[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl[6]
A61K 38/08

[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 95197307.X

[43]公开日 1998年2月4日

[11]公开号 CN 1172434A

[22]申请日 95.11.14

[30]优先权

[32]94.11.14[33]US[31]08/337,781

[32]95.6.6 [33]US[31]08/465,775

[86]国际申请 PCT/US95/14764 95.11.14

[87]国际公布 WO96/14858 英 96.5.23

[85]进入国家阶段日期 97.7.11

[71]申请人 南加利福尼亚大学

地址 美国加利福尼亚州

[72]发明人 凯瑟琳·罗杰斯

杰雷·斯托德·迪泽里戈

[74]专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 2 页 说明书 20 页 附图页数 14 页

[54]发明名称 血管紧张肽Ⅱ片段及其类似物在组织修复中的应用

[57]摘要

血管紧张肽Ⅱ片段及其类似物可用于加速伤口愈合。这些化合物构成用于加速伤口愈合的组合物的基质，其中的活性制剂以加速伤口愈合的有效量存在。优选地，组合物是基质溶液或胶束溶液。

权　利　要　求　书

1．一种加速伤口愈合的方法，包括在伤口应用加速伤口愈合有效量的至少一种活性制剂，所述的活性制剂的特征在于其包括一种由至少三个相邻氨基酸组成的序列，所述的相邻氨基酸对应于下述通式I序列中的基团R^1-R^8的亚序列：

R^1-R^2-R^3-R^4-R^5-R^6-R^7-R^8

其中R^1和R^2一起构成式为X-R^A-R^B-的基团，其中X是H或1－3肽基团并且在R^A和R^B间的肽键易于被氨肽酶A裂解；

R^3选自由Val，Ala，Leu，Ile，Gly，Pro，Aib，Acpc及Tyr组成的一组；

R^4选自由Tyr，Thr，Ser及azaTyr组成的一组；

R^5选自由Ile，Ala，Leu，Val及Gly组成的一组；

R^6是His或Arg；

R^7是Pro或Ala；及

R^8选自由Phe，Phe(Br)，Ile及Tyr组成的一组，其中R^4是末端Tyr基团的序列不包括在内。

2．如权利要求1所述的方法，其中R^A选自由Asp，Glu，Asn，Acpc，Ala，Me^2Gly，Pro，Bet，Glu(NH_2)，Gly，Asp(NH_2)及Suc组成的一组。

3．如权利要求1所述的方法，其中R^B选自由Arg，Lys，Ala，Orn，Ser(Ac)，Sar，D-Arg及D-Lys组成的一组。

4．如权利要求1所述的方法，其中活性制剂以基质溶液或胶束溶液形式给予。

5．如权利要求1所述的方法，其中活性制剂以在适当载体或稀释剂内的至少每公斤体重0.1ng的比率给予。

6．如权利要求5所述的方法，其中载体或稀释剂选自由羧甲基纤维素制备物，类晶体制备物，粘弹性体，聚乙二醇和聚丙二醇组成的一组。

7．如权利要求1所述的方法，其中活性制剂与伤口敷料一起给予。

8．一种加速伤口愈合的组合物，包括一合适载体或稀释剂及加速伤口愈合

有效量的至少一种活性制剂，所述的活性制剂的特征在于其包括一种由至少三个相邻氨基酸组成的序列，所述的相邻氨基酸对应于下述通式I序列中的基团R^1-R^8的亚序列：

R^1-R^2-R^3-R^4-R^5-R^6-R^7-R^8

其中R^1和R^2一起构成式为X-R^A-R^B-的基团，其中X是H或1 －3 肽基团并且在R^A和R^B间的肽键易于被氨肽酶A裂解；

R^3选自由Val，Ala，Leu，Ile，Gly，Pro，Aib，Acpc及Tyr组成的一组；

R^4选自由Tyr，Thr，Ser及azaTyr组成的一组；

R^5选自由Ile，Ala，Leu，Val及Gly组成的一组；

R^6是His或Arg；

R^7是Pro或Ala；及

R^8选自由Phe，Phe(Br)，Ile及Tyr组成的一组，其中R^4是末端Tyr 基团的序列不包括在内。

9．如权利要求8 所述组合物，其中R^A选自由Asp，Glu，Asn，Acpc，Ala，Me^2Gly，Pro，Bet，Glu(NH_2)，Gly，Asp(NH_2)及Suc组成的一组。

10．如权利要求8 所述的组合物，其中R^B选自由Arg，Lys，Ala，Orn，Ser(Ae)，Sar，D-Arg 及D-Lys组成的一组。

11．如权利要求8 所述的组合物，其中活性制剂以基质溶液或胶束溶液给予。

12．如权利要求8 所述的组合物，其中活性制剂以在合适载体或稀释剂中的至少每公斤体重0.1ng的比率给予。

13．如权利要求12 所述的组合物，其中载体或稀释剂选自由羧甲基纤维素制备物，类晶体制备物，粘弹性体，聚乙二醇和聚丙二醇组成的一组。

14．如权利要求8 所述的组合物，其中活性制剂与伤口敷料一起给予。

说　　明　　书

血管紧张肽Ⅱ片段及其类似物在组织修复中的应用

发明背景

本发明一般地涉及生物化学和医药领域，尤其涉及用于加速组织生长或愈合的组合物及方法。

哺乳动物组织创伤（即撕裂伤或开放伤口）可导致创伤表面微血管的组织破坏及凝结。如此组织的修复是一种对伤处有规则的受控细胞应答。所有软组织损伤，无论大小，都以相似方式愈合。组织的生长及修复是一种生物体系，其中在氧梯度存在下发生细胞增殖及血管生成。在组织修复期间相继发生的形态及结构改变的特征已经详细描述并在一些情况下被定量[Hunt，T. K.等人，"血管生成和伤口愈合的凝结作用和巨噬细胞刺激作用"in The surgical wound，pp. 1- 18，编辑 F. Dineen & G.Hildrick-Smith(lea & Febiger，Philadelphia:1981)]。

细胞形态由三个不同区组成。中央无血管的创伤区是乏氧、酸中毒及高碳酸血且高乳酸水平的。与创伤区相邻的是一个由分离的成纤维细胞聚集成的局部缺血的梯度区。在前导区之后是特征在于成熟成纤维细胞和大量新生成的毛细血管（即新血管生成）活性胶原合成的区域。尽管新血管生成是创伤组织愈合所必需的，但生成血管的制剂一般不能满足提供组织修复附加的生物合成效应的长期需要。尽管需尽快愈合创伤（即严重烧伤、手术切口、撕裂伤及其它创伤），但目前只获得了用药物制剂加速伤口愈合的有限的成功。

授予Di Zerga的U.S专利5，015，629（引入本文作参考）描述了一种提高创伤组织愈合速率的方法，包括在该组织中应用适于所述提高的一定量的血管紧张肽Ⅱ（AⅡ）。血管紧张肽Ⅱ在创伤组织的应用有效提高了伤口愈合速率，导致更快的上皮再生及组织修复。术语“血管紧张肽Ⅱ”指的是人体及其它物种体内的一种八肽，其具有Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe[SEQ ID NO:1]的序列。血管紧张肽Ⅱ是已知的升压因子且可商购得到。

尽管血管紧张肽Ⅱ可用于促进伤口愈合，但还需要用于使伤口愈合的另外的制剂。此外，更有利的是使用一种比血管紧张肽Ⅱ的诱导高血压作用低的制剂。

本发明的一个目的就是提供一种克服目前已知组合物不足的组合物及方法。

发明概述

本发明涉及A Ⅱ的活性片段及其类似物在伤口愈合中的应用。这些化合物构成用于加速伤口愈合的组合物的基质，该组合物包括至少一种加速伤口愈合有效量的如此化合物。优选地，该组合物是基质溶液或胶束溶液。

附图简述

经参考附图可更好地了解本发明，其中:

图1 示出与赋形剂处理的对照相比，使用A Ⅲ在伤口愈合中提高的百分比;

图2 示出与赋形剂处理的对照相比，使用各种A Ⅲ类似物在伤口愈合中相应于对照应答的百分比;

图3 示出与赋形剂处理的对照相比，使用各种A Ⅲ类似物在伤口愈合中相应于对照应答的百分比;

图4 示出使用各种A Ⅲ类似物在肉芽组织形成中相应于对照应答的百分比;

图5 示出使用各种A Ⅲ类似物在肉芽组织形成中相应于对照应答的百分比;

图6 示出与赋形剂处理的对照相比，使用各种A Ⅱ片段在伤口愈合中相应于对照应答的百分比;

图7 示出与赋形剂处理的对照相比，使用各种A Ⅱ片段在伤口愈合中相应于对照应答的百分比;

图8 示出使用各种A Ⅱ片段在肉芽组织形成中相应于对照应答的百分比;

图9 示出使用各种A Ⅱ片段在肉芽组织形成中相应于对照应答的百分比;

图1 0 示出使用各种A Ⅱ片段在肉芽组织形成中相应于对照应答的百分比;

图1 1 示出使用各种A II片段在肉芽组织形成中相应于对照应答的百分比;

图1 2 示出使用各种A III类似物在肉芽组织形成中相应于对照应答的百分比;

图1 3 示出使用各种A III类似物在肉芽组织形成中相应于对照应答的百分比;

图1 4 示出与赋形剂处理的对照相比，使用各种A II片段在伤口愈合中相应于对照应答的百分比。

发明详述

根据本发明，促进哺乳动物组织创伤愈合是通过使用包括有效量的至少一种A II活性片段或其类似物的组合物。该活性制剂通常以基质溶液或胶束溶液给予且甚至以非常低的浓度给予就能有效加速上皮再生和组织修复。

本发明特别感兴趣的A II活性片段及其类似物的特征在于，其包括一种由至少三个、优选至少四个相邻氨基酸组成的序列，所述的相邻氨基酸对应于下述通式I序列中的基团R^1-R^8的亚序列:

R^1-R^2-R^3-R^4-R^5-R^6-R^7-R^8

其中R^1和R^2一起构成式为X-R^A-R^B-的基团，其中X是H或1 -3 肽基团并且在R^A和R^B间的肽键易于被氨肽酶A裂解;

R^3选自由Val,Ala,Leu,Ile,Gly,Pro,Aib,Acpc及Tyr组成的一组;

R^4选自由Tyr,Thr,Ser及azaTyr组成的一组;

R^5选自由Ile,Ala,Leu,Val及Gly组成的一组;

R^6是His或Arg;

R^7是Pro或Ala; 及

R^8选自由Phe,Phe(Br),Ile及Tyr组成的一组，其中R^4是末端Tyr 基团的序列不包括在内。

在一优选实施方案中，R^A适于选自Asp,Glu,Asn,Acpc(1-氨基环戊烷羧酸),Ala,Me^2Gly,Pro,Bet,Glu(NH_2),Gly,Asp(NH_2)和Suc。R^B适于选自Ayg,Lys, Ala,Orn,Ser(Ac),Sar,D-Arg和D-Lys。尤其优选的R^A和R^B组合是Asp-Arg,Asp- Lys,Glu-Arg和Glu-Lys。

更优选的实施方案包括以下所述: A III或A II (2-8) , Arg-Val-Tyr- Ile

-His-Pro-Phe[SEQ ID No:2]; A II (3-8)，也称为 des1- A III或A IV， Val -Tyr-Ile-His-Pro-Phe[SEQ ID No:3]; A II (1-7)，Asp-Arg-Val- Tyr- Ile -His-Pro[SEQ ID NO:4]; A II (2-7)，Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro[SEQ ID No:5]; A II (3-7)，Val-Tyr-Ile-His-Pro[SEQ ID No:4]; A II (2-7)， Arg- Val -Tyr-Ile-His-Pro[SEQ ID-No:5]; A II (3-7)，Val-Tyr-Ile-His- Pro[SEQ ID No:6]; A II (5-8)，Ile-His-Pro-Phe[SEQ ID No:7]; A II (1- 6)， Asp -Arg-Val-Tyr-Ile-His[SEQ ID No:8]; A II (1-5)，Asp-Arg-Val-Try-Ile[SEQ ID No:9]; A II (1-4)，Asp-Arg-Val-Tyr[SEQ ID No:10]; 及A II (1-3)，Asp -Arg-Val[SEQ ID No:11]。也测试了A II (6-8)，His-Pro-Phe[SEQ ID No:12]及 A II (4-8)，Tyr-Ile-His-Pro-Phe[SEQ ID No:13]，发现它们没有功效。

