



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102256613 B

(45) 授权公告日 2014. 09. 10

(21) 申请号 200980148561. 3

(22) 申请日 2009. 10. 20

(30) 优先权数据

61/106, 834 2008. 10. 20 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 06. 02

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/061345 2009. 10. 20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/065206 EN 2010. 06. 10

(73) 专利权人 莫伊莱麦屈克斯公司

地址 美国印第安纳州

(72) 发明人 艾丽莎·帕尼什

(74) 专利代理机构 北京市联德律师事务所

11361

代理人 刘永全

(51) Int. Cl.

A61K 38/00 (2006. 01)

(56) 对比文件

W0 2008085191A1 , 2008. 07. 17, 说明书第 3 页第 6-21 行、第 19 页第 12 行、第 19-20 行、第 20 页第 14-17 行、第 21 页第 25 行-第 22 页第 11 行、第 26 页第 1-12 行、第 30 页第 1-25 行、第 31 页第 5 行、第 31 页第 7 行-第 32 页第 6 行。

审查员 程婷

权利要求书2页 说明书23页

序列表1页

(54) 发明名称

用于治疗或者预防粘连的多肽

(57) 摘要

本发明提供用于治疗或者预防在有需要的受治疗者体内粘连的组合物和方法, 该方法包括如下步骤:(a) 施用粘连减少量的组合物, 该组合物包含氨基酸序列为 YARAAARQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO :1] 的多肽或者其功能等同物和载体。该方法可在临床上用于最初减少粘连的形成和治疗性地处理现有的疤痕。

1. 一种用于减少将两个通常彼此相互分离的解剖面连结在一起的疤痕组织的发病率或范围的生物学装置,所述疤痕组织在外科手术、炎症或者损伤后形成,所述装置包括置于所述装置上或者所述装置中治疗量的多肽 YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1),其中,所述治疗量在不损害正常愈合的情况下对减少所述疤痕组织的发病率、严重性或两者是有效的。

2. 根据权利要求1所述的生物学装置,其中,所述疤痕组织为将两个通常彼此相互分离的解剖面连结在一起的腹部疤痕组织,所述腹部疤痕组织在外科手术、炎症或者损伤后形成。

3. 根据权利要求1所述的生物学装置,其中,所述疤痕组织为将两个通常彼此相互分离的解剖面连结在一起的骨盆疤痕组织,所述骨盆疤痕组织在外科手术、炎症或者损伤后形成。

4. 根据权利要求1所述的生物学装置,其中,所述疤痕组织为将两个通常彼此相互分离的解剖面连结在一起的心脏疤痕组织,所述心脏疤痕组织在外科手术、炎症或者损伤后形成。

5. 根据权利要求1所述的生物学装置,其中,所述多肽置于安置在所述装置上的基质中。

6. 根据权利要求5所述的生物学装置,其中,所述基质为肝素涂层。

7. 一种组合物在制备用于减少在有需要的受治疗者体内的将两个通常彼此相互分离的解剖面连结在一起的疤痕组织的发病率或范围的药物中的用途,所述疤痕组织在外科手术、炎症或者损伤后形成,所述组合物包含治疗量的多肽 YARAAARQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO:1] 和药学上可接受的运载体,其中,所述治疗量在不损害正常愈合的情况下对减少所述疤痕组织的发病率、严重性或两者是有效的。

8. 根据权利要求7所述的用途,其中,所述疤痕组织由外科干预引起。

9. 根据权利要求7所述的用途,其中,所述疤痕组织为将两个通常彼此相互分离的解剖面连结在一起的腹部疤痕组织,所述腹部疤痕组织在外科手术、炎症或者损伤后形成。

10. 根据权利要求7所述的用途,其中,所述疤痕组织为将两个通常彼此相互分离的解剖面连结在一起的骨盆疤痕组织,所述骨盆疤痕组织在外科手术、炎症或者损伤后形成。

11. 根据权利要求7所述的用途,其中,所述疤痕组织为将两个通常彼此相互分离的解剖面连结在一起的心脏疤痕组织,所述心脏疤痕组织在外科手术、炎症或者损伤后形成。

12. 根据权利要求7所述的用途,其中,所述疤痕组织为将两个通常彼此相互分离的解剖面连结在一起的小肠疤痕组织,所述小肠疤痕组织在外科手术、炎症或者损伤后形成。

13. 根据权利要求7所述的用途,其中,所述疤痕组织为将两个通常彼此相互分离的解剖面连结在一起的大肠疤痕组织,所述大肠疤痕组织在外科手术、炎症或者损伤后形成。

14. 一种组合物在制备用于治疗现有粘连疤痕的药物中的用途,其中,所述组合物包含粘连预防量的多肽,所述多肽具有序列 YARAAARQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO:1],其中,

所述现有粘连疤痕的治疗过程包括以下步骤:

- (a) 利用外科手术将现有疤痕组织切除,从而产生切除部位;
- (b) 再连接所述切除部位的切除表面;
- (c) 用本发明的组合物处理切除部位;

(d) 使切除部位在所述组合物存在且不损害正常愈合的情况下愈合；
由此减少现有的粘连疤痕。

15. 根据权利要求 14 所述的用途,所述治疗过程进一步包括以下步骤:

(i) 监测所述疤痕组织影响的靶组织中至少一种生物标志物的水平,其中,所述至少一种生物标志物选自如下所述地构成的组,即,所述组由转化生长因子 β (TGF β 1) 表达;胶原 I 表达;结缔组织生长因子 (CTGF) 表达; α -平滑肌肌动蛋白表达;肿瘤坏死因子 α (TNF- α);白介素-1 (IL-1);白介素-6 (IL-6);白介素-8 (IL-8);环氧合酶 2 (COX-2);巨噬细胞炎症蛋白质-1 α (MIP-1 α);和巨噬细胞炎症蛋白质-2 (MIP-2) 组成;以及

(ii) 在治疗期间,将所述疤痕组织影响的所述靶组织中的生物标志物的水平基本维持在正常水平。

16. 根据权利要求 15 所述的用途,其中,与所述靶组织中所述至少一种生物标志物的正常水平比较时,所述靶组织中至少一种生物标志物的水平升高,其中,所述至少一种生物标志物选自如下所述地构成的组,即,所述组由转化生长因子 β (TGF β 1);胶原 I;结缔组织生长因子 (CTGF); α -平滑肌肌动蛋白;肿瘤坏死因子 α (TNF- α);白介素-1 (IL-1);白介素-6 (IL-6);白介素-8 (IL-8);环氧合酶 2 (COX-2);和巨噬细胞炎症蛋白质 (MIP) 组成。

17. 根据权利要求 14 所述的用途,其中,所述现有疤痕组织是选自由如下所述构成的组的至少一种,即,该组由现有腹部疤痕组织、现有骨盆疤痕组织、现有心脏疤痕组织、现有小肠疤痕组织、现有大肠疤痕组织组成,并且其中,所述现有疤痕组织由外科干预引起。

18. 根据权利要求 14 所述的用途,其中,所述现有疤痕组织是现有腹部疤痕组织。

19. 根据权利要求 14 所述的用途,其中,所述现有疤痕组织是现有骨盆疤痕组织。

20. 根据权利要求 14 所述的用途,其中,所述现有疤痕组织是现有心脏疤痕组织。

21. 根据权利要求 14 所述的用途,其中,所述现有疤痕组织是现有小肠疤痕组织。

22. 根据权利要求 14 所述的用途,其中,所述现有疤痕组织是现有大肠疤痕组织。

用于治疗或者预防粘连的多肽

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2008 年 10 月 20 日提交的第 61/106,834 号美国申请和 2008 年 1 月 10 日提交的第 11/972,459 号美国申请的优先权权益,该第 11/972,459 号美国申请要求 2007 年 1 月 10 日提交的美国临时申请 No. 60/880,137 号的优先权。这些申请的每一份的全部内容均通过引用结合在本文中。

[0003] 政府资助声明

[0004] 本发明是在美国政府支持下做出的,NIH/NHLBI 的资助批准号为 K25HL074968,由美国国家卫生研究院授予。美国政府对本发明持有一定权利。

技术领域

[0005] 本发明属于细胞和分子生物学、多肽以及治疗方法应用领域。

[0006] 发明背景

[0007] 1. 粘连

[0008] 粘连是一种疤痕组织带,在外科手术、炎症或者损伤后形成,它将两个通常彼此相互分离的解剖面连结在一起。粘连可以表现为薄层组织或者厚的纤维带。取决于所涉及的组织,粘连可能引起各种病症。例如在眼中,虹膜与晶状体的粘连会导致青光眼。

[0009] 粘连可以发生在任何地方。最常见的部位是在腹部、骨盆和心脏内。

[0010] 腹部粘连是腹部或者骨盆外科中的一种常见并发症,并且也在从来没有进行过外科手术的受治疗者中出现。粘连也可能在患上腹膜炎(一种扩展到腹膜,即,覆盖腹部器官的膜,的感染)的受治疗者中出现,而腹膜炎通常在阑尾炎或者另外的腹部感染后发生。在肠中,粘连会引起成年人体内的局部或者完全肠梗阻,并被认为会导致患上慢性骨盆痛。

[0011] 腹部粘连通常在外科手术后的最初几天里开始形成,但是在数月或者甚至数年内可能不产生任何症状。当疤痕组织开始限制小肠的运动时,食物通过消化系统的过程变得愈加困难,并且肠可能变得阻塞。在极端情况下,粘连会在肠段周围形成纤维带,这限制了血液流动并导致组织坏死。

[0012] 骨盆粘连可能牵连骨盆中的任何器官,例如子宫、卵巢、输卵管或者膀胱,并通常在手术后出现。盆腔炎(PID)由经常导致输卵管内的粘连的感染(通常是性传播疾病)引起。输卵管粘连会导致不孕症以及异位妊娠发病率的增加。子宫内膜异位症,即,一种也可能与腹部和严重的腹部创伤有关的炎性状况,也可以引起粘连。

[0013] 疤痕组织也可能在心包(包围心脏的膜)内形成,从而限制心脏功能,其例如由细菌、病毒或者真菌感染、严重的胸部损伤,或者心脏外科手术导致。例如,在急性缩窄性心包炎中,心包被钙化纤维化材料的致密物质所覆盖。感染,例如风湿热,可能导致在心瓣膜上形成粘连,从而导致心脏功能下降。

[0014] 2. 发病率和死亡率的减少

[0015] 预防粘连的方法是未知的。腹部粘连可以治疗,但是会存在复发问题,因为外科手术既是起因又是治疗途径。已知的能够有效地减少粘连形成的大多数药物,如果不是全部

的话,都对肠吻合愈合具有有害作用。

[0016] 肠吻合的不充分愈合和随后的泄漏是腹部外科中严重的术后并发症。肠吻合并发症 (EAC) 包括但不限于:泄漏、瘘(指当两个中空部分如肠区域形成异常连接时出现的状况)以及腹内脓肿(指位于腹腔内的流体和脓的感染囊)。

[0017] 肠瘘经常与致密性粘连相关联。瘘可以是肠肠的、肠皮肤的、肠膀胱的、肠结肠的或者肠阴道的。瘘可以是医原性的,例如由于手术并发症引起,或者可能来自某些其他过程,包括憩室炎或者炎性肠病。

[0018] 造口(通过外科手术产生的肠开口或者至体表的尿路)以及它们周围的粘连也会产生复杂性。

[0019] 尽管粘连对外科医生来说会特别麻烦,但更重要的是,它们的存在会给患者带来重大后果。肠粘连与患者的许多状况都有关联,包括慢性腹部痛和小肠梗阻。腹内粘连的存在及它们的后果可能导致需要进行外科手术,也许是小肠切除术。

