



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101835486 B

(45) 授权公告日 2012. 12. 12

(21) 申请号 200880101239. 0

A61K 31/403 (2006. 01)

(22) 申请日 2008. 07. 30

A61K 31/404 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 31/7088 (2006. 01)

60/962, 706 2007. 07. 30 US

A61P 17/02 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2010. 01. 29

CN 1852722 A, 2006. 10. 25,

(86) PCT申请的申请数据

WO 2007075911 A2, 2007. 07. 05,

PCT/IL2008/001049 2008. 07. 30

WO 0209639 A2, 2002. 02. 07,

(87) PCT申请的公布数据

US 2006258562 A1, 2006. 11. 16,

WO2009/016629 EN 2009. 02. 05

WO 2007026356 A2, 2007. 03. 08,

(73) 专利权人 希尔洛有限公司

PIERRE E J ET AL.: "EFFECTS OF INSULIN

地址 以色列雷科沃特

ON WOUND HEALING". 《JOURNAL OF TRAUMA》. 1998, 第 44 卷 (第 2 期), 342-345.

(72) 发明人 T·滕宁鲍姆 L·布赖曼-维克斯曼

审查员 周洋

I·索罗莫尼克 O·莱维-哈查姆

E·布雷纳

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司

11332

代理人 杨生平 钟锦舜

(51) Int. Cl.

A61K 38/28 (2006. 01)

A61K 38/08 (2006. 01)

A61K 38/17 (2006. 01)

A61K 31/553 (2006. 01)

权利要求书 4 页 说明书 31 页

序列表 24 页 附图 17 页

(54) 发明名称

用于治疗创伤的药物组合物以及相关方法

(57) 摘要

本发明公开用于加速创伤愈合、增加皮肤创伤闭合以及减少皮肤创伤部位感染的组合物和方法。具体而言, 本发明涉及包含 δ -PKC 活化剂、 α -PKC 抑制剂和不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的药学上可接受的载体的组合物。本发明还涉及包含胰岛素或胰岛素类似物和不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的药学上可接受的载体的组合物。

1. 组合物,其包含 δ -PKC 活化剂、PKC α 假底物抑制肽和不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的药学上可接受的载体,其中所述的 δ -PKC 活化剂是选自由胰岛素、赖脯胰岛素、天冬胰岛素、甘精胰岛素、内脏脂肪素和 L- α -磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸,二棕榈酰基-,七铵盐组成的组中的至少一种。

2. 权利要求 1 的组合物,其中所述的胰岛素是选自由人胰岛素、牛胰岛素和猪胰岛素组成的组中的至少一种。

3. 权利要求 2 的组合物,其中所述的胰岛素是重组表达的。

4. 权利要求 1 的组合物,其中所述 PKC α 假底物抑制肽选自由以下中所示的氨基酸序列的肽组成的组中的至少一种:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54 和 SEQ ID NO:55。

5. 权利要求 1 的组合物,其中所述 PKC α 假底物抑制肽是由 SEQ ID NO:25 中所示的氨基酸序列组成的肽,其在其氨基末端处具有豆蔻酰化的氨基酸残基,并且在其羧基末端处被酰胺化。

6. 权利要求 1 的组合物,其中所述 PKC α 假底物抑制肽是由 SEQ ID NO:1 中所示的氨基酸序列组成的肽,其在其氨基末端处具有豆蔻酰化的氨基酸残基。

7. 权利要求 1、2、3、4、5 或 6 的组合物,其中所述的不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的药学上可接受的载体是包含 0.2g/L KCl、0.2g/L 无水 KH_2PO_4 、8g/L NaCl 和 1.15g/L 无水 Na_2HPO_4 的水性载体。

8. 组合物,其包含胰岛素、由 SEQ ID NO:1 中所示的氨基酸序列组成的并且在其氨基末端处具有豆蔻酰化的氨基酸残基的肽以及包含 0.2g/L KCl、0.2g/L 无水 KH_2PO_4 、8g/L NaCl 和 1.15g/L 无水 Na_2HPO_4 的不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的水性药学上可接受的载体。

9. 权利要求 8 的组合物,其包含 0.0001 单位/L 至 0.1 单位/L 的胰岛素和 1 μM 至 100 μM 的所述肽。

10. 权利要求 9 的组合物,其包含 0.0001 单位/L 的胰岛素和 1 μM 的所述肽。

11. 组合物,其包含 δ -PKC 活化剂、PKC α 假底物抑制肽、不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的药学上可接受的载体以及药物流出支架,其中所述的 δ -PKC 活化剂是选自由胰岛素、赖脯胰岛素、天冬胰岛素、甘精胰岛素、内脏脂肪素和 L- α -磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸,二棕榈酰基-,七铵盐组成的组中的至少一种。

12. 权利要求 11 的组合物,其中所述的药物流出支架包含多孔固体。

13. 权利要求 12 的组合物,其中所述的胰岛素是选自由人胰岛素、牛胰岛素和猪胰岛素组成的组中的至少一种。

14. 权利要求 13 的组合物,其中所述的胰岛素是重组表达的。

15. 权利要求 12 的组合物,其中所述的 PKC α 假底物抑制肽选自以下中所示的氨基酸序列的肽组成的组中的至少一种:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54 和 SEQ ID NO:55。

16. 权利要求 12 的组合物,其中所述的 PKC α 假底物抑制肽是由 SEQ ID NO:25 中所示的氨基酸序列组成的肽,其在其氨基末端处具有豆蔻酰化的氨基酸残基,并且在其羧基末端处被酰胺化。

17. 权利要求 12 的组合物,其中所述的 PKC α 假底物抑制肽是由 SEQ ID NO:1 中所示的氨基酸序列组成的肽,其在其氨基末端处具有豆蔻酰化的氨基酸残基。

18. 权利要求 17 的组合物,其包含 0.0001 单位/L 至 0.1 单位/L 的胰岛素和 1 μ M 至 100 μ M 的所述肽。

19. 权利要求 17 的组合物,其包含 0.0001 单位/L 的胰岛素和 1 μ M 的所述肽。

20. 权利要求 11-19 中任一项的组合物,其中所述的药物流出支架是海绵。

21. 权利要求 20 的组合物,其包含不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的药学上可接受的载体,该药学上可接受的载体包含 0.2g/L KCl、0.2g/L 无水 KH_2PO_4 、8g/L NaCl 和 1.15g/L 无水 Na_2HPO_4 。

22. 由包括以下步骤的方法制得的药物组合物:

a) 提供 δ -PKC 活化剂、PKC α 假底物抑制肽以及不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的药学上可接受的载体;以及

b) 混合所述 δ -PKC 活化剂、PKC α 假底物抑制肽以及不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的药学上可接受的载体;

由此制得药物组合物,

其中所述的 δ -PKC 活化剂是选自由胰岛素、赖脯胰岛素、天冬胰岛素、甘精胰岛素、内脏脂肪素和 L- α -磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸,二棕榈酰基-,七铵盐组成的组中的至少一种。

23. 权利要求 22 的药物组合物,其中所述的胰岛素是选自由人胰岛素、牛胰岛素和猪胰岛素组成的组中的至少一种。

24. 权利要求 23 的药物组合物,其中所述的胰岛素是重组表达的。

25. 权利要求 22 的药物组合物,其中所述的 PKC α 假底物抑制肽选自以下中所示的氨基酸序列的肽组成的组中的至少一种:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:

11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54 和 SEQ ID NO:55。

26. 权利要求 22 的药物组合物,其中所述的 PKC α 假底物抑制肽是由 SEQ ID NO:25 中所示的氨基酸序列组成的肽,其在其氨基末端处具有豆蔻酰化的氨基酸残基,并且在其羧基末端处被酰胺化。

27. 权利要求 22 的药物组合物,其中所述的 PKC α 假底物抑制肽是由 SEQ ID NO:1 中所示的氨基酸序列组成的肽,其在其氨基末端处具有豆蔻酰化的氨基酸残基。

28. 权利要求 27 的药物组合物,其包含 0.0001 单位/L 至 0.1 单位/L 的胰岛素和 1 μ M 至 100 μ M 的所述肽。

29. 权利要求 27 的药物组合物,其包含 0.0001 单位/L 的胰岛素和 1 μ M 的所述肽。

30. 权利要求 22-29 中任一项的药物组合物,其中所述的不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的药学上可接受的载体是包含 0.2g/L KCl、0.2g/L 无水 KH_2PO_4 、8g/L NaCl 和 1.15g/L 无水 Na_2HPO_4 的水性载体。

31. 组合物,其包含 δ -PKC 活化剂、PKC α 假底物抑制肽和含有 K^+ 阳离子而不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的药学上可接受的载体,其中所述的 δ -PKC 活化剂是选自由胰岛素、赖脯胰岛素、天冬胰岛素、甘精胰岛素、内脏脂肪素和 L- α -磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸,二棕榈酰基-,七铵盐组成的组中的至少一种。

32. 权利要求 31 的组合物,其中所述的胰岛素是选自由人胰岛素、牛胰岛素和猪胰岛素组成的组中的至少一种。

33. 权利要求 32 的组合物,其中所述的胰岛素是重组表达的。

34. 权利要求 31 的组合物,其中所述的 PKC α 假底物抑制肽选自由以下中所示的氨基酸序列的肽组成的组中的至少一种:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54 和 SEQ ID NO:55。

35. 权利要求 31 的组合物,其中所述的 PKC α 假底物抑制肽是由 SEQ ID NO:25 中所示的氨基酸序列组成的肽,其在其氨基末端处具有豆蔻酰化的氨基酸残基,并且在其羧基

末端处被酰胺化。

36. 权利要求 31 的组合物,其中所述的 PKC α 假底物抑制肽是由 SEQ IDNO:1 中所示的氨基酸序列组成的肽,其在其氨基末端处具有豆蔻酰化的氨基酸残基。

37. 组合物,其包含 δ -PKC 活化剂和含有 K^+ 阳离子而不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的药学上可接受的载体,其中所述的 δ -PKC 活化剂是选自由胰岛素、赖脯胰岛素、天冬胰岛素、甘精胰岛素、内脏脂肪素和 L- α -磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸,二棕榈酰基-,七铵盐组成的组中的至少一种。

38. 权利要求 37 的组合物,其中所述的胰岛素是选自由人胰岛素、牛胰岛素和猪胰岛素组成的组中的至少一种。

39. 权利要求 38 的组合物,其中所述的胰岛素是重组表达的。

用于治疗创伤的药物组合物以及相关方法

[0001] 优先权

[0002] 本申请要求 2007 年 7 月 30 日提交的标题为“药物组合物”的美国临时专利申请 60/962,706 号的优先权,在此将其全文引入本文作为参考。

发明领域

[0003] 本公开涉及用于加速创伤愈合、增加皮肤创伤闭合以及减少皮肤创伤部位感染的组合物和方法。

背景技术

[0004] 皮肤是复杂的组织,其构成为不同的层,即表皮、真皮和皮下组织,每一个都拥有不同的细胞特征和生理重要性 (Fuchs 和 Byrne 1994 ;Goldsmith 1991)。

[0005] 表皮是分层的鳞状上皮组织,其中严格区分了进行生长和分化的细胞 (Fuchs 和 Byrne 1994)。在正常的生理阶段,增殖被限制到与基底膜相粘附的基底细胞。分化是一个空间过程,其中基底细胞丧失了其与基底膜的粘附,停止 DNA 合成并进行一系列形态和生物化学改变。最终的成熟步骤是角质层的产生,其形成了皮肤的保护屏障 (Tennenbaum 等, 1991 ;Wysocki 1999)。

[0006] 真皮主要由基质纤维构成并含有各种细胞类型。此外,所有的皮肤附属部分,即微脉管系统、汗腺和皮脂腺、感觉神经和毛囊均位于真皮中。真皮起到了支持皮肤营养、维持真皮和下述途径的作用,其中通过该途径信号从身体的其它部分到达外部层 (Green 1977 ; Wysocki 1999)。皮下组织是皮肤的最深层,其主要由脂肪细胞组成,也被称为皮下脂肪层。直到最近,还认为这一层具有隔离外部温度变化的作用并且给皮肤的上层提供机械支持 (Nash 等 2004 ;Querleux 等 2002)。

[0007] 在皮肤中,分层表皮的持续更新是由导致产生没有活力的、角质化的鳞的顺序的且高度特化的过程维持的,所述鳞与衍生自分泌的片层体的脂质一起构成了身体的保护性水屏障。正在增殖的基底细胞与表皮特异性的基底膜粘附。角质化细胞的分化过程与和基底膜接触的细胞的丧失紧密相关;当基底细胞迁移至更外表的棘层时,它们丧失了增殖能力。进一步成熟为颗粒细胞区域,随后形成硬的角质化的包层,这与细胞内细胞器的自溶以及程序性细胞死亡相关联,产生成熟的鳞 (Adams 和 Watt1990 ;Eckert 1989 ;Yuspa 等 1980)。

[0008] 开放的皮肤创伤通常通过包括 6 个主要要素的过程愈合:(i) 发炎;(ii) 成纤维细胞增殖;(iii) 血管增生;(iv) 结缔组织合成;(v) 上皮形成;以及(vi) 创伤收缩。当这些要素个别地或作为整体不恰当地发挥作用时,创伤愈合即会受损。许多因素可影响创伤愈合,包括营养不良、感染、药剂(例如,放线菌素和类固醇)、高龄和糖尿病 (Keast 和 Orsted 1998 ;Kirsner 和 Eaglstein 1993 ;Williams 和 Armstrong 1998)。

[0009] 糖尿病 (Diabetes mellitus) 是糖尿病 (Diabetes) 的常见形式,其特征在于受损的胰岛素信号传导、升高的血浆葡萄糖和在若干个特定组织上发生慢性并发症的易感性。

在所有糖尿病的慢性并发症中,导致足部溃烂的受损的创伤愈合是研究最少的 (Goodson 和 Hunt 1979 ;Grunfeld1992)。然而糖尿病患者的皮肤溃疡花费了大量人力和财力。而且,足部溃烂以及尔后的下肢截断是最常见的糖尿病患者住院的原因。在糖尿病中,创伤愈合过程受到损坏,以及愈合的创伤的特征在于创伤强度减小 (Shaw 和 Boulton 1997)。组织修复中的缺陷与几种因素有关,这些因素包括神经病、血管病和感染 (Mousley 2003 ;Silhi 1998)。但是,尚不明其它机制,通过该机制,与反常的胰岛素信号传导相关的糖尿病状态损坏创伤的愈合并改变皮肤生理。还有一个普遍存在的问题是在身体各个部分中的外科手术之后的创伤愈合受到年龄和诸如糖尿病和肥胖病等的慢性病发展的影响。在外科手术设置中,三分之一的患者由于它们的生理状态以及在创伤部位的相关感染的发展而延迟创伤愈合 (Diegelmann 和 Evans 2004)。

[0010] 皮肤创伤通常在包括马、狗、猫和家畜的动物中被发现。在动物创伤中,有各种常见的疾病提示需要创伤管理。因此,兽医皮肤病学是兽医医学中增长最快的学科之一。

[0011] 一般而言,许多这些创伤通过第二期愈合而治愈。这一过程花费很长的时间,尤其是涉及四肢时尤其如此。在动物中,以及在人类中,创伤愈合过程可能因诸如污染、感染或骨间裂隙的因素而被复杂化,这些因素通常是延长愈合时间或不恰当的创伤闭合的原因 (Grunfeld 1992 ; Knol 和 Wisselink 1996 ;Yeruham 等,1992 ;Yim 等,2007)。

[0012] 典型地,创伤愈合需要诱导 (活化) 新表皮和肉芽组织的形成以及减少感染。这些过程在动物中对于各种急性和慢性创伤,诸如手术后创伤、肢端舔的溃疡和糖尿病溃疡等的愈合也是必要的。马遭受由肉芽组织过剩引起的慢性创伤 (例如,“赘肉”),其中成纤维细胞增殖和血管发生均病理学地升高。这一反常的肉芽组织过度生长在上皮组织水平之上,并且物理地阻断邻近皮肤的接近,否则该邻近皮肤可能生长在这一区域之上。成纤维细胞的这一不受控制的生长的机制还是未知的。仅有的可利用的治疗涉及手术移除过度无约束的组织、压力包扎和皮质类固醇。该治疗花费延长的时间 (5-8 个月) 并且病损常常复发 (De、我和 Theoret2004 ;Stone 1986)。

[0013] 动物中其它特定的病理包括狗中的肢端舔的皮肤炎和咬的溃疡。肢端舔的皮肤炎是狗中常见的问题,其是指与狗病损相关的增加的变红、粗糙、有弹力的组织,其产生自相同区域的反复舔。尽管在肢端舔的皮肤炎的治疗中有许多策略,但是治愈率和效果都还不足并且在许多情况下会发生溃疡的复发 (White 1990 ;Yeruham 等 1992)。

[0014] 蛋白激酶 C(PKC) 是磷脂依赖性酶家族,其催化磷酸从 ATP 共价转移至蛋白质的丝氨酸和苏氨酸残基上,并且其在调节皮肤生理中起着重要的作用。底物蛋白质的磷酸化诱导构象改变,其导致它们功能性质的修饰。到目前为止,发现了 11 种同种型参与各种细胞功能和调节增殖、分化、细胞存活和死亡的信号转导路径 (Nishizuka 1995)。特异性辅因子的需求、组织定位和细胞区室化提示对于每一同种型的不同功能和特定信号传导级联的精确调谐。因此,通过由它们在特定生物设定中的表达、定位和磷酸化状态调节的同种型特异性的 PKC 信号,特异性的刺激可以导致不同的反应。PKC 同种型被各种细胞外信号活化,并且依次修饰细胞蛋白质的活性,所述蛋白质包括受体、酶、细胞骨架蛋白和转录因子。因此,PKC 家族在细胞信号处理中起着中心作用。

[0015] 丝氨酸 / 苏氨酸激酶的蛋白激酶 C(PKC) 家族的原型首先被 Nishizuka 及其同事 (Kikkawa 等,1989) 描述,它们首先发现了被作为磷脂酰肌醇的降解产物的二酰基甘油

(DAG) 活化的 PKC (Castagna 等, 1982)。其它研究揭示了 PKC 是促进肿瘤的佛波酯的细胞内受体。

[0016] 所有的 PKC 家族成员共有一个结构骨架, 其可被划分为两个主要的结构域: 处于 N 端的调节结构域和处于 C 端的催化结构域。将这些区域分类为保守区 (C1-C4) 和在同种型之间变化的区 (V1-V5) (Nishizuka 1988), 同上。此外, PKC 在调节区还展示出与底物识别基序密切相似的假底物结构域, 其封闭识别位点并阻止活化 (Blumberg 1991; House 和 Kemp 1987)。基于它们的结构特征和辅因子需求, 可将 PKC 同种型家族划分为 3 个大组。它们包括典型的 cPKC (α 、 β I、 β II 和 γ)、新的 nPKC (δ 、 ϵ 、 η 、 θ) 和非典型的 aPKC (ζ 和 ι/λ) 同种型 (Azzì 等 1992; Kikkawa 等 1989; Svetek 等 1995)。

[0017] 对于它们的活化, 所有同种型均需要磷脂双层的成分。典型的 cPKC 是钙 (Ca^{2+}) 依赖性的, 并且对于活化还需要 DAG 或 DAG 类似物诸如佛波酯。新的 nPKC 不依赖于 Ca^{2+} , 但对于最大化活化仍需要 DAG 或佛波酯 (Kazanietz 等 1993)。非典型的 aPKC 不依赖于 Ca^{2+} , 也不需要 DAG 或佛波酯, 但对于活化需要磷脂酰丝氨酸 (Chauhan 等 1990)。此外, 底物识别的主要部件是在调控结构域内的假底物区, 其控制与细胞信号中 PKC 同种型的特异性活性有牵连的调控机制, 并且与不同靶底物的磷酸化相关联 (Eichholtz 等 1993; Hofmann 1997)。

[0018] 已经在体内在皮肤表皮中和在培养的角质化细胞中鉴定了五种 PKC 同种型 (α 、 δ 、 ϵ 、 η 和 ζ)。然而, 在皮肤的真皮层中检测到了诸如 β 和 γ 的其它 PKC 同种型。此外, PKC 同种型的类型和 PKC 分布模式在不同的组织中不同, 并且可能还作为表现型的函数而变化。重要的是, 在体内和体外中, PKC 同种型均分布在基底和分化的皮肤角质化细胞中, 并且可能在创伤愈合中起着重要的作用。

[0019] 因此, 需要调控 PKC 活性以帮助治疗皮肤创伤和其它慢性创伤的改进的组合物和方法。

[0020] 公开概述

[0021] 本公开大体上涉及含有不含钙及镁离子的生物活性的皮肤创伤愈合剂和或抗炎剂的药物组合物, 并且还涉及使用该药物组合物治疗皮肤创伤和 / 或炎症的方法。该药物组合物优选地适用于局部或本地给药, 尤其是皮下给药。

[0022] 本公开的一个方面是包含 δ -PKC 活化剂、 α -PKC 抑制剂和不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的药学上可接受的载体的药物组合物。

[0023] 本公开的另一方面是包含胰岛素、由 SEQ ID NO:1 中所示氨基酸序列组成的并且在其氨基末端处具有豆蔻酰化的氨基酸残基的肽以及不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的水性的药学上可接受的载体的组合物, 其中所述的药学上可接受的载体包含 0.2g/L KCl、0.2g/L 无水 KH_2PO_4 、8g/L NaCl 和 1.15g/L 无水 Na_2HPO_4 。

[0024] 所述药学上可接受的载体优选地包括适于缓冲该组合物的磷酸盐或含有磷酸盐的化合物。特别优选的实施方案包括 0.2L KCl、0.2g/L 无水 KH_2PO_4 、8g/L NaCl 和 1.15g/L 无水 Na_2HPO_4 。此类药学上可接受的载体也是本发明的一个方面, 并且可以通过混合所需要的组分以提供不含有钙或镁离子的药学上可接受的载体而制备该载体。

[0025] 本公开的另一方面是包含 δ -PKC 活化剂、 α -PKC 抑制剂、不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的药学上可接受的载体以及药物流出支架的药物组合物。

[0026] 本公开的另一方面是由包括以下步骤的方法制得的药物组合物: 提供 δ -PKC 活

化剂、 α -PKC 抑制剂以及不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的药学上可接受的载体；以及混合所述 δ -PKC 活化剂、 α -PKC 抑制剂以及不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的药学上可接受的载体；由此制得药物组合物。

[0027] 本公开的另一方面是用于增加动物皮肤创伤闭合的方法，其包括以下步骤：提供包含 δ -PKC 活化剂、 α -PKC 抑制剂和不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的药学上可接受的载体的药物组合物；以及向动物上的皮肤创伤给药有效量的该药物组合物；由此增加皮肤创伤的闭合。

[0028] 本公开的另一方面是减少动物皮肤创伤部位上的炎症的方法，其包括以下步骤：提供包含 δ -PKC 活化剂、 α -PKC 抑制剂和不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的药学上可接受的载体的药物组合物；以及向动物上的皮肤创伤给药有效量的该药物组合物；由此减少皮肤创伤部位的炎症。

[0029] 本公开的另一方面是包含胰岛素或胰岛素类似物和不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的药学上可接受的载体的组合物。

[0030] 本发明的另一方面是包含约 0.0001 单位/L 至 0.1 单位/L 的胰岛素和不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的药学上可接受的载体的组合物。

[0031] 本发明的另一方面是用于增加动物创伤闭合的方法，其包括以下步骤：提供包含 δ -PKC 活化剂、 α -PKC 抑制剂和不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的药学上可接受的载体的药物组合物；以及向动物上的创伤给药有效量的该药物组合物，其中所述的创伤是选自糖尿病溃疡、肢端舔的创伤、赘肉创伤、外科手术创伤、慢性日光性脓肿创伤和骨髓炎创伤组成的组中的至少一种；由此增加皮肤创伤的闭合。

[0032] 本发明的另一方面是包含 δ -PKC 活化剂、 α -PKC 抑制剂和含有 K^+ 阳离子而不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的药学上可接受的载体的药物组合物。

[0033] 本发明的另一方面是包含 δ -PKC 活化剂和含有 K^+ 阳离子而不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的药学上可接受的载体的药物组合物。

[0034] 本发明的另一方面是包含 α -PKC 抑制剂和不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的药学上可接受的载体的药物组合物。

[0035] 本发明的另一方面是减少动物上的皮肤创伤部位的炎症的方法，其包括以下步骤：提供包含 α -PKC 抑制剂和不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的药学上可接受的载体的药物组合物；以及向动物上的皮肤创伤给药有效量的该药物组合物；由此减少皮肤创伤部位的炎症。

