



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1961958 B

(45) 授权公告日 2011.05.18

(21) 申请号 200610131802.1

(56) 对比文件

(22) 申请日 2002.09.06

US 6043407 A, 2000.03.28, 全文.

(30) 优先权数据

EP 0723782 A, 1996.07.31, 全文.

60/317,643 2001.09.06 US

审查员 罗德明

(62) 分案原申请数据

02822230.X 2002.09.06

(73) 专利权人 奥姆尼奥治疗有限责任公司

地址 瑞典于默奥

(72) 发明人 托尔·尼 李季男

斯滕·赫尔斯特龙

珀-奥洛夫·埃里克森

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 巫肖南 封新琴

(51) Int. Cl.

A61K 38/48 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

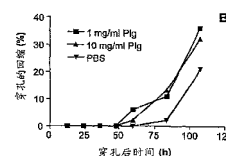
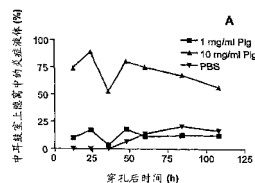
权利要求书 1 页 说明书 22 页 附图 1 页

(54) 发明名称

改善伤口愈合的方法

(57) 摘要

本发明涉及纤溶酶原和纤溶酶作为药物增强鼓膜穿孔或其它伤口的愈合,以及减少伤口愈合期的疤痕或坏死组织形成的应用。本发明还涉及一种筛选增强伤口愈合的化合物的方法,其通过评价动物模型中的鼓膜穿孔愈合来实现。



1. 一种包含有效量的纤溶酶原的组合物在制备在受治疗者中加速伤口愈合的药物中的用途。
2. 权利要求 1 所述的用途,所述的伤口为慢性伤口。
3. 权利要求 1 所述的用途,所述的受治疗者为人,且所述的纤溶酶原为人纤溶酶原。
4. 权利要求 1 所述的用途,所述的药物为用于局部给药的药物,且所述的组合物包括每平方厘米伤口面积 0.5mg 至 5mg 的纤溶酶原。
5. 一种包含有效量的纤溶酶的组合物在制备在受治疗者中加速伤口愈合的药物中的用途。
6. 权利要求 5 所述的用途,所述的伤口为慢性伤口。
7. 权利要求 5 所述的用途,所述的受治疗者为人,且所述的纤溶酶为人纤溶酶。
8. 权利要求 5 所述的用途,所述的药物为用于局部给药的药物,且所述的组合物包括每平方厘米伤口面积 5 μ g 至 0.5mg 的纤溶酶。

改善伤口愈合的方法

[0001] 本发明申请是申请号为 02822230. X, 申请日为 2002 年 9 月 6 日, 发明名称为“改善伤口愈合的方法”的申请的分案申请。

[0002] 本申请依据美国专利法 35 U. S. C. 119(e) 条款要求优先权。2001 年 9 月 6 日递交的临时专利申请 60/317643 因此作为整体并入参考。

[0003] 发明领域

[0004] 本发明涉及伤口愈合的过程。特别的, 本发明涉及改善穿孔鼓膜或伤口愈合或闭合的新方法, 以及使疤痕形成最小化和除去坏死组织的方法。本发明还涉及用于研究伤口愈合过程的动物模型, 以及鉴别和评价改善穿孔鼓膜或伤口愈合的药物和治疗方法的筛选方法。

[0005] 发明背景

[0006] 缓慢或不适当的伤口愈合危害着许多人群的生活质量。一种可存在问题的伤口愈合的特别类型为鼓膜(鼓室膜)穿孔的愈合。虽然大多数的穿孔可以自然愈合, 可通过先于内生结缔组织产生之前的角质化鳞状上皮增生达到闭合, 但是仍然有一些穿孔无法愈合, 通常导致听力丧失或其它并发症。为什么一些穿孔能愈合, 然而其它的却保持未闭合, 仍然是目前亟待解决的问题。此外, 在美国每年有超过 125 万的人遭受烧伤, 有 650 万人患有由于压力、静脉停滞、或糖尿病导致的慢性皮肤溃疡。

[0007] 伤口愈合为一种动态的组织改造(remodeling)过程, 它包括: 富含纤维蛋白和纤连蛋白的基质在伤口部位的形成, 中性白细胞和巨噬细胞的浸润, 表皮角质细胞在伤口边缘的增殖及其通过临时基质的迁移, 含有新发育的血管和迁移的炎症细胞和成纤维细胞的肉芽组织的形成, 和伤口收缩。皮肤伤口愈合的研究表明, 蛋白酶在许多步骤中扮演着重要的角色。现有的完备记录表明, 发生于伤口愈合和其它 ECM 改造过程中的细胞外基质(ECM)的降解依赖于炎症细胞分泌的各种蛋白水解酶的作用, 和基质组织细胞成分的作用。许多不同的蛋白酶被认为在伤口愈合过程中有利于基质的改造(Saksela and Rifkin, *Annu. Rev. Cell Biol.* 4, 93-126(1988))。然而, 该过程的精确机理, 以及它们是如何调控的, 都知之甚少。

[0008] 纤溶酶原-活化系统

[0009] 纤溶酶原-活化系统为一种多用的, 暂时调控的酶系统, 其中纤溶酶原被活化成为蛋白水解酶-纤溶酶, 下述两种生理纤溶酶原激活剂(PAs): 组织型纤溶酶原激活剂(tPA)和尿激酶型纤溶酶原激活剂(uPA)中的任何一种都能促进该过程的发生。该系统的活化首先是由外部信号导致的特定细胞释放 tPA 或 uPA 而引发的, 并导致局部表现出胞外蛋白酶活性(Vassalli et al. *J. Exp. Med.* 159, 1653-1668(1984); Saksela&Rifkin, 1988, supra)。PA-系统同时也由直接抑制 PAs 和纤溶酶的特殊抑制剂调控, 抑制剂包括 PA-抑制剂 1(PAI-1), PA-抑制剂 2(PAI-2), 蛋白酶连接蛋白 1(PN-1)和 $\alpha 2$ -抗纤溶酶(Saksela&Rifkin, 1988, supra; Ny et al., *Thromb Res.* 71(1):1-45(1993))。所有的这些属于丝氨酸蛋白酶抑制剂家族的抑制剂, 均为被同族蛋白酶酶切的自杀抑制剂(Wilczynska et al., *J Biol Chem.* 270(50):29652-5(1995); Wilczynska et al., *Nat*

Struct Biol. 4(5) :354-7(1997))。PA⁻ 系统最重要的特性在于由纤溶酶原转变为纤溶酶形式导致的放大作用。

[0010] 研究发现 PAs 与一些类型的基质金属蛋白酶 (MMPs) 一起存在于伤口的边缘, 其中的基质金属蛋白酶包括: 间质胶原酶 (MMP-1), 溶基质素 -1 (MMP-3), 以及明胶酶 A (MMP-2) 和明胶酶 B (MMP-9) 的潜在形式。PAs 和 MMPs 的表达都是由炎症介质和细胞因子诱导产生的, 这表明上述两个酶系统的作用可能是一致的。目前, 已知 MMPs 是作为能通过限制性蛋白水解作用活化的潜在前体酶合成的, 但是体内发生该活化作用的确切机制还不为人知。纤溶酶是涉及金属蛋白酶一些亚基活化作用的推测因子之一 (Lijnen, Thromb Haemost 86(1) :324-33(2001))。

[0011] 许多报道表明, MMPs, 金属蛋白酶抑制剂 (TIMPs), PAs 和 PA⁻ 抑制剂的表达或活化在伤口愈合过程中发生变化, 同时还表明, 纤溶酶在皮肤伤口愈合中起作用 (Romer et al., Nat. Med. 2 :287-292(1996))。此外, Verheijen 的美国专利 5925350 和 6033664 描述了采用 uPA 或 tPA 促进慢性或非愈合性伤口愈合的应用。在这些研究中, 强调了上述促进机制不与纤维蛋白溶酶活性或坏死组织清除相关。同时, 还提供了一种改善鼓膜愈合的特殊方法, 即在局部给药高浓度的透明质酸盐 (hyaluronan) (Laurent et al., Arch Otolaryngol Head Neck Surg 114 :1435-1441(1988)) 或碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF; Fina et al., Laryngoscope 103(7) :804-809(1993))。

[0012] 虽然对伤口愈合及其各种调控机制的理解加深了, 以及提出了有前景的治疗方法, 但是慢性或非愈合性鼓膜穿孔或其它伤口的愈合仍然是现存的医学问题和社会问题。因此, 本领域需要提出新的加速伤口愈合过程的改进方法, 例如鼓膜穿孔、烧伤和皮肤溃疡的愈合, 任何坏死组织的除去, 和疤痕形成的最小化等。同时, 还需要提出新的筛选方法, 通过该方法能鉴别和评估用于上述治疗方法的药物。本发明满足了该领域的这些需要以及其它需求。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明涉及一种通过给药纤溶酶原, 改善鼓膜穿孔愈合, 或在愈合过程中使疤痕形成最小化的新方法。

[0015] 因此, 本发明提供了一种改善需要治疗的受治疗者的鼓膜穿孔愈合的方法, 该方法包括向受治疗者给药一种包含有效量改善鼓膜穿孔愈合的纤溶酶原的组合物的步骤。优选的, 所述的受治疗者为人类, 所述的纤溶酶原为人纤溶酶原。该组合物还包括一种药学上可接受的载体, 同时也可以是水溶液形式, 胶体, 洗液, 软膏, 粉剂, 糊剂, 绷带, 伤口敷料, 或其它合适的输送载体形式。所述的纤溶酶原可以是局部的或全身的给药。在局部给药的情况下, 所给药的组合物可以包含约为 0.05mg 至约 10mg 的纤溶酶原, 优选约为 0.5 至约 5mg 的纤溶酶原。