本发明特别感兴趣的另一类化合物是那些通式为II的化合物:

$R^2-R^3-R^4-R^5-R^6-R^7-R^8$

其中R^2选自由H,Arg,Lys,Ala,Orn,Ser(Ac),Sar,D-Arg和D-Lys组成的一组;
R^3选自由Val,Ala,Leu,Ile,Gly,Pro,Aib,Acpc,Tyr组成的一组;
R^4选自由Tyr,Thr,Ser及azaTyr组成的一组;
R^5选自由Ile,Ala,Leu,Val和Gly组成的一组;
R^6是His或Arg;
R^7是Pro或Ala; 以及
R^8选自由Ile,Phe,Phe(Br)和Tyr组成的一组。

一种特别优选的通式为II的化合物的亚类具有式

$R^2-R^3-Tyr-R^5-His-Pro-Phe$ [SEQ ID No:14]

其中R^2, R^3和R^5的定义如前述。特别优选的是式为Arg-Val-Tyr- Ile- His -Pro-Phe[SEQ ID No:2]的血管紧张肽III。A II (4-8)片段在重复试验中无效果，据信这是由于N末端上暴露的酪氨酸。

在以上式中使用的是氨基酸三字母缩写。除非另有说明，均指氨基酸的L -型。其它残基缩写如下:

Me^2Gly	N,N-二甲基甘氨酸
Bet	1-羧基-N,N,N-三甲基甲铵氢氧化物内盐(甜菜碱)
Suc	丁二酰
Phe(Br)	p-溴-L-苯丙氨酸
azaTyr	氮杂-α'-同型-L-酪氨酸
Acpc	1-氨基环戊烷羧酸
Aib	2-氨基异丁酸
Sar	N-甲基甘氨酸 (肌氨酸)

已有人提出，A Ⅲ及其类似物呈γ或β转角[Regoli,D.，等人，(1974)，血管紧张肽药物学；药物学综述 26:69]。通常据信R^3、R^5和R^7位的中性侧链参与保持R^4、R^6及R^8位活性基团之间的适当距离以主要负责与受体结合和/或内在活性。R^3、R^5和R^8位的疏水侧链在肽的完整构象中也起重要作用和/有助于形成假设的疏水袋。

在R^2位氨基酸上的合适的侧链可提供该化合物与靶受体的亲和性和/或在肽构象中起重要作用。由此，Arg和Lys特别优选用作R^2。

根据本发明，据信R^3可参与与R^5(在γ转角模型中)或R^6(在β转角模型中)形成线性或非线性氢键。在β反平行结构(其已被认为是可能的结构)中R^3也参与在第一个转角中。与通式I的其它位置相反，在该位置β和γ分支似乎是等效的。此外，一个氢链就足以保持相对稳定的构象。据此R^3可合适地选自Val，Ala，Leu，Ile，Gly，Pro，Aib，Acpc和Tyr。

至于R^4，构象分析已发现该位置的侧链(以及R^3与R^5位的侧链)参与提供一种据信对于受体占据和刺激所必需的疏水簇，因此R^4优选选自Tyr，Thr，Ser及azaTyr。在该位置特别优选Tyr，因为其可以与能接受来自苯酚羟基的氢的受体位点形成氢键[Regoli，等人，(1974)，同上]。

在R^5位，特别希望的是带β脂族或脂环族链的氨基酸。因而尽管Gly适于在R^5位，但优选的是该位置的氨基酸选自Ile，Ala，Leu，Val。

在本发明特别感兴趣的类似物中，R^6是His或Arg，组氨酸的咪唑环的独特性质（如，在生理pH值下离子化，能作为质子供体或受体，芳族特性）据信尤其适于其用作R^6。例如，构象模型提示His可参与氢键形成（在β模型）或通过影响R^7定位参与在反平行结构的第二转角中。类似地，目前认为R^7应该是Pro以提供最希望的R^8定位。在R^8位，疏水环和阴离子羧基末端似乎在感兴趣的类似物与受体的结合中特别有用，因而Tyr，特别是Phe优选适用于本发明。

血管紧张肽II是已知最有效的缩血管剂之一，可使分支形成毛细血管的小动脉收缩。血管紧张肽的生物合成是通过肾素对血浆基质血管紧张肽原的作用开始的。如此合成的产物是十肽称为血管紧张肽I，其通过转化酶血管紧张肽酶除去血管紧张肽I C末端的His-Leu残基转化成血管紧张肽II。

研究表明，肾素-血管紧张肽系统的血管活性产物，血管紧张肽II（AII）促进参与伤口修复的生长因子释放，有丝分裂，趋化性及培养细胞的胞外基质的释放【Dazu，V.E.等人（1989），血管紧张肽在调节血管及心脏生长中的分子机制，心血管分子细胞学杂志21（Supp.Ⅲ）：S7；Berk，B.C.等人，（1989），在培养的血管平滑肌细胞中血管紧张肽II刺激蛋白质合成，Hypertension 13：305-14；Kawahara，Y.等人（1988），血管紧张肽II通过在培养的血管平滑肌细胞中蛋白激酶C激活作用及钙离子活动化作用诱导c-fos基因的表达，BBRC 150：52-9；Naftilan，A.J.等人（1989），在培养的大鼠血管平滑肌细胞中血管紧张肽II对血小板衍生生长因子A-链和c-myc基因表达的诱导，临床研究杂志83：1419-24；Taubman，M.B.等人（1989），血管紧张肽II诱导动脉平滑肌中c-fox mRNA，Ca^{2+}活动化和蛋白激酶C激活的作用，J.Biol.Chem.264：526-530；Nakahara，K.等人（1992），在兔血管平滑肌中三种类型的PDGF-A链基因转录物的鉴别及其在发育过程中通过血管紧张肽II的调节表达，BBRD 184：811-8；Stouffer，G.A.和G.K.Owens（1992），血管紧张肽II诱导的自发高血压大鼠衍生的培养平滑肌细胞的分裂依赖于转化生长因子-β的自泌产生，Circ.Res.70：820；Wolf，G.等人（1992），血管紧张肽II刺激培养的鼠肾小球膜细胞中I型胶原的增殖及生物合成，美国病理学杂志140：95-107；Bell，L.和J.A.Madri（1990），血管紧张肽系统对内皮和平滑肌细胞移动的影响，美国病理学杂志137：7-12】

。另外，在兔角膜及鸡绒毛尿囊膜模型中AⅡ被证明促进血管生成（Fernandez，L．A．等人（1985），由血管紧张肽Ⅱ产生的新生血管化作用，实验临床医学杂志105：141；LeNoble，FAC等人（1991），血管紧张肽Ⅱ刺激鸡胚的绒毛尿囊膜的血管发生，欧洲药物学杂志195：305-6）。因而通过新生血管化作用的提高，生长因子释放，上皮再生，和胞外基质的产生AⅡ可加速伤口修复。通过增加受伤组织处的血流及营养物质，AⅡ可提高伤口修复速度。AⅡ也可通过在受伤部位生长因子的产生促进伤口修复。生长因子的外源加入已证明可通过多种机制加速伤口修复【Grotendorst，G．R．等人（1985），在正常及糖尿病大鼠中血小板衍生生长因子对肉芽组织形成的刺激作用，临床研究杂志76：2323-9；Mustoe，T．A．等人（1987），由转化生长因子β诱导的大鼠切口的加速愈合，Science 237：1333-5；Pierce，G．F．等人（1988），通过血小板衍生生长因子及重组c-sis基因同二聚体蛋白加速的体内切口愈合，实验医学杂志167：974-87；Lynch，S．E．等人（1989），伤口愈合中的生长因子，临床研究杂志84：640-6；Greenhalgh，D．G．等人（1990），在遗传性糖尿病大鼠中PDGF与FGF刺激伤口愈合，美国病理学杂志136：1235-46】。现有研究表明，AⅡ能提高伤后颈动脉及主动脉中新生内膜形成【Powell，J．S．等人（1989），血管紧张肽转化酶抑制剂在脉管伤后可防止肌内膜增生，Science 245：186-8；Powell，J．S．等人（1991），对脉管伤的增殖性应答由抑制转化酶加以抑制，心血管药物学杂志16（suppl．4）：S42-9；Capron，L．等人（1991），ramipril，一种血管紧张肽转化酶抑制剂对大鼠胸主动脉对用气囊导管损伤的应答的作用，心血管药物学杂志18：207-11；Osterriedes，W．等人（1991），血管紧张肽Ⅱ在鼠体内损伤诱导的新生内膜形成中的作用，Hypertension 18：Suppl．1160-64；Daemen，MJ AP等人（1991），血管紧张肽Ⅱ诱导正常及受伤大鼠动脉管壁的平滑肌细胞增殖，Circ．Res．68：450-6】。由于这些观察结果，进行了一些研究以确定内源性AⅡ可诱导内膜增生的机制。结果表明AⅡ可作为平滑肌细胞、成纤维细胞及内皮细胞的促分裂原【Schelling，P．等人（1979），血管紧张肽Ⅱ及其拮抗物saralysin对细胞生长及3T3和SV3T3细胞中肾素的作用，细胞生理学杂志98：503-13；Campbell-Boswell，M．和A．L．Robertson（1981），血管紧张肽Ⅱ及加压素在体外对人平滑肌细胞的作用，实验分子病理学35：265-76；Emmett，N．等人（1986），saralasin（血管紧张肽Ⅱ拮抗物）对3T3细胞生长及增殖的作用，细胞生物

学杂志103：171 (Abst)；Paquet，J．L．等人(1990)，在自发高血压大鼠体内血管紧张肽II诱导的动脉肌细胞增殖，J．Hypertens．8：565-72；Dzau等人，同上】。AII也可提高血管平滑肌细胞的蛋白质含量及大小【Berk等人(1989)，同上；Geisterfer，A．A．T．等人(1988)，血管紧张肽II导致培养的大鼠动脉平滑肌细胞过度生长而非数量性增殖，Circ．Res．62：749-56】。研究表明AII可增加各种类型生长因子包括PDGF，肝素结合EGF及转化生长因子-β (TGFβ) 及生长相关的原癌基因从平滑肌细胞，内皮细胞和心成纤维细胞的释放【Kawahara等人(1988)，同上；Naftilan，A．J．(1992)，血管紧张肽II在血管平滑肌细胞生长中的作用，心血管药物学杂志20：537-40；Naftilan等人(1989)，同上；Taubman等人(1989)，同上；Nakahara等人(1992)，同上；Temizer等人(1992)，同上；Gibbons，G.H.等人(1992)，血管平滑肌细胞过度生长对数量性增殖，自泌转化生长因子-β1表达检测对血管紧张肽II的生长应答，临床研究杂志90：456-61；Bell，L．等人(1992)，牛动脉内皮细胞移动的自泌血管紧张肽系统调节及纤溶酶原激活物参与调节原癌基因pp60c-src的表达，临床研究杂志80：315-20，Stouffer和Owens (1992)，同上】。由AII所致血管平滑肌细胞的过度生长由PDGF介导[Berk，B．C．和G．N．Rao (1993)，血管紧张肽II诱导的血管平滑肌细胞过度生长；PDGF A-链介导大小的增加，细胞生理学杂志54：368-80]。

因此，可确认AII是通过提高在受伤组织中这些生长因子的水平加速伤口修复。另外，AII显示出刺激胶原合成，从而提示该因子在胞外基质形成中的作用[Wolf，G．等人(1991)，在血管紧张肽II诱导的培养的近肾小管细胞的过度生长后，Ⅳ型胶原转录和分泌的胞内信号，Cell．Reg．2：219-27；Wolf，等人，(1992)，同上；Zhou，G．等人(1992)，在培养的心成纤维细胞中胶原合成的血管紧张肽II介导的刺激作用，FASEB J 6：A1914]。伤口修复也涉及必需细胞类型对伤床的趋化性。在体外AII也显示出能诱导内皮细胞和平滑肌细胞移动[Bell和Modri (1990)，同上]。

最近的研究还表明，AII受体的表达在伤口修复过程中是可变的[Viswanathan，M．和J．M．Saavedra (1992)，在大鼠皮肤伤口愈合实验期间血管紧张肽II AT_2受体的表达，Peptides 13：783-6；Kimura，B 等人(1992)，在伤口愈合期间大鼠皮肤

