

(21)申請案號：099130111

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 09 月 06 日

(51)Int. Cl.：

A61K38/29 (2006.01)

A61K47/30 (2006.01)

A61P5/18 (2006.01)

A61P19/02 (2006.01)

A61P19/10 (2006.01)

(71)申請人：高雄醫學大學(中華民國) KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY (TW)

高雄市三民區十全一路 100 號

(72)發明人：何美玲 HO, MEI LING (TW)；王國照 WANG, GWO JAW (TW)；張瑞根 CHANG, JE KEN (TW)；傅尹志 FU, YIN CHIH (TW)；曾誠齊 TZENG, CHERNG CHYI (TW)；路卡曼 RAJALAKSHMANAN, ESWARAMOORTHY (IN)

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：20 項 圖式數：8 共 54 頁

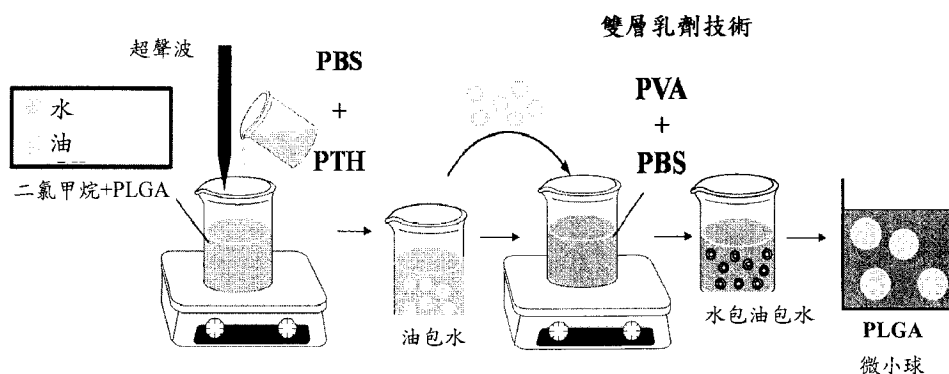
(54)名稱

由聚乳酸-甘醇酸 (POLY (LACTIC-CO-GLYCOLIC ACID)) 微小球控制釋放副甲狀腺素之方法

METHOD FOR CONTROLLED RELEASE OF PARATHYROID HORMONE FROM ENCAPSULATED POLY (LACTIC-CO-GLYCOLIC ACID) MICROSPHERES

(57)摘要

本發明提供了一種生產平均粒徑大於 50 微米之控制釋放微小球的方法，包含製備一油包水〈w/o〉乳劑〈emulsion〉，其包含一層含有藥學上有效量生物活性多肽的內水層，該生物活性多肽之活性與副甲狀腺素類似，以及製備一含有聚乳酸-甘醇酸〈PLGA〉之聚合物的油層，接著將油包水乳劑加入聚乙烯醇〈PVA〉水溶液中以形成水包油包水〈water-in-oil-in-water, w/o/w〉雙乳劑〈double emulsion〉，然後再使油層中的溶劑脫附 (desorb)。本發明同時也提供一個以此方法製備之控制釋放微小球及該微小球之用途。



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明關於一種生產控制釋放微小球的方法，以及一種利用該方法製備的控制釋放微小球及該微小球的用途，該微小球係用於控制釋放藥學上有效劑量的生物活性多肽，且此多肽與副甲狀腺素之活性相近。

【先前技術】

人類副甲狀腺素〈parathyroid hormone, PTH〉是由 84 個胺基酸構成的多肽，其序列如 SEQ ID NO: 1 〈Keutmann. HT, Sauer. MM, Hendy. GN, O’Riordan. JLH, Potts. JT. Complete amino acid sequence of human parathyroid hormone, Biochemistry 17;1978; 5723〉所示，副甲狀腺素直接作用於骨骼及腎臟，是人體鈣平衡中最重要的調控者。近期研究報告指出特定的副甲狀腺素相似物在人體內可在骨骼合成代謝中產生作用〈Podbesek R, Edouard C, Meunier PJ, Parsons JA, Reeve J, Stevenson RW, et al. Effects of two treatment regimes with synthetic human parathyroid hormone fragment on bone formation and the tissue balance of trabecular bone in greyhounds. Endocrinology 1983; 112:1000-6〉，並在用來治療骨骼疾病方面引起高度關注。

PTH 〈1-34〉、PTH 〈1-31〉及 PTH 〈1-38〉在成骨細胞中之表現可與 PTH 〈1-84〉有一樣完整的活性。近年來有許多方法已應用副甲狀腺素於疾病治療臨床試驗上〈Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR,

Prince R, Gaich GA, Reginster J-Y, Hodsman AB, Eriksen EF, Ish-Shalom S, Genant HK, Wang O, Mitlak BH. Effect of parathyroid hormone 〈1 - 34〉 on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *Engl J Med* 2001;344:1434 - 41〉。一個近期報導的方法強調口服施用 PTH 〈1-34〉可表現出生物活性。然而和皮下注射相比，其生物有效性只有 5%和 2.1%〈Leone-Bay A, Sato M, Paton D, Hunt AH, Sarubbi D, Carozza M, Chou J, McDonough J, Baughman RA. Oral delivery of biologically active parathyroid hormone. *Pharm Res* 2001;18 〈7〉:964 - 70〉。另一方面，以氣管灌注或乾粉吸入 PTH 〈1-34〉等經肺部路徑則分別有 41%及 34%的生物有效性〈Codrons V, Vanderbist R, Verbeeck RK, Arras M, Lison D, Preat V, Vanbever R. Systemic delivery of parathyroid hormone 〈1 - 34〉 using inhalation dry powders in rats. *J Pharm Sci* 2003;92 〈5〉:938 - 50〉。除此之外，間歇性 PTH 投予還包括了計畫性滲透壓幫浦給藥〈programmed administration by osmotic pump〉及搏動性經皮給藥〈Suzuki Y, Nagase Y, Iga K, Kawase M, Oka M, Yanai S, Matsumoto Y, Nakagawa S, Fukuda T, Adachi H, Higo N, Ogawa Y. Prevention of bone loss in ovariectomized rats by pulsatile transdermal iontophoretic administration of human PYH 〈1 - 34〉. *J Pharm Sci* 2002;91:350 - 61〉。副甲狀腺素對骨骼合成影響中，上述兩種給藥方式均與皮下給藥有相當的作用效果，而人類副甲狀腺素 PTH 〈1-38〉亦有相似的結果。相對於此，針對局部副甲狀腺素給予的研究工作就較少見。值得注意的是，這些少見的研究指出，直接經由基因傳遞來局部投予副甲狀腺素在治療骨骼缺陷上是一樣有益處的〈Bonadio J,

Smiley E, Patil P, Goldstein S. Localized, direct plasmid gene delivery in vivo: prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration. *Nat Med* 1999; 5: 753 – 9 。

PTH〈1-34〉亦稱做 teriparatide，商品名 FORTEO®，是由 Eli Lilly, Indianapolis, Ind 藥廠生產在市場上銷售，可用於停經後骨折高危險群的婦女，治療骨質疏鬆症〈Zhang, S, Eli Lilly and company, Indianapolis, IA 〈US〉. US patent No. US6590081-B1〉。此藥物是以每日一次皮下注射 PTH〈1-34〉配方（醋酸緩衝液、甘露醇、及間甲酚於水中，pH 4）的方式給予。然而許多人對於注射會有不良反應，因此變成不想遵從 PTH 的處方劑量。

最近，申請人發現 PTH〈1-34〉會作用於關節軟骨細胞，抑制其最終分化，同時亦可在在大鼠中抑制木瓜蛋白酶導致的關節炎〈papain-induced osteoarthritis〉的作用〈Chang. JK, Chang. LH, Hung. SH, Wu. SC, Lee. HY, Lin. YS, Chen. CH, Fu. YC, Wang. GJ, Ho. ML, *Arthritis & Rheumatism*. 2009; 60; 3049-3060〉。然而其治療需要三天投藥一次，會對接受治療的病人帶來更多的痛苦及不便。因此為了減低病人的痛苦，有需要發展一個新的副甲狀腺素胜肽控制釋放載體配方，其具有適當的生物有效性，使其能達到有效治療副甲狀腺素相關疾病的治療濃度。

然而普遍而言，蛋白質和胜肽在腸胃道當中都不穩定、半衰期短、且其水性配方之生物有效性相當低〈Fix, JA. Oral controlled release

technology for peptides: status and future prospects, Pharm. Res. 1996 Dec;13 (12) :1760-4)。這些特性使得蛋白質和胜肽在臨床有效應用上面臨挑戰。

【發明內容】

天然及合成的聚合載體〈微米及奈米球體〉已發展成為一種控制包覆蛋白釋出並避免其被降解的有效方法〈Lu L, Stamatatos GN, Mikos AG. Controlled release of transforming growth factor beta1 from biodegradable polymer microparticles. J Biomed Mater Sci 2000;50:440-51〉。在這些載體中，由於聚乳酸-甘醇酸 (poly (lactic-co-glycolic acid), PLGA) 及聚乳酸 (PLA) 在通過自然途徑時具有極佳的生物適應性和生物降解性，因此更適合用於藥物的傳送。因此本發明提供一種製造可長時間穩定控制釋放副甲狀腺素 (PTH)、並維持其治療濃度和生物有效性的方法。

本發明揭示了一種製造用於控制釋放的 PLGA 微小球的方法，該微小球包覆有具生物活性並穩定的副甲狀腺素。副甲狀腺素成功的被包覆在兩種不同組成的 PLGA 中。發明這些組成是為了使副甲狀腺素在長期的控制釋放過程中能穩定存於微小球中。製造出的 PLGA 微小球可釋放具有生物活性、非聚集的副甲狀腺素，並維持有效的治療濃度範圍在 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 至 $5 \times 10^{-9} \text{ M}$ 之間，持續 21 天。釋出的副甲狀腺素已證明穩定且在長期控制釋放過程中均具有生物活性。

本發明有對包覆於 PLGA 微小球中穩定控制釋放的 PTH 〈1-34〉進行製造及研究。PTH 〈1-34〉在溫度及 pH 改變下會變不穩定，因此

本發明提供了可使 PTH〈1-34〉能長時間穩定包覆的方法。

本發明說明了以 PLGA 包覆方式達到控制局部投予 PTH〈1-34〉並維持固定濃度的可行性。包覆 PTH〈1-34〉的 PLGA 微小球能於一定期間內持續傳送有效濃度範圍的 PTH〈1-34〉，因此可作為一潛在用於 PTH〈1-34〉傳送系統的載體。包覆 PTH〈1-34〉的 PLGA 微小球能用於治療副甲狀腺素不足症、骨質疏鬆、及骨關節炎等。

本文中所使用的術語意義除非另有特別界定，否則均與熟習此項技藝者的普遍認知相同。本申請案中使用的術語其意義如下所列：

「PTH〈1-34〉」意指具有 34 個胺基酸序列的多肽，是由 SEQ ID NO: 1 中從第 1 個至第 34 個胺基酸所構成。更清楚來說，SEQ ID NO: 2 就是 PTH〈1-34〉的多肽序列。

「PTH〈1-31〉」意指具有 31 個胺基酸序列的多肽，是由 SEQ ID NO: 1 中從第 1 個至第 31 個胺基酸所構成。

「PTH〈1-38〉」意指具有 38 個胺基酸序列的多肽，是由 SEQ ID NO: 1 中從第 1 個至第 38 個胺基酸所構成。

「PTH〈1-84〉」意指完整的人類副甲狀腺素，其多肽序列就如 SEQ ID NO: 1 所示。

「退化性骨骼疾病」意指一系列疾病，其特徵為骨骼質量減少和/或由於結構不完整而增加骨折的風險。許多退化性骨骼疾病都是骨質的生成和再吸收失衡所造成。這些失衡可能源自於成骨細胞骨質生成減低、蝕骨細胞骨質再吸收增加、或是成骨細胞與蝕骨細胞兩者共同

的活性改變。

「骨質疏鬆」意指一種退化性骨骼疾病，其特徵包括骨骼質量減低以及骨骼組織微結構的惡化，導致骨質脆弱容易骨折。初級骨質疏鬆是指與其他疾病無關、只與老化和其造成的性腺功能減低有關成的骨骼質量流失。初級骨質疏鬆包含停經後骨質疏鬆和老年骨質疏鬆兩種型式，另外也包括了無潛在因素、也查無其他引起骨質退化次發原因的原發性骨質疏鬆。次發性骨質疏鬆是指除了老化造成的骨質退化以外，其他疾病所導致的骨質疏鬆。世界衛生組織定義骨密度低於骨密度參考標準〈以約 30 歲的健康年輕成人為標準〉2.5 個標準差以下即為骨質疏鬆。

「骨壞死」意指因血流供應至骨骼組織不足而導致骨骼塌陷的疾病。在活體組織當中，骨骼也需要一定足量的血流以供維持正常功能。當缺乏足夠血流時，發生嚴重的骨壞死可引起骨骼組織的死亡。

「骨關節炎」〈簡寫 OA，也就是退化性關節炎或退化性關節疾病〉是指一些疾病及力學上異常引發的關節退化，包括了關節軟骨及在旁的軟骨下骨〈subchondral bone〉。骨關節炎的臨床特徵有關節疼痛、觸痛、僵硬、發出軋軋聲、關節閉鎖和時而局部發炎。軟骨做為強而有力的蛋白質基質可潤滑並緩和關節衝擊，在骨關節炎中，許多潛在因素，像遺傳、生長發育、代謝及力學上的影響都會導致開始軟骨流失的過程。

因此本發明提供一種控制釋放微小球，其平均粒徑大於 50 μm 。該微小球係藉由以下方法製造：製備一包含有內水層的油包水乳劑

〈water-in-oil 〈w/o〉 emulsion〉，該內水層含有藥學上有效量的生物活性多肽，該多肽活性與副甲狀腺素相近；製備一含有聚乳酸-甘醇酸（PLGA）之聚合物質的油層；接著將油包水乳劑倒入聚乙烯醇〈polyvinyl alcohol 〈PVA〉〉水溶液中以形成水包油包水雙乳劑〈water-in-oil-in-water 〈w/o/w〉 double emulsion〉並接著將油層中的溶劑脫附（desorb）掉。在較佳實施例中，聚乳酸-甘醇酸為 PLGA〈50:50〉或 PLGA 〈65:35〉，且多肽之胺基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示，其被固定於含有鹽酸和牛血清白蛋白之儲備溶液中。較佳地，該鹽酸濃度為約 1 mM 到約 8 mM，牛血清白蛋白之濃度為約 0.01%到約 5%。更佳地，鹽酸濃度為約 2 mM 到約 6 mM，牛血清白蛋白之濃度為約 0.05 %到約 0.15 %。

