

(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 1996年12月2日 60/032,215 ☐有 ☒無主張優先權美國 1997年10月24日 60/063,087 ☐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

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(¹)

技術領域

本發明大體上是有關治療或預防發炎疾病之組合物及方法。

發明背景

發炎疾病，不論是慢性或急性，代表健康保健工業的實質問題。簡言之，慢性發炎被視為長期的發炎(數週或數月)，其中活動性發炎，組織破壞，及癒合之企圖同時進行(Robbins Pathological Basis of Disease by S.C. Cotran, V. Kumar, and S.L. Robbins, W.B. Saunders, Co., p.75, 1989)。雖然慢性發炎可在急性發炎期後發生，也可因為隨時間進展之內部過程而開始，如，由於持續性的發炎所致(如結核病，梅毒，真菌感染)其造成延遲的過敏反應，與內源性(如提高之血漿脂質)或外源性(如矽石，石棉，香煙焦油，外科縫線)毒素長期曝露，或拮抗身體本身組織之自體免疫反應(如類風濕性關節炎，全身性紅斑狼瘡，多發性硬化，牛皮癬)。因此慢性發炎疾病包括許多普通的醫學狀況(如類風濕性關節炎，再狹窄，牛皮癬，多發性硬化，手術黏連，結核病及慢性發炎性肺疾(如氣喘，肺塵埃沉著病，慢性阻塞性肺炎，鼻息肉，及肺纖維化)。

牛皮癬

牛皮癬是一種普通的慢性發炎皮膚病，特徵在於高起的，發炎的，增厚的及鱗狀傷處，其極易發癢，灼熱，刺痛及流血。牛皮癬中約10%患者伴有顯著的關節病變症狀，其和在類風濕性關節炎中所見的變化類似。在美國有

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(²)

約2-3%人口罹患牛皮癬，每年則有250,000新病例被診斷出來。

目前，牛皮癬的病因尚未知，然而有相當的證據指出其係一種多種基因之自體免疫失調症。此外，目前對牛皮癬尚無法治癒。可應用的治療包括局部治療，如類固醇乳膏及油膏，煤焦油及蒽林，及全身性治療，如類固醇，紫外線B，PUVA，胺甲碟呤及環孢靈。然而，不令人滿意的緩解率及／或潛在嚴重的副作用是大多數抗牛皮癬療法之特性。在美國治療牛皮癬的整體費用每年估計在約\$30至\$50億美元間，使牛皮癬成為主要的健康保護問題。

多發性硬化

多發性硬化(MS)在美國侵犯350,000人口(女性：男性=2：1)每年有8,000個新病例報告，為涉及神經系的最普遍的慢性發炎疾病。典型而言，MS在臨床上呈現出不良神經性缺失再復發之事件，且可在長達數年期間發生。大多一半的MS會演變成更慢性期。雖然此疾不致造成早期死亡或意識力功能之損傷，因為視覺敏銳力混亂使得病人成殘廢：刺激兩目視力：混亂運動功能會影響步行及手的運用：造成腸及膀胱失禁：痙攣：及感覺缺失(觸覺，疼痛及溫度敏感性)。

MS之病因尚未知，然而有相當的證據顯示其係一種自體免疫疾病。目前對於多發性硬化並無可運用之療法，且目前的治療療程也僅有部份成功。例如，化學治療劑如胺甲碟呤，環孢靈及硫唑嘌呤，雖然對於處理對治療無反應之

五、發明說明(³)

蔓延性疾病已受評估，但長期的益處仍然極少。

目前許可的其他療法包括： β -干擾素可用於再復發一緩解的MS門診病人(Paty et al., Neurology 43 : 662-667, 1993)，特言之，Betaseron(重組體 β -干擾素-1 β ：人類 β 干擾素在第17位置上被取代，Cys[®] Ser：Berlex/Chiror)或Avonex(重組體干擾素 β -1 α ：糖基化之人類干擾素 β ，於哺乳動物中產生：Biogen)。不幸地，雖然Betaseron可對MS患者之生活提供更好的品質，但疾病的進程並未顯著地有所改善。與Betaseron治療有關之不良經驗包括：注射部位的反應(發炎，疼痛，過敏作用及壞死)，及類似感冒的症候群(發熱，發冷，焦慮及精神混亂)。

類風濕性關節炎

類風濕性關節炎(RA)是一種使衰弱的慢性發炎疾病，可侵犯全世界1至2%的人口。此狀況造成身體多重關節的疼痛，腫脹及破壞，且也會造成其他器官的損傷如肺及腎。具末期疾病之患者，其死亡率較某些癌症型式更高，且因此治療療程已轉向積極的早期藥物治療，其設計是減少不可逆的關節損害之可能性。近來American College of Rheumatology建議(Arthritis and Rheumatism 39(5) : 713 - 722, 1996)包括對任何有確定診斷及進行之症狀的病人，早期啟動變化疾病的抗-風濕病藥物(DMARD)療法。對大多數病人而言，抗癌藥是第一線治療，對60-70%風濕病專家而言，化學治療劑-胺甲碟呤為首選的藥。疾病的

五、發明說明(4)

嚴重性常保證以此藥物不明確的每週治療，且對其疾病進展不顧及胺甲喋呤療法的病人中(50%以上的患者)第二線的化學治療藥物經常被應用到，如環孢靈及硫唑嘌呤(單獨的或組合的)。

再狹窄

再狹窄是一種慢性血管損傷，會導致血管壁之增厚且使由血管供應至組織之血流喪失。其因反映血管再構築步驟而發生，包括嚐試解決血管阻塞的實質上任何的操作，且是限制對血管疾病侵入式治療有效性的主要因素。在過去15年來，再狹窄一直是心血管研究的主要挑戰。依據1994年的估計(U.S. Heart and Stroke Foundation)超過60百萬的美國人有一種以上的心血管疾病。這些疾病承認在同一年有約1百萬人口(在美國所有死亡率中占41%)，且被視為是已開發世界死亡及殘疾的主導病因。

目前，對於再狹窄的預防尚無技術上許可的治療法對人類是有效的。受檢視的全身性治療包括直接治療內皮流失之作用物，抗血小板劑(如阿司匹林)，血管擴張劑(如鈣道阻斷劑)，抗血栓劑(如肝素)，抗炎劑(如類固醇)，預防血管平滑肌細胞(VSMC)增殖(如秋水仙素)及再內皮化之促進劑(如血管內皮生長因子)。受檢視之局部治療包括局部藥學遞送(如肝素)及 β 及 γ 照射。在人類的應用上以上全部令人失望，主要是因為其似乎作用在再狹窄過程的有限部份。全身性治療也遭遇到在疾病部位藥物達到適度吸收及滯留的額外問題，以提供持久之生物作用，而不致造成

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(⁵)

不悅的全身性併發症及毒性。

發炎性腸疾

發炎性腸疾(IBD)係指造成小及大腸發炎或潰瘍的慢性失調症(主要是克隆氏病及結腸潰瘍)。簡言之，在美國約有2百萬人口罹患此疾，且男女機會均等。高峰致病期主要在15歲及30歲之間，第二期在55歲及60歲之間。雖然對於感染率已有許多經證明之型式，但此仍是個病因未知之疾病。

IBD之特性通常是交互的緩解期，繼以無可預測之再復發期或不同嚴重度之發展。在任何特定時間時約有52%患者處於緩解期，而在10年間大部份有至少一次的再復發。此外，此中有許多全身性併發症會伴隨此疾，其中最常見的是關節炎。關節炎症狀在IBD患者中有1/4會發生。當腸疾最活躍時，且當結腸涉及於疾病過程及發展中時，最常發生的是關節發炎。此發炎性關節炎不會造成持久性的變形，且常常是短暫的。此疾的其他併發症包括眼睛發炎(虹膜炎，結合膜炎及上鞏膜炎)，口部發炎(黏膜炎)，皮膚發炎(結節性紅斑及壞疽性膿皮病)，肌肉骨骼失常(關節黏連性脊椎炎)，腎臟併發症(腎結石及尿道瘻管)，膽結石及其他肝臟疾病(如肝炎)及膽系疾病(硬化性膽管炎)。不幸的是，在許多例子中長期的疾病(>10年)會造成更嚴重的併發症，如結腸炎及腸外腫瘤。

目前對於IBD並無治癒法。目前許多的治療劑是集中在遏止與疾病有關之發炎上以控制疾症徵狀。用來治療IBD

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

表

訂

五、發明說明⁽⁶⁾)

的主要藥物是胺基水楊酸鹽及皮質類固醇類，若個體對這些作用物無良好的反應時，也可使用抗生素及免疫遏止劑。雖然藥物治療對70-80%的患者有效，對有較活動性疾病之個體而言，則需外科手術。和活動性疾病有關的慢性症狀及併發症，如腸阻塞，穿孔，膿腫，或流血可以侵入性手術緩解及矯正。雖然手術無法持久治癒疾病，且再復發率很高，但其確實會舒減活動性症狀。

手術性黏連

手術性黏連形成是一種複雜的過程，其中通常是分開的身體組織會一起生長，最常是手術創傷所造成的。這些手術後的黏連在進行婦科大手術的病人中有60-90%會發生，且代表工業化社會腸阻塞最常見病因之一。這些黏連為手術治療失敗的主因，且為腸阻塞及不孕的主因。其他處理黏連的併發症包括慢性骨盆疼痛，尿道阻塞及排泄官能障礙。目前，預防性療法為手術後投藥4至5天，且可用來抑制黏連之形成。各種黏連預防的模式已被檢視，包括：(1)預防纖維蛋白沉積，(2)減少局部組織發炎，及(3)移去纖維蛋白沉積。經由機械式或由黏稠溶液組成之物理性障壁可預防纖維蛋白之沉積。雖然許多檢視者利用黏連預防障壁，但仍存有許多技術上的難題。投予藥物可減低發炎，如皮質固醇及非固醇類抗炎藥。然而，在動物模式中由於使用這些藥物的結果並未受到鼓勵，此乃發炎反應程度及由於全身性副作用限制劑量之故。最後，已利用蛋白水解及纖維水解酵素移去纖維蛋白之沉積。這些酵素臨

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(7)

床用途的潛在併發症是會發生過度流血之可能性。

發炎性肺疾

慢性發炎性肺疾，包括如：氣喘，肺塵埃沉著病，慢性阻塞性肺疾，鼻息肉及肺纖維化，可侵犯全世界許多人口。典型而言此疾病特徵在於是一種侵入性發炎過程，且可使受侵襲之組織增厚。

例如，鼻息肉特性為鼻內襯增厚的組織。息肉可在呼吸疾病中發生，如氣喘，纖維囊腫，原發性睫狀運動不能及免疫缺失。鼻息肉被視為是因涉及上呼吸道之慢性發炎過程表徵所發展。頃發明36%的病人有阿司比林不耐性，7%有氣喘，0.1%在孩童且20%左右有纖維囊腫。與鼻息肉有關的其他狀況為Churg-Strauss症候群，變應性真菌性竇炎及睫狀運動不能症候群及Young's症候群。有手術息肉切除的患者40%左右會再復發(Settipane, Allergy Asthma Proc. 17(5): 231-236, 1996)。

鼻息肉病主要的症候是鼻阻塞及嗅覺混亂。鼻息肉病醫學處理之目標有(1)消除鼻息肉及鼻炎症狀，(2)再發展鼻呼吸及嗅覺，及(3)預防再復發。鼻道為一些大息肉阻塞可由單純的息肉切除處理以助病人呼吸之通暢。手術目的是儘可能除去呼吸道之息肉且令受感染之鼻竇引流以恢復鼻子之生理特性。然而，再復發的鼻息肉病是臨床上鼻病最常見的無法解決之難處。總是需要對息肉病有補充的醫學處理，因為手術無法處理黏膜疾病的發炎部份。最常採用的是局部皮質固醇治療以減少息肉之大小及預防手術後之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

表

訂

五、發明說明⁽⁸⁾

再復發。固醇類可減清鼻炎，改善鼻之呼吸，減小息肉及降低再復發率，但其對於嗅覺及任何竇病理學有可忽略的影響。然而在息肉病上使用類固醇與需要抗生素之感染性併發症有關。可用來處理鼻息肉病的其他藥物包括H1-受體拮抗劑（如：azelastine HCl）及抗-利尿劑（如furosemide）。這些治療法並非始終有效，且再復發率仍很高。鼻息肉病目前的醫學處理是利用皮質固醇來舒緩疾病之症狀，但對疾病之基本病理學無拮抗作用。此外，在鼻息肉之患者中可見疾病之再復發或排阻類固醇之治療。

移植物排斥

移植物排斥是一種複雜的過程，因移植的組織被宿主的免疫系統視為外來物。在外形學及基礎機制之基礎上，排斥反應可分成三大類：極急性，急性及慢性。在感染的危險性消除且早期（急性）排斥以免疫遏止性療法已處理時，慢性排斥則成為移植物官能障礙及最終失敗的逐漸重要的原因。目前，慢性血管排斥為心臟移植受者在第一年後死亡或移植失敗的主因。

本發明提出適用於治療或預防發炎性疾病之組合物及方法。這些組合物及方法強調與既存之步驟有關之問題，提供與既存之步驟比較下更顯著的優點，進一步並提供其他相關之優點。

發明要點

簡言之，本發明提出治療或預防發炎疾病之方法，此方法包括在發炎部位遞送抗-微小管作用物。此作用物之代表

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明(⁹)

性實例包括紫杉烷類(如 paclitaxel 及 docetaxel)，Campothcin，epothilones A 及 B，discodermolide，氧化氫(D₂O)，己二醇(2-甲基-2,4-戊二醇)，殺結核菌素(7-去吡腺苷)，LY290181(2-胺基-4-(3-吡啶基)-4H-萘(1,2-b)吡喃-3-心腓)，氟化鋁，乙二醇雙(琥珀醯亞胺基琥珀酸酯)，甘胺酸乙酯，單株抗-遺傳性型抗體，微小管組合促進性蛋白質(類紫杉醇蛋白質，TALP)，由缺氧狀況(190毫滲透壓／升)，胰島素(100毫微莫耳／升)或穀胺醯胺(10毫莫耳／升)所誘生之細胞腫漲，動力蛋白結合，赤霉素，XCHO1(類激動素蛋白質)，溶血磷脂酸，鋰離子，植物細胞壁組份(如聚-L-賴胺酸及伸展蛋白)，甘油緩衝溶液，Triton X-100微小管穩定緩衝溶液，與微小管有關之蛋白質(如MAP2，MAP4， τ ，大 τ ，ensconsin，延長因子1- α -(EF-1 α)及E-MAP-115)，細胞實體(如組織蛋白H1，骨髓磷脂鹼性蛋白質及著絲點)，內源的微小管結構(如染色結構，孢塞及GTP帽)，穩定的小管唯一多肽(如STOP 145及STOP 220)及由有絲分裂力量來之張力，以及上述任一者任何的類似物及衍生物。在其他具體實例中，抗微小管作用物被調和以進一步含有聚合物。

可被治療之發炎疾病代表性實例包括多發性硬化，牛皮癬，關節炎，狹窄，移植物排斥，手術黏連，發炎性腸疾及發炎性肺疾。

在本發明某些具體實例之中，抗微小管作用物可進一步含有載劑，如油膏，乳劑，洗劑，凝膠，噴霧劑等。此種

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(¹⁰)

載劑可為聚合的或非聚合的。聚合性載劑之代表性實例有：聚(乙烯-乙酸乙烯酯)，乳酸及乙醇酸的共聚物，聚(己內酯)，聚(乳酸)，聚(乳酸)及聚(己內酯)之共聚物，明膠，玻璃酸，膠原蛋白基質，及白蛋白。其他適合的載劑代表性實例包括以下，但不限於此：乙醇：乙醇及甘醇(如乙·二醇或丙二醇)之混合物：乙醇及肉豆蔻酸異丙酯或乙醇，肉豆蔻酸異丙酯及水(如55：5：40)之混合物：乙醇及eineol或D-萸二烯(加或不加水)之混合物：甘醇類(如乙·二醇或丙二醇)及甘醇類的混合物，如丙二醇及水，磷脂醯基甘油，二油醯基磷脂醯基甘油，Transcutol[®]或萸品油醯：肉豆蔻酸異丙酯及1-己-2-吡咯啉酮，N-十二碳基-2-六氫吡啶酮或1-己基-2-吡咯啉酮之混合物。

又在另一方面，可調和抗微小管作用物以可包含在，或使適合以利用手術或醫學裝置或植入物釋出，如伸展，縫線，插入導管，彌補物等。

本發明這些及其他的方面經由參考以下詳細說明及所附之圖片可更加明瞭。此外以下示出各種參考文獻，其更詳盡地描述某些步驟，裝置或組合物，且以其全文列為本案之參考。

附圖說明

圖1A圖示嗜中性球(5×10^6 細胞／毫升)對血漿調理的CPPD晶體(50毫克／毫升)之化學發光反應。at(o)無paclitaxel，(•)4.5 μ M)，(△)14 μ M，(▲)28 μ M)，(□)46 μ M)下paclitaxel之作用(也稱為"taxol")：n=3。

五、發明說明 (¹¹)

圖1B示出由paclitaxel抑制血漿調理的CPPD晶體所誘生之嗜中性球化學發光作用之時間過程的濃度依賴性。圖1C示出氟化鋁對經調理的酵母聚糖-誘導之嗜中性球活化作用之作用，可由化學發光偵測。圖1D示出甘胺酸乙酯對經調理之酵母聚糖誘生之嗜中性球活化作用之作用，以化學發光偵測之。圖1E示出ly 290181對經調理之酵母聚糖所誘生之嗜中性球化學發光之作用。

圖2示出因反映血漿調理之CPPD晶體(50毫克／毫升)，自嗜中性球(5×10^6 ／毫升)釋出之溶菌酶。在(o)無paclitaxel，(•)28 μ M，(Δ)對照組(單獨只有細胞)，($\blacktriangle$)對照組(細胞及在28 μ M下之paclitaxel)；n=3，下paclitaxel之作用。

圖3A示出因反映血漿調理之CPPD晶體(50毫克／毫升)，自嗜中性球(5×10^6 細胞／毫升)產生之過氧化物陰離子。圖3B示出paclitaxel抑制血漿調理之CPPD晶體誘生之嗜中性球過氧化物陰離子產製之時間過程濃度依賴性，n=3。

圖4A示出因反映血漿調理之酵母聚糖(1毫克／毫升)，嗜中性球(5×10^6 細胞／毫升)之化學發光反應。在(o)無paclitaxel，(•)28 μ M；n=3，下paclitaxel之作用；n=3。圖4B示出血漿調理的酵母聚糖-誘導之嗜中性球過氧化物陰離子產製。在(o)無paclitaxel，(•)28 μ M，(Δ)對照組(單獨的細胞)下paclitaxel之作用；(n=3)。

圖5A示出因反映血漿調理之CPPD晶體(50毫克／毫

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (¹²)

升)，自嗜中性球(5×10^6 細胞／毫升)釋出之髓過氧化物酶。在(o)無paclitaxel，(•)28 μ M，(△)對照組(單獨細胞)；(▲)對照組(細胞加上28 μ M之paclitaxel)時paclitaxel之作用：n=3。圖5B示出反應血漿調理之CPPD晶體而自嗜中性球釋出之髓過氧化物酶對paclitaxel抑制作用之濃度依賴性，n=3。

圖6示出在paclitaxel各種濃度下滑膜細胞之增殖現象。

圖7示出paclitaxel對試管內角質形成細胞之作用。

圖8A及8B示出paclitaxel對星形細胞外形上之作用。電子顯微鏡影像顯示導入外來基因之對照動物中，其星形細胞有增厚且組織良好之絲狀過程，而經paclitaxel處理過後則有外形已改變之星形細胞。paclitaxel會誘導星形細胞變圓且薄的細胞過程，和未處理之動物比較下胞質內細絲減少。

圖9示出以濃度大於 10^{-8} M之paclitaxel處理過之EOMA細胞之存活力。

圖10是柱狀圖，示出在以濃度漸增之paclitaxel處理過之培養中，自食EOMA細胞之百分率。

圖11A-11E示出在24小時期間後，各種抗-微小管作用物對滑膜細胞之作用。

圖12A-12G吸漬圖示出各種抗-微小管作用物在抑制膠原蛋白酶表現上之作用。

圖13A-13G吸漬圖示出各種抗-微小管作用物在抑制蛋白多糖表現上之作用。

五、發明說明 (¹³)

圖 14A 及 14B 為二張有腫瘤的 CAM 照片，其經對照組之 (未填料) 熱糊處理。簡言之，在圖 14A 中，中央白色團塊是腫瘤組織。注意到許多血管以各種方向由 CAM 進入腫瘤。腫瘤經由 "血管形成性因子" 之產生可誘使宿主之血管向內生長。腫瘤組織沿著供應其養分之血管末梢擴展。圖 14B 為 15A 所示之 CAM 之底面觀。簡言之，此圖說明血管之放射狀外觀，其以類似車輪之輻型式進入腫瘤。注意到血管密度在腫瘤四週高於在正常 CAM 組織周圍。圖 14C 及 14D 為二張有腫瘤之 CAM 照片，經填加有 20% paclitaxel 之熱糊處理。簡言之，在 14C 中間的白色團塊是腫瘤組織。注意到在腫瘤組織四週血管較缺乏。抗-微小管作用物之持續釋出，可克服由腫瘤所產生之血管形成性刺激物。腫瘤本身較無血管形成，且體積逐漸縮小。圖 14D 為 14C 所示 CAM 之底面觀，且說明當與對照之腫瘤組織比較下，進入腫瘤之血流有瓦解現象。注意到在腫瘤四週之血管密度減低，且較正常包圍在 CAM 組織的更貧乏些。

圖 15A 示出在第 6 天時較無殼之蛋培養物。圖 15B 是由數位化電腦所呈現之影像，由活的未染色毛細管立體顯微鏡 (1040x) 取得。圖 15C 為侵蝕性脫皮之照片，其顯示出由較大且基礎的血管 (箭號：1300x) 所供給之尿囊絨膜 (CAM) 微血管分佈。圖 15D 示出 CAM 0.5 毫米厚橫斷之形成組織切面，並在光學顯微鏡水平下記錄。此照片顯示出 CAM 之組成，包括外面的雙層外胚層 (Ec)，中胚層 (M) 含有毛細管 (箭號) 及散射的外膜細胞，及一個單層的内胚層 (En)

五、發明說明 (¹⁴)

(400x)。圖 15E 示出電子顯微鏡層次(3500x)，其中呈現出典型的毛細管結構，顯示出薄壁之內皮細胞(箭頭)及相連接之周皮細胞。

圖 16A，16B，16C 及 16D 為一系列在 10 微克 paclitaxel / 10 毫升甲基纖維素曝露 48 小時後，取自 4 個不同的，未染色的 CAMs 的數位化影像。在各 CAM 上出現含有 paclitaxel 的透明的甲基纖維素圖片(*)，並以單一的無血管區(A)且四週血液使孤立(Is)下標出位置。這些無血管區超越圖片而延伸，且通常有約 6 毫米之直徑。圖 16D 說明小及大血管自無血管區四週改方向離開之"推擠"作用(箭頭)。

圖 17A 示出在無血管區緊鄰四周之毛細管(箭頭)照片(=400x)，呈現許多在有絲分裂呈停止狀態之內皮細胞。外胚層(Ec)：中胚層(M)：內胚層(En)。圖 17B(=400x)示出檢查無血管區內固有的典型毛細管結構，且其中有許多溢出的血液細胞(箭頭)。圖 17C(=400x)示出在無血管區中央部份，在整個中胚層分佈有紅血球細胞。

圖 18A(=2,200x)示出在外胚層(Ec)下方襯底之小毛細管，具有在有絲分裂中呈停止狀態(*)之內皮細胞。在外胚層及中胚層中的其他許多細胞型式也呈有絲分裂停止狀態。圖 18B(=2,800x)示出早期的無血管階段，其在外胚層下方含有外溢之血液細胞：這些血液細胞混雜有推定：內皮細胞(*)及其突起。降解的細胞空泡(箭頭)。圖 18C(=2,800x)示出因反應 paclitaxel，外-中胚層界面變得

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (15)

群集著在各種降解階段之細胞，其中含有緻密的空泡及顆粒(箭頭)。

圖 19A，19B 及 19C 為一系列凝膠照片，其顯示出各種濃度的 paclitaxel 對於 c-fos 表現上之作用。

圖 20A 及 20B 為一系列凝膠照片，其顯示各種濃度的 paclitaxel 對於膠原蛋白酶表現上之作用。

圖 21 為柱形圖，示出 paclitaxel 對於試管內正常軟骨細胞存活力之作用。

圖 22 示出在 paclitaxel 所觀察到的偽一次動力降解作用 (20 微克/毫升⁻¹，分別在 pH 3.7 及 4.9 之 10% HP β CD 及 10% HP γ CD 溶液中，37°C 下)。

圖 23 示出在 37°C 下，環糊精及 paclitaxel 在水中之相溶解度。

圖 24 示出 37°C 下，paclitaxel 與 rCD，HP β CD 或 HP γ CD 絡合作用之二級作圖。

圖 25 表列 PDLLA-PEG-PDLLA 組成之熔點，焓，分子量，聚合度分佈性及特性黏度。

圖 26 示出 PDLLA-PEG-PDLLA 及 PEG 之 DSC 熱解曲線圖。加熱率為 10°C/分。溶解溫度及焓見圖 30。

圖 27 示出自填加有 20% paclitaxel 之 PDLLA-PEG-PDLLA 圓筒中 paclitaxel 釋出至 PBS 白蛋白緩衝溶液之累積量，在 37°C 下。誤差橫線表示 4 種樣品之標準偏差。40% PEG 之圓筒在第 4 天由於分裂而中斷。

圖 28A，28B 及 28C 示出填加有 20% paclitaxel 的

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (¹⁶)

PDLLA-PEG-PDLLA 圓筒，於 37℃ 下 paclitaxel 之試管內釋出之間，在尺寸、長度(A)、直徑(B)及濕重(C)上之變化。

圖 29 表列 PDLLA-PEG-PDLLA 圓筒 (填加有 20% paclitaxel) 在釋放至 37℃ 之 PBS 白蛋白緩衝溶液之中，團塊質量損失及聚合物組成之變化。

圖 30 示出 PDLLA-PEG-PDLLA 圓筒 (填加有 20% paclitaxel) (20% PEG，1 毫米直徑) 在釋放至 37℃ 之 PBS 白蛋白緩衝溶液之中之凝膠滲透色層分離譜圖。

圖 31A，31B，31C 及 31D 為在 paclitaxel 釋放之前及之中，經乾燥之 PDLLA-PEG-PDLLA 圓筒 (填加有 20% paclitaxel，1 毫米直徑) 之 SEMs。A：20% PEG，第 0 天；B：30% PEG，第 0 天；C：20% PEG，第 69 天；D：30% PEG，第 69 天。

圖 32 示出 paclitaxel 自填加有 20% paclitaxel 之 PDLLA：PCL 拌合物及 PCL 中累積釋放至 37℃，PBS 白蛋白緩衝溶液之圖。誤差線表示 4 種樣品之標準偏差。

圖 33 示出經過一段時間，paclitaxel 自 PCL 糊釋放至 37℃ PBS 中。PCL 糊含有 paclitaxel 及各種添加物利用 #140 孔篩製備之微粒。誤差線代表 3 種樣品之標準偏差。

圖 34 示出 paclitaxel 自 paclitaxel-明膠-PCL 糊釋放至 37℃ PBS 中之時間過程。此圖示出明膠濃度 (#140 孔篩) 及利用 #140 或 #60 孔篩製備之 paclitaxel-明膠 (1：1) 微粒大小之影響。誤差線代表 3 種樣品之標準偏差。

五、發明說明 (17)

圖35A及35B示出添加物(17A：孔篩#140)及微粒大小(17B：#140或#60孔篩)及添加物比例(#140孔篩)對於含有20% paclitaxel之PCL糊在懸浮於37°C蒸餾水後，其脹大行為之影響。以paclitaxel-明膠270微米微粒所製成之糊，及含有30%明膠之糊，於測度過程中由於基質之分解而於4小時後中斷。誤差線代表3種樣品之標準偏差。

圖36A，36B，36C及36D示出paclitaxel-明膠-PCL(20：20：60)糊在懸浮於37°C蒸餾水中6小時之前(36A)及之後(36B)之掃描電子顯微鏡圖。顯微圖36C及36D放大倍數大於36B，顯示paclitaxel(棒條型)及明膠基質緊密的結合。

圖37A及37B代表以明膠-PCL(37A)及paclitaxel-明膠-PCL(20：20：60：37B)糊處理之CAMs顯微照片，顯示出在paclitaxel處理過之CAM中之無血管區。

圖38示出環糊精及paclitaxel在37°C水中之相溶解度。

圖39示出paclitaxel及rCD，HP β CD或HP γ CD在37°C下絡合作用之二級製圖。

圖40示出paclitaxel在37°C及羥丙基- β -環糊精於50：50水：乙醇溶液中之相溶解度。

圖41示出paclitaxel在37°C之0，5，10或20% HP γ CD溶液中之溶解速率輪廓。

圖4.2示出所觀察到的paclitaxel(20微克／毫升)在10% HP β CD及10% HP γ CD溶液，37°C下，pH值分別是3.7及4.9之偽一次動力學降解作用。

五、發明說明 (¹⁸)

圖 43 A 及 43 B 分別為二圖，示出 paclitaxel 自 EVA 膜上之釋出，及在相同膜上隨時間留下的 paclitaxel 百分率。圖 43 C 示出無 paclitaxel 下隨時間之 EVA / F127 膜之泡脹。圖 43 D 示出無 paclitaxel 下隨時間之 EVA / Span 80 膜之泡脹。圖 43 E 示出對各種 EVA / F127 拌合物而言的應力對張力之作圖。

圖 44 示出血漿之聚合微球調理作用，對於嗜中性球 (20 毫克 / 毫升微球在 0.5 毫升細胞中 (濃度 5×10^6 細胞 / 毫升)) 對 PCL 微球化學發光反應之影響。

圖 45 示出預先塗佈之血漿 +/- 2% pluronic F127，對於嗜中性球 (5×10^6 細胞 / 毫升) 對 PCL 微球之化學發光反應之影響。

圖 46 示出預先塗佈之血漿 +/- 2% pluronic F127，對於嗜中性球 (5×10^6 細胞 / 毫升) 對 PMMA 微球之化學發光反應之影響。

圖 47 示出預先塗佈之血漿 +/- 2% pluronic F127，對於嗜中性球 (5×10^6 細胞 / 毫升) 對 PLA 微球之化學發光反應之影響。

圖 48 示出預先塗佈之血漿 +/- 2% pluronic F127，對於嗜中性球 (5×10^6 細胞 / 毫升) 對 EVA : PLA 微球之化學發光反應之影響。

圖 49 示出預塗佈之 IgG (2 毫克 / 毫升) 或 2% pluronic F127 再 IgG (2 毫克 / 毫升) 對於嗜中性球對 PCL 微球之化學發光反應之影響。

五、發明說明 (19)

圖 50 示出預塗佈之 IgG (2 毫克 / 毫升) 或 2% pluronic F127 再 IgG (2 毫克 / 毫升) 對於嗜中性球對 PMMA 微球之化學發光反應之影響。

圖 51 示出預塗佈之 IgG (2 毫克 / 毫升) 或 2% pluronic F127 再 IgG (2 毫克 / 毫升) 對於嗜中性球對 PVA 微球之化學發光反應之影響。

圖 52 示出預塗佈之 IgG (2 毫克 / 毫升) 或 2% pluronic F127 再 IgG (2 毫克 / 毫升) 對於嗜中性球對 EVA : PLA 微球之化學發光反應之影響。

圖 53A 示出含有 1% , 2% , 5% 或 10% paclitaxel 之聚己內酯微球至 37°C 磷酸鹽緩衝食鹽水中之釋放率輪廓。圖 53B 示出以對照微球處理過之 CAM。圖 53C 示出以填加有 5% paclitaxel 之微球處理過之 CAM。

圖 54 示出對照組微球 (PLLA : GA-85 : 15) 之粒子大小之範圍。

圖 55 示出填加有 20% paclitaxel 之微球 (PLLA : GA-85 : 15) 之粒子大小範圍。

圖 56 示出對照組微球 (PLLA : GA-85 : 15) 粒子大小之範圍。

圖 57 示出填加有 20% paclitaxel 之微球 (PLLA : GA-85 : 15) 粒子大小範圍。

圖 58A , 58B 及 58C 示出 paclitaxel 自各種微球大小及 PLLA 及 GA 各種比例之微球中釋放率之輪廓。

圖 59A 及 59B 示出 paclitaxel 自 PLLA 及 GA 各種比例之微

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (20)

球中釋放速率之輪廓。

圖 60 A 及 60 B 示出 paclitaxel 自 PLLA 及 GA 各種比例之微球中釋放速率之輪廓。

圖 61 A, 61 B 及 61 C 示出 paclitaxel 自各種大小及 PLLA 及 GA 各種比例之微球中釋放速率之輪廓。

圖 62 示出自 paclitaxel-尼龍微球中釋放之 paclitaxel。

圖 63 A 及 63 B 示出塗佈有纖維網蛋白之 PLLA 微球在膀胱組織上 (63 A) 及聚 (L-賴胺酸) 微球在膀胱組織上之照片。

圖 64 示出微胞的 paclitaxel 可在由膠原蛋白誘導之關節炎大鼠模式中改善每天平均的關節炎分數。

圖 65 A-65 D 為一系列 X 光片，示出微胞的 paclitaxel 在由膠原蛋白誘導之關節炎大鼠模式中之作用。

圖 66 A-66 C 為大鼠踝關節之掃描式電子顯微照片。

圖 67 為膠原蛋白-誘導之關節炎大鼠模式中組織病理學顯示用之放大觀。

圖 68 A 及 68 B 為膠原蛋白-誘導之關節炎大鼠模式中滑膜血管分佈之放大觀。

圖 69 示出在老鼠耳朵上由噁唑酮誘導之接觸過敏反應。於施以抗原之時及後每天一次以 1% paclitaxel 凝膠或溶媒處理。皮膚發炎之定量係和挑戰前耳朵厚度比較下腫脹之程度為準。數據以平均值 $\pm$ SD ($n=5$) 表示。* $p<0.01$; *** $p<0.001$ 。

圖 70 示出在老鼠耳朵上由噁唑酮所誘導之接觸過敏反應。以抗原挑戰後 24 小時，及後每天一次以 1% paclitaxel

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (21)

凝膠或溶媒處理。皮膚發炎之定量係和挑戰前耳朵厚度比較下腫脹之程度為準。數據以平均值 $\pm$ SD($n=5$)表示。

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。

圖71示出由PAM之局部施用在老鼠耳朵上誘導皮膚發炎。在施用PAM後1小時最後一次以1% paclitaxel凝膠或溶媒處理，其後每天一次。皮膚發炎之定量係和挑戰前耳朵厚度比較下腫脹之程度為準。數據以平均值 $\pm$ SD($n=5$)表示。* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ 。

圖72示出由局部施加PMA在老鼠耳朵上誘導皮膚之發炎。於施以PMA後24小時最初以1% paclitaxel凝膠或溶媒處理，之後每天一次。皮膚發炎之定量係和挑戰前耳朵厚度比較下腫脹之程度為準。數據以平均值 $\pm$ SD($n=5$)表示。** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ 。

圖73說明由局部施加PMA在老鼠耳朵上誘導之皮膚發炎。以1% paclitaxel凝膠(右耳)或溶媒(左耳)預先處理。於施加PMA 48小時後照像。可注意到經溶媒處理的左耳有紅且擴張之血管，此係和經paclitaxel處理過之右耳比較而言。在共5隻老鼠中可得相似的結果。

圖74示出paclitaxel對於DM20導入外來基因老鼠體重之影響。導入外來基因老鼠以溶媒或paclitaxel(2.0毫克/公斤)每週處理3次共24天，再於第27天殺死。所得之結果為以paclitaxel處理過的二隻老鼠，及一隻未經處理的老鼠。paclitaxel處理之動物有少量的體重減少，而對照動物有由29克至22克，30%體重減少。

五、發明說明 (²²)

圖 7.5 示出高劑量間隔的 paclitaxel 治療對於導入外來基因老鼠臨床症狀進行上的影響。導入外來基因之老鼠以 20 毫克／公斤 paclitaxel 每週處理一次，共四週(第 0，1，2 及 3 週)，並追蹤達十週，每二天一次，對各症狀決定其分數。數據以經 paclitaxel 處理的導入外來基因老鼠(n=5)及對照組(n=3)之平均分數表示(所有症狀之累積)。paclitaxel 處理可減少在導入外來基因老鼠中由於 DM20 過度表現所致之惡化，而對照組老鼠極快速惡化，且在實驗末了有 3 隻中的 2 隻死亡(如所示)。

圖 76A 及 76B 示出在大鼠頸動脈模式中，paclitaxel 糊劑自血管周邊施加至血管外膜。左頸總動脈之外膜表面以 2.5 毫克對照組之糊劑(76A)或填加有 20% paclitaxel 之糊劑(76B)處理。對照組之動脈由於平滑肌細胞過度增殖，使動脈壁厚度呈現增加現象，而以 paclitaxel 糊劑處理的動脈並無內膜加厚之證據。

圖 77A 及 77B 示出在大鼠頸動脈模式中血管周 paclitaxel 糊劑之接近作用。填加 paclitaxel 之糊劑緊接在血管周邊區域施加以避免再狹窄；然而，當糊劑未直接施加至血管壁下方處則可明顯地見到新內膜之增生。

圖 78A，78B 及 78C 示出 paclitaxel 對星形細胞 GFAP 染色之影響。經溶媒或 paclitaxel 處理的正常動物及導入外來基因動物(其呈現出與多發硬化相似之神經性疾病)腦切片以 GFAP 染色(此為經活化之星形細胞之標幟)，並就組織學檢查之。在對照的導入外來基因老鼠中，與正常的腦切片

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (²³)

比較下，星形細胞數目及GFAP總水平有所增加。然而，細胞的外形是類似的。經paclitaxel處理之導入外來基因老鼠之腦切片，與未處理之導入外來基因動物比較下，星形細胞數目及GFAP水平有所減少。組織學而言，在星形細胞中星形過程有細胞變圓及變薄之現象。

圖79A及79B示出paclitaxel可抑制因反應髓磷脂鹼性蛋白質肽(GP68-88)及ConA之T細胞刺激作用。48小時的T細胞培養物，其RT-1之增殖以GP 68-88(A)或ConA(B)為刺激原來進行之。paclitaxel及其溶媒(微團)在抗原刺激之初或其後24小時，於分級濃度下加入。paclitaxel在低至0.02 μ M濃度時仍會抑制T細胞之增殖，不論其刺激原為何。

圖80A，80B，80C及80D示出殺結核菌素及paclitaxel可抑制IL-1及TNF-誘導之NF-kB活性。

詳細說明

在敘述本發明之前，將下文將使用的某些術語加以說明將有助於更加了解。

"發炎疾病"如此中所用的指特徵為血管性變化的許多疾病中任一者：水腫及嗜中性球之浸潤(如急性發炎反應)；組織為單核細胞之浸潤；組織為發炎細胞，結締組織細胞及其細胞產物所破壞；及嚐試由結締組織替補來修補(如慢性發炎反應)。此種疾病之代表性實例包括許多常見的醫學狀況，如關節炎，動脈粥樣硬化，牛皮癬，發炎性腸疾，多發性硬化，手術黏連，再狹窄，結核病，移植物排斥及

五、發明說明 (²⁴)

慢性發炎性呼吸疾病(如氣喘，肺塵埃沉著病，慢性阻塞性肺疾，鼻息肉及肺纖維化)。

"抗-微小管作用物"應了解包括可破壞微小管功能的任何蛋白質，肽，化學物或其他分子，例如可經由預防或穩定聚合化作用。可利用各種方法來決定特定化合物之抗-微小管活性，包括，如由Smith et al所述之分析法(Cancer Lett 79 (2) : 213 - 219, 1994)及Mooberry et al之方法(Cancer Lett 96(2) : 261-266, 1995)。

