

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200380107727.X

[51] Int. Cl.

A61L 27/24 (2006.01)

A61L 27/12 (2006.01)

A61K 6/033 (2006.01)

A61K 38/39 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

A61L 27/60 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 2 月 8 日

[11] 公开号 CN 1732023A

[51] Int. Cl. (续)

A61F 2/14 (2006.01)

A61F 2/10 (2006.01)

A61F 2/44 (2006.01)

[22] 申请日 2003.12.24

[21] 申请号 200380107727.X

[30] 优先权

[32] 2002.12.27 [33] US [31] 60/436,806

[86] 国际申请 PCT/US2003/041330 2003.12.24

[87] 国际公布 WO2004/060425 英 2004.7.22

[85] 进入国家阶段日期 2005.6.27

[71] 申请人 血管技术国际股份公司

地址 瑞士楚格

[72] 发明人 威廉·L·洪特

戴维·M·格雷维特

菲利普·M·托莱伊克斯 A·迈蒂

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

代理人 程金山

权利要求书 8 页 说明书 65 页

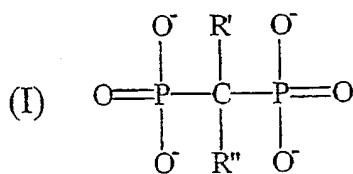
[54] 发明名称

组合物和使用 collajolie 的方法

[57] 摘要

包括胶原蛋白和金属蛋白酶抑制剂的组合物和装置，制备和使用其的方法。

1. 一种组合物，其包含胶原蛋白，MMPI 和羟磷灰石。
- 5 2. 权利要求 1 的组合物，其中 MMPI 是基质金属蛋白酶的抑制剂 (TIMP)。
3. 权利要求 2 的组合物，其中 TIMP 是 TIMP-1 或 TIMP-2。
4. 权利要求 2 的组合物，其中 TIMP 是 TIMP-3 或 TIMP-4。
5. 权利要求 1 的组合物，其中 MMPI 是四环素，或其类似物或衍生物。
- 10 6. 权利要求 5 的组合物，其中 MMPI 是四环素。
7. 权利要求 6 的组合物，其中四环素是二甲胺四环素或 doxycycline。
8. 权利要求 1 的组合物，其中 MMPI 是异羟肟酸盐。
9. 权利要求 8 的组合物，其中异羟肟酸盐是巴马司他，马立马司他，或托卡特。
- 15 10. 权利要求 1 的组合物，其中 MMPI 是 RO-1130830，CGS-27023A 或 BMS-275291。
11. 权利要求 1 的组合物，其中 MMPI 是多肽抑制剂。
12. 权利要求 11 的组合物，其中多肽抑制剂是金属蛋白酶成熟酶的抑制剂。
- 20 13. 权利要求 1 的组合物，其中 MMPI 是基于巯基的化合物。
14. 权利要求 1 的组合物，其中 MMPI 是具有结构 (I) 的双膦酸盐：



25

其中 R'和 R''独立地是氢，卤素，羟基，氨基或其取代的衍生物，硫代基或其取代的衍生物，或烷基，链烷基，链烯基，炔基，烷二基，alkyleno，杂烷基，杂链烷基，杂链烯基，杂链烷基，杂烷二基，heteroalkyleno，芳基，芳烷基，杂芳基，或杂芳烷基，或其取代的衍生物。

- 30 15. 权利要求 14 的组合物，其中 MMPI 是双膦酸盐，和其中 R'和 R''是羟

基，氢或氯。

16. 权利要求 1 的组合物，其包含至少两种 MMPI。

17. 权利要求 16 的组合物，其中所述至少两种 MMPI 包含四环素，或其类似物或衍生物和双膦酸盐。

5 18. 权利要求 16 的组合物，其中所述至少两种 MMPI 包括四环素，或其类似物或衍生物和异羟肟酸盐。

19. 一种组合物，其包含胶原蛋白，至少一种金属蛋白酶抑制剂(MMPI)，和至少一种聚合物。

20. 权利要求 19 的组合物，其中所述聚合物是可生物降解的。

10 21. 权利要求 20 的组合物，其中所述聚合物是可生物降解的聚合物，其选自由清蛋白，明胶，淀粉，纤维素，葡聚糖，多糖，血纤蛋白原，聚酯，聚(D,L-丙交酯)，聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)，聚(乙交酯)，聚(ϵ -己内酯)，聚(羟丁酸酯)，聚(碳酸烷基酯)，聚酸酐，和聚(原酸酯)，和其共聚物和掺合物组成的组。

15 22. 权利要求 19 的组合物，其中所述聚合物是非可生物降解的聚合物，其选自由环氧乙烷和环氧丙烷共聚物，乙烯基乙酸乙烯酯共聚物，硅橡胶，基于聚甲基丙烯酸酯的聚合物或基于聚丙烯酸酯的聚合物组成的组。

23. 权利要求 1 的组合物，其中所述胶原蛋白是 I 型或 II 型胶原蛋白。

20 24. 权利要求 1 的组合物，其中所述胶原蛋白是 III 型或 IV 型胶原蛋白。

25. 权利要求 1-24 任一项的组合物，其中所述组合物是无菌的。

26. 权利要求 1-25 任一项的组合物，其还包含骨形态发生蛋白。

27. 权利要求 26 的组合物，其中所述骨形态发生蛋白是 BMP-2 或 BMP-8。

25 28. 一种增加骨或替换损失骨的方法，其包含在需要的部位向患者递送权利要求 1-27 任一项的组合物。

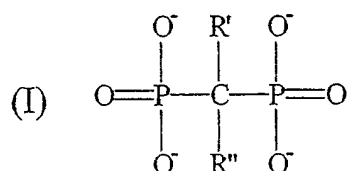
29. 一种医用装置，其包含胶原蛋白海绵和 MMPI。

30. 权利要求 29 的医用装置，其中所述 MMPI 是基质金属蛋白酶的组织抑制剂(TIMPI)。

31. 权利要求 30 的医用装置，其中所述 TIMP 是 TIMP-1 或 TIMP-2。

30 32. 权利要求 30 的医用装置，其中所述 TIMP 是 TIMP-3 或 TIMP-4。

33. 权利要求 29 的医用装置, 其中所述 MMPI 是四环素或其类似物或衍生物。
34. 权利要求 33 的医用装置, 其中所述 MMPI 是四环素。
35. 权利要求 34 的医用装置, 其中所述四环素是二甲胺四环素或 doxycine。
36. 权利要求 29 的医用装置, 其中所述 MMPI 是羟异肼酸盐。
37. 权利要求 36 的医用装置, 其中所述羟异肼酸盐是巴马司他, 马立马司他或托卡特。
38. 权利要求 29 的医用装置, 其中所述 MMPI 是 RO-1130830, CGS-27023A 或 BMS-275291。
39. 权利要求 29 的医用装置, 其中所述 MMPI 是多肽抑制剂。
40. 权利要求 39 的医用装置, 其中所述多肽抑制剂是金属蛋白酶成熟酶的抑制剂。
41. 权利要求 29 的医用装置, 其中所述 MMPI 是基于巯基的化合物。
42. 权利要求 29 的医用装置, 其中所述 MMPI 是具有结构 (I) 的双膦酸盐:



20

其中 R'和 R''独立地是氢, 卤素, 羟基, 氨基或其取代的衍生物, 硫代基或其取代的衍生物, 或烷基, 链烷基, 链烯基, 炔基, 烷二基, alkylene, 杂烷基, 杂链烷基, 杂链烯基, 杂链烷基, 杂烷二基, heteroalkylene, 芳基, 芳烷基, 杂芳基, 或杂芳烷基, 或其取代的衍生物。

43. 权利要求 42 的医用装置, 其中所述 MMPI 是双膦酸盐, 和其中 R'和 R''是羟基, 氢或氯。
44. 权利要求 29 的医用装置, 其包含至少两种 MMPI。
45. 权利要求 29 的医用装置, 其还包含至少一种聚合物。
46. 权利要求 45 的医用装置, 其中所述聚合物是可生物降解的。
47. 权利要求 46 的医用装置, 其中所述可生物降解的聚合物选自清蛋

白,明胶,淀粉,纤维素,葡聚糖,多糖,血纤蛋白原,聚酯,聚(D,L-丙交酯),聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯),聚(乙交酯),聚(ϵ -己内酯),聚(羟丁酸酯),聚(碳酸烷基酯),聚酸酐,和聚(原酸酯),和其共聚物和掺合物组成的组。

5 48. 权利要求 45 的医用装置,其中所述聚合物是非可生物降解的。

49. 权利要求 48 的医用装置,其中所述非可生物降解的聚合物选自环氧乙烷和环氧丙烷共聚物,乙烯基乙酸乙烯酯共聚物,硅橡胶,基于聚甲基丙烯酸酯的聚合物和基于聚丙烯酸酯的聚合物组成的组。

50. 权利要求 29 的医用装置,其中所述胶原蛋白是 I 型或 II 型胶原蛋白。

10 51. 权利要求 29 的医用装置,其中所述胶原蛋白是 III 型或 IV 型胶原蛋白。

52. 权利要求 29—51 任一项的医用装置,其中所述医用装置是无菌的。

53. 权利要求 29—51 任一项的医用装置,其还包含骨形态发生蛋白。

54. 权利要求 53 医用装置,其中所述骨形态发生蛋白是 BMP-2 或 BMP-8。

15 55. 权利要求 29—54 任一项的医用装置,其还包含羟磷灰石。

56. 一种通过外科手术融合一部分脊柱的方法,其包含从患者的脊柱去除一部分退行性椎间盘以形成椎间盘空隙;和向该椎间盘空隙中插入权利要求 29—54 任一项的医用装置。

57. 一种通过外科手术融合一部分脊柱的方法,其包含从患者的脊柱去除一部分退行性椎间盘以形成椎间盘空隙;和向该椎间盘空隙中插入权利要求 20 55 的医用装置。

58. 权利要求 54 或 55 的方法,其中所述 MMPI 是四环素。

59. 权利要求 54 或 55 的方法,其中所述 MMPI 是化学改性的四环素。

60. 权利要求 54 或 55 的方法,其中所述 MMPI 是 BATIMISTAT 或
25 MARIMISTAT。

61. 权利要求 59 或 60 的方法,其中所述装置包含 0.001%—15 重量% 的 MMPI。

62. 一种治疗牙周疾病的方法,其包含:将包含胶原蛋白和 MMPI 的牙齿移植物置于患者口腔中牙龈组织和清除的牙周缺损之间。

30 63. 一种治疗牙周疾病的方法,其包含:将包含胶原蛋白、MMPI 和羟磷

- 灰石的牙齿移植物置于患者口腔中齿龈组织和清除的牙周缺损之间。
64. 一种治疗胃食管回流疾病的方法，其包含将组合物注入患者的下部食管括约肌附近，其中所述组合物包含胶原蛋白的 MMPI。
65. 一种治疗排泄失禁的方法，其包含将组合物注入患者的肛门括约肌附近，其中所述组合物包含胶原蛋白的 MMPI。
66. 一种医用装置，其包含权利要求 1—27 任一项的组合物，其中所述装置选自由外科手术用的筛眼，外科手术用的悬带，外科手术用的补片，牙齿移植物，皮肤移植物，角膜屏蔽体和青光眼引流装置组成的组。
67. 一种在手术修复过程中加固软组织的方法，其包含向软组织附着外科手术用补片，其中所述补片包含胶原蛋白和 MMPI。
68. 权利要求 65 的方法，其中所述手术修复是腹壁或胸壁修复，疝气修复，缝合线加固，造口术加强，或组织瓣供体部位修复。
69. 权利要求 67 的方法，其中所述手术修复是腱，韧带，或软骨修复。
70. 一种在巩膜切除术后改善水状液排出的方法，其包含向下巩膜引流槽中插入青光眼引流装置，其中所述装置包含胶原蛋白和 MMPI。
71. 一种改善伤口愈合的方法，其包含向伤口表面施用伤口敷料，其中所述伤口敷料包含胶原蛋白和 MMPI。
72. 一种改善白内障手术后角膜的术后愈合的方法，包含向巩膜或结膜组织施加包括胶原蛋白和 MMPI 的角膜屏蔽体。
73. 权利要求 62-72 的方法，其中所述 MMPI 是基质金属蛋白酶的抑制剂(TIMPI)。
74. 权利要求 62-72 的方法，其中所述 MMPI 是 TIMP-1 或 TIMP-2。
75. 权利要求 62-72 的方法，其中所述 MMPI 是 TIMP-3 或 TIMP-4。
76. 权利要求 62-72 的方法，其中所述 MMPI 是四环素或其类似物或衍生物。
77. 权利要求 62-72 的方法，其中所述 MMPI 是四环素。
78. 权利要求 62-72 的方法，其中所述 MMPI 是二甲胺四环素或 doxycycline。
79. 权利要求 62-72 的方法，其中所述 MMPI 是羟异肼酸酯。
80. 权利要求 62-72 的方法，其中所述 MMPI 是巴马司他，马立马司他或托卡特。

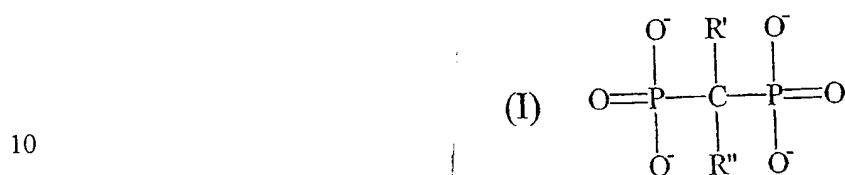
81. 权利要求 62-72 的方法,其中所述 MMPI 是 RO-1130830,CGS-27023A 或 BMS-275291。

82. 权利要求 62-72 的方法,其中所述 MMPI 是多肽抑制剂。

83. 权利要求 62-72 的方法,其中所述 MMPI 是金属蛋白酶成熟酶的抑制剂。

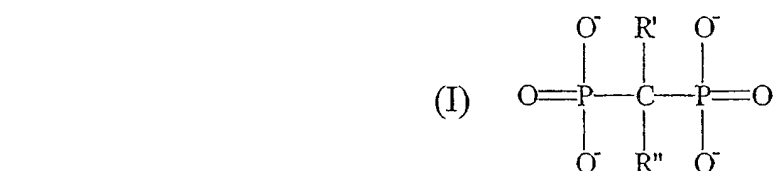
84. 权利要求 62-72 的方法,其中所述 MMPI 是基于巯基的化合物。

85. 权利要求 62-72 的方法,其中所述 MMPI 是具有结构(I)的双膦酸盐:



其中 R'和 R''独立地是氢, 卤素, 羟基, 氨基或其取代的衍生物, 硫代基团或其取代的衍生物, 或烷基, 链烷基, 链烯基, 炔基, 烷二基, alkyleno, 杂烷基, 杂链烷基, 杂链烯基, 杂链烷基, 杂烷二基, heteroalkyleno, 芳基, 芳烷基, 杂芳基, 或杂芳烷基, 或其取代的衍生物。

86. 权利要求 62-72 的方法,其中所述 MMPI 是具有结构(I)的双膦酸盐:



且 R'和 R''独立地是羟基, 氢或氯。

87. 权利要求 62-72 的方法,其中所述方法中使用至少 MMPI。

88. 权利要求 62-72 的方法,其中所述 MMPI 包含四环素或其类似物或衍生物和双膦酸盐。

89. 权利要求 62-72 的方法,其中所述 MMPI 包含四环素或其类似物或衍生物, 和羟异脲酸盐

90. 一种移植物, 其包含整形外科的移植物, 所述整形外科的移植物包含胶原蛋白和 MMPI。

91. 权利要求 90 的移植物, 其为骨移植物基质的形式。

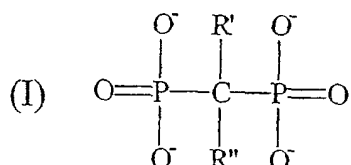
92. 权利要求 90 的移植物, 其中所述移植物是脊柱融合装置。

93. 一种移植物，其包含外科手术用的筛眼，所述筛眼包含胶原蛋白 MMPI。
94. 一种移植物，其包含悬带，所述悬带包含胶原蛋白和 MMPI。
95. 一种移植物，其包含补片，所述补片包含胶原蛋白和 MMPI。
- 5 96. 一种移植物，其包含一种牙齿移植物，所述牙齿移植物包含胶原蛋白和 MMPI。
97. 一种移植物，其包含一种人工皮肤移植物，所述人工皮肤移植物包含胶原蛋白和 MMPI。
98. 一种移植物，其包含一种角膜屏蔽体，所述角膜屏蔽体包含胶原蛋白
10 和 MMPI。
99. 一种移植物，其包含一种青光眼引流装置，所述青光眼引流装置包含胶原蛋白和 MMPI。
100. 一种移植物，其包含一种填充剂，所述填充剂包含胶原蛋白和 MMPI。
101. 权利要求 100 的移植物，其被配制用于治疗 GERD。
- 15 102. 权利要求 100 的移植物，其被配制用于治疗排泄失禁。
103. 权利要求 90-102 的移植物，其中所述 MMPI 是基质金属蛋白酶的组
织抑制剂(TIMP)。
104. 权利要求 90-102 的移植物，其中所述 MMPI 是 TIMP-1 或 TIMP-2。
105. 权利要求 90-102 的移植物，其中所述 MMPI 是 TIMP-3 或 TIMP-4。
- 20 106. 权利要求 90-102 的移植物，其中所述 MMPI 是四环素或其类似物或
衍生物。
107. 权利要求 90-102 的移植物，其中所述 MMPI 是四环素。
108. 权利要求 90-102 的移植物，其中所述 MMPI 是二甲胺四环素或
doxycine。
- 25 109. 权利要求 90-102 的移植物，其中所述 MMPI 是羟异肼酸盐。
110. 权利要求 90-102 的移植物，其中所述 MMPI 是巴马司他，马立马司
他或托卡特。
111. 权利要求 90-102 的移植物，其中所述 MMPI 是 RO-1130830，
CGS-27023A 或 BMS-275291。
- 30 112. 权利要求 90-102 的移植物，其中所述 MMPI 是多肽抑制剂。

113. 权利要求 90-102 的移植物，其中所述 MMPI 金属蛋白酶成熟酶的抑制剂。

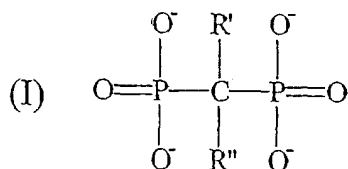
114. 权利要求 90-102 的移植物，其中所述 MMPI 是基于巯基的化合物。

115. 权利要求 90-102 的移植物，其中所述 MMPI 是具有结构(I)的双磷酸盐：



10 其中 R'和 R''独立地是氢，卤素，羟基，氨基或其取代的衍生物，硫代基团或其取代的衍生物，或烷基，链烷基，链烯基，炔基，烷二基，alkyleno，杂烷基，杂链烷基，杂链烯基，杂链烷基，杂烷二基，heteroalkyleno，芳基，芳烷基，杂芳基，或杂芳烷基，或其取代的衍生物。

116. 权利要求 90-102 的移植物，其中所述 MMPI 是具有结构(I)的双磷酸盐：



20 且 R'和 R''独立地是羟基，氢或氯。

117. 权利要求 90-102 的移植物，其包含至少 MMPI。

118. 权利要求 90-102 的移植物，其包含四环素或其类似物或衍生物，和双磷酸盐。

119. 权利要求 90-102 的移植物，其包含四环素或其类似物或衍生物，和羟异脲酸盐。

组合物和使用 collajolie 的方法

5

发明背景

发明领域

本发明通常涉及药物组合物，装置和方法，更具体地，涉及增强移植的胶原蛋白材料的延续时间和效能的组合物、装置和方法。

10

相关领域的描述

胶原蛋白是哺乳动物中最丰富的蛋白质之一，占人体干重高达 30%（参见 L. C. Junqueira 和 J. Carneiro, Basic Histology, 第 4 版., Lange Medical Publications, Los Altos, Calif., 1983, 89-119 页）。胶原蛋白为皮肤、毛发和指甲提供强度和弹性，其还是肌肉、腱、软骨、韧带，关节和血管的主要和基本组分。

发现胶原蛋白以至少 5 种不同天然存在的形式存在，其由几种不同细胞类型产生。I 型胶原蛋白是最高丰度形式的胶原蛋白，遍布于机体内。其是由成纤维细胞、成骨细胞、成牙本质细胞和成软骨细胞产生，存在于骨、牙本质、真皮和纤维软骨中。II 型胶原蛋白由成软骨细胞产生，主要存在于软骨。III 型胶原蛋白是由平滑肌成纤维细胞、网状细胞、神经膜细胞和肝细胞产生。其主要功能在于维持器官的结构，并且存在于平滑肌、神经内膜、动脉、子宫、肝、脾、肾和肺组织中。主要认为 IV 型胶原蛋白涉及支撑和过滤，其存在于上皮和内皮基板和基膜中。V 型胶原蛋白存在于胎膜、血管和胎盘基膜中。

已经建议将胶原蛋白用于各种医学应用的治疗中，包括例如，美容手术、关节炎、皮肤再生、移植、器官置换和用于治疗伤口和灼伤(参见例如，美国专利号 6,309,670, 5,925,736, 5,856,446, 5,843,445, 5,800,811, 5,783,188, 5,720,955, 5,383,930, 5,106,949, 5,104,660, 5,081,106, 4,837,379, 4,604,346, 4,485,097, 4,546,500, 4,539,716 和 4,409,332) 并提供了使用

可注射肉毒杆菌毒素药物如 BOTOX (Allergan, Inc., Irvine, CA)的有吸引力的备选方案。

然而,胶原蛋白已经显示了几种与医学应用有关的问题。例如,在移植的情况下,具有杂质的胶原蛋白制剂是可激发炎性应答的有效免疫原。

- 5 类似地,非人类形式的胶原蛋白如牛胶原蛋白已经于慢性细胞炎症反应有关,其可导致疤痕组织和粘附形成,和短暂的低热。另外,可移植胶原蛋白的延续时间是有限的,需要在定期的基础上重复程序(特别是用于美容增强)。

本发明涉及与胶原蛋白及其在医学应用中的用途有关的缺陷。

10

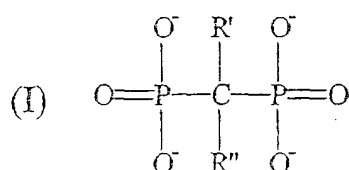
发明概述

- 简而言之,本发明提供了用于延长基于胶原蛋白的移植物的效能的组合物、装置和方法。基于胶原蛋白的移植物用于在各种医学程序中提供结构和支撑,包括用于美容目的的皮肤注射(以减少皱纹、疤痕、轮廓缺陷),
15 用于治疗失禁的尿道周围的填充剂,和在血管穿刺程序后产生止血的血管“塞”。尽管极端有效,胶原蛋白移植物在体内具有短的持续时间的效能,原因在于材料被由临近移植物的白细胞和结缔组织细胞(成纤维细胞)释放的降解性酶(主要地,胶原酶和其他基质金属蛋白酶)快速降解。结果必须重复胶原蛋白移植程序以维持理想的效果。

- 20 本发明描述了结合胶原蛋白和一种化合物的组合物,所述化合物抑制胶原酶的活性以产生具有增加体内延续时间的基于胶原蛋白的移植物("Collajolie")。已知各种天然存在和合成产生分子抑制胶原蛋白酶活性,并已用于除了本发明以外的其他目的(例如治疗恶性肿瘤,关节炎和其他疾病),这些抑制剂共同称为“基质金属蛋白酶抑制剂”(缩写为 MMP
25 抑制剂或 MMPI)或“胶原蛋白酶抑制剂”。基于共同性质,已将金属蛋白酶进行了分类,实例为: MMP-1 (胶原蛋白酶 I, 成纤维细胞胶原蛋白酶; EC 3.4. 24.3); MMP-2 (明胶酶 A, 72 kDa 明胶酶, 基膜胶原蛋白酶, EC 3.4. 24.24), MMP-3 (溶基质素 1, EC 3.4. 24.17); MMP-7 (蛋白多糖酶(proteoglycanase), matrilysin); MMP-8 (胶原蛋白酶 II, 嗜中性粒细胞
30 胶原蛋白酶, EC 3.4. 24.34); MMP-9 (明胶酶 B, 92 kDa 明胶酶, EC 3.4.