[0016] 所述的组合物可以通过加速穿孔愈合, 减少坏死组织, 和减少伤口部位疤痕组织形成来改善愈合。在一具体实施方案中, 纤溶酶原的给药重复至少一次, 优选每天至少一次。

[0017] 本发明还提供了一种在需要治疗的受治疗者的愈合伤口上减少疤痕形成的方法, 该方法包括向受治疗者给药一种包含有效量的减少疤痕形成的纤溶酶原的组合物的步骤。例如, 所述的纤溶酶原可以减少纤维蛋白的沉积。所述的受治疗者优选为人类受治疗者, 所

述的纤溶酶原优选为人纤溶酶原。在一具体实施方案中,所述的纤溶酶原局部给药,所述的组合物包含约为 0.5mg 至约 5mg 纤溶酶原 / 平方厘米伤口面积。

[0018] 本发明还提供了一种加速需要治疗的患病个体的伤口愈合的方法,该方法包括向患病个体给药一种包含有效量的改善伤口愈合的纤溶酶原的组合物的步骤。可选的,所述的伤口为慢性伤口。所述的受治疗者可以是人类受治疗者,在该情况下,所述的纤溶酶原优选为,虽然不是必须的,人纤溶酶原。在所述的纤溶酶原局部给药的情况下,可以按每平方厘米伤口面积,大约 0.5mg 至约 5mg 纤溶酶原的量给药。

[0019] 本发明还提供了一种加速需要治疗的患病个体的伤口愈合的方法,该方法包括向患病个体给药一种包含有效量的改善伤口愈合的纤溶酶的组合物的步骤。可选的,所述的伤口为慢性伤口。在一具体实施方案中,所述的受治疗者为人类受治疗者,所述的纤溶酶为人纤溶酶。如果所述的组合物是采用局部给药的方式给药,所述的组合物可以包括,例如,大约 0.005mg 至约 0.5mg 的纤溶酶原 / 平方厘米伤口面积。

[0020] 本发明还包括一种在需要治疗的受治疗者的正在愈合的伤口上减少坏死组织形成的方法,该方法包括向受治疗者给药一种包含有效量的减少坏死组织形成的纤溶酶原组合物的步骤。可选的,所述的纤溶酶原减少纤维蛋白的沉积。在一具体实施方案中,所述的受治疗者为人类受治疗者,所述的纤溶酶原为人纤溶酶原。如果局部给药,则所给药的组合物的量相应的为,例如,大约 0.5mg 至约 5mg 的纤溶酶原 / 平方厘米伤口面积。

[0021] 本发明还提供一种鉴别用于促进伤口愈合的药物的方法,该方法包括:(i) 将测试药物给药于患有鼓膜穿孔的动物;(ii) 评价鼓膜穿孔愈合的程度,坏死组织形成,和疤痕形成中的至少一种;(v) 将愈合的程度,坏死组织形成,或疤痕形成与对照值相比较;和(vi) 选择愈合程度高于或坏死组织或疤痕形成低于对照值的任何一种测试药物作为用于促进伤口愈合的药物。所述的动物可以是,例如,一种野生型动物或缺乏内源纤溶酶原表达的转基因动物,优选的为一种小鼠或一种大鼠。在一具体实施方案中,所述的测试药剂通过局部给药的方式给药。所述的对照值可以是,例如,在没有给药测试药剂的第二个动物中的愈合程度或疤痕或坏死组织的形成。

[0022] 本发明还涉及一种从伤口愈合中减少疤痕形成的方法,其包括向需要这种治疗的受治疗者给药一种包含有效量的纤溶酶原的组合物,用于减少疤痕形成。

[0023] 此外,本方法还涉及通过纤溶酶原减少纤维蛋白沉积的方法。当受治疗者为人类时,则纤溶酶原为人纤溶酶原。更进一步,本方法涉及局部给药和一种组合物,且所述的组合物包括每平方厘米伤口面积约 0.5mg 至约 5mg 的纤溶酶原。

[0024] 本发明还涉及一种加速伤口愈合的方法,其包括向需要这种治疗的受治疗者给药一种包含有效量的纤溶酶原或纤溶酶的组合物,用于促进伤口的愈合。此外,当伤口为慢性伤口时,还可以应用所述的方法。当受治疗者为人时,则所述的纤溶酶原或纤溶酶为人纤溶酶原或人纤溶酶。更进一步,本方法涉及局部给药和一种组合物,且所述的组合物包括每平方厘米伤口面积约 0.5mg 至约 5mg 的纤溶酶原或纤溶酶。本方法还适用于所述伤口为慢性伤口的情况。

[0025] 本发明还涉及一种从伤口愈合中减少坏死组织形成的方法,其包括向需要这种治疗的受治疗者给药一种包含有效量的纤溶酶原的组合物,用于减少坏死组织形成。此外,本方法还涉及通过纤溶酶原减少纤维蛋白沉积。当受治疗者为人类时,则纤溶酶原为人纤溶

酶原。更进一步,本方法涉及局部给药,且所述的组合物包括每平方厘米伤口面积约 0.5mg 至约 5mg 的纤溶酶原。

[0026] 本发明还涉及一种鉴别用于促进伤口愈合的药物的方法,所述的方法包括:

[0027] (i) 将测试药物给药于患有鼓膜穿孔的动物;

[0028] (ii) 评价鼓膜穿孔愈合的程度,坏死组织形成,和疤痕形成中的至少一种;

[0029] (v) 将愈合的程度,坏死组织形成,或疤痕形成与对照值相比较;和

[0030] (vi) 选择愈合程度高于或坏死组织或疤痕形成低于对照值的任何一种测试药物作为用于提高伤口愈合的药物。

[0031] 此外,所述方法应用于当所述动物选自野生型动物或缺乏内源纤溶酶原表达的转基因动物的情况。更进一步,所述方法应用于当所述给药为局部给药的情况。本方法应用于当所述动物为小鼠或大鼠的情况。

[0032] 本方法应用于当所述的对照值为没有给药测试药物的第二个动物中的愈合程度或疤痕或坏死组织的形成的情况。

[0033] 参考下述的详细描述以及结合相应的附图,有助于更好的理解本发明的上述特性和其它的优点。

[0034] 附图简述

[0035] 图 1A 和 1B:在对野生型大鼠进行鼓膜穿孔后,中耳室的炎症反应的时间进程 (A) 和穿孔的回缩 (B)。在穿孔后给药 $50 \mu\text{l}$ ($50 \mu\text{g}$ ($1\text{mg}/\text{ml}$)-■-;或 0.5mg ($10\text{mg}/\text{ml}$)-▲-) 的纤溶酶原或对照 (PBS-▼-) 溶液,且其后每 24 小时给药一次。

[0036] 发明详述

[0037] 本发明涉及鼓膜穿孔的愈合和伤口的愈合。本发明还适用于以胞外基质结构,尤其是角质化组织,例如鼓膜,的变性 (degeneration) 或不良愈合为特征的疾病和状况。其它异常伤口愈合过程包括,糖尿病溃疡,瘢痕瘤,疤痕过度增生,和皮肤替代物的应用。

[0038] 本发明部分基于下述发现:当在缺乏纤溶酶原的情况下,伤口愈合过程将无法适当的进展,这表明纤溶酶原在伤口愈合过程中,尤其是鼓膜穿孔的情况下扮演了关键的角色(见实施例和表 1)。如实施例所示,在与野生型对照和其它转基因模型相比较时,在缺乏纤溶酶原的大鼠中,鼓膜穿孔的愈合显示出显著的改变和异常(见表 1)。在监测愈合的为期 144 天的实验期间,在纤溶酶原缺陷型大鼠中,鼓膜穿孔无法适当的愈合,并导致了异常鼓膜的形成。同时还发现,经注射过人纤溶酶原后,纤溶酶原缺陷型小鼠回复了正常的愈合过程(见实施例 2 和 5);经纤溶酶原给药后,野生型小鼠显示出鼓膜愈合增强(实施例 6)。此外,实验表明是 uPA 而非 tPA,也在正常的伤口愈合过程中起到了一些作用,因为在除去纤维蛋白沉积过程中需要 uPA 的参与(实施例 3 和 4)。然而,没有哪一个动物模型比纤溶酶原缺陷型小鼠更明显地表现出缺乏正常的愈合,这表明,在伤口愈合过程中,纤溶酶原比 uPA 扮演了更重要的角色,甚至有可能是不同的角色。不受任何特定理论的束缚,本发现支持下述观点:无法适当的愈合可能是由发生在愈合过程中的炎症反应,角质细胞迁移,或基质改造事件的缺陷引起的。

[0039] 正如表 1 的结果所示, uPA, tPA, 和纤溶酶原在伤口愈合过程中扮演着不同的角色,其中纤溶酶原起了关键作用。此外,如实施例所示,与 tPA 或 uPA 相比,坏死组织和纤维蛋白的除去强烈的依赖于纤溶酶原 / 纤溶酶的存在或给药。

[0040] 表 1

[0041] 野生型, uPA- 缺陷型, tPA- 缺陷型, 和纤溶酶原 - 缺陷型小鼠中的鼓膜组织愈合时间和愈合组织外观的比较

[0042]

基因型	愈合天数	愈合模式	坏死组织	纤维蛋白沉积
野生型	8, 7 ± 2, 4	正常愈合	无	无
tPA ^{-/-}	9, 0 ± 2, 4	明显正常愈合	无	无
uPA ^{-/-}	11, 0 ± 1, 7 (7/8 的小鼠在第 11 天愈合)	愈合部位含有褶 皱表面, 并有鹅卵 石状组织沉积	无	在愈合部位存在 斑点状的纤维蛋 白沉积
Plg ^{-/-}	- (0/8 的小鼠在第 144 天愈合)	鼓膜被白色组织 所覆盖, 该组织厚 且不透明	从第 16 天起, 坏 死组织开始清晰 可见	大面积的纤维蛋 白沉积, 从而完全 覆盖鼓膜表面

