

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01815458.1

[51] Int. Cl.

A61K 38/48 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 6 月 17 日

[11] 授权公告号 CN 100500211C

[22] 申请日 2001.7.12 [21] 申请号 01815458.1

[30] 优先权

[32] 2000.7.12 [33] US [31] 60/217583

[86] 国际申请 PCT/US2001/021944 2001.7.12

[87] 国际公布 WO2002/004008 英 2002.1.17

[85] 进入国家阶段日期 2003.3.11

[73] 专利权人 奥索洛吉艾斯有限公司

地址 美国亚利桑那州

[72] 发明人 达芮尔·H·卡尼

[56] 参考文献

US5352664 1994.10.4

US5500412 1996.3.19

US 5352664A 1994.10.4

WO8803151A2 1988.5.5

审查员 裴颖

[74] 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

代理人 陈文平

权利要求书 1 页 说明书 21 页 附图 2 页

[54] 发明名称

用凝血酶派生的肽的治疗方法

[57] 摘要

本发明涉及促进心脏组织修复的方法，包括对心脏组织给药治疗有效量的生血管的凝血酶派生的肽和/或抑制或降低血管的闭塞或再狭窄。本发明涉及刺激换管术的方法。 仍然在另一个实施方案中，本发明涉及在用于本文所用的方法的药物的制造过程中使用凝血酶派生的肽。

1. 氨基酸序列为 SEQ ID NO:3 的肽在制备用于治疗心肌缺血的药物中的用途。

2. 如权利要求 1 所述的用途，其中所述肽的羧基末端被酰胺化。

3. 如权利要求 1 所述的用途，其中所述药物是持续释放制剂。

4. 如权利要求 3 所述的用途，其中所述持续释放制剂包含聚乳酸/聚乙醇酸微颗粒。

5. 氨基酸序列为 SEQ ID NO:3 的肽在制备用于抑制血管成形术后的动脉再狭窄的药物中的用途。

6. 如权利要求 5 所述的用途，其中所述肽的羧基末端被酰胺化。

7. 如权利要求 5 所述的用途，其中所述药物是持续释放制剂。

8. 如权利要求 7 所述的用途，其中所述持续释放制剂包含聚乳酸/聚乙醇酸微颗粒。

用凝血酶派生的肽的治疗方法

政府的支持

本发明整体或部分得到了国立卫生研究院的 R43 HL64508 项拨款的资助。该政府部门在本发明中有一定的权利。

相关的申请

本申请要求保护 2000 年 7 月 12 日递交的美国临时申请号 60/217,583 的权益，该申请的全部内容都通过在此引述而合并于本文。

本发明的背景

人 α 凝血酶对各种组织的许多种细胞似乎都具有生长促进活性。例如， α 凝血酶已经表现出在没有加入血清或其他纯化的生长因子的培养基中能启动成纤维细胞的增殖，在一些仓鼠成纤维细胞和人内皮细胞中能与表皮生长因子协同作用，启动哺乳动物晶状体内皮细胞和脾细胞中的细胞分裂或 DNA 合成，和驱动单核细胞和嗜中性粒细胞。但是，凝血酶作为生长因子的用途和它在治疗创伤的潜在的重要性还没有普遍认可。部分地，这可能是由于凝血酶参与凝血、血小板活化和细胞增殖启动的复杂性以及凝血酶和凝血酶样分子受到血清蛋白酶抑制剂和细胞释放的蛋白酶连接蛋白的复杂调节的缘故。但是，这一复杂性和高度的生理学调节支持这一启动途径在创伤愈合中有潜在的重要性的说法。

凝血酶也可以在正常的血管重建和细胞从血液到损伤部位的迁移和与肿瘤相关的异常转移和血管生成中起作用。凝血酶增强内皮细胞增殖和改变血管的屏障作用的能力可能对组织损伤部位的血管生成和炎症有作用。

本发明人已经叙述了凝血酶的派生肽激动和拮抗凝血酶和/或凝血酶受体的活性，例如在创伤的治疗中。美国专利号 5,500,412 或 5,352,664，它们的全部内容都通过在此引述而合并于本文。但是，该专利没有教导凝血酶派生肽在受损伤的心脏组织的治疗、血管重建或血管闭塞和再狭窄的抑制中的新用途。

