRA+媒介物	ARAS+PTRA+D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2
体重(Kg)	46.1±2.1	44.7±1.8	43.0±1.3	46.7±2.2
狭窄程度(%)	0	88.7±3.9*‡	0	0
平均动脉压(mmHg)	85.9±2.8	166.6±2.4*	90.6±2.8	106.8±2.9
血清肌酸酐(mg/dl)	1.45±1.52	1.96±0.30*	1.91±0.43*	1.98±0.36*
PRA (ng/ml/hr)	0.12±0.05	0.16±0.13	0.15±0.09	0.14±0.11
总胆固醇(mg/dl)	92.2±17.9	498.9±61.3*	383.7±80.6*	469.8±97.0*
甘油三酯(mg/dl)	7.8±2.2	9.6±8.5	4.6±3.0	5.8±2.8
HDL (mg/dl)	42.8±14.1	182.6±55.2*	192.3±54.0*	188.6±47.1*
LDL 胆固醇(mg/dl)	47.8±9.5	314.0±77.5*	241.4±70.1*	247.8±142.4*
8-表-异前列腺素(pg/ml)	94.3±12.5	133.2±11.2*‡	136.9±13.3*‡	118.2±13.9
尿白蛋白(μg/ml)	4.0±2.6	3.8±1.1	3.3±3.0	3.8±3.3

ARAS：动脉粥样硬化性肾动脉狭窄，PTRA：经皮腔内肾血管成形术；PRA：血浆肾素活性；HDL：高密度脂蛋白；LDL：低密度脂蛋白.*相对于正常，$p\leq0.05$；‡相对于 ARAS+PTRA+肽，$p<0.05$.

[0353] 这些结果证实，本发明技术的肽D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2可用于在具有RAS的受试者中治疗和预防与血运重建(通过PTRA实现)有关的肾损伤的方法中。具体地，这些结果证实，D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2的施用会保护肾微脉管系统免于再灌注相关的损伤，从而导致与未治疗的对照组相比改善的肾功能和针对RAS进行治疗的受试者的改善的预后。

[0354] 实施例2通过施用D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2来减轻在人动脉粥样硬化性肾动脉狭窄(ARAS)中经皮腔内肾血管成形术(ARAS)以后的肾损伤

[0355] A.概述

[0356] 本实施例将证实芳族阳离子肽D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2在预防和治疗人类的与肾动脉粥样硬化性动脉狭窄(ARAS)有关的肾损伤中的用途。根据本发明方法，具有ARAS的人受试者经历通过经皮腔内肾血管成形术(PTRA)实现的肾血运重建。给受试者施用与PTRA结合的芳族阳离子肽，包括在血运重建手术之前和之后的确定时间段。对照受试者要么不接受输注，要么接受单独对照媒介物的输注。预期肾功能的多个方面在接受肽的受试者中得到改善(与对照受试者相比)，包括肾容量、肾血流量、肾小球滤过率、肾微脉管系统密度、平均血管直径、血管迂曲度和肾氧合。结果证实，肽D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2可用在治疗或预防与血运重建(在人类的ARAS的治疗中通过PTRA实现)有关的肾损伤的方法中。

[0357] B.实验设计概述

[0358] 将具有ARAS的人受试者随机化成实验组和对照组。通过PTRA用支架治疗受试者，并从PTRA之前的时间点30分钟至PTRA之后的3小时，辅助连续输注芳族阳离子肽D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2 (0.05mg/kg IV)。简而言之，在荧光透视导引下使钽支架缠绕的气囊导管接合进肾动脉的近侧中段，并充气，导致膨胀至整个气囊直径，以恢复腔开放。将气囊

放气并取出，剩下嵌入在血管壁中的支架。从PTRA之前30min至PTRA之后3小时30分钟，用0.50mg/kg的D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2的单次连续静脉内输注治疗实验受试者。对照受试者要么不接受输注(“非输注对照”)，要么仅输注盐水媒介物(“媒介物对照”)。PTRA以后4周，通过血管造影术确定狭窄程度，并收集全身和肾静脉血液样品用于血浆肾素活性和肌酸酐测量(GammaCoat PRA试剂盒;DiaSorin,Inc.,Stillwater,Minnesota,USA)。使用MDCT评估每个肾中的肾血液动力学和功能，并通过BOLD MRI评估肾氧合。

[0359] C.方法

[0360] 血氧水平依赖性的磁共振成像(BOLD-MRI)——PTRA以后4周，使用定制的腹部器官方案，在3特斯拉(Signa Echo Speed;GE Medical Systems,Milwaukee,WI)进行BOLD-MRI，以测量肾的髓质和皮质区域中的R2*水平。在以前的出版物中已经详细描述了BOLD方法的原理。简而言之，顺磁分子诱导磁场微扰。在血液中，氧合血红蛋白是反磁性的，且它的浓度对T2*没有影响，但是脱氧血红蛋白是顺磁的并减少组织T2*。因此，当梯度回波MRI获取的回波时间增加时，MRI信号减弱随着脱氧血红蛋白浓度增加而增加。Ln(强度)相对于回波时间的斜率等于弛豫时间比率R2*(=1/T2)，且与脱氧血红蛋白的浓度直接成比例。在基线BOLD获取以后，静脉内地施用呋塞米(20mg)，并用2ml盐水冲洗。15min以后，重复BOLD测量。对于数据分析，在7-ms回波时间图像上在皮质和髓质中手工地跟踪目标区域，所述图像给出了在每个实验阶段中的最佳解剖学细节。对于每个回波时间，软件自动地计算在每个目标区域内的MR信号的平均值。然后测量BOLD信号，其通过弛豫率R2*来表征。从基线至呋塞米的R2*变化被确定为“δ-R2*”。

[0361] 多检测器计算机断层摄影术(MDCT)——在BOLD MRI以后1-2天，使用MDCT评估每个肾中的肾血液动力学和功能。MDCT是一种超快扫描仪，其提供单个肾容量、局部灌注、血流量、肾小球滤过率(GFR)和肾小管功能的准确且非侵袭性定量。简而言之，在中央静脉注射碘帕醇(每2秒0.5mL/kg)以后，在45次连续扫描以后得到图像。用Analyze软件包(Biomedical Imaging Resource,Mayo Clinic,MN,USA)重构和显示MDCT图像。目标区域选自得自主动脉、肾皮质和髓质的横截面图像。将每个区域中的平均组织减弱相对于时间绘图，并通过曲线拟合算法进行拟合，以得到肾功能的量度。通过Analyze(Biomedical Imaging Resource,Mayo Clinic,MN,USA)计算皮质和髓质体积，并将RBF计算为皮质和髓质灌注和对应容积的乘积之和。使用近侧肾小管曲线的斜率，从皮质曲线计算GFR。在15min以后重复相同的操作，直到10min乙酰胆碱(Ach)(5μg/kg/min)肾上输注结束，以试验内皮依赖性的微血管反应性。将从颈动脉引入的跟踪导管(Prowler Microcatheter,Cordis,Miami,FL,USA)放在肾动脉上面用于输注Ach。因此，在基线和Ach输注期间，在稳定的3-min观察期内测量血液动力学和功能。

[0362] 血浆硝酸盐/亚硝酸盐水平——使用商购可得的试剂盒(Nitric Oxide Quantitation Kit,Active Motif,Carlsbad,CA)，按照生产商的说明书，通过两步测定定量血浆硝酸盐/亚硝酸盐水平。

[0363] 药代动力学分析

[0364] 血液样品收集和处理

[0365] 1.用于生物分析测定开发的对照血液样品收集:收集20mL静脉全血样品。使用注射器将静脉血抽入含有K2EDTA的BD Vacutainer®PST™Plasma Separation Tubes(淡紫色

帽)中,10mL/管。将试管轻轻反转8次,并在离心之前保持在冰水浴中。在血液样品收集以后1小时内,将样品在摆动桶离心机中在4℃在1000-1300RCF(或约1500xG)离心15min。从各个血液试管收获血浆,放在单个聚丙烯瓶(或螺旋帽试管)中,并在-70℃保存。

[0366] 2.用于PK和生物标志物分析的血液样品收集:在下面指定的时间点,收集静脉全血样品用于PK分析以及用于生物标志物分析和其它炎症性生物标志物。

[0367] (i)PK分析:在下述时间点,使用注射器将4mL静脉全血收集进含有K_2EDTA的预冷的BD Vacutainer® PST™ Plasma Separation Tubes(淡紫色帽)中:即将开始D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2输注之前,即将开始PTRA之前,以及再灌注后30、60和180min。将PK血液试管轻轻混合,并立即放入冰(冰浴或碎冰)中。在收集的30分钟内,将样品在4℃在1500xG离心15min,此后取出2个血浆等分试样(各自约0.5mL),并立即放入螺旋帽聚丙烯试管中。将各个血浆样品在干冰上快速冷冻,并在分析之前在-70℃±15℃储存。

[0368] (ii)生物标志物分析:在下述时间点,将4mL静脉全血收集进BD Vacutainer® SST™ Serum Separation Tubes中:即将开始D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2输注之前,即将开始PTRA之前,和再灌注后30、60和180min。在填充之后,将试管反转至少5次。将试管在室温保持约1小时,以允许血液凝固,并离心以收集血清样品。如果没有产生血清,使用下述基线参照:在凝固以后,在室温,在摆动桶中在1000-1300RCF离心10min,或在固定角度转子中离心15分钟。将血清收集进5个聚丙烯试管中,每个试管含有约0.5mL血清,并在-70℃储存。

[0369] 尿样品收集和处理

[0370] 1.用于生物分析测定开发的对照尿样品收集:从每位受试者收集10mL对照尿样品。将样品在约1500xG离心10分钟以除去任何碎片。将样品放入聚丙烯瓶中并在-70℃储存。

[0371] 2.用于D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2测量的尿样品收集:在D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2输注(210min)结束时,将膀胱排空进预称重的容器中。测量并记录样品和容器的合并重量。彻底混合以后,将2个10-mL等分试样分配进标记的螺旋帽聚丙烯试管中。将各个尿样品在干冰上面快速冷冻,并在试验之前在-70℃±15℃储存。

[0372] 统计方法

[0373] 将结果表示为平均值±SEM。使用成对的Student t-检验进行在组内的对比,并使用ANOVA、随后用Tukey检验进行各组之间的对比。所有试验的统计显著性接受为$p \leq 0.05$。

[0374] D.结果

[0375] 预见到,在PTRA以后,所有受试者将表现出平均动脉压下降至与正常对照相当的水平($p > 0.05$)。进一步预见到,接受与PTRA相结合的D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2输注的受试者将表现出与对照受试者相比改善的肾容量、肾血流量、肾小球滤过率、肾微脉管系统密度、平均血管直径、血管迂曲度和肾氧合。

[0376] E.结论

[0377] 这些结果证实,本发明技术的肽D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2可用于在具有RAS的人受试者中治疗和预防与血运重建(通过PTRA实现)有关的肾损伤的方法中。具体地,这些结果证实,所述肽的施用会保护肾微脉管系统免于再灌注相关的损伤,从而导致与对照受试者相比改善的肾功能和针对RAS进行治疗的受试者的预后改善。

[0378] 实施例3:通过施用D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2减轻猪动脉粥样硬化性肾动脉

狭窄(ARAS)中的肾衰退.

[0379] A.概述

[0380] 本实施例将证实,D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2的施用会在未用血管干预治疗的ARAS受试者中减弱肾细胞凋亡和炎症、氧化性应激、纤维化和肾功能结构衰退。对于不是PTRA的候选人的ARAS受试者而言,本实施例的结果是特别相关的。

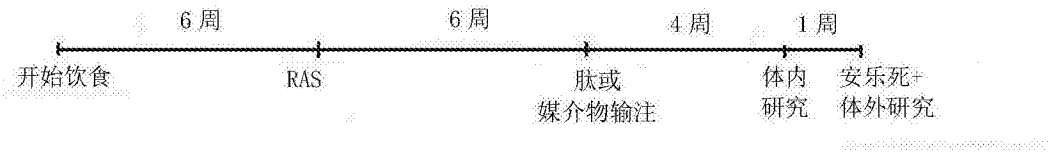
[0381] B.实验设计概述

[0382] 在10周的ARAS和4周的长期皮下(SC)输注D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2或盐水媒介物以后,在体内研究2组猪(表11,12)。使用多检测器计算机断层摄影术和血氧水平依赖性的磁共振,在未治疗的或用D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2治疗的受试者中研究单肾容量、灌注、肾血流量、肾小球滤过率和氧合。每天使用可植入的遥测发射机跟踪血压。使用标准的体外方案,评估D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2对肾炎症、细胞凋亡纤维化、血管生成和氧化性应激的影响。使用微型计算机体层摄影术,离体研究D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2对肾微血管体系结构的影响。

[0383] 在得到动物实验管理小组(IACUC)批准以后,在16周的观察中研究14只猪(50-60kg)(表11)。在基线时,所有受试者开始由2%胆固醇和15%猪油组成的高胆固醇饮食,以便模拟这样的临床情形:其中弥散性早期动脉粥样硬化先于狭窄(表12)。6周后,用0.5g肌肉内氯胺酮和赛拉嗪麻醉ARAS受试者,然后用静脉内氯胺酮(0.2mg/kg/min)和赛拉嗪(0.03mg/kg/min)维持麻醉。如在Chade等人,FASEB J 2006;20:1706-1708中所述,通过将局部刺激线圈(其导致单侧RAS的逐渐发展)放入肾动脉主干中来诱导RAS。

[0384]

表 11 干预和时间点



[0385]

表 12 实验设计概述

组	N	治疗
ARAS + 盐水	7	高胆固醇饮食+ RAS + 假手术+ 盐水
ARAS + D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2	7	高胆固醇饮食+ RAS + 假手术+ D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2

[0386] 诱导RAS(或假)以后,将遥测系统植入左股动脉中以测量MAP,并跟踪动物额外10周。计算在每个研究之前最后2周中的平均MAP。诱导RAS以后6周,类似地麻醉动物,并通过血管造影术确定狭窄程度。在所有受试者中进行假手术,这包括将套管插入肾动脉中和使用反差注射剂的选择性肾血管造影术。另外,7个ARAS受试者开始使用长期皮下D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2(0.1mg/kg,在mL盐水中,每天1次,每周5天)输注的治疗。在其它7个ARAS受试者中施用盐水媒介物(表12)。

[0387] 4周后,类似地再次麻醉受试者。通过血管造影术确定狭窄程度,并收集全身和肾

静脉血液样品用于血浆肾素活性(GammaCoat PRA试剂盒;DiaSorin,Inc.,Stillwater,Minnesota,USA)和肌酸酐测量。使用多检测器计算机断层摄影术(MDCT),评估每个肾中的肾血液动力学和功能,并通过血氧水平依赖性的磁共振成像(BOLD MRI)评估肾氧合(表13)。

[0388] 所有研究完成以后,将受试者用致命的静脉内给药的100mg/kg戊巴比妥钠(Sleepaway,Fort Dodge Laboratories,Inc.,Fort Dodge,Iowa,USA)安乐死。使用腹膜后切口取出肾并立即切开,并将切片在液氮中冷冻(和维持在-80℃)或在福尔马林中保存用于体外研究(表13)。

[0389] C.方法

[0390] 血氧水平依赖性的磁共振成像(BOLD-MRI)——输注以后4周,如以前所述,使用定制的腹部器官方案,在3特斯拉(Signa Echo Speed;GE Medical Systems,Milwaukee,WI)进行BOLD-MRI,以测量肾的髓质和皮质区域中的R2*水平。在悬浮呼吸过程中进行MRI检查。在以前的出版物中已经详细描述了BOLD方法的原理。简而言之,顺磁分子诱导磁场微扰。在血液中,氧合血红蛋白是反磁性的,且它的浓度对T2*没有影响,但是脱氧血红蛋白是顺磁的并减少组织T2*。因此,当梯度回波MRI获取的回波时间增加时,MRI信号减弱随着脱氧血红蛋白浓度增加而增加。Ln(强度)相对于回波时间的斜率等于弛豫时间比率R2*(=1/T2),且与脱氧血红蛋白的浓度直接成比例。在基线BOLD获取以后,将呋塞米(20mg)静脉内地施用进耳静脉导管中,并用2ml盐水冲洗。15min以后,重复BOLD测量。对于数据分析,在7-ms回波时间图像上在皮质和髓质中手工地跟踪目标区域,所述图像给出了在每个实验阶段中的最佳解剖学细节。对于每个回波时间,软件自动地计算在每个目标区域内的MR信号的平均值。然后测量BOLD信号,其通过弛豫率R2*来表征。最后,从基线至呋塞米的R2*变化被确定为“δ-R2*”。

[0391] 多检测器计算机断层摄影术(MDCT)——在BOLD MRI以后1-2天,使用MDCT评估每个肾中的肾血液动力学和功能。MDCT是一种超快扫描仪,其提供单个肾容量、局部灌注、RBF、GFR和肾小管功能的准确且非侵袭性定量。简而言之,在中央静脉注射碘帕醇(每2秒0.5mL/kg)以后,在160次连续扫描以后得到图像。用Analyze软件包(Biomedical ImagingResource,Mayo Clinic,MN,USA)重构和显示MDCT图像。目标区域选自得自主动脉、肾皮质和髓质的横截面图像。将每个区域中的平均组织减弱相对于时间绘图,并通过曲线拟合算法进行拟合,以得到肾功能的量度。通过Analyze计算皮质和髓质体积,并将RBF计算为皮质和髓质灌注和对应容积的乘积之和。使用近侧肾小管曲线的斜率,从皮质曲线计算GFR。在15min以后重复相同的操作,直到10min乙酰胆碱(Ach)(5μg/kg/min)肾上输注结束,以试验内皮依赖性的微血管反应性。将从颈动脉引入的跟踪导管(Prowler Microcatheter,Cordis,Miami,FL,USA)放在肾动脉上面用于输注Ach。因此,在基线和乙酰胆碱(Ach)输注期间,在稳定的3-min观察期内测量血液动力学和功能。

