



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102026656 A

(43) 申请公布日 2011.04.20

(21) 申请号 200980117757.6

(22) 申请日 2009.05.13

(30) 优先权数据

61/127,947 2008.05.16 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.11.16

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/043854 2009.05.13

(87) PCT申请的公布数据

W02009/140433 EN 2009.11.19

(71) 申请人 科尔泰拉公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 D·R·斯图尔特

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51) Int. Cl.

A61K 38/43 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 20 页 序列表 6 页

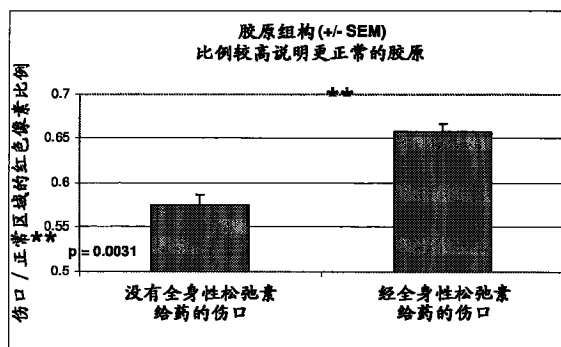
附图 14 页

(54) 发明名称

促进伤口愈合的方法

(57) 摘要

本发明涉及施用松弛素以促进伤口愈合和减少瘢痕形成的方法。本发明还涉及松弛素在整复外科和整形外科中的用途。



1. 改善皮肤伤口的美容外观的方法，其包括：向有皮肤伤口的个体以有效产生与未治疗的个体的愈合伤口相比具有改善的美容外观的愈合伤口的量施用包含药理学活性的松弛素的药物制剂。

2. 权利要求1的方法，其中所述具有改善的美容外观的愈合伤口包括与周围皮肤匹配的更接近的颜色。

3. 权利要求2的方法，其中所述具有改善的美容外观的愈合伤口还包括胶原纤维的交织排列。

4. 权利要求1的方法，其中所述松弛素为纯化的、重组的或合成的人类松弛素。

5. 权利要求1的方法，其中所述松弛素为H1、H2或H3人类松弛素。

6. 权利要求1的方法，其中所述松弛素为松弛素激动剂。

7. 权利要求1的方法，其中所述松弛素经全身给药至所述个体。

8. 权利要求1的方法，其中所述松弛素经局部给药至所述皮肤伤口。

9. 权利要求1的方法，其还包括冲洗所述皮肤伤口。

10. 权利要求1的方法，其中所述药物制剂还包含抗生素和非甾体抗炎药之一或两者。

11. 在皮肤伤口愈合期间减少瘢痕形成的方法，其包括：向有皮肤伤口的个体以有效产生与未治疗的个体的愈合伤口相比具有减少的瘢痕形成的愈合伤口的量施用包含药理学活性的松弛素的药物制剂。

12. 权利要求11的方法，其中所述瘢痕形成选自瘢痕疙瘩、肥厚性瘢痕和条纹状瘢痕。

13. 权利要求11的方法，其还包括预先存在的瘢痕组织的清创或去除。

14. 权利要求11的方法，其中所述松弛素为纯化的、重组的或合成的人类松弛素。

15. 权利要求11的方法，其中所述松弛素为H1、H2或H3人类松弛素。

16. 权利要求11的方法，其中所述松弛素为松弛素激动剂。

17. 权利要求11的方法，其中所述松弛素经全身给药至所述个体和/或经局部给药至所述皮肤伤口。

18. 权利要求11的方法，其还包括冲洗所述皮肤伤口。

19. 权利要求11的方法，其中所述药物制剂还包含抗生素和非甾体抗炎药之一或两者。

20. 权利要求11的方法，其中所述个体为具有受损的愈合能力的人类个体。

21. 促进伤口愈合的方法，其包括：向有伤口的个体以有效促进所述伤口的愈合的量施用包含药理学活性的松弛素的药物制剂。

22. 权利要求21的方法，其中所述伤口源自整形外科手术。

23. 权利要求22的方法，其中所述整形外科手术为面部整形外科手术，其选自：皱纹切除术、眼睑成形术、鼻成形术、耳成形术、颌成形术、除皱整容、前额提升、眉毛提升、面部瘢痕修正、面部瘢痕去除、激光手术、皮肤表面重建、皱纹处理、血浆皮肤再生、面部脂肪移植术、皮肤收紧、纹身去除和毛发置换术。

24. 权利要求22的方法，其中所述整形外科手术为全身整形外科手术，其选自：腹壁成形术、乳房缩小、乳房增大、身体提升操作、蜘蛛静脉治疗、妊娠纹治疗、脂肪抽

吸术、去除过多皮肤术、蜂窝组织减少治疗、体形塑造、身体表面重建和身体植入物。

25. 权利要求 21 的方法，其中所述松弛素为纯化的、重组的或合成的人类松弛素。

26. 权利要求 21 的方法，其中所述松弛素为 H1、H2 或 H3 人类松弛素。

27. 权利要求 21 的方法，其中所述松弛素为松弛素激动剂。

28. 权利要求 21 的方法，其中所述松弛素经全身和 / 或局部给药。

29. 权利要求 21 的方法，其中所述药物制剂还包含抗生素和非甾体抗炎药之一或两者。

30. 权利要求 21 的方法，其中所述个体为具有受损的愈合能力的人类个体。

促进伤口愈合的方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求在 35USC 119(e) 下于 2008 年 5 月 16 日提交的序号为 61/127,947 的美国临时专利申请的优先权，其全部内容引入本文作为参考，用于所有目的。

发明领域

[0003] 本发明涉及促进伤口愈合并减少瘢痕形成的方法。本发明描述的方法利用松弛素的给药。

技术背景

[0004] 伤口经常在愈合后留下明显且难看的瘢痕，并且得到的组织比周围组织脆弱，因为胶原在其最初位置不愈合。多种方法已试图增强伤口愈合并减少瘢痕形成，例如施用硅板至皮肤表面以减少隆起的瘢痕形成。一些局部用霜剂和凝胶剂也作为用于瘢痕的药物出售，声称改善所述瘢痕的外观。然而，许多这样的方法没能提供所声称的解决方案。例如，当在盲法试验中进行测试时，用于促进瘢痕减少的局部用霜剂还未被证明具有效能，因为它们通常不能提供受伤后重新形成的胶原网状结构。

[0005] 根据 Mattson Jack 集团的市场研究，在 2004 年美国总共 4200 万例手术操作中，34% 的患者处于缺乏免疫力的愈合的高度风险中。该研究表明目前市场上有效的疗法具有低满意度，且对加速手术愈合的治疗有巨大兴趣。因此，提供促进伤口愈合的有效药物治疗具有明确的市场需求。具体地，常常期望提高急性伤口（例如穿透性损伤、烧伤、神经损害乃至由选择性外科手术引起的伤口）、慢性伤口（例如糖尿病性溃疡、静脉溃疡或褥疮溃疡）或对于通常缺乏免疫力的愈合的个体（例如老年人或糖尿病个体）的伤口的愈合速率。在所有这些实例中，伤口会严重影响个体的生活质量，甚至导致死亡。例如，伤口部位的细菌感染会妨碍愈合过程，并导致威胁生命的并发症。因此，人们期望临床上尽可能地提高愈合速率。

[0006] 伤口愈合过程是复杂的一系列事件，其开始于损伤那一刻并可能持续数月至数年。具体地，成人组织中的伤口愈合是复杂的修复过程。例如，皮肤的修复过程包括许多专门化的细胞在伤口部位募集、细胞外基质和基底膜沉积、血管发生、选择性蛋白酶活性以及表皮细胞再生（Singer 和 Clark, The New England Journal of Medicine, 341 : 738-743, 1999）。

[0007] 在伤口愈合过程中有三个不同阶段。首先，在炎性阶段（其通常出现在伤口发生的那一刻至最初的二至五天），血小板聚集以沉积颗粒、促进纤维蛋白的沉积并刺激生长因子的释放。白细胞转移至伤口部位并开始从所述伤口消化并运送走碎屑。在该炎性阶段期间，单核细胞也转变为巨噬细胞，其释放刺激血管发生和成纤维细胞生成的生长因子。

[0008] 第二，在增殖阶段（其通常出现在两天至三周），肉芽组织形成且上皮形成开始。成纤维细胞，其为该阶段中的关键细胞类型，增殖并合成胶原以填充伤口并提供上

皮细胞生长的牢固基质。因为成纤维细胞产生胶原，血管化延伸至附近的血管以向再生组织供给营养。血管的红襻 (red loop) 赋予伤口粒状外观，因此称为“粒化的”组织。上皮形成包括上皮细胞从伤口表面迁移以封闭伤口。上皮细胞被该需要驱使去接触相似类型的细胞并由充当这些细胞移动的网格的纤维蛋白链网络引导。称为成肌纤维细胞的收缩细胞出现在伤口中，并帮助伤口闭合。这些细胞具有胶原合成及收缩性，并在粒化的伤口中常见。

[0009] 第三，在重塑阶段（伤口愈合的最后阶段，其可能从第三周发生直至数年），瘢痕中的胶原经历反复降解和再合成。在此阶段，新形成的皮肤的抗拉强度增加。

[0010] 然而，随着伤口愈合速率增加，瘢痕形成经常出现关联性地增加。在大部分成年动物和人类组织中，瘢痕化是愈合过程的一种结果。瘢痕组织与其所代替的组织不完全相同，因为它通常具有较低的机能性质。例如，皮肤中的瘢痕对紫外辐射抵抗力较低，且汗腺和毛囊在瘢痕组织中不再生长。瘢痕的类型包括但不限于：萎缩性瘢痕、肥厚性瘢痕和瘢痕疙瘩，以及瘢痕性挛缩。萎缩性瘢痕是在周围皮肤下扁平或凹陷的，如同山谷凹陷或洞。肥厚性瘢痕是鼓起的瘢痕，其保留在原始损伤的边界内，并常常含有以异常模式排列的过多胶原。瘢痕疙瘩是鼓起的瘢痕，其分布在最初伤口的边界外，并以位点特异性的方式侵入周围正常皮肤，且常常含有以异常模式排列的胶原螺环。瘢痕性挛缩是成直角的交叉关节或皮肤皱褶的瘢痕，并倾向于变短或挛缩。瘢痕性挛缩发生在瘢痕不完全成熟时，常常倾向于肥厚性的，并通常是残疾和功能障碍的。瘢痕形成也可以是局部缺血性的或条纹状的。局部缺血性瘢痕由局部供血不足引起。条纹状瘢痕形成于皮肤被快速拉伸时（例如在妊娠、体重显著增加或青春期生长突增时），或在愈合过程中皮肤被拉伸（通常靠近关节）。这种类型的瘢痕通常在几年后在外观上有改善。

[0011] 相比之下，以篮网状形式排列的胶原纤维组成的正常皮肤促成了真皮的强度和弹性。因此，为实现更平滑的伤口愈合过程，期望一种不仅刺激胶原产生，而且使胶原以更有组织的排列来减少瘢痕形成的方法。本发明迎合了这种未满足的需求。

[0012] 优选实施方案的简述

[0013] 本发明主要提供了促进伤口愈合并减少瘢痕形成的方法。本发明的各方面涉及促进损伤或伤口愈合、促进伤口的表皮细胞再生、减少伤口愈合期间的瘢痕形成、防止伤口愈合期间的瘢痕形成、抑制皮肤伤口的 TGF- β 胶原诱导的成纤维细胞增殖和胶原产生，并改善毁容的外观的方法。

[0014] 伤口可以由切割、撕裂、擦伤、穿刺、穿透、枪弹伤、戳伤，以及面部和全身的整形外科手术引起。虽然许多方法，例如硅板和局部用霜剂已试图增加伤口愈合并减少瘢痕形成，但是许多这样的方法未能实现期望的效果。因此，本发明提供新的治疗方法以实现该需要。本发明的一个优点是松弛素提高了伤口愈合的速度。本发明的另一优点是松弛素改善了伤口部位的强度。而其他优点包括通过施用松弛素刺激可减少瘢痕形成的抗纤维化作用，并抑制 TGF- β 胶原诱导的成纤维细胞增殖和胶原产生。

[0015] 施用松弛素显著地提高了伤口愈合。例如，在啮齿类中，对大鼠全身性松弛素给药与 VEGF 和 bFGF 的转录物上调有关，并选择性地增加了在受伤部位的新血管形成 (Unemori 等人, Wound Repair and Regeneration, 8 : 366-368, 2000)。然而，啮齿动物的伤口愈合机制不同于猪和人类的伤口愈合机制。因此，本发明的一个优点是提供在动

物（例如猪）和人类的皮肤中施用松弛素，以安全有效的方式促进伤口愈合并减少瘢痕形成的方法。

[0016] 对于每种前述方法，选择具有损伤或伤口（其可能是开放性伤口、闭合性伤口、切口或源自面部整形外科或全身整形外科的伤口）的动物或人类个体（包括糖尿病个体），并施用有效量的含有药学可接受的松弛素的药物制剂以促进损伤或伤口愈合。在一些实施方案中，所述损伤是切口（其可能是表皮的切割）或伤口（其可能是开放性或闭合性的）。开放性伤口的实例包括但不限于：切割、撕裂、擦伤、刺伤、穿透伤、枪弹伤和戳伤。闭合性伤口的实例包括但不限于：挫伤或血肿。在一些实施方案中，加速了所述伤口的愈合、表皮细胞再生或愈合期间瘢痕形成的减少。在其他实施方案中，所述伤口完全或部分被痂覆盖、含有活性的成纤维细胞或者是急性或慢性伤口。在另一些实施方案中，所述切口是表皮的切割。

[0017] 在本发明的前述方面的其他实施方案中，伤口可能源自整形外科手术，例如面部整形外科或全身整形外科手术。面部整形外科手术的实例包括但不限于：皱纹切除术、眼睑成形术、鼻成形术、耳成形术、颞成形术、除皱整容、前额提升（fore head lift）、眉毛提升（brow lift）、面部瘢痕修正、面部瘢痕去除、激光手术、皮肤表面重建、皱纹处理、血浆皮肤再生、面部脂肪移植术、皮肤收紧、纹身去除和毛发置换术。全身整形外科手术的实例包括但不限于：腹壁成形术、乳房缩小、乳房增大、身体提升操作（bodylift procedures）、蜘蛛静脉治疗、妊娠纹治疗、脂肪抽吸术、去除过多皮肤术、蜂窝组织减少治疗、体形塑造、身体表面重建和身体植入物。

[0018] 在一些实施方案中，通过调节特异性受体来促进个体伤口或切口的愈合、促进伤口的表皮细胞再生、在伤口愈合期间减少或预防瘢痕形成，或者抑制伤口的 TGF- β 胶原诱导的成纤维细胞增殖和胶原产生。特别地，LGR7 和 LGR8 受体通过结合松弛素被激活，其中所述结合引发一氧化氮（NO）的生成。在其他实施方案中，松弛素通过增加损伤部位周围的血管舒张来促进伤口或切口的愈合、减少伤口部位的组织肉芽形成、减少伤口部位的慢性炎症、减少伤口部位的坏死、增加伤口部位胶原的组构（organization）、改善伤口部位组织学、增加伤口部位的强度，以及它们的组合。前述方法还包括促进皮肤伤口的表皮细胞再生、减少瘢痕形成、防止瘢痕形成和抑制 TGF- β 胶原诱导的成纤维细胞增殖和胶原产生。在一些实施方案中，表皮细胞再生包括但不限于：增加损伤部位的血管舒张、减少伤口部位的组织肉芽形成、减少伤口部位的慢性炎症、减少伤口部位的坏死、增加伤口部位胶原的组构、改善伤口部位组织学和 / 或增加伤口部位的强度。在其他实施方案中，皮肤伤口的表皮细胞再生还减少瘢痕形成、防止瘢痕形成和 / 或抑制 TGF- β 胶原诱导的成纤维细胞增殖和胶原产生。

[0019] 本发明的药物制剂中应用的松弛素可为例如合成的或重组的松弛素。在一个实施方案中，松弛素为人类松弛素。在本发明的另一实施方案中，松弛素为 H2 人类松弛素。在另一实施方案中，松弛素为合成的或重组的 H2 人类松弛素。因此，个体可用合成的或重组的人类松弛素的药物制剂治疗。在本发明的另一实施方案中，所述个体用合成的 H2 人类松弛素治疗。在另一实施方案中，所述个体用重组的 H2 人类松弛素治疗。