如上示，本發明提出可治療或預防發炎疾病之方法，包括在發炎部位遞送抗-微小管作用物之步驟。簡言之，各種作用物可遞送至發炎位置(或發炎的潛在位置)，可加或不加有載劑(如聚合物或油膏)以治療或預防發炎疾病。此作用物的代表性實例包括紫杉烷(如paclitaxel(詳述於下)及docetaxel)(Schitt et al., Nature 277 : 665 - 667, 1979 ; Long and Fairchild, Cancer Research 54 : 4355 - 4361, 1994 ; Ringel and Horwitz, J. Natl. Cancer Inst. 83(4) : 288 - 291, 1991 ; Pazdur et al., Cancer Treat. Rev. 19(4) : 351 - 386, 1993), Camptothecin, epothilones A及B(Bollag et al., Cancer Research 55 : 2325-2333, 1995), discodermolide(ter Haar et al., Biochemistry 35 : 243 - 250, 1996), 氧化氘(D₂O)(James and Lefebvre, Genetics 130 (2) : 305-314, 1992 ; Sollott et al., J. Clin. Invest 95 : 1869 - 1876, 1995), 己二醇(2-甲基-2,4-戊二醇)(Oka et al., Cell struct. Funct. 16(2) : 125 - 134,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (²⁵)

1991)，殺結核菌素(7-去吡腺苷)(Mooberry et al, Cancer Lett. 96(2) : 261-266, 1995)，LY290181(2-胺基-4-(3-吡啶基)-4H-萘(1,2-b)吡喃-3-心腓)(Panda et al., J. Biol. Chem. 272(12) : 7681 - 7687, 1997；Wood et al., Mol. Pharmacol, 52(3) : 437-444, 1997)，氟化鋁(Song et al., J. Cell. Sci. Suppl. 14 : 147-150, 1991)，乙二醇雙(琥珀醯亞胺基琥珀酸酯)(Caplow and Shanks, J. Biol Chem. 265 (15) : 8935 - 8941, 1990)，甘胺酸乙酯(Mejillano et al., Biochemistry 31 (13) : 3478 - 3483, 1992)，單株抗-遺傳性型抗體(Leu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(22) : 10690 - 10694, 1994)，微小管組合促進性蛋白質(類紫杉醇蛋白質，TALP)(Hwang et al, Biochem. Biophys. Res. Commun. 208(3) : 1174 -1180, 1995)，由缺氧(190毫滲透壓／升)狀況所誘導之細胞脹大，胰島素(100毫微莫耳／升)或穀胺醯胺(10毫莫耳／升)(Haussinger et al., Biochem. Cell Biol. 72(1-2) : 12-19, 1994)，動力蛋白結合(Ohba et al., Biochim. Biophys. Acta 1158(3) : 323-332, 1993)，赤霉素(Mita and Shibaoka, Protoplasma 119 (1/2) : 100 - 109, 1984)，XCHO1(類激動素蛋白質)(Yonetani et al., Mol. Biol. Cell 7(Suppl) : 211A, 1996)，溶血磷脂酸(Cook et al., Mol. Biol. Cell 6(Suppl) : 260A, 1995)，鋰離子(Bhattacharyya and Wolff, Biochem. Biophys Res. Commun, 73(2) : 383 - 390, 1976)，植物細胞壁組份(如

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (²⁶)

聚-L-賴胺酸及伸展蛋白)(Akashi et al., *Planta* 182(3) : 363 - 369, 1990) , 甘油緩衝溶液 (Schilstra et al., *Biochem J.* 277(pt.3) : 839 - 847, 1991 ; Farrell and Keates, *Biochem. Cell. Biol.* 68(11) : 1256 - 1261, 1990 ; Lopez et al, *I. Cell, Biochem.* 43(3) : 281-291, 1990) , Triton X-100微小管穩定緩衝溶液 (Brown et al., *J. Cell. Sci.* 104 (pt.2) : 339 - 352, 1993 ; Safiejko-Mrocza and Bell, *J. Histochem. Cytochem.* 44(6) : 641 - 656, 1996) , 與微小管有關的蛋白質 (如 MAP2 , MAP4 , τ , 大 τ , ensconsin , 延長因子 1- α -(EF-1 α) 及 E-MAP-115)(Burgess et al., *Cell Motil. Cytoskeleton* 20(4) : 289-300, 1991 ; Saoudi et al., *J. Cell. Sci.* 108 (Pt.1) : 357 - 367, 1995 ; Bulinski and Bossler, *J. Cell. Sci.* 107 (Pt. 10) : 2839 - 2849, 1994 ; Ookata et al., *J. Cell. Biol.* 128(5) : 849 - 862, 1995 ; Boyne et al., *J. Comp. Neurol.* 358 (2) : 279 - 293, 1995 ; Ferreira and Caceres, *J. Neurosci.* 11(2) : 392 - 400, 1991 ; Thurston et al., *Chromosoma* 105(1) : 20-30, 1996 ; Wang et al., *Brain Res. Mol. Brain Res.* 38(2) : 200 - 208, 1996 ; Moore and Cyr, *Mol. Biol. Cell* 7(Suppl) : 221-A, 1996 ; Masson and Kreis, *J. Cell. Biol.* 123(2), 357 371, 1993) , 細胞實體 (如組織蛋白 H1 , 髓磷脂鹼性蛋白質及著絲點)(Saoudi et al., *J. Cell. Sci.* 108(Pt.1) : 357 - 367, 1995 ; Simerly et al., *J. Cell. Biol.* 111(4) : 1491 - 1504,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (27)

1990)，內源的微小管結構(如染色結構，孢塞及GTP帽)(Dye et al., Cell. Motil. Cytoskeleton 21(3) : 171 - 186, 1992 ; Azhar and Murphy, Cell Motil, Cytoskeleton 15(3) : 156-161, 1990; Walker et al., J. Cell Biol. 114(1) : 73-81, 1991 ; Drechsel and Kirschner, Curr. Biol. 4(12) : 1053 - 1061, 1994)，穩定的小管唯一多肽(如STOP 145及STOP 220)(Pirollet et al., Biochim. Biophys. Acta 1160(1) : 113 - 119, 1992 ; Pirollet et al., Biochemistry 31(37) : 8849 - 8855, 1992 ; Bosc et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93(5) : 2125-2130, 1996 ; Margolis et al., EMBO J 9(12) : 4095 - 4102, 1990)及由有絲分裂力量來之張力(Nicklas and Ward, J. Cell. Biol. 126(5) : 1241 - 1253, 1994)，以及上述任一者任何的類似物及衍生物。此種化合物可經由其去聚合化微小管(如秋水仙素及長春鹼等)或經由穩定微小管形成(如paclitaxel)而作用。

在本發明較佳之具體實例中，治療劑是paclitaxel，其經由與微管蛋白結合形成不正常的有絲分裂紡錘體而可瓦解微小管之形成。簡言之，paclitaxel是一種高度衍生化之類雙萜(Wani et al., J. Am. Chem. Soc. 93 : 2325, 1971)其可得自紫杉Taxus brerifolia (Pacific Yew)及Taxomyces Andreanae回收且乾燥之樹皮及Pacific Yew之植物內真菌(Endophytic Fungus)(Stierle et al., Science 60 : 214 - 216, 1993)。“Paclitaxel”(其在此應了解包括前藥，類似物及衍生物，如TAXOL[®]，TAXOTERE[®]，Docetaxel，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (28)

paclitaxel之10-去乙醯基類似物及paclitaxel之3'-N-去苄醯基-3'-N-第三-丁氧基羰基類似物)可利用精藝者已知之技術容易地製備(如見Schiff et al, Nature 277 : 665-667, 1979 : Long and Fairchild, Cancer Research 54 : 4355 - 4361, 1994 : Ringel and Horwitz, J. Natl. Cancer Inst. 83(4) : 288 - 291, 1991; Pazdur et al., Cancer Treat Rev. 19(4) : 351 - 386, 1993 : WO 94/07882 : WO 94/07881 : WO 94/07880 WO 94/07876 : WO 93/23555 : WO 93/10076 : WO 94/00156 : WO 93/24476 : EP 590267 : WO 94/20089 : 美國專利案Nos. 5,294,637 : 5,283,253 : 5,279,949 : 5,274,137 : 5,202,448 : 5,200,534 : 5,229,529 : 5,254,580 : 5,412,092 : 5,395,850 : 5,380,751 : 5,350,866 : 4,857,653 : 5,272,171 : 5,411,984 : 5,248,796 : 5,248,796 : 5,422,364 : 5,300,638 : 5,294,637 : 5,362,831 : 5,440,056 : 4,814,470 : 5,278,324 : 5,352,805 : 5,411,984 : 5,059,699 : 4,942,184 : Tetrahedron Letters 35(52) : 9709 - 9712, 1994 : J. Med. Chem. 35 : 4230 - 4237, 1992 : J. Med Chem. 34 : 992-998, 1991 : J. Natural Prod 57(10) : 1404 - 1410, 1994 : J. Natural Prod. 57 (11) : 1580 - 1583, 1994 : J. Am. Chem. Soc. 100 : 6558 - 6560, 1988), 或得自各種商業來源, 包括如Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri (T7402-來自Taxus brevifolia)。

五、發明說明 (29)

此 paclitaxel 衍生物或類似物代表性實例包括：7-去氧基-docetaxol，7,8-環丙基紫杉烷，N-經取代的2-吡丁酮，6,7-環氧基 paclitaxel，6,7-經修飾之 paclitaxels，10-去乙醯氧基紫杉醇，10-去乙醯基紫杉醇(來自10-去乙醯基漿果赤霉素III)，紫杉醇之膦氧基及碳酸酯衍生物，紫杉醇2',7-二(1,2-苯二羧酸鈉)，10-去乙醯氧基-11,12-二氫紫杉醇-10,12(18)-二烯衍生物，10-去乙醯氧基紫杉醇，paclitaxel(2'-及／或7-O-酯衍生物)，(2'-及／或7-O-碳酸酯衍生物)，紫杉醇側鏈不對稱的合成，氟紫杉醇，9-去氧紫杉烷，(13-乙醯基-9-去氧漿果赤霉素III，9-去氧紫杉醇，7-去氧基-9-去氧紫杉醇，10-去乙醯氧基-7-去氧基-9-去氧基紫杉醇，含有氫或乙醯基及一個羥基及第三丁氧羰基胺基之衍生物，磺化的2'-丙烯醯基紫杉醇及磺化的2'-O-醯基酸紫杉醇衍生物，琥珀醯基紫杉醇，2'- γ -胺基丁醯基紫杉醇甲酸鹽，2'-乙醯基紫杉醇，7-乙醯基紫杉醇，7-甘胺酸胺基甲酸酯紫杉醇，2'-OH-7-PEG(5000)胺基甲酸酯紫杉醇，2'-苄醯基及2',7-二苄醯基紫杉醇衍生物，其他前藥(2'-乙醯基紫杉醇：2',7-二乙醯基紫杉醇：2'-琥珀醯基紫杉醇：2'-(β -丙胺醯基-紫杉醇)：2', γ -胺基丁醯基紫杉醇甲酸鹽：2'-琥珀醯基紫杉醇之乙二醇衍生物：2'-戊二醯基紫杉醇：2'-(N,N-二甲基甘胺醯基)紫杉醇：2'-(2-(N,N-二甲胺基)丙醯基)紫杉醇：2'-原羧基苄醯基紫杉醇：紫杉醇之2'脂族羧酸衍生物，前藥{2'(N,N-二乙胺基丙醯基)紫杉醇，2'-(N,N-二

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (30)

甲基甘胺鹽基)紫杉醇，7(N,N-二甲基甘胺鹽基)紫杉醇，
 2',7-二-(N,N-二甲基甘胺鹽基)紫杉醇，7(N,N-二乙胺
 基丙鹽基)紫杉醇，2',7-二(N,N-二乙胺基丙鹽基)紫杉
 醇，2'(L-甘胺鹽基)紫杉醇，7-(L-甘胺鹽基)紫杉醇，
 2',7-二(L-甘胺鹽基)紫杉醇，2'-(L-丙胺鹽基)紫杉醇，
 7-(L-丙胺鹽基)紫杉醇，2',7-二(L-丙胺鹽基)紫杉醇，
 2'-(L-白胺鹽基)紫杉醇，7-(L-白胺鹽基)紫杉醇，2',7-
 二(L-白胺鹽基)紫杉醇，2'-(L-異白胺鹽基)紫杉醇，7-
 (L-異白胺鹽基)紫杉醇，2',7-二(L-異白胺鹽基)紫杉醇，
 2'-(L-纈胺鹽基)紫杉醇，7-(L-纈胺鹽基)紫杉醇，2',7-
 二(L-纈胺鹽基)紫杉醇，2'-(L-苯丙胺鹽基)紫杉醇，7-
 (L-苯丙胺鹽基)紫杉醇，2',7-二(L-苯丙胺鹽基)紫杉醇，
 2'-(L-脯胺鹽基)紫杉醇，7-(L-脯胺鹽基)紫杉醇，2',7-
 二(L-脯胺鹽基)紫杉醇，2'-(L-賴胺鹽基)紫杉醇，7-(L-
 賴胺鹽基)紫杉醇，2',7-二(L-賴胺鹽基)紫杉醇，2'-(L-
 穀胺鹽基)紫杉醇，7-(L-穀胺鹽基)紫杉醇，2',7-二(L-穀
 胺鹽基)紫杉醇，2'-(L-精胺鹽基)紫杉醇，7-(L-精胺鹽基)
 紫杉醇，2',7-二(L-精胺鹽基)紫杉醇}，有經修飾之苯基
 異絲胺酸側鏈之紫杉醇類似物，taxotere，CN-去苳鹽基-
 N-第三(丁氧羰基)-10-去乙鹽基紫杉醇，及紫杉烷類(如
 漿果赤霉素III，頭孢甘露素(cephalomannine)，10-去乙
 鹽基漿果赤霉素III，短葉蘇木醇，烏那紫杉素及紫杉
 素)。

微小管去聚合作用(或脫穩定化或瓦解)作用物包括

五、發明說明 (³¹)

Nocodazole(Ding et al., J. Exp. Med. 171(3) : 715 - 727, 1990 : Dotti, et al., J. Cell. Sci. Suppl. 15 : 75-84, 1991 : Oka et al., Cell Struct. Funct. 16(2) : 125-134, 1991 : Wiemer et al., J. Cell. Biol. 136(1) : 71-80, 1997) : 細胞鬆弛素B(Illinger et al., Biol. Cell 73(2-3) : 131 - 138, 1991) : 長春鹼(Ding et al., J. Exp. Med. 171(3) : 715 - 727, 1990 : Dirk et al., Neurochem. Res. 15(11) : 1135 - 1139, 1990 : Illinger et al., Biol. Cell 73(2-3) : 131 - 138, 1991 : Wiemer et al., J. Cell Biol. 136 (1) : 71-80, 1997) : 長春新鹼(Dirk et al., Neurochem. Res. 15(11) : 1135 - 1139, 1990 : Ding et al., J. Exp. Med 171(3) : 715 - 727, 1990) : 秋水仙素(Allen et al., Am. J. Physiol. 261 (4 Pt.1) : L315 - L321, 1991 : Ding et al., J. Ecp. Med. 171(3) : 715 - 727, 1990 : Gonzalez et al., Exp. Cell. Res. 192(1) : 10-15, 1991 : Stargell et al., Mol. Cell. Biol. 12(4) : 1443 - 1450, 1992) : CI980(秋水仙素類似物)(Garcia et al., Anticancer Drugs 6(4) : 533 - 544, 1995) : 秋水仙胺(Barlow et al., Cell. Motil, Cytoskeleton 19(1) : 9-17, 1991 : Meschini, et al., J. Microsc. 176(Pt3) : 204 - 210, 1994 : Oka et al., Cell Struct, Funct. 16(2) : 125-134, 1991) : 鬼臼萜酸(Ding et al., J. Exp. Med. 171(3) : 715-727, 1990) : Benomyl(Hardwick et al., J. Cell Biol. 131(3) : 709 - 720, 1995 : Shero et al., Genes Dev. 5(4) : 549 - 560, 1991) :

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (³²)

Oryzalin (Stargell et al., Mol. Cell. Biol. 12(4) : 1443 - 1450, 1992) ; Majusculamide C (Moore, J. Ind. Microbiol. 16(2) : 134 - 143, 1996) ; Demecolcine (Van Dolah and Ramsdell, J. Cell Physiol. 166(1) : 49-56, 1996 ; Wiemer et al., J. Cell. Biol. 136(1) : 71-80, 1997) ; 及 2-苯咪唑胺基甲酸甲酯 (MBC) (Brown et al., J. Cell Biol. 123 (2) : 387 - 403, 1993) 。

調和物

如上示，本發明的治療組成物可以各種方式調和，且因此可額外地含有載劑。基於此，各種聚合或非聚合來源的載劑均可加以選擇。

例如，在本發明一個具體實例中，可利用各種的聚合載劑以含有及／或遞送上述一種以上的治療劑，包括可生物降解的及非生物降解的組成物。生物可降解之組成物代表性實例包括白蛋白，膠原蛋白，明膠，玻璃酸，澱粉，纖維素(甲基纖維素，羥丙基纖維素，羥丙基甲基纖維素，羧甲基纖維素，醋酸纖維素，醋酸琥珀酸纖維素，羥丙基甲基纖維素，酞酸)，酪蛋白，葡聚糖，多糖，纖維蛋白原，聚(D,L-丙交酯)，聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)，聚(乙交酯)，聚(羥基丁酸酯)，聚(烷基碳酸酯)及聚(原酸酯)，聚酯類，聚(羥基戊酸)，聚二噁烷酮，聚(對苯二甲酸乙二醇酯)，聚(蘋果酸)，聚(丙醇二酸)，聚酞，聚磷腓，聚(胺基酸)及其共聚物(大體上見 Illum, L., David. S.S. (eds.) "Polymers in Controlled Drug Delivery" Wright,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (³⁴)

聚合載劑可作成各種型式，使有欲求之釋放特性及／或有特異欲求之特性。例如，可製作聚合載劑使得在一旦與特異的啟動事件曝露下可釋出治療劑，如pH值(如見，Heller et al., "Chemically Self-Regulated Drug Delivery Systems," in Polymers in Medicine III, Elsevier Science Publishers, B.V., Amsterdam, 1988, pp. 175 - 188 ; Kang et al., J. Applied Polymer Sci. 48 : 343-354, 1993 ; Dong et al., J. Controlled Release 19 : 171 - 178, 1992 ; Dong and Hoffman, J. Controlled Release 15 : 141 - 152, 1991 ; Kim et al., J. Controlled Release 28 : 143-152, 1994 ; Cornejo-Bravo et al., J. Controlled Release 33 : 223-229, 1995 ; Wu and Lee, Pharm. Res. 10(10) : 1544-1547, 1993 ; Serres et al., Pharm. Res. 13(2) : 196-201, 1996 ; Peppas, "Fundamentals of pH-and Temperature-Sensitive Delivery Systems", in Gurny et al., (eds.) Pulsatile Drug. Delivery, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1993, pp. 41-55 ; Doelker, "Cellulose Derivatives," 1993, in Peppas and Langer (eds.), Biopolymers, I. Springer-Verlag, Berlin)。對pH-敏感之聚合物代表性實例包括聚(丙烯酸)及其衍生物(包括如，均聚合物如聚(胺基羧酸)；聚(丙烯酸)；聚(甲基丙烯酸)，此均聚物之共聚物，及聚(丙烯酸)及丙烯酸單體之共聚物如上示。其他對pH敏感之聚合物包括多醣，如醋酸纖維素；酞酸羥丙基甲基纖維素；醋酸琥珀酸羥丙基甲基纖維素。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (³⁵)

維素：乙酸苯偏三酸纖維素；及脫乙醯基殼多糖。又其他對pH值敏感之聚合物包括pH敏感性聚合物及水溶性聚合物之混合物。

另外，可製作之聚合載劑可能是對溫度敏感的(如見Chen et al., "Novel Hydrogels of a Temperature-Sensitive Pluronic Grafted to a Bioadhesive Polyacrylic Acid Backbone for Vaginal Drug Delivery, "in Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 22 : 167-168, Controlled Release Society, Inc., 1995 : Okano, "Molecular Design of Stimuli-Responsive Hydrogels for Temporal Controlled Drug Delivery, "in Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 22 : 111-112, Controlled Release Society, Inc., 1995 : Johnston et al., Pharm. Res. 9(3) : 425-433, 1992 : Tung, Int'l J. Pharm. 107 : 85-90, 1994 : Harsh and Gehrke, J. Controlled Release 17 : 175-186, 1991 : Bae et al., Pharm. Res. 8(4) : 531-537, 1991 : Dinarvand and D'Emanuele, J. Controlled Release 36 : 221-227, 1995 : Yu and Grainger, "Novel Thermo-Sensitive Amphiphilic Gels : Poly N-isopropylacrylamide-co-sodium acrylate-co-n-N-alkyl-acrylamide Network Synthesis and Physicochemical Characterization", Dept. of Chemical & Biological Sci., Oregon Graduate Institute of Science & Technology, Beaverton, OR, pp. 820-821 : Zhou and Smid, "Physical

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (³⁶)

Hydrogels of Associative Star Polymers, "Polymer Research Institute, Dept. of Chemistry, College of Environmental Science and Forestry, State Univ. of New York, Syracuse, NY, pp. 822-823 : Hoffman et al., "Characterizing Pore Sizes and Water Structure "in Stimuli-Responsive Hydrogels," Center for Bioengineering, Univ. of Washington, Seattle, WA, p. 828 : Yu and Grainger, "Thermo-sensitive Swelling Behavior in Crosslinked N-isopropylacrylamide Networks : Cationic, Anionic and Ampholytic Hydrogels," Dept. of Chemical & Biological Sci., Oregon Graduate Institute of Science & Technology, Beaverton, OR, pp 829 - 830 : Kim et al., Pharm. Res. 9(3) : 283-290, 1992 : Bae et al., Pharm Res. 8(5) : 624-628, 1991 : Kono et al., J. Controlled Release 30 : 69-75, 1994 : Yoshida et al., J. Controlled Release 32 : 97-102, 1994 : Okano et al., J. Controlled Release 36 : 125-133, 1995 : Chun and Kim, J. Controlled Release 38 : 39-47, 1996 : D'Emanuele and Dinarvand, Int'l J. Pharm. 118 : 237-242, 1995 : Katono et al., J. Controlled Release 16 : 215-228, 1991 : Hoffman, "Thermally Reversible Hydrogels Containing Biologically Active Species," in Migliaresi et al. (eds.) Polymers in Medicine III, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1988, pp. 161-167 :

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (37)

Hoffman, "Applications of Thermally Reversible Polymers and Hydrogels in Therapeutics and Diagnostics," in Third International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery Systems, Salt Lake City, UT. Feb. 24-27, 1987, pp 297-305 ; Gutowska et al., J. Controlled Release 22 : 95-104, 1992 ; Palasis and Gehrke, J. Controlled Release 18 : 1-12, 1992 ; Paavola et al., Pharm. Res. 12(12) : 1997 - 2002, 1995)。

熱膠凝聚合物之代表性實例，及其凝膠溫度(LCST(°C))包括有均聚物如聚(N-甲基-N-正-丙基丙烯醯胺)，19.8；聚(N-正-丙基丙烯醯胺)，，21.5；聚(N-甲基-N-異丙基丙烯醯胺)，22.3；聚(N-正-丙基異丁烯醯胺)，28.0；聚(N-異丙基丙烯醯胺)，30.9；聚(N-正-二乙基丙烯醯胺)，32.0；聚(N-異丙基丁烯醯胺)，44.0；聚(N-環丙基丙烯醯胺)，45.5；聚(N-乙基異丁烯醯胺)，50.5；聚(N-甲基-N-乙基丙烯醯胺)，56.0；聚(N-環丙基異丁烯醯胺)，59.0；聚(N-乙基丙烯醯胺)，72.0。再者，熱膠凝聚合物可由在上述單體中製備共聚物而製成，或將此均聚物與其他水溶性聚合物，如丙烯基單體混合而成(如丙烯酸及其衍生物，如異丁烯酸，丙烯酸酯及其衍生物，如異丁烯酸丁酯，丙烯醯胺，及N-正-丁基丙烯醯胺)。

熱膠凝聚合物的其他代表性實例包括纖維素醚衍生物，如羥丙基纖維素，41°C；甲基纖維素，55°C；羥丙基甲基纖維素，66°C；及乙基羥乙基纖維素，及pluronic如F-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (³⁸)

127, 10-15°C ; L-122, 19°C ; L-92, 26°C ; L-81, 20°C ; 及 L-61, 24°C。

可以本發明的聚合載劑製作成各種型式，包括如：棒型裝置，丸，厚片，或膠囊(如見 Goodell, et al., Am. J. Hosp. Pharm. 43 : 1454-1461 ; 1986 ; Langer et al., "Controlled release of macromolecules from polymers", in Biomedical Polymers, Polymeric Materials and Pharmaceuticals for Biomedical Use, Goldberg, E.P., Nakagim, Ac (eds.) Academic Press, pp 113-137, 1980 ; Rhine et al., J. Pharm. Sci. 69 : 265-270, 1980 ; Brown et al., J. Pharm. Sci. 72 : 1181 - 1185, 1983 ; and Bgwa et al., J. Controlled Release 1 : 259-267, 1985)。治療劑可由閉塞在聚合物之基質中而鏈結，由共價鏈結結合，或包膠在微膠囊內。在本發明某些較佳具體實例中，治療組成物可以非膠囊調和物型式提供，如微球(範圍大小由毫微米至微米)，糊劑，各種大小之絲線。薄膜及噴霧劑。

較好，本發明的治療組成物以適合所欲求用法之方式製作。在本發明某些方面，治療組成物應是生物可相容的，且經過數天至數月期間可釋出一種以上之治療劑。如，"快速釋放"或"爆發性"治療組成物可提出來，其中經過7至10天可釋出10%，20%或25%(w/v)以上之治療劑(如 Paclitaxel)。此"快速釋放"組成物在某些具體實例中應可釋出具化學治療水平(當可應用時)之欲求的作用物。在其他具體實例中，"緩慢釋出"治療組成物被提出，其在7至

五、發明說明 (³⁹)

10天之間釋出少於1%(w/v)的治療劑。再者，本發明的治療組成物較好可穩定達數月，並可在無菌條件下產生及維持。

在本發明的某些方面，治療組成物可製成任何大小，由50毫微米至500微米，依特定用法而定。另外，此組成物也可以"噴霧劑"型式容易地應用，其可固化成薄膜或塗層。此種噴霧劑可自各種大小之微球中製備，範圍由0.1微米至3微米，由10微米至30微米，及由30微米至100微米。

本發明之治療組成物也可製成各種"糊劑"或凝膠型式。如，在本發明一個具體實例之內，提出在一溫度下為液體(如大於37°C之溫度，如40°C，45°C，50°C，55°C或60°C)且在另一溫度下為固體或半固體(如環境體溫，或低於37°C的任何溫度)的治療性組成物。此"熱糊"可容易地製作而有此中所提供之揭示。

又在本發明另一方面，本發明的治療組成物可形成薄膜。較好，此膜通常厚度少於5，4，3，2或1毫米，更好少於0.75毫米或0.5毫米，且最好少於500微米至100微米。此膜較好是有良好抗張強度(如大於50，較好大於100且更好大於150或200N/公分²)，良好的黏著特性(即易黏附至水氣或潮濕表面)，且有受控制之滲透性。

在本發明進一步方面，治療組成物可調和以供局部施用。代表性實例包括：乙醇：乙醇及甘醇之混合物(如乙二醇或丙二醇)：乙醇及肉豆蔻酸異丙酯或乙醇，肉豆蔻酸異

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (⁴⁰)

丙酯及水之混合物(如55:5:40);乙醇及eineol或D-檸檬烯(有或無水)之混合物;甘醇(如乙二醇或丙二醇)及甘醇之混合物如丙二醇及水,磷脂鹽基甘油,二油鹽基磷脂鹽基甘油,Transcutol[®],或異松油烯;肉豆蔻酸異丙酯及1-己基-2-吡咯啉酮,N-十二碳基-2-六氫吡啶酮或1-己基-2-吡咯啉酮之混合物。其他的賦形劑也可加至上者中,包括如酸,如油酸及亞麻酸,及皂素如硫酸十二碳鈉。對上者更詳盡之說明,可大體上見Hoelgaard et al., J. Contr. Rel. 2:111, 1985; Liu, et al., Pharm. Res. 8:938, 1991; Roy et al., J. Pharm. Sci., 83:126, 1991; Ogiso et al., J. Pharm. Sci. 84:482, 1995; Sasaki et al., J. Pharm. Sci. 80:533, 1991; Okabe et al., J. Contr. Rel. 32:243, 1994; Yokomizo et al., J. Contr. Rel. 38:267, 1996; Yokomizo et al., J. Contr. Rel. 42:37, 1996; Mond et al., J. Contr. Rel. 33:72, 1994; Michniak et al., J. Contr. Rel. 32:147, 1994; Sasaki et al., J. Pharm. Sci. 80:533, 1991; Baker & Hadgraft, Pharm. Res. 12:993, 1995; Jasti et al., AAPS Proceedings, 1996; Lee et al., AAPS Proceedings, 1996; Ritschel et al., Skin Pharmacol. 4:235, 1991; 及McDaid & Deasy, Int. J. Pharm. 133:71, 1996。

在本發明某些具體實例中,治療組合物也可含有額外的組份,如界面活性劑(如Pluronic如F-127, L-122, L-92, L-81及L-61)。

五、發明說明⁽⁴¹⁾

在本發明進一步方面，提出聚合性載劑，其可適於含有及釋放疏水性化合物，含有疏水性化合物之載劑並組合以碳水化合物，蛋白質或多肽。在某些具體實例中，聚合載劑含有或包括一種以上疏水性化合物之區域，小袋或顆粒。例如，在本發明一個具體實例中，疏水性化合物可包括在基質內，其中並含有疏水性化合物，之後基質再納入聚合載劑中。在此方面可利用各種的基質，包括如碳水化合物及多醣如澱粉，纖維素，葡聚糖，甲基纖維素，及玻璃酸，蛋白質或多肽如白蛋白，膠原蛋白及明膠。在另外的具體實例中，疏水性化合物可含在疏水性外衣之內，且此外衣含有親水性外殼之內。

其他可被利用來包含有及遞送此中所述之治療劑的其他載劑包括有：羥丙基 β 環糊精(Cserhati and Hollo, Int. J. Pharm. 108 : 69-75, 1994)，脂質體(如見 Sharma et al., Cancer Res. 53 : 5877-5881, 1993 : Sharma and Straubinger, Pharm. Res. 11(60) : 889-896, 1994 : WO 93/18751 : 美國專利案 5,242,073)，脂質體／凝膠(WO 94/26254)，毫微膠囊(Bartoli et al., J. Microencapsulation, 7(2) : 191 - 197, 1990)，膠團(Alkan-Onyuksel et al., Pharm. Res. 11(2) : 206 - 212, 1994)，植入物(Jampel et al., Invest. Ophthalm. Vis. Science 34(11) : 3076-3083, 1993 : Walter et al., Cancer Res. 54 : 22017-2212, 1994)，毫微粒子(Violante and Lanzafame PAACR)，毫微粒子-經修飾的(美國專利案 No. 5,145,684)，毫微粒子

五、發明說明 (42)

(表面經修飾)(美國專利案No. 5,399,363)，紫杉醇乳劑／溶液(美國專利案No. 5,407,683)，膠團(界面活性劑)(美國專利案No. 5,403,855)，合成的磷脂化合物(美國專利案No. 4,534,899)，攜有氣體之分散劑(美國專利案No. 5,301,664)，液體乳劑，泡沫劑，噴霧劑，凝膠，洗劑，乳劑，油膏，分散的小囊，粒子或油滴固體或液體氣霧劑，微乳劑(美國專利案No. 5,330,756)，聚合外皮(毫微及微膠囊)(美國專利案No. 5,439,686)，以類紫杉為基礎之組成物於界面活性劑中(美國專利案No. 5,438,072)，乳劑(Tarr et al., Pharm. Res. 4 : 62-165, 1987)，毫微球(Hagan et al., Proc. Intern. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 22, 1995 : Kwon et al., Pharm. Res. 12(2) : 192 - 195 : Kwon et al., Pharm. Res 10(7) : 970 - 974 : Yokoyama et al., J. Contr. Rel. 32 : 269-277, 1994 : Gret et al., Science 263 : 1600 - 1603, 1994 : Bazile et al., J. Pharm. Sci. 84 : 493-498, 1994)及植入物(美國專利案No. 4,882,168)。

如下文將詳述的，本發明的治療劑，可視所需納入此中所述的一個載劑之內以形成治療性組成物，可製備及利用來治療或預防各種疾病。

發炎疾病之治療或預防

如上所示，本發明提出治療或預防各種發炎疾病之方法，此方法包括對病人投予抗-微小管作用物。可治療的發炎疾病代表性實例包括如萎縮性胃炎，發炎性溶血性貧

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (43)

血，移植物排斥，發炎性嗜中性白血球減少症，大疱的類天疱瘡，腹腔疾病，髓鞘脫失神經病變，皮膚炎，發炎性腸疾(結腸潰瘍及克隆氏疾病)，多發性硬化，心肌炎，肌炎，鼻息肉，尋常性天疱瘡，原發性血管球性腎炎，牛皮癬，手術黏連，狹窄或再狹窄，鞏膜炎，硬皮病，濕疹(包括異位性皮膚炎，刺激性皮膚炎，過敏性皮膚炎)及I型糖尿病。

發炎疾病的其他實例包括脈管炎(如巨大細胞動脈炎(暫時的動脈炎，Takayasu's動脈炎)，多重動脈炎結節，過敏性血管炎及肉芽腫病(Churg-Strauss病)，多重血管炎重疊症候群，過敏性脈管炎(Henoch-Schonlein紫斑)，血清病，藥物引起之脈管炎，感染性脈管炎，贅瘤脈管炎，與結締組織失調症有關之脈管炎，與補體系統先天缺失有關之脈管炎，Wegener's(韋格納氏)肉芽腫病，Kawasaki's(川崎)病，中樞神經系統之脈管炎，Buerger's(倍耳勾氏)疾病及全身性硬化)；胃腸道疾病(如胰臟炎，Crohn's(克隆氏)病，結腸潰瘍，直腸潰瘍，原發性硬化型膽管炎，任何原因的良性狹窄包括自發病理性(如膽道，食道，十二指腸，小腸或結腸的狹窄)；呼吸道疾病(如氣喘，過敏性肺炎，石棉沉著病，矽肺病及其他型式的肺塵埃沉著病，慢性支氣管炎及慢性阻塞性呼吸道疾病)；鼻及淚管疾病(如所有原因的狹窄包括自發病理性)；及耳咽管疾病(如所有原因的狹窄包括自發病理性)。

1. 發炎性皮膚疾病(如牛皮癬及濕疹)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(⁴⁴)

利用此中所提供的作用劑，組成物及方法，各種的發炎性皮膚疾病均可容易地治療或預防。例如，在本發明的一個具體實例中，經由在發炎部位(或發炎潛在部位)上遞送可抑制微小管功能之作用劑，可治療或預防發炎性皮膚疾病，如牛皮癬或濕疹。

簡言之，皮膚細胞在遺傳上被設計可有二個可能的功能-正常生長或傷口癒合。在正常的生長型式中，皮膚細胞在基礎細胞層上生成，再移至皮膚表面之上皮處。死細胞自健康皮膚上剝落之速率和生長新細胞之速率相同。正常皮膚細胞之轉換時間(即由細胞生成至死亡之時間)約28天。在傷口癒合中，啟動提高的生長及修復功能，造成皮膚細胞快速的轉換(以取代及修復傷口)，增加血液供應(以符合與生長有關之代謝提高需求)並局部化發炎作用。

在許多方面，牛皮癬就像是異常誇大的傷口癒合過程。皮膚細胞(稱為"角質細胞")在短至2-4天內可生成並推擠至皮膚表面。表面皮膚無法夠快地使死細胞脫落，而過多的角質細胞會堆積形成增高的鱗狀傷處。此生長由真皮(在表皮下方之支持組織)中之新血管所支持，經發展可提供支持過度增殖之角質細胞所必要之營養。在此同時，淋巴細胞，嗜中性白血球及巨噬細胞可侵入組織，生成發炎，脹大及疼痛，且可能產生可擴大角質細胞快速增殖之生長因素。所有這些細胞(角質細胞，血管內皮細胞及白血球)可產生組織降解酵素或蛋白酶，有助於疾病之進行及周圍組織之破壞。

五、發明說明 (⁴⁵)

利用以上提供之組成物，可容易地治療發炎性皮膚傷害。特言之，抗-微小管作用劑直接投予至發炎部位(或可能部位)以治療或預防疾病。適合的抗-微小管作用劑在上文中已詳述，且包括有：紫杉烷(如 paclitaxel 及 docetaxel)，camptothecin，epothilones A 及 B，discodermolide，氧化氫(D₂O)，己二醇(2-甲基-2,4-戊二醇)，殺結核菌素(7-去吡腺苷)，LY290181(2-胺基-4-(3-吡啶基)-4H-萘(1,2-b)吡喃-3-心腓)，氟化鋁，乙二醇雙(琥珀醯亞胺基琥珀酸酯)，甘胺酸乙酯，單株抗遺傳性型抗體，微小管組合促進性蛋白質(類-紫杉醇蛋白質，TALP)，由缺氧(190毫滲透壓／升)條件所誘生之細胞脹大，胰島素(100毫微莫耳／升)或穀胺醯胺(10毫莫耳／升)，動力蛋白結合，赤霉素，XCHO1(類激動素蛋白質)，溶血磷脂酸，鋰離子，植物細胞壁組份(如聚-L-賴胺酸及伸展蛋白)，甘油緩衝溶液，Triton X-100微小管穩定緩衝溶液，微小管相關蛋白質(如MAP2，MAP4， τ ，大 τ ，ensconsin，延長因子1- α -(EF-1 α)及E-MAP-115)，細胞實體(如組織蛋白H1，骨髓磷脂鹼性蛋白質及著絲點)，內源性微小管結構(如染色結構，孢塞及GTP帽)，穩定的小管唯一多肽(如STOP 145及STOP 220)及來自有絲分裂力量之張力，以及上述任一者之任何類似物及衍生物。在某些具體實例中，抗-微小管作用劑是 paclitaxel 或 epothilone 以外的作用劑。在某些具體實例中，此作用劑可呈組合物型式沿著聚合載劑而遞送，或在

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明⁽⁴⁶⁾

脂質體，乳劑或油膏調和物中，如上文及下文所詳述的。在本發明較佳之具體實例中，作用劑或組合物可採局部或皮下投藥方式遞送。

對於牛皮癬有效的抗-微小管治療可達成下列至少一者：減少皮膚傷害之量及嚴重度，減少活動性疾病惡化之頻率或期間，增加緩解期時間(即病人無症狀之時期)及／或減少相關症狀之嚴重度或期間(如關節疼痛及紅腫，軸骨骼疼痛，腸方面的症狀)。

臨床上治療可造成皮膚傷處體積或數量之減少，皮膚症狀之消降(受感染皮膚之疼痛，灼熱及流血)及／或相關症狀之減輕(如關節紅腫，熱，脹，下痢，腹痛)。病理學上抗微小管作用劑可產生下列至少一者：抑制角質細胞之增殖，減低皮膚之發炎(如經由衝擊在：趨附及生長因子，抗原之呈現，反應性氧之產生及基質金屬蛋白酶)，且可抑制皮膚之血管生成。

抗-微小管作用劑可以任何方式投予，以達到上述之終點，但較好的方法包括局部及全身性投藥。有局部疾病之患者可以局部paclitaxel乳膏，油膏或潤滑藥直接施加至牛皮癬傷處使疾病減輕。例如，依據疾病之嚴重度及病人對治療的反映可投予含有0.01%至10% paclitaxel之局部乳膏。於較佳具體實例中，可對牛皮癬傷處投予含有0.1%至1% paclitaxel之局部製劑。另外，對於處理個別的傷處可使用在適合的藥學溶媒中之paclitaxel之直接皮內注射。

對於疾病或皮質外症狀較廣佈之病人(如牛皮癬關節炎，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(47)

Reiter's 症狀，相關之軟骨炎，相關之發炎性腸疾)可投予 paclitaxel 之全身性治療。例如，可依治療性反應及病人的耐受性投予 10-75 毫克／米²之靜脈內 paclitaxel 調和物以間歇治療；在此適應症上也可採用相當的口服製劑。其他的抗-微小管劑可以為作用劑之強度及耐受力所調整之 "paclitaxel 當量" 劑量投予。