[0392] 组织学——使用计算机辅助的图像分析程序(MetaMorph,MetaImaging,Molecular Devices,Sunnyvale,CA,USA)检查每个肾(每只动物1个)的中肝门(Midhilar)5-μm横截面。在每个载玻片中,通过计算机程序在15-20个视野中半自动地定量三色染色或DHE荧光,表达为肾表面积的分数,并将得自所有视野的结果平均化。

[0393] 细胞凋亡——通过末端脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP切口末端标记(TUNEL)测

定、活化的半胱氨酰天冬氨酸特异性蛋白酶-3染色和促细胞凋亡的Bax和抗细胞凋亡的Bcl-xL蛋白的水平的测量，评价细胞凋亡。

[0394] 氧化性应激——进行体外研究来评估肾中的氧化性应激。如前所述，使用EIA试剂盒评估氧化性应激生物标志物异前列腺素的全身水平。通过评估超氧化物阴离子的原位产生(如前所述使用二氢溴化乙啶(DHE)通过荧光显微术检测)，并通过形成所述阴离子的酶烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氢(NAD(P)H)-氧化酶和内皮一氧化氮合酶(eNOS)的表达，评价肾氧化还原状态。

[0395] 血浆硝酸盐/亚硝酸盐水平——使用商购可得的试剂盒(Nitric Oxide Quantitation Kit,Active Motif,Carlsbad,CA,USA)，按照生产商的说明书，通过两步测定定量血浆硝酸盐/亚硝酸盐水平二者的总和。

[0396] 蛋白质印迹——使用针对MMP-9、PAI-1、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、VEGF、VEGF受体-1(VEGFR1)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)和转化生长因子β(TGF-β)的特异性多克隆抗体，进行蛋白质印迹方案。确定每个肾中的蛋白表达，并定量蛋白带(每只动物1个)的强度。

[0397] 微型计算机体层摄影术分析(MCT)——在冲洗肾以后，在生理压力下穿过连接进肾动脉分支中的插管将microfil MV122(一种血管内造影剂)灌注进狭窄肾中。制备样品并扫描，并如前所述分析图像。还使用软件包ANALYZE™，计算在肾皮质的内部、中间和外部中的微血管的空间密度和平均直径(在20-500mm范围内的直径)。

[0398]

表13. 体内和体外研究

参数	结果的含义
多检测器计算机断层摄影术(MDCT)	肾血液动力学和功能
血氧水平依赖性的磁共振成像(BOLD-MRI)	肾氧合
微型计算机体层摄影术分析(MCT)	微血管稀薄化
TUNEL、活化的半胱氨酰天冬氨酸特异性蛋白酶-3染色以及Bcl-xL和Bax的蛋白表达	细胞凋亡
H&E和三色染色、巨噬细胞CD163、MCP-1、MMP-9、PAI-1、MCP-1、VEGF、TNF-α、TGF-β和VEGFR1	肾形态学，炎症,和纤维化
异前列腺素、超氧化物产生、NAD(P)H氧化酶的表达、DHE、NO合酶表达、血浆硝酸盐/亚硝酸盐水平	氧化性应激

[0399] 统计方法——基于初步数据，能力计算指示，每组需要6只动物(+1以考虑动物损失)来检测80％的能力的差异。将结果表示为平均值±SEM。使用成对的Student t-检验进行在组内的对比，并使用ANOVA、随后用Tukey检验进行各组之间的对比。所有试验的统计显著性接受为$p \leq 0.05$。

[0400] D.结果

[0401] 预见到，给未治疗的ARAS受试者施用D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2会降低细胞凋亡，如Bax水平的下降、Bcl-xL水平的增加和TUNEL+细胞的数目的减少所指示。进一步预见到，D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2的施用会造成肾血管、肾小管和肾小球纤维化的下降，如纤维化三色染色的程度和纤维发生因子TGF-β和PAI-1的表达的下降所指示。进一步预见到，D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2的施用会减轻肾炎症，如TNF-α、CD163和MCP-1水平的下降所指示。进一步预见到，D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2的施用会减轻氧化性应激，如超氧化物的原位产生和伴有增加的NO可用性的NAD(P)H氧化酶表达(eNOS表达，硝酸盐/

亚硝酸盐水平)的下降所指示。另外,预见到,D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2的施用会阻止肾微脉管系统的损失(如通过微-CT所检测到的),从而导致微血管密度、肾血液动力学和氧合的增加。

[0402] E.结论

[0403] 本实施例证实,芳族阳离子肽D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2可用在用于治疗未用血管干预治疗的受试者(诸如不是PTRA的候选人的那些受试者)的ARAS的方法和组合物中。

[0404] 实施例4使用D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2的长期治疗会维持猪ARVD中的狭窄肾.

[0405] 概述

[0406] 本实施例证实了芳族阳离子肽D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2在维持猪ARVD中的狭窄肾中的用途。根据本发明方法,使动物受试者遭受一段时间的ARAS。在10周时段的最后4周中,每天给受试者施用芳族阳离子肽。对照动物要么不接受输注,要么接受单独对照媒介物的输注。与对照受试者相比,在接受所述肽的受试者中肾功能的多个方面得到改善,包括、但不限于单肾容量、灌注、肾血流量(RBF)、肾小球滤过率(GFR)、皮质氧合和肾纤维化。结果证实,肽D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2可用在ARVD的长期治疗方法中。

[0407] 实验设计

[0408] 所有实验根据指南进行,并得到动物实验管理小组(IACUC)的批准。受试者包括驯养的幼龄雌性受试者(Manthei Hog Farm,LLC,MN),观察10周。在基线时,将动物随机化成正常组或ARAS组。给正常动物饲喂正常猪食,给ARAS受试者饲喂高胆固醇饮食(TD-93296,Harlan-Teklad,Indianapolis,IN,USA),后者诱导弥散性早期动脉粥样硬化,其特征在于升高的胆固醇水平和肾功能损害、RAS肾中的炎症和纤维化。参见表14。

[0409] 6周时段以后,ARAS受试者发生单侧RAS(通过将局部刺激线圈放入肾动脉主干中来诱导),而对正常动物假手术。为了麻醉,用肌肉内注射的氯胺酮和赛拉嗪(0.5g)诱导动物,并用静脉内的氯胺酮(0.2mg/kg/min)和赛拉嗪(0.03mg/kg/min)维持麻醉。将遥测系统(Data Sciences International,St Paul,Minnesota,USA)植入左股动脉中,以在接下来的10周中连续测量平均动脉压(MAP)。

[0410] 诱导RAS以后10周,受试者每周5天地接受0.1mg/kgD-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2或媒介物的皮下注射,持续4周的时段。

[0411] 在用D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2或媒介物治疗4周以后,类似地麻醉受试者,并通过血管造影术确定狭窄程度。进行多检测器计算机断层摄影术(MDCT)研究,用于评估单肾肾血液动力学和功能。在中央静脉注射碘帕醇(每2秒0.5mL/kg)以后,进行140次连续扫描。用Analyze™软件包(Biomedical Imaging Resource,Mayo Clinic,Rochester,MN)重构并分析横截面图像。目标区域选自肾皮质和髓质的横截面图像。将每个区域中的平均组织减弱相对于时间绘图,并通过曲线拟合算法进行拟合,以得到肾功能的量度。通过Analyze计算皮质和髓质体积,并将RBF计算为皮质和髓质灌注和对应容积的乘积之和。使用近侧肾小管曲线的斜率,从皮质曲线计算GFR。在15min以后重复相同的操作,直到10min Ach(5μg/kg/min)肾上输注结束,以试验内皮依赖性的微血管反应性。将从颈动脉引入的跟踪导管(Prowler Microcatheter,Cordis,Miami,FL,USA)放在肾动脉上面用于输注Ach。在

基线和Ach输注期间，在稳定的3-min观察期内测量血液动力学和功能。使用血氧水平依赖性的(BOLD)MRI，评估肾氧合。

[0412]

表14. 实验设计概述

组	治疗
正常+ 媒介物	正常饮食+ 盐水媒介物
正常+ 肽	正常饮食+ D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2
ARVD + 媒介物	高胆固醇饮食+ RAS + 盐水
ARVD + 肽	高胆固醇饮食+ RAS + D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2

[0413] 体内研究结束后，将动物用戊巴比妥钠(100mg/kg，Sleepaway®，FortDodge Laboratories，Fort Dodge，Iowa，USA)安乐死。取出肾脏，切开，并准备用于离体研究。

[0414] 使用计算机辅助的图像分析程序AxioVision®4.8.2.0(Carl ZEISS SMT，Oberkochen，德国)，在用Masson氏三色染色的每个肾的5μm中肝门(mid-hilar)横截面中评估肾纤维化。在15-20个视野中定量管间质纤维化和肾小球评分(100个肾小球中发生硬化的百分比)。

[0415] 使用JMP软件包8.0版(SAS Institute Inc.，Cary，NC，USA)，分析所有数据。使用Shapiro-Wilk检验来检验相对于正常性的偏差。对于正态分布的数据，将结果表达为平均值±标准差(SD)，对于非正态分布的数据，将结果表达为中间值(范围)。在适当时使用参数(ANOVA和不成对的Student t-检验)和非参数(Wilcoxon和Kruskal Wallis)检验。认为$p \leq 0.05$的值是统计上显著的。

[0416] 结果

[0417] 诱导RAS以后6周，在所有ARAS动物中实现显著程度的狭窄(81.0-89.8%)，且平均动脉压(MAP)类似地升高(相对于正常，$p<0.05$)(表15)。

[0418] 表15显示了在10周ARAS时段的最后4周期间用D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2或媒介物治疗以后在正常和ARAS受试者中的平均动脉压(mmHg)、肾容量(cc)、皮质灌注(ml/min/cc)、RBF(ml/min)、GFR(ml/min)和肾小管间质性纤维化(%)。肾组织切片的三色染色显示在图10中，并在图11中定量。血氧水平依赖性的(BOLD)MRI图像显示在图12中，皮质血液氧合指数(R2*)的定量显示在图13中。

[0419] 诱导ARAS以后4周，ARAS受试者中的肾血液动力学参数与正常对照相比下降(表15)。同样地，ARAS受试者表现出与正常对照相比增加的肾小管间质性纤维化和减少的皮质血液氧合(表15；图10-13)。ARAS受试者中的血管反应性下降，如通过RBF和GFR响应于Ach的变化量级所测得的。

[0420] 与未治疗的对照组相比，在ARAS受试者中使用D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2的治疗会减轻肾小管间质性纤维化和增加肾容量、皮质灌注、RBF和GFR(表15；图10-11)。与未治疗的对照组相比，使用D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH_2的治疗也会改善皮质血液氧合和对Ach的血管反应性(图12-15)。

[0421]

表 15: 在正常和 ARAS 受试者中的肾狭窄、血液动力学和功能	正常+媒介物	正常+ Bendavia	ARVD+ 媒介物	ARVD + Bendavia
狭窄的程度(%)	0	0	69.8±5.2*	81.0±5.3*
平均血压(mmHg)	82.2±41.6	84.4±23.7	173.4±19.4*	171.5±15.8*
肾容量(cc)	102.9±4.0	96.1±6.3	66.4±6.3*‡	104.9±3.3
皮质灌注(ml/min/cc)	4.5±0.5	4.0±0.3	3.1±0.2*‡	4.4±0.2
RBF (ml/min)	553.8±62.8	589.7±71.8	318.8±61.0*‡	535.1±24.9
GFR (ml/min)	84.0±3.8	75.8±6.6	48.0±4.0*‡	86.6±11.2
肾小管间质性纤维化(%)	1.9±0.6	2.4±0.4	4.2±0.9*‡	2.6±1.0

[0422] *相对于正常,$p<0.05$

[0423] ‡相对于ARVD+肽,$p<0.05$

[0424] 这些结果证实,本发明技术的D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2肽可用于治疗具有ARAS的受试者。具体地,结果表明,使用D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2肽长期治疗ARAS受试者会减轻肾小管间质性纤维化和改善肾血液动力学和血管反应性。结果进一步证实,D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2肽可用于改善肾功能(通常在具有ARVD的受试者中)和改善受试者的预后。

[0425] 实施例5在具有ARVD的人受试者中用D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2长期治疗以后改善的肾功能.

[0426] 概述

[0427] 本实施例将证实芳族阳离子肽D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2在具有ARVD的人受试者的长期治疗中的用途。

[0428] 根据本发明方法,每天给具有ARVD的人受试者施用D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2肽,持续数周的时段。对照受试者要么不接受输注,要么接受单独对照媒介物的输注。预期肾功能的多个方面在接受肽的受试者中得到改善(与对照受试者相比),包括肾容量、皮质灌注、RBF、GFR、皮质血液氧合和血管反应性。结果证实,D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2肽可用在具有ARVD的人受试者的长期治疗方法中。

[0429] 实验设计

[0430] 将具有ARVD的人受试者随机化成实验组和对照组。每天1次用皮下施用的D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2(0.1mg/kg)肽或媒介物治疗受试者,持续4周的时段。使用MDCT评估每个肾中的肾血液动力学和功能,并通过BOLD MRI评估肾氧合。

[0431] 血氧水平依赖性的磁共振成像(BOLD-MRI)——PTRA以后4周,如以前所述,使用定制的腹部器官方案,在3特斯拉(Signa Echo Speed;GE Medical Systems,Milwaukee,WI)进行BOLD-MRI,以测量肾的髓质和皮质区域中的R2*水平。简而言之,顺磁分子诱导磁场微扰。在血液中,氧合血红蛋白是反磁性的,且它的浓度对T2*没有影响,但是脱氧血红蛋白是顺磁的并减少组织T2*。因此,当梯度回波MRI获取的回波时间增加时,MRI信号减弱随着脱氧血红蛋白浓度增加而增加。Ln(强度)相对于回波时间的斜率等于弛豫时间比率R2*(=1/T2),且与脱氧血红蛋白的浓度直接成比例。在基线BOLD获取以后,静脉内地施用呋塞米

(20mg)，并用2ml盐水冲洗。15min以后，重复BOLD测量。对于数据分析，在7-ms回波时间图像上在皮质和髓质中手工地跟踪目标区域，所述图像给出了在每个实验阶段中的最佳解剖学细节。对于每个回波时间，软件自动地计算在每个目标区域内的MR信号的平均值。然后测量BOLD信号，其通过弛豫率R2*来表征。从基线至呋塞米的R2*变化被确定为“δ-R2*”。

[0432] 多检测器计算机断层摄影术(MDCT)——在BOLD MRI以后1-2天，使用MDCT评估每个肾中的肾血液动力学和功能。MDCT是一种超快扫描仪，其提供单个肾容量、局部灌注、血流量、肾小球滤过率(GFR)和肾小管功能的准确且非侵袭性定量。简而言之，在中央静脉注射碘帕醇(每2秒0.5mL/kg)以后，在45次连续扫描以后得到图像。用Analyze软件包(Biomedical Imaging Resource,Mayo Clinic,MN,USA)重构和显示MDCT图像。目标区域选自得自主动脉、肾皮质和髓质的横截面图像。将每个区域中的平均组织减弱相对于时间绘图，并通过曲线拟合算法进行拟合，以得到肾功能的量度。通过Analyze(Biomedical Imaging Resource,Mayo Clinic,MN,USA)计算皮质和髓质体积，并将RBF计算为皮质和髓质灌注和对应容积的乘积之和。使用近侧肾小管曲线的斜率，从皮质曲线计算GFR。在15min以后重复相同的操作，直到10min乙酰胆碱(Ach)(5μg/kg/min)肾上输注结束，以试验内皮依赖性的微血管反应性。将从颈动脉引入的跟踪导管(Prowler Microcatheter,Cordis,Miami,FL,USA)放在肾动脉上面用于输注Ach。因此，在基线和Ach输注期间，在稳定的3-min观察期内测量血液动力学和功能。

[0433] 将结果表示为平均值±SEM。使用成对的Student t-检验进行在组内的对比，并使用ANOVA、随后用Tukey检验进行各组之间的对比。所有试验的统计显著性接受为$p \leq 0.05$。

[0434] 结果

[0435] 预见到，在用本发明技术的肽D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2长期治疗以后，与未治疗的对照组受试者相比，ARVD受试者将表现出改善的肾容量、皮质灌注、RBF、GFR、皮质血液氧合和血管反应性以及降低的平均动脉血压。进一步预见到，与未治疗的对照组受试者相比，经治疗的受试者将表现出减轻的肾小管间质性纤维化。预见到，前述参数的值与正常对照相当($p<0.05$)。

[0436] 这些结果证实，本发明技术的D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2肽可用于治疗具有ARAS的人受试者。具体地，结果表明，用D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2肽长期治疗人ARAS受试者会减轻肾小管间质性纤维化和改善肾血液动力学和血管反应性。结果进一步表明，D-Arg-2′,6′-Dmt-Lys-Phe-NH_2肽可用于改善肾功能(通常在具有ARVD的受试者中)和改善受试者的预后。

[0437] 参考文件

[0438] Bakker EN,等人,Small artery remodeling depends on tissue-type transglutaminase.Circ Res.2005;96:119-126.

[0439] Chade AR and Kelsen S,Renal Microvascular Disease Determines the Responses to Revascularization in Experimental Renovascular Disease,Circ Cardiovasc Interv 2010;3(4):376-383.

[0440] Chade AR,等人,Antioxidant intervention blunts renal injury in experimental renovascular disease,J Am Soc Nephrol 2004;15:958-966.

[0441] Chade AR,等人,Antioxidant intervention prevents renal

neovascularization in hypercholesterolemic pigs,J Am Soc Nephrol 2004;15:1816-1825.

[0442] Chade AR,等人,Beneficial effects of antioxidant vitamins on the stenotic kidney.Hypertension.2003;42:605-612.

[0443] Chade AR,等人,Comparison of acute and chronic antioxidant interventions in experimental renovascular disease,Am J Physiol Renal Physiol 2004;286:F1079-1086.

[0444] Chade AR,等人,Distinct renal injury in early atherosclerosis and renovascular disease,Circulation 2002;106:1165-1171.

[0445] Chade AR,等人,Endothelin-1receptor blockade prevents renal injury in experimental hypercholesterolemia,Kidney Int 2003;64:962-969.

[0446] Chade AR,等人,Mechanisms of renal structural alterations in combined hypercholesterolemia and renal artery stenosis,Arterioscler Thromb Vasc Biol2003;23:1295-1301.

