



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104736709 A

(43) 申请公布日 2015. 06. 24

(21) 申请号 201380027990. 1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 03. 26

C12N 15/113(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 31/7088(2006. 01)

61/616, 393 2012. 03. 27 US

A61P 17/02(2006. 01)

13/844, 553 2013. 03. 15 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 11. 27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/033948 2013. 03. 26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/148736 EN 2013. 10. 03

(71) 申请人 科达治疗公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 布拉德福德·J·杜夫特

戴维·L·贝克尔

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

代理人 余刚 张英

权利要求书2页 说明书58页 附图11页

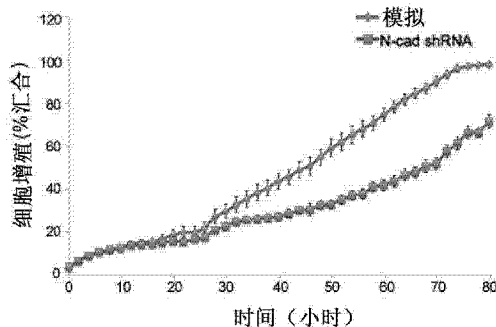
(54) 发明名称

基于钙粘蛋白调节的组合物和治疗

(57) 摘要

用于在创伤愈合和 / 或组织修复的促进和 / 或改善中使用的, 以及用于抗疤痕形成、抗炎、抗纤维化和抗粘附指征的抗钙粘蛋白和抗 ZO-1 试剂和组合物, 以及包含它们的试剂盒。

F



1. 一种多核苷酸,可选地是反义多核苷酸、RNA、shRNA、miRNA 或 siRNA,至编码蛋白质的信使 RNA (mRNA),所述蛋白质是钙粘蛋白蛋白质超家族的成员,可选地是人类钙粘蛋白蛋白质,可选地是选自以下组成的组的钙粘蛋白蛋白质:N-钙粘蛋白、E-钙粘蛋白、P-钙粘蛋白、钙粘蛋白 11、钙粘蛋白 12、原钙粘蛋白蛋白质、桥粒芯蛋白质和桥粒胶蛋白蛋白质,其中,所述多核苷酸可选地长度为约 5 至约 100 个核苷酸之间,可选地长度为约 6 至约 40 个核苷酸。

2. 根据权利要求 1 所述的多核苷酸,其是寡脱氧核苷酸,可选地是未修饰的磷酸二酯寡脱氧核苷酸或化学修饰的脱氧寡核苷酸,可选地是选自以下组成的组的化学修饰的寡核苷酸:硫代磷酸酯、甲基磷酸酯、氨基磷酸酯、二硫代磷酸酯、N3' P5' - 氨基磷酸酯、寡核糖核苷酸硫代磷酸酯和它们的 2'-O- 烷基类似物、2'-O- 甲基核糖核苷酸甲基磷酸酯,以及混合的骨架寡核苷酸。

3. 根据权利要求 1 所述的多核苷酸,其结合 N-钙粘蛋白基因开放阅读框中的靶核苷酸序列,其中所述靶核苷酸序列包含少于约 100 个核苷酸,其包含序列 5' -GACTGGATTCCTGAAGAT-3' (SEQ ID NO:7) 或其 RNA 等价物。

4. 根据权利要求 3 所述的多核苷酸,其是反义多核苷酸、RNA、shRNA 或 siRNA,其中,所述多核苷酸可选地具有与包含所述靶核苷酸序列的 mRNA 或所述信使 RNA 的部分至少约 70%、80%、90%、95% 或 100% 互补性。

5. 至少一种根据权利要求 1 所述的反义多核苷酸在制备用于在治疗与异常的或不期望的钙粘蛋白活性相关的疾病或病况中使用的药物中的应用,其中,所述疾病或病况可选地选自以下组成的组:急性创伤、慢性创伤、炎性疾病、肺脏疾病(可选地哮喘)、肾脏疾病、肝脏疾病(可选地 NASH)、关节炎(可选地幼年型关节炎、骨关节炎和风湿性关节炎)、炎症性肠病(可选地克罗恩氏病和溃疡性结肠炎)、皮肤病、感染、局部缺血(可选地再灌注损伤)和心脏疾病(可选地动脉粥样硬化)。

6. 一种组合物,包含至少一种根据权利要求 1 所述的反义多核苷酸和生理上可接受的载体或媒介物,其中,所述组合物可选地被配制用于经由选自口服给予、局部给予和注射的途径给予。

7. 根据权利要求 6 所述的组合物,其为乳霜剂、软膏剂、凝胶剂、乳剂、洗剂、泡沫剂或涂剂的形式,其中,当所述组合物是凝胶剂时,所述凝胶剂可选地包括非离子聚氧化乙烯-聚氧化丙烯共聚物凝胶。

8. 根据权利要求 6 所述的组合物,其进一步包含表面活性剂或尿素,以帮助多核苷酸渗透进入细胞。

9. 一种将反义多核苷酸递送至编码作为钙粘蛋白蛋白质超家族的成员的蛋白质的信使 RNA (mRNA) 的方法,包括将根据权利要求 6 所述的组合物给予至需要用所述蛋白质的调节剂治疗的受试者,由此将反义多核苷酸递送至编码所述蛋白质的 mRNA,所述受试者可选地是人类或非人类动物,可选地是哺乳动物。

10. 根据权利要求 9 所述的方法,其中,所述受试者经受创伤,可选地是选自以下组成的组的创伤:急性创伤、延迟愈合创伤、不完全愈合创伤、慢性创伤(可选地是糖尿病溃疡、静脉性溃疡、压力溃疡、脉管炎溃疡或动脉性溃疡)和裂开性创伤,并且其中,可选地在创伤的修复或闭合之前应用所述组合物。

11. 一种减少受试者中的蛋白质的表达的方法,所述蛋白质是钙粘蛋白蛋白质超家族成员,包括将根据权利要求 6 所述的组合物给予至所述受试者,由此减少所述蛋白质的表达。

12. 一种治疗方法,包括将包含治疗有效量的第一创伤愈合试剂和第二创伤愈合试剂的组合物给予至需要其的受试者,其中,所述第一创伤愈合试剂是根据权利要求 1 所述的反义多核苷酸而所述第二试剂选自由以下组成的组:抗连接蛋白 43 多核苷酸、抗连接蛋白 43 肽或模拟肽、半通道闭合或阻断剂、连接蛋白 43 羧基末端多肽间隙连接闭合或阻断剂和抗骨桥蛋白多核苷酸。

13. 根据权利要求 12 所述的方法,其中,组合给予所述第一创伤愈合试剂和第二创伤愈合试剂,可选地单独给予,可选地约同时给予或顺序给予。

14. 根据权利要求 12 所述的方法,其中,首先给予所述第一创伤愈合试剂或第二创伤愈合试剂。

15. 根据权利要求 12 所述的方法,其中,在彼此约 1 至约 7 天内、可选地在彼此约 1 至约 2 天内、可选地在彼此约 6 至约 24 小时内、可选地在彼此约 1 至约 6 小时内给予所述第一创伤愈合试剂和第二创伤愈合试剂。

16. 一种制造的物品,包括含有根据权利要求 1 所述的多核苷酸的包装材料连同使用说明。

基于钙粘蛋白调节的组合物和治疗

[0001] 相关申请的参考

[0002] 本申请要求于 2013 年 3 月 15 日提交的美国申请序列号 US 13/844, 553 的优先权, 其是非临时的并且要求于 2012 年 3 月 27 日提交的美国临时申请序列号 US 61/616, 393 的益处, 每一个的全部内容通过引用结合于此。

技术领域

[0003] 本发明与涉及钙粘蛋白蛋白质的调节的组合物和方法有关。这些发明在多个背景下都是有用的, 包括促进创伤愈合和治疗创伤, 特别是急性创伤和不能以预期速度治愈的创伤, 如延迟愈合的创伤、不完全地愈合的创伤、慢性创伤和裂开性 (dehiscent) 创伤。

背景技术

[0004] 以下包含可能在理解本发明中有用的信息。这不是承认此处提供的任何信息是现有技术或与目前描述或要求保护的发明相关或承认特别地或暗含地参考的任何出版物或文献是现有技术。

[0005] 在人类和其他哺乳动物中, 创伤伤害引起细胞和生物化学事件的有组织的复杂级联, 在大部分情况下其将引起愈合的创伤。理想上愈合的创伤是在细胞、组织、器官和生物体水平上恢复正常的解剖结构、功能和外观的一种。创伤愈合, 无论是由外伤、微生物或外来物质引发的, 经由包含许多重叠阶段的复杂过程 (包括炎症、外皮形成、血管生成和基质沉积) 进展。通常地, 这些过程引起成熟的创伤和某种程度的疤痕形成。尽管炎症和修复通常沿着指定过程出现, 但是过程的敏感性取决于多种创伤愈合分子的平衡, 包括例如, 调节性细胞因子和生长因子的网络。

[0006] 细胞粘附和细胞间通讯也在创伤愈合中具有一定作用。细胞粘附涉及细胞通过多种细胞粘附分子如钙粘蛋白、整联蛋白和选择蛋白结合至表面、细胞外基质和 / 或一个或更多邻近细胞的细胞。细胞间通讯包括连接蛋白 (connexin) 蛋白质, 其形成间隙连接。适当的细胞粘附不仅是维持多细胞结构和在伤害之后恢复这样的结构必不可少的, 而且是促进经由信使和信号转导的细胞间通讯必不可少的。

[0007] 钙粘蛋白是涉及将细胞结合在一起以形成、维持和恢复组织的 1 型跨膜蛋白的类别。作为家族, 钙粘蛋白是调节多细胞动物的所有实体组织中的 Ca^{2+} 依赖的细胞 - 细胞粘附的粘附分子。这些蛋白质调节多种过程, 包括细胞极化和迁移。钙粘蛋白调节的细胞 - 细胞连接作为完全相同的钙粘蛋白的胞外域之间的相互作用的结果而形成, 所述胞外域突出于邻接的细胞的膜。通过使细胞内钙粘蛋白结构域与肌动蛋白细胞骨架结合确保这些粘附性结合的稳定性。

[0008] 钙粘蛋白超家族除其他外 (among others) 包括钙粘蛋白、原钙粘蛋白、桥粒芯蛋白和桥粒胶蛋白。结构上, 每一个超家族成员具有钙粘蛋白重复, 其是细胞外的, 钙离子结合结构域。存在许多不同的钙粘蛋白同种型 (isoform) 或亚型 (subtype), 且以组织特异性方式分布于多种生物体内。使用表示通常与它相关的组织的前缀命名不同的钙粘蛋白同

种型或亚型。例如, N- 钙粘蛋白表示神经起源, E- 钙粘蛋白, 表皮细胞, 和 P- 钙粘蛋白, 胎盘。已经观察到, 在细胞培养和在发育期间, 表达特定的钙粘蛋白亚型的细胞趋向于聚集在一起以排除其他类型, 意味着, 例如, 在它们的表面上表达 N- 钙粘蛋白的细胞趋向于与其他表达 N- 钙粘蛋白的细胞聚集。也已经发现, 钙粘蛋白表达引起涉及细胞到层的位置隔离的形态学变化, 表明钙粘蛋白在形态发生、组织发生和再生期间的不同的细胞类型的分类中是重要的。它们也涉及紧密连接和间隙连接的调节, 和细胞间间隔的控制。

[0009] 结构上, 钙粘蛋白超家族的成员包括许多结构域: 信号序列; 约 130 个残基的前肽; 单一跨膜结构域; 含有钙粘蛋白重复基序的至少一个胞外结构域; 和 N- 末端胞质结构域。经典的钙粘蛋白蛋白质具有包含五个衔接重复的细胞外钙粘蛋白结构域的胞外域, 其中四个是钙粘蛋白重复, 并且第五个含有四个保守的半胱氨酸。“钙粘蛋白重复”是约 110 个氨基酸残基的独立地折叠肽, 其含有具有保守的序列 DRE, DXNDNAPXF (SEQ ID NO:1) 和 DXD 的基序。结晶的细胞外钙粘蛋白结构域的研究显示, 多个钙粘蛋白结构域在结构域-结构域界面上形成具有保守的钙结合口袋的 Ca^{2+} 依赖的杆状结构。钙粘蛋白依赖于行驶职责的钙, 因为钙离子在每一个钙粘蛋白重复中结合至特异性残基上, 以确保适当的折叠、在胞外域上赋予硬度和阻止蛋白酶消化。

[0010] 钙粘蛋白蛋白质是体内细胞之间的“粘附连接 (adherens junction)” (也称为“中间连接”或“带状桥粒 (belt desmosomes)”) 的主要的细胞外成分。粘附连接是表皮组织中的细胞-细胞连接处出现的蛋白复合体, 且被限定为具有连接至肌动蛋白细胞骨架的细胞质面的细胞连接。粘附连接通常比“紧密连接”更基础。它们可表现为环绕细胞的带 (“粘着小带 (zonula adherens)”) 或表现为附着至细胞外基质的点 (“粘着斑块”)。在粘附连接处, 钙粘蛋白蛋白质的细胞内部分与连环蛋白或黏着斑蛋白亚基相互作用, 肌动蛋白丝通过其突出。钙粘蛋白蛋白质的胞外域以钙依赖的方式与邻近细胞的钙粘蛋白蛋白质的胞外域形成同源二聚体。

[0011] 如同粘附连接, 间隙连接是细胞膜结构; 然而, 间隙连接促进直接的细胞-细胞通讯。间隙连接通道由两个连接小体 (连接子, connexon) 组成 (半通道), 每一个连接小体由六个连接蛋白亚基组成, 当半通道在“打开”时, 其允许邻近的细胞的细胞质之间的直接的联系, “闭合”结构时则相反。当形成间隙连接通道的连接小体是“打开”时, 分子 (例如, 离子, 信号分子, 等) 可从一个细胞移动到另一个细胞。每一个六聚连接小体与相对的膜中连接小体对接以形成单一间隙连接。据报道, 发现间隙连接通道遍及身体。组织如角膜表皮, 例如, 具有六至八个细胞层, 在不同的层中还表达不同的间隙连接通道, 其中在基础层中具有连接蛋白 43, 而从基础至中间翅细胞层具有连接蛋白 26。通常, 连接蛋白是蛋白质的家族, 通常根据它们的分子重量命名或以系统发生基础分成 α 、 β 和 γ 亚类。已经识别超过 20 个人类同种型。据报道, 不同的组织和细胞类型具有连接蛋白表达的特征模式, 并且显示组织在伤害或移植之后改变连接蛋白表达模式 (Qui, C. et al., (2003) Current Biology, 13:1967-1703)。

[0012] 已经建议了以多核苷酸为基础的治疗方法, 包括反义技术和 RNA 干扰 (RNAi) 用于调节病毒、真菌和代谢疾病中涉及的基因的表达。参考, 例如, 美国专利号 US 5, 166, 195 (HIV 的寡核苷酸抑制剂) 和美国专利号 US 5, 004, 810 (用于杂交至单纯性疱疹病毒 Vmw65mRNA 和抑制复制的寡聚物)。也参考美国专利号 US 7, 098, 190、US 7, 879, 811、

US 7,902,164 和 US 7,919,474(每一个标题为,“Formulations comprising antisense nucleotides to connexins”)。也报道了间隙连接和半通道的肽抑制剂。参考,例如,Berthoud,et al.,Am J.Physiol.Lung Cell Mol.Physiol.279:L619-L622(2000); Evans and Boitano,Biochem.Soc.Trans.29:606-612 和 De Vriese,et al.,Kidney Int.61:177-185(2001)。也参考 PCT/US06/04131(“Anti-connexin compounds and uses thereof”)、US PG 公开号 20110217313(“Treatment of Orthopedic Conditions”)、20110144182(“Treatment of Surgical Adhesions”),20110136890(“Treatment of Fibrotic Conditions”)、20110130710(“Treatment of Abnormal or Excessive Scars”)、20110065770(“Formulations comprising antisense nucleotides to connexins”)、20090220450(“Methods and compositions for wound healing”)和 20080249041、20080221051、20070078103、20070072820、20070072819、20070066555、20070060538 和 20070037765(每一个标题为,“Formulations comprising antisense nucleotides to connexins”)。

[0013] 尽管在创伤愈合过程中为基础的原理的理解存在一定的进步,但是在创伤护理的适当的治疗选项中仍然存在重要的未满足的需求,包括不能以预期速度治愈的创伤如延迟治愈的创伤、不完全地愈合的创伤和慢性创伤。此处描述和要求保护这样的治疗组合物和疗法。

发明内容

[0014] 此处描述和要求保护的发明具有很多属性和实施方式,包括但不限于,在发明内容中阐述或描述或引用的那些。不倾向于是详尽的,并且此处描述和要求保护的发明不限于或通过在这个主要内容中指定的特征或实施方式限制,包括其仅为了说明的目的而非限制的目的。

[0015] 本发明总体上涉及抗钙粘蛋白试剂的应用,优选地涉及抗钙粘蛋白多核苷酸种类,单独的或与一种或更多种在急性、延迟愈合和慢性创伤的治疗中有用的其他试剂组合。

[0016] 这样的其他试剂的实例包括抗连接蛋白试剂,例如,抗连接蛋白多核苷酸(例如,连接蛋白抑制剂如 α -1 连接蛋白寡脱氧核苷酸)、抗连接蛋白肽(例如,抗体和抗体结合片段)和模拟肽(例如, α -1 抗连接蛋白肽或模拟肽)、间隙连接闭合或阻断化合物、半通道闭合或阻断化合物和连接蛋白羧基末端多肽,例如,结合至 ZO-1 或 ZO-1 结合位点的多肽、抗 ZO-1 多核苷酸,以及抗骨桥蛋白试剂,具体地是抗骨桥蛋白多核苷酸。优选的组合包含抗 N-钙粘蛋白多核苷酸物质和抗连接蛋白多核苷酸物质(具体地,抗连接蛋白 43 多核苷酸种类)和/或靶向 ZO-1 表达的多核苷酸种类。

[0017] 描述和要求保护本发明的组合物和方法,其采用例如,用于急性、延迟愈合和慢性创伤的治疗的一种或更多种抗钙粘蛋白试剂种类。优选的组合物包括治疗上有用的组合物,具体地药理学上或兽医的组合物,其以有效地促进受试者中的治愈或组织修复的量包含治疗上可接受的量的一种或更多种抗钙粘蛋白试剂物质。在优选的实施方式中,这样的组合物以有效地下调或另外减少一种或更多种钙粘蛋白物质的表达或存在的量包含治疗上可接受的量的一种或更多种抗钙粘蛋白试剂物质;例如,伤害或创伤位点处和/或附近的一种或更多种钙粘蛋白物质。结果,可以起始和/或增强伤害或创伤的愈合,并且减少炎症

和 / 或疤痕形成。

[0018] 优选的抗钙粘蛋白试剂是抗钙粘蛋白多核苷酸。在一个实施方式中, 抗钙粘蛋白多核苷酸是抗 N- 钙粘蛋白寡脱氧核苷酸 (ODN)。优选的肽或模拟肽是抗钙粘蛋白肽或模拟肽, 例如, 钙粘蛋白复合体阻断肽 (例如, 抗钙粘蛋白抗体和抗体结合片段) 或模拟肽 (例如, 针对钙粘蛋白的一个或更多区域的模拟肽)。优选的钙粘蛋白复合体阻断化合物是钙粘蛋白细胞外多肽。模拟肽可以给予其本身, 或复合至一种或更多种其他试剂例如穿膜肽 (antennapedia) 以促进膜运输。

[0019] 本发明的组合物包含, 例如, 局部或吸入的递送形式和制剂。这样的递送形式和制剂包含用于受试者的治疗的那些, 如此处描述的。

[0020] 也以组合制剂的形式提供药学组合物, 例如, 作为一种或更多种不同的抗钙粘蛋白试剂物质的混合物、单独和结合不是抗钙粘蛋白试剂的一种或更多种治疗试剂物质, 例如, 一种或更多种抗连接蛋白或抗骨桥蛋白试剂, 包含抗连接蛋白和抗骨桥蛋白多核苷酸、肽和 / 或模拟肽物质。

[0021] 术语“组合制剂”包括“部分的试剂盒”, 就这个意义而言, 可单独地或通过使用与不同量的两种或更多种试剂物质的不同的固定组合, 即, 同时地、单独地或顺序地定量给予 (dose) 此处限定的组合伴侣。然后, 例如, 可同时地或按时间顺序交错 (chronologically staggered) 给予试剂盒的部分, 即, 在不同的时间点、以相同的或不同的时间间隔和 / 或对于部分的试剂盒的任何部分以相同的或不同数量的剂量 (dosing)。

[0022] 在某些实施方式中, 给予组合制剂, 其中将两种或更多种单独的组合物给予受试者, 其中第一组合物包含治疗有效量的抗钙粘蛋白试剂而第二组合物包含治疗有效量的抗连接蛋白多核苷酸、肽或模拟肽。在其他实施方式中, 给予第三组合物, 包含一种或更多种抗骨桥蛋白多核苷酸、肽或模拟肽。

[0023] 提供用于组合的、同时的、单独顺序的或持续的给予的药学组合物。在某些实施方式中, 与一种或更多种抗连接蛋白试剂和 / 或抗骨桥蛋白试剂同时或约同时给予包含一种或更多种抗钙粘蛋白试剂的组合物。在一个实施方式中, 在一种或更多种抗连接蛋白试剂和 / 或抗骨桥蛋白试剂的至少约三十、六十、九十或一百二十分钟, 或约 3、4、5、6、8、12、24、48 或 168 小时内给予包含一种或更多种抗钙粘蛋白试剂的组合物。

[0024] 在一个方面中, 本发明包括药学组合物, 包括局部的、全身的和吸入递送形式和制剂, 包含药学上可接受的载体和治疗有效量的抗钙粘蛋白试剂物质, 单独的或与不同的抗钙粘蛋白试剂物质和 / 或一种或更多种其他治疗试剂物质组合, 例如, 第一抗连接蛋白试剂物质、第二抗连接蛋白试剂物质、第一抗骨桥蛋白试剂物质和 / 或第二抗骨桥蛋白试剂物质。例如, 这样的组合物对创伤愈合是有用的。

[0025] 抗钙粘蛋白试剂的实例是抗钙粘蛋白多核苷酸, 包括下面描述的抗钙粘蛋白反义寡脱氧核苷酸 (“ODN”)。抗钙粘蛋白多核苷酸的实例包括抗钙粘蛋白寡脱氧核苷酸, 包括反义 (包含修饰的和未修饰的骨架反义)、RNAi 以及 miRNA 和 siRNA。适当的抗钙粘蛋白肽包括结合钙粘蛋白细胞外结构域的肽, 例如, 或钙粘蛋白细胞内结构域。适当的抗钙粘蛋白试剂包括, 例如, 反义 ODN、肽和抗以下各项的模拟肽: N- 钙粘蛋白、E- 钙粘蛋白、P- 钙粘蛋白、钙粘蛋白 11、钙粘蛋白 12、原钙粘蛋白蛋白质、桥粒芯蛋白蛋白质和桥粒胶蛋白蛋白质。包括的肽或模拟肽是抗钙粘蛋白肽或模拟肽, 例如, 钙粘蛋白复合体阻断肽 (例如, 抗

钙粘蛋白抗体和抗体结合片段)或模拟肽(例如,针对钙粘蛋白的一个或更多细胞外或细胞内区域的模拟肽)。可将模拟肽复合至一种或更多种其他试剂上,例如,穿膜肽,以促进用于结合至细胞内钙粘蛋白区域和结构域的膜运输。

[0026] 本发明提供通过使用至少一种抗钙粘蛋白试剂物质,单独的或与同时地、单独或顺序地给予的一种或更多种治疗剂物质组合,在创伤愈合的速度、程度和/或质量方面的增加。

[0027] 本发明提供通过使用至少一种抗钙粘蛋白试剂物质,单独的或与同时地、单独或顺序地给予的一种或更多种治疗剂物质组合,在炎症方面的减少。

[0028] 本发明提供通过使用至少一种抗钙粘蛋白试剂物质,单独的或与同时地、单独或顺序地给予的一种或更多种治疗剂物质组合,在疤痕形成方面的减少和/或在疤痕的质量方面的增加。

[0029] 在某些实施方式中,抗钙粘蛋白试剂与一种或更多种其他治疗剂,例如,一种或更多种抗连接蛋白多核苷酸、肽或模拟肽和/或一种或更多种抗骨桥蛋白多核苷酸、肽或模拟肽组合的组合应用,在促进期望的治疗结果(例如,创伤愈合和用于减少炎症和疤痕形成)方面具有累加的(additive)、协同的或超累加的效果。在一些这些优选的实施方式中,作为这样的组合应用的结果,组合制剂的给予将具有较少的给予时间点和/或在给予之间增加的时间间隔。在其他这样的优选的实施方式中,组合应用允许减少的给予频率。在其他优选的实施方式中,与当单独给予试剂时可以是有效的一个或更多个剂量相比,组合应用允许使用这样的试剂的减少的剂量。

[0030] 在另一个方面中,本发明包括用于单独的或与一种或更多种治疗性抗连接蛋白试剂组合给予治疗有效量的抗钙粘蛋白试剂的方法。在某些实施方式中,例如,以延迟释放制剂、缓慢释放制剂、缓释制剂、控释制剂和/或适于给予至具有创伤的受试者的重复作用制剂配制组合物,创伤包括慢性创伤和特征是完全地或部分地缓慢的、延迟的或不完全的创伤愈合的创伤。慢性创伤包含糖尿病性溃疡(例如,糖尿病足部溃疡)、静脉性溃疡、静脉郁血溃疡、压力溃疡、褥疮性溃疡、脉管炎溃疡、动脉性溃疡、传染性溃疡、烧伤溃疡、外伤诱导的溃疡、炎症性溃疡和与坏疽性脓皮病相关的溃疡。慢性创伤也包括眼部溃疡,包括持久性表皮缺陷。在某些实施方式中,受试者是糖尿病患者;在其他实施方式中,受试者具有心血管疾病或病况,例如,静脉高血压、静脉功能不全和/或动脉功能不全。

[0031] 在某些其他方面中,本发明涉及使用本发明的化合物和组合物治疗遭受或处于创伤相关的多种疾病、病症和病况(diseases, disorders, and condition)的受试者,包括急性创伤和不能以预期速度治愈的创伤,包括延迟愈合和慢性创伤。用本发明的一种或更多种药学组合物,例如,一种或更多种抗钙粘蛋白试剂治疗受试者,例如,对于创伤,可以包括它们的的同时的、单独的、顺序的或持久的给予。

[0032] 在又一个方面中,本发明包括用于治疗具有或怀疑具有或易受,或处于完全的或部分地特征是需要修复的创伤或组织的任何疾病、病症和/或病况的受试者的方法。这样的组合物包括,例如,局部和吸入的递送形式和制剂。

[0033] 在另一个方面中,本发明提供治疗的方法,包括给予受试者本发明的用于在创伤的治疗中使用的药学组合物,创伤包括,例如,急性的,以及不能以预期速度治愈的创伤,包括延迟愈合和慢性创伤。

[0034] 在另一个方面中,本发明提供治疗的方法,包括给予需要它的受试者组合物,组合物包含治疗有效量的抗钙粘蛋白试剂,单独的或与一种或更多种抗连接蛋白和/或抗骨桥蛋白试剂组合。在外科手术之前的预处理也在本发明的范畴内。这将减少切开、切除或修正的点处的局部损伤,例如,用于愈合的初始细胞(主要细胞,prime cell)。

[0035] 在又一个方面中,本发明提供治疗的方法,包括给予需要它的受试者第一组合物和至少一种其他治疗组合物(例如,第二组合物、第二和第三组合物,等)。在这个方面的实施方式中,“第一”组合物包含治疗有效量的抗钙粘蛋白试剂,尽管这不意味着暗示在其他治疗组合物之前、更频繁地或经由不同于其他治疗组合物的途径给予这样的组合物。换句话说,在这些实施方式的一些中,首先给予第一组合物,然而在其他中,首先给予第二组合物。在涉及给予三种不同治疗组合物的实施方式中,这样的方法可以包括根据相同的或不同的剂量或给予方案同时给予每一种组合物。

[0036] 在进一步的方面中,本发明提供用于改善或减少需要它的受试者的疤痕形成、用于改善或减少受试者的纤维化和用于改善或减少受试者的粘附形成的方法,包括给予所述受试者治疗有效量的包含抗钙粘蛋白试剂的药理学组合物,单独或与一种或更多种其他治疗剂结合。

[0037] 组合治疗的优选的方法包括单独或与一种或更多种其他治疗剂物质组合、顺序或同时给予一种或更多种抗钙粘蛋白试剂,在身体上或在要改善的创伤或其他病症的治疗的过程中,与当单独给予一种或更多种试剂时(即,当没有组合给予它们时)所使用的那些相比,以较少的量或剂量提供这些试剂中的一些或所有。典型地,给予的试剂的这样的较少的量是当单独给予时的量的约一半、三分之一、四分之一、五分之一、六分之一、八分之一、十分之一或约二十分之一。

[0038] 在进一步的方面中,本发明包含透皮贴剂、敷料剂(dressing)、衬垫(pad)、缠料(wrap)、基质和能够粘附或另外与受试者的皮肤相关的绷带,所述物品能够将治疗有效量的抗钙粘蛋白试剂(单独或与一种或更多种治疗剂组合)递送至受试者。

[0039] 在另一个方面中,本发明包括制造的物品,包括含有治疗有效量的一种或更多种抗钙粘蛋白试剂(单独或与一种或更多种其他治疗剂组合)的容器,和使用说明,包括用于受试者的治疗的应用。

[0040] 本发明包含制造的物品,包括含有一种或更多种剂型的包装材料,其中剂型包含一种或更多种抗钙粘蛋白试剂,单独或连同含有一种或更多种其他治疗剂的剂型,其中包装材料具有指示剂型可以用于具有或怀疑具有或易受此处描述的或引用的任何疾病、病症和/或病况的受试者的标签,包括全部或部分特征是急性、受损的、延迟的或慢性创伤愈合、疤痕形成、纤维化或粘连的疾病、病症和/或病况。这样的剂型包括,例如,局部递送形式和制剂、粉末递送形式和制剂、适于注射或灌注的递送形式和制剂(包括在给予之前必须使用适当的稀释剂重构的干燥或粉末状组合物)和适于滴注的递送形式和制剂。适当的制剂递送适于实现期望的治疗效果的量的治疗剂。优选的局部制剂包括泡沫剂、喷雾剂和凝胶剂。优选的凝胶剂是以聚乙二醇-聚丙二醇共聚物为基础的凝胶剂和以羧甲基纤维素为基础的以及相关的纤维素凝胶,其中特别优选普朗尼克凝胶。

[0041] 本发明也包括治疗有效量的本发明的组合物在药物的制造中的应用的的方法,包括,例如,局部递送形式和制剂。这样的药物包括用于此处描述的受试者的治疗的那些。

[0042] 在另一个方面中,本发明提供一种或更多种抗钙粘蛋白试剂在药学产品的制造中的应用,所述药学产品用于促进需要它的患者中的创伤愈合、改善的和 / 或减少的疤痕形成、改善的和 / 或减少的炎症、减少的纤维化或减少的粘附形成。在这些实施方式的一些中,产品包括创伤敷料剂或创伤愈合促进基质。优选地,以具有包含分散在固体基质上或分散于其中的抗钙粘蛋白试剂的组合物的固体基质的形式提供创伤敷料剂或基质。

[0043] 在还有的另一个实施方式中,本发明提供本发明的化合物和组合物连同 (in conjunction with) 结缔组织生长因子 (CTGF) 抑制剂例如 CTGF 反义化合物的应用。在另一个实施方式中,本发明提供本发明的化合物和组合物连同 PDGF 受体抑制剂以例如治疗创伤和 / 或减少粘附和疤痕形成的应用。PDGF 受体抑制剂包括,例如,受体阻断剂、受体拮抗剂。CTGF 和 PDGF 受体抑制剂也包括单克隆抗体、多克隆抗体、抗体片段 (包括,例如, Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段); 单链抗体; 单链 Fv; 和单链结合分子如包括以下那些: 例如, 结合结构域、铰链、CH2 和 CH3 结构域、重组抗体和能够结合抗原决定簇 (例如, 表位) 的抗体片段, 其中抗原决定簇与特定的抗体或其他结合分子、包括针对 CTGF 或 PDGF 受体的抗体和抗体结合片段接触。

[0044] 在还有的另一个实施方式中,本发明提供本发明的化合物和组合物连同人造皮肤产品的敷贴 (应用, application) 的应用, 人造皮肤产品包括, 例如, Dermagraft[®] (由人类纤维母细胞、细胞外周围物质和生物可吸收的框架组成的单层冷冻保存的真皮代替品)、Apligraf[®] (活的, 双层皮肤构造, 在牛科动物 1 型胶原网络中, 具有由人类角质细胞组成的表皮层和由人类纤维母细胞组成的真皮层)、Integra[®] (用于皮肤替换的双层膜系统, 包括由牛科动物腱胶原和粘多糖 (软骨素 -6- 硫酸盐) 的纤维的多孔模板构成的真皮替代层和由薄的硅树脂构成以控制水分损失的表皮代替层)、AlloDerm[®] (非细胞真皮基质)、Cyzact[™] (经由纤维蛋白递送的人类真皮纤维母细胞)、ICX-SKN (再造以产生胶原蛋白基质的纤维母细胞和纤维蛋白基质的组合)、Keragraft[™] (作为自体表皮等价物开发用于创伤护理的人类干细胞来源的产物)、OASIS[®] 创伤基质 (形成于猪来源的非细胞小肠粘膜下层的生物学上来源的细胞外基质类的创伤产品)、OrCel[™] (两层细胞模板, 其中在两个分离的层中将人类表皮角质细胞和真皮纤维母细胞培养到牛科动物胶原海绵上)、TransCyte[®] (由聚合物膜和新生儿人类纤维母细胞组成的人类纤维原细胞来源的临时皮肤代用品), 等。本发明的化合物和组合物也与其他敷料剂的应用结合用于促进创伤愈合, 包括例如, BioBrane。本发明的化合物和组合物也可以与其他类型的支架或敷料剂的应用结合用于促进创伤愈合, 包括, 例如, 由 HealthPoint 开发的细胞上喷雾 (称为 HP802-247 的细胞治疗喷雾悬浮液, 其由两种成分组成, 即, 在治疗的时间上顺序地喷洒在创伤基础上: 纤维蛋白原溶液和含有生长停滞的、活的、同种异体表皮角质细胞和真皮纤维母细胞的混合物的细胞制剂) 和培养的同种异体角质细胞。

[0045] 本发明也涉及抗 ZO-1 试剂的应用, 抗 ZO-1 试剂包括肽和生理活性肽 (peptido), 优选抗 ZO-1 多核苷酸种类, 单独的或与在急性、延迟愈合和慢性创伤的治疗中有一种或更多种其他试剂组合。

[0046] 在另一个方面中,本发明涉及 (a) 抗连接蛋白试剂,优选地抗连接蛋白 43 试剂,和 / 或 (b) 抗钙粘蛋白试剂,优选地抗 N- 钙粘蛋白试剂,最优选地抗连接蛋白 43 和 / 或抗 N- 钙粘蛋白多核苷酸 (包含,例如,反义多核苷酸) 增加体内和体外的 Rac1 和 RhoA GTP 酶活性的应用。

[0047] 在另一个方面中,本发明涉及 (a) 抗连接蛋白试剂,优选地抗连接蛋白 43 试剂,和 / 或 (b) 抗钙粘蛋白试剂,优选地抗 N- 钙粘蛋白试剂,最优选地抗连接蛋白 43 和 / 或抗 N- 钙粘蛋白多核苷酸 (包含,例如,反义多核苷酸) 在体内和体外诱导细胞骨架改变和增加细胞内的板状伪足 (lamellipodial) 突出的应用。

[0048] 在另一个方面中,本发明涉及 (a) 抗连接蛋白试剂,优选地抗连接蛋白 43 试剂,和 / 或 (b) 抗钙粘蛋白试剂,优选地抗 N- 钙粘蛋白试剂,最优选地抗连接蛋白 43 和 / 或抗 N- 钙粘蛋白多核苷酸 (包含,例如,反义多核苷酸) 减少细胞粘附的应用。

[0049] 在另一个方面中,本发明涉及减少钙的试剂的应用,例如,用于在钙粘蛋白活性 (例如,N- 钙粘蛋白活性) 的减少中使用的减少细胞外钙的试剂,单独或与其他抗钙粘蛋白试剂结合。