在一較佳實施例中，該多肽係以範圍約 1×10^{-7} M 到約 5×10^{-9} M 的有效治療濃度釋放至少 21 天，該聚乙烯醇水溶液之重量百分比濃度為約 0.1%到約 5%，且生物活性多肽之包封率不低於約 60%。較佳地，聚乙烯醇水溶液之重量百分比為約 0.5%到約 1.5%。

本發明進一步提供一種製造平均粒徑大於 50 微米之控制釋放微小球的方法，包含：製備一油包水〈w/o〉乳劑，其包含一內水層，該內水層並含有藥學上有效量的生物活性多肽，此生物活性多肽之活性與副甲狀腺素類似；製備一含有聚乳酸-甘醇酸之聚合物質的油層；接著緩慢將油包水乳劑加入聚乙烯醇水溶液中以形成水包油包水〈w/o/w〉雙乳劑並接著將油層中的溶劑脫附掉。較佳地，聚乳酸-甘醇酸為 PLGA 〈50:50〉或 PLGA 〈65:35〉，且多肽之胺基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所

示，其被固定於含有鹽酸和牛血清白蛋白之儲備溶液中。較佳地，該鹽酸濃度為約 1 mM 到約 8 mM，牛血清白蛋白之濃度為約 0.01% 到約 5%。更佳地，該鹽酸濃度為約 2 mM 到約 6 mM，牛血清白蛋白之濃度為約 0.05 % 到約 0.15 %。

在一較佳實施例中，該多肽係以範圍約 1×10^{-7} M 到約 5×10^{-9} M 的有效治療濃度釋放至少 21 天，該聚乙烯醇水溶液之重量百分比濃度為約 0.1% 到約 5%，且生物活性多肽之包封率不低於約 60%。較佳地，聚乙烯醇水溶液之重量百分比為約 0.5% 到約 1.5%。

本發明更進一步提供一種控制釋放投遞具治療性多肽至一對象之方法，包含向該對象投予平均粒徑大於 50 μ m 之控制釋放微小球，該微小球係藉由以下方法製造：製備一包含有內水層的油包水乳劑，該內水層含有藥學上有效量的生物活性多肽，該多肽活性與副甲狀腺素相近；製備一含有聚乳酸-甘醇酸之聚合物質的油層；接著將油包水乳劑倒入聚乙烯醇水溶液中以形成水包油包水雙乳劑並接著將油層中的溶劑脫附掉。在較佳實施例中，聚乳酸-甘醇酸為 PLGA〈50:50〉或 PLGA〈65:35〉，且多肽之胺基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示，其被固定於含有鹽酸和牛血清白蛋白之儲備溶液中。較佳地，該鹽酸濃度為約 1 mM 到約 8 mM，牛血清白蛋白之濃度為約 0.01% 到約 5%。更佳地，鹽酸濃度為約 2 mM 到約 6 mM，牛血清白蛋白之濃度為約 0.05 % 到約 0.15 %。

在一較佳實施例中，該多肽係以範圍約 1×10^{-7} M 到約 5×10^{-9} M 的有效治療濃度釋放至少 21 天，該聚乙烯醇水溶液之重量百分比濃度

為約 0.1%到約 5%。較佳地，聚乙烯醇水溶液之重量百分比為約 0.5%到約 1.5%。

在一較佳實施例中，該對象係患有副甲狀腺功能不全症、骨疾病或軟骨疾病。在一更佳實施例中，該骨疾病為骨質疏鬆症或骨壞死症；該軟骨疾病為骨關節炎。在另一更佳實施例中，該對象係人類。

在傳統的雙乳劑技術中，人們使用 250 至 400 mL 的 1-5 % PVA 溶液作為水相 (Y.-Y. Yang et al., Biomaterials 22 (2001) 231-241 and G. Wei et al. / Biomaterials 25 (2004) 345-352)，但本發明僅使用 20 mL 的 1 % PVA 作為水相。

通常雙乳劑技術需要至少 4 小時的製備時間 (Y.-Y. Yang et al., Biomaterials 22 (2001) 231-241)，但本發明的方法僅需要 2 小時的製備時間。因此本發明也降低了製備所需時間。

US 4652441、US 4954298、US 5271945、US 5330767、US 5611971 及 US 5651990 揭露了製備用於延長釋放的微小球的方法，然而，本發明的技術優於彼等之處在於：(1) 較少的製備時間 (2 小時之內)；(2) 微小球的尺寸較適於關節內注射；(3) 可重複性較高且較重要；(4) 微小球可釋放 PTH 〈1-34〉至少 21 天並均落在有效治療濃度範圍內。

Anthony 等人 (Journal of Pediatric Surgery, 40, 81-85 (2005)) and Fong et al. (Journal of Surgical Reserch, 143, 195-199 (2007)) 揭露了用於副甲狀腺低能症的控制釋放系統，其 PTH 的釋放濃度為 1000-6000 微微克 (1 微微克= 10^{-12} g) 且在第一天 (24 小時) 內有非常高的爆發性釋

放。他們的製備方法需要 4 小時以及大量的 PVA。本發明僅需要 2 小時以及少量的 PVA。除此之外，本發明的 PTH 釋放濃度為 20-400 微克 ($1 \text{ 微克} = 10^{-6} \text{ g}$)。

因此，本發明的特徵在於降低 PVA 溶液的量以及百分比，並使用 700 rpm 以產生粒徑大於 $50 \mu\text{m}$ 的微小球，其大小適合關節內注射。本發明的關鍵步驟或發現是在於使用 20 mL 的 1 % PVA 作為水相，以 700 rpm 的攪拌速度仍能產出適當尺寸的微小球（根據 Butoescu. N, Jordan. O, Doelker. E, Intra-articular drug delivery systems for the treatment of rheumatic diseases: A review of the factors influencing their performance European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2009; 73; 205–218，關節內注射適合的粒徑為直徑 35 至 $105 \mu\text{m}$ ）以釋放具有治療濃度的 PTH 超過三星期的時間。

【實施方式】

以下實例並非作為限制，僅代表本發明的各種面相與特徵。

實例 1 微小球的製備和特徵

本研究中使用兩種不同的 PLGA 組成—PLGA 〈50:50〉和 PLGA 〈65:35〉。微小球以 w/o/w 雙乳劑技術製造〈圖 1〉。簡言之，90 μl 的 PTH 〈1-34〉儲備溶液〈PTH 於 4mM HCl/ 0.1% 牛血清白蛋白〈BSA〉溶液〉在 10% 二氯甲烷〈DCM〉聚合物溶液中被乳化，並在冰浴中使用輸出功率為 15W 之超聲波探針〈Virsonic 100, Cardiner, NY〉20 秒以形成最初的油包水(w/o)乳劑。逐步將油包水乳劑加入 20 ml 的 1% 聚乙醇

〈PVA〉水溶液中，並同時用力攪拌（700 rpm）以形成水包油包水的雙乳劑。在室溫下攪拌該溶液30分鐘以硬化微小球，接著在吸水狀態下將二氯甲烷蒸發，然後離心收集固體微小球。將所生成的微小球以蒸餾水清洗3次並冷凍乾燥。該微小球的整體形態會在微小球樣本於顯微鏡載台〈stub〉上以金包覆後，以掃描電子顯微鏡〈SEM〉〈Hitachi S3200, Tokyo, Japan〉研究，微小球的平均尺寸則會被粒徑分析儀測量。

使用 4 mM 鹽酸和生理食鹽水〈0.9 % NaCl〉以及 0.1 % 的 BSA 作為穩定劑以保護被包封在微小球中的 PTH 〈1-34〉。為了控制釋放被包覆在微小球中的藥劑，微小球之表面必須要是平滑的。掃描式電子顯微鏡的觀察確認 PLGA 微小球是平滑的，且在降解過程中也維持此現象。文獻報告強調，用於在大鼠關節內注射之微小球適當大小為 35-105 μm 〈Butoescu. N, Jordan. O, Doelker. E, Intra-articular drug delivery systems for the treatment of rheumatic diseases: A review of the factors influencing their performance European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2009; 73; 205–218〉，粒徑分析儀的數據顯示以本研究中之本方法可成功製造出多於 90% 的平均粒徑為 45-80 μm 之微小球〈圖 2 及圖 3a〉。

實例 2 包封和釋放動力學

將裝有10毫克PTH 〈1-34〉之微小球懸浮於0.9 %的1 mL氯化鈉與200 μL 二氯甲烷混合液中，並於室溫下震盪培養1小時。PTH 〈1-34〉標準溶液〈0.1 ml〉也藉由加入0.9 %氯化鈉與0.1 % BSA來製備。以市

售的免疫試劑套組，根據製造商的指示測量PTH〈1-34〉之濃度。蛋白質的裝載與包封效率〈Encapsulation efficiency〉則分別以方程式〈1〉和〈2〉計算〈表 1〉。

方程式〈1〉：蛋白質裝載 〈w/w%〉 = 微小球中蛋白質的總量 / 微小球總量

方程式〈2〉：蛋白質包封效率 〈%〉 = 〈被測量之蛋白質濃度 / 蛋白質濃度之理論值〉 X100

表 1 PLGA微小球中PTH〈1-34〉之包封效率

PLGA	PTH 〈ng/mL〉 濃度理論值	測量的 PTH 〈ng/mL〉 濃度	包封效率
50:50	1800	1319.0	73.3 %
65:35	1800	1129.4	62.7 %

實例 3 生物體外 (*In vitro*) 之 PTH 〈1-34〉釋放

在生物體外由PLGA微小球釋放PTH〈1-34〉的釋放曲線由下述方法測定。將10毫克的微小球懸浮在1ml PBS 〈pH = 7.4〉中，微小球懸浮液被靜置培養在4、25、37 °C下，在設定的時間間隔下，藉由離心收集1ml的培養液，並以等量的新鮮PBS替換。以具有PTH抗體塗層之培養格的PTH〈1-34〉ELISA套組〈Immutopics, San Clemente, CA〉，遵

從廠商建議來測量經釋出之培養液中的PTH〈1-34〉濃度。每個時間點都使用三個培養格作三重複。使用微量盤讀取儀(microtiter plate reader)在450 nm測量吸光度，並使用GraphPad Prisms程式以log-logit法搭配標準曲線〈standard curve〉計算出PTH之濃度〈GraphPad Software, San Diego, CA〉。

發明人近期的研究報告提出，治療被木瓜酶誘導之大鼠骨關節炎之有效劑量 PTH 〈1-34〉為 10^{-8} M，注射頻率為每三天一次連續五週。來自 PTH 〈1-34〉特定 ELISA 分析的釋放動力學數據顯示，在 37 °C 下，PLGA 〈65:35〉微小球可釋放所欲濃度範圍 10^{-7} - 10^{-8} M 的 PTH 〈1-34〉兩週〈圖 4〉。相較於 PLGA 〈50:50〉，PLGA 〈65:35〉在 PBS 中 37 °C 模擬生理條件下，在超過 17 天後顯示一致的釋放曲線。

實例 4 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 分析法

在處理 MC3T3-E1 〈成骨細胞〉時，PTH 〈1-34〉之毒性範圍會以 MTT 分析測試。簡言之，如先前所述，藉由轉換 MTT 成為甲臍(formazan)，以偵測培養格中培養的 MC3T3-E1 的粒線體活性，大量的甲臍產物會釋入培養液中，而這直接與培養格中的活細胞數量呈正比，且可在 490nm 藉由吸光度測定而測得。在指定的時間間隔內，以體積比 1：5 〈MTT：培養液〉將 MTT 稀釋於標準培養基中，並將該新鮮製備的 MTT 加入含有細胞的培養格中，然後在 37 °C 下以 5% CO₂ 再培養四小時。經過額外培養後，每一個培養格中，釋入培養液且被

轉換之 100 ul MTT 會從中被轉移到 96 孔培養盤，使用微孔盤讀取儀〈PathTech〉記錄在 490 nm 的吸光度，並使用 KC junior 軟體分析〈圖 3b〉。

實例 5 釋放之 PTH 〈1-34〉之生物活性

藉由測量經釋放的 PTH 〈1-34〉處理之細胞內所含的環磷酸腺甘〈cAMP〉，以測定控制釋放之 PTH 〈1-34〉之活性。為了這些實驗，將 MC3T3-E1 培養於添加有 10%胎牛血清和 50 mg/mL 抗壞血酸之 α -MEM 內。將細胞以每孔 50,000 個細胞的密度培養於 24 孔盤〈24-well plates〉上。與從微小球釋放之 PTH 〈1-34〉培養六小時後，加入 0.1N 之鹽酸與 0.5 mM 之霍亂毒素〈isobutylmethylxanthine〉讓細胞在培養基中直接被水解，以保護所產生之 cAMP。以市售的 ELISA 套組〈Endogen/Pierce, Rockford, IL〉按照廠商說明測量細胞內之 cAMP。生物活性數據顯示經釋放的 PTH 〈1-34〉處理的 MC3T3-E1 細胞在第一和第三天都有增加 cAMP 的生產，表示釋放的 PTH 〈1-34〉具有生物活性〈圖 5〉。

實例 6 統計分析

測試三個為了生化分析而獨立培養的樣本。每個實驗都重複至少三次，並顯示出具代表性之實驗之數據〈表示為平均值 $\pm$ 標準差〉。以單因子變異數分析〈ANOVA〉評估統計顯著性，並使用薛費法進行多重比較。 $p < 0.05$ 被認為是顯著的。

實例 7 生物體內 (*In vivo*) 實驗

方法：

動物實驗

動物實驗經高雄醫學大學之動物實驗管理小組核准。由樂斯科生物科技股份有限公司〈BioLASCO Taiwan〉購入 54 隻 12 週大的雄性 Sprague-Dawley 大鼠〈250–300 gm〉，並將其飼養在標準的實驗室條件下〈溫度 24°C，日夜週期 12 小時〉且可自由的取用食物和水。實驗動物會在實驗室中適應一星期，之後再進行實驗。