24.35), MMP-10 (溶基质素 2, EC 3.4. 24.22), MMP-11 (溶基质素 3),
MMP-12 (金属弹性蛋白酶, HME, 人巨噬细胞弹性蛋白酶); MMP-13 (胶
原蛋白酶 III) ; 和 MMP-14 (膜 MMP)。本发明涉及抑制降解胶原蛋白的
MMP。适合用于本发明的 MMPI 的代表实例包括 TIMP-1, 四环素, 强力
霉素, 二甲胺四环素, 巴马司他, 马立马司他, RO-1130830, CGS 27023A,
BMS-275291, CMT-3, 索利司他, 伊洛马司他, CP-544439, 普淋司他,
PNU-1427690, SU-5402 和托卡特。在另一个实施方案中, 本文描述的组
合物还可另外包含一种或多种因子、化合物或试剂, 它们促进或增强骨生
长, 包括, 例如羟磷灰石和骨形态发生蛋白 (BMP, 如 BMP-2)。

因此, 本发明的一个方面提供了组合物, 其包含胶原蛋白和一种基质
金属蛋白酶抑制剂(MMPI)。在一些方面, 该组合物还包括羟磷灰石。在某
些实施方案中, MMPI 是基质金属蛋白酶的抑制剂 (如 TIMP-1,
TIMP-2, TIMP-3, 或 TIMP-4)。在其它实施方案中, MMPI 是四环素或
其类似物或衍生物 (如二甲胺四环素或 doxycycline); 异羟肟酸盐
(hydroxamate)(如 BATIMISTAT, MARIMISTAT, 或托卡特); RO-1130830,
CGS 27023A, BMS-275291, CMT-3, 索利司他, 伊洛马司他, CP-544439,
普淋司他, PNU-1427690, 或 SU-5402。在其它方面, MMPI 可能是多肽
抑制剂(如金属蛋白酶成熟酶抑制剂), 基于巯基的化合物, 或具有结构 (I)
的双膦酸盐:



其中 R' 和 R'' 独立地是氢, 卤素, 羟基, 氨基或其取代的衍生物, 硫代基
团或其取代的衍生物, 或烷基或链烷基 (alkanyl), 链烯基, 炔基, 烷二
基 (alkyldiyl), alkylene, 杂烷基, 杂链烷基 (heteroalkanyl), 杂链烯基,
杂链烷基, 杂烷二基 (heteroalkyldiyl), heteroalkylene, 芳基, 芳基烷基,
杂芳基, 或杂芳基烷基, 或其取代的衍生物。在一个实施方案中, R' 和
R'' 独立地是羟基, 氢或氯。

在一个方面, 本发明提供了一种组合物, 其包括胶原蛋白, 羟磷灰

石, 和至少两种 MMPI。例如, 组合物可以包括四环素, 或其类似物或衍生物, 和双膦酸盐。在另一个实施方案中, 该组合物包括四环素或其类似物或衍生物和异羟肟酸盐(hydroxymate)。

在另一个方面, 本组合物可包括胶原蛋白, 至少一种 MMPI 和至少一种聚合物。在一个方面中, 该聚合物是可生物降解的聚合物(如清蛋白, 明胶, 淀粉, 纤维素, 葡聚糖, 多糖, 血纤蛋白原, 聚酯, 聚(D,L-丙交酯), 聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯), 聚(乙交酯), 聚(ϵ -己内酯), 聚(羟丁酸酯), 聚(碳酸烷基酯), 聚酸酐和聚(原酸酯), 和其共聚物和掺合物), 而在另一方面, 聚合物是非可生物降解的聚合物(如环氧乙烷和环氧丙烷共聚物, 乙烯乙酸乙烯酯共聚物, 硅橡胶, 基于聚(甲基丙烯酸酯)的聚合物或基于聚(丙烯酸酯)的聚合物)。

在单独的实施方案中, 胶原蛋白是 I 型胶原蛋白或 II 型胶原蛋白。在另外其它单独的实施方案中, 本文提供的该组合物可包含其它化合物或组合物, 包括例如, 凝血酶和/或染料, 或骨形态发生蛋白, 例如 BMP-2 或 BMP-8。在另外的实施方案中, 该组合物可以是无菌的, 和该组合物可以是以适于人类给药的方式被灭菌。

本文描述的组合物可用于各种适应症, 包括例如, 在脊柱融合外科手术中作为医用装置增加骨生长, 作为外科手术悬带, 筛眼或补片用于治疗牙周疾病(如作为牙齿移植物), 作为皮肤移植物(如用于开发人造皮肤), 作为角膜屏蔽体, 或作为青光眼引流装置。例如, 医用装置可以是胶原蛋白海绵, 其包括 MMPI (关于胶原蛋白海绵的代表性讨论, 参见例如美国专利 6,649,162; 6,425,918; 6,183,496; 5,116,552; 4,789,401; 4,412,947; 和 4,193,813, 以及 Burton 等., British J. of Dermatology 99: 681-5, 1978 和 Natsume, 等 J. Biomedical Materials Res., 27: 867-875, 1993)。在某些实施方案中, 该装置还可包括如上所述的聚合物。

在本发明的其他方面, 提供了用于制备本文描述的组合物的方法, 包含混合胶原蛋白和一种或多种本文所述的 MMPI 的步骤, 优选结合一种或多种促进或帮助骨生长的因子、试剂或化合物, 包括, 例如羟磷灰石和骨形态发生蛋白 (BMP, 如 BMP-2 和 BMP-8)。在其它实施方案中, 可将本文提供的组合物和装置灭菌。

本文描述了用于治疗或预防各种适应症的方法。在一个方面，描述了用于外科手术融合一部分脊柱的方法，包括从患者的脊柱去除一部分退行性椎间盘以形成椎间盘空间，将如本文所述的医用装置（具有或不具有羟磷灰石）插入到椎间盘空间。该装置可包括如 0.001%—15 重量%的 MMPI。

5 在另一个方面，描述了用于增加骨或替代损失骨的方法。该方法包括向需要其的患者在理想的位置递送包括胶原蛋白，MMPI 和羟磷灰石的组合物。在另一个方面，本发明提供了治疗牙周疾病的方法，包含将牙齿移植物放置在需要治疗的患者口腔中的齿龈组织和清除的牙周缺损间，所述移植物包括胶原蛋白和 MMPI (具有或不具有羟磷灰石)。

10 应用依照本发明的包括胶原蛋白和 MMPI 的组合物可治疗其它的适应症。例如，描述了治疗胃食道回流疾病的方法，其包括将依照本发明的组合物注射到患者的下部食管括约肌附近。在另一个方面，描述了治疗排泄失禁的方法，其包括将组合物注射到患者的肛门括约肌附近。在另一个方面，本发明提供了在手术修复期间强化软组织的方法(如腹壁或胸壁

15 修复，疝气修复，缝合线加固，造口术加强，组织瓣供体部位修复，或腱、韧带或软骨的修复)，包含向软组织附着包括胶原蛋白和 MMPI 的外科手术用的补片（关于外科手术用的补片的代表性讨论参见例如美国专利号 6,238,416； 5,665,114 和 5,290,217）。在另一个方面，本发明提供了在巩膜切除术后改善水状液排出的方法，其包含向巩膜下引流槽插入青光眼引流

20 装置，所述装置包括胶原蛋白的 MMPI。在另一个方面，提供了促进伤口愈合的方法，其包括向伤口表面施加包括胶原蛋白和 MMPI 的伤口敷料。在另一个方面，本发明描述了促进白内障手术后角膜在术后愈合的方法，包含向巩膜或结膜组织施加包括胶原蛋白和 MMPI 的角膜屏蔽体。

参考下文详细描述后，本发明的这些和其它方面将变得明显。

25

发明详述

在阐述本发明前，阐述下文将使用的某些术语的定义对理解本发明可能是有帮助的。

如本文所用，“胶原蛋白”指如同本文描述了参考的所有形式的胶原蛋白，包括那些已加工或修饰的胶原蛋白。代表性实例包括 I 型和 II 型胶

30

原蛋白。胶原蛋白可制备自人或动物来源，或可使用重组技术生产。

"基质金属蛋白酶抑制剂"或"MMPI"指一种化合物，试剂或组合物，其抑制基质金属蛋白酶活性。MMP 抑制剂的代表性实例包括金属蛋白酶的
5 组织抑制剂(TIMPs) (如 TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 或 TIMP-4), α_2 -巨球蛋白, 四环素 (如四环素, 二甲胺四环素, 和强力霉素), 异羟肟酸盐 (如巴马司他, MARIMISTAT 和托卡特), 螯合剂(如 EDTA, 半胱氨酸, 乙酰半胱氨酸, D-青霉胺和金盐), 合成的 MMP 片段, 琥珀酰基巯基嘌呤, 磷酸酰胺化物 (phosphonamidate), 和异羟肟酸(hydroxaminic acids)。

本文引用的任何浓度或百分比范围被理解为包括在其范围内的任何
10 整数及其分数的浓度, 如整数的十分之一和百分之一, 除非另外说明。如本文所用, "约" 或 "基本上包含" 表示平均值 $\pm 15\%$ 。

在本文陈列了各种参考文献, 其例如更详细描述某些程序或组合物 (如化合物, 蛋白质, 载体和它们的产出等)。这些参考文献包括专利和文章, 其全文结合于此作为参考。还应注意当引用 PCT 申请时, 还应理解
15 潜在的或引用的美国申请也通过参考全文结合于此。

I. 胶原蛋白

胶原蛋白是皮肤、软骨、骨和结缔组织的主要组分, 以几种不同类型或形式存在, I 型、II 型、III 型和 IV 型是最普遍的。典型地, 胶原蛋白
20 分离自天然来源, 例如牛骨, 软骨或皮革。常常将骨脱脂、研磨, 干燥和去除矿物质以提取胶原蛋白。相反, 常常切碎牛软骨或皮革并用非胶原酶的酶消化 (以便去除污染的蛋白质)。胶原蛋白也可制备自人组织 (患者自身的或供体组织)或通过重组方法制备。

在本发明的某些实施方案中, 优选的胶原蛋白是作为非-免疫反应性
25 无菌组合物来制备的。它们可以是可溶的 (如 VITROGEN 胶原蛋白溶液, 获自 Cohesion Technologies, Palo Alto, CA), 或处于再造的纤丝发育不全肽胶原蛋白形式, 例如获自 Inamed Aesthetics, Santa Barbara, CA ZYDERM 的 胶原蛋白移植物)。胶原蛋白的其它实例包括组织构造的人胶原蛋白产品, 其设计用于减少皱纹, 如 COSMODERM, 其意图处理表
30 面区域, 和 COSMOPLAST (均来自 Inamed Aesthetics), 其用于治疗更大

的空隙,和粘弹性可注射凝胶制剂,如 HYLAFORM (Inamed Aesthetics),用于面部皱纹和疤痕的改日治疗。

公开含胶原蛋白的组合物、装置和用于制备和/或递送该组合物和装置的方法的专利的代表性实例包括美国专利号 4,164,559, 4,424,208, 4,140,537, 4,563,350, 4,582,640, 4,642,117, 4,743,229, 4,776,890, 4,795,467, 4,888,366, 5,035,715, 5,162,430, 5,304,595, 5,324,775, 5,328,955, 5,413,791, 5,428,022, 5,446,091, 5,475,052, 5,523,348, 5,527,856, 5,543,441, 5,550,187, 5,565,519, 5,580,923, 5,614,587, 5,616,689, 5,643,464, 5,693,341, 5,744,545, 5,752,974, 5,756,678, 5,786,421, 5,800,541, 5,807,581, 5,823,671, 5,874,500, 5,895,833, 5,936,035, 5,962,648, 6,090,996, 6,096,039, 6,111,165, 6,165,489, 6,166,130, 6,280,727, 6,312,725 和 6,323, 278。

II. 基质金属蛋白酶 (MMP) 抑制剂

金属蛋白酶 (MMP) 是一组天然存在的依赖锌的酶,其涉及胞外基质大分子的分解和代谢。迄今已经鉴定超过 23 种金属蛋白酶,并已主要归类为酶家族,所述的酶已知为胶原蛋白酶,溶基质素,明胶酶,弹性蛋白酶和基质溶素(matrilysin)。金属蛋白酶衍生自各种细胞类型,包括嗜中性粒细胞,单核细胞,巨噬细胞和成纤维细胞。

MMP 是涉及胶原蛋白体内分解和正常代谢的主要酶。尽管许多 MMP 能分解几种结缔组织元件包括胶原蛋白,对胶原蛋白具有最高特异性的酶来自胶原蛋白酶家族(如 MMP-1, MMP-8, MMP-13 和 MMP-14)。通过已知为“金属蛋白酶的抑制剂”或“TIMP”的抑制剂家族体内天然抑制金属蛋白酶活性,所述抑制剂结合金属蛋白酶的活性区域而赋予其无活性。在酶活性和抑制之间是天然平衡的,其在生理条件下调节胞外基质的代谢速率。

在本领域中已知测量 MMP 抑制的试验,包括例如下述: Cawston T. E., Barrett A. J., "A rapid and reproducible assay for collagenase using [^{14}C] acetylated collagen, "AnaL Biochem. 35: 1961-1965 (1963); Cawston T. E., Murphy G, "Mammalian collagenases, Methods in Enzymology 80: 711(1981); Koshy P. T. J., Rowan A. D., Life P. F., Cawston T. E., "96- well

plate assays for measuring collagenase activity using (3) H-acetylated collagen, " Anal. Biochem. 99: 340-345 (1979); Stack M. S., Gray R. D., "Comparison of vertebrate collagenase and gelatinase using a new fluorogenic substratepeptide, "J. Biol. Chem. 264: 4277-4281 (1989); 和 Knight C.G.,
5 Willenbrock F., MurphyG., "A novel coumarin-labelled peptide for sensitive continuous assays of the matrix metalloproteinases, "FEBS Lett 296 : 263-266 (1992)。本领域已知的这些和其它试验适合用于鉴定可用于本发明的 MMPI。

在本发明的上下文中, MMPI 可能具有约 3-10 mM—约 9-10nM 的抑制浓度(IC), 优选浓度为约 50 mM—约 50nM。
10

当作为部分治疗程序移植胶原蛋白时, 它被来自 MMPI 家族的酶逐渐代谢, 直至它被完全再吸收。由于酶降解胶原蛋白移植物导致的这种结构完整性的逐步损失导致功能活性的损失, 其导致移植失败和最终需要随后的再干预。延长胶原蛋白移植物效能的尝试已集中在交联胶原蛋白移植物以减慢酶降解。本发明描述了在胶原蛋白移植物中结合能抑制 MMP 活性的
15 的一种或多种试剂, 以倾向于有利于胶原蛋白维持的生理平衡。本发明与其它维持策略兼容, 并且可结合其它维持策略使用, 所述其它维持策略如胶原蛋白交联, 设计用于增加胶原蛋白移植物的存留时间。

由于 MMP 的病态生成已与各种临床重要疾病过程如肿瘤转移和慢性
20 炎性疾病如骨关节炎和类风湿性关节炎的进展有关, 已开发许多天然存在和合成的试剂以抑制 MMP 活性。不令人惊讶的是, MMP 活性的调节是体内重要和高度调节的过程。结果, 在导致 MMP 生产的途径中存在许多位点, 可能开发能抑制 MMP 合成或活性的分子。在下文更详细描述能抑制 MMP 活性的试剂类型, 其可依照本发明的组合物、方法和装置来使用。

简而言之, 各种细胞因子(如 TNF- α , IL-1, FGF 等)能刺激导致
25 MMP 产生的途径。已证实封闭它们细胞受体的这些细胞因子或试剂的抑制剂在某些环境下抑制 MMP 合成, 并适合用于本发明。结合其细胞受体后, MMP 产生的刺激引发产生各种第二信使和细胞信号分子(如 jun kinase, JKK), 其抑制还可降低 MMP 的产生。在 MMP 基因转录过程中
30 已涉及多种转录因子(如 c-fos, cjun, NF κ -B, c-myc)。这些转录因子和它

们产物的抑制剂(如 AP-1 蛋白)还可降低转录的 MMP 的量,并可用于本发明的目的。类似地,抑制 MMP 基因本身的策略(如基因敲除)或抑制 MMP RNA 的策略(如反义,核酶,四环素,强力霉素,二甲胺四环素)可用于本发明以降低在胶原蛋白移植物周围区域中活性 MMP 酶的量。

5 另外,在金属蛋白酶已被从细胞分泌后可能抑制金属蛋白酶的功能和活性。由于 MMP 作为无活性前体蛋白质(称为原-MMP)分泌自细胞,所述前体蛋白质随后通过高度特异性的酶切割(通过酶例如纤溶酶,肥大细胞蛋白酶,组织蛋白酶 G,血浆激肽释放酶和其它催化剂)转换成活性酶,可能抑制 MMP 从其无活性状态转变为活性状态(从而维持其处于无
10 活性形式)。负责 MMP 从其无活性状态转变为活性状态的酶的抑制剂也可用于本发明。另外,可能通过几种机制直接抑制活性 MMP 的功能,所述机制如螯合其锌金属活性中心(如 EDTA, 半胱氨酸, 乙酰半胱氨酸, D-青霉胺, 金盐; 异羟肟酸盐如巴马司他, 马立马司他, 托卡特(F. Hoffman-La Roche Ltd., Basel, Switzerland), 放线酰胺素(Actinonin),
15 Matlylstatins; 磷酸抑制剂; 磷酸盐; 磷酸酰胺化物; 硫醇和硫代二亚胺, 其与催化的锌形成单齿配位作用(monodentate coordination); 羧化物, 其于催化的锌形成二齿配位作用(bidentate coordination); 琥珀酰基巯基酮和巯基醇)。这些化合物对于抑制 MMP 活性相当有效,并且可用于本发明的目的。

20 一类重要的 MMPI 通过特异结合 MMP 导致形成无活性复合物发挥它们的作用。已知为金属蛋白酶组织抑制剂(TIMPs)的这些化合物如 TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 和 TIMP-4 实质上能抑制所有 MMP 的活性。尽管任何 TIMP 适于本发明的目的,但特别优选 TIMP-1(较少程度优选 TIMP-2),原因在于它对抑制胶原蛋白具有最高的特异性。应当注意的是,
25 任何增加 TIMP 产生的化合物可能维持胶原蛋白,因此可能用于实施本发明。还有其他抑制剂通过防止 MMP 与其底物结合发挥作用(如合成的 MMP 片段,合成的胶原蛋白片段),可单独使用或与其它 MMPI 结合使用用于本发明。对于本领域的技术人员而言清楚的是,不考虑抑制的具体机制,任何能抑制 MMP 酶产生、活化或酶功能的试剂均是用于本发明的理
30 想试剂。

MMPI 的代表性实例包括放线酰胺素(3-[[1-[[2-(羟甲基)-1-吡咯烷基
(pyrrolidiny)]氨基甲酰基]-辛酰-异羟肟酸]; 溴基环-腺苷一磷酸; N-氯牛
磺酸; BATIMISTAT, 也已知为 BB-94 (British Biotech, UK); CT1166,
也已知为 N1{N-[2-(吗啉代磺酰基氨基)-乙基]-3-环己基-2-(S)-丙酰胺
5 基}-N4-羟基-2-(R)-[3-(4-甲基苯基)丙基]-琥珀酰胺(Biochem. J 308:
167-175 (1995)); 雌莫司汀(雌二醇-3-双(2-氯乙基)氨基甲酸酯); 二十-五
烯酸; 马立马司他(也已知为 BB-2516); matlystatin-B; 肽基异羟肟酸如
pNH₂-Bz-Gly-Pro-D-Leu-D-Ala-NHOH (Biophys.Biochem. Res. Comm. 199:
1442-1446 (1994)) ; N-磷酰烷基二肽如 N-[N-((R)-1-磷酰丙基)-(S)-亮氨酰
10 基]-(S)-苯丙氨酸-N-甲酰胺(*J Med Chem.* 37: 158-169 (1994)); 原儿茶醛
(3,4-二羟基苯甲醛);; Ro-31-7467, 也已知为 2-[(5-溴-2,3-二氢-6-羟基-1,3-
二氧代-1H-苯基[de] 异喹啉-2-基)甲基] (羟基)-[氧磷基]-N-(2-氧-3-氮杂环
十三烷基)-4-甲基戊酰胺; 四环素如(4-(二甲基氨基)-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-八氢
-3,6,10,12, 12a-五羟基-6-甲基-1,11-二氧-2-并四苯氨甲酰), 强力霉素(α -6-
15 脱氧-5-羟基四环素) 二甲胺四环素 (7-二甲基氨基-6-二甲基-6-脱氧四环
素), 和甲烯土霉素 (6-亚甲基氧基四环素); 三氟乙酸 (*J. Med Clzem.* 36:
4030-4039 (1993)) 和基于 1,10-菲咯啉(o-菲咯啉[4-(N-羟基氨基)-2R-异丁
基-3S-(噻吩-2-基硫甲基)-琥珀酰基]-L-苯丙氨酸-N-甲基酰胺羧基烷基氨
基的化合物如 N-[1-(R)-羧基-3-(1,3-二氢-2H-苯并[f]异氮杂茛-2-基)丙
20 基]-N',N'-二甲基-L-亮氨酸酰胺。

其它代表性MMPI包括, 例如, 螯合剂(如EDTA, 半胱氨酸, 乙酰
半胱氨酸, D-青霉胺和金盐); 双(二氧哌嗪(piperzaine)), 参见美国专利号
5,866,570; NEOVASTAT(Les Laboratories Aeterna, Inc., Canada), 其抑制
MMP2、MMP-9和MMP-12的明胶水解(gelatinolytic)和弹性蛋白水解
25 (elastinolytic)活性(参见例如美国专利号6,168,807, Aeterna Laboratorie);
KB-R7785 (Akzo Nobel); 获自 Glycomed/Ligand, Inc.,的伊洛马司他(参
见例如美国专利号5,892,112); RPR-122818 (Aventis S.A., France); 索利司他
(British Biotech; 参见例如WO 99/25693); BB-1101, BB-2983, BB-3644
(British Biotech); BMS-275291 (参见Rizvi 等., Proceedings of the 1999
30 AACR NCI EORTC International Conference #726 "A Phase I, safety and

pharmacokinetic trial of BMS-275291, a matrix metalloproteinase inhibitor (MMP1), in patients with advanced or metastatic cancer"); D-1927, D-5410 Bristol Meyers-Squibb ; CH-5902, CH-138 (Celltech Group, UK); CMT-3 (化学改性的四环素3), DERMOSTAT (CollaGenex Pharmaceuticals, Inc., Newtown, PA; 美国专利号 5,837,696); DAC-MMPI (ConjuChem Inc., Canada); RS-1130830 和 RS-1 13-080 (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Switzerland); GM-1339 (Ligand Pharmaceuticals, Inc., San Diego, CA); GI-155704A (GlaxoSmithKline, UK); ONO-4817 (Ono Pharmaceutical Co., Osaka, Japan); AG3433, AG-3088, 普淋司他 (Agouron Pharmaceuticals, San Diego, CA; 参见例如美国专利号 5,753,653), CP-544439 (Pfizer Inc., New York, NY; 美国专利号 6,156,798); POL-641 (Polifarma SpA, Italy); SC-964, SD-2590, PNU-142769 (Pharmacia Corporation, Peapack, NJ; WO 97/32846), SU-5402 (Pharmacia; WO 98/50356); PGE-2946979, PGE-4304887 (Procter & Gamble, Cincinnati, OH); 纤维酶-缀合物 (Schering-AG, Berlin, Germany); EF-13 (Scotia-Pharmaceuticals, Scotland); S-3304 (Shionogi, Japan); CGS-25015 和 CGS-27023A (Novartis, Switzerland); XR-168 (Xenova, UK); 和 RO 1130830 (Fisher, 等., 219 American Chemical Society National Meeting, San Francisco, CA, March 26-30, 2000, ORGN 830 "Synthesis of RO 1130830, a Matrix Metalloproteinase Inhibitor: Evolution of a Research Scheme to Pilot-Plant Production"). 其它MMPI描述于例如美国专利号 4,235,885; 4,263,293; 4,276,284; 4,297,275; 4,367,233; 4,371,465; 4,371,466; 4,374,765; 4,382,081; 4,558,034; 4,704,383; 4,950,755; 5,270,447, 6,294,694 和 6,329,550

