



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107979996 A

(43)申请公布日 2018.05.01

(21)申请号 201680037030.7

(22)申请日 2016.05.02

(30)优先权数据

15166070.1 2015.04.30 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.12.22

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2016/059789 2016.05.02

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/174269 EN 2016.11.03

(71)申请人 不莱梅大学

地址 德国不莱梅

(72)发明人 厄休拉·米拉斯切斯基

(74)专利代理机构 北京卓孚知识产权代理事务所(普通合伙) 11523

代理人 张颖 任宇

(51)Int.Cl.

A61K 8/64(2006.01)

A61Q 7/00(2006.01)

A61K 38/39(2006.01)

A61Q 19/08(2006.01)

A61Q 19/00(2006.01)

A61K 8/98(2006.01)

A61K 45/06(2006.01)

A61K 9/70(2006.01)

A61K 31/685(2006.01)

A61P 17/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书19页 附图6页

(54)发明名称

新的皮肤医疗和美容护理产品

(57)摘要

本申请提供了基于肺表面活性物质的新的皮肤医学和美容护理产品以及用于皮肤治疗的组合物。

1. 肺表面活性物质或其生物活性衍生物的药物组合物用于预防或治疗皮肤病,其特征在于所述组合物局部给药到所述皮肤上。

2. 根据权利要求1药物组合物的应用,其中所述皮肤病选自皮肤创伤、纤维化、烧伤、组织增大、组织缺损、炎症、刺激、过敏症、具有并发炎症的遗传性或获得性皮肤病、良性或恶性畸形、瘢痕形成和与皮肤移植相结合的补充治疗、重建手术和皮肤外科或任何局部、表皮内或皮内皮肤治疗。

3. 肺表面活性物质或其生物活性衍生物的组合用于促进角质形成细胞的上皮迁移或用于皮肤的美容性治疗,例如用于皮肤瘢痕、皱纹、变色的治疗,皮肤脱皮、磨皮和医疗针刺后皮肤刺激、体积增大、脱发的治疗。

4. 根据权利要求1或2药物组合物的应用或权利要求3的应用,其中所述肺表面活性物质或其生物活性衍生物有效地在所述皮肤上产生抗炎效果。

5. 根据权利要求1、2或4药物组合物的应用或权利要求3或4的应用,其中所述肺表面活性物质选自波拉克坦 α 、卡尔法坦、勃法克坦和贝拉克坦。

6. 根据权利要求5药物组合物的应用或权利要求5的应用,其中所述肺表面活性物质是勃法克坦。

7. 根据权利要求1、2或4至6任一项药物组合物的应用或根据权利要求3至6任一项的应用,其中所述组合物中的肺表面活性物质或其生物活性衍生物用可药用载体配制。

8. 根据权利要求7药物组合物的应用或根据权利要求7的应用,其中所述载体是溶剂,优选为水性、两亲性或亲脂性溶剂。

9. 根据权利要求7或8药物组合物的应用或根据权利要求7或8的应用,其中所述肺表面活性物质或其生物活性衍生物以0.005mg/ml至100mg/ml、优选地约0.01mg/ml至约0.5mg/ml的浓度和单元剂量,最优选地以约0.01mg/ml至约0.1mg/ml的浓度存在于所述制剂中。

10. 根据权利要求1、2或4至9任一项药物组合物的应用或根据权利要求3至9任一项的应用,其中所述肺表面活性物质或其生物活性衍生物以0.01 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ 至100mg/ mm^2 、优选地0.1 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ 至0.5 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ 的剂量给药。

11. 根据权利要求1、2或4至10任一项药物组合物的应用或根据权利要求3至10任一项的应用,其中所述组合物还包含其他活性剂,优选皮肤活性剂,其优选是抗炎、抗纤维化、促迁移、增强血管生成、增强伤口愈合、减少瘢痕、减少皮肤刺激和/或抗过敏活性剂。

12. 权利要求1至11任一项限定的组合物作为抗炎药物用于皮肤病的治疗。

13. 药物包装,其包含优选地以干燥形式包含权利要求1至11任一项限定的肺表面活性物质或其生物活性衍生物的第一容器,和包含生理上可接受的水性稀释剂的第二容器,以及用于在皮肤上局部给药的说明书。

14. 皮肤创伤护理治疗、皮肤科或美容产品,其包含权利要求1至11任一项限定的组合物,有效地用于在皮肤上产生抗炎、促迁移、抗纤维化和/或增强伤口闭合的效果。

15. 权利要求14的产品,所述产品:

(a) 是能局部施用的产品,例如凝胶、软膏、洗剂或霜剂;

(b) 包含载体,所述载体由其上施加有所述组合物、凝胶、软膏、洗剂或霜剂的膏药、纱布、衣物、硅、聚酯或聚丙烯网状物构成,以产生其中浸渍或掺有所述组合物、凝胶、软膏、洗剂或霜剂的皮肤贴片、脂肪纱布、弹力衣物、硅片、吸水(聚氨酯)泡沫板,或与所述组合物、

凝胶、软膏、洗剂或霜剂混合的藻酸盐；

(c) 是喷剂；或者

(d) 是任何其他皮肤创伤治疗产品或愈合疗法产品。

16. 权利要求14的产品在皮肤细胞、优选角质形成细胞、皮肤和/或伤口愈合测定法中的应用。

17. 一种治疗皮肤病例如创伤、局部炎症和/或瘢痕形成的方法，所述方法包括向需要的对象给药肺表面活性物质或其生物活性衍生物，给药量有效地在所述对象的皮肤上产生抗炎、促迁移、抗纤维化和/或增强伤口闭合的效果。

18. 权利要求17的方法，其中所述肺表面活性物质或其生物活性衍生物以权利要求1至11任一项的组合物的形式或通过施用权利要求14或15的产品来给药。

19. 权利要求17或18的方法，其中所述肺表面活性物质或其生物活性衍生物被局部给药到所述对象的皮肤上。

20. 权利要求17至19任一项的方法，其中所述皮肤病是权利要求1至4任一项中所定义的皮肤病或状况。

新的皮肤医疗和美容护理产品

技术领域

[0001] 本发明总的来说涉及基于肺表面活性物质或其衍生物的皮肤护理和治疗产品。具体来说,本发明涉及包含肺表面活性物质或其生物活性衍生物、用于预防或治疗皮肤损伤和/或皮肤病的组合物。此外,本发明涉及这些组合物用于皮肤的皮肤科和美容性治疗的用途。另外,本发明涉及被设计用于施用到皮肤、优选地施用到皮肤上的药物组合物、包装和产品,其包含所述含有肺表面活性物质或其生物活性衍生物的组合物。

背景技术

[0002] 在西欧国家,热损伤的发生率在4%¹至10%²之间。在德国,每年登记有 20,000例烧伤,其中4,000位患者需要一般性医院护理,并且1,200位进入烧伤中心的专门特护病房¹。儿童和老人是烧伤的高危人群,发生率分别为15%³至58%⁴之间或20%²。在深度和全厚度烧伤中,坏死组织被手术去除并通常用中厚皮肤移植物替换。在伤口愈合完成后,需要用软膏、物理疗法、职业疗法和硅酮敷料疗法进行连续的病后调养,以防增生性瘢痕的形成。此外,医嘱使用个人定制的弹力衣物,尽管其有益效果的证据不足⁵⁻⁷。深度烧伤引起瘢痕形成和挛缩。烧伤后病理性瘢痕形成的发生率在30%至91%之间变化^{6,8},其中伤口深度和烧伤的身体总表面积是严重瘢痕形成的预测因子⁹。在致残性瘢痕形成中,需要二次手术干预进行瘢痕松解和整形外科重建。总共约3 亿欧元或每位患者每年270,000欧元花费在烧伤后遗症上¹⁰。由于瘢痕形成造成的多次手术干预,瘢痕的治疗产生比其他烧伤后遗症更高的成本¹¹。

[0003] 皮肤伤口愈合的生理学

[0004] 创伤修复的主要目标是恢复对抗物理、化学和微生物损害的完整屏障¹²。空气-液体界面处的表皮再生与伤口表面的最小化相伴而行。在完成伤口闭合后,角质形成细胞负责终端分化,并形成新的多层表皮。这种形态变化引起细胞的基底接触面积缩小并伴有细胞外环境的重塑,例如半桥粒、桥粒和黏着连接的形成和紧密的细胞间接触¹³。由此,表皮细胞收缩并在空气-液体界面处有效地使它们的外表面最小化。机械张力的差异被传递到底层的细胞外基质,并与分泌的生长因子一起刺激肌成纤维细胞对齐和收缩¹⁴。含有 α -平滑肌肌动蛋白(ASMA)的肌成纤维细胞在伤口收缩的第二阶段中发挥重要作用¹⁴。从机械论来说,细胞内肌动蛋白微丝终结于细胞表面处将细胞内肌动蛋白束与细胞外基质(ECM)相连的黏着复合体中。因此,机械力由肌成纤维细胞产生并传递到周围ECM中,引起基质重新组织和伤口收缩¹⁴。

[0005] 异常伤口愈合的病理生理学

[0006] 异常皮肤伤口愈合的特征在于两种截然相反的实体:慢性、不愈合的伤口和伴有瘢痕形成和挛缩形成的过度伤口愈合。

[0007] 慢性或不愈合的伤口是开放性伤口,其不能在通常被定义为30天的合理时间内形成表皮并闭合。这些伤口通常在临床上停滞并且不能形成强健的肉芽组织。许多因素对在这些患者中抑制愈合有贡献,但没有统一的理论能够解释每位个体的不愈合伤口的发病机

理¹⁵。许多医学病症造成伤口愈合受损,例如糖尿病、动脉供血不足、静脉疾病、淋巴水肿、压迫性坏死、感染和许多其他病症¹⁵。研究暗示,糖尿病患者伤口中的生长因子表达情况改变¹⁶。持续的炎症以促炎性细胞因子¹⁷和伤口周边的细胞例如巨噬细胞、B-细胞、浆细胞的增加¹⁸为标志。MMP的产生由促炎性MMP-9向溃疡床转移位置解除调控^{19,20}。晚期糖基化终产物和炎症介导体使成纤维细胞和血管细胞发生凋亡,并损害肉芽组织形成²¹。糖尿病人的成纤维细胞和角质形成细胞具有降低的增殖速率和胶原蛋白生产²²。

[0008] 不愈合伤口治疗的现有技术状态

[0009] 在每种情况下,治疗始于存在的任何坏死组织的清创术²³。然而,尽管对每个临床问题进行了最佳治疗,但这些伤口通常仍然不愈合,并且需要手术干预。治疗始于坏死组织的清创术,其除去潜在的细菌感染源。取决于细菌载量,推荐使用针对细菌的药物抗性进行过调整的系统性抗微生物治疗。为了提供最愈合条件,应该使用足够的敷料和加压疗法校正伤口的水分失衡²⁴。对有源医疗合并症进行积极治疗。继续进行护理直至伤口清洁并准备好重建或通过二期照料进行愈合,其可以继续几个星期。