[0020] 松弛素可通过许多不同路径向个体给药，其包括但不限于：局部、皮下、全身、肌内、舌下、静脉内、通过吸入、通过注射、通过冲洗和 / 或通过渗透泵（例如多

室渗透泵系统)给药。例如,局部递送可包括但不限于:洗剂、凝胶剂、霜剂、溶液剂和绷带(其中松弛素递送至绷带的纱布上,并当其施用至湿的伤口时,会释放进伤口部位)。在一些实施方案中,松弛素以渐进的逐步减少的速率给药。可以预设该速率以使松弛素的血清浓度保持在从约 0.5 至约 500ng/mL,更优选从约 0.5 至约 300ng/mL,且最优选从约 3 至约 75ng/mL。可能的范围是约 1 至约 50ng/mL,其中优选的血清浓度为 20ng/mL。在其他实施方案中,松弛素每天按约 10 至 1000 μ g/kg 个体体重的量给药。在另一实施方案中,松弛素的剂量为 10、30、100 和 250 μ g/kg/天。在另一实施方案中,这些剂量导致松弛素的血清浓度分别为约 3、10、30 和 75ng/mL。在其他实施方案中,优选每天以约 960 μ g/kg 个体体重施用松弛素。对于任何剂量水平,可以施用松弛素持续足以获得治疗效果的一段时间。

[0021] 在一些实施方案中,上述方法可包括冲洗伤口以加速愈合。松弛素可以与药学可接受的载体、稀释剂或赋形剂一起给药,其可被结合为洗剂、凝胶剂、霜剂和/或溶液剂的形式。在其他实施方案中,松弛素与伤口渗透促进剂一起给药。松弛素还可与至少一种其他药学活性剂(例如 NSAID 或抗生素)联合给药。在其他实施方案中,施用松弛素持续足以获得治疗效果的一段时间。

[0022] 本发明的其他方面提供治疗损伤、伤口的表皮细胞再生、预防或减少皮肤伤口愈合期间的瘢痕形成的方法,其中向个体施用药学活性的合成的人类松弛素。这包括每天按约 10 至约 1000 μ g/kg 体重的剂量的可注射制剂,其中施用松弛素持续足以获得治疗效果的一段时间。在一个实施方案中,所述个体是人类个体。在其他实施方案中,所述损伤是切口(其可以是表皮的切口)或者是伤口(其可以是开放性或闭合性的)。开放性伤口的实例包括但不限于:切割、撕裂、擦伤、刺伤、穿透伤、枪弹伤和/或戳伤。在另一实施方案中,所述制剂为可注射的。

[0023] 在其他方面,本发明提供预防或减少皮肤伤口愈合期间的瘢痕形成的方法,其中药学活性的合成的人类松弛素每天以约 10 至约 1000 μ g/kg 体重的量向个体给药,给药持续足以获得个体中的治疗效果的一段时间。在一个实施方案中,所述个体是人类个体。在另一实施方案中,所述伤口是开放性或闭合性伤口。在另一实施方案中,所述开放性伤口包括但不限于:切割、撕裂、擦伤、刺伤、穿透伤、枪弹伤和戳伤。在另一实施方案中,瘢痕形成包括但不限于瘢痕疙瘩、肥厚性、局部缺血型和条纹状瘢痕。在另一实施方案中,预先存在的瘢痕组织被首先除去。在另一实施方案中,所述制剂为可注射的。

[0024] 本发明还包括用于促进人类个体(包括糖尿病个体)中损伤愈合的松弛素;用于促进人类个体(包括糖尿病个体)中伤口愈合的松弛素;用于促进人类个体(包括糖尿病个体)中伤口的表皮细胞再生的松弛素;用于减少人类个体(包括糖尿病个体)中伤口愈合期间的瘢痕形成的松弛素;用于预防人类个体(包括糖尿病个体)中伤口愈合期间的瘢痕形成的松弛素;用于抑制人类个体(包括糖尿病个体)中皮肤伤口的 TGF- β 胶原诱导的成纤维细胞增殖和胶原产生的松弛素;以及用于改善人类个体(包括糖尿病个体)中毁容的外貌的松弛素,如上所述。

[0025] 本发明还提供改善皮肤伤口的美容外观的方法,其包括:向有皮肤伤口的个体以有效产生与未治疗的个体的愈合伤口相比具有改善的美容外观的愈合伤口的量施用包

含药活性的松弛素的药物制剂。 在一些实施方案中, 所述具有改善的美容外观的愈合伤口包括与周围皮肤匹配的更接近的颜色(更平滑的纹理、周围皮肤变形减少、与周围皮肤更加吻合, 以及没有总体的病理)。 在一些优选实施方案中, 所述具有改善的美容外观的愈合伤口还包括胶原纤维的交织排列。 在一些实施方案中, 所述松弛素为纯化的、重组的或合成的人类松弛素。 在一些优选实施方案中, 所述松弛素为 H1、H2 或 H3 人类松弛素, 而在其他实施方案中所述松弛素为松弛素激动剂。 在一些优选实施方案中, 所述松弛素经全身给药至所述个体和 / 或所述松弛素经局部给药至所述皮肤伤口。 一些实施方案还包括冲洗所述皮肤伤口。 此外, 在一些实施方案中, 所述药物制剂还包含抗生素和非甾体抗炎药之一或两者。 在一些实施方案中, 所述个体为具有受损的愈合能力的人类个体(如: 糖尿病个体、老年人)。

[0026] 此外, 本发明提供了在皮肤伤口愈合期间减少瘢痕形成的方法, 其包括: 向有皮肤伤口的个体以有效产生与未治疗的个体的愈合伤口相比具有减少的瘢痕形成的愈合伤口的量施用包含药活性的松弛素的药物制剂。 在一些实施方案中, 所述瘢痕形成选自瘢痕疙瘩、肥厚性瘢痕和条纹状瘢痕。 在一些优选实施方案中, 所述方法还包括预先存在的瘢痕组织的清创或去除。 在一些实施方案中, 所述松弛素为纯化的、重组的或合成的人类松弛素。 在一些实施方案中, 所述松弛素为 H1、H2 或 H3 人类松弛素, 而在其他实施方案中所述松弛素为松弛素激动剂。 在一些优选实施方案中, 所述松弛素经全身给药至所述个体和 / 或经局部给药至所述皮肤伤口。 一些方法还包括冲洗所述皮肤伤口。 此外, 在一些实施方案中, 所述药物制剂还包含抗生素和非甾体抗炎药之一或两者。 在一些实施方案中, 所述个体为具有受损的愈合能力的人类个体(如: 糖尿病个体、老年人)。

[0027] 本发明还提供了促进伤口愈合的方法, 其包括: 向有伤口的个体以有效促进所述伤口的愈合的量给药包含药活性的松弛素的药物制剂。 在一些实施方案中, 所述伤口源自整形外科手术。 在一些实施方案中, 所述整形外科手术为面部整形外科手术, 其选自: 皱纹切除术、眼睑成形术、鼻成形术、耳成形术、颞成形术、除皱整容、前额提升、眉毛提升、面部瘢痕修正、面部瘢痕去除、激光手术、皮肤表面重建、皱纹处理、血浆皮肤再生、面部脂肪移植术、皮肤收紧、纹身去除和毛发置换术。 在其他实施方案中, 所述整形外科手术为全身整形外科手术, 其选自: 腹壁成形术、乳房缩小、乳房增大、身体提升操作、蜘蛛静脉治疗、妊娠纹治疗、脂肪抽吸术、去除过多皮肤术、蜂窝组织减少治疗、体形塑造、身体表面重建和身体植入物。 在一些实施方案中, 所述松弛素为纯化的、重组的或合成的人类松弛素。 在一些优选实施方案中, 所述松弛素为 H1、H2 或 H3 人类松弛素, 而在其他实施方案中所述松弛素为松弛素激动剂。 在一些优选实施方案中, 所述松弛素经全身和 / 或局部给药。 此外, 在一些优选实施方案中所述药物制剂还包含抗生素和非甾体抗炎药之一或两者。 在一些实施方案中, 所述个体为具有受损的愈合能力的人类个体(如: 糖尿病个体、老年人)。

[0028] 附图简述

[0029] 当与用作解释优选实施方案的附图一起阅读时, 能够最佳地理解本发明内容。 然而, 应当理解本发明不限于附图中公开的特定实施方案。

[0030] 图 1A 描述了在尺寸和形状上类似于胰岛素的肽类激素 H2 松弛素。 图 1B 提供

了人类松弛素 2(H2) 的 B 链 (SEQ ID NO : 1) 和 A 链 (SEQ ID NO : 2, 其中 X 表示谷氨酸 [E] 或谷氨酰胺 [Q]) 的氨基酸序列。

[0031] 图 2 描述了活猪的猪伤口布局, (A) 为图解, 而 (B) 为照相。

[0032] 图 3 描述了在用松弛素和安慰剂处理六周后幼猪背上的伤口部位。第 3 部分是在第一周期间用松弛素冲洗, 并接着在第 2-6 周用高剂量的局部用松弛素制剂处理。第 4、5 和 6 部分在第一周没有接受冲洗。第 4 部分用安慰剂处理。第 5 部分用低剂量局部用制剂处理, 而第 6 部分用高剂量局部用制剂处理。

[0033] 图 4 描述了伤口外观在第六天后的差异。(A) 上面的照片描述了对照猪的皮肤。(B) 下面的照片描述了经处理的猪的皮肤, 其中全身性施用松弛素。正如可以从该图所见, 与对照猪相比, 用松弛素处理的伤口愈合得更快、更好并且愈合皮肤的外观看起来更平滑。

[0034] 图 5 描述了皮肤外观的视觉评分: (A) 描述了美容得分, 而 (B) 描述了与周围皮肤颜色匹配的得分。两组分数都取自第四周和第六周。

[0035] 图 6 描述了处理六周后幼猪的伤口部位。用箭头指示的区域表明: 当用全身性松弛素处理皮肤时, 区域 (A) 没有瘢痕可见, 而当用安慰剂处理皮肤时, 区域 (B) 可见红色瘢痕。图两侧的黑色标记指示最初伤口的程度。图中可见的痂指示研究期间在该处钻取活组织检查。

[0036] 图 7 是描述用松弛素处理后的伤口部位的组织病理学切片。

[0037] 图 8 显示了对使用及未使用松弛素处理的两组幼猪伤口部位的肉芽组织进行比较的组织病理学切片。在左边切片 (未经松弛素处理) 中观察到严重的瘢痕形成, 而在右边切片 (经松弛素处理) 中观察到轻微的瘢痕形成。切片指示在受伤六周后可以看到的肉芽组织中的宽范围。切片还说明了松弛素在减少肉芽组织的量 (右) 以及因此而导致的组织恢复至正常外观的效果。

[0038] 图 9 说明了六周后伤口部位中的肉芽组织 (左) 的量和炎症 (右) 的评分 (盲法评估)。用全身性松弛素处理 (红色) 的伤口与未经全身性松弛素处理 (蓝色) 的伤口相比具有显著减少的肉芽组织或炎症。这指示当用松弛素经全身递送处理时, 伤口部位消退得较好。

[0039] 图 10 显示了用于评估伤口愈合的胶原修复的切片。(A) 上面的图描述了相对无结构的胶原。(B) 下面的图描述了愈合良好的胶原。

[0040] 图 11 用图解表明与未接受全身性松弛素 (左) 的伤口相比, 用全身性松弛素 (右) 处理的伤口中综合的伤口愈合得分显著提高。该伤口得分基于伤口部位的胶原的主观外观的三点比例, 且更高的数字说明更好的愈合。在确定该得分时, “1” 指的是排列在平行束或一个平面中的更多纤维, 尺寸小得多且填充更紧密。“2” 指的是中间的纤维排列和织法。“3” 指的是与正常形式类似的胶原纤维的交织排列, 但与正常真皮相比尺寸更小, 表明了最佳的愈合。

[0041] 图 12 说明了描述对瘢痕进行分类的新瘢痕得分系统的显微照片。正常皮肤描述于 (A), 轻度瘢痕于 (B), 重度瘢痕于 (C), 以及瘢痕形成描述于 (D)。胶原束定向用颜色指示: 蓝、白和黄-橙。轻度瘢痕出现针织状但含有较薄胶原。重度瘢痕具有极薄胶原束, 主要定向在一个平面中。该比例尺是 100 微米, 刚果红染色, 偏振光, 20X。

[0042] 图 13 描述了定量的胶原得分系统。使用 Photoshop 软件完成“发红”比例的计算。记录瘢痕周长并计算红色像素的平均数。记录相邻的正常区域并计算红色像素的平均数。

[0043] 图 14 说明了用于该研究的目标胶原得分系统的结果。接受全身性松弛素（右）的伤口与未接受全身性松弛素（左）的伤口相比具有显著更好的胶原组构。

[0044] 图 15 描述了在注射 1 小时、2 小时和 4 小时后，从经处理的狗齿龈的距离注射部位 0.5cm、1.0cm 和 2.0cm 处测量检出的 H2 松弛素 (H2RLX) 的浓度。评价经处理的狗齿龈显示松弛素 (RLX) 出现在全部三个时间点，但在第 1、2 和 4 小时观察到浓度稳定减少。具体地，分别检测到 H2RLX 的 90nM、78nM 和 21nM。RLX 被确定通过齿龈具有有限的移动。在 1 小时时间点，从注射部位的 0.5cm 处检测到 RLX，但没有在注射部位的 1.0 和 2.0cm 处检测到。在剩余时间点，仅在注射部位检测到 RLX。因此，该图清楚地说明松弛素停留在注射部位附近。

[0045] 发明详述

[0046] 一般综述

[0047] 本发明涉及促进损伤或伤口愈合的方法。本发明提出用于治疗损伤、促进伤口的表皮细胞再生，以及减少和预防愈合过程中的瘢痕形成的方法。本发明还提供抑制 TGF- β 胶原诱导的成纤维细胞增殖和胶原产生，以及改善皮肤毁容的外观的方法。在一些实施方案中，本发明的方法特别适用于伤口加速和强化伤口边界，例如，在手术或损伤后愈合较差的患者如老年人以及在患有并存病如糖尿病患者以及免疫妥协患者中。在其他实施方案中，本发明的方法在美容外科中具有实用性。

[0048] 本发明在伤口愈合和瘢痕预防领域显示显著的进步。在临床和临产前环境中向伤口加入松弛素加速了愈合过程，特别是表皮细胞再生速率。用松弛素的治疗在减少和预防瘢痕形成中也是治疗有效的。松弛素对特异性的 G 蛋白偶联的松弛素受体例如 LGR7 和 LGR8 也被认为带来更好的伤口愈合并防止瘢痕，因为松弛素有能力调节这些受体。

[0049] 通过诱导血管发生的细胞因子如血管内皮生长因子 (VEGF) 和成纤维细胞生长因子 (FGF)，松弛素还促进伤口部位的新血管生长（血管发生）。刺激 VEGF 的释放促进了内皮细胞的有丝分裂和 / 或迁移活性。对组织修复也很关键的是支持细胞迁移和 / 或增殖的细胞外骨架的建立。刺激 FGF 从任意的许多细胞类型中的释放促进了成纤维细胞的增殖和迁移，其涉及细胞外基质 (ECM) 例如胶原的产生。令人惊奇的是，发明人发现在约六周的治疗后，松弛素导致伤口部位的血管整体减少，即：作为松弛素处理的结果，伤口部位可见的发红显著减少。这是个新发现，其吸引人处在于松弛素首先促进新伤口部位的新血管生长，并接着在约六周的处理后减少这些新血管，导致更好、更平滑和更正常的皮肤外观。

[0050] 定义

[0051] 术语“松弛素”指的是本领域所熟知的一种肽类激素（见图 1）。如本文所使用，术语“松弛素”包括人类松弛素，包括完整的全长人类松弛素或保持了生物活性的松弛素分子的一部分。术语“松弛素”还包括合成的人类松弛素与重组的人类松弛素，包括合成的 H2 人类松弛素与重组的 H2 人类松弛素。该术语还包括具有松弛素样活性的活性剂，例如松弛素类似物及其保持生物活性的部分，以及从松弛素受体例如 LGR7 或

