



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101850108 A

(43) 申请公布日 2010. 10. 06

(21) 申请号 200910217138. 6 *A61P 1/04* (2006. 01)
(22) 申请日 2004. 07. 15 *A61P 9/14* (2006. 01)
(30) 优先权数据 *A61P 15/02* (2006. 01)
60/486906 2003. 07. 15 US *A61P 17/02* (2006. 01)
10/644775 2003. 08. 21 US *A61P 17/06* (2006. 01)
A61P 27/02 (2006. 01)
(62) 分案原申请数据 *A61P 31/18* (2006. 01)
200480026529. 5 2004. 07. 15 *A61K 38/18* (2006. 01)
(71) 申请人 巴尔 - 伊兰大学 *A61K 38/19* (2006. 01)
地址 以色列拉马特甘 *A61K 38/20* (2006. 01)
(72) 发明人 T · 藤兰鲍姆 S · 森普森 *A61K 38/22* (2006. 01)
T · 库罗基 A · 阿尔特 S · 沈 *C12N 5/22* (2006. 01)
(74) 专利代理机构 中国专利代理 (香港) 有限公
司 72001
代理人 付磊

(51) Int. Cl.
A61K 38/28 (2006. 01)
A61K 35/12 (2006. 01)
A61K 45/00 (2006. 01)
A61K 48/00 (2006. 01)
A61P 1/02 (2006. 01)

权利要求书 8 页 说明书 51 页 附图 29 页

(54) 发明名称

用于愈合创伤的方法和药物组合物

(57) 摘要

一种用于诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的药物组合物, 所述药物组合物包括, 作为活性成分的治疗有效量的胰岛素和至少一种与所述胰岛素协同作用的其它试剂, 以及适合于所述药物组合物局部施用的药学可接受的载体。一种用于诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的方法, 所述方法包括对损伤的皮肤或皮肤创伤施用治疗有效量的胰岛素和至少一种与所述胰岛素协同作用的其它试剂以诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程。

1. 一种诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤愈合过程的方法,所述方法包括给所述损伤的皮肤或皮肤创伤施用治疗有效量的胰岛素和至少一种其它与所述胰岛素协同作用的试剂以诱导或加速所述损伤的皮肤或皮肤创伤的所述愈合过程。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述施用是通过单次施用实现的。

3. 权利要求 1 的方法,其中所述治疗有效量的胰岛素具有 0.1 μ M 到 10 μ M 的胰岛素浓度。

4. 权利要求 1 的方法,其中所述至少一种其它试剂是血小板衍生生长因子。

5. 权利要求 1 的方法,其中所述至少一种其它试剂是 PKC- α 抑制剂。

6. 权利要求 1 的方法,其中所述皮肤创伤选自溃疡,糖尿病相关的创伤,烧伤,晒伤,老化皮肤创伤,角膜溃烂创伤,炎性胃肠道疾病创伤,肠炎性疾病创伤,克罗恩氏病创伤,溃疡性结肠炎,痔疮,大疱性表面松解症创伤,皮肤起疱创伤,牛皮癣创伤,动物皮肤创伤,动物糖尿病创伤,视网膜病创伤,口腔创伤(粘膜炎症),阴道粘膜炎症创伤,牙龈病创伤,裂伤,手术切口创伤和手术后粘连创伤。

7. 权利要求 6 的方法,其中所述溃疡选自糖尿病性溃疡,褥疮,静脉溃疡,胃溃疡和 HIV 相关溃疡。

8. 权利要求 1 的方法,其中所述胰岛素是重组的。

9. 权利要求 1 的方法,其中所述胰岛素是天然来源的。

10. 权利要求 1 的方法,其中所述胰岛素和至少一种其它试剂包含于适合于局部施用的药物组合物中。

11. 权利要求 10 的方法,其中所述药物组合物选自水溶液,凝胶,霜剂,糊剂,洗剂,喷雾,悬液,粉末,分散液,油膏剂和软膏剂。

12. 权利要求 10 的方法,其中所述药物组合物包括固体支持物。

13. 一种诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤愈合过程的方法,所述方法包括向所述损伤的皮肤或皮肤创伤中植入治疗有效量的胰岛素分泌细胞,从而诱导或加速所述损伤的皮肤或皮肤创伤的所述愈合过程。

14. 权利要求 13 的方法,其中所述皮肤创伤选自溃疡,糖尿病相关的创伤,烧伤,晒伤,老化皮肤创伤,角膜溃烂创伤,炎性胃肠道疾病创伤,肠炎性疾病创伤,克罗恩氏病创伤,溃疡性结肠炎,痔疮,大疱性表面松解症创伤,皮肤起疱创伤,牛皮癣创伤,动物皮肤创伤,动物糖尿病创伤,视网膜病创伤,口腔创伤(粘膜炎症),阴道粘膜炎症创伤,牙龈病创伤,裂伤,手术切口创伤和手术后粘连创伤。

15. 权利要求 14 的方法,其中所述溃疡选自糖尿病性溃疡,褥疮,静脉溃疡,胃溃疡和 HIV 相关溃疡。

16. 权利要求 13 的方法,其中所述细胞被转化以产生和分泌胰岛素。

17. 权利要求 16 的方法,其中所述细胞被重组 PDX1 基因转化,从而使所述细胞产生和分泌天然胰岛素。

18. 权利要求 16 的方法,其中所述细胞被顺式作用元件序列转化,该序列整合到所述细胞的内源胰岛素基因的上游,从而所述细胞产生和分泌天然胰岛素。

19. 权利要求 16 的方法,其中所述细胞被重组胰岛素基因转化,从而所述细胞产生和分泌重组胰岛素。

20. 权利要求 13 的方法,其中所述胰岛素分泌细胞能够形成分泌颗粒。
21. 权利要求 13 的方法,其中所述胰岛素分泌细胞是内分泌细胞。
22. 权利要求 13 的方法,其中所述胰岛素分泌细胞是人源的。
23. 权利要求 13 的方法,其中所述胰岛素分泌细胞是组织相容性人化动物来源的。
24. 权利要求 13 的方法,其中所述胰岛素分泌细胞分泌人胰岛素。
25. 权利要求 13 的方法,其中所述胰岛素分泌细胞是自体细胞。
26. 权利要求 13 的方法,其中所述细胞选自成纤维细胞,上皮细胞和角质化细胞。
27. 一种诱导或加速皮肤创伤的愈合过程的方法,所述方法包括转化所述损伤的皮肤或皮肤创伤的细胞以产生和分泌胰岛素,从而诱导或加速所述损伤的皮肤或皮肤创伤的所述愈合过程。
28. 权利要求 27 的方法,其中所述创伤选自溃疡,糖尿病相关的创伤,烧伤,晒伤,老化皮肤创伤,角膜溃烂创伤,炎性胃肠道疾病创伤,肠炎性疾病创伤,克罗恩氏病创伤,溃疡性结肠炎,痔疮,大疱性表面松解症创伤,皮肤起疱创伤,牛皮癣创伤,动物皮肤创伤,动物糖尿病创伤,视网膜病创伤,口腔创伤(粘膜炎),阴道粘膜炎创伤,牙龈病创伤,裂伤,手术切口创伤和手术后粘连创伤。
29. 权利要求 28 的方法,其中所述溃疡选自糖尿病性溃疡,褥疮,静脉溃疡,胃溃疡和 HIV 相关溃疡。
30. 权利要求 27 的方法,其中所述细胞被重组 PDX1 基因转化,从而所述细胞产生和分泌天然胰岛素。
31. 权利要求 27 的方法,其中所述细胞被顺式作用元件序列转化,该序列整合到所述细胞的内源胰岛素基因的上游,从而所述细胞产生和分泌天然胰岛素。
32. 权利要求 27 的方法,其中所述细胞被重组胰岛素基因转化,从而所述细胞产生和分泌重组胰岛素。
33. 一种诱导或加速皮肤创伤的愈合过程的方法,所述方法包括转化所述皮肤创伤的细胞以产生蛋白激酶 C,从而诱导或加速所述损伤的皮肤或皮肤创伤的所述愈合过程。
34. 权利要求 33 的方法,其中所述皮肤创伤选自溃疡,糖尿病相关的创伤,烧伤,晒伤,老化皮肤创伤,角膜溃烂创伤,炎性胃肠道疾病创伤,肠炎性疾病创伤,克罗恩氏病创伤,溃疡性结肠炎,痔疮,大疱性表面松解症创伤,皮肤起疱创伤,牛皮癣创伤,动物皮肤创伤,动物糖尿病创伤,视网膜病创伤,口腔创伤(粘膜炎),阴道粘膜炎创伤,牙龈病创伤,裂伤,手术切口创伤和手术后粘连创伤。
35. 权利要求 34 的方法,其中所述溃疡选自糖尿病性溃疡,褥疮,静脉溃疡,胃溃疡和 HIV 相关溃疡。
36. 权利要求 33 的方法,其中所述细胞被转化以产生蛋白激酶 C 转录活化剂,从而所述细胞产生天然蛋白激酶 C。
37. 权利要求 33 的方法,其中所述细胞被顺式作用元件序列转化,该序列整合到所述细胞的内源蛋白激酶 C 的上游,从而所述细胞产生天然的蛋白激酶 C。
38. 权利要求 33 的方法,其中所述细胞被重组蛋白激酶 C 基因转化,从而所述细胞产生重组蛋白激酶 C。
39. 权利要求 33 的方法,其中所述蛋白激酶 C 选自 PKC- β 1, PKC- β 2, PKC- γ , PKC- θ ,

PKC- λ , 和 PKC- ι 。

40. 权利要求 33 的方法, 其中所述蛋白激酶 C 选自 PKC- α , PKC- δ , PKC- ϵ , PKC- η 和 PKC- ζ 。

41. 一种用于诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的药物组合物, 所述药物组合物包括, 作为活性成分的治疗有效量的胰岛素, 至少一种与所述胰岛素协同作用的其它试剂, 以及设计用于所述药物组合物局部施用的药学可接受的载体。

42. 权利要求 41 的药物组合物, 其中所述至少一种其它试剂是生长因子。

43. 权利要求 42 的药物组合物, 其中所述生长因子是血小板衍生生长因子。

44. 权利要求 41 的药物组合物, 其中所述至少一种其它试剂是 PKC- α 抑制剂。

45. 权利要求 41 的药物组合物, 其中所述胰岛素是重组的。

46. 权利要求 41 的药物组合物, 其中所述胰岛素是天然来源的。

47. 权利要求 41 的药物组合物, 其中所述创伤选自溃疡, 糖尿病相关的创伤, 烧伤, 晒伤, 老化皮肤创伤, 角膜溃烂创伤, 炎性胃肠道疾病创伤, 肠炎性疾病创伤, 克罗恩氏病创伤, 溃疡性结肠炎, 痔疮, 大疱性表面松解症创伤, 皮肤起疱创伤, 牛皮癣创伤, 动物皮肤创伤, 动物糖尿病创伤, 视网膜病创伤, 口腔创伤 (粘膜炎), 阴道粘膜炎创伤, 牙龈病创伤, 裂伤, 手术切口创伤和手术后粘连创伤。

48. 权利要求 47 的方法, 其中所述溃疡选自糖尿病性溃疡, 褥疮, 静脉溃疡, 胃溃疡和 HIV 相关溃疡。

49. 权利要求 41 的药物组合物, 其中所述胰岛素和至少一种其它试剂包含于适于局部施用的制剂中。

50. 权利要求 49 的药物组合物, 其中所述制剂选自水溶液, 凝胶, 霜剂, 糊剂, 洗剂, 喷雾, 悬液, 粉末, 分散液, 油膏剂和软膏剂。

51. 权利要求 50 的药物组合物, 其中所述药物组合物包括固体支持物。

52. 一种用于诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的药物组合物, 所述药物组合物包括, 作为活性成分的胰岛素分泌细胞, 以及设计用于所述药物组合物局部施用的药学可接受的载体。

53. 权利要求 52 的药物组合物, 其中所述创伤选自溃疡, 糖尿病相关的创伤, 烧伤, 晒伤, 老化皮肤创伤, 角膜溃烂创伤, 炎性胃肠道疾病创伤, 肠炎性疾病创伤, 克罗恩氏病创伤, 溃疡性结肠炎, 痔疮, 大疱性表面松解症创伤, 皮肤起疱创伤, 牛皮癣创伤, 动物皮肤创伤, 动物糖尿病创伤, 视网膜病创伤, 口腔创伤 (粘膜炎), 阴道粘膜炎创伤, 牙龈病创伤, 裂伤, 手术切口创伤和手术后粘连创伤。

54. 权利要求 53 的方法, 其中所述溃疡选自糖尿病性溃疡, 褥疮, 静脉溃疡, 胃溃疡和 HIV 相关溃疡。

55. 权利要求 52 的药物组合物, 其中所述细胞被转化以产生和分泌胰岛素。

56. 权利要求 52 的药物组合物, 其中所述细胞被重组 PDX1 基因转化, 从而所述细胞产生和分泌天然胰岛素。

57. 权利要求 52 的药物组合物, 其中所述细胞被顺式作用元件序列转化, 该序列整合到所述细胞的内源胰岛素基因的上游, 从而所述细胞产生和分泌天然胰岛素。

58. 权利要求 52 的药物组合物, 其中所述细胞被重组胰岛素基因转化, 从而所述细胞

产生和分泌重组胰岛素。

59. 权利要求 52 的药物组合物,其中所述胰岛素分泌细胞能够形成分泌颗粒。

60. 权利要求 52 的药物组合物,其中所述胰岛素分泌细胞是内分泌细胞。

61. 权利要求 52 的药物组合物,其中所述胰岛素分泌细胞是人源的。

62. 权利要求 52 的药物组合物,其中所述胰岛素分泌细胞是组织相容性人化动物来源的。

63. 权利要求 52 的药物组合物,其中所述胰岛素分泌细胞分泌人胰岛素。

64. 权利要求 52 的药物组合物,其中所述胰岛素分泌细胞是自体细胞。

65. 权利要求 52 的药物组合物,其中所述细胞选自成纤维细胞,上皮细胞和角质化细胞。

66. 一种用于诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的药物组合物,所述药物组合物包括,作为活性成分的,设计用于转化所述皮肤创伤的细胞以产生和分泌胰岛素的核酸构建体,以及设计用于所述药物组合物局部施用的药学可接受的载体。

67. 权利要求 66 的药物组合物,其中所述创伤选自溃疡,糖尿病相关的创伤,烧伤,晒伤,老化皮肤创伤,角膜溃烂创伤,炎性胃肠道疾病创伤,肠炎性疾病创伤,克罗恩氏病创伤,溃疡性结肠炎,痔疮,大疱性表面松解症创伤,皮肤起疱创伤,牛皮癣创伤,动物皮肤创伤,动物糖尿病创伤,视网膜病创伤,口腔创伤(粘膜炎),阴道粘膜炎创伤,牙龈病创伤,裂伤,手术切口创伤和手术后粘连创伤。

68. 权利要求 67 的方法,其中所述溃疡选自糖尿病性溃疡,褥疮,静脉溃疡,胃溃疡和 HIV 相关溃疡。

69. 权利要求 66 的药物组合物,其中所述细胞被重组 PDX1 基因转化,从而所述细胞产生和分泌天然胰岛素。

70. 权利要求 66 的药物组合物,其中所述细胞被顺式作用元件序列转化,该序列整合到所述细胞的内源胰岛素基因的上游,从而所述细胞产生和分泌天然胰岛素。

71. 权利要求 66 的药物组合物,其中所述细胞被重组胰岛素基因转化,从而所述细胞产生和分泌重组胰岛素。

72. 一种用于诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的药物组合物,所述药物组合物包括,作为活性成分的,设计用于转化所述皮肤创伤的细胞以产生蛋白激酶 C 的核酸构建体,以及设计用于所述药物组合物局部施用的药学可接受的载体。

73. 权利要求 72 的药物组合物,其中所述皮肤创伤选自溃疡,糖尿病相关的创伤,烧伤,晒伤,老化皮肤创伤,角膜溃烂创伤,炎性胃肠道疾病创伤,肠炎性疾病创伤,克罗恩氏病创伤,溃疡性结肠炎,痔疮,大疱性表面松解症创伤,皮肤起疱创伤,牛皮癣创伤,动物皮肤创伤,动物糖尿病创伤,视网膜病创伤,口腔创伤(粘膜炎),阴道粘膜炎创伤,牙龈病创伤,裂伤,手术切口创伤和手术后粘连创伤。

74. 权利要求 73 的方法,其中所述溃疡选自糖尿病性溃疡,褥疮,静脉溃疡,胃溃疡和 HIV 相关溃疡。

75. 权利要求 72 的药物组合物,其中所述细胞被转化以产生蛋白激酶 C 转录活化剂,从而所述细胞产生天然蛋白激酶 C。

76. 权利要求 72 的药物组合物,其中所述细胞被顺式作用元件序列转化,该序列整合

到所述细胞的内源蛋白激酶 C 的上游,从而所述细胞产生天然的蛋白激酶 C。

77. 权利要求 72 的药物组合物,其中所述细胞被重组蛋白激酶 C 基因转化,从而所述细胞产生重组蛋白激酶 C。

78. 权利要求 72 的药物组合物,其中所述蛋白激酶 C 选自 PKC- β 1, PKC- β 2, PKC- γ , PKC- θ , PKC- λ , 和 PKC- ι 。

79. 权利要求 72 的药物组合物,其中所述蛋白激酶 C 选自 PKC- α , PKC- δ , PKC- ϵ , PKC- η 和 PKC- ζ 。

80. 一种诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的方法,所述方法包括给所述皮肤创伤施用治疗有效量的调节 PKC 表达或活化的试剂。

81. 一种用于诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的药物组合物,所述药物组合物包括,作为活性成分的,治疗有效量的调节 PKC 表达或活化的试剂;和药学可接受的载体。

82. 一种诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的方法,所述方法包括给所述损伤的皮肤或皮肤创伤施用治疗有效量的 PKC 活化剂,从而诱导或加速所述损伤的皮肤或皮肤创伤的所述愈合过程。

83. 一种用于诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的药物组合物,所述药物组合物包括,作为活性成分的,治疗有效量的 PKC 活化剂,以诱导或加速所述损伤的皮肤或皮肤创伤的所述愈合过程,以及药学可接受的载体。

84. 一种诱导或加速离体皮肤细胞增殖的方法,所述方法包括给予所述皮肤细胞有效量的调节 PKC 产生的试剂。

85. 一种诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的方法,所述方法包括给所述损伤的皮肤或皮肤创伤施用单一剂量的治疗有效量的胰岛素,从而诱导或加速所述损伤的皮肤或皮肤创伤的所述愈合过程。

86. 权利要求 85 的方法,其中所述皮肤创伤选自溃疡,糖尿病相关的创伤,烧伤,晒伤,老化皮肤创伤,角膜溃烂创伤,炎性胃肠道疾病创伤,肠炎性疾病创伤,克罗恩氏病创伤,溃疡性结肠炎,痔疮,大疱性表皮松解症创伤,皮肤起疱创伤,牛皮癣创伤,动物皮肤创伤,动物糖尿病创伤,视网膜病创伤,口腔创伤(粘膜炎症),阴道粘膜炎症创伤,牙龈病创伤,裂伤,手术切口创伤和手术后粘连创伤。

87. 权利要求 86 的方法,其中所述溃疡选自糖尿病性溃疡,褥疮,静脉溃疡,胃溃疡和 HIV 相关溃疡。

88. 权利要求 85 的方法,其中所述胰岛素是重组的。

89. 权利要求 85 的方法,其中所述胰岛素是天然来源的。

90. 权利要求 85 的方法,其中所述胰岛素包含于适于局部施用的药物组合物中。

91. 权利要求 90 的方法,其中所述药物组合物选自水溶液,凝胶,霜剂,糊剂,洗剂,喷雾,悬液,粉末,分散液,油膏剂和软膏剂。

92. 权利要求 90 的方法,其中所述药物组合物包括固体支持物。

93. 一种诱导或加速陈旧皮肤创伤的愈合过程的方法,所述方法包括给所述陈旧皮肤创伤施用单一剂量的治疗有效量的胰岛素,从而诱导或加速所述陈旧皮肤创伤的所述愈合过程。

94. 权利要求 93 的方法,其中所述陈旧皮肤创伤是至少 2 天龄的。

95. 权利要求 93 的方法,其中所述陈旧皮肤创伤选自溃疡,糖尿病相关的创伤,烧伤,晒伤,老化皮肤创伤,角膜溃烂创伤,炎性胃肠道疾病创伤,肠炎性疾病创伤,克罗恩氏病创伤,溃疡性结肠炎,痔疮,大疱性表面松解症创伤,皮肤起疱创伤,牛皮癣创伤,动物皮肤创伤,动物糖尿病创伤,视网膜病创伤,口腔创伤(粘膜炎),阴道粘膜炎创伤,牙龈病创伤,裂伤,手术切口创伤和手术后粘连创伤。

96. 权利要求 95 的方法,其中所述溃疡选自糖尿病性溃疡,褥疮,静脉溃疡,胃溃疡和 HIV 相关溃疡。

97. 权利要求 93 的方法,其中所述胰岛素是重组的。

98. 权利要求 93 的方法,其中所述胰岛素是天然来源的。

99. 权利要求 93 的方法,其中所述胰岛素包含于适于局部施用的药物组合物中。

100. 权利要求 99 的方法,其中所述药物组合物选自水溶液,凝胶,霜剂,糊剂,洗剂,喷雾,悬液,粉末,分散液,油膏剂和软膏剂。

101. 权利要求 99 的方法,其中所述药物组合物包括固体支持物。

102. 一种用于诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的药物组合物,所述药物组合物包括,作为活性成分的,所选择的能诱导或加速所述损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的单一剂量单位的胰岛素,以及设计用于所述药物组合物局部施用的药学可接受的载体。

103. 权利要求 102 的药物组合物,其中所述单一剂量单位的胰岛素是在 0.01-0.2ml 的所述药物组合物中的 0.001 到 5nM。

104. 权利要求 102 的药物组合物,其中所述单一剂量单位的胰岛素是在 0.01-0.2ml 的所述药物组合物中的 0.01 到 0.5nM。

105. 权利要求 102 的药物组合物,其中所述胰岛素是重组的。

106. 权利要求 102 的药物组合物,其中所述胰岛素是天然来源的。

107. 权利要求 102 的药物组合物,其中所述损伤的皮肤或皮肤创伤选自溃疡,糖尿病相关的创伤,烧伤,晒伤,老化皮肤创伤,角膜溃烂创伤,炎性胃肠道疾病创伤,肠炎性疾病创伤,克罗恩氏病创伤,溃疡性结肠炎,痔疮,大疱性表面松解症创伤,皮肤起疱创伤,牛皮癣创伤,动物皮肤创伤,动物糖尿病创伤,视网膜病创伤,口腔创伤(粘膜炎),阴道粘膜炎创伤,牙龈病创伤,裂伤,手术切口创伤和手术后粘连创伤。

108. 权利要求 107 的方法,其中所述溃疡选自糖尿病性溃疡,褥疮,静脉溃疡,胃溃疡和 HIV 相关溃疡。

109. 权利要求 102 的药物组合物,其中所述胰岛素包含于适于局部施用的制剂中。

110. 权利要求 109 的药物组合物,其中所述制剂选自水溶液,凝胶,霜剂,糊剂,洗剂,喷雾,悬液,粉末,分散液,油膏剂和软膏剂。

111. 权利要求 102 的药物组合物,其中所述药物组合物包括固体支持物。

112. 一种诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的方法,所述方法包括给所述皮肤创伤施用治疗有效量的共聚物-1。

113. 权利要求 112 的方法,其中所述施用是通过单次施用进行的。

114. 权利要求 111 的方法,其中所述治疗有效量的共聚物-1 是浓度为 1 到 500 $\mu\text{g/ml}$

的共聚物-1。

115. 权利要求 111 的方法,其中所述创伤选自溃疡,糖尿病相关的创伤,烧伤,晒伤,老化皮肤创伤,角膜溃烂创伤,炎性胃肠道疾病创伤,肠炎性疾病创伤,克罗恩氏病创伤,溃疡性结肠炎,痔疮,大疱性表面松解症创伤,皮肤起疱创伤,牛皮癣创伤,动物皮肤创伤,动物糖尿病创伤,视网膜病创伤,口腔创伤(粘膜炎),阴道粘膜炎创伤,牙龈病创伤,裂伤,手术切口创伤和手术后粘连创伤。

116. 权利要求 115 的方法,其中所述溃疡选自糖尿病性溃疡,褥疮,静脉溃疡,胃溃疡和 HIV 相关溃疡。

117. 权利要求 111 的方法,其中所述碱性蛋白类似物包含于适于局部施用的制剂中。

118. 一种用于诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的药物组合物,所述药物组合物包括,作为活性成分的,治疗有效量的共聚物-1,以及设计用于所述药物组合物局部施用的药学可接受的载体。

119. 权利要求 118 的药物组合物,其中所述皮肤创伤选自溃疡,糖尿病相关的创伤,烧伤,晒伤,老化皮肤创伤,角膜溃烂创伤,炎性胃肠道疾病创伤,肠炎性疾病创伤,克罗恩氏病创伤,溃疡性结肠炎,痔疮,大疱性表面松解症创伤,皮肤起疱创伤,牛皮癣创伤,动物皮肤创伤,动物糖尿病创伤,视网膜病创伤,口腔创伤(粘膜炎),阴道粘膜炎创伤,牙龈病创伤,裂伤,手术切口创伤和手术后粘连创伤。

120. 权利要求 119 的方法,其中所述溃疡选自糖尿病性溃疡,褥疮,静脉溃疡,胃溃疡和 HIV 相关溃疡。

121. 权利要求 111 的药物组合物,其中所述共聚物-1 包含于适合于局部施用的制剂中。

122. 权利要求 121 的药物组合物,其中所述制剂选自水溶液,凝胶,霜剂,糊剂,洗剂,喷雾,悬液,粉末,分散液,油膏剂和软膏剂。

123. 权利要求 111 的药物组合物,其中所述药物组合物包括固体支持物。

124. 一种诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的方法,所述方法包括调节定居于所述皮肤创伤的真皮细胞中的至少一种 PKC 同种型的表达和/或活性;给所述真皮细胞施用治疗有效量的至少一种选自激素,生长因子,脂肪细胞激素,PKC δ RACK 和 GW9662 的其它试剂以及调节所述 PKC 同种型的表达和/或活性,从而诱导或加速所述损伤的皮肤或皮肤创伤的所述愈合过程。

125. 权利要求 124 的方法,其中所述真皮细胞是成纤维细胞或角质化细胞。

126. 权利要求 124 的方法,其中所述 PKC 同种型选自 PKC- α , PKC- β , PKC- δ , 和 PKC- ζ 。

127. 权利要求 124 的方法,其中所述激素是胰岛素。

128. 权利要求 124 的方法,其中所述生长因子选自 IL-6, KFG 和 TNF α 。

129. 权利要求 124 的方法,其中所述脂肪细胞激素是 adipsin 或脂联素。

130. 一种用于诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的药物组合物,所述药物组合物包括,作为活性成分的,治疗有效量的调节至少一种 PKC 同种型的表达或活化的物质,和至少一种选自激素,生长因子,脂肪细胞激素,PKC δ RACK 和 GW9662 的其它试剂,以及药学可接受的载体。

131. 权利要求 130 的药物组合物,其中所述激素是胰岛素。

132. 权利要求 130 的药物组合物,其中所述生长因子选自 IL-6, KFG 和 $TNF\alpha$ 。

133. 权利要求 130 的药物组合物,其中所述脂肪细胞激素是 adipisin 或脂联素。

134. 权利要求 130 的药物组合物,其中所述皮肤创伤选自溃疡,糖尿病相关的创伤,烧伤,晒伤,老化皮肤创伤,角膜溃烂创伤,炎性胃肠道疾病创伤,肠炎性疾病创伤,克罗恩氏病创伤,溃疡性结肠炎,痔疮,大疱性表面松解症创伤,皮肤起疱创伤,牛皮癣创伤,动物皮肤创伤,动物糖尿病创伤,视网膜病创伤,口腔创伤(粘膜炎症),阴道粘膜炎症创伤,牙龈病创伤,裂伤,手术切口创伤和手术后粘连创伤。

135. 权利要求 134 的药物组合物,其中所述溃疡选自糖尿病性溃疡,褥疮,静脉溃疡,胃溃疡和 HIV 相关溃疡。

136. 权利要求 130 的药物组合物,其包含于适合于局部施用的制剂中。

137. 权利要求 136 的药物组合物,其中所述制剂选自水溶液,凝胶,霜剂,糊剂,洗剂,喷雾,悬液,粉末,分散液,油膏剂和软膏剂。

138. 权利要求 130 的药物组合物,其中所述药物组合物包括固体支持物。

139. 一种适于局部施用以诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的药物组合物,所述药物组合物包含治疗有效量的胰岛素和至少一种与所述胰岛素协同作用的其它试剂,其中所述至少一种其它试剂是十四酰化 $PKC\alpha$ 伪底物肽。

140. 一种适于局部施用以诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的药物组合物,所述药物组合物由治疗有效量的胰岛素和至少一种与所述胰岛素协同作用的其它试剂组成,其中所述至少一种其它试剂是十四酰化 $PKC\alpha$ 伪底物肽。

用于愈合创伤的方法和药物组合物

[0001] 本申请是以下申请的分案申请：申请日 2004 年 7 月 15 日，申请号 200480026529.5 (PCT/IL2004/000640)，标题“用于愈合创伤的方法和药物组合物”。

发明领域

[0002] 本发明涉及一种用于诱导和 / 或加速细胞增殖和 / 或细胞分化并因此而加速创伤 (wounds) 的愈合过程的方法和药物组合物。更具体而言，本发明涉及经调节的丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶，也称为 PKC 的表达和 / 或活化，例如由膜运输和活化引起的，用于诱导和 / 或加速细胞增殖和 / 或细胞分化和 / 或细胞迁移从而加速创伤的愈合过程的用途。根据本发明的教导，这种表达的调节可以通过下述作用实现：(i) 用 PKC 表达构建体转化创伤细胞；(ii) 用顺式作用元件转化创伤细胞，该元件将被插入到创伤细胞内源 PKC 基因上游邻近位置；(iii) 给予胰岛素以诱导创伤细胞中 PKC 的表达和 / 或活化；(iv) 用胰岛素表达构建体转化创伤细胞，其产生的表达的和分泌的胰岛素可作为 PKC 的表达和 / 或活化的上调剂；(v) 用顺式作用元件转化创伤细胞，该元件将被插入到创伤细胞内源胰岛素基因上游邻近位置，被表达和分泌的胰岛素可作为 PKC 的表达和 / 或活化的上调剂；(vi) 向创伤中植入胰岛素分泌细胞；(vii) 用反式作用因子，例如 PDX1 转化创伤细胞，以诱导内源胰岛素产生和分泌，所述胰岛素可作为 PKC 的表达和 / 或活化的上调剂；以及 (viii) 给创伤施用 PKC 调节剂。

[0003] 本发明正如任何上述方法所实现的那样，也可离体实施，以产生皮肤移植物。

背景技术

[0004] 创伤治疗最主要的目的是使创伤闭合。张开的皮肤创伤代表了一类主要的创伤，包括烧伤，神经性溃疡，褥疮性溃疡，静脉淤滞性溃疡，和糖尿病性溃疡。

[0005] 张开的皮肤创伤通常经过这样的过程愈合，包括六个主要要素：(i) 发炎；(ii) 成纤维细胞增殖；(iii) 血管增殖；(iv) 结缔组织合成；(v) 形成上皮；和 (vi) 创伤收缩。当这些要素，无论是单独的还是作为整体，不能正确发挥作用的时候，则破坏了创伤的愈合。有多种因素都可以影响创伤愈合，包括营养不良，感染，药理学试剂（例如放线菌素和类固醇），高龄和糖尿病 [参见 Hunt and Goodson, Current Surgical Diagnosis & Treatment (Way ; Appleton & Lange), pp. 86-98 (1988)]。

[0006] 就糖尿病而言，糖尿病的特征就在于胰岛素信号传导 (signaling) 受到损伤，血浆葡萄糖升高，以及在几种特定组织上发生慢性的并发症的易感性。在所有糖尿病的慢性并发症中，导致足部溃烂的受损的创伤愈合是研究最少的。然而糖尿病患者的皮肤溃疡花费了大量人力和财力 (29, 30)。而且，足部溃烂以及而后的下肢截断是最常见的糖尿病患者住院的原因 (30-33)。在糖尿病中，创伤愈合过程受到破坏，愈合的创伤的特征在于伤口强度减小。组织修复的缺陷与几种因素有关，包括神经病，血管病和感染。但是，尚不明其它机制，通过该机制，与胰岛素信号传导异常相关的糖尿病状态破坏创伤的愈合并改变皮肤生理。

[0007] 还有一个普遍存在的问题是身体的各个部分的外科手术之后的创伤愈合,手术成功但是创伤切口不愈合。

[0008] 皮肤是分层的鳞状的上皮,其中正在进行生长和分化的细胞被严格隔开。在生理状态,增殖只限于附着于基底膜上的基底细胞。分化是一种空间过程,其中基底细胞失去与基底膜的附着,停止 DNA 合成并经历一系列形态学的和生物化学的变化。最终的成熟步骤是产生角质层,其形成皮肤的保护屏障 (1,2)。在基底细胞开始分化的时候观察到的最早的变化与基底细胞从基底膜分离和迁移的能力有关 (3)。创伤的愈合过程也有类似的变化,其中细胞迁移到创伤部位,增殖能力也增加。这些过程是皮肤层的重建和诱导表皮层正确分化所必需的。

[0009] 小鼠和人角质化细胞培养系统的开发大大方便了对表皮细胞生长和分化调节机制的分析 (2,4)。在体外,角质化细胞可以保持为具有高生长速度的基底增殖细胞。而且,遵循表皮在体内的成熟模式可以在体外诱导分化。早期事件包括半桥粒组分的丧失 (3,5) 和 $\alpha 6 \beta 4$ 整联蛋白的选择性丧失以及细胞与基质蛋白的附着的选择性丧失。这表明整联蛋白表达的变化是角质化细胞分化中的早期事件。早期的半桥粒接触 (hemidesmosomal contact) 的丧失导致角质化细胞向基底层上迁移,并且与培养的角质化细胞中以及皮肤中角蛋白 1(K1) 的诱导有关 (1,3,6)。向颗粒层表型的进一步分化与 $\beta 1$ 和 $\beta 4$ 整联蛋白的表达的下调,与所有基质蛋白的附着潜力的丧失有关,然后就是角质化包膜的形成和细胞死亡。分化细胞最终从培养皿上脱落成为成熟鳞屑 (2,7)。这种体外分化过程是严格遵循体内表皮成熟模式进行的。

[0010] 最近对于角质化细胞生物学的研究突出了蛋白激酶 C(Protein Kinase C) 途径的贡献,其调节皮肤增殖和分化。丝氨酸-苏氨酸激酶的蛋白激酶 C(PKC) 家族在多种生物现象中都起着重要的调节作用 (8,9)。PKC 家族由至少 12 个单独的同种型 (isoform) 构成,其属于 3 个不同的类别:(i) 传统同种型 (α , $\beta 1$, $\beta 2$, γ),其被磷脂酶 C 在胞内释放的 Ca^{2+} ,佛波酯和二酰甘油激活;(ii) 新同种型 (δ , ϵ , η , θ),其也可以被佛波酯和二酰甘油激活,但不能被 Ca^{2+} 激活;(iii) 家族的非典型性 (ζ , λ , τ) 成员,其不能被 Ca^{2+} ,佛波酯或二酰甘油激活。

[0011] 当被激活的时候,大部分但不是所有同种型被认为会从细胞质迁移到质膜上。同种型的类型和分布模式在不同的组织中各不相同,也会随表型而变化。由于 PKC 在多种激素作用的细胞终点中的重要性,已有多项研究阐明了其结构和功能。在体内和培养物中已识别了皮肤中的五种 PKC 同种型 - α , δ , ϵ , η 和 ζ 。近来的研究表明 PKC 信号传导途径是分化反应的主要胞内调节剂 (10,11)。而且,PKC 的药理学活化剂是体内和体外角质化细胞分化的强有力的诱导剂 (4,12),PKC 抑制剂能防止分化标志物的表达 (10)。

[0012] 在构思本发明时,猜测 PKC 同种型的过表达和 / 或活化可能会有助于加速创伤愈合过程。由于难以有效地用传统方法向原代细胞中引入外源基因,因而对各个 PKC 同种型在皮肤细胞增殖和 / 或分化中的作用的研究受到了限制。生命期短,存在分化可能以及不能分离到稳定的转化体都使得外源基因不能有效转导入原代皮肤细胞。

[0013] 现有技术描述了胰岛素作为创伤愈合的治疗剂的潜在应用。美国专利 5,591,709, 5,461,030 和 5,145,679 描述了将胰岛素局部施用于创伤以促进创伤愈合。但是,这些专利所描述的都是将胰岛素和葡萄糖组合使用,因为胰岛素的功能是增加葡萄糖的吸收,因而

促进创伤愈合。

[0014] 美国专利申请 09/748, 466 和国际专利申请 PCT/US98/21794 描述了局部施用于皮肤以促进皮肤健康或治疗较浅的皮肤损伤的含有胰岛素的组合物。但是, 这些专利申请并没有教导使用胰岛素治疗慢性的, II 度 (Grade II) 或较深的创伤。

[0015] 国际专利申请 PCT/US01/10245 描述了将氰基丙烯酸酯聚合物密封剂与胰岛素或银组合使用以使创伤愈合。但是, 在此申请中既没有教导也没有暗示胰岛素和另一种生物活性试剂组合使用可以调节 PKC 的表达和 / 或活化。

[0016] 国际专利申请 PCT/US85/00695 描述了局部施用胰岛素以治疗糖尿病。但是, 该专利申请并没有教导使用胰岛素治疗与糖尿病无关的创伤。

[0017] 国际专利申请 PCT/US92/03086 描述了可以含有胰岛素的治疗用微乳制剂。但是, 其公开的内容没有教导使用胰岛素制剂使创伤愈合。

[0018] 美国专利 4, 673, 649 和 4, 940, 660 描述了用于人角质化细胞和表皮细胞体外无性系生长的组合物, 其中含有表皮生长因子和胰岛素。这些专利教导了将胰岛素用于培养的皮肤细胞的发育, 所述细胞可用于移植。但是, 这些专利并未教导将胰岛素在体内用于创伤。

