

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 31/395



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02805296. X

A61K 31/337 A61K 38/13
A61K 38/08 A61K 31/727
A61K 31/122 A61K 31/573
A61K 47/36 A61K 47/42
A61P 43/00 A61K 9/00

[43] 公开日 2004 年 4 月 28 日

[11] 公开号 CN 1492759A

[22] 申请日 2002. 1. 16 [21] 申请号 02805296. X

[30] 优先权

[32] 2001. 1. 16 [33] US [31] 60/262,132

[86] 国际申请 PCT/US2002/001375 2002. 1. 16

[87] 国际公布 WO02/062335 英 2002. 8. 15

[85] 进入国家阶段日期 2003. 8. 21

[71] 申请人 血管治疗有限责任公司

地址 美国纽约

[72] 发明人 西瑞兰姆 S·耶尔

尼古拉斯 N·基普希泽

维克托 V·尼古拉奇科

[74] 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限公司

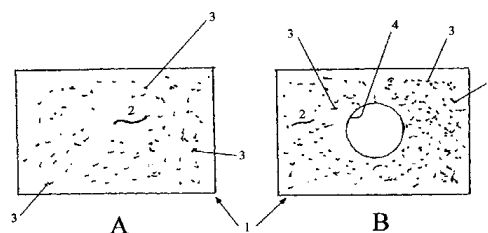
代理人 王达佐 韩克飞

权利要求书 4 页 说明书 28 页 附图 14 页

[54] 发明名称 预防或治疗血液透析中血管通路和
其它血管移植物故障的装置及方法

[57] 摘要

本发明提供一种通常放置在血管或移植物外部的修复装置，该装置能将抗增生药物或试剂从药物-释放基质材料中释放出来。本发明还公开了从血管周给予抗增生药物的方法。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种预防或治疗血管结构中血管增生疾病的方法，其包括以下步骤：
5

从血管外和局部给予血管结构抗增生有效量的抗增生制剂。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述的制剂包括雷帕霉素。

3. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述的抗增生制剂是通过血管周
10 给药。

4. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述的血管外和局部给药是通过
一种植入式的、用来释放抗增生制剂、位于血管周的血管外套实现的，
所述的外套包括吸附有制剂的基质材料。
15

5. 如权利要求 4 所述的方法，其中所述的外套基本上是包围血管。

6. 如权利要求 4 所述的方法，其中所述的基质材料包括纤维蛋白。

7. 如权利要求 4 所述的方法，其中所述的制剂包括雷帕霉素和肝素。
20

8. 如权利要求 4 所述的方法，其中所述的基质材料包括胶原。

9. 如权利要求 4 所述的方法，其中所述的基质材料包括壳聚糖。
25

10. 一种植入式、能给予抗增生制剂的血管周外套，所述外套适于
与血管结构外部联系，其包括：

a) 柔软的、圆柱状、可生物吸收的、制剂-释放基质材料，所述材料
具有血管尺寸的管腔，所述管腔基本上穿过所述的基质材料，所述的基
30 质材料分散在其中；

b) 抗增生制剂。

11. 如权利要求 10 所述的外套，还包括支撑装置，所述的装置成圆周地排列于所述基质材料的外部。

5

12. 一种治疗血液透析通路位置中血管增生疾病的方法，所述方法包括以下步骤：

从血管外和局部给予通道位置抗增生有效量的抗增生制剂。

10 13. 一种抑制血管结构中血管增生反应的方法，所述方法包括以下步骤：

从血管的血管周和局部给予血管结构抗增生有效量的抗血管增生制剂。

15 14. 一种治疗血管结构中平滑肌细胞（SMC）增生的方法，所述方法包括以下步骤：

从血管周和局部给予血管结构抗平滑肌细胞有效量的抗平滑肌细胞制剂。

20 15. 如权利要求 13 所述的方法，其中所述的血管结构是血液透析通路位置。

16. 如权利要求 13 所述的方法，其中所述的血管结构是血管移植物。

25 17. 如权利要求 13 所述的方法，其中所述的血管结构是移植物吻合处。

18. 如权利要求 13 所述的方法，其中所述的血管结构是静脉。

30 19. 如权利要求 13 所述的方法，其中所述的血管结构是静脉导管或

吻合处。

20. 一种通过从血管周和局部给予能预防、抑制或治疗血管增生反应或平滑肌细胞增生的制剂来预防或延缓血液透析通路位置故障的方法。

21. 如权利要求 20 所述的方法，其中所述血液透析血管通路的故障模型选自于血栓、感染、异物反应、腔道变窄或吻合处的闭塞、静脉、动脉或修复导管的变窄或闭塞。

10

22. 如权利要求 20 所述的方法，其中所述的从血管周和局部给予的制剂是通过与通路位置相连接的药物释放外套来输送药物而完成的。

23. 如权利要求 22 所述的方法，其中所述的外套通过选自缝合、钉合、粘和或应用自连锁机理的固定技术与通路位置相连接。

15

24. 如权利要求 20 所述的方法，其中所述用于预防、抑制或治疗过度增生性血管疾病的制剂选自雷帕霉素或雷帕霉素类似物、紫杉醇、紫杉醇类似物、其它的紫杉烷类物质、他克莫司、他克莫司类似物、放线菌素 D、地塞米松、类固醇、分馏肝素、未分馏肝素、金属蛋白酶抑制剂、Flavoperidol、人体固有的不同血管、骨髓细胞、其它细胞、干细胞、常规修饰的人类细胞、IIBIIIA 拮抗剂及抗生素。

20

25. 如权利要求 22 所述的方法，其中所述的外套由天然或合成的可生物降解性聚合物制得。

25

26. 如权利要求 22 所述的方法，其中所述的外套由 I 型胶原制得。

27. 如权利要求 22 所述的方法，其中所述的外套包括纤维蛋白。

30

28. 如权利要求 22 所述的方法，其中所述的外套包括壳聚糖。

29. 如权利要求 22 所述的方法，其中所述的外套包括可生物降解性材料。

5

30. 如权利要求 22 所述的方法，其中所述的外套包括非生物降解性材料。

31. 如权利要求 22 所述的方法，其中所述的药物与基质材料套通过
10 选自包括饱和、分散和固定的方法结合在一起。

32. 如权利要求 23 所述的方法，其中所述的用于在通路位置保护药物释放外套的缝合处涂覆有抗增生药物。

15 33. 一种用于预防或延缓血液透析中血管通路位置故障的局部给予制剂的装置。

34. 如权利要求 33 所述的装置，其包括结合有药物的胶原基质材料，所述的基质材料呈螺旋形。

20

35. 如权利要求 34 所述的装置，其含有联锁部件。

36. 一种包括结合有一种或多种抗增生药物的血管移植物的装置。

预防或治疗血液透析中血管通路
和其它血管移植物故障的装置及方法

5

相关申请的交叉参考

不适用。

关于联邦政府资助的研究或进展的声明

10

不适用。

发明背景

血液透析中血管通路和其它血管移植物的故障对天然血管（静脉或动脉）或者对处于或远离复原位置的修复导管管腔的危害变得日益明显。管腔危害呈现出或者是管腔狭窄或者是管腔闭塞，其是管腔内血栓和/或血管增生反应的结果。移植物故障的病因可能和多种物理（例如引起血液动力学紊乱的切应力）、化学和/或生物刺激有关，也与感染以及异物排斥有关，异物排斥可以解释为什么不含异物（在这个例子中，例如是聚四氟乙烯，PTFE）的瘘管比含有插入 PTFE 移植物的血管通路移植

15 物能保持更长时间的开通。

20

本发明一般涉及用于预防、压制（抑制）或治疗血液透析中血管通路和其它血管移植物故障的治疗用移植物、装置以及方法。

血管通路移植物，尤其是血液透析通路移植物是本领域公知的。在美国每年大约要进行 100,000 起血管通路治疗。血液透析中血管通路可以经如下几种方法之一构建：动静脉瘘管（例如，Brescia-Cimino），或移

25 植物，在动脉和静脉之间插入修复组织（如 PTFE）或生物组织（如静脉）。这种移植物通常由管状或圆柱状的、具有适当生物相容性、基本上为惰性的材料例如聚四氟乙烯（PTFE）的片段构建而成。事实上，PTFE 是用于修复透析通道最常用的材料。一种方法是将 PTFE 片段通过外科手术

30 插入手臂、前臂或大腿的动脉和静脉中间。然后就可利用此移植物重现

血管通道的功能以进行血液透析。

放置通道移植物后，动脉和静脉的缝合位置将经历复原过程。通常由于静脉末端变窄（狭窄）的原因，每年这些移植物的百分之六十发生故障。相似的故障也发生在动脉循环中的 PTFE 移植物上，该移植物的远端也有受到相似影响的倾向。众所周知，用于管状动脉通路移植手术或外周血管手术（例如，髂骨大动脉、股骨-股骨、腿弯部股骨、大腿胫骨等）中的 V 型移植物和/或其它移植导管，易发生功能异常或故障。在动脉通路移植物狭窄的产生没有静脉末端通路移植物狭窄的产生迅速。在人的透析通路狭窄中已经有对可导致静脉中和邻近的移植物口处内膜增生的平滑肌细胞的增生与迁移的描述。由于移植物的狭窄日益变得严重，所以使得移植物产生功能障碍而且血液透析不理想。如果移植物的狭窄不能得到治疗，那么最终将导致闭塞和移植物故障。

通路移植物的静脉末端会出现如此显著的狭窄倾向的原因是多方面的。对这一点独有的特性包括对动脉压和动脉流速的暴露、在血管壁和周围组织中的声学（振动）能量的耗散、移植物的反复穿刺、以及经处理血液的灌输。此外，移植物的静脉末端可浸在有丝分裂原中，此有丝分裂原可在血液通过透析管时或是在针穿刺激活血小板的时候被释放。

组织样本采集于手术修复期间狭窄的 PTFE 移植物的移植-静脉吻合处，该样本表现出显著的管腔变窄，其特征在於：(i)平滑肌细胞的存在，(ii)外-细胞基质的积聚，(iii)在新内膜（neointima）和动脉外膜内的血管生成，(iv)列于 PTFE 移植物材料上的活性巨噬细胞层的存在。多种细胞活素以及细胞生长刺激因子，比如象来源于血小板的生长因子（PDGF）、碱性纤维原细胞生长因子(bFGF)、和血管内皮生长因子(VEGF)，可由静脉新内膜内的平滑肌细胞/成肌纤维细胞、列于 PTFE 移植物两侧的巨噬细胞、以及新内膜和动脉外膜的血管中表达。已表明巨噬细胞、特异性细胞活素（bFGF、PDGF 和 VEGF）以及新内膜和动脉外膜中的血管生成可能是导致静脉新内膜增生（VNH）的发病机理，也是 PTFE 透析移植物中发生血管增生反应的证明。

患有慢性肾功能衰竭病人的生存依赖于适宜的定期透析治疗。如果不可能进行透析（例如由于血管通路功能异常或故障的结果），那么将导

致快速的临床恶化，除非这种形势得到治疗，否则病人会死亡。在美国，血管通路功能异常是导致血液透析病人发病和住院的最重要的原因，每年预计花费大约是十亿美元。静脉新内膜增生的特征是狭窄以及并发血栓，其为绝大多数导致 PTFE 透析移植物故障的病理作出了解释。尽管存在大量问题并且花销巨大，但是目前对预防或治疗在 PTFE 透析移植物中的静脉新内膜增生仍没有有效的治疗方法。因此，对特定介质和过程的干预可以成功地减少发生血管通路功能异常的大多数人并降低花销。

一旦出现狭窄，目前的治疗方法之一是借助于非手术性的、基于诸如球囊血管成形术的皮下导管的治疗方法来缩减或消除狭窄以及恢复流过移植物中的血流（允许进行足量的血液透析）。一方面，球囊血管成形术包括将球囊导管置于阻塞处，通过挤压对血管内壁产生反抗的材料来使球囊充气膨胀以此加大血管的最小管腔直径（MLD），从而扩张血管。根据受阻的长度和严重程度，可以重复多次进行这一过程（通过充气膨胀和放气缩小球囊）。完成后，将球囊导管从系统中取出。

尽管球囊血管成形术能作为“单独”过程应用，但是它往往要伴随着使用被称为支架的配置。支架是一种可扩张性脚架或支撑物装置，其放置在血管系统中以防止血管机械性弹回并降低原始受阻位置处发生再变窄（再狭窄）的可能性。支架是“球囊扩张式支架”或者是“自扩张式支架”，当将其置于血管内时其紧贴血管内壁。无论是否放置支架，这种治疗方式都会产生很高的失效危险，即在治疗位置外发生再变窄（再狭窄）的危险性很大。除非移植物通路内出现的狭窄能得到有效和永久的治疗，否则总会倾向于出现移植障碍。如果发生移植障碍，除非患者接受肾移植，否则患者不得不经受血管内治疗过程，即非手术性的、基于导管的皮下过程重复进行血管手术，例如通过血管切除术“去除”移植物中的血凝块，或者在不同位置放置另外的血管通路移植物或分流器（有时会用到）。由于重复手术存在明显问题而且移植的适用性也有限，所以需要提供一种既有效又持久（耐用）的方法来预防和治疗透析移植物狭窄。

大多数降低或预防血管增生反应（被确信是发生再狭窄的病理生理学基础）的通用方法是基于对血管腔和移植物腔的治疗选择。有一种通用新方法是在血管的管腔内放置涂覆有药物或含有药物的支架。用于涂