[0050] 下面提供本发明的这些和其他方面,其不限于或不能通过这个主要内容限制。

附图说明

[0051] 专利或申请文件含有至少一个以彩色展示的附图。将经要求和必要的费用的支付,通过政府机关提供具有彩图的这个专利或专利申请出版物的副本。

[0052] 这个申请含有至少一个以彩色展示的附图。将经要求和必要的费用的支付提供具有彩图的这个申请的副本。下面提供附图的每一个的主要内容。

[0053] 图 1. 人类慢性 VLU 中的真皮 Cx43 极大上调。(A) 减少在健康志愿者的皮肤的腿钻取活组织检查之后 4 小时,在真皮创伤边缘处的 Cx43 表达水平。比例尺 = 25 μ m。蓝色信号是核的 Hoechst 染色和胶原束自发荧光。点状白线显示表皮和真皮之间的边界。(B) Cx43 水平随着来自伤害位点的渐进的距离而增加 (C)。值代表平均 $\pm$ SD ($n = 3$; ** $p < 0.01$)。 (D) 患者的小腿中慢性 VLU 的代表性的图,已经从其采取创伤边缘钻取活组织检查 - 白色点状圆圈。(E) 与相配的非受伤的样品相比,在慢性 VLU 中真皮 Cx43 表达水平显著地上调 ($n = 6$; *** $p < 0.005$)。 (F) 描述 VLU 对非受伤的皮肤的 Cx43 水平的图表。以平均值 $\pm$ SEM 表示值。比例尺 = 25 μ m。

[0054] 图 2. 在人类慢性 VLU 的真皮中 N- 钙粘蛋白和 ZO-1 的增加的表达。(A) 与相配的非受伤的对照相比,在慢性 VLU 的真皮中的 ZO-1 表达水平提高 ($n = 6$)。比例尺 = 25 μ m。示出对于 ZO-1 (绿色) 和 Hoechst (蓝色) 染色的 VLU 和完整的皮肤 (加框区域 1 和 2) 的更高的放大倍率。比例尺 = 10 μ m。(B) 与相配的非受伤的样品相比,在慢性 VLU 中的 N- 钙粘蛋白显著地上调 ($n = 6$)。比例尺 = 25 μ m。加框区域 1 和 2 显示对于 N- 钙粘蛋白 (绿色) 和 Hoechst (蓝色) 染色的 VLU 和非受伤的皮肤样品的高的放大倍率。比例尺 = 10 μ m。值代表平均值 $\pm$ SD。(C 和 D) 图显示在 VLU 对非受伤的皮肤中的 ZO-1 和 N- 钙粘蛋白表达水平。以平均值 $\pm$ SD 表示对于 ZO-1 和 N- 钙粘蛋白的值;分别地, ** $p < 0.01$ 和 $p < 0.005$ 。

[0055] 图 3. 靶向 Cx43 减少纤维母细胞中的 N- 钙粘蛋白和 ZO-1 表达。在体内使用 Cx43sODN 或 Cx43asODN 处理的小鼠皮肤创伤中检查 (A) ZO-1 或 (B) N- 钙粘蛋白表达水平

($n = 6$)。在 Cx43 敲低之后的小鼠的真皮中发现 ZO-1 和 N-钙粘蛋白的下调。图表示平均值 $\pm$ SD; * $p < 0.05$ 和 ** $p < 0.01$ 。(C-D) 在 Cx43shRNA 和 p. Sup 转导的纤维母细胞中,通过蛋白质印记分析 ZO-1 和 Cx43 水平。包含作为上样对照的微管蛋白。定量显示, Cx43 的敲低减少 ZO-1 的表达 (** $p < 0.005$; $n = 3$)。(E) 在受伤的 Cx43shRNA 或 p. Sup 转导的细胞中,通过共聚焦显微镜分析在前缘 (LE) 和内域 (IA) 中的 ZO-1 (红色) 和 Cx43 (绿色) 表达和分布 ($n = 4$)。也使用 Hoechst (蓝色) 对细胞复染色。比例尺 = $20 \mu\text{m}$ 。(F) 在靶向 Cx43 之后, N-钙粘蛋白表达水平显著地减少 (** $p < 0.01$; $n = 3$)。(G) 在汇合 3T3 单层细胞的擦伤受伤之后 3h, 在 p. Sup 和 Cx43shRNA 纤维母细胞中, 连同 F-肌动蛋白 (红色) 分析从膜 (箭头) 至细胞溶质隔室 (箭) 的 N-钙粘蛋白 (绿色) 再分布 ($n = 3$)。比例尺 = $20 \mu\text{m}$ 。

[0056] 图 4. Cx43 和 N-钙粘蛋白敲低加速纤维母细胞迁移的速度。(A 和 B) 分别地在 Mock (模拟、模拟品、模拟构建体) 或 N-cadshRNA 转导的细胞中, 和 ZO-1asODN 或正义处理的 (ZO-1sODN) 细胞中, 通过蛋白质印记评价 N-钙粘蛋白和 ZO-1 表达。值代表平均 $\pm$ SD ($n = 3$, ** $p < 0.005$; $n = 3$, * $p < 0.05$)。(C) 允许 Cx43shRNA 和 p. Sup 细胞, Mock 和 N-cadshRNA 细胞, 或使用 ZO-1sODN 和 ZO-1asODN 处理的纤维母细胞迁移到创伤内持续 3h。示出迁移记录的开始 (0h) 和在结束 (3h) 时的细胞的照片。(D) 图显示所有上述条件的迁移的速度。值代表平均值 $\pm$ SEM (** $p < 0.005$)。

[0057] 图 5. Cx43 和 N-钙粘蛋白有助于纤维母细胞中的细胞极化、粘附和增殖。(A-B) 对 Cx43shRNA 和 p. Sup, 和对 Mock 和 N-cadshRNA 细胞评估悬滴中悬浮液上的细胞-细胞粘附。为每一个条件确定从六个不同的悬滴选取的六个任意视场的细胞簇的面积。图代表落入每一个条件的三个大小范围的每一个细胞簇的平均数。比例尺 = $300 \mu\text{m}$ 。(C-D) 使 Cx43shRNA 和 p. Sup, 以及 Mock 和 N-cadshRNA 细胞受伤, 允许迁移 3h, 和然后固定和用抗 GM130 (红色) 和 Hoechst (蓝色) 免疫染色。比例尺 = $25 \mu\text{m}$ 。将具有位于面向创伤的 120° 弧内的高尔基体的细胞的百分比记录为阳性。在 $n = 3$ 独立实验中, 评价 66-106 之间的细胞。数据代表平均值 $\pm$ SEM (* $p < 0.05$)。显示示出使用 (E) p. Sup 和 Cx43shRNA, 和 (F) Mock 和 N-cadshRNA 构建体转导的纤维母细胞的细胞增殖的生长曲线。数据代表三个独立实验的平均值 $\pm$ SD, 一式二份进行。

[0058] 图 6. 靶向 Cx43 诱导前缘纤维母细胞中的细胞骨架改变。(A) 典型的图像显示, 在受伤之后 3h, 前缘 Cx43sODN 和 C43asODN 纤维母细胞中的 F-肌动蛋白 (红色) 和酪氨酸化微管蛋白 (绿色) 和乙酰化微管蛋白 (蓝色) (分别地 TyrTub 和 AcetTub) 的分布。也使用核标志物 Hoechst 复染色细胞。比例尺 = $20 \mu\text{m}$ 。(B) 图显示创伤边缘细胞的突出的长度。数据代表 $n = 3$ 实验中的从核至前缘的距离 (平均值 $\pm$ SEM) (** $p < 0.005$)。

[0059] 图 7. 调节 Cx43 水平影响纤维母细胞中的创伤边缘细胞骨架的体系结构。使用 (A) 对照 pGFP 构建体 (B) Cx43-DN, 或 (C) Cx43-WT 转染的前缘细胞的代表性的图像 (箭头), 对于 TyrTub、F-肌动蛋白和 Hoechst 染色。比例尺 = $20 \mu\text{m}$ 。(D) 显示描述使用不同的构建体转染的纤维母细胞的板状伪足突出的长度的图 (* $p < 0.01$; ** $p < 0.005$; $n = 3$)。

[0060] 图 8. Cx43 和 N-钙粘蛋白敲低增加纤维母细胞中的 Rac1 和 RhoA GTP 酶 (GTPase) 活性。(A) 通过使用 PAK (Rac1 和 Cdc42) 的 PBD 结构域, 或 Rhotekin (RhoA) 的 RBD 结构域的下拉实验 (pull-down assay), 之后是使用各自的抗体的免疫印迹法测量受伤的纤维母细胞中的 Rho GTP 酶 (GTP) 活性。另外, 将来自总裂解物的 Rac1、Cdc42 和 RhoA 用作上样对

照。(B)图显示活性 Rac1 和 RhoA GTP 酶活性 (GTP 水平 / 总水平 ; 平均值 $\pm$ SEM, * $p < 0.05$) ; $n = 3$ 独立实验。前缘 Cx43shRNA 和 p. Sup 转导的细胞的代表性的图像显示在汇合的单层细胞的受伤之后 3h 的 (C) Rac1, 和 (D) RhoA GTP 酶活性。比例尺 = 10 μ m。箭头指示迁移的方向。(E) FRET 效率分析显示在 Cx43shRNA 对 p. Sup 转导的细胞中的 Rac1 和 RhoA 活性的两倍增加, 而对于 Cdc42 没有观察到区别。数据是每个条件 $n = 3$ 实验的代表 ; * $p < 0.05$ 。

[0061] 图 9. 在受伤之后的纤维母细胞中 Cx43 下调。(A) 在切除受伤之后 2d, 通过免疫组织化学检验小鼠的皮肤真皮中的 Cx43 的表达和分布。在这样的受伤之后在真皮纤维母细胞中的创伤边缘 Cx43 减少。箭头显示 Cx43 如何随着从创伤边缘的增加的距离变得更普遍。比例尺 = 25 μ m。沿着创伤位点定量 Cx43 水平, 并且在创伤边缘显著地降低 ; $p < 0.005$ 。以平均值 $\pm$ SD 表达值。(B) 在体内使用 Cx43sODN 或 Cx43asODN 处理的小鼠皮肤创伤中检查 ZO-1 (绿色) 和 Cx43 (红色) ($n = 6$)。也使用 Hoechst (蓝色) 复染色细胞。在使用 Cx43asODN 处理的小鼠的真皮中发现 ZO-1 的明显下调。比例尺 = 100 μ m。(C) 使用 Cx43asODN 或对照 Cx43sODN 处理的切除的创伤用于通过免疫组织化学评价 N- 钙粘蛋白的分布 (绿色)。比例尺 = 100 μ m。

[0062] 图 10. 敲低 Cx43 诱导细胞骨架改变。(A) 在 Cx43asODN 或 LiCl 处理的 3T3 纤维母细胞, 以及在未处理的或正义处理的 (Cx43-sODN) 对照中评价 (A) Cx43 表达水平和 (B) 细胞 - 细胞通讯。以平均值 $\pm$ SD 表示值 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 和 *** $p < 0.005$; $n = 4$)。(C) 使用 Cx43sODN、Cx43asODN 或 LiCl 处理的汇合的单层细胞受伤并允许其迁移 3 小时。显示迁移记录的开始 (0 小时) 和结束 (3 小时) 的细胞的图像。比例尺 = 25 μ m。(D) 图像显示迁移的速度, 其与染料耦合和 Cx43 表达反比例相关。值代表平均值 $\pm$ SEM (* $p < 0.01$; *** $p < 0.05$; $n = 6$)。(E) 允许用 Cx43-DN、Cx43-WT 或 pGFP 构建体 ($n = 3$) 转染的细胞, 以及 Cx43shRNA 或 p. Sup- 感染的细胞 ($n = 6$) 迁移到创伤持续 3 小时。在迁移记录的开始 (0 小时 ; 箭指向 Cx43-DN、Cx43-WT 或 pGFP- 转染的细胞) 和 3 小时后 (箭头指向 Cx43-DN、Cx43-WT 或 pGFP) 获取图像。Cx43shRNA 和 Cx43-DN 细胞加速迁移, 而 Cx43-WT 放慢迁移。比例尺 = 25 μ m。(F) 图显示每一个处理的迁移的速度, 并证实相对于分析的其他条件, Cx43 的沉默或用 Cx43-DN 转染诱导迁移的速度的显著增加。以平均值 $\pm$ SD 表示数据 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; $n = 4$)。(G) 在 Cx43shRNA 或 p. Sup- 感染的 3T3 纤维母细胞中评价 LY 显微注射之后的 Cx43 水平和染料耦合。Cx43shRNA 有效地下调 Cx43 并消除与相邻细胞的通讯。值代表 Cx43 水平的平均值 $\pm$ SEM, 以及对于细胞耦合的平均值 $\pm$ SD (*** $p < 0.005$; $n = 4$)。(J) 使 Cx43shRNA 和 p. Sup 细胞在血清的存在 (FBS) 或缺少 (SS) 下生长并允许迁移到创伤持续 4h。图显示迁移的速度 ; 值代表 $n = 3$ 独立实验的平均值 $\pm$ SEM (*** $p < 0.005$)。

[0063] 图 11. 靶向 Cx43 之后的 α - 和 β - 连环蛋白表达和分布的分析。(A 和 C) 在汇合的 3T3 单层的创伤擦伤之后 3h, 分析 p. Sup 和 Cx43shRNA 感染的纤维母细胞中的 α - 和 β - 连环蛋白的蛋白质分布。(A) 中的箭指示在 Cx43shRNA 感染的细胞中的 β - 连环蛋白从细胞质膜至细胞溶质的细胞质再定位。单箭头指示 Cx43shRNA 感染的纤维母细胞中的 β - 连环蛋白的假定的核定位的位点。比例尺 = 25 μ m。(B 和 D) 也通过蛋白质印记评价这些蛋白质的表达水平并关于肌动蛋白或微管蛋白 (Tub) 将值归一化。

[0064] 图 12. 敲低 Cx43 诱导细胞骨架改变。在使 Cx43shRNA 和 p. Sup 转导的纤维母细胞的汇合的单层细胞受伤之后 3h 研究 TyrTub、AcetTub 和 F- 肌动蛋白的分布。比例尺

= 25 μ m。图显示创伤边缘细胞的突出的长度,并且数据代表从核至前缘的距离(平均值 $\pm$ SEM ;n = 3 实验 ;***P<0.005)。

[0065] 图 13. 敲低 N- 钙粘蛋白增加板状伪足突出。(A) 在使 Cx43shRNA 和 p. Sup 转导的纤维母细胞的汇合单层受伤之后 3h 研究 F- 肌动蛋白的分布。靶向 N- 钙粘蛋白诱导创伤边缘细胞中的细胞骨架改变。比例尺 = 25 μ m。(B) 图显示对照 (Mock) 和 NcadshRNA 创伤边缘细胞的突出的长度。数据代表从核至前缘的距离(平均值 $\pm$ SEM ;n = 3 实验 ;***P<0.005)。

具体实施方式

[0066] 如此处使用的,“病症”是将得益于引发、加速、促进或增强创伤愈合(包括急性创伤、裂开的创伤和缓慢愈合的延迟愈合和慢性创伤)、减少炎症、减少或减轻疤痕形成、改善疤痕质量),减少纤维化和 / 或减少粘附的试剂的任何病症、疾病或病况。例如,疾病、病症和病况包括急性创伤。疾病、病症和病况也包括裂开的创伤和缓慢愈合的延迟愈合和慢性创伤。也包括特征是纤维物质的过量产生的疾病、病症和病况,包括细胞外基质内的纤维物质的过量产生。也包括特征是通过基质相关的组分的异常的、非功能的和 / 或过度的积聚对正常的组织要素的取代的疾病、病症和病况。也包括特征是粘附形成的疾病、病症和病况。也包括将得益于促进创伤愈合和 / 或减少肿胀、炎症和 / 或疤痕形成(包括异常的和过度的疤痕形成,包含瘢痕(keloid)疤痕、增生性疤痕、广泛分布的(伸展的)疤痕和萎缩性(凹陷性(depressed))疤痕)的任何病症、疾病或病况。例如,包含起因于外科手术或外伤的创伤、不能以预期速度治愈的创伤(如延迟愈合创伤、不完全地愈合创伤、慢性创伤和裂开性创伤)和与神经病的、缺血性的、微血管病理学、超过骨面积的压力(尾椎骨(骶骨的)、臀部(hip)(股骨)、半边臀部(buttock)(坐骨)或脚的后跟)、再灌注伤害和瓣膜逆流病理学和病况相关的异常相关的创伤。也包括特征是不期望的 ZO-1 蛋白质或 ZO-1 蛋白质活性或将得益于减少的 ZO-1 蛋白质或 ZO-1 蛋白质活性的疾病、病症和病况。也包括特征是不期望的减少的 Rac1 或 Rac1 活性或将得益于增加的 Rac1 或 Rac1 活性的疾病、病症和病况。也包括特征是不期望的减少的 RhoA GTP 酶或 RhoA GTP 酶活性或将得益于增加的 RhoA GTP 酶或 RhoA GTP 酶活性的疾病、病症和病况。也包括特征是将得益于增强的细胞迁移、减少的细胞粘附、如此处描述的细胞细胞骨架改变和 / 或如此处描述的增加的细胞的板状伪足突出的疾病、病症和病况。

[0067] 如此处使用的,“受试者”指的是任何哺乳动物,包括人类、驯养动物和农场动物以及动物园动物、运动场动物和宠物动物,如狗、马、猫、羊、猪、牛等。此处优选的哺乳动物是人类,包括成人、儿童和老年人。受试者也可以是鸟,包括动物园鸟、运动场鸟和宠物鸟。优选的运动场动物是马和狗。优选的宠物动物是狗和猫。

[0068] 如此处使用的,“预防”意味着全部或部分地预防、或减轻或控制、或减少或停止要阻止的事物或事件的产生或发生。

[0069] 如此处使用的,提到本发明的化合物或组合物的“治疗上有效的量”或“有效的量”指的是,足够诱导期望的生物学、药学或治疗结果的量。那个结果可以是疾病或病症或病况的标志、症状或原因的减轻,或生物系统的任何其他期望的改变。在本发明中,结果将包括预防纤维化。在本发明的另一个方面中,结果将包括粘附的预防和 / 或减少。在本发明的另一个方面中,结果将包含预防和 / 或减少疤痕形成和异常的疤痕形成,以及预防和 / 或减

少过度的疤痕形成和组织的其他类型的异常的增殖,包括瘢痕疤痕、增生性疤痕、广泛分布的疤痕和萎缩性疤痕。

[0070] 根据进一步的方面,结果将包含创伤愈合的促进和 / 或改善和创伤的闭合,全部或部分地,包括愈合速度的改善。其他益处全部或部分地包括肿胀、炎症和 / 或疤痕形成的减少。还有的其他益处包括减少的 ZO-1 蛋白质或 ZO-1 蛋白质活性、增加的 Rac1 或 Rac1 活性、增加的 RhoA GTP 酶或 RhoA GTP 酶活性或将得益于增加的 RhoA GTP 酶或 RhoA GTP 酶活性的益处。也包含特征是不期望的减少的 RhoA GTP 酶或 RhoA GTP 酶活性的疾病、病症和病况。还有的其他益处是如此处描述的细胞的细胞骨架改变和如此处描述的增加的细胞的板状伪足突出。

[0071] 如此处使用的,术语“处理”和“治疗”指的是治疗性处理和预防性或防御性 (prophylactic or preventative) 措施。需要处理的那些包含已经具有病症的那些以及易于具有病症或诊断具有病症的那些或其中需要预防病症的那些。因此,举例来说,在纤维化或纤维组织的形成之前,给予的本发明的化合物和组合物和制剂的创伤愈合的促进、炎症的减少、细胞迁移的促进、细胞粘附的减少、抗纤维化应用在本发明内,如在粘连的形成之前给予的本发明的化合物和组合物和制剂的抗粘连应用,和在疤痕形成之前给予的本发明的化合物和组合物和制剂的抗疤痕形成应用,包括,例如,在疤痕减少外科手术或过程中。

[0072] 如此处使用的,“抗钙粘蛋白试剂”是影响或调解钙粘蛋白蛋白质的活性、表达或形成的化合物。抗钙粘蛋白试剂包括,但不限于,抗钙粘蛋白多核苷酸,其包括反义化合物 (例如,反义多核苷酸)、RNAi、miRNA 和 siRNA 化合物;抗体和它的抗原结合片段;和肽和多肽,其包括“模拟肽”和肽类似物。除了抗钙粘蛋白多核苷酸和抗钙粘蛋白肽、模拟肽或粘附连接修饰试剂之外,其他抗钙粘蛋白试剂包括粘附连接扰乱化合物 (例如,钙离子结合化合物) 和钙粘蛋白羧基末端多肽 (例如,其可阻断或扰乱相邻细胞之间的钙粘蛋白 - 钙粘蛋白蛋白质相互作用,因此扰乱粘附连接形成和 / 或维持)。优选的抗钙粘蛋白试剂是抗 N- 钙粘蛋白试剂。此处进一步详细地讨论示例性的抗钙粘蛋白试剂。

[0073] 术语“模拟肽”和“模拟的”包含自然地存在的和合成的化学化合物,其可具有与它们模拟的蛋白质区域基本上相同的结构和功能特征。在钙粘蛋白蛋白质的情况下,例如,这些可模拟涉及钙粘蛋白重复组合、粘附连接形成和维持和细胞 - 细胞粘附的钙粘蛋白蛋白质的细胞外区域中的钙粘蛋白 - 重复结构域的细胞外环。

[0074] “肽类似物”指的是,具有类似于模板肽的那些的性质的化合物,并且可以是非肽药物。“模拟肽” (也称为“拟肽”),其包括肽类化合物,也包括这样的非肽类的化合物如肽类似物。结构上与治疗上有用的肽相似的模拟肽可用于产生等价的或增强的治疗效果或预防效果。通常,模拟肽与实例多肽 (也就是,具有生物学或药理学功能或活性的多肽) 结构上相同或类似,但是也可以具有由选自以下组成的组的连接可选地取代的一个或更多肽键,例如, $-\text{CH}_2\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ (顺式和反式)、 $-\text{COCH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 和 $-\text{CH}_2\text{SO}-$ 。模拟的可能完全地由天然的氨基酸组成或由氨基酸的非天然的类似物组成,或是部分地天然的肽氨基酸的嵌合分子和氨基酸的部分地非天然的类似物。模拟的也可包含任何数量的天然的氨基酸保守替换,只要这样的替换同样实质上不改变模拟的活性。例如,模拟的组合物作为抗钙粘蛋白试剂可以是有用的,如果它能够下调钙粘蛋白蛋白质、钙粘蛋白复合体或粘附连接的生物作用或活性,如,例如,阻止相邻的细胞上的相对的

钙粘蛋白细胞外结构域的钙粘蛋白重复的头-对-头联合 (head-to-head association)、相同的细胞中的钙粘蛋白蛋白质的组合、细胞中的钙粘蛋白复合体的形成、钙粘蛋白复合体与肌动蛋白细胞骨架的联合和 / 或粘附连接形成。模拟肽、拟肽和钙粘蛋白调节肽,以及化合物,包括包含一种或更多种钙粘蛋白重复的钙粘蛋白细胞外结构域,包含此处描述或引用的那些,以及本领域已知的那些,无论是现在已知或稍后开发的。

[0075] 在它的变化形式中,如此处使用的术语钙粘蛋白活性的“调节剂”和“调节”指的是,钙粘蛋白蛋白质、钙粘蛋白复合体或粘附连接的表达或作用或活性的全部或部分的抑制,并且可起抗钙粘蛋白试剂的作用。

[0076] 通常,术语“蛋白质”指的是经由肽键连接的两个或更多个体氨基酸 (不论自然地存在的) 的任何聚合物,正如当结合至一个氨基酸 (或氨基酸残基) 的 α -碳的羧基基团的羧基碳原子与结合至相邻的氨基酸的 α -碳的氨基基团的氨基氮原子成为共价地结合时出现的那样。这些肽键,和包括它们的原子 (也就是, α -碳原子、羧基碳原子 (和它们的取代氧原子) 和氨基氮原子 (和它们的取代氢原子)) 的原子形成蛋白质的“多肽骨架”。另外,如此处使用的,术语“蛋白质”应该被理解为包括术语“多肽”和“肽” (有时,此处它们可交换地使用)。相似地,除非另外指出,蛋白质片段、类似物、衍生物和变体此处可称为“蛋白质”和应该被认为是“蛋白质”。术语蛋白质的“片段”指的是包括比蛋白质的所有的氨基酸残基少的多肽。蛋白质的“结构域”也是片段,并且包含经常需要赋予活性或功能的蛋白质的氨基酸残基。

[0077] 如此处使用的,“同时地 (simultaneously)”用于意味着,同时发生地 (concurrently) 给予本发明的一种或更多种试剂,然而术语“组合”用于意味着,给予它们,如果不同时地或物理组合,那么时间表内的“顺序地”意味着,它们都可用于在治疗上起作用。因此,“顺序地”给予可允许在其他之后,在数分钟内 (例如,1、2、3、4、5、10、15、20、25、30 分钟) 或约 (a matter of) 小时、天、周或月内给予一种试剂,条件是两者都以有效的量存在。将取决于成分的准确性质、它们之间的相互作用和它们各自的半衰期改变给予或成分的给予之间的时间延迟。

[0078] 术语“敷料剂”指的是用于局部应用至创伤的敷料和排除适合于全身给予的组合物。例如,可将一种或更多种抗钙粘蛋白试剂分散到创伤接触性物质的固体薄片 (如纺织或非纺织纺织物质) 内或分散于其上,或可将其分散在泡沫层中如聚氨酯泡沫,或分散在水凝胶中如聚氨酯水凝胶、聚丙烯酸酯水凝胶、明胶、羧甲基纤维素、果胶、藻酸盐和 / 或透明质酸水凝胶,例如,分散于凝胶或药膏中。在某些实施方式中,可将一种或更多种抗钙粘蛋白多核苷酸分散在可生物降解的薄片物质中或分散于其上,其将活性成分持续地释放到创伤中,例如,冷冻干燥的胶原、冷冻干燥的胶原 / 藻酸盐混合物 (以来自 Johnson&Johnson Medical Limited 的注册商标 FIBRACOL 下可获得的) 或冷冻干燥的胶原 / 氧化的再生纤维素 (以来自 Johnson&Johnson Medical Limited 的注册商标 PROMOGRAN 下可获得的) 的薄片。

[0079] 如此处使用的,“基质”包括,例如,基质如胶原、非细胞基质、交联的生物支架分子、组织类 (基于组织) 的基质 (包含猪类 (基于猪) 的创伤愈合基质)、培养的表皮自体移植物、培养的表皮同种异体移植物、组织工程的皮肤、灌输有自体纤维母细胞和角质细胞的胶原和粘多糖真皮基质、AlloDerm[®] (具有完整的基底膜复合体的无生命的同种异体的

非细胞真皮基质)、活的皮肤等价物(例如, Dermagraft[®](在可降解的支架上生长的活的同时种异体真皮纤维母细胞)、TransCyte[®](由同种异体人类真皮纤维母细胞产生的细胞外基质)、Apligraf[®](含有角质细胞、纤维母细胞和牛科动物 I 型胶原的活的、同种异体双层构建体)、Integra[®](用于皮肤替换的双层膜系统,包括由牛科动物腱胶原和粘多糖(软骨素-6-硫酸盐)的纤维的多孔模板构成的真皮替代层和由薄的硅树脂构成以控制水分损失的表皮代替层)、Cyzact[™](经由纤维蛋白递送的人类真皮纤维母细胞)、ICX-SKN(重塑以产生胶原蛋白基质的纤维母细胞和纤维蛋白基质的组合)、Keragraft[™](作为自体表皮等价物开发用于创伤护理的人类干细胞来源的产物)、OASIS[®]创伤基质(形成于猪来源的非细胞小肠粘膜下层的生物学上来源的细胞外基质类的创伤产品)和 OrCel[™](接种在牛科动物胶原的双层基质的相反面上的同种异体纤维母细胞和角质细胞)、BioBrane、培养的同种异体角质细胞、动物来源的敷料剂(例如, Oasis 的猪小肠粘膜下层非细胞胶原基质;和 E-Z Derm 的非细胞异种胶原蛋白基质),组织类的生物工程的结构骨架、支架、生物制造的生物假体和其他植入的或应用的结构如例如,适于在促进创伤愈合中有用的细胞渗透和增殖的血管移植物。也通过称为 HP802-247 的细胞治疗喷雾悬浮液提供基质,其是由 HealthPoint 开发的,其由两种成分组成,即,在治疗的时间上顺序地喷洒在创伤基础上:纤维蛋白原溶液和含有生长停滞的、活的、同种异体表皮角质细胞和真皮纤维母细胞的混合物的细胞制剂。

[0080] 另外的适当的生物基质物质可以包括化学修饰的成胶性(collagenous)组织以减少抗原性和免疫原性。其他适当的实例包含用于创伤敷料剂的胶原薄片,无抗原或抗原减少的非细胞基质(Wilson, et al., Trans Am Soc Artif Intern 1990 ;36:340-343),或设计以减少对异种移植物质的抗原响应的其他生物基质。在创伤愈合的促进中有用的其他基质可以包括,例如,包含不能溶解的胶原和弹性蛋白的加工过的牛科动物心包蛋白质(Courtman, et al., J Biomed Mater Res 1994 ;28:655-666)和可用于为宿主细胞迁移提供天然微环境以加速组织再生的其他非细胞组织(Malone, et al., J Vasc Surg 1984 ;1:181-91)。在某些实施方式中,可以用一种或更多种抗钙粘蛋白试剂、抗 ZO-1 试剂、抗连接蛋白 43 试剂和 / 或一种或更多种用于这样的试剂的位点特定的释放的治疗试剂补充基质物质。

[0081] 创伤和创伤分类

[0082] 慢性创伤、缓慢愈合的创伤和不完全愈合的创伤经常导致感染和可导致截肢或死亡。已经发现使用某些化合物,包括此处描述或引用的那些,可以阻断、抑制或改变细胞通讯,其可促进慢性、缓慢愈合和不完全愈合创伤的闭合和愈合。

[0083] “创伤”意味着对任何组织的伤害,包括,例如,急性、延迟、缓慢或难于治愈的创伤,以及慢性创伤。创伤的实例可以包括开放性和闭合性创伤。创伤包括,例如,烧伤、切口伤、切除伤、撕裂伤、擦伤、穿刺伤或穿透伤、外科手术创伤、挫伤、血肿、挤压伤和溃疡。也包括不能以预期速度治愈的创伤。

[0084] “不能以预期速度治愈的创伤”意味着不能在预期的或典型的时间范围内愈合的任何组织伤害,包括延迟的、缓慢或难于愈合的创伤(包括延迟的或不完全愈合的创伤)和

慢性创伤。不能以预期速度治愈的创伤的实例包括糖尿病溃疡、糖尿病足部溃疡、脉管炎溃疡、动脉性溃疡、静脉性溃疡、静脉郁血溃疡、压力溃疡（压疮）、褥疮、传染性溃疡、创伤诱导的溃疡、烧伤溃疡、与坏疽性脓皮病相关的溃疡和混合性溃疡。

[0085] 如此处描述的，延迟性或难于治愈创伤可以包括，例如，至少部分特征是以下中的一个或更多的创伤：1) 延长的炎症性阶段，2) 缓慢形成的细胞外基质，和 3) 表皮形成的停止或减少的速度。

[0086] 在本领域中，术语“慢性创伤”通常指的是在约三个月内不能治愈的创伤，但是可以是在约一或两个月内不能治愈的创伤。慢性皮肤创伤包括，例如，压力溃疡、糖尿病溃疡、静脉性溃疡、动脉性溃疡、炎症性溃疡和混合性溃疡。慢性创伤可以是可包括起因于完全的或部分的动脉堵塞的溃疡形成 (ulceration) 的动脉性溃疡。慢性创伤可以是静脉郁血溃疡，其可以包括起因于静脉瓣的功能失灵 (malfunction) 的溃疡形成和相关的血管疾病。慢性创伤可以是创伤诱导的溃疡。

[0087] 如此处使用的，慢性创伤也可以包括，例如，至少部分特征是以下的的创伤：1) 创伤炎症的慢性自我延续状态，2) 不足的和有缺陷的创伤细胞外基质 (ECM)，3) 差地响应的（衰老的）创伤细胞（例如，纤维母细胞），受限的 ECM 产生，和 4) 部分地由于必要的 ECM 编排 (orchestration) 的缺少和用于迁移的骨架的缺少的表皮再形成 (re-epithelialization) 的失败。

[0088] 慢性创伤的特征也可以是，例如，1) 延长的炎症和蛋白质水解活性，导致溃疡性损伤，包括，例如，糖尿病性、压力（褥疮）、静脉性和动脉性溃疡，2) 导致疤痕形成的创伤中的延长的纤维化，3) 感染的区域中的基质的渐进沉积，4) 较长的修复时间，5) 较少的创伤收缩，6) 较慢的表皮再形成，和 7) 增加的肉芽组织的厚度。

[0089] 示例性的慢性创伤也包括“压力溃疡”。典型的压力溃疡可以包括基于 AHCPR（卫生保健政策和研究的代理处，健康与人类服务的美国部门）指南的创伤分类的所有四个阶段，包括，例如，阶段 1。阶段 1 压力溃疡是完整的皮肤的可观察的压力相关的改变，与身体上的相邻的或相反的区域相比，它的指标可以包括以下中的一个或更多的改变：皮肤温度（温暖或冷）、组织相容性（紧实 (firm) 感或宽松间大的 (boggy) 感）和 / 或感觉（疼痛，发痒）。溃疡表现为轻着色的皮肤中的持久发红的限定区域，然而在较暗的肤色中，溃疡可表现具有持久的红色、蓝色或紫色色调。阶段 1 溃疡形成可以包括完整的不发白红斑和皮肤溃疡形成的先驱损害。在具有较暗的皮肤的个体中，皮肤的变色、温暖、水肿、硬化或硬度也可以是阶段 1 溃疡形成的指标。阶段 2：阶段 2 溃疡形成特征可以是涉及表皮、真皮或两者的局部厚度皮肤损失。溃疡是表面的并且临床上表现为擦伤、水泡或浅坑。阶段 3：阶段 3 溃疡形成的特征可以是涉及皮下组织损伤或坏死的完全厚度皮肤损失，其可向下延伸至，但是不通过，在下面的筋膜。溃疡临床上表现为具有或不具有相邻的组织的逐渐损害 (undermining) 的深坑。阶段 4：阶段 4 溃疡形成的特征可以是具有广泛的破坏、组织坏死或肌肉、骨或支撑结构的损害（例如，腱、关节囊，等）的完全厚度皮肤损失。

[0090] 示例性的慢性创伤也包括“褥疮”。示例性的褥疮可以作为导致局部缺血的骨突出处的延长的和未减轻的压力的结果而发生。创伤倾向于在不能改变他们自己的位置 (reposition themselves) 回到摆脱重量的患者中发生，如瘫痪的、无意识的或严重的虚弱的人。如由美国健康和人类服务部门限定的，主要的预防措施包括高危患者的识别；频繁评

估 ;和预防措施如定期改变位置、适当的减压寝具、防潮层和充足的营养状况。处理选项可以包括,例如,压力减低、外科手术和酶清创术、潮湿的创伤护理和细菌负载控制。本发明的某些实施方式包括处理特征是由导致局部缺血的骨突出处的延长的、未减轻的压力引起的褥疮或溃疡形成的慢性创伤。

[0091] 示例性的慢性创伤也包括“动脉性溃疡”。动脉性溃疡包括特征是完全的或局部的动脉堵塞的那些,其可以导致组织坏死和 / 或溃疡形成。动脉性溃疡的标志可以包括,例如,手足的脉搏消失 ;痛苦的溃疡形成 ;通常非常局限的小的、点状的溃疡 ;凉的或冷的皮肤 ;延迟的毛细血管返流时间 (短暂地推进脚趾的末端和释放,正常的颜色应该在约 3 秒或更少内返回到脚趾) ;萎缩性外观的皮肤 (例如,有光泽的 (shiny)、薄的、干燥的) ;和手指和脚毛发的损失。

[0092] 示例性的慢性创伤也包括“静脉性溃疡”。示例性的静脉性溃疡包括影响下肢的常见类型的溃疡并且特征可以是静脉瓣的功能失灵。正常的静脉具有阻止血液的回流的瓣膜。当这些瓣膜变得无力 (incompetent) 时,静脉血的回流引起静脉淤血 (venous congestion)。来自红细胞的血红蛋白逸出并渗入血管外空间,引起通常注意到的呈褐色变色点。已经显示,静脉性溃疡周围的皮肤的透皮氧压是降低的,表明存在阻碍区域的正常血供 (vascularity) 的压力。淋巴引流和流动也在这些溃疡中起作用。静脉性溃疡可在内踝附近出现并且通常伴随水肿和硬化的下肢发生 ;它可以是浅的,但是不太痛苦,并且可以与来自受感染位点的渗出液体流出而出现。

[0093] 示例性的慢性创伤也包括“静脉郁血溃疡”。示例性的静脉郁血溃疡的特征是导致局部低氧的下肢的慢性被动的静脉充血。这些创伤的发病机理的一个可能机制包括穿过厚的血管周纤维蛋白袖 (fibrin cuffs) 的氧扩散进入组织被阻止。另一个机制是渗漏进入至血管周组织的大分子捕获对于维持皮肤完整性所需要的生长因子。另外,由于静脉淤血,大白血球的流速减慢,闭塞毛细血管、变成激活的并破坏血管内皮,从而易于感染溃疡形成。