[0019] 上述引用的现有技术参考文献并未教导或暗示将胰岛素用于调节 PKC 的表达和 / 或活化, 从而加速创伤的愈合过程。而且, 现有技术并未教导或暗示使用核酸构建体或基因转化技术向创伤提供胰岛素, 从而加速创伤的愈合过程。

[0020] 目前普遍意识到需要, 并且为了便利之目的也需要能加速创伤愈合相关过程的新方法。此外, 还普遍意识到需要, 并且为了便利之目的也需要能将重组基因插入到皮肤细胞中的有效方法, 其将加速细胞增殖和 / 或分化过程和创伤愈合。

发明内容

[0021] 当实施本发明的时候, 发明人发现将胰岛素单独施用到创伤处会产生不良的副作用例如过度血管生成, 发炎, 上皮细胞增生和疤痕形成 (见下文实施例部分的实施例 23)。本发明人进一步发现将胰岛素和一种或多种能在定居于创伤部位的细胞 (cells colonizing the wound area) 中调节 PKC 的表达和 / 或活性的试剂组合使用可有效避免胰岛素引起的副作用, 并且同时显著加速创伤愈合过程。

[0022] 本发明提供了高效治疗创伤并且没有不良副作用的新方法和组合物, 包括向创伤部位提供有效量的胰岛素和 / 或其它能在创伤部位的细胞中调节 PKC 的表达和 / 或活性并与胰岛素有协同作用的试剂以加速创伤愈合的过程。

[0023] 因此, 根据本发明的一个方面, 提供了一种诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的方法, 所述方法包括给损伤的皮肤或皮肤创伤施用治疗有效量的调节 PKC 产生和 / 或 PKC 活化的试剂的步骤。

[0024] 根据本发明的另一个方面, 提供了一种用于诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的药物组合物, 所述药物组合物包括, 作为活性成分的, 治疗有效量的至少一种调节 PKC 产生和 / 或活性的试剂; 和药学可接受的载体。

[0025] 根据本发明的另一个方面, 提供了一种诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的方法, 所述方法包括给损伤的皮肤或皮肤创伤施用治疗有效量的胰岛素和至少一种

与胰岛素有协同作用的其它试剂的步骤,以诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程。

[0026] 根据本发明的另一个方面,提供了一种用于诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的药物组合物,所述药物组合物包括,作为活性成分的,治疗有效量的胰岛素,至少一种能与胰岛素协同作用的其它试剂,以及设计用于所述药物组合物局部施用的药学可接受的载体。

[0027] 根据本发明的另一个方面提供了一种诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的方法,所述方法包括给损伤的皮肤或皮肤创伤施用单次剂量的治疗有效量的胰岛素的步骤,从而诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程。

[0028] 根据本发明的另一个方面提供了一种用于诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的药物组合物,所述药物组合物包括,作为活性成分的,所选择的能诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的单一剂量单位的胰岛素,以及设计用于所述药物组合物局部施用的药学可接受的载体。

[0029] 根据本发明的另一个方面提供了一种诱导或加速陈旧皮肤创伤 (old skin wound) 的愈合过程的方法,所述方法包括给陈旧皮肤创伤施用单次剂量的治疗有效量的胰岛素的步骤,从而诱导或加速陈旧皮肤创伤的愈合过程。

[0030] 根据本发明的另一个方面,提供了一种诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的方法,所述方法包括向损伤的皮肤或皮肤创伤植入治疗有效量的胰岛素分泌细胞的步骤,从而诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程。

[0031] 根据本发明的另一个方面,提供了一种用于诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的药物组合物,所述药物组合物包括,作为活性成分的胰岛素分泌细胞,以及设计用于所述药物组合物局部施用的药学可接受的载体。

[0032] 根据本发明的另一个方面,提供了一种诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的方法,所述方法包括转化损伤的皮肤或皮肤创伤的细胞以产生和分泌胰岛素的步骤,从而诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程。

[0033] 根据本发明的另一个方面,提供了一种用于诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的药物组合物,所述药物组合物包括,作为活性成分的,设计用于转化损伤的皮肤或皮肤创伤处细胞以产生和分泌胰岛素的核酸构建体,以及设计用于所述药物组合物局部施用的药学可接受的载体。

[0034] 根据本发明的另一个方面,提供了一种诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的方法,所述方法包括转化损伤的皮肤或皮肤创伤处细胞以产生蛋白激酶 C 的步骤,从而诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程。

[0035] 根据本发明的另一个方面,提供了一种用于诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的药物组合物,所述药物组合物包括,作为活性成分的,设计用于转化损伤的皮肤或皮肤创伤处细胞以产生蛋白激酶 C 的核酸构建体,以及设计用于所述药物组合物局部施用的药学可接受的载体。

[0036] 根据本发明的另一个方面,提供了一种诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的方法,所述方法包括给损伤的皮肤或皮肤创伤施用治疗有效量的 PKC 活化剂的步骤,从而诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程。

[0037] 根据本发明的另一个方面,提供了一种用于诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的药物组合物,所述药物组合物包括,作为活性成分的,治疗有效量的 PKC 活化剂,以诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程,以及药学可接受的载体。

[0038] 根据本发明的另一个方面,提供了一种诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的方法,所述方法包括给损伤的皮肤或皮肤创伤施用治疗有效量的共聚物-1 的步骤。

[0039] 根据本发明的另一个方面,提供了一种用于诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的药物组合物,所述药物组合物包括,作为活性成分的,治疗有效量的共聚物-1,以及设计用于所述药物组合物局部施用的药学可接受的载体。

[0040] 根据本发明的另一个方面,提供了一种用于诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的药物组合物,所述药物组合物包括,作为活性成分的,治疗有效量的共聚物-1,以及设计用于所述药物组合物局部施用的药学可接受的载体。

[0041] 根据本发明的另一个方面,提供了一种诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的方法,所述方法包括调节定居于损伤的皮肤或皮肤创伤处真皮细胞中的至少一种 PKC 同种型的表达和/或活性;给所述真皮细胞施用治疗有效量的至少一种选自激素,生长因子,脂肪细胞激素,PKC δ RACK 和 GW9662 的其它试剂以及调节所述 PKC 同种型的表达和/或活性,从而诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程。

[0042] 根据本发明的另一个方面,提供了一种用于诱导或加速损伤的皮肤或皮肤创伤的愈合过程的药物组合物,所述药物组合物包括,作为活性成分的,治疗有效量的调节至少一种 PKC 同种型的表达或活性的物质,和至少一种选自激素,生长因子,脂肪细胞激素,PKC δ RACK 和 GW9662 的其它试剂,以及药学可接受的载体。

[0043] 根据下述的发明的优选实施方案的其它特征,所述创伤选自溃疡,糖尿病相关的创伤,烧伤,晒伤,老化皮肤创伤,角膜溃烂创伤,炎性胃肠道疾病创伤,肠炎性疾病创伤,克罗恩氏病创伤,溃疡性结肠炎,痔疮,大疱性表面松解症创伤,皮肤起疱创伤,牛皮癣创伤,subcorneal 皮炎创伤,动物皮肤创伤,动物糖尿病创伤,视网膜病创伤,口腔创伤(粘膜炎症),阴道粘膜炎症创伤,牙龈病创伤,裂伤(laceration),手术切口创伤和手术后粘连创伤(adhesion wound)。

[0044] 根据所述的优选实施方案的其它特征,所述溃疡是糖尿病性溃疡,褥疮,静脉性溃疡,胃溃疡和 HIV 相关溃疡。

[0045] 根据所述的优选实施方案的其它特征,所述胰岛素是重组的。

[0046] 根据所述的优选实施方案的其它特征,所述胰岛素是天然来源的。

[0047] 根据所述的优选实施方案的其它特征,所述其它试剂是血小板衍生的生长因子。

[0048] 根据所述的优选实施方案的其它特征,所述其它试剂是 PKC- α 抑制剂。

[0049] 根据所述的优选实施方案的其它特征,给药是单次施用。

[0050] 根据所述的优选实施方案的其它特征,所述陈旧皮肤创伤是至少 2 天龄(2day old)的。

[0051] 根据所述的优选实施方案的其它特征,所述胰岛素浓度为 0.1 μ M 到 10 μ M。根据所述的优选实施方案的其它特征,胰岛素的剂量单位是在 0.01-0.2ml 的药物组合物中的 0.001 到 5nM。

[0052] 根据所述的优选实施方案的其它特征,所述胰岛素的剂量为在 0.01-0.2ml 的药

物组合物中的 0.01 到 0.5nM。

[0053] 根据所述的优选实施方案的其它特征,所述药物组合物选自水溶液,凝胶,乳剂,糊剂,洗剂,喷雾,悬液,粉末,分散剂,油膏剂和软膏剂。

[0054] 根据所述的优选实施方案的其它特征,所述药物组合物含有固体支持物。

[0055] 根据所述的优选实施方案的其它特征,所述细胞被转化以产生和分泌胰岛素。

[0056] 根据所述的优选实施方案的其它特征,所述细胞被重组 PDX1 基因转化,从而使得所述细胞产生和分泌天然的胰岛素。

[0057] 根据所述的优选实施方案的其它特征,所述细胞被顺式作用元件序列转化,该序列整合到所述细胞的内源胰岛素基因的上游,从而所述细胞产生和分泌天然胰岛素。

[0058] 根据所述的优选实施方案的其它特征,所述胰岛素分泌细胞能够形成分泌颗粒。

[0059] 根据所述的优选实施方案的其它特征,所述胰岛素分泌细胞是内分泌细胞。

[0060] 根据所述的优选实施方案的其它特征,所述胰岛素分泌细胞是人源的。

[0061] 根据所述的优选实施方案的其它特征,所述胰岛素分泌细胞是组织相容性人化动物来源的。

[0062] 根据所述的优选实施方案的其它特征,所述胰岛素分泌细胞分泌人胰岛素。

[0063] 根据所述的优选实施方案的其它特征,所述胰岛素分泌细胞是自体细胞。

[0064] 根据所述的优选实施方案的其它特征,所述细胞选自成纤维细胞,上皮细胞和角质化细胞。

[0065] 根据所述的优选实施方案的其它特征,所述细胞被转化以产生蛋白激酶 C 转录激活剂,从而使得所述细胞产生天然的蛋白激酶 C。

[0066] 根据所述的优选实施方案的其它特征,所述细胞被顺式作用元件序列转化,该序列整合到所述细胞的内源蛋白激酶 C 的上游,从而使得所述细胞产生天然的蛋白激酶 C。

[0067] 根据所述的优选实施方案的其它特征,所述细胞被重组蛋白激酶 C 基因转化,从而使得所述细胞产生重组蛋白激酶 C。

[0068] 根据所述的优选实施方案的其它特征,所述蛋白激酶 C 选自 PKC- β 1, PKC- β 2, PKC- γ , PKC- θ , PKC- λ , 和 PKC- τ 。

[0069] 根据所述的优选实施方案的其它特征,所述蛋白激酶 C 选自 PKC- α , PKC- δ , PKC- ε , PKC- η 和 PKC- ζ 。

[0070] 根据所述的优选实施方案的其它特征,在适于局部施用的药物组合物中含有共聚物-1。

[0071] 根据所述的优选实施方案的其它特征,所述 PKC 同种型选自 PKC- α , PKC- β , PKC- δ , 和 PKC- ζ 。

[0072] 根据所述的优选实施方案的其它特征,所述激素是胰岛素。

[0073] 根据所述的优选实施方案的其它特征,所述生长因子选自 IL-6, KFG 和 TNF α 。

[0074] 根据所述的优选实施方案的其它特征,所述脂肪细胞激素是 adipsin 或脂联素(adiponectin)。

[0075] 本发明成功解决了现有的已知技术的缺点,提供了用于对抗损伤的皮肤或皮肤创伤的新的治疗方法。

附图说明

[0076] 本发明仅通过举例方式并参考所附的附图进行描述。现在具体参考附图的细节,应当指出所示出的细节仅仅是举例方式,用于对本发明的优选实施方案进行举例说明,而且是为了提供对本发明的原理和概念最有用的和最容易理解的描述。从这一点来说,除了对本发明有基本理解所必需的内容不会再对本发明进行更详细的结构性细节描述,对于附图的描述可使所属领域技术人员明了本发明的各种形式如何实施。

[0077] 在附图中:

[0078] 图 1 证明了使用重组腺病毒载体可有效过表达 PKC 同种型:左边:四天龄的原代角质化细胞用 β -gal 腺病毒感染 1 小时。感染后 48 小时,固定细胞,通过诱导蓝色反应定量确定 β -半乳糖苷酶蛋白的活化并与未感染的角质化细胞相比。右边:四天龄的原代角质化细胞用重组同种型特异性 PKC 腺病毒感染 1 小时。二十四小时后,提取感染培养物(Ad)和未感染对照培养物(C)的蛋白进行 Westernblot 分析,用下述实施例部分所述的同种型特异性抗-PKC 抗体分析样品。

[0079] 图 2 显示了苔藓虫素 1(bryostatin 1)对 PKC 的激活诱导过表达的 PKC 同种型的迁移。四天龄的原代角质化细胞用同种型特异性的重组 PKC 腺病毒感染 1 小时。感染后二十四小时,细胞不进行处理(C)或用苔藓虫素 1(B)刺激 30 分钟,然后分级。将蛋白样品进行 Westernblot,用同种型特异性抗-PKC 抗体分析。

[0080] 图 3 显示了过表达的 PKC 同种型的天然形式具有活性。四天龄的原代角质化细胞用同种型特异性重组 PKC 腺病毒感染 1 小时。感染后 18 个小时,将未感染的对照细胞(C)和 PKC 同种型过表达细胞(OE)的细胞裂解物用同种型特异性抗 PKC 抗体进行免疫沉淀反应。将免疫沉淀物用于进行 PKC 活性检测,如下述实施例部分所述。

[0081] 图 4 证明了过表达的特异性 PKC 同种型诱导原代角质化细胞中的明显的形态学改变。原代角质化细胞不进行处理(C)或者用重组 PKC α , δ , η , 或 ζ 腺病毒感染。二十四小时后,用亮场显微镜对培养物进行观察并拍照(x20)。

[0082] 图 5 显示了过表达的 PKC 同种型在被感染的原代角质化细胞中的清楚定位。将原代角质化细胞接种在层粘连蛋白 5(laminin 5)涂覆的玻璃载玻片上。培养物不进行处理或者用不同的重组 PKC 腺病毒感染。感染后二十四小时,固定细胞,洗涤并风干。用同种型特异性抗 PKC 抗体然后用 FITC 结合的二抗对培养物进行免疫荧光分析。用共聚焦显微镜对细胞进行扫描,对典型视野进行拍照。

[0083] 图 6 证明了 PKC 同种型特异性调节 $\alpha 6 \beta 4$ 整联蛋白的表达。五天龄的原代小鼠皮肤角质化细胞不进行处理或者用 PKC δ , PKC α , PKC η 或 PKC ζ 重组腺病毒感染。感染后四十八小时,用膜细胞组分进行 SDS-PAGE 电泳,转至硝酸纤维素滤膜上,用抗 $\alpha 6$ 和抗 $\beta 4$ 抗体进行免疫印迹并用 ECL 进行分析。

[0084] 图 7 显示了过表达的 PKC η 和 PKC δ 诱导角质化细胞的增殖。五天的原代小鼠皮肤角质化细胞不进行处理或者用 PKC δ , PKC α , PKC η 或 PKC ζ 重组腺病毒感染。感染后四十八小时,进行 1 小时的 ^3H -胸苷掺入以分析细胞增殖,如实验步骤中所述。结果表示为 cpm/培养皿,与 β -半乳糖苷酶感染的角质化细胞相比较。各个值表示为 3 次独立实验中三次重复测定值的平均值 $\pm$ 标准差。

[0085] 图 8 证明了 PKC 同种型的过表达对 $\alpha 6 \beta 4$ 整联蛋白的半桥粒定位的作用。原代

角质化细胞接种在层粘连蛋白5涂覆的玻璃载玻片上,将角质化细胞培养物在低 Ca^{2+} 的MEM中保持48小时。然后培养物不进行处理(A),或者被PKC α , PKC δ , PKC η 或PKC ζ 重组腺病毒感染(分别是B-E)。感染后二十四小时,用4%多聚甲醛固定角质化细胞,然后用0.2% Triton-X-100温和提取,用PBS洗涤并风干,如实验步骤中所述。用同种型特异性抗 α 6抗体然后用FITC结合的二抗对培养物进行免疫荧光分析,如实验步骤中所述。

[0086] 图9A-B显示了过表达的PKC δ 和PKC ζ 在体外诱导角质化细胞的分离(detachment)。(A)原代角质化细胞不进行处理(C)或者被重组PKC α , δ , η 或 ζ 腺病毒感染。感染后24小时和48小时分析细胞附着,提取细胞并且再次将它们接种到基质涂覆的培养皿上。细胞数目表示为附着细胞的蛋白浓度(mg/个培养皿)。(B)原代角质化细胞不进行处理(C)或者被重组PKC α , δ , η 或 ζ 腺病毒感染。感染后24小时收集培养基中的脱离的漂浮细胞,对细胞的分离进行分析。细胞数目表示为分离细胞的蛋白浓度(mg/个培养皿)。

[0087] 图10证明了在正在积极增殖的角质化细胞中表达PKC η 。原代角质化细胞接种(plate)在层粘连蛋白5涂覆的玻璃载玻片上。接种后四十八小时,将角质化细胞与BrdU溶液培育1小时,然后用抗PKC η (红色)和抗BrdU(绿色)抗体进行免疫荧光分析,如下述的实施例部分所述。用共聚焦显微镜对细胞进行扫描,对典型视野进行拍照。

[0088] 图11证明了PKC η 诱导,而PKC η 突变体减少角质化细胞增殖。原代皮肤角质化细胞被重组PKC η 腺病毒或PKC η 腺病毒的显性失活突变体(DNPKC η 或PKC DN η)感染1小时。感染后四十八小时,进行1小时的 ^3H -胸苷掺入以分析细胞增殖,如下述实施例部分所述。结果表示为cpm/个培养皿。对照是未感染的细胞。

[0089] 图12A-B证明了PKC η 和DNPKC η 的过表达特异调节PKC的定位和细胞形态。原代皮肤角质化细胞被重组PKC η 腺病毒或PKC η 腺病毒的显性失活突变体(PKC DN η)感染1小时。感染后四十八小时,固定角质化细胞并且(A)进行亮场照相(x20)以及(B)用PKC η 特异性抗体然后用FITC结合的二抗进行免疫荧光分析,如实验步骤中所述。对照为未感染的细胞。

[0090] 图13A-B显示了在增殖的角质化细胞中PKC η 表达的抑制诱导角质化细胞的分化。原代皮肤角质化细胞在低 Ca^{2+} 的培养基中保持增殖或者在0.12mM Ca^{2+} 的条件下分化24小时。然后,用重组PKC η 腺病毒或PKC η 腺病毒的显性失活突变体(PKC DN η)感染角质化细胞1小时。感染后二十四小时,将角质化细胞保持在低 Ca^{2+} 的培养基中或者转至含有0.12mM Ca^{2+} 的分化培养基中再保持24小时。感染后四十八小时,提取角质化细胞并用SDS-PAGE凝胶分析。用Western blotting分析PKC η (A)和角蛋白1(B)的表达。

[0091] 图14证明了在小鼠的切割创伤中,体内PKC η 的局部表达增加肉芽组织的形成并加速创伤愈合。在裸鼠背部造成7mm的整块皮肤的切口。在发生创伤后1天和4天局部施用对照 β -gal, PKC η 和PKC α 腺病毒悬液。将整块皮肤创伤固定在4%多聚甲醛中,用H&E染色以及亮场显微镜对皮肤切片进行组织学分析。E是表皮,D是真皮。

[0092] 图15证明了在增殖的角质化细胞中胰岛素,而不是IGF1特异地诱导PKC δ 的迁移。分离原代角质化细胞并接种,如下述实施例部分所述。在低 Ca^{2+} 的培养基(0.05mM)中保持增殖的角质化细胞5天,直至它们达到80%汇合。将细胞用 10^{-7}M 胰岛素(Ins)或 10^{-8}M IGF1(IGF)刺激15分钟。如上所述溶解细胞,用刺激过的或者未刺激过的对照(Cont)细胞

的 20 μ g 膜或细胞溶质提取物进行 SDS-PAGE 并转移。用针对每一个 PKC 同种型的特异性多克隆抗体对印迹进行探测。

[0093] 图 16 显示了是胰岛素而不是 IGF1 可诱导 PKC δ 的活性。为了确定 PKC δ 的活性, 将五天的角质化细胞培养物用 10^{-7} M 胰岛素 (Ins) 或 10^{-8} M IGF1 (IGF) 刺激指定的时间 (1, 15, 或 30 分钟)。用特异性抗 PKC δ 抗体从膜 (蓝色条, mem) 和细胞溶质 (紫色条, cyto) 组分中将 PKC δ 免疫沉淀出来。用体外激酶检测分析 PKC δ 免疫沉淀物的 PKC 活性, 如实验步骤中所述。每一条表示 3 次独立实验中 3 个测定值的平均值 $\pm$ SE。各个值表示为 pmol ATP/ 培养皿 / 分钟。

[0094] 图 17A-B 显示了胰岛素和 IGF1 对于角质化细胞增殖具有加和效果。增殖的角质化细胞在低 Ca^{2+} 的培养基 (0.05mM) 中保持 5 天直至它们达到 80% 汇合。(A) 五天的角质化细胞培养物用指定浓度的胰岛素或 IGF1 刺激 24 小时。(B) 同时, 将角质化细胞用 10^{-7} M 胰岛素 (Ins) 和剂量增加的 IGF1 (IGF) 刺激。在每个浓度, 右条 (条纹条) 表示将两个激素一起加入观察到的增殖。左条证明了 10^{-7} M 胰岛素 (红色条) 和浓度增加的 IGF1 (灰色条) 单独的效果。如实验步骤中所述检测胸苷的掺入。结果代表了六个实验的结果。每一条都是 3 次测定值的平均值 $\pm$ SE, 表示为高于对照的未刺激的角质化细胞的百分数。

[0095] 图 18A-B 证明了重组 PKC 腺病毒构建体的过表达。用含有野生型 PKC δ (WTPKC δ), 野生型 PKC α (WTPKC α), 或显性失活 PKC δ 突变体 (DNPKC δ) 的重组腺病毒构建体感染角质化细胞培养物。(A) 感染后将细胞培养 24 小时, 收集, 对 20 μ g 蛋白质提取物用特异性抗 PKC α 或抗 PKC δ 抗体进行 Western blotting 分析。印迹结果代表了 5 次独立实验的结果。(B) 感染后二十四个小时, 收集细胞, 用体外激酶检测分析 PKC α 或 PKC δ 免疫沉淀物。

[0096] 图 19 显示了 PKC 过表达对于胰岛素或 IGF1 诱导的增殖的作用。未感染的 (浅蓝条), 或过表达 WTPKC δ (深蓝条) 或 DNPKC δ (斜线蓝条) 的细胞用 10^{-7} M 胰岛素 (Ins), 10^{-8} M IGF1 (IGF) 或二者 (Ins+IGF) 处理 24 小时。如实验步骤中所述检测胸苷的掺入。每一条表示用单独的培养物进行的 3 次实验的 3 个测定值的平均值 $\pm$ SE。各个值表示为基于作为对照的每个实验中同一培养物的未刺激的角质化细胞的百分数。

[0097] 图 20 显示了 PKC δ 活性的抑制特异性消除胰岛素诱导的角质化细胞的增殖。如下述实施例部分所述培养原代角质化细胞。未感染的细胞或 DNPKC δ 感染的角质化细胞用下述浓度的生长因子刺激 24 小时: 10^{-7} M 胰岛素 (Ins), 10^{-8} M IGF1 (IGF), 10ng/ml EGF, 10ng/ml PDGF, 1ng/ml KGF 或 5ng/ml ECGF。如下述实施例部分所述检测胸苷的掺入。每一条都表示用单独的培养物进行的 3 次实验的 3 个测定值的平均值 $\pm$ SE。各个值表示为基于作为对照的每个实验中同一培养物的未刺激的角质化细胞的百分数。

[0098] 图 21 显示了过表达的 PKC δ 特异调节胰岛素诱导的角质化细胞增殖。原代角质化细胞如图 1 所述那样培养。未感染的细胞或用过表达的 WTPKC δ 感染的角质化细胞用下述浓度的生长因子刺激 24 小时: 10^{-7} M 胰岛素 (Ins), 10^{-8} M IGF1 (IGF), 10ng/ml EGF, 10ng/ml PDGF, 1ng/ml KGF 或 5ng/ml ECGF。如下述实施例部分所述检测胸苷的掺入。每一条都表示用单独的培养物进行的 3 次实验的 3 个测定值的平均值 $\pm$ SE。各个值表示为基于作为对照的每个实验中同一培养物的未刺激的角质化细胞的百分数。

[0099] 图 22A-B 证实了 PKC δ 和 PKC ζ 在体内皮肤创伤愈合过程中具有重要作用。使用

新开发的同种型特异性 PKC 无效小鼠的体内小鼠模型,对 PKC α , PKC δ 和 PKC ζ 无效小鼠和它们的野生型的同窝出生小鼠进行创伤愈合研究。麻醉小鼠并在小鼠背上通过穿刺活检造成直径 4mm 的皮肤。在进行一周的跟踪后取下小鼠皮肤,用破裂室方法对皮肤薄片进行创伤强度测试以确定皮肤创伤的愈合。其值表达为破裂压力,其代表在监测室内直至发生破裂的最大压力。结果为 12-20 小鼠的不同组的测定值。实验重复至少 3 次。

[0100] 图 23 确定了原代皮肤角质化细胞中 STAT3 和 PKC δ 之间的特异的相互作用。原代角质化细胞不进行处理(上)或者用同种型特异性重组 PKC 腺病毒感染 1 小时(下)。提取细胞用同种型特异性 PKC 抗体进行免疫沉淀(IP)。用抗 PKC 或抗 STAT3 抗体对免疫沉淀物进行 Western blot 分析。

[0101] 图 24 证明了 PKC δ 的活化对于胰岛素诱导的 STAT 3 的转录活化具有重要作用。将原代角质化细胞接种在玻璃载玻片上,在低 Ca^{++} (0.05mmol/l) 的培养基中保持 5 天直至它们达到 80% 汇合。细胞不进行处理(Cont, 上)或者用 5 μM Rottlerin 预处理 7 分钟(R, 下),然后用 10^{-7}M 胰岛素处理 5 分钟(Ins)。用甲醇固定细胞,洗涤并风干。用抗磷酸-Tyr-705-STAT3 抗体然后用 FITC 结合的二抗免疫荧光以分析培养物。用共聚焦显微镜扫描细胞。

[0102] 图 25 证明了过表达 DN PKC δ 抑制 PKC δ 和 STAT3 的过表达诱导的角质化细胞的增殖。原代角质化细胞用含有 β -Gal (作为对照), PKC δ , WT STAT3, DN STAT3 的重组腺病毒构建体感染 1 小时或用 DN PKC δ , 然后用 STAT3 进行双重感染。感染后 24 小时,进行 1 小时的 ^3H -胸苷掺入以分析细胞增殖。结果表示为 DPM/mg 蛋白质。每一条都是用同一培养物的平板(plate)进行的三次测定的平均值。

[0103] 图 26 证明了胰岛素施用的浓度和频率对于体内创伤愈合的作用。在 8-10 周龄的 C57BL 小鼠背部切出创伤切口,用 PBS (对照) 处理或者以不同浓度和频率进行胰岛素处理(也就是七天里每天重复施用相对于单独施用一次)。致创后七天将小鼠处死,检测处理的创伤部位。结果表示为 mm^2 创伤部位,每一条都是六次重复的平均值 $\pm$ 标准差 ($p < 0.005$)。

[0104] 图 27 证明了胰岛素施用的浓度和频率对于体内创伤愈合的组织学效果。在 8-10 周龄的 C 57BL 小鼠背部切出创伤切口,以不同浓度和频率进行胰岛素处理(也就是七天里每天重复施用相对于单独施用一次)。致创后七天制备组织学创伤切片,分析表皮和真皮的闭合(创伤收缩)。表皮的闭合用 Keratin 14(K14) 抗体染色(左)检测,如果创伤的整个裂口都是染色阳性,则视为阳性。如果真皮创伤的两边在光学显微镜下在 x100 的放大倍数下在一个视野中都能看见(右),则真皮的闭合视为阳性。结果表示为创伤闭合相对于对照的百分数,每一条都是六次重复的平均值。

[0105] 图 28 证明了胰岛素和血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF-BB) 组合使用对于体内创伤愈合的协同作用。在 8-10 周龄的 C57BL 小鼠背部切出创伤切口,用胰岛素,PDGF-BB,或组合使用胰岛素和 PDGF-BB 进行单次施用。致创后七天处死小鼠,取活组织进行表皮和真皮闭合(创伤收缩)的组织学分析。表皮的闭合用 Keratin 14(K14) 抗体染色(左)检测,如果创伤的整个裂口都是染色阳性,则视为阳性。如果真皮创伤的两边在光学显微镜下在 x100 的放大倍数下在一个视野中都能看见(右),则真皮的闭合视为阳性。结果表示为条形图,为创伤闭合相对于对照的百分数,每一条都是六次重复的平均值。

[0106] 图 29A-D 是示出胰岛素和 PKC α 抑制剂组合使用对体内创伤愈合的形态学作用的照片。在 8-10 周龄的 C57BL 小鼠背部切出创伤切口,不进行处理(对照)或用胰岛素(HO/01)和 PKC α 抑制剂(HO/02)组合处理。致创后 7 天除下皮肤活组织进行形态学观察。图 29A-B 显示了对照创伤,图 29C-D 显示了处理的创伤。

[0107] 图 30 是示出胰岛素和 PKC α 抑制剂组合使用对真皮闭合(创伤收缩)的作用的组织显微照片。在 8-10 周龄的 C57BL 小鼠背部切出创伤切口,不进行处理(对照)或用胰岛素(HO/01)和 PKC α 抑制剂(HO/02)组合起来每天处理。致创后七天处死处理的小鼠。制作组织学创伤切片并在光学显微镜下观察。如果真皮创伤的两边在 $\times 100$ 的放大倍数下在一个视野中都能看见,则真皮的闭合视为阳性。未处理的对照切片(左)的张开的创伤区域太大不能容纳于一个 $\times 100$ 放大的视野中,而处理的创伤切片(右)表现出真皮闭合阳性。黄色斑点线标出了真皮的边缘。

[0108] 图 31 是示出胰岛素和 PKC α 抑制剂组合使用对表皮闭合的作用的组织显微照片。在 8-10 周龄的 C57BL 小鼠背部切出创伤切口,不进行处理或用胰岛素(HO/01)和 PKC α 抑制剂(HO/02)组合起来每天处理。致创后七天处死处理的小鼠。制备创伤的组织切片,用角蛋白 14(指示基底角质化细胞)染色,在光学显微镜下观察。未处理的对照切片(左)中的张开的创伤区域(箭头标出)太大不能容纳于一个 $\times 100$ 放大的视野中,而处理的创伤切片(右)整个裂口表现出表皮闭合。

[0109] 图 32 是示出胰岛素和 PKC α 抑制剂组合使用对表皮细胞空间分化的作用的组织显微照片。致创小鼠(C57BL, 8-10 周龄)用胰岛素(HO/01)和 PKC α 抑制剂(HO/02)组合起来每天局部施用进行处理。致创后七天处死处理的小鼠。制备创伤的组织切片,用突出显示细胞空间分化的初始阶段的 keratin 1(K1) 抗体染色。未处理的对照切片(左)表现出大的未分化的创伤区域(由箭头标出),而处理的创伤切片(右)中则观察到大量的表皮重建。

[0110] 图 33 证明了胰岛素和 PKC α 抑制剂组合使用对体内创伤愈合的定量作用。致创小鼠(C57BL, 8-10 周龄)用胰岛素(HO/01)和 PKC α 抑制剂(HO/02)组合起来每天局部施用进行处理。致创后七天处死处理的小鼠。制备创伤的组织切片,进行真皮收缩,表皮闭合和空间分化的分析,如上述图 30-32 所述。条形图显示出了通过组织学分析得出的每一个处理组中完全愈合的创伤的发生率(百分数)。

[0111] 图 34A-G 是真皮细胞中 PKC α 的表达和 / 或活性的抑制和另一种 PKC 同种型的表达和 / 或活性的调节,或者给真皮细胞施用激素对于体外皮肤创伤的闭合的组合效果的示例照片。将培养的原代皮肤成纤维细胞用显性失活(DN)的激酶失活的 PKC α 感染。二十四小时后实施刮擦,培养物不进行处理(图 34A),或者用野生型(WT)PKC δ (图 34B), PKC η (图 34C), WT PKC ζ (图 34D) 或 WT PKC ϵ (图 34E) 感染。另外,PKC α 抑制的培养物用 adipsin($2 \mu\text{g/ml}$; 图 34F) 或胰岛素($6.7 \times 10^{-7}\text{M}$; 图 34G) 处理。处理后 24 小时拍照。

[0112] 图 35A-H 是真皮细胞中 PKC α 的表达和 / 或活性的抑制和另一种 PKC 同种型的表达和 / 或活性的调节,或者给真皮细胞施用生长因子对于体外皮肤创伤的闭合的组合效果的示例照片。将培养的原代皮肤成纤维细胞用显性失活(DN)的激酶失活的 PKC α 感染。二十四小时后实施刮擦,培养物不进行处理(图 35A),或者用野生型(WT)PKC ϵ (图 35D), WT PKC ζ (图 35E) 或 WT PKC η (图 35F) 感染。或者,PKC α 抑制的培养物用 IL-6(每个培养皿

1 μ g ;图 35B), KGF (每个培养皿 1 μ g ;图 35C), PKC δ RACK (10^{-7} M ;图 35H) 或 TNF α (12 μ g/ml ;图 35G) 处理。处理后 24 小时拍照。

[0113] 图 36A-B 是真皮细胞中 PKC ζ 的表达和 / 或活性的抑制, 和给真皮细胞施用生长因子对于体外皮肤创伤的闭合的组合效果的示例照片。将培养的原代皮肤成纤维细胞用显性失活 (DN) 的激酶失活的 PKC ζ (DN ζ) 感染。二十四小时后实施刮擦, 培养物不进行处理 (图 36A), 或者用 KGF (每个培养皿 1 μ g ;图 36B) 处理。处理后 24 小时拍照。

[0114] 图 37A-D 是真皮细胞中 PKC ζ 的表达和 / 或活性的抑制, 和给真皮细胞施用生长因子或激素对于体外皮肤创伤的闭合的组合效果的示例照片。将培养的原代皮肤角质化细胞用显性失活 (DN) 的激酶失活的 PKC ζ (DN ζ) 感染。二十四小时后实施刮擦, 培养物不进行处理 (图 37A), 或者用 IL-6 (每个培养皿 1 μ g ;图 37B), TNF α (12 μ g/ml ;图 37C) 或 adiponectin (每个培养皿 1 μ g ;图 37D) 处理。处理后 24 小时拍照。

[0115] 图 38A-E 是真皮细胞中 PKC β 的表达和 / 或活性的抑制, 和给真皮细胞施用生长因子, 胰岛素或 GW9662 对于体外皮肤创伤的闭合的组合效果的示例照片。将培养的原代皮肤成纤维细胞用显性失活 (DN) 的激酶失活形式的 PKC β (DN β) 感染。二十四小时后实施刮擦, 培养物不进行处理 (图 38A), 或者用 KGF (每个培养 1 μ g ;图 38B), IL-6 (每个培养 1 μ g ;图 38C), 胰岛素 (6.7×10^{-7} M ;图 38D) 或 GW9662 (每个培养皿 1 μ g ;图 38E) 处理。处理后 24 小时拍照。

[0116] 图 39A-E 是真皮细胞中 PKC δ 的表达和 / 或活性的抑制和另一种 PKC 同种型的表达和 / 或活性的调节, 或者给真皮细胞施用激素对于体外皮肤创伤的闭合的组合效果的示例照片。将培养的原代皮肤角质化细胞用野生型 (WT) 的激酶形式的 PKC δ (DN δ) 感染。二十四小时后实施刮擦, 培养物不进行处理 (图 39A), 或者用 WT PKC ζ (PKC ζ ;图 39B), WT PKC ϵ (PKC ϵ ;图 39C) 或 DN PKC α (PKC α ;图 39D) 感染。或者, PKC δ 提高的培养物用 adipsin (2 μ g/ml ;图 39E) 处理。处理后 48 小时拍照。

[0117] 图 40A-F 是施用共聚物 -1, 胰岛素, PKC α 伪底物, 或其组合对于体外皮肤创伤闭合的效果的示例照片。培养的原代皮肤角质化细胞不进行处理 (图 40A), 或者仅用胰岛素 (6.7×10^{-7} M ;图 40B), 仅用共聚物 -1 (55 μ g / 培养皿 ;图 40C), 胰岛素和 PKC α 伪底物的混合物 (分别为 6.7×10^{-7} M 和 10^{-7} M ;图 40D), 共聚物 -1 和胰岛素的混合物 (分别为 55 μ g / 培养皿和 6.7×10^{-7} M ;图 40E), 或共聚物 -1, 胰岛素和 PKC α 伪底物的混合物 (分别为 55 μ g / 培养皿, 6.7×10^{-7} M 和 10^{-7} M ;图 40F) 处理。处理后 48 小时拍照。

[0118] 图 41A-D 是共聚物 -1, 胰岛素, PKC α 伪底物, 或其组合对于体内创伤愈合的效果的示例照片。致创小鼠不进行处理 (图 41A) 或在 4 天里每天局部施用共聚物 -1 (55 μ g/ml ;图 41B), 共聚物 -1 和胰岛素的混合物 (分别为 55 μ g/ml 和 1 μ M ;图 41C), 或共聚物 -1, 胰岛素和 PKC α 伪底物的混合物 (分别为 55 μ g/ml, 1 μ M 和 1 μ M ;图 41D)。致创后 4 天拍照。

