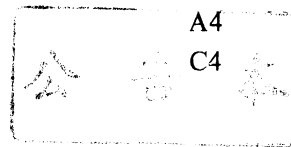


申請日期	88. 11. 23
案 號	88 120 406
類 別	A61K 9/06, 47/34



(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書

一、發明 新 名稱	中 文	用於生物活性劑之持續運送之生物可降解pH/熱敏性水凝膠
	英 文	"BIODEGRADABLE pH/THERMOSENSITIVE HYDROGEL FOR SUSTAINED DELIVERY OF BIOLOGICALLY ACTIVE AGENTS"
二、發明 人	姓 名	1. 蘇布德 夏 2. 戴威古
	國 籍	1. 美國 2. 中國
	住、居所	1. 美國加州紐伯利公園市西山脊道1890號 2. 美國加州溫內卡市OSO道7220號
三、申請人	姓 名 (名稱)	美商安美基公司
	國 籍	美國
	住、居所 (事務所)	美國加州千橡市安美基中心大道1號
	代 表 人 姓 名	史帝芬 M. 歐惻

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
I P C 分類：

A6
B6

本案已向：

國(地區) 申請專利，申請日期： 案號： ，☐有 ☐無主張優先權美國 1998年12月23日 09/221,178 ☒有 ☐無主張優先權

有關微生物已寄存於： ，寄存日期： ，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

五、發明說明 (1)

技術範圍

本發明係關於使用生物可降解pH/熱敏性水凝膠，其係由聚(d,l-或l-乳酸)(PLA)或聚(丙交酯-共-乙共交酯)(PLGA)(嵌段A)與聚乙二醇(PEG)(嵌段B)之一種A-B-A三嵌段共聚物組成，具可電離化官能基團在該聚合物鏈之一或雙端，供生物活性劑之持續輸送。

發明背景

由於遺傳與細胞工程技藝方面晚近之進展，能大量製造在活體內展示各種藥學作用之蛋白質用於藥物用途。此類蛋白質包括紅血球生成素(EPO)，促進紅血球生成之新穎蛋白質(NESP)，促進粒性白血球因素(G-CSF)，干擾素(α , β , γ , 同感)，拘束腫瘤壞死因素之蛋白質(TNFbp)，白血球素間-1受體對抗劑(IL-1ra)，衍生自腦之向神經因素(BDNF)，角化細胞生長因素(KGF)，莖細胞因素(SCF)，巨核細胞生長差異因素(MGDF)，osteoprotegerin(OPG)，衍生自神經膠質細胞系之向神經因素(GDNF)及肥胖蛋白質(OB蛋白質)。在本說明書中OB蛋白質也指稱為leptin。

由於蛋白質類諸如leptin有在活體中短半衰期及微不足道的口服生物有效性，其典型上是藉不時注射給藥，因此對患者構成重大的身體負擔(例如，對多種leptin配方注射部位反應是特別有問題)及連帶的給藥成本。由於如此情況，現時對開發及評估持續釋出配方有高度興趣。有效的持續釋出配方能提供控制該有效成分在血液中之濃度之

五、發明說明 (2)

方法，及也提供較高的效能，安全性，患者方便及患者遵循。不幸者是，多數蛋白質之不穩定性(例如，變性及當暴露至熱、有機溶劑等生物活性之損失)已大為限制持續釋出配方之開發與評估。

於是已評估生物可降解基體作為持續釋出輸送系統。開發持續釋出配方之嘗試已包括含該有效成分之多種生物降解及非生物降解聚合物(例如聚(丙交酯-共-乙交酯))微粒子(見例如，Wise等，Contraception, 8:227-234 (1973)；及Hutchinson等，Biochem. Soc. Trans., 13:520~523 (1985)，及已知有多種技術可以用於將有效劑，例如，蛋白質納入至聚合物微球體中(見例如，美國專利4,675,189及在其中引述之參照資料)。

利用這些物料之固有生物可降解性以控制有效劑之釋出與提供給藥之更一致的持續性及提供在有效劑之持續釋出方面之改進。不幸者是，使用微粒子之持續釋出裝置其中有些仍遭受此類情事諸如：形成有效劑聚集作用；有效劑之高初始突爆與隨後之低量釋出；及有效劑未完全釋出。

也已經研究其他荷載藥物之聚合物裝置供多種疾病之長期治療處理，也是甚重視衍生自 α -羧基氨基酸，尤其是乳酸以其外消旋及旋光性形態兩者，及羧基乙酸，之聚合物，及其共聚物。商業上可取得這些聚合物及已用於FDA(美國食品藥物署認可之系統中，例如，Lupron Depot™，其含可注射的微膠囊，其釋出leuprolide乙酸酯為時約30天用於治療前列腺癌。

五、發明說明 (3)

使用此類聚合物有多種問題包括：某些大分子無法經由該基體滲出；藥物之變質及分解（例如，由使用有機溶劑造成之變性）；對生物體之刺激（例如，由於使用有機溶劑之副作用）；低生物可降解性（諸如一種聚合物與一種多官能醇或多官能羧酸之聚縮合，是即油膏，所發生者；及低降解速率。

也已有報告關於使用聚合物其展示逆熱膠凝作用者。例如，Okada等，日本專利申請2-78629 (1990)描述籍聚(乳酸)(PLA)或聚(乳酸/羥基乙酸(PLA)GA)及聚(乙二醇)(PEG)之酯基轉移作用合成之生物可降解嵌段共聚物。使用分子量自200至2000之範圍之PEGs，及分子量自400至5000之範圍之PLA/GA。所得之產物與水溶混及生成一種水凝膠。Okada等之資料未提供使用該凝膠之藥物之持續輸送之任何證明。

Cha等，美國專利5,702,717描述用於一種藥物之腸胃外輸送之系統，包括一種可注射生物可降解嵌段共聚物藥物輸送液其有逆熱膠凝性質，是即，於某些溫度生成半固體凝膠，乳膠或懸膠之能力。特定言之，這些熱敏性凝膠於低溫作為一種流動黏性液存在，但於較高溫度生成一種剛性半固體凝膠。因此可能使用這些聚合物以設計一種配方，其於室溫或於較低溫度是液態，但一旦注射乃膠凝，於是在注射處所生成藥物之儲所。Cha描述之系統使用一種疏水性A聚合物嵌段包括選自由聚(甲位-羥基酸)及聚(碳酸伸乙酯)組成之組群之一種成員及一種親水性B聚合

五、發明說明 (4)

物嵌段包括一種 PEG。Cha 等之系統需要使用低於 50 重量 % 之疏水性 A 聚合物嵌段及高於 50 重量 % 之親水性 B 聚合物嵌段。然而，有趣的是所揭示之水凝膠中數種顯示似乎無法用於商業上，在於這些凝膠之多種之低臨界溶液溫度是高於 37°C。雖然 Cha 等建議使用其水凝膠供藥物之受控制之釋出，但未提供此類證明。

Churchill 等，美國專利 4,526,938 描述一種連續釋出組合物其包括一種生物可降解 (PLGA/PEG) 嵌段共聚物與一種藥物混合，其是自該嵌段共聚物連續釋出。描述於 Churchill 等之專利中之例，使用 50/50 重量 % 共聚物。Churchill 等未討論該組合物是否展示逆熱膠凝作用性質，也未教導含藥物之嵌段共聚物之水溶液其於注射時是可溶性及其進行膠凝作用隨著其達體溫，Churchill 等卻是教導一種嵌段共聚物以固體形態之給藥方式。

Martini 等，J. Chem. Soc., 90(13):1961~1966 (1994) 描述低分子量 ABA 型三嵌共聚物其使用疏水性聚 (ε-己內酯) (PCL) 及 PEG。不幸者是在活體外這些共聚物之降解率是極緩慢，因此喚起其作為持續釋出系統之能力之問題。

Stratton 等，PCT/US97/13479 (WO 98/02142) 1998 1 月 22 日，描述藥學組合物其包括一種聚合基體有熱膠凝作用性質，供蛋白質之輸送。所描述之嵌段共聚物門類定屬上是指稱為聚氧乙烯-聚氧丙烯縮合物 (也稱為 pluronics)。不幸者是僅高分子量 Pluronic 於較高濃度 (25~40 重量 %) 展示逆熱膠凝作用，及在濃 pluronics 溶液中緊密充填之液體

五、發明說明 (5)

結晶相之生成造成之膠凝作用之本性限制 Pluronic 在藥物輸送中之應用性。

Kim 等，J. Appl. Polym. Sci., 45:1711 (1992) 描述各種 pH-敏性水凝膠及使用此類水凝膠以製作一種葡萄糖-敏性胰島素釋出裝置。