如下描述另外的MMPI: D-9120, BB-2827, BB-1101(2S-烯丙基-N1-羟基-3R-异丁基-N4-(1S-甲基氨基甲酰基-2-苯基乙基)-琥珀酰胺), BB-2983, 索利司他(N'-[2, 2-二甲基-1(S)-[N-(2-吡啶基)氨基甲酰基]丙基]-N4-羟基-2(R)-异丁基-3(S)-甲氧基琥珀酰胺), N4-羟基-N1-[2-(甲基氨基)-2-氧-1-(苯基甲基)乙基]-2-(2-甲基丙基)-3-[(2-噻吩基硫代)甲基]-, [2R-[1(S*), 2R*, 3S*]]-[CAS]), rebimastat(L-缬氨酸酰胺, N-((2S)-2-巯基-1-氧-4-(3,4,4-三甲基-2,5-二氧-1-咪唑烷基)丁基)-L-亮氨酸-N,3-二甲基

-[CAS]), PS-508, CH-715, 尼美舒利(甲磺酰胺, N-(4-硝基-2-苯氧基苯基)-[CAS]), 六氢-2-[2 (R)-[1(RS)- (羟基氨基甲酰基)-4- 苯基丁基]壬酰]-N-(2,2,6,6,-四甲基-4-哌啶基)-3(S)-吡嗪甲酰胺, 西马司他(1-哌啶丁酰胺, β -(环戊基甲基)-N-羟基- γ -氧- α -[3,4,4-三甲基-2,5-二氧-1-咪唑烷基]甲基)-, (α R, β R)-[CAS]), 5-(4'-二苯基)-5-[N-4-硝基苯基]哌嗪基]巴比土酸, 6-甲氧基-1,2,3,4-四氢-norharman-1-羧酸, Ro-31-4724(L-丙氨酸, N-[2-[2-(羟基氨基)-2-氧乙基]-4-甲基-1-氧苯基]-L-亮氨酸基-, 乙基酯 [CAS]), N-羟基-2,2-二甲基-4-((4-(4-吡啶基氧基)苯基)磺酰基)-, (3R)-[CAS]), PNU-142769(2H-异吲哚-2-丁酰氨, 1,3-二氢-N-羟基- α -[(3S)-3-(2-甲基丙基)-2-氧-1-(2-苯基乙基)-3-吡咯烷基]-1,3-二氧-, (α R)-[CAS]), (S)-1[2-[[[(4,5-二氢-5-硫代-1,3,4-噻二唑-2-基)氨基]-羰基]氨基]-1-氧-3-(五氟苯基)丙基]-4-(2-吡啶基)哌嗪, SC-77964, PNU-171829, N-羟基-2(R)-[(4-甲氧基苯-磺酰基)(4-吡啶甲基)氨基]-2-(2-四氢呋喃基)-乙酰胺, L-758354 ((1,1'-二苯基)-4-己酸, α -丁基- γ -(((2,2-二甲基-1-(甲基氨基)羰基)丙基)氨基)羰基)-4'-氟-, (α S-(α R*, γ S* (R*)))-[CAS])或其类似物或衍生物。

类外的MMPI代表性实例鉴定于美国专利号5,665,777; 5,985,911; 6,288,261; 5,952,320; 6,441,189; 6,235,786; 6,294,573; 6,294,539; 6,563,002; 6,071,903; 6,358,980; 5,852,213; 6,124,502; 6,160,132; 6,197,791; 6,172,057; 6,288,086; 6,342,508; 6,228,869; 5,977,408; 5,929,097; 6,498,167; 6,534,491; 6,548,524; 5,962,481; 6,197,795; 6,162,814; 6,441,023; 6,444,704; 6,462,073; 6,162,821; 6,444,639; 6,262,080; 6,486,193; 6,329,550; 6,544,980; 6,352,976; 5,968,795; 5,789,434; 5,932,763; 6,500,847; 5,925,637; 6,225,314; 5,804,581; 5,863,915; 5,859,047; 5,861,428; 5,886,043; 6,288,063; 5,939,583; 6,166,082; 5,874,473; 5,886,022; 5,932,577; 5,854,277; 5,886,024; 6,495,565; 6,642,255; 6,495,48; 6,479,502; 5,696,082; 5,700,838; 6,444,639; 6,262,080; 6,486,193; 6,329,550; 6,544,980; 6,352,976; 5,968,795; 5,789,434; 5,932,763; 6,500,847; 5,925,637; 6,225,314; 5,804,581; 5,863,915; 5,859,047; 5,861,428; 5,886,043; 6,288,063; 5,939,583; 6,166,082; 5,874,473; 5,886,022; 5,932,577; 5,854,277; 5,886,024; 6,495,565; 6,642,255; 6,495,548; 6,479,502; 5,696,082;

5,700,838; 5,861,436; 5,691,382 ; 5,763,621 ; 5,866,717; 5,902,791 ;
5,962,529; 6,017,889; 6,022,873; 6,022,898; 6,103,739; 6,127,427;
6,258,851; 6,310,084; 6,358,987; 5,872,152; 5,917,090; 6,124,329;
6,329,373; 6,344,457; 5,698,706; 5,872,146 ; 5,853,623; 6,624,144;
5 6,462,042; 5,981,491; 5,955,435; 6,090,840; 6,114,372; 6,566,384;
5,994,293; 6,063,786; 6,469,020 ; 6,118,001; 6,187,924; 6,310,088;
5,994,312; 6,180,611; 6,110,896; 6,380,253; 5,455,262; 5,470,834;
6,147,114; 6,333,324; 6,489,324; 6,362,183; 6,372,758; 6,448,250;
6,492,367; 6,380,258; 6,583,299; 5,239,078; 5,892,112; 5,773,438;
10 5,696,147; 6,066,662; 6,600,057; 5,990,158; 5,731,293; 6,277,876;
6,521,606; 6,168,807; 6,506,414; 6,620,813; 5,684,152; 6,451,791;
6,476,027; 6,013,649; 6,503,892; 6,420,427; 6,300,514; 6,403,644;
6,177,466; 6,569,899; 5,594,006; 6,417,229; 5,861,510 ; 6,156,798;
6,387,931 ; 6,350,907; 6,090,852; 6,458,822; 6,509,337; 6,147,061;
15 6,114,568; 6,118,016; 5,804,593; 5,847,153; 5,859,061; 6,194,451 ;
6,482,827; 6,638,952; 5,677,282; 6,365,630; 6,130,254; 6,455,569;
6,057,369; 6,576,628; 6,110,924; 6,472,396; 6,548,667; 5,618,844;
6,495,578; 6,627,411; 5,514,716; 5,256,657; 5,773,428; 6,037,472;
6,579,890; 5,932,595; 6,013,792; 6,420,415; 5,532,265; 5,691,381;
20 5,639,746; 5,672,598; 5,830,915; 6,630,516; 5,324,634; 6,277,061;
6,140,099; 6,455,570; 5,595,885; 6,093,398; 6,379,667; 5,641,636;
5,698,404; 6,448,058; 6,008,220; 6,265,432; 6,169,103 ; 6,133,304;
6,541,521; 6,624,196; 6,307,089; 6,239,288; 5,756,545; 6,020,366;
6,117,869; 6,294,674; 6,037,361; 6,399,612; 6,495,568; 6,624,177;
25 5,948,780; 6,620,835; 6,284,513; 5,977,141; 6,153,612; 6,297,247;
6,559,142; 6,555,535; 6,350,885; 5,627,206; 5,665,764; 5,958,972;
6,420,408; 6,492,422; 6,340,709; 6,022,948; 6,274,703; 6,294,694;
6,531,499; 6,465,508; 6,437,177; 6,376,665; 5,268,384; 5,183,900;
5,189,178; 6,511,993; 6,617,354; 6,331,563; 5,962,466; 5,861,427;
30 5,830,869; 6,087,359。

在下文更详细讨论的MMPI的代表性实例种类包括(1)基质金属蛋白酶的抑制剂 (TIMP); (2) 四环素, (3) 异羟肟酸盐, (4) 合成的MMP片段 (如肽抑制剂), (5)基于巯基的化合物, 和(6)双膦酸盐。在本发明的单独的方面, 这些代表性实例种类的每种可与胶原蛋白结合。

5

1. 基质金属蛋白酶的抑制剂

基于它们抑制金属蛋白酶的能力、彼此的结构类似性、形成在二级结构中重要的二硫键的12个半胱氨酸和存在与金属蛋白酶的金属离子相互作用的VIRAF基序, 将基质金属蛋白酶的抑制剂(TIMPs)分类。已描述了TIMP的核酸和氨基酸序列: TIMP-1 (Docherty, A. J. P. 等., (1985) Nature 318 : 66-69), TIMP-2 (Boone, T. C., 等(1990)Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 2800-2804; Stetler-Stevenson, W. G, 等. (1990) J. Biol. Chem. 265: 13933-38), 和TIMP-3(Wilde, C. G., 等(1994) DNA Cell Biol. 13: 711-18; Apte 等., "The Gene Structure of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases"- (TIMP-3 and Its Inhibitory Activities Define the Distinct TIMP Gene Family); (还参见Boone, T. C.等."cDNA cloning and expression of a metalloproteinase inhibitor related to tissue inhibitor of metalloproteinases, "Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 2800-2804 (Apr. 1990), Freudenstein, mRNA of bovine tissue inhibitor of metalloproteinase: Sequence and expression in bovine ovarian tissue, Biochem Biophys. Res. Comm., 171: 250-256 (1990), 美国专利号5,643,752和6,300,310)。

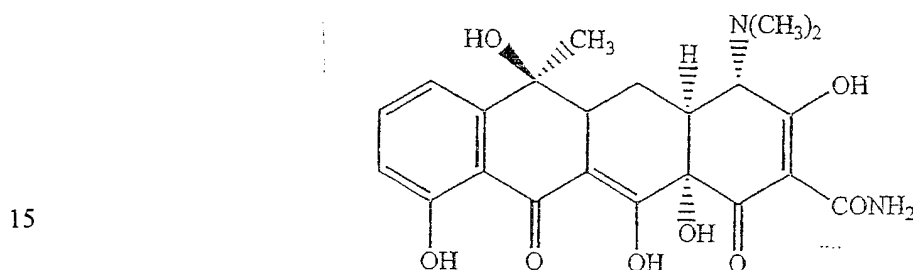
TIMP-1 是30 kD蛋白质, 且是最广泛表达的TIMP分子。它含有两个天冬酰胺残基, 其作为碳水化合物结合位点发挥作用, 一个在环1, 一个在环2 (Murphy和Docherty, 见上文)。另外, 仅含有一个三环分子的截短形式的TIMP-1能够抑制MMP。尽管TIMP-1是比MMP-2更好的间质胶原蛋白酶抑制剂(Howard, E. W. 等. (1991)J. Biol. Chem. 266: 13070-75), 但23 kD的TIMP- 2分子是最有效的明胶酶A和B的抑制剂。TIMP-3 是21 kD的蛋白质, 其抑制胶原蛋白酶1, 溶基质素, 和明胶酶A和B (Apte, S. S., 等. (1995) J. Biol. Chem. 270: 14313-18)和可由促分裂原诱导(Wick等. (1994)J Biol Chem. 269: 18953-60)

如上所述，四种TIMP分子的任何一种实质上能抑制迄今鉴定的所有MMP的活性，适于本发明的目的。然而，对抑制胶原蛋白酶具有高度特异性的TIMP-1对于结合入胶原蛋白移植物而言是特别优选的。

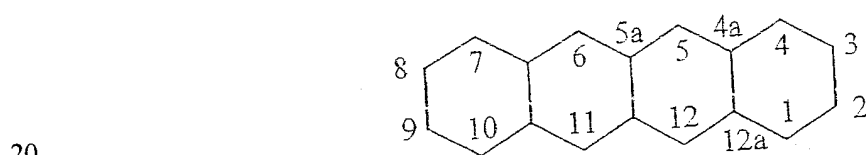
5 2. 四环素

四环素是一类最初已知它们用作抗生素的类似物和衍生化合物。许多四环素，包括四环素、强力霉素，二甲胺四环等已被证实抑制MMP的产生和活性。尽管不完全理解准确的进制，但通过下调MMP表达和/或翻译后通过螯合锌金属活性位点可能发生MMP抑制。考虑到它们广泛的用途和低毒性，这些化合物特别用于结合入胶原蛋白移植物。

四环素家族的母体化合物—四环素，具有下述通用结构：



可如下编号多环核：



四环素，以及5-OH (氧四环素)和7-Cl (氯四环素)衍生物天然存在，并且众所周知是抗生素。其它四环素包括例如，阿哌环素，四环林，氯莫环素，地美环素，强力霉素，乙莫环素，胍甲环素，赖甲环素，甲葡环素，mepycyhline，二甲胺四环素，甲烯土霉素，青哌环素，piacycline，罗利环素和山环素。

也可修饰四环素使得它们保持它们与作为抗生素的四环素的结构关系，但它们的抗生素的活性通过化学改性被实质上或完全降低。化学改性的四环素(CMT)的代表实例包括例如，CMT-1 (4-脱(二甲基氨基)-四环素)，CMT-2 (四环素腈)，CMT-3 (6-脱甲基-6-脱氧基-4-脱(二甲基氨基) 四

素), CMT-4 (7-氯-4-脱(二甲基氨基)四环素), CMT-5 (四环素吡唑), CMT-6 (4-羟基-4-脱(二甲基氨基)四环素), CMT-7 (4-脱(二甲基氨基)-12 α -脱氧四环素), CMT-8 (6-脱氧-5 α -羟基-4-脱(二甲基氨基)四环素), CMT-9 (4-脱(二甲基氨基)-12 α -脱氧脱水-四环素), 和CMT-10 (4-脱(二甲基氨基) 二甲胺
5 四环素)。

四环素的代表实例(包括四环素衍生物) 描述于美国专利号3,622, 627 (Blackwood等), 3,846,486(Marcus), 3,862,225 (Conover等), 3,895,033 (Murakami 等), 3,901,942 (Bernard 等), 3,914,299(Muxfeldt), 3,925,432(Gillchriest), 3,927,094 (Villax), 3,932,490(Fernandez),
10 3,951,962(Murakami等), 3,983,173(Hartung等), 3,991,111(Murakami等), 3,993,694(Martin 等), 4,060,605 (Cotti), 4,066,694 (Blackwood 等), 4,081,528(Armstrong), 4,086,332 (Armstrong), 4,126,680 (Armstrong), 4,853,375(Krupin等), 4,918,208 (Hasegawa等), 和5,538,954 (Koch 等)(通常参见, Mitscher, L. A., The Chemistry of Tetracycline Antibiotics, ch. 6,
15 Marcell Dekker, New York, 1978)。

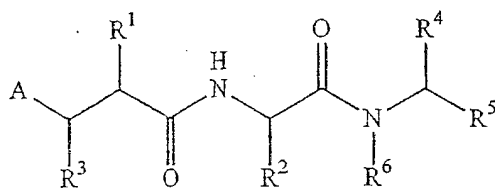
四环素衍生物的另外的实例描述于美国专利号4,666,897(Golub等), 4,704,383 (McNamara等), 4,904,647 (Kulcsar 等), 4,935,412 (McNamara 等), 5,223,248 (McNamara 等), 5,248,797 (Sum 等), 5,281,628 (Hlavka 等), 5,326,759(Hlavka 等), 5,258,371(Golub 等), 5,308,839(Golub 等),
20 5,321,017(Golub 等), 5,326,759—5,401,863(Hlavka 等), 5,459,135(Golub 等), 5,530,117 (Hlvaka 等), 5,563,130 (Backer 等), 5,567,693 (Backer 等), 5,574,026 (Backer 等), 5,698,542 (Zheng 等), 5,773,430 (Simon 等), 5,834,450 (Su), 5,843,925 (Backer 等), 5,856,315 (Backer 等), 6,028,207 (Zheng 等), 6,143,161 (Heggie 等) 和6,165,999 (Vu), 以
25 及PCT公开号WO99/33455, WO 99/37306, WO 99/37307, WO 00/18353 和 WO 00/28983。

3. 异羟肟酸盐

另一类抑制MMP的化合物是异羟肟酸盐 (或异羟肟酸)。尽管 异羟肟
30 酸盐抑制MMP的准确机制尚未精确了解, 但认为这些化合物主要通过与

酶中的锌金属活性位点相互作用来发挥它们的作用(如通过以二配位基的方式与催化锌配位以采用三角双锥体几何构型)。已合成了各种异羟肟酸盐,并在具有混合的临床结果的几种疾病状态中进行了检测。然而,考虑到它们对MMP的选择活性和它们的极佳安全性和耐力,这些试剂对于结合入胶原蛋白移植物以增强移植物的耐用性是特别优选的。

异羟肟酸盐 (或异羟肟酸) 具有如下显示的通用结构:

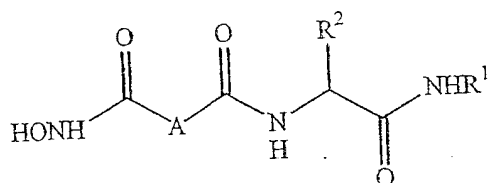


10

其中 A是HN (OH)-CO-或HCO-N (OH)-; R¹是C₂-C₅烷基; R²天然 α 氨基酸的表征基团,其可被保护,条件是R² 不是H或甲基; R³是H, NH₂, OH, SH, C₁-C₆ 烷基, C₁-C₆烷氧基, C₁-C₆烷基氨基, C₁-C₆烷硫基, 芳基 (C₁-C₆烷基), 或氨基(C₁-C₆烷基), 羟基(C₁-C₆烷基), 巯基 (C₁-C₆烷基) 或羧基(C₁-C₆烷基), 其中氨基, 羟基, 巯基或羧基可被保护, 氨基 可被酰化或羧基可被酰胺化; R⁴是H或甲基; R⁵是H, C₁-C₆烷基, C₁-C₆烷氧基 (C₁-C₆烷基), 二(C₁-C₆烷氧基)亚甲基, 羧基, (C₁-C₆烷基)羰基, (C₁- C₆烷氧基)羰基, 芳基甲氧基羰基, (C₁-C₆烷基)氨基羰基或芳基氨基羰基; 和R⁶是H或甲基; 或R²和R⁴一起形成(CH₂)_n, 其中n是4-11的整数; 或R⁴和R⁵一起形成环丙烷, 和这些酸性或碱性的异羟肟酸化合物的药用盐。在这方面, 参见例如EP-A-0236872。

15

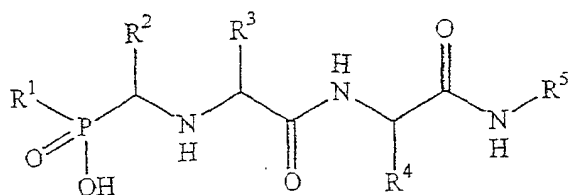
20



25

其中 R¹是C₁-C₆烷基; R²是C₁-C₆烷基, 苄基, 羟基苄基, 苄氧基苄基, (C₁-C₆烷氧基)苄基或苄氧基(C₁-C₆烷基); A是(CHR³-CHR⁴)或(CR³ = CR⁴)基团; R³是氢, C₁-C₆烷基, 苯基或苯基(C₁-C₆烷基); 和R⁴是H或C₁-C₆烷基, 苯基(C₁-C₆烷基), 环烷基或环烷基(C₁-C₆烷基)。在这方面, 参见例如 EP-A-0214639。

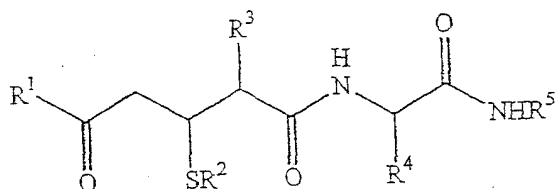
30



5

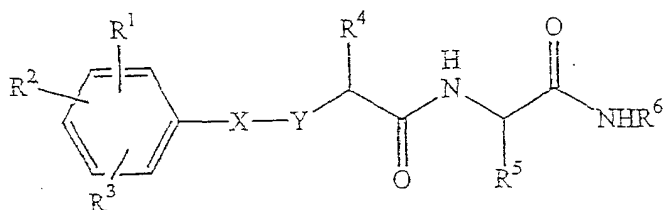
其中 R^1 是氢或羟基, R^2 是氢或烷基, R^3 是 C_3 - C_6 烷基, R^4 是氢, 烷基, $-\text{CH}_2\text{Z}$, 其中 Z 是任选取代的苯基或杂芳基, 或 R^4 是基团 $\text{C}(\text{HOR}^8)\text{R}^9$, 其中 R^8 是氢, CH_2Ph 的烷基, 其中 Ph 是任选取代的苯基, 和 R^9 是氢或烷基; 和 R^5 是氢或烷基。在这方面, 参见例如 EP-A-320118。

10



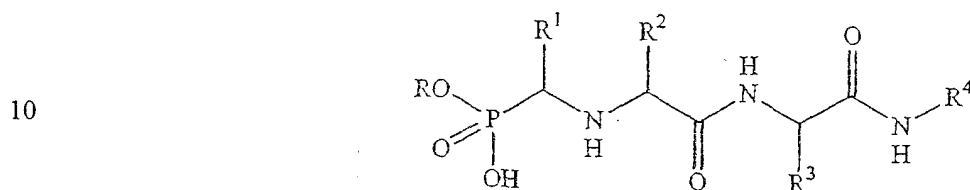
15 其中 R^1 是氢, 烷基或任选取代的芳基, R^2 是氢或酰基如 CO 烷基或 COZ 其中 Z 是任选取代的芳基; R^3 是 C_{3-6} 烷基, R^4 是氢, 烷基, $-\text{CH}_2\text{R}^{10}$, 其中 R^{10} 是任选取代的苯基或杂芳基, 或 R^4 是 $\text{C}(\text{HOR}^{11})\text{R}^{12}$, 其中 R^{11} 是氢, 烷基或 CH_2Ph , 其中 Ph 是任选代的苯基, 和 R^{12} 是氢或烷基; 和 R^5 是氢, 烷基或基团 $\text{C}(\text{HR}^{13})\text{COR}^{14}$, 其中 R^{13} 是氢或烷基, 和 R^{14} 是羟基, 烷氧基, 或 $-\text{NR}^6\text{R}^7$,
20 其中 R^6 或 R^7 每一个是氢或烷基, 或 R^6 和 R^7 与它们结合的氮原子一起形成 5-、6 或 7 元环, 其在环中任选具有氧或硫原子或具有任选另外的任选被烷基取代的氮原子。在这方面, 参见例如 EP-A-0322184。