[0119] 图 42A-H 是接近创伤裂口的胸腺对于创伤愈合过程的效果的示例的组织显微照片。图 42A-B 显示了正常的成年啮齿动物的胸腺的 200 倍 (x200) 放大图。图 42C 显示了 7 天龄创伤的 40 倍 (x40) 放大图, 在离创伤裂口非常接近的地方观察到胸腺 (红色正方形, 放大 200 倍, 图 42D)。创伤重新形成上皮, 形成肉芽组织, 真皮正在进行收缩。图 42E-F 显示了放大 40 倍 (图 42E) 和 200 倍 (图 42F) 的 STZ 糖尿病小鼠的 9 天龄创伤, 在创伤裂口

附近没有观察到胸腺,没有观察到重新形成上皮,肉芽组织,或真皮收缩。图 42G 显示了放大 40 倍的 STZ 糖尿病小鼠的 9 天龄创伤。将创伤用胰岛素和 PKC α 伪底物的混合物处理。在创伤裂口附近观察到胸腺(红色正方形,放大 20 倍,图 42H)。创伤重新形成上皮,形成肉芽组织,真皮正在进行收缩。

[0120] 图 43 是胰岛素和 PKC α 抑制剂组合使用对创伤和损伤皮肤愈合的作用的示例照片。在 Large Whites & Landrace 家养猪的背部形成纵向创伤切口,在 15 天中每天用 PBS(对照)或 1 μ M 胰岛素和 1 μ M PKC α 伪底物(H0/03/03)的混合物处理。致创后 30 天对创伤拍照。与缓冲液对照相比,H0/03/03 处理的创伤完全愈合,没有疤痕形成,显著增加了皮肤的美感。

具体实施方式

[0121] 本发明是用于调节丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,也称为 PKC 的表达和/或活化,以诱导和/或加速细胞增殖和/或细胞分化,从而加速创伤的愈合过程的方法和药物组合物。根据本发明的教导,这种表达的调节可以通过下述作用实现:(i) 用 PKC 表达构建体转化创伤细胞;(ii) 用顺式作用元件转化创伤细胞,该元件将被插入到创伤细胞内源 PKC 基因上游邻近位置;(iii) 施用胰岛素和其它能与胰岛素协同作用的试剂以调节创伤细胞中 PKC 的表达和/或活化;(iv) 用胰岛素表达构建体转化创伤细胞,其产生的表达的和分泌的胰岛素可作为 PKC 的表达和/或活化的上调剂;(v) 用顺式作用元件转化创伤细胞,该元件将被插入到创伤细胞内源胰岛素基因上游邻近位置,其产生的表达的和分泌的胰岛素可作为 PKC 的表达和/或活化的上调剂;(vi) 向创伤中植入胰岛素分泌细胞;(vii) 用反式作用因子,例如 PDX1 转化创伤细胞,以诱导内源胰岛素的产生和分泌,胰岛素可作为 PKC 的表达和/或活化的上调剂;以及(viii) 给创伤施用 PKC 调节剂。

[0122] 参考附图以及说明书可更好地理解本发明所述方法和药物组合物的原理和操作。

[0123] 在详细描述本发明的至少一个实施方案之前,应当理解本发明不限于下述说明书中或实施例部分例示的具体的组分组成或排列。本发明能够以其它实施方案或者以不同的方式实施。而且,应当理解本文所使用的措辞和术语仅是为了描述使用,而不应当视为是限制。

[0124] 成年人皮肤包括两层:角质化的成层的表皮层和在下面的厚层的富含胶原的真皮层结缔组织,提供支持和营养。皮肤作为保护屏障抵御外界。因此任何皮肤的损伤或破裂都必须被快速有效地修复。如上述背景技术部分所述,修复的第一个阶段是通过形成血液凝块堵住最初的创伤来实现的。然后炎性细胞,成纤维细胞和毛细血管侵入血液凝块形成肉芽组织。后续阶段包括创伤的上皮重建,其中基底角质化细胞必须失去与半桥粒的连接,角质化细胞迁移到肉芽组织上,覆盖住创伤。角质化细胞迁移以后,角质化细胞加速增殖,其容许代替在损伤中损失的细胞。在创伤被单层的角质化细胞覆盖之后,形成新成层的表皮,重建新的基底膜(20-23)。已证明几种生长因子参与该过程,包括生长因子的 EGF 家族, KGF, PDGF 和 TGF β 1(22-24)。在这些生长因子中,EGF 和 KGF 与表皮角质化细胞的增殖和迁移的调节密切相关(25,26)。对于了解创伤愈合生物学而言很重要的是了解触发创伤中的细胞迁移、增殖、并在创伤裂口上铺放新的基质的信号。

[0125] 为了便于理解下面公开的发明,如下述定义多个术语。

[0126] 术语“创伤 (wound)”泛指通过多种方式 (例如长时间卧床休息造成的褥疮, 外伤导致的创伤, 切口, 溃疡, 烧伤等) 中的任意一种导致的皮肤和皮下组织的损伤, 其特征各不相同。创伤根据创伤的深度典型地可分为四个等级中的一种: (i) I 级: 创伤只限于上皮; (ii) II 级: 创伤延伸到真皮; (iii) III 级: 创伤延伸到皮下组织; (iv) IV 级 (或全厚度创伤): 暴露出骨头的创伤 (例如骨头突出的压力点 (bony pressure point) 例如较大的转节或骶骨)。

[0127] 术语“部分厚度创伤”指包括 I-III 级的创伤; 部分厚度创伤的实例包括烧伤, 褥疮, 静脉淤滞溃疡, 和糖尿病溃疡。

[0128] 术语“深度创伤”包括 III 级和 IV 级创伤。

[0129] 术语创伤“愈合”指例如通过形成疤痕修复创伤的过程。

[0130] 短语“诱导或加速皮肤创伤的愈合过程”指诱导创伤收缩的肉芽组织形成和 / 或诱导上皮形成 (也就是在上皮生成新细胞)。创伤愈合可方便地通过减小的创伤面积检测。

[0131] 本发明考虑了治疗所有的创伤类型, 包括深度创伤和慢性创伤。

[0132] 术语“慢性创伤”指在三十天内没有愈合的创伤。

[0133] 短语“转化细胞”指通过引入外源核酸暂时或永久地改变细胞的核酸, 所述外源核酸整合到细胞基因组中, 从遗传上改变所述细胞, 或者保持未整合状态。

[0134] 本文所用的术语“顺式作用元件”是指作为 DNA 结合蛋白的附着位点的基因区域 (例如增强子, 操纵子 (operator) 和启动子), 从而影响同一个染色体上一个或多个基因的活性。

[0135] 本文所用的短语“反式作用因子”是指与顺式作用元件结合并调节其有关基因表达的活性的因子。例如, PDX1 是与胰岛素基因启动子结合并调节其活性的反式作用因子。

[0136] 本文所用的短语“转录活化剂”是指能增加基因表达的因子。反式作用因子是直接转录活化剂的实例。

[0137] 本文所用的术语“活化剂”是指增强活性的分子。

[0138] 本文所用的短语“被调节的表达和 / 或活化”是指增强的或抑制的表达和 / 或活化。

[0139] PKC 是一条主要的信号传导途径, 其可以调节角质化细胞的增殖和分化。PKC 同种型 α , δ , ϵ , η 和 ζ 在皮肤中表达 (4,10)。在构思本发明时, 设想 PKC 表达和 / 或活化的调节可以诱导细胞增殖和 / 或细胞分化, 从而加速创伤的愈合过程。当实施本发明的时候大量实验证明了这个理论, 表明 PKC 表达和 / 或活化的调节确实诱导细胞增殖和细胞分化并加速创伤的愈合过程。在进一步的具体描述中, 采用了多种不同的方法调节 PKC 的表达和 / 或活化, 从而加速了创伤的愈合过程。基于这些实验发现, 设计了其它方法。当实施本发明的时候发现了一个引人注目的新现象 - 胰岛素可作为 PKC 表达和 / 或活化的调节剂。因此, 胰岛素可作为调节 PKC 表达和 / 或活化的治疗剂以加速创伤的愈合过程。

[0140] 不同的 PKC 同种型的特征以及它们对于细胞增殖和 / 或分化的效果对于皮肤创伤愈合生物学是非常重要的。使用 PKC 腺病毒构建体能够鉴别各种 PKC 同种型对于体外和体内创伤愈合过程的特定作用。所有同种型都能够特定地影响角质化细胞生长和分化的不同方面。两个同种型, PKC δ 和 PKC ζ 能够特定地调节整联蛋白的调控 (参见下述实施例 6), 与基底膜的附着 (参见下述实施例 9) 和半桥粒的形成 (参见下述实施例 8)。发现两种同

种型, PKC δ 和 PKC η 调节表皮角质化细胞的增殖潜力 (参见下述实施例 7 和 11)。另外, PKC η 的显性失活同种型 (DNPKC η) 特别能够在积极增殖的角质化细胞中诱导分化 (参见下述实施例 12)。最后, 还在体内系统中证实了不同 PKC 同种型对于皮肤创伤愈合过程的作用。使用其中不同 PKC 同种型的表达被破坏的 PKC 无效的小鼠, 本文显示了皮肤角质化细胞的附着和迁移过程所必需的 PKC δ 和 PKC ζ 对于动物模型中体内创伤愈合过程也是很重要的。(参见实施例 19)。PKC 无效的皮肤的整个皮肤的全厚度活组织检查表明 PKC δ 和 PKC ζ 而不是 PKC α 对于创伤的正确愈合是必需的。而且, 下述实施例 22 显示了 PKC α 抑制剂有效促进体内创伤愈合, 因而表明 PKC α 同种型可能对创伤愈合具有拮抗作用。

[0141] PKC η 具有独特的组织分布。它主要在上皮组织中表达 (27, 28)。原位杂交研究和免疫组织化学研究证明 PKC η 在正在分化的和分化的 (differentiating and differentiative) 层中高度表达 (27)。本文的结果表明根据细胞生理学 PKC η 可作为皮肤增殖和分化的功能性调节剂。当角质化细胞在低 Ca^{2+} 条件下维持在增殖状态的时候, PKC η 诱导增殖的速度为对照角质化细胞的五到七倍。但是, 当通过增加 Ca^{2+} 浓度诱导细胞分化的时候, 与对照细胞相比分化以更快和更高的速度被诱导 (参见实施例 12)。这可以解释 PKC η 显著诱导创伤愈合以及肉芽组织形成的能力, 因为增殖能力和分化层形成都实现了。有趣的是, 体内创伤愈合结果和 PKC η 在胚胎组织中的表达, 其通常在成年期不以高水平表达 PKC η , 表明 PKC η 在其它组织的增殖和组织结构中可能具有作用。这包括神经以及真皮和肌肉组织, 它们可在创伤的肉芽组织中有效愈合。而且, 通过使用显性失活 (dominantnegative) 突变体在积极增殖的细胞中特别调节角质化细胞的分化和诱导正常分化的能力使得特别可以操纵分化并控制创伤愈合过程中的过度增殖失调。

[0142] 本文举例说明了在裸鼠背部产生的创伤上, PKC η 的愈合能力是体内施加的。下述实施例 14 表明在局部感染后四天, 对创伤施用 PKC η 表达构建体导致肉芽组织的形成。

[0143] 总的来说, 本文的结果证明了调节不同 PKC 同种型的表达和 / 或活化 (膜迁移) 是对抗创伤的有效工具。相应地, 可以通过增加同种型 PKC δ , PKC η 和 PKC ζ 的表达和 / 或活性, 或者通过抑制同种型 PKC α 的表达和 / 或活性促进创伤愈合。

[0144] 因此, 根据本发明的一个方面, 提供了一种诱导或加速皮肤创伤或损伤的愈合过程的方法, 所述方法通过给皮肤创伤施用治疗有效量的至少一种调节 PKC 表达和 / 或活化的试剂来实现。根据本发明的该方面, 用于实施该方法的药物组合物因此包括作为活性成分的治疗有效量的至少一种用于调节 PKC 表达和 / 或活化的试剂; 和药学可接受的载体。

[0145] 本文所用的短语“皮肤创伤”是指任何类型的上皮创伤, 包括但不限于溃疡, 例如糖尿病性溃疡, 褥疮, 静脉溃疡, 胃溃疡和 HI V 相关溃疡, 糖尿病相关的创伤, 烧伤, 晒伤, 老化皮肤创伤, 角膜溃疡创伤, 炎性胃肠道疾病创伤, 肠炎性疾病创伤, 克罗恩氏病创伤, 溃疡性结肠炎, 痔疮, 大疱性表面松解症创伤, 皮肤起疱创伤, 牛皮癣创伤, 动物皮肤创伤, 动物糖尿病创伤, 视网膜病创伤, 口腔创伤 (粘膜炎), 阴道粘膜炎创伤, 牙龈病创伤, 裂伤, 手术切口创伤和手术后粘连创伤 (adhesion wound)。

[0146] 本文所用的短语“皮肤损伤”是指任何类型的皮肤损伤或状况例如, 皱纹 (例如紫外线照射导致的皱纹), 皮肤纹, 裂缝, 肿块, 大毛孔 (例如与附件结构如汗腺管, 皮脂腺, 或毛囊相关的), 或不平或粗糙, 皮肤失去弹性 (功能性皮肤弹性蛋白丧失和 / 或失活), 下垂 (包括眼部和下颌浮肿), 皮肤硬度 (firmness) 丧失, 皮肤紧实度丧失, 皮肤变形后的回复

能力丧失,变色(包括黑眼圈),斑疱,肤色灰黄,色素过量皮肤区域例如老年斑和雀斑,角质物,异常的分化,过度角质化,弹性组织变性,胶原蛋白的破坏,以及皮肤角质,真皮,表皮层,皮肤血管系统(例如毛细血管扩张或多叉血管),以及皮下组织,特别是靠近皮肤的皮下组织中的其它组织变化。

[0147] 皮肤不被认为是典型的胰岛素反应性组织。因此胰岛素在皮肤中的效果主要归于它激活紧密相关的 IGF1 的能力。已表明在角质化细胞中,胰岛素和 IGF1 可以刺激受体,激活类似的下效应子 (34)。但是,本发明证明了虽然这两个生长因子都能以剂量依赖的方式诱导角质化细胞增殖,但是每种激素都是以不同的信号传导途径发挥作用。最初指出的胰岛素和 IGF1 对角质化细胞增殖的不同的调节由以下发现证实:这些激素以每种激素的最大增殖诱导浓度一起加入的时候对于角质化细胞增殖具有加和作用(参见实施例 15)。为了鉴别胰岛素和 IGF1 信号传导途径在角质化细胞增殖的调控上的不同点,检测了已知的可以调节角质化细胞增殖并且作为胰岛素信号传导下游效应子的元件。这些研究表明在角质化细胞的增殖中胰岛素信号传导特别受到 PKC δ 的调节(参见实施例 17)。在 PKC 蛋白家族中 PKC δ 是一种独特的同种型,特别参与各种细胞类型的生长和成熟 (35)。但是,虽然 PKC δ 被证明特别受到几种生长因子包括 EGF,血小板衍生生长因子和神经递质的刺激的调节,但是它的生理学作用已表明是参与了细胞生长包括细胞凋亡、分化和细胞循环延迟或停止的生长因子抑制 (36-41)。近来表明在培养的小鼠角质化细胞中在升高 Ca^{2+} 浓度之后 12-24 小时内, $\alpha 6 \beta 4$ 整联蛋白复合体的选择性丧失与 K1 的诱导互相关联 (6)。 $\alpha 6 \beta 4$ 蛋白表达的丧失是转录和翻译后事件,包括对 $\alpha 6$ 和 $\beta 4$ 链的处理的增加,导致的。在初步的研究中在 PKC 的活化和 $\alpha 6 \beta 4$ 整联蛋白的调节和调节之间建立起了联系。这些结果与有关 PKC δ 以及 PKC ζ 对于 $\alpha 6 \beta 4$ 表达的丧失和诱导角质化细胞的分离的半桥粒形成的作用的以前的结果是一致的。然而,本发明发现了 PKC δ 的另一个作用,就是作为胰岛素诱导的角质化细胞增殖的靶。下述实施例表明只有胰岛素的刺激,而不是多种生长因子,包括但不限于 EGF, KGF, PDGF, ECGF 和 IGF1,能够使 PKC δ ,而不是皮肤中表达的任何其它 PKC 同种型迁移并使其活化。当 EGF, KGF, PDGF, ECGF 和 IGF1 的促有丝分裂刺激没有被 PKC δ 的显性失活突变体阻断的时候,PKC δ 对胰岛素刺激的重要性进一步得到证实,在角质化细胞增殖的调节中胰岛素似乎是这种 PKC 同种型的主要活化剂(参见实施例 17)。但是,当角质化细胞被 WT PKC δ 角质化细胞感染的时候,EGF 和 KGF 的促有丝分裂刺激增加。这表明 PKC δ 的活化对于通过上游信号传导途径对其它生长因子的增殖性刺激也是必需的。而且,鉴定了下游元件,其在胰岛素诱导的 PKC δ 活化和角质化细胞增殖中起调节作用,而且鉴定了 STAT3,一种参与此过程的转录活化剂。STAT(信号传导和转录激活子)蛋白是一个转录因子家族,包括多种细胞因子和生长因子。在七个已知的 STAT 家族成员中,STAT3 是独特的。靶定破坏 STAT3 而不是其它 STAT 家族成员导致早期胚胎致死。特别地,当在皮肤中有条件地去除 STAT3 的时候,皮肤的重建被严重破坏。一旦被激活,STAT 蛋白形成同源二聚体或异源二聚体,迁移到细胞核中,与靶基因的 DNA 反应元件结合以诱导转录。发现在角质化细胞中,PKC δ 而不是皮肤中表达的其它 PKC 同种型(PKC α , ζ , η 和 ϵ)与 STAT3 组成型相关(参见实施例 18)。而且,胰岛素通过对 PKC δ 的特异性激活调节 STAT 3 的磷酸化,活化和核迁移。通过药物抑制剂,卡马拉素或者过表达显性失活 PKC δ 突变体导致的对 PKC δ 活性的抑制会阻断胰岛素诱导的 STAT3 活化和核移位。最终,显性失活 PKC δ 突变

体的过表达会抑制 STAT3 的过表达诱导的角质化细胞增殖（参见实施例 18）。这些结果表明在皮肤角质化细胞增殖中胰岛素诱导的 PKC δ 活性对于 STAT 3 的转录激活的作用。由于 STAT3 对于皮肤重建非常重要，是多种细胞因子和生长因子的下游效应子，全部这些结果表明 PKC δ 的活化是通过多种皮肤生长因子介导角质化细胞增殖的主要下游元件。特别地，PKC δ 是糖尿病病人的缺陷性创伤愈合的发病机理的主要候选物。PKC δ 和创伤愈合之间的联系也在体内得到了确证。使用新构建的 PKC δ 无效小鼠，本文表明了缺少 PKC δ 会延迟小鼠皮肤的创伤愈合（参见实施例 19）。在几种其它系统中也确定了 PKC δ 和胰岛素信号传导之间的联系。例如，最近表明在肌肉培养物中，PKC δ 调节胰岛素诱导的葡萄糖转运（42, 43）。类似地，在过表达胰岛素受体的细胞中，表明胰岛素刺激与 PKC δ 的活化有关（44-46）。但是，虽然在这些研究中胰岛素介导的 PKC δ 的活化与胰岛素的代谢效果有关，这是第一个将 PKC δ 与胰岛素介导的细胞增殖联系起来的报道。鉴别了 PKC δ 在角质化细胞的增殖和早期分化阶段的控制中起的双重作用，其中在所述早期分化阶段中，细胞丧失了与下面的基底膜之间的附着。这表明胰岛素诱导的 PKC δ 作为调节皮肤的增殖与分化之间的生理平衡的主要候选者。

[0148] 因此，根据本发明的教导，通过使创伤细胞接触胰岛素来调节 PKC 表达和 / 或活化。这可以通过多种方式实现，如下述的进一步例示。

[0149] 一种方式是直接将胰岛素给予创伤。如下述实施例 21 和 22 所述，以 0.1-10 μ M 的浓度对创伤局部施用胰岛素有效促进表皮和真皮闭合以及随后的创伤愈合。然而，令人惊讶的和出乎意料的是，胰岛素和 PDGF-BB 生长因子，或者和 PKC α 抑制剂组合施用比单独施用胰岛素对创伤愈合过程产生了显著的和协同性的促进。

[0150] 因此，根据本发明的另一个方面，提供了一种诱导或加速皮肤创伤或损伤的愈合过程的方法。所述方法通过给皮肤创伤施用治疗有效量的胰岛素和至少一种与胰岛素协同作用的其它试剂来实现，以诱导或加速皮肤创伤或损伤的愈合过程。优选地，所述试剂是 PKC α 抑制剂。进一步优选地，所述试剂是生长因子例如 PDGF, EGF, TGF β , KGF, ECGF 或 IGF1, 最优选地所述试剂是 PDGF-BB。

[0151] 胰岛素的直接给药，或者单独给药或者与另一种试剂组合给药，可以通过单次或重复应用来实现。在实施本发明的时候，发明人惊讶地发现以 1 μ M 的浓度单次施用胰岛素对于创伤愈合比以类似浓度进行七次的每天重复给药显著更有效（参见下述实施例 20）。

[0152] 因此，根据本发明的另一个方面，提供了一种诱导或加速皮肤创伤或损伤的愈合过程的方法，包括给皮肤创伤施用单一剂量单位的治疗有效量的胰岛素。优选所述单一剂量单位包括 0.001 到 5nM, 优选 0.01 到 0.5nM 胰岛素的，例如，水溶液，凝胶，霜剂，糊剂，洗剂，喷雾，悬液，粉末，分散剂，油膏剂或软膏剂制剂，其量足以覆盖 1cm 面积的皮肤创伤，例如 0.01-0.2ml。

[0153] 将胰岛素施用在创伤上的时间安排可能很重要，如下述实施例部分中的实施例 20 中所述。例如对 4 天的创伤单次施用胰岛素产生有效的创伤愈合。因此，根据本发明的另一个方面，提供了一种诱导或加速陈旧皮肤创伤的愈合过程的方法，包括给皮肤创伤施用单一剂量的治疗有效量的胰岛素。

[0154] 本文所用的短语“陈旧皮肤创伤”是指至少一天的，至少两天的，至少三天的，优选至少四天的皮肤创伤。

[0155] 根据本发明的另一个方面,用于诱导或加速皮肤创伤或损伤的愈合过程的药物组合物包括,作为活性成分的,治疗有效量的胰岛素,至少一种与胰岛素协同作用的其它试剂,以及设计用于药物组合物的局部应用的药学可接受的载体。优选地,所述试剂是 PKC α 抑制剂或生长因子例如 PDGF, EGF, TGF β , KGF, ECGF 或 IGF1, 最优选是 PDGF-BB。药学可接受的载体可以是但不限于凝胶,霜剂 (cream), 糊剂,洗剂,喷雾,悬液,粉末,分散剂,油膏剂 (salve) 和软膏剂,下文将进一步详细描述。还可以使用固体支持物以对创伤延长释放胰岛素。应当理解所述胰岛素可以是天然的或者优选是重组的,可以是人源的或是任何其它合适来源的。

[0156] 根据本发明的另一个方面,用于诱导或加速皮肤创伤或损伤的愈合过程的药物组合物可以包括所选择的能够诱导或加速皮肤创伤或损伤的愈合过程的单一剂量单位的胰岛素,以及设计用于药物组合物的局部施用的药学可接受的载体。优选地,所述单一剂量单位的胰岛素是在 0.01-0.2ml 制剂的剂量单位中的 0.001 到 5nM, 优选 0.01 到 0.5nM。

[0157] 在本发明的另一个实施方案中,将表达和分泌胰岛素的细胞植入创伤,以诱导或加速皮肤创伤或损伤的愈合过程。这种能产生胰岛素的细胞可以是天然产生胰岛素的细胞,或者可以是被转化以产生和分泌胰岛素的细胞。所述细胞可以用例如重组 PDX1 基因 (参见 GeneBankAccession No. AH005712, AF035260, AF035259) 转化,该基因是产生和分泌胰岛素的反式作用因子。或者,所述细胞可以通过基因敲入的方式用顺式作用元件序列转化,例如整合到所述细胞的内源胰岛素基因上游的强的组成型或诱导型启动子,以转化细胞以过度产生和分泌天然胰岛素。这是可以实现的,因为胰岛素基因的上游区域已经被克隆 (参见 Accession No. E00011, NM000207)。另外,所述细胞可以用重组胰岛素基因 (例如 Accession No. J02547) 转化,因此使得所述细胞产生和分泌重组胰岛素。

[0158] 因此根据本发明的该方面,用于诱导或加速皮肤创伤或损伤的愈合过程的药物组合物包括,作为活性成分的,胰岛素分泌细胞,以及设计用于药物组合物的局部施用的药学可接受的载体。有利的是,施用给创伤的胰岛素分泌细胞能形成分泌颗粒,因而分泌所产生的胰岛素。所述胰岛素分泌细胞可以是内分泌细胞。其可以是人源的或组织相容性人化的动物来源的。最优选地,所述胰岛素分泌细胞或者是转化的,或者是自体来源的。由所述胰岛素分泌细胞分泌的胰岛素优选是人胰岛素或者具有人胰岛素的氨基酸序列。所述胰岛素分泌细胞可以是成纤维细胞,上皮细胞或角质化细胞,前提是如上所述进行转化以使这些细胞产生和分泌胰岛素。

[0159] 在另一个实施方案中,皮肤创伤的细胞被转化以产生和分泌胰岛素,以诱导或加速皮肤创伤的愈合过程。

[0160] 因此根据本发明的该方面,用于诱导或加速皮肤创伤的愈合过程的药物组合物包括,作为活性成分的,设计用于转化皮肤创伤细胞以产生和分泌胰岛素的核酸构建体,以及设计用于药物组合物的局部施用的药学可接受的载体。

[0161] 上述的任何一种转化方法,例如用编码胰岛素的构建体转化,用含有将通过基因敲入的方式插入到内源胰岛素基因下游的顺式作用元件的构建体转化,以及用编码反式作用因子的构建体转化以激活内源胰岛素的产生和分泌,都可以用于本发明的实施方案中。

[0162] 由于生命期短,可能发生分化以及无法分离稳定的转化子,很难用传统方法将外源基因有效引入原代细胞,从而阻碍了以前对于不同 PKC 同种型对于皮肤的效果的研究。

为了克服这些障碍,使用病毒载体引入感兴趣的基因。对病毒基因组进行修饰得到复制缺陷型病毒形式的病毒载体。最广泛使用的病毒载体是逆转录病毒和腺病毒,它们可用于实验目的和基因治疗目的(13)。特别地,与逆转录载体相比,在不复制型细胞中腺病毒感染的高效率,病毒的高滴度和转导蛋白(transduced protein)的高表达使得该系统可非常有利地用于原代培养物。由于腺病毒不整合到宿主基因组中,稳定的病毒滴度可以成为复制缺陷型,因此该病毒构建体在人和动物模型中引起恶性肿瘤的危险最小(14)。至今为止,在皮肤中,已经成功使用腺病毒构建体在离体和体内方法中进行高效感染(15,16)。在本研究中使用由 I. Saito 和他的同事们开发的一种腺病毒载体(17)。粘粒盒(pAxCAt)具有几乎是全长的腺病毒 5 基因组,但是不含有 E1A, E1B 和 E3 区域,使得该病毒为复制缺陷型。它含有复合的 CAG 启动子,由巨细胞病毒立即早期增强子,小鸡 β -肌动蛋白启动子,和兔 β -球蛋白多聚腺苷酸化信号组成,可强烈诱导插入的 DNA 的表达(13,17)。感兴趣的基因插入到粘粒盒中,然后与腺病毒 DNA 末端蛋白复合体(TPC)一起共转染到人胚胎肾 293 细胞中。在表达 E1A 和 E1B 区域的 293 细胞中,在粘粒盒和腺病毒 DNA-TPC 之间发生重组,以传统方法的一百倍效率产生所需的重组病毒。这种高效率主要是由于使用腺病毒 DNA-TPC 代替了蛋白质(protein)DNA。而且,较长同源区域的存在增加了同源重组的效率。由于存在多个 EcoT221 位点,避免了复制型病毒的再生。应当注意,角质化细胞是用不同的 PKC 重组腺病毒感染的,证明 24 小时后有效过表达 PKC 同种型(参见实施例 1)。

[0163] 因此,根据本发明,另一种调节 PKC 表达和 / 或活化的方法是通过在皮肤创伤细胞中诱导 PKC 过表达。这可以通过用顺式作用元件序列转化细胞来实现,所述顺式作用元件序列通过同源重组整合到细胞内源蛋白激酶 C 的上游从而使所述细胞产生天然蛋白激酶 C。另外,这也可以通过用重组蛋白激酶 C 基因转化细胞实现,例如但不限于 PKC- β 1 基因 (Accession No. X06318, NM002738), PKC- β 2 基因 (Accession No. X07109), PKC- γ 基因 (Accession No. L28035), PKC- θ 基因 (Accession No. L07032), PKC- λ 基因 (Accession No. D28577), PKC- τ 基因 (Accession No. L18964), PKC- α 基因 (Accession No. X52479), PKC- δ 基因 (Accession No. L07860, L07861), PKC- ϵ 基因 (Accession No. X72974), PKC- η 基因 (Accession No. Z15108) 和 PKC- ζ 基因 (Accession No. Z15108, X72973, NM002744),从而使所述细胞产生重组蛋白激酶 C。

[0164] 根据本发明的该方面,用于诱导或加速皮肤创伤的愈合过程的药物组合物包括,作为活性成分的,设计用于转化皮肤创伤细胞以产生蛋白激酶 C 的核酸构建体,以及设计用于所述药物组合物局部施用的药学可接受的载体。

[0165] 根据本发明,另一种调节 PKC 表达和 / 或活化的方法是用 PKC 活化剂,例如但不限于 Ca^{2+} , 胰岛素或苔藓虫素 1 来实现的,以诱导或加速皮肤创伤的愈合过程。

[0166] 因此根据本发明的此方面,用于诱导或加速皮肤创伤或损伤的愈合过程的药物组合物包括,作为活性成分的,治疗有效量的 PKC 活化剂,以诱导或加速皮肤创伤或损伤的愈合过程,以及药学可接受的载体。

[0167] 根据本发明,另一种调节 PKC 表达和 / 或活化的方法是下调 PKC 同种型的表达和 / 或活性。

[0168] PKC 同种型的活性的下调可以使用 PKC 伪底物同种型抑制剂,例如 PKC α , PKC ζ 或 PKC η 伪底物抑制剂 (CalbioChem, California USA),或者另一种 PKC 同种型抑制剂例如药

用肽 LY379196 (Eli Lilly, USA)。

[0169] 或者, PKC 同种型的活性的下调可以用显性失活 (DN) PKC 腺病毒构建体来实现, 如下述实施例部分所述。

[0170] PKC 同种型的表达的下调可以使用小干扰 RNA (siRNA) 分子。RNA 干扰是一个两步过程。第一步, 定义为起始步骤, 可能是通过 Dicer, dsRNA 特异性核糖核酸酶的 RNase III 家族的成员的作用, 以依赖于 ATP 的方式处理 (切割) dsRNA (直接引入或通过转基因或病毒), 将输入的 dsRNA 消化为 21-23 个核苷酸 (nt) 的小干扰 RNA (siRNA)。后续切割将会将 RNA 降解为 19-21bp 的双链 (siRNA), 每个都有 2' - 核苷酸 3' 突出端 [Hutvagner and Zamore Curr. Opin. Genetics and Development 12 :225-232 (2002) ; 和 Bernstein Nature 409 :363-366 (2001)]。

[0171] 在效应步骤中, siRNA 双链与核酸酶复合体结合形成 RNA 诱导的沉默复合体 (RISC)。RISC 的激活需要 siRNA 双链以 ATP 依赖的方式解旋。然后活性 RISC 通过碱基对的相互作用靶定同源转录物, 从 siRNA 的 3' 末端将 mRNA 切割成 12 个核苷酸的片段 [Hutvagner and Zamore Curr. Opin. Genetics and Development 12 :225-232 (2002) ; Hammond et al. (2001) Nat. Rev. Gen. 2 :110-119 (2001) ; 和 Sharp Genes. Dev. 15 :485-90 (2001)]。虽然切割的机制还有待阐明, 研究表明每个 RISC 含有一个单个的 siRNA 和 RNAase [Hutvagner and Zamore Curr. Opin. Genetics and Development 12 :225-232 (2002)]。

[0172] 由 RNAi 的显著效力, 表明 RNA i 途径中具有扩增步骤。可以通过拷贝输入的 dsRNA, 这会产生更多的 siRNA, 或者通过复制形成的 siRNA 来扩增。另外或此外, 可以通过 RISC 的多转换事件 (multiplet turnover events) 实现扩增 [Hammond et al. Nat. Rev. Gen. 2 :110-119 (2001), Sharp Genes. Dev. 15 :485-90 (2001) ; Hutvagner and Zamore Curr. Opin. Genetics and Development 12 :225-232 (2002)]。要获得更多关于 RNAi 的信息, 参见下述综述 Tuschl ChemBiochem. 2 :239-245 (2001) ; Cullen Nat. Immunol. 3 :597-599 (2002) ; 和 Brantl Biochem. Biophys. Act. 1575 :15-25 (2002)。

[0173] 可以如下所述合成适用于本发明的 RNAi 分子。首先, 在 PKC 同种型 mRNA 序列的 AUG 起始密码子的下游寻找 AA 二核苷酸序列。每个 AA 和 3' 附近 19 个核苷酸的出现计录为潜在的 siRNA 靶位点。由于在调控蛋白结合位点中更富含不翻译区 (UTR), 优选 siRNA 靶位点选自开放阅读框架。UTR 结合蛋白和 / 或翻译起始复合物会干扰 siRNA 核酸内切酶复合物的结合 [Tuschl ChemBiochem. 2 :239-245]。应当理解, 针对不翻译区的 siRNA 也是有效的, 由 GAPDH 证明, 其中针对 5' UTR 的 siRNA 介导细胞 GAPDH mRNA 减少大约 90%, 完全破坏了蛋白水平 (www.ambion.com/techlib/tn/91/912.html)。

[0174] 其次, 用任何序列比对软件, 例如 NCB I 服务器上的 BLAST 软件 (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) 将潜在的靶位点与合适的基因组数据库 (例如人, 小鼠, 大鼠等) 相比较。筛选出与其它编码序列具有显著同源性的推定的靶位点。

[0175] 选择合格的靶序列作为 siRNA 合成的模板。优选的序列是具有低的 G/C 含量的那些, 这是因为这种序列已证明与那些 G/C 含量高于 55% 的序列相比能更有效地介导基因沉默。优选沿着靶基因的长度选择几个靶位点进行评价。为了更好地评价所选的 siRNA, 优选同时使用负对照。负对照 siRNA 优选与所述 siRNA 具有同样的核苷酸成分, 但是与基因组

没有显著的同源性。因此,优选使用 siRNA 的混杂核苷酸序列,前提是它不会与任何其它基因具有任何显著的同源性。根据本发明,合适的 siRNA 可以是,例如,能抑制 PKC α 表达的 siRNA,例如 SEQ ID NO:1-6 的任何核酸序列。

[0176] 另一种能下调 PKC 同种型的试剂是能特异性切割 PKC 同种型的 mRNA 转录物或 DNA 序列的 DNA 酶分子。DNA 酶是能切割单链和双链靶序列的单链多核苷酸 (Breaker, R. R. and Joyce, G. Chemistry and Biology 1995 ;2 :655 ;Santoro, S. W. & Joyce, G. F. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997 ;943 :4262)。已提出了 DNA 酶的通用模型 (“10-23”模型)。“10-23”DNA 酶具有一个 15 个脱氧核糖核苷酸的催化结构域,侧翼是两个各自具有七个到九个脱氧核糖核苷酸的底物识别结构域。这种类型的 DNA 酶可以在嘌呤:嘧啶结合处有效切割其底物 RNA (Santoro, S. W. & Joyce, G. F. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 199 ;DNA 酶的综述参见 Khachigian, LM [Curr Opin Mol Ther 4 :119-21 (2002)])。

[0177] 构建和扩增合成的、基因工程的能识别单链的和双链的靶切割位点的 DNA 酶的例子已在 Joyce 等的 U. S. Pat. No. 6, 326, 174 中公开。最近观察到类似设计的针对人尿激酶受体的 DNA 酶抑制尿激酶受体的表达,并成功抑制体内结肠癌细胞转移 (Itoh et al, 20002, Abstract 409, Ann Meeting Am Soc Gen Ther www.asgt.org)。在另一种应用中,互补于 bcr-abl 致癌基因的 DNA 酶成功抑制白血病细胞中致癌基因的表达,在 CML 和 ALL 中减少自体骨髓移植的复发率。

[0178] PKC 同种型的下调还可以使用能特异与编码所述 PKC 同种型的 mRNA 转录物杂交的反义多核苷酸来实现。

[0179] 可用于有效下调 PKC 同种型的反义分子的设计要考虑反义技术的两个重要方面。第一个方面是寡核苷酸向合适细胞的细胞质中的递送,第二个方面是能以抑制其翻译的方式在细胞中特异结合指定 mRNA 的寡核苷酸的设计。

[0180] 现有技术给出了许多递送策略,可用于将寡核苷酸有效递送到多种细胞类型中 [参见,例如 Luft J Mol Med 76 :75-6 (1998) ;Kronenwett et al. Blood 91 :852-62 (1998) ;Rajur et al. Bioconjug Chem 8 :935-40 (1997) ;Lavigne et al. Biochem Biophys Res Commun 237 :566-71 (1997) 和 Aoki et al. (1997) Biochem Biophys Res Commun 231 :540-5 (1997)]。

[0181] 此外,根据能解释靶 mRNA 和寡核苷酸中结构变化的能量的热力学循环,鉴别与它们的靶 mRNA 具有最高的预测的结合亲和力的序列的算法也是可获得的 [参见,例如, Walton et al. Biotechnol Bioeng 65 :1-9 (1999)]。

[0182] 这些算法已成功用于实现细胞中的反义方法。例如, Walton et al. 开发的算法使得科学家成功设计出了兔 β -球蛋白 (RBG) 和小鼠肿瘤坏死因子- α (TNF α) 转录物的反义寡核苷酸。同一个研究小组最近报道了针对三个模型靶 mRNA (人乳酸脱氢酶 A 和 B 和大鼠 gp130) 合理选择的寡核苷酸在细胞培养物中的反义活性,其是用证明在几乎所有情况下都有效的动态 PCR 方法评估的,包括用磷酸二酯和硫代磷酸酯寡核苷酸化学对两种细胞类型中的三个不同靶的检测。