[0020] 在具有大量腹内粘连的患者中,直视下的输尿管经常变得模糊不清,并甚至会变成被包裹在肠的粘连物中,增加了对输尿管造成损伤的风险。其他的潜在损伤包括大血管、肠和膀胱的损伤。实体器官损伤也潜在地使具有广泛腹内粘连的患者的手术复杂化。外科手术、感染或者炎性过程后,可能形成从肠到肝和脾的粘连。由于肠可能通过粘连而附着到任一器官上,外科医生必须小心避免肠的后缩。这一问题常见于进行胆囊切除术后的患者。在右半结肠切除术中会遇到多处通常致密的粘连。结肠肝曲或者横结肠可以在胆囊窝的区域中出现与肝囊的粘连,并且甚至十二指肠也会被牵连。结肠的后缩,无论是用腹腔镜进行的手术还是通过剖腹术,都会引起对肝囊的牵拉,这会导致囊撕裂和大出血。尤其是对于患憩室病或者结肠炎的患者,十二指肠也会在这个切开过程中受到损伤。通常,憩室病涉及脾曲,而且从脾曲到脾的粘连使已经可能十分困难的切开复杂化。因此,曲的活动化期间必须要格外小心,因为肠的再次后缩会导致脾的囊撕裂,引发可能的出血或者甚至需要进行脾切除术。

[0021] 这些粘连的后果可能非常严重,以至于能够导致极大的发病率和死亡率。粘连会显著增加手术的持续时间和复杂性,而且这种外科手术术后会伴随着肠皮瘘、短肠综合征和显著持久的肠梗阻。

[0022] 此外,甚至在彻底且全面的粘连物松解术之后(指分离或者去除粘连的手术),还可能形成新粘连并导致额外的住院治疗和手术。很清楚的是,不适、病残和花费是相当大的。在对医疗保健费用的关注增加的这个年代,肠粘连每年仅在美国就产生超过 10 亿美元的花费。

[0023] 外科医生一直在试图开发防止粘连产生或者至少降低它们的严重性和/或数量的对策和产品。他们已经尝试了不同的药物和技术,但是几乎没有获得成功。在近十年来,新技术如腹腔镜检查术,以及新产品如 Seprafilm(Genzyme, Cambridge, MA) 已经在减少术后腹内粘连中发挥了重要作用。

[0024] 尽管其中的这些进步在该过程的病理本质上具有作用,但粘连对患者和外科医生而言都仍然是一个非常大的挑战 (Jobanputra, S. 和 Wexner, SD Colorectal Dis. 2007 年 10 月;9 Suppl 2:54-9)。腹内粘连的出现会引起非常复杂的情况,这些情况要求要有仔细的术前计划、一丝不苟的术中技术和详细的术后管理。

[0025] 2.1. 复杂情况的原因

[0026] 粘连的病理生理学比较复杂。由于绝大多数粘连是术后形成的,外科技术是腹内粘连的最常见原因。任何时候组织面被侵犯,身体的自然反应就是通过形成疤痕组织来回应;在腹膜腔的情况下,结果是粘连。许多实际作法与使该问题恶化有关,从处理小肠到不佳的技术。已经发现的其他责任因素包括对肠壁浆膜表面的损害、来自手术手套的粉末、使用的缝合材料的类型以及失活组织的范围。因此,术后粘连是粘连预防中大部分新创新的关注焦点。

[0027] 炎症是另一个可以使外科手术更加复杂的粘连的原因。患有炎症疾病的患者作为对炎症的反应而出现腹部粘连。在剖腹术或者腹腔镜检查术期间经常遇到这些粘连。这个患者群会极其难以管理,这不仅是因为他们的粘连,而且也因为他们的术后管理可能由于外部因素而复杂化,例如类固醇和其他消炎药物的使用。例如,免疫抑制和营养不良在特别是患炎症肠病的患者中并非是不常见的。

[0028] 憩室病,作为导致粘连形成的较常见感染性过程之一,会将前切除术转变成更加复杂的情况,无论是通过腹腔镜进行的手术还是常规的剖腹术。它可能是次于社区中普通外科医生所遇到的粘连的最为常见的复杂情况,仅次于粘连性小肠梗阻。其他会导致粘连形成的常见腹内感染过程包括盆腔炎、胆囊炎和阑尾炎的先期发作。

[0029] 外束放射治疗也与粘连有关,尽管粘连形成的机理还没有得到很好的研究。外束放射对现有的腹内粘连的作用是众所周知的;特别地,与非放射性粘连相比,放射治疗之后的粘连趋向于更加血管的,更广泛的且更加纤维变性的。

[0030] Weibel 等人 (Weibel, MA 和 Majano, G. Am. J. Surg. 1973 ;126 :345-53) 描述了年龄的增长与粘连形成之间的关系,并描述了在年龄超过 60 岁的患者中自发性粘连的发病率会增加。这些粘连的意义没有得到很好的认识,但极可能是由于炎症或者感染过程。

[0031] 当对存在腹内粘连的可能性很高的患者作出实施外科手术的决定时,需要制定详细的术前计划,以降低发病率和死亡率。腹内粘连的存在能够使任何外科情况更加复杂和耗时,并且有极大的术后发病的可能性。因此,术前和术中的预防性措施是优先于治疗性术后处理而需要考虑的。

[0032] 无论病因如何,腹内粘连性疾病对患者和外科医生而言都是一个巨大的负担。粘连可以将任何手术转化为充满会对患者具有严重不利后遗症的潜在隐患的步骤。采取细心的判断和所有可用的技术来避免这些结果是外科医生的责任所在。

[0033] 本发明旨在解决这些问题。

[0034] 发明概述

[0035] 根据一个方面,本发明提供了一种用于治疗或者预防在有需要的受治疗者体内的粘连的组合物,该组合物包含粘连预防量的序列为 YARAAARQARAKALARQLGVAA[SEQ ID NO: 1] 的多肽和药学上可接受的载体。根据一种实施方案,该粘连为腹部粘连。根据另一种实施方案,该粘连为骨盆粘连。根据另外一种实施方案,该粘连为心脏粘连。根据另一种实施方案,该组合物为局部施用。根据另外一种实施方案,该组合物为通过生物学装置局部施用。根据另外一种实施方案,该组合物为肠胃外施用。根据另外一种实施方案,该组合物为通过生物学装置肠胃外施用。

[0036] 根据另一方面,本发明提供了一种用于治疗或者预防粘连的生物学装置,

该装置包括置于所述装置上或者所述装置中的粘连预防量的多肽,该多肽的序列为 YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO :1)。根据一种实施方案,该粘连为腹部粘连。根据另外一种实施方案,该粘连为骨盆粘连。根据另外一种实施方案,该粘连为心脏粘连。根据另外一种实施方案,该多肽置于安置在所述装置上的基质中。根据另外一种实施方案,该基质为肝素涂层。

[0037] 根据另一方面,本发明提供了一种用于预防在有需要的受治疗者体内的粘连的方法,该方法包括以下步骤:(a)施用治疗有效量的组合物,该组合物包含粘连预防量的、序列为 YARAAARQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO :1] 的多肽和药学上可接受的载体。根据一种实施方案,该粘连由外科干预引起。根据另一种实施方案,该粘连为腹部粘连。根据另外一种实施方案,该粘连为骨盆粘连。根据另外一种实施方案,该粘连为心脏粘连。根据另外一种实施方案,该粘连为小肠粘连。根据另外一种实施方案,该粘连为大肠粘连。

[0038] 根据另一方面,本发明提供了一种用于治疗现有的粘连疤痕的方法,该方法包括以下步骤:(a)在所述粘连疤痕形成后通过外科手术将其切除;(b)再连接切除的表面;(c)用本发明的组合物处理切除部位;(d)在所述组合物存在的情况下使切除部位愈合;由此减少现有的粘连疤痕。根据一种实施方案,该方法进一步包括如下所述步骤:(i)监测靶组织中至少一种生物标志的水平,其中,所述至少一种生物标志选自如下所述的组:TGF β 1 表达;胶原 I 表达;CTGF 表达; α -平滑肌肌动蛋白表达;TNF- α ;IL-1;IL-6;IL-8;COX-2;MIP-1 α ;和 MIP-2;以及(ii)在治疗期间将靶组织中生物标志的水平基本上维持在正常水平。

[0039] 根据另一方面,本发明提供了一种用于治疗或者预防粘连的组合物,该组合物包含一种分离的核酸,该核酸编码氨基酸序列与 [SEQ ID NO :1] 的同一性至少为 85% 的多肽,其中,所述多肽预防粘连。根据一种实施方案,该分离的核酸编码氨基酸序列与 [SEQ ID NO :1] 的同一性至少为 95% 的多肽。根据另一种实施方案,该分离的核酸编码氨基酸序列与 [SEQ ID NO :1] 的同一性至少为 100% 的多肽,其中,所述多肽预防腹部粘连。

[0040] 发明详述

[0041] 本发明提供了用于治疗或者预防在有需要的受治疗者体内的粘连的组合物和方法,该方法包括如下步骤:(a)施用粘连减少量的组合物,该组合物包含氨基酸序列为 YARAAARQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO :1] 的多肽或者其功能等同物和载体。本发明的方法可在临床上用于最初减少腹部粘连的形成和治疗性地处理现有的疤痕。

[0042] 本文主要用单个字母代号来表示氨基酸。如本领域技术人员所熟知的,这种单个字母代号如下:

[0043] A 为丙氨酸;C 为半胱氨酸;D 为天冬氨酸;E 为谷氨酸;F 为苯丙氨酸;G 为甘氨酸;H 为组氨酸;I 为异亮氨酸;K 为赖氨酸;L 为亮氨酸;M 为蛋氨酸;N 为天冬酰胺;P 为脯氨酸;Q 为谷氨酰胺;R 为精氨酸;S 为丝氨酸;T 为苏氨酸;V 为缬氨酸;W 为色氨酸;和 Y 为酪氨酸。

[0044] 本文所用的术语“吻合”指两个管状结构的连接,如肠袢。外科吻合术在切除一段肠并且将两个剩余端部缝合或钉合在一起(吻合)时进行。该过程被称为肠吻合。由外伤或者疾病引起并可能涉及静脉、动脉或者肠的病理吻合通常被称为瘘。在静脉或者动脉的情况下,创伤性瘘通常在动脉和静脉之间发生。创伤性肠瘘通常在两个肠袢(肠-肠瘘)

或者肠和皮肤（肠皮瘻）之间发生。

[0045] 本文所用的术语“疾病”或“障碍”指健康的恶化或异常执行功能的状况。本文所用的术语“综合征”是指表现出某种疾病或状况的症状的型式。本文所用的术语“损伤”是指由外物或力对身体结构或者功能造成的损坏或伤害，它可以是物理的或化学的。本文所用的术语“状况”是指各种健康状态，并意在包括由任何潜在的机理或紊乱、损伤以及对健康组织和器官的促进作用引发的障碍或疾病。

[0046] 术语“有需要的个体”用来指已经遭受或者将要经受（例如，通过外科手术）可能导致或已经导致粘连形成的创伤。

[0047] 本文所用的术语“炎症”指对感染和损伤的生理反应，其中参与解毒和修复的细胞由炎性介体迁移到受损部位。炎症的典型征兆是：痛（dolor）、热（calor）、发红（rubor）、肿胀（tumor）和功能丧失（functio laesa）。从组织学上说，炎症包括复杂的一系列事件，包括小动脉、毛细血管和小静脉扩张，伴随通透性和血流量增加；包括血浆蛋白质的流体的渗出；以及白细胞移行到炎症病灶中。

