

A4  
C4

|      |                      |
|------|----------------------|
| 申請日期 | 87.12.14             |
| 案 號  | 87120706             |
| 類 別  | 07K 7/14, A61K 38/08 |

(以上各欄由本局填註)

542843

## 發明專利說明書

|             |               |                                                                |
|-------------|---------------|----------------------------------------------------------------|
| 一、發明<br>名稱  | 中 文           | 傷口癒合之組成物                                                       |
|             | 英 文           | WOUND HEALING COMPOSITIONS                                     |
| 二、發明<br>創作人 | 姓 名           | 1.凱特琳.勞傑<br>2.吉爾 S.狄吉瑞加                                        |
|             | 國 籍           | 美 國                                                            |
|             | 住、居所          | 1.美國,加州 90815,長堤,加利諾街 4403 號<br>2.美國,加州 91106,帕薩狄納,山頂大道 1270 號 |
|             |               |                                                                |
| 三、申請人       | 姓 名<br>(名稱)   | 南加州大學                                                          |
|             | 國 籍           | 美 國                                                            |
|             | 住、居所<br>(事務所) | 美國,加州 90007,洛杉磯市,313 棟,南賀樸街 3716 號                             |
|             | 代 表 人<br>姓 名  | 丹尼斯 F. 道格提                                                     |

裝

訂

線

(由本局填寫)

|          |
|----------|
| 承辦人代碼：   |
| 大類：      |
| I P C分類： |

A6  
B6

本案已向：

美 國 ( 地 區 ) 申請專利，申請日期： 1997.12.12 案號： 60/069,662 , ☒有 ☐無主張優先權

有關微生物已寄存於： , 寄存日期： , 寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝 訂 線

## 五、發明說明 ( / )

### 發明領域

本發明係與一般生物化學及醫藥領域相關。更明確的來說，係關於能有效促進哺乳動物傷口癒合之組成物及方法。

### 發明背景

哺乳動物組織之傷口(即撕裂傷或開口)會導致組織破壞及微血管在傷口表面聚集。修復這類組織意指細胞對傷口所產生之有序的、控制式的細胞反應。所有軟組織傷口，無論大小，其癒合模式都非常類似。組織生長及修復係為其中在氧氣梯度存在下所進行的細胞增生及血管生成之生物系統。組織修復過程中發生的連續形態及結構上的變化已被詳細研究過，且在某些情況下已定量(Hunt, T.K., et al., "Coagulation and macrophage stimulation of angiogenesis and wound healing", in The surgical wound, pp. 1-18, ed. F. Dineen & G. Hildrick-Smith (Lea & Febiger, Philadelphia, 1981)。

傷口之細胞形態包括三個明顯不同的區域。傷口中央無血管區域為缺氧、酸性且高碳，並且乳酸含量高。緊鄰傷口區域乃是一局部貧血(缺血)梯度區，該區有大量分化的纖維母細胞。在此區域後，則是活性膠原蛋白合成區域，特點是有許多成熟的纖維母細胞及無數新合成的微血管(即新血管形成)。對傷口組織癒合而言，新血管生長(即血管生成)乃是必要的，但血管生成藥物一般無法提供長期以來組織修復所亟需之額外的生物合成效果。儘管一直亟需

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

## 五、發明說明 ( 6 )

### 附圖簡單說明

經由所附圖形可以更了解本發明，其中：

圖 1 顯示相對於以載體處理之控制組，AII 或  $(\text{TyrPO}_3)_2^4\text{-AII}$  在傷口封合上之控制反應百分比。

圖 2 顯示相對於以載體處理之控制組，AII 或類似物 GSD-39B 在傷口封合上之控制反應百分比。

圖 3 顯示相對於以載體處理之控制組，AII 或類似物 GSD-40B 在傷口封合上之控制反應百分比。

圖 4 顯示相對於以載體處理之控制組，AII 或類似物 GSD-41B 在傷口封合上之控制反應百分比。

圖 5 顯示相對於以載體處理之控制組，AII 或類似物 GSD-28 在傷口封合上之控制反應百分比。

圖 6 顯示相對於以載體處理之控制組，AII 或類似物 GSD-39A 及 GSD-40A 在傷口封合上之控制反應百分比。

圖 7 顯示相對於控制組，以 AII 或  $(\text{TyrPO}_3)_2^4\text{-AII}$  處理傷口後其肉芽組織大小之改變百分比。

圖 8 顯示相對於控制組，以 AII 或類似物 GSD-39B 處理傷口後其肉芽組織大小之改變百分比。

圖 9 顯示相對於控制組，以 AII 或類似物 GSD-40B 處理傷口後其肉芽組織大小之改變百分比。

圖 10 顯示相對於控制組，以 AII 或類似物 GSD-28 處理傷口後其肉芽組織大小之改變百分比。

圖 11 顯示相對於以載體處理之控制組，以 AII、

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 12 )

，血管緊縮素 II，能促進生長因子釋出、細胞分裂、趨化性及促使參與傷口癒合之培育細胞釋出細胞外母組織 (Dzau, V.E., et al., (1989), Molecular mechanism of angiotensin in the regulation of vascular and cardiac growth, *J. Mol. Cell Cardiol.* 21 (Supple III):S7; Berk, B.C., et al., (1989), Angiotensin II stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells, *Hypertension* 13:305-14; Kawahara, Y. et al., (1988) Angiotensin II induces expression of the c-fos gene through protein kinase C activation and calcium ion mobilization in cultured vascular smooth muscle cells, *BBRC* 150:52-9; Naftilan, A.J., et al., (1989), Induction of platelet-derived growth factor A-chain and c-myc gene expressions by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells, *J. Clin. Invest.* 83:1419-24; Taubman, M.B., et al., (1989), Angiotensin II induces c-fos mRNA in aortic smooth muscle, Role of  $Ca^{2+}$  mobilization and protein kinase C activation, *J. Biol. Chem.* 264:526-530; Nakahara, K., et al., (1992), Identification of three types of PDGF-A chain gene transcripts in rabbit vascular smooth muscle and their regulated expression during development and by angiotensin II, *BBRC* 184:811-8; Stouffer, G.A. and G.K. Dwens (1992), Angiotensin II induced mitogenesis of spontaneously hypertensive rat derived cultured smooth

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

像

## 五、發明說明 ( 13 )

muscle cells is dependent on autocrine production of transforming growth factor- $\beta$ , *Circ. Res.* 70:820; Wolf, G. et al., (1992), Angiotensin II stimulates the proliferation and biosynthesis of type I collagen in cultured marine mesangial cells, *Am. J. Pathol.* 140:95-107; Bell, L. and J.A. Madri (1990), Influence of the angiotensin system on endothelial and smooth muscle cell migration, *Am. J. Pathol.* 137:7-12)。此外，AII 在兔子眼角膜系統及雞絨毛膜尿囊膜系統中都顯出能促進血管生成的效果 (Fernandez, L. A., et al., (1985), Neovascularization produced by angiotensin II, *J. Lab. Clin. Med.* 105:141; LeNoble, F.A.C., et al., (1991) Angiotensin II stimulates angiogenesis in the chorio-allantoic membrane of the chick embryo, *Eur. J. Pharmacol.* 195:305-6)。因此，AII 可藉由增加新血管生成、釋放生長因子、表皮再生及製造細胞外基質來加速傷口癒合。藉由增加血流及營養物至受傷組織處，AII 可加快傷口癒合的速率。AII 也可藉著在受傷位置製造生長因子來促進傷口癒合。已知外加生長因子可藉由數種機轉來促進傷口癒合 (Grotendorst, G.R., et al., (1985), Stimulation of granulation tissue formation by platelet-derived growth factor in normal and diabetic rats, *J. Clin. Invest.* 76:2323-9; Mustoe, T.A., et al., (1987), Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor- $\beta$ , *Science* 237:1333-5;

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

表

## 五、發明說明 ( 14 )

Pierce, G.F., et al., (1988) In vivo incisional wound healing augmented by platelet-derived growth factor and recombinant c-sis gene homodimeric proteins, *J. Exp. Med.* 167:974-87; Lynch, S.E., et al., (1989) Growth factors in wound healing, *J. Clin. Invest.* 84:640-6; Greenhalgh, D.G., et al., (1990) PDGF and EFG stimulate wound healing in the genetically diabetic mouse, *Am. J. Pathol.* 136:1235-46)。最近的研究結果顯示 AII 可促進頸動脈及主動脈在受傷後其新血管內膜的生成(Powell, J.S., et al., (1989) Inhibitors of angiotensin-converting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury, *Science* 245:186-8; Powell, J.S., et al., (1991) The proliferative response to vascular injury is suppressed by converting enzyme inhibition, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 16 (suppl 4):S42-9; Capron, L., et al., (1991), Effect of ramipril, an inhibitor of angiotensin converting enzyme, on the response of rat thoracic aorta to injury with a ballon catheter, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 18:207-11; Osterriedes, W., et al., (1991) Role of angiotensin II injury-induced neointima formation in rats, *Hypertension* 18:Suppl 1160-64; Daemen, M.J.A.P., et al., (1991) Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall, *Circ. Res.* 68:450-6)。由上述這些實驗觀察結果，一系列欲確定 AII 機制，即 AII 引發血管內膜生長

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 15 )

的實驗也隨後展開。已知對平滑肌細胞、纖維母細胞及內皮細胞而言，AII 作用就和促細胞分裂素(mitogen)一樣 (Schelling, P., et al., (1979), Effects of angiotensin II and angiotensin II antagonist saralysin on cell growth and renin in 3T3 and SV3T3 cells, *J. Cell Physiol.* 98:503-13; Campbell-Boswell, M. and A.L Robertson (1981), Effects of angiotensin II and vasopressin on human smooth muscle cells in vitro, *Exp. Mol. Pathol.* 35:265-76; Emmett, N., et al., (1985), Effects of saralasin (angiotensin II antagonist) on 3T3 cell growth and proliferation, *J. Cell Biol.* 103:171 (Abst); Paquet, J.L., et al., (1990), Angiotensin II-induced proliferation of aortic myocytes in spontaneously hypertensive rats, *J. Hypertens.* 8:565-72; Dzau, et al., *supra*)。AII 也會增加蛋白質含量及血管平滑肌肉細胞之體積大小(Berk, et al., (1989) *supra*; Geisterfer, A.A.T. et al., (1988), Angiotensin II induces hypertrophy, not nyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells, *Cir. Res.* 62:749-756)。研究也顯示 AII 會增加各類生長因子的釋出，包括 PDGF、與肝素結合之 EGF 及轉化生長因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ )、和源自平滑肌細胞、內皮細胞及心臟纖維母細胞之與生長相關的原癌基因(Kawahara, et al., (1988), *supra*; Naftilan, A.J. (1992), The role of angiotensin II in vascular smooth muscle cell growth, *J. Cardiovas. Pharmacol.* 20:S37-40; Naftilan, et al. (1989),

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 16 )

*supra*; Taubman, et al., (1989), *supra*; Nakahara, et al., (1988), *supra*; Temizer, et al., (1992), *supra*; Gibbons, G. H., et al., (1992), Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs hyperplasia, Autocrine transforming growth factor- $\beta$  1 expression determines growth response to angiotensin II, *J. Clin. Invest.* 90:456-61; Bell, et al., (1992), Autocrine angiotensin system regulation of bovine aortic endothelial cell migration and plasminogen activator involves modulation of proto-oncogene pp60c-src expression, *J. Clin. Invest.* 89:315-20; Stouffer and Owens (1992) *supra*) 。 AII 所引發平滑肌細胞肥大的效果係藉由 PDGF 的作用來達成(Berk, B.C. and G.N. Rao (1993) Angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell hypertrophy: PDGF A-chain mediates the increase in size, *J. Cell. Physiol.* 154:368-80)。

因此，可以想見 AII 促進傷口癒合的作用乃是經由在受傷組織增加這些生長因子來達成。此外，也已知 AII 會激活膠原蛋白質的合成，此也暗喻著其在細胞外基質的生成上扮演了一個角色(Wolf, G., et al., (1991) Intracellular signalling of transcription and secretion of type IV collagen after angiotensin II-induced cellular hypertrophy in cultured proximal tubular cells, *Cell. Reg.* 2:219-27; Wolf, et al., (1992), *supra*; Zhou, G., et al., (1992), Angiotensin II mediated stimulation of collagen

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

象

## 五、發明說明 ( 17 )

synthesis in cultured cardiac fibroblasts, *FASEB. J.* 6:A1914)。

近來的研究也顯示在傷口癒合過程中 AII 受體的表現也會有所改變 (Viswanathan, M., and J.M. Saavadra (1992), Expression of angiotensin II AT2 receptors in the rat skin during experimental wound healing, *Peptides* 13:783-6; Kimura, B., et al., (1992), Changes in skin angiotensin II receptors in rats during wound healing, *BBRC* 187:1083-90)。這些變化，以及 AII 在傷口組織處局部濃度升高，顯示 AII 可能在傷口癒合過程中扮演了相當關鍵的角色。

AII 可能涉及傷口癒合的作用，最近也被詳細評論 (Phillips et al., (1994), Angiotensin receptor stimulation of transforming growth factor- $\beta$  in rat skin and wound healing. In *Angiotensin Receptors* (ed JM Sasvedra and PBMWM Timmermans), Plenum Press, New York, NY pp377-396)。在大部分的研究報告中，都認為這些效果係經由 AT1 受體所介導的。

AII 對血壓的影響(及其他大部分的影響，例如醛固酮分泌及造成口渴)係經由第 1 型受體(AT1 受體)而達成 (Wong, PC (1994) Angiotensin antagonists in models of hypertension. In: *Angiotensin Receptors* (ed JM Saavedra and PBMWM Timmermans), Plenum Press, NY, NY pp319-336; Mackenzie et al., 1994, TCV 116 prevents progressive