[0094] 示例性的慢性创伤进一步包括“糖尿病足部溃疡”。由于神经和血管并发症,具有典型的糖尿病足部溃疡的糖尿病患者易于足部溃疡。外周神经病变可引起足部和 / 或腿的感觉的改变或完全的损失。具有晚期的神经病变的糖尿病患者损失对锐 - 钝辨别 (sharp-dull discrimination) 的全部能力。在具有神经病变的患者中,可以在几天或几周内完全地忽视对足部的任何割伤或外伤。具有晚期神经病变的患者可以失去感觉持续的压力冒犯 (insult) 的能力,结果是,可以出现组织局部缺血和坏死,导致,例如,脚底溃疡。另外,如果未被注意和未经处理,足部的骨骼中的微骨折可以导致损形 (disfigurement)、慢性肿胀和另外的骨骼突出物。微脉管疾病是也可以导致溃疡形成的糖尿病的一种重大的并发症。

[0095] 示例性的慢性创伤也包括“外伤溃疡”。作为身体的外伤伤害的结果,可以发生示例性的创伤溃疡的形成。这些伤害包括,例如,对动脉、静脉或淋巴系统的连累 ;骨骼的骨骼体系结构的变化 ;组织层 - 表皮、真皮的损失、皮下软组织、肌肉或骨骼 ;身体部位或器官的损伤和身体部位或器官的损失。

[0096] 示例性的慢性创伤可以包括“烧伤溃疡”,包括,例如,由于烧伤而出现的溃疡形成,包括一度烧伤 (也就是,皮肤的表面的,变红的区域) ;二度烧伤 (起泡的伤害位点,在去除水泡流体之后,其可自发地愈合) ;三度烧伤 (烧蚀整个皮肤并通常需要外科手术用于

创伤愈合);烫伤(可发生于滚烫的热水、油脂或散热器流体);热灼伤(可发生于火焰,通常是深度烧伤);化学烧伤(可来自酸和碱,通常是深度烧伤);电烧伤(家庭附近的低电压或工作的高电压);爆炸闪光(通常是表面的伤害);和接触烧伤(通常是深度的和可发生于消音器尾部管道、烙铁和炉灶)。

[0097] 如此处使用的,延迟的或难于愈合创伤可以包括,例如,至少部分特征是以下的创伤:1) 延长的炎症性阶段,2) 缓慢形成的细胞外基质(ECM),和3) 降低的表皮形成速度。

[0098] 如此处使用的,“纤维化的”疾病、病症或病况包括此处提到的那些,并进一步包括急性和慢性的、临床的或亚临床的表现,其中,纤维发生相关的生物学或病理学是明显的。纤维化疾病、病症或病况包括全部或部分的特征是纤维物质的过度产生的疾病、病症或病况,包括细胞外基质内的纤维物质的过度产生,或由异常的、非功能的和/或过度的聚集基质相关的成分对正常的组织要素的取代。纤维化疾病、病症或病况包括,例如,特征是纤维化的纤维发生相关的生物学或病理学。

[0099] 示例性的纤维化疾病、病症和病况包括,例如,硬化病(包括硬斑病,广义的硬斑病,或线性硬皮病)、肾脏纤维化(包括肾小球硬化、肾小管间质纤维化、进行性肾疾病或糖尿病性肾病)、心肌纤维化(例如,心肌纤维化)、肺纤维化(例如,肾小球硬化症肺纤维化(glomerulosclerosis pulmonary fibrosis)、特发性肺纤维化、矽肺、石棉肺、间质性肺病、间质纤维肺疾病和化疗/辐射诱导的肺纤维化)、口腔纤维化、心内膜心肌纤维化、三角肌纤维化、胰腺炎、炎症性肠病、克罗恩氏病、结节状筋膜炎、嗜曙红筋膜炎、特征是由不同程度的纤维化组织代替正常肌肉组织的广泛性纤维化综合征(general fibrosis syndrome)、腹膜后纤维化、肝纤维化、肝硬化、慢性肾功能衰竭、骨骼纤维化(骨髓纤维化)、药物诱导的麦角中毒、李-佛美尼综合症中的恶性胶质瘤、分散的恶性胶质瘤、髓细胞白血病(myeloid leukemia)、急性骨髓性白血病、骨髓增生异常综合征、骨髓增殖综合征、妇科癌症、卡波济氏肉瘤、汉森氏病、成胶性结肠炎和急性纤维化。

[0100] 纤维化疾病、病症和病况也包括挛缩。挛缩,包括手术后的挛缩,指的是由于强直性痉挛或纤维化,或由于正常组织顺从性、移动或平衡的损失(例如,肌肉、腱、韧带、筋膜、滑膜、关节囊、其他结缔组织或脂肪)导致的活动范围的永久性 or 长期减少。通常,挛缩的病况可以包括具有炎症性组分的纤维化响应,急性和慢性二者。其中某些可以与外科手术相关,包括释放手术。也包括遗传性挛缩如迪皮特朗氏(Dupuytren's)挛缩、佩罗尼氏(Peyronie's)病和跖部纤维瘤病(Ledderhose's disease)。

[0101] 纤维化可以是慢性的或急性的。纤维化病况包括过量的纤维组织,包括组织内的过量的细胞外基质积累,形成引起功能紊乱和可能地器官衰竭的组织。慢性纤维化包括主要的器官的纤维化,最常见是肺、肝脏、肾脏和/或心脏。急性纤维化(通常具有突然和严重的发作和短的持续时间)典型地作为对多种形式的创伤的一般响应发生,创伤包括伤害、缺血性疾病(例如,心脏病发作之后的心脏疤痕形成)、环境的污染物、酒精和其他类型的毒素、急性呼吸窘迫综合征、辐射和化疗治疗。由外伤损伤的所有的组织可以变成是纤维化的,特别是如果损伤重复发生。

[0102] 对伤害的响应包括继受伤之后组织中的介质的协调和暂时调节的模式和细胞事件的顺序。最初的伤害引起凝血级联和急性局部炎症应答,之后间充质细胞招募、增殖和基质合成。不受控制的基质积聚,经常涉及异常的细胞因子途径,可以导致纤维化病况或

病症。重要器官如肺、肾脏、肝脏、心脏、脑和骨髓中的进行性纤维化是疾病和死亡的主要原因。

[0103] 粘附

[0104] 在本发明的其他方面内,提供通过将抗连接蛋白多核苷酸给予患者用于处理、减少粘附、外科手术粘附和 / 或次级外科手术粘附的发病率或严重性和 / 或阻止或阻滞所述粘附的方法。

[0105] 粘附形成是其中正常地分离的身体组织在一起生长的复杂过程。例如,报道在约 60% 至 90% 的经历主要的妇科手术的患者中发生手术后粘附。长久以来认为作为组织(例如,表皮、结缔、肌肉和神经组织)干燥、局部缺血、热伤害、感染或存在异物的结果,外科手术创伤是组织粘附形成的刺激。这些粘附是失败的外科疗法的主要原因并且是肠梗阻和不孕的主要原因。其他粘附处理的并发症包括慢性骨盆痛、尿道梗阻和排泄功能紊乱。

[0106] 通常,粘附形成是其中释放因子、增加血管通透性和导致纤维蛋白原汇集和纤维蛋白沉积的炎症反应。这种沉积形成桥接邻近组织的基质。纤维母细胞积累、依附于基质、沉积胶原并诱导血管生成。如果可在外科手术后 4 至 5 天内阻止事件的这种级联,可抑制粘附形成。

[0107] 由于设计以纠正的矫正性外科手术程序和现有的粘附也可以形成次级(二次, secondary) 外科手术粘附。程序可以是释放或分离程序。

[0108] 多种动物模型可用于评估对于它的治疗潜能的特定治疗组合物或治疗方案。简单地说,作为通常涉及两个邻接面的强加的严重损伤的结果,观察到在动物中发生腹膜粘附。由于局部缺血,或作为引入异物的结果,伤害可以是机械性的。机械伤害包括肠的挤压和肠壁的外层的剥离或擦伤。将大血管分开进入肠的循环诱导局部缺血。可被引入区域的异物包括滑石、纱布海绵、有毒化学物质、细菌和排泄物。

[0109] 目前,评价粘附的形成的预防的典型的动物模型包括:包含兔子宫的擦伤的兔子宫角模型,包括擦伤、子宫的血行阻断的兔子宫角血行阻断修正模型和涉及腹膜壁层(parietal peritoneum) 的块的切除加上盲肠的擦伤的兔盲肠侧壁模型。此处描述那些和其他报道的评价模型。

[0110] 抗钙粘蛋白试剂

[0111] 此处描述的本发明的抗钙粘蛋白试剂能够调节(例如,阻断或抑制或下调)或影响钙粘蛋白活性和功能、钙粘蛋白复合体形成和维持、粘附连接形成和维持和细胞-细胞粘附。因此,此处描述的某些抗钙粘蛋白试剂调节细胞粘附(也就是,细胞-对-细胞粘附)。某些抗钙粘蛋白试剂是粘附连接调节试剂。这样的抗连接蛋白试剂通常靶向信使 RNA(mRNA) 分子(或编码它们的基因),当翻译时,使得钙粘蛋白蛋白质合成并定位于细胞膜,其中它们可用于粘附连接形成。其他抗钙粘蛋白试剂干扰钙粘蛋白复合物和 / 或粘附连接形成。因此,此处提供的抗钙粘蛋白试剂可以直接地或间接地减少细胞之间的耦合和通讯或减少或阻断邻近细胞之间的通讯(或分子的传输)。优选地,钙粘蛋白是 N- 钙粘蛋白。

[0112] 能够诱发钙粘蛋白活性、钙粘蛋白复合体形成和 / 或粘附连接形成的期望的调节的任何抗钙粘蛋白试剂可以用于实践本发明。这样的化合物包括,例如,蛋白质和多肽、多核苷酸和其他有机化合物,并且例如,它们可以完全或部分地阻断粘附连接的功能或表达,

或完全或部分地下调一种或更多种钙粘蛋白蛋白质、钙粘蛋白复合体和 / 或粘附连接的产生。

[0113] 某些抗钙粘蛋白试剂提供钙粘蛋白表达的下调(例如,通过下调 mRNA 转录或翻译)或另外减少或抑制钙粘蛋白蛋白质、钙粘蛋白复合体或粘附连接的活性。在下调的情况下,这将具有减少通过粘附连接介导的直接的细胞-细胞粘附的作用。

[0114] 抗钙粘蛋白试剂的实例包括减少或抑制钙粘蛋白 mRNA 和 / 或蛋白质的表达或功能或减少钙粘蛋白蛋白质物质、钙粘蛋白复合体或粘附连接的活性、表达或形成的试剂。抗钙粘蛋白试剂包括抗钙粘蛋白多核苷酸,如反义多核苷酸和其他多核苷酸(如 miRNA 和具有 siRNA 或核酶功能的多核苷酸),以及抗体和它的抗原结合片段,以及肽和多肽,包括调节钙粘蛋白或粘附连接活性或功能的模拟肽和肽类似物,和脱氧核酶。优选抗钙粘蛋白试剂,特别地抗 N-钙粘蛋白试剂。

[0115] 抗钙粘蛋白多核苷酸

[0116] 抗钙粘蛋白多核苷酸包括连接蛋白反义多核苷酸以及具有能够使它们下调钙粘蛋白表达的功能的多核苷酸。其他适当的抗钙粘蛋白多核苷酸包括 miRNA、RNAi 多核苷酸和 siRNA 多核苷酸。优选抗 N-钙粘蛋白多核苷酸。

[0117] 本领域的技术人员已知可用作抗钙粘蛋白多核苷酸如 miRNA、RNAi、siRNA 和核酶多核苷酸以及具有修饰的和混合的骨架的多核苷酸的反义多核苷酸和其他多核苷酸的合成。参见,例如,Stein C.A. and Krieg A.M. (eds), *Applied Antisense Oligonucleotide Technology*, 1998 (Wiley-Liss)。本领域的技术人员已知合成期望的抗体和抗原结合片段,以及期望的肽和多肽,包括模拟肽和肽类似物的方法。参见,例如, Lihu Yang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1 ;95(18):10836-10841 (Sept 11998); Harlow and Lane (1988) "Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Publications, New York; Harlow and Lane (1999) "Using Antibodies" A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York。

[0118] 根据一个方面,钙粘蛋白表达的下调通常基于使用反义多核苷酸(如 DNA 或 RNA 多核苷酸)的反义途径,并且更具体地基于使用反义寡脱氧核苷酸(ODN)。这些多核苷酸(例如,ODN)靶向编码要下调的一个或多个钙粘蛋白蛋白质的 mRNA 分子。典型地,多核苷酸是单链的,但是可以是双链的。

[0119] 反义多核苷酸可以抑制靶标钙粘蛋白蛋白质物质的转录和 / 或翻译。优选地,多核苷酸是由钙粘蛋白基因或 mRNA 的转录和 / 或翻译的特异性抑制剂,并且不抑制由其他基因或 mRNA 的转录和 / 或翻译。产物结合至钙粘蛋白基因或 mRNA (i) 5' 至编码序列,和 / 或 (ii) 至编码序列,和 / 或 (iii) 3' 至编码序列。

[0120] 反义多核苷酸对钙粘蛋白 mRNA、优选地 N-钙粘蛋白 mRNA 通常是反义的。这样的多核苷酸可以是能够杂交至钙粘蛋白 mRNA 和因此可以通过干扰钙粘蛋白 mRNA 代谢的一个或更多个方面抑制钙粘蛋白的表达,包括转录、mRNA 加工、由细胞核的 mRNA 运输、转录或 mRNA 降解。虽然不希望受到特定的理论的限制,典型地,反义多核苷酸杂交至钙粘蛋白 mRNA 以形成双链,其可引起翻译的直接抑制和 / 或 mRNA 的去稳定。这样的双链可能易受核酸酶的降解。

[0121] 反义多核苷酸可杂交至所有或部分的钙粘蛋白 mRNA。典型地,反义多核苷酸杂交

至核糖体结合区域和 / 或钙粘蛋白 mRNA 的编码区。多核苷酸可以与所有的或靶标钙粘蛋白 mRNA 的区域互补。例如,多核苷酸可以是所有的或部分的钙粘蛋白 mRNA 的精确的互补。然而,不需要绝对的互补性,并且具有足够的互补性以形成具有大于超过生理学温度约 5℃、10℃、20℃、30℃或 40℃的溶解温度的双链的多核苷酸特别适用于本发明。

[0122] 因此,典型地,多核苷酸是与靶标钙粘蛋白 mRNA 序列互补的同系物。多核苷酸可以是在高严格度的介质的条件下杂交至钙粘蛋白 mRNA 的多核苷酸,高严格度的介质的条件如在约 50℃至约 60℃下,0.03M 氯化钠和 0.03M 柠檬酸钠。

[0123] 对于某些方面,典型地,例如,适当的多核苷酸是约 6 至 40 核苷酸长度。优选地,多核苷酸可以是约 5 至约 100 核苷酸长度,优选地约 6 至约 40 核苷酸长度,优选地约 12 至约 35 核苷酸长度,或可替换地,约 12 至约 20 核苷酸长度,或更优选地约 18 至约 32 核苷酸长度。根据可替换的实施方式,多核苷酸是至少约 40,例如,至少约 60 或至少约 80 核苷酸长度和最高达约 100,约 200,约 300,约 400,约 500,约 1000,约 2000,或约 3000 或更多核苷酸长度。

[0124] 连接蛋白蛋白质或由抗钙粘蛋白多核苷酸靶向的蛋白质将依赖于受影响的下调的位点。这反映在钙粘蛋白复合组合物方面,在遍及身体的不同位点处的一个或多个粘附连接的不均匀组成 (make-up)。在一个方面中,钙粘蛋白是在人类或动物中自然地存在的一种,或在要调节、优选地减少的钙粘蛋白表达或活性的组织中自然地存在的一种。钙粘蛋白基因 (包括编码序列) 通常与此处提到的一种或更多种特异性钙粘蛋白的编码序列具有同源性,如与下面实施例 1 中显示的钙粘蛋白编码序列同源。典型地,钙粘蛋白是 N-钙粘蛋白、E-钙粘蛋白、P-钙粘蛋白、钙粘蛋白 11、钙粘蛋白 12、原钙粘蛋白蛋白质、桥粒芯蛋白蛋白质或桥粒胶蛋白蛋白质。优选地,在待处理的组织中表达钙粘蛋白 N-钙粘蛋白。

[0125] 抗钙粘蛋白多核苷酸包括钙粘蛋白反义多核苷酸以及具有能够使它们下调钙粘蛋白表达的功能的多核苷酸。其他适当的抗钙粘蛋白多核苷酸包括 RNAi 多核苷酸和 siRNA 多核苷酸。

[0126] 在很多优选的实施方式中,反义多核苷酸仅靶向一种钙粘蛋白蛋白质种类的 mRNA。最优选地,这种钙粘蛋白蛋白质是 N-钙粘蛋白。也应该预期,组合使用靶向单独的钙粘蛋白蛋白质物质的多核苷酸 (例如,可以靶向 1、2、3、4 或更多不同的钙粘蛋白超家族成员)。例如,可组合使用靶向 N-钙粘蛋白和钙粘蛋白超家族的一个或更多其他成员 (例如,E-钙粘蛋白、P-钙粘蛋白、钙粘蛋白 11、钙粘蛋白 12、原钙粘蛋白蛋白质、桥粒芯蛋白蛋白质或桥粒胶蛋白蛋白质) 的多核苷酸。可替换地,本发明的反义多核苷酸是可以包含靶向超过一种钙粘蛋白蛋白质的多核苷酸的组合物的部分。优选地,这样的多核苷酸指向的钙粘蛋白蛋白质中的一种是 N-钙粘蛋白。因此,个体反义多核苷酸可以对特定的钙粘蛋白蛋白质种类的 mRNA 是特异性的,或可以靶向两种或更多种不同钙粘蛋白蛋白质种类的 mRNA。特异性的多核苷酸通常将靶向钙粘蛋白基因或 mRNA 中的序列,它们在钙粘蛋白之间是非保守的,然而,非特异性抗钙粘蛋白多核苷酸将靶向多种钙粘蛋白的保守序列。

[0127] 用于在本发明中使用的多核苷酸和其他试剂,包括脱氧核酶可以是未修饰的磷酸二酯寡聚物。这样的寡脱氧核苷酸长度可不同。已经发现 15-18mer、20-mer 和 30-mer 多核苷酸是适当的。关于寡脱氧核苷酸描述了本发明的很多方面;然而,应该明白,其他适当的多核苷酸 (如 RNA 多核苷酸) 也可以用于这些实施方式中。

[0128] 可以化学修饰反义多核苷酸和其他试剂,包括脱氧核酶。这可增强它们对核酸酶的抗性,和可增强它们进入细胞的能力。这样的修饰在本领域中是已知的。例如,可以使用硫代磷酸酯(phosphorothioate)寡核苷酸。其他脱氧核苷酸类似物包括甲基磷酸酯(methylphosphonate)、氨基磷酸酯(phosphoramidate)、二硫代磷酸酯(phosphorodithioate)、N3'P5'-氨基磷酸酯和寡核糖核苷酸硫代磷酸酯和它们的2'-O-烷基类似物和2'-O-甲基核糖核苷酸甲基磷酸酯。可替换地,可使用混合的骨架寡核苷酸(“MBO”)。MBO含有硫代磷酸酯寡脱氧核苷酸的区段(segment)和修饰的寡脱氧-或寡核糖核苷酸的适当地放置的区段。MBO具有硫代磷酸酯键的区段和其他修饰的寡核苷酸(如甲基磷酸酯)的其他区段,其是非离子的,并对核酸酶或2'-O-烷基寡核苷酸非常具有抗性。本领域已知制备修饰的骨架和混合的骨架寡核苷酸的方法。

[0129] 在本发明中使用的一种或更多种反义多核苷酸的精确的序列将取决于靶标钙粘蛋白蛋白质。在某些实施方式中,适当的钙粘蛋白反义多核苷酸可以包括多核苷酸如寡脱氧核苷酸。用于制备此处描述的组合的多核苷酸组合物的适当的多核苷酸包括,例如,对N-钙粘蛋白的多核苷酸和对于E-钙粘蛋白、P-钙粘蛋白、钙粘蛋白11、钙粘蛋白12、原钙粘蛋白蛋白质、桥粒芯蛋白蛋白质或桥粒胶蛋白蛋白质的多核苷酸。

[0130] 通过任何方便的和传统的途径,可以根据它们的核苷酸序列选择针对钙粘蛋白蛋白质的多核苷酸,包括ODN's。例如,可使用计算机程序MacVector和OligoTech(来自Oligos etc. Eugene, Oregon, USA)。一旦选择,可使用自动化DNA合成仪合成ODN's。

[0131] 多核苷酸同系物

[0132] 此处讨论同源性和同系物(例如,多核苷酸可以是与钙粘蛋白mRNA中的序列互补的同系物)。例如,在(同源序列的)至少约15、至少约20、至少约25、至少约30、至少约40、至少约50或至少约100更多的连续的核苷酸的区域上,这样的多核苷酸与相关的序列具有至少约70%同源性,优选地至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约97%或至少约99%同源性。

[0133] 可基于本领域的任何方法计算同源性或序列同一性。例如,UWGCG程序包提供可用于计算同源性的BESTFIT程序(Devereux, et al. (1984) Nucleic Acids Research 12, p387-395)。PILEUP和BLAST算法也可用于计算序列同一性或对齐序列,例如,如在Altschul, S. F. (1993), J Mol Evol 36:290-300; Altschul, et al (1990), J Mol Biol 215:403-10中描述的。可通过生物技术信息国家中心公共可获得用于进行BLAST分析的软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。BLAST算法进行两个序列之间的相似性的统计分析;参见,例如, Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787。典型地,同源序列由至少约(或由不超过约)2、5、10、15、20或更多核苷酸差异(其可以是替换、缺失或插入)不同于相关序列。关于计算的序列同一性或同源性,可以在上述提到的任何区域上测量这些差异。

[0134] 典型地,同源序列以显著地高于背景的水平选择性杂交到原始序列上。典型地,使用高严格度的介质的条件(例如,在约50℃至约60℃下,0.03M氯化钠和0.03M柠檬酸钠)实现选择性杂交。然而,可以在本领域已知的任何适当的条件下进行这样的杂交(参考, Sambrook, et al. (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual)。例如,如果需要高严格度,适当的条件包括在60℃的0.2x SSC。如果需要较低的严格性,适当的条件包括在

60℃的 2x SSC。

[0135] 肽和多肽抗钙粘蛋白试剂

[0136] 钙粘蛋白结合蛋白,包括肽、模拟肽、抗体、抗原结合抗体片段等也是粘附连接的适当的调节剂。

[0137] 结合蛋白包括,例如,单克隆抗体、多克隆抗体、抗体片段(包括,例如,Fab, F(ab')₂)和Fv片段;单链抗体;单链Fv;和单链结合分子如包括以下的那些,例如,结合结构域、铰链、CH2和CH3结构域、重组抗体和能够结合与特定抗体或其他结合分子接触的抗原决定簇的抗体片段(也就是,分子的部分,通常称为表位)。这些结合蛋白质,包括抗体、抗结合抗体片段,等可以是嵌合体或人源化的或另外制备以在它们将要给予的受试者中是较少免疫原性的,并且可以是合成的、重组产生的或在表达库中产生的。预期本领域已知或稍后发现的任何结合分子,如此处引用的和/或本领域更详细地描述的那些。例如,结合蛋白质不仅包括抗体等,而且包括配体、受体、模拟肽或其他结合片段或分子(例如,通过噬菌体展示产生的),其结合至靶标(例如,钙粘蛋白蛋白质、钙粘蛋白复合体或粘附连接中的另外的蛋白质或相关的分子)。已经报道Fab片段对N-钙粘蛋白细胞外结构域抑制粘附连接形成。Meyer, et al. (1992) J Cell Biol. 1992 October 1;119(1):179-189。

[0138] 结合分子通常将具有期望的特异性,包括但不限于结合特异性,以及期望的亲合力。例如,亲合力可以是以下的K_a:大于或等于约10⁴M⁻¹、大于或等于约10⁶M⁻¹、大于或等于约10⁷M⁻¹、大于或等于约10⁸M⁻¹。甚至大于约10⁸M⁻¹的亲合力是适当的,如等于或大于约10⁹M⁻¹、约10¹⁰M⁻¹、约10¹¹M⁻¹和约10¹²M⁻¹的亲合力。可容易地使用传统的技术例如由Scatchard, et al., 1949 Ann. N. Y. Acad. Sci. 51:660描述的那些确定根据本发明的结合蛋白质的亲合力。

[0139] 由两个相邻细胞贡献的钙粘蛋白蛋白质的细胞外结构域彼此“对接(dock)”以形成完整的间隙连接通道。干扰这些细胞外结构域的相互作用的试剂可以损害粘附连接形成和/或稳定性。

[0140] 抗钙粘蛋白试剂包括肽,其包含与来自钙粘蛋白蛋白质(例如,E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白等)的钙粘蛋白结构域基序一致(corresponding to)的氨基酸序列。其他实施方式涉及抗连接蛋白试剂,其是具有包含由钙粘蛋白基因编码的至少约5、至少约6、至少约7、至少约8、至少约9、至少约10、至少约11、至少约12、至少约13、至少约14、至少约15、至少约20、至少约25或至少约30个连续的氨基酸的氨基酸序列的肽,例如,在下面实施例1中列出的N-钙粘蛋白基因。在此处提供的某些抗连接蛋白试剂中,N-钙粘蛋白的细胞外结构域可以用于开发特定的肽序列。肽不需要具有与自然地存在的N-钙粘蛋白的那些部分相同的氨基酸序列,并且可以作出保守的氨基酸改变使得肽保留结合活性或功能活性。可替换地,肽可以靶向细胞外结构域的其他区域。

[0141] 抗钙粘蛋白肽可以包含与具有保守氨基酸替换的钙粘蛋白细胞外结构域的部分一致的序列,使得肽是功能上活性的抗钙粘蛋白试剂。示例性的保守氨基酸替换包括例如用另一个非极性氨基酸替换非极性氨基酸、用另一个芳香族氨基酸替换芳香族氨基酸、用另一个脂肪族氨基酸替换脂肪族氨基酸、用另一个极性氨基酸替换极性氨基酸、用另一个酸性氨基酸替换酸性氨基酸、用另一个碱性氨基酸替换碱性氨基酸和用另一个可电离的氨基酸替换可电离的氨基酸。

[0142] 粘附连接调节试剂

[0143] 此处描述的某些抗钙粘蛋白试剂能够调节或影响（例如，阻断或抑制）细胞之间的粘附。因此，此处描述的某些粘附连接调节试剂调节细胞粘附。如此处使用的，“粘附连接调节试剂”广泛地包括全部或部分地阻止、减少或调节粘附连接的活性、功能、形成或稳定性的任何试剂或化合物。在某些实施方式中，粘附连接调节试剂全部或部分地阻止或减少粘附连接的功能。示例性的粘附连接调节试剂可以包括，但不限于，多核苷酸、多肽（例如，模拟肽、抗体、它的结合片段，和合成构建体）和其他粘附连接调节试剂。

[0144] 剂型和制剂和给予

[0145] 可以同时地、单独地（分开地）或顺序地和以任何顺序给予治疗有效量的本发明的试剂中的每一种。可以单独地或以固定组合给予试剂。当没有以固定组合给予时，优选的方法包括顺序给予一种或更多种抗钙粘蛋白试剂，单独或与一种或更多种其他治疗剂组合，其他治疗剂包括其他抗钙粘蛋白试剂、抗连接蛋白试剂、抗 ZO-1 试剂和 / 或抗骨桥蛋白试剂。

[0146] 当组合给予抗钙粘蛋白试剂和其他治疗剂时，以少于当单独给予一种或更多种试剂时（也就是，当身体上或在创伤的处理的过程中没有组合给予它们时）使用的那些的量或剂量提供任一种或两种。典型地，这样较少的给予的试剂的量是当单独给予时试剂的量的约二十分之一至约十分之一量，并且可以是当单独给予时的约八分之一的量、约六分之一的量、约五分之一的量、约四分之一的量、约三分之一的量和约二分之一的量。优选地，在彼此的至少约二分之一小时内顺序地给予试剂。也可关于彼此约一小时、关于彼此约一天或约一周，或作为另外认为适当的给予试剂。

[0147] 可以将本发明的试剂给予需要治疗的受试者，如具有此处提到的任何疾病或病况的受试者。因此可改善受试者的病况。因此，可将抗钙粘蛋白试剂通过治疗在受试者的身体的处理中使用。它们可用于在药剂的制造中使用以治疗此处提到的任何病况。

[0148] 优选地，本发明的抗钙粘蛋白试剂以基本隔离的形式在本发明的多种组合物和方法中使用。应该明白，可以将产物与不会干扰产物的预期目的的载体或稀释剂混合并仍然被认为是基本隔离的。本发明的产物也可能处于基本纯的形式，在这种情况下，它通常将包含约 80%、85% 或 90%，例如，至少约 95%、至少约 98% 或至少约 99% 的多核苷酸（或其他抗钙粘蛋白试剂）或干物质制剂。

[0149] 取决于预期的给予途径，本发明的药用产物、药学组合物、组合制剂和药物可以采取例如溶液剂、悬浮剂、滴注剂、药膏剂 (salve)、乳霜剂、凝胶剂、泡沫剂、软膏剂 (ointment)、乳剂、洗剂、涂剂、缓释制剂或粉剂的形式，并且典型地含有约 0.1% -95%、优选地约 0.2% 至 70% 的一种或更多种活性组分。其他适当的制剂包括以普朗尼克凝胶为基础的制剂、以羧甲基纤维素 (CMC) 为基础的制剂和以羟丙基甲基纤维素 (HPMC) 为基础的制剂。例如，包括普朗尼克凝胶的适当的制剂具有约 10 至约 15 百分比、约 15-20 百分比、约 20-25 百分比、和约 25-30 百分比、适当地约 22 百分比的普朗尼克凝胶。其他有用的制剂包括缓慢释放制剂或延迟释放制剂和滴剂。

[0150] 可使用适当的胶凝剂 (gelling agent) 生产凝胶剂或凝胶剂 (gels or jellies)，胶凝剂包括，但不限于，明胶、黄芪胶、藻朊酸盐或纤维素衍生物并且可以包括作为湿润剂、软化剂和防腐剂的丙三醇。软膏剂是由并入脂肪、蜡或合成基础的活性组分组成的半固体

制剂。适当的乳霜剂的实例包括,但不限于,油包水和水包油乳剂。可以通过使用具有类似于,但不限于,脂肪醇如鲸蜡醇(十六醇)或鲸蜡硬脂醇(十八醇十六醇)的那些和乳化蜡的性质的适当的乳化剂配制油包水乳霜。可以使用乳化剂如西土马哥(聚乙二醇与十六醇缩合物, cetomacrogol) 乳化蜡配制水包油乳霜。适当的性质包括修饰乳剂的粘性的能力和在广泛的 pH 上的物理和化学稳定性。水可溶的或微溶的乳霜基础可以含有防腐剂系统并且也可以缓冲以维持可接受的生理学 pH。

[0151] 可配制泡沫制剂以使用惰性推进剂、经由适当的涂药器从加压的气溶胶筒中递送。用于泡沫基础的制剂的适当的赋形剂包括,但不限于,丙二醇、乳化蜡、鲸蜡醇和硬脂酸甘油酯。可能的防腐剂包括对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯。

[0152] 优选地,将本发明的试剂与药学上可接受的载体或稀释剂组合以产生药学组合物。适当的载体和稀释剂包括等渗盐水溶液,例如,磷酸盐缓冲盐水。适当的稀释剂和赋形剂也包括,例如,水、盐水、葡萄糖、丙三醇等和它们的组合。另外,如果期望,也可以存在物质如湿润剂或乳化剂、稳定剂或 pH 缓冲剂。

[0153] 术语“药学上可接受的载体(药用载体)”指的是自身不诱导产生对接受组合物的个体不期望的抗体的任何药学载体,并且其可以在给予而没有异常毒性。适当的载体可以是大的、缓慢地代谢的大分子如蛋白质、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、聚合的氨基酸和氨基酸共聚物。

[0154] 也可以存在药学上可接受的盐,例如,矿物酸盐如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐,等;和有机酸的盐如醋酸盐、丙酸盐、丙二酸盐、苯酸盐,等。

[0155] 适当的载体物质包括通常用于乳霜剂、洗剂、凝胶剂、乳剂、洗剂或局部给予的涂剂的基础的任何载体或媒介物。实例包括乳化剂、包括碳氢化合物基础的惰性载体、乳化基础、无毒性溶剂或水溶的基础。具体的适当的实例包括普朗尼克(Pluronic)、HPMC、CMC 和其他纤维素类成分、羊毛脂、硬石蜡、液体石蜡、软黄色石蜡或软白色石蜡、白色蜂蜡、黄色蜂蜡、鲸蜡硬脂醇、鲸蜡醇、二甲聚硅氧烷、乳化蜡、肉豆蔻酸异丙酯、微晶蜡、油醇、蜂蜜(包括麦卢卡树蜂蜜)和硬脂醇。

[0156] 优选地,药学上可接受的载体或媒介物是凝胶,适当地非离子聚氧化乙烯-聚氧化丙烯共聚物凝胶,例如,普朗尼克凝胶,优选地,Pluronic F-127(BASF Corp.)。特别优选这种凝胶,因为它在低温下是液体,但是在生理温度下迅速地凝固,其限制试剂至应用的位点或直接地邻近那个位点的释放。药学载体也包括脂质体、纳米粒子等。

[0157] 本发明的制剂中也包括助剂如酪蛋白、明胶、白蛋白、胶、海藻酸钠、羧甲基纤维素、甲基纤维素、羟乙基纤维素或聚乙烯醇。

[0158] 其他适当的制剂包括以普朗尼克凝胶为基础的制剂、以羧甲基纤维素(CMC)为基础的制剂和以羟丙基甲基纤维素(HPMC)为基础的制剂。可配制组合物用于任何期望的递送形式,包括局部、灌注、肠胃外、肌肉内、皮下或透皮给予。其他有用的制剂包括缓慢或延迟释放制剂。

[0159] 可以通过本领域已知的或稍后发现的方法进行透皮给予,包括,例如,涉及以下的方法:1) 化学渗透增强剂或皮肤增强剂的应用;2) 脂质体介导的递送;3) 电离子透入疗法;4) 电穿孔;5) 超声促渗;6) 机械(例如,微穿孔(microporation))设备。适于透皮给予此处公开的试剂的示例性的方法可包括,例如,涉及通过增加经过现有的孔的运输速度

或通过产生人造孔的放大可用的皮肤孔的数量来增强物质经过皮肤孔的运输的方法。

[0160] 可通过使用化学或渗透增强剂进行透皮递送,包括例如,药学上可接受的植物油、坚果油、包括鸕鹚油的合成或动物来源的油、乙氧化油、PEG、亚油酸、乙醇、1- 甲醇和 / 或使角质层脱脂 (delipidize) 的试剂。适当的油包括白芒花籽油、蓖麻油、荷荷芭油、玉米油、葵花油、芝麻油和鸕鹚油,所有的油可以可选地乙氧化。实例包括如在美国专利号 US 7291591、US7201919、US 7052715、US 7033998、US 6946144 ;US 6951658、US 6759056、US 6720001、US 6224853、US 5695779 和 US 6750291 中描述的那些。另外,透皮贴剂也适于递送干粉或冻干药物,并且实例包括在美国专利号 US 5,983,135 中描述的那些。

[0161] 可以通过脂质体介导的递送方法进行透皮递送(通过亲脂性膜活性剂的应用促进的运输)。适当的实例可以包括在美国专利号 US 5910306、US5718914 和 US 5064655 中描述的那些。

[0162] 也可以与多种电离子透入疗法或电转运系统结合使用透皮递送系统。在美国专利号 US 5,147,296、US 5,080,646、US 5,169,382 和 US 5,169383 中公开说明性的电转运药物递送系统。

[0163] 术语“电转运”通常指的是有益的试剂,例如,药物或药物前体,通过体表如皮肤、黏膜、指甲等的通道。通过应用电位诱导或增强试剂的运输,其使得应用电流,其递送试剂或增强试剂的递送,或,对于“逆向”电转运、采样或增强试剂的采样。可以多种方式实现进入或离开人类身体的试剂的电转运。

[0164] 可通过电离子透入疗法方法进行透皮递送(例如,通过随着时间将低电平电场应用至皮肤促进递送)。适当的实例可以包括在美国专利号 US6731987、US 6391015、US 6553255、US 4940456、US 5681580 和 US6248349 中描述的那些。

[0165] 同样,可以通过电穿孔方法进行透皮递送(例如,通过短暂应用高电压脉冲以在皮肤中形成瞬时孔促进的递送)。适当的实例可以包括美国专利号 US 7008637、US 6706032、US 6692456、US 6587705、US 6512950、US 6041253、US 5968006 和 US 5749847。

[0166] 可以通过超声促渗方法进行透皮递送(例如,通过应用低频超声的脉冲以增加皮肤渗透性促进的运输)。适当的实例可包括美国专利号 US7232431、US 7004933、US 6842641、US 6868286、US 6712805、US 6575956、US 6491657、US 6487447、US 623499 和 US 6190315。