[0043] 因此,纤溶酶原可以用于治疗伤口愈合方面的疾病,以及作为加速的手段用于鼓膜和伤口愈合,用于对影响破裂上皮组织愈合的状况或疾病的治疗,用于减少疤痕形成或坏死组织聚积或形成的方法,以及用于上述治疗的药物的筛选方法。在伤口愈合过程中,进行纤溶酶原给药,同时也能使鼓膜或其它上皮组织的疤痕形成或坏死组织蓄积最小化。例如,可将纤溶酶原与整形手术联合给药,从而减少,或防止,剩余的疤痕,纤维蛋白沉积,或坏死组织形成的外观。同时,纤溶酶原可以给药于溃疡或烧伤表面从而促进其愈合。

[0044] 此外,本发明的方法还可用于改善局部或全部缺乏纤溶酶原情况下的伤口愈合,或改善非愈合或慢性愈合伤口的愈合。特别是,如实施例 5 所示,在损伤后的数周内重复纤溶酶原给药,能减少胞外基质的堆积和重新开始正常的愈合,因此,该结果表明纤溶酶原能用于治疗慢性伤口,例如溃疡和褥疮。

[0045] 或者,纤溶酶本身能用于治疗伤口愈合方面的疾病,以及作为加速的手段用于鼓膜和伤口愈合,对影响破裂上皮组织愈合的状况或疾病的治疗,或减少疤痕形成或坏死组织堆积或形成的方法。在伤口愈合过程中,进行纤溶酶给药,同时也能使鼓膜或其它上皮组织的疤痕形成或坏死组织堆积最小化。例如,可将纤溶酶与整形手术联合给药,从而减少,或防止,剩余的疤痕,纤维蛋白沉积,或坏死组织形成的外观。同时,纤溶酶可以给药于溃疡,褥疮,或烧伤表面从而促进其愈合。

[0046] 本发明的组合物可以通过注射局部给药,或以静脉注射的方式给药。优选的,虽然不是必须的,给药方式是局部的,也就是,在邻近伤口的部位给药。当所述的纤溶酶原或纤溶酶通过注射方式给药(例如,静脉的,皮下的,肌内的),将该物质制备成溶于药学上可接受的液体的溶液形式,例如,等渗盐溶液,是十分有利的。在一优选实施方案中,纤溶酶原或纤溶酶局部给药,形成高浓度,例如在穿孔或伤口部位,存在至少 200 μ g/mg 的纤溶酶原或至少 20 μ g/mg 的纤溶酶。对于局部给药,所述的纤溶酶原或纤溶酶组合物可以,例如,部分的为一种胶体,洗液,软膏,糊剂,喷雾剂,粉剂,绷带,或伤口敷料形式。为了加快鼓膜穿孔的愈合,所述的组合物优选经外耳道给药,例如,通过喷雾方式传递至穿孔部位,或通过滴加纤溶酶原或纤溶酶溶液滴剂的方式。通过喷雾方式输送组合物的装置为本领域的已知技术,其详细描述于,例如,美国专利 6027712 中。

[0047] 纤溶酶原 / 纤溶酶的给药方式,例如通过喷雾,以及通过胶体或糊剂,或局部给药的溶液形式,也可用于治疗口腔部位的伤口。为了加速伤口的愈合,纤溶酶原或纤溶酶可以以伤口敷料的形式给药于伤口处,从而将其传递至伤口部位。在其它实施例中,所述的组合包含一种模拟纤溶酶原活性或纤溶酶活性的复合物,例如,纤溶酶原 / 纤溶酶片段或突变体,或其它具有类似活性的分子。

[0048] 本发明还提供了一种鉴别用于改善动物模型的伤口愈合的组合物的筛选方法。所述的筛选方法,优选的基于患有鼓膜穿孔的动物模型,该模型为伤口愈合提供了详细的机能方面的描述,从而能有效的筛选,鉴别,和定性涉及鼓膜穿孔愈合和其它伤口愈合过程的新的化学物质,药学效果,和新药的靶位点。因此,可以使野生型或纤溶酶原缺陷型动物产生伤口,然后将测试药物通过预设的途径对动物进行给药。然后可以将动物中的伤口愈合程度和 / 或伤口部位的纤溶酶原水平与对照值相比较,例如野生型动物或没有给药测试药物的动物中的伤口愈合,从而来评价测试的组合物是否具有提高愈合率或降低坏死组织或疤痕的形成的能力。在一实施例中,所述的动物为缺失了一个或一对纤溶酶原等位基因的

缺陷型小鼠。作为对照模型,或为了进一步测试鉴别的药物,可以采用纤溶酶原活化系统的野生型成分正常表达的模型,或者,可选择的,采用一种或多种野生型蛋白被相应的人源或非人源同系物 (homologs) 替代的转基因动物模型。

[0049] 定义

[0050] 本说明书中使用的术语在本发明的上下文和每个术语所处的特定上下文中的含义一般为其在本领域的通常含义。对下文,或在本说明书中其它部分出现的特定术语的论述,为本领域的技术人员在描述本发明的组合物和方法,及如何制备和使用方面提供了额外的指导。

[0051] 在本文中“鼓膜”和“鼓室膜 (eardrum)”可以交换使用。

[0052] “鼓膜穿孔”是指通常由外伤造成的鼓膜上的开口。这至少存在 4 种一般的分类:挤压损伤 (compression injuries) (最常见的一种,通常是由打耳光引起的);器械性损伤 (第二种常见类型,通常是非故意的,通常由棉签或小大头针 (bobby pins) 造成的);烧熔性 (burn-slag) 损伤 (通常见于工业上,由机械或焊接产生的热金属造成);和冲击波损伤 (通常见于战争或爆炸中)。感染可以导致鼓膜愈合推迟,持续的穿孔通常是咽鼓管鼓膜炎的表现,即咽鼓管和鼓膜腔 (中耳) 的炎症。

[0053] “伤口 (wound)”是指包括上皮,结缔组织,和肌肉组织的器官或组织由外因造成的破损 (break) 或断裂。伤口的例子包括,但不限于,皮肤伤口,挫伤,溃疡,褥疮,擦伤,撕裂,切割伤,刺伤,牛皮癣伤,鼓膜穿孔,和烧伤。伤口的一种特别的情况为整形手术过程中产生的结果。

[0054] “局部的”和“局部给药”是指非全身性的,部分的,给予活性成分。因此,局部给药可以是指将活性成分涂于伤口的外表面。

[0055] “纤溶酶原”在这里包括内源的哺乳动物纤溶酶原,等位纤溶酶原,纤溶酶原的功能保守性衍生物,具有功能活性的纤溶酶原片段,以及哺乳动物纤溶酶原同系物。可选的,一种纤溶酶原组合物可以包含多于一种类型的,纤溶酶原衍生物或同系物。优选的,受治疗者所给予的组合物中所含纤溶酶原的类型为受治疗者内源的类型。一优选的组合物为生物来源的纯化纤溶酶原,例如,人纤溶酶原重组产物,或纯化的人纤溶酶原,其可从例如, BiopoolAB (Umea, 瑞典) 获得。一种优选的人纤溶酶原具有 GenBank, 登记号为 PLHU (GI : 625234) (SEQ ID NO :1) 所示的氨基酸序列。

[0056] “纤溶酶”在这里包括内源的哺乳动物纤溶酶,等位纤溶酶,纤溶酶的功能保守的衍生物,具有功能活性的纤溶酶片段,以及哺乳动物纤溶酶同系物。可选的,一种纤溶酶组合物可以包含多于一种类型的,纤溶酶衍生物或同系物。优选的,受治疗者所给予的组合物中所含纤溶酶的类型为受治疗者内源的类型。一优选的组合物为生物来源的纯化纤溶酶,例如,人纤溶酶重组产物,或纯化的人纤溶酶。

[0057] “功能保守性变体”是指这样的蛋白,其氨基酸残基发生变化,但并不改变该蛋白的整体构象和功能,它包括,但不限于,采用相似性质的氨基酸进行替换 (例如,举例来说,酸性,碱性,疏水性,及其类似的)。具有相似性质的氨基酸为本领域公知的技术。例如,精氨酸,组氨酸和赖氨酸为可以互换的亲水性碱性氨基酸。类似的,疏水性氨基酸,异亮氨酸可以被亮氨酸,甲硫氨酸或缬氨酸所替换。除了上述保守氨基酸外的氨基酸在蛋白或酶中也可以不同,从而基于 MEGALIGN 算法得到的功能类似的蛋白,在采用对比方案,例如

Cluster Method 比较时,任意两个类似功能的蛋白之间的蛋白或氨基酸相似性百分比可能变化,例如,可以为 70%至 99%。“功能保守性变体”还包括根据 BLAST 或 FASTA 算法确定的具有至少 60%氨基酸同一性的多肽或酶,优选至少 75%,更优选至少 85%,进一步优选至少 90%,还优选为 95%,这些多肽或酶与天然或亲代蛋白或酶比较,具有相同或实质上相同的特性或功能。

[0058] “受治疗者”在这里包括人类或非人类的动物。非人类的动物包括,但不限于,哺乳动物,实验动物,例如小鼠,大鼠,兔子,仓鼠,豚鼠等;驯养动物,例如猫和狗;以及农场动物,例如绵羊,山羊,猪,马,和牛。本发明的非人类动物可以是哺乳动物或非哺乳动物;脊椎动物或无脊椎动物。