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

象

## 五、發明說明 ( 18 )

renal injury in rats with extensive renal ablation. *J. Hypertension* 12(suppl 9):S11-S16; Gupta, et al., 1995, Locally generated angiotensin II in the adreanal gland regulates basal, corticotropin and potassium-stimulated aldosterone secretion. *Hypertension* 25:443-448; Llorens-Cortes, et al., 1994, Tissue expression and regulation of type 1 angiotensin II receptor subtypes by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis. *Hypertension* 24:538-548; Wong, et al., 1992 Enhancement of losartan (Dup 753)-induced angiotensin II receptor antagonism by PD 123177 in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 220:267-70)。此結論係基於 AII 之作用能被亞型受體專一性拮抗劑阻斷而得到的。

AII 及 AII 拮抗劑之影響已在兩種血管受傷及修復之實驗性模型系統中被檢視過。有關氣球血管擴張術後，AT2 對血管增生之貢獻的研究結果非常混雜。在老鼠頸動脈上，大部分的受體都是 AT2 (Pratt, RE et al., 1992 The AT2 isoforms of the angiotensin receptor mediates myointimal hyperplasia following vascular injury. *Hypertension* 20:432)。相反的，在受傷後之老鼠胸腔動脈的新生血管內膜細胞卻大半表現出 AT1 受體 (Viswanathan, M et al., Balloon angioplasty enhances the expression of angiotensin II subtype AT1 receptors in the neointima of rat aorta. *J. Clin. Invest.* 90:1707-12, 1992)。

## 五、發明說明 (19)

以 PD 123319(AT2 之專一性拮抗劑)來處理老鼠會降低血管內膜細胞增生約 73%，而羅沙藤(losartan)(AT1 之專一性拮抗劑)則會降低血管內膜面積約 95%(Pratt et al., (1992), supra)。在類似的模型中，由週邊血管內灌注 CGP 42112(AT2 拮抗劑)14 天後可阻斷血管內膜的新生，但低劑量之羅沙藤(losartan)卻完全沒有效用(Janiak et al., 1992, Role of angiotensin subtype 2 receptor in neointima formation after vascular injury. Hypertension 20:737-45)。在其他的研究中，高劑量的羅沙藤(losartan)則具效果(Forney Prescott et al., 1991, Angiotensin-converting enzyme inhibitor versus angiotensin II, AT1 receptor antagonist. Effect on smooth muscle cell migration and proliferation after balloon catheter injury. *Am. J. Pathol* 139:1291-6; Kauffman, et al., 1991, Losartan, a nonpeptide angiotensin II (Ang II) receptor antagonist, inhibits neointima formation following balloon injury to rat carotid arteries. *Life Sci* 49:223-228)。因此，可能兩種受體對氣球血管擴張術後之血管增生上均扮演了一些角色。

在年輕動物之傷口癒合實驗上，環繞傷口皮膚表面的局部組織上，AII 受體的表現明顯增加許多；大部分都是 AT2 受體(Viswanathan et al., 1992 Expression of angiotensin II AT2 receptors in the rat skin during experimental wound healing. *Biochem Biophys Res Commun* 187:1083-90)。這些試驗係於成鼠身上所進行的(在此所報

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

象

## 五、發明說明 ( 20 )

導之實驗)，發現手術後傷口之 AT1 受體有明顯改變。這些後期研究中的實驗設計無法將傷口中的真皮與其他區域區分出來。

許多研究都著重於評估 AII(1-7)之活性。AII(1-7)之許多影響都被歸諸於 AT2 受體的作用。然而，這點並不一致，且需視所檢視之組織而定。

許多 AII 的效果，AII(1-7)並不具有。在所測試的模型系統及施用途徑中，AII(1-7)並不具有增加血壓效果或是對血壓之影響相當溫和(需較 AII 劑量高約 10,000-100,000 倍才有效)。事實上，AII(1-7)可能會經由前列腺素的合成調控而有降低血壓的作用。此外，與 AII 效果不同的是，AII(1-7)並不會引發腎上腺素及醛固酮的釋出，且不會引起口渴 (Webb et al., 1992, *Molecular characterization of angiotensin II type II receptors in rat pheochromocytoma cells*, *Peptides* 13:499-508; Cheng et al., (1994) Comparison of pressor responses to angiotensin I, II and III in pulmonary vascular bed of cats. *Am. J. Physiol.* 266:H2247-2255; Moriguchi, A., et al., (1994), Differential regulation of central vasopressin in transgenic rats harboring the mouse Ren-2 gene, *Am. J. Physiol.* 267:R786-R791; Schievone et al., (1990), Angiotensin-(1-7): Evidence for novel actions in the brain, *J. Cardiovascular Pharmacol.* 16(Suppl. 4):S19-S24; Ferrario, et al., (1991), Angiotensin-(1-7): A new hormone of the

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

象

## 五、發明說明 ( 21 )

angiotensin system, *Hypertension* 19(suppl. III):III-126-III-133)。

有一分報告中，AII(1-7)有微弱的加血壓效果，但需約 10,000 倍以上之 AII(1-7)量才可使其反應程度達到能與 AII 相比的大小(Benter et al., (1993), *Cardiovascular actions of angiotensin (1-7)*, *Peptides* 14:679-684)。在此系統中，AII(1-7)展現出一種長期的降血壓效果，且此效果為視劑量而定。AII(3-7)之加血壓效果稍低於 AII(1-7)，但不具任何降血壓效果。也有人提到 AII(1-7)、AII(2-7)及 AII(3-7)可能也會影響多巴胺系統及記憶。

在許多系統中，AII(1-7)之作用與 AII 有很大的不同。在老鼠球內系膜細胞中 AII 會經由 AT1 受體刺激產生膽素；AII(1-7)和 AII(1-6)對此之影響則極微弱(Pfeilschifter, et al., (1992), *Angiotensin II stimulation of phospholipase D in rat renal mesangial cells is mediated by the AT1 receptor subtype. Eur. J. Pharmacol.* 225:57-62)。

在豬動脈表皮細胞中，AI 及 AII(1-7)會刺激前列腺素 E21 及 12 之釋出，但 AII 則無此效應(Jaiswal et al., (1992), *Stimulation of endothelial cells prostaglandin production by angiotensin peptides, Characterization of receptors, Hypertension* 19(Suppl II):II-49-II55)。在其他型細胞及完整的血管中，AII 會刺激醛固酮的釋出，但不是人類或豬表皮細胞。對表皮細胞的影響係經由與 AT1 及 AT2 截然不同的受體來作用。

## 五、發明說明 ( 22 )

在老鼠腎小球細胞製備中，AII 會經由 AT1 受體抑制組織胺、5-羥色胺及副甲狀腺荷爾蒙所引起之 cAMP 的生成(Edwards R.M. and E.J. Stack (1993), Angiotensin II inhibits glomerular adenylate cyclase via the angiotensin II receptor subtype 1 (AT1), *J. Pharmacol. Exper. Ther.* 266:506-510)。AII(1-7)則無此效應。

在豬血管平滑肌細胞及人類星形細胞中，AII 及 AII(1-7)可增加前列腺素之釋出；而只有 AII 會造成細胞內鈣離子濃度上升(Jaiswal et al., (1993), Differential regulation by angiotensin peptides in porcine aortic smooth muscle cells; subtypes of angiotensin receptors involved. *J. Pharmacol. and Exp. Therapeutic* 265:664-673; Jaiiswal et al., (1991) Subtype 2 angiotensin receptors mediate prostaglandin synthesis in human astrocytes. *Hypertension* 17:1115-1120)。

AII(1-7)可能係經由一氧化氮的產生使豬冠狀動脈血管環擴張(Porsti et al., (1994), Release of nitric oxide by angiotensin-(1-7) from porcine coronary endothelium: Implications for a novel angiotensin receptor, *Br. J. Pharmacol.* 111:652-654)。這點在 AII、AIII 或 AII(3-8)上則未發現。AT1 或 AT2 受體拮抗劑並無法減弱此效果。

AII 會引起分離出之老鼠迷走神經下節產生去極化現象；AII(1-7)則否(Widdop et al., (1992)

## 五、發明說明 ( 23 )

Electrophysiological responses of angiotensin peptides on the rat isolated nodose ganglion, *Clin. And Exper. Hyper-Theory and Practice* A14:597-613)。的確，AII(1-7)可能對腦部功能有一些新穎的作用(Schiavone et al., (1990), Angiotensin-(1-7): Evidence for novel actions in the brain, *J. Cardiovascular Pharmacol.* 16(Suppl 4):S19-S24)。

AII 和 AII(1-7)也具有某些相同的活性，例如血管加壓素的釋出及調控近端腎曲小管細胞中之磷脂酶之活性 (Andreata-Van Leyen, S. et al., (1993) Modulation of phospholipase A2 activity and sodium transport by angiotensin-(1-7), *Kidney International* 44:932-6; Moriguchi, A. et al., (1994) Differential regulation of central vasopressin in transgenic rats harboring the mouse Ren-2 gene, *Am. J. Physiol.* 267:R786-791; Farrario et al., (1991), Angiotensin-(1-7): A new hormone of the angiotensin system, *Hypertension* 19(Suppl III):III126-III133)。但這些活性似乎與傷口癒合並不相關。

僅有少數的研究曾探討過 AII 其他斷片的效果。旁室神經核中大部分的神經元可以被 AII(1-7)、AII 及 AIII 所激發，但 AII(1-7)之效果較弱；在許多神經元中，AII(2-7)並不具效用 (Ambuhl et al., 1992 Effects of angiotensin analogues and angiotensin receptor antagonists on paraventricular neurons, *Regulatory Peptides* 38:111-120)。將 AII 注入大腦室周邊會增進運動性、立體形態及

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

象

## 五、發明說明(24)

條件反射之學習；AII(1-6)及 AII(2-6)對這些心理層面活性則沒有效用(Holy, Z., et al., (1993) *Polish J. Pharmacol.* 45:31-41)。

將 AII(4-8)、AII(5-8)及 AII(1-4)注入老鼠前間腦，發現其對水分的攝取只有些微的影響，而 AII(1-7)則完全不具影響力(Fitzsimmons, J. T. (1971), The effect on drinking of peptide precursors and of shorter chain peptide fragments of angiotensin II injected into the rat's diencephalon, *J. Physiol.* 214:295-303)。即使在老鼠腦室中灌注入比 AII 濃度高 1000 倍以上之 AII 斷片(AII(4-8)及 AII(5-8))，也只會對血壓產生輕微的影響(Wright, et al., 1989 Structure-function analysis of brain angiotensin control of pressor action in rats, *Am. J. Physiol.* 257:R1551-R1557)。在此兩研究中，斷片都是被直接注入腦中；此舉乃屬極端人爲的方式，因此會阻斷系統性代謝作用。

依據本發明方法，在此所揭露之一或多種具活性的 AII 類似物係以足以能促進組織癒合速率之量而被施用於受傷組織上。在體內試驗中，這些化合物在濃度爲微毫莫耳時即可明顯增加癒合速率。對任何一個具活性的藥劑而言，一選定配方之最佳濃度可輕易的經由常規試驗來測出。一般來說，依據本發明適合之活性物用量係介於每公斤體重 0.001 微克至約 10 毫克間。

本發明化合物可施用於許多類溶液中。依據本發明

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

象

## 五、發明說明(26)

水、林格氏乳酸鹽溶液(Ringer's lactate solution)、磷酸緩衝液及其他)，黏稠彈性物、聚乙二醇、聚丙二醇及傷口敷料(如繃帶等)。

本發明化合物之癒合效果可於許多情況下使用。在治療潰瘍、損害、傷害、糖尿病引起的潰瘍、燒傷、外傷、鬱積性潰瘍、牙周病、撕裂傷及其他傷害時，可將溶液局部塗抹在傷口組織表面上。此外，因手術所致之腹膜間傷口組織也可以本發明組成物來處理以加速其癒合。例如，在手術去除一段直腸或其他組織後，在縫合傷口前可先在傷口組織表面塗上一層活性物溶液以加速內部微血管癒合。此外，也可以注射或其他方式將活性物送入皮下以促進局部癒合的速率。

具有在此所揭露結構之血管緊縮素 II 之類似物及血管緊縮素 II 斷片之類似物可藉自動化肽合成儀及此領域中習知技藝人士所熟知的方法來進行製備。依下述方法測試每一個類似物其促進傷口癒合之能力。將其結果用來在第 2、4、7 及 8 天來測量傷口封閉的程度，並和以載體處理之控制組百分比來表示。因所有類似物並非在同一實驗中進行測試，因此每一組測試的肽中均含有 AII 為正控制組。

本發明可以下列實施例來作說明，這些實施例乃是用來闡述本發明，並不限制本發明之範疇，如下列申請專利範圍所示。在此所示之實驗結果代表本發明組成物能促進傷口癒合之一般性應用。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 (27)

下列實施例所述之方法顯示具有在此所揭露結構之血管緊縮素之類似物在一體內傷口癒合試驗中展現出非常好的活性。

### 實施例 1

#### 傷口癒合組成物之應用

12 週大之 Sprague Dawley 雌鼠係購自加州 Simonsen 實驗室(Gilroy, California)。手術當天，在手術前先以肌肉內注射氯胺酮(ketamine)/羅朴(rompum)的方式將動物麻醉。將老鼠剃毛並以貝他碘(Betadine)刷洗。在老鼠背部做出兩個各 1.5x1.5 公分深及整個真皮層之傷口。在切除皮膚後，於玻璃片上畫出整個傷口範圍大小之區域，並以 100 微升溶於 0.05M 磷酸緩衝液(pH 7.2)之 10%羧化甲基纖維素溶液進行處理。測試化合物之施用則為隨機性，所有測試物量均為每個傷口 100 微克。控制組則是僅施以載體來進行處理。在施用化合物後，將老鼠包紮後讓其慢慢由麻醉中清醒。在手術後前五天，每天均以化合物進行治療。在第 2、4、7 及 9 天，以甲氧呋喃(methoxyflurane，商品名稱 Metrofane (Pittman-Moore 公司，Mundelein, Illinois))麻醉老鼠後測量其皮膚傷口。傷口區域之測量係先以(1)將傷口形狀畫在方格紙上(每格為 1x1 毫米正方)；(2)將形狀剪出；(3)稱重並與剪下之 1.5x1.5 公分紙張比較；及(4)計算格數。此外，以類似的方法定出第 2 及 4 天其肉芽組織區域大小。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