[0010] 过度瘢痕形成和纤维化的病理生理学

[0011] 正常伤口具有“终止”信号,其在皮肤缺损闭合并且表皮形成完成时停止修复过程,当这些信号不存在或无效时,修复过程可能继续而不减弱,并引起过度瘢痕形成。已暗示牵涉到在修复结尾时缺少程序化细胞死亡即凋亡,并且分泌细胞外基质(ECM)组分的活化的成纤维细胞例如肌成纤维细胞继续存在²⁵。增生性瘢痕成纤维细胞在TGF- β 刺激后产生更多的结缔组织生长因子(CTGF)²⁶。CTGF刺激趋化性、增殖、基质金属蛋白酶(MMP)表达和ECM生产²⁷。蛋白聚糖核心蛋白聚糖结合TGF- β ,并通过下调TGF- β 产生来调控胶原蛋白原纤维生成^{28,29}。与正常的皮肤成纤维细胞相比,增生性瘢痕来源的成纤维细胞分泌较少的核心蛋白聚糖并因此可能对持续的TGF- β 活性有贡献³⁰。程序化细胞死亡据认为是伤口闭合后肌成纤维细胞消失的基础,并且在过度瘢痕形成中持续存在肌成纤维细胞¹⁵。

[0012] 瘢痕治疗的现有技术状态

[0013] 具有过度瘢痕形成的高风险的患者从预防性技术获益,所述预防性技术包括硅胶敷料或软膏、低过敏性微孔带和同时进行的病灶内甾类注射³¹。尽管采取了预防性措施,但过度瘢痕形成仍可能发生并引起瘢痕挛缩。多模态疗法常被用来治疗过度瘢痕形成;这些疗法包括硅胶敷料、量身定做的弹力衣物和单独或与按摩、电刺激或超声相结合的物理疗法。有时需要对特别困难的区域进行甾类注射。激光治疗可能是有用的³²。常常需要使用Z-整形术、切除和移植、和皮瓣修复的手术治疗³¹。到目前为止尚无促进皮肤伤口愈合、减弱伴随的炎性反应并有效预防过度瘢痕形成的疗法。因此,对用于治疗伤口、局部炎症和瘢痕形成,就这些治疗目的而言具有改进的品质的新的治疗方法和物质,存在着需求。

[0014] 这个技术难题已通过权利要求书中表征并在下文进一步描述的本发明的实施方式得以解决。

发明内容

[0015] 本发明总的来说涉及包含基于肺表面活性物质的药物组合物的皮肤用医学和护理产品,其特别适合于皮肤损伤的表面治疗,同时避免或预防过度瘢痕形成和皮肤的其他异常,例如常常与伤口闭合相关的纤维化。

[0016] 肺表面活性物质是脂类和蛋白质的复杂组合物,其由肺中的肺泡细胞产生并覆盖肺泡的空气-液体界面。它们促进塌陷气道的补充,提高肺的顺应性即肺和胸扩张的能力,并可能通过降低表面张力和粘度来防止呼气末期肺泡塌陷⁴²。此外,它们减少流体积聚并参与肺中的先天性免疫应答⁴³。

[0017] 迄今为止,肺表面活性物质已被应用于治疗与表面活性物质缺乏相关的病症,所述表面活性物质缺乏是引起新生儿呼吸窘迫综合征(IRDS)和成年人呼吸窘迫综合征(ARDS)的主要因素,其中所述表面活性物质通过吸入或抽吸到患者来给药。用于治疗呼吸窘迫综合征的肺表面活性物质描述在例如国际申请WO 2011/029525中。

[0018] 本发明是基于下述令人吃惊的观察,即改性的天然肺表面活性物质即勃法克坦(bovactant)(Alveofact[®])在基于细胞的测定法中能够促进角质形成细胞的上皮迁移,并在小鼠中的相关标准化切除伤口愈合模型中增强伤口闭合,其中所述治疗伴有(促)炎性细胞因子的减少并减少瘢痕形成。不打算受到理论限制,根据随附的实施例中描述的实验,据信肺表面活性物质对伤口表面重塑和收缩的效果是由于空气-液体界面处的表皮角质形成细胞通过伤口表面的最小化而触发伤口收缩。因此,它们通过真皮区域中的肌成纤维细胞诱导基质收缩。局部施用的表面活性剂样物质可以使用它的抗微生物表面活性蛋白降低表面张力并影响伤口愈合。事实上,本发明的发现转化为肺表面活性物质用于皮肤伤口愈合的临床应用,特别强调的是烧伤的治疗。这种新的方法标志着皮肤创伤疗法的转向,其不仅对伤口愈合研究而且对患者的生活具有根本性影响。

[0019] 因此,在本发明的范围内进行的实验中发现提供了肺表面活性物质及其生物活性衍生物的新用途,其用于治疗广泛的各种皮肤病,包括但不限于皮肤创伤、纤维化、烧伤、组织增大、组织缺损、炎症、刺激、过敏症、良性或恶性畸形、瘢痕形成和与皮肤移植相结合的补充治疗、重建手术和皮肤外科或任何表面、表皮内或皮内皮肤治疗,并且用于非医学治疗例如皮肤的瘢痕、皱纹、变色的皮肤学或美容性治疗,皮肤脱皮、磨皮、医疗针刺后的皮肤刺激、体积增大、脱发,治疗,以及任何表面、表皮内、皮内或皮下皮肤治疗。

[0020] 此外,本发明还涉及肺表面活性物质或其生物活性衍生物用途,其用于在体外或体内促进角质形成细胞的上皮迁移。

[0021] 定义

[0022] “单元剂量”是指在单一药剂中给药到患者的表面活性物质的量。所述单元剂量可以相对于体重和/或皮肤类型来计算。

[0023] 当在本文中使用时,术语“约”定义了所涉及的值的可能的偏差,所述偏差在不使用该术语所定义的值的1%-30%、特别是1%-20%、特别是1%-10%、特别是1%-5%、特别是1%-2%的范围内。

[0024] 如果没有另外明确规定,本文中使用的“肺表面活性物质”是指例如从肺或羊水回收的天然表面活性物质⁴⁶,也从例如肺或羊水提取并优选地增补有脂类和/或表面活性蛋白或其他表面活性材料的改性的天然表面活性物质,人造的表面活性物质和重构的表面活性物质。根据Wilson,Expert Opin. Pharmacother.2(2001),1479-1493,这些类别的肺表面活性物质可以规定如下:

[0025] (i) “天然”表面活性物质是不通过提取从肺或羊水完整回收的表面活性物质,并具有天然的、内源的、具有表面活性的脂类和蛋白质组成;

[0026] (ii) “改性的天然”表面活性物质是粉碎的哺乳动物肺、肺灌洗液或羊水的脂类提取物。由于在制造过程中使用的脂类提取方法,亲水性蛋白质SP-A 和SP-D丢失或量极大减少。这些制备物具有可变量的SP-B和SP-C,并且取决于提取方法,可能含有不具表面活性的脂类、蛋白质或其他组分。市场上存在的某些改性的天然表面活性物质如牛肺提取物(Survanta) (vide ultra) 添加有合成的组分例如三棕榈酸甘油酯、二棕榈酰磷脂酰胆碱和棕榈酸;

[0027] (iii) “人造的”表面活性物质,其是合成化合物、主要是磷脂和其他脂类的简单混合物,其被配制成模拟天然表面活性物质的脂类组成和行为。它们不含具有表面活性的载体蛋白;

[0028] (iv) “重构的”表面活性物质是人造的表面活性物质,已向其添加从动物分离的表面活性蛋白质/肽或例如在国际申请WO 95/32992中所描述的通过重组技术制造的蛋白质/肽,或例如在国际申请WO 89/06657、WO 92/22315 和W000/47623中所描述的合成的表面活性蛋白类似物。

[0029] “可药用的”是指当给药到婴儿时不产生过敏或类似的不适宜反应的介质。

[0030] 对于肺表面活性物质制备物来说,“表面活性”被定义为降低表面张力的能力。外源表面活性物质制备物的体外效能通常通过使用适合的装置例如 Wilhelmy 称重仪 (Balance)、脉动气泡表面活性仪 (Pulsating Bubble Surfactometer)、捕泡表面活性仪 (Captive Bubble Surfactometer) 和毛细表面活性仪 (Capillary Surfactometer) 测量它降低表面张力的能力来试验。

[0031] 迄今为止,外源表面活性物质制备物的体内效能按照已知方法,通过在早产动物模型中测量肺力学来试验。按照本发明,肺表面活性物质制备物和包含它们的组合物的体内效能,例如增强伤口闭合的能力、抗炎效果和/或促迁移效果,可以使用实施例中描述的基于细胞的测定法和动物模型来试验。

[0032] 肺表面活性物质的衍生物例如人造的和重构的肺表面活性物质,如果表现出实施例中说明的改性的肺表面活性物质勃法克坦 (bovactant) 的本质特征,即能够在使用刮伤模型的单一培养物中以剂量依赖性方式促进角质形成细胞的上皮迁移,同时成纤维细胞的迁移和收缩性不受实质性影响,和/或能够在动物模型中实现切除伤口愈合,则被称为是根据本发明具有生物活性。此外或可选地,为了评估肺表面活性物质的衍生物用于本发明的目的的适合性,可以进行如实施例2和3中所示的表达情况分析,其中所述衍生物优选地表现出与勃法克坦 (bovactant) 相似或基本上一致的表达模式,即降低肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、包括由TNF- α 信号传导诱导的下游信号传导分子和蛋白质或过程、TNF- α 转化酶 (TACE) 和/或其他促炎性细胞因子或蛋白酶或介导物的表达,减少TNF- α 受体;和/或抗纤维化,例如减少肌成纤维细胞或细胞向肌成纤维细胞的分化或促纤维化细胞或二次诱导纤维化的其他细胞的激活,例如减少转化生长因子- β (TGF- β) 包括下游信号传导分子、TGF- β 受体、血管紧张肽原、血管紧张肽、血管紧张肽II受体 (ATII-R) 和由ATII 和血管紧张肽受体诱导的下游信号传导分子和/或过程和/或结缔组织生长因子 (CTGF), 以及由所有提到的分子诱导的下游信号传导分子或过程。

[0033] 用于制备肺表面活性物质例如改性的天然表面活性物质波拉克坦 α (poractant alfa)、卡尔法坦 (calfactant)、勃法克坦 (bovactant) 或贝拉克坦 (beractant) 的衍生物的

手段和方法对于本领域技术人员来说是已知的;参见例如国际申请WO 02/17878第27页的表1(获自D.Gommers在1998年的论文,鹿特丹大学,“影响表面活性物质响应性的因素”(Factors affecting surfactant responsiveness),在Rüdiger等(2005)⁴²中,例如在L380页处的表1中;Herting等(2001)⁴⁴,例如在第45页处的表面活性物质节段中和第46页处的图1中;以及Bernhard等(2000)⁴⁵,例如在“可商购的治疗性表面活性物质”节段和其中的应用文献15和16中;所述参考文献的公开内容整体通过参考并入本文。

附图说明

[0034] 图1:使用不同浓度或不使用Alveofact时的角质形成细胞迁移。将人类原代角质形成细胞培养至合生,使用标准化刮擦诱导迁移并监测3天。与对照(在间隙中具有两个点的线和菱形)或0.1mg/ml(具有间隙的线和正方形)的Alveofact或1mg/ml(连续线和圆圈)的Alveofact相比,0.01mg/ml的Alveofact(虚线和三角形)增加上皮迁移。平均值±SD。

