



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101965193 A

(43) 申请公布日 2011. 02. 02

(21) 申请号 200780049832. 0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2007. 11. 15

A61K 38/18 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 31/711 (2006. 01)

60/859, 437 2006. 11. 15 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009. 07. 14

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2007/024085 2007. 11. 15

(87) PCT申请的公布数据

W02008/060622 EN 2008. 05. 22

(71) 申请人 科达治疗公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 科林·R·格林

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 吴贵明 张英

权利要求书 5 页 说明书 59 页 附图 16 页

(54) 发明名称

用于伤口愈合的改进方法和组合物

(57) 摘要

本发明提供了含有一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种用于促进和 / 或改善伤口愈合和 / 或组织修复的其它药剂的组合的方法和组合物。

1. 一种治疗方法,包括向需要治疗的受试者给予一种组合物,所述组合物包含治疗有效量的抗连接蛋白 43 药剂和有效促进或改善伤口愈合的蛋白或肽。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述蛋白或肽选自由有效促进或改善伤口愈合的生长因子和有效促进或改善伤口愈合的细胞因子组成的组。

3. 根据权利要求 2 所述的方法,其中,所述生长因子选自由血小板源性生长因子、表皮生长因子、成纤维细胞生长因子、结缔组织生长因子、血管内皮生长因子、胰岛素样生长因子、或转化生长因子 β 3 组成的组。

4. 根据权利要求 2 所述的方法,其中,所述细胞因子是 IL-7 或 IL-10。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述蛋白或肽是胰岛素样生长因子连接蛋白或分泌性白细胞蛋白酶抑制剂。

6. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述蛋白或肽是胸腺素 β 4。

7. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述蛋白或肽在载体中递送。

8. 根据权利要求 7 所述的方法,其中,所述载体包含编码血小板源性生长因子 -B 的序列。

9. 根据权利要求 8 所述的方法,其中,所述载体是腺病毒载体。

10. 一种治疗方法,包括向需要治疗的受试者给予一种包含治疗有效量的第一伤口愈合化合物和第二伤口愈合化合物的组合物,其中,所述第一化合物是抗连接蛋白 43 药剂而所述第二化合物选自由 β 肾上腺素拮抗剂、白细胞介素 -1 受体拮抗剂、和游离自由基清除剂组成的组。

11. 根据权利要求 10 所述的方法,其中,所述 β 肾上腺素拮抗剂是噻吗洛尔。

12. 根据权利要求 10 所述的方法,其中,所述白细胞介素 -1 受体拮抗剂是阿那白滞素。

13. 根据权利要求 10 所述的方法,其中,所述游离自由基清除剂是 N-乙酰半胱氨酸。

14. 一种治疗方法,包括向需要治疗的受试者给药一种包含治疗有效量的第一伤口愈合化合物和第二伤口愈合化合物的组合物,其中,所述第一化合物是抗连接蛋白 43 药剂而所述第二化合物选自由抗炎剂和抗微生物剂组成的组。

15. 根据权利要求 14 所述的方法,其中,所述抗微生物剂是杆菌肽、新霉素、多粘菌素、短杆菌肽或甲氧苄啶。

16. 根据权利要求 14 或 15 中任一项所述的方法,其中,所述组合物进一步包含麻醉剂。

17. 根据权利要求 16 所述的方法,其中,所述麻醉剂是普莫卡因。

18. 一种治疗方法,包括向需要治疗的受试者给予包含治疗有效量的第一伤口愈合化合物和第二伤口愈合化合物的组合物,其中,所述第一化合物是抗连接蛋白 43 药剂而所述第二化合物是阿片类药。

19. 根据权利要求 18 所述的方法,其中,所述阿片类药是吗啡、氢吗啡酮或芬太尼。

20. 根据权利要求 18 所述的方法,其中,所述阿片类药是氢吗啡酮。

21. 一种治疗方法,包括向需要治疗的受试者给予包含治疗有效量的第一伤口愈合化合物和第二伤口愈合化合物的组合物,其中,所述第一化合物是抗连接蛋白 43 药剂而所述第二化合物是连接蛋白磷酸化剂。

22. 根据权利要求 21 所述的方法,其中,所述连接蛋白磷酸化剂是一种能够使连接蛋白 43 的至少一个酪氨酸残基磷酸化的化合物。

23. 根据权利要求 21 所述的方法,其中,所述连接蛋白磷酸化剂是一种能够使连接蛋白 43 的至少一个苏氨酸残基磷酸化的化合物。

24. 根据权利要求 1、10、14、18 或 21 中任一项所述的方法,其中,所述抗连接蛋白 43 药剂是多核苷酸。

25. 根据权利要求 24 所述的方法,其中,所述多核苷酸是反义多核苷酸。

26. 根据权利要求 25 所述的方法,其中,所述反义多核苷酸包含选自 SEQ. ID. NO :1 至 SEQ. ID. NO :12 的序列。

27. 根据权利要求 25 所述的方法,其中,所述反义多核苷酸选自:

GTA ATT GCG GCA AGA AGA ATT GTT TCT GTC(SEQ ID NO :1);

GTA ATT GCG GCA GGA GGA ATT GTT TCT GTC(SEQ ID NO :2);和

GGC AAG AGA CAC CAA AGA CAC TAC CAG CAT(SEQ ID NO :3)。

28. 根据权利要求 25 所述的方法,其中,所述反义多核苷酸具有约 15 至约 35 个核苷酸,并且足以与连接蛋白 43mRNA 互补而形成在生理条件下熔点超过 20℃的双链体。

29. 根据权利要求 25 所述的方法,其中,所述反义多核苷酸具有约 15 至约 35 个核苷酸,并且与连接蛋白 43mRNA 的反义序列具有至少约 70%的同源性。

30. 根据权利要求 1、10、14、18 或 21 中任一项所述的方法,其中,所述组合物包含约 0.1 至约 1000 微克的所述抗连接蛋白 43 药剂,所述抗连接蛋白 43 药剂是反义多核苷酸。

31. 根据权利要求 1、10、14、18 或 21 中任一项所述的方法,其中,所述抗连接蛋白 43 药剂是肽或拟肽。

32. 根据权利要求 31 所述的方法,其中,所述组合物包含约 0.01 至约 100 毫克的所述抗连接蛋白 43 肽或抗连接蛋白 43 拟肽。

33. 根据权利要求 1、10、14、18 或 21 中任一项所述的方法,其中,所述抗连接蛋白 43 药剂是 RNAi 或 siRNA 多核苷酸。

34. 根据权利要求 1、10、14、18 或 21 中任一项所述的方法,其中,所述受试者是哺乳动物。

35. 根据权利要求 34 所述的方法,其中,所述哺乳动物是人类。

36. 根据权利要求 35 所述的方法,其中,所述哺乳动物选自由家畜、农场动物、动物园动物、体育运动动物和宠物组成的组。

37. 根据权利要求 36 所述的方法,其中,所述动物是马。

38. 根据权利要求 36 所述的方法,其中,所述动物是狗或猫。

39. 根据权利要求 1、10、14、18 或 21 中任一项所述的方法,其中,所述受试者具有伤口。

40. 一种治疗方法,包括向需要治疗的受试者给予第一伤口愈合组合物和第二伤口愈合组合物,所述第一伤口愈合组合物包含治疗有效量的抗连接蛋白 43 药剂,而所述第二种伤口愈合组合物包含治疗有效量的有效促进或改善伤口愈合的蛋白或肽。

41. 根据权利要求 40 所述的方法,其中,所述第一和第二伤口愈合组合物彼此间隔至少约半小时给药。

42. 根据权利要求 40 所述的方法,其中,所述第一和第二伤口愈合组合物彼此间隔至少约 1 小时给药,在约 1 天内或彼此间隔约 1 天给药,或彼此间隔约 1 周给药。

43. 根据权利要求 40 所述的方法,其中,首先给药予所述第一伤口愈合组合物。

44. 根据权利要求 40 所述的方法,进一步包括给予第三伤口愈合组合物,其中所述第三伤口愈合组合物包含抗连接蛋白 43 肽或拟肽。

45. 根据权利要求 44 所述的方法,其中,首先给予所述第三伤口愈合组合物。

46. 根据权利要求 40 所述的方法,其中,所述对于促进或改善伤口愈合有效的蛋白或肽选自表皮生长因子、成纤维细胞生长因子、结缔组织生长因子、IL-7、分泌性白细胞蛋白酶抑制剂、胰岛素样生长因子和胰岛素样生长因子连接蛋白。

47. 根据权利要求 40 所述的方法,其中,所述对于促进或改善伤口愈合有效的蛋白或肽是血小板源性生长因子。

48. 根据权利要求 40 所述的方法,其中,所述对于促进或改善伤口愈合有效的蛋白或肽是血管内皮生长因子。

49. 根据权利要求 40 所述的方法,其中,所述对于促进或改善伤口愈合有效的蛋白或肽是转化生长因子 β 3。

50. 根据权利要求 40 所述的方法,其中,所述对于促进或改善伤口愈合有效的蛋白或肽是 IL-10。

51. 根据权利要求 40 所述的方法,其中,所述对于促进或改善伤口愈合有效的蛋白或肽是胸腺素 β 4。

52. 根据权利要求 40 所述的方法,其中,所述对于促进或改善伤口愈合有效的蛋白或肽是在载体中递送的。

53. 根据权利要求 52 所述的方法,其中,所述载体包含编码血小板源性生长因子 -B 的序列。

54. 根据权利要求 53 所述的方法,其中,所述载体是腺病毒载体。

55. 一种药物组合物,包含根据权利要求 1 ~ 15、18 ~ 22 或 23 中任一项所述的组合物的组分。

56. 根据权利要求 55 所述的药物组合物,其中,所述抗连接蛋白 43 药剂是肽或拟肽。

57. 根据权利要求 56 所述的药物组合物,其中,所述组合物包含约 0.01 至约 100 毫克的所述抗连接蛋白肽或抗连接蛋白拟肽。

58. 根据权利要求 55 所述的药物组合物,其中,所述抗连接蛋白 43 药剂是多核苷酸。

59. 根据权利要求 58 所述的药物组合物,其中,所述多核苷酸是反义多核苷酸。

60. 根据权利要求 59 所述的药物组合物,其中,所述反义多核苷酸包含选自 SEQ. ID. NO :1 至 SEQ. ID. NO :12 的序列。

61. 根据权利要求 59 所述的药物组合物,其中,所述反义多核苷酸选自 :

GTA ATT GCG GCA AGA AGA ATT GTT TCT GTC(SEQ ID NO :1) ;

GTA ATT GCG GCA GGA GGA ATT GTT TCT GTC(SEQ ID NO :2) ;和

GGC AAG AGA CAC CAA AGA CAC TAC CAG CAT(SEQ ID NO :3)。

62. 根据权利要求 59 所述的药物组合物,其中,所述反义多核苷酸具有约 15 至约 35 个核苷酸,并且足以与连接蛋白 43mRNA 互补以形成在生理条件下熔点超过 20℃的双链体。

63. 根据权利要求 59 所述的药物组合物,其中,所述连接蛋白 43 多核苷酸具有约 15 至约 35 个核苷酸,并且与连接蛋白 43mRNA 的反义序列具有至少约 70%的同源性。

64. 根据权利要求 55 所述的药物组合物,其中,所述组合物包含约 0.1 至约 1000 微克

的所述抗连接蛋白药剂,且所述抗连接蛋白药剂是反义多核苷酸。

65. 根据权利要求 55 所述的药物组合物,其中,所述抗连接蛋白药剂是 RNAi 或 siRNA 多核苷酸。

66. 一种用于促进或改善伤口愈合的药物组合物,其包含治疗有效量的抗连接蛋白 43 药剂和对于促进或改善伤口愈合有效的蛋白或肽。

67. 根据权利要求 66 所述的药物组合物,其中,所述对于促进或改善伤口愈合有效的蛋白或肽是 PDGF。

68. 根据权利要求 67 所述的药物组合物,其中,所述 PDGF 蛋白或肽是以载体的形式提供的。

69. 根据权利要求 68 所述的药物组合物,其中,所述载体是腺病毒载体。

70. 根据权利要求 66 所述的药物组合物,其中,所述对于促进或改善伤口愈合有效的蛋白或肽是血管内皮生长因子。

71. 根据权利要求 66 所述的药物组合物,其中,所述对于促进或改善伤口愈合有效的蛋白或肽是胸腺素 β 4。

72. 根据权利要求 66 所述的药物组合物,其中,所述对于促进或改善伤口愈合有效的蛋白或肽是 TGF- β 3。

73. 根据权利要求 66 所述的药物组合物,其中,所述对于促进或改善伤口愈合有效的蛋白或肽是 IL-10。

74. 根据权利要求 66 ~ 72 或 73 中任一项所述的药物组合物,其中,所述药物组合物被配制成为用于局部给药。

75. 根据权利要求 74 所述的药物组合物,其中,所述药物组合物被配制成凝胶。

76. 根据权利要求 75 所述的药物组合物,其中,所述凝胶是聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物基凝胶或羧甲基纤维素基凝胶。

77. 根据权利要求 76 所述的药物组合物,其中,所述凝胶是普流尼克凝胶。

78. 一种治疗慢性伤口的方法,包括向需要治疗的受试者给予治疗有效量的根据权利要求 67 ~ 70 或 71 中任一项所述的药物组合物。

79. 根据权利要求 78 所述的方法,其中,所述慢性伤口是糖尿病性溃疡。

80. 根据权利要求 78 所述的方法,其中,所述慢性伤口是静脉曲张性溃疡。

81. 根据权利要求 78 所述的方法,其中,所述慢性伤口是压迫性溃疡、血管炎性溃疡或动脉溃疡。

82. 一种用于减少需要治疗的受试者中疤痕形成的方法,包括向所述受试者给予治疗有效量的根据权利要求 72 或 73 中任一项所述的药物组合物。

83. 根据权利要求 78 所述的方法,其中,所述药物组合物是局部给药的。

84. 根据权利要求 82 所述的方法,其中,所述药物组合物是局部给药的。

85. 一种制备用于治疗伤口的药物的方法,包括将一定用量的第一伤口愈合组合物和第二伤口愈合组合物组合到一起,其中,所述第一伤口愈合组合物含有有效量的抗连接蛋白药剂,而所述第二伤口愈合组合物含有有效量的对于促进或改善受试者伤口愈合有效的蛋白或肽。

86. 根据权利要求 85 所述的方法,其中,所述抗连接蛋白药剂包含反义多核苷酸。

-
87. 根据权利要求 85 所述的方法,其中,所述药物被配制成用于局部给药。
88. 根据权利要求 51 所述的方法,其中,所述药物配制成用于缓释。
89. 一种制品,包含容纳有根据权利要求 55、66 ~ 72 和 73 中任一项所述的用于促进或改善伤口愈合或组织修复的药物组合物的包装材料以及在受试者体内或体表使用的说明书。
90. 一种伤口敷料,包含抗连接蛋白药剂和对于促进或改善伤口愈合有效的蛋白或肽。

用于伤口愈合的改进方法和组合物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于 2006 年 11 月 15 日提交的美国临时专利申请序列号第 60/859,437 号的优先权,其内容以其全文结合于此作为参考。

技术领域

[0003] 本领域涉及伤口愈合和组织修复,并涉及连接蛋白、连接蛋白半通道和间隙连接,包括具有一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗剂、对伤口愈合有用的药剂、和/或间隙连接修饰剂的组合物,含有这种组合物的制品和试剂盒以及递送装置,和含有这种组合物的制剂,以及治疗伤口和疾病、紊乱或病症的方法,该伤口和疾病、紊乱或病症的特征在于其整体或部分为急性的、延迟的或不完全的伤口愈合或其会受益于改善的组织修复或愈合。

背景技术

[0004] 以下包括可以用于理解本发明的信息。我们不承认本文中所提供的任何信息是现有技术,或与所描述或要求的本发明相关,或明确或隐含地参考的任何出版物或文献是现有技术。

[0005] 在人或其它哺乳动物中,伤口损伤会引发细胞和生化事件的组织的级联反应,这在大多数情况下都会导致伤口愈合。理想的愈合伤口是恢复正常的解剖学结构、功能以及细胞、组织、器官和生物体水平的外观。伤口愈合过程,无论是由于外伤、微生物还是外来物质所引起,都是经由包括许多重叠阶段的复杂过程进行的,这些阶段包括炎症、上皮形成、血管形成和基质沉积。一般而言,这些过程都会导致形成成熟的伤口和一定程度上的疤痕形成。尽管炎症和修复主要沿着规定的过程发生,但是该过程的敏感性取决于各种愈合分子的平衡,包括例如调节细胞因子和生长因子的网络。

[0006] 间隙连接是有利于直接的细胞-细胞通信的细胞膜结构。间隙连接通道由两个连接子(半通道)构成,每一个连接子由六个连接蛋白亚单元构成。每一个六聚体连接子与相对膜中的一个连接子对接以形成单个间隙连接。据报道,在遍及整个机体内都能找到间隙连接通道。例如,诸如角膜上皮的组织具有 6 至 8 层细胞,然而在不同的层中也表达不同的间隙连接通道,在基底层中是连接蛋白 43,而在基底层到中间翼细胞层为连接蛋白 26。一般而言,连接蛋白是一个蛋白家族,通常根据其分子量命名或基于系统发生的基础分成 α 、 β 和 γ 亚类。已经确定了至少 20 种人类和 19 种鼠科动物的同种型。据报道,不同组织和细胞类型具有连接蛋白表达的特征图谱,且已经证实在损伤或移植之后组织表现出改变连接蛋白的表达(Qui, C. et al., (2003) *Current Biology*, 13:1967-1703; Brander et al., (2004), *J. Invest Dermatol.* 122:1310-20)。

[0007] 反义技术已经提出用于调整病毒、真菌和代谢病中隐含的基因表达。参见例如美国专利第 5,166,195 号(HIV 的寡核苷酸抑制剂(oligonucleotide inhibitors of HIV))和美国专利第 5,004,810 号(用于与单纯疱疹病毒 Vmw65 mRNA 杂交并抑制复制的低聚

物 (oligomers for hybridizing to herpes simplex virus Vmw65 mRNA and inhibiting replication))。也参见授予 Becker 和 Green 的美国专利第 7,098,190 号 (连接蛋白中包含反义核苷酸的配方 "Formulations comprising antisense nucleotides to connexin")。也已经有间隙连接和半通道的肽抑制剂的报道。例如参见 Berthoud, V. M. et al., Am J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 279 :L619-L622 (2000) ; Evans, W. H. and Boitano, S. Biochem. Soc. Trans. 29 :606-612, 以及 De Vriese A. S., et al. Kidney Int. 61 :177-185 (2001)。还参见 Becker 和 Green 的 PCT/US06/04131 (抗连接蛋白混合物及其应用 "anti-connexin compounds and uses thereof")。

[0008] 已经研究了各种细胞因子和生长因子以确定其在伤口愈合中作为治疗性介入的潜力。然而,除血小板源性生长因子 (**Regranex[®]** 中的活性成分) 之外在美国都还没有被批准销售。而且,尽管在理解伤口愈合过程进行的原理方面取得了进展,但是对于适用于伤口护理以及改善和 / 或促进伤口愈合的治疗性选项还存在显著不足的需求,包括延迟的或缺乏免疫力的伤口的愈合,如慢性伤口、与伤口有关的肿胀、炎症和疤痕形成、该伤口包括急性和亚急性伤口。

发明内容

[0009] 本文中所描述和要求保护的本发明具有许多属性和实施方式,包括但不限于在发明内容部分中提出或描述或参照的那些。并不是意在所有都包括在内,但是本文中所描述和要求保护的本发明并不限于发明内容部分中确定的特征或实施方式或者受到其限制,其所包含的内容仅仅出于举例说明的目的而不是要进行限制。

[0010] 本发明大体上涉及一种或多种抗连接蛋白药剂 (例如,连接蛋白抑制剂,如 α -1 连接蛋白脱氧寡核苷酸和 α -1 抗连接蛋白肽或拟肽),其与一种或多种治疗剂、用于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂组合来进行伤口治疗的应用,这些伤口包括急性伤口、亚急性伤口、延迟愈合伤口和慢性伤口。

[0011] 本发明通过使用一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗剂、用于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂而增加了伤口愈合的速率、程度和 / 或质量。在一种优选实施方式中,一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗剂、用于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂的组合使用对于促进伤口愈合具有加性效应、协同效应或超加性效应。在另一优选实施方式中,一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗剂、用于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂的组合使用,与这些药剂单独给药时有效的剂量相比,可以降低这些药剂使用的剂量。在另一优选实施方式中,一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗剂、用于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂的组合使用,与这些药剂单独使用时的给药频率相比,可以降低给药频率。

[0012] 本发明披露并要求保护采用抗连接蛋白药剂与其它治疗剂、用于伤口愈合的药剂、和 / 或间隙连接修饰剂组合使用的组合物和方法。

[0013] 本发明包括含有 (a) 治疗有效量的抗连接蛋白药剂和 (b) 用于伤口治疗或促进伤口愈合的治疗有效量的另一种治疗剂的药物组合物。本发明包括含有 (a) 治疗有效量的抗连接蛋白药剂和 (b) 治疗有效量的间隙连接修饰剂的药物组合物。优选地,该药物组合物进一步包含药用载体、稀释剂或赋形剂。

[0014] 本发明药物组合物以组合的、同时的、分别连续的或持续给药的方式来提供。在一种实施方式中,含有一种或多种抗连接蛋白药剂的组合物与一种或多种治疗剂、用于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂同时给药或大致同时给药。

[0015] 药物组合物也以组合制剂的形式提供,例如,作为一种或多种抗连接蛋白药剂与一种或多种用于伤口愈合的其它药剂的混合物,这些其它药剂例如是有效促进或改善伤口愈合的生长因子,例如血小板源性生长因子、表皮生长因子、成纤维细胞生长因子 (例如, FGF2)、血管内皮生长因子和转化生长因子 $\beta 3$; 和 / 或有效促进或改善伤口愈合的细胞因子,例如 IL-7 和 IL-10; 和 / 或有效促进或改善伤口愈合的其它药剂,例如 IGF (如, IGF-1) 和 IGFBP (例如, IGFBP-2)。

[0016] 术语“组合制剂”包括“套装试剂盒 (kit of parts)”,其意思是如上文所限定的组合配方 (combination partner) 成分能够独立给药或通过使用与不同于组合配方 (a) 和 (b) 的用量的不同固定组合来给药,即同时给药、分别给药或连续给药。例如,然后试剂盒部件就能同时或按时序错开,即对于试剂盒部件中任何组件在不同时间点并以相等的或不同的时间间隔错开。

[0017] 在一种优选的实施方式中,组合制剂给药会由于使用这种组合而具有更少的给药时间点和 / 或给药之间的时间间隔增加。

[0018] 一方面,本发明包括药物组合物,包括局部递送形式和制剂,该药物组合物含有药用载体和治疗有效量的抗连接蛋白药剂和一种或多种本文中描述的药剂。抗连接蛋白药剂的实例包括抗连接蛋白寡聚脱氧核苷酸 (“ODN”),包括反义 (包括修饰的和未修饰骨架反义)、RNAi、和 siRNA,以及抗连接蛋白肽类和拟肽类。适合的抗连接蛋白药剂包括例如,针对连接蛋白 43、26、37、30 和 31.1 以及 32 的反义 ODN、肽和拟肽。在某些实施方式中,适合的组合物包括多种抗连接蛋白药剂,包括例如连接蛋白 43、26、30 和 31.1,与一种或多种有助于伤口愈合和 / 或组织修复的其它药剂的组合。优选的抗连接蛋白药剂是直接针对抗连接蛋白 43 的。与一种或多种抗连接蛋白药剂组合以用于使伤口愈合的优选药剂包括某些生长因子,例如包括血小板源性生长因子、表皮生长因子、成纤维细胞生长因子 α 、成纤维细胞生长因子 β 、血管内皮生长因子和转化生长因子 $\beta 3$,以及胰岛素样生长因子。与一种或多种抗连接蛋白药剂组合以用于使伤口愈合的其它优选药剂包括某些细胞因子,包括例如 IL-7 和 IL-10。与一种或多种抗连接蛋白药剂组合以用于使伤口愈合的其它优选药剂包括胸腺素 β -4、分泌性白细胞蛋白酶抑制剂、 β 肾上腺素拮抗剂 (例如,噻吗洛尔)、白细胞介素 -1 受体拮抗剂 (例如,阿那白滞素)、游离自由基清除剂 (例如, N-乙酰半胱氨酸),以及含有用于促进或改善伤口愈合的蛋白编码序列的基因疗法载体 (例如,包括编码血小板源性生长因子-B 序列的腺病毒载体)。与一种或多种抗连接蛋白药剂组合给药的优选治疗剂包括例如,抗炎剂、抗微生物剂 (例如,甲氧苄啶)、局部麻醉剂和表层麻醉剂、以及局部阿片类药 (例如,吗啡、氢吗啡酮和芬太尼)。

[0019] 另一方面,本发明包括向带有伤口受试者给予以延迟释放制剂、缓释制剂、持续释放制剂、控释制剂和 / 或以重复作用制剂形式配制的治疗有效量的一种或多种药用抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗性药剂、用于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂的方法,该伤口包括特征为整体上或部分延迟愈合或未完全伤口愈合的伤口。

[0020] 在某些其它方面,本发明还涉及利用这样的组合物治疗患有与创伤有关的各种疾

病、紊乱和病症或者具有患病的危险的受试者的方法，其中的创伤包括急性的和亚急性的伤口、以及延迟愈合的伤口或慢性伤口。

[0021] 另一方面，本发明包括用于治疗具有或疑似患病或易感染特征为整体或部分有伤或需要修复组织的任何疾病、紊乱和 / 或病症或具有患病危险的受试者的方法。这样的组合物包括例如局部递送形式和制剂。

[0022] 优选的方法包括连续给予或同时给予一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种有助于伤口愈合的药剂，其中的一者或两者都按照低于（一种或多种）药剂单独给药时（即当它们既不是物理组合也不是在治疗伤口的过程中组合给药时）所使用的剂量提供。这种药剂的较小给药剂量典型地为药剂单独给药时剂量的约十二分之一至约十分之一，并可以为单独给药时的约八分之一的剂量，约六分之一的剂量，约五分之一的剂量，约四分之一的剂量，约三分之一的剂量和约一半的剂量。优选地，给药连续进行。优选地，药剂在彼此间隔至少约半小时的时间内连续给药。药剂也可以在彼此间隔约 1 小时内、彼此间隔约一天到约一周或者以其它认为合适的方式来给药。优选地，首先给予抗连接蛋白药剂。在使用一种或多种抗连接蛋白药剂的情况下，优选在给予阻断或降低连接蛋白表达或半通道或间隙连接形成的抗连接蛋白药剂（例如通过下调连接蛋白的蛋白质表达的抗连接蛋白药剂）之前给予抗连接蛋白肽或抗连接蛋白拟肽，例如能够阻断或降低半通道开放的抗连接蛋白药剂。优选地，该抗连接蛋白药剂是（一种或多种）抗连接蛋白 43 药剂。

[0023] 另一方面，本发明包括能够粘附或与受试者皮肤结合的透皮贴剂、敷料、衬垫、缠绕带 (wrap)、基质和绷带，所述的物品能够向受试者递送治疗有效量的一种或多种药用抗连接蛋白药剂和一种或多种其他药用治疗剂、有助于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂。

[0024] 另一方面，本发明包括一种制造的制品，其包括盛装治疗有效量的一种或多种药用抗连接蛋白药剂和一种或多种促进伤口愈合的药用治疗剂的容器以及包括用于治疗受试者用途的使用说明书。

[0025] 另一方面，本发明包括一种制造的制品，其包括盛装治疗有效量的一种或多种药用抗连接蛋白药剂和一种或多种促进伤口愈合或有助于伤口愈合的药用治疗剂的容器以及包括用于治疗受试者用途的使用说明书。

[0026] 另一方面，本发明包括一种制造的制品，其包括盛装治疗有效量的一种或多种药用抗连接蛋白药剂和一种或多种药用间隙连接修饰剂的容器以及包括用于治疗受试者用途的使用说明书。

[0027] 本发明包括一种制造的制品，其包括含有一种或多种剂量形式的一种或多种药用抗连接蛋白药剂和一种或多种药用治疗剂、有助于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂的包装材料，其中该包装材料具有标签，指明该剂量形式能够用于患有或疑似患有或有易感本文所描述的或引用的任何疾病、紊乱和 / 或病症，包括整体上或部分地以急性、受损、缓发或慢性伤口愈合为特征的疾病、紊乱和 / 或病症。这样的剂量形式包括，例如，局部递送形式和制剂。

[0028] 本发明包括一种制剂，该制剂包含药用抗连接蛋白药剂和以治疗有效量促进受试者伤口愈合或组织修复的有助于伤口愈合的药用药剂。本发明包括一种制剂，该制剂包含药用抗连接蛋白药剂和以治疗有效量促进受试者伤口愈合的药用药剂。本发明包括一种制

剂,该制剂包含药用抗连接蛋白药剂和以治疗有效量促进受试者伤口愈合的药用间隙连接修饰剂。这样的制剂包括,例如,局部递送形式和制剂。优选的制剂包括一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种有助于伤口愈合的药剂,其中的一者或二者都以低于该药剂或该些药剂单独使用时所用用量或剂量(即当它们既不进行物理组合也不在治疗伤口疗程中组合给药时)来提供。这种以组合方式给予或提供较小剂量的药剂典型地为药剂单独给药时剂量的约十二分之一到约十分之一的量,并可以为单独给药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一半的量。

[0029] 本发明包括在药品的制造中使用治疗有效量的含有一种或多种药用抗连接蛋白药剂和一种或多种药用治疗剂、有助于伤口愈合的药剂和/或间隙连接修饰剂的组合物的方法。这样的药品包括,例如局部递送的形式和制剂。这样的药品包括治疗如本文中所披露的受试者的那些药品。正如本文中所提到的,这样的药品优选包括用量降低的一种或多种药用抗连接蛋白药剂和一种或多种药用治疗剂、有助于伤口愈合的药剂和/或间隙连接修饰剂。

[0030] 本发明包括在一种剂型的生产中使用治疗有效量的一种或多种药用抗连接蛋白药剂和一种或多种药用治疗剂、对伤口愈合有用的和/或间隙连接修饰剂的方法。这样的剂型包括,例如局部递送的形式和制剂。这样的剂型包括治疗本文中所公开的受试者的那些剂型。正如本文中所提到的,这样的剂型优选包括用量降低的一种或多种药用抗连接蛋白药剂和一种或多种药用治疗剂、有助于伤口愈合的药剂和/或间隙连接修饰剂。

[0031] 另一方面,本发明提供了包括向受试者给予本发明的药物组合物而用于治疗伤口例如包括急性的、亚急性的、缓发性的和慢性伤口的治疗方法。

[0032] 另一方面,本发明提供了抗连接蛋白药剂(例如,抗- α -10DN、肽或拟肽)和治疗药剂、有助于伤口愈合的药剂和/或间隙连接修饰剂在生产用于促进需要治疗的患者的伤口愈合的药物产品中的用途。

[0033] 另一方面,本发明提供了促进或增强伤口愈合或治疗,或者预防或改善纤维化或其它纤维化病症的方法,该方法包括向需要治疗的患者给予一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗剂、有助于伤口愈合的药剂和/或间隙连接修饰剂。

[0034] 在某些其它方面,本发明提供了:(i) 包含抗连接蛋白药剂和其与治疗剂、有助于伤口愈合的药剂和/或促进(例如,缩短愈合时间,改善伤愈效果)伤口愈合的间隙连接修饰剂组合的使用说明的包装;(ii) 包含一种或多种治疗剂、有助于伤口愈合的药剂和/或间隙连接修饰剂以及它们与一种或多种促进伤口愈合的抗连接蛋白药剂组合的使用说明的包装;和(iii) 包含一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗剂、有助于伤口愈合的药剂和/或间隙连接修饰剂及其在促进伤口愈合或减少伤口相关的纤维化方面的使用说明的包装。

[0035] 在一种实施方式中,本发明的药物产品与伤口敷料或伤愈促进基质组合提供。提供伤口敷料或基质的适当形式包括含有分散于固体基底之上或之中的抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗剂、有助于伤口愈合的药剂和/或间隙连接修饰剂的固体基底。

[0036] 抗连接蛋白药剂和治疗剂、有助于伤口愈合的药剂和/或间隙连接修饰剂可以在同一组合物中给予或者由分别的组合物给予。优选地,正如本文中所提到的,这些药剂以减少用量的一种或多种药用抗连接蛋白药剂和一种或多种药用治疗剂、有助于伤口愈合的药剂

剂和 / 或间隙连接修饰剂来给药。

[0037] 抗连接蛋白药剂和治疗剂、有助于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂可以同时、连续或分别地向患者给药。如果连续给药,则优选将抗连接蛋白药剂和治疗剂、有助于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂连续给药。优选地,这些药剂在彼此间隔至少约半小时内连续给药。这些药剂也可以在彼此间隔约 1 小时内,在彼此间隔约 1 天到 1 周内或者按照其它认为合适的方式给药。优选地,首先给予抗连接蛋白药剂。在使用一种或多种抗连接蛋白药剂的情况下,优选在给予阻断或降低连接蛋白表达或半通道或间隙连接形成的抗连接蛋白药剂(例如通过下调连接蛋白的蛋白质表达的抗连接蛋白药剂)之前给予抗连接蛋白肽或抗连接蛋白拟肽,例如能够阻断或降低半通道开放的抗连接蛋白药剂。优选地,该抗连接蛋白药剂是(一种或多种)抗连接蛋白 43 药剂。

[0038] 以下将提供本发明的这些和其它方面,但这都不应该限制发明内容部分中的信息或受到发明内容部分中的信息的限制。

附图说明

[0039] 图 1A 至图 1I 描述了伤口处的 Cx43 的表达。图 1A 描述了伤口处的 Cx43 基因表达的实时 PCR 分析。图 1A 描述了用对照 sODN($n = 4$, 开口柱)和 Cx43asODN($n = 4$; 填充柱)治疗的伤口中在第 1 天和第 7 天 Cx43 对 GAPDH 的相对表达水平;数据表示为平均值 $\pm$ 标准误差 * $P < 0.05$ 。图 1B 至图 1F 描述了用双苯酰亚胺(bis-benzimide)核染色(蓝)对用 Cx43asODN(图 1B:1 天,图 2D:2 天,图 1F:7 天)或对照治疗的伤口(图 1C:1 天,图 1E:2 天和图 1G:7 天)实施的 Cx43 染色(绿)。图 1H 和图 1I 描述了在伤口边缘中成像位置的图示。(图 1H)图像 B-E。(图 1I)图像 F 和 G。

[0040] 图 2A 至图 2H 描述了受伤后的细胞增殖。图 2A 至图 2D 描述了通过对对照 ODN(图 2A:第 2 天,图 2C:第 7 天)和 Cx43asODN(图 2B:第 2 天,图 2D:第 7 天)中的抗 BrdU 单克隆抗体进行免疫组织化学染色而实施的伤口处的细胞增殖分析。箭头和箭分别指示伤口边缘和前缘。图 2E 至图 2H 描述了 BrdU 染色的细胞;(i)和表皮(图 2E: $n = 5$)和新生表皮(图 2F: $n = 5$)中伤口边缘每个区域的 BrdU 阳性细胞的数目;(ii)在皮肤伤口边缘(图 2G: $n = 5$)和形成的肉芽组织(图 2H: $n = 5$)中 BrdU 阳性细胞的数目。以平均值 $\pm$ 标准误差表示计数,* $P < 0.05$ 。刻度条表示 $200 \mu\text{m}$ 。

[0041] 图 3A 至图 3C 描述了中性白细胞募集进入伤口位置。图 3A 和图 3B 描述了中性白细胞募集到用对照 sODN(图 3A)处理和 Cx43asODN 处理(图 3B)并在第 1 天采用抗 MPO 抗体进行分析的皮肤伤口中。图 3C 描述了用对照 sODN(开口柱:在第 1 天 $n = 4$;在第 2 天 $n = 5$)和 Cx43asODN(填充柱:在第一天 $n = 3$;在第二天 $n = 4$)治疗之后伤口位置 MPO 阳性细胞的数目。数据表示为平均值 $\pm$ 标准误差,* $P < 0.05$ 。刻度条表示 $50 \mu\text{m}$ 。

[0042] 图 4A 至图 4C 描述了巨噬细胞募集到伤口位置。图 4A 和图 4B 描述了巨噬细胞募集进入用对照 sODN(图 4A)和 Cx43asODN(图 4B)治疗的皮肤伤口,采用抗 F4/80 抗体在第 7 天进行分析。图 4C 描述了用对照 sODN(开口柱:在第 2 天 $n = 4$;在第 7 天 $n = 7$)和 Cx43asODN(填充柱:在第 2 天 $n = 34$;在第 7 天 $n = 6$)治疗之后在第 2 天和第 7 天巨噬细胞募集到皮肤伤口中。数据表示为平均值 $\pm$ 标准误差,* $P < 0.01$ 。刻度条表示 $50 \mu\text{m}$ 。

[0043] 图 5A 至图 5B 描述了 Cc12 和 TNF- α 在伤口位置的表达。图 5A 和图 5B 描述了 Cc12

和 TNF- α 在伤口位置基因表达的实时 PCR 分析。将用对照 sODN(开口柱)或 Cx43asODN(填充柱)治疗后在第 1、2 和 7 天(对于每一个 $n = 5$) Cc12(图 5A) 和 TNF- α (图 5B) 对 GAPDH 的相对表达水平的定量化。数据表示为平均值 $\pm$ 标准误差, $*P < 0.05$ 。