象

## 五、發明說明 ( 30 )

&lt;400&gt; 2

Arg Val Tyr Ile His Pro Phe

1

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人爲序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成序列

&lt;400&gt; 3

Tyr Ile His Pro Phe

1

5

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人爲序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成序列

&lt;221&gt; 變異物

&lt;222&gt; (4)...(4)

<223> Xaa(4)爲 Tyr(PO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

&lt;400&gt; 4

Asp Arg Val Xaa Ile His Pro Phe

1

5

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

象

五、發明說明 ( ㄅ )

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> 人爲序列

<220>

<223> 合成序列

<221> 變異物

<222> (3)...(3)

<223> Xaa(3)爲 norLeu

<400> 5

Asp Arg Xaa Tyr Ile His Pro Phe

1

5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> 人爲序列

<220>

<223> 合成序列

<221> 變異物

<222> (5)...(5)

<223> Xaa(5)爲 norLeu

<400> 6

Asp Arg Val Tyr Xaa Ile His Pro Phe

1

5

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

象

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

象

五、發明說明 ( 32 )

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> 人爲序列

<220>

<223> 合成序列

<221> 變異物

<222> (4)...(4)

<223> Xaa(4)爲 homoSer

<400> 7

Asp Arg Val Xaa Ile His Pro Phe

1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> 人爲序列

<220>

<223> 合成序列

<221> 變異物

<400> 8

Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Ile

1 5

<210> 9

<211> 7

五、發明說明 ( 7 )

<212> PRT  
<213> 人爲序列  
<220>  
<223> 合成序列  
<221> 變異物  
<222> (2)...(2)  
<223> Xaa(2)爲 norLeu  
<400> 9

Arg Xaa Tyr Ile His Pro Phe  
1 5

<210> 10  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人爲序列  
<220>  
<223> 合成序列  
<221> 變異物  
<222> (4)...(4)  
<223> Xaa(4)爲 norLeu  
<400> 10

Arg Val Tyr Xaa His Pro Phe  
1 5

<210> 11  
<211> 8

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

象

五、發明說明 ( 34 )

- <212> PRT
- <213> 人爲序列
- <220>
- <223> 合成序列
- <221> 變異物
- <222> (1)...(1)
- <223> Xaa(1)爲 氫 或 Asp
- <221> 變異物
- <222> (3)...(3)
- <223> Xaa(3)爲 norLeu
- <221> 變異物
- <222> (4)...(4)
- <223> Xaa(4)爲 Tyr , Tyr(PO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 或 homoSer
- <221> 變異物
- <222> (5)...(5)
- <223> Xaa(5)爲 Ile 或 norLeu
- <221> 變異物
- <222> (8)...(8)
- <223> Xaa(8)爲 H , Phe , 或 Ile
- <400> 11
- Xaa Arg Xaa Xaa Xaa His Pro Phe
- 1                          5
- <210> 12
- <211> 8

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

象

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

## 五、發明說明 ( 35 )

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人爲序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成序列

&lt;221&gt; 變異物

&lt;222&gt; (1)...(1)

&lt;223&gt; Xaa(1)爲 氫 或 Asp

&lt;221&gt; 變異物

&lt;222&gt; (3)...(3)

&lt;223&gt; Xaa(3)爲 Val 或 norLeu

&lt;221&gt; 變異物

&lt;222&gt; (4)...(4)

<223> Xaa(4)爲 Tyr(PO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

&lt;221&gt; 變異物

&lt;222&gt; (5)...(5)

&lt;223&gt; Xaa(5)爲 Ile 或 norLeu

&lt;221&gt; 變異物

&lt;222&gt; (8)...(8)

&lt;223&gt; Xaa(8)爲 H , Phe , 或 Ile

&lt;400&gt; 12

Xaa Arg Xaa Xaa Xaa His Pro Xaa

1

5

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 8

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

象

## 五、發明說明 ( 36 )

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人爲序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成序列

&lt;221&gt; 變異物

&lt;222&gt; (1)...(1)

&lt;223&gt; Xaa(1)爲 氫 或 Asp

&lt;221&gt; 變異物

&lt;222&gt; (3)...(3)

&lt;223&gt; Xaa(3)爲 Val 或 norLeu

&lt;221&gt; 變異物

&lt;222&gt; (4)...(4)

&lt;223&gt; Xaa(4)爲 homoSer

&lt;221&gt; 變異物

&lt;222&gt; (5)...(5)

&lt;223&gt; Xaa(5)爲 Ile 或 norLeu

&lt;221&gt; 變異物

&lt;222&gt; (8)...(8)

&lt;223&gt; Xaa(8)爲 H , Phe , 或 Ile

&lt;400&gt; 13

Xaa Arg Xaa Xaa Xaa His Pro Xaa

1

5

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 8

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

象

五、發明說明 ( 37 )

- <212> PRT
- <213> 人爲序列
- <220>
- <223> 合成序列
- <221> 變異物
- <222> (1)...(1)
- <223> Xaa(1)爲 氫 或 Asp
- <221> 變異物
- <222> (3)...(3)
- <223> Xaa(3)爲 Val 或 norLeu
- <221> 變異物
- <222> (4)...(4)
- <223> Xaa(4)爲 Tyr、Tyr(PO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 或 homoSer
- <221> 變異物
- <222> (5)...(5)
- <223> Xaa(5)爲 norLeu
- <221> 變異物
- <222> (8)...(8)
- <223> Xaa(8)爲 H，Phe，或 Ile
- <400> 14
- Xaa Arg Xaa Xaa Xaa His Pro Xaa
- 1                          5
- <210> 15
- <211> 7

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

象

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

## 五、發明說明 ( 38 )

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人爲序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成序列

&lt;221&gt; 變異物

&lt;222&gt; (3)...(3)

&lt;223&gt; Xaa(3)爲 Val 或 norLeu

&lt;400&gt; 15

Asp Arg Xaa Tyr Ile His Pro

1

5

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

象

四、中文發明摘要（發明之名稱：

）

### 傷口癒合之組成物

以血管緊縮素 II 之類似物或其斷片所作成之能有效  
促進哺乳動物傷口癒合之組成物。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）

裝

訂

線

英文發明摘要（發明之名稱：

**WOUND HEALING COMPOSITIONS**

）

Compositions useful for accelerating wound healing in mammals are based on chemical analogs of  
angiotensin II or fragments thereof.