[0183] 此外,还已公开了几种用体外系统设计和预测特定寡核苷酸的效率的方法 (Matveeva et al., Nature Biotechnology 16 :1374-1375 (1998))。

[0184] 几个临床实验已证明反义寡核苷酸是安全性,可行性和活性。例如,适用于

治疗癌症的反义寡核苷酸已经成功使用 [Holmund et al., Curr Opin Mol Ther 1: 372-85(1999)], 而用靶定 c-myc 基因, p53 和 Bcl-2 的反义寡核苷酸治疗血液肿瘤也进入了临床实验, 已显示被病人耐受 [Gerwitz Curr Opin Mol Ther 1:297-306(1999)]。

[0185] 最近, 已报道了在小鼠模型中反义介导的人乙酰肝素酶 (heparanase) 基因表达的抑制可抑制人癌细胞的胸膜扩散 [Uno et al., Cancer Res 61:7855-60(2001)]。

[0186] 因此, 目前的共识就是最近反义技术领域中的进展, 如上所述, 导致产生了高度精确的反义设计算法和多种寡核苷酸递送系统, 使得普通技术人员能够设计和实施适用于下调已知序列的表达的反义方法而不需要过度的试验和错误实验。

[0187] 另一种能下调 PKC 同种型的试剂是能特异切割编码 PKC 同种型的 mRNA 转录物的核糖酶 (ribozyme) 分子。核糖酶越来越多地用于基因表达的序列特异性抑制, 通过切割编码感兴趣蛋白的 mRNA [Welch et al., Curr Opin Biotechnol. 9:486-96(1998)]。能够设计用于切割任何特异靶 RNA 的核糖酶, 这使得核糖酶成为基础研究和治疗应用中的很有价值的工具。在治疗领域, 核糖酶用于在感染性疾病中靶定病毒 RNA, 在癌症中靶定优势的致癌基因以及在遗传疾病中靶定特异的体细胞变异 [Welch et al., Clin Diagn Virol. 10: 163-71(1998)]。最值得注意的是, 有几种用于 HIV 患者的核糖酶基因治疗方案已经在进行 I 期实验。最近, 核糖酶用于进行转基因动物研究, 基因靶的验证和途径的阐明。有几种核糖酶正在进行不同阶段的临床实验。ANGIOZYME 是第一个化学合成的用在人临床实验研究中的核糖酶。ANGIOZYME 特异性抑制 VEGF-r (血管内皮生长因子受体), 一种血管生成途径中的关键成分的形成。Ribozyme Pharmaceuticals, Inc. 与其它公司证明了动物模型中抗血管生成治疗的重要性。HEPTAZYME, 一种设计用于选择性破坏 C 型肝炎病毒 (HCV) RNA 的核糖酶, 已发现在细胞培养物的检测中有效减少 C 型肝炎病毒 RNA (Ribozyme Pharmaceuticals, Incorporated-WEB 主页)。

[0188] 优选地, 用于诱导或加速皮肤创伤或损伤的愈合过程的药物组合物进一步包括至少一种选自以下成员构成的组的其它试剂: 激素, 生长因子, 脂肪细胞激素 (adipokine), PKC δ RACK 和 GW9662。合适的激素包括, 但不限于胰岛素。合适的生长因子可以是但不限于白介素 -6 (IL-6), 角质化细胞生长因子 (KFG) 或肿瘤坏死因子 α (TNF α)。合适的脂肪细胞激素可以是但不限于 adiponectin 或脂联素 (adiponectin)。

[0189] 在实施本发明的时候, 发明人惊讶地和出乎意料地发现共聚物 -1 (glatiremar acetate) 能够在体外和体内显著促进创伤愈合 (参见下述实施例部分的实施例 26)。以前已知共聚物 -1 是一种免疫调节剂, 用于治疗多发性硬化和中枢神经系统疾病 (美国专利号 6,620,847, 6,362,161, 6,342,476, 6,054,430, 6,046,898, 5,981,589 和 5,800,808; 美国申请序列号 10/615865, 10/666857 和 10/014477), 现有技术没有描述或提示共聚物 -1 可用于加速创伤愈合过程。

[0190] 因此根据本发明的另一个方面提供了一种用于诱导或加速皮肤创伤或损伤的愈合过程的方法, 所述方法包括给皮肤创伤或损伤施用治疗有效量的共聚物 -1, 优选浓度范围为 1 到 500 μ g/ml。因此根据本发明的该方面用于实施该方法的药物组合物包括, 作为活性成分的, 治疗有效量的共聚物 -1 和药学可接受的载体。

[0191] 本发明的治疗 / 药学活性成分可以以其本身, 或者与合适的载体和 / 或赋形剂混合成药物组合物施用给创伤。适用于本发明的药物组合物包括其中含有有效量的能获得预

期治疗效果的活性成分的那些组合物。

[0192] 这里所用的“药物组合物”指本文所述的一种或多种活性成分,蛋白质,化学品,核酸或细胞,或其生理学可接受的盐或药物前体,与其它化学组分例如传统药物,生理学合适的载体和赋形剂的制剂。药物组合物的目的是便于将化合物或细胞给予生物体。本发明的药物组合物可以用本领域公知的方法制备,例如通过传统的混合,溶解,制粒,包糖衣,粉碎,乳化,制成胶囊,包埋或冻干过程制备。

[0193] 在下文中,短语“生理学合适的载体”和“药学可接受的载体”可互换使用,均指不会对生物体引起显著刺激以及不会破坏给药的结合物 (conjugate) 的生物活性和性质的载体或稀释剂。

[0194] 本文中术语“赋形剂”是指添加到药物组合物中以进一步方便所述活性成分的加工和给药的惰性物质。赋形剂的非限制性实例包括碳酸钙,磷酸钙,不同的糖和不同类型的淀粉,纤维素衍生物,明胶,植物油和聚乙二醇。

[0195] 活性成分的配制和给药技术可见“Remington's Pharmaceutical Sciences,”Mack Publishing Co., Easton, PA 的最后一版,在此引入作为参考。

[0196] 尽管活性成分可经不同的途径给药,如前所述,为本发明的目的,局部给药方式是优选的,助以局部载体。局部载体通常适用于活性成分的局部给药,包括本领域公知的任何一种材料。为将所述组合物制成所需形式可选择局部载体,例如流体或非流体载体,洗剂,霜剂,糊剂,凝胶,粉末,软膏剂,溶剂,流体稀释剂,滴剂等,并且可以包括天然存在的或合成来源的物质。明显所选的载体必须不能对局部制剂的活性试剂或其它成分产生不良影响,对于局部制剂中的所有成分应是稳定的。可用于本文的合适的局部载体的实例包括水,酒精和其它无毒的有机溶剂,甘油,矿物油,硅氧烷,凡士林,羊毛脂,脂肪酸,植物油,对羟基苯甲酸酯,蜡等。本文中优选制剂是无色,无味的软膏,流体,洗液,霜和凝胶。

[0197] 软膏 (ointment) 是半固体制剂,典型地是以矿脂或其它石油衍生物为基质。本领域技术人员知道,待使用的特定的软膏基质能够提供最佳的活性成分递送,优选能够提供其它需要的特性以及例如软化作用等。与其它载体或媒介物一样,软膏基质应是惰性的,稳定的,无刺激性的不致敏的。如 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Ed. (Easton, Pa.: Mack Publishing Co., 1995) 的 1399-1404 页中指出的,软膏基质可分为四类:油质基质;可乳化基质;乳液基质;和水溶性基质。油质软膏基质包括,例如植物油,获自动物的脂肪,以及从石油获得的半固体碳氢化合物。可乳化软膏基质,也称为可吸收软膏基质,含少量或不含水,包括,例如羟基硬脂酸甘油硫酸酯,无水羊毛脂和亲水矿脂 (petrolatum)。乳液软膏基质是油包水 (W/O) 或水包油 (O/W) 乳液,包括,例如十六烷醇,单硬脂酸甘油酯,羊毛脂和硬脂酸。优选的水溶性软膏基质是用不同分子量的聚乙二醇制备的;此外,进一步的信息参考 Remington: The Science and Practice of Pharmacy。

[0198] 洗液是用于皮肤表面并且不用摩擦的制剂,通常是流体或半流体制剂,其中固体颗粒,包括活性试剂,存在于水或酒精基质中。洗液通常是固体悬液,可含有水包油类型的流体油状乳液。洗液是本文中优选用于治疗身体大面积的制剂,这是由于更具流动性的组合物容易施用。通常洗液中的不溶物质必需磨碎。洗液典型地包括悬浮试剂以更好地分散,以及用于使所述活性试剂局部化和保持与皮肤接触的化合物,例如甲基纤维素,羧甲基纤维素钠等。

[0199] 含有选定的活性成分的霜剂 (creams), 如本领域公知的, 是粘性流体或半固体的乳液, 是水包油或油包水的。霜剂基质是可水洗的, 含有油相, 乳化剂和水相。油相, 有时也称为“内部”相, 通常包括矿脂和脂肪醇例如十六烷醇或十八烷醇; 水相通常, 但不是必需的, 体积超过油相, 通常含有湿润剂。霜剂中的乳化剂, 在 Remington, 上文中解释, 通常是非离子的, 阴离子的, 阳离子的或两性的表面活性剂。

[0200] 凝胶制剂优选应用于头皮。在局部活性成分制剂领域工作的技术人员知道, 凝胶是半固体, 悬液类型的系统。单相凝胶含有基本上均匀分布于载体流体中的有机大分子, 典型地是水性的, 但是优选还含有酒精以及任选的, 油。

[0201] 核酸载体包括但不限于脂质体, 包括靶定的脂质体, 核酸络合剂, 病毒包被等。但是也可以使用裸露核酸转化。

[0202] 本发明的局部制剂中可以包含本领域技术人员公知的各种添加剂。例如, 可以用溶剂溶解某些活性成分物质。其它任选的添加剂包括皮肤渗透增强剂, 遮光剂, 抗氧化剂, 胶凝剂, 增稠剂, 和稳定剂等。

[0203] 如上所述的, 根据本发明, 用于治疗创伤的局部制剂可以含有传统用于治疗这种创伤的其它药学活性试剂或成分。包括免疫抑制剂, 例如环孢霉素, 抗代谢物, 例如氨甲喋呤, 皮质类固醇, 维生素 D 和维生素 D 类似物, 维生素 A 或其类似物, 例如依曲替酯 (etretinate), 焦油, 煤焦油, 抗痒和促角质化 (keratoplastic) 试剂, 例如杜松油, 角质层分离试剂, 例如水杨酸, 软化剂, 润滑剂, 防腐剂和消毒剂, 例如杀菌剂葱三酚 (也称为葱蒯), 光敏剂, 例如补骨脂素和甲氧补骨脂素和 UV 辐射。还可以加入其它试剂, 例如抗微生物试剂, 抗真菌试剂, 抗生素和抗炎性试剂。还可以同时进行氧处理 (高氧压)。

[0204] 本发明的局部组合物还可以用传统的皮肤贴片或用品递送到皮肤上, 其中所述活性成分组合物包含于层状结构中, 其中层状结构作为药物递送装置固定于皮肤上。在这样一种结构中, 所述活性成分组合物含于一层, 或“储库 (reservoir)”中, 其上面是表面垫层 (upperbacking layer)。所述层状结构可含有单个储库, 或者它可以含有多个储库。在一个实施方案中, 所述储库含有聚合物基质的药学可接受的接触粘附物质, 以在活性成分递送期间将该系统固定于皮肤上。合适的皮肤接触粘附物质的实例包括但不限于聚乙烯, 聚硅氧烷, 聚异丁烯, 聚丙烯酸酯和聚氨酯等。特定的聚合物胶粘剂的选择取决于特定的活性成分, 媒介物等, 也就是, 所述胶粘剂必须与含有活性成分的组合物中的所有组分是相容的。另外, 含有活性成分的储库和皮肤接触胶粘剂应当是独立的和不同的层, 胶粘剂在储库之下, 在这种情况下, 储库可以是如上所述的聚合物基质, 或者可以是液体或水凝胶储库, 或者可以是其它一些形式。

[0205] 这些层状物中的垫层是作为该装置的表面层, 作为层状结构的主要结构元件, 并给予该装置以相当多的弹性。选择作为垫层的材料应当是对所述活性成分和含有所述活性成分的组合物中的任何其它组分都基本不能渗透的, 从而防止任何组分通过该装置的表面层丧失。所述垫层可以是闭合的或是不闭合的, 这取决于是否希望皮肤在活性成分递送过程中水化。垫层优选由优选柔韧的弹性材料的薄片或膜组成。适用于垫层的聚合物的实例包括聚乙烯, 聚丙烯和聚酯。

[0206] 在储存过程中和使用前, 所述层状结构还包括释放衬垫。立即使用前从所述装置上除去该层以使其基底面, 或者是活性成分储库或者是独立的接触粘附层暴露, 使得所述

系统能够固定于皮肤上。所述释放衬垫应当用活性成分 / 载体不可透过的材料制成。

[0207] 该装置可以用本领域公知的传统技术制造,例如将胶粘剂,活性成分和载体的流体混合物浇模于垫层上,然后使释放衬垫成层。类似地,可以将胶粘剂混合物浇模于释放衬垫上,然后使垫层成层。或者,可以在没有活性成分或赋形剂的情况下制备活性成分储库,然后通过“浸吸(soaking)”在活性成分 / 载体混合物中来载入。

[0208] 与本发明中的局部制剂一样,包含于这些层状系统的活性成分储库中的活性成分组合物可以含有多种组分。在一些情况下,所述活性成分可以以“纯(neat)”的方式递送,即不含其它的流体。但是在大部分情况下,所述活性成分溶解,分散或悬浮于合适的药学可接受的载体,典型地是溶剂或凝胶中。其它可能含有的组分包括防腐剂,稳定剂和表面活性剂等。

[0209] 本文所述的药物组合物还可以包含合适的固体或凝胶相载体或赋形剂。这种载体或赋形剂的实例包括但不限于碳酸钙,磷酸钙,各种糖,淀粉,纤维素衍生物,明胶和聚合物例如聚乙二醇。

[0210] 剂量取决于病痛的类型,严重程度和表现形式,以及患者对于所使用的活性成分和剂型的反应,特定缀合物的效力和所使用的给药途径。所属领域普通技术人员能容易地确定最佳的剂量,剂量给药方法和重复率。正确的配方,给药途径和剂量可以由各个医师根据患者情况选择(参见例如, Fingl, et al., 1975, in “The Pharmacological Basis of Therapeutics”, Ch. 1 p. 1)。

[0211] 因此,依赖于要治疗的状况的严重程度和反应性,剂量可以是单次或是重复给药,治疗持续几天到几周,或者直至治愈或皮肤创伤减小。

[0212] 在本发明的某些方面中使用体内或离体(细胞)基因治疗技术,其涉及细胞转化和基因敲入类型的转化。本文所用的基因治疗指将感兴趣的遗传物质(例如 DNA 或 RNA)转入宿主中以治疗或防止遗传性的或获得性的疾病或状况或表型。所述感兴趣的遗传物质编码希望在体内产生的产品(例如蛋白质,多肽,肽,功能性 RNA,反义 RNA)。例如,所述感兴趣的遗传物质可以编码具有治疗价值的激素,受体,酶,多肽或肽。其综述一般可参见“Gene Therapy”(Advanced in Pharmacology 40, Academic Press, 1997) 原文。

[0213] 基因治疗的两种基本方法是 (i) 离体;和 (ii) 体内基因治疗。在离体基因治疗中从患者中取出细胞或者从另一种来源衍生出细胞,培养并在体外治疗。通常,将功能性的替换基因通过合适的基因递送载体 / 方法(转染,转导,同源重组等)和,如果需要时,表达系统引入细胞,然后在培养物中使修饰的细胞扩增并使其返回宿主 / 患者中。这些遗传上重新植入的细胞已显示在原位表达转染的遗传物质。

[0214] 在体内基因治疗中,靶细胞不从受试者中取出,而是将要转移的遗传物质原位,也就是在接受体中引入接受生物体的细胞中。在另一个实施方案中,如果宿主基因是有缺陷的,所述基因在原位被修复(Culver, 1998. (Abstract) Antisense DNA&RNA based therapeutics, February 1998, Coronado, CA)。这些遗传上改变的细胞已显示在原位表达转染的遗传物质。

[0215] 所述基因表达载体能够将异源核酸递送 / 转移到宿主细胞中。所述表达载体可以包括能以细胞选择性的方式控制所述核酸的靶定,表达和转录的元件,如本领域公知的。应当注意到通常所述基因的 5' UTR 和 / 或 3' UTR 可被表达载体的 5' UTR 和 / 或 3' UTR 取代。

因此,本文所述的表达载体可以,如果需要的话,不包括要转移的实际基因的 5' UTR 和 / 或 3' UTR,只包括特定的氨基酸编码区域。

[0216] 所述表达载体可以包括用于控制所述异源物质的转录的启动子,所述启动子可以是组成型的或是诱导型的以允许选择性转录。任选地可以包括获得必要的转录水平所需的增强子。增强子通常是任何不翻译的 DNA 序列,临近编码序列起作用(以顺式)以改变启动子所支配的基本转录水平。所述表达载体还可以含有如下文所述的选择基因。

[0217] 载体可以以本领域公知的多种方法中的任何一种引入细胞或组织。这些方法在 Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory, New York 1989, 1992), Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland 1989), Chang et al. *Somatic Gene Therapy*, CRC Press, Ann Arbor, MI 1995), Vega et al., *Gene Targeting*, CRC Press, Ann Arbor MI (1995), *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Butterworths, Boston MA 1988) 和 Gilboa et al. (*Biotechniques* 4(6):504-512, 1986) 中有描述,包括,例如稳定或暂时性的转染,脂质体转染(lipofection),电穿孔和用重组病毒载体感染。此外,参见美国专利 4,866,042 中的涉及中枢神经系统的载体以及美国专利 5,464,764 和 5,487,992 中的正负选择方法。

[0218] 通过感染引入核酸与其它所列出的方法相比具有几个优点。由于感染特性因而能够获得更高的效率。而且病毒是非常特化的,典型地可以感染并在特定的细胞类型中增殖。因而,它们天然的特异性可以用于使载体在体内或在组织中或细胞的混合培养物中靶定特异的细胞类型。病毒载体还可以用特异的受体或配体修饰以通过受体介导的事件改变靶的特异性。

[0219] 用于引入和表达重组序列的 DNA 病毒载体的特定实例是腺病毒衍生的载体 Adenov53TK。该载体表达疱疹病毒胸苷激酶(TK)基因,以提供正向或负向选择,和所期望的重组序列的表达盒。该载体可用于感染具有腺病毒受体的细胞,包括大部分上皮来源和其它来源的组织。该载体和其它具有类似的所期望的功能的载体可用于处理混合群体的细胞,包括,例如细胞的体外或离体培养物,组织或人受试者。

[0220] 还可以包含限制在特定细胞类型中表达的特征。这种特征包括,例如,对所希望的细胞类型特异的启动子和调控元件。

[0221] 此外,重组病毒载体可用于所希望的核酸的体内表达,这是由于它们可提供例如横向感染和靶定特异性的优点。横向感染是例如逆转录病毒的生命周期中固有的,是单个感染细胞产生许多子代病毒颗粒,释放出并感染相邻的细胞的过程。结果是大片区域迅速被感染,其中大部分最初并没有被原始的病毒颗粒感染。这与垂直类型的感染相反,其中感染试剂只通过下一代子代传播。也可以制造不能横向传播的病毒载体。如果目的是将特定基因引入有限数目的靶细胞的话,该特征可能是有用的。

[0222] 如上所述,病毒是非常特化的感染试剂,在许多情况下可以避开宿主的防御机制。典型地,病毒感染并在特定类型的细胞中增殖。病毒载体的靶定特异性是利用了它的天然的特异性,特异性靶定预定细胞类型,因而将重组基因引入感染细胞中。本发明的方法和组合物中使用的载体取决于所希望靶定的细胞类型,本领域技术人员均知道。

[0223] 可以构建逆转录病毒载体作为感染颗粒或只是进行起始一轮的感染。在第一种情

况中,对病毒基因组进行修饰使其保持所有必需基因,调控序列和包装信号以合成新的病毒蛋白和 RNA。这些分子一旦合成,宿主细胞会将所述 RNA 包装成新的病毒颗粒,其能进行下一轮的感染。还可以通过基因工程使所述载体的基因组编码和表达所希望的重组基因。在无感染性的病毒载体中,载体基因组通常进行突变以破坏将 RNA 包装成病毒颗粒所必需的病毒包装信号。没有这样的信号,任何形成的颗粒都不含有基因组,因此不能进行下一轮感染。载体的特定类型取决于预期的应用。实际的载体也是已知的,在本领域中可容易获得,或者可由本领域技术人员通过熟知的方法构建。

[0224] 重组载体可以几种方式给药。如果使用病毒载体,例如,给药过程可以利用它们的靶特异性,因而不用在疾病部位局部给药。但是,局部给药可以更快更有效地治疗。

[0225] 包括敲入程序所用的同源重组在内的体内和离体细胞转化过程如下述文献中所述,例如,

[0226] United States Patents 5,487,992,5,464,764,5,387,742,5,360,735,5,347,075,5,298,422,5,288,846,5,221,778,5,175,385,5,175,384,5,175,383,4,736,866 以及 Burke and Olson, *Methods in Enzymology*, 194:251-270 (1991); Capecchi, *Science* 244:1288-1292 (1989); Davies et al., *Nucleic Acids Research*, 20(11):2693-2698 (1992); Dickinson et al., *Human Molecular Genetics*, 2(8):1299-1302 (1993); Duff and Lincoln, "Insertion of a pathogenic mutation into a yeast artificial chromosome containing the human APP gene and expression in ES cells", *Research Advances in Alzheimer's Disease and Related Disorders*, 1995; Huxley et al., *Genomics*, 9:742-750 (1991); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-261 (1993); Lamb et al., *Nature Genetics*, 5:22-29 (1993); Pearson and Choi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993). 90:10578-82; Rothstein, *Methods in Enzymology*, 194:281-301 (1991); Schedl et al., *Nature*, 362:258-261 (1993); Strauss et al., *Science*, 259:1904-1907 (1993).

[0227] 进一步,专利申请 WO 94/23049, W093/14200, WO 94/06908, W094/28123 也提供了部分信息。

[0228] 本领域普通技术人员可参考下述非限制性的实施例显而易见地知晓本发明的其它目的,优点和新的特征。另外,上述的和下述权利要求部分的权利要求中所述的本发明的每一个不同的实施方式和方面在下述实施例中都有实验支持。

实施例

[0229] 参考下述实施例,与上述说明一起以非限制性的方式对本发明进行举例说明。

[0230] 通常,本文所用的术语和本发明中所用的实验程序包括分子,生物化学,微生物和重组 DNA 技术。这些技术在文献中已有详细解释。参见,例如,

[0231] " *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* " Sambrook et al., (1989); " *Current Protocols in Molecular Biology* " Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., " *Current Protocols in Molecular Biology* ", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, " *A Practical Guide to Molecular Cloning* ", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., " *Recombinant DNA* ", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) " *Genome Analysis* :

A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998) ;

[0232] 方法如

[0233] U. S. Pat. Nos. 4, 666, 828 ; 4, 683, 202 ; 4, 801, 531 ; 5, 192, 659 and 5, 272, 057 ; " Cell Biology : A Laboratory Handbook " , Volumes I-III Cellis, J. E. , ed. (1994) ; " Culture of Animal Cells-A Manual of Basic Technique " by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition ; " Current Protocols in Immunology " Volumes I-III Coligan J. E. , ed. (1994) ; Stites et al. (eds), " Basic and Clinical Immunology " (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994) ; Mishell and Shiigi (eds), " Selected Methods in Cellular Immunology " , W. H. Freeman and Co. , New York (1980) ;

[0234] 中所述 ; 可获得的免疫检测方法广泛描述于专利和科技文献中, 参见, 例如

[0235] U. S. Pat. Nos. 3, 791, 932 ; 3, 839, 153 ; 3, 850, 752 ; 3, 850, 578 ; 3, 853, 987 ; 3, 867, 517 ; 3, 879, 262 ; 3, 901, 654 ; 3, 935, 074 ; 3, 984, 533 ; 3, 996, 345 ; 4, 034, 074 ; 4, 098, 876 ; 4, 879, 219 ; 5, 011, 771 and 5, 281, 521 ; " Oligonucleotide Synthesis " Gait, M. J. , ed. (1984) ; " Nucleic Acid Hybridization " Hames, B. D. , and Higgins S. J. , eds. (1985) ; " Transcription and Translation " Hames, B. D. , and Higgins S. J. , eds. (1984) ; " Animal Cell Culture " Freshney, R. I. , ed. (1986) ; " Immobilized Cells and Enzymes " IRL Press, (1986) ; " A Practical Guide to Molecular Cloning " Perbal, B. , (1984) and " Methods in Enzymology " Vol. 1-317, Academic Press ; " PCR Protocols : A Guide To Methods And Applications " , Academic Press, San Diego, CA (1990) ; Marshak et al. , " Strategies for Protein Purification and Characterization-A Laboratory Course Manual " CSHL Press (1996) ;

[0236] 在此引入所有这些文献的全文作为参考。本文中还提供了其它一般参考。其中所述程序是本领域熟知的, 是为读者方便而提供的。其中包含的所有信息在此都引入作为参考。

[0237] 材料和实验方法

[0238] 材料 : 组织培养介质和血清购于 Biological Industries (Beit HaEmek, Israel)。强化化学发光 (Enhanced Chemical Luminescence, ECL) 的操作使用从 BioRad (Israel) 购买的试剂盒。单克隆抗 p-tyr 的抗体购于 Upstate Biotechnology Inc. (Lake Placid, NY, USA)。PKC 同种型的单克隆和多克隆抗体购于 Santa Cruz (California, USA) 和 Transduction Laboratories (Lexington, KY)。α 6 大鼠抗小鼠 mAb (GoH3) 购于 Pharmingen (San Diego, CA)。α 6A 细胞质结构域的抗体 6844 得自 Dr. V. Quaranta (Scripps Research Institute, La Jolla, CA) 的馈赠。针对小鼠 β 4 的细胞外结构域 (346-11A) 的大鼠 mAb 得自 Dr. S. J. Kennel (Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN) 的馈赠。针对磷酸化酪氨酸的大鼠 mAb 购自 Sigma (St. Louis, MO), 兔抗磷酸化丝氨酸购自 Zymed (San Francisco, CA)。辣根过氧化物酶抗兔和抗小鼠 IgG 得自 Bio-Rad (Israel)。亮氨酸, 抑肽酶, PMSF, DTT, Na- 原钒酸盐, 和抑胃肽购自 Sigma Chemicals (St. Louis, MO)。

胰岛素 (humulin R- 重组人胰岛素) 购自 EliLillyFrance SA (Fergersheim, France)。IGF1 得自 Cytolab (Israel) 的馈赠。角蛋白 14 抗体购自 Babco-Convance (Richmond, CA)。BDGF-BB 购自 R&D 系统 (Minneapolis), 十四酰化 (myristolated) 的 PKC α 伪底物购自 Calbinochem (San Diego, CA)。

[0239] 鼠角质化细胞的分离和培养: 如文献中所述从新生皮肤上分离原代角质化细胞 (18)。在含有 8% 的 Chelex (Chelex-100, BioRad) 处理的胎牛血清的 Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM) 中培养角质化细胞。为了维持增殖的基底细胞的表型, 将最终的 Ca²⁺ 浓度调节为 0.05mM。铺板后五天到七天进行实验。

[0240] 细胞提取物的制备和 Western blot 分析: 为得到膜组分粗提物, 在含有 10 μ g/ml 抑肽酶, 10 μ g/ml 亮肽素, 2 μ g/ml 抑胃肽 (pepstatin), 1mM PMSF, 10mM EDTA, 200 μ M NaVO₄ 和 10mM NaF 的 PBS 中破碎细胞, 制备全细胞溶解物。经过匀浆和 4 次冻/溶循环后, 将溶解物置于微型离心机中以最大速度在 4°C 旋转 20 分钟。将含有可溶性细胞溶质蛋白组分上清液转移至另一个管子中。将沉淀重悬于 250 μ l 含有 1% Triton X-100 及蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 PBS 中, 在 4°C 保温 30 分钟, 在 4°C 在微型离心机中以最大速度旋转。上清中含有膜组分。用改进的 Lowery 检测 (Bio-Rad DC Protein Assay Kit) 测定蛋白质浓度。如文献中所述对细胞蛋白质组分进行 Western blot 分析 (6)。

[0241] 用于免疫沉淀的细胞溶解物的制备: 含有角质化细胞的培养皿用不含 Ca²⁺/Mg²⁺ 的 PBS 洗涤。用机械力使细胞分离, 置于含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的混合物 (20 μ g/ml 亮肽素, 10 μ g/ml 抑肽酶; 0.1mM PMSF; 1mM DTT; 200 μ M 原钒酸盐; 2 μ g/ml 抑胃肽) 的 RIPA 缓冲液 (50mM Tris • HCl pH 7.4; 150mM NaCl; 1mM EDTA; 10mM NaF; 1% Triton X-100; 0.1% SDS, 1% 脱氧胆酸钠) 中。将此制备物在 4°C 在微型离心机中以最大速度离心 20 分钟。将上清液用于免疫沉淀。

[0242] 免疫沉淀: 将 300 μ g 细胞溶解物与 25 μ l 蛋白 A/G Sepharose (Santa Cruz, CA, USA) 混合, 将悬液在 4°C 连续旋转 30 分钟, 进行溶解物的预处理。然后将制备物在 4°C 以最大速度离心 10 分钟, 向上清液中加入 30 μ l A/G Sepharose 以及针对个别抗原的特异性多克隆或单克隆抗体 (稀释率 1:100)。将样品在 4°C 旋转过夜。然后将悬液在 4°C 以最大速度离心 10 分钟, 将沉淀用 RIPA 缓冲液洗涤。然后将悬液以 15,000 $\times$ g 再次离心 (4°C, 10 分钟), 用 TBST 洗涤四次。加入样品缓冲液 (0.5M Tris • HCl pH 6.8; 10% SDS; 10% 甘油; 4% 2- β -巯基乙醇; 0.05% 溴酚蓝), 将样品煮沸 5 分钟, 然后进行 SDS-PAGE。

[0243] 附着检测: 用 PBS 中的 20 μ g/ml 的基质蛋白对二十四孔皮氏培养皿 (petri plates) (Greiner) 进行涂层 (250 μ l/孔), 37°C 保温 1 小时。保温后洗涤培养皿, 并在室温与 0.1% BSA 培育 30 分钟以阻断非特异性结合。角质化细胞培养物用 0.25% 的胰蛋白酶短暂消化, 待分离后将细胞重悬, 将角质化细胞 (1 $\times$ 10⁶) 加到已涂层的孔中, 在 37°C 培育 1 小时。除去未附着的细胞, 将孔用 PBS 漂洗两次, 将剩余的细胞用 1M NaOH 提取。用改进的 Lowery 检测 (Bio-Rad DC Protein Assay Kit) 通过蛋白浓度确定细胞计数。结果计算为相对于未处理对照的百分数。

[0244] 免疫荧光: 将原代角质化细胞接种于层粘连蛋白 (laminin) 5 涂布的玻璃载玻片上。用 PKC 腺病毒感染两天大的角质化细胞一小时, 用 PBS 洗涤两次, 保存在低 Ca²⁺ 浓度的 MEM 培养物中。感染后二十四小时; 将细胞用 4% 多聚甲醛固定 30 分钟, 然后用 0.2%

Triton 透化 (permeabilization) 5 分钟。为进行分析, 将对照和 PKC 感染的角质化细胞用 PBS 漂洗, 与稀释在含有 1% BSA 的 PBS 中的 PKC 抗体 (Santa Cruz) 在 4°C 培育过夜。培育后, 载玻片用 PBS 洗涤两次 10 分钟, 与生物素化的抗兔的二抗培育 20 分钟, 用 PBS 洗涤两次, 与 streptavidin-FITC 培育 20 分钟。为分析 $\alpha 6 \beta 4$ 的染色, 将玻璃载玻片用 0.2% Triton X-100 在冰上处理 5 分钟, 然后在甲醇中固定 5 分钟。将载玻片与抗 $\alpha 6$ 或抗 $\beta 4$ 的抗体培育过夜, 然后分别与生物素化的抗兔的二抗培育 20 分钟, 用 PBS 洗涤两次, 与 streptavidin-FITC 培育 20 分钟。用 PBS 洗涤两次后, 用含有 1% 对苯二胺 (Sigma) 的甘油缓冲液处理 (mount) 载玻片, 用激光扫描共聚焦成像显微镜 (MRC1024, Bio-Rad, UK) 检测荧光。

[0245] 腺病毒构建体: 重组腺病毒载体如文献所述构建 (19)。小鼠 PKC 的显性失活突变体是通过用丙氨酸取代 ATP 结合位点的赖氨酸残基产生的。用 EcoR I 从 SRD 表达载体上切下突变体的 cDNA, 连接到 pAxCA1w 粘粒盒上, 构建 Ax 载体。其自体磷酸化活性的破坏证明了所述基因的显性失活活性。

[0246] 用 PKC 同种型基因转导角质化细胞: 吸出培养基, 用含有 PKC 重组腺病毒的病毒上清液感染角质化细胞培养物一小时。然后用 MEM 洗涤所述培养物两次并重新培养。感染后十小时, 将细胞转移至不含血清的低 Ca^{2+} 的 MEM 中 24 小时。来自对照的和用胰岛素处理的或用 IGF1 处理的培养物的角质化细胞用于进行增殖检测, ^{86}Rb 吸收, 或者提取并分级成细胞溶质和膜组分进行免疫沉淀, 免疫荧光和 Western blotting。

[0247] PKC 活性: 在用经适当处理后的角质化细胞培养物新鲜制备的免疫沉淀物中测定特异的 PKC 活性。这些细胞溶解物制备于不含 NaF 的 RIPA 缓冲液中。用 SigmaTECT Protein Kinase C Assay System (Promega, Madison, WI, USA) 测定活性, 根据制造商的说明操作。在这些研究中用 PKC α 伪底物作为底物。

[0248] 细胞增殖: 在 24 孔板中用 [^3H] 胸苷掺入测定细胞增殖。细胞用 [^3H] 胸苷 (1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) 脉冲过夜。培育后细胞用 PBS 洗涤五次, 将 5% TCA 加入每个孔 30 分钟。除去溶液, 将细胞溶于 1% Triton X-100 中。在 Tricarb 液体闪烁计数器的 ^3H 窗口中对掺入细胞的标记的胸苷进行计数。

[0249] Na^+/K^+ 泵活性: Na^+/K^+ 泵活性通过测量全细胞在 1ml 含有 2mM RbCl 和 2.5 μCi 的 ^{86}Rb 的并且不含 K^+ 的 PBS 中对 ^{86}Rb 的乌巴因敏感 (ouabain-sensitive) 的吸收 (uptake) 来确定。15 分钟后吸去培养液终止 Rb 的吸收, 然后将细胞在冷的 4°C 的不含 K^+ 的 PBS 中快速漂洗四次, 并溶于 1% Triton X-100 中。在闪烁瓶中将培养皿上的细胞加入到 3ml H_2O 中。在 Tricarb 液体闪烁计数器的 ^3H 窗口中对样品进行计数。特定地与 Na^+/K^+ 泵活性相关的 Rb 吸收是通过将在缺乏抑制剂的条件下测定的吸收值减去在存在 10^{-4}M 乌巴因的条件下积累的 cpm 来确定。

[0250] PKC 免疫激酶检测: 纯化的和标准化的 PKC 同工酶由 Dr. P. Blumberg (NCI, NIH, U. S.) 和 Dr. Marcello G. Kazanietz (University of Pennsylvania, School of Medicine) 慷慨提供。收集原代角质化细胞于 500 μl 1% Triton Lysis 缓冲液 (1% Triton X-100, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抑肽酶和亮肽素, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抑胃肽, 1mM PMSF, 1mM EDTA, 200 μM Na_2VO_4 , 10mM NaF 在 1x PBS 中) 中。胞溶产物在 4°C 培育 30 分钟, 在 4°C 以 16,000 $\times g$ 旋转 30 分钟。将上清液转至新鲜管中。用 5 $\mu\text{g}/$ 个样品的抗 $\alpha 6/\text{GoH3}$ (PharMingen) 和 30 $\mu\text{l}/$ 个样品的蛋

白 A/G-plus agarose slurry (Santa Cruz) 在 4℃ 对细胞溶解物进行免疫沉淀过夜。珠子用 RIPA 缓冲液洗涤一次, 用 50mM Tris/HCl pH 7.5 洗涤两次。向每个检测中加入 35 μ l 反应缓冲液 (1mM CaCl_2 , 20mM MgCl_2 , 50mM Tris $\cdot$ HCl pH 7.5)。对于每个检测, 向淤浆中加入 5.5 μ l/ 个检测的含有 DMSO 或 10mM TPA 的磷脂囊泡悬液, 以及标准化量的特异 PKC 同工酶。加入 10 μ l/ 个检测的 125mM ATP (1.25 μ Ci/ 个检测 [γ - ^{32}P]ATP, Amersham) 起始反应, 在 30℃ 继续 10 分钟。珠子用 RIPA 缓冲液洗涤两次。加入 30 μ l/ 个样品的蛋白质加样染料 (proteinloading dye) (3xLaemmli, 5% SDS), 将样品在水浴中煮沸 5 分钟。用 SDS-PAGE 在 8.5% 的凝胶上分离蛋白质, 转移到 Protran 膜 (Schleicher&Schuell) 上, 用放射自显影显像。组蛋白的磷酸化和 PKC 底物肽的磷酸化用作 PKC 活性的对照。