[0447] Chade AR,等人,Simvastatin promotes angiogenesis and prevents microvascular remodeling in chronic renal ischemia,FASEB J 2006;20:1706-1708.

[0448] Cho S,等人,A novel cell-permeable antioxidant peptide,SS31,attenuates ischemic brain injury by down-regulating CD36,J Biol Chem 2007;282:4634-4642.

[0449] Daemen MA,等人,Inhibition of apoptosis induced by ischemia-reperfusion prevents inflammation,J Clin Invest 1999;104:541-549.

[0450] Dai DF,等人,Mitochondrial targeted antioxidant peptide ameliorates hypertensive cardiomyopathy.J Am Coll Cardiol.2011.

[0451] Epstein FH and Prasad P,Effects of furosemide on medullary oxygenation in younger and older subjects,Kidney Int 2000;57:2080-2083.

[0452] Epstein FH,等人,Effect of diabetes on renal medullary oxygenation during water diuresis,Diabetes Care 2002;25:575-578.

[0453] Favreau F,等人,Revascularization of swine renal artery stenosis improves renal function but not the changes in vascular structure,Kidney Int.2010;78(11):1110-1118.

[0454] Gerwins P,等人,Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis.Crit Rev Oncol Hematol.2000;34:185-194.

[0455] Gloviczki ML,等人,Comparison of 1.5and 3T BOLD MR to study oxygenation of kidney cortex and medulla in human renovascular disease,Invest Radiol 2009;44:566-571.

[0456] Gloviczki ML,等人,Preserved oxygenation despite reduced blood flow in poststenotic kidneys in human atherosclerotic renal artery stenosis, Hypertension 55:961-966.

[0457] Gomez SI,等人,Increased hypoxia and reduced renal tubular response to

furosemide detected by BOLD magnetic resonance imaging in swine renovascular hypertension,Am J Physiol Renal Physiol 2009;297:F981-986.

[0458] Hansen KJ,等人,Prevalence of renovascular disease in the elderly:a population-based study,J Vasc Surg 2002;36:443-451.

[0459] Heil M and Schaper W.Influence of mechanical,cellular,and molecular factors on collateral artery growth(arteriogenesis).Circ Res.2004;95:449-458.

[0460] Hricik DE,等人,Captopril-induced functional renal insufficiency in patients with bilateral renal-artery stenoses or renal-artery stenosis in a solitary kidney.N Engl J Med.

[0461] Juillard L,等人,Blood oxygen level-dependent measurement of acute intra-renal ischemia,Kidney Int 2004;65:944-950.

[0462] Kalra PA,等人,Atherosclerotic renovascular disease in United States patients aged 67years or older:risk factors,revascularization,and prognosis, Kidney Int2005;68:293-301.

[0463] Langille BL and Dajnowiec D.Cross-linking vasomotor tone and vascular remodeling:A novel function for tissue transglutaminase?Circ Res.2005;96:9-11.

[0464] Lavi R,等人,Simvastatin decreases endothelial progenitor cell apoptosis in the kidney of hypertensive hypercholesterolemic pigs, Arterioscler Thromb Vasc Biol 30:976-983.

[0465] Lerman LO,等人,Noninvasive evaluation of a novel swine model of renal artery stenosis,J Am Soc Nephrol 1999;10:1455-1465.

[0466] Mizuguchi Y,等人,A novel cell-permeable antioxidant peptide decreases renal tubular apoptosis and damage in unilateral ureteral obstruction,Am J Physiol Renal Physiol 2008;295:F1545-1553.

[0467] Nogae S,等人,Induction of apoptosis in ischemia-reperfusion model of mouse kidney:possible involvement of Fas,J Am Soc Nephrol 1998;9:620-631.

[0468] Orrenius S,Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death,Drug Metab Rev 2007;39:443-455.

[0469] Plouin PF,等人,Blood pressure outcome of angioplasty in atherosclerotic renal artery stenosis:a randomized trial,Essai Multicentrique Medicaments vs Angioplastie(EMMA)Study Group,Hypertension 1998;31:823-829.

[0470] Prasad PV and Epstein FH,Changes in renal medullary pO2during water diuresis as evaluated by blood oxygenation level-dependent magnetic resonance imaging:effects of aging and cyclooxygenase inhibition,Kidney Int 1999;55:294-298.

[0471] Prasad PV,等人,Noninvasive evaluation of intrarenal oxygenation with BOLD MRI,Circulation 1996;94:3271-3275.

[0472] Rosenberger C,等人,Up-regulation of hif in experimental acute renal

failure:Evidence for a protective transcriptional response to hypoxia.Kidney Int.2005;67:531-542.

[0473] Sachse A and Wolf G.Angiotensin ii-induced reactive oxygen species and the kidney.J Am Soc Nephrol.2007;18:2439-2446.

[0474] Shanley PF.The pathology of chronic renal ischemia.Semin Nephrol.1996;16:21-32.

[0475] Stulak JM,等人,Renal vascular function in hypercholesterolemia is preserved by chronic antioxidant supplementation.J Am Soc Nephrol.2001;12:1882-1891.

[0476] Szeto HH,等人,Mitochondria-targeted peptide accelerates atp recovery and reduces ischemic kidney injury.J Am Soc Nephrol.2011;22:1041-1052.

[0477] Szeto HH,Mitochondria-targeted cytoprotective peptides for ischemia-reperfusion injury,Antioxid Redox Signal 2008;10:601-619.

[0478] Textor SC and Wilcox CS,Renal artery stenosis:a common,treatable cause of renal failure?,Annu Rev Med 2001;52:421-442.

[0479] van Jaarsveld BC,等人,The effect of balloon angioplasty on hypertension in atherosclerotic renal-artery stenosis.Dutch Renal Artery Stenosis Intervention Cooperative Study Group,N Engl J Med 2000;342:1007-1014.

[0480] Vedder NB,等人,Inhibition of leukocyte adherence by anti-CD18monoclonal antibody attenuates reperfusion injury in the rabbit ear,Proc Natl Acad Sci U S A 1990;87:2643-2646.

[0481] Verhoeff BJ等人,Influence of percutaneous coronary intervention on coronary microvascular resistance index.Circulation.2005;111:76-82.

[0482] Webster J,等人,Randomised comparison of percutaneous angioplasty vs continued medical therapy for hypertensive patients with atheromatous renal artery stenosis.Scottish and Newcastle Renal Artery Stenosis Collaborative Group,J Hum Hypertens 1998;12:329-335.

[0483] Wheatley K,等人,Revascularization versus medical therapy for renal-artery stenosis.N Engl J Med.2009;361:1953-1962.

[0484] Yao EH,等人,Oxidative stress on progenitor and stem cells in cardiovascular diseases.Curr Pharm Biotechnol.2006;7:101-108.

[0485] Zhu XY,等人,Antioxidant intervention attenuates myocardial neovascularization in hypercholesterolemia,Circulation 2004;109:2109-2115.

[0486] Zhu XY,等人,Cortical microvascular remodeling in the stenotic kidney:role of increased oxidative stress,Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004;24:1854-1859.

[0487] Zhu XY,等人,Redox-sensitive myocardial remodeling and dysfunction in swine diet-induced experimental hypercholesterolemia,Atherosclerosis 2007;

193:62-69.

[0488] Zhu XY,等人,Simvastatin prevents coronary microvascular remodeling in renovascular hypertensive pigs,J Am Soc Nephrol 2007;18:1209-1217.

[0489] Zhu,等人,The chemokine monocyte chemoattractant protein-1contributes to renal dysfunction in swine renovascular hypertension,J Hypertens 2009;27:2063-2073.

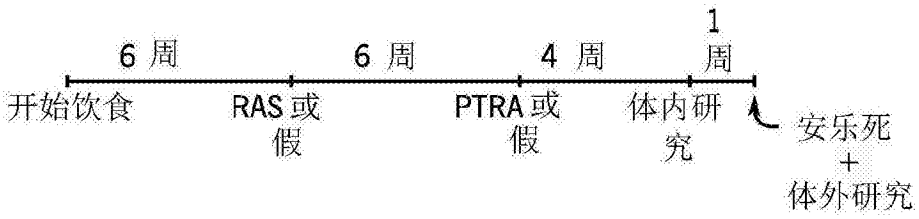

6 周
6 周
4 周
1 周
开始饮食
RAS 或假
PTRA 或假
体内研究
安乐死 + 体外研究

图1A

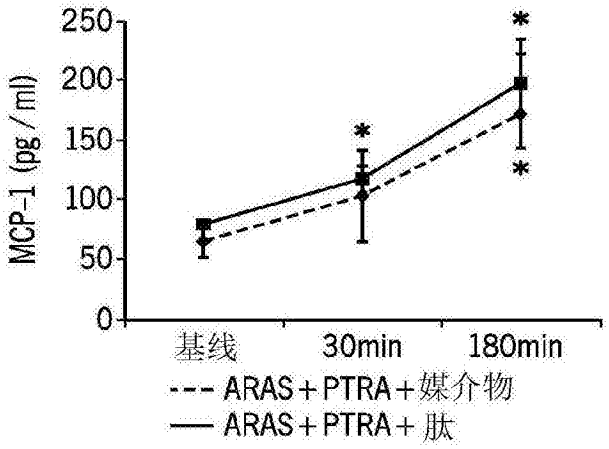

MCP-1 (pg / ml)
250
200
150
100
50
0
基线
30min
180min
ARAS + PTRA + 媒介物
ARAS + PTRA + 肽

图1B

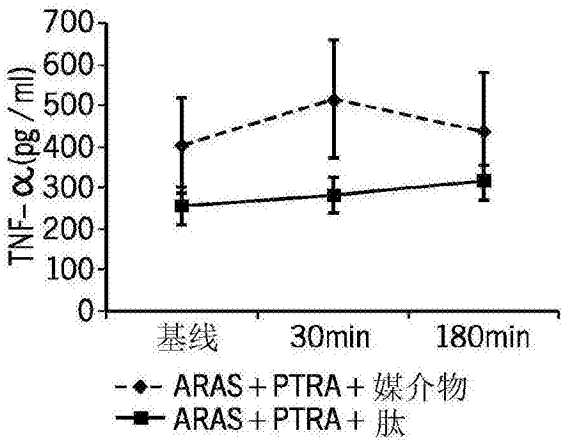

TNF-α (pg / ml)
700
600
500
400
300
200
100
0
基线
30min
180min
ARAS + PTRA + 媒介物
ARAS + PTRA + 肽

图1C

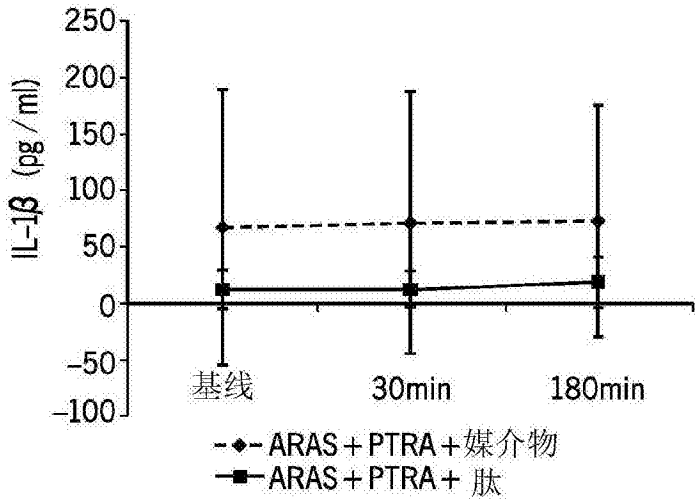

250
200
150
100
50
0
-50
-100
IL-1β (pg/ml)
基线
30min
180min
ARAS+PTRA+媒介物
ARAS+PTRA+肽

图1D

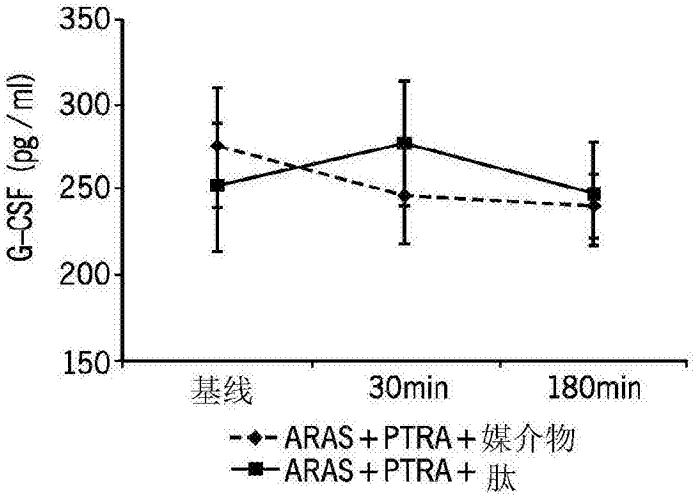

350
300
250
200
150
G-CSF (pg/ml)
基线
30min
180min
ARAS+PTRA+媒介物
ARAS+PTRA+肽

图1E

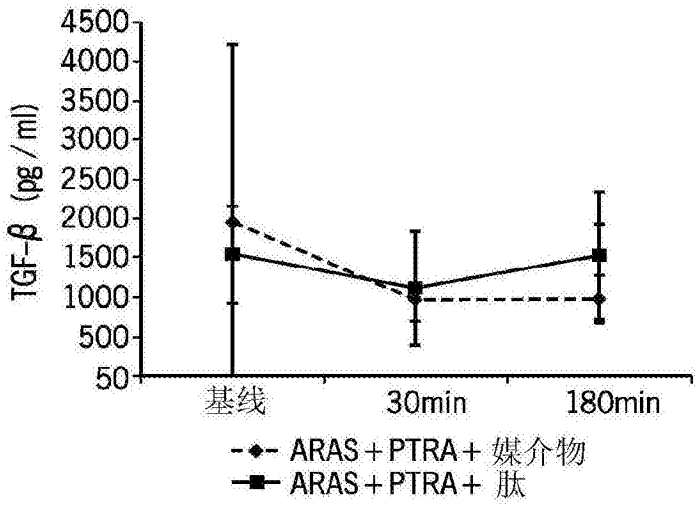

4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
50
TGF-β (pg / ml)
基线
30min
180min
ARAS + PTRA + 媒介物
ARAS + PTRA + 肽

图1F

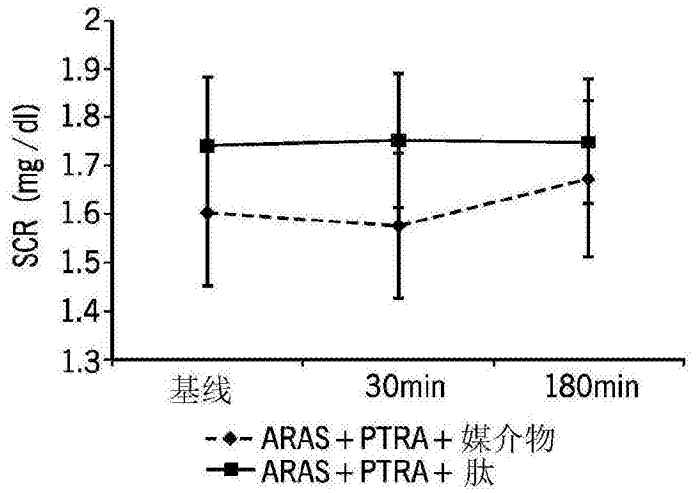

2
1.9
1.8
1.7
1.6
1.5
1.4
1.3
SCR (mg / dl)
基线
30min
180min
ARAS + PTRA + 媒介物
ARAS + PTRA + 肽

图1G

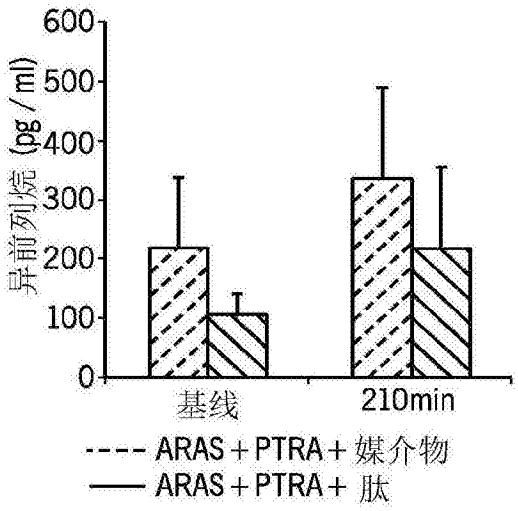

600
500
400
300
200
100
0
异前列烷 (pg / ml)
基线
210min
---- ARAS + PTRA + 媒介物
—— ARAS + PTRA + 肽

图2A

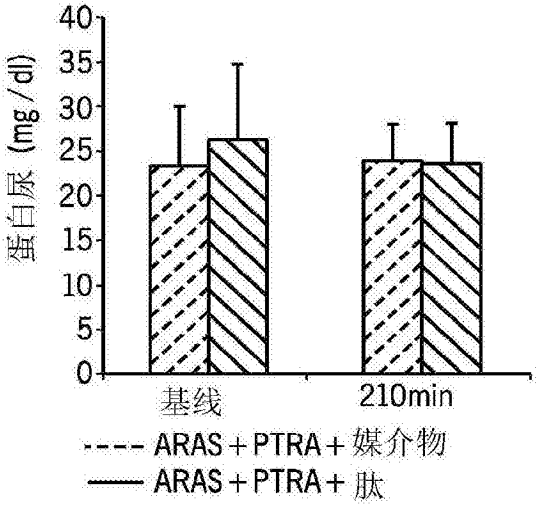

40
35
30
25
20
15
10
5
0
蛋白尿 (mg / dl)
基线
210min
---- ARAS + PTRA + 媒介物
—— ARAS + PTRA + 肽