覆支架的药物例子包括从 Wyeth Ayerst 公司(Sirolimus[®])得来的商用雷帕霉素、以及从 Bristol-Myers Squibb 公司(Taxol[®])得来的商用紫杉醇。在这个基于支架的方法中，雷帕霉素或紫杉醇从支架中逐渐释放出来并经内膜（血管壁的最内层）到外膜（血管壁的最外层）扩散进入血管壁。研究表明，雷帕霉素和紫杉醇有助于抑制平滑肌细胞增生。

使用合成型基质材料（乙烯/醋酸乙烯共聚物，EVA）和具有抗增殖活性（例如肝素）的抗凝血药物通过动脉壁或血管壁从血管周空间或血管外空间的输送已被表明。此方法有两点不足：肝素是水溶性物质，会从血管壁迅速消失，而且乙烯/醋酸乙烯共聚物是非生物降解性材料，这一点潜在地提高了对其在体内长期作用的关注。

如果用基于基质材料的系统局部输送治疗制剂，那么该基质材料优选具有以下特性：

1. 基质材料必须装载足量的治疗制剂。
2. 基质材料必须以适当的、确定的速率释放治疗制剂。
- 15 3. 基质材料应该优选可移植的和可生物降解的。从而，不需要在给药后从受者组织中物理移除该基质材料并避免了对残留基质长期作用的关注。
4. 基质及其降解产物都不应引起严重的炎症或组织增生反应，也不应改变或干扰受者的天然防御系统或复原。
- 20 5. 装置（包括基质材料和药物）应具有足够的柔韧性以覆盖血管周围。及
6. 装置应该可调节地固定在防止其向非目标区域移动的位置上。

用于在上下文中的可移植装置内输送药物的聚合物基质材料或者是天然的或者是合成的，其实例包括但不限于由化学物质组成的聚合物，例如聚乙二醇酸，或聚羧基丁酸酯、EVA，或天然聚合物，例如胶原、纤维蛋白，或多糖，例如壳聚糖。然而，并不是所有的基质材料都是理想的，不适宜的方面包括差机械性质、潜在的免疫原性、以及花费。此外，有些物质还能产生有毒的降解产物，并诱导炎症或增生反应。

胶原是公知的用于输送药物的基质材料，其具有生物相容性、生物可降解性以及再吸收性。胶原作为可生物降解药物装置的制造材料的应

用已经并且正在通过认真研究。U.S. 6,323,184, 6,206,931, 4,164,559, 4,409,332, 6,162,247。目前的焦点涉及到抗生素、以及诸如生长因子之类的生理活性蛋白质和肽的药物制剂的输送。

经扫描电镜观察，胶原基质是带有纹理表面和不同孔尺寸的凝聚多层薄膜形态。它可在从 0.001 微米到 100 微米甚至更大的有效孔尺寸的宽范围内被生产。内部孔网络（多孔材料）产生大的表面积，并作为微储库储存和输送治疗制剂。这几个特性使得胶原成为药物输送的极好的理想基质材料。胶原表现出高度的柔韧性和机械耐性，以及固有的水可湿性、半透性和一致的流动性。更重要的是，胶原是天然存在的物质，可生物降解并无毒。此外，胶原具有良好的可生物降解性，完成降解或再吸收的时间即用于药物输送的胶原基质的耐性可被改变。

第二个适于药物输送的蛋白基质是纤维蛋白。纤维蛋白基质由交联的纤维蛋白单元组成，交联的纤维蛋白单元是经凝血酶修饰的纤维蛋白原分子的错综网络。此基质与天然血块相似，与天然血块相比，纤维蛋白基质内的孔尺寸可被控制在 0.001 毫微米到 0.004 毫微米内，所以被称作微孔。胶原基质和纤维蛋白基质孔尺寸的差异使得带有截然不同的释放速率的治疗制剂可以结合。

纤维蛋白基质被制成干粒状(cf., PCT/EP99/08128)。这种由 HyQ Solvelopment, Bühlmhle, Germany 制造的制剂含有 D-甘露醇、D-山梨醇、纤维蛋白原水溶液以及凝血酶组织混悬液。这种制剂用流化床制粒法制备。干纤维蛋白原的用途多种多样：伤口愈合、促进愈合以及动态平衡。然而，由于这样的制剂不允许靶向形状的固体颗粒在血管壁周围，而且精确剂量的输送也是困难的，所以限制了其在药物输送中的应用。由于干纤维蛋白颗粒的低多孔性和容量，所以其物理稳定性也差。

另一种具有可能使用的再吸收性的天然聚合物基质材料是壳聚糖。壳聚糖被证实是一种可使用的具生物相容性的氨基多糖和能够控制局部输送的试剂释放的基质。壳聚糖移植植物不会产生系统和局部副作用或免疫反应，并且易于生物降解。壳聚糖可通过使用高温氢氧化钠将惰性壳多糖（分子量 1×10^6 ）水解到分子量为 5×10^5 的降解来制备。多孔性不可控是这种基质材料的缺点。

发明简要说明

本发明的独特之处至少有以下两个方面：1) 尽管用于预防、抑制或治疗血管增生反应（平滑肌细胞增生、再狭窄、血管阻塞）的大多数通用方法都是从血管内部（即动脉和/或静脉）或移植物管腔道中预防、抑制或治疗血管增生反应，但是本发明是一种在血管外或血管周即从血管或移植物管腔外部并通过血管壁预防、抑制或治疗血管增生反应的方法。2) 所有的通用治疗方法都是在变窄或狭窄已经确实发生后才进行的。一方面本发明是一种预防或抑制血管增生疾病的方法，并对比在治愈血管增生疾病方面的区别。

在进一步的实施方案中，本发明提供了一种放置于血管或移植物外表面的植入式修复装置，然后该装置将会释放抗血管增生药物或制剂，例如雷帕霉素、紫杉醇、他克莫司以及其它的细胞周期抑制剂或具有类似功能的制剂。除了可再吸收性的基质材料例如蛋白质、和抗增生制剂之外，这种植入式装置可选择地包括可抑制血管壁的膜介质和外膜胶原聚积的制剂、以及可减少血管壁钙化的药物。本发明提供了一种预防或治疗新内膜增生（一种血管增生性反应的表现）以及钙化的方法，该方法是通过在血管外输送有效量的、低水溶性的抗增生制剂来实现的，其中的抗增生制剂可单独或与辅料及其它的抗增生制剂结合起来输送

雷帕霉素是应用于本发明中具有抗增生活性的特别优选的药物。也可使用适宜药物的混合物。雷帕霉素从外部并经过血管壁和/或移植物壁扩散到静脉和/或动脉和/或移植物的内部。在装置被植入后不久，雷帕霉素（以及其它具有抗增生作用的药物）从外部进入并通过血管壁的释放开始，然后此药物将抑制在血液透析和其它血管移植物内和/或它们吻合位置的平滑肌细胞增生。因此，一方面本发明提供了一种抑制血管通道移植物或分流器的平滑肌细胞增生的方法，该方法是通过从血管通道血管壁外部将药物逐渐释放或定时释放至血管内部，即在血管外或血管周输送而实现的。另一方面，本发明提供一种修复装置，该装置包括具有圆柱状外型、吸收有抗增生药物的蛋白内层、以及可选择的外支撑物部分或骨架物或层。在一个实施方案中，吸收的蛋白层是胶原，外部骨架

支撑物结构是 PTFE 片。在本实施方案中，抗增生药物优选雷帕霉素。紫杉醇（或泰素）是另一种适用于本发明实施方案的抗增生药物或制剂。

本发明的第三个实施方案是提供一种抑制血液透析中通路移植物狭窄的方法，该方法包括在移植物或血管结构上和/或吻合处放置修复装置
5 （如上所述的），然后在预期位置（例如缝合处）将修复装置固定。

本发明的装置可以使用生物相容性基质材料，如胶原、纤维蛋白或壳聚糖。选择特定基质材料的一个重要因素是材料的多孔性和生物降解速率的可控性。由于基质材料将产生输送储库并控制制剂输送的动力学，所以基质材料的使用是重要的。

10 本发明的优选装置包括吸收有雷帕霉素的胶原基质材料，此装置被置于便于血管外输送制剂的位置。

在优选的实施方案中，将大约 120 微克/cm² 的雷帕霉素（范围：50 微克到 10mg/cm²）与胶原基质材料层结合，该层在干燥状态下厚度为 0.3 到 2.0mm，然后将其植入或包裹在血管壁或移植物壁的外部。

15 本发明的另一方面是输送药物或制剂到血管壁或移植物壁外表面的装置是“自固定式”。如果在最后阶段胶原和光学活性物质结合在一起，例如从 Sigma Chemical, St Louis, MO 得来的 FITS（荧光素异硫氰酸盐）或 Bengal Rose，那么胶原装置就能够对血管壁产生更好的粘性。紫外线对装置的荧光放射将会激活这些光学活性物质，进而提高粘合力。纤维
20 蛋白密闭剂和乙酰化胶原也被发现能提高胶原基质材料对血管壁外部的粘合力。

早期工作表明了局部血管损伤和加速钙化间的关系。近来，对于人类的研究表明基质 Gla-蛋白（Gla-protein）基质（蛋白-羧酸酯化的维生素 K 依赖性羧化酶）由正常血管平滑肌细胞和骨细胞进行基本表达。高
25 水平的 Gla-蛋白 mRNA 和非羧酸酯化的蛋白质在动脉粥样硬化血管组织中被发现。这种羧酸酯化的蛋白对于预防或延缓血管钙化的发生是必须的（Price, P.等, “Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves,” *Atheroscler Thromb Vasc Biol*, (1998) 18: 1400-1407）。这些数据表明，由损伤引起的钙化必须被有效抑制。防止钙
30 聚积药物的介入有助于延缓钙化，并且有助于预防、抑制或治疗血管增

生过程。本发明一方面是通过即时激活羧化酶（这里是指 Gla-蛋白）使局部输送的维生素 K 抵销与血管损伤有关的钙化作用，从而确保其它的钙连蛋白功能完全，并不会结合过多的钙（Hermann, S.M.等，“Polymorphisms of the human matrix Gla-protein gene (MGP) vascular calcification and myocardial infarction,” *Atheroscler Thromb Vasc Biol*, (2000) 20: 2836-2893.），也可以使用维生素 K 和其它抗增生药物的混合物。

特征为炎症反应的急性反应是对限制动态平衡中的干扰的尝试。炎症反应的特点包括白细胞聚集、增多的纤维蛋白沉积和细胞因子的释放。合成的糖皮质激素例如地塞米松的加入能降低这种炎症反应，而且最终可减缓血管增生过程。由于抗增生制剂和合成的糖皮质激素的药理作用机理不同，所以期望有着不同“作用机理”的制剂可产生协同作用。因此将这些制剂中的两种或更多种联用会起作用。

由此，本发明提供了一种预防、抑制或治疗新内膜增生的方法，该方法是通过在血管外（例如血管周）局部输送有效量的、低水溶性抗血管增生制剂（例如雷帕霉素）来实现的，其中的抗血管增生制剂可单独或与其它抗增生制剂和辅料结合起来输送。一方面，本发明是一种放置于血管或移植物外表面的修复装置，该装置包括结合有药物的再吸收性的蛋白基质。然后该装置释放可抑制血管平滑肌细胞增生（抗血管增生）的药物。此药物的例子包括雷帕霉素、紫杉醇、他克莫司、其它细胞周期抑制剂或具有类似功能的制剂。可以使用适宜的药物和/或添加剂的混合物。除了可再吸收性的蛋白基质和抗增生制剂之外，这种植入式装置可选择地包括可抑制血管壁的胶原聚积的制剂、以及有助于降低血管壁钙化的药物。雷帕霉素是用于本发明中特别优选的药物。雷帕霉素（或其它药物）从外部释放，并经过血管壁和/或移植物壁扩散到静脉和/或动脉和/或移植物内部。在吻合位置的愈合期雷帕霉素（或有相似活性或类似性质的药物）从外部进入并通过血管壁的释放发生，然后该药物将发挥预防、抑制/压制或治疗平滑肌细胞增生的作用，从而完成愈合。因此，一方面本发明提供了一种在血管通道移植物或分流器吻合末端抑制血管增生反应的方法，该方法是通过从血管外部将药物逐渐释放或定时释放

至血管内部，即通过外血管源的血管周输送而实现的。另一方面，本发明是一种修复装置，该装置包括抗增生吸收蛋白内层、以及可选择的外支撑物部分或骨架物或层。在一个实施例中，吸收的蛋白层是胶原，外部骨架支撑物结构是 PTFE 片。在本实施例中，抗增生药物优选雷帕霉素

5 支撑物或其它的具有类似功能的药物。

本发明的另一个实施方案是一种抑制血液透析中通路移植物狭窄的方法，该方法包括在移植物或血管结构上和/或吻合处放置修复装置（如上所述的），然后在预期位置（例如缝合处）将修复装置固定。