[0251] 实验结果

[0252] 实施例 1

[0253] 用重组腺病毒载体有效过表达 PKC 同种型

[0254] 用重组 β -半乳糖苷酶腺病毒获得高的感染率, 超过 90% 的培养的角质化细胞群体表达重组蛋白。重组 β -半乳糖苷酶腺病毒感染不会影响细胞的生存力或细胞生长。进一步, β -半乳糖苷酶的表达持续长达两周的培养, 在下面的实验中可用作对照感染。检测了重组 PKC 腺病毒构建体诱导蛋白表达和在鼠角质化细胞培养物中正确活化的效率。如图 1 中的 Western blotting 所示, 用重组 PKC 腺病毒构建体进行 1 小时的感染之后 24 小时, 观察到特定 PKC 蛋白表达显著增加, 是该特定同种型内源表达水平的五到十倍。早在感染后 6 小时在感染的角质化细胞培养物中就可检测到重组蛋白, 表达的峰值在 24 小时获得。在整个培养阶段 (长达十四天) 中蛋白都持续表达。

[0255] 实施例 2

[0256] 过表达的 PKC 同种型被 PKC 活化剂激活

[0257] PKC 同种型的重组蛋白典型地对 PKC 活化剂具有反应。如图 2 所示, 用苔藓虫素 1 处理诱导 PKC α 和 δ 蛋白向膜组分迁移, 而对 PKC η 和 ζ 同种型效果较弱, 用内源同种型也得到相似结果, 正如根据它们对辅因子的需要所预料的那样。

[0258] 实施例 3

[0259] 过表达的 PKC 同种型的天然形式是有活性的

[0260] 早在感染后 18 个小时, PKC 激酶检测就表明不同 PKC 同种型的免疫沉淀物不需要进一步用 PKC 活化剂激活就具有酶促活性 (图 3)。

[0261] 实施例 4

[0262] 过表达的特定 PKC 同种型在原代角质化细胞中诱导不同的形态变化

[0263] 使用的每一种 PKC 腺病毒构建体在原代角质化细胞中均诱导特定的形态变化 (图 4)。未感染的原代小鼠角质化细胞培养物和 β -半乳糖苷酶感染的细胞具有培养物中的增殖的基底细胞的典型的立方形态特征。无论同种型的特异性如何, 所有的 PKC 过表达角质化细胞都表现出了 PKC 活化的典型的形态变化, 包括细胞伸长, 出现神经元样的突起。但是, PKC 同种型中的每一个对于角质化细胞形态都具有独特的效果。PKC α 感染诱导角质化细胞成层, 具有典型的扁平形态。相反, PKC η 表现为紧缩的细胞克隆, 是快速增殖的基底细胞的形态特征 (图 4)。所述同种型中的两个似乎影响细胞基质以及细胞和细胞间的联系。在 PKC δ 感染后 18-48 小时, 细胞伸长, 伸出神经元样的突起。然后是细胞逐渐从培养皿中

丧失,这是在培养过程中逐渐发生的。过表达 PKC ζ 的角质化细胞表现为圆形的角质化细胞簇,其松散地附着于培养皿上,在感染后几天逐渐地丧失。

[0264] 实施例 5

[0265] 在感染的原代角质化细胞中过表达的 PKC 同种型的不同定位

[0266] 由免疫荧光分析证明不同的形态变化与不同的细胞定位有关。在增殖的角质化细胞中,PKC α , PKC δ 和 PKC ζ 在细胞质中以及质膜上表达。与内源蛋白表达类似,PKC η 同种型定位于角质化细胞的细胞核周区域(图 5)。PKC δ 和 PKC ζ 与分布的动态变化有关,其中在细胞分离之后,PKC 同种型表达主要定位于细胞膜(图 5)。

[0267] 实施例 6

[0268] PKC 同种型对 $\alpha 6 \beta 4$ 表达的调控

[0269] 实验结果

[0270] 检测了特定 PKC 同种型调节那些对于增殖的基底层的基础表型特征性的蛋白的能力。由于 $\alpha 6 \beta 4$ 整联蛋白的下调是角质化细胞分化过程中发生的早期事件之一,评估了不同 PKC 同种型调节 $\alpha 6 \beta 4$ 整联蛋白,一种特别定位于基底层的半桥粒的整联蛋白,的表达的能力。由图 6 的免疫杂交可看出,与对照角质化细胞中 $\alpha 6 \beta 4$ 整联蛋白亚基水平相比,只有 PKC δ 和 PKC ζ 同种型能够下调 $\alpha 6 \beta 4$ 表达。同时, $\alpha 3$ 或 $\beta 1$ 整联蛋白亚基的水平没有减少。相反,一致地,PKC α 同种型的过表达导致 $\alpha 6 \beta 4$ 水平增大到对照表达的两到三倍(图 6)。PKC η 的过表达不影响 $\alpha 6 \beta 4$ 蛋白的表达。要分化的细胞与几个特征有关,其在 $\alpha 6 \beta 4$ 蛋白下调后,包括增殖速度的降低,新的角蛋白的合成,细胞分离,丧失与基底膜组分的附着。没有观察到不同 PKC 同种型的过表达导致角蛋白表达的变化。这包括 K5 和 K14,基底增殖角质化细胞的特征物,和 K1 和 K10,棘状分化(spinous differentiation)早期的特征物,的表达。此外,当用 ^3H - 胸苷掺入分析增殖速度的时候,在 $\alpha 6 \beta 4$ 表达丧失和增殖潜力之间没有相关性。

[0271] 实施例 7

[0272] 过表达的 PKC η 和 PKC δ 在体外诱导角质化细胞增殖

[0273] PKC η 和 PKC δ 的过表达分别显著诱导角质化细胞以对照五倍和两倍的水平增殖(图 7)。PKC ζ 和 PKC α 不会影响细胞增殖。

[0274] 实施例 8

[0275] 过表达的 PKC δ 和 ζ 在体外诱导角质化细胞分离

[0276] 研究了 PKC δ 和 ζ 过表达的角质化细胞的附着特性。与对照角质化细胞相比,与特定的基质蛋白包括层粘连蛋白 1,层粘连蛋白 5,纤连蛋白和胶原蛋白的附着能力没有变化(数据未显示)。但是,在过表达 PKC δ 和 PKC ζ 同种型的细胞中,细胞与培养皿之间的接触的丧失与角质化细胞逐渐从培养皿上的分离有关(图 4)。

[0277] 实施例 9

[0278] PKC 同种型的过表达对 $\alpha 6 \beta 4$ 整联蛋白的半桥粒定位的影响

[0279] 由于 $\alpha 6 \beta 4$ 表达对于半桥粒附着复合体的形成是必需的,检测了 $\alpha 6 \beta 4$ 下调以及细胞分离与 $\alpha 6 \beta 4$ 向半桥粒的定位之间的关系。图 8 显示了 $\alpha 6 \beta 4$ 与半桥粒复合体之间的关系的免疫荧光分析。如图 8 所示,与对照感染角质化细胞相比,在过表达 PKC α 的角质化细胞(图 6)中 $\alpha 6 \beta 4$ 整联蛋白表达的上调与 $\alpha 6 \beta 4$ 向半桥粒复合体整合的增加

有关。过表达 PKC η 的细胞也诱导 $\alpha 6 \beta 4$ 整联蛋白与半桥粒复合体的结合,虽然比过表达 PKC α 的细胞中观察到的少。正如所料,在 PKC δ 和 PKC ζ 过表达的角质化细胞中 $\alpha 6 \beta 4$ 整联蛋白的显著下调与 $\alpha 6 \beta 4$ 向细胞半桥粒复合体整合的减少有关(图 8)。这些结果表明 $\alpha 6 \beta 4$ 整联蛋白在细胞-基质联系和角质化细胞向下面的基底膜的锚定中起着重要作用。而且,PKC δ 和 ζ 介导的 $\alpha 6 \beta 4$ 的下调,使角质化细胞开始以一种不同于角质化细胞分化过程的途径分离。最后,为了将 PKC 介导的 $\alpha 6 \beta 4$ 下调,减少的半桥粒上的 $\alpha 6 \beta 4$ 的整合和特定的形态变化与角质化细胞的分离联系起来,检测了在培养期间附着和分离的过表达不同 PKC 同种型的细胞的量的变化。在图 9 中,在 PKC 腺病毒感染后 24 和 48 小时对培养物中附着的细胞进行计数。能清楚观察到 PKC δ 和 PKC ζ 在体外诱导细胞丧失。同时,培养物细胞的丧失与培养基中漂浮的细胞的增加有关。这些结果表明 PKC δ 和 PKC ζ 对于控制与细胞分化和迁移早期相关的分离步骤非常重要。

[0280] 实施例 10

[0281] PKC η 在生理条件下有差别地调控角质化细胞的增殖和分化。

[0282] 从图 7 中可明显看出,过表达 PKC η 同种型的细胞以加速的速度增殖,为对照的未感染细胞五到七倍,也比过表达其它 PKC 同种型的角质化细胞培养物高。但是增殖的诱导取决于角质化细胞的分化状态,这是通过调节培养基中 Ca^{2+} 的浓度决定的。在保持在低 Ca^{2+} 浓度 (0.05mM) 的增殖的角质化细胞中内源 PKC η 定位于大多数增殖细胞的细胞核周区域(图 10)。在这些条件下,PKC η 的过表达诱导角质化细胞增殖的显著增加(图 11)。但是,当将 Ca^{2+} 浓度增加到 0.12mM 使角质化细胞分化的时候,PKC η 的过表达并不诱导增殖而是进一步刺激角质化细胞分化。这些结果表明过表达 PKC η 仅在在进行生理性增殖的细胞中诱导增殖,而并不干扰细胞的分化。在体内也观察到 PKC η 表达的调控作用的差异。在积极增殖的皮肤以及胚胎神经元细胞中鉴别到 PKC η 的表达,而在成熟的成人脑部没有观察到 PKC η ,在表皮中 PKC η 定位到皮肤的粒层。

[0283] 实施例 11

[0284] PKC η 和 DNPKC η 的过表达特别调控 PKC 的定位和细胞形态

[0285] 为了进一步确证支持 PKC η 在角质化细胞的增殖状态或分化状态都具有积极作用的结果,通过研究感染对于增殖的和分化的角质化细胞的效果分析了激酶失活的显性失活腺病毒 PKC η 构建体的作用。如图 12 所示,在增殖状态和分化状态 PKC η 和 DNPKC η 的腺病毒感染都是高效的。正如所预测的那样,在增殖的角质化细胞中 DNPKC η 诱导角质化细胞的分化,同时使细胞形态发生巨大变化包括细胞变得扁平,细胞和细胞之间的边界消失,正与 Ca^{2+} 诱导的分化伴随的形态改变类似(图 12A-B)。而且,这些变化伴随着角质化细胞增殖的停止(图 11)和分化标记包括角蛋白 1,角蛋白 10,兜甲蛋白 (loricrin) 和纤维聚合蛋白 (filaggrin) 的显著诱导,其量增加到与体内正常皮肤中类似的水平(图 13A-B)。同时,随着分化程序的开始,DNPKC η 的过表达不破坏 Ca^{2+} 诱导的分化。这些结果表明 PKC η 和 DNPKC η 可用于在生理条件下有差别地调控角质化细胞的增殖和分化。

[0286] 实施例 12

[0287] 体内实验

[0288] 为了检测 PKC η 在体内有差别地调控细胞增殖和分化的能力,评价了 PKC η 诱导裸鼠背部完全切开的创伤 (full incisional wounds) 愈合的能力。用对照 β -gal 腺病毒

验证了角质化细胞表达外源重组蛋白的能力。如图 14 所示,感染后两周,在体外角质化细胞和体内皮肤都持续有 β -gal 表达。有趣的是,当用对照, PKC α 和 PKC η 腺病毒构建体局部感染后检查小鼠的创伤愈合过程的时候,只有 PKC η 早在局部感染后四天就诱导肉芽组织形成。这还包括肌肉,脂肪和真皮层的有组织的形成。同时在对照和 PKC α 感染的皮肤中,没有观察到致密的肉芽组织,没有观察到创伤闭合(图 14)。因此,PKC η 可以视为是在诱导创伤愈合过程中调控皮肤增殖和分化的一个主要候选物。

[0289] 实施例 13

[0290] 胰岛素在增殖的角质化细胞中特异诱导 PKC δ 的迁移

[0291] 已发现皮肤中表达的两种 PKC 同种型影响角质化细胞的增殖:PKC η 和 PKC δ 。为了尝试和鉴别激活特定的调节皮肤增殖的 PKC 同种型的内源因子,评价了几种已知促进角质化细胞增殖的生长因子以生长依赖的方式激活特定 PKC 同种型的能力,包括:EGF, KGF, 胰岛素, PDGF 和 IGF1。PKC 同种型 α , δ , ϵ , η 和 ζ 在皮肤中表达。由于 PKC 同种型的激活与它们向膜组分的迁移有关,因此检查了这些生长因子对于不同 PKC 同种型从细胞溶质向膜迁移的作用。如图 15 所示,早在刺激后 5 分钟,胰岛素就特异诱导 PKC δ 从细胞质向膜组分迁移。胰岛素刺激后 PKC δ 在膜上的表达维持数小时。相反, IGF1 减少了 PKC δ 在膜上的表达,而增加了其在细胞质组分中表达的相对水平。没有其它生长因子显著影响 PKC δ 的迁移和定位。其它 PKC 同种型在被任何生长因子包括 IGF1 和胰岛素刺激以后都没有观察到分布上的变化。

[0292] 实施例 14

[0293] 胰岛素在增殖的角质化细胞中特异诱导 PKC δ 的活化

[0294] 为了确定 PKC δ 的迁移是否足以使其活化,测定了来自胰岛素和 IGF1 处理的角质化细胞中细胞质和膜组分的 PKC 免疫沉淀物的激酶活性。如图 16 所示,胰岛素而不是 IGF1 增加膜组分中 PKC δ 的活性。在细胞质组分中没有观察到 PKC α 活性的提高。胰岛素诱导的活化是对 PKC δ 特异性的,在胰岛素刺激后长达 30 分钟都没有观察到 PKC α , ϵ , η 或 ζ 的活化。总而言之,这些结果表明胰岛素而不是 IGF1 选择性刺激 PKC δ 的活化。

[0295] 实施例 15

[0296] 胰岛素和 IGF1 对于角质化细胞增殖具有加和作用

[0297] 为了分析 PKC δ 的特异性活化是否意味着在角质化细胞中特定的胰岛素诱导的促有丝分裂途径,通过研究胰岛素和 IGF1 诱导角质化细胞增殖的能力检查了它们的促有丝分裂作用,通过胸苷掺入检测。如图 17A 所示,胰岛素和 IGF1 以剂量依赖的方式刺激胸苷掺入,分别在 10^{-7} 和 10^{-8} M 的时候达到最大诱导值。在每个浓度, IGF1 的最大刺激值都比胰岛素高。有趣的是,在所有浓度,当两种激素一起使用的时候,具有加和的促有丝分裂作用(图 17B)。这些结果表明胰岛素通过一种和 IGF1 诱导的角质化细胞增殖无关的不同途径调控角质化细胞的增殖。

[0298] 实施例 16

[0299] 胰岛素诱导的 PKC δ 活化和胰岛素诱导的角质化细胞增殖之间的关系

[0300] 为了直接研究胰岛素诱导的 PKC δ 活化和胰岛素诱导的角质化细胞增殖之间的关系,用重组 PKC 腺病毒构建体过表达野生型 PKC δ (WTPKC δ) 以及 PKC 的激酶失活的显性失活突变体,其破坏了内源 PKC δ 活性 (DN PKC δ)。检查了 WT PKC δ 和 DN PKC δ 的过表

达对于胰岛素诱导的角质化细胞增殖的作用。两个构建体以及 PKC α 构建体都能在角质化细胞中高效表达 (图 18A)。而且,用 PKC δ 和 PKC α 感染都可以比对照水平高出几倍地诱导同种型特异性的 PKC 活性 (图 18B)。正如所料, DN PKC δ 的过表达不诱导 PKC 活性。如图 19A 所示,未转染细胞用胰岛素处理或不用胰岛素处理的 WT PKC δ 的过表达增加胸苷掺入到大约相同的水平,是未处理的细胞,或是用 PKC α 转导的细胞的二至三倍。而且,向已经过表达 WT PKC δ 的细胞中加入胰岛素不会引起胸苷掺入的任何额外增加。IGF1 在未感染的细胞和过表达 WT PKC δ 和 PKC α 的细胞中类似地增加胸苷吸收 (图 19A)。进一步通过破坏 PKC δ 的活性证明 PKC δ 直接参与胰岛素诱导的增殖。如图 19B 所示,在过表达显性失活 PKC δ 的细胞中基础胸苷掺入轻微地,但显著地 (significantly),低于未感染细胞。DN PKC δ 的过表达完全消除了胰岛素诱导的增殖,但是不影响 IGF-1 诱导的增殖。而且,胰岛素和 IGF1 的加和效果减至 IGF1 单独的水平。

[0301] 实施例 17

[0302] PKC δ 活化对胰岛素介导的途径的特异性

[0303] 通过研究 PKC δ 和 DN PKC δ 对于针对多种生长因子包括 IGF1, EGF, KGF, ECGF 和 PDGF 的促有丝分裂反应的作用来分析 PKC δ 活化对胰岛素介导的途径的特异性。如图 20 所示, DN PKC δ 的过表达选择性地消除胰岛素诱导的增殖作用,但是不阻断所检测的任何其它生长因子的作用。但是, PKC δ 的过表达模拟胰岛素诱导的增殖但不影响 IGF1 诱导的增殖。EGF 和 KGF 的刺激诱导的增殖增加 (图 21)。这些数据表明胰岛素对 PKC δ 的活化通过涉及 PKC δ 的途径介导角质化细胞的增殖,这个途径位于 EGF 和 KGF, 两种主要的已知能调控角质化细胞增殖的生长因子的信号传导途径的上游。总的来说,发现胰岛素是 PKC δ 活性的特异性调节剂,其可能是在调控胰岛素, EGF 和 KGF 诱导的角质化细胞增殖中的特异性候选物。

[0304] 实施例 18

[0305] 胰岛素诱导的 PKC δ 活性角质化细胞增殖是由 STAT 3 的转录激活介导的

[0306] 进一步研究 PKC δ 在胰岛素信号传导中的作用并发现其涉及 STAT3 介导的转录激活的诱导。如图 23 所示,在原代角质化细胞中, PKC δ 特别与 STAT3 相关。在胰岛素刺激后, PKC δ 被活化,然后磷酸化并激活 STAT3 (图 24)。而且,用药理学抑制剂 (卡马拉素) 破坏 PKC δ 的活性抑制 STAT3 的活化以及其核定位。进一步,如图 25 所示, STAT3 的过表达诱导与胰岛素诱导的和 PKC δ 过表达诱导的类似的增殖,过表达显性失活 PKC δ 突变体破坏 PKC δ 活性,破坏了 STAT3 诱导角质化细胞增殖的能力。这些结果总体表明胰岛素和 PKC δ 在与角质化细胞增殖相关的转录激活中发挥作用。

[0307] 实施例 19

[0308] PKC δ 和 PKC ζ 对于体内创伤愈合过程是必需的

[0309] 用同种型特异性 PKC 无效小鼠 (PKC null mice) 验证 PKC 同种型在体内创伤愈合过程中的重要性。如图 22A-B 所示,当在 PKC δ , PKC ζ , PKC α 无效小鼠 (基因敲除, KO) 和它们的野生型同窝出生鼠的背部造成全厚度创伤的时候,在 PKC δ 和 PKC ζ 无效小鼠中观察到创伤愈合延迟,而 PKC α 无效小鼠没有。这个结果表明甚至是在没有糖尿病背景下,特定的 PKC 同种型对于皮肤的创伤愈合过程也是必需的。

[0310] 实施例 20

[0311] 用于体内创伤愈合的胰岛素的单次应用与多次应用

[0312] 通过切割在 8-10 周龄 C57BL 小鼠背部造成创伤,然后进行如下处理:(i) 在 7 天中每天施用胰岛素 $0.1 \mu\text{M}$;(ii) 在 7 天中每天施用胰岛素 $1 \mu\text{M}$;(iii) 在 7 天中每天施用胰岛素 $10 \mu\text{M}$;(iv) 在致创后 4 天一次性施用胰岛素 $1 \mu\text{M}$;以及 (v) 在 7 天中每天施用载体 (PBS) 对照。所有小鼠都在致创后七天处死,测量它们的张开的创伤的面积。如图 26 所示,以 $1 \mu\text{M}$ 的浓度每天用胰岛素处理显著地比用更低 ($0.1 \mu\text{M}$) 或更高 ($10 \mu\text{M}$) 浓度的胰岛素每天处理更有效。令人惊讶地是,以 $1 \mu\text{M}$ 的浓度单次施用胰岛素比用相同浓度的胰岛素每天施用重复七天处理明显更有效。

[0313] 由于观察到的创伤被疤痕组织覆盖,很难正确评价创伤的实际闭合和重建的表皮的形成。因此用组织学参数来确定胰岛素对于创伤组织的表皮和真皮的闭合的效果。创伤的表皮闭合是通过用角蛋白 14 抗体 (K14, Babco-Convance, Richmond, CA, USA) 对创伤切片 (sections) 染色来确定的,它能够突出显示创伤裂口上基底细胞的形成。如果真皮创伤的两边在 x100 倍放大的光学显微镜下在一个视野中都能看见,则创伤的真皮闭合视为阳性。

[0314] 如图 27 所示,所有胰岛素处理都能有效促进表皮和真皮闭合。与图 26 所示的结果类似,每天用 $1 \mu\text{M}$ 浓度的胰岛素处理显著比用 $0.1 \mu\text{M}$ 或 $10 \mu\text{M}$ 浓度的胰岛素每天处理更有效。此外,用 $1 \mu\text{M}$ 浓度的胰岛素单次施用比用相同浓度的胰岛素每天施用重复七天处理明显更有效。

[0315] 因此,由形态学和组织学参数得到的这些结果显然证明胰岛素对于体内创伤愈合的治疗效果。这些结果令人惊讶地表明确定胰岛素施用的最佳数目和 / 或频率是正确治疗创伤的关键步骤。

[0316] 实施例 21

[0317] 组合使用胰岛素和血小板衍生生长因子 (PDGF-BB) 用于体内创伤愈合

[0318] 通过切割在 8-10 周龄 C57BL 小鼠背部造成创伤,致创 4 天后进行如下处理:(i) 载体 (PBS) 对照;(ii) 胰岛素 $1 \mu\text{M}$;(iii) PDGF-BB $10 \mu\text{M}$ (R&D Systems, Minneapolis, USA); 和 (iv) 胰岛素 $1 \mu\text{M}$ +PDGF-BB $10 \mu\text{M}$ 。处理后三天处死所有小鼠,对处理的创伤从组织学上分析表皮和真皮闭合,如上述实施例 20 中所述。

[0319] 如图 28 所示,单独用胰岛素或 PDGF-BB 处理对于表皮闭合 (比对照高 30-40%) 和真皮闭合 (比对照高 10-20%) 都是部分有效。但是用胰岛素和 PDGF-BB 组合处理产生了明显更高的表皮闭合 (大约比对照高 80%) 以及真皮闭合 (大约 60%)。因此,这些结果表明组合使用胰岛素和 PDGF-BB 能以协同作用的方式影响创伤愈合。这些结果还表明可将胰岛素和其它生长因子或转化因子例如 EGF, TGF β , KGF 组合使用用于创伤的治疗性处理。

[0320] 实施例 22

[0321] 组合使用胰岛素和 PKC α 抑制剂用于体内创伤愈合

[0322] 通过切割在 8-10 周龄 C57BL 小鼠背部造成创伤,用载体 (PBS) 对照或 $0.67 \mu\text{M}$ 胰岛素 (HO/01; Humulin, Eli Lilly, USA) 和 PKC α 抑制剂 (HO/02; 十四酰化的 PKC α 伪底物; Calbiochem, San Diego, CA, USA) 的组合每天处理连续 7 天。致创后 7 天处死所有小鼠,对被处理的创伤分析其创伤闭合,表皮闭合,真皮闭合,和表皮细胞的空间分化。测定张开的创伤区域以确定创伤闭合。如果真皮创伤的两边在 x100 倍放大的光学显微镜下在一

个视野中都能看见,则创伤的真皮闭合视为阳性。用突出显示创伤裂口上基底细胞的形成的 k14 抗体对创伤切片进行染色来确定创伤的表皮闭合。表皮细胞的空间分化通过用突出显示新形成的表皮细胞的 k1 抗体对创伤切片进行染色来确定。

[0323] 如图 28-32 所示,组合使用胰岛素和 (H0/01) 和 PKC α 抑制剂 (H0/02) 显著能促进创伤闭合 (图 29A-B),真皮闭合 (图 30),表皮闭合 (图 31),和表皮细胞的空间分化 (图 32)。如图 33 所示,与载体对照相比,组合使用胰岛素 H0/01 和 PKC α 抑制剂 H0/02 进行处理可分别将创伤表皮闭合从大约 15%提高到 70%,将真皮闭合从大约 15%提高到 50%,将表皮细胞的空间分化从大约 15%提高到 50%。

[0324] 因此,这些结果表明组合使用胰岛素和 PKC α 抑制剂对创伤进行治疗性处理有效促进表皮闭合,真皮闭合,表皮细胞的空间分化,和随后的创伤愈合。

[0325] 实施例 23

[0326] 组合使用胰岛素和 PKC α 抑制剂可防止单独使用胰岛素处理引起的不良的副作用

[0327] 通过切割在 8-10 周龄 C57BL 小鼠背部造成创伤,用载体 (PBS) 对照或 1 μ M 胰岛素 (Humulin, Eli Lilly, USA) 或者 1 μ M 胰岛素和 1 μ M PKC α 伪底物 (Calibiochem, San Diego, CA, USA) 的混合物每天处理连续 7 天。致创后 7 天处死全部小鼠,对被处理的创伤从组织学上分析其表皮的增殖能力 (PCNA),血管生成,炎症,表皮细胞和创伤裂口的重建过程。

[0328] 如下述表 1 所示,与缓冲液对照相比,仅用胰岛素处理会在创伤部位引起异常血管生成的大幅增大 (分别为 60%和 25%)。由于创伤愈合过程涉及快速增殖的表皮细胞,因此血管生成的增加也可能会增加引发癌症发展的危险。另一方面,当组合使用胰岛素和 PKC α 抑制剂的时候,在被处理的创伤部位没有观察到血管生成。

[0329] 表 1

[0330] 单独使用胰岛素和组合使用胰岛素和 PKC α 抑制剂对创伤部位的血管生成的严重程度的影响

[0331]

处理	表皮的增殖能力 (基底细胞层, PCNA)	血管生成
PBS 对照 (PBS 处理) n = 4	5	高度异常
	7	正常
	8	正常
	6 平均 6.5	正常

处理	表皮的增殖能力 (基底细胞层, PCNA)	血管生成
仅用胰岛素 n = 5	8 8 6 5 5 平均 6.4	高度异常 正常 正常 高度异常 高度异常
胰岛素 +PKC α 抑制剂 n = 5	6 6 4 2 3 平均 4.2	正常 正常 正常 正常 正常

[0332] 此外,仅用胰岛素进行处理会导致炎症增加,表皮细胞增生,表皮细胞棘层分化延迟和疤痕增加。当 PKC α 抑制剂和胰岛素组合在一起的时候没有观察到使用胰岛素单独进行处理导致的不良副作用。

[0333] 实施例 24

[0334] PKC α 抑制剂减少创伤炎症

[0335] 创伤处晚期的和严重的炎症反应可能会抑制愈合过程,因此防止这种炎症发生可促进创伤愈合过程。相应地,在下面的实验中检验了 PKC α 抑制剂和胰岛素对创伤炎症的作用。

[0336] 通过切割在 C57BL 小鼠背部造成创伤,每天进行如下处理连续 7 天:(i)PBS,对照;(ii)1 μ M PKC α 抑制剂(十四酰化的伪底物;Calibiochem, USA);(iii)1 μ M 胰岛素(Eli Lilly, USA);或 1 μ M PKC α 抑制剂和 1 μ M 胰岛素的混合物。致创后 7 天处死所有小鼠,在显微镜下观察被处理创伤的炎症。在创伤部位观察到的严重炎症的发生率总结在下述表 1a 中。

[0337] 表 1a

[0338]

处理	创伤中严重炎症的发生率(%)
PBS 对照	60.0
PKC α 抑制剂	40.0

处理	创伤中严重炎症的发生率 (%)
胰岛素	56.0
PKC α 抑制剂 + 胰岛素	50.0

[0339] 结果表明与对照相比,给创伤施用 PKC α 抑制剂可使严重创伤炎症的发生率实质(33.3%)减少。在实验条件下单独使用胰岛素没有抗炎性效果。

[0340] 这些结果表明 PKC α 抑制剂可用于控制创伤的严重炎症的治疗。已证明的 PKC α 抑制剂的减少炎症的能力与它能促进表皮闭合,真皮闭合和表皮细胞的空间分化的能力(参见上述实施例 22),使得它可能成为创伤愈合的最有效的治疗剂。

[0341] 实施例 25

[0342] 调节真皮细胞中特定 PKC 同种型的表达和 / 或活性和给细胞施用不同试剂对加速体外创伤闭合的组合效果

[0343] 材料和方法:

[0344] 试剂:因子 D(Adipsin) 人, CalbioChem, California USA;重组 TNF α 小鼠, R&D Systems, Minneapolis USA;GW 9662, Caymanchemical, USA;蛋白激酶 C α 伪底物抑制剂, CalbioChem, CaliforniaUSA;蛋白激酶 C ζ 伪底物抑制剂, CalbioChem, California USA;蛋白激酶 C η 伪底物抑制剂, CalbioChem, California USA;PDGF-BB, Cytolab, Israel;IL-6, Cytolab, Israel;KGF/FGF-7, Cytolab, Israel;IGF-1, Cytolab, Israel;TGF β 2, Cytolab, Israel;表皮生长因子 (EGF), 小鼠, Chemicon international, California USA;PKC δ RACK, Ana Spec, California USA;罗格列酮 (Rosiglitazon), CalbioChem. California USA;脂联素 (Adiponectin), MBL, Massachusetts USA and **Copaxone®**, TEVA. Israel.

[0345] 体外创伤闭合检测:在皮氏培养皿 (5cm i. d.) 中将角质化细胞和成纤维细胞 (真皮细胞) 培养五天,然后用 200 μ l 的移液管头在每个培养皿中形成人工的交叉划痕。将培养的细胞用能调节特定 PKC 同种型的表达和 / 或活性的腺病毒构建体感染。相应地,用野生型 (WT) PKC 腺病毒构建体活化特定的 PKC,用显性失活 (DN) PKC 腺病毒构建体抑制特定的 PKC。向培养的细胞中进一步加入下述试剂中的一种:胰岛素 (6.7×10^{-7} M), 脂联素 (每培养皿 1 μ g), adipsin (2 μ g/ml), IL-6 (每培养皿 1 μ g), GW9662 (每培养皿 1 μ g), KGF (每培养皿 1 μ g), TNF α (12 μ g/ml), TGF β , rosiglitazone, SRC 抑制剂, PKC δ RACK (10^{-7} M) 和 PKC α 伪底物抑制肽 (10^{-7} M)。在处理 24-48 小时确定得到的创伤闭合水平,用从 0 (不闭合) 到 10 (完全闭合) 的指数值表示。

[0346] 结果:

[0347] 组合治疗对体外成纤维细胞创伤闭合的作用总结于下表 2a-b 和 3a-b。结果表明当配合 adipsin 或胰岛素对细胞给药的时候,成纤维细胞中 PKC α 表达和 / 或活性的抑制显著促进创伤闭合 (创伤闭合的指数值分别为 10 和 8)。在成纤维细胞中 PKC α 的抑制与 PKC η 的抑制, PKC ϵ 的抑制, PKC δ 的活化, 或 PKC ζ 的活化相组合也加速创伤闭合 (创伤闭合的指数值分别为 9, 9, 9 和 7;图 34A-E)。此外,在成纤维细胞中 PKC ζ 的抑制与 KGF 对细胞的给药相组合促进创伤愈合 (创伤愈合指数值为 7;图 36)。进一步另外,成纤维细胞

中 PKC β 的抑制与胰岛素, IL-6, KGF 或 GW9662 的给药相组合加速创伤闭合 (创伤闭合指数值分别为 8, 7, 9 和 8 ;图 38A-E)。

[0348] 表 2a

[0349] 组合处理对体外创伤成纤维细胞闭合的效果¹

[0350]

	对照	Adipsin	胰岛素	IL-6	TGF β	KGF
PKC α 的抑制	4	10	8	3	ND	2
PKC β 的抑制	4	ND	8	7	1	9
PKC ζ 的抑制	2	ND	0	2	ND	7

[0351] ¹ 闭合的数值是 0 (不闭合) 到 10 (完全闭合)

[0352] ND = 未测定

[0353] 表 2b

[0354] 组合处理对体外创伤成纤维细胞闭合的效果¹

[0355]

	脂联素	Rosiglitazone	GW9662	SRC 抑制剂
PKC α 的抑制	3	5	2	3
PKC β 的抑制	3	3	8	2
PKC ζ 的抑制	2	2	1	1

[0356] ¹ 闭合的数值是 0 (不闭合) 到 10 (完全闭合)

[0357] 表 3a

[0358] 组合处理对体外创伤成纤维细胞闭合的效果¹

[0359]

	对照	PKC γ 的活化	PKC η 的抑制	PKC ϵ 的活化
PKC α 的抑制	4	5	9	3

[0360] ¹ 闭合的数值是 0 (不闭合) 到 10 (完全闭合)

[0361] 表 3b

[0362] 组合处理对体外创伤成纤维细胞闭合的效果 ¹

[0363]

	PKC ϵ 的抑制	PKC δ 的活化	PKC ζ 的活化	PKC ζ 的抑制
PKC α 的抑制	9	9	7	1

[0364] ¹ 闭合的数值是 0 (不闭合) 到 10 (完全闭合)

[0365] 组合处理对于体外角质化细胞创伤闭合的效果总结于下表 4a-b 和 5a-b 中。结果显示当配合 KGF, IL-6, TNF α 或 PKC δ RACK 肽对细胞给药的时候, 角质化细胞中 PKC α 表达和 / 或活性的抑制显著促进创伤闭合 (创伤闭合的指数值分别为 6, 8, 10 和 8 ; 图 35A-C 和 G)。角质化细胞中 PKC α 的抑制与细胞中 PKC η , PKC ϵ , 或 PKC ζ 的刺激相组合也增加创伤闭合 (创伤闭合的指数值分别为 10, 9 和 6 ; 图 35A, D-F 和 H)。此外, 角质化细胞中 PKC ζ 的抑制与 IL-6, TNF- α 或脂联素对细胞的给药相组合促进创伤闭合 (创伤闭合指数值分别为 9, 9 和 7 ; 图 37A-D)。进一步另外, 在角质化细胞中提高 PKC δ 的活性和 / 或表达与细胞中 PKC ϵ 的激活, PKC ζ 的激活, 或 PKC α 的抑制相组合, 或者 adipsin 向细胞的给药, 加速创伤闭合 (创伤闭合指数值分别为 7, 8, 8 和 8 ; 图 39A-E)。

[0366] 表 4a

[0367] 组合处理对体外创伤角质化细胞闭合的效果 ¹

[0368]

	对照	KGF	IL-6	TNF α	Adipsin	脂联素
胰岛素	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PKC α 的抑制	3	6	8	10	4	2
PKC δ 的活化	ND	ND	ND	ND	8	ND
PKC ζ 的抑制	0	0	9	9	ND	7

[0369] ¹ 闭合的数值是 0 (不闭合) 到 10 (完全闭合)

[0370] ND = 未测定

[0371] 表 4b

[0372] 组合处理对体外创伤角质化细胞闭合的效果 ¹

[0373]

	Rosiglita zone	SRC 抑制 剂	PKC δ RACK	PKC α 伪 底物	PKC α 伪 底物 + 胰 岛素
胰岛素	ND	ND	9	9	ND
PKC α 的 抑制	2	0	8	ND	ND
PKC β 的 活化	ND	ND	ND	ND	ND
PKC ζ 的 抑制	2	0	0	ND	ND

[0374] ¹ 闭合的数值是 0 (不闭合) 到 10 (完全闭合)

[0375] ND = 未测定

[0376] 表 5a

[0377] 组合处理对体外创伤角质化细胞闭合的效果 ¹

[0378]

	对照	PKC η 的活化	PKC η 的抑制	PKC ϵ 的活化
PKC α 的抑制	3	10	5	9
PKC δ 的 活化	3	ND	ND	7

[0379] ¹ 闭合的数值是 0 (不闭合) 到 10 (完全闭合)

[0380] ND = 未测定

[0381] 表 5b

[0382] 组合处理对体外创伤角质化细胞闭合的效果 ¹

[0383]

	PKC ϵ 的抑 制	PKC ζ 的活化	PKC ζ 的抑制	PKC α 的抑制
PKC α 的抑制	2	6	3	
PKC δ 的 活化	3	8	3	8

[0384] ¹ 闭合的数值是 0 (不闭合) 到 10 (完全闭合)

[0385] ND = 未测定

[0386] 因此,该结果表明当联合生长因子例如 IL-6, KGF, TNF α , 激素例如胰岛素, 脂肪细胞激素例如 adipsin 或脂联素, PKC δ RACK 和 / 或 GW9662 对细胞的给药时, 调节创伤部位的真皮细胞和表皮细胞中特定 PKC 同种型的表达和 / 或活性显著加速创伤闭合。

[0387] 实施例 26

[0388] 体外和体内施用共聚物 -1 用于创伤愈合

[0389] 材料和方法:

[0390] 共聚物 -1: 共聚物 -1 (Glatiramer acetate) 是药物 **Copaxone®** (Teva, Israel) 的活性成分, 在临床上用于治疗多发性硬化。共聚物 -1 是髓鞘碱性蛋白 (MBP) 的合成多肽类似物, MBP 是髓鞘的天然成分。从化学上来分析, 共聚物 -1 是 L- 谷氨酸和 L- 丙氨酸, L- 赖氨酸和 L- 酪氨酸的聚合物的乙酸盐。它的结构式是: (Glu, Ala, Lys, Tyr) x . X CH₃COOH (C₅H₉N₀₄ • C₃H₇N₀₂ • C₆H₁₄N₀₂ • C₉H₁₁N₀₃) x • xC₂H₄O₂。glatiramer acetate 的平均分子量是 4,700-11,000 道尔顿。它的合成是将这四种氨基酸进行化学聚合形成平均分子量为 23,000 道尔顿的产物 (美国专利 No. 3,849,550)。

[0391] 体外检测: 基本按照上述实施例 24 中所述进行检测。向培养的角质化细胞中加入共聚物 -1, 浓度为每个培养 55 μ g, 单独加入或与 PKC α 伪底物 (1 μ M) 和 / 或胰岛素 (1 μ M) 一起加入。处理后 48 小时确定得到的创伤闭合水平, 采用从 0 (不闭合) 到 10 (完全闭合) 的指数值。

[0392] 体内检测: 通过切割在 C57BL 小鼠背部造成创伤 (20mm), 致创 4 天后进行如下处理: (i) 载体 (PBS) 对照; (ii) 共聚物 -1 (55 μ g/ml); (iii) 共聚物 -1 (55 μ g/ml) 和胰岛素 (1 μ M) 的混合物; (iv) PKC α 伪底物抑制肽 (1 μ M) 和胰岛素 (1 μ M) 的混合物; 以及 (v) 共聚物 -1 (55 μ g/ml), PKC α 伪底物抑制肽 (1 μ M) 和胰岛素 (1 μ M) 的混合物。从形态学上对创伤评估其 (i) 创伤闭合, (ii) 痂的形成和 (iii) 创伤的出血 / 渗液。

[0393] 结果

[0394] 体外检测: 给培养的角质化细胞施用共聚物 -1 促进体外创伤闭合, 在指数值范围为 0 (不闭合) 到 10 (完全闭合) 的尺度中达到指数值为 8。将共聚物 -1 与 PKC α 伪底物抑制肽组合, 或与 PKC α 伪底物和胰岛素的混合物组合, 获得相似的效果 (创伤闭合指数值分别为 8 和 9; 图 40A-F)。因此, 这些结果表明共聚物 -1 本身能够显著加速体外创伤闭合。

[0395] 体内检测: 与未处理的对照相比, 给切开的创伤单独施用共聚物 -1, 或与胰岛素和 / 或 PKC α 伪底物组合施用, 能够显著减少创伤裂口区域并加速创伤中痂的形成。此外, 所有用共聚物 -1 进行的处理都有效防止创伤部位出血和渗液。

[0396] 因此, 这些结果表明给创伤部位单独施用有效量的共聚物 -1 或与胰岛素和 / 或 PKC α 伪底物抑制肽组合施用可以能够显著加速创伤愈合过程。

[0397] 实施例 27

[0398] 胸腺分泌的物质对于创伤愈合过程的影响

[0399] 材料和方法:

[0400] 在正常的成年啮齿动物或 STZ 糖尿病小鼠的上背部 (靠近脖颈处) 切出创伤。处理后 7 或 9 天处死动物, 从组织学对创伤分析创伤部位附近胸腺的存在, 用上述实施例 20 中所述的染色程序分析创伤的表皮和真皮闭合。

[0401] 结果：

[0402] 如图 42A-H 所示,在创伤裂口紧邻处胸腺的存在与创伤中加速的上皮化,组织的粒化和真皮收缩有关。这些观察结果表明胸腺分泌的物质可有效利于创伤的愈合过程。相应地,胸腺衍生的物质例如胸腺素, β 胸腺素 (例如胸腺素 β 4,胸腺素 β 10,胸腺素 β 9,胸腺素 β 12,胸腺素 β 14), α thimosin (例如胸腺素 α , 1/zadaxin, 前胸腺素 α , parathymosin α), 胸腺肽, IGF1, IGFII, NGF, 生长激素抑制素, 甲状腺球蛋白, 副甲状腺激素和 / 或胸腺激素肽 (THP) 可用于加速创伤愈合过程的治疗。

[0403] 应当理解在分开的实施方案中为清楚起见描述的本发明的特定特征,也可以在单个实施方案中组合提供。相反地,在单个实施方案中为简洁起见描述的本发明的各个特征,也可以分开提供或者以任何合适的次组合提供。

[0404] 虽然本发明是结合特定的实施方案描述的,很明显对于本领域技术人员来说有多种替代方案,修改和变化都是显而易见地。相应地,本发明意在包括落在本发明的附加的权利要求的精神和范围中的所有替代方案,修改和变化。说明书中提到的所有出版物,专利,专利申请都将其全文引入说明书中作为参考,如同特别地和单独指出每一个出版物,专利,专利申请都被引入本文作为参考。此外,本申请中对任何参考文献的引用或标识不应当理解为承认这些文献可作为本发明的现有技术。

[0405] 由数字标识的参考文献

[0406] (其它的文献在文中引用)

[0407] 1. Hennings, H., Michael, D., Cheng, C., Steinert, P., Holbrook, K., and Yuspa, S. H. Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell*, 19 :245-254, 1980.