[0044] 图 6A 至图 6K 描述了 TGF- $\beta 1$ 的表达。图 6A 至图 6J 描述了用对照 sODN(图 6A 至图 6E) 和 Cx43asODN(图 6F 至图 6J) 治疗的伤口位置的 TGF- $\beta 1$ 的免疫组织化学。刻度条表示 $200 \mu m$ (图 6A 和图 6F) 和 $50 \mu m$ (图 6B 至图 6E, 以及 6G 至图 6J)。黑箭头示出了表皮的新生边缘。相对于对照 sODN(图 6D 和图 6E) 处理的伤口表皮, Cx43asODN 处理的伤口(图 6I 和图 6J) 表皮中的 TGF- $\beta 1$ 染色强得多。红箭头和黑箭头分别示出了典型的 TGF- $\beta 1$ 伸长的成纤维细胞样细胞和圆形的推定的白细胞(presumptive leukocyte)。图 6K 描述了用对照 sODN(开口柱)或 Cx43asODN(填充柱)治疗的伤口位置的 TGF- $\beta 1$ 的 mRNA 在第 1、2 和 7 天(每一个 $n = 5$) 表达的实时 PCR 分析。数据表示为平均值 $\pm$ 标准误差, $*P < 0.05$ 。

[0045] 图 7A 至图 7F 描述了肉芽组织的形成和成纤维细胞的迁移。图 7A 和图 7B 描述了成纤维细胞样细胞募集进入用对照 sODN(图 7A) 和 Cx43asODN(图 7B) 治疗的皮肤伤口中, 采用 TRITC-鬼笔环肽(TRITC-Phalloidin) 和 DAPI 核染色在第 2 天进行分析。图 7C 描述了观察用对照 sODN(开口柱: $n = 5$) 或 Cx43asODN(填充柱: $n = 5$) 治疗的伤口时每个区域内每一伤口位置处成纤维细胞样细胞的数目。图 7D 描述了显示用 Cx43asODN 治疗后迁移显著地更快的成纤维细胞迁移的伤愈分析结果。图 7E 和图 7F 描述了在成纤维细胞培养基中的伤口图像; 其为受伤时(图 7E) 和伤后 4 小时(图 7F) 的图像。数据表示为平均值 $\pm$ 标准误差, $*P < 0.02$ $**P < 0.01$ 。刻度条表示 $50 \mu m$ 。

[0046] 图 8A 至图 8B 描述了伤口位置中的胶原表达。图 8A 描述了在用对照 sODN(开口柱) 和 Cx43asODN(填充柱) 治疗的伤口位置通过定量测定受伤后在第 7、10 和 14 天和未受伤皮肤($n = 5$) 中的羟脯氨酸(HP) 含量而评估的胶原含量。数据表示为平均值 $\pm$ 标准误差, $P < 0.05$ 。图 8B 描述了用对照 sODN(开口柱) 和 Cx43asODN(填充柱) 治疗的伤口位置在第 1、2 和 7 天(每一个 $n = 5$) Col1 $\alpha 1$ 的 mRNA 表达的实时 PCR 分析。数据表示为平均值 $\pm$ 标准误差, $*P < 0.05$ 。

[0047] 图 9A 至图 9C 描述了肉芽组织浓度。图 9A 和图 9B 描述了在对照 sODN 治疗(图 9A) 和 asODN 治疗(图 9B) 的伤口中第 14 天伤口肉芽组织 H&E 染色。图 9C 描述了用对照 sODN(开口柱) 和 Cx43asODN(填充柱) 治疗之后的第 5 天(对照物: $n = 7$, asODN: $n = 6$)、第 7 天(对照物: $n = 5$, asODN: $n = 5$)、第 10 天(对照: $n = 5$, asODN: $n = 6$) 和第 14 天(对照: $n = 5$, asODN: $n = 6$) 分析的肉芽组织区域。在用 asODN 治疗之后肉芽组织区域在第 5 天的测定已经显示出面积稍有减小, 但是在第 7、10 和 14 天面积减小变得很显著($*P < 0.05$, $**P < 0.01$)。数据表示为平均值 $\pm$ 标准误差。刻度条表示 $1mm$ 。

[0048] 图 10A 至图 10C 描述了伤口位置处的细胞凋亡。图 10A 和图 10B 描述了在第 7 天以对照 sODN(图 10A) 和 Cx43asODN(图 10B) 治疗的伤口中肉芽组织的 TUNEL 染色。死亡的细胞显示为亮绿色点、其中一些已用箭头加亮。刻度条表示 $50 \mu m$ 。图 10C 描述了在第 5、7 和 10 天(每一个 $n = 6$) 观察用对照 sODN(开口柱) 和 Cx43asODN(填充柱) 治疗的伤口位置中每个视野区域的死亡细胞数目。数据表示为平均值 $\pm$ 标准误差。刻度条表示 $50 \mu m$ 。

[0049] 图 11A 至图 11F 描述了伤口位置处成肌纤维细胞的成熟。图 11A 和图 11D 描述了第 7 天的伤口中用双苯酰亚胺核染色（蓝）对肉芽组织边缘（图 11A 和图 11B）和在 10 天伤口中用双苯酰亚胺核染色（蓝）对肉芽组织中心（图 11C 和图 11D）进行的抗- α 平滑肌肌动蛋白（SMA）染色（绿）。图 11E 描述了定量化染色水平，这表明，在第 7 天（ $P = 0.004$ ）Cx43asODN 治疗伤口中的 SMA 染色显著地多于对照，表明肌成纤维细胞的较早成熟和分化。在第 10 天当大多数 SMA 染色和成肌纤维细胞在 Cx43asODN 治疗伤口中消失时，仍然存在这种较早的成熟，而在对照伤口中染色仍然十分强烈（ $P = 0.000002$ ）。图 11F 描述了在肉芽组织中成像位置的图示：区域 I（图 11A 和图 11B）和区域 II（图 11C 和图 11D）。数据表示为平均值 $\pm$ 标准误差。刻度条表示 $25\ \mu\text{m}$ 。

[0050] 图 12A 至图 12H 描述了伤口位置的血管形成。图 12A 至图 12F 描述了伤后第 7 天（图 12A 和图 12B）、第 10 天（图 12C 和图 12D）第 14 天（图 12E 和图 12F）用双苯酰亚胺核染色（蓝）对肉芽组织新生血管的血管假性血友病因子的染色（绿）。在反义治疗的伤口（图 12A、图 12C 和图 12E）中，血管在早期时间点（第 7 天图 12A 和图 12B 以及第 10 天图 12C 和图 12D）的形成更广泛且明显好于用对照 ODN 治疗的情况（图 12B、图 12D 和图 12F），与对照的情况相比对照 ODN 治疗导致染色显著减少（7 天 $*P = 0.0019$ ；10 天 $**P = 0.015$ ）。到第 14 天，asODN 组中的血管尺寸已经显著增加，并与对照具有相似大小的尺寸（图 12G）。图 12H 描述了肉芽组织中成像位置的图示：区域 I（图 12A 和图 12B）和区域 II（图 12C 至图 12E）。数据表示为平均值 $\pm$ 标准误差。刻度条表示 $25\ \mu\text{m}$ 。

[0051] 图 13A 至图 13B 描述了与对照治疗相比，asODN 治疗后伤口愈合的肉眼可见图像（图 13A）和在伤口区域中的相对变化（图 13B）。

[0052] 图 14 描述了人角膜缘（Human Limbal rim）-脱落的猪间质基质嵌合体。

[0053] 图 15 描述了连接到用于检测 120 种不同生长因子和细胞因子的蛋白水平的抗体芯片（antibody array）的生长因子和细胞因子的实例。每个两阵列膜上载有四个样品（每个具有重复且具有阴性和阳性对照的膜有 60 种生长因子 / 细胞因子）。

[0054] 图 16 描述了在培养基中 2 周后，与异源嵌合体的角膜缘区域相比异源嵌合体间质中的生长因子水平分析。这就是对照角膜（未经反义处理）。对两种生长因子特别感兴趣（箭头）。在异源嵌合体基质中 IGFBP-2 的水平非常高，而在角膜缘中 IGF-I 的水平更高。据报道，前者对于促进细胞迁移（其对于间质角膜细胞使切口（stoma）从角膜缘再增殖可能很重要）很重要，而后者对于促进细胞增殖（其在可能对在角膜缘中提供增加切口的细胞来源很重要）很重要。

[0055] 图 17 描述了在培养基中 2 周后与异源嵌合体的角膜缘区域相比异源嵌合体基质中的生长因子水平分析（基于 CX43asODN 治疗的角膜的数据）。对两种生长因子特别感兴趣（箭头）。与未处理的对照物相比，在经反义处理的异源嵌合体间质中具有高水平的 IGF-7，而与未处理的对照物尤其是对照角膜缘相比，在角膜缘和间质中都具有更高水平的 IGFBP-2。据报道，前者对于促进上皮生长（其与在反义处理的异源嵌合体中所观察到的上皮再生的增加一致）很重要，而后者对于促进细胞迁移（其与从反义处理的角膜缘的上皮再增殖增加一致）很重要。

[0056] 图 18 图示说明了一组典型的细胞因子，其基于在相比于低炎性伤口模型的发炎中它们的表达水平增加而进行识别。这些典型的细胞因子能够作为用于调节伤口愈合的适

合靶标。

[0057] 图 19 图示说明了一组典型的细胞因子,其基于相比于炎性模型在低炎性伤口模型中它们的表达水平增加而进行识别。这些典型的细胞因子能够作为用于调节伤口愈合的适合靶标。

具体实施方式

[0058] 定义

[0059] 本文中所使用的术语“紊乱”是受益于促进伤口愈合和 / 或减少肿胀、发炎和 / 或疤痕形成的药剂的任何紊乱、疾病或病症。例如,包括外科手术或外伤所致的伤口,以及伴有与神经性、局部缺血性、微脉管病理学、骨区(尾骨(骶骨)、髌(转子)、臀(坐骨)或脚踵)上的压力相关的畸形有关的伤口、再灌注损伤和瓣回流病因和病症引起的伤口。

[0060] 本文中所用的术语“受试者”是指任何哺乳动物,包括人类、家畜和农场动物,以及动物园动物、体育运动动物、或宠物,如狗、马、猫、羊、猪、牛等。本文中优选的哺乳动物是人,包括成年人、儿童和老年人。

[0061] 本文中所使用的“预防”是指整体上或部分地预防,或改善或控制。

[0062] 如本文中所使用的,关于本发明的化合物或组合物的“治疗有效量”是指足以产生所需的生物的、药物的或治疗结果的用量。那些结果可以是疾病或紊乱或病症的征候、症状或病因的减轻,或者生物系统的任何其它的期望变化。在优选的实施方式中,该结果会涉及伤口愈合的促进作用以及整体或部分地减少肿胀、发炎和 / 或疤痕形成。

[0063] 如本文中所使用的,术语“治疗”既指治疗性处理也指预防性或防御性措施。需要治疗的对象包括已经带有伤口或其它相关障碍的对象,以及易于具有伤口或相关紊乱或被诊断患有该紊乱的对象或者在其中体内预防该紊乱的对象。

[0064] 如本文中所使用的,术语“抗连接蛋白药剂”是影响或调节连接蛋白、连接蛋白半通道(连接子)、或间隙连接的活性、表达或形成的化合物。抗连接蛋白药剂包括但不限于反义化合物(例如,反义多核苷酸)、RNAi 和 siRNA 化合物、抗体及其连接片断,以及肽和多肽,其包括“拟肽”和肽类似物。优选的抗连接蛋白药剂是抗连接蛋白 43 药剂。示例性的抗连接蛋白药剂将在本文中更加详细地讨论。

[0065] 如本文中所使用的,术语“治疗”既指治疗性处理也指预防性或防御性措施。需要治疗的对象包括已经患有紊乱的对象,以及易于患有给紊乱或被诊断患有该障碍的对象或者在其体内预防该紊乱的对象。

[0066] 术语“拟肽”和“模拟物”包括可以与它们所模拟的蛋白区域具有基本相同的结构和功能特征天然存在的和人工合成化学化合物。在连接蛋白的情况下,可以模拟例如与连接子-连接子分子对接和细胞-细胞通道形成有关的相对的连接蛋白的细胞外环。

[0067] “肽类似物”是指具有类似于模板肽的特性的化合物,并且可以是非肽类药物。“拟肽”(也称为“模拟肽”)包括肽基化合物,也包括非肽基化合物如肽类似物。在结构上类似于治疗用肽的拟肽可以用于生产等价物或增强治疗或预防的效果。一般而言,拟肽在结构上与模板多肽(即具有生物学或药理学功能或活性的多肽)相同或相似,但也可具有一个或多个肽键,该肽键可选地由选自例如 $-\text{CH}_2\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ (顺式和反式)、 $-\text{COCH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 和 $-\text{CH}_2\text{SO}-$ 组成组中的键所替代。模拟物能够完全由天然氨基

酸,或氨基酸的非天然类似物构成,或者是部分天然肽氨基酸与部分氨基酸的非天然类似物的嵌合分子。该模拟物也可包含任意量的天然氨基酸保守置换,只要这样的置换也不会实质上改变模拟物的活性即可。例如,如果模拟组合物能够下调连接蛋白或连接子的生物行为或活性,例如阻止连接子对接而形成间隙-连接-介导的细胞-细胞通信,或者阻止连接子打开而将细胞质暴露于细胞外环境,则该模拟组合物可被用作抗-链接蛋白药剂。拟肽、模拟肽和连接蛋白修饰肽包括了本文中所提出描述的,以及本领域或许已知的这种拟肽、模拟肽和连接蛋白修饰肽,无论是现在已知的还是未来开发的。

[0068] 本文中以其各种形式所使用的术语“调节子(modulator)”和连接蛋白活性的“调节(modulation)”是指整体或部分地抑制连接蛋白或连接蛋白半通道的表达或行为或活性,可以起到抗连接蛋白药剂的作用。

[0069] 一般而言,术语“蛋白”是指两个或多个单个氨基酸(无论是不是天然存在的)经由肽键连接的任何聚合物,也就是当连接到一个氨基酸(或氨基酸残基) α 碳的羧基碳原子的羧基碳原子共价连接至连接于相邻氨基酸 α 碳的氨基的氨基氮原子时就会形成肽键。这些肽键连接,以及包含这些连接的原子(即 α 碳原子、羧基碳原子(及其取代氧原子),和氨基氮原子(及其取代氢原子))形成了蛋白质的“多肽骨架”。另外,本文中所使用的术语“蛋白质”应理解成包括术语“多肽”和“肽”(在本文中它们有时可以互换使用)。类似地,在本文中蛋白片断、类似物、衍生物和变异体都可以被称为“蛋白质”,而且除非另外指出都应该认为是“蛋白”。术语蛋白质的“片断”是指包含少于该蛋白质全部氨基酸残基的多肽。蛋白质的“域”也是一个片断,且包含经常要求具备活性或功能的该蛋白质的氨基酸残基。

[0070] 本文中所使用的术语“同时”用于意指本发明的一种或多种药剂同时进行给药,而术语“组合”用于意指它们如果不是同时或物理组合给药时,那么就在利用它们都可以而起治疗作用的时间内“连续”给药。因此,“连续”给药可以容许一种药剂在其它药剂给药之后在数分钟(例如,1、2、3、4、5、10、15、20、25、30分钟)或大约数小时、数天、数周或数月给药,条件是一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗剂、有助于伤口愈合的药剂和/或间隙连接修饰剂以有效量同时存在。组分的一次或多次给药之间的时间延迟会根据组分的精确性质、彼此间的相互作用和其各自的半衰期而有所不同。

[0071] 术语“伤口”是指任何组织的创伤,包括例如急性的、亚急性的、延迟的或难以愈合的伤口,以及慢性伤口。伤口的实例可以包括开放伤口和闭合伤口。伤口包括例如烧伤、切口伤、切除伤、撕裂伤、擦伤、刺伤或贯通伤、外科手术伤口、挫伤、血肿、挤压伤和溃疡。

[0072] 如本文中所描述的,延迟愈合的伤口或难以愈合的伤口可以包括例如至少部分以以下一种或多种情况为特征的伤口:1) 发炎阶段延长,2) 缓慢形成细胞外基质(ECM),以及3) 上皮形成的速率停滞或降低。

[0073] 如本文中所使用的,慢性伤口可以是指例如至少部分以以下一种或多种情况为特征的伤口:1) 伤口发炎的慢性自身延续状态,2) 缺乏性和缺陷性伤口ECM,3) 受伤细胞响应差(衰老),尤其是成纤维细胞,限制了ECM的产生,以及4) 部分由于缺少必要的ECM配合作用且缺乏迁移的支架(scaffold)而不能发生上皮再生。慢性伤口包括静脉曲张性溃疡、动脉溃疡、压迫性溃疡、血管炎性溃疡和糖尿病性溃疡。

[0074] 术语“敷料”是指用于向伤口局部施用且不包括适用于全身给药的组合物的敷料。

例如,可将一种或多种抗连接蛋白药剂和 / 或一种或多种有助于伤口愈合的药剂、治疗剂和 / 或间隙连接修饰剂分散于伤口接触材料的固体片材之上或之内,该固体片材例如是纺织物或无纺织物材料,或者可以分散于泡沫层(如聚氨酯泡沫)内,或分散于水凝胶内,该水凝胶例如是聚氨酯水凝胶、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,例如分散在凝胶剂或软膏剂中。在某些实施方式中,抗连接蛋白药剂和 / 或所述一种或多种有助于伤口愈合的药剂、治疗剂和 / 或间隙连接修饰剂分散于向伤口中提供持续释放活性成分的可生物降解固体片材之上或之内,例如冻干胶原片、冻干胶原 / 藻酸盐混合物片(可以注册商标 FIBRACOL 从 Johnson & Johnson Medical Limited 获得)或冻干胶原 / 氧化再生纤维素片(可以注册商标 PROMOGRAN 从 Johnson & Johnson Medical Limited 获得)。

[0075] 如本文中所使用的,“基质”包括例如基质如胶原、无细胞基质、交联的生物学支架分子、基于组织的生物工程结构框架、生物制造的生物假体和其它移植结构例如适用于促进伤口愈合的细胞浸润和增殖作用的人造血管。其它合适的生物基质材料可以包括化学修饰的胶原组织以降低抗原性和免疫原性。其它合适的实例包括用于伤口敷料的胶原薄膜、无抗原或减少抗原的无细胞基质 (Wilson et al., Trans Am Soc Artif Intern 1990 ;36 : 340-343) 或其它设计用于降低对异种移植物质产生抗原应答的生物基质。其它用于促进伤口愈合的基质可以包括例如含有不溶胶原和弹性蛋白的经过处理的牛心包蛋白 (Courtman et al., J Biomed Mater Res 1994 ;28 :655-666) 以及其他可以用于为宿主细胞迁移提供天然微环境从而加速组织再生的无细胞组织 (Malone et al., J Vase Surg 1984 ;1 : 181-91)。在某些实施方式中,可以用有助于伤口愈合的药剂如生长因子或其他位置特异性释放的伤口愈合促进剂、治疗剂和 / 或间隙连接修饰剂来补充基质物质。

[0076] 伤口和伤口分类

[0077] 除了前文所提供的定义之外,术语“伤口”也可以包括例如由不同方式引起的皮肤和皮下组织的损伤(例如由长期卧床休息产生的褥疮和由于外伤引起的伤口)且具有各种不同的特征。伤口可以根据伤口的深度而分成 1 到 4 级:i) I 级:限于上皮组织的伤口;ii) II 级:延伸到真皮的伤口;iii) III 级:延伸到皮下组织的伤口;和 iv) IV 级(或全厚度伤口):暴露出骨头的伤口(例如,诸如大转子或骶骨的骨压觉点)。术语“部分皮层厚度伤口 (partial thickness wound)”是指包括 I ~ III 级的伤口;部分皮层厚度伤口的实例包括烧伤创面、褥疮、静脉瘀滞溃疡和糖尿病性溃疡。术语“深度伤口”是指既包括 III 级伤口又包括 IV 级伤口。本发明的组合物和方法意图治疗所有伤口类型,包括深度伤口和慢性伤口。术语“慢性伤口”是指未愈合的伤口。优选地,慢性伤口选自静脉曲张性溃疡、压迫性溃疡、血管炎性溃疡、糖尿病性溃疡和褥疮性溃疡组成的组。慢性皮肤伤口包括例如压迫性溃疡、糖尿病性溃疡、静脉曲张性溃疡、血管炎性溃疡、动脉溃疡,以及混合性溃疡。慢性伤口可以是动脉溃疡,其包括由完全或部分动脉阻塞所致的溃疡。慢性伤口可以是静脉淤滞性溃疡,其包括由于静脉瓣失灵和有关血管疾病而导致的溃疡。慢性伤口可以是外伤引发的溃疡、糖尿病性溃疡或血管炎性溃疡。

[0078] 压迫性溃疡:压迫性溃疡可以基于美国卫生保健政策研究所((AHCP, Agency for Health Care Policy and Research), 美国卫生及公共服务部 (U. S. Department of Health and Human Services)) 指南分成 4 个阶段:阶段 I:阶段 I 压迫性溃疡是一种可见的与压力

相关的未受损皮肤的变化,其与身体上邻近或相对区域相比的指征可以包括在一种或多种以下指征的变化:皮肤温度(发热或发冷)、组织连贯性(强健感(firm)或泥软感(boggy))和/或感觉(疼痛、发痒)。溃疡表现为在轻度变色皮肤中持续发红的限定区域,而在肤色较深的皮肤中,溃疡可以表现出持续发红、发蓝或发紫。阶段1的溃疡可以包括未受损皮肤的不可变白的红斑和皮肤溃疡的先兆性损伤。在肤色更深的个体中,皮肤的变色、发热、水肿、硬结或硬化也可以是阶段1溃疡的指征。阶段2:阶段2溃疡的特征为涉及表皮、真皮或这两者的部分厚度的皮肤缺失。这种溃疡是浅表性的而临床表现为擦伤、水疱或浅的溃疡龕(crater)。阶段3:阶段3的溃疡的特征为涉及到皮下组织损伤或坏死的全厚度皮肤缺失,其可以延伸到但不贯穿底层筋膜。这种溃疡临床表现为与邻近组织剥离或不与邻近组织剥离的深的溃疡龕。阶段4:阶段4溃疡的特征为大面积破损、组织坏死或对肌肉、骨骼或支持结构(例如腱、关节囊)产生损坏的全厚度皮肤缺失。在某些实施方式中,提供了治疗慢性伤口的组合物和方法,其中该慢性伤口的特征为压迫性溃疡的以下 AHCPR 阶段:阶段1、阶段2、阶段3和/或阶段4中的一个或多个。

[0079] 褥疮性溃疡:褥疮性溃疡是由于长期和不变姿势地压迫骨突起部从而导致局部缺血而引起的。那些不能自己翻身以卸载体重的患者(如瘫痪、昏迷或严重衰弱的人)易于出现这种伤口。根据美国卫生及公共服务部的定义,主要预防性措施包括确证高危患者;经常性地进行评估;以及预防措施,如定期翻身、合适的卸压寝具、防潮垫和充足的营养状态。治疗选择可以包括例如,卸压、手术清创和酶清创、潮湿伤口护理和控制细菌负荷量。在某些实施方式中,提供了治疗慢性伤口的组合物和方法,其中该慢性伤口的特征为褥疮性溃疡或由于长期压迫骨突出部而导致局部缺血引起的溃疡。

[0080] 动脉溃疡:动脉溃疡的特征为可导致组织坏死和/或溃疡的完全或部分动脉阻塞。动脉溃疡的征兆可以包括例如肢体末端无脉;疼痛性溃疡;通常为界限分明的小斑点状溃疡;冷却或冷冻皮肤;毛细血管复原时间延迟(短暂地推压在脚趾末端并释放,脚趾应该在约3秒或更短的时间内回复正常的颜色);皮肤出现萎缩(例如,发亮、变薄、变干);以及手指和脚趾以及足部毛发脱落。在某些实施方式中,提供了治疗慢性伤口的组合物和方法,其中该慢性伤口的特征为动脉溃疡或由于完全或部分动脉瘀滞所致的溃疡。

[0081] 静脉曲张性溃疡:静脉曲张性溃疡是最常见的影响下肢的溃疡类型,其特征为静脉瓣功能障碍。正常的静脉具有能够阻止血液回流的瓣膜。当这些瓣膜功能不健全时,静脉血的回流就会引起静脉充血。血红蛋白从红血细胞逸出并泄漏到血管外空间,导致通常所见的呈褐色的变色。人们已经证明,静脉曲张性溃疡周围皮肤的经皮氧分压下降,这暗示了存在阻塞该区域正常血管形成的力。淋巴引流和流动也对这些溃疡起作用。静脉曲张性溃疡可以出现在脚踝内侧附近,并且通常伴有下肢水肿和硬结;其可以是浅表的,并不太疼痛并且表现为从患处排出渗液。在某些实施方式中,提供了治疗慢性伤口的组合物和方法,其中慢性伤口的特征为静脉曲张性溃疡或由于静脉瓣功能障碍和相关的静脉疾病所致的溃疡。

[0082] 静脉瘀滞性溃疡:静脉瘀滞性溃疡的特征为下肢慢性被动静脉充血导致局部缺氧。这种伤口的发病机理一种可能机制包括氧跨过厚的血管周纤维蛋白套(perivascular fibrin cuff)扩散到组织中受阻。另一种机理是大分子渗漏到血管周组织中捕获维持皮肤完整性所需的生长因子。另外,由于静脉充血而使大的白细胞的流动变慢从而易于形成溃

疡,静脉充血会使毛细管闭塞、活化、并使静脉内皮组织受损。因此,在某些实施方式中,提供了治疗慢性伤口的组合物和方法,其中该慢性伤口的特征为静脉瘀滞溃疡或由于下肢慢性被动静脉充血和 / 或引起局部缺氧所致的溃疡。

[0083] 糖尿病性溃疡:糖尿病患者易于发生由神经性和脉管并发症产生的足部溃疡和其他溃疡。外周神经病能够导致足部和 / 或腿部的知觉变化或完全丧失。之前就患有神经病的糖尿病患者由于分辨力急剧变差而丧失了全部能力。或许几天或几周都完全不会注意到患有神经病的患者脚部的任何切口或外伤。之前就患有老年性神经病的患者丧失了感知持续压力损伤的能力,因此,就可能发生导致例如足底溃疡的组织局部缺血和坏死。微血管疾病是糖尿病显著并发症之一,其也会导致溃疡。在某些实施方式中,提供了治疗慢性伤口的组合物和方法,其中该慢性伤口的特征为糖尿病足部溃疡和 / 或由于糖尿病的神经过和 / 或血管并发症所致的溃疡。

[0084] 外伤性溃疡:外伤性溃疡的形成可以是由于身体受伤而引起的。这些创伤包括例如,动脉、静脉或淋巴系统的损伤;骨骼的骨架结构发生的变化;组织层-上皮、真皮、皮下软组织、肌肉或骨骼的丧失;身体部分或器官的损伤以及身体部分或组织的丧失。在某些实施方式中,提供了治疗慢性伤口的组合物和方法,其中该慢性伤口的特征为与身体外部伤害相关的溃疡。

[0085] 烧伤性溃疡:溃疡也可以是由于烧伤所致,包括 1 级烧伤(即,皮肤浅表性的发红区域);2 级烧伤(在水疱流体除去后可以自然痊愈的起疱受伤位置);3 级烧伤(贯穿整个皮肤的烧伤,且通常需要手术干预才能痊愈);烫伤(可以是由于热水、热油或辐射流体烫伤所致);热致烧伤(由于火焰烧炙所致,通常是深度烧伤);化学灼伤(可以由于酸、碱所致烧伤,通常是深度烧伤);电致烧伤(住宅低压所致或工业高压所致);爆炸突燃(通常是浅表伤);和接触性烧伤(通常是深度烧伤,可以是由于消声器尾管、热铁和炉子所致)。在某些实施方式中,提供了治疗慢性伤口的组合物和方法,其中该慢性伤口的特征为与身体烧伤有关的溃疡。

[0086] 抗连接蛋白药剂

[0087] 本文中所述的本发明抗连接蛋白药剂能够调节或影响的分子运输进入或运输出细胞(例如,阻断或抑制或下调)。因此,本文中描述的某些抗连接蛋白药剂调节细胞通信(例如细胞对细胞)。某些抗连接蛋白药剂调节或影响分子在细胞质和周质空间或胞外空间之间的分子传递。这种抗连接蛋白药剂一般靶向连接蛋白和 / 或连接蛋白半通道(连接器)。含有连接蛋白的半通道以及所产生的间隙连接,在半通道开放的情况下,独立地涉及与细胞质和胞外空间或组织之间的小分子释放或交换,而在间隙连接开放的情况下,独立地涉及与邻接细胞的细胞质之间的小分子释放或交换。因此,本文中所提供的抗连接蛋白药剂可以直接地或间接地降低细胞之间的耦合和通信或者降低或阻断细胞与胞外空间或组织之间的通信(或分子传递),而对细胞向胞外空间或组织(或者从细胞外空间或组织向细胞内)或者邻接细胞之间分子传递的调节也属于本发明抗连接蛋白药剂和实施方式的作用范围内。

[0088] 能够对分子通过(例如传递)间隙连接或连接蛋白半通道产生所需抑制作用的任何抗连接蛋白药剂都可以用于本发明的实施方式中。特定的实施方式还提供了调节分子通过间隙连接或连接蛋白半通道的任何抗连接蛋白药剂(例如调节、阻断或减少分子从细胞

细胞质向胞外空间或邻接细胞的细胞质之间通过的那些药剂)。无论是否存在间隙连接解偶联(阻断分子运输通过间隙连接),这种抗连接蛋白药剂都可以调节分子通过间隙连接或连接蛋白半通道。这样的化合物包括例如,蛋白质和多肽、多核苷酸和其它有机化合物,它们可以例如整体上或部分地阻断间隙连接或半通道的功能或表达,或者整体上或部分地下调连接蛋白的产生。Evans, W. H. and Boitano, S. *Biochem. Soc. Trans.* 29 :606-612 (2001) 中列出了某些间隙连接抑制剂。

[0089] 某些抗连接蛋白药剂提供连接蛋白表达的下调作用(例如通过下调 mRNA 的转录或翻译)或者降低或抑制连接蛋白、连接蛋白半通道或间隙连接的活性。在下调作用的情况下,这会具有在连接蛋白表达下调的位置通过间隙连接降低直接细胞-细胞通信的作用,或者通过半通将细胞细胞质暴露于胞外空间的作用。

[0090] 抗连接蛋白药剂的实例包括降低或抑制连接蛋白 mRNA 和 / 或蛋白表达或功能或者降低连接蛋白、连接蛋白半通道或间隙连接的活性、表达或形成的药剂。抗连接蛋白药剂包括抗连接蛋白多核苷酸,如反义多核苷酸和其它多核苷酸(如具有 siRNA 或核糖核酸酶功能的多聚核苷酸),以及抗体及其连接片断,以及肽和多肽,包括调节半通道或间隙连接活性或功能的拟肽和肽类似物。

[0091] 抗连接蛋白多核苷酸

[0092] 抗连接蛋白多核苷酸包括连接蛋白反义多核苷酸以及具有使之能够下调连接蛋白表达功能的多核苷酸。其它合适的抗连接蛋白多核苷酸包括 RNAi 多核苷酸和 siRNA 多核苷酸。

[0093] 反义多核苷酸和其它抗连接蛋白多核苷酸如 RNAi、siRNA 和核糖核酸酶多核苷酸,以及具有修饰的和混合骨架的多核苷酸的合成,对于本领域技术人员来说是已知的。参见例如 Stein CA. and Krieg A. M. (eds), *Applied Antisense Oligonucleotide Technology*, 1998 (Wiley-Liss)。合成抗体和连接片断以及肽和多肽,包括拟肽和肽类似物的方法对于本领域技术人员来说是已知的。参见例如 Lihu Yanget al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1 ;95(18) :10836-10841 (1998 年 9 月 1 日); Harlow and Lane (1988) " *Antibodies :A Laboratory Manuel* " Cold Spring Harbor Publications, New York; Harlow and Lane (1999) " *Using Antibodies* " A Laboratory Manuel, Cold Spring Harbor Publications, New York。

[0094] 根据一个方面,下调连接蛋白表达可以一般基于采用反义多核苷酸的(如 DNA 或 RNA 多核苷酸)的反义方法,且更具体而言是基于反义脱氧寡核苷酸(ODN)的使用。这些多核苷酸(例如 ODN)靶向将要被下调的连接蛋白。典型地多核苷酸是单链的,但也可以是双链的。

[0095] 反义多核苷酸可以抑制连接蛋白的转录和 / 或翻译。优选多核苷酸是从连接蛋白基因或 mRNA 转录和 / 或翻译的特异性抑制剂,而不会抑制从其它基因或 mRNA 的转录和 / 或翻译。产物可以连接到连接蛋白基因或 mRNA 的 (i) 5' 编码序列,和 / 或 (ii) 编码序列,和 / 或 (iii) 3' 编码序列。

[0096] 反义多核苷酸一般是与连接蛋白 mRNA 反义的。这样的多核苷酸或许能够杂交到连接蛋白 mRNA,并由此可以通过干扰连接蛋白 mRNA 代谢的一个或多个方面,包括转录、mRNA 合成调控、从细胞核运输 mRNA、翻译或 mRNA 降解,而抑制连接蛋白的表达。反义多核

核苷酸典型地杂交到连接蛋白 mRNA 而形成双链体,能够产生对 mRNA 的翻译和 / 或去稳定化 (destabilization) 的直接抑制。这种双链体可以通过核酸酶易于降解。

[0097] 反义多核苷酸可以杂交到所有的或部分的连接蛋白 mRNA。典型地,反义多核苷酸杂交到连接蛋白 mRNA 的核糖体结合区域或编码区域。多核苷酸与所有连接蛋白 mRNA 或局部连接蛋白 mRNA 是互补的。例如,多核苷酸可以是所有或部分连接蛋白 mRNA 的精确补体。然而,绝对的互补性是不需要的,而对于形成在生理条件下熔点超过约 20℃、30℃或 40℃ 的双链体具有足够互补性的多核苷酸尤其适用于本发明。

[0098] 因此,多核苷酸一般是与 mRNA 互补的序列的同源物。多核苷酸可以是在中等到高严格度条件下 (如 0.03M 氯化钠和 0.03M 柠檬酸钠在约 50℃到约 60℃) 杂交到连接蛋白 mRNA 的多核苷酸。

[0099] 对于某些方面,合适的多核苷酸的长度典型地为约 6 至 40 核苷酸。优选多核苷酸的长度可以为约 12 至约 35 个核苷酸,或可替代地长度为约 12 至约 20 个核苷酸或更优选长度为约 18 至约 32 个核苷酸。根据一个可替代方面,多核苷酸的长度可以为至少约 40,例如至少约 60 或至少约 80 个核苷酸以及长度为高达约 100、约 200、约 300、约 400、约 500、约 1000、约 2000 或约 3000 或更多的核苷酸。

[0100] 连接蛋白或多核苷酸靶向的蛋白质将依赖于将会发生下调作用的位置。这根据连接蛋白亚单位组成反映了身体不同位置的间隙连接的非均匀结构 (non-uniform makeup)。连接蛋白一方面是在人体或动物体内天然存在的连接蛋白,或者是在连接蛋白表达或活性将会降低的组织中天然存在的连接蛋白。连接蛋白基因 (包括编码序列) 一般与本文中提及的一种或多种特异性连接蛋白的编码序列具有同源性,如与表 8 中所示的连接蛋白 43 编码序列具有同源性。连接蛋白典型地是一种 α 或 β 连接蛋白。优选连接蛋白是一种 α 连接蛋白且在待治疗的组织中表达。

[0101] 然而,一些连接蛋白比其它的连接蛋白在组织中的分布更为普遍。最普遍的一种是连接蛋白 43。靶向连接蛋白 43 的多核苷酸特别适合在本发明中使用。在其它方面,其它连接蛋白被靶向。

[0102] 抗连接蛋白多核苷酸包括连接蛋白反义多核苷酸以及具有能够下调连接蛋白表达功能的多核苷酸。其它合适的抗连接蛋白多核苷酸包括 RNAi 多核苷酸和 SiRNA 多核苷酸。

[0103] 在一个优选方面,反义多核苷酸仅仅靶向一种连接蛋白的 mRNA。最优选地,该连接蛋白是连接蛋白 43。在另一方面,该连接蛋白是连接蛋白 26、30、31.1、32、36、37、40 或 45。在其它方面,该连接蛋白是连接蛋白 30.3、31、40.1 或 46.6。

[0104] 还应该理解,靶向单独连接蛋白的多核苷酸可以组合使用 (例如可以靶向 1、2、3、4 或多种不同的连接蛋白)。例如,靶向连接蛋白 43 的多核苷酸和连接蛋白家族的一个或多个其它成员 (例如连接蛋白 26、30、30.3、31.1、32、36、37、40、40.1、45 和 46.6) 能够组合使用。

[0105] 可替代地,反义多核苷酸可以是组合物的部分,该组合物可以含有指向超过一种连接蛋白的多核苷酸。优选多核苷酸指向的连接蛋白之一是连接蛋白 43。脱氧寡核苷酸指向的其它连接蛋白可以包括,例如,连接蛋白 26、30、30.3、31.1、32、36、37、40、40.1、45 和 46.6。指向各种连接蛋白的适合的示例性多核苷酸 (和 ODN) 列于表 1 中。

[0106] 单个反义多核苷酸对特定的连接蛋白可以是特异性的,或可以靶向 1、2、3 或多种不同连接蛋白。特异性多核苷酸一般会靶向于连接蛋白之间不保守的连接蛋白基因或 mRNA 中的序列,而非特异性多核苷酸则会靶向于各种连接蛋白的保守序列。