本发明的概述

本发明涉及促进心脏组织或心肌的修复、促进血管重建或抑制血管的闭塞或再狭窄的方法。该方法包括对心脏组织或血管给药治疗有效量的生成血管的凝血酶派生的肽。在优选的实施方案中，该肽是美国专利号 5,500,412 或 5,352,664 中叙述的肽，这两个专利的内容都通过在此引述而合并于本文。例如，该肽可以优选地包括具有序列 Arg-Gly-Asp-Ala(SEQ ID NO:2)的凝血酶受体结合区；和丝氨酸酯酶保守序列。优选的丝氨酸酯酶保守序列包括 Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val (SEQ ID NO:2)。在另一个更优选的实施方案中，凝血酶派生肽包括氨基酸序列：Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val(SEQ ID NO:3)，如由氨基酸序列 Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val(SEQ ID NO:3)组成的肽。具有序列 SEQ ID NO: 3 的肽在本文中也称为“TP508”。

该肽可以优选地在心脏手术的过程中或以后给药，例如，作为可溶的肽或持续释放的制剂直接或通过导管介导注射进受损伤的或局部缺血的心脏组织中。

本发明也涉及刺激血管重建或血管的内皮细胞增殖的一个方法，包括对心脏组织给药治疗有效量的生血管的凝血酶派生的肽，如本文所述。

本发明也涉及防止血管闭塞或再狭窄的一个方法，包括例如通过系统注射对血管给药治疗有效量的生成血管的凝血酶受体结合肽，通过导管或通过将肽附着于支架（stent）上来将该肽递送到血管的损伤部位。

附图的简要说明

图 1 是显示浓度逐渐提高的 TP508(具有 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列的肽)刺激体外的人微血管内皮细胞的增殖的图。该图显示了在给药各种浓度的 TP508(以 $\mu\text{g/ml}$ 表示)后 48 小时时的细胞数。

图 2 显示浓度逐渐提高的 TP508 刺激微血管内皮细胞在塑料上的迁移。该图显示了在给药各种浓度的 TP508(以 $\mu\text{g/ml}$ 表示)后，细胞的迁移距离。

图 3 显示在猪的心脏缺血模型中，TP508 处理的猪和对照猪的心脏功能的变化。

本发明的详细说明

通常，心血管疾病的特征是血液到心脏或其他靶器官的供应有障碍。心脏中的冠状动脉狭窄或封闭使心脏缺少需要的营养和氧气，导致心肌梗死(MI)。当心脏的血液供应受损时，细胞通过产生诱导新的血管生长以致增强心脏的血液供应的化合物而产生响应。这些新的血管称为侧支血管。诱导现有的脉管系统长出

新的血管的方法称为血管生成，细胞为诱导血管生成而产生的物质是血管生成因子。

当心脏肌肉由于血管闭塞而缺乏氧气和营养时，心脏肌肉组织变成局部缺血的并且失去了它收缩和发挥作用的能力。这一功能的丧失可以通过来自缺血的心脏肌肉的天然信号来恢复，这些信号通过绕过闭塞的侧支血管的发育诱导了生血管的血管重建。这一血管重建或血管生成包括刺激内皮细胞的增殖和新的血管的迁移和萌芽。但是，在许多情况中，天然的信号不足以引起侧支血管的生长，并且缺血的组织可能变成纤维化或坏死。如果不通过打通闭塞的血管的方法或进一步诱导侧支血管来逆转这一过程，那么心脏可能完全丧失功能而需要移植。

本文所述的肽可以用于诱导内皮细胞的血管生成性的增殖和迁移，导致形成新的毛细血管和侧支血管，辅助恢复损坏或缺血的心脏组织的功能。这些肽可以优选地在开胸手术中注射进或应用于心脏组织，以避免心室辅助装置的外科操作或插入，或通过导管注射，作为可溶肽或持续释放的制剂递送进心脏。

如血管生成中发生的内皮细胞的增殖也可用于防止或抑制气囊血管成形术后的再狭窄。气囊血管成形术方法经常损伤血管内壁内层的内皮细胞和破坏血管壁的完整性。平滑肌细胞和炎性细胞经常渗入损伤的血管，在称为再狭窄的过程中引起二次阻塞。刺激在气囊诱导的损伤区周围的内皮细胞的增殖和迁移，以用新的内皮细胞单层覆盖血管的腔表面，将潜在地恢复血管的原始结构。

优选地，内皮化包括在血管成形术后的再内皮化、降低、抑制或防止再狭窄。本领域技术人员将明白，用本发明的方法治疗的患者可以用或不用支架治疗。

气囊被肽包被的可膨胀的气囊导管或直接注射肽到血管壁的导管也可以用于将物质递送到靶动脉。

气囊血管成形术是局部缺血的心脏病的普通治疗方法，包括在凝血的血管中膨胀气囊，以打通闭塞的血管。不幸的是，这一治疗方法导致了衬于血管内壁内层的内皮细胞的损伤，经常导致再狭窄。本文所述的肽可以用于诱导在气囊诱导的损伤区周围的内皮细胞增殖和迁移，从而用新的内皮细胞单层覆盖血管的腔表面，可望恢复血管的原初结构。冠状动脉成形术经常通过展开血管内的支架来辅助维持血管的功能和避免再狭窄。支架已经用肝素包被，以防止发生血栓形成，直到支架形成的新的通道可以内皮化。本文所述的肽可以利用本领域技术人员已知的方法直接应用于支架。这些肽可以局部地应用或系统地给药，以增强血管或血管壁的内皮化和/或调节其他过程抑制或降低血栓形成和再狭窄。