[0408] 2. Yuspa, S. H., Kilkeny, A. E., Steinert, P. M., and Roop, D. R. Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro. *J. Cell Biol.*, 109 :1207-1217, 1989.

[0409] 3. Fuchs, E. Epidermal differentiation: the bare essentials. *J. Cell Biol.*, 111 :2807-2814, 1990.

[0410] 4. Yuspa, S. H. The pathogenesis of squamous cell cancer: lessons learned from studies of skin carcinogenesis--Thirty-third G. H. A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res.*, 54 :1178-1189, 1994.

[0411] 5. Hennings, H. and Holbrook, K. A. Calcium regulation of cell-cell contact and differentiation of epidermal cells in culture. An ultrastructural study. *Exp. Cell Res.*, 143 :127-142, 1983.

[0412] 6. Tennenbaum, T., Li, L., Belanger, A. J., De Luca, L. M., and Yuspa, S. H. Selective changes in laminin adhesion and $\alpha 6 \beta 4$ integrin regulation are associated with the initial steps in keratinocyte maturation. *Cell Growth Differ.*, 7 :615-628, 1996.

[0413] 7. Tennenbaum, T., Belanger, A. J., Quaranta, V., and Yuspa, S. H. Differential regulation of integrins and extracellular matrix binding in epidermal differentiation and squamous tumor progression. *J. Invest. Dermatol.*, 1 :

157-161, 1996.

[0414] 8. Nishizuka, Y. The molecular heterogeneity of PKC and its implications for cellular regulation. *Nature*, 334 :661-665, 1988.

[0415] 9. Nishizuka, Y. The family of protein kinase C for signal transduction. *JAMA*, 262 :1826-1833, 1989.

[0416] 10. Denning, M. F. , Dlugosz, A. A. , Williams, E. K. , Szallasi, Z. , Blumberg, P. M. , and Yuspa, S. H. Specific protein kinase C isozymes mediate the induction of keratinocyte differentiation markers by calcium. *Cell Growth Differ.*, 6 : 149-157, 1995.

[0417] 11. Dlugosz, A. A. , Pettit, G. R. , and Yuspa, S. H. Involvement of Protein kinase C in Ca^{2+} -mediated differentiation on cultured primary mouse keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, 94 :519-519, 1990. (Abstract)

[0418] 12. Dlugosz, A. A. and Yuspa, S. H. Coordinate changes in gene expression which mark the spinous to granular cell transition in epidermis are regulated by protein kinase C. *J. Cell Biol.*, 120 :217-225, 1993.

[0419] 13. Kuroki, T. , Kashiwagi, M. , Ishino, K. , Huh, N. , and Ohba, M. Adenovirus-mediated gene transfer to keratinocytes--a review. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, 4 :153-157, 1999.

[0420] 14. Rosenfeld, M. A. , Siegfried, W. , Yoshimura, K. , Yoneyama, K. , Fukayama, M. , Stier, L. E. , Paakko, P. K. , Gi, P. , Stratford-Perricaudet, M. , Jallet, J. , Pavirani, A. , Lecocq, J. P. , and Crystal, R. G. Adenovirus-mediated transfer of a recombinant al-antitrypsin gene to the lung epithelium in vivo. *Science*, 252 :431-434, 1991.

[0421] 15. Setoguchi, Y. , Jaffe, H. A. , Danel, C. , and Crystal, R. G. Ex Vivo and in vivo gene transfer to the skin using replication-deficient recombinant adenovirus vectors. *J. Invest. Dermatol.*, 102 :415-421, 1994.

[0422] 16. Greenhalgh, D. A. , Rothnagel, J. A. , and Roop, D. R. Epidermis : An attractive target tissue for gene therapy. *J. Invest. Dermatol.*, 103 :63S-69S, 1994.

[0423] 17. Miyake, S. , Makimura, M. , Kanegae, Y. , Harada, S. , Sato, Y. , Takamori, K. , Tokuda, C. , and Saito, I. Efficient generation of recombinant adenoviruses using adenovirus DNA-terminal protein complex and a cosmid bearing the full-length virus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93 :1320-1324, 1996.

[0424] 18. Dlugosz, A. A. , Glick, A. B. , Tennenbaum, T. , Weinberg, W. C. , and Yuspa, S. H. Isolation and utilization of epidermal keratinocytes for oncogene research. In : P. K. Vogt and I. M. Verma (eds.), *Methods in Enzymology*, pp. 3-20, New York : Academic Press. 1995.

[0425] 19. Ohba, M. , Ishino, K. , Kashiwagi, M. , Kawabe, S. , Chida, K. , Huh, N. H. , and Kuroki, T. Induction of differentiation in normal human keratinocytes by adenovirus-mediated introduction of the eta and delta isoforms of protein kinase C. *Mol. Cell Biol.*, 18 :5199-5207, 1998.

- [0426] 20. Weinstein, M. L. Update on wound healing :a review of the literature. *Mil. Med.* ,163 :620-624,1998.
- [0427] 21. Singer, A. J. and Clark, R. A. Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med.* ,341 :738-746,1999.
- [0428] 22. Whitby, D. J. and Ferguson, M. W. Immunohistochemical localization of growth factors in fetal wound healing. *Dev. Biol.* ,147 :207-215,1991.
- [0429] 23. Kiritsy, C. P. , Lynch, . B. , and Lynch, S. E. Role of growth factors in cutaneous wound healing :a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* ,4 :729-760,1993.
- [0430] 24. Andresen, J. L. , Ledet, T. , and Ehlers, N. Keratocyte migration and peptide growth factors :the effect of PDGF, bFGF, EGF, IGF-I, aFGF and TGF-beta on human keratocyte migration in a collagen gel. *Curr. Eye Res.* ,16 :605-613,1997.
- [0431] 25. Werner, S. , Breeden, M. , Hubner, G. , Greenhalgh, D. G. , and Longaker, M. T. Induction of keratinocyte growth factor expression is reduced and delayed during wound healing in the genetically diabetic mouse. *J. Invest. Dermatol.* ,103 :469-473,1994.
- [0432] 26. Threadgill, D. W. , Dlugosz, A. A. , Hansen, L. A. , Tennenbaum, T. , Lichti, U. , Yee, D. , LaMantia, C. , Mourton, T. , Herrup, K. , Harris, R. C. , Barnard, J. A. , Yuspa, S. H. , Coffey, R. J. , and Magnuson, T. Targeted disruption of mouse EGFR receptor :effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* ,269 :230-234,1995.
- [0433] 27. Osada, S. , Mizuno, K. , Theo, T. C. , Akita, Y. , Suzuki, K. , Kuroki, T. , and Ohno, S. A phorbol ester receptor/protein kinase, nPKC α , a new member of the protein kinase C family predominantly expressed in lung and skin. *J. Biol. Chem.* ,265 :22434-22440,1990.
- [0434] 28. Chida, K. , Sagara, H. , Suzuki, Y. , Murakami, A. , Osada, S. , Ohno, S. , Hirosawa, K. , and Kuroki, T. The η isoform of protein kinase C is localized on rough endoplasmic reticulum. *Mol. Cell Biol.* ,14 :3782-3790,1994.
- [0435] 29. Knighton, D. R. and Fiegel, V. D. Growth factors and comprehensive surgical care of diabetic wounds. *Curr. Opin. Gen. Surg.* ,32-9 :32-39,1993.
- [0436] 30. Shaw, J. E. and Boulton, A. J. The pathogenesis of diabetic foot problems : an overview. *Diabetes* ,46 Suppl 2 :S58-61 :S58-S61,1997.
- [0437] 31. Coghlan, M. P. , Pillay, T. S. , Tavare, J. M. , and Siddle, K. Site-specific anti-phosphopeptide antibodies :use in assessing insulin receptor serine/threonine phosphorylation state and identification of serine-1327 as a novel site of phorbol ester-induced phosphorylation. *Biochem. J.* ,303 :893-899,1994.
- [0438] 32. Grunfeld, C. Diabetic foot ulcers :etiology, treatment, and prevention. *Adv. Intern. Med.* ,37 :103-132 :103-132,1992.
- [0439] 33. Reiber, G. E. , Lipsky, B. A. , and Gibbons, G. W. The burden of diabetic foot ulcers. *Am. J. Surg.* ,176 :5S-10S,1998.

- [0440] 34. Wertheimer, E., Trebicz, M., Eldar, T., Gartsbein, M., Nofeh-Mozes, S., and Tennenbaum, T. Differential Roles of Insulin Receptor and Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor in Differentiation of Murine Skin Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, in press; 2000.
- [0441] 35. Gschwendt, M. Protein kinase C δ . *Eur. J. Biochem.*, 259:555-564, 1999.
- [0442] 36. Bajou, K., Noel, A., Gerard, R. D., Masson, V., Brunner, N., Holst-Hansen, C., Skobe, M., Fusenig, N. E., Carmeliet, P., Collen, D., and Foidart, J. M. Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat. Med.*, 4:923-928, 1998.
- [0443] 37. Alessenko, A., Khan, W. A., Wetsel, W. C., and Hannun, Y. A. Selective changes in protein kinase C isoenzymes in rat liver nuclei during liver regeneration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 182:1333-1339, 1992.
- [0444] 38. Soltoff, S. P. and Toker, A. Carbachol, substance P, and phorbol ester promote the tyrosine phosphorylation of protein kinase C δ in salivary gland epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 270:13490-13495, 1995.
- [0445] 39. Mischak, H., Pierce, J. H., Goodnight, J., Kazanietz, M. G., Blumberg, P. M., and Mushinski, J. F. Phorbol ester-induced myeloid differentiation is mediated by protein kinase C- α and - δ and not by protein kinase C- β II, - ϵ , -zeta and eta. *J. Biol. Chem.*, 268:20110-20115, 1993.
- [0446] 40. Sun, Q., Tsutsumi, K., Kelleher, M. B., Pater, A., and Pater, M. M. Squamous metaplasia of normal and carcinoma in situ of HPV 16-immortalized human endocervical cells. *Cancer Res.*, 52:4254-4260, 1992.
- [0447] 41. Mischak, H., Goodnight, J., Kolch, W., Martiny-Baron, G., Schaehtle, C., Kazanietz, M. G., Blumberg, P. M., Pierce, J. H., and Mushinski, J. F. over-expression of protein kinase C- δ and - ϵ in NIH 3T3 cells induces opposite effects of growth, morphology, anchorage dependence, and tumorigenicity. *J. Biol. Chem.*, 268:6090-6096, 1993.
- [0448] 42. Braiman, L., Alt, A., Kuroki, T., Ohba, M., Bak, A., Tennenbaum, T., and Sampson, S. R. Protein kinase C δ mediates insulin-induced glucose transport in primary cultures of rat skeletal muscle. *Mol. Endocrinol.*, 13:2002-2012, 1999.
- [0449] 43. Braiman, L., Sheffi-Friedman, L., Bak, A., Tennenbaum, T., and Sampson, S. R. Tyrosine phosphorylation of specific protein kinase C isoenzymes participates in insulin stimulation of glucose transport in primary cultures of rat skeletal muscle. *Diabetes*, 48:1922-1929, 1999.
- [0450] 44. Bandyopadhyay, G., Standaert, M. L., Kikkawa, U., Ono, Y., Moscat, J., and Farese, R. V. Effects of transiently expressed atypical (zeta, lambda), conventional (alpha, beta) and novel (delta, epsilon) protein kinase C isoforms on insulin-stimulated translocation of epitope-tagged GLUT4 glucose

transporters in rat adipocytes: specific interchangeable effects of protein kinases C-zeta and C-lambda. *Biochem. J.*, 337:461-470, 1999.

[0451] 45. Formisano, P., Oriente, F., Miele, C., Caruso, M., Auricchio, R., Vigliotta, G., Condorelli, G., and Beguinot, F. In NIH-3T3 fibroblasts, insulin receptor interaction with specific protein kinase C isoforms controls receptor intracellular routing. *J. Biol. Chem.*, 273:13197-13202, 1998.

[0452] 46. Wang, Q. J., Bhattacharyya, D., Garfield, S., Nacro, K., Marquez, V. E., and Blumberg, P. M. Differential localization of protein kinase C delta by phorbol esters and related compounds using a fusion protein with green fluorescent protein. *J. Biol. Chem.*, 274:37233-37239, 1999.

[0453] 序列表

[0454] <110> Tennenbaum, Tamar

[0455] Sampson, Sanford

[0456] Kuroki, Toshio

[0457] Alt, Addy

[0458] Shen, Shlomzion

[0459] <120> 用于愈合创伤的方法和药物组合物

[0460] <130> 28181

[0461] <160> 16

[0462] <170> Patent In version 3.2

[0463] <210> 1

[0464] <211> 21

[0465] <212> DNA/RNA

[0466] <213> 人工序列

[0467] <220>

[0468] <223> siRNA 寡核苷酸

[0469] <400> 1

[0470] ggaccacaaa uucaucgcgt t 21

[0471] <210> 2

[0472] <211> 21

[0473] <212> DNA/RNA

[0474] <213> 人工序列

[0475] <220>

[0476] <223> siRNA 寡核苷酸

[0477] <400> 2

[0478] cgcgauaau uugugucct t 21

[0479] <210> 3

[0480] <211> 21

[0481] <212> DNA/RNA

- [0482] <213> 人工序列
[0483] <220>
[0484] <223>SiRNA 寡核苷酸
[0485] <400>3
[0486] auucaucgcg cgcuccuuct t 21
[0487] <210>4
[0488] <211>21
[0489] <212>DNA/RNA
[0490] <213> 人工序列
[0491] <220>
[0492] <223>SiRNA 寡核苷酸
[0493] <400>4
[0494] gaagaagcgc gcgaugaut t 21
[0495] <210>5
[0496] <211>21
[0497] <212>DNA/RNA
[0498] <213> 人工序列
[0499] <220>
[0500] <223>SiRNA 寡核苷酸
[0501] <400>5
[0502] acaaggcuuc cagugccaat t 21
[0503] <210>6
[0504] <211>21
[0505] <212>DNA/RNA
[0506] <213> 人工序列
[0507] <220>
[0508] <223>SiRNA 寡核苷酸
[0509] <400>6
[0510] uuggcacugg aagccuugut t 21
[0511] <210>7
[0512] <211>21
[0513] <212>DNA/RNA
[0514] <213> 人工序列
[0515] <220>
[0516] <223>SiRNA 寡核苷酸
[0517] <400>7
[0518] ucccuaugga uccaaacggt t 21
[0519] <210>8
[0520] <211>21

- [0521] <212>DNA/RNA
[0522] <213> 人工序列
[0523] <220>
[0524] <223>SiRNA 寡核苷酸
[0525] <400>8
[0526] ccguuuggau ccuagggat t 21
[0527] <210>9
[0528] <211>21
[0529] <212>DNA/RNA
[0530] <213> 人工序列
[0531] <220>
[0532] <223>SiRNA 寡核苷酸
[0533] <400>9
[0534] acuuauuccu gaucceaagt t 21
[0535] <210>10
[0536] <211>21
[0537] <212>DNA/RNA
[0538] <213> 人工序列
[0539] <220>
[0540] <223>SiRNA 寡核苷酸
[0541] <400>10
[0542] cuugggauca ggaauaagut t 21
[0543] <210>11
[0544] <211>21
[0545] <212>DNA/RNA
[0546] <213> 人工序列
[0547] <220>
[0548] <223>SiRNA 寡核苷酸
[0549] <400>11
[0550] auccgcagug gaugaguct t 21
[0551] <210>12
[0552] <211>21
[0553] <212>DNA/RNA
[0554] <213> 人工序列
[0555] <220>
[0556] <223>SiRNA 寡核苷酸
[0557] <400>12
[0558] gacucauucc acugcgaut t 21
[0559] <210>13

- [0560] <211>21
[0561] <212>DNA/RNA
[0562] <213> 人工序列
[0563] <220>
[0564] <223>SiRNA 寡核苷酸
[0565] <400>13
[0566] agaccgacga cugucuguat t 21
[0567] <210>14
[0568] <211>21
[0569] <212>DNA/RNA
[0570] <213> 人工序列
[0571] <220>
[0572] <223>SiRNA 寡核苷酸
[0573] <400>14
[0574] uacagacagu cgucggucut t 21
[0575] <210>15
[0576] <211>21
[0577] <212>DNA/RNA
[0578] <213> 人工序列
[0579] <220>
[0580] <223>SiRNA 寡核苷酸
[0581] <400>15
[0582] ggaaccacaa gcaguauuct t 21
[0583] <210>16
[0584] <211>21
[0585] <212>DNA/RNA
[0586] <213> 人工序列
[0587] <220>
[0588] <223>SiRNA 寡核苷酸
[0589] <400>16
[0590] gaauacugcu ugugguucct t 21