[0059] “治疗”受治疗者,或“进行治疗”受治疗者的疾病或状况在这里是指减轻或缓和所述疾病或状况,例如损伤的或慢性的伤口愈合的临床症状。

[0060] “促进”,“增强”,或“改善”鼓膜或伤口愈合一般是指提高伤口或穿孔愈合的速度,或者在伤口或穿孔愈合过程中或之后,减少剩余疤痕或坏死组织的程度。

[0061] 实验中的“对照”,“对照值”或“参考值”为用于检测变化的数值,例如,鼓膜穿孔或皮肤伤口,以及本发明所述的其它实验的愈合程度。例如,当研究鼓膜穿孔时,药物的抑制/刺激效果可以通过比较给药后和对照值的伤口或穿孔的愈合程度来进行评价。所述的对照值或参考值可以是,例如,预先设定的参考值,或实验确定的参考值。例如,在这种实验中,对照值或参考值可以是在没有给药实验药物或活性剂的动物中,或者是给药了相同的药物或活性剂,但并不改变伤口愈合能力的动物中,类似伤口或穿孔的愈合程度。

[0062] “有效量”或“治疗有效量”是指能够达到增加局部和 / 或全身纤溶酶原浓度的,和 / 或促进伤口愈合的量。例如,活性剂有效量可以是其结果为局部(穿孔,伤口,或疤痕部位)或全身纤溶酶原水平超过 200 微克 /ml 的量。可选的,活性成分有效量可以是,与不给药该药物相比,导致穿孔或伤口愈合加快,或与不给药该药物相比,导致疤痕或坏死组织形成减少的量。有效量还可以是指足够使局部和 / 或全身纤溶酶原水平与活性剂或药物给药前的水平相比增加的量或剂量,例如增加约 10%,优选增加 50%,更优选增加 100%的量或剂量。可选的,纤溶酶原的有效量为相应于每平方厘米伤口面积约 5 μ g 至约 50mg 的纤溶酶原量,优选为约 0.05mg 至约 10mg,更优选为约 0.5mg 至约 5mg。治疗有效量能使受治疗者改善或呈现明显的临床反应,例如,促进鼓膜穿孔或伤口愈合,或疤痕形成减少。可选的,治疗有效量是指在临床上足以明显改善宿主中伤口愈合或疤痕形成状况的量。

[0063] 如此处所述,“大约”或“接近”可以被认为是在给定值或范围的 50%以内,优选 20%以内,更优选 5%以内波动。

[0064] 与另一值“实质上不同”的值的含义是指两个值之间存在统计学上的显著差异。本领域公知的任何合适的统计方法可以用于评价差异是否显著。“统计学上的显著”差异是指显著性是在至少 90%的置信区间内确定的,优选 95%的置信区间。

[0065] 依照本发明,可以应用本领域熟知的分子生物学,微生物学,和 DNA 重组技术。这些技术在教科书中有完整的解释。参见,例如 Sambrook 等(分子克隆 - 实验手册,冷泉港实验室出版,1989);Glover(DNA 克隆:实验入门, I 和 II 卷,1985);Hames 和 Higgins(核酸杂交技术,1985);Hames 和 Higgins(转录和翻译,1984);Freshney(动物细胞培养,1986);Perbal(分子克隆实用指南,1984);和 Ausubel 等(现代分子生物学手册, John

Wiley&Sons, Inc., 1994)

[0066] 本说明书采用的缩略语如下：

[0067] uPA = 尿激酶型纤溶酶原激活物；

[0068] PA = 纤溶酶原激活物；

[0069] MMP = 基质金属蛋白酶；

[0070] TIMP = 金属蛋白酶组织抑制物；

[0071] tPA = 组织型纤溶酶原激活物；

[0072] Plg = 纤溶酶原

[0073] ECM = 细胞外基质

[0074] 改善伤口愈合

[0075] 根据本发明,通过提供或增强纤溶酶原的水平能改善伤口的愈合。这可以通过许多不同的方法实现。例如,可以采用有效量的活性剂来治疗患病个体,例如,采用药物,激素,细胞因子,抗体,或其它组合物来上调纤溶酶原的表达;减少纤溶酶原的降解;或增加局部或全身纤溶酶原或纤溶酶原同系物或衍生物的水平。编码纤溶酶原的核酸也可以以治疗为目的进行给药。

[0076] 在一优选实施方案中,采用了基本上纯的人纤溶酶原制品。纤溶酶原可以购买其纯化形式,或通过从人或其它动物中纯化该组分而制得,或通过宿主细胞生产重组产物而得到,所述的宿主细胞包括原核宿主细胞,例如,酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 或大肠杆菌,和更优选的,哺乳动物宿主细胞,例如 CHO 细胞。纤溶酶原可以为人类野生型,哺乳动物同系物,或其修饰或突变产物。特别的,可以使用该组分的片段,该片段保存了全长组分的至少一部分目的活性。

[0077] 具体应用

[0078] 本发明的方法可以用于加速动物的鼓膜或其它伤口的愈合,所述的动物包括,但不限于,脊椎动物,例如人类,和驯养动物,包括,狗,猫和马。此外,纤溶酶原在临床上使用可以用于减少疤痕组织和坏死组织在伤口部位的形成,以及加强组织碎屑的去除。

[0079] 在一实施例中,本发明的方法用于增强人类受治疗者的鼓膜穿孔的愈合。所述的人类或非人类受治疗者患有或不患有损害的或减缓的鼓膜穿孔愈合病症。

[0080] 在另一实施例中,本发明的方法提供了一种加速受治疗者伤口愈合的方法。受治疗者患有或不患有与伤口外观相关的病症,或影响伤口愈合的病症,例如糖尿病(糖尿病溃疡瘢痕瘤),慢性伤口例如溃疡或褥疮。

[0081] 由于本发明的方法不仅增加了伤口的愈合率,而且改善了伤口的愈合质量,即减少了疤痕和坏死组织的出现,因此,至少在伤口部位增加纤溶酶原水平的组合物可以给药于任何病人,从而减少疤痕的形成。在一特定实施方案中,所述的受治疗者为,准备经历,正在经历,或已经历整形手术或皮肤置换过程的个人。在该情况下,含有纤溶酶原的组合物可以在手术前和/或手术后施用或给药。

[0082] 此外,纤溶酶原给药可以重新启动受损害伤口愈合情况下的正常伤口愈合模式。不受任何特定理论所限,除了纤维蛋白溶解,提高纤溶酶原水平可以导致纤溶酶增加,从而通过激活细胞因子途径,启动伤口愈合过程。

[0083] 组合物和治疗方法

[0084] 本发明提供了一种纤溶酶原组合物,当该组合物以有效量给药时,将导致受治疗者伤口部位纤溶酶原水平增加,从而提高鼓膜穿孔或其它伤口的愈合。

[0085] 例如,为了加速鼓膜的愈合,可以将一种含有约 $5\ \mu\text{g}$ 至约 50mg 的,优选约 0.05mg 至约 10mg ,更优选约 0.5mg 至约 5mg 的包括纤溶酶原同系物或衍生物在内的纤溶酶原的组合物,给药于鼓膜穿孔周围的部位。可选的,可以给药约 $10\text{--}50\ \mu\text{l}$ 的 1mg/ml 的纤溶酶原溶液,或分散于另一合适配方中的相应量的纤溶酶原。为了加速伤口愈合,一般的,可以给药纤溶酶原组合物,从而使每平方厘米 (cm^2) 伤口面积含有的纤溶酶原量为,约 $5\ \mu\text{g}$ 至约 50mg ,优选约 0.05mg 至约 10mg ,更优选约 0.5mg 至约 5mg 的包括纤溶酶原同系物或衍生物在内的纤溶酶原。

[0086] 可选的,进行纤溶酶原给药,从而使受治疗者,例如,人类患病个体,的鼓膜穿孔或伤口部位达到局部高浓度的纤溶酶原量。在一优选实施方案中,给药有效量的活性剂,从而使穿孔或伤口部位的纤溶酶原浓度达到至少约 $200\ \mu\text{g/ml}$ 。在另一优选实施方案中,给药有效量的活性剂,从而使穿孔或伤口部位的纤溶酶原浓度达到至少约 $200\ \mu\text{g/ml}$ 。仍然在另一优选实施方案中,给药有效量的活性剂达到的纤溶酶原浓度为约 $2\ \mu\text{g/ml}$ 至约 2mg/ml ,更优选至少 $200\ \mu\text{g/ml}$ 。人类血浆中的纤溶酶原浓度为约 $200\ \mu\text{g/ml}$ 。

[0087] 在纤溶酶组合物的情况下,为了加速鼓膜愈合,可以将一种含有约 $0.05\ \mu\text{g}$ 至约 5mg ,优选约 0.5mg 至约 1mg ,更优选约 $5\ \mu\text{g}$ 至约 0.5mg 的包括纤溶酶同系物或衍生物在内的纤溶酶的组合物,给药于鼓膜穿孔周围的部位。可选的,可以给药约 $10\text{--}50\ \mu\text{l}$ 的 1mg/ml 的纤溶酶溶液,或分散于另一合适配方中的相应量的纤溶酶。为了加速伤口愈合,一般的,可以给药纤溶酶组合物,从而使每平方厘米 (cm^2) 伤口面积含有的纤溶酶量为,约 $0.05\ \mu\text{g}$ 至约 5mg ,优选约 $0.5\ \mu\text{g}$ 至约 1mg ,更优选约 $5\ \mu\text{g}$ 至约 0.5mg 的包括纤溶酶同系物或衍生物在内的纤溶酶。