[0167] 可以通过诱导结构要素中的机械改变或破坏、热稳定性性质、膜流动性和真皮体系结构和亚结构的完整性,包括使用机械装置和 / 或产生人造微孔或微通道(例如,显微投影)的方法进行透皮递送。适当的实例可以包括 MicroPor (Altea Therapeutics)、MacroFlux (Alza Corporation),以及在美国专利号 US 6893655、US 6730318、US 5484604、US 5362308、US 5320850 和 US 5279544 以及美国复审证书 RE35474 中描述的那些。

[0168] 其他适当的制剂是可吸入的制剂。

[0169] 当抗钙粘蛋白试剂(和 / 或一种或更多种其他治疗剂,如有的话)是核酸、如多核苷酸时,通过几个已知的转染技术例如,包括使用转染试剂的那些增强由哺乳动物细胞摄取核酸。可与某些抗连接蛋白试剂(包括多核苷酸)一起使用这样的技术。给予的制剂可以含有这样的转染试剂。这些试剂的实例包括阳离子试剂(例如,磷酸钙和 DEAE- 右旋糖酐)和脂质体转染剂 (lipofectants)(例如, lipofectamTM和 transfectamTM)和表面活性

剂。

[0170] 当抗钙粘蛋白试剂（和 / 或一种或更多种其他治疗剂，如有的话）包含多核苷酸时，方便地，制剂进一步包含表面活性剂以帮助多核苷酸细胞渗透或制剂可含有任何适当的填充剂（loading agent）。可以包括任何适当的无毒性表面活性剂，如 DMSO。可替换地，可以包括透皮渗透试剂如尿素。

[0171] 优选地，对于给定受试者或病况的有效剂量在对至少 50% 的群体治疗上有效、并且在那个水平上表现小的或没有毒性的剂量内。

[0172] 取决于许多因素包括采用的具体的一种或更多种抗连接蛋白试剂、组合的伴侣（若有的话）、给予的模式、给予的频率、正在处理的病况、正在处理的病况的严重性、给予的途径、要处理的患者亚群体的需要或个体患者的需要（其中不同的需要可以是由于患者特异的年龄、性别、体重、相关医疗条件），可以改变在本发明的方法和组合物中采用的抗钙粘蛋白试剂（和 / 或一种或更多种其他治疗剂，若有的话）中的每一种的有效剂量。

[0173] 给予患者的抗钙粘蛋白试剂（和 / 或一种或更多种其他治疗剂，若有的话）的剂量将取决于多种因素，如患者的年龄、体重和一般情况、正在处理的病况和正在给予的具体的抗连接蛋白试剂。

[0174] 抗钙粘蛋白试剂（和 / 或一种或更多种其他治疗剂，若有的话）的适当的治疗上有效剂量可以是约 0.001 至约 1mg/kg 体重，如约 0.01 至约 0.4mg/kg 体重。然而，适当的剂量可以是约 0.001 至约 0.1mg/kg 体重，如约 0.01 至约 0.050mg/kg 体重。

[0175] 约 1 至 100、100-200、100- 或 200-300、100- 或 200- 或 300-400，和 100- 或 200- 或 300- 或 400-500 微克的一种或更多种抗钙粘蛋白试剂（和 / 或一种或更多种其他治疗剂，如有的话）的治疗上有效的剂量是适当的。约 1-1000 微克的剂量也是适当的。也可使用最高达 2 微克的剂量。当以敷料剂的形式提供抗一种或更多种钙粘蛋白试剂（和 / 或一种或更多种其他治疗剂，若有的话）时，适当地调整剂量，典型地向上调整以维持期望的总剂量给予。

[0176] 可替换地，在抗钙粘蛋白寡核苷酸或抗钙粘蛋白蛋白质或肽（和 / 或一种或更多种其他治疗剂，若有的话）的情况下，可以通过参考组合物相对于它将应用的区域的尺寸、长度、深度、面积或体积的浓度确定组合物中的每一种试剂的剂量。例如，在某些局部应用中，可以基于每应用的区域的长度、深度、面积或体积的药学组合物的质量（例如，克）或药学组合物中的浓度（例如， $\mu\text{g}/\text{ul}$ ）计算药学组合物的给药（剂量，dosing）。有用的剂量范围是约 1 至约 10 微克每平方厘米的创伤尺寸。某些剂量将是约 1-2、约 1-5、约 2-4、约 5-7 和约 8-10 微克每平方厘米的创伤尺寸。其他有用的剂量大于约 10 微克每平方厘米的创伤尺寸，包括至少约 15 微克每平方厘米的创伤尺寸、至少约 20 微克每平方厘米的创伤尺寸、至少约 25 微克每平方厘米的创伤尺寸、约 30 微克每平方厘米的创伤尺寸、至少约 35 微克每平方厘米的创伤尺寸、至少约 40 微克每平方厘米的创伤尺寸、至少约 50 微克每平方厘米的创伤尺寸和至少约 100 至至少约 150 微克每平方厘米的创伤尺寸。其他剂量包括约 150-200 微克每平方厘米、约 200-250 微克每平方厘米、约 250-300 微克每平方厘米、约 300-350 微克每平方厘米、约 350-400 微克每平方厘米和约 400-500 微克每平方厘米和 500-1000 微克每平方厘米和至少约 600-1000 微克每平方厘米。

[0177] 在某些实施方式中，可以在处理位点和 / 或邻近处理位点处以约 0.01 微摩尔

(μM) 或 $0.05\ \mu\text{M}$ 至约 $200\ \mu\text{M}$ 或最高达 $300\ \mu\text{M}$ 或最高达 400 、 500 、 600 、 700 、 800 、 $900\ \mu\text{M}$ 或最高达 $1000\ \mu\text{M}$ 或最高达 $2000\ \mu\text{M}$ 或最高达 $3200\ \mu\text{M}$ 或更高, 以及在这些剂量数内的任何剂量和剂量范围的最终浓度应用抗钙粘蛋白试剂组合物 (和 / 或一种或更多种其他治疗剂组合物, 如有的话)。优选地, 以约 $0.05\ \mu\text{M}$ 至约 $100\ \mu\text{M}$ 或更高的最终浓度应用反义多核苷酸组合物, 更优选地, 以约 $1.0\ \mu\text{M}$ 至约 $50\ \mu\text{M}$ 最终浓度, 和更优选地, 以约 5 – $10\ \mu\text{M}$ 至约 30 – $50\ \mu\text{M}$ 最终浓度应用抗钙粘蛋白多核苷酸组合物。另外, 以约 $8\ \mu\text{M}$ 至约 $20\ \mu\text{M}$ 最终浓度应用组合的抗钙粘蛋白试剂组合物, 并且可替换地, 以约 $10\ \mu\text{M}$ 至约 $20\ \mu\text{M}$ 最终浓度, 或以约 10 至约 $15\ \mu\text{M}$ 最终浓度应用抗钙粘蛋白试剂组合物。在某些其他实施方式中, 以约 $10\ \mu\text{M}$ 最终浓度应用抗钙粘蛋白试剂组合物。在还有的另一个实施方式中, 以约 1 – $15\ \mu\text{M}$ 最终浓度应用抗钙粘蛋白试剂组合物。在其他实施方式中, 以约 $20\ \mu\text{M}$ 、 $30\ \mu\text{M}$ 、 $40\ \mu\text{M}$ 、 $50\ \mu\text{M}$ 、 $60\ \mu\text{M}$ 、 $70\ \mu\text{M}$ 、 $80\ \mu\text{M}$ 、 $90\ \mu\text{M}$ 、 $100\ \mu\text{M}$ 、 10 – $200\ \mu\text{M}$ 、 200 – $300\ \mu\text{M}$ 、 300 – $400\ \mu\text{M}$ 、 400 – $500\ \mu\text{M}$ 、 500 – $600\ \mu\text{M}$ 、 600 – $700\ \mu\text{M}$ 、 700 – $800\ \mu\text{M}$ 、 800 – $900\ \mu\text{M}$ 、 900 – 1000 或 1000 – $1500\ \mu\text{M}$ 或 $1500\ \mu\text{M}$ – $2000\ \mu\text{M}$ 或 $2000\ \mu\text{M}$ – $3000\ \mu\text{M}$ 或更高应用抗钙粘蛋白试剂。

[0178] 抗钙粘蛋白剂量量包括, 例如, 约 0.1 – 1 、 1 – 2 、 2 – 3 、 3 – 4 或 4 – 5 微克 (μg)、约 5 至约 $10\ \mu\text{g}$ 、约 10 至约 $15\ \mu\text{g}$ 、约 15 至约 $20\ \mu\text{g}$ 、约 20 至约 $30\ \mu\text{g}$ 、约 30 至约 $40\ \mu\text{g}$ 、约 40 至约 $50\ \mu\text{g}$ 、约 50 至约 $75\ \mu\text{g}$ 、约 75 至约 $100\ \mu\text{g}$ 、约 $100\ \mu\text{g}$ 至约 $250\ \mu\text{g}$ 和约 $250\ \mu\text{g}$ 至约 $500\ \mu\text{g}$ 。如上述提到的, 也提供 0.5 至约 1.0 微克或更多的剂量。剂量体积将取决于要处理的位点的尺寸, 并且例如, 范围可以是约 25 – $100\ \mu\text{L}$ 至约 100 – $200\ \mu\text{L}$ 、约 200 – $500\ \mu\text{L}$ 至约 500 – $1000\ \mu\text{L}$ 。毫升剂量也适于较大的处理位点。

[0179] 此处描述在约 1 纳克 (ng)/ kg 和约 $1\text{mg}/\text{kg}$ 体重每天每种试剂之间的另外的其他剂量水平。在某些实施方式中, 每一种受试化合物的剂量通常将在以下范围内: 约 1ng 至约 1 微克每 kg 体重, 约 1ng 至约 0.1 微克每 kg 体重、约 1ng 至约 10ng 每 kg 体重、约 10ng 至约 0.1 微克每 kg 体重、约 0.1 微克至约 1 微克每 kg 体重、约 20ng 至约 100ng 每 kg 体重、约 0.001mg 至约 0.01mg 每 kg 体重、约 0.01mg 至约 0.1mg 每 kg 体重或约 0.1mg 至约 1mg 每 kg 体重。在某些实施方式中, 每一种受试化合物的剂量通常将在以下的范围内: 约 0.001mg 至约 0.01mg 每 kg 体重、约 0.01mg 至约 0.1mg 每 kg 体重、约 0.1mg 至约 1mg 每 kg 体重。如果使用超过一种抗钙粘蛋白试剂, 每一种抗钙粘蛋白试剂的剂量不需要在与其他的相同的范围内。例如, 一种抗钙粘蛋白试剂的剂量可以在约 0.01mg 至约 10mg 每 kg 体重之间, 而另一种抗钙粘蛋白 (或其他治疗剂) 的剂量可以在约 0.1mg 至约 1mg 每 kg 体重之间。

[0180] 此处引用的所有的剂量和剂量范围可适用于例如多核苷酸治疗剂, 包括包含寡核苷酸的抗钙粘蛋白试剂。这些剂量范围也可适用于例如治疗剂, 包括抗钙粘蛋白试剂, 其包括蛋白质和肽, 以及拟肽和模拟肽。

[0181] 便利地, 以给予之后足以下调钙粘蛋白蛋白质的表达或调节粘附连接形成或稳定性持续至少约 0.5 至 1 小时、至少约 1 – 2 小时、至少约 2 – 4 小时、至少约 4 – 6 小时、至少约 6 – 8 小时、至少约 8 – 10 小时、至少约 12 小时或至少约 24 小时的量的给予抗钙粘蛋白试剂。

[0182] 也可以参考组合物相对于它将应用的区域的尺寸、长度、深度、面积或体积的浓度确定本发明的组合物和方法中的一种或更多种抗钙粘蛋白试剂中的每一种的剂量。例如, 在某些局部和其他应用中, 例如, 灌注, 可基于每应用的区域的长度、深度、面积或体积的药学组合物的质量 (例如, 微克) 或药学组合物中的浓度 (例如, $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 计算药学组合物的

给药（剂量，dosing）。

[0183] 此处上述和下面描述的相同的剂量和频率和给予对抗 ZO-1 试剂来说是有用的。

[0184] 如此处提到的，可以从当单独给予时给予的剂量向下调整以组合给予的抗钙粘蛋白多核苷酸、肽或模拟肽的剂量，或与任一或两者组合给予的其他 - 抗钙粘蛋白试剂（和 / 或其他治疗剂）的量。几种试剂的组合应用可以减少对于任何个别试剂的需要的剂量，因为不同的试剂的效果的开始和持续时间可以是互补的。在优选的实施方式中，两种或更多种抗钙粘蛋白试剂的组合应用具有累加效应、协同效应或超累加效应。在某些情况下，一种或更多种抗钙粘蛋白试剂和 / 或与任一或两者组合的一种或更多种其他治疗剂的组合具有累加效应。在其他情况下，组合可以具有超过累加的效应。此处，将这样的效应称为“超累加”效应，并且可以是由于协同或加强的相互作用。

[0185] 术语“创伤愈合的超累加促进”指的是通过给予一种或更多种抗钙粘蛋白试剂与任一或两者组合给予的一种或更多种治疗剂的组合产生的平均创伤愈合统计学上显著地高于通过个别给予任一单独试剂在粘附形成方面减少的总和。可以通过此处描述的和 / 或本领域的技术人员已知的多种统计方法确定结果是否“统计学上显著地高于”个别化合物的预期累加值。术语“协同”指的是超累加抑制的类型，其中，例如，抗钙粘蛋白多核苷酸和抗钙粘蛋白肽或模拟肽两者，或与任一或两者组合给予的其他抗钙粘蛋白试剂，单独地具有阻止或减少粘附形成的能力。例如，术语“加强的”指的是超累加效应的类型，其中一种或更多种抗钙粘蛋白多核苷酸、一种或更多种抗钙粘蛋白肽或一种或更多种模拟肽，或以组合给予的一种或更多种其他治疗剂中的一种，例如，单独地具有阻止或减少粘附形成的增加的能力。

[0186] 通常，可以通过确定组合治疗是否产生平均减少评估增强作用，举例来说，在处理组中的粘附形成中，当与在它们的治疗组中由单独处理分别地产生的粘附形成的平均减少的总数相比，为统计学上显著地超累加。例如，可以作为粘附形成中的对照组和处理组平均减少之间的差异计算粘附形成的平均减少。可以通过粘附形成中的处理组平均减少除以粘附形成对照组平均减少计算粘附形成的分数减少 (fractional decrease)，例如，“受感染的分数”(Fa)。对统计上显著的增强作用的检验需要对每一个处理组计算 Fa。可将组合处理的预期的累加 Fa 看作是来自接受组合的任一要素的组的平均 Fa 的总和。例如，双尾单样本 T 测试 (Two-Tailed One-Sample T-Test) 可以用于评价由实验获得的结果是由于单独的偶然性的可能性，如通过 p- 值测量的。认为小于 0.05 的值是统计学上显著的，即，不可能是由于单独的机会。因此，对组合处理组的 Fa 必须统计学上显著地高于单一要素处理组的预期的累加 Fa，以认为组合产生加强的超累加效应。

[0187] 通过中值效应 / 组合指数等效线图解法 (median-effect/combination-index isobologram method) 评价协同效应是否起因于组合处理 (Chou, T., and Talalay, P. (1984) *Ad. Enzyme Reg.* 22:27-55)。在这个方法中，基于来源于单独的抗骨桥蛋白或抗连接蛋白试剂，例如，单独的一种或更多种试剂，和固定的摩尔比的两种的组合的中值效应图的参数计算不同的剂量效应水平的组合指数 (CI) 值。CI 值的 ≤ 1 指示协同，CI=1 指示累加效应，和 CPI 指示拮抗效应。可使用计算机软件工具，如 CalcuSyn，用于剂量效应分析的微软软件 (Biosoft (D, Cambridge UK) 进行这种分析。

[0188] 用于分析对于组合治疗是否存在超累加效应的本领域已知的或稍后开发的任何

方法预期用于筛选适当的抗钙粘蛋白试剂,其与其他抗钙粘蛋白或其他治疗剂组合使用。

[0189] 在另一个优选的实施方式中,与当单独给予所述试剂时的有效剂量相比,一种或更多种抗钙粘蛋白试剂,具体地抗钙粘蛋白多核苷酸,和一种或更多种抗钙粘蛋白肽或模拟肽的组合应用减少任何这样的试剂的有效剂量。在某些实施方式中,当组合使用时的试剂的有效剂量是当单独使用时的试剂的剂量的约 1/15 至约 1/2、约 1/10 至约 1/3、约 1/8 至约 1/6、约 1/5、约 1/4、约 1/3 或约 1/2。

[0190] 在另一个优选的实施方式中,与当单独给予所述试剂时的频率相比,一种或更多种抗钙粘蛋白试剂和一种或更多种抗钙粘蛋白肽或模拟肽,或与任一或两者结合的其他治疗剂的组合应用减少给予所述试剂的频率。因此,这些组合允许使用比先前需要实现期望的治疗目的的每一种试剂低和 / 或少的剂量。

[0191] 可以在单独或分开的应用中给予剂量。可以一次给予剂量,或可以重复应用。典型地,将每周重复应用直到例如促进创伤愈合,或可以在例如创伤愈合减速或停止的事件中作出重复应用。可以间隔 3-7 天或更多应用剂量。在慢性创伤的情况下,例如,可作出重复应用,例如,每周一次或两周一次或每月一次或以其他频率,例如,如果并且当,例如,创伤愈合减慢或停止时。对于某些适应症,如某些眼部应用,可以采用更高频率的给药,最高达每小时地。

[0192] 在组合治疗中,可以通过相同的或不同的途径给予一种或更多种抗钙粘蛋白试剂,单独或与一种或更多种治疗剂组合。可以在治疗期间在不同的时间单独地给予多种试剂,或以分开或单一的组合形式同时地给予。

[0193] 在某些组合治疗实施方式中,在一个组合物中给予抗钙粘蛋白试剂或抗 ZO-1 试剂,而在第二组合物中给予第二治疗剂,它是第二抗钙粘蛋白试剂、抗连接蛋白试剂和 / 或抗骨桥蛋白试剂。在这些实施方式的某些中,在第二组合物之前给予第一组合物。在其他实施方式中,在第二组合物之后给予第一组合物。在还有的其他实施方式中,在第二组合物之前和之后给予第一组合物。在还有的其他实施方式中,在第一组合物之前和之后给予第二组合物。在进一步这样的实施方式中,约于第二组合物相同的时间给予第一组合物。

[0194] 优选地,通过局部给予(外周地或直接地给予位点)给予一种或更多种抗钙粘蛋白试剂和 / 或抗 ZO-1 试剂,包括但不限于使用固体支撑物(support)和药用制剂(如凝胶剂、混合物、悬浮剂和软膏剂)的局部给予(如敷料剂和其他基质)。在一个实施方式中,固体支撑物包括进入处理位点的生物适合的膜或插入物。在另一个实施方式中,固体支撑物包括敷料剂或基质。在本发明的一个实施方式中,固体支撑物组合物可以是缓释固体支撑物组合物,其中抗钙粘蛋白试剂,单独的或以与一种或更多种另外的治疗剂的混合物或组合,分散于缓释固体基质如藻朊酸盐、胶原或合成的生物可吸收的聚合物的基质中。优选地,固体支撑物组合物是无菌的或低生物负担的。在一个实施方式中,可以使用包含两种或更多种抗连接蛋白试剂的清洗液。

[0195] 随着一段时间,在某些情况下约 1-2 小时、约 2-4 小时、约 4-6 小时、约 6-8 小时或约 24 小时或更长,递送包含一种或更多种活性成分的本发明的制剂,在某些更严重的伤害或病况中可以是特别有利的。

[0196] 虽然递送周期将取决于待诱导钙粘蛋白或钙粘蛋白复合体调节的位点和期望的治疗效果,但是提供约 0.5-1 小时、约 1-2 小时、约 2-4 小时、约 4-6 小时、约 6-8 小时或约

24 小时或更长的连续的或缓释递送。根据本发明,在连同药学上可接受的载体或媒介物的制剂中,特别是以用于连续或缓慢释放给予的制剂的形式,通过包括一种或更多种抗钙粘蛋白试剂物质,单独或组合,实现这种释放。

[0197] 如提到的,可以在受伤之前、期间或立即在受伤之后例如,或可能或怀疑导致疤痕、粘附或纤维化的步骤之后,给予本发明的一种或更多种试剂,例如,或在受伤之后或在可能或怀疑导致粘附的步骤之后约 180、约 120、约 90、约 60 或约 30 天内,但是优选地在约 10、约 9、约 8、约 7、约 6、约 5、约 4、约 3 或约 2 或更少天内,和最优选地在约 24、约 12、约 10、约 9、约 8、约 7、约 6、约 5、约 4、约 3、约 2 小时内,或在约 60、约 45、约 30、约 15、约 10、约 5、约 4、约 3、约 2、约 1 分钟内。例如,也可以在可能或怀疑导致粘附的步骤之前和 / 或期间给予本发明的一种或更多种试剂。

[0198] 可以实现期望的结果的任何方式给予本发明的试剂和试剂组合。优选的方法包括管周 (peritubular) 给予 (在外科手术时直接应用或使用内窥镜、超声、CT、MRI 或荧光镜指导);“涂覆”外科移植物;和在外科手术位点处放置药物洗脱性聚合物移植物。在优选的实施方式中,将按重量计算 0.5% 至 20% 一种或更多种抗钙粘蛋白试剂装载到聚合载体中 (如在以下实施例中描述的) 且作为“糊剂”、“薄膜”或“缠料”应用于管周 (肠系膜) 表面,其在一段时期内释放药物使得减少外科手术粘附的发病率。在内窥镜步骤期间,聚合物制剂可作为“喷雾”经由内窥镜的运输端口应用于在手术期间操作的腹部的肠系膜和盆腔器官。在特别优选的实施方式中,管周组合物是按重量计算约 0.1% 至约 5% 活性组分。在另一个优选的实施方式中,将含有约 0.1% 至约 20% 或更多的一种或更多种活性组分的聚合物涂层应用于外科移植物的表面 (例如,乳房移植物、人造关节、血管移植物,等) 以阻止植入物的附近的封装 / 不适当的疤痕形成。在还有的另一个优选的实施方式中,将含有约 0.01% 至约 20% 或更多的一种或更多种活性试剂的聚合移植物直接地应用于外科手术位点 (例如,直接地应用到静脉窦腔、胸腔、腹腔或神经外科期间的手术部位),使得粘附形成例如被阻止或减少。在一个实施方式中,可以经由荧光镜指导的关节内注射给予一种或更多种活性试剂。

[0199] 在另一个实施方式中,将由医师,在外科手术时或紧接外科手术后使用并在外科手术期间或腹腔内给予含有约 1 至约 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (优选地约 10 至约 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 的灌洗流体。在所有的实施方式中,将以对调整试剂的效力和耐受度调整的当量剂量给予其他抗钙粘蛋白试剂和 / 或抗 ZO-1 试剂,单独或与其他治疗剂组合。

[0200] 此处描述的给予的途径和剂量仅意在作为指导,因为熟练的医师将确定给予的最佳途径和对于任何特定的患者和病况的剂量。

[0201] 治疗具有此处引用或描述的疾病、病症或病况的受试者和在外科手术步骤之前或之后治疗受试者的任何试剂和方法可以利用此处描述的任何剂量、剂量形式、制剂和 / 或组合物的给予。

[0202] 敷料剂和基质

[0203] 在一个方面中,以敷料剂或基质的形式提供一种或更多种活性试剂。在某些实施方式中,以液体、半固体或固体组合物的形式提供本发明的一种或更多种试剂用于直接地应用,或将组合物应用于固体接触层如敷料纱布或基质的表面,或并入其中。例如,可以以流体或凝胶的形式提供敷料组合物。可以与用于局部应用的传统药学赋形剂组合提供一种

或更多种活性试剂。适当的载体包括：普朗尼克凝胶、泊洛沙姆凝胶、含有纤维素衍生物的水凝胶，纤维素衍生物包括羟乙基纤维素、羟甲基纤维素、羧甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素和它们的混合物；和含有聚羧乙烯（卡波普，Carbopol）的水凝胶。适当的载体也包括用于局部药制剂的乳霜 / 软膏，例如，基于西土马哥乳化软膏的乳霜。上述载体可包括藻酸盐（如增稠剂或兴奋剂（stimulant））、防腐剂如苯甲醇、控制 pH 的缓冲剂如磷酸氢二钠 / 磷酸二氢钠、调节同渗容摩（osmolarity）的试剂如氯化钠和稳定剂如 EDTA。

[0204] 除了先前提到的生物基质之外，适当的敷料剂或基质可以包括，例如，具有一种或更多种抗钙粘蛋白试剂的以下各项（或单独或与之组合给予的其他活性试剂）：

[0205] 1) 吸收剂：适当的吸收剂可以包括，例如，吸收性敷料剂，例如，其可以与高吸收性纤维层如，例如，纤维素、棉或人造纤维组合提供半粘附品质或非粘附层。可替换地，吸收剂可以被用作初级或二级（主要的或次要的，primary or secondary）敷料剂。

[0206] 2) 海藻酸盐：适当的海藻酸盐包括，例如，非纺织的、无粘着力垫和由天然多糖纤维或来源于海藻的干凝胶组成的丝带的敷料剂。例如，适当的海藻酸盐敷料剂可以通过接触分泌液后的离子交换的过程形成潮湿的凝胶。在某些实施方式中，将海藻酸盐敷料剂设计为软的和顺从的，在不规则的形状区域上易于包装、缩拢或应用。在某些实施方式中，海藻酸盐敷料剂可与第二敷料剂一起使用。

[0207] 3) 抗菌敷料剂：适当的抗菌敷料剂可以包括，例如，可以促进生物活性试剂的递送的敷料剂，如，例如，银和聚亚己基双胍（PHMB），以在需要或期望的地方维持抗感染的效力。在某些实施方式中，例如，适当的抗菌敷料剂可以作为海绵、浸渍的纺织纱布、薄膜敷料剂、吸收性产品、岛状物敷料剂、尼龙织物、无粘着屏障层或材料的组合可用。

[0208] 4) 生物学 & 生物合成的：适当的生物敷料剂或生物合成的敷料剂可包括，例如，凝胶、溶液或来源于天然来源（例如，猪或牛）的半渗透薄片。在某些实施方式中，将凝胶或溶液应用于治疗位点并使用用于屏障保护的敷料剂覆盖。在另一个实施方式中，原位放置生物类的（例如，猪肠粘膜或膀胱组织）或生物合成类的薄片，其可用作膜，在单一的应用之后停留在适当位置，或可以是生物敷料剂或生物合成的敷料剂，可以是提前制备的以包含一种或更多种，优选地两种抗钙粘蛋白试剂。

[0209] 5) 胶原：适当的胶原敷料剂可包括，例如，来源于例如牛科动物、猪或鸟类来源或其他天然来源或供体的凝胶、衬垫、颗粒、糊剂、粉末、薄片或溶液。在某些实施方式中，胶原敷料剂可以与治疗位点分泌液相互作用以形成凝胶。在某些实施方式中，可以与第二敷料剂组合使用胶原敷料剂。

[0210] 6) 复合材料：适当的复合材料敷料剂可以包括，例如，将生理上不同的成分组合到单一产品中以提供多功能的敷料剂，如，例如，细菌屏障、吸收和粘附。在某些实施方式中，例如，复合材料敷料剂由多层组成和包括半粘着或非粘着垫。在某些实施方式中，复合材料也可以包括，例如，无纺布纺织带或透明薄膜的粘性边界。在某些其他实施方式中，例如，复合材料敷料剂可起初级或二级敷料剂的作用，并且在还有的另一个实施方式中，可以与局部药学组合物组合使用敷料剂。

[0211] 7) 接触层：适当的接触层敷料剂可以包括，例如，置于区域上以保护组织免于例如与应用于治疗位点的其他试剂或敷料剂直接接触的薄的、非粘着的薄片。在某些实施方式中，可以展开接触层以符合治疗位点的区域的形状，并且是能渗透的以允许分泌液经过，

用于通过覆盖的、第二敷料剂吸收。在还有的另一个实施方式中,可以与局部药学组合物组合使用接触层敷料剂。

[0212] 8) 弹性绷带:适当的弹性绷带可以包括,例如,伸缩和符合躯体轮廓的敷料剂。在某些实施方式中,织物组合物可以包括,例如,棉、聚酯、人造丝或尼龙。在某些其他实施方式中,例如,弹性绷带可作为第二层或敷料剂提供吸收以将覆盖物保持在适当的位置,以提供压力或缓冲治疗位点。

[0213] 9) 泡沫:适当的泡沫敷料剂可包括,例如,具有能够保持流体的小的、敞开的单元的薄片和其他形状的泡沫状聚合物溶液(包括聚氨酯)。例如,示例性的泡沫可以是与其他材料组合浸渍的或分层的。在某些实施方式中,可基于泡沫的厚度和组成调整吸收能力。在某些其他实施方式中,接触治疗位点的区域可以是无粘着力的用于容易的去除。在还有的另一个实施方式中,可以与用作抗感染的屏障的粘着边界和/或透明薄膜敷层组合使用泡沫。

[0214] 10) 纱布 & 非纺织敷料剂:适当的纱布敷料剂和纺织敷料剂可包括,例如,具有不同程度的吸收性的干燥的纺织或非纺织海绵和缠料。示例性的织物组合物可以包括,例如,棉、聚酯或人造丝。在某些实施方式中,纱布和非纺织敷料剂可以是无菌的或散装(in bulk) 未经灭菌可获得的并且具有或没有粘合剂边界。示例性的纱布敷料剂和纺织敷料剂可用于清洗、包装和覆盖多个治疗位点。

[0215] 11) 水状胶体:适当的水状胶体敷料剂可以包括,例如,由明胶、果胶或羧甲基纤维素组成的晶片、粉末或糊剂。在某些实施方式中,晶片是自粘附的并且具有或不具有粘合剂边界和多种形状和尺寸可获得的。示例性的水状胶体在需要造型(contouring)的区域上是有用的。在某些实施方式中,可以与第二敷料剂组合使用粉末和糊剂水状胶体。

[0216] 12) 水凝胶(无定形的):适当的无定形(amorphous)水凝胶敷料剂可以包括,例如,不具有形状的水、聚合物和其他成分的制剂,设计用于提供(donate)水分和维持潮湿的治愈环境和/或用于再水化治疗位点。在某些实施方式中,可以与第二敷料剂覆盖物组合使用水凝胶。

[0217] 13) 水凝胶:浸渍型敷料剂:适当的水凝胶敷料剂可以包括,例如,用无定形水凝胶饱和的纱布和非纺织的海绵、绳索和条状物。无定形水凝胶可包括,例如,不具有形状的水、聚合物和其他成分的制剂,设计向干燥的治疗位点提供水分并维持潮湿的治愈环境。

[0218] 14) 水凝胶薄片:适当的水凝胶薄片可以包括,例如,不能溶于水和通过膨胀(swelling)与含水溶液相互作用的交联的亲水聚合物的三维网络。取决于它们的成分,示例性的水凝胶是高度地顺从的和可渗透的并且可以吸收不同量的排出物。在某些实施方式中,水凝胶对治疗位点是非粘着的或经处理易于去除的。

[0219] 15) 浸渍型敷料剂:适当的浸渍型敷料剂可以包括,例如,用溶液、乳剂、油、凝胶或一些其他药学活性化合物或载体试剂饱和的纱布和非纺织的海绵、绳索和条状物,包括,例如,盐水、油、锌盐、石油冻、三溴苯酚铋(塞罗仿,xeroform)和猩红(scarlet red)以及此处描述的化合物。

[0220] 16) 硅酮凝胶片:适当的硅酮凝胶片敷料剂可以包括,例如,由用网丝或织物加强或结合至网丝或织物的交联聚合物组成的软的覆盖物。

[0221] 17) 溶液：适当的液体敷料剂可以包括，例如，在细胞外基质中发现的多蛋白质物质和其他要素的混合物。在某些实施方式中，可在清创术和清洗之后将示例性的溶液应用于治疗位点，并且然后使用能吸收的敷料剂或非粘连垫覆盖。

[0222] 18) 透明薄膜：适当的透明薄膜敷料剂可包括在一面上使用粘合剂涂覆的不同厚度的聚合物膜。在某些实施方式中，透明薄膜不能渗透液体、水和细菌但是可渗透水蒸气和大气气体。在某些实施方式中，透明度允许治疗位点的可视化。

[0223] 19) 填料剂：适当的填料剂敷料剂可包括，例如，玻璃珠、乳霜、泡沫、凝胶、软膏、垫、糊剂、枕芯、粉末、绳索或其他制剂。在某些实施方式中，填料剂是非粘着的并且可以包括延时释放的 (time-released) 抗菌剂。示例性的填料剂对维持潮湿的环境、应对分泌液和用于例如局部 - 和完全厚度的创伤、受感染的创伤、引流创伤 (draining wounds) 和需要填充物的深度创伤的治疗可以是有用的。

[0224] 创伤治疗

[0225] 一般方面

[0226] 本发明涉及药学组合物和它们的应用的方法，其中组合物包含治疗有效量的一种或更多种抗钙粘蛋白试剂，单独或与一种或更多种治疗剂组合。组合物在例如，增强或促进创伤（例如，包括急性创伤和不能以预期速度治愈的创伤，如慢性创伤和对传统的创伤治疗或创伤治愈促进疗法是缓慢愈合或难于治愈 (refractory) 的其他创伤）和此处描述的其他疾病、病症和病况（包括特征是炎症或不期望的炎症的疾病、病症和病况）的治愈中是有用的。慢性创伤经常的特征是不期望的炎症。

[0227] 同样地，在其他组织损伤的情况中（特别是创伤），本发明的方法和组合物在促进创伤愈合过程、减少肿胀和炎症和使疤痕形成最小化中是有效的。这些形成在治疗纤维化的疾病、病症和病况中和在治疗、减少粘附、外科手术粘附和 / 或次级外科手术粘附的发生率或严重性或预防或阻滞上述粘附中是有用的。制剂在创伤的治疗中具有明确的益处，无论是外部创伤（包括烧伤）、内部创伤的结果或外科干预、以及慢性创伤的结果。

[0228] 组合物

[0229] 因此，在一个方面中，本发明提供用于在治疗性创伤处理中使用的组合物，其包含抗钙粘蛋白试剂和 / 或抗 ZO-1 试剂。在另一个方面中，本发明提供用于在治疗性创伤处理中使用的组合物，其包含至少一种抗钙粘蛋白试剂和至少一种其他治疗剂的种类，例如，抗连接蛋白试剂和 / 或抗 ZO-1 试剂。在优选的实施方式中，组合物进一步包含药学上可接受的载体或媒介物。

[0230] 在一个实施方式中，抗钙粘蛋白试剂选自自由以下组成的组：用于创伤治疗的抗钙粘蛋白多核苷酸、抗钙粘蛋白肽或模拟肽、粘附连接调节剂和钙粘蛋白复合体调节剂。在另一个实施方式中，抗 ZO-1 试剂选自自由以下组成的组：用于创伤治疗的抗 ZO-1 多核苷酸、抗 ZO-1 肽或模拟肽、粘附连接调节剂和 ZO-1 复合体调节剂。

[0231] 在优选的实施方式中，抗钙粘蛋白或抗 ZO-1 多核苷酸是反义多核苷酸。在一个优选的形式中，组合物含有仅对于一种钙粘蛋白蛋白质或一种 ZO-1 蛋白质的 mRNA 的一种或更多种反义多核苷酸。最优选地，这种钙粘蛋白蛋白质是 N- 钙粘蛋白。在另一个优选的形式中，组合物包含抗钙粘蛋白肽或模拟肽和钙粘蛋白或 ZO-1 蛋白质的 mRNA 的反义多核苷酸。最优选地，这种钙粘蛋白是 N- 钙粘蛋白。

[0232] 组合物可以包含多核苷酸或抗钙粘蛋白多肽或模拟肽,或具有任一或两者的其他抗钙粘蛋白试剂,其针对超过一种钙粘蛋白蛋白质。组合物可以包含多核苷酸或 ZO-1 肽或模拟肽,或具有任一或两者的其他抗 ZO-1 试剂,其针对超过一种 ZO-1 蛋白质。多核苷酸或抗钙粘蛋白肽或其他抗钙粘蛋白试剂针对的钙粘蛋白蛋白质中的一种是 N- 钙粘蛋白。多核苷酸或抗钙粘蛋白肽或其他抗钙粘蛋白试剂针对的其他钙粘蛋白蛋白质可以包括,例如,E- 钙粘蛋白、P- 钙粘蛋白、钙粘蛋白 11、钙粘蛋白 12、原钙粘蛋白蛋白质、桥粒芯蛋白蛋白质和桥粒胶蛋白蛋白质。此处表格中列出针对多种连接蛋白的适当的示例性的多核苷酸(和 ODN)。此处也提供适当的抗钙粘蛋白肽。也描述适当的粘附连接或钙粘蛋白复合体调节试剂。