[0048] 本文所用的术语“急性炎症”通常是指突然发作、以典型征兆为特征的炎症，伴以显著的血管性和渗出性过程。

[0049] 本文所用的术语“慢性炎症”是指缓慢发展且主要以形成新结缔组织为标志的炎症；它可以是急性型或者延长的低级别型的延续，并通常引起永久性组织损害。

[0050] 无论引发动因如何，伴随急性炎症的生理变化包括 4 个主要特征：(1) 血管舒张是对急性组织损伤的一种早期身体反应，它导致血流量的净增加；(2) 响应于炎性刺激，内衬小静脉的内皮细胞收缩，扩展细胞内连接以形成间隙，导致血管通透性增加，而这可使血浆蛋白质和血细胞泄漏出血管；(3) 炎症通常以在炎症部位白细胞的强烈浸润为特征，特别是嗜中性粒细胞（多形核细胞）。这些细胞通过在血管壁或者未损伤的组织内释放有毒物质而促进组织损害；以及 (4) 发热，作为对特异性刺激的反应，由从白细胞释放的热原引起。

[0051] 在炎性过程中，炎性反应的可溶性炎性介体和细胞组分以全身方式一起起作用，以试图遏制并消除引起身体不适的动因。本文所用的术语“炎性介体”是指炎性过程的分子介体。这些可溶性、扩散性分子在组织损害和感染的部位以及在更远的部位均局部地起作用。一些炎性介体由炎性过程激活，而其他的炎性介体响应于急性炎症或因另外的可溶性炎性介体而从细胞源合成和 / 或释放。炎性反应的炎性介体的例子包括但不限于：血浆蛋白酶、补体、激肽、血凝固和纤维蛋白溶解性蛋白质、脂质性介体、前列腺素、白三烯、血小板活化因子（PAF）、肽和胺（包括但不限于组胺、血清素和神经肽）、促炎性细胞因子（包括但不限于白介素 -1、白介素 -4、白介素 -6、白介素 -8、肿瘤坏死因子（TNF）、 γ 干扰素和白介素 -12）。

[0052] 术语“肠”用于指在人体和其他哺乳动物中从胃延伸到肛门的消化道部分，它由小肠和大肠两部分组成。在人体中，小肠被进一步细分成十二指肠、空肠和回肠，而大肠被细分成盲肠和结肠。

[0053] 本文所用的术语“调节”是指调节、改变、适应或调整到某一数值或比例。

[0054] 本文所用的术语“降低”或“减少”指在有产生某障碍的风险下限制个体出现该障碍。

[0055] 本文所用的短语“减少疤痕形成”指可为患者提供治疗或者美容益处的任何减少疤痕形成的情形。这种治疗或者美容益处可以例如通过在没有使用本发明方法治疗的情况下,减小疤痕相对于疤痕形成的大小和/或深度,或者通过减小现有疤痕的大小来实现。如本文中所采用的那样,这种疤痕包括在器官表面之间的粘连形成,包括但不限于由外科手术引起的那些粘连。

[0056] 术语“受治疗者”或者“个体”可互换地用于指哺乳动物源动物物种的成员,包括人类。

[0057] 本文所用的术语“治疗”或“处理”指能够实现如下所述的一种或者更多种情形:(a) 降低障碍的严重性;(b) 限制治疗中的障碍的特征性症状的发展;(c) 限制治疗中的障碍的特征性症状的恶化;(d) 限制患者曾患的障碍的复发;以及(e) 限制患者先前曾有的障碍症状的复发。

[0058] 本文所用的术语“伤口”广义地指对皮下组织的损伤。这种伤口包括但不限于:瘰;溃疡;由感染引起的损伤;剖腹术伤口;外科手术伤口;切口;和心脏组织纤维化。

[0059] 在提到通常一端具有头部和口、相对端经常具有肛门和尾部的动物时,头端是指颅端,而尾端是指尾侧端。在头部本身内,“嘴的”指朝向鼻端的方向,而“尾部的”用来指尾部方向。背离地心引力的吸引、通常朝上取向的动物体的表面或者侧面为背侧;相对侧,当用所有腿行走、游泳或飞行时通常最靠近地面的一侧,为腹侧。在肢体或者其他附肢上,更靠近主体的点为“近端的”;远离的点为“远端的”。动物解剖学中使用3个基本参考面。“矢状”平面将身体分成左部和右部。“正中矢状”平面位于中线上,也即,它将通过中线结构,例如脊柱,并且所有其他的矢状平面和它平行。“冠状”平面将身体分成背部和腹部。“横”面将身体分成颅部和尾部。

[0060] 当指人类时,身体及其部分总是利用身体是竖直站立的假设来进行描述。接近头端的身体部分是“上方的”(对应于动物的颅部),而远离的那些部分是“下方的”(对应于动物的尾部)。靠近身体前面的对象被称为“在前的”(对应于动物的腹部);靠近身体后面的那些对象被称为“在后的”(对应于动物的背部)。横向、轴向或者水平面为与地面平行的X-Y平面,该平面将上方的/头部与下方的/足部分开。冠状平面或者额面为与地面垂直的Y-Z平面,该平面将在前的与在后的分开。矢状平面为与地面和冠状平面都垂直的X-Z平面,该平面将左边与右边分开。正中矢状平面为恰好在身体中间的特定矢状平面。

[0061] 中线附近的结构被称作“内侧的”,而靠近动物侧面的那些被称为外侧的。因此,内侧结构更靠近正中矢状平面,外侧结构远离正中矢状平面。在身体中线上的结构为正中的。例如,人类受治疗者的鼻端位于中线上。

[0062] 同侧的是指在同一侧,对侧的是指在另一侧,两侧的指在两个侧面上。靠近身体中央的结构是近端的或者中央的,而更远的结构是远端的或者外周的。例如,手是在手臂的远端,而肩部是在近端。

[0063] 在一个方面中,本发明提供了一种用于治疗或者预防在有需要的受治疗者体内的粘连形成的组合物,该组合物包含治疗有效量的、氨基酸序列为YARAAARQARAKALARQLGVAA[SEQ ID NO:1]的多肽或者其功能等同物和药学上可接受的载体。这种药物组合物对实现如下所述的本发明的方法特别有用。

[0064] 术语“有效的”指本发明组合物中负责实现预期疗效的成分、组分或者组成。

[0065] “药物组合物”为一种用来预防、降低强度、治愈或者换个方式说是治疗目标病症、综合征、障碍或者疾病的组合物,所述药物组合物已经经过了联邦法规审查。

[0066] 本文所用的术语“药学上可接受的载体”指常规地对药物施用有用的任何基本无毒的载体,其中本发明的分离多肽将保持稳定和生物可利用性。

[0067] 术语“肽”在本文中用于指通过肽键连接起来的两个或者更多个氨基酸。

[0068] 术语“多肽”在其广义上用来指亚基氨基酸、氨基酸类似物或者肽模拟物的序列。除非特别指明,亚基由肽键连接。本文所描述的多肽可以是化学合成的或者重组表达的。

[0069] 术语“蛋白质”在本文中用于指由氨基酸组成的大的复杂分子或者多肽。蛋白质中氨基酸的序列通过在编码它的核酸序列中的碱基序列来确定。

[0070] 术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”也适用于其中的一个或者多个氨基酸残基为对应的天然存在的氨基酸的人造化学类似物的氨基酸聚合物以及天然存在的氨基酸聚合物。天然存在的氨基酸的这些类似物的本质属性是,当添加到蛋白质中时,该蛋白质与针对同一蛋白质激发的、但完全由天然存在的氨基酸组成的抗体发生特异性反应。术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”也包括修饰,该修饰包括但不限于:糖基化、脂质附着、硫化、谷氨酸残基的 γ 羧化、羟化和 ADP-核糖基化。可以认识到,如所熟知的以及上面所指出的,多肽可以不完全是线性的。例如,多肽可以由于泛素化而分支,并且通常由于翻译后事件而导致它们可以是具有分支或者没有分支的环状,所述翻译后事件包括天然加工事件和由不是自然发生的人类操纵引起的事件。环状、分支和具有分支的环状多肽也可以通过非翻译自然过程并通过完全的合成方法合成。

[0071] 术语“残基”或者“氨基酸残基”或者“氨基酸”可互换地用来指包含在蛋白质、多肽或者肽中的氨基酸,包括但不限于天然存在的氨基酸和能够以与天然存在的氨基酸相似的方式起作用的天然氨基酸的已知类似物。

[0072] 本文所用的术语“变体”、“突变体”和“衍生物”指与参考核苷酸序列基本相同的核苷酸序列。序列中的差异可能由序列或结构上的自然或者设计的变化引起。自然变化可以在特定核酸序列的正常复制或者重复过程中出现。出于特定的目的,可以特殊地设计出有计划的变化并引入序列中。可以采用各种诱变技术离体做出这类特定变化。这类专门产生的序列变体可以被称作原始序列的“突变体”或者“衍生物”。

[0073] 本领域的普通技术人员同样能够制备具有一个或者多个氨基酸取代、缺失、添加或者置换的多肽变体。这些变体尤其可以包括:(a) 其中一个或者多个氨基酸残基被保守型或非保守型氨基酸取代的变体;(b) 其中添加一个或者多个氨基酸的变体;(c) 其中至少一个氨基酸包含取代基的变体;(d) 其中来自一个物种的氨基酸残基在保守或者非保守位置把另一物种中的对应残基取代的变体;以及(e) 其中靶蛋白与另一种肽或者多肽例如融合配偶体、蛋白质标记物或者可以赋予该靶蛋白有用特性的其他化学部分(例如,抗体表位)融合的变体。用于获得此类变体的技术,包括基因技术(抑制、缺失、突变等)、化学技术和酶技术,是本领域普通技术人员已知的。如本文所采用的,术语“突变”指在生物的基因或染色体 DNA 序列的变化,其导致形成在亲代型中不存在的新特征或性状;或者指这样的过程,其中这种变化或者通过编码基因的 DNA 的核苷酸序列中的改变或者通过染色体物理排列的改变而在染色体中发生。三种突变的机理包括取代(一个碱基对被另一个交换)、添加(一个或者多个碱基对插入序列中)和缺失(一个或多个碱基对的丢失)。

[0074] 本文所用的术语“取代”指 DNA 中一个碱基或者多个碱基被另外的一个碱基或者多个碱基交换。取代可以是同义取代或者非同义取代。如本文所用的，“同义取代”指在编码蛋白质的基因的外显子中的一个碱基把另一个取代，使得所产生的氨基酸序列未被修改。本文所用的术语“非同义取代”指在编码蛋白质的基因的外显子中的一个碱基把另一个取代，使得所产生的氨基酸序列被修改。