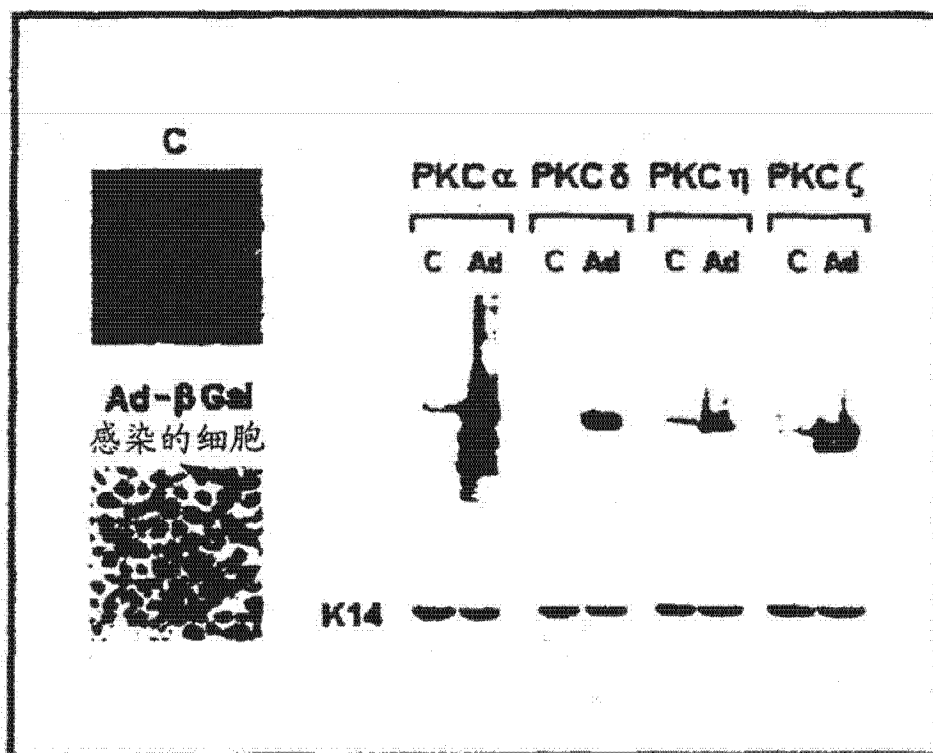


图 1

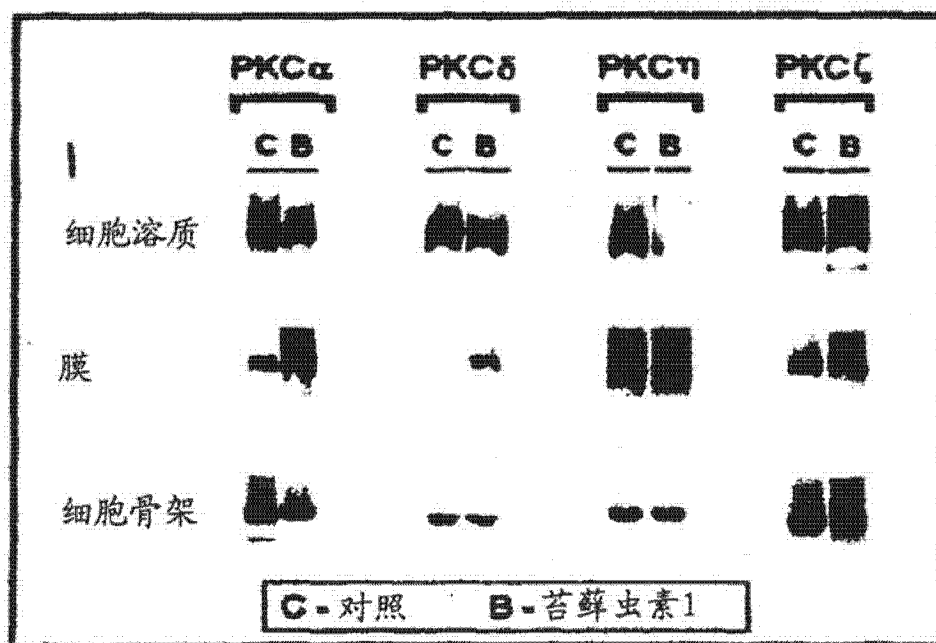


图 2

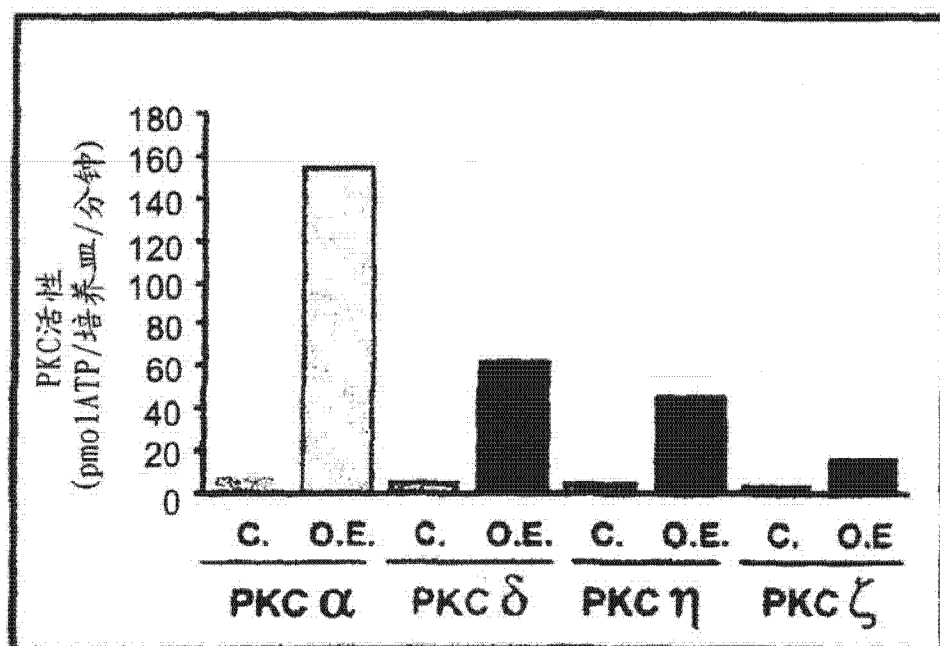


图 3

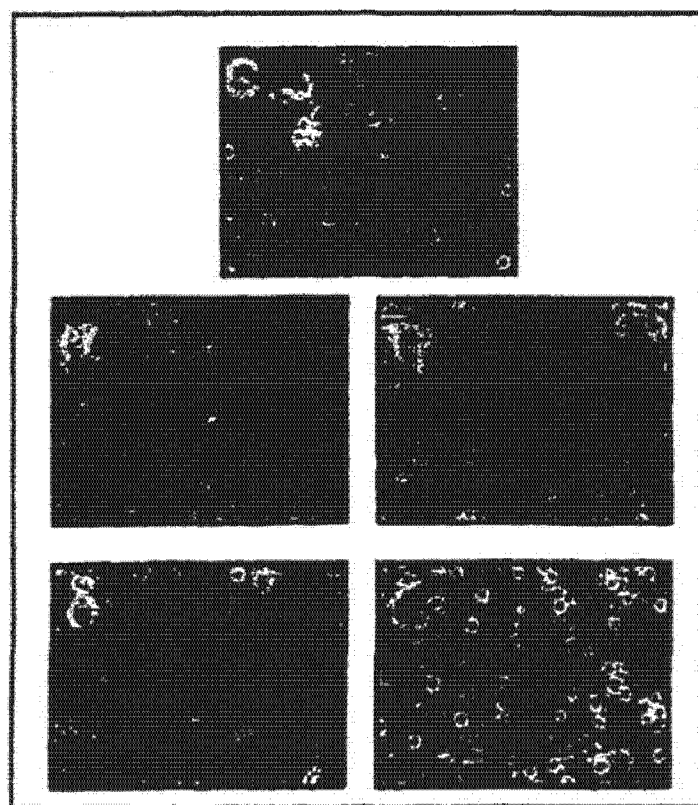


图 4

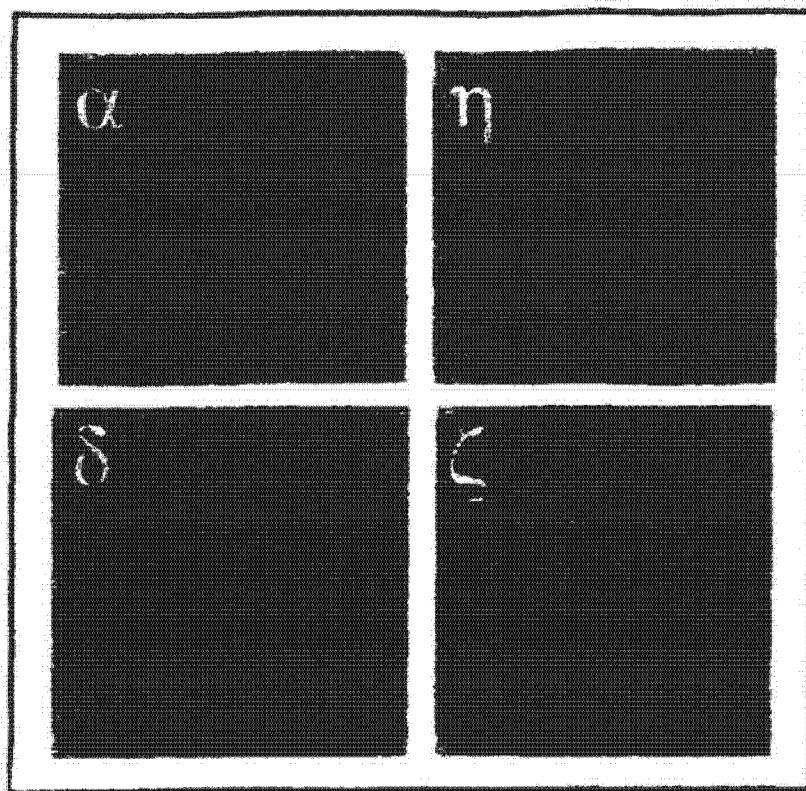


图 5

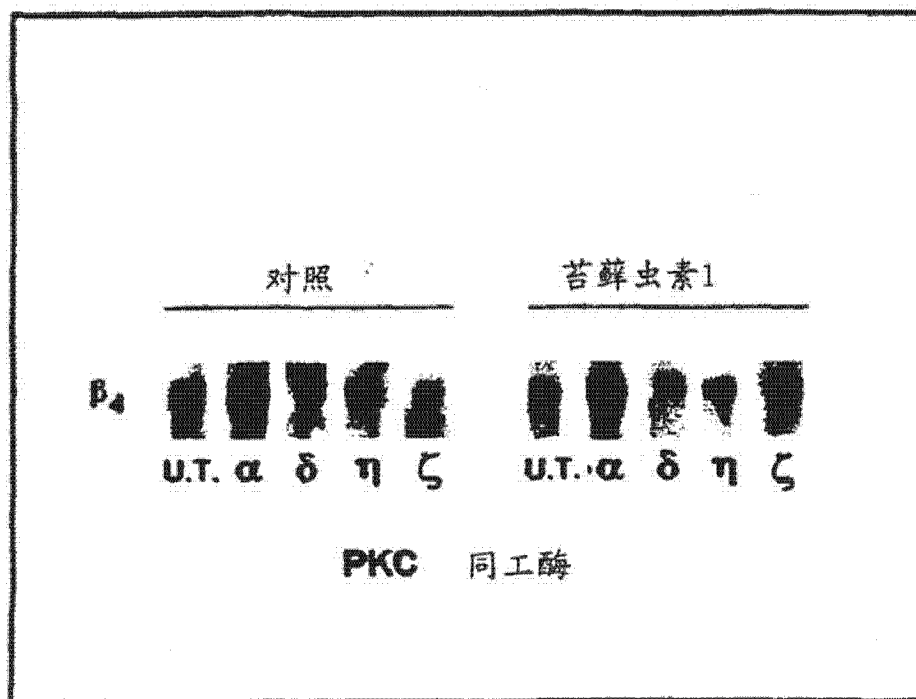


图 6

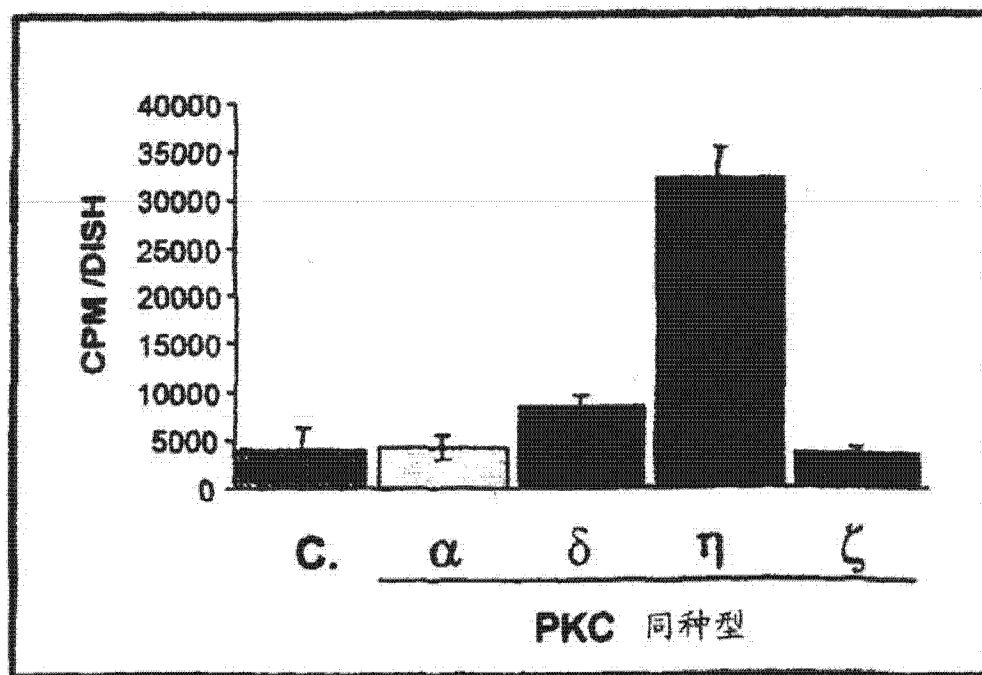


图 7

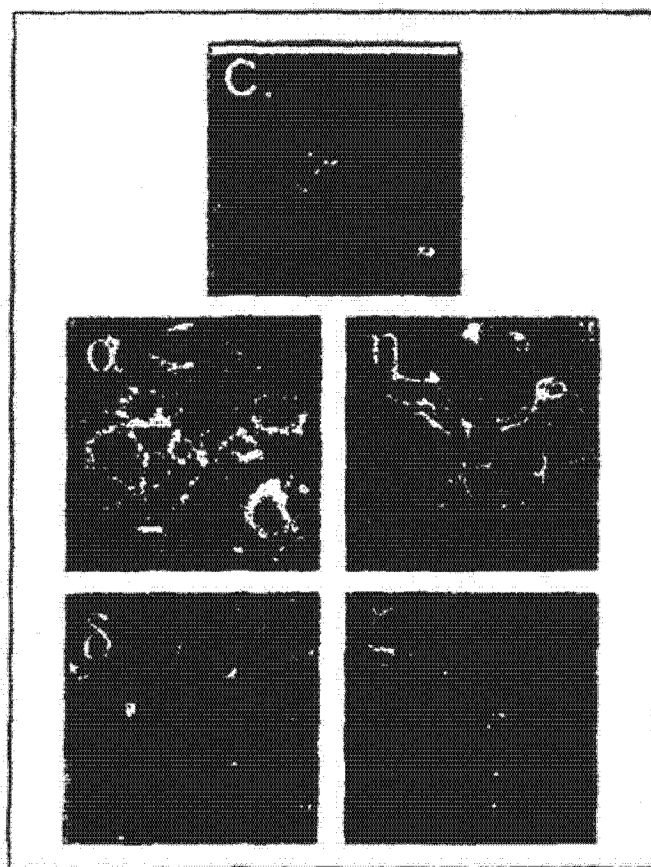


图 8

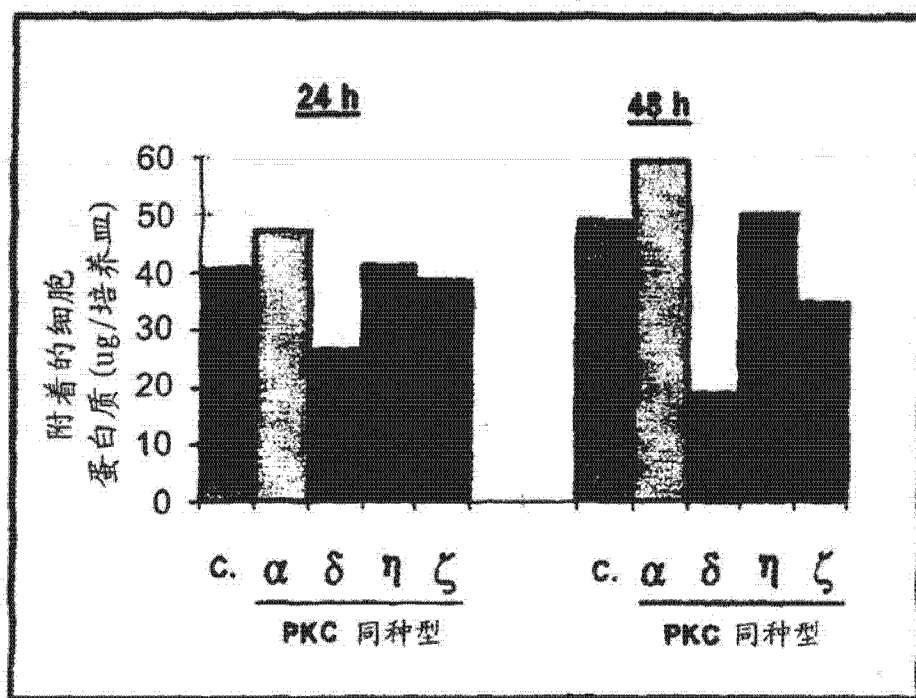


图 9a

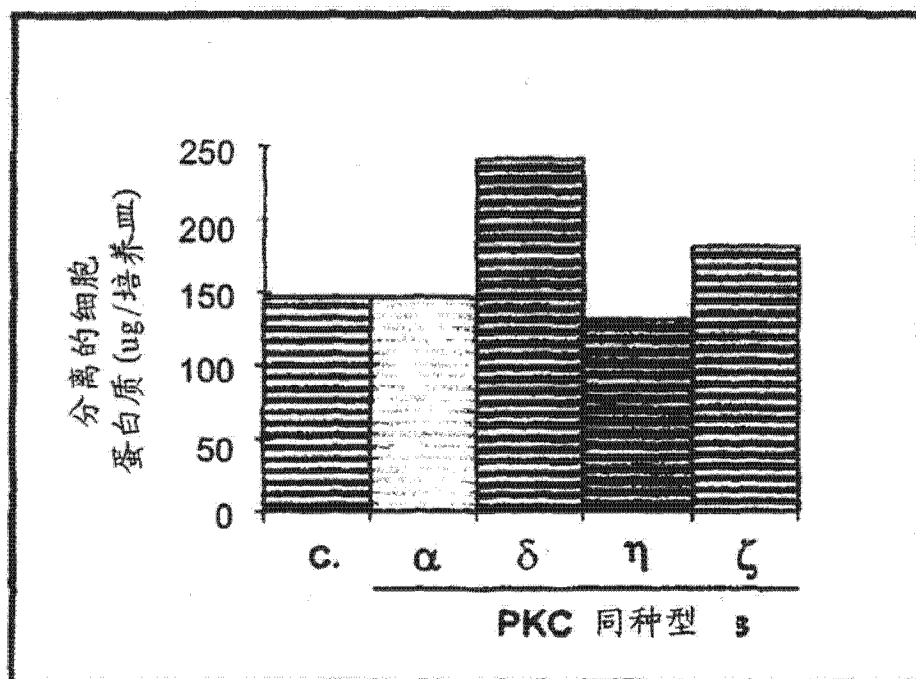


图 9b

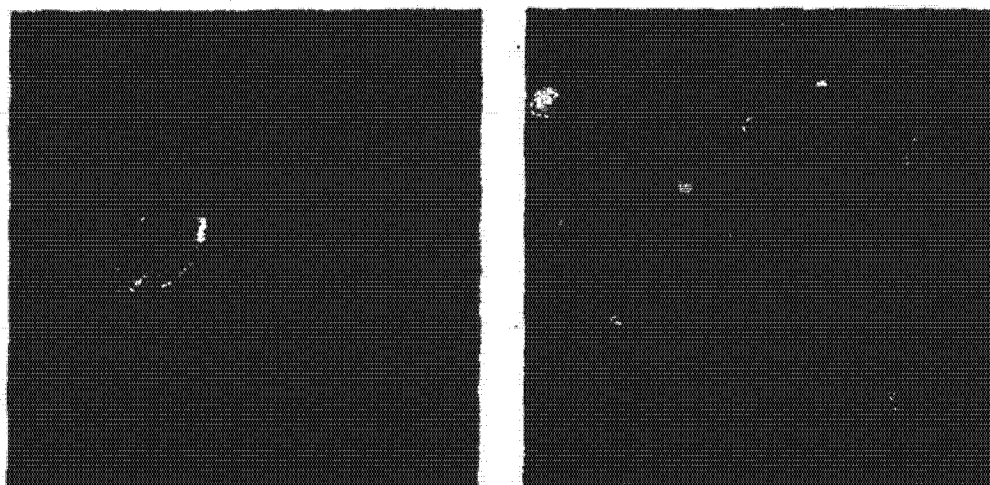


图 10

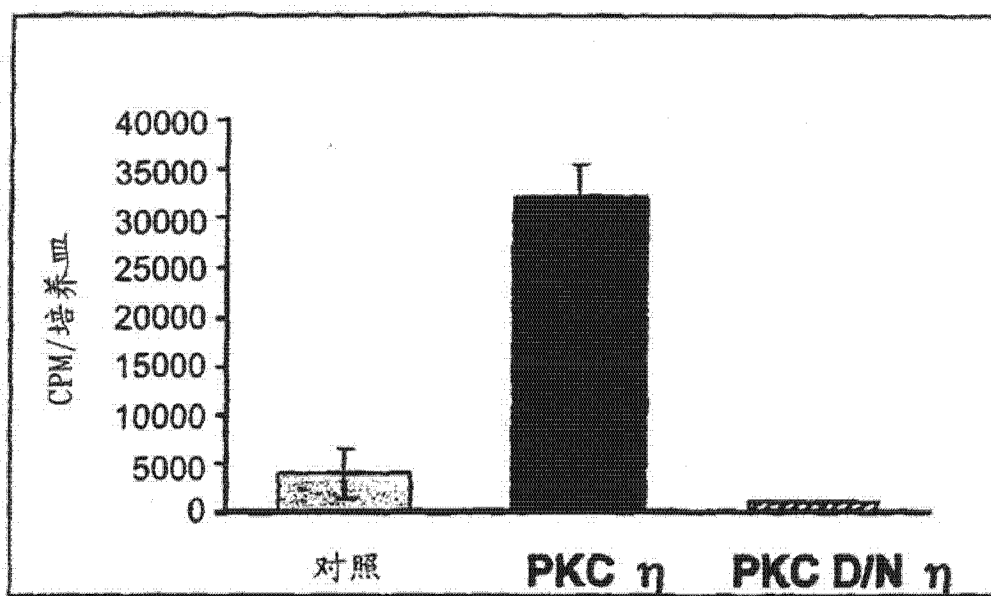


图 11

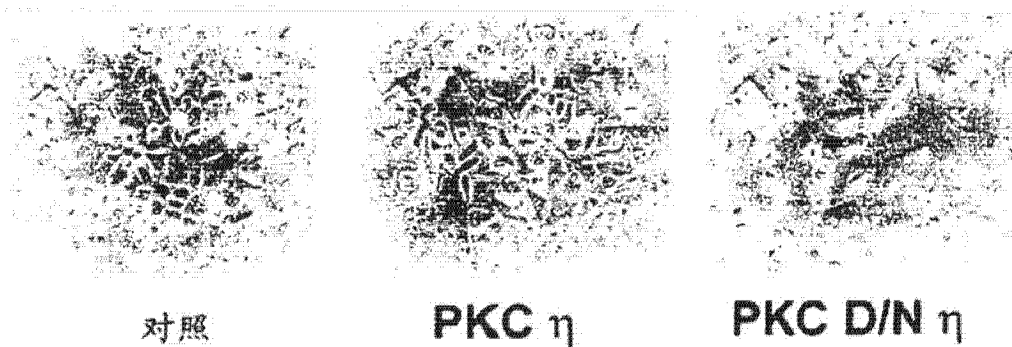


图 12a

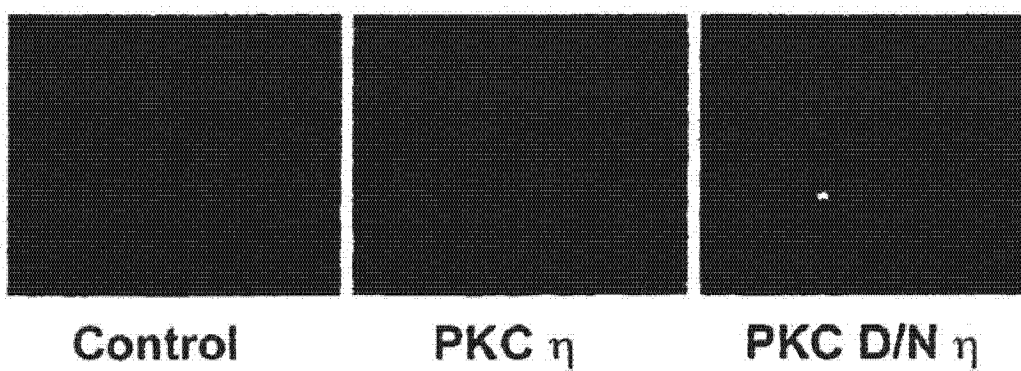


图 12b

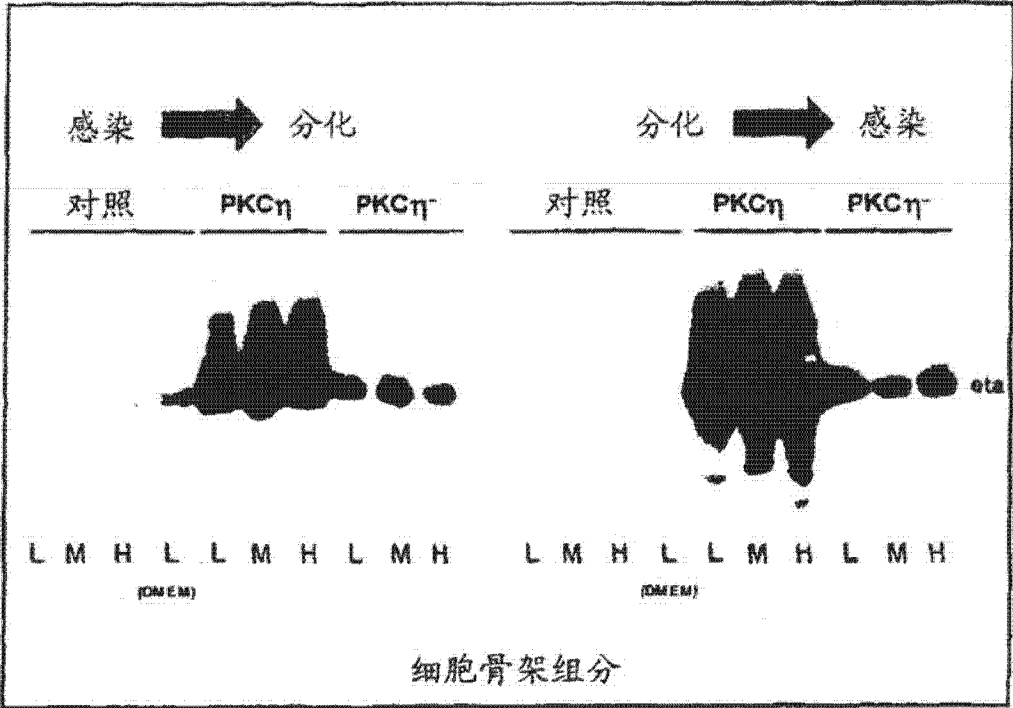


图 13a

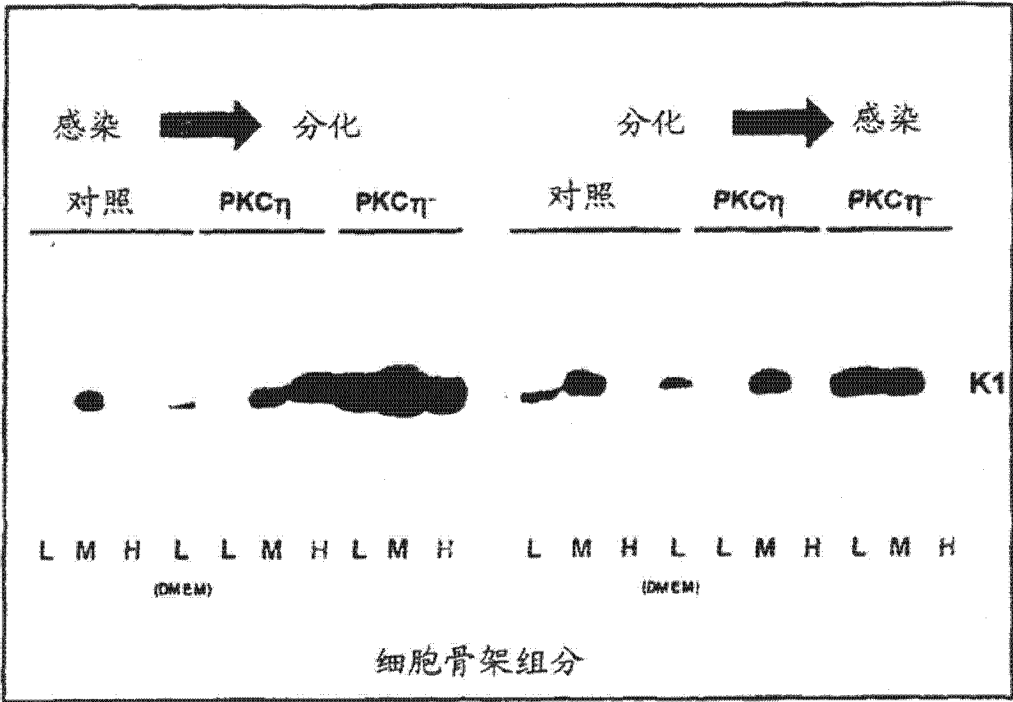


图 13b

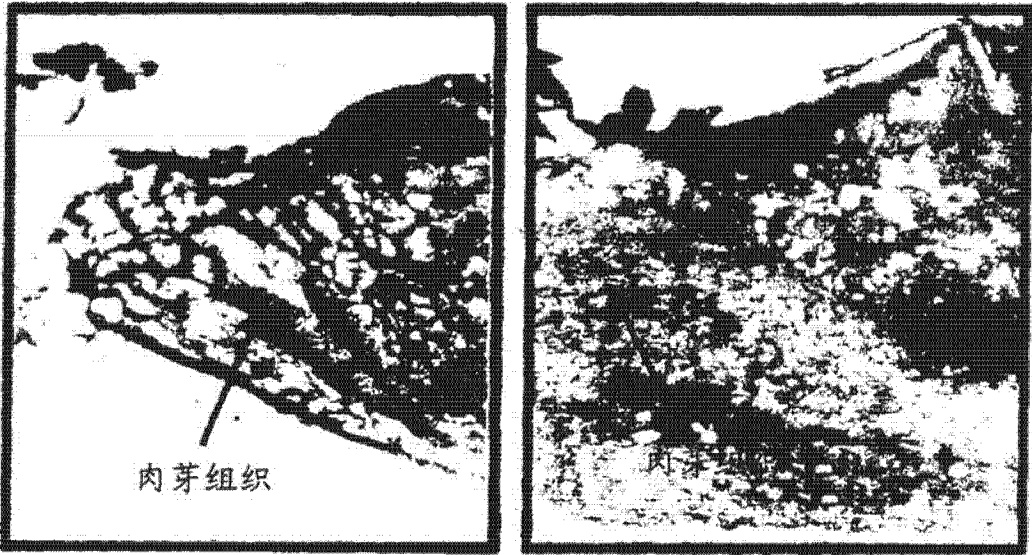


图 14

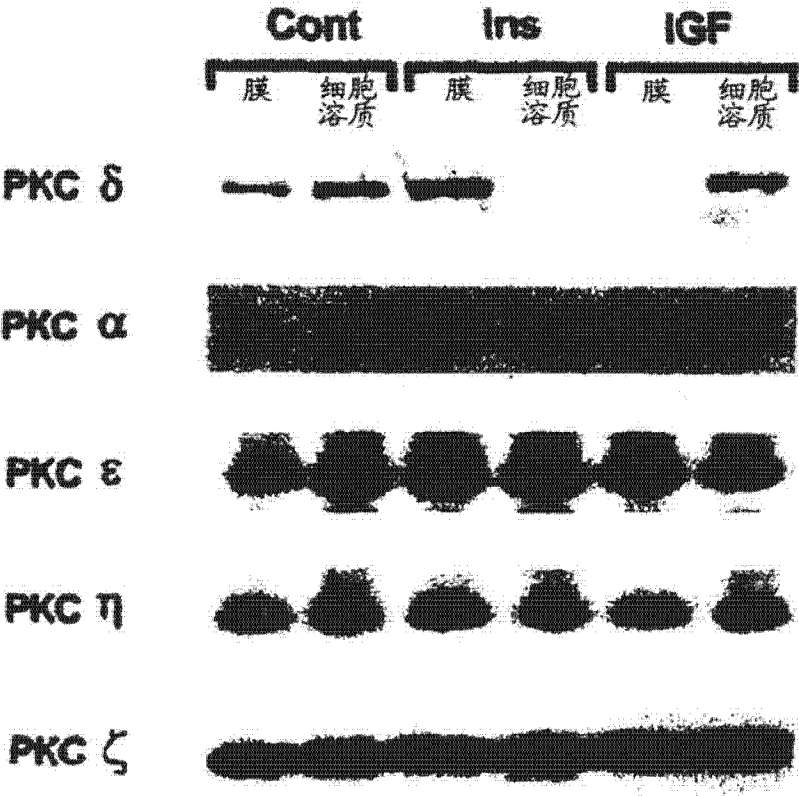


图 15

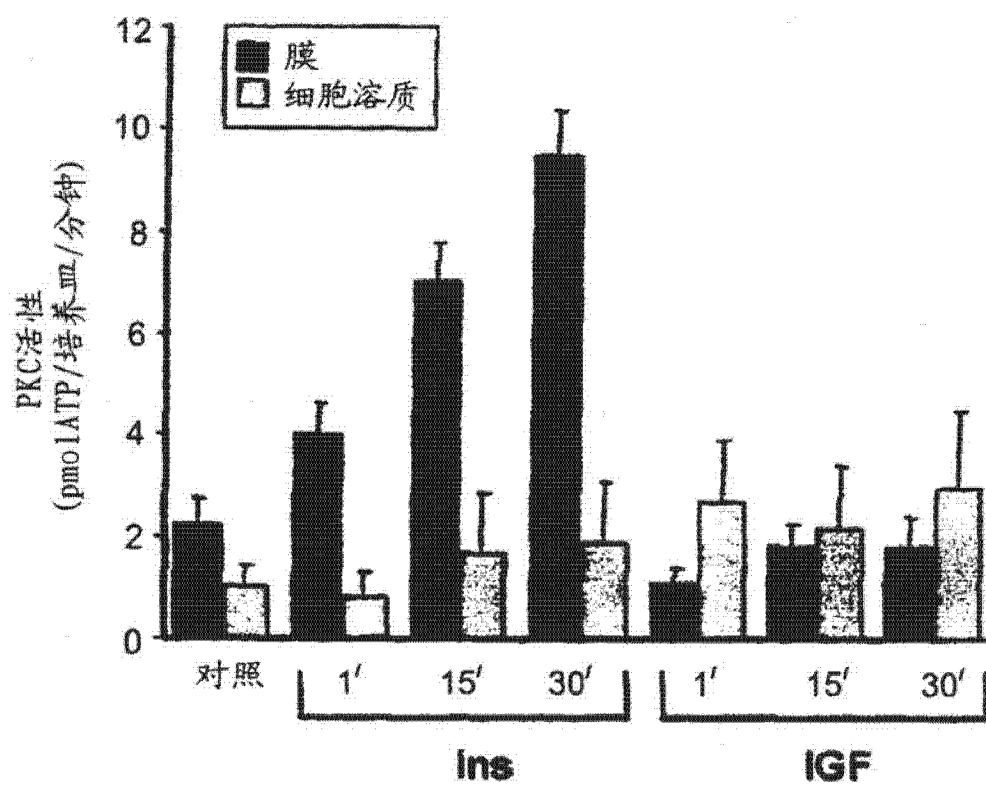


图 16

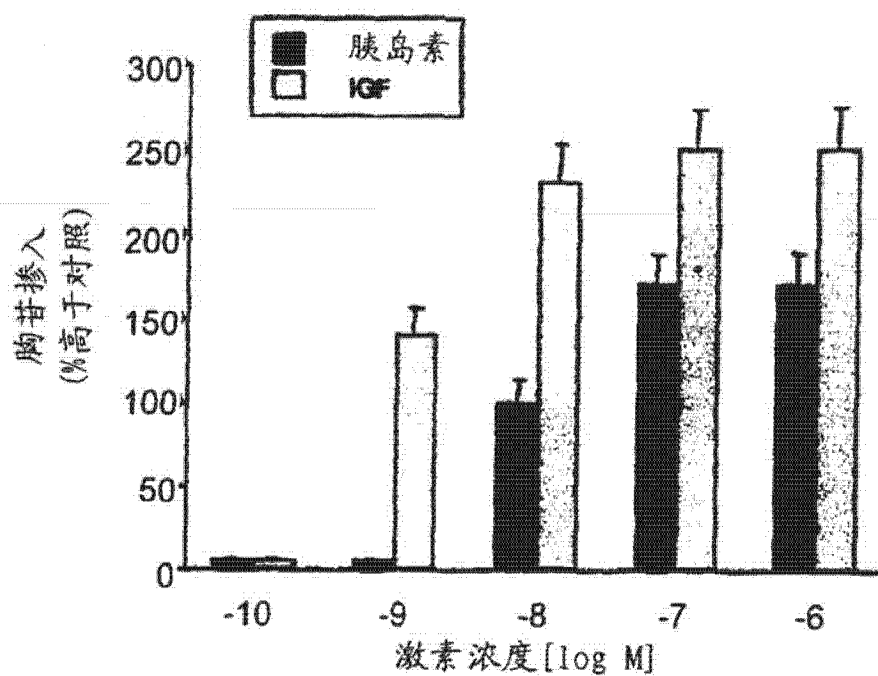


图 17a

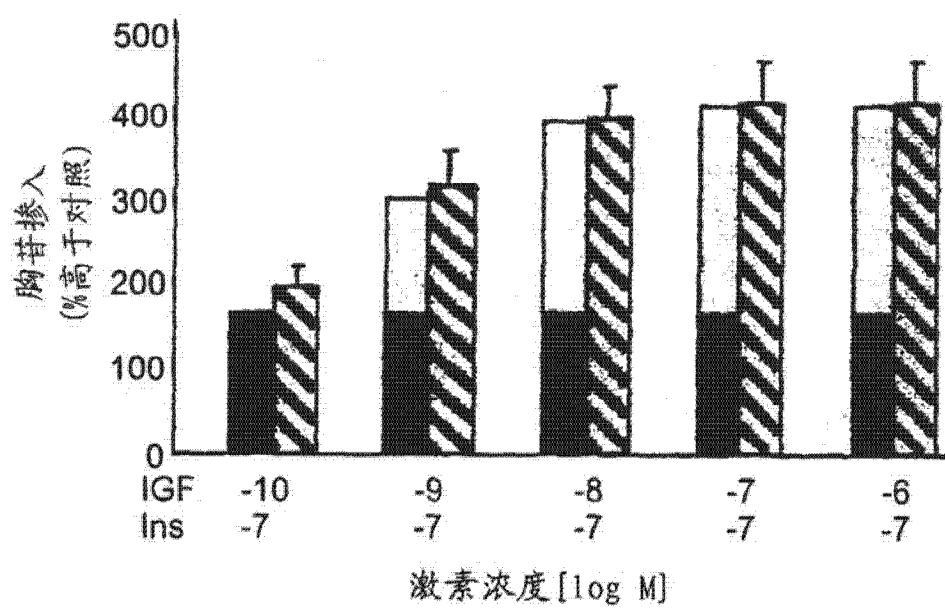


图 17b

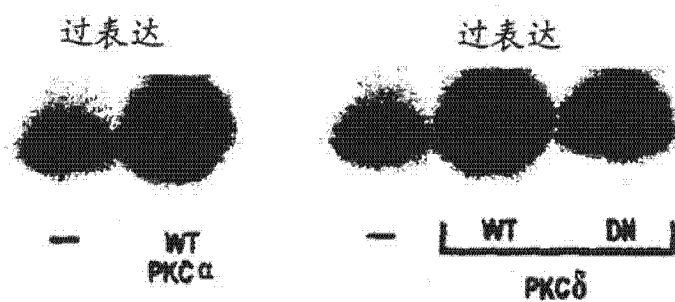


图 18a

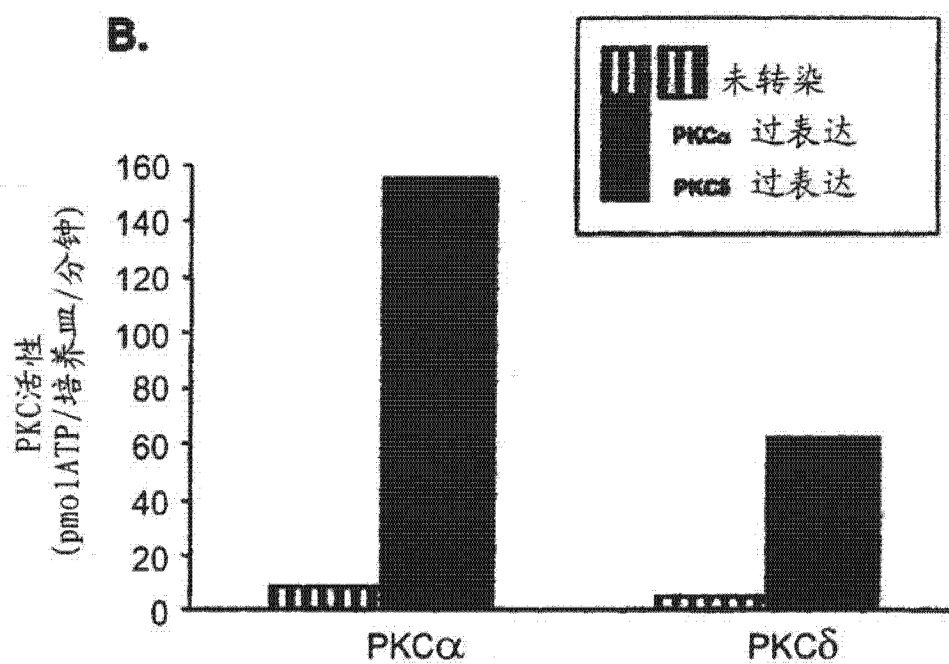


图 18b

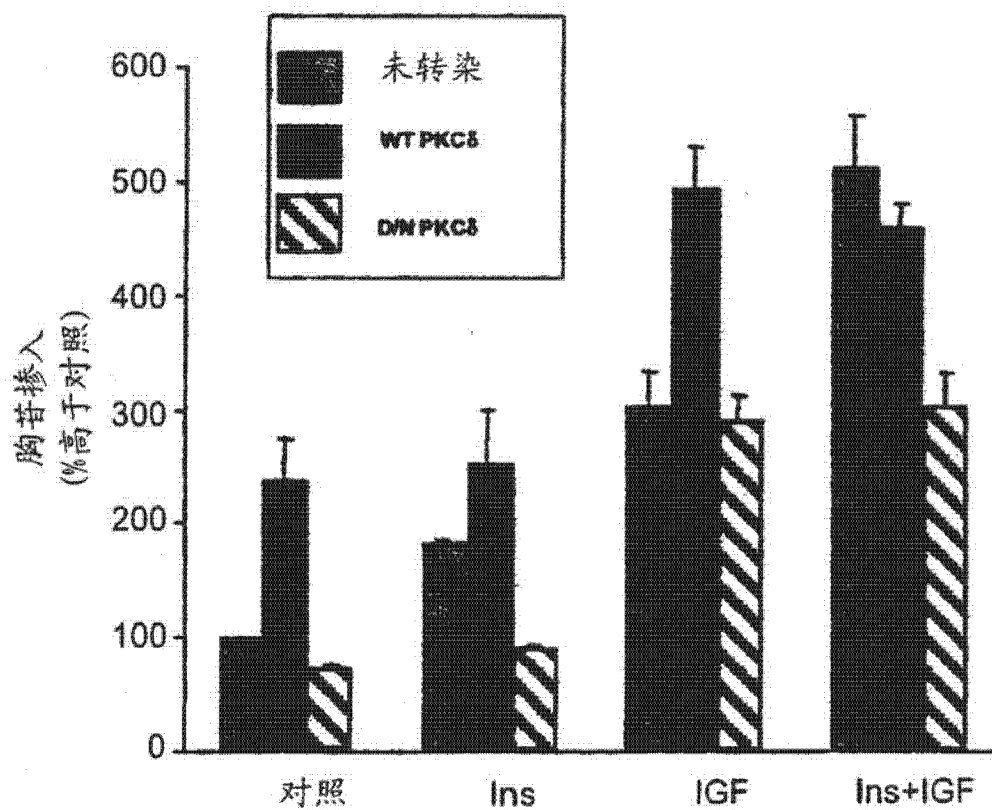


图 19

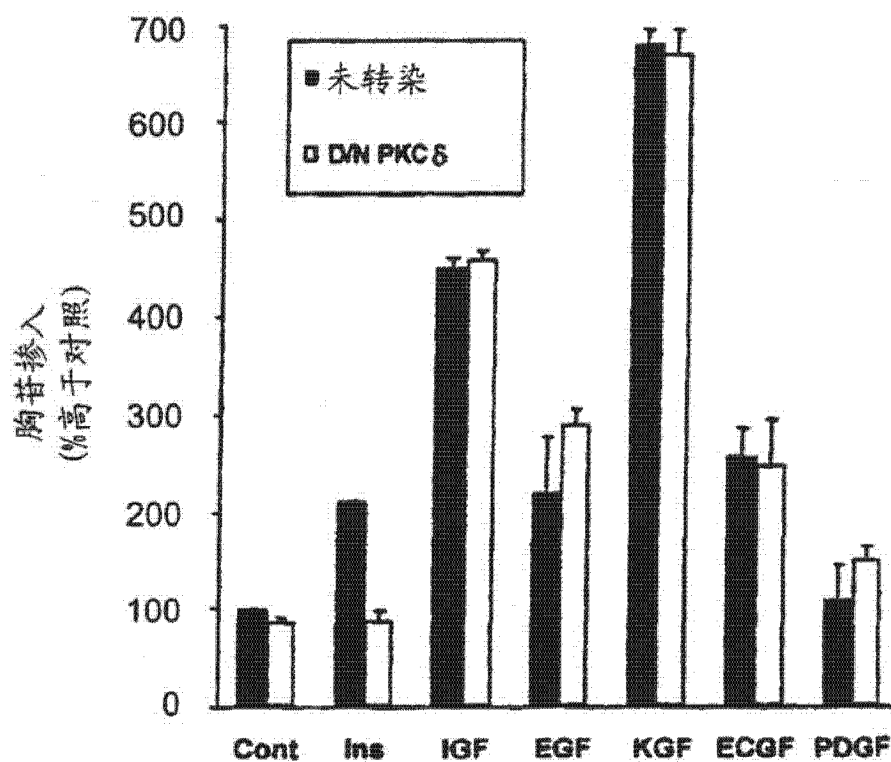


图 20

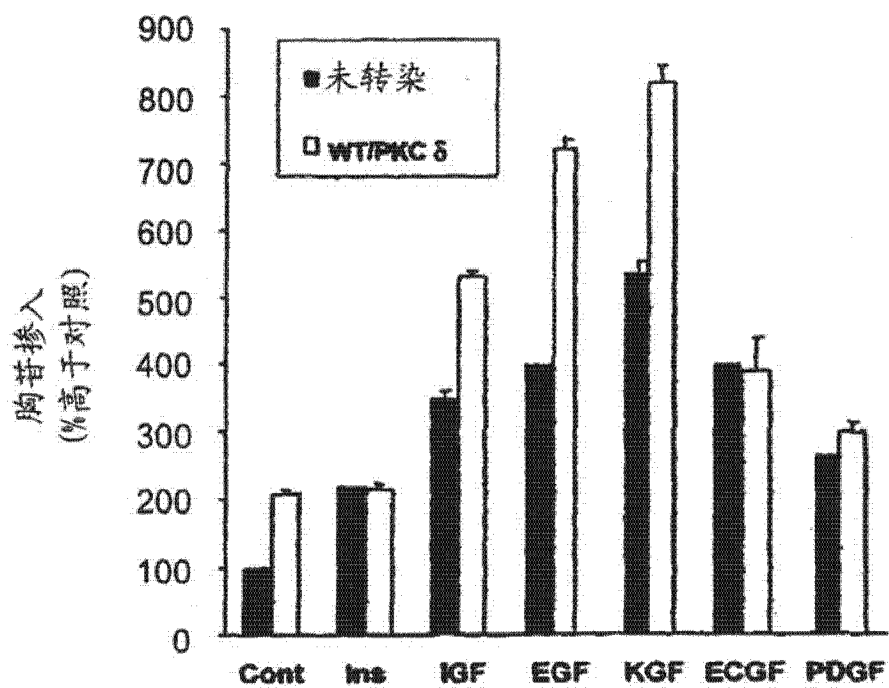


图 21

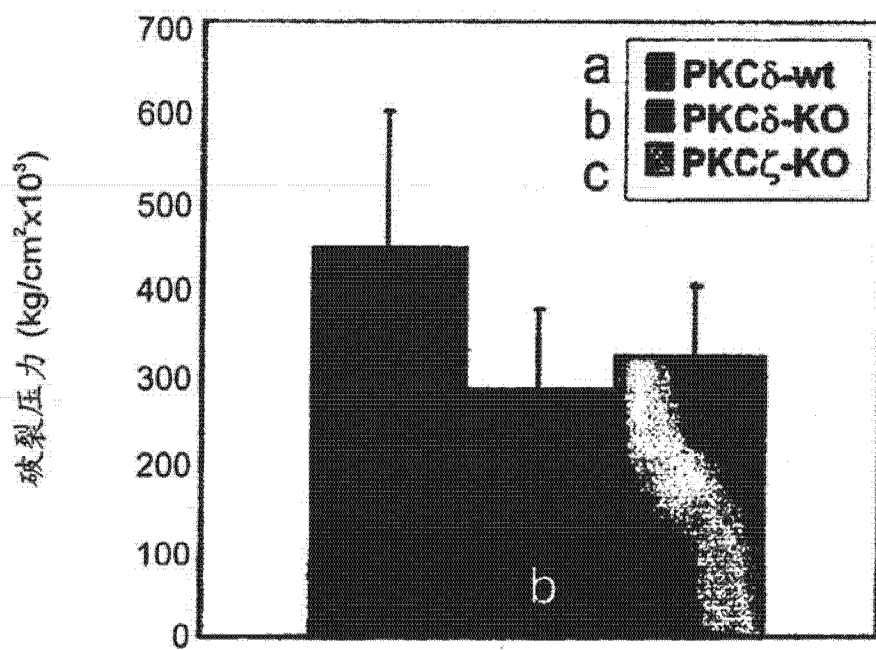


图 22a

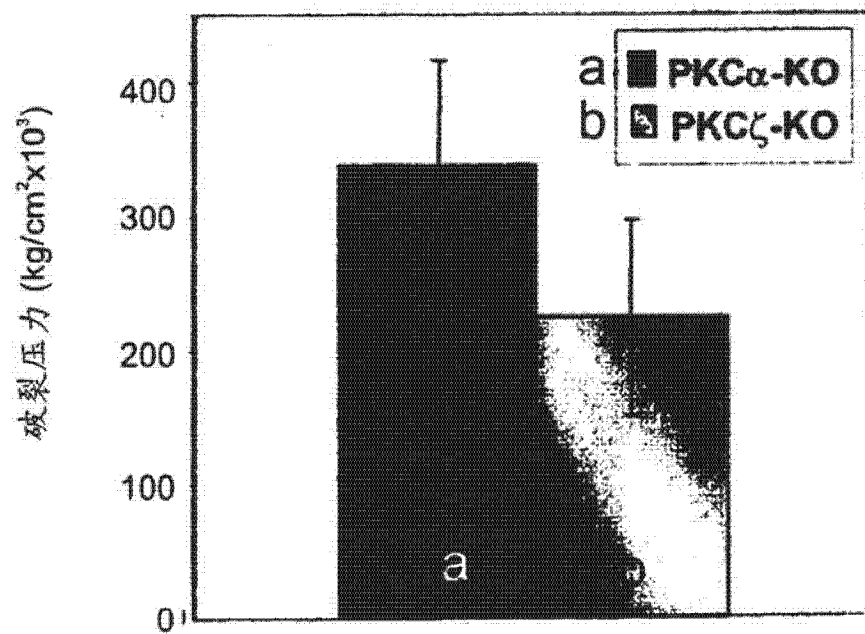


图 22b

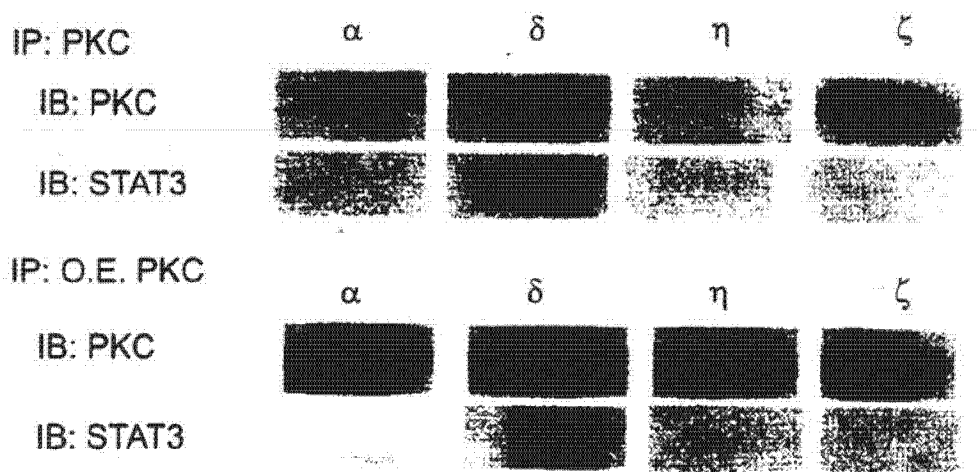


图 23

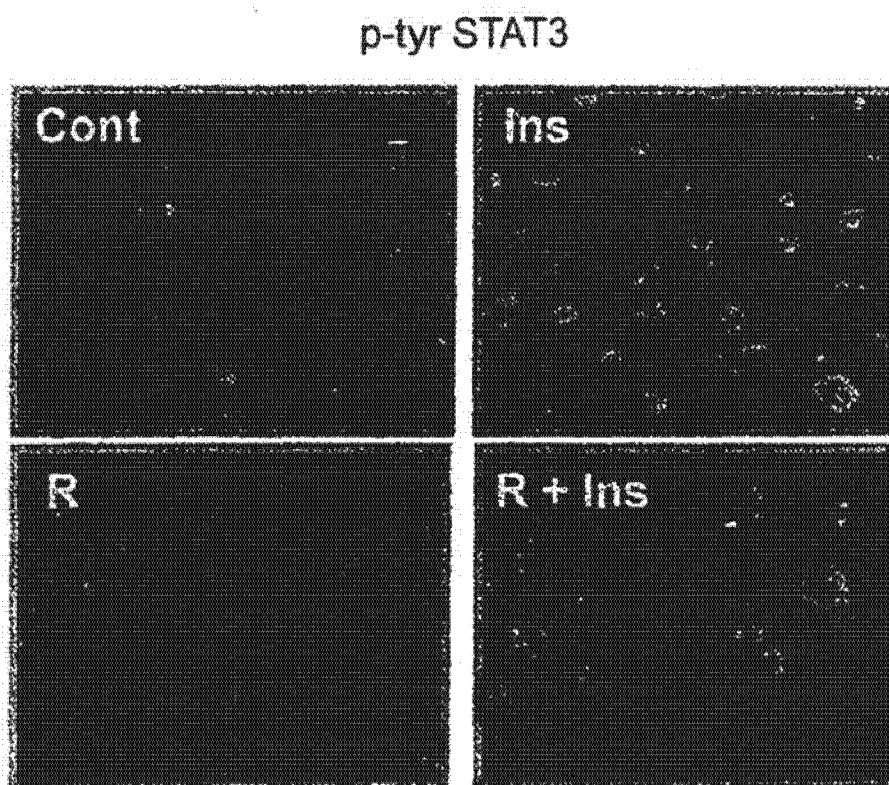


图 24

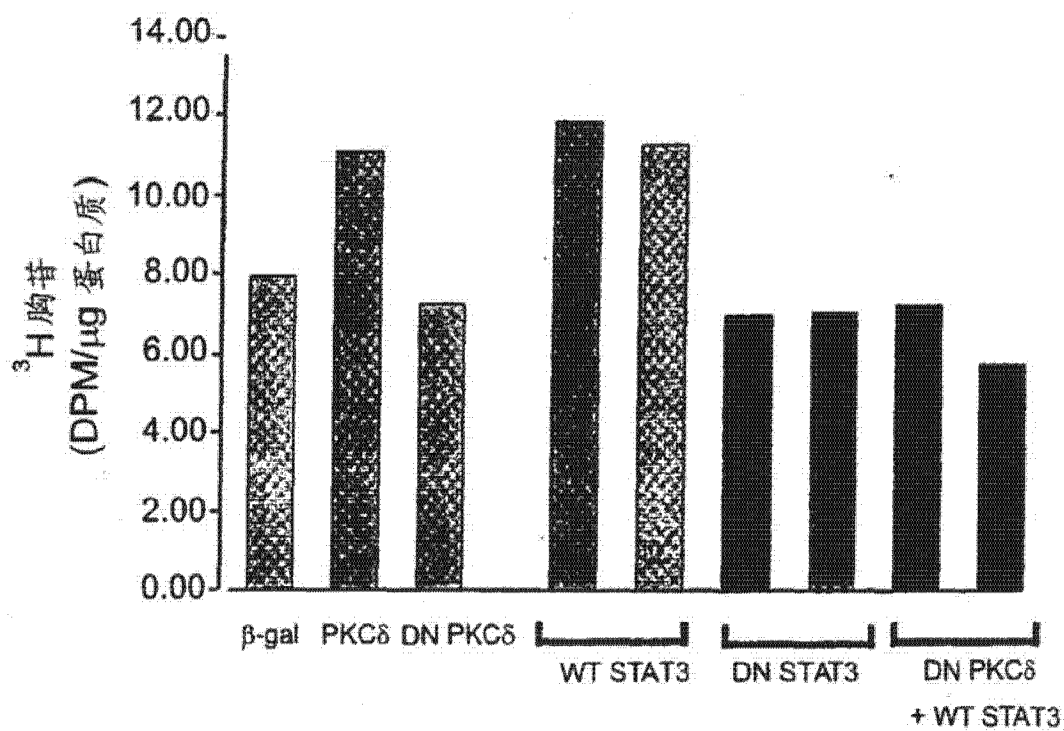


图 25

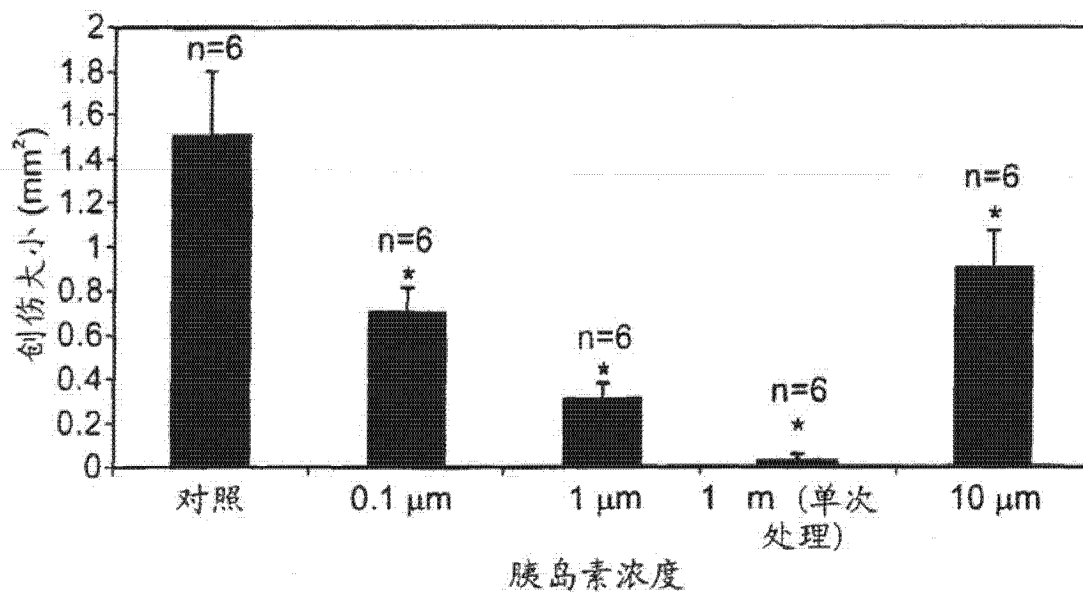


图 26

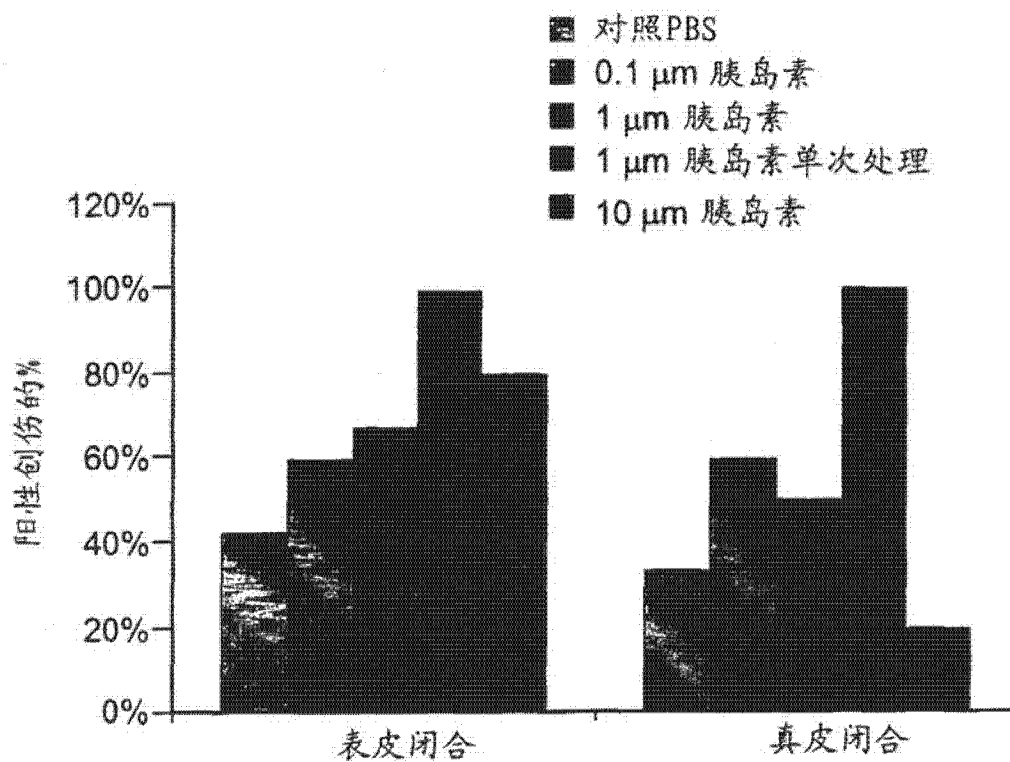


图 27

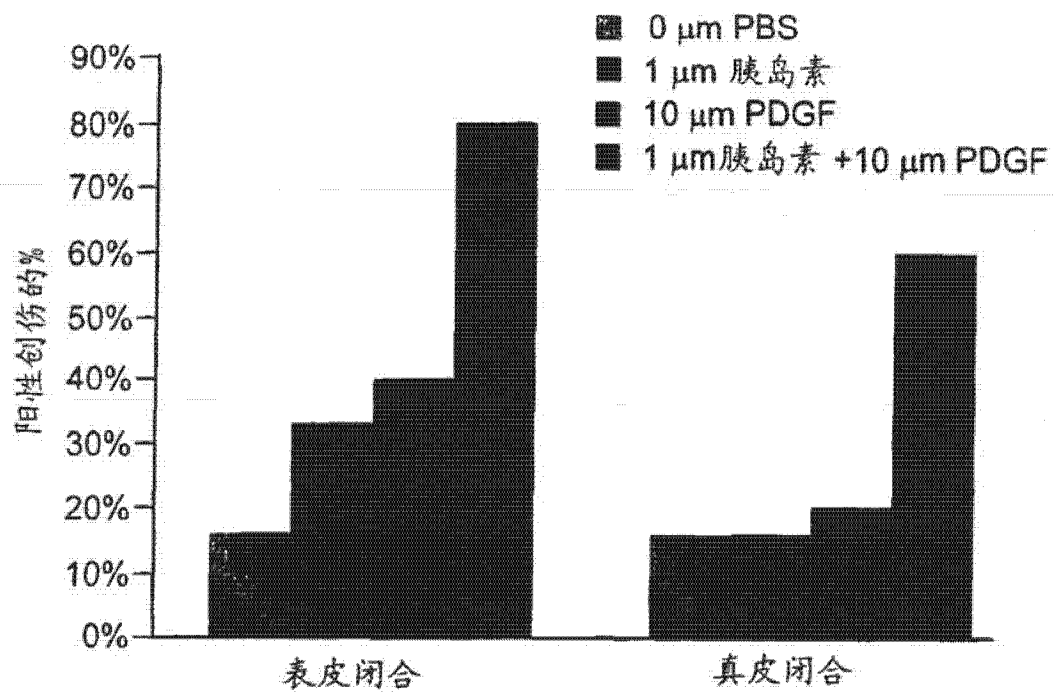


图 28

对照



图 29a

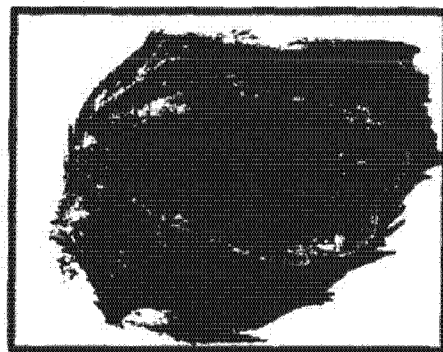


图 29b

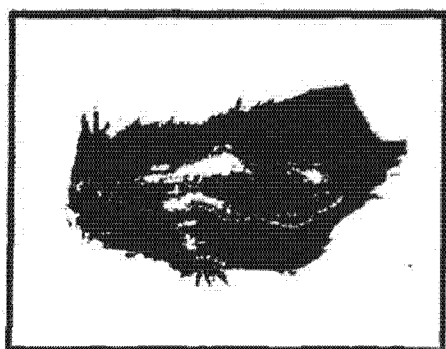
HO/01
HO/02 +

图 29c



图 29d

对照

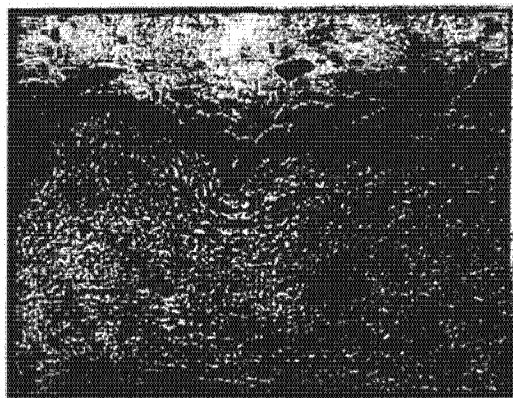
HO/01
HO/02 +

图 30

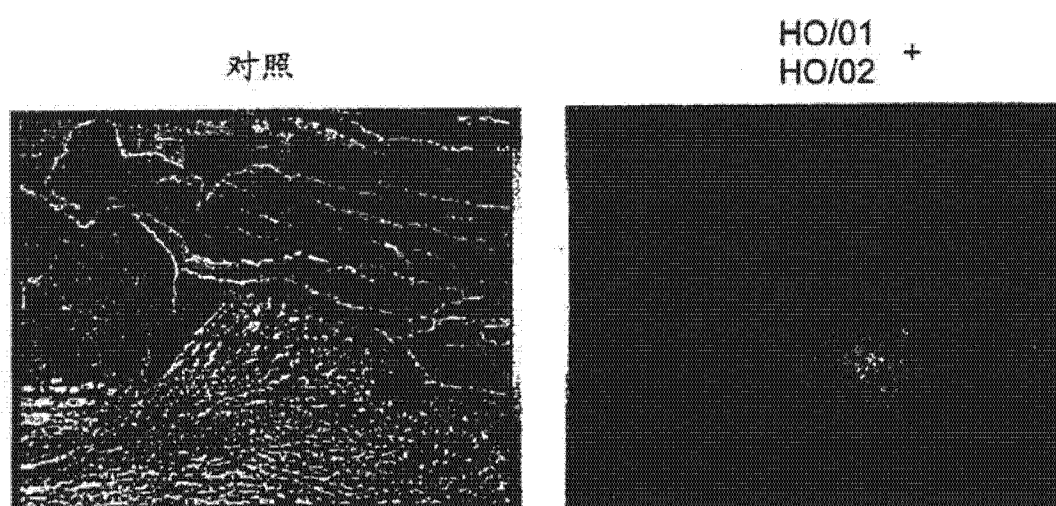


图 31

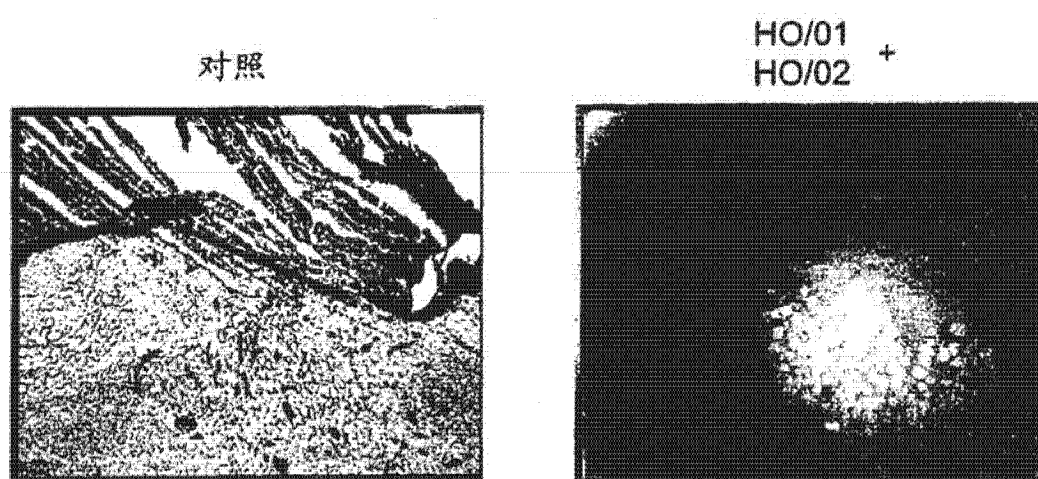


图 32

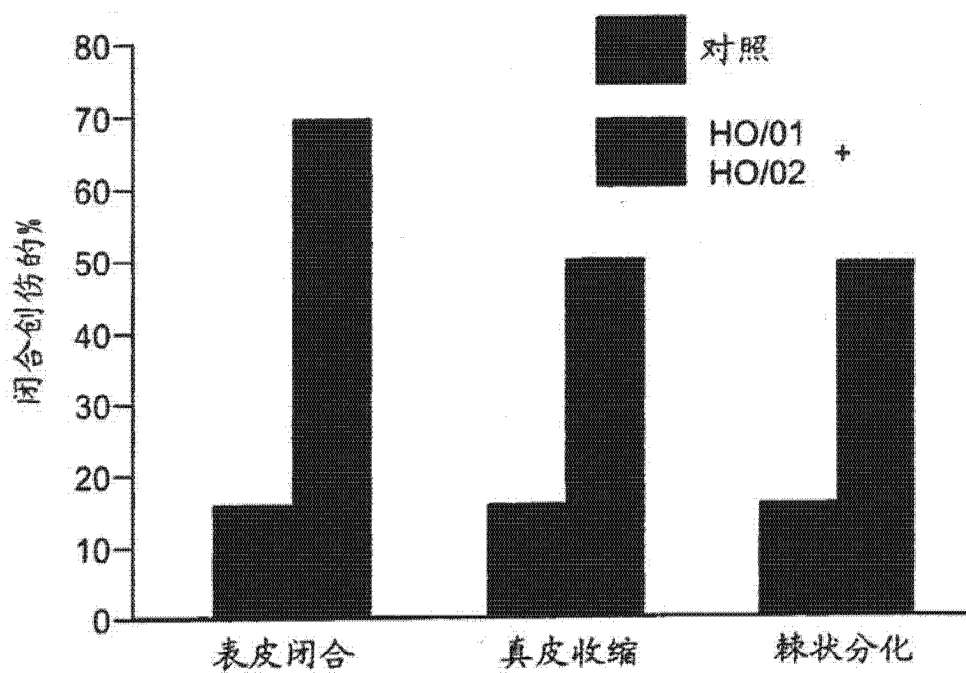


图 33

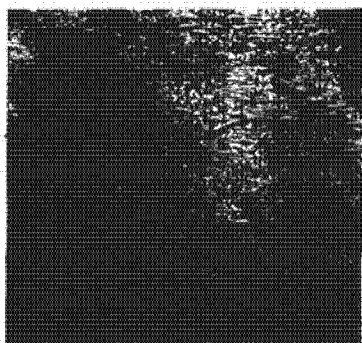