血管紧张肽Ⅱ受体的变化，ＢＢＲＣ　１８７：１０８３－１０９０]。这些变化与在修复部位ＡⅡ的局部含量增高这一事实一起提示ＡⅡ在伤口修复过程中起关键作用。

已观察到ＡⅡ与ＡⅢ在某些方面有非常不同的生物活性。例如，ＡⅡ对于激发的神经元去甲肾上腺素释放呈双相功能（早期降低而后提高），而升高的自发去甲肾上腺素的释放仅仅在１２分钟后；ＡⅢ则对激发和自发的神经元去甲肾上腺素释放均呈双相功能[Ｖａｔｔａ，ＭＳ等人（１９９２），在大鼠肾上腺髓质中血管紧张肽Ⅱ及Ⅲ对去甲肾上腺素的吸收与释放的单相和双相功能，Ｃａｎ．生理药物学杂志７０：８２１]。另外ＡⅡ与ＡⅢ对压力感受器－心脏－反射的影响不同；ＡⅡ增强反射敏感性而ＡⅢ削弱反射敏感性[Ｂｒａｔｔｓｔｒｏｍ，Ａ．等人（１９９２），在孤束核中的神经肽调节中央心血管控制过程，脑研究进展９１：７５]。令人惊奇的是，尽管ＡⅡ与ＡⅢ之间有明显不同的生物学活性，ＡⅢ，尤其是其类似物可用于加速伤口愈合。

许多研究集中于ＡⅡ（１－７）以评价其活性。ＡⅡ（１－７）的许多功能是通过ＡＴ２受体而起作用，但这不是一成不变的，根据所测组织的不同而变化。

ＡⅡ(1-7)不具备ＡⅡ的许多功能。AII(1-7)没有升高血压的功能或根据受试模型及给药方式对于血压只有非常轻微的作用（在ＡⅡ剂量的１００００－１００００倍才有效）。事实上，AII(1-7)具有降血压功能，其可经前列腺素类激素合成而介导。另外与AII作用相反，AII(1-7)不能引起儿茶酚胺释放及醛固酮释放且不是ｄｉｐｓｏｇｅｎｉｃ[Ｗｅｂｂ等人，１９９２，在大鼠副神经节瘤细胞中血管紧张肽Ⅱ的Ⅱ型受体的分子鉴定，Ｐｅｐｔｉｄｅｓ　１３：４９９－５０８；Ｃｈｅｎｇ等人，１９９４，在猫肺血管床中对血管紧张肽Ⅰ、Ⅱ及Ⅲ的升压应答的对比。美国生理学杂志２６６：Ｈ２２４７－Ｈ２２５５；Ｍｏｒｉｇｕｃｈｉ，Ａ等人，１９９４，含有小鼠Ｒｅｎ－２基因的转基因大鼠体内中心升压素的不同调节，美国生理学杂志２６７：Ｒ７８６－Ｒ７９１；Ｓｃｈｉａｖｏｎｅ等人，１９９０，血管紧张肽－[１－７]：在脑中的新功能的证据，心血管药物学杂志１６（Ｓｕｐｐｌ　４）：Ｓ１９－Ｓ２４；Ｆｅｒｒａｒｉｏ等人，１９９１，血管紧张肽－（１－７）：血管紧张肽系统的新激素，Ｈｙｐｅｒｔｅｎｓｉｏｎ　１９[ｓｕｐｐｌ　III]Ⅲ－１２６－Ⅲ－１３３]。

在一篇报道中，ＡⅡ（１－７）是一弱升压素，需要大约比ＡⅡ高１０００倍以上才能有可比的应答[Ｂｅｎｔｅｒ等人，１９９３，血管紧张肽（１－

7）的心血管作用，Peptides 14：679－684]。在这一系统中，AII（1－7）具有剂量依赖型的长期降压功能。AII（3－7）的升压功能不如AII（2－7），但其没有降压功能。同样注意到AII（1－7），AII（2－7）及AII（3－7）可能影响多巴胺系统及记忆（提示有治疗精神病的功能）。

在某些系统中，AII（1－7）的功能明显不同于AII。AII通过AT1受体在大鼠肾小球膜细胞中刺激胆碱产生；AII（1－7）与AII（1－6）在这项参数上作用微弱 [Pfeilschifter 等人，1992，在大鼠肾小球膜细胞中磷脂酶D的血管紧张肽II刺激作用由AT1受体亚型介导，欧洲药物学杂志225：57－62]。

在猪主动脉内皮细胞中，AI 和AII（1－7）刺激前列腺素E2和I2的释放，但AII不具有该作用 [Jaiswal 等人，1992，血管紧张肽刺激内皮细胞前列腺素的产生，受体的鉴别，Hypertension 19（Suppl II）：II－49－II－55]。AII在其它细胞类型及未受损血管（但除人或猪内皮细胞外）中能刺激前列腺素类激素的释放。对内皮细胞的这项作用是通过不同于AT1和AT2的受体完成的。

在大鼠肾小球制备物中，AII通过AT1受体抑制在对组氨酸、5－羟色胺、甲状旁腺素应答中cAMP的形成 [Edwards，RM和EJ Stack 1993 血管紧张肽II通过血管紧张肽II受体亚型1（AT1）抑制肾小球腺苷酸环化酶，药物学实验及理论杂志266：506－510]，AII（1－7）不具备该功能。

在猪血管平滑肌细胞和人星形细胞中，AII和AI（1－7）增加前列腺素释放；只有AII增加细胞内Ca^{2+}释放 [Jaiswal 等人，1993，血管紧张肽在猪主动脉平滑肌细胞中的不同调节作用：所涉及的血管紧张肽受体的亚型，药物学和实验治疗学杂志265：664－673；Jaiswal 等人，1991，血管紧张肽受体亚型2介导人星形细胞中的前列腺素合成，Hypertension 17：1115－1120]。

AII（1－7）扩张猪冠状动脉环，可能是通过氧化氮的作用 [Porst et al，1994，由血管紧张肽－（1－7）导致的从猪冠状内皮释放氧化氮：新血管紧张肽受体的作用，英国药物学杂志111：652－654]。AII，AIII或AII（3－8）未观测到有该功能。该功能经AT1或AT2受

体的拮抗物作用未被减弱。

AII使从大鼠分离的多极神经节去极化；AII（1－7）则不能[Widdop等人，1992，血管紧张肽在大鼠分离的多极神经节上的电物理应答，临床及实验高血压－理论和实践A 14：597－613]。实际上，AII（1－7）可能在脑功能方面有新作用[Schiavone等人，1990，血管紧张肽（1－7）在脑中的新作用的证据，心血管药物学杂志16（Suppl 4）：S19－S24]。

AII（1－7）与AII有一些共有的功能，如在近肾小管细胞中释放加压素及调节磷脂酶A2活性[Andreatta－Van Leyen，S 等人，1993，通过血管紧张肽（1－7）对磷脂酶A2活性及钠转运的调节，国际肾脏学44：932－6；Moriguchi，A等人，1994，在含小鼠Ren－2基因的转基因大鼠中中心加压素的不同调节，美国生理学杂志267：R786－R791；Ferrario等人，1991，血管紧张肽－（1－7）：血管紧张肽系统的一种新激素，Hypertension 19（suppl）Ⅲ－126－Ⅲ－133]。但这些功能不参与伤口修复。

AII的其它片段的功能仅有几个研究例子。Ang（1－7），AII及AⅢ可兴奋室旁核中的大多数神经元，而AII（1－7）在该功能上较弱；在许多神经元中，AII（2－7）是失活的[Ambuhl等人，1992，血管紧张肽类似物及血管紧张肽受体拮抗物对室旁核神经元的作用，调节肽38：111－120]。 将AII注入侧脑室可提高对条件回避反射的能动性、 定型(stereotypy)及认知；而AII（1－6）及AII（2－6）无此治疗精神病的功能[Holy，Z等人，1993，血管紧张肽IIN末端片段：Asp－Arg－Val－Tyr－Ile－His及Arg－Val－Tyr－Ile－His治疗大鼠精神病的功能，波兰药物学杂志45：31－41]。

当AII（4－8），AII（5－8）及AII（1－4）被注入大鼠前间脑中时，显示在水吸收方面只有轻微的作用，而AII（1－7）则完全无活性（Fitzsimmons，JT，1971，注射入大鼠间脑的血管紧张肽II的肽前体和较短链肽片段对饮水的作用，生理学杂志 214：295－303]。甚至在大鼠脑室内输注比输注AII升高血压时的浓度高1000倍浓度的AII片段[AII（4－8）及AII（4－8）]，其对血压的作用仍非常低[Wright等人，1989，在大鼠中脑血管紧张肽对升压作用的控制的结构－功能分析，美国生理学杂志257:R1551-R1557）。在所有这些研究中，直接将片段注入脑内； 这是非常人工化的且不允许全身代谢。

根据本发明的方法，本发明的活性片段或其类似物以足以提高组织的愈合速率的量用于伤口组织。这些成份在体内以毫摩尔水平就能有效加速愈合速率。对于任何所给定的活性制剂，其在给定的配制品中的最佳浓度可容易地经实验确定。一般地，本发明适用的活性制剂的量大约在0.0001ug-10mg/kg体重范围内。

本发明的化合物可以各种溶液应用。本发明适用的溶液是无菌的、能溶解足够量的肽且对伤口组织无毒副作用。由此，本发明的化合物是非常稳定的但可被强酸和强碱水解。本发明的化合物可溶于有机溶剂及P H 为5 －8 的水溶液中。任何可允许活性制剂经过一段时间输入组织中的应用方法都可使用。例如，水溶液可通过纱布绷带应用于伤口组织，或可配制如此溶液以获得定时的灌流（可使用如：脂质体、软膏、胶束等）。这些含有本发明化合物的配制品的生产方法为本领域技术人员所熟知。应用的活性制剂的浓度不是关键的，这是由于组织修复作用即使当化合物以毫摩尔的量给予时也是存在的。

优选地，采用一种基质溶液或胶束溶液，其中活性制剂以至少3 0 ug/ml 的浓度存在。一种特别适用于所述实施例的特殊的基质溶液是Hydro Med Sciences, New Brunswick, New Jersey 所售，商标为H ydron的一种半固体聚乙二醇聚合物。另一优选的溶液是一种商品名Pluronics F108 、 由 BASF, Ludwigshafen ,Germany所售的胶束溶液。在室温条件下，该溶液是液体的，但当用于温的组织时该溶液形成凝胶以使活性制剂在几天时间里可输入伤口组织中。其它优选的配制品包括羧甲基纤维素制备物（用于本文的实施例中），类晶体制备物（如盐水，林格氏乳酸液、磷酸盐缓冲盐水等），粘弹性体，聚乙二醇，聚丙二醇及伤口敷料（如绷带等）。

本发明的化合物的愈合作用可以各种实例提供。可将溶液局部用于伤口组织表面以治疗溃疡、损伤、外伤、糖尿病溃疡、烧伤、创伤、郁滞溃疡、牙周病、撕裂伤及其它疾病。另外，如由损伤性手术所致的腹膜内伤口组织可用本发明的组合物治疗以加速愈合。例如，在外科结肠或其它组织切除术后，手术创面可先用活性剂溶液涂覆然后封闭手术部位以加速内部毛细血管灌注及愈合。另外，通过注射或其它方法皮下给予活性制剂可提高局部伤口愈合速率。

参考实施例可更好地了解本发明，但其只作为例证并不限制如权利要求所述本发明范围。

实施例1

雄性Sprague Dawley鼠，１２周龄，得自Simonsen实验室， Gilroy，CA.在进行手术当天，先将大鼠肌注氯胺酮/甲苯噻嗪麻醉。将鼠备皮并用聚烯吡酮碘清洗消毒。在大鼠背部表面做4个2 X 2 cm切除表皮伤口。在对皮肤做切除之后，在玻片上画出伤口大小并将药物含在１００微升Hydron溶液（含１０％Hydron，１％聚乙二醇（MW ４００）及６０％乙醇）中给予。随机给予测试物质；每伤口给予3和１０微克的血管紧张肽Ⅲ并评价，对照组只用赋形剂处理。

在给予这些物质之后，将大鼠伤口用绷带包好并解除麻醉状态。在第2、5、6、８、１０天，在甲氧氟烷（商品名为 Metofane，来自 Pittman- Moore ,Mundelein，IL）麻醉下，测定皮肤伤口的面积。伤口面积通过如下步骤测定：（１）在图纸上绘出伤口形状（１X１ mm见方）；（２）剪下伤口形状；（３）将纸称重并与剪下的2 X 2 cm的纸对比重量；（４）计算平方数。