10 附图简要说明：

图 1A、图 1B、图 2A 和图 2B 表明本发明的优选实施方案。

图 2A 和图 2B 表明本发明的另一个实施方案，其中使用了外支撑物或骨架物。

图 3A-3C 表明本发明的自联锁实施方案。

15 图 4 是本发明自联锁设计的另一个实施例。

图 5 表明图 1A-1B/图 2A-2B 中所示的基本装置，其包括有助于保持外套形状的外部线支撑或外部框架结构。

图 6-13 表明对于不同的血管修复需求，本发明的药物-释放外套各种可能的配置。

20 图 14 表明用四环素和雷帕霉素饱和的胶原释放速率，基中用四种不同的方法将雷帕霉素和胶原基质材料结合起来。

图 15 是结合有不同抗增生药物的胶原基质对平滑肌细胞生长抑制的比较。

25 图 16 是雷帕霉素、他可莫司和三种剂量的紫杉醇对人平滑肌细胞作用效果的比较。

图 17 是雷帕霉素、他可莫司和三种剂量的紫杉醇对人内皮细胞作用效果的比较。

图 18A、图 18B、图 19A、图 19B 和图 20 表明应用本发明取得的某些结果。

发明详细说明

一方面，本发明提供一种能够预防、抑制或治疗血管增生的修复装置，该装置适于血管外药物或制剂的输送，该制剂包括药物或结合有药物的制剂-释放基质材料。

- 5 基质材料：基质材料可以是天然来源或是合成制得的，或是两者的结合物。本发明的装置可以使用生物相容性、可生物降解的再吸收基质材料，例如胶原、纤维蛋白或壳聚糖。也可以使用适宜的生物相容性、非生物降解性基质。基质材料可以选自可降解和不可降解材料的组合、或是两种或更多可生物降解物质（例如，胶原加纤维蛋白）的结合，或是两种或多种非生物降解性材料的联合。选择特定基质材料的重要因素是材料的多孔性，以及在使用时生物降解的速率可控性。由于基质材料将产生输送库或储库并控制制剂输送的动力学，所以基质材料的使用是重要的。整个基质的厚度、多孔性和生物降解速率等特征不需相同。也可以想到，由于从药物中产生聚合物（例如抗增生药物），所以基质和药物是一体并且是相同的，随着聚合物的降解而释放药物。
- 10 胶原（I型）是本发明药物释放外套优选的生物相容性、可生物降解的再吸收基质材料。胶原可来自于动物或人类、或用DNA重组技术生产。其它类型的胶原，例如II型、III型、V型和XI型，可以单独使用或是和I型胶原联合使用。尽管片层或薄膜形状的胶原基质是本发明的优选实施例，但是其它形状的胶原，例如凝胶状、纤维状、海绵状和管状等也可以使用。众所周知，胶原的再吸收速率可以通过蛋白质的交联而改变。
- 15 治疗制剂：为了预防、抑制或治疗主要由新内膜增生而引起的平滑肌增生反应，在本发明中将使用具有明显抗血管增生性质的治疗制剂。应该理解的是，就目前所知平滑肌增生被认为是导致移植物障碍中狭窄和腔道损伤的主要原因。本发明不是解释障碍的作用机理。换言之，申请人不希望被任何移植障碍理论所限制而缩小其发明的范围。具有明显抗增生效果的药物包括但并不限于雷帕霉素、紫杉醇、其它的紫杉烷类物质、他克莫司、放线菌素D、angiopentin、vassenoids、flavoperidol、激素例如雌激素、卤夫酮、基质金属蛋白酶抑制剂、核糖体（ribosimes）、干扰素和反义化合物。也可以使用母体化合物的类似物，例如雷帕霉素、
- 20
- 25
- 30

紫杉醇和他克莫司的类似物。其它治疗试剂的例子包括抗炎化合物、地塞米松和它的类固醇、抗血小板制剂,包括阿斯匹林、氯吡格雷、II/IIIa拮抗剂、抗凝血酶、抗凝血剂,包括未分馏和分馏的肝素、抑制素、钙通道拮抗剂、蛋白酶抑制剂、乙醇、肉毒杆菌毒素和基因物质。也可使用血管细胞、骨髓细胞和干细胞。

这些制剂可以单独或以结合物的形式与基质结合。取决于治疗制剂,制剂可以通过物理、化学和/或生物学方法与基质结合。可以使用结合技术。也应该理解,不要求药物浓度与整个基质的相同(通常也不会相同)。

应该理解的是,从基质材料(外套)释放药物到达并通过血管壁的过程仅仅表明了一种可能的药物输送过程。例如,药物可以通过刺激或引发而释放,例如光、温度变化、压力、超声-电离能、电磁或磁场。药物也可以以前药或无活性的形式存在于基质中。刺激应用是指经上述引发使药物成为活性形式然后释放。下面说明这种应用,已经知道通过应用可见光或紫外线可激活卟啉和补骨脂素,然后它们可以从基质上释放到吸收或限制部位。光的应用改变了药物的结构,切断了药物与蛋白储库或蛋白源的结合。因此,按照本发明,药物从基质或储库中释放,释放到达并通过血管壁,然后进入血管腔。

辅剂: 本发明的装置可选择地包括能实现其它目的的制剂,例如可抑制胶原聚集和有助于降低血管壁钙化的制剂。Selye 及其同事的早期研究工作表明了局部血管损伤和过度钙化的关系。近来,对人类的研究表明,基质 Gla-蛋白(Gla-protein)(蛋白-羧酸酯化的维生素 K 依赖性羧化酶)由正常血管平滑肌细胞和骨细胞进行基本表达。高水平的 Gla-蛋白 mRNA 和非羧酸酯化的蛋白质在动脉粥样硬化血管组织中被发现。这种羧酸酯化的蛋白对于预防或延缓血管钙化的发生是必须的(Price, P. 等, "Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves," *Atheroscler Thromb Vasc Biol*, (1998) 18: 1400-1407)。这些数据表明,由损伤引起的钙化必须被有效抑制。防止钙聚积药物的介入有助于延缓钙化和再狭窄过程。本发明中,通过即时激活羧化酶(这里是指 Gla-蛋白)使局部输送的维生素 K 中和与血管损伤有关的钙化作用,从而确保其它的钙连蛋白功能完全,并不会结合过多的钙(Hermann,

S.M.等, “Polymorphisms of the human matrix Gla-protein gene (MGP) vascular calcification and myocardial infarction,” *Atheroscler Thromb Vasc Biol*, (2000) 20: 2836-2893.), 也可以使用维生素 K 和其它抗增生药物的混合物。特征为炎症反应、对任何损伤(这里是指手术损伤)的急性反应是对限制动态平衡中的干扰的尝试。炎症反应的特点包括白细胞聚集、增多的纤维蛋白沉积和细胞因子的释放。合成的糖皮质激素例如地塞米松的加入能降低这种炎症反应, 而且最终可减缓再狭窄过程。由于抗增生制剂和合成型糖皮质激素的药理作用机理不同, 因此期望有着不同“抗再狭窄作用机理”的制剂可产生协同作用。因此将这些制剂中的两种或更多种联用会起作用。

根据目前公开的内容, 本领域所属技术人员可想起使用众多的其它抗增生或抗狭窄药物以及其它适宜的治疗物质和辅剂。

外套的制备方法: 鉴于上述公开的内容, 本领域所属技术人员可想起几种制备修复装置和应用该修复装置的可能方法。

单独或单层装置: 在本发明的优选实施方案中, 蛋白基质为 I 型胶原蛋白片层或薄膜, 药物为雷帕霉素。因为胶原具有可生物降解性和再吸收性, 所以对于基质而言胶原是特别优选的实施例。基质的耐用性反映了完成胶原再吸收的时间, 多孔性会影响胶原的药物粘合能力, 这两个特点均可控制和变化。作为例子, 雷帕霉素可以灌注、吸收、饱和、分散或固定在相对较平的胶原片层中。以大约 120 微克/cm^2 (范围: $50 \text{ 微克}-2 \text{ 毫克/cm}^2$) 的雷帕霉素和胶原基质结合, 该基质是厚度为 $0.3-2.0 \text{ mm}$ 的干燥形式的薄片。与胶原片(外套)结合的药物被调成管状(圆柱状)或其它几何形状, 该药物直接固定在天然血管的外部、移植吻合位和/或静脉、动脉或移植物本身上。该装置通过缝合或锁环固定。缝合材料本身可以和抗血管增生药物结合。在这方面, 被选的抗增生制剂渗透入血管壁, 药物从膜中的释放速度可变化, 而且可持续到胶原基质完全被吸收。也可以使用他克莫司、紫杉醇、其它的紫杉烷类物质、flavoperidol、抗敏感剂、或紫杉醇、雷帕霉素和他克莫司的类似物、以及其它本领域所属技术人员公知的辅剂。

两层或双层装置: 另一方面, 本发明提供一种双层的修复装置, 该

装置包括抗增生-吸收内基质层和外部支撑物骨架物或层。在这个实施方案中，内部基质材料是 I 型胶原片层或薄膜，外部骨架支撑物材料结构是 PTFE 片层。在此实施方案中，抗增生药物为雷帕霉素。可以应用多种技术将胶原片吸附到 PTFE 片层上，例如物理缝合、粘合、锁环或化学键合。

- 5 然后，将这两个外壳复合物卷成管状或其它几何变体。然后复合装置或外套经适宜修整，以便其可应用于预期的位置上：动脉、静脉、移植吻合位等，然后 PTFE 外套的自由边缘通过粘合、缝合或锁环等相互连接。这就在血管结构或移植物外部稳定了整个装置。而后，药物渗透入血管或修复材料壁，而该药物在手术构建移植物后愈合反应的主要部分的壁
- 10 里抑制平滑肌细胞增生。

- 在血管或修复表面的外部放置胶原以后，经过一段时间，人体将胶原吸收，留下完整的外部支撑物骨架或结构。本领域所属技术人员将会理解，被选择来吸收药物的蛋白层可为人体再吸收，这是本发明一个可选择的优选例子。不会被吸收的 PTFE 倾向于保持可再吸收的蛋白层在适当的位置，使药物有足够长的时间渗透入血管、移植物或修复材料壁中。
- 15 PTFE 除了能支撑物释放到内膜或基质材料里的药物外，它还具有其它外层潜在优点。尽管药物预期的效果是药物抑制平滑肌细胞增生反应的能力，但正是这种增生反应形成了良好（坚固）的手术疤痕。手术吻合位置的微小疤痕可潜在地导致移植物的断裂或动脉瘤的生成。外部 PTFE
- 20 骨架作为附加的加固层，并可预防性的治疗与微小疤痕、移植物断裂和/或动脉瘤的生成有关的问题。外部的 PTFE 层可使药物与血管或移植物壁的外层面并排贴近，从而限制了其向周围组织和皮肤的扩散。本发明也意图使修复装置外部骨架或支撑物层本身可生物降解。因此，与可再吸收内部药物释放的胶原层相结合的可再吸收的外部骨架物（这两层具有
- 25 相同或不同的降解和吸收速率）将使得血管或移植物结构产生愈合，而不必在愈合后遗留外来物质。本领域所属技术人员根据以上公开可以理解的是，众多的其它此类材料也适用于本发明。例如，Dacron[®]聚酯也是一种适宜作为外部支撑物结构的材料。

- 本发明的进一步目的是提供一种能自固定在血管壁外表面的装置。
- 30 如果在最后阶段，胶原和光学活性物质结合在一起，例如从 Sigma

Chemical, St Louis, MO, USA 得来的 FITS(荧光素异硫氰酸盐)或 Bengal Rose, 那么胶原装置就能够对血管壁产生更好的粘性。紫外线对装置产生的荧光放射将会激活这些光学活性物质, 进而提高粘合力。纤维蛋白密闭剂和乙酰化胶原也被发现能提高胶原基质材料对血管壁外部的粘合力。

本发明的另一个实施方案是一种抑制血液透析中血管通路移植物狭窄的方法,该方法包括在移植物或血管结构和/或吻合处放置修复装置(如上所述的),然后在预期位置(例如缝合处)将修复装置固定。

图 1A、图 1B、图 2A 和图 2B 表明本发明的优选实施方案。图 1A 表明本发明的矩形基质材料片层 2，其中分配或分布有制剂 3（如斑点所示）。图 1B 表明的是图 1A 所示的本发明的另一个实施方案，其中在含药基质材料 3 中形成有洞 4。本领域所属技术人员应该理解，洞 4 的直径可被调节以使其适应在其内通过的任何血管或移植物结构的外直径。在一个实施方案中，洞 4 的直径为 6 毫米。

图 2A 和图 2B 表明本发明的另一个实施方案，其中使用了外支撑物或外骨架物或外装置 5。当基质材料片层 2 被卷成或盘绕成圆柱状时，外支撑物 5 在基质材料片层 2 的外部。外骨架装置如聚四氟乙烯（PTFE）和涤纶片层是在目前可想到的支撑材料范围中。本领域所属技术人员也将会想到使用其它此类外部骨架支撑装置。图 2B 表明具有洞 4（其直径是变化的）的本发明的实施方案。

图 3A、图 3B 和图 3C 表明本发明使用联锁设计的实施方案，其中矩形制剂-释放片层或基质材料的一边与邻近的另一边联锁。更具体地讲，图 3A 表明含有置于或分散在矩形基质材料 2 中的制剂 3（如图中的斑点所示）的矩形基质材料 2。图 3A 中也表明在含制剂基质材料的边缘 7 附近设有一系列 V 型的槽 6。在对侧边缘 8 与槽 6 相配合的是一系列突出部 9。该突出部 9 呈箭头状。然而，突出部 9 与槽 6 的其它组合方式也在本发明的预期范围内。因此本发明的外套实施例的装配包括：将边缘 8 卷向边缘 7（如图 3B 所示），然后把突出部 9 插入到槽 6 中。图 3C 所示的突出部 9 从管状结构的内侧插入到槽 6 中去，意味着突出部 9 上的尖 10 从组织的内侧穿到了外侧。如图所示，突出部 9 的底边 11 与 V 型槽 6