[0233] 因此,在一个方面中,本发明提供用于在治疗创伤中使用的组合物,创伤包括慢性和缓慢或延迟愈合创伤。在另一个方面中,本发明提供用于在治疗纤维化或纤维化的疾病、病症或病况中使用的组合物。在可替换的方面中,本发明提供用于在预防和 / 或治疗异常的或过度的疤痕形成和 / 或过度的组织增生和相关的病症和病况中使用的组合物。在进一步的方面中,本发明提供它们用于在预防和 / 或减少粘附,包括外科手术粘附中使用的组合物和方法。在进一步的方面中,本发明提供它们的用于在预防和 / 或减少炎症中使用的组合物和方法。

[0234] 试剂盒、药物和制造的物品

[0235] 可选地,一种或更多种抗钙粘蛋白试剂和 / 或抗 ZO-1 试剂,单独或与一种或更多种其他治疗剂组合,也可以在药物的制造中使用。

[0236] 在一个方面中,本发明提供包括此处描述的一种或更多种组合物或制剂的试剂盒。例如,试剂盒可以包括包含有效量的一种或更多种抗钙粘蛋白试剂和 / 或抗 ZO-1 试剂,单独或与一种或更多种其他抗钙粘蛋白试剂物质和 / 或抗 ZO-1 试剂和 / 或其他治疗剂组合的组合物。

[0237] 也提供制造的物品,包括含有此处描述的本发明的组合物或制剂的容器和用于受试者的治疗的使用说明。例如,在另一个方面中,本发明包括制造的物品,其包括含有治疗有效量的一种或更多种抗钙粘蛋白试剂(单独或与一种或更多种其他治疗剂组合)的容器,和使用说明,包括用于受试者的治疗的应用。

[0238] 在一个方面中,本发明提供用于治疗创伤(包括慢性和缓慢或延迟愈合创伤)的试剂盒。在另一个方面中,本发明提供用于治疗纤维化或纤维化的疾病、病症或病况的试剂盒。根据可替换的方面,本发明提供用于预防和 / 或治疗异常的或过度的疤痕形成和 / 或过度的组织增生和病况的试剂盒,包括此处描述的一种或更多种制剂。在另一个方面中,本发明提供用于预防和 / 或减少粘附的试剂盒,包括此处描述的一种或更多种组合物或制剂。在另一个方面中,本发明提供用于预防和 / 或减少炎症的试剂盒,包括此处描述的一种或更多种组合物或制剂。

[0239] 提供用于预防和 / 或治疗创伤(包括慢性和缓慢或延迟愈合创伤)的制造的物品。在另一个方面中,提供用于预防和 / 或治疗纤维化或纤维化的疾病、病症或病况的制造的物品。也提供用于预防和 / 或治疗异常的或过度的疤痕形成和 / 或过度的组织增生和相关的病症和病况的制造的物品。提供用于预防和 / 或减少此处描述的粘附的另外的制造的物品。提供用于预防和 / 或减少此处描述的炎症的另外的制造的物品。

[0240] 治疗

[0241] 可结合或组合用于促进创伤的愈合的组合物使用本发明的组合物和制剂,例如,并且也可用于减少肿胀、炎症和 / 或疤痕形成。本发明的组合物和制剂也可与用于促进和 / 或改善急性或慢性创伤 (包括缓慢愈合和延迟愈合创伤) 的愈合的组合物结合或组合使用。在一个方面中,创伤将是外科手术或外伤或潜在的身体病况例如,糖尿病、外周性水肿、脉管炎或心血管疾病的结果。

[0242] 在一个方面中,本发明涉及促进或改善受试者的创伤愈合的方法,包括给予治疗有效量的一种或更多种抗钙粘蛋白试剂,单独或与一种或更多种其他治疗剂组合。在某些实施方式中,这样的给予有效地减少炎症、促进细胞迁移以加速创伤闭合和愈合,和 / 或促进表皮生长和表面恢复。在某些实施方式中,给予本发明的一种或更多种组合物有效地减少或阻止疤痕形成,包括不规则的疤痕形成。

[0243] 在一个方面中,本发明涉及促进或改善受试者的创伤愈合的方法,包括在创伤或组织损伤或损害的其他位点处,以有效地调节粘附连接和 / 或钙粘蛋白复合体形成和 / 或稳定性的量、以与一种或更多种其他治疗剂组合给予一种或更多种抗钙粘蛋白试剂和 / 或抗 ZO-1 试剂。

[0244] 在还有的进一步的方面中,本发明提供在遭受创伤 (例如,外科手术创伤 (如,例如,在美容、疤痕修复和其他外科手术中)) 的患者中减少疤痕形成和 / 或改善疤痕外观的方法,其包括将一种或更多种抗钙粘蛋白试剂和 / 或抗 ZO-1 试剂,单独或与一种或更多种其他治疗剂组合,给予至所述创伤以在所述创伤的位点处和直接邻近所述创伤位点处下调一种或更多种钙粘蛋白蛋白质和 / 或一种或更多种 ZO-1 蛋白质的表达的步骤。再一次,创伤可以是外伤或外科手术的结果,例如,其中在马上外科手术修复前和 / 或它的闭合前将制剂应用于创伤。如此处提到的,在减少或改善疤痕形成或外观,或预防或减少炎症的方法中,优选地,与适当量的另一种创伤愈合试剂 (例如,抗连接蛋白试剂或抗骨桥蛋白试剂) 组合,或在给予适当量的另一种创伤愈合试剂 (例如,抗连接蛋白试剂或抗骨桥蛋白试剂) 之后或之前给予抗钙粘蛋白试剂和 / 或抗 ZO-1 试剂。

[0245] 在一个方面中,本发明涉及减少、预防或改善受试者中的组织损伤 (包括炎症损伤) 的方法,包括给予一种或更多种抗钙粘蛋白试剂和 / 或抗 ZO-1 试剂,单独或与一种或更多种其他治疗剂组合。

[0246] 在进一步的方面中,本发明涉及减少肿胀和 / 或炎症的方法,例如,作为治疗急性或慢性创伤和 / 或组织 (包括经受物理创伤的组织) 的部分,其包括将一种或更多种抗钙粘蛋白试剂和 / 或抗 ZO-1 试剂,单独或与一种或更多种其他治疗剂组合,给予或接近所述创伤或组织的步骤。在一个实施方式中,创伤是对组织的物理外伤的结果,组织包括真皮组织 (例如,导致压力溃疡) 和神经元组织如脑、脊髓或视神经或皮肤或眼。

[0247] 在一个方面中,本发明涉及持续给予一种或更多种抗钙粘蛋白试剂和 / 或抗 ZO-1 试剂,单独或与一种或更多种其他治疗剂组合。在一个实施方式中,以至少约 0.5 小时、约 1-24 小时、至少约 2 小时、至少约 3 小时、至少约 4 小时、至少约 5 小时、至少约 6 小时、至少约 7 小时、至少约 8 小时、至少约 9 小时、至少约 10 小时、至少约 11 小时、至少约 12 小时或至少约 24 小时给予一种或更多种试剂。在一个实施方式中,在持续时期上下调钙粘蛋白表达。在另一个实施方式中,在优选的一段时间内,调节,优选地部分地或完全地抑制钙粘蛋

白复合体和 / 或粘附连接形成和 / 或稳定性。优选地, 这样的一段时间是至少约 1、2、4、6、8、10、12 或 24 小时。根据一个实施方式, 创伤是慢性创伤。适当的受试者包括糖尿病受试者。其他受试者包括, 例如, 具有外周性水肿、脉管炎或心血管疾病的那些。其他受试者包括, 例如, 具有静脉疾病, 包括静脉功能不全, 或动脉疾病, 包括动脉功能不全的那些。

[0248] 在一个方面中, 本发明提供治疗具有创伤的受试者的方法, 包括将有效量的一种或更多种抗钙粘蛋白试剂和 / 或抗 ZO-1 试剂, 单独或与一种或更多种其他治疗剂组合, 持续给予至创伤。

[0249] 在另一个方面中, 提供用于治疗具有慢性创伤的受试者的方法。这样的方法包括将一种或更多种抗钙粘蛋白试剂和 / 或抗 ZO-1 试剂, 单独或与一种或更多种其他治疗剂组合给予至受试者。

[0250] 在一个方面中, 本发明涉及用于治疗或预防慢性创伤的方法, 包括给予需要它的受试者有效量的抗钙粘蛋白试剂和 / 或抗 ZO-1 试剂, 单独或与一种或更多种其他治疗剂组合。在一个实施方式中, 慢性创伤是慢性皮肤创伤并且将本发明的组合物给予至与所述受试者的皮肤相关的皮肤或组织持续有效的一段时间。例如, 适于治疗的慢性皮肤创伤可以选自压力溃疡、糖尿病、静脉性溃疡、动脉性溃疡、脉管炎溃疡和混合型溃疡和此处提到的其他组成的组。慢性创伤可以是动脉性溃疡, 其包括起因于完全的或部分的动脉堵塞的溃疡形成。慢性创伤可以是静脉郁血溃疡, 其包括起因于静脉瓣的功能失灵和相关的血管疾病的溃疡形成。慢性创伤可以是外伤诱导的溃疡。慢性、缓慢或延迟 - 愈合创伤可以是例如真皮或眼部的, 与另外的器官组织相关 (例如, 肾、肠、肝脏、肺), 或在 CNS 中。

[0251] 当没有作为固定组合给予时, 优选的组合治疗方法包括顺序给予一种或更多种抗钙粘蛋白试剂和 / 或抗 ZO-1 试剂和一种或更多种其他治疗剂。优选地, 在彼此的至少约二分之一小时内顺序地给予试剂。也可关于彼此一小时、彼此约一天或约一周或作为另外认为适当的时间给予试剂。

[0252] 在一个实施方式中, 用于治疗或预防慢性创伤的方法包括持续给予一种或更多种抗钙粘蛋白试剂和 / 或抗 ZO-1 试剂, 单独或与一种或更多种其他治疗剂组合。在一个实施方式中, 以持续释放制剂给予一种或更多种组合物。在另一个实施方式中, 给予一种或更多种组合物持续的一段时间。便利地, 组合物有效地减少钙粘蛋白和 / 或 ZO-1 蛋白质水平, 或阻断或减少钙粘蛋白或 ZO-1 复合体和 / 或粘附连接形成和 / 或稳定性, 持续至少约 1-2 小时、至少约 2-4 小时、约 4-6 小时、约 4-8 小时、约 12 小时、约 18 小时或约 24 小时。可被治疗的受试者包括糖尿病受试者, 和具有其他溃疡的患者, 包括静脉性溃疡和此处描述和本领域已知的其他。

[0253] 在一个方面中, 本发明涉及预防和 / 或治疗受试者的纤维化或纤维化的疾病、病症或病况的方法, 包括给予根据本发明的治疗有效量的组合物。在某些实施方式中, 给予有效地减少纤维化。在某些实施方式中, 给予有效地预防或减少挛缩。

[0254] 在一个方面中, 本发明涉及预防和 / 或治疗受试者的纤维化或纤维化的疾病、病症或病况的方法, 包括有效地减少纤维化的治疗有效量的一种或更多种抗钙粘蛋白试剂和 / 或抗 ZO-1 试剂的给予。在一个实施方式中, 抗钙粘蛋白试剂和 / 或抗 ZO-1 试剂, 和可选地, 一种或更多种抗连接蛋白试剂的给予有效地预防或减少挛缩。

[0255] 根据方法的一个实施方式, 受试者具有选自以下组成的组的病症: 硬皮病、肾脏

纤维化（包括糖尿病性肾病）、心肌纤维化（例如，心肌纤维化）、肺纤维化（例如，肾小球硬化症肺纤维化、特发性肺纤维化、矽肺、石棉肺、间质性肺病、和纤维化肺疾病、和化疗 / 辐射诱导的肺纤维化）、口腔纤维化、心内膜心肌纤维化、三角肌纤维化、胰腺炎、炎症性肠病、克罗恩氏病、结节状筋膜炎、嗜曙红筋膜炎、特征是由不同程度的纤维组织代替正常肌肉组织的广泛性纤维化综合征、腹膜后纤维化、肝纤维化、肝硬化、慢性肾功能衰竭、骨骼纤维化（骨髓纤维化）、药物诱导的麦角中毒、李-佛美尼综合症中的恶性胶质瘤、分散的恶性胶质瘤、髓细胞白血病、急性骨髓性白血病、骨髓增生异常综合征、骨髓增殖综合征、妇科癌症、卡波济氏肉瘤、汉森氏病、成胶性结肠炎和急性纤维化。根据这个实施方式，硬皮病可以是硬斑病、广泛性硬斑病或线性硬皮病。也根据这个实施方式，肾脏纤维化可以是肾小球硬化、肾脏肾小管间质纤维化或进行性肾疾病。进一步根据这个实施方式，肺纤维化可以是弥散间质肺纤维化。

[0256] 根据方法的另一个实施方式，纤维化是急性纤维化。急性纤维化可能响应多种形式的外伤，包括意外伤害、感染、辐射或化疗治疗。

[0257] 根据方法的另一个实施方式，纤维化是慢性纤维化。本发明也包括用于完全或部分地治疗和 / 或预防多种疾病、病症和病况或它们的复发的方法，多种疾病、病症和病况包括例如，包膜挛缩 (capsular contracture)、迪皮特朗氏挛缩（掌腱膜挛缩症, Dupuytren's contracture）、福耳克曼氏挛缩 (Volkmann's contracture)、Ledderhose 氏挛缩（跖部纤维瘤病, Ledderhose's contracture）、Peyronie 氏挛缩（阴茎硬结症, Peyronie's contracture），包括给予有效量的组合物，包含抗钙粘蛋白试剂，优选地，抗钙粘蛋白多核苷酸。在某些优选的实施方式中，在释放步骤（例如，强压性操作、敞开释放、关节镜释放或疤痕的减瘤）之前、之时和 / 或之后将组合物给予至伤害的位点以预防疤痕性的和异常的组织 / 或进一步挛缩的复发。

[0258] 在一个方面中，本发明涉及用于预防和 / 或治疗受试者中的异常的或过度的疤痕形成和 / 或过度的组织增生或相关的病症和病况的方法，包括给予治疗有效量的一种或更多种抗钙粘蛋白试剂和 / 或抗 ZO-1 试剂，单独或与一种或更多种其他治疗剂组合。在某些实施方式中，给予有效地减少异常的或过度的疤痕形成和 / 或过度的组织增生和相关的病症和病况。

[0259] 在一个方面中，本发明涉及用于预防和 / 或治疗受试者中的异常的或过度的疤痕形成和 / 或过度的组织增生和相关的病症和病况的方法，包括给予治疗有效量的抗钙粘蛋白和 / 或抗 ZO-1 试剂。在一个实施方式中，抗钙粘蛋白和 / 或抗 ZO-1 试剂有效地减少异常的或过度的疤痕形成和 / 或过度的组织增生和相关的病症和病况。

[0260] 在一个方面中，本发明涉及持续给予抗钙粘蛋白和 / 或抗 ZO-1，单独或与一种或更多种其他治疗剂组合。

[0261] 根据一个实施方式，受试者具有异常的疤痕，选自由瘢痕疤痕、增生性疤痕、广泛分布的疤痕和萎缩性疤痕的组。

[0262] 根据另一个实施方式，待治疗的受试者包括具有已经历的外伤、手术治疗、烧伤和其他类型伤害的那些，其导致，或可以导致异常的或过度的疤痕形成，以及过度的疤痕形成和其他类型的异常的组织增生，包括瘢痕疤痕、增生性疤痕、广泛分布的疤痕和萎缩性疤痕。

[0263] 在某些实施方式中,将一种或更多种抗钙粘蛋白和 / 或抗 ZO-1 试剂,单独或与一种或更多种其他治疗剂组合,给予在手术期间或由于外伤暴露的或受伤的表皮、结缔、肌肉和神经组织或其他组织。在某些实施方式中,局部地给予抗钙粘蛋白试剂。在其他实施方式中,植入或灌注或注射抗钙粘蛋白和 / 或抗 ZO-1 试剂。

[0264] 以下实例应该被理解为仅为了说明提供而不构成对本发明的范畴的限制。

[0265] 实施例

[0266] 实施例 1

[0267] 靶向 N- 钙粘蛋白的寡核苷酸

[0268] 这个实施例描述关于 N- 钙粘蛋白 AS ODN(反义寡脱氧核苷酸)和 shRNA(小发夹 RNA 分子)的几个候选物。

[0269] 已知人类 N- 钙粘蛋白的核苷酸序列。全长 N- 钙粘蛋白 cDNA 的核苷酸序列(GenBank 登录号 EL733845 ;SEQ ID NO:2) 包括 2,721 个核苷酸碱基并编码 906 个氨基酸,且如下:

[0270]

```
atgtgccgga tagcgggagc gctgcccacc ctgctgccgc tgctggcggc cctgcttcag gcgtctgtag    70
aggcttctgg tgaatcgca ttatgcaaga ctggatttcc tgaagatgtt tacagtgcag tcttatcgaa   140
ggatgtgcat gaaggacagc ctcttctcaa tgtgaagttt agcaactgca atggaaaaag aaaagtacaa   210
tatgagagca gtgagcctgc agattttaag gtggatgaag atggcatggg gtatgccctg agaagcttct   280
cactctcttc tgaacatgcc aagticttga tataatgccc agacaaagag acccaggaaa agtggcaagt   350
ggcagtaaaa ttgagcctga agccaacctt aactgaggag tcaagtgaag agtcagcaga agttgaagaa   420
atagtgttcc caagacaatt cagtaagcac agtggccacc tacaaggcca gaagagagac tgggtcatct   490
ctccaatcaa ctgccagaa aactccaggg gaccttttcc tcaagagctt gtcaggatca ggtctgatag   560
agataaaaac ctttactgc ggtacagtgt aactgggcca ggagctgacc agcctccaac tggtatcttc   630
attatcaacc ccattcggg tcagctgtcg gtgacaaagc ccctggatcg cgagcagata gcccggtttc   700
atttgagggc acatgcagta gatattaatg gaaatcaagt ggagaacccc attgacattg tcatcaatgt   770
tattgacatg aatgacaaca gacctgagtt ctacaccag gtttggaatg ggacagttcc tgagggatca   840
aagcctggaa catatgtgat gaccgtaaca gcaattgatg ctgacgatcc caatgccctc aatgggatgt   910
tgaggtagag aatcgtgtct caggctccaa gcacccttc acccaacatg ttacaatca acaatgagac   980
tggtgacatc atcacagtgg cagctggact tgatcgagaa aaagtgaac agtatagtt aataattcaa  1050
gctacagaca tggaaggcaa tcccatatat ggctttcaa acacagccac ggccgtcatc acagtgacag  1120
```

[0271]

atgtcaatga caatcctcca gagtttactg ccatgacgtt ttatggtgaa gttcctgaga acagggtaga 1190
 catcatagta gctaattcaa ctgtgaccga taaggatcaa ccccatcac cagcctggaa cgcagtgtac 1260
 agaatacgtg gcgagatcc tactggacgg ttgccatcc agaccgacca aaacagcaac gacgggtag 1330
 tcaccgtggt caaaccaatc gactttgaag caaafaggat gttgtcctt actgttctg cagaaaatca 1400
 agtgccatta gccaaaggaa ttacgacccc gccctagtca actgcaacca tgtctgttac agttattgac 1470
 gtaaatgaaa acccttattt tgcccccaat cctaagatca ttgcccaaga agaagggtt catgccggtta 1540
 ccatgttgac aacattcact gctcaggacc cagatcgata tatgcagcaa aatattagat aactaaatt 1610
 atctgatcct gccaaattggc taaaaataga tctgtgaat ggacaaataa ctacaattgc tgttttgac 1680
 cgagaatcac caaatgtgaa aaacaataa tataatgcta ctttcttgc ttctgacaat ggaattcctc 1750
 ctatgagtgg aacaggaacg ctgcagatct atttacttga tattaatgac aatgcccctc aagtgttacc 1820
 tcaagaggea gagacttgcg aaactccaga cccaattca attaatatta cagcacttga ttatggcatt 1890
 gatccaaatg ctggaccatt tgctttgat ctctcttat ctccagtgc tattaagaga aattggacca 1960
 tcactcggct taatggtgat ttgtctcgc ttaattttaa gataaaattt ctggaagctg gtatctatga 2030
 agttcccatc ataatacag attcgggtta tcttcccaa tcaaatattt ccatctgcg cgtgaagggt 2100
 tgccagtgtg actccaacgg ggactgcaca gatgtggaca ggattgtggg tgcggggctt ggcaccgggtg 2170
 ccatcattgc catcctgtc tgcacatca tctgtctat cctgtgtctg atgtttgtgg tatggatgaa 2240
 acgcccgggt aaagaacgcc aggccaaaca acttttaatt gatccagaag atgatgtaag agataatatt 2310
 ttaaaatatg atgaagaagg tggaggagaa gaagaccagg actatgact gagccagctg cagcagcctg 2380
 aactgtgga gccatgatcc atcaagcctg tgggaatccg acgaatgat gaaagacca tccacgtga 2450
 gcccagtat cgggtccgat ctgcagcccc acacctgga gacattggg acttcattaa tgagggcctt 2520
 aaagcggctg acaatgacce cacagctcca ccatatgact cctgttagt gtttgactat gaaggcagt 2590
 gtccaactgc tgggtcctg agctccctta attctcaag tagtggtgtg gagcaggact atgattacct 2660
 gaacgactgg gggccacgg tcaagaaact gctgacatg tatgtggag gtgatgactg a 2721

[0272] 靶向适于扰乱 N- 钙粘蛋白表达的任何反义分子或 shRNA 在实践本发明中将是有益的。这个方面中的一个适当的途径涉及 RNA 干扰 (RNAi)。正如具有很多其他基因的表达的情况,通过使用 RNAi 在体内或体外敲低 N- 钙粘蛋白表达。可用于 RNAi 的分子的代表性的类别是短发夹 RNA (shRNA)。可使用称为 pSuper-Ncad 的载体如下构建一个这样的抗 N- 钙粘蛋白 shRNA 分子。使用以下正义和反义寡核苷酸 (ON) 装配这个载体:正义 ODN:

[0273] 5'-GATCCCCGATGTTTACAGCGCAGTCTTTCAAGAGAAGACTGCGCTGTAAACATCTTTTGGAA A-3' (SEQ ID NO:3)

[0274] 反义 ON:

[0275] 5'-AGCTTTTCCAAAAAGATGTTTACAGCGCAGTCTTGTAAAGACTGCGCTGTAAACATCGGG-3' (S

EQ ID NO:4)

[0276] 可使正义和反义寡核苷酸退火且将其结合至线性化的 pSuper 载体中 (OligoEngine:catalog VEC-PBS-0011)。这个靶序列对应于对由 Fairless, et al. ((2005), Mol. Cell. Neurosci., vol. 28:253-263 报道的大鼠 Ncad 的 RNAi 的那个。作为阴性对照,可设计由 Ncad 的扰乱靶向序列组成的 shRNA 载体以构建阴性对照。作为实施例,以下正义和反义 ON 可用于构建称为 pSuper-Ncad-scrambled 的载体。正义和反义序列是:

[0277] 正义 ON:

[0278] 5'-GATCCCCGCTATCGCTACGTGTAAGTTTCAAGAGAACTTACACGTAGCGATAGCTTTTTGGAAA-3' (SEQ ID NO:5)

[0279] 反义 ON:

[0280] 5'-AGCTTTTCCAAAAAGCTATCGCTACGTGTAAGTTCTCTTGAAACTTACACGTAGCGATAGCGGG-3' (SEQ ID NO:6)

[0281] 靶向人类 N-钙粘蛋白的反义和短发夹 RNA 也包括靶向特异性序列的那些。N-钙粘蛋白基因中的一个这样的代表性的靶标核苷酸序列是:5'-GACTGGATTTCCTGAAGAT-3' (SEQ ID NO:7);人类 N-钙粘蛋白 GenBank 登录号 BC036470 的核苷酸 215-233,其也是 GenBank 登录号 EL733845 的碱基 99-117;上述的 SEQ ID NO:8。

[0282] 实施例 2

[0283] 靶向 Cx43 和 N-钙粘蛋白,其在静脉性腿溃疡中异常地上调,影响 Rho GTP 酶的迁移、粘附和活性

[0284] 综述

[0285] 静脉性腿溃疡可以是非常难于治愈并且代表没有目前可用的有效的治疗性处理的重要的医学需要。在这个实施例描述的实验中,在来自人类静脉性腿溃疡的创伤边缘活组织检查中发现,与在完整的皮肤中观察到的以下蛋白质水平相比,真皮 N-钙粘蛋白 (N-cad)、闭锁小带蛋白 -1 (Zonular Occluden-1, ZO-1) 和间隙连接蛋白质连接蛋白 43 (Cx43) 的显著的上调,并且与在急性、愈合创伤中看到的 Cx43 表达的下调形成明显对比。在 3T3 纤维母细胞中靶向这些蛋白质的表达以评价它们在静脉性腿溃疡治愈中的作用。在划痕实验 (scratch wound-healing assay) 中,敲低 Cx43 和 N-cad 加速细胞迁移。减少的 Cx43 增加高尔基体再定位,而减少细胞粘附和增殖。此外,连接蛋白 43 和 N-cad 敲低导致对在划痕之后的纤维母细胞细胞骨架动力学的深远影响。细胞表现较长的板状伪足突出,缺少在受伤对照细胞的前缘处看到的 F-肌动蛋白条带。这种表型伴随 Rac-1 和 RhoA GTP 酶的扩张性激活,如通过 Förster 共振能量转移和下拉实验显示的。在其他之中,这些结果显示, Cx43 和 N-cad 将是促进静脉性腿溃疡的治愈中的治疗性靶点,至少部分通过细胞粘附、迁移、增殖和细胞骨架动力学的不同的贡献行使作用。

[0286] 介绍

[0287] 慢性创伤,如糖尿病足溃疡、压力溃疡和静脉性腿溃疡 (VLU),是日益增加的世界问题,其中估计西方国家的人口的 1-2%将在他们的一生的过程中发展慢性创伤。慢性创伤代表保健服务上的主要的经济负担,估计每年 USA 支出 \$250 亿。随着人口中日渐增加的老年人和糖尿病的数量,预期这个支出数字逐年上升。不幸地,对于这些使人虚弱的创伤存在

很少有效的治疗选项,并且仍然存在对于有效的新的治疗的重要需要。

[0288] Cx43 是皮肤中的最普遍存在的连接蛋白蛋白质,在角质细胞、纤维母细胞、内皮细胞和真皮附器 (appendage) 中表达。已知,啮齿动物模型中,将含有 Cx43- 特异性反义凝胶局部应用至急性创伤显著地加速愈合过程同时减少炎症和疤痕尺寸。

[0289] 在正常的愈合过程中, Cx43 蛋白质在第一个 24-48 小时中在角质细胞中开始下调,随着 (as) 细胞变得迁移的和向前爬行以封闭创伤。在 Cx43 条件性敲除小鼠中的实验之后,稍后报道 Cx43 的下调似乎是创伤愈合期间的角质细胞的协调的增殖和转移的必要条件。相反,显示在 STZ 糖尿病大鼠中 (用于慢性创伤的模型) Cx43 在创伤边缘角质细胞中上调而不是下调,并且迁移被延迟,直到发生下调。将 Cx43 反义应用至 STZ 糖尿病大鼠创伤阻止 Cx43 的异常上调并将创伤闭合恢复至正常速度或更好。也显示过表达 Cx43 在体内大鼠角膜抓伤伤害模型中抑制角膜内皮创伤愈合,而用 Cx43 反义的敲低使其加速。也在从九个混合型 and 两个糖尿病腿溃疡获取的大多数活组织的创伤边缘上的细胞中检测到 Cx43。

[0290] 慢性创伤的愈合的一个关键阻碍是纤维母细胞迁移、增殖和产生肉芽组织的失败。大多数先前的报道集中于创伤愈合中的表皮的 Cx43,而将很少的关注应用于真皮纤维母细胞中的 Cx43。在这个实施例描述的工作中,体内和体外模型的组合用于分析升高的 Cx43 表达的含义,发现其在人类慢性 VLU 的真皮中不期望地上调,并且与过表达 Cx43 的抓伤的纤维母细胞迁移的减少的速度相关。除了 Cx43 之外,也发现了 ZO-1 和 N-cad, (其与 Cx43 以及彼此相互作用) 在人类慢性 VLU 的真皮中异常地过表达。靶向 Cx43 在体内和体外减少 ZO-1 和 N-cad 的表达水平。在细胞划痕实验中,敲低 Cx43 和 N-cad,但是不是单独的 ZO-1,加速细胞迁移。减少 Cx43 或 N-cad 也增加高尔基体极化同时减少纤维母细胞中的增殖和细胞粘附。此外,靶向 Cx43 或 N-cad 伴随细胞骨架改变、增加板状伪足突出和活化 Rho GTP 酶。这些结果支持治疗上靶向 Cx43 和 N-cad 以通过涉及纤维母细胞中的细胞接触的重塑和粘附依赖性细胞骨架修饰改善创伤修复。

[0291] 材料和方法

[0292] 人类慢性 VLU 和相配的完整的皮肤样品

[0293] 在获得书面知情同意之后并根据可适用的指南进行从慢性静脉溃疡腿创伤的创伤边缘钻取活组织检查和正常手臂活组织检查的采集。简单来说,对于 VLU,在具有临床确定的静脉性溃疡的患者中,在局部麻醉下,从创伤边缘获取单一的 4mm 钻取活组织检查样品。在相同的受试者中,从前臂上正常的皮肤获取第二 4mm 钻取活组织检查样品。总共,获取来自 6 个具有临床上证实的 VLU 的受试者 (三个男性,三个女性;范围 38-79 岁) 的活组织检查样品。平均的溃疡持续时间是 6 个月 (范围是 1.5-36 月),并且平均尺寸是 10cm^2 (范围 $2-113\text{cm}^2$)。VLU 活组织检查样品首先用 4% 多聚甲醛 (PFA) 固定过夜,然后转移至 25% 蔗糖,且存储在 4°C 直到处理。对于免疫组织化学,将组织活组织检查样品包埋在 OCT (BDH, UK) 中。将样品冷冻 - 切割 ($10\text{ }\mu\text{m}$),用于免疫组织化学分析。对于正常的 (急性) 创伤活组织检查,在三个健康的男性志愿者 (范围 20-36 岁) 的前外侧大腿上,在局部麻醉下进行最初的 6mm 钻取活组织检查样品,和然后,4 小时后,使用更大的 10mm 钻切除钻取的创伤位点,并缝合闭合产生的创伤。将 2mm 宽环状线圈形状的活组织检查样品立即包埋在 OCT 中,在液氮中突然冰冻,并然后存储在 -80°C ,直到在分析前的冷冻 - 切割。

[0294] 小鼠和大鼠皮肤创伤愈合模型和 ODN 应用

[0295] 根据 UK 内政部动物管理条例喂养来自 UCL 的生物服务单位 (UCL's Biological Services Unit) 的雄性、8 周龄的 ICR 小鼠或斯普拉-道来氏大鼠。如先前描述的进行切除损伤 (Mori, et al. (2006), J Cell Sci, vol. 119:5193-5203)。在 30% Pluronic F-127 凝胶 (Sigma) 中, 将 10 μ M 未修饰的 Cx43asODN 和对照 Cx43sODN (Sigma-Genosys) 单一的局部应用递送于两个独立创伤中的每一个。在受伤之后两天, 人道处死动物并收获创伤组织。

[0296] 细胞培养和 ODN 处理

[0297] 在 37°C、5% CO₂ 中, 使 3T3 纤维母细胞生长在用 10% FBS (Gibco, Invitrogen) 补充的 DMEM-GlutaMAX™-1 (Gibco, Invitrogen) 中。对于 ODN 处理, 用 PBS 洗涤纤维母细胞以消除任何血清的痕迹, 并在无血清培养基中用 20 μ M Cx43asODN 或 Cx43sODN (Qiu, et al., (2003), Curr Biol, vol. 13:1697-1703) (Sigma-Genosys) 或用 10 μ M ZO-1asODN 或 ZO-1sODN (Underwood, et al. (1999), Am J Physiol, vol. 277:C330-342) (Sigma-Genosys) 孵育 2 小时。在这个孵育之后, 去除具有 ODN 的培养基并由 DMEM 中的 10% FBS 代替。

[0298] 转染; 逆转录病毒的和慢病毒构建体和转导

[0299] 含有 Cx43- 特异性 shRNA 靶序列 5'-GGTGTGGCTGTCAGTGCTC-3' (SEQ ID NO:9; van Zeijl, et al. (2007), J Cell Biol, vol. 177:881-891) (这里, 特指 Cx43shRNA) 的逆转录病毒 pSuper 载体, 用于在 3T3 纤维母细胞中建立 Cx43 的稳定敲低。将 pSuppressor (p. Sup) 逆转录病毒载体 (Imgenex Co) 用作对照。如先前描述的, 用 p. Sup 和 Cx43shRNA 构建体转染封装细胞系 GP2-293 (Clontech)。 (Carr and Whitmore (2005), Nat Cell Biol, vol. 7:319-321)。如描述的 (Demaison, et al. (2002), Hum Gene Ther, vol. 13:803-813), 将 Mock 和 N-cad shRNA 构建体 (Hosokawa, et al. (2010), Blood, vol. 116:554-563) 转染到 HEK 293T 细胞中。用逆转录病毒或慢病毒转导 3T3 纤维母细胞 2 天, 并基于对 2 μ g/ml 嘌呤霉素或 500 μ g/ml 遗传霉素 (geneticin) (用于 p. Sup) 的抗性选择 Cx43shRNA 和 N-cadshRNA 和 Mock 转导的细胞。

[0300] 如描述的, 用 1mg/ml pGFP、Cx43-DN 或 Cx43-WT 构建体, 将 Fugene HD (Roche) 用于转染 70% 汇合的纤维母细胞。在第二天早上改变培养基, 并在 24h 后, 在不同组的实验中使用细胞。

[0301] 鼠科动物和人类皮肤样品的免疫组织化学

[0302] 在受伤的大鼠和小鼠皮肤的 6- μ m 冷冻切片上, 或 10- μ m 人类慢性 VLU 或相配的未受伤的皮肤上进行免疫染色, 在 4°C 在丙酮中固定 5 分钟。在室温下, 孵育 Cx43 (1:2000 稀释; Sigma, 6219)、N-钙粘蛋白 (1:100 稀释; Abcam, ab18203) 和 ZO-1 (1:100 稀释; Zymed Laboratories, 61-7300) 的第一抗体 (一抗) (Abs) 1 小时。用 PBS 洗涤切片, 和然后用各自的第二抗体 (二抗), 猪抗兔 FITC-结合的 (DAKO) 和山羊抗小鼠 Cy3-结合的 (Pierce) 孵育。将缺少第一抗体的第二抗体孵育用作阴性对照。然后, 用 5 μ g/ml 的细胞核染料 Hoechst 33342 (Sigma) 将切片复染色 10 分钟, 并在 Leica SP2 共聚焦显微镜上获取单一的光学切片 (Leica Microsystems, UK)。遍及每一个实验使图像获取期间的所有的参数保持恒定, 以允许直接比较所有的 8 比特 (bit) 数字图像。使用 ImageJ 软件 (NIH), 使用已确定的像素-计数方法 (Wang, et al. (2007), Diabetes, vol. 56:2809-2817) 量化每单位面积的免疫染色水平。使用相同的阈值将图像转换为二进制图像。计数比两个像素大的目标以产

生每单位面积的阳性像素的数目的读出用于条件间比较。

[0303] 免疫染色

[0304] 使汇合的纤维母细胞单层受伤并且 3h 后用 4% PFA 固定 10 分钟 (and fixed 3h later with 4% PFA for 10minutes) 并用 0.1% Triton X-100 使可渗透。根据制造商的建议使用以下各项的第一抗体: Cx43 (1:2000 稀释; Sigma)、ZO-1 (1:100 稀释; Zymed Laboratories)、N-钙粘蛋白 (1:100 稀释; Abcam)、 β -连环蛋白 (1:200 稀释; ab6302Abcam)、 α -连环蛋白 (1:200 稀释; C2081Sigma)、酪氨酸化微管蛋白 (1:400 稀释; YL1/2; Ab6160Abcam) 和乙酰化的微管蛋白 (1:200 稀释; T7451Sigma)。用适当的第二抗体 (Alexa 488 or 633; Molecular Probes) 孵育之后是应用 5 μ g/ml 的细胞核染料 Hoechst 33342 (Sigma) 10 分钟。将缺少第一抗体的第二抗体孵育用作阴性对照。在某些实验中, 包括 TRITC-鬼笔环肽 (Sigma) 用于 F-肌动蛋白的可视化。在 Leica SP2 共聚焦显微镜上 (Leica Microsystems, UK) 上, 使用 63 $\times$, 1.25NA 物镜成像细胞。遍及每一个实验使所有获取的参数保持恒定, 并基于像素计数来量化染色 (Wang, et al. (2007), 上文)。