[0075] 术语“缺失”和“缺失突变”在本文中可互换地用来指其中一个碱基或者多个碱基从 DNA 丧失的情形。

[0076] 本文所用的术语“添加”指将一个或者多个碱基，或者一个或者多个氨基酸插入到序列中。

[0077] 以下内容表示保守性取代另一种的氨基酸的组：

[0078] 1) 丙氨酸 (A)，丝氨酸 (S)，苏氨酸 (T)；

[0079] 2) 天冬氨酸 (D)，谷氨酸 (E)；

[0080] 3) 天冬酰胺 (N)，谷氨酰胺 (Q)；

[0081] 4) 精氨酸 (R)，赖氨酸 (K)；

[0082] 5) 异亮氨酸 (I)，亮氨酸 (L)，蛋氨酸 (M)，缬氨酸 (V)；以及

[0083] 6) 苯丙氨酸 (F)，酪氨酸 (Y)，色氨酸 (W)。

[0084] 词语“相似的”可以与词语“类似的”、“可比较的”或者“比拟的”互换使用，指具有共有的性状或者特征。

[0085] 在一些实施方案中，本发明的多肽为化学合成。用公知的固相技术、液相技术或者肽缩合技术或者这些技术的任意组合制备的这种合成多肽可以包括天然和非天然氨基酸。用于肽合成的氨基酸可以是标准的 Boc (N- α -氨基受保护的 N- α -t-丁氧基羰基) 氨基酸树脂，利用 Merrifield 的原始固相工艺的标准脱保护、中和、偶联和洗涤方案 (1963, J. Am. Chem. Soc. 85 :2149-2154)，或者可以是最先由 Carpino 和 Han 描述 (1972, J. Org. Chem. 37 : 3403-3409) 的碱基不稳定的 N- α -氨基受保护的 9-苄基甲氧羰基 (Fmoc) 氨基酸。Fmoc 和 Boc N- α -氨基受保护的氨基酸都可以从 Sigma, Cambridge Research Biochemical，或者其他本领域人员所熟悉的其他化学公司获得。此外，多肽可以利用本领域技术人员所熟悉的其他 N- α -保护基合成。

[0086] 固相肽合成可以用本领域技术人员所熟知的技术完成，例如，在 Stewart 和 Young, 1984, Solid Phase Synthesis, 第二版, Pierce Chemical Co., Rockford, Ill. ; Fields and Noble, 1990, Int. J. Pept. Protein Res. 35 :161-214 中提供的技术，或者使用自动合成器。

[0087] 本文所用的术语“功能等同物”指具有相似或者相同的效果或者用途的物质、分子、蛋白质、肽或者多肽。多肽 [SEQ ID NO :1] 的功能等同的多肽可以具有相似或者相同的活性、相似或者相同的抑制活性、动力学参数、盐抑制、辅因子依赖活性和与表达的多肽 [SEQ ID NO :1] 非常相似的功能单元大小。

[0088] 在一些实施方案中，本发明的多肽可以包含 D-氨基酸（其在体内抵抗 L-氨基酸特异性蛋白酶）、D-氨基酸和 L-氨基酸的组合以及各种“人造”氨基酸（例如， β -甲基氨基酸、C- α -甲基氨基酸和 N- α -甲基氨基酸等）以传达特殊的性能。合成氨基酸包括针对赖氨酸的鸟氨酸和针对亮氨酸或者异亮氨酸的正亮氨酸。

[0089] 此外,本发明的多肽可以具有肽模拟键,例如酯键,以制备具有新颖性能的肽。例如,可以形成包含还原肽键的肽,也就是, $R_1-CH_2-NH-R_2$ [SEQ ID NO :2],其中, R_1 和 R_2 是氨基酸残基或者序列。还原肽键可以作为二肽亚基引入。这种多肽将对蛋白酶活性具有抗性,并将具有延长的体内半寿期。

[0090] 在另一种实施方案中,本发明提供了一种分离的核酸,该分离的核酸编码氨基酸序列与 [SEQ ID NO :1] 的同一性至少为 85% 的多肽。在一些这样的实施方案中,本发明提供了一种分离的核酸,该分离的核酸编码氨基酸序列与 [SEQ ID NO :1] 的同一性至少为 95% 的多肽。在一些这样的实施方案中,本发明提供了一种分离的核酸,该分离的核酸编码氨基酸序列与 [SEQ ID NO :1] 的同一性至少为 100% 的多肽。在另外一种实施方案中,本发明提供了一种分离的核酸,该分离的核酸编码氨基酸序列与 [SEQ ID NO :1] 的同一性至少为 85% 的多肽,其中,该多肽预防腹部粘连。在另外一种实施方案中,本发明提供了一种分离的核酸,该分离的核酸编码氨基酸序列与 [SEQ ID NO :1] 的同一性至少为 95% 的多肽,其中,该多肽预防腹部粘连。在另外一种实施方案中,本发明提供了一种分离的核酸,该分离的核酸编码氨基酸序列与 [SEQ ID NO :1] 的同一性至少为 100% 的多肽,其中,该多肽预防腹部粘连。

[0091] 本文所用的术语“分离的”指例如但不限于核酸、肽、多肽或者蛋白质的物质,该物质:(1) 大体上或者基本上不含如在它的天然存在环境中发现的通常与其伴随或起作用的组分。本文所用的术语“大体上不含”或“基本上不含”指明显地不含或者实质上不含,或者高于大约 95% 地不含,或者高于大约 99% 地不含。分离的物质任选地包括未与在其天然环境中的物质一起发现的物质;或者(2) 如果该物质处于其天然环境中,该物质已经通过有意的人为干预合成地(非天然地)改变成一种对前述环境中存在的物质而言非固有的组合物和/或位于细胞中对前述环境中存在的物质而言非固有的位置(例如,基因组或者亚细胞器)。产生合成物质的改变可以对处在其天然状态下或者从其天然状态中移出的物质进行。例如,借助于在其发源的细胞内实施的人为干预,如果天然存在的核酸被改变或者从已经被改变的 DNA 转录出,则它变为分离的核酸。例如参见,Compounds and Methods for Site Directed Mutagenesis in Eukaryotic Cells, Kmiec, 美国专利 No. 5,565,350; In Vivo Homologous Sequence Targeting in Eukaryotic Cells; Zarling 等人的国际专利申请 PCT/US93/03868。同样,如果天然存在的核酸(例如,启动子)通过非天然存在的手段被引入非该核酸所固有的基因组的基因座,则它变成分离的。在此被限定成是“分离的”核酸也被称为“异源”核酸。

[0092] 本文所用的术语“核酸”指单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或者核糖核苷酸多聚体,并且除非另外限定,包括已知的具有天然核苷酸的本质特性的类似物,因为它们以与天然存在的核苷酸相似的方式与单链核酸杂交(例如,肽核酸)。

[0093] 本文所用的术语“核苷酸”指由杂环碱基、糖和一个或者多个磷酸基组成的化合物。在大部分常见的核苷酸中,碱基是嘌呤或者嘧啶的衍生物,糖是戊糖脱氧核糖或者核糖。核苷酸是核酸的单体,并且三个或者更多个键合在一起,以便形成核酸。核苷酸是 RNA、DNA 和数个辅因子的结构单元,包括但不限于:CoA、FAD、DMN、NAD 和 NADP。嘌呤包括腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G);嘧啶包括胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U)。

[0094] 以下出现的术语在本文中用以描述两个或者多个核酸或者多核苷酸之间的序列

关系:(a)“参考序列”,(b)“比较窗(comparison window)”,(c)“序列同一性”,(d)“序列同一性百分比”,和(e)“基本同一性”。

[0095] 术语“参考序列”指用来作为序列比较基础的序列。参考序列可以是特定序列的子集或者全部;例如,全长 cDNA 或者基因序列的片段或者整个 cDNA 或者基因序列。

[0096] 术语“比较窗”指多核苷酸序列的相连的特定片段,其中,多核苷酸序列可以和参考序列进行比较,而且,与用于两个序列的最优比对的参考序列(不包含增加或者缺失)相比,多核苷酸序列的在比较窗中的部分可以包含添加或者缺失(即缺口)。通常,比较窗是至少 20 个相邻核苷酸的长度,且任选地可以是至少 30 个相邻核苷酸的长度,至少 40 个相邻核苷酸的长度,至少 50 个相邻核苷酸的长度,至少 100 个相邻核苷酸的长度,或者更长。本领域的技术人员都可以理解,为了避免由于多核苷酸序列中包含缺口而与参考序列有高度相似性,通常引入缺口罚分,并将其从匹配数中减去。

[0097] 用于比较的序列比对方法在本领域中是公知的。可以通过以下方法进行用于比较的序列的最优比对:Smith 和 Waterman 的局部同源性算法,Adv. Appl. Math. 2:482(1981); Needleman 和 Wunsch 的同源性比对算法, J. Mol. Biol. 48:443(1970);Pearson 和 Lipman 的相似性搜索方法, Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444(1988);这些算法的计算机化执行,包括但不限于:PC/Gene 程序中的 CLUSTAL,由 Intelligenetics, Mountain View, Calif. 开发;Wisconsin Genetics 软件包中的 GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA 和 TFASTA, Genetics Computer Group(GCG),575 Science Dr., Madison, Wis., USA;CLUSTAL 程序由以下人员进行了充分的披露:Higgins 和 Sharp, Gene 73:237-244(1988);Higgins 和 Sharp, CABIOS 5:151-153(1989);Corpet 等人, Nucleic Acids Research 16:10881-90(1988);Huang 等人, Computer Applications in the Biosciences 8:155-65(1992),以及 Pearson 等人, Methods in Molecular Biology 24:307-331(1994)。可以用于数据库相似性搜索的 BLAST 程序族包括:针对核苷酸数据库序列用于核苷酸查询序列的 BLASTN;针对蛋白质数据库序列用于核苷酸查询序列的 BLASTX;针对蛋白质数据库序列用于蛋白质查询序列的 BLASTP;针对核苷酸数据库序列用于蛋白质查询序列的 TBLASTN;以及针对核苷酸数据库序列用于核苷酸查询序列的 TBLASTX。参见 Current Protocols in Molecular Biology,第 19 章, Ausubel 等人编辑, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York(1995)。

[0098] 除非特别指出,本文提供的序列同一性/相似性数值指通过 BLAST 2.0 程序包、用默认参数获得的数值。Altschul 等人, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402(1997)。用于执行 BLAST 分析的软件可以公开地获得,例如,通过美国国家生物技术信息中心 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。该算法包括通过在查询序列中识别长度为 W 的短字而首先识别高分序列对(HSP),在与数据库序列中长度相同的字比对时,所述的短字匹配或者满足某个正值阈值得分 T。T 被称为相邻字得分阈值(Altschul 等人,见上文)。这些初始的相邻字命中充当启动搜索以发现含有它们的更长 HSP 的起始值。随后,沿着每个序列在两个方向上扩展所述字命中,只要累积的比对得分可以增加。对于核苷酸序列,采用参数 M(对一个匹配残基对的奖励分;总是 > 0)和 N(对不匹配残基的罚分;总是 < 0)计算累积得分。对于氨基酸序列,用得分矩阵计算累积得分。在出现以下情况时,停止字命中沿每个方向的扩展:累积比对得分从其达到的最大值降低量 X;累积得分因一个或者多个负得分残基比对的积累而变为零或者低于零;或者抵达任何一个序列的末端。BLAST 算法参数 W、T 和 X 确定比对的

灵敏度和速度。BLASTN 程序（用于核苷酸序列）采用以下默认值：字长 (W) 为 11, 期望值 (E) 为 10, 截断值为 100, $M = 5$, $N = -4$, 以及两条链的比较。对于氨基酸序列, BLASTP 程序采用以下默认值：字长 (W) 为 3, 期望值 (E) 为 10 和 BLOSUM62 得分矩阵（参见 Henikoff & Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 :10915）。

[0099] 除了计算序列同一性百分比外, BLAST 算法还执行两个序列间的相似性的统计分析（参见, 例如, Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :5873-5787 (1993)）。BLAST 算法提供的相似性的一个度量标准是最小和概率 ($P(N)$), 其提供了两个核苷酸序列或者氨基酸序列之间的匹配偶然发生的可能性的指标。BLAST 搜索假定蛋白质可以作为随机序列建模。然而, 许多真蛋白质包含非随机序列区域, 所述非随机序列区域可以是同聚体束、短期重复或者一种或多种氨基酸富集的区域。可以在不相关的蛋白质之间比对此类低复杂性区域, 即使蛋白质的其他区域完全不相似。可以运用许多低复杂性过滤程序来减少这种低复杂性比对。例如, 可以单独或者组合使用 SEG (Wooten 和 Federhen, Comput. Chem., 17 :149-163 (1993)) 和 XNU (Claverie 和 States, Comput. Chem., 17 :191-201 (1993)) 低复杂性过滤。