[0088] 因此,纤溶酶原或纤溶酶可以配制成对受治疗者给药的药物组合物,该组合物呈一种生物相容形式适合体内给药,例如局部给药,注射,或输液。通过生物相容形式适合体内给药是指一种可给药的物质形式,其中治疗作用超出了任何毒性作用。本发明中的药物组合物给药的治疗活性量定义为有效量,即达到理想效果所必需的剂量和时间段。例如,一种物质的治疗活性量可以根据多种因素的变化而发生变化,例如:个体所处的疾病阶段,年龄,性别,和体重。剂量方案 (regima) 是可以调整的,从而获得最佳治疗效果。例如,每天可以给药一剂以上,或者根据治疗状况的紧急性按比例减少药剂的量。

[0089] 如果需要,在治疗穿孔或伤口时,可将其它活性成分与纤溶酶原或纤溶酶联合给药。所述的活性成分包括,但不限于,哺乳动物 PAs,例如人 tPA 或人 uPA,或细菌 PAs,例如链激酶。

[0090] 所述的活性物质可以采用一种适当的方式给药,例如通过注射(皮下,静脉,等),吸入,喷雾,局部或透过皮肤给药,或进行直肠给药。根据给药的途径,可以采用某种材料包裹活性物质,从而保护该化合物,使其免受酶,酸和其它使该化合物失活的天然环境的作用。因此,合适的给药途径包括,局部的,静脉的,肌内的,真皮内的,直肠的,和阴道内的给药方式。优选的给药途径为局部给药。在鼓膜穿孔的情况下,活性剂可经由外耳道给药。支持鼓膜的血管终止于该膜的边缘。因此,血液和血液中的成分,例如,氧气,营养物质,和纤溶酶原只能通过扩散的方式到达鼓膜。

[0091] 此处描述的组合物可以通过本质上制备能给药于受治疗者的药学上可接受的组合物的方法来制备,也就是,将有效量的活性物质与药学上可接受的载体相混合,合适的载体描述于,例如, Remington' s 药物科学 (MackPublishing Company, Easton, Pa., USA 1985)。在此基础上,所述的组合物包括,虽然不仅仅是,与一种或多种药学上可接受的载体或稀释剂相连的所述物质或组合物的溶液,且溶于合适 pH 值并与生理体液等渗的缓冲溶液中。

[0092] 可以用于传送本发明的纤溶酶原或其它组合物的载体的例子包括,但不仅限于,可注射的剂量形式,灌输液,胶体,糊剂,软膏,蜡状物,洗液,皮肤霜,以及各种其它的本领域已知的局部给药方式。所述的组合物还可以通过粉剂或液体喷雾的形式给药于伤口部位。可选的本发明的组合物可以存在于给药于伤口的伤口敷料,垫,绷带,纱布或其它的方式,从而传递至伤口部位。这种装置还包括缓释装置,在一段延长的时间内持续释放纤溶酶原或其它组合物。至于鼓膜伤口的愈合,采用胶体,喷雾,或滴液方式,经由外耳道进行组合物给药是一种优选的实施方式。可注射的剂量形式或输液剂包括溶于药学上可接受液体的纤溶酶原或纤溶酶溶液,例如,等渗盐溶液,灭菌水或液体缓冲系统。

[0093] 在药物组合物制备后,可将其置于合适的容器中,并作标识注明其治疗的适应症。对于本发明组合物的给药,上述标识可以包括给药的量,频率,以及给药方法。

[0094] 纤溶酶原的给药可以被重复至少一次。例如,可以在固定的间隔时间进行纤溶酶原给药,例如,约每两天至少给药一次,约一天一次,或约一天两次,或加入到可适当更换的伤口敷料或缓释装置中。

[0095] 动物模型

[0096] 提供了筛选或评价改善伤口愈合的候选化合物或治疗方法的新方法。由于其简单的结构和与皮肤组织的高度类似,鼓膜提供了一种研究伤口愈合机制的独特机会。可以获得标准大小的穿孔,并可采用各种技术例如耳显微镜或光学显微镜 (Hellstrm et al., In: Fidia Research Series, Vol. 8, Liviana Press, Padova 1989) 观察伤口愈合模式。因此,采用这种动物模型可以对药物实验和筛选增加伤口部位纤溶酶原浓度的化合物,以及给药剂量和给药途径进行有效的研究。本发明的动物模型还提供了一种愈合过程缓慢或被抑制情况下的药物筛选。

[0097] 根据本发明,野生型或纤溶酶原-缺陷型小鼠可用于筛选提高伤口愈合和/或减少疤痕形成的化合物。采用本模型已经鉴别和验证了用于治疗伤口和与 ECM 降解相关的疾病和病症的化合物。但是,在本模型的背景中,也可以采用野生型动物和其它基因缺陷型动物。

[0098] 本方法中使用的动物可以是本领域传统采用的野生型实验动物,或基因修饰的动物,或“转基因”动物。可以采用任何方法制备转基因哺乳动物,所述的方法包括,但不仅限于,胚胎干细胞 (ES) 的修饰和对胚胎细胞的异源核注射 (heteronuclear injection)。特别优选的动物模型包括纯合体或杂合体的纤溶酶原-缺陷型小鼠(参见,例如 Ploplis et al. Circulation 92, 2585-2593 (1995))。作为实例,纤溶酶原被认为是一种如实施例所述的提高伤口愈合和减少疤痕形成的化合物。

[0099] 例如,“基因敲除 (knockout) 的哺乳动物”是指其基因组中的特定基因被基因靶向方法失活的哺乳动物(例如,小鼠)(参见,例如美国专利 5777195 和 5616491)。基因

敲除的哺乳动物既包括杂合体的基因敲除（也就是，一缺陷型等位基因和一野生型等位基因），又包括纯合体的突变体。制备基因敲除的哺乳动物首先需要将用于抑制特定基因表达的核酸构建体导入一种未分化的细胞类型 - 胚胎干细胞中。然后将该细胞注入哺乳动物胚胎中。然后将携带整合细胞的哺乳动物胚胎植入代孕母体内孕育。Zhou 等 (*Genes and Development* 9 :2623-34(1995)) 描述了一种 PPCA 基因敲除的小鼠，本文中的实施例描述了一种一个或一对纤溶酶原等位基因被敲除的动物。

[0100] “基因敲入 (knock-in)” 的哺乳动物是指其内源基因被异源基因所取代 (Roemer et al., *New Biol.* 3 :331-5(1991))。优选的，所述的异源基因被“敲入 (knocked-in)” 感兴趣的位点；评价受试者的表达情况（在该情况下所述的基因为报告基因；参见 Elegant et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 :11897(1998)) 或同源基因的功能，从而将异源基因的表达与自合适启动子的转录相连。这可通过同源重组，转座子 (Westphal and Leder, *Curr Biol* 7 :530(1997))，采用重组位点突变 (Araki et al., *Nucleic Acids Res* 25 :868(1997)) 或 PCR 技术 (Zhang and Henderson, *Biotechniques* 25 :784(1998)) 获得。在本发明的上下文中，人纤溶酶原可以被“敲入”从而取代 CIA 小鼠相应的基因，进而研究直接针对任一药物目标的药物的效果。

[0101] 在其它一系列的实施方案中，可以制备如下类型的转基因动物 (i) 人纤溶酶原基因稳定插入其基因组的转基因动物；和 / 或 (ii) 使内源相应的基因失活，并采用其人源的对应物替代（参见，例如，Coffman, *Semin. Nephrol.* 17 :404(1997)；Esther et al., *Lab. Invest.* 74 :953(1996)；and Murakami et al., *Blood Press. Suppl.* 2 :36(1996))。可以采用候选化合物治疗上述动物，并监测伤口愈合或纤溶酶原或纤溶酶的水平 / 活性。

[0102] 可以制备基于鼓膜穿孔的转基因动物，从而用来研究伤口愈合新药的靶位点，或用来评价潜在药物影响伤口愈合的能力。这种动物为筛选或测试候选药物提供了非常好的模型。如实施例所描述的那样，可以制备人纤溶酶原活性“敲除”动物用于鉴别新药的靶位点，同时可制备“基因敲入”的哺乳动物用于评价药物对纤溶酶原活化系统的人源对应物的影响。上述的技术都能允许在细胞基因组的天然位置操纵单个遗传信息单元，同时在终末分化的有机体背景下研究所述操纵的结果。

[0103] 由于其简单的结构和与皮肤组织高度类似，鼓膜穿孔提供了一种研究伤口愈合的一般机制的独特机会。由于其精确和明确的组成，因而鼓膜是一种能严格定义伤口的非常标准的模型。鼓膜具有 3 层结构，其中的一层为 5-6 个角质细胞厚；中间层为结缔组织层，由一层非常薄的胶原 II 组成，粘膜内层是由上皮细胞组成的。因此，伤口愈合可以在细胞水平上进行研究。与之相比较，在皮肤伤口的情况下，则很难评价和使伤口的深度标准化。

[0104] 筛选方法

[0105] 在鼓膜愈合模型中，野生型，纤溶酶原缺陷型或其它基因缺陷型的动物可以用作模型来筛选对伤口愈合有效的化合物，并允许监测炎症的阶段（可在穿孔后持续约 3 天），和随后组织的形成和改造阶段。这种动物模型对筛选能加速伤口愈合或减少疤痕形成的活性剂特别有效。如实施例中描述的那样，向纤溶酶原缺陷型小鼠中添加纤溶酶原可以产生鼓膜愈合和减少疤痕形成的效果，然而在不添加纤溶酶原时将导致鼓膜不愈合或缓慢愈合，并有疤痕形成。

[0106] 采用野生型小鼠时，当进行穿孔后，可以同时给药不同的化合物，且可通过耳显微

镜对愈合模式进行形态学分析。其中鼓膜的一边给药化合物,而另一边给药盐水作为对照。如果采用具有伤口愈合缺陷的不同基因缺陷型小鼠,例如纤溶酶原缺陷型小鼠,则可以发现可替代基因缺失产物的不同化合物。在缺乏该基因产物时,将这种化合物给药于小鼠则能导致小鼠愈合。那样,就可发现那些影响下游步骤的化合物。