本发明优选地利用了凝血酶受体介导的事件的合成的或天然起源的多肽激动剂。这两类药剂具有凝血酶受体结合区，其中包括能够选择性地结合高亲和性的凝血酶受体的多肽的一部分。多肽的这一部分包括与纤连蛋白的三肽细胞结合区同源的氨基酸序列。

除了凝血酶受体结合区，刺激性的(激动性的)多肽具有的氨基酸序列具有由前面已经显示在丝氨酸蛋白酶中高度保守的十二肽的N末端氨基酸派生的序列。但是，抑制性的多肽不包括这些丝氨酸酯酶保守序列。

例如，本发明提供了许多用于促进心脏组织修复的多肽。对于这样的应用，本发明提供了一种凝血酶的多肽衍生物(或这样的衍生物的功能等同物)，它具有一个凝血酶受体结合区以及一个有至少12个氨基酸的丝氨酸酯酶保守序列的区域。本发明也

提供了一种至少 23 个 L-氨基酸的多肽化合物，它具有一个凝血酶受体结合区和一个具有丝氨酸酯酶保守氨基酸序列的区域。

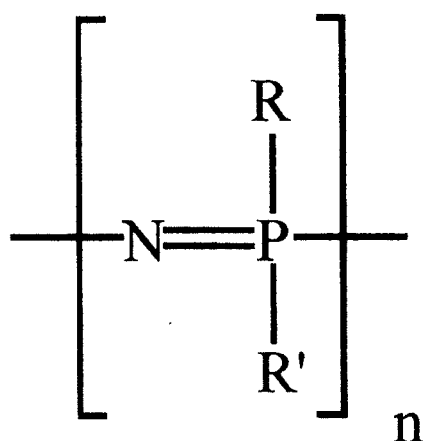
在一个实施方案中，本发明提供了含有特定氨基酸序列的几种多肽，如这样一种多肽化合物，其中凝血酶受体结合区包括 L 氨基酸序列 Arg-Gly-Asp-Ala(SEQ ID NO:1)以及丝氨酸酯酶保守氨基酸序列：Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val (SEQ ID NO:2)。在一个优选的实施方案中，该多肽化合物包括 L-氨基酸序列：Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val (SEQ ID NO:3)。

本发明也提供了一种促进组织修复的药物组合物，它包括治疗有效浓度的任何上面所述的化合物和药物学可接受的赋形剂。通常，这样的组合物例如包括，足够浓度的多肽，以便对凝血酶受体产生刺激作用，如本文所证明的。所以，这样的组合物通常应该包括足够的浓度，以便在靶部位获得如体外所示能够刺激受体的多肽水平。当确认内源性的次级信号的水平不足时，可以使用进一步加入治疗有效浓度的 VEGF、 α 凝血酶、 γ 凝血酶或其他生长因子的组合物。这样的组合可以发挥附加的或协同作用的效果。在一些情况中，如果组织的损伤范围并不广泛，能够对多肽应答的细胞不是足量存在，那么可以期望，可以同时注射应答细胞以提供治疗上有效的组合方法。

适当的载体也提供在靶部位释放活性成分，优选地随时间慢慢地持续地释放。许多合成性的可生物降解的多聚体可以作为具有持续释放特征的载体。这些多聚体的例子包括聚 α 羟基酯，如聚乳酸/聚乙醇酸均聚物和共聚物、聚磷腈(PPHOS)、聚酸酐和聚(丙烯富马酸酯)。

聚乳酸/聚乙醇酸(PLGA)均聚物和共聚物是本领域已知的持续释放的载体。释放的速度可以由技术人员通过改变聚乳酸和聚乙醇酸的比例和多聚体的分子量来调整(参见 Anderson, et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 28:5(1997), 该文献全文都通过在此引述而合并于本文。聚(乙二醇)掺入多聚体中作为混合物形成微颗粒载体, 能允许进一步减弱活性成分的释放性质(参见 Cleek et al., 控制释放杂志 48: 259(1997), 该文献全文都通过在此引述而合并于本文。PGLA 微颗粒经常与 pluronic 凝胶或胶原混合, 以防止凝集, 和形成适于直接注射的微颗粒。

