

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
A61K 38/39 (2006.01)



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 99805220.5

[45] 授权公告日 2006年4月5日

[11] 授权公告号 CN 1248734C

[22] 申请日 1999.2.26 [21] 申请号 99805220.5  
[30] 优先权  
    [32] 1998.2.27 [33] DK [31] PA199800270  
    [32] 1998.4.13 [33] US [31] 60/081,551  
    [32] 1998.10.16 [33] DK [31] PA199801328  
[86] 国际申请 PCT/IB1999/000337 1999.2.26  
[87] 国际公布 WO1999/043344 英 1999.9.2  
[85] 进入国家阶段日期 2000.10.19  
[71] 专利权人 拜奥拉拜奥爱克斯公司  
    地址 瑞典马尔默  
[72] 发明人 斯蒂纳·格斯特瑞里埃斯  
    拉尔斯·哈马斯特伦  
    彼得·林斯塔多斯  
    克里斯特·安德松 伊万·斯拉比  
    托马斯·哈马尔格伦

审查员 徐 莉  
[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司  
    代理人 林晓红

权利要求书 3 页 说明书 61 页 附图 11 页

[54] 发明名称  
    用于伤口愈合的基质蛋白组合物

[57] 摘要  
    活性粘质物质可以用来制备用于伤口愈合，改善伤口愈合、软组织再生或修复，或预防或治疗炎症感染的药物组合物或化妆品组合物。

1、一种活性釉质物质在制备用于皮肤或粘膜中的伤口愈合的药物或化妆品组合物中的应用。

2、权利要求 1 的应用，其中所述药物或化妆品组合物是用于改善皮肤或粘膜中的伤口愈合的药物或化妆品组合物。

3、根据权利要求 1 或 2 的应用，其中伤口存在于口腔粘膜中。

4、根据权利要求 1 或 2 的应用，其中伤口是身体损伤或与口腔手术包括牙周手术，拔牙术，牙髓治疗，牙植入物的插入，假牙应用相关的外伤。

5、根据权利要求 1 或 2 的应用，其中伤口选自无菌伤口，挫伤伤口，切割伤口，撕裂伤口，非穿透伤口，开放伤口，穿透伤口，穿孔伤口，刺破伤口，脓毒伤口，梗死和皮下伤口。

6、根据权利要求 1 或 2 的应用，其中伤口选自缺血性溃疡，褥疮，瘰，严重咬伤，热灼伤和供体部位伤口。

7、根据权利要求 1 或 2 的应用，其中伤口是口疮伤口，外伤伤口或与疱疹相关的伤口。

8、一种活性釉质物质在制备用于皮肤或粘膜的再生或修复的药物或化妆品组合物中的应用。

9、根据权利要求 1、2 和 8 中任一项所述的应用，其中所述活性釉质物质是釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白。

10、根据权利要求 1、2 和 8 中任一项所述的应用，其中活性釉质物质选自釉质蛋白，珐琅蛋白，非珐琅蛋白，富含脯氨酸的非珐琅蛋白，成釉质蛋白，成釉细胞蛋白，鞘质蛋白，簇质蛋白和其衍生物和混合物。

11、根据权利要求 1、2 和 8 中任一项所述的应用，其中活性釉质物质的分子量通过 SDS-PAGE 电泳确定最高为 120kDa。

12、根据权利要求 1、2 和 8 中任一项所述的应用，其中活性釉

质物质的分子量通过 SDS-PAGE 电泳确定最高为 100 kDa。

13、根据权利要求 1、2 和 8 中任一项所述的应用，其中活性釉质物质的分子量通过 SDS-PAGE 电泳确定最高为 90 kDa。

14、根据权利要求 1、2 和 8 中任一项所述的应用，其中活性釉质物质的分子量通过 SDS-PAGE 电泳确定最高为 70 kDa。

15、根据权利要求 1、2 和 8 中任一项所述的应用，其中活性釉质物质的分子量通过 SDS-PAGE 电泳确定最高为 60 kDa。

16、根据权利要求 1、2 和 8 中任一项所述的应用，其中活性釉质物质制剂包含不同分子量的活性釉质物质的混合物。

17、根据权利要求 1、2 和 8 中任一项所述的应用，其中活性釉质物质制剂包含选自珐琅蛋白，富含脯氨酸的非珐琅蛋白，簇质蛋白，簇蛋白，血清蛋白，唾液蛋白，成釉质蛋白，成釉质细胞蛋白，鞘质蛋白，和它们的衍生物的至少两种物质。

18、根据权利要求 1、2 和 8 中任一项所述的应用，其中活性釉质物质的分子量高至 40,000。

19、根据权利要求 1、2 和 8 中任一项所述的应用，其中活性釉质物质的分子量在 5,000 到 25,000 之间。

20、根据权利要求 1、2 和 8 中任一项所述的应用，其中活性釉质物质的主要部分的分子量 20kDa。

21、根据权利要求 1、2 和 8 中任一项所述的应用，其中活性釉质物质中至少有一部分呈聚集体形式或在体内使用后形成聚集体。

22、根据权利要求 21 的应用，其中聚集体的颗粒大小从 20nm 至 1 $\mu$ m。

23、根据权利要求 1、2 和 8 中任一项所述的应用，其中活性釉质物质制剂中的蛋白质含量从 0.05%w/w 到 100%w/w。

24、根据权利要求 1、2 和 8 中任一项所述的应用，其中活性釉质物质制剂中的蛋白质含量为 5-99%w/w。

25、根据权利要求 1、2 和 8 中任一项所述的应用，其中活性物质物质制剂中的蛋白质含量为 10-95%w/w。

26、根据权利要求 1、2 和 8 中任一项所述的应用，其中活性物质物质制剂中的蛋白质含量为 15-90%w/w。

27、根据权利要求 1、2 和 8 中任一项所述的应用，其中活性物质物质制剂中的蛋白质含量为 20-90%w/w。

28、根据权利要求 1、2 和 8 中任一项所述的应用，其中活性物质物质制剂中的蛋白质含量为 30-90%w/w。

29、根据权利要求 1、2 和 8 中任一项所述的应用，其中活性物质物质制剂中的蛋白质含量为 40-85%w/w。

30、根据权利要求 1、2 和 8 中任一项所述的应用，其中活性物质物质制剂中的蛋白质含量为 50-80%w/w。

31、根据权利要求 1、2 和 8 中任一项所述的应用，其中活性物质物质制剂中的蛋白质含量为 60-70%w/w。

32、根据权利要求 1、2 和 8 中任一项所述的应用，其中活性物质物质制剂中的蛋白质含量为 70-90%w/w。

33、根据权利要求 1、2 和 8 中任一项所述的应用，其中活性物质物质制剂中的蛋白质含量为 80-90%w/w。

34、根据权利要求 1、2 和 8 中任一项所述的应用，其中药物组合物进一步包含药物学上可接受的赋形剂。

35、根据权利要求 34 的应用，其中药物学上可接受的赋形剂是丙二醇藻酸盐。

36、根据权利要求 34 的应用，其中药物学上可接受的赋形剂是透明质酸或其盐或衍生物。

## 用于伤口愈合的基质蛋白组合物

### 发明领域

本发明涉及釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白作为治疗或预防制剂的应用。这些物质具有伤口愈合，抗细菌和/或抗炎制剂的活性。

### 本发明的背景

釉基质蛋白例如存在于釉基质中的基质蛋白众所周知是作为釉质的前体。釉质蛋白和釉基质衍生物以前曾在用于硬组织形成的专利（即釉质形成，美国专利 4, 672, 032 (Slavkin)），或硬组织间的连接（EP-B-O 337 967 和 EP-B-O 263, 086）的专利中叙述。因此现有技术主要侧重于硬组织的再生，而本申请却涉及对软组织伤口愈合的有益效应和抗细菌和抗炎作用这些先前未曾预见到的发现。

### 本发明的描述

本发明是基于如下发现，即釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白（术语“活性釉质物质”在下文中也被用于指代釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白）在提高和改善软组织（即非矿化组织）的伤口愈合中是有利的制剂，所述组织例如含胶原或表皮的组织，包括皮肤和粘膜，肌肉、血液和淋巴管，神经组织，腺体，腱，眼和软骨。正如在本文中实验部分所证实的那样，这种釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白在软组织伤口的愈合或预防上显示出特殊的功效。

因此，本发明涉及一种活性釉质物质的制剂在制备一种药物组合物或化妆品组合物中的应用，所述组合物 i) 用于伤口的愈合，ii )

改善伤口的愈合, 和/或 iii) 用于软组织再生和/或修复。

另一方面, 本发明涉及一种改善伤口愈合或促进软组织再生和/或修复的方法, 该方法包括给予有此需要的个体治疗或预防有效量的活性釉质物质。

另外, 釉基质, 釉基质衍生物和釉基质蛋白已经被发现具有抗细菌和/或抗炎的性质, 可以用于治疗软和硬(即矿化)组织病症。

本发明的另一方面涉及活性釉质物质制剂在制备预防和/或治疗感染或炎症的药物组合物中的应用。

### 伤口愈合

伤口和/或溃疡经常突出于皮肤或发生在粘膜表面或由于器官的梗死所致(“中风”)。伤口可以源于软组织的缺陷或损伤或潜在的病症。实验条件下所产生的牙周伤口的再生先前已被本发明人阐述过, 它们不属于本发明的范畴。在本文中, 术语“皮肤”是指包括人在内的动物身体最外层表面, 它包含完整的或几乎完整的皮肤以及受伤的皮肤。术语“粘膜”指动物例如人的未损害的或损害的粘膜, 它可以是口腔, 颊, 耳腔, 鼻腔, 肺, 眼, 胃肠, 阴道, 或直肠粘膜。

在本发明中, 术语“伤口”指造成组织结构正常完整性破坏的机体损伤。该术语也包括术语“疮”, “损害”, “坏死”和“溃疡”。一般来说, 术语“疮”是涵盖包括皮肤或粘膜表面几乎所有损害的广义术语, 术语“溃疡”则指器官或组织表面由于坏死组织脱落而导致的局部缺损或出现孔洞。损害一般与组织的缺损相关。坏死则是由于感染, 受伤, 炎症或梗死而导致的组织死亡。

本文中的术语“伤口”指任何伤口(见下文对伤口的分类), 并且指愈合过程中的任何一个特殊阶段, 包括愈合开始以前的阶段甚或一个例如手术切口出现以前的阶段(预防治疗)。

根据本发明可以被预防和/或治疗的伤口的例子是, 例如无菌伤

口，挫伤伤口，切割伤口，撕裂伤口，非穿透伤口（即对皮肤没有破坏但对下层结构有伤害的伤口），开放伤口，穿透伤口，穿孔伤口，脓毒伤口，皮下伤口等。疮的例子是褥疮，溃疡，铬溃疡，感冒疮，褥疮等。溃疡的例子是，例如消化器官溃疡，十二指肠溃疡，胃溃疡，痛风溃疡，糖尿病溃疡，高血压性局部缺血性溃疡，郁积溃疡，下腿部溃疡（静脉溃疡），舌下溃疡，粘膜下溃疡，症状性溃疡，营养性溃疡，热带溃疡，软下疳等，例如由淋病所致（包括尿道炎，子宫颈内膜炎和直肠炎）。可以根据本发明成功治疗的与伤口或疮有关的症状是灼伤，炭疽，破伤风，气性坏疽，猩红热，丹毒，芒须疮，毛囊炎，接触性脓疱病，大疱性脓疱病等。在术语“伤口”和“溃疡”以及“伤口”和“疮”之间的使用上经常有一定程度的重叠，而且这些术语经常随机使用。因此如上所述，在本文中术语“伤口”包含术语“溃疡”，“损害”，“疮”和“梗死”，这些术语的使用是无区别的，除非特殊指出。

根据本发明可以治疗的伤口的种类还包括 i) 普通伤口，例如，手术，外伤，感染，缺血、热、化学和大疱的伤口；ii) 特别针对口腔的伤口，例如拔牙后的伤口，特别是针对囊肿和脓肿治疗的牙周伤口，细菌性溃疡和损害，病毒或自身免疫原性的，机械的，化学的，热，感染性的和青苔状的伤口；疱疹溃疡，口腔溃疡，急性坏死溃疡性齿龈炎和灼伤性口腔综合症则是一些特例；iii) 皮肤的伤口例如赘生物，灼伤（例如化学灼伤，热灼伤），损害（细菌性，病毒性，自身免疫性），叮咬和手术切口。对伤口分类的另一种方法是例如，i) 由于手术切口而造成的小的组织丧失，轻微磨损和轻微叮咬，或例如 ii) 严重的组织缺损。后者包括缺血性溃疡，褥疮，痿，撕裂，严重叮咬，热灼伤，和供体部位损伤（软和硬组织）和梗死。

活性釉质物质的愈合效应是通过它对口腔伤口的作用发现的。

这种伤口可以是身体损伤和与口腔手术有关的外伤，包括牙周手术，拔牙，牙髓处理，植牙，牙具的应用，诸如此类。在本文的实验部分，一种活性釉质物质对此类伤口的有益效应得到了证实。而且观察到了软组织的愈合效应。

在口腔中口疮，外伤或疱疹相关伤口的愈合在使用了这种活性釉质物质后也得到改善。当然外伤和疱疹相关伤口在口腔以外的身体其它部分也会出现。

在本发明的其他方面，可以被预防和/或治疗的伤口选自无菌伤口，梗死，挫伤，切割伤口，撕裂伤口，非穿透性伤口，开放伤口，穿透性伤口，穿孔伤口，刺破伤口，脓毒伤口和皮下伤口。

与本发明有重要联系的其它伤口包括缺血性溃疡，褥疮，瘰，严重叮咬，热灼伤和供体部位处的伤口。

缺血性溃疡和褥疮是通常状况下愈合非常缓慢的伤口，在这种特殊情况下，一种改善的和更快速的愈合当然对病人至关重要。而且涉及此类病人伤口愈合治疗的成本也会由于愈合的改善和发生的快速而大大降低。

供体部位处的伤口是指例如，将身体一个部分的硬组织转移到身体的另一部分，例如与移植有关。由于此手术造成的伤口非常疼痛，因此改进的愈合也非常有价值。

术语“皮肤”在一个很广泛的意义上使用，包括皮肤的表皮层，在皮肤的表层或多或少被损坏的情形下，也包括皮肤的真皮层。除了角膜层，皮肤的表皮层是指外皮（上皮）层，皮肤深层的结缔组织层称作真皮。

由于皮肤是身体最暴露的部分，它特别易于受到各种损伤，例如破裂，切割，摩擦，灼伤，冻伤或由各种疾病造成的损伤。而且，大部分皮肤也很容易被偶然性损伤。然而，由于皮肤重要的屏障和生理作用，皮肤的完整对每个人的正常生存至关重要，任何裂口和



撕裂都需要机体做出反应以保护其继续生存。

除了皮肤的损害外，各种组织也会出现损伤（例如软组织和硬组织）。包括粘膜和/或皮肤的软组织的损伤与本发明极其相关。

皮肤或粘膜伤口的愈合需要经过一系列的阶段才能导致皮肤或粘膜的修复或再生。近年来，再生和修复被区分成两种形式的愈合。再生被认为是一种失去的组织结构和功能得到完全更新的生物学过程。另一方面，修复则指受损伤的组织连续性被新组织恢复，而不是对失去组织的结构和功能的复制的生物学过程。

伤口愈合的主要部分是通过修复，它意味着所形成的新组织在结构和化学性质上与原组织不同（疤痕组织）。在组织修复的最初阶段，几乎都要涉及的一个过程是在伤口处形成一个暂时的结缔组织。这一过程是通过成纤维细胞形成的一种新的细胞外胶原基质启动的。此后这种新的胶原基质在愈合的最后阶段作为连接组织的支持。对很多组织来说愈合的最后阶段是指包含连接组织的伤疤的形成。对于有再生性质的组织例如皮肤和骨骼，最终的愈合包括原组织的再生。再生的组织也经常有一些疤痕的性质，例如，愈合的骨骼的增厚。

在正常情况下机体会提供一种使受伤的皮肤或粘膜愈合的机制以恢复皮肤屏障和粘膜的完整性。这种对甚至很微小的割裂或伤口的修复可能要用从几小时到几天至几周的时间。然而，对于溃疡来说，愈合将非常缓慢，可能持续一段很长的时间，即数月或数年。

伤口愈合的阶段一般包括发炎（一般 1-3 天），迁移（一般 1-6 天），增殖（一般 3-24 天）和成熟（一般 1-12 个月）。愈合过程是一个复杂的和精确的物理过程，它涉及迁移，增殖，各种细胞类型的分化以及基质组分的合成。愈合过程可以分成以下三个阶段：

i) 止血和炎症

当血小板出现在循环系统以外并暴露于凝血酶和胶原时，它们

将被激活并聚集。因此血小板通过聚集并形成确保凝血和防止细菌侵入组织的暂时性血栓来启动修复的过程。被激活的血小板启动凝结系统并释放生长因子，例如血小板衍生生长因子（PDGF），表皮生长因子（EGFs）和转化生长因子（TGFs）等。

最先进入伤口区的是中性白细胞，紧接着是被巨噬细胞激活的单核细胞。

中性白细胞的作用体现在清洁伤口或阻止伤口被感染性细菌感染和通过除去死细胞和血小板来改善伤口的愈合。如果伤口不出现细菌感染，中性白细胞的浸润将在大约最初 48 小时终止。多余的中性白细胞被循环系统中血液携带的单核细胞所募集的组织巨噬细胞所吞噬。巨噬细胞被确信对有效的伤口愈合是必要的，这表现在它们也负责对致病性生物体进行吞噬和清除组织碎片。而且它们还释放涉及愈合过程的后续阶段的多种因子。巨噬细胞吸引成纤维细胞启动胶原的生成。

#### ii ) 肉芽组织形成和上皮重新合成

受伤后 48 小时，成纤维细胞开始增殖并从伤口边缘的连接组织迁移到伤口处。成纤维细胞生成胶原和粘多糖，伤口处存在的低氧张力等刺激内皮细胞的增殖。这些内皮细胞产生一个新的毛细网络。

胶原酶和纤溶酶原激活物是由角质化细胞分泌的。如果伤口没有被干扰并有充足的氧气和营养物质供应，角质化细胞将迁移到伤口上。角质化细胞被认为仅仅迁移到活组织上，因此，角质化细胞将迁移到伤口的死组织和之下的区域。

伤口的面积由于收缩的原因进一步缩小。

#### iii ) 真皮的重构

一旦上皮的重新合成完成紧接着就开始真皮的重构。这一阶段往往延续若干年以恢复伤口组织的强度。

所有如上所述的愈合过程都要经过相当长的时间。愈合的速度

受以下因素影响，伤口不被感染，个体的大致健康情况，外源物质的出现等。一些致病性因素例如感染，浸泡，脱水，不良的健康状况和营养不良可以导致慢性溃疡，例如缺血性溃疡。

在至少是表面的愈合出现以前，伤口仍有持续或重新感染的危险。因此，伤口愈合愈快，这种危险也会愈快清除。

因此，任何可以影响伤口愈合速度或对伤口愈合有益步骤都具有很高的价值。

而且由于在几乎所有的组织修复以前都包含一个早期连接组织形成的阶段，因此对这一阶段和其后过程的刺激也被认为可以改善组织愈合。

在本文中术语“临床愈合”被用来指肉眼观察不到的组织中断并且仅有离散的炎症迹象例如轻微红肿或不连续的肿胀组织存在的情况。而且当器官放松或不被接触时无疼痛感觉。

如上所述，本发明涉及釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白作为伤口愈合制剂的应用，即可以加速，刺激或促进皮肤或粘膜伤口愈合的制剂。相应的，其作为组织再生和/或修复制剂的应用也非常重要。而且，由于其伤口愈合的效应，釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白也具有止痛的作用。

传统上，干燥的或湿到干燥的敷料被广泛应用于伤口的保护。渐渐的它们被在潮湿环境下使用封闭的绷带所代替。为了成功的修复或取代受伤的机体部分，伤口愈合，纤维化和微生物的侵入之间必须得到平衡。许多防止感染的手段有损伤口愈合。延迟的伤口愈合或炎症能加速纤维化。而且，尽管以前曾经认为生长因子例如表皮生长因子（EGF），转化生长因子- $\alpha$ （TGF- $\alpha$ ），血小板衍生生长因子（PDGF），包含酸性成纤维生长因子（ $\alpha$ -FGF）和碱性成纤维生长因子（ $\beta$ -FGF）在内的成纤维细胞生长因子（FGFs），转化生长因子- $\beta$ （TGF- $\beta$ ）和胰岛素样生长因子（IGF-1 和 IGF-2）是伤