[0107] 用于本发明中的多核苷酸可以合适地是未修饰的磷酸二酯寡聚体。这样的脱氧寡核苷酸的长度可以是不同的。已经发现 30 聚体多核苷酸是特别合适的。

[0108] 本发明的许多方面参照脱氧寡核苷酸进行描述。然而,应该理解,其它合适的多核苷酸(如 RNA 多核苷酸)可以用于这些方面。

[0109] 反义多核苷酸可以进行化学修饰。这可以增强其对核酸酶的抗性,并且可以增强其进入细胞的能力。例如,可以使用硫代磷酸寡核苷酸。其它脱氧核苷酸类似物包括甲基磷酸酯、氨基磷酸酯(phosphoramidate)、二硫代磷酸酯、N3' P5' - 氨基磷酸酯和寡核糖核苷酸硫代磷酸酯以及它们的 2' -O- 烷基类似物和 2' -O- 甲基核糖核苷甲基磷酸酯。可替代地,可以使用混合骨架寡核苷酸(“MBO”)。MBO 含有硫代磷酸酯脱氧寡核苷酸的片断且适合代替修饰的脱氧寡-或寡核糖核苷酸。MBO 含有硫代磷酸酯键的片断和其他修饰寡核苷酸的其它片段,如非离子性的甲基磷酸酯,其对核酸酶或 2' -O- 烷基寡核糖核苷酸具有非常高的耐性。制备修饰骨架和混合骨架寡核苷酸的方法在本领域是已知的。

[0110] 本发明中使用的反义多核苷酸的精确序列取决于靶连接蛋白。在一种实施方式中,合适的连接蛋白反义多核苷酸能够包括如选自表 1 中所列以下序列的脱氧寡核苷酸的多核苷酸:

[0111] 表 1

[0112]

5' GTA ATT GCG GCA AGA AGA ATT GTT TCT GTC 3'	(连接蛋白 43)	(SEQ. ID. NO :1)
5' GTA ATT GCG GCA GGA GGA ATT GTT TCT GTC 3'	(连接蛋白 43)	(SEQ. ID. NO :2)
5' GGC AAG AGA CAC CAA AGA CAC TAC CAG CAT 3'	(连接蛋白 43)	(SEQ. ID. NO :3)
5' TCC TGA GCA ATA CCT AAC GAA CAA ATA 3'	(连接蛋白 26)	(SEQ. ID. NO :4)
5' CAT CTC CTT GGT GCT CAA CC 3'	(连接蛋白 37)	(SEQ. ID. NO :5)
5' CTG AAG TCG ACT TGG CTT GG 3'	(连接蛋白 37)	(SEQ. ID. NO :6)
5' CTC AGA TAG TGG CCA GAA TGC 3'	(连接蛋白 30)	(SEQ. ID. NO :7)
5' TTG TCC AGG TGA CTC CAA GG 3'	(连接蛋白 30)	(SEQ. ID. NO :8)
5' CGT CCG AGC CCA GAA AGA TGA GGT C 3'	(连接蛋白 31.1)	(SEQ. ID. NO :9)
5' AGA GGC GCA CGT GAG ACA C 3'	(连接蛋白 31.1)	(SEQ. ID. NO :10)
5' TGA AGA CAA TGA AGA TGT T 3'	(连接蛋白 31.1)	(SEQ. ID. NO :11)
5' TTT CTT TTC TAT GTG CTG TTG GTG A 3'	(连接蛋白 32)	(SEQ. ID. NO :12)

[0113] 用于制备本文中描述的组合多核苷酸组合物的合适多核苷酸包括例如,靶向连接蛋白 Cx43 的多核苷酸和靶向以上表 1 中描述的连接蛋白 26、30、31.1、32 和 37 的多核苷酸。

[0114] 尽管本发明中所用反义多核苷酸的精确序列取决于靶连接蛋白,而对于连接蛋白 43,已经发现具有以下序列的反义多核苷酸是特别合适的:GTA ATT GCG GCA AGA AGA ATT GTT TCT GTC(SEQ. ID. NO :1) ;GTA ATT GCG GCA GGA GGA ATT GTT TCT GTC(SEQ. ID. NO :2) ;和 GGC AAG AGA CAC CAA AGA CAC TAC CAGCAT(SEQ. ID. NO :3)。

[0115] 例如,合适于连接蛋白 26、31.1 和 32 的反义多核苷酸具有以下序列:

[0116] 5' TCC TGA GCA ATA CCT AAC GAA CAA ATA(连接蛋白 26)(SEQ. ID. NO :4) ;

5' CGT CCG AGC CCA GAA AGA TGA GGT C(连接蛋白 31.1)(SEQ. ID. NO :9) ;和 5' TTT CTT TTC TAT GTG CTGTTG GTG A(连接蛋白 32)(SEQ. ID. NO. 12)。

[0117] 根据本发明方法的其它有用的连接蛋白反义多核苷酸序列包括:

[0118] 5' CAT CTC CTT GGT GCT CAA CC 3' (连接蛋白 37)(SEQ. ID. NO :5) ;

[0119] 5' CTG AAG TCG ACT TGG CTT GG 3' (连接蛋白 37)(SEQ. ID. NO :6) ;

[0120] 5' CTC AGA TAG TGG CCA GAA TGC 3' (连接蛋白 30)(SEQ. ID. NO :7) ;

[0121] 5' TTG TCC AGG TGA CTC CAA GG 3' (连接蛋白 30)(SEQ. ID. NO :8) ;

[0122] 5' AGA GGC GCA CGT GAG ACA C 3' (连接蛋白 31.1)(SEQ. ID. NO :10) ;和

[0123] 5' TGA AGA CAA TGA AGA TGT T 3' (连接蛋白 31.1)(SEQ. ID. NO :11)。

[0124] 指向连接蛋白蛋白质的多核苷酸(包括 ODN)能够根据其核苷酸序列通过任何方便的常规方法来选择。例如,可以使用计算机程序 Mac Vector and OligoTech(获自 Oligos etc. Eugene, 俄勒冈州, USA)。选择后,就能够采用 DNA 合成器来合成 ODN。

[0125] 多核苷酸同源物

[0126] 在此处将讨论同源性和同源染料(例如,多核苷酸可以是连接蛋白 mRNA 中序列的补体的同源物),这样的多核苷酸典型地与相关序列例如在(同源序列的)至少约 15、至少约 20、至少约 40、至少约 100 更多的邻近核苷酸上具有至少约 70%的同源性,优选至少约 80%,至少约 90%,至少约 95%,至少约 97%或至少约 99%的同源性。

[0127] 同源性可以基于本领域的任何方法进行计算。例如 UWGCG 软件包提供的 BESTFIT 程序能够用于计算同源性(例如采用其缺省设置)(Devereux et al(1984)Nucleic Acids Research 12,第 387-395 页)。PILEUP 和 BLAST 算法能够用于计算同源性或排列序列(典型地按照其缺省设置),例如按照文献 Altschul S.F. (1993)J MolEvol 36 :290-300 ; Altschul, S,F et al(1990)J Mol Biol 215 :403-10 中的描述进行。

[0128] 实施 BLAST 分析的软件通过国家生物技术信息中心(NationalCenter for Biotechnology Information)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)公开地获得。该算法涉及通过在查询序列中识别长度 W 的短字符串而首先识别高评分序列对(high scoring sequence pair, HSP),当在数据库序列中与相同长度的字符串比对时,该查询序列匹配或满足一些正值(positive-valued)的阈值评分 T。T 被称为比邻字符串评分阈值(neighbourhood word score threshold)(Altschul et al, supra)。这些初始比邻字符串的命中起到开始寻找以发现含有它们的 HSPs 的初始搜索的种子作用。字符串命中在两个方向上沿着每一个序列延伸直至累积比对评分能够增加。当出现以下情况时,字符串命中在每个方向上的延伸停止:当累积比对评分从其达到的最大值下降数量值 X 时;累积评分由于一个或多个负评分残基比对的累积

而接近零或更低时 ;或者其中一个方向的序列达到末端时。

[0129] BLAST 算法参数 W、T 和 X 决定了比对的灵敏度和速度。BLAST 程序采用字符串长度 (W) 作为缺省值, BLOSUM62 评分矩阵 (参见 Henikoff and Henikoff(1992)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919) 比对 (B) 为 50, 期望值 (E) 为 10, $M = 5$, $N = 4$, 和双链对比。

[0130] BLAST 算法对两个序列之间的相似性实施统计分析;参见 Karlin 和 Altschul(1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787。通过 BLAST 算法提供的相似性的一个测量值是最小的总概率 ($P(N)$), 其提供了一个概率指示, 通过这个概率指示会偶然产生两个核苷酸或氨基酸序列之间的匹配。例如, 如果在第一序列与第二序列对比时最小总概率低于约 1, 优选低于约 0.1, 更优选低于约 0.01 且最优选低于约 0.001 时, 这个序列就被认为类似于另一个序列。

[0131] 同源序列典型地不同于相关序列至少约 (或不超过约) 2、5、10、15、20 个之多的突变 (其可以是取代的、缺失的或插入的)。这些突变可以横跨以上所提及的有关计算同源性的任一区域进行测定。

[0132] 同源序列典型地以显著高于背景的水平选择性地杂交到初始序列。选择性杂交典型地是采用中度到高严格度 (如 0.03M 氯化钠和 0.03M 柠檬酸钠在约 50°C 到约 60°C) 的条件下实现的。然而, 这样的杂交可以在本领域已知的任何合适的条件下进行 (参见 Sambrook et al. (1989)Molecular Cloning: A Laboratory Manual)。例如, 如果需要高严格度, 则合适的条件包括在 60°C 下的 $0.2 \times \text{SSC}$ 。如果需要较低的严格度, 合适的条件包括在 60°C 下的 $2 \times \text{SSC}$ 。

[0133] 肽和多肽抗连接蛋白药剂

[0134] 结合蛋白 (包括肽、拟肽、抗体、抗体片断等) 也是合适的间隙连接和半通道的调控子。

[0135] 例如, 结合蛋白包括单克隆抗体、多克隆抗体、抗体片断 (包括, 例如, Fab, $F(ab')_2$ 和 Fv 片断; 单链抗体; 单链 Fv; 以及单链结合分子, 例如那些含有如结合域、铰链、CH2 和 CH3 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 (即那一般称为表位的分子部分) 的抗体片断。这些结合蛋白, 包括抗体、抗体片断等, 可以是嵌合的或人源化的或另外在待给药的受试者体内形成较少免疫原, 并且可以进行合成、重组生成, 或在表达文库中产生。可以预见任何本领域已知的或未来发现的任何结合分子, 如本文中所指的和 / 或在本领域内更详细地描述的那些。例如, 结合蛋白不仅包括抗体等, 而且也包括配体、受体、拟肽, 或者其它连接到靶 (例如连接蛋白、半通道或相关分子) 的结合片断或分子 (例如, 通过噬菌体展示而产生的)。

[0136] 结合分子一般具有所需的特异性, 包括但不限于结合特异性, 和所需的亲合力。亲合力例如可以是 K_d 大于或等于约 $10^4 M^{-1}$, 大于或等于约 $10^6 M^{-1}$, 大于或等于约 $10^7 M^{-1}$, 大于或等于约 $10^8 M^{-1}$ 。甚至大于约 $10^8 M^{-1}$ 的亲合力也是适合的, 如亲合力等于或大于约 $10^9 M^{-1}$, 约 $10^{10} M^{-1}$, 约 $10^{11} M^{-1}$ 和约 $10^{12} M^{-1}$ 。根据本发明的结合蛋白亲合力采用常规技术能够易于测定, 例如 Scatchard et al, 1949Ann. N. Y. Acad. Sci. 51:660 所描述的。

[0137] 通过使用由亲水性图获得的数据, 已经提出连接蛋白含有四次横跨膜区域 (four-transmembrane-spanning region) 和两个短细胞外环。连接蛋白的第一和第二细

胞外区域的定位通过已报道的产生用于使裂开的间隙连接上的对应表位的免疫组化定位的抗肽抗体而进一步表征。Goodenough D. A. J Cell Biol 107:1817-1824(1988); Meyer R. A., J Cell Biol 119:179-189(1992)。

[0138] 通过邻近的两个细胞的半通道的细胞外域相互“对接”而形成完全的间隙连接通道。干扰这些细胞外域相互作用的试剂能够削弱细胞-与-细胞的通信。已经有关于间隙连接和半通道的肽抑制剂的报道。参见例如 Berthoud, V. M. et al, Am J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 279:L619-L622(2000); Evans, W. H. and Boitano, S. Biochem. Soc. Trans. 29:606-612 以及 De Vriese A. S., et al. Kidney Int. 61:177-185(2001)。据说对应于连接蛋白细胞外环内序列的短肽能抑制细胞之间的通信。Boitano S. and Evans W. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 279:L623-L630(2000)。已经报道了使用肽作为通过在配对异爪蛙卵母细胞中表达的连接蛋白 (Cx) 32 产生的细胞-细胞通道形成的抑制剂。Dahl G, et al, Biophys J 67:1816-1822(1994)。Berthoud, V. M. 和 Seul, K. H., 总结了一些这种结果。Am J, Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 279:L619-L622(2000)。

[0139] 抗连接蛋白药剂包括含有对应于连接蛋白 (例如, 连接蛋白 45、43、26、30、31.1 和 37) 的横跨膜区域 (例如, 1st ~ 4th) 的氨基酸序列的肽。连接蛋白药剂可以包含含有对应于连接蛋白 45 的部分横跨膜区域的氨基酸序列的肽。抗连接蛋白药剂包括具有含 SEQ. ID. NO:13 的约 5 至 20 个邻接氨基酸的氨基酸序列的肽, 具有含 SEQ. ID. NO:13 的约 8 至 15 个邻接氨基酸的氨基酸序列的肽, 或具有含 SEQ. ID. NO:13 的约 11 至 13 个邻接氨基酸的氨基酸序列的肽。其他实施方式涉及的抗连接蛋白药剂是具有含 SEQ. ID. NO:13 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 个邻接氨基酸的氨基酸序列的肽。在本文中提供的某些抗连接蛋白药剂中, 对应于 SEQ. ID. NO:13 的 46-75 和 199-228 位置处的氨基酸的连接蛋白 45 的细胞外域可以用于产生特定的肽序列。本文中描述的某些肽序列具有对应于 SEQ. ID. NO:13 的 46-75 和 199-228 位置处的区域的氨基酸序列。该肽不需要具有与 SEQ. ID. NO:13 的那些部分完全相同的氨基酸序列, 且保守氨基酸可以变化, 以使得肽保存结合活性或功能活性。可替代地, 该肽可以靶向该连接蛋白的区域而不是细胞外域 (例如, 不对应于位置 46-75 和 199-228 的 SEQ. ID. NO:13 的部分)。

[0140] 而且, 合适的抗连接蛋白药剂包含的肽含有对应于连接蛋白 43 的部分跨膜区域。抗连接蛋白药剂包括具有含 SEQ. ID. NO:14 的约 5 至 20 个邻接氨基酸的氨基酸序列的肽, 具有含 SEQ. ID. NO:14 的约 8 至 15 个邻接氨基酸的氨基酸序列的肽, 或具有一个含 SEQ. ID. NO:14 约 11 至 13 个邻接氨基酸的氨基酸序列的肽。其他抗连接蛋白药剂包括具有含 SEQ. ID. NO:14 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 个邻接氨基酸的氨基酸序列的肽。其它抗连接蛋白药剂含有对应于 SEQ. ID. NO:14 的 37-76 和 178-208 位置处的氨基酸的连接蛋白 43 的细胞外域。抗连接蛋白药剂包括本文中描述的肽, 具有对应于 SEQ. ID. NO:14 的 37-76 和 178-208 位置处的区域的氨基酸序列。该肽不需要具有与 SEQ. ID. NO:14 的那些部分完全相同的氨基酸序列, 且保守氨基酸可以变化, 以使得肽保存结合活性或功能活性。可替代地, 该肽可以靶向该连接蛋白蛋白质的区域而不是细胞外域 (例如, 不对应于位置 37-76 和 178-208 的 SEQ. ID. NO:14 的部分)。

[0141] 连接蛋白 45 (SEO ID NO. 13)

[0142] Met Ser Trp Ser Phe Leu Thr Arg Leu Leu Glu Glu Ile His Asn His

[0143] 1 5 10 15

[0144] Ser Thr Phe Val Gly Lys Ile Trp Leu Thr Val Leu Ile Val Phe Arg

[0145] 20 25 30

[0146] Ile Val Leu Thr Ala Val Gly Gly Glu Ser Ile Tyr Tyr Asp Glu Gln

[0147] 35 40 45

[0148] Ser Lys Phe Val Cys Asn Thr Glu Gln Pro Gly Cys Glu Asn Val Cys

[0149] 50 55 60

[0150] Tyr Asp Ala Phe Ala Pro Leu Ser His Val Arg Phe Trp Val Phe Gln

[0151] 65 70 75 80

[0152] Ile Ile Leu Val Ala Thr Pro Ser Val Met Tyr Leu Gly Tyr Ala Ile

[0153] 85 90 95

[0154] His Lys Ile Ala Lys Met Glu His Gly Glu Ala Asp Lys Lys Ala Ala

[0155] 100 105 110

[0156] Arg Ser Lys Pro Tyr Ala Met Arg Trp Lys Gln His Arg Ala Leu Glu

[0157] 115 120 125

[0158] Glu Thr Glu Glu Asp Asn Glu Glu Asp Pro Met Met Tyr Pro Glu Met

[0159] 130 135 140

[0160] Glu Leu Glu Ser Asp Lys Glu Asn Lys Glu Gln Ser Gln Pro Lys Pro

[0161] 145 150 155 160

[0162] Lys His AspGly Arg Arg Arg Ile Arg Glu Asp Gly Leu Met Lys Ile

[0163] 165 170 175

[0164] Tyr Val Leu Gln Leu Leu Ala Arg Thr Val Phe Glu Val Gly Phe Leu

[0165] 180 185 190

[0166] Ile Gly Gln Tyr Phe Leu Tyr Gly Phe Gln Val His Pro Phe Tyr Val

[0167] 195 200 205

[0168] Cys Ser Arg Leu Pro Cys Pro His Lys Ile Asp Cys Phe Ile Ser Arg

[0169] 210 215 220

[0170] Pro Thr Glu Lys Thr Ile Phe Leu Leu Ile Met Tyr Gly Val Thr Gly

[0171] 225 230 235 240

[0172] Leu Cys Leu Leu Leu Asn Ile Trp Glu Met Leu His Leu Gly Phe Gly

[0173] 245 250 255

[0174] Thr Ile Arg Asp Ser Leu Asn Ser Lys Arg Arg Glu Leu Glu Asp Pro

[0175] 260 265 270

[0176] Gly Ala Tyr Asn Tyr Pro Phe Thr Trp Asn Thr Pro Ser Ala Pro Pro

[0177] 275 280 285

[0178] Gly Tyr Asn Ile Ala Val Lys Pro Asp Gln Ile Gln Tyr Thr Glu Leu

[0179] 290 295 300

[0180] Ser Asn Ala Lys Ile Ala Tyr Lys Gln Asn Lys Ala Asn Thr Ala Gln
 [0181] 305 310 315 320
 [0182] Glu Gln Gln Tyr Gly Ser His Glu Glu Asn Leu Pro Ala Asp Leu Glu
 [0183] 325 330 335
 [0184] Ala Leu Gln Arg Glu Ile Arg Met Ala Gln Glu Arg Leu Asp Leu Ala
 [0185] 340 345 350
 [0186] Val Gln Ala Tyr Ser His Gln Asn Asn Pro His Gly Pro Arg Glu Lys
 [0187] 355 360 365
 [0188] Lys Ala Lys Val Gly Ser Lys Ala Gly Ser Asn Lys Ser Thr Ala Ser
 [0189] 370 375 380
 [0190] Ser Lys Ser Gly Asp Gly Lys Asn Ser Val Trp Ile
 [0191] 385 390 395
 [0192] 连接蛋白 43 (SEQ ID NO. 14)
 [0193] Met Gly Asp Trp Ser Ala Leu Gly Lys Leu Leu Asp Lys Val Gln Ala
 [0194] 1 5 10 15
 [0195] Tyr Ser Thr Ala Gly Gly Lys Val Trp Leu Ser Val Leu Phe Ile Phe
 [0196] 20 25 30
 [0197] Arg Ile Leu Leu Leu Gly Thr Ala Val Glu Ser Ala Trp Gly Asp Glu
 [0198] 35 40 45
 [0199] Gln Ser Ala Phe Arg Cys Asn Thr Gln Gln Pro Gly Cys Glu Asn Val
 [0200] 50 55 60
 [0201] Cys Tyr Asp Lys Ser Phe Pro Ile Ser His Val Arg Phe Trp Val Leu
 [0202] 65 70 75 80
 [0203] Gln Ile Ile Phe Val Ser Val Pro Thr Leu Leu Tyr Leu Ala His Val
 [0204] 85 90 95
 [0205] Phe Tyr Val Met Arg Lys Glu Glu Lys Leu Asn Lys Lys Glu Glu Glu
 [0206] 100 105 110
 [0207] Leu Lys Val Ala Gln Thr Asp Gly Val Asn Val Asp Met His Leu Lys
 [0208] 115 120 125
 [0209] Gln Ile Glu Ile Lys Lys Phe Lys Tyr Gly Ile Glu Glu His Gly Lys
 [0210] 130 135 140
 [0211] Val Lys Met Arg Gly Gly Leu Leu Arg Thr Tyr Ile Ile Ser Ile Leu
 [0212] 145 150 155 160
 [0213] Phe Lys Ser Ile Phe Glu Val Ala Phe Leu Leu Ile Gln Trp Tyr Ile
 [0214] 165 170 175
 [0215] Tyr Gly Phe Ser Leu Ser Ala Val Tyr Thr Cys Lys Arg Asp Pro Cys
 [0216] 180 185 190
 [0217] Pro His Gln Val Asp Cys Phe Leu Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr Ile
 [0218] 195 200 205

[0219]	Phe Ile Ile Phe Met Leu Val Val Ser Leu Val Ser Leu Ala Leu Asn		
[0220]	210	215	220
[0221]	Ile Ile Glu Leu Phe Tyr Val Phe Phe Lys Gly Val Lys Asp Arg Val		
[0222]	225	230	235 240
[0223]	Lys Gly Lys Ser Asp Pro Tyr His Ala Thr Ser Gly Ala Leu Ser Pro		
[0224]	245	250	255
[0225]	Ala Lys Asp Cys Gly Ser Gln Lys Tyr Ala Tyr Phe Asn Gly Cys Ser		
[0226]	260	265	270
[0227]	Ser Pro Thr Ala Pro Leu Ser Pro Met Ser Pro Pro Gly Tyr Lys Leu		
[0228]	275	280	285
[0229]	Val Thr Gly Asp Arg Asn Asn Ser Ser Cys Arg Asn Tyr Asn Lys Gln		
[0230]	290	295	300
[0231]	Ala Ser Glu Gln Asn Trp Ala Asn Tyr Ser Ala Glu Gln Asn Arg Met		
[0232]	305	3103	15 320
[0233]	Gly Gln Ala Gly Ser Thr Ile Ser Asn Ser His Ala Gln Pro Phe Asp		
[0234]	325	330	335
[0235]	Phe Pro Asp Asp Asn Gln Asn Ser Lys Lys Leu Ala Ala Gly His Glu		
[0236]	340	345	350
[0237]	Leu Gln Pro Leu Ala Ile Val Asp Gln Arg Pro Ser Ser Arg Ala Ser		
[0238]	355	360	365
[0239]	Ser Arg Ala Ser Ser Arg Pro Arg Pro Asp Asp Leu Glu Ile		
[0240]	370	375	380

[0241] 抗连接蛋白肽可以含有对应于含保守氨基酸置换的一部分连接蛋白细胞外域的序列,以使得肽成为功能活性的抗连接蛋白药剂。示例性的保守氨基酸置换包括例如用另一种非极性氨基酸来置换一种非极性氨基酸,用另一种芳香氨基酸来置换一种芳香氨基酸,用另一种脂族氨基酸来置换一种脂族氨基酸,用另一种极性氨基酸来置换一种极性氨基酸,用另一种酸性氨基酸来置换一种酸性氨基酸,用另一种碱性氨基酸来置换一种碱性氨基酸,以及用另一种可离子化的氨基酸来置换一种可离子化的氨基酸。

[0242] 靶向于连接蛋白 43 的示例性肽如下表 2 中所示。M1、2、3 和 4 分别是指连接蛋白 43 蛋白质的第 1 至第 4 跨膜区域。E1 和 E2 分别是指第一和第二细胞外环。

[0243] 表 2. 细胞之间通信的肽抑制剂 (cx43)

[0244]	FEVAFLLIQWI	3&E2	(SEQ. ID. NO :15)
[0245]	LLIQWYIGFSL	E2	(SEQ. ID. NO :16)
[0246]	SLSAVYTCKRDPCPHQ	E2	(SEQ. ID. NO :17)
[0247]	VDCFLSRPTEKT	E2	(SEQ. ID. NO :18)
[0248]	SRPTEKTIFII	E2&M4	(SEQ. ID. NO :19)
[0249]	LGTAVESAWGDEQ	M1&E1	(SEQ. ID. NO :20)
[0250]	QSAFRCNTQQPG	E1	(SEQ. ID. NO :21)
[0251]	QQPGCENVCYDK	E1	(SEQ. ID. NO :22)

[0252] 表 3 提供了用于抑制半通道或间隙连接功能的其他示例性连接蛋白肽。在其它实施方式中,对肽或其片断作出了保守氨基酸的变化。

[0253] 表 3. 其他的胞间通信的肽抑制剂 (cx32、cx43)

[0254] 连接蛋白 位置 AA' s 和序列

[0255] AAESVWGDEIKSSFICNTLQPGCNSVCYDHFFPIS (SEQ. ID. NO :24)

[0256] Cx32 E1 39-77

[0257] HVR

[0258] Cx32 E1 41-52 ESWWGDEKSSFI (SEQ. ID. NO :25)

[0259] Cx32 E1 52-63 ICNTLQPGCNSV (SEQ. ID. NO :26)

[0260] Cx32 E1 62-73 SVCYDHFFPISH (SEQ. ID, NO :27)

[0261] Cx32 E2 64-188 RLVKCEAFPCPNTVDCFVSRPTEKT (SEQ. ID, NO :28)

[0262] Cx32 E2 166-177 VKCEAFPCPNTV (SEQ. ID. NO :29)

[0263] Cx32 E2 177-188 VDCFVSRPTEKT (SEQ. ID. NO :30)

[0264] Cx32 E1 63-75 VCYDHFFPISHVR (SEQ. ID. NO :31)

[0265] Cx32 E1 45-59 VWGDEKSSFIICNTLQPGY (SEQ. ID. NO :32)

[0266] Cx32 E1 46-59 DEKSSFIICNTLQPGY (SEQ. ID. NO :33)

[0267] Cx32 E2 182-192 SRPTEKTVFTV (SEQ. ID. NO :34)

[0268] E2 182-188/ (SEQ. ID. NO :35)

[0269] Cx32/Cx43 SRPTEKT

[0270] 201-207

[0271] Cx32 E1 52-63 ICNTLQPGCNSV (SEQ. ID. NO :36)

[0272] Cx40 E2 177-192 FLDTLHVCRRSPCPHP (SEQ. ID. NO :37)

[0273] Cx43 E2 188-205 KRDPCHQVDCFLSRPTEK (SEQ. ID. NO :38)

[0274] 表 4 提供了用于培养如本文中所述的肽抑制剂的连接蛋白家族成员的细胞外环。这些肽和表 4 中提供的,及其片断,在某些非限制性实施方式中都用作肽抑制剂。在其它非限制性实施方式中,含有约 8~约 15 或约 11~约 13 个表 4 中的肽的邻接氨基酸的肽是肽抑制剂。可对该肽或其片断进行保守氨基酸变化。

[0275] 表 4 各种连接蛋白家族成员的细胞外环

[0276] E1

[0277] huCx26 KEVWGDEQADFVCNTLQPGCKNVCYDHYFPISHIR (SEQ. ID. NO :39)

[0278] huCx30 QEVWGDEQEDFVCNTLQPGCKNVCYDHFFPVSHIR (SEQ. ID. NO :40)

[0279] huCx30. 3 EEVWDDEQKDFVCNTKQPGCPNVCYDEFFPVSHVR (SEQ. ID. NO :41)

[0280] huCx31 ERVWGDEQKDFDCNTKQPGCTNVCYDNYFPISNIR (SEQ. ID. NO :42)

[0281] huCx31. 1 ERVWSDDHKDFDCNTRQPGCSNVCFDEFFPVSHVR (SEQ. ID. NO :43)

[0282] huCx32 ESWWGDEKSSFIICNTLQPGCNSVCYDQFFPISHVR (SEQ. ID. NO :44)

[0283] huCx36 ESWWGDEQSDFECNTAQP GCTNVCYDQAFPI SHIR (SEQ. ID. NO :45)

[0284] huCx37 ESWWGDEQSDFECNTAQP GCTNVCYDQAFPI SHIR (SEQ. ID. NO :46)

[0285] huCx40. 1 RPVYQDEQERFVCNTLQPGCANVCYDVFSVSHLR (SEQ. ID. NO :47)

[0286] huCx43 ESAWGDEQSAFRCNTQQPGCENVCYDKSFPI SHVR (SEQ. ID. NO :48)

[0287]	huCx46	EDVWGDEQSDFTCNTQQPGCBNVCYBRAFPISHIR	(SEQ. ID. NO :49)
[0288]	huCx46. 6	EAIYSDEQAKFTCNTRQPGCDNVCYDAFAPLSHVR	(SEQ. ID. NO :50)
[0289]	huCx40	ESSWGDEQADFRCDTIQPGCQNVCTDQAFPI SHIR	(SEQ. ID. NO :51)
[0290]	huCx45	GESIYYDEQSKFVCNTEQPGCENVCYDAFAPLSHVR	(SEQ. ID. NO :52)
[0291]	E2		
[0292]	huCx26	MYVFYVMYDGFMSQRLVKCNAWPCPNTVDCFVSRPTEKT	(SEQ. ID. NO :53)
[0293]	huCx30	MYVFYFLYNGYHLPWVLKCGIDPCPNLVDCFISRPTTEKT	(SEQ. ID. NO :54)
[0294]	huCx30. 3	LYIFHRLYKDYDMPRVVACSVPCPHTVDCYISRPTTEKK	(SEQ. ID. NO :55)
[0295]	huCx31	LYLLHTLWHGFNMPRLVQCANVAPCPNIVDCYIARPTEKK	(SEQ. ID. NO :56)
[0296]	huCx31. 1	LYVFHSFYPKYILPPVVKHADPCPNIVDCFISKPSEKN	(SEQ. ID. NO :57)
[0297]	huCx32	MYVFYLLYPGYAMVRLVKCDVYPCPNTVDCFVSRPTEKT	SEQ. ID. NO :58)
[0298]	huCx36	LYGWTMEPVFVCQRAPCPYLVDVCFVSRPTEKT	(SEQ. ID. NO :59)
[0299]	huCx37	LYGWTMEPVFVCQRAPCPYLVDVCFVSRPTEKT	(SEQ. ID. NO :60)
[0300]	huCx40. 1	GALHYFLFGFLAPKKFPCTRPCTGVVDCYVSRPTS	(SEQ. ID. NO :61)
[0301]	huCx43	LLIQWYIYGFSLSAVYTCKRDPCPHQVDCFLSRPTEKT	(SEQ. ID. NO :62)
[0302]	huCx46	IAGQYFLYGFELKPLYRCRWPCPNTVDCFISRPTTEKT	(SEQ. ID. NO :63)
[0303]	huCx46. 6	LVGQYLLYGFVVRPFPCSRQPCPHVVDVCFVSRPTEKT	(SEQ. ID. NO :64)
[0304]	huCx40	IVGQYFIYGIFLTTLHVCRRSPCPHPVNCYVSRPTEKN	(SEQ. ID. NO :65)
[0305]	huCx45	LIGQYFLYGFQVHPFYVCSRLPCHPKIDCFISRPTTEKT	(SEQ. ID. NO :66)

[0306] 表 4 提供了用于培养肽抗连接蛋白药剂的连接蛋白家族成员的细胞外域。这些肽和表 4 中提供的, 及其片断, 也可以用作肽抗连接蛋白药剂。在该表 5 中, 这种肽可以含有该肽序列的约 8 ~ 约 15 或约 11 ~ 约 13 个氨基邻接氨基酸。对该肽或其片断可以作出保守氨基酸变化。

[0307] 表 5. 细胞外域

[0308]	肽	VDCFLSRPTEKT (SEQ. ID. NO :18)
[0309]	肽	SRPTEKTIFII (SEQ. ID. NO :19)
[0310]	huCx43	LLIQWYIYGFSLSAVYTCKRDPCPHQVDCFLSRPTEKTIFII (SEQ. ID. NO :67)
[0311]	huCx26	MYVFYVMYDGFMSQRLVKCNAWPCPNTVDCFVSRPTEKTVFTV (SEQ. ID. NO :68)
[0312]	huCx30	YVFYFLYNGYHLPWVLKCGIDPCPNLVDCFISRPTTEKTVFTI (SEQ. ID. NO :69)
[0313]	huCx30. 3	LYIFHRLYKDYDMPRVVACSVPCPHTVDCYISRPTTEKKVFTY (SEQ. ID. NO :70)
[0314]	huCx31	LYLLHTLWHGFNMPRLVQCANVAPCPNIVDCYIARPTEKKTY (SEQ. ID. NO :71)
[0315]	huCx31. 1	LYVFHSFYPKYILPPVVKHADPCPNIVDCFISKPSEKNIFTL (SEQ. ID. NO :72)
[0316]	huCx32	MYVFYLLYPGYAMVRLVKCDVYPCPNTVDCFVSRPTEKTVFTV (SEQ. ID. NO :73)
[0317]	huCx36	LYGWTMEPVFVCQRAPCPYLVDVCFVSRPTEKTIFII (SEQ. ID. NO :74)
[0318]	huCx37	LYGWTMEPVFVCQRAPCPYLVDVCFVSRPTEKTIFII (SEQ. ID. NO :75)
[0319]	huCx40. 1	GALHYFLFGFLAPKKFPCTRPCTGVVDCYVSRPTEKSLML (SEQ. ID. NO :76)
[0320]	huCx46	IAGQYFLYGFELKPLYRCRWPCPNTVDCFISRPTTEKTIFII (SEQ. ID. NO :77)
[0321]	huCx46. 6	LVGQYLLYGFVVRPFPCSRQPCPHVVDVCFVSRPTEKTVFLL (SEQ. ID. NO :78)
[0322]	huCx40	IVGQYFIYGIFLTTLHVCRRSPCPHPVNCYSRPTEKNVFIV (SEQ. ID. NO :79)

[0323] huCx45 LIGQYFLYGFQVHPFYVCSRLPCHPKIDCFISRPTEKTIFLL (SEQ. ID. NO :80)

[0324] 表 6 提供了参照连接蛋白 40 的细胞外环 (E1 和 E2) 而示出的连接蛋白 40 的肽抑制剂。黑体氨基酸为连接蛋白 40 的跨膜区域。

[0325] 表 6. Cx40 肽抑制剂

[0326] E2

[0327] LGTAAESSWGDEQADFRCDTIQPGCQNVCTDQAFPISHIRFWVLQ (SEQ. ID. NO :94)

[0328] LGTAAESSWGDEQA (SEQ. ID. NO :94)

[0329] DEQADFRCDTIQP (SEQ. ID. NO :94)

[0330] TIQPGCQNVCTDQ (SEQ. ID. NO :94)

[0331] VCTDQAFPISHIR (SEQ. ID. NO :94)

[0332] AFPISHIRFWLQ (SEQ. ID. NO :94)

[0333] E2

[0334] MEVGFIVGQYFIYGIFLTTLHVCRRSPCPHPVNCYVSRPTEKNVFIV (SEQ. ID. NO :94)

[0335] MEVGFIVGQYF (SEQ. ID. NO :94)

[0336] IVGQYFIYGIFL (SEQ. ID. NO :94)

[0337] GIFLTTLHVCRRSP (SEQ. ID. NO :94)

[0338] RRSPCPHPVNCY (SEQ. ID. NO :94)

[0339] VNCYVSRPTEKN (SEQ. ID. NO :94)

[0340] SRPTEKNVFIV (SEQ. ID. NO :94)

[0341] 表 7 提供了参照连接蛋白 45 的细胞外环 (E1 和 E2) 而示出的连接蛋白 45 的肽抑制剂。黑体氨基酸为连接蛋白 45 的跨膜区域。

[0342] 表 7. Cx45 肽抑制剂

[0343] E1

[0344] LTAVGGESIYYDEQSKFVCNTEQPGCENVCYDAFAPLSHVRFWVFQ (SEQ. ID. NO :94)

[0345] LTAVGGESIYYDEQS (SEQ. ID. NO :95)

[0346] DEQSKFVCNTEQP (SEQ. ID. NO :96)

[0347] TEQPGCENVCYDA (SEQ. ID. NO :97)

[0348] VCYDAFAPLSHVR (SEQ. ID. NO :98)

[0349] APLSHVRFWVFQ (SEQ. ID. NO :99)

[0350] E2

[0351] FEVGFLIGQYFLYGFQVHPFYVCSRLPCHPKIDCFISRPTEKTIFLL (SEQ. ID. NO :100)

[0352] FEVGFLIGQYF (SEQ. ID. NO :101)

[0353] LIGQYFLYGFQV (SEQ. ID. NO :102)

[0354] GFQVHPFYVCSRLP (SEQ. ID. NO :103)

[0355] SRLPCHPKIDCF (SEQ. ID. NO :104)

[0356] IDCFISRPTEKT (SEQ. ID. NO :105)

[0357] SRPTEKTIFLL (SEQ. ID. NO :106)

[0358] 在某些实施方式中, 优选某些肽抑制剂阻断半通道而不会破坏现有的间隙连接。尽管不期望受到任何具体理论或机理的束缚, 但是据信某些拟肽 (例如, VCYDKSFPISHVR,