25

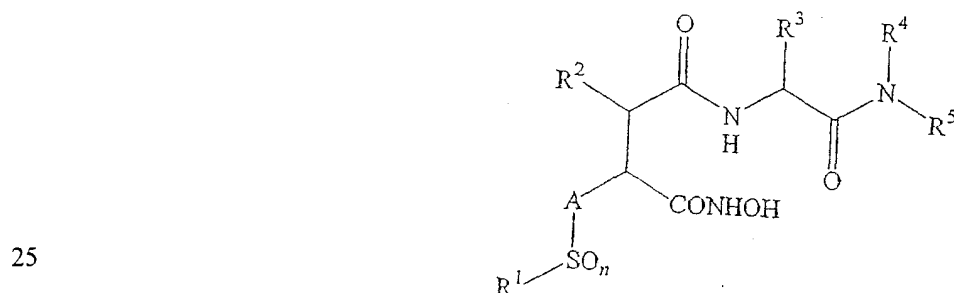


其中 R^1 和 R^2 独立地是 H , 烷基, 烷氧基, 卤素或 CF_3 , R^3 是 H , 酰基, 例如 CO 烷基或 COZ , 其中 Z 是任选取代的芳基, 或基团 RS , 其中 R 是有机残
30 基, 使得基团 RS 提供体内可切割的二硫键; R^4 是 C_3 - C_6 烷基, R^5 是 H , 烷

基, $-\text{CH}_2\text{R}^{10}$, 其中 R^{10} 是任选取代的苯基或杂芳基, 或基团 $\text{C}(\text{HOR}^{11})\text{R}^{12}$ 其中 R^{11} 是氢, 烷基或 CH_2Ph , 其中Ph是任选取代的苯基, 和 R^{12} 是氢或烷基; 和 R^6 是氢, 烷基或基团 $\text{C}(\text{HR}^{13})\text{COR}^{14}$, 其中 R^{13} 是氢, 或烷基, 和 R^{14} 是羟基, 烷氧基, 或 $-\text{NR}^7\text{R}^8$, 其中 R^7 或 R^8 各自是氢或烷基, 或 R^7 和 R^8 与它们结合的氮原子一起形成5-、6-或7-元环, 其在环中任选具有氧、硫或任选取代的氮原子, 或 R^5 和 R^6 一起结合为 $(\text{CH}_2)_m$, 其中m是4-12的整数; X 是 $(\text{CH}_2)_n$, 其中n是0, 1, 或2; 和Y是 CH_2 。在这方面, 参见例如EP-A-358305。

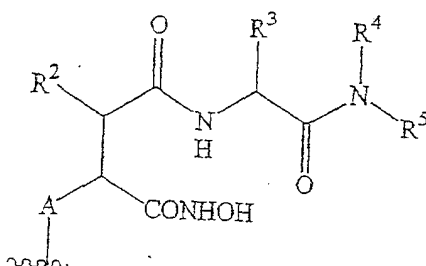


其中R是氢，C₁-C₆烷基或任选取代的苄基，R¹是氢或C₁-C₆烷基，R²是C₃-C₆烷基，R³是氢，烷基，-CH₂Z，其中Z是任选取代的苯基或杂芳基，或R³是基团C(HOR⁷)R⁸，其中R⁷是氢，烷基或CH₂Ph，其中Ph是任选取代的苯基，和R⁸是氢或烷基；和R⁴是-CH₂-(CH₂)_nOR⁵，-CH₂-(CH₂)_nOCOR⁶或-CH(R⁹)COR¹⁰，其中n是1-6的整数；R⁵，R⁶和R⁹是氢或C₁-C₆烷基；和R¹⁰是羟基或O(C₁-C₆烷基)或NR⁵R⁶，其中R⁵和R⁶可以连接形成杂环；或R³和R⁴一起结合为(CH₂)_m，其中m是4-12的整数。在这方面，参见例如EP-A-0401963。



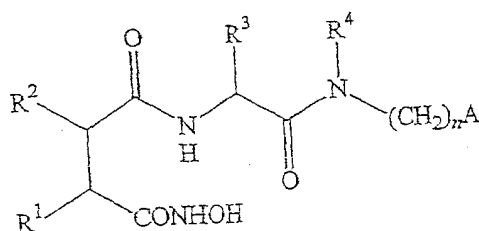
其中R¹是H, C₁-C₆烷基, 苯基, 噻吩基, 取代的苯基, 苯基 (C₁-C₆)烷基, 杂环基, (C₁-C₆)烷基羰基, 苯甲酰甲基或取代的苯甲酰甲基; 或当n是0时, R¹表示SR^x, 其中R^x表示下式的基团:

5



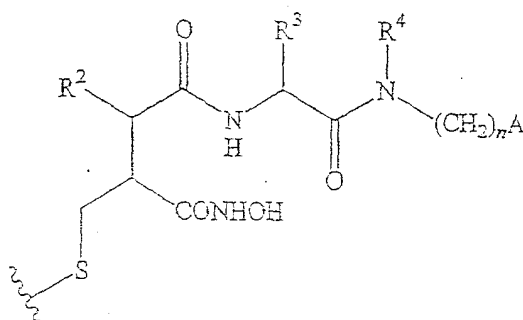
和 R^2 是H, C_1 - C_6 烷基, C_1 - C_6 链烯基, 苯基(C_1 - C_6)烷基, 环烷基 (C_1 - C_6)烷基或环链烯基 (C_1 - C_6)烷基; R^3 是氨基酸侧链或 C_1 - C_6 烷基, 苄基, (C_1 - C_6)烷氧基)苄基, 苄氧基(C_1 - C_6 烷基)或苄氧基苄基; R^4 是H或 C_1 - C_6 烷基; R^5 是H或甲基; n 是0, 1或2; 和A表示 C_1 - C_6 烃链, 其任选地被一个或多个 C_1 - C_6 烷基取代, 苯基或取代的苯基; 和它们的盐和N-氧化物。在这方面, 参见例如PCT国际公开号WO90/05719。

15



其中 R^1 是H, C_1 - C_6 烷基, C_2 - C_6 链烯基, 苯基, 苯基(C_1 - C_6)烷基, C_1 - C_6 烷硫基甲基, 苯硫基甲基, 取代的苯硫基甲基, 苯基(C_1 - C_6)烷硫基甲基, 或杂环硫甲基或 R^1 表示 $-SR^x$, 其中 R^x 表示基团

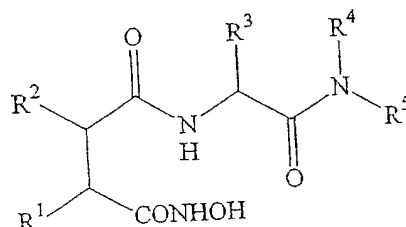
25



和 R^2 表示氢原子, 或 C_1 - C_6 烷基, C_1 - C_6 链烯基, 苯基 (C_1 - C_6) 烷基, 环烷基 (C_1 - C_6) 烷基, 或环链烯基(C_1 - C_6)烷基; R^3 表示氨基酸侧链或 C_1 - C_6 烷基, 苄基, (C_1 - C_6) 烷氧基苄基, 苄氧基(C_1 - C_6) 烷基, 或苄氧基苄基; R^4 表示氢原子或甲基; n 是1-6的整数; 和A表示基团 $-NH_2$, 取代的无环胺

或杂环碱；或其盐和/或N-氧化物和/或(其中所述化合物是硫代化合物)亚砷或砷。在这方面，参见例如PCT国际公开号WO09/05716。

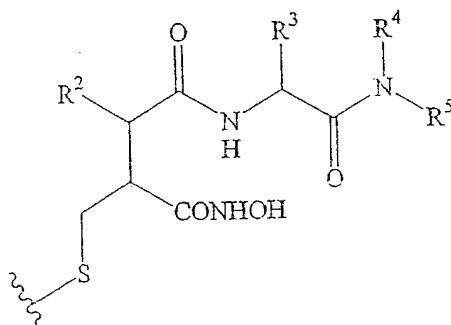
5



10

其中 R^1 是H, C_1 - C_6 烷基, C_1 - C_6 链烯基, 苯基, 苯基(C_1 - C_6)烷基, C_1 - C_6 烷硫基甲基, 取代的苯硫基甲基, 苯基(C_1 - C_6)烷硫基甲基或杂环基甲硫基；或 R^1 表示-S- R^x , 其中 R^x 表示基团

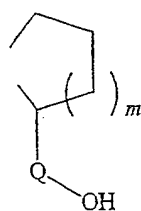
15



20

和 R^2 表示氢原子或 C_1 - C_6 烷基, C_1 - C_6 链烯基, 苯基(C_1 - C_6)烷基, 环烷基(C_1 - C_6)烷基或环链烯基(C_1 - C_6)烷基； R^3 表示氨基酸侧链或 C_1 - C_6 烷基, 苄基, (C_1 - C_6)烷氧基苄基, 苄氧基(C_1 - C_6)烷基或苄氧基苄基； R^4 表示氢原子或甲基； R^5 表示基团 $(CH_2)_nA$ ；或 R^4 和 R^5 一起表示基团

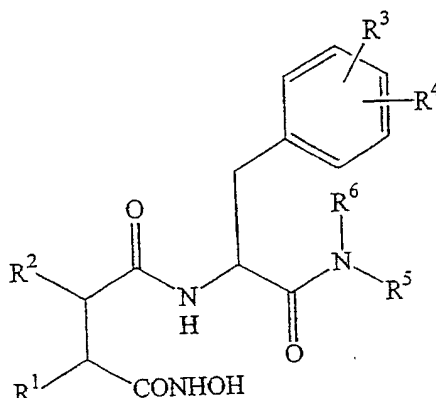
25



和Q表示 CH_2 或CO；m是1—3的整数；n是1—6的整数；和A表示羟基, (C_1 - C_6)烷氧基, (C_2 - C_7)酰氧基, (C_1 - C_6)烷硫基, 苯硫基, (C_2 - C_7)酰氨基或N-吡咯烷酮基团；或其盐和/或N-氧化物和/或(其中所述化合物是硫代化合物)亚砷或砷。在这方面，参见例如 PCT国际公开号WO91/02716。

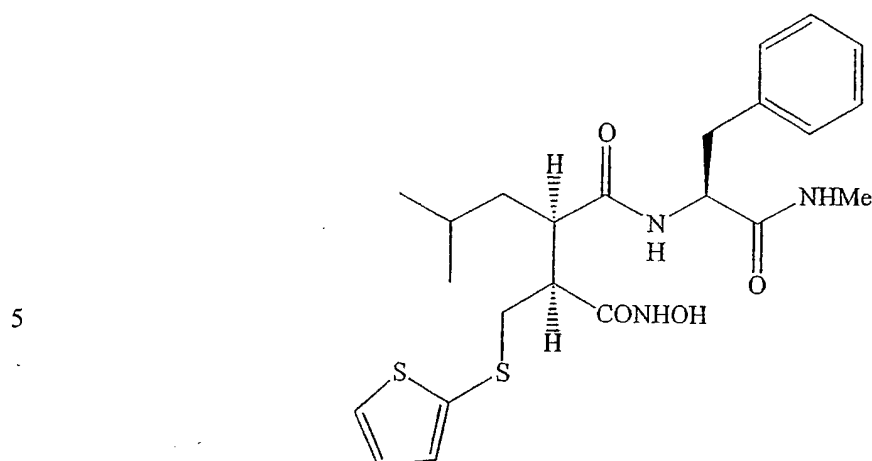
30

5

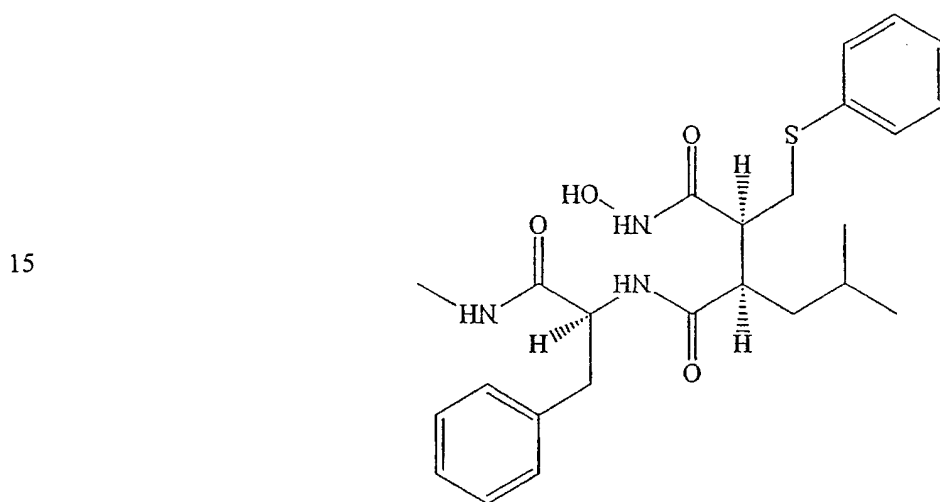


其中 R^1 是 H, C_1 - C_6 烷基, 苯基, 取代的苯基, 苯基 (C_1 - C_6 烷基), 或杂环基; 或 R^1 是 ASO_nR^7 , 其中 A 表示 C_1 - C_6 烃链, 任选被一个或多个 C_1 - C_6 烷基取代, 苯基或取代的苯基, n 是 0, 1 或 2, 和 R^7 是 C_1 - C_6 烷基, 苯基, 取代的苯基, 苯基 (C_1 - C_6 烷基), 杂环基, (C_1 - C_6 烷基) 酰基, 噻吩基或苯甲酰基; R^2 是氢, C_1 - C_6 烷基, C_1 - C_6 链烯基, 苯基 (C_1 - C_6 烷基) 或环烷基 (C_1 - C_6 烷基); R^3 和 R^4 选自氢, 卤素, 氰基氨基, 氨基 (C_1 - C_6) 基, 氨基二 (C_1 - C_6) 烷基, 氨基 (C_1 - C_6) 烷基酰基, 氨基苯甲酰基, 氨基 (取代的) 苯基, 氨基酸或其衍生物, 羟基, 氧基 (C_1 - C_6) 烷基, 氧基酰基, 甲酰基, 羧酸, 氨甲酰, 羧基 (C_1 - C_6) 烷基酰胺, 羧基苯基酰胺, 羧基 (C_1 - C_6) 烷基, 羟基 (C_1 - C_6) 烷基, (C_1 - C_6) 烷氧基 (C_1 - C_6) 烷基或酰氧基 (C_1 - C_6) 烷基, (C_1 - C_6) 烷基羧酸, 或 (C_1 - C_6) 烷基羧基 (C_1 - C_6) 烷基; 或 R^3 是 OCH_2COR^8 和 R^4 是氢其中 R^8 是羟基, C_1 - C_6 氧基烷基, C_1 - C_6 氧基烷基苯基, 氨基, C_1 - C_6 氨基烷基, C_1 - C_6 氨基二烷基, C_1 - C_6 氨基烷基苯基, 氨基酸或其衍生物; 或 R^3 是 $OCH_2CH_2OR^9$ 和 R^4 是氢, 其中 R^9 是 C_1 - C_6 烷基, C_1 - C_6 烷基苯基, 苯基, 取代的苯基, (C_1 - C_6 烷基) 酰基, 或苯甲酰基; 或 R^3 是 OCH_2CN 和 R^4 是氢; R^5 是氢或 C_1 - C_6 烷基, 或 (C_1 - C_6) 烷基苯基; R^6 是氢或甲基; 或其盐。在这方面, 参见例如 PCT 国际申请号 PCT/GB92/00230。

在美国专利号 5,872,152 中提及的用于本发明的两个优选的化合物是:
[4-(N-羟基氨基)-2R-异丁基-3S-噻吩基甲硫基]琥珀酰基]-L-苯基丙氨酸-N-甲基酰胺, 其具有下述结构:



和[4-(N-羟基氨基)-2R-异丁基-3S-苯硫基甲基]琥珀酰基]-L-苯基丙氨酸
 10 -N-甲基酰胺，其具有下述结构



20

如本文用于描述具有异羟肟酸部分的MMP抑制剂，下述术语具有指定的含义。术语“C₁-C₆烷基”直链或支链的具有1—6个碳原子的烃基，其中举例说明的烷基是甲基，乙基，丙基，异丙基，丁基，异丁基，仲丁基，叔丁基，戊基，新戊基和己基。术语“C₁-C₆链烯基”指直链或支链的具有1—6个碳原子的烃基，且具有另外一个或多个双键，当适用时每一个是E或Z立体化学，其中该术语包括例如， α,β -不饱和的亚甲基，乙烯基，1-丙烯基，1-和2-丁烯基和2-甲基-2-丙烯基，和其中在优选的实施方案中，C₁-C₆链烯基是C₂-C₆链烯基。术语“C₃-C₆环烷基”指具有3—6个碳原子的脂环基团，其中举例说明的环烷基是环丙基，环丁基，环戊基和环己基。术语“C₄-C₆环链烯基”指具有4—6个碳原子、且另外具有一个或
 30

多个双键的脂环基团，其中举例说明的环链烯基是环戊烯基，环己烯基，环庚烯基和环辛烯基。术语“卤素”指氟、氯、溴或碘。术语“氨基酸侧链”指在下述R或S氨基酸中附着于-CH(NH₂)(COOH)部分的特征侧链：甘氨酸，丙氨酸，缬氨酸，亮氨酸，异亮氨酸，苯丙氨酸，酪氨酸，色氨酸，
5 丝氨酸，苏氨酸，半胱氨酸，甲硫氨酸，天冬酰胺，谷氨酰胺，赖氨酸，组氨酸，精氨酸，谷氨酸和天冬氨酸。

异羟肟酸盐的代表性实例和合成异羟肟酸盐的方法描述于美国专利号 4,599,361, 4,720,486, 4,743,587, 4,996,358, 5,183,900, 5,189,178, 5,239,078, 5,240,958, 5,256,657, 5,300,674, 5,304,604, 5,310,763, 5,412,145,
10 5,442,110, 5,473,100, 5,514,677, 5,530,161, 5,643,964, 5,652,262, 5,691,382, 5,696,082, 5,700,838, 5,747,514 5,594,006, 5,763,621, 5,821,262, 5,840,939, 5,849,951, 5,859,253, 5,861,436, 5,866,717, 5,872,152, 5,902,791, 5,917,090, 5,919,940, 5,932,695, 5,962,521, 5,962,529, 6,017,889, 6,022,898, 6,028,110, 6,093,798, 6,103,739, 6,124,329, 6,124,332, 6,124,333, 6,127,427, 6,218,389,
15 6,228,988 和 6,258,851。代表性外国和国际申请和出版物包括 EP-A-0231081, EP-A-0236872, EP-A-0274453, EP-A-0489577, EP-A-0489579, EP-A-0497192, EP-A-0574758和EP-A-0575844, 以及WO 90/05716, WO 90/05719, WO 91/02716, WO 92/09563, WO92/17460, WO 92/13831, WO 92/22523, WO 93/09090, WO 93/09097, WO 93/20047, WO 93/24449, WO 93/24475, WO 94/02446, WO 94/02447, WO 94/21612, WO 94/21625, WO 94/24140, WO 94/25434, WO 94/25435和WO 99/06361。
20 许多异羟肟酸盐还容易获自各种商业来源。

4. 多肽抑制剂

25 在本发明的其它方面中，基质金属蛋白酶多肽(包括多肽衍生物)抑制剂可用于扩展胶原蛋白的延续时间和效用。多肽抑制剂的代表实例包括那些公开于美国专利号5,300,501, 5,530,128, 5,569,665, 5,714,491和5,889,058中的那些。

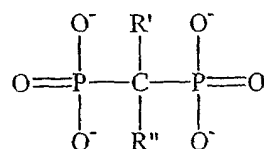
30 5. 基于巯基的化合物

基于巯基的化合物还可用作MMPI。代表性实例包括巯基酮和巯基醇化合物，如描述于美国专利号5,831,004，5,840,698和5,929,278中的那些；和巯基硫化物，如描述于美国专利号5,455,262的那些。

5 6. 双膦酸盐

双膦酸盐是涉及无机焦磷酸的化合物（通常参见H. Fleisch, *Endocr. Rev.*, 19(1):80-100 (1998); 还参见H. Fleisch, *Bisphosphonates in Bone Disease: From the Laboratory to the Patient* (1997, 第3版). The Parthenon Publishing Group, New York和London)。通常，双膦酸盐具有结构：P-C-P。

10 特别优选的双膦酸盐具有结构



15 其中取代基R'和R''独立地表示氢或卤素原子，羟基，任选取代的氨基或任选取代的硫代基团或任选取代的烃残基。在一个方面，R'和R''的一个是羟基，氢或氯。

双膦酸盐的代表实例包括例如，阿仑膦酸盐((4-氨基-1-羟基亚丁基)双膦酸)；氯膦酸盐(二氯甲烷双膦酸)；依替膦酸盐((1-羟基亚乙基)双膦酸)；帕米膦酸盐((3-氨基-1-羟基亚丙基)双膦酸)；利塞膦酸盐([-羟基-2-(3-吡啶基)亚乙基]双膦酸)；替鲁膦酸盐([(4-氯苯基)硫代]-亚甲基)双膦酸)；唑来膦酸盐；[1-羟基-3-(甲基-戊基氨基)-亚丙基]双膦酸盐；(BM21.0955, Boehringer Mannheim)；[(环庚基氨基)亚甲基]双膦酸盐(YM175)；1-羟基-3-(1-吡咯烷基)-亚丙基]双膦酸盐(EB-1053)；[1-羟基-2-(1H-咪唑-1-基)亚乙基]双膦酸盐(CGP 42'446, Novartis AG, Switzerland)和(1-羟基-2-咪唑-[1,2-a]吡啶-3-基-亚乙基)双膦酸盐(YM 529, Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd., Japan)。双膦酸盐的代表性实例描述于美国专利号5,652,227和5,998,390

30 7. MMPI的组合

在本发明的另外的实施方案中，可利用多于一种的MMPI (即可组合使用两种或多种MMPI)。合成的MMPI包括例如四环素和双膦酸盐(参见例如美国专利号5,998,390和6,114,316)。同样可利用其它组合的MMPI，包括例如，在不同阶段抑制MMP的MMPI(如异羟肟酸盐和四环素)。

5

III. 制剂

如上所述，胶原蛋白是可获自天然来源或重组产生的纤维状蛋白质。描述基于胶原蛋白的组合物和制备该组合物的美国专利的代表性实例包括美国专利号6,166,130， 6,051,648， 5,874,500， 5,705,488， 5,550,187，
10 5,527,856， 5,523,291， 4,582,640， 4,424,208和3,949,073。

本发明的MMPI组合物可以各种途径来制备。例如，可将MMPI直接溶解在胶原蛋白溶液中。如果MMPI在胶原蛋白溶液中是可溶的，那么含胶原蛋白和MMPI的组合物可在单个的应用设备中制备。如果MMPI显著长的时间不溶于胶原蛋白溶液，那么可将组合物制备成两个组分体系，其中
15 在使用前立即混合组分。