骨關節炎誘發與 PTH 處理

每個被視作對側控制關節之左膝，均施加未以 PTH 處理或進行 OA 誘發的媒液，右膝為被研究之關節。大鼠會被分至五個組別：Non-OA+PTH 組〈以 PTH〈1-34〉處理但不進行 OA 誘發〉〈n=6〉、Non-OA+PTH/PLGA 組〈以 PTH/PLGA 微小球處理但不進行 OA 誘發〉〈n=6〉、OA 組〈進行 OA 誘發但不以 PTH〈1-34〉處理〉〈n=6〉、OA+PTH 組〈以 PTH〈1-34〉處理過後，再進行 OA 誘發〉〈n=6〉和 OA+PTH/PLGA 組〈以 PTH/PLGA 微小球處理過，再進行 OA 誘發〉〈n=6〉。OA 組與 OA+PTH 組之大鼠，右膝關節內會被注射 20 μ l 之 4%木瓜酶溶液以及 20 μ l 之 0.03 M 半胱胺酸，使 OA 被誘發。這些關節會於實驗日之第 1、4 和 7 天以 26-gauge 針頭透過膝蓋肌腱注射（美國專利號 US 659081）。在 OA+PTH 組，在 OA 被誘發後至將大鼠犧牲

前，每隔三天會注射 40 μ l 之 10nM PTH 〈1-34〉至右膝關節內。在 PTH 組，在沒有 OA 被誘發的情況下進行同樣的 PTH 〈1-34〉處理。在 OA+PTH/PLGA group 組，在 OA 被誘發後之第 1 天與第 15 天，將 0.4 mg 的 PTH/PLGA 微小球注射至右膝關節內。在 5 週後的同一個時間點，以過量二氧化碳吸入的方式將大鼠犧牲。

組織學

進行犧牲後，採取每個大鼠的膝蓋，收集脛骨平台連同關節軟骨，並於組織實驗準備前先以 10% 中性緩衝福馬林固定。接著以 10% 甲酸／PBS 緩衝液將樣本脫鈣，將脫鈣後之脛骨關節樣本以石蠟包埋，並製備 5 μ m 的冠狀面微切片。GAG 以番紅速綠 〈Safranin-O-Fast-Green〉（1% 番紅以 0.75% 蘇木精接著 1% 速綠作對比染色）〈Sigma, St. Louis, MO〉染色。局部之第二型膠原蛋白與 X 型膠原蛋白則被免疫染色。

組織形態計量學研究

將 GAG 以番紅染紅，以 Image-Pro plus 5.0 軟體〈Media Cybernetics Inc. MD, USA〉測量每個脛骨近端之關節軟骨內所有區域與被染紅的區域〈圖 6C〉。計算各組中被染為紅色之區域在所有區域中的比例〈紅/全部〉。

免疫組織化學

將該脛骨關節切片再次水合（re-hydrated），並以 3% 過氧化氫阻塞

組織中內生的過氧化酶。樣本在與初級抗體靜置培養前，為了抗原表位回復〈epitope retrieval〉會先以酵素分解。該酵素分解的方法是修改先前的報告（Butoescu. N, Jordan. O, Doelker. E, Intra-articular drug delivery systems for the treatment of rheumatic diseases: A review of the factors influencing their performance *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2009; 73; 205–218）而來。酵素分解第二型膠原蛋白免疫染色之最佳條件，是在37°C下2.5%玻尿酸酶〈hyaluronidase〉與於PBS〈pH 7.4〉〈Sigma, St. Louis, MO〉中的1 mg/ml 鏈蛋白酶之混合物中1小時。x型膠原蛋白免疫染色之最佳條件，是在0.1 U/ml的軟骨速分解酵素〈chondroitinase ABC〉(Sigma, St. Louis, MO) 中1小時以及在37°C下於1 mg/ml tris-HCl (pH 3.0) 中的胃蛋白酶中15分鐘。接著將切片以胎牛血清阻塞1小時，並於37°C下，以針對第二型膠原蛋白的初級抗體〈小鼠單株抗體〉〈Chemicon International, Temecula, CA〉與針對X型膠原蛋白的初級抗體〈大鼠之多株抗體〉〈1:200〉〈COSMO, Tokyo, Japan〉培養4小時。將第二型膠原蛋白以生物素標記的羊抗鼠免疫球蛋白〈DAKO, Carpinteria, CA〉進行二抗培養，X型膠原蛋白則以生物素標記的羊抗兔免疫球蛋白〈Biocare medical, Walnut Creek, CA〉進行二抗培養，並再加入生物活性酶〈Streptavidin-HRP〉〈鏈黴卵白素 (streptavidin) 偶聯辣根過氧酵素 (horseradish peroxidase)〉(Biocare medical, Walnut Creek, CA)。再以含有0.01%過氧化氫之3,3'-二胺基聯苯胺〈3,3'-diaminobenzidine〉溶液染為褐色，最後，將切片以蘇木素做背景染色〈counterstained〉並以顯微鏡做觀察。免疫染色之相對密度

〈密度/面積；面積 $25.44 \pm 2.77 \text{ mm}^2$ 〉會以Image-Pro plus 5.0軟體〈Media Cybernetics Inc. MD, USA〉進行測量〈圖7C〉。

結果：

大鼠關節軟骨節的組織學及組織形態計量學研究

在對側控制、Non-OA+PTH、Non-OA+PTH/PLGA、OA、OA+PTH和OA+PTH/PLGA組中的經番紅染色的大鼠關節之關節軟骨的代表性照片顯示於圖6〈A&B〉。測量經番紅染色之區域在所有區域中的比率〈紅色：全部〉並於分組中做比較〈圖6C〉。各組之間，對側控制關節中的紅色：全部比率並沒有顯著差異。對側控制關節中軟骨的紅色：全部比率，以及Non-OA+PTH和Non-OA+PTH/PLGA兩組的研究關節中的紅色：全部比率也並沒有顯著差異〈圖6C〉。OA組中，研究關節之軟骨的紅色：全部比率，顯著比經OA誘導五個星期之對側控制軟骨的紅色：全部比率來得低〈 $P < 0.01$ 〉〈圖6C〉。經五個禮拜的PTH〈1-34〉處理後，OA+PTH組之軟骨並沒有與對側控制組之軟骨有明顯差異〈圖6C〉。五週後，OA+PTH/PLGA組的紅色：全部比率則顯著高於OA組〈 $P < 0.01$ 〉〈圖6C〉。除此之外，OA+PTH/PLGA組的紅色：全部比率與對側控制軟骨也沒有顯著差異。在第五週時，OA+PTH組、OA+PTH/PLGA組和對側控制軟骨組之間，沒有顯著差異〈圖6C〉。

大鼠關節軟骨節之第Ⅱ型膠原蛋白之免疫組織化學研究

在對側控制、Non-OA+PTH、Non-OA+PTH/PLGA、OA、OA+PTH

和OA+PTH/PLGA組中之大鼠關節之關節軟骨的第二型膠原蛋白染色〈染成棕色〉之代表性顯微照片顯示於圖7〈A、B和C〉。測量第二型膠原染色區域對全部區域之比率〈棕色：全部〉並做各組間比較〈圖7D〉。對側控制關節的棕色：全部比率於各組之間並無顯著差異；對側控制關節內之軟骨的棕色：全部比率，以及Non-OA+PTH和Non-OA+PTH/PLGA組中所研究之關節也都沒有顯著差異〈圖7D〉。OA組之研究關節軟骨中的棕色：全部比率則顯著低於以OA誘導五週的對側控制軟骨中的棕色：全部比率〈 $P < 0.01$ 〉〈圖7D〉。經PTH〈1-34〉處理五週後之OA+PTH組之軟骨與對側控制軟骨並無顯著差異〈圖7D〉。五週後，OA+PTH/PLGA組之棕色：全部比率則顯著高於OA組的棕色：全部比率〈 $P < 0.01$ 〉〈圖7D〉。除此之外，OA+PTH/PLGA組之棕色：全部比率也與對側控制軟骨無顯著差異。在第五週，OA+PTH、OA+PTH/PLGA和對側控制軟骨組之間沒有顯著差異〈圖7D〉。

大鼠關節軟骨節中 X 型膠原之免疫組織化學研究

對側控制軟骨中，並沒有發現明顯的X型膠原蛋白染色之軟骨細胞〈圖8A和8B〉。免疫定位之X型膠原蛋白〈染成棕色〉主要在OA組之關節軟骨細胞中被發現，但在處理五週後之OA+PTH和OA+PTH/PLGA組軟骨中，則很少發現陽性染色〈positive stained〉之細胞〈圖8A和8B〉。

一個熟知此領域技藝者能很快體會到本發明可很容易達成目

標，並獲得所提到之結果及優點，以及那些存在於其中的東西。本發明中之微小球及其製造程序與方法乃較佳實施例的代表，其為示範性且不僅侷限於本發明領域。熟知此技藝者將會想到其中可修改之處及其他用途。這些修改都蘊含在本發明的精神中，並在申請專利範圍中界定。

本發明的內容敘述與實施例均揭示詳細，得使任何熟習此技藝者能夠製造及使用本發明，即使其中有各種不同的改變、修飾、及進步之處，仍應視為不脫離本發明之精神及範圍。

說明書中提及之所有專利及出版品，都以和發明有關領域之一般技藝為準。所有專利和出版品都在此被納入相同的參考程度，就如同每一個個別出版品都被具體且個別地指出納入參考。

在此所適當地舉例說明之發明，可能得以在缺乏任何要件，或許多要件、限制條件或並非特定為本文中所揭示的限制情況下實施。所使用的名詞及表達是作為說明書之描述而非限制，同時並無意圖使用這類排除任何等同於所示及說明之特點或其部份之名詞及表達，但需認清的是，在本發明的專利申請範圍內有可能出現各種不同的改變。因此，應了解到雖然已根據較佳實施例及任意的特點來具體揭示本發明，但是熟知此技藝者仍會修改和改變其中所揭示的內容，諸如此類的修改和變化仍在本發明之申請專利範圍內。

【圖式簡單說明】

圖 1：包覆 PTH〈1-34〉之聚乳酸-甘醇酸〈PLGA〉微小球製造示意圖。

圖 2：包覆 PTH〈1-34〉之聚乳酸-甘醇酸微小球之掃描式電子顯微鏡（SEM）影像。

圖 3：〈a〉為以粒徑分析儀〈particle size analyzer〉分析之微小球大小；〈b〉以 MTT 分析之 PTH〈1-34〉細胞毒性。

圖 4：PLGA〈50:50〉及 PLGA〈65:35〉的累積釋放曲線。

圖 5：PLGA 微小球釋出之 PTH〈1-34〉對 MC3T3-E1 細胞的生物活性

圖 6：以番紅（Safranin-O）染色的關節軟骨看其 GAG 量的組織分析圖。

這些圖分別為對側控制組、Non-OA+PTH、Non-OA+PTH/PLGA、OA、OA+PTH 和 OA+PTH/PLGA 組之被 Safranin-O 染色之大鼠對側脛骨近端的關節軟骨。OA 組中的 OA+PTH 組以 PTH〈1-34〉〈 10^{-8} M〉每 3 天處理 1 次，而 OA+PTH/PLGA 0.4mg 組每 15 天進行處理 2 次，同時所研究之大鼠關節也列於圖中。每一個橫條分別代表八個樣本之平均數±標準差。數據以單因子變異數分析〈One way analysis of variance, ANOVA〉，並使用薛費法〈Scheffe's method〉進行多重比較。

〈**〉 $p < 0.01$ ，於每個時間點，對側控制組與實驗組樣本做比較。〈##〉 $p < 0.01$ ，於每個時間點，OA 組中之實驗組樣本做比較。

圖 7：對側控制組、Non-OA+PTH 組、Non-OA+PTH/PLGA 組、OA 組、OA+PTH 組和 OA+PTH/PLGA 組中被染色之關節軟骨之第二型膠原蛋白〈COL. II〉的組織學分析結果。OA 組中代表性的為大鼠對側關節之

脛骨近端免疫染色關節軟骨，OA+PTH 組以 PTH $\langle 1-34 \rangle \langle 10^{-8}M \rangle$ 每 3 天處理 1 次，而 OA 組中的 OA+PTH/PLGA 0.4mg 組每 15 天處理 2 次。顯示的圖為所研究的大鼠關節。將生長板軟骨染色以作為正控制，沒有以一抗染色之生長板與關節軟骨作為負控制。將第二型膠原蛋白染為棕色。每一個橫條分別代表八個樣本之平均數 $\pm$ 標準差。數據以單因子變異數分析，並使用薛費法進行多重比較。

$\langle ** \rangle$ $p < 0.01$ ，於每個時間點，對側控制組與實驗組樣本做比較。 $\langle \#\# \rangle$ $p < 0.01$ ，於每個時間點，OA 組中之實驗組樣本做比較。

圖 8：對側控制組、Non-OA+PTH 組、Non-OA+PTH/PLGA 組、OA 組、OA+PTH 組和 OA+PTH/PLGA 組中被染色之關節軟骨之 X 型膠原蛋白 $\langle COL. X \rangle$ 的組織學分析結果。OA 組中代表性的為大鼠對側關節之脛骨近端免疫染色關節軟骨，OA+PTH 組以 PTH $\langle 1-34 \rangle \langle 10^{-8}M \rangle$ 每 3 天處理 1 次，而 OA 組中的 OA+PTH/PLGA 0.4mg 組每 15 天處理 2 次。將生長板軟骨染色以作為正控制，沒有以一抗染色之生長板與關節軟骨作為負控制。將 X 型膠原蛋白染為棕色。以箭頭指出 X 型膠原蛋白被染色之軟骨。每一個橫條分別代表八個樣本之平均數 $\pm$ 標準差。數據以單因子變異數分析，並使用薛費法進行多重比較。

$\langle ** \rangle$ $p < 0.01$ ，於每個時間點，對側控制組與實驗組樣本做比較。 $\langle \#\# \rangle$ $p < 0.01$ ，於每個時間點，OA 組中之實驗組樣本做比較。

附件 1：圖 1 之彩色示意圖。

附件 2：圖 6A 之彩色示意圖。

附件 3：圖 6B 之彩色示意圖。

附件 4：圖 7A 之彩色示意圖。

附件 5：圖 7B 之彩色示意圖。

附件 6：圖 7C 之彩色示意圖。

附件 7：圖 8A 之彩色示意圖。

附件 8：圖 8B 之彩色示意圖。

序列表

<110> 高雄醫學大學

<120> 由聚乳酸-甘醇酸 (POLY(LACTIC-CO-GLYCOLIC ACID)) 微小球控制釋放副甲狀腺素之方法

<130> 1183-KNU-US

<160> 2

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 84

<212> PRT

<213> 人類 (Homo sapiens)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(84)

<400> 1

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn

1 5 10 15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His
20 25 30

Asn Phe Val Ala Leu Gly Ala Pro Leu Ala Pro Arg Asp Ala Gly Ser
35 40 45

Gln Arg Pro Arg Lys Lys Glu Asp Asn Val Leu Val Glu Ser His Glu
50 55 60

Lys Ser Leu Gly Glu Ala Asp Lys Ala Asn Val Asp Val Leu Thr Lys
65 70 75 80

Ala Lys Ser Gln

<210> 2
<211> 34
<212> PRT
<213> 人類 (Homo sapiens)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(34)



<400> 2

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn
1 5 10 15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His
20 25 30

Asn Phe

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 99130111

※ 申請日： 99 9 6

※IPC 分類：

A61K 38/29 (2006.01)

A61K 9/30 (2006.01)

A61P 5/18 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

由聚乳酸-甘醇酸 (POLY(LACTIC-CO-GLYCOLIC ACID)) 微小球控制

釋放副甲狀腺素之方法 / METHOD FOR CONTROLLED RELEASE OF

PARATHYROID HORMONE FROM ENCAPSULATED

POLY(LACTIC-CO-GLYCOLIC ACID) MICROSPHERES

二、中文發明摘要：

本發明提供了一種生產平均粒徑大於 50 微米之控制釋放微小球的方法，包含製備一油包水〈w/o〉乳劑〈emulsion〉，其包含一層含有藥學上有效量生物活性多肽的內水層，該生物活性多肽之活性與副甲狀腺素類似，以及製備一含有聚乳酸-甘醇酸〈PLGA〉之聚合物的油層，接著將油包水乳劑加入聚乙烯醇〈PVA〉水溶液中以形成水包油包水〈water-in-oil-in-water, w/o/w〉雙乳劑〈double emulsion〉，然後再使油層中的溶劑脫附 (desorb)。本發明同時也提供一個以此方法製備之控制釋放微小球及該微小球之用途。

三、英文發明摘要：

The present invention provides a method for producing a controlled release microsphere with mean average size greater than 50 μm , comprising preparing a water-in-oil (w/o) emulsion comprising an inner aqueous layer containing a pharmaceutically effective amount of a biologically active polypeptide with activity similar to parathyroid hormone, and an oil layer containing a polymer substance of poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA), then adding the w/o emulsion into aqueous polyvinyl alcohol (PVA) solution to form a water-in-oil-in-water (w/o/w) double emulsion and then desorbing the solvent in the oil layer. The present invention also provides a controlled release microsphere prepared by the method and use thereof.

