



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104394883 B

(45)授权公告日 2017.05.31

(21)申请号 201380034024.2

(22)申请日 2013.07.04

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104394883 A

(43)申请公布日 2015.03.04

(30)优先权数据
2012902874 2012.07.04 AU

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.12.25

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/AU2013/000729 2013.07.04

(87)PCT国际申请的公布数据
W02014/005183 EN 2014.01.09

(73)专利权人 悉尼大学
地址 澳大利亚新南威尔士州

(72)发明人 克里斯托弗·约翰·杰克逊
薛妹朗

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
代理人 郑斌 彭鲲鹏

(51)Int.Cl.
A61K 38/48(2006.01)
A61P 17/06(2006.01)
A61P 17/10(2006.01)
A61P 17/00(2006.01)

(56)对比文件
CN 101912450A ,2010.12.15,权利要求1.
审查员 程婷

权利要求书1页 说明书18页 附图2页

(54)发明名称
炎性皮肤病症的治疗

(57)摘要
本发明涉及使用有效量的活化蛋白C(APC)来治疗个体的特征在于存在过度增殖性角质化细胞的皮肤病症的方法。

1. 治疗有效量的活化蛋白C (APC) 在制备用于治疗个体的皮肤病症的药物中的用途, 其中所述皮肤病症特征在于在皮肤区域中存在过度增殖性角质化细胞, 并且其中提供所述药物来与所述皮肤区域接触。

2. 如权利要求1所述的用途, 其中所述治疗有效量的APC使所述皮肤区域中的炎症减至最轻。

3. 如权利要求1或权利要求2所述的用途, 其中所述治疗有效量的APC使所述皮肤区域中的细胞凋亡减至最少。

4. 如权利要求1或权利要求2所述的用途, 其中所述治疗有效量的APC不抑制正常角质化细胞的生长, 或诱导正常角质化细胞的增殖。

5. 如权利要求1或权利要求2所述的用途, 其中所述治疗有效量的APC是每平方厘米所述皮肤区域1 μ g至5mg APC。

6. 如权利要求1或权利要求2所述的用途, 其中所述APC是以凝胶剂、霜剂、软膏剂、喷雾剂、洗剂形式提供来与所述皮肤区域接触。

7. 如权利要求1或权利要求2所述的用途, 其中所述APC是以适合于皮下注射的组合物形式提供来与所述皮肤区域接触。

8. 如权利要求1或权利要求2所述的用途, 其中所述皮肤病症的特征在于以下过程中的一个或多个: 细胞凋亡、炎症、屏障功能受损。

9. 如权利要求1或权利要求2所述的用途, 其中所述皮肤病症选自由牛皮癣、疱疹样皮炎、寻常天疱疮和白癜风组成的组。

10. 如权利要求1或权利要求2所述的用途, 其中所述皮肤病症是非脓疱性牛皮癣。

11. 如权利要求10所述的用途, 其中所述牛皮癣是寻常性牛皮癣或红皮病性牛皮癣。

12. 如权利要求1或权利要求2所述的用途, 其中所述皮肤病症是脓疱性牛皮癣。

13. 如权利要求12所述的用途, 其中所述牛皮癣是全身性脓疱性牛皮癣、掌跖脓疱病、环状脓疱性牛皮癣、连续性肢端皮炎或疱疹样脓疱病。

14. 如权利要求1或权利要求2所述的用途, 其中特征在于存在过度增殖性角质化细胞的所述皮肤区域是牛皮癣斑块。

15. 如权利要求1或权利要求2所述的用途, 其中所述药物还包含抗炎剂。

16. 治疗有效量的活化蛋白C (APC) 在制备用于治疗个体的牛皮癣的药物中的用途, 其中所述药物待被施用至牛皮癣斑块。

17. 治疗有效量的活化蛋白C (APC) 在制备用于治疗个体的粉刺的药物中的用途, 其中提供所述药物来与所述个体的皮肤接触。

18. 治疗有效量的活化蛋白C (APC) 在制备用于治疗个体的异位性皮炎的药物中的用途, 其中提供所述药物来与所述个体的皮肤接触。

19. 治疗有效量的活化蛋白C (APC) 在制备用于治疗个体的皮肤病症的药物中的用途,

-其中所述皮肤病症特征在于在皮肤区域中存在过度增殖性角质化细胞, 并且

-其中所述APC为凝胶剂、霜剂、软膏剂、喷雾剂、洗剂形式。

炎性皮肤病症的治疗

发明领域

[0001] 本发明涉及特征在于角质化细胞过度增殖的皮肤病症,包括但不限于牛皮癣;以及对所述皮肤病症的治疗。

[0002] 发明背景

[0003] 在说明书中提及任何现有技术都不且不应视为承认或以任何形式暗示该现有技术构成澳大利亚或任何其它管辖区域的公知常识的一部分或该现有技术可合理地被预期由本领域技术人员确定为、理解为以及认为是相关的。

[0004] 牛皮癣作为最突出的自体免疫性疾病在性质上是慢性和复发性的。它的特征在于屏障功能受损、表皮角质化细胞过度增殖和炎性细胞显著浸润。

[0005] 最近的数据表明尽管炎性T细胞对于疾病是必要的,但角质化细胞通过整合对白细胞介素(IL)-1、IL-6、IL-8、IL-17、干扰素(INF- γ)和TNF- α (1,2)的反应和活化核因子NF- κ B(一种维持表皮角质化细胞的免疫体内平衡的信号传导分子)(3,4)而成为牛皮癣中病理性炎症的关键驱动者。

[0006] 不存在对牛皮癣的治愈。局部用药物、光照疗法、传统全身性药剂和生物剂仅提供用于管理其症状的选项。药剂的组合常为中度至重度病例所需,且积极长期成果要求药物依从(5)。

[0007] 通常,局部化疾病(10%体表面积)是通过局部用药物来管理,而较大面积需要光照疗法或全身性疗法。定位于手掌和脚底的疾病常加以全身性治疗,因为此区域中的皮肤厚度不可经受表面疗法。

[0008] 表面治疗剂包括皮质类固醇,如氯倍他索(clobetasol);和维生素D类似物,如钙三醇(calcitriol)或卡泊三烯(calcipotriene)(6,7)。皮质类固醇通过减轻炎症、抑制有丝分裂活性以及导致靶向区域中的血管收缩来起作用。维生素D类似物作用的机理未被完全了解,但它似乎调控角质化细胞增殖和分化(6)。因此,两种治疗的组成部分包括抑制细胞增殖,但这是非特异性的。

[0009] 局部用皮质类固醇可导致受影响区域中皮肤萎缩、刺激和干燥。维生素D类似物通常是安全的,但可导致刺激,而如果极其大剂量使用,那么存在高钙血症的风险(8)。

[0010] 就广泛牛皮癣疾病而言,使用光照疗法或全身性治疗。用于广泛牛皮癣的一线治疗是通过紫外光,如UVB和UVA来达成。然而,此治疗伴有灼伤和皮肤癌的较大风险,特别是在肤色较浅的患者中。如果紫外光疗法被证明无效,那么也可使用低剂量甲氨蝶呤(methotrexate)。甲氨蝶呤相当有效控制牛皮癣,但因严重毒性作用而严重受限。

[0011] 随着对疾病的免疫性质的认识的增加,靶向T淋巴细胞、TNF- α 、IL-12和IL-23的生物药剂已成功用于中度至重度牛皮癣中(8)。三种通常使用的TNF抑制剂包括恩博(Enbrel)(依那西普(etanercept))、修美乐(Humira)(阿达木单抗(adalimumab))和类克(Remicade)(英夫利昔单抗(infliximab))。优特克单抗(Ustekinumab)作为一种靶向IL-12和IL-23的新型药剂在2009年被批准上市,从而提供与抗TNF药剂类似的功效和安全性分布(9)。

[0012] 生物药剂提供超过先前可用全身性疗法的可观优势,然而,这些药物的临床试验

显示所述化合物的活性长期伴有许多缺点(10-11)。首先,在患有潜在结核分枝杆菌(TB)感染的患者中,活动性TB可在起始用英夫利昔单抗治疗之后不久滋长。此外,采用TNF抑制剂的患者的机会性真菌感染的风险增加,所述感染如肺和播散性组织胞浆菌病、球孢子菌病和芽生菌病。其次,包括淋巴瘤和皮肤癌的恶性肿瘤的风险呈剂量依赖性增加适用于一些治疗。第三,一定比例的患者不对药剂起反应,或未能维持初始反应。生物药剂的可用性也受限于它的高经济成本。

[0013] 活化蛋白C(APC)诱导抗细胞凋亡人基因bcl-2和MIHB的基因表达。基于此抗细胞凋亡功能,APC已被提及用于使其中细胞凋亡是有关的广泛范围的病状中的细胞凋亡减至最少,所述病状包括大范围的器官特异性和非特异性炎性疾病、自体免疫性疾病、瘤形成和感染性疾病。值得注意的是,使用APC并未表明可治疗这些病状中的所有疾病症状,而仅仅使细胞凋亡减至最少(参见W02001/072328)。

[0014] 此外,本领域中许多人持以下观点:抗细胞凋亡作用(如W02001/072328中所提出的)应使得APC不适于治疗其中存在功能异常性细胞增殖调控的病征,尤其是涉及角质化细胞过度增殖的病征。具体来说,已知除通过由APC防止细胞凋亡来减弱钙诱导的细胞死亡之外,APC也对角质化细胞增殖具有强力刺激作用,且APC以自分泌方式通过EPCR、表皮生长因子受体和活化ERK1/2来促进角质化细胞存活、生长和迁移(17,20)。