LGR8受体竞争性地取代被结合的松弛素的物质。此外，如本文所使用的人类松弛素的核酸序列不是必须100%等同于人类松弛素H2的核酸序列，但是可以至少约40%、50%、60%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%等同于人类松弛素H2的核酸序列。如本文所使用，松弛素可由本领域技术人员已知的任何方法制得。这样的方法的实例被说明在例如美国专利5,759,807中，以及在Büllesbach等人，J Biol Chem, 266: 10754-10761, 1991中。松弛素分子及类似物的实例被说明在例如美国专利5,166,191中。

[0052] 术语“伤口”通常指的是开放性和闭合性伤口，如下文所定义。伤口可进一步被分为急性或慢性伤口。急性伤口是这样的伤口，其没有潜在的愈合缺陷，并通常继发于健康个体中的手术或外伤，愈合快且完全。相反，慢性伤口是这样的伤口，其由具有延长的持续时间或频繁复发的创伤或损伤产生，其组织完整性丧失。如本文所使用，术语“皮肤伤口”指的是皮肤的破裂。

[0053] 术语“开放性伤口”通常根据引起所述伤口的物体进行分类。这包括切割、撕裂、擦伤、刺伤、穿透伤、枪弹伤等。切割或切开的伤口可能由平整、锋利的物体例如刀、剃刀或玻璃碎片引起。仅涉及表皮的切割可被划分为切口。撕裂是由生硬的撞击至位于硬组织之上的软组织而引起的不规则伤口（例如覆盖颅骨的皮肤的撕裂）或者撕开皮肤和其他组织（例如由分娩引起的）。撕裂可显示桥连，因为结缔组织或血管被潜在的硬表面弄平。擦伤（轻擦）是浅层伤口，其中皮肤的最上层（表皮）被刮去，且通常由滑动跌落至粗糙面上引起。刺伤可由物体例如指甲或针刺穿皮肤引起。穿透伤可由物体例如刀进入身体引起。枪弹伤由子弹或类似的发射物驱动进入或穿过身体引起。因而，可能有两个伤口，一个在进入部位而另一个在出口部位，其通常被称为贯通伤（through-and-through）。

[0054] 术语“闭合性伤口”指的是挫伤，更通常地被称为瘀伤，由破坏皮肤下的组织的钝力损伤引起；血肿，也称为动脉瘤，由对血管的破坏引起，其随后造成血液聚集在皮肤下；以及压碎性损伤，其可能由长时间施加的巨大或极端量的力引起。

[0055] 术语“瘢痕”指的是由过去的损伤或伤口（如：切割、切除或外伤）引起的异常的形态学结构。瘢痕由结缔组织构成，其主要为胶原型1和3以及纤连蛋白的基质。瘢痕可能由异常结构的胶原纤维组成（如在皮肤的正常瘢痕中所见的）或者可能为结缔组织的异常聚积（如在中枢神经系统的瘢痕或皮肤的病态瘢痕形成中所见的）。瘢痕的类型包括但不限于：萎缩性瘢痕、肥厚性瘢痕和瘢痕疙瘩，以及瘢痕性挛缩。萎缩性瘢痕是在周围皮肤下扁平或凹陷的，如同山谷凹陷或洞。肥厚性瘢痕是鼓起的瘢痕，其保留在原始损伤的边界内，并常常含有以异常模式排列的过多胶原。瘢痕疙瘩是鼓起的瘢痕，其分布在最初伤口的边界外，并以位点特异性的方式侵入周围正常皮肤，且常常含有以异常模式排列的胶原螺环。瘢痕性挛缩是成直角的交叉关节或皮肤皱褶的瘢痕，并倾向于变短或挛缩。瘢痕性挛缩发生在瘢痕不完全成熟时，常常倾向于肥厚性的，并通常是残疾和功能障碍的。

[0056] “给药”指的是通过特定路径向个体给予或施用药物治疗或制剂，所述特定路

径包括但不限于：局部、静脉内、全身、皮下、肌肉、舌下以及通过吸入或注射、冲洗或渗透泵。

[0057] 松弛素

[0058] 松弛素是肽类激素，其在尺寸和形状上类似于胰岛素（见图 1）。更具体地，松弛素是一种属于胰岛素基因超家族的内分泌和自分泌 / 旁分泌激素。编码蛋白的激活形式由 A 链和 B 链组成，由两个链间和一个链内的二硫键连接在一起。因此，该结构非常类似于胰岛素的二硫键排布。在人类中，有三种非等位基因的松弛素基因：松弛素 -1 (RLN-1 或 H1)、松弛素 -2 (RLN-2 或 H2) 和松弛素 -3 (RLN-3 或 H3)。H1 和 H2 具有高度的序列同源性。有两种可选的剪接转录物变体，编码该基因描述的不同亚型。H1 在人类中的表达是不确定的。H2 在生殖器官中表达而 H3 被发现主要在脑中。松弛素肽家族在其受体中的进化通常为本领域所熟知 (Wilkinson 等人, BMC Evolutionary Biology, 5 : 1-17, 2005 ; 以及 Wilkinson 和 Bathgate, 第一章, Relaxin and Related Peptides, Landes Bioscience and SpringerScience+Business Media, 2007)。

[0059] 松弛素激活两种特异性松弛素受体，即：LGR7 (RXFP1) 和 LGR8 (RXFP2)。LGR7 和 LGR8 是含有富亮氨酸重复序列的 G 蛋白偶联受体 (LGRs)，其代表 G 蛋白偶联受体的独特亚群。它们含有七螺旋跨膜结构域和大的糖基化的胞外结构域，与糖蛋白激素的受体（例如 LH 受体或 FSH 受体）不明显相关。这些松弛素受体被发现在心脏、平滑肌、结缔组织，以及中枢和自律神经系统中。有效的松弛素例如 H1、H2、猪和鲸松弛素具有一些共同序列，即：Arg-Glu-Leu-Val-Arg-X-X-Ile 序列或结合盒。源自其序列同源性的松弛素例如大鼠、鲨鱼、狗和马松弛素显示经由 LGR7 和 LGR8 受体的降低的生物活性 (Bathgate 等人, Ann NY Acad Sci, 1041 : 61-76, 2005)。

[0060] 在女性和男性中都发现了松弛素 (Tregear 等人 ; Relaxin 2000, Proceedings of the Third International Conference on Relaxin & Related Peptides, 2000 年 10 月 22-27 日, 布鲁姆, 澳大利亚)。在女性中，松弛素由卵巢的黄体、乳腺以及在妊娠期间产生，也由胎盘、绒毛膜和蜕膜产生。在男性中，松弛素由睾丸产生。在人类中，松弛素在妊娠、提高精子活力、调节血压、控制心率以及释放催产素和加压素中起作用。在动物中，松弛素还影响胶原代谢、抑制胶原合成并通过增加基质金属蛋白酶来增加其断裂。松弛素还增加血管发生并且是肾脏血管舒张剂。

[0061] 松弛素具有生长因子的普遍性质并能够改变结缔组织的性质并影响平滑肌收缩。H2 被认为主要在生殖组织中表达（见美国专利 5,023,321）。然而，发明人已发现 H2 在改善伤口愈合和减少瘢痕形成中起重要作用。

[0062] 松弛素激动剂

[0063] 在一些实施方案中，本发明提供了包括施用松弛素激动剂治疗与血压正常或高血压患者的急性心肌梗塞有关的呼吸困难的方法。在一些方法中，所述松弛素激动剂激活一种或多种松弛素相关的 G 蛋白偶联受体 (GPCR)，其选自但不限于：RXFP1、RXFP2、RXFP3、RXFP4、FSHR (LGR1)、LHCGR (LGR2)、TSHR (LGR3)、LGR4、LGR5、LGR6、LGR7 (RXFP1) 和 LGR8 (RXFP2)。在一些实施方案中，所述松弛素激动剂包含 Compugen 的 WO 2009/007848 中式 I 的氨基酸序列（在此引入作为参考，用于教导松弛素激动剂序列）。

[0064] 式 I 的肽长度上优选从 7 至 100 个氨基酸并包含氨基酸序列：X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-X22-X23-X24-X25-X26-X27-X28-X29-X30-X31-X32-X33；其中 X1 为不存在或 G 或者小的天然或非天然存在的氨基酸；X2 为不存在或 Q 或者极性的天然或非天然存在的氨基酸；X3 为不存在或 K 或者碱性的天然或非天然存在的氨基酸；X4 为不存在或 G 或者小的天然或非天然存在的氨基酸；X5 为不存在或 Q 或 S 或者极性的天然或非天然存在的氨基酸；X6 为不存在或 V 或 A 或 P 或 M 或者疏水性的天然或非天然存在的氨基酸；X7 为不存在或 G 或者小的天然或非天然存在的氨基酸；X8 为不存在或 P 或 L 或 A 或者天然或非天然存在的氨基酸；X9 为不存在或 P 或 Q 或者天然或非天然存在的氨基酸；X10 为不存在或 G 或者小的天然或非天然存在的氨基酸；X11 为不存在或 A 或 H 或 E 或 D 或者疏水性的或小的或酸性的天然或非天然存在的氨基酸；X12 为不存在或 A 或 P 或 Q 或 S 或 R 或 H 或者疏水性的或小的天然或非天然存在的氨基酸；X13 为不存在或 C 或 V 或者疏水性的天然或非天然存在的氨基酸；X14 为不存在或 R 或 K 或 Q 或 P 或者碱性的或极性的天然或非天然存在的氨基酸；X15 为不存在或 R 或 Q 或 S 或者碱性的或极性的天然或非天然存在的氨基酸；X16 为不存在或 A 或 L 或 H 或 Q 或者疏水性的或小的天然或非天然存在的氨基酸；X17 为不存在或 Y 或者疏水性的或芳族的天然或非天然存在的氨基酸；X18 为不存在或 A 或者疏水性的或小的天然或非天然存在的氨基酸；X19 为不存在或 A 或者疏水性的的小的天然或非天然存在的氨基酸；X20 为不存在或 F 或者疏水性的或芳族的天然或非天然存在的氨基酸；X21 为不存在或 S 或 T 或者极性的天然或非天然存在的氨基酸；X22 为不存在或 V 或者疏水性的天然或非天然存在的氨基酸；X23 为不存在或 G 或者疏水性的或小的天然或非天然存在的氨基酸或者被酰胺替换；X24 为不存在或 R 或者碱性的天然或非天然存在的氨基酸；X25 为不存在或 R 或者碱性的天然或非天然存在的氨基酸；X26 为 A 或者疏水性的或小的天然或非天然存在的氨基酸；X27 为 Y 或者疏水性的或芳族的天然或非天然存在的氨基酸；X28 为 A 或者疏水性的或小的天然或非天然存在的氨基酸；X29 为 A 或者疏水性的或小的天然或非天然存在的氨基酸；X30 为 F 或者疏水性的天然或非天然存在的氨基酸；X31 为 S 或 T 或者极性的天然或非天然存在的氨基酸；X32 为 V 或者疏水性的天然或非天然存在的氨基酸；X33 为不存在或 G 或者疏水性的或小的天然或非天然存在的氨基酸或者被酰胺替换；或者它们的药学可接受的盐 (SEQ ID NO：4)。在一些优选实施方案中，所述松弛素激动剂包含肽 P59C13V(游离酸)GQKGQVGPPGA AVRRA Y AAFSV (SEQ ID NO：5) 的序列。在另一优选实施方案中，所述松弛素激动剂包含肽 P74C13V(游离酸)GQKGQVGPPGAA VRRAYAAFS VGRRA Y AAFSV (SEQ ID NO：6) 的序列。人类补体 C1Q 肿瘤坏死因子相关蛋白 8 (CTRP8 或 C1QT8) 的更多衍生物例如肽 P59-G(游离酸 Gly)GQKGQVGPPGAACRRAYAAFSVG (SEQ ID NO：7) 也被预期适用于本发明的方法。C1QT8 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：8 所述：MAAPALLLLALLPVGAWPGLPRRPCVHCCRPAPWPPGPYARVSDRDLWRGDLWRGLPRVRPTIDIEILKGEKGEAGVRGRAGRSKGEGPPGARGLQGRRGQKGQVGPPGAACRRAYAAFSVGRRAYAAFSVGRREGLHSSDHFQAVPFDTELVNLDGAFDLAAGRFLCTVPGVYFLSLNVHTWNYKETYLHIMLNRRPAAVLYAQPSERSVMQAQSLMLLLAAGDAVWVRMFQRDRDNAIYGEHGDLYITFSGHLVKPAAEL。

[0065] 本发明还包括这些多肽的同系物，这样的同系物可与示例性的松弛素激动剂的氨基酸序列（例如 SEQ ID NO：5 或 SEQ ID NO：6）至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 或接近 100% 相同，正如可以使用美国国家生物技术信息中心（NCBI）的 BlastP 软件用默认参数所确定的，所述默认参数任选并优选包括下述：过滤（该选项使用 Seg（蛋白质）程序从询问中过滤重复的或低复杂性的序列），评分矩阵为用于蛋白质的 BLOSUM62，字长为 3，E 值为 10，缺口花费为 11，1（初始化与（初始化及扩展））。任选并优选地，使用美国国家生物技术信息中心（NCBI）的 BlastN 软件用默认参数测定核酸序列的同一性/同源性，其优选地包括使用 DUST 过滤程序，并还优选地包括具有 E 值为 10，过滤低复杂性序列并且字长为 11。最后，本发明还包括上述多肽及具有突变的多肽的片段，所述突变例如一个或多个氨基酸的缺失、插入或替换，所述缺失、插入或替换是天然存在的或人工诱导的，随机的或定向方式的。

[0066] 松弛素治疗促进伤口愈合

[0067] 当皮肤受损伤时（例如由于切口），产生湿伤口，且机体重生真皮和表皮组织以修复损害的自然过程由一系列复杂生化事件组成。松弛素增强并加快了该过程。在伤口愈合的早期，一旦细菌和碎屑从伤口部位移走，新血管通过血管发生从内皮细胞中长出。此外，成纤维细胞生长并通过分泌胶原和纤连蛋白形成新的细胞外基质（ECM）。本发明提供了加速天然的伤口愈合过程和增加伤口部位强度的方法，其通过增加肉芽组织形成、最终减少源自血管发生的血管数目、增加胶原沉积、帮助形成更好的结构的胶原基质并促进伤口的表皮细胞再生。在一些情况下，当伤口不适当愈合时（如：在糖尿病人中，在患有皮肤病症的个体中），松弛素治疗不仅增加伤口愈合，而且使其合适。

[0068] 更具体地，发明人已发现松弛素优点在于其以两步过程促进伤口愈合的能力。首先，松弛素活化成纤维细胞并为良好愈合促进血管发生，以快速闭合伤口。第二，松弛素具有抗纤维化和抗血管生成的作用以获得更平滑的愈合，从而减少瘢痕形成。松弛素具有抗血管生成作用的事实是新的发现，其与通常认为的（即：松弛素仅促进血管的生长且因此增加血管发生）相反。

[0069] 成纤维细胞通过持续分泌 ECM 的前体，在保持结缔组织的结构完整性中起关键作用。在通常情况下，成纤维细胞处于静止状态。然而，当成纤维细胞在湿伤口中被激活时，它们分泌更多胶原。松弛素参与成纤维细胞的激活，其导致胶原的分泌增加。成纤维细胞还分泌基质金属蛋白酶（MMPs），其帮助胶原断裂。松弛素也能抑制 TGF- β 胶原诱导的成纤维细胞增殖和胶原产生。因此，增加胶原分泌和增加胶原周转的这种组合导致更有组织的和强的胶原基质，其促进伤口愈合并减少瘢痕形成。

[0070] 血管发生在伤口愈合过程中出现得非常早。当巨噬细胞和淋巴细胞被募集至伤口部位，新血管形成以给伤口提供充足血供。具体地，巨噬细胞释放 VEGF，其刺激新血管形成。当松弛素用于治疗时，VEGF 的量增加，导致更多血管且因此给伤口更多血供。

[0071] 募集免疫系统、形成新血管（血管发生）和激活成纤维细胞的整个过程被总体地认为是肉芽形成过程——即：肉芽组织藉此产生的过程。在某些情况下，为了最终获得存在于正常、健康、光滑皮肤中的所需篮网状形式，该肉芽必须被消解。这使得必须减慢