口愈合过程中的传导因素，经常被认为是伤口愈合促进剂；但是它们实际上是促进纤维化，后者反过来则损害成功的愈合。尽管加速的愈合对减轻感染的危险提供了最大保证，但加速正常的伤口愈合的过程的治疗性尝试却仅获得了相对很少的成功。这可能是由于修复进程涉及一系列如上所述的相关因子的介入。

为此，本发明人观察到在各种成纤维细胞培养物中（牙周膜，鱼或鸟衍生的胚胎成纤维细胞，皮肤成纤维细胞），通过例如 ELISA 方法对取自培养物培养基中的样品进行检测发现 EMDOGAIN®刺激过的细胞所产生的 TGF  $\beta$  1 的量比未经刺激细胞增加 2 倍（参阅下面的实施例 1）。这种增加在培养 24 小时后出现，而大量的增加出现在随后几天（第 2 和 3 天）。第 2 天以后使用 EMDOGAIN®刺激的细胞的增殖也明显增加。在人上皮细胞中也观察到同样的但不是很显著的 TGF  $\beta$  1 量的增加。由于 TGF  $\beta$  1 似乎在表皮损伤的上皮形成中起重要作用，这些发现支持了本发明的观点。

在口腔中使用敷料是很普通的。这些敷料是传统的形式，例如在开放伤口中用于止血的外科手术垫料和 Coe-Pack 牙周塞制剂（Coe Laboratory, GC 集团, Chicago, USA），拔牙时插入牙槽并在几天后愈合开始时需要去除的在抗生素溶液中浸湿的棉球。用例如洗必太的抗菌剂进行冲洗是在口腔手术后经常使用的。有时也使用全身用或局部用抗生素。

一般来说在伤口治疗的过程中需要考虑一些特殊的注意事项，例如无菌条件，污染问题，正确使用绷带/敷料等，这些治疗/应用过程一般来说需要受过专门训练的护士及相关人员进行。因此在用于伤口愈合的制剂需要在一天里反复更换时，伤口的处理经常变为一种非常昂贵的操作。因此一种理想的在伤口愈合治疗中降低成本的方法应该是旨在减少（制剂）的使用频率或改进愈合的程序以缩短伤口愈合所需要的时间。

本发明人发现釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白具有伤口愈合的性质。而且有显示应用釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白可以改善伤口的愈合。特别是本发明人观察到在使用了釉基质和/或釉基质衍生物后，炎症的阶段得以缩短，热，红肿，水肿和疼痛等典型症状不大容易观察到，新的组织形成的非常快。所观察到的伤口愈合的时间与未使用釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白相比（例如手术后）显著的缩短。

釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白的治疗和/或预防活性可以通过实验动物和人在体内得到证实（参见本文中的实验部分）。然而，通过进行一些相对比较简单的体外实验例如涉及细胞培养物的实验也可以显示出釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白的治疗和/或预防活性。

而且，有很多可以用于评价伤口愈合效果的参数。它们包括：

计算机辅助测面法（评价开放伤口愈合的速度）

激光多普勒成象（评价伤口的灌注）

张力测量术（测定伤口强度）

组织学/细胞学方法（伤口组织和液体的微观评价）

生化方法（HPLC/RIA）（评价组织愈合的各种药物和生化成分）

电子诊断（评价伤口组织和神经支配的关系）

闪烁扫描法（伤口组织的放射性核成象）

与伤口/溃疡治疗相关的清创和伤口的清洁也特别重要。已确信伤口/溃疡的清创和伤口的清洁是愈合过程的前提条件，而且当使用伤口愈合制剂时，这些制剂必须作用于新鲜的或活组织而不是死组织或污染的组织。对坏死组织的清创可以至少采用四种不同的方法：i) 切割除创，ii) 机械除创，iii) 酶法除创，和 iv) 自裂解除创。

因此本发明也涉及除创方法与应用釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白进行伤口愈合和预防的联合应用。这种联合治疗涉及以

下 2 个步骤，即 i) 除创方法，ii) 釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白的应用，这两个步骤可以根据需要按照适当的顺序多次进行。

伤口已经除创后，釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白即可以直接应用在伤口上或伤口内，也可以以某种合适的药物组合物例如一种包含釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白的干或湿的清洁敷剂的形式使用。釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白当然也可以与伤口的清洁联系起来使用。

正如后面要讨论的，釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白可以直接使用或者它们也可以以一种合适的制备物或药物组合物的形式使用。

#### 降低感染作用

本发明另一个方面是釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白被用作具有抗微生物效应的治疗和预防制剂。釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白显示出降低感染的效应。

在本文中术语降低感染效应是指当使用釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白处理某个组织或个体时，它们对个体中受感染的组织所产生的治疗和预防效应。

术语感染指微生物对机体组织的侵入和在其中繁殖或在组织上的聚集，其可以不表现出临床症状，或者由于竞争代谢，酶，毒素，胞内复制或抗原-抗体应答而导致局部细胞损伤。

根据本发明，需预防和/或治疗的感染可由微生物引起。与本发明有关的微生物包括细菌，病毒，酵母，霉菌，原生动物和里克次氏体。

在本发明中术语“抗细菌效应”是指细菌的生长被抑制或细菌被破坏。该术语不仅限定在某一种细菌而是包含几乎任何细菌。然而，本发明侧重于 i) 对包括人在内的哺乳动物引起疾病的致病细菌

和/或 ii) 一般情况下在哺乳动物体内正常存在但在特定条件下可以对机体产生有害作用的细菌。

相应的本发明涉及使用一种有活性的釉基质物质用以治疗和预防机体表面例如皮肤，粘膜表面或指甲或牙齿表面上的细菌生长。

对将要遇到的细菌情况的一般和特殊说明

釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白可以在存在抗菌剂或不存在抗菌剂时用来治疗细菌引起的感染。可以用活性釉质物质处理的革兰氏阴性菌可以是球菌例如奈瑟氏球菌属（例如脑膜炎奈瑟氏球菌，淋病奈瑟氏球菌），和杆菌，例如拟杆菌属（例如脆壁拟杆菌），博德特氏菌属（例如百日咳博德特氏菌和副百日咳博德特氏菌），布鲁氏菌（例如马尔他布鲁氏菌，流产布鲁氏菌，猪布鲁氏菌），弯曲杆菌属（例如空肠弯曲杆菌，大肠弯曲杆菌，胎儿弯曲杆菌），柠檬酸杆菌，肠杆菌，埃希氏杆菌属（例如大肠杆菌），嗜血杆菌（例如流感嗜血杆菌，副流感嗜血杆菌），克氏杆菌属（例如肺炎克氏杆菌），军团菌属（例如肺炎军团菌），巴斯德氏菌（例如耶尔森氏鼠疫杆菌，多杀巴斯德氏菌），变形杆菌属（例如奇异变形杆菌，寻常变形杆菌），假单胞菌属（例如铜绿假单胞菌，伪鼻疽假单胞菌，鼻疽假单胞菌），沙门氏菌属（例如肠沙门氏菌，婴儿沙门氏菌，都柏林沙门氏菌，伤寒沙门氏菌，副伤寒沙门氏菌，薛氏沙门氏菌，鼠霍乱沙门氏菌，鼠伤寒沙门氏菌，或其它 2500 个血清型的任何一个），沙雷氏菌属（例如粘质沙雷氏菌，液化沙雷氏菌），志贺氏菌属（例如索氏志贺氏菌，弗氏志贺氏菌，痢疾志贺氏菌，鲍氏志贺氏菌），弧菌（例如霍乱弧菌，艾罗特弧菌），和耶尔森氏菌属（例如小肠结肠炎耶尔森氏菌，假结核耶尔森氏菌，鼠疫耶尔森氏菌）。可以使用活性釉质物质治疗的革兰氏阳性菌可以是球菌例如链球菌（例如肺炎链球菌，绿色链球菌，粪链球菌，化脓链球菌），葡萄球菌属（例如金黄色葡萄球菌，表皮葡萄球菌，腐生葡萄球菌，白葡萄球菌），和杆菌，例

如放线菌（例如以色列放线菌），芽孢杆菌属（例如蜡状芽孢杆菌，枯草杆菌，炭疽芽孢杆菌），梭菌属（例如肉毒梭菌，破伤风梭菌，产气荚膜梭菌，艰难梭菌），棒状杆菌（例如白喉棒杆菌），李斯特氏菌属和普罗威登斯菌属。其它一些引起感染的细菌包括疮疱丙酸杆菌和 *Pityosporon ovale*。

釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白也可以被用来治疗由螺旋体例如疏螺旋体，钩端螺旋体，密螺旋体或假单胞菌引起的感染。

和釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白联合使用的抗菌剂可以是具有抑制细胞壁合成活性的抗菌剂，例如  $\beta$ -内酰胺和万古霉素，最好是青霉素例如巴比妥霉素，氨苄青霉素，羟氨苄青霉素，阿洛西林，氨苄青霉素，苄星青霉素 G，羧苄青霉素，邻氯青霉素，氨环己青霉素，双氯青霉素，甲基青霉素，梅兹洛西林，乙氧萘(胺)青霉素，苯甲异噻唑青霉素，青霉素 G，青霉素 V，哌哌青霉素，和羧噻吩青霉素；

头孢菌素，例如第一代头孢羟氨苄，氯头孢菌素，头孢氨苄，头孢菌素，头孢吡硫，和头孢环己烯，第二代氯头孢菌素，羟下四唑头孢菌素，盐头孢菌素，水溶性头孢菌素，头孢甲氧霉素和头孢噻甲羧肟，第三代氧哌羟苯唑头孢菌素族抗菌素，氨中噻肟头孢菌素，头孢双硫唑甲氧，去甲噻肟头孢菌素，菌必治，和羟羧氧酰胺菌素；carbapenems 例如亚胺培南；或 monobactam 例如氨曲南；

其它通过抑制蛋白质合成的抗菌药物有，例如氯霉素；其它四环素特别是地美环素，强力霉素，甲烯土霉素，二甲胺四环素，和地霉素；氨基肽酶例如氨基丁卡霉素，庆大霉素，卡那霉素，新霉素，乙基西梭霉素，巴龙霉素，奇放线菌素，链霉素，和托普霉素；多粘菌素例如粘菌素，colistimathate，和多粘菌素 B，红霉素和林肯霉素；

具有抑制核苷酸合成活性的抗菌剂药物特别是磺胺类药物例如



sulfacytine, 磺胺嘧啶, 磺胺异嘧啶, 磺胺甲基异恶唑, 磺胺甲基噻代二嗪, 和磺胺嘧啶, 甲氧苄氨嘧啶, 喹啉衍生物, 新生霉素, 乙嘧啶, 和利福平。

作为本发明的一个特殊实施方案, 感染可以出现在口腔并且感染可以由细菌引起。

可以被完全抑制或被抵抗的口腔细菌。例子(不是条件)包括引起溃疡的细菌, 例如突变链球菌, 乳酸杆菌。

引起牙周疾病的细菌例如伴放线放线杆菌, 牙龈卟啉单胞菌, 中间普雷沃氏菌, 微小消化链球菌, 弯曲杆菌(梭杆菌, 葡萄球菌), *B. forsythus*。

引起牙槽炎等的细菌例如葡萄球菌, 放线菌和杆菌。

引起尖周损害的细菌, 例如螺旋体和所有上述细菌。

#### 抗炎效应

本发明涉及釉基质, 釉基质衍生物和/或釉基质蛋白作为具有抗炎效应的治疗和预防制剂的应用。

很多药物被用来抑制炎症的出现, 包括肾上腺皮质类固醇, 包含所谓非类固醇抗炎药物或称 NSAID 在内的一大组药物, 和例如免疫抑制剂药物。肾上腺皮质类固醇, 特别是糖皮质激素当使用药理学剂量时, 具有强抗炎效应。它们通过降低血管的渗透性进而降低粒细胞的迁移以此特异性地抑制早期血管相的炎症进程。糖皮质激素也干扰晚期炎症和修复进程, 这一效应是通过抑制间叶细胞的增殖和细胞外包括蛋白多糖和胶原在内大分子的生成来完成的。实验证明糖皮质激素还抑制例如巨噬细胞的功能, 体液抗体的产生, 细胞免疫, 或许还有溶菌酶的释放。

组织损害的严重程度依赖于机体的抗原抗体反应和受损伤区域炎症产物存在的程度。局部炎症介体的积聚加速了这个进程。在大多数情况下, 这个进程是缓慢的, 它伴随着组织的免疫渗透和包含

炎症细胞的粒状组织的形成。

在本文中术语“抗炎效应”指对抗或抑制炎症的发生。

所治疗的炎症情况的种类的一般和特殊说明

根据本发明所能治疗的炎症情况当然可以是机体任何部分内/上的或软（或硬）组织内出现的任何炎症情况。作为本发明的一个实施方案，炎症可以出现在口腔。关于口腔炎症情况的例子是牙槽炎，唇炎，牙周坏死（外伤后），牙破碎。

在本发明的另一个实施方案中，炎症的情况出现在骨髓捐献者的相应位置。在本发明的第三个实施方案中炎症出现在关节腔。该种炎症情况的例子是风湿性关节炎和与其相关的症状。

与抗炎相对应的抗细菌作用

与现今正在使用的多种抗菌剂相比，釉基质蛋白可以促进伤口愈合，因此反过来，它也就不会给慢性或长期存在的炎症进程的发生留有余地。而且，正如所叙述的那样，当釉基质衍生物作用于牙周感染后，适当组织的重新组成由快速的伤口愈合并且没有细菌或炎症反应而受益。

釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白的应用可以导致手术伤口的快速愈合，这可能是通过它们可以产生一个与细菌接触的表面从而抑制细菌的生长并同时增强成纤维细胞的迁移和胶原的合成。如果炎症阶段缩短，其典型的迹象例如热，红肿，水肿和疼痛也不大容易观察到。

釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白

釉基质是釉质的前体，它可以从任何相关的自然原料获得，例如正处于牙齿发育阶段的哺乳动物。一个合适的来源是从被屠宰动物的正在发育的牙齿获得，例如小牛，猪或羊。另一个来源可以是例如鱼皮。

釉基质可以通过先前所述的方法从发育的牙齿制备（EP-B-0 337

967 和 EP-B-0 263 086)。将釉基质刮下以制备釉基质衍生物，例如使用水溶液如一种缓冲液、稀酸或碱或水/溶剂混合物抽提，然后进行大小分离，除盐或其它纯化步骤，随后任选地冻干。酶类可以通过加热或溶剂处理灭活，这样可以使制备的衍生物以液体形式存在而无须冻干。

在本文中，釉基质衍生物是指通过可变剪接或加工天然生成的，或通过对天然长度的蛋白用酶或化学方法切割得到的，或通过体外或体内的多肽合成获得的（重组 DNA 方法或二倍体细胞的培养）包含一个或多个釉基质蛋白或蛋白部分的釉基质的衍生物。釉基质蛋白衍生物也包括与釉基质相关的多肽或蛋白。这些蛋白或多肽可以被连接在适当的可生物学降解的载体分子上，例如聚氨基酸或多糖，或其组合。而且，术语釉基质衍生物也包括合成的类似物。

蛋白是通过肽键连接起来的氨基酸残基所组成的生物学大分子。蛋白作为氨基酸的线形多聚体也叫多肽。典型的蛋白有 50-800 个氨基酸残基，因此分子量介于 6000 至几十万道尔顿之间。小的蛋白被称作肽或寡肽。

釉基质蛋白一般是指存在于釉基质中的蛋白，即釉质前体（Ten Cate: 口腔组织学, 1994; Robinson: 欧洲口腔科学杂志, 1998 年 1 月, 106 suppl.1: 282-91), 或通过切割此种蛋白而获得的新蛋白。一般来说, 此种蛋白的分子量低于 120, 000 道尔顿, 具体包括珐琅蛋白, 非珐琅蛋白, 富含脯氨酸的非珐琅蛋白, 成釉质蛋白 (amelin) (成釉细胞蛋白 (ameloblastin), 鞘质蛋白 (sheathlin) 和簇质蛋白 (tuftelin)。

根据本发明所使用的蛋白的例子包括珐琅蛋白, 富含脯氨酸的非珐琅蛋白, 簇质蛋白, 簇蛋白 (tuft protein), 血清蛋白, 唾液蛋白, 成釉质蛋白, 成釉细胞蛋白, 鞘质蛋白, 和其相应衍生物及混合物。含有用于本发明的活性釉质物质的制剂也包含至少两种上述蛋白物

质。包含珐琅蛋白和可能的其它一些釉基质蛋白的商品化的产品品为 EMDOGAIN® (Biora AB)。

一般来说釉基质的主要蛋白已知为珐琅蛋白。它们组成大约 90%w/w 的基质蛋白。剩余的 10%w/w 包含富含脯氨酸的非珐琅蛋白，簇质蛋白，簇蛋白，血清蛋白和至少一种唾液蛋白；然而也可存在一些其它蛋白，例如已经被鉴定的与釉基质相关的成釉质蛋白（成釉质细胞蛋白，鞘质蛋白）。而且各种蛋白可以被合成和/或加工成不同的大小（例如不同的分子量）。因此釉基质中的主要蛋白珐琅蛋白被发现以多种不同大小的形式存在，这些蛋白在一起组成超分子聚合物。它们在生理条件形成明显疏水性物质。它们可以携带其他蛋白或肽或是其他蛋白或肽的载体。

其它一些蛋白也被认为适合本发明的使用。这些蛋白的例子包括例如富含脯氨酸的蛋白和聚脯氨酸。被认为适合本发明使用的其它物质的例子包括釉基质衍生物和/或釉基质蛋白的聚合物以及釉基质，釉基质衍生物和釉基质蛋白的代谢物。代谢物可以是分子量从蛋白质到短肽的任何大小。

如上所述，根据本发明所使用的典型的蛋白，多肽和肽的分子量多数为大约 120kDa，例如通过 SDS-PAGE 确定多数为 100 kDa，90 kDa，80 kDa，70 kDa 或 60 kDa。

根据本发明所使用的蛋白一般是以制备物的形式存在，制备物中活性釉质物质的蛋白含量的范围在 0.05%w/w 至 100%w/w 之间，例如大约 5-99%w/w，大约 10-95%w/w，大约 15-90%w/w，大约 20-90%w/w，大约 30-90%w/w，大约 40-85%w/w，50-80%w/w，大约 60-70%w/w，大约 70-90%w/w，或大约 80—90%w/w。

根据本发明所使用的活性釉质物质的制备物也可包括不同分子量的活性釉质物质的混合物。

一种釉基质的蛋白可以被分成高分子量部分和低分子量部分，

且已经发现一种已熟知的釉基质蛋白的组分在牙周缺损（例如牙周伤口）的治疗中具有很高的价值。这种组分包括醋酸抽提的蛋白即通常所指的珐琅蛋白并组成釉基质的低分子量部分（参考 EP-B-0 337 967 和 EP-B-0 263 086）。

正如上面所讨论的，釉基质的低分子量部分具有诱导牙周缺陷中的硬组织连接的适当活性。然而在本文中，活性蛋白不只局限在釉基质的低分子量部分。本文中优选的蛋白包括釉基质蛋白例如珐琅蛋白，成釉质蛋白，簇质蛋白等，其分子量（体外 SDS-PAGE 测定）小于约 60000 道尔顿，但是大于 60000 道尔顿的蛋白在作为伤口愈合，抗细菌和/或抗炎候选制剂上也显示出很好的前景。

相应的，根据本发明所使用的活性釉质物质的分子量大于大约 40,000，例如分子量约在 5000-25000 之间。

在本发明的范围内也包括 WO97/02730 中叙述的肽，即包括选自四肽 DGEA (Asp-Gly-Glu-Ala)，VTKG (Val-Thr-Lys-Gly)，EKGE (Glu-Lys-Gly-Glu) 和 DKGE (Asp-Lys-Gly-Glu) 的至少一个序列单元的肽，并且进一步包含一氨基酸序列，该序列的连续 20 个氨基酸与选自 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列，SEQ ID NO: 1 中 1 到 103 位氨基酸及 SEQ ID NO: 2 中的 6 到 324 位氨基酸的相同长度的氨基酸序列有至少 80% 相同性。