(SEQ. ID. NO :23) 也阻断半通道而不会导致间隙连接解偶联 (参见 Leybeart et al., CellCommun. Adhes. 10 :251-257 (2003)), 或以更低剂量的用量如此发挥效用。肽 SRPTEKTIFII (SEQ. ID. NO :19) 也可以用于, 例如阻断半通道而不使间隙连接解偶联。可以使用肽 SRGGEKNVFIV (SEQ. ID. NO :107) 作为对照序列 (DeVriese et al., Kidney Internat. 61 :177-185 (2002))。连接蛋白 45 肽抑制剂的实例有 YVCSRLPCHP (SEQ. ID. NO :108)、QVHPFYVCSRL (SEQ. ID. NO :109)、FEVGFLIGQYFLY (SEQ. ID. NO :110)、GQYFLYGFQVHP (SEQ. ID. NO :111)、GFQVHPFYVCSR (SEQ. ID. NO :112)、AVGGESIYYDEQ (SEQ. ID. NO :113)、YDEQSKFVCNTE (SEQ. ID. NO :114)、NTEQPGCENVCY (SEQ. ID. NO :115)、CYDAFAPLSHVR (SEQ. ID. NO :116)、FAPLSHVRFWVF (SEQ. ID. NO :117) 和 LIGQY (SEQ. ID. NO :118)、QVHPF (SEQ. ID. NO :119)、YVCSR (SEQ. ID. NO :120)、SRLPC (SEQ. ID. NO :121)、LPCHP (SEQ. ID. NO :122) 和 GESIY (SEQ. ID. NO :123)、YDEQSK (SEQ. ID. NO :124)、SKFVCN (SEQ. ID. NO :125)、TEQPGCEN (SEQ. ID. NO :126)、VCYDAFAP (SEQ. ID. NO :127)、LSHVRFWVFQ (SEQ. ID. NO :128)。该肽的长度可以仅为三个氨基酸, 包括 SRL、PCH、LCP、CHP、IYY、SKF、QPC、VCY、APL、HVR, 或者更长, 例如 :LIQYFLYGFQVHPF (SEQ. ID. NO :129)、VHPFYCSRLPCHP (SEQ. ID. NO :130)、VGGESIYYDEQSKFVCNTEQPG (SEQ. ID. NO :131)、TEQPGCENVCYDAFAPLSHVR (SEQ. ID. NO :132)、AFAPLSHVRFWVFQ (SEQ. ID. NO :133)。

[0359] 表 8

[0360] 表 8A

[0361] 来自 GenBank 登录号为 M65188 (SEQ. ID. NO :134) 的人连接蛋白 43

[0362] 1 ggcttttagc gtgaggaaag taccaaacag cagcggagtt ttaaacttta aatagacagg
[0363] 61 tctgagtgcc tgaacttgcc ttttcatttt acttcactct ccaaggagtt caatcacttg
[0364] 121 gcgtgacttc actactttta agcaaaagag tgggtgccag gcaacatggg tgactggagc
[0365] 181 gccttaggca aactccttga caaggttcaa gcctactcaa ctgctggagg gaaggtgtgg
[0366] 241 ctgtcagtac ttttcatttt ccgaatcctg ctgctgggga cagcggttga gtcagcctgg
[0367] 301 ggagatgagc agtctgcctt tcgttgtaac actcagcaac ctggttgtga aaatgtctgc
[0368] 361 tatgacaagt ctttcccaat ctctcatgtg cgcttctggg tcctgcagat catatttgtg
[0369] 421 tctgtacca cactcttgta cctggctcat gtgttctatg tgatgcgaaa ggaagagaaa
[0370] 481 ctgaacaaga aagaggaaga actcaaggtt gcccaactg atggtgtcaa tgtggacatg
[0371] 541 cacttgaagc agattgagat aaagaagttc aagtacggta ttgaagagca tggtaagggtg
[0372] 601 aaaatgcgag gggggttgct gcgaacctac atcatcagta tcctcttcaa gtctatcttt
[0373] 661 gaggtggcct tcttgctgat ccagtggtag atctatggat tcagcttgag tgctgtttac
[0374] 721 acttgcaaaa gagatccctg cccacatcag gtggactgtt tcctctctcg cccacaggag
[0375] 781 aaaaccatct tcatcatctt catgctggtg gtgtccttgg tgtccctggc cttgaatate
[0376] 841 attgaactct tctatgtttt cttcaagggc gttaaggatc ggggttaaggg aaagagcgac
[0377] 901 ccttaccatg cgaccagtgg tgcgctgagc cctgccaaag actgtgggtc tcaaaaatat
[0378] 961 gcttatttca atggctgctc ctaccaacc gctccctct cgcctatgtc tcctcctggg
[0379] 1021 tacaagctgg ttactggcga cagaaacaat tcttcttggc gcaattacaa caagcaagca
[0380] 1081 agtgagcaaa actgggctaa ttacagtga gaacaaaate gaatggggca ggcgggaagc
[0381] 1141 accatctcta actcccatgc acagcctttt gatttccccg atgataacca gaattctaaa

[0382] 1201 aaactagctg ctggacatga attacagcca ctagccattg tggaccagcg accttcaage
[0383] 1261 agagccagca gtcgtgccag cagcagacct cggcctgatg acctggagat ctag
[0384] 表 8B
[0385] 人连接蛋白 43 (SEQ. ID. NO :135)
[0386] 1 atgggtgactggagcgcctt aggcaaactc cttgacaagg ttcaagccta ctcaactgct
[0387] 61 ggaggggaaggtgtgtgctgtc agtacttttc attttccgaatcctgtgct ggggacagcg
[0388] 121 gttgagtcagcctggggaga tgagcagtct gcctttcggt gtaacactca gcaacctggt
[0389] 181 tgtgaaaatg tctgctatga caagtctttcccaatctctc atgtgcgctt ctgggtcctg
[0390] 241 cagatcatat ttgtgtctgt acccacactcttgtacctgg ctcatgtgttctatgtgatg
[0391] 301 cgaaaggaag agaaactgaa caagaaagag gaagaactca aggttgccca aactgatggt
[0392] 361 gtcaatgttg acatgcactt gaagcagatt gagataaagaagttcaagta cggatttgaa
[0393] 421 gagcatggta aggtgaaaat gcgagggggg ttgctgcgaa cctacatcatcagtatcctc
[0394] 481 ttcaagtcta tctttgaggt ggccttcttg ctgatccagt ggtacatcta tggattcagc
[0395] 541 ttgagtgtg tttacacttg caaaagagat ccctgcccac atcaggtgga ctgtttcctc
[0396] 601 tctcgcccca cggagaaaac catcttcac atcttcatgc tgggtggtgtc cttggtgtcc
[0397] 661 ctggccttga atatcattga actcttctat gttttcttca agggcggttaa ggatcgggtt
[0398] 721 aagggaaga gcgaccctta ccatgcgacc agtggtgcgc tgagccctgc caaagactgt
[0399] 781 ggggtctcaa aatatgctta tttcaatggc tgctcctcac caaccgctcc cctctcgctt
[0400] 841 atgtctctc ctgggtacaa gctggttact ggcgacagaa acaattcttc ttgccgcaat
[0401] 901 tacaacaagc aagcaagtga gcaaaactgg gctaattaca gtgcagaaca aaatcgaatg
[0402] 961 gggcagcgcg gaagcaccat ctctaactcc catgcacagccttttgattt ccccgatgat
[0403] 1021 aaccagaatt ctaaaaaactagctgctgga catgaattac agccactagc cattgtggac
[0404] 1081 cagcgacctt caagcagagc cagcagtcgtgccagcagca gacctcggcctgatgacctg
[0405] 1141 gagatctag

[0406] 治疗剂

[0407] 治疗药剂包括用于治疗伤口或促进伤口愈合的药用药剂,无论该药剂是现有的还是之后开发的。治疗药剂包括例如,抗感染剂、麻醉剂、止痛剂、抗生素、镇静剂以及甾类和非甾类抗炎剂。优选的治疗剂包括局部施用类固醇抗炎剂、抗微生物剂、局部麻醉剂和局部阿片类药。在某些实施方式中,一种、两种、三种、四种、五种或六种治疗药剂可以组合使用。

[0408] 对伤口愈合有用的药剂

[0409] 本文中所用的有利于伤口愈合的药剂包括伤口愈合级联反应的刺激剂、增强剂或正调节剂,其 1) 促进或加速自然伤愈过程或 2) 降低与不正常或延迟伤口愈合有关的影响,这些影响包括,例如有害的发炎、上皮形成、血管形成和基质沉积以及产生疤痕和纤维化。

[0410] 正调节剂、增强剂和刺激剂包括例如,可以刺激、增强、促进或加速(即激活(agonize))伤口愈合或积极伤口愈合过程,或在伤口位置处与伤口愈合有关的生长因子或细胞因子,或激活与伤口愈合有关的生长因子或细胞因子受体的数量、质量或效能的药剂。这样的药剂可以包括例如与伤口愈合有关的生长因子或部分修饰形式的细胞因子或与伤口愈合有关的生长因子或细胞因子。部分修饰形式的细胞因子或与伤口愈合有关的生长因子或细胞因子,比例如与自然伤口愈合有关的生长因子或细胞因子具有更长的半衰期。可

替代地,其可以是与伤口愈合有关的生长因子或细胞因子代谢的抑制剂。

[0411] 这样的药剂的部分修饰可以以加入、缺失或置换氨基酸残基的方式进行。置换可以例如是保守置换。因此,部分修饰的分子可以是该分子衍生的分子的同源物。它与其所衍生的分子可以具有至少约 40%,例如约 50、60、70、80、90 或 95%的同源性。

[0412] 如本文所用的对伤口愈合有用的药剂可以包括例如,本领域现在已知的或未来开发的伤口治疗药征的促进伤口愈合或减少疤痕的药剂;包括促进伤口愈合的天然或合成生长因子、细胞因子或其调节剂的示例性因子、药剂或药征、促进伤口愈合的生物工程基质、敷料绷带等。合适的实例可以包括但不限于 1) 局部施用或敷裹以及相关治疗和清创药剂(例如**Santyl®**胶原酶)和**Iodosorb®**(卡地姆碘);2) 抗微生物剂,包括系统的或局部的霜剂或凝胶,包括例如含银药剂如 SAG(银抗微生物凝胶),(CollaGUARD(TM),Innocoll, Inc)(纯化的 I 型胶原蛋白基的敷料)、CollaGUARD Ag(用于已感染的伤口或具有感染风险的伤口的浸润银的胶原-基生物活性敷料)、DermaSIL(TM)(胶原-合成泡沫组合物敷料,用于深度或重度渗出的伤口);3) 细胞疗法或生物工程皮肤、皮肤替代品和皮肤等价物,包括例如, Dermograft(分泌细胞因子和生长因子的人成纤维细胞的 3- 维基质培养物)、**Apligraf®**(人角化细胞和成纤维细胞)、**Graftskin®**(组织学上类似于正常皮肤并产生类似于正常皮肤生成的那些生长因子的双层上皮细胞和成纤维细胞)、TransCyte(人成纤维细胞衍生的临时皮肤替代品)和**Oasis®**(一种含有生长因子和细胞外基质组分如胶原、蛋白聚糖和糖胺聚糖的活性生物材料);4) 引入到伤口而促进伤口愈合的细胞因子、生长因子或激素(天然的和合成的),包括例如 NGF、NT3、BDGF、整联蛋白、纤溶酶、信号素、血液衍生长因子、角化细胞生长因子、组织生长因子、TGF- α 、TGF- β 、PDGF(可以使用三个亚型中的一种或多种:AA、AB 和 B)、PDGF-BB、TGF- β 3、调节 TGF β 3、TGF β 1 和 TGF β 2 相对水平的因子(例如甘露糖-6 磷酸)、性甾体,包括例如雌激素、雌二醇或选自由乙炔雌二醇、己二烯雌酚、炔雌醇甲醚、雌二醇、雌三醇、共轭雌激素、硫酸雌酮哌嗪盐、己烯雌酚、磷酸雌酚四钠盐、聚磷酸雌二醇、替勃龙、植物雌激素、17- β -雌二醇组成的组的雌激素受体激动剂;胸腺激素,如胸腺素- β 4、EGF、HB-EGF、成纤维细胞生长因子(例如 FGF1、FGF2、FGF7)、角化细胞生长因子、TNF、炎性应答调节剂的白介素家族例如 IL-10、IL-1、IL-2、IL-6、IL-8 和 IL-10 及其调节剂;INF 类(INF- α 、INF- β 和 INF- δ);活化素或抑制素的刺激剂,以及干扰素 γ 、前列腺素 E2(PGE2)的抑制剂和 3',5'-环一磷酸腺苷(cAMP)介质的抑制剂;腺苷 A1 激动剂、腺苷 A2 激动剂,或 5) 其它有利于伤口愈合的药剂,包括例如天然的或合成的同源物、VEGF、VEGFA、IGF 的激动剂和拮抗剂;IGF-1、致炎细胞因子、GM-CSF 和致轻素(或来普汀, leptin),和 6) IGF-1 和 KGF cDNA,自体血小板凝胶、次氯酸(**Sterilox®**硫辛酸、一氧化氮合酶 3、基质金属蛋白酶 9(MMP-9)、CCT-ETA、 α v β 6 整联蛋白、生长因子预处理的成纤维细胞(growthfactor-primed fibroblast)和核心蛋白多糖,含银的伤口敷料、Xenaderm™、木瓜蛋白酶伤口清创剂、乳铁蛋白、P 物质、胶原和银-ORC、胎盘碱性磷酸酶或胎盘生长因子、hedgehog 信号的调节剂、胆固醇合成路径调制剂、以及 APC(激活蛋白 C)、角化细胞生长因子、TNF、血栓素 A2、NGF、BMP 骨形态生成蛋白、CTGF(结缔组织生长因子)、伤口愈合趋化因子、核心蛋白多糖、乳酸盐诱导新血管形成的调制剂、鱼肝油、胎盘碱性磷酸酶或胎盘生长因子、和胸腺素 β 4。在某些实施方式中,一种、两种、三种、四种、五种或六种有利于伤口愈合的药剂可以组合使用。

[0413] 应该理解,以上有利于伤口愈合的药剂(包括例如生长因子和细胞因子)包含所有天然存在的多形体(polymorph)(例如,生长因子或细胞因子的多形体)。而且,功能片断、含有有利于伤口愈合的所述药剂之一的嵌合体蛋白或其功能片断、通过伤口愈合剂的一种或多种氨基酸的类似物置换获得的同源物以及物种同源物都被包含在内。可以设想,有利于伤口愈合的一种或多种药剂可以是重组 DNA 技术的产物,且一种或多种有利于伤口愈合的药剂可以是转基因技术的产物。例如,可以以重组 PDGF 或含有 PDGF 编码序列的基因疗法载体的形式提供血小板源性生长因子。

[0414] 片断或其部分修饰形式是指保留该因子生物功能或伤口愈合功能的伤口愈合药剂的片段或部分修饰的形式,但是当然其也可以具有其它功能。部分修饰可以例如通过插入、缺失或置换氨基酸残基的方式。例如,置换可以是保守置换。因此,部分修饰的分子可以是伤口愈合药剂的同源物。它们与所述因子可以例如具有至少约 40% 的同源性。它们与所述因子可以例如具有至少约 50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 的同源性。例如,在某些实施方式中,IL-10 或其片段或部分修饰形式可以以约 1 μ M 至约 10 μ M 的浓度给药。其可以以约 2.5 μ M 至约 5 μ M 的浓度给药。在某些其它实施方式中,IL-10 或其片段或部分修饰形式可以在伤口愈合之前立即给药,但是在受伤约 7 日内给药可以是有效的。其能够在至少两个时机给药。

[0415] 间隙连接修饰剂

[0416] 本文中所使用的“间隙连接修饰剂”可以广义地包括整体上或部分地预防、降低或调节半通道或间隙连接活性、功能或形成的那些药剂或化合物。

[0417] 在其它实施方式中,间隙连接修饰剂整体上或部分地预防或降低半通道或间隙连接的形成或活性。

[0418] 在某些实施方式中,间隙连接修饰剂在整体上或部分地诱导半通道或间隙连接的关闭。在其它实施方式中,间隙连接修饰剂整体上或部分地阻断半通道或间隙连接。在某些实施方式中,间隙连接修饰剂整体上或部分地降低或防止半通道或间隙连接的开启。

[0419] 在某些实施方式中,通过间隙连接修饰剂阻断或关闭间隙连接或半通道能够通过防止或降低小分子流动通过开启的通道进出细胞外或周质空间而减少或抑制细胞外半通道的通信。

[0420] 在某些实施方式中,间隙连接修饰剂防止、降低或改变连接蛋白、半通道或间隙连接的活性或功能。如本文中所使用的,间隙连接活性或功能的修饰可以包括间隙连接的开启或关闭,连接半通道的开启或关闭,和 / 或分子或离子通过间隙连接的通行。

[0421] 在某另一方面,间隙连接修饰剂可以包括例如,脂族醇;辛醇、庚醇;麻醉剂(例如氟罗生)、安氟醚(ethrane)、氟烷、异丙酚和硫喷妥钠(thiopental);内源性大麻素(anandamide);芳基氨基苯甲酸酯(arylaminobenzoate)(FFA:氟芬那酸及其亲脂性类似衍生物);甘珀酸;查耳酮:(2',5'-二羟基查耳酮);CHF 类(氯代羟基呋喃酮,Chlorohydroxyfuranone);CMF 类(3-氯-4-(氯甲基)-5-羟基-2(5H)-呋喃酮);地塞米松;阿霉素(以及其它蒽醌衍生物);类花生酸血栓素 A(2)(TXA(2))模拟物;NO(一氧化氮);脂肪酸(例如,花生四烯酸、油酸和脂肪氧合酶代谢物);芬那酯(Fenamate)(氟芬那酸(FFA)、氮氟灭酸(NFA)和甲氯芬那酸(MFA));染料木黄酮;乌拉尔甘草次酸(GA):18 α -乌拉尔甘草次酸和 18- β -乌拉尔甘草次酸及其衍生物;林旦(lindane);溶血磷脂酸;甲氟

喹；甲萘醌；2-甲基-1,4-萘醌，维生素 K(3)；纳芬诺平；冈田酸；油酰胺；油酸；PH，通过细胞内酸化作用控制；例如酸化剂；多不饱和脂肪酸；脂肪酸 GJIC 抑制剂（例如，油酸和花生四烯酸）；奎尼丁；奎宁；所有反式视黄酸；以及他莫昔芬。

[0422] 用于改变间隙连接功能的示例性化合物（例如，间隙连接阻断剂、间隙连接蛋白磷酸化和去磷酸化剂）先前已经由文献报道，参见 Jensen et al.，美国专利第 7,153,822 号，参见 Larsen et al.，美国专利第 7,250,397 号，Gourdie et al.，参见 W02006069181，以及 Tudoret al.，参见 W02003032964 和其它配合的公开专利申请。

[0423] 本文中所使用的“间隙连接磷酸化剂”或“间隙连接去磷酸化剂”可以包括那些能够诱导连接蛋白残基上的磷酸化或去磷酸化作用的试剂或化合物。磷酸化或去磷酸化的典型位置包括连接蛋白上的一个或多个酪氨酸、丝氨酸或苏氨酸残基。在某些实施方式中，磷酸化的调节可以出现在一种或多种连接蛋白蛋白质上的一个或多个残基上。典型的间隙连接磷酸化或去磷酸化剂在本领域是公知的，可以包括例如，c-Src 酪氨酸激酶或其它 G 蛋白-偶联受体激动剂。参见 Giepmans B, J. Biol. Chem., Vol. 276, Issue 11, 8544-8549, 2001 年 3 月 16 日。在一种实施方式中，在一个或多个这些残基上的磷酸化调节作用影响半通道的功能，尤其是通过关闭半通道。在另一实施方式中，在一个或多个这些残基上的磷酸化调节作用影响间隙连接功能，尤其是通过关闭间隙连接。

[0424] 剂型和制剂以及给药

[0425] 治疗有效量的每一种组合成分（例如抗连接蛋白药剂和伤口愈合治疗剂）可以同时给药、分开给药或按序给药和以任何顺序依序给药。药剂可以分开给药或作为固定的组合给药。当不是以固定的组合给药时，优选的方法包括依序给予一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种对伤口愈合有用的药剂，其中的一者或二者都以低于该药剂或该些药剂单独使用时所用用量或剂量（即当它们既不进行物理组合也不在治疗伤口疗程中组合给药时）来提供。这种降低的给药剂量通常地为其单独给药时所用的药剂用量或剂量的约十二分之一到约十分之一，且可以为约八分之一的剂量，约六分之一的剂量，约五分之一的剂量，约四分之一的剂量，约三分之一的剂量和约一半的剂量给药。优选地，药剂在彼此间隔至少约半小时的时间内按序给药。该药剂也可以在彼此间隔约 1 小时内、彼此间隔约一天到约一个星期或者以其它认为合适的方式来给药。优选首先给予抗连接蛋白药剂。在使用一种或多种抗连接蛋白药剂处，优选在给予阻断或降低连接蛋白表达或半通道或间隙连接形成（例如通过下调连接蛋白蛋白质表达）的抗连接蛋白药剂之前给予抗连接蛋白肽或抗连接蛋白拟肽，例如能够阻断或降低半通道开放的抗连接蛋白药剂。优选地，该抗连接蛋白药剂是（一种或多种）抗连接蛋白 43 药剂。

[0426] 本发明的药剂可以向需要治疗的受试者（如患有本文中提及的任何疾病或病症的受试者）给药。该受试者的病状由此而能够改善。抗连接蛋白药剂及其组合的成分由此可以用于通过疗法治疗受试者的身体。它们可以用于生产治疗本文中所提及的任何病症的药品。因此，根据本发明，提供了制剂，通过该制剂能够以瞬时性和位点特异性的方式下调细胞间的通信。

[0427] 抗连接蛋白药剂可以以基本分离的形式存在。应该理解，产品可以与不会影响该产品所需目的的载体或稀释剂混合而仍然被认为是基本分离的。本发明的产品也可以是基本纯化的形式，在这种情况下，其一般会含有约 90%，例如至少约 95%，至少约 98% 或至少

约 99% 的多核苷酸（或其它抗连接蛋白药剂）或干物质的制剂。

[0428] 根据所给药的所需路径，本发明的药物产品、药物组合物、组合制剂和药品可以例如，采用溶液、混悬液、滴剂、药膏、霜剂、凝胶剂、泡沫剂、软膏剂、乳液、洗剂、敷料、持续释放制剂或粉末的形式，且典型地含有约 0.1%～95% 的活性成分，优选约 0.2%～70%。其它合适的制剂包括普流尼克 (Pluronic) 凝胶基的制剂、羧甲基纤维素 (CMC) 基的制剂和羟丙基甲基纤维素 (HPMC) 基的制剂。其它有用的制剂包括慢释或缓释制剂。

[0429] 凝胶或凝胶剂的生产可以采用合适的胶凝剂，包括但不限于明胶、黄芩胶或纤维素衍生物，并且可以含有作为润湿剂、柔润剂和防腐剂的甘油。柔润剂是半固体制剂，其含有引入到脂肪状、蜡状或合成的基础物中的活性成分。适合的霜剂实例包括但不限于，油包水和水包油的乳液。油包水霜剂可以通过采用具有类似于但不限于脂肪醇（如十六醇或十六十八混合醇）和乳化蜡性质的适合的乳化剂来配制。水包油霜剂可以采用诸如聚乙二醇单鲸蜡基醚乳化蜡 (cetomacrogol emulsifying wax) 的乳化剂来配制。适合的性质包括能够改善乳液粘度和在较宽的 pH 范围内的物理化学稳定性的能力。可溶于水或可溶混的霜剂基质可以含有防腐剂体系，而且可以被缓冲而维持可接受的生理 pH。

[0430] 泡沫制剂可以配制成利用惰性推进剂从加压气溶胶容器经由适合的施加器进行递送。泡沫基质制剂的合适赋形剂包括但不限于，丙二醇、乳化蜡、十六醇和硬脂酸甘油酯。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。

[0431] 优选本发明的药剂与药用载体或稀释剂混合而产生药物组合物。合适的载体和稀释剂包括等渗盐溶液，例如磷酸盐缓冲盐水。合适的稀释剂和赋形剂还包括例如，水、盐水、葡萄糖、甘油等，以及它们的组合。另外，如果需要，也可以存在诸如润湿剂或乳化剂、稳定剂或 pH 缓冲剂的物质。

[0432] 术语“药用载体”是指其自身不会诱导对个体接受该组合物有害的抗体生成，且在给药时不会产生异常毒性的任何药物载体。合适的载体能够是大的代谢缓慢的大分子，如蛋白质、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、多聚氨基酸和氨基酸共聚物。

[0433] 也可存在药用盐，例如无机酸盐，如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐等；以及有机酸的盐，如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐、苯甲酸盐等。

[0434] 适合的载体材料包括常用作霜剂、洗剂、凝胶剂、乳剂、局部给药的洗剂或涂布剂的基础物质的任何载体或赋形剂。实例包括乳化剂，包括烃类基础物质、乳化基础物质、无毒溶剂或水溶性基础物质的惰性载体。特别适合的实例包括普流尼克、HPMC、CMC 和其它纤维素基的成分、羊毛脂、固体石蜡、液状石蜡、软黄石蜡或软白石蜡、白蜂蜡、黄蜂蜡、十六十八混合醇、十六醇、二甲基硅油、乳化蜡、肉豆蔻酸异丙酯、微晶蜡、油醇和硬脂醇。

[0435] 优选地，该药用载体或赋形剂是凝胶，适合凝胶的是非离子聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物凝胶，例如，普流尼克（或聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物，Pluronic）凝胶，优选 Pluronic F-127 (BASF Corp.)。特别优选这种凝胶，因为其在低温下是液体但在生理温度下迅速固化，这将药剂的释放限定于施用位置或其紧邻的位置。

[0436] 助剂如酪蛋白、明胶、白蛋白、粘胶剂、藻蛋白酸钠、羧甲基纤维素、甲基纤维素、羟乙基纤维素或聚乙烯醇也可以包含在本发明的制剂中。

[0437] 其它适合的制剂包括普流尼克凝胶基的制剂、羧甲基纤维素 (CMC) 基的制剂和羟丙基甲基纤维素 (HPMC) 基的制剂。该组合物可以根据任何所需的递送形式进行配制，包括

局部给药、滴注给药、肠胃外给药、肌肉给药、皮下给药或经皮肤给药。其它有用的制剂包括缓释或延释制剂。

[0438] 在抗连接蛋白药剂是核酸的情况下,如多核苷酸,哺乳动物细胞对核酸的摄取通过几种已知的转染技术(例如那些包括使用转染剂的技术)而得到增强。这样的技术可以与某些抗连接蛋白药剂,包括多核苷酸一起使用。所给药的制剂可以含有这种转染剂。这些试剂的实例包括阳离子剂(例如,磷酸钙和 DEAE-葡聚糖)和脂质体剂(lipofectant)(例如, lipofectam™ 和 transfectam™),以及表面活性剂。

[0439] 在抗连接蛋白药剂含有多核苷酸的情况下,该制剂方便地进一步包含表面活性剂辅以多核苷酸细胞渗透,或该制剂可以含有任何适合的填充剂。可以包含任何合适的无毒表面活性剂,如 DMSO。可替代地,也可以包含经皮肤渗透剂(如豚)。

[0440] 对于既定的受试者或病症的有效剂量能够通过常规的实验或本领域已知的其它方法或未来开发的方法来确定。例如,为了配制一定范围的剂量值,可以利用细胞培养分析和动物试验研究。这样的化合物的剂量优选在对于至少 50% 人群治疗有效的剂量的剂量范围内,并且在该水平表现出低毒性或无毒性。

[0441] 本发明的方法和组合物中采用的每一种抗连接蛋白药剂的有效剂量可以根据许多因素而变化,这些因素包括所采用的(一种或多种)特定抗连接蛋白药剂、组合成分、给药模式、给药频率、所治疗的病症、所治疗病症的严重程度、给药途径、待治疗患者亚群的需要或个体患者的需要,由于年龄、性别、体重、对患者特异性的相关医疗条件而具有不同的需要。

[0442] 给予患者的抗连接蛋白药剂的剂量取决于各种因素,例如年龄,体重和患者的一般条件,正在治疗的病症,以及给予的具体抗连接蛋白药剂。

[0443] 适合的剂量可以为约 0.001 至约 100mg/kg 体重,如约 0.01 至约 40mg/kg 体重。然而,合适的剂量为约 0.001 至约 0.1mg/kg 体重,如约 0.01 至约 0.050mg/kg 体重。约 1 至 100、200、300、400 和 500 微克的剂量也是合适的。

[0444] 例如,在某些实施方式中,抗连接蛋白药剂组合物可以以约 0.01 微摩(μM)或 0.05 μM 至约 200 μM 的终浓度施用于治疗部位和/或邻近的治疗位置。优选地,反义多核苷酸组合物以约 0.05 μM 至约 100 μM 的终浓度施用,更优选地,抗连接蛋白药剂组合物以约 1.0 μM 至约 50 μM 的终浓度施用,且更优选地,抗连接蛋白药剂组合物以约 5 至 10 μM 到约 30 至 50 μM 的终浓度施用。另外,组合的抗连接蛋白药剂组合物以约 8 μM 至约 20 μM 的终浓度施用,且可替代地,抗连接蛋白药剂组合物以约 10 μM 至约 20 μM 的终浓度或以约 10 至约 15 μM 的终浓度施用。在某些其它实施方式中,抗连接蛋白药剂以约 10 μM 的终浓度施用。在另一实施方式中,该抗连接蛋白药剂组合物以约 1 至 15 μM 的终浓度施用。抗连接蛋白药剂的剂量包括例如,约 0.1 ~ 1、1 ~ 2、2 ~ 3、3 ~ 4 或 4 ~ 5 微克(μg),约 5 ~ 约 10 μg ,约 10 ~ 约 15 μg ,约 15 ~ 约 20 μg ,约 20 ~ 约 30 μg ,约 30 ~ 约 40 μg ,约 40 ~ 约 50 μg ,约 50 ~ 约 75 μg ,约 75 ~ 约 100 μg ,约 100 ~ 约 250 μg ,和约 250 ~ 约 500 μg 。如上文所述,还提供了 0.5 ~ 约 1.0mg 或更多的剂量用量。剂量体积取决于待治疗位置的尺寸,例如可以为约 25 ~ 100 μL 到约 100 ~ 200 μL ,约 200 ~ 500 μL 到约 500 ~ 1000 μL 的范围。对于更大的治疗部位,毫升剂量也是适用的。

[0445] 本文中描述还描述了每天每一所描述试剂约 1 纳克(ng)/kg ~ 约 100mg/kg 体重的其

它剂量水平。在某些实施方式中,每一种主体化合物的剂量一般为约 1ng ~ 约 1 μ g/kg 体重的范围,约 1ng ~ 约 0.1 μ g/kg 体重的范围,约 1ng ~ 约 10ng/kg 体重的范围,约 10ng ~ 约 0.1 μ g/kg 体重的范围,约 0.1 μ g ~ 约 1 μ g/kg 体重的范围,约 20ng ~ 约 100ng/kg 体重的范围,约 0.001mg ~ 约 100mg/kg 体重的范围,约 0.01mg ~ 约 10mg/kg 体重的范围,或约 0.1mg ~ 约 1mg/kg 体重的范围。在某些实施方式中,每一种主体化合物的剂量一般为约 0.001mg ~ 约 0.01mg/kg 体重的范围,约 0.01mg ~ 约 0.1mg/kg 体重的范围,约 0.1mg ~ 约 1mg/kg 体重的范围,约 1mg ~ 约 10mg/kg 体重的范围或约 10mg ~ 约 100mg/kg 体重的范围。如果采用一种以上的抗连接蛋白药剂,则每一种抗连接蛋白的剂量不需要采用与其它药剂相同的范围。例如,一种抗连接蛋白药剂的剂量可以为约 0.01mg ~ 约 10mg/kg 体重,而另一种抗连接蛋白药剂的剂量可以为约 0.1mg ~ 约 1mg/kg 体重。其它用量对于本领域技术人员来说是已知的且易于确定。

[0446] 抗连接蛋白药剂方便地以足以在给药后下调连接蛋白表达或者调节间隙连接形成或连接子打开持续至少约 0.5 ~ 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 小时的用量给药。

[0447] 也可以参照将要施用的有关区域的尺寸、长度、深度、面积或体积的组合物浓度来确定本发明组合物和方法中每一种抗连接蛋白药剂的剂量。例如,在某些局部施用和其它施用(如灌注)方式中,药物组合物的剂量可以基于其在药物组合物中的浓度(例如, μ g/ μ L)或质量(例如,微克)/施用区域的长度、深度、面积或体积进行计算。

[0448] 适用于制备本文中描述的药物组合物且有利于伤口愈合的药剂可以采用本领域已知的方法制备和给药(参见,例如美国专利 7,098,190、6,319,907、6,331,298、6,387,364、6,455,569、6,566,339、6,696,433、6,855,505、6,900,181、7,052,684 和 EP 1100529 B1)。有利于伤口愈合的每一种抗连接蛋白药剂的浓度不必采用与其它药剂一样的范围。其它用量对于本领域的技术人员来说是已知的且易于确定的。例如,根据本文中描述的各个方面和实施方式,适合的组合剂量和制剂根据授予 Lewis 的题为《Combination PDGF, KGF, IGF, and IGFBP for wound healing》的美国专利 US6903078 中描述剂量给药方式给药。

[0449] 初始和任何随后的给药剂量将根据患者的年龄、体重、病状以及待治疗的疾病、伤口、紊乱或生理条件而定。根据伤口愈合药剂,给药的剂量和方案会有所不同,而剂量也会根据所选择的给药方法,例如局部或系统给药,而有所不同。

[0450] 伤口愈合药剂可以内用或外用,可以直接使用到任何展现伤口的组织。对于局部给药 IGF,例如,可以施用能诱导局部产生 IGF 的氧化锌制剂,正如 Tarnow et al., Scand J. Plast Reconstr Hand Surg. 28:255-259(1994) 中所描述的。当按照美国专利第 4,861,757 号的描述局部施用时,PDGF 的有效剂量据报道为 5ng/mm² 或更高,并且 PDGF 同种型(例如 PDGF-AA、PDGF-BB 或 PDGF-AB)的局部施用浓度为至少 1ng/mL,按照文献 Lepisto et al., Biochem Biophys Res. Comm 209:393-399(1995) 的描述以高达约 30ng/mL 局部浓度施用到成纤维细胞群。PDGF 能够以羧甲基纤维素凝胶制剂的形式在约 10 μ g/gm ~ 约 500 μ g/gm 凝胶,约 20 μ g/gm ~ 约 200 μ g/gm 凝胶和约 30 μ g/gm ~ 约 100 μ g/gm 凝胶,最佳约 100 μ g/gm 凝胶的浓度进行给药。在所给予的约 3 μ g/mL 溶液 ~ 约 300 μ g/mL 溶液的

范围内实现 PDGF 的效力。

[0451] 通过根据 Sotozono et al, Invest. Ophthalm. Vis. Science 36 :1524-29 (1995) 中的描述将约 50 μ L 浓度为约 5 μ g/mL 的 KGF 局部施用到上皮组织对伤口愈合是有效的。如美国专利第 4,861,757 号中描述的,当与 PDGF 同时给药时 IGF 的有效剂量范围为至少 2.5ng/ mm^2 至约 5ng/ mm^2 , PDGF 与 IGF 的重量比率为约 1 : 10 至约 25 : 1, PDGF 与 IGF 的最有效的重量比率是约 1 : 1 ~ 约 2 : 1。已经证实,与 IGF 组合给药的 IGFBP 以约 5 μ g IGF 与约 1.5 μ g 磷酸化的 IGFBP 的剂量水平给药 (IGF : IGFBP 摩尔比为约 11 : 1) 能够促进伤口愈合,如 Jyunget al, Surgery 115 :233-239 (1994) 中所描述的。

[0452] 对于多肽疗法的给药,例如 PDGF、KGF、IGF 和 IGFBP 多肽,剂量能够为约 5 μ g ~ 约 50 μ g/kg 直接施用的组织,也可以为约 50 μ g ~ 约 5mg/kg 组织,也可以为约 100 μ g ~ 约 500 μ g/kg 组织,以及约 200 ~ 约 250 μ g/kg 组织。对于多核苷酸疗法,例如在基因疗法给药方案中,根据患者体内的多核苷酸表达强度而对组织靶向给药,含有包括 PDGF、KGF、IGF 和 IGFBP 编码序列可表达结构的载体,对于基因疗法方案中的局部给药,每次注射或给药时可以为约 100ng 至约 200mg DNA 的范围进行给药,在基因疗法方案中的局部给药期间,也可以为约 500ng ~ 约 50mg,约 1 μ g ~ 约 2mg DNA,约 5 μ g DNA ~ 约 500 μ g DNA 和约 20 μ g ~ 约 100 μ g,以及约 250 μ g。因此,诸如作用方法和转化和表达效力的因素是所考虑内容,其会影响 DNA 疗法给药最终效力的所需剂量。其中需要更大表达的情况下,在更大面积的组织上,可能需要更大用量的 DNA 或在给药的连续方案中重复给药的相同用量,或者对例如伤口部位的不同相邻或附近组织部分进行几次给药以影响正治疗结果。

[0453] 适用于本文中所描述的药物组合物制备的治疗药剂和间隙连接修饰剂可以利用本领域已知的方法进行配制和给药。所给药的初始的和随后的任何剂量都取决于患者的年龄、体重、病况,以及所治疗的疾病、伤情、紊乱或生理条件。根据治疗方法,给药的剂量和方案会有所不同,而剂量也会根据所选的给药方法,例如局部给药或全身给药而有所不同。