成纤维细胞，因为不再需要额外的胶原，以及必须减慢免疫系统，因为炎症需要消退以使皮肤中的红痕可消退。此外，血管发生需要被逆转，即：在开始时愈合伤口所需的血管和毛细血管目前需要消失以防止生成难看的永久性红色瘢痕。令人惊奇的是，松弛素不仅增加并且加速消退形成的肉芽，而且其还促进新血管尽早消失，留下平滑的皮肤且没有红痕。特别是，松弛素治疗显著地降低瘢痕形成并增加皮肤的健康篮网状形式的外观。

[0072] 此外，松弛素可促进瘀伤和溃疡中的伤口愈合。这样的伤口优选全身治疗，因为局部用松弛素治疗不像进入开放性伤口或湿伤口那样容易地进入封闭性伤口。然而，开放性伤口和湿伤口优选局部治疗，通过冲洗和/或直接注射治疗（如实施例1的猪皮肤研究中所说明的）。

[0073] 松弛素治疗预防和减少瘢痕形成

[0074] 瘢痕包括纤维组织并在损伤或伤口后替代正常皮肤。瘢痕形成是伤口愈合过程的自然部分，而瘢痕几乎在所有皮肤损伤后均产生。每年在发达国家，1亿患者留下瘢痕，其中一些造成了相当的健康以及心理问题，作为结果，在创伤后进行5500万例选择性手术和2500万例手术。有估计1100万例瘢痕疙瘩和400万例烧瘢痕，其中70%发生在儿童中。有异常皮肤瘢痕的人可能面对身体、审美、心理学和社会后果，这可能与重要的感情及财务成本有关。尽管瘢痕经常被认为是轻微的，但它们可能毁损面容并在审美上造成不快和引起严重的痒、触痛、疼痛、睡眠障碍、焦虑、抑郁和扰乱日常活动。其他心理学后果包括创伤后应激反应的发展、自尊的丧失和程式化，导致降低生活质量。由于皮肤瘢痕使身体变形的结果可能使人残疾。尽管媒体指示是相反的，但因为瘢痕组织的复杂和不可预知的性质，瘢痕仍然不能被轻易去除（Bayat等人，*Clinical Review-BMJ*, 326: 88, 2003）。松弛素提供了不仅通过加速伤口愈合过程，而且在瘢痕形成开始前减少瘢痕形成来治疗这样的瘢痕的方法。

[0075] 瘢痕通常由于面部整形外科手术形成，所述面部整形外科手术包括但不限于：皱纹切除术、眼睑成形术、鼻成形术、耳成形术、颏成形术、除皱整容、前额提升、眉毛提升、面部瘢痕修正、面部瘢痕去除、激光手术、皮肤表面重建、皱纹处理、血浆皮肤再生、面部脂肪移植术、皮肤收紧、纹身去除和毛发置换术。此外，面部整形外科手术会经常导致肿胀、瘀伤和瘢痕形成。因而，松弛素特别适用于整形外科和整复外科。肿胀是面部对损伤的自然反应，且当面部开始自身愈合前会消退，其可能就在手术后出现数天或者可能持续数周或更长时间。瘀伤也是由于面部受变化作用时，在面部外科手术后自然反应，且通常在手术后恢复的最初几天最显著。而大部分瘀伤会在几周内消失，完全愈合可能需要数月或更长，这取决于个体。瘢痕形成仍是面部整形外科的另一种令人不快的副作用，因为瘢痕通常在变得较不显著前会持续数月保持粉红。因此，本发明通过加速伤口愈合和减少瘢痕形成，有利于经历面部整形外科手术的患者，特别对有瘢痕形成和瘀伤的患者有帮助。

[0076] 瘢痕还通常由于全身整形外科手术形成，所述全身整形外科手术包括但不限于：腹壁成形术、乳房缩小、乳房增大、身体提升操作、蜘蛛静脉治疗、妊娠纹治疗、脂肪抽吸术、去除过多皮肤术、蜂窝组织减少治疗、体形塑造、身体表面重建和身体植入物。全身整形外科也经常导致肿胀、瘀伤和瘢痕形成。肿胀是对损伤的机体反应，

且当机体开始自身愈合前通常消退，其可能就在手术后出现数天或者直至数周或更长。当机体受变化作用时，瘀伤通常作为全身手术操作的结果发生。瘀伤通常在手术后恢复的最初几天最显著但可能持续更长。而大部分瘀伤会在几周内消失，完全愈合可能需要数月或数年。瘢痕形成也是全身整形外科手术的一种令人不快的副作用，因为瘢痕通常在变得较不显著前会持续数月保持粉红。因此，本发明通过加速伤口愈合和减少瘢痕形成，也有利于经历全身整形外科手术的患者，特别对有瘢痕形成和瘀伤的患者有帮助。

[0077] 瘢痕形成和发红也是去除纹身的常见副作用。其他副作用包括起泡、感染和肤色丧失。因此，本发明提供了最小化去除纹身的某些副作用的方法，特别地，提供了通过减少皮肤发红（即：如上文所讨论的松弛素的抗血管发生作用）以及通过减少一些可能源自纹身去除操作的瘢痕来最小化副作用的方法。

[0078] 松弛素组合物和制剂

[0079] 松弛素和松弛素类似物被配制为用于本发明的方法中的药物。任何能够刺激与生物学或药理学活性的松弛素（如：合成松弛素、重组松弛素）或松弛素激动剂（如：松弛素类似物或松弛素样调节剂）对松弛素受体的结合有关的生物反应的组合物或化合物都可用作本发明的药物。关于制剂和给药的一般细节详述在科学文献中（参见 Remington's Pharmaceutical Sciences, Maack Publishing Co, Easton Pa.）。可根据本领域已知的任何用于生产药物制剂的方法制备含药理学活性的松弛素的药物制剂。可以配制本发明的方法中使用的含药理学活性的松弛素或松弛素激动剂的制剂用于任何传统可接受的方式给药，其包括但不限于：局部、静脉内、全身、皮下、肌内、舌下，以及通过吸入或注射、冲洗或渗透泵给药。说明性实例详述于下文中。

[0080] 在一个优选实施方案中，在局部应用至已保护的伤口时，松弛素可作为冲洗液向开放性伤口施用，和/或在伤口修复的任何阶段全身施用。认为制剂可被注射至伤口部位或瘢痕附近，或者霜剂将被擦进伤口部位或瘢痕中以延长停留时间和渗透。通过冲洗进行治疗包括例如向伤口部位缓慢滴注 0.5ml 在乙酸钠中的 1.0mg/ml 松弛素溶液。在其他实施方案中，松弛素向伤口滴注松弛素溶液的范围可以是向伤口部位滴注约 0.5ml 至约 5.0ml 或者更多的约 1.0 至约 5.0mg/ml 的松弛素溶液。冲洗伤口，例如在损伤后每日一次，持续七天。在另一实施方案中，冲洗伤口，例如在损伤后每日两次或更多次，持续约七天。在另一实施方案中，在损伤后每周或每月一次，持续更长或更短时间冲洗伤口。可根据损伤的严重性和患者的情况调节用于松弛素给药的剂量。

[0081] 在另一实施方案中，松弛素可被局部施用，例如递送 0.5ml 的 0.5 或 2.5mg/ml 松弛素的制剂，所述制剂由 76.5% 20mM 乙酸钠缓冲液、0.17% 对羟基苯甲酸甲酯、0.03% 对羟基苯甲酸丙酯、5% 丙二醇、5% 乙醇、1% HED 250HX 和在乙酸钠缓冲液中的 12.285% 松弛素组成。处理伤口例如每天两次持续 2 周，接着每天处理一次持续 3 周。当药物被局部递送时，该制剂含有丙二醇和乙醇。此外，发明人还观察到当所述制剂包含渗透促进剂（其可被粘在湿伤口上）时，松弛素的效能增强。渗透促进剂包括但不限于：物理的（如：微针阵列）、化学的（如：乙醇、甘油单乙基醚、甘油单酯、肉豆蔻酸异丙酯等）或者物理和化学促进剂的组合。例如，发明人还注意到加入粘膜粘附性渗透促进剂例如壳聚糖，增加了松弛素经过齿龈组织的渗透（参见 Squier 等人；Mucoadhesive vehicles for the delivery of relaxin across oral mucosa, The International Association for Dental

Research, 2006 年 6 月 28 日-7 月 1 日, 布里斯班, 澳大利亚)。

[0082] 在另一优选实施方案中, 在全身途径后, 通过渗透输液泵以 5.3ug/kg/ 小时直接递送松弛素至伤口以获得约 20ng/ml 的全身浓度。

[0083] 在另一优选实施方案中, 松弛素可通过静脉注射递送至伤口部位, 其中所述制剂含有的药学活性的松弛素或松弛素激动剂可以是无菌注射剂的形式, 例如无菌可注射的水性或油性混悬剂。该混悬剂可根据已知领域使用那些已在上文提及的适合的分散剂或润湿剂以及助悬剂来配制。所述无菌注射剂也可在无毒的胃肠外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射的溶液剂或混悬剂。在可接受的载体和溶剂中, 可使用的水和林格液(等渗氯化钠)。此外, 无菌固定油可按常规用作溶剂或助悬介质。为此目的, 可应用任何温和的固定油包括合成的甘油单酯或甘油二酯。此外, 脂肪酸例如油酸也可用于注射剂的制备。

[0084] 本发明的含水混悬剂含有松弛素, 与适于制备含水混悬剂的赋形剂混合。这样的赋形剂包括助悬剂, 例如: 羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、西黄蓍胶和阿拉伯胶, 以及分散剂或润湿剂例如天然存在的磷脂(如卵磷脂)、烯烃氧化物与脂肪酸的缩合产物(如聚氧乙烯硬脂酸酯)、环氧乙烷与长链脂肪醇的缩合产物(如十七乙烯氧基鲸蜡醇)、环氧乙烷与得自脂肪酸和己糖醇的偏酯的缩合产物(如聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯)或环氧乙烷与得自脂肪酸和己糖醇酐的偏酯的缩合产物(如聚氧乙烯去水山梨糖醇单油酸酯)。所述含水混悬剂也可含有一种或多种防腐剂例如对羟基苯甲酸乙酯或对羟基苯甲酸丙酯, 一种或多种着色剂、一种或多种矫味剂和一种或多种甜味剂例如蔗糖、阿斯巴甜或糖精。制剂可被调节重量摩尔渗透压浓度。

[0085] 可通过在植物油例如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油中或者在矿物油例如液体石蜡中悬浮松弛素来配制油混悬剂。所述油混悬剂可含有增稠剂, 例如蜂蜡、固体石蜡或鲸蜡醇。可加入甜味剂以提供可口的口服制剂。这些制剂可通过加入抗氧化剂如抗坏血酸进行保存。

[0086] 适于通过加入水制备含水混悬剂的本发明的可分散的粉末和颗粒可由松弛素与分散、助悬和/或润湿剂以及一种或多种防腐剂进行制备。合适的分散或润湿剂以及助悬剂由那些上文中公开的进行例示。也可存在另外的赋形剂例如甜味剂、矫味剂和着色剂。

[0087] 本发明的药物制剂也可水包油的乳剂形式。油相可为植物油例如橄榄油或花生油, 矿物油例如液体石蜡, 或者这些的混合物。合适的乳化剂包括天然存在的树胶例如阿拉伯胶和西黄蓍胶、天然存在的磷脂例如大豆卵磷脂、得自脂肪酸和己糖醇酐的酯或偏酯例如去水山梨糖醇单油酸酯, 以及这些偏酯与环氧乙烷的缩合产物例如聚氧乙烯去水山梨糖醇单油酸酯。该乳剂也可包含甜味剂和矫味剂。糖浆剂和酏剂可与甜味剂例如甘油、山梨醇或蔗糖进行配制。这样的制剂也可包含缓和剂、防腐剂、矫味剂或着色剂。

[0088] 松弛素制剂的给药和剂量方案

[0089] 本发明的方法中使用的含药学活性的松弛素的制剂可按任何传统可接受的方式给药, 其包括但不限于: 静脉内、皮下、肌内、舌下、局部、口服以及通过吸入给药。

给药会随着药物的药代动力学和其他性质以及患者的健康状况而改变。一般的指导原则在下文提出。

[0090] 本发明的方法促进伤口和损伤的愈合并减少瘢痕形成。足以实现这些效应的单独的或与另一药理学活性剂（例如 NSAID 或抗生素）联用的松弛素的量被认为是治疗有效剂量（如：促进愈合的药理学可接受的量）。

[0091] 本领域的状态允许临床医生为每个单独的动物或人类个体确定松弛素的剂量方案。作为说明性实例，当实践本发明的方法时施用的含有药理学活性的松弛素的制剂的剂量方案，可根据下文提供的对于松弛素的指导确定所述剂量方案，即：剂量时间表和剂量水平。具体而言，所述的个体每天按约 10 至 1000 $\mu\text{g/kg}$ 个体体重的量接受药理学活性的 H2 人类松弛素（如：合成的、重组的）。在一个实施方案中，松弛素的剂量为 10、30、100 和 250 $\mu\text{g/kg/天}$ 。在另一实施方案中，这些剂量导致松弛素的血清浓度分别为约 3、10、30 和 75ng/mL。在另一实施方案中，持续施用松弛素以保持松弛素的血清浓度从约 0.5 至约 500ng/mL，更优选从约 0.5 至约 300ng/mL，且最优选从约 3 至约 75ng/mL。可能的范围为约 1 至约 50ng/mL，其中优选的血清浓度为 20ng/mL。

[0092] 作为一般指导原则，期望药理学活性的 H2 人类松弛素（如：合成的、重组的）的日剂量通常为每天约 10 至 1000 $\mu\text{g/kg}$ 个体体重的量，且最优选每天约 960 $\mu\text{g/kg}$ 个体体重的量。根据个体，松弛素给药采取持续特定时间段或者按照需要持续给药，以便在个体中获得稳定性。

[0093] 实验

[0094] 下述具体实施例用来说明本发明而不应被解释为限制权利要求的范围。

[0095] 实施例 1

[0096] 猪的皮肤伤口研究

[0097] 动物研究概述：在选择合适的动物用于该研究时，选择猪是因为猪皮肤和人类皮肤之间的解剖学相似性。事实上，猪伤口愈合已被用于模拟人类皮肤的许多研究中（Sullivan 等人，Wound Repair Regen.9：66-76，2001）。该研究的结果提示在猪皮肤中，松弛素减少肉芽组织和慢性炎症，从而导致总体更快的愈合过程和更平滑的皮肤外观。

[0098] 研究设计：在该研究中，幼猪被定位了十二个伤口部位，每个动物——20x6mm 背上切开的伤口——经过六周研究过程（见图 2）。全身用松弛素经由微型真空泵递送以获得 20ng/mL 的血清浓度。由 Dow Pharma 制备局部制剂，且包含丙二醇和乙醇，其促进治疗剂的良好长期稳定性。准备给药剂量，包括安慰剂、0.5mg/mL（低剂量）和 2.5mg/mL（高剂量）。该研究的目的是评价局部用松弛素对伤口愈合的安全性，以及确定松弛素作为治疗伤口愈合和 / 或瘢痕形成的效能。在第一周，每天进行一次冲洗。在第 2-3 周，每天施用两次局部制剂，并在第 3-6 周，每天施用一次局部制剂。

[0099] 药物设计：本研究的药物是松弛素（由重组技术生产）。重组的松弛素使用重组单链方法生产，与天然的人类激素 H2 松弛素相同。活性检品可用乙酸盐稀释剂（20mM 乙酸钠，pH 5.0）无菌稀释至期望浓度。

[0100] 研究步骤：参考图 3，其描述了在完成了六周治疗时具有根据本发明所述的实验设计的切口的猪背，第 3 部分中的伤口在第一周期间用松弛素组成物冲洗，并接着在第 2-6 周用高剂量的局部用松弛素制剂处理，如上所述。第 4、5 和 6 部分在第一周没有

接受冲洗。第4部分用安慰剂处理。第5部分用低剂量局部用制剂处理，而第6部分用高剂量局部用制剂处理。

[0101] 第4部分与第5和6部分的每一种的对比清晰地表明与安慰剂相比，用松弛素仅局部治疗就改善了伤口愈合。甚至更显著的是与第3部分对比，其除了局部处理外还接受松弛素的冲洗处理。该实验证明了与安慰剂相比，松弛素促进伤口愈合及降低和/或预防瘢痕形成的惊人能力。该数据还显示用松弛素组成物冲洗特别有效。