[0107] 如果采用野生型小鼠,则可采用鼓膜穿孔模型开发加速伤口愈合的药物。可以将待测试的药物给药于小鼠,并监测鼓膜穿孔的愈合与对照组的比较。优选,所述的药物或活性剂与纤溶酶原活化途径的组分相作用从而使伤口部位的纤溶酶原水平升高。一种对伤口愈合有效的筛选得到的化合物的非限制性的实例为生长因子。

[0108] 可选的,可以使用具有异常伤口愈合的纤溶酶原缺陷型小鼠,并通过制造标准大小的伤口来研究伤口愈合。小鼠同时也可使用待测试的潜在化合物。如果该小鼠能发展到适当的伤口愈合,则说明该测试的化合物能干扰或靶向某些对伤口愈合很重要的组分。在一优选实施方案中,所述的药物为纤溶酶原或纤溶酶原衍生物(变体,片段,等)。在另一实施方案中,所述的药物能补偿纤溶酶原的缺失,从而增强伤口愈合。

[0109] 在另一实施方案中,所述的小鼠缺失纤溶酶原活化系统的至少一种其它组分,或者是一种或多种 MMP' s。基于该目的,如此处所述,可以制备 tPA, uPA, uPA 受体, PAI-1, MMP-9, 溶基质素 -3 缺陷型小鼠。

[0110] 本发明还提供了一种转基因非人动物的实验系统,该系统提供了一种测试药物的模型系统,所述药物通过活化药物靶向目标如纤溶酶或纤溶酶原的表达或活性,从而加速伤口的适当愈合。上述系统包括:(a) 制造伤口,优选鼓膜穿孔;(b) 将测试药物给药于选择的野生型或转基因的非人类动物(该药物也可在制造伤口前给药);(c) 与步骤(a)中未给药药物的野生型或转基因的非人类动物相比,确定在野生型或转基因的非人类动物中给药的所述药物是否增强伤口愈合和/或减少疤痕形成。

[0111] 可以采用此处所述的任何合适的给药方式将药物给药于动物,例如,局部给药和静脉注射。可以基于本领域对合适的给药时间和给药量的公知常识,或根据在未有过度实验的情况下,评价在一定范围内变化的给药时间和给药量的实验结果,来确定个体需要给药的时间和剂量。

[0112] 如果给药的药物能减少伤口愈合的时间和/或减少疤痕的形成,则根据本发明的方法,该药物可用于增强伤口愈合。如此处所述,该药物还可用于制成药物组合物。

[0113] 与对照值或参考值相比较,本发明方法中所采用的药物优选的通过增强纤溶酶原或纤溶酶水平或活性,从而增强伤口愈合。所述的对照值或参考值可以是,例如,预先设定的值或实验评价的值。所述的药物可以与这些组分中的任意一种结合或相互作用。在一基于细胞基础的实验中,其中表达重组纤溶酶原的宿主细胞在含有潜在调节作用的药物组分的培养基中培养,所述的对照或参考可以是,例如,与对药物靶向蛋白的表达或活性有已知影响的药物共培养的宿主细胞,在不含任何药物的相同培养基中培养的宿主细胞,转染了“假(mock)”载体,并不表达任何药物靶向蛋白的宿主细胞,或其它任何合适的对照或参考。在无细胞的实验中,所述的药物靶向蛋白或片段在含有潜在调节作用的药物组分的培养基中培养,所述的对照或参考可以是,例如,不含药物靶向成分的培养基,不含任何药物的培养基,含有参考多肽或药物的培养基,或其它任何合适的对照或参考。

[0114] 实施例

[0115] 下述实施例用于进一步描述本发明。但是,这些实施例仅用于说明本发明,其并不能用于限定本发明的范围和含义。实质上,本领域的普通技术人员在阅读本说明书后,在不脱离本发明的主旨和范围的情况下,可以清楚的预见本发明的许多改进和变化。

[0116] 实施例 1:野生型和纤溶酶原缺陷型小鼠中的穿孔鼓膜的愈合

[0117] 本实施例表明,与野生型同胞 (siblings) 对照相比,纤溶酶原缺陷型小鼠呈现伤口愈合推迟或异常情况。对于纤溶酶原缺陷型和野生型对照小鼠的短期研究表明,早在穿孔发生后的 6 小时,纤溶酶原缺陷型小鼠就表现出更高的炎症反应,这表明纤溶酶原早在伤口愈合的炎症阶段就开始发生作用了。

[0118] 方法

[0119] 小鼠:通过显色活性实验 (chromogenic activity assay) 来鉴别纤溶酶原基因缺陷型成年雄性小鼠及野生型同胞小鼠 (C57BL/6J, 8-12 周) 基因型,从而确定了小鼠血浆中的纤溶酶原水平 (Ny et al., Endocrinology. 140(11):5030-5(1999)), 并通过 PCR 技术证实。首先将小鼠麻醉,并在耳显微镜下采用鼓膜切开刀将小鼠鼓膜穿孔。穿孔的位置位于鼓膜上部的后四分之一处。

[0120] 通过 PCR 技术,鉴定动物基因型:从小鼠尾部顶端分离基因组 DNA,并通过 PCR 技术确定其基因型。PCR 反应中采用的引物对序列如下:

[0121] neo:5' ATG ATT GAA CAA GATGGA TTG CAC G 3' (SEQ ID NO:2)

[0122] 5' TTC GTC CAG ATC ATC CTG ATC GAC 3' (SEQ ID NO:3)

[0123] plg:5' TCA GCA GGG CAA TGT CAC GG 3' (SEQ ID NO:4)

[0124] 5' CTC TCT GTC TGC CTT CCA TGG 3' (SEQ ID NO:5)

[0125] “Neo”是指新霉素,为一构建基因缺陷型小鼠的抗性标记。neo 基因作为“子弹 (bullet)”加入基因组中,使基因失活。因此,获得的基因缺陷型细胞缺失了完整 (intact) 基因,并作为替代有 neo 基因插入。

[0126] 采用标准的方法进行 PCR 反应。简要的,首先在 94°C 变性 3 分钟;然后进行 30 个循环的反应:93°C 变性 30 秒,55°C 退火 30 秒,72°C 延伸 45 秒;最终,72°C 延伸 5 分钟。

[0127] 通过显色实验鉴定动物基因型:为了确定小鼠血浆中的纤溶酶原水平,加入尿激酶 (ukidan),并确定产生纤溶酶的量。通过比较不同血浆样品中产生的纤溶酶的量,从而确定小鼠的基因型。简要的,从小鼠尾顶端收集血样并置于 0.04M 柠檬酸溶液中。3000rpm,离心 10 分钟,收集血浆,并置于 -20°C 保存直至实验使用。将小鼠血浆稀释 1000 倍,并与 65nM 尿激酶,10mM 赖氨酸和溶于 PBS 的 80uM 生色底物 S-2251 (PBS 中) 一起置于有孔板 (96 孔) 中,37°C 温育,其中总体积为 200 μ l/孔。当蛋白酶酶切时,S-2251 开始显色。为了弥补血浆样品造成的颜色差,设置了单个样品空白,该样品空白与测试样品一致,仅除去了其中的尿激酶。采用微量滴定 (microtiter) 读板仪,在 405nm 处,2 小时内每隔 30 分钟测量一次吸光度。然后计算每只小鼠随时间变化的吸光度平均增长。可以基于吸光度随时间变化的 3 种不同水平的平均增长,区别 3 种不同的基因型,分为高 (plg+/+),中 (plg+/-) 和低 (plg-/-)。

[0128] 伤口愈合的临床评价和组织学制品。分别在穿孔后的第 4, 8, 36, 72, 和 144 天,采用耳显微镜,评价伤口愈合的外观。在每个时间点,将小鼠断头,并从软组织中分离出鼓膜疤 (bullas),切开并置于 2% 戊二醛,在二甲砷酸盐缓冲液中过夜。剪切鼓膜,包括紧张部

和松弛部,漂洗,并置于四氧化锇中后固定。在丙酮中脱水后,将样品在环氧树脂中包埋。将塑性包埋的鼓膜在穿孔的四分之一处平行于锤骨柄切片。经甲苯胺蓝染色,将 0.5 微米厚的切片在光学显微镜下观察。700nm 后的超薄切片,在经醋酸双氧铀和柠檬酸铅复染后,置于电镜下观察。

[0129] **结果**

[0130] 组织学和形态学检查表明,纤溶酶原缺陷型小鼠的鼓膜愈合受到损害(见表 2)。表 2 显示了穿孔后耳显微镜下观察到的鼓膜穿孔外观的评价随时间变化的函数结果。相对于所检查的总数,该表给出了明显闭合的鼓膜的数目。形态学分析表明野生型小鼠完全愈合,但与野生型相比,所有纤溶酶原缺陷型小鼠中的穿孔都有完全破裂的愈合模式。

[0131] **表 2**

[0132] 在纤溶酶原缺陷型小鼠中鼓膜愈合的长久受损

[0133] 本表显示了在每个时间点,每组中明显覆盖的鼓膜的分数的。

[0134]

穿孔后的时间(天数):	4	8	11	36	72	144
纤溶酶原缺陷型小鼠:	2/24	6/14	0/6	1/6	8/30	0/12
野生型小鼠:	0/18	10/14	10/10	10/10	24/24	12/12

[0135] 此外,对纤溶酶原基因为杂合体的小鼠的愈合资料进行了评估。与野生型小鼠相比,这些小鼠体液中的纤溶酶原含量只有 50%,且表现愈合延迟的现象。这表明愈合过程为剂量依赖型,从而对野生型小鼠和人类给药纤溶酶原能加速伤口的愈合。