Chen 與 Hoffman，Nature，373:49~52 (1995) 描述熱膠凝界面活性劑與含可離子化羧基團之 pH-回應生物黏合聚合物之新一代之“智慧”共聚物，其獲致 pH 與溫度敏性。製備這些聚合物，是藉接枝一種溫度-敏性聚合物 (PNIPAAm) 至一種 pH-敏性聚合物主鏈上，及已示具生物黏合性質由於該主鏈聚合物。需要獲得一種接枝(或嵌段)共聚物因為經發現該溫度-及 pH-敏性單體之無規共聚物至該 pH-敏性成分之量是夠高以獲得一種充份生物黏合物料時於體溫喪失其溫度敏性。由 Chen 與 Hoffman 描述之共聚物之缺點是潛在的不良生物相容性及 PNIPAAm 聚合物之非生物降解性，及含於某些含 NIPAAm 之水凝膠中之藥物已知其隨著該水凝膠解體被有效地擠出該凝膠之事實，導致每次該凝膠解體時藥物突增，其對持續輸送藥物不是理想情況。

Lee 等，J. Appl. Polym. Sci., 62:301~311 (1996) 報告藉一種獨特的凍結解凍方法製備依賴 pH 與溫度之聚(乙烯醇)(PVA)/聚(丙烯酸)(PAAc)互相滲透之聚合物網絡(IPN)水凝膠及其溶脹性質。報告稱該水凝膠示正與負溶脹性質兩者視 PAAc 含量而定。聲張該水凝膠可以選用作為藥物

五、發明說明(6)

輸送物料，但未示用於此類用途。

本發明之目的是提供生物可降解、pH/熱敏性水凝膠供用於藥物之持續輸送。本發明之水凝膠使用含可離子化官能基團之共聚合物組合物，其在注射時提供立即膠凝作用圍陷全部生物活性劑在該凝膠內，是即，沒有突爆，及更重要是具有改良的降解、脫凝膠作用自注射處所清除儲庫之速率，使此類水凝膠較先前描述者更具商業可行性。

概要說明

在一種具體體系中，本發明提供藥學組合物其含有效量之一種生物活性劑納入至一種聚合基體中，該聚合基體包括一種二嵌段或三嵌段共聚物其是熱敏性，展示pH-回應凝膠作用/脫膠凝作用，及能提供該生物活性劑之持續釋出。

在另一具體體系中，本發明提供一種生物活性劑在一種生物可降解聚合物基體中之腸胃外給藥至一種溫血動物之方法，在其中一種凝膠儲庫形成在該動物之體內，及隨著該聚合物基體之生物降解該生物活性劑以受控制之速率自該儲庫釋出。

圖式概述

圖1是示意圖其描述本發明之水凝膠之pH/熱敏性性質。T=溫度，及該深色水凝膠描述該水凝膠以膠凝形態，而該清澈水凝膠描述該水凝膠以溶液形態。

圖2描述本發明之A-B-A三嵌段共聚物可以藉其製備之兩種方法。

五、發明說明 (7)

圖3描述在活體外leptin自各種水凝膠釋出之釋出特性。-◆-描述自一種100%羥基-終端之PLGA-PEG-PLGA水凝膠釋出；-■-描述自一種80%羥基-終端+20%羧基終端之PLGA-PEG-PLGA水凝膠(重量比)釋出；及-▲-描述自一種50%羥基-終端+50%羧基終端之PLGA-PEG-PLGA水凝膠(重量比)釋出。 %蛋白質釋出對時間(天)標繪。

圖4描述在活體內各種含leptin之水凝膠配方之生物活性。---代表緩衝液對照(0.1 ml之10 mM乙酸鹽緩衝液，pH 4.0，(僅0天)；-●-代表leptin對照(0.1 ml之20 mg/ml (100 mg/kg) leptin配製於10 mM乙酸鹽緩衝液中，pH 4(僅0天))；-▲-代表0.1 ml之一種95%羥基-終端+5%羧基-終端之PLGA-PEG-PLGA水凝膠(重量%)含20 mg/ml (100 mg/kg) leptin，在10 mM乙酸鹽中，pH 4.0(僅0天)；及-■-代表0.1 ml之一種70%羥基-終端+30%羧基終端之PLGA-PEG-PLGA水凝膠(重量比)含20 mg/ml (100 mg/kg) leptin，在10 mM乙酸鹽中，pH 4.0(僅0天)。 %體重改變(自0天體重)對時間(天)標繪。

詳細說明

用於本說明書中，以次之詞具下列之意義：

“逆熱膠凝作用溫度”界定為意指低於該溫度一種共聚物是可溶於水中及高於該溫度該嵌段共聚物溶液形成一種半固體，是即凝膠、乳膠、分散體及懸膠。

“LCST”(“lower critical solution temperature”“低臨界溶液溫度”)，界定為意指一種嵌段共聚物於其進行逆熱膠凝

五、發明說明 (8)

作用(溶液至凝膠至溶液)之溫度。供本發明之目的，該詞“LCST”可以與“逆熱膠凝作用溫度”互換使用。

“儲庫”界定為意指一種藥物輸送液，其在注射至一種溫血動物體內後，於溫度已提升至該“LCST”或以上形成一種凝膠。

“生物可降解”界定為意指該嵌段共聚物將在活體內侵蝕或降解以形成較小的無毒性成分。

“腸胃外給藥”界定為意指消化道以外之任何途徑，包括例如皮下及肌肉內。

供本發明之目的，熱敏性、熱可逆性及熱回應性這些詞可以互換使用。

本發明包括使用嵌段共聚物其有生物可降解疏水性(“A”)嵌段及親水性(“B”)嵌段。這些嵌段共聚物是二嵌段，例如A-B，或三嵌段共聚物，例如A-B-A或B-A-B，型嵌段共聚物。

擬使用之生物可降解疏水性A嵌段，包括衍生自或選自由聚(丙交酯)(d,l-或l-形態)，聚(乙交酯)，聚酐，聚酯，聚正酯，聚醚酯，聚己內酯，聚酯醯胺，聚碳酸酯，聚氰基丙酸酯，聚胺基甲酸乙酯，聚丙烯酸酯之單質聚合物及共聚物，其混合物及共聚物組成之組群之聚(甲位羥基酸)。

用於本說明書中，“PLGA”此詞意指乳酸單獨之一種聚合物，羥基乙酸單獨之一種聚合物，此類聚合物之一種混合物，羥基乙酸與乳酸之一種共聚物，此類共聚物之一種

五、發明說明 (9)

混合物，或此類聚合物與共聚物之一種混合物。該生物可降解A嵌段聚合物以是聚丙交酯-共-乙交酯(PLGA)為佳。該PLGA可以是非離子性，例如，羥基終端，或可以是離子性，例如，羧基終端，就該離子性聚合物而言，該可離子化官能基團可以是在該聚合物鏈之任何一端或兩端，及被考慮供使用之終端可離子化基團包括有 pK_a 3~8之任何可離子化基團，例如，羧酸，胺，磺酸，銨鹽。

被考慮供用於本發明之方法中之A嵌段聚合物之分子量之範圍，精於此技藝者可以依據所需之聚合物降解率此類因素簡捷決定。典型上，A嵌段之分子量範圍將是1000至20,000道爾頓。

被考慮供使用之親水性B嵌段包括聚乙二醇其有分子量介於500與10,000。倘若例如使用B-A-B型共聚物，這些親水嵌段也可以含可離子化基團。

用於本發明之三嵌段共聚物之共聚物組成，是特地調節以確保保持所需之水溶解度及膠凝性質，是即，其比必須是如此是以該嵌段共聚物於溫度低於LCST具水溶解度，及是如此是以在生理條件(是即pH 7.0及37°C)下是立即膠凝是以使藥物之初始突爆減至最低。在本發明之水凝膠中，該疏水性A嵌段構成該共聚物之20%至80重量%，及該親水性B嵌段構成該共聚物之80%至20重量%。

低於該LCST本發明之嵌段共聚物濃度在該處保持可溶，典型上是達至約60重量%，以10%至30%為佳。使用之濃度將視該實際使用之共聚物組成，以及所需者是一種凝

五、發明說明 (10)

膠或乳膠而定。

本發明之 pH/熱敏性水凝膠包含離子性嵌段共聚物是以所得之水凝膠除該逆熱膠凝性質外展示 pH-回應膠凝作用/脫-膠凝作用(見圖1)。該水凝膠可以包含非離子性嵌段共聚物與離子性嵌段共聚物混合或“摻合”，及可以調節在該摻混物中離子性嵌段共聚物對非離子性嵌段共聚物之重量比是以所得之水凝膠具降解、脫膠凝作用之所需之速率及自該注射處所清除之速率。由於此新門類之水凝膠提供該水凝膠自該注射處所改進之清除速率，它們比先前描述之水凝膠及組合物商業上更為實用。