配合以将平面结构固定成血管尺寸的圆柱形外套 12。血管外套 12 还限定了管腔 14。管腔 14 与血管尺寸相同，以使外套 12 的内表面可与血管结构的外表面粘合接触。在这种方式中，在本发明使用的血管结构上和外围处配置有药物或制剂-释放血管尺寸的外套。

5 图 4A 和图 4B 表明本发明的第二个联锁实施方案。在这个实施方案中，使用了本发明的带状物。制剂-释放外套 16 包括拉长的药物或制剂-释放基质材料 17（图未示，单独或与外部支撑装置结合应用）。在基质材料 17 相对的两端形成两个锁 18。与锁 18 配合的是其内可插入锁 18 的窗口 19，以致于外套 16 就配置成靠近其作用的血管结构外部。如图 4B 所示，锁 18 可以从内侧向外侧插入到窗口 19 中。在可选择的实施方案中，锁 18 可以从外套结构的外侧向内侧插入窗口 19 中。图 4A 还表明典型的分流器开口 20，其包括两个分流连接翼或片 21。

图 5 表明本发明的另一个实施方案，其中使用了外部线支撑或框架装置。外部的线框架 20 缠绕在本发明的优选实施方案的装置上，即设在血管 24 周围的 PTFE 和经药物涂覆的胶原基质材料 22 上。

图 6-13 表明各种动脉-静脉瘘管。这几幅图展示的是，本发明的药物释放外套或基质材料 26 被植入、包裹或放置在各种瘘管 32 周围。在每幅图中，静脉结构为 28，动脉结构为 30。箭头 34 表示血流方向。

图 10-13 表明本发明另一个实施方案，其中有本发明使用的移植物，例如 PTFE 移植物 36。如图 13 所示，移植物 36 本身可以包括带有本发明的药物或制剂 36（如图中的斑点所示）的基质材料。

本发明外套的进一步应用包括使用内部吸收有药物的蛋白层作为药源或药物储库。在这个应用中，被选药物可以定时得到补充，例如通过针刺外套，然后输送额外的药物，或者是在外套内建立一个药物储库，使药物能够从储库中逐渐释放。

实施例

下列实施例旨在阐明为输送抗增生药物或其它的治疗剂而制备基质的装置及方法。实施例旨在阐明本发明，而不具有限制意义。

30 实施例 1：不同抗增生制剂的抑制作用

的基质表面上。与 0.14M 的氯化钠溶液孵化后，剩余的雷帕霉素用二甲基亚砷(DMSO)提取，产率用荧光光度法测定，数据见表 2。

基质	雷帕霉素容量 (g/cm ²)
胶原	124.5±14.3
胶原-海藻酸盐	131.1±12.3
壳聚糖	78.7±8.9
纤维蛋白	145.8±12.7

表 2: 基质对雷帕霉素的容量

如所预期的那样，发现蛋白基质的容量比壳聚糖基质要高，纤维蛋白或胶原作为输送抗增生药物的治疗基质的有效性取决于基质中特定基

5 质组合物或添加成分或所需物的寿命。

实施例 3: 脂质体输送系统

脂质体代表了一种形式的药物输送系统，它能控制生物活性制剂的

10 释放。其被用于药制剂中，尤其是用于水不溶性药物中，雷帕霉素就是一个典型的例子。脂质体俘获显示其对给药后的药物动力学和组织分布都有相当大的影响。测定的制剂包括非离子脂质体制剂，非离子脂质体制剂或者由二月桂酸甘油酯 (Sigma Chemicals, St Louis MO)、胆固醇

15 (Sigma Chemicals, St Louis MO)、以及硬酯酰-10-聚氧烯烃 (Sigma Chemicals, St Louis MO) 以 56: 12: 32 的重量比组成 (制剂 1)，或者由含有异丙醇肉蔻酸酯 (Sigma Chemicals, St Louis MO) 和矿物油 (Sigma Chemicals, St Louis MO) 以非离子浓度为 40% 水醇的水包油脂质体乳液组成 (制剂 2)。雷帕霉素以 250 g/ml 的浓度溶解在二甲基亚砷或异丙醇

20 中并包裹在每一种制剂中，生成的脂质体用于预制胶原片层的表面以形成雷帕霉素的最高表面密度。样本在 37°C 下用 0.066M 的磷酸缓冲液 (pH 为 7.4) 洗涤 24 小时。为了比较基质的容量，使用载有荧光雷帕霉素衍生物的脂质体，荧光雷帕霉素衍生物被置于面积为 1.88 cm² 的盘中。与 0.14M 的氯化钠溶液孵化后，含有剩余雷帕霉素的基质用二甲基亚砷 (DMSO) 提取，测定荧光产率。

脂质体类型	雷帕霉素结合容量 (g/cm ²)
非离子胆固醇脂质体 (制剂 1)	117.4±10.9
非离子水包油乳液 (制剂 2)	89.6±7.5
饱和胶原基质 (DMSO)	124.5±14.3

原来制备雷帕霉素-胶原基质组合物。三种不同浓度分别标记为高、中、低，浓度分别为 $120\pm5\text{ g/cm}^2$ 、 $60\pm4\text{ g/cm}^2$ 、 $30\pm3\text{ g/cm}^2$ 。这些基质都不发生破碎，也不产生雷帕霉素分布不均匀的现象。不同的密度能调节药物的释放动力学。

5

实施例 5: 制备结合有抗增生药物的植入式纤维蛋白基质装置

一般来说，为了得到载有抗增生制剂的纤维蛋白基质装置，需要按下述方法制备水溶性纤维蛋白原和凝血酶溶液。商用纤维蛋白原可从诸如 Sigma, American Red Cros 购得，或是通过公知的技术从血浆制备。可选择地，由重组方法制备的纤维蛋白原也适用。商用活性凝血酶可从 Sigma 或 Johnson and Johnson 的凝血酶、当前美国专利、凝血酶原取得。为了得到用于制备基质的纤维蛋白原和凝血酶溶液，必要成分被计量、称量并溶解在约 900ml 的去离子水中。表 4 和表 5 分别公开了制备预制基质的纤维蛋白原和凝血酶溶液的优选成分。

10

表 4 中的甘油作为增塑剂。其它的增塑剂也适用于本发明。TRIS 缓冲液用于调节 pH 值。适宜的可选择的 TRIS 缓冲液包括 HEPES、Tricine 和 pKa 在 6.8 至 8.3 之间的其它缓冲液。Triton X-100 是非离子去垢剂和稳定剂，也可以用其它去垢剂和稳定剂代替。辛酸可用具有防变性功能的其它制剂代替，例如褐藻酸。

15

成分	成分范围 克/升	优选成分 克/升
纤维蛋白原	50-120	76
甘油	20-80	40.5
TRIS 缓冲液	3-25	12.1
辛酸	10-35	18.7
Triton X-100	2-8	5.4
肝素	0.5-6	2.38

20

表 4: 纤维蛋白原溶液成分

成分	成分范围 (克/升)	优选成分 (克/升)
凝血酶	5,000-10,000 单元	8,000 单元
白蛋白	1-100	50
因子 XIII	1,000-5,000 单元	2,500 单元
CaCl ₂	50-250 mg/升	123 mg/升

曲格列酮	3-24	8
------	------	---

表 5: 凝血酶成分

纤维蛋白原转变成纤维蛋白是制备基质最重要的反应，因为它控制着基质的材料性质，例如柔韧性、孔尺寸以及纤维质量密度。这些特性决定了其它分子在基质内扩散的难易程度，以及在基质被吸收前维持其完整性态的时间长短。

在表 5 中，白蛋白是凝血酶的稳定剂。凝血酶控制着纤维蛋白基质的形成速率。优选存在因子 XIII，但其并不是必需的。因子 XIII 使纤维蛋白共价交联，使得基质更加稳定。钙离子是激活凝血酶的必须物质。曲格列酮（Sankyo, Japan）是噻唑烷酮衍生物，它能减少血管壁胶原的聚集。（Yao L, Mizushige K, Murakami K 等，Troglitazone decreases collagen accumulation in prediabetic stage of a type II diabetic rat model. *Heart* 2000: 84:209-210)

优选地，在加入下一组分前先将每一种组分完全溶解。如果需要，在最后一种组分溶解后，调节 pH 值到 7.0 - 7.4，并且用水将溶液体积调至 1 升。然后将溶液脱气。两种溶液都通过泵分散，经混合室到达非粘连的、优选疏水表面上以形成约为 2mm 厚的膜。然后在约 30 毫巴的压力下，将该膜在约 20°C 到 60°C 的温度范围内干燥约 3 到 6 小时。膜中的水分残留量约为总湿重的 10%，优选低于 3%。

将干燥的固体雷帕霉素加入到该表面上，以形成密度范围为 100 到 500 g/cm² 的膜。第二层纤维蛋白基质在这一层的表面上形成，使药物夹在这两层纤维蛋白之间。

在本发明的一个实施方案中，还可加入（和/或）抗增生/抗再狭窄制剂如雷帕霉素或泰素、抗排异反应药物如雷帕霉素或他克莫司、抗炎药物和/或抗反义寡核苷酸，用来进抗再狭窄作用。加入的这些固体物质作为对上述夹芯纤维蛋白-雷帕霉素复合物的补充。

实施例 6: 制备交联壳聚糖基质的方法

为了提高壳聚糖基质结合抗增生药物的容量，使用交联纤维蛋白。将 50 ml 浓度为 10%到 25%（优选 12%）的冷冻壳聚糖悬浮液，轻缓地与 5 到 25ml 的丙烯酸脱水氯化物混合 30 分钟，以乙酰化该聚合物。之

后, 加入浓度为 250 g/ml 的雷帕霉素的 DMSO 溶液, 强力混合, 然后倒到壳聚糖基质的表面以发生自发交联形成共轭雷帕霉素。由于壳聚糖的多微孔结构, 此方法可将基质的结合容量从 15% 提高到 45%。

5 实施例 7: 通过分散、固定和固定-分散法将雷帕霉素结合到胶原基质中

除了浸润技术以外, 雷帕霉素还可以通过分散法、固定法和固定-分散法这三种不同的方法与胶原基质结合。

I) 分散法: 通过非交联干燥的、高度纯化的、从 Elastin Product Co., Inc. (Owensville, MO) 得到的冻干的牛胶原制备水不溶性胶原的水性浆料。将这种胶原和增溶缓冲液冷却到 2-8°C, 优选 4°C, 然后强力混合以
10 制备含有 10-21% (优选 12%) 胶原蛋白质的胶原浆料。该浆料含有 9% 的增塑剂、15% 的甘油、浓度为 250g/ml 的雷帕霉素 DMSO 溶液以及水。该溶液的粘度是 50,000cps。与雷帕霉素混合后, 立即将 8% 的戊二醛加入到浆料中 (每升浆料加 100-350ml)。水性浆料必须是均匀的并且经过
15 脱气, 调节 pH 为 6.0-7.1。将溶液不断强力混合, 然后通过泵分散于非粘性表面上, 以形成约为 2mm 厚的膜。所有的过程均在 4°C 下进行。然后将膜在接近 45°C、15 毛的压力条件下干燥约 3-7 小时, 直至水份残留量低于总重的约 10%。将药物溶液的使用和干燥步骤重复进行三次。

II) 固定法: 用来自于 Elastin Product Co. 的相同胶原进行制备。冷冻
20 体积为 12% 的胶原浆料, 并通过抗增生药物的酯化作用与雷帕霉素结合。酯化作用是在 2-4°C 下与 0.9M 的 N-羟基琥珀酰亚胺 (Pierce Biochemical, Rockford, IL) 在 0.9M 的 N-二环己基碳化二亚胺 (Pierce Biochemical, Rockford, IL) 的存在下持续 2 天完成的。共轭物是通过在搅拌的胶原悬浮液表面, 滴定雷帕霉素的活性 N-羟基琥珀酰亚胺酯溶于 DMSO 的溶液
25 而制备的, 反应的 pH 保持在 7.0 到 8.5 之间, 优选 7.8。干燥后, 含有共轭的雷帕霉素的膜用 pH 为 7.4 含有 0.02M 碳酸氢钠的 0.15M NaCl 洗涤。HPLC 测定显示基质中没有游离的雷帕霉素。雷帕霉素酯与氨基酸残基的氨基或羟基反应, 与胶原形成共价连接。如此固定后, 雷帕霉素随着基质在体内或体外降解-溶蚀而被释放。Nakano 等人通过对恒河猴的六个月
30 的自然代谢过程, 对胶原 (SM-10500) 的降解和再吸收进行研究, 参照:

Nakano M, Nakayama Y, Kohda A 等: Acute subcutaneous toxicity of SM-10500 in rats. *Kisoto Rinsho(Clinical Report)*1995; 29: 1675-1699.