术语“序列相同性”被认为是肽段之间氨基酸的序列和相应位置相同。一个或几个氨基酸不相同的间隔是合适的。

该种肽可以包含 6-300 个氨基酸，例如至少 20 个氨基酸，至少 30 个氨基酸，至少 60 个氨基酸，至少 90 个氨基酸，至少 120 个氨基酸，至少 150 个氨基酸或至少 200 个氨基酸。

一种分离釉基质蛋白的方法涉及对蛋白进行抽提和通过一种适当的方法从溶解的羟磷灰石中除去钙离子和磷酸根离子，所述方法例如凝胶过滤，透析或超滤（参见例如 Janson, J-C&Ryden, L. (Eds.),

蛋白纯化, VCH 出版社 1989 和 Harris, ELV&Angal, S.,蛋白纯化方法-一种实用方法, IRS 出版社, Oxford, 1990)。

一种典型的冻干蛋白质制备物可高至 70—90% 主要或仅包含分子量在 40000 到 5000 道尔顿之间的珐琅蛋白, 另外 10-30% 是由短肽, 盐和残余水分组成。主要的蛋白带位于 20kDa, 12-14kDa 和大约 5kDa。

通过例如沉淀, 离子交换层析, 制备电泳, 凝胶渗透层析, 反向层析或亲和层析的方法分离蛋白, 可以对不同分子量大小的珐琅蛋白进行纯化。

不同分子量的珐琅蛋白的组合可以多种多样, 从 20kDa 的化合物占主要成分到 40-5kDa 的不同分子量的聚集体直至 5kDa 的化合物占主要组分。在釉基质中经常发现的其它一些釉基质蛋白例如成釉质蛋白, 簇质蛋白或蛋白水解酶也可以被加入到珐琅蛋白聚集体并被其携带。

作为又一个来源, 也可以使用本领域技术人员熟知的已经被应用的合成途径或通过用重组 DNA 技术改造的培养的细胞或细菌生成釉基质衍生物或蛋白。

釉基质, 釉基质衍生物和釉基质蛋白的理化特性

釉基质, 釉基质衍生物和/或釉基质蛋白是疏水性物质, 也就是水中溶解性很低, 特别是在温度升高时。一般来说, 这些蛋白在非生理条件的 pH 值和较低温度例如大约 4-20°C 时溶解, 然而它们在体温 (35-37°C) 和中性 pH 条件下却积聚和沉淀。

根据本发明所使用的釉基质, 釉基质衍生物和/或釉基质蛋白也包括活性釉质物质, 其中至少部分活性釉质物质是以聚集体的形式存在或在体内使用时能够形成聚集体。聚集体中粒子的大小在 20nm-1 $\mu$ m 之间。

釉基质, 釉基质衍生物和/或釉基质蛋白的可溶性被认为是对该

种物质所具有的预防和治疗活性非常重要的。当一个包含釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白的组合物（在下文中也使用“活性釉质物质”作为通用术语）作用于，例如人体时，其中的蛋白物质由于存在于正常的生理条件下的 pH 值占优势的条件将会发生沉淀。因此，就会在作用区域处形成一个釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白层，这一层（在聚集体形成时也可是一个分子层）在生理条件下很难被去除。而且由于该物质的生物学粘附特征（见下文），该沉积层会与组织在沉积层和组织的边缘紧密结合。这样，施加了釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白或其组合物的组织就被该蛋白层覆盖，并且活性釉质物质在作用区域保持很长的时间，即不需以短间隔给予活性釉质物质。另外，在作用区域处形成的层可以被视作一个封闭的敷料，也就是说所形成的层可以阻止被其覆盖的组织与周围组织的接触。在有受伤组织，感染组织或炎症组织的情况下，该层可保护组织避免被周围环境中存在的微生物进一步感染。而且，所形成的蛋白层可以通过与组织或存在于组织内/上的微生物的直接接触发挥作用。

为了使用后能够在作用区域形成一个蛋白层，将适当的缓冲物质掺入釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白的药物或化妆品组合物是有利的，这种缓冲物质的目的是避免活性釉质物质在作用区域处溶解。

釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白还（被本发明人）观察到具有生物粘附性质，即，它们可以粘附于皮肤或粘膜表面。这些性质至少是基于以下几个原因对于它们的治疗和/或预防作用是很有价值的：

一对治疗和/或预防起作用的活性物质可以在作用区域处保持很长的时间，（即 i）给药频率可以降低，ii）可获得活性物质的受控释放，iii）在作用区域处的局部治疗可以得到改善）；

一釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白本身还适于做其它治疗或预防活性物质的载体，因为包含釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白的载体可以被设计成一种生物粘附载体（也就是说，基于釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白的生物粘附性质的新型生物粘附药物输送系统）。

#### 与作用机制相关的原理

釉基质是可以粘附于矿物表面及蛋白表面的细胞外蛋白基质的一个例子。在生理性 pH 值和温度条件下，该蛋白形成一种不溶的超分子聚集体（Fincham 等，结构生物学杂志，1994 3-4 月；112（2）：103-9 和结构生物学杂志 1995 7-8 月；115（1）：50-9），该聚集体在蛋白水解酶的作用下逐渐降解（如果蛋白酶不失活，此种情况可以在体内或体外都发生）。

最近观察到的关于釉基质在牙根和牙根牙骨质的形成过程中形成并短暂存在的情况可以用来解释釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白是怎样促进牙周组织的再生的。然而本发明所观察到的釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白也具有对软组织缺损例如伤口愈合的积极作用是非常令人惊奇的。同样令人惊奇地观察到了这些物质在抗感染和抗炎上的功效。

在很多物种中，当牙齿在口腔内长出时，在新生的矿化牙冠中发现有釉基质的残留物。这可能是由于新生的牙齿对通常的口腔细菌的侵害来说是非常脆弱的，除非在起始阶段有一个天然的保护存在。

具有适当的抗细菌和/或抗炎的性质的不溶性的釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白在伤口表面应用会促进和改善伤口的愈合。

正如在本文的实验部分所证实的那样，釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白或蛋白聚集体通过接触抑制阻止细菌的生长，而暴露的细胞作为正常的环境与釉基质反应以抑制炎症反应。



根据本发明釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白可以用作治疗和预防。而且釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白还可以与其它有活性的药物物质例如抗细菌，抗炎，抗病毒，抗真菌物质一起使用，或与生长因子例如 TGF $\beta$ ，PDGF，IGF，FGF，角化细胞生长因子或其相应的肽类似物合并使用（据信 EGF 通过促进上皮细胞的迁移和细胞分化促进伤口愈合，另外，EGF 通过增加伤口处的成纤维细胞的数目导致大量的胶原合成）。釉基质或其制剂中固有的或添加的酶也可以与釉基质，釉基质衍生物和/或釉基质蛋白合并使用，特别是蛋白酶。

活性釉质物质的制剂一般被配制成一种药物或化妆品组合物。这种组合物当然可以由蛋白制备物组成，或者它可以进一步包含可以接受的药物或化妆品赋形剂。药物和化妆品组合物中使用的特别合适的赋形剂是丙二醇海藻酸盐，或透明质酸，或其盐或衍生物。

#### 药物和/或化妆品组合物

以下给出了包含活性釉质物质的适当组合物的例子。根据活性釉质物质的应用，组合物可以是药物组合物或化妆品组合物。在下文中，术语“药物组合物”也包含化妆品组合物以及属于介于药物和化妆品之间的所谓灰色区域的组合物，即药物化妆品。

当给予个体（动物或人）时，釉基质，釉基质蛋白和/或釉基质衍生物（以下称作“活性釉质物质），和/或其制剂优选设计成一个包含活性釉质物质以及任选的一种或几种药物学可接受的赋形剂的组合物。

组合物可以以例如固体，半固体，或流体的形式存在，比如可生物吸收片，浸湿物，敷料，水凝胶，水状胶体敷料，薄膜，泡沫，薄片，绷带，膏药，输送装置，植入物，

粉剂，小颗粒，颗粒，胶囊，琼脂糖或脱乙酰壳多糖珠，片剂，丸剂，小球，微胶囊，微球体，纳米颗粒，

喷洒剂，气雾剂，吸入装置，  
凝胶，水溶胶，糊剂，软膏，乳膏，皂，栓剂，vagitorie，牙膏，  
溶液，分散液，悬浮液，乳状液,混合物，洗液，漱口水，洗发  
精，灌肠剂，

试剂盒，其包含例如两个分开的容器，第一个容器含有活性粘  
质物质，任选地与其它活性药物和/或药物学可接受的赋形剂混合，  
第二个容器含有适当的介质以备在使用前加入第一个容器获得待用  
的组合物；

以及其它一些合适的形式，例如植入物或植入物涂层或一种适  
合于植入和移植条件下使用的形式。

用于皮肤或粘膜的组合物被认为是本发明最重要的。因此，包  
含待给药的活性粘质物质的组合物可适合任何适当的使用途径，例  
如，通过局部（皮肤），口腔，面颊，鼻腔，耳腔，直肠或阴道使用  
和体腔使用，例如牙根或牙根槽。而且，组合物可适合与手术相关  
的使用，例如在机体的切口给药以推动内部伤口和软组织损伤的愈  
合。

如上所述，活性粘质物质组合物可适合于手术中的应用，例如  
以一种凝胶，薄膜或干片剂的形式局部使用（例如口腔），或作为清  
洗溶液或糊剂或乳膏作用于组织或表面阻止细菌侵入。牙根槽区域  
的手术或植入时，可以使用能封闭牙腔的糊剂。

组合物可以根据常规的药物实践来配制，参见，例如“Remington's  
药物科学”和“药物技术百科全书”，由 Swarbrick, J.&J.C.Boylan  
编辑，Marcel Dekker 公司出版，纽约，1988。

如上所述包括活性粘质物质的组合物趋向于使用在皮肤或粘膜  
上。当然其它一些应用也可涉及，例如在义齿，假体，植入物上的  
应用，以及应用于体腔例如口腔，鼻腔和阴道。粘膜优选选自口腔、  
颊、鼻腔、耳腔、直肠和阴道粘膜。另外，该组合物还可以直接作

用于伤口或其它软组织损伤上。

另外，在牙齿/牙科领域的应用也十分重要。相关的例子是应用于牙周（牙齿）袋，齿龈或齿龈伤口或位于口腔内或与口腔手术相关的其它伤口。

根据本文叙述的活性釉质物质的抗细菌效应，可以进一步预期它们可以有利地应用于预防牙齿或牙根的溃疡和牙斑。为了支持这一应用，现已证实（Weinmann, J.P.等：釉质形成和钙化的遗传干扰，美国牙科协会杂志，32：397-418，1945；Sundell S，遗传性釉质发育不完全，对瑞典儿童人群的流行病学，遗传学和临床研究，瑞典牙科杂志提供 1986；31：1-38），发育不完全的牙齿（釉质发育不完全）由于包含大量的珐琅蛋白对溃疡有很强的阻止作用。

包括活性釉质物质的药物组合物可以充当药物输送系统。在本发明中，术语“药物输送系统”指当药物组合物（药物配制品或剂型）被使用时，可以将活性物质呈递给人或动物的机体。因此术语“药物输送系统”包括普通的药物组合物例如乳膏，软膏，液体，粉剂，片剂等以及更复杂的配方例如喷雾装置，膏药，绷带，敷料和器具等。

除了活性釉质物质以外，根据本发明所使用的药物组合物还包含药理学或化妆品可接受的赋形剂。

药理学或化妆品可接受的赋形剂是指当使用该组合物时对个体没有明显危害的物质。这种赋形剂一般满足国家健康管理部门颁布的要求。官方药典例如英国药典，美国药典和欧洲药典都规定了可接受的药物赋形剂的标准。

一个可接受的药物赋形剂是否可以被一种药物组合物使用依赖于针对一个特殊形式的伤口所选择的剂型。以下是根据本发明用于不同形式的组合物的药理学可接受的赋形剂的例子。

以下是根据本发明对所使用的相关的药物组合物的综述。该综

述是基于特定给药途径。然而，应理解的是，在那些药学可接受的赋形剂可以不同的剂型或组成使用的情形下，特定的药学可接受的赋形剂的应用将不限于某种特定的剂型或该赋形剂的某种特定功能。

用于本发明的组合物的药学可接受赋形剂的选择及其相应的最适浓度一般不能预测，而是要基于对最终组合物的实验评价才能决定。然而，药物配制领域熟练技术人员可以在，例如“Remington's 药物科学”第18版，Mack 出版公司，Easton，1990中得到指导。

#### 局部组合物

针对于粘膜或皮肤的应用，根据本发明所使用的组合物可以含有常规的无毒性的药学可接受的载体和赋形剂，包括微球体和脂质体。

根据本发明所使用的组合物包括所有形式的固体，半固体，和流体组合物。特殊相关的组合物是，例如，糊剂，软膏，亲水软膏，乳膏，凝胶，水凝胶，溶液，乳液，悬浮液，洗液，擦剂，洗发剂，者哩，皂剂，粘贴物，喷雾剂，粉末，薄膜，泡沫，垫料，海绵（例如胶原海绵），敷剂，（例如吸收性伤口敷剂），浸湿剂，绷带，膏药，和经皮输送系统。

药学可接受的赋形剂可以包括，溶剂，缓冲试剂，防腐剂，湿润剂，螯合剂，抗氧化剂，稳定剂，乳化剂，悬浮剂，凝胶形成剂，药膏基质，渗透增强剂，香料，和皮肤保护剂。

溶剂的例子是，例如，水，酒精，植物油或鱼油，（例如食用油，如杏仁油，蓖麻油，可可油，椰子油，玉米油，棉籽油，亚麻子油，橄榄油，棕榈油，花生油，罂粟油，菜籽油，芝麻油，大豆油，葵花油，和绒草油），矿物油，脂肪油，液体石蜡，聚乙二醇，丙二醇，甘油，液体聚烷基硅氧烷，和其混合物。

缓冲剂的例子是，例如，柠檬酸，醋酸，酒石酸，乳酸，磷酸，

二乙胺等。

组合物使用的保护剂的适当的例子是对羟基苯甲酸酯类，例如甲基、乙基、丙基对羟基苯甲酸酯，对羟基苯甲酸丁酯，对羟基苯甲酸异丁酯，对羟基苯甲酸异丙酯，山梨酸钾，山梨酸，安息香酸，安息香酸甲酯，苯氧乙醇，bronopol，bronidox，MDM 乙内酰脲，氨基甲酸碘丙炔丁酯，EDTA，氯化 benzalconium，和苄基醇或防腐剂混合物。

湿润剂的例子是丙三醇，丙二醇，山梨(糖)醇，乳酸，尿素和相应的混合物。

螯合剂的例子是 EDTA 钠和柠檬酸。

抗氧化剂的例子是丁基化羟基苯甲醚 (BHA)，抗坏血酸，和其相应衍生物，生育酚及其相应衍生物，半胱氨酸和其混合物。

乳化剂的例子是天然存在的树胶，例如阿拉伯树胶或黄芪胶，天然存在的磷脂例如大豆卵磷脂；山梨聚糖单油酸衍生物，羊毛脂，羊毛醇，山梨聚糖酯；单甘油酯；脂肪醇；脂肪酸酯（例如脂肪酸甘油三酯）；及其混合物。

悬浮剂的例子是，例如纤维素及纤维素衍生物，例如羧甲基纤维素，羟乙基纤维素，羟丙基纤维素，羟丙基甲基纤维素，角叉菜胶，阿拉伯树胶，阿拉伯树胶，胶黄芪，和相应的混合物。

凝胶基质，粘性增强剂或可以从伤口吸收渗出液的组分的例子是：液体石蜡，聚乙烯，脂肪油，胶体二氧化硅，或胶体铝，锌皂，丙三醇，丙二醇，胶黄芪，羧乙烯基聚合物，硅酸镁铝，Carbopol® 亲水聚合物，例如淀粉或纤维素衍生物例如羧甲基纤维素，羟乙基纤维素，和其它纤维素衍生物，水溶胀性 hydrocolloid，角叉菜胶，透明质酸（例如任选地包含氯化钠的透明质酸凝胶）和包括丙二醇藻酸盐的藻酸盐。

软膏基质的例子是例如，蜂蜡，石蜡，鲸蜡醇，鲸蜡醇十六酸

酯，植物油，失水山梨糖醇脂肪酸酯（Span），聚乙二醇，以及失水山梨糖醇脂肪酸酯和环氧乙烷的缩合产物，例如聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯（Tween）。

疏水性或水乳化软膏基质的例子是石蜡，植物油，动物脂肪，合成甘油酯，蜡，羊毛脂，和液体聚烷基硅氧烷。

亲水性软膏基质的例子是 macrogols（聚乙二醇）。

其它软膏基质的例子是三乙醇胺皂，硫化脂肪醇，和多乙氧基醚。

粉末组分的例子是：海藻酸盐，胶原，乳糖，当作用于伤口时可以形成凝胶的粉末（吸收液体/伤口渗出液）。一般来说，用于大的开放伤口的粉末必须是无菌的，其呈现的粒子必须是微小的。

其它赋形剂的例子是聚合物，例如 carmelose，carmelose 钠，羟丙基甲基纤维素，羟基乙基纤维素，果胶，黄原胶，刺槐豆胶，阿拉伯树胶，白明胶，carbomer，乳化剂，例如维生素 E，硬脂酸甘油酯，十六烷基糖苷，胶原，角叉菜胶，透明质酸，和藻酸盐和 kitosans。

敷料和/绷带也是重要的活性釉质物质的输送系统，活性釉质物质可以在敷料生产前或生产中可以与其它物质或成分一起混合加入，或者活性釉质物质可以涂覆在敷料上，例如，使用含有活性釉质物质的溶液或分散剂的溶液滴加在敷料上或者将含有有活性物质的溶液或分散剂的溶液喷洒在敷料上。另外，活性釉质物质也可以以粉剂的形式加在敷料上。敷料可以以伤口吸收剂的形式渗入伤口。敷料还可以以水凝胶的形式（例如交联的聚合物，例如包含羧甲基纤维素，丙二醇，或多糖，二糖，亲水性聚亚氨酯膜，和蛋白，Intrasite 公司）的形式或以封闭的敷剂例如藻酸盐，脱乙酰甲壳质，亲水性聚尿烷膜，胶原垫，片，粉末，泡沫，或海绵，泡沫（例如聚尿烷或硅酸盐），水状胶体（例如羧甲基纤维素，CMC），胶原和基于透明质酸的敷料以及相应的合并物。

也可以设想活性釉质物质也可以被掺入组织粘合剂，包括例如血纤蛋白原和凝血酶和任选地因子 XIII 或其它可以促进止血的血浆凝血因子。这些组织粘合剂也可以制备成活性釉质物质，血纤蛋白原和任选地因子 XIII 的预混合物，凝血酶在组织粘合剂使用于伤口前立即加入该预混合物。或者，血纤蛋白原，活性釉质物质和任选地因子 XIII 的预混合物也可以在使用凝血酶前施加于伤口。在作用区域处，凝血酶将血纤蛋白原转化成血纤蛋白，由此再现了伤口愈合中天然存在的凝血过程。组织粘合剂中活性釉质物质的存在可以起到如上所述的促进愈合的作用。可以适合包含活性釉质物质的商品化物质是 Tisseel®，其是由奥地利维也纳的 Immuno AG 公司生产的一个二组分的纤维蛋白封闭剂。

对于应用于牙齿或牙根的牙膏或漱口液配方或其它配方，活性釉质物质可以在略酸性 pH 条件的溶剂中以溶解状态存在，或者分散在中性 pH 的溶剂中。可以预测活性釉质物质在使用时可以在牙齿的表面形成一个保护层，以此阻止龋齿生成细菌的附着（参见下文的实施例 4）。在这种牙齿护理制备物中，活性釉质物质可以被设计成与一种或多种具有抗龋齿效应的化合物配制在一起，最常见的是氟或其它微量元素例如钒或钼。在中性 pH 下，这些微量元素被认为是结合（如经离子键）或包埋在活性釉质物质中，釉质物质在由于例如龋齿生成细菌产生的酸性代谢物导致 pH 大约是 5.5 或更低时呈溶解状态时，微量元素从中释放出来显示抗龋齿效应。