[0035] 图2:将人类原代成纤维细胞接种在胶原凝胶中,并在7天内监测凝胶收缩。(A)向温浴介质添加盐水中的Alveofact或单独的盐水(对照)。Alveofact不影响成纤维细胞迁移(未示出)或收缩性。(B)具有接种有成纤维细胞的胶原凝胶的实验模型在不同时间点的宏观外观。

[0036] 图3:用对照(NaCl=盐水)、脂肪纱布、0.01或0.5mg/ml Alveofact处理14天后的切除伤口的宏观伤口闭合(A)和微观伤口长度(B)。平均值±SD。

[0037] 图4:(A)通过HE染色(苏木精和曙红)切片的光学显微术评估的表皮宽度。平均值±SD。(B)正常皮肤、(C)Alv/NaCl处理的皮肤和(D)脂肪纱布处理的皮肤的光学显微镜照片。

[0038] 图5:温浴18h的均质化的伤口组织的明胶酶谱分析。在不同组之间没有发现主动和潜伏性MMP-2条带的差异。使用Alv 0.01处理时注意到MMP-9水平的降低。平行地运行重组小鼠MMP-2和rmMMP-9的标准品。箭头指示MMP-2和MMP-9的条带。

[0039] 图6:在用NaCl(对照)或0.01或0.5mg/ml Alveofact处理8天后,切除的伤口的ASMA(α -平滑肌肌动蛋白)的Western免疫印迹分析。注意到使用Alv 0.01时ASMA水平降低。MW,分子量标志物。平行地运行重组小鼠MMP-3和重组人rhMMP-10的标准品。

[0040] 图7:在用NaCl(对照)或0.01或0.5mg/ml Alveofact处理8天后,切除的伤口的E-钙粘蛋白的Western免疫印迹分析。注意到使用Alv 0.01时片段化和全尺寸E-钙粘蛋白的水平降低。MW,分子量标志物。图上右侧的箭头指示在24kDa和约60kDa处的E-钙粘蛋白⁴¹。

[0041] 发明详述

[0042] 本发明总的来说涉及基于肺表面活性物质的皮肤护理和治疗产品,包括药物和美容组合物,其被改造和/或设计以适应于应用到皮肤、优选为皮肤上,并且在治疗急性和慢性皮肤创伤中有效,并用于预防和治疗瘢痕形成和纤维化。

[0043] 第一方面,本发明涉及一种包含肺表面活性物质或其生物活性衍生物的组合物,其用于治疗性应用在皮肤病的预防或治疗中。

[0044] 所述皮肤病包括但不限于影响皮肤的正常连贯性和/或功能的伤口、刺激或手术治疗。皮肤伤口通常被理解为由对皮肤的直接损伤造成的皮肤组织连续性的破口,例如“破损”、“切口”、“表皮脱落”。几种类型通常表征皮肤创伤,例如穿刺,切口、包括由多种手术程

序产生的切口,切除,撕裂,擦伤,萎缩性皮肤或坏死性伤口和烧伤,包括大面积烧伤。在优选实施方式中,提供了符合本发明用途的组合物,其中所述皮肤病选自皮肤创伤、纤维化、烧伤、组织增大、组织缺损、炎症、刺激、过敏症、具有并发炎症的遗传性或获得性皮肤病、良性或恶性畸形、瘢痕形成和与皮肤移植相结合的补充治疗、重建手术和皮肤外科或任何表面、表皮内、皮内或皮下皮肤治疗。

[0045] 另一方面,本发明涉及一种包含肺表面活性物质或其生物活性衍生物的组合物,其用于皮肤的非医学治疗,例如不是病理性的但与不想要的皮肤学皮肤异常相关的皮肤病症。因此,本发明还涉及包含肺表面活性物质或其生物活性衍生物的组合物的用途,其用于皮肤的非医学例如美容性治疗,例如用于治疗皮肤的瘢痕、皱纹、变色,皮肤脱皮、磨皮和医疗针刺后的皮肤刺激、体积增大、脱发的治疗。

[0046] 在优选实施方式中,按照本发明使用改性的天然肺表面活性物质例如卡尔法坦(Infasurf®, ONY, Inc. Amherst, NY, USA)、勃法克坦(bovactant) (Alveofact®, 勃林格殷格翰制药(Boehringer Ingelheim Pharma), Ingelheim, Germany)、波拉克坦 α (poractant alfa) (Curosurf®, Chiesi Farmaceutici SpA, Parma, Italy) 和贝拉克坦(Survanta®, Abbvie Inc., North Chicago, IL, USA)。勃法克坦(bovactant)从牛肺灌洗液通过脂类提取获得,贝拉克坦通过粉碎的牛肺的脂类提取来制备,波拉克坦 α (poractant alfa)是天然猪肺表面活性物质的提取物,卡尔法坦源自于小牛肺。

[0047] 合成/人造的表面活性物质的实例是芦西纳坦(lucinactant) (Surfaxin®)、考佛塞尔棕榈酸酯(Colfosceril palmitate) (Exosurf®)和卢舒普肽(Lusupultide) (Venticute®)。所有合成/人造的表面活性物质主要包含具有表面活性的脂类组分,并具有极大降低的蛋白质含量,或完全不包含蛋白质或肽。为了重新获得表面活性蛋白质的某些功能,芦西纳坦(lucinactant)包含模拟SP-B的C-末端中疏水性和亲水性残基的重复模式的肽片段,并且卢舒普肽(Lusupultide)包含重组SP-C。考佛塞尔棕榈酸酯(Colfosceril palmitate)是无蛋白质的表面活性物质制备物,它含有比例为13.5:1.5:1的 DPPC、十六烷醇和泰洛沙泊,作为唯一磷脂的DPPC以质量计为84%,其中十六烷醇和泰洛沙泊在某种程度上模拟表面活性蛋白的功能⁴⁵。

[0048] 正如提到的,在改性的天然肺表面活性物质中,表面活性蛋白的量极大降低至约1%,其中SP-B和SP-C仍然与磷脂结合,但SP-A和SP-D的量极大减少或甚至不可检测⁴⁵。不同表面活性物质的组成描述在例如国际申请W0 02/17878第27页的表1(获自D. Gommers在1998年的论文,鹿特丹大学,“影响表面活性物质响应性的因素”(Factors affecting surfactant responsiveness),在Rüdiger等(2005)⁴²中,例如在L380页处的表1中;Herting等(2001)⁴⁴,例如在第45页处的表面活性物质节段中和第46页处的图1中;以及Bernhard等(2000)⁴⁵,例如在“可商购的治疗性表面活性物质”节段和其中的应用文献15和16中;所述参考文献的公开内容整体通过参考并入本文。

[0049] 优选地,本发明的组合物包含改性的肺表面活性物质或其生物活性衍生物,其具有与天然表面活性物质相似的组成,即包含脂类和蛋白质组分。特别是,正如上面提到的,与在现有技术中例如在美国专利申请US 2010/0048514中使用的基于肺表面活性物质的磷脂组分的改性的肺表面活性物质相反,按照本发明使用的肺表面活性物质优选地并有利地

至少包含亲水性蛋白SP-A,优选地还另外包含SP-B和SP-C,最优选地还另外或可选地包含SP-D。在这种情形中,正如上面描述的,任何天然的亲水性蛋白可以用蛋白质片段、等效的蛋白质或肽替换,所述蛋白质片段、等效的蛋白质或肽模拟天然蛋白质(的一部分)中疏水性和亲水性残基的模式并表现出与在肺表面活性物质的完整制备物的情况下相同的生物活性;参见同上的参考文献。在本发明的优选实施方式中,所述肺表面活性物质选自波拉克坦 α (poractant alfa)、卡尔法坦、勃法克坦 (bovactant) 和贝拉克坦。最优选地,所述改性的肺表面活性物质是勃法克坦 (bovactant)。

[0050] 为了获得所需的治疗或美容效果,优选地将本发明的组合物与待治疗的皮肤区域相接触。因此,在本发明的一个实施方式中,所述组合物被设计成用于表面、病灶内、上皮内、表皮内、皮内或皮下给药到皮肤中,或优选地给药到皮肤上。在优选实施方式中,本发明的组合物被设计成用于表面给药到皮肤例如受伤皮肤上。

[0051] 优选地,按照本发明使用的组合物中的肺表面活性物质或其生物活性衍生物用可药用载体配制。可药用载体和给药途径可以从本领域技术人员已知的相应文献获取。本发明的药物组合物可以按照本领域中公知的方法来配制,参见例如《Remington药理学科学与实践》(Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (2000), 费城大学 (University of Sciences in Philadelphia), ISBN 0-683-306472); 《疫苗手册》(Vaccine Protocols, 第二版, Robinson等主编, Humana Press, Totowa, New Jersey, USA, 2003); Banga, 《治疗性肽和蛋白质: 配制、加工和递送系统》(Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems, 第二版, Taylor和Francis主编, (2006), ISBN: 0-8493-1630-8)。适合的药用载体的实例在本领域中是公知的, 并包括磷酸盐缓冲的盐水溶液、水、乳液例如油/水乳液、各种不同类型的润湿剂、无菌溶液等。优选地, 所述药用载体是适合的生理上可耐受的溶剂, 优选为水性、两亲性或亲脂性溶剂。在优选实施方式中, 所述溶剂是水性溶液例如氯化钠溶液、Ringer溶液或Ringer乙酸盐溶液, 优选为无菌的, 其也可以包含pH缓冲剂和其他可药用赋形剂例如聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80 或失水山梨糖醇单月桂酸酯作为润湿剂, 并且氯化钠作为等渗剂, 优选地浓度为0.9%w/v。包含这些载体的组合物可以通过公知的常规方法配制。这些药物组合物可以适合的剂量给药到对象。适合的组合物的给药可以通过不同方式实现。正如上面指出的, 所述给药优选地通过局部、病灶内、上皮内、表皮内、皮内或皮下方法, 在皮肤上或皮肤内进行。气溶胶制剂例如伤口喷剂可以包括所述活性剂的纯化的水性或其他溶液以及防腐剂和等渗剂。用于直肠或阴道给药的制剂可以使用适合载体的栓剂的形式提供; 也参见O'Hagan等, Nature Reviews, Drug Discovery 2 (9) (2003), 727-735。关于适合于多种不同给药类型的制剂的进一步指导, 可以在《Remington制药学》(Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 第17版, (1985)) 和相应的更新中找到。对于药物递送方法的简短综述, 参见Langer, Science 249 (1990), 1527-1533。

[0052] 所述制剂可以存在于单元药剂或多药剂容器例如密封的安瓿和小管中, 或者可以储存在冷冻或冷冻干燥(冻干)条件下, 只需在即将使用之前添加无菌液体载体。优选地, 所述制剂作为在缓冲的生理盐水(0.9%w/v氯化钠)水性溶液中的无菌悬液, 在单次使用的小瓶中供应。在优选实施方式中, 所述肺表面活性物质或其生物活性衍生物以约0.005mg/ml至约100mg/ml、优选地约0.005mg/ml至约50mg/ml、更优选地约0.01mg/ml至约5mg/ml、甚