[0036] 本发明的其它方面包括应用本发明的诸如本文描述的组合物促进肉芽组织的形成、表皮增殖和皮肤生长。

[0037] 最后，本文公开的组合物可以完全不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子，或含有不含这些阳离子的药学上可接受的载体。

[0038] 附图简述

[0039] 图 1A 提供了细胞培养皿的照片，其显示了应用所指示的在不同的制剂中配制的药物组合物的体外创伤愈合效力。（在 Axiovert 25 Zeiss 显微镜下放大 50 倍）。

[0040] 图 1B 以处理 24 小时后的闭合百分比显示了创伤闭合。

[0041] 图 2A 是显示了在制剂 A 中的药物组合物促进显著的创伤闭合的图。

- [0042] 图 2B 是采用各种制剂处理后的代表性创伤的照片。
- [0043] 图 3 是显示了在各种制剂中处理后的创伤部位的炎症负担的图。
- [0044] 图 4 是显示了采用各种制剂处理后的肉芽组织形成的图。
- [0045] 图 5 是显示了在各种制剂中 Myr- 假底物 PKC α 肽抑制 PKC α 活性的能力的图。
- [0046] 图 6A 是细胞培养皿的放大图（在 Axiovert 25 Zeiss 显微镜下放大 200 倍），其显示了在各种制剂中胰岛素对创伤闭合及细胞增殖的影响。
- [0047] 图 6B 是显示了以采用各种制剂在胰岛素存在或不存在的条件下处理 24 小时后占对照的百分比形式表示的体外创伤闭合的图。
- [0048] 图 6C 是显示了根据通过胸腺嘧啶掺入测量的细胞增殖的图。
- [0049] 图 7 是显示了在更换细胞培养基之前或之后胰岛素和胰岛素 +PKC α 抑制剂对来自 7 个月大至 2 年大的小鼠的角质化细胞增殖的影响的图。
- [0050] 图 8A 提供了显示采用在各种制剂中的药物组合物治疗慢性足溃疡及其增加的闭合的照片和图。
- [0051] 图 8B 是显示了在各种制剂中在第 0 天和第 60 天时患者的慢性糖尿病创伤的治疗和增加的闭合的照片。
- [0052] 图 9 提供了显示在第 0 天、3 个月和 6 个月时采用药物组合物治疗马慢性赘肉创伤的照片。
- [0053] 图 10 提供了显示在第 0、30 和 60 天用药物组合物治疗伴随骨髓炎的慢性日光性脓肿的照片。
- [0054] 图 11 提供了显示在第 0 天、2 个月和 3.5 个月时采用药物组合物治疗由自损伤引起的未愈合肢端舔的创伤的进展的照片。
- [0055] 图 12 是表示以商标 **HUMALOG®** 而为人所知的人类胰岛素类似物赖脯胰岛素（rDNA 起源）的一级结构的示意图。
- [0056] 图 13 是表示以商标 **NOVOLOG®** 而为人所知的人类胰岛素类似物天冬胰岛素（rDNA 起源）的一级结构的示意图。
- [0057] 图 14 是表示以商标 **LANTUS®** 而为人所知的人类胰岛素类似物甘精胰岛素（rDNA 起源）的一级结构的示意图。
- [0058] 图 15 是表示也以商标 **NOVOLIN® R** 而为人所知的人类胰岛素类似物 **HUMULIN® R** 的一级结构的示意图。
- [0059] 图 16 是显示了在用胰岛素类似物（单独在制剂 A 中提供的）治疗后通过表皮和肉芽组织的形成而测量的创伤愈合的百分比并与未治疗的对照创伤比较的图。所研究的胰岛素类似物是赖脯胰岛素（HumL）、天冬胰岛素（Novo）、甘精胰岛素（**LANTUS®**）和优泌林® R（HumR）。
- [0060] 图 17 是显示了单独用优泌林® R（HumR）、USP 胰岛素（Ins USP）和 PKC α 假底物抑制肽（pep）或与胰岛素类似物以及抑制肽组合治疗的、通过肉芽组织的形成测量的促进创伤愈合的图。
- [0061] 图 18 是显示了单独用优泌林® R（HumR）、赖脯胰岛素（HumL）和 PKC α 假底物抑制肽（pep）治疗或与胰岛素类似物以及抑制肽协同组合治疗的严重炎症的百分比的图。
- [0062] 图 19 是显示了在培养基 A 和培养基 B 中培养的原代皮肤角质化蛋白中，在用内脏

脂肪素 (visfatin) 或 L- α - 磷脂酰肌醇 -3,4,5- 三磷酸,二棕榈酰基 -,七铵盐处理后,在 7 个月大至 2 年大的小鼠角质化细胞中角蛋白 1 的表达的图。

[0063] 发明详述

[0064] 本公开的药物组合物包含药学上可接受的载体和 PKC α 抑制剂和 / 或胰岛素,其中所述的药学上可接受的载体包含在各种溶剂中的不同的无机盐和有机盐。

[0065] 示范性的药学上可接受的载体的制剂组合物可以含有水、钾、氯化钠和生理上可耐受的磷酸盐,并且可如下制备:

[0066] A) 氯化钾 0.2g/L (KCl)

[0067] B) 磷酸二氢钾 (无水) 0.2g/L (KH_2PO_4)

[0068] C) 氯化钠 8.0 (g/L) (NaCl)

[0069] D) 磷酸氢二钠 (无水) 1.15 (g/L) (Na_2HPO_4)

[0070] 该制剂必须不含有钙或镁离子。

[0071] 尽管可以使用任何 PKC α 抑制剂,但优选地该 PKC α 抑制剂为豆蔻酰化的相应于 PKC α 的假底物区的肽 (Myr*-Phe-Ala-Arg-Lys-Gly-Ala-Leu-Arg-Gln-OH (SEQ ID NO: 1 CAS[147217-25-2])). 该 PKC α 假底物区对这一特定同种型的底物区具有特别高的亲和力。可使用的其它 PKC 抑制剂的实例包括下列表 1 中所示的肽:

[0072] 表 1. PKC 抑制剂肽

[0073]

Arg Phe Ala Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Lys Asn Val	SEQ ID NO :2
Arg Phe Ala Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Lys Asn Val His Glu Val Lys Asn	SEQ ID NO :3
Arg Phe Ala Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Lys Asn Val His Glu Val Lys Asn Leu Lys Gly Ala	SEQ ID NO :4
Arg Phe Ala Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Leu Ala Val	SEQ ID NO :5
Arg Phe Ala Arg Lys Gly Ala Leu Ala Gln Lys Asn Val	SEQ ID NO :6
Arg Phe Ala Arg Lys Gly Ala Leu Arg	SEQ ID NO :7
Tyr Tyr Xaa Lys Arg Lys Met Ala Phe Phe Glu Phe Phe (Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸)	SEQ ID NO :8
Phe Lys Leu Lys Arg Lys Gly Ala Phe Lys Lys Phe Ala	SEQ ID NO :9
Ala Arg Arg Lys Arg Lys Gly Ala Phe Phe Tyr Gly Gly	SEQ ID NO :10
Arg Arg Arg Arg Arg Lys Gly Ala Phe Arg Arg Lys Ala	SEQ ID NO :11
Arg Phe Ala Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Lys Asn Val Tyr	SEQ ID NO :12
Asp Ala Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Asn Lys Val	SEQ ID NO :13
Glu Arg Met Arg Pro Arg Lys Arg Gln Gly Ala Val Arg Arg Arg Val	SEQ ID NO :14
Gly Pro Arg Pro Leu Phe Cys Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Lys Val Val	SEQ ID NO :15
Gln Lys Arg Pro Ala Gln Arg Ser Lys Tyr Leu	SEQ ID NO :16
Gln Lys Arg Pro Ser Gln Arg Ala Lys Tyr Leu	SEQ ID NO :17
Gly Gly Pro Leu Arg Arg Thr Leu Ala Val Arg Arg	SEQ ID NO :18
Gly Gly Pro Leu Ser Arg Arg Leu Ala Val Arg Arg	SEQ ID NO :19
Gly Gly Pro Leu Ser Arg Thr Leu Ala Val Arg Arg	SEQ ID NO :20
Gly Gly Pro Leu Ser Arg Arg Leu Ala Val Ala Arg	SEQ ID NO :21
Gly Gly Pro Leu Arg Arg Thr Leu Ala Val Ala Arg	SEQ ID NO :22
Val Arg Lys Ala Leu Arg Arg Leu	SEQ ID NO :23
Gly Gly Arg Leu Ser Arg Thr Leu Ala Val Ala Arg	SEQ ID NO :24

[0074]

Thr Arg Lys Arg Gln Pro Ala Met Arg Arg Arg Val His Gln Ile Asn Gly 这一肽在N端处被豆蔻酰化并且在C端处被酰胺化。	SEQ ID NO :25
Arg Lys Arg Gln Arg Ala Met Arg Arg Arg Val His	SEQ ID NO :26
Glu Arg Met Arg Pro Arg Lys Arg Gln Gly Ala Val Arg Arg Arg Val	SEQ ID NO :27
Phe Lys Leu Lys Arg Lys Gly Ala Phe Lys Lys Phe Ala	SEQ ID NO :28
Tyr Tyr Xaa Lys Arg Lys Met Ala Phe Phe Glu Phe Phe Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸	SEQ ID NO :29
Ala Arg Arg Lys Arg Lys Gly Ala Phe Phe Tyr Gly Gly	SEQ ID NO :30
Arg Arg Arg Arg Arg Lys Gly Ala Phe Arg Arg Lys Ala	SEQ ID NO :31
Ala Ala Ala Lys Ile Gln Ala Ala Trp Arg Gly His Met Ala Arg Lys Lys Ile Lys Ser	SEQ ID NO :32
Ala Ala Ala Lys Ile Gln Ala Ala Phe Arg Gly His Met Ala Arg Lys Lys Ile Lys	SEQ ID NO :33
Glu Arg Met Arg Pro Arg Lys Arg Gln Gly Ala Val Arg Arg Arg Val	SEQ ID NO :34
Val Arg Lys Ala Leu Arg Arg Leu	SEQ ID NO :35
Lys Lys Lys Lys Lys Arg Phe Ser Phe Lys Lys Ala Phe Lys Leu Ser Gly Phe Ser Phe Lys Lys	SEQ ID NO :36
Gly Pro Arg Pro Leu Phe Cys Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Lys Val Val	SEQ ID NO :37
Glu Ser Thr Val Arg Phe Ala Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Lys Asn Val	SEQ ID NO :38
Glu Arg Met Arg Pro Arg Lys Arg Gln Gly Ala Val Arg Arg Arg Val	SEQ ID NO :39
Arg Phe Ala Arg Leu Gly Ala Leu Arg Gln Lys Asn Val	SEQ ID NO :40
Tyr Tyr Xaa Lys Arg Lys Met Ala Phe Phe Glu Phe Phe Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸	SEQ ID NO :41
Arg Arg Phe Lys Arg Gln Gly Ala Phe Phe Tyr Phe Phe	SEQ ID NO :42
Phe Lys Leu Lys Arg Lys Gly Ala Phe Lys Lys Phe Ala	SEQ ID NO :43
Ala Arg Arg Lys Arg Lys Gly Ser Phe Phe Tyr Gly Gly	SEQ ID NO :44
Phe Lys Leu Lys Arg Lys Gly Ser Phe Lys Lys Phe Ala	SEQ ID NO :45
Arg Arg Phe Lys Arg Gln Gly Ser Phe Phe Tyr Phe Phe	SEQ ID NO :46
Tyr Tyr Xaa Lys Arg Lys Met Ser Phe Phe Glu Phe Phe Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸	SEQ ID NO :47
Arg Arg Arg Arg Arg Lys Gly Ser Phe Arg Arg Lys Ala	SEQ ID NO :48
Glu Arg Met Arg Pro Arg Lys Arg Gln Gly Ser Val Arg Arg Arg Val	SEQ ID NO :49
Met Asn Arg Arg Gly Ser Ile Lys Gln Ala Lys Ile	SEQ ID NO :50
Met Phe Ala Val Arg Asp Arg Arg Gln Thr Val Lys Lys Gly Val Ile Lys Ala Val Asp Ala Val	SEQ ID NO :51
Phe Gly Glu Ser Arg Ala Ser Thr Phe Cys Gly Thr Pro Asp	SEQ ID NO :52
Lys Ala Arg Leu Ser Tyr Ser Asp Lys Asn	SEQ ID NO :53
Ser Ala Phe Ala Gly Phe Ser Phe Val Asn Pro Lys Phe	SEQ ID NO :54
Lys Lys Lys Lys Lys Arg Phe Ser Phe Lys Lys Ser Phe Lys Leu Ser Gly Phe Ser Phe Lys Lys	SEQ ID NO :55

[0075]

[0076] 此外,以下 PKC 抑制剂也可在根据本发明的药物组合物中应用:

[0077] A) NPC 15437-二盐酸盐水合物 (Sigma), 也被称为 (S)-2,6-二氨基-N-[(1-(1-氧代十三烷基)-2-哌啶基)甲基]己酰胺二盐酸盐水合物。

[0078] 分子式 $-C_{25}H_{50}N_4O_2 \cdot 2HCl \cdot xH_2O$

[0079] 分子量 -511.61 (无水基础上)

[0080] CAS 号 -141774-20-1 (无水的)

[0081] MDL 号 -MFCD00210207

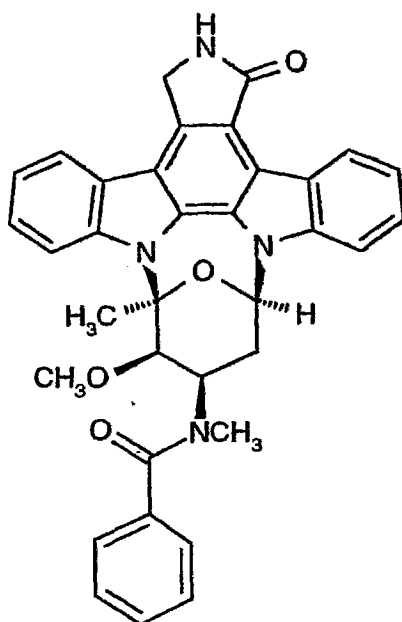
[0082] PubChem Substance ID-24897504

[0083] B) CGP41251-[4'-N-苯甲酰基星形孢菌素][米啉妥林]。该星形孢菌素衍生物 PKC412 (CGP 41251) 是蛋白激酶 C (CGP 41251) 的常规同种型的更具选择性的抑制剂。

[0084] 分子式 $-C_{35}H_{30}N_4O_4$

[0085] 分子量 -570.65

[0086]



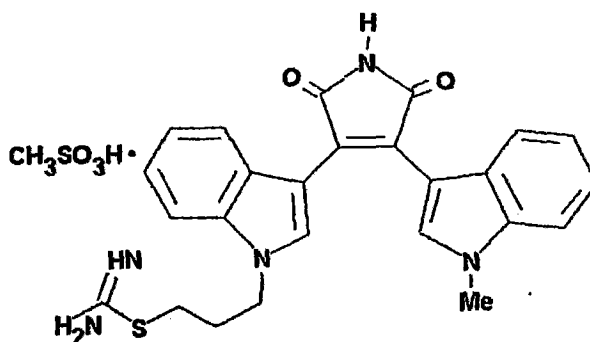
[0087] C) Ro 31-8220- 双吲哚基马来酰亚胺 IX, 甲磺酸盐 (Upstate Biotechnology)。

[0088] 分子式 $-C_{25}H_{23}N_5O_2S \cdot CH_4O_3S$

[0089] 分子量 -553.66

[0090] 目录号 #19-163, 结构式显示如下

[0091]



[0092] D) **Gö6976**, 其为 12-(2-氰基乙基)-6,7,12,13-四氢-13-甲基-5-氧代-5H-吲哚并[2,3-a]吡咯并[3,4-c]咪唑, 一种 α 和 PKC β 1 抑制剂。

[0093] E) GF-109203X 2-[1-(3-二甲基氨基丙基)-1H-吲哚-3-基]-3-(1H-吲哚-3-基)马来酰亚胺, 一种强有力的且选择性的蛋白激酶 C 抑制剂。

[0094] F) ISIS 3521/LY900003, 也被称为阿普卡生 (aprinocarsen), 20-核苷酸硫代磷酸脱氧寡核苷酸, 可购自 Isis Pharmaceuticals, Inc., Carlsbad, CA, 其具有以下序列 (SEQ ID NO: 56):

[0095] 5'-GTTCTCGCTGGTGAGTTTCA-3'

[0096] 在优选的实施方案中, 本公开的药物组合物包含药学上可接受的载体、活化 PKC δ 的常规胰岛素或其功能类似物以及商业上可获得的由 9 个氨基酸构成的抑制 PKC α 的合成肽。

[0097] 一种优选的药物组合物, 其包括:

[0098] a) 氯化钾 0.2g/L (KCl)

[0099] b) 磷酸二氢钾 (无水) 0.2g/L (KH_2PO_4)

[0100] c) 氯化钠 8.0(g/L) (NaCl)

[0101] d) 磷酸氢二钠 (无水) 1.15(g/L) (Na_2HPO_4)

[0102] e) 豆蔻酰化的肽 (1-100 μM), 诸如 $\text{Myr}^*\text{-Phe-Ala-Arg-Lys-Gly-Ala-Leu-Arg-Gln-OH}$ (SEQ ID NO:1)

[0103] f) 常规胰岛素或其功能类似物 (治疗剂量: 0.1-10 单位 /ml)

[0104] 上面列出的浓度是优选的在组合物中的最终浓度。

[0105] 可以通过在不含有钙和镁离子的药学上可接受的载体中混合胰岛素或其功能类似物和 PKC α 抑制剂来制备该药物组合物。预期可以通过本领域技术人员已知的方法以溶液、凝胶、软膏、霜剂或乳化剂的形式制备根据本公开的药物组合物。

[0106] 当配制在溶液中时, 两种生物活性成分即胰岛素和 PKC α 抑制肽一起作用以诱导创伤愈合。胰岛素或其功能类似物的浓度可以是 0.1-10 单位 /ml。PKC α 的肽抑制剂的浓度可以是 1 至 100 μM 。优选的浓度是在 1ml 溶液中 0.1 单位的胰岛素 (10^{-6}M) 和 1 μg 肽 (10^{-6}M)。

[0107] 用于根据本公开的药物组合物的胰岛素可以是重组的或来自天然来源, 诸如人类胰岛素或适于人类应用的非人类哺乳动物胰岛素。还预期可以用胰岛素类似物诸如胰岛素功能类似物来制备该药物组合物。胰岛素类似物的非限制性实例是赖脯胰岛素、天冬胰岛素、甘精胰岛素和重组的人胰岛素、内脏脂肪素和 L- α -磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸, 二棕榈酰基-, 七铵盐 (本文也称为 L- α)。

[0108] 这些胰岛素类似物中的一些与常规的人胰岛素共享基本的一级结构。赖脯胰岛素与人胰岛素不同, 因为在该类似物中 B-28 处的脯氨酸和 B-29 处的赖氨酸颠倒了。天冬胰岛素与人胰岛素不同是因为 B-28 处的脯氨酸被天冬氨酸替代了。甘精胰岛素与人胰岛素不同, 因为 A-21 位的氨基酸天冬酰胺被甘氨酸替代了, 并且将两个精氨酸残基添加到 β -链的 C-端。重组的人胰岛素可与人胰岛素在结构上相同并且通过 rDNA 技术来制备, 例如通过应用酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 以产生所述的肽。

[0109] 内脏脂肪素是脂质细胞因子, 其可作为胰岛素类似物而起作用并且是能够结合并活化胰岛素受体的胰岛素模拟物。L- α 是活化 Ca^{2+} -不敏感的 PKC 同工酶 δ 、 ϵ 和 η 的有机化合物。其通过血小板-白细胞 C 激酶底物同源性 (PH) 结构域与磷酸肌醇-1 (GRP1) 蛋白的通用受体结合, 并且还报道其增加 NIH/3T3 细胞的运动性以及产生肌动蛋白重组和膜边缘波动。

[0110] 在优选的实施方案中, 将治疗有效量的药物组合物给药到有需要的受试者。可通过有效地提供期望治疗的任何已知的给药途径给药该药物组合物, 优选地通过以溶液、软膏、凝胶、霜剂形式局部应用或任意局部应用 (诸如皮下注射) 来给药该药物组合物。还可通过药物流出装置, 诸如纱布、贴片、垫片或药棉来给药该药物组合物。

[0111] 根据本公开的本药物组合物的进一步方面是使用该药物组合物治疗受损的皮肤或皮肤创伤。应当以有序地治疗该创伤及达到期望端点 (例如, 直到创伤完全消除) 所需要的频率和所需要的时间长度来给药该组合物。本领域技术人员能很容易地确定应用根据本公开的组合物和方法的合适疗程。

[0112] 根据本公开的药物组合物的进一步方面是促进肉芽组织形成、表皮增殖和皮肤生

长。根据本公开的药物组合物的另一方面是治疗炎症,例如由炎性皮肤病引起的炎症的方法。

[0113] 本文中所使用的术语“ α -PKC 抑制剂”的意思是能够通过任何机制抑制 PKC α 同种型活性的分子。PKC α 同种型的实例包括由登录号 NM_002737[人 PKC α]、XM_548026[家犬 (*Canis lupus familiaris*) PKC α]、XM_001494589[马 (*Equus caballus*) PKC α] 和 NM_011101[小鼠 PKC α] 描述的核酸编码的 PKC α 同种型,或者与这些 PKC α 同种型的成熟形式至少 95% 同一的肽链,如应用 CLUSTALW 算法的缺省设置所确定的那样。 α -PKC 抑制剂分子可通过结合、共价修饰或涉及此类分子与 PKC α 同种型物理相互作用的其它机制而直接地抑制 PKC α 同种型。 α -PKC 抑制剂分子还可以通过调节参与 PKC α 同种型活化的第二分子的活性(例如通过调节 PKC α 同种型相关信号传导级联的成分的活性以抑制 PKC α 同种型的活性,或通过使阻止 PKC α 同种型表达的 RNA 沉默)而间接地抑制 PKC α 同种型。

[0114] 本文中所使用的术语“ δ -PKC 活化剂”意思是能够在细胞或组织中通过任何机制活化 PKC δ 同种型或增加 PKC δ 同种型活性的分子。PKC δ 同种型的实例包括由登录号 NM_006254[人 PKC δ]、XM_001008716[家犬 PKC δ]、XM_001915127[马 PKC δ] 和 NM_011103[小鼠 PKC δ] 描述的核酸编码的 PKC δ 同种型,或者与这些 PKC δ 同种型的成熟形式至少 85% 同一的肽链,如应用 CLUSTALW 算法的缺省设置所确定的那样。 δ -PKC 活化剂分子可通过结合、共价修饰或涉及此类分子与 PKC δ 同种型物理相互作用的其它机制来直接地活化 PKC δ 同种型,并且可包括 PKC δ 同种型底物和辅因子。 δ -PKC 活化剂分子还可通过调节参与 PKC δ 同种型活化的第二分子的活性来间接地活化 PKC δ 同种型(例如,通过调节 PKC δ 同种型相关的信号传导级联的成分,诸如胰岛素受体的活性来活化 PKC δ 同种型)。 δ -PKC 活化剂分子还可通过在细胞或组织中产生 PKC δ 同种型的升高的表达从而增加细胞或组织中的 PKC δ 同种型活性。

[0115] 本文中所使用的术语“药物流出支架”的意思是能够释放生理活性分子的固定材料。药物流出支架可以包含固定相材料,其可以是不溶的、可溶的、非生物可吸收的或生物可吸收的。

[0116] 本文中所使用的术语“胰岛素”的意思是那些天然存在的肽激素或它们的前胰岛素原和胰岛素原前体形式,在它们的成熟形式中,其包含二硫键连接的 A 链和 B 链,其可以活化胰岛素受体并且已知可用于治疗糖尿病。来自许多不同的动物物种,诸如人类、牛和猪的胰岛素是公知的,并且本领域技术人员可很容易地识别。重要的是,胰岛素可以是重组产生的。

[0117] 本文中所使用的术语“胰岛素类似物”的意思是包含没有在天然存在的胰岛素中发现的结构的分子,其能够通过任何机制活化胰岛素受体。此类分子可以是胰岛素的结构类似物,其中天然存在的胰岛素的一个或多个结构方面已经被修饰。此类分子还可以是模拟分子,其不包含在天然存在的胰岛素中发现的结构。胰岛素类似物还可以包括胰岛素样生长因子(例如,胰岛素样生长因子-1)。胰岛素类似物可通过结合、共价修饰或涉及与此类受体物理相互作用的其它机制而直接地活化胰岛素受体。胰岛素类似物还可通过调节参与此类受体活化的第二分子的活性而间接地活化胰岛素受体。不希望被理论所束缚,相信胰岛素受体的活化导致 PKC δ 的间接活化。许多不同的胰岛素类似物是已知的并且本领域技术人员很容易地识别。