[0454] 如本文中所述,组合给药的抗连接蛋白药剂或另一种药剂的剂量能够根据其单独给药的给药剂量进行下调。

[0455] 几种药剂的组合使用可以降低任何单个药剂的所需剂量,因为不同药剂作用的起效和持续可以是互补的。在一种优选实施方式中,一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗药剂、有利于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂的组合使用,具有额外的、协同的或超加性 (super-additive) 的效应。

[0456] 在一些情况下,一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗药剂和 / 或对伤口愈合有用的药剂和 / 或间隙连接修饰剂的组合,具有相加效应。在其它情况下,这种组合能够具有大于加性效应的效应 (greater-than-additive effect)。这种效应在本文中称为“超加性”效应,这或许是由于协同的或增强的相互作用所致。

[0457] 术语“超加性促进伤口愈合”是指通过一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗药剂、有利于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂的组合给药产生的平均伤口愈合作用,在统计学上意义上显著地超过了通过单独给药其中任一种药剂所产生的伤口愈合作用的总和。一种抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗药剂、有利于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂的组合给药产生的伤口愈合作用,是否“在统计学上意义上显著地超过”了单独化合物所期望的加和值,可以通过本文中所描述的和 / 或通过本领域普通技术人员已知

的各种统计方法来确定。术语“协同的”是指其中抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗药剂、有利于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂都单独具有促进伤口愈合或降低纤维细胞形成和疤痕产生能力的一类超加性抑制作用。术语“增强的”是指其中抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗药剂、有利于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂中的单一一种药剂具有促进伤口愈合的能力增加的一类超加性效应。

[0458] 一般而言,增强可以通过确定组合治疗在治疗组中是否产生了与通过其治疗组中单个治疗分别产生的平均伤口愈合增加的总和相比统计显著的超加性平均伤口愈合的增加来进行评价。平均伤口愈合增加可以作为对照组与治疗组平均伤口愈合之间的差值进行计算。在伤口愈合中增加份数,“受影响的分数 (fraction affected)” (Fa) 可以通过治疗组平均伤口愈合增加除以对照组平均伤口愈合来计算。统计学显著增强的测试需要计算每一个治疗组的 Fa。对于组合治疗所期望的额外 Fa 可以当成从组中每一组合元素得到平均 Fa 的总和。例如,双尾单样本 t 检验就可以用于评价通过实验获得的结果是仅由于偶然所致的可能性,正如通过 thep- 值测定的。p 值小于 0.05 就可以认为是统计显著的,即,仅由于偶然所致是不可能的。因此,对于组合治疗组的 Fa 必须统计学显著地高于单个组成治疗组的期望加和 Fa,才能认为组合疗法产生了增强的超加和效应。

[0459] 组合治疗是否产生协同效应可以通过中效 / 联合指数等效线法 (median-effect / combination-index isobologram method) (Chou, T., and Talalay, P. (1984) *Ad. Enzyme Reg.* 22 :27-55) 来评价。在该方法中,对于不同剂量效应水平,基于由单独抗连接蛋白药剂、单独一种或多种有利于伤口愈合的药剂和固定摩尔比的两种药剂组合的中效作图得到的参数,计算联合指数 (CI) 值。<1 的 CI 值指征协同效应, CI=1 指征加性效应,而 CI>1 指征拮抗效应。这种分析可以利用计算机软件工具如 CalcuSyn, Windows Software for DoseEffect Analysis (Biosoft (D, Cambridge UK) 来实现。

[0460] 用于分析组合疗法是否存在超加性效应的本领内已知的或未来开发的任何方法都可以预期用于筛选与一种或多种治疗药剂、有利于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂组合使用的合适的抗连接蛋白药剂。

[0461] 在另一优选的实施方式中,与当单独给予所述药剂时的有效剂量相比,组合使用一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗剂、有利于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂降低了任何这种药剂的有效剂量。在某些实施方式中,当组合使用一种或多种抗连接蛋白药剂时,该药剂的有效剂量是其单独使用时该药剂使用剂量的约 1/15 ~ 约 1/2, 约 1/10 ~ 约 1/3, 约 1/8 ~ 约 1/6, 约 1/5, 约 1/4, 约 1/3 或约 1/2。

[0462] 在另一优选实施方式中,与单独给予所述药剂时的用药频率相比,组合使用一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗药剂、有利于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂降低了这些药剂的给药频率。因此,这些组合容许使用比实现所需治疗目标的先前所需每一种药剂剂量更低和 / 或更少的剂量。

[0463] 该剂量可以单独施用或分开施用。该剂量可以一次性给药,或者施药可以重复进行。

[0464] 一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗药剂、有利于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂可以通过相同的或不同的路径给药。本发明的各种药剂在治疗期间能够以不同次数独立给药,或者以分开的或单个组合的形式同时给药。

[0465] 在本发明的一个方面,抗连接蛋白药剂在一种组合物中给药,而治疗剂、伤口愈合药剂和 / 或间隙连接修饰剂在第二组合物中给药。在一种实施方式中,含有一种或多种抗连接蛋白药剂的第一组合物在含有一种或多种治疗药剂、伤口愈合药剂和 / 或间隙连接修饰剂的第二组合物给药之前进行给药。在一种实施方式中,含有一种或多种抗连接蛋白药剂的第一组合物在含有一种或多种治疗剂、伤口愈合药剂和 / 或间隙连接修饰剂的第二组合物给药之后进行给药。在一种实施方式中,含有一种或多种抗连接蛋白药剂的第一组合物在含有一种或多种治疗剂、伤口愈合药剂和 / 或间隙连接修饰剂的第二组合物给药之前和之后进行给药。在一种实施方式中,含有一种或多种抗连接蛋白药剂的第一组合物与含有一种或多种治疗剂、伤口愈合剂和 / 或间隙连接修饰剂的第二组合物给药同时给药。

[0466] 优选一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗剂、伤口愈合药剂和 / 或间隙连接修饰剂通过局部给药(部位外围给药或直接对该部位给药)进行递送,包括但不限于,利用固体载体的局部给药(如敷料和其它基质)和药用制剂(如凝胶剂、混合剂、混悬剂和软膏剂)。在一种实施方式中,该固体载体含有生物相容性的膜或插进治疗部位的插入物。在另一实施方式中,该固体载体包含敷料或基质。在本发明的一种实施方式中,该固体载体组合物可以是缓慢释放的固体载体组合物,其中一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗剂、伤口愈合剂和 / 或间隙连接修饰剂分散于缓慢释放的固体基质中,该固体基质例如是海藻酸盐、胶原或合成的可生物吸收的聚合物。优选地,该固体载体组合物是无菌的或低生物负载的。在一种实施方式中,可以使用含有一种或多种抗连接蛋白药剂的冲洗溶液。

[0467] 一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗剂、伤口愈合剂和 / 或间隙连接修饰剂的制剂的递送持续一定时间,在一些情况下进行约 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,在更严重的受伤或病状中或许是特别有利的。在一些情况下,细胞损失(cell loss)可以很好地超出治疗部位而延伸到周围细胞。这样的细胞损失会在初始疗程的 24 小时内发生,并且由间隙连接的细胞-细胞间通信介导。给予(一种或多种)抗连接蛋白药剂,例如用于下调连接蛋白表达,或阻断连接子开启的抗连接蛋白药剂,因此会调节细胞之间的通信,或者在连接子调节的情况下细胞损失进入细胞外空间中,并使其他的细胞损失或受伤或受伤后果最小化。

[0468] 递送时间将取决于下调作用将会被诱导的位置和所需的治疗效果,可以在约 1~2 小时,约 2~4 小时,约 4~6 小时,约 6~8 小时或约 24 小时或更长的时间内提供连续释放或缓释递送。根据本发明,这是通过在制剂中包含抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗剂、伤口愈合剂和 / 或间隙连接修饰剂并与药用载体或赋形剂一起,特别是以连续释放或缓释给药的制剂形式实现的。

[0469] 如所述,本发明的一种或多种药剂可以在受伤之后立即给药,例如,约 180 天,约 120 天,约 90 天,约 60 天,或约 30 天之前或期间或之内,但是优选在约 10 天,约 9 天,约 8 天,约 7 天,约 6 天,约 5 天,约 4 天,约 3 天,或约 2 天或更少的时间内给药,而最优选例如在受伤后约 24 小时,约 12 小时,约 10 小时,约 9 小时,约 8 小时,约 7 小时,约 6 小时,约 5 小时,约 4 小时,约 3 小时,约 2 小时或在约 60 分钟,约 45 分钟,约 30 分钟,约 15 分钟,约 10 分钟,约 5 分钟,约 4 分钟,约 3 分钟,约 2 分钟,约 1 分钟内给药。

[0470] 本文中所描述的给药途径和剂量仅仅意在作为指导性的,因为有经验的医师会针对任何特定患者和病状来确定最佳给药途径和剂量。

[0471] 治疗患有或疑似患有或易于患有本文中所涉及或描述的疾病、紊乱和 / 或病症或具有其患病危险的受试者的任何方法都可以利用本文中所描述的任何剂量、剂量形式、制剂和 / 或组合物给药。

[0472] 敷料和基质

[0473] 在一个方面,一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗剂、伤口愈合药剂和 / 或间隙连接修饰剂以敷料或基质的形式提供。在某些实施方式中,本发明的一种或多种药剂以直接施用的液体、半固体或固体组合物的形式提供,或者将组合物施加到固体接触层(如敷料纱布或基质)的表面或结合到固体接触层中。敷料组合物可以例如,以流体或凝胶的形式提供。一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗剂、有利于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂可以与用于局部施用的常规药用赋形剂一起组合提供。合适的载体包括:普流尼克(Pluronic)凝胶;泊洛沙姆(Polaxamer)凝胶;含纤维素衍生物的水凝胶,该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、羟丙基甲基纤维素及它们的混合物;以及含有聚丙烯酸树脂(Carbopol,卡伯波树脂)的水凝胶。适合的载体还包括用于局部药物制剂的霜剂 / 软膏剂,例如,基于聚西托醇乳化软膏的霜剂。上述载体可以包括海藻酸盐(作为增稠剂或刺激剂)、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、调节渗透性的药剂如氯化钠、以及稳定剂如 EDTA。

[0474] 适合的敷料或基质可以包括例如含有一种或多种抗连接蛋白药剂与一种或多种治疗剂、有利于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂的以下物质:

[0475] 1) 吸附物:合适的吸附物可以包括例如吸收性敷料,其能够例如提供与具有高吸收性的纤维层(例如纤维素、棉或人造丝)组合的半粘着特性或非粘着层。可替代地,吸附物可以用作初级或第二级敷料。

[0476] 2) 海藻酸盐:适合的海藻酸盐包括例如由天然的多糖纤维或海藻衍生的干凝胶构成的无纺的非粘性衬垫和纱带的敷料。适合的海藻酸盐敷料可以例如通过与渗出物接触而发生离子交换的方法形成湿凝胶。在某些实施方式中,海藻酸盐敷料被设计成柔软且舒适,在不规则形状的创面上易于包裹、缠绕或施用。在某些实施方式中,海藻酸盐敷料可以与第二敷料一起使用。

[0477] 3) 抗微生物敷料:适合的抗微生物敷料可以包括例如能够便于递送生物活性剂例如银和聚六亚甲基双胍(PHMB)并维持其抗感染效能的敷料,这是所需的或合乎需要的。在某些实施方式中,适合的抗微生物剂敷料可以作为例如,作为海绵、浸透纺织纱布、膜敷料、吸附物产品、隔离敷料(island dressings)、尼龙纤维、非粘性阻隔层或其材料组合而获得。

[0478] 4) 生物 & 生物合成敷料:适合的生物敷料或生物合成敷料可以包括,例如,来自天然来源的凝胶、溶液或半透性片材。在某些实施方式中,将凝胶或溶液施用到治疗部位并覆以隔绝保护的敷料。在另一实施方式中,可以起到薄膜作用的片材原位放置,在单独施用后其仍残留在适当位置。

[0479] 5) 胶原:适合的胶原敷料可以包括例如,来源于例如牛、猪或鸟类来源或其它天然来源或供体的凝胶、衬垫、颗粒、浆料、粉末、薄片或溶液。在某些实施方式中,胶原敷料可以与治疗部位渗出物作用而形成凝胶。在某些实施方式中,胶原敷料可以与第二敷料组合使用。

[0480] 6) 复合物:适合的复合敷料可以包括例如,将不同组分物理地组合成单个产品而提供多种功能(例如隔绝细菌、吸收和粘附)的敷料。在某些实施方式中,复合敷料例如由多层构成并结合了半粘性或非粘性的衬垫。在某些实施方式中,复合敷料也可以包括例如无纺纤维带或透明膜的粘合边沿。在某些其他实施方式中,复合敷料能够起到例如初级或次级敷料的作用,而在另一实施方式中,敷料可以与局部施用药物组合物组合使用。

[0481] 7) 接触层:适合的接触层敷料可以包括例如,放置于一定区域以保护组织例如不与施用到治疗部位的其它药剂或敷料直接接触的非粘性片材。在某些实施方式中,接触层可以采用与治疗部位面积一致的形状,并且其是多孔性的从而容许渗出物流过以便其上覆盖的第二敷料吸收。在另一实施方式中,接触层敷料可以与局部施用药物组合物组合使用。

[0482] 8) 弹性绷带:适合的弹性绷带可以包括例如,拉伸展开而与身体形状一致的敷料。在某些实施方式中,纤维组合物可以包括例如,棉、聚酯、人造丝或尼龙。在某些其它实施方式中,弹性绷带可以例如作为第二层或敷料而提供吸收功能,从将覆盖物固定在适当位置,以施加压力或在治疗部位垫上衬垫。

[0483] 9) 泡沫:适合的泡沫敷料可以包括例如,具有能够容纳流体的小的开放空间的薄膜和其它形状的泡沫化聚合物溶液(包括聚氨酯)。典型的泡沫可以例如与其它材料组合而浸透或分层。在某些实施方式中,可以基于泡沫的厚度和组成来调节吸收容量。在某些其它实施方式中,与治疗部位接触的区域可以是无粘性的从而易于除去。在另一实施方式中,泡沫可以与能够作为抗感染阻隔层的粘性边沿和/或透明膜涂层组合使用。

[0484] 10) 纱布和无纺敷料:适合的纱布敷料和织物敷料可以包括例如,具有不同吸收度的干纺(dry woven)或无纺海绵和包裹物。典型的纤维组合物可以包括例如,棉、聚酯或人造丝。在某种实施方式中,纱布和无纺敷料可以批量灭菌或未经灭菌并且具有或没有粘合边沿而获得。示例性的纱布敷料和织物敷料可以用于清洗、包裹和覆盖各种治疗部位。

[0485] 11) 水胶体:合适的水胶体敷料可以包括例如,由明胶、果胶或羧甲基纤维素构成的糯米纸(wafer)、粉末或糊状物。在某种实施方式中,该糯米纸是自粘性的并且能够以具有或没有粘结性边沿的方式提供且具有各种形状和尺寸。典型的水胶体用于需要外形修整的区域。在某些实施方式中,粉末和糊状水胶体可以与第二敷料组合使用。

[0486] 12) 水凝胶(无定形的):适合的无定形水凝胶敷料可以包括例如,水、聚合物和其它成分的无形制剂,设计用于提供水分并维持湿润的愈合环境和/或使治疗部位再水化。在某种实施方式中,水凝胶可以与第二敷料覆盖物组合使用。

[0487] 13) 水凝胶:浸渍的敷料:适合的浸渍水凝胶敷料可以包括例如,用无定形水凝胶饱和的纱布和无纺海绵、绳和带。无定形水凝胶可以包括例如,水、聚合物和其它成分的无形制剂,设计用于向干治疗部位提供水分而维持湿润的愈合环境。

[0488] 14) 水凝胶薄膜:适合的水凝胶薄膜可以包括例如,不溶于水而通过溶胀与含水溶液相互作用的交联亲水聚合物的三维网络。典型的水凝胶是高舒适度的且可渗透的,并且能够吸收不同量的排出物,这取决于其组成。在某实施方式中,水凝胶对治疗部位是非粘性的或者是治疗时易于除去的。

[0489] 15) 浸渍敷料:适合的浸渍敷料可以包括例如,用溶液、乳液、油、凝胶或一些其它药物活性化合物或载体药剂,包括例如盐水、油、锌盐、矿物油(petrolatum)、三溴苯酚铋(xeroform)和猩红(scarlet red)以及本文中描述的化合物饱和的纱布和无纺海绵、绳和

带。

[0490] 16) 硅凝胶薄片 :适合的硅凝胶薄片敷料可以包括例如,由用丝网或纤维强化或与丝网或纤维粘接的交联聚合物构成的软覆盖物。

[0491] 17) 溶液 :适合液体敷料可以包括例如,多蛋白质和在细胞外基质中发现的其它成分的混合物。在某实施方式中,在清创和清洗之后可以将典型的溶液施用到治疗部位,然后就用吸附敷料或无粘性衬垫覆盖。

[0492] 18) 透明膜 :适合的透明膜敷料可以包括在一面上涂有粘合剂的不同厚度的聚合物膜。在某些实施方式中,透明膜是液体、水和细菌不可透过的,但是对于湿蒸气 and 大气气体是可透过的。在某些实施方式中,透明使得治疗部位可视化。

[0493] 19) 填料 :合适的填料敷料可以包括例如,珠状物、膏状物、泡沫、凝胶、软膏、衬垫、浆料、枕垫、粉末、丝条或其它制剂。在某些实施方式中,填料是无粘性的,可以包含适时释放的抗微生物剂。典型的填料可以用于维持湿润的环境,处理渗出物和用于治疗例如需要包扎的部分和全厚度伤口、感染的伤口、流血伤口和深伤口。

[0494] 组合伤口治疗

[0495] 概述

[0496] 本发明涉及药物组合物和其用法,其中组合物含有治疗有效量的一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗剂、有利于伤口愈合药剂和 / 或间隙连接修饰剂。该组合物用于增强或促进伤口愈合,这样的伤口包括愈合较慢的伤口或常规的伤口处理或伤口愈合促进疗法难以治愈的伤口。

[0497] 同样地,在其它组织损伤(尤其是伤口)的情况下,本发明的方法和组合物能够有效促进伤口愈合过程,减少肿胀和发炎,且使疤痕的形成最小化。该制剂在治疗伤口,无论是外伤(包括烧伤)、内伤还是外科手术以及慢性伤口的结果,都具有明显的益处。

[0498] 组合物

[0499] 因此,在一方面,本发明提供了用于治疗性处理的组合物,该组合物含有至少一种抗连接蛋白药剂和至少一种治疗剂,和 / 或有利于伤口愈合药剂和 / 或间隙连接修饰剂。在一种优选的实施方式中,组合物进一步含有药用载体或赋形剂。

[0500] 在一种优选的形式中,组合物含有仅一种连接蛋白 mRNA 的一种或多种反义多核苷酸。在另一优选形式中,该组合物含有一种或多种抗连接蛋白肽或拟肽。最优选这种连接蛋白是连接蛋白 43。

[0501] 组合物可以含有不只一种连接蛋白的多核苷酸或抗连接蛋白肽。优选地,多核苷酸或抗连接蛋白肽所指向的连接蛋白中的一种是连接蛋白 43。多核苷酸或抗连接蛋白肽所指向的其它连接蛋白可以包括例如,连接蛋白 26、30、30.3、31.1、32、36、37、40、40.1、44.6、45 和 46。指向各种连接蛋白的合适的示例性多核苷酸(和 ODN)列于表 1 中。本文还提供了合适的抗连接蛋白肽。

[0502] 示例性组合

[0503] 根据本发明组合物和方法的抗连接蛋白药剂和伤口愈合药剂的示例性组合包括如下组合:

[0504] (a) 以下抗连接蛋白药剂中的一种:

[0505] 连接蛋白 43 反义多核苷酸;

- [0506] 连接蛋白 43 反义 ODN ;
- [0507] 含有 SEQ. ID. NO :2 的多核苷酸 ;
- [0508] 含有 SEQ. ID. NO :2 的 ODN ;
- [0509] 含有 SEQ. ID. NO :1 的多核苷酸 ;
- [0510] 含有 SEQ. ID. NO :1 的 ODN ;
- [0511] 连接蛋白 43RNAi 多核苷酸 ;或
- [0512] 连接蛋白 43siRNA 多核苷酸 ;以及
- [0513] (b) 以下有利于伤口愈合的药剂中的一种 :
- [0514] 活化素 ;
- [0515] FGF-2 或成纤维细胞生长因子 2 ;
- [0516] FGF-1 或成纤维细胞生长因子 -1 ;
- [0517] VEGF 或血管内皮生长因子 ;
- [0518] GM-SF 或粒细胞单核细胞刺激因子 ;
- [0519] 血小板因子 4 ;
- [0520] EGF 或表皮生长因子 ;
- [0521] TGF 或转化生长因子 β (例如, TGF-1、TGF-2、TGF-3) ;
- [0522] TNF- α 或肿瘤坏死因子 α ;
- [0523] IL-1 白细胞介素 -1 ;
- [0524] IL-4 白细胞介素 -4 ;
- [0525] IL-7 白细胞介素 -7 ;
- [0526] IL-8 白细胞介素 -8 ;
- [0527] IL-10 白细胞介素 -10 ;
- [0528] GMCSF 或粒细胞 - 巨噬细胞 / 集落 - 刺激因子 ;
- [0529] CTGF 或结缔组织生长因子 ;
- [0530] 胸腺素 β 4 ;
- [0531] IGF-1 或胰岛素样生长因子 -1 ;
- [0532] PDGF 或血小板源性生长因子 ;
- [0533] PDGF-BB 或血小板源性生长因子 BB ;
- [0534] 甘露糖 -6- 磷酸 ;
- [0535] (aFGF) 酸性成纤维细胞生长因子 ;
- [0536] (bFGF) 碱性成纤维细胞生长因子 ;
- [0537] (HB-EGF) 肝素结合表皮生长因子 ;
- [0538] (hGH) 人生长激素 ;
- [0539] (KGF) 角化细胞生长因子 ;
- [0540] (KGF-2) 角化细胞生长因子 -2 ;
- [0541] (MMP) 基质金属蛋白酶 ;
- [0542] (PDEC GF) 血小板源性内皮细胞生长因子 ;
- [0543] (PDEGF) 血小板源性表皮生长因子 ;
- [0544] (rb bFGF) 重组牛碱性成纤维细胞生长因子 ;

[0545] (rhbFGF) 重组人碱性成纤维细胞生长因子；

[0546] (rhPDGF-BB) 重组人血小板源性生长因子 (BB-二聚体)；

[0547] (TGF- α) 转化生长因子- α ；

[0548] (TGF- β) 转化生长因子- β ；

[0549] (TIMP) 基质金属蛋白酶的组织抑制剂；

[0550] (VEGF) 血管内皮生长因子；

[0551] (IGFBP) 胰岛素样生长因子结合蛋白 (例如 IGFBP-2、IGFBP-3、IGFBP-4)；以及

[0552] (FGF) 或成纤维细胞生长因子 (例如, FGF-1、FGF-2)。

[0553] 该组合列表本质上是示例性的。本文中描述的抗连接蛋白药剂和治疗剂的其它组合也包括在内。本文中描述的抗连接蛋白药剂和有利于伤口愈合的药剂的其它组合也包括在内。本文中描述的抗连接蛋白药剂和间隙连接修饰剂的其它组合也包括在内。

[0554] 生产商的试剂盒、药品和制品

[0555] 可选地, 一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种有利于伤口愈合的药剂、治疗剂, 和 / 或间隙连接修饰剂 (例如, 肽、蛋白水解抑制剂、细胞外基质组分、片断和肽、类固醇、细胞因子、氧供体或维生素) 也可以用于该药品的生产。

[0556] 在一方面, 本发明提供了含有一种或多种本文中描述的组合物或制剂的试剂盒。例如, 该试剂盒可以包括含有有效量的一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗剂、有利于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂的组合物。

[0557] 本文也提供的制造商制品, 包括盛装本文中所描述的本发明组合物或制剂的容器和用于受试者治疗用法的说明书。例如, 在另一方面, 本发明包括所生产的含有盛装治疗有效量的一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种用于促进或改善伤口愈合的药用治疗剂的容器以及针对受试者治疗用法的说明书的制品。

[0558] 治疗

[0559] 本发明的组合物和制剂可以与促进伤口愈合或减少肿胀、发炎和 / 或疤痕形成的组合物结合或组合使用。本发明的组合物和制剂也可以与促进和 / 或改善急性或慢性伤口愈合的组合物结合或组合使用。在一方面, 该伤口是由外科手术或外伤所致。

[0560] 本文中描述了与一种或多种用于伤口治疗的抗连接蛋白药剂组合使用的合适的治疗剂、有利于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂。在一方面, 抗连接蛋白药剂可以与有利于伤口愈合的药剂如趋化因子、细胞因子、生长因子或它们的组合进行联合给药。在一种实施方式中, 趋化因子是趋化因子配体 2 (Ccl2) 拮抗剂。在另一实施方式中, 细胞因子是肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 拮抗剂。在另一实施方式中, 细胞因子是 IL-10。在一种实施方式中, 生长因子是 TGF- β -3。根据另一实施方式, 伤口愈合药剂是胸腺素 β 4。在另一实施方式中, 抗连接蛋白药剂可以与 IGFBP-2、IGF-7、IGF-1 或它们的调节剂中的一种或多种联合给药, 以增加促进伤口愈合的羟基脯氨酸和 1 α 1 型胶原合成。

[0561] 本文中描述了与有利于伤口愈合的药剂、治疗剂和 / 或间隙连接修饰剂组合使用的适合的抗连接蛋白药剂, 且可以包括例如, 多核苷酸如 ODN、阻断剂或其它连接蛋白结合剂例如受体模拟肽; 去除活性的吸收剂, 例如合成性的表达受体分子或模拟物; 或抗体; 以及例如其它用于调节间隙连接关闭或开启的药剂, 如磷酸化或去磷酸化间隙连接的化合物。

[0562] 在一方面,本发明涉及促进或改善受试者伤口愈合的方法,包括给予治疗有效量的一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗剂、有利于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂或用于促进或改善愈合的化合物。在某些实施方式中,给予一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗剂、有利于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂能够有效减少炎症发生,减少中性白细胞和 / 或巨噬细胞渗透到伤口中,减少肉芽组织沉积,促进细胞迁移以加速伤口闭合和痊愈,而有利于上皮生长、组织构建和烧伤的表面恢复或它们的任何组合。在某些实施方式中,给予一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗剂、有利于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂能够有效减少或预防疤痕形成。在促进或改善疤痕形成的方法中,该抗连接蛋白药剂优选与 TGF- β -3 或 IL-10 或甘露糖-6-磷酸的给药实施联合给药,或者在 TGF- β -3 或 IL-10 或甘露糖-6-磷酸的给药之后或之前给予抗连接蛋白药剂。

[0563] 在一方面,本发明涉及促进或改善受试者伤口愈合的方法,包括以有效量给予一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗剂、有利于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂,从而有效调节上皮基细胞分裂和生长。在一种实施方式中,抗连接蛋白药剂是有效调节上皮基细胞分裂和生长的连接蛋白反义多核苷酸。在一种实施方式中,该连接蛋白反义多核苷酸是连接蛋白 26 反义多核苷酸、连接蛋白 43 反义多核苷酸或它们的混合物。

[0564] 在一方面,本发明涉及促进或改善伤口愈合的方法,包括以有效量给予一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗剂、有利于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂,从而有效调节外层角蛋白分泌。在一种实施方式中,该抗连接蛋白药剂是有效调节外层角蛋白分泌的连接蛋白反义多核苷酸。在一种实施方式中,该连接蛋白反义多核苷酸是连接蛋白 43 反义多核苷酸、连接蛋白 31.1 反义多核苷酸或它们的混合物。

[0565] 在另一方面,本发明提供了降低具有伤口如外科手术伤口(例如在整容和其它外科手术中)的患者的疤痕形成和 / 或改善疤痕外观的方法,该方法包括的步骤有:向所述伤口给予一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗剂、有利于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂,以下调紧邻所述伤口部位处的一种或多种连接蛋白的表达。而且,该伤口可以是由于外伤或手术所致的伤口,该制剂恰好在手术性修复和 / 或其闭合之前施用到该伤口。正如本文所述,在减少或改善疤痕形成或外观的方法中,抗连接蛋白药剂优选与 TGF- β -3 或 IL-10 或甘露糖-6-磷酸的给药实施联合给药,或者在 TGF- β -3 或 IL-10 或甘露糖-6-磷酸的给药之后或之前给予抗连接蛋白药剂。

[0566] 在一方面,本发明涉及减少、预防或改善受试者中组织损伤的方法,包括给予一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗剂、有利于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂。

[0567] 在另一方面,本发明涉及减少伤口和 / 或遭受身体外伤的组织治疗部分的肿胀和 / 或发炎的方法,其包括的步骤有:向所述伤口或组织或紧接所述伤口或组织处给予上文中限定的抗连接蛋白组合物或制剂以及一种或多种治疗剂、有利于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂。在一种实施方式中,该伤口是身体外伤对组织影响的结果,该组织包括神经组织,如大脑、脊髓或视神经,或者皮肤或眼。

[0568] 在一方面,本发明涉及持续给予一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗剂、有利于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂。在一种实施方式中,抗连接蛋白药剂给

药至少约 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。在一种实施方式中,连接蛋白表达下调持续一段时间。优选连接蛋白 43 表达下调持续一段时间。方便地,连接蛋白 43 表达下调至少约 2、4、6、8、10、12 或 24 小时。根据一种实施方式,伤口是慢性伤口。适合的受试者包括糖尿病患者。

[0569] 在一方面,本发明提供了一种治疗受伤的受试者的方法,该方法包括向该伤口持续给予有效剂量的抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗剂、有利于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂。在另一方面,本发明提供了一种促进或改善受试者伤口愈合的方法,该方法包括向伤口持续给予一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗剂、有利于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂。在另一方面,本发明提供了一种减少、预防或缓解受试者的肿胀和 / 或发炎的方法,该方法包括向伤口持续给予一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗剂、有利于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂。在另一方面,本发明提供了一种减少、防止或改善受试者疤痕形成的方法,该方法包括向伤口持续给予一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗剂、有利于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂。

[0570] 根据另一个方面,本发明提供了促进或改善受伤受试者的伤口愈合的方法,该方法包括以有效量向伤口持续给予本发明的抗连接蛋白组合物或制剂以及一种或多种治疗剂、有利于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂,从而提高伤口区域中的上皮再生速率。在一种实施方式中,该方法包括持续给予连接蛋白 43 反义多核苷酸和 / 或连接蛋白 31.1 反义多核苷酸和一种或多种治疗剂、伤口愈合药剂和 / 或间隙连接修饰剂。在一种实施方式中,该组合物或这些组合物以持续释放制剂给药。在另一实施方式中,该组合物或这些组合物在一段持续时期内给药。方便地,该组合物能够有效降低连接蛋白 43 和 / 或 31.1 水平或活性(例如半通道或间隙连接活性)至少约 24 小时。根据一种实施方式,该伤口是慢性伤口。可以治疗的受试者包括糖尿病患者。

[0571] 在另一方面,本发明提供了一种促进或改善受伤受试者的伤口愈合的方法,该方法包括以有效量向伤口区域持续给予本发明的抗连接蛋白组合物或制剂以及一种或多种治疗剂、有利于伤口愈合的药剂和 / 或间隙连接修饰剂,从而有效调节上皮基细胞分裂和生长和 / 或有效调节外层角蛋白分泌。在一种实施方式中,该组合物含有有效调节上皮基细胞分裂或生长的连接蛋白反义多核苷酸,优选连接蛋白 26 反义多核苷酸、连接蛋白 43 反义多核苷酸或它们的混合物。在一种实施方式中,该组合物含有有效调节外层角蛋白化的连接蛋白反义多核苷酸,优选含有连接蛋白 31.1 反义多核苷酸。在一种实施方式中,该组合物或这些组合物以持续释放制剂给药。在另一实施方式中,该组合物或这些组合物在一定持续时期内给药。方便地,该组合物能够有效降低连接蛋白 43、26 和 / 或 31.1 水平至少约 24 小时。根据一种实施方式,该伤口是慢性伤口。可以治疗的受试者包括糖尿病患者。

[0572] 在另一方面,提供了治疗具有慢性伤口的受试者的方法。这种方法包括,能够抑制连接蛋白或连接蛋白半通道的表达、形成或活性的抗连接蛋白药剂与一种或多种治疗剂、伤口愈合药剂和 / 或间隙连接修饰剂一起对受试者联合给药。

[0573] 本发明的一个方面涉及治疗或预防慢性伤口的方法,包括将给予所述慢性伤口或与所述慢性伤口相关的组织的有效量的抗连接蛋白药剂与一种或多种治疗剂、伤口愈合药剂和 / 或间隙连接修饰剂联合给予有需要的受试者。在另一实施方式中,慢性伤口是慢性

皮肤伤口,且本发明的组合物是在一段有效时间内向该皮肤或所述受试者该皮肤相关的组织给药。例如适合接受治疗的慢性皮肤伤口选自压迫性溃疡、糖尿病性溃疡、静脉曲张性溃疡、动脉溃疡、血管炎性溃疡和混合性溃疡组成的组。慢性伤口可以是动脉溃疡,其包括由于完全或部分动脉淤塞产生的溃疡。慢性伤口可以是静脉淤滞性溃疡,其包括由于静脉瓣功能障碍和有关的脉管疾病所导致的溃疡。慢性伤口可以是外伤所致的溃疡。

[0574] 在一种实施方式中,抗连接蛋白药剂与生长因子联合给药。优选生长因子是PDGF、EGF 或 FGF (例如 FGF-2)。

[0575] 如果不是作为固定的组合给药,优选的方法包括按序给药一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种生长因子。优选该药剂至少彼此间隔约半小时按序给药。该药剂也可以不辞间隔约 1 小时给药,或者彼此间隔约 1 天至 1 周给药,或者以其它认为合适的时间间隔给药。优选首先给予抗连接蛋白药剂。优选地,在其中使用一种或多种抗连接蛋白药剂的情况下,抗连接蛋白肽或抗连接蛋白拟肽,例如能够阻断或降低半通道打开的抗连接蛋白药剂,在例如通过下调连接蛋白的蛋白质表达而阻断或降低连接蛋白表达或半通道或间隙连接形成的抗连接蛋白药剂给药之前给药。优选地,该抗连接蛋白药剂是(一种或多种)抗连接蛋白 43 药剂。

[0576] 在治疗伤口(包括慢性伤口)的另一种实施方式中,一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种生长因子中的一者或两者都以低于其单独给药(即它们在物理或在伤口治疗期间不是联合给药)时所用剂量或用量的剂量或用量提供。这种给药药剂的低剂量典型地为药剂单独给药时剂量的约十二分之一到约十分之一,且可以为单独给药时剂量的约八分之一的量,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一半的量。

[0577] 在一种实施方式中,该治疗或预防慢性伤口的方法包括持续给药一种或多种抗连接蛋白药剂和一种或多种治疗剂、有利于伤口愈合的药剂和/或间隙连接修饰剂。在一种实施方式中,该组合物或这些组合物以持续释放的制剂给药。在另一实施方式中,该组合物或这些组合物在一段持续时间内给药。方便地,该组合物有效降低连接蛋白 43 水平或者阻断或降低连接蛋白 43 半通道打开至少约 1~2 小时,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。可以治疗的受试者包括糖尿病患者,以及患有其它溃疡的患者,包括静脉曲张性溃疡和其它本文中描述的和在本技术领域内已知的溃疡。

[0578] 以下将要描述的实施例仅仅是以举例说明的方式提供,而不构成对本发明范围的限制。

[0579] 实施例

[0580] 实施例 1

[0581] 采用在 8 周龄小鼠上具有直径 1.6mm 全厚度切除伤口的模型来评价伤口愈合。接着采用基因表达的 RT-PCR 分析进行免疫组织化学和组织学评价。

[0582] 通过上皮再生作用和结缔组织收缩,以及随后产生伤口肉芽组织中血管稠密网络的血管生成响应的组合来修复皮肤伤口 (Grose, R. and Werner, S. (2004). Wound-healing studies in transgenic and knockout mice. Mol Biotechnol 28,147-66.)。在任何组织损伤之后不久就会开始有力的炎性应答。这两者都保护伤口免受微生物感染并产生多种类型的生物活性物质并在受伤部位的宿主细胞上产生作用。各种炎性细胞迁移到伤口中实现

几种不同的功能。中性白细胞是最早被募集到伤口的白细胞,它们的主要作用通过释放有毒的游离氧自由基并分泌促炎细胞因子而保护宿主免受微生物侵害。随后,巨噬细胞清除伤口部位失去效能的中性白细胞和其他细胞以及细胞外基质残片。巨噬细胞也是指向修复响应的后继细胞和组织迁移的细胞因子、趋化因子和生长因子的主要生产者。当调节发炎和组织修复过程的许多信号明显可传播的并在长距离内起作用时,经由细胞粘附分子的局部细胞间通信和细胞间连接也逐渐出现并起到重要的作用。

[0583] 一种起重要调节作用的细胞之间的连接是间隙连接,其是由连接蛋白家族中的蛋白质形成的六聚体通道。据报道,间隙连接是通过体内几乎所有的细胞表达的 (Wei, C. J., Xu, X. and Lo, C. W. (2004). *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 811-38), 并已报道其介导细胞迁移中的变化。