[0102] 皮肤美容外观：由中立的观察者（其评价早期伤口愈合（第5-7天）期间的瘢痕和研究末期的瘢痕）进行伤口图片的视觉评分（见图4）。图片出示给非皮肤科医生用于评价。观察者被对处理设盲，并被要求以他们自己的标准评价图片，选择并且给六组中最佳的三组打分（各自有八张照片），其中三组接受了松弛素而三组没有。该视觉的伤口评价结果确定了此时89%的情况中，松弛素处理组被选择在最高三组中。此时仅11%的情况中，用松弛素处理的一组没被选择在最高三组中。中立的观察者选择用松弛素处理的伤口，因为看起来“更好”。这些数据强烈暗示松弛素在伤口的早期闭合中有帮助。

[0103] 还由专业的皮肤科医生在第2、4和6周确定了美容得分。该美容得分具有五个分量：(1) 颜色——与周围皮肤匹配；(2) 手感——不硬；(3) 变形——附近皮肤没有变形；(4) 轮廓——与周围皮肤吻合；(5) 总体——没有过度生长或瘢痕疙瘩形成。在该皮肤病学评价中，由于瘢痕而含糊了第二周的评价，因此美容得分数据从评价的第4和6周收集（见图5）。图6显示6周时伤口部位间的差异。在上部的图中（松弛素处理），瘢痕不可见。在底部图中，瘢痕可见。接受松弛素冲洗处理的伤口/瘢痕区域得分总体高于那些仅局部用松弛素处理的。

[0104] 组织学评价：专业的组织病理学者评价了对于此类适应症例如肉芽形成、炎症和坏死的治疗的病理学。在判断肉芽组织时，认为对伤口的早期响应包括成纤维细胞、炎症细胞和新血管侵入该部位。随着时间过去，因为该部位愈合，这转化为更正常的组织。慢性炎症的特征为存在巨噬细胞、巨细胞、淋巴细胞和PMN指示的不良反应。也考虑了次要因素例如角化症（表皮外形成了角蛋白层）和棘皮症（表皮层变厚）。

[0105] 图7和8说明没有与松弛素治疗相关的副作用。用全身性松弛素治疗减少了肉芽组织（即：使用松弛素的伤口更快的消退指示）。最后，用全身性松弛素减少了慢性炎症，再次显示松弛素治疗促进了更快的愈合（见图9、10）。

[0106] 专业的组织学家根据考虑到伤口评分系统的组织学评价对伤口愈合进行了评价，由红色像素计数（由计算机程序计数——瘢痕区域与周围正常组织的红色像素比例指示了胶原的相对有序的组构）和从因子VIII染色的血管（见图12、13）确定胶原组构。伤口愈合得分计算如下：3分为胶原纤维的交织排列（最佳愈合）；2分为中间的纤维排列和织法；而1分为胶原纤维排列在平行束或一个平面中（最差愈合）。由类似于正常模式但在尺寸上小于正常真皮的胶原纤维的交织排列证明最佳排列（见图11）。

[0107] 因此确定松弛素治疗（即：冲洗或局部给药）没有见到任何副作用。此外，没有与松弛素治疗关联的坏死或炎症。与局部给药相比，在使用松弛素全身治疗后有许多指征表明观察到更好的伤口愈合。

[0108] 发现及结论：该初步研究是首次探索松弛素在动物皮肤上的用途。发明人的首要目标是确立局部用松弛素对伤口愈合的安全性。该研究的第二目标是证明松弛素在伤

口愈合和 / 或瘢痕形成中的效能。 发明人证明了下述：(1) 在宽剂量范围 (10-960 μ g/kg/天) 内，该药物没有显示相关副作用且良好耐受。(2) 松弛素通过加速天然的伤口愈合过程并增加伤口部位强度产生了有益效果，这是通过增加肉芽组织形成、减少源自血管发生的血管数目、增加胶原沉积、帮助形成更好的结构的胶原基质并促进伤口的表皮细胞再生实现的。

[0109] 实施例 2

[0110] 狗的齿龈研究

[0111] 狗研究概述 人类 2 松弛素 (H2RLX) 由于其重塑软组织的能力已被探索作为牙科正畸的应用中的有效治疗。 以前在狗模型中的研究已证明 RLX 经齿龈注射的施用可加速牙齿运动并预防复发。

[0112] 本研究的目标是确定 RLX 的迁移速率和齿龈注射后降解的程度。 该研究说明 RLX 停留在注射部位附近。 应用狗模型，施用 RLX 并在注射部位处和距离注射部位 0.5、1 和 2cm 处收集钻取活组织检查的组织。 在注射后的几个时间点，包括第 1、2 和 4 小时收集组织。 从齿龈活组织中提取蛋白质并经蛋白质晶片技术 (表面增强的激光解吸 / 离子化飞行时间质谱法，SELDI-TOF MS) 进行分析，其将建立良好的固相色谱和 TOF-MS 两种方法组合为完整的平台。 用抗 H2RLX 抗体涂覆蛋白质晶片，以便特异性地俘获 RLX 和相关的断裂 / 修饰产物。

[0113] 在所有三个时间点均清楚地检测到 RLX，但观察到浓度稳定减少：第 1、2 和 4 小时，我们分别检测到 H2RLX 的 90nM、78nM 和 21nM。 RLX 通过齿龈的运动看起来很有限。 从距离注射部位 0.5cm 处检测到 RLX，但在 1cm 和 2cm 标记处没有检测到。

[0114] 药物设计：施用齿龈注射剂 (25 μ g H2RLX/100 μ l, 41 μ M) 并在包括注射部位和距离注射部位的 0.5、1 和 2cm 处的几个位置收集组织。 在注射后第 1、2 和 3 小时收集组织。 没有接受 RLX 处理的对照动物中同样收集组织活检。

[0115] 研究步骤

[0116] a) 蛋白质提取和定量：在含有 10mM Tris-HCl、10mM NaCl、0.1% TFA 和蛋白酶抑制剂 (complete mini, Roche) 的提取缓冲液 (10 μ l/mg 组织) 中匀浆冷冻的齿龈活检样品。 将提取物离心 (6000x g) 10 分钟并收集上清液，等分并在 -80°C 储存。 使用 Bradford 测定法确定总蛋白浓度。 蛋白质浓度范围从 1.4mg/ml 至 2.8mg/ml，所有样品在提取缓冲液中标准化至 1.4mg/ml。

[0117] b) SELDI-TOF MS 分析 -- 在 PG20 芯片上分析 RLX 处理的齿龈：将抗 H2RLX 抗体 (2 μ l/0.25mg/ml; Genentech) 或对照 IgG (Ciphergen Biosystems) 施用至已用蛋白 G (Ciphergen Biosystems) 预涂覆的 PS20 芯片的各点。 当抗体结合后，用 PBS/0.5% Triton X-100 洗涤该芯片一次，持续 5 分钟，伴随搅拌 (每点为 5 μ l)，接着用 PBS 洗涤两次。 将狗齿龈提取物 (3 μ l/1.4mg/ml) 施用至各点并温育 4 小时。 通过用 PBS/0.5% Triton X-100、PBS 和 1mM HEPES, pH 7.2 先后洗涤除去非特异性结合蛋白。 将该晶片风干并将在 50% (v/v) 乙腈、0.5% 三氟乙酸中的 1 μ l 的 50% 饱和芥子酸施用至各点两次，晶片在各次施用间风干。 芯片接着用 SELDI-TOF MS (Ciphergen Biosystems) 分析，使用下列设置：激光 220 和灵敏度 9。

[0118] c) 生成 PG20 测定的 H2RLX 标准曲线：以不同浓度将 H2RLX (批号 11835-89)

加入对照狗齿龈 (1.4mg/ml) 中, 浓度包括 100nM、50nM、12.5nM、6.25nM、3.125nM 和 1.56nM, 并按上文描述的进行分析。

[0119] d) 测定 NP20 芯片上的 H2RLX: 在正相 (NP20) 芯片上分析 H2RLX 以评估纯度。将 H2RLX (1 μ L/500nM) 载入点, 芯片经空气干燥, 并将两份 50% SPA 应用至各点, 如上所述。

[0120] 研究结果: 为了定量 RLX 在处理的齿龈样品中的水平, 生成 H2RLX 标准曲线。线性动态范围测定为两个数量级, R^2 值为 0.9495。

[0121] 测定经处理的狗齿龈显示 RLX 出现在全部三个时间点, 但观察到浓度稳定减少; 在第 1、2 和 4 小时我们分别检测到 H2RLX 为 90nM、78nM 和 21nM。RLX 被确定通过齿龈具有有限的移动。在 1 小时时间点, 从距离注射部位的 0.5cm 处检测到 RLX, 但没有在距离注射部位的 1cm 和 2cm 处检测到。在剩余时间点, 仅在注射部位检测到 RLX (见图 15)。

[0122] 结论: 因此, 涉及松弛素治疗狗齿龈的本研究清楚地说明松弛素停留在注射部位附近, 达到了局部的靶向, 无需沿着瘢痕的不同点注射松弛素。

[0123] 实施例 3

[0124] 人类部分愈合的开放性伤口研究

[0125] 部分愈合的开放性伤口一般已经凝结, 其中细胞外基质和纤维蛋白的初级层已经铺展为桥连的凝块和组织。本研究的目的是确定松弛素对部分愈合的伤口的安全性、在人类伤口愈合和 / 或瘢痕形成中的效能, 以及将松弛素递送至部分愈合的伤口以促进期望的结果的最有效方法。

[0126] 松弛素与至少一种其他药理学活性剂 (其可为 NSAID 或抗生素) 联合给药。在第一组实验中, 松弛素经注射在伤口部位给药。在第二组实验中, 通过除去已固定的胶原基质的薄层而手术般地再次打开已部分愈合的伤口, 并经冲洗施用松弛素, 其包括向伤口部位缓慢滴注 0.5ml 在乙酸钠中的 1.05mg/ml 松弛素溶液。在第三组实验中, 通过除去已固定的胶原基质的薄层而手术般地再次打开已部分愈合的伤口, 并经局部施用松弛素, 其包括直接向伤口部位施用松弛素。局部递送含有 0.5mL 的 0.5mg/ml (低剂量) 或 2.5mg/ml (高剂量) 松弛素的制剂, 所述制剂含有 0.5mL 的 0.5 或 2.5mg/ml 松弛素, 由 76.5% 20mM 乙酸钠缓冲液、0.17% 对羟基苯甲酸甲酯、0.03% 对羟基苯甲酸丙酯、5% 丙二醇、5% 乙醇、1% HED 250HX 和在乙酸钠缓冲液中的 12.285% 松弛素组成。在第四组实验中, 通过除去已固定的胶原基质的薄层而手术般地再次打开已部分愈合的伤口, 并通过渗透输液泵以 5.3 μ g/kg/ 小时全身给药以获得约 20ng/ml 的全身浓度。该伤口每天处理两次, 持续两周, 接着每天处理一次, 持续三周。

[0127] 对于每种前述递送方法的伤口愈合均与安慰剂对比。由中立的观察者 (其评价早期伤口愈合 (第 5-7 天) 期间的瘢痕和研究末期的瘢痕) 进行伤口图片的视觉评分。伤口的图片出示给非皮肤科医生用于评价。观察者被对处理设盲, 并被要求以他们自己的标准评价图片, 选择并且给六组中最佳的三组打分 (各自有八张照片), 其中三组接受了松弛素而三组没有。

[0128] 还由专业的皮肤科医生每周确定美容得分。该美容得分具有五个分量: (1) 颜色 -- 与周围皮肤匹配; (2) 手感 -- 不硬; (3) 变形 -- 附近皮肤没有变形; (4) 轮廓 -- 与

周围皮肤吻合；(5) 总体 -- 没有过度生长或瘢痕疙瘩形成。

[0129] 此外，专业的组织病理学者评价了对于这样的适应症例如肉芽形成、炎症和坏死的治疗的病理学。在评价伤口愈合时，组织病理学者使用考虑到伤口评分系统的组织学评价进行，由红色像素计数（由计算机程序计数 -- 瘢痕区域与周围正常组织的红色像素比例指示了胶原的相对有序的组构）和从因子 VIII 染色的血管确定胶原组构。类似于正常模式但在尺寸上小于正常真皮的胶原纤维的交织排列证明是最佳排列。该评价在确定是否存在任何与松弛素治疗相关的副作用中是重要的。

[0130] 实施例 4

[0131] 人类的新开放性伤口研究

[0132] 用松弛素处理发生两至三小时内的人类皮肤上的新鲜开放性伤口和损伤。本研究的目的是确定松弛素对人类的开放性伤口的安全性、在人类伤口愈合和 / 或瘢痕形成中的效能，以及松弛素递送至开放性伤口以促进期望的结果的最有效的方法。该损伤可能是切口（其可能是表皮的切割）或伤口（其可能是开放性或闭合性的）。开放性伤口可包括但不限于：切割、撕裂、擦伤、刺伤、穿透伤、枪弹伤和戳伤。

[0133] 松弛素与至少一种其他药理学活性剂（其可为 NSAID 或抗生素）联合给药。递送至开放性伤口的方法包括冲洗、局部、全身给药和注射。

[0134] 在第一组实验中，松弛素经冲洗给药，其包括向伤口部位缓慢滴注 0.5ml 在乙酸钠中的 1.05mg/ml 松弛素溶液。在第二组实验中，松弛素经局部给药，其包括直接向伤口部位施用松弛素。局部递送含有 0.5mL 的 0.5mg/ml（低剂量）或 2.5mg/ml（高剂量）松弛素的制剂，所述制剂含有 0.5mL 的 0.5 或 2.5mg/ml 松弛素，由 76.5% 20mM 乙酸钠缓冲液、0.17% 对羟基苯甲酸甲酯、0.03% 对羟基苯甲酸丙酯、5% 丙二醇、5% 乙醇、1% HED250HX 和在乙酸钠缓冲液中的 12.285% 松弛素组成。在第三组实验中，松弛素通过渗透输液泵以 5.3ug/kg/ 小时全身给药以获得约 20ng/ml 的全身浓度。在第四组实验中，松弛素经注射在伤口部位或在靠近伤口部位处给药。新鲜伤口每天处理两次，持续两周，接着每天处理一次，持续三周。

[0135] 对于每种前述递送方法的伤口愈合均与安慰剂对比。由中立的观察者（其评价早期伤口愈合（第 5-7 天）期间的瘢痕和研究末期的瘢痕）进行伤口图片的视觉评分。伤口的图片出示给非皮肤科医生用于评价。观察者被对处理设盲，并被要求以他们自己的标准评价图片，选择并且给六组中最佳的三组打分（各自有八张照片），其中三组接受了松弛素而三组没有。

[0136] 还由专业的皮肤科医生每周确定美容得分。该美容得分具有五个分量：(1) 颜色 -- 与周围皮肤匹配；(2) 手感 -- 不硬；(3) 变形 -- 附近皮肤没有变形；(4) 轮廓 -- 与周围皮肤吻合；(5) 总体 -- 没有过度生长或瘢痕疙瘩形成。

[0137] 此外，专业的组织病理学者评价了对于这样的适应症例如肉芽形成、炎症和坏死的治疗的病理学。在评价伤口愈合时，组织病理学者使用考虑到伤口评分系统的组织学评价进行，由红色像素计数（由计算机程序计数 -- 瘢痕区域与周围正常组织的红色像素比例指示了胶原的相对有序的组构）和从因子 VIII 染色的血管确定胶原组构。类似于正常模式但在尺寸上小于正常真皮的胶原纤维的交织排列证明是最佳排列。该评价在确定是否存在任何与用松弛素治疗相关的副作用中是重要的。

[0138] 实施例 5

[0139] 人类整形外科伤口研究

[0140] 源自整形外科手术（包括面部和身体整形外科手术）的开放性伤口在手术结束时用松弛素治疗以促进伤口愈合和最小化瘢痕形成。该研究的目标是确定松弛素对源自面部或全身整形外科手术的伤口愈合的安全性、松弛素对伤口愈合和 / 或瘢痕形成中的效能，以及松弛素递送至整形外科伤口以促进期望的结果的最有效的方法。