[0015] 需要用于治疗表征在于角质化细胞过度增殖的疾病或病症(如牛皮癣)或使所述疾病或病症的进展或症状减至最轻的新方法和疗法。

[0016] 发明概述

[0017] 本发明设法解决一个或多个以上问题或限制,且在某些实施方案中提供一种治疗个体的特征在于存在过度增殖性角质化细胞的皮肤病症的方法,其包括:

[0018] 提供具有特征在于存在过度增殖性角质化细胞的皮肤区域的个体;

[0019] 使所述皮肤区域与治疗有效量的活化蛋白C(APC)接触;

[0020] 从而治疗所述个体的所述皮肤病症。

[0021] 在其它实施方案中,提供一种治疗个体的牛皮癣的方法,其包括:

[0022] 提供具有牛皮癣斑块的个体;

[0023] 向所述斑块涂覆包含治疗有效量的活化蛋白C(APC)的组合物;

[0024] 从而治疗所述个体的牛皮癣。

[0025] 在其它实施方案中,提供一种治疗个体的粉刺的方法,其包括:

[0026] 提供患有粉刺的个体;

[0027] 向所述粉刺涂覆包含治疗有效量的活化蛋白C(APC)的组合物;

[0028] 从而治疗所述个体的粉刺。

[0029] 在其它实施方案中,提供一种治疗个体的异位性皮炎的方法,其包括:

[0030] 提供患有异位性皮炎的个体;

[0031] 向所述异位性皮炎或含有所述异位性皮炎的皮肤区域涂覆包含治疗有效量的活化蛋白C(APC)的组合物;

[0032] 从而治疗所述个体的异位性皮炎。

[0033] 在其它实施方案中,提供一种治疗个体的坏疽性脓皮病(Pyoderma gangrenosum)的方法,其包括:

[0034] 提供患有坏疽性脓皮病的个体；

[0035] 向所述坏疽性脓皮病或含有所述坏疽性脓皮病的皮肤区域涂覆包含治疗有效量的活化蛋白C (APC) 的组合物；

[0036] 从而治疗所述个体的坏疽性脓皮病。

[0037] 在另一实施方案中,提供一种诱导患有特征在于角质化细胞过度增殖的病症的皮肤区域中的伤口愈合或组织再生的方法,其包括:

[0038] 提供具有患有特征在于存在过度增殖性角质化细胞的病症的皮肤区域的个体;

[0039] 使所述皮肤区域与治疗有效量的活化蛋白C (APC) 接触;

[0040] 从而诱导所述皮肤区域中的伤口愈合或组织再生。

[0041] 在其它实施方案中,提供一种用于在个体中使特征在于存在过度增殖性角质化细胞的皮肤病症减至最轻或治疗牛皮癣、粉刺或异位性皮炎的包含治疗有效量的APC的组合物。

[0042] 在其它实施方案中,提供一种APC制造在个体中用于使特征在于存在过度增殖性角质化细胞的皮肤病症减至最轻或用于治疗牛皮癣、粉刺或异位性皮炎的药剂的用途。

[0043] 在其它实施方案中,提供一种APC在个体中用于使特征在于存在过度增殖性角质化细胞的皮肤病症减至最轻或用于治疗牛皮癣、粉刺或异位性皮炎的用途。

[0044] 在其它实施方案中,提供一种包括组合物和书面说明书的试剂盒,所述组合物包含治疗有效量的APC,所述书面说明书是关于在治疗特征在于存在过度增殖性角质化细胞的病症的方法中使用所述APC或关于治疗个体的牛皮癣、粉刺或异位性皮炎,所述方法如本文所述。

[0045] 附图简述

[0046] 图1. (A) 人新生儿包皮角质化细胞用APC预处理4小时,接着将TNF- α 和细胞孵育72小时且通过MTT测定来检测增殖。相较于相关对照,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。(B) APC对正常小鼠真皮成纤维细胞(MDF)、正常人真皮成纤维细胞(HDF)和人类风湿性滑液成纤维细胞(RSF,用红色表示)的生长的作用,使用结晶紫测定所测量(平均值+SD)。N=4个单独实验。相较于相关对照,*、 $\ddagger$ 、 $\#p < 0.01$,ANOVA。(C) RSF用APC处理24小时。通过蛋白质印迹测量p21和p27。

[0047] 图2:外源性或内源性APC刺激培养的角质化细胞增殖且阻止其细胞凋亡。A) 使用MTT测定测量增殖且数据表示为相较于对照的细胞增殖%。B) 在72小时之后,角质化细胞反应于PC siRNA和APC处理的增殖,如通过MTT测定所检测。细胞增殖表示为对照的百分比。C和D) 角质化细胞用PC siRNA (0.5 μ m) 处理。在48小时之后,细胞用于TUNEL (末端dUTP缺口末端标记) 测定以检测凋亡细胞(黑色箭号指示凋亡细胞) (C) 并通过根据高倍显微术($\times 20$) 对凋亡细胞计数来定量(D)。数据表示为15个视区中每个视区的平均凋亡细胞数(平均值 $\pm$ S.E, n=3)。各图代表三个独立实验之一。各图像代表三个独立实验之一。* $p < 0.05$,** $p < 0.01$ 。标尺:40 μ m。

[0048] 图3:PC或EPCR siRNA处理抑制HUVEC的生长且促进其细胞凋亡。A) 在存在或不存在外源性APC或PC下,HUVEC反应于对照、PC siRNA或EPCR siRNA (500nM) 处理的增殖速率,如通过MTT测定所检测。细胞增殖表示为历经72小时的对照百分比(平均值+SD)。相较于对照(第1棒条),** $P < 0.01$,相较于PCsiRNA(第2棒条), $\#P < 0.01$ 。B) 在存在或不存在重组APC

下,HUVEC反应于针对EPCR的阻断抗体(RCR252)的增殖。细胞增殖表示为历经72小时的对照百分比(平均值+SD)。相较于对照(第1棒条), $*P<0.05$,相较于单独APC(第5棒条), $^{#}P<0.05$ 。C-E)HUVEC用对照、PC siRNA或EPCR siRNA(两者均在500nM下)处理。在36小时之后,转染的细胞用重组APC(1 μ g/ml)处理12小时,且在48小时收集细胞。通过免疫荧光染色来检测活性卡斯帕酶-3(白色箭头指示活性卡斯帕酶-3阳性细胞)(C)且通过原位细胞死亡检测试剂盒来检测凋亡细胞(白色箭头指示凋亡细胞)(D)。各图像代表三个独立实验之一。标尺40 μ m。E)通过根据显微术对用DAPI共染色的细胞计数来定量凋亡细胞(来自D)。数据表示为根据高倍率(40 $\times$)的平均凋亡细胞数(平均值 $\pm$ SEM,n=3)。相较于对照(第1棒条), $*P<0.05$, $**P<0.01$,相较于PCsiRNA处理(第2棒条), $^{#}P<0.05$ 。

[0049] 实施方案详述

[0050] 如在本发明时先前所提及,角质化细胞被认为关键性地涉及于一定范围的皮肤炎性病症(包括牛皮癣)的病理学中。许多长久消炎性疗法被认为有益地使炎性细胞的复制减至最少,且鉴于抑制炎性细胞的生长和/或复制是优选的,已被预测具有抗细胞凋亡性的那些化合物不被考虑来临床用于治疗这些疾病。这些是为何尽管具有消炎性功能,但在本发明之前,APC从未被建议使特征在于角质化细胞的增殖具有过度增殖性、增生性或另外调控异常的皮肤病症减至最轻或消除的一些原因。实际上,在本发明之前,注意到关于APC对角质化细胞增殖的刺激作用的公开数据暗示APC疗法将对炎性皮肤病,如牛皮癣、粉刺和特征在于角质化细胞过度增殖的其它皮肤病症有害。

[0051] 如本文所述,发明人已惊人地发现APC抑制缓慢生长或正常人角质化细胞或细胞的细胞凋亡,但对抑制异常或快速生长角质化细胞或细胞的增殖无影响,后者是广泛范围的炎性皮肤病症的介导者。

[0052] 从而,发明人已认识到在与角质化细胞过度增殖相关的皮肤病症中,就对抗细胞凋亡APC介导的信号的反应而言,存在两个群体的角质化细胞。具体来说,对APC起反应(即反应于基底水平的APC不经受细胞凋亡)的那些是缓慢生长、正常、非炎性细胞。此外,对APC起反应(即反应于基底水平的APC经受细胞凋亡)的那些是较快生长、异常炎性细胞。

[0053] 重要的是,发明人已发现尽管APC可刺激较慢生长的正常细胞的增殖,但它具有抑制快速生长细胞的增殖的独特选择性能力。本文显示数据表明在基底条件下,APC增强缓慢生长或正常人细胞,包括内皮和角质化细胞的增殖且抑制细胞凋亡。然而,根据本发明,视细胞的炎性状态而定,APC差异性调控细胞增殖-具体来说,APC抑制TNF- α 刺激的角质化细胞和来自类风湿性关节炎滑膜的快速生长滑液成纤维细胞的生长。

[0054] 根据本文所述的研究,发明人已设想与本发明之前的文献的理解相反,APC的消炎性益处可能在需要治疗特征在于角质化细胞过度增殖的皮肤病症的患者中得以实现,因为尽管消炎性作用将施加于炎性细胞,但抗细胞凋亡作用将选择性或特异性施加于非炎性角质化细胞而非炎性角质化细胞。

[0055] 此外,所述治疗的结果应是非炎性角质化细胞持续正常增殖(由APC的抗细胞凋亡功能引起)以及通过施用APC,会提供各种状况,包括消炎以及有可能使炎性、过度增殖性角质化细胞逐渐凋亡。