可以以一種兩步驟程序，其使用熱縮合作用，製備本發明之生物可降解、pH/熱敏性嵌段共聚物。在步驟1中，藉混合聚丙交酯(PLA)之單質聚合物或聚丙交酯-共-乙交酯(PLGA)之共聚物與聚乙二醇(PEG)及於160°C及在減壓下任由二-羥基PEG與PLGA或PLA反應合成PLGA/PLA(嵌段A)與PEG(嵌段B)之熱敏性、羥基終端之A-B-A嵌段共聚物。使用PLGA與PEG之不同重量比於熱縮合作用以獲得一系列之嵌段共聚物其有所需之共聚物組成及嵌段長度。籍¹H-NMR光譜法證實共聚物組成及相對嵌段長度。在步驟2中，該熱敏性、羥基終端之A-B-A嵌段共聚物是進一步與，例如，丁二酸酐反應，以獲得A-B-A嵌段共聚物具丁二酸基團於該聚合物鏈之一或兩端，是以提供水凝膠其展示熱敏性/pH-回應膠凝作用。此兩步驟程序圖示於圖2方案1中。

五、發明說明 (11)

也可以藉 PLGA 與活化之 PEG 之單一步驟縮合作用合成本發明之生物可降解、離子性嵌段共聚物。此程序圖示於圖 2 方案 2 中。

替代方式是可以在一種熔體方法中合成該熱敏性、非離子性嵌段共聚物，其包括 A 嵌段之環開啓聚合作用，使用 B 嵌段作為起發劑。在一代表性試驗中，藉 d,l-二丙交酯 (PLGA) 之亞錫辛酸鹽催化之環開啓聚合作用，使用 α, ω -二羥基終端之 PEG 作為起發劑，製備該 A-B-A 三嵌段共聚物，使用 B 嵌段對 d,l-二丙交酯 (或 PLGA) 之莫耳比以控制 A 嵌段之長度，及提供一系列之聚合物其有漸增的 A 嵌段含量及疏水性。A 與 B 嵌段之相對長度可以藉 $^1\text{H-NMR}$ 光譜法證實。

用於混合該共聚物與一種生物活性劑及 / 或其他物料之方法，包括溶解該 A-B-A 三嵌段共聚物於一種水溶液中，繼以加入該生物活性劑 (以溶液、懸浮液或粉末)，繼以徹底混合以確保該生物活性劑遍佈於該共聚物之均勻分佈。替代方式是該方法可以包括溶解該 A-B-A 嵌段共聚物於一種含生物活性劑之溶液中。在任何案例中，於溫度低於該共聚物之膠凝作用溫度進行該方法，及注入該物料作為溶液至體內其然後在身體中膠凝成為儲庫。在本發明之組合物中，該生物活性劑通常會有濃度在 0 至 200 mg/mL 之範圍。

被考慮供用於製備含生物活性劑之水凝膠之緩衝劑，其是對此技藝有一般技術之人所熟知者，及包乙酸鈉，三羧

五、發明說明 (12)

甲基胺基甲烷 (Tris)，磷酸鈉，MOPS，PIPES，MES 及磷酸鉀，在 25 mM 至 500 mM 之範圍及 pH 在 4.0 至 8.5 之範圍。

也擬想可以包括其他賦形劑，例如，各種糖 (葡萄糖，蔗糖)，鹽 (NaCl，ZnCl) 或界面活性劑於本發明之含生物活性劑之水凝膠中，以改變凝膠之 LCST 或膠凝作用速率。改變膠凝作用速率及 / 或 LCST 是具重要性及籍加入此類賦形劑可以使一種不然的話無用的水凝膠變為有用。

用於本說明書中，生物活性劑是指可用供預防，治療或診斷用途之重組或天然存在的蛋白質，不論是人或動物者。該生物活性劑可以是天然，合成，半合成的或其衍生物。此外，本發明之生物活性劑是可認知的。被考慮之生物活性劑範圍廣泛。這些生物活性劑包括，但不限於，激素，cytokines，造血因子，生長因子，抗肥胖因子，營養因子，抗炎性因子，小分子及酶 (可用之生物活性劑之其他例參閱美國專利 4,695,463)。精於此技藝者可以簡易適應一種所需之生物活性劑至本發明之組合物。

被考慮使用之蛋白質包括，但不限於，同感干擾素 (見美國專利 5,372,808，5,541,293，4,897,471 及 4,695,623，併附於此供參照，包括圖式)。介白血球素 (見美國專利 5,075,222，併附於此供應參照，包括圖式)，紅血球生成素 (見美國專利 4,703,008，5,441,868，5,618,698，5,547,933 及 5,621,080，併附於此併參照，包括圖式)，顆粒性白血球聚落刺激因子 (見美國專利 4,810,643，4,999,291，

五、發明說明 (13)

5,581,476, 5,582,823, 及 PCT Publication No. 94/17185, 併附於此供參照, 包括圖式), 幹細胞因子 (PCT Publication Nos. 91/05795, 92/17505 及 95/17206, 併附於此供參照, 包括圖式), 及 leptin (OB 蛋白質) (見 PCT Publication Nos. 96/40912, 96/05309, 97/00128, 97/01010 及 97/06816, 併附於此供參照, 包括圖)。

用於本發明之配方之 leptin 之類型, 可以選自描述於 PCT International Publication No. WO 96/05309 中者, 如以上所引述及其全文併附於此供參照。該發佈之圖 3 (如在其中引述為 SEQ ID NO:4) 描述為人類 leptin 導衍之完整推尋源流之胺基酸順序 (指稱為人類“OB”蛋白質)。胺基酸編號自 1 至 167。一個信號順序製解位置位於胺基酸 21 (Ala) 之後是以成熟蛋白質自胺基酸 22 (Val) 伸展至胺基酸 167 (Cys)。在本說明書中, 使用一種不同的編號。其中該胺基酸位置 1 是該 2-胺基異戊酸殘基其是在成熟蛋白質之起始。成熟、重組甲二磺醯基人類 leptin 呈示於本說明書中作為 SEQ ID NO:1, 其中該成熟蛋白質之第一胺基酸是 α -胺基異戊酸 (於位置 1) 及一甲二磺醯基殘基是位於位置 -1 (未包括於以下之順序中)。

SEQ ID NO: 1

	V	P	I	Q	K	V	Q	D	D	T	K	T	L	I	K	T	I	V	
T	R	I	N	D	I	S	H	T	Q	S	V	S	S	K	Q	K	V	T	G
L	D	F	I	P	G	L	H	P	I	L	T	L	S	K	M	D	Q	T	L
A	V	Y	Q	Q	I	L	T	S	M	P	S	R	N	V	I	Q	I	S	N
D	L	E	N	L	R	D	L	L	H	V	L	A	F	S	K	S	C	H	L
P	W	A	S	G	L	E	T	L	D	S	L	G	G	V	L	E	A	S	G
Y	S	T	E	V	V	A	L	S	R	L	Q	G	S	L	Q	D	M	L	W
Q	L	D	L	S	P	G	C												

五、發明說明 (14)

然而，在本發明之leptin分之任何其一，在位置-1之該甲二磺醯基殘基可以不存在。

替代方式是可以使用人類leptin之天然變體，其有145胺基酸，及與SEQ ID NO: 1之rmetHu-leptin比較，在位置28缺穀胺醯胺。

一般上，在本說明書中供用於人類藥物用途之leptin分，會可用於人類之治療用途(也見以下之動物leptin)。因此，可以藉實驗性試驗活性以決定何種leptin分可以使用。如列於WO 96/05309中，leptin蛋白質以其天然形態，或片段(諸如酶裂解產物)或其他截斷形態及類似物可能完全保留生物活性。可以使用任何此類形態作為一種leptin分供本發明之配方，雖然必須試驗此類形態以決定所需之特性。也見PCT International Publication Nos. WO 96/40912，WO/97/06816，97/18833，WO 97/38014，WO 98/08512及WO 98/28427，全部併附於此供參照。

藉改變胺基酸殘基在該重組人類順序中，諸如取代該胺基酸其是異於該鼠順序者，可以製備重組人類leptin之一種類似物。鼠leptin與人類leptin是大體上同系，尤其是作為一種成熟蛋白質及，更尤其是在N-末端。由於重組人類蛋白質在鼠中有生物活性，如此的一種類似物似會是在人類中有活性。例如，呈列於SEQ ID NO: 1之天然人類leptin中之胺基酸順序，可以以其他胺基酸取代在位置32，35，50，64，68，71，74，77，89，97，100，101，105，106，107，108，111，118，136，138，142及145之一

五、發明說明 (15)

或多種胺基酸。可以選擇胺基酸在鼠蛋白質之對應位置者 (見 Zhang 等 , 1994 , supra) 或其他胺基酸。

可以進一步製備根據鼠 (rat) OB 蛋白質順序之“同感”分子。Murakami 等 , Biochem. Biophys. Res. Comm., 209:944-52 (1995) , 併附於此供參照。鼠 OB 蛋白質異於人類 OB 蛋白質於以次位置 (使用 SEQ ID NO: 1 之編號) : 4 , 32 , 33 , 35 , 50 , 68 , 71 , 74 , 77 , 78 , 89 , 97 , 100 , 101 , 102 , 105 , 106 , 107 , 108 , 111 , 118 , 136 , 138 及 145 。可以以另一種胺基酸取代在這些分散的位置之胺基酸之一或多種。畫線之位置是那些在其中鼠 (murine) OB 蛋白質以及鼠 (rat) OB 蛋白質是異於人類 OB 蛋白質者 , 因此是特別適合供變更。於這些位置之一或多個 , 可以以自對應的鼠 (rat) OB 蛋白質之一種胺基酸或另一種胺基酸取代。