七、申請專利範圍：

1. 一種控制釋放微小球，其平均粒徑大於 50 μm 。該微小球係藉由以下方法製造：製備一包含有內水層的油包水〈w/o〉乳劑，該內水層含有藥學上有效量的生物活性多肽，該多肽活性與副甲狀腺素相近；製備一含有聚乳酸-甘醇酸 (PLGA) 之聚合物質的油層；接著將油包水乳劑倒入聚乙醇醇〈PVA〉水溶液中以形成水包油包水〈w/o/w〉雙乳劑並接著將油層中的溶劑脫附掉。
2. 根據申請專利範圍第 1 項所述之微小球，其中該聚乳酸-甘醇酸〈PLGA〉為 PLGA 〈50:50〉或 PLGA 〈65:35〉。
3. 根據申請專利範圍第 1 項所述之微小球，其中該多肽的胺基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示。
4. 根據申請專利範圍第 1 項所述之微小球，其中該多肽係固定於含有鹽酸和牛血清白蛋白之儲備溶液中。
5. 根據申請專利範圍第 1 項所述之微小球，其中該鹽酸濃度為約 1 mM 到約 8 mM，牛血清白蛋白之濃度為約 0.01%到約 5%。
6. 根據申請專利範圍第 1 項所述之微小球，其中該聚乙醇醇水溶液之重量百分比濃度為約 0.1%到約 5%。
7. 一種製造平均粒徑大於 50 微米之控制釋放微小球的方法，包含：製備一油包水〈w/o〉乳劑，其包含一內水層，該內水層並含有藥學上有效量的生物活性多肽，此生物活性多肽之活性與副甲狀腺素類似；製備一含有聚乳酸-甘醇酸之聚合物質的油層；接著緩慢將油包水乳劑加入聚乙醇醇水溶液中以形成水包油包水〈w/o/w〉雙乳劑並接著將油層中

的溶劑脫附掉。

8. 根據申請專利範圍第 7 項所述之方法，其中該聚乳酸-甘醇酸〈PLGA〉為 PLGA 〈50:50〉或 PLGA 〈65:35〉。
9. 根據申請專利範圍第 7 項所述之方法，其中該多肽的胺基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示。
10. 根據申請專利範圍第 7 項所述之方法，其中該多肽係固定於含有鹽酸和牛血清白蛋白之儲備溶液中。
11. 根據申請專利範圍第 10 項所述之方法，其中該鹽酸濃度為約 1 mM 到約 8 mM，牛血清白蛋白之濃度為約 0.01%到約 5%。
12. 根據申請專利範圍第 7 項所述之方法，其中該多肽係以範圍約 1×10^{-7} M 到約 5×10^{-9} M 的有效治療濃度釋放至少 21 天。
13. 根據申請專利範圍第 7 項所述之方法，其中該聚乙醇水溶液之重量百分比濃度為約 0.1%到約 5%。
14. 根據申請專利範圍第 7 項所述之方法，其中該生物活性肽之包封率不低於約 60%。
15. 一種控制釋放投遞具治療性多肽至一對象之方法，包含向該對象投予平均粒徑大於 50 μ m 之控制釋放微小球，該微小球係藉由以下方法製造：製備一包含有內水層的油包水乳劑，該內水層含有藥學上有效量的生物活性多肽，該多肽活性與副甲狀腺素相近；製備一含有聚乳酸-甘醇酸之聚合物質的油層；接著將油包水乳劑倒入聚乙醇水溶液中以形成水包油包水雙乳劑並接著將油層中的溶劑脫附掉。
16. 根據申請專利範圍第 15 項所述之方法，其中該多肽的胺基酸序列如

SEQ ID NO: 2 所示。

17. 根據申請專利範圍第 15 項所述之方法，其中該對象係患有副甲狀腺功能不全症、骨疾病或軟骨疾病。
18. 根據申請專利範圍第 17 項所述之方法，其中該骨疾病為骨質疏鬆症或骨壞死症。
19. 根據申請專利範圍第 17 項所述之方法，其中該軟骨疾病為骨關節炎。
20. 根據申請專利範圍第 15 項所述之方法，其中該對象係人類。

八、圖式：

圖 1

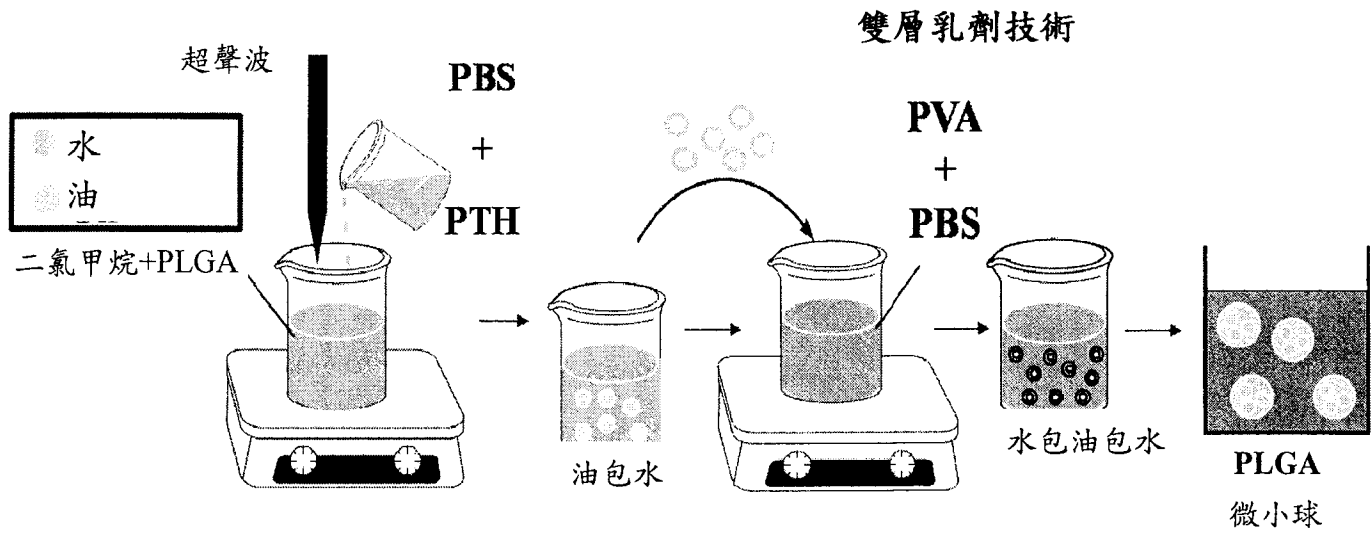


圖 2

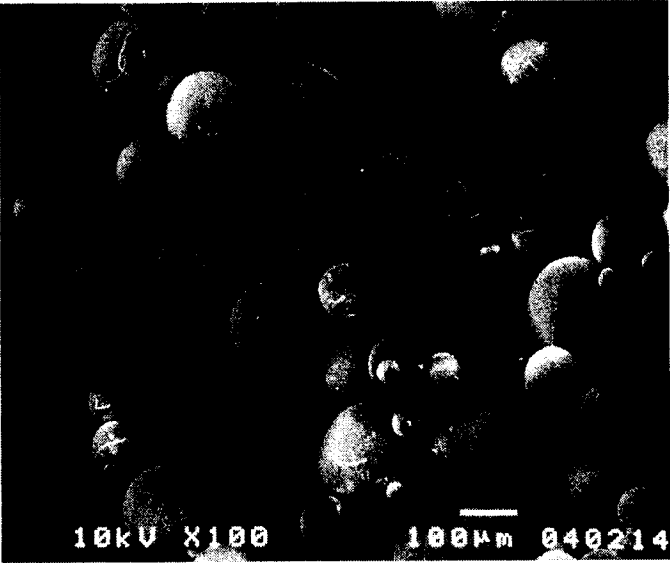
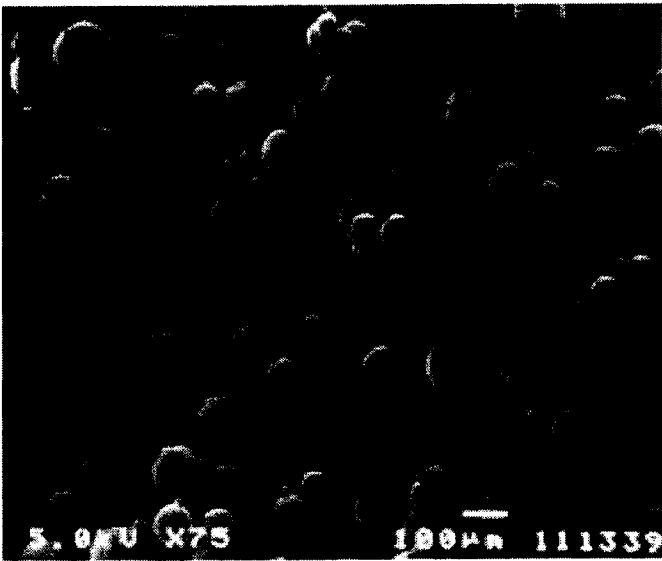