[0118] 本文中所使用的术语“标准状态”的意思是 25°C $\pm$ 2°C 的温度以及 1 个大气压的压力。在本文中描述并且以每单位体积为基础表示（例如，mol/L、M、单位 /ml、 μ g/ml 等）的溶液、悬浮液和其它制剂的浓度均是在“标准状态”下被确定的。在本领域中术语“标准状态”不是用来指单个领域认可的温度或压力设置，而是一种参照状态，所述参照状态应用特定温度和压力以描述在参照“标准状态”条件下具有特定组成的溶液、悬浮液或其它制剂。这是因为溶液的体积部分地是温度和压力的函数。本领域技术人员将认识到可在其它温度和压力下制备与本文公开的那些组合物等价的组合物。

[0119] 本文中所使用的术语“药学上可接受的载体”的意思是适于向人或其它动物给药的一种或多种相容的固态或液态填充剂稀释剂或包封物质。

[0120] 本公开的一个方面是包含 δ -PKC 活化剂、 α -PKC 抑制剂和不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的药学上可接受的载体的组合物。理想地，药学上可接受的载体应当是高纯度的并且低毒性的，以使得它们适于向待治疗的人类或动物给药。此类药学上可接受的载体还应当维持 δ -PKC 活化剂和 α -PKC 抑制剂的生物活性。

[0121] 此类药学上可接受的载体还可包括，例如，基于醋酸盐的缓冲剂、基于 2- 吗啉代乙磺酸 (MES) 的缓冲剂、基于邻苯二甲酸氢钾的缓冲剂、基于 KH_2PO_4 的缓冲剂、基于三（羟甲基）甲胺的缓冲剂和基于硼酸钠 ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) 的缓冲剂。100mL 0.1M 邻苯二甲酸氢钾 + 体积指示的（以 ml）0.1M NaOH。此类缓冲液可以被制得或可包含以下配方：

[0122] 100mL 的 0.1M KH_2PO_4 ，用 0.1M NaOH 调节至期望的 pH；

[0123] 100mL 的 0.1M 三（羟甲基）甲胺，用 0.1M HCl 调节至期望的 pH；

[0124] 以及 100mL 的 0.025M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ （硼酸钠），用 0.1M HCl 调节至期望的 pH。

[0125] 合适的药学上可接受的载体的实例包括水，石油膏，矿脂，矿物油，植物油，动物油，有机和无机蜡，例如微晶蜡、石蜡和地蜡，天然聚合物诸如苍耳烷，麦芽，滑石，明胶，糖，纤维素，胶原，淀粉，或阿拉伯树胶，合成的聚合物，醇，多元醇，磷酸盐缓冲液，可可脂，乳化剂，洗涤剂，例如吐温™等。载体可以是基本上可在水中混溶的水可混溶的载体组合物，例如诸如，醇。水可混溶的局部药学上可接受的载体可以包括用上述一种或多种组分制得的那些，并且还可包括持续或延迟释放的载体，包括含水的、水可分散的或水可溶的组合物，例如脂质体、微海绵物、微球体或微胶囊，水基油膏，油包水或水包油乳液，或凝胶等。本领域技术人员将认识其它药学上可接受的载体。

[0126] 其它相容的药物活性剂和添加剂可以被包括在用于本发明组合物的药学上可接受的载体中。例如，局部麻醉剂诸如 NOVOCaine™、利多卡因等可以被包括在药学上可接受的载体中。添加剂诸如苯甲醇和其它防腐剂也可以被包括在药学上可接受的载体中。本领域技术人员将能很容易地识别其它可药用活性剂和添加剂。

[0127] 在本公开的组合物和方法的一些实施方案中， δ -PKC 活化剂是选自由胰岛素和胰岛素类似物组成的组中的至少一种。

[0128] 在本公开的组合物和方法的一些实施方案中，胰岛素类似物是选自由赖脯胰岛素、天冬胰岛素、甘精胰岛素、内脏脂肪素和 L- α -磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸，二棕榈酰基-，七铵盐组成的组中的至少一种。其它胰岛素类似物的实例包括谷赖胰岛素 (insulin glulisine)、地特胰岛素和白蛋白胰岛素 (albumin)。这些胰岛素类似物中的某些也通过商标名

APIDRA®、HUMALOG®、LANTUS®、LEVEMIR®、NOVOLIN®、

优泌 林®、NOVOLOG®等为人所知。此外,可将优泌 林®配制为包含 0.16mg/ml 甘油和 0.7 μ g/ml 氯化锌。可用 1N 盐酸或 1N 氢氧化钠将这些优泌 林® R 组合物的 pH 调节至 pH 7.4。本文中公开的组合物还可包含如上所述的包括 Zn^{2+} 离子的优泌 林® R 胰岛素类似物制剂的成分。内脏脂肪素可包含 SEQ ID NO:63 中所示的人内脏脂肪素氨基酸序列。内脏脂肪素也可包含 SEQ ID NO:64 所示的小鼠内脏脂肪素氨基酸序列。本领域技术人员将识别其它的内脏脂肪素分子,诸如与 SEQ ID NO:63 或 SEQ ID NO:64 具有超过 90% 的同一性、或超过 95% 的同一性的那些分子,或它们的生物活性片段或变体。此外,本领域技术人员还将认识到氨基末端处的甲硫氨酸残基典型地被从多肽链例如体内表达的内脏脂肪素和其它的成熟形式中切除。

[0129] 在本公开的组合物和方法的一些实施方案中,胰岛素是选自由人胰岛素、牛胰岛素和猪胰岛素组成的组中的至少一种。

[0130] 在本公开的组合物和方法的一些实施方案中,胰岛素是重组表达的。可通过本领域技术人员公知的常规技术实施通过用重组的 DNA 转化宿主细胞的重组表达。宿主细胞可以是原核细胞、古细菌细胞或真核细胞。可通过本领域公知的技术实施重组表达的多肽(诸如重组胰岛素肽链)的分离和纯化,例如,制备色谱法以及应用抗体或与给定多肽特异性地结合的其它分子的亲和纯化。

[0131] 在本公开的组合物和方法的一些实施方案中, α -PKC 抑制剂是选自由(S)-2,6-二氨基-N-[(1-(1-氧代十三烷基)-2-哌啶基)甲基]己酰胺二盐酸盐水合物;4'-N-苯甲酰星形孢菌素;双吡啶基马来酰亚胺 IX,甲磺酸盐;12-(2-氰基乙基)-6,7,12,13-四氢-13-甲基-5-氧代-5H-吡啶并[2,3-a]吡咯并[3,4-c]吡啶;2-[1-(3-二甲基氨基丙基)-1H-吡啶-3-基]-3-(1H-吡啶-3-基)马来酰亚胺和阿普卡生组成的组中的至少一种。本领域技术人员将认识到在所公开的组合物中,PKC 抑制剂可以呈盐、水合物和复合物的形式。此外,本领域技术人员还将认识到 PKC 抑制剂可以被混合在公开的组合物中。

[0132] 在本公开的组合物和方法的一些实施方案中, α -PKC 抑制剂是选自由具有以下中所示的氨基酸序列的肽组成的组中的至少一种:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54 和 SEQ ID NO:55。

[0133] 可通过这样的通常使用的方法合成此类肽,所述方法例如为 t-BOC 或 FMOC 保护 α -氨基基团。这两种方法均涉及逐步的合成,由此从肽的羧基末端处开始,每一步添加单个氨基酸(Coligan 等,Current Protocols in Immunology,Wiley Interscience,1991,单元 9)。还可通过在 Merrifield(85J. Am. Chem. Soc. 2149(1962)) 和 Stewart 及 Young,Solid

PhasePeptides Synthesis, (Freeman, San Francisco, 1969, 第 27-62 页) 中描述的公知的固相肽合成方法, 使用含有 0.1-1.0mMol 的胺 /g 聚合物的共聚 (苯乙烯-二乙烯基苯), 来合成本发明的肽。在化学合成完成之后, 可以使肽脱保护, 并通过用 HF-10% 苯甲醚在 0℃ 处理约 1/4-1 小时而将肽从聚合物上切下。在蒸发试剂后, 用 1% 乙酸溶液从聚合物中提取肽, 然后将其冻干以产生粗材料。这通常可以通过诸如应用 5% 乙酸作为溶剂在 Sephadex G-15 上凝胶过滤的方法对其进行纯化。将适当的柱的级分冻干将产生均匀的肽或肽衍生物, 然后可通过这样的标准技术如氨基酸分析、薄层色谱、高效液相色谱法、紫外吸收光谱、摩尔旋光和基于溶解度的方法对其进行表征。

[0134] 还可通过任何生物学方法, 例如通过在哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母和细菌以及无细胞系统 (诸如体外转录和翻译系统) 中重组表达蛋白质来合成肽。可通过大家接受的方法针对每一系统将蛋白质表达最优化。可通过标准方法 (Frederich M. Ausubel, 等, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, 1989) 纯化蛋白质。例如, 可如描述的那样 (Erangionic 和 Neel, Analytical Biochemistry, 210:179, 1993) 在细菌中以 GST- 融合蛋白形式表达并通过谷胱甘肽琼脂糖珠 (Sigma) 纯化蛋白质。备选地, 可在哺乳动物细胞中以分泌产物形式表达并从条件培养基中纯化蛋白质 (Cadena 和 Gill, Protein Expression and Purification 4:177, 1993)。可应用自动肽合成仪 [诸如 Applied Biosystems 431A-01 肽合成仪 (Mountain View, Calif.)] 或应用 Houghten, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82:5131 (1985) 描述的人工肽合成技术合成通过 Merrifield 的方法制备的肽。还可通过使用共价修饰、液相肽合成或本领域技术人员公知的任何其它方法合成肽。

[0135] 可应用氨基酸或氨基酸类似物来合成肽, 可如需要的那样应用例如二碳酸叔丁酯 (t-BOC) 基团或苄基甲氧羰基 (Fmoc) 基团保护氨基酸或氨基酸类似物的活性基团。氨基酸和氨基酸类似物可商购 (Sigma Chemical Co.; Advanced Chemtec) 或应用本领域已知的方法合成。

[0136] 本文中公开的肽中的氨基酸可通过示范性肽中所示的一个或多个特定氨基酸的氨基酸替换而被修饰。氨基酸替换改变可包括一个碱性氨基酸替换另一个碱性氨基酸, 一个疏水氨基酸替换另一个疏水氨基酸或其它保守替换。氨基酸替换还可以包括使用非天然存在的氨基酸, 例如, 例如鸟氨酸 (Orn) 或高精氨酸 (homoArg) 替换 Arg。

[0137] 还可通过其它分子的共价连接或肽中存在的官能团的反应来修饰肽。此类修饰的实例包括连接聚乙二醇分子、脂质、糖类或其它分子。此类修饰的特定实例还包括豆蔻酰化和酰胺化。用于肽共价修饰的技术是本领域中公知的, 并且本领域技术人员将知晓许多此类技术。

[0138] 在本公开的组合物和方法的一些实施方案中, α -PKC 抑制剂是由 SEQ ID NO:25 中所示的氨基酸序列组成的肽, 其在其氨基末端处具有豆蔻酰化的氨基酸残基, 并且在其羧基末端处被酰胺化。

[0139] 在本公开的组合物和方法的一些实施方案中, α -PKC 抑制剂是由 SEQ ID NO:1 中所示的氨基酸序列组成的肽, 其在其氨基末端处具有豆蔻酰化的氨基酸残基。

[0140] 在本公开的组合物和方法的一些实施方案中, 不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的药学上可接受的载体是包含 0.2g/L KCl、0.2g/L 无水 KH_2PO_4 、8g/L NaCl 和 1.15g/L 无水 Na_2HPO_4 的水性载体。

[0141] 本公开的另一方面是组合物,其包含胰岛素、由 SEQ ID NO:1 中所示的氨基酸序列组成并且在其氨基末端处具有豆蔻酰化的氨基酸残基的肽以及包含 0.2g/L KCl、0.2g/L 无水 KH_2PO_4 、8g/L NaCl 和 1.15g/L 无水 Na_2HPO_4 的不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的水性药学上可接受的载体。

[0142] 在本公开的组合物和方法的一些实施方案中,所述组合物包含约 0.0001 单位 /L 至约 0.1 单位 /L 的胰岛素和约 1 μM 至约 100 μM 的所述肽。

[0143] 在本公开的组合物和方法的一些实施方案中,所述组合物包含 0.0001 单位 /L 的胰岛素和 1 μM 的所述肽。

[0144] 本公开的另一方面是包含 δ -PKC 活化剂、 α -PKC 抑制剂、不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的药学上可接受的载体以及药物流出支架的药物组合物。所述药物流出支架可以是能够递送药物组合物的任何固相结构。该药物流出支架可以保持药物组合物并随时间通过手段例如扩散、毛细管作用、重力或其它用于使分子流动的物理过程递送药物组合物。药物流出支架可以包括,例如,层状纤维或纺织纤维、纤维垫、泡沫、凝胶、不同固体的基质或任何其它的固相结构,并且可以以任何形式,例如支架被提供。本领域技术人员将知晓其它合适的药物流出支架。

[0145] 在该组合物的一个实施方案中,药物流出支架包含多孔固体。此类多孔固体的实例包括海绵、泡沫、纱布、凝胶或其它基质。本领域技术人员将知晓药物流出支架的其它实例。

[0146] 在该组合物的一个实施方案中,药物流出支架是海绵。

[0147] 本公开的另一方面是由包括以下步骤的方法制得的药物组合物:a) 提供 δ -PKC 活化剂、 α -PKC 抑制剂以及不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的药学上可接受的载体;以及 b) 混合所述 δ -PKC 活化剂、 α -PKC 抑制剂以及不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的药学上可接受的载体;由此制得药物组合物。

[0148] 本文中公开的其它组合物还可通过类似地涉及提供该组合物的成分并然后混合这些成分以制备此类组合物的步骤的方法制备。

[0149] 本公开的另一方面是用于增加动物皮肤创伤闭合的方法,其包括以下步骤:a) 提供包含 δ -PKC 活化剂、 α -PKC 抑制剂和不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的药学上可接受的载体的药物组合物;以及 b) 向动物上的皮肤创伤给药有效量的该药物组合物;由此增加皮肤创伤的闭合。

[0150] 可通过鉴定包含正常组织的未受影响的创伤边缘并确定创伤边缘内未治愈的区域来评估皮肤创伤闭合。当创伤边缘内未治愈的区域相对于之前的测量值下降时,则发生了创伤的闭合。最终,增加皮肤创伤的闭合导致创伤的完全闭合,使得没有未治愈的区域。本领域技术人员将知晓用于评估创伤闭合及其是否增加的其它技术。

[0151] 本领域技术人员可以通过本领域技术人员容易操作的常规实验,通过组织学、H&E 染色、角蛋白 14 染色或免疫化学或通过观察脓肿形成、过度的白细胞增多和血管中高的 RBC/WBC 比值来确定药物组合物的有效量。本领域技术人员还可通过简单地观察或测量治疗之前和治疗之后合理时间的创伤面积的改变来鉴定有效量的药物组合物已经被给药到具有皮肤创伤的受试者。

[0152] 适用于在本公开的方法中给药的药物组合物可以以溶液、油膏、乳液、霜剂、凝胶、

颗粒、薄膜和硬膏的形式被提供。本领域技术人员将知晓适用于给药的所公开的药物组合物的其它形式。

[0153] 本发明的另一方面是用于减少动物上的皮肤创伤部位的炎症的方法,其包括以下步骤:a) 提供包含 δ -PKC 活化剂、 α -PKC 抑制剂和不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的药学上可接受的载体的药物组合物;以及 b) 向动物上的皮肤创伤给药有效量的该药物组合物;由此减少皮肤创伤部位的炎症。

[0154] 当以下参数中的至少两个存在于皮肤创伤部位时,则发生了炎症:在创伤的区域形成脓肿;过度的白细胞增多(在 200 倍的固定视野中 > 100 个细胞);以及在血管中高的 WBC/RBC(白细胞/红细胞)比,其中在固定视野(200 倍)中显示在血管内 $> 20\%$ 的 WBC 含量。当没有或仅有上述参数中的一个存在于皮肤创伤部位时,则可认为炎症下降了。备选地,可通过其它公知的临床征兆,例如肿胀、红色、脓等来评估皮肤创伤部位的炎症。当这些临床征兆的严重性下降或完全消失时,则可认为炎症下降了。本领域技术人员还将知晓用于评估炎症及其是否下降的其它技术。

[0155] 本公开的另一方面是包含胰岛素或胰岛素类似物和不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的药学上可接受的载体的组合物。

[0156] 在本公开的组合物和方法的一些实施方案中,该组合物包含约 0.0001 单位/L 至约 0.1 单位/L 的胰岛素或胰岛素类似物。

[0157] 在本公开的组合物和方法的一些实施方案中,该组合物包含约 0.0001 单位/L 的胰岛素或胰岛素类似物。

[0158] 在本公开的组合物和方法的一些实施方案中,该组合物包含约 0.0001 单位/L 至约 0.1 单位/L 的胰岛素和不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的药学上可接受的载体的组合物。

[0159] 本公开的另一方面是用于增加动物创伤闭合的方法,其包括以下步骤:提供包含 δ -PKC 活化剂、 α -PKC 抑制剂和不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的药学上可接受的载体的药物组合物;以及向动物上的创伤给药有效量的该药物组合物,其中所述的创伤是选自糖尿病溃疡创伤、肢端舔的创伤、赘肉创伤、外科手术创伤、慢性日光性脓肿创伤和骨髓炎创伤组成的组中的至少一种;由此增加皮肤创伤的闭合。

[0160] 本公开的另一方面是包含 δ -PKC 活化剂、 α -PKC 抑制剂和含有 K^+ 阳离子而不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的药学上可接受的载体的药物组合物。 K^+ 阳离子的来源的实例包括氯化钾 (KCl)、碳酸氢钾 (KHCO_3) 和磷酸钾 (KH_2PO_4)。本领域技术人员将很容易地知晓其它 K^+ 阳离子来源。

[0161] 本公开的另一方面是包含 δ -PKC 活化剂和含有 K^+ 阳离子而不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的药学上可接受的载体的药物组合物。

[0162] 本公开的另一方面是包含 α -PKC 抑制剂和不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的药学上可接受的载体的药物组合物。

[0163] 在本公开的组合物和方法的一些实施方案中,该药物组合物包含约 1 μM 至约 100 μM 的 α -PKC 抑制剂肽。

[0164] 在本公开的组合物和方法的一些实施方案中,该药物组合物包含 1 μM 的 α -PKC 抑制剂肽。

[0165] 本公开的另一方面是减少动物上的皮肤创伤部位的炎症的方法,其包括以下步

骤:提供包含 α -PKC 抑制剂和不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子的药学上可接受的载体的药物组合物;以及向动物上的皮肤创伤给药有效量的该药物组合物;由此减少皮肤创伤部位的炎症。

实施例

[0166] 材料和实验方法

[0167] 材料:组织培养基和血清是从 Biological Industries(Beit HaEmek, Israel) 购买的。增强的化学发光 (Enhanced Chemical Luminescence, ECL) 使用从 BioRad (Israel) 购买的试剂盒进行。单克隆抗 p-tyr 抗体购于 Upstate Biotechnology Inc. (Lake Placid, NY, USA)。PKC 同种型的多克隆和单克隆抗体购于 Santa Cruz (California, USA) 和 Transduction Laboratories (Lexington, KY)。辣根过氧化物酶抗兔和抗小鼠 IgG 获自 Bio-Rad (Israel)。亮肽素、抑肽酶、PMSF、DTT、原钒酸钠和胃蛋白酶抑制剂购自 Sigma Chemicals (St. Louis, MO)。胰岛素 (优泌林 R- 重组人胰岛素) 购自 Eli Lilly France SA (Fergersheim, France)。IGF1 购自 Cytolab (Israel)。角蛋白 14 抗体购自 Babco-Convance (Richmond, CA)。BDGF-BB 购自 R&D 系统 (Minneapolis), 豆蔻酰化 (myristolated) 的 PKC α 假底物购自 Calbiochem (San Diego, CA)。快速细胞增殖试剂盒购自 Calbiochem (San Diego, CA)。

[0168] 所使用的胰岛素类似物是赖脯胰岛素 (Humalog®, Eli Lilly)、天冬胰岛素 (NovoLog®, Novo Nordisk)、甘精胰岛素 (Lantus®, Sanofi Aventis) 和重组常规胰岛素 (优泌林® R, Eli Lilly)。其它所使用的胰岛素类似物是鼠内脏脂肪素 (ALEXIS Corporation, Lausen, Switzerland, Product Number ALX-201-318-C050) 和 L- α -磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸,二棕榈酰基-,七铵盐 (Calbiochem; 目录号 524615) (L- α)。

[0169] 角蛋白 1 特异性抗体和蛋白质印记分析二抗可商业获得。

[0170] 鼠角质化细胞的分离和培养:如之前所述从新生皮肤上分离原代角质化细胞。在含有 8% 的 Chelex (Chelex-100, BioRad) 处理的胎牛血清的 Eagle's 最小必需培养基 (EMEM) 中培养角质化细胞。为了维持增殖的基底细胞的表型,将最终的 Ca^{2+} 浓度调节为 0.05mM。铺板后五天到七天进行实验。

[0171] 培养基 A 和 B 都是含有经 8% CHELEX™ 处理的胎牛血清的来自 Biological Industries (以色列) 的 EMEM eagle's 最小必需培养基。CHELEX™ 是强螯合剂,其与游离的 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 结合以防止这些离子可以被培养的细胞生物利用。培养基 A 不含有 KCl, 培养基 B 含有 KCl 0.4mg/ml。

[0172] 用于免疫沉淀的细胞裂解物的制备:将含有角质化细胞的培养皿用不含 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 的 PBS 洗涤。用机械力使细胞分离,并且在含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的混合物 (20 $\mu\text{g/ml}$ 亮肽素、10 $\mu\text{g/ml}$ 抑肽酶;0.1mMPMSF;1mM DTT;200 μM 原钒酸盐;2 $\mu\text{g/ml}$ 胃蛋白酶抑制剂) 的 RIPA 缓冲液 (50mM Tris·HCl pH 7.4;150mM NaCl;1mM EDTA;10mM NaF;1% Triton x100;0.1% SDS,1% 脱氧胆酸钠) 中裂解。将此制备物在 4°C 在微型离心机中以最大速度离心 20 分钟。将上清液用于免疫沉淀。

[0173] 免疫沉淀:通过将 300 μg 细胞裂解物与 25 μl 蛋白 A/G 琼脂糖凝胶 (Santa Cruz, CA, USA) 混合,并将悬浮液在 4°C 连续旋转 30 分钟,进行裂解物的预处理。然后将制备物在

4℃以最大速度离心 10 分钟,向上清液中加入 30 μ l A/G 琼脂糖凝胶以及个别抗原的特异性多克隆或单克隆抗体(稀释率 1 : 100)。将样品在 4℃旋转过夜。然后将悬浮液在 4℃以最大速度离心 10 分钟,用 RIPA 缓冲液洗涤沉淀。然后将悬浮液以 15,000xg 再次离心(4℃,10 分钟),用 TBST 洗涤四次。加入样品缓冲液(0.5M Tris·HCl pH6.8;10% SDS;10% 甘油;4% 2- β -巯基乙醇;0.05% 溴酚蓝),将样品煮沸 5 分钟,然后进行 SDS-PAGE。

[0174] 腺病毒构建体:按照 Saito 等人 54J. Virol. 711(1985) 之前描述的那样构建重组腺病毒载体。

[0175] 用 PKC 同种型基因转导角质化细胞:吸出培养基,用编码特定 PKC 同种型(诸如 PKC α) 的 PKC 重组腺病毒感染角质化细胞培养物一小时。然后用 MEM 洗涤所述培养物两次并重新培养。感染后十小时,将细胞转移至无血清的含低 Ca^{2+} 的 MEM 中 24 小时。

[0176] PKC 活性:在从经适当处理后的角质化细胞培养物新鲜制备的免疫沉淀物中测定特定 PKC 活性。在不含 NaF 的 RIPA 缓冲液中制备这些细胞裂解物。用 SigmaTECT 蛋白激酶 C 分析系统(Promega, Madison, WI, USA) 测定活性,根据制造商的说明操作。在这些研究中用 PKC α 假底物作为底物。