[0305] 高尔基体再定位测量

[0306] 如先前描述的进行高尔基体再定位的测量 (Magdalena, et al. (2003), J Cell Sci, vol. 116:743-756)。将汇合的纤维母细胞划痕且孵育 3h。在这个时间之后, 细胞用 4% PFA 固定并用抗 GM130 (BD Biosciences) 和 Hoechst 33342 细胞核染色剂 (Sigma) 染色。评价十个随机选择的视场中的一百个细胞的高尔基体定位。

[0307] 细胞增殖

[0308] 将用 pSup、Cx43shRNA、Mock 和 N-cadshRNA 构建体转导的 3T3 纤维母细胞 (1×10^4 细胞) 接种于 96-孔板中并使用 IncuCyte™ 活细胞成像系统 (Essen Instruments, Ann Arbor, MI) 实时监测细胞生长。一式两份至少三次进行实验并以汇合的百分比表示数据。

[0309] 突出长度的测量

[0310] 使用 Cx43shRNA、p. Sup、N-cadshRNA 和 Mock 构建体转导的, 或用 pGFP、Cx43-DN 或 Cx43-WT 转染的汇合的纤维母细胞受伤, 并在 3h 后用 4% PFA 固定。然后, 用 Hoechst 33342 细胞核染色剂 (Sigma) 染色细胞。为了量化突出长度, 测量创伤边缘细胞的从细胞核至前缘的距离。在三个独立的实验的每一个中, 分析随机选择的视场中的 3-5 个转染的细胞, 或 30 个转导的细胞以计算平均突出长度。

[0311] 蛋白质印记

[0312] 在冰冷的 RIPA 缓冲液加蛋白酶抑制剂中, 在 4 $^{\circ}$ C 悬浮来自收获的纤维母细胞 (Cx43shRNA-或 p. Sup 转导的) 的细胞球 (Cell pellet)。在 Laemmli 4 $\times$ 样品缓冲液中重悬等量的蛋白质, 通过 10% SDS-PAGE 分离和用对 Cx43 (1:2000 稀释; Sigma)、ZO-1 (1:500 稀释; Zymed Laboratories)、 α -连接蛋白 (1:200 稀释; Sigma)、 β -连接蛋白 (1:1000 稀释; Abcam) 或 N-钙粘蛋白 (1:500 稀释; Abcam) 的第一 Abs 可视化。将对 α -微管蛋白或肌动蛋白 (两者都来自 Sigma) 的抗体用作上样对照。第二抗体是 HRP-结合的, 并使用增强化学发光 (ECL) 系统 (Amersham) 可视化蛋白质水平。使用 ImageJ 软件 (NIH), 通过扫描和量化条带确定比率蛋白质 / 微管蛋白或 / 肌动蛋白。

[0313] 染料-迁移实验

[0314] 根据先前描述的方法进行染料注射 (Becker, et al. (1995), J Cell

Sci, vol. 108 (Pt 4):1455-1467)。在可视化控制下穿刺细胞并通过离子电渗疗法用染料填充。在停止离子电渗疗法之后 1 分钟评估通讯。对每组实验条件进行至少 10 次注射。在以下细胞中检测耦合 :a) 用 Cx43sODN、Cx43asODN 处理的或对照未处理的细胞 ;b) 用 Cx43-DN、Cx43-WT 或 pGFP 瞬时转染的 ;和 c) Cx43shRNA 或 p. Sup 转导的细胞。使用 Volocity 获取软件 (Improvision/Perkin Elmer), 在 Leica DMLFS 显微镜上 (Leica Microsystems, UK), 用 40×0.8NA 物镜获取微注射的细胞的图像。

[0315] 细胞迁移实验

[0316] 使 Cx43sODN、Cx43asODN、ZO-1asODN 和 ZO-1sODN 处理的纤维母细胞的 ;或 Cx43shRNA、p. Sup、N-cadshRNA 和 Mock 转导的细胞, 以及 Cx43-WT、Cx43-DN 和 pGFP 转染的纤维母细胞的汇合的培养物经受机械细胞划痕。在某些实验中, 已经描述血清饥饿的 (SS) 或在血清的存在下 (FBS) 孵育的 Cx43shRNA 和 p. Sup 纤维母细胞 (Francis, et al. (2011), PloS one, vol. 6:e26379)。在这一段时间之后, 使细胞受伤和在用血清补充的 DMEM 中孵育。在 3-4 小时内, 以 5 分钟的时间间隔, 在受伤后不久采集延时图像, 和用在 37℃ 和 5% CO₂ 的孵育腔、使用 40×1.2NA 物镜, 在装备有 Orca CCD 照相机 (Hamamatsu, UK) 的倒置式 Zeiss LSM AxioPlan400 荧光显微镜上获取图像。使用 OpenLab 图像采集软件 (Improvision/Perkin Elmer, UK) 捕获延时图像。通过测量在受伤之后 3 小时的前沿细胞的最初位置和最后位置之间的距离, 使用 Volocity4 分析软件 (Improvision/Perkin Elmer) 量化个体纤维母细胞的迁移速度 (migration velocity)。对于每一个实验条件, 以平均值 ±SD (μm/sec) 表示速度。

[0317] Rho GTP 酶活化作用实验

[0318] 将新鲜的裂解物用于 Rac1/Cdc42 和 RhoA - 下拉实验, 使用 PAK 的 Rac/Cdc42- 结合结构域 (p21- 结合结构域, PBD), 如先前描述的 (Mendoza-Naranjo, et al. (2007), J Cell Sci, vol. 120:279-288), 或 GST-Rhotekin, 以检测 RhoA -GTP 的相对量。通过蛋白质印记检测结合蛋白质 (GTP- 结合的 Rac1、Cdc42 或 RhoA) 水平。也分析作为上样对照的来自总的细胞裂解液的总的 Rac1、Cdc42 和 RhoA。

[0319] Förster 共振能量转移 (FRET) 实验

[0320] 使用 Eugene HD (Roche), 将编码 FRET 探针 Raichu-Rac1、Raichu-Cdc42 (Itoh, et al. (2002), Mol Cell Biol, vol. 22:6582-6591) 和 RhoA 生物传感器 (Pertz, et al. (2006), Nature, vol. 440:1069-1072) 的质粒转染到 Cx43shRNA 或 p. Sup 转导的纤维母细胞中。使用共聚焦荧光显微镜和受体光漂白测量表达 EYFP-ECFP 融合构建体的细胞的 FRET 效率。使用 Olympus FluoView 1000 激光扫描共聚焦显微镜和 60x 1.4NA 油镜 (Olympus Microscopes, UK) 成像前缘转染的细胞。分别地使用 440nm 和 515nm 激光激发 CFP 和 YFP 通道。两个发射通道是对于 CFP 460-510nm 和对于 YFP 520-620nm。将每一个通道的增益设定为约 75% 的动态范围 (12- 比特, 4096 灰度水平) 和偏移设定使得背景是零。获取漂白前和后的 CFP 和 YFP 图像, 并且 FRET 模式用于以最大功率 (以漂白 YFP), 使用 515nm 氩激光线的 10-12 次扫描漂白受体之后采集每一个通道的图像。将 Olympus FluoView 1000 软件用于在漂白之前 (前, pre) 和之后 (后, post) 分析供体和受体强度值, 并且然后从落入感兴趣的细胞内的像素以及细胞外的相等尺寸漂白的区域提取值, 并且对每一个区域确定平均比率。使用以下等式计算全细胞上的 FRET 效率比 :FRET 效率 = $[ID_{(后)} - ID_{(前)}] / ID_{(后)}$,

其中 ID_前 和 ID_后 指的是在受体 (YFP) 的光漂白之前 (前) 和之后 (后) 的供体 (CFP) 的强度。

[0321] 悬滴实验

[0322] 从 24-孔皿的盖子, 将约 20,000 个单一细胞悬浮在 DMEM 中的 10% FBS 的 35 μ l 液滴中。将水放置在每一个孔的底部以维持湿度。用 200 μ l 黄色尖头上上下下吹吸液滴五次, 用 4% 多聚甲醛固定, 并将等分试样在玻片上展开。在倒置式 Axiovert Zeiss LSM 显微镜上, 使用 4 $\times$ 0.1NA 物镜获取来自研究的每一个条件的六个单独样品的六个随机视场的图像 (p. Sup 和 Cx43shRNA 转导的细胞)。约 $2.5 \times 10^2 - 7.5 \times 10^2 \mu\text{m}^2$ 的区域相当于 1-3 个细胞的簇而 $2.5 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ 相当于约 10 个细胞。使用 ImageJ 软件 (NIH) 的定制编写插件 (custom-written plug-in) 确定每一个细胞簇的面积。平行于估计每单位面积的细胞的量测量由单一细胞占据的面积。

[0323] 统计学分析

[0324] 使用用于成对数据的威氏配对符号秩次检验 (Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Ranks Test), 或用于多重比较的数据组的方差的单项分析 (ANOVA) 确定统计学差异。双侧 (two-tailed) Chi (X, x, 希腊语字母表第 22 字母) - 卡方检测 (Chi-squared test) 用于粘附的悬滴实验中的细胞簇尺寸的分析。以平均值 $\pm$ SD 表示所有的数据, 除了指出的地方之外。下面在结果中给出个体检测的标准水平。

[0325] 结果

[0326] 人类 VLU 的真皮中 Cx43、N-钙粘蛋白和 ZO-1 显著地上调

[0327] 来自健康人类志愿者的皮肤钻取活组织检查样品, 2mm, 和来自 6 个人类 VLU 的慢性创伤边缘活组织检查样品, 4mm, 连同来自相同的患者的相应的完整的皮肤样品, 用于分析慢性对急性创伤的真皮中的 Cx43 蛋白质水平。如图 1 显示的, 在人类慢性 VLU 中, 真皮 Cx43 蛋白质水平极大上调。图 1, D 是患者的小腿的慢性 VLU 的典型图片, 从那里获取创伤边缘钻取活组织检查样品 (照片中的白色虚线圆圈, 图 1, D)。

[0328] 在急性创伤中, 切除创伤之后 4 小时在真皮创伤边缘处看到 Cx43 的下调 (图 1A; 比例尺 = 25 μ m)。在图 1A 显示的照片中, 蓝色信号是细胞核的 Hoechst 染色和胶原束自发荧光, 而点状白线显示表皮和真皮之间的边界。这些结果类似于在切除受伤之后的鼠科动物模型中的创伤边缘真皮中观察到的那些 (图 9, A; 比例尺 = 25 μ m), 其中在切除受伤之后两天, 通过免疫组织化学检查小鼠皮肤真皮中的 Cx43 的表达和分布。在这些小鼠实验中, 在这样的创伤之后, 真皮纤维母细胞中的创伤 - 边缘 Cx43 减少。在图 9, A 中, 箭头显示 Cx43 如何随着从创伤边缘的距离增加变得更加普遍。沿着创伤位置量化 Cx43 水平并且在创伤边缘处显著地降低 ($p < 0.005$)。以平均值 $\pm$ SD 表示图 9, A 中显示的图中的值。另一方面, 已经报道 Cx43 在大多数混合型糖尿病性腿溃疡的创伤边缘表皮处持续 (persist) (Brandner, et al. (2004), J Invest Dermatol, vol. 122:1310-1320)。

[0329] 人类和鼠科动物皮肤钻取活组织检查分析显示, 在创伤边缘处 Cx43 蛋白质水平显著地减少, 具有从伤害位点以渐进距离向正常的增加的水平 (图 1, A、B 和 C; $p < 0.01$; 和图 9, A, 箭头; $p < 0.005$)。在锐对比中, 于相配的未受伤的样品相比, 来自 VLU 的创伤边缘的活组织检查样品不仅不能下调 Cx43, 而且也显示遍及从慢性 VLU 采集的整个的 4mm 活组织检查的真皮, Cx43 蛋白质的显著升高的表达 (图 1, E)。图 1, F 中显示的图描述 VLU 对未

受伤的皮肤中的 Cx43 蛋白质水平 ($p < 0.005$)。

[0330] 人类和鼠科动物皮肤钻取活组织检查分析显示,在创伤边缘处 Cx43 蛋白质水平显著地减少,具有从伤害位点以渐进距离向正常位点的增加的水平(图 1、A、B 和 C; $p < 0.01$; 和图 9, A, 箭头; $p < 0.005$)。在锐对比中,与相配的未受伤的样品相比,来自 VLU 的创伤边缘的活组织检查不仅不能下调 Cx43,而且也显示遍及从慢性 VLU 采集的整个的 4mm 活组织检查的真皮, Cx43 蛋白质的显著升高的表达(图 1, E)。图 1, F 显示的图描述 VLU 对未受伤的皮肤中的 Cx43 蛋白质水平 ($p < 0.005$)。

[0331] Cx43 可以与粘附连接蛋白质如 N-钙粘蛋白相互作用 (Wei, et al. (2005), J Biol Chem, vol. 280:19925-19936; Shaw, et al. (2007), Cell, ol. 128:547-560), 并且与紧密连接相关的蛋白质 ZO-1 相互作用 (Giepmans and Moolenaar (1998), Curr Biol, vol. 8:931-934), 其也彼此相互作用。在慢性 VLU 活组织和相配的未受伤的皮肤的真皮中研究这些蛋白质的表达和分布。与相配的、未受伤的对照相比,在慢性 VLU 的真皮中, ZO-1 表达水平升高(图 2, A; $n = 6$; 比例尺 = $25 \mu\text{m}$)。也显示对于 ZO-1 (绿色) 和 Hoechst (蓝色) 染色的 VLU 和完整的皮肤 (加框区域 1 和 2) 的更高的放大倍率的照片 (图 2, A, 比例尺 = $10 \mu\text{m}$)。

[0332] 与相配的、未受伤的样品相比,也观察到 N-钙粘蛋白蛋白质水平在慢性 VLU 中显著地上调(图 2, B; $n = 6$; 比例尺 = $25 \mu\text{m}$)。加框区域, 编号 1 和 2, 在图 2, B 的最左侧照片中 (比例尺 = $10 \mu\text{m}$) 显示使用用于 N-钙粘蛋白的抗体 (绿色) 和使用 Hoechst (蓝色) 染色的 VLU 和未受伤的皮肤样品的更高的放大倍率。比例尺 = $10 \mu\text{m}$ 。

[0333] 图 2, C 和 D 中的图形显示,人类慢性 VLU 的真皮中的 ZO-1 和 N-钙粘蛋白蛋白质水平显著地高于相配的、未受伤的对照真皮中的。在这些图形中,以平均值 $\pm$ SD 表示对于 ZO-1 和 N-钙粘蛋白的值 (分别地, $p < 0.01$ 和 $p < 0.005$)。总之,这些数据指示,在人类慢性 VLU 中,真皮创伤边缘中的 Cx43 蛋白质水平没有下调,而且显示,与完整的皮肤中 N-钙粘蛋白和 ZO-1 的水平相比, N-钙粘蛋白和 ZO-1 异常地上调。

[0334] 纤维母细胞中 Cx43 表达与 N-钙粘蛋白和 ZO-1 表达紧密相关

[0335] 先前已经显示, Cx43 下调显著地加速皮肤愈合过程 (Qiu, et al. (2003), Curr Biol, vol. 13:1697-1703; Mori, et al. (2006), J Cell Sci, vol. 119:5193-5203)。在这个实施例描述的实验中,研究 Cx43 敲低对体内 ZO-1 和 N-钙粘蛋白蛋白质表达的影响。为此,使用创伤愈合的体内小鼠模型 ($n = 6$), 其中用 Cx43 反义或正义对照寡脱氧核苷酸 (分别地 Cx43asODN 和 Cx43sODN) 处理完全厚度皮肤切除创伤。

[0336] 免疫组织化学分析显示在真皮的正义处理的创伤中染色的阳性 ZO-1, 其中 ZO-1 (绿色) 经常地与 Cx43 (红色) 共定位 (图 9, B; $n = 6$; 比例尺 = $100 \mu\text{m}$)。另一方面,用 Cx43asODN 处理不仅诱导 Cx43 蛋白质的显著下降,而且诱导真皮创伤边缘中的 ZO-1 蛋白质水平的下降 (图 9, B; 图 3, A, 图表代表平均值 $\pm$ SD, $*p < 0.05$)。图 9, B 显示的结果中,也使用 Hoechst (蓝色) 复染色细胞。这些实验显示用 Cx43asODN 处理的小鼠的真皮中的 ZO-1 蛋白质水平的明显的下调。

[0337] 也进行 N-钙粘蛋白蛋白质表达的免疫组织化学分析,并且显示与使用对照寡核苷酸 Cx43sODN 的处理相比,正义处理的创伤的真皮中的蛋白质的优先的分布,而在用 Cx43asODN 处理之后,显著的 N-cad 蛋白质 (绿色) 下调 (图 9, C (比例尺 = $100 \mu\text{m}$); 图

3, B, 图形代表平均值 $\pm$ SD, $**p < 0.01$)。

[0338] 同时, 这些数据证明, Cx43 表达与真皮中的 ZO-1 和 N- 钙粘蛋白蛋白质水平紧密相关, 并且靶向 Cx43 可以减少体内的 ZO-1 和 N- 钙粘蛋白表达。

[0339] 为了更好的理解 Cx43、N- 钙粘蛋白和 ZO-1 蛋白质水平对纤维母细胞迁移的影响, 响应受伤刺激, 使用 3T3 纤维母细胞细胞系。可以容易地用 shRNA 构建体转染或转导这种细胞系, 并且当使用来源于不同的患者的初级 (原生, primary) 人类纤维母细胞时, 它避免变异性 (variability)。在用抑制 Cx43 表达的 Cx43 短发夹 RNA (Cx43shRNA) (van Zeijl, et al. (2007), J Cell Biol, vol. 177:881-891) 或用 p. Sup 对照质粒转导的纤维母细胞中评价 ZO-1 和 N- 钙粘蛋白蛋白质表达。与 p. Sup 对照细胞形成对比, 在产生 Cx43shRNA 的细胞中, Cx43 蛋白质表达和间隙连接介导的细胞间通讯 (GJIC) 被有效地阻止, 如在蛋白质印记和在图 3C 和图 10, G、H 和 I 中的随附的条形图中显示的, 其显示在 LY (荧光黄) 微注射之后 Cx43 蛋白质水平和染料耦合。

[0340] 关于 ZO-1 表达, 在 Cx43shRNA 转导的细胞中, ZO-1 蛋白质水平下调 (图 3D)。也分析用 Cx43shRNA 产生的纤维母细胞细胞划痕实验和对照细胞中的 ZO-1 分布。Cx43shRNA 转导的细胞显示位于创伤前缘 (LE) 和更内部的区域 (IA) 的细胞接触处的 ZO-1 的减少, 伴随来自前缘板状伪足的 ZO-1 的缺失 (图 3, E, 箭头)。然而, 在 p. Sup 转导的纤维母细胞中, ZO-1 主要地限于细胞之间的接触边缘, 经常与 Cx43 共定位 (图 3, E)。关于 N- 钙粘蛋白, 在 Cx43shRNA 转导的纤维母细胞中蛋白质水平显著地减少 (图 3, F; $p < 0.01$) 并发现 N- 钙粘蛋白主要地位于细胞质基质中 (图 3, G, 箭) 而不是在 p. Sup 转导的对照纤维母细胞中发现的那样优先的质膜定位 (图 3, G, 箭头)。

[0341] 也检查在 p. Sup 和 Cx43shRNA 转导的细胞中的蛋白质 α - 和 β - 连环蛋白的表达和分布。然而, 在 Cx43 敲低之后, 总的 β - 连环蛋白蛋白质水平没有显著地改变 (图 11, B), 它的细胞分布被改变。在 p. Sup 转导的细胞中, β - 连环蛋白主要地定位于细胞-细胞接触的位点处的质膜上 (图 11, A), 但是另外在 Cx43shRNA 转导的纤维母细胞中发现对细胞质基质的再定位 (图 11A, 箭), 具有某些细胞核定位的证据 (图 11, A, 箭头)。在 p. Sup 和 Cx43shRNA 转导的细胞中, 看到 α - 连环蛋白定位在质膜上和细胞质基质中 (图 11, C), 并且用 Cx43 敲低没有改变表达水平和定位 (图 11, D)。

[0342] Cx43 和 N- 钙粘蛋白而不是 ZO-1 敲低, 加速纤维母细胞迁移的速度

[0343] 敲低的靶向 Cx43 加速体内创伤闭合的速度 (Qiu, et al. (2003), 上文)。这里, 几个实验研究在 Cx43 表达减少之后的细胞迁移的增加是否与 ZO-1 蛋白质水平的减少或减少的细胞粘附相关 (分别地, ZO-1 或 N- 钙粘蛋白下调)。

[0344] 首先, 评价用 Cx43shRNA 或 p. Sup 载体转导的纤维母细胞, 或用 Cx43asODN 或对照 Cx43sODN 处理的细胞的迁移速度 (迁移率, migration rate)。类似于 Cx43shRNA 细胞, 与 Cx43sODN, 或未处理的细胞相比, 用 Cx43asODN 处理的纤维母细胞显示极大减少的 Cx43 蛋白质水平和 GJIC (分别地, 图 10, A 和 B; $p < 0.05$ 和 $p < 0.01$)。也使用双顺反 pIRES-GFP 空载体 (pGFP) 或用编码 GFP 的相配的载体和野生型 Cx43 (Cx43-WT) 或干扰内源性 Cx43 蛋白质至质膜的运输的显性失活的 Cx43 构建体 (Cx43-DN) 瞬时转染纤维母细胞, 由此阻断 GJIC (Becker, et al. (2001), Cell Commun Adhes, vol. 8:355-359)。

[0345] Cx43shRNA 和 Cx43asODN 细胞的迁移的速度显著地比 p. Sup 或 Cx43sODN 对照细胞

的快,分别地图 4, C 和 D, $p < 0.005$; 图 10, C 和 D)。Cx43 敲低细胞也显示比对照细胞更加广泛的板状伪足(图 4C)。同样地, Cx43-DN 转染的纤维母细胞比它们的未转染的相邻细胞或 pGFP 对照细胞迁移更快, 并且在前缘处也比通常的板状伪足延伸更大(图 10, E 和 F)。相反地, 过表达 Cx43 的纤维母细胞(Cx43-WT) 比 pGFP 或 Cx43-DN 构建体显著地迁移更慢(图 10, E 和 F; 分别地 $p < 0.05$ 和 $p < 0.01$)。这些数据提供在细胞划痕之后 Cx43 蛋白质水平和纤维母细胞迁移的速度之间的负相关的进一步证据。然而, 也报道了在已经血清饥饿 2 天的 3T3 细胞划痕实验中, Cx43 的 siRNA 减少可以减慢细胞迁移 (Francis, et al. (2011), PloS one, vol. 6:e26379)。

[0346] 在血清饥饿条件和正常量的细胞培养血清的存在下重复这些实验。发现在血清饥饿的条件中, 降低 Cx43 蛋白质水平减慢迁移, 而在具有血清的更加正常的培养基条件中, 减少 Cx43 显著地加速迁移(图 10, J)。

[0347] 然后, 分析用 N-钙粘蛋白或 Mock shRNA 构建体(分别地, N-cadshRNA 和 Mock) 转导的纤维母细胞的迁移的速度。N-cadshRNA 构建体有效地抑制 NIH 3T3 纤维母细胞中的 N-钙粘蛋白表达(图 4, A), 其加速细胞划痕实验中的细胞迁移, 几乎与 Cx43shRNA 转导的细胞中相同的程度(图 4, C 和 D)。为了减少纤维母细胞中的 ZO-1 表达, 用 ZO-1 正义和反义寡脱氧核苷酸(ZO-1sODN 和 ZO-1asODN)(先前描述的能够有效地减少 ZO-1 表达 (Underwood, et al. (1999), Am J Physiol, vol. 277:C330-342)) 处理细胞。与 Cx43 和 N-钙粘蛋白形成对比, ZO-1 下调(图 4, B) 对纤维母细胞迁移或创伤闭合的速度没有任何影响(图 4, C 和 D)。这些结果指示, 靶向 Cx43 可另外通过减少纤维母细胞中的 N-钙粘蛋白和或许 ZO-1 蛋白质水平而有助于细胞迁移。

[0348] Cx43 和 N-钙粘蛋白调节纤维母细胞中的细胞粘附、极化和增殖

[0349] 细胞-细胞粘附的机制的下调是其中不同的细胞类型(包括皮肤细胞)再活化它们自己以获取迁移表型的一种方式。先前将悬滴实验用于表征细胞间粘附的强度 (Elbert, et al. (2006), Mol Biol Cell, vol. 17:3345-3355; Redfield, et al. (1997), J Cell Biol, vol. 138:1323-1331)。因此, 通过测量在悬浮的液体中形成的细胞簇的尺寸, 并且其耐受使用微量吸液管尖头的研磨, 这个途径被用于比较细胞-细胞粘附性质。通过形态测量图像分析评价细胞簇, 并且根据它们的面积将其分为三个尺寸组。Cx43shRNA 和 N-cadshRNA 转导的细胞形成较少耐研磨的细胞簇(面积 $> 2.5 \times 10^3 \mu m^2$) 和具有减少的细胞-细胞粘附特征的较小细胞簇(面积 $< 7.5 \times 10^2 \mu m^2$) (图 5, A 和 B; $p < 0.005$)。

[0350] 高尔基体的再分布是很多类型细胞(包括纤维母细胞)的极化和迁移中的重大事件 (Magdalena, et al. (2003), Mol Biol Cell, vol. 14:670-684)。为了检查 Cx43 和 N-钙粘蛋白在细胞迁移期间的细胞极化中的作用, 在用 Cx43shRNA、N-cadshRNA 或它们的各自的对照转导的纤维母细胞中分析高尔基体蛋白质 GM130 的定位。在受伤之后 3h, 与 p. Sup 和 Mock 对照相比, 在 Cx43shRNA 和 N-cadshRNA 细胞中观察到增加的朝向创伤的 GM130 极化(图 5, C 和 D; $p < 0.05$)。

[0351] 也使用 IncuCyte™活细胞成像系统研究细胞增殖。与 p. Sup 和 Mock 对照细胞相比, 在 Cx43shRNA 和 N-cadshRNA 转导的细胞中观察到细胞生长的明显的减少, 表明 Cx43 和 N-钙粘蛋白表达, 和纤维母细胞中的细胞增殖之间直接相关。

[0352] 总之, 这些数据证实 Cx43 和 N-钙粘蛋白对创伤修复期间纤维母细胞中的细胞极

化、粘附和增殖过程的调节的重要的贡献。

[0353] 靶向 Cx43 诱导前缘纤维母细胞中细胞骨架改变

[0354] 使用细胞划痕实验,观察到,创伤边缘中极化的 Cx43 敲低细胞比通常的板状伪足突出延伸更长。定向细胞移动需要肌动蛋白微丝 (F- 肌动蛋白) 和微管之间的复杂的相互作用,因此,在纤维母细胞中在靶向 Cx43 表达之后的受伤的单层细胞中分析 F- 肌动蛋白和酪氨酸化和乙酰化的微管蛋白的分布。前 - 行 (Front-row) 对照 Cx43sODN、pGFP 转染的和 p. Sup 纤维母细胞显示典型的极化的游走细胞的 F- 肌动蛋白带 (图 6, A 和 7, A, 箭头; 图 12, A), 由粘附连接调节 (Yonemura, et al. (1995), J Cell Sci, vol. 108 (Pt 1):127-142)。与此形成对比, Cx43asODN、Cx43-DN 和 Cx43shRNA 创伤边缘细胞发展朝向移动的方向的丰富的板状伪足凸起,并缺少在对照细胞中发现的 F- 肌动蛋白带 (图 6, A 和 7, B, 箭头; 图 12, A)。在对照条件下,如在受伤的纤维母细胞单层实验中先前描述的,排列非常大量酪氨酸化和乙酰化的微管 (分别地, TyrTub 和 AcetTub) (Gundersen and Bulinski (1988), Proc Natl Acad Sci USA, vol. 85:5946-5950), 从细胞核周围区域向创伤边缘成扇形散开。在 Cx43asODN、Cx43shRNA 和 Cx43-DN 细胞中 (其趋向于更多延伸), 酪氨酸化的微管主要地垂直定向于创伤边缘 (图 6, A 和 7, B, 箭头; 图 12, A)。过表达 Cx43 (Cx43-WT) 的细胞显示不如 pGFP 转导的对照细胞广泛的微管和板状伪足 (图 7, C)。

[0355] 通过使用红色荧光蛋白 (RFP)- 肌动蛋白构建体转染纤维母细胞更详细地分析板状伪足动力学。RFP- 肌动蛋白转染之后十六小时,使汇合的单层细胞划痕,和通过共聚焦显微镜成像 1.5 小时。p. Sup 细胞显示活跃的、富含肌动蛋白的板状伪足和丝状伪足 (影片 4) 和肌动蛋白重塑,特征是前 - 行细胞中的丝状伪足和肌动蛋白褶边 (ruffle) 的动态形成和瓦解。Cx43shRNA 转导的纤维母细胞显示前缘细胞的前面相当更加广泛的富含肌动蛋白的膜突出。量化细胞突出的程度,和确定 Cx43asODN、Cx43-DN 和 Cx43shRNA 细胞显示几乎两倍的由 Cx43sODN、pGFP 和 p. Sup 对照细胞表现的平均突出长度 (图 6, B 和 7, D; 图 12, B)。

[0356] 下面证明 Cx43 敲低减少 N- 钙粘蛋白表达,其也有助于加速纤维母细胞中的细胞迁移 (图 4, D), 在细胞划痕实验之后 3h, 在 N-cadshRNA - 转导的和 Mock 转导的细胞中分析聚合的肌动蛋白的分布。类似于 Cx43 敲低纤维母细胞,创伤边缘 N- 钙粘蛋白靶向的细胞延伸丰富的朝向细胞迁移的方向的板状伪足突出 (图 13, A), 并且定量显示与 Mock 对照细胞相比更广泛的板状伪足突出 (图 13, B)。

[0357] 靶向 Cx43 和 N- 钙粘蛋白增加纤维母细胞中的 Rac1 和 Rho-GTP 酶活性

[0358] Rho-GTP 酶是肌动蛋白和微管动力学的关键的调节剂且在控制细胞移动和趋化现象响应关键的不同的以肌动蛋白为基础的结构中扮演必不可少的作用。使用具有对于活化的 Rac1、Cdc42 和 RhoA (GTP 结合形式) 的特异性 GST 融合蛋白结合结构域的下拉实验检测 Cx43 和 N- 钙粘蛋白敲低对 Rho 家族 GTP 酶活化作用的影响。定量分析显示,分别地与 p. Sup 和 Mock 对照相比, Cx43shRNA 和 N-cadshRNA 细胞中的增强的 Rac1 和 RhoA 活性 (图 8, A 和 B)。相反,没有检测到在 Cdc42GTP 酶活性方面的差异。

[0359] 为了更详细地检查 Rho GTP 酶的活化作用,将用于 Rac1、RhoA 和 Cdc42 的生物传感器 (Itoh, et al. (2002), Mol Cell Biol, vol. 22:6582-6591; Pertz, et al. (2006), Nature, vol. 440:1069-1072) 转染到 p. Sup 或 Cx43shRNA 转导的细胞内并且将 FRET 用于检查细

胞划痕诱导的迁移之后 3 小时的前缘纤维母细胞中的这些 GTP 酶的活性。用 Cx43shRNA 的靶向 Cx43 诱导超过 p. Sup 对照的两倍的 Rac1 和 RhoA 活性的增加 (图 8, C 和 E ; $p < 0.05$), 但是对 Cdc42 的活性没有影响 (图 8E)。这些发现指示, Cx43 在细胞迁移期间纤维母细胞中的细胞骨架动力学的调节中的直接作用。

[0360] 讨论

[0361] 慢性创伤是重要的和发展的全球问题且给患者和医疗保健系统资源带来重大的负担。虽然慢性创伤可以发生在身体的任何地方, 但是大多数属于 VLU、糖尿病足部溃疡和压力溃疡的类别, 其不能通过有组织的、有秩序的和及时的创伤修复顺序进展。创伤闭合的加速或甚至刺激对这些慢性创伤来说都是重要的, 其经常被感染和发炎, 使得它们使越来越多的老年人和糖尿病患者疼痛和虚弱, 和使他们处于下肢截肢的危险。这里, 实验显示, Cx43 在人类慢性 VLU 的真皮中显著地上调, 类似于在 STZ 糖尿病大鼠的创伤边缘表皮中发现的那样, 是构成损伤的迁移和愈合的基础的特征 (Wang, et al. (2007), *Diabetes*, vol. 56:2809-2817)。

[0362] 因为活组织检查和用 Cx43 反义处理人类 VLU 和随后用另外的活组织检查重新取样这些难于愈合创伤将是不道德的, 所以利用纤维母细胞系可靠地操作 Cx43 蛋白质表达并在细胞划痕愈合实验中探索对细胞迁移的动力学的影响。这样的实验对探索 Cx43 调节对纤维母细胞行为的影响是有用的。在这些细胞培养实验中, 当在用 Cx43-WT 构建体转染之后 Cx43 蛋白质水平和 GJIC 升高时, 纤维母细胞迁移受损害。这些发现导向以下结论: 在人类慢性 VLU 创伤中看到的损害的愈合是由升高的 Cx43 蛋白质水平引起的减少的纤维母细胞迁移率的结果。

[0363] 然而, 升高的 Cx43 水平可能不是危及 VLU 中的愈合的唯一因素。据报道, Cx43 与 ZO-1、 α -和 β -连环蛋白以及 N-钙粘蛋白 (可能影响创伤愈合中的细胞粘附和迁移的蛋白质) 形成多蛋白复合体或“连结 (nexus)”。事实上, 当与完整的皮肤比较时, 发现, 在人类慢性 VLU 的真皮中的 ZO-1 和 N-钙粘蛋白蛋白质水平显著地上调, 连同 Cx43 上调。临床上相关的是观察沉默 Cx43 加速纤维母细胞迁移的速度, 其指示, 可治疗上控制这个过程。使用体外模型, 最近报道, 连接蛋白模拟肽也改善真皮纤维母细胞的迁移率 (Wright, et al. (2009), *Wound Repair Regen*, vol. 17:240-249), 以及有机类型模型和 2D 培养中的角化细胞和纤维母细胞迁移 (Pollok, et al. (2010), *J Cell Mol Med*, 2011Apr ; 15(4):861-73), 其进一步加强这些观察。那些研究报道, 不能由肽改变 Cx43 蛋白质的水平, 但是 Cx43 的磷酸化增加并且细胞粘附减少。然而, 这些实验这里显示, 直接地靶向 Cx43 蛋白质产生另外地减少体内 N-钙粘蛋白和 ZO-1 蛋白质水平, 其中将两种蛋白质从质膜再分布至细胞质基质。在 ZO-1 的情况中, 蛋白质从前缘板状伪足显著地损失, 其通常是细胞划痕实验创伤愈合中的纤维母细胞迁移的特征, 其可以引起它结合的细胞骨架成分的分布的改变。

[0364] Cx43 的胞质尾能够与 ZO-1 上的 PDZ2 结构域相互作用, 但是可以由将模拟肽 (ACT-1) 添加至 Cx43 尾的最后 9 个氨基酸竞争这种相互作用 (Hunter, et al. (2005), *Mol Biol Cell*, vol. 16:5686-5698)。已经报道这个肽稳定形成更大的间隙连接斑块的细胞膜中的 Cx43 (Hunter, et al. (2005), *Mol Biol Cell*, vol. 16:5686-5698)。报道将这种肽应用于急性皮肤损害加速创伤愈合同时减少疤痕形成, 作用类似于 Cx43 反义寡核苷酸的那些

(Gourdie, et al. (2006), *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1080:49-62; Ghatnekar, et al. (2009), *Regenerative Medicine*, vol. 4:205-223; Rhett, et al. (2008), *Trends in Biotechnology*, vol. 26:173-180)。

[0365] 关于间隙连接 (GJ) 通讯和细胞迁移的文献含有相矛盾的报道。升高的连接蛋白表达与减少的迁移相关 (McDonough et al. (1999), *Int J Dev Neurosci*, vol. 17:601-611; Batten and Haar (1979), *Anat Rec*, vol. 194:125-141), 而其他报道相反的效果 (Xu, et al. (2006), *Development*, vol. 133:3629-3639; Huang, et al. (1998), *J Cell Biol*, vol. 143:1725-1734)。使用不同的途径, 在 NIH 3T3 细胞上进行的体外研究显示, 当用 siRNA 下调 Cx43 时, 看起来个别分离的和未受伤的细胞在一个小时内的动态伸展运动减少 (Wei, et al. (2005), *J Biol Chem*, vol. 280:19925-19936)。这种矛盾可以反映不同的细胞状态 (受伤的对未受伤的) 和使用的不同的模型 (与稀疏培养中的未受伤的细胞的传播相比, 细胞迁移至细胞划痕)。最近, 某些组报道, 在细胞划痕实验中, Cx43KO 小鼠胚胎纤维母细胞迁移比具有 Cx43 的那些更加缓慢 (Francis, et al. (2011), *PloS one*, vol. 6:e26379)。