[0056] A. 定义

[0057] 如本文所用,除上下文另外要求之外,术语“包含(comprise)”和所述术语的变化

形式(如“包含(comprising)”、“包含(comprises)”和“包含(comprised)”)不意图排除其它添加物、组分、整数或步骤。

[0058] “角质化细胞”通常是指合成角蛋白和其它蛋白质以及固醇的表皮细胞。这些细胞占表皮的95%，由未分化或基底细胞在真皮-表皮接合处形成。它的特征性中间丝蛋白质是细胞角蛋白(cytokeratin)。在它的各种连续阶段，角蛋白形成棘细胞层和粒细胞层，其中细胞变得扁平且缓慢死亡以形成最终层角质层，其逐渐剥离。

[0059] “过度增殖”通常是指细胞通过快速分裂达成异常较高增殖速率。在一些情形下，过度增殖可由主要存在于细胞周期的G₁-S或G₂期的细胞引起。过度增殖也可被称为增生，且过度增殖性细胞可被称为增生性细胞或组织。

[0060] “过度增殖性角质化细胞”通常是倾向于存在于细胞周期的间期阶段，如G₁-S或G₂的角质化细胞。这些细胞不同于正常角质化细胞，因为正常角质化细胞通常存在于作为与间期分开的阶段的G₀(间隙零)或在限制点(见于G₁结束时的细胞周期检查点)之后的延伸G₁期中。过度增殖性角质化细胞的特征也通常在于具有炎性基因，且具体来说NF- κ B信号传导路径中涉及的基因的表达。

[0061] “正常角质化细胞”通常是倾向于存在于G₀或延伸G₁期中的角质化细胞。一般来说，这些角质化细胞通常是尚未被TNF- α 刺激的那些角质化细胞，且它们通常不具有NF- κ B信号传导路径的基因的表达。

[0062] “活化蛋白C”或“APC”通常是指通过结合蛋白质S和蛋白水解性失活因子Va和VIIIa以及通过中和纤维蛋白溶酶原活化因子抑制剂以刺激纤维蛋白溶解来充当抗凝血剂的丝氨酸蛋白酶。Walker等,FASEB J.6,2561-2567(1992);Esmon,Arterioscler.Thromb.12,135-145(1992);van Hinsbergh等,Blood 65,444-451(1985)。前体蛋白C主要在肝中产生。活化是通过在蛋白C的重链的N末端处移除十二肽来达成。当凝血酶(thrombin)结合内皮细胞表面蛋白质血栓调节蛋白(thrombomodulin)且蛋白C结合内皮细胞蛋白C受体时，蛋白C路径被启动。通过使因子Va和VIIIa失活，APC限制形成的凝血酶的量。Esmon,Arterioscler.Thromb.12,135-145(1992)。

[0063] “治疗(treating)”和“治疗(treatment)”通常是指出于抗击疾病、病状或病症的目的来管理和照护患者以消除所述疾病、病状或病症，或防治性预防所述疾病、病理性病状或病症的症状或并发症的发作。

[0064] “特征在于存在过度增殖性角质化细胞的皮肤病症”通常是指其中过度增殖性角质化细胞占优势，且具体来说相较于正常组织，过度增殖性角质化细胞充裕的疾病、病状、综合征等。病症可为炎性病症，且通常涉及以下一者或多者：基底层(生发层)、棘层、颗粒层、透明层和角质层。皮肤病症的实例包括脓疱性(化脓性)和非脓疱性(非化脓性)牛皮癣，包括本文所述的形式；以及粉刺，包括寻常痤疮或囊性痤疮。

[0065] “治疗有效量”通常是指医药化合物提供所需临床结果的量。在某些实施方案中，治疗有效量的APC通常提供对正常角质化细胞的抗细胞凋亡作用，且可或可不提供对过度增殖性角质化细胞的细胞凋亡作用。在一个实施方案中，治疗有效量的APC可终止过度增殖性角质化细胞的增殖和/或提供消炎性作用。相关量可根据本文公开的本发明方法确立或确定。

[0066] “细胞凋亡诱导量”通常是指APC提供诱导过度增殖性角质化细胞的细胞凋亡的

量。

[0067] “生长刺激量”通常是指APC提供诱导非过度增殖性角质化细胞,且具体来说缓慢生长、正常、非炎性角质化细胞的增殖的量。

[0068] “消炎量”通常是指APC提供使特征在于角质化细胞过度增殖的皮肤病症的炎症减至最轻的量。

[0069] B. 治疗方法

[0070] 在了解APC不阻止炎性过度增殖性角质化细胞经受细胞凋亡下,发明人已认识到APC可用于向如牛皮癣和粉刺的病症提供消炎性作用而不加剧或恶化这些病状,如先前在本发明之前所认为,如果炎性角质化细胞被阻止免遭细胞凋亡或另外被诱导来增殖或生长,那么将另外发生所述加剧或恶化这些病状。因此,在某些实施方案中,提供一种治疗个体的特征在于存在过度增殖性角质化细胞的皮肤病症的方法。所述方法包括:

[0071] -提供具有特征在于存在过度增殖性角质化细胞的皮肤区域的个体;

[0072] -使所述皮肤区域与治疗有效量的活化蛋白C (APC) 接触;

[0073] 从而治疗所述个体的所述皮肤病症。

[0074] 根据所述方法,APC是通过使所述APC或含有所述APC的制剂与相关区域接触来直接递送至特征在于存在过度增殖性角质化细胞的皮肤部位或区域中。部位或区域可为如存在于粉刺或脓疱性牛皮癣中的开放性伤口或被破坏皮肤表面,或它可不被实质上破坏,即它可更像斑块或其它鼓起、硬化或纤维化组织。当部位或区域在被破坏等的意义上是开放的时,APC可涂覆于破坏周围的表面和/或通常潜伏在皮肤表面下的暴露组织(例如基底层(生发层)、棘层、颗粒层、透明层)。

[0075] 在此情形下,发明人的一项重要发现是APC可被递送在其中皮肤实质上未破损的所需部位处,例如在破坏脓疱周围的区域处,或在另外实质上未破坏的皮肤表面处。这使得能够通过使APC或相关制剂与部位直接接触来进行局部递送,此完全不同于先前临床全身性施用APC治疗散播性疾病或病状,如败血症。根据本发明局部施用APC对局部性而非散播性或全身性疾病而言是有利和可适用的,因为这限制与向局部区域中递送APC相关的风险,且实质上使与例如通过连续输注来全身性递送APC相关的风险降至最低。

[0076] 向有关部位中局部递送APC显著偏离本领域中已知的用于治疗其它疾病和病状的APC施用。根据在本发明时本领域中已知的方法,对于人患者,APC是优选胃肠外,最优选静脉内在约1 μ g/天至约500mg/天或约1IU/kg/天至约6000IU/kg/天的剂量下施用。参见例如美国专利号5,151,268和5,571,786。对于重度败血症,XigrisTM是通过在约12 μ g/kg/h至约30 μ g/kg/h的速率下连续输注以在输注约两小时之后得到稳态血浆浓度约45ng/ml APC来施用。本发明大体上不基于通过全身性施用来连续输注。更确切而言,它是基于通过使皮肤区域与如本文所述的治疗有效量的APC接触来局部施用APC。

[0077] 与治疗有效量的APC接触的皮肤区域可为发炎的,或炎症可处于消退中。在一个实施方案中,皮肤病症的特征在于一个或多个或所有以下过程:细胞凋亡、炎症、屏障功能受损。

[0078] 在一个实施方案中,皮肤区域是发炎的。一个特别重要的实例是与慢性炎症相关的皮肤区域。此皮肤可出现牛皮癣斑块,且伴随显现脓疱,但斑块可实质上是非脓疱性的。

[0079] 皮肤病症可选自由牛皮癣、疱疹样皮炎、寻常天疱疮、白癜风和寻常痤疮或囊性痤疮

疮组成的组。

[0080] 皮肤病症可为非脓疱性牛皮癣,例如寻常性牛皮癣或红皮病性牛皮癣。

[0081] 皮肤病症可为脓疱性牛皮癣,例如全身性脓疱性牛皮癣、掌跖脓疱病、环状脓疱性牛皮癣、连续性肢端皮炎或疱疹样脓疱病。

[0082] 通常,当病状是牛皮癣时,与APC接触的皮肤区域是牛皮癣斑块。因此,在另一实施方案中,提供一种治疗个体的牛皮癣的方法。所述方法包括:

[0083] -提供具有牛皮癣斑块的个体;

[0084] -向所述斑块涂覆包含治疗有效量的活化蛋白C (APC) 的组合物;

[0085] 从而治疗所述个体的牛皮癣。

[0086] 当病状是寻常痤疮时,与APC接触的皮肤区域可包括破坏和未破坏的皮肤。因此,在另一实施方案中,提供一种治疗个体的粉刺的方法。所述方法包括:

[0087] -提供患有粉刺的个体;

[0088] -向所述粉刺涂覆包含治疗有效量的活化蛋白C (APC) 的组合物;

[0089] 从而治疗所述个体的粉刺。

[0090] 当病状是异位性皮炎时,与APC接触的皮肤区域可包括破坏和未破坏的皮肤。因此,在另一实施方案中,提供一种治疗个体的异位性皮炎的方法。所述方法包括:

[0091] -提供患有异位性皮炎的个体;

[0092] -向所述异位性皮炎涂覆包含治疗有效量的活化蛋白C (APC) 的组合物;

[0093] 从而治疗所述个体的异位性皮炎。

[0094] 异位性皮炎可为选自由内源性湿疹、屈部湿疹、婴儿湿疹组成的组的一种湿疹形式,且它也可称为“贝尼耶痒疹 (prurigo Besnier)”、“神经性皮炎”或“素质性痒疹 (prurigo diath6sique)”。