[0584] 据报道,在上皮伤口边沿处的连接蛋白 43 (Cx43) 蛋白质水平在 24 ~ 48 小时后就会自然降低。与对照的正义脱氧寡核苷酸 (sODN) 治疗的伤口相比,据报道通过向皮肤伤口和烧伤部位施用反义脱氧寡核苷酸 (asODN) 而下调 Cx43 蛋白水平能够导致伤口愈合显著加速 (Qiu, C, Coutinho, P., Frank, S., Franke, S., Law, L. Y., Martin, P., Green, C.R. and Becker, D. L. (2003). Targeting connexin 43 expression accelerates the rate of wound repair. *Curr Biol* 13, 1697-703; Coutinho, P., Qiu, C, Frank, S., Wang, C.M., Brown, T., Green, C.R. and Becker, D. L. (2005). Limiting burn extension by transient inhibition of connexin 43 expression at the site of injury. *Br J Plast Surg* 58, 658-67)。

[0585] 实验表明,急剧下调伤口部位的 Cx43 蛋白质会导致角化细胞增殖和迁移增加,并以成纤维细胞迁移到伤口并生产胶原基质的速率增加。我们注意到中性白细胞浸润发生了降低,趋化因子配体 2 (Ccl2) 和细胞因子肿瘤坏死因子 α (TNF- α) mRNA 也随之降低。随后,我们也注意到,巨噬细胞的募集也发生了减少,这或许是初始炎性应答减慢的结果,已知其对随后的伤口愈合过程会产生下游效应。连同这些修饰的响应一起对伤口愈合产生了显著改善。

[0586] 伤口模型和 ODN 治疗

[0587] 以下实验中使用雄性 8 周龄 ICR 小鼠。所有的小鼠都在特定的无病原条件下在伦敦大学学院 (University College London) 的环境受控的清洁室内饲养,并且所有实验都在英国内政部规则 (UK Home Office regulation) 下进行。通过吸入氟烷对鼠进行麻醉。用 6mm 活检穿孔器 (Kai Industries) 在背脊中线每一侧的经剃毛的背部上制造四个直径 6mm 的全厚度切除伤口。向每对伤口中一个伤口单次局部施用冷却于冰上的含 1 μ M Cx43asODN (SEQ. ID No. 2) (Sigma-Genosys) 的 50 μ L 在 30 % Pluronic F-127 凝胶 (Sigma-Aldrich), 并同样地向另一伤口施用 1 μ M 正义对照 sODN。Cx43asODN 的施用导致在 2 小时内 Cx43 蛋白在递送位置被显著地抑制 (Becker, D. L., McGonnell, I., Makarenkova, H. P., Patel, K., Tickle, C, Lorimer, J. and Green, C. R. (1999). Roles for alpha 1 connexin in morphogenesis of chick embryos revealed using a novel antisense approach. *Dev Genet* 24, 33-42; McGonnell, I. M., Green, C.R., Tickle, C. and Becker, D. L. (2001). Connexin 43 gap junction protein plays an essential role in morphogenesis of the embryonic chick face. *Dev Dyn* 222, 420-38; Qiu, C, Coutinho,

P., Frank, S., Franke, S., Law, L. Y., Martin, P., Green, CR. and Becker, D. L. (2003). Targeting connexin 43 expression accelerates the rate of wound repair. *Curr Biol* 13, 1697-703)). 以所示时间间隔对每一伤口区域进行数字拍照, 并计算伤口面积。所有伤口面积都表示为初始伤口面积的百分数。在一些系列实验中, 用过量氯仿将小鼠杀死, 之后用 8mm 活检穿孔器 (Kai Industries) 以所示时间间隔收获伤口和其周围区域, 包括结痂和上皮边缘。对于所检测的每一时间点最少使用 8 只小鼠。

[0588] 组织学和免疫染色

[0589] 将伤口组织固定在用 PBS 缓冲的 4% 甲醛中, 并嵌埋于石蜡中。对切片 (6 μ m 厚) 进行苏木精和曙红染色或免疫染色。在 H&E 中肉芽组织面积的测定采用 Improvision Openlab™ 4.0.2 软件 (Improvision) 完成。对于免疫组织学化学, 在室温下分别用内源性过氧化物酶阻断剂 (Dako Cytomation A/S) 和蛋白酶 K (Dako Cytomation A/S) 处理去石蜡化的切片 20 分钟和 6 分钟。然后在室温下用 15% 脱脂乳将其封闭 1 小时之后, 用 1 : 200 稀释的兔抗髓过氧化物酶 (MPO) 多克隆抗体 (NeoMarkers)、1 : 400 稀释的大鼠抗小鼠 F4/80 单克隆抗体 (mAb) (Abcom Limited) 或 1 : 500 稀释的大鼠抗小鼠 CD31 (血小板源性内皮细胞粘合分子 1, PECAM-1) mAb (PharMingen) 或兔抗鼠 TGF- β 1 多克隆抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc) 于 4°C 温育过夜。另外, 一些切片与 1 : 500 稀释的鬼笔环肽 - 四甲基若丹明 B 异氰酸酯 (phalloidin-tetramethylrhodamine B isothiocyanate) (Sigma-Aldrich) 在室温下反应 1 小时。抗体用背景还原组分 (Background Reducing Component) (Dako Cytomation A/S) 在抗体稀释剂中适当稀释。根据制造商的说明书, 与抗 MPO 抗体和抗 TGF- β 1 抗体反应的切片用 EnVision+™ (Dako Cytomation A/S) 染色而增强信号。已经与抗 -F4/80 和抗 -CD31 抗体反应的切片用 1 : 200 稀释的生物素化兔抗大鼠免疫球蛋白 (Dako Cytomation A/S) 在 37°C 温育 1 小时。然后根据生产商的说明书, 用催化信号放大系统® (Catalyzed Signal Amplification System®) (Dako Cytomation A/S) 增强信号。此后, 采用甲基绿 (Dako Cytomation A/S) 实施对比染色, 接着进行 MPO、TGF- β 1、F4/80 和 CD31 染色, 或 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 染色后用鬼笔环肽 (phalloidin) 染色。

[0590] 连接蛋白 43、血管或 α 平滑肌肌动蛋白的免疫染色在伤口冷冻切片上进行。切片 4°C 下在丙酮中固定 5 分钟, 随后封闭 45 分钟。在一抗中以以下稀释度: 兔抗 -Cx43 (Sigma) 1 : 3,000; 异凝集素 B FITC 1 : 2000; 血管假性血友病因子 (rabbit Dako) 1 : 400; 抗 - α 平滑肌肌动蛋白 (Sigma) 1 : 400 于室温下温育 1 小时。切片在 PBS 中冲洗 3×5min, 随后在室温下于 1 : 200 的抗 -兔 -FITC 二抗 (Dako) 中温育 1 小时。在 PBS 中冲洗 3×5 分钟, 在某些情况下用 1 μ M 双苯酰亚胺 (bis-benzimide) (Sigma) 在第一次冲洗中作为核计数器染色, 并安装在 Citifluor (Citifluor, London, UK) 中。切片通过共聚焦显微镜在所有参数都保持恒定下成像, 并进行数码图像的直接比对。

[0591] TUNEL 染色

[0592] 用 PBS 缓冲的 4% 甲醛固定伤口组织, 嵌埋于石蜡中并进行切片。用蛋白酶 K (Dako Cytomation A/S) 在室温下处理去石蜡化的切片 5 分钟。然后根据制造商说明书对它们采用原位细胞死亡检测试剂盒 (In Situ Cell Death Detection Kit) (Roche) 进行染色。此后, 用 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 进行复染。TUNEL 染色的切片进行成像, 而在三

个随机区域,即在每块伤口的两侧和中间(每区域为 0.332mm^2),的肉芽组织中计数阳性细胞。

[0593] 通过 5' - 溴 -2' - 脱氧 - 嘧啶核苷 (BrdU) 标记的增殖细胞检测

[0594] 在另一实验中,受伤的小鼠在第 1、2 和 7 天收获之前用 1mL BrdU (Sigma) 的 PBS 溶液 ($1\text{mg}/\text{mL}$) 进行腹膜内注射 2 小时。伤组织在 PBS 缓冲的 4% 甲醛中固定,并嵌埋于石蜡中。根据制造商说明书,去石蜡化的切片 ($6\mu\text{m}$ 厚) 用 HistoMouse™-Plus 试剂盒 (ZYMED Laboratories, Inc) 处理而降低背景信号。根据制造商说明书,切片用 BrdU 检测试剂盒 (BrdU Detection Kit) (BD BiosciencePharmingen) 染色。此后,用甲基绿 (Dako Cytomation A/S) 进行复染。

[0595] 中性白细胞、巨噬细胞、成纤维细胞、BrdU- 阳性细胞核血管形成的测定

[0596] 在创面床 (wound bed) (定义为由未受伤的皮肤、筋膜、再生上皮和焦痂围绕的区域) 中用单盲处理观察 (treatment-blinded observer) 于 3 个 0.332mm^2 的随机高倍视野内计数 MPO- 阳性中性白细胞和 F4/80- 阳性巨噬细胞。按照先前的描述计数伤口边沿和每一免疫组织化学染色切片的新生表皮区域内的 BrdU- 阳性细胞,并表示为每 $100\mu\text{m}$ 表皮细胞的个数 (Mori, R., Kondo, T., Nishie, T., Ohshima, T. and Asano, M. (2004). Impairment of skin wound healing in beta-1,4-galactosyltransferase-deficient mice with reduced leukocyte recruitment. Am J Pathol 164, 1303-14)。伤口边沿的成纤维细胞样细胞的数目 (具有纺锤体形状的鬼笔环肽 - 阳性细胞) 也在高倍视野 (每个视野为 0.332mm^2) 内计数。采用伤后第 5、7、10 和 14 天上皮细胞的血管假性血友病因子荧光染色来观察新血管化。肌成纤维细胞通过抗 α - 平滑肌肌动蛋白染色来识别。对于两种荧光染色的定量化,采用共聚焦显微镜从每时间点最少 6 只动物的可比较区域拍摄单个断面图像。图像采集的所有参数都保持恒定以便比较。在标准阈值下将图像放大 2 倍,利用 Image J (NIH Image) 计数正像素。

[0597] 羟脯氨酸分析

[0598] 伤口区域的胶原含量通过测定羟脯氨酸 (HP) 的含量,也就是胶原的主要成分的含量,来进行评价。样品在含有 Halt™ 蛋白酶抑制剂混合物 (Protease Inhibitor Cocktail), 无 EDTA (PIERCE Biotechnology Inc.) 的 1mL T-PER® 组织蛋白提取试剂 (Tissue Protein Extraction Reagent) (PIERCE Biotechnology Inc.) 中均质化,在 4°C 下于 $15,000\text{rpm}$ 下离心 20 分钟除去碎片。蛋白质浓度采用 BCA™ 蛋白分析试剂盒 (Protein Assay Kit) (PIERCE Biotechnology Inc.) 测定,并用 Sircol™ 可溶性胶原分析试剂盒 (Biocolor Ltd.) 测定 HP 的量。数据表示为每个样品中的 HP 含量 / 总蛋白含量 ($\text{ng}/\mu\text{g}$)。

[0599] 细胞培养

[0600] Swiss 3T3 成纤维细胞在补充有 10% 胎牛血清 (Labtech) 和 1% 青霉素 - 链霉素溶液 (Sigma, Poole) 的 Dulbecco' s 改性 Eagle' s 培养基 (DMEM; Gibco) 中于 5% CO_2 培养箱中在 37°C 下生长。除非另外指出,对于大多数实验,细胞都维持在该培养基中。细胞通过胰蛋白酶消化进行传代,并以 6 至 10 代和融合度 (confluency) $\approx 90\%$ 进行使用。以 $4-5 \times 10^5$ 细胞 / 孔装板 (每个孔中含 1mL 培养基) 将细胞平铺 (plate) 在 24 孔培养皿 (Nunc) 的 13mm 玻璃盖玻片上。在 72 小时后细胞达到融合度,然后用于实验。

[0601] 创伤的细胞迁移分析

[0602] 成纤维细胞分析涉及在成纤维细胞的融合单层内制造一个“创伤”。这广泛地用于体外技术模拟体内细胞迁移行为 (Lampugnani, M. G. (1999). Cell Migration into a wounded area in vitro. Methods Mol Biol 96:177-182)。创伤是通过在横跨盖玻片上牵引微电极而产生标准宽度的损伤而实施的。采用 x5 物镜在 Zeiss 倒置显微镜上用 37°C 和 5% CO₂ 的温育室获取相衬图像 (Phase contrast images)。在创伤形成后,立即拍摄盖玻片边沿限定的区域的图像,并在 4 小时后,即能够清楚地观察已经发生迁移 (图 7E、图 7F) 的时间,在同一区域再次拍摄图像。在每一个对照物和所治疗的组中最少使用 8 个盖玻片拍摄图像。通过图像分析,利用 Image J 软件 (NIH) 测定伤口区域的变化 (像素) 来将迁移量化。

[0603] 为了阻断成纤维细胞中 Cx43 表达,用含 20 μ M asODN 或 20 μ M 对照 sODN 的无血清 DMEM 代替培养基。在用含 DMEM 血清培养之前培养 2 小时。然后按照上述进行创伤分析。先前的实验证实,2 小时足以实现 Cx43 蛋白的显著阻断 (Qiu, C, Coutinho, P., Frank, S., Franke, S., Law, L. Y., Martin, P., Green, C. R. and Becker, D. L. (2003). Targeting connexin 43 expression accelerates the rate of wound repair. Curr Biol 13, 1697-703),而阻断过程则在伤口迁移分析期间持续进行。

[0604] RNA 的分离和具有实时-PCR 的定量基因表达水平

[0605] 利用 TRIzol 试剂 (Invitrogen) 根据制造商说明书从皮肤伤口样品提取总 RNA。利用用于 RT-PCR 的 Superscript First-Strand Synthesis System (Invitrogen) 将 10 μ g 总 RNA 反转录成 cDNA。

[0606] 基因特异性引物和探针作为 Cx43、Ccl2、Col α 1、TNF α 和 TGF β 1 的 TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems) 而获得。每样品平行地进行两份分析。放大和实时检测在 DNA Engine Opticon® 2 (MJ Research Inc.) 中进行。将靶基因的表达与 GAPDH 表达进行对比。

[0607] 统计分析

[0608] 按照合适的情况采用非配对学生 t 检验 (unpaired Student's t test) 或 Mann Whitney U 检验来检测显著性差异。所有数据表示为平均值 $\pm$ 标准误差。对于单个试验的标准水平在结果中给出。

[0609] 用 Cx43asODN 下调伤口部位的 Cx43

[0610] 发现 Cx43 主要表达于上皮的下层和中间棘状细胞层和完整皮肤的成纤维细胞、血管和皮肤附属物中。在伤后 6 小时, Cx43 在增殖的表皮中表达,但是在前缘角化细胞中开始下调。从受伤时间起在治疗的 2 小时内 Cx43asODN 的递送显著地降低了表皮和真皮中 Cx43 的蛋白表达。这种迅速阻断可能是因为 Cx43 蛋白的迅速代谢回转 (turn over) 所致,有时在 1.5 ~ 2 小时内就会发生。为了更精确地确定 asODN 治疗后 Cx43 蛋白和 mRNA 阻断和恢复的程度,我们采用实时 PCR (RT-PCR; 图 1) 比较了治疗位置与未治疗位置的 Cx43mRNA 的表达水平。伤后 1 天,与对照 sODN 治疗伤口比较, Cx43asODN 治疗伤口的 Cx43mRNA 的表达显著地降低 (2.95 与 4.7 单位分别对应于 asODN 和对照 sODN 治疗部位, 37% 的降低; $P < 0.05$)。然而,到伤后第 7 天,两个伤口状况的表达水平类似 (4.6 与 5.2 单位分别对应于 asODN 和对照 sODN 治疗部位)。对于伤后第 1 天、第 2 天和第 7 天伤口的免疫染色显示,在第 1 天与对照 (图 1) 相比, Cx43asODN 治疗伤口前缘的上皮真皮中 Cx43 蛋白的水平非常

低。到第 2 天,一些 Cx43 染色已经回复到 Cx43asODN 治疗伤口的真皮中,但是在上皮中水平仍然非常低。到第 7 天,与 RT-PCR 结果一致,经治疗与未治疗的之间 Cx43 染色没有明显差异。这些结果证实,当通过普流尼克凝胶递送时,该 Cx43asODN 在伤后早期的时间点确实抑制了 Cx43mRNA 的表达。

[0611] 在 Cx43asODN 治疗伤口中的闭合加速且增殖增加

[0612] 同样对伤口进行肉眼可见的拍照并数字测定其面积。这在前面我们已经报道的 (Qiu, C, Coutinho, P., Frank, S., Franke, S., Law, L. Y., Martin, P., Green, C R. and Becker, D. L. (2003). Targeting connexin 43 expression accelerates the rate of wound repair. *Curr Biol* 13, 1697-703), 与对照伤口相比,经 Cx43asODN 治疗的伤口在第 1 天和第 2 天显著地更小,更干,发炎程度更小,封闭更快。到第 7 天,覆盖伤口的结痂使得不可能获得伤口闭合的精确测量值。在伤后不久伤口边缘开始再生表皮细胞以覆盖裸露的部位。切除和切口伤的 Cx43asODN 治疗均使得伤口的上皮再生比对照 ODN 治疗的伤口更加迅速。因此,我们检测了这是否是部分由于角化细胞和成纤维细胞在 Cx43asODN 治疗伤口的愈合皮肤内的增殖增强所致 (图 2A 至图 2H)。当上皮伤口边缘的对照和治疗组之间的角化细胞增殖几乎没有差异时 (图 2E),我们证实,在第 2 天和第 7 天 (图 2F) 之后 Cx43asODN 治疗伤口的新生上皮中 BrdU- 阳性细胞的数目确实显著增加。同样地, BrdU- 阳性细胞计数表明,在第 1 天和第 2 天 (图 2G 和图 2H),经 asODN 治疗后在皮肤伤口边缘中的细胞稍微增多而在肉芽组织中却显著较多。这些结果与我们的总体显微观察结果一致,也暗示了在伤口部位 Cx43 的精确下调导致了随着上皮组织继续再生而使伤口边沿角化细胞增殖继续波动。这种增强的增殖可以有助于 asODN 治疗伤口中再生表皮覆盖作用的加速并增强肉芽组织成熟。

[0613] Cx43asODN 治疗伤口中发炎细胞 - 中性白细胞和巨噬细胞内向通量降低

[0614] 在组织损伤发炎响应期间随着不同的时间段几种白细胞谱系浸润伤口部位。两种主要的细胞谱系是中性白细胞和巨噬细胞,这两种细胞都能对修复过程的方方面面产生深远影响。我们先前已经评价了 Cx43asODN 治疗伤口中中性白细胞的内向通量 (influx),而在此我们采用抗 MP0 抗体进行证实,抗 -MP0 抗体的数目在第 1 天和第 2 天显著降低,而在这个阶段在对照治疗伤口 (图 3) 中中性白细胞数目却达到高峰。现在存在明显的证据,那就是在伤口部位的巨噬细胞内向通量或许与再生表皮覆盖速率相关,并与伤口部位的疤痕形成的实际程度有关,因此我们采用 F4/80 免疫组织化学研究巨噬细胞数目 (图 4A 至图 4C)。我们发现,在 Cx43asODN 治疗伤口部位的巨噬细胞数目在伤后第 2 天和第 7 天与对照 sODN 治疗伤口相比发生了显著下降,在第 2 天下降 33%,而在第 7 天下降 32% (图 4C)。这些数据清楚地表明,在受伤期间 Cx43 急剧阻断导致早期的中性白细胞以及后来的巨噬细胞以及发炎阶段随后也发生引人注目的下降。

[0615] 在 Cx43asODN 伤口中的 Cc12 和 TNF- α 表达下降

[0616] 在伤口部位的中性白细胞和巨噬细胞释放大量的各种促炎细胞因子和趋化因子,其能在该部位直接作用于细胞 (角化细胞、成纤维细胞和内皮细胞) 并放大伤口的炎性应答。为了检测 Cx43 阻断之后发炎细胞内向通量的降低如何影响这些信号的水平,我们分析了分别作为典型的趋化因子和细胞因子的 Cc12 和 TNF- α 。为了量化 Cc12 和 TNF- α 的表达水平,我们对伤口组织在第 1 天、第 2 天和第 7 天 (图 5A 和 5B) 实施了 RT-PCR 分析。两

种 mRNA 在对照 sODN 治疗伤口部位第 1 天强劲上调,而在第 2 天表达水平都出现峰值,之后其水平降低。通过对比,在 Cx43asODN 治疗伤口中 Cc12 和 TNF- α 的表达水平在第 2 天 (Cc12) 和第 7 天 (TNF- α) 发生显著下降 ($P < 0.05$)。这些结果表明, Cx43asODN 治疗伤口中的中性白细胞和巨噬细胞募集减少确实伴随着这些信号分子的表达减少,而没有受到其它细胞类型的补偿。

[0617] 为了量化 Cc12 和 TNF- α 的表达水平,对伤口组织在第 1 天、第 2 天和第 7 天实施了 RT-PCR 分析。两种 mRNA 在对照 sODN 治疗伤口部位第 1 天强劲上调,而在第 2 天表达水平都出现峰值,之后其水平降低。通过对比,在 Cx43asODN 治疗伤口中 Cc12 和 TNF- α 的表达水平在第 2 天 (Cc12) 和第 7 天 (TNF- α) 发生显著降低 ($P < 0.05$)。这些结果表明,在 Cx43asODN 治疗伤口中中性白细胞和巨噬细胞的募集减少确实伴随着这些信号分子的表达减少,而没有受到其它细胞类型的补偿。

[0618] Cx43asODN 治疗伤口部位处的 TGF- β 1 表达增加

[0619] 与伤口有关的生长因子 TGF- β 1,据报道在伤愈过程的许多方面起到各种各样的作用。因此,我们采用 RT-PCR 在伤后第 1 天、第 2 天和第 7 天 (图 6) 分析了对照 sODN 和 Cx43asODN 治疗伤口部位的 TGF- β 1 表达水平。TGF- β 1 在第 1 天和第 7 天水平较低,在对照伤口和治疗伤口之间没有差异。然而,在伤后第 2 天,与对照 sODN 治疗伤口相比,在 Cx43asODN 治疗伤口中的 TGF- β 1 表达发生了显著的升高 ($P < 0.05$)。对于在第 2 天的 TGF- β 1 免疫染色显示出在伤口部位和邻近组织中的真皮中都存在 TGF- β 1 阳性细胞。大多数这种细胞都是圆形的,具有白细胞的外观。然而,在 Cx43asODN 治疗的组织中,能够在伤口的真皮边沿看到大量其他的 TGF- β 1 阳性细胞类型。这些细胞看起来细长,在其形态学上更像成纤维细胞。有意思的是,在 Cx43asODN 治疗伤口的上皮中 TGF- β 1 显示出比对照伤口上皮 (图 6) 中更加强烈地染色。这些结果提升了 TGF- β 1 的表达增加可能有助于在 Cx43asODN 治疗后的伤口愈合中所见的某些变化的可能性。

[0620] 肉芽组织形成和成熟

[0621] 结缔组织伤口收缩据说是皮肤修复过程的一个关键因素。这个步骤与成纤维细胞迁移到创面床及其分化成收缩性的肌成纤维细胞以及随后的丧失紧密相关 (Martin, P. (1997). Science 276,75-81)。利用结合 DAPI 的若丹明鬼笔环肽进行核计数染色,与对照伤口 (图 7A 和图 B) 相比,我们发现在第 2 天 Cx43asODN 治疗伤口边沿处的伸长的成纤维细胞样细胞的数目发生了显著升高 (在对照中平均为 39.4 而在 asODN 中平均为 99.2 ; $P < 0.01$)。这些数据表明,当伤口中的 Cx43 蛋白减少时,形成伤口肉芽组织的成纤维细胞的内向通量得到了增强。这可能是由于我们在 asODN 治疗伤口的肉芽组织中所见的迁移增强和显著更多的细胞增殖所致。

[0622] 为了研究成纤维细胞迁移速率增加是否是由于 Cx43 蛋白表达降低所致,我们采用了成纤维细胞伤愈分析。此处,我们通过擦伤创面分析之前将 Cx43asODN 施用于成纤维细胞的铺满培养中 2 小时而阻断 Cx43 蛋白。因为 Cx43 蛋白迅速代谢回转 (半衰期短到 1.5 ~ 2 小时),这在 2 小时内足以产生 95% 的蛋白阻断,根据细胞类型这能够持续 8 ~ 48 小时。用 Cx43asODN 处理的成纤维细胞培养基与对照 (图 7D) 相比表现出伤口闭合的速率显著增强 ($P = 0.02$),这与我们在体内试验结果完全一致。这强烈地暗示了 Cx43 蛋白的阻断增强了体内和体外成纤维细胞的迁移速率,由此加快了肉芽组织形成的速率。

[0623] 当测量肉芽组织面积时,我们发现所治疗的组织的肉芽组织面积在第 5 天稍微小于未经治疗的组织,但是这个差异并不显著。然而,我们发现,在伤后第 7 天、第 10 天和第 14 天,经 Cx43asODN 治疗伤口表现出肉芽组织面积显著地 (* $P < 0.05$;** $P < 0.01$) 小于对照 sODN 治疗伤口的面积。

[0624] 当测量肉芽组织面积时,我们发现经治疗的组织的肉芽组织面积在第 5 天稍微小于未经治疗的组织,但是这个差异并不显著。然而,我们发现,在伤后第 7 天、第 10 天和第 14 天,经 Cx43asODN 治疗的伤口表现出肉芽组织面积显著地 (* $P < 0.05$;** $P < 0.01$) 小于对照 sODN 治疗伤口的面积 (图 9)。为了研究肉芽组织更迅速的收缩如何产生,我们用 TUNEL 标记的试剂盒对进行切片染色,或者以抗平滑肌肌动蛋白 (SMA) 作为肌成纤维细胞的标记,以期找寻凋亡性细胞死亡。尽管在所治疗的肉芽组织中一直存在较少的凋亡细胞,但是我们现在发现在伤后第 5、7 和 10 天对照和治疗动物之间 TUNEL 阳性细胞的数目没有显著差别 (图 10)。然而,我们在所有的这些时间点两组之间 SMA 染色的表达观察到非常显著的差异 (图 11)。在第 5 天,能够在 Cx43asODN 治疗伤口的肉芽组织的边缘检测到 SMA 染色,但是在对照伤口中没有观察到染色。到第 7 天, SMA 染色在对照伤口肉芽组织边缘和整个 Cx43asODN 治疗伤口肉芽组织中都能检测到 (图 11A 和图 11B)。在肉芽组织边缘处的染色量化处理表明,在 Cx43asODN 治疗的伤口中的染色显著更高 ($P = 0.004$) (图 11E)。在伤后第 10 天, SMA 的大多数染色已经从 Cx43asODN 治疗伤口肉芽组织边缘褪去,仅在该伤口的中间处残存很少的染色。这显著地不同于对照伤口 ($P = 0.000002$),这表明整个肉芽组织中存在强烈 SMA 表达 (图 11C 和图 11D)。这些结果暗示了在 Cx43asODN 治疗伤口中成纤维细胞分化成肌成纤维细胞出现较早,并且这些细胞运动接触伤口并比对照伤口中的损失更快。Cx43asODN 治疗的伤口在其肉芽组织迁移方面表现出比对照伤口要早 2 ~ 3 天。

[0625] 血管形成

[0626] 除了成纤维细胞的内向通量之外,伤口肉芽组织的其它主要细胞成分是新血管的内皮细胞。因此我们采用抗 CD31 和血管假性血友病因子抗体或异凝集素 B-FITC 进行免疫组织化学染色,以评价伤后第 5、7、10 和 14 天治疗伤口部位的血管形成 (图 12A 至图 12H)。在第 5 天,在对照伤口肉芽组织中未观察到血管染色,然而在所有的 Cx43asODN 治疗伤口的肉芽组织边缘都观察到出现染色。在第 7 天,在六个 Cx43asODN 治疗伤口中有 5 个的整个肉芽组织都发现了细小血管,但是在对照伤口中,细小血管仅仅刚开始进入肉芽组织边缘。然而,当 asODN 治疗伤口的血管更普遍深入时,它们看起来比在这个时间点的对照伤口中的血管明显更细或更薄 (图 12A)。这意味着,当在第 7 天和 10 天量化血管染色时,在对照伤口中存在显著更多的染色 (第 7 天 $P = 0.0019$;第 10 天 $P = 0.015$) 对照伤口中的血管更大。在第 14 天,血管的尺寸和染色程度在治疗组和对照组 (图 12E、12F) 中类似。这些结果表明,在 Cx43asODN 治疗之后血管形成更早发生。连同我们的其它有关肉芽组织成熟的结果,可以看出治疗使得伤口成熟速率加快了 2 ~ 3 天。

[0627] 如结果所示,在此处提出了利用由 Pluronic F-127 缓释凝胶将 Cx43asODN 递送至皮肤伤口愈合位置处的由 Cx43 的急剧下调作用产生的典型病理和生理后果。该治疗迅速下调了伤口部位上皮和真皮中的 Cx43 蛋白至少 24 小时,一些真皮表达的回需要 48 小时,而在 7 天之后两组之间没有明显差异。我们证实, Cx43asODN 治疗显著加速了皮肤伤口愈合,同时减少了白细胞浸润,减少了细胞因子,增加了表皮细胞再生,并增强了伤口收缩。

[0628] 发炎

[0629] 伤口的初始响应典型地就是形成血块,其与局部损伤的组织一起,释放促炎信号,这种信号引发炎症细胞以中性白细胞然后是巨噬细胞的形式浸润到伤口位置。这些信号和那些来自侵入炎症细胞的信号既影响了伤口上皮再生又影响伤口结缔组织收缩 (Martin, P. (1997). *Science* 276,75-81)。炎症细胞向伤口的迁移和浸润与细胞-细胞和细胞-基质间相互作用以及在伤口附近血管形成的血管舒张有关。近年来已报道 Cx43 的表达发生在活化的粒细胞中,并且在发炎条件下产生外渗期间在白细胞-白细胞和白细胞-内皮细胞接触位置发生,同时还报道了功能性 Cx43 通道与细胞因子和免疫球蛋白的释放有关(由以下文献综述:Oviedo-Orta, E. and Evans, W. H. (2004). *Biochim Biophys Acta* 1662, 102-12)。此处所报道的结果表明,中性白细胞和巨噬细胞的数量在 Cx43asODN 治疗的伤口中显著减少,这就需要保持中性白细胞的外渗的 Cx43 表达并释放促炎细胞因子。另外,该结果表明,据报道是中性白细胞和单核细胞/巨噬细胞的化学引诱物的趋化因子 Ccl2 和细胞因子 TNF- α (Rossi, D. and Zlotnik, A. (2000). *Annu Rev Immunol* 18,217-42),在 Cx43asODN 治疗之后的第 2 天和第 7 天也都分别发生了降低。显然,这些和伤口部位处的其他生长因子、趋化因子和细胞因子水平降低,是对伤口愈合有用的那些药剂是中性白细胞和其它炎症细胞内向通量降低的重要介体(既是上游的也是下游的)的指征。

[0630] 几个近来的报道已经提出假设认为正常的炎症应答对于皮肤伤口愈合并不重要 (Martin, P. and Leibovich, S. J. (2005). *Trends Cell Biol.*)。遗传上缺失中性白细胞和巨噬细胞的 PU.1 缺失小鼠,据说能够以与其野生型同属动物相似或更快的速率无疤痕修复皮肤损伤 (Martin, P., D' Souza, D., Martin, J., Grose, R., Cooper, L., Maki, R. and McKercher, S. R. (2003). *Current Biol* 13,1122-8)。类似地,据报道通过施用抗中性白细胞血清降低伤口部位的中性白细胞数目能够更快地实现上皮再生 (Dovi, J. V., He, L. K. and DiPietro, L. A. (2003). *J Leukoc Biol* 73,448-55)。在上皮迁移和增殖容量方面的增加和炎症应答降低与 Cx43 阻断在前缘角化细胞和成纤维细胞中的可能作用之间具有相互关系。而且,Cx43 阻断可能会导致白细胞内向通量降低。对于 Cx43asODN 作用的目标组织可包括内皮细胞或白细胞,这两种细胞据报道都需要有效外渗和强劲炎症应答的 Cx43 表达 (Oviedo-Orta, E., Hoy, T. and Evans, W. H. (2000). *Immunology* 99,578-90;Oviedo-Orta, E., Gasque, P. and Evans, W. H. (2001). *FASEB J* 15,768-74)。基于这些结果,在内皮细胞或白细胞中的 Cx43 蛋白表达的改变也可以调节炎症应答。

[0631] TGF- β 1

[0632] 在 Cx43asODN 治疗的伤口中,我们发现,与对照伤口相比, TGF- β 1 的 mRNA 在第 2 天显著增加,但是第 1 天和第 7 天在治疗的伤口和对照伤口中发现其水平相对较低。TGF- β 1 的表达据报道与伤口愈合过程的许多关键问题有关。其报道的活性包括免疫抑制作用、促进成纤维细胞的迁移和增殖、增强伤口收缩、增强肉芽组织形成、增强胶原合成和沉积、刺激血管形成和促进上皮再生。TGF- β 1 对伤口的影响据报道在某种程度上取决于剂量和伤口的模型。各种结果也基于 TGF- β 1 信号通路不同部份的干扰进行了报道并利用遗传修饰实验。例如,在 T 细胞和 B 细胞缺失的 TGF- β 1 敲除小鼠 (Scid^{-/-} 小鼠) 中,伤口愈合就发生了延迟 (Crowe, M. J., Doetschman, T. and Greenhalgh, D. G. (2000) *J. Invest. Dermatol* 115:3-11)。然而,当 TGF- β 1 信号通路中断时,正如在 Smad3 敲除

小鼠中那样,伤口愈合会加速 (Ashcroft, G. S., Yang, X, Glick, A. B., Weinstein, M., Letterio, J. L., Mizel, D. E., Anzano, M., Greenwell-Wild, T., Wahl, S. M., Deng, C. and Roberts, A. B. (1999) *Nat Cell Biol.* 1:260-6)。类似地, II 型显性负相 TGF- β 受体在角化细胞中的表达导致上皮细胞再生再次被加速。具有 TGF- β 1 过表达的转基因小鼠显示出更高质量的伤口愈合并减少疤痕的形成 (Shah, M., Revis, D., Herrick, S., Baillie, R., Thorpeirson, S., Ferguson, M. and Roberts, A. (1999) *Am. J. Pathol.* 154:1115-24)。类似地, 缺乏 β 3- 整联蛋白的转基因小鼠显示出与增强愈合和成纤维细胞更快向伤口迁移相关的 TGF- β 1 水平升高 (Reynolds, L. E., Conti, F. J., Lucas, M., Grose, R., Robinson, S., Stone, M., Saunders, G., Dickson, C, Hynes, R. O., Lacy-Hulbert, A. and Hodivala-Dilke, K. (2005) *Nat. Med.* 11:167-74)。CD18 敲除小鼠表现出 TGF- β 1 表达降低并且伤口愈合延迟, 这能够通过向伤口边缘注射 TGF- β 1 来挽救 (Peters, T., Sindrilaru, A., Hinz, B., Hinrichs, R., Menke, A., Al-Azzeh, E. A., Holzwarth, K., Oreshkova, T., Wang, H., Kess, D., Walzog, B., Sulyok, S., Sunderkotter, C, Friedrich, W., Wlaschek, M., Krieg, T. and Scharffetter-Kochanek, K. (2005) *EMBO J.* 24:3400-10)。

[0633] 我们在第 2 天观察到的 TGF- β 1 染色的水平升高, 主要出现在伤口边缘的伸长的成纤维细胞样细胞和伤口边缘的角化细胞中。这与先前描述的我们在组织修复的早期阶段观察到的 TGF- β 1 对强化增殖和迁移的影响是一致的 (Postlethwaite, A. E., Keski-Oja, J., Moses, H. L. and Kang, A. H. (1987) *JExp Med* 165:251-6)。确实, 根据我们在早期时间点观察的成纤维细胞增殖和迁移速率升高以及胶原合成速率增强, TGF- β 1 升高可能是在这些有助于促进伤口愈合的条件的众多因素中之一。

[0634] Cx43 蛋白活性下调和与伤口有关的生长因子 TGF- β 1 的行为据报道能够激活 Col1 α 1 的表达 (Cutroneo, K. R. (2003). *How is Type I procollagen synthesis regulated at the gene level during tissue fibrosis.* *J Cell Biochem* 90,1-5; Waggett, A. D., Benjamin, M. and Ralphs, J. R. (2006) *Eur J Cell Biol* 2006 Jul 19; [Epub ahead of print])。我们在以下治疗中所观察到的 Col1 α 1 表达和胶原沉积增强可能与第 2 天的 TGF- β 1 表达增加有关, 或者与 Cx43 蛋白下调有关, 或者与二者都有关。

[0635] 与伤口有关的生长因子、TGF- β 1, 在伤口愈合过程的许多方面都起到了各种各样的作用。TGF- β 1 在第 1 天和第 7 天水平较低, 经治疗的伤口和对照伤口之间没有差别。然而, 在伤后第 2 天, 与对照 sODN 治疗伤口相比, 经 asODN 治疗的伤口中 TGF- β 1 的表达显著增加 ($P < 0.05$)。TGF- β 1 的免疫染色在第 2 天在伤口部位和邻近组织的真皮中都显示出 TGF- β 1 阳性细胞。大多数细胞都是圆形的, 具有白细胞外观。然而, 在 Cx43asODN 治疗的组织中, 在伤口上皮边缘能够观察到数量巨大的其他类型的 TGF- β 1 阳性细胞。这些细胞呈细长形, 在形态学上更类似于成纤维细胞。感兴趣的是, 在 asODN 治疗的伤口上皮细胞中的 TGF- β 1 表现出比对照伤口上皮细胞中更加强烈的染色 (图 6)。这些结果提升了 TGF- β 1 的表达增加可能有助于在按照 Cx43asODN 治疗后的伤口愈合中所见的某些变化的可能性。