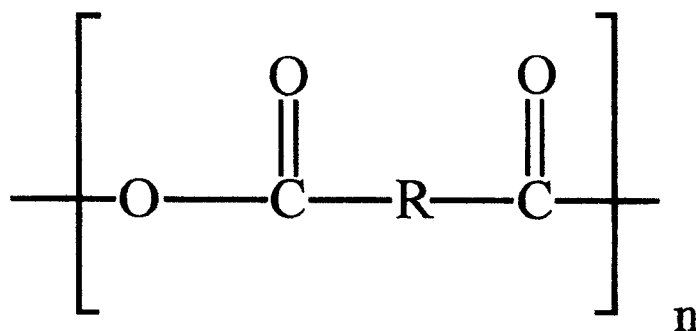
PPHOS 多聚物在多聚体骨架中含有交替的氮和磷而没有碳, 如下面的结构式(I)所示:



(I)

该多聚物的特性可以通过适当改变与多聚体主链键合的侧基 R 和 R' 来调节。例如, PPHOS 的降解和通过它释放药物可以通过改变对水解不稳定的侧基的量来控制。例如, 掺入更多的咪唑基或乙基甘氨酸取代的 PPHOS, 可以观察到降解速度的增大(参见 Laurencin et al., J Biomed Mater. Res. 27:963(1993), 该文献的全部内容都通过在此引述而合并于本文), 从而增大了药物释放的速度。

结构式(II)所示的聚酸酐已经具有明确的降解和释放特性,这些特性可以通过包含不同量的疏水或亲水单体如癸二酸和 1,3-二(对-羧基苯氧基)丙烷来控制(参见 Leong et al., J.Biomed. Mater. Res. 19: 941(1985), 该文献全文都通过在此引述而合并于本文)。



(II)

聚(丙烯富马酸酯)(PPF)是非常理想的生物相容性的可植入载体,因为它们是可注射的、可原位聚合的、可生物降解的物质。

“可注射”是指该物质可以通过用于注射浆液和凝胶的标准针头利用针筒来注射。PPF, 与乙烯基单体(N-乙烯基吡咯烷酮)和引发剂(过氧化苯甲酰)混合, 形成可以原位聚合的可注射溶液(参见 Suggs et al., 大分子 30: 4318(1997), Peter et al., J. Biomater.Sci. Poly., Ed. 10:363(1999)和 Yaszemski et al., Tissue Eng. 1:41(1995), 该文献全部都通过在此引述而合并于本文)。

如本文所用, 治疗上有效的浓度被定义为提供满意的修复或血管生成速度增加或提供满意的再狭窄或血管闭塞减少或抑制的特定药剂的浓度。另外, 这样的浓度确认是对应于足以在体外引发刺激高亲和力的凝血酶受体的水平。但是, 可以相信, 当刺激(激动性)多肽以 0.1 μ M 到 10 μ M 的浓度存在时, 这些组合物被证明是最有效的。

对于本发明，凝血酶衍生物被定义为在体内或体外合成的、具有至少部分由凝血酶派生的氨基酸序列的任何分子。因此，如本文定义，凝血酶衍生物是含有比凝血酶更少的氨基酸的多肽分子。

凝血酶衍生物的生理功能等同物包括在不影响凝血酶受体结合区或丝氨酸酯酶保守氨基酸序列的功能的细节上与凝血酶衍生物不同的分子。这样的细节包括，但不限于保守氨基酸取代和修饰，例如羧基末端的酰胺化，氨基末端的乙酰化，多肽与生理惰性载体分子的结合，或根据丝氨酸酯酶保守序列的序列变化。

凝血酶受体结合区被定义为直接结合凝血酶受体和/或竞争性抑制高亲和性凝血酶受体和 α 凝血酶之间的结合的多肽序列。

具有丝氨酸酯酶保守序列的区域包括至少含有前面所示在丝氨酸蛋白酶中是高度保守的十二肽的4-12个N-末端氨基酸的多肽序列(Asp-X₁-Cys-X₂-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-X₃-Val-SEQ ID NO:4); 其中 X₁ 是 Ala 或 Ser; X₂ 是 Glu 或 Gln; 和 X₃ 是 Phe、Met、Leu、His 或 Val)。

刺激性的多肽被定义为具有结合和刺激凝血酶受体的能力的凝血酶的多肽衍生物，或其生理功能等同物。所以，刺激性肽将包括凝血酶受体结合区和具有丝氨酸酯酶保守氨基酸序列的区域。