[0136] **实施例 2 用纤溶酶原重建的纤溶酶原缺陷型小鼠中的鼓膜愈合**

[0137] 本实施例显示了,通过全身给药,使纤溶酶原缺陷型小鼠获得纤溶酶原的重建(reconstitution),则小鼠的表型完全转换,回复到正常的伤口愈合。

[0138] **方法**

[0139] 本实验除了将纤溶酶原给药于一组动物外,其它与实施例 1 类似。

[0140] 纤溶酶原缺陷型小鼠中的纤溶酶原重建:通过反复静脉注射溶于 100 μ l 磷酸缓冲盐溶液(PBS)的 1.5mg 纤溶酶原,进行纤溶酶原缺陷型小鼠的纤溶酶原重建。在鼓膜穿孔前 12 小时,进行首次剂量给药。随后,在整个实验期间,每隔 24 小时进行一次纤溶酶原给药。

[0141] **结果**

[0142] 在纤溶酶原缺陷型小鼠中,通过静脉注射方式进行的纤溶酶原缺陷型小鼠的纤溶酶原重建,使纤溶酶原缺陷型小鼠回复了正常的伤口愈合过程。表 3 显示了愈合后耳显微镜下观察到的鼓膜外观评价结果。相对于所检查的总数,该表给出了愈合的鼓膜的数目。

[0143] **表 3**

[0144] 在给药 P1g 后,P1g 缺陷型小鼠的鼓膜愈合本表显示了在每个时间点,每组中愈合鼓膜的分数的。

[0145]

穿孔后的时间(天数):	4	8	11
-------------	---	---	----

p1g ^{-/-} 小鼠 :	0/3	0/3	0/3
野生型小鼠 :	0/3	2/3	3/3
注射了 p1g 的 p1g ^{-/-} 小鼠 :	0/3	2/3	3/3

[0146] 因此,虽然在纤溶酶原缺陷型小鼠中鼓膜伤口愈合异常,但是,当对纤溶酶原缺陷型小鼠给药纤溶酶原时,鼓膜愈合回复。此外,在 144 天后,没有一个纤溶酶原缺陷型小鼠具有正常愈合的鼓膜,愈合模式完全异常,其中鼓膜增厚,且不透明,且伤口部位覆盖有白色鹅卵石状的组织。形态学分析显示,填充伤口部位的组织为纤维蛋白样结构,这表明细胞迁移被阻断。在第 16 天及向前的时间 (onwards),有坏死组织出现。

[0147] 实施例 3 :在 tPA⁻ 缺陷型小鼠中鼓膜穿孔的愈合

[0148] 在第 0 天对 tPA⁻ 缺陷型小鼠 (tPA^{-/-}) 和野生型小鼠实施鼓膜穿孔,并如上文所述在耳显微镜下观察其愈合模式。结果示于表 4 中。与 C57B1/6 遗传背景的小鼠反交 6 次的 tPA⁻ 缺陷小鼠与 DBA1/J 遗传背景的小鼠正交一次。其杂合体后代用于繁殖。繁殖得到的野生型 (tPA^{+/+}) 和纯合体 (tPA^{-/-}) 后代用于伤口愈合实验。

[0149] 表 4

[0150] tPA⁻ 缺陷型小鼠中鼓膜的愈合

[0151] 本表显示了在每个时间点,每组中愈合鼓膜的分数。

[0152]

穿孔后的时间 (天数) :	4	6	8	12
tPA ^{+/+} 小鼠 :	0/20	5/14	9/14	6/6
tPA ^{-/-} 小鼠 :	0/24	4/16	10/16	8/8

[0153] tPA^{-/-} 小鼠中 TM 穿孔的愈合模式与野生型对照小鼠中的一致,并且 tPA^{-/-} 小鼠中的 TM 组织愈合质量也与野生型对照相一致,因为在伤口部位没有观察到“鹅卵石状”组织或纤维蛋白沉积。因此,与野生型对照相比,在 tPA⁻ 缺陷小鼠的鼓膜愈合中没有观察到数量或质量上的明显不同,从而表明,在鼓膜愈合中,tPA 起了极小作用 (如果的确起作用的话)。

[0154] 实施例 4 :在 uPA⁻ 缺陷型小鼠中的鼓膜愈合

[0155] 在第 0 天对 uPA⁻ 缺陷型小鼠 (uPA^{-/-}) 和野生型小鼠实施鼓膜穿孔,并如上文所述在耳显微镜下观察其愈合模式。结果示于表 5 中。与 C57B1/6 遗传背景的小鼠反交 6 次的 uPA⁻ 缺陷小鼠与 DBA1/J 遗传背景的小鼠正交一次。其杂合体后代用于繁殖。繁殖得到的野生型 (uPA^{+/+}) 和纯合体 (uPA^{-/-}) 后代用于伤口愈合实验。

[0156] 表 5

[0157] uPA⁻ 缺陷型小鼠中鼓膜的愈合

[0158] 本表显示了在每个时间点,每组中愈合鼓膜的分数。

[0159]

穿孔后的时间 (天数) :	4	8	16	30
---------------	---	---	----	----

野生型小鼠 :	0/12	5/8	8/8	6/6
uPA ^{-/-} 小鼠 :	0/16	5/12	7/8	3/4

[0160] 本实验结果显示,与野生型对照相比,uPA⁻ 缺陷型小鼠中的鼓膜穿孔愈合显示一定程度的推迟,同时在愈合后的穿孔部位可以观察到白色和鹅卵石状的组织,有纤维蛋白沉积。这些资料表明,虽然其程度次于纤溶酶原,但 uPA 在鼓膜伤口愈合过程中扮演了某种角色,潜在影响着纤维蛋白沉积的清除。

[0161] 实施例 5:“晚期”给药纤溶酶原

[0162] 本实施例表明,在实施鼓膜穿孔几周后给药纤溶酶原,能回复被损害了的愈合过程。

[0163] 方法:采用上述方法制备纤溶酶原缺陷型 (plg^{-/-}) 小鼠。在第 0 天进行鼓膜穿孔。在第 36 天及向前的 (onwards) 7 天内,对一组小鼠每天注射溶于 150 μ l 溶液中的 1.5mg 的人纤溶酶原。

[0164] 结果:可以通过耳显微镜观察到由于给药纤溶酶原引起的胞外基质异常堆积减少的现象。特别的,在每天给药人纤溶酶原的纤溶酶原缺陷型小鼠中,在首次给药药物后的两天内开始了炎症反应,它引起堆积物质从鼓膜部位渗出。在 7 天的注射期内,这些小鼠显示出异常堆积的胞外基质(主要由纤维蛋白和坏死组织组成)的厚度明显减少。在最初的 7 天注射期之后,一些鼓膜的愈合模式显示出类似正常的愈合状况。这些结果表明,纤溶酶原是纤维蛋白清除和坏死组织除去中所必须的。

[0165] 在一类似的纤溶酶原回复实验中,在穿孔后的第 0-3 天,第 4-7 天,或第 8-11 天中的任一时段,将纤溶酶原给药于纤溶酶原缺陷型小鼠。该实验显示,在伤口愈合的全部 3 个阶段,即炎症期,组织形成期和组织改造期,纤溶酶原都十分重要。

[0166] 实验 6:将纤溶酶原局部给药于野生型大鼠的穿孔鼓膜上

[0167] 本实验表明在野生型大鼠中局部给药纤溶酶原有助于促进鼓膜穿孔的愈合。

[0168] 方法:将每个研究组中的动物鼓膜进行穿孔。将 50 μ l PBS(对照)或浓度为 1mg/ml 或 10mg/ml 的人纤溶酶原直接给药于鼓膜穿孔处。然后每隔 24 小时重复给药附加的纤溶酶原或对照,随后在不同的时间点监测其炎症反应和愈合模式。特别的,在鼓膜穿孔后的最初 108 小时内,记录中耳室的鼓室上隐窝部位的炎症液体的聚集,以及 TM 穿孔的回缩。

[0169] 结果:记录了每组中的平均愈合时间,并如下图 6 所示。该表显示了每组中鼓膜穿孔愈合的平均时间周期。

[0170] 表 6

[0171] 通过给药纤溶酶原改善野生型大鼠中的鼓膜穿孔愈合

[0172]

实验组 :	对照 (PBS)	1mg/ml Plg	10mg/ml Plg
愈合时间 (天数)	8.1 \pm 0.5	7.4 \pm 0.6	6.8 \pm 0.5

[0173] 结果显示,给药 10mg/ml 纤溶酶原的大鼠在中耳的鼓膜上隐窝部位具有最强的炎症反应,而给药 1mg/ml 纤溶酶原的大鼠则显示出与对照组几乎类似的炎症反应。虽然与对照组相比,在最初的 108 小时内所有给药纤溶酶原的实验组都显示出穿孔回缩提高,但是

在 10mg/ml 的实验组中观察到最快的鼓膜愈合。

[0174] 实施例 7:纤溶酶原缺陷型小鼠中组织改造和细胞迁移状况的特性

[0175] 为了描述纤溶酶原缺陷型小鼠 (plg-/-) 中的异常组织细胞改造和细胞迁移状况的特性,在穿孔后第 4, 8, 16, 36, 72 和 144 天的野生型和 plg-/- 缺陷型小鼠的愈合中 / 愈合后的鼓膜上,对角蛋白,纤维蛋白和嗜中性白细胞进行连续免疫染色。嗜中性白细胞 - 反应性抗体来源于 Cedarlane (加拿大),抗角蛋白抗体来源于 ICN 药品有限公司,而纤维蛋白原 / 纤维蛋白 - 反应性抗体来自 Nordic Immunology。