[0366] 不清楚这些相异的观察的原因, 但是可能与在进行细胞划痕实验之前 48 小时的细胞的血清饥饿有关。在上述描述的实验中, 用对照 3T3 细胞和用 Cx43shRNA 转导以减少 Cx43 表达的 3T3 细胞重复迁移实验。一批是血清饥饿 2 天, 而另一批没有。然后, 使培养物划痕和成像 4 小时。发现, 具有减少的 Cx43 的血清饥饿的细胞迁移更缓慢, 然而在缺少血清饥饿时的减少的 Cx43 蛋白质水平加速迁移。正如将没有预期血清饥饿匹配在体内急性创伤中发现的条件, 其中结果显示, 下调的 Cx43 加速纤维母细胞和角质细胞的迁移, 合理的是预期它是引起异常的血清饥饿的异常的条件。

[0367] 报道钙粘蛋白介导的细胞-细胞粘连协调连接发展与细胞移动和细胞极化, 并通过与肌动蛋白微丝形成连接维持连接整体性 (Pokutta and Weis (2002), *Curr Opin Struct Biol*, vol. 12:255-262)。报道破坏 N-钙粘蛋白表达通过增强迁移细胞的数目和最大迁移距离两者增加星形胶质细胞上的施旺细胞 (Schwann cell) 迁移的速度 (rate) (Wilby, et al. (1999), *Mol Cell Neurosci*, vol. 14:66-84)。这里, 证明靶向 Cx43 (其始终减少 N-钙粘蛋白表达) 显著地削弱细胞-细胞粘附, 而增加纤维母细胞的细胞极化。通过直接地靶向 N-钙粘蛋白进一步证明这点, 其提供类似的结果。Cx43-靶向纤维母细胞对接的 Cx43-Cx43 连接小体的直接损失也可能有助于减少细胞-细胞粘附, 如为钙粘蛋白空的人类鳞状表皮细胞癌细胞报道的 (Chakraborty, et al. (2010), *J Biol Chem*, vol. 285:10761-10776), 和也在其中 Cx43 的表达增加细胞粘连性的其他模型中 (Lin, et al. (2002), *J Neurosci*, vol. 22:4302-4311; Cotrina, et al. (2008), *Glia*, vol. 56:1791-1798)。以相同的方式, 先前已经显示干扰 8-16 细胞小鼠胚胎的个体细胞中的 Cx43 减少粘附和产生靶向细胞的振松 (松散, decompaction) (Becker and Davies (1995), *Microsc Res Tech*, vol. 31:364-374), 然而最近报道 ZO-1 是压紧 (compaction) 步骤必不可少的 (Wang, et al. (2008), *Dev Biol*, vol. 318:112-125)。基于在这个实施例中描述的发现, 看起来 Cx43 下调通过减少 N-钙粘蛋白表达和 / 或对接 (docking) 它们自身的连接小体至少部分地阻止稳定的细胞-细胞粘附的成熟。

[0368] 这里, 发现了, 通过用 shRNA 转导, 3T3 细胞中的 Cx43 或 N-钙粘蛋白的表达的持

续减少,导致减少的细胞增殖。虽然这个观察似乎不符合与 Cx43 和细胞增殖相关的先前的报道,但是发现,将 Cx43 反义应用于小鼠的切除创伤上导致增加的纤维母细胞和初期角质细胞的增殖,但是这是处理之后的 1、2 或 7 天,这个时间,反义不再阻止 Cx43 蛋白质产生 (Mori, et al. (2006), J Cell Sci, vol. 119:5193-5203)。Pollock, et al. (2011, 上文) 报道,在某些情况下,模拟肽 GAP27 可以增强角质细胞或纤维母细胞的细胞划痕实验的前缘处的细胞增殖。这种影响没有引起明显的减少的 Cx43 蛋白质水平,并且因此,当 Cx43 蛋白质显著地减少时观察到的差异可能反映 Cx43 蛋白质的存在对细胞增殖的直接影响而不是以 Cx43 为基础的间隙连接通讯的影响。

[0369] 通过依赖于微管的通道发生 Cx43 半通道至细胞-细胞连接的运输,并且已知 Cx43 的胞质尾能够与细胞骨架的多个成分相互作用,包括微管和肌动蛋白。这里,上面描述的实验显示缺少 N-钙粘蛋白或 Cx43 蛋白质的前-行迁移的纤维母细胞采取具有在迁移的方向延伸至创伤基础内的板状伪足的瘦长的表型。相反,对照-受伤的纤维母细胞中肌动蛋白组织(构造, organization)的特征是典型的极化的游走细胞的 F-肌动蛋白带,已知通过粘连接调节。也在 Cx43 和 N-钙粘蛋白靶向的纤维母细胞中识别增强的 Rac1 和 RhoA 活性。这些发现与 RhoA 在调节纤维母细胞突出中作为突出-缩回循环的开始处的肌动蛋白聚合的引发剂的作用相关 (Machacek, et al. (2009) Nature, vol. 461:99-103)。另一方面, Rac1 可以影响最近展开的突出的加强和稳定性,其可解释在 Cx43 靶向的纤维母细胞中观察到的更快的迁移和更广泛的板状伪足。

[0370] 也研究微管细胞骨架的组织并且发现在减少 Cx43 蛋白质水平之后其改变,指示 Cx43 不仅直接地与微管相互作用,而且可影响纤维母细胞迁移期间的微管动力学。参考, Francis, et al. (2011), PloS one, vol. 6:e26379, 报道 Cx43K0 小鼠胚胎纤维母细胞中的改变的微管动力学。

[0371] 总的说来,这个实施例中描述的实验提供深刻理解,为什么在真皮中过表达 Cx43 和钙粘蛋白的慢性 VLU 减慢愈合,和关于减少的 Cx43 和钙粘蛋白蛋白质表达如何加速纤维母细胞迁移的细胞机制,指向对这个使人衰弱的问题的治疗解决方法。这些发现支持 Cx43 不是简单地形成 GJ 通道的作用,而且还稳定包含 N-钙粘蛋白等的连结或蛋白质复合体,其是细胞-细胞粘附和粘附-依赖的肌动蛋白动力学必须的,必须将其破坏以促进有效的纤维母细胞迁移。

[0372] 实施例 3

[0373] 糖尿病足部溃疡中的 Cx43、N-Cad 和 ZO-1 过表达阻碍纤维母细胞迁移

[0374] 简介

[0375] 糖尿病足部溃疡的不良愈合是可能极端地使人虚弱和导致下肢截肢的主要的临床问题。在正常的急性创伤中,创伤边缘处作为细胞迁移和愈合的前体的连接蛋白 43 (Cx43) 间隙连接蛋白质下调。在这个实施例中,与未受伤的皮肤相比,使用来自人类慢性糖尿病足部溃疡创伤边缘的纤维母细胞的实验显示连接蛋白 43 蛋白质的惊人的和显著的 10 倍升高,以及 N-钙粘蛋白 (N-Cad) 的 6 倍升高和闭锁小带蛋白-1 (ZO-1, 带闭合蛋白) 的 2 倍增加。在链脲霉素糖尿病小鼠中,发现 Cx43 在完整的皮肤纤维母细胞中与血糖水平正比例的上调并且进一步增加 2 倍以响应受伤。对于模拟的糖尿病,在不同浓度的葡萄糖或甘露糖下培养 3T3 纤维母细胞并确定 Cx43 蛋白质细胞间通讯和迁移率。非常高的

(40mM) 葡萄糖条件中的纤维母细胞的培养显示显著升高的 Cx43 蛋白质水平, 如通过免疫染色和蛋白质印记显示的, 以及显著增加的间隙连接通讯, 如通过干转移显示的。在细胞划痕愈合实验中, 来自高的葡萄糖的增加的 Cx43 的水平导致抑制的丝状伪足延伸和比标准条件 (5.5mM 葡萄糖) 或等渗的甘露醇的对照显著更慢的迁移率。相反地, 当用 Cx43shRNA 转导阻止葡萄糖诱导的连接蛋白 43 上调时, 纤维母细胞延伸长的丝状伪足并且显著地迁移更快。连接蛋白 43 蛋白质在糖尿病足部溃疡的纤维母细胞中以及在培养中高葡萄糖暴露之后上调, 其与纤维母细胞迁移的抑制相关并且可能有助于受损的创伤愈合。

[0376] 背景

[0377] 具有糖尿病的人可具有不良治愈的创伤并遭受高的非治愈皮肤溃疡 (更频繁地在腿上发现) 的发病率。这样的溃疡可能使人极度地虚弱, 并且最终导致下肢截肢的重大的数字。

[0378] 间隙连接蛋白连接蛋白 43 (Cx43) 在创伤愈合响应中扮演主要的角色。在创伤边缘角质细胞中, Cx43 通常在伤害之后的第一个 24-48 小时下调, 因为角质细胞变成迁移的和向前爬行以愈合创伤。当通过将 Cx43 特异性反义凝胶应用至创伤使 Cx43 更迅速地下调时, 显示啮齿动物中迁移状态的加速的转变。相反, 链脲霉素 (STZ) 糖尿病小鼠中 Cx43 蛋白质在受伤之后的创伤边缘角质细胞中异常地过度产生并且迁移不能发生, 直到 Cx43 蛋白质水平减少。至少部分地认为异常的 Cx43 蛋白质表达加强 (underpin) 在糖尿病皮肤溃疡中观察到的不良愈合, 并且通过将 Cx43 反义应用至创伤 (阻止 Cx43 的异常升高的处理) 可以实现 STZ 糖尿病小鼠的角质细胞的正常的迁移速度的恢复。

[0379] 在下面描述的实验中, 量化在从血糖量正常的供体采集的完整的人类皮肤活组织检查样品中以及从具有确诊的糖尿病的患者的前臂和溃疡创伤边缘活组织检查样品中的真皮 Cx43 蛋白质水平。描述补充性体内和体外研究, 其中检查升高的葡萄糖对 Cx43 蛋白质水平、间隙连接通讯和细胞划痕 - 愈合实验中的迁移的影响, 以及 Cx43 蛋白质水平对迁移的速度的贡献。

[0380] 材料和方法

[0381] 2.1 人类皮肤活组织检查

[0382] 由 Western Institutional Review Board, Olympia, Washington State, USA 批准采集来自慢性糖尿病足部溃疡的边缘的 4mm 钻取活组织检查。从溃疡创伤边缘以及未受伤的皮肤的相配的前臂活组织检查获取这个样品。单独的非糖尿病同生群 (cohort) 具有前臂皮肤的活组织检查样品。在获得书面的知情同意之后获取所有的活组织检查样品。

[0383] 糖尿病同生群包括 10 个白种人受试者 (6 个男性和 4 个女性), 具有中值 (median) 年龄 59.5 岁 (范围: 48-82 岁)。九个受试者在进行胰岛素和一个进行口服医药, 具有同生群中值 HbA1c 6.9 (范围 5.3-9.9; n = 6 有效的)。所有的具有四肢的糖尿病性神经病变和 6 个具有外周血管疾病的临床指征。每一个受试者具有临床上证实的糖尿病足部溃疡。中值溃疡尺寸 9.4cm^2 (1-81 cm^2), 具有 3.5 月的持续时间中值 (范围 1.5-26 月)。从白种人个体获取非糖尿病完整皮肤手臂活组织检查的对照同生群, 包括 6 个中值年龄 48.5 岁的受试者 (2 个男性和 4 个女性; 范围 36-79 岁)。

[0384] 糖尿病大鼠

[0385] 在通过腹腔内注射 STZ (65mg/Kg) 在雄性斯普拉 - 道来氏大鼠 (350-400g) 中诱导

糖尿病并使用葡萄糖尿液测试条 (urinary strip) (Clinistix, Bayer, UK) 证实糖尿病。在诱导糖尿病之后 2 周采取创伤愈合研究并且如先前描述的进行 (Wang, Lincoln (2007), Diabetes, vol. 56:2809-17)。将单次局部应用的 50 μ l 的 10 μ M 未修饰的 Cx43asODN (5'-GTA ATT GCG GCA GGA GGA ATT GTT TCT GTC-3'; SEQ ID NO:10) 或对照 Cx43sODN (5'-GAC AGA AAC AAT TCC TCC TGC CGC AAT TAC; SEQ ID NO:11; Sigma) 递送至创伤并在受伤之后 24 小时收获组织。获取血液葡萄糖读取并证实所有的大鼠是严重的血糖过高 (血糖 27.07 ± 1.09 mmol/L)。

[0386] 细胞培养

[0387] 在 5.5% 葡萄糖 DMEM (D5796: Invitrogen, UK) 补充的 10% 胎牛血清和青霉素 / 链霉素中生长 NIH 3T3 纤维母细胞的汇合单层细胞。在某些实验中, 将葡萄糖的水平升高至 25 或 40mM 或等渗对照的 19.5 或 34.5mM 甘露醇。在进行实验之前, 将细胞培养在这些条件中持续 2 周。根据由 Becker, et al. (Journal of Cell Science (1995), vol. 108, part 4:1455-67) 描述的方法进行染料注射。如通过 Mori, et al. (Journal of Cell Science (2006), vol. 119:5193-203) 描述的, 在纤维母细胞的汇合单层上进行细胞划痕实验, 和在 Olympus IX81 显微镜上在 4 小时一段时间内通过时间流逝成像监测迁移。

[0388] 免疫组织化学和成像

[0389] 如通过 Wang, et al. (Diabetes (2007), vol. 56:2809-17) 描述的, 在受伤的和完整的皮肤的培养的细胞或冷冻切片上进行免疫染色。在室温下孵育对于以下的第一抗体 1 小时: Cx43, 1:2000 稀释 (Sigma, Poole, UK)、N- 钙粘蛋白, 1:100 稀释 (Abcam, ab18203) 和 ZO-1, 1:100 稀释 (Zymed Laboratories, 61-7300) 的。组织用 PBS 洗涤, 并且然后使用第二抗体猪抗兔 FITC- 结合的 (DAKO) 孵育。将缺少第一抗体的第二抗体孵育用作阴性对照。然后, 使用 5 μ g/ml 的细胞核染料 Hoechst 33342 (Sigma, Poole, UK) 将组织复染色 10 分钟, 并且在 Leica SP2 共聚焦显微镜上获取图像 (Leica Microsystems, UK)。遍及每一个实验, 使图像获取期间的所有的参数保持恒定以允许直接比较所有的 8 比特数字图像。当成像时, 避开视场中的主要的真皮附器, 因为它们表达相当更多的 Cx43 和将使结果失真。使用 ImageJ 软件 (NIH), 使用已经确定的像素 - 计数方法, 量化每单位面积的免疫染色水平。使用完全相同的阈值将图像转变为二进制图像。计算大于 2 像素的目标以产生每单位面积的积极的像素的数目的读出用于条件之间的比较。

[0390] 逆转录病毒构建体: 含有 Cx43shRNA 序列 5'-GGTGTGGCTGTCAGTGCT-3' (SEQ ID NO:12; van Zeijl, et al. (2007), J. Cell Biol., vol. 177:881-91) 的逆转录 pSuper 载体。pSuppressor (p. Sup) 逆转录病毒载体用作对照, 和如由 Carr and Whitmore (Nature Cell biology (2005), vol. 7:319-21) 描述的进行转染。

[0391] 统计分析

[0392] 使用 ANOVA, 之后 Tukey's 分析确定统计差异, 其中将 $P < 0.05$ 认为是显著的。

[0393] 结果

[0394] 人类活组织检查中的 Cx43、N- 钙粘蛋白和 ZO-1 蛋白质水平

[0395] 与糖尿病足部溃疡的影响 (DFU) 形成对比, 在 Cx43 蛋白质水平方面, 潜在的糖尿病状态对来自完整的未受伤的真皮的人类纤维母细胞 Cx43 蛋白质水平的影响是可以忽略的。来自 DFU 内部的纤维母细胞显示 Cx43 蛋白质的惊人的上调, 其约高于相当的完整的糖

尿病患者或非糖尿病患者皮肤的 10 倍 ($P < 0.05$)。Cx43 蛋白质经常与紧密连接蛋白质 ZO-1 和粘附蛋白 N-钙粘蛋白紧密相关,并且发现这两种蛋白质在 DFU 样品中都升高。与完整的皮肤相比 ($P < 0.05$),DFU 中 N-钙粘蛋白蛋白质水平升高 6 倍,并且发现平均 ZO-1 蛋白质水平升高 2 倍。也观察到,在完整的人类皮肤中,可看到弹性蛋白的自发荧光束(但是在大鼠皮肤中不能看到),而来自 DFU 的创伤边缘缺少这些,其中它们已被蛋白酶降解。

[0396] STZ 大鼠的创伤边缘纤维母细胞中的 Cx43 蛋白质水平

[0397] 在受伤之后 24 小时,STZ 糖尿病大鼠的创伤-边缘区域中的真皮纤维母细胞的 Cx43 免疫染色大于对照小鼠的两倍。通过在受伤之后立即单一局部应用 Cx43-特异性反义凝胶 (Cx43asODN;SEQ ID NO:13) 有效地阻止 ($P < 0.001$) 糖尿病创伤-边缘纤维母细胞中的 Cx43 蛋白质的这种异常的增加。在完整的糖尿病小鼠皮肤中,发现 Cx43 蛋白质水平的显著的增加与血糖水平直接相关 $r = 0.625$ 。

[0398] 纤维母细胞 Cx43 表达和通讯

[0399] 在渐增的葡萄糖 (5.5、25 和 40mM) 条件下将用 p. Sup 或 Cx43shRNA 构建体转导的 3T3 纤维母细胞培养 2 周以模拟这些细胞中的糖尿病状态。为了控制增加的葡萄糖同渗容摩的影响,在分别地用 19.5 或 34.5mM 甘露醇补充的 5.5mM 葡萄糖 DMEM 中孵育纤维母细胞。40mM 水平的葡萄糖导致显著升高的 Cx43 蛋白质的水平,如通过蛋白质印记和免疫染色显示的 ($P < 0.01$)。通过用 Cx43shRNA ($P < 0.001$) 转导极大地阻止 Cx43 蛋白质水平的这种升高。在不同浓度的葡萄糖中培养的纤维母细胞中分析细胞通讯的程度,和与较低的葡萄糖或对照的高甘露醇条件相比,在最高的葡萄糖浓度 (40mM) 看到染料耦合的发生率的显著增加 ($P < 0.01$)。

[0400] 纤维母细胞迁移

[0401] 当在 4 小时一段时间上成像时(对于 25 和 40mM 葡萄糖分别地 $P < 0.05$ 和 $P < 0.001$),响应划痕,在渐增的葡萄糖条件两周下培养的细胞迁移显著地比 5.5mM 葡萄糖慢。在使用 19.5mM 和 34.5mM 甘露醇孵育的纤维母细胞的迁移速度中,这没有显著的变化,排除渗透影响。当在增加的葡萄糖和甘露醇条件下孵育用 Cx43shRNA 或 p. Sup 稳定转导的纤维母细胞时,Cx43shRNA 极大地阻止在 40mM 葡萄糖条件中看到的 Cx43 上调,并且显著地增强所有条件的迁移速度 ($P < 0.05$; $P < 0.001$)。尽管 Cx43shRNA 40mM 高葡萄糖剂量的迁移速度比 p. Sup 40mM 葡萄糖增加 2 倍,但是它不能达到在所有的其他 Cx43shRNA 处理条件中看到的速度。然而,它匹配或超过在所有的 p. Sup 转染的纤维母细胞培养中获得的速度。另外,与迁移的更迅速的发生和更大的运动性一致,Cx43shRNA 也增强迁移细胞的前缘上板状伪足延伸的产生的速度和尺寸。

[0402] 讨论

[0403] 在这个研究中,已经第一次在来自人类 DFU 创伤边缘的活组织检查的真皮纤维母细胞中量化的间隙连接蛋白质 Cx43 的表达水平中观察到显著的 10 倍增加。据信 Cx43(通常必须在急性创伤愈合中瞬时下调的蛋白质)的这种异常的表达抑制纤维母细胞迁移和愈合这样的慢性创伤的能力。

[0404] 这些结果显示, Cx43 的升高发生在 STZ 大鼠的创伤边缘纤维母细胞中,并且可以通过 Cx43asODN 阻止这种升高。发现完整的 STZ 大鼠真皮中的 Cx43 的增加与血糖的水平成正比例,因此葡萄糖自身可以至少部分地是纤维母细胞中的 Cx43 表达改变的驱动剂。同

样地,这些结果也显示,将 3T3 细胞培养的培养基中的葡萄糖的水平提高至 40mM 升高 Cx43 蛋白质水平和 GJIC。由葡萄糖带来这种影响,而不是增加的同渗容摩,因为相似水平的甘露醇不显著地增加 Cx43 蛋白质或 GJIC。升高水平的 Cx43 对纤维母细胞的迁移速度具有负面影响,其与显示创伤边缘中异常地升高的 Cx43 的 STZ 糖尿病大鼠的扰乱的创伤愈合一致。另外,通过证明在 Cx43 敲低之后细胞以对照或更快的速度迁移,提供升高水平的 Cx43 延迟纤维母细胞迁移的有利的支持证据。甚至在非常高的葡萄糖水平下 (40mM), Cx43shRNA 迁移比 p. Sup (40mM) 快 2 倍,并且超过在 p. Sup 对照 (5.5mM) 葡萄糖浓度下看到的水平。虽然 Cx43shRNA 可以容易地阻止 Cx43 蛋白质的正常水平的表达,但是它不能完全地阻止由 40mM 葡萄糖诱导的升高的水平。有趣的是,当 Cx43shRNA (40mM 葡萄糖) Cx43 水平类似于 p. Sup (5.5mM 葡萄糖) 的那些时,迁移速度也相似。

[0405] 通过以下事实,即,如果 Cx43 蛋白质水平升高则损害纤维母细胞迁移,突出创伤愈合过程期间下调 Cx43 蛋白质的重要性。将清楚的是,存在的 Cx43 蛋白质越多,纤维母细胞迁移越慢。DFU 的纤维母细胞中的 Cx43 蛋白质的 10 倍升高可以解释为什么这些细胞不能迁移。精确地, Cx43 如何抑制纤维母细胞迁移还不是很清楚;然而, Cx43 的胞质尾可与许多细胞骨架和膜蛋白如 α -和 β -连环蛋白、N-钙粘蛋白和 ZO-1 相互作用,并且可以形成蛋白质连接复合体,有时称为“蛋白体 (蛋白组, Proteome)”或“连结”,其可影响迁移。另外, Cx43 基因可以是控制其他基因的表达的主基因。这里的发现,在人类糖尿病皮肤的真皮中, ZO-1 和 N-钙粘蛋白两者上调,并且在 DFU 中更多,也支持 Cx43 的调控角色。由升高的 N-钙粘蛋白蛋白质水平形成的粘附的增加可有助于阻碍的纤维母细胞迁移。另外,也将凭借 DFU 纤维母细胞之间对接的升高的 Cx43-Cx43 半通道增加细胞-细胞粘附。

[0406] 概要和结论

[0407] 在这个研究中,在来自糖尿病足部溃疡的人类活组织检查的真皮纤维母细胞中发现 Cx43 蛋白质水平的 10 倍升高。另外,在 DFU 中,分别地发现 N-钙粘蛋白和 ZO-1 的水平升高 6 倍和 2 倍。也显示,在 STZ 糖尿病大鼠真皮中, Cx43 与血糖的水平成比例升高,并且可以通过将 Cx43-特异性反义应用至创伤纠正 STZ 糖尿病大鼠的创伤边缘真皮中观察到的 Cx43 的 3 倍升高。也显示在培养的纤维母细胞中,高水平的葡萄糖可以诱导升高的 Cx43 蛋白质水平,和这样的葡萄糖水平体外阻碍纤维母细胞迁移。这些结果证实增加的 Cx43 表达是糖尿病溃疡中不良的纤维母细胞迁移和减少的愈合速度的基本原因。

[0408] 实施例 4

[0409] 寡核苷酸靶向 ZO-1

[0410] 这个实施例描述对于 ZO-1AS ODN (反义寡脱氧核苷酸)、shRNA (小发夹 RNA 分子) 和 siRNA (小干扰 RNA 分子) 的几个候选。

[0411] ZO-1 最初地在紧密连接上被识别,该紧密连接形成细胞内部的网络。这个结构仅存在于细胞-细胞接触区上的两个细胞之间的交叉上。ZO-1 是 220-kDa 膜蛋白质,其与跨膜蛋白紧密连接蛋白 (claudin) 和闭合蛋白 (occludin) 共定位。稍后,在将细胞拉在一起 (zip...together) 的粘附连接上证明和识别 ZO-1 并因此维持细胞和组织极性。这些连接也锚定细胞骨架,允许质膜上形成大的复合体。

[0412] 靶向 ZO-1 用于合成反义多核苷酸的一个选择的序列 5'-CTGCTTTCTGTTGAGAGGCT-3' (SEQ ID NO:14),相当于来自 MUSZO1 登录号 D14340I 中的碱

基对 3154-3169 区段。可将互补正义多核苷酸, 5' -AGCCTCTCAACAGAAAGCAG-3' (SEQ ID NO:25), 和随机顺序无义多核苷酸, 5' -TATGGTACGTGTCGTCCTTG-3' (SEQ ID NO:26) 用作对照。

[0413] 小干扰 RNA (无论是现在已知的或稍后开发的) 也可用于减少或消除 ZO-1 表达。几个这样的分子包括:

- [0414] siRNA 扰乱 5' -GGGAAGACAGAACUUGUACUCAA A -3' (SEQ ID NO:15)
[0415] 3' -CCCUUCUGUCUUGAACAUAGAGUUUU-5' (SEQ ID NO:16)
[0416] siRNA p53 5' -AAAACUCAUGUUCAAGACAGAAGGGU-3' (SEQ ID NO:17)
[0417] 3' -UUUUGAGUACAAGUUCUGUCUCCCC A -5' (SEQ ID NO:18)
[0418] siRNA ZO-1 1681 5' -CCAUCUGAUGGUGUCCUACCUAUU-3' (SEQ ID NO:19)
[0419] 3' -GGUAGACUACCACAGGAUGGAUUA A -5' (SEQ ID NO:20)
[0420] siRNA ZO-1 2137 5' -GGGCUCUUGGCUUGCUAUUCGAAUU-3' (SEQ ID NO:21)
[0421] 3' -CCCGAGAACCGAACGAUAAGCUUA A -5' (SEQ ID NO:22)
[0422] siRNA ZO-1 5518 5' -CCUCCACCUUUAGAUAAAGAGAA A -3' (SEQ ID NO:23)
[0423] 3' -GGAAGGUGGAAAUCUAUUUCUCUUU-5' (SEQ ID NO:24)

[0424] 此处参考或提到的所有的专利、出版物、科学文章、网址和其他文献和材料表示本发明所属领域的技术人员的技能水平, 并且通过引用结合于此的这样参考的文献和材料中的每一个达到如同分别地将它的全部通过引用结合于此或以其全部阐述于此的相同程度。申请人保留对物理上并入说明书的任何和所有的材料和信息的权利, 其来自任何这样的专利、出版物、科学文章、网址、电子有效信息和其他参考的材料或文献。

[0425] 此处描述的具体的方法和组合物是优选的实施方式的代表, 并且是示例性的和不打算作为本发明的范围的限制。本领域的技术人员考虑本说明书时将想到其他目标、方面和实施方式, 且这些包括在由权利要求的范围限定的本发明的精神内。本领域的技术人员将显然可见, 可对此处公开的发明作出多种替换和修改而不脱离本发明的范围和精神。可适当地在缺少任何一种或更多种元素, 或一种或更多种限制时实施此处说明性地描述的发明, 此处其没有作为必要要素而特别地公开。因此, 例如, 此处每一个实施例中, 在本发明的实施方式或实施例中, 说明书中的术语“包含”、“基本上由...组成”和“由...组成”中的每一个可以用其他两个术语中的任一个代替。同样, 术语“包含”、“包括”、“含有”等被扩展性地理解且没有限制性。可以适当地以不同的步骤顺序实施此处说明性描述的方法和过程, 并且它们不一定限制于此或权利要求中指示的步骤的顺序。如此处和另外的权利要求中使用的, 单数形式“一个 (a)”、“一种 (an)”和“该 (the)”包括复数参考, 除非上下文另外明确地指出。绝不可能将专利解释为限于此处特别公开的具体的实施例或实施方式或方法。绝不可能将专利解释为受限于通过政府专利局的任何审查员或其他官员或雇员作出的任何声明限制, 除非在通过发明人或发明人的代理的答复书面意见中特别地并且没有限制或保留明显地采纳这样声明。

[0426] 可以根据描述使用采用的术语和表达且不是限制, 并且不打算将这样的术语和表达的应用排除显示和描述的特征的任何等价物或它的部分, 但是应该认识到, 在要求保护的本发明的范畴内多种修改是可能的。因此, 应该明白, 尽管通过优选的实施方式和可选的特征特别地公开本发明, 但是此处公开的概念的修改和变化可依靠本领域的技术人员, 并

且应该明白,认为这样的修改和变化由另外的权利要求限定的这个发明的范畴内。

[0427] 此处广泛地和一般性地描述本发明。属于一般公开的较窄的种类和亚属组群的每一个也形成本发明的部分。这包括本发明的一般性描述,具有从属去除任何主旨的附带条件或负面限制,不管此处是否特异性地列举离体材料。

[0428] 其他实施方式在以下权利要求内。另外,其中以马库什组描述本发明的特征或方面,本领域的技术人员将认识到,因此,也根据任何个体成员或马库什组的成员的亚组描述本发明。