位置自鼠 (rat) 及鼠 (murine) OB 蛋白質其是異於成熟人類 OB 蛋白質者是 : 4 , 32 , 33 , 35 , 50 , 64 , 68 , 71 , 74 , 77 , 78 , 89 , 97 , 100 , 101 , 102 , 105 , 106 , 107 , 108 , 111 , 118 , 136 , 138 , 142 及 145 。依照 SEQ ID NO: 1 之一種 OB 蛋白質其有以上之胺基酸之一或多種以另一種胺基酸 , 諸如胺基酸在對應的鼠 (rat) 或鼠 (murine) 順序中者 , 取代也可以是有效。

此外 , 發現恆河猴 OB 蛋白質中之胺基酸其異於成熟人類 OB 蛋白質者是 (身份以一字母胺基酸縮寫示於括號內) : 8 (S) , 35 (R) , 48 (V) , 53 (Q) , 60 (I) , 66 (I) , 67 (N) , 68 (L) , 89 (L) , 100 (L) , 108 (E) , 112 (D) 及 118 (L) 。由於重組人

五、發明說明 (16)

類OB蛋白質在cynomolgus猴中是活性，根據SEQ ID NO: 1之一種人類OB蛋白質其有恆河猴偏異胺基酸之一或多種以另一種胺基酸(諸如在括號內之胺基酸)取代者，可以是有效。務請注意某些恆河猴偏異胺基酸也出現於以上鼠(murine)及鼠(rat)中(位置35, 68, 89, 100, 108及118)

。於是，可以製備一種鼠(murine)/鼠(rat)/恆河猴/人類同感分子(使用該SEQ ID NO: 1編號)有胺基酸之一或多種於位置: 4, 8, 32, 33, 35, 48, 50, 53, 60, 64, 66, 67, 68, 71, 74, 77, 78, 89, 97, 100, 102, 105, 106, 107, 108, 111, 112, 118, 136, 138, 142及145被另一種胺基酸取代。劃線之位置是那些在其中三物種是全部異於人類OB蛋白質者。一種特別可取的人類leptin類似物是一種在其中胺基酸位於位置100 (Trp)或138 (Trp)，及更宜是，兩位置均是以另一種胺基酸(宜是Gln)取代者。

可以藉刪除蛋白質胺基酸順序之一部分製備其他類似物。例如，缺前導順序(-22至-1)之成熟蛋白質。可以製備人類OB蛋白質分子之以次切去頭端形態(使用SEQ ID NO: 1編號):

- (i) 胺基酸98~146；
- (ii) 胺基酸1~99及(連接至)112~146；
- (iii) 胺基酸1~99及(連接至)112~146具胺基酸100~111之一或多種順序置於胺基酸99及112間。

此外，該切去頭端形態也可以已改變胺基酸之一或多種其是異於(在鼠(murine)，鼠(rat)或恆河猴OB蛋白質中)

五、發明說明（¹⁷）

人類OB蛋白質。此外，任何改變可以以改變之胺基酸（諸如擬肽或D-胺基酸）之形態。

期企有如此的含蛋白質之持續釋出組合物，該組合物能增進外生地施技之或內生之蛋白質之有效性，或可以用於，例如，降低或消除對內生的蛋白質施技之需要。

此外，由於用於本發明之物料是生物可相容及生物可降解，使用本發明之蛋白質組合物有助於防止有時與各種蛋白質（諸如leptin）注射關連之注射處所不利反應。

此外，生物活性劑可以也包括胰島素，促胃液素，催乳激素，促腎上腺皮質激素（ACTH），甲狀腺刺激素（TSH），黃體化激素（LH），卵泡刺激素（FSH），人類絨膜促性腺激素（HCG），干擾素（ α ， β ， γ ），腫瘤壞死因子（TNF），腫瘤壞死因子-關連蛋白質（TNF-bp），間白血素-1受體對抗劑（IL-1ra），腦衍生之神經因子（BDNF），神經膠質衍生之神經因子（GDNF），向神經因子-3（NT-3），纖維細胞生長因子（FGF），向神經生長因子（NGF），似胰島素生長因子（IGFs），巨噬細胞聚落刺激因子（M-CSF），粒性白血球巨噬細胞聚落刺激因子（GM-CSF），巨核細胞衍生之生長因子（MGDF），新穎紅血球生成刺激蛋白質，角化細胞生長因子（KGF），thrombopoietin，小板衍生之生長因子（PGDF），聚落刺激生長因子（CSFs），骨形態形成蛋白質（BMP），超氧化物歧化酶（SOD），組織前纖維蛋白溶酶活化劑（TPA），尿激酶，鏈球菌激酶及血管舒張素。蛋白質此詞，用於本說明書中，包括肽類，多肽類，同感分

五、發明說明 (18)

子，其類似物，衍生物或組配。

也包括多肽類其有胺基酸取代其是“保守”依照酸度，電荷，疏水性，極性，大小或任何其他特性是精於此技藝之人所知者，見 Creighton, Proteins, W.H. Freeman and Company, N.Y., (1984) 498 pp. 加上索引 passim。可以變換選定之胺基酸只要此類變換保留該蛋白質之整體環抱或活性。微小的胺基末端伸延，諸如一種胺基末端蛋胺酸殘基，達至約 20 ~ 25 個殘基之一種微小連結肽，或一種微小伸延其利助純化作用，諸如一種組胺酸束，一種抗原表位或一種結合區域，也可以存在。見 Ford 等，Protein Expression and Purification 2:95 ~ 107 (1991)，其是併附於此供參照。多肽類或其類似物也可以含一或多種胺基酸類似物，諸如擬肽。

一般上，本發明包含藥學組合物其含有效量之化學改性之蛋白質，或衍生產物，連同藥學上可接受的稀釋劑，防腐劑，助溶劑，乳化劑，補助劑及/或給藥所需之媒質(見 PCT 97/01331，併附於此供參照)。對一種所需之生物活性劑之最佳藥學配方，將由一位精於此技藝者依據給藥之途徑及所需之劑量而決定。範例性藥學組合物揭示於 Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., 18th Ed., Easton, PA, pgs. 1435 ~ 1712 (1990))。

本發明之藥學組合物是作為一種液體經由肌肉內或皮下途徑給藥及進行一種相改變，在其中在體內形成一種凝膠，由於體溫將是高於該物料之膠凝作用溫度。該特定生

五、發明說明 (19)

物活性劑之釋出率及期間將尤其是水溶膠密度及該活性劑之分子量之函數。

本發明之組合物之治療用途視使用之生物活性劑而定。隨於此技藝者將能簡捷適應一種所需之生物活性劑至本發明供其所擬定之治療用途。此類活性劑之治療用途在以次之出版物中有更詳盡之說明，其是併附於此供參照，包括圖式。治療用途包括(但不限於)使用蛋白質如干擾素(見美國專利Nos. 5,372,808, 5,541,293, 併附於此供參照，包括圖式)，間白血球素(見美國專利No. 5,075,222, 併附於此供參照，包括圖式)，紅蛋白質(見美國專利Nos. 4,703,008, 5,441,868, 5,618,698, 5,547,933, 及5,621,080, 併附於此供參照，包括圖式)，粒性白血球-聚溶刺激因子(見美國專利Nos. 4,999,291, 5,581,476, 5,582,823, 4,810,643及PCT Publication NO. 94/17185, 併附於此供參照，包括圖式)，幹細胞因子(PCT Publication Nos. 91/05795, 92/17505及95/17206, 併附於此供參照，包括圖式)，新穎紅血球生成刺激蛋白質(PCT Publication No. 94/09257, 併附於此供參照，包括圖式)，及OB蛋白質(見PCT Publication Nos. 96/40912, 96/05309, 97/00128, 97/01010及97/06816, 併附於此供參照，包括圖)。此外，也可以使用本發明之組合物供製備一或多種藥劑供治療或改善該生物活性劑擬治療之情況。

在本發明之持續釋出組合物中將使用活性成分之一種有效量。用於本說明書中，持續釋出意指自該聚合物基體於

五、發明說明 (20)

一段時間間活性成分之逐漸釋出。該持續釋出可以是連續的或不連續的，線型的或非線型的，及可以藉使用一或多種聚合物組合物，藥物荷載，賦形劑之選擇，或其他修訂達成之。該持續釋出將造成該活性劑之生物有效血清濃度(典型上在內生的濃度之上)為時長於該活性劑以直接給藥所見者。典型上，該活性劑之持續釋出將是為時數天至數星期，視所需之治療效應而定。