[0095] 尽管如前所述,但本领域技术人员应了解的是APC、蛋白C、增加蛋白C的合成的药剂和/或蛋白C活化剂的剂量将随所用特定化合物或化合物的组合、待治疗的疾病或病状、疾病或病状的严重性、局部施用的类型、化合物的排泄速率、治疗的持续时间、向动物施用的任何其它药物的身份、动物的年龄、身材和物种、以及医学领域中已知的类似因素而变化。一般来说,化合物或化合物的组合的适合每日剂量将为有效产生治疗作用的最低剂量的那个量。施用的剂量、剂型和模式将由照护医师在合理医学判断的范围内确定。施用各种化合物和化合物的组合的有效剂量、剂型和模式可凭经验确定且作出所述确定在本领域的技术范围之内。

[0096] 在某些实施方案中,重要的是提供APC以便使得APC能够与皮肤角质化细胞接触,因为尽管不想要受假设束缚,但据信通过此接触,APC会提供本发明的选择性抗细胞凋亡活性(即对非炎性非过度增殖性细胞具有选择性)和消炎活性。通常,已与APC接触的细胞可由于具有以下特征而被识别:活化的基质金属蛋白酶 (MMP) -2和内皮蛋白C受体 (EPCR) 的水平较高以及活化的MAP激酶ERK的活性较低,且因此细胞与APC接触以及因此治疗的治疗功效可通过评估这些细胞表型来确定。

[0097] 在某些实施方案中,治疗有效量的APC通常提供对正常角质化细胞的抗细胞凋亡作用和对过度增殖性角质化细胞的细胞凋亡作用。此结果可如下加以评估:测量细胞存活/增殖 (MTT) 测定和细胞细胞凋亡 (TUNEL测定),从而确定是否已提供治疗有效量的APC。本文

进一步显示一种示例性方法。

[0098] 在一个实施方案中,治疗有效量的APC可终止过度增殖性角质化细胞的增殖和/或提供消炎性作用。此结果可如下加以评估:

[0099] -测量细胞活力/增殖 (MTT测定);

[0100] -针对炎性细胞因子IL-1、IL-6、IL-10、IL-17、IL-21/23或TNF- α 的酶联免疫吸附测定 (ELISA) 或

[0101] -针对EPCR的ELISA (R&D Systems, Inc., MN);

[0102] -用碘化丙啶 (PI) 或PI加膜联蛋白进行的针对细胞凋亡的FACS分析;

[0103] -用以检测如NF- κ B的炎性信号传导分子的蛋白质印;

[0104] 从而确定是否已提供治疗有效量的APC。

[0105] 在另一实施方案中,以上结果是通过确定皮肤区域中的APC的局部组织浓度是每克皮肤组织1 μ g至100mg APC来获得。这可通过在局部麻醉剂下自同一慢性斑块获取皮肤穿孔活检体来确定。可接着通过本领域中已知的方法来测定APC的量。在一个实例中,在冰上切碎并溶解活检体组织。在离心之后,澄清上清液用于通过ELISA测量PC浓度,且通过显色底物Spectrozyme PCa测定 (American Diagnostica) 测量APC活性。酶活性是通过测量在 λ 450nm下每单位时间产生的游离发色团的吸光度增加来测定。

[0106] 在某些实施方案中,APC的治疗有效量是APC所涂覆的每平方厘米皮肤区域0.1 μ g至5000 μ g APC,或APC所涂覆的每平方厘米皮肤区域1 μ g至2000 μ g APC,或APC所涂覆的每平方厘米皮肤区域10 μ g至1000 μ g APC,或APC所涂覆的每平方厘米皮肤区域10 μ g至200 μ g、或10 μ g至400 μ g、或10 μ g至800 μ g APC。

[0107] 视病状的性质而定,APC可每周一次直至每日两次加以施用。通常持续至多20周的连续日或至多6周的连续日来提供它。

[0108] B.1治疗方法-局部

[0109] 当相关皮肤区域是含有被破坏皮肤表面的皮肤区域时,例如使用糊剂、凝胶剂、霜剂、油剂、洗剂、泡沫剂、软膏剂或类似物质的局部治疗方法是特别适用的,因为这允许APC渗透至皮肤组织的驻留有炎性角质化细胞的相关层中。然而,当皮肤表面实质上未破坏时,也可例如向牛皮癣斑块涂覆这些治疗剂。

[0110] 在一个实施方案中,APC的治疗有效量可为每平方厘米皮肤区域0.1至2000 μ g、优选20至200 μ g APC。当皮肤更严重受影响时,较高量通常是优选的,且通常就其中病变伴有溃疡而存在的重度慢性斑块型牛皮癣[牛皮癣面积和严重性指数 (PASI) 大于或等于12,体表面积 (BSA) 大于或等于10] 而言是优选的,其中APC可促进溃疡愈合。当皮肤未严重受影响时,例如当病变不伴有溃疡而存在时,较低量可为优选的。

[0111] 制剂中的APC浓度可在约10 μ g/ml与1mg/ml之间,且涂覆于皮肤区域的组合物的体积是约100 μ l至10ml。

[0112] 通常,当相关病状是牛皮癣时,通常用无菌表面,如手指或药勺向皮肤的至多约10mm厚度、优选约3mm厚度的层中提供组合物。它可接着被摩擦或按摩至皮肤区域和周围区域中。涂覆通常是每天一次至每周一次,且通常不长于20周或不长于12周。

[0113] 类似涂覆工序和剂量方案可应用于治疗粉刺或异位性皮炎。

[0114] 在一个实施方案中,含有APC的组合物可涂覆于固体基质,即绷带、敷料等,且接着

将基质固定于相关皮肤区域。

[0115] B.2治疗方法-皮内注射

[0116] 在某些实施方案中,以上结果是通过建立局部APC浓度高于基线至少2倍来获得。APC的此量可通过使用如上提及的ELISA和显色底物Spectrozyme PCa测定测量皮肤活检体的APC活性来测量。当角质层是完整的且具有APC有限渗透过表面皮肤层的所述性质时,皮内或皮下注射通常优选作为施用途径。通常,可使用1ml注射器上的关于(约28-34G)针的精细规格针。可给与多次注射以覆盖皮肤表面积,其中每厘米对应约1次注射。每次注射的量将自10 μ l至1ml变化,其中典型量是50 μ l。通常,自每天一次至每周一次给与施用,且通常不长于20周。皮内或皮下注射可与表面涂覆APC同时使用。优选适应症是牛皮癣或异位性皮炎,但特征在于角质化细胞过度增殖的其它病状可经受此治疗。

[0117] 皮下/皮内施用的一示例性实施方案可适用于重度慢性斑块型牛皮癣[牛皮癣面积和严重性指数(PASI) ≥ 12 ,体表面积(BSA) ≥ 10],其中病变伴有或不伴有溃疡而存在。视斑块或病变的尺寸而定,APC是在200-2000 μ g的剂量下,一周两次持续12周皮下施用,继之以4周追踪时期。注射是通过30号针以总体积500 μ l至5ml,优选1ml来进行。APC是在病变周围相等间隔的部位处多次(皮内或皮下)注射—如果病变 $< 10\text{cm}^2$,那么存在4个部位,且部位数目和剂量随病变尺寸增加而成比例增加。将APC溶解于水中以制备等张缓冲盐溶液。必要时,此治疗可与表面治疗组合。呈液体形式的APC可被每日涂覆在病变上,持续与皮下治疗相同的时期。在两个研究(用或不用表面治疗)中,可分析PASI、静态医师整体评估(sPGA)、皮肤学生活质量指数(DLQI)、不利事件以及常规血液学和实验室数值(例如细胞因子、组织学检查、PC/APC活性)。预期结果:预期在第12周时,所有患者的PASI都改善 $> 30\%$ 且50%患者的PASI改善 $> 60\%$ 。

[0118] 在一个实施方案中,上述方法包括使皮肤区域与消炎量的APC接触的步骤。

[0119] 在一个实施方案中,上述方法包括使皮肤区域与生长刺激量的APC接触的步骤。

[0120] 在一个实施方案中,上述方法包括使皮肤区域与细胞凋亡诱导量的APC接触的步骤。

[0121] C.APC及其制剂

[0122] 用于上述方法中的APC可采用组合物形式,或另外通过如下所述的方法获得。

[0123] APC可通过体外活化自血浆纯化或通过用本领域中熟知的方法执行重组DNA技术制备的蛋白C来制备。参见例如美国专利号4,981,952、5,151,268、5,831,025、6,156,734、6,268,344和6,395,270。

[0124] 或者,APC可直接通过重组DNA技术来制备。参见例如美国专利号4,981,952、5,151,268、6,156,734、6,268,344和6,395,270。重组活化蛋白C可通过体外活化重组人蛋白C酶原或通过直接自细胞分泌活化形式的蛋白C来产生。蛋白C可在转基因动物、转基因植物或多种真核细胞中产生,包括例如以酶原形式自人肾293细胞分泌,接着通过为熟练技术人员所知的技术来纯化并活化。

[0125] APC可来自任何动物物种,但人APC是优选的。

[0126] APC的片段和衍生物可用于实施本发明,前提是它们展现本文所述的活性。参见例如美国专利号5,151,268、5,453,373和5,516,650以及PCT申请WO 89/12685、WO 01/56532、WO 01/59084和WO01/72328。

[0127] APC可为人APC的具有人APC的蛋白水解、酰胺水解、酯水解和生物(抗凝血、消炎或促纤维蛋白溶解)活性特征的衍生物。蛋白C衍生物的实例由Gerlitz,等,美国专利号5,453,373以及Foster,等,美国专利号5,516,650加以描述,所述专利的全部教导据此以引用的方式并入本文。