87120706

公告本

1/13

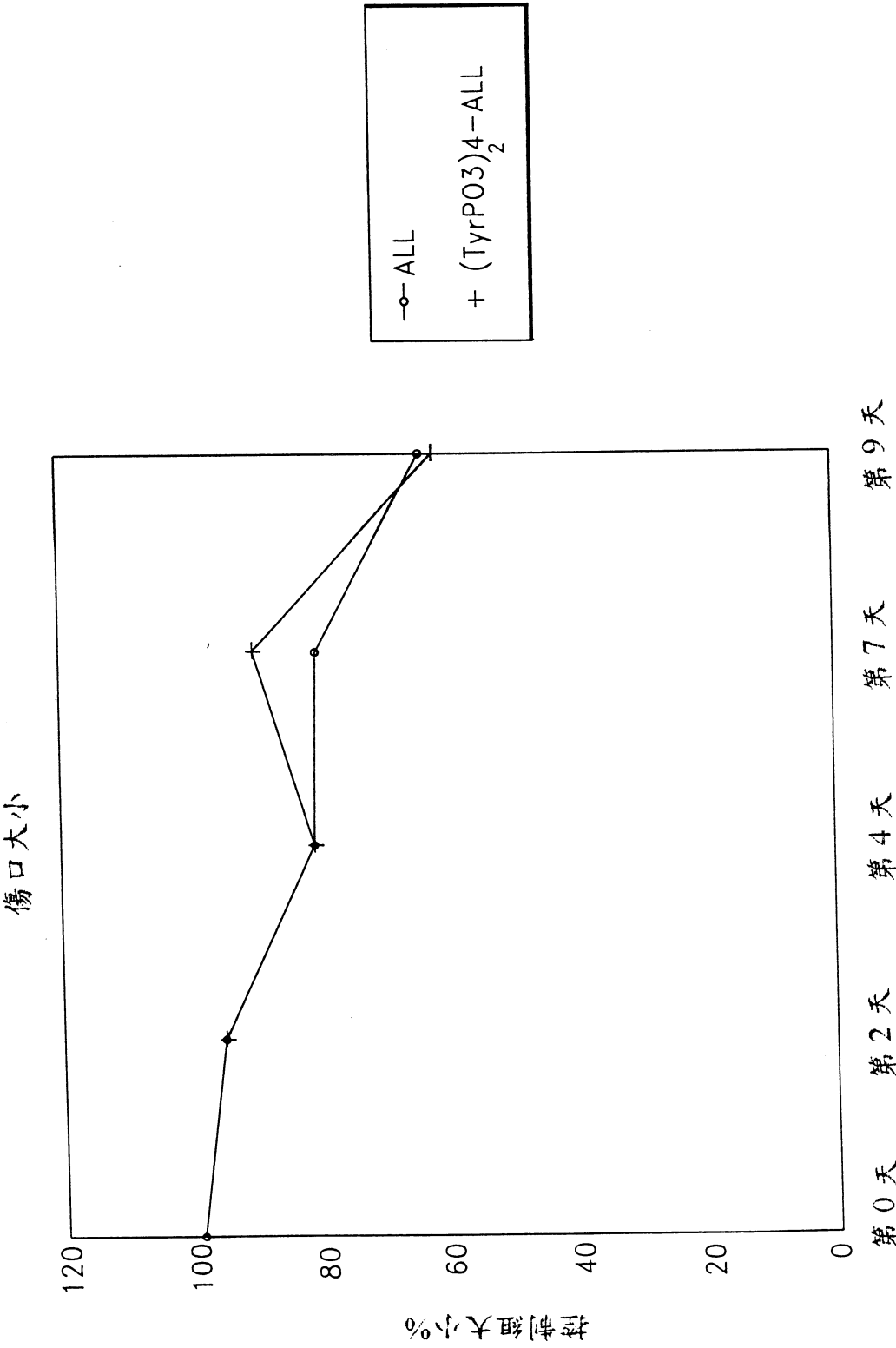


圖1

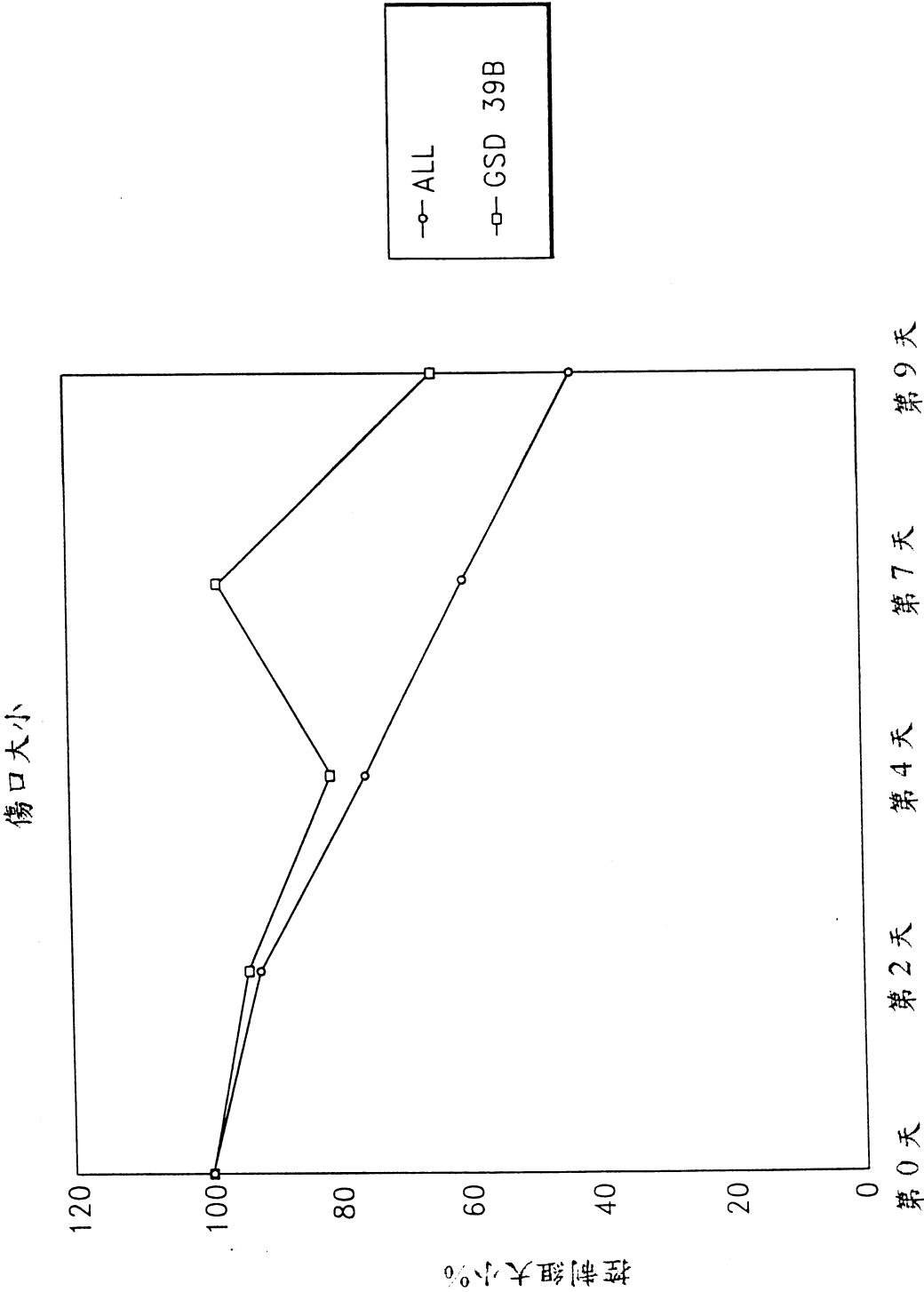


圖 2

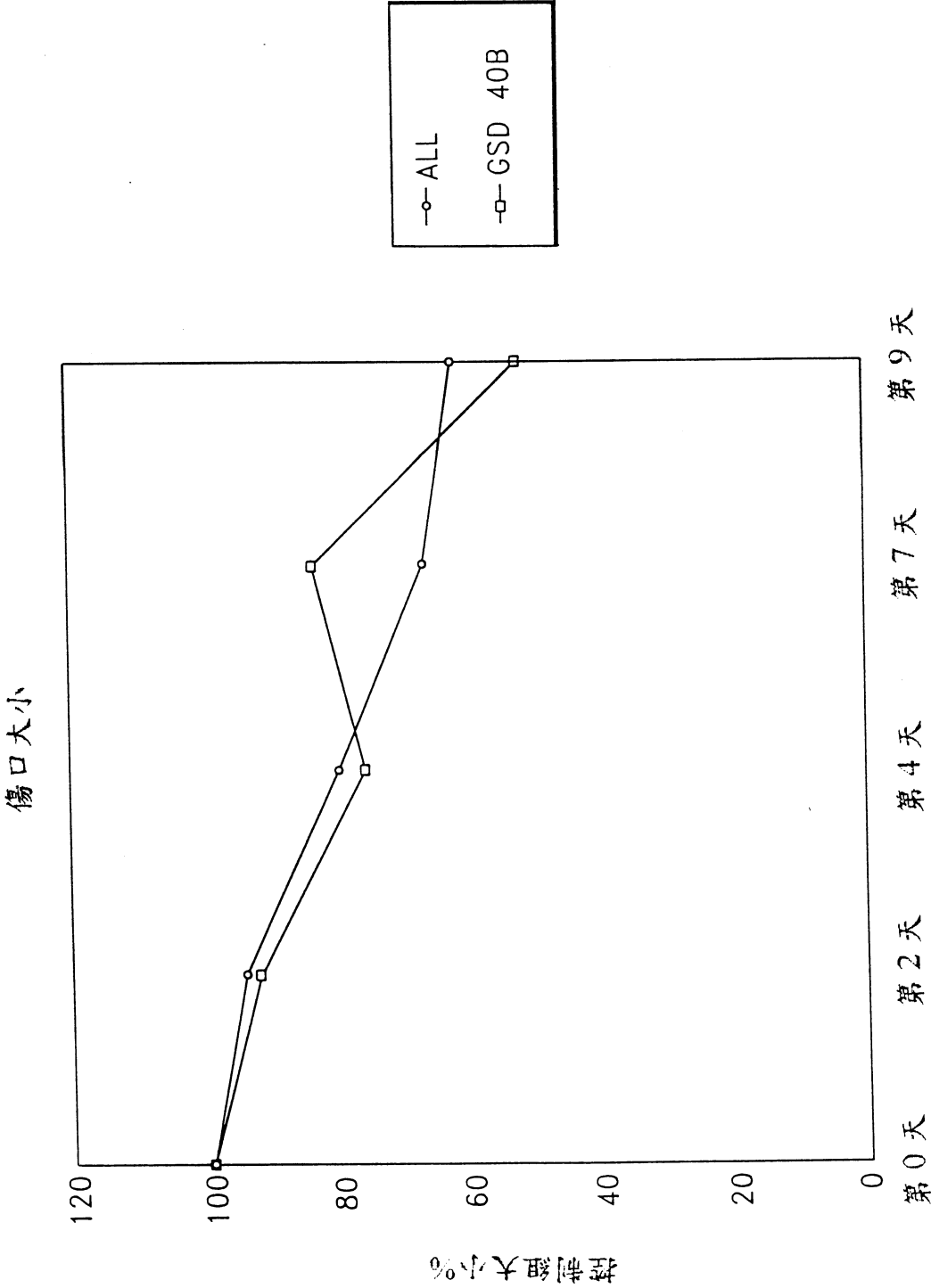


圖 3

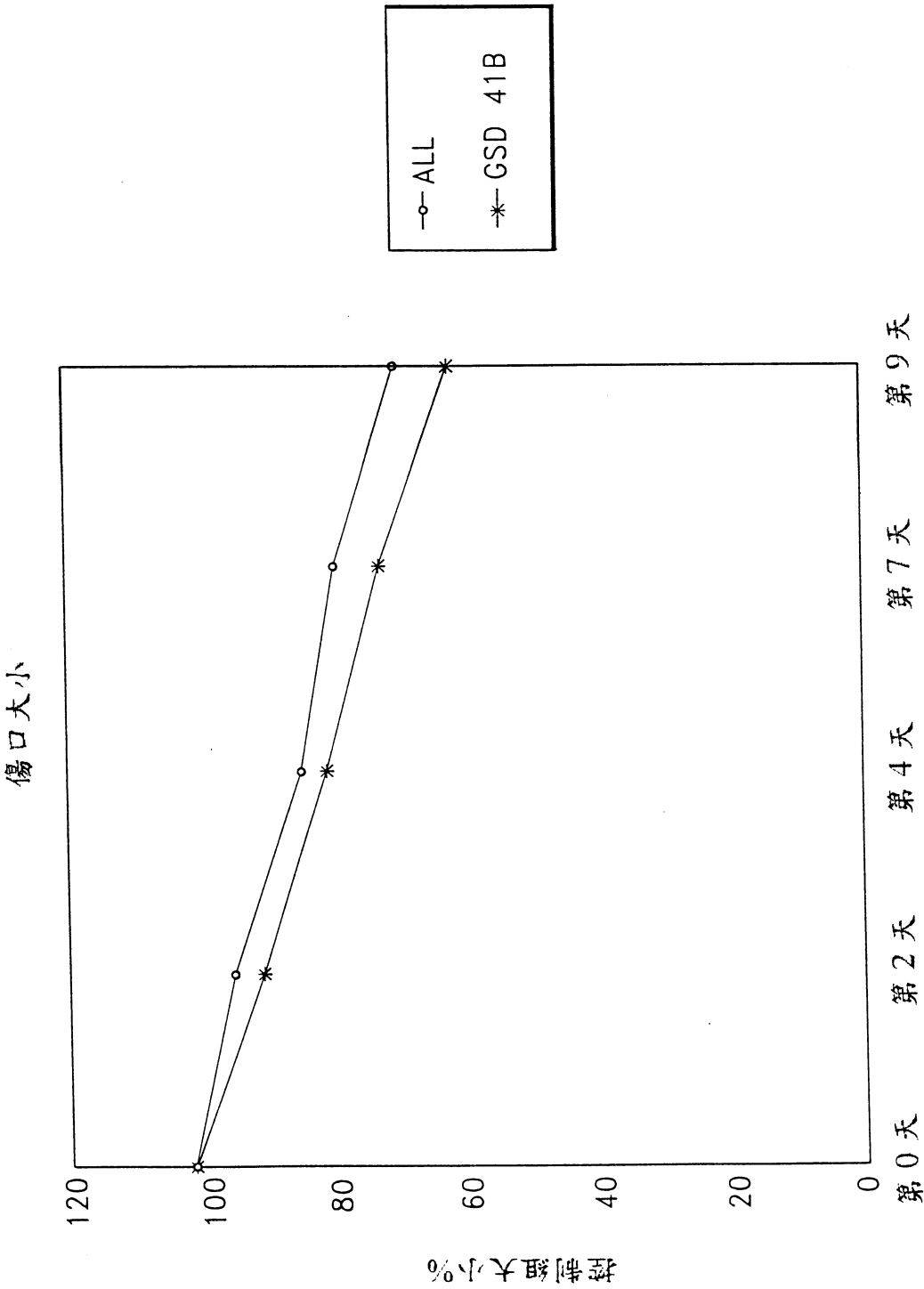


圖 4

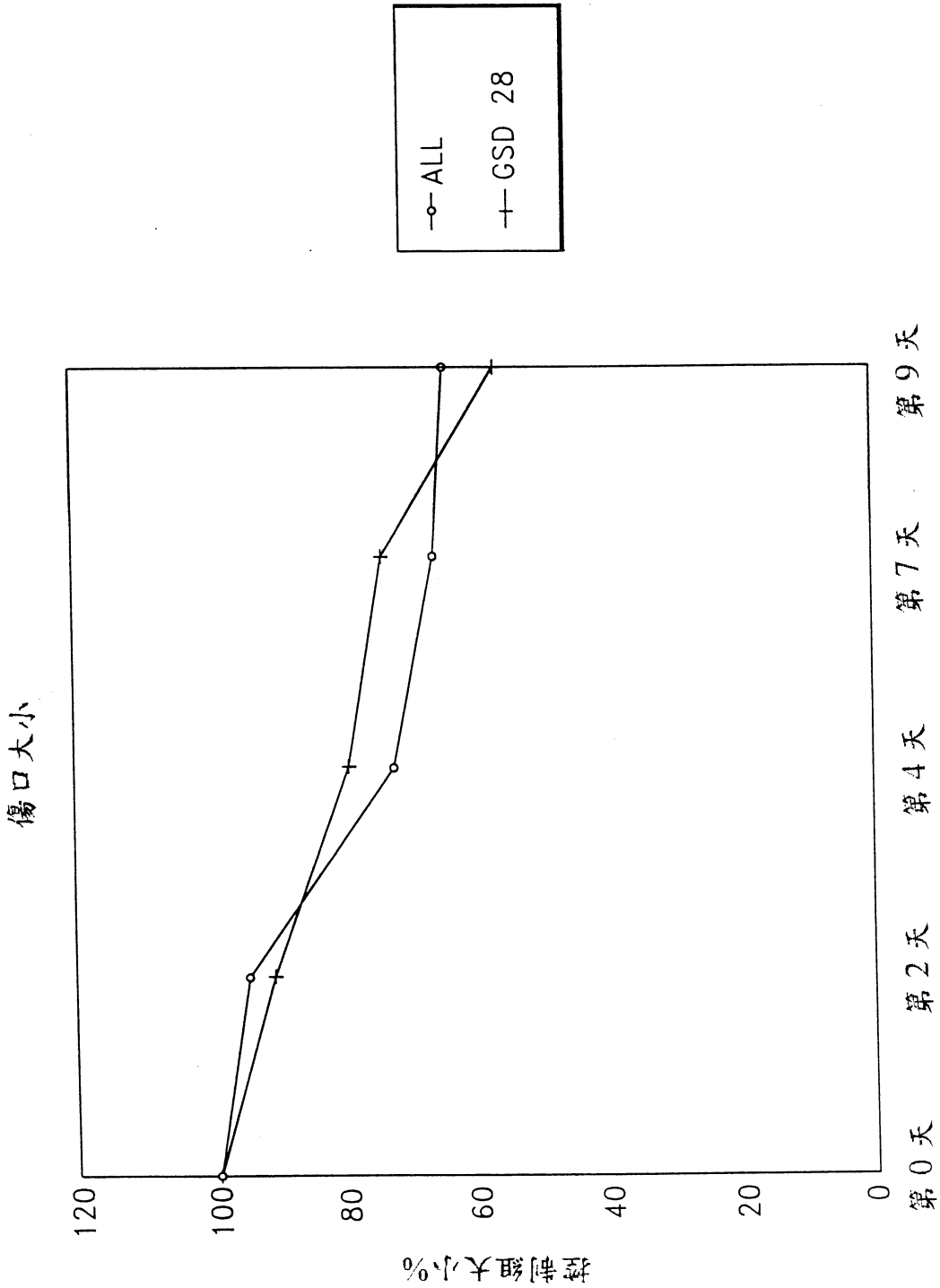


圖 5

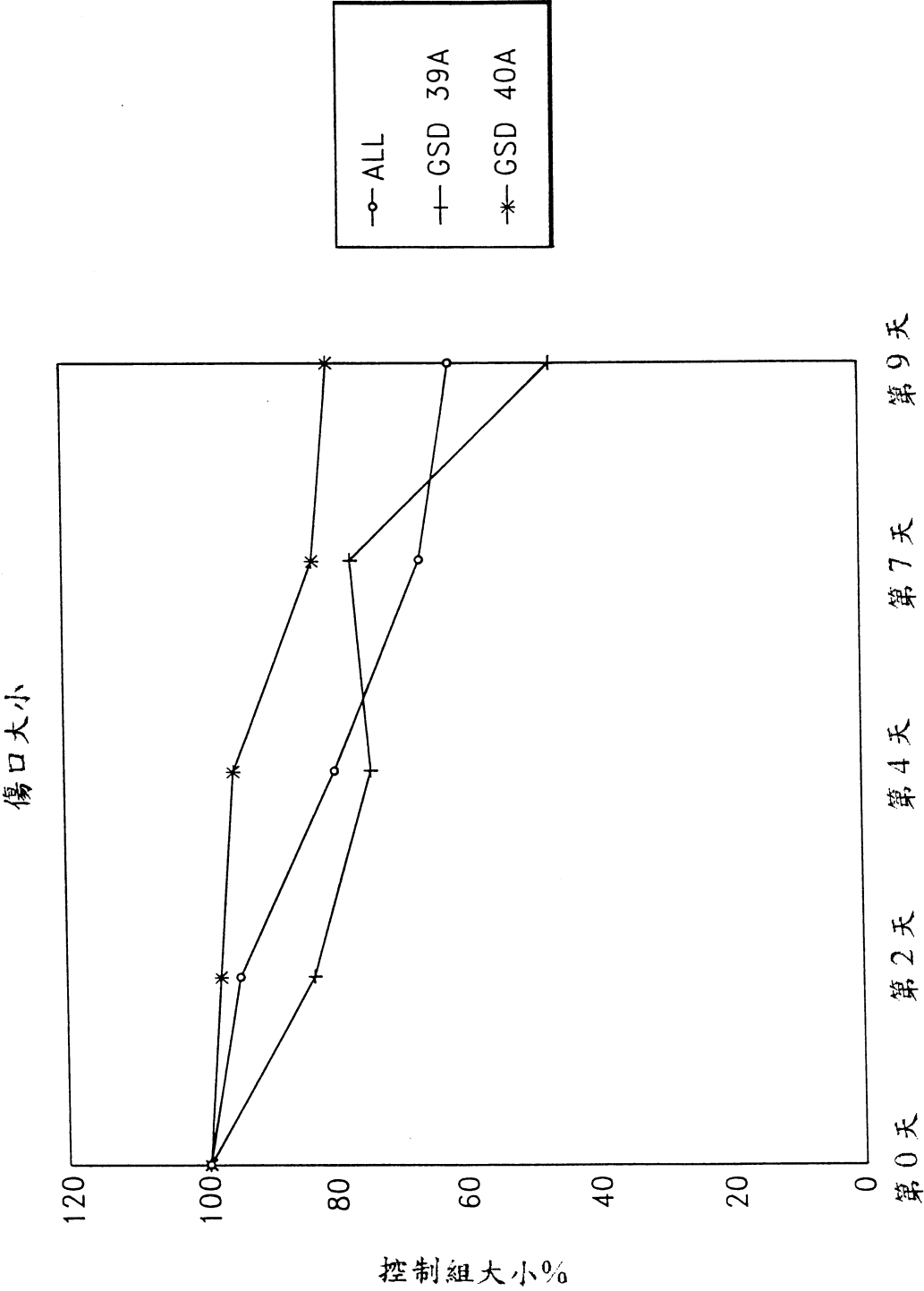


圖 6

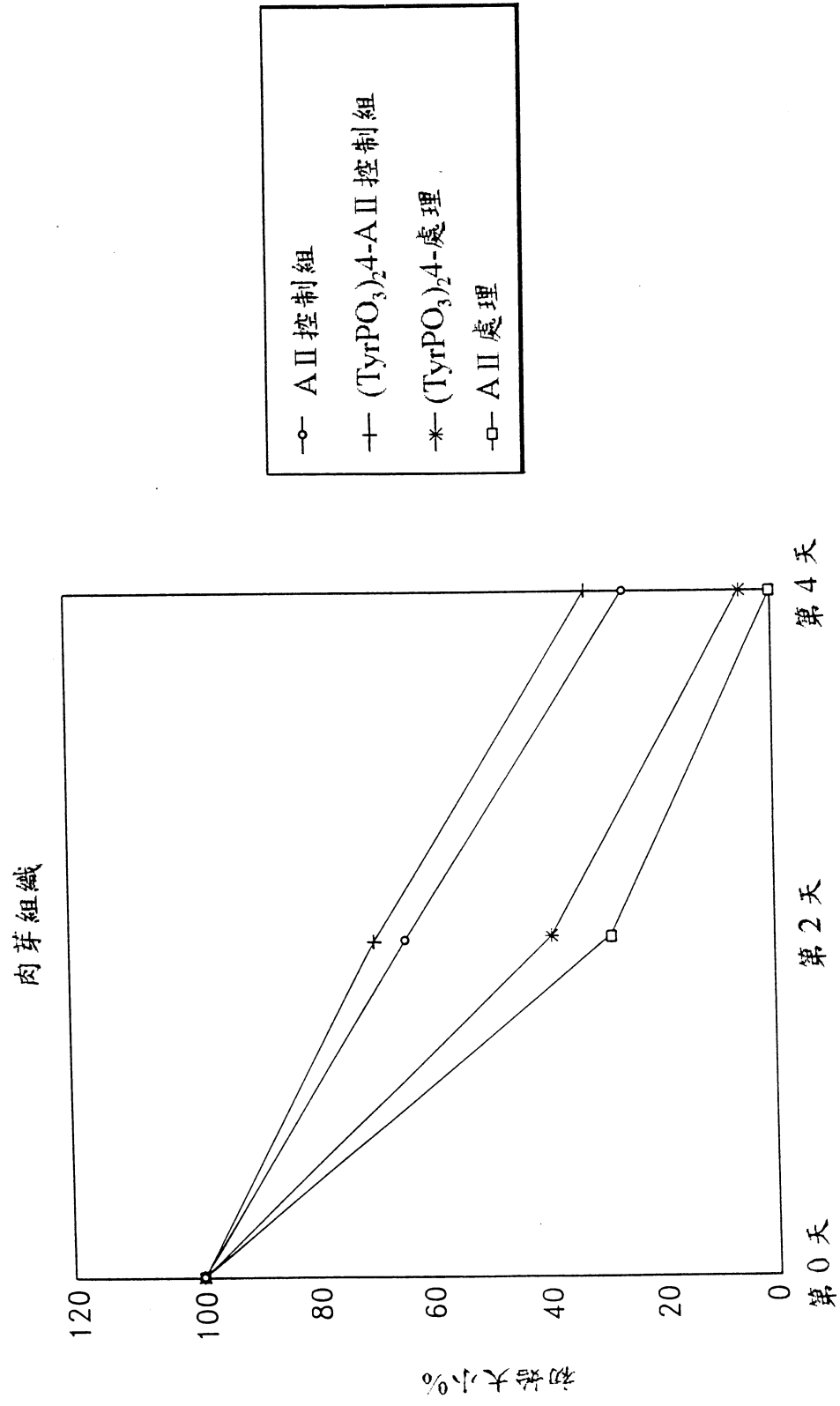