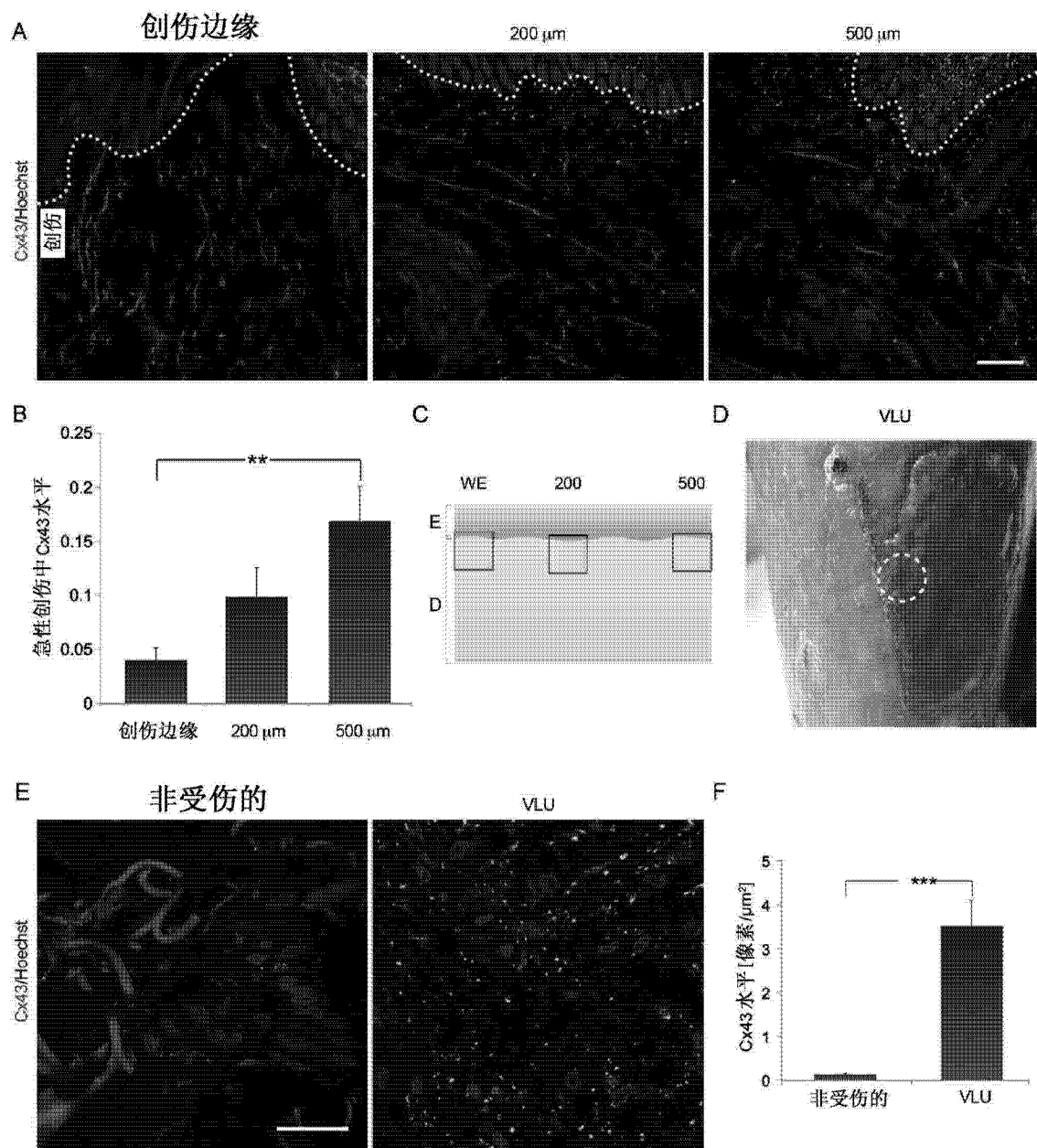


图 1

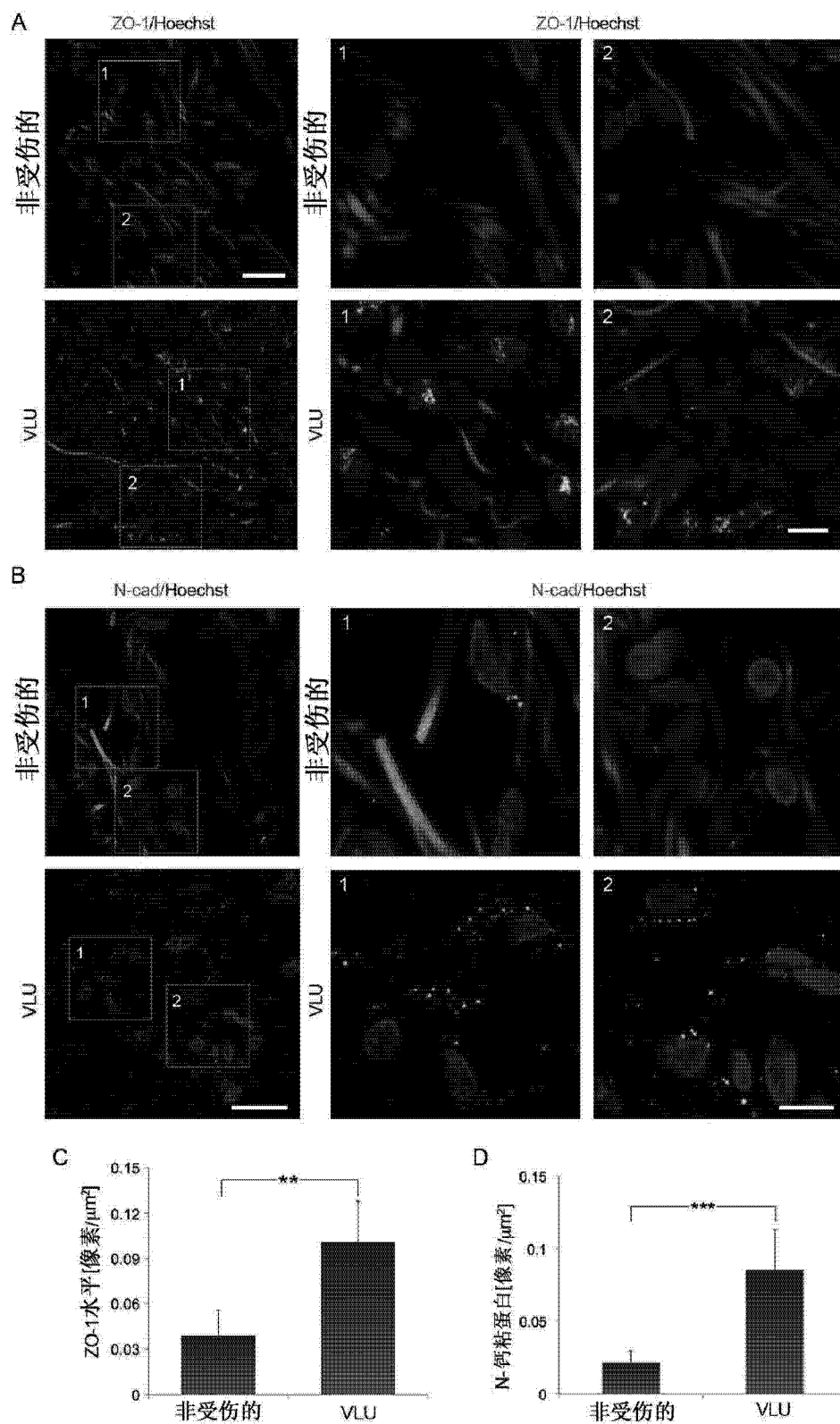


图 2

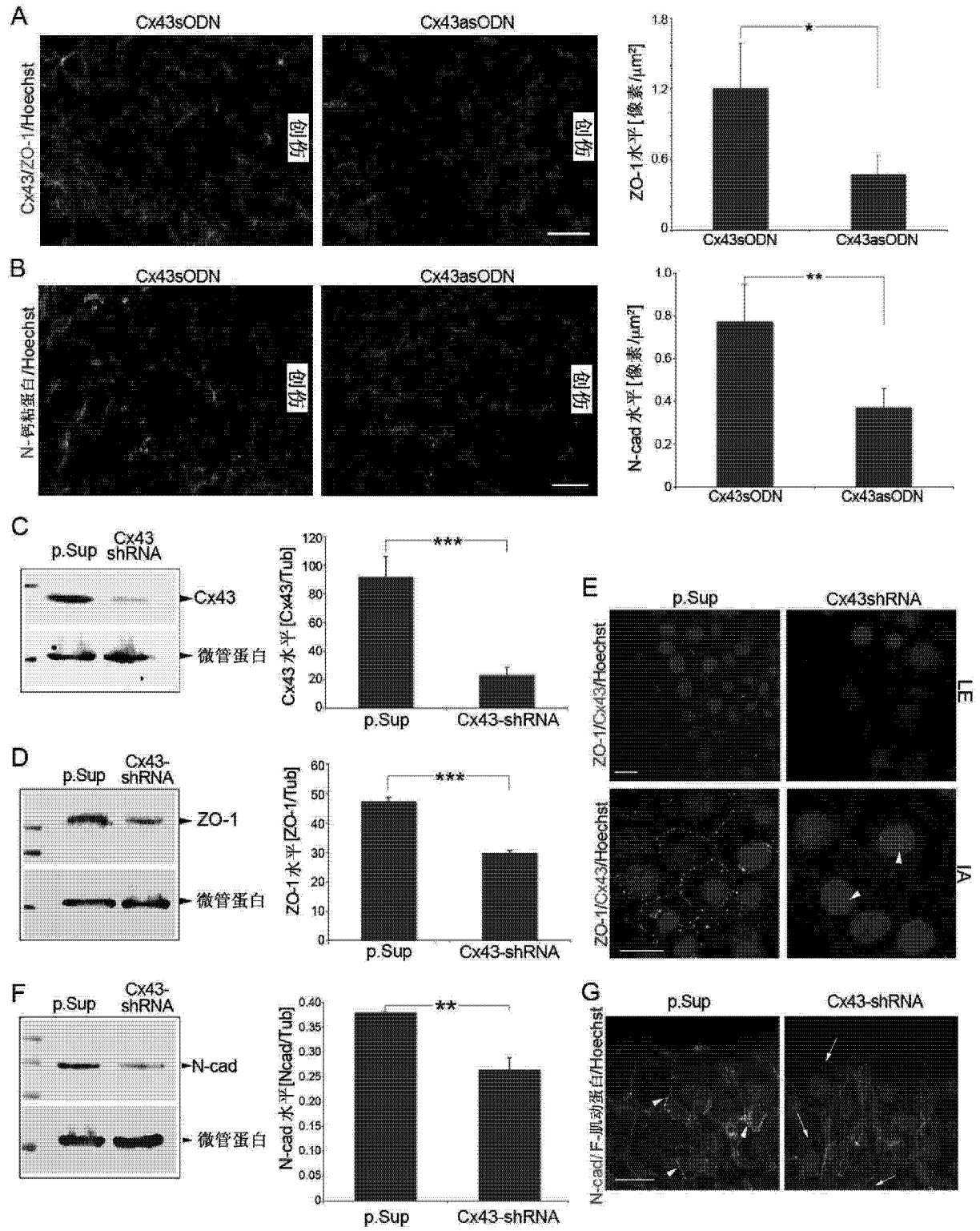


图 3

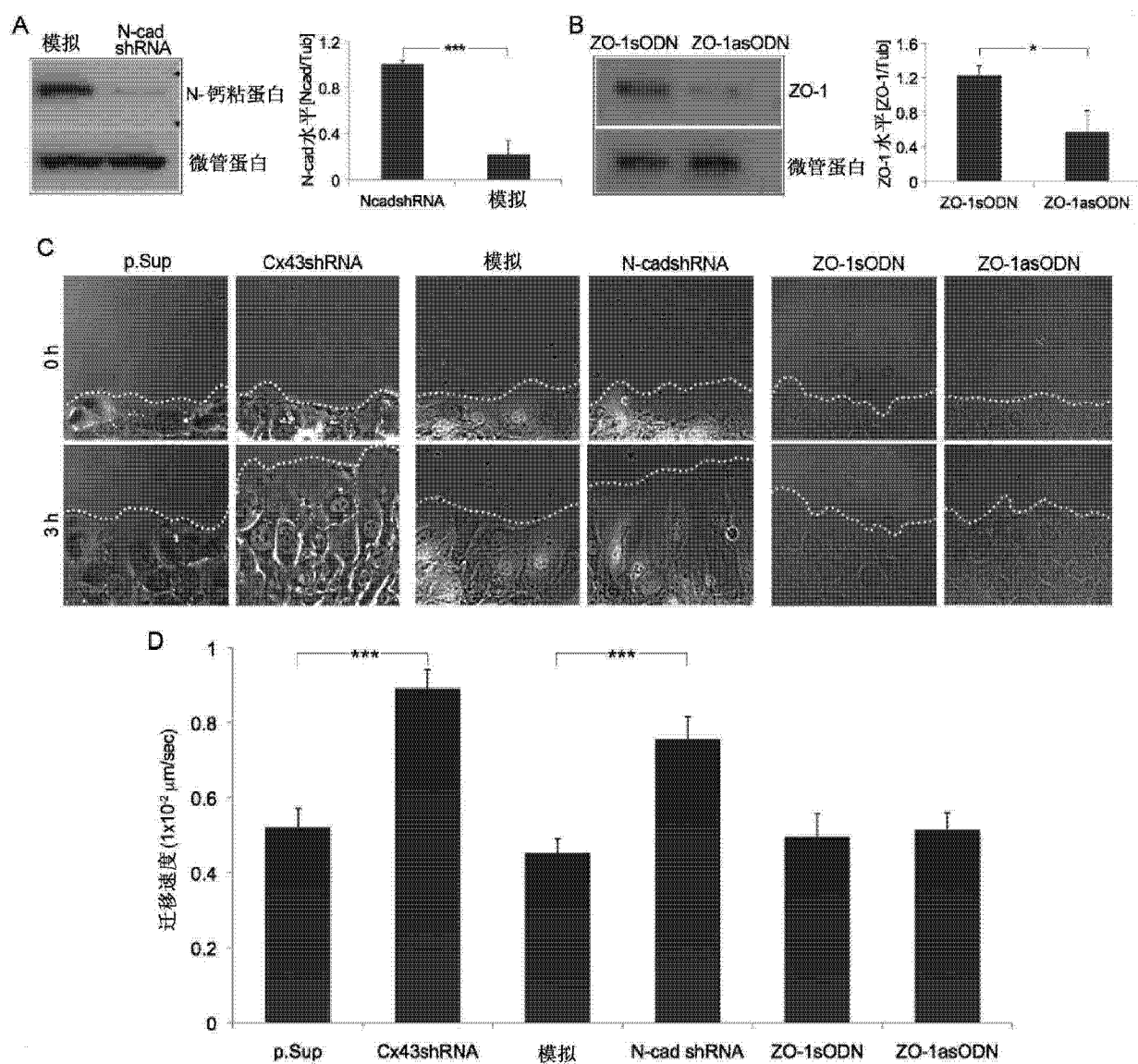


图 4

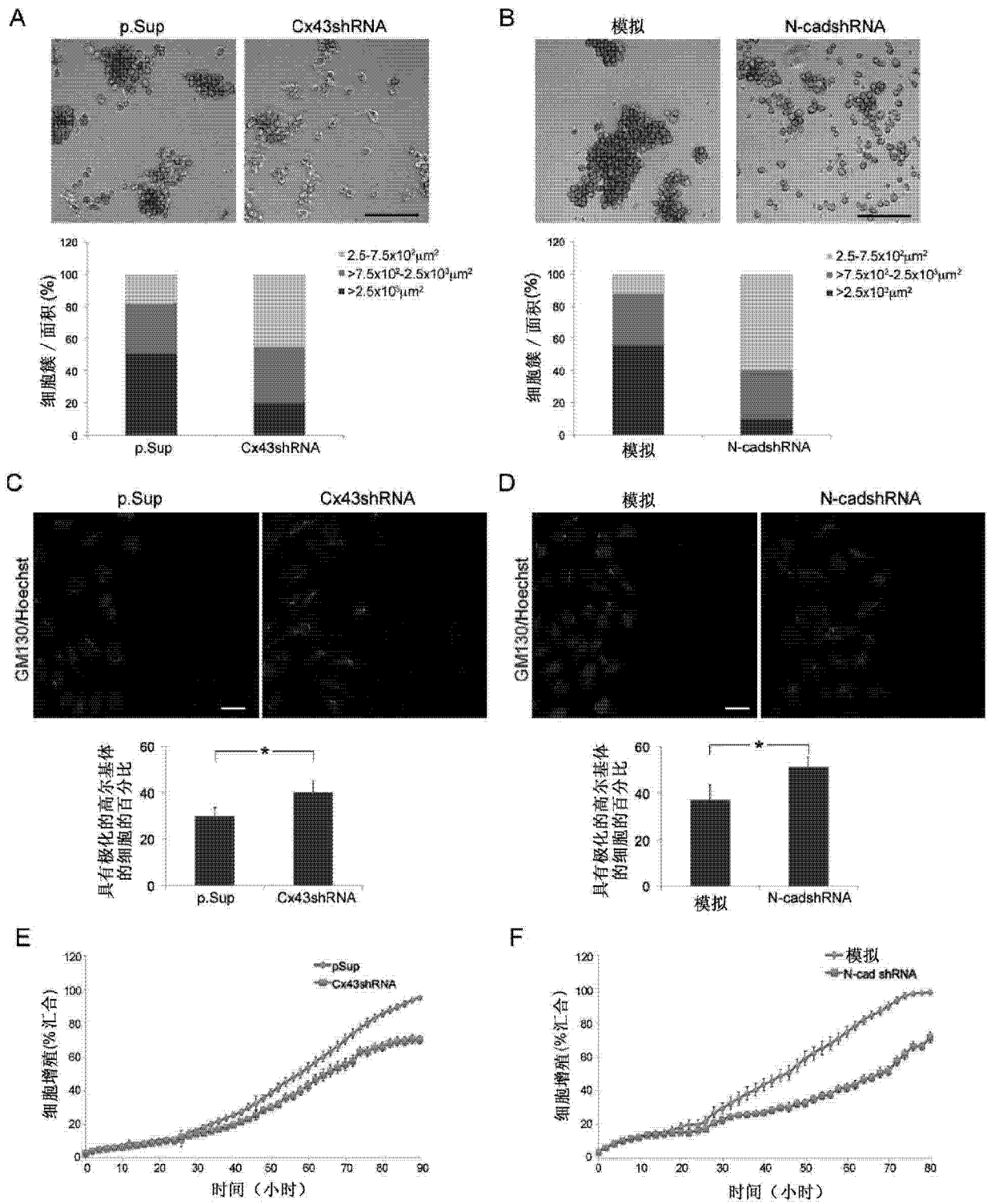


图 5

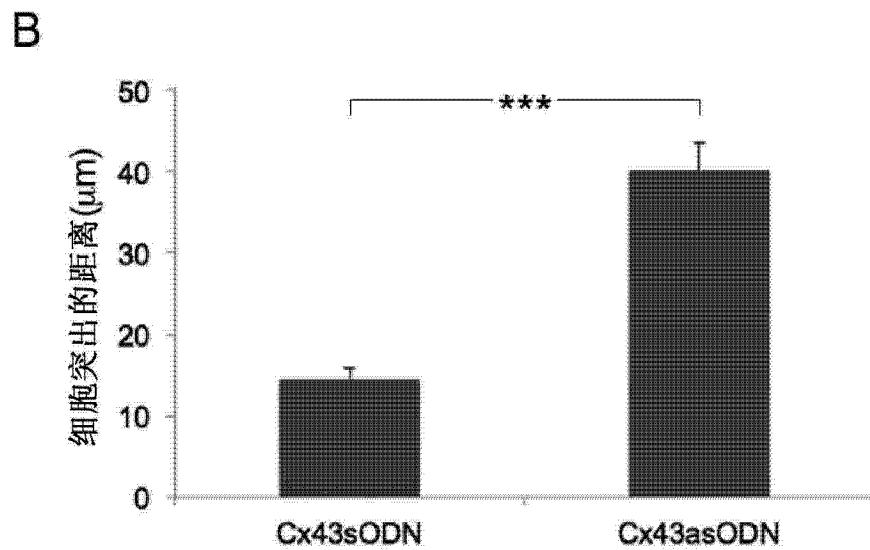
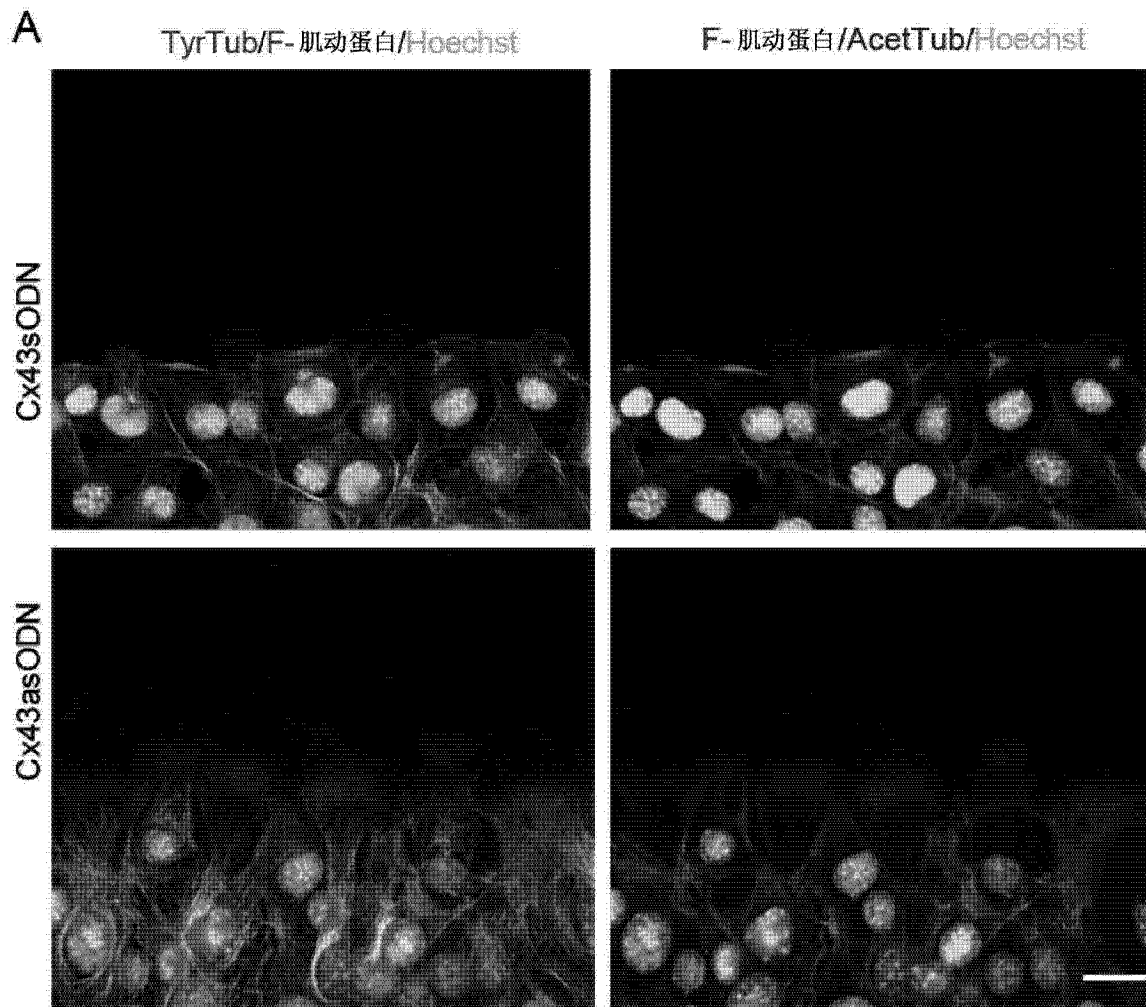


图 6

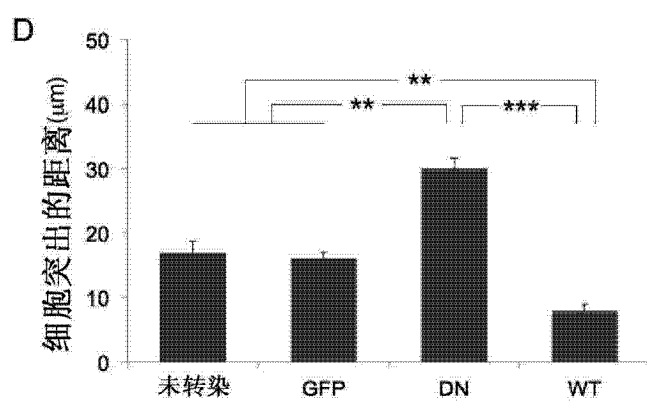
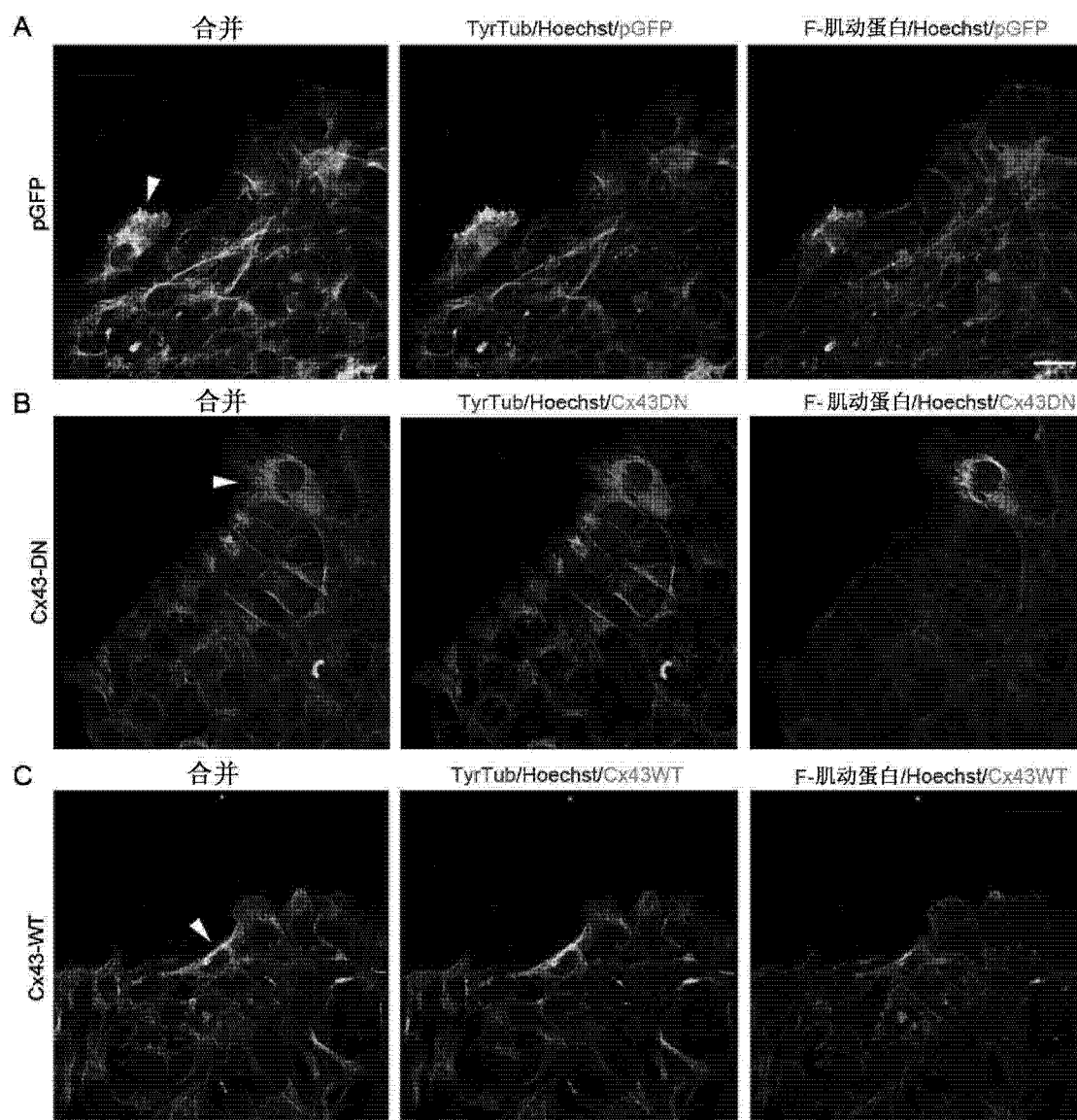


图 7

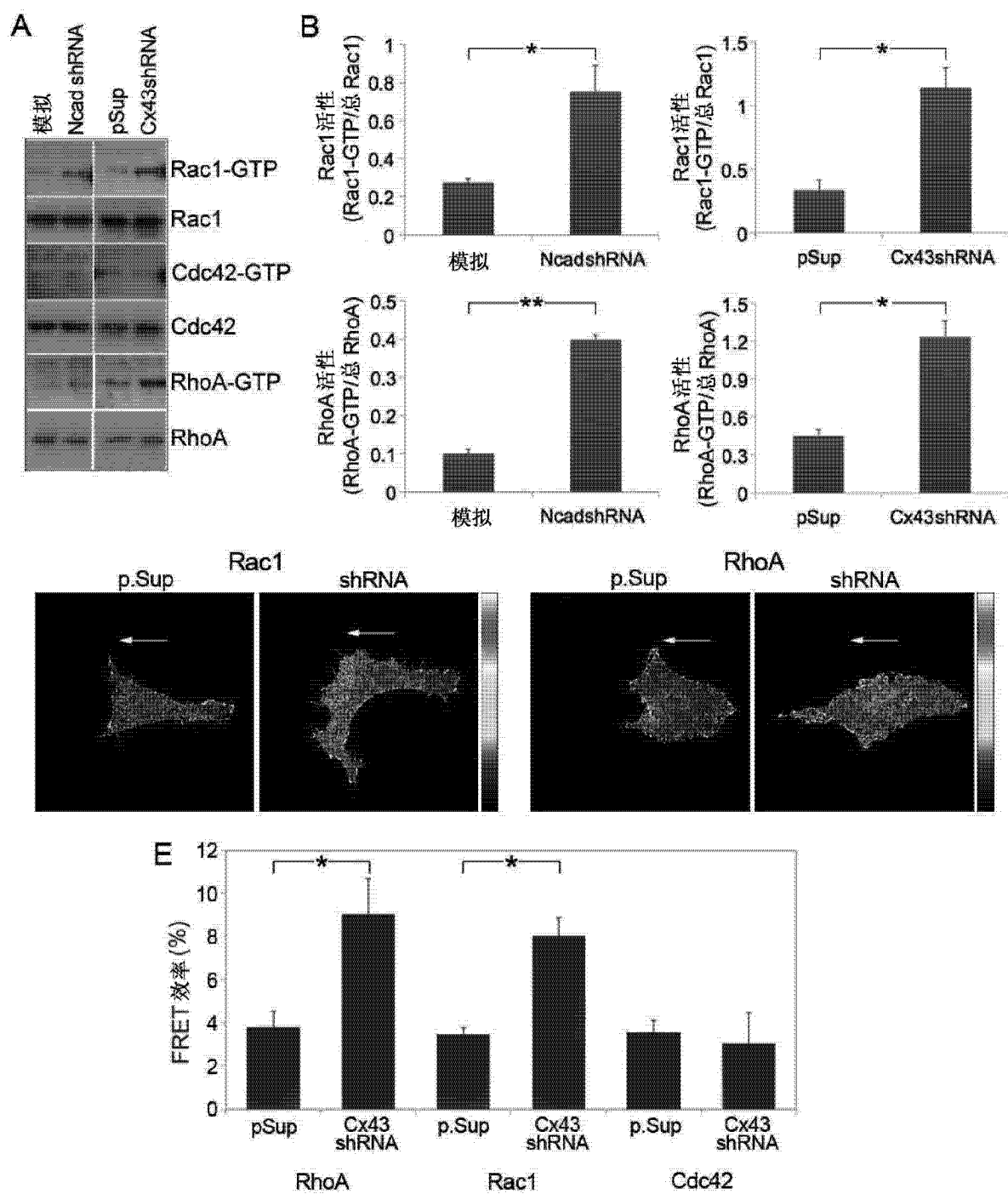


图 8

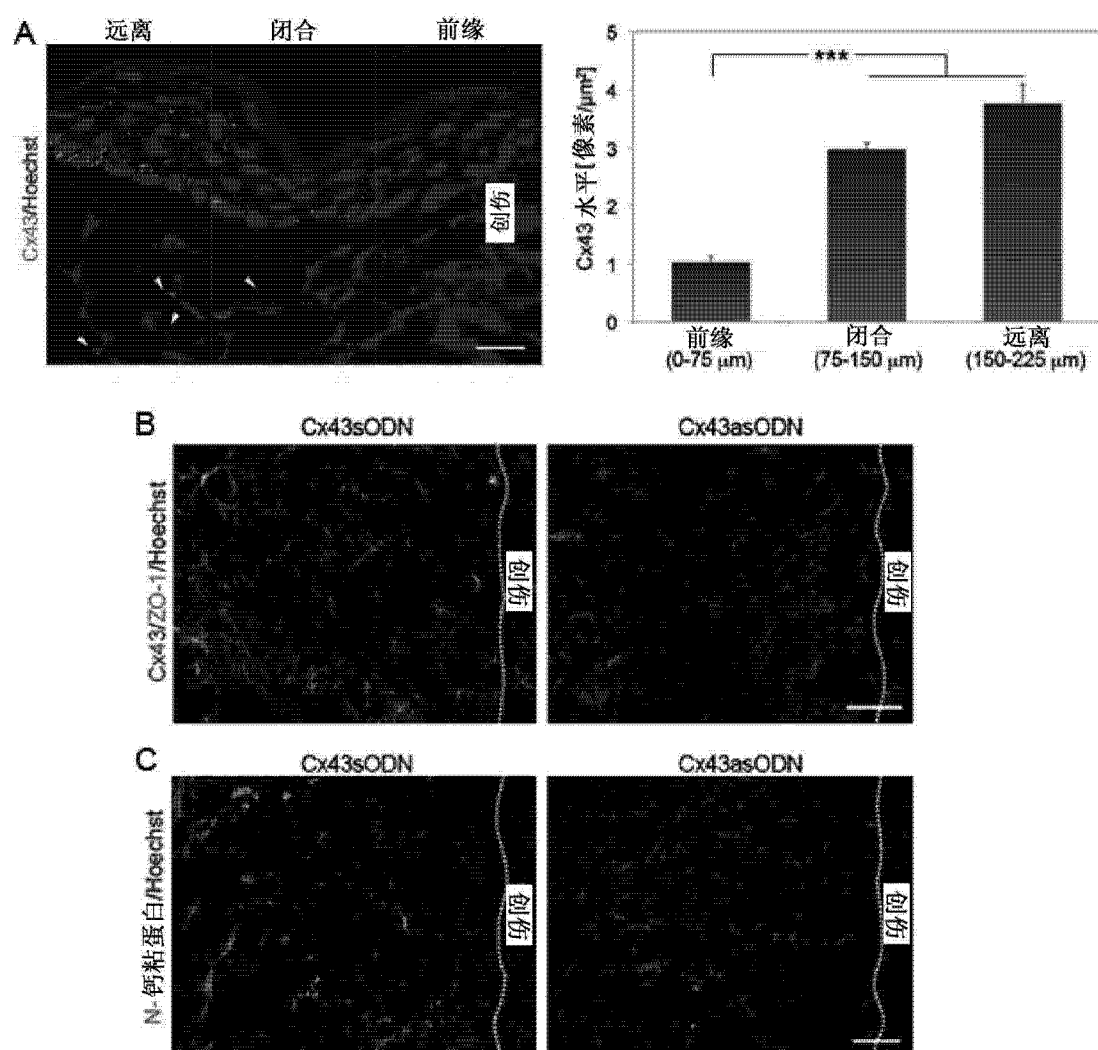


图 9

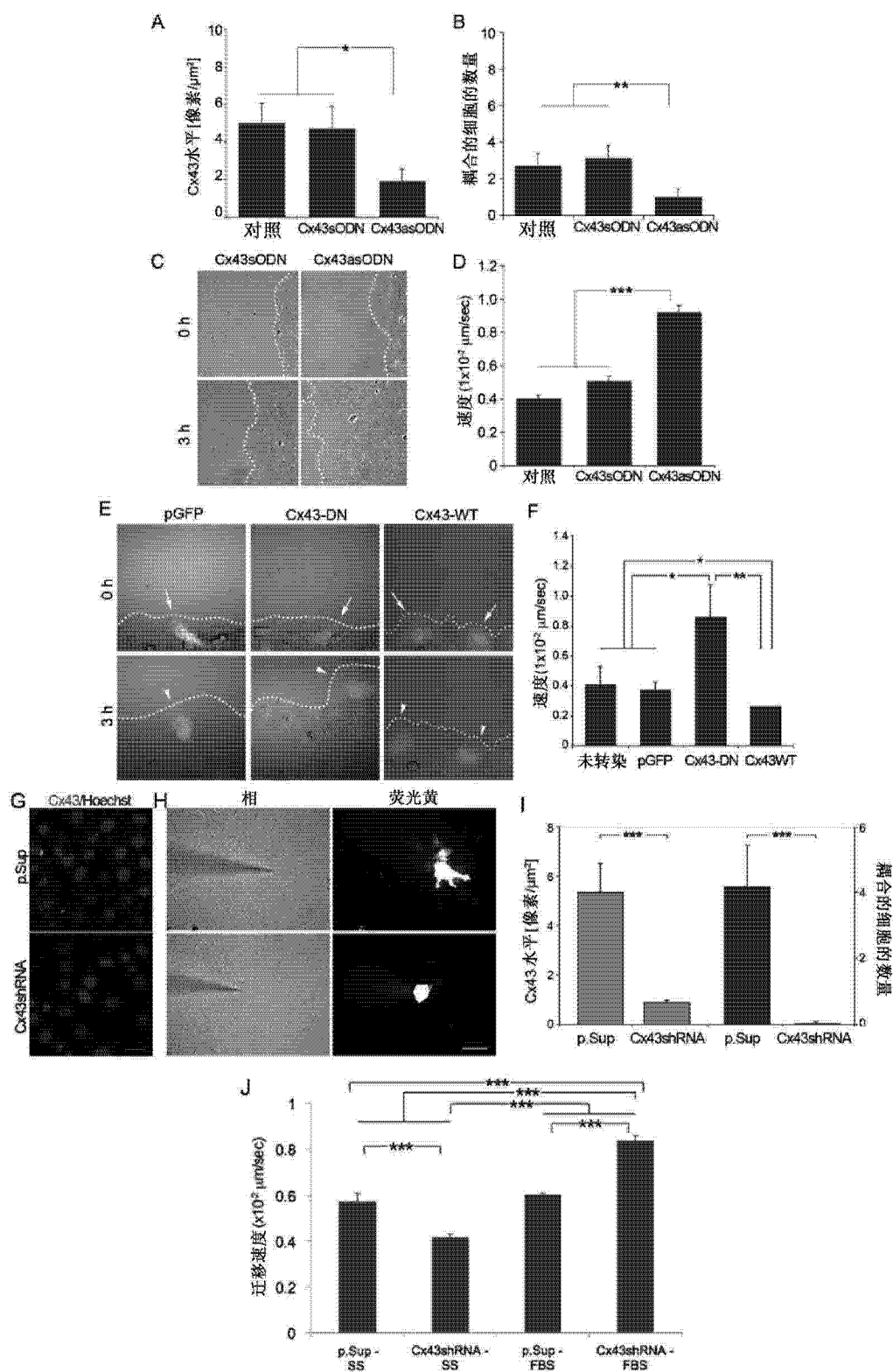


图 10

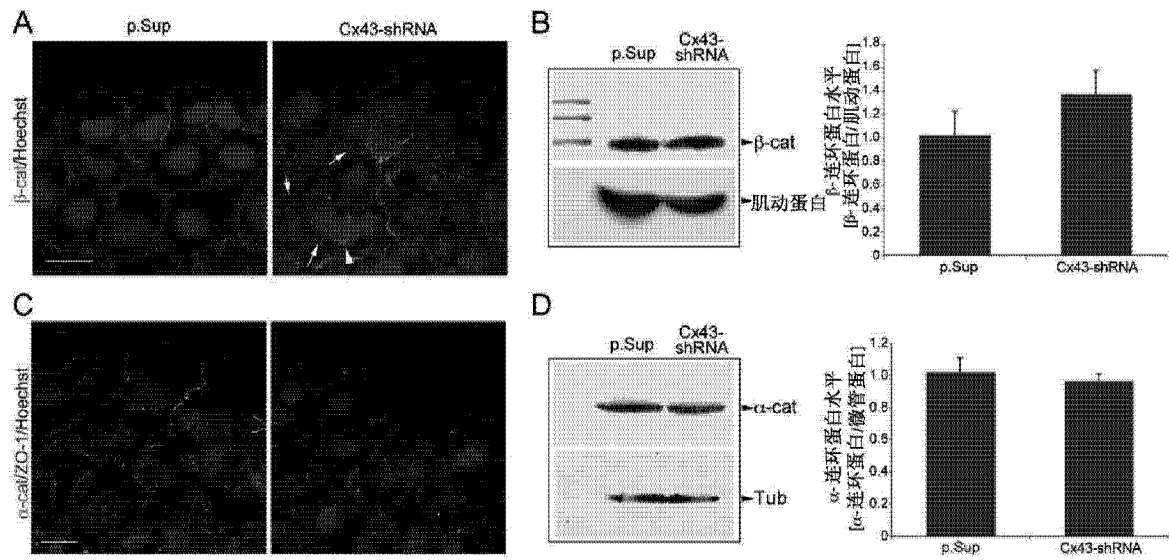


图 11

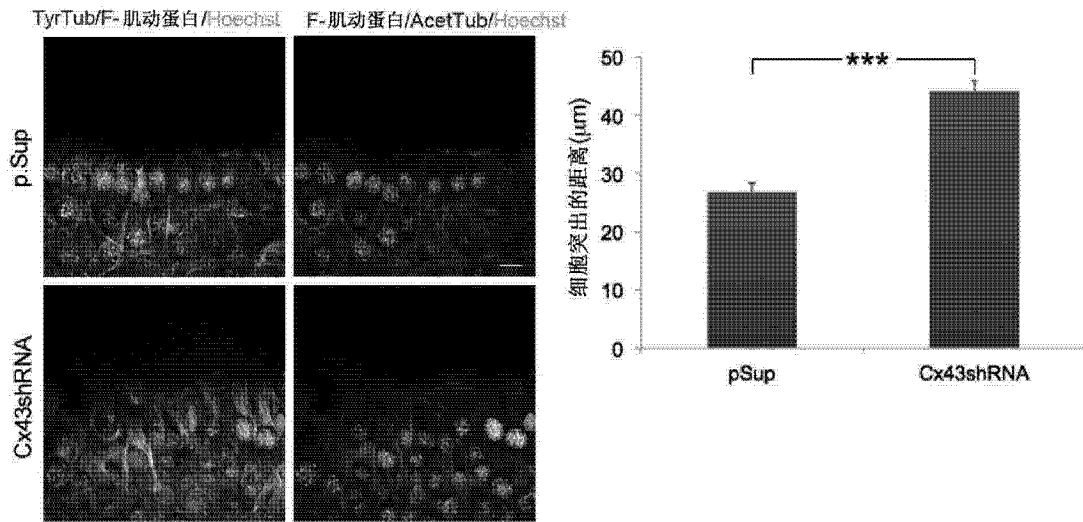


图 12

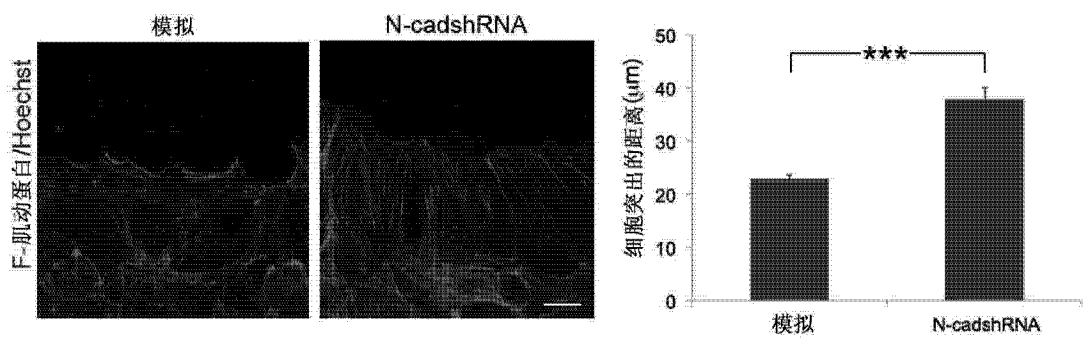


图 13