本发明是通过下面的实施例进一步说明，但这些实施例不以任何方式作为限制范围。

示例

实施例 1 TP508 刺激体外的人内皮细胞的增殖和迁移

为了确定 TP508 是否能够直接诱导内皮细胞的增殖, 从 Clonetics 购买人微血管内皮细胞, 接种于 24 孔培养皿中的组织培养级塑料上, 处于血清饥饿状态 24 小时。在有或没有 TP508 的培养基中刺激细胞 48 小时, 在这个时间内, 用直接细胞计数评估增殖。如图 1 所示, 相比在单独培养基中处理的那些, TP508 刺激微管内皮细胞的增殖达 30 到 50 % (1.0 μ g/ml TP508)。这一效果似乎是具有特异性的, 因为从大鼠主动脉分离的平滑肌细胞的生长是不受 TP508 影响的。

利用体外单层创伤实验评估 TP508 对人内皮细胞的迁移的影响, 其中将内皮细胞接种到 35mm 的培养皿上, 并且生长 3 天, 到接近融合的程度, 这时, 用橡胶刮在培养皿的中央擦去一条细胞带从而“损伤”单层。对这点拍照, 然后, 用新鲜的单独的培养基或含有各种浓度的 TP508 的培养基处理细胞, 使其再生长 48 小时。再对细胞拍照, 测量内皮细胞迁移进损伤区域的距离。如图 2 所示, 甚至当细胞在单独的塑料上培养时, TP508 也刺激内皮细胞的迁移。

这些研究证明, TP508 对人内皮细胞有直接的生血管效果, 导致体外的增殖和迁移增强。其他研究表明, 内皮细胞与 TP508 的接触具有保护作用, 能够防止氧化接触引起的细胞死亡。这一保护效果也对再内皮化和血管生成的过程有作用。

实施例 2 TP508 在体外刺激尿囊绒毛膜模型中的血管生成

利用在大鼠背部形成完全的皮肤外科切口和开放的外切创伤进行的研究显示单一地局部应用 TP508 刺激血管重建和跨越外科切口的血管开放。在大鼠的背部形成两个外科切开创伤。一

个创伤单独应用 TP508(0.1 μ g)来处理, 另一个不处理。血管被吸引到已处理的创伤而不是对照上。

向放置于鸡胚尿囊绒膜上的琼脂盘中加入 TP508 导致血管的生血管生长。血管被刺激生长到含有 TP508 的琼脂盘中。位于堵塞远侧的管中也存在侧支血管生长的增加, 这与应用其它血管生成因子所见的情况相似。

实施例 3 TP508 显示在猪模型中处理心肌缺血中有效

Yucatan 小种猪在它们的左旋动脉附近放置了环形收缩环闭合器。收缩环随时间吸水, 引起血管收缩。在手术后 4 个星期, 通过反差增强的血管造影术证明有闭塞。这时, 再次打开每个动物的胸, 然后, 向缺血的区域注射悬浮于 Pluronic 凝胶中的 TP508 缓释制剂, 即含有 TP508 的 PLGA 微球体。PLGA 微球体是如实施例 6 所述制备的, 提供了最初的突发的药物释放(在 24 小时中释放 50% 的加载量), 然后显示另外 3 - 4 天的控制释放, 这时, 80% 的加载量已经释放。使用的凝胶是在 0.9% 的盐水中的 30% w/v Pluronic F68。在注射之前立即向为了降低粘度而置于冰上的凝胶中每微升加入 3.3mg 的 PLGA 微球体。这样得到了 100 μ g/ml 凝胶的 TP508 剂量, 注射到缺血区域的 10 个部位中(100 μ l/部位)。对照接受不含 TP508 的 Pluronic 凝胶中的 PLGA 微球体。得到了基线和处理后的血管造影片和超声波心动图。

心肌壁增厚的指标和心脏射血分数显示的趋势是 TP508 处理的动物比对照能更好地耐受多巴酚丁胺诱导的应激。在 3 个星期后, 用反差增强的超声波心动描记术评价动物。这一有限数目的动物的最初结果证明, TP508 处理的动物在多巴酚丁胺的应激下比对照具有稍微更大的射血分数增加和更好维持的壁增厚。所以, 这一处理似乎能帮助恢复缺血的心脏肌肉的功能。

实施例 4 在兔子模型中 TP508 刺激心肌的血管重建

将配制成持续释放的 PLGA 微球体的 TP508 注射进缺血的兔子心肌中。将收缩环闭合器放置于两个兔子的左主冠状动脉的侧支上,恰好位于 A - V 沟下方,如 Operschall et al., J. Appl. Physiol. 88: 1438(2000)中所述。在放置后的两个星期后,再打开动物的胸。在一个动物中,将 pluronic 凝胶中的 TP508 微球体(如实施例 3 所述)注射进被闭塞的血管作用的区域之内和周围的 8 个不连续的位置中。另一个动物作为未处理对照。大约在注射后 4 个星期,将动物杀死,在 10% 的缓冲富尔马林中将它们的心脏固定 24 小时。然后,在感兴趣的区域切开心脏,用苏木精-曙红染色,并且对 Von Willebrand 因子(vWF)(一种内皮细胞标记)进行免疫标记。