本发明的MMPI组合物还可通过将MMPI置于载体中来产生。载体的代表性实例包括聚合的或非聚合的载体(如脂质体或基于维生素的载体，其可以是可生物降解的或非可生物降解的。可生物降解的组组合物的代表性实例包括清蛋白，明胶，淀粉，纤维素，葡聚糖，多糖，血纤蛋白原，聚
20 酯[如聚(D,L-丙交酯)，聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)，聚(乙交酯)，聚(ϵ -己内酯)，其共聚物和掺合物]，聚(羟基丁酸酯)，聚(碳酸烷基酯)，聚(酸酐)和聚(原酸酯) (通常参见，Illum, L., Davids, S.S. (编辑) "Polymers in controlled Drug Delivery" Wright, Bristol, 1987; Arshady, J., Controlled Release 17: 1-22 (1991); Pitt, Int. J. Pharm 59: 173-196 (1990); Holland 等., J. Controlled
25 Release 4:155-0180 (1986))。非可生物降解的聚合物的代表性实例包括环氧乙烷和环氧丙烷聚合物的共聚物，如获自BASF公司的 PLURONIC聚合物(Mount Olive,NJ)，EVA共聚物，硅橡胶，基于聚(丙烯酸甲酯)和聚(丙烯酸酯)的聚合物。特别优选的聚合载体包括聚(D,L-乳酸)寡聚物和聚合物，聚(L-乳酸)寡聚物和聚合物，聚(乙醇酸)，乳酸和乙醇酸的共聚物，聚(己
30 内酯)，聚(戊内酯)，聚酸酐，己内酯和/或乳酸和/或乙醇酸与聚乙二醇或

甲氧基聚乙二醇的共聚物及其掺合物。

可以各种形式形成聚合载体, 包括例如杆形装置、球形、板形或胶囊 (参见例如Goodell等., Am. J. Hosp. Pharm. 43: 1454-1461 (1986); Langer等., "Controlled release of macromolecules from polymers"; Biomedical
5 polymers, Polymeric materials and pharmaceuticals for biomedical use, Goldberg, E. P., Nakagim, A. (编辑) Academic Press, 113-137页, 1980; Rhine 等., J. Pharm. Sci. 69: 265-270 (1980); Brown 等., J. Pharm. Sci. 72: 1181-1185 (1983); 和Bawa 等., J. Controlled Release 1: 259-267 (1985))。MMPI可以通过包藏在聚合物的基质中连接, 通过共价键合结合, 或包埋
10 在微胶囊中。在本发明的某些优选实施方案中, 以非胶囊制剂的形式例如微球体(大小从纳米至微米), 膏, 各种大小的线, 薄膜和喷雾剂提供MMPI组合物。

优选地, 本发明的MMPI组合物(在某些实施方案中, 其包含一种或多种MMPI因子, 和聚合载体)以适于意欲应用的形式形成。在本发明的某些
15 方面中, MMPI组合物是可生物兼容的, 并在几天至几个月的时期释放一种或多种MMPI因子。例如, "快速释放"或"爆裂"MMPI组合物的条件是 在7—10天释放多于10%, 20%或25%的MMPI因子(如四环素)。在某些实施方案中, 这种"快速释放"组合物应能释放化疗水平的(当可施用时的)需要的MMPI因子。在其它实施方案中, "低释放"MMPI组合物的条件是在7
20 —10天释放少于5% (w/v)的MMPI因子。此外, 本发明的MMPI 组合物优选可稳定几个月, 并能在无菌条件下产生和维持。

在本发明的某些方面, MMPI组合物可以各种大小形式形成, 范围从约0.050 nm—约500 μm , 这取决于具体的应用。例如, 当用于美容组织增大(如下文所讨论)时, 通常优选以约0.1—约100 μm 、优选约0.5—约50 μm
25 最优选约1—约25 μm 的微球体形式形成MMPI组合物。备选地, 这种组合物也可作为溶液的形式施用, 其中MMPI溶解在微团中。微团的组合物在性质上可以是聚合的。例如聚合微团可包括MePEG和聚(D,L-丙交酯)的共聚物。备选地, 该组合物还可作为溶液施用, 其中MMPI包封在脂质体中 (参见上文)。备选地, 该组合物还可作为溶液施用, 其中MMPI包封在
30 乳状液或微乳状液的油相中。

本发明的MMPI组合物还可以各种"糊剂"或凝胶形式来制备。例如，在本发明的一个实施方案中，在一种温度（如温度高于37℃，如40℃、45℃、50℃、55℃或60℃）时MMPI组合物为液体，在另一个温度（如周围体温或低于37℃的任何温度）下是固体或半固体。根据本文提供的内容可容易地制备该"热糊剂"。

在下文的实施例中更详细地描述将MMPI因子如上文描述的那些结合到聚合的载体中的代表性实例。

在本发明的另外方面，提供了聚合载体，其适于包含和释放疏水化合物，该载体含有结合以碳水化合物、蛋白质或多肽的疏水化合物。在某些实施方案中，聚合载体包含一种或多种疏水化合物的区域，袋或颗粒。例如，在本发明的一个实施方案中，疏水化合物可以结合到基质中，所说基质包含疏水化合物，接着将基质结合到聚合载体中。在这方面可利用各种基质，包括例如，碳水化合物和多糖如淀粉，纤维素，葡聚糖，甲基纤维素和透明质酸，蛋白质或多肽如清蛋白，胶原蛋白和明胶。在备选实施方案中，疏水化合物可包含在疏水核中，该核包含在亲水壳中。例如，如下文实施例所述，可将紫衫醇结合到具有亲水壳的疏水核中（如聚D,L乳酸-PEG或MePEG 聚集物的疏水核中）。

1. 胶原蛋白-MMP前体药物

在本发明的某些方面，可如下形成MMPI组合物：MMPI共价附着于在具体应用中使用的胶原蛋白。MMPI可直接或通过连接物分子(如聚(乙二醇))附着于胶原蛋白。一旦将结合物(即前体药物)引入或施用于所需部位，MMPI在仍然附着于胶原蛋白时可抑制MMP或其在从胶原蛋白切割（水解和/或酶切割）后可抑制MMP。

对于TIMP，可使用异双功能交联剂（如SulfoEMCS [Pierce Chemical Co., Rockford, IL]）将TIMP共价结合到胶原蛋白上。更具体地，TIMP可与Sulfo-EMCS反应使得马来酰亚胺基团与包含在TIMP序列中的半胱氨酸的-SH反应。然后活化的TIMP可与胶原蛋白溶液反应。然后胶原蛋白-TIMP结合物可用于组织增大施用。

2. 另外的组合物

在本发明的某些实施方案中，此处提供的组合物可被进一步修饰以增强它们的效能。例如，在一个实施方案中，可加入染料或其它着色剂以增强组合物的可视化。染料或着色剂可以是持久的或瞬时的（如亚甲基蓝）。

5 在其它实施方案中，可向本文描述的组合物中添加辅助凝结的化合物或因子（如凝血酶）。

在其它实施方案中，本文提供的组合物可另外包括额外的化合物或试剂，其促进或刺激骨生长，包括例如，羟磷灰石和/或骨形态发生蛋白(如BMP-1至BMP-9)，其描述在例如美国专利号4,877,864； 5,013,649；
10 5,661,007； 5,688,678； 6,177,406； 6,432,919； 和6,534,268； 和Wozney, J. M., 等., Science:242 (4885): 1528-1534 (1988)。

IV. 临床应用

1. 基于MMPI-装载的胶原蛋白的整形外科移植

15 已开发了各种胶原蛋白移植用于整形外科手术，作为自体或异体骨移植物的替代物。胶原蛋白是骨的主要有机组分，可结合矿物制剂、自体骨髓、骨移植物和/或生长因子(如BMP)用作骨替代物或骨骼修复产品。典型的应用包括但不限于，全部关节替代手术(如人造髌，膝盖等)，脊柱融合手术，长骨骨折，外伤造成的骨损伤的修复，空隙或缝隙，以增加自体
20 移植，和在骨移植收获部位作为骨填料。可商业获得的基于胶原蛋白的骨移植植物包括Neucoll, Inc. (Campbell, CA)制备的COLLAGRAFT糊剂和COLLAGRAFT棒。COLLAGRAFT是高度纯化的I型骨皮纤维胶原蛋白与65%羟磷灰石和35%磷酸三钙混合物的组合。该材料极其类似人骨，并且在愈合过程中被再吸收和替代骨。骨移植物的代表性实例描述于美国专利
25 号6,083,522和6,280,474和PCT公开号WO 98/52498中。

在本发明的一个方面，MMPI以持续释放的形式添加到胶原蛋白基质以降低骨移植植物材料的降解速率和延长其体内活性，这强于单独施用胶原蛋白。这允许基质作为支架更长时间的起作用，以允许在溶解胶原蛋白基质前发生更坚固更成熟的骨生长。在实施该实施方案时任何上述MMPI可
30 单独使用或结合使用。在骨移植植物中使用的优选的MMPI包括TIMP-1，四

环素，强力霉素，二甲胺四环素和其它化学改性的四环素(CMT)，BATIMISTAT，MARIMISTAT，RO-1130830，CGS 27023A，BMS-275291，CMT-3，索利司他，伊洛马司他，CP-544439，普淋司他，PNU-1427690，SU-5402和托卡特以及前述类似物和衍生物。所有这些试剂适于与促进骨生长的因子结合使用，所述因子包括但不限于BMP (如BMP-2)，自体骨髓，矿物质，和自体骨抑制物质。下述特别优选的组合物理想地适合用于该适应症。

a. 装载马立马司他的胶原蛋白骨移植物基质

10 优选的装载马立马司他的胶原蛋白骨移植物基质是约0.001%-30重量%马立马司他 (即1 μg -30mg 马立马司他/100mg胶原蛋白移植物)。特别优选的剂量是0.01-15重量% 马立马司他 (即 10 μg -15mg/100mg胶原蛋白糊剂)。备选地，由于常常将材料包装成棒状，药物剂量也可作为面积的函数来确定。利用该给药方案优选的马立马司他剂量是1 μg -37.5 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ 15 胶原蛋白棒。在装载马立马司他的胶原蛋白的整形外科移植程序中递送的总剂量典型地不超过45 mg (或少于确立的耐药良好的50mg单个日剂量)。在一个实施方案，0.001-30重量% 马立马司他被装载入PLGA微球体，其又装载入胶原蛋白移植物，以产生在几天至几个月的时期内持续释放的药物。任何来源的胶原蛋白 (如猪、牛、人或重组体；交联的或非交联的) 20 适合与上述结合以产生需要的终产品。对于本领域的技术人员同样显而易见的是马立马司他的药用类似物和衍生物同样适合用于该实施方案，无论是单独使用或与其它MMPI结合使用。

b. 装载巴马司他的胶原蛋白骨移植物基质

25 优选的装载巴马司他的胶原蛋白骨移植物基质是0.001-30重量% 巴马司他 (即1 μg -30mg 巴马司他/100mg胶原蛋白移植物)。特别优选的剂量是0.01-30重量% (10 μg -30mg/100mg胶原蛋白糊剂)。备选地，由于常常将材料包装成棒状，药物剂量也可作为面积的函数来确定。利用该给药方案优选的巴马司他剂量是1 μg -200 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ 胶原蛋白棒。无论如何，在装载 30 巴马司他的胶原蛋白整形外科移植程序中递送的总剂量不超过240 mg 巴

马司他 (或少于确立的耐药良好的300 mg/m²单个剂量)。在一个实施方案, 0.001-30重量%巴马司他被装载入PLGA微球体, 其又装载入胶原蛋白移植
物, 以产生在几天至几个月的时期内持续释放的药物。任何来源的胶原蛋
白 (如猪、牛、人或重组体; 交联的或非交联的) 适合与上述结合以产生
5 需要的终产品。巴马司他的药用类似物和衍生物同样适合用于该实施方
案, 无论是单独使用或与其它MMPI结合使用。

c. 装载强力霉素的胶原蛋白骨移植基质

优选的装载强力霉素的胶原蛋白骨移植基质是0.001-30重量% 强
10 力霉素 (1 µg-30mg 强力霉素/100mg胶原蛋白移植)。特别优选的剂量是
0.01-30重量% 强力霉素 (10 µg-30mg强力霉素/100mg胶原蛋白糊剂)。备
选地, 由于常常将材料包装成棒状, 药物剂量也可作为面积的函数来确定。
利用该给药方案优选的强力霉素剂量是1 µg-83 µg/mm²胶原蛋白棒。在装
载强力霉素的胶原蛋白整形外科移植程序中递送的总剂量典型地不超过
15 150 mg 强力霉素 (或少于确立的耐药良好的200 mg/m²单个剂量)。在一个
实施方案, 0.01-30重量%强力霉素被装载入PLGA微球体, 其又装载入胶
原蛋白移植, 以产生在几天至几个月的时期内持续释放的药物。任何来
源的胶原蛋白 (如猪、牛、人或重组体; 交联的或非交联的) 适合与上述
结合以产生需要的终产品。强力霉素的药用类似物和衍生物同样适合用于
20 该实施方案, 无论是单独使用或与其它MMPI结合使用。

d. 装载四环素的胶原蛋白骨移植基质

优选的装载四环素的胶原蛋白骨移植基质是0.001- 30重量%四环
素(1 µg-30mg四环素/100mg胶原蛋白移植)。特别优选的剂量是0.01-30
25 重量%四环素(10µg-30mg四环素/100mg胶原蛋白糊剂)。备选地, 由于材
料常常包装成棒状, 药物剂量也可作为面积的函数来确定。使用该给药方
案的四环素的优选剂量是1 µg-625 µg/mm²胶原蛋白棒。在装载四环素的胶
原蛋白整形外科移植程序中递送的总剂量典型地不超过750 mg四环素
(或少于确立的耐药良好的1000mg单个剂量)。在一个实施方案中, 0.001-30
30 重量%四环素装载到PLGA微球体中, 其又装载到胶原蛋白移植中, 以

产生在几天到几个月的时期内持续释放的药物。任何来源的胶原蛋白(如猪、牛、人或重组体; 交联的或非交联的)适于与上述结合以产生需要的终产品。四环素的药用类似物和衍生物包括化学改性的四环素(CMTs)也适合用于该实施方案, 无论是单独使用或与其它MMPI结合使用。

5

e. 装载二甲胺四环素的胶原蛋白骨移植物基质

优选的装载二甲胺四环素的胶原蛋白骨移植物基质是0.001-30重量%二甲胺四环素(1 μ g-30mg二甲胺四环素/100mg胶原蛋白移植物)。特别优选的剂量是0.01-6重量%二甲胺四环素(10 μ g-6mg二甲胺四环素/100mg胶原蛋白糊剂)。备选地, 由于材料常常包装成棒状, 药物剂量也可作为面积的函数来确定。使用该给药方案的二甲胺四环素的优选剂量是1 μ g-150 μ g/mm²胶原蛋白棒。在装载二甲胺四环素的胶原蛋白整形外科移植程序中递送的总剂量典型地不超过180 mg四环素 (或少于确立的耐药良好的200mg单个剂量)。在一个实施方案中, 0.001-30重量%二甲胺四环素装载到PLGA微球体中, 其又装载到胶原蛋白移植物中, 以产生在几天到几个月的时期内持续释放的药物。任何来源的胶原蛋白(如猪、牛、人或重组体; 交联的或非交联的)适于与上述结合以产生需要的终产品。二甲胺四环素的药用类似物和衍生物也适合用于该实施方案, 无论是单独使用或与其它MMPI结合使用。

20

f. 装载托卡特的胶原蛋白骨移植物基质

优选的装载托卡特的胶原蛋白骨移植物基质是0.001-30重量%托卡特(1 μ g-30mg托卡特/100mg胶原蛋白移植物)。特别优选的剂量是0.01-5重量%托卡特 (10 μ g-5mg托卡特/100mg胶原蛋白糊剂)。备选地, 由于材料常常包装成棒状, 药物剂量也可作为面积的函数来确定。使用该给药方案的托卡特的优选剂量是1 μ g-100 μ g/mm²胶原蛋白棒。在装载托卡特的胶原蛋白整形外科移植程序中递送的总剂量典型地不超过120 mg托卡特 (或少于确立的耐药良好的150mg单个剂量)。在一个实施方案中, 0.001-30重量%托卡特装载到PLGA微球体中, 其又装载到胶原蛋白移植物中, 以产生在几天到几个月的时期内持续释放的药物。任何来源的胶原蛋白(如猪、

30

牛、人或重组体；交联的或非交联的)适于与上述结合以产生需要的终产品。托卡特的药用类似物和衍生物也适合用于该实施方案，无论是单独使用或与其它MMPI结合使用。

5 2. 含有装载MMPI的胶原蛋白的脊柱融合装置

已开发了含有胶原蛋白海绵的可移植医用装置以改善脊柱融合外科手术的缺点。当保守处理退行性椎间盘疾病无效时，常常需要通过外科手术将临近的骨腰椎区段在受影响的椎间盘任一侧融合在一起。在脊柱融合外科手术中使用的含胶原蛋白的医用装置的实例是LT-CAGE和INFUSE
10 骨移植系统，其由Medtronic Sofamor Danek, Inc. (Memphis, TN)开发。LT-CAGE系统是空心的线状金属筒，其穿过患病的椎间盘并锚定在其上下方的椎骨中。使用前述方法（在开放式的外科手术或腹腔外科手术中），外科医生接近脊柱并从患病的椎间盘区域去除一部分退行性椎间盘。然后将金属支架置于椎间盘区域以提供支持和复原脊柱的正常解剖学定位，直
15 至发生骨融合。支架的空心允许放置材料，如自体骨移植物和骨形态发生蛋白 (BMP)，其将促进骨向内生长。合适的脊柱融合装置的代表实例描述于美国专利号5,702,449和5,645,084。

I型骨吸收胶原蛋白海绵用作INFUSE重组骨形态发生蛋白-2(BMP-2)的载体 (购自Medtronic Sofamor Danek)。在将胶原蛋白海绵置于椎间盘区
20 域前，用含BMP-2的溶液水化胶原蛋白海绵，卷起并置于支架中，一旦处于合适的位置，BMP从胶原蛋白基质缓慢释放以刺激骨生长，而基质本身用作新骨沉积的支架。在本发明中，将MMPI以持续释放的形式添加到胶原蛋白海绵以降低移植物的降解速率和延长其在体内的活性，这超过仅用胶原蛋白获得的结果。这允许基质作为支架更长时间的发挥作用，以允许
25 在溶解胶原蛋白基质前发生更坚固更成熟的骨生长。

在实施该实施方案时，先前描述的任何MMPI可单独使用，或组合使用。在脊柱移植物中使用的代表性MMPI包括TIMP-1，四环素，强力霉素，二甲胺四环素和其它化学改性的四环素(CMT)，巴马司他，马立马司他，RO-1130830，CGS 27023A，BMS-275291，CMT-3，索利司他，伊洛马司
30 他，CP-544439，普淋司他，PNU-1427690，SU-5402和托卡特以及前述

的类似物和衍生物。所有这些试剂适合与促进骨生长的因子使用，所说因子包括但不限于BMPs (如BMP-2或BMP-8) 和自体骨移植材料。下述特别优选的组合物理想地适合在该适应症中使用：

5 a. 装载马立马司他的胶原蛋白脊柱移植物

优选的装载马立马司他的脊柱胶原蛋白移植物是0.001%-30重量% 马立马司他 (即 $1\mu\text{g}$ -30mg 马立马司他/100mg胶原蛋白移植物)。特别优选的剂量是0.01- 15重量% 马立马司他 (即 $10\mu\text{g}$ -15mg/100mg胶原蛋白移植物)。备选地，由于常常将材料包装成板状，也可作为面积的函数来确定药物剂量。使用该给药方案的马立马司他优选剂量是 $1\mu\text{g}$ -37.5 $\mu\text{g}/\text{mm}^3$ 胶原蛋白移植物。在脊柱融合治疗中递送的总剂量典型地不超过45 mg (或少于确立的耐药良好的50mg单个日剂量)。在一个实施方案中，将0.001-30重量% 马立马司他装载入PLGA 微球体，其又装载入胶原蛋白移植物中，以产生在几天到几个月的期间持续释放的药物。任何来源的胶原蛋白 (如猪，牛，人，或重组体；交联的或非交联的)适合与上述结合以产生需要的终产品。马立马司他的药用类似物和衍生物也适合用于该实施方案，无论是单独使用或是与其它MMPI组合使用。

20 b. 装载巴马司他的胶原蛋白脊柱移植物

优选的组合物是0.001%-30重量%巴马司他 (即 $1\mu\text{g}$ -30mg 巴马司他/100mg 胶原蛋白移植物)。特别优选的剂量是0.01- 30重量% ($10\mu\text{g}$ -30mg/100mg胶原蛋白移植物)。备选地，由于常常将材料包装成板状，也可作为面积的函数来确定药物剂量。使用该给药方案的巴马司他优选剂量是 $1\mu\text{g}$ -200 $\mu\text{g}/\text{mm}^3$ 胶原蛋白移植物。在装载巴马司他的胶原蛋白脊柱移植物中递送的总剂量典型地不超过240 mg 巴马司他 (或少于确立的耐药良好的300 mg/ mm^2 单个日剂量)。在一个实施方案中，将0.001-30重量% 巴马司他装载入PLGA 微球体，其又装载入胶原蛋白移植物中，以产生在几天到几个月的期间持续释放的药物。任何来源的胶原蛋白 (如猪，牛，人，或重组体；交联的或非交联的)适合与上述结合以产生需要的终产品。

30 巴马司他的药用类似物和衍生物也适合用于该实施方案，无论是单独使用

或是与其它MMPI组合使用。

c. 装载强力霉素的胶原蛋白脊柱移植植物

优选的组合物是0.001%-30重量%强力霉素(1 μ g-30mg 强力霉素
5 /100mg胶原蛋白移植植物)。特别优选的剂量是0.01- 30重量%强力霉素 (10
 μ g-30mg强力霉素/100mg胶原蛋白移植植物)。备选地, 由于常常将材料包装
成板状, 也可作为面积的函数来确定药物剂量。使用该给药方案的强力霉
素优选剂量是1 μ g-83 μ g/mm³胶原蛋白移植植物。在装载强力霉素的胶原蛋
白脊柱移植植物中递送的总剂量典型地不超过100 mg强力霉素(或少于确立
10 的耐药良好的200mg单个日剂量)。在一个实施方案中, 将0.001-30重量%
强力霉素装载入PLGA 微球体, 其又装载入胶原蛋白移植植物中, 以产生在
几天到几个月的期间持续释放的药物。任何来源的胶原蛋白 (如猪, 牛,
人, 或重组体; 交联的或非交联的)适合与上述结合以产生需要的终产品。
强力霉素的药用类似物和衍生物也适合用于该实施方案, 无论是单独使用
15 或是与其它MMPI组合使用。

d. 装载四环素的胶原蛋白脊柱移植植物

优选的组合物是0.001%-30重量%四环素(1 μ g-30mg四环素/100mg胶
原蛋白移植植物)。特别优选的剂量是0.01- 30重量%四环素 (10 μ g-30mg四
20 环素/100mg胶原蛋白移植植物)。备选地, 由于常常将材料包装成板状, 也
可作为面积的函数来确定药物剂量。使用该给药方案的四环素优选剂量是
1 μ g-625 μ g/mm³胶原蛋白移植植物。在装载四环素的胶原蛋白脊柱移植植物中
递送的总剂量典型地不超过750 mg四环素(或少于确立的耐药良好的
1000mg单个日剂量)。在一个实施方案中, 将0.001-30重量%四环素装载入
25 PLGA 微球体, 其又装载入胶原蛋白移植植物中, 以产生在几天到几个月的
期间持续释放的药物。任何来源的胶原蛋白 (如猪, 牛, 人, 或重组体;
交联的或非交联的)适合与上述结合以产生需要的终产品。四环素的药用
类似物和衍生物, 包括化学改性的四环素 (CMT) 也适合用于该实施方
案, 无论是单独使用或是与其它MMPI组合使用。

e. 装载二甲胺四环素的胶原蛋白脊柱移植物

优选的组合物是0.001%-30重量%二甲胺四环素(1 μ g-30mg二甲胺四环素/100mg胶原蛋白移植物)。特别优选的剂量是0.01-6重量%二甲胺四环素(10 μ g-6mg二甲胺四环素/100mg胶原蛋白移植物)。备选地, 由于常常将材料包装成板状, 也可作为面积的函数来确定药物剂量。使用该给药方案的二甲胺四环素优选剂量是1 μ g-150 μ g/mm³胶原蛋白移植物。在胶原蛋白脊柱移植物中递送的总剂量典型地不超过180 mg二甲胺四环素(或少于确立的耐药良好的200mg单个日剂量)。在一个实施方案中, 将0.001-30重量%二甲胺四环素装载入PLGA 微球体, 其又装载入胶原蛋白移植物中, 以产生在几天到几个月的期间持续释放的试剂。任何来源的胶原蛋白 (如猪, 牛, 人, 或重组体; 交联的或非交联的)适合与上述结合以产生需要的终产品。二甲胺四环素的药用类似物和衍生物也适合用于该实施方案, 无论是单独使用或是与其它MMPI组合使用。