實例說明

以次之例更詳細說明本發明，但請勿解釋本發明之範圍限於這些例。

物料

於減壓下藉羥基乙酸與乳酸於180°C之直接熱縮合作用合成低分子量(Mn 2000~6000) PLGA(聚乳酸-共-羥基乙酸)與PLA(聚乳酸)。自B.I. Chemicals取得高分子量PLGAs。自Fluka Chemicals取得聚乙二醇(PEG)。自Amgen Inc.取得leptin，鋅-leptin，G-CSF，Fc-Leptin，及Fc-OPG。全部其他化學品是自本技藝所熟知之來源。

例 1

此例描述藉熱縮合作用(圖2，方案1a)合成一種羥基終端之A-B-A(PLGA-PEG-PLGA)三嵌段共聚物。

置30克PLGA(75%/25% LA/GA比)(Mn 3740，MW 7050)及10.7克聚乙二醇(MW 1000)至一個裝設溫度計，氮氣入口及一支蒸餾冷凝器連接至一台真空泵之三頸圓底瓶中。於加入該聚合物後，於氮氣吹驅下慢慢提升反應混合物之

五、發明說明 (21)

溫度至160°C。於500毫托壓力下及以乾氮氣之連續吹泡該縮合反應繼續於160°C進行14小時。於縮合反應終結時，冷卻該反應混合物，溶解於二氯甲烷中及以過量之冷異丙醇使其沉澱。

分離出之聚合物於真空下在40°C乾燥48小時。藉凝膠滲透色譜法(GPC)使用聚苯乙烯標準測定該嵌段共聚物之分子量。藉¹H-NMR測定該共聚物之組成及嵌段相對長度。

溶解該PLGA-PEG-PLGA三嵌段共聚物於100 mM乙酸鈉中，pH 6.0，或100 mM磷酸鈉中，pH 7.0，展示獨特的熱可逆性質(溶液低於室溫及凝膠高於室溫，溶膠-凝膠溶膠)有低臨界溶液溫度(LCST)於約30°C至35°C。

例 2

此例描述羥基-終端之PLGA-PEG-PLGA三嵌段共聚物改性成為羧基-終端之PLGA-PEG-PLGA三嵌段共聚物(圖2，方案Ib)。

在連續氮吹驅下，對描述於例1中之羥基-終端之PLGA-PEG-PLGA共聚物(30克)加入120毫升之無水1,4-二噁烷。於該聚合物完全溶解後加入丁二酸酐(Sigma) 8.57克(在1,4-二噁烷中)，繼以加入1.9克三乙胺(Aldrich)及2.3克之4-二甲胺異吡啶(Aldrich)。在氮大氣下於室溫攪拌該反應混合物24小時。藉IR光譜法追蹤終端羥基轉化為羧基。於反應完成後藉沉澱法(使用乙醚)分離該粗嵌段共聚物。進一步純化該粗酸終端之聚合物藉溶解其於二氯

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (22)

甲烷(40毫升)中及自乙醚沉澱。在真空下於40℃乾燥該分離出之聚合物48小時。溶解該經乾燥之酸終端嵌段聚合物(21克)於400毫升之100 mM磷酸鈉緩衝液(pH 7.4)中，及濾經0.45微米濾器。然後置該聚合物溶液於一種滲析膜(2,000分子量斷流)(Spectrum)中及對去離子水於4℃滲析。於滲析後，凍乾該聚合物溶液及在氮氣下於-20℃儲存該經乾燥之聚合物。

藉凝膠滲透色譜法(GPC)使用聚苯乙烯標準測定該三嵌段共聚物之分子量。藉¹H-NMR測定該共聚物組成及嵌段相對長度。

溶解該羧基終端之PLGA-PEG-PLGA三嵌段共聚物於100 mM乙酸鈉中，pH 4.8展示如描述於例1中相似的熱可逆膠凝作用(溶液低於室溫及凝膠高於室溫，溶膠-凝膠溶膠)有約30℃至35℃之低臨界溶液溫度(LCST)。隨著於生理條件下該水凝膠自酸性逐漸升高至中性該羧基-終端之PLGA-PEG-PLGA三嵌段共聚物也展示完全脫膠凝作用。

例 3

此例描述使用PLGA對PEG之不同重量比合成羧基-終端之PLGA-PEG-PLGA三嵌段共聚物。

以不同的PLGA對PEG比(見以下表I)使用描述於例1及2中之合成程序製備羧基-終端之PLGA-PEG-PLGA三嵌段共聚物。列於以下之全部三嵌段共聚物示熱可逆膠凝作用(溶膠-凝膠-溶膠)有LCST在25℃~35℃之範圍。

五、發明說明 (23)

表 I

聚合物	PEG (MW)	PLGA (MW) (Mn)	PLGA (LA/GA莫耳比)	PLGA/PEG (重量/重量)
1	1000	3550	75 / 25	64 / 36
2	1000	3550	75 / 25	66 / 34
3	1000	3550	75 / 25	70 / 30
4	1000	4200	75 / 25	72 / 28
5	1000	3500	75 / 25	74 / 26
6	1000	3500	75 / 25	76 / 24
7	1000	3158	100 / 0	72 / 28
8	1000	3557	56 / 44	72 / 28

例 4

此例描述藉 PLGA 與活性 PEG 之縮合作用 (圖 2, 方案 2) 合成羧基-終端之 PLGA-PEG-PLGA。

在氮氣流下加入 1 克 PGE-二異氰酸酯 (NCO-PEG-NCO, MW 980 自 Shearwater Polymers Inc.), 2.3 克 PLGA (Mn 1652, 多分散性 1.4) 及 1.1 克二月桂酸二丁基錫 (Aldrich) 至一個貯 30 毫升無水二氯甲烷之 100 毫升瓶中。在氮大氣下於室溫攪拌該反應混合物 24 小時。藉 IR 光譜儀追蹤該反應。於該反應完成後, 藉沉澱法使用過量之二乙醚/石油醚 (50/50 (容積/容積)) 自該溶液分離粗聚合物。在真空下於 40 °C 乾燥該分離出之聚合物 48 小時。溶解該經乾燥之羧基-終端嵌段共聚物 (2 克) 於 38 毫升之 100 mM 磷酸鈉緩衝液 (pH 7.4) 中, 及濾經一個 0.45 微米未濾器。置該

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (24)

聚合物溶液於一個滲析膜(2,000 分子量斷流)(Spectrum)中及對去離子水於4℃滲析。於滲析後，凍乾該聚合物溶液及在氮環境下於-20℃儲存該經乾燥之聚合物。

藉凝膠滲透色譜法(GPC)使用聚苯乙烯標準測定該三嵌段共聚物之分子量。藉¹H-NMR測定該共聚物組成及嵌段相對長度。藉此法合成之三嵌段共聚物展示如以上諸例中所述之相似的pH/熱敏性凝膠作用。

例 5

以次之例證明該羧基-終端之PLGA-PEG-PLGA三嵌段共聚物溶液之依賴pH膠凝作用。

溶解描述例2文中之羧基終端PLGA-PEG-PLGA三嵌段共聚物於50 mM乙酸鈉或磷酸鈉緩衝液中以得30%(重量)聚合物溶液具最終pH在4.0~8.0之範圍。置1毫升聚合物溶液(配製於不同pH之緩衝溶液中)於一支玻璃小管中於37℃，及藉目測監測膠凝作用作為時間之函數。其結果摘錄於表2中。如記述於表2中，該羧基-終端三嵌段共聚物溶液示依賴pH之膠凝作用，在pH 6.5以上時沒有溶膠-凝膠性質。列於表1中(例3)之全部三嵌段共聚物於37℃示相似的pH敏性膠凝作用。

五、發明說明 (25)

表 2

<u>起始水凝膠pH</u>	<u>凝膠形成於37°C</u>
4	迅速膠凝
4.5	迅速膠凝
5.0	迅速膠凝
5.5	迅速膠凝
6.0	緩慢膠凝作用
6.5	高度黏性溶液
7.0	任何時間不膠凝
7.4	任何時間不膠凝
8.0	任何時間不膠凝

例 6

以次之例證明該羧基終端之 PLGA-PEG-PLGA 水凝膠之依賴 pH 之脫-膠凝作用 (凝膠至溶液)。

溶解描述於例 2 中之羧基終端 PLGA-PEG-PLGA 三嵌段共聚物於 50 mM 乙酸鈉緩衝液中，以獲得 30 % (重量) 聚合物溶液具最終 pH 4.5。置 1 毫升聚合物溶液至滲析匣中 (MW 10,000 斷流) (Pierce)。然後置匣於一台 37 °C 保溫箱中以確保在滲析匣內水凝膠之膠凝作用。於膠凝作用完成後，置每一匣於一個貯 500 毫升緩衝液有不同 pH 自 4.0 至 7.4 之範圍之燒杯中，及保溫於 37 °C。監測該凝膠於不同 pH 之稠度作為時間之函數為時 1 星期。觀察結果摘錄於表 3 中。如記述於表 3 中，至外部媒質之 pH 是 6.5 或更高時，自匣之水凝膠脫膠凝成為溶液，由於與外部緩衝液緩衝液

五、發明說明 (26)