[0177] 细胞增殖:在 6 孔板中通过 [^3H] 胸苷掺入测定细胞增殖。将细胞用 [^3H] 胸苷(3 μ Ci/ml) 脉冲一小时。温育后,用 PBS 洗涤细胞五次,将 5% TCA 加入每个孔中持续 1 小时。除去溶液,将细胞溶于 1M NaOH 中。在 TRI-CARBTM 液体闪烁计数器的 ^3H 窗口中对掺入细胞的标记的胸苷进行计数。

[0178] PKC 免疫激酶检测:纯化的和标准化的 PKC 同工酶由 P. Blumberg 博士(NCI, NIH, U. S.) 和 Marcello G. Kazanietz 博士(宾夕法尼亚州大学,医学院) 慷慨提供。将原代角质化细胞收集在 500 μ l 1% Triton 裂解缓冲液(在 1x PBS 中的 1% TritonX-100、10 μ g/ml 抑肽酶和亮肽素、2 μ g/ml 胃蛋白酶抑制剂、1mM PMSF、1mM EDTA、200 μ M Na_2VO_4 、10mM NaF) 中。在 4℃培育胞溶产物 30 分钟,在 4℃以 16,000xg 旋转 30 分钟。将上清液转移至新鲜试管中。用 5 μ g/ 个样品的抗 α 6/GoH3(PharMingen) 和 30 μ l/ 个样品的蛋白 A/G+ 琼脂糖浆(Santa Cruz) 在 4℃对细胞裂解物进行免疫沉淀过夜。用 RIPA 缓冲液洗涤珠子一次,用 50mM Tris/HClpH7.5 洗涤两次。向每个检测中加入 35 μ l 反应缓冲液(1mM CaCl_2 、20mM MgCl_2 、50mM Tris·HCl pH7.5)。对于每个检测,向所述浆中加入 5.5 μ l/ 个检测的含有 DMSO 或 10mM TPA 的磷脂囊泡悬浮液以及标准化量的特异性 PKC 同工酶。加入 10 μ l/ 个检测的 125mM ATP(1.25 μ Ci/ 个检测 [γ - ^{32}P]ATP, Amersham) 起始反应,在 30℃持续 10 分钟。用 RIPA 缓冲液洗涤珠子两次。加入 30 μ l/ 个样品的负载蛋白质的染料(3xLaemmli, 5% SDS),将样品在水浴中煮沸 5 分钟。用 SDS-PAGE 在 8.5%的凝胶上分离蛋白质,转移到氯丙酮膜(Schleicher&Schuell) 上,用放射自显影显像。将组蛋白的磷酸化和 PKC 底物肽的磷酸化用作 PKC 活性的对照。

[0179] 体内切开创伤的产生和炎症的诱导:在麻醉的 C57BL/6J 小鼠(每组 6 只小鼠) 的上背上进行全厚(20mm 长) 皮肤切口。

[0180] 其它技术:应用公知的标准方案,例如描述于 Sambrook 等,Molecular Cloning :A Laboratory Manual(第 3 版,2001) 中的那些进行其它技术例如蛋白质印记等。

[0181] 除非另外指出,在实施例和附图中的 PKC α 抑制剂是豆蔻酰化的在 SEQ ID NO :1 中所示的肽。类似地,除非另外指出,胰岛素是人重组胰岛素,并且被称为“胰岛素”、“USP

胰岛素”或“Ins USP”。

[0182] 实施例 1

[0183] 进行了以下试验,以应用在各种制剂中制备的胰岛素 (10^{-6} M; 0.1 单位 /ml) 和 PKC α 抑制剂 (Myr- 假底物 PKC α 肽, 1μ M) 来确定体外创伤愈合的效果。

[0184] 首先,分离并培养鼠角质化细胞。简而言之,根据 Alt 等人 2004; Li 等人 1996,从新生皮肤上分离原代角质化细胞。在含有经 8% Chelex (Chelex-100, BioRad) 处理的胎牛血清的 Eagle's 最小必需培养基 (EMEM) 中培养角质化细胞。为了维持增殖的基底细胞的表型,将最终的 Ca^{2+} 浓度调节为 0.05mM。

[0185] 5 天后,使汇合的角质化细胞进行体外划伤测试并随后愈合伤口。创伤形成后,将在各种制剂中的胰岛素 +PKC α 抑制剂加入细胞培养物中:制剂 A Dulbecco 磷酸缓冲盐水 (DPBS--); 制剂 B 含有磷酸盐、钾、钙和镁的磷酸盐缓冲的盐水 (PBS); 制剂 C 三羟甲基氨基乙烷 (CAS No. [77-86-1]) 以及含有三羟甲基氨基乙烷 (CAS No. [77-86-1]) 和 KCl 0.4mg/ml 的制剂 D。在约 7.2 的 pH 下提供制剂,并且其可包含用来维持给定渗透压所需的其它组分,例如盐等。

[0186] 随后是创伤闭合。在处理 24 小时后,与未处理的对照相比,仅有用在制剂 A 中的胰岛素 +PKC α 抑制剂处理的培养物显示出创伤闭合。这一试验以一式三份进行。代表性的细胞培养皿被显示于图 1A 中。图 1B 显示了在处理 24 小时后以闭合百分数表示的创伤闭合。

[0187] 实施例 2

[0188] 进行了以下试验以进一步评估由在各种制剂中制备的胰岛素 +PKC α 抑制剂介导的创伤闭合。

[0189] 在麻醉的 C57BL/6J 小鼠 (每组 6 只小鼠) 的上背上进行全厚 (20mm 长) 皮肤切口。切开后,每天用直接施用于伤口上的在上述各种制剂 (制剂 A-C) 中的胰岛素 (10^{-6} M; 0.1 单位 /ml); 假底物 PKC α 肽, 1μ M (PKC α 抑制剂); 或胰岛素 +PKC α 抑制剂 (1μ M Myr- 假底物 PKC α 肽和胰岛素 0.1 单位) 治疗创伤。

[0190] 7 天后,切下创伤,并通过检查创伤的形态学和组织学来评估愈合创伤的百分比。以愈合创伤相对于每组创伤总数的百分数形式显示结果。与在制剂 B 和制剂 C 中的创伤边缘闭合相比,通过在制剂 A 中施用的胰岛素 +PKC α 抑制剂的治疗显著地诱导了创伤的完全愈合。对于所有制剂,相对于仅单独用制剂治疗的对照组,单独用胰岛素或假底物肽治疗没有促进创伤愈合。结果显示于图 2A 中。治疗 7 天后创伤的代表性照片被提供于图 2B 中。

[0191] 实施例 3

[0192] 进行了以下试验以评估假底物 PKC α 肽 (PKC α 抑制剂) 的抗炎效果。

[0193] 在麻醉的 C57BL/6J 小鼠 (每组 6 只小鼠) 的上背上进行全厚 (20mm 长) 皮肤切口。切开后,每天用直接施用于伤口上的在上述各种制剂 (制剂 A-C) 中的 1μ M Myr- 假底物 PKC α 肽治疗创伤。

[0194] 7 天后,切下创伤,并进行组织学和免疫组织化学。当以下 3 个参数中的至少 2 个存在于皮肤创伤缺口时,则认为炎症负担是严重的: (1) 在创伤区域形成脓肿; (2) 过度的白细胞增多 (在 200 倍的固定视野中 > 100 个细胞); (3) 在血管中高的 WBC/RBC 比,其中在固定视野 (x200) 中显示在血管内 $> 20\%$ 的 WBC 含量。以具有严重炎症的创伤相对于该组

中创伤数的百分数形式概述和展示结果。如图3中所示,仅当在制剂A中施用假底物PKC α 肽时,注意到严重炎症的显著减少。当在制剂B或制剂C中施用治疗时,没有观察到炎症负担的减少。

[0195] 实施例4

[0196] 进行了以下试验以评估药物组合物对肉芽组织形成的效果。

[0197] 在麻醉的C57BL/6J小鼠(每组6只小鼠)的上背上进行全厚(20mm长)皮肤切口。切开后,每天用直接施用于伤口上的在上述各种制剂(制剂A-C)中的1 μ M Myr-假底物PKC α 肽和0.1单位/ml的胰岛素治疗创伤。

[0198] 7天后,切下创伤,根据标准方法固定并在H&E染色后以组织化学方式进行评估。应用H&E染色评估肉芽组织形成,并且根据在创伤床处所形成的肉芽组织占总创伤面积的百分数来打分。当用胰岛素+PKC α 抑制剂治疗时,仅每天用在制剂A中的胰岛素+PKC α 抑制剂治疗的创伤显示出与对照和制剂B及制剂C治疗的组相比的肉芽组织形成的显著增加。结果被显示于图4中。

[0199] 实施例5

[0200] 进行了以下实验以确定制剂的含量是否影响假底物PKC α 肽抑制PKC α 活性的能力。

[0201] 如上所述那样分离并培养鼠角质化细胞。5天后,用PKC α 重组腺病毒感染汇合的角质化细胞。如Alt等人2001;Alt等人2004;Gartsbein等人2006描述的那样构建重组的腺病毒载体。用含有PKC α 重组腺病毒的上清液感染角质化细胞培养物1小时。然后用MEM洗涤所述培养物两次并重新培养。感染后十小时,将细胞转移至无血清的低Ca²⁺的MEM中24小时。

[0202] 感染后24小时,用在上述各种制剂(制剂A和B)中的PKC α 抑制剂(My r-假底物PKC α 肽,1 μ M)处理细胞15分钟。

[0203] 然后对细胞提取物进行PKC活性分析。首先,将原代角质化细胞收集在500 μ l 1% Triton裂解缓冲液(在1x PBS中的1% TritonX-100、10 μ g/ml抑肽酶和亮肽素、2 μ g/ml胃蛋白酶抑制剂、1mM PMSF、1mMEDTA、200 μ M Na₂VO₄、10mM NaF)中。然后在4 $^{\circ}$ C培育胞溶产物30分钟,使其在4 $^{\circ}$ C以16,000xg旋转30分钟。将上清液转移至新鲜试管中。用5 μ g/个样品的抗 α 6/GoH3(PharMingen)和30 μ l/个样品的蛋白A/G-Plus琼脂糖浆(Santa Cruz)在4 $^{\circ}$ C对细胞裂解物进行免疫沉淀过夜。用RIPA缓冲液洗涤珠子一次,用50mM Tris/HCl pH7.5洗涤两次。向每个检测中加入35 μ l反应缓冲液(1mM CaCl₂、20mM MgCl₂、50mM Tris $\cdot$ HCl pH7.5)。对于每个检测,向浆中加入5.5 μ l/个检测的含有DMSO或10mM TPA的磷脂囊泡悬浮液,以及标准化量的特异性PKC同工酶。通过加入10 μ l/个检测的125mM ATP(1.25 μ Ci/个检测 [γ -32P]ATP, Amersham)使反应开始,让其在30 $^{\circ}$ C持续10分钟。然后用RIPA缓冲液洗涤珠子两次。加入30 μ l/个样品的负载蛋白的染料(3xLaemmli, 5% SDS),将样品在水浴中煮沸5分钟。通过SDS-PAGE在8.5%的凝胶上分离蛋白质,转移到氯丙嗪膜(Schleicher&Schuell)上,并且通过放射自显影显像。将组蛋白的磷酸化和PKC底物肽的磷酸化用作PKC活性的阳性对照。

[0204] 应用SignaTECT蛋白质激酶C分析系统(Promega, Madison, WI, USA),根据制造商的说明书测量特异性的PKC活性。在这些研究中,应用PKC α 假底物作为底物。

[0205] 仅有在制剂 A 中的 PKC α 抑制剂能相对于对照制剂和未处理的细胞培养板显著地抑制过表达细胞中的 PKC α 活性。一式两份地进行试验。将结果以 PKC α 活性相对于过表达 PKC α 的对照细胞中 PKC α 活性的减少百分数形式显示于图 5 中。

[0206] 实施例 6

[0207] 进行了进一步试验以体外评估由在各种制剂中的胰岛素介导的创伤闭合及细胞增殖。

[0208] 如上所述那样分离并培养鼠角质化细胞。5 天后,使汇合的角质化细胞进行体外划伤测试以跟踪创伤愈合。创伤形成后,将在上述各种制剂(制剂 C 和 D)中的胰岛素(胰岛素 10^{-6} M, 0.1 单位/ml)加入到细胞培养基中。跟踪创伤闭合 48 小时。一式三份地进行这一试验。代表性的细胞培养皿显示于图 6A 中。在图 6B 中,以处理 48 小时后闭合的百分数形式表示创伤闭合。

[0209] 然后,应用胸苷掺入评估所培养的创伤中的细胞的增殖(图 6C)。在 6 孔板中通过 [^{3} H] 胸苷掺入测定细胞增殖。将细胞置于 24 孔板中,并用 [^{3} H] 胸苷 (3 μ Ci/ml) 脉冲一小时。温育后,用 PBS 洗涤细胞五次,将 5% TCA 加入每个孔中持续 1 小时。然后除去溶液,将细胞溶于 1MNaOH 中。在液体闪烁计数器的 ^{3} H 窗口中对掺入细胞的标记的胸苷进行计数。如图 6A-C 中所示, KCl 的加入改变了胰岛素诱导的创伤闭合及细胞增殖。

[0210] 实施例 7

[0211] 评估了在培养基 B 中预温育角质化细胞对胰岛素和胰岛素 +PKC α 抑制剂对细胞体外增殖效果的影响。允许 5 天龄的、来自成年小鼠(7-10 个月至 2 年)尾部的汇合的角质化细胞的培养物在体外增殖。在 MEM(培养基 A) 中 5 天后,将生长培养基更换为培养基 B(上述的)。与培养基更换平行或在更换后 24 小时,用胰岛素或胰岛素 +PKC α 抑制剂处理细胞。用可商购的快速细胞增殖试剂盒(目录号 QIA127 ;Calbiochem) 测量细胞的增殖率。一式六份地进行该试验。以占未处理的细胞(对照)的百分数形式展示结果。正如可从图 7 所看到的那样,在培养基 B 中预温育细胞 24 小时增强了胰岛素和胰岛素 +PKC α 抑制剂对细胞增殖的效果。

[0212] 实施例 8A

[0213] 通过每天局部应用在制剂 A(结果显示于图 8A 的下图)或制剂 C(结果显示于图 8A 的上图)中应用的胰岛素 +PKC α 抑制剂来治疗患有慢性足溃疡的人类患者,历时 12 周。尽管在制剂 A 中应用的胰岛素 +PKC α 抑制剂显示出在第 12 周前完全的闭合,在用制剂 C 中的胰岛素 +PKC α 抑制剂治疗的患者的溃疡中没有观察到显著的愈合。每周跟踪患者创伤并应用 **Visitrak®** (Smith&Nephew) 测量。对于两个患者的每周一次的 12 个测量值,显示了创伤宽度和创伤长度的随访图(下图)。

[0214] 实施例 8B

[0215] 通过局部每日应用在制剂 A(结果显示于图 8B 的左图)或制剂 C(结果显示于图 8B 的右图)中应用的胰岛素 +PKC α 抑制剂来治疗患有糖尿病创伤的人类患者,历时 60 天。尽管在制剂 A 中应用的胰岛素 +PKC α 抑制剂显示出在第 60 天前完全的创伤闭合及愈合,在用制剂 C 中的胰岛素 +PKC α 抑制剂治疗的创伤中没有观察到显著的愈合。图 8B 显示了在第 0 天和第 60 天时的创伤随访记录。

[0216] 实施例 9

[0217] 一年龄的雌性夸特马 (quarter horse) 患有冗长肉芽组织 (赘肉) 创伤, 数月未治愈。用在制剂 A 中的胰岛素 +PKC α 抑制剂每天治疗该创伤, 历时 3 个月。这一阶段后, 该创伤完全闭合并治愈。6 个月的随访显示完全的组织再生。结果被显示于图 9 中。

[0218] 实施例 10

[0219] 两年龄的马具有蹄创伤, 被诊断为伴有骨髓炎的慢性日光性脓肿。持续几个月的阶段没有发生这一创伤的愈合。通过将该组合物直接应用于该创伤持续 30 分钟, 用在制剂 A 中的胰岛素 +PKC α 抑制剂每天进行治疗。如图 10 中所示, 在一个月的治疗内, 该创伤大小显著减小, 在两个月内, 该创伤完全闭合并治愈。

[0220] 实施例 11

[0221] 使用常规治疗来治疗由于经常的舔 (肢端舔) 而在其爪子上患有创伤的狗, 历时几个月而未任何愈合。每天应用在制剂 A 中的胰岛素 +PKC α 抑制剂进行治疗, 该创伤在 2 个月内完全闭合并治愈。在治疗 3.5 个月后, 观察到完全的毛皮再生。结果被显示在图 11 中。

[0222] 实施例 12

[0223] 研究了在制剂 A 中制备的四种胰岛素类似物以确定胰岛素是否能单独促进创伤愈合。在麻醉的 C57BL/6J 小鼠 (每组 6 只小鼠) 的上背上进行全厚 (20mm 长) 皮肤切口。切开后, 每天用直接置于伤口上的在制剂 A (上述) 中的 0.1 单位 /ml 的各种胰岛素类似物治疗创伤。所研究的胰岛素类似物是赖脯胰岛素 (HumL)、天冬胰岛素 (Novo)、甘精胰岛素 (LANTUS®) 和优泌林® R (HumR)。7 天后, 切下创伤, 固定并在 H&E 染色后进行组织学评估。

[0224] 通过测量表皮基底层形成和肉芽组织形成而独立地评估创伤愈合的百分数。通过应用角蛋白 14 染色以检测表皮基底层形成, 从而评估表皮闭合。展示出完全的表皮重建的创伤被认为是愈合的。应用 H&E 染色评估肉芽组织形成, 并根据在创伤床处所形成的肉芽组织在总创伤面积中所占的百分数进行打分。展示出 > 70% 肉芽组织形成的创伤被认为是愈合的。

[0225] 结果表明, 在制剂 A 中单独的胰岛素类似物相对于对照增加了创伤愈合及创伤闭合。结果显示于图 16 中。在图 16 中, 通过商标名的缩写称呼胰岛素类似物: “HumL” 是赖脯胰岛素、“Novo” 是天冬胰岛素、“Lantus®” 是甘精胰岛素, 以及 “HumR” 是优泌林® R。

[0226] 实施例 13

[0227] 在如图 17 中所指示的那样, 在用正常重组人胰岛素和 USP 胰岛素 PKC α 假底物抑制肽治疗后, 通过评估肉芽组织形成来测量创伤愈合, 从而鉴定协同作用。

[0228] 在麻醉的 C57BL/6J 小鼠 (每组 6 只小鼠) 的上背上进行全厚 (20mm 长) 皮肤切口。切开后, 每天用直接置于创伤上的如图 17 中指示的在制剂 A (上述) 中的 PKC α 假底物抑制肽 (1 μ g/ml) 或 0.1 单位 /ml 的常规重组人胰岛素、USP 胰岛素和 PKC α 假底物抑制肽 (1 μ g/ml) 治疗创伤。7 天后, 切下创伤, 固定并在 H&E 染色后进行组织学评估。

[0229] 应用 H&E 染色评估肉芽组织形成, 并根据所形成的肉芽组织在创伤床的总创伤面积中所占的百分数进行打分。展示出 > 70% 肉芽组织形成的创伤被认为是愈合的。

[0230] 当与对照创伤或与单独给药每一种化合物比较时, 结果表明与 PKC α 假底物抑制肽组合的 USP 胰岛素产生了与常规人胰岛素 +PKC α 假底物抑制肽类似的对创伤愈合的协

同作用。这一数据指示胰岛素类似物和 PKC α 假底物抑制肽的组合可能有助于促进肉芽组织的形成和治疗创伤。

[0231] 结果显示于图 17 中。在图 17 中,分别通过缩写“HumR”和“Ins USP”来表示常规重组人胰岛素和 USP 胰岛素。PKC α 假底物抑制肽被称为“pep”。

[0232] 实施例 14

[0233] 测量了在用胰岛素类似物、重组人胰岛素和 PKC α 假底物抑制肽治疗后的炎症,以确定这些治疗对炎症的效果。

[0234] 在 C57BL/6J 小鼠(每组 6 只小鼠)的皮肤创伤部位测量严重炎症水平。如上所述那样通过切开制备创伤。如图 18 中所指示的那样,每天用在制剂 A 中的 PKC α 假底物抑制肽(1 μ g/ml)、0.1 单位/ml 的重组人胰岛素、或 0.1 单位/ml 的赖脯胰岛素进行治疗。应用标准方法制备乳液,并用纱布绷带(其作为药物流出支架起作用)递送至皮肤。7 天后,切下皮肤组织,固定并在 H&E 染色后进行组织学评估。

[0235] 应用以下参数评估严重炎症(如上所述):

[0236] (1) 脓肿形成;

[0237] (2) 过度的白细胞增多(在 200 倍的固定视野中 > 100 个细胞);

[0238] (3) 在血管中高的 WBC/RBC 比,其中在固定视野(x200)中显示在血管内 > 20% 的 WBC 含量。

[0239] 通过合并根据对每一标本观察到的上述参数的每一个所记录的数据来确定严重炎症的总百分数。当上述 3 个参数中的至少 2 个存在于创伤缺口处时,则认为炎症负担是严重的。

[0240] 结果证实,当与制剂 A 中的 PKC α 抑制肽组合时,与对照相比,胰岛素类似物和重组人胰岛素协同地促进了严重发炎的皮肤中炎症反应的减少。这一数据指示可应用图 18 中显示的治疗来治疗皮肤的炎症疾病,例如由炎性皮肤病引起的炎症。这一数据还指示乳液制剂和药物流出支架例如纱布绷带可用于递送本发明公开的药物组合物。

[0241] 结果被描绘在图 18 中。在图 18 中,分别通过缩写“HumR”和“HumL”来表示常规重组人胰岛素和赖脯胰岛素。PKC α 假底物抑制肽被称为“pep”。

[0242] 实施例 15

[0243] 在培养基 A 和培养基 B 中温育角质化细胞以及使用鼠内脏脂肪素和 L- α -磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸,二棕榈酰基-,七铵盐(L- α)(Calbiochem;目录号:524615)治疗对角蛋白 1 表达的影响。

[0244] 如上所述那样,在培养基 A(MEM)中维持从成年小鼠(7-10 月至 2 年)尾部分离的原代皮肤角质化细胞。在(培养基 A)中 5 天后,将一半的培养板中的生长培养基更换为培养基 B(如上述)。

[0245] 随后将内脏脂肪素或 L- α 单个地加入到在培养基 A(图 19A)中培养的细胞以及在培养基 B(图 19B)中培养的细胞中,如图 19 所示。内脏脂肪素在培养基中的终浓度是 0.0001 μ g/ml 内脏脂肪素。在培养基中 L- α 的终浓度是 100ng/ml。

[0246] 如上所述那样,通过将钙从 0.05mM 升高至 0.12mM 而诱导细胞分化。在分化二十四(24)小时后,收集细胞并进行蛋白质印记分析。应用标准蛋白质印记技术使用角蛋白 1 的特异性抗体评估角蛋白 1 的表达。然后应用标准密度方法量化角蛋白 1 的表达。

[0247] 角蛋白 1 是棘分化标记。在角质化细胞中角蛋白 1 的表达与表皮角质化细胞有丝分裂活性的丧失相关,并且被限制在终端分化的中间阶段。减少的角质化细胞分化与角质化细胞迁移及增殖相关,并且因此与表皮形成相关联。

[0248] 结果指示,在培养基 A 中用内脏脂肪素和 L- α 处理后,角蛋白 1 的表达相对于对照样本下降了(图 19A)。相反,在培养基 B 中培养的角质化细胞的角蛋白 1 的表达没有受到内脏脂肪素或 L- α 处理的显著影响(图 19B)。一并考虑,这些结果指示,当在培养基 A 中提供时,胰岛素类似物例如内脏脂肪素或 L- α 能够抑制角蛋白分化并促进表皮形成。

[0249] 附图详述

[0250] 图 1

[0251] 应用在各种制剂中制备的胰岛素 +PKC α 抑制剂的体外创伤愈合的效力。

[0252] 对 5 天龄的、汇合的角质化细胞进行体外划伤测试并检查创伤愈合。

[0253] 创伤形成后,将在上述各种制剂(制剂 A-C)中的胰岛素和 PKC α 抑制剂(胰岛素 10^{-6} M;0.1 单位/ml)、Myr-假底物 PKC α 肽,1 μ M)加入到细胞培养物中,并跟踪创伤闭合。在处理 24 小时后,仅有用在制剂 A 中提供的胰岛素和 PKC α 抑制剂处理的细胞相对于未处理的对照显示出创伤闭合。这一试验以一式三份进行。图 1A 显示了代表性的细胞培养板的照片。图 1B 显示了处理 24 小时后的闭合百分数($p < 0.05$)。