圖 3a

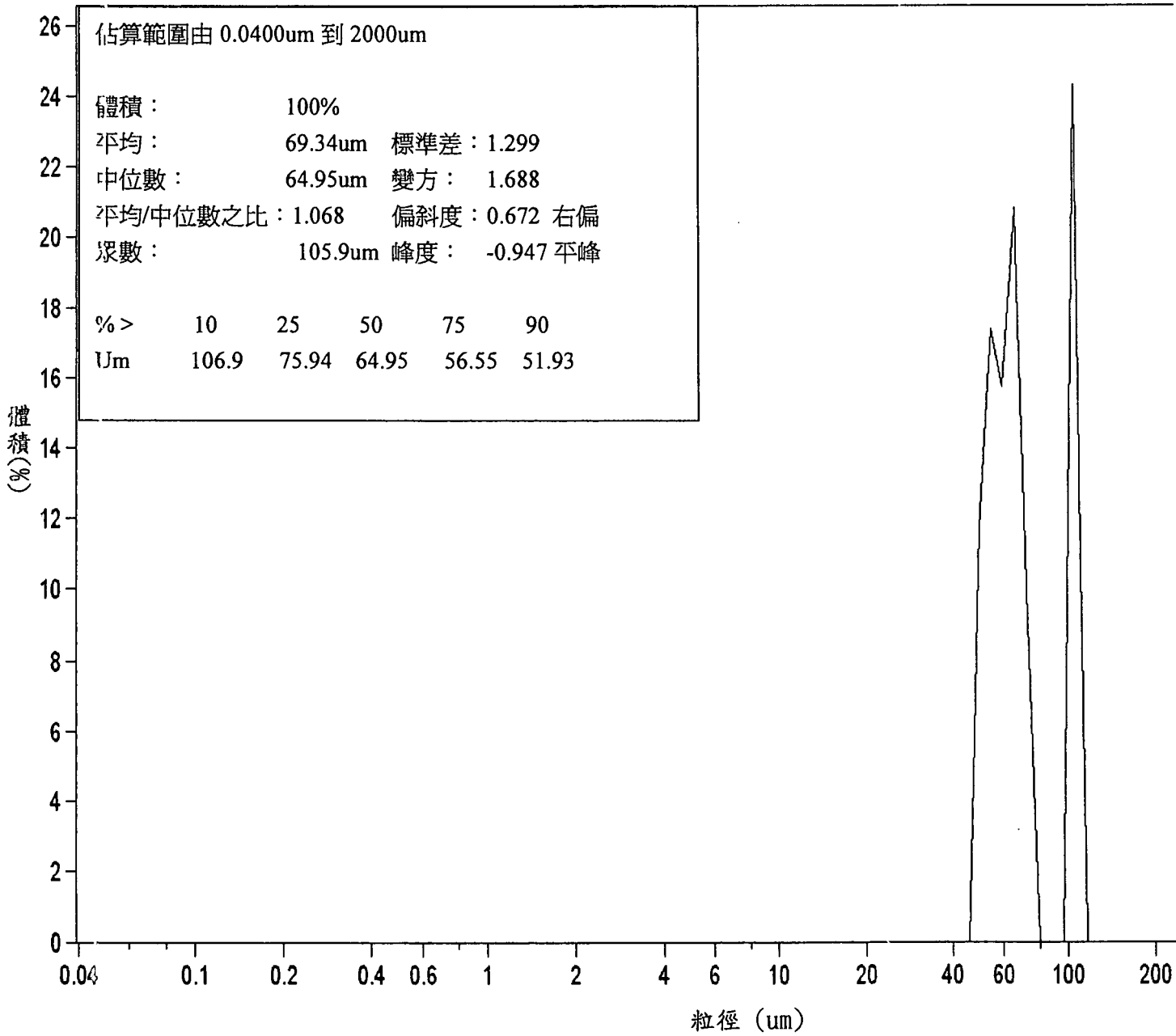


圖 3b

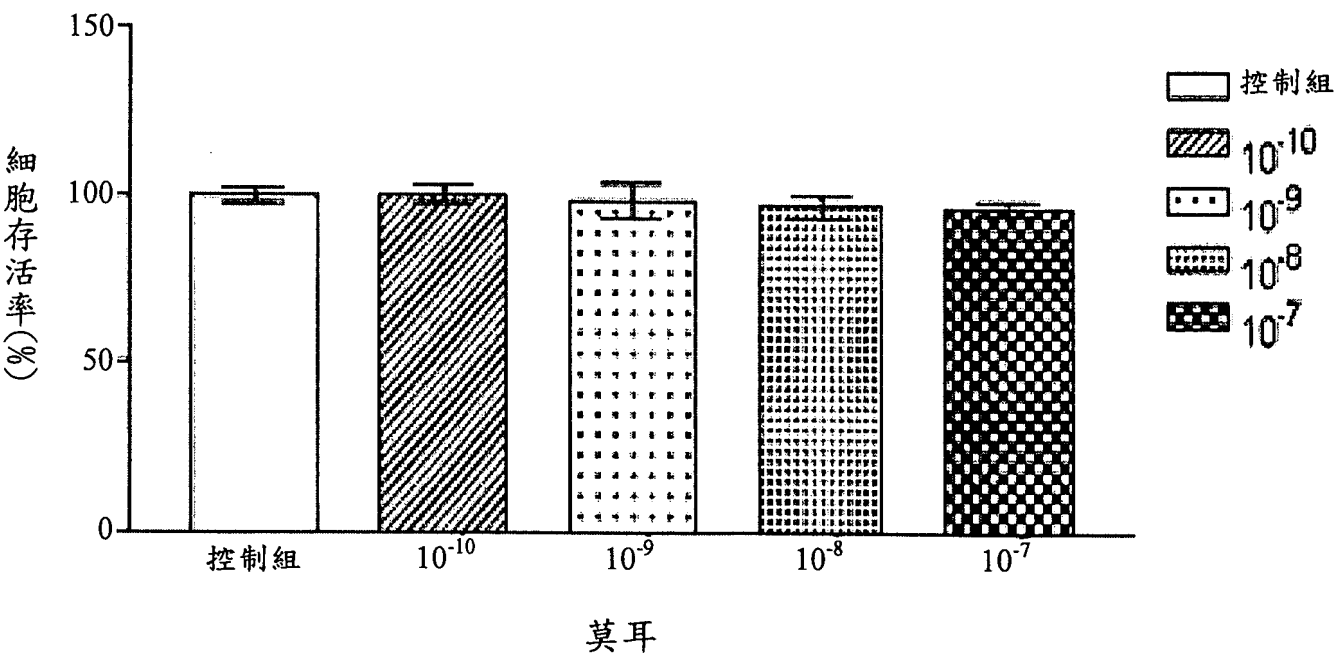
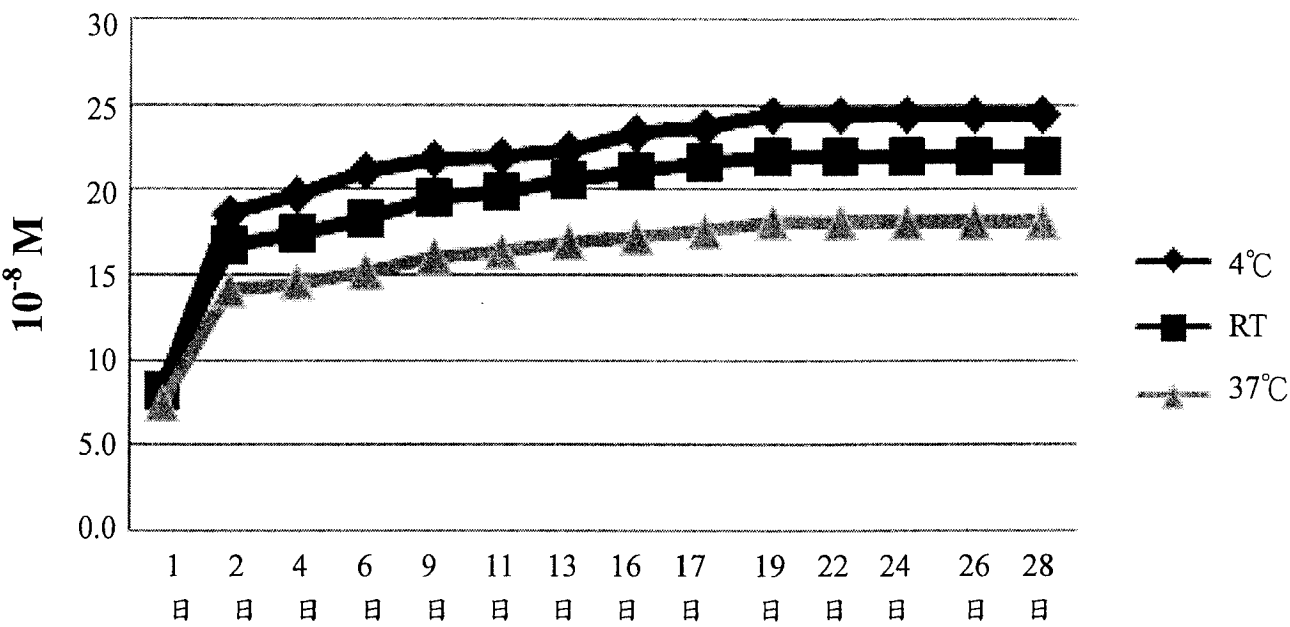


圖 4

PLGA 50:50



PLGA 65:35

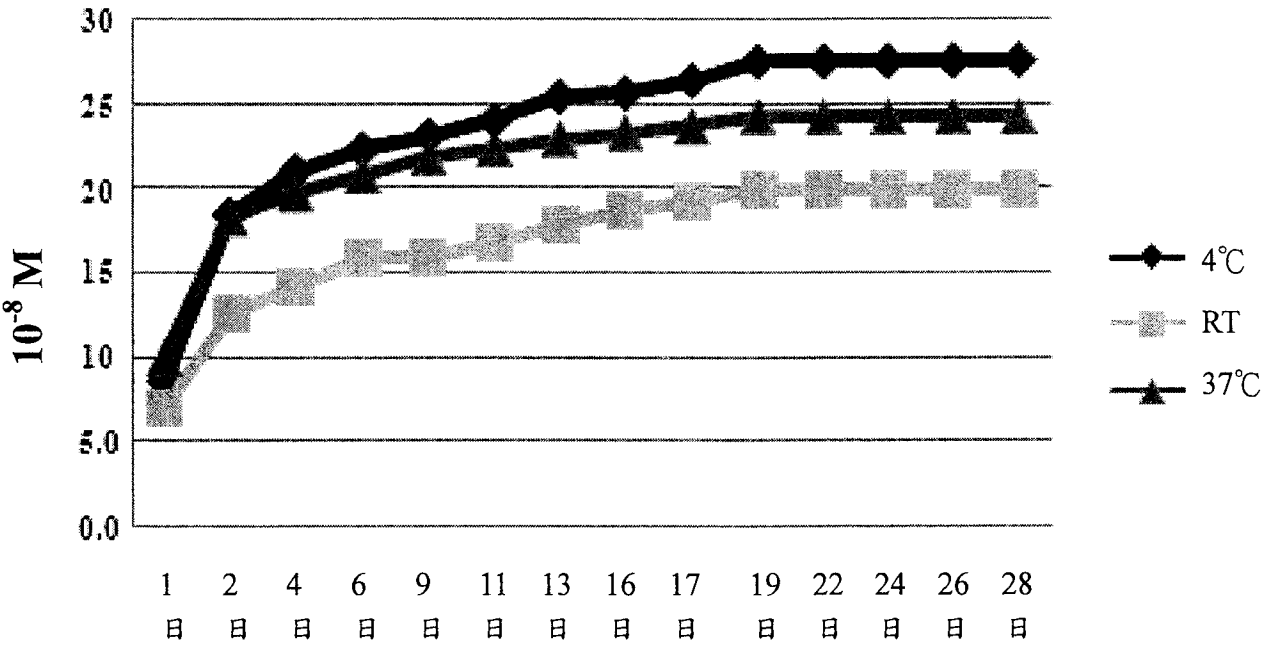


圖 5

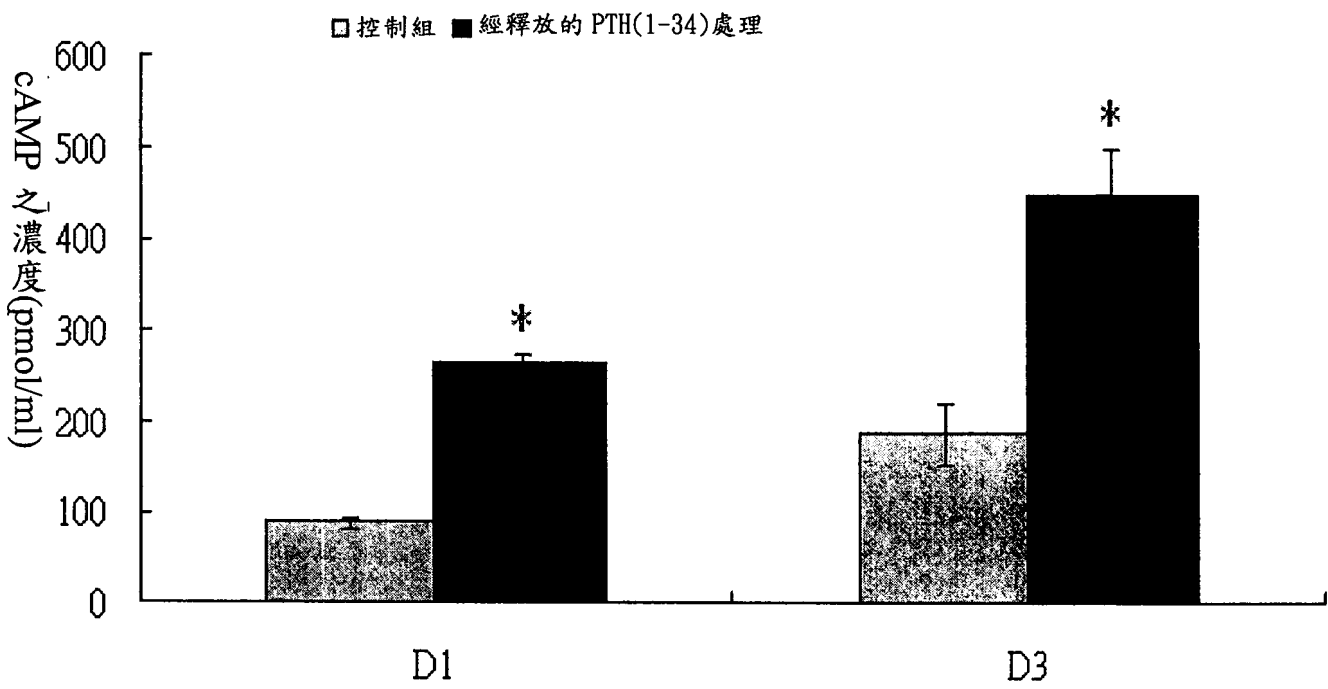
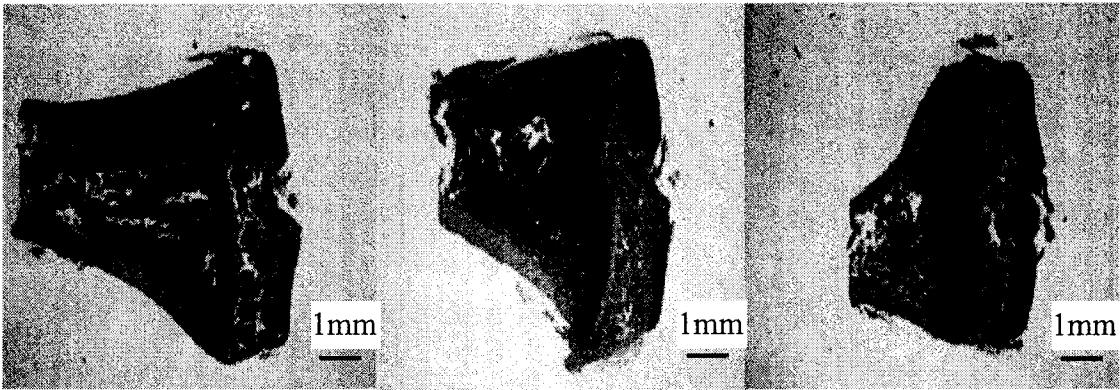