交換期間水凝膠之pH上升。於諸pH低於6.0者，凝膠保持不變及堅實。此試驗指示本發明之羧基-終端PLGA-PEG-PLGA三嵌段共聚物水凝膠對周遭pH改變是pH-回應。列於表1中(例3)之全部嵌段共聚物於接近中性pH示相似的脫膠凝作用。

表 3

外部緩衝液	水凝膠形態
pH 4.0	凝膠一星期以上
pH 5.0	凝膠一星期以上
pH 5.5	凝膠一星期以上
pH 6.0	軟凝膠2-3天及溶液在一星期內
pH 7.4	溶液在1-2小時內

例 7

此例證明藉摻合羧基-終端之PLGA/PEG嵌段共聚物與羥基-終端之PLGA/PEG嵌段共聚物以操縱水凝膠之脫膠凝作用率。

分別製備描述於例1中之羥基-終端PLGA-PEG-PLGA三嵌段共聚物(聚合物A)及描述於例2中之羧基-終端PLGA-PEG-PLGA三嵌段共聚物(聚合物B)之30%(重量)溶液，藉溶液各該聚合物於50 mM乙酸鈉緩衝液中。使用鹽酸或氫氧化鈉之烯溶液調節該兩種溶液之最終pH至4.5。以不同比例混合該兩種聚合物溶液以得聚合物摻合物之溶液其有聚合物A對聚合物B之各種重量比率。

置1毫升之每一聚合物摻合物溶液於各一個滲析匣(MW

五、發明說明 (27)

10,000 斷流)(Pierce)中，及然後置這些匣於一台37℃保溫箱中以確保在滲匣內水凝膠之膠凝作用。於膠凝作用完成後，置匣於貯500毫升磷酸鈉緩衝液，pH 7.4，之燒杯中，保溫於37℃。監測水凝膠之稠度及脫-膠凝作用率作為時間之函數為期一星期。觀察之結果摘錄於表4中。如表4中所記述，該水凝膠之脫-膠凝作用率，於生理條件下，隨增加在該摻合物中羧基-終端嵌段共聚物之量而增加。

表 4

試樣(重量%)	脫-膠凝作用率
100% A	堅實凝膠超過一星期
80% A + 20% B	4天後軟凝膠，一星期後黏性溶液
50% A + 50% B	6-10小時內溶液
100% B	1小時內溶液
A：羧基-終端之PLGA-PEG-PLGA共聚物	
B：羧基-終端之PLGA-PEG-PLGA共聚物	

例 8

此例證明水凝膠儲庫自正常小鼠之注射處所之清除。
如描述於例7中裝備有不同重量比之羧基-終端與羧基-終端PLGA-PEG-PLGA三嵌段共聚物之水凝膠溶液。皮下注射100微升之該水凝膠摻合物溶液至小鼠。於所需之時間點藉二氧化碳窒息殺死自每一組之兩隻小鼠。在近注射處所切一小刀，及謹慎剝退皮膚是以不干擾該水凝膠儲庫。於露出該注射處所後，謹慎切除周遭組織以容清楚觀

五、發明說明 (28)

察該周遭組織及該水凝膠儲庫。記錄肉眼所見者及使用相立得拍攝注射處所。觀察結果摘錄於表5中。如記述於表5中，水凝膠儲庫自注射處所之消失率是隨增加在該水凝膠摻合物中羧基-終端三嵌段共聚物之量逐漸上升。

表 5

<u>試樣(重量%)</u>	<u>自注射處所清除</u>
100% A	4-6天星期
90% A + 10% B	2-3星期
80% A + 20% B	3天
70% A + 30% B	1天
100% B	1-2天

A：羧基-終端之PLGA-PEG-PLGA共聚物
B：羧基-終端之PLGA-PEG-PLGA共聚物

例 9

此例描述一種leptin/水凝膠配方之製備及用於測定該leptin/水凝膠配方在活體外釋出動力學及在活體內生物活性之方法。

leptin/水凝膠配方之製備

分別溶解描述於例1中之羧基-終端之PLGA-PEG-PLGA三嵌段共聚物及描述於例2中之羧基-終端之PLGA-PEG-PLGA三嵌段共聚物於50mM乙酸鈉緩衝液(pH 6.0)中。以不同比例混合該兩種聚合物溶液以獲得具羧基-終端對羧基-終端共聚物之各種比之摻合物。徐徐加入leptin溶液(配製於10mM乙酸鹽中，pH 4.0)至該水凝膠溶液中，及

五、發明說明 (29)

在一台軌道搖動器於5°C溫和旋轉該混合物以確保leptin均勻混合遍及該水凝膠溶液。該共聚物之最終濃度是28%(重量)，pH 4.5。leptin濃度在該leptin/水凝膠配方中是20毫升/毫升。將該最終leptin/水凝膠配方濾經0.2微米濾器及儲存於5°C作為溶液或儲存於-20°C作為凍結物。

活體外釋出研究

在20mM磷酸鈉，pH 7.4，於37°C進行leptin自該leptin/水凝膠之活體外釋出。置1克之leptin/水凝膠溶液配方於一支小玻璃管中於37°C。於該leptin/水凝膠配方膠凝後，加入1毫升之20mM磷酸鹽，pH 7.4，緩衝液直接於其上及與該凝膠接觸。藉UV分光光度計於280毫微米以及藉SEC-HPLC於220毫微米在該頂緩衝相釋出之leptin量。為維持完善的池槽條件，於一定時間間隔完全移除，在該凝膠之上之水性受體相及替代以新鮮緩衝液。經歷時間釋出之%leptin記述於圖2中。自該水凝膠配方釋出之leptin之完整是由凝膠及HPLC證實。

活體內生物活性

在正常小鼠評估leptin/水凝膠配方之活體內生物活性。

以(a)0.1毫升之10mM乙酸鹽緩衝液，pH 4.0，(n=5，僅日0)；(b)0.1毫升之20毫克/毫升leptin配製於10mM乙酸鹽緩衝液，pH 4.0 (n=5，100毫克/公斤，僅日0)；(c)0.1毫升之一種leptin/水凝膠摻合物溶液(95%羥基-終端+5%羧基-終端聚合物)(重量/重量))配方含20毫克/

五、發明說明 (30)

毫升 leptin，在 10mM 乙酸鹽 pH 4.0 中 (n=5，100 毫克/公斤，僅日 0)；(d) 0.1 毫升之一種 leptin/水凝膠摻合物溶液 (70% 羥基-終端 + 30% 羧基-終端聚合物) (重量/重量) 配方含 20 毫克/毫升 leptin，在 10mM 乙酸鹽 pH 4.0 中 (n=5，100 毫克/公斤，僅日 0) 之任何其一對小鼠作皮下 (S.C.) 注射。

藉每天秤量小鼠之體重測定 % 體重改變 (自日 0 體重，直至注射以試樣 (b)，(c) 及 (d) 之小鼠之體重達到注射以後衡對照 (試樣 (a)) 之小鼠之體重。重要事項是 leptin/水凝膠配方 (試樣 (c)，(d)) 之 100 毫克/公斤之單一次皮下注射在正常小鼠示為時 5 天之持續重量損失 (圖 4)。

例 10

此例描述納入 Fc-leptin 至水凝膠中，及使用該配方在活體外釋出研究之結果。

加入 Fc-leptin 溶液 (配製於 10mM 磷酸鹽，2.7% 精胺酸，0.01% Tween-20 中，pH 6.0) 至如描述於例 7 中之共聚合物水凝膠摻合物溶液 (配製於 50mM 乙酸鹽中，pH 6.0) 中。在該 Fc-leptin/水凝膠配方中該共聚物之最終濃度是 10-30% (重量/重量)，及該 Fc-leptin 濃度是在 20 毫克/毫升之範圍。如例 9 中所述，在 20mM 磷酸鈉緩衝液中，pH 7.4，於 37°C 進行 Fc-leptin 自該水凝膠之活體外釋出。該 Fc-leptin/水凝膠配方示為期 7-10 天之 Fc-leptin 持續釋出。

五、發明說明 (31)

例 11

此例描述納入BDNF至水凝膠中，及使用該配方之活體外釋出研究之結果。

加入BDNF溶液(配製於10 mM磷酸鈉，150 mM氯化鈉中，pH 7.0)至如例7中所述之共聚物水凝膠摻合物溶液中(配製於50 mM乙酸鹽中，pH 6.0)。在該BDNF/水凝膠配方中該共聚物之最終濃度是20-30%(重量/重量)，及該BDNF濃度是在20毫克/毫升之範圍。如例9中所述在20 mM磷酸鈉緩衝液中，pH 7.4，於37°C進行BDNF自該水凝膠之活體外釋出。BDNF之釋出可能維持為期6-9天。

已經以發現或建議之特定具體體系，其包含實施本發明之較佳方式，描述本發明。請察知對此技藝具一般技巧者，根據本發明之揭示，可以對舉例之特定具體體系作無數的修訂及更改而不背離本發明用意所在之範圍。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

表

訂

線

四、中文發明摘要(發明之名稱： 用於生物活性劑之持續運送之生物可降解pH/
熱敏性水凝膠)

本發明係關於開發藥學組合物其提供生物活性多肽之持續釋出。更特定言之，本發明係關於使用pH/熱敏性生物可降解水凝膠，其含聚(d,l-或l-乳酸)(PLA)或聚(丙交酯-共-乙共酯)(PLGA)(嵌段A)與聚乙二醇(PEG)(嵌段B)之一種A-B二嵌段或A-B-A三嵌段共聚物，有可離子化官能基團在聚合物鏈之一或兩端，供用於生物活性劑之持續運送。

英文發明摘要(發明之名稱： "BIODEGRADABLE pH/THERMOSENSITIVE
HYDROGEL FOR SUSTAINED DELIVERY OF
BIOLOGICALLY ACTIVE AGENTS")

The present invention relates generally to the development of pharmaceutical compositions which provide for sustained release of biologically active polypeptides. More specifically, the invention relates to the use of pH/thermosensitive, biodegradable hydrogels, consisting of a A-B di block or A-B-A tri block copolymer of poly(d,l- or l-lactic acid)(PLA) or poly(lactide-co-glycolide)(PLGA)(block A) and polyethylene glycol (PEG)(block B), with ionizable functional groups on one or both ends of the polymer chains, for the sustained delivery of biologically active agents.