[0254] 图 2

[0255] 只有在制剂 A 中,胰岛素 +PKC α 抑制剂促进显著的创伤闭合。

[0256] 在麻醉的 C57BL/6J 小鼠(每组 6 只小鼠)的上背上进行全厚(20mm 长)皮肤切口。切开后,每天用直接施用于伤口上的在上述各种制剂(制剂 A-C)中的胰岛素(10^{-6} M;0.1 单位/ml);PKC α 抑制剂(假底物 PKC α 肽,1 μ M);或胰岛素 +PKC α 抑制剂(1 μ M Myr-假底物 PKC α 肽和胰岛素 0.1 单位)治疗创伤。7 天后,切下创伤,并通过创伤的形态学和组织学评估愈合创伤的百分比。在图 2A 中,以愈合创伤占每一组的创伤总数的百分数显示结果。通过在制剂 A 中施用的胰岛素 +PKC α 抑制剂的治疗显著地诱导了创伤的完全愈合。相反,在制剂 B 和制剂 C 中仅观察到创伤边缘闭合。对于所有制剂条件,与仅用各种制剂治疗的对照组相比,单独用胰岛素或假底物肽治疗没有促进创伤愈合的效力。图 2B 显示了来自代表性的创伤活组织的照片。

[0257] 图 3

[0258] 仅当在制剂 A 中施用,PKC α 抑制剂才减少创伤床处的严重炎症负担。

[0259] 在麻醉的 C57BL/6J 小鼠(每组 6 只小鼠)的上背上进行全厚(20mm 长)皮肤切口。切开后,每天用直接施用于伤口上的在上述各种制剂(制剂 A-C)中的 PKC α 抑制剂(1 μ M 假底物 PKC α 肽)治疗创伤。7 天后,切下创伤,并进行组织学和免疫组织化学。当以下 3 个参数中的至少 2 个存在于皮肤创伤缺口处时,则认为炎症负担是严重的:(1)在创伤区域形成脓肿;(2)过度的白细胞增多(在 200 倍的固定视野中 > 100 个细胞);(3)在血管中高的 WBC/RBC 比,其中在固定视野(x200)中显示在血管内 $> 20\%$ 的 WBC 含量。以具有严重炎症的创伤在该组中每总创伤数中所占的百分数概括和展示结果。如柱状图所示,仅当在制剂 A 中施用 PKC α 抑制剂时,才观察到严重炎症的显著减少。当在制剂 B 或制剂 C 中应用治疗时,没有观察到炎症负担的减少。

[0260] 图 4

[0261] 当在制剂 A 中治疗时,胰岛素 +PKC α 抑制剂诱导肉芽组织形成。

[0262] 在麻醉的 C57BL/6J 小鼠 (每组 6 只小鼠) 的上背上进行全厚 (20mm 长) 皮肤切口。切开后,每天用直接施用于创伤上的在上述各种制剂 (制剂 A-C) 中的胰岛素和 PKC α 抑制剂 (1 μ M 假底物 PKC α 肽和 0.1 单位 /ml 胰岛素) 治疗创伤。7 天后,切下创伤,固定并在 H&E 染色后进行组织化学评估。应用 H&E 染色评估肉芽组织形成,并且根据所形成的肉芽组织相对于创伤床处的总创伤面积的百分数来打分。仅每天用在制剂 A 中的胰岛素和 PKC α 抑制剂治疗的创伤显示出与对照和制剂 B 及制剂 C 治疗组相比的肉芽组织形成的显著增加。

[0263] 图 5

[0264] 制剂条件影响假底物 PKC α 肽抑制 PKC α 活性的能力。

[0265] 用编码 PKC α 的重组腺病毒感染 5 天龄的、汇合的角质化细胞的培养物。在感染后 24 小时,用在如图 5 中所指示的制剂 (制剂 A 和 B) 中的 PKC α 抑制剂 (Myr- 假底物 PKC α 肽, 1 μ M) 处理细胞 15 分钟。处理后,如上所述那样裂解细胞并进行 PKC α 活性分析。仅有在制剂 A 中提供的 PKC α 抑制剂能相对于对照显著地抑制过表达细胞中的 PKC α 活性。一式两份地进行试验。以相对于过表达 PKC α 的对照细胞的 PKC α 活性的减少的百分数形式显示结果。

[0266] 图 6

[0267] 应用胰岛素的体外创伤闭合及细胞增殖效力依赖于制剂成分。

[0268] 对 5 天龄的、汇合的角质化细胞的培养物进行体外划伤测试并检查创伤愈合。创伤形成后,将在上述各种制剂 (制剂 C 和 D) 中的胰岛素 (10⁻⁶M, 0.1 单位 /ml) 加入到细胞培养物中。跟踪创伤闭合 48 小时。一式三份地进行这一试验。(A) 显示了代表性的细胞培养皿的照片。(B) 以处理 48 小时后闭合的百分数形式表示创伤闭合。(C) 应用上述的胸苷掺入增殖测试法在培养的创伤细胞中进行增殖测试。当被提供在含有 KCl 的制剂 D 中时,胰岛素本身诱导了部分的创伤闭合及细胞增殖。正如图 6A-C 中所见,制剂 C 抑制了胰岛素诱导的创伤闭合及细胞增殖。

[0269] 图 7

[0270] 在培养基 B 中预温育增强了胰岛素和胰岛素 +PKC α 抑制剂对细胞体外增殖的效力。

[0271] 应用可商购的快速细胞增殖试剂盒 (目录号 QIA127 ;Calbiochem),对从成年小鼠 (7-10 个约至 2 年) 的尾制备的 5 天龄的、汇合的角质化细胞的培养物进行体外增殖测试。在 MEM (培养基 A) 中 5 天后,如上所述那样将生长培养基更换为培养基 B。

[0272] 与培养基更换平行或在更换后 24 小时,用胰岛素或胰岛素 +PKC α 抑制剂处理细胞。一式六份地进行该试验。以占未处理细胞 (对照) 的百分数形式展示结果。如可从图 7 中所看到的那样,在培养基 B 中预温育 细胞 24 小时增强了胰岛素和胰岛素 +PKC α 抑制剂对细胞增殖的效力。

[0273] 图 8

[0274] 在制剂 A 而非在制剂 C 中制备的胰岛素 +PKC α 抑制剂诱导慢性、非愈合创伤的创伤愈合。

[0275] 通过局部应用在制剂 A (图 8A, 下图) 或制剂 C (图 8A, 上图) 中应用的胰岛素

+PKC α 抑制剂来治疗患有慢性糖尿病相关的溃疡（例如糖尿病相关的足或手溃疡）患者，历时 12 周。在制剂 A 中应用的胰岛素 +PKC α 抑制剂显示出在 12 周完全的闭合，在用制剂 C 中的胰岛素 +PKC α 抑制剂治疗的患者的溃疡中没有观察到显著的愈合。每周跟踪患者创伤并应用 **Visitrak®** (Smith&Nephew) 测量。对于两个患者每周一次的 12 次测量，显示了创伤宽度和创伤长度的随访图（图 8A 中的右图）。

[0276] 通过每天局部应用在制剂 A（图 8B，右图）或制剂 C（8B，左图）中应用的胰岛素 +PKC α 抑制剂来治疗患有糖尿病创伤的人类患者，历时 60 天。在制剂 A 中应用的胰岛素 +PKC α 抑制剂显示出到第 60 天止完全的愈合及创伤闭合。在用制剂 C 中的胰岛素 +PKC α 抑制剂治疗的创伤中没有观察到显著的愈合。图 8B 显示了在第 0 天和第 60 天时的创伤随访照片记录。

[0277] 图 9

[0278] 在制剂 A 中制备的胰岛素 +PKC α 抑制剂诱导马的赘肉慢性创伤愈合。

[0279] 一年龄的雌性夸特马患有冗长肉芽组织（赘肉）创伤，数月未治愈。用在制剂 A 中的胰岛素 +PKC α 抑制剂每天治疗该创伤，历时 3 个月。这一阶段后，该创伤完全闭合并治愈。6 个月的随访观察到完全的组织再生。

[0280] 图 10

[0281] 在制剂 A 中制备的胰岛素 +PKC α 治愈慢性日光性脓肿和骨髓炎。

[0282] 两年龄的马具有蹄创伤，被诊断为伴有骨髓炎的慢性日光性脓肿，数月未愈合。通过将该组合物直接应用于该创伤 30 分钟来进行用在制剂 A 中的胰岛素 +PKC α 抑制剂进行的每日治疗。如图 10 中所示，在治疗一个月内，该创伤大小显著减小，并且在两个月内该创伤完全闭合并治愈。

[0283] 图 11

[0284] 在制剂 A 中制备的胰岛素 +PKC α 治愈由自创伤（肢端舔）引起的慢性创伤。

[0285] 使用常规方法来治疗由于不停的舔（肢端舔）而在其爪子上患有创伤的狗，历时数月而未愈合。每日采用局部应用的在制剂 A 中的胰岛素 +PKC α 抑制剂对该创伤进行治疗。该创伤在 2 个月内完全闭合并治愈。在 3.5 个月内，观察到完全的毛皮再生。

[0286] 图 12

[0287] 以商标 **HUMALOG®** 为人所知的赖脯胰岛素（rDNA 起源）的示意图。显示了赖脯胰岛素的 α 链（SEQ ID NO :57）和 β 链（SEQ ID NO :58）各自的氨基酸序列。

[0288] 图 13

[0289] 以商标 **NOVOLOG®** 为人所知的人胰岛素类似物天冬胰岛素（rDNA 起源）的一级结构的示意图。显示了天冬胰岛素的 α 链（SEQ ID NO :57）和 β 链（SEQ ID NO :59）各自的氨基酸序列。

[0290] 图 14

[0291] 以商标 **LANTUS®** 为人所知的人类胰岛素类似物甘精胰岛素（rDNA 起源）的一级结构的示意图。显示了 **LANTUS®** 的 α 链（SEQ ID NO :60）和 β 链（SEQ ID NO :61）各自的氨基酸序列。

[0292] 图 15

[0293] 以商标优泌林® R 和 **NOVOLIN®** R 为人所知的常规重组人胰岛素的一级结

构的示意图。显示了优泌 林® R 的 α 链 (SEQ ID NO :57) 和 β 链 (SEQ ID NO :62) 各自的氨基酸序列。

[0294] 图 16

[0295] 在制剂 A 中提供的各种胰岛素类似物以类似方式影响创伤愈合。

[0296] 在麻醉的 C57BL/6J 小鼠 (每组 6 只小鼠) 的上背上进行全厚 (20mm 长) 皮肤切口。切开后, 每天用直接置于伤口上的在制剂 A (上述) 中的 0.1 单位 /ml 图 6 中所指示的各种胰岛素类似物治疗创伤。所研究的胰岛素类似物是赖脯胰岛素 (“HumL”)、天冬胰岛素 (“Novo”)、甘精胰岛素 (“LANTUS®”) 和重组人胰岛素 (“HumR”)。7 天后, 切下创伤, 固定并在 H&E 染色后进行组织学评估。

[0297] 通过测量表皮基底层形成和肉芽组织形成来评估创伤愈合的百分数。通过应用角蛋白 14 染色以检测表皮基底层形成, 从而评估表皮闭合。展示出完全的表皮重建的创伤被认为是愈合的。应用 H&E 染色评估肉芽组织形成, 并根据所形成的肉芽组织相对于创伤床处的总创伤面积的百分数进行打分。展示出 > 70% 肉芽组织形成的创伤被认为是愈合的。

[0298] 通过商标名的缩写来鉴别胰岛素类似物: “HumL” 是赖脯胰岛素、“Novo” 是天冬胰岛素、“Lantus®” 是甘精胰岛素, 以及 “HumR” 是优泌 林® R。

[0299] 图 17

[0300] 与 PKC α 抑制肽组合的 USP 胰岛素以与优泌 林® R+PKC α 抑制肽类似的方式促进创伤愈合。

[0301] 在麻醉的 C57BL/6J 小鼠 (每组 6 只小鼠) 的上背上进行全厚 (20mm 长) 皮肤切口。切开后, 每天用直接置于创伤上的在制剂 A (上述) 中的 PKC α 假底物抑制肽 (1 μ g/ml) 或 0.1 单位 /ml 的优泌 林® R、或 USP 胰岛素治疗创伤。7 天后, 切下创伤, 固定并在 H&E 染色后进行组织学评估。

[0302] 应用 H&E 染色评估肉芽组织形成, 并根据所形成的肉芽组织相对于创伤床处的总创伤面积的百分数进行打分。展示出 > 70% 肉芽组织形成的创伤被认为是愈合的。

[0303] 分别通过缩写 “HumR” 和 “Ins USP” 来鉴别常规的重组人胰岛素和 USP 胰岛素。PKC α 假底物抑制肽被称为 “pep”。

[0304] 图 18

[0305] 与 PKC α 抑制肽组合的胰岛素类似物协同地促进严重发炎皮肤中炎症反应的减少。

[0306] 测量在 C57BL/6J 小鼠 (每组 6 只小鼠) 上的皮肤创伤部位的严重炎症水平。如上所述那样, 通过切开制备创伤。如图 19 中所示那样, 每天用在制剂 A (上述) 中的 PKC α 假底物抑制肽 (1 μ g/ml)、0.1 单位 /ml 的优泌 林® R 或赖脯胰岛素进行治疗。应用标准方法制备乳液, 并通过从纱布绷带 (其作为药物流出支架起作用) 递送而置于皮肤上。7 天后, 切下皮肤组织, 固定并在 H&E 染色后进行组织学评估。

[0307] 应用以下参数评估严重的炎症:

[0308] (1) 脓肿形成;

[0309] (2) 过度的白细胞增多 (在 200 倍的固定视野中 > 100 个细胞);

[0310] (3) 在血管中高的 WBC/RBC 比, 其中在固定视野 (x200) 中显示在血管内 > 20% 的 WBC 含量。

[0311] 当上述 3 个参数中的至少 2 个存在于创伤缺口处时,则认为炎症负担是严重的。

[0312] 通过合并根据对每一标本观察到的上述参数的每一个所记录的数据来确定严重炎症的总百分数。

[0313] 分别通过缩写“HumR”和“HumL”来鉴别优泌林® R 和赖脯胰岛素。PKC α 假底物抑制肽被称为“pep”。

[0314] 图 19

[0315] 在培养基 A 和培养基 B 中用内脏脂肪素和 L- α 处理的老角质化细胞中角蛋白 1 的表达。

[0316] 在培养基 A(MEM) 中 3 维持从成年小鼠(7-10 月至 2 年)的尾制备的原代皮肤角质化细胞。在培养基 A 中 5 天后,将一半培养板中的生长培养基更换为培养基 B(如上述)。随后将内脏脂肪素或 L- α 加入到在培养基 A 和培养基 B 中培养的细胞中。

[0317] 然后通过将培养基中钙的水平从 0.05mM 升高至 0.12mM 来诱导细胞分化。在诱导分化二十四(24)小时后,收集细胞并进行蛋白质印记分析。使用商业上可获得的角蛋白 1 特异性抗体来评估细胞裂解物中角蛋白 1 的表达。使用标准蛋白质印记和密度测量技术评估角蛋白 1 的表达。

[0318] 本文中引用的所有参考文献(例如,杂志文章、专利文件以及登录号)均通过引用此全文并入本文。

[0319] 参考文献

[0320] Adams JC 和 Watt FM(1990)Changes in keratinocyte adhesion during terminal differentiation: reduction in fibronectin binding precedes $\alpha 5 \beta 1$ integrin loss from the cell surface. Cell 63:425-435.

[0321] Alt A, Gartsbein M, Ohba M, Kuroki T, 和 Tennenbaum T(2004)Differential regulation of $\alpha 6 \beta 4$ integrin by PKC isoforms in murine skin keratinocytes. Biochem Biophys Res Commun 314:17-23.

[0322] Alt A, Ohba M, Li L, Gartsbein M, Belanger A, Denning MF, Kuroki T, Yuspa SH, 和 Tennenbaum T(2001)Protein kinase C δ -mediated phosphorylation of $\alpha 6 \beta 4$ is associated with reduced integrin localization to the hemidesmosome and decreased keratinocyte attachment. Cancer Res 61:4591-4598.

[0323] Ausubel FM 等人(1989)Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience.

[0324] Azzi A, Boscoboinik D, 和 Hensey C(1992)The protein kinase C family. Eur J Biochem 208:547-557.

[0325] Bell E, Sher S, Hull B, Merrill C, Rosen S, Chamson A, Asselineau D, Dubertret L, Coulomb B, Lapiere C, Nusgens B, 和 Neveux Y(1983)The reconstitution of living skin. J Invest Dermatol 81:2s-10s.

[0326] Blumberg PM(1991)Complexities of the protein kinase C pathway. Mol Carcinog 4:339-344.

[0327] Boyce ST 和 Ham RG(1983)Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free

serial cultute. J Invest Dermatol 81:33s-40s.

[0328] Bradshaw D, Hill CH, Nixon JS 和 Wilkinson SE(1993)Therapeuticpotential of PKC inhibitors. Agents Actions 38:135-147.

[0329] Breitkreutz D, Bohnert A, Herzmann E, Bowden PE, Boukamp P 和 Fusenig NE(1984)Differentiation specific functions in cultured andtransplanted mouse keratinocytes:environmental influences onultrastructure and keratin expression. Differentiation 26:154-169.

[0330] Breitkreutz D, Stark HJ, Plein P, Baur M 和 Fusenig NE(1993) Differential modulation of epidermal keratinization in immortalized(HaCaT)and tumorigenic human skin keratinocytes(HaCaT-ras)by retinoicacid and extracellular Ca^{2+} . Differentiation 54:201-217.

[0331] Cadena, Gill(1993)Protein Expression and Purification 4:177.

[0332] Castagna M, Takai Y, Kabuchi K, Kikkawa U 和 Nishizuka Y(1982)Direct activation of calcium-activated phospholipid dependent proteinkinase by tumor-promoting phorbol esters. J Biol Chem 257:7847-7851.

[0333] Chakravarthy BR, Isaacs RJ, Morley P, Durkin JP 和 Whitfield JF(1995)Stimulation of protein kinase C during Ca^{2+} -induced keratinocytedifferentiation. Selective blockade of MARCKS phosphorylation bycalmodulin. J Biol Chem 270:1362-1368.

[0334] Chauhan VPS, Chauha A, Deshmukh Ds 和 Brockerhoff H(1990)Lipidactivators of protein kinase C. Life Sci 47:981-986.

[0335] Coligan 等人, Current Protocols in Immunology, Wiley Interscience, 1991, Unit 9.

[0336] De M, I 和 Theoret CL(2004)Spatial and temporal expression oftypes I and II receptors for transforming growth factor beta in normalequine skin and dermal wounds. Vet Surg 33:70-76.

[0337] Denning MF, Dlugosz AA, Cheng C, Dempsey PJ, Coffey RJJ, Threadgill DW, Magnuson T 和 Yuspa SH(2000)Cross-talk betweenepidermal growth factor receptor and protein kinase C duringcalcium-induced differentiation of keratinocytes. Exp Dermatol 9:192-199.

[0338] Denning MF, Dlugosz AA, Williams EK, Szallasi Z, Blumberg PM, 和 Yuspa SH(1995)Specific protein kinase C isozymes mediate the inductionof keratinocyte differentiation markers by calcium. Cell Growth Differ 6:149-157.

[0339] Deucher A, Efimova T, 和 Eckert RL(2002)Calcium-dependentinvolucrin expression is inversely regulated by protein kinase C(PKC)alphaand PKCdelta. J Biol Chem 277:17032-17040.

[0340] Diegelmann RF 和 Evans MC(2004)Wound healing:an overview ofacute, fibrotic and delayed healing. Front Biosci 9:283-9. :283-289.

[0341] Eckert RL(1989)Structure, function, and differentiation of the

keratinocyte. *Physiol Rev* 69 :1316-1346.

[0342] Eichholtz T, de Bont DB, de WJ, Liskamp RM, 和 Ploegh HL(1993) A myristoylated pseudosubstrate peptide, a novel protein kinase C inhibitor. *J Biol Chem* 268 :1982-1986.

[0343] Erangionic, Neel(1993) *Analytical Biochemistry*, 210 :179.

[0344] Freeman(1969) San Francisco, pp. 27-62.

[0345] Fuchs E 和 Byrne C(1994) The epidermis : rising to the surface. *Curr Opin Genet Dev* 4 :725-736.

[0346] Gartsbein M, Alt A, Hashimoto K, Nakajima K, Kuroki T, 和 Tennenbaum T(2006) The role of protein kinase C delta activation and STAT3 Ser727 phosphorylation in insulin-induced keratinocyte proliferation. *J Cell Sci* 119 :470-481.

[0347] Goldsmith, L. A.

[0348] Goodson WH 和 Hunt TK(1979) Wound healing and the diabetic patient. *Surg Gynecol Obstet* 149 :600-608.

[0349] Green H(1977) Terminal differentiation of cultured human epidermal cells. *Cell* 11 :405-416.

[0350] Grunfeld C(1992) Diabetic foot ulcers : etiology, treatment, and prevention. *Adv Intern Med* 37 :103-32 :103-132.

[0351] Hennings H, Michael D, Cheng C, Steinert P, Holbrook K, 和 Yuspa SH(1980) Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* 19 :245-254.

[0352] Hofmann J(1997) The potential for isoenzyme-selective modulation of protein kinase C. *FASEB J* 11 :649-669.

[0353] Houghten(1985) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 82 :5131.

[0354] House C 和 Kemp BE(1987) Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. *Science* 238 :1726-1728.

[0355] Jones KT 和 Sharpe GR(1994) Staurosporine, a non-specific PKC inhibitor, induces keratinocyte differentiation and raises intracellular calcium, but Ro31-8220, a specific inhibitor, does not. *J Cell Physiol* 159 :324-330.

[0356] Kazanietz MG, Areces LB, Bahador A, Mischak H, Goodnight J, Mushinski JF, 和 Blumberg PM(1993) Characterization of ligand and substrate specificity for the calcium-dependent and calcium-independent PKC isozymes. *Mol Pharmacol* 44 :298-307.

[0357] Keast DH 和 Orsted H(1998) The basic principles of wound care. *Ostomy Wound Manage* 44 :24-1.

[0358] Kikkawa U, Kishimoto A, 和 Nishizuka Y(1989) The protein kinase C family : heterogeneity and its implications. *Annu Rev Biochem* 58 :31-44.

[0359] Kirsner RS 和 Eaglstein WH(1993) The wound healing process. *Dermatol Clin* 11 :629-640.

- [0360] Knol BW 和 Wisselink MA(1996)Lick granuloma in dogs;anobsession for dogs, owners and veterinarians.Tijdschr Diergeneeskd 121 :21-23.
- [0361] Li L, Tennenbaum T, 和 Yuspa SH(1996)Suspension-induced murinekeratinocyte differentiation is mediated by calcium.J Invest Dermatol 106 :254-260.
- [0362] Li W, Nadelman C, Gratch NS, Chen M, Kasahara N, 和 Woodley DT(2002)An important role for protein kinase C-delta in human keratinocytemigration on dermal collagen.Exp Cell Res 273 :219-228.
- [0363] Merrifield(1962)85J. Am. Chem. Soc. 2149.
- [0364] Mousley M(2003)Diabetes and its effect on wound healing andpatient care.Nurs Times 99 :70,73-70,74.
- [0365] Nash LG, Phillips MN, Nicholson H, Barnett R, 和 Zhang M(2004)Skin ligaments:regional distribution and variation in morphology.ClinAnat 17 : 287-293.
- [0366] Nishizuka Y(1988)The molecular heterogeneity of PKC and itsimplications for cellular regulation.Nature 334 :661-665.
- [0367] Nishizuka Y(1995)Protein kinase C and lipid signaling for sustainedcellular responses.FASEB J 9 :484-496.
- [0368] Ohba M, Ishino K, Kashiwagi M, Kawabe S, Chida K, Huh NH, 和 Kuroki T(1998)Induction of differentiation in normal human keratinocytesby adenovirus-mediated introduction of the eta and delta isoforms of protein kinase C.Mol Cell Biol 18 :5199-5207.
- [0369] Querleux B, Cornillon C, Jolivet O, 和 Bittoun J(2002)Anatomy andphysiology of subcutaneous adipose tissue by in vivo magnetic resonanceimaging and spectroscopy:relationships with sex and presence of cellulite.Skin Res Technol 8 :118-124.
- [0370] Saito I, Oya Y, Yamamoto K, Yuasa T, Shimojo H. (1985)Construction of nondefective adenovirus type 5 bearing a 2.8-kilobasehepatitis B virus DNA near the right end of its genome.J Virol. Jun ;54(3) :711-719.
- [0371] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T(2001)Molecular Cloning :ALaboratory Manual(3d ed.).
- [0372] Seo HR, Kwan YW, Cho CK, Bae S, Lee SJ, Soh JW, Chung HY, 和 Lee YS(2004) PKCalpha induces differentiation through ERK1/2phosphorylation in mouse keratinocytes.Exp Mol Med 36 :292-299.
- [0373] Shaw JE 和 Boulton AJ(1997)The pathogenesis of diabetic footproblems :an overview.Diabetes 46 Suppl 2 :S58-61 :S58-S61.
- [0374] Shen S,Alt A, Wertheimer E, Gartsbein M, Kuroki T, Ohba M, Braiman L, Sampson SR, 和 Tennenbaum T(2001)PKCdelta activation :adivergence point in the signaling of insulin and IGF-1-induced proliferationof skin keratinocytes.Diabetes 50 :

255-264.