图2B

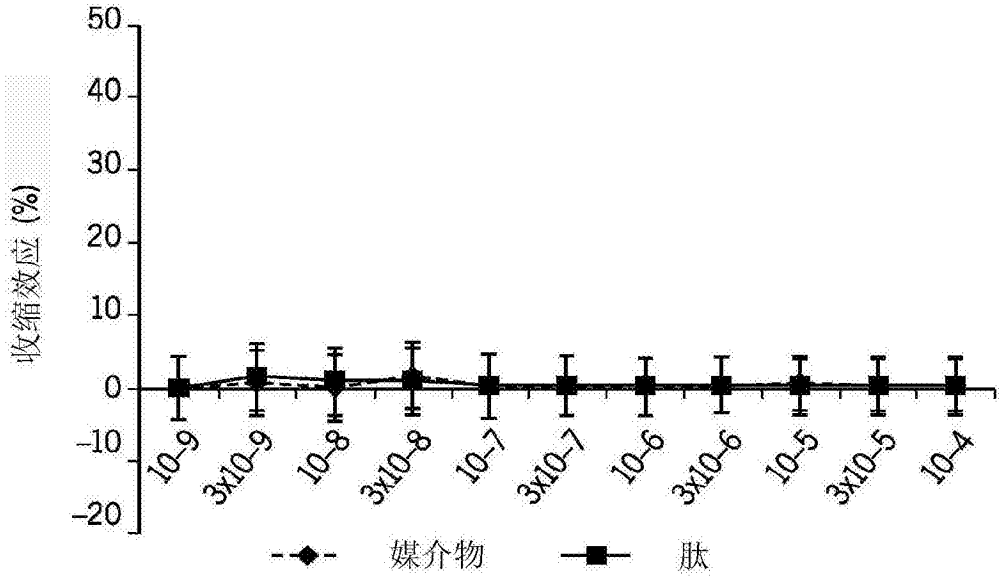

50
40
30
20
10
0
-10
-20
收缩效应 (%)
10-9
3x10-9
10-8
3x10-8
10-7
3x10-7
10-6
3x10-6
10-5
3x10-5
10-4
媒介物
肽

图2C

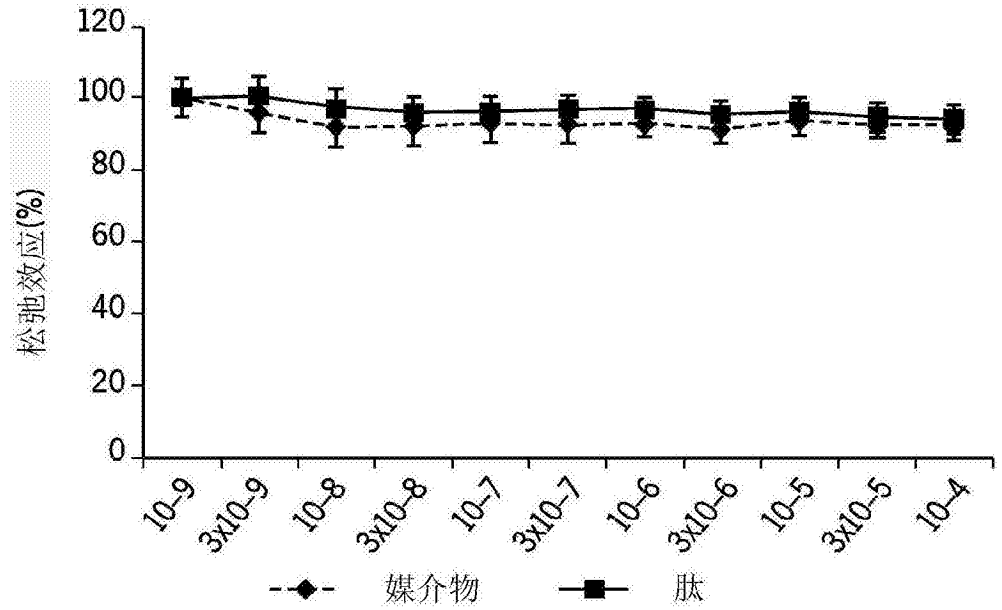

120
100
80
60
40
20
0
松弛效应(%)
10-9
3x10-9
10-8
3x10-8
10-7
3x10-7
10-6
3x10-6
10-5
3x10-5
10-4
媒介物
肽

图2D

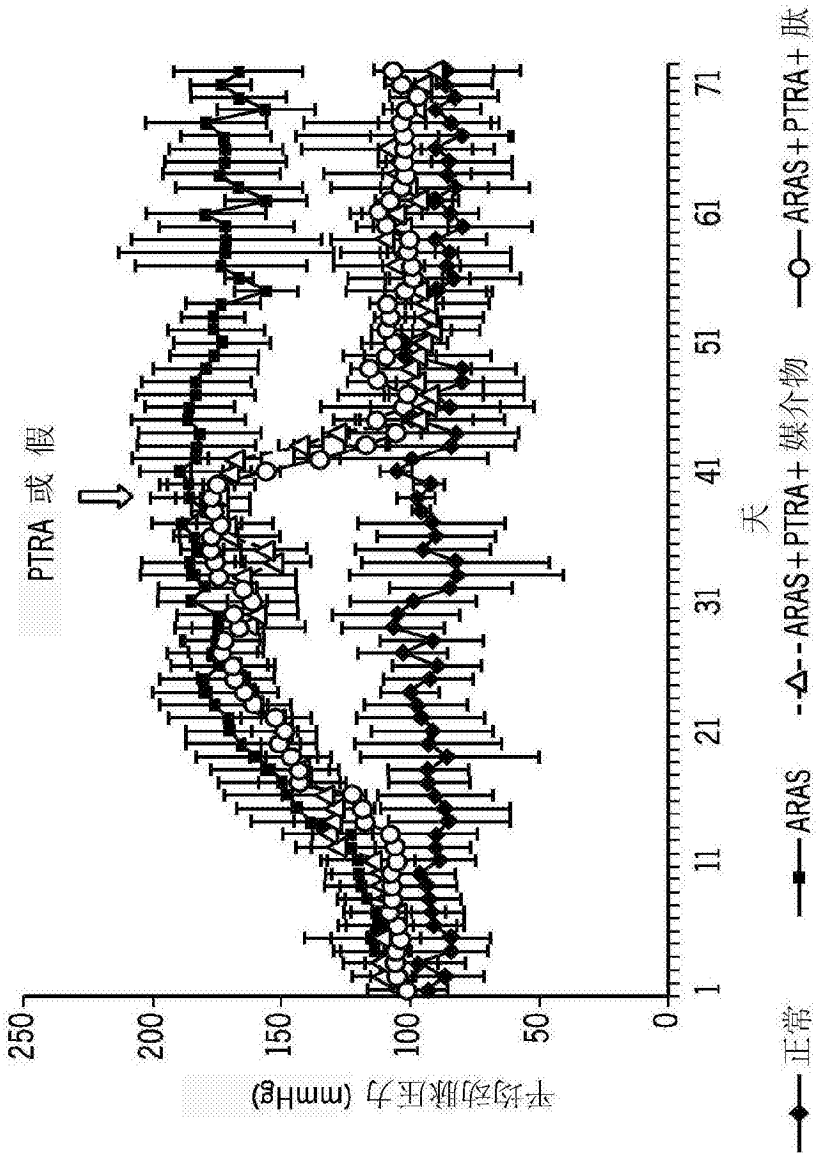

PTRA 或 假
平均动脉压力 (mmHg)
250
200
150
100
50
0
1
11
21
31
41
51
61
71
天
正常
ARAS
ARAS + PTRA + 媒介物
ARAS + PTRA + 肽

图3A

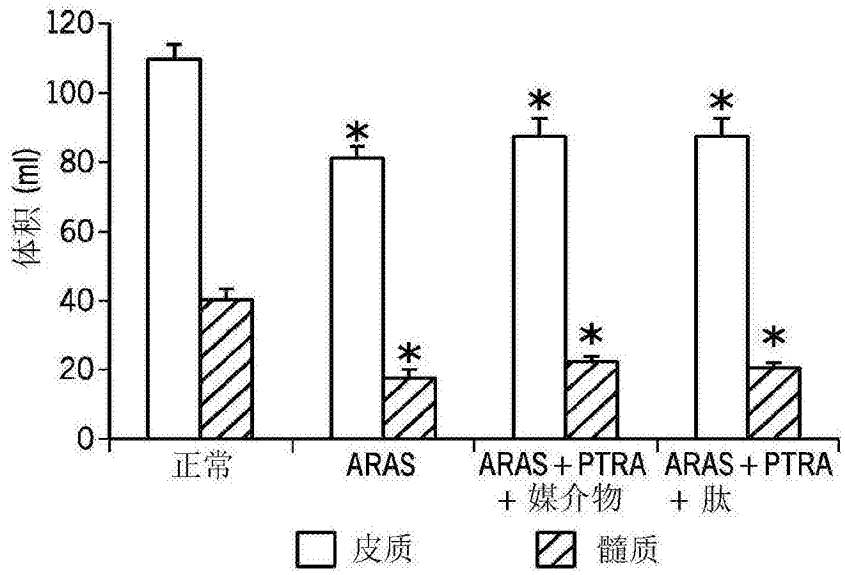

120
100
80
60
40
20
0
体积 (ml)
*
正常
ARAS
ARAS + PTRA + 媒介物
ARAS + PTRA + 肽
皮质
髓质

图3B

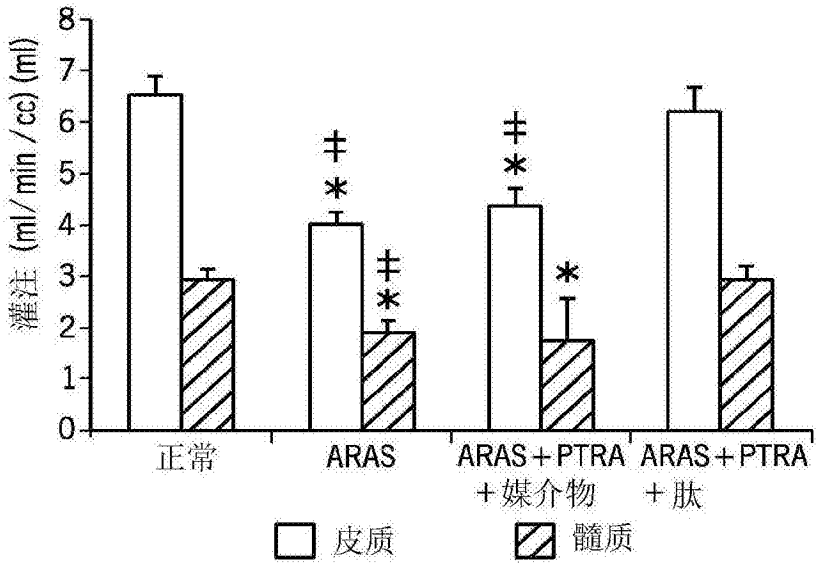

8
7
6
5
4
3
2
1
0
灌注 (ml/min/cc) (ml)
‡
*
正常
ARAS
ARAS + PTRA + 媒介物
ARAS + PTRA + 肽
皮质
髓质

图3C

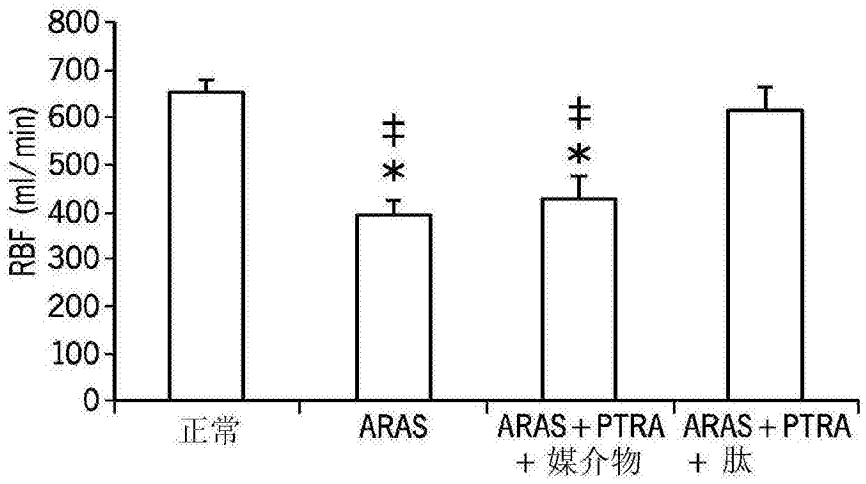

800
700
600
500
400
300
200
100
0
RBF (ml/min)
‡
*
‡
*
正常
ARAS
ARAS+PTRA
+ 媒介物
ARAS+PTRA
+ 肽

图3D

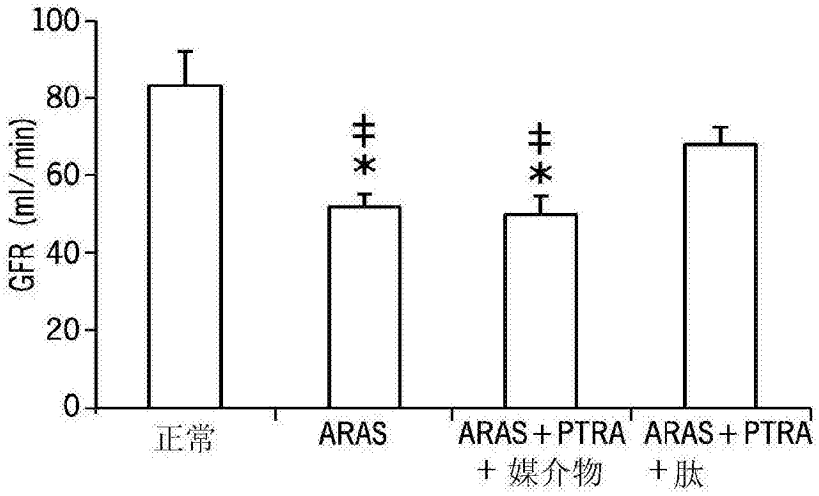

100
80
60
40
20
0
GFR (ml/min)
‡
*
‡
*
正常
ARAS
ARAS+PTRA
+ 媒介物
ARAS+PTRA
+肽

图3E

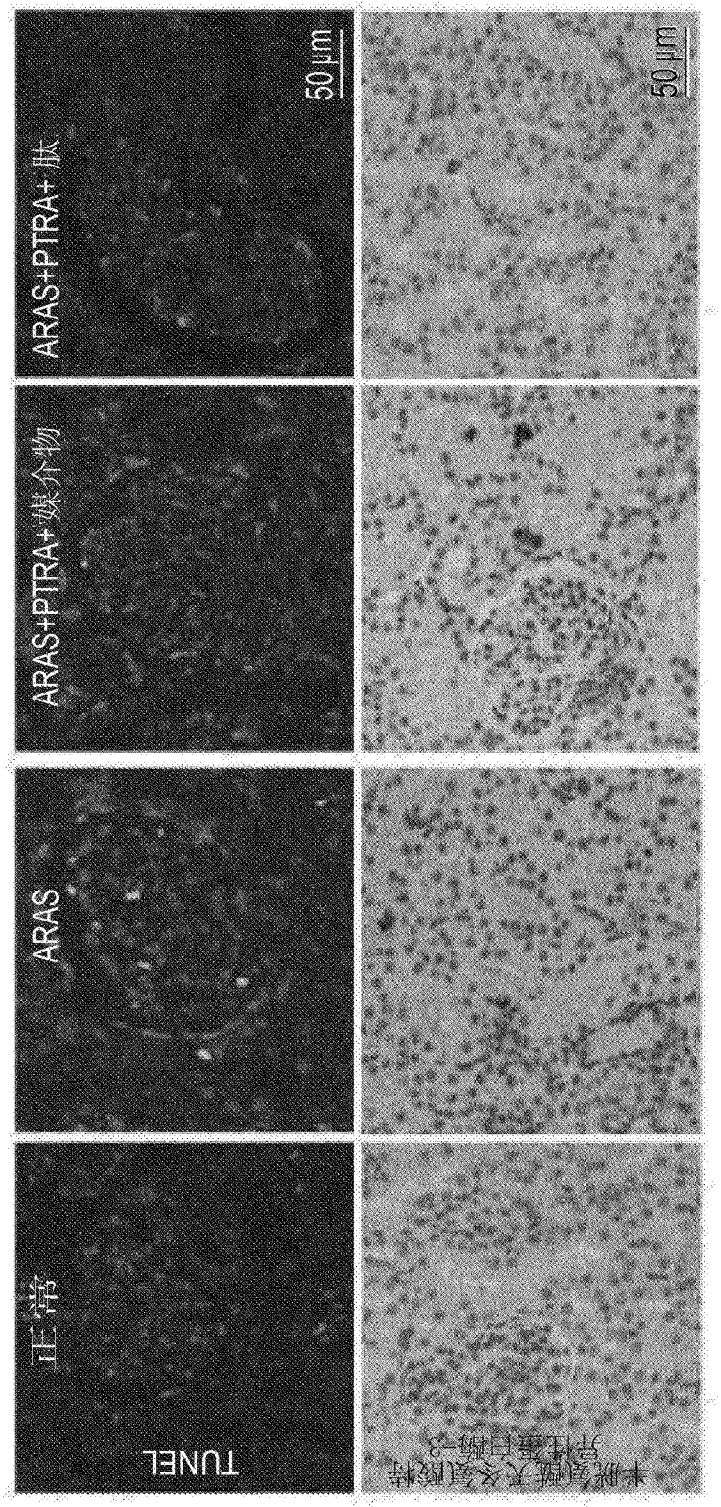


图4A

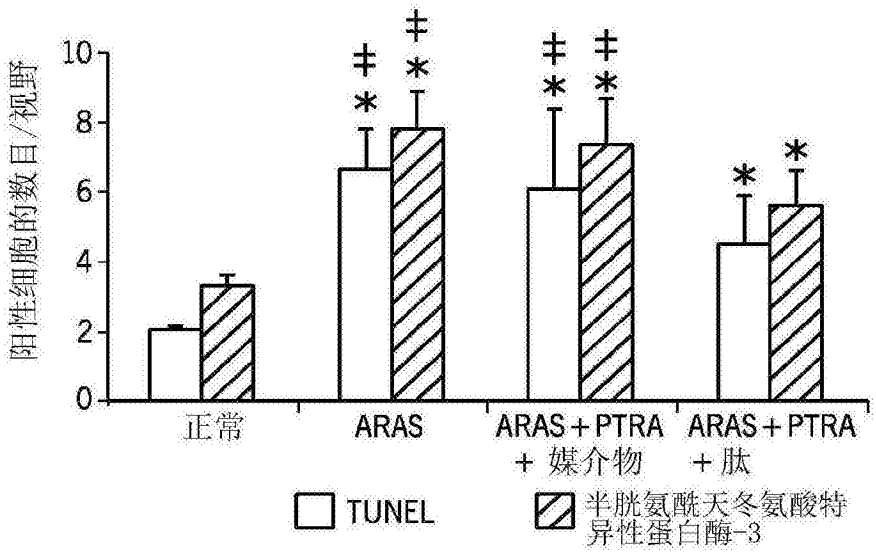

阳性细胞的数目/视野
10
8
6
4
2
0
正常
ARAS
ARAS+PTRA
+媒介物
ARAS+PTRA
+肽
TUNEL
半胱氨酰天冬氨酸特
异性蛋白酶-3