上述用于局部应用的组合物非常适合直接作用于伤口或适合引入机体的相关出口，例如直肠，尿道，阴道，耳腔，鼻腔或口腔。这些组合物也可以简单的直接应用于要治疗的部位例如粘膜，或通过其它合适的途径使用。

已经证实的对局部应用非常重要的组合物是那些有触变性质的物质，即组合物的粘度受诸如摇动或搅拌的影响以至于在作用时其

粘度降低，而在作用后其粘度又可以增加使得组合物保留在作用处。

#### 用于口腔或用于粘膜或皮肤的组合物

根据本发明所使用的组合物可以以悬浮液，乳液或分散液的形式存在。这种组合物包含的活性釉质物质与分散剂或湿润剂，悬浮剂和/或一种或多种防腐剂和其药学可接受的赋型剂混合在一起。该种组合物也适合活性釉质物质释放到作用区域例如完整的或受损伤的粘膜比如口腔，面颊，鼻腔，直肠或阴道粘膜，或向完整的或损伤的皮肤，或伤口给药。

适当的分散剂或湿润剂是，例如，天然存在的磷脂，例如卵磷脂，大豆卵磷脂；环氧乙烷与例如脂肪酸的缩合产物，长链脂族醇，或由脂肪酸衍生的部分酯，和一种己糖醇或一种己糖醇酐，例如聚氧乙烯硬脂酸酯，聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯，聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯等。

适合的悬浮剂是，例如天然存在的胶例如阿拉伯树胶，黄原胶，或黄芪胶；纤维素例如羧甲基纤维素钠，微晶纤维素（例如 Avicel®RC591，甲基纤维素）；藻酸盐和脱乙酰甲壳质例如藻酸钠等。

根据本发明在组合物中所使用的适当的防腐剂与上文所述一致。

根据本发明所使用的组合物也可以通过口腔途径使用。适当的口腔组合物可以被设计成颗粒配制品或固体，半固体或流体剂型。

口腔使用的组合物包括固体剂型例如粉剂，小颗粒，颗粒，锭剂，片剂，胶囊，起泡片剂，咀嚼片剂，糖锭，速释片剂，或修饰的释放片剂以及流体或液体配方，例如溶液，悬浮液，乳液，分散液和混合物。另外，组合物可以是粉末，分散粉末，或适合于通过加入液体介质例如一种水性介质而制备成水性悬浮液的颗粒。

对于口腔（或局部使用）的固体剂型，根据本发明所使用的组合物一般包括活性釉质物质和任何其它活性物质，它们任选地与一



种或多种药学上可接受的赋形剂混合。这些赋形剂包括，例如

惰性稀释剂或填充剂，例如蔗糖，山梨糖醇，糖，甘露醇，微晶纤维素，淀粉包括马铃薯淀粉，碳酸钙，氯化钠，乳糖，磷酸钙，硫酸钙，或磷酸钠；

颗粒或崩解剂例如淀粉衍生物，包括微晶纤维素，淀粉包括马铃薯淀粉，croscarmellose 钠，藻酸盐，藻酸，和脱乙酰甲壳质；

粘合剂例如蔗糖，葡萄糖，山梨糖醇，阿拉伯树胶，藻酸，海藻酸钠，白明胶，淀粉，预胶凝化淀粉，微晶淀粉，硅酸镁铝，羧甲基纤维素钠，甲基纤维素，羟丙基甲基纤维素，乙基纤维素，聚乙烯吡咯烷酮，聚乙烯基乙酸酯，或聚乙二醇；和脱乙酰甲壳质；

润滑剂包括助流剂和抗粘附剂，例如硬脂酸镁，硬脂酸锌，硬脂酸，二氧化硅，氢化植物油，或滑石。

其它药学上可接受的赋形剂可以是着色剂，调味剂，可塑剂，保湿剂，缓冲剂等。

在药物组合物以单位剂型的固体剂型存在的条件下（例如片剂或胶囊），该单位剂型可以以以下所述的包被物的形式提供。

在组合物以片剂，胶囊或多单位组合物的形式存在的条件下，组合物或各个单位或包含各个单位的片剂或胶囊可以用下列物质包被例如糖衣，薄膜，（例如基于羟丙基甲基纤维素，甲基纤维素，甲基羟乙基纤维素，羟丙基纤维素，羧甲基纤维素，丙烯酸酯共聚物（Eudragit），聚乙二醇和/或聚乙烯吡咯烷酮）或肠衣（例如基于甲基丙烯酸酯共聚物（Eudragit），邻苯二甲酸醋酸纤维素，羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯，羟丙基甲基纤维素醋酸琥珀酸酯，聚乙烯基乙酸邻苯二甲酸酯，虫胶，和/或乙基纤维素）。另外，延时物质例如甘油单硬脂酸酯或甘油二硬脂酸酯也可以使用。

直肠和/或阴道组合物

为了应用于直肠和阴道粘膜，根据本发明所使用的组合物包括

栓剂（乳液或悬浮液型），灌肠剂，直肠明胶胶囊（溶液或悬浮液）。适当的药理学可接受的栓剂基质包括可脂，酯化脂肪酸，甘油明胶，和各种水溶性或水分散性基质例如聚乙二醇和聚氧乙烯失水山梨糖醇脂肪酸酯。各种添加剂例如增强剂或表面活性剂也可以加入。

#### 鼻腔组合物

针对鼻腔粘膜的使用（以及口腔粘膜），适合吸入的喷雾剂或气雾剂是本发明适当的组合物。在一个典型的鼻腔组合物中活性釉质物质以颗粒形式存在并任选地分散在适当的载体中。在组合物中存在的药理学上可接受的载体和赋形剂和任选地其它药理学上可接受的材料例如稀释剂，增强剂，调味剂，防腐剂等均是根据常规药物实践以药物配制领域熟练技术人员所理解的方式选择。

#### 釉基质，釉基质衍生物和釉基质蛋白的剂量

在根据本发明针对皮肤或粘膜使用的药物组合物中，活性釉质物质的浓度通常介于大约 0.01%w/w 至 99.9%w/w 之间。组合物的使用量通常针对每平方厘米的伤口/皮肤/组织面积的总蛋白量是从大约 0.01mg/cm<sup>2</sup> 至大约 20mg/cm<sup>2</sup>，例如从大约 0.1mg/cm<sup>2</sup> 至大约 15 mg/cm<sup>2</sup>。

组合物的使用量依赖于组合物中活性釉质物质的浓度以及活性釉质物质从组合物中释放的速度，但是通常多数大约 15-20mg/cm<sup>2</sup>。

当活性釉质物质以流体组合物的形式给药时，组合物中活性釉质物质的浓度在大约 0.1 到大约 50mg/ml 之间。在某些情况下希望更高的浓度，也可以获得例如大约 100mg/ml 的浓度。

当组合物应用于口腔时，下列剂量是相关的：

典型的口腔内的实验损伤面积（猴子）大约 4×2×5-6mm，相应于 50 微升或大约 0.025 至大约 0.15mg 总蛋白/mm<sup>2</sup> 或大约 2.5-15mg/cm<sup>2</sup>。一般来说至多 0.5，例如 0.4，0.3，0.2，0.1ml 的组合物，浓度大约是 1-40mg/ml，例如 5-30mg/ml 被给药。

人口腔由于牙周疾病所造成的损害面积典型大小是  $5-10 \times 2-4 \times 5-10\text{mm}$ , 相应地需要使用浓度大约  $1-40\text{mg}$  总蛋白/ml, 例如  $5-30\text{mg/ml}$  的大约 200 微升, 通常多数大约  $0.5-1\text{ml}$ , 例如  $0.2-0.3\text{ml}$ /每个牙齿的组合物。 $0.2-0.3\text{mg/ml}$  相应于每  $25-100\text{cm}^2$  的损害面积  $6\text{mg}$  蛋白, 或者如果仅按牙根面积计算大约  $0.1\text{mg/mm}^2$ 。一般来说常使用过量体积的组合物以覆盖整个表面。甚至一个多层的形成也仅需要上述剂量的一小部分。

一般来说, 大约  $0.1-0.5\text{ml}$ , 例如大约  $0.15-0.3\text{ml}$  或大约  $0.25-0.35\text{ml}$  的包含活性釉质物质的组合物可以施加到拔牙后牙槽的缺陷空间内 (拔牙后的孔洞)。组合物中活性釉质物质的浓度通常是  $1-40\text{mg}$  总蛋白/ml, 例如  $5-30\text{mg/ml}$ 。当  $0.3-0.4\text{ml}$  的这种组合物作用于智齿时, 这一体积相应于  $0.1\text{mg/cm}^2$  (牙槽的计算是按照直径  $5\text{mm}$  高  $20\text{mm}$  的圆柱体计算的)。

药物组合物中活性釉质物质的浓度依赖于特异的釉质物质, 其活性, 需要治疗和预防的疾病的严重程度, 及被病人的年龄和身体情况。对于药物组合物中活性釉质物质相应浓度的选择为本领域技术人员熟知, 并可以依据例如国际标准 ISO/DIS 14155 医用设备的临床研究, 1994 和 ICH (国际协调组织) 的良好的临床应用的三方协定, Brookwood 医学出版有限公司, Surrey, 1996 所叙述的良好临床应用 (GCP) 或研究新型药物条例中已建立的条款执行。在本领域中的技术人员可以使用如上所述的标准教科书, 条例和规则以及本领域中的常用知识叙述的方法选择针对一些活性釉质物质的恰当摄入剂量, 和/或简单地通过常规实验步骤选择出其它活性物质的剂量形式。

在其它方面, 本发明涉及下列方法, i) 预防和/或治疗伤口, ii) 降低感染, iii) 预防和/或治疗炎症, 这些方法包括给予需此治疗的哺乳动物有效量的活性釉质物质。

正如将被理解的，关于使用活性釉质物质预防和或治疗伤口的细节与上文讨论的该物质的其它应用（抗细菌和抗炎效应）和方法是相同的或类似的，这意味着合适时，上述关于活性釉质物质，包含活性釉质物质的制备物，包含活性釉质物质的药物组合物，i) 活性釉质物质的制备物，ii) 包含活性釉质物质的制备物，iii) 包含活性釉质物质的药物组合物，以及其改进的性质和使用可以应用于本发明所有方面有的变化情形。

#### 附图的简要说明

通过参考附图可以对本发明进行进一步的揭示，其中

图 1 显示出用 EMD 刺激或未刺激的人 PDL 细胞中的 DNA 合成；

图 2 显示出用 EMD 刺激或未刺激的人 PDL 细胞中的 TGF- $\beta$  1 生成；

图 3 显示出下面的实施例 3 和 4 所述的流动实验中流动室和计算机系统的示意图；

图 4, 5, 6 显示出粘放线菌与分别用 EMD 和乙酸处理过的玻璃板附着的 3 个独立实验的结果图；

图 7, 8, 9 显示出突变链球菌与分别用 EMD 和乙酸处理过的玻璃板附着的 3 个独立实验的结果图；

图 10A 显示出智齿摘除后的术后损伤的 X-射线照片；

图 10B 显示出下文实施例 12 所述的 EMD 处理后的牙周膜的再生过程的 X-射线照片。

#### 实验部分

##### 材料和方法

产于瑞典 BIORA AB, S-205 12 Malmo 的釉基质衍生物 EMDOGAIN®包含 30mg 冻干的釉基质蛋白（下文中简述为 EMD）和 1ml 载体溶液（丙二醇藻酸盐），其在使用前混合，除非蛋白和载体分别进行实验。主要的蛋白峰 20, 14, 5kDa 之间重量比大约是

85/5/10。

热处理的 EMD 指 EMD 在约 80℃ 处理 3 小时用以灭活残余的蛋白酶。

采用 HPLC 凝胶渗透层析（使用溶于 0.9%NaCl 的 30%乙腈平衡的 TSK G-2000 SW）从 EMD 中分离 20kDa 的珐琅蛋白和 5kDa 的富含酪氨酸的珐琅蛋白肽（TRAP），进一步使用乙腈梯度通过反向层析（Pro-RPC，HR5/10，Pharmacia-Upjohn，瑞典）进行纯化。然后将不同量的所分离的蛋白/多肽加入 EMDOGAIN®载体溶液中，除非是二者分开检测。

透明质酸是来自日本东京的 Seikagaku 公司的 HMT-0028（MW 990000）。

细菌和酵母都是最初从病人分离的，按照标准步骤根据代谢和抗原性质进行分类。所使用的细菌和酵母的种类在下表中列出。

血清白蛋白（牛）和 I 型胶原（牛）均购自 Sigma, St.Louis, U.S.A. 琼脂板均为脑心浸液琼脂，购自 Difco，补加入血红细胞（每升琼脂 100ml）。

#### 实施例

##### 实施例 1

用 EMDOGAIN®处理的 PDL 细胞的细胞增殖和 TGF-β 1 生成  
将 3ml 无菌过滤的 0.1%的 HAc 加入小瓶（含 30mg 的 EMD）  
制备 EMD 的贮存液。60 微升的 EMD 贮存液加入 6000 微升的含有 10%胎牛血清和 1%的青链霉素溶液的 DMEM 培养基。将 300 微升的混合物加入 96 孔微量滴定板（NUNC A/S，丹麦，目录号#167008）的每个孔中。1000 个人牙周膜细胞（PDL）（取自由于畸齿矫正的原因需要进行前臼齿摘除的健康人的牙周组织，而后按照 Somerman 等，牙齿研究杂志 67，1988，pp.66-70 叙述的方法进行培养）被加入到每个孔，37℃，5%CO<sub>2</sub> 培养 5 天。

用作对照的 PDL 细胞基本如上所述在 DMEM 培养基中培养，但不加入 EMD。

孵育后的细胞按照厂商指导通过测定掺入的 5-溴-2'-脱氧尿苷 (BrdU) 量的免疫分析来观察细胞增殖的情况 (Boehringer Mannheim, 目录号#1647 229)。在该步骤中, BrdU 代替胸苷掺入到生长细胞的 DNA 中。通过 ELISA 方法对掺入的 BrdU 的量进行测定, 用该方法测定的 BrdU 的掺入量是 DNA 合成速率的一个指示, 相应的显示出 PDL 细胞的增殖速率。

图 1 的结果显示出在 EMD 存在下培养的 PDL 细胞的增殖速率远远高于未用 EMD 培养的细胞。

从微量滴定板上取 100 微升的细胞上清加入到 20 微升 1N 的 HCl 中, 室温孵育 10 分钟。孵育混合物用 20 微升的 1N NaOH/0.5M HEPES 中和。100 微升的该混合物加入 400 微升的稀释缓冲液。200 微升的稀释液使用英国 R&D Systems 的 Quantikines™ 试剂盒 (目录号: #DB100) 按照说明书介绍的方法进行 ELISA 检测。

图 2 的结果显示出与 EMD 保温的 PDL 细胞中 TGF- $\beta$  1 生成的量比未用 EMD 处理的细胞显著增加。

## 实施例 2

在釉基质衍生物和釉基质蛋白存在的条件下微生物生长情况的研究

本实施例的目的是证实釉基质衍生物和釉基质蛋白在体外对微生物的生长有抑制作用。

本实施例中所使用的蛋白溶解在用乙酸调节至 pH5.5 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 中。所使用的微生物悬浮在 pH6.8 的 PBS 中, 终浓度为 OD<sub>600</sub>0.4。

将 50 微升的 EMDOGAIN® (30mg 的 EMD 溶解在 1ml PGA 中) 和 50 微升的 EMD, 热处理的 EMD, EMD 组分 A, B, C 和 H (均

为每毫升 PBS 含 10mg 蛋白)滴在琼脂板上,使之在平板(9cm 直径,根据每种微生物的需要加有用来确定抗性的补充物质的标准平板)上空气干燥。随后微生物的均一悬浮液(1ml  $OD_{280}=0.5$ )涂布在琼脂板上,平板根据每种细菌生长的要求在  $CO_2$  富集的空气或厌氧条件下  $35^\circ C$  孵育 3 天(需氧培养)或 14 天(厌氧培养)。所有培养物每天检查一次。在相同的条件下 I 型胶原和血清白蛋白(均来源于牛)作为对照检测。未稀释的丙二醇藻酸盐(PGA-EMD 载体),PBS 缓冲液和透明质酸(HA-另一种 EMD 载体)也作为阴性对照。

表 1 的结果显示出仅有釉基质衍生物或釉基质蛋白或衍生物抑制一些微生物的生长。在蛋白周围没有扩散区的迹象表明所使用的 EMD 蛋白聚集在琼脂表面,并且只有与蛋白直接接触的微生物的生长被抑制。当收集被抑制区域的样品并在液体培养基(加入补充物质的 LB 肉汤)培养时,可以复活原始微生物的单培养物,这表明活性蛋白不是来自微生物。所有的对照均为阴性显示出没有非特异性的机制影响结果。

表 1

在测试物质上的生长 (+/-)

菌株	血清白蛋白	I 型胶原	丙二醇藻酸盐	EMDOGAIN®	EMD	热处理的 EMD	EMD 部分 A	EMD 部分 B	EMD 部分 C	EMD 部分 H	透明质酸	缓冲液对照
伴放线放线杆菌	+	+	+	-	-	-	±	+	-	+	+	+
大肠杆菌	+	+	+	-	-	-	+	+	±	+	+	+
金黄色葡萄球菌	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
突变葡萄球菌	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
枯草芽孢杆菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
白色假丝酵母	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

EMD 组分 A: 多数为珐琅蛋白, 约 26-20kDa

EMD 组分 B: 约 17-13 kDa 的蛋白

EMD 组分 C: 约 10-5 kDa 的肽

EMD 组分 H: EMD 中分子量大于 27 kDa 的所有蛋白

+指微生物的正常生长

-指微生物的生长完全被抑制

+/-指与阴性对照相比生长部分被抑制

表中所有的结果是在孵育第二天（需氧培养）或第五天（厌氧培养）记录的。

这些结果显示出 EMD 包含的蛋白和肽在表面聚集时可以抑制某些革兰氏阴性杆菌和某些革兰氏阳性球菌的生长。基于 EMD 蛋白的基本行为特性（参考 jpc），并且因为该种抑制效应不是来源于微生物，对所观察到的效应的一个合理的解释是蛋白聚集物形成一种不溶性屏障将微生物和其生长所需的底物隔开。

### 实施例 3

EMD 在体外对粘放线菌附着速率的作用

#### 介绍

EMD 对广泛存在于牙斑但一般不认为与严重的牙周炎相关的一种口腔微生物粘放线菌的最初附着的作用得到了研究。尽管该微生物可以与牙龈卟啉单胞菌形成聚集体并因此对潜在的牙周病原体在牙根表面的寄居有影响，但放线菌也被发现大量存在于健康的齿龈下部位（这些发现与 Liljemark 等，微生物免疫 8，1993，pp.5-15 的内容一致，Liljemark 发现在牙周治疗后，放线菌的比例明显增加。Haffajee 等在“牙周临床杂志” 24，1997，pp.767-776 中通过对对最初的牙周治疗反应较好的个体的牙龈下牙斑的微生物进行计数后得出结论，粘放线菌和 *T. denticola* 的数量相对丰富。



## 材料

粘放线菌 HG85 由 A.J.van Winkelhoff 博士（口腔微生物系，ACTA）提供。Emdogain®由 BIORA 提供（Malmo, 瑞典）。RBS 去污剂购自 Fluka（Fluka Chemie AG, Buchs, 瑞士）。

## 细菌生长和收获

粘放线菌从血琼脂接种到 Schaedler's 分批培养基，37°C 培养 24 小时。该培养物被用来接种第二个培养基 Schaedler's 肉汤，继续培养 16 小时。离心收集细胞（5 分钟，6500xg），用无离子水洗 2 次。随后微生物在 30W 下用超声波处理 20 秒（Vibra Cell model 375, Sonics and Materials Inc., Danbury, CT, USA）打碎菌体链和聚集体。超声处理及将菌体放入冰水混合物间隔进行。使用 Burker-Turker 细胞计数器对细胞进行计数。最后将粘放线菌悬浮于粘附缓冲液（2mM 磷酸钾，50 mM 氯化钾和 1mM 氯化钙，pH 6.8）中。