组织学证明,在闭合器作用的区域中,对照动物有明显的纤维化。在另一方面,TP508 处理的心脏具有健康表现的心肌,其中具有更大数目的功能毛细血管,具有明显的红细胞。

实施例 5 在血胆固醇过多的兔子模型中 TP508 抑制再狭窄

将这一方法设计成提供一个在血胆固醇过多的新西兰白兔的血管成形术后,测试试验样品抑制新内膜形成和血管闭塞的效率的系统。给动物饲喂含有 0.5%胆固醇和 2.0%花生油的高脂肪食物 3 个星期。在进行外科手术之前将动物预处理 24 小时,用所述的气囊血管成形术损伤髂动脉;用 TP - 508 处理动物 7 天。用高脂肪食物喂养动物 4 星期。在气囊血管成形术之前和在实验结束时进行血管造影术。收集损伤的和未损伤的髂动脉,准备进行组织学分析。对该腔、新内膜(如果存在)和血管中膜进行形态测量。

在无菌的、无热原的盐水中溶解/稀释 TP508 的试验样品至需要的浓度，并且在外科手术之前一天、外科手术的当天、和外科手术后连续 6 天以 0.2ml 的体积经静脉内注射给药。

形成 5cm 的中线颈切口，暴露右颈动脉，贴近结扎并且切开。然后，向主动脉中导入 4Fr Berman 气囊血管成形术导管。通过 4Fr 的 Berman 气囊血管成形术导管向主动脉中导入 5Fr 的套。收集 3ml 的血液用于胆固醇计量。然后，给兔子注射肝素和更多的麻醉剂（如果需要）。为了显现髂动脉，通过导管注射与 4 毫升无菌盐水混合的 6 毫升 76% 的 Hypaque。对髂动脉成象(用格栅标记图象，剪刀放在右侧)。从套中除去 4Fr 的 Berman 气囊血管成形术导管。然后，通过套，向主动脉中插入 0.014"/3.0mm X 20.0mm/120cm 的气囊导管，并且到达髂动脉。在 10ATM 下膨胀气囊 3 次，各 30 秒，间隔 1 分钟。然后，除去导管和套。将右颈动脉用 3.0 的丝缝线结扎。用 PDS 闭合颈的切口，缝合皮肤，抹上双抗生素油膏。

然后，对兔子给药试验样品或对照样品。以下面的方法稀释试验样品：将 0.3ml 的盐水吸入带有 23G 1"针头的 1.0ml 的针筒中。将这一体积的液体注射进 TP508 vile 中。在 TP508 溶解后，取出 0.25ml 的溶液，给药。然后，用盐水冲洗该套管。如果兔子是对照，则注射 0.2ml 的盐水，再用另外的盐水冲洗。兔子也通过皮下注射接受 0.3ml 的丁丙诺啡。

在外科手术后，让兔子在热垫子上休息，恢复警觉。然后将兔子放回笼中，使其随意获得食物和水。再以该饮食喂养兔子 4 星期，直到杀死。

术后四个星期，将两个髂动脉原位固定，收集，并准备进行组织学分析。然后，对约间隔 1 毫米的连续组织学切片获取数码

图像，并对整个损伤区域的腔、新内膜(如果存在)和血管中膜进行形态测量。

组织学总结

用 Image-Pro Plus 和 Excel 软件完成 19 个样品的形态组织学分析。在这 19 个样品中，证明 2 个有外侧弹性膜受损。19 个中的一个似乎需要再切片。所以，比较了 16 个样品，其中有 7 个已处理的样品和 9 个盐水对照。

通过数字分析测量新内膜的区域可以确定再狭窄病灶的厚度。同样地测量血管的中膜。然后，总计这两个区域的面积并将这一结果除以相同的组织学切片系列内发现的正常(未受损)的中膜的面积，将这些值标准化。结果证明，在未受损的中膜中发现的区域上，各组之间没有显著性差异。

当比较处理的动物和对照时，通过三个明显不同的方法分析再狭窄的程度：“单个最坏值”方法，“平均损伤厚度”方法，和“所有切片平均值”方法。“单个最坏值”方法比较已手术的血管之间得到的最大的再狭窄值。“平均损伤厚度”方法比较已手术的血管之间已经确定的损伤区域内的所有异常点的平均值。最后，“所有切片平均值”方法比较所有测量的样品的平均厚度，不管它们看起来是否是损伤的部分。通过 Student's T-检验分析了这些结果的平均值的统计学显著性。

数据总结

利用假设不等方差的双尾 t-检验完成所有的数据分析。 α 是 0.05，平均差假定是 0。每个分析包括 $n=7$ 个处理的样品和 $n=9$ 个盐水对照。结果总结在下面的表 1 中。显示的“差异”值与处