[0128] ACC的适合药物组合物包含APC和药学上可接受的载体。参见例如美国专利号6,395,270和6,159,468以及PCT申请WO 98/48818、WO 01/56532和WO 01/72328。含有ACC的组合物可通常为作为具有高纯度的稳定冻干产物的包含增积剂(如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖和棉子糖)、盐(如氯化钠和氯化钾)、缓冲剂(如柠檬酸钠、Tris-乙酸盐和磷酸钠)和ACC的组合物。举例来说,稳定冻干组合物可包含重量比约1份ACC、约7-8份之间的盐、和约5-7份之间的增积剂。所述稳定冻干组合物的一实例是:每个小瓶5.0mgACC、30mg蔗糖、38mg NaCl和7.56mg柠檬酸盐,pH 6.0。

[0129] C.1局部施用的制剂

[0130] 在一个特别优选实施方案中,ACC是以适合于根据在以上章节B下所述的方法向患有相关病症的受试者的相关皮肤病变、斑块或其它皮肤表面进行局部施用的组合物或制剂形式提供。所述制剂的实例包括可直接向相关表面涂覆,从而使得能够向相关部位局部施用ACC的制剂。这些制剂包括凝胶剂、油剂、喷雾剂、滚球式制剂、软膏剂、洗剂、泡沫剂等。在一个实施方案中,APC是以甲基纤维素凝胶剂形式提供且可含有稳定剂,如碳水化合物和盐。

[0131] 皮肤软膏剂可为有机、健康、美容或医学成分通常于石油基质中的组合。这赋予皮肤软膏剂稠密、水溶性较小的配方,其在身体表面上停留较长久以使成分可更有效起治疗广泛多种问题的作用。存在可自公司(如Therapex)定购的许多天然和有机皮肤软膏剂。

[0132] 也可使用丙酸氯倍他索(CP)泡沫剂(0.05%)。这是一种在美国已用于治疗皮质类固醇反应性皮肤病的炎性和瘙痒性表现形式以及在加拿大用于中度至重度异位性皮炎的炎性和瘙痒性表现形式的乳液气雾泡沫剂(0lux-E(丙酸氯倍他索)泡沫剂,0.05%Stiefel Laboratories Inc,Research Triangle Park,NC(2011))。

[0133] 当制剂是凝胶剂时,它可以每克凝胶剂10-5000 μ g的量含有APC。

[0134] C.2可注射制剂

[0135] APC的一特别优选制剂是由Eli Lilly and Co.(Indianapolis,Indiana)在商标XigrisTM下销售的产品。XigrisTM是以供静脉内输注的无菌冻干粉末形式供应。XigrisTM的5mg小瓶含有5.3mg/小瓶的人重组APC、31.8mg/小瓶的蔗糖、40.3mg/小瓶的NaCl和10.9mg/小瓶的柠檬酸钠,而XigrisTM的20mg小瓶含有20.8mg/小瓶的人重组APC、124.9mg/小瓶的蔗糖、158.1mg/小瓶的NaCl和42.9mg/小瓶的柠檬酸钠。小瓶是用USP无菌注射用水复原以得到约2mg/ml浓度的APC,且此稀释的APC被接着添加至0.9%氯化钠注射液中以得到约100至约5000 μ g/ml浓度的APC供向患者施用。这是用于通过如以上在章节B下所述的皮下注射技术施用APC的特别优选制剂。

[0136] 无论以表面方式抑或通过皮下注射来施用,在某些实施方案中,相关制剂都可含有蛋白C作为APC的替代物,或除APC之外,也可含有蛋白C。举例来说,可施用有效量的蛋白C,其在体内将通过内源性蛋白C路径活化以产生APC。参见例如美国专利号5,151,268和PCT申请WO 93/09807。如上所指示,蛋白C可自血浆纯化或可通过重组DNA技术来制备。参见例

如美国专利号4,959,318、4,981,952、5,093,117、5,151,268、5,571,786、6,156,734、6,268,344和6,395,270。包含蛋白C的适合药物组合物是已知的(参见例如美国专利号5,151,268和5,571,786)。

[0137] 也可通过施用一定量的增加蛋白C在动物中的合成的试剂来增加APC的内源性产量。参见例如PCT申请W0 93/09807。适合试剂包括合成代谢类固醇(例如达那唑(danazolol))。参见例如PCT申请W0 93/09807。

[0138] 在某些实施方案中,可通过施用有效导致体内自内源性合成的蛋白C和/或自共施用的蛋白C产生APC的一定量的蛋白C活化剂来增加APC的内源性产量。参见例如PCT申请W0 93/09807。蛋白C活化剂是导致或增加APC产生的任何化合物。适合蛋白C活化剂包括凝血酶、 α -凝血酶、活性位点酰化凝血酶、凝血酶类似物和突变体(例如凝血酶E192Q和凝血酶K52E)、可溶性凝血酶-血栓调节蛋白复合物、将阻止凝血酶-血栓调节蛋白复合物的清除或衰退的试剂、增强血栓调节蛋白的合成或延迟血栓调节蛋白的清除的试剂、毒物(如普罗太克(Protac)或拉塞尔(Russel)蝰蛇毒物)、因子Xa、纤维蛋白溶酶、胰蛋白酶以及能够导致或增加自蛋白C产生APC的任何其它毒物、酶或化合物。参见例如PCT申请W0 93/09807。优选蛋白C活化剂是凝血酶和活性位点酰化凝血酶。

[0139] 在一些实施方案中,APC可与用于控制炎症、细胞增殖和细胞凋亡的一者或多者的另一药剂一起施用。一种特别优选药剂是抗IL-17抗体,具体来说是伊赛珠单抗(Ixekizumab),其在患有慢性斑块牛皮癣的患者中进行的II期研究中显示相较于安慰剂,在皮肤疾病严重性计分方面显著改善(NEJM,2012)。用于控制炎症的药剂的其它实例包括TNF- α 抑制剂以及消炎性细胞因子和生物医药。

[0140] 应了解的是,在本说明书中公开和定义的本发明延伸至两个或更多个提及的或根据正文或图式显而易见的个别特征的所有替代性组合。所有这些不同组合构成本发明的各个替代性方面。

[0141] 本发明的其它方面和先前段落中所述的各方面的其它实施方案将根据通过举例方式以及参照随附图式所给出的以下描述而变得显而易见。

实施例

[0142] 实施例1.确立APC对缓慢生长非炎性角质化细胞和牛皮癣皮肤角质化细胞的选择性抗细胞凋亡活性的临床前试验

[0143] 招募6名患有活动性慢性斑块牛皮癣的患者和6名正常个体。他们在取样之前至少4周尚未接受任何治疗。在局部麻醉剂下自同一慢性斑块获取两个6mm穿孔活检体。如先前所述(20)分离角质化细胞。

[0144] 正常角质化细胞用细胞因子[IL-1 α (10ng/ml)、IL-6 (5ng/ml)、TNF- α (5ng/ml)、IL-17A (10ng/ml)]的混合物处理以诱导牛皮癣表型。在1、10 μ g/ml下添加APC至角质化细胞中且处理24、48和72小时。使用MTT测定、BrdU增殖测定考查细胞增殖/存活。通过TUNEL测定、流动式细胞测量术(碘化丙啶(PI)或PI加膜联蛋白-V)来考查细胞凋亡。通过RT实时PCR和ELISA来检测细胞因子产量和四个所选牛皮癣相关基因TNF、DEFB4、CAMP、PI3。通过蛋白质印迹来检测细胞凋亡信号分子卡斯帕酶(caspase)-3、卡斯帕酶-8和卡斯帕酶-9以及MAK激酶ERK的活化和表达。

[0145] 结果将显示APC诱导牛皮癣性角质化细胞的细胞凋亡且减缓其生长,而它刺激正常角质化细胞的生长和存活。APC也降低炎性细胞因子IL-1、TNF- α 、IL-17和IL-6以及牛皮癣相关分子TNF、DEFB4、CAMP、PI3的水平。在用炎性介体处理的正常对照细胞中,细胞生长得以增强且添加APC使此作用逆转。总之,结果将明确显示APC不仅可抑制与牛皮癣性角质化细胞相关的炎症,而且它也降低与这些细胞相关的特征性过度增殖。

[0146] 实施例2.用皮下APC历经12周的2期预试验

[0147] 患者选择:招募5名患有重度慢性斑块型牛皮癣[牛皮癣面积和严重性指数(PASI) ≥ 12 ,体表面积(BSA) ≥ 10]的患者。主要纳入标准包括患者是18至70岁,已患有稳定斑块牛皮癣至少6个月。主要排除标准包括:i) 患者患有非斑块或药物诱发性牛皮癣;ii) 在研究之前28天内使用生物制剂,如利妥昔单抗(rituximab)、阿巴西普(abatacept)、英夫利昔单抗、阿达木单抗(adalimumab)、环孢灵(cyclosporine)或霉酚酸和依那西普(etanercept)或阿那白滞素(anakinra);iii) 患者在研究之前8周期间已接受抗牛皮癣治疗,包括任何光照疗法,以及在研究之前4周期间用除温和润肤剂以外的针对牛皮癣的任何标准表面疗法治疗;iv) 在研究期间使用的表面疗法限于仅在头皮、腋窝和腹股沟上使用的III至VII类糖皮质激素;v) 有任何活动性或新近感染的迹象或有恶性肿瘤或其它自体免疫性疾病的病史,妊娠妇女也是排除标准。