如图1所示，当受试动物用血管紧张肽Ⅲ在3 ug和１０ug剂量下处理时，伤口愈合较对照组明显增快。图1示出与赋形剂处理的对照组相比，伤口愈合增加的百分比。

实施例2

雌性Sprague Dawley大鼠，１２周龄，来自Simonsen实验室,Gilroy，CA，并用如实施例1方式进行术前准备。在大鼠背部表面做2个1.5X1.5cm的切除表皮伤口。切除皮肤之后，在玻片上画出伤口大小并将药物含在１００微升Hydron溶液（含１０％Hydron，１％聚乙二醇（MW ４００）及６０％乙醇）中给予。随机给予测试物质；所有物质都在每伤口给予１０微克的剂量下受试。对照组只用赋形剂处理。在给予上述物质后，用绷带将鼠包扎并解除麻醉状态。在第2－3，５，７－８，９－１０天，在甲氧氟烷（商品名 Metofane，来自 Pittman -Moore，Mundelein，IL)麻醉下测定皮肤伤口面积（测定的是使用类似物1 A和2 －8的情况）。伤口面积通过如下步骤测定：（１）在图纸上绘出伤口形状（１X１ mm见方）；（２）剪下伤口形状；（３）将纸称重并与剪下的1.5X1．5cm的纸对比重量；（４）计算平方数。另外，在第2－3，５及8天，用相似手段检测肉芽组织的面积（测定的是使用类似物1 A，１B及2 －7的情况）。使用的类似物如下：

类似物1 A　　Ile^{7}－血管紧张肽Ⅲ
类似物1 B　　Val^{4}－血管紧张肽Ⅲ

类似物2　　Lys^1－血管紧张肽Ⅲ
类似物3　　Ala^2－血管紧张肽Ⅲ
类似物4　　Thr^3－血管紧张肽Ⅲ
类似物5　　Leu^4－血管紧张肽Ⅲ
类似物6　　Arg^5－血管紧张肽Ⅲ
类似物7　　Ala^6－血管紧张肽Ⅲ
类似物8　　Tyr^7－血管紧张肽Ⅲ

如图2 －5 所示，当受试伤口用通式I 的类似物1 －8 处理时，与对照伤口相比伤口愈合明显增快。图2 和图3 示出与用赋形剂处理的对照组相比，伤口愈合中相应于对照应答的百分比；在每种情况下，给予类似物其中任何一种都可在术后加速伤口愈合。图4 和图5 示出在肉芽组织形成中相应于对照应答的百分比；同样，在每种情况下，与只给予赋形剂相比给予其中任何一种类似物均可加速肉芽组织形成。因此，这些类似物加速伤口愈合的作用是显而易见的。

实施例3

雌性Sprague Dawley大鼠，175 －100 g，来自Simonsen实验室，Gilroy. CA。在手术当天，将大鼠肌内给予氯胺酮/甲苯噻嗪麻醉做术前准备。将大鼠备皮并用聚烯吡酮碘清洗消毒。在大鼠背部表面做2 个1.5X 1.5表皮切除伤口。切除皮肤后，在玻片上绘出伤口大小并将药物含在100 微升10 %低粘度羧甲基纤维素 (Sigma) 中给予。随机给予受试物质； 所有物质在每伤口100 微克下受试，对照组只用赋形剂处理。在给予上述物质后，将大鼠用绷带包扎伤口并解除麻醉状态。在术后第1 －4 天，将大鼠用附加的100 微克肽配制品处理。在第2 、4 、7 、9 天，在甲氧氟烷 (商品名 Metofane，来自 Pittman- Moore，Mundelein，IL)麻醉下测定皮肤伤口面积。伤口面积通过如下步骤测定： (1) 在图纸上绘出伤口形状 (1 X 1 mm见方) ； (2) 剪下伤口形状； (3) 将纸称重并与剪下的1.5X1.5cm的纸对比重量； (4) 计算平方数。另外，在第2 、4 、7 天，用相似方法检测肉芽组织面积。

如图6 －11 所示，当受试动物用除A Ⅱ (6 －8) 及A Ⅱ (4 －8) 之外的所有片段处理时，伤口愈合比对照动物明显加快。图6 、图7 示出与赋形剂处理的对照组相比，使用此处限定的A Ⅱ的片段的伤口愈合相应于对照应答的百分比。图8 －11 示出在肉芽组织形成中相应于对照应答的百分比；图8 和图9 示出来自对照伤口的数据，其是图10 和图11 分别应参照对比的。

从以上所述，本领域技术人员可十分明了本发明的主要特征，并在不违背本发明的精神及范围下可根据使用法及条件对本发明加以改动。形式的改变及等价代换可由于情况变化而备用，尽管本文使用一些特定术语，但只是为具体描述而非限制目的。

序列表

(1) 一般信息

(i) 申请人: Rodgers, Kathleen E. diZerega, Gere S.

(ii) 发明名称: 血管紧张肽II片段及其类似物在组织修复中的应用

(iii) 序列数: 14

(iv) 通讯地址

(A) 收信人: c/o Robbins,Berliner & Carson

(B) 街道: 201 North Figueroa Street #500

(C) 城市: 洛杉矶

(D) 州: 加列福尼亚州

(E) 国家: U.S.A.

(F) 邮编: 90012

(v) 计算机可读形式:

(A) 媒介类型: 软盘

(B) 计算机: IBM PC兼容

(C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS

(D) 软件: Patent In Release #1.0, Version #1.25

(vi) 本申请资料:

(A) 申请号:

(B) 申请日:

(C) 分类:

(vii) 律师/代理人信息:

(A) 姓名: Spitals,John P.

(B) 注册号: 29,215

(C) 参考/案号: 1920-360

(viii) 电讯信息:

(A) 电话: (213)977-1001

(B) 传真: (213)977-1003

(2) SEQ ID NO: 1 的信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 1

Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Phe

1 5

(2) SEQ ID NO: 2 的信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 7 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 2

Arg Val Tyr Ile His Pro Phe

1 5

(2) SEQ ID NO: 3 的信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 6 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 3

Val Tyr Ile His Pro Phe

1 5

(2) SEQ ID NO: 4 的信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 7 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 4

Asp Arg Val Tyr Ile His Pro

1 5

(2) SEQ ID NO: 5 的信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 6 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 5

Arg Val Tyr Ile His Pro

1 5

(2) SEQ ID NO: 6 的信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 5 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 6

Val Tyr Ile His Pro

1 5

(2) SEQ ID NO: 7 的信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 4 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 7

Ile His Pro Phe

1

(2) SEQ ID NO: 8 的信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 6 个氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(C) 拓扑结构: 线型
(ii) 分子类型: 肽
(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 8

Asp Arg Val Tyr Ile His
1 5

(2) SEQ ID NO: 9 的信息
(i) 序列特征
(A) 长度: 5 个氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(C) 拓扑结构: 线型
(ii) 分子类型: 肽
(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 9

Asp Arg Val Tyr Ile
1 5

(2) SEQ ID NO: 10 的信息
(i) 序列特征
(A) 长度: 4 个氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(C) 拓扑结构: 线型
(ii) 分子类型: 肽
(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 10

Asp Arg Val Tyr
1

(2) SEQ ID NO: 11 的信息
(i) 序列特征
(A) 长度: 3 个氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(C) 拓扑结构: 线型
(ii) 分子类型: 肽
(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 11

Asp Arg Val
1

(2) SEQ ID NO: 12 的信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 3 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 12

His Pro Phe

1

(2) SEQ ID NO: 13 的信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 5 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 13

Tyr Ile His Pro Phe

1 5

(2) SEQ ID NO: 14 的信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 7 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 14

Xaa Xaa Tyr Xaa His Pro Phe

1 5

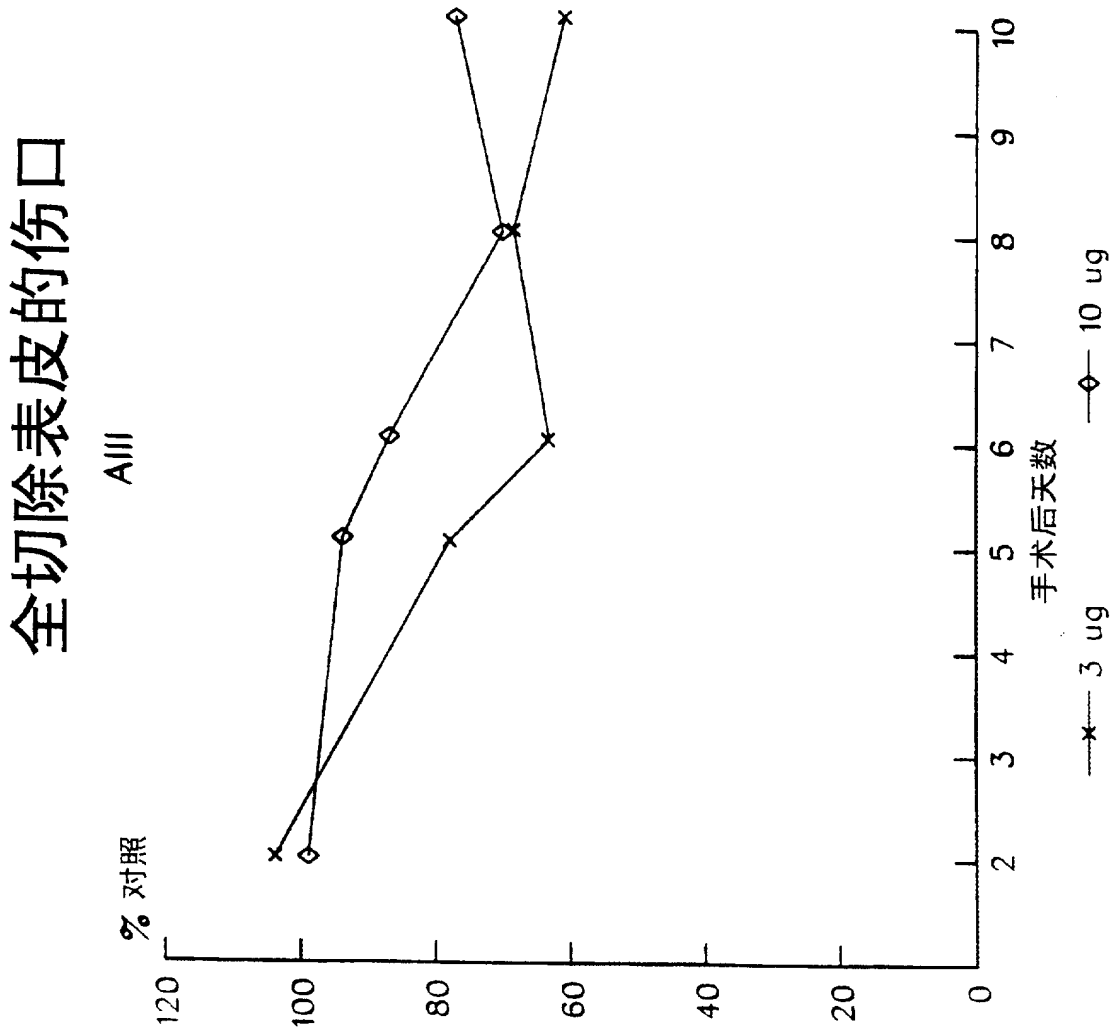
全切除表皮的伤口
AIII
% 对照
120
100
80
60
40
20
0
2
3
4
5
6
7
8
9
10
手术后天数
3 ug
10 ug