圖 7

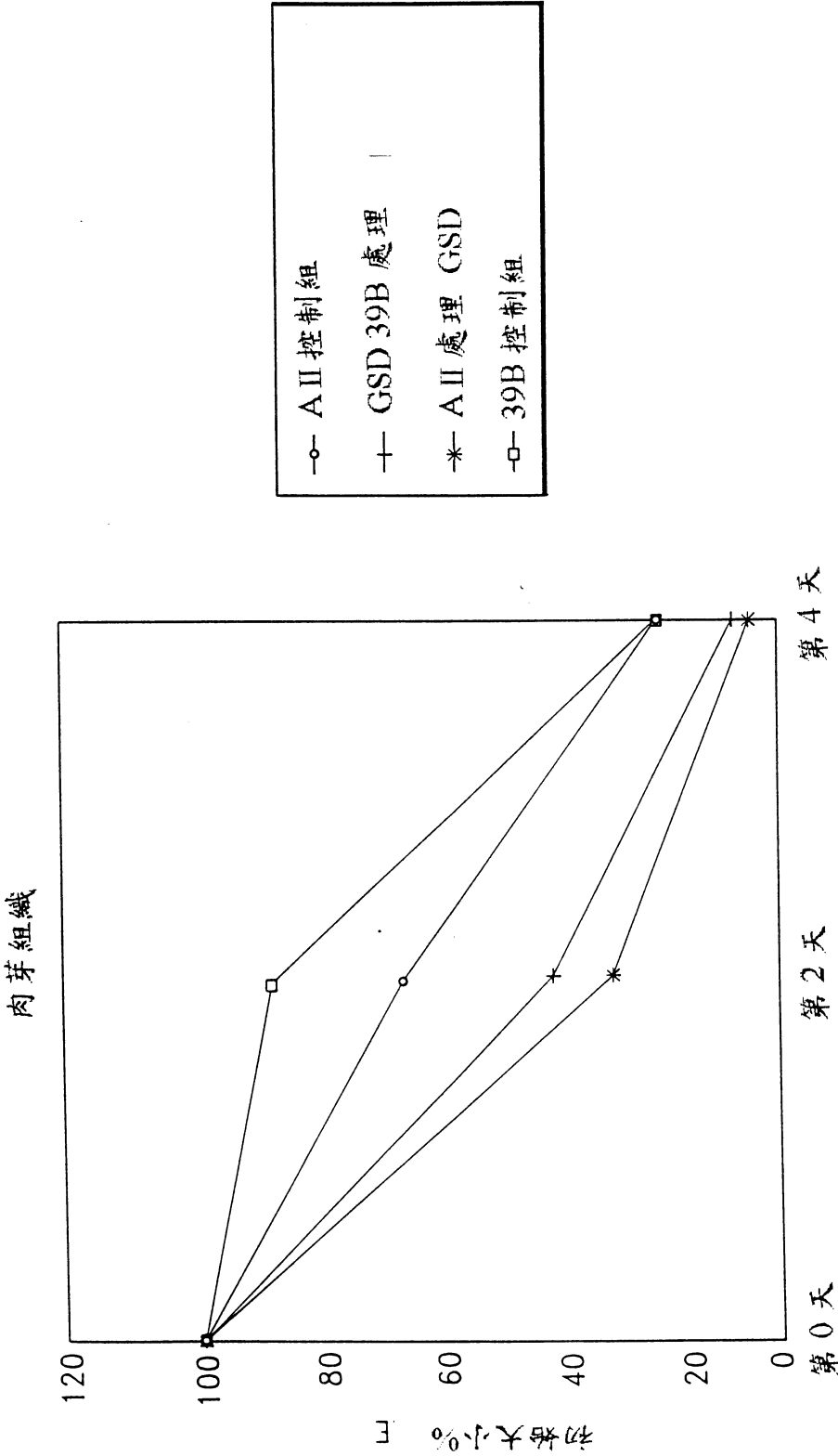


圖 8

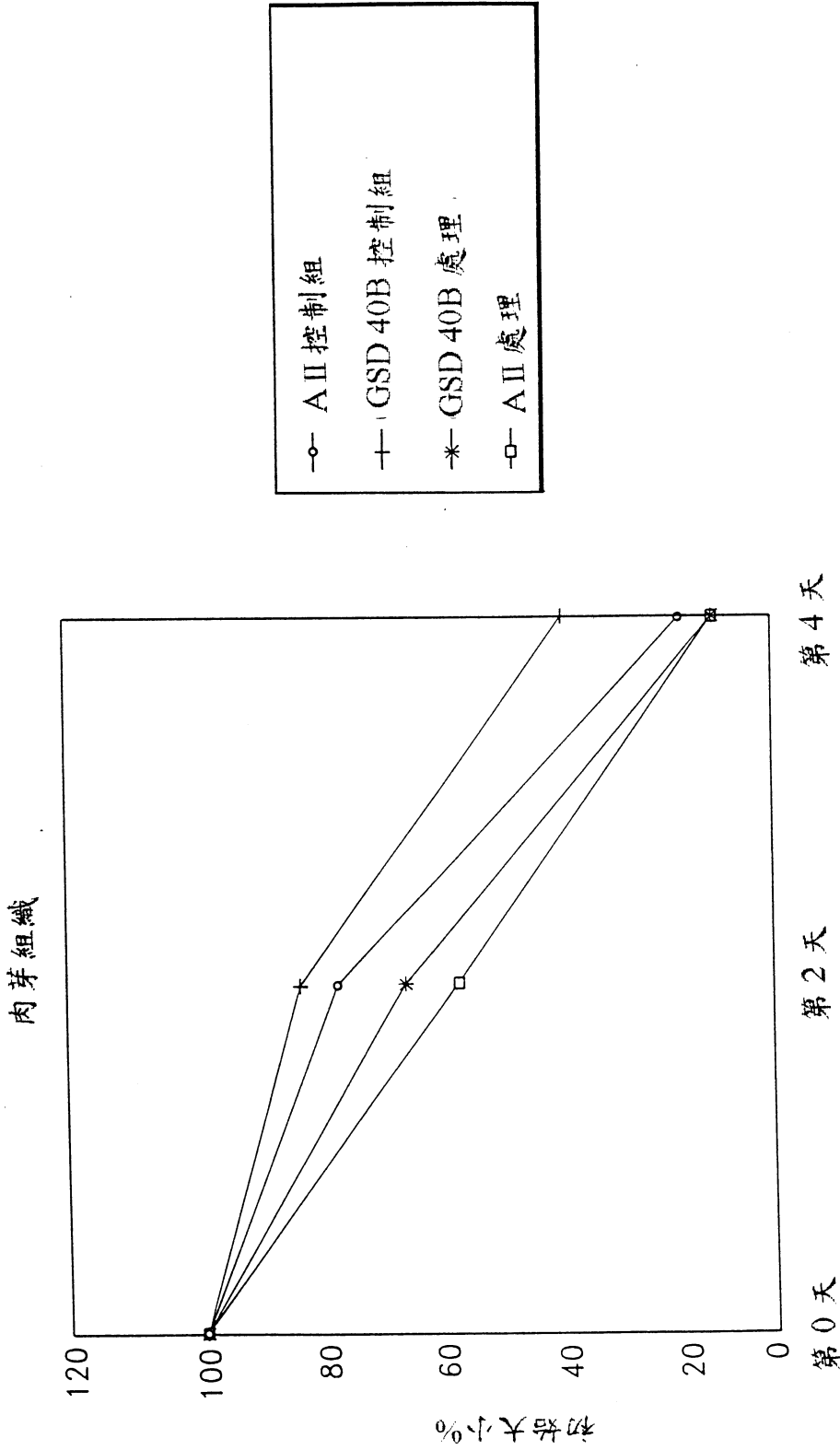


圖 9

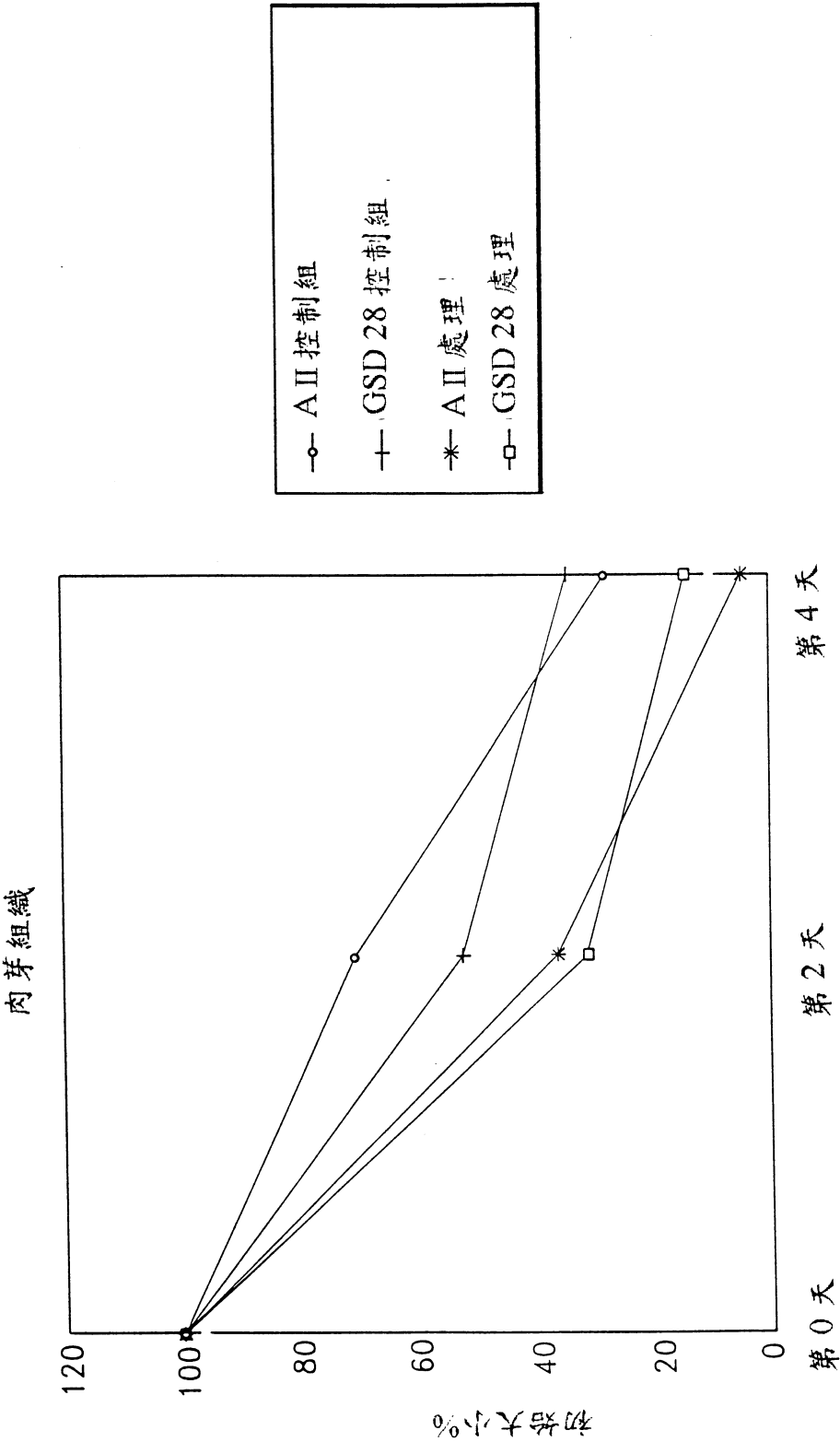


圖 10

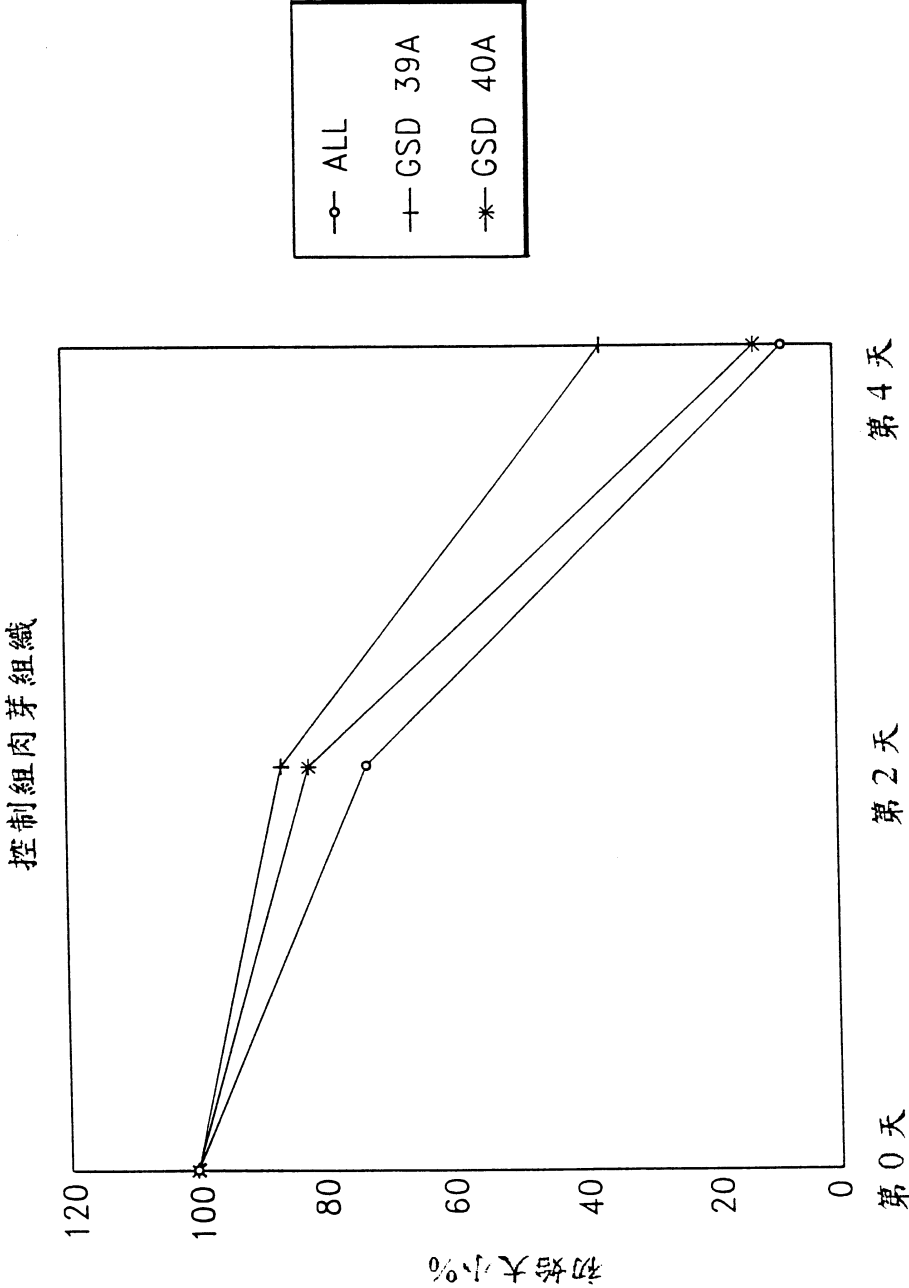


圖 11

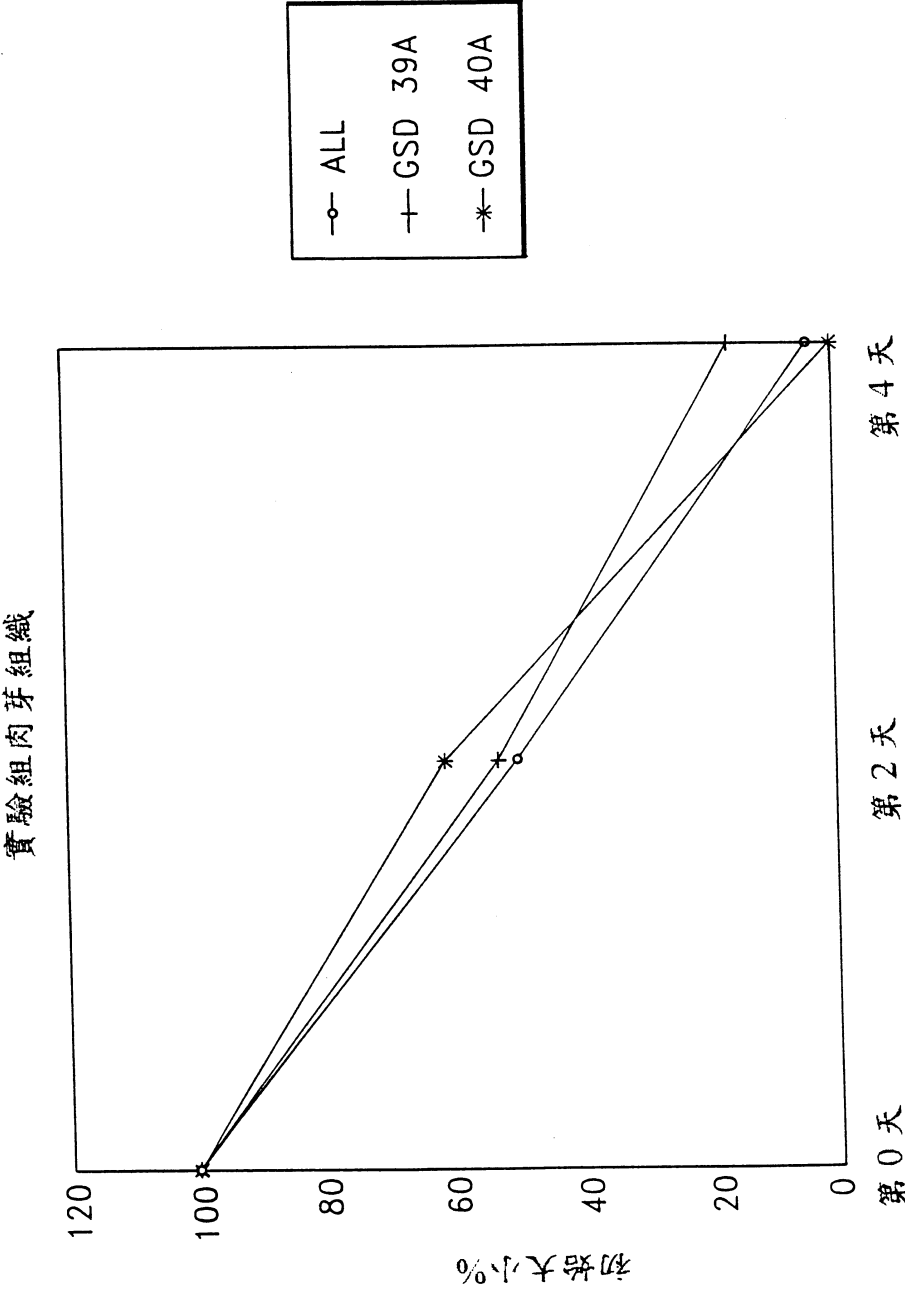


圖 12

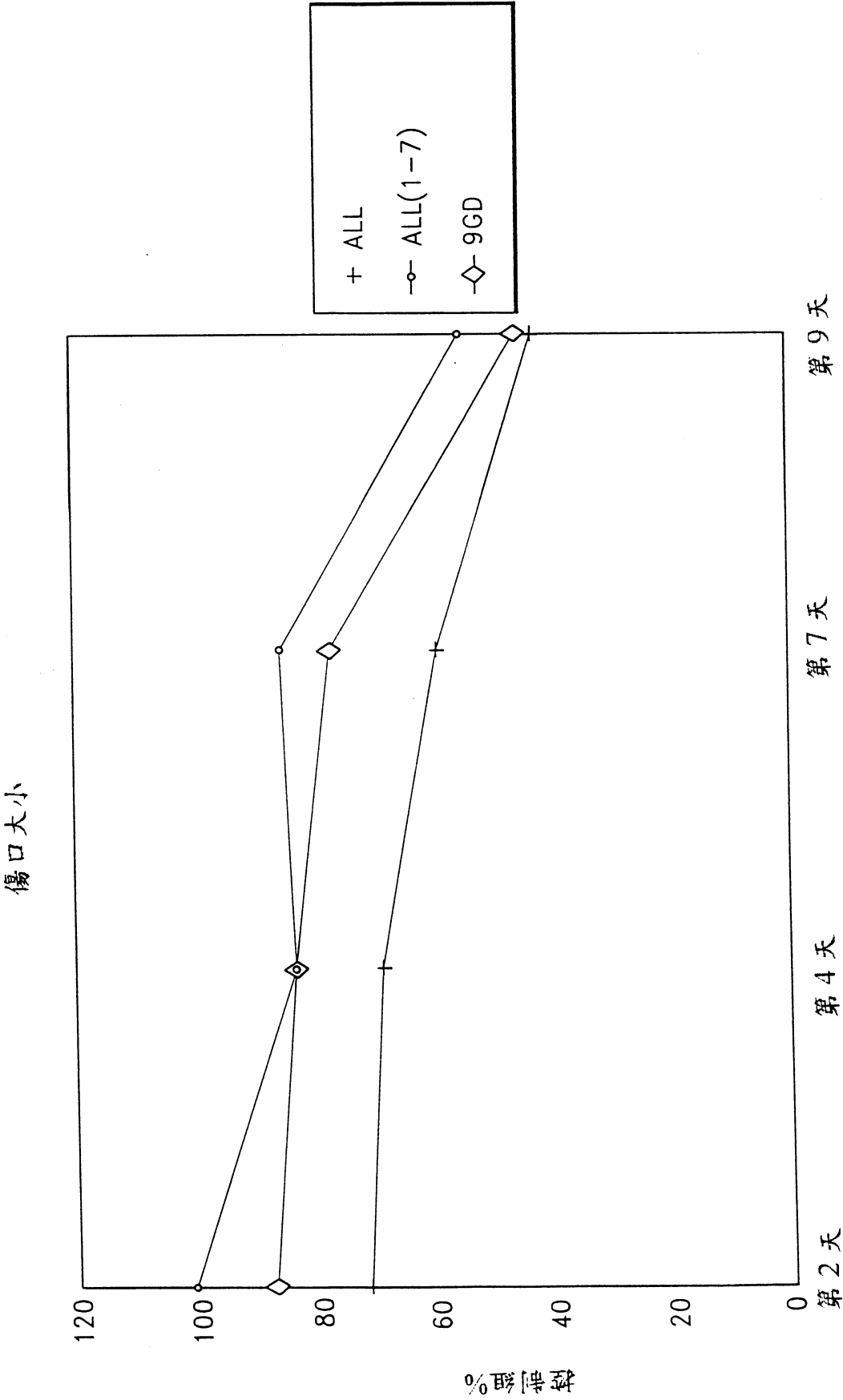


圖 13

## 五、發明說明 ( )

能更快速癒合傷口(即，嚴重燒傷、手術傷口、撕裂傷及其他外傷)，但迄今在以藥劑促進傷口癒合上的成就卻非常有限。

美專利案第 5,015,629 號中，DiZerega 描述了一種能加速傷口組織癒合速率的方法，包括在這類組織上施用一足以造成此加速效果量的血管緊縮素 II(angiotensin II)(AII)。在傷口組織上施用血管緊縮素 II 能顯著提高傷口癒合速率，導致更快速的表皮再生及組織修復。血管緊縮素 II 係指人體及其他動物體中一段具有八個胺基酸的胜肽，其序列為 Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe (胺基酸序列編碼：1)。血管緊縮素 II 乃是一已知的加血壓劑且市面上均有販售。