## 玻璃板的包被

玻璃板先用 5% 的 RBS 去污剂通过超声波彻底洗净，进一步用自来水冲洗，然后再用甲醇洗涤，最后用蒸馏水冲洗。这些步骤使得水接触角为零度。EMD 用 0.01M 的醋酸溶解，浓度为 7.5mg/ml。玻璃板用聚四氟乙烯记号笔（DAKO A/S, Glostrup, 丹麦）分割成相等的两部分。一边加入醋酸（0.01M），另一边是 250ug 的 EMD。玻璃板在一个流动橱柜中空气干燥 4-6 小时。

## 流动试验

本试验使用的流动室和计算机系统见图 3 所示。在试验进行以前，所有的试管及流动室均加满粘附缓冲液，应该注意的是系统内不能含有空气气泡。包被好的玻璃板组成流动室的底部。流动速度设置为 2.5ml/min（与人体内唾液的平均流动速度相当）。细菌悬液在系统内大约循环 3-4 小时，计数附着于基材上的细菌数。共进行 3 个独立的试验。所有的试验均用每 250ml 粘附缓冲液含有  $3 \times 10^8$

细胞进行。在实验过程中，对于对照和 EMD 包被板上的 6 个预先确定的位置每隔 10-15 分钟呈像一次。平行的流动室的槽高度为 0.6mm。

### 数据分析

在对所有图象中的吸附细胞进行计数后，数据被转变成每平方厘米细菌数。对于每一个实验，每平方厘米细菌最终数用于统计学分析（对于成对观察的 Student's t-检验，以 n 作为实验次数）。

### 结果

实验 1（图 4）显示出特别是在流动的最初 150 分钟所粘附的微生物数量的逐渐增加。在这个时间段后，与 EMD 粘附的微生物的数量达到一个  $2.0 \times 10^6$  个细菌/平方厘米的平台期，这个数量比用醋酸处理的玻璃板的数量高 4 倍。

在实验 2 中（图 5），EMD 也显示出强烈的刺激粘放线菌与基材粘附的能力。然而，在实验开始的最初阶段，这种效应不是很明显。也许这是由于此时流动系统中微生物尚处在低浓度。90 分钟以后，与 EMD 粘附的细菌数量同对照相比逐渐增加，3 小时后达到最大值  $1.6 \times 10^6$ /每平方厘米，增加 3 倍。

实验 3（图 6）表明在流动后 5 分钟就已经显示出对粘放线菌附着于 EMD 包被的玻璃板的刺激作用。EMD 在最初的 45 分钟诱导附着微生物的数量快速增加。与乙酸处理的一面的附着作用也显示出相似的情况，但相比之下所吸附的微生物的数量要少。200 分钟以后，对 EMD 包被板的附着比乙酸处理的表面上的附着高 2 倍。

3 个实验结合在一起看，其差异证明是统计学显著的 ( $p < 0.05$ )。

从这些结果看出，EMD 作为玻璃表面的一个包被物，在体外对于粘放线菌的附着有非常显著的刺激效应。尽管现在还没有弄清是什么原因导致这种增强的初始附着，但现在的假设是微生物与商购的蛋白质混合物中的珐琅蛋白组分中富含的脯氨酸残基相互作用。

细菌的粘附作用一般是由特异的蛋白质-肽和外源凝集素-碳水化合物的识别决定的。已知粘放线菌中的 1 型菌毛可以与富含脯氨酸的蛋白结合，例如唾液中的富含脯氨酸的蛋白（PRP）以及 I 型和 III 型胶原。

EMD 和某些口腔微生物之间的特异性相互作用由于使得菌斑处的生态学发生改变因而对于口腔中生物膜的组成有重要作用。如果该种生态学的改变的方向是促使微生物不与牙周疾病相关，EMD 的应用就可以通过发挥这种效应而改善牙周的情况。当然，这一点是在 EMD 的其它有益效应之外的。

#### 实施例 4

##### EMD 在体外对突变链球菌附着速率的作用

##### 介绍

已经有大量的证据显示菌斑微生物是引起例如牙周炎和龋齿的口腔疾病的原因。根据当前龈上菌斑形成的模型，链球菌被认为是牙齿表面的主要寄居者。因此菌斑的产生是由于细菌的生长或其它种类的细菌的进一步增加。这种增加可以经细菌和细菌的结合而发生或由唾液分子介导。细胞外大分子的生成也促进了菌斑的发生。突变链球菌现今被认为是值得密切注意的生物膜种类细菌中的一种，因为它与龋齿有关。尽管很多革兰氏阳性菌（即突变链球菌）已经显示出对限菌动物引起牙槽骨损伤，但这些微生物似乎不是造成牙周袋的生态学的主要因素。然而，潜在的致病微生物一定可以逃避宿主防御和免疫机制从而对宿主组织造成损伤。

##### 材料

突变链球菌 NS 由 H.van der Mei 博士惠赠（材料技术，Groningen 大学）。EMDOGAIN®由 BIORA 提供（Malmo，瑞典）。RBS 去污剂购自 Fluka（Fluka Chemie AG，Buchs，瑞典）。

##### 细胞生长和收获

将突变链球菌从血琼脂板上接种到分批培养基 Todd Hewitt 肉汤中，37℃培养 24 小时。该培养物用于第二次接种 Todd Hewitt 肉汤，生长 16 小时。离心收获细胞（5 分钟 6000xg），无离子水洗两次。最后微生物在 30W 下用超声波处理 20sec (Vibra Cell model 375, Sonics and Materials Inc., Danbury, CT, USA) 打碎菌体链和聚集体。超声处理和即将菌体放入冰水混合物中间隔进行。使用 Burkert-Turker 细胞计数器对细胞进行计数。最后将突变链球菌悬浮于粘附缓冲液（2mM 磷酸钾，50 mM 氯化钾和 1mM 氯化钙，pH 6.8）中。

#### 玻璃板的包被

玻璃板先用 5% 的 RBS 去污剂通过超声波彻底洗净，进一步用自来水冲洗，然后再用甲醇洗涤，最后用蒸馏水冲洗。这些步骤使得水接触角为零度。EMD 用 0.01M 的醋酸溶解，浓度为 7.5mg/ml。玻璃板用聚四氟乙烯记号笔 (DAKO A/S, Glostrup, 丹麦) 分割成相等的两部分。一边加醋酸 (0.01M)，另一边是 250ug 的 EMD。玻璃板在一个空气流动的橱柜中干燥 4-6 小时。

#### 流动试验

本试验使用的流动室和计算机系统见图 3 所示。在试验进行以前，所有的试管及流动室均加满粘附缓冲液，应该注意的是系统内不能含有空气气泡。包被好的玻璃板组成流动室的底部。流动速度设置为 2.5ml/min（与人体内唾液的平均流动速度相当）。细菌悬液在系统内大约循环 3-4 小时，计数附着于包被的基材的细菌数。共进行 3 个独立的试验。所有的试验均用每 250ml 粘附缓冲液含有  $3 \times 10^8$  细胞进行。在实验过程中，对于对照和 EMD 包被板上的 6 个预先确定的位置每隔 10-15 分钟呈像一次。平行的流动室的槽高度为 0.6mm。

#### 数据分析

在对所有图象中的附着细胞进行计数后，数据被转变成每平方

厘米细菌的数量。对于每一个实验，每平方厘米细菌最终数量用于统计学分析（对成对观察的 Student's t-检验，以 n 作为实验次数）。

### 结果

在三个实验中的每一个实验中，EMD 显示出对突变链球菌附着速率的抑制作用（图 7, 8, 9;  $p < 0.05$ ）。与乙酸处理的对照相比抑制大约为 40-70%。

第一个实验（图 7）显示出在流动开始 10 分钟后就已经显示出附着于 EMD 包被的玻璃板附着的突变链球菌的数量受到抑制。3 小时后，附着被抑制为对照的大约 60%。

在第二个实验中（图 8），流动开始 1.5 小时后，EMD 开始抑制突变链球菌的附着。附着于 EMD 的突变链球菌数量在流动开始后大约 40 分钟达到一个平台期，500000 个/cm<sup>2</sup>。大约 3.5 小时后，计数大约是对照的 25%。

第三个实验（图 9）显示出从流动程序一开始，在 EMD 的影响下对突变链球菌附着的抑制作用就存在。如实验 1 所示，流动 3 小时后，抑制达到对照的大约 60%。

本发明的研究显示 EMD 对突变链球菌在玻璃表面的附着有明显的抑制作用。对这种抑制作用的一种可能的解释是 EMD 混合物中疏水性化合物的存在。在混合物中大量存在的蛋白之一是珐琅蛋白，该蛋白除包含一个酸性亲水性 C-端序列外，还包括一个富含脯氨酸，亮氨酸，蛋氨酸和谷氨酰胺的 100-300 个残基的疏水核心部分。Saito 等在“口腔生物学报，42，1997，pp.539-545”报导发现各种突变链球菌菌株对固定化疏水性蛋白（OAIIS）的附着受到抑制。作者将这种效应归因于微生物细胞表面的负电荷（突变链球菌即是如此）。其它一些表面特征也可以参与受影响的对基材的附着作用。突变链球菌包含一个表面抗原 I/II，它具有特别富含丙氨酸的 N-端部分和并包括串联重复。这种区域预测为  $\alpha$ -螺旋，它采取一种卷曲

构象，这可能是与抗原 I/II 表达有关的细胞表面疏水性的原因。

### 实施例 5

#### EMD 对一些牙周病原体生长的效应

中间普雷沃氏菌和牙龈卟啉单胞菌在补加 0.5mg/ml 维生素 K 和 5mg/ml 血晶素的硫代乙醇酸盐肉汤培养基中，在通过 GasPakPlus 封袋在适当的发酵罐中产生的厌氧气氛下预培养 10-16 小时。当培养物的  $OD_{600}$  值达到 0.1-0.2，即相应的细胞密度至  $10^6$ - $10^7$ cfu/ml（菌落形成单位）时，吸出 100 微升等份，菌体经离心沉淀。菌体沉淀用 100 微升新鲜配制的人血清和无菌盐水的混合物重悬，包含  $10^5$ - $10^6$  个细胞的悬浮液转移到无菌的 1.5ml 的 Eppendorf 管中，与 (i) 100 微升的 EMD 制备物（溶解在 0.1mlPGA 中的 3mg EMD），(ii) 100 微升的 PGA 载体或 (iii) 100 微升的血清/NaCl 溶液混合物混合作为生长对照。0, 3, 6, 24 小时后分别取 10 微升培养液进行生长测定。吸取的等份用无菌 0.9%的 NaCl 溶液系列稀释，每个稀释度取 10 微升涂在 Schaedler 琼脂上。培养条件与预培养条件相同。琼脂板培养 3-4 天，随后测定 cfu 和细胞密度 (cfu/ml)。所有实验重复 6 次。

结果（以相对于开始时 cfu/ml 浓度百分比表示）

#### 1) 不同时间点对照培养物

	0	3 小时	6 小时	24 小时
中间普雷沃氏菌	100	160	25	10
牙龈卟啉单胞菌	100	100	125	150

#### 2) 在 PGA 载体存在时不同时间点的培养物

	0	3 小时	6 小时	24 小时
中间普雷沃氏菌	100	140	25	10
牙龈卟啉单胞菌	100	75	50	5

## 3) 在 EMD 存在时不同时间点的培养物

	0	3 小时	6 小时	24 小时
中间普雷沃氏菌	100	40	0	0
牙龈卟啉单胞菌	100	30	0	0

与仅使用载体或不添加 EMD 的对照相比，EMD 的存在显著抑制培养物的生长。

## 实施例 6

对 EMODGAIN®在牙周手术后改善软组织伤口愈合效应的研究本实施例的目的是显示在牙周手术后釉基质衍生物和/或釉基质蛋白对改善软组织伤口愈合的影响。

50 个以上猕猴牙齿的牙周边缘的实验损伤是通过除去牙骨质，牙周膜和边缘牙槽骨后造成一个颈-尖距离大约 5mm 的牙齿毛刺。将釉基质衍生物（购自 EMODGAIN®，未重配的冻干粉末或重配的组合物）加入实验损伤处，或不加任何物质（对照）。在重配的组合物中蛋白质的含量大约是 5-30mg/ml，每个实验损伤所加的体积介于大约 0.1 到 0.2 毫升。

伤口愈合在接下来的 8 周内通过目测进行评价。在给药 EMODGAIN®的损伤处，可观察到很好的愈合效果（无红色和肿胀），给药 2 周后拆线时几乎看不到斑，5 周后可见良好的愈合，几乎无牙龈炎，8 周即实验终止时完全愈合无任何并发症。相比之下，对照伤口 2 周后出现炎症，并伴有收缩和明显斑，5 周和 8 周后出现明显的收缩和牙龈炎。

## 实施例 7

对牙周手术后釉基质衍生物和釉基质蛋白的伤口愈合效应的研究

本发明的目的是显示牙周手术后釉基质衍生物和釉基质蛋白对

病人的快速伤口愈合的影响。

需要进行牙周手术的 55 个病人被分成两组，一种进行常规的手术并使用改进过的 Widman 牙周翻瓣术（20 个病人），另一组使用相同的步骤但附加使用 EMODGAIN®（35 个病人）（浓度为 30mg 蛋白/ml，每个牙齿大约使用 0.3ml）。在手术时没有病人使用抗生素，但所有人均被指导每天使用无菌（洗必太）漱口水。

在拆线时（手术后 1-3 周）每个病人被询问问题。尽管 3 个对照组病人（15%）出现术后问题需要使用抗生素，但仅有一个使用 EMODGAIN®处理的病人需要此种治疗。

#### 实施例 8

##### 拔牙后釉基质衍生物和釉基质蛋白的伤口愈合效应的研究

本实施例的目的是为了证明在第三磨牙摘除后釉基质衍生物和釉基质蛋白对伤口愈合的影响。

30 岁或大于 30 岁的需要摘除对称阻生或半阻生下颌第三磨牙的病人采用传统方法进行一个第三磨牙的摘除，该方法涉及垂直向翻瓣术以进行必要的骨切除术和切开，而另一个磨牙摘除后牙槽在缝合前添满 EMODGAIN®。所有的病人在手术前 1-2 小时使用抗生素（3g 羟氨苄青霉素或 1g 红霉素），手术后使用 Ibuprofen（600mgx3）。然后他们被指导使用洗必太漱口（0-1%，10mlx2）4 周。

2 周后拆线。用 EMODGAIN®处理和对照位置的愈合情况由病人和牙科医生共同评价。在一个中心，9 个病人对侧摘除后使用/不使用 EMODGAIN®处理。一个病人在两个位置的缝合处均有轻微疼痛，而其它病人仅在对照位置有严重痛觉，而在 EMODGAIN®处理的位置无任何问题。在第二个中心，6 个病人中的 3 个仅在对照位置有疼痛。最终在第三个中心，一个病人被诊断为对照位置的牙槽有严重问题，即牙槽炎，EMODGAIN®处理的位置无问题。另一个病人在两个摘除的缝合处均有轻微疼痛，但只有对照处出现炎症和



明显疼痛，需要反复用盐水冲洗并摄入止痛剂。

这些临床结果显示出在智齿被摘除后采用 EMODGAIN®处理牙槽可以改善愈合并缓解其它情况下经常出现的疼痛性肿胀。

#### 实施例 9

釉基质衍生物和釉基质蛋白对干痛牙槽炎愈合效应的研究

本实施例的目的是显示釉基质衍生物和釉基质蛋白对干痛牙槽炎（干槽症）愈合的影响。

在摘除一个 70 岁的男性患者的一个感染的 35 牙根残余物后，病人经历了与摘除牙槽有关的剧烈疼痛和肿胀。当他的牙科医生为他检查时发现他已经发展成干痛牙槽炎，即最初的凝结物已经分离，牙槽骨壁坏死。邻接的牙槽骨和软组织出现炎症。

该病人有心脏病史，曾采用抗凝剂 Marevan 进行治疗。作为其病况的结果，他的外周血循环降低。他还经常每天吸多支烟。

病人的牙槽炎按照传统方法除去坏死牙槽骨，导致新出血。而且病人的齿龈松动，采用缝合术封闭牙槽。而后对病人使用青霉素（apocillin 660mg，早晚共 2 片，使用 7 天）以防止感染，同时建议病人使用洗必太每天漱口两次。5 天后停用抗生素时病人仍显示出临床症状并抱怨有严重疼痛。对手术处进行肉眼观察，触摸和探测显示出牙槽炎持续存在并出现更多的骨坏死。X-射线显示骨破坏和坏死均出现在牙槽的顶点部分。手术处被再一次清理干净，所产生的骨损害处用 EMODGAIN®添满（30mg/ml，最多使用 0.5ml），在齿龈处使用新的缝合以封闭牙槽。未再采用其它的治疗方法，但病人被告知继续用洗必太漱口。两天后病人回到诊所报告说疼痛和肿胀均消失。临床检查和在 EMODGAIN®处理一周后拆线显示出良好的愈合效果，没有炎症和坏死的迹象，没有红色和肿胀的完整的齿龈覆盖伤口区域。当触摸和探测时没有流血和疼痛感。观察不到恶臭或怪味或渗出液。病人没有报告有任何痛觉和发现其它症状。

## 实施例 10

### 釉基质衍生物和釉基质蛋白对干痛牙槽炎的预防效应的研究

本实施例的目的是显示釉基质衍生物和釉基质蛋白抗干痛牙槽炎的预防效应。

一个 82 岁的女性病人患有 44 号牙垂直根断裂。该牙齿是跨越 35 号到 46 号牙的桥梁的支柱，病人曾在很多年以前接受牙髓治疗。临床上，牙齿周围的牙龈出现炎症，有一个牙龈袋沿着垂直方向直至牙齿的顶端。X-射线显示 44 号牙的严重局部牙周炎。

该病人有很好的口腔卫生，但由于使用 Marevan（抗凝剂）治疗心脏病，牙槽在触探时很容易造成流血。6 个月以前，病人由于严重的牙周炎通过手术摘除了第 35 号牙。那次手术后她经历了长时间的干痛牙槽炎。她非常关心的是 44 号牙的摘除会不会导致她曾经经历的相同的术后并发症。她被告知由于年龄大，使用过 Marevan 进行治疗和感染的牙根和牙龈袋的合并作用将使得她遭受术后综合症例如牙槽炎的危险性大大增加，而除了手术除去牙根碎片外无其它办法。

该病人同意将 44 号牙摘除并且作为实验使用 EMODGAIN® 进行预防治疗以阻止干痛牙槽炎的发生。病人在麻醉后被实施切口和摘除面颊骨，以使在不松动（牙齿）间桥的情况下摘除牙根碎片。摘除后牙槽经机械清洗后添满 EMODGAIN®（30mg/ml，最多使用 0.5ml），通过缝合使瓣重新复位。当天晚上病人报告（通过电话）在手术区域有长时间流血（手术前未停止使用 Marevan），但无其它症状。当手术 5 天后拆线时，手术过的软组织损伤完全愈合。病人没有报告有任何例如疼痛或肿胀的症状，对此治疗大体上非常满意。

## 实施例 11

### 釉基质衍生物和釉基质蛋白对外伤后并发症的愈合效应

本实施例的目的是为了显示釉质蛋白/釉基质衍生物对病人外伤

后并发症愈合的影响。

在一次意外事故后，病人在一个急诊所将受伤的上前牙进行连接。牙科医生发现 11 和 21 号牙齿死亡，12 和 22 号牙齿有 I 或 II 类近中切骨折。边缘龈出现严重的炎症，与牙齿表面的附着非常差。病人有疼痛和麻木，肿胀和味嗅觉不好的并发症。在 11 和 21 号牙的根尖区还出现牙周膜损伤。两个中切牙被清洁，将新鲜混合的  $\text{Ca(OH)}_2$  添满牙根。