圖 6A

10X



非 OA 組

對側控制

PTH 10^{-8} M

PTH/PLGA
0.4mg

100X

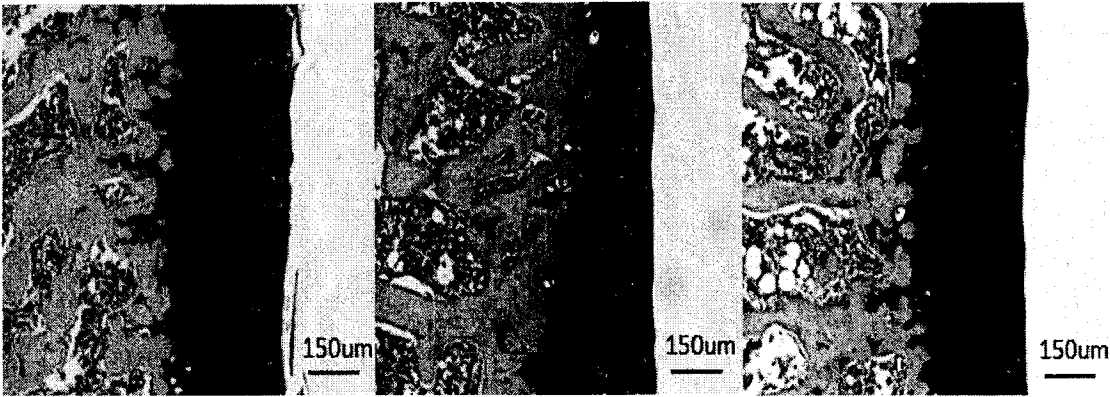


圖 6B

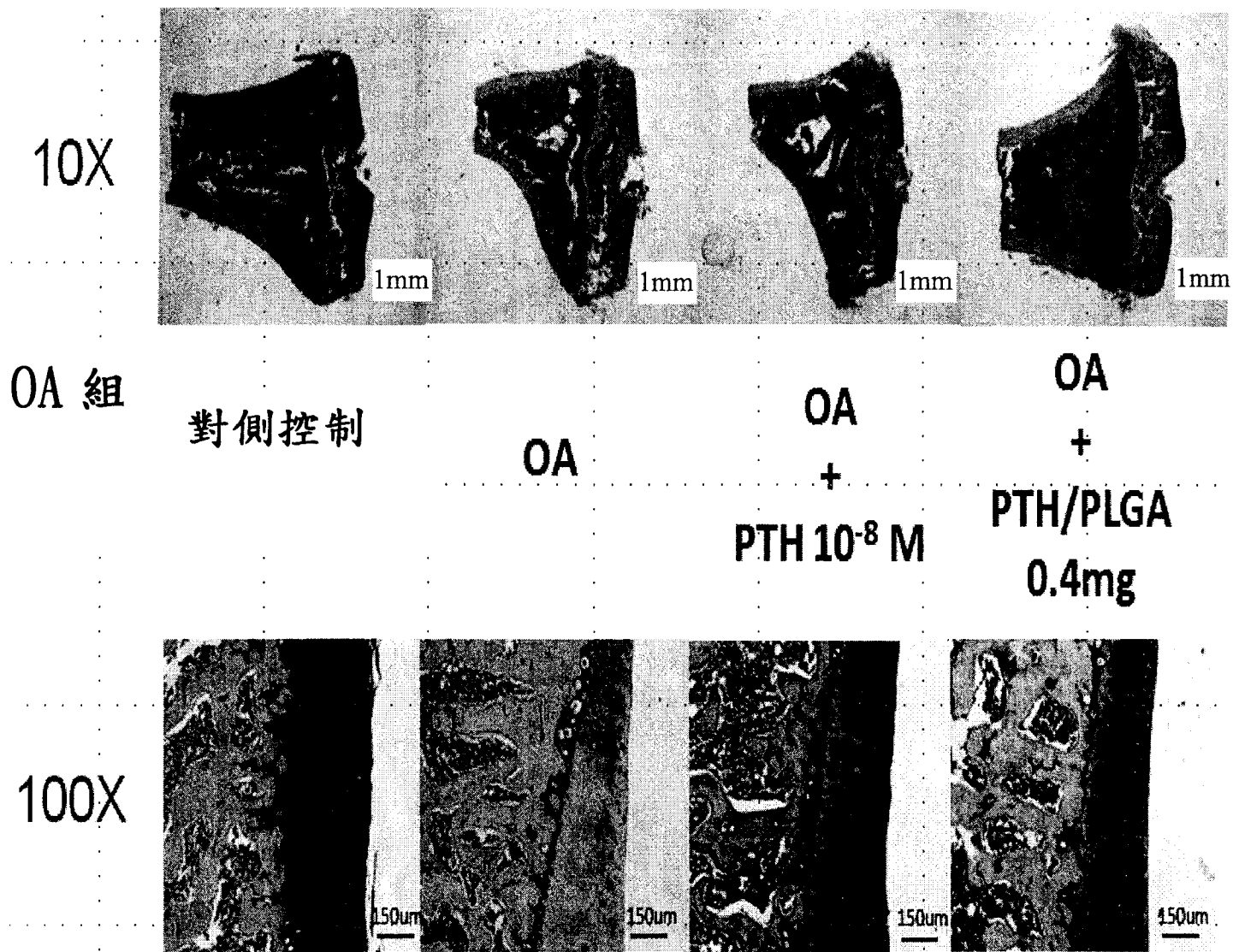


圖 7A

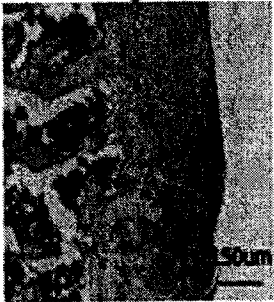
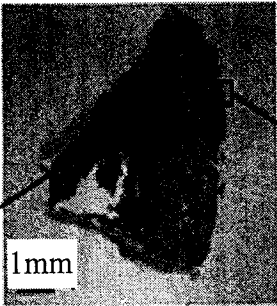
第 II 型膠原蛋白 — IHC 染色

經五週處理

生長板軟骨
(負控制)



關節軟骨
(負控制)



生長板軟骨
(正控制)

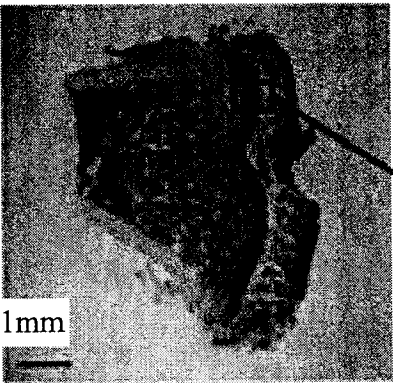
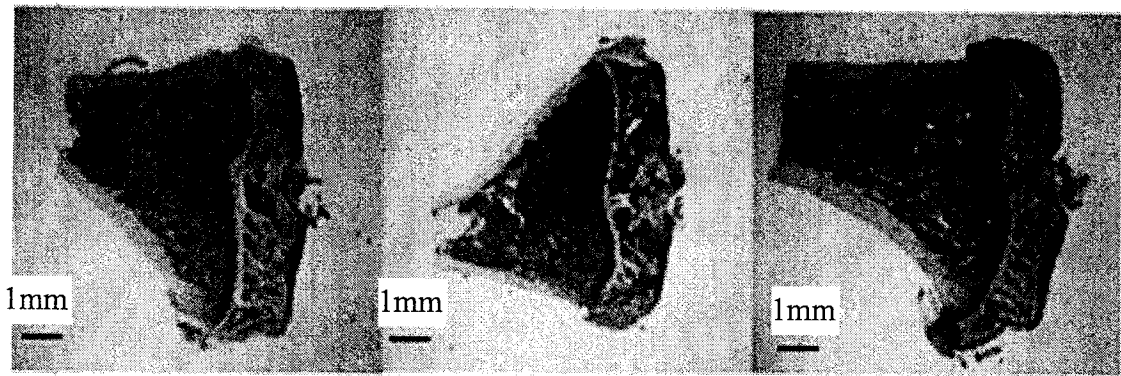


圖 7B

10X
非 OA 組



對側控制 PTH 10⁻⁸ M PTH/PLGA 0.4mg

100X

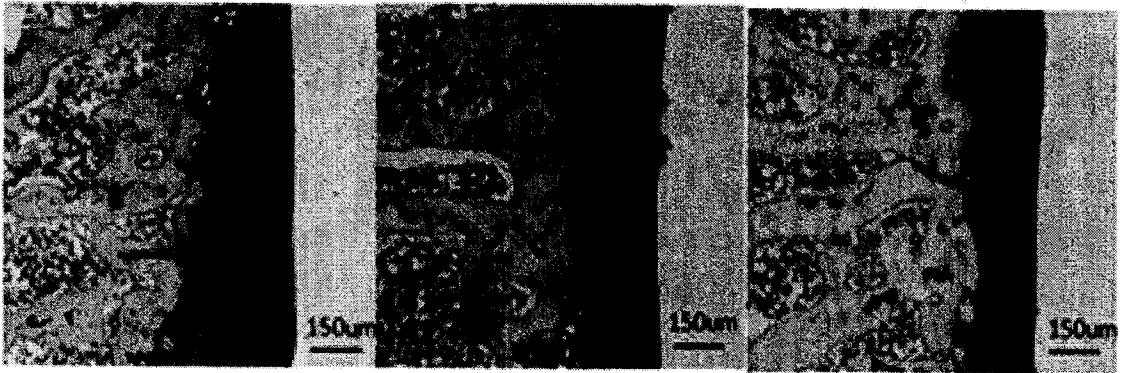


圖 7C

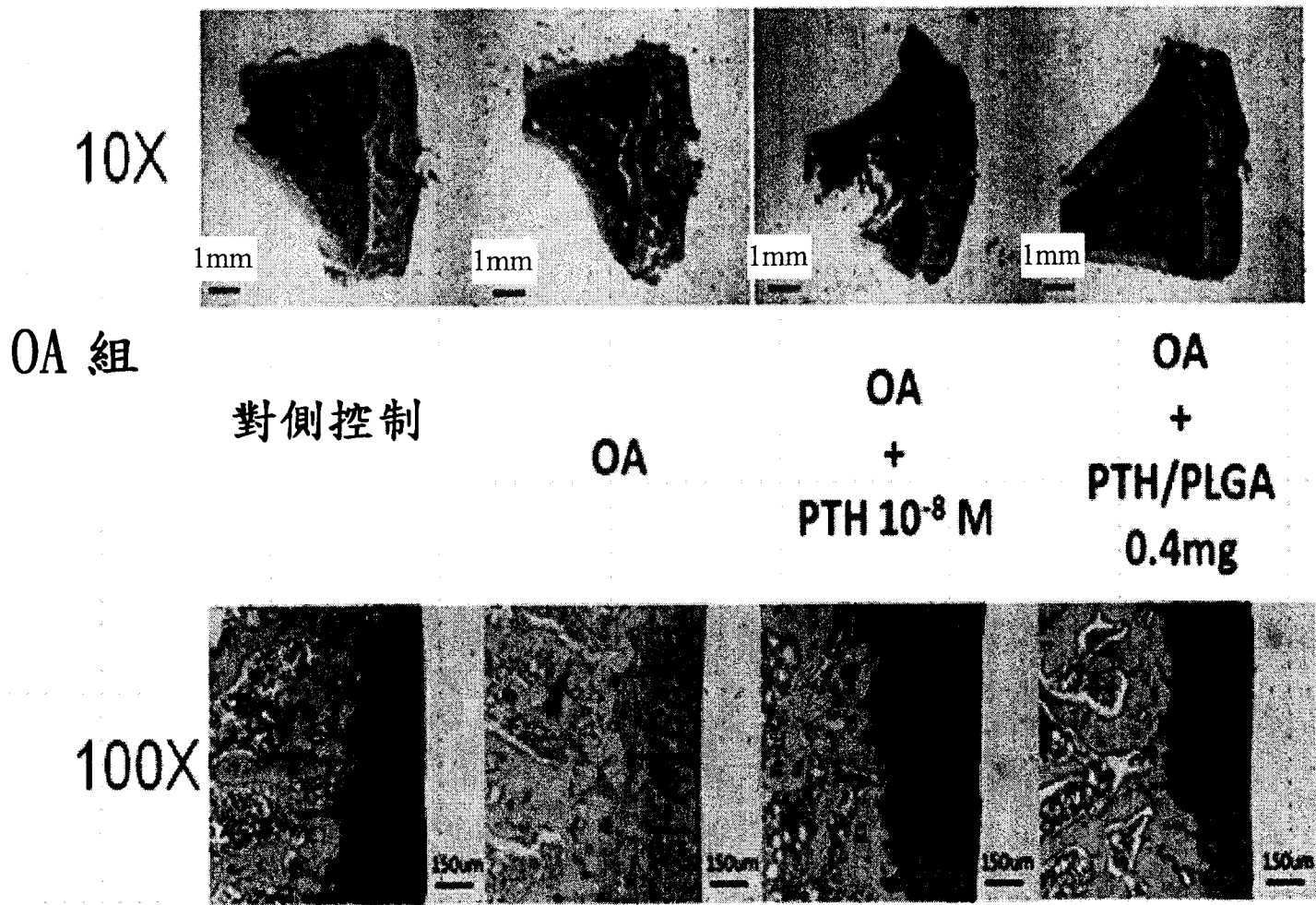


圖 7D

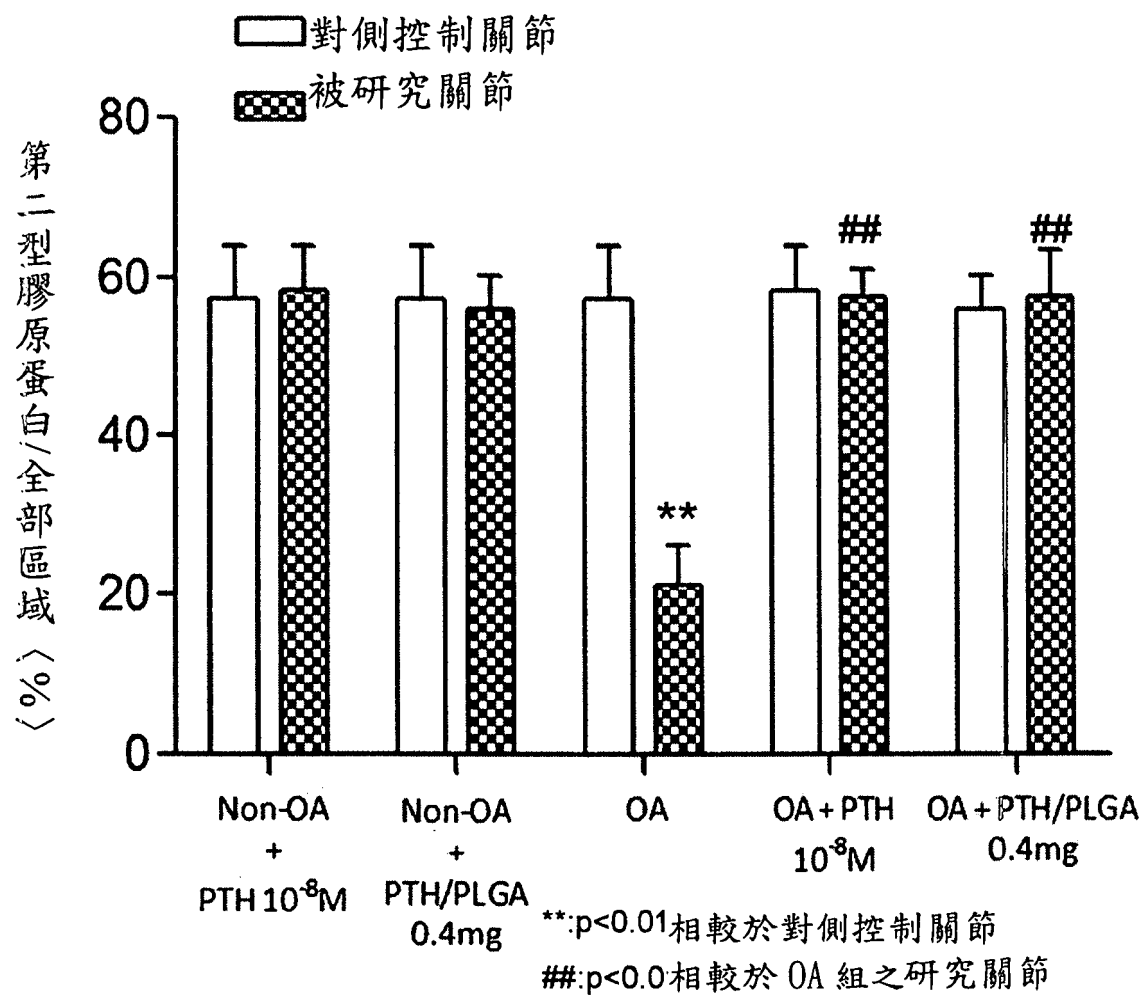
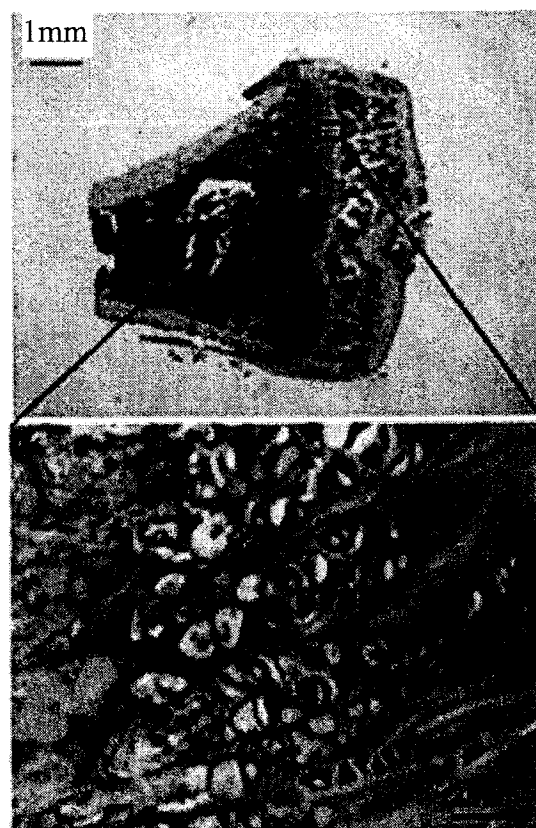