[0148] 治疗:一周两次向患者皮下施用400ugAPC/斑块,持续多达12周或当斑块消除时。围绕(如先前所述)周边以及在牛皮癣斑块下均匀注射APC,且类似地向对称地位于身体另一侧的对照斑块中注射单独媒介物(安慰剂)。接着在最终治疗之后再持续4周追踪患者。

[0149] 测量:分析PASI、静态医师整体评估(sPGA)、皮肤学生活质量指数(DLQI)、不利事件以及常规血液学和实验室数值(例如细胞因子、组织学检查、PC/APC活性)。安全性考虑包括流血风险、头痛、疲劳、感染和过敏。相关细胞和生物化学事件包括白血球、嗜中性白细胞和血小板计数;凝血活性、PC/APC水平和血清中针对APC的抗体形成。获取4mm活检体以进行PC/APC和EPCR的组织学检查,以及评估主要牛皮癣性参数,如棘皮症、表皮角质化病和角质不全、表皮的有丝分裂活性、乳头状水肿、毛细血管扩张和扭曲、及分别在真皮、棘层以及角质层中的嗜中性白细胞。

[0150] 统计分析:使用1侧2样本t检验在显著水平0.05下比较基线值和在治疗期间的各周和治疗之后4周时的值。

[0151] 结果和讨论:APC治疗将显示是安全的和良好耐受的,且患者将显示牛皮癣病变消除至少60%,其中5名患者中的3名显示斑块完全消除。在4周追踪期间,APC的作用将得以持续。所有患者都将显示PASI、sPGA、DLQI改善以及无不利作用且反应于治疗无APC抗体形成。可观察到表皮厚度和皮肤中炎性细胞显著降低,且EPCR的角质化细胞表达增加,然而,循环PC/APC水平不受影响。总之,结果将显示APC针对牛皮癣斑块是安全的,良好耐受的 and 高度有效的。

[0152] 实施例3用皮下aPC在10名患者中进行的针对寻常痤疮的2期预试验

[0153] 患者选择:招募10名患有寻常痤疮的患者。主要纳入标准包括:患者是18至30岁,已患有双侧性面部粉刺至少6个月。主要排除标准包括有任何活动性或新近感染的迹象;或有恶性肿瘤或其它自体免疫性疾病的病史;妊娠妇女。

[0154] 治疗:一天一次以凝胶剂形式向患者施用200ug APC,持续12周或当粉刺消除时。

向患者提供以两管标记有L和R的凝胶剂且建议向指定受影响区域涂覆自管挤压的2cm凝胶剂(L在左侧脸上而R在右侧脸上),并均匀摩擦。接着在最终治疗之后再持续4周追踪患者。

[0155] 测量:在治疗之前以及每4周进行照相且使用电脑辅助的图像分析计算粉刺面积。分析不利事件以及常规血液学和实验室数值(例如细胞因子、组织学检查、PC/APC活性)。监测安全性,包括流血风险、头痛、疲劳、感染、过敏。相关细胞和生物化学事件包括白血球、嗜中性白细胞和血小板计数;凝血活性、PC/APC水平和血清中针对APC的抗体形成。

[0156] 统计分析:使用1侧2样本t检验在显著水平0.05下比较基线值和在治疗期间的各周和治疗之后4周时的值。

[0157] 结果和讨论:APC治疗将显示是安全的和良好耐受的,且患者将显示粉刺消除至少50%。在4周追踪期间,APC的作用将得以持续。将不存在不利作用且反应于治疗无APC抗体形成。应存在表皮厚度和皮肤中炎性细胞显著降低,EPCR的角质化细胞表达增加,然而,循环PC/APC水平不受影响。总之,我们的结果将显示APC针对寻常痤疮是安全的,良好耐受的 and 高度有效的。

[0158] 实施例4凝胶制剂和治疗涂覆

[0159] 此实施例提供一种非无菌性、低生物负荷、防腐羧甲基纤维素钠基表面凝胶剂,其含有活性成分活化蛋白C和以下非活性成分:羧甲基纤维素钠、冰乙酸、1-赖氨酸盐酸盐、间甲酚、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、三水乙酸钠、氯化钠和注射用水。每克凝胶剂含有100ug活化蛋白C。

[0160] 实施例5凝胶制剂和治疗涂覆

[0161] Carbopol®*Ultrez 30聚合物(Lubrizol Advanced Materials,Inc)与黄原胶组合在1%水杨酸和5%含电解质提取物存在下在此冷法制剂(pH 4)中提供良好粘度。Glucam™*E 20保湿剂连同甘油一起赋予保湿性。以下是配方。

		INCI 名称, 商标名	重量%	功能
[0162]	A. 1.	去离子水	79.15	稀释剂
	2.	EDTA 二钠, Protachem NA2	0.05	螯合剂
	3.	卡波姆(Carbomer), Carbopol®* Ultrez 30 聚合物	0.80	流变学调节剂

[0163]	B. 4.	甘油, <i>甘油, 99.7%, USP</i>	2.00	保湿剂
	5.	甲基葡糖醇聚醚-20, <i>Glucam™ * E-20 保湿剂</i>	1.00	保湿剂
	6.	黄原胶, <i>Keltrol® CG</i>	0.25	增稠剂
	C. 7.	氢氧化钠(18%溶液)	1.75	中和剂
	D. 8.	丁二醇	6.00	增溶剂
	9.	醇, <i>乙醇</i>	2.00	增溶剂
	10.	水杨酸	1.00	抗粉刺剂
	E. 11.	PEG-40 氢化蓖麻油, <i>Cremophor® CO-40</i>	0.25	增溶剂
	12.	乳酸月桂酯, <i>Schercemol™ * LL 酯</i>	0.25	润肤剂
	F. 13.	苯氧乙醇(和)乙基己基甘油, <i>Euxyl® PE 9010</i>	0.50	防腐剂
	14.	水、甘油	5.00	抗刺激剂

[0164] 工序:

[0165] 1. 组合D部分成分且混合直至水杨酸晶体完全溶解。搁置供稍后添加。

[0166] 2. 将EDTA二钠溶解于水中。当EDTA二钠完全溶解时, 将混合速度设置在400-500rpm下且将Carbopol®*Ultrez 30聚合物缓慢分散至水中, 继续混合直至聚合物完全水合。

[0167] 3. 将B部分成分预混合成均一浆液。添加至A部分中。视需要增加混合速度以维持均一性。

[0168] 4. 添加C部分至A/B部分中且视需要增加混合速度以维持均一性。继续混合10分钟。

[0169] 5. 添加D部分至批料中且视需要调整混合速度以降低归因于粘度变化的任何飞溅。混合直至均一。

[0170] 6. 预混合E部分成分且添加至批料中。混合直至均一。

[0171] 7. 单独添加F部分成分, 其中在添加之间进行充分混合。

[0172] 添加APC以达到每克凝胶剂10-5000μg或0.01-0.05w/w%的量

[0173] 此凝胶剂可直接向病变区域涂覆。

[0174] 实施例6喷雾制剂和治疗涂覆

[0175] 如上对于注射APC所述将APC溶解于等张无菌溶液中。通过使用抽取针将小瓶的内含物向上抽取至2.5ml注射器中来达成喷雾递送。将灭菌喷雾嘴装配于注射器的末端(替代针)且将治疗剂(APC或生理食盐水)均匀喷雾在斑块上以覆盖整个受影响表面。因此, 无需推进剂来获得雾化, 仅需向注射器施加压力。必要时重复涂覆, 优选是一天一次。此技术易于以一致方式执行和重复, 从而提供治疗剂的均匀覆盖。

[0176] 实施例7用于评估对正常角质化细胞的抗细胞凋亡作用和对过度增殖性角质化细胞的细胞凋亡作用的技术。

[0177] 根据本发明,治疗有效量的APC通常提供对正常角质化细胞的抗细胞凋亡作用和对过度增殖性角质化细胞的细胞凋亡作用。此结果可如下在体外或原位加以评估:

[0178] 体外方法1。

[0179] 使用活检穿孔机移除未治疗的活动性牛皮癣性皮肤,且分离角质化细胞。简要说,将细胞(3000个细胞/孔)接种于96孔板中以达到最终体积200 μ l,接着孵育4小时以允许细胞附着。接着用APC在0.1、1和10 μ g/ml下处理细胞72小时。

[0180] 1) 根据MTT测定的细胞存活/生长速率:在此测定中,活细胞的线粒体脱氢酶裂解四唑鎓环,从而产生不溶于水溶液中的紫色MTT甲臞晶体。可将晶体溶解于酸化异丙醇中。以分光光度方式测量所得紫色溶液。细胞数目增加导致形成的MTT甲臞的量增加和吸光度增加。在完成处理之前三小时,添加10 μ l 5mg/ml MTT至细胞中。在再孵育3小时之后,移除MTT溶液且用100 μ l DMSO替换。在波长570nm下,以630nm为参照波长测定各孔的光密度。细胞活力与OD直接相关。APC以剂量依赖性方式使活力降低。

[0181] 2) 通过TUNEL测定、用碘化丙啶(PI)或PI加膜联蛋白-V的FACS分析、和活性卡斯帕酶活性来进行细胞凋亡速率检测。

[0182] 根据制造商说明书(Roche Diagnostics Australia Pty.Ltd.,NSW,Australia)使用原位细胞死亡检测试剂盒来进行TUNEL测定。简要说,细胞用含0.1%曲通X-100的新鲜制备的0.1%柠檬酸钠加以可渗透化,且与末端脱氧核苷酰基转移酶一起在荧光素标记的dUTP存在下孵育(在37 $^{\circ}$ C下60分钟)。使用抗荧光素过氧化物酶(POD)缀合的抗体和POD底物反应来观察TUNEL阳性细胞。切片用DAPI对比染色。由不知情的研究者通过在高倍率视野(40 $\times$)下计数TUNEL阳性细胞和总细胞数目并计算TUNEL阳性细胞的百分比来确定凋亡细胞的出现率。