图4B

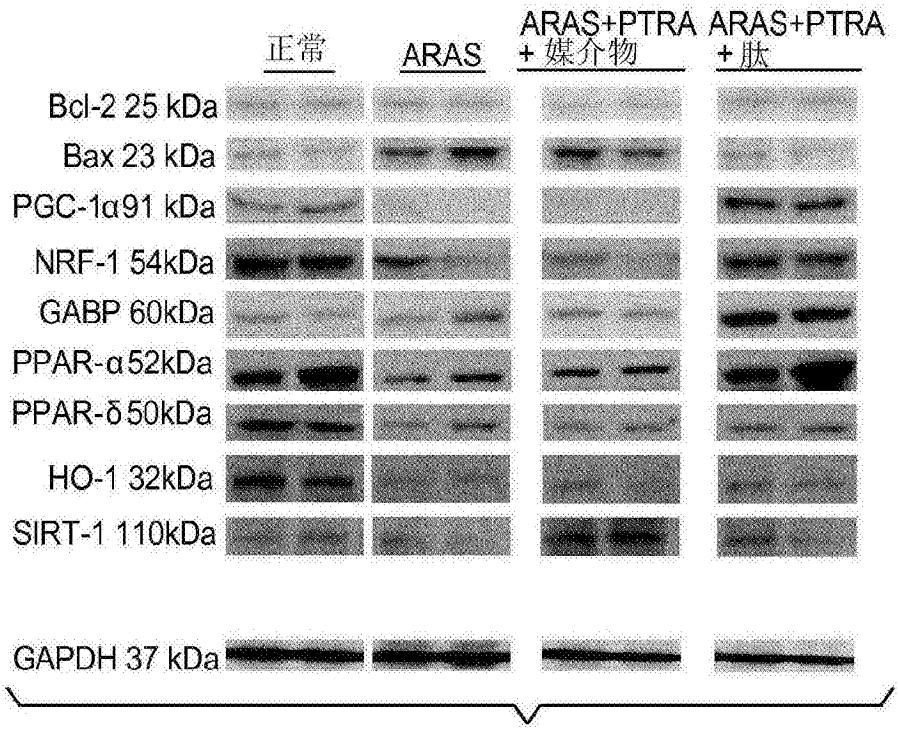

正常
ARAS
ARAS+PTRA
+媒介物
ARAS+PTRA
+肽
Bcl-2 25 kDa
Bax 23 kDa
PGC-1α91 kDa
NRF-1 54kDa
GABP 60kDa
PPAR-α52kDa
PPAR-δ50kDa
HO-1 32kDa
SIRT-1 110kDa
GAPDH 37 kDa

图4C

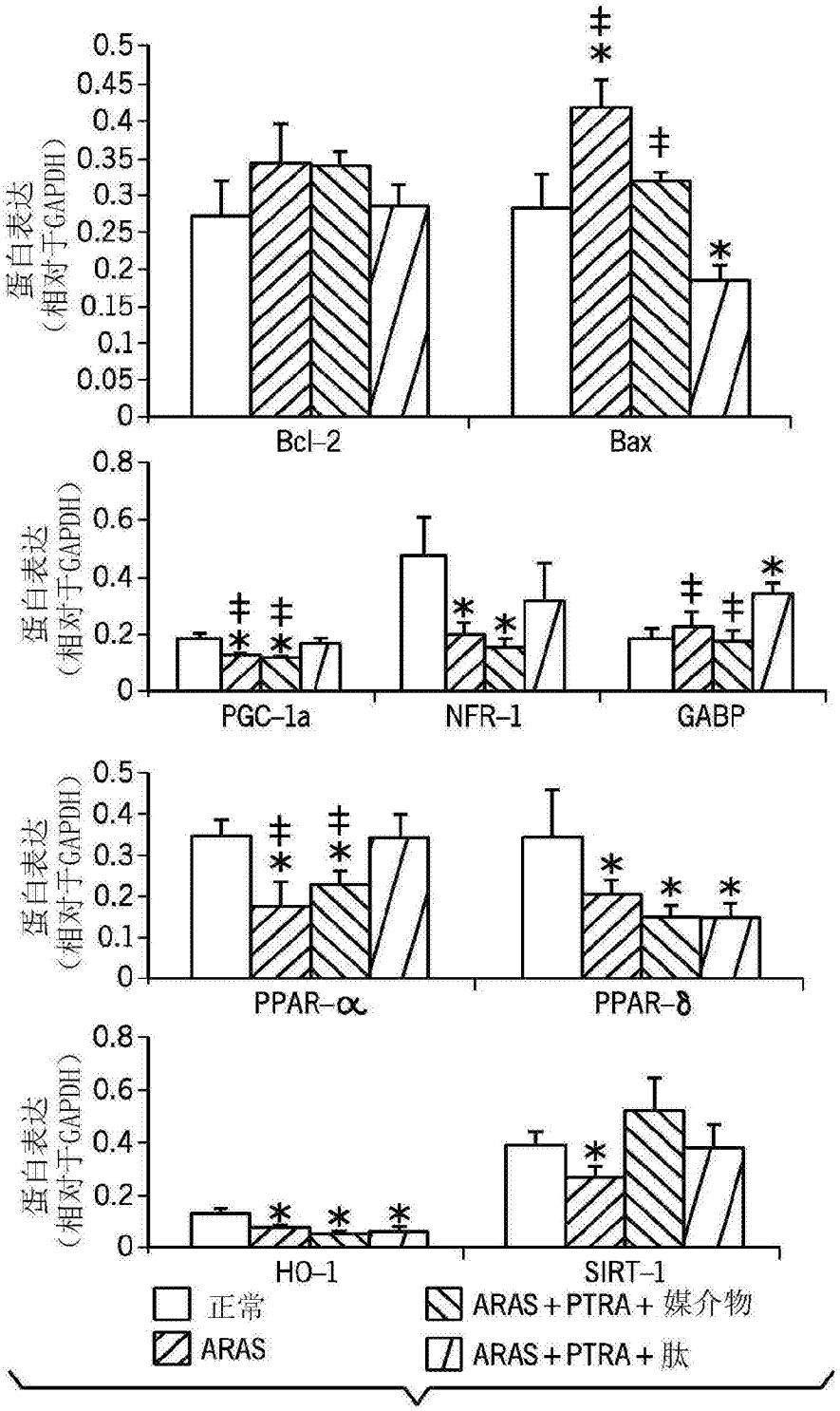

蛋白表达
（相对于GAPDH）
0.5
0.45
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
Bcl-2
Bax
0.8
0.6
0.4
0.2
0
PGC-1a
NFR-1
GABP
PPAR-α
PPAR-δ
HO-1
SIRT-1
正常
ARAS
ARAS+PTRA+媒介物
ARAS+PTRA+肽

图4D

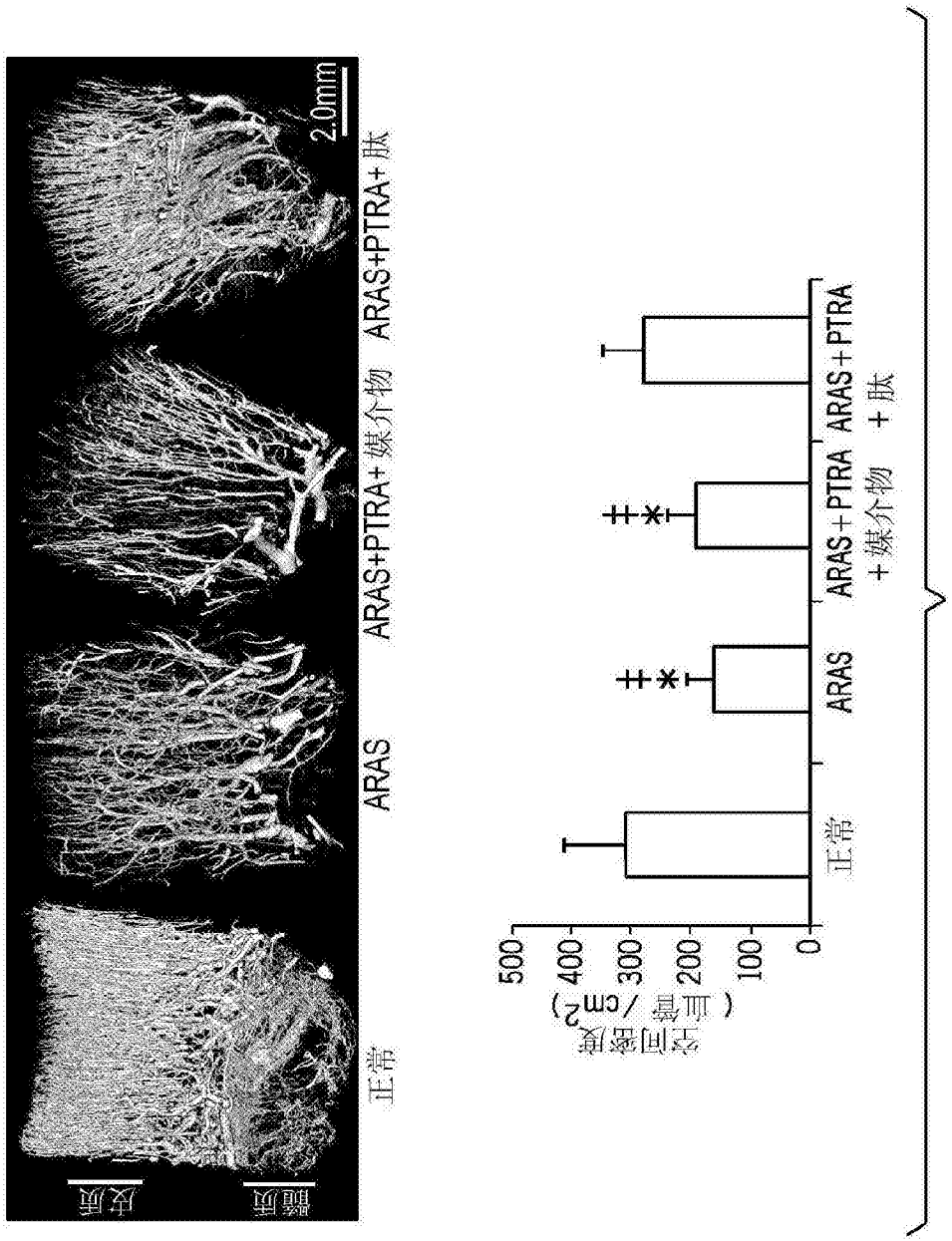

皮质
髓质
2.0mm
正常
ARAS
ARAS+PTRA+媒介物
ARAS+PTRA+脉
空间密度
（血管/cm2）
500
400
300
200
100
0
正常
ARAS
ARAS+PTRA
+媒介物
ARAS+PTRA
+脉

图5A

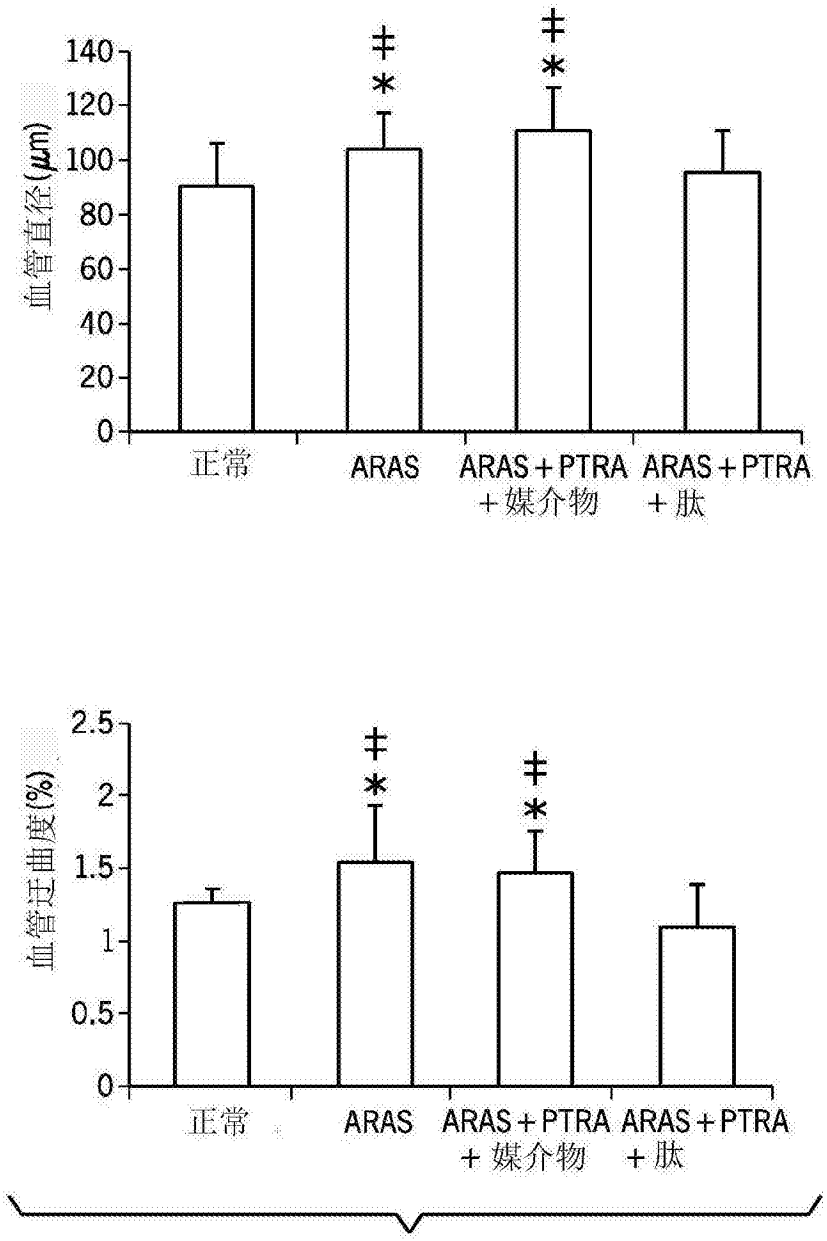

血管直径(μm)
140
120
100
80
60
40
20
0
‡
*
‡
*
正常
ARAS
ARAS+PTRA
+媒介物
ARAS+PTRA
+肽
血管迂曲度(%)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
‡
*
‡
*
正常
ARAS
ARAS+PTRA
+媒介物
ARAS+PTRA
+肽

图5B

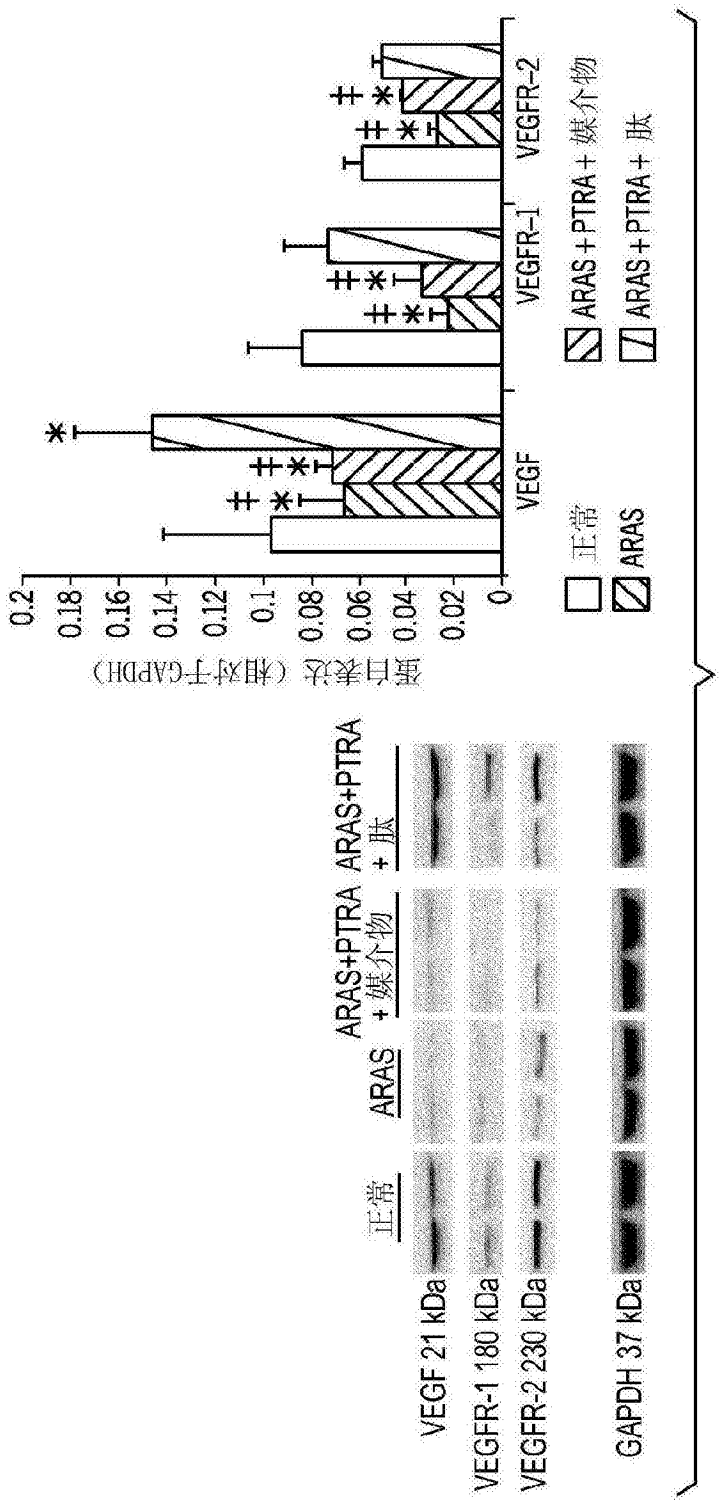
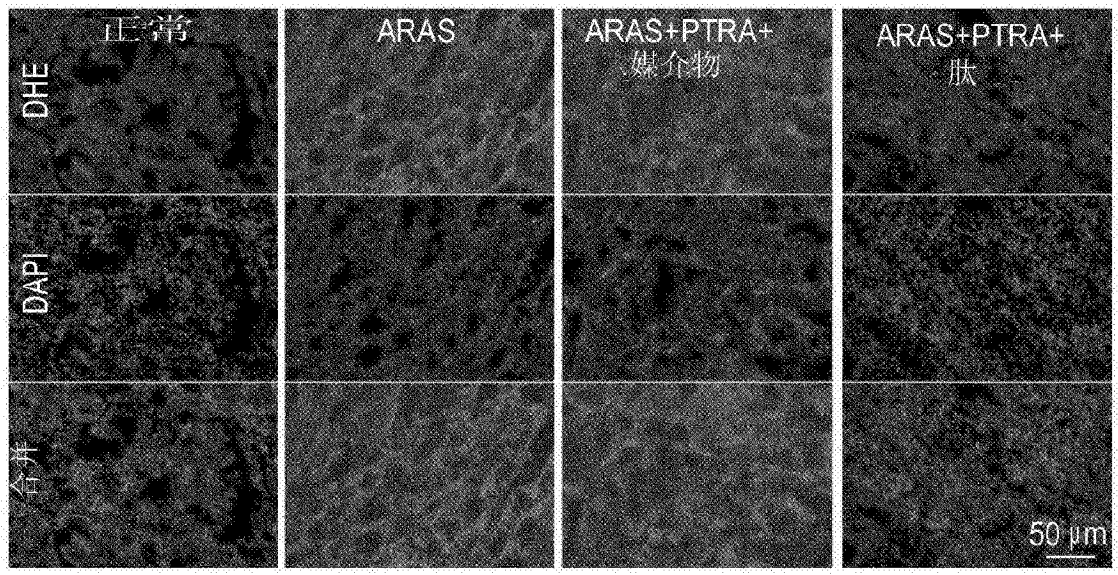