4 个星期后，伤口的愈合仍被判断为不理想。情况发展成一种慢性炎症，牙齿被视作失去。对于此种情形的标准的治疗方法是取出全部 4 个切牙并用间桥或植入物代替。然而，病人强烈反对这种治疗方法，作为保存牙齿的最后努力，对所有四个受伤的牙齿（11，12，21，22）进行龈翻瓣术。使用了两瓶 EMODGAIN®（60mg 在 3ml 溶液中）。在瓣用 7 针缝合以前，用注射器向每个牙齿内注入至多 0.2ml 的 EMODGAIN®（30mg/ml）。手术 5 天后拆除 4 针缝合线。在主观和临床条件下均有显著改善。病人不再抱怨疼痛，麻痹的感觉消失，伤口区域不再有恶臭味。两周后拆除剩余的缝合线，齿龈不显示任何炎症，病人没有任何抱怨。齿龈完好无任何炎症，它牢牢的与牙齿和/或牙槽骨附着，颜色为粉色（没有炎症区域内存在的鲜红色），存在正常的牙齿间突起（非肿胀）。而且观察到牙齿受伤部分的牙周膜重新出现，显示出很好的改善效果，通过 X-射线检查可以观察到新的牙槽骨沉积。

## 实施例 12

### 相邻牙齿和神经的外伤愈合

#### 病例报告

一个 39 岁的女性病人其下方左侧的智齿（38）的周围患有严重的冠周炎。在公共牙科诊所其牙齿被部分摘除，在下颌留有牙齿的根尖部分，并伴有手术造成的根部骨折。由于疼痛，第二天，该病

人给推荐到一个牙科手术的专家处以除去牙根碎片。

手术后两天，病人去见她的常务牙科医生进行处置。她的面颊左侧肿胀，并且其左侧下颌骨神经显示出持续的和完全的阻滞。临床检查和 X-射线照片显示手术时对下颌骨、37 号牙齿的牙根末梢的三分之一根尖和下颌神经槽造成严重的钻开损害（见 X-射线照片，图 1A）。对 37 号牙齿的探洞深度穿越末梢根部至牙冠顶端为 25mm。

为了诱导 37 号牙齿的骨骼和神经的愈合和失去的牙周膜的再生，手术伤口被打开并仔细清理干净。当用盐水去除残余碎片后，37 号牙齿暴露的骨头，末梢根部的表面和下颌神经使用 EMODGAIN®（30mg/ml，过量提供，约 1ml）覆盖，然后将伤口使用三针缝合在一起。病人被指导使用洗必太溶液（Corsodyl®）在接下来的 5 天里每天漱口两次，并开始使用青霉素（氨卞青霉素，660mgx4）进行为期 5 天的预防治疗。

10 天后，病人返回，拆除缝合线。此时肿胀消失，软组织的愈合良好。然而下颌神经的完全麻痹仍然存在，病人被告知其受损伤的神经的前景至多是难以预料的。此时麻痹使得 37 号牙齿的存活难以预料。通常情况下，象这个病人呈现出来的根部损伤会导致牙髓坏死和牙齿僵硬。为了阻止这种并发症，需要进行牙髓治疗。然而为了看到所使用的实验治疗是否可以促进牙周膜的愈合，病人同意此时不对牙齿进行治疗。此后病人被安排每月接受一次处置。

上述处置两个月后，病人左侧下嘴唇出现过敏感觉，显示出神经愈合的迹象。37-38 号牙之间区域的软组织完全愈合无任何伤疤。X-射线也显示出在摘除位置的牙槽出现新骨的形成。但 37 号牙齿和其周围组织仍处于麻痹状态。

治疗后四个月，麻痹消失，牙齿被证实存活，但处于过敏状态，对温度和电刺激均敏感。X-射线显示摘除位置的牙槽明显被骨填充，37 号牙齿的根部末梢显示出牙周再生的迹象。

在使用 EMODGAIN®治疗后 5 个月，37 号牙齿的存活经检测正常。此时通过 X-射线可以证实有功能的牙周膜的完全再生（图 1B）和正常外观的新形成的牙槽骨已经添满骨骼缺损和摘除位置的牙槽。没有僵硬的迹象。

37 号牙末梢的孔洞探测深度现仅约 10mm，在釉质牙骨质界之下约 1mm。经过这种处置后，病人被认为完全康复，只安排每一年一次的常规复诊。

评价：

在手术去除智齿后相邻牙齿和神经外伤的完全和快速愈合是很少见的。经常出现的严重程度如上所述的并发症往往以被损伤牙齿的完全摘除而结束，或者至少也是牙髓的去除和牙根填充，随后出现伴有僵硬的骨愈合。受损伤的神经一般需要 8 到 12 个月才能愈合，即使如此经常在一些区域会出现麻痹现象，而且维持数年。上文报道的良好和快速的愈合是非常少见的，应被认为是 EMODGAIN®伤口愈合能力的一个体现。

X-射线

A：38 号牙摘除后两天的病人。注意到存在于牙齿 37 远中端的大大的缺损并累及下颌管。而且 37 号牙齿远中颊的牙槽骨在手术中被摘除。

B：手术后 5 个月的病人。注意到在 37 号牙齿远在中根损伤处完全的、有功能的牙周膜（lamina dura）迹象。没有僵硬的迹象。此时可以看到下颌管的轮廓，并且摘除位置的牙槽完全被骨添满。同时也观察到 37 号牙周围有新的远中颊牙槽骨的形成。

实施例 13

釉基质衍生物和釉基质蛋白对小腿部溃疡（静脉溃疡）愈合效应的研究

病人 1

病人为男性，生于 1926 年，有血栓病史和很严重的血栓后遗症和反复发作的静脉溃疡。他采用过抗凝集香豆素衍生物的系统治疗，溃疡在局部使用 Crupodex（右旋糖单体）和 3%的硼酸溶液治疗。

在开始启动 EMODGAIN®治疗以前他的静脉溃疡为一个椭圆形，大小 5x4cm，深度为 0.5mm，病程处于肉芽化阶段，有很差的上皮化。

伤口用 3%的双氧水消毒后，将 500 微升的 EMODGAIN®滴加施用并用无菌的拭子均匀铺开。EMODGAIN®在空气中暴露 10 分钟，然后伤口用 10%的 Prvidone 碘药膏浸湿的 Inadine（Johnson&Johnson）Rayon 敷料覆盖。

5 天后，在最接近溃疡的位置出现上皮形成，溃疡面减少至 1.8x2.2cm，无任何副反应（炎症）。不再加 EMODGAIN®。12 天后在最接近溃疡的位置出现进一步的上皮化，并且侧部出现新的上皮化，面积大约为 2x2cm。大约一半的溃疡得到愈合。使用 400 微升的 EMODGAIN®。

19 天后在最接近溃疡的位置和其侧面出现进一步的上皮化，但在远端部分未上皮化，溃疡很深（大约 1mm）。一半以上的溃疡得到愈合。继续使用 300 微升的 EMODGAIN®。自从启动了 EMODGAIN®的治疗，病人与这种治疗开始以前相比不再感觉溃疡处有疼痛感。EMODGAIN®再继续每周使用一次至第 40 天（200 微升），在 47 天后溃疡被认为全部愈合。

## 病人 2

该病人为女性，生于 1949 年，患有血管曲张，长期静脉供血不全和反复发作的静脉溃疡。她对于药物（药物，药剂）多价过敏并静脉曲张（excema varicosum）。该病人曾使用 Otosporin 滴剂（硫酸多粘菌素 B+硫酸新霉素+氢化可的松）和氢化可的松敷布接受过局部治疗。

在启动使用 EMODGAIN®治疗时，她的静脉溃疡是直径 1cm，深度 2mm。使用 300 微升的 EMODGAIN®。

5 天后，在伤口周围（周长）2mm 的范围内出现上皮化，无任何副反应（炎症）。此时不再使用 EMODGAIN®。12 天后，溃疡缩小到直径大约 2mm，此时再使用 100 微升的 EMODGAIN®。

19 天后溃疡仍为直径 2mm，但底部很好地肉芽化，溃疡不再很深（仅大约 0.2mm）。使用 100 微升的 EMODGAIN®。

同样是该病人在另一条腿出现一个大约 0.3x1cm 的溃疡。此时使用 200 微升的 EMODGAIN®。

7 天后，出现新的上皮化，底部出现良好的肉芽化，溃疡面积缩小到大约 0.2x0.5cm。

随后针对每一个溃疡每周使用 100 微升 EMODGAIN®直至第 40 天。47 天后，溃疡被认为全部愈合。没有发现对 EMODGAIN®的过敏反应。

在同一条腿上又形成另一个溃疡，面积为 0.5x0.3cm，使用了 100 微升 EMODGAIN®进行治疗。

### 病人 3

该病人为女性，1929 年生，患有丹毒后出现的严重静脉血栓，在启动 EMODGAIN®治疗前有 15X19cm 的大面积小腿溃疡，并且由于使用了各种治疗方法后几乎没有效果，病程处于发展中。700 微升的 EMODGAIN®作用于从上边开始 3cm 的面积。

7 天后没有出现上皮生成，但治疗区域变得更透明（更结构类似），并伴有小的分散区域的肉芽化，在这一区域无疼痛感和进展现象。再使用 700 微升的 EMODGAIN®作用于同一区域。

4 周后，病人在未使用 EMODGAIN®治疗的溃疡远端出现感染，被确认为假单胞菌所致。加入 700 微升的 EMODGAIN®。感染 7 天后消失。

#### 病人 4

该病人为女性，1947 年出生，患有血管曲张和丹毒后引起的血栓性静脉炎，在启动 EMODGAIN®治疗时，她有一个面积为 2x0.8cm 的小腿溃疡，溃疡底部清洁但没有肉芽化。先使用 300 微升的 EMODGAIN®。

7 天后，溃疡面积减少至 0.3x0.7cm，表皮生成开始出现，底部开始出现肉芽化。再使用 200 微升的 EMODGAIN®，随后每周使用 100 微升 EMODGAIN®，共五周。溃疡在 5 周后被认定全部愈合。

#### 实施例 14

EMODGAIN®作为一种辅助物对平坦表面位置上的非手术牙周治疗

##### 目的

本研究的目的是评价 EMODGAIN®是否可以用于改善非手术牙周治疗的愈合结果。本研究的特殊目的是评价在平表面位置上的效应。

##### 研究设计

本研究是针对一个个体在 6 个月的时间里的垂直试验进行的。

本研究采取双盲，分说(split-mouth)，安慰剂对照和随机的设计。

##### 受检者

Goteborg 大学的牙科学系中的 14 个病人被视做牙科临床病人，需要对他们的中等严重程度的牙周疾病进行治疗。

##### 包括的标准

在探测袋深度 $\geq 5\text{mm}$ 的 2 个对侧四分体的每一个，至少有 3 个平坦的牙齿表面部位，其中至少一对部位的探测袋深度 $\geq 6\text{mm}$

所选择的牙齿必须有通过热或电刺激确定为存活的牙髓，或者，如果进行牙根管治疗，必须是无症状的和没有技术 remars 的。

##### 治疗



在进行完基本检查后，所有病人被告知疾病情况并被指导使用恰当的龈上斑控制措施。进行定位和牙根设计。

当袋流血停止时，24%的 EDTA（购自 Biora AB，瑞典）作用于袋 2 分钟。待用盐水仔细清洗后加入测试物质（EMODGAIN®）或者对照物质（PGA 凝胶）。

#### 评估

基线测定，1，2，3，8 和 24 周跟踪检查包括以下变量：

1. 口腔卫生情况—出现或/没有牙斑
2. 牙龈情况—（牙龈指数；Loe 1967）
3. 探测袋深度
4. 探测附着水平
5. 探测出血—出现/未出现（15 秒）
6. 牙质超敏—鼓风机刺激
7. 不舒适程度—在 1，2 和 3 周跟踪检查记录，使用一个

10cm<<视觉类似水平（VAS）

牙斑： 平均值（sd）

	对照	EMODGAIN®
基线	0.10(0.30)	0.19(0.40)
1 周	0.08(0.27)	0.05(0.22)
2 周	0.05(0.22)	0.02(0.15)
3 周	0.05(0.22)	0.10(0.30)
6 周	0.14(0.35)	0.19(0.40)
26 周	0.12(0.33)	0.07(0.34)

## 牙龈指数；平均值(sd)

	对照	EMODGAIN®
基线	1.40(0.50)	1.40(0.50)
1周	1.00(0.32)	0.87(0.52)
2周	0.83(0.44)	0.74(0.45)
3周	0.69(0.60)	0.60(0.50)
6周	0.67(0.53)	0.64(0.58)
26周	0.62(0.54)	0.62(0.49)

## 探测出血；%

	对照	EMODGAIN®
基线	100	100
1周	67	44
2周	43	33
3周	29	26
6周	33	31
26周	19	24

## 病人主观评价；VAS 得分

## 第一周

	对照	EMODGAIN®
VAS 得分		
0-20	8%	0%
21-40	15%	8%
41-60	31%	30%
61-80	8%	0%
81-100	38%	62%

### 第三周

	对照	EMODGAIN®
VAS 得分		
0-20	14%	7%
21-40	0%	7%
41-60	3%	0%
61-80	21%	22%
81-100	57%	64%

### 结论

病人仅有很轻的术后问题，流血少，牙斑少，并有改进的牙龈指数。这一结果支持了 EMODGAIN®对伤口愈合的效应。

### 实施例 15

#### 猪中先导伤口愈合研究

#### 介绍

#### 目的

该先导研究的目的是评价猪中深度裂口伤口的愈合和 EMD 对这些伤口的效应

#### 选择该种动物物种的原因

猪作为实验模型被选出是因为该种动物已被证实是评价人的伤口愈合的一个良好模型。

#### 材料和方法

#### 动物

本实验将在 4 个雌性 SPF 猪（丹麦乡村杂交种，Yorkshire 和 Duroc）上进行。在观察初期动物的体重大约 35kg。

观察期需要 1 周，其间每天对动物进行观察以淘汰身体状况不好的个体。所有的观察需要记录。

#### 饲养舍

本研究在有滤过空气供给，温度  $21^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ，湿度  $55\% \pm 15\%$ 和

空气变化 10 次/小时的动物舍中进行。室内提供一个每天 12 小时照明和 12 小时黑暗的循环的条件。照明时间是从 6 点到 18 点。

动物在隔离栏中分开饲养。

#### 草垫

草垫为软木锯屑” LIGNOCEL H3/4” ，购自 Hahn&Co, D-24796 Bredeneb-Kronsburg。对相关的可能污染物需要进行定期分析。

#### 食物

一种商购猪食 “Altromin” 购自 Chr.Peterson A/S, DK-4100。食物按份提供（大约 800g，每天 2 次）。对食物中主要的营养成分和相关的可能性污染物的分析定期进行。

#### 饮用水

动物每天被提供 2 次家庭质量的饮用水。对相关的可能性的污染物的分析定期进行。

#### 伤口

伤口在第一天建立。动物用 Stresnil®Vet.Janssen, 比利时（40mg azaperone/ml, 1ml/10kg），和 Atropin DAK, 丹麦（1 mg 阿托品/ml, 0.5mg/10kg）进行一次肌肉内注射而麻醉，紧接着静脉注射 Hypnodil® Janssen, 比利时（50mg metomidate/ml, 大约 2ml）。

动物背部任何一面的一个侧面区域被切开，用肥皂和清水洗涤，70%的乙醇消毒，无菌盐水冲洗，最后用灭菌纱布敷干。

使用 ACCU-Dermatom（GA 630, Aesculap®）在制备区域获得 8 个深度裂口伤口（25X25X0.4mm），其中每四个位于脊柱的一侧。动物左侧的伤口被编号为 1（从头部开始）至 4（尾部）号，动物右侧的伤口被编号为 4（从头部开始）至 8（尾部）号。

凝集的血液用灭菌纱布除去。

在即将手术前，手术停止后约 8 小时，和其后必要时的任何时间给动物肌肉注射 Anorfin® A/S GEA, 丹麦（0.3mg 丁丙诺啡叔丁

啡/ml, 0.04ml/kg)。

剂量

受伤后伤口将按以下方式处理:

	动物号			
	1		2	
位置	左侧	右侧	左侧	右侧
头部	A			B
	B	A		
		B	A	
尾部			B	A

	动物号			
	3		4	
位置	左侧	右侧	左侧	右侧
头部	A			B
	B	A		
		B	A	
尾部			B	A

A=对照

B=EMD

在用药前大约 15 分钟, EMD 配制品按照生产商的指导进行制备。EMD 配制品在制备后 2 小时使用。对于伤口的 B 治疗, EMD 将作为一个薄层作用于伤口表面。每 4 个伤口使用 1 瓶 EMD。

伤口敷料

伤口用 Tegaderm®覆盖。该敷料用无菌纱布覆盖, Fixomul®固

定。敷料，纱布和 Fixomul®被网状袜 Bend-a-rete®（Tesval，意大利）保持。每天观察敷料的情况。

敷料将在第二天（所有动物）和第3天（动物编号3和4）更换。

在每次更换以前在动物颈部肌肉注射 Zoletil 50®Vet.,Virbac，法国（125mg 替来他明和 125mg zolazepam，溶解在 5ml 溶剂中，5ml），Rompun®Vet., Bayer，德国（20mg 甲苯噻嗪/ml，6.5ml）和 Methadon®DAK，丹麦（10mg 美沙酮/ml，2.5ml）的混合物（1.0ml/10kg 体重）而麻醉。

#### 伤口的观察

所有伤口分别在第二天（所用动物），第三天（所有动物）和第四天（动物编号3和4）进行观察和照相。渗出液和炎症的水平将被评估。移植表皮的出现将被详细记录。

#### 临床迹象

所有可以观察到的疾病健康和行为变化每天都被记录。一些与正常情况的背离将按照出现的时间，持续的时间和强度进行记录。

#### 体重

所有动物在到来，伤口的出现日和研究结束时都要被称重。

#### 终期观察

在第三天（大约伤口出现后 56 小时），1 和 2 号动物使用栓枪击昏后，由锁骨下静脉和动脉刺入致死。

在第四天（大约伤口出现时 72 小时），3 和 4 号动物使用栓枪击昏后，由锁骨下静脉和动脉刺入致死。

#### 组织取样

每一个伤口分块从骨骼肌肉组织切割下来。如果伤口与下层的骨骼肌肉组织发生一些粘连，部分肌肉将被包含在用于固定的材料中。每一个伤口切块用含 4%甲醛的中性磷酸缓冲液固定。

#### 组织学制备

固定后从所有伤口中选择 4 个有代表性的样品包被在石蜡中，切成一般  $5\mu\text{m}$  的厚度，使用苏木素和曙红进行染色。染色后使用栅栏在光学显微镜下进行观察。这种观察可以对伤口的总长度和表面积进行测定。取每个伤口的平均值，然后用于计算群平均值。

### 统计学

数据经加工后计算出群平均值和适当的标准方差。可能的出入也被鉴定出来。此后每一个连续的变化将用 Bartlett's 实验测定变化的同质性，如果这些差异是同质的，即可对变化进行差异的分析。如果检测到一些有意义的差异，可能的群内差异将用 Dunnett's 实验评估。如果变化是异质的，每一个变化将按通常的 Shapiro-Wilk 方法测定。在正常分布的情况下，可能的群内差异将用 Student's t-检验鉴定，否则其它可能的群内差异将用 Kruskal-Wallis's 检验评估。如果检测到一些有意义的群内差异，将使用 Wilcoxon Rank-Sum 检验对这些群作随后的鉴定。

统计学的分析将使用“SAS/STAT®使用者指导，第 6 版，第 4 次编辑，Vol.1+2”，SAS Institute Inc.,Norht Carolina 27513,美国”中介绍的 SAS®程序（版本 6.12）进行。