15 f. 装载托卡特的胶原蛋白脊柱移植物

优选的组合物是0.001%-30重量%托卡特 (1 μ g-30mg 托卡特/100mg胶原蛋白移植物)。特别优选的剂量是0.01-5重量%托卡特 (10 μ g-5mg托卡特/100mg胶原蛋白移植物)。备选地, 由于常常将材料包装成板状, 也可作为面积的函数来确定药物剂量。使用该给药方案的托卡特优选剂量是1 μ g-100 μ g/mm³胶原蛋白移植物。在装载托卡特的胶原蛋白脊柱移植物中递送的总剂量典型地不超过120 mg托卡特 (或少于确立的耐药良好的150mg单个日剂量)。在一个实施方案中, 将0.001-30重量%托卡特装载入PLGA 微球体, 其又装载入胶原蛋白移植物中, 以产生在几天到几个月的期间持续释放的药物。任何来源的胶原蛋白 (如猪, 牛, 人, 或重组体; 交联的或非交联的)适合与上述结合以产生需要的终产品。托卡特的药用类似物和衍生物也适合用于该实施方案, 无论是单独使用或是与其它MMPI组合使用。

3. 装载MMPI的胶原蛋白外科手术用的筛眼、悬带和补片

30 已生产了几种基于胶原蛋白的外科手术用的筛眼以作为组织修复产

品在开放式外科手术中使用。产品如FORTAGEN外科手术用的筛眼 (Organogenesis Inc., Canton, MA), GRAFT补片 (Organogenesis Inc., Canton, MA), 和SURGISIS (Cook Biotech, Inc., West Lafayette, IN)组成了主要由I型胶原蛋白(通常是猪或牛)组成的多层板, 其用于在手术修复过程中加固软组织。适应症包括腹壁和胸壁的缺损, 肌肉瓣加强, 直肠和阴道下垂, 组织瓣供体部位的修复, 造口术加强, 骨盆底部的再造, 疝气修复, 缝合线加固和重建目的。

外科手术用的悬带, 如FORTAFLEX外科手术用的悬带(Organogenesis Inc., Canton, MA)和SURGISIS悬带同样主要由I型胶原蛋白(通常猪或牛)组成, 且在开放式泌尿道外科手术程序中使用。适应症包括 pubourethral support, 下垂修复(尿道, 阴道, 直肠和结肠的), 脱肛, 膀胱突出, 肠疝, 乳房固定术(mastopexy), 骨盆底部的再造, 膀胱支撑, sacrocolposuspension和其它重建目的。

胶原蛋白外科手术用的补片也用于腱、韧带、软骨修复外科手术。在美国每年进行超过700,000例韧带和腱修复, 包括: 修复足和踝(总数的11%-特别是跟腱; 还有腓骨腱, 足底筋膜修复, 伸指肌腱, 前胫骨腱, 踝的侧稳定韧带, 前下胫骨腓骨韧带, 内三角肌韧带), 膝盖(总数的38%-特别是内侧并行韧带, 侧面并行韧带, 前十字形韧带, 后十字形韧带, 半月板(meniscal)修复; 还有软骨表面修复, 膝盖骨腱修复, 股二头肌腱修复), 臀(股直肌起端, 股薄肌腱, 腘绳肌腱起端的撕脱), 骨盆(股薄肌起端, 收肌起端, 股直肌插入, 耻骨联合软骨), 肩(总数的25%-特别是肌腱套腱; 还有肩峰锁骨稳定韧带, 二头肌腱), 背部(骶髂稳定韧带), 肘(二头肌腱, 侧上髁-伸肌起端, 内上髁-屈肌起端, 三头肌复合体), 和手(总数的26%-腕和手的屈肌和伸肌腱)。胶原蛋白补片如FORTAFLEX补片用于在外科手术修复和愈合过程中加固组织。腱和韧带修复外科手术典型涉及缝合线锚或穿过缝合线的装置以使受损的腱绑住骨。取决于受损处的大小, 胶原蛋白补片可用于填补腱或韧带中的缺损。

在上述所有情况中, 胶原蛋白移植物用作可再吸收的支架, 其提供生物力学强度, 支持和加固外科手术修复的软组织。最终, 胶原蛋白变成被能修复和再生受损组织的宿主组织细胞浸润和替代。对于许多这些外科手

术而言，胶原蛋白移植物的持久性成为重要的临床问题。在泌尿程序中，组织缺损的外科校正（特别是腹壁和疝气修复）和在腱和韧带修复中，胶原蛋白移植物提供结构完整性直至可以发生完全的愈合是理想的。在大面积组织缺损情形中，其可能花费几个月一几年痊愈，如果在完成愈合前它完整地被吸收，胶原蛋白移植物的有限持久力可能成为临床问题。

在试图解决该问题的过程中，制造商已尝试通过增加的胶原蛋白交联生产具有改善的持久力的胶原蛋白移植物。利用该方法，产品例如FORTAPERM外科手术移植物(Organogenesis Inc., Canton, MA)可更长期地用作组织支架。然而，这保持着生产具有持续结构完整性和更低降解时间的胶原蛋白外科手术用的筛眼，悬带和补片的需要。利用依照本发明的基于装载MMPI的胶原蛋白外科手术用的筛眼，悬带或补片可维持移植物的效能，并允许软组织缺损的更有效和完整的愈合。移植物仍将最终被降解，但比当前可获得的可生物降解移植物持续更长时间。这也优于永久移植物，如e-PTFE外科手术用的筛眼，如GORE-TEX (Gore & Associates, Inc., Newark, DE)，其需要第二次手术程序以去除。

在实施该实施方案时，上述任何MMPI可单独使用或结合使用。用作外科手术用的筛眼，悬带和补片优选MMPI的实例包括TIMP-1，四环素，强力霉素，二甲胺四环素，和其它化学改性的四环素(CMT)，巴马司他，马立马司他，RO-1130830，CGS 27023A，BMS-275291，CMT-3，索利司他，伊洛马司他，CP-544439，普淋司他，PNU-1427690，SU-5402和托卡特以及前述的类似物和衍生物。下述特别优选的组合物理想地适合用作该适应症：

a. 装载马立马司他的胶原蛋白外科手术用的筛眼，悬带和补片

优选的装载马立马司他的胶原蛋白外科手术用的筛眼，悬带或补片是0.001%-30重量% 马立马司他(即1 μ g-30mg 马立马司他/100 mg 外科手术用的筛眼，悬带或补片)。特别优选的剂量是0.01-15重量% 马立马司他(即 10 μ g-15mg/100mg 胶原蛋白移植物)。备选地，由于常常将材料包装成板状（典型尺寸是2cm x 5cm；5cm x 5cm；12cm x 36cm），也可作为面积的函数来确定药物剂量。利用该给药方案马立马司他的优选剂量是1

5 μg -104 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 胶原蛋白板。在软组织修复过程中递送的总剂量典型地不超过45 mg (或少于确立的耐药良好的50mg单个日剂量)。不考虑使用的胶原蛋白移植物(外科手术用的筛眼, 悬带或补片)的尺寸或类型, 总的药物含量应典型地不超过50mg 马立马司他。在一个实施方案中, 将0.001-30重量% 马立马司他装载入PLGA微球体, 其又装载入胶原蛋白移植物, 以产生在几天到几个月的时期内持续释放的药物。任何来源的胶原蛋白 (如猪, 牛, 人, 或重组体; 交联的或非交联的)适合与上述结合以产生需要的终产品。马立马司他的药用类似物和衍生物也适合用于该实施方案, 无论是单独使用或是与其它MMPI组合使用。

10

b. 装载巴马司他的胶原蛋白外科手术用的筛眼, 悬带和补片

优选的组合是0.001%-30重量% 巴马司他 (即1 μg -30mg 巴马司他/100 mg 胶原蛋白外科手术用的筛眼, 悬带或补片)。特别优选的剂量是0.01-30重量% 巴马司他 (10 μg -30mg/100mg胶原蛋白外科手术用的筛眼, 悬带或补片)。备选地, 由于常常将材料包装成板状 (典型尺寸是2cm x 5cm; 5cm x 5cm; 12cm x 36cm), 也可作为面积的函数来确定药物剂量。利用该给药方案巴马司他的优选剂量是1 μg -555 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 胶原蛋白移植物。在12cm x 36cm装载巴马司他的胶原蛋白外科手术移植物中递送的总剂量典型地不超过240 mg 巴马司他 (或少于确立的耐药良好的300 mg/m²单个日剂量)。不考虑使用的胶原蛋白移植物(外科手术用的筛眼, 悬带或补片)的尺寸或类型, 总的药物含量应典型地不超过300mg 巴马司他。在一个实施方案中, 将0.001-30重量% 巴马司他装载入PLGA微球体, 其又装载入胶原蛋白移植物, 以产生在几天到几个月的时期内持续释放的药物。任何来源的胶原蛋白 (如猪, 牛, 人, 或重组体; 交联的或非交联的)适合与上述结合以产生需要的终产品。巴马司他的药用类似物和衍生物也适合用于该实施方案, 无论是单独使用或是与其它MMPI组合使用。

15

20

25

c. 装载强力霉素的胶原蛋白外科手术用的筛眼, 悬带和补片

30 优选的组合是0.001%-30重量% 强力霉素(1 μg -30mg 强力霉素/100 mg 胶原蛋白外科手术用的筛眼, 悬带或补片)。特别优选的剂量是

- 0.01-30重量% 强力霉素(10 μg -30mg/100mg胶原蛋白外科手术用的筛眼, 悬带或补片)。备选地, 由于常常将材料包装成板状 (典型尺寸是2cm x 5cm; 5cm x 5cm; 12cm x 36cm), 也可作为面积的函数来确定药物剂量。利用该给药方案强力霉素的优选剂量是1 μg -350 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 胶原蛋白移植物。
- 5 在12cm x 36cm装载强力霉素的胶原蛋白外科手术移植物中递送的总剂量典型地不超过160 mg 强力霉素(或少于确立的耐药良好的200mg单个日剂量)。不考虑使用的胶原蛋白移植物(外科手术用的筛眼, 悬带或补片)的尺寸或类型, 总的药物含量应典型地不超过200mg 强力霉素。在一个实施方案中, 将0.001-30重量%强力霉素装载入PLGA微球体, 其又装载入胶原
- 10 蛋白移植物, 以产生在几天到几个月的时期内持续释放的药物。任何来源的胶原蛋白 (如猪, 牛, 人, 或重组体; 交联的或非交联的)适合与上述结合以产生需要的终产品。强力霉素的药用类似物和衍生物也适合用于该实施方案, 无论是单独使用或是与其它MMPI组合使用。
- 15 d. 装载四环素的胶原蛋白外科手术用的筛眼, 悬带和补片
- 优选的组合是0.001%-30重量%四环素(1 μg -30mg 四环素/100 mg 胶原蛋白外科手术用的筛眼, 悬带或补片)。特别优选的剂量是0.01-30重量%四环素(10 μg -30mg四环素/100mg胶原蛋白外科手术用的筛眼, 悬带或补片)。备选地, 由于常常将材料包装成板状 (典型尺寸是2cm x 5cm;
- 20 5cm x 5cm; 12cm x 36cm), 也可作为面积的函数来确定药物剂量。利用该给药方案四环素的优选剂量是1 μg -1.75 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 胶原蛋白移植物。因此, 在12cm x 36cm装载四环素的胶原蛋白外科手术移植物中递送的总剂量典型地不超过760 mg 四环素(或少于确立的耐药良好的1000mg单个日剂量)。不考虑使用的胶原蛋白移植物(外科手术用的筛眼, 悬带或补片)的尺寸
- 25 或类型, 总的药物含量应典型地不超过1000mg 四环素。在一个实施方案中, 将0.001-30重量%四环素装载入PLGA微球体, 其又装载入胶原蛋白移植物, 以产生在几天到几个月的时期内持续释放的药物。任何来源的胶原蛋白 (如猪, 牛, 人, 或重组体; 交联的或非交联的)适合与上述结合以产生需要的终产品。四环素的药用类似物和衍生物包括化学改性的四环
- 30 素(CMT)也适合用于该实施方案, 无论是单独使用或是与其它MMPI组合

使用。

e. 装载二甲胺四环素的胶原蛋白外科手术用的筛眼，悬带和补片

优选的组合是0.001%-30重量%二甲胺四环素(1 μg -30mg 二甲胺四环素/100 mg 胶原蛋白外科手术用的筛眼，悬带或补片)。特别优选的剂量是0.01-6重量% 二甲胺四环素(10 μg -6mg二甲胺四环素/100mg胶原蛋白外科手术用的筛眼，悬带或补片)。备选地，由于常常将材料包装成板状(典型尺寸是2cm x 5cm; 5cm x 5cm; 12cm x 36cm)，也可作为面积的函数来确定药物剂量。利用该给药方案二甲胺四环素的优选剂量是1 μg -415 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 胶原蛋白移植物。在12cm x 36cm装载二甲胺四环素的胶原蛋白外科手术移植中递送的总剂量典型地不超过180 mg 二甲胺四环素(或少于确立的耐药良好的200mg单个剂量)。不考虑使用的胶原蛋白移植物(外科手术用的筛眼，悬带或补片)的尺寸或类型，总的药物含量应典型地不超过200mg 二甲胺四环素。在一个实施方案中，将0.001-30重量%二甲胺四环素装载入PLGA微球体，其又装载入胶原蛋白移植物，以产生在几天到几个月的时期内持续释放的药物。任何来源的胶原蛋白(如猪，牛，人，或重组体；交联的或非交联的)适合与上述结合以产生需要的终产品。二甲胺四环素的药用类似物和衍生物也适合用于该实施方案，无论是单独使用或是与其它MMPI组合使用。

20

f. 装载托卡特的胶原蛋白外科手术用的筛眼，悬带和补片

优选的组合是0.001%-30重量%托卡特(1 μg -30mg 托卡特 /100 mg 胶原蛋白外科手术用的筛眼，悬带或补片)。特别优选的剂量是0.01-5重量%托卡特 (10 μg -5mg托卡特/100mg胶原蛋白外科手术用的筛眼，悬带或补片)。备选地，由于常常将材料包装成板状(典型尺寸是2cm x 5cm; 5cm x 5cm; 12cm x 36cm)，也可作为面积的函数来确定药物剂量。利用该给药方案托卡特的优选剂量是1 μg -275 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 胶原蛋白移植物。在12cm x 36cm装载托卡特的胶原蛋白外科手术移植中递送的总剂量典型地不超过120 mg托卡特(或少于确立的耐药良好的150mg单个剂量)。不考虑使用的胶原蛋白移植物(外科手术用的筛眼，悬带或补片)的尺寸或类型，总的

30

药物含量应典型地不超过150mg 托卡特。在一个实施方案中，将0.001-30重量%托卡特装载入PLGA微球体，其又装载入胶原蛋白移植物，以产生在几天到几个月的时期内持续释放的药物。任何来源的胶原蛋白（如猪，牛，人，或重组体；交联的或非交联的）适合与上述结合以产生需要的终产品。托卡特的药用类似物和衍生物也适合用于该实施方案，无论是单独使用或是与其它MMPI组合使用。

4. 装载MMPI的牙齿移植物

在牙科程序中常使用可植入的胶原蛋白以填补组织缺损和促进愈合和组织再生。下文描述的实施方案详述了装载金属蛋白酶抑制剂的胶原蛋白产品的组成和它们依照本发明在治疗常规牙周疾病中应用的方法。

简而言之，牙周疾病是牙齿支撑结构的炎性疾病，所述支撑结构包括韧带，牙骨质，骨膜，牙槽骨和临近的牙龈，它们将牙齿锚定在适当的位置。病症起始于牙龈出血，但可发展成松动牙齿，牙龈萎缩，牙龈和牙齿之间穴袋脓肿，和坏死溃疡性牙龈炎。在发展阶段，可能需要程序如龈切除术，龈成形术，和牙齿骨结构的校正来治疗该病症。传统的治疗涉及牙周穴袋的开盖清创术，去除已被牙周感染破坏的患病的牙骨质，牙周韧带和牙槽骨。不幸地，上皮组织可偶尔移到外科手术创建的缺损，削弱了牙骨质、韧带和骨的准确愈合。

已开发了胶原蛋白移植物以试图控制愈合进程和优化组织再生。通常使用的移植物包括如BIOMEND，获自Sulzer Medica, Inc. (Houston, TX)，其是由来源于牛Achilles腱的压缩的I型胶原蛋白基质组成的胶原蛋白膜。胶原蛋白膜(作为板状提供，如15mm x 20mm； 20mm x 30mm； 和30mm x 40mm)被切割成适当的大小和形状，水化并放置在层叠的牙龈组织和清除的牙周缺损之间作为屏障；可在适当的位置缝合该屏障，但这常常不需要。相对于牙根隐蔽地放置膜，并覆盖周围的牙槽骨（在缺损边缘下扩大至少3mm）以有效维持再生空间。胶原蛋白膜上粘膜骨膜盖的最初闭合度是重要的，原因在于膜暴露于口腔可导致过早的降解。屏障防止较快速生长的上皮组织进入该区域，并允许较慢生长的牙周韧带和骨细胞重新定居在该区域，并实现适当的愈合。胶原蛋白膜是可生物再吸收的，保持6—7周，

在实施该实施方案时，上述任何MMPI可单独使用或结合使用。用于牙移植物的优选的MMPI包括TIMP-1，四环素，强力霉素，二甲胺四环素，和其它化学改性的四环素(CMT)，巴马司他，马立马司他，RO-1130830，CGS 27023A，BMS-275291，CMT-3，索利司他，伊洛马司他，CP-544439，普淋司他，PNU-1427690，SU-5402和托卡特以及前述的类似物和衍生物。可设计递送的总剂量，剂量降解的速率和药物从基质释放的持续时间以获得需要的胶原蛋白移植物的可变降解时间。下述组合物理想地适合用作牙移植植物：

a. 装载马立马司他的胶原蛋白牙齿移植植物

10 优选的装载马立马司他的牙齿胶原蛋白移植植物是0.001%-30重量%马立马司他(即1 μg -30mg 马立马司他/100mg胶原蛋白移植植物)。特别优选的剂量是0.01-15重量% 马立马司他 (即10 μg -15mg/100mg 胶原蛋白移植植物)。备选地，由于常常将材料包装成板状(典型尺寸是15mm x 20mm; 20mm x 30mm; 和30mm x 40mm)，也可以作为面积的函数来确定药物剂量。使用该给药方案马立马司他的优选剂量是1 μg -37.5 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ 胶原蛋白移植植物。在牙周治疗中递送的总剂量典型地不超过45 mg (或少于确立的耐药良好的50mg单个日剂量)。不考虑使用的胶原蛋白移植植物的尺寸或类型(板状、带型、插塞或组织填料)，总药物含量应典型地不超过50 mg 马立马司他。在一个实施方案中，将0.001-30重量% 马立马司他装入PLGA微球体，其又装入胶原蛋白移植植物，以产生几天一几个月持续释放的药物。任何来源的胶原蛋白(如猪，牛，人，或重组体；交联的或非交联的)适合与上述结合以产生需要的终产品。马立马司他的药用类似物和衍生物也适合用于该实施方案，无论是单独使用或是与其它MMPI组合使用。

25 b. 装载BATIMISTAT的胶原蛋白牙齿移植植物

优选的组合物是0.001%-30重量%BATIMISTAT(即1 μg -30mg BATIMISTAT/100mg胶原蛋白移植植物)。特别优选的剂量是0.01-30重量%(即10 μg -30mg/100mg 胶原蛋白移植植物)。备选地，由于常常将材料包装成板状(典型尺寸是15mm x 20mm; 20mm x 30mm; 和30mm x 40mm)，也可以作为面积的函数来确定药物剂量。使用该给药方案BATIMISTAT的优

选剂量是1 μg -200 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ 胶原蛋白移植物。因此，在30mm x 40mm装载BATIMISTAT的胶原蛋白牙齿移植物中递送的总剂量典型地不超过240 mg BATIMISTAT (或少于确立的耐药良好的300 mg/m^2 单个剂量)。不考虑使用的胶原蛋白移植物的尺寸或类型（板状、带型、插塞或组织填料），

5 总药物含量应典型地不超过300 mg BATIMISTAT。在一个实施方案中，将0.001-30重量% BATIMISTAT装入PLGA微球体，其又装入胶原蛋白移植物，以产生几天一几个月持续释放的药物。任何来源的胶原蛋白（如猪，牛，人，或重组体；交联的或非交联的）适合与上述结合以产生需要的终产品。BATIMISTAT的药用类似物和衍生物也适合用于该实施方案，无论

10 是单独使用或是与其它MMPI组合使用。

c. 装载强力霉素的胶原蛋白牙齿移植物

优选的组合是0.001%-30重量%强力霉素(即1 μg -30mg 强力霉素/100mg胶原蛋白移植物)。特别优选的剂量是0.01-30重量%强力霉素 (即10

15 μg -30mg强力霉素/100mg 胶原蛋白移植物)。备选地，由于常常将材料包装成板状（典型尺寸是15mm x 20mm；20mm x 30mm；和30mm x 40mm），也可以作为面积的函数来确定药物剂量。使用该给药方案强力霉素的优选剂量是1 μg -83 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ 胶原蛋白移植物。在30mm x 40mm装载强力霉素的胶原蛋白牙齿移植物中递送的总剂量典型地不超过100 mg 强力霉素(或

20 少于确立的耐药良好的200mg单个剂量)。不考虑使用的胶原蛋白移植物的尺寸或类型（板状、带型、插塞或组织填料），总药物含量应典型地不超过200 mg 强力霉素。在一个实施方案中，将0.001-30重量% 强力霉素装入PLGA微球体，其又装入胶原蛋白移植物，以产生几天一几个月持续释放的药物。任何来源的胶原蛋白（如猪，牛，人，或重组体；交联的或非