[0141] 松弛素有利于治疗源自面部整形外科手术的伤口，其包括但不限于：皱纹切除术、眼睑成形术、鼻成形术、耳成形术、颏成形术、除皱整容、前额提升、眉毛提升、面部瘢痕修正、面部瘢痕去除、激光手术、皮肤表面重建、皱纹处理、血浆皮肤再生、面部脂肪移植术、皮肤收紧、纹身去除和毛发置换术。此外，松弛素有利于治疗源自身体整形外科手术的伤口，其包括但不限于：腹壁成形术、乳房缩小、乳房增大、身体提升操作、蜘蛛静脉治疗、妊娠纹治疗、脂肪抽吸术、去除过多皮肤术、蜂窝组织减少治疗、体形塑造、身体表面重建和身体植入物。

[0142] 松弛素与至少一种其他药理学活性剂（其可为 NSAID 或抗生素）联合给药。在手术结束经冲洗给药首剂量的松弛素，其包括向开放性伤口部位缓慢滴注 0.5ml 在乙酸钠中的 1.05mg/ml 松弛素溶液。接着，松弛素经局部给药，每天两次，持续两周，然后每天处理一次，持续三周。局部给药包括直接向伤口部位施用松弛素。局部递送含有 0.5mL 的 0.5mg/ml（低剂量）或 2.5mg/ml（高剂量）松弛素的制剂，所述制剂含有 0.5mL 的 0.5 或 2.5mg/ml 松弛素，由 76.5% 20mM 乙酸钠缓冲液、0.17% 对羟基苯甲酸甲酯、0.03% 对羟基苯甲酸丙酯、5% 丙二醇、5% 乙醇、1% HED 250HX 和在乙酸钠缓冲液中的 12.285% 松弛素组成。

[0143] 对于每种前述递送方法的伤口愈合均与安慰剂对比。由中立的观察者（其评价早期伤口愈合（第 5-7 天）期间的瘢痕和研究末期的瘢痕）进行伤口图片的视觉评分。伤口的图片出示给非皮肤科医生用于评价。观察者被对处理设盲，并被要求以他们自己的标准评价图片，选择并且给六组中最佳的三组打分（各自有八张照片），其中三组接受了松弛素而三组没有。

[0144] 还由专业的皮肤科医生每周确定美容得分。该美容得分具有五个分量：(1) 颜色 -- 与周围皮肤匹配；(2) 手感 -- 不硬；(3) 变形 -- 附近皮肤没有变形；(4) 轮廓 -- 与周围皮肤吻合；(5) 总体 -- 没有过度生长或瘢痕疙瘩形成。

[0145] 此外，专业的组织病理学者评价了对于这样的适应症例如肉芽形成、炎症和坏死的治疗的病理学。在评价伤口愈合时，组织病理学者使用考虑到伤口评分系统的组织学评价进行，由红色像素计数（由计算机程序计数 -- 瘢痕区域与周围正常组织的红色像素比例指示了胶原的相对有序的组构）和从因子 VIII 染色的血管确定胶原组构。类似于正常模式但在尺寸上小于正常真皮的胶原纤维的交织排列证明是最佳排列。该评价在确定是否存在任何与用松弛素治疗相关的副作用中是重要的。

[0146] 在不背离本发明的范围和主旨的情况下，本发明的许多修饰和变化对本领域技术人员而言是显而易见的。尽管本发明已经结合具体实施方案进行了描述，但应当理解，所要求的本发明不应被过分限制于这样的具体实施方案。事实上，本领域技术人员理解的用于实现本发明的所描述方式的多种变化也涵盖于权利要求的范围内。

[0001]

序列表

<110> D·R·斯图尔特

<120> 促进伤口愈合的方法

<130> 64325-2001640

<140> PCT/US2009/043854

<141> 2009-05-13

<150> US 61/127,947

<151> 2008-05-16

<160> 8

<170> FastSEQ for Windows 版本4.0

<210> 1

<211> 29

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

Asp	Ser	Trp	Met	Glu	Glu	Val	Ile	Lys	Leu	Cys	Gly	Arg	Glu	Leu	Val
1				5					10					15	
Arg	Ala	Gln	Ile	Ala	Ile	Cys	Gly	Met	Ser	Thr	Trp	Ser			
			20					25							

<210> 2

<211> 24

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 变体

<222> (1)... (24)

<223> Xaa = Glu或Gln

<400> 2

Xaa	Leu	Tyr	Ser	Ala	Leu	Ala	Asn	Lys	Cys	Cys	His	Val	Gly	Cys	Thr
1				5					10					15	
Lys	Arg	Ser	Leu	Ala	Arg	Phe	Cys								
			20												

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 松弛素共有序列

<221> 变体

<222> (1)... (8)

[0002]

<223> Xaa = 任何氨基酸

<400> 3

Arg Glu Leu Val Arg Xaa Xaa Ile
1 5

<210> 4

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 松弛素共有序列

<221> 变体

<222> 1

<223> Xaa = 不存在或Gly或者小的天然或非天然存在的氨基酸

<221> 变体

<222> 2

<223> Xaa = 不存在或Gln或者极性的天然或非天然存在的氨基酸

<221> 变体

<222> 3

<223> Xaa = 不存在或Lys或者碱性的天然或非天然存在的氨基酸

<221> 变体

<222> 4

<223> Xaa = 不存在或Gly或者小的天然或非天然存在的氨基酸

<221> 变体

<222> 5

<223> Xaa = 不存在或Gln或Ser或者极性的天然或非天然存在的氨基酸

<221> 变体

<222> 6

<223> Xaa = 不存在或Val或Ala或Pro或Met或者疏水性的天然或非天然存在的氨基酸

<221> 变体

<222> 7

<223> Xaa = 不存在或Gly或者小的天然或非天然存在的氨基酸

<221> 变体

<222> 8

<223> Xaa = 不存在或Pro或Leu或Ala或者天然或非天然存在的氨基酸

<221> 变体

<222> 9

<223> Xaa = 不存在或Pro或Gln或者天然或非天然存在的氨基酸

<221> 变体

<222> 10

<223> Xaa = 不存在或Gly或者小的天然或非天然存在的氨基酸

<221> 变体

<222> 11

<223> Xaa = 不存在或Ala或His或Glu或Asp或者疏水性的或小的或酸性的天然或非天然

[0003]

存在的氨基酸

<221> 变体

<222> 12

<223> Xaa = 不存在或Ala或Pro或Gln或Ser或Arg或His或者疏水性的或小的天然或非天然存在的氨基酸

<221> 变体

<222> 13

<223> Xaa = 不存在或Cys或Val或者疏水性的天然或非天然存在的氨基酸

<221> 变体

<222> 14

<223> Xaa = 不存在或Arg或Lys或Gln或Pro或者碱性的或极性的天然或非天然存在的氨基酸

<221> 变体

<222> 15

<223> Xaa = 不存在或Arg或Gln或Ser或者碱性的或极性的天然或非天然存在的氨基酸

<221> 变体

<222> 16

<223> Xaa = 不存在或Ala或Leu或His或Gln或者疏水性的或小的天然或非天然存在的氨基酸

<221> 变体

<222> 17

<223> Xaa = 不存在或Tyr或者疏水性的或芳族的天然或非天然存在的氨基酸

<221> 变体

<222> 18

<223> Xaa = 不存在或Ala或者疏水性的或小的天然或非天然存在的氨基酸

<221> 变体

<222> 19

<223> Xaa = 不存在或Ala或者疏水性的小的天然或非天然存在的氨基酸

<221> 变体

<222> 20

<223> Xaa = 不存在或Phe或者疏水性的或芳族的天然或非天然存在的氨基酸

<221> 变体

<222> 21

<223> Xaa = 不存在或Ser或Thr或者极性的天然或非天然存在的氨基酸

<221> 变体

<222> 22

<223> Xaa = 不存在或Val或者疏水性的天然或非天然存在的氨基酸

<221> 变体

<222> 23

<223> Xaa = 不存在或Gly或者疏水性的或小的非天然存在的氨基酸或者被酰胺替换

<221> 变体

<222> 24

<223> Xaa = 不存在或Arg或者碱性的天然或非天然存在的氨基酸

<221> 变体

[0004]

- <222> 25
 <223> Xaa = 不存在或Arg或者碱性的天然或非天然存在的氨基酸
 <221> 变体
 <222> 26
 <223> Xaa = Ala或者疏水性的或小的天然或非天然存在的氨基酸
 <221> 变体
 <222> 27
 <223> Xaa = Tyr或者疏水性的或芳族的天然或非天然存在的氨基酸
 <221> 变体
 <222> 28
 <223> Xaa = Ala或者疏水性的或小的天然或非天然存在的氨基酸
 <221> 变体
 <222> 29
 <223> Xaa = Ala或者疏水性的或小的天然或非天然存在的氨基酸
 <221> 变体
 <222> 30
 <223> Xaa = Phe或者疏水性的天然或非天然存在的氨基酸
 <221> 变体
 <222> 31
 <223> Xaa = Ser或Thr或者极性的天然或非天然存在的氨基酸
 <221> 变体
 <222> 32
 <223> Xaa = Val或者疏水性的天然或非天然存在的氨基酸
 <221> 变体
 <222> 33
 <223> Xaa = 不存在或Gly或者疏水性的或小的天然或非天然存在的氨基酸或者被酰胺替换
 <400> 4
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa
 <210> 5
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 5
 Gly Gln Lys Gly Gln Val Gly Pro Pro Gly Ala Ala Val Arg Arg Ala
 1 5 10 15
 Tyr Ala Ala Phe Ser Val
 20
 <210> 6
 [0005]

<211> 32
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 6
 Gly Gln Lys Gly Gln Val Gly Pro Pro Gly Ala Ala Val Arg Arg Ala
 1 5 10 15
 Tyr Ala Ala Phe Ser Val Gly Arg Arg Ala Tyr Ala Ala Phe Ser Val
 20 25 30

<210> 7
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人

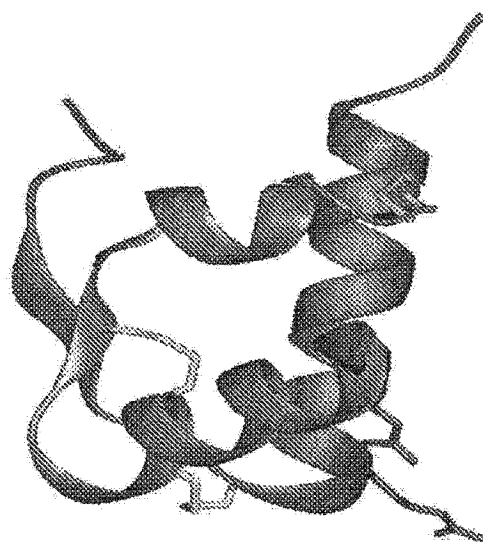
<400> 7
 Gly Gln Lys Gly Gln Val Gly Pro Pro Gly Ala Ala Cys Arg Arg Ala
 1 5 10 15
 Tyr Ala Ala Phe Ser Val Gly
 20

<210> 8
 <211> 262
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 8
 Met Ala Ala Pro Ala Leu Leu Leu Leu Ala Leu Leu Leu Pro Val Gly
 1 5 10 15
 Ala Trp Pro Gly Leu Pro Arg Arg Pro Cys Val His Cys Cys Arg Pro
 20 25 30
 Ala Trp Pro Gly Pro Tyr Ala Arg Val Ser Asp Arg Asp Leu Trp
 35 40 45
 Arg Gly Asp Leu Trp Arg Gly Leu Pro Arg Val Arg Pro Thr Ile Asp
 50 55 60
 Ile Glu Ile Leu Lys Gly Glu Lys Gly Glu Ala Gly Val Arg Gly Arg
 65 70 75 80
 Ala Gly Arg Ser Gly Lys Glu Gly Pro Pro Gly Ala Arg Gly Leu Gln
 85 90 95
 Gly Arg Arg Gly Gln Lys Gly Gln Val Gly Pro Pro Gly Ala Ala Cys
 100 105 110
 Arg Arg Ala Tyr Ala Ala Phe Ser Val Gly Arg Arg Ala Tyr Ala Ala
 115 120 125
 Phe Ser Val Gly Arg Arg Glu Gly Leu His Ser Ser Asp His Phe Gln
 130 135 140
 Ala Val Pro Phe Asp Thr Glu Leu Val Asn Leu Asp Gly Ala Phe Asp
 145 150 155 160
 Leu Ala Ala Gly Arg Phe Leu Cys Thr Val Pro Gly Val Tyr Phe Leu
 165 170 175
 Ser Leu Asn Val His Thr Trp Asn Tyr Lys Glu Thr Tyr Leu His Ile
 180 185 190
 Met Leu Asn Arg Arg Pro Ala Ala Val Leu Tyr Ala Gln Pro Ser Glu
 195 200 205
 Arg Ser Val Met Gln Ala Gln Ser Leu Met Leu Leu Leu Ala Ala Gly
 210 215 220
 Asp Ala Val Trp Val Arg Met Phe Gln Arg Asp Arg Asp Asn Ala Ile

[0006]

225					230					235					240
Tyr	Gly	Glu	His	Gly	Asp	Leu	Tyr	Ile	Thr	Phe	Ser	Gly	His	Leu	Val
				245					250					255	
Lys	Pro	Ala	Ala	Glu	Leu										
				260											

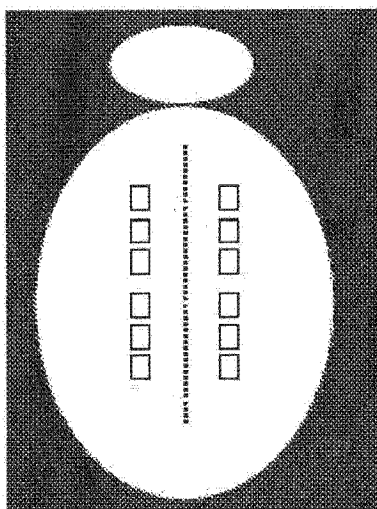
A**B**

松弛素 H2 B 链 (SEQ ID NO:1)
DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS

松弛素 H2 A 链 (SEQ ID NO:2)
XLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC

图 1

A



B



图 2

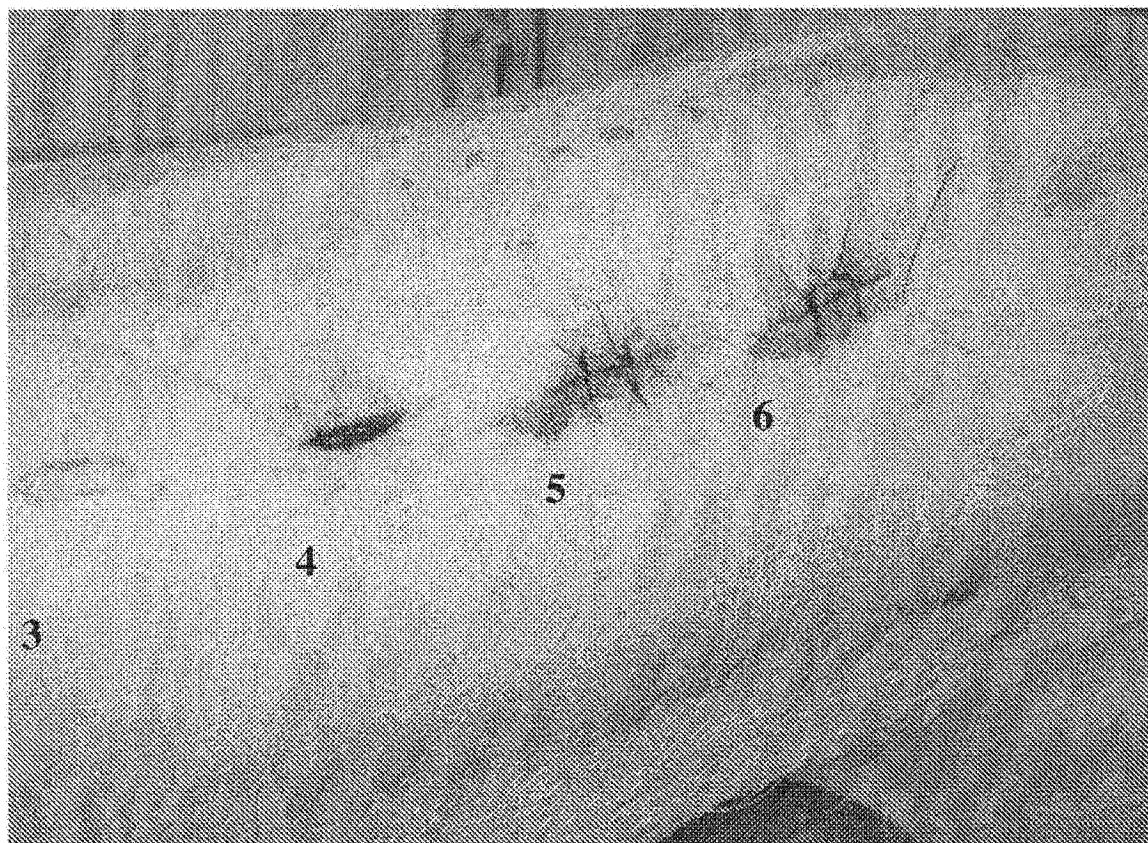


图 3

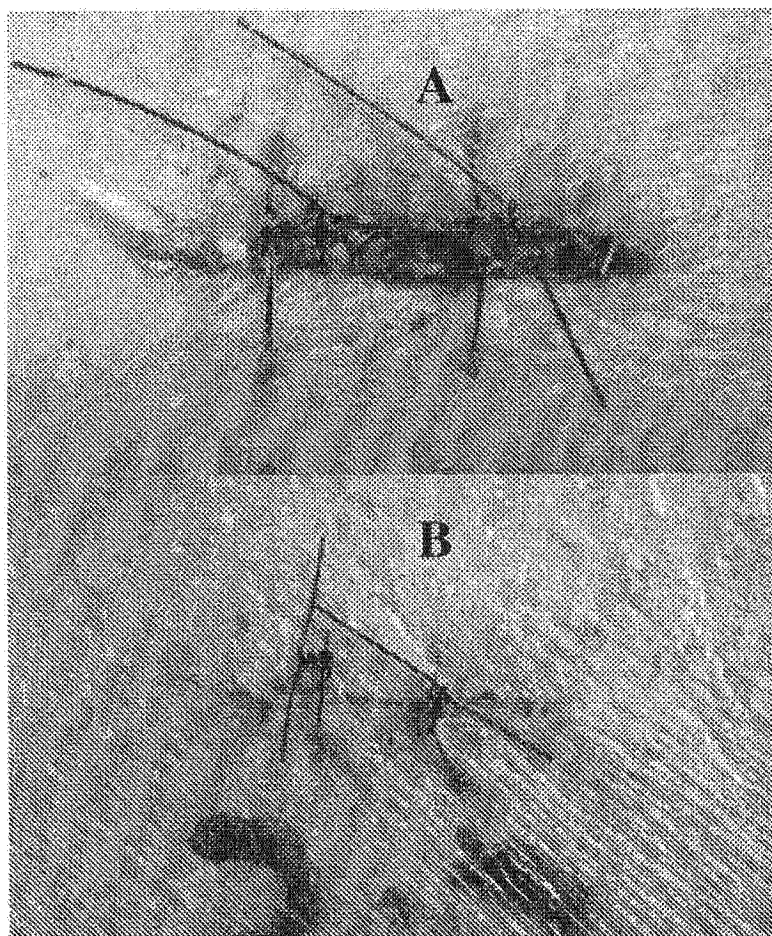
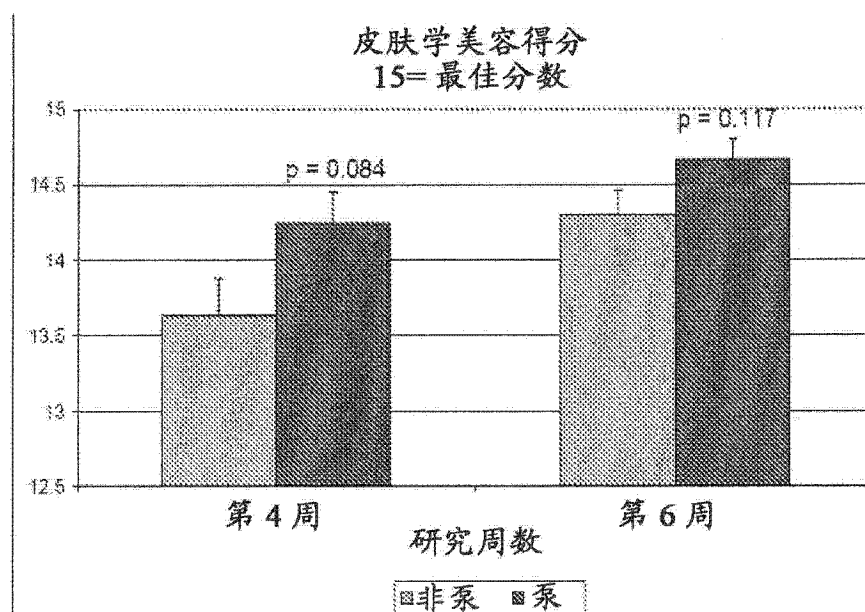


图 4

(A)



(B)

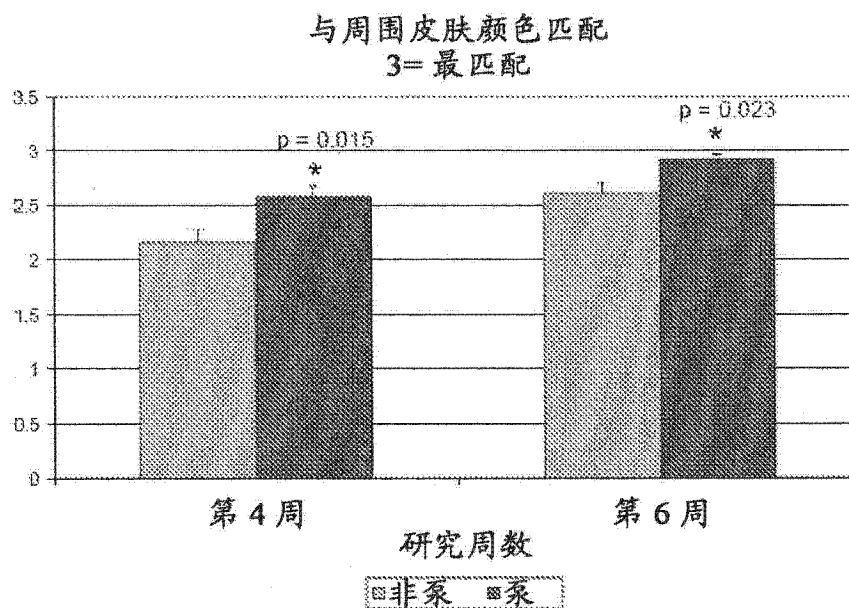
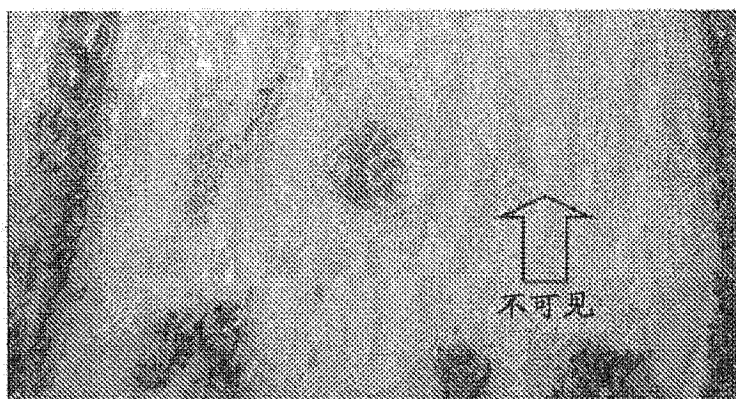


图 5

(A)



(B)

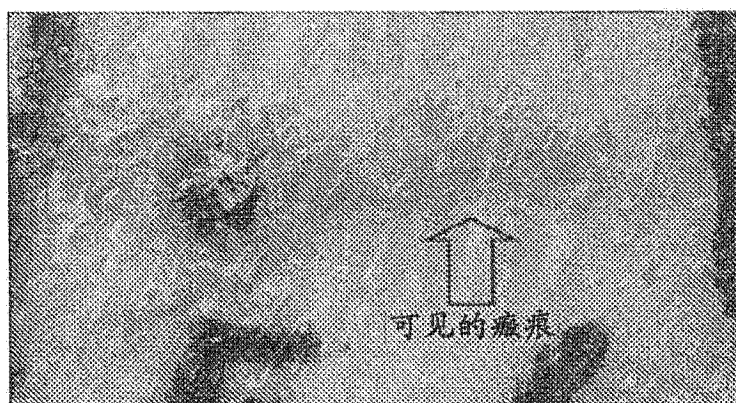


图 6

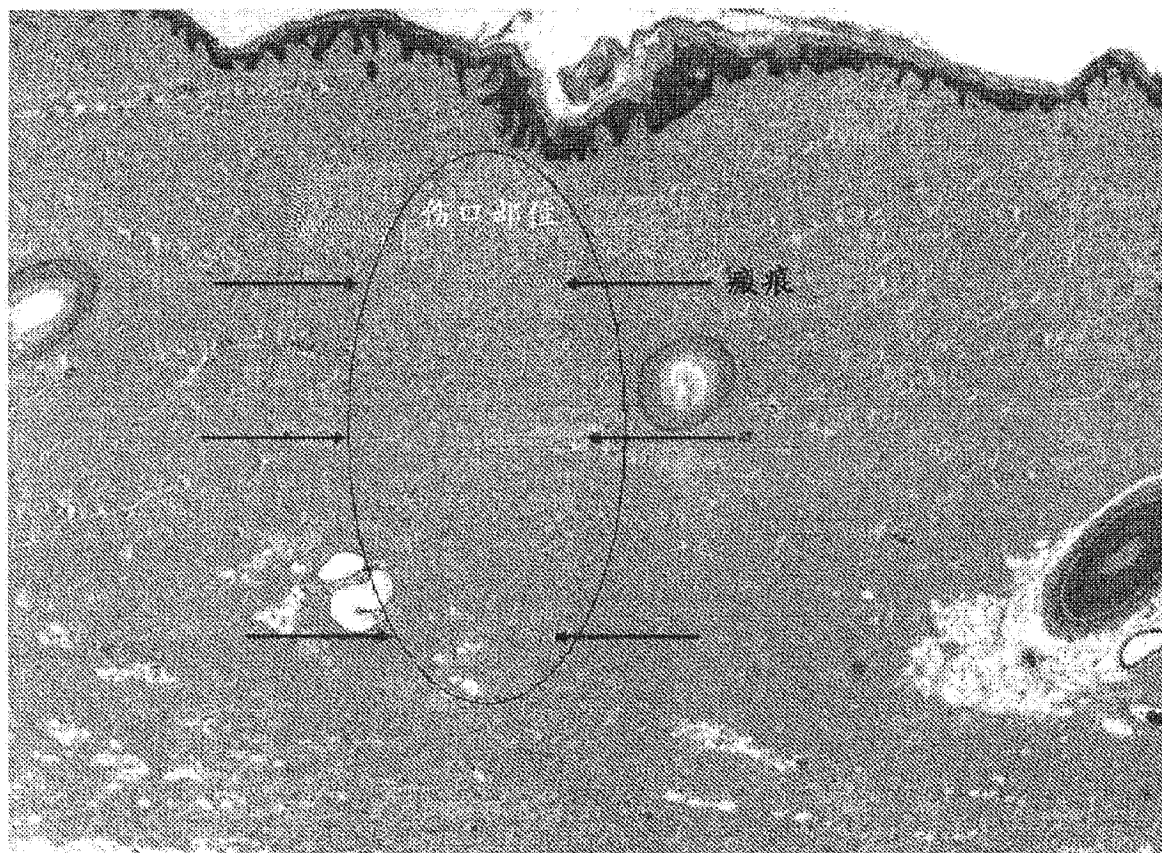


图 7

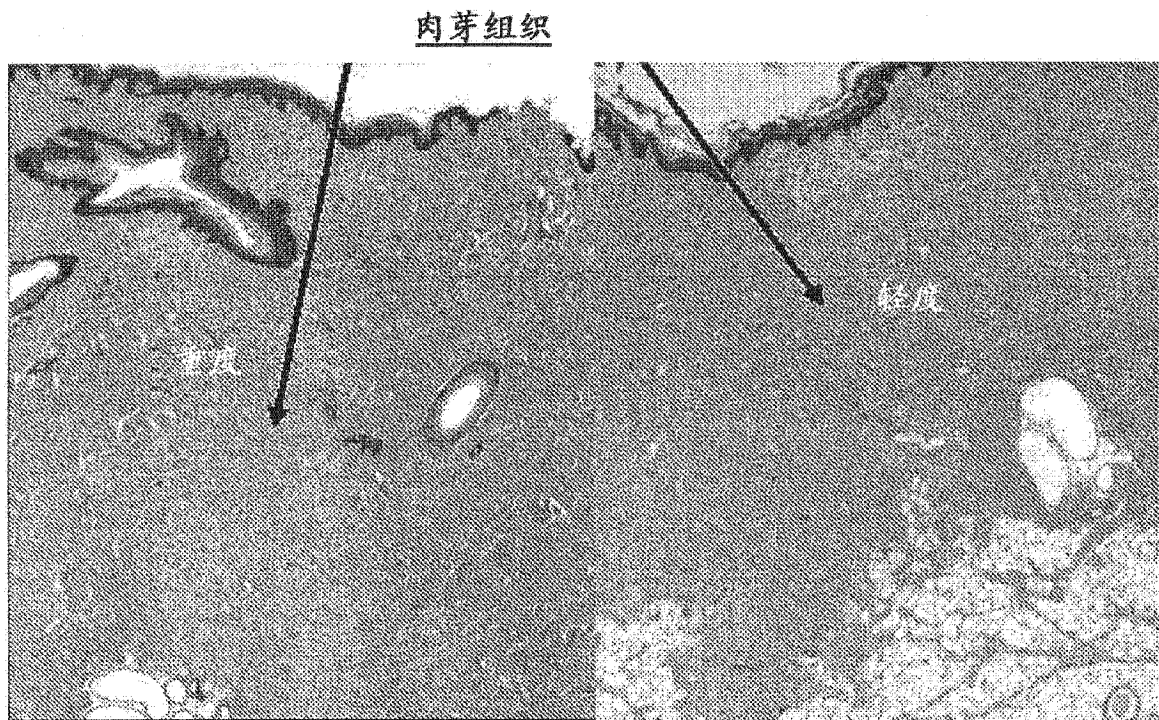


图 8

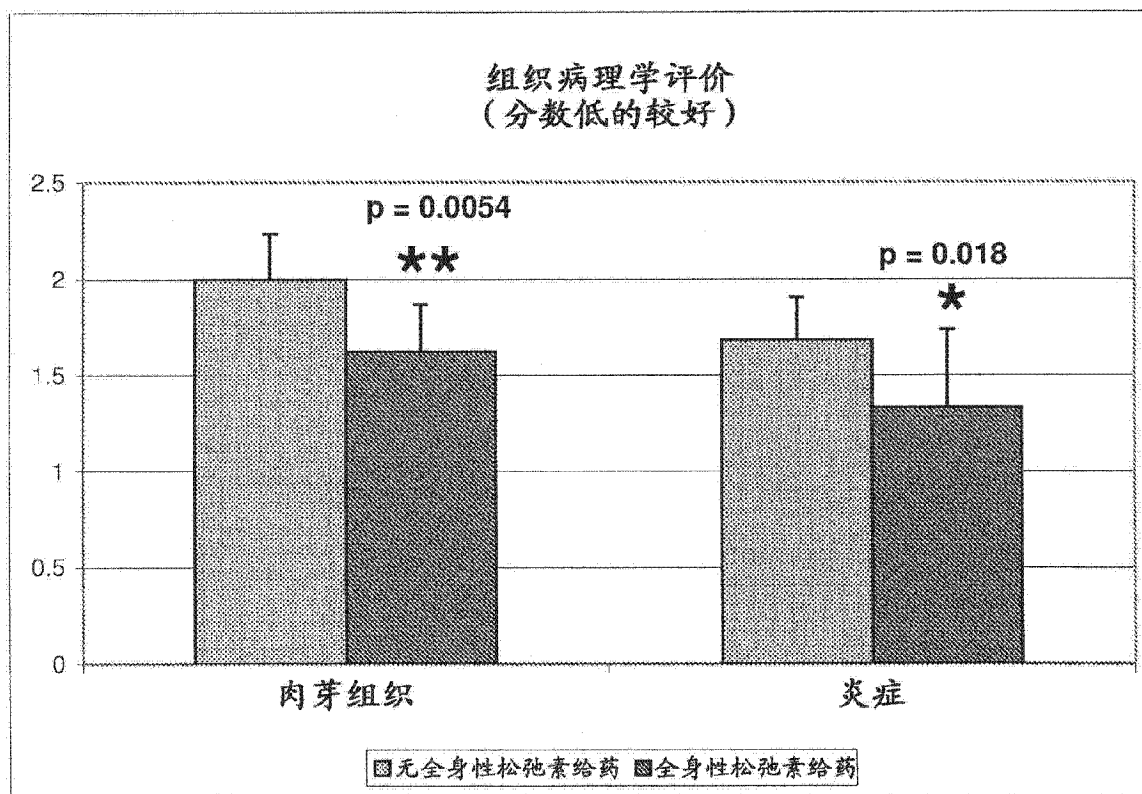
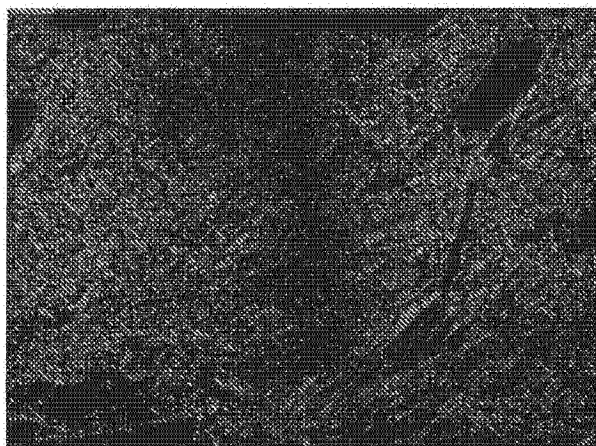