[0636] 当 TGF- β 1 被认为能够抑制发炎时, 其不可能成为导致我们所观察到的发炎降低的主要因素, 这一点在 TGF- β 1 升高之前第 1 天就已经是很明显的。类似地, 当 TGF- β 1 已经证实在伤口愈合过程中的后期阶段促进了血管形成和肉芽组织成熟时, 我们在这些后期时间点没有观察到 TGF- β 1 升高; 而是那时其处于与对照类似的低水平。因此, 其它因素必

定促进了我们所观察到治疗后的肉芽组织成熟增强。

[0637] 这些实验支持了 TGF- β 1 已经涉及到抑制发炎、促进伤口愈合过程的血管形成和肉芽组织成熟的论断,并表明结合其它伤口治疗方式的 TGF- β 1 的调节能够用于促进伤口愈合过程。

[0638] 迁移和增殖

[0639] 成纤维细胞和角化细胞的迁移和增值对于皮肤伤口愈合而言是不可或缺的,既有助于伤口收缩,又有助于伤口闭合。在该研究中我们证实,采用 Cx43asODN 治疗能够增强成纤维细胞向伤口位置的迁移,并能加快表皮细胞再生。这些结果表明,Cx43 或许在调节细胞迁移中起到重要作用。关于 Cx43 在细胞迁移中的作用,其他人已经报道了与之相矛盾的结果,即报道了在胚胎发育中,Cx43- 不足的心外膜下细胞 (proepicardial cell) 的迁移比那些表达 Cx43 的更快 (Li, W. E., Waldo, K., Linask, K. L., Chen, T., Wessels, A., Parmacek, M. S., Kirby, M. L. and Lo, C. W. (2002). *Development* 129, 2031-42)。然而,同组之前也已报道,Cx43 不足的神经嵴细胞显示出迁移速率降低 (Huang, G. Y., Cooper, E. S., Waldo, K., Kirby, M. L., Gilula, N. B. and Lo, C. W. (1998). *J Cell Biol* 143, 1725-34)。后者的结果与具有通信干扰或 Cx43 表达减少的视神经上皮细胞的迁移速率减慢相一致 (Pearson R., Luneborg, N., Becker, D. L. and Mobbs P. (2005) *J. Neurosci* 25(46), 10803-10814)。在通信对迁移影响方面的这些差异或许反映了所涉及的不同细胞类型,以及细胞迁移是独立的还是处于通信组中。

[0640] 上皮细胞更快再生和肉芽组织形成速率加快,还可以有助于 asODN- 治疗组中增殖的强化,我们已经在伤后第 2 天和第 7 天新生上皮和肉芽组织中发现了这一点。与迁移速率一样,存在有关 Cx43 表达和增殖的混合报道。Cx43- 不足的心外膜下细胞增殖增加,但是在 Cx43- 不足的心神经嵴细胞中或者在用 Cx43asODN 治疗的发育中的神经视网膜细胞中却并未观察到,其中增殖是降低的 (Huang, G. Y., Cooper, E. S., Waldo, K., Kirby, M. L., Gilula, N. B. and Lo, C. W. (1998). *J Cell Biol* 143, 1725-34; Becker, D. L. and Mobbs, P. (1999) *Exp. Neurology*, 156, 326-332; Li, W. E., Waldo, K., Linask, K. L., Chen, T., Wessels, A., Parmacek, M. S., Kirby, M. L. and Lo, C. W. (2002). *Development* 129, 2031-42)。有意思的是,Cx43 对心外膜下细胞的影响既促进了增殖和迁移,而对神经嵴和视神经上皮细胞的影响却是干扰了增殖和迁移。在此我们的实验表明,在成纤维细胞伤口愈合分析中采用 asODN 降低 Cx43 表达显著地加速了其迁移速率。因此,Cx43 蛋白的下调可以辅助加速上皮细胞再生和成纤维细胞迁移到我们在此所见的肉芽组织中。可替代地,这种影响可能来自 TGF- β 1 水平的升高,在 Cx43asODN 治疗伤口中第 2 天我们就观察到这种现象,这已经隐含表明对细胞增殖起到增强作用,对成纤维细胞迁移起到了加速作用 (Mustoe, T. A., Pierce, G. F., Thomason, A., Gramates, P., Sporn, M. B. and Deuel, T. F. (1987). *Science* 237, 1333-6; Postlethwaite, A. E., Keski-Oja, J., Moses, H. L. and Kang, A. H. (1987) *J Exp Med* 165 :251-6) 或者二者的组合。

[0641] 血管形成

[0642] 血管形成是肉芽组织形成和成熟的另一重要特征,涉及到细胞侵入、延伸和随后的重塑。在本研究中,血管生长进入 Cx43asODN 治疗伤口的肉芽组织中要比对照伤口进展得快得多。在第 5 天,就能观察到细血管进入到所有治疗伤口的肉芽组织中,而在任何对照

肉芽组织中都没有观察到血管。到第 7 天,在大多数治疗伤口中遍及整个肉芽组织都能观察到细血管,但是在对照伤口中仅仅只能在其边缘处观察到。有意思的是,在对照伤口中的血管在这些早期阶段呈现较粗,因此在第 7 天和第 10 天表现出显著更高的染色面积。到第 14 天,在治疗伤口中的血管已经发育到较大的尺寸,看起来与对照伤口中非常类似。已知 Cx43 与冠状动脉形成和血管形成有关 (Walker, D. L., Vacha, S. J., Kirby, M. L. and Lo, C. W. (2005). *Dev Biol* 284, 479-98)。然而,在对照伤口和治疗伤口中,伤后第 7 天的 Cx43 蛋白水平类似的观察结果隐含表明,在该阶段 Cx43asODN 治疗的伤口中血管形成最可能是受到我们在早期所见的反义介导的变化的间接影响。通过早期提升 TGF- β 1 的水平促进血管形成是可能的,因为据报道这种生长因子能够促进血管形成 (Roberts, A. B., Sporn, M. B., Assoian, R. K., Smith, J. M., Roche, N. S., Wakefield, L. M., Heine, U. I., Liotta, L. A., Falanga, V., Kehrl, J. H. et al. (1986). *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 4167-71),但是其时间范围不匹配。

[0643] 肉芽组织成熟、收缩和细胞死亡

[0644] 经 Cx43asODN 治疗的肉芽组织面积始终小于对照伤口的肉芽组织面积。这可能是由于几个因素所致。炎性应答降低对于伤口愈合过程的后期阶段具有若干冲击效应 (knock-on effect)。中性白细胞侵入的降低会导致周围组织的损伤降低,而大多数切除性伤口随着发炎过程的介入在伤口愈合的前几天在尺寸上是延伸的,而在经治疗的伤口中在相同的时期内却是显著地收缩的。因此,减少发炎会预期导致成纤维细胞填充的面积显著更小。因为我们已经观察到的其它关键影响之一是成纤维细胞增殖和迁移增强,其能够更快地填充较小的伤口,并且肉芽组织能够显著更快地开始成熟。

[0645] 总之,这些研究报道了我们对伤口位置 Cx43 蛋白减少的细胞生物学下游机理的第一手数据的领先分析。局部下调作用强烈地影响着伤口愈合的非常早期事件。具体而言,其限制了炎性应答的程度并推进了上皮细胞再生的开始和速率以及肉芽组织形成的水平和速率。然后肉芽组织需要填充的面积更小且填充更快,以导致伤口收缩和成熟更早。该方法明显为各种临床条件下改善伤口愈合提供了可能的新疗法。

[0646] 基于这些结果,在皮肤伤口部位的连接蛋白 43 表达的实验下调显著地改进了伤口愈合的速率和质量。修复过程的生理学和细胞生物学方面对使用或不使用典型的抗连接蛋白药剂 - 连接蛋白 43 反义多核苷酸治疗的情况进行了对比。经治疗的伤口表示出皮肤伤口愈合加速,角化细胞、成纤维细胞增殖和迁移显著地增加。在成纤维细胞伤口愈合模型中,连接蛋白 43 的体外阻断还导致了伤口愈合显著更快,这都与伤口部位的转化生长因子 β 1 mRNA 的增加,以及胶原 α 和普通胶原含量有关。经治疗的伤口表明,由于血管形成、肌成纤维细胞分化和伤口收缩更为迅速,肉芽组织形成和成熟增强明显提前了 2 ~ 3 天。经治疗的伤口中的中性白细胞和巨噬细胞的募集都显著减少,伴随的白细胞浸润也减少。由此在伤口部位趋化因子配体 2 和肿瘤坏死因子 α 的 mRNA 水平也降低。这些数据表明,在这些条件下,在伤口部位的皮肤愈合过程的早期降低连接蛋白 43- 特异性反义的连接蛋白 43 蛋白质,至少部分地通过加速细胞迁移和增殖以及通过减少炎症及其能够导致的其它损害而使修复作用得以增强。

[0647] 在伤口部位的 Cx43 蛋白急剧地下调,导致角化细胞的增殖和迁移增加,还导致了成纤维细胞迁移到伤口中并产生胶原基质的速率也增加。这关系到中性白细胞浸润降低以

及趋化因子配体 2 (Ccl2) 和细胞因子肿瘤坏死因子 α (TNF- α) mRNA 的随之降低。其次,观察到巨噬细胞的募集减少,或许是由于初始炎性应答下降的结果所致。相比之下,随着羟(基)脯氨酸和胶原引导增加而在 Cx43asODN 治疗伤口中观察到 TGF- β 1 的表达增加。这些修饰的应答一起导致伤口愈合发生显著的改善。

[0648] 实施例 2

[0649] 细胞脱落的猪间质组织嵌合体培养 2 周,然后利用生长因子 / 细胞因子抗体分析测量 120 种不同生长因子 / 细胞因子的蛋白质水平来进行评价。

[0650] 将角膜成形术(移植术)的中心角膜切除后由手术恢复的人角膜缘放置于空气液体界面的有机型培养基(organotypic culture)中并将裸露的猪间质细胞外基质插入到该中部区域中(图 14)。通过在液氮中冻融而使猪间质基质裸露(除去细胞)。

[0651] 嵌合体生长长达 2 周,此时人体角膜缘上皮细胞已经发生上皮细胞再生,且具有标准 5 至 7 层细胞的猪间质完全分化上皮细胞。另外,人角膜缘间质角膜细胞已经增殖和迁移通过角膜缘-间质而插入以使得猪间质基质与人角膜细胞一起再生。

[0652] 在其它实验中,用连接蛋白 43 特异性反义 ODN 在第 1 天处理嵌合体。这导致了上皮细胞再生速率显著增加,而与 7 至 14 天的对照相比,猪间质在 3 天内被上皮细胞完全覆盖。

[0653] 两周后在培养基中将嵌合体分成两半:一半用于组织学分析,而另一半用于生长因子和细胞因子矩阵分析。对于生长因子和细胞因子分析,除去中部间质区域(具有完全恢复的人上皮细胞)和部分再生的间质(人角膜细胞)并与含有干细胞群的人体角膜缘分别均质化。组织均浆继续进行生长因子 / 细胞因子矩阵(图 15)并采用矩阵膜的光密度分析法进行生长因子水平分析。关键生长因子的分析揭示了许多感兴趣的问题(图 16 和 17)。

[0654] 与培养两周后的嵌合体的角膜缘区域(对照角膜-而不是经反义治疗的角膜)相比,嵌合体间质中的生长因子水平的分析显示出了两种特别感兴趣的生长因子(图 16)。在嵌合体间质中 IGFBP-2 具有非常高的水平而在角膜缘中 IGF-1 具有更高的水平。前者据说能促进细胞迁移(这是间质角膜细胞迁入再生到角膜缘间质中所需的)而后者据说能够促进细胞增殖(在角膜缘中提供再生间质的细胞源所必需的)。

[0655] 在嵌合体间质中生长因子水平分析,与两周后培养基中 Cx43asODN 治疗的嵌合体的角膜缘区域相比,显示出了两种特别有感兴趣的生长因子(图 17)。与未经治疗的对照物相比,在反义治疗的嵌合体间质中 IGF-7 具有非常高的水平,而与未治疗的对照物,尤其是对照角膜缘相比,在角膜缘和间质二者之中 IGFBP-2 具有更高的水平。前者据说能促进表皮生长(这与反义治疗嵌合体中所见的上皮细胞再生的增加是一致的)而后者据说能够促进细胞迁移(这与反义治疗的角膜缘表皮细胞再生的增加是一致的)。

[0656] 实施例 3

[0657] 利用含有抗连接蛋白药剂、10 μ g/mL KGF、30ng/mL PDGF 同种型、10ng/mL IGF-1 和 30ng/mL IGFBP-1 的喷雾制剂来治疗二级烧伤。喷雾容许口昂起中干燥。每两个小时重复施用。

[0658] 实施例 4

[0659] 使缝合的伤口闭合,并在包扎之前将由抗连接蛋白药剂、10% KGF 和 / 或 5% PDGF

组成的局部施用药膏涂施到缝合的伤口上。为了有利于或改善伤口愈合,根据需要进行药膏的重复施用,例如每天施用达 2 ~ 3 次,施用约 4 ~ 7 天,或者适当地进行施用。

[0660] 实施例 5

[0661] 将含有抗连接蛋白药剂和 5 % KGF、2.5 % PDGF、10 % IGFBP 中的一种或多种的 20 % 氧化锌制剂施加到较小的擦伤、晒伤和磨伤上而加快这些伤口的愈合。

[0662] 实施例 6

[0663] 含有抗连接蛋白药剂和一种或多种抗生物成分,例如,杆菌肽、新霉素和多粘菌素中的一种或多种的制剂制备而成。在这种制剂中,每克含硫酸多粘菌素 B(5,000 单位)、杆菌肽锌(400 单位)和 / 或新霉素(3.5mg)。制剂的惰性成分可以按所需含量包括可可油、棉籽油、橄榄油、丙酮酸钠、醋酸维生素 E 和白凡士林。优选抗连接蛋白药剂是抗连接蛋白 43 药剂。这种制剂例如施用于较小的割伤、擦伤、晒伤和磨伤而加快 / 改进这些伤口的愈合。

[0664] 实施例 7

[0665] 制备如实施例 6 提供的含有抗连接蛋白药剂的制剂,其还含有局部镇痛剂(例如,普莫卡因)。

[0666] 实施例 8

[0667] 制备如实施例 6 或实施例 7 提供的含有抗连接蛋白药剂的制剂,其含有短杆菌肽。

[0668] 实施例 9

[0669] 制备含有抗连接蛋白药剂和一种或多种活性抗真菌成分(例如含硝酸咪康唑)的制剂。这种制剂含有 2 % 的硝酸咪康唑。惰性成分可以包括聚乙二醇 300、聚山梨酸酯 20(和)、SD 醇 40B。产品可以配制成霜剂、凝胶剂、喷雾剂或液体。用于喷雾剂的合适推进剂包括甲醚。优选抗连接蛋白药剂是抗连接蛋白 43 药剂。这种制剂例如适用于治疗足癣、股癣和金钱癣。

[0670] 实施例 10

[0671] 该实施例采用角膜模型举例说明识别伤口治疗中有用的潜在细胞因子的方法。角膜含有已知称为朗格汉斯细胞(Langerhans cell)的树突细胞,其响应受伤而被活化。然后从边缘的血管募集其他的炎性细胞。我们的模型角膜与血液供给保持分离培养,因此不可能募集到巨噬细胞、T-细胞核和多形核细胞(polymorphonuclear cell)。

[0672] 模型角膜用于测定朗格汉斯细胞的存在是否足以限定炎性应答以及该应答是否能够与伤口愈合应答区别开。利用不同技术将两个配对的人角膜弄伤。一个角膜采用激发态激光光治疗性角膜切削烧蚀法烧蚀成直径为 7mm 深度为 80 μ m 的伤口,该技术刺激的非常低水平的炎症。另一角膜采用浸泡在氢氧化钠中 1 分钟的 7mm 的圆形滤纸弄伤,已知这种技术能诱导发炎。培养 24 小时后,将该角膜对半分开(一半用于免疫组织化学测定,另一半用于细胞因子分析)。在进行细胞因子矩阵分析之前在治疗区和治疗区外进一步将该角膜分成若干部分。

[0673] 在两种角膜中都检测到炎性应答,但是在碱灼伤中炎性应答增强。由于在碱灼伤样品中的发炎程度更大,而在激光灼伤角膜中由于需要去除的坏死组织较少且伤口愈合开始较快,因此两组之间的细胞因子分布是必需的。图 18 表明,在两种伤口中细胞因子组均增加而在发炎伤口模型中增加多得多。该组包含了白细胞介素。图 19 示出了在两个模型中

增加的一组细胞因子,但是在低发炎模型中增加更多,由此代表旨在改善伤愈的细胞因子。

[0674] 在伤口愈合模型中各种细胞因子的效力通过评价伤口愈合模型中细胞因子增加的影响进行测定。另外,还对增加伤口愈合速率和改善伤口愈合质量的所感兴趣的细胞因子的能力进行了评价。

[0675] 实施例 11

[0676] 该实施例示范了测定治疗用的细胞因子的方法。细胞因子在本文中可以基于其按照 Cx43asODN 治疗诱导的可变水平选择施用。例如,当它们在角膜移植模型的伤口愈合中外源性给药时,这些细胞因子能够对角膜伤口愈合产生影响。

[0677] 模型:采用插入猪间质移植技术的成对人角膜缘在培养的用于细胞因子水平变化的角膜移植模型中测试。所加入的细胞因子的组织水平通过矩阵数据计量。对于当时的研究,在伤愈过程开始之时加入细胞因子。如果需要的话,采用另外的数据点来确定最佳治疗时间。在伤愈与 Cx43asODN 模型相同时间段进行的情况下,则培养时间对第 3 天和第 7 天进行评价。利用暗视野显微镜法确定并根据必要情况调整伤愈时间段。

[0678] 技术:每种细胞因子 5 对角膜缘用于逐级增加的剂量而建立剂量响应曲线。

[0679] 除了在未缝合角膜伤愈中形成的上皮栓用于分离间质伤口愈合的上皮伤口愈合之外,按照实施例 9 中所述采用相同的方法用于角膜伤愈研究。影响上皮恢复的因素与间质细胞的影响分开进行评价。在一些情况下,增加角膜上皮伤愈而保存屏障保护或许是优选的,但是不能增加间质伤口愈合,这或许会引起混浊。

[0680] 在角膜伤口愈合中所感兴趣的细胞因子进行了识别。例如,所推荐的因子包括标准组织研究中的 IGF 和 IGFBP2 和反义研究的 FGF-7。

[0681] ***

[0682] 所有专利、出版物、科学著作、网站和其它文献以及本文中提及的或参考的资料是本发明所属领域中技术人员水平的指示,而每一种这种参考文献和资料由此结合于此作为参考的程度,如同以其全文单个结合于此或者以其全文罗列于此作为参考一样。申请人保留将来自任何这种专利、出版物、科学著作、网站、电子可获得的信息和其它参考资料或文献的任何所有资料和信息物理地引入到该说明书中的权利。

[0683] 本文中描述的特定方法和组合物是优选实施方式的代表,是示例性的而不是为了限制本发明的范围。本领域的技术人员根据本说明书就会想到的其它目的、方面和实施方式,它们都涵盖在由权利要求范围所限定的本发明精神中。对于本领域技术人员来说,对本文公开的本发明作出各种替换和修改而不偏离本发明的范围和精神是显而易见的。在本文中适当举例说明地描述的本发明可以无需任何元素或组件,或者限制或限定地实施,这在此并未作为本质而具体公开。因此,例如,在本文中本发明的每一实例、实施方式或实施例中,任何术语“含有”、“基本由... 组成”和“由... 组成”在本说明书中任何两个术语可以进行替换。而且,术语“包含”、“包括”、“含有”等都应广义地进行理解而无限制。本文中适当举例说明的方法和工艺过程可以按照不同的步骤次序实施,而没有必要限制本文中或权利要求中所示的步骤次序。这也如本文中或所附权利要求中所使用的,除非上下文另外明确指出,单数形式“一个”、“一种”和“该”也包括其复数参考物。本专利无任何条件解释限制于本文中具体公开的特定实施例或实施方式或方法。本专利无任何条件被任何检测员或任何其他官方或专利审查员和商标部门所作的任何声明而进行限制性解释,除非这种声明

通过申请人以书面回复形式特定地而无条件或限制地明确采纳。

[0684] 已经采用的术语和表达是用作描述性的术语而非限制性的,使用这种术语和表达并不是为了特意地排除任何本文中所示和描述特征的等价物或其部分,而是应该认知到,各种修改是可能的,都在权利要求所要求的本发明范围内。因此,应该理解,尽管本发明已经通过优选实施方式和可选的特征特定地公开,本领域技术人员仍可以采用本文中公开的概念改变和变体,这种改变和变体都被认为属于由所附权利要求所限定的本发明范围内。

[0685] 本发明在本文中进行了广义和普遍性地描述。每一属于一般性公开中的狭义物种和子类组群也构成了本发明的部分。这包括带有从种群中排除任何受试者物质的限制条件或负面限制的本发明一般性描述,不管是否是离体物质,都特定地引用于此。

[0686] 其它实施方式均包括在以下权利要求的范围内。另外,本领域技术人员都将认知到,以马库什组描述的本发明的特征或方面之处,本发明也由此根据马库什组的任何单个成员或成员的亚组来描述。

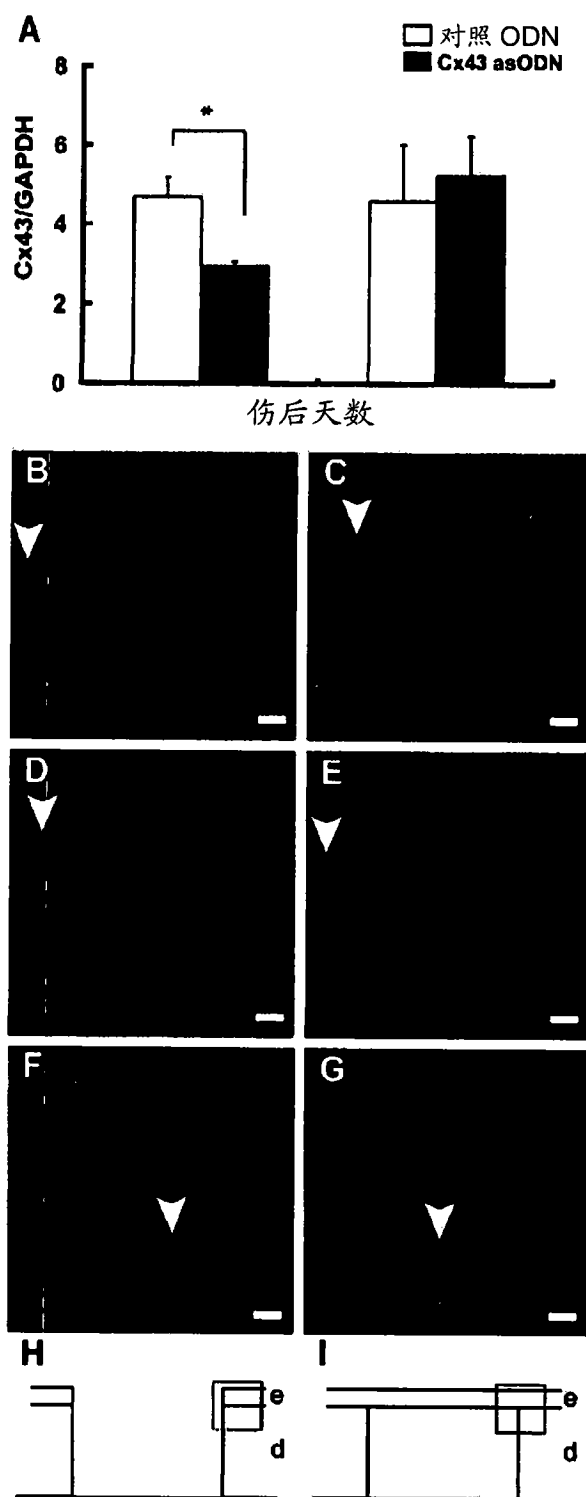


图 1

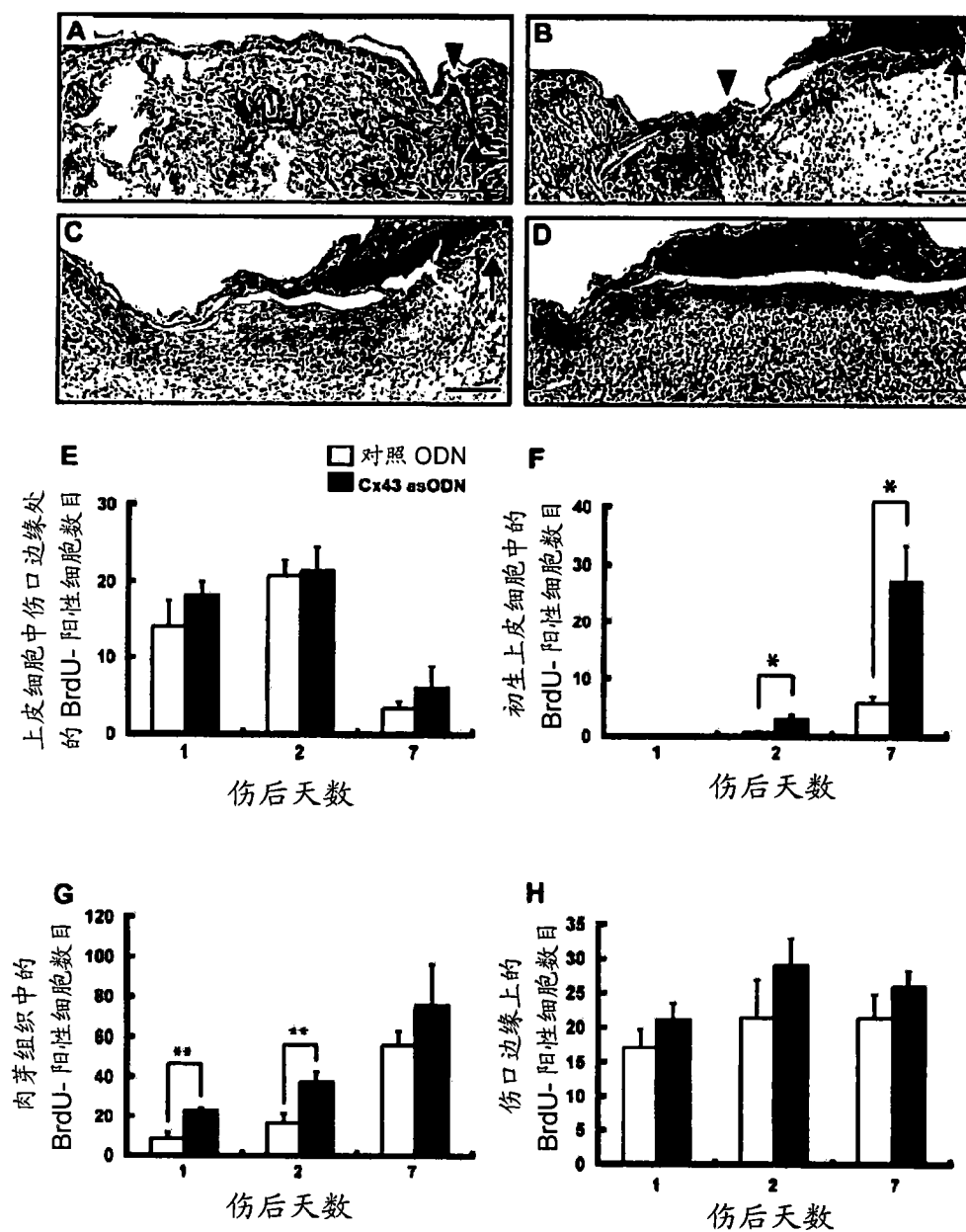


图 2

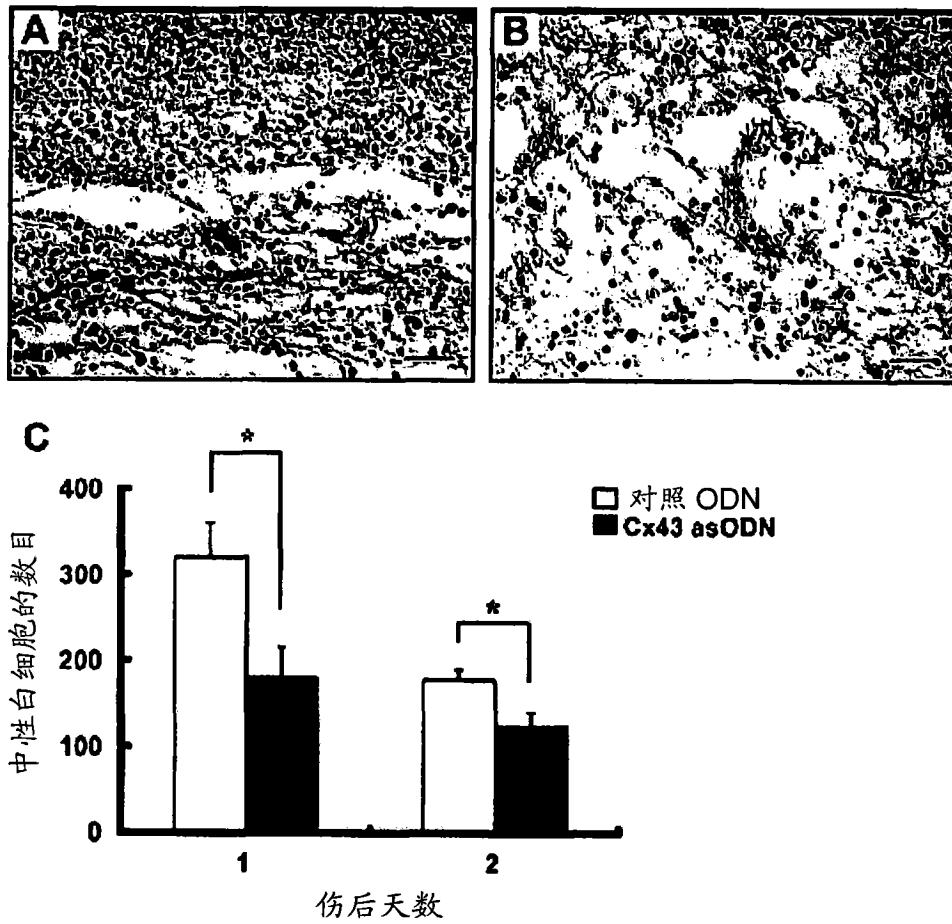


图 3

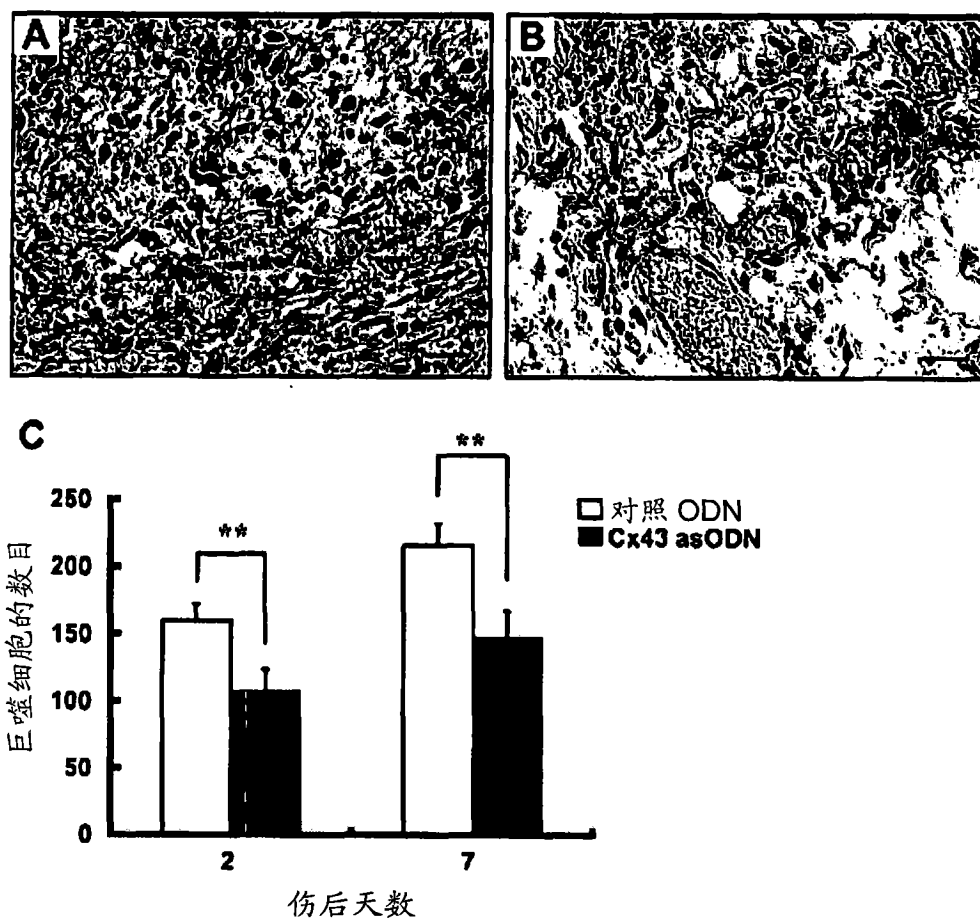


图 4

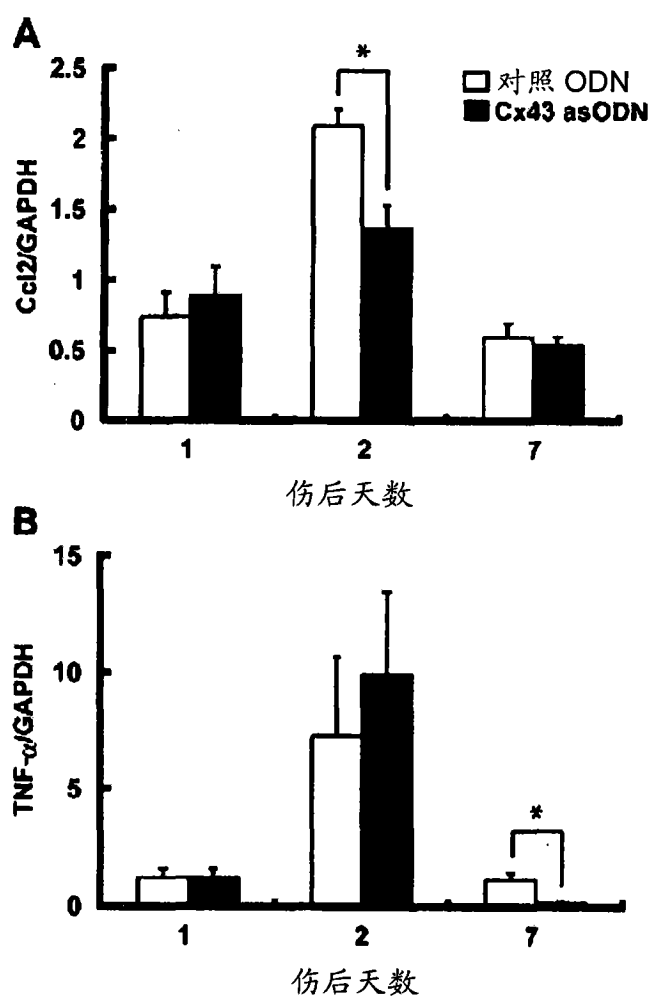


图 5

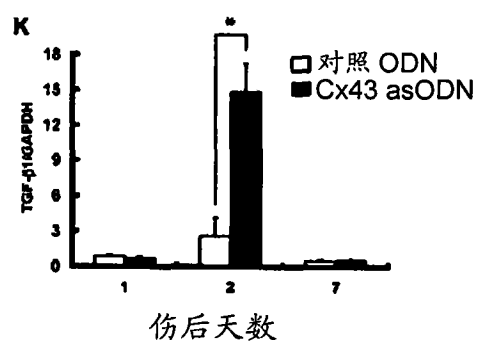
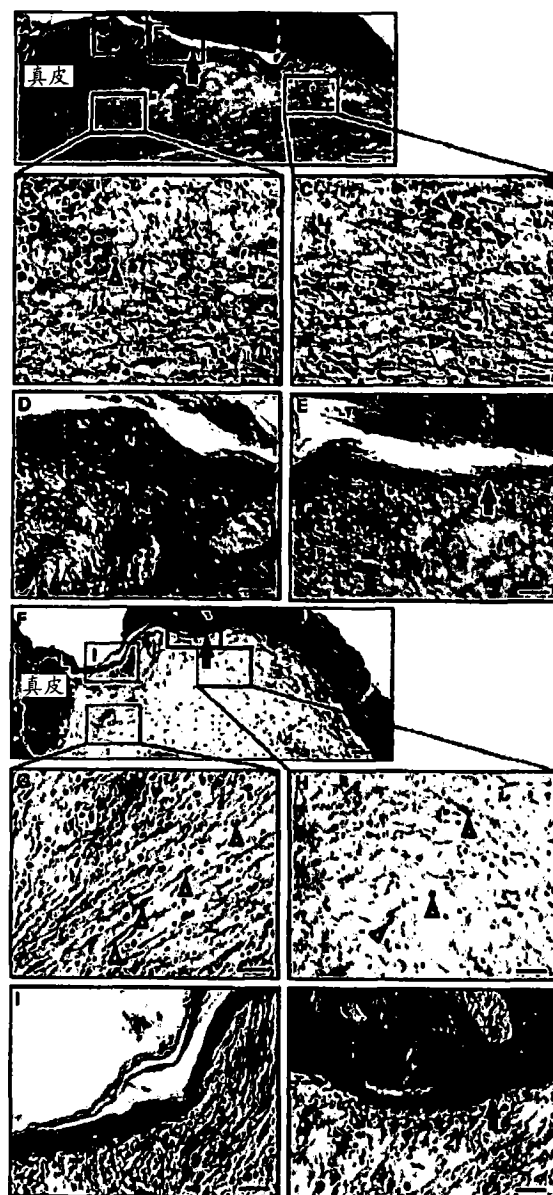