图 1

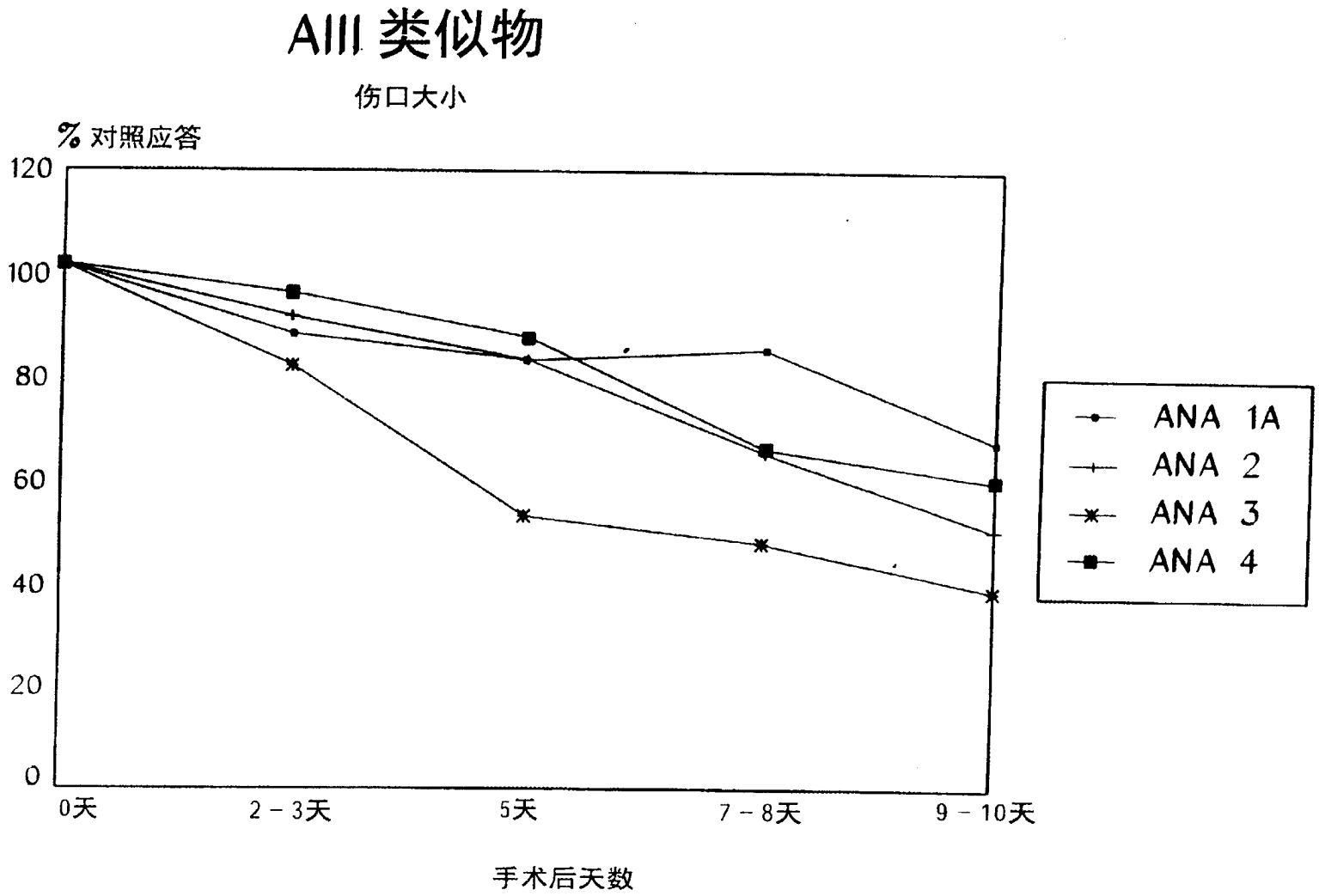
AIII 类似物
伤口大小
% 对照应答
120
100
80
60
40
20
0
0天
2 – 3天
5天
7 – 8天
9 – 10天
手术后天数
ANA 1A
ANA 2
ANA 3
ANA 4

图 2

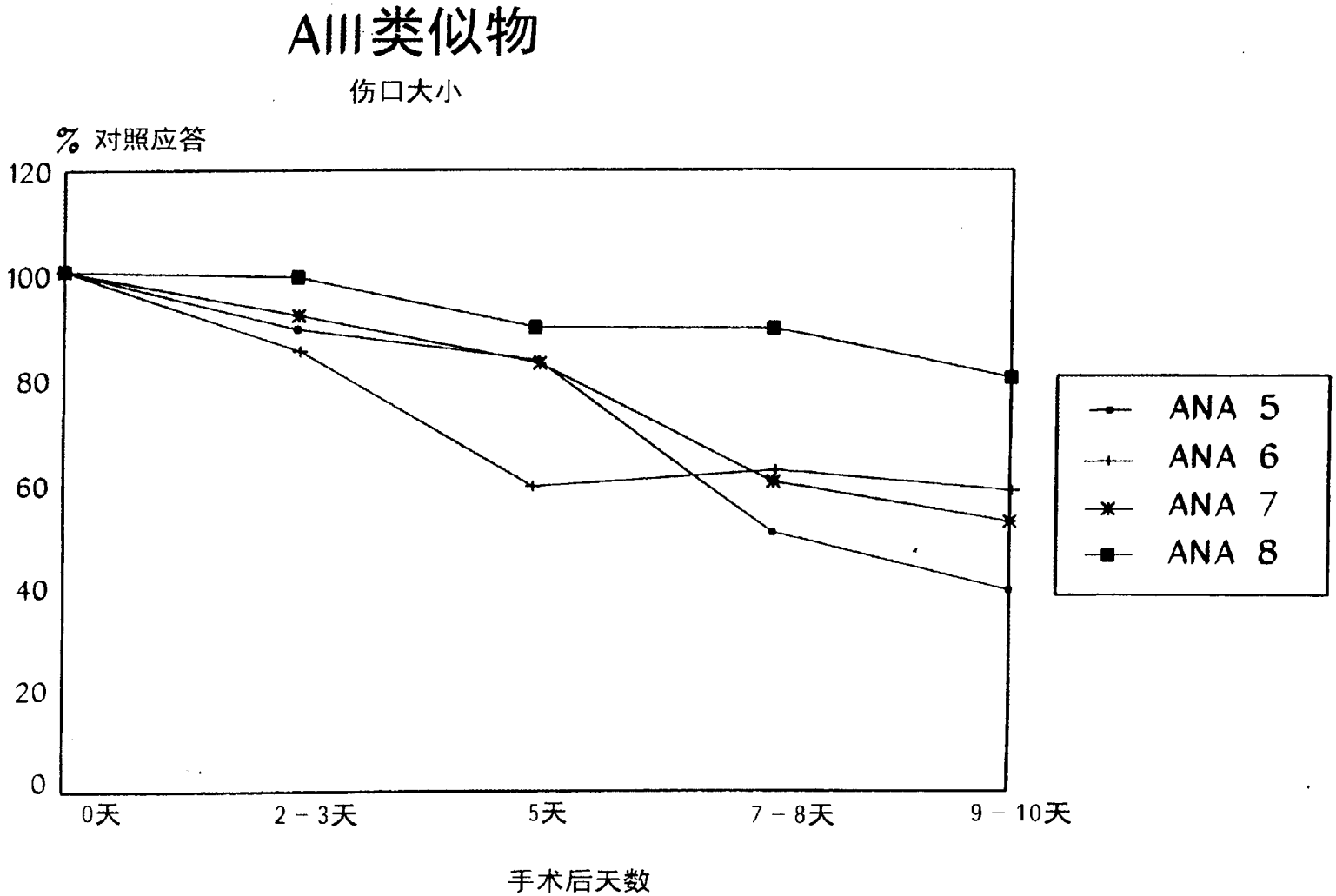
AIII类似物
伤口大小
% 对照应答
120
100
80
60
40
20
0
0天
2－3天
5天
7－8天
9－10天
手术后天数
ANA 5
ANA 6
ANA 7
ANA 8

图3

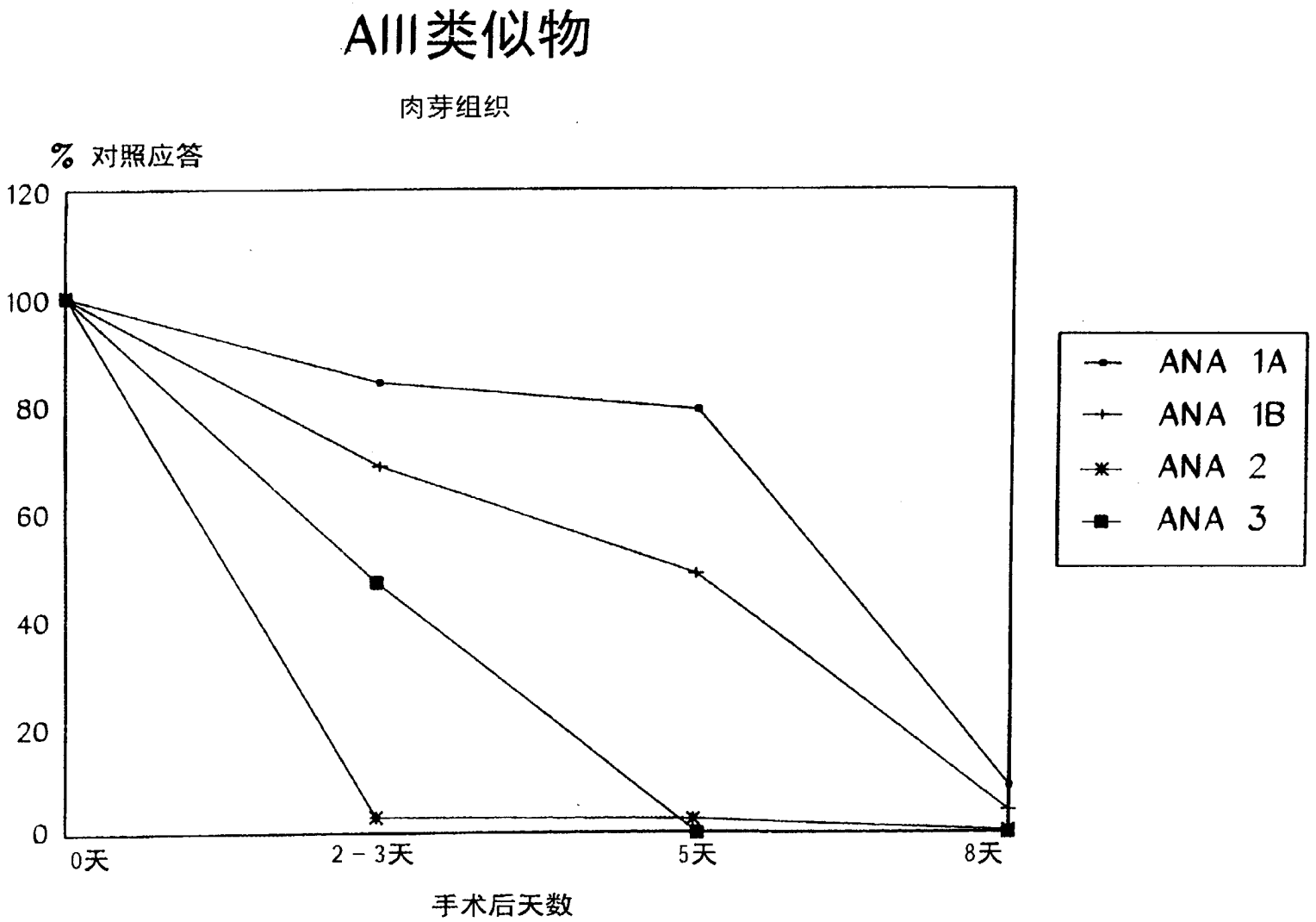
AIII类似物
肉芽组织
% 对照应答
120
100
80
60
40
20
0
0天
2－3天
5天
8天
手术后天数
ANA 1A
ANA 1B
ANA 2
ANA 3