25 交联的）适合与上述结合以产生需要的终产品。强力霉素的药用类似物和衍生物也适合用于该实施方案，无论是单独使用或是与其它MMPI组合使用。

d. 装载四环素的胶原蛋白牙齿移植物

30 优选的组合是0.001%-30重量%四环素(即1 μg -30mg四环素/100mg

胶原蛋白移植物)。特别优选的剂量是0.01-30重量%四环素 (即10 μg -30mg 四环素/100mg 胶原蛋白移植物)。备选地, 由于常常将材料包装成板状(典型尺寸是15mm x 20mm; 20mm x 30mm; 和30mm x 40mm), 也可以作为面积的函数来确定药物剂量。使用该给药方案四环素的优选剂量是1 μg -625 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ 胶原蛋白移植物。在30mm x 40mm装载四环素的胶原蛋白牙齿移植物中递送的总剂量典型地不超过750 mg四环素(或少于确立的耐药良好的1000mg单个剂量)。不考虑使用的胶原蛋白移植物的尺寸或类型(板状、带型、插塞或组织填料), 总药物含量应典型地不超过1000 mg 四环素。在一个实施方案中, 将0.001-30重量% 四环素装入PLGA微球体, 其又装入胶原蛋白移植物, 以产生几天一几个月持续释放的药物。任何来源的胶原蛋白(如猪, 牛, 人, 或重组体; 交联的或非交联的)适合与上述结合以产生需要的终产品。四环素的药用类似物和衍生物包括化学改性的四环素(CMT)也适合用于该实施方案, 无论是单独使用或是与其它MMPI组合使用。

15

e. 装载二甲胺四环素的胶原蛋白牙齿移植物

优选的组合物是0.001%-30重量%二甲胺四环素(1 μg -30mg二甲胺四环素/100mg胶原蛋白移植物)。特别优选的剂量是0.01-6重量%二甲胺四环素(10 μg -6mg二甲胺四环素/100mg 胶原蛋白移植物)。备选地, 由于常常将材料包装成板状(典型尺寸是15mm x 20mm; 20mm x 30mm; 和30mm x 40mm), 也可以作为面积的函数来确定药物剂量。使用该给药方案二甲胺四环素的优选剂量是1 μg -150 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ 胶原蛋白移植物。在30mm x 40mm装载二甲胺四环素的胶原蛋白牙齿移植物中递送的总剂量典型地不超过180 mg二甲胺四环素(或少于确立的耐药良好的200mg单个剂量)。不考虑使用的胶原蛋白移植物的尺寸或类型(板状、带型、插塞或组织填料), 总药物含量应典型地不超过200 mg 二甲胺四环素。在一个实施方案中, 将0.01-30 % 二甲胺四环素装入PLGA微球体, 其又装入胶原蛋白移植物, 以产生几天一几个月持续释放的药物。任何来源的胶原蛋白(如猪, 牛, 人, 或重组体; 交联的或非交联的)适合与上述结合以产生需要的终产品。二甲胺四环素的药用类似物和衍生物也适合用于该实施方案, 无论是单独

30

使用或是与其它MMPI组合使用。

f. 装载托卡特的胶原蛋白牙齿移植物

优选的组合是0.001%-30重量%托卡特 (1 μg -30mg托卡特/100mg胶原蛋白移植物)。特别优选的剂量是0.01-5重量%托卡特 (10 μg -5mg托卡特/100mg 胶原蛋白移植物)。备选地, 由于常常将材料包装成板状 (典型尺寸是15mm x 20mm; 20mm x 30mm; 和30mm x 40mm), 也可以作为面积的函数来确定药物剂量。使用该给药方案托卡特的优选剂量是1 μg -100 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ 胶原蛋白移植物。在30mm x 40mm装载托卡特的胶原蛋白牙齿移植物中递送的总剂量典型地不超过120 mg托卡特 (或少于确立的耐药良好的150mg单个剂量)。不考虑使用的胶原蛋白移植物的尺寸或类型(板状、带型、插塞或组织填料), 总药物含量应典型地不超过150 mg托卡特。在一个实施方案中, 将0.01-30 重量% 托卡特装入PLGA微球体, 其又装入胶原蛋白移植物, 以产生几天一几个月持续释放的药物。任何来源的胶原蛋白 (如猪, 牛, 人, 或重组体; 交联的或非交联的)适合与上述结合以产生需要的终产品。托卡特的药用类似物和衍生物也适合用于该实施方案, 无论是单独使用或是与其它MMPI组合使用。

5. 装载MMPI的胶原蛋白皮肤移植物

已开发了几种基于胶原蛋白的产品用作人工皮肤移植物。ORCEL双层细胞基质(Ortec International, Inc., New York, NY) 是由纯化的牛I型胶原蛋白与两种类型的活人皮肤细胞组成。ORCEL是施用于伤口表面在逐渐被吸收前促进愈合的伤口敷料。相关的产品, Composite Cultured Skin (Ortec International, Inc.), 由纯化的牛I型胶原蛋白混合人皮肤细胞组成的伤口敷料, 用于处理隐性营养不良性大疱性表皮松解(recessive dystrophic epidermolysis bullosa) (RDEB), 所述的皮肤细胞取自健康的供体。APLIGRAF (Organogenesis Inc., Canton, MA) 是使用新生包皮角化细胞和成纤维细胞与牛I型胶原蛋白制备的活的、双层皮肤替代物。其显示用于治疗部分和/或完全的厚度的皮肤溃疡, 如静脉的腿溃疡和糖尿病的足溃疡。皮肤移植物和制备人造皮肤的方法的代表实例描述于美国专利号

5,166,187, 5,263,983, 5,326,356, 5,350,583, 5,800,811和5,945,101。

依照本发明，将MMPI不同地装入基于胶原蛋白的皮肤移植物中可用于精确控制移植物的溶解速率。因此，本发明提供了结合MMPI的基于胶原蛋白的皮肤移植物。尽管任何先前描述的金属蛋白酶抑制剂可适合结合入基于胶原蛋白的皮肤移植物，但特别优选下述物质：TIMP-1，四环素，化学改性的四环素(CMT)，强力霉素，二甲胺四环素，巴马司他，马立马司他，RO-1130830，CGS 27023A，BMS-275291，CMT-3，索利司他，伊洛马司他，CP-544439，普淋司他，PNU-1427690，SU-5402和托卡特以及前述类似物和衍生物。通过从0.001-30重量%改变装入基于胶原蛋白的皮肤移植物中的MMPI的量，(1 μ g- 30mg/100mg 胶原蛋白)，可从12小时—72小时和以上改变溶解。任何来源的胶原蛋白（如猪，牛，人或重组体；交联的或非交联的）适合用于生产上述产品。

6. 装载MMPI的胶原蛋白角膜移植物

15 通常在白内障外科手术后，在术后使用角膜屏蔽体，以用作夹板通过固定和保护巩膜和结缔组织促进愈合。角膜屏蔽体为受损组织提供了持续的润滑同时提供了保护性屏障，并增加患者的舒适度。对于该临床应用，可获得各种基于胶原蛋白的角膜屏蔽体，它们主要由于效能的持续时间而不同。SURGILENS屏蔽体(Bausch & Lomb, Inc., Rochester, NY) 在12小时完全再吸收的快速溶解的晶状体。Oasis Medical Inc. (Glendora, CA) 制备了几种不同的胶原蛋白角膜屏蔽体，包括：SOFT SHIELD QS; SOFT SHIELD, 12小时 (12小时溶解时间); SOFT SHIELD, 24小时(24小时溶解时间); 和SOFT SHIELD, 72小时(72小时溶解时间)。Alcon Laboratories, Inc. (Fort Worth, TX) 还制备了一系列胶原蛋白角膜屏蔽体，已知为 PROSHIELD, 其在广泛范围的溶解速率中是可利用的。角膜屏蔽体的代表实例描述于美国专利号6,106,554, 5,128,134, 5,094,856, 5,094,855, 5,093,125, 和4,913,904。

依照本发明，在胶原蛋白角膜屏蔽体中装入不同装载的MMPI可用于精确控制屏蔽体的溶解速率。因此，在一个实施方案中，本发明提供了集合MMPI的含胶原蛋白的角膜屏蔽体。尽管先前描述的任何金属蛋白酶抑

制剂可适合结合入胶原蛋白角膜屏蔽体，但特别优选下述物质：TIMP-1，四环素，化学改性的四环素(CMT)，强力霉素，二甲胺四环素，巴马司他，马立马司他，RO-1130830，CGS 27023A，BMS-275291，CMT-3，索利司他，伊洛马司他，CP-544439，普淋司他，PNU-1427690，SU-5402和托卡特以及前述的类似物和衍生物。通过从0.001-30重量%改变装入胶原蛋白角膜屏蔽体的MMPI的量(1 μ g-30mg/100mg胶原蛋白)，可从12小时—72小时和以上改变溶解。任何来源的胶原蛋白(如猪，牛，人或重组体；交联的或非交联的)适合用于生产上述产品。

10 7. 装载MMPI的胶原蛋白青光眼引流装置

基于胶原蛋白的青光眼引流装置用于开角(open-angle)青光眼的外科手术处理。青光眼是常见的眼病，其中眼球中的压力(眼内压-IOP)增加到视网膜组织可被损伤的点(偶尔增加到导致失明的点)。当药物治疗无效时，可能需要外科手术以促进水状液的引流和降低眼内压。进行非穿透性深度巩膜切除术以提供水性流体引流的备选途径和降低压力。圆柱管，如AQUAFLOW 胶原蛋白青光眼引流装置(STAAR Surgical Company, Monrovia, CA)，用于维持巩膜下引流管道。AQUAFLOW是4.0mm长，0.5mm 宽(当干燥时)和完全由冻干的、交联的猪胶原蛋白组成。放置后，装置吸收流体并膨胀以填充外科手术产生的空间，以允许水状液的正在进行的引流。随着时间的流逝，装置开始缓慢溶解，直至它在6—9小时内被完全再吸收。青光眼引流装置的代表实例描述于美国专利号4,722,724，5,178,604和5,893,837。

将MMPI装入胶原蛋白青光眼引流装置可用于减慢移植物的溶解速率，并延长它的功效超过6—9个月。因此，在一个实施方案中，本发明提供了结合MMPI的含胶原蛋白的青光眼引流装置。尽管任何前述金属蛋白酶抑制剂可适合用于结合入胶原蛋白青光眼引流装置，但特别优选下述物质：TIMP-1，四环素，化学改性的四环素，强力霉素，二甲胺四环素，BATIMISTAT，马立马司他，RO-1130830，CGS 27023A，BMS-275291，CMT-3，索利司他，伊洛马司他，CP-544439，普淋司他，PNU-1427690，SU-5402和托卡特以及前述的类似物和衍生物。通过从1-30重量%改变装

入胶原蛋白青光眼引流装置中的MMPI的量，可将该装置的有效期限增加超过9个月。在一个实施方案中，将1-30重量% TIMP-1，四环素，强力霉素，二甲胺四环素，巴马司他，马立马司他，RO-1130830，CGS 27023A，BMS-275291，CMT-3，索利司他，伊洛马司他，CP-544439，普淋司他，
5 PNU-1427690，SU-5402和/或托卡特 装入PLGA微球体，其又装入胶原蛋白圆筒，以产生几个月持续释放的药物。

8. 用于GERD的装载MMPI的胶原蛋白填充剂

基于胶原蛋白的可注射剂用于处理胃食管回流疾病(GERD)。当下部的食管括约肌(胃和食道之间的肌肉)不能防止胃中的内容物回流到食道中时，发生GERD。胃酸和酶对食道的上皮衬里是相当腐蚀的，并且可导致糜烂，溃疡，使食道留下疤痕和变狭窄。重复回流到食道可导致不可逆的损伤，还倾向于使患者发展成食道癌。向下部食道括约肌(LES)附近注射胶原蛋白填充剂可恢复组织结构并减少回流到食道中。胶原蛋白填充剂
10 典型地通过在内窥镜查看下直接注射给药。如同用所有基于胶原蛋白的程序所实质发生的一样，主要问题是移植物的降解，其限制了治疗的期限。当胶原蛋白丧失了其结构完整性并不能再维持LES时，需要用重复注射胶原蛋白或括约肌的开放式外科手术强化来重复干预。

在本发明中，以持续释放的形式将MMPI加入到基于胶原蛋白的注射物中，以降低LES移植物的降解速率，并延长其体内效能，这超过单独用胶原蛋白所看到的结果(如在多于75%的患者中持续超过1年，在多于35%的患者中超过35%)。实施该实施方案时，先前描述的任何MMPI可单独使用或结合使用。优选的在用于GERD的可注射胶原蛋白移植物中使用的MMPI包括TIMP-1，四环素，强力霉素，二甲胺四环素和其它化学改性的
20 四环素(CMT)，巴马司他，马立马司他，RO-1130830，CGS 27023A，BMS-275291，CMT-3，索利司他，伊洛马司他，CP-544439，普淋司他，PNU-1427690，SU-5402和托卡特 以及前述的类似物和衍生物。可设计递送的总剂量、药剂释放的速率和药物从基质释放的持续时间以根据需要显著延长胶原蛋白移植物的效能。下述组合物理想地适合用于该适应症：

a. 用于GERD的装载的马立马司他胶原蛋白填充剂

优选的装载马立马司他的可注射胶原蛋白移植物是0.001%-30重量% 马立马司他 (即 1 μ g-30mg MARIMISTAT/100mg注射的胶原蛋白)。特别优选的剂量是0.01-15重量% 马立马司他 (即 10 μ g-15mg/100mg移植的胶原蛋白)。不考虑注射的胶原蛋白移植物的尺寸和类型, 总的药物含量应典型地不超过50mg 马立马司他。在一个实施方案中, 将0.001-30重量% 马立马司他装入PLGA微球体, 其又装入胶原蛋白移植物, 以产生几天一几个月持续释放的药物。任何来源的胶原蛋白 (如猪, 牛, 人, 或重组体; 交联的或非交联的)适合与上述结合以产生需要的终产品。马立马司他的药用类似物和衍生物也适合用于该实施方案, 无论是单独使用或是与其它MMPI组合使用。

b. 用于GERD的装载巴马司他的胶原蛋白填充剂

优选的组合物是0.001%-30重量% 巴马司他 (即 1 μ g-30mg 巴马司他/100mg注射的胶原蛋白)。特别优选的剂量是0.01-30重量% (10 μ g-30mg/100mg移植的胶原蛋白)。不考虑使用的胶原蛋白移植物的尺寸和类型, 总的药物含量应典型地不超过300mg 巴马司他。在一个实施方案中, 将0.01-30重量% 巴马司他装入PLGA微球体, 其又装入胶原蛋白移植物, 以产生几天一几个月持续释放的药物。任何来源的胶原蛋白 (如猪, 牛, 人, 或重组体; 交联的或非交联的)适合与上述结合以产生需要的终产品。巴马司他的药用类似物和衍生物也适合用于该实施方案, 无论是单独使用或是与其它MMPI组合使用。

c. 用于GERD的装载强力霉素的胶原蛋白填充剂

优选的组合物是0.001%-30重量% 强力霉素 (1 μ g-30mg 强力霉素/100mg注射的胶原蛋白)。特别优选的剂量是0.01-30重量%强力霉素 (10 μ g-30mg强力霉素/100mg移植的胶原蛋白)。不考虑使用的胶原蛋白移植物的尺寸和类型, 总的药物含量应典型地不超过200mg 强力霉素。在一个实施方案中, 将0.001-30重量% 强力霉素装入PLGA微球体, 其又装入胶原蛋白移植物, 以产生几天一几个月持续释放的药物。任何来源的胶原蛋

白 (如猪, 牛, 人, 或重组体; 交联的或非交联的)适合与上述结合以产生需要的终产品。强力霉素的药用类似物和衍生物也适合用于该实施方案, 无论是单独使用或是与其它MMPI组合使用。

5 d. 用于GERD的装载四环素的胶原蛋白填充剂

优选的组合是0.001%-30重量% 四环素 (1 μ g-30mg 四环素/100mg 注射的胶原蛋白)。特别优选的剂量是0.01-30重量%四环素 (10 μ g-30mg 四环素/100mg移植的胶原蛋白)。不考虑使用的胶原蛋白移植物的尺寸和类型, 总的药物含量应典型地不超过1000mg 四环素。在一个实施方案中, 10 将0.001-30重量% 四环素装入PLGA微球体, 其又装入胶原蛋白移植物, 以产生几天一几个月持续释放的药物。任何来源的胶原蛋白 (如猪, 牛, 人, 或重组体; 交联的或非交联的)适合与上述结合以产生需要的终产品。四环素的药用类似物和衍生物包括化学改性的四环素也适合用于该实施方案, 无论是单独使用或是与其它MMPI组合使用。

15

e. 用于GERD的装载二甲胺四环素胶原蛋白的填充剂

优选的组合是0.001%-30重量% 二甲胺四环素 (1 μ g-30mg 二甲胺四环素/100mg注射的胶原蛋白)。特别优选的剂量是0.01-6重量%二甲胺四环素 (10 μ g-6mg二甲胺四环素/100mg移植的胶原蛋白)。不考虑使用的胶原蛋白移植物的尺寸和类型, 总的药物含量应典型地不超过200mg 二甲胺四环素。在一个实施方案中, 将0.001-30重量% 二甲胺四环素装入PLGA微球体, 其又装入胶原蛋白移植物, 以产生几天一几个月持续释放的药物。任何来源的胶原蛋白 (如猪, 牛, 人, 或重组体; 交联的或非交联的)适合与上述结合以产生需要的终产品。二甲胺四环素的药用类似物和衍生物 20 也适合用于该实施方案, 无论是单独使用或是与其它MMPI组合使用。

25

f. 用于GERD的装载托卡特的胶原蛋白填充剂

优选的组合是0.001%-30重量% 托卡特 (1 μ g-30mg 托卡特/100mg 注射的胶原蛋白)。特别优选的剂量是0.01-5重量%托卡特 (10 μ g-5 mg托卡特/100mg移植的胶原蛋白)。不考虑使用的胶原蛋白移植物的尺寸和类 30

型，总的药物含量应典型地不超过150mg 托卡特。在一个实施方案中，将0.001-30重量% 托卡特装入PLGA微球体，其又装入胶原蛋白移植物，以产生几天一几个月持续释放的药物。任何来源的胶原蛋白（如猪，牛，人，或重组体；交联的或非交联的）适合与上述结合以产生需要的终产品。

5 托卡特的药用类似物和衍生物也适合用于该实施方案，无论是单独使用或是与其它MMPI组合使用。

9. 用于排泄失禁的装载MMPI的胶原蛋白填充剂

基于胶原蛋白的注射物还可用于局部处理排泄失禁。排泄失禁是常见的且在社交上丧失能力的病症，其影响高达11%的北美成年人。胃肠气或粪便的失禁可由各种因素引起，但在分娩过程中损伤肛门括约肌的妇女中更常见（尤其是那些遭受了三度阴道撕裂、需要钳子，怀有大的婴儿和/或作为阴道分娩的一部分经历长时间的分娩的那些妇女）。尽管排泄失禁的病因常常是多因素的，病因包括括约肌损伤（产科的，外科手术的，意外的），

15 肛门直肠疾病（痔疮，直肠下垂，炎性肠疾病，瘘，肿瘤，结肠切除，粪便嵌塞，痢疾），先天的（脊柱裂，脑膜突出，先天性巨肠病），自发的或行为的（对通便的抵触，痴呆，智力迟钝）。被动排泄失禁（即患者无意识地发生）主要是由于内肛门括约肌功能障碍导致的，而主动排泄失禁（urge fecal incontinence）（无力主动抑制通便）通常是由于外肛门括约肌功能障碍。

20

矫正措施最初是保守的或针对消除潜在的因素（如果容易明显的）。在许多患者中，没有确定的病因可被鉴定，常常尝试内或外肛门括约肌的外科修复。不幸地，超过50%的这些患者将不能获得长期的成功结果，需要另一种形式的治疗。那些外科手术失败的患者、不希望进行外科手术的患者和由于医学原因不能进行手术的患者均是可注射括约肌增强的候选者。在该程序中，将填充剂，典型地胶原蛋白，注射到内或外括约肌周围区域，以增加括约肌压力和减少排泄失禁。

25

尽管在治疗排泄失禁中已用周围-肛门-括约肌胶原蛋白注射物实现了极大成功，但多数病例由于胶原蛋白移植物的有限持续时间而需要多于一次的治疗。利用依照本发明的装载MMPI的胶原蛋白注射物可维持移植

30

物的效能并降低随后的周围-肛门-括约肌注射的需要和频率。

可获得几种可商业获得的基于胶原蛋白的填充剂用于治疗排泄失禁。CONTIGEN (以35 mg/ml 分散在磷酸盐缓冲的生理盐水中的纯化的牛皮戊二醛交联的胶原蛋白, 获自CR Bard)是广泛使用的填充剂。另外的基于胶原蛋白的可注射产品, 包括衍生自非牛, 人或重组体来源的那些也可用于该实施方案中。用CONTIGEN, 交联的胶原蛋白在约12周开始降解, 在10—19个月降解完全。尽管在注射胶原蛋白后显示排泄失禁得到改善的患者的百分比最初相当的高, 但胶原蛋白的逐渐再吸收导致需要在多数患者中重复该程序。在本发明中, 将MMPI加入到持续释放形式的基于胶原蛋白的可注射物中, 以降低移植物的降解速率和延长其体内效能, 这超过单独使用胶原蛋白所看到的结果 (即, 在多数患者中持续超过6个月, 在显著百分比的另外的患者中超过1年)。

以下述方式进行装载MMPI的胶原蛋白的周围-肛门-括约肌注射。在给药材料前, 应对患者完成两次皮肤测试 (分开进行2周), 以检测过敏反应。如果这些测试是阴性的, 则可对患者给药装载MMPI的胶原蛋白注射物。使用含有2.5 mL移植物材料的冷冻的、单个使用、具有细微刻度针头的预先装载的注射器。将患者置于切石术状态, 取决于选择注射的区域, 将10 mL 2% 利多卡因插入会阴皮肤或直肠粘膜。将针头通过皮肤或直肠粘膜插入到肛门括约肌周围的粘膜下层平面。当针头到达适当的位置时, 将装载MMPI的胶原蛋白缓慢注入该部位 (典型地在周缘地、横穿括约肌地注入的3次注射中, 远离肛门边缘进入并在齿状线或刚好在其上部注入) 直至在肛管周围实现对称。可将亚甲基蓝或其它无毒着色剂添加到移植物中以有助于看见注射。