蛋白表达（相对于GAPDH）
0.2
0.18
0.16
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
VEGF
VEGFR-1
VEGFR-2
正常
ARAS
ARAS+PTRA+媒介物
ARAS+PTRA+肽
正常
ARAS
ARAS+PTRA+媒介物
ARAS+PTRA+肽
VEGF 21 kDa
VEGFR-1 180 kDa
VEGFR-2 230 kDa
GAPDH 37 kDa

图5C


正常
ARAS
ARAS+PTRA+
媒介物
ARAS+PTRA+
肽
DHE
DAPI
合并
50 μm

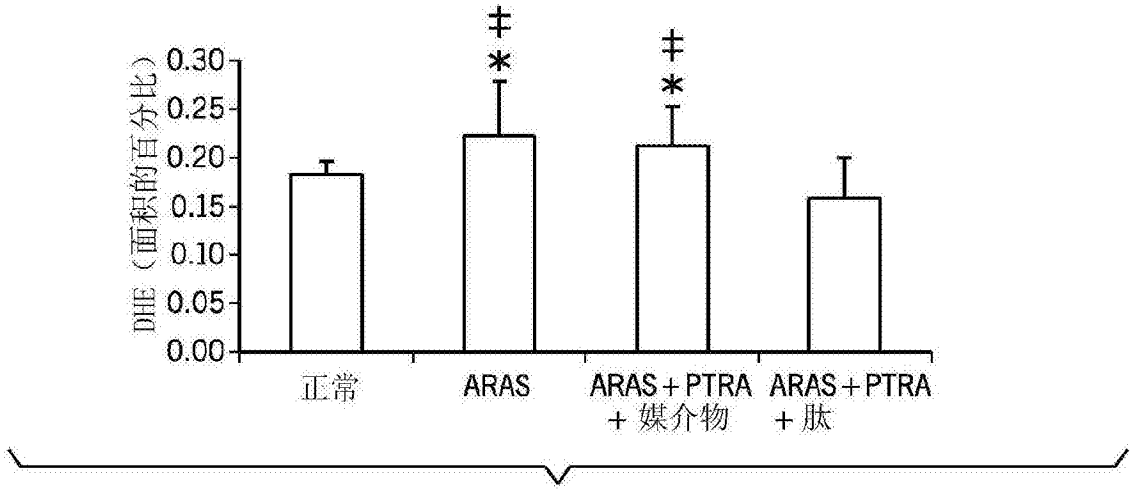

DHE（面积的百分比）
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
‡
*
‡
*
正常
ARAS
ARAS＋PTRA
＋媒介物
ARAS＋PTRA
＋肽

图6A

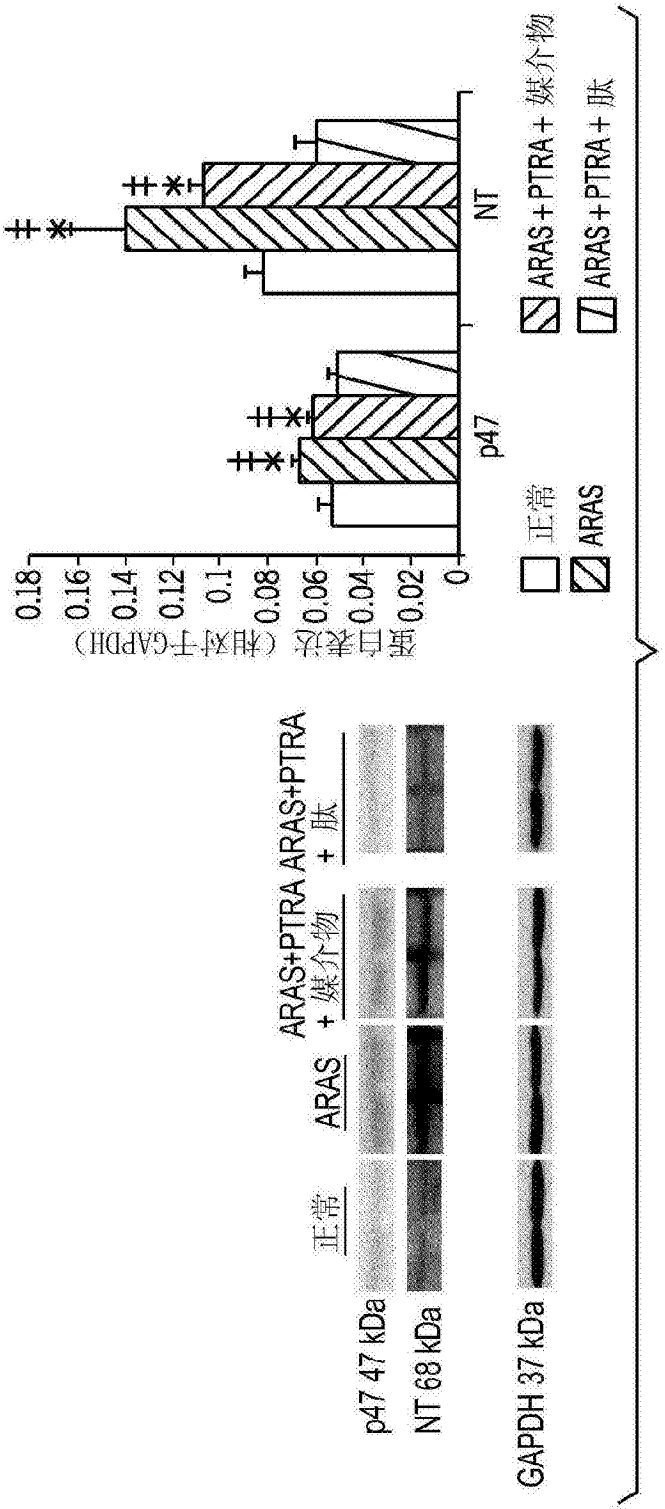

蛋白表达（相对于GAPDH）
0.18
0.16
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
p47
NT
正常
ARAS
ARAS+PTRA+媒介物
ARAS+PTRA+肽
正常
ARAS
ARAS+PTRA
+媒介物
ARAS+PTRA
+肽
p47 47 kDa
NT 68 kDa
GAPDH 37 kDa

图6B

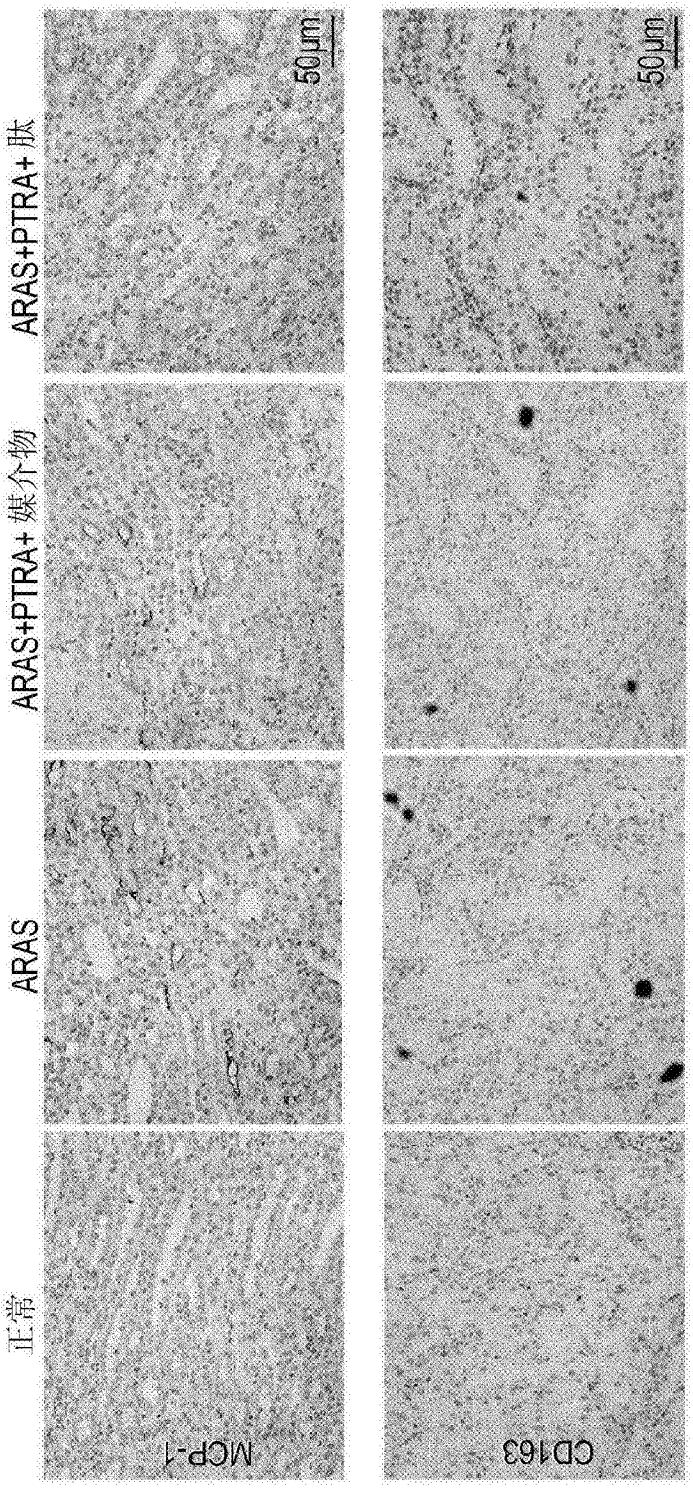


图7A

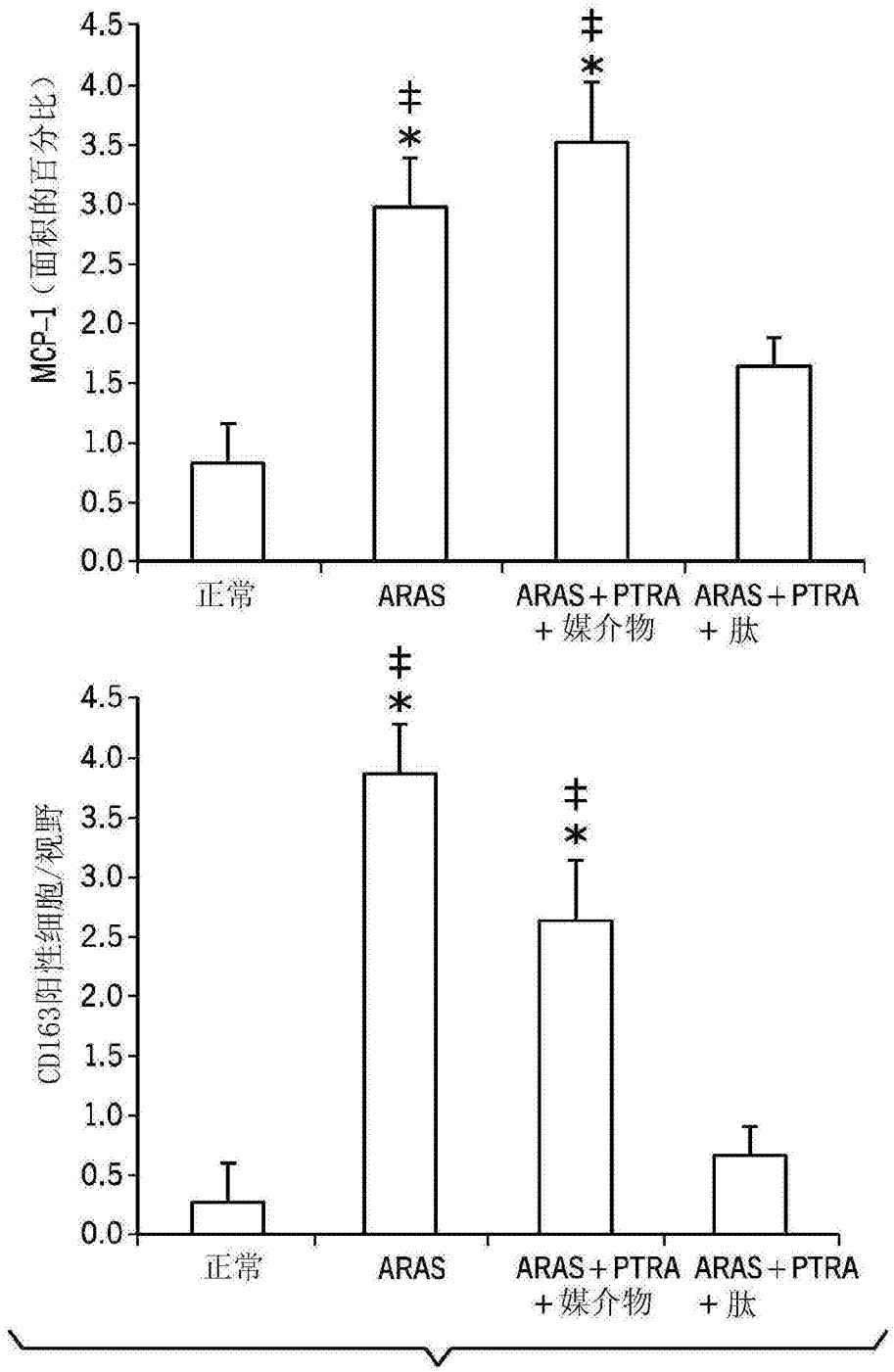

MCP-1（面积的百分比）
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
‡
*
正常
ARAS
ARAS＋PTRA ＋媒介物
ARAS＋PTRA ＋肽
CD163阳性细胞/视野
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
‡
*
正常
ARAS
ARAS＋PTRA ＋媒介物
ARAS＋PTRA ＋肽

图7B

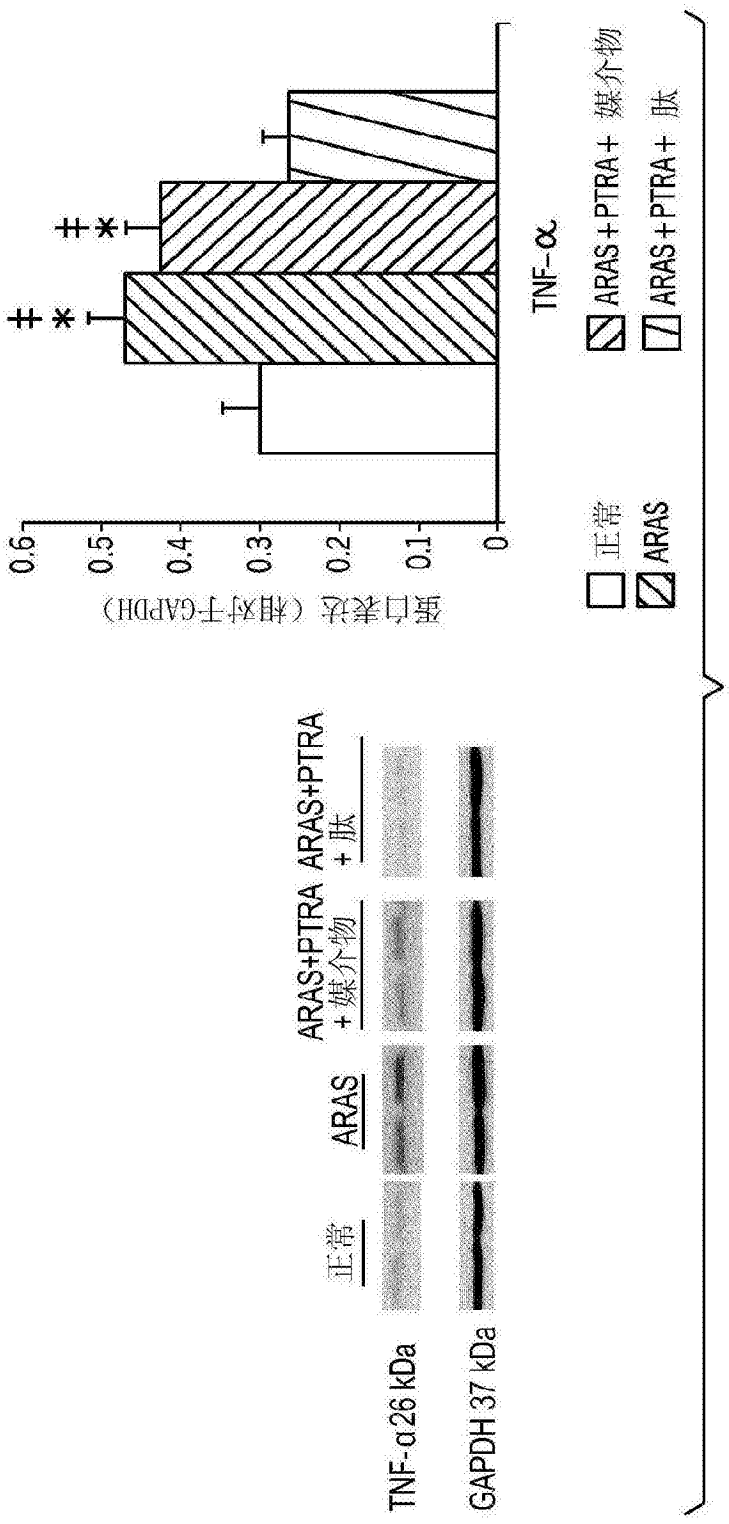

蛋白表达（相对于GAPDH）
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
TNF-α
正常
ARAS
ARAS+PTRA+媒介物
ARAS+PTRA+肽
正常
ARAS
ARAS+PTRA+媒介物
ARAS+PTRA+肽
TNF-α 26 kDa
GAPDH 37 kDa