[0183] FACS分析:用胰蛋白酶处理角质化细胞且用FACS洗涤缓冲液(具有5%FCS的PBS)洗涤。使200 μ l细胞混悬液与碘化丙啶(PI)或PI加膜联蛋白-V或缀合的抗体一起孵育,且随后通过流式细胞仪检测细胞周期/细胞凋亡和蛋白质表达。使用FlowJo软件分析数据。

[0184] 通过蛋白质印迹检测活性卡斯帕酶活性。在处理之后,角质化细胞用PBS和补充有蛋白酶抑制剂的溶解缓冲液(0.15M NaCl、0.01mM PMSF、1%NP-40、0.02M Tris、6M脲/H₂O)洗涤三次,且添加磷酸抑制剂(Roche,Indianapolis,IN,USA)。在10,000g下离心细胞溶解产物15分钟且通过10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离上清液并转移至PDVF膜中。检测抗人卡斯帕酶-3、卡斯帕酶-8和卡斯帕酶-9抗体。使用ECL检测系统(Amersham,Piscataway,NJ)检测免疫反应性。包括抗人 β -肌动蛋白抗体来相对于不等装载量进行标准化。

[0185] 在所有细胞凋亡测定中,APC都促进快速生长角质化细胞的细胞凋亡。

[0186] 体外方法2。

[0187] 目的在于确定来自APC治疗的斑块的角质化细胞是否比安慰剂处理的细胞更倾向于细胞凋亡。使用以下2种方法将APC递送至牛皮癣斑块(尺寸约5-50cm²)中:i)表面注射(100ng-1mg);ii)使用在0.5ml注射器的末端上的灭菌喷雾嘴喷雾溶液(10ng-1mg)。使用活检穿孔机移除用APC或安慰剂治疗的活动性牛皮癣性皮肤,且分离角质化细胞。立刻使用如上所述的FACS分析测量细胞的凋亡。结果指示相较于安慰剂治疗的皮肤,来自APC治疗的皮肤的凋亡细胞的水平显著较高。

[0188] 原位方法

[0189] 原位细胞凋亡：目的在于确定来自APC治疗的斑块的角质化细胞是否比安慰剂处理的细胞更倾向于细胞凋亡。使用以下2种方法将APC递送至牛皮癣斑块（尺寸约5-50cm²）中：i) 表面注射（100ng-1mg）；ii) 使用在0.5ml注射器的末端上的灭菌喷雾嘴喷雾溶液（10ng-1mg）。使用活检穿孔机移除用APC或安慰剂治疗的活动性牛皮癣性皮肤。固定皮肤且根据制造商说明书（Roche Diagnostics Australia Pty.Ltd., NS W, Australia）使用原位细胞死亡检测试剂盒检测细胞凋亡。简要说来，细胞用含0.1%曲通X-100的新鲜制备的0.1%柠檬酸钠加以可渗透化，且与末端脱氧核苷酰基转移酶一起在荧光素标记的dUTP存在下孵育（在37℃下60分钟）。使用抗荧光素过氧化物酶（POD）缀合的抗体和POD底物反应来观察TUNEL阳性细胞。切片用DAPI对比染色。由不知情的研究者通过在高倍率视野（40x）下计数TUNEL阳性细胞和总细胞数目并计算TUNEL阳性细胞的百分比来确定凋亡细胞的出现率。用APC治疗的皮肤相较于安慰剂治疗的皮肤具有显著较高水平的TUNEL阳性凋亡细胞。

[0190] 小鼠牛皮癣模型

[0191] 如先前所述（Raychaudhuri, 2001 Br. J. Dermatol）建立牛皮癣异种移植物SCID小鼠模型（需要82只小鼠）。简要说来，在移除完整厚度的皮肤样本之后，将人牛皮癣斑块（1cm²）移植于约8周龄SCID小鼠的背上。在3-4周内接受牛皮癣性移植物且牛皮癣样疾病维持至少10周。在牛皮癣显现之后使用以下2种方法递送APC：i) 皮内注射（10ng-100ug）；ii) 使用在0.5ml注射器的末端上的灭菌喷雾嘴在受影响皮肤上（8/组），每周3次持续多达8周喷雾溶液（10ng-100ug）。生理食盐水用作安慰剂对照。将在第0天（在治疗之前）和第28天（在治疗之后）获取的穿孔活检体（2mm）快速冷冻且处理以进行免疫染色和组织学分析来测定表皮厚度、表皮突长度（表皮厚度的指标）和炎性细胞浸润。在第28天，收集皮肤以测量炎性介体、分化标记和接合蛋白质。APC治疗使皮肤厚度和炎性细胞（特别是嗜中性白细胞和T细胞）的数目降低。相较于安慰剂，APC治疗的皮肤中的炎性细胞因子降低，特别是肿瘤坏死因子- α ，且接合相关蛋白质增加，尤其是封闭区-1紧密连接蛋白（claudin）、封闭蛋白（occludin）和JAM-A。

[0192] 使用BrdU并入的细胞增殖：为达成标记经受DNA合成的细胞，成年小鼠在安乐死之前2小时接受1次BrdU（100mg/kg）注射，且收集小鼠皮肤并用10%福尔马林固定。通过用抗BrdU抗体进行免疫染色来检测增殖细胞。APC处理的细胞展现BrdU并入显著较少，从而指示增殖能力较低。

[0193] 实施例8用皮下APC历经一个月在五名患者中进行的2期预试验

[0194] 患者

[0195] 患有稳定斑块牛皮癣至少6个月的18至70岁患者已接受光照疗法或全身性牛皮癣疗法或是光照疗法或全身性牛皮癣疗法的候选者。

[0196] 排除：

[0197] 患有非斑块或药物诱发性牛皮癣的患者。

[0198] 在研究之前8周期间已接受抗牛皮癣治疗（包括任何光照疗法）以及在研究之前4周期间用除温和润肤剂以外的针对牛皮癣的任何标准表面疗法治疗的患者。在研究期间使用的表面疗法将限于仅在头皮、腋窝和腹股沟上使用的III至VII类糖皮质激素。

[0199] 在研究之前3周期间具有临床感染迹象的患者，以及具有癌症病史的患者。

[0200] 研究设计

[0201] 用皮下APC (100ug) 每周一次持续一个月在五名患者中进行的2期预试验。

[0202] APC施用方案。

[0203] 选择五名患有慢性斑块牛皮癣的另外健康男性患者供用APC治疗。以剂量100ug每周一次历经4周时期来施用药物。

[0204] 直接在牛皮癣斑块下皮下注射APC,且在对称地位于身体另一侧的对照斑块下注射单独媒介物(安慰剂)。选择类似于另外两个斑块的对照斑块进行两者均不注射的研究。

[0205] 报道

[0206] 描述性分析(基线)

[0207] 借助于静态医师整体评估来评估表面治疗之前、光照疗法之前、全身性疗法之前、生物疗法之前的基线人口资料(年龄、重量、BMI、种族划分)和疾病特征(牛皮癣持续时间、受牛皮癣影响的身体面积的百分比、平均PASI计分、显著或重度牛皮癣的存在性)。

[0208] 功效和安全性评估

[0209] 通过照相记录和/或20mHz超声来考察第1天(疗法之前)直至疗法结束之后3天(第31天)的功效。

[0210] 详细监测各患者的三个不同斑块(包括APC和媒介物施用部位)以确定各患者的不良回声带(代表上部真皮中的表皮棘皮症与浸润两者)降低和牛皮癣面积和严重性指数(PASI)改善百分比。

[0211] 在APC之前4天、在一周时以及在第24天(疗法结束)的皮肤活检体(4mm穿孔活检体)用于组织学和免疫组织化学检查以及mRNA测定。

[0212] 组织学和免疫组织化学

[0213] 组织学探究包括评估主要牛皮癣性参数,如棘皮症、表皮角化病和角化不全、表皮的有丝分裂活性、乳头状水肿、毛细血管扩张和扭曲、及分别在真皮、棘层以及角质层中的嗜中性白细胞。

[0214] 免疫组织化学探究

[0215] 安全性

[0216] 不利事件、严重不利事件、常规血液学和实验室数值、针对APC的抗体形成。

[0217] 副作用和瘙痒

[0218] 延迟型过敏反应(DTH)

[0219] 参考文献

[0220] 1.Chiricozzi,A.,Guttman-Yassky,E.,Suarez-Farinas,M.,Nograles,K.E.,Tian,S.,Cardinale,I.,Chimenti,S.,and Krueger,J.G.(2011)J Invest Dermatol 131, 677-687

[0221] 2.Nestle,F.O.,Di Meglio,P.,Qin,J.Z.,and Nickoloff.B.J.(2009)Nat RevImmunol 9,679-691