理样品相对于相应对照的变化百分数相关。用星号表示的值是有统计学意义的。

表 1

方法	单个最坏值			平均损伤厚度			所有切片的平均值		
	已处理	对照	差异值	已处理	对照	差异值	已处理	对照	差异值
测量的面积									
新内膜	.202	.332	-39%*	.158	.245	-36%	.117	.185	-37%*
中膜	.113	.133	-15%	.123	.152	-19%	.116	.140	-17%
新内膜 + 中膜/ 未损伤的中膜	4.56	7.73	-41%*	4.18	5.87	-29%*	3.49	5.55	-37%*

结论

数据显示，在血胆固醇过多的兔子模型中，TP - 508 明显抑制再狭窄和血管的闭塞。这一结果是强有力的，因为它是不依赖为了定量结果而选择的技术的。

实施例 6 TP508 的聚乳酸/聚乙醇酸共聚物微球体的制备

利用双乳化技术制备含有 TP508 的聚乳酸/聚乙醇酸共聚物 (PLA/PGA) 的微球体。简要地说，将基质成分溶解于二氯甲烷中，将 TP508 溶解于水中。在涡旋的同时将两者逐步混合在一起，形成油包水型 (W/O) 乳液。在进一步涡旋下向乳液中加入聚乙烯醇 (水中 0.3%)，形成第二种乳液 (O/W)，从而形成双乳液：O/W 乳液包括 PLA/PGA 小滴，在那些小滴中，第二个分散相由水中的 TP508 组成。在相分离时，PLA/PGA 小滴形成含有容纳 TP508 的腔的分散的微球体。为了引起微球体的相分离，加入 2% 的异丙醇溶液。离心收集颗粒，然后冻干除去残留的水分。改变基质的组成形成释放动力学不同的微球体 (表 2)。

表 2: 不同的微球体制剂的组成

制剂	PLA: PGA	多聚物 M. Wt.	% TP508	% 聚乙二醇
A	50: 50	46,700	5	0
B	50: 50	7,200	5	0
C	50: 50	46,700	5	5
D	50: 50	46,700	5	0
E	75: 25	120,000	5	0

利用 Coulter 粒度仪测量微球体的平均直径, 在将已称重的微球体样品溶解在二氯甲烷中并将释放的药物萃取到水中后, 通过 276nm 的分光光度计测定测量药物包埋效率 (表 3)。

表 3: 制剂直径和药物包埋效率

制剂	直径, μm	TP508 包埋, %
A	26.0	53.8
B	16.2	27.1
C	17.6	58.9
D	23.9	42.6
E	25.8	36.2

为了检测 TP508 从不同的 PLA/PGA 基质的释放, 将 20mg 的微球体放置于 1.5ml 的聚丙烯微量离心管中含有的 1.0ml 的 PBS 中。将离心管在 37℃ 温育, 以 60rpm 振摇。在不同时间里, 将离心管离心, 移出含有释放的 TP508 的上清液, 冷冻, 随后进行分析。加入新鲜的 PBS 到微球体中, 继续温育。根据 276nm 处的吸光度测量上清液中的 TP508。对于每个制剂, 进行四次重

复的释放测定。在 37°C，28 天的温育过程中，制剂 B 和 D 没有显示可检测的药物释放。其余的制剂都释放了可检测量的 TP508，尽管在所有的情况中，在 3-4 天内，释放的药物的量降至可检测的限度以下(<1ug/mg 基质/天)。制剂 A 和 C 显示了最大的 TP508 释放，在 3-4 天内释放 60-80% 的包埋的药物。选择具有最快释放动力学的制剂 C 在实施例 3 和实施例 4 的体内研究中进行进一步实验。

本发明已经根据优选的实施方案进行了说明和叙述，本领域的技术人员将理解，在不脱离权利要求范围的情况下，可以作形式和细节上的各种变化。

序 列 表

<110> 德克萨斯系统大学董事会

达芮尔·卡尼

<120> 用凝血酶派生的肽的治疗方法

<130> 3033.1000003

<140> PCT/US01/21944

<141> 2001-07-12

<150> US 60/217,583

<151> 2000-07-12

<160> 4

<170> FastSEQ 的 Windows 4.0 版

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Polypeptide, fragment of thrombin

<400> 1

Arg Gly Asp Ala

1

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Polypeptide, fragment of thrombin

<400> 2

Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val

1

5

10

<210> 3

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Polypeptide, fragment of thrombin

<400> 3

Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly

1

5

10

15

Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val

20

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Polypeptide, fragment of thrombin