图 4

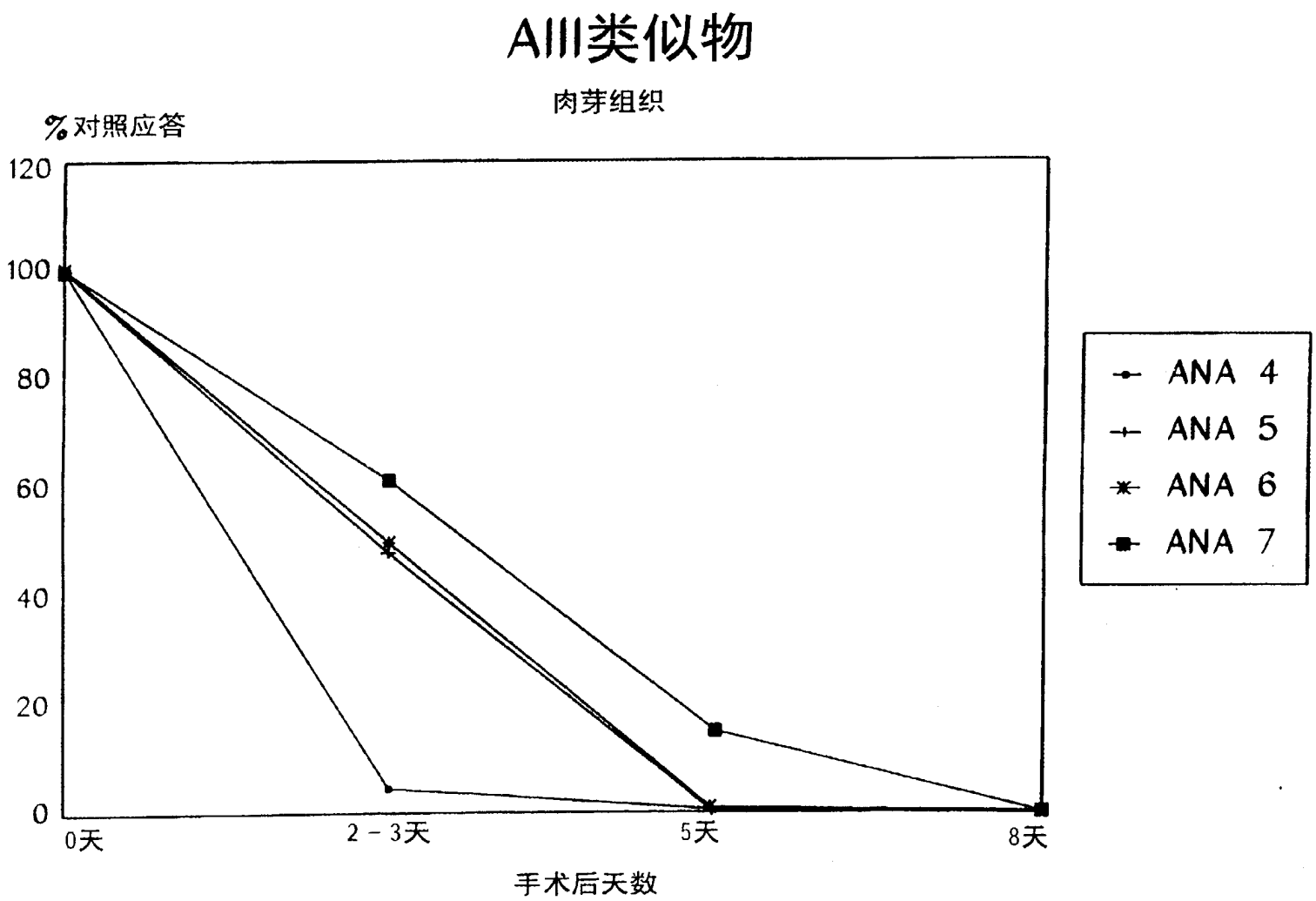
AIII类似物
肉芽组织
%对照应答
120
100
80
60
40
20
0
0天
2－3天
5天
8天
手术后天数
ANA 4
ANA 5
ANA 6
ANA 7

图5

对照大小

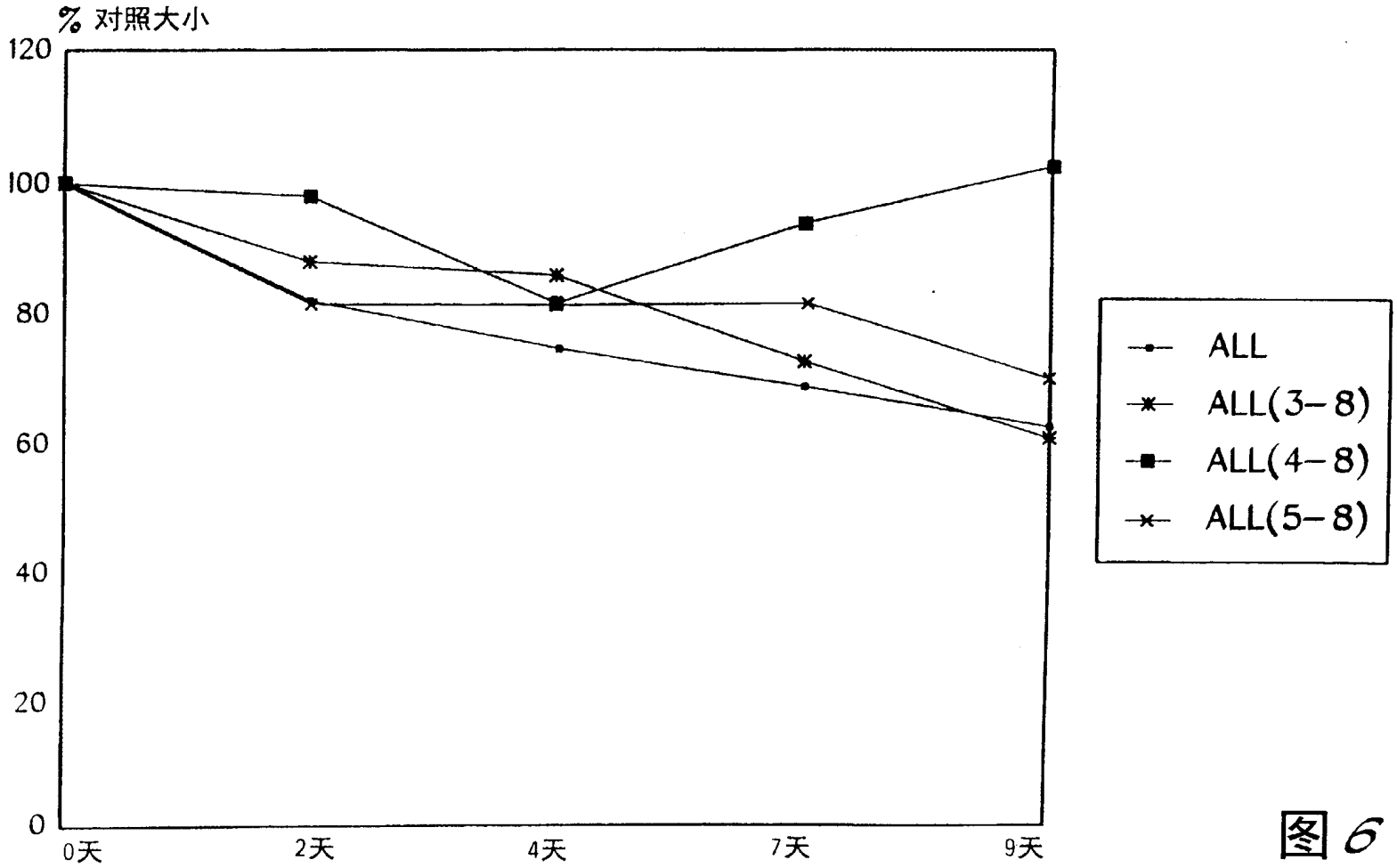

图 6

对照大小

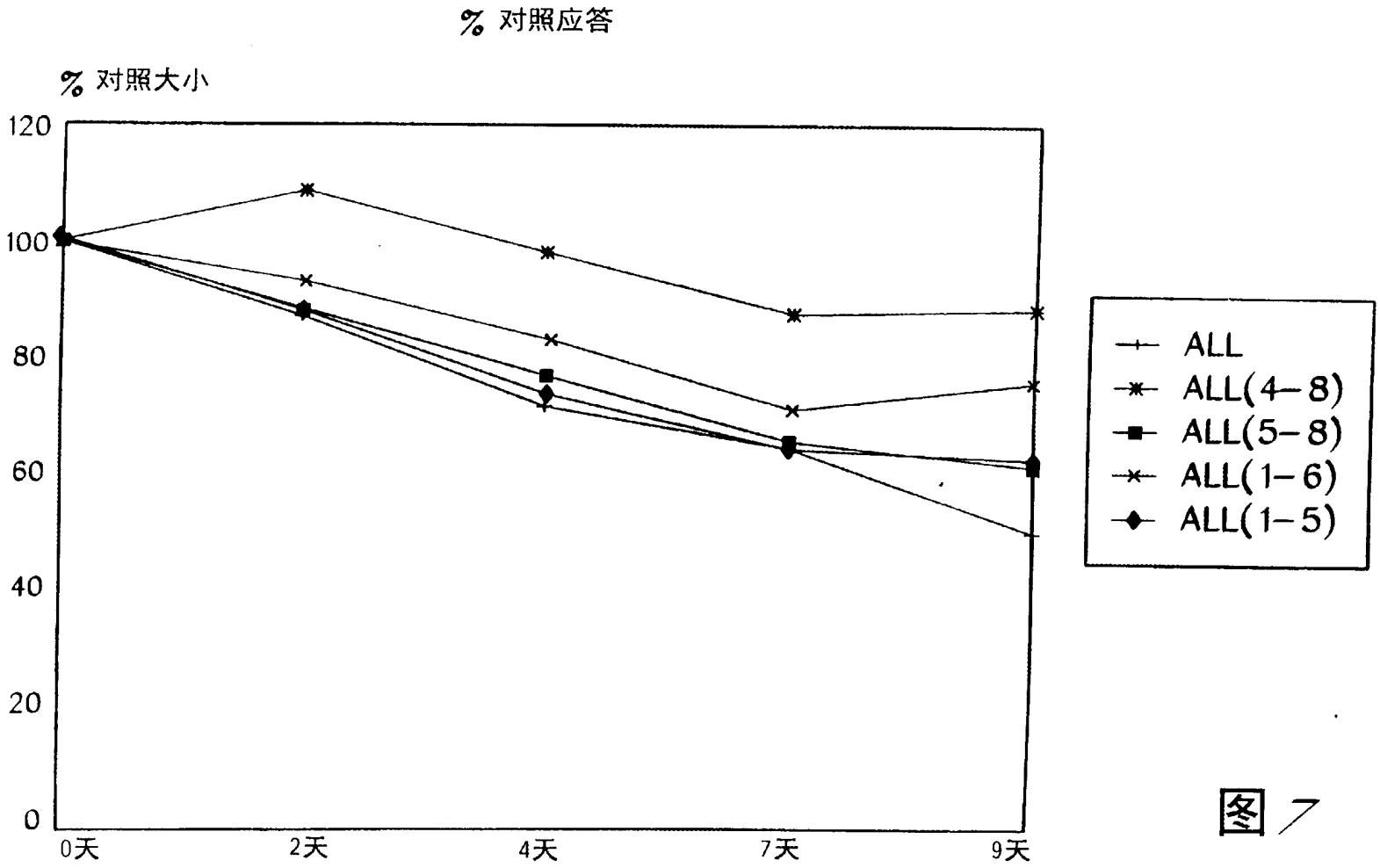
% 对照应答
% 对照大小
120
100
80
60
40
20
0
0天
2天
4天
7天
9天
ALL
ALL(4-8)
ALL(5-8)
ALL(1-6)
ALL(1-5)