[0100] 在两个核酸序列或者多肽序列的语境下, 术语“序列同一性”或者“同一性”在这里用来指这两个序列中当在指定比较窗上比对最大对应时相同的残基。当序列同一性百分比用于蛋白质时, 可以认识到, 不同的残基位置经常在保守性氨基酸取代方面不同, 即, 此时氨基酸残基被具有相似化学性质（例如电荷或者憎水性）的其他氨基酸残基取代, 并且因此不改变该分子的功能特性。在序列在保守性取代方面不同的情况下, 序列同一性百分比可以向上调整, 以校正取代保守性本质。在保守性取代上不同的序列据称具有“序列相似性”或者“相似性”。用于做出这种调整的手段对本领域技术人员而言是公知的。一般而言, 这包括将保守性取代评价为局部错配而非完全错配, 由此提高了序列同一性百分比。因此, 例如, 在给予相同氨基酸得分 1 且给予非保守性取代得分 0 的情况下, 给予保守性取代在 0 和 1 之间的得分。计算保守性取代的得分, 例如, 根据 Meyers 和 Miller 的算法, Computer Applic. Biol. Sci., 4 :11-17 (1988), 例如, 如在 PC/GENE 程序 (Intelligenetics, Mountain View, Calif, USA) 中执行的。

[0101] 术语“序列同一性百分比”在本文中用于指通过在比较窗上比较两个最优比对序列所确定的值, 其中, 与用于两个序列的最优比对的参考序列（它不包含添加或者缺失）相比, 多核苷酸序列在比较窗中的部分可以包括添加或者缺失（即缺口）。通过如下步骤计算该百分数, 即, 确定两个序列中出现相同核酸碱基或者氨基酸残基的位置数以得到匹配位置的数目, 将匹配位置数除以比较窗中的位置总数, 以及将结果乘以 100, 以得到序列同一性百分比。

[0102] 术语多核苷酸序列的“基本同一性”指, 采用用标准参数的上述对程序之一, 与参考序列相比, 多核苷酸包含具有至少 70% 序列同一性, 至少 80% 序列同一性, 至少 90% 序列同一性和至少 95% 序列同一性的序列。本领域技术人员将认识到, 在考虑密码子简并、氨基酸相似性、读框定位等的情况下, 可以适当调整这些数值, 以确定由两个核苷酸序列编码的蛋白质的相应同一性。为此, 氨基酸序列的本质同一性通常指至少 60%, 或者至少 70%, 至少 80%, 至少 90%, 或者至少 95% 的序列同一性。判断核苷酸序列基本上相同的另一个指标是两个分子是否在严紧条件下彼此杂交。然而, 在严紧条件下不相互杂交的核酸, 如果

它们编码的多肽基本上相同,则依然是基本上相同的。这可能会发生在例如利用由遗传密码所允许的最大密码子简并来形成核酸的副本时。判断两个核酸序列基本相同的一个指标是第一个核酸编码的多肽与由第二个核酸编码的多肽发生免疫交叉反应。

[0103] 在肽的语境中,术语“基本同一性”表明:在规定的比较窗口上肽包含与参考序列具有至少 70%序列同一性、与该参考序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%或者 95%序列同一性的序列。任选地,最优对比采用 Needleman 和 Wunsch 的同源性比对算法(J. Mol. Biol. 48 :443(1970))进行。判断两个肽序列基本上相同的一个指标是一个肽与针对第二个肽产生的抗体发生免疫反应。因此,例如在这两个肽的区别仅在保守性取代不同的情况下,一个肽与第二个肽是基本上相同的。“基本上相似”的诸肽如上所述地共享序列,除了不相同的残基位置可以在保守性氨基酸变化方面不同之外。

[0104] 在另一方面中,本发明提供了用于治疗或者预防在有需要的受治疗者体内的粘连的方法,该方法包括以下步骤:(a)施用治疗有效量的组合物,该组合物包含序列为 SEQ ID NO :1 的多肽或者其功能等同物和载体。

[0105] 为了施用,本发明的多肽一般与一种或多种适合于所示施用途的载体组合。本文所用的术语“载体”和“药学上可接受的载体”指用于递送一种或多种有效物质至受治疗者的药学上可接受的惰性物质或者载体,并经常被称为“赋形剂”。术语“载体”指有利于使用与其混合的药物或其他物质的物质。

[0106] (药物)载体必须具有足够高的纯度和足够低的毒性,以使其适合施用到接受治疗的受治疗者。(药物)载体进一步应当保持有效物质如本发明的多肽的稳定性和生物利用度。(药物)载体可以是液体或固体,并且在与给定组合物的活性物质和其他组分组合时,根据头脑中计划的施用方式进行选择,以提供需要的体积和一致性等。(药物)载体包括但不限于:粘结剂(例如,预胶化玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素等);填充剂(例如,乳糖和其他糖类、微晶纤维素、果胶、明胶、硫酸钙、乙基纤维素、聚丙烯酸盐或磷酸氢钙等);润滑剂(例如,硬脂酸镁、滑石、硅石、胶态二氧化硅、硬脂酸、硬脂酸金属盐、氢化植物油、玉米淀粉、聚乙二醇、苯甲酸钠、醋酸钠等);崩解剂(例如,淀粉、羟基乙酸淀粉钠等)和润湿剂(例如,十二烷基硫酸钠等)。其他可用于本发明组合物的合适的(药物)载体包括但不限于:水、盐溶液、醇、聚乙二醇、明胶、直链淀粉、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮,等等。本发明肠胃外施用多肽的组合物可以包括的(药物)载体诸如无菌水溶液、普通溶剂如醇类中的非水溶液、或者液体油碱中多肽的溶液。

[0107] 在一些实施方案中,本发明组合物的载体包括释放剂,例如持续释放或者延迟释放载体。在这类实施方案中,载体可以是任何能够持续释放或者延迟释放信号转导调制化合物的物质,以提供更高效的施用,例如,导致化合物的施用频率更低和/或剂量减少,改善处理的方便性,以及扩展或者延迟对正在接受治疗、预防或改善的疾病、障碍、病症、综合征等的效果。此类载体的非限制性例子包括天然和合成的聚合物的脂质体、微海绵体、微球体或者微胶囊等。脂质体可以由各种磷质如胆固醇、硬脂胺或者磷脂酰胆碱形成。

[0108] 多肽可以连接到其他化合物如聚乙二醇,以促进体内半寿期的增加。如本领域技术人员所理解的,这种连接可以是共价的或者非共价的。

[0109] 多肽可以制备成固体形式(包括颗粒、粉末或者栓剂)或者液体形式(例如,溶

液、混悬剂或者乳剂)。本发明的多肽可以施加到各种溶液中。为了适用,制成物是无菌的、溶解足够量的多肽,并且对推荐用途无害。

[0110] 例如,本发明的组合物可以配制成水性混悬剂,其中,有效成分与适于制造水性混悬剂的赋形剂混合。这类赋形剂为悬浮剂,例如,羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄芪胶和阿拉伯树胶;分散剂或润湿剂可以是天然存在的磷脂,例如卵磷脂或烯化氧与脂肪酸的缩合产物,例如聚氧乙烯硬脂酸酯,或者环氧乙烷与长链脂肪族醇的缩合产物,例如十七乙基-十六烷氧烯醇(heptadecaethyl-eneoxycetanol),或者环氧乙烷与从脂肪酸和己糖醇衍生出的偏酯的缩合产物,例如聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯,或者环氧乙烷与从脂肪酸和己糖醇酐获得的偏酯的缩合产物,例如聚乙烯失水山梨糖醇酐单油酸酯。

[0111] 本发明的组合物还可以通过将有效成分混悬在植物油(例如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油)中或者矿物油(例如液体石蜡)中而配制成油性混悬剂。油性混悬剂可以含有增稠剂,例如,蜂蜡、硬石蜡或十六醇。

[0112] 本发明的组合物也可以制备成适于通过加入水而配制成水性混悬剂的可分散粉末和颗粒的形式。这类粉末和颗粒中的有效成分与分散剂或润湿剂、悬浮剂及一种或多种防腐剂混合。合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂用上面已经提到的那些举例说明。也可以有另外的赋形剂。

[0113] 本发明的组合物也可以为乳剂形式。乳剂为两相体系,通过混合两种不互溶的液态运载体而制备,其中一种载体均匀地分散于另一种载体中,并由直径等于或大于最大胶粒直径的小球构成。小球尺寸非常关键,其必须使得体系能够达到最大稳定性。通常,如果没有第三种物质即乳化剂的掺入,将不会出现两相的分离。因此,基本的乳剂含有至少三种组分,两种不互溶的液态运载体和乳化剂,以及有效成分。大部分乳剂是将水相混入非水相中(或者反之亦然)。然而,制备基本上非水性的乳剂是可能的,例如,甘油和橄榄油非水性不互溶体系的阴离子和阳离子表面活性剂。因此,本发明的组合物可以呈水包油乳剂的形式。油相可以为植物油,例如橄榄油或花生油,或者为矿物油,例如液体石蜡,或者为这两类物质的混合物。合适的乳化剂可以为天然存在的树胶,例如阿拉伯树胶或黄芪胶,天然存在的磷脂,例如大豆磷脂、卵磷脂和从脂肪酸和己糖醇酐获得的酯类或偏酯,例如山梨糖醇酐单油酸酯,以及偏酯与环氧乙烷的缩合产物,例如,聚氧乙烯失水山梨糖醇单油酸酯。

[0114] 在另一方面中,本发明提供了一种生物医学装置,该装置包括安置于该装置上或者该装置中的序列为 SEQ ID NO:1 的多肽或者其功能等同物。本文所用的“生物医学装置”指将要植入受治疗者如人类体内的装置,以便产生期望的结果。根据本发明的该方面,特别优选的生物医学装置包括但不限于:支架;移植物;分路;斯滕特移植物;瘘管;血管成形装置;球囊导管;静脉导管;可植入的给药装置;将组织分开的粘连屏障(包括但不限于羧甲基纤维素、透明质酸和 PTFE 薄片);伤口敷料,例如薄膜(例如,聚氨酯膜)、水胶体(结合到聚氨酯泡沫体上的亲水性胶粒)、水凝胶(含有至少约 60% 水的交联聚合物)、其他粘性液体和水凝胶样种类的物质(包括但不限于在 US 20030190364 中所披露的那些);泡沫体(亲水的或者憎水的);海藻酸钙(来自海藻酸钙的纤维的非织造复合材料);玻璃纸、普朗尼克(pluronic,也即,聚乙二醇-聚丙二醇嵌段共聚物)和生物聚合物。

[0115] 本文所用的术语“移植物”指天然的和假体的移植物和植入物。

[0116] 本文所用的术语“置于上面或者其中”指一种或者多种多肽可以直接或间接地与外表面、内表面接触或者被嵌置于生物学装置中。“直接”接触指直接将多肽置于装置上或装置中,包括但不限于将生物学装置浸入含有一种或者多种多肽的溶液中、将含有一种或者多种多肽的溶液旋涂或者喷涂在装置上、埋置于任何将会递送多肽的装置、以及通过导管将多肽直接施用至表面上或者任何器官中。