由局部的抗-微小管劑中也可受益之其他狀況包括：濕疹疾病(異位性皮膚炎，接觸性皮膚炎，濕疹)，免疫疾病，惡性前期上皮腫瘤(基礎細胞腫瘤，鱗狀細胞腫瘤，角質眼角腫瘤，惡性黑色素瘤)及病毒性疣。含有 0.01% 至 10% paclitaxel 按重計之局部乳膏，油膏及潤滑藥也適用於處理這些狀況。

2. 多發性硬化

在本發明其他方面，可利用抗-微小管作用劑來治療或預防多發性硬化。簡言之，多發性硬化(MS)是一種人類中樞神經系統的毀壞性髓鞘脫失疾病。雖然其病因學及致病原理是未知的，但咸信遺傳，免疫學及環境因素扮演重角色。在疾病過程中，MS 病人腦中會逐漸的脫髓化，造成運動功能之喪失。雖然涉及髓質流失之確實機制尚未知，但對於髓質破壞區域內星形細胞增殖及累積會有所增加。在這些部位，有類巨噬細胞活性及增加的蛋白酶活性，其至少部份負責髓鞘之降解作用。

抗-微小管作用劑可投予至發炎位置(或可能的發炎位置)以治療或預防疾病。適合的抗-微小管作用劑詳述於上，並

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明⁽⁴⁸⁾

包括如紫杉烷(如 paclitaxel 及 docetaxel)，campothecin，epothilones A 及 B，discodermolide，氧化氘(D₂O)，己二醇(2-甲基-2,4-戊二醇)，殺結核菌素(7-去吡腺苷)，LY290181(2-胺基-4-(3-吡啶基)-4H-萘(1,2-b)吡喃-3-心腓)，氟化鋁，乙二醇雙(琥珀鹽亞胺基琥珀酸酯)，甘胺酸乙酯，單株抗遺傳性型抗體，微小管組合促進性蛋白質(類-紫杉醇蛋白質，TALP)，由於缺氧誘導的細胞漲大(190毫滲透壓／升)，胰島素(100毫微莫耳／升)或穀胺鹽胺(10毫莫耳／升)，動力蛋白結合，赤霉素，XCHO1(類激動素蛋白質)，溶血磷脂酸，鋰離子，植物細胞壁組份(如聚-L-賴胺酸及伸展蛋白)，甘油緩衝溶液，Triton X-100 微小管穩定緩衝溶液，微小管相關的蛋白質(如 MAP2，MAP4， τ ，大 τ ，ensconsin，延長因子1- α -(EF-1 α)及E-MAP-15)，細胞實體(如組織蛋白H1，骨髓磷脂鹼性蛋白質及著絲點)，內源的微小管結構(如染色結構，孢塞及GTP帽)，穩定的小管唯一多肽(如STOP 145及STOP 220)及由有絲分裂力量來之張力，以及上述任一者任何的類似物及衍生物。此作用物在某些具體實例中可呈組成物配合聚合載劑遞送，或在脂質體調和物中遞送，如上文及下文所詳述的。在本發明的某些具體實例中，作用物或組成物可口服，靜脈內投藥，或直接投予(較好加上超音波，CT，螢光顯微鏡，MRI或內腔鏡準則)至疾病部位。

對多發性硬化有效的抗-微小管治療可完成下列一種以

五、發明說明 (⁴⁹)

上：減低症狀之嚴重度；減短疾病惡化之作用期；增加疾病緩解／無症狀期之頻率及作用期；預防固定的破壞及無能力；及／或預防／減弱疾病之長期進行。就臨床上而言，此可造成視覺症狀之改善(視覺喪失，複視)，步態失調症(虛弱，中軸不穩定，感覺喪失，痙攣性，喪失右側性)，上肢官能障礙(虛弱，痙攣，感覺喪失)，膀胱官能障礙(急迫，失禁，遲疑，不完全排空)，抑鬱，感情不安定性，及認識力受損。病理上治療將可減少下列一者以上，如髓鞘脫失，血腦障壁之瓦解，單核細胞之血管周浸潤，免疫學失常，神經膠質疤之形成及星形細胞增殖作用，金屬蛋白酶之產生，及破壞傳導速率。

抗-微小管作用劑可以任何方式投予以達到上述終點。然而，較佳的投藥方法包括靜脈內，口服或皮下，肌肉或鞘內注射。抗-微小管作用物可以長期低劑量治療方式投予以預防疾病之進行，延長疾病之緩解或減少活性疾病中之症狀。另外，治療劑可以較高劑量呈"脈衝"治療方式投藥以誘導在急性活動性疾病中之緩解。可使用可達到這些終點的最低劑量，且可依據病人，疾病的嚴重度，所投予作用劑之調和物及投藥路徑而變化。例如，對paclitaxel而言，全身性長期低劑量治療可以10-50毫克／米²之paclitaxel每1-4週連續投予，依治療反應而定；全身性高劑量"脈衝"療法可以50-250毫克／米²每2-21天投予歷1-6個循環。其他的抗-微小管作用劑可針對作用物之強度及耐受力調整以相當劑量投予。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (⁵⁰)

3. 植入物及手術或醫學裝置，包括人工支架及移植物

各種的植入物，手術裝置或人工支架可塗佈或另外構築以含有及／或釋出此中所提供的任何抗-微小管劑。代表性實例包括心血管裝置(如可植入之靜脈導管，靜脈通口，有坑道之靜脈導管，慢性輸液管線或通口，包括肝動脈輸液導管，心律調整器線路，可植入之組織纖維脫離器)；神經學／神經手術裝置(如心室腹膜分流器，心室前房分流器，神經刺激器裝置，硬膜貼及預防硬膜上纖維椎板切除術後之植入物，可行蜘蛛下連續輸液之裝置)；胃腸裝置(如長期駐內導管，餵食管，門脈全身性分流器，用於腹水之分流器，用於遞送藥物之腹膜內植入物，腹膜透析導管，可於疝脫之可植入網，懸液或固體植入劑以預防手術黏連，包括篩網)；生殖泌尿裝置(如子宮植入物，包括，子宮內裝置(IUDs)及預防子宮內膜肥大之裝置，輸卵管植入物，包括可逆的絕育裝置，輸卵管人工支架，用於失禁之人工括約肌及尿道周植入物，輸尿管人工支架，長期內駐導管，膀胱加強物，或用於輸精管兩段造口吻合術之外罩或夾板)；眼科植入物(如用於新血管青光眼的多結植入物及其他植入物，用於翼狀胬肉之藥物溶離用隱形鏡片，用於失敗的淚囊鼻切開術之夾板，用於角膜新血管生成之藥物溶離用隱形鏡片，用於糖尿病視網膜病變之植入物，用於高危險角膜移植之藥物溶離用隱形鏡片)；耳喉科裝置(如聽骨植入物，歐氏管夾板或用於膠耳之人工支架或用於慢性耳炎不同於transtympanic引流)；整型手術植入物(如避

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明⁽⁵¹⁾

免在胸肌下或腺體下趨近或乳房切除術後因反應含有凝膠或食鹽水之乳房植入物之纖維攣縮，或類植入物)，及齒科矯形植入物(如堊質之齒科矯正彌補物)。

適合的抗-微小管作用劑討論於上文，且包括如紫杉烷類(如 paclitaxel 及 docetaxel)，camptothecin，epothilones A 及 B，discodermolide，氧化氘(D₂O)，己二醇(2-甲基-2,4-戊二醇)，殺結核菌素(7-去吡腺苷)，LY290181(2-胺基-4-(3-吡啶基)-4H-茶(1,2-b)吡喃-3-心腓)，氟化鋁，乙二醇雙(琥珀醯亞胺琥珀酸酯)，甘胺酸乙酯，單株抗-遺傳性型抗體，微小管組合促進性蛋白質(類紫杉醇蛋白質，TALP)，由缺氧狀況(190毫滲透壓／升)所誘導的細胞脹大，胰島素(100毫微莫耳／升)或穀胺醯胺(10毫莫耳／升)，動力蛋白結合，赤霉素，XCHO1(類激動素蛋白質)，溶血磷脂酸，鋰離子，植物細胞壁組份(如聚-L-賴胺酸及伸展蛋白)，甘油緩衝溶液，Triton X-100微小管穩定緩衝溶液，與微小管相關之蛋白質(如 MAP2，MAP4， τ ，大 τ ，ensconsin，延長因子1- α -(EF-1 α)及 E-MAP-115)，細胞實體(如組織蛋白H1，骨髓磷脂鹼性蛋白及著絲點)，內源的微小管結構(如染色結構，孢塞及GTP帽)，穩定的小管唯一多肽(如STOP 145及STOP 220)及由有絲分裂力量來之張力，以及上述任一者之任何類似物及衍生物。在某些具體實例中，此作用物可呈組合物型式配合聚合載劑來遞送，或呈脂質體調和物型式，如上文及下文中所詳述的。在某些具體實例中(如於人工支架例子

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(⁵²)

中)抗微小管作用劑是 paclitaxel 或 epothilone 以外之作用物。

植入物及其他的手術或醫學裝置可以本發明的抗-微小管組成物或抗-微小管因子塗佈(或另外適合以釋出)，利用各種方式包括：(a)將抗-微小管作用物或組成物直接固定在植入物或裝置上(如可以聚合物／藥物薄膜噴灑植入物或裝置，或將植入物或裝置浸泡至聚合物／藥物溶液中，或利用共價或非共價方法)；(b)以物質塗佈於植入物或裝置上，如水凝膠，其可再吸收抗-微小管組成物(或如上之抗-微小管因子)；(c)將塗佈有抗-微小管組成物線(或聚合物本身形成線狀)交織至植入物或裝置內；(d)將植入物或裝置嵌入套筒或網中，其由抗-微小管組成物組成或以其所塗佈；(e)以抗-微小管作用劑或組成物本身構築植入物或裝置；或(f)使植入物或裝置適於釋出抗微小管作用劑。在本發明較佳之具體實例中，於貯存期間及嵌入之時，組成物應可牢固地黏附至植入物或裝置之上。抗微小管作用劑或組成物於貯存期間，嵌入之前，或於嵌入體內後加溫至體溫時(若此是必要的)，應該也較好是不會降解。此外，較好可平滑且均勻地塗佈抗微小管作用劑，使其有一致的分佈且無人工支架顏色之變化。在本發明較佳具體實例中，植入物或裝置一旦確立，應可使抗微小管作用劑或組成物中之作用劑在植入物或裝置四週之組織有均勻，可預測且延長之釋出。於血管人工支架方面，除了上述特性外，組成物應該不致使人工支架會產生血栓(造成血塊形成)，或

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (53)

造成血流顯著的不穩定(較人工支架本身若未塗佈時可能會造成的更甚)。

於人工支架例子中，可發展各種的人工支架以含有及／或釋出此中所提供之抗微小管作用物，包括食道人工支架，胃腸道人工支架，血管人工支架，膽道人工支架，胰人工支架，輸尿管及尿道人工支架，淚腺人工支架，歐氏管人工支架、輸卵管人工支架及氣管／支氣管人工支架。人工支架可由商業來源容易地獲得，或依據熟知之技術構築。人工支架的代表性實例述於美國專利案No. 4,768,523 "Hydrogel Adhesive"；美國專利案No. 4,776,337 "Expandable Intraluminal Graft, and Method and Apparatus for Implanting and Expandable Intraluminal Graft"；美國專利案No. 5,041,126 "Endovascular Stent and Delivery System"；美國專利案No. 5,052,998 "Indwelling Stent and Method of Use"；美國專利案No. 5,064,435 "Self-Expanding Prosthesis Having Stable Axial Length"；美國專利案No. 5,089,606 "Water-insoluble Polysaccharide Hydrogel Foam for Medical Applications"，美國專利案No. 5,147,370 "Nitinol Stent for Hollow Body Conduits"；美國專利案No. 5,176,626 "Indwelling Stent"；美國專利案No. 5,213,580 "Biodegradable Polymeric Endoluminal Sealing Process"；及美國專利案No. 5,328,471，"Method and Apparatus for Treatment of Focal Disease in Hollow Tubular Organs

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(⁵⁴)

and Other Tissue Lumens"。

在本發明其他方面，提出擴大體內通道內腔之方法，此方法包括將人工支架嵌入通路中，人工支架具有大體上管狀結構，結構體表面塗佈以(或另外使適於釋出)抗微小管作用劑組成物(或是單獨的抗微小管因子)，如此通道可被擴大。下文詳述各種實例，其中體內通道之內腔被擴大以消除膽管，胃腸，食道，氣管／支氣管，尿道或血管之阻塞。

大體而言，人工支架以不論被處理之位置或疾病之相似方式嵌入。簡言之，通常先進行嵌入前的檢查，通常是一種診斷顯影步驟，內視鏡，或在手術位置直接之目視，以決定可嵌入人工支架之適合部位。再將引導線穿過嵌入之傷處或建議部位前進，在此中再通過遞送導管使人工支架可以其壓縮型式被嵌入。典型而言人工支架可被壓縮，如此其可經由小導管穿越細小管腔，並在其一旦到達欲求位置時可擴大至更大尺寸。一旦擴大，人工支架可物理性迫使通道壁分開並使其保持暢開。如此其可經由小的開口嵌入，且又可保持大尺寸之管腔或通道是開的。人工支架可自體擴大(如 Wallstent 及 Gianturco 人工支架)，可以氣球擴大的(如 Palmaz 人工支架及 Strecket 人工支架)，或可由於溫度之變化而植入(如 Nitinol 人工支架)。

通常人工支架可在雷射或直接目視控制下演練至其所在，特別要小心將人工支架精確地穿越欲處理器官之最狹處。再移去遞送導管，留下人工支架本身作骨架之用。嵌

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(⁵⁵)

入後之檢查，通常是利用X-射線，常被用來證實是否在適合的定位上。

在本發明之具體實例中，提出可消除膽道阻塞之方法，此方法包括將膽道人工支架嵌入其通路內，人工支架具有大體上管狀結構，結構體表面塗佈以(或另外使適於釋出)如上述之作用劑或組成物，如此消除膽道之阻塞。簡言之，總膽管之腫瘤過度生長會造成進行性膽汁鬱滯性黃膽，此不容於生命。大體而言，膽系中將膽汁由肝引流至十二指腸中最常為下列所阻塞(1)由膽管細胞所組成之腫瘤(膽管腫瘤)，(2)侵入膽管之腫瘤(如胰臟癌)，或(3)可呈現外在壓力並壓縮膽道之腫瘤(如擴大之淋巴結)。

原發性膽腫瘤，以及造成膽樹壓縮的其他腫瘤可利用此中所述之人工支架處理之。原發性膽腫瘤的一個實例是腺癌(其當被發現在總肝管之分歧處時也稱為klatskin腫瘤)。這些腫瘤也稱為膽癌，輸膽管癌或膽系之腺癌。侵犯膽道的良性腫瘤(如膽系之腺瘤)，及膽道之鱗狀細胞癌(罕見病例)及膽囊之腺癌，也可造成膽樹之壓縮且因此造成膽之阻塞。

膽樹之壓縮最常是因肝及胰腫瘤所致，其壓縮也因此阻塞管道。始自胰臟之腫瘤大部份由胰管之細胞所造成。此為高度致命型癌症(占有癌症死亡例的5%：每年在美國有26,000個新病例)，平均6個月存活期，而1年的存活率僅10%。當這些腫瘤位於胰臟之頭部時，其通常會造成膽阻塞，且此顯著地損及病人之生命品質。所有的胰臟腫瘤

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(⁵⁶)

型式雖通常為"胰臟癌"，但仍有組織學亞型存在：腺癌，腺鱗狀癌，囊腺癌及腺胞細胞癌。肝臟腫瘤，如上文所述，也可造成膽樹之壓縮，因此造成膽道之阻塞。

在本發明之具體實例中，膽人工支架先以下列方式之一嵌入膽通路中：自頂端經由腹壁及經由肝嵌入針(穿皮經肝之膽管血管X光攝影，或"PTC")；自底部經由自口，胃及十二指腸通過之內視鏡在膽管裝套管(內視鏡逆行的膽管血管X光攝影或"ERCP")；或在外科手術步驟中直接之切開。嵌入前之檢查，PTC，ERCP，或在手術時直接的目視大體上可用來決定人工支架嵌入之適當位置。引導線再經由傷處行進，在此之上則通過遞送導管令人工支架可以其壓縮型式嵌入。若診斷檢查是PTC時，引導線及遞送導管經由腹壁嵌入，而若原先的檢查是ERCP，則人工支架可經由安置。人工支架再於放射學的、內視鏡的或直接目視控制下定位，要特別小心精確地穿越膽管之最狹處。之後移去遞送導管留下人工支架充作骨架，其使膽管可保持開口。可進行進一步的膽管血管X光攝影，以證明人工支架被適當地安置。

在本發明又另一具體實例中，提出消除食道阻塞之方法，此方法包括將食道人工支架嵌入食道中。人工支架具有大體上管狀結構，結構體表面塗佈以(或另外使適於釋出)如上述之抗微小管作用物或組合物，如此可消除食道之阻塞。簡言之，食道是中空狀管，其可將食物及液體由口運送至胃。食道癌或由於始自鄰近器官而為癌症侵入(如胃或

五、發明說明(⁵⁷)

肺癌)可造成食物或唾液吞嚥之困難。在此實例中，嵌入前檢查，通常是吞食鋇或內視鏡，可用來決定嵌入人工支架之適當位置。再經由口定位導管或內視鏡，並將引導線經由阻塞處前進。遞送人工支架之導管在放射線或內視鏡控制下經引導線通過，且人工支架穿越食道最狹處精確穿越。嵌入後之檢查，通常是吞服鋇之X光照射，可用來證實確實之定位。

在本發明其他具體實例中，提出消除氣管／支氣管阻塞之方法，此方法包括將氣管／支氣管人工支架嵌入氣管或支氣管內，人工支架有大體上管狀結構，結構體塗佈以(或另外使適於釋出)抗微小管作用劑或組成物(如上述)如此可消除氣管／支氣管之阻塞。簡言之，氣管及支氣管為管道，其自口及鼻攜帶空氣之肺部。氣管因癌症，由於鄰近器官所致之癌症侵入(如肺癌)，或由於軟骨軟化所致之氣管或支氣管萎縮(軟骨環虛弱)造成呼吸困難。在本發明此具體實例內，嵌入前檢查，通常是內視鏡，大體上可用來決定人工支架嵌入的位置。導管或內視鏡再經口定位，且引導線穿越阻塞處前進。遞送導管再於引導線上通過以可嵌入壓縮之人工支架。人工支架在放射學的或內視鏡控制下安置，以可精確穿越最狹處。遞送導管再移去，留下人工支架本身為架構。嵌入後之檢查，通常採用支氣管鏡，可用來證實適合的位置。

在本發明另外的具體實例中，提出消除尿道阻塞之方法，此方法包括將尿道人工支架嵌入尿道內，人工支架有

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (⁵⁸)

大體上管狀結構，結構體表面塗佈以(或另外使適於釋出)如上述之抗-微小管作用劑或組成物，如此可消除尿道之阻塞。簡言之，尿道是管路可自膀胱經由陰莖引流。尿道內在的狹窄，因其經過前列腺而其肥厚之故，基本上每一位60歲以上的男子均會發生，並逐漸有排尿的困難。在此具體實例中，嵌入前之檢查，通常是內視鏡或尿道X光，以決定人工支架嵌入之適當位置，其位在尿道外括約肌上之較低端，且接近沖洗處而膀胱頸位於較上端。內視鏡或導管再穿過陰莖開口定位，且將引導線前進至膀胱。遞送導管再經引導線上方通過以可嵌入人工支架。再移去遞送導管，且人工支架擴大至定位。嵌入後之檢查，通常是內視鏡或逆行尿道攝影，可用來證實適合的位置。

在本發明另外的具體實例中，提出可消除血管阻塞之方法，此方法包括將血管人工支架嵌入血管之內，人工支架具大體上管狀結構，結構體表面塗佈以(或使適合以釋出)如上述之抗-微小管作用劑或組成物，如此可消除血管之阻塞。簡言之，人工支架可安置在一大列血管中，動脈及靜脈均可，以避免已失敗之血管造形術部位再復發之狹窄，以處理若以血管造形術治療可能會失敗之變窄，以及可治療手術後之變窄(如透析移植物狹窄)。適合的部位包括：腸骨，腎及冠狀動脈，上腔靜脈及在透析中之移植物。在一個具體實例內，先進行血管造形術以定位出安置人工支架之部位。此通常可由進行X光攝影時，經由嵌入動脈或靜脈之導管注射不透射線之對比劑而完成。導管再穿皮地

五、發明說明 (⁵⁹)

嵌入或由手術嵌入股動脈，肱動脈，股靜脈，或肱靜脈，再於螢光顯微鏡檢查之指導下經血管系統推進適合的血管。人工支架再穿越血管最狹處定位。嵌入後之血管攝影也可用來證實適合之定位。

用於研究狹窄之常用的動物模式是大鼠頸動脈模式，其中總頸動脈之內皮會因經頸動脈外引入之氣球導管在腔內通過而剝落(Clowses et al., Lab. Invest. 49(2) 208-215, 1983)。在2週時，頸動脈由於平滑肌細胞緊縮而顯著地變窄，但2至12週間血管內膜厚度加倍而導致腔管大小減少。

4. 發炎性腸疾

在本發明另外方面，可利用抗-微小管作用劑(及組成物)以治療或預防如發炎性腸疾一類之疾病。特言之，可在發炎部位投予抗微小管作用物(或可能的發炎位置)以治療疾病。適合的抗微小管作用物詳述於上，且包括有：紫杉烷(如 paclitaxel 及 docetaxel)，camptothecin，epothilones A 及 B，discodermolide，氧化氫(D₂O)，己二醇(2-甲基-2,4-戊二醇)，殺結核菌素(7-去吡腺苷)，LY290181(2-胺基-4-(3-吡啶基)-4H-萘(1,2-b)吡喃-3-心腓)，氟化鋁，乙二醇雙-(琥珀醯亞胺琥珀酸酯)，甘胺酸乙酯，單株抗-遺傳性型抗體，微小管組合促進性蛋白質(類-紫杉醇蛋白質，TALP)，由於缺氧狀況(190毫滲透壓／升)所誘生之細胞脹大，胰島素(100毫微莫耳／升)或穀胺醯胺(10毫莫耳／升)，動力蛋白結合，赤霉素，XCHO1(類激動素蛋白

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(⁶⁰)

質)，溶血磷脂酸，鋰離子，植物細胞壁組份(如聚-L-賴氨酸及伸展蛋白)，甘油緩衝溶液，Triton X-100微小管穩定緩衝溶液，微小管相關之蛋白質(如MAP2，MAP4， τ ，大 τ ，ensconsin，延長因子1- α -(EF-1 α)及E-MAP-115)，細胞實體(如組織蛋白H1，骨髓磷脂鹼性蛋白質及著絲點)，內源性微小管結構(如染色結構，孢塞及GTP帽)，穩定的小管唯一多肽(如STOP 145及STOP 220)及由有絲分裂力量來之張力，以及上述任一者任何的類似物及衍生物。此作用劑在某些具體實例中，可呈組成物型式配合聚合載劑投藥，或呈脂質體調和物型式，如上文及下文所詳述的。在某些本發明具體實例中，作用劑或組成物可口服，經由肛門，或由管周投藥(較好利用超音波，CT，螢光顯微鏡，MRI或內視鏡引導至疾病部位)。

研究IBD的理想模式應是自然發生的或可誘生之動物疾病，其基本上和人類疾病相同。近來，關於腸發炎僅有二個自然生成之模式(二者均在靈長類)，其中未見有原因之有機體。首先，在獅猴有一種與可鑑知之病原體無關之高度流行的自發性結腸炎，且如同在人類，疾病過程之活性會自主地盛衰(Madara et al., Gastroenterology, 88: 13-19, 1985)。另一自發性慢性結腸炎也見於幼年的恆河猴彌猴(Adler et al., Gastroenterology 98: A436, 1990)。

此中有許多實驗可誘生之結腸炎動物模式。在老鼠，大鼠，天竺鼠及兔子中，結腸炎可由口服硫酸化之多醣而誘生(角叉菜膠硫酸支鏈澱粉，硫酸葡聚糖)(Marcus and

五、發明說明(⁶¹)

Watt, Lancet 2 : 489-490, 1969), 或由肛門注入化學性刺激物(經稀釋的乙酸)(MacPherson and Pfeiffer, Digestion 17 : 135-150, 1978)及對二硝基氯苯之延緩型過敏反應(Glick and Falchuk, Gut, 22 : 120-125, 1981)或對三硝基苯磺酸之反應(Rabin and Rogers, Gastroenterology 75 : 29-33, 1978)。

5. 手術步驟

如上所示，抗-微小管作用劑及組成物可利用於各種手術步驟中。例如，在本發明一方面中，可利用抗-微小管作用劑或組合物(如呈噴霧劑或薄膜型式)塗佈或噴灑在欲移去腫瘤前之區域，以自惡性組織中分離出正常的周圍組織，及／或預防疾病散佈至周圍組織。在本發明的其他方面，抗微小管作用物或組成物(如呈噴霧劑型式)可經內視鏡步驟遞送以塗佈於腫瘤，或在欲求之所在抑制微小管之活性。又本發明另一方面，可在任何步驟中利用已塗佈有或可適於釋出本發明之抗微小管作用劑或組成物之外科用篩網。例如，在本發明一個具體實例中，於腹部癌症切除手術中(如在結腸切除術之後)可利用載滿有抗-微小管組成物之外科篩網，以對結構提供支持，且釋出抗-微小管因子。

在本發明進一步方面，提出可處理腫瘤切除部位之方法，此方法包括於切除之後在腫瘤切除之邊緣處投予上述之抗-微小管作用劑或組成物，如此可抑制癌症之局部復發及新血管在該位置之形成。於本發明一個具體實例中，抗-微小管組成物(或單獨的抗-微小管因子)可直接投至腫瘤切

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (62)

除位置(如經塗抹，擦拭或塗佈抗-微小管組成物或因子至腫瘤切除邊緣)。另外，抗微小管組成物或因子可在投藥之前納入已知之外科用糊劑內。在本發明特佳之具體實例中，可在惡性肝癌肝切除之後及神經外科手術之後施加抗-微小管組成物。

在本發明一方面，抗-微小管作用劑或組成物(如上所述)可投予至各種腫瘤之切除邊緣，包括如：乳房，結腸，腦及肝腫瘤。例如，在本發明一個具體實例中，抗-微小管作用劑或組成物可投予至切除後之神經腫瘤部位，如此抑制該部位新血管之形成。簡言之，腦係高度功能化座落，即，各特異的解剖區域對進行特異的功能是特異化的。因此，腦病理學之所在位置常較型式來得重要些。在關鍵性區域中相當小的傷處常更具損害力尤甚於在較不重要區域中之較大傷處。類似地，在腦表面之傷處可較易以外科方法切除，而相同的腫瘤但位在較深處者則否(吾等可能必須切過太多的生命結構體才到達該部位)。同時，即使是良性腫瘤基於以下許多原因仍是十分危險的：其在關鍵部位生長並造成顯著的損害：即使可由外科切除予以治療，此也可能是不可行的：及最後，若不予以檢查，其可造成顱內壓之增高。頭顱是一個不可擴大的密閉空間。因此若在某處有東西生長，則有某物將被壓縮在另一位置，造成頭顱內壓力增高或顱內壓增加。若此狀況不予以處理，生命結構會被壓縮而造成死亡。中樞神經系統(CNS)惡性發生率每100,000例中有8-16例。腦之原發性惡性之預後不樂

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (⁶³)

觀，平均存活少於一年，即使在外科切除後亦然。這些腫瘤，尤其是神經膠瘤，大部份是局部疾病，於外科除去後在疾病原先病灶的2公分內會重現。

利用此中所述之作用劑，組成物及方法可予以治療之腦腫瘤代表性實例包括神經膠質瘤(如補形的星細胞瘤，多形神經膠母細胞瘤，毛狀細胞之星形細胞瘤，寡樹突膠質瘤，室管膜瘤，黏液乳頭室管膜瘤，下室管膜瘤，脈絡叢乳頭狀瘤)，；神經元腫瘤(如神經母細胞瘤，神經節母細胞瘤，神經節細胞瘤及神經管胚細胞瘤)；松果體腫瘤(如松果體胚瘤及松果體細胞瘤)；腦膜腫瘤(如腦膜瘤，腦膜血管外皮細胞瘤，腦膜肉瘤)；神經鞘細胞之腫瘤(如神經鞘瘤(神經膜瘤)及神經纖維瘤)；淋巴瘤(如霍奇金氏及非霍奇金氏淋巴瘤(包括許多亞型，原發性及繼發性均有)；畸型腫瘤(如顱咽管瘤，表皮樣之囊腫，皮樣囊腫及膠質囊腫)；及轉移性腫瘤(其實質上可衍生自任何腫瘤，最常見的是來自肺，乳房，黑色素瘤，腎及胃腸道腫瘤)。

適合的抗微小管作用劑如上文所詳述的，且包括有如：紫杉烷(如 paclitaxel 及 docetaxel)，camptothecin，epothilones A及B，discodermolide，氧化氫(D₂O)，己二醇(2-甲基-2,4-戊二醇)，殺結核菌素(7-去吡腺苷)，LY290181(2-胺基-4-(3-吡啶基)-4H-萘(1,2-b)吡喃-3-心脛)，氟化鋁，乙二醇雙-(琥珀醯亞胺琥珀酸酯)，甘胺酸乙酯，單株抗-遺傳性型抗體，微小管組合促進性蛋白質(類紫杉醇蛋白質，TALP)，因缺氧(190毫滲透壓／升)狀

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (⁶⁴)

況所誘生之細胞脹大，胰島素(100毫微莫耳／升)或穀胺醯胺(10毫莫耳／升)，動力蛋白結合，赤霉素，XCHO1(類激動素蛋白質)，溶血磷脂酸，鋰離子，植物細胞壁組份(如聚-L-賴胺酸及伸展蛋白)，甘油緩衝溶液，Triton X-100微小管穩定緩衝溶液，微小管相關之蛋白質(如MAP2，MAP4， τ ，大 τ ，ensconsin，延長因子1- α -(EF-1 α)及E-MAP-115)，細胞實體(如組織蛋白H1，骨髓磷脂鹼性蛋白質及著絲點)，內源性微小管結構(如染色結構，孢塞及GTP帽)，穩定的小管唯一多肽(如STOP 145及STOP 220)及由有絲分裂力量來之張力，以及上述任一者任何的類似物及衍生物。此作用劑在某些具體實例中，可呈組成物型式配合聚合載劑遞送，或於脂質體調和物中，如上文及下文所詳述的。在某些具體實例中，抗-微小管作用劑為paclitaxel或epothilone之作用劑。

6. 外科黏連

在本發明其他方面，經由對病人投予抗-微小管作用劑可治療及／或預防外科黏連。簡言之，外科黏連的形成是一個複雜的過程，其中正常是分開的身體組織會一起生長。這些手術後的黏連，在進行重大婦科手術的病人中有60-90%的發生率，且為工業社會造成腸阻塞的最常見原因之一。外科上之創傷，由於組織乾燥，絕血，熱傷害，感染或外來實體之存在，長久以來即被視為是組織黏連形成的刺激物。這些黏連為手術治療失敗的主因，且為腸阻塞及不孕的肇因。其他處理黏連的併發症包括慢性骨盆疼痛，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(⁶⁵)

尿道阻塞及排泄官能障礙。

大體而言，黏連的形成是一種發炎反應，其中因子被釋出，增加血管之通透性及造成血纖維蛋白原流入及血纖維蛋白沉積。此沉積會形成一種基質，其橋接鄰接之組織。纖維母細胞累積，會黏附至基質，沉積膠原蛋白及誘導血管生成。若此事件之聯級可在手術後4至5天內預防，則可抑制黏連之形成。

因此，如上示本發明提出治療及／或預防外科黏連之方法。可利用各種動物模式，以評估特定的治療組成物或治療療程。簡言之，腹膜黏連發生在動物由於遭受嚴重傷害之結果，其通常涉及二個相鄰接之表面。傷害可能是機械性，由於絕血或外來物質引入所致。機械性傷害包括腸之支離破碎(Choate et al., Arch. Surg. 88 : 249-254, 1964)及自腸壁外層剝離或磨擦(Gustavsson et al., Acta Chir. Scand. 109 : 327-333, 1955)。主脈管分配至腸環上會誘生絕血(James et al., J. Path. Bact. 90 : 279-287, 1965)。可引入之外來物質包括滑石(Green et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 133 : 544-550, 1970)，紗布海棉(Lehman and Boys, Ann-Surg, 111 : 427-435, 1940)，毒性化學藥品(Chancy Arch. Surg. 60 : 1151-1153, 1950)，細菌(Moin et al., Am. J. Med. Sci. 250 : 675-679, 1965)及糞便(Jackson, Surgery 44 : 507-518, 1958)。

目前，典型的預防黏連模式包括兔子子宮角模式，其中涉及磨損兔子之子宮(Linsky et al., J. Reprod. Med. 32

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (⁶⁶)

(1)：17-20, 1987)，兔子之子宮角減除血液供應之修飾模式，其中涉及磨損及減少子宮之血液供應(Wiseman et al., J. Invest. Surg. 7：527-532, 1994)以及兔子盲腸側壁模式，其中涉及切除一片腹膜壁層加上磨損盲腸(Wiseman and Johns, Fertil. Steril. Suppl. 25S, 1993)。

可治療黏連之代表性抗-微小管作用劑如上文所詳述的，且包括：紫杉烷(如 paclitaxel 及 docetaxel)，camptothecin，epothilones A 及 B，discodermolide，氧化氫(D₂O)，己二醇(2-甲基-2,4-戊二醇)，殺結核菌素(7-去吡腺苷)，LY290181(2-胺基-4-(3-吡啶基)-4H-萘(1,2-b)吡喃-3-心腓)，氟化鋁，乙二醇雙(琥珀醯亞胺琥珀酸酯)，甘胺酸乙酯，單株抗-遺傳性型抗體，微小管組合促進性蛋白質(類紫杉醇蛋白質，TALP)，細胞因缺氧(190毫滲透壓／升)狀況而脹大，胰島素(100毫微莫耳／升)或穀胺醯胺(10毫莫耳／升)，動力蛋白結合，赤霉素，XCHO1(類激動素蛋白質)，溶血磷脂酸，鋰離子，植物細胞壁組份(如聚-L-賴胺酸及伸展蛋白)，甘油緩衝溶液，Triton X-100微小管穩定緩衝溶液，微小管相關之蛋白質(如MAP2，MAP4， τ ，大 τ ，ensconsin，延長因子1- α -(EF-1 α)及E-MAP-115)，細胞實體(如組織蛋白H1，骨髓磷脂鹼性蛋白質及著絲點)，內源的微小管結構(如染色結構，孢塞及GTP帽)，穩定的小管唯一多肽(如STOP 145及STOP 220)及由有絲分裂力量來之張力，以及上述任一者之任何類似物及衍生物。此作用劑在某些具體

五、發明說明(⁶⁷)

實例中可呈組成物型式配合聚合載劑一起遞送，或於脂質體組成物中，如上文及下文所詳述。在某些具體實例中，抗-微小管作用劑是paclitaxel或epothilone外之作用劑。

7. 關節炎

發炎性關節炎是開發國家中一個嚴重的健康問題，特別在上了年紀之個體有增加之情況。例如，一種發炎性關節炎-類風濕性關節炎(RA)是一種原因未知之多重系統慢性，會復發的發炎性疾病。雖然許多器官可能受害，RA基本上是嚴重的慢性滑膜炎，有時會導致受損關節之破壞及關節黏連(Robbins Pathological Basis of Disease, by R.S. Cotran, V. Kumar, and S.L. Robbins, W.B. Saunders Co., 1989)。就病理上而言，疾病的特徵在於滑膜顯著的變厚，其會形成絨毛狀突起延伸出關節空間，滑膜細胞內視多層化(滑膜細胞增殖)，滑膜為白血球(巨噬細胞，淋巴細胞，血漿細胞及淋巴樣濾泡；稱為"發炎性滑膜炎)所浸潤，及血纖維蛋白之沉積並在滑膜內有細胞壞死現象。由於此過程結果所形成之組織增為血管翳，且最後此血管翳生長至充填整個關節空間。血管翳經由血管生成過程發展新血管網路，此為滑膜炎發展所必要的。但血管翳組織細胞中水解酵素(基質金屬蛋白酶(如膠原蛋白酶，stromelysin))及發炎過程其他介體(如過氧化氫，過氧化物，溶酶體酵素及花生四烯酸代謝產物)之釋出可造成軟骨組織逐漸的破壞。血管翳侵入關節軟骨，造成軟骨組織的磨耗及成片段。最後軟骨下骨骼磨耗並有纖維關節黏連且

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(⁶⁸)

最後骨性關節黏連，指所涉及之關節而言。

大體上咸信但非總結性證明，RA是一種自體免疫疾病，且許多不同的關節性刺激可活化免疫學上可感受宿主之免疫反應。外源性感染劑(EB病毒，風疹病毒，巨細胞病毒，疱疹病毒，人類T細胞親淋巴性病毒，黴漿菌及其他)及內源性蛋白質(膠原蛋白，蛋白多醣，經改變的免疫球蛋白)已被視為肇因劑，其可啟動不適切之免疫反應。估不論誘因為何，自體免疫性在疾病之演進中扮演重要角色。特言之，相關的抗原為抗原-呈現細胞(滑液膜中之巨噬細胞或樹突細胞)所攝入，處理及呈現至T淋巴細胞。T細胞啟動細胞免疫反應，並刺激B淋巴細胞增殖及分化至漿細胞。最終的結果是產生過多不適當的免疫反應直接拮抗宿主組織(如抗體直接拮抗II型膠原蛋白，抗體直接拮抗自體IgG之Fc部份(稱為"類風濕因子"))。此進一步擴大免疫反應並加快軟骨組織之破壞。一旦此聯級被啟動，許多軟骨破壞之介體將對類風濕性關節炎之發展負責。

因此，在本發明的一方面，提出治療或預防發炎性關節炎(如類風濕性關節炎)之方法，此方法包括對病人投予治療有效劑量之抗微小管作用劑。在本發明較佳具體實例中，抗-微小管作用劑可經由關節內注射直接投予至關節，或呈外科糊劑，或以另外的路徑投藥，如全身性或口服。

適合的抗-微小管作用劑如上文所詳述，且包括如：紫杉烷(如paclitaxel及docetaxel)，camptothecin，epothilones A及B，discodermolide，氧化氫(D₂O)，己二醇(2-甲基-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(⁶⁹)

2,4-戊二醇)，殺結核菌素(7-去吡腺苷)，LY290181(2-胺基-4-(3-吡啶基)-4H-萘(1,2-b)吡喃-3-心腓)，氟化鋁，乙二醇雙(琥珀醯亞胺琥珀酸酯)，甘胺酸乙酯，單株抗-遺傳性型抗體，微小管組合促進性蛋白質(類紫杉醇蛋白質，TALP)，因缺氧(190毫滲透壓／升)所誘生之細胞脹大，胰島素(100毫微莫耳／升)或穀胺醯胺(10毫莫耳／升)，動力蛋白結合，赤霉素，XCHO1(類激動素蛋白質)，溶血磷脂酸，鋰離子，植物細胞壁組份(如聚-L-賴胺酸及伸展蛋白)，甘油緩衝物質，Triton X-100微小管穩定緩衝物質，微小管相關蛋白質(如MAP2，MAP4， τ ，大 τ ，ensconsin，延長因子1- α -(EF-1 α)及E-MAP-115)，細胞實體(如組織蛋白H1，骨髓磷脂鹼性蛋白質及著絲點)，內源的微小管結構(如染色結構，孢塞及GTP帽)，穩定的小管唯一多肽(如STOP 145及STOP 220)及由有絲分裂力量來之張力，以及上述任一者任何的類似物及衍生物。此作用劑在某些具體實例中可呈組成物配合聚合載體一起遞送，或於脂質體調和物中，如上文及下文所述的。在某些具體實例之內，抗-微小管作用劑是paclitaxel或epothilone以外之作用劑。

如本案內容所利用的，應了解抗-微小管作用劑及此中所述之組成物其有效的投藥可以許多方式評估，包括(1)經由預防或減輕與類風濕性關節炎有關之病理及／或臨床症狀；(2)反向調控白血球細胞之反應，其可啟動發炎聯級並造成滑膜炎，腫脹，疼痛及組織破壞；(3)抑制滑膜細胞"