[0176] 结果:在穿孔后第 36 天及向前的时间 (onwards),与野生型小鼠相比,纤溶酶原缺陷型小鼠出现异常的胞外基质组合物。在纤溶酶原缺陷型小鼠中,穿孔部位存在替代角蛋白的增加量的纤维蛋白,然而角蛋白则“保持”于穿孔的边缘。在耳显微镜下,这些纤维蛋白沉积物呈一种白色的,“鹅卵石状”的硬壳 (crust) 组织。大量的嗜中性白细胞也渗入伤口部位。此外,在穿孔后第 16 天及向前的时间,纤溶酶原缺陷型小鼠中出现了坏死组织。野生型小鼠显示出的愈合伤口面积与正常野生型小鼠对照一致。

[0177] 这些资料表明,纤溶酶原,无论是直接作用还是通过形成纤溶酶,对防止或减少纤维蛋白沉积,促进角蛋白层形成,以及坏死组织的去除都十分重要。

[0178] ****

[0179] 本发明要求保护的范围不受本处所描述的特定实施例的限制。实质上,本领域的普通技术人员根据前面的描述及其相应的附图,很容易预见到本发明描述所附加的各种修改。这种修改被认为属于附加的权利要求范围之内。

[0180] 这种修改被进一步理解为与本发明主旨接近,且得到说明书的支持。

[0181] 本发明说明书中引用并讨论了众多的参考文献,包括:授权专利,专利申请,图表,参考数据库,和各种出版物。所有的这些参考资料作为整体纳入作为参考,且与每篇文献单独并入作参考的程度相一致。

[0182] 序列表

[0183] <110> 奥姆尼奥公司

[0184] <120> 改善伤口愈合的方法

[0185] <130>3810/2J759-W00

[0186] <140>US 60/317,643

[0187] <141>2001-09-06

[0188] <160>5

[0189] <170>PatentIn version 3.2

[0190] <210>1

[0191] <211>810

[0192] <212>PRT

[0193] <213>人 (Homo sapiens)

[0194] <400>1

[0195] Met Glu His Lys Glu Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Phe Leu Lys Ser

[0196] 1 5 10 15

[0197] Gly Gln Gly Glu Pro Leu Asp Asp Tyr Val Asn Thr Gln Gly Ala Ser

[0198]	20	25	30	
[0199]	Leu Phe Ser Val Thr Lys Lys Gln Leu Gly Ala Gly Ser Ile Glu Glu			
[0200]	35	40	45	
[0201]	Cys Ala Ala Lys Cys Glu Glu Asp Glu Glu Phe Thr Cys Arg Ala Phe			
[0202]	50	55	60	
[0203]	Gln Tyr His Ser Lys Glu Gln Gln Cys Val Ile Met Ala Glu Asn Arg			
[0204]	65	70	75	80
[0205]	Lys Ser Ser Ile Ile Ile Arg Met Arg Asp Val Val Leu Phe Glu Lys			
[0206]	85	90	95	
[0207]	Lys Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg			
[0208]	100	105	110	
[0209]	Gly Thr Met Ser Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser			
[0210]	115	120	125	
[0211]	Ser Thr Ser Pro His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser			
[0212]	130	135	140	
[0213]	Glu Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln			
[0214]	145	150	155	160
[0215]	Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys			
[0216]	165	170	175	
[0217]	Asp Ile Leu Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn			
[0218]	180	185	190	
[0219]	Tyr Asp Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala			
[0220]	195	200	205	
[0221]	Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe			
[0222]	210	215	220	
[0223]	Pro Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu			
[0224]	225	230	235	240
[0225]	Leu Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu			
[0226]	245	250	255	
[0227]	Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr			
[0228]	260	265	270	
[0229]	Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala			
[0230]	275	280	285	
[0231]	Val Thr Val Ser Gly His Thr Cys Gln His Trp Ser Ala Gln Thr Pro			
[0232]	290	295	300	
[0233]	His Thr His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp			
[0234]	305	310	315	320
[0235]	Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His			
[0236]	325	330	335	

[0237]	Thr Thr Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys
[0238]	340 345 350
[0239]	Asp Ser Ser Pro Val Ser Thr Glu Gln Leu Ala Pro Thr Ala Pro Pro
[0240]	355 360 365
[0241]	Glu Leu Thr Pro Val Val Gln Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser
[0242]	370 375 380
[0243]	Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser
[0244]	385 390 395 400
[0245]	Trp Ser Ser Met Thr Pro His Arg His Gln Lys Thr Pro Glu Asn Tyr
[0246]	405 410 415
[0247]	Pro Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp
[0248]	420 425 430
[0249]	Lys Gly Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr
[0250]	435 440 445
[0251]	Cys Asn Leu Lys Lys Cys Ser Gly Thr Glu Ala Ser Val Val Ala Pro
[0252]	450 455 460
[0253]	Pro Pro Val Val Leu Leu Pro Asp Val Glu Thr Pro Ser Glu Glu Asp
[0254]	465 470 475 480
[0255]	Cys Met Phe Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Arg Ala Thr Thr
[0256]	485 490 495
[0257]	Val Thr Gly Thr Pro Cys Gln Asp Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg
[0258]	500 505 510
[0259]	His Ser Ile Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Lys
[0260]	515 520 525
[0261]	Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Gly Gly Pro Trp Cys Tyr
[0262]	530 535 540
[0263]	Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln Cys
[0264]	545 550 555 560
[0265]	Ala Ala Pro Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys Lys
[0266]	565 570 575
[0267]	Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala His Pro His Ser Trp
[0268]	580 585 590
[0269]	Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Met His Phe Cys Gly
[0270]	595 600 605
[0271]	Gly Thr Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu
[0272]	610 615 620
[0273]	Glu Lys Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala His
[0274]	625 630 635 640
[0275]	Gln Glu Val Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile Glu Val Ser Arg

[0276]		645	650	655
[0277]	Leu Phe Leu Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser			
[0278]		660	665	670
[0279]	Ser Pro Ala Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu Pro Ser			
[0280]		675	680	685
[0281]	Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe Ile Thr Gly Trp			
[0282]		690	695	700
[0283]	Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu Ala Gln			
[0284]	705	710	715	720
[0285]	Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr Glu Phe Leu Asn			
[0286]		725	730	735
[0287]	Gly Arg Val Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu Ala Gly Gly			
[0288]		740	745	750
[0289]	Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Phe Glu			
[0290]		755	760	765
[0291]	Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly Cys			
[0292]		770	775	780
[0293]	Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg Phe Val			
[0294]	785	790	795	800
[0295]	Thr Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn			
[0296]		805	810	
[0297]	<210>2			
[0298]	<211>25			
[0299]	<212>DNA			
[0300]	<213>人工的			
[0301]	<220>			
[0302]	<223>PCR 引物			
[0303]	<400>2			
[0304]	atgattgaac aagatggatt gcacg	25		
[0305]	<210>3			
[0306]	<211>24			
[0307]	<212>DNA			
[0308]	<213>人工的			
[0309]	<220>			
[0310]	<223>PCR 引物			
[0311]	<400>3			
[0312]	ttcgtccaga tcatectgat cgac	24		
[0313]	<210>4			
[0314]	<211>20			

- [0315] <212>DNA
- [0316] <213> 人工的
- [0317] <220>
- [0318] <223>PCR 引物
- [0319] <400>4
- [0320] tcagcagggc aatgtcacgg 20
- [0321] <210>5
- [0322] <211>21
- [0323] <212>DNA
- [0324] <213> 人工的
- [0325] <220>
- [0326] <223>PCR 引物
- [0327] <400>5
- [0328] ctctctgtct gcct tccatg g 21

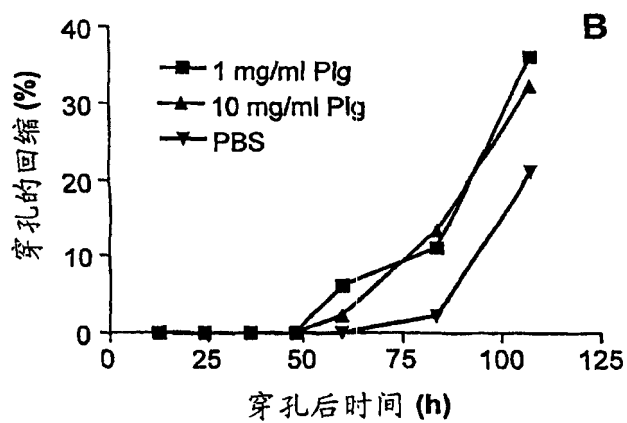
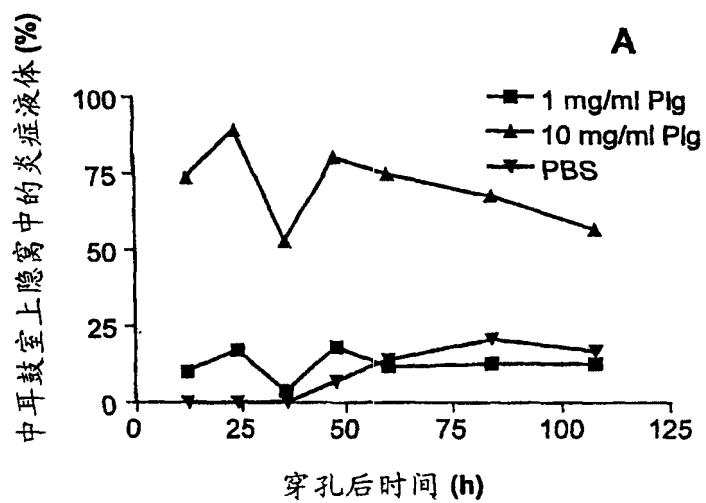


图 1