[0375] Silhi N(1998)Diabetes and wound healing. J Wound Care 7 :47-51.

[0376] Stone OJ(1986)Hyperinflammatory proliferative(blastomycosis-like) pyodermas :review,mechanisms,and therapy. J Dermatol Surg Oncol 12 :271-273.

[0377] Svetek J, Schara M, Pecar S, Hergenahm M,和 Hecker E(1995)Spectroscopic characterization of specific phorbol ester binding toPKC-receptor sites in membranes in situ.Carcinogenesis 16 :2589-2592.

[0378] Tennenbaum T, Yuspa SH, Knox B, Sobel ME, Castronovo V, YamadaY, 和 De Luca LM(1991)Alterations in attachment to laminin andlocalization of laminin binding proteins during differentiation of primarymouse keratinocytes in vitro(abstract). J Invest Dermatol 96 :Abstract 566.

[0379] White SD(1990)Naltrexone for treatment of acral lick dermatitis in dogs. J Am Vet Med Assoc 196 :1073-1076.

[0380] Williams RL 和 Armstrong DG(1998)Wound healing.New modalitiesfor a new millennium. Clin Podiatr Med Surg 15 :117-128.

[0381] Wysocki AB(1999)Skin anatomy, physiology, and pathophysiology. Nurs Clin Norrh Am 34 :777-97, v.

[0382] Yeruham I, Gur Y, 和 Harmelin A(1992)Acral lick dermatitis in adairy cow. Vet Rec 130 :479-480.

[0383] Yim VW, Yeung JH, Mak PS, Graham CA, Lai PB, 和 Rainer TH(2007)Five year analysis of Jockey Club horse-related injuries presenting to atrauma centre in Hong Kong. Injury 38 :98-103.

[0384] Yuspa SH, Hawley-Nelson P, Stanley JR, 和 Hennings H(1980)Epidermal cell culture. Transplant Proc 12 :114-122.

序列表

<110>HEALOR LTD.

<120> 药物组合物

<130>P-10756-PC

<140>

<141>

<150>60/962, 706

<151>2007-07-30

<160>64

<170>PatentIn version 3.3

<210>1

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<220>

<223>N- 端豆蔻酰化的

<400>1

Phe Ala Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln

1

5

<210>2

<211>13

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>2

Arg Phe Ala Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Lys Asn Val

1 5 10

<210>3

<211>18

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>3

Arg Phe Ala Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Lys Asn Val His Glu Val

1 5 10 15

Lys Asn

<210>4

<211>22

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>4

Arg Phe Ala Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Lys Asn Val His Glu Val

1 5 10 15

Lys Asn Leu Lys Gly Ala

20

<210>5

<211>13

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>5

Arg Phe Ala Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Leu Ala Val

1 5 10

<210>6

<211>13

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>6

Arg Phe Ala Arg Lys Gly Ala Leu Ala Gln Lys Asn Val

1 5 10

<210>7

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>7

Arg Phe Ala Arg Lys Gly Ala Leu Arg

1 5

<210>8

<211>13

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<220>

<221>MOD_RES

<222>(3)..(3)

<223> 任意氨基酸

<400>8

Tyr Tyr Xaa Lys Arg Lys Met Ala Phe Phe Glu Phe Phe

1 5 10

<210>9

<211>13

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>9

Phe Lys Leu Lys Arg Lys Gly Ala Phe Lys Lys Phe Ala

1 5 10

<210>10

<211>13

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>10

Ala Arg Arg Lys Arg Lys Gly Ala Phe Phe Tyr Gly Gly

1 5 10

<210>11

<211>13

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>11

Arg Arg Arg Arg Arg Lys Gly Ala Phe Arg Arg Lys Ala

1 5 10

<210>12

<211>14

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>12

Arg Phe Ala Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Lys Asn Val Tyr

1 5 10

<210>13

<211>12

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>13

Asp Ala Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Asn Lys Val

1 5 10

<210>14

<211>16

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>14

Glu Arg Met Arg Pro Arg Lys Arg Gln Gly Ala Val Arg Arg Arg Val

1 5 10 15

<210>15

<211>17

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>15

Gly Pro Arg Pro Leu Phe Cys Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Lys Val

1 5 10 15

Val

<210>16

<211>11

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>16

Gln Lys Arg Pro Ala Gln Arg Ser Lys Tyr Leu

1 5 10

<210>17

<211>11

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>17

Gln Lys Arg Pro Ser Gln Arg Ala Lys Tyr Leu

1 5 10

<210>18

<211>12

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>18

Gly	Gly	Pro	Leu	Arg	Arg	Thr	Leu	Ala	Val	Arg	Arg
1				5						10	

<210>19

<211>12

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>19

Gly	Gly	Pro	Leu	Ser	Arg	Arg	Leu	Ala	Val	Arg	Arg
1				5						10	

<210>20

<211>12

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>20

Gly	Gly	Pro	Leu	Ser	Arg	Thr	Leu	Ala	Val	Arg	Arg
1				5						10	

<210>21

<211>12

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>21

Gly Gly Pro Leu Ser Arg Arg Leu Ala Val Ala Arg

1 5 10

<210>22

<211>12

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>22

Gly Gly Pro Leu Arg Arg Thr Leu Ala Val Ala Arg

1 5 10

<210>23

<211>8

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>23

Val Arg Lys Ala Leu Arg Arg Leu

1 5

<210>24

<211>12

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>24

Gly Gly Arg Leu Ser Arg Thr Leu Ala Val Ala Arg

1	5	10
---	---	----

<210>25

<211>17

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<220>

<223>N- 端豆蔻酰化的

<220>

<223>C- 端酰胺化的

<400>25

Thr Arg Lys Arg Gln Pro Ala Met Arg Arg Arg Val His Gln Ile Asn

1	5	10	15
---	---	----	----

Gly

<210>26

<211>12

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>26

Arg Lys Arg Gln Arg Ala Met Arg Arg Arg Val His

1	5	10
---	---	----

<210>27

<211>16

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>27

Glu Arg Met Arg Pro Arg Lys Arg Gln Gly Ala Val Arg Arg Arg Val
1 5 10 15

<210>28

<211>13

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>28

Phe Lys Leu Lys Arg Lys Gly Ala Phe Lys Lys Phe Ala
1 5 10

<210>29

<211>13

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<220>

<221>MOD_RES

<222> (3).. (3)

<223> 任意氨基酸

<400>29

Tyr Tyr Xaa Lys Arg Lys Met Ala Phe Phe Glu Phe Phe
1 5 10

<210>30

<211>13

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>30

Ala Arg Arg Lys Arg Lys Gly Ala Phe Phe Tyr Gly Gly
1 5 10

<210>31

<211>13

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>31

Arg Arg Arg Arg Arg Lys Gly Ala Phe Arg Arg Lys Ala
1 5 10

<210>32

<211>20

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>32

Ala Ala Ala Lys Ile Gln Ala Ala Trp Arg Gly His Met Ala Arg Lys
1 5 10 15
Lys Ile Lys Ser
20

<210>33

<211>19

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>33

Ala Ala Ala Lys Ile Gln Ala Ala Phe Arg Gly His Met Ala Arg Lys

1 5 10 15

Lys Ile Lys

<210>34

<211>16

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>34

Glu Arg Met Arg Pro Arg Lys Arg Gln Gly Ala Val Arg Arg Arg Val

1 5 10 15

<210>35

<211>8

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>35

Val Arg Lys Ala Leu Arg Arg Leu

1 5

<210>36

<211>22

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

〈223〉人工序列的描述:合成肽

<400>39

Glu Arg Met Arg Pro Arg Lys Arg Gln Gly Ala Val Arg Arg Arg Val
1 5 10 15

<210>40

<211>13

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>40

Arg Phe Ala Arg Leu Gly Ala Leu Arg Gln Lys Asn Val
1 5 10

<210>41

<211>13

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<220>

<221>MOD_RES

<222> (3).. (3)

<223> 任意氨基酸

<400>41

Tyr Tyr Xaa Lys Arg Lys Met Ala Phe Phe Glu Phe Phe
1 5 10

<210>42

<211>13

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>42

Arg Arg Phe Lys Arg Gln Gly Ala Phe Phe Tyr Phe Phe
1 5 10

<210>43

<211>13

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>43

Phe Lys Leu Lys Arg Lys Gly Ala Phe Lys Lys Phe Ala
1 5 10

<210>44

<211>13

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>44

Ala Arg Arg Lys Arg Lys Gly Ser Phe Phe Tyr Gly Gly
1 5 10

<210>45

<211>13

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>45

Phe Lys Leu Lys Arg Lys Gly Ser Phe Lys Lys Phe Ala
1 5 10

<210>46

<211>13

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>46

Arg Arg Phe Lys Arg Gln Gly Ser Phe Phe Tyr Phe Phe
1 5 10

<210>47

<211>13

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<220>

<221>MOD_RES

<222>(3)..(3)

<223> 任意氨基酸

<400>47

Tyr Tyr Xaa Lys Arg Lys Met Ser Phe Phe Glu Phe Phe
1 5 10

<210>48

<211>13

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>48

Arg Arg Arg Arg Arg Lys Gly Ser Phe Arg Arg Lys Ala

1 5 10

<210>49

<211>16

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>49

Glu Arg Met Arg Pro Arg Lys Arg Gln Gly Ser Val Arg Arg Arg Val

1 5 10 15

<210>50

<211>12

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>50

Met Asn Arg Arg Gly Ser Ile Lys Gln Ala Lys Ile

1 5 10

<210>51

<211>22

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>51

Met Phe Ala Val Arg Asp Arg Arg Gln Thr Val Lys Lys Gly Val Ile

1 5 10 15

Lys Ala Val Asp Ala Val

20

<210>52

<211>14

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>52

Phe Gly Glu Ser Arg Ala Ser Thr Phe Cys Gly Thr Pro Asp

1

5

10

<210>53

<211>10

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>53

Lys Ala Arg Leu Ser Tyr Ser Asp Lys Asn

1

5

10

<210>54

<211>13

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>54

Ser Ala Phe Ala Gly Phe Ser Phe Val Asn Pro Lys Phe

1

5

10

<210>55

<211>22

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>55

Lys Lys Lys Lys Lys Arg Phe Ser Phe Lys Lys Ser Phe Lys Leu Ser

1 5 10 15

Gly Phe Ser Phe Lys Lys

20

<210>56

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的寡核苷酸

<400>56

gttctctgctg gtgagtttca 20

<210>57

<211>21

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>57

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn

20

<210>58

<211>30

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>58

Phe	Val	Asn	Gln	His	Leu	Cys	Gly	Ser	His	Leu	Val	Glu	Ala	Leu	Tyr
1				5				10						15	
Leu	Val	Cys	Gly	Glu	Arg	Gly	Phe	Phe	Tyr	Thr	Lys	Pro	Thr		
				20				25						30	

<210>59

<211>30

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>59

Phe	Val	Asn	Gln	His	Leu	Cys	Gly	Ser	His	Leu	Val	Glu	Ala	Leu	Tyr
1				5				10						15	
Leu	Val	Cys	Gly	Glu	Arg	Gly	Phe	Phe	Tyr	Thr	Asp	Lys	Thr		
				20				25						30	

<210>60

<211>21

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>60

Gly	Ile	Val	Glu	Gln	Cys	Cys	Thr	Ser	Ile	Cys	Ser	Leu	Tyr	Gln	Leu
1				5				10						15	
Glu	Asn	Tyr	Cys	Gly											
				20											

<210>61

<211>32

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>61

Phe	Val	Asn	Gln	His	Leu	Cys	Gly	Ser	His	Leu	Val	Glu	Ala	Leu	Tyr
1				5				10					15		
Leu	Val	Cys	Gly	Glu	Arg	Gly	Phe	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys	Thr	Arg	Arg
			20					25					30		

<210>62

<211>30

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成肽

<400>62

Phe	Val	Asn	Gln	His	Leu	Cys	Gly	Ser	His	Leu	Val	Glu	Ala	Leu	Tyr
1				5				10					15		
Leu	Val	Cys	Gly	Glu	Arg	Gly	Phe	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys	Thr		
			20					25					30		

<210>63

<211>337

<212>PRT

<213> 人

<400>63

Pro	Pro	Asn	Thr	Ser	Lys	Val	Tyr	Ser	Tyr	Phe	Glu	Cys	Arg	Glu	Lys
1				5				10					15		
Lys	Thr	Glu	Asn	Ser	Lys	Leu	Arg	Lys	Val	Lys	Tyr	Glu	Glu	Thr	Val
			20					25					30		

Phe Tyr Gly Leu Gln Tyr Ile Leu Asn Lys Tyr Leu Lys Gly Lys Val		
35	40	45
Val Thr Lys Glu Lys Ile Gln Glu Ala Lys Asp Val Tyr Lys Glu His		
50	55	60
Phe Gln Asp Asp Val Phe Asn Glu Lys Gly Trp Asn Tyr Ile Leu Glu		
65	70	75
Lys Tyr Asp Gly His Leu Pro Ile Glu Ile Lys Ala Val Pro Glu Gly		
85	90	95
Phe Val Ile Pro Arg Gly Asn Val Leu Phe Thr Val Glu Asn Thr Asp		
100	105	110
Pro Glu Cys Tyr Trp Leu Thr Asn Trp Ile Glu Thr Ile Leu Val Gln		
115	120	125
Ser Trp Tyr Pro Ile Thr Val Ala Thr Asn Ser Arg Glu Gln Lys Lys		
130	135	140
Ile Leu Ala Lys Tyr Leu Leu Glu Thr Ser Gly Asn Leu Asp Gly Leu		
145	150	155
Glu Tyr Lys Leu His Asp Phe Gly Tyr Arg Gly Val Ser Ser Gln Glu		
165	170	175
Thr Ala Gly Ile Gly Ala Ser Ala His Leu Val Asn Phe Lys Gly Thr		
180	185	190
Asp Thr Val Ala Gly Leu Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Tyr Gly Thr Lys		
195	200	205
Asp Pro Val Pro Gly Tyr Ser Val Pro Ala Ala Glu His Ser Thr Ile		
210	215	220
Thr Ala Trp Gly Lys Asp His Glu Lys Asp Ala Phe Glu His Ile Val		
225	230	235
Thr Gln Phe Ser Ser Val Pro Val Ser Val Val Ser Asp Ser Tyr Asp		
245	250	255
Ile Tyr Asn Ala Cys Glu Lys Ile Trp Gly Glu Asp Leu Arg His Leu		
260	265	270
Ile Val Ser Arg Ser Thr Gln Ala Pro Leu Ile Ile Arg Pro Asp Ser		
275	280	285
Gly Asn Pro Leu Asp Thr Val Leu Lys Val Leu Glu Ile Leu Gly Lys		
290	295	300
Lys Phe Pro Val Thr Glu Asn Ser Lys Gly Tyr Lys Leu Leu Pro Pro		
305	310	315
Tyr Leu Arg Val Ile Gln Gly Asp Gly Val Asp Ile Asn Thr Leu Gln		
325	330	335
Glu		

<210>64

<211>491

<212>PRT

<213> 小鼠属

<400>64

```

Met Asn Ala Ala Ala Glu Ala Glu Phe Asn Ile Leu Leu Ala Thr Asp
  1              5              10              15
Ser Tyr Lys Val Thr His Tyr Lys Gln Tyr Pro Pro Asn Thr Ser Lys
              20              25              30
Val Tyr Ser Tyr Phe Glu Cys Arg Glu Lys Lys Thr Glu Asn Ser Lys
              35              40              45
Val Arg Lys Val Lys Tyr Glu Glu Thr Val Phe Tyr Gly Leu Gln Tyr
              50              55              60
Ile Leu Asn Lys Tyr Leu Lys Gly Lys Val Val Thr Lys Glu Lys Ile
  65              70              75              80
Gln Glu Ala Lys Glu Val Tyr Arg Glu His Phe Gln Asp Asp Val Phe
              85              90              95
Asn Glu Arg Gly Trp Asn Tyr Ile Leu Glu Lys Tyr Asp Gly His Leu
              100             105             110
Pro Ile Glu Val Lys Ala Val Pro Glu Gly Ser Val Ile Pro Arg Gly
              115             120             125
Asn Val Leu Phe Thr Val Glu Asn Thr Asp Pro Glu Cys Tyr Trp Leu
              130             135             140
Thr Asn Trp Ile Glu Thr Ile Leu Val Gln Ser Trp Tyr Pro Ile Thr
  145             150             155             160
Val Ala Thr Asn Ser Arg Glu Gln Lys Lys Ile Leu Ala Lys Tyr Leu
              165             170             175
Leu Glu Thr Ser Gly Asn Leu Asp Gly Leu Glu Tyr Lys Leu His Asp
              180             185             190
Phe Gly Tyr Arg Gly Val Ser Ser Gln Glu Thr Ala Gly Ile Gly Ala
              195             200             205
Ser Ala His Leu Val Asn Phe Lys Gly Thr Asp Thr Val Ala Gly Ile
              210             215             220
Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Tyr Gly Thr Lys Asp Pro Val Pro Gly Tyr
  225             230             235             240
Ser Val Pro Ala Ala Glu His Ser Thr Ile Thr Ala Trp Gly Lys Asp
              245             250             255
His Glu Lys Asp Ala Phe Glu His Ile Val Thr Gln Phe Ser Ser Val

```

260	265	270
Pro Val Ser Val Val Ser Asp Ser Tyr Asp Ile Tyr Asn Ala Cys Glu		
275	280	285
Lys Ile Trp Gly Glu Asp Leu Arg His Leu Ile Val Ser Arg Ser Thr		
290	295	300
Glu Ala Pro Leu Ile Ile Arg Pro Asp Ser Gly Asn Pro Leu Asp Thr		
305	310	315
Val Leu Lys Val Leu Asp Ile Leu Gly Lys Lys Phe Pro Val Thr Glu		
325	330	335
Asn Ser Lys Gly Tyr Lys Leu Leu Pro Pro Tyr Leu Arg Val Ile Gln		
340	345	350
Gly Asp Gly Val Asp Ile Asn Thr Leu Gln Glu Ile Val Glu Gly Met		
355	360	365
Lys Gln Lys Lys Trp Ser Ile Glu Asn Val Ser Phe Gly Ser Gly Gly		
370	375	380
Ala Leu Leu Gln Lys Leu Thr Arg Asp Leu Leu Asn Cys Ser Phe Lys		
385	390	395
Cys Ser Tyr Val Val Thr Asn Gly Leu Gly Val Asn Val Phe Lys Asp		
405	410	415
Pro Val Ala Asp Pro Asn Lys Arg Ser Lys Lys Gly Arg Leu Ser Leu		
420	425	430
His Arg Thr Pro Ala Gly Asn Phe Val Thr Leu Glu Glu Gly Lys Gly		
435	440	445
Asp Leu Glu Glu Tyr Gly His Asp Leu Leu His Thr Val Phe Lys Asn		
450	455	460
Gly Lys Val Thr Lys Ser Tyr Ser Phe Asp Glu Val Arg Lys Asn Ala		
465	470	475
Gln Leu Asn Ile Glu Gln Asp Val Ala Pro His		480
485	490	