## 序列表

<110> 拜奥拉公司

<120> 用于伤口愈口的基质蛋白组合物

<130> 20542PC1

<160> 2

<170> Fast SEQ软件, Windows3.0版

<210> 1

<211> 407

<212> PRT

<213> 未知

<400> 1

```

Met Ser Ala Ser Lys Ile Pro Leu Phe Lys Met Lys Gly Leu Leu Leu
 1          5          10          15
Phe Leu Ser Leu Val Lys Met Ser Leu Ala Val Pro Ala Phe Pro Gln
 20          25          30
Arg Pro Gly Gly Gln Gly Met Ala Pro Pro Gly Met Ala Ser Leu Ser
 35          40          45
Leu Glu Thr Met Arg Gln Leu Gly Ser Leu Gln Gly Leu Asn Ala Leu
 50          55          60
Ser Gln Tyr Ser Arg Leu Gly Phe Gly Lys Ala Leu Asn Ser Leu Trp
 65          70          75          80
Leu His Gly Leu Leu Pro Pro His Asn Ser Phe Pro Trp Ile Gly Pro
 85          90          95
Arg Glu His Glu Thr Gln Gln Pro Ser Leu Gln Pro His Gln Pro Gly
 100         105         110
Leu Lys Pro Phe Leu Gln Pro Thr Ala Ala Thr Gly Val Gln Val Thr
 115         120         125
Pro Gln Lys Pro Gly Pro His Pro Pro Met His Pro Gly Gln Leu Pro
 130         135         140
Leu Gln Glu Gly Glu Leu Ile Ala Pro Asp Glu Pro Gln Val Ala Pro
 145         150         155         160
Ser Glu Asn Pro Pro Thr Pro Glu Val Pro Ile Met Asp Phe Gly Asp
 165         170         175
Pro Gln Phe Pro Thr Val Phe Gln Ile Ala His Ser Leu Ser Arg Gly
 180         185         190
Pro Met Ala His Asn Lys Val Pro Thr Phe Tyr Pro Gly Met Phe Tyr
 195         200         205
Met Ser Tyr Gly Ala Asn Gln Leu Asn Ala Pro Gly Arg Ile Gly Phe
 210         215         220
Met Ser Ser Glu Glu Met Pro Gly Glu Arg Gly Ser Pro Met Gly Tyr
 225         230         235         240
Gly Thr Leu Phe Pro Gly Tyr Gly Gly Phe Arg Gln Thr Leu Arg Gly
 245         250         255
Leu Asn Gln Asn Ser Pro Lys Gly Gly Asp Phe Thr Val Glu Val Asp
 260         265         270
Ser Pro Val Ser Val Thr Lys Gly Pro Glu Lys Gly Glu Gly Pro Glu
 275         280         285
Gly Ser Pro Leu Gln Glu Pro Ser Pro Asp Lys Gly Glu Asn Pro Ala
 290         295         300
Leu Leu Ser Gln Ile Ala Pro Gly Ala His Ala Gly Leu Leu Ala Phe
 305         310         315         320
Pro Asn Asp His Ile Pro Asn Met Ala Arg Gly Pro Ala Gly Gln Arg

```



```

          325          330          335
Leu Leu Gly Val Thr Pro Ala Ala Ala Asp Pro Leu Ile Thr Pro Glu
          340          345          350
Leu Ala Glu Val Tyr Glu Thr Tyr Gly Ala Asp Val Thr Thr Pro Leu
          355          360          365
Gly Asp Gly Glu Ala Thr Met Asp Ile Thr Met Ser Pro Asp Thr Gln
          370          375          380
Gln Pro Pro Met Pro Gly Asn Lys Val His Gln Pro Gln Val His Asn
385          390          395          400
Ala Trp Arg Phe Gln Glu Pro
          405

```

```

<210> 2
<211> 324
<212> PRT
<213> 未知

```

```

<400> 2
Met Lys Pro Asn Ser Met Glu Asn Ser Leu Pro Val His Pro Pro Pro
1          5          10          15
Leu Pro Ser Gln Pro Ser Leu Gln Pro His Gln Pro Gly Leu Lys Pro
          20          25          30
Phe Leu Gln Pro Thr Ala Ala Thr Gly Val Gln Val Thr Pro Gln Lys
          35          40          45
Pro Gly Pro His Pro Pro Met His Pro Gly Gln Leu Pro Leu Gln Glu
          50          55          60
Gly Glu Leu Ile Ala Pro Asp Glu Pro Gln Val Ala Pro Ser Glu Asn
65          70          75          80
Pro Pro Thr Pro Glu Val Pro Ile Met Asp Phe Gly Asp Pro Gln Phe
          85          90          95
Pro Thr Val Phe Gln Ile Ala His Ser Leu Ser Arg Gly Pro Met Ala
          100          105          110
His Asn Lys Val Pro Thr Phe Tyr Pro Gly Met Phe Tyr Met Ser Tyr
          115          120          125
Gly Ala Asn Gln Leu Asn Ala Pro Gly Arg Ile Gly Phe Met Ser Ser
          130          135          140
Glu Glu Met Pro Gly Glu Arg Gly Ser Pro Met Gly Tyr Gly Thr Leu
145          150          155          160
Phe Pro Gly Tyr Gly Gly Phe Arg Gln Thr Leu Arg Gly Leu Asn Gln
          165          170          175
Asn Ser Pro Lys Gly Gly Asp Phe Thr Val Glu Val Asp Ser Pro Val
          180          185          190
Ser Val Thr Lys Gly Pro Glu Lys Gly Glu Gly Pro Glu Gly Ser Pro
          195          200          205
Leu Gln Glu Pro Ser Pro Asp Lys Gly Glu Asn Pro Ala Leu Leu Ser
          210          215          220
Gln Ile Ala Pro Gly Ala His Ala Gly Leu Leu Ala Phe Pro Asn Asp
225          230          235          240
His Ile Pro Asn Met Ala Arg Gly Pro Ala Gly Gln Arg Leu Leu Gly
          245          250          255
Val Thr Pro Ala Ala Ala Asp Pro Leu Ile Thr Pro Glu Leu Ala Glu
          260          265          270
Val Tyr Glu Thr Tyr Gly Ala Asp Val Thr Thr Pro Leu Gly Asp Gly
          275          280          285
Glu Ala Thr Met Asp Ile Thr Met Ser Pro Asp Thr Gln Gln Pro Pro
          290          295          300
Met Pro Gly Asn Lys Val His Gln Pro Gln Val His Asn Ala Trp Arg
305          310          315          320
Phe Gln Glu Pro

```

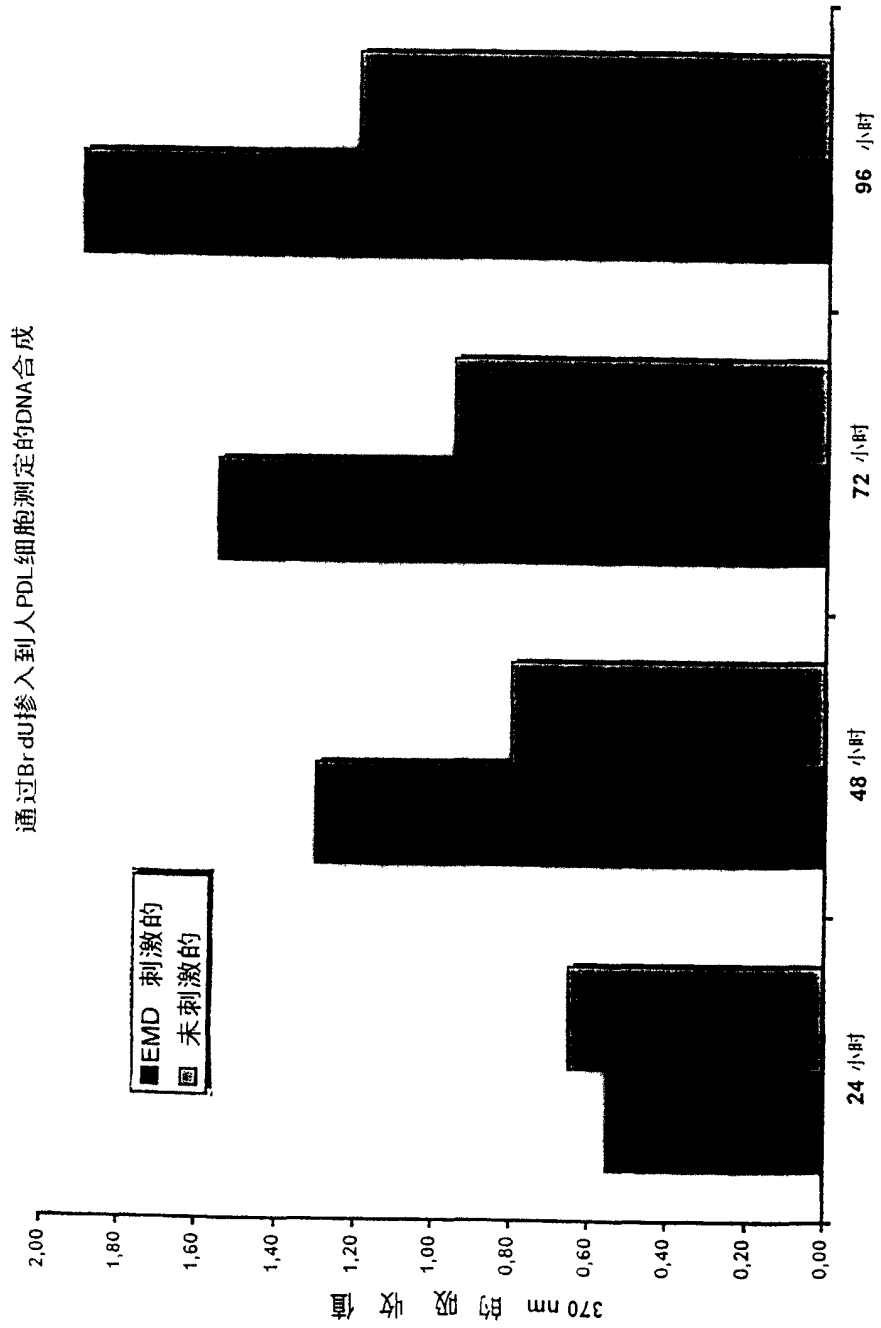


图 1

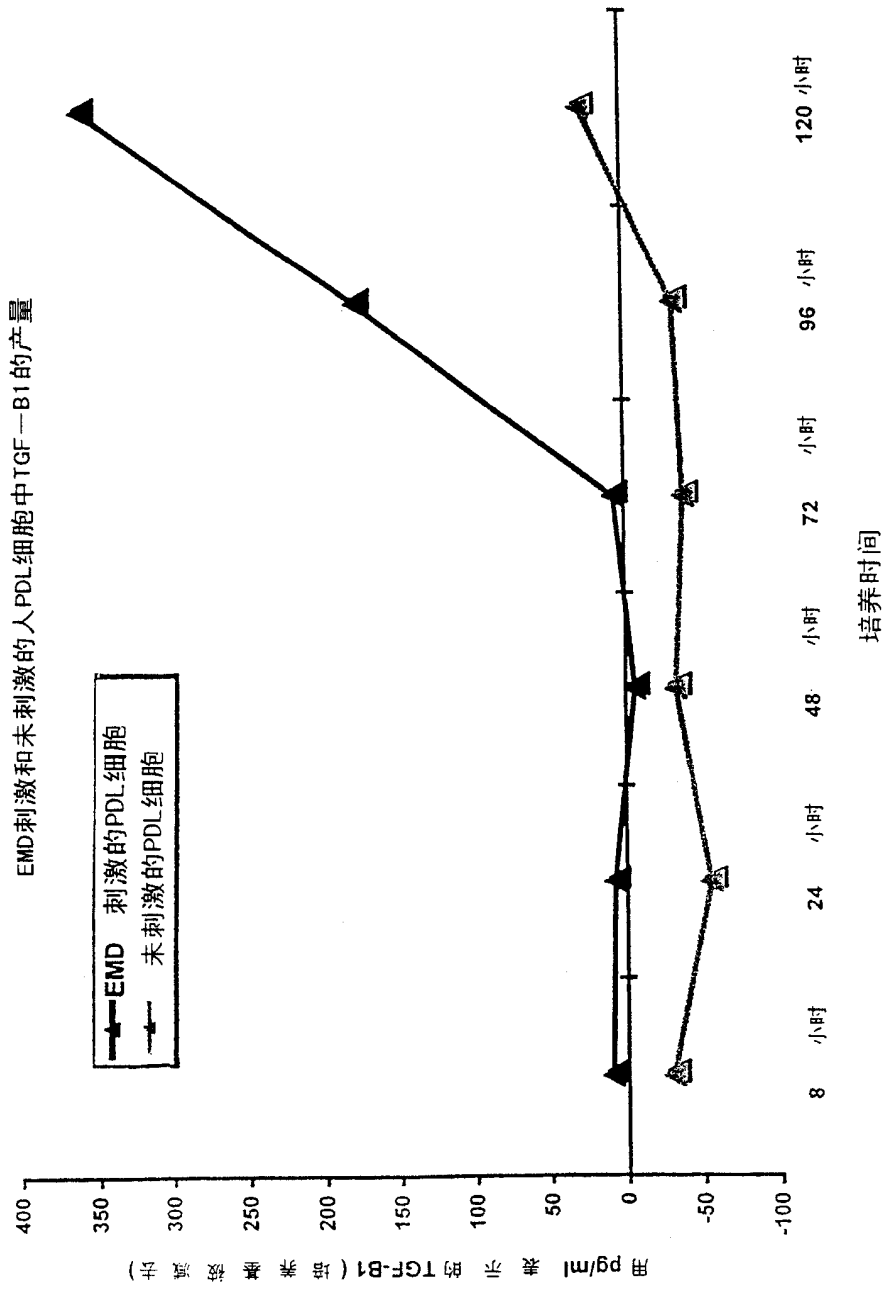


图2

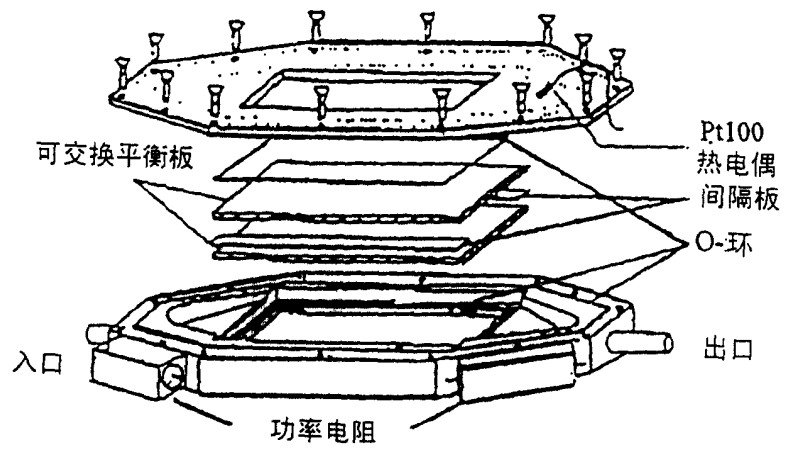
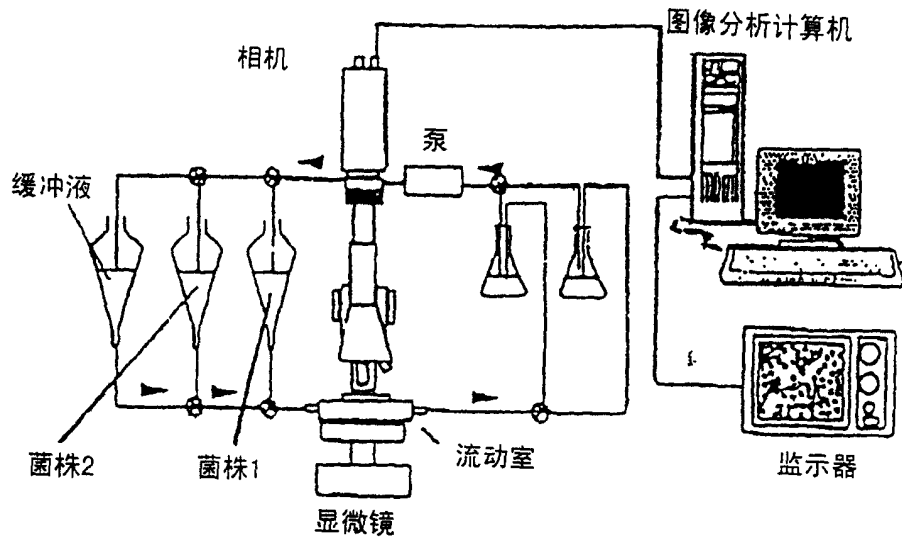