图 7

肉芽

对照伤口

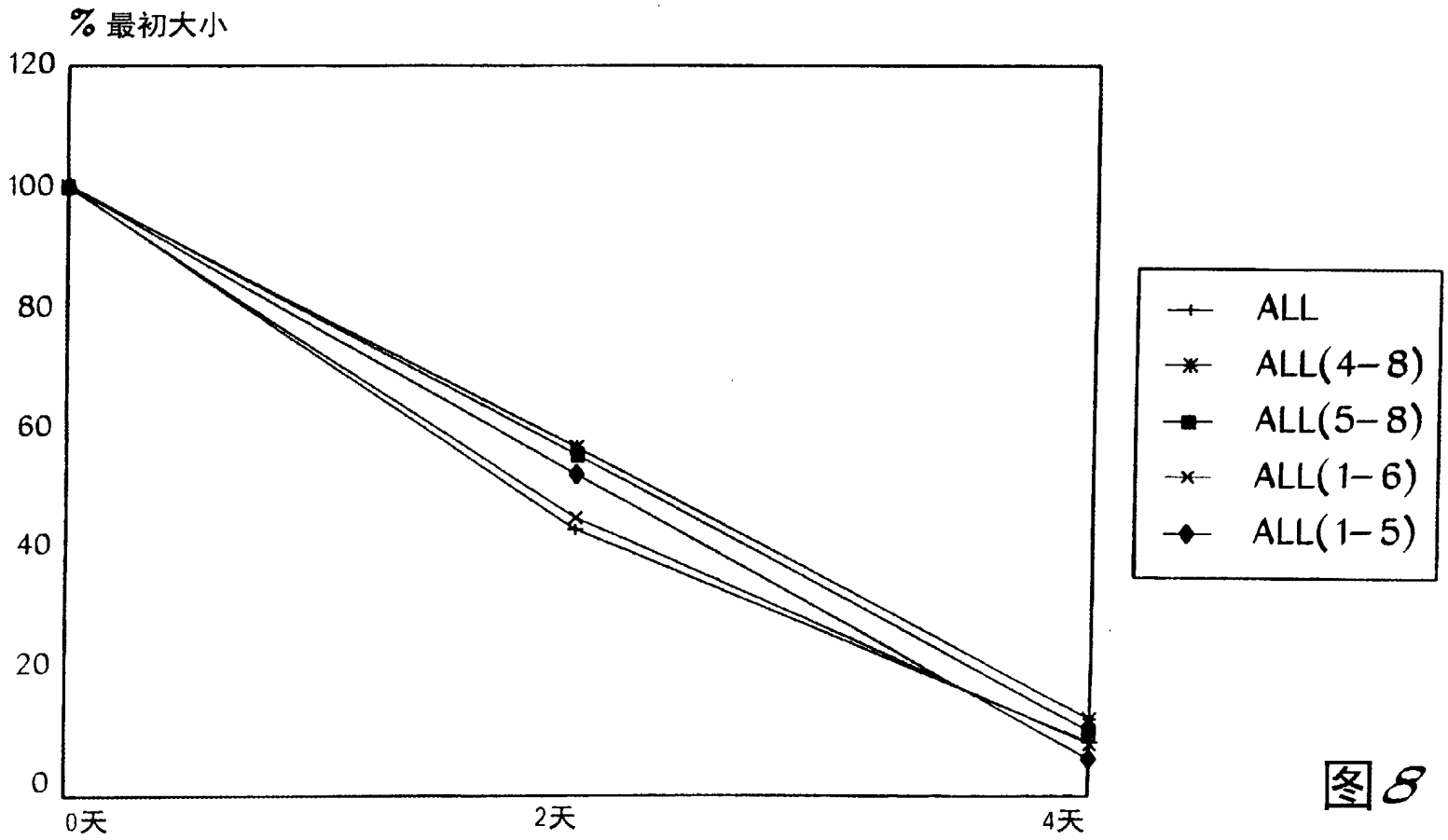

图8

肉芽

对照伤口

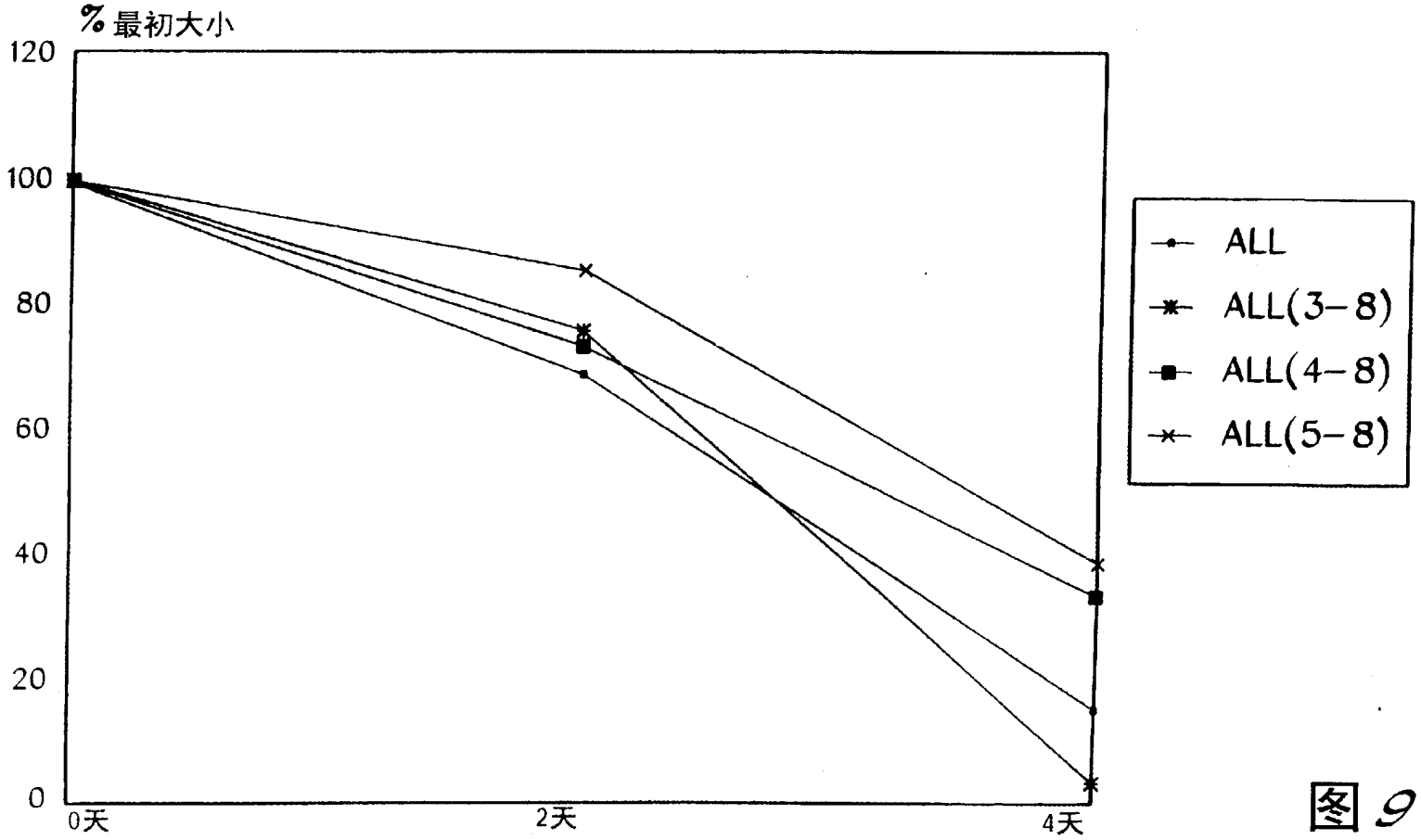

图 9

肉芽

治疗的伤口

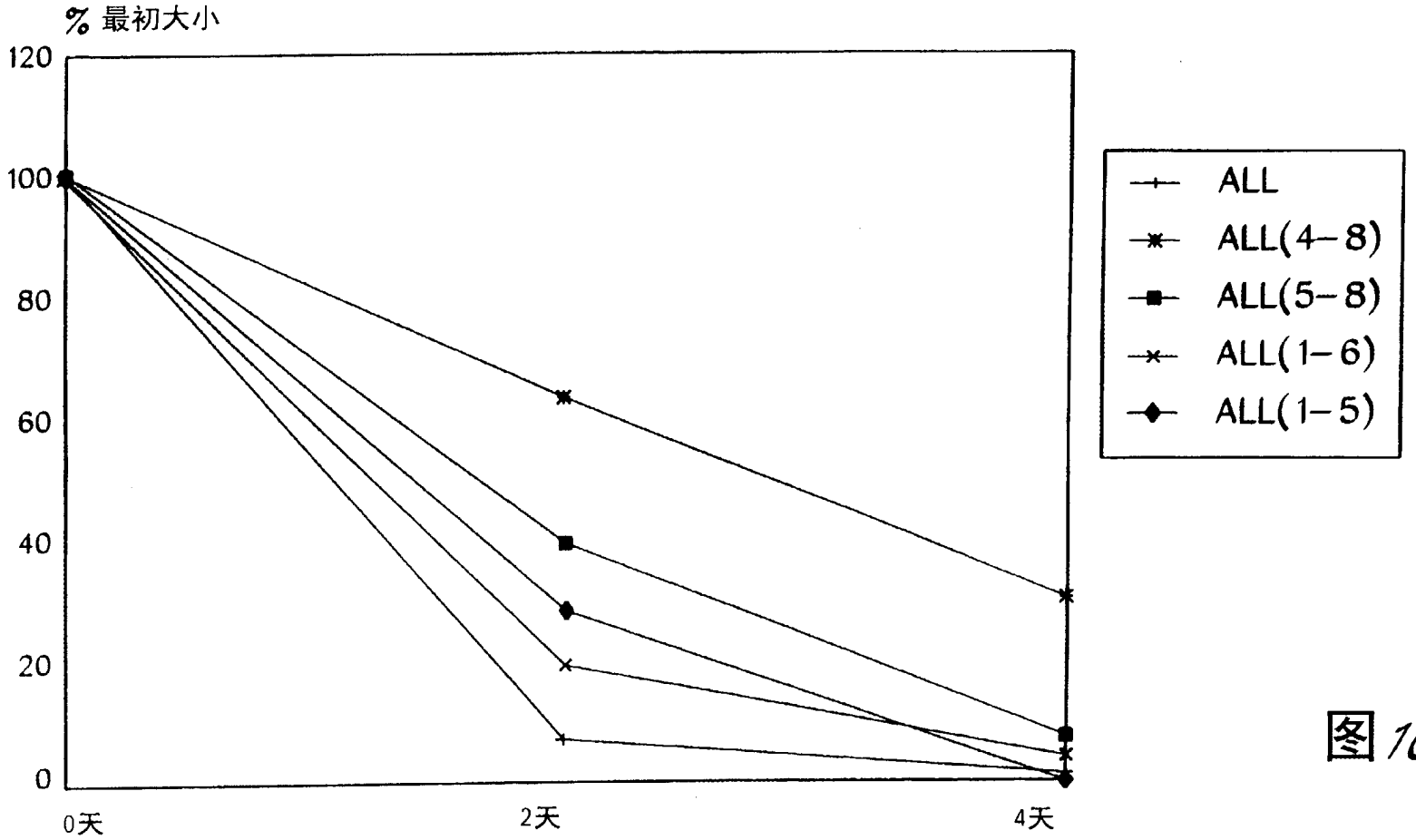

图10

肉芽组织

治疗的伤口