P-10756-PC

1

P-10756-PC

1

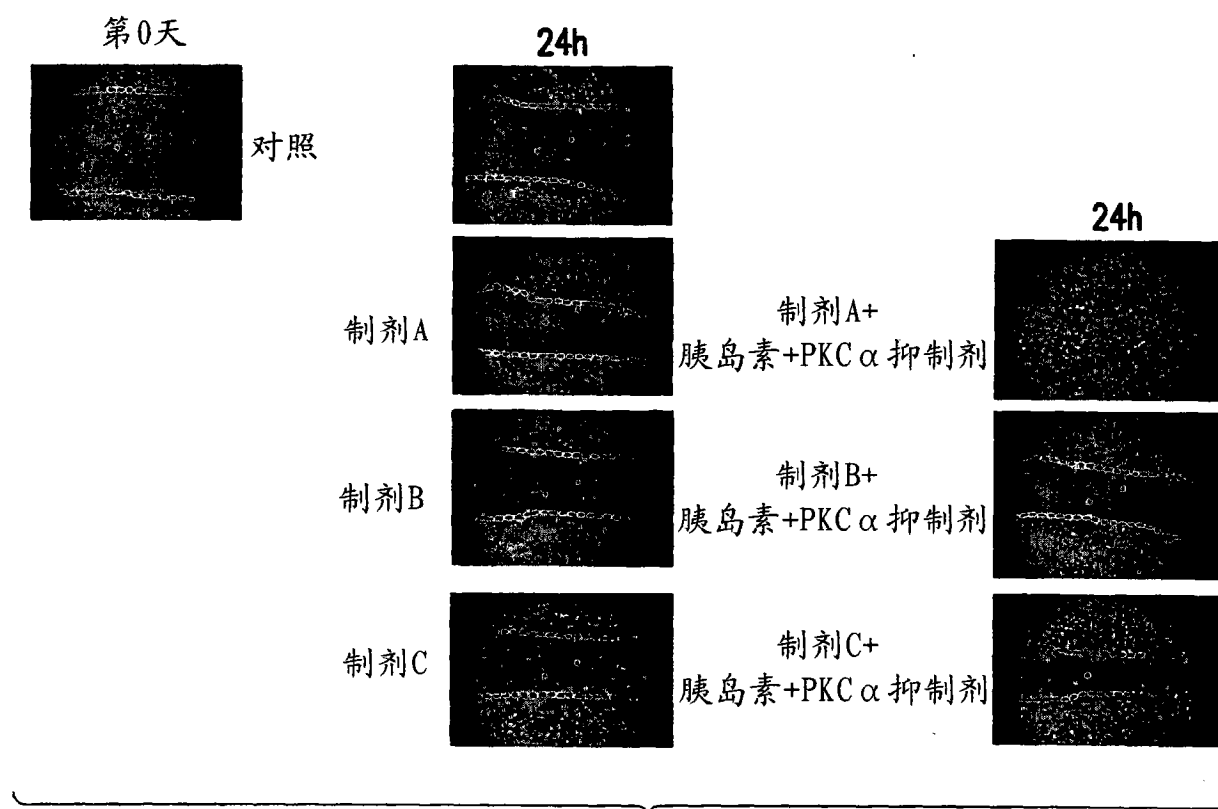


图 1A

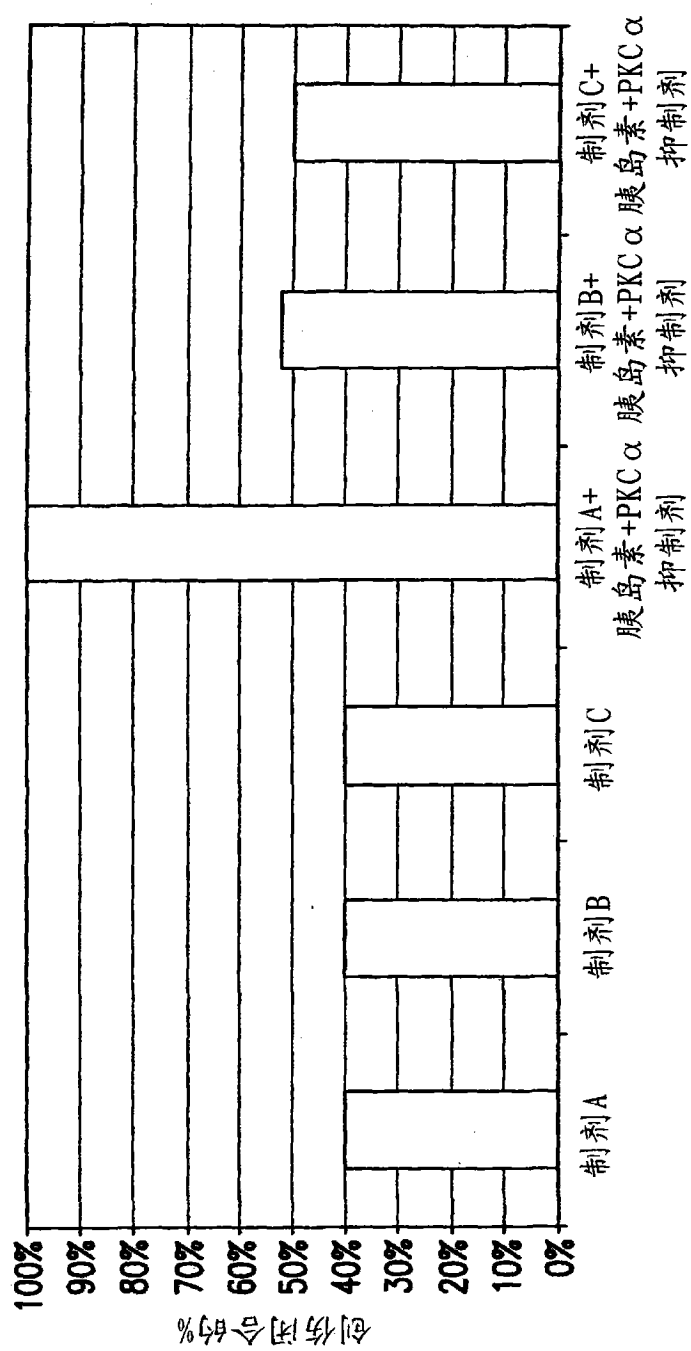


图 1B

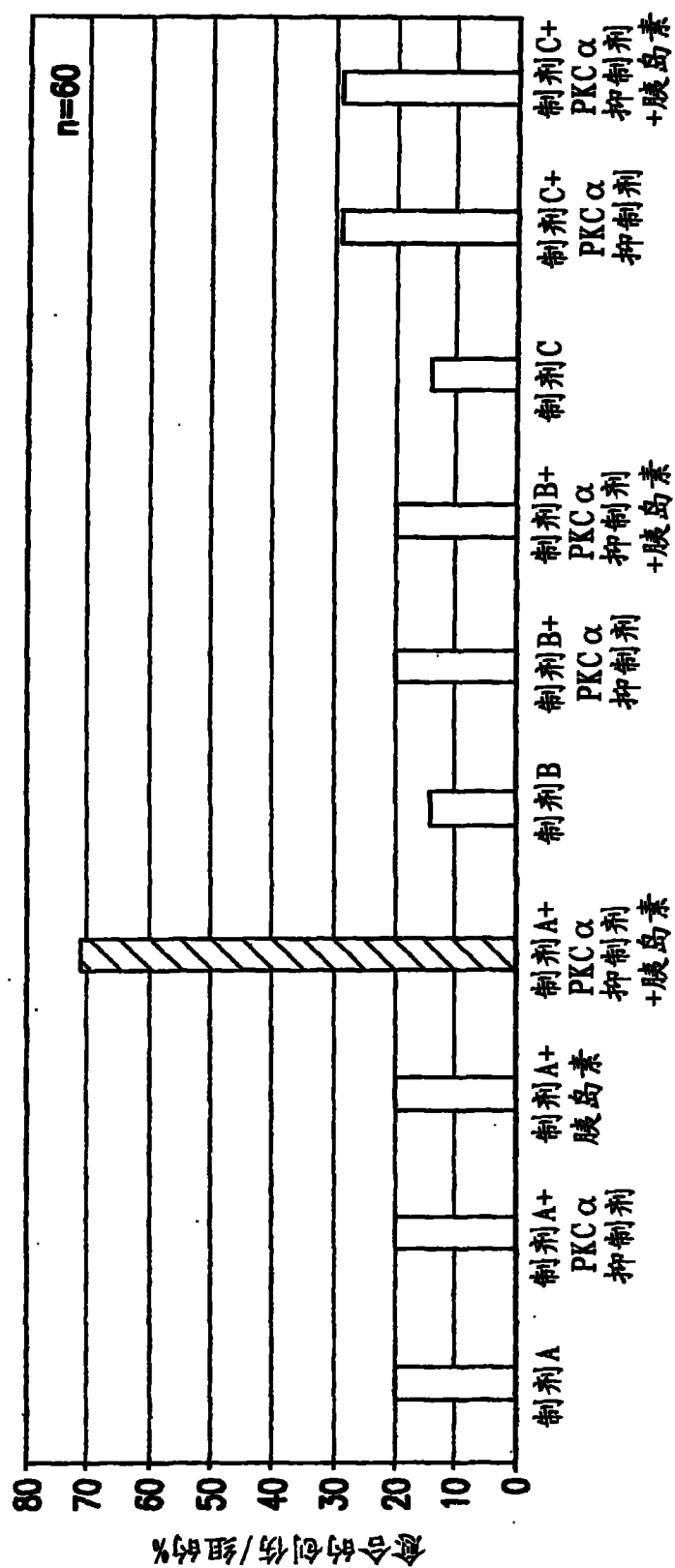


图 2A

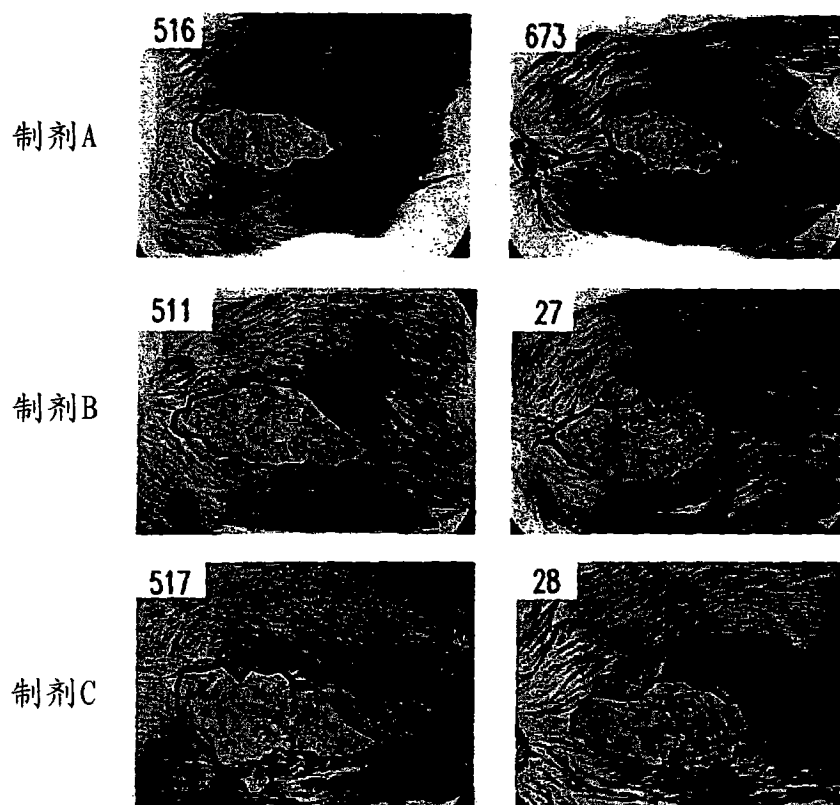


图 2B

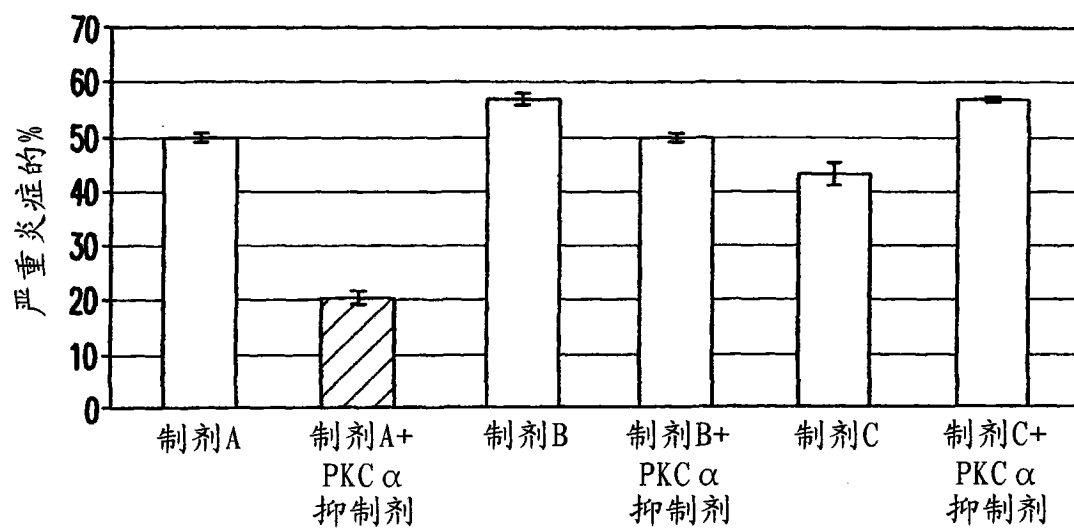


图 3

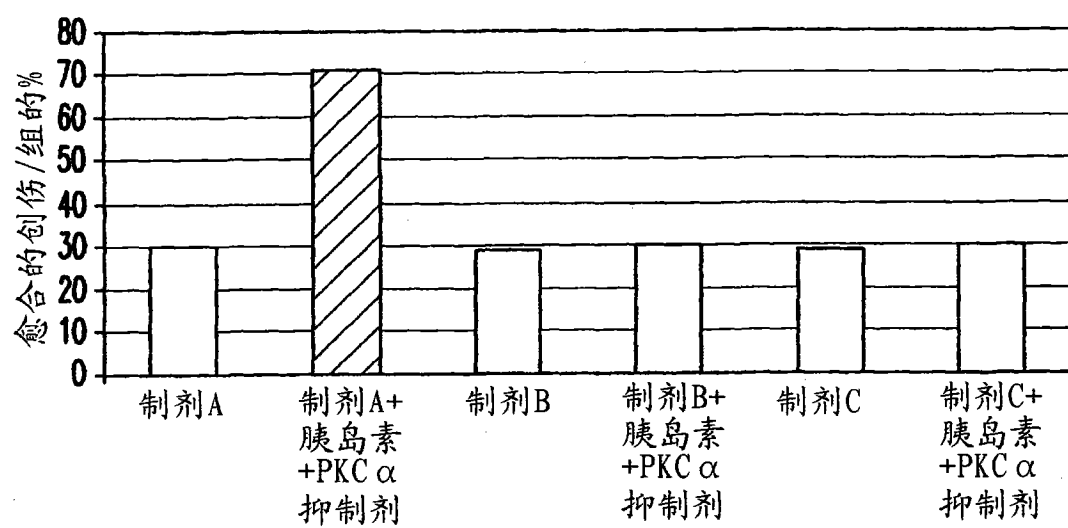


图 4

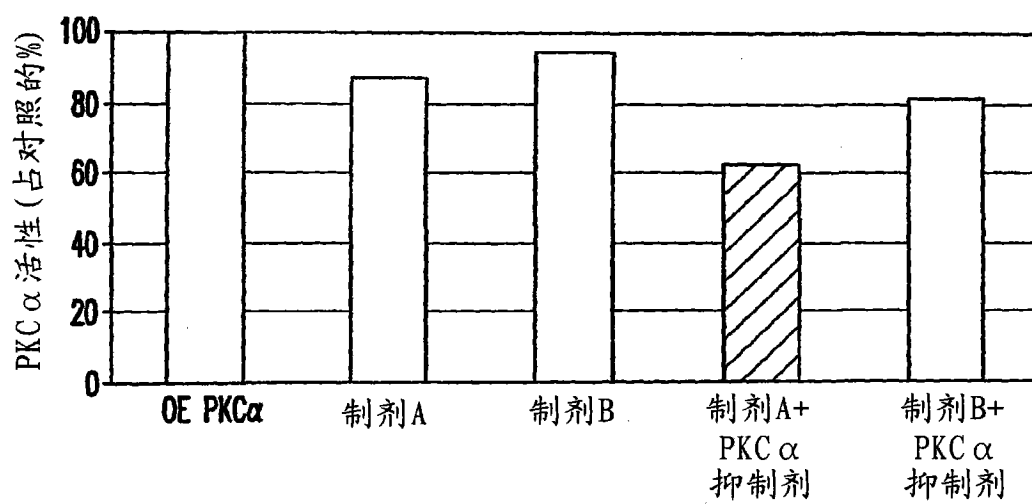


图 5

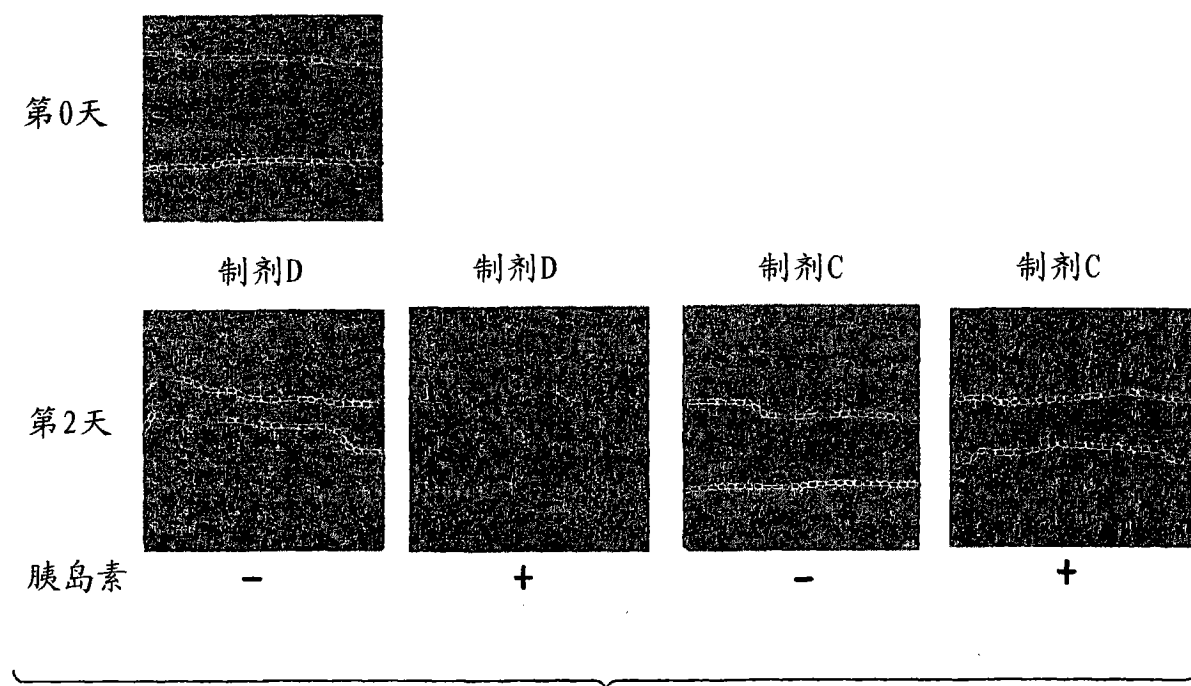


图 6A

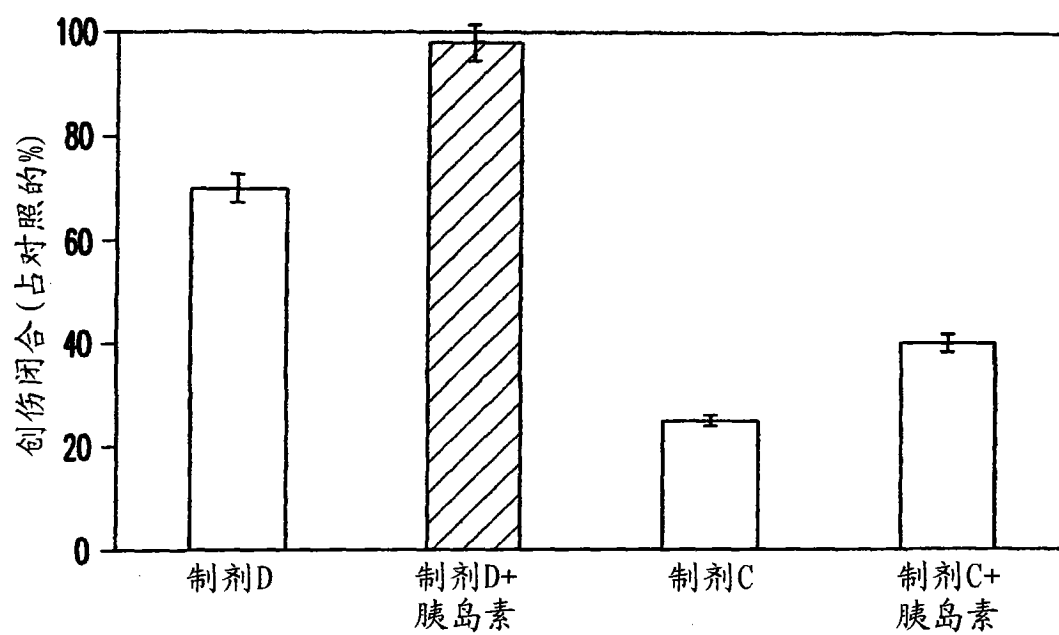


图 6B

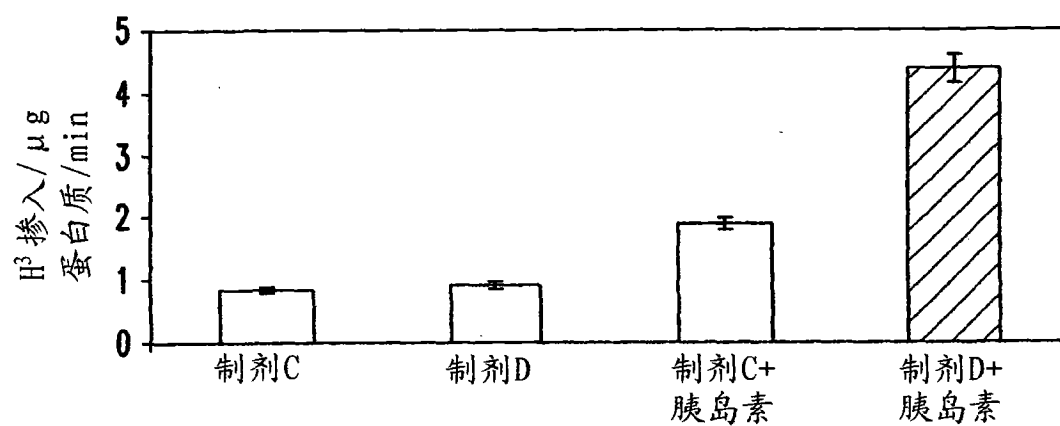


图 6C

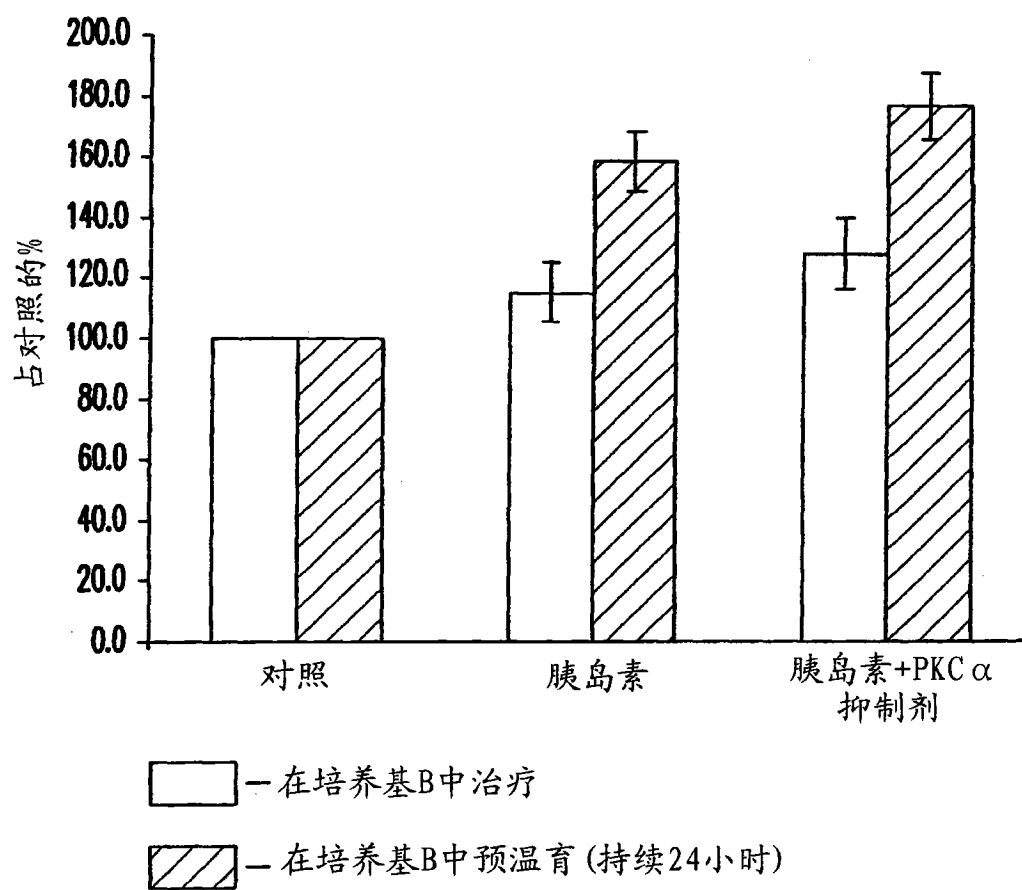


图 7

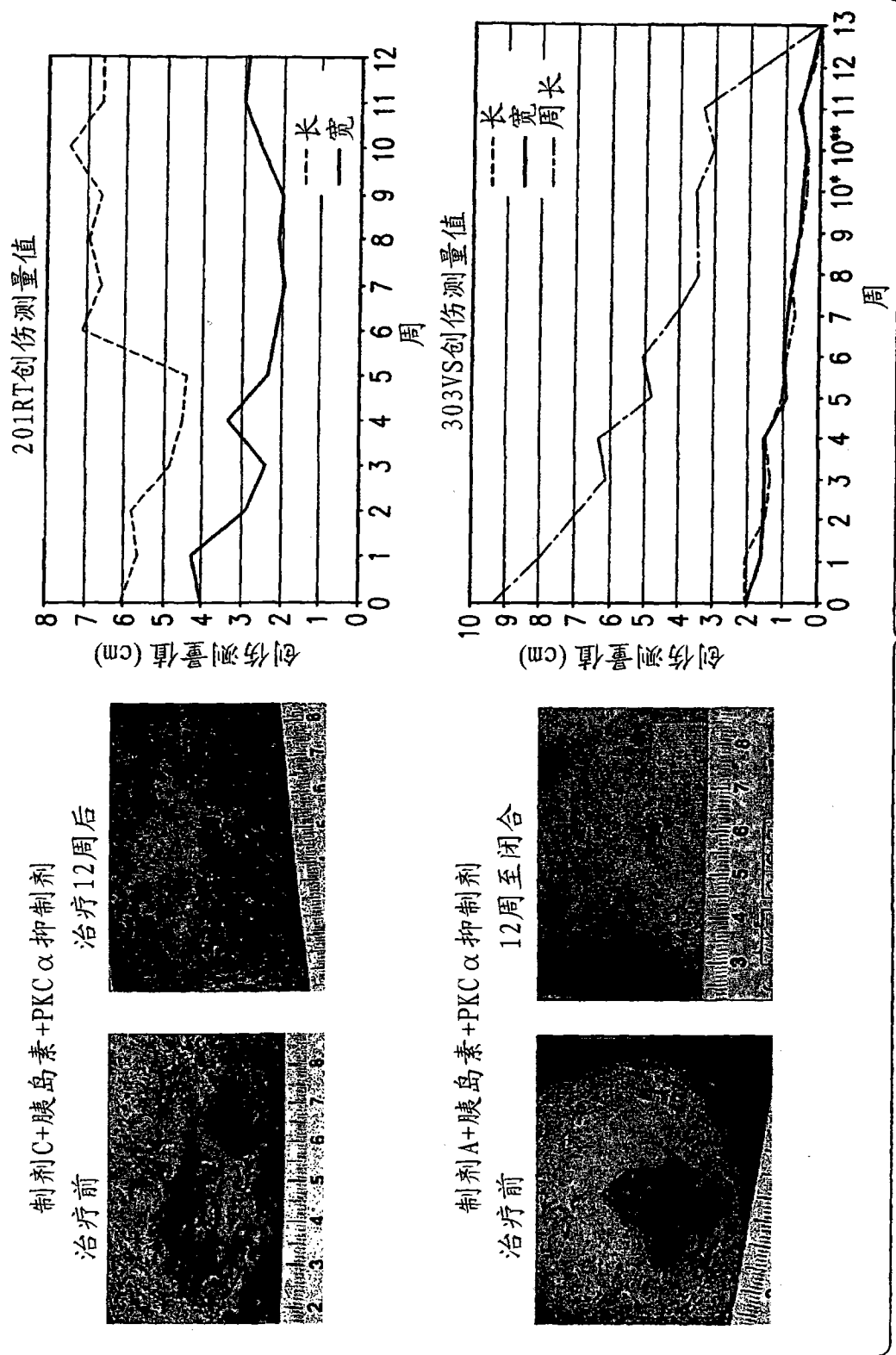


图 8A