[0117] “间接”接触指一种或者多种多肽不直接接触生物学装置。例如,可以将一种或者多种多肽置于一种例如凝胶基质(例如,肝素涂层)或者粘性流体的基质中,该基质被置于生物学装置上。可以制备这样的基质以例如根据需要改进一种或者多种多肽的结合和释放性能。在一个非限制性实施例中,将肝素涂层置于生物学装置上(例如,聚四氟乙烯(PTFE)血管装置或者薄片),并且将一种或者多种多肽置于肝素涂层上或者肝素涂层中;在该实施例中,一种或者多种多肽可以受控的方式被递送至需要的受治疗者。在一个非限制性实施例中,通过首先将肝素吸附或者结合到 PTFE 装置的表面和/或间隙上并随后吸附多肽,可以控制一种或者多种多肽从聚四氟乙烯(PTFE)血管装置或者薄片的间隙表面的释放。交替的肝素层和多肽层也可用于增加多肽剂量和/或释放时间。在体内的生理条件下,与多肽从裸 PTFE 装置的释放相比,本文所披露的多肽与肝素的缔合和解离的动力学将导致延迟的释放曲线。此外,释放曲线可以通过改变局部温度、pH 或者离子强度而得到进一步改变。如下面所讨论的,这种受控制的释放在可以使用生物学装置的各种治疗处理中具有巨大的应用价值。

[0118] 各种医学装置上的肝素涂层在本领域中是公知的。在人体上的应用包括中央静脉导管、冠状支架、心室辅助装置、体外血液回路、血液取样装置和血管移植术。这种涂层可以呈现为凝胶或者非凝胶的形式。本文所用的“肝素涂层”包括吸附到表面上的肝素、结合到表面上的肝素和包埋于 PTFE 聚合物表面的肝素。用于结合肝素的方法的一个实例是采用氨等离子体处理例如 PTFE 表面,并使所生成的胺和氧化的肝素反应。然后,可以使用肝素和一种或者多种多肽的一层接一层的叠加来增加表面上的多肽并延长递送时间。肝素涂层的凝胶形式可以包括但不限于任何含有与凝胶共价结合或物理结合的肝素的水凝胶。肝素涂层置于生物学装置上,包括与生物学装置的外表面或者内表面直接接触,或者嵌埋于生物学装置中。“直接”接触指直接置于装置上或装置中,包括但不限于:将生物学装置浸入肝素涂层溶液中(其中,可以加入多肽作为肝素涂层溶液的一部分,或者可以在肝素涂层与装置接触之后,随即置于肝素涂层上或肝素涂层中);将肝素涂层溶液旋涂或者喷涂在装置上(其中,可以加入多肽作为肝素涂层溶液的一部分,或者可以在肝素涂层与装置接触之后,随即置于肝素涂层上或肝素涂层中);以及通过导管将含有多肽的肝素涂层溶液直接施用到表面上或者任何器官中。肝素层的物理性质和具体成分可以是提供一种或者多种多肽的理想释放曲线的任何一种。例如参见,Seal 和 Panitch, *Biomacromolecules* 2003(4):1572-1582(2003);US20030190364,其全部内容均通过引用结合到本文中;和 Carmeda BioActive Surface(CBAS™),瑞典斯德哥尔摩 Carmeda AB 的产品。“间接”接触指像例如在将一个介入层放置在装置表面和肝素涂层之间时,肝素涂层不直接接触生物学装置。在一个非限制性实施例中,可以首先(直接地或者间接地)吸附一种或者多种多肽,随后吸附肝素涂层;根据需要,这可以任选地依次跟着多肽层、肝素层或者其组合。如本领域技术人员可以理解的,任何硫酸化多糖或者带负电荷的聚合物都可

以与如上所述的肝素类似的方式使用,以提供期望的释放特性。

[0119] 不受理论限制,认为序列为 SEQ ID NO:1 的多肽提供的疗效至少部分地是抑制由 HSP27 激酶 (MAPKAP 激酶 2) 所引起的 HSP27 磷酸化的结果。替代的机理包括但不限于,抑制由 MAPKAP 激酶 3 所引起的 HSP27 磷酸化,而且 MAPKAP 激酶 5 也可能对其疗效有贡献。由于 MAPKAP2 是 p38 MAP 激酶的下游,p38 MAPK 抑制剂有用的任何治疗用途均也落入本发明的范围内。

[0120] 本文所用的术语“施用”包括体内施用以及直接向体外组织施用。本发明的组合物可以以含有所需的常规无毒且药学上可接受的载体、佐剂和载体的剂量单位制成物,以经口的、向颊的、肠胃外的、局部的、通过吸入或吹入(即,通过口或通过鼻)或者直肠的方式,全身施用。

[0121] 本文所用的术语“肠胃外”指通过注射的方法引入体内(即,注射施用),例如包括:皮下注射(即,注射到皮肤之下),肌肉注射(即,注射到肌肉);静脉注射(即,注射入静脉内),鞘内注射(即,注射到脊髓周围的空间中),胸骨内注射,或者输注技术。本发明的肠胃外施用组合物使用针递送,例如,外科针。本文所用的术语“外科针”指任何适合于将本发明的流态(即,能够流动)组合物递送入所选择的解剖结构中的针。可注射制剂,例如注射用无菌水性或油性混悬剂,可以利用合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂根据公知技术配制。

[0122] 无菌的可注射制剂还可以为在无毒的肠胃外可接受的稀释液或溶剂中的无菌可注射溶液或者混悬剂,例如像在 1,3-丁二醇中的溶液。通常认为溶液是两种或者多种物质的均质混合物;它常常是液体,尽管并非必要的。在溶液中,溶质(或者溶解的物质)的分子均匀地分散在溶剂的分子中。混悬剂是分散物(混合物),其中被精细分离的物质与另一种物质混合,并且前者被如此精细地分离和混合,以至于它不会迅速地沉淀出来。在日常生活中,最常见的混悬剂是将固体分散在液体水中的那些。可以采用的、可接受的运载体和溶剂是水、林格液和等渗的氯化钠溶液。此外,常规地使用无菌的不挥发油作为溶剂或悬浮介质。对于肠胃外应用,特别合适的运载体由溶液(优选地为油性或者水性溶液)以及混悬剂、乳剂或者植入剂(implant)构成。水性混悬剂可以含有增加混悬剂粘性的物质,并包括例如羧甲基纤维素钠、山梨醇和/或者右旋糖酐。任选地,混悬剂还可以含有稳定剂。

[0123] 在本文中所使用的术语“局部的”指本发明的组合物在应用部位处或者紧位于应用部位下方的施用。短语“局部应用”描述应用到一种或多种表面上,包括上皮表面。尽管与经皮施用相比,局部施用通常提供局部而非全身的作用,如本文中所用,除非另外指出或显示,术语局部施用和经皮施用可互换地使用。

[0124] 局部施用也可以包括经皮施用的使用,例如,根据本领域公知的技术和工艺制备的经皮贴剂或离子电渗疗法装置。术语“经皮递送系统”、“经皮贴剂”或“贴剂”指放置在皮肤上的粘附体系,以递送随时间释放的药物剂量,药物从该剂型中经皮肤穿过,以使药物能经由全身循环而分布。经皮贴剂为用于递送多种药物的广为接受的技术,包括但不限于,用于晕动病的东莨菪碱,用于治疗心绞痛的确化甘油,用于高血压的可乐定,用于绝经后适应症的雌二醇,和用于戒烟的尼古丁。适合用于本发明的贴剂包括但不限于:(1) 基质贴剂;(2) 储库型贴剂(reservoir patch);(3) 多层型药物在粘胶层中的贴剂(multi-laminate drug-in-adhesive patch);和(4) 整体型药物在粘胶层中的贴

剂 (monolithic drug-in-adhesive patch); TRANSDERMAL AND TOPICAL DRUG DELIVERY SYSTEMS, 第 249-297 页 (Tapash K. Ghosh 等人编著, 1997), 其在本文中通过引用的方式并入本文。这些贴剂在本领域中是公知的, 而且通常可以从市场上购买到。

[0125] 本发明的组合物可以是用于通过吸入或吹入 (或者通过口或者通过鼻) 递送的可分散干燥粉末。干燥粉末组合物可以采用本领域已知的工艺制备, 例如, 如在国际专利公开 No. WO 91/16038 和美国专利 No. 6, 921, 527 号中披露的冻干法和射流粉碎法, 这些文献中所公开的内容通过引用的方式并入本文。本发明的组合物以足够为受治疗者提供单位剂量治疗的量装在合适的剂量容器中。剂量容器为装配在合适的吸入装置中的剂量容器, 以允许干燥粉末组合物通过分散到气流中而雾化, 形成气溶胶, 随后将这样产生的气溶胶捕集在具有吹嘴的腔室内, 所装的吹嘴用于由需要治疗的受治疗者随后的吸入。这种剂量容器包括本领域已知的任何盛装组合物的容器, 例如, 带有允许将气流 (例如, 空气流) 引导到容器中以分散干燥粉末组合物的可拆卸部分的明胶或塑料胶囊。这类容器在第 4, 227, 522 号美国专利; 第 4, 192, 309 号美国专利; 以及第 4, 105, 027 号美国专利中被举例说明。合适的容器也包括与 Glaxo's Ventolin® Rotohaler 牌粉末吸入器或 Fison's Spinhaler® 牌粉末吸入器组合使用的那些容器。另一种提供优异的防潮性能的合适的单位剂量容器由铝箔塑料层压材料制成。药物基粉末按重量或体积计装入用可成形箔形成的凹窝中, 并用箔-塑料层压材料覆盖物气密地密封。这种与粉末吸入装置配合使用的容器在第 4, 778, 054 号美国专利中披露, 并与 Glaxo's Diskhaler® (美国专利 Nos. 4, 627, 432, 4, 811, 73 和 5, 035, 237) 结合使用。所有这些文献都通过引用的方式并入本文。

[0126] 本发明的组合物可以是用于组合物的直肠施用的栓剂。本文所用的术语“直肠的”或“直肠地”指通过直肠导入体内, 在那里经由直肠壁发生吸收。这些组合物可以通过将药物与合适的无刺激性赋形剂, 例如可可脂和聚乙二醇混合来制备, 其中所述的赋形剂在常温下为固体, 但是在直肠温度下为液体, 因此在直肠中将会熔化, 并释放出药物。当配制成栓剂时, 本发明的组合物可以混合常规的粘合剂和运载体, 例如甘油三酯来配制。

[0127] 这些实施方案的方法在临床上可用于治疗所有类型的创伤, 以减少粘连形成, 既可以减少最初的粘连形成, 也可以用于现有粘连的治疗处理。为了治疗现有的粘连, 该方法包括以下步骤: 在粘连疤痕形成后将其切除; 用本发明的组合物处理切除部位; 以及使切除部位更缓慢地愈合。

[0128] 在一些实施方案中, 用于治疗或者限制纤维变性性病症的需要治疗的个体是经受一种或者多种与 TGF β 诱导的结缔组织生长因子 (“CTGF”) 表达相关联的纤维变性性病症或面临患所述病症风险的那些个体, 所述病症包括但不限于: 组织纤维化 (包括但不限于特发性肺纤维化、肝纤维化、肾纤维化、腹膜后纤维化、囊性纤维化、血管纤维化、CNS 纤维化和心脏组织纤维化); 糖尿病肾病、肾小球硬化和 IgA 肾病 (肾衰竭及需要透析和再移植的原因); 糖尿病性视网膜病和黄斑变性 (眼部的纤维化疾病和失明的主要原因); 肝硬化和胆道闭锁 (肝纤维化和衰竭的主要原因); 充血性心力衰竭; 肺纤维化; 硬皮病; 腹部粘连; 以及间质纤维化。CTGF 是富半胱氨酸、与基质相关联、结合肝素的蛋白质。CTGF 在创伤愈合、硬皮病和其他纤维化过程中的胞外基质重塑中具有作用, 因为它能够向上调节基质金属蛋白酶 (MMP) 和它们的抑制剂 (TIMP)。