五、發明說明(⁷⁰)

類似腫瘤"增殖作用，其可造成局部侵入性及破壞性血管翳組織之生成；(4)減少由白血球細胞，滑膜細胞，軟骨細胞及內皮細胞所產生之基質金屬蛋白酶之產製／活性，其可降解軟骨基質並造成關節軟骨不可逆之破壞；及(5)抑制血管之形成，其提供血管翳組織生長及發展所必要之營養。再者，抗-微小管作用劑在治療水平下對於正常的軟骨細胞應是無毒的。這些各方面由下文可更加明白。

A. 發炎反應

嗜中性球可在滑膜液中大量發現，但在滑膜本身則僅有少量。據估計，每天有10億以上的嗜中性球會進入中度發炎的類風濕膝蓋關節中(Hollingsworth et al., Yale J. Biol. Med. 39: 289-296, 1967)，且因為尚無可離開關節的路徑因此仍留在其中。這些細胞釋出反應性自由基及可降解軟骨組織之溶酶體酵素。其他的PMN產物如前列腺素及白三烯可擴大發炎反應，且將更多的發炎細胞補充至關節組織。

淋巴細胞，特別是T細胞，大量存在於有病的滑膜組織中。經活化的T細胞可產生各樣的淋巴激素，並與B細胞合作產生自體抗體。T細胞產物可造成巨噬細胞之活化，此細胞被視為在疾病之病理學上具重要角色。巨噬細胞可產生各種具破壞性的溶酶體酵素，前列腺素及單激素，且也可刺激血管生成。由巨噬細胞所分泌的較重要的單激素之一為IL-1。簡言之，已知IL-1可以：刺激滑膜細胞及滑膜纖維母細胞合成及釋出膠原蛋白酶，抑制軟骨細胞合成蛋

五、發明說明 (⁷¹)

白多糖，可活化破骨細胞，誘導滑膜血管內皮中之變化(刺激內皮產生血纖維蛋白溶酶原活化物及集落刺激因子，表現白血球黏附分子，促進凝血原活性)，及可充作淋巴細胞及嗜中性球之化學吸引物。

在一個具體實例中，白血球細胞反應之反向調控，或免疫反應之抑制，可由決定抗-血管生成因子或抗-血管生成組成物在經調理的焦磷酸鈣二水合物(CPPD)晶體或經調理的酵母聚糖刺激之嗜中性球上的反應而予以評估。此方法在以下的實例中有更詳盡的說明。

B. 滑液細胞增生

在RA發展之中，滑液的襯底細胞可為發炎產物或經免疫複合物之吞噬作用而活化。已鑑知許多滑液襯底細胞亞型，且一旦被刺激時其均可充份被活化並進行過度之增生及生長。由於滑液組織可組成血管翳，滑液細胞，血管，結締組織元件及發炎細胞數目可增加形成較其原先大小多100倍之團塊。在許多方面，類風濕性關節炎中滑液炎較像局部的贅瘤(Harris, N. Engl. J. Med. 322: 1277 - 1289, 1990)。事實上，發展出非勾引性生長表型特色之經培養的類風濕滑膜細胞，若給予充份的由血小板所衍生之生長因子(PDGF)則其通常與贅瘤細胞有關。(Lafyatis et al., J. Clin. Invest. 83: 1267-1276, 1989)。此外，滑膜細胞也可產生大量的膠原蛋白酶，基質溶解素，前列腺素及間白素-1。

滑膜結締組織基質細胞之類似腫瘤的增殖作用(滑膜細

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (⁷²)

胞，類纖維母細胞及新血管組織)，可產生具有許多局部化惡性特色之血管翳。支持此腫瘤類似性乃因以下許多的發現：血管翳可表現高水平的致癌蛋白質，如c-Myc及c-Fos，產生金屬蛋白酶以助周圍組織之侵入，表現不佳分化之間葉組織具特性之細胞骨骼標幟(如vimentin)；滑膜細胞於試管內可快速生長，無接觸抑制性，可形成病症，且可在無勾引性條件下於軟瓊脂上生長；且血管翳組織可誘導支持性血管分布之生長(即血管生成)。所有這些發現均推測為正常生長調控已喪失之組織。

在一個具體實例內，滑膜細胞增殖之抑制可利用如分析納入滑膜細胞內之³H-胸苷，或於試管內滑膜細胞之增殖予以決定。此方法詳述於以下實例中。

C. 基質金屬蛋白酶(MMP)

軟骨細胞外基質不能恢復之降解作用，咸信大部份是由於基質金屬蛋白酶在軟骨基質組份上之酵素作用所致。雖然其他許多的酵素似乎也涉及於RA之發展作用，但膠原蛋白酶(MMP-1)及基質溶解素(MMP-3)在疾病之進行中扮演重要的角色(Vincenti et al., Arthritis Rheum. 37 : 1115-1126, 1994)。這些酵素分別可降解II型膠原蛋白及蛋白多糖；為軟骨組織2個主要的細胞外組份。細胞動素如IL-1，上皮生長因子(RGF)，PDGF及腫瘤壞死因子(TNF)均為膠原酶及基質溶解素產製強力的刺激物。如上述，見於風濕性關節中的許多細胞型式(白血球，滑膜細胞，內皮細胞及軟骨細胞)均可合成及分泌MMP。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (⁷³)

於增殖中之類風濕滑膜組織，膠原酶及基質溶解素漸漸成為血管翳的主要基因產物，且可含有多至20%由滑膜纖維母細胞所產生之傳訊RNA (Brinkerhoff and Auble, Ann. N.Y. Acad. Sci. 580 : 355-374, 1990)。在有RA之患者軟骨中存在增高水平之膠原酶及基質溶解素，且關節中酵素活性水平和傷處之嚴重性極有關 (Martel-Pelletier et al., Arthritis Rheum. 36(Suppra) : 5191, 1993 ; Walakovitis et al., Arthritis Rheum, 35 : 35-42, 1992)。因為這些酵素為RA病理學之基礎，且造成不可逆之軟骨傷害，因此許多治療策略被建議要抑制其作用。

MMP活性許多自然存在之抑制劑已被鑑知，並命名為金屬蛋白酶之組織抑制劑，"TIMPs"。這些蛋白質抑制劑有許多可與活性MMPs結合形成1:1非共價複合物，其可使MMP酵素失去活性。TIMPs由軟骨細胞及滑膜纖維母細胞局部產生，且似乎負責結締組織降解之正常調控。對軟骨基質諸多之損害被視為是MMP及TIMP活性間局部之失衡所致。此可能是由於金屬蛋白酶產製增加，而TIMPs之產製保持在正常或固定的水平 (Vincenti et al., Arthritis Rheum. 37 : 1115-1126, 1994)。為克服此點，已設計療程以加入外源的TIMPs(如經化學修飾之四環素分子，膠原蛋白受質類似物)或正面調控TIMP之產製(類視黃醇，轉形生長因子 β (TGF β)，IL-6，IL-1，制瘤素 μ)，以努力恢復酵素平衡。然而，此途徑尚未轉變成有意義的臨床結果。

另一個途徑是抑制或反向調控MMPs之產製，以恢復活

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

表

訂

五、發明說明 (⁷⁴)

性之正常平衡。自然生成之化合物(TNF β ，全反式之視黃酸)及合成的化合物(類視黃醇，糖皮質激素)已證明經由遏止這些蛋白質之轉錄及合成可抑制MMP活性。阻斷MMP釋出之轉錄後方法預期也可造成MMP產量之減少，且可改進關節中MMP及TIMP活性間之平衡。

在一個具體實例中，MMPs產製或活性之減低可利用如分析IL-1誘導之膠原酶表現而決定。此方法之一在下文實例中有更詳盡之說明。

D. 血管生成

新血管廣闊網路之發展為類風濕性關節炎發展滑膜炎所必要的(Harris, N. Engl. J. Med. 322 : 1277 - 1289, 1990 : Folkman et al., 1989 : Sano et al., J. Cell Biol. 110 : 1417-1426, 1990)。許多局部介質，如PDGF，TGF- β 及纖維母細胞生長因子(FGF)似乎負責滑液中新血管生成之誘導及持久。由新的毛細管及滑膜結締組織組成之血管翳組織，可侵入及破壞關節軟骨。轉移的血管本身可產生及分泌增加水平之金屬蛋白酶，如膠原酶及基質溶解素，可降解軟骨基質(Case et al., J. Clin. Invest. 84 : 1731-1740, 1989)。新形成的血管也十分"易漏"因微血管內皮細胞間有間隙存在。此有助於血漿蛋白質齊壓至滑液內(其可增加腫漲)，加強WBC由循環移至血管翳組織(其可增加發炎)，並造成單核發炎細胞在血管週之累積。

總而言之，內皮組織在此疾病中扮演重要角色，即表現必要的表面受體以令發炎細胞可離開循環並進入發展中之

五、發明說明 (⁷⁵)

血管翳，分泌可降解軟骨基質之蛋白水解酶，及增殖形成血管翳組織所需之新血管(血管生成)以增加尺寸及侵入鄰近組織。

8. 狹窄

如上示，本發明提出治療或預防與身體通道阻塞有關的各種疾病之方法，包括如血管疾病，贅瘤阻塞，發炎疾病及感染性疾病。

例如，在本發明一方面是利用此中所述之各種抗微小管作用物及組成物，以治療造成血管系阻塞的血管疾病。此疾病具代表性之實例包括所有血管之粥樣硬化(包圍任何的動脈，靜脈或移植物)，包括下列但不限於此：冠狀動脈，大動脈，髂動脈，頸動脈，總股動脈，上股動脈，腦動脈，及在移植物接通位置處：血管痙攣(如冠狀血管痙攣及雷諾氏病)；狹窄(在先前介入位置處血管之阻塞，如氣球血管造形術，迴路手術，塑料嵌入及移植物嵌入)；發炎及自體免疫狀況(如暫時的動脈炎，血管炎)。

簡言之，在血管疾病時如動脈粥樣硬化，白血球，特別是單核細胞及T淋巴細胞會黏附至內皮細胞，尤其在動脈分支處。一旦黏附至內皮後，白血球會反應制化刺激物而移動穿越內皮細胞襯裏，並累積在動脈壁血管內膜，並加上平滑肌細胞。動脈粥樣硬化發展的此最初之傷害已知為"脂肪痕"。在脂肪痕內之單核細胞會分化成巨噬細胞，且巨噬細胞及平滑肌細胞逐漸地吸收脂質及脂蛋白而變成泡沫細胞。

五、發明說明 (⁷⁶)

當巨噬細胞累積時，壓在上面的內皮細胞會被機械地瓦解並為巨噬細胞釋出之經氧化之脂質，氧-衍生之自由基及蛋白酶所化學改變。泡沫細胞浸蝕穿過內皮表面會造成血管壁之微小潰瘍。可能生成血栓之下內皮組織(如膠原蛋白及其他蛋白質)與血流中組份之曝露，可造成血小板與已瓦解之內皮區域之黏附現象。血小板之黏附及其他事件會啟動生長因子竭力完成及釋出至此狀況，包括PDGF，血小板活化因子(PAF)，IL-1及IL-6。這些分泌因子被視為可刺激血管平滑肌細胞(VSMC)移動及增殖。

在正常的(無病的)血管壁中，VSMCs具有收縮性表型，及低的有絲分裂活性指數。然而，在由血小板，巨噬細胞及內皮細胞所釋出之細胞動素及生長因子影響下，VSMC可進行表型的改變，由成熟的會收縮細胞成為不成熟的分泌細胞。經轉形的VSMC-可在血管壁中層中增殖，移至血管內膜，在此中繼續增殖並產生大量細胞外基質。此轉形可在纖維化斑內誘生血管傷害。由分泌性VSMC所竭力生成之細胞外基質包括膠原蛋白，彈性蛋白，糖蛋白及糖胺基多糖，而此中膠原蛋白含有動脈粥樣硬化斑大多數的細胞外基質組份。彈性蛋白及糖胺基多糖可與脂蛋白結合，也可造成傷處之生長。纖維狀斑由不同厚度之稠密結締組織纖維罩所組成，其中含有平滑肌細胞及壓在上面之巨噬細胞，T細胞及細胞外物質。

除了PDGF，IL-1及IL-6之外，其他的有絲分裂因子且可為浸潤血管壁之細胞所產生者包括：TGF β ，FGF，

五、發明說明(⁷⁷)

thrombospondin，5羥色胺，凝血噁烷A₂，正腎上腺素及血管收縮素II。此造成更多細胞之補充，進一步細胞外基質之竭力完成及額外脂質之累積。此逐漸加大粥樣硬化之傷害直到其顯著地侵入血管腔為止。最初，阻塞之血液流過管腔造成距動脈粥樣硬化斑較遠處組織之絕血，此僅在當需有增加之流量時，後來傷口進一步阻礙動脈，靜止時即發生絕血。

在加大之動脈粥樣硬化斑內之巨噬細胞可釋出經氧化之脂質，自由基，彈性蛋白酶及膠原酶，造成細胞傷害及周圍組織之壞死。傷處發展成一個壞死的中心區，再轉形成為複雜的斑。複雜的斑是不穩定的傷處，其可裂開造成栓塞：局部的出血（次於供應斑之血管滋養管之瓦解，此因傷處快速之擴大造成管腔之阻塞）；或潰瘍及裂傷形成（此將產生血栓之壞死中心區暴露在血流下產生局部的血栓或遠端之栓塞）。即使上述之後發病無一者發生，所黏附之血栓也會組織起來納入斑內，由是加速其生長。再者，當血纖維蛋白原及凝血酶之局部濃度增加時，則可刺激中層及血管內膜內血管平滑肌細胞之增殖；此過程最後也會導致血管額外的狹窄。

正常動脈之血管內膜及中層係被氧化的，且由動脈腔或動脈外膜中之血管滋養管供應營養份。在動脈粥養硬化斑發展中，由血管外膜所生成之微血管會延伸至增厚之血管內膜及中層之內。此血管網路當斑更惡化時會加劇，而斑消退時則縮小。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (⁷⁸)

自這些微血管之出血會沉澱突然的膨脹，並且瓦解斑且加上動脈的分割，潰瘍或栓塞。也推測血漿蛋白質自這些微血管之滲漏可吸引發炎浸潤液進入此區，且這些發炎細胞可造成動脈粥樣硬化斑之快速生長及相關之併發症(經由局部的水腫及發炎)。

爲了治療血管疾病，如上文所述，抗微小管作用物(可加或不加有載劑)可遞送至身體通道之外端，或經由身體通道之動脈外膜至平滑肌細胞。在此方面特佳之抗微小管作用物可包括如：紫杉烷(如 paclitaxel 及 docetaxel)，camptothecin，epothilones A 及 B，discodermolide，氧化氫(D₂O)，己二醇(2-甲基-2,4-戊二醇)，殺結核菌素(7-去吡腺苷)，LY290181(2-胺基-4-(3-吡啶基)-4H-茶(1,2-b)吡喃-3-心腓)，氟化鋁，乙二醇雙(琥珀醯亞胺琥珀酸酯)，甘胺酸乙酯，單株抗-遺傳性型抗體，微小管組合促進性蛋白質(類紫杉醇蛋白質，TALP)，因缺氧(190毫滲透壓／升)所誘生之細胞脹大，胰島素(100毫微莫耳／升)或穀胺醯胺(10毫莫耳／升)，動力蛋白結合，赤霉素，XCHO1(類激動素蛋白質)，溶血磷脂酸，鋰離子，植物細胞壁組份(如聚-L-賴胺酸及伸展蛋白)，甘油緩衝溶液，Triton X-100 微小管穩定緩衝溶液，微小管有關之蛋白質(如 MAP2，MAP4， τ ，大 τ ，ensconsin，延長因子1- α -(EF-1 α)及 E-MAP-115)，細胞實體(如組織蛋白 H1，髓磷脂鹼性蛋白質及著絲點)，內源微小管結構(如染色結構，孢塞及 GTP 帽)，穩定的小管唯一多肽(如 STOP 145 及

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

衣

訂

五、發明說明(⁷⁹)

STOP 220)及由有絲分裂力量來之張力，以及上述任一者任何的類似物及衍生物。在某些具體實例內，抗微小管作用物是paclitaxel或epothilone以外之作用物。在某些具體實例內，此作用物可呈組成物型式配合聚合載劑遞送，或於脂質體調和物中，如上文及下文所詳述。在本發明的較佳具體實例內，作用物或組成物可由氣球導管，口服，血管週，塑料，全身性方式投藥。

在本發明其他方面內，可利用抗微小管治療劑或組成物(如此中所述)來治療贅瘤阻塞。簡言之，如此中所利用的，應了解"贅瘤阻塞"包括身體管道任何的贅瘤(良性或惡性)阻塞，而不論管道之位置或所存在之惡疾之組織學型式。具代表性之實例包括胃腸疾病(如口-咽癌腺癌，食道癌(鱗狀細胞，腺癌，淋巴瘤，黑色素瘤)，胃癌(腺癌，成形性胃蜂窠織炎，脂肪瘤，腺癌，淋巴瘤，輕癌)，結腸癌(腺癌)及肛門直腸癌)；膽道疾病(如贅瘤造成膽阻塞，如胰臟癌(導管腺癌，小島細胞腫瘤，膀胱腺癌)，膽管癌及肝細胞腫瘤)；肺疾病(如肺及／或氣管／支氣管通道之腫瘤(小細胞肺癌，非小細胞肺癌))；女性生殖系疾病(如輸卵管之惡疾，子宮癌，子宮頸癌，陰道癌)；男性生殖系疾病(如睪丸癌，附睪癌，輸精管腫瘤，前列腺癌，良性前列腺肥厚)；及泌尿道疾病(如腎細胞癌，腎盂腫瘤，尿液收集系之腫瘤如過度細胞癌，膀胱癌，及尿道阻塞(由於良性狹窄之故)或惡疾)。

至於實例，良性前列腺肥厚(BPH)是前列腺增大，特別

五、發明說明(⁸⁰)

是腺體之中央部份，其圍繞著尿道，因反應延長之雄性素刺激而發生。在50歲以上的男子其侵害達80%以上。此增大可造成尿部部份之壓縮，此經過前列腺的部份，造成膀胱外流管道之阻塞，即為產生尿流需有不正常高之膀胱壓力。1980年在美國有367,000例的前列腺經由尿道切除手術是為治療BPH而進行。其他的治療法包括：藥物，經由尿道的括約肌切斷術，經由尿道的雷射或微波，經由尿道的發熱，經由尿道的超音波，經由肛門的微波，經由肛門的發熱，經由肛門的超音波及外科切除。以上均有的缺點是中斷了括約肌機制而造成失禁及狹窄的形成。

為了治療贅瘤疾病，如上文所述，各種治療劑(加或不加聚合載劑)可遞送至身體通道之外部，或經由身體通道動脈外膜至平滑肌細胞。例如，在一個具體實例中，將針或導管在超音波下於經由肛門路徑(或採經會陰路徑)引入鄰接尿道之前列腺內，並由此遞送治療劑，較好在腺體的數個象限中，特別是在尿道四週。針或導管也可置於直接的觸診下或於內視鏡，螢光顯微鏡，CT或MRI引導下，並在固定間隔下投藥。另外，也可經由導管或套針安置藥丸。上述的步驟可單獨完成或配合置入尿道前列腺部份之塑料完成。為避免尿道器械應用或危及尿道，可使括約肌機制保持完整，避免失禁及似乎較無狹窄之虞。

在本發明另一方面，提出預防或治療發炎疾病之方法，其係會影響或造成身體通道的阻塞。發炎疾病包括可造成各種身體管道阻塞之急性及慢性發炎。具代表性之實例包

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (⁸¹)

括脈管炎(如巨細胞動脈炎(暫時性動脈炎，Takayasu's動脈炎)，多動脈炎結節，過敏性血管炎及肉芽腫病(Churg-Strauss疾病)，多血管炎重疊性症狀，過敏性脈管炎(Henoch-Schonlein紫斑病)，血清病，藥物-誘導的脈管炎，感染性脈管炎，贅瘤性脈管炎，與脈管炎有關之結締組織失調症，與脈管炎有關之補體系統先天性缺失症)，Wegeners'病及全身性硬化)；胃腸道疾病(如胰臟炎，Crohns'病，結腸潰瘍，潰瘍性直腸炎，原發性硬化膽管炎，任何原因之良性狹窄包括自發性病理(如膽道，食道，十二指腸，小腸或結腸之狹窄))；呼吸道疾病(如氣喘，過敏性肺炎，石棉沉著病，矽土沉著病，及其他型式之肺塵埃沉著病，慢性支氣管炎及慢性阻塞性呼吸道疾病)；鼻淚管疾病(如所有原因之狹窄，包括自發性病理)；及耳咽管疾病(如所有原因之狹窄，包括自發性病理)。

爲了治療發炎疾病，如上文所述，抗微小管作用物(可加或不加有載劑)，可遞送至身體通道之外部，或經由身體通道之動脈外膜至平滑肌細胞。

又在本發明另一方面，提出治療或預防與身體通道阻塞有關或爲病因之感染性疾病。簡言之，包括許多急性及慢性感染過程的感染性疾病可造成身體通道阻塞的包括如：男性生殖道之阻塞(如由於尿道炎，附睪炎，前列腺炎所致之狹窄)；女性生殖道之阻塞(如陰道炎，子宮頸炎，骨盆發炎疾病(如結核病，淋病雙球菌，衣原體，腸球菌及梅毒))；尿道阻塞(如膀胱炎，尿道炎)；呼吸道阻塞(如慢性

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (⁸²)

支氣管炎，結核病，其他黴菌感染(MAI等)，缺氧菌感染，真菌感染及寄生蟲感染)；及心血管阻塞(如黴菌性動脈瘤及感染性心內膜炎)。

爲了治療感染性疾病，如上文所述，各種治療劑(可加或不加有載劑)可遞送至身體通道之外部，或經由身體通道之動脈外層至平滑肌細胞。特佳之治療劑在此方面包括上文所討論之抗微小管劑。

9. 慢性發炎性肺疾

在本發明另外方面，可利用抗微小管作用物(及組成物)來治療或預防疾病，如慢性發炎性肺疾。特言之，抗-微小管作用物可投予至發炎位置(或可能的發炎部位)以治療疾病。適合的抗-微小管作用物如上文所詳述，且包括如：紫杉烷(如 paclitaxel 及 docetaxel)，camptothecin，epothilones A及B，discodermolide，氧化氘(D₂O)，己二醇(2-甲基-2,4-戊二醇)，殺結核菌素(7-去吡腺苷)，LY290181(2-胺基-4-(3-吡啶基)-4H-萘(1,2-b)吡喃-3-心腓)，氟化鋁，乙二醇雙(琥珀醯亞胺琥珀酸酯)，甘胺酸乙酯，單株抗-遺傳性型抗體，微小管組合促進性蛋白質(類-紫杉醇蛋白質，TALP)，細胞因低張(190毫滲透壓／升)所誘生之脹大，胰島素(100毫微莫耳／升)或穀胺醯胺(10毫莫耳／升)，動力蛋白結合，赤霉素，XCHO1(類激動素蛋白質)，溶血磷脂酸，鋰離子，植物細胞壁組份(如聚-L-賴胺酸及伸展蛋白)，甘油緩衝溶液，Triton X-100微小管穩定緩衝溶液，微小管相關蛋白質(如MAP2，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (⁸³)

MAP4, τ , 大 τ , ensconsin, 延長因子 1- α -(EF-1 α) 及 E-MAP-115), 細胞實體(如組織蛋白 H1, 骨髓磷脂鹼性蛋白質及著絲點), 內源性微小管結構(如染色結構, 孢塞及 GTP 帽), 穩定的小管唯一多肽(如 STOP 145 及 STOP 220)及來自有絲分裂力量之張力, 以及上述任一者任何的類似物及衍生物。在某些具體實例內, 此作用物可以組成物型式配合聚合載劑來遞送, 或呈脂質體調和物, 如上文及下文所詳述。在本發明較佳之具體實例中, 作用物或組成物可由鼻內, 全身或吸入方式或局部投藥(如在鼻息肉之例子中)。

10. 移植物排斥

上述的抗微小管作用物及組成物另外也可用於治療或預防移植物之排斥。簡言之, 慢性移植物／器官之排斥, 其二個主要的組織學表徵為發炎及動脈粥樣硬化。此新血管內膜之肥厚可在存活較久之腎臟同種移植物(Hume et al., J. Clin. Invest. 34 : 327, 1995 : Busch et al., Human Pathol. 2 : 253, 1971)以及心臟(Johnson et al., J. Heart Transplantation 8 : 151, 1985)及肺臟移植物(Burke et al., Lancet 1 : 517 : 1986)中觀察得到。心臟移植物對管腔變窄的此點極為敏感, 因為心肌對冠狀血流之依賴性所致。

已使用動物模式來研究慢性心臟同種移植物之排斥現象。Lewis-F 344 大鼠心臟移植模式可產生心臟同種移植物, 其有慢性排斥特有之動脈粥樣硬化傷害。此模式十分有用; 因為受者有 80% 以上可存活達 3 週以上, 其中 90%

五、發明說明 (⁸⁴)

會呈現冠脈動內膜傷害 (Adams et al., Transplantation 53 : 1115 - 1119, 1992)。除了顯示出高的罹病率及傷害之嚴重性外，傷害發展之發炎階段十分可被確認，因為此系統勿需免疫遏止。雖然單核之浸潤作用及壞死程度更為嚴重，在此模式中動脈之傷害和臨床上移植物動脈粥樣硬化十分相似。

11. 全身性紅斑狼瘡

全身性紅斑狼瘡 (SLE) 是一種病因未知之疾病，其特徵在於在許多不同器官系統中之發炎，並加上可產生與核，胞質及細胞膜抗原反應之抗體。SLE 是相當普遍的疾病，在某些人口中流行率可高至 1 / 2500 (Michet et al., Mayo Clin. Proc. 60 : 105, 1985)。SLE 主要是女性的疾病，在 10 至 64 歲間之女性機率為 1 / 700，且女性對男性之比例為 9 : 1。SLE 每年整體之罹病率，依人口之危險性而定，每年在每 100,000 人口中有約 6 至 35 個新病例。

SLE 似乎是多重因素的一種複雜的失調症，由遺傳，激素及環境因素間之交互作用所致，其一致作用造成輔助 T 及 B 細胞之活化，之後導致許多種自體抗體之分泌。SLE 常初歸類為自體免疫疾病，特徵為自體抗體數目增加，尤其是直接拮抗核抗原 (抗核抗體 - ANAs) 及磷脂者。抗磷脂抗體在 20-40% SLE 患者中出現，且頃發現可與許多的陰離子磷脂反應。

SLE 之外形學變化是極多變的，反映出臨床表徵之變異性及個別患者中疾病過程之變異性。最具特性之傷害來自

五、發明說明 (⁸⁵)

免疫複合物之沉積，且可見於血管，腎臟，結締組織及皮膚。涉及小動脈及微動脈的急性壞死型脈管炎可在任何組織中出現，然而以皮膚及肌肉最受侵害。在為小血管性脈管炎侵害之器官中，第一種傷害通常以粒性細胞浸潤及小動脈週水腫為典型。血管壁中類纖維素沉積也是動脈炎特有的。在慢性階段，血管在纖維化增厚下伴有管腔之變窄。在脾臟中，這些血管傷害涉及中央動脈，且特徵為顯著的血管周纖維化，產生所謂的蔥樣皮膚傷害。

可用於治療SLE之適合的抗-微小管作用物包括如：紫杉烷(如paclitaxel及docetaxel)，camptothecin，epothilones A及B，discodermolide，氧化氬(D₂O)，己二醇(2-甲基-2,4-戊二醇)，殺結核菌素(7-去吡腺苷)，LY290181(2-胺基-4-(3-吡啶基)-4H-茶(1,2-b)吡喃-3-心腓)，氟化鋁，乙二醇雙(琥珀醯亞胺琥珀酸酯)，甘胺酸乙酯，單株抗-遺傳性型抗體，微小管組合促進性蛋白質(類紫杉醇蛋白質，TALP)，因低張(190毫滲透壓／升)所誘生之細胞脹大，胰島素(100毫微莫耳／升)或穀胺醯胺(10毫莫耳／升)，動力蛋白結合，赤霉素，XCHO1(類激動素蛋白質)，溶血磷脂酸，鋰離子，植物細胞壁組份(如聚-L-賴胺酸及伸展蛋白)，甘油緩衝溶液，Triton X-100微小管穩定用緩衝溶液，微小管相關蛋白質(如MAP2，MAP4， τ ，大 τ ，ensconsin，延長因子1- α -(EF-1- α)及E-MAP-115)，細胞實體(如組織蛋白H1，骨髓磷脂鹼性蛋白質及著絲點)，內源性微小管結構(如染色結構，孢塞及GTP帽)，穩

五、發明說明(⁸⁶)

定的小管唯一多肽(如STOP 145及STOP 220)及來自有絲分裂力量之張力，以及上述任一者任何的類似物及衍生物。在某些具體實例中，此作用物可呈組成物配合聚合載劑一起遞送，或呈脂質體調和物，如上文及下文所詳述的。在本發明較佳之具體實例中，作用物或組成物可採鼻內，全身，吸入或局部方式投藥(如在鼻息肉例子中)。

調和物及投藥

如上示，本發明的抗微小管作用物可調和成各種型式(如微球，糊，薄膜，噴霧劑，油膏，乳液，凝膠等)。再者，本發明之組成物可調和以含有一種以上之抗微小管作用物，以含有各種額外化合物，以具有某些物理特性(如彈性，特定的熔點或特異之釋出率)。在本發明某些具體實例內，組成物可混合以達到欲求之作用(如可混合數種微球製劑，以達到快速及緩慢或一種以上抗微小管作用物之延長釋出)。

抗-微小管作用物可單獨投藥，或組合以藥學上或生理上可接受之載劑，賦形劑或稀釋劑。一般而言，此載劑應是在所應用之劑型及濃度下對受者無害的。通常此組成物之製備需混合治療劑及緩衝物質，抗氧化劑如抗壞血酸，低分子量(少於約10個殘基)多肽，蛋白質，胺基酸，碳水化合物包括葡萄糖，蔗糖或糊精，嵌合劑如EDTA，穀胱甘肽及其他穩定劑及賦形劑。中性緩衝之食鹽水，或食鹽水混合以非特異的血清白蛋白為示範之適合的稀釋劑。

如上示，此處提出之抗微小管作用物，組成物，或藥學

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (⁸⁷)

組成物可製備之再經各種不同的路徑投藥，包括如局部投予至發炎位置，口服，經直腸，顱內，鞘內，鼻內，眼眶內，靜脈內，皮下，腹膜內，肌內，舌下及囊內。其他代表性之投藥路徑包括直接投至(較好在超音波，CT，螢光顯微鏡，MRI或內視鏡引導下)疾病部位。

此中提出之治療劑，治療組成物及藥學組成物可置於容器內，配合包裝材料可提供關於此物質用法之指示。一般而言，此種指示包括說明試劑濃度之有形表示，以及在某些具體實例中為構成抗微小管作用物，抗微小管組成物或藥學組成物所必要之賦形劑組份或稀釋劑(如水，食鹽水或PBS)之相對含量。

以下實例經由說明提出，且不予以限制。

實例

如上文所討論的，慢性發炎是一種過程，特徵在於組織為白血球細胞(巨噬細胞，淋巴細胞，嗜中性球及血漿細胞)所浸潤，組織為發炎細胞及細胞產物(反應性氧，組織降解酵素，如基質金屬蛋白酶)所破壞，及以結締組織置換重覆企圖修補(血管生成及纖維化)。

為了評估抗微小管作用物影響慢性發炎之能力，需有以下病理／生理終點：(1)白血球細胞反應之抑制作用(巨噬細胞，嗜中性球及T細胞)其可啟動發炎聯級；(2)間葉細胞(纖維母細胞，滑膜細胞等)過度增殖之抑制作用，其可導致纖維化之發展及失去器官功能)；(3)基質金屬蛋白酶產生／活性之抑制作用，其可造成組織損傷；(4)血管生成

五、發明說明 (⁸⁸)

之瓦解，其可加強發炎反應且提供纖維組織生長及發展所必要之代謝支持；及(5)以上均需達成，而實質上對正常的間葉細胞無毒性或不會破壞基質組份正常的合成(如膠原蛋白)。

如下文所詳述的，可穩定微小管之作用物如paclitaxel，其活性已在許多組織及發炎疾病狀態下受檢。這些作用物說明改變上述許多疾病變數之能力。

實例 1

paclitaxel在嗜中性球活性上之作用

此實例說明paclitaxel在嗜中性球經過經調理的CPPD晶體或經調理之酵母聚糖刺激反應上之作用。如下文實驗所示，paclitaxel是一種由微粒誘導之嗜中性球活化作用的強抑制劑，其由化學發光，過氧化物陰離子產製及反應血漿調理的微晶體或酵母聚糖之去粒作用而測知。

A材料及方法

Hanks經緩衝的食鹽水溶液(HBSS)pH 7.4於本研究前後中使用。所有的化學藥品均購自Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)除非另有所示。所有實驗均在37°C下進行，除非另有所示。

1 晶體之製備及特性化

製備CPPD(三斜晶系)晶體。晶體的大小分佈為約33%少於10微米，58%在10及20微米之間，及9%大於20微米。在上述條件下製備之晶體為無熱原的，且在無菌無熱原條件下所產生之晶體，和在正常，非無菌實驗室條件下製備

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(⁸⁹)

之晶體，在嗜中性球反應上有相同的程度。

2. 晶體及酵母聚糖之調理作用

在 paclitaxel 存在下研究嗜中性球對晶體或酵母聚糖反應的所有實驗均利用血漿調理之 CPPD 或酵母多糖來進行。晶體或酵母聚糖之調理作用以 50% 肝素化血漿在 75 毫克 CPPD 或 12 毫克酵母多糖(每毫升 50% 血漿下)濃度下進行。晶體或酵母聚糖與血漿在 37°C 下培育 30 分鐘，再以過量的 HBSS 洗滌。

3. 嗜中性球之製備

嗜中性球由新收集之人類經檸檬酸鹽化全血所製備。簡言之，400 毫升血液與 80 毫升 4% 右旋糖 T500(Pharmacia LKB, Biotechnology AB Uppsala, Sweden) 混合於 HBSS 中，再令其沉降 1 小時。血漿不斷收集，且取 5 毫升加至 5 毫升 Ficoll Paque 上(Pharmacia)再置 15 毫升聚丙烯試管內(Coming, NY)。以 500 g 離心 30 分鐘後，嗜中性球團塊以 20 秒之低張震盪洗去紅血球。嗜中性球再懸浮於 HBSS 中，保持在冰上並於 3 小時內應用於實驗中。嗜中性球之存活力及純度始終大於 90%。

4. 嗜中性球與抗-微小管作用物之培育

(a) paclitaxel

12 mM 於二甲亞砜(DMSO)之 paclitaxel 貯液在各實驗中新鮮製備。此貯液稀釋於 DMSO 中，以得到在 1 至 10 mM 濃度範圍下之 paclitaxel 溶液。這些稀的 paclitaxel 溶液等量加至嗜中性球，每毫升 5,000,000 個細胞，在緩和渦旋下達

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (⁹⁰)

到0-50 μ M濃度，且有0.5%之DMSO終濃度。細胞在33°C下培育20分鐘，再於37°C下10分鐘，再加至晶體或酵母聚糖。

(b) 氟化鋁

新鮮製備在HBSS中之1M氟化鋁(AlF_3)貯液。此貯液稀釋於HBSS中以生成 AlF_3 於5-100 mM濃度範圍之溶液。這些稀的 AlF_3 溶液等量(50微升)加至嗜中性球，每毫升5,000,000細胞，並在37°C下培育15分鐘。加入Luminol (1 μ M)，之後加20微升經調理的酵母聚糖(終濃度=1毫克/毫升)以活化細胞。化學發光追蹤20分鐘。

(c) 甘胺酸乙酯

新鮮製備在HBSS中的10 mM甘胺酸乙酯貯液。此貯液稀釋於HBSS中，以生成濃度範圍在0.5至10 mM之甘胺酸乙酯溶液。這些經稀釋之甘胺酸乙酯溶液取等量(50微升)加至嗜中性球，每毫升5,000,000細胞，再於37°C下培育15分鐘。加入Luminol (1 μ M)再加20微升經調理的酵母聚糖(終濃度=1毫克/毫升)以活化細胞。以化學發光追蹤20分鐘。

(d) LY290181

新鮮製備LY290181在100 μ M HBSS之貯液。此貯液稀釋於HBSS中以生成0.5 - 50 μ M濃度範圍之LY290181溶液。這些稀的LY290181溶液取等量(50微升)加至嗜中性球中，每毫升5,000,000細胞，並在37°C下培育15分鐘。加入Luminol (1 μ M)再加20微升經調理的酵母聚糖(終濃

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (⁹¹)

度=1毫克／毫升)以活化細胞。以化學發光追蹤20分鐘。

5. 化學發光分析

所有化學發光研究均在5,000,000細胞／毫升於HBSS有CPPD(50毫克／毫升)之細胞濃度下進行。在所有實驗中10.5毫升細胞加至25毫克CPPD或0.5毫克酵母聚糖中，再於1.5毫升加蓋之Eppendorf試管內。加入於HBSS中之溶液於25% DMSO之10微升luminol，使終濃度達1 μ M，樣品再混合以經由晶體或酵母聚糖啟動嗜中性球之活化作用。化學發光利用LKB Luminometer(1250機型)在37°C下追蹤，於偵測前要旋即震盪以可再懸浮晶體或酵母聚糖。對照試管中含有細胞，藥物及luminol(不含有晶體)。

6. 過氧化物陰離子產生

利用細胞色素C分析之過氧化物歧化酶可抑制之還原作用偵測過氧化物陰離子濃度。簡言之，25毫克晶體或0.5毫克酵母聚糖置於1.5毫升加蓋之Eppendorf管內，再加溫至37°C。0.5毫升的細胞與高鐵細胞色素C(終濃度1.2毫克／毫升)在37°C下一起加入，再經由震盪已加蓋之管子使細胞活化。在適時下試管以10,000g離心10秒，且收集上清液偵測550毫微米下之吸光度。對照組在相同條件下構成，同時包括有每毫升600單位的過氧化物歧化酶。

7. 嗜中性球去粒作用分析

含有25毫克CPPD或1毫克酵母聚糖之1.5毫升Eppendorf管預熱至37°C。加入37°C下之0.5毫升細胞，再劇烈震盪以啟動反應。在適合時間下管子以10,000 g離心10秒，再

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (⁹²)

取0.4毫升上清液貯於-20℃下以進行下一分析。

溶菌酶利用溶壁微球菌(*Micrococcs lysodeikticus*)懸液在450毫微米波長下吸光度之減少來測知。簡言之，溶壁微球菌以0.1毫克／毫升懸浮在65 mM磷酸鉀緩衝溶液，pH 6.2，再經稀釋使450毫微米下之吸光度調為0.7單位。晶體(或酵母聚糖)及細胞上清液(100微升)加至2.5毫升微球菌懸液中，且追蹤吸光度之減少。製備在0至2000單位／毫升範圍中之溶菌酶標準品(雞蛋白)，並劃出在450毫微米吸光度下溶菌酶濃度對下降速率之作圖。

由450毫微米下吸光度之增加測知髓過氧化物酶(MPO)活性，其伴有鄰聯茴香胺之氧化。7.8毫克的鄰聯茴香胺溶於100毫升0.1M檸檬酸緩衝溶液，pH 5.5，3.2 mM並音波震盪之。在1毫升石英管中加入0.89毫升鄰聯茴香胺溶液，再加50微升的1% Triton X100，10微升0.05%過氧化氫於水之溶液，再加50微升晶體-細胞上清液。MPO活性自每分鐘吸光度(450毫微米)之變化上決定， δA_{450} ，利用以下方程式：

鄰聯茴香胺氧化作用(毫微莫耳／分)

$$= 50 \times \delta A_{450}$$

8. 嗜中性球之存活力

為決定抗-微小管作用物在嗜中性球存活力上之作用，測知胞質標幟酵素-乳糖去氫酶(LDH)之釋出。對照組含有細胞及來自去粒化作用實驗之藥物(無晶體)，也進行LDH之分析。