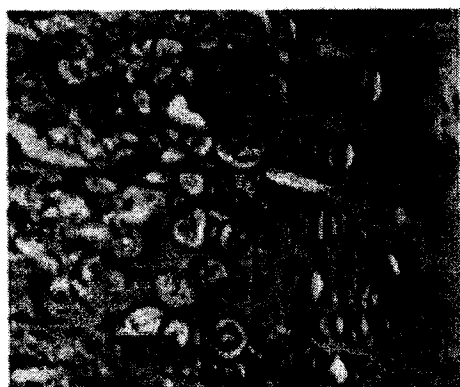
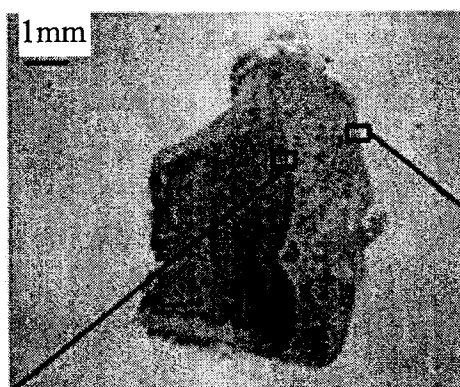
圖 8A

X 型膠原蛋白 - 以 IHC 染色
經處理五週後

生長板軟骨
(正控制)
400X



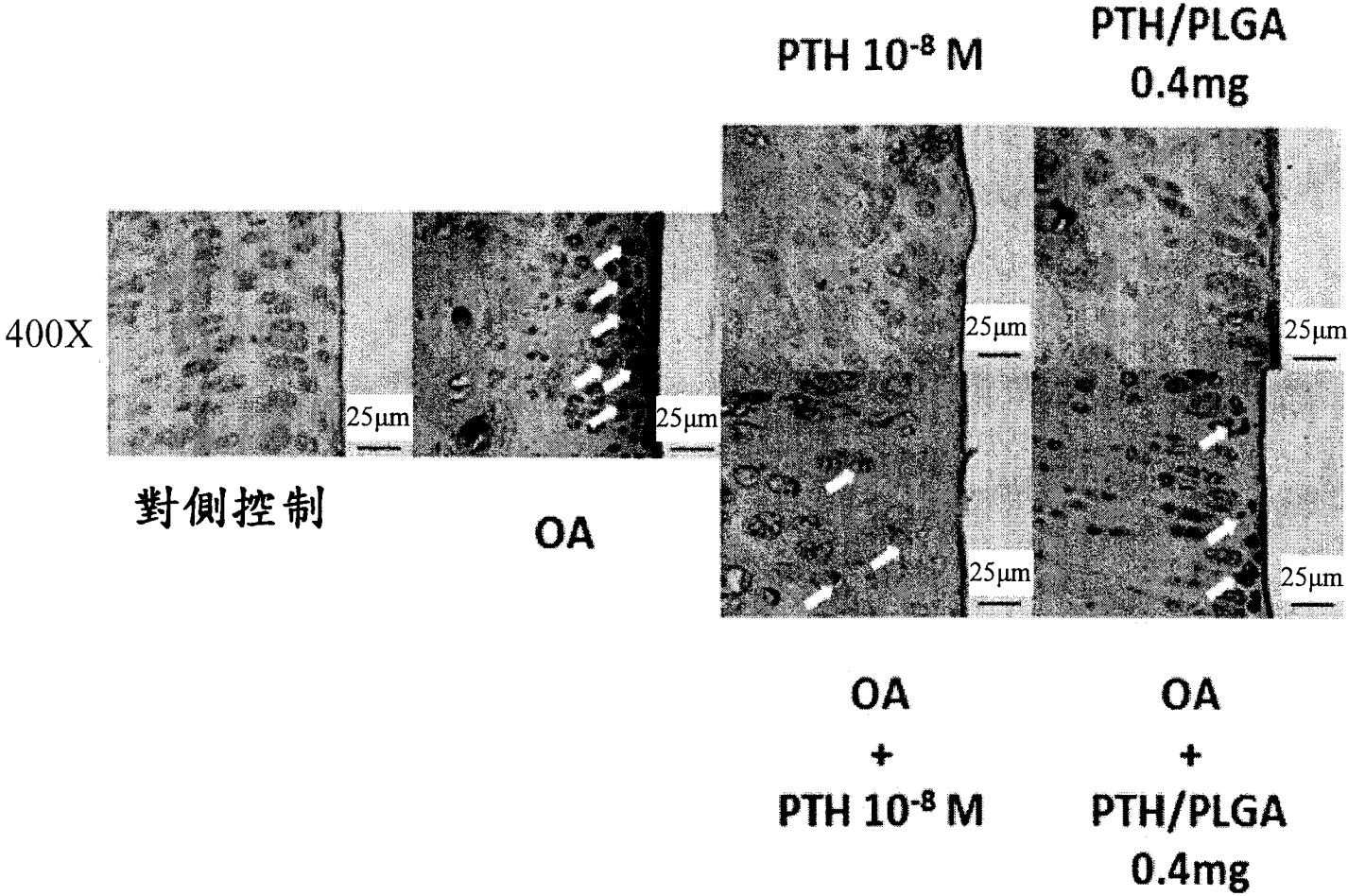
生長板軟骨
(負控制)
400X



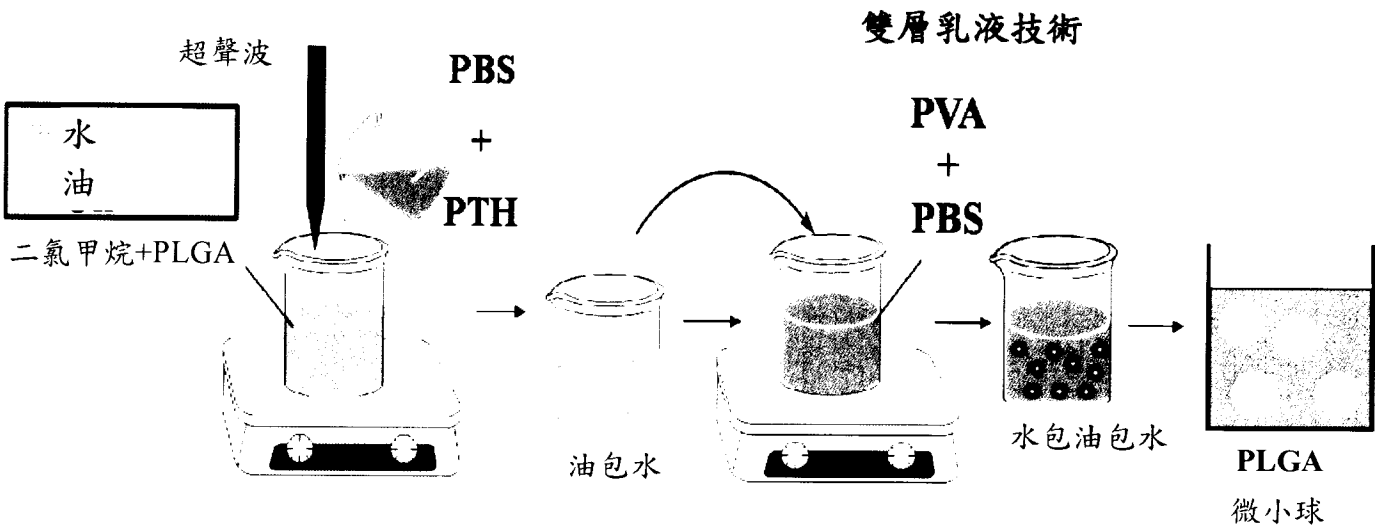
關節軟骨
〈副控制〉
400X



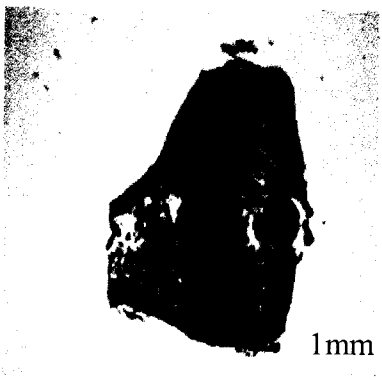
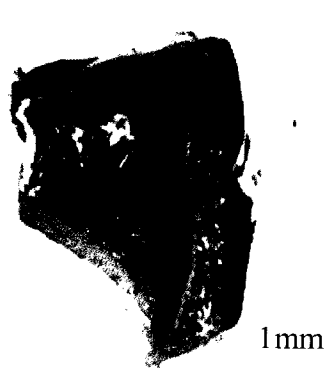
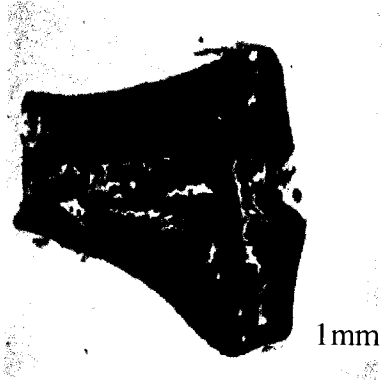
圖 8B



附件 1



10X



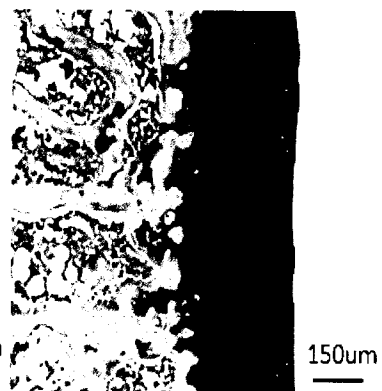
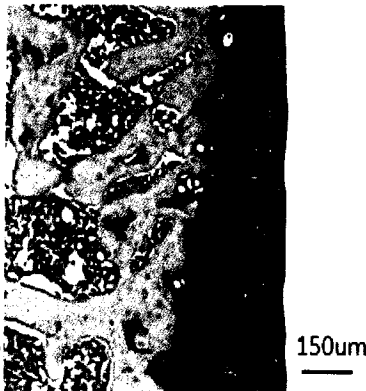
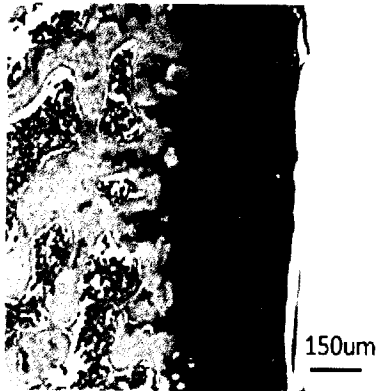
非 OA 組