为了研究雷帕霉素从基质中释放的速率,将样本在 37°C 下用 0.066M 磷酸缓冲液 (pH 为 7.4) 洗涤 24 小时, 然后切割成面积为 1.88 cm² 的圆
5 盘状, 并在 pH 为 7.0 时放入含有 0.14M NaCl、0.05 M Tris 缓冲液、0.5% 白蛋白、0.1mg/ml 胶原酶的 24 孔培养基板中。胶原酶的加入能提高胶原基质的溶蚀, 并且有利于雷帕霉素的释放。在不同的时间间隔从孔中收集等份试样。

同样制备分散和共轭形式的组合物。在所有形式的组合物中, 雷帕
10 霉素的含量均为 5.0g/ cm²。将样本放入孔中, 加入 1 ml 含有血清的洗脱介质。每小时取等份试样。

雷帕霉素的含量根据 Ferron 等人所述的过程测定 (Ferron GM, Conway WD, and Jusko WJ. Lipophilic benzamide and anilide derivatives as high-performance liquid chromatography internal standard: application to
15 sirolimus (rapamycin) determination. *J Chromatorgr B Biomed Sci Appl* 1997; Dec703: 243-251)。这些测定方法是通过批测定进行的, 因此, 表观释放速率 0 ml/min 流速。结果列于表 6, 在图 14 中有图示说明, 抗增生药物的浓度单位是 g/ml。

这些数据表明嵌入药物的不同方式和药物不同的溶解性有截然不同的
20 的动力学性质。与可溶性四环素相比而言, 胶原基质用游离碱饱和后, 在短时间内就出现了释放峰值, 而水溶性差的雷帕霉素峰值要延迟几小时出现。体外实验已经表明, 用可溶性抗生素, 例如庆大霉素、cefotaxin、四环素或氟林可霉素, 饱和的胶原能持续 4 天以有效浓度输送这些抗生素。[Wachol-Drewek Z, Pfeifer M, Scholl E. "Comparative investigation of
25 drug delivery of collagen implants saturated in antibiotic solutions and sponge containing gentamicin." (*Biomaterials* 1996; 17: 1733-1738)]。

时间 (小时)	四环素饱和的胶原	雷帕霉素饱和的胶原	分散于整个胶原的雷帕霉素	与雷帕霉素共轭的胶原	分散和共轭形式的组合物
1	0.06	0.01	0.01	0	0.01
2	0.4	0.05	0.03	0	0.02
3	0.96	0.09	0.06	0.01	0.07
4	0.54	0.15	0.08	0.02	0.09

5	0.15	0.19	0.12	0.05	0.17
6	0.08	0.28	0.18	0.07	0.26
7	0.02	0.57	0.19	0.11	0.31
8	0.01	0.44	0.29	0.13	0.32
9	0.01	0.24	0.41	0.19	0.34
10	-	0.20	0.62	0.27	0.41
11	-	0.19	0.61	0.31	0.78
12	-	0.18	0.40	0.42	0.76
13	-	0.15	0.32	0.45	0.79
14	-	0.02	0.16	0.32	0.45
24	-		0.11	0.24	0.42
溶解基质的 总量	0	0.003	0.23	0.53	0.39

表 6: 用四环素和雷帕霉素饱和的胶原的
释放速率, 雷帕霉素用四种不同的方法与胶原基质结合。

其它的体内实验也表明用庆大霉素饱和的胶原以浓度 3g/g 植入到肌肉组织中, 能够持续 28 天将抗生素输送到血液中。然而, 浓度低于最佳值。(Mehta S, Humphrey JS, Schenkman DI 等“Gentamycin distribution from a collagen carrier.” *J Orthop. Res.*, 1996; 14: 749-754)。理论上说, 可知血管周空间内胶原酶浓度低, 血管周流速也低(每天仅几毫升), 用雷帕霉素饱和的基质材料或许能产生体内输送动力学, 这将会维持抗增生药有效的局部浓度长达几星期的时间, 以此预防或对抗平滑肌细胞增生过程。培养基介质中平滑肌细胞的抑制浓度范围是 0.001 到 0.005g/ml。在体外会达到或超过这样的水平长达 3 周。此外, 分散在胶原基质中的雷帕霉素可以在一个月或更长的时间内表现出抗增生作用。最后, 共轭和结合形式的基质可以持续发挥治疗作用, 直至基质完全被溶蚀。

实施例 8: 在雷帕霉素-胶原基质中雷帕霉素的生物活性

评定雷帕霉素和胶原组合物最重要的参数是对平滑肌细胞 (SMC) 生长的抑制性。为了评价这个参数, 在对照组织培养基表面接种密度为 5,000 细胞/cm² 的 SMC, 然后检测基质 (见表 7)。细胞的生长曲线见图 15。

放线菌素 D 能从药物基质中快速释放, 短期内抑制细胞生长。移走介质中的可溶性放线菌素, 洗涤几次后介质或基质中不存在抗生素。结

果是细胞开始照常增生。由于雷帕霉素的缓慢逐渐释放,使得在整个观察期间均能产生抑制细胞生长的作用。

细胞数

在培养基中的天数	对照	胶原+放线菌素 D	胶原+雷帕霉素
0	5000	5000	5000
1	6430 ρ 20.4	5230 ρ 16.8	4800 ρ 9.5
2	10240 ρ 27.1	7350 ρ 19.5	5040 ρ 11.2
3	16340 ρ 30.12	9400 ρ 13.2	6230 ρ 13.4
4	27100 ρ 25.4	14280 ρ 17.6	7400 ρ 15.1
5	38450 ρ 22.6	23540 ρ 17.8	8000 ρ 17.8
6	40000 ρ 20.7	29300 ρ 19.4	8550 ρ 13.9
7	40100 ρ 20.5	32090 ρ 32.1	8500 ρ 14.4

表 7: 对用放线菌素 D 和雷帕霉素

5 饱和的胶原基质对平滑肌细胞生长抑制的比较

实施例 9

两种不同类型的基质、胶原和纤维蛋白与抗增生药物（单独或合用）结合，以不同比率与维生素 K 一起加入到细胞培养基媒介中。细胞接种浓度相同，在第 5 天通过 Alamar blue 实验检测活细胞数量。数据见表 8。

基质和媒介的比率	胶原加雷帕毒素	胶原加雷帕毒素加紫杉酚	胶原加雷帕毒素加维生素 K	纤维蛋白加雷帕毒素	纤维蛋白加雷帕毒素加泰素
1:400	5	4	8	3	2
1:200	25	27	34	21	19
1:100	54	50	77	56	55
1:50	73	76	99	79	78
1:25	88	88	99	79	84
1:12.5	95	99	99	98	96
1:6.25	95	99	99	100	98

表 8: 细胞生长抑制率 (%)

实施例 10: 雷帕霉素和肝素与胶原基质的组合物的抗增生效果

与基质结合的不同组分表现出协同的抗增生效果。应用分散态的雷帕霉素和溶解或固定的肝素组合物。为了固定肝素,将5ml浓度为1mg/ml到10mg/ml(优选5mg/ml)的冷冻肝素溶液与5到20ml(优选11.4ml)丙烯酸脱水氯化物,以约1 l/min(优选2.5 l/min)的速度混合。加入后,将

混合物在 4-8°C 下搅拌 30min。肝素化胶原用 pH 为 7.4 磷酸钠缓冲盐水充分洗涤。用 Eosin A 显色试验检测固定在基质中的肝素浓度。应用这种方法,能将含量为 0.01 g/cm²到 0.1 g/cm²之间的肝素共价连接到基质上。

如果以 1: 100 的比例将悬浮液加入到介质中,那么在培养基中与雷帕霉素结合的这种制剂将会对 SMC 生长起抑制作用,而单独形式的制剂起较小的作用;单独的肝素比例为 1: 25,分散态雷帕霉素比率 1: 65。每种药物都能通过不同的机理抑制再狭窄的发生,因此当结合应用时,可以合理的预见到协同作用。肝素也能用于和抗增生药物结合的饱和基质中。

10

实施例 11

持续的局部输送地塞米松和雷帕霉素(或其它抗增生制剂)的组合物可同时抑制再狭窄和炎症反应。制备 20% (重量/重量)的胶原浆料,其中加入 2% (重量/重量)地塞米松悬浮液。喷射此混合物到塑料表面上以形成膜状。最终膜的厚度范围在 1.92 到 2.14mm (平均 2 mm) 内。此薄片是柔软的并且具有机械稳定性。从基质(胶原加雷帕霉素)上释放地塞米松的动力学特征在于体外系统。将直径 15mm 的薄片放入孔中,并浸在 2.5 ml 磷酸缓冲溶液中。在从 1 到 7 天的时间内,每等份洗脱缓冲液中地塞米松的浓度由分光光度法测定。地塞米松在片状制剂、干燥形式以及释放过程中的化学稳定性,通过 HPLC 测定。体外地塞米松的累积释放量如表 9 所示。

在最初的三天中,发生超过 50%的地塞米松释放,6 天后释放曲线将保持平稳。在这段期间地塞米松的含量达到最高值,以此预防严重的炎症反应,而且与雷帕霉素一起发挥协同作用以降低再狭窄。与地塞米松释放支架不同的是,血管周输送不会抑制内皮细胞的再生,而直接作用于纤维原细胞和平滑肌细胞。

地塞米松释放量 (微克)	时间 (天)
0	0
211 $\pm$ 23	1
489 $\pm$ 31	2
605 $\pm$ 42	3
672 $\pm$ 38	4
725 $\pm$ 21	5

733 p 18	6
745 p 13	7

表 9: 胶原基质中地塞米松的体外累积释放量

实施例 12

具有大孔和微孔的组合物能够提高装置的容量。将胶原和纤维蛋白
5 基质混合就能获得这样的组合物。此外，胶原良好的机械特性能可提高
纤维蛋白的稳定性。使用表 4 和表 5 中所公开的组分制备纤维蛋白-雷帕
霉素载体基质（雷帕霉素密度为 150 ug/cm²）。形成第一干燥纤维蛋白层
后，按照实施例 4 公开的方法形成第二胶原层，即雷帕霉素和肝素层（雷
帕霉素密度为 128 μg/cm²，肝素密度为 5000 U/cm²）。载药的胶原纤维蛋
10 白外套（厚度 2mm）呈管状结构，用高浓度的戊二醛（25%）达 1 分钟
以在外部形成交联。干燥后，制备如图 4 所示的螺旋型外套。这个外套
被平着缠绕十次，每次都形成一个螺旋。最终外套中雷帕霉素的容量为
143 μg/cm²。体外肝素释放能持续 7 天。

肝素的浓度由实例 10 记载的方法测定，每天补充稀释用缓冲液。数
15 据见表 10。

可知抑制 SMC 增生的有效肝素浓度是 100 u/ml。在这个实施例中，
肝素可在最少 4 天内显著抑制 SMC 的增生。此外，分散态肝素外套能防
止分流器内表面形成血栓，以及长时间的血管壁损伤。除此以外，水溶
性肝素的浓度可以提高到 20,000 单元/cm²，而不会改变基质的机械特性。
20 因此，抗平滑肌细胞增生作用与抗血栓作用可被延长。

时间（天）	肝素释放量（U/ml）
0	0
1	341
2	275
3	188
4	103
5	57
6	24
7	8

表 10: 结合有雷帕霉素和肝素的胶原基质中肝素的释放分布

实施例 13 和 14: 雷帕霉素、他克莫司和紫杉醇对人平滑肌细胞以及内皮

细胞的体外作用效果的比较

将人平滑肌细胞和内皮细胞（Clonetics, 美国）接种（100,000 个细胞）到 24 孔板中并过夜。两种类型的细胞均在 37°C、5%二氧化碳和 95%空气下，于 OPTI-MEM(Gibco, Long Island, NY)和 5%牛胎血清中生长和保存。将细胞分别与一定范围浓度的雷帕霉素（10-100nM）、紫杉醇（0.1-10mM）以及他克莫司（10-100 nM）接触。每种类型的细胞都将生长 24 小时，最后 4 小时加入 [³H]-胸苷。应用 ³H-胸苷吸收分析确定作为新 DNA 合成标志的细胞增生的数量。培养 72 小时后，将细胞用冷磷酸缓冲盐溶液（PBS）洗涤两次，然后在每个孔中加入 1ml 甲醇，将平板在 4°C 下保存 60 分钟，再用冷 PBS 洗涤一次，于每个孔中加入 500 微升 0.2M 的 NaOH，平板在 4°C 下保存 30 分钟。把各孔中的物质移入液闪瓶中，然后加入液体闪烁液，用液闪计数器定量放射活性，实验结果表示每分钟的液闪计数。

实验结果见表 11 和表 12，分别对应图 16 和图 17。雷帕霉素和紫杉醇可抑制人平滑肌细胞和内皮细胞（新 DNA 合成）的增生。他克莫司对人平滑肌细胞和少量内皮细胞中新 DNA 的合成表现出较佳的抑制作用。如果他克莫司被用于抑制平滑肌细胞增生，那么此不同作用将极为重要，而且能够被有利地开发。

	[³ H]-胸苷吸收分析平均值 (ρ SD)	p
未治疗 (对照)	17434 (1822)	
雷帕霉素	6498 (245)	0.01
他克莫司	11995 (1850)	0.05
紫杉醇	2421 (206)	0.001
紫杉醇	2527 (195)	0.001
紫杉醇	2710 (162)	0.001

表 11: 雷帕霉素、他克莫司和紫杉醇
(3 种剂量) 对人平滑肌细胞作用效果的比较

	[³ H]-胸苷吸收分析平均值 (ρ SD)	p
未治疗 (对照)	16342 (3039)	
雷帕霉素	5787 (1323)	0.01
他克莫司	16073 (3008)	ns
紫杉醇	2222 (228)	0.001