图 9

(A)



(B)

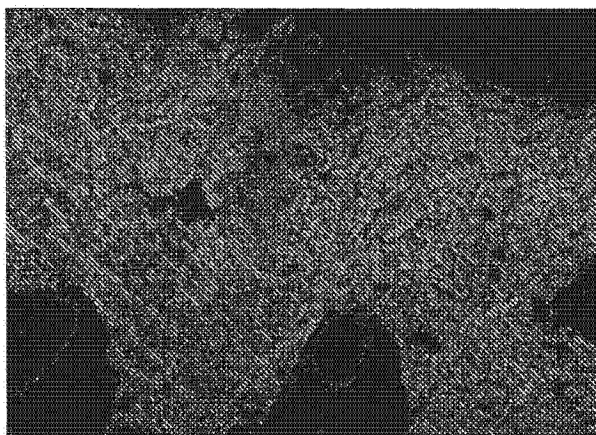


图 10

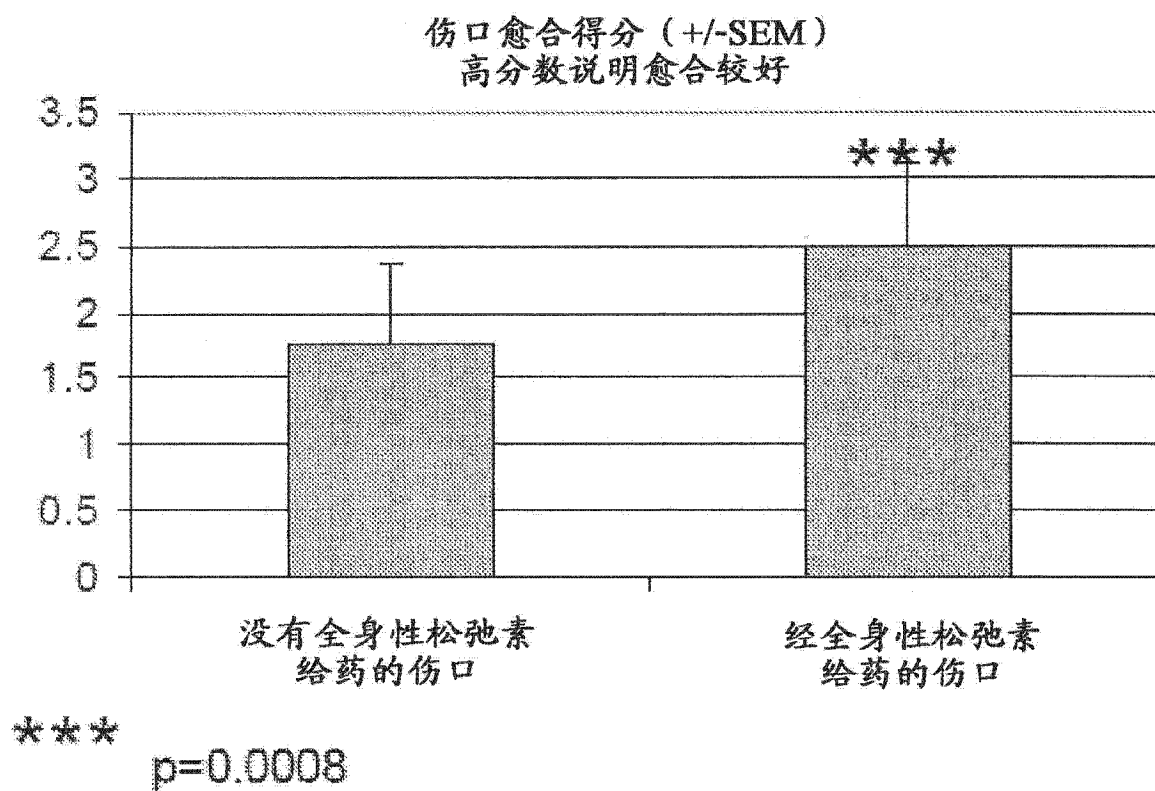


图 11

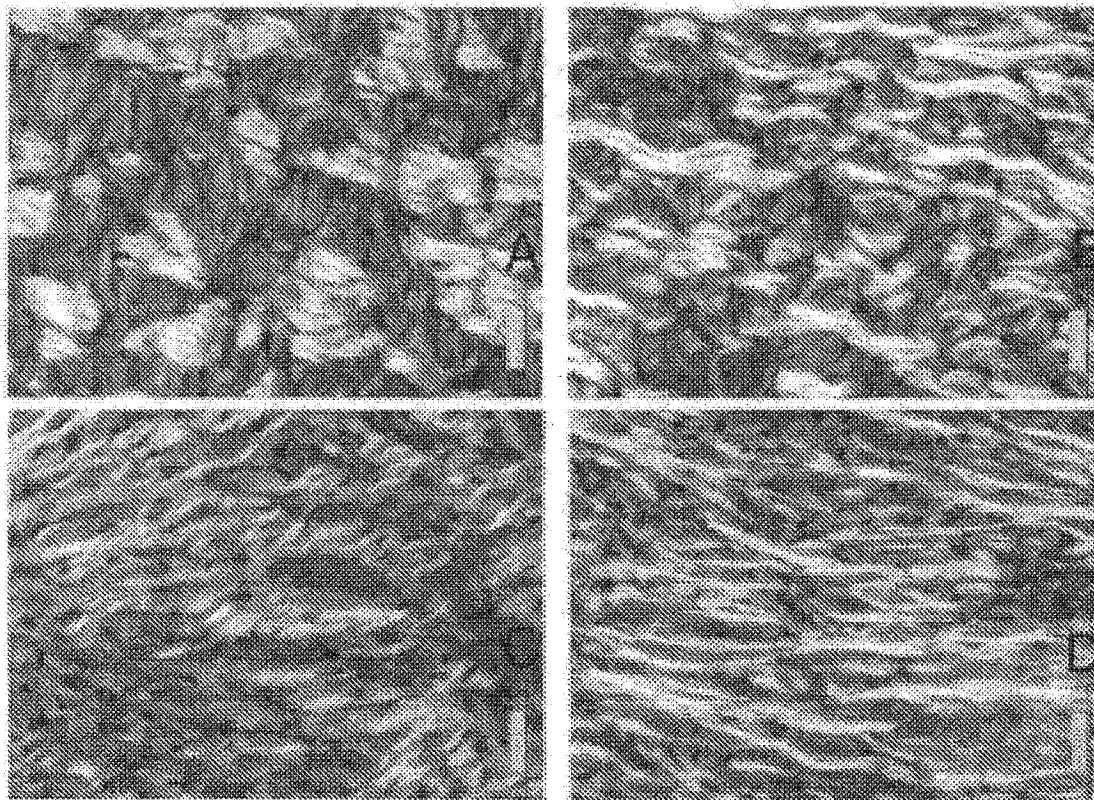


图 12

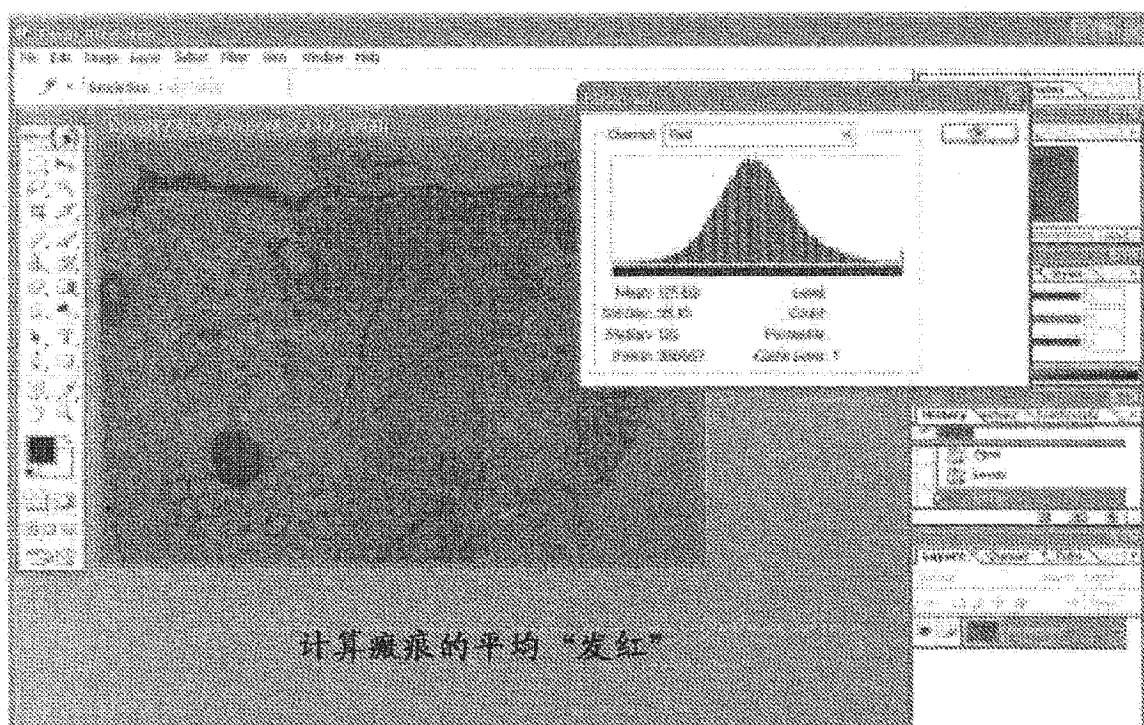


图 13

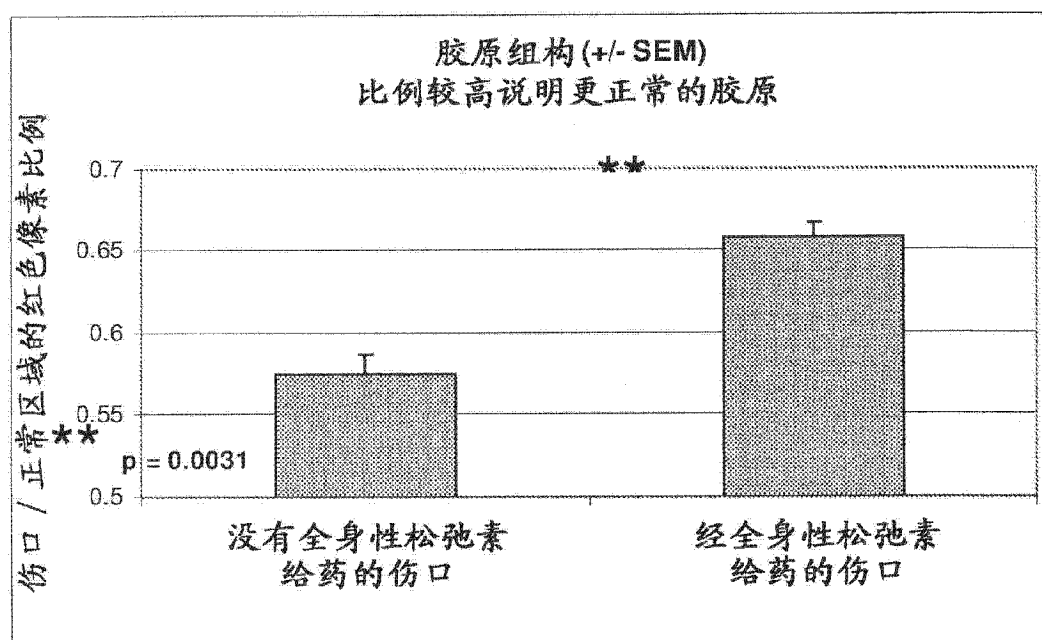


图 14

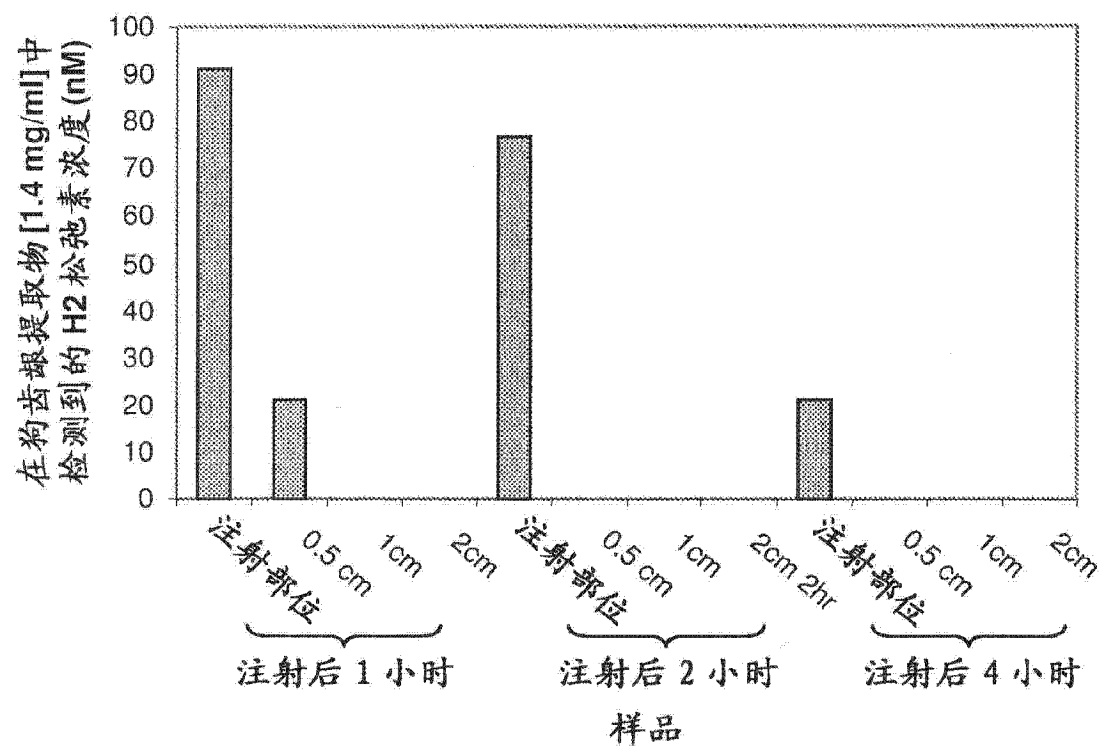


图 15