至更优选地约0.01mg/ml至约0.5mg/ml的浓度存在于所述制剂中。由于如实施例中所示,浓度为0.01mg/ml的示例性改性肺表面活性物质显示出最好的皮肤伤口闭合增强,因此在特别优选的实施方式中,所述肺表面活性物质或其生物活性衍生物以约0.01mg/ml至约0.1mg/ml的浓度存在于所述制剂中。

[0053] 其中悬浮有所述肺表面活性物质或生物活性衍生物的制剂的体积将取决于所需浓度。有利情况下,所述制剂的体积应该不超过5.0ml,优选为4.0至 0.5ml,更优选为2.0至1.0ml。剂量方案将由主治医师和临床因素决定。正如在医学领域中公知的,任一患者的剂量取决于许多因素,包括患者或动物的大小、待治疗的身体表面积、年龄、给药的具体化合物、性别、给药的时间和途径、总体健康和同时给药的其他药物。由于使用所述肺表面活性物质或其生物活性衍生物治疗的区域是近似平面的,因此在下文中剂量相对于表面来描述。

[0054] 在按照本发明使用的组合物的典型单元剂量中,所述肺表面活性物质或其生物活性衍生物以约0.01 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ 至约100 mg/mm^2 或至约10 mg/mm^2 ,优选地约0.05 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ 至约1 mg/mm^2 ,更优选地约0.05 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ 至约0.5 mg/mm^2 ,更优选地约0.1 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ 至约25 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ 或约0.1 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ 至约10 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$,最优选地约0.1 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ 至约2 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ 或约0.1 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ 至约0.5 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ 的剂量给药,例如对于实施例中有利的单元剂量0.01mg/ml来说,以实施例中所示的约0.2 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ 的剂量给药;然而,低于或高于该范围的剂量是可以设想的,特别是考虑到上面提到的因素。

[0055] 治疗或使用的进展可以通过定期评估来监测。用于局部、病灶内、上皮内、表皮内、皮内或皮下给药在皮肤上或皮肤中的制剂包括例如水性或非水性溶液、悬液和包含两亲性和/或亲脂性溶剂和制剂的乳液。非水性溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油例如橄榄油和可注射有机酯类例如油酸乙酯。水性载体包括水、醇性/水性溶液、乳液或悬液,包括盐水和缓冲的介质。肠胃外介质包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸化林格氏或不挥发油。防腐剂和其他添加剂也可以存在,例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。此外,取决于药物组合物的目标用途,本发明的药物组合物可以包含其他药剂。

[0056] 如实施例2中所示,在小鼠中的标准化切除伤口愈合模型中,当每隔天施用一次时,伤口闭合可以使用符合本发明的勃法克坦(bovactant)来实现。因此,在本发明的一个实施方式中,所示肺表面活性物质或其生物活性衍生物大约每隔一天给药一次。在特别优选的实施方式中,按照本发明使用的组合物被改造或设计成使得所述肺表面活性物质或其生物活性衍生物大约每隔一天一次以约0.1 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ 至约1 mg/mm^2 的剂量给药在皮肤上。

[0057] 除了给药符合本发明的肺表面活性物质或其生物活性衍生物之外,对于抗生素、抗真菌剂或止痛剂来说,其他治疗剂的共同给药可能是合乎需要的,分别用于预防感染和缓解疼痛,其通常与皮肤病、特别是伤口相伴。因此,在一个实施方式中,按照本发明使用的组合物还包含其他活性剂。优选地,所述其他药剂选自皮肤活性剂和/或治疗剂例如消炎药、抗纤维化药剂、促迁移药剂、血管生成和伤口愈合增强剂、减少瘢痕形成和皮肤刺激的药剂、抗过敏药物、抗生素、抗真菌或止痛药物。

[0058] 或者,当所述肺表面活性物质或其生物活性衍生物和所述一种或多种其他药剂被分开给药时,每种个体活性组分可以分开地配制。在这种情况下,所述个体活性组分不是无

条件地必须在同一时间服用。在分开给药的情况下,每种个体活性组分的配方可以同时包装在适合的容器中以形成药剂盒。

[0059] 正如在实施例中所示,所述改性的天然肺表面活性物质当施用到皮肤上时在增强伤口闭合中特别有效。因此,本发明提供并涉及一种用于在皮肤上局部给药的药物组合物,其包含肺表面活性物质或其衍生物的任一种上面描述的组合物和制剂。因此,对于皮肤病的治疗来说,所述肺表面活性物质或其生物活性衍生物优选为按照本发明使用的组合物中唯一的治疗性或美容性活性成分。

[0060] 按照本发明使用的肺表面活性物质或生物活性衍生物的组合物或制剂可以被制造成药剂盒、药物或美容套装,例如分别包含含有所述组合物或制剂的第一容器和包含例如将要与所述组合物和制剂联合使用的第二药物的第二容器,生理上可接受的水性稀释剂,以及用于在皮肤上局部给药的说明书。

[0061] 此外,本发明涉及一种药剂盒或药物或美容套装,其包含含有优选采取干燥形式的本文中定义的肺表面活性物质或其生物活性衍生物的第一容器,包含生理上可接受的水性稀释剂的第二容器,以及用于在皮肤上表面给药的说明书。与本发明的药剂盒和相应的套装相伴的,例如在包含所述药剂盒或套装的容器内,可以存在由管理药物产品的制造、使用或销售的政府机构规定的形式的通知,所述通知反映出所述机构批准其制造、使用或销售以用于人类给药。在所述药剂盒或套装被设计用于美容用途的情况下,它包含适合的用途的说明。此外,所述药剂盒或套装可以含有用于将所述肺表面活性物质或其生物活性衍生物与所述生理上可接受的水性稀释剂混合的机构例如注射器、移液管、药匙,和/或用于在所述混合物以备转移、浸渍或并入在其中之后将所述混合物给药到皮肤的机构,例如注射器、移液管、膏药、纱布、衣物、聚酯或聚丙烯网状物。在本发明的药剂盒的优选实施方式中,所述改性的肺表面活性物质、优选为勃法克坦(bovactant),以干燥形式并且以25至100mg之间、优选为50mg的浓度存在于容器例如小瓶中。在另一个优选实施方式中,所述改性的肺表面活性物质、优选为勃法克坦(bovactant)的组合物或制剂被设计成即用型药剂盒,例如作为皮肤贴片。

[0062] 正如在实施例中提到并说明的,所述改性的天然肺表面活性物质当施用在皮肤上时,在增强伤口闭合而没有过度瘢痕和诱导抗炎效果中特别有效。因此,本发明提供并涉及一种皮肤伤口护理治疗、皮肤学或美容产品,其包含本文中所定义的肺表面活性物质或其生物活性衍生物的组合物,并且对于在皮肤上产生抗炎、促迁移和/或特别是抗纤维化和/或增强伤口闭合效果来说有效。换句话说,本发明提供并涉及一种肺表面活性物质,其作为抗炎药物,优选地通过局部给药在皮肤上,用于治疗本文描述的皮肤病。通常,皮肤医学和美容护理产品以优选惰性的载体例如贴片、膏药、纱布、衣物、聚酯或聚丙烯网状物等的形式制造或在其中实施;参见例如国际申请W0 2007/137881,其描述了在蜂蜜基础上的伤口护理治疗产品。因此,本发明的产品可以具有各种不同形式,如对于伤口治疗领域或皮肤护理产品的美容领域中的医学产品来说已知的那些形式。在优选实施方式中,符合本发明的产品是:

[0063] (a) 可局部施用的产品,例如凝胶、软膏、洗剂或霜剂;

[0064] (b) 由其上施加有所述组合物、凝胶、软膏、洗剂或霜剂的膏药、纱布、衣物、硅、聚酯或聚丙烯网状物构成的载体,以产生其中浸渍或掺有所述组合物、凝胶、软膏、洗剂或霜

剂的皮肤贴片、脂肪纱布、弹力衣物、硅片、吸水(聚氨酯)泡沫板,或与所述组合物、凝胶、软膏、洗剂或霜剂混合的藻酸盐;

[0065] (c) 喷剂;

[0066] (d) 任何其他皮肤伤口治疗产品或愈合疗法;或

[0067] (e) 用于角质形成细胞、皮肤和/或伤口愈合测定法的产品。

[0068] 最后一种产品包括但不限于药剂盒和组合物,其任选地还包含例如细胞如角质形成细胞、细胞培养基、细胞培养板、标准化浓度的肺表面活性物质和/或其衍生物、在实施例1和2中描述的测定法中特别有用的溶剂,所述测定法可以被进一步设计以用于例如皮肤活性剂的筛查或毒理测试。

[0069] 本发明的说明书和实施例公开并涵盖了这些和其他实施方式。关于将在本发明中使用的任何材料、方法、用途和化合物的其他文献,可以例如使用电子装置从公共图书馆和数据库检索。例如,可以利用公共数据库“Medline”,其由美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)的国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)和/或国家医学图书馆(National Library of Medicine)主持。其他数据库和网址,例如作为欧洲分子生物学实验室(European Molecular Biology Laboratory)(EMBL)的一部分的欧洲生物信息学研究所(European Bioinformatics Institute)(EBI)的数据库和网址,对于本领域技术人员来说是已知的,并且也可以使用因特网搜索引擎获得。对于回溯检索和对于近期通报来说有用的生物技术专利信息的浏览和专利信息相关来源的调查,提供在Berks, TIBTECH 12(1994), 352-364中。

[0070] 上述公开内容总体描述了本发明。在本说明书的文本中引用了几份文献。完整的文献引用可以在本说明书结尾处权利要求书之前找到。所有引用的参考资料的内容(包括在整个本申请中引用的文献参考、授权的专利、公布的专利申请,包括背景部分和制造商的说明书、操作指南中的公开内容等),明确地通过参考并入本文;然而,并不承认任何引用的文献对本发明来说事实上是现有技术。

[0071] 通过参考下面的具体实施例,可以获得更完整的理解,在本文中提供所述实施例仅仅是出于说明的目的,并且不打算限制本发明的范围。

[0072]

实施例

[0073] 材料和方法

[0074] 肺表面活性物质

[0075] 伤口愈合和收缩以自下而上的方式进行,始于细胞水平并终于体内实验。通过体外和体内局部施用试验了用于儿童中的呼吸窘迫综合征疗法的标准表面活性物质。

[0076] 表面活性物质作为标准疗法用于在早产婴儿中降低肺泡表面张力³³。含有表面活性蛋白的磷脂薄膜通过控制表面张力来调节肺泡巨噬细胞的形状和活性³⁴。这种治疗的重要特点是表面活性薄膜的亲脂本性。到目前为止,湿性伤口愈合是用于表皮伤口的标准治疗。在皮肤伤口上施用表面活性物质是致力于皮肤伤口愈合和收缩的革新性、令人惊异且非正统但简单的方式。为皮肤和施用在皮肤伤口上而定制的表面活性物质可以降低表面张力并促进角质形成细胞收缩。到目前为止,不存在关于皮肤表面活性物质疗法的已发表的

数据。

[0077] 对于婴儿呼吸窘迫综合征 (IRDS) 的治疗来说,牛肺表面活性物质可以在德国以商品名 Alveofact® 获得。在与本发明相关进行的细胞培养物实验中,使用添加到培养基的 0.01mg/ml、0.1mg/ml 和 1mg/ml Alveofact® 进行了剂量响应实验。对于体内实验来说,将 Alveofact® 按照制造商的说明书溶解在 0.9% 盐水中,并以 0.01mg/ml 和 0.5mg/ml 的浓度局部添加在皮肤伤口上。伤口敷料每隔一天用新施加的 Alveofact® 或作为对照组的单独的盐水更换。