紫杉醇	2648 (248)	0.001
紫杉醇	3459 (272)	0.001

表 12: 雷帕霉素、他克莫司和紫杉醇
(3 种剂量) 对人内皮细胞作用效果的比较

动物研究

- 5
- 应用猪模型进行机理实验研究。实验共用 6 头猪，2 头用于对照，4 头用于实验。用 6mm PTFE 血管移植物将一侧颈动脉和对侧的颈静脉吻合，这就形成了与人血液透析通路回路构造相似的动静脉（AV）回路。与已知量的雷帕霉素（约 500 微克/cm²）结合的胶原外套绕在治疗组动物的 PTFE 血管移植物远端并位于邻近静脉吻合处。
- 10
- 30 天后进行血管造影，以检验血管和移植物的开放性。将动物无痛处死并分离相应部分。雷帕霉素对细胞周期进行的抑制效果被认为是通过诱导周期抑制剂实现的。因此，经雷帕霉素治疗的组织中 p21 的表达将会增多，而对照组中则没有增加。换言之，p21 的存在证实了观察到的效果是由雷帕霉素产生的。
- 15
- 取治疗组和非治疗组的组织，制备 RNA 并反转录为 cDNA，通过 PCR 技术放大管家基因、β-肌动蛋白和 p21。

结果

- 20
- 两只对照动物均出现了管腔道狭窄现象，这是静脉吻合处（见图 8A 和图 19A）的新内膜严重增生的结果。所有 4 只治疗动物的静脉和移植物处均呈现出明显更高的腔开放，并且新内膜出现最小限度的增生（见图 18B 和图 19B）。从雷帕霉素治疗组动物（图 20）的周吻合位置处能观察到静脉组织中 p21 mRNA 的表达，而对照组中则没有。这就证明了包含在外套基质中的雷帕霉素是降低/有效消除新内膜增生的原因（血管增生反应的表达），该外套是通过雷帕霉素诱导产生细胞增生抑制效果的有效媒介。
- 25

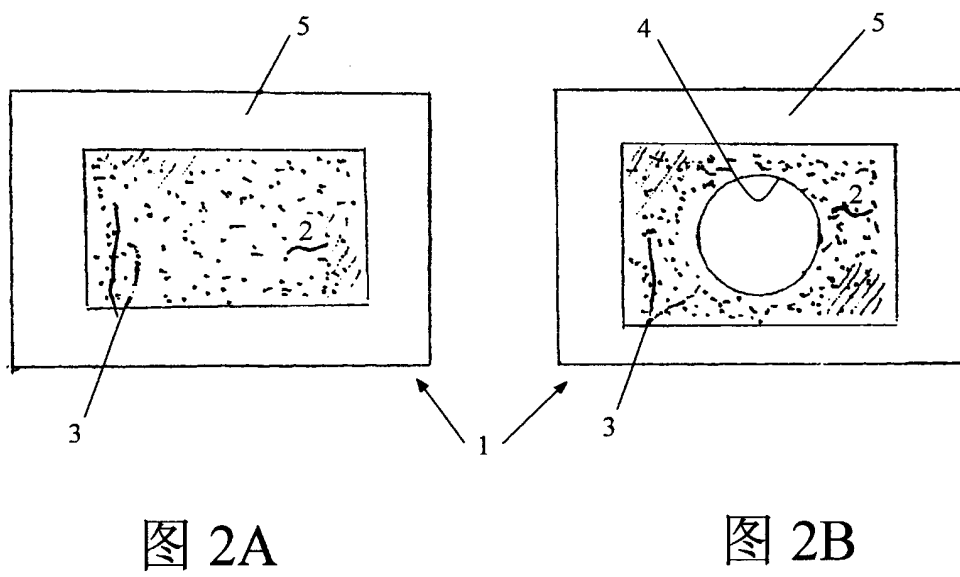
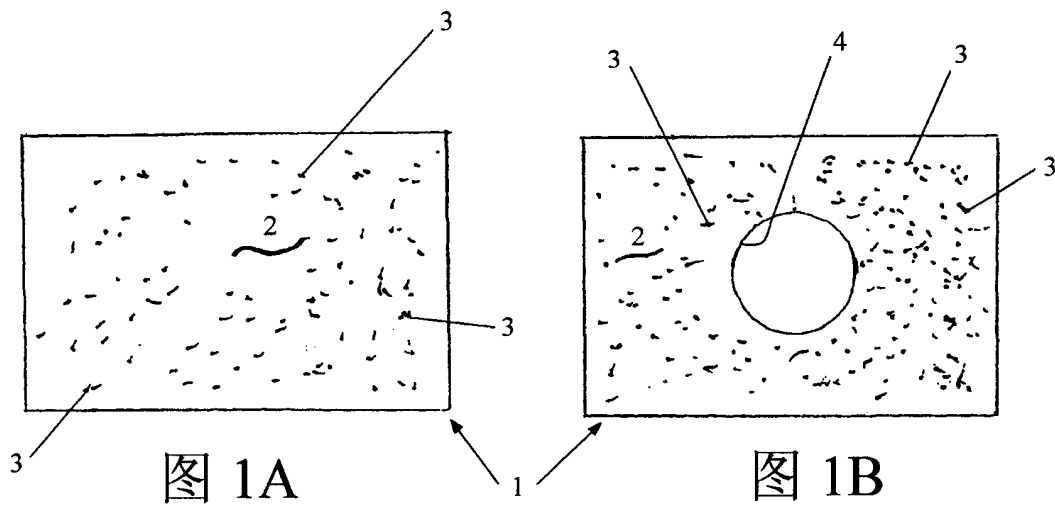