图 34a

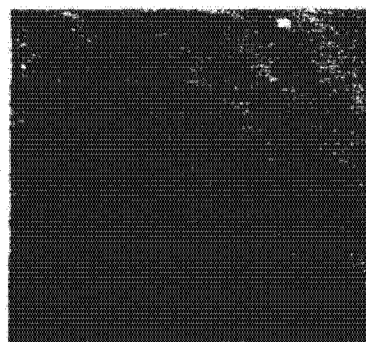


图 34b

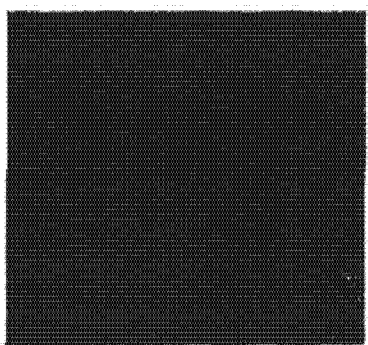


图 34c

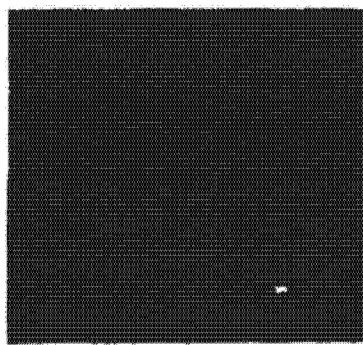


图 34d



图 34e

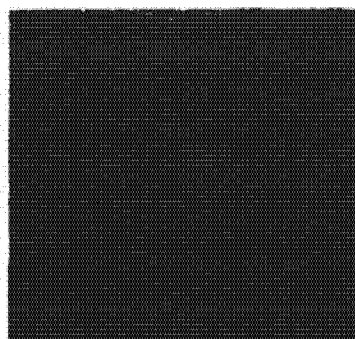


图 34f

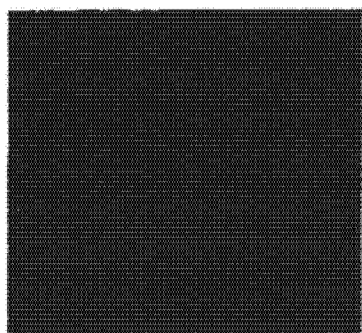


图 34g



图 35a

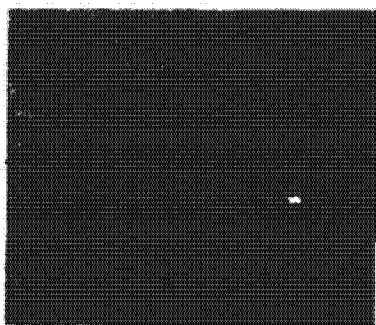


图 35b

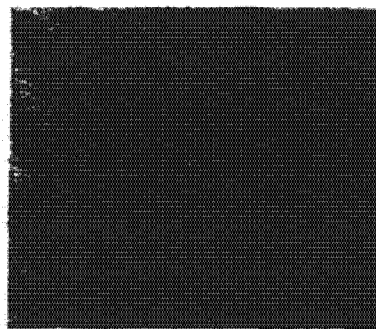


图 35c

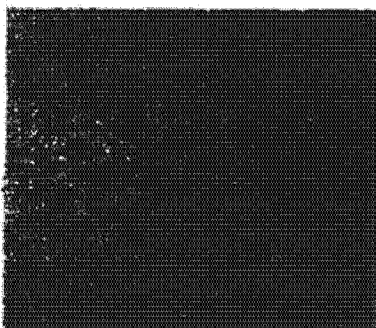


图 35d

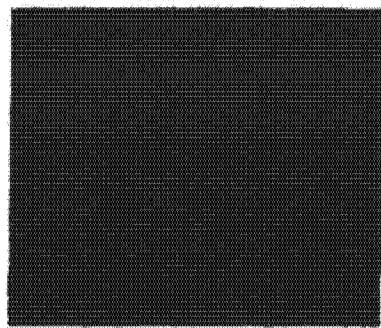


图 35e

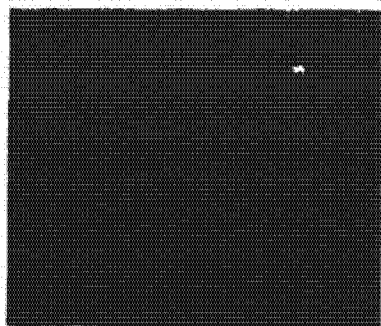


图 35f

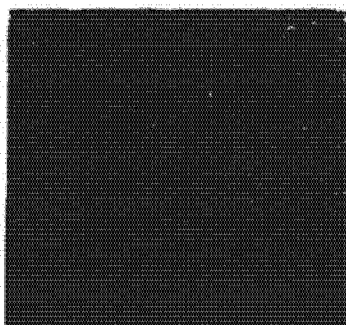


图 35g

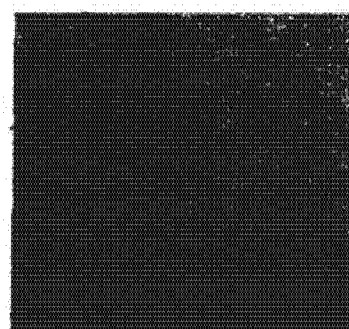


图 35h



图 36a

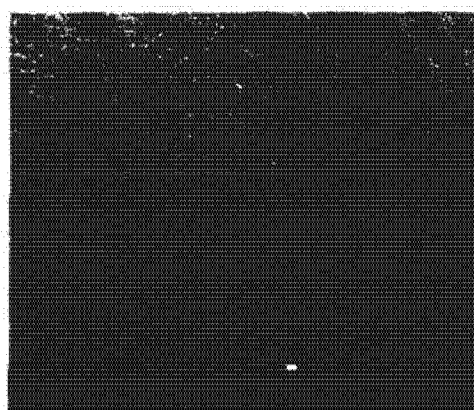


图 36b



图 37a



图 37b

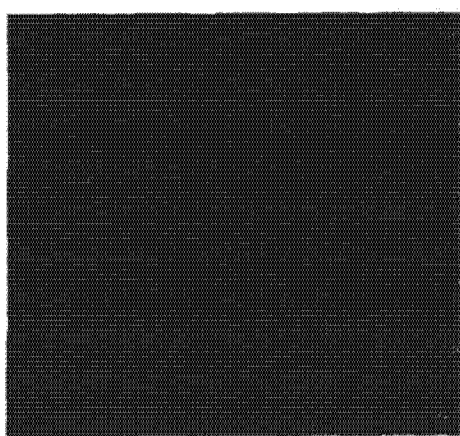


图 37c



图 37d



图 38a

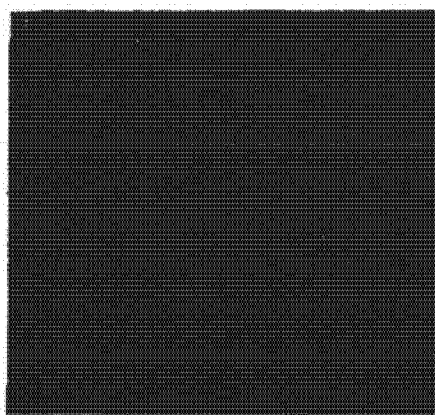


图 38b



图 38c

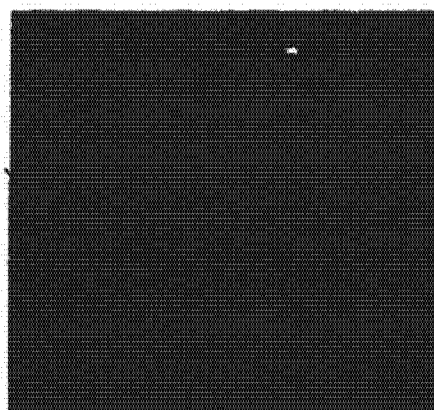


图 38d



图 38e

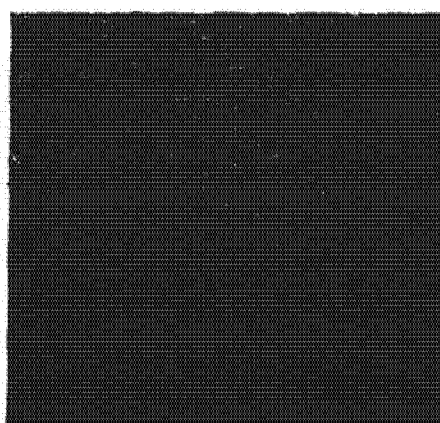


图 39a

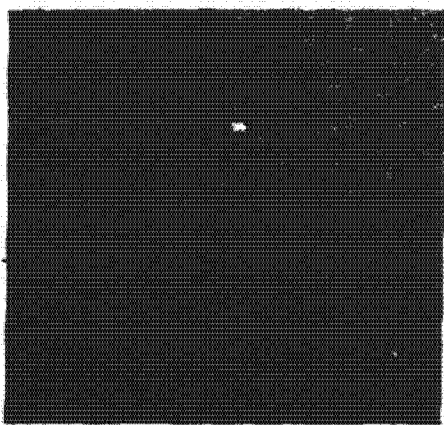


图 39b



图 39c

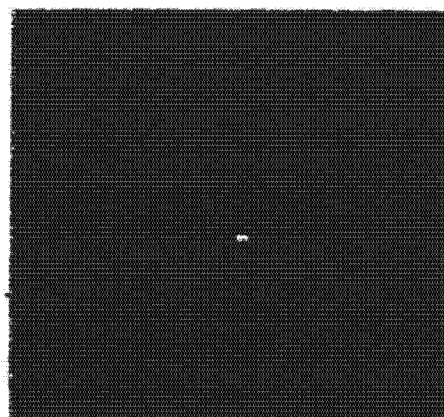


图 39d



图 39e

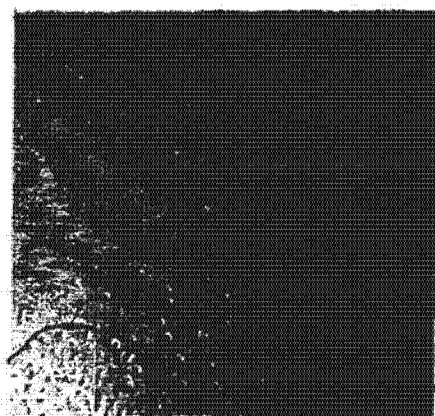


图 40a

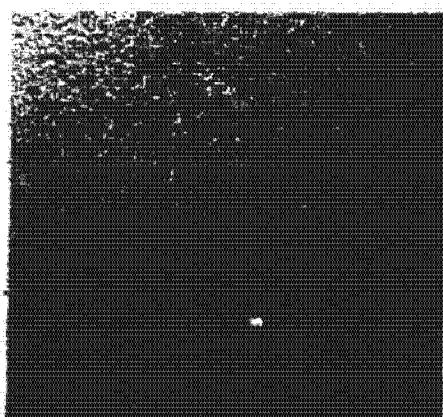


图 40b

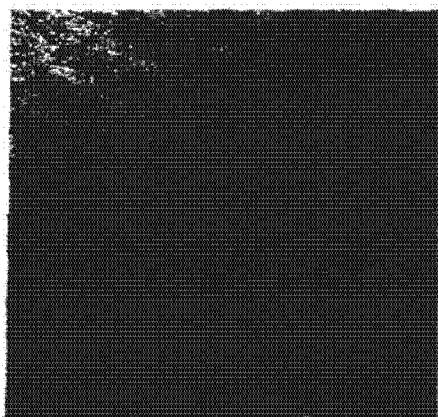


图 40c

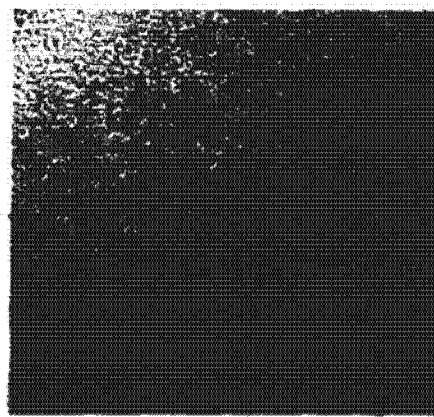


图 40d



图 40e

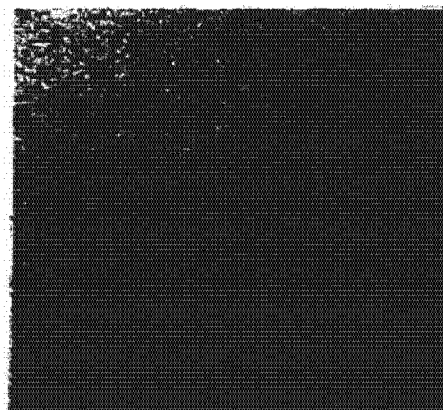


图 40f

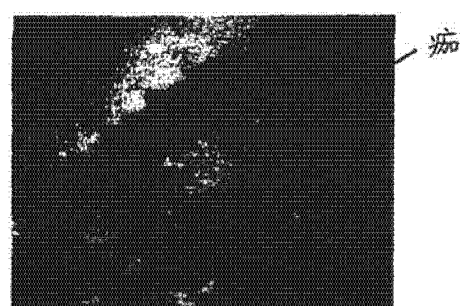


图 41a

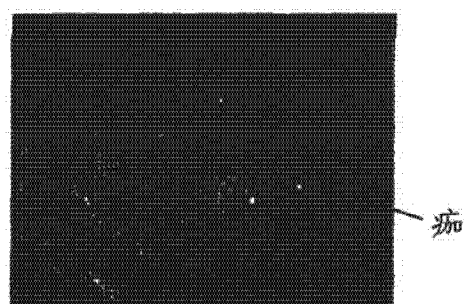


图 41b

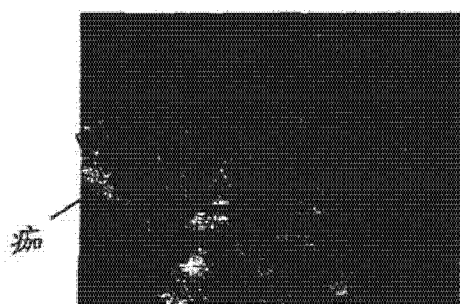


图 41c

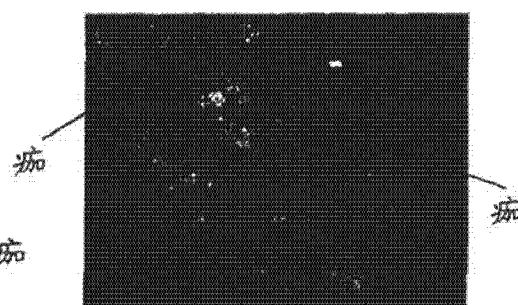


图 41d

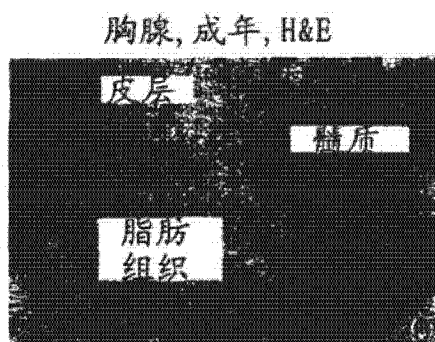


图 42a

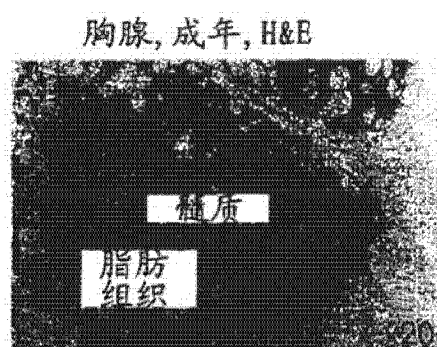


图 42b

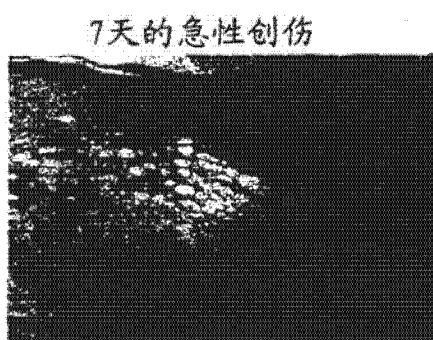


图 42c



图 42d

9天的糖尿病性创伤, 对照

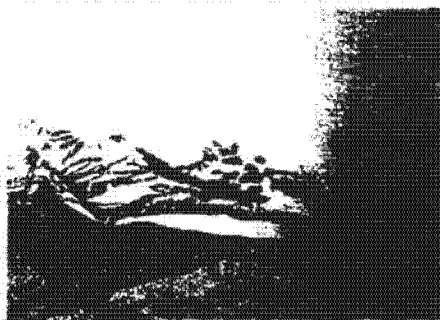


图 42e

9天的糖尿病性创伤, 对照

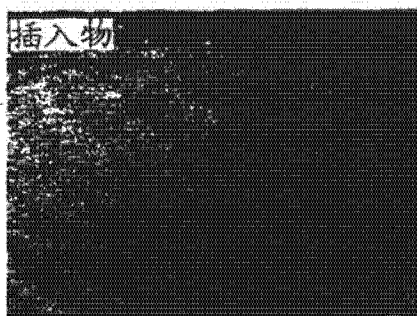


图 42f

9天的糖尿病性创伤 HO/03/03

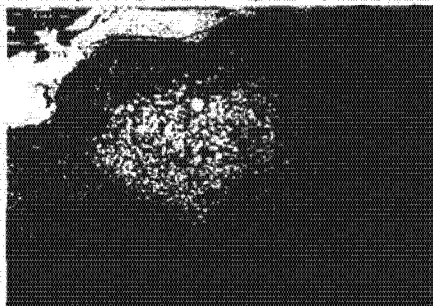


图 42g

创伤部位附近的胸腺

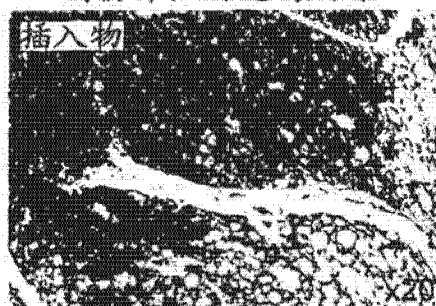
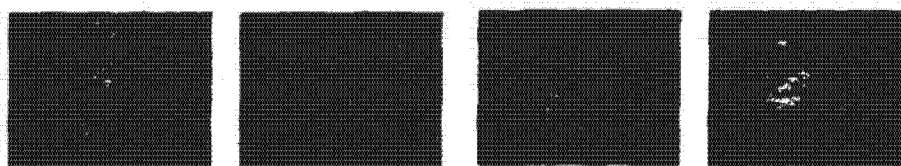


图 42h

对照



HO/03/03

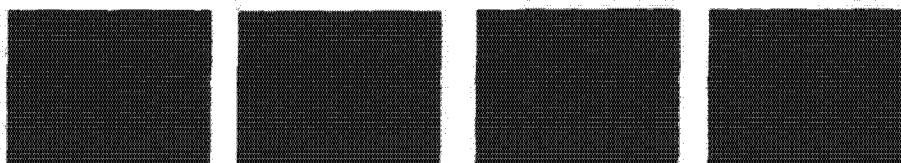


图 43