[0222] 3.Pasparakis,M.(2009)Nat Rev Immunol 9,778-788

[0223] 4.Pasparakis,M.(2012)Immunol Rev 246,346-358

[0224] 5.Zanni,G.R.(2012)Consult Pharm27,86-88,90,93-86

[0225] 6.Berth-Jones,J.,and Hutchinson, P.E.(1992)Br J Dermatol 127,71-78

- [0226] 7.Kurian,A.,and Barankin,B. (2011) Skin Therapy Lett 16,4-7
- [0227] 8.Tran,B.,and Feldman,S.R. (2011) J Dermatolog Treat 22,18-26
- [0228] 9.Herrier,R.N. (2011) American Journal of Health-System Pharmacy 68, 795-806
- [0229] 10.Montesu,M.A.,Addis,G.M.,SaRa,R.,and Cottoni,F. (2011) G Ital Dermatol Venereol 146,273-281
- [0230] 11.Wallis,R.S. (2011) Infect Dis Clin North Am 25,895-910
- [0231] 12.Esmon,C.T. (2004) Crit Care Med.32,S298-S301
- [0232] 13.Xue,M.,Campbell,D.,and Jackson,C.J. (2007) Journal of Biological Chemistry 282,13610-13616
- [0233] 14.Xue,M.,Campbell,D.,Sambrook,P.N.,Fukudome,K.,and Jackson,C.J. (2005) J Invest Dermatol.125,1279-1285
- [0234] 15.Esmon,C.T. (2004) Maturitas 47,305-314
- [0235] 16.Yuksel,M.,Okajima,K.,Uchiba,M.,Horiuchi,S.,and Okabe,H. (2002) Thromb Haemost. 88,267-273
- [0236] 17.Xue,M.,March,L.,Sambrook,P.N.,Fukudome,F.,and Jackson,C.J. (2007) Ann.Rheum.Dis.
- [0237] 18.Xue,M.,March,L.,Sambrook,P.N.,and Jackson,C.J. (2007) Arthritis Rheum.56,2864-2874
- [0238] 19.Lay,A.J.,Donahue,D.,Tsai,M.J.,and Castellino,F.J. (2007) Blood 109, 1984-1991
- [0239] 20.Xue,M.,Thompson,P.,Kelso,I.,and Jackson,C. (2004) Exp Cell Res 299, 119-127
- [0240] 21.van Zonneveld,A.J.,de Boer,H.C.,van der Veer,E.P.,and Rabelink, T.J. (2010) Annals of the Rheumatic Diseases 69,i57-i60
- [0241] 22.Feistritz,C.,and Riewald,M. (2005) Blood 105,3178-3184
- [0242] 23.Finigan,J.H.,Dudek,S.M.,Singleton,P.A.,Chiang,E.T.,Jacobson,J.R., Camp,S.M.,Ye,S.Q.,and Garcia,J.G. (2005) J.Biol.Chem.
- [0243] 24.Xue,M.,Chow,S.O.,Dervish,S.,Chan,Y.K.,Julovi,S.M.,and Jackson,C.J. (2011) Journal of Biological Chemistry 286,6742-6750
- [0244] 25.Vetrano,S.,Ploplis,V.A.,Sala,E.,Sandoval-Cooper,M.,Donahue,D.L., Correale,C.,Arena,V.,Spinelli,A.,Repici,A.,Malesci,A.,Castellino,F.J.,and Danese,S. (2011) Proc Natl Acad Sci U S A 108,19830-19835
- [0245] 26.Uchiba,M.,Okajima,K.,Oike,Y.,Ito,Y.,Fukudome,K.,Isobe,H.,and Suda, T. (2004) Circ Res 95,34-41

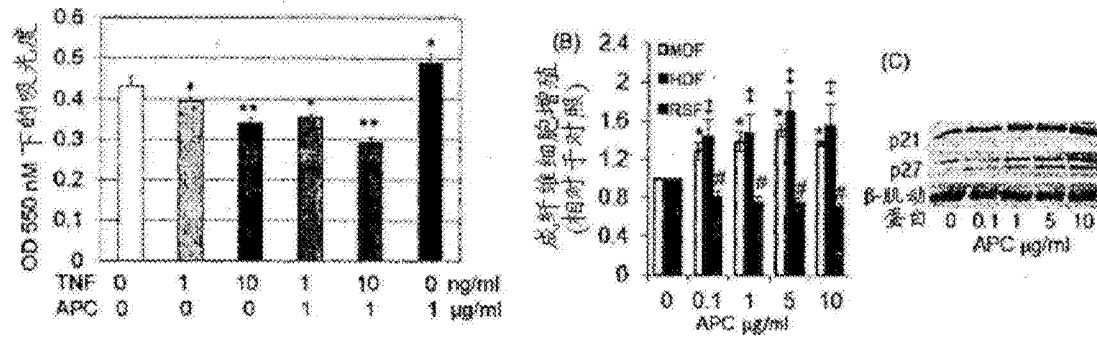


图1

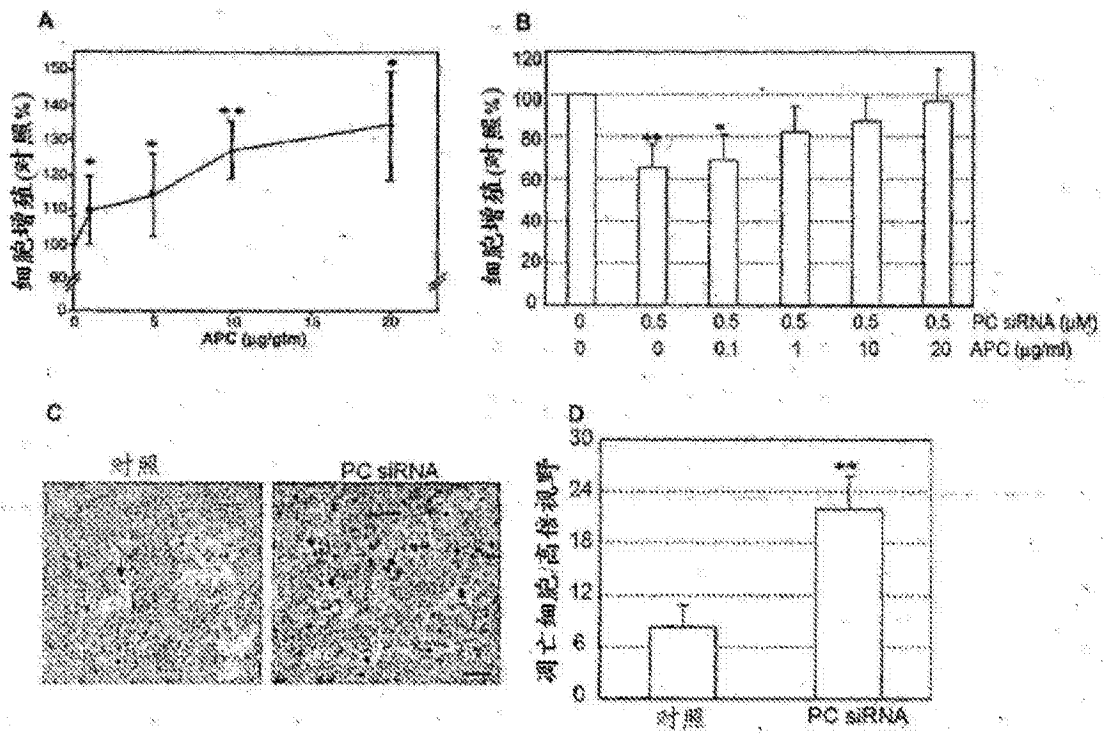


图2

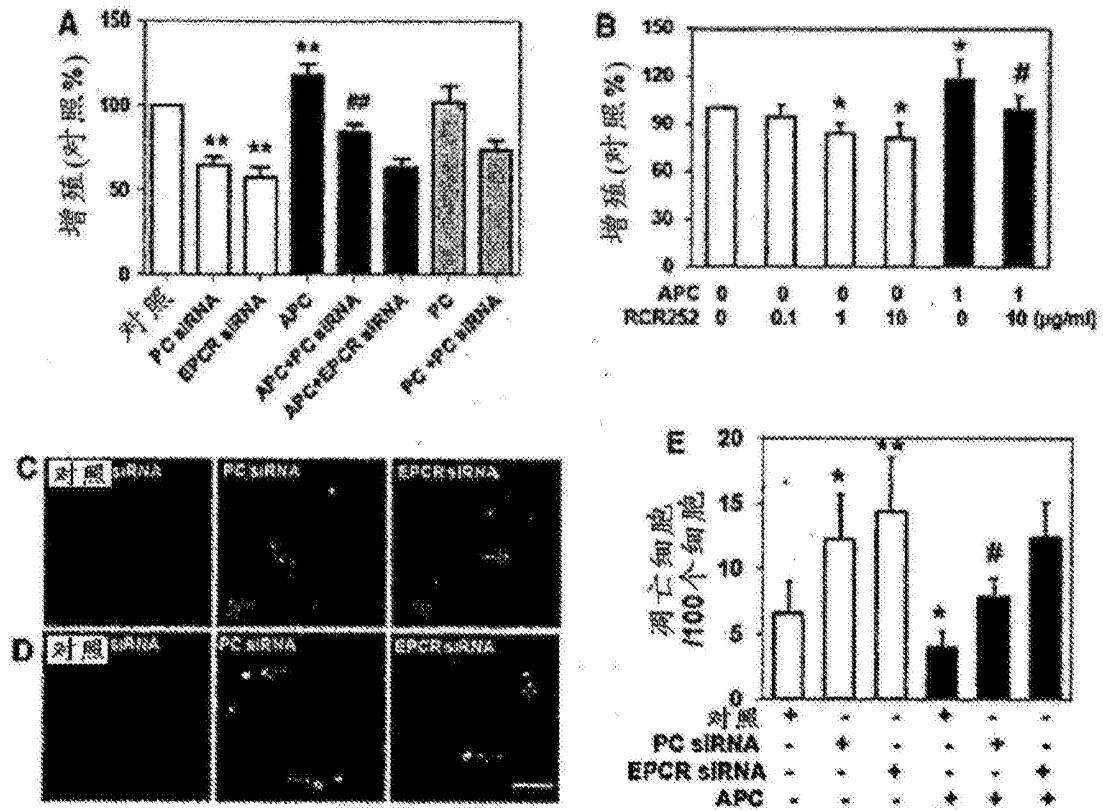


图3