血管緊縮素 III (AIII) 是一個衍生自 AII、具有生物活性的化合物，其係將 AII 之 N-端上的一個胺基酸移除後所產生的化合物。因此，AIII 之序列為 Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe (胺基酸序列編碼：2)。儘管 AII 及 AIII 具有類似的結構，但這兩分子在功能上卻有明顯的差異。例如，在誘導性神經正腎上腺素釋放上，AII 表現出一種兩相效果(初期上升接著一個較後期的上升)，而其促進立即性的正腎上腺素釋放則是在 12 分鐘後才開始；AIII 則對誘導性及立即性神經正腎上腺素釋放兩者上均表現出兩相效果(Vatta, M.S., et al., (1992), Monophasic and biphasic effects of angiotensin II and III on norepinephrine uptake and release in rat adrenal medulla, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 70:821)

## 五、發明說明( )

。再者，AII 及 AIII 對重覺受器-聽-反射的影響也不同。AII 能促進反射動作的靈敏性，而 AIII 則會延緩反射動作 (Brattstrom, A., et al., (1992) Neuropeptides within the nucleus tractus solitarii modulate the central cardiovascular control process, *Progress in Brain Research* 91:75)。

### 發明概述

本發明之第一方面係關於一種能有效促進傷口癒合的組成物。此組成物包括一適當的載體或稀釋物及一有效量能促進傷口癒合之至少一種含至少五個連續胺基酸，其可以下列任一通式來表示之化合物：

$R^1$ -Arg-norLeu- $R^3$ - $R^4$ -His-Pro- $R^5$  (胺基酸序列編碼：11)，  
 $R^1$ -Arg- $R^2$ -Tyr( $PO_3$ )<sub>2</sub>- $R^4$ -His-Pro- $R^5$  (胺基酸序列編碼：12)，  
 $R^1$ -Arg- $R^2$ -homoSer- $R^4$ -His-Pro- $R^5$  (胺基酸序列編碼：13)，及  
 $R^1$ -Arg- $R^2$ - $R^3$ -norLeu-His-Pro- $R^5$  (胺基酸序列編碼：14)。在這些通式中  $R^1$  為氫(H)或天門冬胺酸(Asp)； $R^2$  是纈胺酸(Val)或正亮胺酸(norLeu)； $R^3$  為酪胺酸(Tyr)、酪胺酸二亞磷酸鹽(Tyr( $PO_3$ )<sub>2</sub>)或同素絲胺酸(homoSer)； $R^4$  為異亮胺酸(Ile)或正亮胺酸(norLeu)；且  $R^5$  為氫(H)、苯丙胺酸(Phe)或異亮胺酸(Ile)。

依據一實施例，化合物可以是以下任一種：Asp-Arg-Val-Tyr( $PO_3$ )<sub>2</sub>-Ile-His-Pro-Phe (胺基酸序列編碼：4)，Asp-Arg-norLeu-Tyr-Ile-His-Pro-Phe (胺基酸序列編碼：5)，Asp-Arg-Val-Tyr-norLeu-His-Pro-Phe (胺基酸序列編碼：6)，Asp-Arg-Val-

## 五、發明說明 ( )

homoSer-Ile-His-Pro-Phe (胺基酸序列編碼：7)，Arg-norLeu-Tyr-Ile-His-Pro-Phe (胺基酸序列編碼：9)，Arg-Val-Tyr-norLeu-His-Pro-Phe (胺基酸序列編碼：10)，或 Asp-Arg-norLeu-Tyr-Ile-His-Pro (胺基酸序列編碼：15)。依據另一不同的實施例，通式中  $R^5$  位置乃是氫。依據另一不同的實施例，化合物乃是在一基質或一微胞溶液中。依據另一不同的實施例，化合物乃是以 1 毫微克/毫升至 5000 微克/毫升的濃度，或是 10-500 微克/毫升的濃度，或甚至是 30-200 微克/毫升的濃度被分散在一載體或一稀釋物中。在一較佳之實施例中，化合物係以至少 30 微克/毫升的濃度被分散在一載體或一稀釋物中。依據本發明另一實施例，載體或稀釋物可以是下列任一種：半固體之聚乙二醇聚合物、羧化甲基纖維素製劑、類晶體製劑、黏稠彈性物或聚丙二醇。依據某些實施例，本發明化合物係被加在傷口敷料中。

本發明之另一方面係關於一種能加速傷口癒合之化合物。此化合物較好具有至少五個連續胺基酸且可以下列任一通式來表示之化合物：

$R^1$ -Arg-norLeu- $R^3$ - $R^4$ -His-Pro- $R^5$  (胺基酸序列編碼：11)，

$R^1$ -Arg- $R^2$ -Tyr( $PO_3$ )<sub>2</sub>- $R^4$ -His-Pro- $R^5$  (胺基酸序列編碼：12)，

$R^1$ -Arg- $R^2$ -homoSer- $R^4$ -His-Pro- $R^5$  (胺基酸序列編碼：13)，及

$R^1$ -Arg- $R^2$ - $R^3$ -norLeu-His-Pro- $R^5$  (胺基酸序列編碼：14)。在這些通式中  $R^1$  為氫(H)或天門冬胺酸(Asp)； $R^2$  是纈胺酸(Val)或正亮胺酸(norLeu)； $R^3$  為酪胺酸(Tyr)、酪胺酸二亞

## 五、發明說明( )

磷酸鹽( $\text{Tyr}(\text{PO}_3)_2$ )或同素絲胺酸(homoSer)； $\text{R}^4$  為異亮胺酸(Ile)或正亮胺酸(norLeu)；且  $\text{R}^5$  為氫(H)、苯丙胺酸(Phe)或異亮胺酸(Ile)。依據一實施例，本發明化合物可以是以下多肽序列之任一種：Asp-Arg-Val-Tyr( $\text{PO}_3$ )<sub>2</sub>-Ile-His-Pro-Phe (胺基酸序列編碼：4)，Asp-Arg-norLeu-Tyr-Ile-His-Pro-Phe (胺基酸序列編碼：5)，Asp-Arg-Val-Tyr-norLeu-His-Pro-Phe (胺基酸序列編碼：6)，Asp-Arg-Val-homoSer-Ile-His-Pro-Phe (胺基酸序列編碼：7)，Arg-norLeu-Tyr-Ile-His-Pro-Phe (胺基酸序列編碼：9)，Arg-Val-Tyr-norLeu-His-Pro-Phe (胺基酸序列編碼：10)，或 Asp-Arg-norLeu-Tyr-Ile-His-Pro (胺基酸序列編碼：15)。在另一實施例中，本發明化合物乃是被分散於一基質或一微胞溶液中。依據另一實施例，化合物乃是以 1 毫克/毫升至 5000 毫克/毫升的濃度，或是 10-500 毫克/毫升的濃度，或甚至是 30-200 毫克/毫升的濃度被分散在一載體或一稀釋物中。在一較佳之實施例中，化合物係以至少 30 毫克/毫升的濃度被分散在載體或稀釋物中。依據另一實施例，載體或稀釋物可以是下列任一種：半固體之聚乙二醇聚合物、羧化甲基纖維素製劑、類晶體製劑、黏稠彈性物或聚丙二醇。依據某些實施例，本發明化合物係被加在傷口敷料中。

本發明之另一方面係關於以前述之任一化合物來製造一種可加速傷口癒合的藥物。

本發明之另一方面係關於以前述之任一化合物來加速傷口癒合。

## 五、發明說明 ( )

GSD-39A 或 GSD-40A 處理傷口(示於圖 12 中)後，其肉芽組織大小之改變百分比。

圖 12 顯示以 AII、GSD-39A 或 GSD-40A 處理傷口後，測試傷口之肉芽組織大小之改變百分比。相對之以載體處理的控制組結果示於圖 11 中。

圖 13 顯示相對於以載體處理之控制組，AII、AII(1-7)及 norLeu<sup>3</sup>AII(1-7)(9GD)在傷口封合上之控制反應百分比。

### 發明詳述

如本發明所述，藉由使用一種包含一有效量之至少一種在此所述之 AII 類似物來促進哺乳動物傷口之癒合。具活性藥劑一般係施用於一基質或微胞溶液中，並能於極低濃度下即可有效的加速表皮細胞再生及組織修復。

依據本發明，具活性的 AII 類似物及特別有興趣之 AII 斷片的類似物，其特點是具有至少五個連續胺基酸之序列，其可以下列任一通式來表示：

$R^1\text{-Arg-norLeu-R}^3\text{-R}^4\text{-His-Pro-R}^5$  (胺基酸序列編碼：11)，

$R^1\text{-Arg-R}^2\text{-Tyr(PO}_3)_2\text{-R}^4\text{-His-Pro-R}^5$  (胺基酸序列編碼：12)，

$R^1\text{-Arg-R}^2\text{-homoSer-R}^4\text{-His-Pro-R}^5$  (胺基酸序列編碼：13)，及

$R^1\text{-Arg-R}^2\text{-R}^3\text{-norLeu-His-Pro-R}^5$  (胺基酸序列編碼：14)，

其中  $R^1$  為氫(H)或天門冬胺酸(Asp)；

$R^2$  是選項纈胺酸(Val)及正亮胺酸(norLeu)所組成的族群中；

## 五、發明說明( )

$R^3$  為選自酪胺酸(Tyr)、酪胺酸二亞磷酸鹽( $\text{Tyr}(\text{PO}_3)_2$ )及同素絲胺酸(homoSer)所組成的族群中；

$R^4$  為選自異亮胺酸(Ile)及正亮胺酸(norLeu)所組成的族群中；且

$R^5$  為選自苯丙胺酸(Phe)及異亮胺酸(Ile)所組成的族群中。

依據本發明，特別較佳之組成物包括具表 1 中所示序列之血管緊縮素類似物。明確的來說，並非所有血管緊縮素 II 之斷片或類似物，及血管緊縮素 II 斷片都具有本發明組成物特點之能使傷口癒合的活性。例如，AII(6-8)、His-Pro-Phe 及 AII(4-8)、Tyr-Ile-His-Pro-Phe (胺基酸序列編碼：3) 都已被測試過，且發現其在吾人之活體內模型系統中並無法有效的促進傷口癒合。

依據本發明，其他內含 AII(1-7)類似物之特別較佳組成物，其中在胺基酸序列編碼：11-14 之任一序列中的  $R^5$  位置乃是一氫原子。另一內含 AII(3-8)類似物之特別較佳組成物，其中在胺基酸序列編碼：11-14 序列中 N-端的前兩個位置均被氫原子取代。因此，在這些後來的序列中，其分子 N-端乃是正亮胺酸(norLeu)或纈胺酸(Val)。需知 AII(3-8)亦即“AIV”。

在上式中，係使用標準之三個字母簡簡寫來代表胺基酸殘基，在沒有相反的標示存在下，所意指為 L-形式的胺基酸。

已有人提出，AII 及其類似物在其結構中具有一個 $\gamma$ -

## 五、發明說明 ( )

或  $\beta$ -旋轉 (Regoli, D., et al., (1974) Pharmacology of Angiotensin, *Pharmacological Reviews* 26:69)。一般深信，在分子中  $R^2$ 、 $R^4$  位置上之中性支鏈及第 7 位置之脯氨酸和保持  $R^3$  位置上活性基團間的距離有關，組胺酸(His)及  $R^5$  位置之殘基則主要是與受體結合和/或與其本身活性有關。 $R^2$ 、 $R^4$  及  $R^5$  位置上親油性支鏈也在胜肽之整體組態，和/或造成一假設的親油性口袋之形成上扮有相當重要的角色。

分子之第二胺基酸位置精胺酸(Arg)上之支鏈，可能促成化合物對目標受體間的親和力，和/或在胜肽之組態上扮有相當重要的角色。

對本發明之目的而言，一般深信  $R^2$  可能和與  $R^4$  (在具  $\gamma$ -旋轉之模型中)或組胺酸(His)(在具  $\beta$ -旋轉之模型中)間所形成之線型或非線型氫鍵有關。 $R^2$  也參與了  $\beta$ -旋轉反式平行結構中的第一次旋轉(此結構也被認為是一種可能的結構)。與上述通式其他位置不同的是，在此位置  $\gamma$ -或  $\beta$ -旋轉同樣有效。再者，單一氫鍵即足以維持一相當穩定的組態。因此， $R^2$  可適合地選自纈胺酸(Val)或正亮胺酸(norLeu)。

至於  $R^3$ ，組態分析顯示此位置(及  $R^2$  和  $R^4$ )之支鏈與佔據並激活受體所必要的親油性反應相關。因此， $R^3$  較好是選自酪胺酸(Tyr)，酪胺酸二亞磷酸鹽( $\text{Tyr}(\text{PO}_3)_2$ )或同素絲胺酸(homoSer)。

至於  $R^4$ ，特別適合的是那些具  $\beta$ -脂肪性或脂肪環狀

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明( )