五、發明說明 (⁹³)

B. 結果

在所有實驗中以 Students' t- 試驗決定統計學意義，且 $p < 0.05$ 時為有意義。當示出誤差值時，此說明在所給的 n 數目下，平均值的一個標準偏差。

1. 嗜中性球存活力

(a) paclitaxel

嗜中性球以 $46 \mu\text{M}$ 之 paclitaxel 在 37°C 下處理 1 小時，結果 LDH 之釋出並無超出對照組之增加水平之顯示 (始終少於總數的 5%)，顯示 paclitaxel 並未造成細胞之死亡。

(b) 氟化鋁

嗜中性球以 5-100 mM 濃度的氟化鋁在 37°C 下處理 1 小時，結果未示出有較對照組增加之 LDH 釋出，顯示氟化鋁不會造成細胞死亡。

(c) 甘胺酸乙酯

嗜中性球以 0.5 - 20 mM 濃度的甘胺酸乙酯在 37°C 下處理 1 小時，結果未示出有較對照組增加之 LDH 釋出，顯示甘胺酸乙酯不會造成細胞的死亡。

2. 化學發光

(a) paclitaxel

$28 \mu\text{M}$ 的 paclitaxel 可對經血漿調理的 CPPD 及血漿調理的酵母聚糖-誘導之嗜中性球化學發光產生強的抑制作用，分別如圖 1A，1B 及 2A 所示。化學發光之抑制高峰於 CPPD 及酵母聚糖分別為 $52\% (+/- 12\%)$ 及 $45\% (+/- 11\%)$ 。血漿調理的 CPPD 及血漿調理的酵母聚糖所誘生之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (94)

化學發光為 $28 \mu \text{M}$ paclitaxel 之抑制作用在由 3 至 16 分鐘的所有時間下均是顯著的 (圖 1 及 4A)。圖 1A 及 1B 示出 paclitaxel 抑制血漿調理的 CPPD-誘生之嗜中性球化學發光之濃度依賴性。在所有實驗中，對照組樣品均未產生大於 5mV 之化學發光值，且在研究中加入所有使用濃度下之 paclitaxel 對於對照組之化學發光值也無作用。

(b) 氟化鋁

5-100 mM 濃度下之氟化鋁如圖 1C 所示，可對經血漿調理的酵母聚糖誘生之嗜中性球化學發光產生強烈的抑制作用。此圖示出 AlF_3 抑制血漿調理之酵母聚糖-誘生之嗜中性球化學發光之濃度依賴性。添加在此研究中所使用的所有濃度之 AlF_3 ，對於對照組之化學發光值並無作用。

(c) 甘胺酸乙酯

在 0.5 - 20 mM 濃度之甘胺酸乙酯，可對血漿調理的酵母聚糖-誘生之嗜中性球化學發光產生強烈的抑制作用，如圖 1D 所示。此圖示出甘胺酸乙酯抑制血漿調理的酵母聚糖-誘生之嗜中性球化學發光之濃度依賴性。添加在此研究所有使用濃度下之甘胺酸乙酯，對於對照組之化學發光值並無作用。

(d) LY 290181

0.5-50 μM 濃度下之 LY 290181 可對血漿調理的酵母聚糖-誘生之嗜中性球化學發光產生強的抑制作用，如圖 1E 所示。此圖示出 LY 290181 抑制由血漿調理的酵母聚糖-誘生的嗜中性球化學發光之濃度依賴性。添加在此研究所有

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (⁹⁵)

使用濃度下之LY 290181，對於對照組之化學發光值並無作用。

3. 過氧化物的產生

圖3示出血漿調理的CPPD-晶體誘生之過氧化物陰離子產製之時間曲線，可由細胞色素C之過氧化物歧化酶(SOD)可抑制之還原作用中測知。以28 μ M之paclitaxel處理細胞，可造成在所有時間下產生之過氧化物減少。如圖3A所示，此減少在所示的所有時間下均是有意義的。此抑制作用之濃度依賴性示於圖3B。經調理的酵母聚糖對過氧化物陰離子產製之刺激作用(圖4B)，和CPPD-誘生之活化作用有相似的時間曲線。28 μ M paclitaxel對由酵母聚糖誘生之過氧化物陰離子產製之抑制作用，較CPPD活化之抑制較不劇烈，但在圖4B所示之所有時間下均是顯著的。

4. 嗜中性球之去粒作用

嗜中性球之去粒作用追踪，係利用由血漿調理的CPPD晶體所誘生之髓過氧化物酶及溶菌酶之釋出，或由血漿調理的酵母聚糖所誘生之髓過氧化物酶之釋出來進行。已示出當以塗佈血漿之CPPD晶體刺激嗜中性球，且勿需加細胞鬆弛素B至細胞時，此二酵素可以充份量被釋出至細胞外之介質中。圖5及2分別示出，由塗佈血漿之CPPD所刺激之嗜中性球釋出的MPO及溶菌酶之時間曲線。圖5A示出在晶體-細胞培育的前9分鐘中，paclitaxel可抑制由血漿調理的CPPD所活化之嗜中性球對髓過氧化物酶之釋出。如圖5A所示，paclitaxel於所有時間均明顯抑制由CPPD所誘發之髓

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

象

五、發明說明 (96)

過氧化物酶釋出。圖 5B 示出 paclitaxel 抑制 CPPD-誘生之髓過氧化物酶釋出之濃度依賴性。

28 μ M 下之 paclitaxel 可減低溶菌酶之釋出，且此去粒作用之抑制在圖 2 所示的所有時間下均是顯著的。

當嗜中性球以經調理的酵母聚糖刺激時，僅可釋出少量的 MPO 及溶菌酶。估不論這些低水平，在 28 μ M paclitaxel 存在下經過 9 分鐘培育後，MPO 之釋出有可能追蹤到 50% 抑制作用，此是統計上有意義的 ($p < 0.05$) (數據未示出)。

C. 討論

這些實驗證明 paclitaxel 是晶體-誘生之嗜中性球活化作用中一個強的抑制劑。此外，在嗜中性球對另一型微粒活化劑反應，經調理的酵母聚糖，之相似抑制水平之示出可證知 paclitaxel 之抑制活性並不限於嗜中性球對晶體之反應。也示出氟化鋁及甘胺酸乙酯為酵母聚糖-誘生之嗜中性球活化作用中一個強的抑制劑，且不致造成細胞之死亡。

實例 2

T 細胞對抗原性刺激物之反應

為了決定 paclitaxel 是否可影響 T 細胞因反應刺激物之活化作用，於是 TR1T 細胞純系以骨髓鹼性蛋白質肽，GP68-88，或外源凝集素，conA，刺激 48 小時，並有漸增濃度之 paclitaxel 於膠團調和物之存在或不存在。於實驗之初或細胞以肽或 conA 刺激後 24 小時時加入 paclitaxel。經氟化之胸苷納入狀況以 T 細胞反應肽或 conA 刺激而增殖之測度

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

章

五、發明說明(97)

來決定。

結果證明，T細胞刺激作用因反應肽GP 68-88及conA而增加。於對照的聚合膠團存在下，T細胞反應二種激動劑後之刺激作用並未改變。然而，以paclitaxel膠團處理，不論在實驗之初或刺激後24小時，均以濃度依賴方式降低T細胞的反應，在二種情況下，T細胞之增殖可為 $0.02 \mu M$ paclitaxel所完全抑制(圖79)。

這些數據顯示，paclitaxel是T細胞反應抗原-誘生之刺激作用後增殖之強力抑制劑。

實例3

paclitaxel在試管內滑膜細胞增殖上之作用

進行二個實驗以評估不同濃度的paclitaxel對經氘化之胸苷納入作用(偵測滑膜細胞DNA之合成)及試管內細胞增殖作用上之作用。

A材料及方法

1. 3H -胸苷納入滑膜細胞

滑膜細胞與不同濃度的paclitaxel($10^{-5}M$ ， $10^{-6}M$ ， $10^{-7}M$ ，及 $10^{-8}M$)在試管內連續培育6或24小時。此時，加 1×10^{-6} cpm的 3H -胸苷至細胞培養基中，再於 $37^{\circ}C$ 下培育2小時。細胞經由細胞回收器，經濾器洗滌，濾紙切割，再決定留在濾紙上放射活性之含量。一旦確定納入細胞中胸苷之含量，此可用來決定細胞增殖之速率。此實驗重覆三次再收集數據。

2. 滑膜細胞之增殖作用

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

泉

五、發明說明⁽⁹⁸⁾

牛滑膜纖維母細胞在不同濃度的(10^{-5}M , 10^{-6}M , 10^{-7}M , 及 10^{-8}M)paclitaxel存在或不存在下生長24小時。於此時期末了,由錐藍染色之染料排擠計數可目測決定存活的滑膜細胞總數。此實驗進行4次並收集數據。

B. 結果

1. ^3H -胸苷納入滑膜細胞

此研究證明,paclitaxel在低至 10^{-8}M 濃度下之低濃度時可抑制 ^3H -胸苷納入滑膜細胞內(及延長DNA之合成)。於6小時時,由較高及較低paclitaxel濃度所產生之抑制作用程度間並無顯著的差異(圖8)。然而,24小時時在較低的藥物濃度時(10^{-8}M)某些作用會喪失,但實質上仍較在對照組動物中所見的還低。

2. 滑膜細胞之增殖作用

此研究證明,paclitaxel以一種濃度依賴方式對增殖中之滑膜纖維母細胞具胞毒性。低至 10^{-7}M 濃度之paclitaxel可抑制滑膜細胞之增殖(圖9)。在較高的paclitaxel濃度下(10^{-6}M 及 10^{-5}M),藥物對試管內之滑膜纖維母細胞具有毒性。

C. 討論

上述研究說明,paclitaxel在相當低的濃度下可於試管內抑制由滑膜所衍生之纖維母細胞之增殖。因此,既已知結締組織在慢性發炎發展中之角色,及在發炎疾病致病過程中彼之行爲,因此阻斷細胞之增殖可有益地影響疾病於活體內之結果。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

章

五、發明說明 (⁹⁹)

實例 4

paclitaxel在試管內人類上皮角質細胞活性上之特性

此例中檢視paclitaxel對活躍地增殖之正常人類角質細胞及HaCAT角質細胞(自主不朽地人類上皮角質細胞)之時間及劑量-依賴性作用。

A. 材料及方法

評估paclitaxel對角質細胞之作用係決定細胞數及為細胞所納入之³H-胸苷。於胸苷納入時，以低密度塗佈之角質細胞(於DMEM中並添加有10%FCS，穀胺醯胺，抗生素)以 $0-10^{-4}$ M濃度之paclitaxel於對數生長期時處理6小時。³H-胸苷加至細胞中，並再培育6小時。細胞回收再決定放射活性。為決定細胞總數，角質細胞如所述地塗佈，並在paclitaxel有或無之下培育4天。於培育後，收集細胞再以錐藍排阻分析法計數。

B. 結果

決定存活細胞呈未處理對照組百分率之數目。在 10^{-9} M之paclitaxel濃度下，細胞存活力大於未處理組之100%，而 10^{-8} M之存活力略少於87%(圖7)。在 10^{-7} M以上之paclitaxel濃度下，細胞存活力有顯著的下降。

C. 討論

paclitaxel在低至 10^{-7} M濃度時對人類角質細胞極具胞毒性。於牛皮癬時，角質細胞是不正常增殖的細胞，且因paclitaxel可穩定微小管，因此其在此絲狀分裂具活性系統上之作用是可預期的。在另外的研究中，頃發現paclitaxel

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

象

五、發明說明 (100)

對增殖中之滑膜細胞具胞毒性，但對未增殖之軟骨細胞則無作用。因此，paclitaxel可作用在牛皮癬傷處之過度增殖細胞上，但對正常的上皮細胞是無毒的。

實例5

paclitaxel對星形細胞增殖上之作用

已確定在MS傷處中纖維狀星形細胞的數目有所增加，其被視為涉及於髓脂質之破壞，此乃因細胞動素及基質金屬蛋白酶產生之故 (Mastronardi, et al., J. Neurosci. Res. 36 : 315-324, 1993 ; Chandler et al., J. Neuroimmunol. 72 : 155-161, 1997)。纖維狀星形細胞有高水平的神經膠質微纖維狀酸性蛋白質(GFAP)，其可充作纖維狀星形細胞增殖之生化標幟。paclitaxel膠團抑制星形細胞增殖之能力在去髓脂質疾病之導入外來基因在老鼠模式中評估 (Mastronardi et al., J. Neurosci. Res. 36 : 315-324, 1993)。

A. 材料及方法

於疾病臨床上開始之際即進行paclitaxel連續皮下投藥之療程(2毫克／公斤：3x每週，共10次注射)(約4個月大)。在接受膠團paclitaxel的5隻動物中，2隻充作對照組：1隻為未處理之正常組且另一為未處理之導入外來基因之同窩。僅一個導入外來基因之老鼠充作對照組，因疾病過程已在實驗室中確定。4個月的老鼠注射以膠團paclitaxel，此在MS之神經病理學最初徵兆已證明之後注射。

於第10次注射後3天，終止實驗研究再處理腦組織以作

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

象

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (101)

組織學分析。於光學顯微鏡檢時，組織以甲醛固定再包埋在石蠟中。切片以抗-GFAP抗體(DACO)染色，洗滌再與共軛有HPP之第二抗體反應。切片以HPP染色再以蘇木素對染。於電子鏡檢時，組織固定在2.5%戊二醛及磷酸鹽緩衝之食鹽水中(pH 7.2)，再以1%肆氧化鐵後固定。製備切片，再以JEOL 1200 EXII透射EM觀察。

B 結果

於神經學病理進行時，GFAP水平在導入外來基因老鼠腦中有所提高；此被視為纖維狀星形細胞含量增加之反映。相反的，以paclitaxel處理的導入外來基因老鼠有近正常的GFAP水平(表1)。這些數據建議paclitaxel可抑制活體內星形細胞之增殖，其可因此預防MS中之去髓鞘作用。

表 1
腦勻漿中 GFAP 之定量

組別	GFAP(毫微克)	GFAP(毫微克／微克)
正常老鼠	0.64±0.02	12.8
導入外來基因之老鼠	1.80+/-0.10	36.0
導入外來基因之老鼠 以paclitaxel處理	0.69+/-0.05	13.8

以組織學評估進一步分析在腦組織中之GFAP。圖78說明來自正常老鼠，正常導入外來基因老鼠未以paclitaxel處理及以paclitaxel處理之腦切片。

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (102)

雖然正常的導入外來基因老鼠有較多數的纖維狀星形細胞，星形細胞之外形與在正常動物中所見的相似(厚的星形過程自細胞體伸展出來)。然而，在導入外來基因的老鼠中以paclitaxel處理則纖維狀星形細胞之數目會顯著地減少。再者，可觀察到二個外形上的變化：纖維狀星形細胞之細胞體似乎會變圓(其已示出可造成培養之細胞預期死亡)，且細胞突起在細胞體四週變得極薄。

再者利用電子顯微鏡檢之超結構分析已示出，導入外來基因老鼠之星形細胞特徵在於源自細胞體被濃厚染色的星狀突起。這些寬的突起含有已充份組織的細絲排列，顯示出是一個有活力且被活化的細胞。然而，導入外來基因動物且經paclitaxel處理過之星形細胞之外形特徵在於細胞變圓，有薄的絲狀突起及細胞內絲狀蛋白質之耗盡及瓦解(圖80)。

C. 結論

這些數據資料說明paclitaxel可造成活體內變化成纖維狀星形細胞，是MS傷處中最具增殖力之細胞型式。paclitaxel似乎也可抑制星狀突起的功能，且因此可改變涉及於髓脂質破壞之細胞事件中。

實例6

paclitaxel對內皮細胞增殖上之作用

爲了決定paclitaxel是否可抑制內皮細胞之增殖，EOMA細胞(一種內皮細胞株)以低密度塗佈，並在濃度漸增的paclitaxel存在及不存在下培育48小時。於培育後，利用

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明(103)

錐藍排阻分析法決定存活的細胞數目。結果(示於圖9)顯示，在 10^{-8} M濃度下之paclitaxel可抑制內皮細胞之增殖達50%以上，而 10^{-7} M以上的濃度則可完全抑制細胞的增殖。這些資料說明paclitaxel是內皮細胞增殖之強力抑制劑。所有細胞之毒性分析均進行三次，且各個別的偵測也進行三次。

爲了決定paclitaxel在內皮細胞生命循環及預期死亡上之作用，EOMA在濃度漸增的paclitaxel存在及不存在下共培育24小時。細胞以3.7%甲醛於磷酸鹽緩衝食鹽水固定20分鐘，以DAPI染色(4'-6-二脒基-2-苯基吲哚)，1微克／毫升，並在表螢光光學儀器下以40x物鏡檢查。針對成片段之核及凝縮的染色質分類細胞可評估預期死亡之細胞。資料顯示大於 10^{-8} 以上之paclitaxel可誘導內皮細胞之預期死亡(圖10)。

實例7

增殖分析策略(MTT)

於第一天時，每孔洞(96孔洞之盤)中塗佈 $5-10 \times 10^4$ 個滑膜細胞。#1欄保持無細胞(空白組)。於第2天，輕彈此盤可除去培養基，再加入200微升含有不同藥物濃度之培養基。細胞曝露達6小時，24小時或4天。於#1及#2欄不加藥(分別爲空白及未處理之對照組)。丟棄含有藥物之培養基，再加200微升新鮮的完全培養基。再令細胞生長3-4天。於第5天，加入20微升二甲基噻唑二苯基四唑化溴鹽(MTT)(5毫克／毫升PBS)，再令其於37°C下培育4小時。

五、發明說明 (¹⁰⁴)

培養基傾析，再加200微升DMSO。盤子攪動30分鐘，再讀取562毫微米下之吸光度。

結果

數據以存活%表示，此為處理後留下之細胞數目除以在#2欄未處理對照組中之細胞數目而得(此細胞數目由分析前進所進行的標準品中獲得)。可殺死50%族群之藥物濃度， IC_{50} ，可由圖11A-E中內插而得。於曝露24小時時，項發現LY 290181化合物為最強力的抗微小管作用物，以少於5nM之 IC_{50} 可減少及抑制細胞之增殖(圖C)。paclitaxel, epothilone B及殺結核菌素為較非強力的作用物， IC_{50} 值分別為約30 nM(圖A)，45 nM(圖F)及45 nM(圖B)。最後，氟化鋁(AlF_3)及己二醇之 IC_{50} 則顯著較高，分別的數值為約32 μ M(圖E)及64 mM(圖D)。

實例8

抗-微小管作用物在基質金屬蛋白酶產製上之作用

原始的軟骨細胞培養自牛軟骨中新鮮分離。細胞以每毫升 2.5×10^6 塗佈在100×20毫米之培養皿中，並在Ham's F12培養基中(含有5% FBS)以37°C培育一夜。細胞在無血清之培養基中使飢餓一夜，再以各種濃度的抗-微小管作用物(10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M及 10^{-4} M)處理6小時。再於各盤中加入IL-1(20毫微克/毫升)，且培養皿再培育18小時。以酸化的異硫氰酸胍方法分離總RNA，再於變性凝膠上接受電泳。變性之RNA樣品(15微克)以1%變性凝膠電泳分析，轉移至耐綸膜上再與經³²P-標記之膠原酶cDNA探

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (¹⁰⁵)

針雜交。以經³²P-標記之甘油醛磷酸脫水酶(GAPDH)cDNA為內部標準品，以確定大約等量之填料。經曝露之底片以Image Quant掃描及定量分析之。

結果

圖12A-G明示抗-微小管作用物可抑制膠原酶之表現。加入IL-1刺激膠原酶之表現，其係一種發炎原細胞動素。軟骨細胞與各種抗微小管作用物預先培育，特別是LY290181，己二醇，氧化氫，甘胺酸乙酯，AIF₃，殺結核菌素及乙二醇雙-(琥珀醯亞胺琥珀酸酯)，其在低至 1×10^{-7} M濃度時均可預防IL-1-誘導之膠原酶表現。

實例9

抗-微小管作用物對蛋白多糖表現上之作用

原始軟骨培養物自牛軟骨中新鮮分離。細胞以 2.5×10^6 / 毫升塗佈在100×20毫米之培養皿中，再培育於含有5% FBS之Hams' F12培養基中，37°C下歷一夜。細胞置無血清培養基一夜中使飢餓，再以各種濃度的抗微小管作用物(10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M及 10^{-4} M)處理6小時。再於各盤中加入IL-1(20毫微克/毫升)，並再培育18小時。以酸化的異硫氰酸胍方法分離總RNA，並接受變性凝膠之電泳。變性的RNA樣品(15微克)以1%變性凝膠電泳分析，轉移至尼龍膜上再以經³²P-標記之蛋白多糖(aggre-can)cDNA探針雜交。以經³²P-標記之甘油醛磷酸脫水酶(GAPDH)cDNA為內部標準品，以確定大約等量之填料。經曝露之底片以Image Quant掃描及定量分析之。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (¹⁰⁶)

結果

圖 13 A-G 示出抗-微小管作用物，其在膠原酶表現上具抑制作用(圖 8)，尤其是 LY 290181，己二醇，氧化氫，甘胺酸乙酯， AlF_3 ，殺結核菌素及乙二醇雙-(琥珀醯亞胺琥珀酸酯)，但在所評估的濃度下並不會影響 aggrecan，一種軟骨基質主要組份，的表現。

實例 10

NF- κ B 活性(以細胞為基礎)分析

IL-1 及 TNF 二者均被鑑知為發炎原細胞動素，其可活化由轉錄因子，NF- κ B，所驅動之基因轉錄作用，此因子也涉及於發炎過程中。因此，IL-1 及 TNF 之發炎作用可利用告知者基因分析(NF- κ B)反映 IL-1 及 TNF 刺激予以直接評估。

於第 1 天時，以 NF- κ B 告知者構體(蟲螢光素酶，Promega Corp.)穩定轉感的 5×10^4 NIH-3T3(鼠之纖維母細胞)塗佈於每孔洞中(24 孔洞盤)。一旦呈融合狀(於第 3-4 天)細胞置加有 1 毫升無血清培養基之完全培養基中使飢餓。經 24 小時的飢餓後，在加入 IL-1(20 毫微克/毫升)及 TNF(20 毫微克/毫升)前，細胞以各種濃度的抗-微小管作用物處理 6 小時。細胞與 IL-1 及 TNF 共曝露 1 小時及 16 小時，於 24 小時後偵測 NF- κ B 活性。於第 5 天，丟棄培養基，細胞再以 PBS 潤洗一次。細胞再以 250 微升溶解緩衝溶液萃取 15 分鐘(Promega Corp., Wisconsin)。加入 25 微升中螢光素酶受質至含有 2.5 微升細胞萃取物之管中，以評

五、發明說明 (107)

估 NF-kB 轉錄活性。管立即置 luminometer (Turner Designs) 中，再以發射光偵測 10 秒。蟲螢光素酶數據再以蛋白質濃度使常歸化。

結果

數據以抗-微小管作用物呈現在 NF-kB 誘導作用之干擾來表示 (倍數誘導)。如圖 80A, 80B, 80C 及 80D 所示，殺結核菌素及 paclitaxel 均可抑制 IL-1 及 TNF-誘導之 NF-kB 活性。殺結核菌素及 paclitaxel 處理 6 小時及 24 小時之抑制作用分別為 $10 \mu M$ 及 $2 \mu M$ 。

實例 11

paclitaxel 對腫瘤血管生成之抑制作用

受精的家養雞胚胎在移去蛋殼前先培育 4 天。移去在氣室四週之殼以排空蛋內容物，分開內部殼膜，將殼對面一端穿孔，再令蛋內容物由平鈍端緩緩地滑出來。內容物排空至圓底無菌玻璃碗內，蓋上巴氏皿蓋再於 90% 相對濕度及 3% 二氧化碳下培育。

將 MDAY-D2 細胞 (鼠淋巴樣腫瘤) 注入老鼠中，再令腫瘤長至重 0.5 - 1.0 克。犧牲老鼠，腫瘤位置以乙醇擦拭，切下，置於無菌組織培養基中，再於層流通風廚下切成 1 毫米厚度。將切碎的腫瘤置於 9 天大的雞胚中，CAM 表面以 30 號針緩緩磨擦以確保腫瘤植入。腫瘤再置於 CAMs 中，此係培育 8 天後進行 (剝殼後 4 天)，再令其於 CAM 上生長以確定血管供應。利用此方法製備 4 個胚胎，各胚胎中接受 3 個腫瘤。於第 12 天時，在胚胎中 3 個腫瘤各自接受填加有

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (¹⁰⁸)

20%paclitaxel之熱糊，未填料的熱糊，或不予以處理。在記錄結果之前繼續2天的處理。

植出之MDAY-D2腫瘤會分泌血管性因子，其可誘導毛細管(衍生自CAM)在腫瘤內向內生長，並繼續生長至一定尺寸。由於腫瘤所有的血管均衍生自CAM，而所有腫瘤細胞均衍自外植體，因此可評估治療方法在此二種不同過程中之作用。此分析法已被用於決定填加有paclitaxel之熱糊在以下之效力：(a)抑制腫瘤之血管生成，及(b)抑制腫瘤細胞本身之生長。

經固定組織直接的活體內立體顯微鏡檢評估及組織學檢查，由此研究中可證明以下。以填加有20%paclitaxel之熱糊處理過之腫瘤，與對照組腫瘤比較，供應腫瘤之血管數目會減少(圖14C及14D)，腫瘤內的血管數目減少，腫瘤四週之血管數目減少(此區域通常是固態腫瘤最高度血管化之區域(圖14A及14B)。在進行研究的2天中，腫瘤大小及團塊會開始縮小。另外，許多內皮細胞似乎停止在細胞分裂中，顯示內皮細胞增殖會受到影響。腫瘤細胞也常見在有絲分裂時停止。4個胚胎均顯示一致的形式，即填加有20%paclitaxel的熱糊會遏止腫瘤血管之生成，而未填料之熱糊則無作用。

比較下，以未填料之熱糊處理的CAMs中，腫瘤與周圍正常組織比較下，其充份血管化且密度及數目均有所增加，而以填加有paclitaxel之熱糊處理過之腫瘤則可觀察到顯著較多的血管。新形成的血管以輻條狀自所有角度進入腫

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (109)

瘤，並黏附至車輪中央(圖14A及14B)。於研究過程中，對照的腫瘤繼續增加大小及團塊。就組織學而言，許多擴張的薄壁毛細管可在腫瘤四週被察覺，而一些內皮細胞可見在細胞分裂中。腫瘤組織充份血管生成且整個期間均具活力。

舉例言之，將二個大小相似(最初，於植出之際)的腫瘤置於相同的CAM中可得以下資料。以填加有20% paclitaxel之熱糊所處理之腫瘤，測知為330毫米×597毫米；腫瘤四週緊鄰14條血管，而腫瘤團僅有3-4個小毛細管。以未填料之熱糊處理過之腫瘤大小為623毫米×678毫米；腫瘤四週緊鄰54條血管，而團內僅有12-14個小毛細管。此外，周圍的CAM本身與包圍經paclitaxel處理之腫瘤區域比較，前者含較多的血管。

此研究證明，熱糊可釋出充份量之paclitaxel以抑制腫瘤生長及發展時所伴隨之病理性血管生成。在這些條件下，血管生成是腫瘤細胞可最大刺激的狀況，其產生可誘導毛細管自周圍組織內向生長至腫瘤團塊之血管性因子。填加有20%paclitaxel之熱糊可阻斷此過程，並限制腫瘤組織維持適度血液供應之能力。此造成腫瘤團塊之縮小，不僅經由藥物對腫瘤細胞本身之胞毒性，也包括將生長及擴大所需之營養自組織中剝奪。

實例12

Paclitaxel對血管生成之抑制作用

A. 雞絨毛尿膜("CAM")分析法

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (¹¹⁰)

在少殼培養前，經受精的家養雞胚先培育3天。在此步驟中，蛋的內容物由剝去氣室四週之殼而移去排空。內部殼膜再分開，且將對側之殼穿孔以令內容物可自平鈍端緩緩流出。蛋內容物排空至圓底無菌的玻璃碗內，並蓋上巴氏皿蓋。這些再置於90%相對濕度及3%CO₂之培育箱中培育3天。

在每10微升0.5%甲基纖維素水溶液有0.25，0.5，1，5，10，30微克之濃度下混合Paclitaxel(Sigma, St. Louis, MI)。由於paclitaxel不溶於水，可以玻璃珠來產生細粒子。此溶液取10微升於石蠟上乾燥1小時，可形成直徑2毫米之圓片。經乾燥之圓片含有paclitaxel，再小心地置於培育6天的各CAM生長緣上。將無paclitaxel之甲基纖維素圖片置CAM上歷相同的時間可得對照組。經過2天的曝露(培育第8天)以立體顯微鏡之助檢查血管分佈。將Liposyn II，一種不透明白色溶液，注入CAM中以增加血管之能見度。未染色活胚胎之血管分佈利用Zeiss立體顯微鏡影像，其以電視照像機分界面(Dage-MTI Inc., Michigan City, IN)。這些電視訊號再以160x放大倍率呈現，並以影像-分析系統捕捉(Vidas, Kontron: Etching, Germany)。影像負片再於印刷記錄器上製成(3000機型: Matrix Instrument, Orangeburg, NY)。

8天大的少殼胚胎膜漲滿2%戊二醛於0.1M卡可基酸鈉緩衝溶液；在CAM下注入額外的固定劑。於原位10分鐘後，CAM移去再置入新鮮的固定劑，室溫下歷2小時。組

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (¹¹¹)

織再以含有6%蔗糖之卡可基酸緩衝溶液洗一夜。重點區域以1%四氧化鐵後固定，4℃下歷1.5小時。再令組織於連續乙醇系列中脫水，以環氧丙烷交換溶劑，再包埋在Spurr樹脂中。以鑽石刀切出薄切片，置銅網上，染色及以Joel 1200 EX電子顯微鏡檢查。類似的，切下0.5毫米切片，以甲苯藍染色再行光學鏡檢。

於發展的第11天時，以雞胚進行腐蝕澆鑄技術。將Mercox樹脂(Ted Pella, Inc., Redding, CA)注入CAM血管分佈中，以30號皮下針頭進行。澆鑄材料包括2.5克的Mercox CL-2B聚合物及0.05克催化劑(55%苒醯過氧)有5分鐘的聚合作用時間。於注射之後，令塑質在原位安置1小時，室溫下，再於65℃之烘箱中一夜。再將CAM置50%氫氧化鈉溶液中以水解所有的有機組份。塑質澆鑄物以蒸餾水充份洗滌，風乾，塗佈以金／鈹，再以Philips 501B掃描電子顯微鏡觀察。

上述實驗的結果示於圖15-18中。簡言之，正常雞少殼的培養物一般特色示於圖15A。在培育6天時，胚胎向心地放置在血管軸射狀擴大的網路上；CAM鄰接胚胎發展。這些生長中之血管靠近表面並可被清楚看到，使該系統是研究血管生成的理想模式。CAM活且未染色的毛細管網路可以立體顯微鏡非侵入性地顯像。圖15B說明此一血管區域，其中在毛細管內之細胞血液成份利用電視／電腦界面記錄之。此CAM毛細管網路之3度空間結構以腐蝕澆鑄技術顯示，並在掃描電子顯微鏡上觀察(圖15C)。這些鑄型

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (¹¹²)

顯示基礎脈管，其可突出CAM表面在此形成單一接合毛細管層。

經由CAM之橫斷切片顯示一個外胚層，含有雙細胞層，含毛細管之較廣的中胚層，其接在外胚層下，動脈外膜細胞，及內部單一之內胚細胞層(圖15D)。在電子顯微鏡水平下，明示出CAM毛細管典型結構。典型而言，這些脈管與外胚層之內部細胞層緊密相接(圖15E)。

經過與0.25，0.5，1，5，10或30微克濃度下之paclitaxel曝露48小時後，各CAM以立體顯微鏡，其配備有電視／電腦界面，在活的條件下檢查以評估血管生成之影響。此顯像之裝配於160x放大倍率下使用，可直接目視毛細管內之血液細胞，因此可容易地評估及記錄在重點區域中之血流。在此研究中，血管生成之抑制作用可定義為缺乏毛細管網路及血管血流之CAM區域(直徑約2-6毫米)。在整個實驗之中，在4點無血管等級上評估無血管區(表1)。此分數代表整體抑制作用之程度，最大抑制作用在無血管等級分數上以3代表。依paclitaxel之濃度，其十分一致且可在48小時內誘生最大的無血管區(直徑6毫米或無血管等級分數上之3)。

表 1

無血管等級

0-正常多血管情形

1-缺少某些微血管移動

五、發明說明 (¹¹³)

2* - 約2毫米直徑之小的無血管區

3* - 無血管情形延身出圓片之外(直徑6毫米)

* - 表示正的抗血管生成反應

表2示出各種治療劑在不同濃度下作用之劑量-依賴性，
實驗數據

表 2

作用物	遞送溶媒	濃度	抑制/n
paclitaxel	甲基纖維素(10微升)	0.25微克	2/11
	甲基纖維素(10微升)	0.5微克	6/11
	甲基纖維素(10微升)	1微克	6/15
	甲基纖維素(10微升)	5微克	20/27
	甲基纖維素(10微升)	10微克	16/21
	甲基纖維素(10微升)	30微克	31/31
	PCL糊(3毫克)	0.05%	0/9
	PCL糊(3毫克)	0.10%	1/8
	PCL糊(3毫克)	0.25%	5/7
	PCL糊(3毫克)	0.5%	4/4
	PCL糊(3毫克)	1%	8/8
	PCL糊(3毫克)	2%	10/10
	PCL糊(3毫克)	5%	10/10
	PCL糊(3毫克)	10%	9/9
	PCL糊(3毫克)	20%	6/6
	20%明膠：60% PCL糊(3毫克)	20%	5/6

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (¹¹⁴)

明膠(1毫克)	20%	17/17
眼用懸液(2×10微升)	0.3%	1/12
眼用懸液(2×15微升)	0.3%	3/3
眼用懸液(1×15微升)	0.3%	15/15
眼用微球懸液(15微升)	10%	4/4
塑形塗料(~1毫克)	2.5%	5/5
塑形塗料(~1毫克)	10%	1/1
塑形塗料(~1毫克)	33%	3/3
環糊精溶液(10微升)	10%	5/5
膠團調和物乾式(1毫克)	10%	太毒
膠團溶液(10微升)	10%	太毒
膠團溶液(10微升)	4微克	1/1-太毒
Cremophor Taxol(10微升)	4微克	1/1太毒
4PCL : 1MePEG片(1毫克)	20%	10/13
PCL : MePEG糊(3毫克)	20%	6/9
微球(黏液黏著)	20%	7/7
微球(EVA)	0.6%	2/2
微球(30-100微米)-緩釋	20%	11/11
微球(30-100微米)-緩釋	10%	1/8
微球(10-30微米)-中度釋出	20%	5/6
微球(10-30微米)-中度釋出	10%	5/9
微球(1-10微米)-快速釋出	20%	8/11
微球(1-10微米)-快速釋出	10%	9/9
漿果赤霉素	糊(2毫克)	2微克
	2/3	
	甲基纖維素(5微升)	5微克
	4/7	
胺甲碟呤	PCL糊(3毫克)	1%
	0/13	

五、發明說明 (¹¹⁵)

	PCL糊(3毫克)	2%	0/3
	PCL糊(3毫克)	20%	0/1
	PCL : MePEG糊(3毫克)	2%	1/1
	95PCL : 5MePEG糊(3毫克)	1%	0/6
	95PCL : 5MePEG糊(3毫克)	10%	0/5
	甲基纖維素(10微升)	2微克	0/8
醋酸氫化	眼用懸液(2×10微升)	1%	3/4
潑尼松	眼用懸液(2×15微升)	1%	1/1
pycnogenol	甲基纖維素(10微升)	10微克	1/18
(proanthocyaingin)	PCL糊(3毫克)	15%	1/2
	PCL糊(3毫克)	30%	太毒
verotoxin	甲基纖維素(10微升)	10毫微克	0/8
	甲基纖維素(10微升)	675毫微克	0/2
硫酸肝素(1)	甲基纖維素(10微升)	0.2微克	0/6
硫酸肝素片段(II)	甲基纖維素(10微升)	0.4微克	0/7
vanadate	微球(1毫克)	5%	0/5
vanadyl sulphate	PCL糊(3毫克)	2.5%	0/3
BMOV	PCL糊(3毫克)	10%	太毒
	PCL糊(3毫克)	25%	太毒
	PCL糊(3毫克)	35%	太毒
BEOV	PCL糊(3毫克)	10%	太毒
S-麟酸酯	80% PLA : 20%MePEG糊 (1毫克)	20%	太毒
	PCL糊(1毫克)	2%	2/7
	PCL糊(3毫克)	1%	0/9
	PCL糊(3毫克)	2%	0/6
	PCL糊(3毫克)	4%	0/3

五、發明說明 (116)

	PCL糊(3毫克)	8%	1/9
tamoxifen	甲基纖維素(10微升)	5微克	0/2
鯊魚軟骨粉	N/A	1毫克	0/5
estramustine磷酸鈉	PCL糊(3毫克)	5%	0/6
	PCL糊(3毫克)	10%	0/6
長春鹼	甲基纖維素(10微升)	9微克	太毒
	甲基纖維素(10微升)	2微克	太毒
	PCL糊(3毫克)	0.25%	4/6
	PCL糊(3毫克)	0.5%	0/4
	PCL糊(3毫克)	1%	2/3
	PCL糊(3毫克)	2%	太毒
長春新鹼	甲基纖維素(10微升)	9微克	太毒
	甲基纖維素(10微升)	1微克	太毒
	PCL糊(3毫克)	0.05%	1/1-太毒
	PCL糊(3毫克)	0.1%	2/2-太毒
	PCL糊(3毫克)	0.25%	1/1-太毒
	PCL糊(3毫克)	0.5%	太毒
	PCL糊(3毫克)	1%	太毒
	PCL糊(3毫克)	2%	太毒
二帖-1	甲基纖維素(10微升)	3微克	0/5
二帖-2	甲基纖維素(10微升)	3微克	0/5
lavendustine-c	PCL糊(3毫克)	10%	6/14
	PCL糊(3毫克)	20%	0/10
MDHC(酪胺酸抑制劑)	PCL糊(3毫克)	20%	0/8
erbstatin	PCL糊(3毫克)	20%	0/5-太毒

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (117)

金雀異黃素	PCL糊(3毫克)	10%	0/7
	PCL糊(3毫克)	20%	0/4
herbimysin	PCL糊(3毫克)	2%	3/4
	PCL糊(3毫克)	0.5%	1/1
camptothecin	PCL糊(3毫克)	0.25%	3/4
	PCL糊(3毫克)	1%	2/3
	PCL糊(3毫克)	5%	4/5
蘇拉明及醋酸	甲基纖維素(10微升)	20微克/70微克	2/4
可體松	甲基纖維素(10微升)	50微克/40微克	5/14
	甲基纖維素(10微升)	50微克/50微克	3/26
	甲基纖維素(10微升)	20微克/50微克	0/24
	甲基纖維素(10微升)	70微克/70微克	0/9
蘇拉明及四氫S	甲基纖維素(10微升)	50微克/50微克	0/6
硫酸魚精蛋白	甲基纖維素(10微升)	50微克	0/10
	甲基纖維素(10微升)	100微克	0/10
TIMP	甲基纖維素(10微升)	15微克	0/5
秋水仙素	甲基纖維素(10微升)	3微克	1/1-太毒

也示出經 paclitaxel 處理的典型 CAMs，其中透明的甲基纖維素圓片位在無血管區中央，其為 6 毫米直徑大小。在較高的放大倍率下，此無血管區域的四週可清楚的看出來 (圖 16C)；周圍具功能的血管常自 paclitaxel 源改方向地離開 (圖 16C 及 16D)。在正常條件下並未見到血流的此有角的改方向。paclitaxel 作用的另一特色是可在無血管區內形成血液小島，代表血液細胞之凝集。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (¹¹⁸)