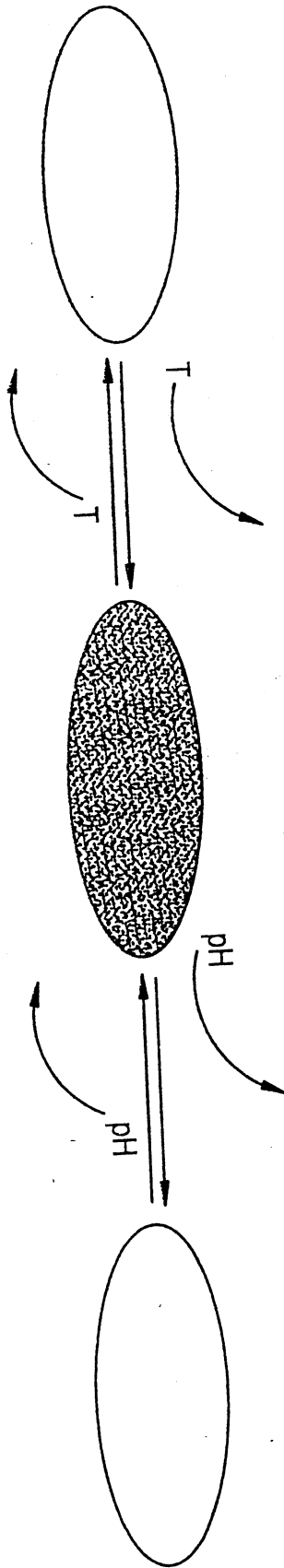
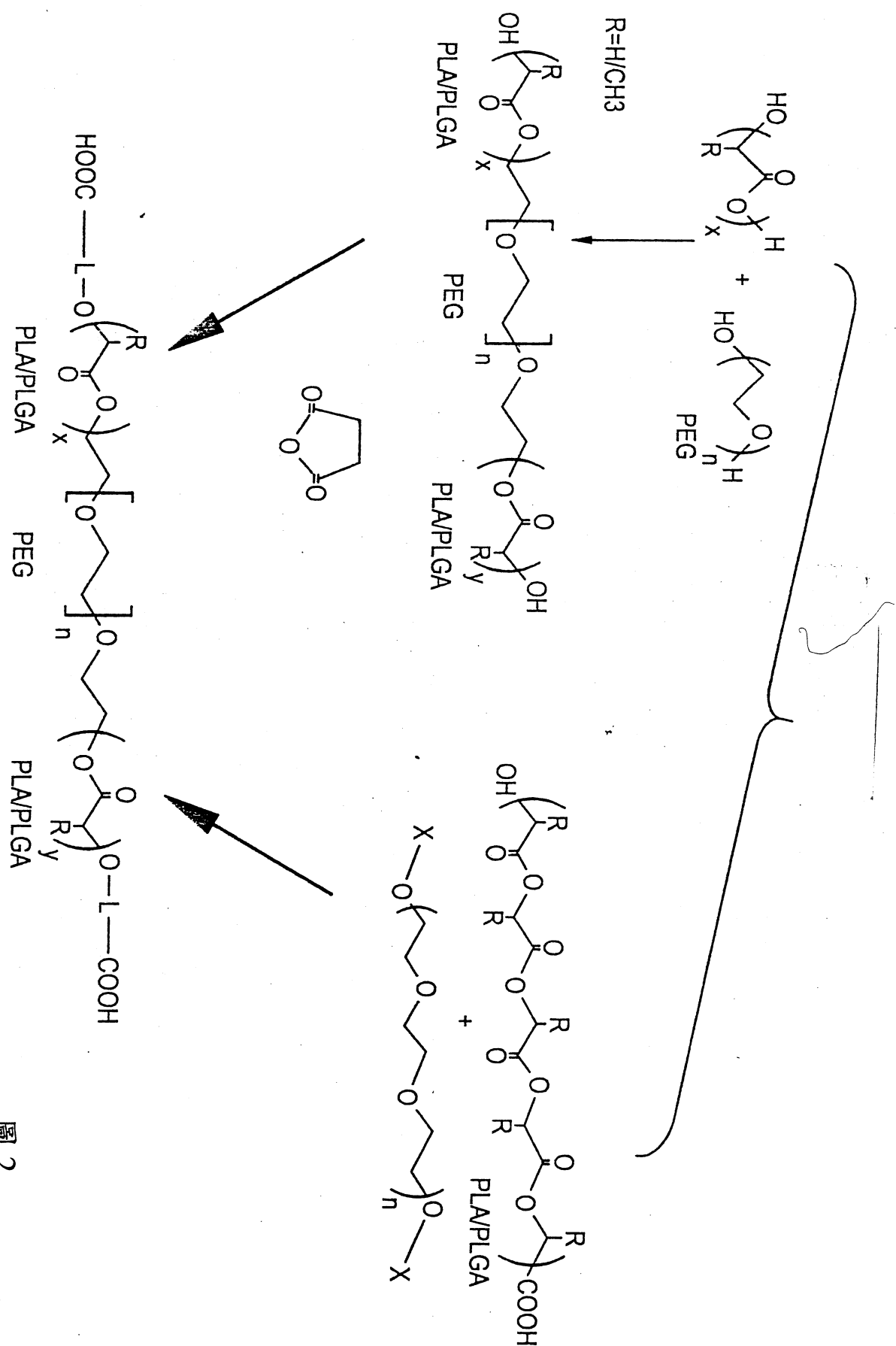