图7C

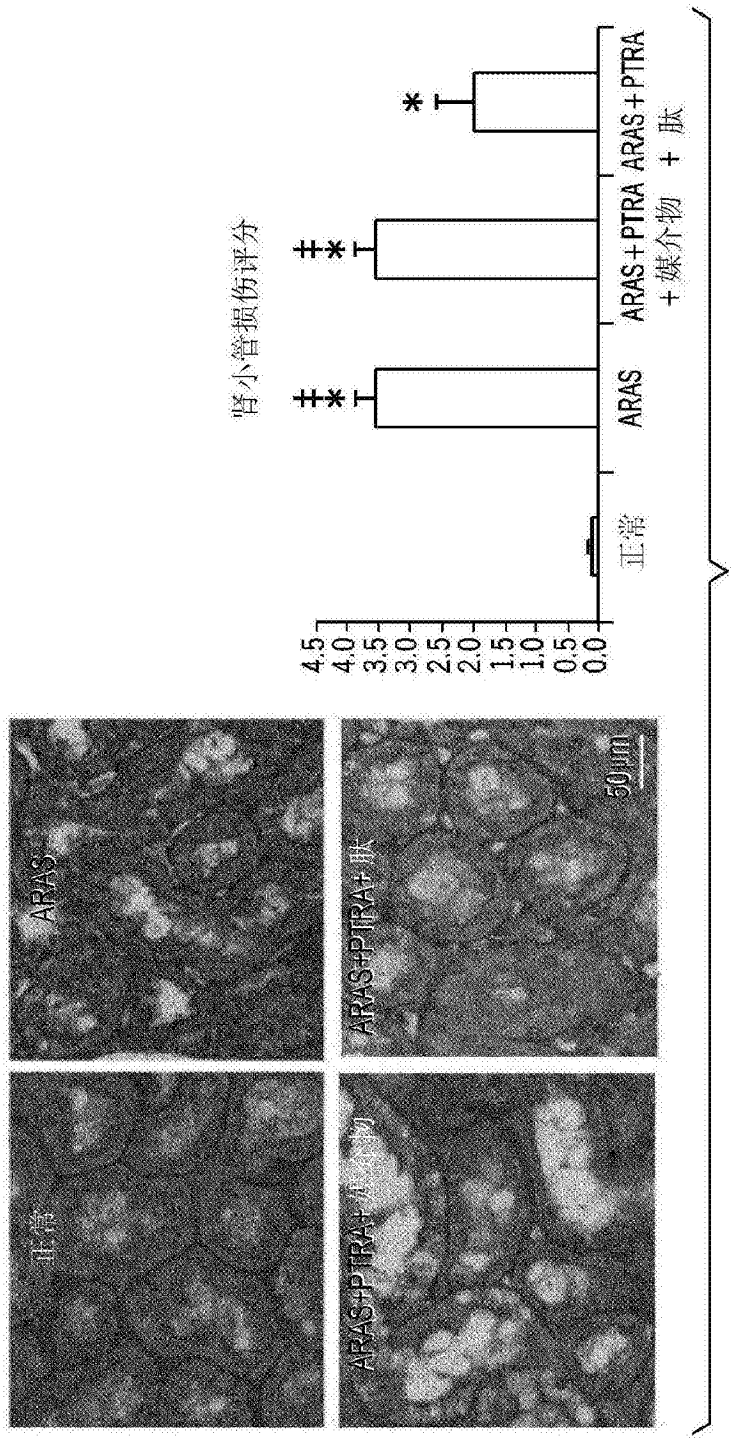

肾小管损伤评分
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
正常
ARAS
ARAS+PTRA
ARAS+PTRA
+媒介物
+肽
##
##
*
正常
ARAS
ARAS+PTRA+媒介物
ARAS+PTRA+肽
50μm

图8A

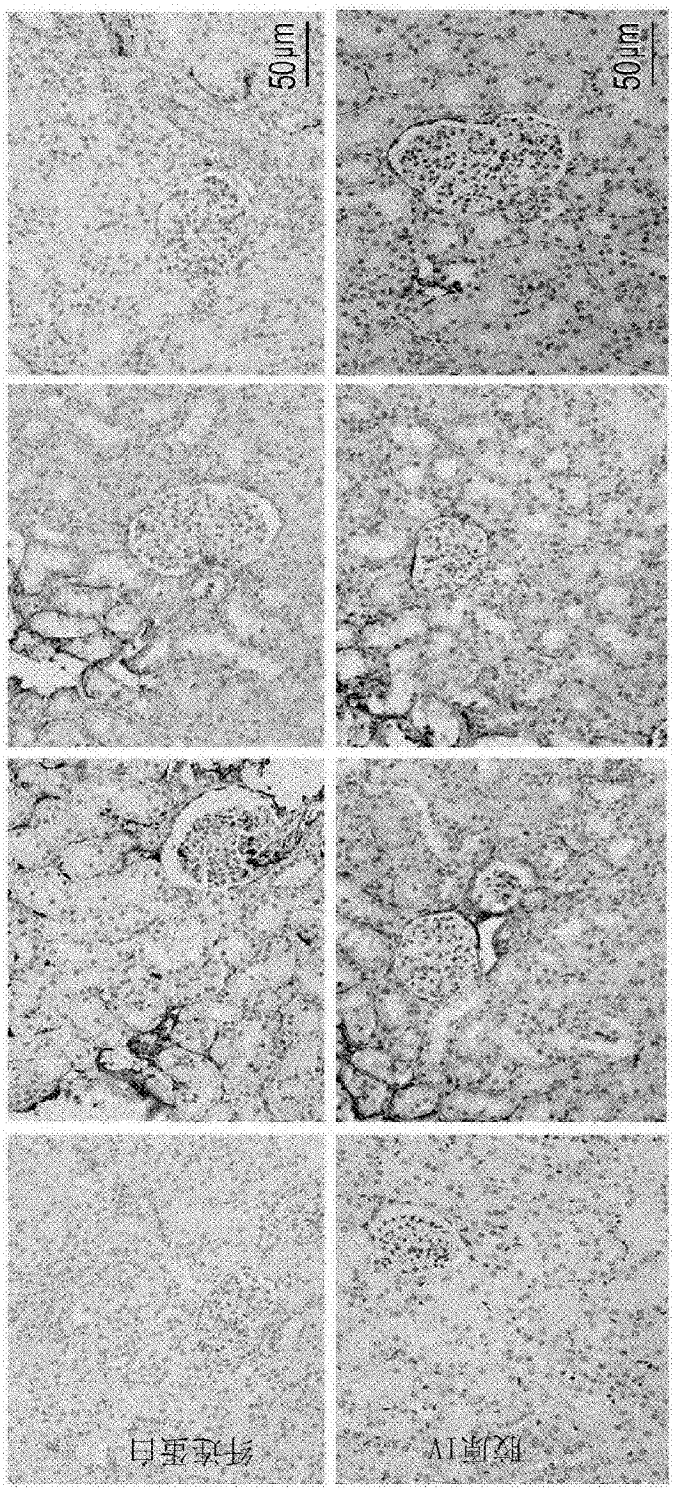


图8B

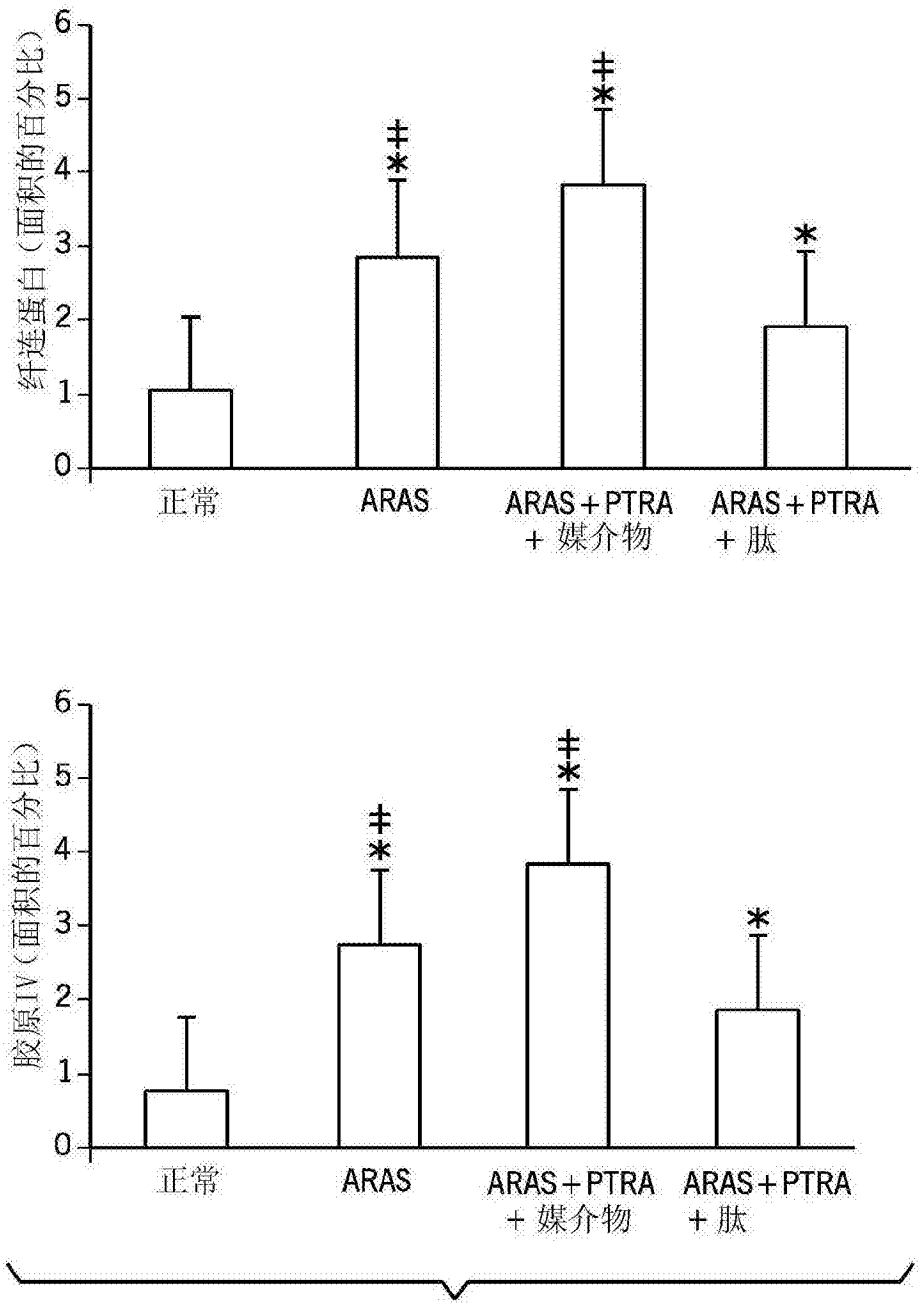

纤连蛋白（面积的百分比）
6
5
4
3
2
1
0
正常
ARAS
ARAS＋PTRA
＋媒介物
ARAS＋PTRA
＋肽
胶原IV（面积的百分比）
6
5
4
3
2
1
0
正常
ARAS
ARAS＋PTRA
＋媒介物
ARAS＋PTRA
＋肽