<221> VARIANT

<222> 2, 4, 11

<223> Xaa, position 2 = Ala or Ser

Xaa, position 4 = Glu or Gln

Xaa, position 11 = Phe, Met, Leu, His or Val

<221> VARIANT

<222> (1)...(12)

<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 4

Asp Xaa Cys Xaa Gly Asp Ser Gly Gly Pro Xaa Val

1

5

10

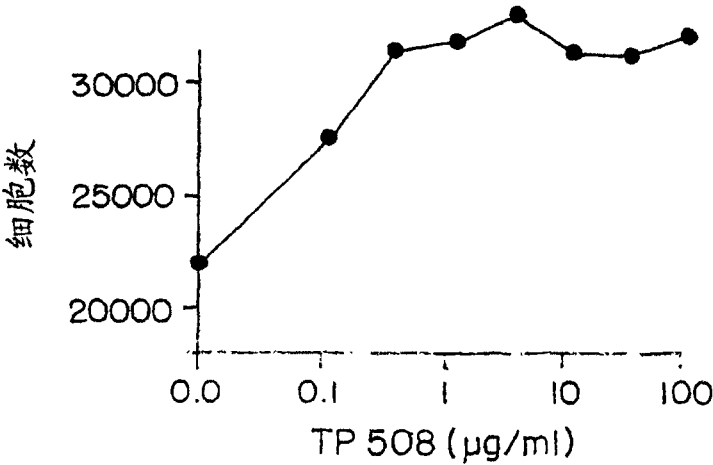


图 1

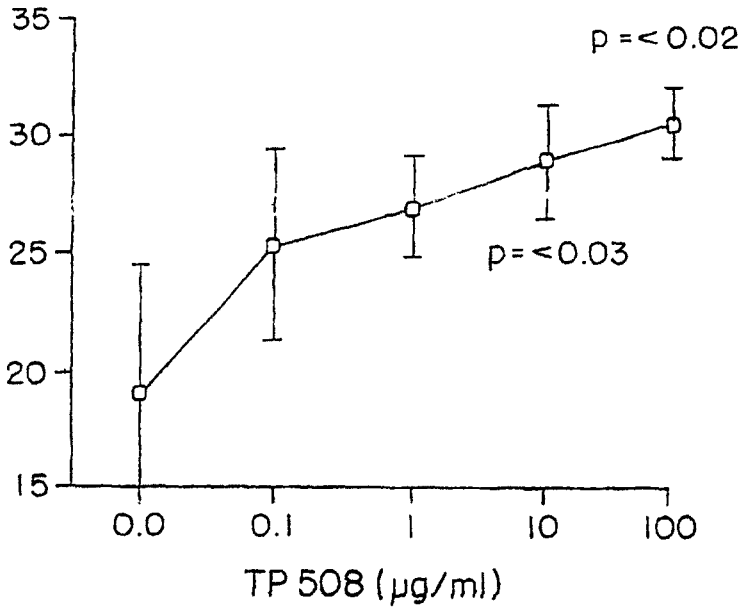


图 2

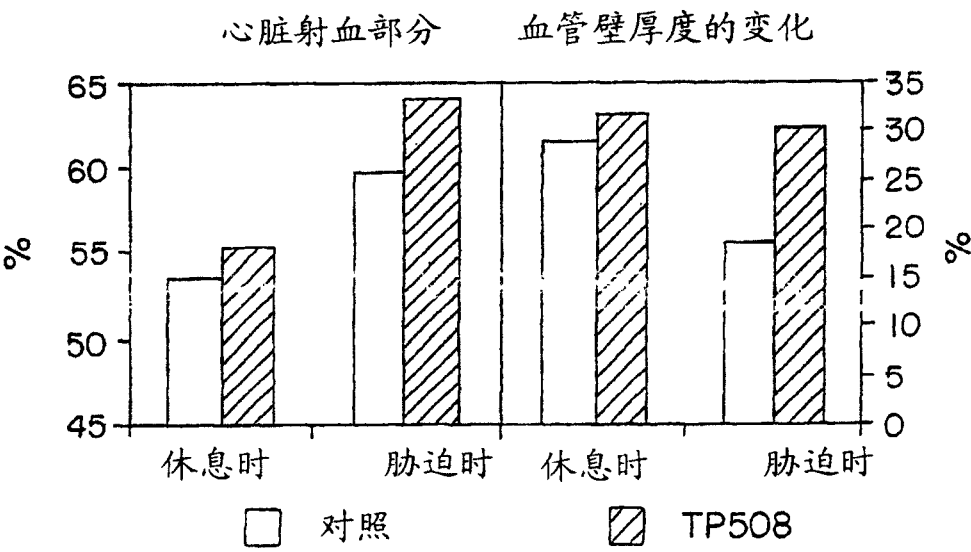


图 3