图 6

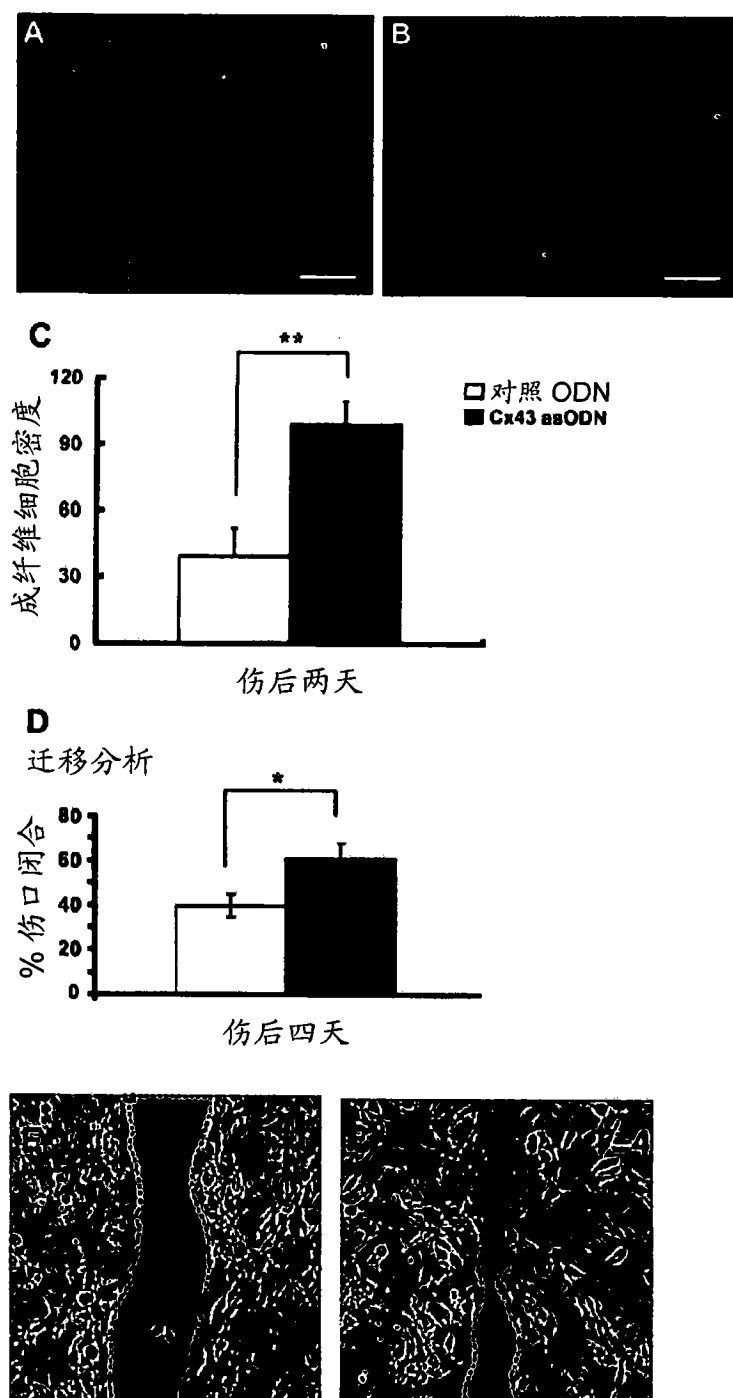


图 7

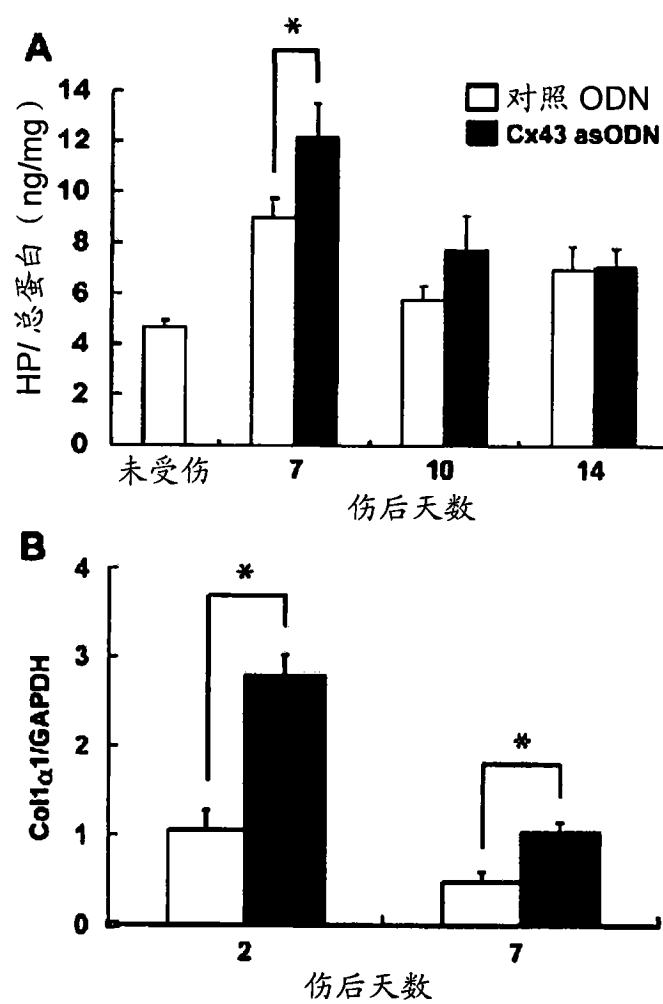


图 8

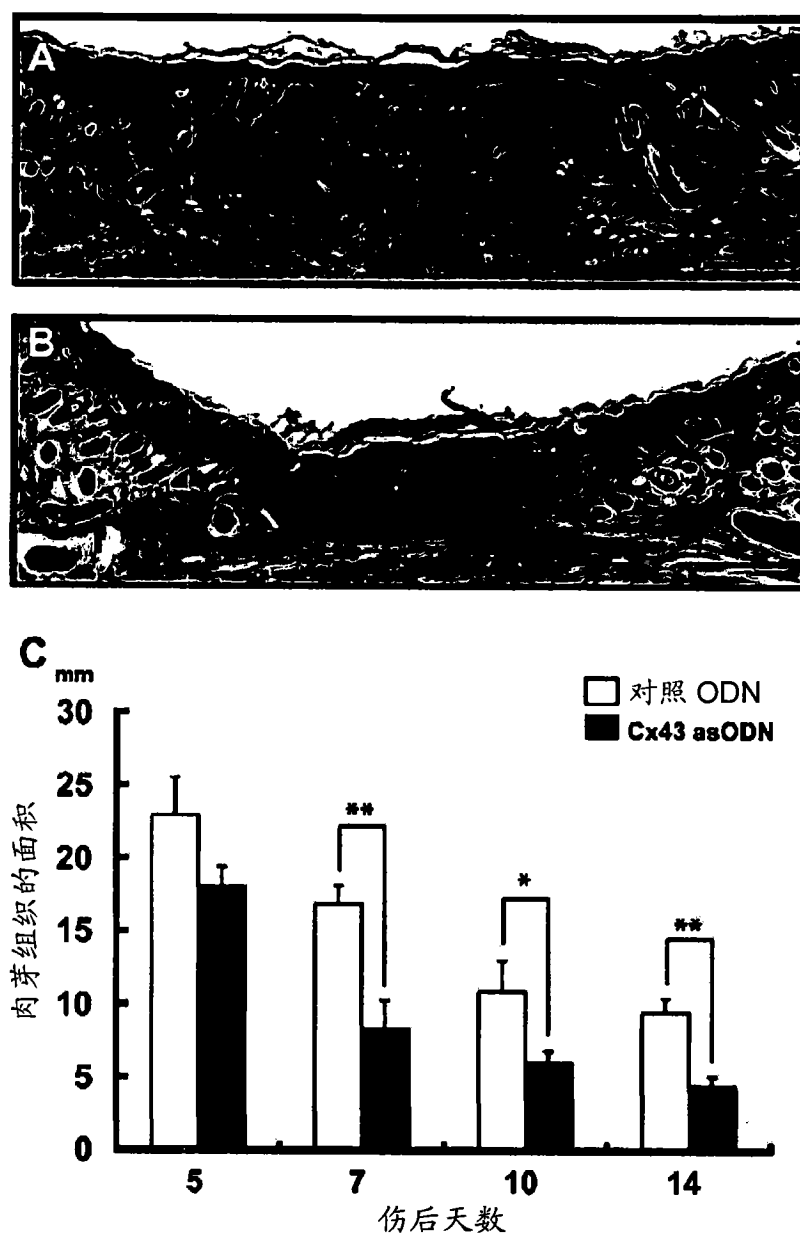


图 9

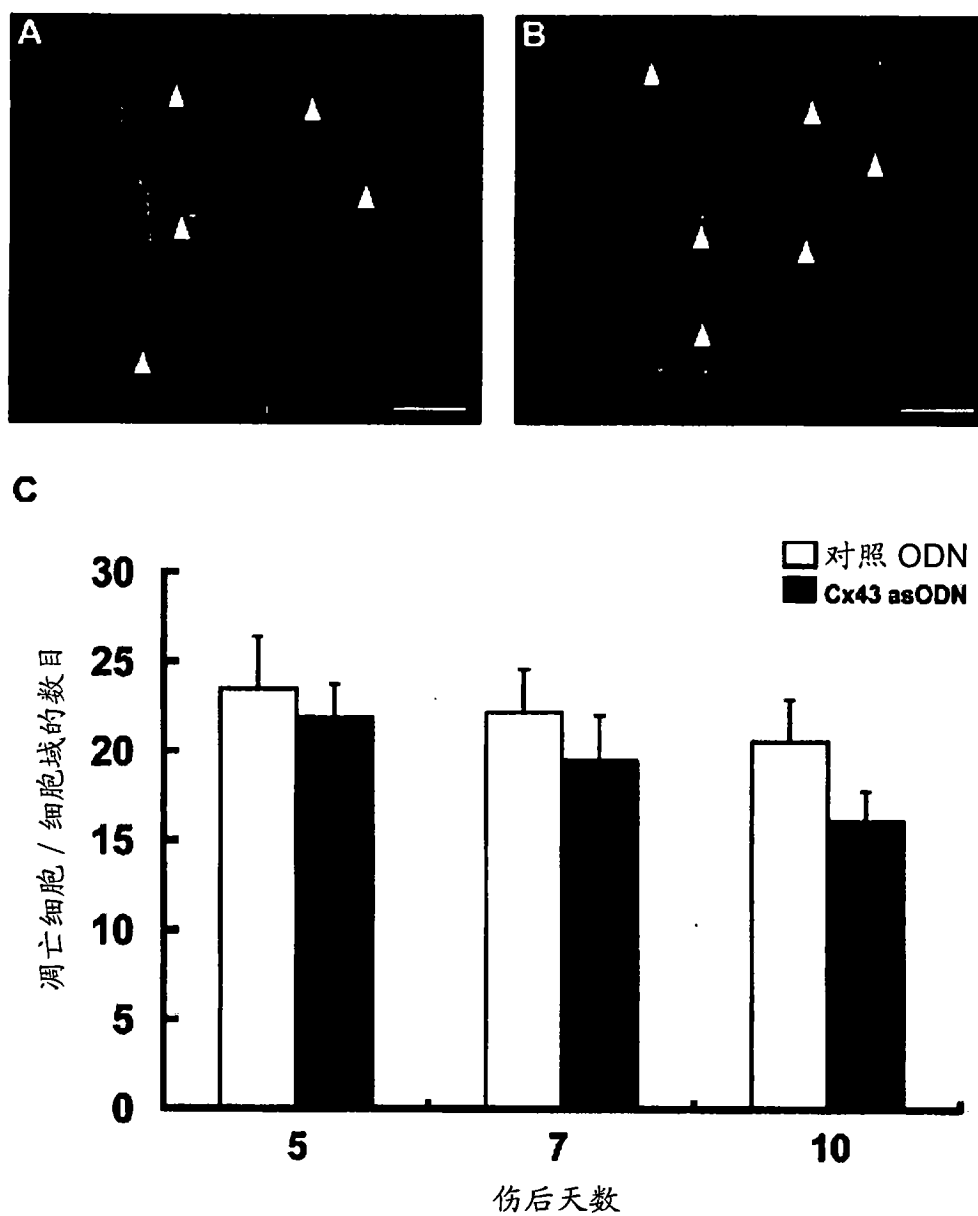


图 10

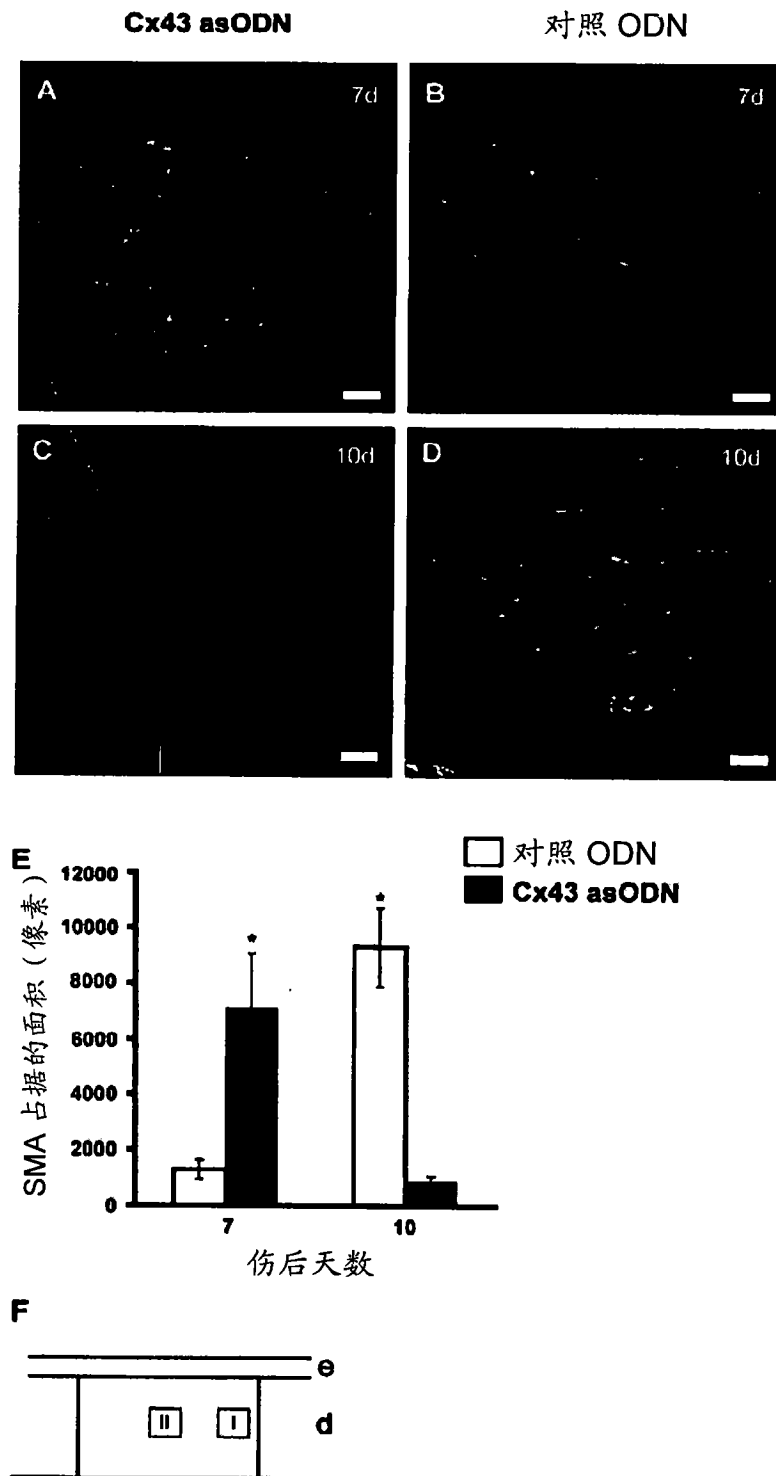


图 11

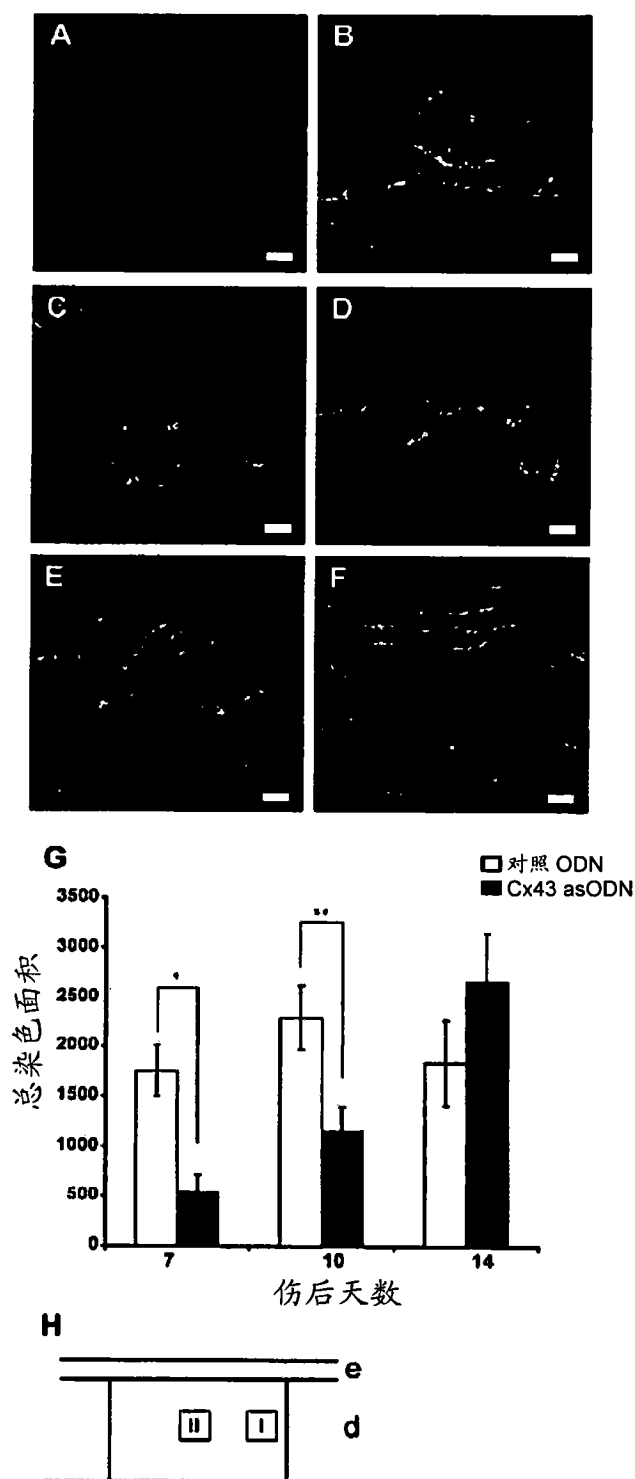


图 12

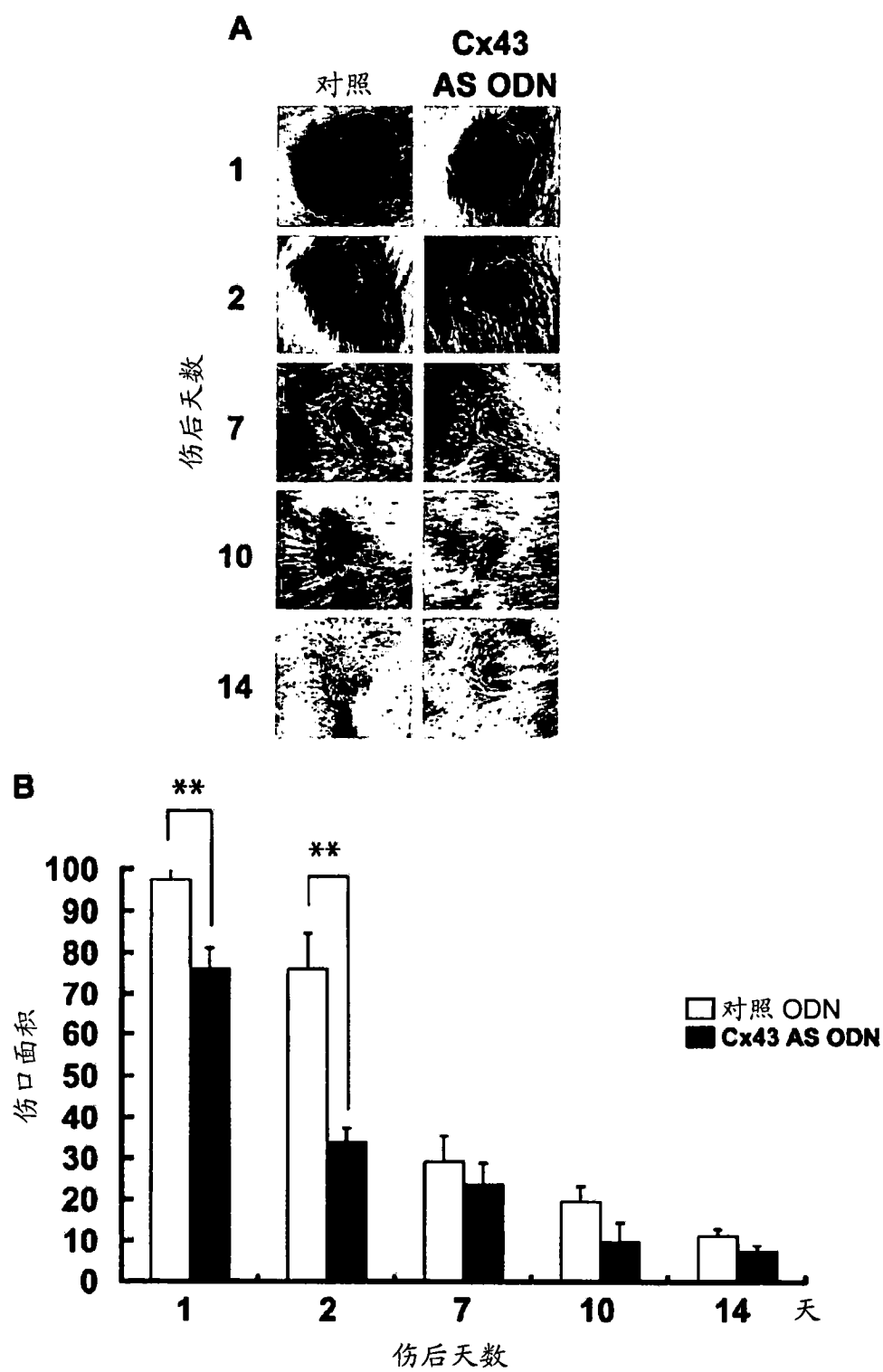


图 13

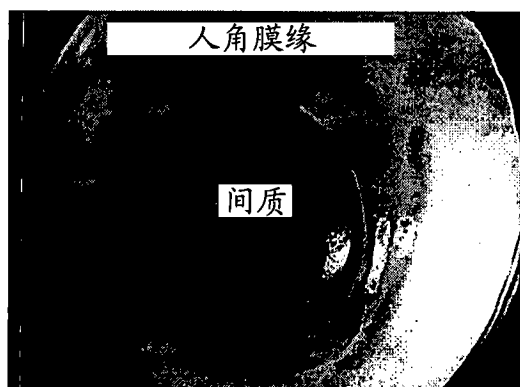


图 14

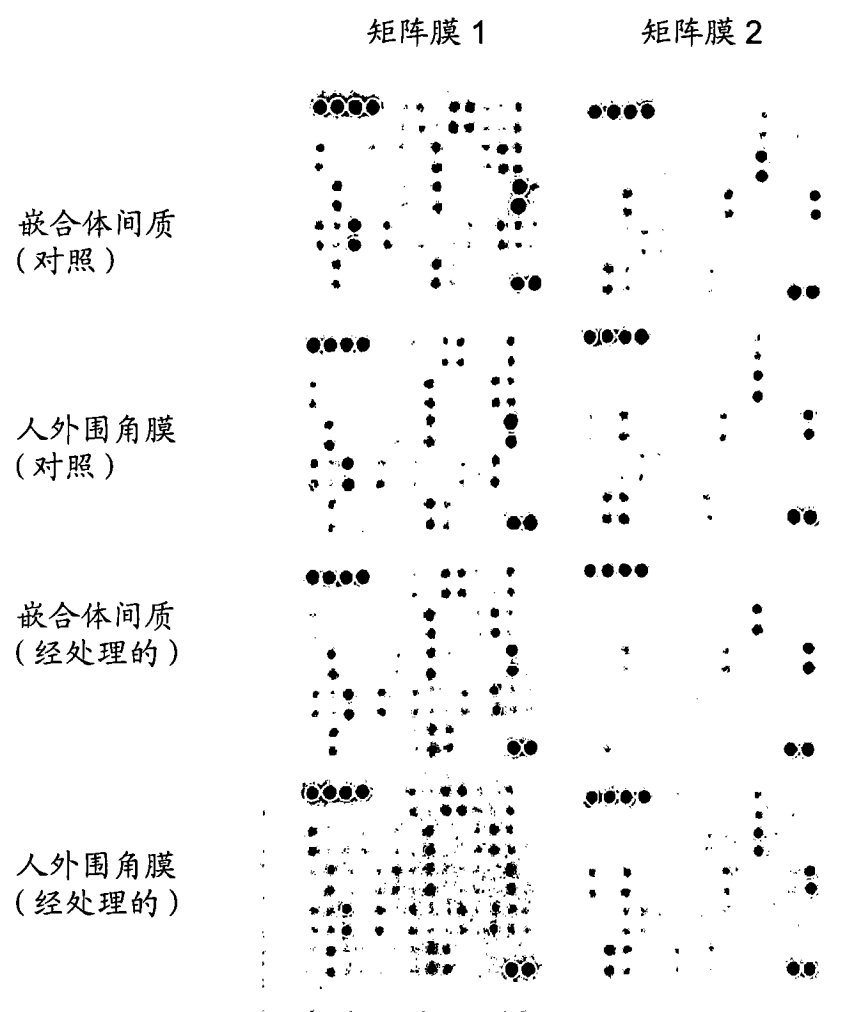


图 15

猪角膜(对照) vs. 外围角膜(对照)

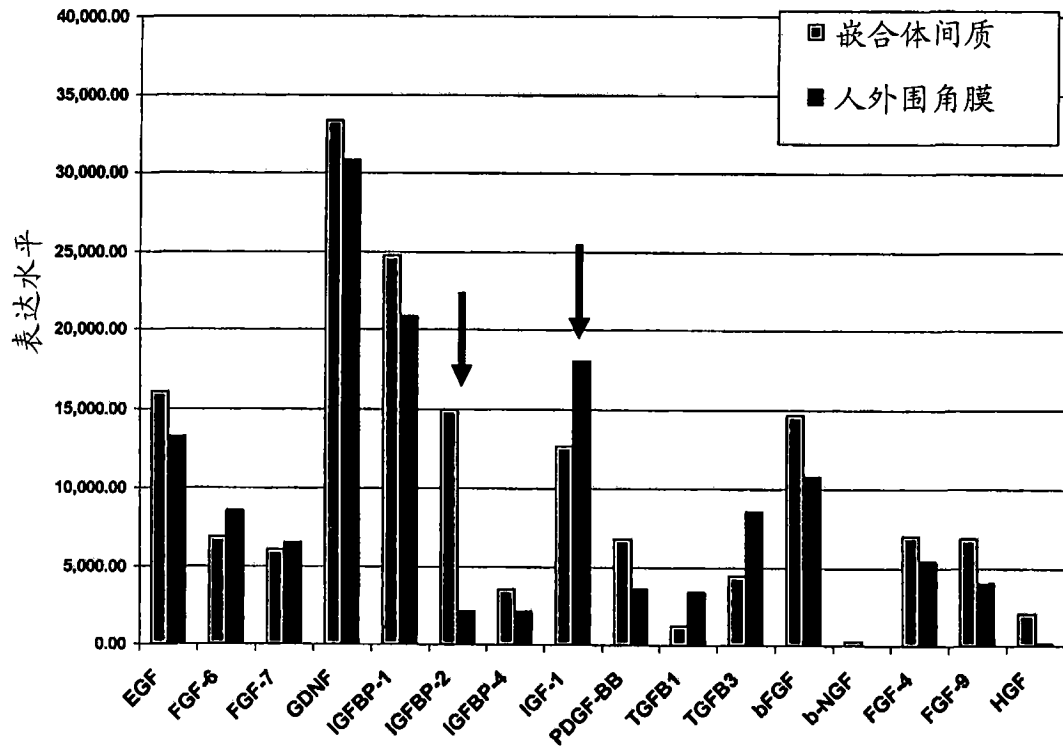


图 16

对照嵌合体 vs. 反义治疗嵌合体

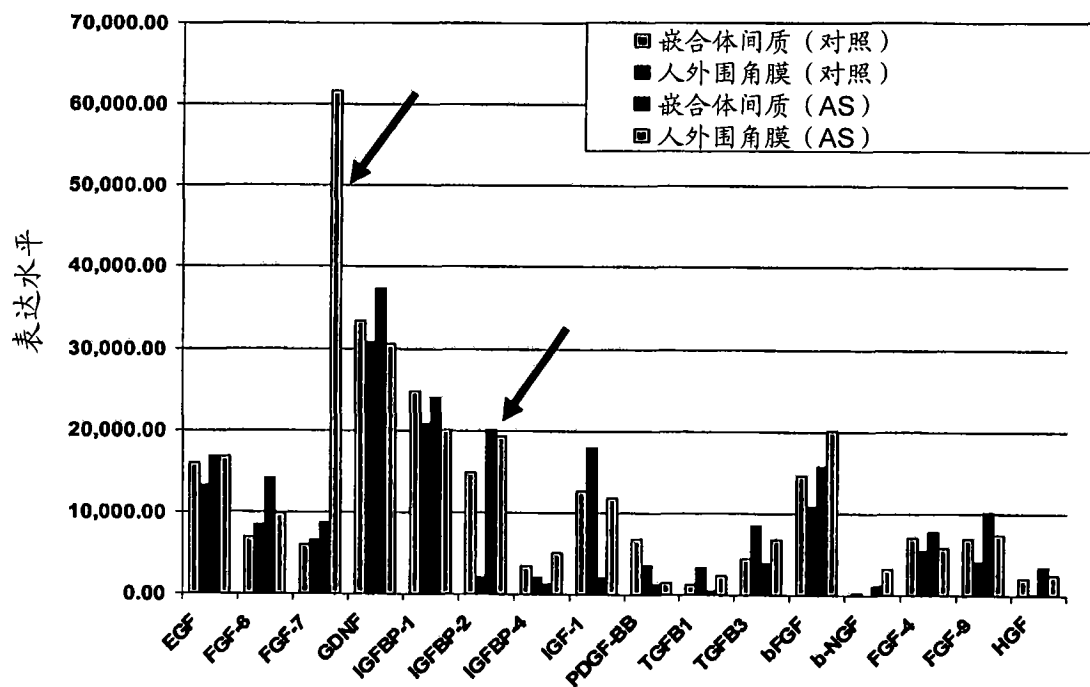


图 17

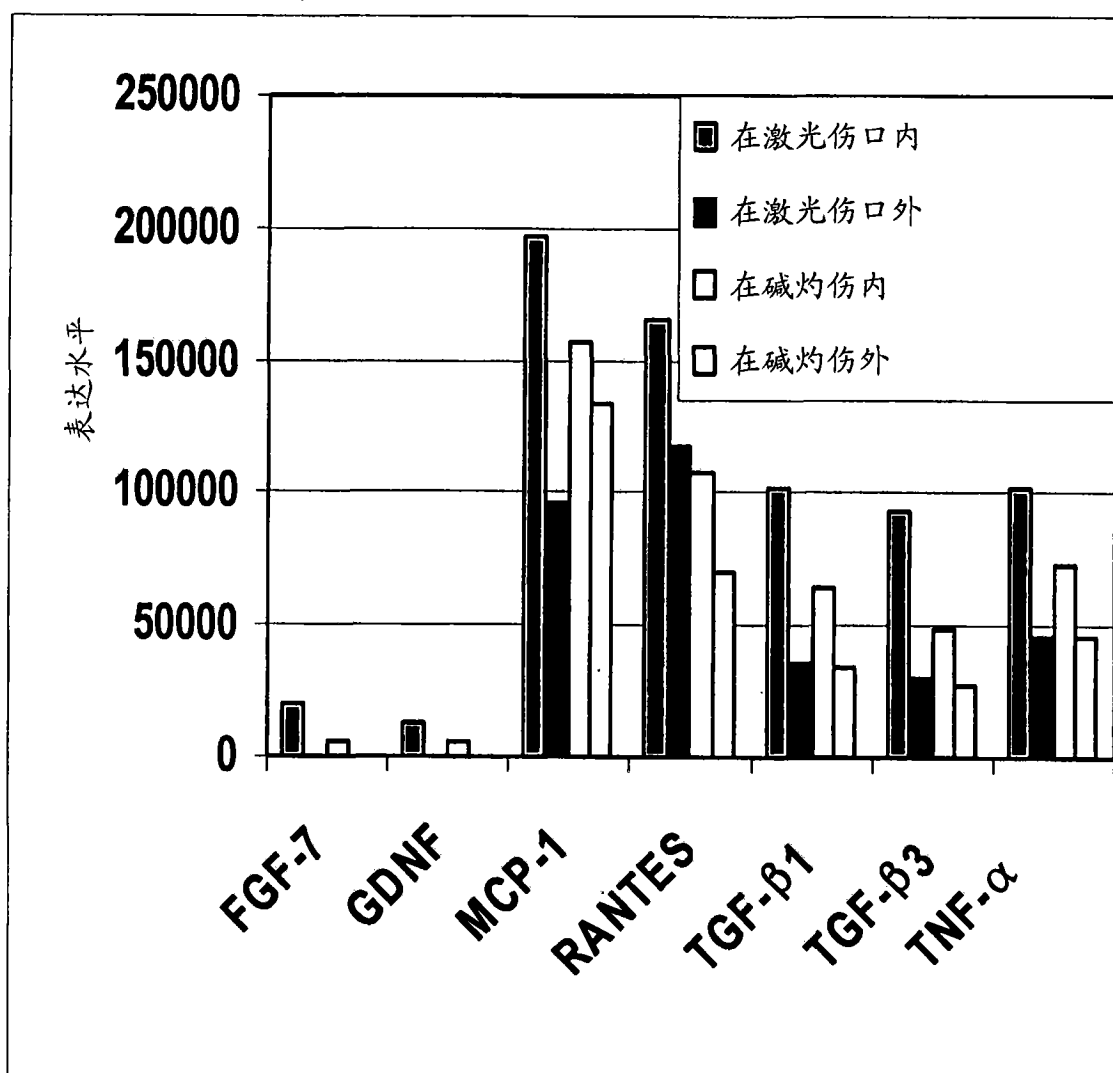


图 18

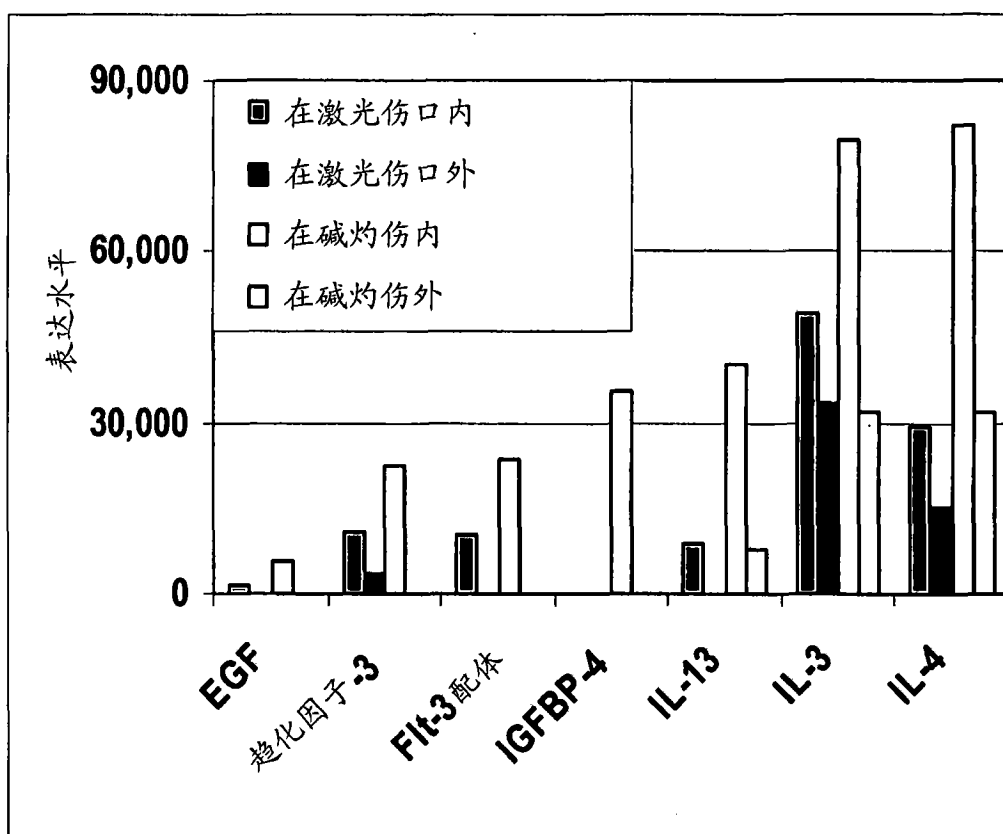


图 19