图8C

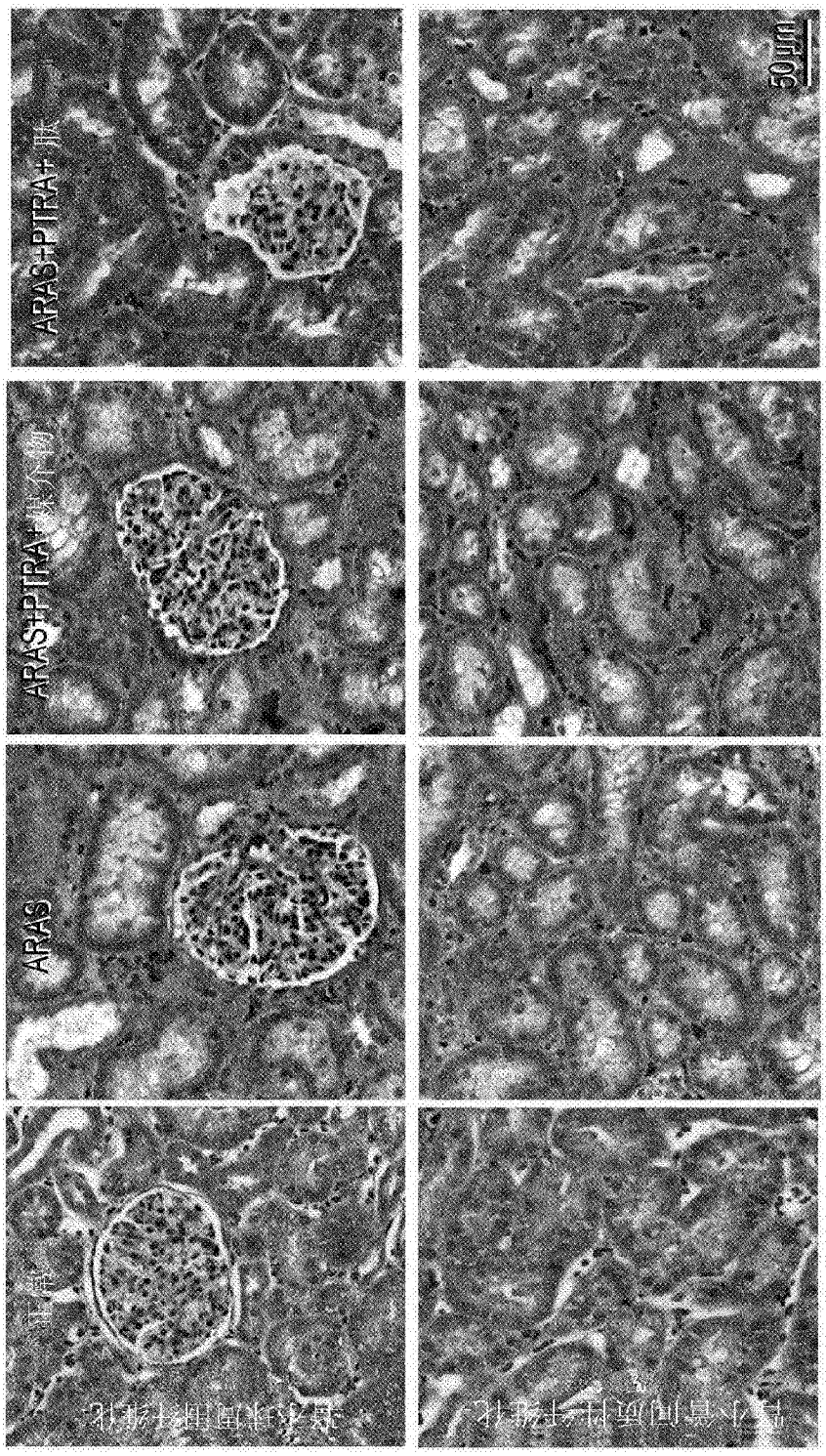

50μm
ARAS+PTRA+脉
ARAS+PTRA+媒介物
ARAS
正常
ARAS+PTRA+脉
ARAS+PTRA+媒介物
ARAS
正常

图9A

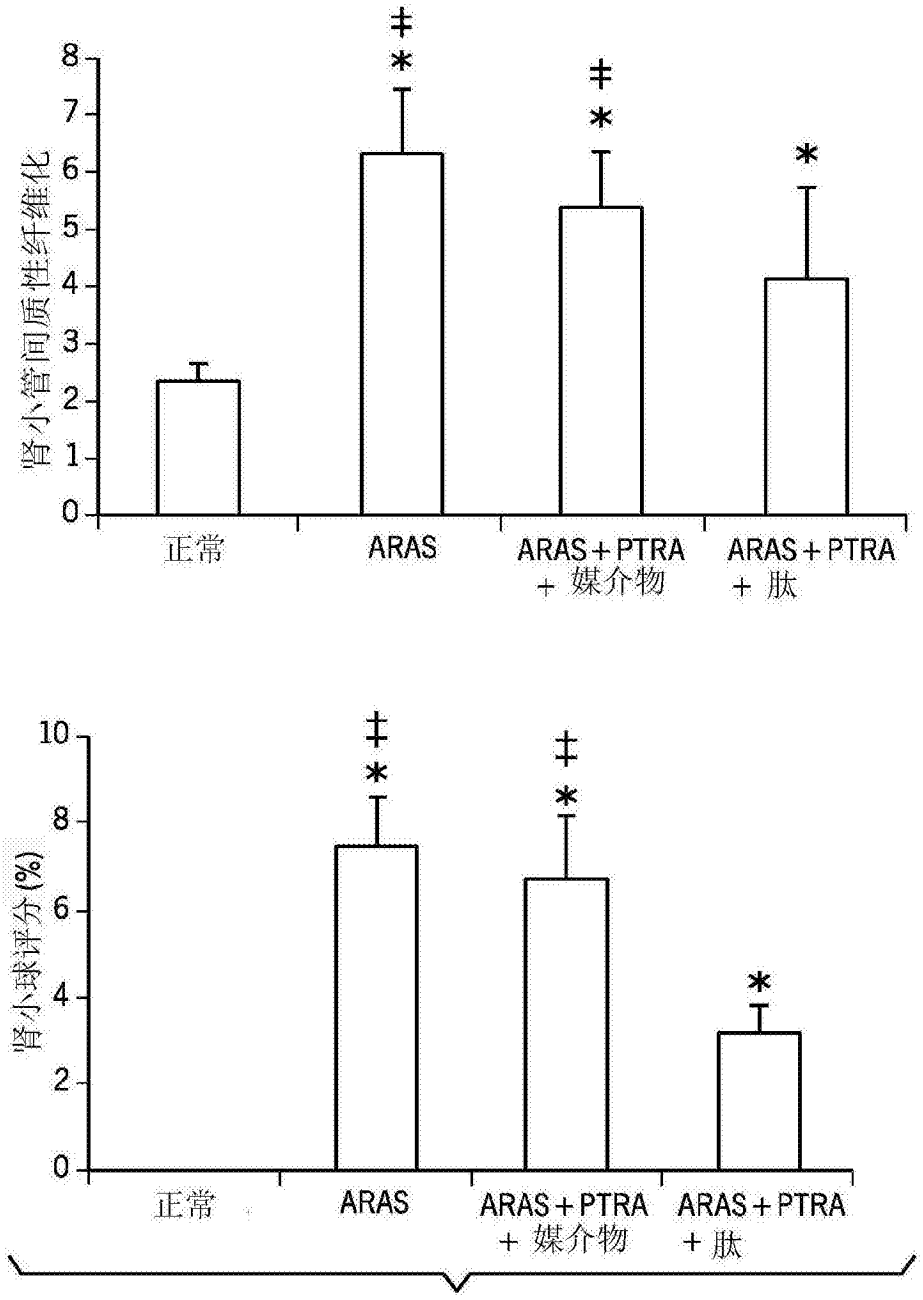

肾小管间质性纤维化
8
7
6
5
4
3
2
1
0
‡
*
‡
*
*
正常
ARAS
ARAS + PTRA + 媒介物
ARAS + PTRA + 肽
肾小球评分 (%)
10
8
6
4
2
0
‡
*
‡
*
*
正常
ARAS
ARAS + PTRA + 媒介物
ARAS + PTRA + 肽

图9B

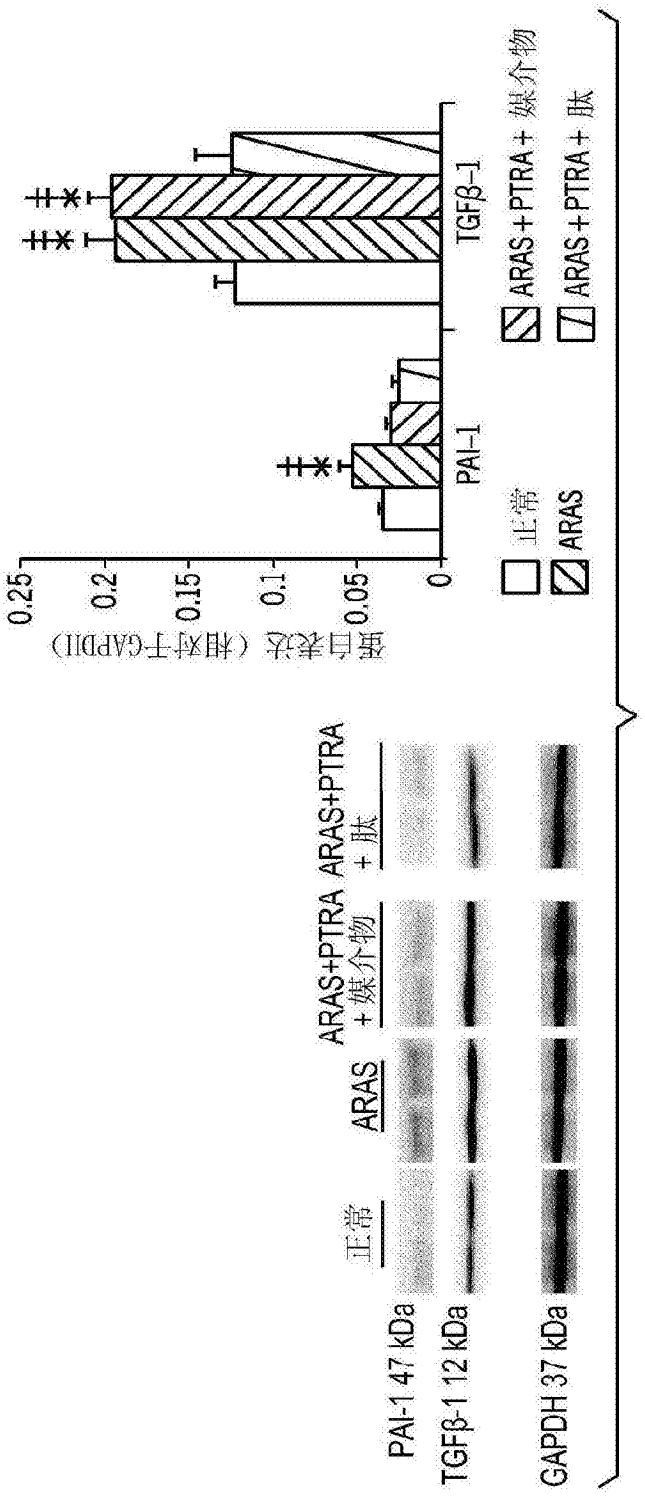

蛋白表达（相对于GAPDH）
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
PAI-1
TGFβ-1
正常
ARAS
ARAS+PTRA+媒介物
ARAS+PTRA+肽
正常
ARAS
ARAS+PTRA +媒介物
ARAS+PTRA +肽
PAI-1 47 kDa
TGFβ-1 12 kDa
GAPDH 37 kDa

图9C

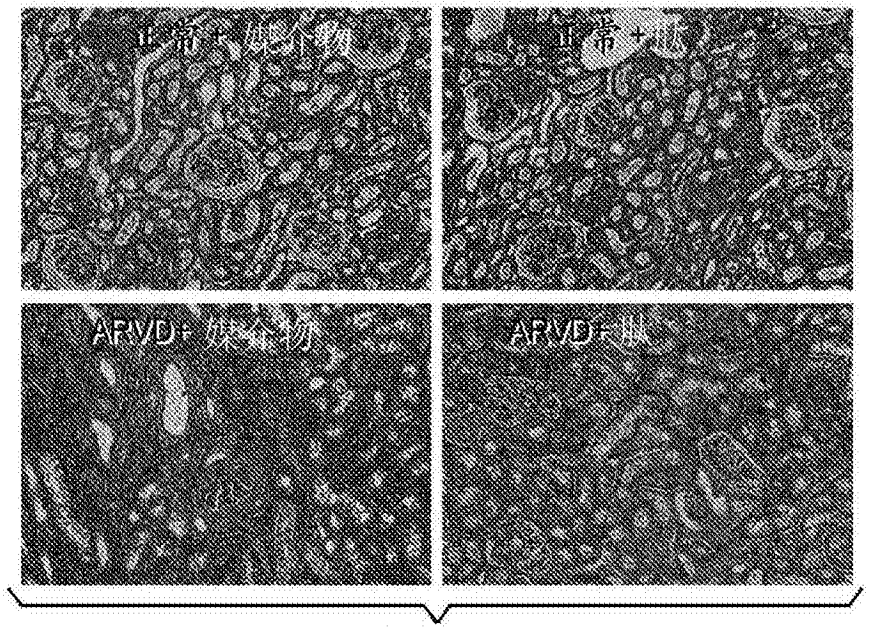

正常+媒介物
正常+肽
ARVD+媒介物
ARVD+肽

图10

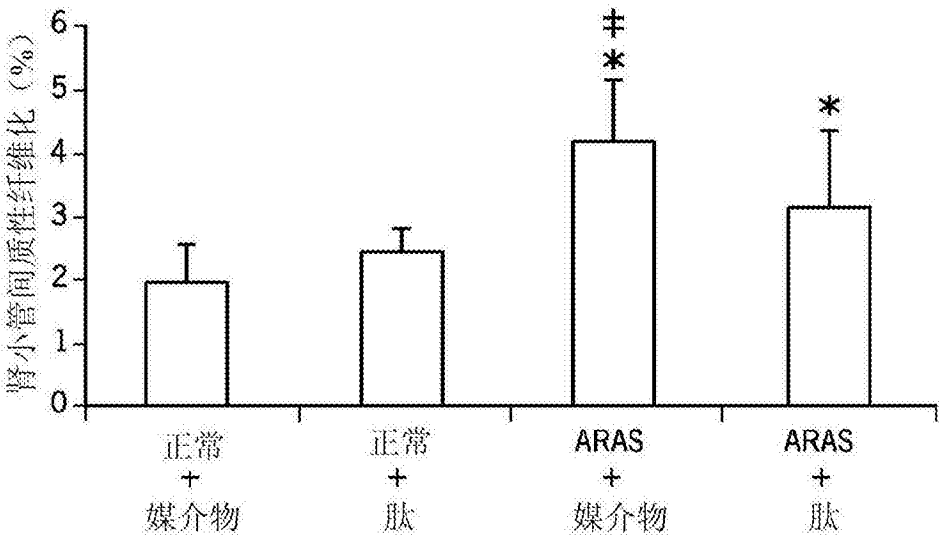

肾小管间质性纤维化（%）
0
1
2
3
4
5
6
‡
*
*
正常 + 媒介物
正常 + 肽
ARAS + 媒介物
ARAS + 肽

图11

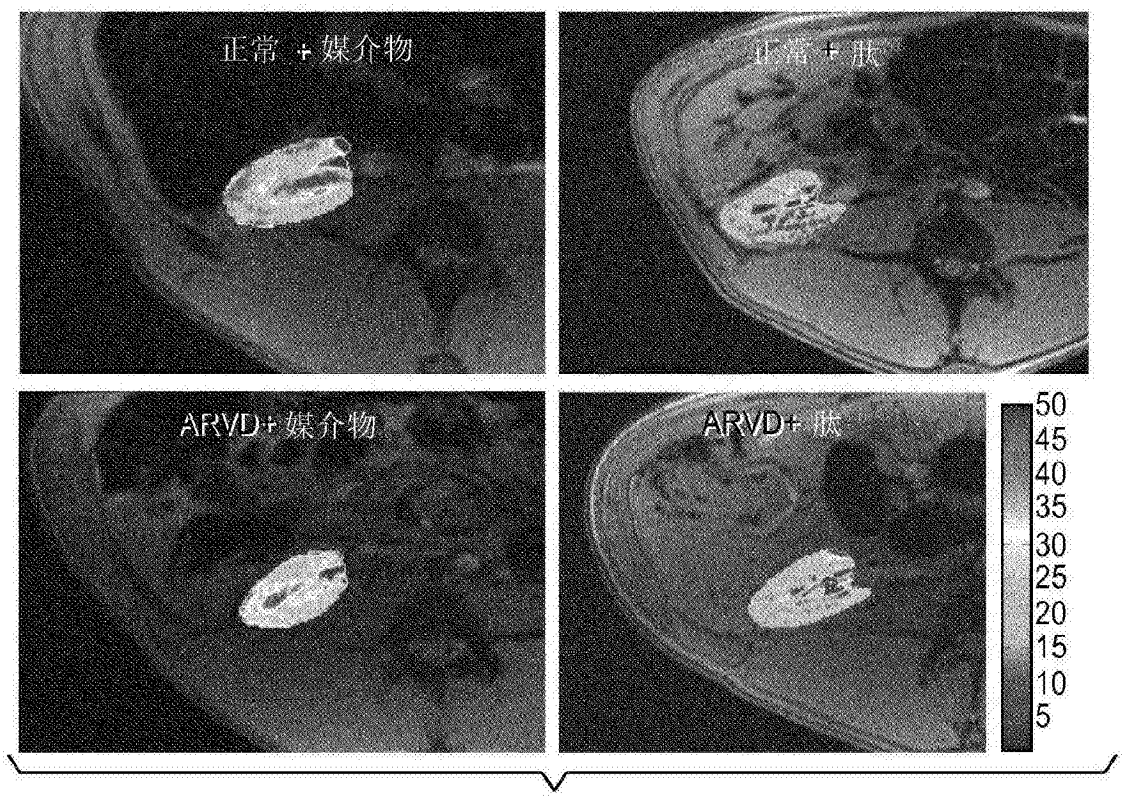

正常 + 媒介物
正常 + 肽
ARVD+媒介物
ARVD+肽
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5

图12

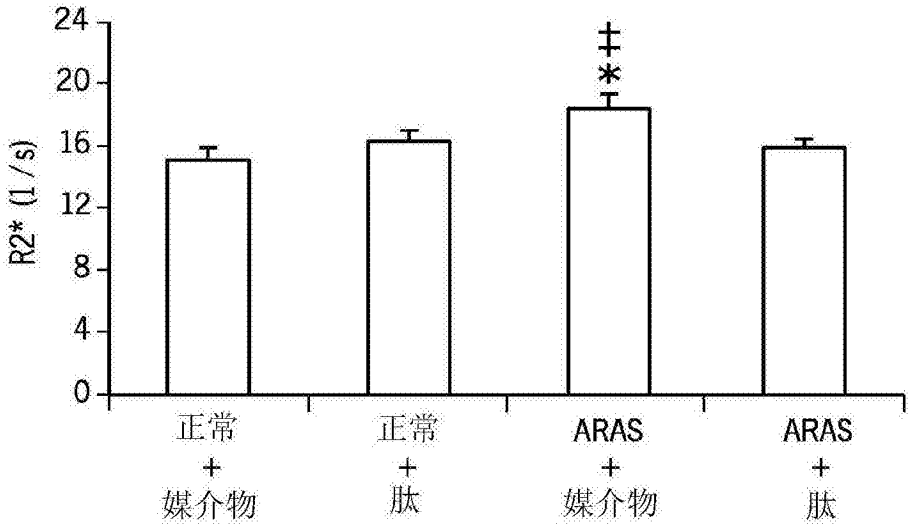

R2* (1/s)
24
20
16
12
8
4
0
‡
**
正常 + 媒介物
正常 + 肽
ARAS + 媒介物
ARAS + 肽

图13

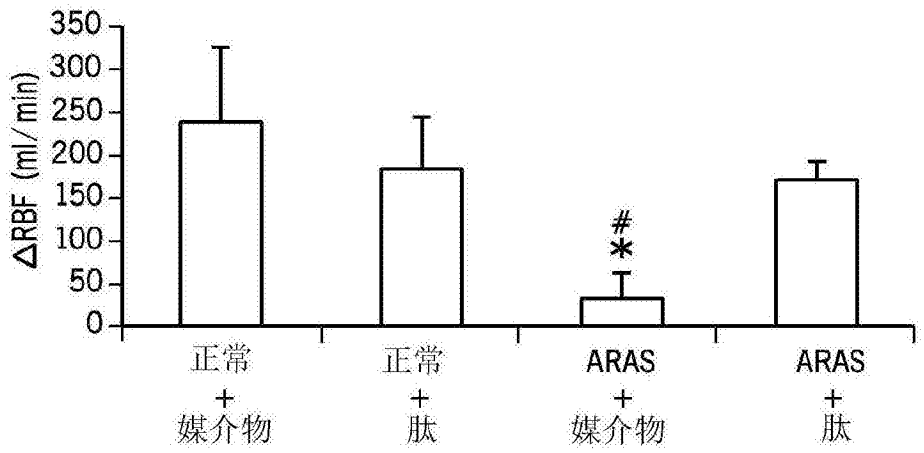

350
300
250
200
150
100
50
0
ΔRBF (ml/min)
#
*
正常
+
媒介物
正常
+
肽
ARAS
+
媒介物
ARAS
+
肽

图14

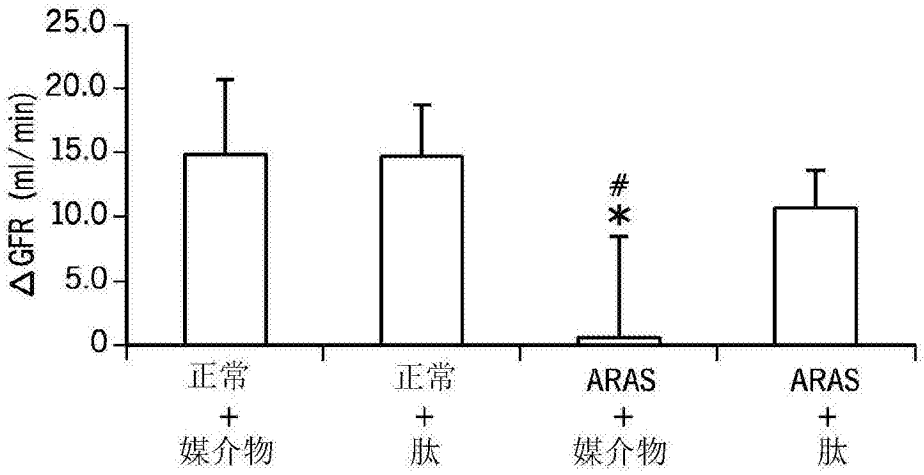

25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0
ΔGFR (ml/min)
#
*
正常
+
媒介物
正常
+
肽
ARAS
+
媒介物
ARAS
+
肽

图15