[0129] 在多个其他的实施方案中, 用于治疗和 / 或限制纤维化病症的需要治疗的个体是

具有升高水平的一种或者多种以下生物标志物的那些个体：TGF β 1 表达；胶原 I；CTGF 表达；和 α 平滑肌肌动蛋白。

[0130] 转化生长因子 β (TGF β 1) 是细胞因子的转化生长因子 β 超家族的多肽成员。它是执行许多细胞功能的分泌性蛋白质，包括控制细胞生长、细胞增殖、细胞分化和细胞凋亡。

[0131] I 型胶原是人体最为丰富的胶原。它在疤痕组织中存在。也可以在腱、肌原纤维的肌内膜和骨的有机部分中发现它。I 型胶原的主要组分由 COL1A1 基因编码。

[0132] α -平滑肌 (α -sm) 肌动蛋白是平滑肌细胞 (SMC) 典型的同工型，并大量存在于血管 SMC 中。 α -sm 用作 SMC 的分化标志物。

[0133] 这种生物标志物的升高的水平可使用可商购的针对一种或者多种生物标志物的抗体，通过标准技术检测，所述技术包括但不限于免疫技术 (ELISA、免疫细胞化学等)。

[0134] 如下所述，本发明的多肽抑制人瘢痕疙瘩成纤维细胞中 TGF β 1 诱导的 CTGF 和胶原表达，所述 TGF β 1 诱导的 CTGF 和胶原表达在纤维化病症中升高，表明具有升高水平的一种或者多种这些生物标志物的个体尤其可能受益于本发明的方法。如本文所用，“升高”水平的一种或者多种生物标志物指在有关靶组织中任何高于所述个体或者相似情况的个体的正常状态的增加。这种靶组织是受纤维化病症影响的那些组织，包括但不限于血液、伤口渗出物和从受纤维化影响的组织 (包括但不限于上面披露的那些 (皮肤、肾、肺、肝、腹膜、血管、心脏、视网膜等)) 取下的活组织。在多个另外的实施方案中，有需要的个体为具有高于正常水平 5%、10%、15%、20%、25%、50%、75%、100% 或者更高的一种或者多种所述生物标志物水平的个体。可以使用本领域中用于度量蛋白质和 / 或基因表达的标准技术 (包括但不限于下面将描述的那些技术) 确定所述一种或者多种生物标志物的水平。

[0135] 这些一种或者多种生物标志物的“正常”水平可以通过任何合适的手段来建立，包括但不限于确定不存在纤维化病症和 / 或瘢痕疙瘩的所述个体或者相似情况的个体的正常水平，或者可以通过任何其他合适的手段来建立，以确立参考标准。根据本发明的一种治疗疾病、障碍或者病症的方法包括以下步骤：(1) 对有需要的受治疗者施用治疗有效量的根据本发明的组合物；(2) 监控靶组织中至少一种生物标志物的水平，其中，该至少一种生物标志物选自如下所述构成的组，即，该组由 TGF β 1 表达；胶原 I 表达；CTGF 表达；和 α -平滑肌肌动蛋白表达组成；以及 (3) 在治疗期间将靶组织中生物标志物的水平基本维持在正常水平。

[0136] 在其他实施方案中，本发明的方法用于治疗炎症或者限制炎症的发病率。

[0137] 在多个其他实施方案中，用于治疗和 / 或限制炎性病症和 / 或自身免疫病的需要治疗的个体通常是具有升高水平的一种或者多种以下生物标志物的那些个体：TGF β 1 表达；TNF- α ；IL-1；IL-6；IL-8；COX-2；MIP-1 α ；和 MIP-2。

[0138] 肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 是与全身性炎症有关的细胞因子，并且是完全刺激急性期反应的细胞因子组的成员。TNF 引起凋亡性细胞死亡；细胞增殖，分化，炎症，肿瘤发生和病毒复制。

[0139] 白介素 -1 (IL-1) 是由 IL-1 α 和 IL-1 β 组成的细胞因子。IL-1 α 和 IL-1 β 均由巨噬细胞、单核细胞和树突细胞产生。它们构成身体对感染的炎性反应的一个重要部分。这些细胞因子增加了内皮细胞上粘连因子的表达，以使白细胞能够移行到感染部位，并重

置下丘脑体温调节中枢,导致以发烧自我表现的体温增加。

[0140] 白介素-6(IL-6)是担当促炎性和抗炎性细胞因子的白介素。它由T细胞和巨噬细胞分泌,以刺激对损伤(特别是引起炎症的烧伤或其他组织损坏)的免疫应答。

[0141] 白介素-8(IL-8)是由巨噬细胞和其他细胞类型如上皮细胞产生的趋化因子。它也可以由内皮细胞合成,所述内皮细胞在它们的贮存小泡、Weibel-Palade小体中贮存IL-8。IL-8的主要功能是在它的靶细胞(例如,嗜中性粒细胞)中诱导趋化作用。

[0142] 环氧合酶(COX)为一种负责形成被称作前列腺素类(包括前列腺素、前列环素和血栓烷)的重要生物介质的酶(EC 1.14.99.1)。COX-I和COX-2具有相似的分子量(分别是大约70和72kDa),并且具有65%的氨基酸序列同源性和近乎相同的催化部位。同工酶之间的会引起选择性抑制的最显著差异是COX-I中第523位的异亮氨酸被COX-2中的缬氨酸置换。COX-2中相对较小的Val523残基允许接近该酶中的疏水性侧袋(side-pocket)(Ile523空间位阻)。

[0143] 巨噬细胞炎症蛋白质(MIP)属于被称为趋化因子的趋化细胞因子的家族。MIP激活能够引起急性嗜中性炎症的人类粒细胞(嗜中性粒细胞、嗜伊红粒细胞和嗜碱性粒细胞)。它们也诱导其他促炎性细胞因子如白介素1(IL-1)、IL-6和TNF- α 从成纤维细胞和巨噬细胞的合成和释放。巨噬细胞炎症蛋白-1(MIP-1)是在募集和激活多形核白细胞中涉及急性炎症状态的单核因子。

[0144] 这类生物标志物的升高的水平可使用可商购的针对一种或者多种生物标志物的抗体,通过标准技术检测,所述技术包括但不限于免疫技术(ELISA、免疫细胞化学等)。

[0145] 炎症(可以使用本发明的方法进行治疗或者减少其发病率)的症状性特性包括但不限于红、发热、肿、痛和所涉及器官的功能不良。可以通过本发明的方法治疗或者降低其发病率的具体炎性病症包括但不限于哮喘、关节炎(类风湿性的或者变性的)、脓毒症、内毒素性休克、牛皮癣、放射性小肠炎、硬皮病、肝硬化、间质纤维化、克罗恩病(Crohn disease)、炎性肠病、阑尾炎、胃炎、喉炎、脑膜炎、胰腺炎和耳炎。

[0146] 在不受理论限制的前提下,认为给需要消炎治疗的受治疗者施用本发明的多肽抑制了对炎性细胞因子的应答和/或炎性细胞因子的表达,所述炎性细胞因子包括但不限于TGF β 1、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素1(IL-1)、IL-6、IL-8、COX-2和巨噬细胞炎症蛋白质(例如,MIP-1 α 和MIP-2)。

[0147] 在本发明治疗方法的所有上述实施方案中,根据主治医生所确定的,本发明的多肽可以作为唯一的有效药物,或者与一种或者多种其他的疗法联合用于适应症。

[0148] 对于所有本发明的方法,本文所用的一种或者多种多肽的“治疗有效量”或者“有效量”为足以提供预期的治疗益处的量。可以使用的多肽的有效量其范围通常在约0.01 μ g/kg体重至约10mg/kg体重之间,优选范围在约0.05 μ g/kg体重至约5mg/kg体重之间。然而,剂量水平是基于多种因素的,包括损伤类型、年龄、体重、性别、个体的医学状况、病症的严重性、施用途径和使用的具体化合物。因此,剂量方案可以变化很大,但可以由医师采用标准方法常规地确定。

[0149] 术语多肽的“腹部粘连预防量”指足以抑制、避免、阻止或者减少受治疗者体中形成、出现腹部粘连或者形成或者出现腹部粘连的风险的量。

[0150] 本文所用的术语“置于”指以连续的、非连续的、随机的、非随机的、均匀的或者不

均匀的的次序、密度、厚度、浓度或者体积放入内部或上面。

[0151] 本文所用的术语“基质”指其中产生、生长或者含有其他某物的物质。

[0152] 在本申请中,除非特别指出,所采用的技术可以在一些熟知的参考文献的任一篇中找到,例如:Molecular Cloning:A Laboratory Manual(Sambrook 等人,1989,Cold Spring Harbor Laboratory Press),Gene Expression Technology(Methods in Enzymology, Vol.185, D.Goeddel 编辑,1991.Academic Press, San Diego, CA),“Guide to Protein Purification”in Methods in Enzymology(M.P.Deutschcer, ed., (1990) Academic Press, Inc.) ;PCR Protocols :A Guide to Methods and Applications(Innis 等人1990.Academic Press, San Diego, CA),Culture of Animal Cells :A Manual of Basic Technique,2nd Ed. (R. I.Freshney.1987.Liss, Inc.New York, NY) 和 Gene Transfer and Expression Protocols,第109-128页,ed.E. J.Murray,The Humana Press Inc.,Clifton, N. J.),全部这些参考文献均通过引用并入本文。

[0153] 除非文中特别指出,本文所用的单数形式“一种”和“该”包括复数个所指对象。例如,提到一种“多肽”指一个或者多个多肽。

[0154] 在提供数值范围的情况下,除非文中另外明确指明,应当理解为在该范围及任一其他所描述范围的上限和下限之间的每一个中间值,到下限单位的十分之一,或在所描述范围内的中间值均包括在本发明的范围内。被独立地包括在这些较小范围内的这些范围的上限和下限也都包括在本发明的范围内,在所描述的范围可以有任何明确排除的界限。当所描述的范围包括一个或者两个界限时,排除这些所包括的界限的两者中任一个的范围也包括在本发明中。

[0155] 除非另有说明,在本文中使用的所有技术和科学术语如本发明所属领域的普通技术人员通常理解的那样,具有相同的含义。尽管任何与本文中所述的那些类似或等同的方法和材料也可用在本发明的实施和试验中,但现在对优选的方法和材料进行描述。在本文中所提及的所有公开出版物通过引用的方式并入本文,以结合引用的公开出版物披露和描述这些方法和 / 或材料。

[0156] 本文中讨论的公开出版物的提供仅是因为它们公开于本发明的申请日之前。本文中并没有内容可理解为承认本发明由于在先发明而不能早于这样的出版物。此外,所提供的公开日也可能不同于需要独立核实的实际公开日。

实施例

[0157] 提出以下的实施例,以便为本领域普通技术人员提供如何做出和使用本发明的完整公开和描述,并不是用来限制发明人认为的本发明的范围,也不是用来代表下面的实验是所有实验或者仅做了的实验。已经为确保有关所用数值(例如用量、温度等等)的准确度作出了努力,但是应当考虑一些实验误差和偏差。除非另外指明,份数为重量份,分子量为重均分子量,温度为摄氏温度,压力为大气压或接近大气压。