之胺基酸。因此，此位置之胺基酸較好是選自異亮胺酸(Ile)及正亮胺酸(norLeu)。

依據本發明，特別值得注意的類似物，其分子之第 6 位置上之胺基酸乃是組胺酸(His)。一般深信組胺酸獨特的咪唑環(例如，在生理情況之 pH 值下會產生游離化，其作為質子捐贈者或接受者的能力，芳香性特性)會促成分子在該位置上之特定功能。例如組態模型系統即認為組胺酸(His)可能會藉由影響分子中第 7 胺基酸位置上脯胺酸(Pro)的方向，進而參與氫鍵的形成(在具 $\beta$ -旋轉之模型中)或反式平行結構中的第二次旋轉。

分子中第 8 胺基酸位置，其親油性支鏈對於讓有興趣之類似物與受體結合特別有用。最佳的是，分子中第 8 胺基酸位置之  $R^5$  係選自苯丙胺酸(Phe)或異亮胺酸(Ile)。

如下示，在此所指出之胜肽類似物乃是 AII 之類似物或 AII 斷片之類似物，以上標來表示其取代胺基酸。因此，舉例來說， $\text{Tyr}(\text{PO}_3)_2^4\text{-AII}$  即係指在 AII 之第 4 個位置被  $\text{Tyr}(\text{PO}_3)_2$  殘基所取代。

特別適合用來實施本發明之類似物包括下列：

## 五、發明說明( )

表 1

## 血管緊縮肽素類似物

| 類似物名稱              | 胺基酸序列                                                           | 序列編號 |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------|------|
| 類似物 1              | Asp-Arg-Val-Tyr(PO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -Ile-His-Pro-Phe | 4    |
| 類似物 2<br>(GSD-39B) | Asp-Arg-norLeu-Tyr-Ile-His-Pro-Phe                              | 5    |
| 類似物 3<br>(GSD-40B) | Asp-Arg-Val-Tyr-norLeu-His-Pro-Phe                              | 6    |
| 類似物 4<br>(GSD-41B) | Asp-Arg-Val-homoSer-Ile-His-Pro-Phe                             | 7    |
| 類似物 5<br>(GSD-28)  | Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Ile                                 | 8    |
| 類似物 6<br>(GSD-39A) | Arg-norLeu-Tyr-Ile-His-Pro-Phe                                  | 9    |
| 類似物 7<br>(GSD-40A) | Arg-Val-Tyr-norLeu-His-Pro-Phe                                  | 10   |
| 類似物 8<br>(9GD)     | Asp-Arg-norLeu-Tyr-Ile-His-Pro                                  | 15   |

血管緊縮素 II 乃是已知強效血管加壓劑之一，能使分岔形成微血管之小動脈(即微動脈)收縮。血管緊縮素在生物體內的合成乃是因腎酵素在血漿受質血管緊縮原上作用後產生的。所形成的物質為一段稱血管緊縮素 I 之 12 個胺基酸的胜肽，稍後經血管緊縮素酶將血管緊縮素 I 之 C-端的 His-Leu 殘基移除而轉化為血管緊縮素 II。

研究顯示腎酵素-血管緊縮素系統之具血管活性產物

## 五、發明說明( )

適當之溶液為無菌、溶有足量胜肽且對傷口組織無害之溶液。因此，本發明化合物非常安定且可溶於強酸及強鹼中。本發明化合物也可溶於有機溶劑及 pH5.8 之水溶液中。

任何一種施用方式均意指能在一段時間內使活性物進入組織中。例如，可藉由一繃帶膠布或膠帶將一水溶液施用於傷口組織上，或是將此水溶液配方成為可得到一段時間浸潤之效果(藉由脂肪微粒、軟膏、微膠粒等)。習知此技藝人士應能很輕易的了解製造含有本發明化合物配方之方法。所用活性物之濃度並不是非常關鍵，因為即使化合物濃度低至微毫莫耳也能得到傷口癒合之效果。

基質或微胞溶液較好是與濃度介於 1 毫微克/毫升-5000 微克/毫升間，10-500 微克/毫升至 30-500 微克/毫升間之活性物一起施用。較方便之濃度範圍係至少 30 微克/毫升。能造成實施例中所述優點之較佳的母組織溶液乃是一種由紐澤西州、紐邦土維克市之水性醫療公司(Hydro Med Sciences, New Brunswick, New Jersey)所出售之、名為 HYDRON 之半固體的聚乙二醇聚合物。另一種較佳之溶液乃是由德國 BASF 公司販售、名為 PLURONICS F108 之微胞溶液(Ludwigshafen, Germany)。此溶液在室溫下為固體，但當其被施用於溫暖的組織上時會形成凝膠使活性物質能在數天中持續進入傷口組織中。其他較佳的配方包括羧化甲基纖維素製劑、類晶體製劑(諸如生理食鹽

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明( )

如圖 1-6 及圖 13 所示，當與控制組傷口比較時，以上述一般配方中之類似物 1-8 處理傷口，其傷口癒合較快速。如圖 1-6 及圖 13 所示，在每一個實驗，施用類似物之一均能促進手術後傷口的癒合。圖 7-12 顯示與控制組反應相比，形成肉芽組織之百分比。在每一個實驗，與控制組相較下，施用類似物均能加速肉芽組織之生成。這些結果顯示具本發明胺基酸序列之 AII 類似物或 AII 斷片之類似物可用來加速傷口的癒合。再者，這些結果也確定了本發明組成物具有非常強能癒合整個傷口深度的效果。

由前述，習知此技藝人士應能輕易了解本發明的主要特性，且在不悖離本發明之範疇下，可將本發明應用於各種情況下。視情況需要可作適當改變或以同等物進行取代，在此雖然使用了某些特定名詞，但其係爲了說明之用，而非欲對本發明進行限制。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( )

## 胺基酸序列表

&lt;110&gt; 凱瑟琳·羅格

傑瑞·迪勒瑞加

&lt;120&gt; 傷口癒合組成物

&lt;130&gt; USC013.001A

&lt;150&gt; 60/069,662

&lt;151&gt; 1997-12-12

&lt;160&gt; 15

&lt;170&gt; 供視窗 3.0 平台用之 FastSEQ 軟體

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人爲序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成序列

&lt;400&gt; 1

Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Phe

1

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人爲序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成序列

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

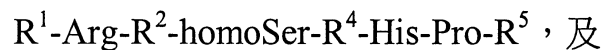
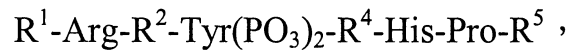
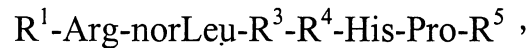
87120706

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂  
線

## 六、申請專利範圍

1. 一種化合物，包含有至少五個連續的胺基酸之選自下列所成組群之通式



其中  $R^1$  為氫(H)或天門冬胺酸(Asp)；

$R^2$  是選自由纈胺酸(Val)及正亮胺酸(norLeu)所組成之組群中；

$R^3$  為選自由酪胺酸(Tyr)、酪胺酸二亞磷酸鹽( $\text{Tyr(PO}_3)_2$ )及同素絲胺酸(homoSer)所組成之組群中；

$R^4$  為選自由異亮胺酸(Ile)及正亮胺酸(norLeu)所組成之組群中；且

$R^5$  為選自由氫(H)、苯丙胺酸(Phe)及異亮胺酸(Ile)所組成之組群中；

其中當通式為  $R^1\text{-Arg-R}^2\text{-Tyr(PO}_3)_2\text{-R}^4\text{-His-Pro-R}^5$  時，至少下列一者為真： $R^1$  為 H；

$R^2$  為 norLeu；

$R^4$  為 norLeu；或

$R^5$  為選自由 H 及 Ile 所成之組群；及

其中當通式為  $R^1\text{-Arg-norLeu-R}^3\text{-R}^4\text{-His-Pro-R}^5$  時，至少下列一者為真： $R^3$  為 homoSer；

$R^4$  為 norLeu；或

$R^5$  為 Ile 或 H；及

## 六、申請專利範圍

其中當通式為  $R^1\text{-Arg-R}^2\text{-R}^3\text{-norLeu-His-Pro-R}^5$  時， $R^5$  為 Ile 或 H。

2．如申請專利範圍第 1 項之化合物，其中該化合物係由選自該組群之通式之至少五個連續的胺基酸所組成。

3．如申請專利範圍第 1 項之化合物，其中該化合物包含選自該組群之通式之至少六個連續的胺基酸。

4．如申請專利範圍第 1 項之化合物，其中該化合物係由選自該組群之通式之至少六個連續的胺基酸所組成。

5．如申請專利範圍第 1 項之化合物，其中該化合物包含選自該組群之通式之至少七個連續的胺基酸。

6．如申請專利範圍第 1 項之化合物，其中該化合物係由選自該組群之通式之至少七個連續的胺基酸所組成。

7．如申請專利範圍第 1-6 項中任一項之化合物，其中該通式為  $R^1\text{-Arg-norLeu-R}^3\text{-R}^4\text{-His-Pro-R}^5$ 。

8．如申請專利範圍第 7 項之化合物，其中該化合物為胺基酸序列編碼：15。

9．如申請專利範圍第 1-6 項中任一項之化合物，其中該通式為  $R^1\text{-Arg-R}^2\text{-Tyr(PO}_3)_2\text{-R}^4\text{-His-Pro-R}^5$ 。

10．如申請專利範圍第 1-6 項中任一項之化合物，其中該通式為  $R^1\text{-Arg-R}^2\text{-homoSer-R}^4\text{-His-Pro-R}^5$ 。

11．如申請專利範圍第 10 項之化合物，其中該化合物為胺基酸序列編碼：7。

12．如申請專利範圍第 1-6 項中任一項之化合物，其中該通式為  $R^1\text{-Arg-R}^2\text{-R}^3\text{-norLeu-His-Pro-R}^5$ 。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

## 六、申請專利範圍

1 3 · 如申請專利範圍第 1-6 項中任一項之化合物，其中該至少一種化合物係選自 Asp-Arg-Val-homoSer-Ile-His-Pro-Phe (胺基酸序列編碼：7)，及 Asp-Arg-norLeu-Tyr-Ile-His-Pro (胺基酸序列編碼：15)所成之組群中。

1 4 · 如申請專利範圍第 1 項之化合物，其中該化合物包含至少一個選自由 norLeu 及 homoSer 所成組群之殘基。

1 5 · 如申請專利範圍第 1 項之化合物，其中  $R^5$  是氫。

1 6 · 如申請專利範圍第 1-6 項中任一項之化合物，其是被施用於傷口敷料上。

1 7 · 一種用於加速傷口癒合之醫藥組成物，其包括一種適當的載體或稀釋劑及有效加速傷口癒合之量的至少一種申請專利範圍第 1-16 項中任一項之化合物。

1 8 · 如申請專利範圍第 17 項之醫藥組成物，其中該至少一種化合物係存在於基質或膠束溶液中。

1 9 · 如申請專利範圍第 17 項之醫藥組成物，其中該化合物乃是以 1 毫微克/毫升-5,000 微克/毫升之濃度分散於該適當之載體或稀釋劑中。

2 0 · 如申請專利範圍第 17 項之醫藥組成物，其中該化合物乃是以 10-500 微克/毫升之濃度分散於適當之載體或稀釋劑中。

2 1 · 如申請專利範圍第 17 項之醫藥組成物，其中該化合物乃是以 30-200 微克/毫升之濃度分散於該適當之載體或稀釋劑中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

## 六、申請專利範圍

2 2 . 如申請專利範圍第 17 項之醫藥組成物，其中該化合物乃是以至少 30 微克/毫升之濃度存在於該適當之載體或稀釋劑中。

2 3 . 如申請專利範圍第 17 項之醫藥組成物，其中該載體或稀釋劑乃是選自由半固體之聚乙二醇聚合物、羧甲基纖維素製劑、類晶體製劑、黏稠彈性物及聚丙二醇所組成之組群中。

2 4 . 如申請專利範圍第 17 項之醫藥組成物，其中該至少一種化合物乃是被散佈於傷口敷料上。

2 5 . 如申請專利範圍第 17-24 項中任一項之醫藥組成物，其中該至少一種化合物係選自由 Asp-Arg-Val-homoSer-Ile-His-Pro-Phe (胺基酸序列編碼：7)，及 Asp-Arg-norLeu-Tyr-Ile-His-Pro (胺基酸序列編碼：15)所組成之組群中。

2 6 . 如申請專利範圍第 1-6 項中任一項之化合物，其係用來製備藥物。

2 7 . 如申請專利範圍第 26 項之化合物，其係用來製備加速傷口癒合的藥物。

2 8 . 如申請專利範圍第 27 項之化合物，其中該傷口係選自由燒傷、手術傷口、撕裂傷、潰瘍及外傷所成之組群。

2 9 . 如申請專利範圍第 17-24 項中任一項之醫藥組成物，其係用來製備藥物。

3 0 . 如申請專利範圍第 29 項之醫藥組成物，其係用來製備加速傷口癒合的藥物。

## 六、申請專利範圍

3 1 . 如申請專利範圍第 30 項之醫藥組成物，其中該傷口係選自由燒傷、手術傷口、撕裂傷、潰瘍及外傷所成之組群。

3 2 . 如申請專利範圍第 25 項之醫藥組成物，其係用來製備藥物。

3 3 . 如申請專利範圍第 32 項之醫藥組成物，其係用來製備加速傷口癒合的藥物。

3 4 . 如申請專利範圍第 33 項之醫藥組成物，其中該傷口係選自由燒傷、手術傷口、撕裂傷、潰瘍及外傷所成之組群。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

87120706

補充說明

附件二是關於胺基酸序列編碼 15 ( Asp-Arg-norLeu-Tyr-Ile-His-Pro ) 之鑑定資料。該胜肽是以 Perkin Elmer 系列 4 液相層析儀鑑定。所用的管柱是 Vydac brand C4 管柱；洗脫溶劑為 70%乙腈+0.9%三氟醋酸。所用的梯度為 0-100%。我們並未有該梯度之確切的洗脫時間的記錄，但最可能的是 1 小時。