尽管潜在的任何装载MMPI的胶原蛋白注射物可适合用于治疗排泄失禁, 但特别优选MMPI如TIMP-1, 四环素, 强力霉素, 二甲胺四环素, BATIMISTAT, MARIMISTAT, Ro-1130830, CGS 27023A, BMS-275291, CMT-3, 索利司他, 伊洛马司他, CP-544439, 普淋司他, PNU-1427690, SU-5402和托卡特。下述组合物理理想地适合用作肛门括约肌填充剂;

a. 装载MARIMISTAT的胶原蛋白肛门括约肌填充剂

优选的组合物是0.001%-30% MARIMISTAT/cc (即 1 μ g-30 mg重量 MARIMISTAT)的胶原蛋白/盐水悬浮液。特别优选的剂量是0.01-15% MARIMISTAT(即 10 μ g-15 mg)/mL的胶原蛋白/盐水悬浮液。因此,在2.5 mL处理中递送的总剂量典型地不超过45 mg (或少于确立的耐药良好的 50mg单个日剂量)。在一个实施方案中,将0.001-30% MARIMISTAT装入 PLGA微球体或其它基于聚合物的微球体,其又装入胶原蛋白,以产生几天一几个月持续释放的物质。任何来源的可注射胶原蛋白 (如牛,人或重组体,交联的或非交联的)适合与上述结合以产生需要的终产品。MARIMISTAT的药用类似物和衍生物也适合用于该实施方案,无论是单独使用或是与其它MMPI组合使用。

b. 装载BATIMISTAT的胶原蛋白肛门括约肌填充剂

优选的组合物是0.001%-30% BATIMISTAT (即 1 μ g-30 mg重量 BATIMISTAT)/mL的可注射胶原蛋白/盐水悬浮液。特别优选的剂量是 0.01-30% (即 10 μ g-30 mg重量)/mL的胶原蛋白/盐水悬浮液。因此,在2.5 mL处理中递送的总剂量典型地不超过75mg BATIMISTAT (或少于确立的耐药良好的300 mg/m²单个剂量)。在一个实施方案中,将0.001-30% BATIMISTAT装入PLGA微球体或其它基于聚合物的微球体,其又装入胶原蛋白,以产生几天一几个月持续释放的试剂。任何来源的可注射胶原蛋白 (如牛,人或重组体,交联的或非交联的)适合与上述结合以产生需要的终产品。BATIMISTAT的药用类似物和衍生物也适合用于该实施方案,无论是单独使用或是与其它MMPI组合使用。

c. 装载强力霉素的胶原蛋白肛门括约肌填充剂

优选的组合物是0.001%-30%强力霉素 (即 1 μ g-30 mg重量强力霉素)/mL的可注射胶原蛋白/盐水悬浮液。特别优选的剂量是0.01-30% (10 μ g-30 mg重量强力霉素)/mL的胶原蛋白/盐水悬浮液。因此,在2.5 mL处理中给药的总剂量典型地不超过75mg (或少于耐药良好的100 mg日剂量)。在一个实施方案中,将0.001-30% 强力霉素装入PLGA微球体或其它基于聚合物的微球体,其又装入胶原蛋白,以产生几天一几个月持续释放的试

剂。任何来源的可注射胶原蛋白 (如牛, 人或重组体, 交联的或非交联的) 适合与上述结合以产生需要的终产品。强力霉素的药用类似物和衍生物也适合用于该实施方案, 无论是单独使用或是与其它MMPI组合使用。

5 d. 装载四环素的胶原蛋白肛门括约肌填充剂

优选的组合物是0.001%-30%四环素 (1 μ g-30 mg重量四环素)/mL的可注射胶原蛋白/盐水悬浮液。特别优选的剂量是0.01-30% 四环素(10 μ g—30 mg重量四环素)/mL的胶原蛋白/盐水悬浮液。因此, 在2.5 mL处理中给药的总剂量典型地不超过75mg (或少于耐药良好的1g单个日剂量)。在
10 一个实施方案中, 将0.001-30% 四环素装入PLGA微球体或其它基于聚合物的微球体, 其又装入胶原蛋白, 以产生几天一几个月持续释放的试剂。任何来源的可注射胶原蛋白 (如牛, 人或重组体, 交联的或非交联的) 适合与上述结合以产生需要的终产品。四环素的药用类似物和衍生物也适合用于该实施方案, 无论是单独使用或是与其它MMPI组合使用。

15

e. 装载二甲胺四环素的胶原蛋白肛门括约肌填充剂

优选的组合物是0.001%-30%二甲胺四环素 (1 μ g-30 mg重量二甲胺四环素)/mL的可注射胶原蛋白/盐水悬浮液。特别优选的剂量是0.01-6% 二甲胺四环素(10 μ g—6 mg重量二甲胺四环素)/cc的胶原蛋白/盐水悬浮
20 液。因此, 在30cc处理中给药的总剂量典型地不超过180 mg (或少于耐药良好的200mg日剂量)。在一个实施方案中, 将0.001-30% 二甲胺四环素装入PLGA微球体或其它基于聚合物的微球体, 其又装入胶原蛋白, 以产生几天一几个月持续释放的试剂。任何来源的可注射胶原蛋白 (如牛, 人或重组体, 交联的或非交联的) 适合与上述结合以产生需要的终产品。二甲
25 胺四环素的药用类似物和衍生物也适合用于该实施方案, 无论是单独使用或是与其它MMPI组合使用。

f. 装载托卡特的胶原蛋白肛门括约肌填充剂

优选的组合物是0.001%-30%托卡特 (1 μ g-30 mg重量托卡特)/mL的可注射胶原蛋白/盐水悬浮液。特别优选的剂量是0.01-5%托卡特(10 μ g—5
30

mg重量托卡特)/ml的胶原蛋白/盐水悬浮液。因此,在2.5 mL处理中给药的总剂量典型地不超过75 mg。在一个实施方案中,将0.001-30% 托卡特装入PLGA微球体或其它基于聚合物的微球体,其又装入胶原蛋白,以产生几天一几个月持续释放的试剂。任何来源的可注射胶原蛋白(如牛,人或重组体,交联的或非交联的)适合与上述结合以产生需要的终产品。托卡特的药用类似物和衍生物也适合用于该实施方案,无论是单独使用或是与其它MMPI组合使用。

对本领域的技术人员容易显而易见的是,任何前述MMPI试剂或其衍生物和类似物可用于产生上述组合物的变体而不脱离本发明的精神和范围。同样显而易见的是可在具有或不具有聚合物载体的胶原蛋白移植物中利用,并且改变载体不背离本发明的范围。

实施例

实施例 1

15 胶原蛋白的制备

胶原蛋白来源

从新鲜处死的兔去除获得皮肤。通过锐器解剖法将去除的皮肤修刮,脱脂,并切割成2平方厘米的方块。将皮肤方块在环境温度下冷冻干燥24小时,然后借助于固体CO₂在研磨器中研磨成粉末。

20

溶解

通过将粉末物质加入到0.5M 乙酸溶液中使得皮肤浓度为5g干重皮肤/1来制备粉末化皮肤的悬浮液。将悬浮液冷却到10℃。向皮肤悬浮液中加入新鲜制备的胃蛋白酶溶液(在10 ml 0.01N的HCl中0.5g),将混合物在10℃温育5天,并伴有偶尔的搅拌。

25

去除胃蛋白酶

在酶处理后,通过加入5 ml Tris碱并用3N NaOH将pH调整至7.0,在4℃将混合物中残留的胃蛋白酶变性。将30 g NaCl拌入混合物中以保持胶原蛋白处于溶液状态。4小时后,将混合物在30,000 g 离心30分钟以去除沉

30

淀的胃蛋白酶。

纯化

通过加入额外的140 g NaCl将酶处理的胶原蛋白从上清液体中沉淀出来。搅拌溶液并在4℃放置4小时。在30,000 g离心30分钟将沉淀的胶原蛋白分离。将得到的胶原蛋白沉淀重悬于200 ml去离子水中。加入0.5N乙酸以将终体积补至1升。通过加入50 g NaCl，将溶液在4℃放置5小时，并在30,000 g离心30分钟从该溶液中沉淀胶原蛋白。

10 灭菌

将胶原蛋白沉淀重悬于200 ml蒸馏水中，转移到灭菌的透析管中，并用50体积的1 N乙酸透析72小时。然后用50体积的0.001 N乙酸将胶原蛋白透析24小时，期间将溶液更换3次。然后通过层流细菌学屏障中将透析管放置于无菌吸收纸巾上浓缩透析的溶液直至浓度达到12-15 mg 胶原蛋白/ml溶液。然后将浓缩的溶液用50体积的0.001 N乙酸透析24小时。然后将胶原蛋白溶液于4℃存储在无菌小瓶中。

向浓缩物中添加聚合启动剂

在使用前，于4℃立即向胶原蛋白溶液中以10:1的体积：体积比率（胶原蛋白：缓冲液）加入缓冲的盐溶液（NaCl 2.5mM/l，NaHPO₄ 0.1mM/l，pH 7.4），将缓冲的浓缩物转移至预冷的（4℃）注射器中。对于具体的应用（如美容组织增加）缓冲的盐溶液还可包含0.3-1% (w/v)的局部麻醉剂（如利多卡因）。

25 实施例 2

使用W/O/W方法制备装载TIMP-1的微球体

向 12mL 二氯甲烷中添加 100 mg 50/50 PLGA 共聚物(IV= 0.15)。向其中添加 800 µL 磷酸盐缓冲的盐水(PBS)溶液或 TIMP-1 (浓度典型地 1—10 mg/mL)的 PBS 溶液。然后将该混合物均质化 (在 6,000 rpm 进行 20 秒)。一旦形成，将该混合物分散到 100 mL 1.0%的聚乙烯醇 (PVA) 水溶液中，

并立即均质化(在 8,000 rpm 进行 40 秒)以形成水/油/水双乳剂。在这些条件下形成多分散的微球体(多数在尺寸上少于 10 微米)。然后通过蒸发将溶剂缓慢去除,并通过离心收集微球体。用去离子水洗涤颗粒(5 次),然后在干冰/丙酮浴中冷冻,并冻干过夜,以产生白色自由流动粉末的微球体。

利用上述方法,使用 85/15 PLGA (IV=0.68)制备具有更长降解图谱的微球体。

上述方法还用于制备含 TIMP-2, TIMP-3 和 TIMP-4 的微球体。

10 实施例 3

利用 W/O/W 方法制备装载四环素的微球体

除了使用四环素盐酸盐以外,以类似于上述实施例中描述的方式制备装载四环素的微球体。

15 实施例 4

利用 W/O/W 方法制备装载强力霉素的微球体

除了使用强力霉素盐酸盐以外,以类似于上述实施例中描述的方式制备装载强力霉素的微球体。

20 实施例 5

利用 W/O/W 方法制备装载二甲胺四环素的微球体

除了使用二甲胺四环素盐酸盐以外,以类似于上述实施例中描述的方式制备装载二甲胺四环素的微球体。

25 实施例 6

利用水包油的方法制备装载 BATIMISTAT 的微球体
PVA 溶液制备

在 1000ml 烧杯中,加入 1000ml 蒸馏水和 100g PVA (Aldrich 13-23K, 98% 水解的)。将两英寸的搅拌棒放入烧杯中。将悬浮液加热高达 75—80 °C,同时搅拌。一旦 PVA 完全溶解(形成清澈的溶液),将 PVA 溶液(w/v)

冷却至室温，并通过注射器在管线中的滤器过滤。

用巴马司他制备PLGA溶液

5 称重100 mg 巴马司他和900 mg PLGA(50/50, IV=0.15)并转移至20ml 闪烁管重。向管中加入10 mL HPLC级的二氯甲烷 (DCM)以溶解PLGA和巴马司他。将样品置于轨道摇动器（设置为4），直至聚合物和巴马司他溶解。

制备直径小于25 μm 的微球体

10 将100ml 10% PVA溶液转移至400ml烧杯中。使用双面胶带保护烧杯直立。将3叶搅拌棒浆叶放置在烧杯中，并调整高度为在杯底上方约0.5 cm。将搅拌机电动机(购自Fisher Scientific的DYNA-MIX)首先调至2.5。在搅拌过程中将10ml PLGA/巴马司他溶液倒入PVA溶液中。将搅拌速度逐渐增加至设置5。将搅拌持续2.5-3.0小时。通过2个金属筛（53 μm (上面)和 15 25 μm (下面))将获得的微球体过滤到100ml烧杯中，以去除任何大尺寸的物质。在过滤时用蒸馏水洗涤微球体。将收集在滤器中的微球体离心（1000rpm，10分钟），以沉淀微球体。使用巴斯德吸管去除上清液，并用100ml蒸馏水重悬沉淀。将该过程另外重复2次。

将洗涤的微球体转移到玻璃容器中。通过用少量蒸馏水(20-30ml)漂洗 20 烧杯完成转移。用石蜡膜包封容器，并放置于-20℃冷冻机中过夜。然后使用冷冻干燥器将冷冻的微球体溶液冷冻干燥约3天。将干燥的微球体转移至20ml闪烁管中，并存储于-20℃。然后通过用至少2.5 Mrad 钴-60 (Co-60) x-射线照射最终灭菌微球体。

25 实施例 7

利用水包油方法制备装载MARMISTAT的微球体

除了使用MARMISTAT代替巴马司他以外，以类似于上述实施例的方式制备装载马立马司他的微球体。

30 实施例 8

利用水包油的方法制备装载托卡特的微球体

除了使用托卡特代替Batimistat以外,以类似于上述实施例的方式制备装载托卡特的微球体。

5 实施例 9

制备含微球体BATIMISTAT的胶原蛋白溶液

制备聚合物

在存在 0.5% w/w 辛酸亚锡条件下,使用 D,L-丙交酯和甲氧基聚(乙二醇)[MePEG 2000]通过本体开环聚合(bulk ring opening polymerization)合成聚合物。

使用用于灌溉 USP 的无菌水洗涤和漂洗反应玻璃器皿,在 37°C 干燥,接着在 250°C 去热原至少 1 小时。称重 MePEG 2000 和 D,L-丙交酯(分别 240 g 和 160 g)并利用不锈钢漏斗转移至圆底烧瓶中。将 2-英寸特氟纶® 包被的磁力搅拌棒加入烧瓶中。用玻璃塞密封烧瓶,然后将其浸没在预热的油浴中直至颈部。使用温度控制电热板将油浴温度维持在 140°C。在 MePEG 和 D,L-丙交酯已熔化并达到 140°C 后,将 2mL 95%辛酸亚锡(催化剂)加入烧瓶中。在加入后立即将烧瓶剧烈摇动,以保证快速混合,然后放回油浴中。伴随加热和搅拌允许将反应进行 6 小时。然后将液体聚合物倒入不锈钢盘中,盖上盖子,并放置在烟橱中过夜(约 16 小时)。聚合物在盘中凝固。使用石蜡膜密封盘的盖子。将含聚合物的密封盘放置在冷冻机中,于 -20°C ± 5°C 放置 0.5 小时。然后将聚合物从冷冻机中移出,并转移至玻璃储存瓶中,于 2—8°C 存储。

制备胶束Batimistat(Batimistat/聚合物基质)

使用用于灌溉USP的无菌水洗涤和漂洗反应玻璃器皿,在37°C干燥,接着在250°C去热原至少1小时。首先,制备磷酸缓冲液,0.08M, pH 7.6。将缓冲液分配成每瓶1mL体积。将瓶在90°C加热2小时以干燥缓冲液。然后将温度升至160°C,将瓶另外干燥3小时。

将聚合物以10% w/v 浓度溶解在THF中,伴随搅拌和加热。然后将聚合物溶液在3000 rpm离心30分钟。倒出上清液并放置一边。向沉淀中加入

另外的THF并在3000 rpm第二次离心30分钟。合并第二个上清液和第二个上清液。称重巴马司他，然后加入到合并的上清液中。用THF将溶液补至最终的理想体积，制得含1.1% 巴马司他的9.9%聚合物溶液。

5 为了制备研制批次的最终产品瓶，将胶束Batimistat以1mL/瓶的体积分配到含有干燥的磷酸缓冲液的瓶中。将瓶置于50℃真空炉中。将真空设置在 $\leq -80\text{kPa}$ 并将瓶保持在真空炉中过夜（15—24小时）。将瓶用特氟纶贴面的灰色丁基塞塞住，并用铝封条密封。利用2.5Mrad γ -射线照射灭菌巴马司他/聚合物基质。每个瓶含有约11 mg 巴马司他， 99 mg聚合物，和11 mg磷酸盐。将瓶存储在2—8℃直至组成。

10

制备胶束Batimistat/胶原蛋白凝胶

15 在无菌的生物安全橱柜中，向含有约11 mg巴马司他， 99 mg聚合物，和11 mg磷酸盐（如上制备）瓶中加入2毫升无菌盐水。通过将瓶置于37℃水浴中约30分钟并定时涡流，瓶中的内容物溶解在2mL的无菌盐水中。使用1 mL无菌注射器，从瓶中取出1 mL等分试样的胶束巴马司他溶液并注入到29 mL 胶原蛋白凝胶中。混合样品以产生在胶原蛋白凝胶中胶束巴马司他的均质溶液。然后将样品装入1mL注射器中用于体内实验。

实施例 10

20 制备2组分胶束试剂盒

制备冻干的胶束巴马司他

如下制备在与水性含胶原蛋白的基质组成后能形成胶束的固体组合物：

25 在不锈钢烧杯中将41.29 g MePEG (MW = 2,000 g/mol)与412.84 g 60:40 MePEG:聚(D,L-丙交酯)双嵌段共聚物(参见上文提供的实施例)合并，在矿物油浴中加热至75℃并通过上面的搅拌叶进行搅拌。一旦获得清澈的液体，将混合物冷却至55℃。向混合物中加入200 ml 45.87 g 巴马司他的四氢呋喃溶液。以约40 ml/min加入溶剂，并将混合物在55℃下搅拌4小时。在混合这段时间后，将液体组合物转移至不锈钢盘中，并放置在50℃的强迫通风炉中约48小时，以去除残留的溶剂。然后将组合物冷却至环

30

境温度，并允许固化以形成Batimistat-聚合物基质。

通过在1600 ml水中结合237.8 g磷酸氢二钠七水合物，15.18 g磷酸二氢钠制备磷酸盐缓冲液。向磷酸盐缓冲液中，加入327 g巴马司他-聚合物基质，并搅拌2小时以溶解固体。在获得清澈的溶液后，用额外的水将体
5 积调至2000 ml。用15 ml等分试样的该溶液填充瓶，并通过冷去至-34℃冷冻干燥，保持5小时，加热至-16℃同时将压力降低至少于0.2 mmHg，保持68小时，加热至30℃，同时保持低压，接着保持另外20小时。结果获得能构建形成清澈胶束溶液的冻干基质。

10 制备2组分试剂盒

称重 40 mg 冻干的胶束巴马司他物质，放入带帽的 1 mL 注射器中。将柱塞放回原处，使用热封仪将注射器密封在塑料袋中。使用 2.5Mrad γ -ray 照射灭菌样品。在使用前，将含无菌冻干物质的塑料袋开口，并连接到双注射器连接器上。将含 2mL 3.5% 牛胶原蛋白 (95% I 型和 5% III 型)
15 的注射器附着在双注射器连接器的剩余一端。推动含胶原蛋白物质的注射器的柱塞以将胶原蛋白物质注入含胶束物质的注射器中。将物质快速从一个注射器推注到另一个注射器，直至获得均质溶液。然后将物质转移至最初含胶原蛋白的注射器中。将该注射器从连接器分离，并将 30-规格的针头接到注射器上。当前该物质对于应用而言已准备就绪。

20

实施例 11

制备2组分微球体试剂盒

称重40mg冷冻干燥的微球体巴马司他物质，并放入带盖的1 mL 注射器中。把柱塞放回原处，并用热密封仪将注射器在塑料袋中密封。利用2.5
25 Mrad γ -射线照射将样品灭菌。仅仅在施用前，将含有灭菌的、冻干物质的塑料袋开口，并连接到双注射器连接器上。将含2mL 3.5% 牛胶原蛋白 (95% I型和5% III型)的注射器附着到双注射器连接器的剩余一端。推入含胶原蛋白物质的注射器的柱塞，以将胶原蛋白物质转移至含胶束物质的注射器中。将物质从一个注射器推入另一个注射器，直至获得均质溶液。然
30 后将物质转移至最初含有胶原蛋白的注射器中。将该注射器从连接器分

离，并将30-规格的针头安装到注射器上。当前该物质对于应用而言已准备就绪。

实施例 12

5 脂质体制剂

MLV脂质体

在50 mL圆底烧瓶中，向5 mL二氯甲烷中加入总共100 mg卵磷脂酰胆碱(Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL)和胆固醇(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) [5:1 摩尔比]。一旦溶解，向溶液中加入3 mg 巴马司他。使用旋转蒸发器，在轻度真空下去除溶剂。在真空下过夜干燥脂质-药物混合物。向干燥的脂质-药物混合物中加入5 mL 0.9%NaCl。使用旋转蒸发器和37℃的水浴温和旋转该溶液1小时。当向0.9% NaCl组成溶液中添加5%麦芽糖时，在丙酮干冰中冷冻样品，并将样品冷冻干燥以产生固体产品。

取决于需要的具体剂量，称重一定量的冷冻干燥微球体BATIMISTAT物质(如上制备)并放入带帽的1 mL注射器中。把柱塞放回原处，并用热密封仪将注射器在塑料袋中密封。利用2.5 Mrad γ -射线照射将样品灭菌。仅仅在施用前，将含有灭菌的、冻干物质的塑料袋开口，并连接到双注射器连接器上。将含3.5% 牛胶原蛋白 (95% I型和5% III型)的注射器附着到双注射器连接器的剩余一端。推入含胶原蛋白物质的注射器的柱塞，以将胶原蛋白物质转移至含胶束物质的注射器中。将物质从一个注射器推入另一个注射器，直至获得均质溶液。然后将物质转移至最初含有胶原蛋白的注射器中。将该注射器从连接器分离，并将30-规格的针头安装到注射器上。当前该物质对于应用而言已准备就绪。

25 SUV脂质体

通过将样品放置在超声波浴(45℃)将上述制备的脂质体粉碎10分钟。该溶液从不透明的乳状溶液转变为透明的淡蓝色溶液。该溶液可原样使用或将其冻干产生固体产品。可以与上文所述类似的方式将该固体产品用于制备胶原蛋白溶液

SUV脂质体

通过将样品放置在超声波浴(45℃)将上述制备的脂质体粉碎10分钟。该溶液从不透明的乳状溶液转变为透明的淡蓝色溶液。该溶液可原样使用或将其冻干产生固体产品。可以与上文所述类似的方式将该固体产品用于
5 制备胶原蛋白溶液

实施例 13

评估胶原蛋白降解的羟脯氨酸试验

胶原蛋白是唯一含有3-和4-羟脯氨酸的蛋白质，因此药物制剂对胶原
10 蛋白降解的作用可通过在不同时间点用装载药物的制剂处理后测量羟脯氨酸来定量。在存在维生素C的条件下将人皮肤成纤维细胞在培养基中培养3周，以形成三维胶原蛋白基质。将不同浓度的药物制剂等分施加到胶原蛋白基质上，连同施加各种浓度的胶原蛋白降解酶。可以改变药物作用的持续时间。将细胞上清液收集在0.1 M NaCl, 5 mM NaHCO₃中，并于110
15 °C在6N HCl中水解16小时。然后将样品真空干燥，并在用水稀释10倍的缓冲液原液重建。缓冲液原液由1 L含50 g柠檬酸，12 mL冰醋酸，120 g乙酸钠和34 g NaOH的溶液组成。

通过将100 μL样品等分到具有50 μL Chloramine-T试剂(1.41 g Chloramine-T溶解于20.7 mL H₂O, 26 mL n-丙醇，和缓冲液原液)和50 μL
20 二甲基氨基苯甲醛(15 g p-二甲基氨基苯甲醛的60 mL n-丙醇溶液和缓慢加入26 mL 60%高氯酸)的96孔培养板中重复三次检测每个样品。将培养板在60℃温育15分钟，并放置在8—10℃ 5分钟。立即在550nm吸光度在微板分光光度计上读出光密度。在减去背景后将三个吸光度平均，从羟脯氨酸标准曲线获得浓度值(0—5 μg)。测量的羟脯氨酸的量是胶原蛋白降解
25 的测定值。与药物制剂温育后羟脯氨酸量的减少说明胶原蛋白降解减少。

本申请要求2002年12月27日提交的美国临时专利申请号60/436,806的权益，该临时申请全文结合于此作为参考。从前述内容，应当理解尽管为了解释说明的目的在此处描述了本发明的具体实施方案，但在未脱离本发明的精神和范围的条件下可进行各种改变。因此，除了后附的权利要求
30 以外，本发明不受限制。