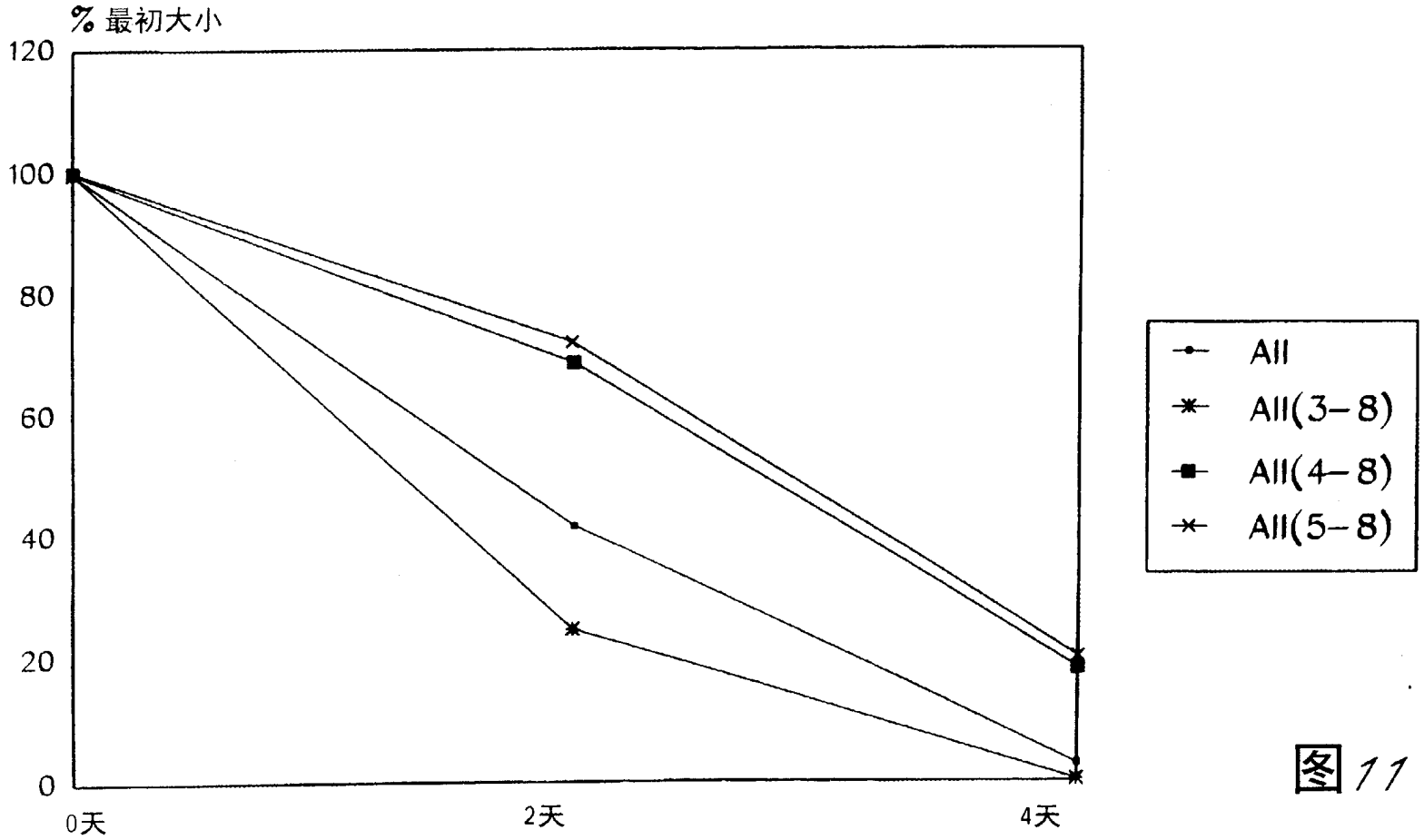

图11

肉芽

对照伤口

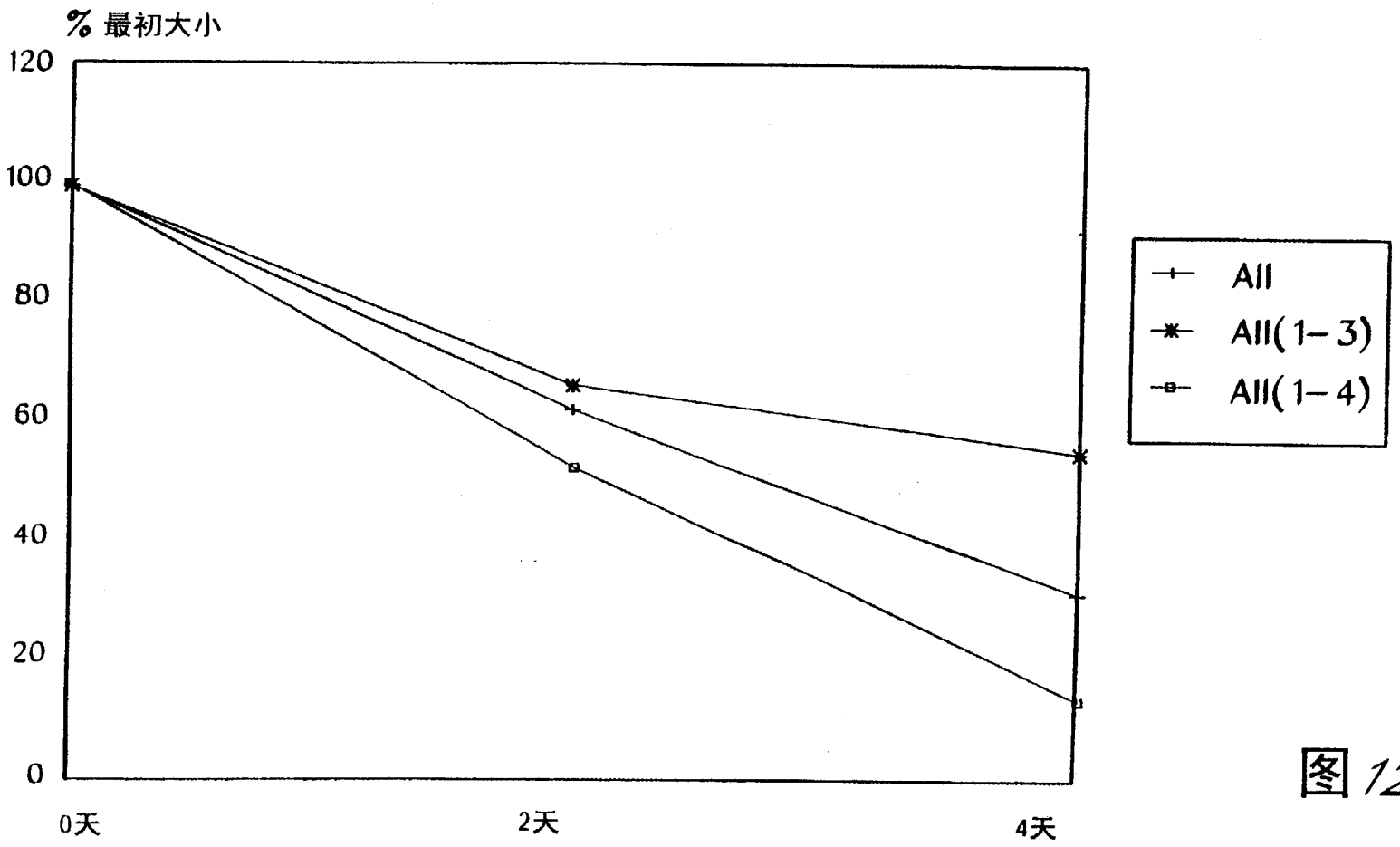

图 12

肉芽

治疗的伤口

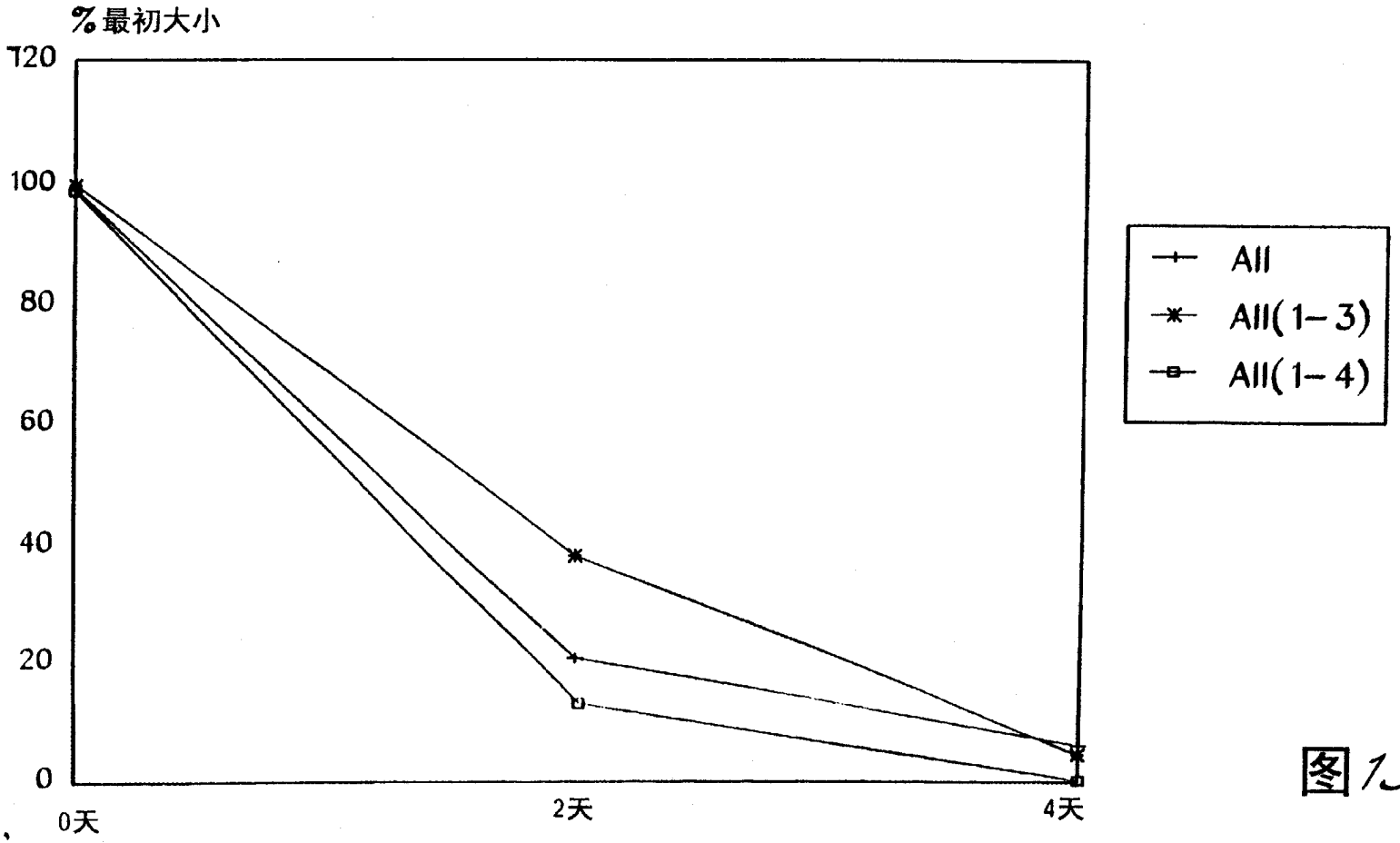

图13

对照大小

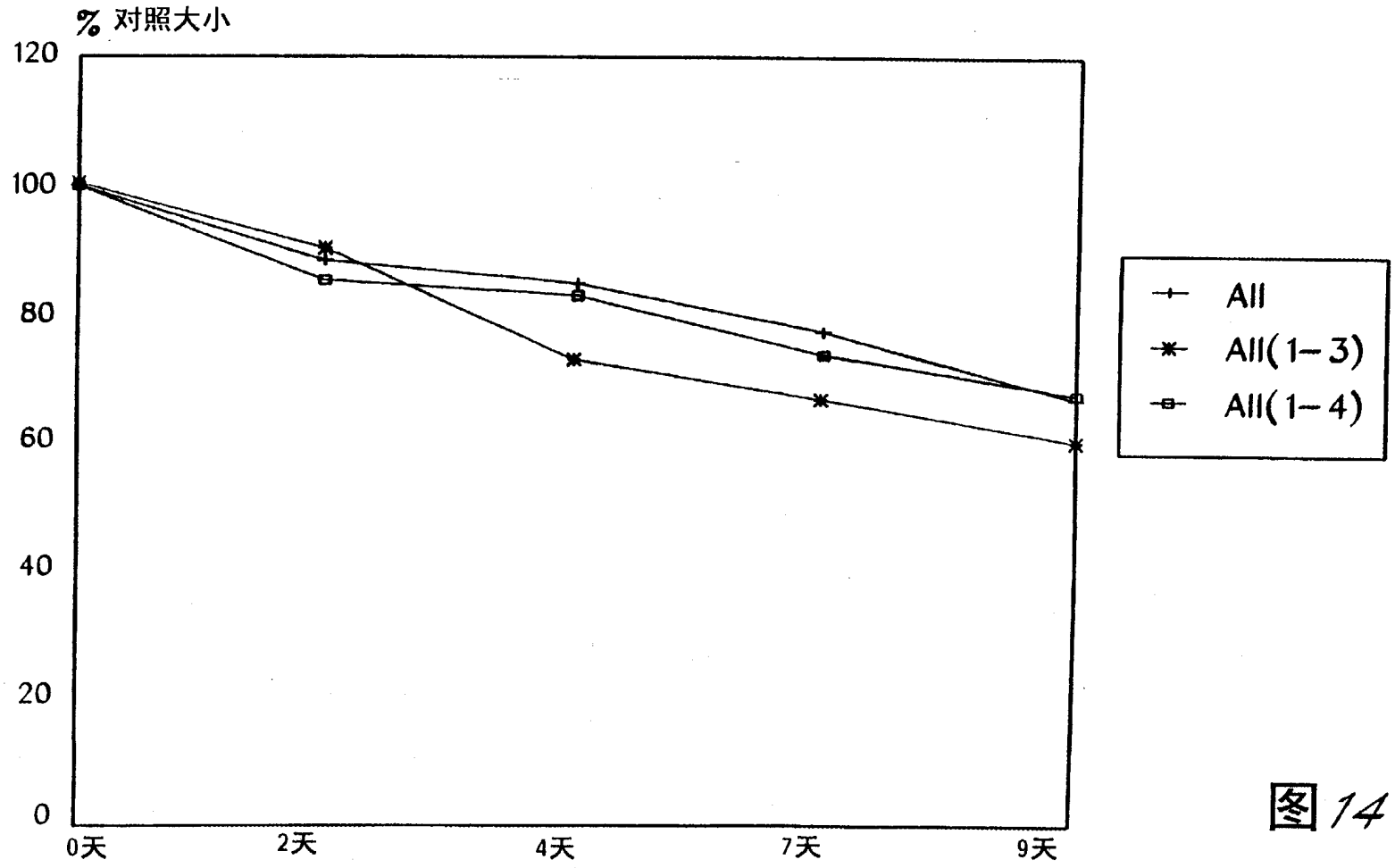

图 14