經paclitaxel處理過的CAM，其相關外形上的變化由光學及電子顯微鏡上均可容易地觀察到。為呈現方便之故，示出由正常至無血管階段一般轉位之鮮明三相。在靠近無血管區四週，CAM由在三個胚層內均有豐富的分裂細胞而驗證(圖17A及18A)。此加強的有絲分裂狀況和毛細管內皮細胞中所見的一致。然而內皮細胞連接上保持完整，無血液細胞之外溢。由進一步的降解作用中，CAM特徵在於毛細管的瓦解及溶解(圖17B及18B)。推測的內皮細胞，通常停止在有絲分裂中，仍與血液細胞保持緊密的空間相互關係且位於外胚層下方；然而這些細胞並非連接在一起。無血管區最中央部位特徵是加厚的外胚及內皮層(圖17C及18C)。雖然這些層均加厚，細胞之連接仍保持完整，且各層保有其結構特色。在中胚層中，散亂有絲分裂下停止的細胞極豐；這些細胞未呈現出在前一相中所見之內皮細胞極化現象。同時，在此無血管區域中，由電子稠密之空泡及細胞殘屑可注意到變性細胞是很普遍的(圖18C)。

總而言之，此研究說明在paclitaxel施加至CAM後48小時，血管之生成是被抑制的。血管之抑制作用可形成一個無血管區域，其由paclitaxel作用的轉換三相代表。無血管區的中央最受影響區域含有經瓦解之毛細管，且紅血球已外溢；此顯示在內皮細胞間之細胞間連接已不存在。內胚層及外胚層之細胞仍維持其細胞間之連接，因此這些胚層是保持完整的；然而，其略有增厚。當正常血管區趨近

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (¹¹⁹)

時，血管保有其連接複合物因此也是保持完整的。在 paclitaxel 處理帶之四週，進一步血管生長均受制，此可由血管典型的改方向或"推擠"作用證知(圖 16D)。

經 paclitaxel 處理過之無血管區也顯示在 CAM 三胚層中，富含停止有絲分裂階段之細胞；此是 paclitaxel 所特有的，因此先前的研究無一者說明過此狀況。由於停止在有絲分裂，內皮細胞無法進行涉及於血管生成之正常代謝功能。就比較而言，由蘇拉明及醋酸可體松所形成之無血管區在 CAM 中並不產生有絲分裂停止之細胞；其僅僅是預防血管進一步生長至經處理區域。因此這些作用物即使是抗-血管性的，此中仍有血管生成過程可為目標之數點。

也可觀察到經過 48 小時期間 paclitaxel 之作用。在此觀察期間，可注意到血管生成之抑制作用在施加後 9 小時即已經發生。組織學切片顯示 48 小時時和無血管區第一個轉換期中相似之外形，如圖 17A 及 18A 中所說明的。同時吾等也觀察到在血管分佈過程進入先前所觀察到的無血管區。頃發現，由肝素及血管制止性固醇所形成之無血管區於施加 60 小時後會再血管分佈。在一個研究中，經 paclitaxel 處理的無血管區於施藥後至少 7 天不會再有血管分佈，暗示其有更具效力之長效作用。

實例 13

Paclitaxel 對於基質金屬蛋白酶表現上之作用

A. 材料及方法

1. Paclitaxel 在 C-FOS 表現上之作用

五、發明說明 (¹²⁰)

軟骨細胞以不同濃度的 paclitaxel ($10^{-6}M$, $10^{-7}M$ 及 $10^{-8}M$) 處理 2 小時，再以 30 毫微克／毫升的 TNF α 處理 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 歷 1 小時。人類重組體 TNF α 溶於加有 0.1% 牛血清白蛋白 (BSA) 之磷酸鹽緩衝食鹽水內 (PBS)。以酸化的異硫氰酸胍方法分離出牛關節軟骨細胞之總 RNA，再以北方吸漬分析決定 c-fos mRNA 之水平。變性的 DNA 樣品 (12 微克) 以變性的 1% 瓊脂糖凝膠電泳分析，轉移至尼龍膜上 (Bio-Rad)，再與紫外線交聯劑 (Stratagene UV Stratalinker 1800) 交聯，及以 ^{32}P -標記之大鼠 c-fos DNA 雜交。以微管蛋白 mRNA 及總 RNA 充作對照組。為決定微管蛋白 mRNA，上述之吸漬物再汽滌下 DNA 並以 ^{32}P -標記之大鼠 P-微管蛋白 cDNA 再探測之。此實驗進行三次並收集數據。

2. Paclitaxel 在膠原酶表現上之作用

軟骨細胞以不同濃度的 paclitaxel ($10^{-6}M$ 及 $10^{-7}M$) 處理 2 小時，再加 IL-1 (20 毫微克／毫升)。細胞再培育 16 小時。以酸化的異硫氰酸胍方法分離出牛關節軟骨細胞中之總 RNA，再以北方吸漬分析決定膠原酶 mRNA。RNA 樣品如上述，利用 ^{32}P -標記之大鼠膠原酶 cDNA 製備

B 結果

1. Paclitaxel 在 C-FOS 表現上之作用

此實驗說明，paclitaxel 在任何濃度下均不會改變 c-fos 表現 (圖 19)。不論 paclitaxel 濃度存在，在對照組及所有的實驗組中，c-fos mRNA 均可測及到可比較之水平。總

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (¹²¹)

RNA及微管蛋白的表現也類似地不受影響。

2. Paclitaxel在膠原酶表現上之作用

此實驗說明，在 10^{-6} M濃度下之paclitaxel可完全抑制IL-1誘生之膠原酶表現。paclitaxel在此濃度下，於試管內膠原酶mRNA無背景值以上之可測知值。(圖20)。

C. 討論

Paclitaxel在 10^{-6} M濃度下可於試管內抑制由軟骨細胞所產生之膠原酶。此抑制作用自c-fos轉錄因子活性下游發生，但仍代表一種二次基因反應，因為膠原酶mRNA之產生受影響了。如此，膠原酶產製上的抑制並不嚴格，此乃因涉及於蛋白質分泌路徑之微管被干擾之故(其依賴微管功能才可移動分泌顆粒)，但其作用在反應膠原酶產製之刺激作用之基因層次上。估不論作用之機制如何，paclitaxel可抑制由至少一種細胞型式對膠原酶之產製，此細胞型式係已知可在關節疾病過程中產生此酵素者。

實例14

額外的抗-微小管作用物之抗血管生成活性

除了paclitaxel之外，其他的抗微小管作用物也可另外地納入聚合載劑之中。以下可提供之代表性實例包括Campothecin及長春花生物鹼，如長春鹼及長春新鹼，及微小管穩定劑，如殺結核菌素，氟化鋁及LY 290181。

A. 作用物納入PCL中

作用物以研鉢及研杵磨粉以將粒子大小減至5微米以下。其再呈乾粉型式與聚己內酯(分子量18,000 Birmingham

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

總

五、發明說明 (¹²²)

Polymers, AL USA) 混合。混合物加熱至 65°C 歷 5 分鐘，再將熔化的聚合物／作用物混合物攪拌成平滑的糊狀物，歷 5 分鐘。已融化之糊再以 1 毫升注射器吸取，並擠壓形成 3 毫克之團塊。這些小丸再置於受孕 6 天之 CAM 上，以評估其抗血管生成之特性。

B. Camptothecin- 填料之 PCL 糊在 CAM 上之作用

填加有 Camptothecin 之熱糊，當與對照組之 PCL 小丸比較下可有效抑制血管生成。在 5% 藥物填料量下，受試的 CAM 有 4／5 有強力的血管生成抑制作用。此外，在 1% 及 0.25% 填料量下，CAM 分別有 2／3 及 3／4 顯示出血管生成抑制作用。因此，由這些結果可證知，Camptothecin 可自 PCL 熱糊中充份釋出，且其具有治療性抗-血管生成效力。

C. 長春鹼及長春新鹼- 填料之 PCL 糊在 CAM 上之作用

當在 CAM 上測試調和物時，可證知作用物以充份量自 PCL 小丸中釋出以誘生生物作用。當與對照之 PCL 熱糊小丸比較下，在 CAM 分析法中長春鹼及長春新鹼二者均可誘生抗-血管生成作用。

在 0.5% 及 0.1% 之藥物填加量下，長春新鹼在所有受試的 CAM 中均可誘生血管生成抑制作用。當濃度超過 2%，可達到有毒之藥物水平，並發生非預期的胚胎死亡。

在 0.25%，0.5% 及 1% 濃度下，長春鹼在 CAM 上也可有效抑制血管生成。然而，超過 2% 濃度時，長春鹼對胚胎是有毒的。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (¹²³)

D. 殺結核菌素-填料之PCL糊在CAM上之作用

當與對照小丸比較下，殺結核菌素填料之糊可有效抑制血管生成。在1%之藥物填料量下，殺結核菌素在受試CAM中有1/3可誘生血管生成之抑制作用。然而在大於5%藥物填料量之藥物更大濃度下，2/3 CAM殺結核菌素可強力抑制血管生成。因此，由這些結果證知，殺結核菌素可自PCL糊中充份釋出，其並有強力的抗-血管生成活性。

E. 氟化鋁填料之PCL糊在CAM上之作用

填加有氟化鋁(AlF_3)之PCL糊，當與對照小丸比較下，在20%藥物填料量下可有效抑制血管生成。在20%藥物填加量下，2/4 CAMs顯示出血管生成之抑制作用，此可由直徑2至6毫微米間之無血管環而證知。然而在較低之藥物填加量下，1%及5%，血管生成之抑制作用並不明顯(0/6及0/5 CAM)。因此，氟化鋁僅在較高藥物濃度下才可有效誘生血管生成之抑制作用。

F. LY 290181填料之糊在CAM上之作用

填加有5%LY 290181之PCL糊在CAM上進行評估，顯示在1/3受試CAM中，LY 290181可誘生血管生成之抑制作用。然而，在1%藥物填加量下，LY 290181並不誘生抗血管生成之反應($n=2$)。

實例5

Paclitaxel在非增殖性細胞存活力上之作用

雖然可變化疾病之作用物可強烈抑制各種不適當的細胞

五、發明說明 (¹²⁴)

活性(增殖，發炎，蛋白水解酶之產生)，此為慢性發炎發展中過度發生的，但其必需對正常組織是無毒的。正常細胞不受損是十分具關鍵性的，因其會造成疾病之進展。在此實例中，檢查試管內paclitaxel對正常未分裂細胞存活力之作用，其中利用已生長至匯合狀之培養中之軟骨細胞。

簡言之，軟骨細胞在paclitaxel存在($10^{-5}M$ ， $10^{-7}M$ ，及 $10^{-9}M$)或不存在下(對照組)培育72小時。於此時期末了，由錐藍染料排阻法，目視決定存活細胞之總數。此實驗進行4次，再收集數據。

此實驗之結果示於圖21中。簡言之，由圖21明顯得之，paclitaxel不會影響試管內正常非增殖細胞之存活力，即使paclitaxel在高濃度下亦然($10^{-5}M$)。更特異地，即使在藥物濃度足以阻斷前一實例所述之病理過程，其對正常的軟骨細胞仍無胞毒性。

實例16

選擇滲透加強劑應用於paclitaxel之局部調和物中

A. 在各種加強劑中paclitaxel的溶解度

檢查以下的滲透加強劑：Transcutol[®]，乙醇，丙二醇，肉豆蔻酸異丙酯，油酸及Transcutol：肉豆蔻酸異丙酯(9：1，v/v)。各加強劑取1毫升於玻璃小管中，預熱至37℃，再加過量的paclitaxel。得自各小管中0.5毫升之流體樣品，以13000 rpm在37℃下離心2分鐘。自離心管取下一份上清液(0.1毫升)，再轉移至計量燒瓶中，以甲醇稀釋。以高壓液相層析(HPLC)評估paclitaxel之含量。

五、發明說明 (125)

B. 分配係數

將定量的 paclitaxel 溶於等量加強劑中，亦加熱至 37℃。取此溶液一份(1 毫升)加至 1 毫升辛醇中，於 4 毫升玻璃小瓶內。再加磷酸鹽緩衝食鹽水(1 毫升)(pH 7.4)，且以小瓶渦旋以生成乳劑。小瓶置於 37℃ 之烘箱中 16 小時，之後自各小瓶移去 0.1 毫升的辛醇相，再以 9.9 毫升甲醇稀釋。至於水相，自油酸及肉豆蔻酸異丙酯小瓶中取 0.5 毫升樣品，自丙二醇小瓶中取 0.5 毫升樣品，再以 0.5 毫升甲醇稀釋。自 Transcutol 小瓶中取 0.1 毫升，並以 9.9 毫升 50 : 50 Transcutol : PBS 稀釋，自乙醇小瓶中取 0.1 毫升並以 50 : 50 乙醇 : PBS 稀釋。以 HPLC 決定 paclitaxel 含量。各次決定均進行三次。

C. 結果

Paclitaxel 在各加強劑之溶解度，於 37℃ 下，列於表 1。

表 1 : Paclitaxel 在各滲透加強劑中飽和狀態下之濃度

加強劑	Paclitaxel 濃度(毫克／毫升)	
	平均	標準偏差
Transcutol [®]	346.85	2.59
乙醇	68.91	3.49
丙二醇	21.56	0.11
肉豆蔻酸異丙酯	0.43	0.01
油酸	0.31	0.01
Transcutol : 肉豆蔻酸異丙酯(9 : 1, v/v)	353.93	0.42

辛醇／水之分配係數，K_{ow} 列於表 2。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (126)

表 2：Paclitaxel 於各種加強劑溶液中之辛酸／水分配係數

加強劑	$K_{o/w}$	標準偏差
Transcutol®	25.25	0.27
乙醇	6.88	0.13
丙二醇	37.13	2.48
肉豆蔻酸異丙酯	∞	-
油酸	∞	-

爲了可有效率地作用，paclitaxel 必須可穿透皮膚之活上
皮之下層。可確定爲使藥物可穿透活的上皮，其必須有接
近 100 之辛醇／水分配係數 (Hadgraft, J.H. and Walters K.,
Drug absorption enhancements, A.G. de Boers Ed.,
Harwood Publishers, 1994)。依據表 1 及 2 之結果，丙二醇
及 Transcutol 顯示出在助溶 paclitaxel 及加強其由油相分配
至水相有最佳之組合作用。

然而，由 Transcutol 及丙二醇二者產生之 $K_{o/w}$ 多少較低，
因此其可與肉豆蔻異丙酯混合，後者在增加 paclitaxel 於辛
醇相之溶解度上具有無限的 $K_{o/w}$ 值。肉豆蔻酸異丙酯及
Transcutol 以 1：9 體積比例混合。肉豆蔻酸異丙酯在室溫
下可容易地溶於 Transcutol 中。爲了形成均質相，丙二醇
及肉豆蔻酸異丙酯也以 4：3.5：0.5 丙二醇：乙醇：肉豆蔻
酸異丙酯之比例混合於乙醇。 $K_{o/w}$ 結果示於表 3 中。

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (127)

表 3：Paclitaxel 於加強劑組合之辛醇／水分配係數

加強劑	k _{o/w}	標準偏差
Transcutol [®] ：肉豆蔻酸異丙酯(9：1)	43.45	0.43
丙二醇：乙醇：肉豆蔻酸異丙酯(4.0：3.5：0.5)	42.39	1.66

將肉豆蔻酸異丙酯加至Transcutol中可造成分配係數顯著的增加。然而，丙二醇：乙醇：肉豆蔻酸異丙酯溶液並不會使分配係數之改善顯著於單獨的丙二醇。此最後的結果，及頃發現乙醇可加劇惡化牛皮癬狀況之事實，因此在進一步考量下將此加強劑組合有效地除去。再者，加入肉豆蔻酸異丙酯確實可使paclitaxel之溶解度增加，且超過單獨在Transcutol之狀況。paclitaxel在Transcutol中之溶解度為346.9毫克／毫升，而在Transcutol：肉豆蔻酸異丙酯組合中溶解度可增加至353.9毫克／毫升。因此，此加強劑組合被選用在皮膚研究中。

實例 17

局部paclitaxel調和物之製備及分析

A. Paclitaxel油膏A之製備

Transcutol(3.2克)，肉豆蔻酸異丙酯(0.3克)，labrasol(2.5克)，paclitaxel(0.01克)及0.5毫居里／毫升³H-paclitaxel(0.3毫升)混合於20毫升之液體閃爍計數小瓶內。在另一個小瓶內，labrafil(2.5克)，arlacel 165(1.2克)及compritol(0.3克)混合並加熱至70℃，直到完全熔化為止。第一個液體閃爍計數小瓶之內容物加至熔融物中，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (¹²⁸)

並渦旋直到呈均勻狀為止，再令其冷卻。

B. Paclitaxel 油膏B之製備

Transcutol(2.5克)，肉豆蔻酸異丙酯(1.0克)，labrasol(2.5克)，paclitaxel(0.01克)及0.5毫居里／毫升³H-paclitaxel(0.3毫升)混合於20毫升之液體閃爍計數小瓶內。在另一個小瓶內，labrafil(2.5克)，arlacel 165(1.2克)及compritol(0.3克)混合並加熱至70℃直到完全熔化為止。第一個液體閃爍計數小瓶之內容物加至熔融物中，再渦旋直到均勻並令其冷卻。

C. 皮膚製劑及穿透研究

經冷凍且切除的Yucatan迷你豬皮膚貯存在-70℃下直到使用。利用No. 10的軟木錐子自冷凍皮膚上穿出圓片而製備皮膚樣品。樣品以鏈黴素-青黴素溶液潤濕，再置冷凍袋內，貯於-70℃下。

皮膚切片覆在Franz擴散小池上，角質層向上。底下的接受溶液為於R.O.水中之0.05%羥氨基青黴素溶液。供表細胞束緊至各皮膚表面。將paclitaxel油膏加熱至熔化(40-50℃)，再以注射器吸取。在仍熔化狀態時，取0.1毫升擠至各皮膚表面。供者細胞覆以玻璃盤，此裝置再放置24小時。

24小時後，細胞分解，移去過量的油膏並貯於液體閃爍計數小瓶中。皮膚表面以3毫升二氯甲烷(DCM)快速洗滌再乾燥。洗過的DCM貯於如過量油膏之相同小瓶內。皮膚切片及接受之溶液貯於不同的液體閃爍計數小瓶內。皮膚

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (¹²⁹)

在-30°C下切成30微米之切片，並收集在不同的小瓶中。最初之刮屑及留下的皮膚也收集在分別的玻璃小瓶中。經切片之皮膚樣品由加入0.5毫升組織助溶劑而溶解。樣品放置一夜以在室溫下溶解。次日，加3毫升液體閃爍計數用之摻和液至小瓶中。於DCM洗滌中，取100微升轉移至1毫升乙腈中，在加3毫升液體閃爍計數之摻和液。所有溶液之放射活性利用 β -計數器偵測。

皮膚樣品覆在Franz擴散小池上，並分成三組。各樣品依序處理(未處理，或以油膏B加或不加paclitaxel處理)。24小時後，移去樣品並利用標準組織學技術處理。

D. 結果

由組織學切片，頃發現未處理皮膚之角質層介於50至120微米厚，而活的上皮400 - 700微米厚。對於含有3%肉豆蔻酸異丙酯之油膏而言(油膏A)，paclitaxel在皮膚上之濃度於角質層及整個活上皮中是基本上固定的1微克/毫升($1.2 \times 10^{-6}M$)。而對含有10% w/w肉豆蔻酸異丙酯之油膏而言(油膏B)，paclitaxel濃度在角質層及活上皮中是固定的，但在角質層中較高(6微克/毫升對2微克/毫升)。對各受檢之油膏而言，於接受溶液中並無放射活性，顯示paclitaxel並不會完全通過皮膚。

當應用含有paclitaxel之油膏時，未有顯著的差異存在。

實例18

治療牛皮癬之paclitaxel全身性調和物之發展

在嚴重的牛皮癬例子中，較積極的治療法確是可接受

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (¹³⁰)

的，且因此與paclitaxel全身治療有關之毒性也是可接受的。

Paclitaxel之全身性調和物含有親兩性的二段共聚物，其在水溶液中可形成由疏水性核心及在水中為親水性外殼所組成之膠團。可利用整體溶化之聚合作用步驟或類似方法合成聚(DL-丙交酯)-嵌段-甲氧基聚乙二醇(PDLLA-MePEG)，聚己內酯-嵌段-甲氧基聚乙二醇(PCL-MePEG)及聚(DL-丙交酯-共己內酯)-嵌段-甲氧基聚乙二醇(PDLLACL-MePEG)之二段共聚物。簡言之，將特定量的單體DL-丙交酯，己內酯及甲氧基聚乙二醇(具不同的分子量)加熱(130°C)至熔融，在氮泡罩及攪拌下。催化劑辛酸亞錫(0.2% w/w)加至已熔化的單體中。聚合化作用進行4小時。以GPC，螢光及溶解測試分別偵測分子量，臨床膠團濃度及最大paclitaxel填量(圖22)。可得攜有大量paclitaxel的毛細管。助溶paclitaxel的能力依共聚物之組成及濃度而定(圖22及23)。PDLLA-MePEG可生成最穩定溶解的paclitaxel(圖23及24)。

在聚合膠團內部核心內強的締合作用，代表可攜帶疏水性藥物，如paclitaxel，的一種高能力環境。藥物可共價偶合至嵌段共聚物以形成膠團結構，或可物理性納入膠團之疏水性核心內。膠團中藥物釋出之機制包括自核心擴散，及單聚合物鏈及膠團間之交換。膠團之小尺寸(通常少於100毫微米)可消除注入較大粒子有關之困難性。

實例19

五、發明說明 (¹³¹)

產生熱糊之步驟

5 克 Mw 10,000 至 20,000 之聚己內酯 (Polysciences, Warrington Penn. USA) 一種 20 毫升的玻璃閃爍計數小瓶，置入 600 毫升燒杯中，內含有 50 毫升的水。燒杯緩和加熱至 65°C，再於該溫度下保持 20 分鐘直到聚合物熔化為止。已知量之 paclitaxel，或其他的血管生成抑制劑，充份混合至 65°C 已熔化之聚合物中。已熔化之聚合物倒入預加熱 (60°C 烘箱) 之模內，令其冷卻直到聚合物固化為止。聚合物切成小片 (約 2 毫米 × 2 毫米) 再置入 1 毫升玻璃注射器內。

玻璃注射器再垂直 (加蓋之頂端向下) 置於 500 毫升玻璃燒杯內，其中並含有 65°C 之蒸餾水 (Corning 熱盤) 直到聚合物完全熔化。再將柱塞塞入注射器內以壓縮已熔化之聚合物在筒身頂端成黏稠的團塊。注射器加蓋並令其冷卻至室溫。

於應用時，注射器再加熱至 60°C，並呈液體型式投予，其當冷卻至體溫時會固化。

實例 20

利用 PDLA-PEG-PDLA 及低分子量聚 (D,L-乳酸) 變化 paclitaxel 自熱糊之釋出

A. 製備 PDLA-PEG-PDLA 及低分子量的 PDLA

DL-丙交酯購自 Aldrich。聚乙二醇 (PEG) 具有分子量 8,000，辛酸亞錫，及 DL-乳酸得自 Sigma。聚-ε-己內酯 (PCL) 具分子量 20,000 得自 Birmingham Polymers

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (¹³²)

(Birmingham, AL)。paclitaxel 購自 Hauser Chemicals (Boulder, Co)。聚苯乙烯標準品具窄的分子量分佈則購自 Polysciences (Warrington, PA)。乙腈及二氯甲烷為 HPLC 級 (Fisher Scientific)。

PDLLA-PEG-PDLLA 之三嵌段共聚物以開環聚合作用合成。呈不同比例之 DL-丙交酯及 PEG 單體混合，再加 0.5 wt% 辛酸亞錫。聚合作用在 150°C 下進行 3.5 小時。低分子量 PDLLA 經由 DL-乳酸之聚縮合作用合成。反應在玻璃燒瓶中，於緩和氮氣清洗條件下進行，機械攪拌，加熱至 180°C 歷 1.5 小時。PDLLA 之分子量約 800，由滴定羧酸末端基團而知。

B. 糊劑調和物之製作

填料量 20% 或 30% 之 paclitaxel 充份混合至 PDLLA-PEG-PDLLA 共聚物或 PDLLA : PCL 90 : 10, 80 : 20 及 70 : 30 (熔化至約 60°C) 拌合物中。填有 paclitaxel 之糊劑稱重至 1 毫升注射器內，再貯於 4°C。

C. PDLLA-PEG-PDLLA 及糊劑拌合物之特性

在環境溫度下以 GPC 來決定 PDLLA-PEG-PDLLA 共聚物之分子量及分佈，利用 Shimadzu LC-10AD HPLC 泵及 Shimadzu RID-6A 折射率偵測器 (Kyoto, 日本)，其並偶合至 10^4Å Hewlett Packard P1 凝膠管柱上。移動相為氯仿，流速 1 毫升/分。樣品注入之體積為 20 微升，在 0.2% (w/v) 聚合物濃度下。聚合物之分子量就聚苯乙烯標準品相對地決定。利用 Cannon-Fenske 黏度計偵測 25°C 下 PDLLA-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (¹³³)

PEG-PDLLA於CHCl₃中之內在黏度。

由差別掃描熱量計(DSC)進行共聚物之熱量分析，其中採用TA Instruments 2000控制器及DuPont 910S DSC(Newcastle, Delaware)。加熱速率為10°C／分，且共聚物及paclitaxel／共聚物基質樣品稱重(3-5毫克)再置於捲縮的開口式鋁樣品盤上。

使用¹H核磁共振(NMR)來決定聚合物之化學組成。填加有paclitaxel之PDLLA-PEG-PDLLA，其¹H NMR光譜在CDCl₃中利用NMR儀器獲得(Bruker, AC-200E)，200 MHz。聚合物之濃度為1-2%。

paclitaxel／PDLLA-PEG-PDLLA糊之外形利用掃描電子顯微鏡(SEM)(Hitachi F-2300)檢查。樣品塗佈以60% Au及40% Pd(厚10-15毫微米)，利用Hummer儀器進行(Technics, USA)。

D. paclitaxel之試管內釋出

填加有20% paclitaxel之PDLLA：PCL糊(約2毫克)小丸或填加有20% paclitaxel之PDLLA-PEG-PDLLA糊之圓柱體(由注射器擠壓融化狀糊而製成)，置於加蓋的14毫升玻璃管內，其中含有10毫升磷酸鹽緩衝之食鹽水(pH 7.4)及0.4克／升白蛋白。管子在37°C利用緩和旋轉式混合下培育。上清液定期吸出以作paclitaxel分析，再以新鮮的PBS／白蛋白緩衝溶液替換之。上清液(10毫升)以1毫升二氯甲烷萃取。水相傾析，且二氯甲烷相在氮蒸汽下於60°C下乾燥。乾燥之殘留物重組於40：60水：乙腈混合物中，再

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (¹³⁴)

以 10,000 g 離心約 1 分鐘。之後以 HPLC 分析在上清液中 paclitaxel 之含量。HPLC 分析利用 110A 泵及 C-8 Ultrasphere 管柱 (Beckman) 進行，SPD-6A UV 偵測計定在 232 毫微米，SIL-9A 自動注射器及 C-R3A 積分計 (Shimadzu)。注射體積為 20 微升，流速為 1 毫升／分。移動相為 58% 乙腈，5% 甲醇，及 37% 蒸餾水。

E. 結果及討論

以 GPC 偵測 PDLLA-PEG-PDLLA 相對於聚苯乙烯標準品之分子量及分子量分佈 (圖 30)。決定共聚物在 CHCl_3 之內在黏度係於 25°C 下利用 Canon-Fenske 黏度計進行。隨 PEG 含量之增加，分子量及內在黏度會減小。PDLLA-PEG-PDLLA 具 10%-40% PEG 含量，其多分散性為由 2.4 至 3.5。然而，具有 70% PEG 之共聚物具 1.21 多分散性之窄的分子量分佈。此可能是由於高的 PEG 含量減少副反應之機會，如轉酯作用，可造成聚合物分子量較廣的分佈。另外，疏水性-親水性嵌段共聚物之捲起結構可造成偽的低多分散性數值。

純 PEG 及 PDLLA-PEG-PDLLA 共聚物之 DSC 掃描示於圖 25 及 26 中。具有 70% 及 40% PEG 含量之 PDLLA-PEG-PDLLA 及 PEG 示出吸熱的峰，當共聚物中 PEG 含量減少時焓及溫度也減少。在 40% 及 70% PEG 共聚物中之吸熱峰可能是由於 PEG 區域之融化之故，顯示相分離之發生。雖然純的 PEG 有鮮明的融化峰，70% 及 40% PEG 之共聚物則顯示廣的峰，而在 70% PEG 例中有不同的肩。寬廣的融化峰

五、發明說明 (¹³⁵)

可能得自 PEG 結晶作用對 PDLA 之干擾。在 70% PEG 例中之肩可能代表 PDLA 區域之玻璃態化作用。在 PEG 含量為 10%，20% 及 30% 之共聚物中，溫度範圍 10-250℃，並未發生熱量之變化，顯示未發生顯著的結晶作用（因此是相之分離）。

無 paclitaxel 或有 20% paclitaxel 之 PDLA : PCL (70 : 30, 80 : 20, 90 : 10) 拌合物之 DSC 自記溫度圖在約 60℃ 下顯示出一個吸熱峰，得自 PCL 溶化之故。由於 PDLA 之無晶形本質及其低分子量 (800)，並未觀察到 PDLA 之溶化及玻璃態化。無熱量變化是因觀察到 paclitaxel 之再結晶或溶化。

20% 及 30% PEG 含量之 PDLA-PEG-PDLA 共聚物選出作為最佳的糊劑調和物材料，其理由如下：10% PEG 之 PDLA-PEG-PDLA 在約 60℃ 下無法溶化；40% 及 70% PEG 之共聚物在 60℃ 下可容易地溶化，且 20% 及 30% PEG 共聚物在 50℃ 及 60℃ 間會變成黏稠之液體；且將 40% 及 70% PEG 共聚物泡脹在水中可脹至極高，造成糊劑在水中快速的分散。

paclitaxel 自 PDLA-PEG-PDLA 圓柱體試管內釋出之概圖示於圖 27)。在 40% PEG 圓柱體中之實驗性偵測釋出被中止，因為圓柱體有極高之泡脹度（在一天內吸收約 200% 水）並可在數天內崩散。paclitaxel 自 30% PEG 圓柱體中釋出之部份在 70 天中會逐漸增加。自 20% PEG 圓柱體中釋出之部份緩緩增加至 30 天，再快速瓦解，再繼以另一段徐徐

五、發明說明 (¹³⁶)

增加期。在程度上出現顯著的差異，在此各個別的圓柱體 (20% PEG 內容物) 在 paclitaxel 釋出上顯示突然的變化。在突然增加之前，paclitaxel 之釋出部份於相同圓柱體直徑下 (1 毫米) 有較少 PEG 含量者將較少。40% 及 30% PEG 圓柱體顯示出較 20% PEG 圓柱體還高之 paclitaxel 釋出率。例如，30% PEG 之圓柱體在 30 天中可釋出 17% paclitaxel，和 20% PEG 圓柱體中之 2% 釋出比較之。具較小直徑之圓柱體可有較快之釋出率 (如在 30 天內，0.65 毫米及 1 毫米直徑之 30% PEG 圓柱體，可分別釋出 26% 及 17% 的 paclitaxel (圖 27))。

上述的觀察可由 paclitaxel 自圓柱體之釋出機制中解釋。paclitaxel 分散於聚合物中，呈晶體狀如光學顯微鏡所觀察的。晶體在 170°C 之共聚物基質中開始溶解，在 180°C 下完全溶解，此由填加有 20% paclitaxel 之 PDLLA-PEG-PDLLA (30% PEG) 之糊劑熱階段顯微鏡檢 DSC 自記溫度圖可觀察到，顯示 paclitaxel 有小的再結晶放熱 (16J/克，190°C) 及熔化吸熱 (6J/克，212°C)，顯示 paclitaxel 自共聚物熔融化於 180°C 後再結晶。在此藥物/聚合物基質型式中，paclitaxel 可經由擴散及/或聚合物浸蝕釋出。

在擴散受控制中，藥物可由聚合物中之分子擴散及/或經由連接之藥物粒子所形成之開放管道而釋出。因此在 20% 填料下，某些 paclitaxel 粒子可分離，且 paclitaxel 可由共聚物中之溶解繼而擴散而釋出。其他的 paclitaxel 粒子可形成簇集連接至表面，並經由管道擴散釋出。在二例

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

約

五、發明說明 (¹³⁷)

中，具較小尺寸的圓柱體由於較短的擴散路徑可有更快的藥物釋出。(圖27)。

於釋出中記錄圓柱體的尺寸變化及水份之吸收(圖28)。於2天內，30% PEG圓柱體長度，直徑及濕重的變化可快速增加至最大，保持不變達15天再逐漸降低。圓柱體之最初直徑並不影響泡脹行為。至於20% PEG之圓柱體，在一天內長度減少10%並成平抑狀態，而直徑及水之吸收隨時間而逐漸增加。由於共聚物較多的PEG吸收較多水以助paclitaxel之擴散，可觀察到更快之釋放(圖27)。

以GPC追蹤PDLLA-PEG-PDLLA糊劑共聚物分子量之降解。對20% PEG圓柱體而言，高峰部份之溶離體積隨時間而增加，顯示在釋出實驗過程中減少的聚合物分子量(圖30)。在第69天可觀察到二相分子量分佈。在30% PEG圓柱體方面，聚合物分子量也降低(1毫米及0.65毫米)。然而並未觀察到二相分佈。

NMR光譜顯示PEG峰在3.6 ppm及PDLLA峰在1.65 ppm及5.1 ppm。69天後，PEG之峰區較共聚物中PDLLA之區域顯著降低(圖29)，顯示PEG自PDLLA分解後之溶解。圓柱體之乾團塊喪失也予以記錄(圖29)，並顯示出30% PEG - 0.65毫米 > 30% PEG - 1毫米 > 20% PEG - 1毫米次序之降解速率。

利用SEM觀察paclitaxel釋出之前及之中，經乾燥圓柱體之外形變化(圖31)。簡言之，在釋出前可觀察到固態paclitaxel晶體及無孔之聚合物基質(圖31A及31B)。於釋

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (¹³⁸)

出69天後，未觀察到paclitaxel晶體，且由於聚合物之降解及水份之吸收，基質含有許多孔洞(圖31C及31D)。

30% PEG圓柱體在水中僅2天後即顯示充份之泡脹(圖28)，且因此對分離的水溶性PEG塊及已分解之PDLLA(即DL-乳酸寡聚物)之擴散阻礙會減少。由於30% PEG圓柱體之團塊喪失及降解是連續的，腐蝕釋出之貢獻逐漸增加，造成paclitaxel在無任何突然變化下之持續釋出(圖27)。對20% PEG圓柱體而言，泡脹在最初是緩慢的(圖28)造成降解產物緩慢的擴散。因此在內部區域中之降解產物會大部份保留，而在外區因為較短的擴散路徑有較少的降解產物。降解產物加速降解速率，因為寡聚物之羧酸末端催化水解降解作用之故。此造成高分子量之外殼及低分子量之內部，可由二相共聚物分子量分佈顯示(圖30，69天)。由於殼的瓦解依據因素而定，如殼及內部降解產物之強度，厚度及抵禦力量，因此內部降解產物喪失之時機及程度有極多變化。由於殼之瓦解並非一致的，且聚合物中之藥物非顯微上均質的，因此4種受試樣品釋放爆發及爆發程度均異(圖27)。

paclitaxel自PDLLA及PCL拌合物及純PCL中之釋出示於圖32。簡言之，依拌合物中PDLLA含量，釋出部份有所增加。例如，在10天內，自80：20，70：30及0：100 PDLLA：PCL中所釋出之paclitaxel分別為17%，11%及6%。經過一天中最初之爆發後，自80：20 PDLLA：PCL糊中可得大約固定之釋出。於釋放之中，並未觀察到顯著

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (¹³⁹)

的泡脹程度。對PDLLA：PCL拌合物而言，由於PDLLA具有約800極低之分子量，其可快速水解至水溶性產物中，在團塊之損失上無長期之延緩。PCL充作"保持"材料使糊劑可快速崩散。因此釋放率隨拌合物中之PDLLA含量而增加，此乃加強降解之故。PDLLA連續的浸蝕可控制paclitaxel之釋出，且造成固定的釋出。paclitaxel自純PCL中之釋出，由於PCL緩慢的降解速率(在1-2年內)因此可能是受制的擴散。

由於糊劑小丸在24小時培育期內之降解，因此在填加有20%paclitaxel之90：10 PDLLA：PCL糊劑釋出研究中要考慮困難性。簡言之在培育的前12小時中，每小時採取樣品，以確保paclitaxel釋出之降低狀況。自90：10糊劑中釋出之paclitaxel在10小時內為25-35%。

含有30%paclitaxel之90：10 PDLLA：PCL糊劑，可釋出較含有20%paclitaxel之90：10 PDLLA：PCL糊更多之paclitaxel。因此，paclitaxel釋出率之調節，其由聚合物及化學治療劑之特性及投藥位置所調控，在發展局部治療上十分重要。

實例21

製備含有水溶性添加物及paclitaxel之聚合組成物

A. 聚合組成物之製備

製備paclitaxel／添加物共沉澱物之微粒，再加至PCL上形成糊劑。簡言之，paclitaxel(100毫克)溶解於0.5毫升乙醇中(95%)，再與先前溶解或分散於1.0毫升蒸餾水中之添

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (¹⁴⁰)

加物(100毫克)混合。混合物滴定直到形成平滑之糊劑為止。糊劑塗佈在巴氏皿上，再於37°C下風乾一夜。乾燥之團塊利用研鉢及研杵粉碎，並通過#140(106微米)篩(Endecotts Test Sieves Ltd, London, England)。微粒(40%)再納入熔化的PCL(60%)中，65°C下，相當於paclitaxel 20%填料。用於此研究中之添加物為明膠(B型，100 bloom, Fisher Scientific)，甲基纖維素(British Drug Houses)，右旋糖，T500 (Pharmacia, Sweden)，白蛋白(Fisher Scientific)及氯化鈉(Fisher Scientific)。如上述製備paclitaxel及明膠或白蛋白之微粒，但通過#60篩(270微米)(Endecotts Test Sieves Ltd, London, England)以評估微粒大小在paclitaxel自糊劑中釋出之作用。也製備糊劑，以含有10，20或30%明膠及20%paclitaxel於PCL中，以評估添加物之比例對藥物釋出上之作用。除非另有所示，製備含有20%paclitaxel並分散在PCL中之糊劑，充作釋出藥研究中之對照組。

B. 藥物釋出研究

約2.5毫克的填有paclitaxel之糊劑小丸，懸浮在50毫升的10 mM PBS(pH 7.4)中，於有螺紋蓋之試管中。管子在37°C下上下滾動，並在固定間隔時間移出49.5毫升的上清液，經由0.45微米濾膜過濾，再保留以供paclitaxel分析。在各管中放置等量PBS，以維持在整個研究期間之下降狀況。於分析時，濾液以3×1毫升二氯甲烷(DCM)萃取，再將DCM萃取物於氮蒸汽下蒸乾，再溶於1毫升乙腈中。以

五、發明說明 (¹⁴¹)

HPLC 利用水：甲醇：乙腈(37：5：58)之移動相，流速1毫升／分(Beckman Isocratic Pump)，C18 逆相管柱(Beckman)及UV偵測計(Shimadzu SPDA)，232毫微米波長。

C. 泡漲研究

利用paclitaxel-#140孔篩大小之添加物微粒(及僅在明膠時之#60)製備之paclitaxel／添加物／PCL糊，擠壓以形成圓柱體，切片，稱重且各片之直徑及長度利用測微計(Mitutoyo Digimatic)測量。小片懸浮於37℃之蒸餾水中(10毫升)，在預定間隔時間下丟棄水份，再測量圓柱片之直徑及長度及稱重樣品。樣品之外形(懸浮於水中之前及之後)利用掃描電子顯微鏡檢查(SEM)(Hitachi F-2300)。樣品以60%Au及40%Pd(厚10-15毫微米)利用Hummer儀器(Technics, USA)塗佈。

D. 雞胚胎絨毛尿膜(CAM)研究

受精，家養之雞胚在少殼培養之前先培育4天。在90%相對濕度及3%CO₂下培育卵內容物，且在培育第6天時，將1毫克填加有paclitaxel之糊劑(含有6%paclitaxel，24%明膠及70%PCL)或對照組(30%明膠於PCL)糊劑直接放置在CAM表面。經2天的曝露後，利用立體顯微鏡且以電視攝影機界面來檢查血管分佈；再將電視訊號呈現在電腦上並印出來。