图 3

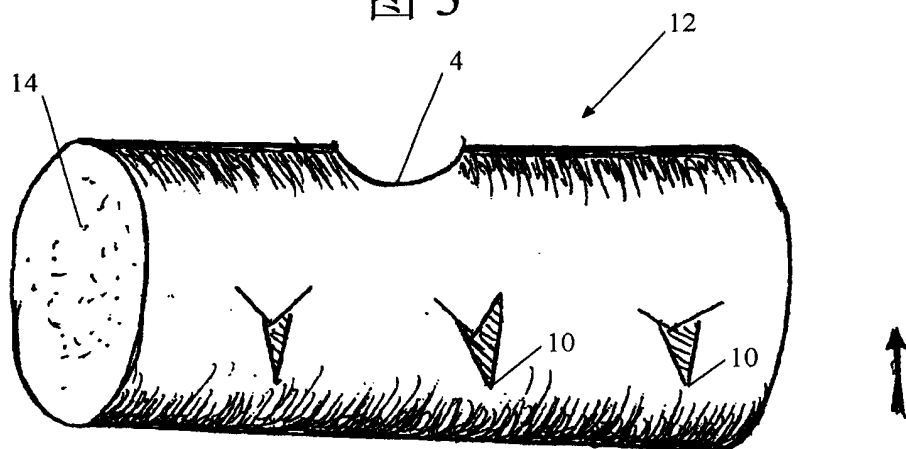


图 3C

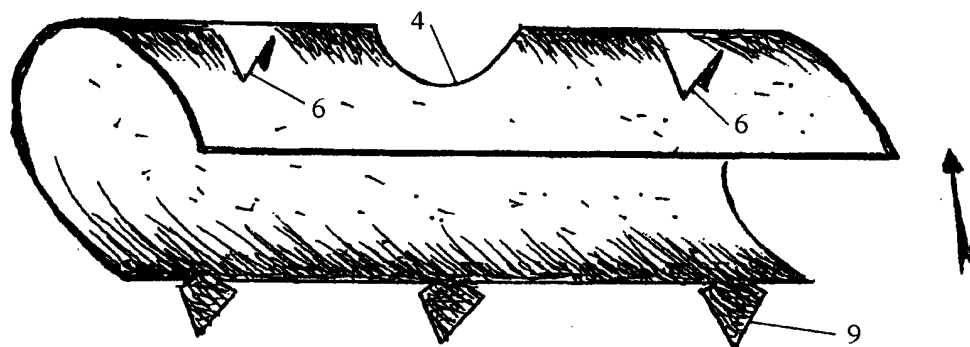


图 3B

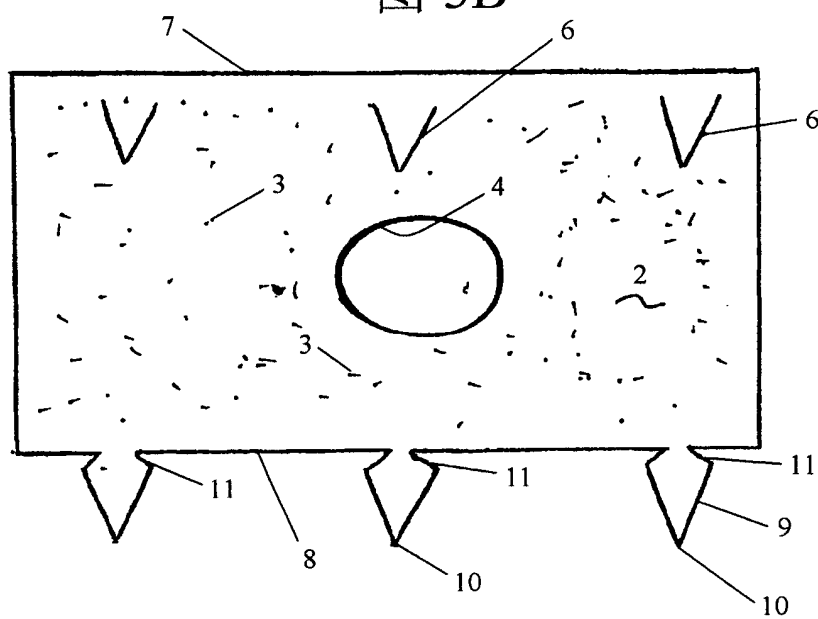


图 3A

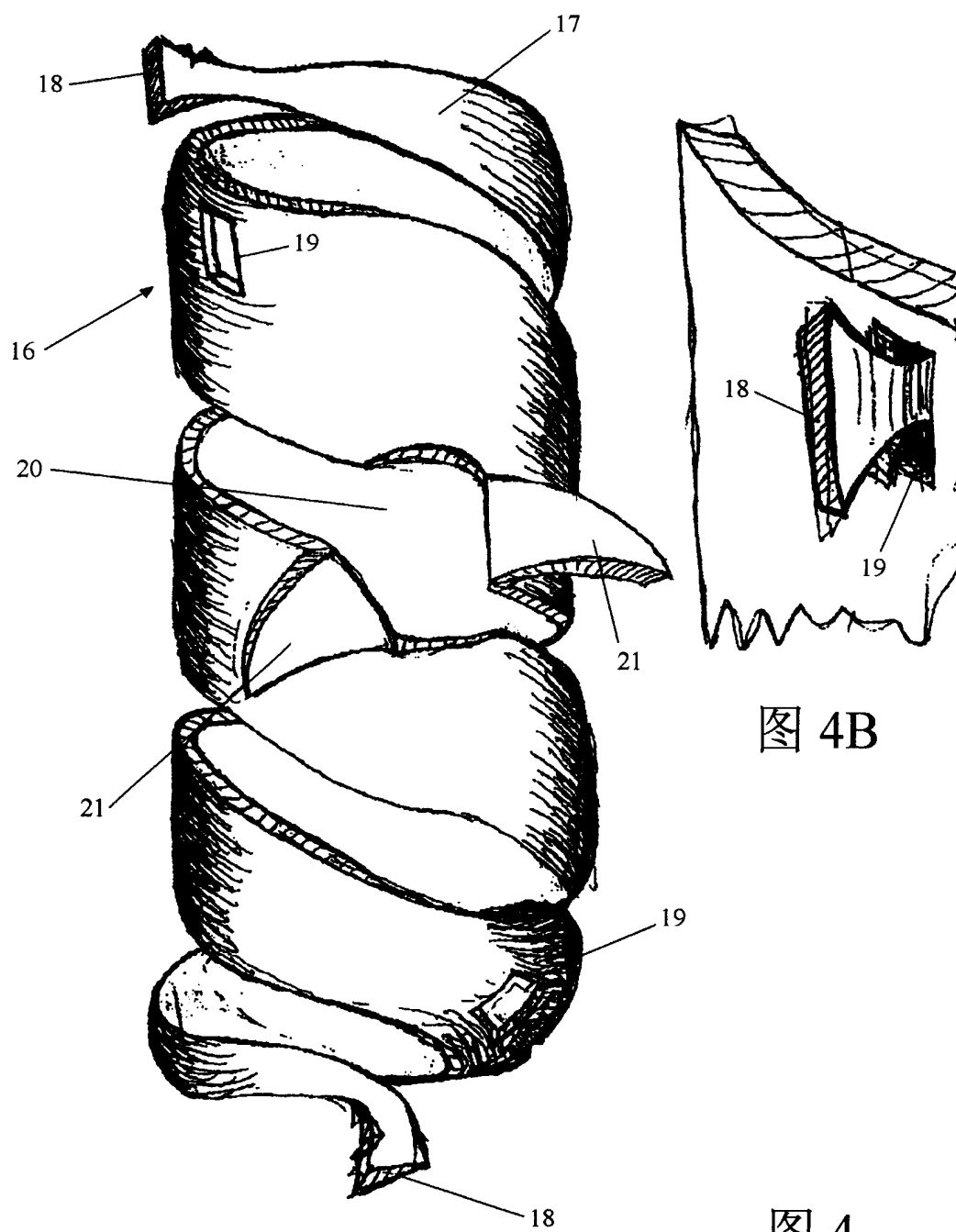


图 4B

图 4

图 4A

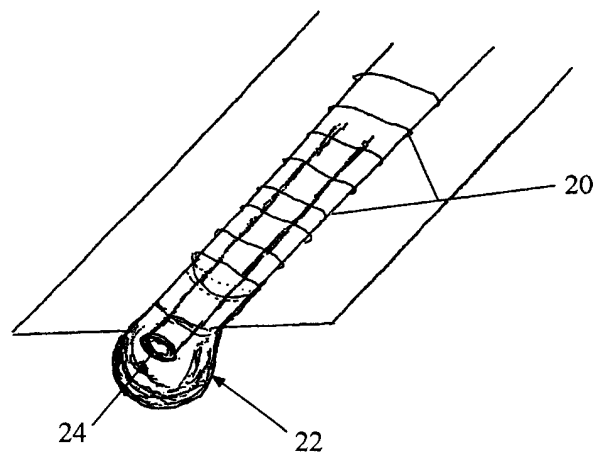


图 5

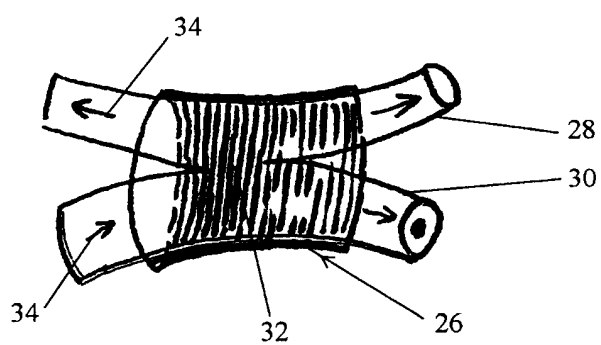


图 6

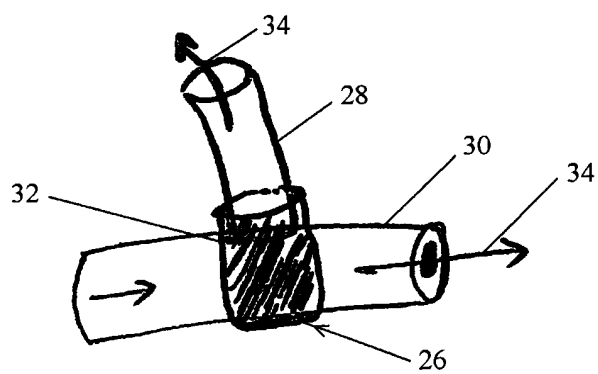


图 7

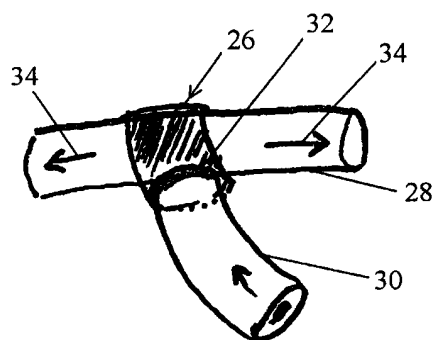


图 8

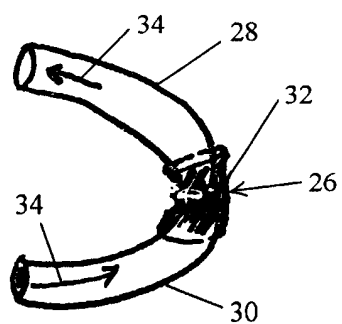


图 9

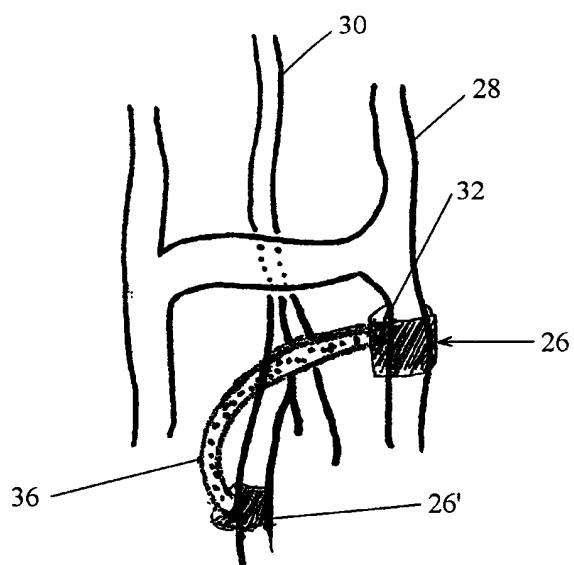


图 10

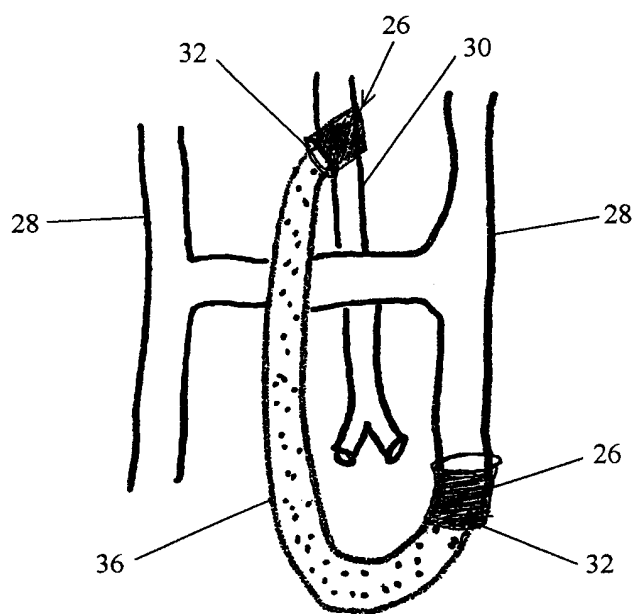


图 11

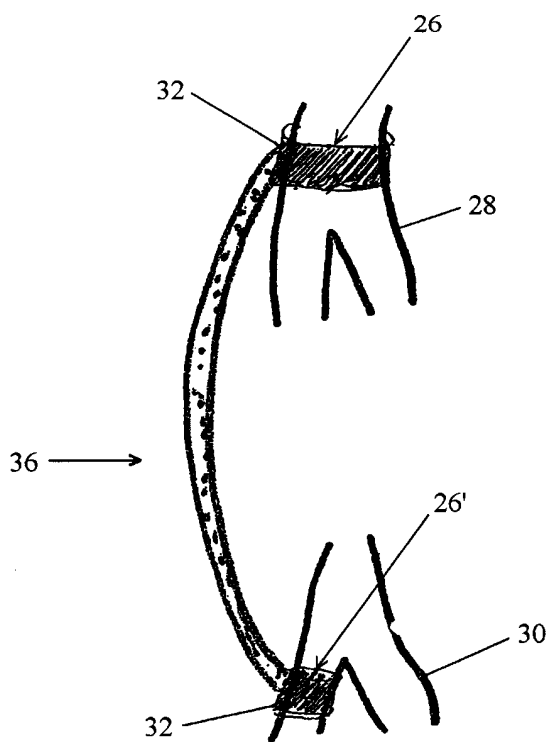


图 12

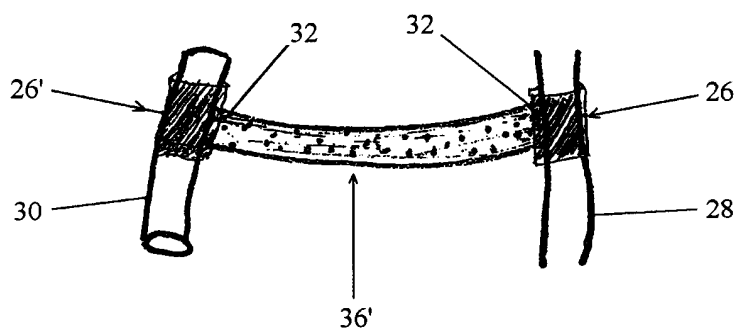


图 13