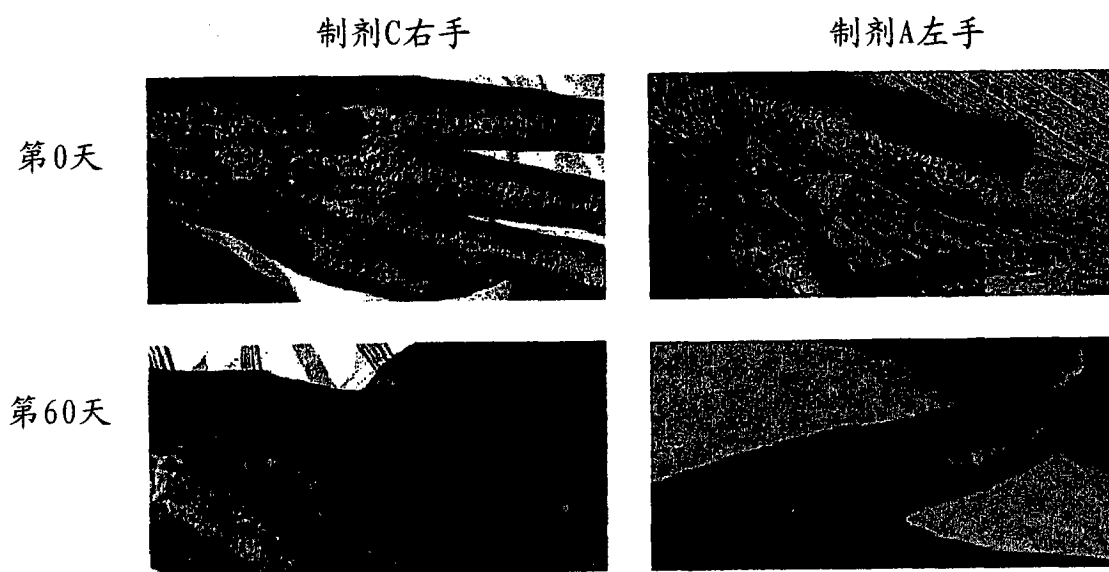


图 8B

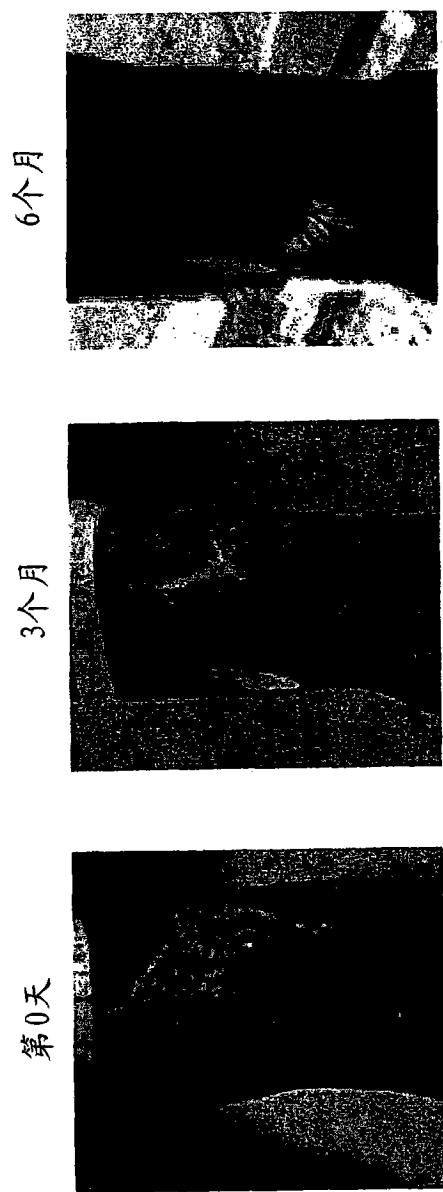


图 9

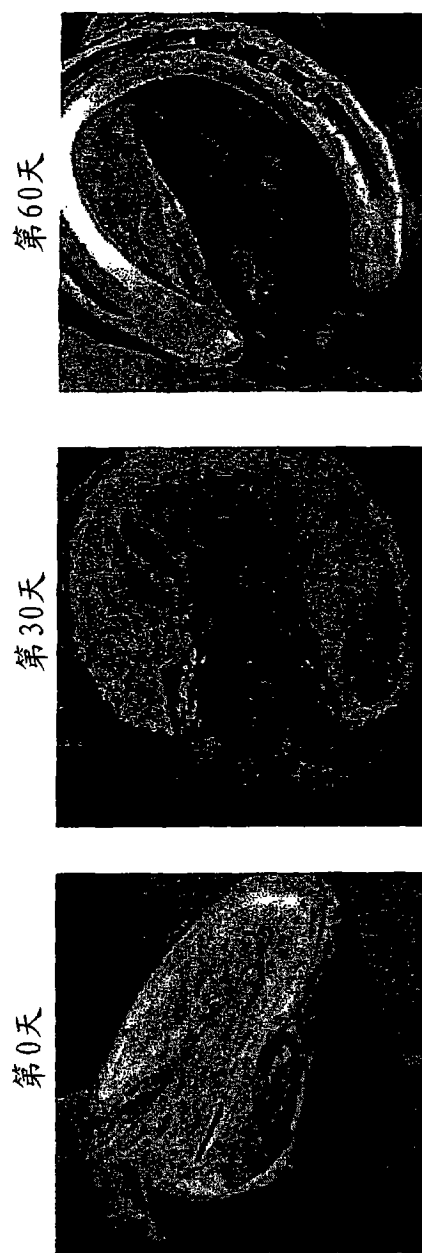


图 10

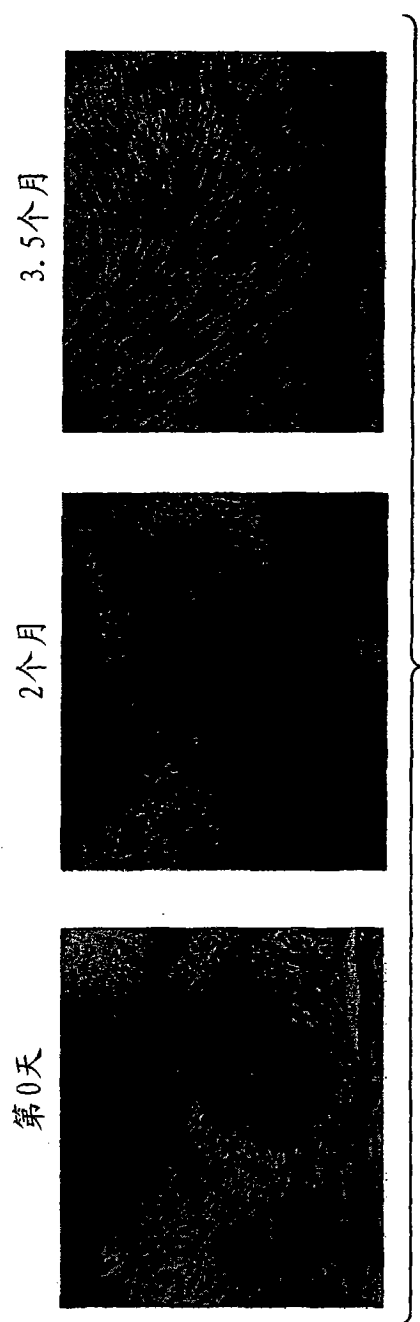


图 11

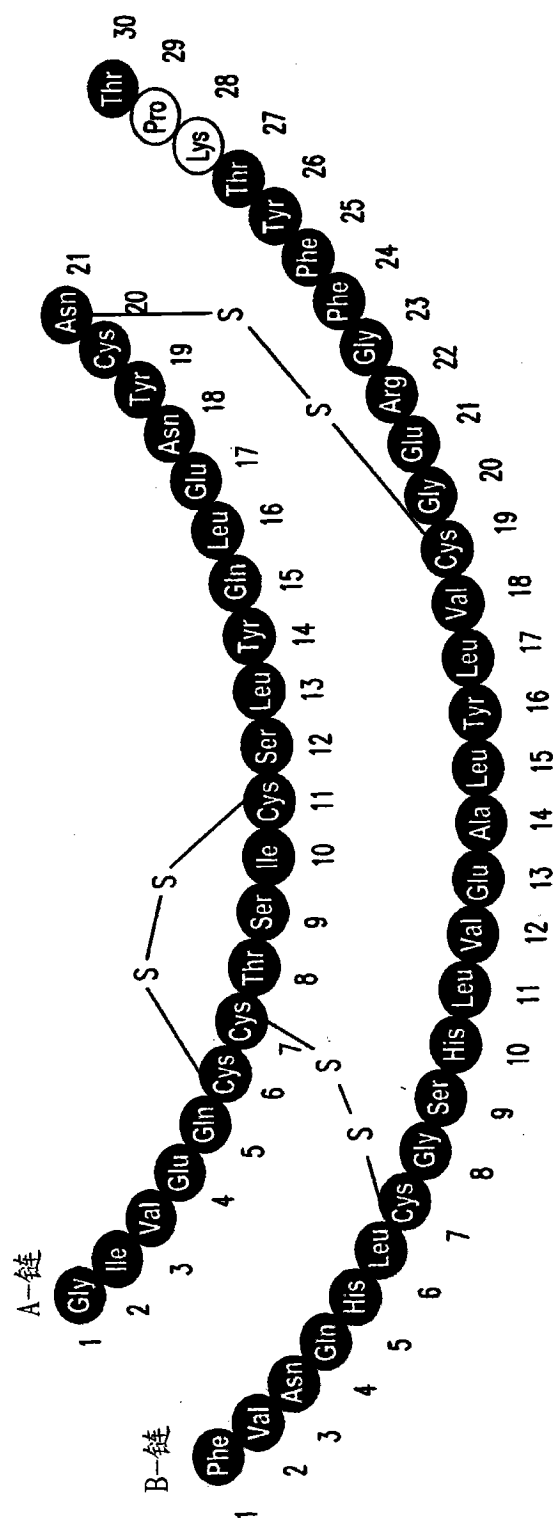


图 12

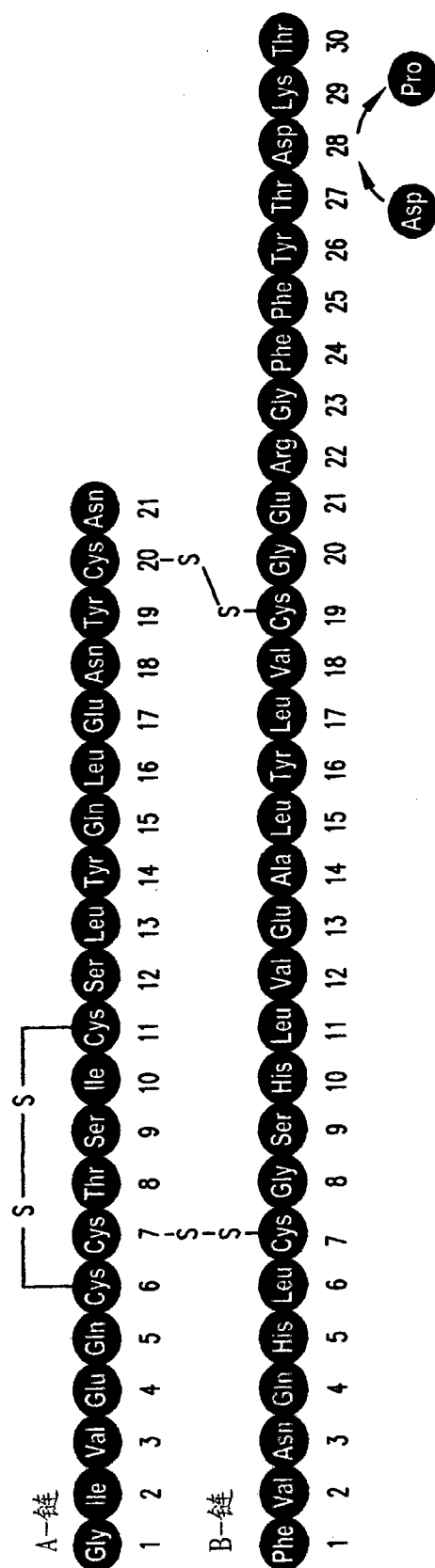


图 13

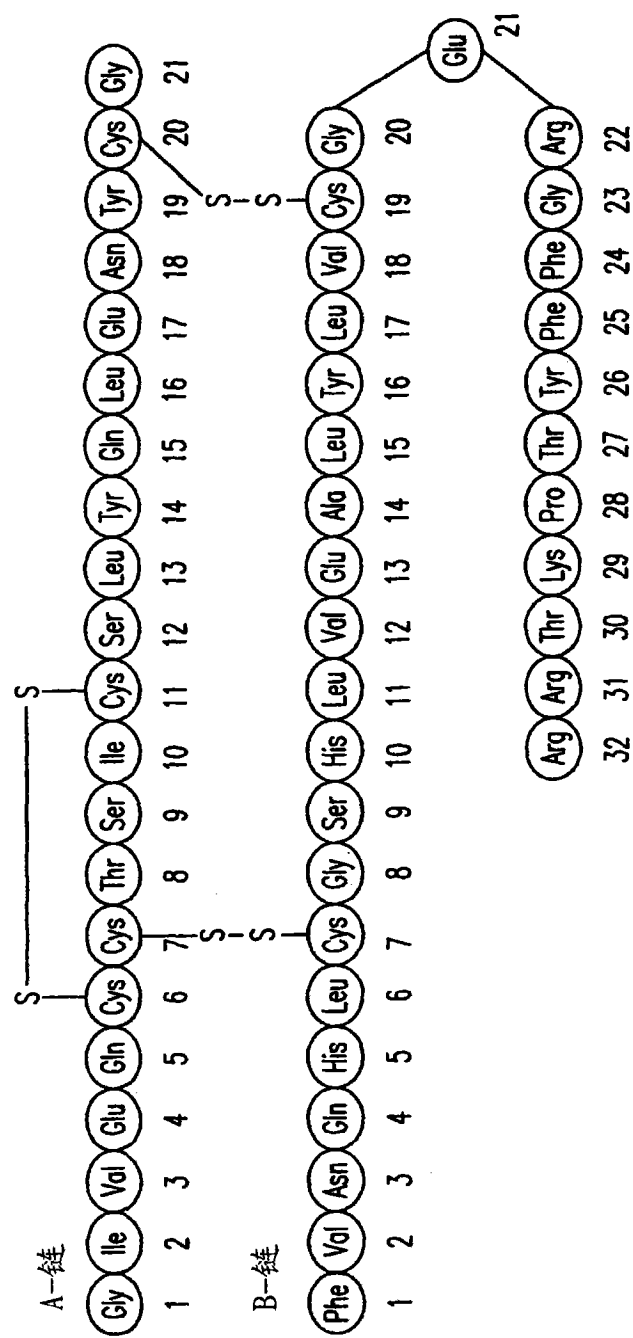


图 14

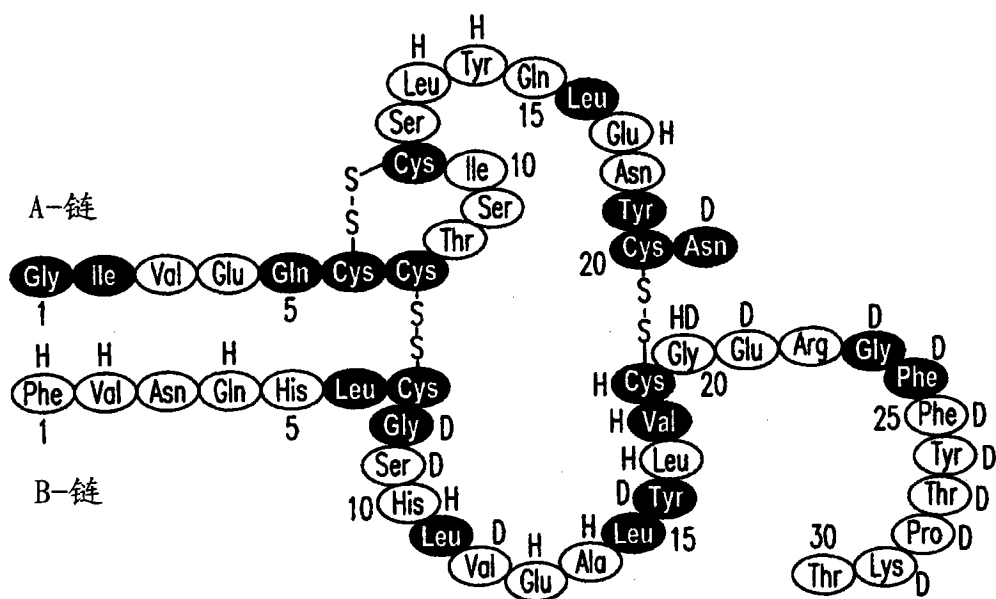


图 15

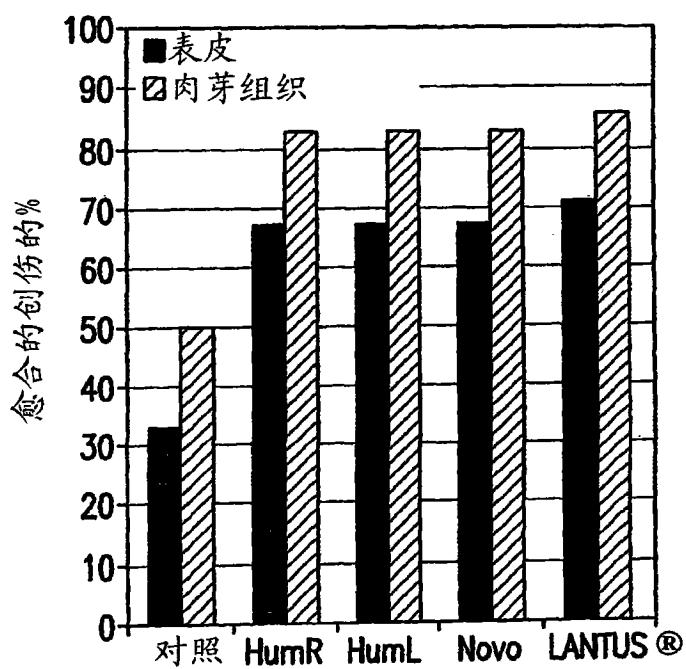


图 16

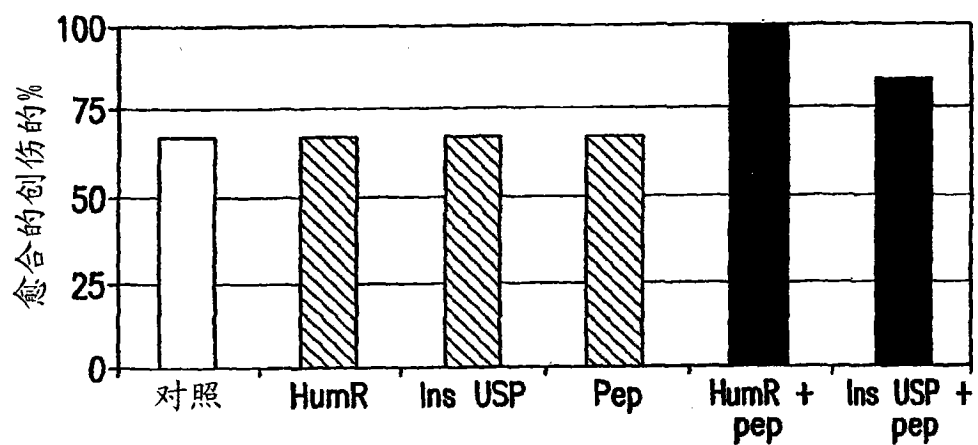


图 17

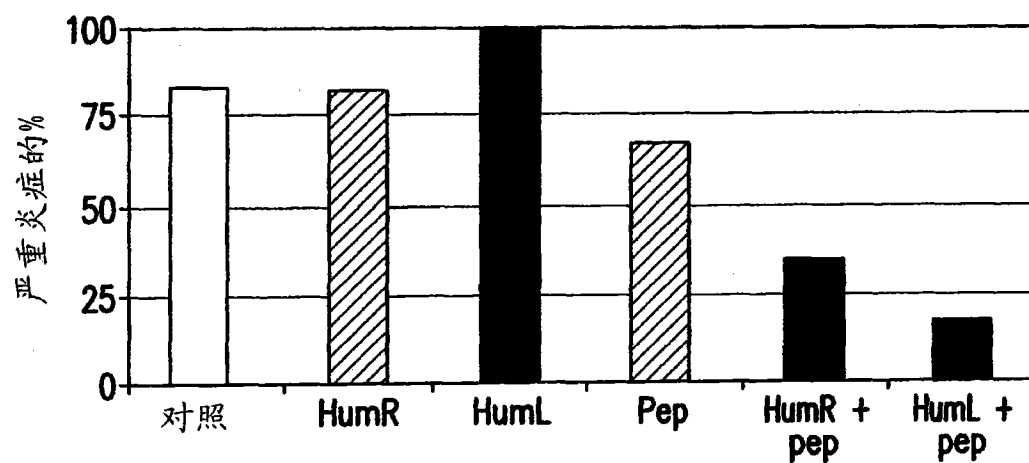


图 18

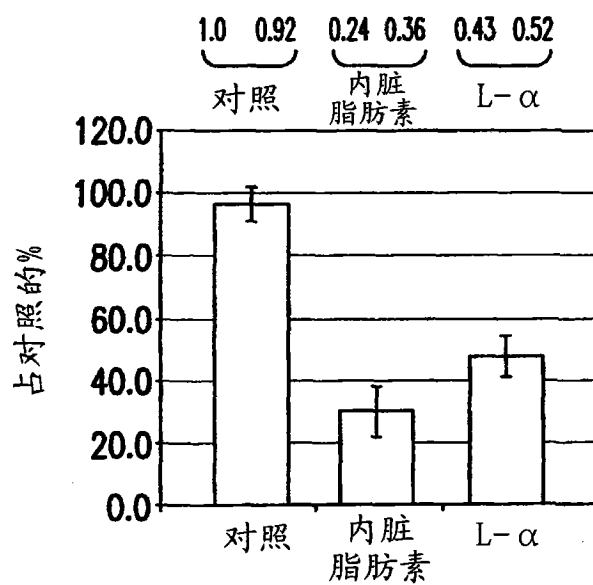


图 19A

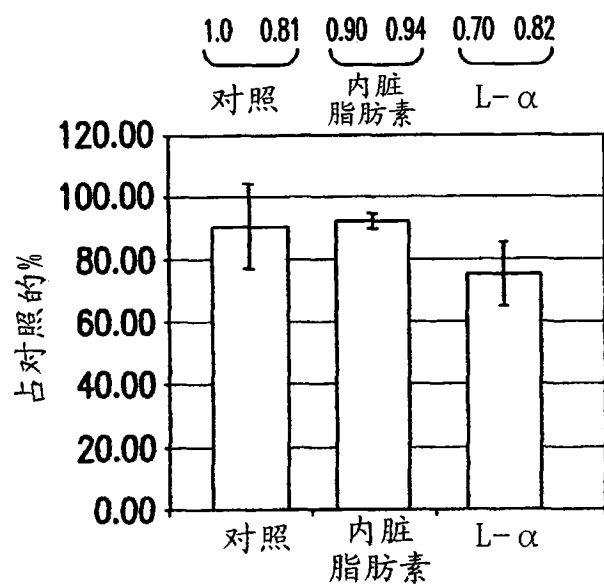


图 19B