[0078] 实验设置

[0079] 使用包括细胞³⁵和器官培养物³⁶和小鼠中的体内切除伤口模型³⁷的标准实验模型,分析 Alveofact 对伤口愈合的影响。

[0080] 进行的分析:

[0081] -跟踪伤口边缘并分析伤口面积³⁷。

[0082] -分析培养基和组织中蛋白质的分泌和定位。

[0083] -组织学、免疫组织化学和免疫荧光分析³⁸

[0084] -生物化学和生物分子分析,包括底物明胶酶谱³⁹、Western 免疫印迹分析³⁹、ELISA、RT-PCR、基因阵列分析⁴⁰

[0085] 通过定制阵列进行的基因表达分析

[0086] 使用 Aurum 总脂肪和纤维组织试剂盒 (Biorad, Munich, Germany) 分离总 RNA (mg)。在反转录期间,将 RNA 转变成荧光素 (F1) 和生物素 (B) 标记的 cDNA。使用一系列偶联报告物,最终使用 Tyramide-Cy3 和 Tyramide-Cy5,顺序检测特异性结合的 F1 和 B 标记的 cDNA。将杂交过的芯片用 Axon 400B_扫描仪以不同的设置扫描 6 次。原始图像分析使用软件机构 Gene Pix Pro 6.0 来进行。

[0087] 统计学

[0088] 基因表达分析的每个基因的平均值包含 9 个平行样。基因平行样中的离群值按照 Nalimov 的离群值检验被剔除。将 Student's t-检验的改编版本例如用于被分析的样品的不等方差的 Welch's t-检验,用于平均值的比较。p 值 < 0.05 被假定为显著的,并表示成平均值 ± SD (标准偏差) 或 SEM (平均值的标准误差)。

[0089] 实施例 1: 细胞培养物中的剂量响应

[0090] 首先,使用擦伤模型在角质形成细胞单一培养物上进行剂量响应实验,其中将细胞 (每孔 $4 \times 8 \times 10^4$ 个细胞) 悬浮在单独或包含勃法克坦 (bovactant) (Alveofact®) 的培养基中。0.01mg/ml 的 Alveofact® 促进上皮迁移,而 0.1 mg/ml 的浓度具有与对照处理相同的效果,并且 1mg/ml 延迟了角质形成细胞迁移 (图 1)。成纤维细胞迁移和收缩性不受低浓度 Alveofact® 影响 (图 2A、B)。

[0091] 实施例 2: 体内切除伤口愈合

[0092] 使用小鼠中的标准化切除伤口愈合模型,体内研究小鼠皮肤的上皮迁移和伤口收缩。在小鼠背上进行 8-mm 钻取活组织检查,并将伤口用不同敷料封闭,即 1ml 的 0.9% 盐水 (对照)、0.01mg/ml 或 0.5mg/ml Alveofact®, 后者等同于 $0.2 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ 和 $10 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ 的浓度。作为人类伤口治疗的临床黄金标准,在第四组中将脂肪纱布施用到伤口。

[0093] 在 0.01mg/ml Alveofact® 后使用脂肪纱布的组中观察到最快的伤口闭合。盐水对

照组的伤口闭合速率与0.5mg/ml Alveofact®组平行。这强调了在使用0.01mg/ml Alveofact®的细胞培养物实验中看到的结果是增强皮肤伤口闭合的最佳浓度(图3)。

[0094] 组织学分析产生了非常有趣的结果。使用脂肪纱布处理时,与对照或Alveofact®处理相比皮肤宽度几乎加倍,并具有增生性瘢痕的组织学表型,具有富含细胞且富含胶原蛋白的真皮层。使用Alveofact®处理时,注意到薄的表皮层以及蓬松的真皮区划,没有任何过度瘢痕形成的迹象(图4)。

[0095] 实施例3:基因表达阵列分析

[0096] 将伤口在-80℃下快速冷冻并按照标准流程提取RNA。开发了定制的基因阵列来分析涉及皮肤伤口愈合和皮肤瘢痕形成的159个基因。所分析的基因根据家族或功能的亚类陈述在附录I中(附录I.通过基因阵列分析分析的在伤口愈合期间表达的基因)。在手术后第8天或第14天,将用不同浓度的Alveofact®处理的伤口的基因表达与用单独的介质(NaCl)处理的伤口进行比较。

[0097] 表1:基因阵列分析:对于不同组和时间点来说,在炎症、纤维化或迁移中表达的基因。统计学显著的值($p < 0.05$)用白色标记,脂肪用黑色背景标记; $0.051 < p < 0.075$ 之间的p值用黑色标记,脂肪为斜体并具有灰色背景; $0.076 < p < 0.1$ 之间的值加下划线,用斜体标记,具有浅灰色背景,并在格子的右侧处对齐。

[0098]

组	基因	NaCl	Alv 0.01	t-检验	NaCl	Alv 0.5	t-检验
第 8 天							
炎症	TNF α	0,024	0,009	0,010	0,024	0,009	0,011
	MMP08	0,408	0,014	0,075	0,408	0,090	0,141
	MMP09	3,997	3,145	0,594	3,997	0,763	0,011
	TACE	0,046	0,034	0,417	0,046	0,009	0,000
	IL1b	1,187	0,636	0,415	1,187	0,562	0,344
纤维化	CTGF	0,473	0,466	0,969	0,473	0,604	0,513
	ASMA	0,677	0,964	0,353	0,677	1,678	0,232
	Smad2	0,308	0,230	0,659	0,308	0,028	0,069
	Smad4	0,106	0,036	0,082	0,106	0,064	0,314
	TGFb1	0,293	0,080	0,097	0,293	0,239	0,704
	TGFb2	0,058	0,058	0,995	0,058	0,011	0,024
	TGFbRI	0,005	3,195	0,027	0,005	4,712	0,104
	ATIIR2	0,008	0,014	0,139	0,008	0,009	0,706
	MMP03	0,202	0,034	0,034	0,202	0,089	0,129
迁移	TGFa	0,776	0,472	0,304	0,776	0,167	0,038
	丝切蛋白	4,731	1,883	0,079	4,731	3,394	0,376

[0099]

	整合蛋白 aV	0,786	0,662	0,811	0,786	0,782	0,993
	整合蛋白 b5	0,128	0,078	0,335	0,128	0,072	0,277
	MMP01b	0,101	0,025	0,212	0,101	0,033	0,267
	MMP03	0,202	0,034	0,034	0,202	0,089	0,129
	MMP09	3,997	3,145	0,594	3,997	0,763	0,011
	MMP13	0,019	0,222	0,008	0,019	0,134	0,040
	MMP14	2,507	0,749	0,259	2,507	0,689	0,252
	张力蛋白 2	0,017	0,012	0,559	0,017	0,007	0,206

[0100]

组	基因	NaCl	Alv 0.01	t-检验	NaCl	Alv 0.5	t-检验
第 14 天							
炎症	TNF α	0,045	0,006	0,005	0,045	0,013	0,012
	MMP08	0,081	0,420	0,117	0,081	0,660	<i>0,088</i>
	MMP09	1,574	1,245	0,790	1,574	0,433	0,291
	TACE	0,099	0,028	0,100	0,099	0,006	0,043
	IL1 β	0,370	0,077	0,023	0,370	0,213	0,223
纤维化	CTGF	0,330	0,059	<i>0,059</i>	0,330	0,096	<i>0,092</i>
	ASMA	1,679	0,462	0,041	1,679	0,423	0,041
	Smad2	0,093	0,137	0,255	0,093	0,269	<i>0,080</i>
	Smad4	0,155	0,134	0,800	0,155	0,120	0,653
	TGF β 1	0,432	0,322	0,545	0,432	0,511	0,728
	TGF β 2	0,060	0,025	0,037	0,060	0,028	<i>0,070</i>
	TGF β RI	5,831	0,000	<i>0,084</i>	5,831	0,000	<i>0,084</i>
	AT1R2	0,013	0,002	0,018	0,013	0,004	0,036
	MMP03	0,079	0,093	0,747	0,079	0,109	0,540
迁移	TGF α	1,363	0,144	0,020	1,363	0,766	0,265
	丝切蛋白	2,779	1,223	<i>0,070</i>	2,779	0,775	0,030
	整合蛋白 aV	1,623	0,763	0,180	1,623	0,297	0,048
	整合蛋白 b5	0,230	0,055	0,022	0,230	0,074	0,037
	MMP01b	0,037	0,130	0,034	0,037	0,211	0,001
	MMP03	0,079	0,093	0,747	0,079	0,109	0,540
	MMP09	1,574	1,245	0,790	1,574	0,433	0,291
	MMP13	0,219	0,140	0,298	0,219	0,267	0,511

[0101]

	MMP14	2,538	0,409	<i>0,061</i>	2,538	0,159	0,042
	张力蛋白 2	0,026	0,006	0,049	0,026	0,007	<i>0,059</i>

[0102] 在使用0.01mg/ml和0.5mg/ml Alveofact®时,在第8天和第14天发现促炎性TNF- α 的值显著降低。在整个观察期间,0.5mg/ml的 Alveofact®显著降低TACE表达。此外,0.01mg/ml Alveofact®处理在第14天显著降低IL-1 β 表达(表1)。

[0103] 在第8天和一部分在第14天,发现促纤维化TGF- β 2、TGF β -RI和MMP-3 的下调。与对照相比,在两个组中发现肌成纤维细胞标志物 α -平滑肌肌动蛋白(ASMA)和血管紧张肽II受

体2(ATII-R2)的值显著降低。值得注意的是,使用两种Alveofact®浓度时,在第14天促纤维化结缔组织生长因子(CTGF)减少(表1)。

[0104] 在伤口愈合期间在细胞培养物中和显微镜下观察到细胞迁移的增强,由在整个观察期间,在我们的基因阵列分析中促迁移基因的提高所反映(表1)。使用Alveofact处理时,在第8天和第14天,促迁移的MMP-13表达显著提高(表1)。

[0105] 明胶酶谱检测和Western免疫印迹分析

[0106] 与NaCl或0.5mg/ml的Alveofact®相比,使用0.01mg/ml的Alveofact®时发现促炎性的MMP-9的蛋白值降低(图5)。

[0107] 肌成纤维细胞标志物ASMA的Western免疫印迹分析显示,与NaCl或0.5mg/ml的Alveofact®相比,使用0.01mg/ml Alveofact®处理的值减小(图6)。E-钙粘蛋白是上皮细胞的细胞内接触蛋白。在迁移期间,E-钙粘蛋白水平降低,正如使用0.01mg/ml Alveofact®处理时所看到的(图7)。

[0108] 结论

[0109] 肺表面活性物质及其组分似乎对皮肤伤口愈合具有抗炎、促迁移和抗纤维化效果。这一发现是新的,并且迄今为止未被描述。肺表面活性物质或其组分的表面或病灶内施用可能对人类或动物皮肤伤口愈合例如急性、慢性或异常伤口愈合包括瘢痕形成具有有益效果。通过用肺表面活性物质或其组分处理伤口,可以加速皮肤伤口愈合,减少局部炎症,并因此增强伤口闭合和减少瘢痕形成。这将是用于皮肤伤口愈合和预防皮肤瘢痕形成的革新和创新的治疗策略。

[0110] 参考文献

[0111] 1 Ziegenthaler H,Neumann U,Fritzsche U等,伤势严重的烧伤受害者[Polytraumatized burn injury victims].Orthopade 2005;34:906-16.