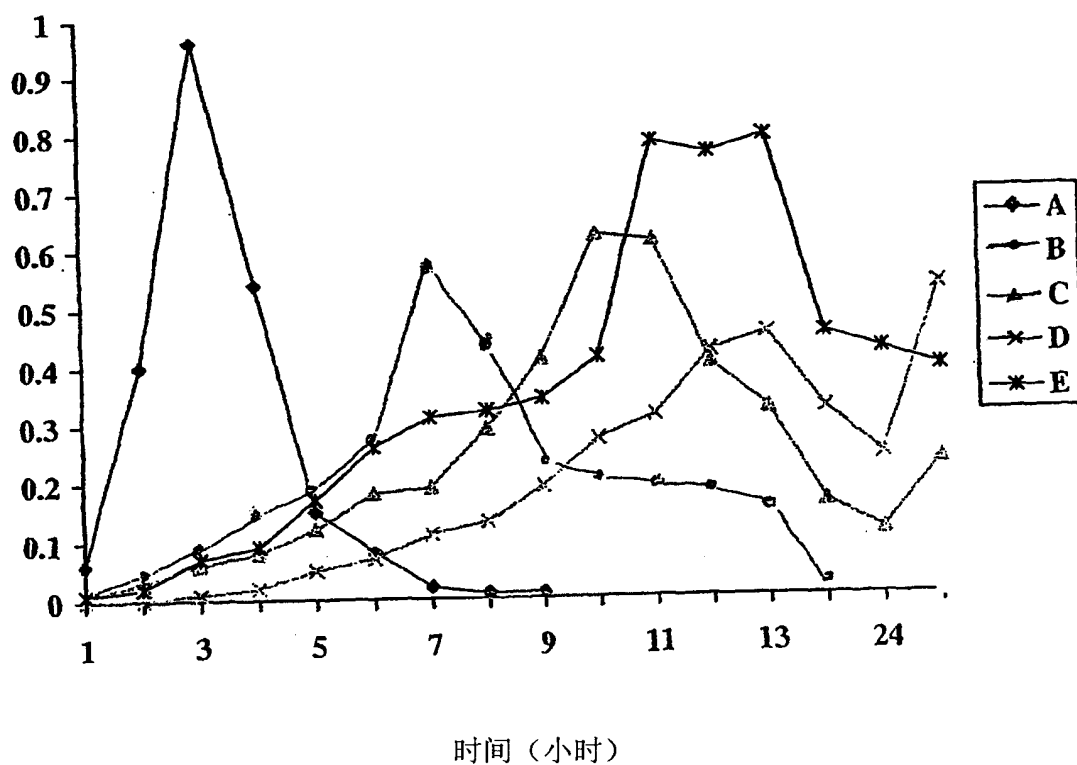


图14: 用四环素和雷帕霉素饱和的胶原的释放速率, 用四种不同的形式使雷帕霉素与胶原基质结合。Y-轴上的数字表明药物的浓度, 单位是微克/ml。

图例: A=四环素饱和的胶原

B=雷帕霉素饱和的胶原

C=分散于整个胶原的雷帕霉素

D=与雷帕霉素共轭的胶原

E=分散和共轭形式的雷帕霉素组合物

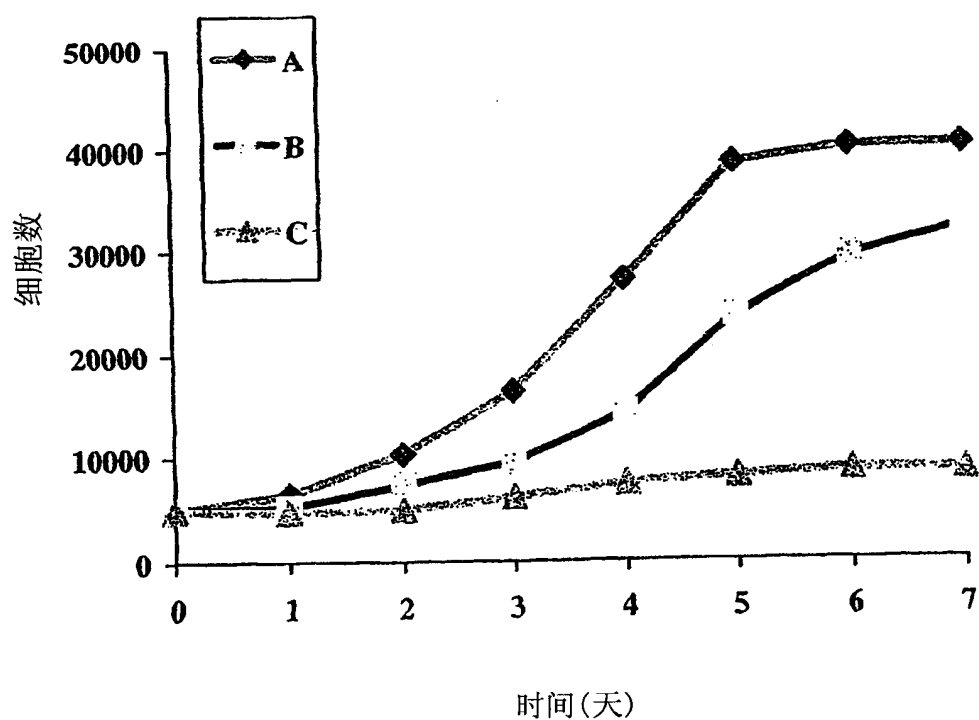


图15: 结合有不同抗增殖制剂的胶原基质对平滑基细胞生长抑制的比较。Y-轴上的数字表明细胞数。

图例: A=对照

B=胶原+放线菌素D

C=胶原+雷帕霉素

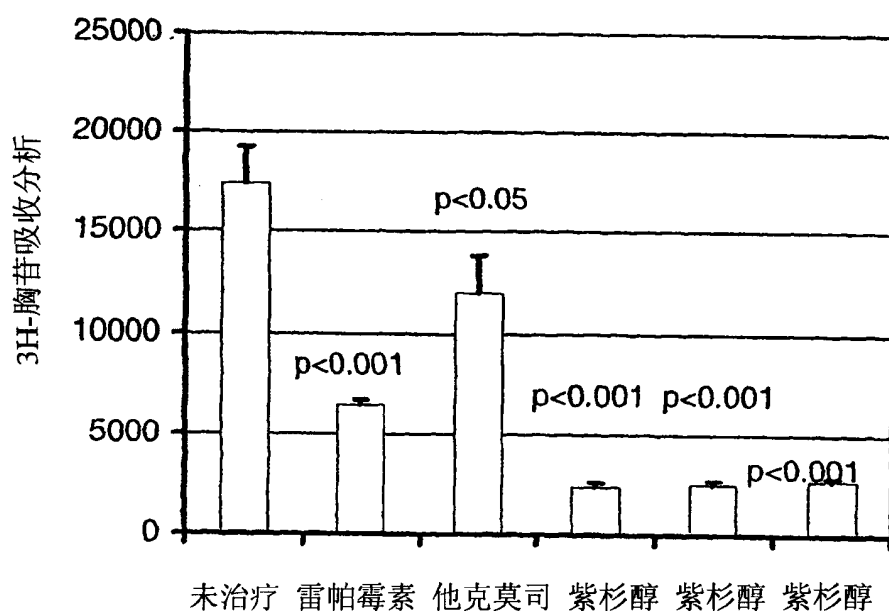


图16: 雷帕霉素、他克莫司和紫杉醇 (3种剂量) 对人平滑肌细胞作用效果的比较。

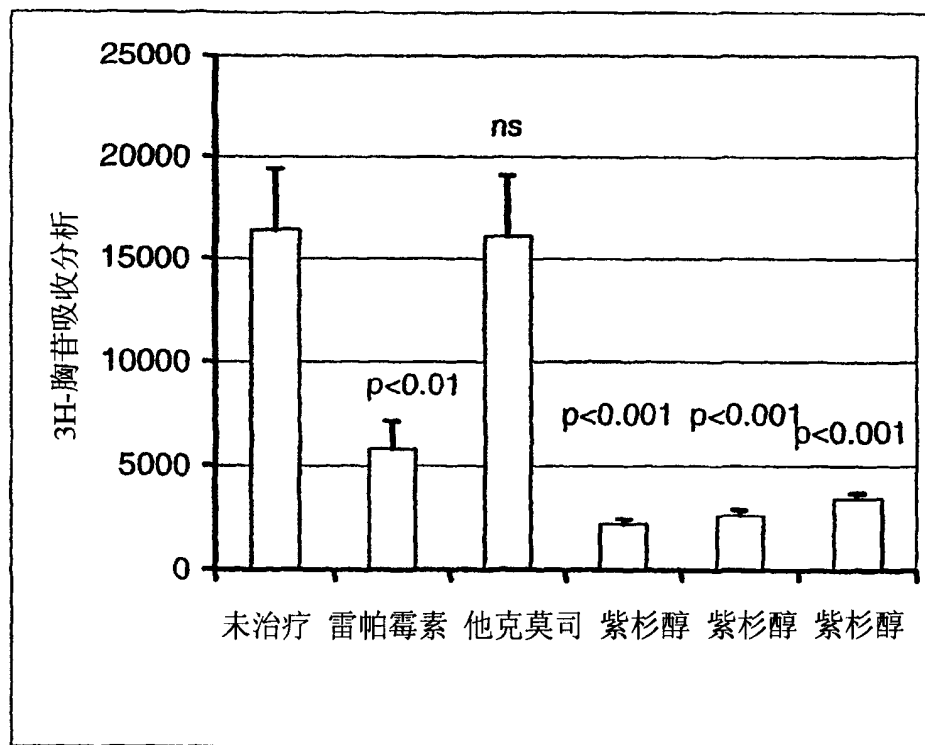
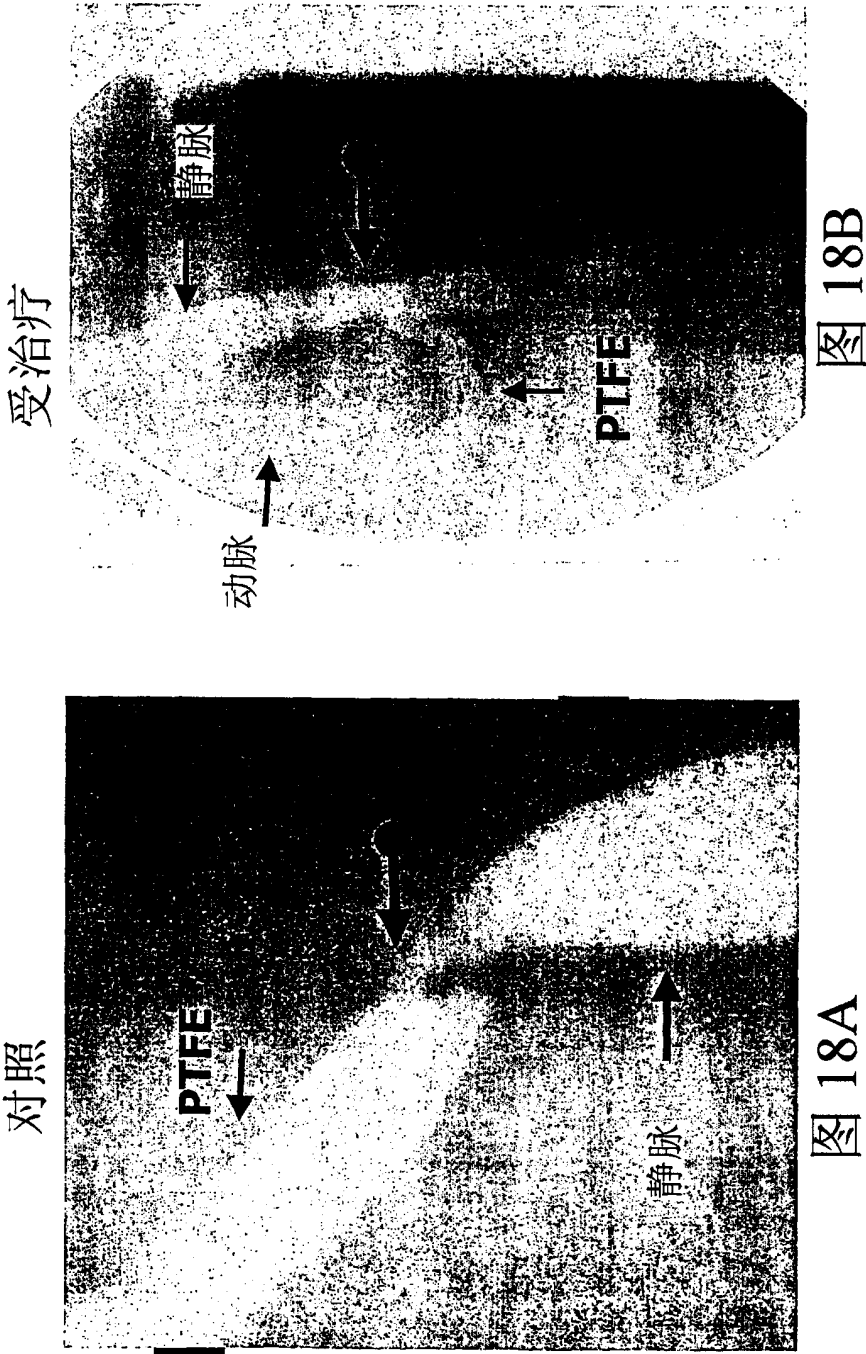
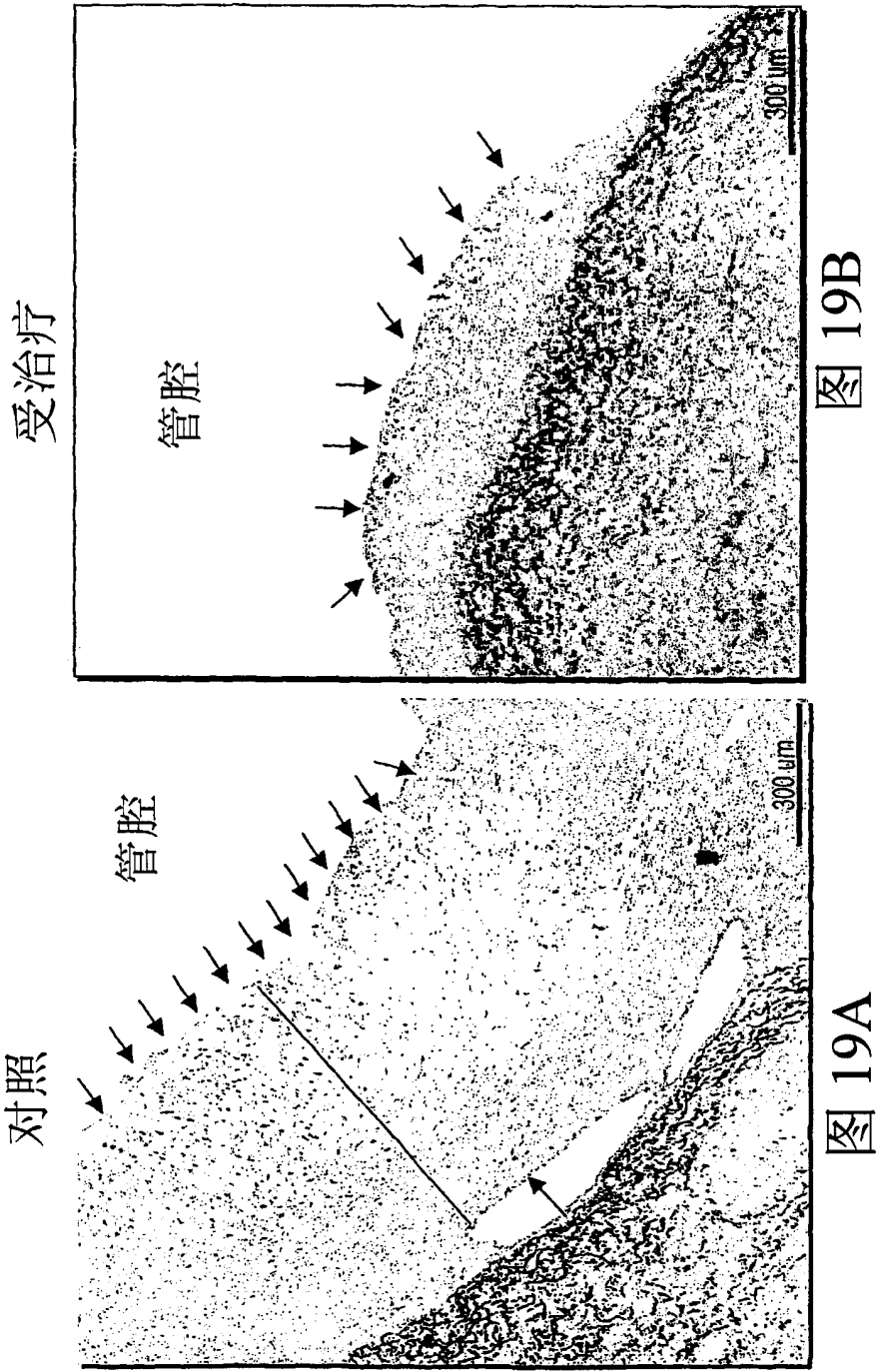


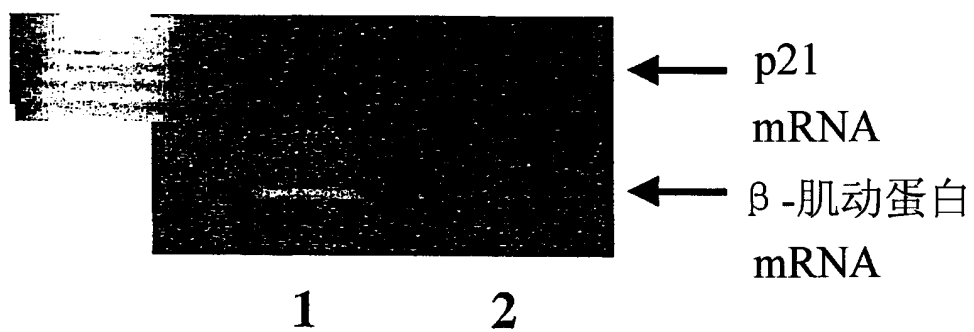
图17: 雷帕霉素、他克莫司和紫杉醇 (3种剂量) 对人内皮细胞作用效果的比较



尾部画圆的箭头表明吻合的位置



小箭头之间的区域表明新内膜的厚度



1=受治疗的雷帕霉素

2=未受治疗

图 20