圖 1



2

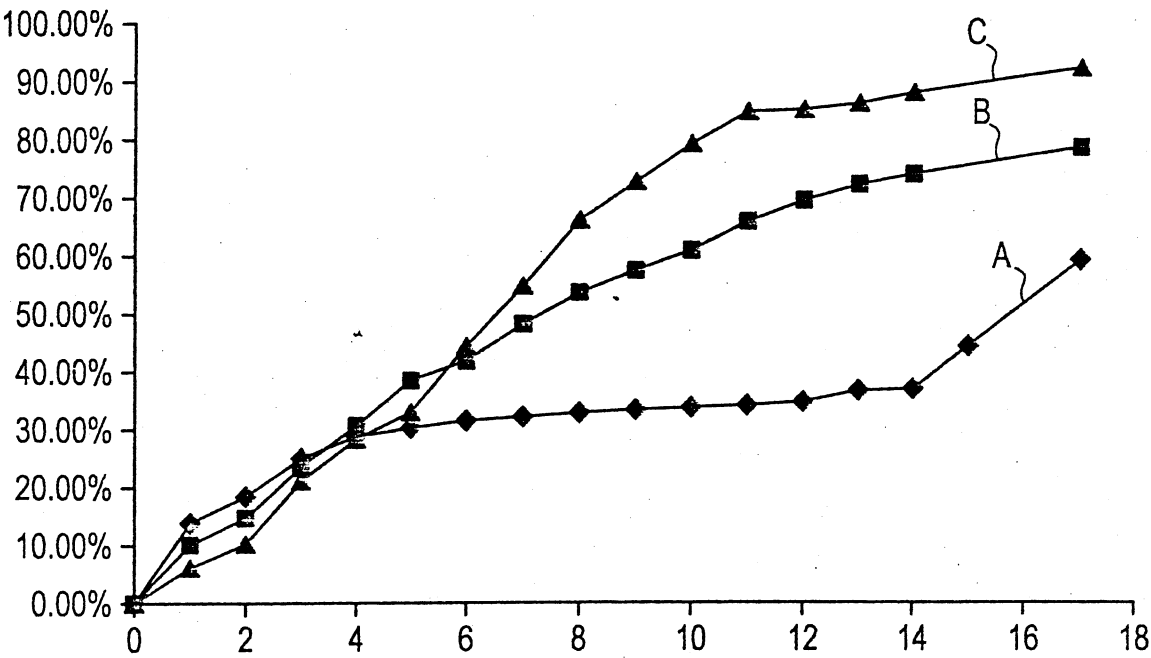


圖 3

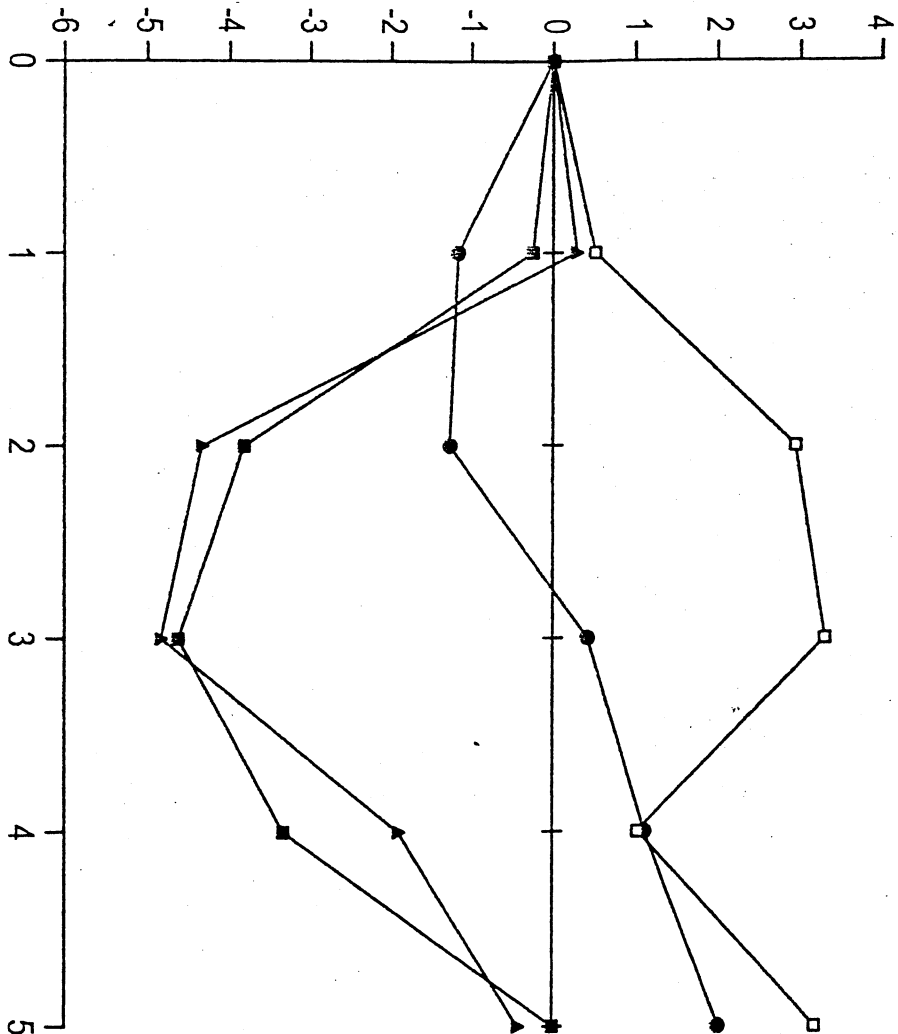


圖 4

六、申請專利範圍

公 告 本

修正
本94年10月21日
補充

1. 一種用於持續施給有效量之生物活性劑或其衍生物、同類物、融合物、共軛物或化學改性形態之醫藥組合物，其含有可注射生物可降解聚合物基質，其已納入該生物活性劑，該聚合物基質有逆熱膠凝作用性質及pH-回應的膠凝作用/脫-膠凝作用性質；其中該聚合物基質是一種生物可降解嵌段共聚物其包括：
 - (a) 55%至80重量%之一種疏水性A聚合物嵌段，其包含具有介於1000-20,000之平均分子量的聚-丙交酯-共-乙交酯(PLGA)；及
 - (b) 20%至45重量%之一種親水性B聚合物嵌段，包含一種具有介於500-10,000之平均分子量的聚乙二醇；且其中該生物可降解嵌段共聚物有可離子化官能基團在聚合物鏈之一或兩端。
2. 根據申請專利範圍第1項之組合物，其中該可離子化官能基團有範圍3-8之 pK_a 。
3. 根據申請專利範圍第1項之組合物，其中該嵌段共聚物是一種三嵌段共聚物有選自A-B-A或B-A-B嵌段部分組成之組群之一種組態。
4. 根據申請專利範圍第3項之組合物，其中該疏水性A聚合物嵌段構成該嵌段共聚物之74重量%及該親水性B聚合物嵌段構成該嵌段共聚物之26重量%。
5. 根據申請專利範圍第4項之組合物，其另包含一種賦形劑其會改變該嵌段共聚物之低臨界溶液溫度及增加該

六、申請專利範圍

嵌段共聚物之膠凝作用速率。

6. 根據申請專利範圍第1項之組合物，其中該生物活性劑是選自同感干擾素，間白血球素，造紅血球素，粒性白血球-聚落刺激因子(GCSF)，幹細胞因子(SCF)，leptin (OB蛋白質)，干擾素(α , β , γ)，腫瘤壞死因子(TNF)，腫瘤壞死因子關連蛋白質(TNF-bp)，間白血素-1受體對抗劑(IL-1ra)，腦衍生之向神經因子(BDNF)，神經膠質衍生之向神經因子(GDNF)，向神經因子-3(NT-3)，纖維細胞生長因子(FGF)，向神經生長因子(NGF)，骨生長因子諸如 osteoprotegerin(OPG)，粒性白血球巨噬細胞聚落刺激因子(GM-CSF)，巨核細胞衍生之生長因子(MDGF)，角化細胞生長因子(KGF)，血小板生成素(thrombopoietin)，小板衍生之生長因子(PDGF)，新穎紅血球生長刺激蛋白質(NESP)，組織前纖維蛋白溶酶活化劑(TPA)，尿激酶，鏈球菌激酶及血管舒緩素組成之組群之一種蛋白質。
7. 根據申請專利範圍第1項之組合物，其中該生物活性劑是一種小分子。
8. 一種生物可降解聚合物基質(其中摻有生物活性劑或其衍生物、同類物、融合物、共軛物或化學變性形態)之用途，其係用以製備用於非經腸道施用至溫血動物之藥劑，其可造成該活性劑持續釋出，並於該聚合物基質之注射處生物降解及清除之結果，其中該聚合物基

六、申請專利範圍

質有逆熱膠凝作用性質及pH-回應膠凝作用/脫-膠凝作用性質；其中該聚合物基質是一種生物可降解嵌段共聚物，其包括：

(a) 55%至80重量%之一種疏水性A聚合物嵌段，其包含具有介於1000-20,000之平均分子量的聚-丙交酯-共-乙交酯(PLGA)；及

(b) 20%至45重量%之一種親水性B聚合物嵌段含一種具有介於500-10,000之平均分子量的聚乙二醇；

且其中該生物可降解嵌段共聚物有可離子化官能基團在聚合物鏈之一或兩端。

9. 根據申請專利範圍第8項之用途，其中該嵌段共聚物是一種三嵌段共聚物有選自A-B-A或B-A-B嵌段部分組成之組群之一種組態。
10. 根據申請專利範圍第9項之用途，其中該疏水性A聚合物嵌段構成該嵌段共聚物之74重量%及該親水性B聚合物嵌段構成該嵌段共聚物之26重量%。
11. 根據申請專利範圍第10項之用途，另包含一種賦形劑其會變動該嵌段共聚物之較低臨界溶液溫度及增加該嵌段共聚物之膠凝作用速率。
12. 根據申請專利範圍第8項之用途，其中該生物活性劑是選自同感干擾素，間白血球素，造紅血球素，粒性白血球-聚落刺激因子(GCSF)，幹細胞因子(SCF)，leptin(OB蛋白質)，干擾素(α , β , γ)，腫瘤壞死因子(TNF)，腫瘤壞死因子關連蛋白質(TNF-bp)，間白血

六、申請專利範圍

素-1 受體對抗劑(IL-1ra)，腦衍生之向神經因子(BDNF)，神經膠質衍生之向神經因子(GDNF)，向神經因子-3 (NT-3)，纖維細胞生長因子(FGF)，向神經生長因子(NGF)，骨生長因子諸如 osteoprotegerin (OPG)，粒性白血球巨噬細胞聚落刺激因子(GM-CSF)，巨核細胞衍生之生長因子(MDGF)，角化細胞生長因子(KGF)，血小板生成素，小板衍生之生長因子(PDGF)，新穎紅血球生長刺激蛋白質(NESP)，組織前纖維蛋白溶酶活化劑(TPA)，尿激酶，鏈球菌激酶及血管舒緩素組成之組群之一種蛋白質。

13. 根據申請專利範圍第8項之用途，其中該生物活性劑是一種小分子。