[0112] 2 de Roche R.流行病学[Epidemiology].In:Handbuch der Verbrennungstherapie(Bruck JC,Müller FE,Steen M,eds).Landsberg:Ecomed. 2002; 27-33.

[0113] 3 German Burn Association DGV.烧伤统计数据(Burn statistics).In,Vol. 2011:<http://www.verbrennungsmedizin.de/statistik.php>.2009.

[0114] 4 D'Souza AL,Nelson NG,McKenzie LB.在1990至2006年间在美国急诊室治疗的儿科烧伤(Pediatric burn injuries treated in US emergency departments between 1990and 2006),Pediatrics 2009;124:1424-30.

[0115] 5 Anzarut A,Olson J,Singh P等,弹力衣物疗法对预防烧伤后异常瘢痕形成的有效性:元分析(The effectiveness of pressure garment therapy for the prevention of abnormal scarring after burn injury:a meta-analysis),J Plast Reconstr Aesthet Surg 2009;62:77-84.

[0116] 6 Bloemen MC,van der Veer WM,Ulrich MM等,增生性瘢痕形成的预防和治愈性管理(Prevention and curative management of hypertrophic scar formation),Burns 2009;35:463-75.

[0117] 7 Engrav LH,Heimbach DM,Rivara FP等,定制弹力衣物疗法的有效性的12年内伤口研究(12-Year within-wound study of the effectiveness of custom pressure

garment therapy), Burns 2010;36:975-83.

[0118] 8 Stella M, Castagnoli C, Gangemi EN. 烧伤后瘢痕:更新 (Postburn scars: an update), Int J Low Extrem Wounds 2008;7:176-81.

[0119] 9 van der Wal MB, Vloemans JF, Tuinebreijer WE等, 烧伤后的结果:烧伤瘢痕成熟的观察性研究和严重瘢痕形成的预测物 (Outcome after burns:an observational study on burn scar maturation and predictors for severe scarring), Wound Repair Regen 2012;20:676-87.

[0120] 10 Mirastschijski U, Sander JT, Weyand B等, 烧伤患者的复原:被低估的社会经济负担 (Rehabilitation of burn patients:an underestimated socio-economic burden), Burns 2013;39:262-8.

[0121] 11 Mirastschijski U, Sander J-T, Zier U等, 德国烧伤中心的患者的烧伤后瘢痕形成和治疗成本 (Post-burn scarring and treatment costs for patients of a German Burn Centre), In. Ann Burns Fire Disasters. submitted;1-19.

[0122] 12 Martin P. 伤口愈合——以完美皮肤再生为目标 (Wound healing--aiming for perfect skin regeneration), Science 1997;276:75-81.

[0123] 13 Muller EJ, Williamson L, Kolly C等, 通过整合蛋白和钙黏蛋白的自外而内的信号传导:控制表皮生长和分化的中心机制? (Outside-in signaling through integrins and cadherins:a central mechanism to control epidermal growth and differentiation?), The Journal of investigative dermatology 2008;128: 501-16.

[0124] 14 Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B等, 肌成纤维细胞和结缔组织重塑的力学调控 (Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling), Nat Rev Mol Cell Biol 2002;3:349-63.

[0125] 15 Mirastschijski U, Jokuszies A, Vogt PM. 皮肤伤口愈合:修复生物学、伤口和瘢痕治疗 (Skin wound healing:repair biology,wound and scar treatment), In: Plastic Surgery (Neligan PC,ed), Vol.1:Elsevier Saunders.2012; 267-96.

[0126] 16 Blakytyn R, Jude EB. 糖尿病足溃疡的改变的分子机制 (Altered molecular mechanisms of diabetic foot ulcers), Int J Low Extrem Wounds 2009;8: 95-104.

[0127] 17 Mishima Y, Kuyama A, Tada A等, 在患有2型糖尿病的肥胖男性中血清肿瘤坏死因子- α 与胰岛素抗性之间的关系 (Relationship between serum tumor necrosis factor-alpha and insulin resistance in obese men with Type 2 diabetes mellitus), Diabetes Res Clin Pract 2001;52:119-23.

[0128] 18 Loots MA, Lamme EN, Zeegelaar J等, 慢性糖尿病和静脉性溃疡与急性创伤相比细胞浸润和细胞外基质的差异 (Differences in cellular infiltrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds), The Journal of investigative dermatology 1998;111:850-7.

[0129] 19 Nwomeh BC, Liang HX, Cohen IK等, MMP-8是愈合中的伤口和难愈合溃疡中的主要胶原酶 (MMP-8 is the predominant collagenase in healing wounds and nonhealing ulcers), J Surg Res 1999;81:189-95.

[0130] 20 Mirastschijski U, Impola U, Jahkola T等, 基质金属蛋白酶-9在慢性皮肤伤

口中的异位定位 (Ectopic localization of matrix metalloproteinase-9 in chronic cutaneous wounds), *Human pathology* 2002;33:355-64.

[0131] 21 Acosta JB, del Barco DG, Vera DC 等, 顽固糖尿病足伤口中的促炎性环境 (The pro-inflammatory environment in recalcitrant diabetic foot wounds), *Int Wound J* 2008;5:530-9.

[0132] 22 Darby IA, Bisucci T, Hewitson TD 等, 在遗传性糖尿病小鼠中糖尿病损害的伤口愈合模型中凋亡增加 (Apoptosis is increased in a model of diabetes-impaired wound healing in genetically diabetic mice), *The international journal of biochemistry & cell biology* 1997;29:191-200.

[0133] 23 Sibbald RG, Orsted H, Schultz GS 等, 准备伤口床 2003: 聚焦于感染和炎症 (Preparing the wound bed 2003: focus on infection and inflammation), *Ostomy Wound Manage* 2003;49:23-51.

[0134] 24 Schultz GS, Sibbald RG, Falanga V 等, 伤口床准备: 伤口管理的系统性方法 (Wound bed preparation: a systematic approach to wound management), *Wound Repair Regen* 2003;11Suppl 1:S1-28.

[0135] 25 Wassermann RJ, Polo M, Smith P 等, 具有增生性烧伤瘢痕的患者中凋亡调节的蛋白质的差异生产 (Differential production of apoptosis-modulating proteins in patients with hypertrophic burn scar), *J Surg Res* 1998;75:74-80.

[0136] 26 Colwell AS, Krummel TM, Longaker MT 等, 在胎儿和新生儿伤口修复期间和 TGF- β 1 刺激后成纤维细胞中的 Wnt-4 表达 (Wnt-4 expression is increased in fibroblasts after TGF- β 1 stimulation and during fetal and postnatal wound repair), *Plast Reconstr Surg* 2006;117:2297-301.

[0137] 27 Brigstock DR. 通过结缔组织生长因子 (CTGF) 和富含半胱氨酸的蛋白 61 (CYR61) 进行的血管生成和内皮细胞功能的调控 (Regulation of angiogenesis and endothelial cell function by connective tissue growth factor (CTGF) and cysteine-rich 61 (CYR61)), *Angiogenesis* 2002;5:153-65.

[0138] 28 Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E. 蛋白聚糖核心蛋白聚糖对转化生长因子- β 的负调控 (Negative regulation of transforming growth factor- β by the proteoglycan decorin), *Nature* 1990;346:281-4.

[0139] 29 Zhang Z, Li XJ, Liu Y 等, 重组人核心蛋白聚糖抑制细胞增殖并下调增生性瘢痕成纤维细胞中的 TGF- β 1 生产 (Recombinant human decorin inhibits cell proliferation and downregulates TGF- β 1 production in hypertrophic scar fibroblasts), *Burns* 2007;33:634-41.

[0140] 30 Scott PG, Dodd CM, Ghahary A 等, 来自于烧伤后增生性瘢痕组织的成纤维细胞比正常真皮成纤维细胞合成更少的核心蛋白聚糖 (Fibroblasts from post-burn hypertrophic scar tissue synthesize less decorin than normal dermal fibroblasts), *Clin Sci (Lond)* 1998;94:541-7.

[0141] 31 Mustoe TA, Cooter RD, Gold MH 等, 关于瘢痕管理的国际临床推荐 (International clinical recommendations on scar management), *Plast Reconstr*

Surg 2002;110:560-71.

[0142] 32 Liew SH, Murison M, Dickson WA. 使用脉冲式染料激光器对深度真皮烧伤瘢痕进行预防性治疗以预防增生性瘢痕形成:初步研究 (Prophylactic treatment of deep dermal burn scar to prevent hypertrophic scarring using the pulsed dye laser: a preliminary study), *Ann Plast Surg* 2002;49:472-5.

[0143] 33 Halliday HL. 表面活性物质:过去、现在和未来 (Surfactants: past, present and future), *J Perinatol* 2008;28Suppl 1:S47-56.

[0144] 34 Akei H, Whitsett JA, Buroker M等, 表面张力影响细胞形状和肺泡巨噬细胞中的吞噬作用 (Surface tension influences cell shape and phagocytosis in alveolar macrophages), *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;291:L572-9.

[0145] 35 Rehders M, Grosshäuser BB, Smarandache A等, 月球和火星尘埃模拟物对HaCat角质形成细胞和CHO-K1成纤维细胞的影响 (Effects of lunar and mars dust simulants on HaCat keratinocytes and CHO-K1 fibroblasts), *Advances in Space Research* 2011;47:1200-13.

[0146] 36 Mirastschijski U, Bugdahl R, Rollman O等, 在培养物中从生物工程皮肤外植体进行的表皮再生 (Epithelial regeneration from bioengineered skin explants in culture), *Br J Dermatol* 2006;154:42-9.

[0147] 37 Mirastschijski U, Haaksma CJ, Tomasek JJ等, 在皮肤伤口中基质金属蛋白酶抑制剂GM6001减弱角质形成细胞迁移、收缩和肌成纤维细胞形成 (Matrix metalloproteinase inhibitor GM 6001 attenuates keratinocyte migration, contraction and myofibroblast formation in skin wounds), *Exp Cell Res* 2004;299:465-75.

[0148] 38 Mirastschijski U, Impola U, Jahkola T等, 基质金属蛋白酶-9在慢性皮肤伤口中的异位定位 (Ectopic localization of matrix metalloproteinase-9 in chronic cutaneous wounds), *Human pathology* 2002;33:355-64.

[0149] 39 Mirastschijski U, Impola U, Karsdal MA等, 基质金属蛋白酶抑制剂 BB-3103与丝氨酸蛋白酶抑制剂抑肽酶不同, 废除离体人类皮肤伤口的表皮愈合 (Matrix metalloproteinase inhibitor BB-3103 unlike the serine proteinase inhibitor aprotinin abrogates epidermal healing of human skin wounds ex vivo), *The Journal of investigative dermatology* 2002;118:55-64.