图3

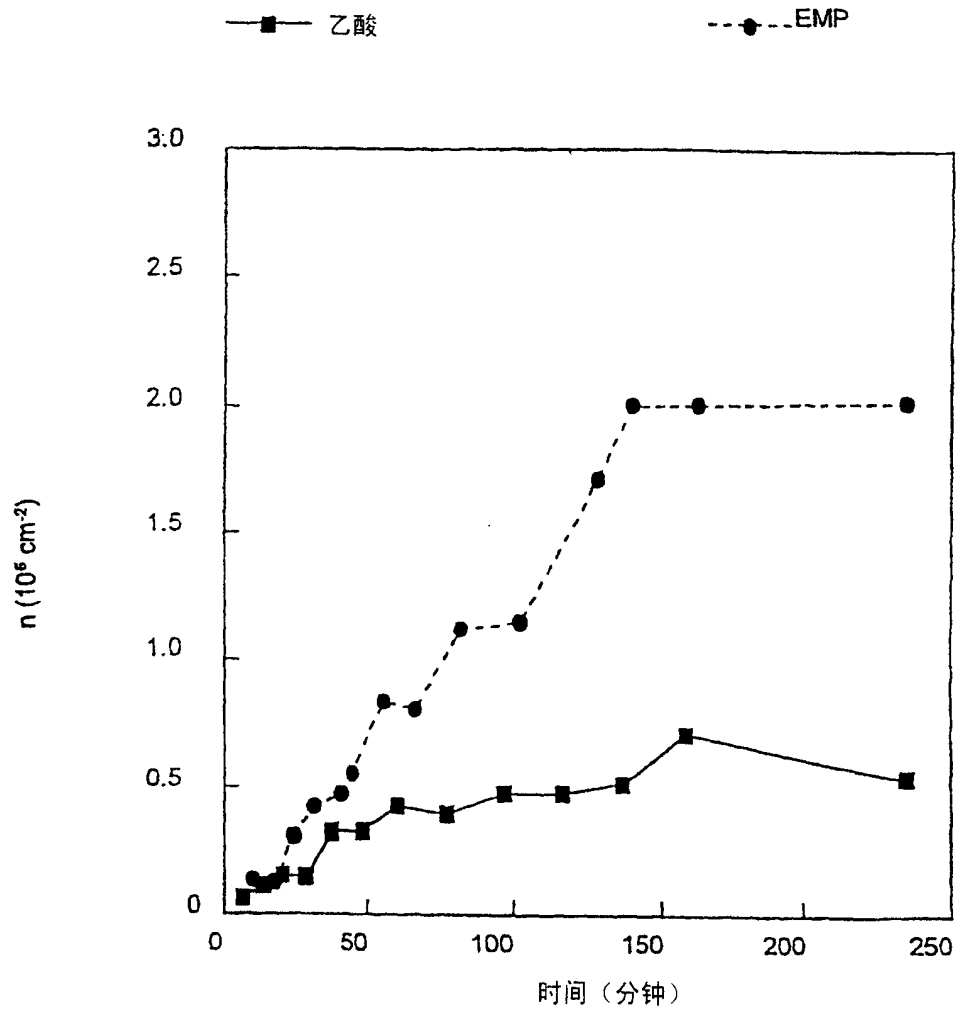


图4

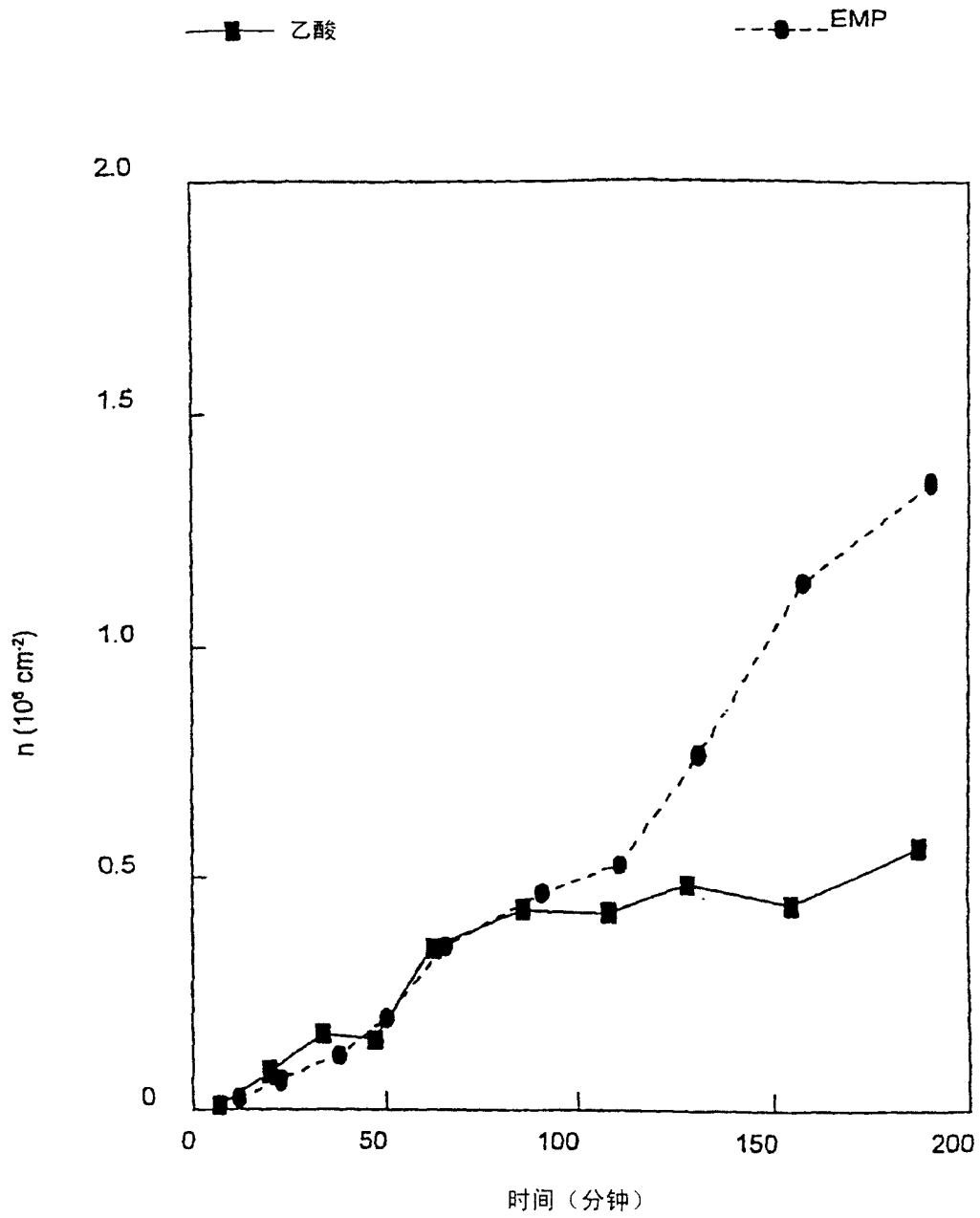


图5

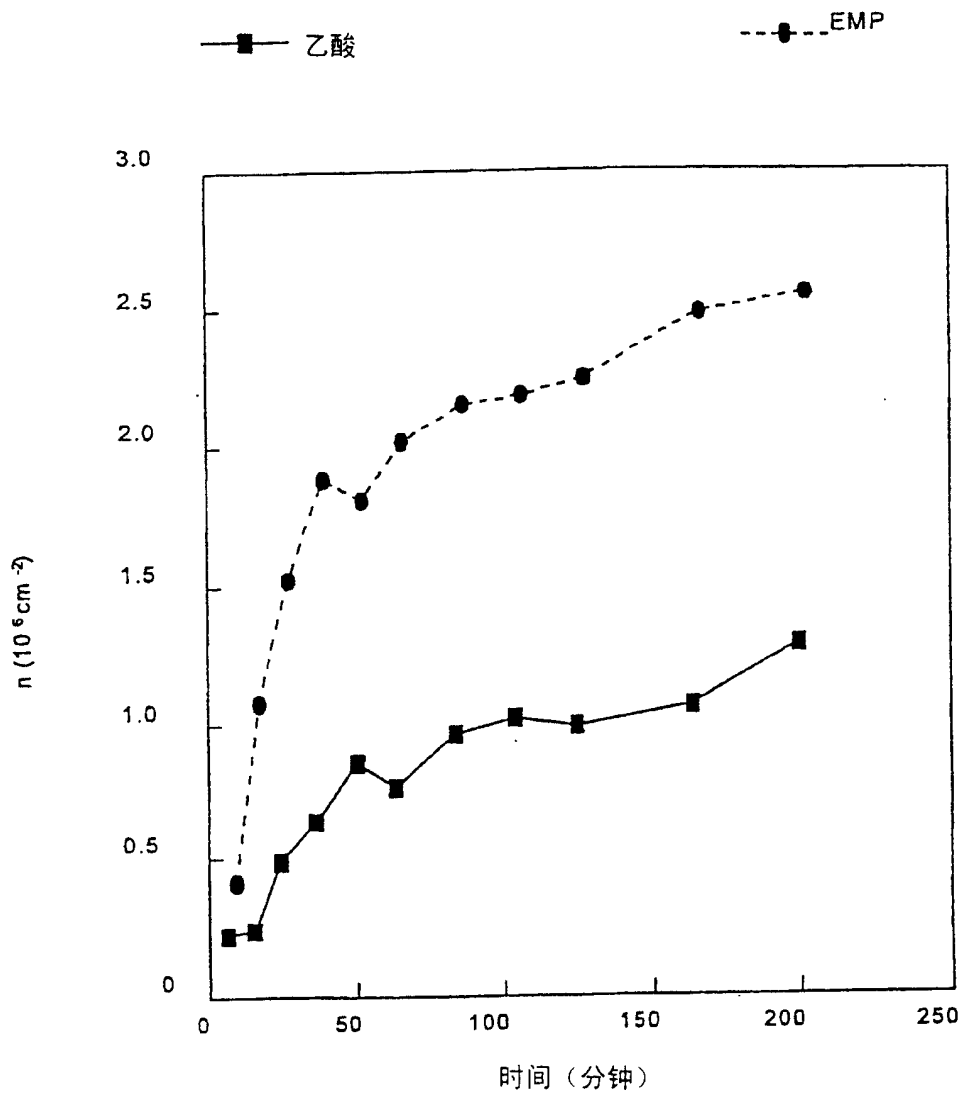


图6

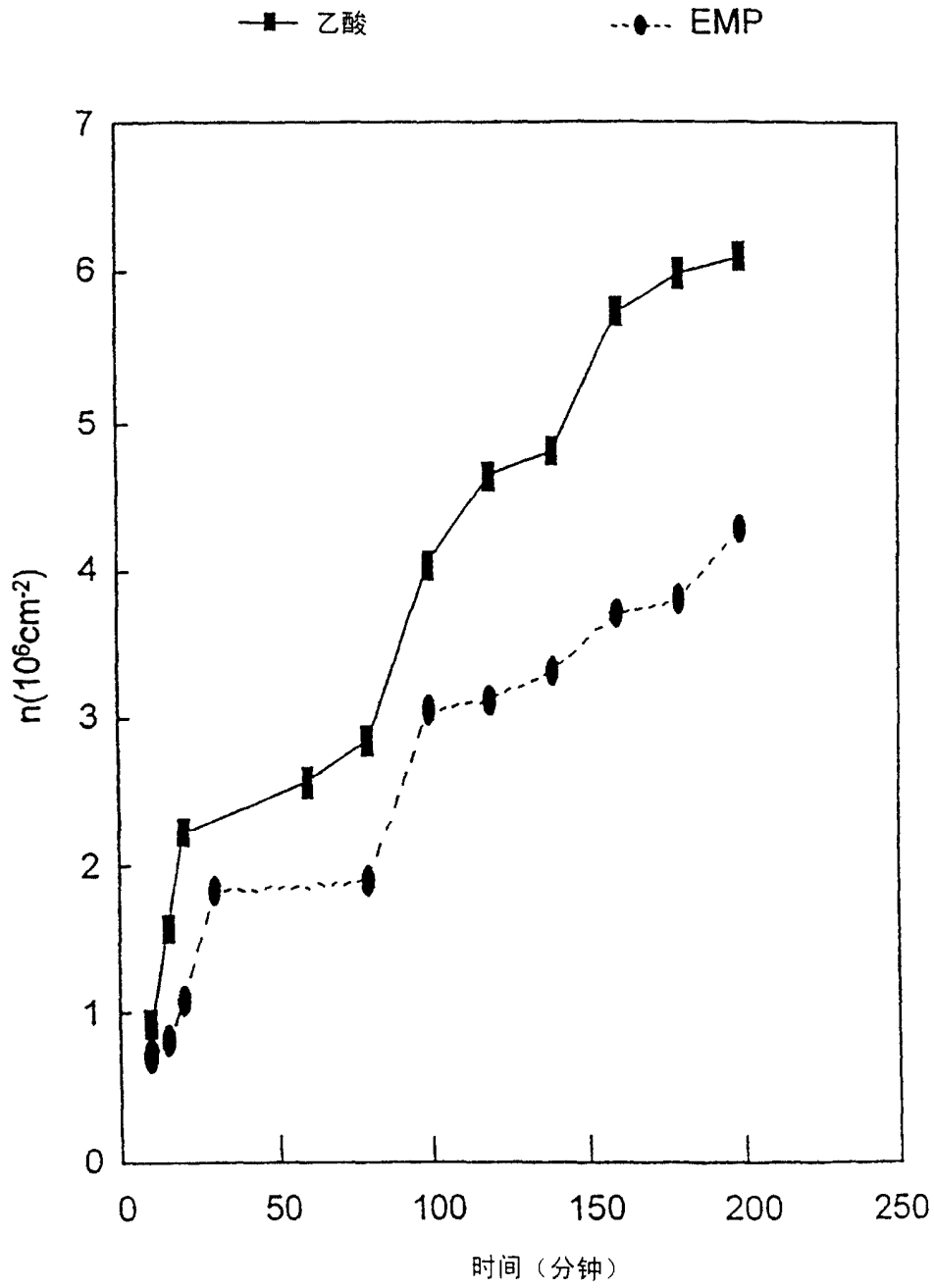


图7



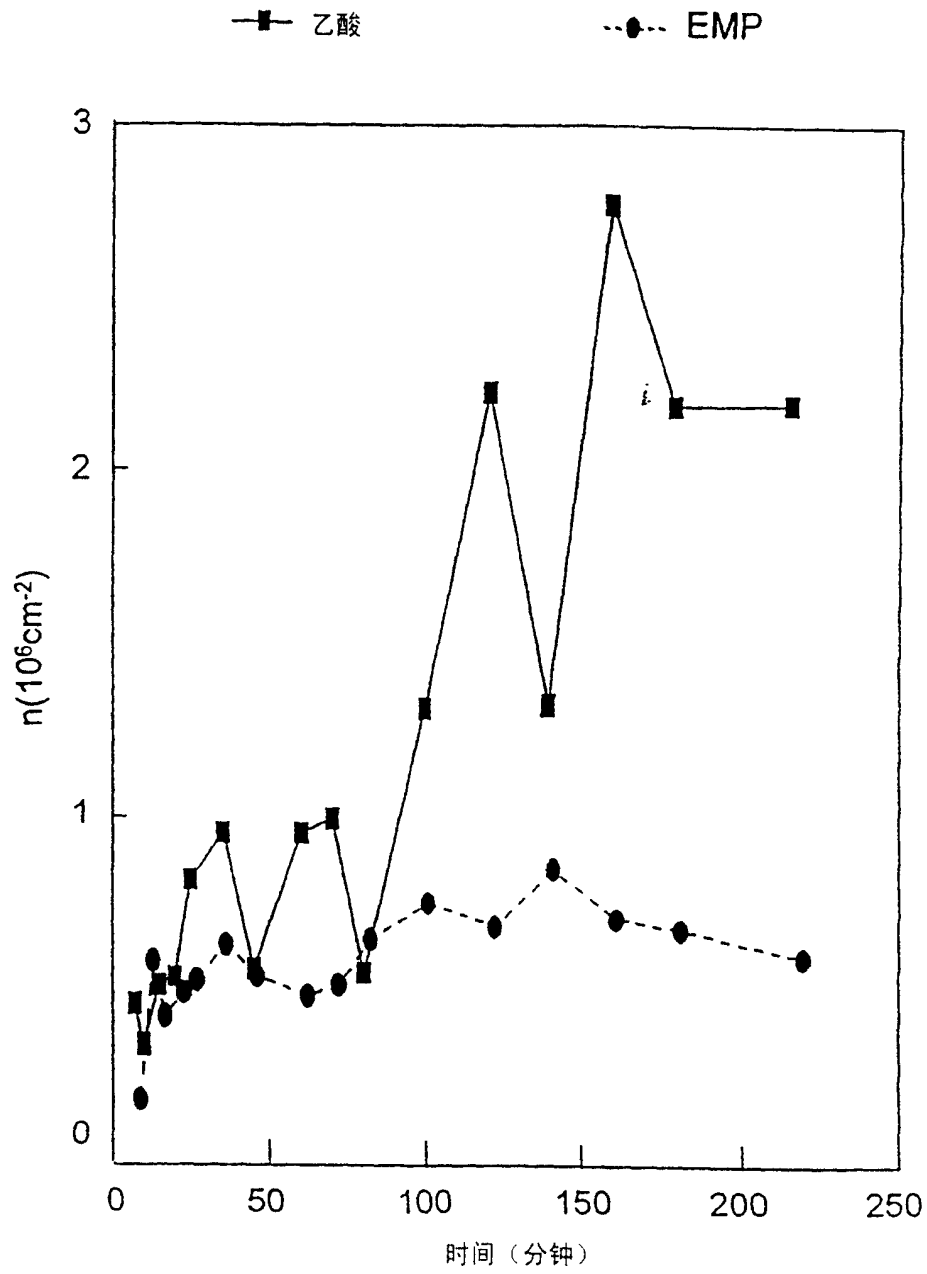


图8

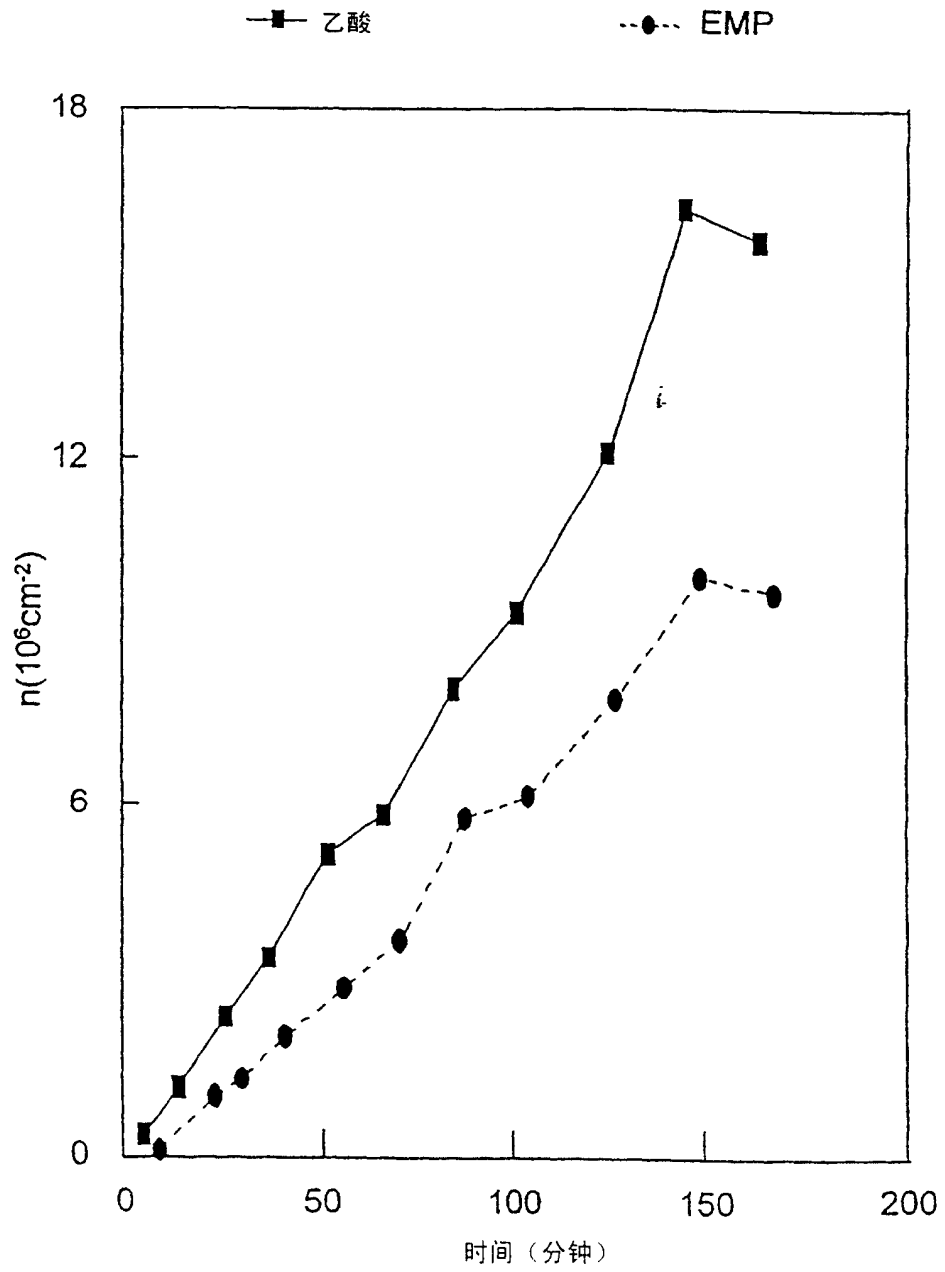


图9



图10A

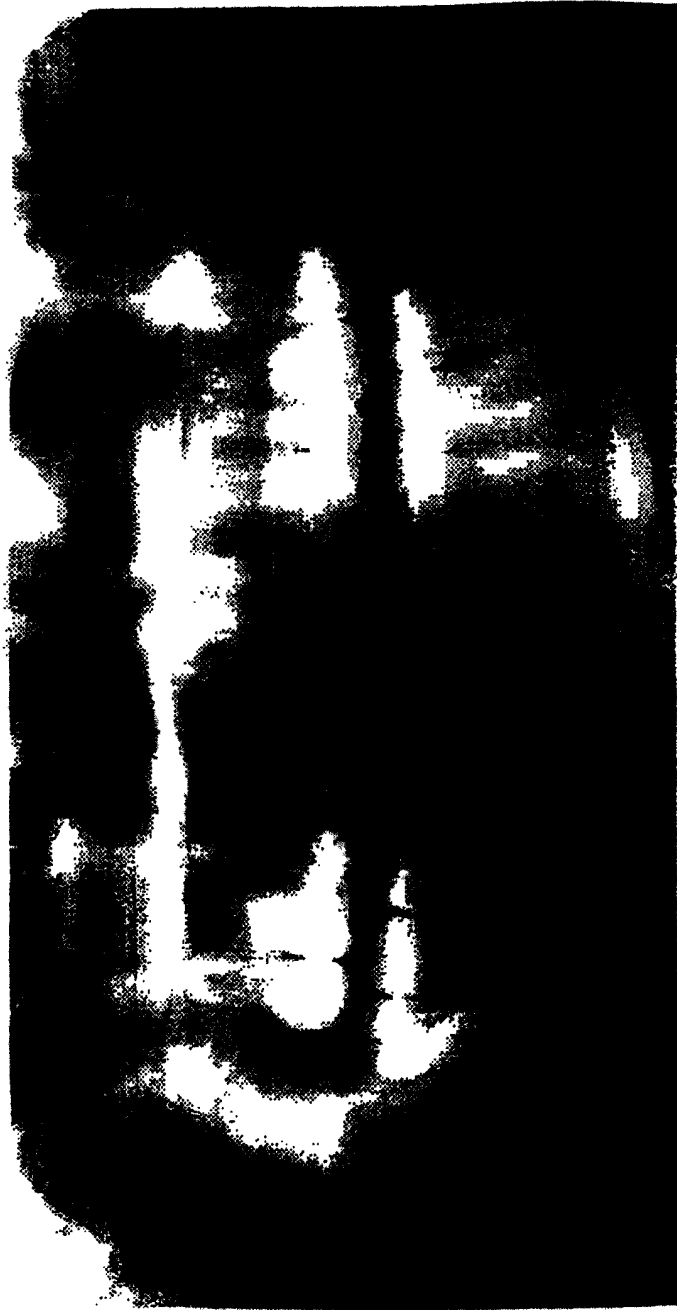


图 10B