[0158] 实施例 1. 肠粘连模型

[0159] 将使用人类疾病的动物肠粘连模型中的实验确定具有 SEQ ID NO :1 序列的多肽的效果。这些动物模型已经被其他研究者使用过,并通常因此而被接受。因此,由这个模型获得的治疗结果可以推广到治疗人类受治疗者的方法。

[0160] 依照美国国家卫生研究院动物护理和使用指南 (National Institutes of Health Guide for Care and Use of Animals), 在普渡大学的经 AAALAC (美国实验动物管理认可协会) 认证的动物设施中进行动物研究。研究中使用重量在 240-280g 之间的雄性 Sprague-Dawley 大鼠。将队列设计成包括盲肠磨损的无治疗的阳性对照和无磨损的无治疗的阴性对照, 以及另外的队列, 以评价预防肠粘连的最优递送方法。所有的动物将在 12 小时光照 / 黑的暗周期下在单独的笼中饲养, 并在手术前和手术后无限制地提供食物和水。所有动物均采用腹膜内注射氯胺酮 (75-100mg/kg) 和赛拉嗪 (5-10mg/kg) 进行麻醉。麻醉将用腹膜内注射 10% 诱导剂量的氯胺酮 / 赛拉嗪维持。麻醉水平使用夹趾方法 (toe pinch method) 评估。而且, 在该过程中监视动物的呼吸和粘膜颜色。将使用过量的巴比妥酸盐 (例如, 内布特 (Nembutal) 120mg/kg) 或者类似的可商购的安乐死溶液以建议剂量 IV 或者 IP 对动物施行安乐死。

[0161] 通过刮刺已麻醉的大鼠的下腹部并用碘清洗来对该大鼠进行手术准备。动物将接受中线剖腹术, 确定盲肠并将其放置到含盐水的纱布垫上, 用盐水来保持组织湿润。用强生的 1x1cm 电外科刀头清洁片刮擦盲肠壁, 直到在前面上观察到出血为止。使用 0.8mm 活检凿在腹膜和下面的肌肉中形成 1.6mmx0.8mm 的缺损。在施加治疗前冲洗腹腔。在并置的盲肠和受伤的腹膜之间施行适当的治疗。具体而言, 在队列 1 中, 将磨损的盲肠与受伤的腹膜和闭合的手术切口并置。队列 2 仅接受剖腹术, 而且闭合切口。另外的队列用 10ml 含有适当浓度 MK2 抑制剂的 PBS 冲洗。如果在手术过程中发生诸如肠穿孔的损伤或者隔离物未能将受损的组织分开, 将从研究中除去该动物并进行替换 [Buckenmaier, CC, 3rd, 等, Comparison of antiadhesive treatments using an objective rat model. Am Surg, 1999. 65(3) : 第 274-82 页 ; Zong, X., 等人, Prevention of postsurgery-induced abdominal adhesions by electrospun bioabsorbable nanofibrous poly(lactide-co-glycolide)-based membranes. Ann Surg, 2004. 240(5) : 第 910-5 页]。

[0162] 手术后 14 天, 对实验鼠再次进行如上所述的麻醉, 并且由不知道所述治疗的外科医生实施第二次剖腹术, 以评价粘连的范围和严重性。绝大多数腹部粘连研究采用目测类比分系统而非组织学。将采用如下所述的评分系统 : 0 = 无粘连, 1 = 细薄且容易分离的粘连, 2 = 量多而薄, 且组织难以分离, 以及 3 = 严重, 并且伴随纤维化, 需要器械来分离组织。记录每组中具有粘连的动物数和粘连的严重性, 随后采用 ANOVA 方差分析进行组间比较, 以确定抑制粘连的最佳治疗组合 (屏障、释放速度和药物浓度)。

[0163] 实施例 2. 肽 YARAAARQARAKALARQLGVAA[SEQ ID NO :1] 在粘连预防中的效力和其对肠吻合术的效果

[0164] 人类疾病的动物肠粘连模型中的实验已经用于确定具有氨基酸序列 SEQ ID NO :1 的多肽在粘连预防和肠吻合术中的效力。因为这个动物模型已经被其他研究者使用过, 并通常因此而被接受, 所以用该模型获得的治疗结果可以推广到治疗人类受治疗者的方法。

[0165] 将四十 (40) 只雄性 Sprague-Dawley 大鼠分别关在笼中, 并容许一个为期 5 天的顺应时期。采用标准的粒状实验室食物 (pelleted lab chow), 对所有动物没有限制地提供食物和水。在外科手术前半小时, 用皮下注射丁丙诺啡 (Buprenorphine) (50 μ g/kg) 来对所有动物进行预处理, 以用于控制疼痛。通过在右后腿上使用氯胺酮 (35mg/kg) IM 并在左后腿上使用赛拉嗪 (5mg/kg) IM 来实现麻醉。

[0166] 在达到足够的麻醉水平后,腹部的毛被剪去并用贝塔定 (Betadine) 溶液预备好。采用 15 号刀片划出 3cm 的纵向中线腹部切口。使小肠向上回缩并且暴露出降结肠。将乙状结肠在腹膜反折上方约 2cm 锐性分离。使用 6-0 普罗林 (Prolene), 布置 8 个间断的缝合, 以实现手缝吻合。

[0167] 任何具有看得见的裂隙的区域也布置了另外的缝合线。

[0168] 在闭合前, 将 5ml 试验溶液 (无菌生理盐水中溶有肽药物, 最终浓度为 100 μ M) 或者盐水置于吻合部上以及腹腔和骨盆中。随后, 用 3-0 丝缝合线以直线的、连续的方式闭合腹部, 并且以相同的方式作为单独的层闭合皮肤。在使用 Gaymar 加热泵的情况下, 将动物放置在恢复区, 直至完全从麻醉中清醒。在手术后 4 小时以及第二天早晨进一步注射丁丙诺啡, 以控制疼痛。

[0169] 处死实验动物在距手术日 4 天和 10 天时进行 (10 只动物, 每天每组处理 5 只)。处死点要谨慎地选择, 因为可以预见在第 4 天肠完整性方面的效果是最显著的, 如果存在的话; 以及 2) 10 天时间段是形成最大粘连的时间段。

[0170] 用 Euthasol (200mg/kg) 对动物实施安乐死。用左侧面正中旁切口进入腹腔; 然后在切口尖端做出两个水平切口, 从而可以向后拉动皮瓣, 且可以在不会无意地损伤任何组织的情况下评估到前腹壁的粘连形成。

[0171] 在仔细地移回任何上面覆盖的非粘连的内脏后, 随后识别出吻合部位。使直接与吻合部形成的任何粘连保持原位, 同时不试图除去或者扰动该区域。对吻合部拍照, 以用于进一步评估。这是粘连评分系统的第二部分。对每个发现与吻合部粘连的组织指定为“1”, 包括附睾脂肪、网膜、小肠、大肠。增加所有可能性作为累积得分的部分。

[0172] 随后, 测量结肠爆裂压力。使用丝带, 将距吻合部远端的结肠挤出粪便并结扎。在近端小心地挤出其余的任何结肠内容物, 并随后在靠近吻合部处锐性分离结肠。将 18 号 Angiocath 穿刺针插入结肠腔, 并再次用丝带扎住近端和所包括的穿刺针, 以将它固定在适当位置并确保无泄漏。使穿刺针与压力传感器连接, 并且预设置输液泵以递送 300cc/hr 生理盐水作为逐渐增加结肠内压力的手段。将结肠开始泄漏盐水或者压力突然下降的点记录为爆裂压力, 无论泄漏是否发生在吻合部或者缝合线外侧。

[0173] 接下来, 对与吻合部的粘连的密度和韧性进行分级。从吻合部切取或者切开粘连, 并根据切开的难度分级。该得分作为累积总计的部分被包括。

[0174] 随后, 以每侧留有 5mm 边缘的方式切除吻合部。部分储存在 -20°C , 以用于羟脯氨酸分析, 作为胶原含量的指示。吻合部的其他部分置于 RNA 中, 稍后在后来的时间用于可能的 Northern 分析。

[0175] 表 1. 粘连评分系统:

[0176]

粘连部位	得分
与腹壁粘连	1
附睾脂肪与吻合部	1

小肠与吻合部	1
结肠与吻合部	1
网膜与吻合部	1
密度	得分
轻而薄,容易解剖	1
中度,粘合的,需要一定的力	2
严重,需要锐性切开	3

[0177] 理论上,最小的可能得分为 0,最高的可能得分为 8。

[0178] 动物在最初的 48-72 小时内体重量大量减少,但随后恢复体重。在 4 天组里,肽组中出现一例麻醉死亡。在 10 天组里,对照组中有两例手术后死亡,一例来自术后第 5 天横结肠扭转,一例来自术后第 7 天吻合部泄漏;术后第 6 天,肽组中出现一例死亡,但尸检未披露明显原因。因此,这两个实验的总死亡率为 10%。

[0179] 如表 2 中所示,在肽治疗组中起初有一些体重减少,然而,到第 10 天,体重减少并不显著,并且实际上比对照组所看到的情况更小。通过测定来自吻合部位的组织的羟脯氨酸(OHP,用于确定胶原含量)含量而确定正常胶原合成。基于 OHP 含量和爆裂强度,未见正常愈合中出现抑制。粘连得分显示,在第 10 天形成的粘连的数量和严重性显著减少。

[0180] 表 2. 数据总结 - 平均 $\pm$ SEM

[0181]

	重量增加 (累积)	爆裂压力 (mmHg)	OHP 吻合	粘连器官 得分	粘连严重性 得分	粘连累积 得分
对照 4天	0.7 $\pm$ 4.3	96 $\pm$ 32	2679 $\pm$ 475	2.2 $\pm$ 0.2	2.4 $\pm$ 0.2	4.7 $\pm$ 0.4
肽 4天	-3.3 $\pm$ 5.2	86 $\pm$ 13	2055 $\pm$ 184	2.0 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 0.2	4.1 $\pm$ 0.3
P	NS	NS	NS	NS	NS	NS
对照 10天	-5.6 $\pm$ 3.1	191 $\pm$ 29	4980 $\pm$ 205	3.4 $\pm$ 0.3	2.6 $\pm$ 0.2	6.0 $\pm$ 0.3
肽 10天	-1.3 $\pm$ 3.7	175 $\pm$ 27	5284 $\pm$ 218	2.1 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.3	3.8 $\pm$ 0.4
P	NS	NS	NS	0.003	0.023	0.00296

[0182] 使用来自吻合部位的氧化的羟脯氨酸(OHP)测定新胶原合成,以确认药物不损害正常愈合。

[0183] 如表 2 中所用的,“爆裂压力”指引起结肠破裂或者裂开的最小内压。

[0184] 在第 10 天,肽显著减少粘连的数量和质量(最相关的时间点),而且不影响第 4 天(最相关)或者第 10 天的肠爆裂压力或者 OHP 含量。

[0185] 在已经参照本发明的具体实施方式对其进行描述的情况下,本领域技术人员应当

理解的是,在不偏离本发明真实精神和范围的情况下,可以做出各种改变及等同替换。此外,可以做出许多修改以适应具体的情况、材料、物质组成、方法、工艺步骤或步骤。所有这些修改均在所附权利要求的范围之内。

[0001]

序列表

<110> 艾丽莎·帕尼什

<120> 用于治疗或者预防粘连的多肽

<130> 117477.010101

<150> US 61/106,834

<151> 2008-10-20

<160> 1

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 哺乳动物

<400> 1

Tyr	Ala	Arg	Ala	Ala	Ala	Arg	Gln	Ala	Arg	Ala	Lys	Ala	Leu	Ala	Arg
1			5					10					15		

Gln	Leu	Gly	Val	Ala	Ala
			20		