[0150] 40 Aust MC, Reimers K, Kaplan HM等, 经皮胶原蛋白诱导的再生代替创面愈合? (Percutaneous collagen induction-Regeneration in place of cicatrization?), *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2010;64:97-107.

[0151] 41 Steinhilber U, Weiske J, Badock V等, 凋亡诱导后E-钙黏蛋白的切割和脱落 (Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis), *The Journal of biological chemistry* 2001;276:4972-80.

[0152] 42 Rüdiger M., Tölle A., Meier W. and Rüstow B. 天然衍生的商品化表面活性物质在表面活性脂类的组成和表面粘度方面不同 (Naturally derived commercial surfactants differ in composition of surfactant lipids and in surface

viscosity), *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;288:L379-L383.

[0153] 43 Wright JR. 肺表面活性物质的宿主防御功能 (Host defense functions of pulmonary surfactant), *Biol Neonate*.2004;85:326-32.

[0154] 44 Herting E, Rauprich P, Stichtenoth G 等, 不同表面活性物质制备物对胎粪引起的失活的抗性 (Resistance of different surfactant preparations to inactivation by meconium), *Pediatr Res*.2001;50:44-9.

[0155] 45 Bernhard W, Mottaghian J, Gebert A, Rau GA, von Der HARDT H, Poets CF. 商品化与天然表面活性物质的比较: 表面活性、分子组分和钙的影响 (Commercial versus native surfactants. Surface activity, molecular components, and the effect of calcium), *Am J Respir Crit Care Med*.2000Oct;162(4Pt 1):1524-33.

[0156] 46 Hallman M, Teramo K, Ylikorkala O, Merritt TA. 呼吸窘迫综合征中的天然表面活性物质替代 (Natural surfactant substitution in respiratory distress syndrome), *J Perinat Med*.1987;15(5):463-8。