E. 結果及討論

Paclitaxel及明膠或白蛋白共沉澱之微粒係硬且脆的，且

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (142)

可容易地納入PCL中，而其他的添加物產生軟粒子，有在糊劑製備之破裂之傾向。

圖33示出paclitaxel自含有20%paclitaxel於PCL，或20%paclitaxel，20%添加物及60%PCL之糊劑中釋出之過程。paclitaxel自加或不加添加物之PCL中之釋出係依循一個二相釋出型式：最初，是較快的藥物釋出繼以較緩的藥物釋出。paclitaxel自糊劑中最初之較快釋出被視為是位在表面之paclitaxel溶解之故，或paclitaxel自糊劑表面區域擴散之故。接下來較慢的釋出相可歸因於藥物與緩衝溶液接觸之有效表面積減少，緩衝溶液慢慢進入聚合物基質或藥物穿越聚合物基質之平均擴散經增加。

PCL中paclitaxel釋出概況有二相在親水性添加物存在下更有增加，以明膠，白蛋白及甲基纖維素可產生藥物釋出率最大的增加(圖33)。當以較大的paclitaxel-添加物粒子(270微米)製備糊劑，則paclitaxel自聚合物基質之釋出較使用較小paclitaxel-添加物粒子(106微米)有進一步的增加。(圖34)。增加添加物之用量(如明膠)可對藥物釋出產生相當的增加(圖34)。圖35A示出含有20%paclitaxel，20%添加物及60%PCL之糊劑之泡脹行為。泡脹速率依循明膠>白蛋白>甲基纖維素>右旋糖>氯化鈉之次序。此外，當較高比例的水溶性聚合物加至糊劑中，泡脹速率會增加(圖35B)。含有明膠或白蛋白之糊劑可在前8-10小時內快速泡脹，接下來當樣品之體積變化大於40%泡脹速率下降。利用較大的(270微米)paclitaxel-明膠粒子製備之糊

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (¹⁴³)

劑，可以較以較小(106微米)paclitaxel-明膠粒子製備的較快速率泡漲。當體積增加超過50%時所有的糊劑會崩散。SEM研究顯示，糊劑之泡漲由基質之分解而完成(圖36)。在高倍率下(圖36C及36D)，於糊劑表面有針狀或棒狀paclitaxel晶體明顯，且在泡漲後與明膠極緊密相連。(圖36C及36D)。

滲透的或可泡漲的親水性作用物，在疏水性聚合物中呈分離的粒子型式包埋，造成藥物經由基質浸蝕，藥物經由聚合物基質擴散，及／或基質中因水溶性添加物溶解在基質中生成孔洞而由此擴散及／或對流之組合而釋出。滲透作用物及可泡漲聚合物分散在疏水性聚合物中，可吸水(作用如芯給劑)，溶解或泡漲且呈現出腫脹壓力，其可瓦解相鄰粒子間之中隔(聚合物層)，造成微管道，因此有助藥物分子由擴散或對流逃至周圍介質中。糊劑基質之泡漲及分解(圖36)似乎可造成穿越基質內部之微管道之形成。聚合物泡漲不同的速率及程度(圖35)可因所觀察到的paclitaxel釋出率變異之故(圖33及34)。

圖37示出經對照的明膠-PCL糊(圖37A)及20%paclitaxel-明膠-PCL糊(圖37B)處理之CAMs。CAM表面上之糊劑由箭號示出。以對照組糊處理過之CAM有正常的毛細管網路架構。以paclitaxel-PCL糊處理的CAMs可一致地顯出血管的退化及缺乏毛細管網路之環帶。在糊劑內納入添加物可顯著地增加無血管環帶之直徑(圖37)。

此研究顯示，paclitaxel自PCL試管內之釋出，可因PCL

五、發明說明 (¹⁴⁴)

基質中納有paclitaxel／親水性聚合物微粒而增加。評估調和物治療老鼠皮下腫瘤之活體內研究也顯示，paclitaxel／明膠／PCL糊劑可顯著地減少腫瘤團塊。已示出水溶性作用物之型式，添加物微粒大小及比例等因素可影響藥物之釋出特性。

實例22

產生毫微糊劑之步驟

毫微糊劑是一種微球於親水性凝膠中之懸液。在本發明一方面內，凝膠或糊劑可抹過組織，充作填加有藥物之微球靠近標的組織定位之方法。由於以水為基礎，糊劑可立即被體液稀釋，造成糊劑黏性及沉積在附近組織之傾向降低。一群包膠有藥物之微球是緊靠近標的組織。

在這些實驗中被利用到的試劑及設備包括：玻璃燒杯，Carbopol 925(藥用級，Goodyear Chemical Co.)，蒸餾水，氫氧化鈉(1M)於水溶液中，氫氧化鈉溶液(5M)於水溶液中，在0.1-3微米大小範圍內之微球，懸浮在水中呈20% w/v(見前文)。

1. 製備5% w/v Carbopol凝膠

充份量之Carbopol加至1M氫氧化鈉中以達到5% w/v溶液。為將Carbopol溶於1M氫氧化鈉，冷混合物靜置約1小時。在此期間，混合物攪拌且於1小時後pH值以5M氫氧化鈉調至pH 7.4，直到Carbopol完全溶解為止。一旦pH值到達7.4，凝膠覆上再靜置2-3小時。

2. 產製毫微糊劑之步驟

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (¹⁴⁵)

將0.1微米-3微米微球充份量加至水中，產生20%的微球懸液 - Carbopol凝膠(8毫升的5% w/v)置玻璃燒杯中，再加2毫升20%微球懸液。混合物充份攪拌以將微球在凝膠中分散。此混合物貯於4°C下。

實例23

Paclitaxel與環糊精之絡合作用

A. 材料

Paclitaxel 得自 Hauser Chemicals Inc. (Boulder, Colorado)。磷酸二鈉(Fisher)，檸檬酸(British Drug Houses)，羥丙基-β-環糊精(HPβCO)，γ-環糊精(γ-CD)及羥丙基-γ-環糊精(HPγCD)得自 American Maize-Products Company (Hammond, Indiana)，並以所接受之型式使用。

B. 方法

1. 溶解度研究

過量的paclitaxel(5毫克)加至含有各種濃度之γ-CD，HPγ-CD或HPβ-CD之水溶液中，並緩和滾動於37°C下歷約24小時。於平衡之後，一份懸液經0.45微米膜過濾(Millipore)，適當地稀釋再以HPLC分析。移動相由乙腈，甲醇及水(58:5:37)所組成，流速為1.0毫升/分。研究paclitaxel在50:50水及乙醇(95%)之溶劑中之溶解度，其中並含有至多10%的各種濃度的HPβ-CD。此外，加2毫克paclitaxel(如所接收的)至0，5，10或20%HPγ-CD溶液，或2毫克先前水解之paclitaxel(由懸浮在水中7天

五、發明說明 (¹⁴⁶)

而得)加至純水並緩和攪動於37°C下，可檢視paclitaxel之溶解概況。在各種時間間隔下取樣，再進行paclitaxel之分析。

2. 穩定性研究

含有20%HP β -CD或HP γ -CD之溶液分別具有3.9及5.2之pH值。檢視paclitaxel於環糊精溶液中之穩定性，係在含有10或20%HP γ -CD或HP β -CD於水或50:50水-乙醇混合物之溶液中(20微克/毫升)，於37°C或55°C不同時間間隔下分析paclitaxel。此外，也決定paclitaxel在含有1%，2%或5%HP β -CD溶液中(1微克/毫升)，55°C下之穩定性。

C. 結果

1. 溶解度研究

Paclitaxel之溶解度隨受檢之整體CD濃度範圍而增加；HP β -CD可造成paclitaxel溶解度最大的增加(圖38)。由溶解度曲線中可推知，化學計量較1:1複合物有更高等級。Paclitaxel可與HP β -CD及HP γ -CD形成Ap型曲線，與 γ -CD形成AN型曲線。paclitaxel在50%HP β -CD於水中之溶解度於37°C下為3.2毫克/毫升，其係較paclitaxel在水中溶解度約增大2000倍。對paclitaxel-環糊精所估計之一級複合物穩定性常數(得自圖39)於 γ_1 -CD，HP γ -CD及HP β -CD分別為3.1，5.8及7.2M⁻¹，且二級複合物於 γ -CD，HP γ -CD及HP β -CD分別為0.785 × 10³，1.886 × 10³及7.965 × 10³M⁻¹。由所觀察到之穩定性常數值可推

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (¹⁴⁷)

測，由paclitaxel與環糊精所形成之包涵體複合物主要是二級複合物。

Paclitaxel在50：50水：乙醇混合物中之溶解度隨環糊精濃度增加而增加(圖40)，此可由在純水中之複合作用觀察到。paclitaxel及HP β -CD複合物在50%乙醇(26.57M⁻¹)存在下之表現穩定常數顯著低於無乙醇時之穩定常數(約300倍)。較低的穩定常數可歸因於在乙醇存在下溶劑之介電常數或極性變化所致。

Paclitaxel在0，5，10及20% γ -CD溶液中之溶解概況(圖41)說明paclitaxel在純水或環糊精中亞穩溶液之形成；paclitaxel在溶液中之量逐漸增加，到達最高值再下降。以先前懸浮在水中48小時而水解之paclitaxel樣品進行溶解研究，並未顯示有亞穩溶液之形成。此外，已水解的paclitaxel之DSC分析(在室溫下之真空烘箱中乾燥)顯示在60及110°C間有二個寬廣的吸熱峰。這些峰伴隨約4.5%重量之損失(由熱解重量分析法決定)顯示有水合物之存在。重量約2.1%之損失可推知是形成paclitaxel之單水合物。因此在60°C及110°C間發生DSC峰及重量損失約4.5%，可推知二水合物之存在。對於如所接受之paclitaxel樣品，在60°C及110°C間之吸熱峰(DSC結果)或重量損失(TGA結果)並無證據。因此，(如所接受的)paclitaxel是無水的且在水中之懸液內其可溶解形成超飽和溶液，其呈較低溶解度水合物型式般再結晶(圖41)。

2. 穩定性研究

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (¹⁴⁸)

paclitaxel降解作用依環糊精濃度而定，並依循偽一次降解動力學(見圖42)。Paclitaxel在含有1%HP β -CD溶液中(1微克／毫升paclitaxel)，於55℃下之降解速率，較在更高環糊精濃度下之速率還高($K=3.88 \times 10^{-3}$ ／小時⁻¹)。1.78 $\times 10^{-3}$ ／小時⁻¹及0.96 $\times 10^{-3}$ ／小時⁻¹之降解速率常數可分別在paclitaxel於10%HP β -CD及HP γ -CD中觀察到。含有2，4，6或8%HP β -CD之paclitaxel溶液(1微克／毫升)與得自10或20%HP β -CD溶液(20微克／毫升)之降解速率並無任何顯著的差異。乙醇之存在並不會有害地影響paclitaxel於環糊精溶液中之穩定性。

D. 結論

此研究顯示，paclitaxel的溶解度可經由環糊精之複合作用而增加。這些以水為基礎的環糊精調和物可被用於治療各種的發炎疾病。

實例24

aclitaxel濃度增加之聚合組成物

PDLLA-MePEG及PDLLA-PEG-PDLLA為具有疏水性區域(PDLLA)及親水性區域(PEG或MePEG)之嵌段共聚物。在適當的分子量及化學組成物，其可形成疏水性PDLLA核心及親水性MePEG外殼之緊密凝集物。paclitaxel可填加至疏水性核心內，由是提供具"溶解度"增加之paclitaxel。

A. 材料

D,L-丙交酯購自Aldrich，辛酸亞錫，聚乙二醇(Mw 8,000)，MePEG(Mw-2,000及5,000)得自Sigma。MePEG

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (¹⁴⁹)

(Mw 750)得自 Union Carbide。共聚物利用開環聚合作用步驟合成，其中以辛酸亞錫為催化劑 (Deng, et al., J. Polym. Sci. Polym, Lett. 28 : 411-416, 1990 ; Gohn, et al., J. Biomed, Mater, Res. 22 : 993-1009, 1988)。

於合成 PDLA-MePEG 時，DL-丙交酯 / MePEG / 辛酸亞錫之混合物加至 10 毫升玻璃安瓿內。安瓿連接至真空計，再以焰火封口。聚合作用由安瓿在 150°C 之油浴中培育 3 小時而完成。於 PDLA-PEG-PDLA 時，D,L-丙交酯 / PEG / 辛酸亞錫之混合物轉移至玻璃燒瓶，以橡皮塞封口，再於 150°C 烘箱內加熱 3 小時。共聚物之起始組成示於表 1 及 2。在所有例子中，辛酸亞錫之量為 0.5%-0.7%。

B. 方法

聚合物溶於乙腈中，並以 10,000 g 離心 5 分鐘以丟棄任何不可溶解之雜質。再加 paclitaxel 乙腈至各聚合物溶液中，以生成有 10% wt paclitaxel 之溶液 (paclitaxel+聚合物)。再移去溶劑乙腈以得澄清的 paclitaxel / PDLA-MePEG 基質，於氮蒸汽及 60°C 加熱下進行。蒸餾水，0.9% NaCl 食鹽水，或 5% 右旋糖以 4 倍於基質之重量加入。基質以渦旋混合及在 60°C 下定期加溫之助最後"溶解"。在所有例子中均可得澄清的溶液。粒子大小以亞微細粒填充器 (NICOMP 270 機型) 決定知均在 50 毫微米以下。調和物示於表 1。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (¹⁵⁰)

表 1. Paclitaxel / PDLLA - MePEG* 之調和物

PDLLA-MePEG	溶解介質	Paclitaxel填料 (最終的paclitaxel濃度)
2000/50/50	水	10%(20毫克/毫升)
2000/40/60	水	10%(20毫克/毫升)
2000/50/50	0.9%食鹽水	5%(10毫克/毫升)
2000/50/50	0.9%食鹽水	10%(20毫克/毫升)
2000/50/50	5%右旋糖	10%(10毫克/毫升)
2000/50/50	5%右旋糖	10%(20毫克/毫升)

於 PDLLA - PEG - PDLLA 之例中 (表 2)，由於共聚物無法溶於水中，paclitaxel 及聚合物可共溶於丙酮中。水或水／丙酮之混合物逐漸加至此 paclitaxel 聚合物溶液中，以誘導 paclitaxel／聚合物球之形成。

表 2. PDLLA - PEG - PDLLA 之組成

共聚物名稱	PEG wt(克)	DL-內交酯wt(克)
PDLLA - PEG - PDLLA 90/10	1	9
PDLLA - PEG - PDLLA 80/20	2	8
PDLLA - PEG - PDLLA 70/30	3	7
PDLLA - PEG - PDLLA 60/40	4	6
PDLLA - PEG - PDLLA 30/70	14	6

* PEG 分子量 8,000。

五、發明說明 (¹⁵¹)

C. 結果

PDLLA-MePEG 組成物有許多可在水，0.9% 食鹽水，或 5% 右旋糖中形成澄清溶液，顯示可在毫微米範圍中形成緊密的凝集物。paclitaxel 可成功地填加至 PDLLA-MePEG 膠團。例如，在 % 填料中 (此代表 10 毫克 paclitaxel 於 1 毫升 paclitaxel / PDLLA-MePEG / 水系統)，自 2000、50 / 50 及 2000-40 / 60 可得澄清的溶液。粒子大小為約 60 毫微米。

實例 25

產製薄膜之步驟

所謂薄膜係指聚合物形成許多幾何形狀之一。薄膜可以是聚合物薄且具彈性之薄片，或聚合物 2 毫米厚之圓片，其可供應至組織表面預防進一步的結疤及黏連之形成。此薄膜經設計可以放置在曝露出之組織上，如此任何的包膠藥物可長期於組織位置上自聚合物中釋出。薄膜可由許多方法製成，包括如澆鑄，及利用噴灑。

在澆鑄技術中，聚合物或可溶化並倒入形狀中，或可溶於二氯甲烷中並倒入形狀內。聚合物再由冷卻固化，或於溶劑蒸發時固化。於噴灑技術中，聚合物可溶於溶劑中並塗佈在玻璃上，當溶劑蒸發時聚合物可在玻璃上固化。重覆的噴灑可將聚合物組成薄膜，再可自玻璃上剝離。

在這些實驗中有利用到的試劑及設備包括小的燒杯，Corning 熱盤攪拌器，澆鑄模 (如 50 毫升的離心管蓋) 及模型保持裝置，20 毫升的玻璃液體閃爍計數小瓶 (有

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (¹⁵²)

蓋)(Plastic 嵌入型)，TLC 噴霧器，氮氣桶，聚己酸內酯 ("PCL"-Mw 10,000-20,000；Polysciences)，paclitaxel (Sigma 95% 純度)，乙醇，"洗過的"(見前文) 乙烯醋酸乙烯酯 ("EVA")，聚(DL) 乳酸 ("PLA"-Mw 15,000-25,000)；Polysciences)，DCM(HPLC 級；Fisher Scientific)。

1. 產製薄膜之步驟-熔體澆鑄

具有已知 PCL 重量之小的玻璃燒杯置於含有水的大燒杯中(以充作水浴)，再置於 70°C 之熱盤上直到聚合物完全熔化為止。加已知重量的藥物至已熔化的聚合物中，混合物再充份攪拌。已熔化的聚合物倒入模具內，再令其冷卻。

2. 產製薄膜之步驟-溶劑澆鑄

已知量之 PCL 直接稱重至 20 毫升玻璃液體閃爍計數小瓶內，再加入充份量的 DCM 以達成 10%w/v 溶液。溶液混合，再加充份量的 paclitaxel 以達到欲求的 paclitaxel 最終濃度。溶液渦旋以溶解 paclitaxel，令其靜置一小時(為消除所存在之空氣氣泡)，再緩緩倒入模具內。模具置於通風櫥下一夜，令 DCM 蒸發。

3. 產製薄膜之步驟-噴灑

充份劑量的聚合物直接稱重至 20 毫升玻璃液體閃爍計數小瓶內，再加充份的 DCM 使達 2% w/v 溶液。溶液混合以溶解聚合物。利用自動吸量管，將適量(最少 5 毫升)的 2% 聚合物溶液轉移至另一個 20 毫升玻璃液體閃爍計數小瓶中。加充份量之 paclitaxel 至溶液中，並震盪加蓋小瓶使溶

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (¹⁵³)

解。爲作噴灑之準備，移去小瓶之蓋子，且TLC噴霧器之桶再浸漬入聚合物溶液。

氮桶連接至霧化器之氣體入口，且壓力逐漸增加直到霧化及噴灑開始。模具利用5秒的擺動噴霧器噴灑，且在噴灑之間有15秒之乾燥時間。繼續噴灑直到適當厚度之聚合物沉積在模具上爲止。

實例26

由乙烯醋酸乙烯酯及界面活性劑組成之填加有治療劑之聚合薄膜

在此實例中檢視二型薄膜：填加有paclitaxel之純的EVA薄膜，及填加有paclitaxel之EVA／界面活性劑拌合薄膜。

受檢之界面活性劑爲二種疏水性界面活性劑(Span 80及Pluronic L101)及一種親水性界面活性劑(Pluronic F127)。Pluronic界面活性劑本身是聚合物，其有令人吸引的特性，因爲其可與EVA拌合使各種藥物之遞送特性更臻完善。Span 80是一種較小的分子，其可分散在聚合物基質內且不會形成拌合物。

界面活性劑可用於調控paclitaxel自薄膜之釋出藥，且使薄膜的某些物理變數更臻完善。界面活性劑拌合薄膜的一方面，其顯示可受控的藥物釋出速率是可變化化合物泡漲於水中之速率及程度之能力。水擴散至聚合物-藥物基質對於藥物自載劑中釋出是具關鍵性的。圖43C及43D示出當改變拌合物中界面活性劑之水平，薄膜之泡漲程度。純的

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (¹⁵⁴)

EVA 薄膜在2個月期間不會泡漲至任何顯著的程度。然而，由增加添加至EVA中界面活性劑之水平，可增加化合物之泡漲程度，且經由增加親水性可增加泡漲程度。

以這些薄膜所進行的實驗結果示於圖43A-E。簡言之，圖43A示出隨時間自純EVA膜釋出之paclitaxel(按毫克計)。圖43B示出留在相同薄膜上之藥物百分率。由此二圖中可看出，當paclitaxel之填料填加時(即按重計之paclitaxel百分率增加)藥物釋出率會增加，顯示預期的濃度依賴性。當paclitaxel填料增加時，留在薄膜上之paclitaxel百分率也會增加，顯示較多的填料對長期釋外型調和物較具吸引力。

評估薄膜之物理強度及彈性，且示於圖43E中。簡言之，圖43E示出純EVA及EVA／界面活性劑拌合物之應力／張力曲線。此應力粗略的偵測說明薄膜之彈性隨著Pluronic F127之加入而增加，且抗張強度(在打破上之應力)在加入Pluronic F127下以濃度依賴方式增加。在膜的設計上，彈性及強度是重要的考量，其必需針對特殊臨床應用而操作，且不致使化合物有持久的變形。

上述資料說明，某些界面活性劑添加物在控制藥物釋出率及改變溶媒物理特性上之能力。

實例27

產製毫微噴霧劑之步驟

毫微噴霧劑之小微球在食鹽水中之懸液。若微球十分小(即直徑在1微米以下)其可形成膠態，如此懸浮液在重力下

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

總

五、發明說明 (¹⁵⁵)

不會沉降。如下文所詳述的，可生成0.1微米至1微米微粒子之懸液，使適合氣霧化沉積在組織上，此係指在手術之際(如用於血管黏連)，經由kaproscopic之介入，或經由手指泵給之氣霧劑(如可局部遞送)。可用來產生毫微噴霧劑之設備及材料包括：200毫升水加套之燒杯(Kimax或Pyrex)，Haake循環水浴，架高之攪拌器及2英寸直徑之控制器(4葉式，推進型不銹鋼攪拌器；Fisher牌)，500毫升的燒杯，熱盤／攪拌器(Corning牌)，4×50毫升聚丙烯離心管(Nalgene)，玻璃閃爍計數小瓶，有塑質之嵌入型蓋子，桌上型離心機(Beckman)，高速離心機-地上型(JS 21 Beckman)，Mettler分析天平(AJ 100，0.1毫克)，Mettler數據式上裝型天平(AE 163，0.01毫克)，自動吸量計(Gilson)，無菌吸量頭，泵給作用之氣霧劑(Pfeiffer藥品) 20毫升，層流通風廚，PCL(Mw 10,000 - 20,000；Polysciences, Warkington, Pennsylvania USA)，"洗過的"(見前文)EVA，PLA(Mw 15,000 - 25,000；Polysciences)，聚乙稀醇("PVA"-Mw 124,000-186,000；99%水解的；Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, USA)，DCM或"二氯甲烷"；HPLC級Fisher Scienitific)，蒸餾水，無菌食鹽水(Becton and Dickenson or同等物)。

1. 製備5%(w/v)聚合物溶液

依據所製備之聚合物溶液，以下直接稱重至20毫升的玻璃閃爍計數小瓶中：1.00克的PCL或PLA或各0.50克的

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (¹⁵⁶)

PLA 及洗過的 EVA。利用測量筒，20 毫升 DCM 加入再將小瓶緊緊蓋好。小瓶在室溫下靜置(25℃)直到所有的聚合物溶解為止。

2. 製備 3.5%(w/v) 貯液

由下示之步驟製備溶液，或將製備之 5%(w/v) PVA 貯液稀釋以產製微球(見實例 28)。簡言之，17.5 克的 PVA 直接稱重至 600 毫升玻璃燒杯中，再加 500 毫升蒸餾水。燒杯加蓋，置 2000 毫升含有 300 毫升水之玻璃燒杯中。在 85℃ 下 PVA 以 300 rpm 攪拌直到完全溶解為止。

3. 產製毫微噴霧劑之步驟

簡言之，100 毫升 3.5% PVA 溶液置於 200 毫升水加套之燒杯中，並接上 Haake 水浴。燒杯之內容物在 3000 rpm 下攪拌，且 10 毫升聚合物溶液(依據所產生之毫微噴霧劑型式使用聚合物溶液)利用 5 毫升自動吸量管以 2 分鐘時間滴入攪拌之 PVA 內。3 分鐘後，攪拌速率調整至 2500(+/- 200 rpm) 歷 2.5 小時。2.5 小時後，攪拌葉自毫微噴霧劑製劑中移去，並以 10 毫升蒸餾水潤濕以令潤濕溶液可進入毫微噴霧劑製劑內。

微球製劑倒入 500 毫升燒杯中。加套之水浴以 70 毫升蒸餾水洗滌，令 70 毫升的潤濕溶液可進入微球製劑之內。180 毫升之微球製劑以玻棒攪拌，有同等地倒入 4 個聚丙烯 50 毫升離心管內，再以 10,000 g(+/- 1000 g) 離心 10 分鐘。PVA 溶液自各微球小丸中吸乾再丟棄。加蒸餾水(5 毫升)至各離心管中再渦旋。4 個微球懸液倒入一個離心管

五、發明說明 (¹⁵⁷)

中，利用20毫升蒸餾水並以10,000 g(+/- 1000 g)離心10分鐘。上清液自微球小丸中洩出，加入40毫升蒸餾水，再渦旋微球製劑(此過程重覆3x)。微球製劑再轉移至已預先稱重之玻璃閃爍計數小瓶內。

令小瓶在室溫下(25°C)靜置1小時，令2微米及3微米直徑之微球在重力下沉降出來。經1小時後，吸出上方9毫升懸浮液，置入無菌且加蓋之50毫升離心管中，以10,000 g(+/- 1000 g)離心10分鐘。上清液丟棄，小丸懸浮於20毫升無菌食鹽水中，以10,000 g(+/- 1000 g)離心懸液10分鐘。上清液丟棄，小丸再懸浮於無菌食鹽水中。食鹽水之用量依所終所需要之懸液濃度而定(通常10% w/v)。毫微噴霧懸液加至氣霧劑中。

實例28

微球之製備

用於製造微球之裝置包括：200毫升水加套之燒杯(Kimax或Pyrex)，Haake循環水浴，架高之攪拌器及2英寸直徑之控制器(4葉式，推進型不銹鋼攪拌器 - Fisher牌)，500毫升玻璃燒杯，熱盤／攪拌器(Corning牌)，4×50毫升聚丙烯離心管(Nalgene)，玻璃閃爍計數小瓶有塑質之嵌入蓋，桌上型離心機(Beckman)，高速離心機-地上型(JS 21 Beckman)，Mettler分析天平(AJ 100，0.1毫克)，Mettler數據式上方填料型天平(AE 163，0.01毫克)，自動吸量管(Gilson)。試劑包括PCL(Mw 10,000 - 20,000；Polysciences, Warrington Pennsylvania, USA)，

五、發明說明 (158)

"洗過的"(見"洗滌"之後-方法)EVA, PLA(Mw 15,000-25,000; Polysciences); 聚乙烯醇("PVA"-Mw 124,00 - 186,000; 99% 水解; Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, USA), DCM 或 "二氯甲烷"; HPLC 級 Fisher Scientific, 及蒸餾水。

A. 製備 5%(w/v) 聚合物溶液

DCL(1.00 克)或 PLA 或各 0.50 克的 PLA 及洗過的 EVA 直接稱重至 20 毫升玻璃液體閃爍計數小瓶內。20 毫升的 DCM 再加入。小瓶加蓋, 並貯於室溫下(25°C)1 小時(可能需要經常的震盪), 或直到所有聚合物溶解為止。溶液可貯於室溫下達至少二週。

B. 製備 5%(w/v) PVA 貯液

25 克的 PVA 直接稱重至 600 毫升玻璃燒杯中, 再加 500 毫升蒸餾水, 配合 3 英寸之塗佈 Teflon 的攪拌子。燒杯以玻璃加蓋以減少蒸發之損失, 再置於含有 300 毫升水之 2000 毫升玻璃燒杯中。PVA 在 85°C 下(Corning 熱盤/攪拌器)以 300 rpm 攪拌 2 小時, 或直到完全溶解為止。以目視檢查決定 PVA 之溶解現象, 溶液應該是澄清的。溶液再轉移至玻璃製有螺紋頂之貯存容器內, 並在 4°C 下貯存至多 2 個月。然而使用前或稀釋前溶液均需加溫至室溫。

C. 產製微球之步驟

依據所製作之微球尺寸(見表 1), 100 毫升 PVA 溶液(濃度示於表 1)置於 200 毫升水加套之燒杯中。在此燒杯上接上 Maake 循環水浴, 令內容在 27°C (+/- 1°C) 下平衡 10 分

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (159)

鐘。依據所製備之微球尺寸(見表1)，定出架高之攪拌器開始之速率，且架高攪拌器之葉片置PVA溶液下半部。開始啓動攪拌器，再以5毫升自動吸量管，歷2分鐘期將10毫升之聚合物溶液(所使用之聚合物溶液依所產生之微球型式而定)滴入攪拌中之PVA內。3分鐘後，攪拌速率調整(見表1)，且溶液再攪拌2.5小時。再自微球製劑中移去攪拌葉，並以10毫升蒸餾水潤洗，如此潤洗溶液可引流至微球製劑中。微球製劑再倒入500毫升燒杯中，且加套之水浴以70毫升蒸餾水洗滌，其也可引流至微球製劑內。再將180毫升微球製劑以玻棒攪拌，取等量倒入4個50毫升的聚丙烯離心管內。瓶再加蓋，離心10分鐘(力量示於表1)。各微球小丸可吸取出45毫升的PVA溶液。

表 1
各直徑範圍微球所需之PVA
濃度，攪拌速率及離心力

產製階段	微球直徑		
	30微米至100微米	10微米至30微米	0.1微米至3微米
PVA濃度	2.5%(w/v)(即以蒸餾水稀釋5%貯液)	5%(w/v)(即未稀釋之貯液)	3.5%(w/v)(即以蒸餾水稀釋5%貯液)
攪拌起始速率	500 rpm +/- 50 rpm	500 rpm +/- 50 rpm	3000 rpm +/- 200 rpm
調整之攪拌速率	500 rpm +/- 50 rpm	500 rpm +/- 50 rpm	2500 rpm +/- 200 rpm
離心力	1000 g +/- 100 g (桌上型模式)	1000 g +/- 100 g (桌上型模式)	10000 g +/- 1000 g (高速模式)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (160)

再加5毫升蒸餾水至各離心管中，並渦旋以懸浮微球。4個微球懸浮液再倒入一個離心管內，並加上20毫升蒸餾水，再離心10分鐘(力量亦於表1)。此過程重覆二次以上共三次洗滌。微球再離心最後一次，並再懸浮於10毫升蒸餾水中。於最後一次洗滌後，微球製劑轉移至預先稱重之玻璃閃爍計數小瓶內。小瓶加蓋，置室溫下(25°C)一夜以令微球在重力下沉降。由於在0.1微米至3微米大小範圍內下降之微球不在重力下沉積，其留在10毫升懸液中。

D. 乾燥10微米至30微米或30微米至100微米直徑之微球

於微球在室溫下飽和一夜後，上清液自己沉降之微球中吸取出來。微球再於未加蓋之小瓶內，於櫥內乾燥1週，或直到其充份乾燥為止(在恆重下之小瓶)。將未加蓋之小瓶在氮氣緩慢氣流下(流速約10毫升/分)於通風櫥內可完成較快速之乾燥。當完全乾燥(在恆重下之小瓶)，小瓶稱重並加蓋。已標記好且加蓋之小瓶貯於室溫下之櫥內。微球貯放通常不超過3個月。

E. 決定0.1微米-3微米直徑微球懸液之濃度

此大小範圍下之微球不會沉積，故其可在4°C之懸液中放置最多4週。為決定微球在10毫升懸液中之濃度，200微升的懸液樣品吸量至1.5毫升已預重之離心管內。瓶子再於10000 g下離心(Eppendorf桌上型離心機)，移去上清液，令管子在50°C下乾燥一夜。管子再稱重以決定管中已乾燥微球之重量。

F. 填加有paclitaxel微球之製備

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (¹⁶¹)

爲了製備含有 paclitaxel 之微球，將適量已稱重(依欲加蓋之 paclitaxel 百分率而定)直接置於 20 毫升玻璃閃爍計數小瓶內。10 毫升詩合的聚合物溶液再加至含有 paclitaxel 之小瓶內，再渦旋直到 paclitaxel 溶解爲止。

含有 paclitaxel 之微球可再依上文步驟(C)至(E)基本地產製。

實例 29

塗佈有界面活性劑之微球

A. 材料及方法

微球製備自聚(DL)乳酸(PLA)，聚甲基異丁烯酸酯(PMMA)，聚己內酯(PCL)及 50 : 50 乙烯醋酸乙烯酯(EVA) : PLA，基本上如上文所述。大小範圍在 10 至 100 微米，平均直徑 45 微米。

人類血液得自健康之志願者。自血液中利用右旋糖沉降法及 Ficoll Hypaque 離心技術分離出嗜中性球(白血球)。嗜中性球以每毫升 5 百萬細胞懸浮在 HBSS 中。

由反應性氧之產生來決定嗜中性球活化作用水平，此由化學發光可決定。特言之，利用 LKB 發光計加 1 μ M luminol 加強劑可決定化學發光。進行微球之血漿預先塗佈(或調理作用)，係將 10 毫克微球懸浮在 0.5 毫升血漿中，並於 37°C 下滾動 30 分鐘。

微球再以 1 毫升 HBSS 洗滌，並將已離心之微球小丸加至 37°C 之嗜中性球懸液內，於 t=0 時間下。微球表面利用 Pluronic F127(BASF)之界面活性劑修飾，係將 10 毫克微

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (¹⁶²)

球懸浮在0.5毫升的2% w/w F127於HBSS溶液中，於37℃下歷30分鐘。微球再以1毫升HBSS洗二次，再加至嗜中性球或血漿中以進一步預先塗佈。

B. 結果

圖44示出未經處理的微球可得少於50 mV之化學發光。這些數值代表低水平的嗜中性球活化作用。經由比較，發炎的微晶體可得到接近1000 mV之值，可溶性化學活性劑得接近5000之數值。然而，當微球以血漿預先塗佈時，所有的化學發光值均放大至100至300 mV範圍(圖44)。這些嗜中性球反應或活化作用之程度，可視為緩和的發炎。PMMA可有最大的反應，且可視為最為發炎。PLA及PCL二者在血漿前處理(或調理作用)之後於活化嗜中性球上均可變為3至4倍強，但二聚合物間在此方面少有差異。EVA：PLA似乎無法用於血管生成調和物，因為微球難以乾燥及再懸浮於水性緩衝溶液中。血漿的此作用稱為調理作用，且由抗體或補體分子吸附至表面而得。這些經吸附之種類與在白血球上之受體交互作用，且造成擴大的細胞活化作用。

圖45-48描述分別預先塗佈PCL，PMMA，PLA及EVA：PLA之血漿之作用，並示出Pluronic F127預先塗佈在微球之血漿預先塗佈前之作用。這些圖片均顯示出相同的作用：(1)血漿預塗佈可擴大反應；(2)Pluronic F127預塗佈在其本身無作用；(3)由血漿預先塗佈所造成之經擴大的嗜中性球反應，可以2% Pluronic F127預先處理微球

五、發明說明 (163)

表面而予以強烈抑制。

血漿中經吸附蛋白質之本質也以電泳研究。利用此方法，可示出以Pluronic F127預處理聚合表面可抑制抗體吸附至聚合表面。

圖49-52另外示出以IgG(2毫克／毫升)或2% Pluronic F127再IgG(2毫克／毫升)分別預先塗佈PCL，PMMA，PLA或EVA：PLA微球之作用。由這些圖中也可看出，經擴大之反應(由IgG預先塗佈微球而致)可由於Pluronic F127之處理而抑制。

此結果顯示，以Pluronic F127預先處理所有4型微球之聚合表面，嗜中性球對微球之"發炎"反應可予以抑制。

實例30

治療劑包膠在聚(E-己內酯)微球

在CAM分析上以填加有paclitaxel之微球抑制血管生成

此實例評估自聚(ϵ -己內酯)(PCL)可生物降解之微球中paclitaxel之試管內釋出率概況，並說明自這些微球中釋出之paclitaxel當置於CAM時之活體內抗血管生成活性。

在這些實驗中利用的試劑包括：PCL(分子量35,000 - 45,000；購自Polysciences(Warrington, PA))，DCM自Fisher Scientific Co., Canada；聚乙醇醇(PVA)(分子量12,000 - 18,000；99%經水解)自Aldrich Chemical Co., (Milwaukee, Wis)，及paclitaxel來自Sigma Chemicel Co. St. Louis, MO)。除非另有所示，使用的所有化學品及試劑均如所供應。全部過程中使用蒸餾水。

五、發明說明 (¹⁶⁴)

A. 微球之製備

微球之製備基本上如實例28中所述，利用溶劑蒸發方法。簡言之，填加有5% w/w paclitaxel之微球，先將10毫克paclitaxel及190毫克PCL溶於2毫升DCM中，加至100毫升1% PVP水溶液中，並在25°C下以1000 rpm攪拌2小時而製備。微球懸液以1000 xg離心10分鐘(Beckman GPR)，移出上清液且微球以水洗三次。洗過之微球風乾一夜，再貯於室溫下。對照組微球(不含paclitaxel)如上述地製備。也製備含有1%及2%paclitaxel之微球。微球利用加有分級測微計之光學顯微鏡分出大小。

B. 包膠效率

將已知量之填加有藥物之微球(約5毫克)溶於8毫升乙腈內，再加2毫升蒸餾水以沉澱聚合物，混合物在1000 g下離心10分鐘，且自上清液以UV分光光度計(Hewlett-Packard 8452A Diode Array Spectrophotometer)在232微米下測知之吸光度中估計所包膠之paclitaxel量。

C. 藥物釋出研究

約10毫克填加有paclitaxel之微球懸浮於20毫升10 mM PBS (pH 7.4)中，於有螺紋蓋之管內。管上下滾動，於37°C下，再以特定時間間隔下取出，19.5毫升之上清液(係令微球沉降在底部之後)，經0.45微米濾膜過濾，留下的再行paclitaxel分析。等體積的PBS置於各管內，在整個研究過程中保持沉下狀況。濾液以3×1毫升DCM萃取，DCM萃取物在氮蒸汽下蒸發至乾，再溶於1毫升乙腈中，並以

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (¹⁶⁵)

HPLC 分析，所利用之移動相之水：甲醇：乙腈(37：5：58)，流速1毫升／分(Beckman Isocratic 泵)，C8 逆相管柱(Beckman)，及UV 偵測(Shimadzu SPD A)於232 毫微米波長下。

D. CAM 研究

經受精-家養之雞胚在少殼培養前先培育4天。在培育的第6天，1份1毫克填加有5%paclitaxel 或對照組(無paclitaxel)之微球直接置於CAM 表面上。經2天之曝露後，利用以電視照像機為界面之立體顯微鏡檢查血管分布，電視訊號再呈現於電腦上並印出來。

E. 掃描電子顯微鏡

微球置樣品架上，以金噴鍍再置於Philips 501B SEM，以15 kV 操作。

F. 結果

微球樣品之大小範圍在30-100 μ m 間，雖然某些微球填加上paclitaxel 或對照組之微球批次有些在此範圍之外。以paclitaxel 填加至PCL 微球之效率始終大於95%，此對所有接受研究之藥物填料而言。掃描電子顯微鏡檢證明，微球均為球型，且有許多顯示出粗糙或突起之表面外觀。在微球表面上無固體藥物之證據顯現。

自填加1%，2%及5%PCL 微球上，paclitaxel 釋出之時間曲線示於圖53A。釋放概圖是二相的。在所有藥物填料上，paclitaxel 有一個最初的快速釋放或"突現相"。突現相在1%及2%paclitaxel 填料時歷1-2天，在5%填料微球上則

五、發明說明 (¹⁶⁶)

歷3-4天。快速釋放之最初相繼以顯著較緩之藥物釋出相。對含有1%或2%paclitaxel微球而言，在21天後並無進一步藥物之釋放。對5%paclitaxel填料而言，微球在21天後均釋出總藥物含量的約20%。

圖53B示出以對照組PCL微球處理之CAMs，且圖53C示出以填加有5%paclitaxel之微處之處理。以對照微球處理之CAM顯示出正常的毛細管網路結構。以paclitaxel-PCL微球處理的CAM顯示出顯著的脈管退化，及無毛細管網路之環帶。