對側控制

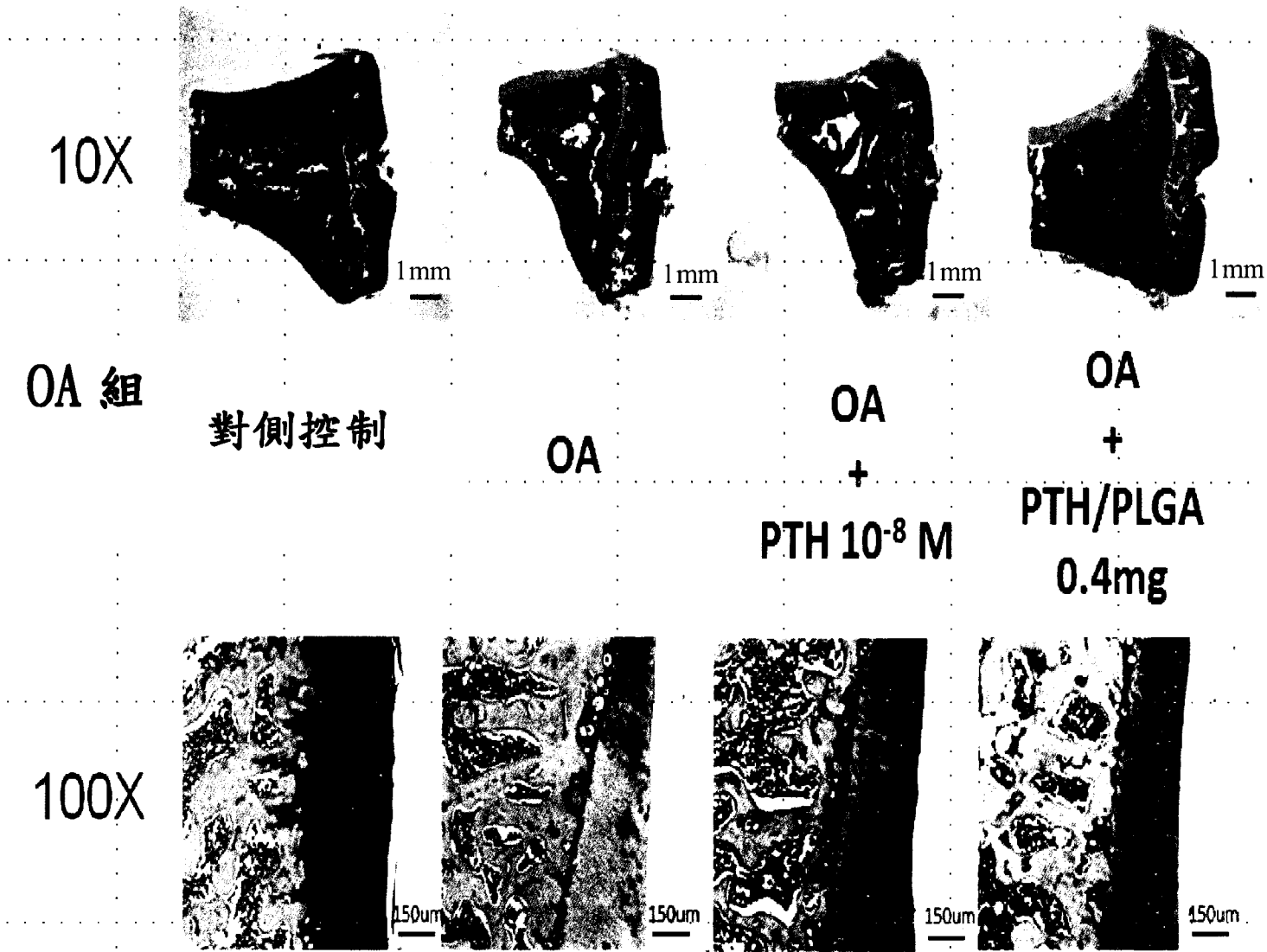
PTH 10^{-8} M

PTH/PLGA
0.4mg

100X



附件3

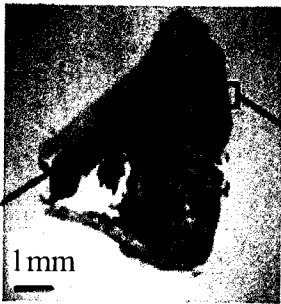


附件 4

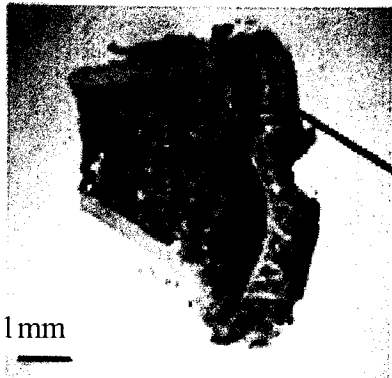
第 II 型膠原蛋白 — IHC 染色

經五週處理

生長板軟骨
(負控制)



關節軟骨
(負控制)



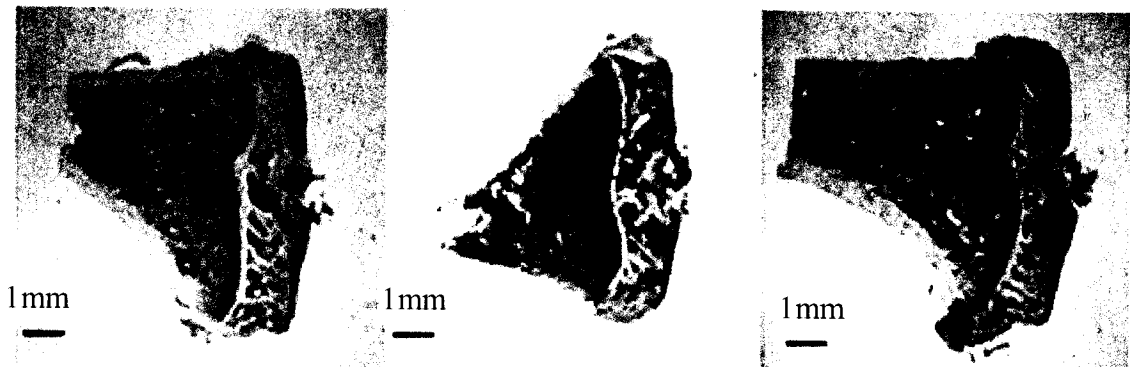
生長板軟骨
(正控制)



9

10X

非 OA 組



對側控制

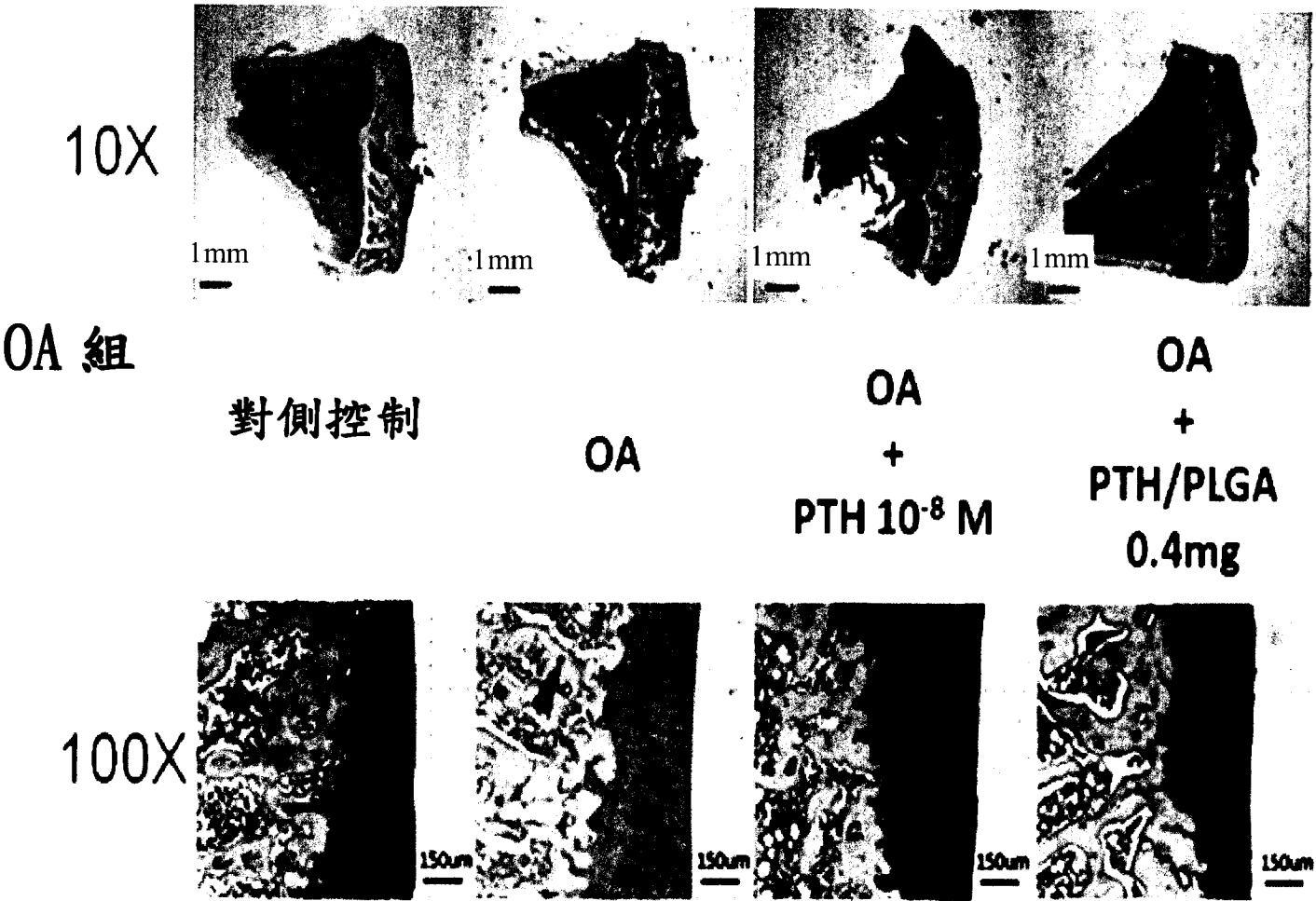
PTH 10^{-8} M

PTH/PLGA
0.4mg

100X

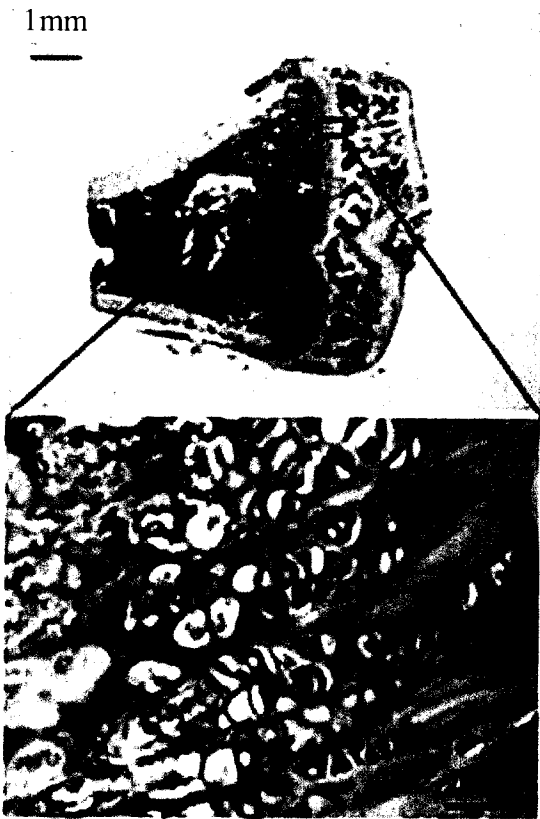


附件 6



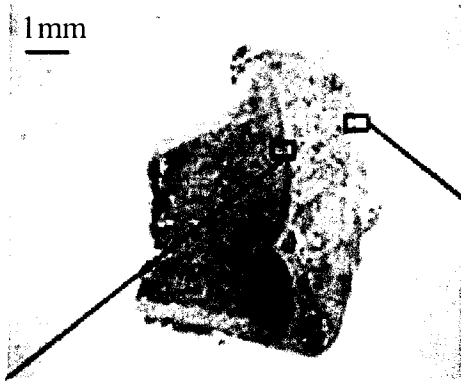
附件7

X型膠原蛋白 - 以 IHC 染色
經處理五週後



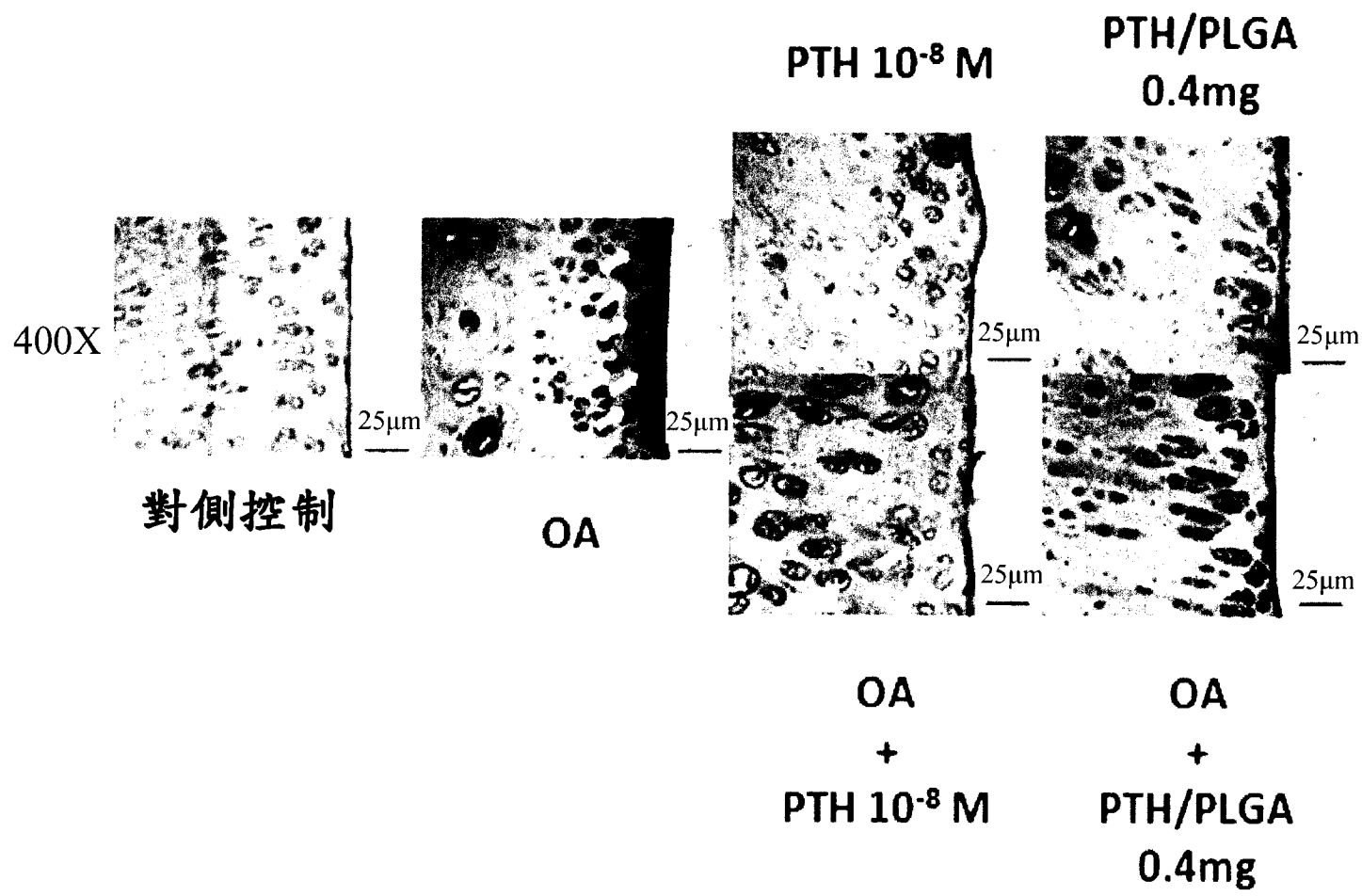
生長板軟骨
(正控制)
400X

生長板軟骨
(負控制)
400X



關節軟骨
〈副控制〉
400X





四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無。

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無。