刮擦试验 - 角质形成细胞

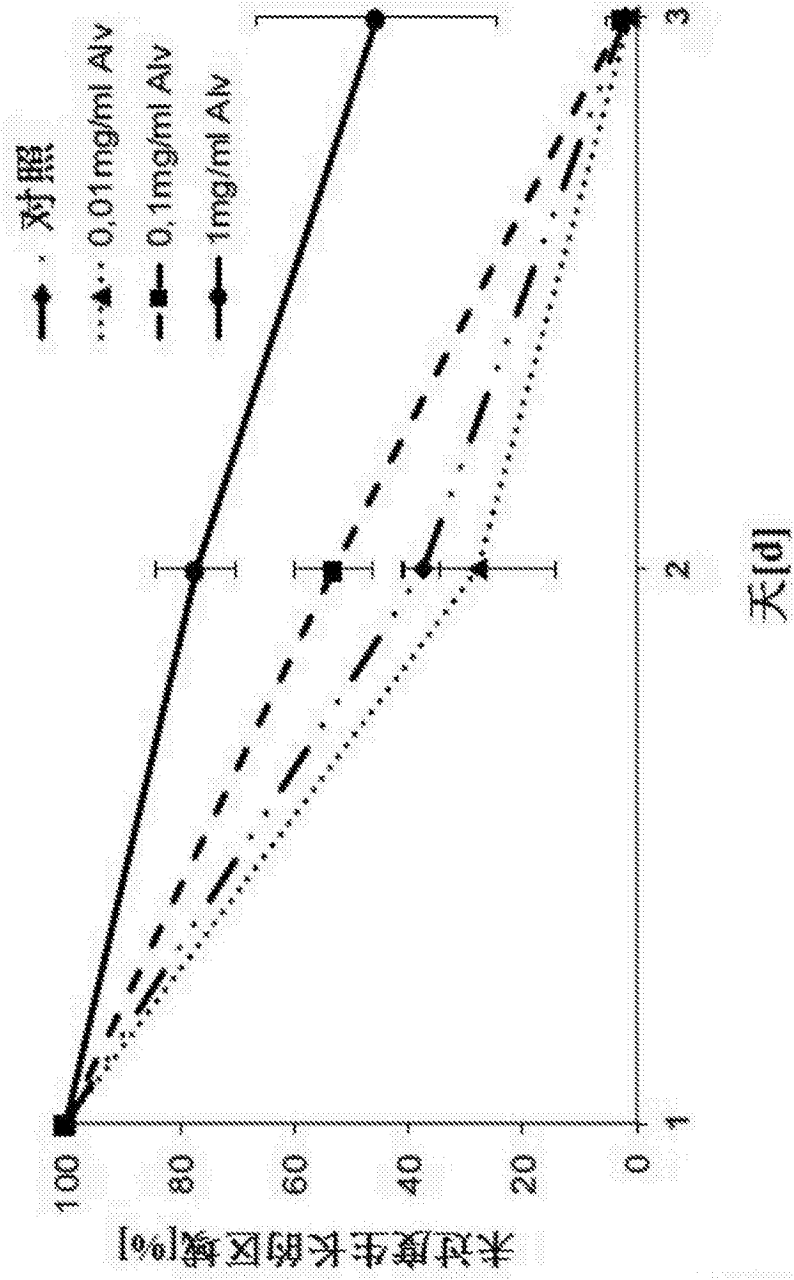


图1

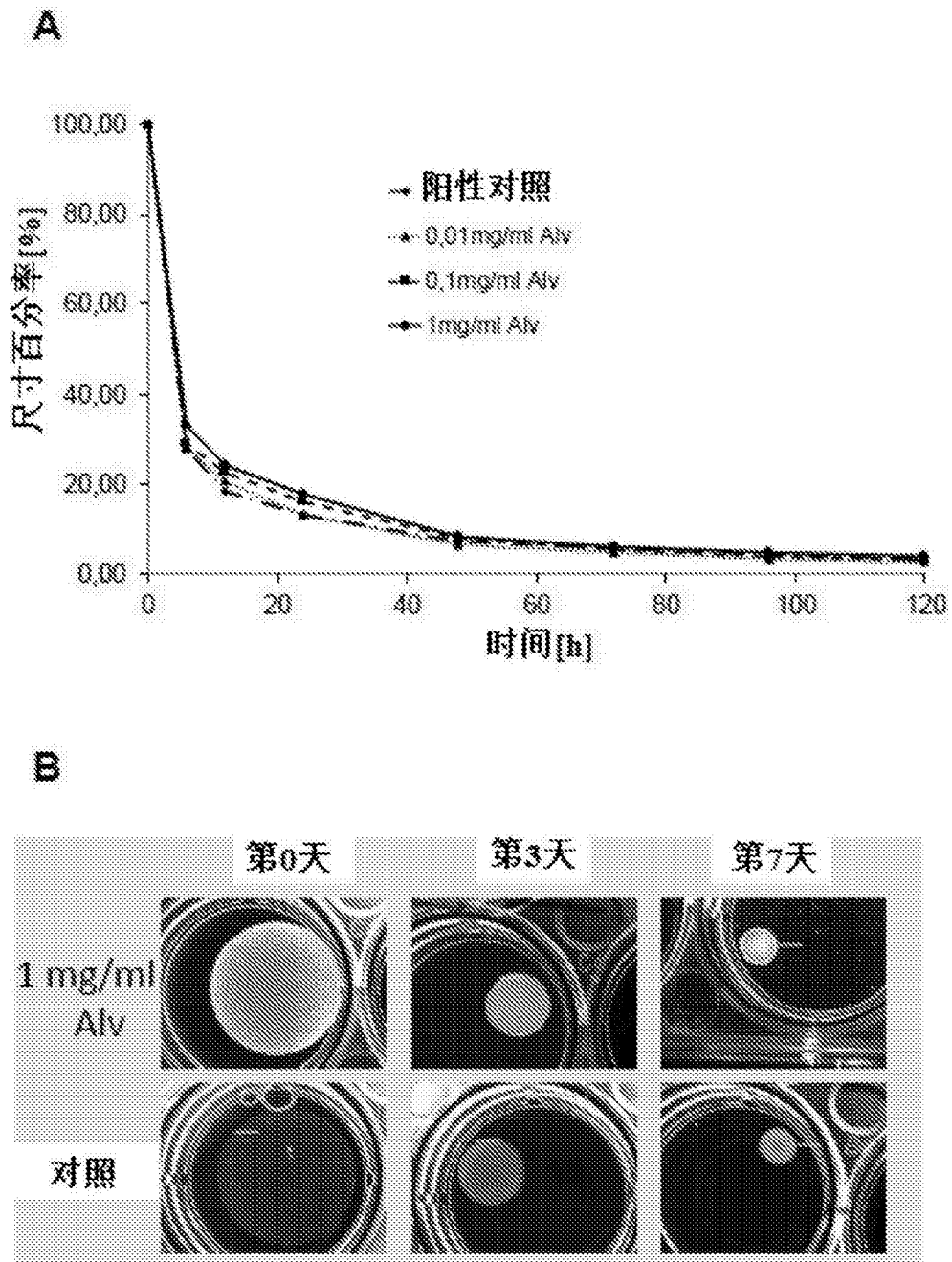


图2

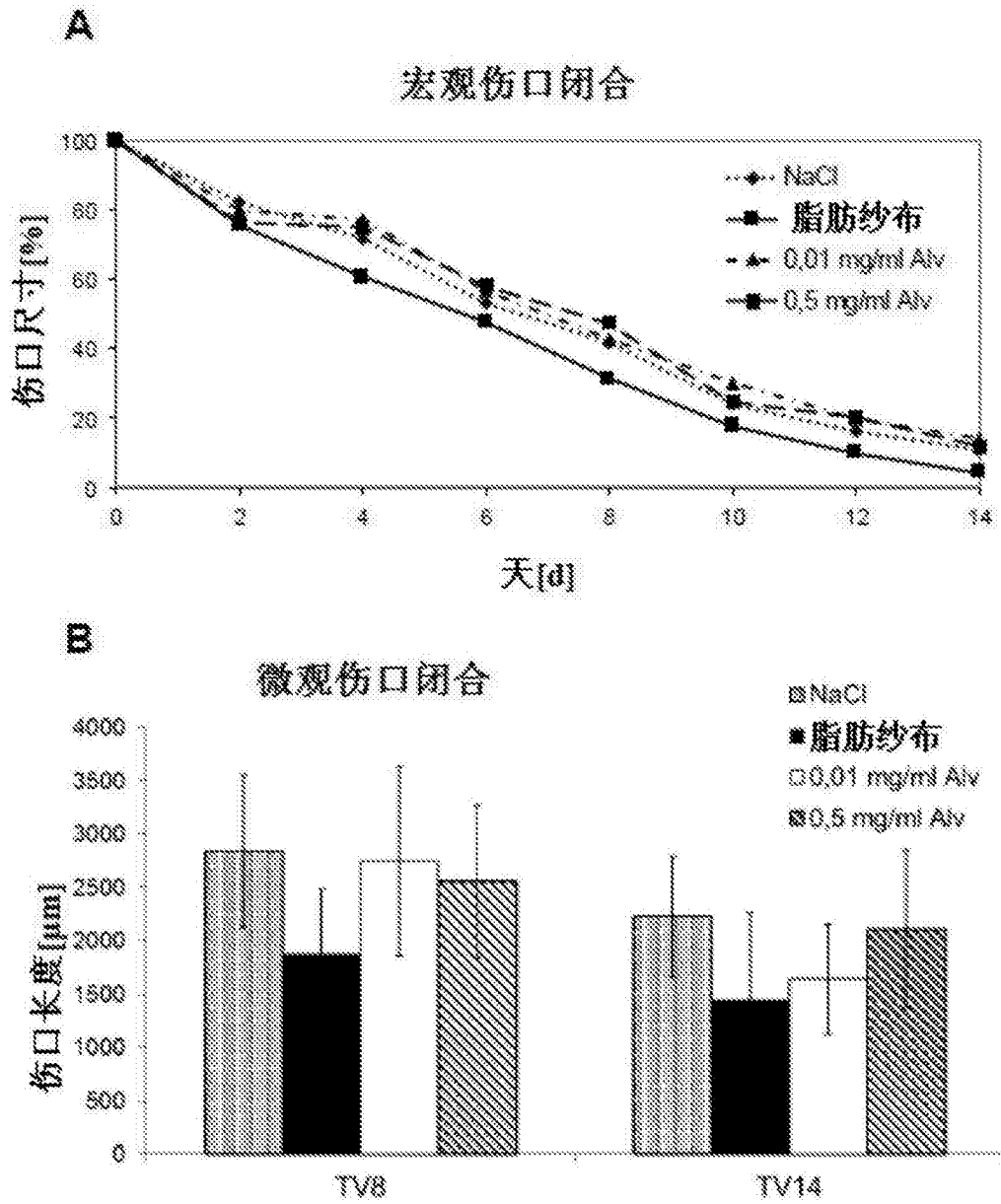


图3

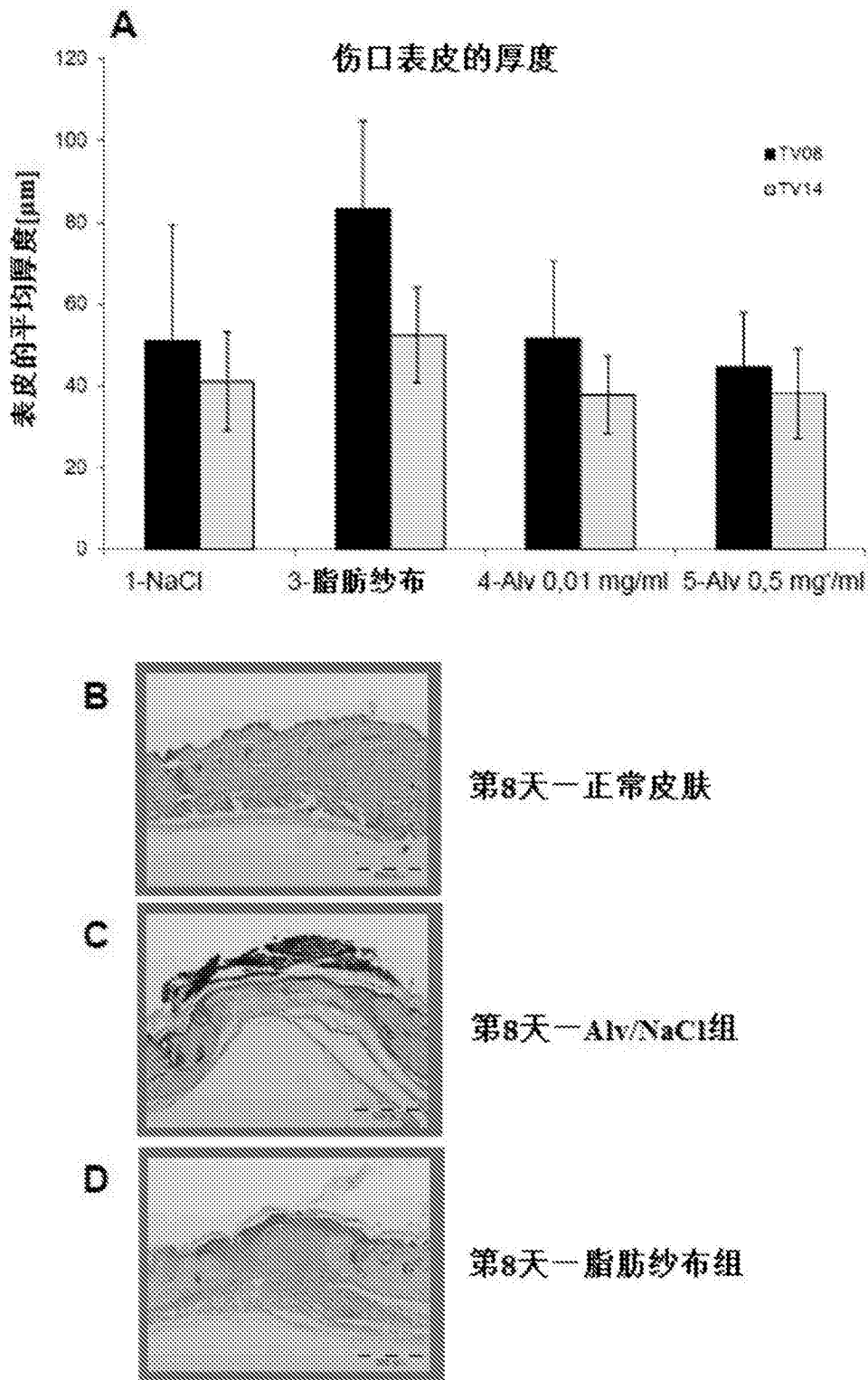


图4

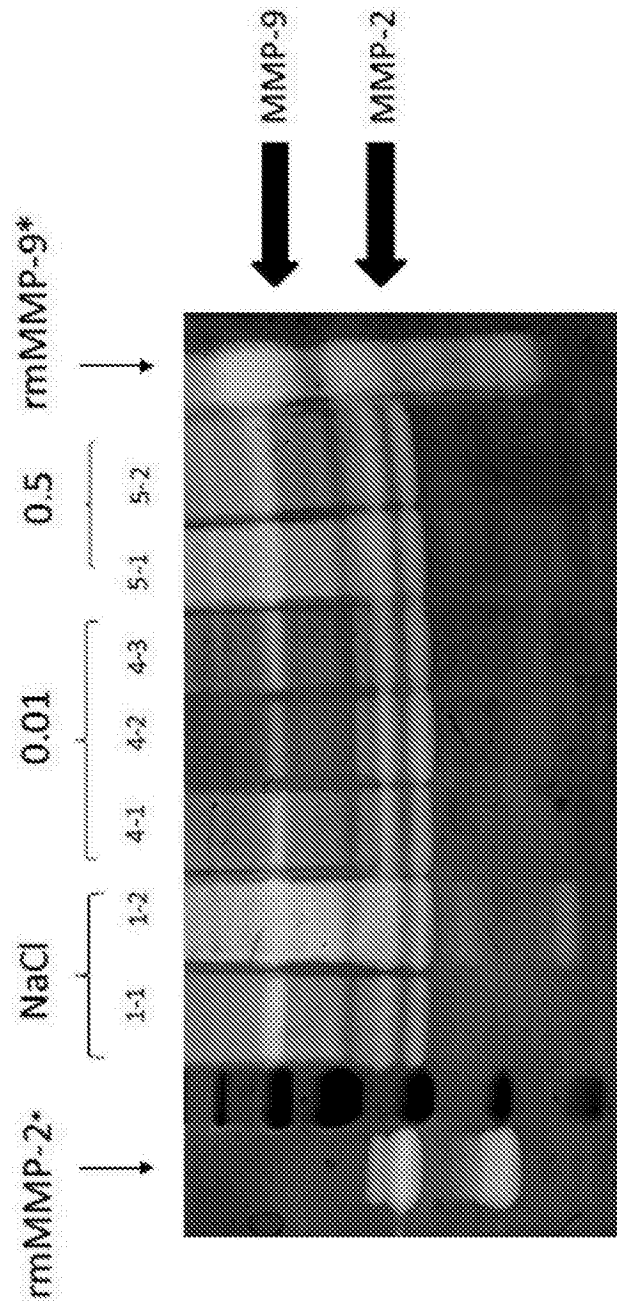


图5

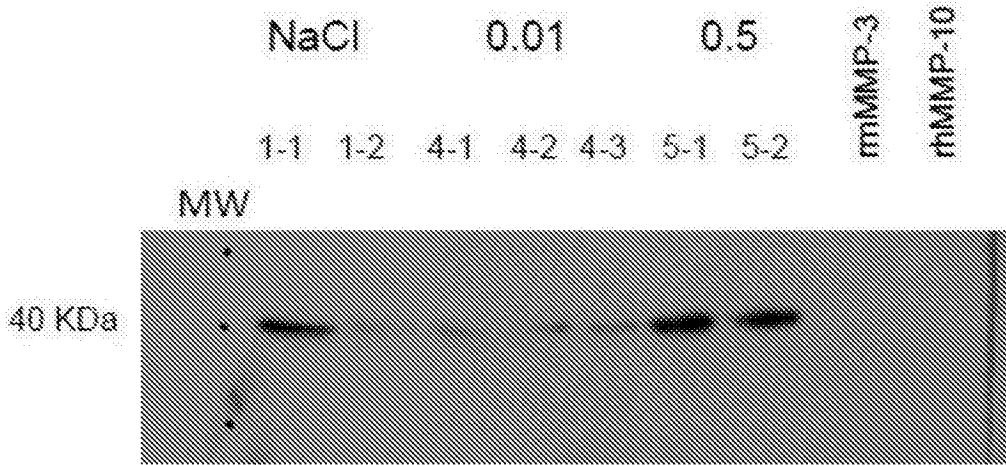


图6

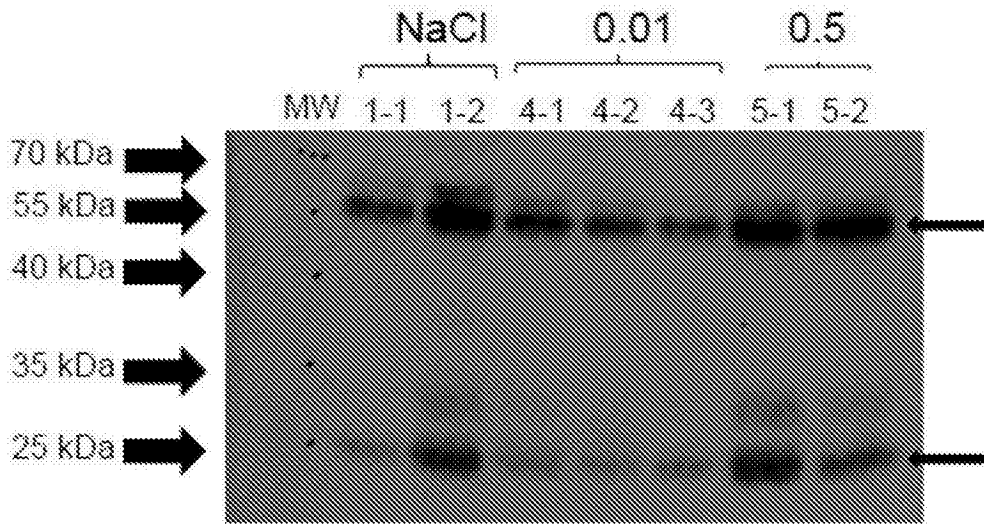


图7