G. 討論

製造填加有paclitaxel之微球之溶劑蒸發方法，可產生95-100%間高的paclitaxel包膠效率。此是因paclitaxel不佳之水溶性及其疏水性本質有益於分配在含有聚合物之有機溶劑相中。

Paclitaxel之二相式釋出概圖為許多藥物自可生物降解之聚合物基質中釋出之典型型式。聚(ϵ -己內酯)是一種脂族聚酯，其可在生理條件下為水解作用之降解，且其係無毒且組織可相容的，PCL之降解作用顯著緩慢於乳酸及乙醇酸已被充份研究之聚合物及其聚物，且因此適用於長期藥物遞送系統之設計。Paclitaxel釋放最初快速或突現相被視為是藥物自微球之表面區域擴散釋出(接近微球表面)之故。Paclitaxel在釋出概圖第二(較緩慢)相之釋出似乎並非PCL降解或浸蝕所致，因為研究中已顯示，在試管內條件下，於水中PCL經過7.5週期間並無PCL顯著的重重量損失或

五、發明說明 (167)

表現浸蝕現象。paclitaxel釋出之較緩慢相可能是由於藥物在聚合基質充滿流體之孔洞內之溶解，以及經由孔洞之擴散。在較高paclitaxel填料下之較大釋放率可能是聚合物基質內較廣闊的孔洞網路之故。

在5%填料下之paclitaxel微球，已示出可釋放充份的藥物，使得當安置在CAM時可對血管生成產生充份之抑制作用。血管生長之抑制作用造成如圖53C所示之無血管環帶。

實例31

PLGA微球之製造

自乳酸-乙醇酸共聚物(PLGA)製造微球。

A. 方法

利用標準方法製造大小範圍在0.5-10微米，10-20微米及30-100微米之微球(聚合物溶在二氯甲烷中，並攪拌地乳化於聚乙醇醇溶液中，如同先前在PCL或PDLLA微球製造方法中所述)。使用各種比例的PLLA或GA為具有不同分子量之聚合物(如特性黏度(I.V.)所示)。

B. 結果

自以下起始聚合物中成功地製造微球：

PLLA	:	GA	I.V.
50	:	50	0.74
50	:	50	0.78
50	:	50	1.06

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (168)

65	:	35	0.55
75	:	25	0.55
85	:	15	0.56

在 10 % 或 20 % 填料下的 paclitaxel 可成功地納入所有這些微球中。對一起始聚合物 (85 : 15 , IV = 0.56) 大小分佈之實例示於圖 54 - 57 中。利用各種大小及各種組成之微球進行 paclitaxel 釋放實驗。釋放率示於圖 58 - 61 。

實例 32

Paclitaxel 包膠在尼龍微膠囊中

治療劑也可包膠在各種載劑內，其可成型為可選擇之型式或裝置。例如，如下文所詳述的，paclitaxel 可納入尼龍微膠囊中，其可調和成人工心臟瓣膜，脈管移植物，外科手術網或縫線。

A. 填加有 paclitaxel 之微膠囊之製備

Paclitaxel 包膠至尼龍微膠囊內，利用界面聚合作用技術進行。簡言之，100 毫克的 paclitaxel 及 100 毫克的 Pluronic F127 溶於 1 毫升 DCM 中，再加 0.4 毫升 (約 500 毫克) 氯化己二醇 (ADC)。此溶液勻漿成 2 % PVA 溶液，利用 Polytron 勻漿機 (定在 1) 作用 15 秒。於勻漿時同時逐滴加入 1,6 - 己烷二胺 (HMD) 於 5 毫升蒸餾水之溶液。混合物加入 HMD 容液後再勻漿 10 秒。混合物轉移至燒杯中，以磁性攪拌器攪拌 3 小時。混合物離心，收集並再懸浮於 1 毫升蒸餾水中。

B. 包膠效率 / paclitaxel 填料

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (¹⁶⁹)

過濾約0.5毫升懸液，且微球乾燥。稱重約2.5毫克微膠囊，並懸浮在10毫升乙腈中歷24小時。上清液進行paclitaxel之分析，且結果以paclitaxel之百分率表示。初步的研究顯示，paclitaxel可以高的填料率(高至60%)及高的包膠效率(大於80%)包膠在尼龍微膠囊中。

C. Paclitaxel釋放研究

約2.5毫克的paclitaxel-尼龍微球懸浮在50毫升水中，其內含有各1M的氯化鈉及尿素，並定期分析之。在72小時後微球內paclitaxel之釋出十分快速，有95%以上的藥物會釋出(圖62)。

實例33

生物黏附性微球

A. 製備生物黏附性微球

微球以粒子直徑在10-60微米範圍之100公斤／莫耳PLLA製成。微球培育在氫氧化鈉溶液中，以經由聚酯之水解作用在表面產生羧酸基。反應之特徵是關於氫氧化鈉濃度及經由測度表面電荷而得之培育時間。經在0.1M氫氧化鈉中培育45分鐘後，反應可達到完全的程度。經過鹼處理後，微球可塗佈以二甲胺基丙基碳化二亞胺(DEC)，一種交聯劑，係將微球懸浮在DEC之醇溶液中，再令混合物乾燥成可分散之粉末。微球與DEC之重量比例為9：1。一旦乾燥微球後，以攪拌分散在2% (w/v) 聚(丙烯酸)(PAA)溶液中，且令DEC與PAA反應產生交聯的PAA在微球表面之水不溶性網路。使用掃描式電子顯微鏡檢來證實微球表面

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

給

五、發明說明 (¹⁷⁰)

PAA之存在。

以鹼處理前後之微球差別掃描量熱學顯示，以SEM未觀察到大量熱特性之變化(Tg，融化，及結晶程度)。

B. 試管內paclitaxel之釋放率

製造具有相同粒子直徑大小範圍之填加有paclitaxel之微球(10%及30% w/w填料)，及進行歷10天的試管內釋放概圖，釋於PBS中。釋放和藥物之填加呈比例，400微克的paclitaxel自5毫克填料30%的微球中以10天釋放，150微克自10%填料的微球中以相同期間釋放。包膠效率約80%。填加有paclitaxel之微球培育在0.1M氫氧化鈉中歷45小時，並測出在氫氧化鈉中培育前後之 δ -電勢。填加paclitaxel之微球其表面電荷，在與鹼處理前後均較無paclitaxel之微球還低。

C. 製備及於試管內評估塗佈以聚-賴胺酸或纖維網蛋白之 PLLA

製備含有1%蘇丹黑之PLLA微球(以使微球著色)。這些小球懸浮在2% (w/v) 聚賴胺酸(Sigma Chemicals-Hydrobromell型)或纖維網蛋白(Sigma)溶液中，歷10分鐘。微球以緩衝溶液洗一次，再置於由大鼠新鮮製備之膀胱內表面。令膀胱置10分鐘，再以緩衝溶液洗三次。殘留的(已結合的)微球經過處理後留在膀胱上，因此顯示生物黏附已發生(圖63A及63B)，此在纖維網蛋白-及聚-L-賴胺酸塗佈之微球上皆然。

實例34

五、發明說明 (¹⁷¹)

在CIA大鼠模式中以paclitaxel預防關節炎發作

A. 材料及方法

同源的雌的Louvain大鼠重120 - 150克，於皮下注入0.5毫克天然的雞膠原蛋白II(Genzyme Boston, MA)，其係溶解在0.1M醋酸中並乳化於FIA(Difco, Detroit, MI)。免疫接種約9天後，動物發展成多重關節炎，並有血管翳形成及骨骼／軟骨浸蝕之組織學變化。在4種策略中共使用45隻大鼠：對照組(n=17)接受單獨的溶媒，而3個paclitaxel處理組包括一個預防及二個遏止策略。為了評估paclitaxel之作用，paclitaxel(溶於1：1之乙醇及Cremophor E.L.[®](Sigma)稀釋液中，並加入食鹽水使達到4.8毫克／毫升paclitaxel於5% w/v乙醇及Cremophor E.L.之終濃度)於免疫接種後2天(預防組)或關節炎發作的第9天(遏止策略)開始由腹膜內投藥(i.p.)。於預防組中(n=8)，paclitaxel於第2天開始給予1毫克／公斤體重之濃度，第5，7，9，12及14天有相繼5個劑量。於高劑量遏止策略中(n=10)，paclitaxel(1毫克／公斤體重)由第9天開始交替日子下給予。於較低劑量遏止策略中(n=10)，paclitaxel以1毫克／公斤體重在第9，11及13天時給予，之後此劑量之75%(0.75毫克／公斤體重)在交替天數下給予直到第21天。評估疾病嚴重度之對照組及實驗組動物均由臨床上及放射照相上經個別盲目相對於處理組的方式進行。

每天評估各四肢發炎的嚴重度，並依據腫漲及關節週紅腫之標準化水平記分(0為正常而4為嚴重)。於實驗第28天

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (¹⁷²)

以放射照相評估動物。之後肢之放射照相，由軟組織腫漲，關節空間變狹，骨質破壞及骨膜新骨的形成等程度分出階段。使用0-3之等級來定量各肢(0=正常，1=軟組織腫漲，2=骨骼的早期浸蝕，3=嚴重骨質破壞及／或關節黏連)。在實驗完結時完成關節的組織學評估。

以幅射計耳朵分析法決定對CII的延緩型過敏(DTH)，此在第28天時完全。幅射計耳朵指數 ≥ 1.4 代表對CII的顯著反應。由酵素-鏈結的免疫吸附分析法(ELISA)決定抗-CII IgG抗體之存在。在第26天所得的血清樣品稀釋至1:2,560，結果以在490毫微米下之平均光密度表示，一式四份。在此稀釋倍數下，在正常大鼠血清之背景水平為0，且可與來自經膠原蛋白免疫的大鼠血清容易地區別。

B. 結果

在此模式中，paclitaxel處理於關節炎開始前可於所有受試大鼠中完全排阻疾病之發展(即使於中止paclitaxel處理之後)，此與溶媒對照組比較而言。

在對照動物中，疾病的臨床症狀有逐漸增加，直到發生變形及關節功能的喪失為止。於關節炎發生後，接受低及高劑量paclitaxel的動物可證明有顯著的臨床改進。平均而言，臨床分數相當於在治療之初所見的，顯示paclitaxel有預防疾病臨床演進的能力。

接受paclitaxel的動物可增加體重及移動，並證明極少有，若有任何對治療之副作用。在接受治療動物中可觀察到在接種部位有傷口癒合及毛髮的再生長。經paclitaxel處

五、發明說明 (¹⁷³)

理的動物和對照組比較下較可獲重。

在paclitaxel關節炎預防策略中無一隻大鼠顯現出有任何的放射照相變化或臨床的關節炎。在高及低劑量的paclitaxel處理組中，與對照組比較下前二者有顯著較少的放射照相疾病。進一步的組織學評估顯示，對照組大鼠有顯著的血管翳，並有骨骼及軟骨之浸蝕現象，然而經過paclitaxel處理過的大鼠若有血管翳的話也是極少，並保全關節軟骨。

利用ELISA分析法，相對於II型膠原蛋白之IgG抗體在經paclitaxel處理之大鼠中顯著低於對照組；在預防策略中之大鼠與高及低paclitaxel劑量遏止策略中之大鼠比較，前者有顯著較低的IgG抗體。

C. 討論

Paclitaxel對於關節炎及可能其他形式的自體免疫疾病是一種有活力之治療法，因其於關節炎發作前之免疫接種後投予可阻斷疾病之過程。結果顯示若在CII免疫接種之後2天開始，paclitaxel可完全消除關節炎之發作。在遏止策略中以paclitaxel處理，關節炎的嚴重度在paclitaxel整個投藥期間均會繼續降低，但在二種遏止策略中於停止處理後4天內開始升高。然而，以paclitaxel所進行的早期涉入，似乎可減緩對繼續治療之需求。

實例35

以paclitaxel消退由膠原蛋白-誘生之關節炎

Paclitaxel當以膠團調和物全身投藥時，其可在CIA模式

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (¹⁷⁴)

中明示出疾病-修飾作用。爲了評估paclitaxel的潛在疾病修飾作用，膠團(無Cremophor)paclitaxel腹膜內投予(i.p.)，以5毫克／公斤(1組)或10毫克／公斤(2組)每4天(q.o.d.)投予以於動物在臨床上可偵測之關節炎開始之際(第9天)免疫接種動物。在整個評估期間均投予paclitaxel。至於與標準療法之比較，第三組接受0.3毫克／公斤(i.p.)(人類相當之劑量)之胺甲碟呤，於關節炎開始的第0，5及10天投予。第四組接受胺甲碟呤(0.3毫克／公斤)及膠團paclitaxel(10毫克／公斤)之組合治療。對照組(第5組)及實驗動物就臨床及放射照相上評估疾病的嚴重性，係個別盲目於治療組。

每天評估各四肢之發炎程度，並依腫漲及關節週紅腫之標準化水平記分(0爲正常，而4爲嚴重)。在實驗第28天放射照相地評估動物。二後肢的放射照相由軟組織腫漲，關節空間之變狹，骨質破壞及骨膜新骨之形成程度而分級：0至3的分數可用來定量各後肢(0=正常，1=軟組織腫漲，2=骨質的早期浸蝕，3=嚴重的骨質破壞及／或關節黏連)(Brahm et al., Arthritis Rheum. 37 : 839-845, 1994 ; Oliver et al., Cell. Immunol. 157 : 291 - 299, 1994)。關節之組織學評估在實驗結論時可完成。

在此模式中，膠團paclitaxel處理，在關節炎開始發作前進行可完全排除疾病之發展，即使中止paclitaxel之處理亦然。在對照動物中，在疾病之臨床症狀上有逐漸的增加(圖64)，直到發生變形及關節功能之喪失爲止。接受胺甲碟

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

五、發明說明 (175)

吟治療之動物和對照組比較下無令人滿意的改進(圖64&表1)。接受低劑量膠團 paclitaxel 之動物(5毫克／公斤)，於關節炎之後處理，已證明有某些改進，但接受10毫克／公斤膠團 paclitaxel 之動物則高度顯著($p=0.0002$) 在臨床上有所改進(圖64)。平均而言，臨床分數相當於在治療之初所見的，顯示膠團 paclitaxel 可預防疾病臨床演進之能力(表1)。

表 1
在膠原蛋白誘生之關節炎大鼠模式中
膠團 paclitaxel 可改進臨床指數

	關節炎指數 在第10天	最大平均關節炎 分數	對膠原蛋白II之抗 體
關節炎對照組 (n=11)	6.1±0.6	6.4±0.5	0.199±0.0042
胺甲喋吟(0.3毫克 /公斤)(n=5)	5.4±0.6 (p=NS)	5.7±0.6 (p=NS)	0.182±0.0034 (p<0.03)
膠團 paclitaxel(5毫 克/公斤)(n=4)	4.3±1.8 (p=NS)	4.3±1.8 (p=NS)	0.176±0.0042 (p<0.01)
膠團 paclitaxel(10 毫克/公斤)(n=5)	2.0±0.7 (p=0.0002)	3.8±0.7 (p=0.0002)	0.162±0.0194 (p<0.02)
膠團 paclitaxel(10 毫克/公斤)胺甲喋 吟(0.3毫克/公斤) 混合(n=7)	1.1±0.5 (p=0.0001)	3.6±0.9 (p≤0.0001)	0.164±0.0090 (p<0.001)

- 關節炎指數可定量腫漲及關節週紅腫之水平，以0代表正常且4代表嚴重，且最大的可能分數8為後肢之總和。
T試驗可比較經藥物治療之大鼠與對照組膠原蛋白-誘生

五、發明說明 (176)

之關節炎大鼠，係在關節炎發作後第10天進行。

- 經paclitaxel處理的動物臨床分數顯著低於對照組動物，且相當於在治療之初所見的，顯示有預防疾病進行之能力。
- NS=不顯著

接受膠團paclitaxel的動物可負重且行動，且並未顯示出對治療有任何毒性作用。於接受治療動物中，於免疫接種之處可觀察到傷口的癒合及毛髮之再生長。經膠團paclitaxel處理過的動物相較於未處理組係有所獲重。接受膠團paclitaxel及胺甲碟呤之動物可充份耐受治療，且顯示出相較於對照組更令人印象深刻之臨床改進($p \leq 0.0001$) (圖64)。利用酵素鏈結之免疫吸附抗體(ELISA)分析法，相對於II型膠原蛋白之IgG抗體於paclitaxel及組合(MTX- / paclitaxel)處理之大鼠中較低於在對照組中。

放射照相研究也證明以paclitaxel治療有顯著的改進。雖然對照組及經胺甲碟呤處理之動物呈現軟骨組織腫漲，關節空間變狹，骨質破壞及骨膜新骨形成之放射照相證據，經paclitaxel處理的動物在x射線上有幾乎正常的關節特色(圖65)。

事實上，接受膠團paclitaxel單獨的(10毫克／公斤)或組合以胺甲碟呤的動物中，僅少數比率(17-18%)會發展軟骨之浸蝕。軟骨浸蝕-是疾病演變／結果的一個重要指示，在對照組動物發生之頻率或在僅接受胺甲碟呤之動物均較

五、發明說明 (177)

接收膠團 paclitaxel 療法之動物多 4 倍 (72%) (表 2)。

表 2
在膠原蛋白-誘生之關節炎大鼠中
膠團 paclitaxel 可改進放射照相指數

	有浸蝕之動物百分率	放射照相
關節炎對照組(n=32)	72%	4.31±0.45
胺甲碟呤(0.3毫克/公 斤)(n=17)	76% (p=NS)	4.25±0.64 (p=NS)
膠團 paclitaxel(5毫克/公 斤)(n=8)	50% (p=NS)	3.25±1.60 (p=NS)
膠團 paclitaxel(10毫克/公 斤)(n=18)	17% (p=0.0005)	1.78±0.60 (p<0.003)
膠團 paclitaxel(10毫克/公斤) 胺甲碟呤(0.3毫克/公斤)組 合(n=22)	18% (p=0.0003)	1.45±0.39 (p<0.0001)

- 經膠原蛋白誘生之關節炎(CIA)大鼠，其後二肢的放射照相依軟骨組織腫漲，關節空間變窄，骨質破壞及骨膜新骨形成分級。使用 0 至 3 整數等級以定量各肢，最大的分數 6 來自二肢之總和。
- 軟骨浸蝕之存在，此係疾病演進／結果的一個重要指示，發生頻率在對照組動物 4 倍於 (72%) 接受膠團 paclitaxel 之動物 (18%)。

掃描電子顯微術顯示 paclitaxel 治療在活體內之軟骨保護作用。正常關節的表面特徵在於平滑的完整軟骨基質，由薄的滑膜襯裏所包圍 (圖 66A)。在 CIA 中，軟骨表面為由

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (178)

血管翳組織及發炎滑膜所產生之MMP所浸蝕(圖66B)。表面的軟骨基質被水解，曝露出軟骨細胞或使一旦被占據之陷窩排空(圖66B插圖)。在有CIA之動物，且於臨床關節炎發作後接受paclitaxel治療者，關節表面保持完整(圖66C)且軟骨基質大體上是正常的，即使在高倍率觀察下(圖66C插圖)。在以paclitaxel處理的組別中，並未見血管翳組織之形成及滑膜肥厚。

就組織上而言，CIA的特徵在於顯著的滑膜肥厚，發炎細胞浸潤滑液及軟骨的破壞(圖67A)。在經paclitaxel處理的動物中，滑液似乎是正常的，僅有1-2層滑膜細胞且無發炎細胞之浸潤(圖67B)。

浸蝕鑄型也進行評估以決定paclitaxel是否可在有CIA動物之滑液中阻斷血管之生成。Mercox聚合物注入已殺死動物之頸動脈內(有100 mmHg之壓力)，令其在原位固化，且接下來水解組織以產生下肢血管結構之鑄型。CIA動物滑膜血管分佈鑄型之掃描電子顯微相片顯示，閉塞末端之毛細管會突然伸出長向關節空間(圖68A)。這些脈管在外形上似乎與在固體腫瘤及其他血管生成條件下所述之生長中之血管性脈管相似(圖68A插圖)。相反的，經paclitaxel處理的動物，其滑液脈管排列在毛細管環帶中(圖68B)，無新血管突出之跡象。

在paclitaxel／MTX受者中，其血管增殖作用及外形學之脈管結構有退縮現象，類似在天然對照組中所見的。這些研究建議，膠團paclitaxel及組合的paclitaxel／胺甲碟

五、發明說明 (179)

吟治療可逆轉新血管之生成，抑制發炎過程，退縮已發展的滑液炎及預防關節的破壞。

已證明 paclitaxel 的全身性投藥是對關節炎具活力之療法。疾病的天然過程是發作及消退，各相繼的發作造成累積的傷害，最後導致關節的破壞。較短期，較高劑量的全身性治療有存在的可能性，使其可用來誘導疾病之緩解或以持續較低劑量之療法以維持疾病之受控。遞送 paclitaxel 的另外方法包括將藥物直接關節內注入患者受損之關節內，其有，或2個關節主要疾病。

實例36

在牛皮癬動物模式中評估 paclitaxel 調和物

A. 皮膚血管生成模式

使用一個新穎的動物模式來檢視皮膚-特異的血管生成。以免疫上具缺失之 SCID 老鼠為受者，接受人類角質細胞株之表面移植物，其並以有意識或抗有意識股方向轉感有血管內皮生長因子(VEGF)。角質細胞經由經修飾的聚矽氧移植室分析法而移植至受者老鼠之皮膚上。令角質細胞分化並誘導皮膚之血管生成。再全身性或局部地(乳膏，油膏，洗劑，凝膠)給予 paclitaxel，再對血管數目及大小進行外形上之評估，於未處理及經處理組上進行。

B. 角質延遲型過敏反應之老鼠模式

使用角質延遲型過敏反應之老鼠模式來檢視 paclitaxel 在經誘生之皮膚發炎上之作用。簡言之，老鼠以噁唑酮局部施加在皮膚上使敏感之。5天後，將噁唑酮局部施加至耳

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (¹⁸⁰)

朵皮膚上以挑戰之(左耳：噁唑酮，右耳：單獨的溶媒)，可造成角質的發炎，即"延遲型過敏反應"。以48小時偵測所造成耳朵之漲大狀況來定量發炎程度(見圖69及70)。以Epon-包埋且Giesma-染色的1微米組織切片可評估發炎細胞是否存在，評估組織肥大細胞及其活化狀態，以及上皮膚肥厚之程度。paclitaxel可全身或局部給予以定量其在此活體內模式中對角質發炎反應之作用。

C. 結果

這些研究顯示，局部投予1% paclitaxel對單獨的溶媒，治療處理因實驗而誘生之老鼠皮膚發炎，結果顯示paclitaxel在皮膚發炎上可呈現抑制作用。於由實驗-誘生之延遲型過敏反應中，局部以1% paclitaxel處理對單獨的溶媒而言，前者可使耳朵之腫漲顯著地減少。局部投予1% paclitaxel調和物可顯著地抑制由於PMA(大戟二萜醇12-肉豆蔻13-醋酸)局部施加所誘生之耳朵腫漲及皮膚紅腫(見圖71及72)。如圖73中所說明的，經paclitaxel處理過的耳朵(右耳)與對照組(左耳)比較下在外觀上是正常的。在共5隻老鼠中可得到相似的結果。

為評估1% paclitaxel對單獨溶媒而言之皮膚刺激性，此二調和物可每天施用，於耳朵各測20微升，共歷8天。8天後，在施以單獨的溶媒或1% paclitaxel調和物後，於正常的或發炎的老鼠耳朵皮膚上均未測及皮膚刺激反應。

實例37

在動物模式中進行長期排斥之評估

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (¹⁸¹)

動脈粥樣硬化之增速型式可在大部份心臟移質受者中發展生成，並限制移植物長期之存活。Lewis-F344異養的大鼠心臟移植長期排斥模式，是一種可用的實驗模式，因其可在中期及長期存活之同種異體移植中分階段造成動脈粥樣硬化傷害。Lewis-F344模式之優點為：(i)動脈粥樣硬化之罹病率及嚴重度在長期存活之移植物中十分高；及(ii)可容易地確認傷害發展的發炎階段，因為此系統勿需免疫遏止作用。

成年雄的Lewis大鼠充作供者，且F344大鼠為受者。20個異養的腹部心臟同種異體移植物進行移植，即在已麻醉受者之腹部中線作一長的切開，以曝露出大動脈及下腔靜脈。二脈管互相分開，且與周圍的結締組織分開，再將小的夾子置於脈管上。在吻合位置處於各脈管作縱向切開(2至3毫米)。

打開已麻醉供者大鼠之腹部，注射300單位的肝素水溶液至下腔靜脈內。胸壁打開曝出心臟。接好下腔靜脈，將上升大動脈及主脈動脈橫切，留下脈管源頭2至3毫米長與心臟相接。分出與連接處較遠之腔靜脈，且結紮線放在左心房及肺靜脈團四週。分出在結紮線肺側之脈管，並移出心臟。

供者心臟置受者之腹腔，且大動脈在受者脈管切開位置處縫合在一起。類似地，以類似方式將肺動脈與在下腔靜脈之切開位置連接。放開夾子(近腔靜脈，遠腔靜脈及大動脈，及近大動脈)以減少由針孔來之流血。

五、發明說明 (¹⁸²)

移植之後，在聚己內酯(PCL)糊中之paclitaxel(33%)(n=10)或單獨的PCL糊(n=10)，經由心包外膜歷冠狀動脈之外表面長度注入10隻大鼠內，如此包埋在心肌中之動脈可保持未予以處理。

所有受者均接受移植之初，青黴素G(100,000單位)的單-肌內注射。同種異體移植後繼以每天的觸診，且以1至4之等級評估功能，4代表正常的心跳，而0為無機械活性。在14天犧牲各組別中之5隻大鼠，在第28天為最後5隻。觀察大鼠有否失重，及其他全身性疾病之跡象。於14或28天後，動物麻醉，且以最初實驗之方式曝露出心臟。分出經塗佈及未塗佈之冠狀動脈，以10%經緩衝之甲醛固定，再行組織學檢查。

可變化最初的實驗，以使用paclitaxel/EVA薄膜或經塗佈之塑料於移植後之冠狀動脈。EVA薄膜以類似上述的方式應用至冠狀動脈之腔外表面，而經塗佈的塑料係在腔內放置。

此外，可進一步延伸這些檢查以包括其他的器官移植物以及移植物移植片(如靜脈，皮膚)。

實例38

Paclitaxel在MS動物模式中之作用

在此檢查paclitaxel膠團在脫髓鞘之導入外來基因老鼠模式中(Mastronardi et al., J. Neurosci, Res. 36: 315-324, 1993)抑制MS症狀及病理過程進行之能力。這些導入外來基因之老鼠含有70套的導入基因DM20，一種髓磷脂蛋白

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (¹⁸³)

脂質。就臨床上，動物在3個月大以前看起來都正常。3個月後，就出現神經病理學證據，如發作，搖擺，後肢可動性，步態不穩，跛行，不穩步速及活動性程度減低，並逐漸嚴重直到6及8個月間動物死亡為止。臨床跡象與脫髓鞘在組織學上相符，並在腦中有增加之星狀細胞增殖作用 (Mastronardi et al., J. Neurosci, Res. 36 : 315-324, 1993)。

A. 材料及方法

所進行的二個動脈研究係皮下投予低劑量連續療法之 paclitaxel 策略 (2.0 毫克／公斤；每週 3x，共 10 次注射) 或高劑量的 "脈衝" 療法 paclitaxel 策略 (20 毫升／公斤；4 次，每週一次) 於疾病臨床開始時進行 (約 4 個月大)。關於低劑量策略，5 隻動物接受膠團 paclitaxel，2 隻老鼠充作對照組；1 隻老鼠為未處理的正常組，且 1 隻為未處理的導入外來基因之同窩。僅 1 隻導入外來基因之老鼠充作對照組，因為疾病過程已在實驗室中充分發展確立。4 個月大的動物注入膠團 paclitaxel，於 MS 最初跡象到達上述症狀分類之 1+ 分數之後。治療過程歷 24 天 (2.0 毫克／公斤 paclitaxel，每週 3x，× 10 劑量)。在每個注射日子均決定體重及臨床跡象。

B. 結果

接受 paclitaxel 的 5 隻動物並未顯明有重大的體重喪失。然而，未處理之導入外來基因老鼠在體重上有 29 克至 22 克之 30% 減少 (圖 74)，和疾病之演變當然有關。

五、發明說明 (184)

MS之臨床指徵，如搖擺，後肢可動性，發作，頭震顫，步態不穩，跛行及活動性程度，每天追蹤之。在治療之初，動物在主要症狀分類中有1+分數。未經處理的動物在下27天中於症狀數上有由1+至4+之分數；3+的特徵為平衡不良，為疾病的主要特色之一。在以paclitaxel處理一組中，所有5隻動物在所追蹤的所有症狀的相同期間，均保持1+之分數(表1)。

表 1

低劑量連續的paclitaxel對於在導入外來
基因老鼠中多發性硬化症狀演進上之作用

老鼠	年齡 (月)	發作	搖擺	後肢 麻痺	頭震 顫	減少的 wt(%)
導入外來基因 動物(未處理的)	3 6	1+ 2+-3+	1+ 2+-3+	1+ 2+-4+	1+ 3+	0 30%
導入外來基因動物 (以paclitaxel處理)	3 6	1+ 1+	1+ 1+	1+ 1+	1+ 1+	0 5-10%
對照組動物 (以paclitaxel處理)	3 6	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0-5%

- 未處理之導入外來基因動物有27天嚴重症狀之病程，而經paclitaxel處理的動物在相同的時期中有極少的神經學症狀。
- 1+之分數表示明確但最少之徵兆；4+是垂死的。

關於高劑量策略，老鼠以20毫克／公斤的paclitaxel處理，每週一次共4週以模擬在腫瘤患者中所採用的間歇脈

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (¹⁸⁵)

衝式化學治療(對乳房及卵巢癌採每月方式)。動物共追蹤10週，對各症狀每二天決定其分數。在3隻未處理動物中，神經學症狀快速地演進，且在實驗過程中有二隻動物死亡(在第5及第9週時)；第三隻存活的動物有嚴重的臨床症狀。5隻導入外來基因的動物於症狀開始後接受paclitaxel之治療，在第一週追蹤後相對於對照組，在MS分數上有所減低，而並未觀察到進一步的神經學惡化。在這些動物中，並未觀察到疾病之進展，且動物在治療之間(0至3週)及停止藥物治療之後在臨床上均保持緩解狀況(圖75)。

C. 結論

Paclitaxel以低及高劑量均可預防在MS動物模式中所見的神經學症狀之快速進展。這些資料可建議，paclitaxel可以是脫髓鞘疾病的一個可能的治療劑。

實例39

評估paclitaxel及其他微小管穩定劑於鼻息肉上之治療

上皮細胞培養物及／或鼻息肉組織培養物，可用來評估含有paclitaxel或其他作用物之調和物在治療鼻息肉上之效力。此途徑以下列前題為據，即上皮細胞可釋出細胞動素並造成在鼻息肉以及鼻炎及氣喘中所測及之慢性發炎，且一個延長釋放之醫藥品可預防嗜伊紅血球增多及可抑制細胞動素基因之表現。

Paclitaxel調和物包括溶液劑(使用環糊精)或懸液劑，其中paclitaxel包膠成黏液黏附性聚合物以充作鼻噴霧劑，及

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (¹⁸⁶)

／或微包膠之 paclitaxel 在黏液黏附性聚合物中充作吸入劑。這些調和物可用於下文詳述之研究中。

A. paclitaxel 於試管內之作用

組織之處理-自無鼻光臨床症狀及在鼻重建手術中呈陰性皮膚-穿刺試驗之患者中得正常鼻黏膜(NM)檢品。鼻息肉(NP)檢品得自在進行鼻息肉切除術中呈陽性及陰性皮膚-穿刺試驗之患者。鼻檢品置入添加有 100 UI／毫升青黴素，100 微克／毫升鏈黴素及 2 微克／毫升兩性霉素之 Hams' F12 培養基中，並立即移至實驗室中。

上皮細胞培養-來自 NM 及 NP 之鼻上皮細胞以如下的蛋白酶水解分離出來。組織檢品以添加有 100 UI／毫升青黴素，100 微克／毫升鏈黴素及 2 微克／毫升兩性霉素 B 之 Hams' F12 潤洗 2-3 次，再培育於 0.1% 蛋白酶 XIV 型於 Hams' F12 中，4℃ 下歷一夜。培育之後，加入 10% FBS 以中和蛋白酶活性，並以緩和的攪動偵測上皮細胞。細胞懸液經 60 孔篩的細胞分解篩中過濾，再以 500g 在室溫下離心 10 分鐘。細胞團塊再懸浮於含有下列的內分泌素明確之 Hams' F12 培養基(Hams' HD)中：100 UI／毫升青黴素，100 微克／毫升鏈黴素，2 微克／毫升兩性霉素 B，150 微克／毫升穀胺醯胺，5 微克／毫升鐵傳遞蛋白，5 微克／毫升胰島素，25 毫微克／毫升上皮生長因子，15 微克／毫升內皮細胞生長添加物，200 pM 三碘甲狀腺原胺酸及 100 nM 氫化可體松。細胞懸液(10^5 細胞／孔洞)再塗佈在已有膠原蛋白塗佈之孔洞中，於 2 毫升 Hams' HD 中，並於 5%

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (¹⁸⁷)

CO₂且濕潮的37°C大氣下培養。培養基當日更換並於每隔一日更換，單層細胞之匯合狀可於培養6-10天後達成。

人類上皮調適培養基(HECM)之產生-當上皮細胞培養物達到匯合狀時，將Hams' HD轉換成RPMI 1640培養基(Irvin, Scotland)，其中並添加有100 UI／毫升青黴素，100微克／毫升鏈黴素，2微克／毫升兩性霉素B，150微克／毫升穀胺鹽胺及25 mM Hepes緩衝溶液(RPMI 10%)。在以RPMI(10%)培育48小時後可得HECM，自培養物中回收，以400g在室溫下離心10分鐘，經由0.22微米濾膜過濾滅菌，再貯於-70°C下直到使用為止。

嗜伊紅血球細胞之存活及paclitaxel之作用-自周邊血液中分離出嗜伊紅血球細胞，在以二個不同方式決定NM及NP之HECM在嗜伊紅血球細胞存活上之作用：時間過程及劑量反映分析。在時間過程之實驗中，濃度約250,000／毫升之嗜伊紅血球細胞培育在6個孔洞之組織培養皿上，加或不加(負面對照組)50% HECM，並在第2，4，6及8天時評估存活指數。以1-50% HECM進行其他的實驗。在測試藥物(如paclitaxel)對HECM-誘生之嗜伊紅血球存活之作用之實驗中，由0.1 nM至10 μM之藥物(paclitaxel)與嗜伊紅血球細胞在37°C下培育1小時，再加HECM。在各實驗中，始終要評估負面對照組(僅培養基而已)及正面對照組(加有HECM之培養基)。為檢查藥物有否任何的毒性作用，嗜伊紅血球細胞與藥物(各種濃度)共培育後之存活力與嗜伊紅血球細胞僅與單獨的RPMI10%培育24小時的比

五、發明說明 (¹⁸⁸)

較之。

B. Paclitaxel在細胞動素基因表現上之作用，及自上皮細胞之釋出

得自鼻息肉及正常鼻黏膜的上皮細胞培養至匯合狀，可產生有或無paclitaxel(或其他作用物)之人類上皮細胞調適培養基，再以ELISA偵測上清液。由 Mullol et al., Clinical and Experimental Allergy 25 : 607-615, 1995 中所述之逆轉錄作用-聚合酶鏈反應(RT-PCR)可檢視細胞動素基因之表現。

結果顯示不論細胞動素可否調控細胞動素之基因表現，均可作為抑制嗜伊紅血球細胞存活之方法。利用初級細胞培養的主要缺點為需花10天細胞才會到達匯合狀，使細胞功能與局部狀況以及全身性作用分離，此使得造成在第一所在之疾病生成。然而，這是一個極佳的試管內／活體外模式，可研究調控結構細胞功能及增殖之生長因子(如上皮細胞)由是可闡明黏膜發炎的某些方面。

C. 化學介體自人類鼻息肉中之免疫學釋出

為paclitaxel及其他作用物所調介-在切除之際獲得息肉，以Tyrodes'緩衝溶液洗5次，再以細剪刀切碎成濕重約200毫克的重覆片。重覆片懸浮在3毫升緩衝溶液中，其中含有各種濃度的paclitaxel，37°C下，再以0.2微克／毫升抗原E挑戰之(5分鐘後)。經與抗原培育15分鐘後，移去滲出液，且組織在新鮮的緩衝溶液中煮沸1分鐘以萃取出殘留的組織胺。利用HPLC分析所釋出之組織胺及SRS-A。

五、發明說明 (¹⁸⁹)

實例 40

Paclitaxel 之血管周圍投藥

進行研究以評估填加有 paclitaxel 之外科糊劑 (PCL) 及 EVA 薄膜充作血管周圍處理之效力。

A. 材料及方法

重約 250 - 300 克的 WISTAR 大鼠肌內注入 Innovar (0.33 毫升／公斤) 使麻醉。一旦鎮靜，再置 Halothane 麻醉下。於大體麻醉完成時，將頸部區域之軟毛刮除，夾好皮膚並塗抹碘酒。在左頸靜脈作一個垂直切開，並曝露出外側的頸動脈。二個結紮線在外頸動脈四週，並作橫向的動脈切開術。再將 No.2 French Fogarty 汽球導管引入頸動脈內，通過左總頸動脈，汽球再以食鹽水使膨脹。內皮剝落，係將脹大的汽球在頸動脈中上下通過三次。再移出導管，在左外頸動脈處解開結紮線。

大鼠任意分成 10 隻一組，分別接收無處理，單獨的聚合物 (EVA 薄膜或 PCL 糊劑)，或聚合物加上 20% paclitaxel。聚合物混合物 (2.5 毫克) 置頸動脈四週採圍周方式。再閉合傷口。各組 5 隻大鼠在第 14 天，另 5 隻在 28 天時犧牲。在中間時期，觀察大鼠的重量有否損失或其他全身性疾病之跡象。在第 14 或 28 天時，動物麻醉，並分離出左頸動脈，以 10% 經緩衝的甲醛固定再做組織學檢查。

B. 結果

由這些結果顯示，填加 paclitaxel (20%) 之聚合物可完全預防狹窄，而對照組動物及僅接受聚合物之動物，則在汽

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (¹⁹⁰)

球傷害第14天及28天時發展出28%及55%的脈管損害(圖76A及76B)。

當paclitaxel與血管壁接觸時，此中對於血管內膜肥厚有絕對的抑制作用。然而，作用是極局部的，可由paclitaxel不平均的作用中證知，其中並無法維持藥物鄰近到血管壁(圖77A及77B)。

實例41

Paclitaxel在外科黏連之動物模式中之作用

在大鼠子宮角模式中檢查填加有paclitaxel的EVA薄膜在減少黏連形成上之用途。

將New Zealand雌白兔麻醉，再經中線切開進行剖腹術。曝出子宮角，利用小刀片削去各5公分片段。此削磨足以移去漿膜，造成小斑點式出血。兔子任意分組成對照組或paclitaxel處理組，並在手術後評估2，4及8週。在paclitaxel處理組中，各子宮角完全為填加有paclitaxel之EVA薄膜所包覆。肌腹膜層以縫線密合，角質層則利用皮膚原料密合。

動物在外科手術後評估黏連之形成，歷2，4或8週。動物以人性方式安樂死再進行屍體解剖。子宮角利用標準的顯微鏡檢技術大體地及組織學地檢查。大體而言，黏連利用標準的計分系統分級，其以5公分的子宮角受創之事實為據；因此，由測出含有黏連區域之長度可決定黏連形成之程度。使用以下的分級系統：0=無黏連，1=在25%區域中有黏連，2=在50%區域中有黏連，及3=完全黏連之涉

五、發明說明 (¹⁹¹)

及。如下偵測黏連之嚴重度：0=對分離無抗阻，0.5=某些抗阻(需中等力量)，及1=需銳利的切開。總級數是加成的，0-4的黏連分數範圍代表程度及嚴重度。

實例42

膠團paclitaxel可治療發炎性腸疾(IBD)

發炎性腸疾(IBD)，即克隆氏病(Crohns')及結腸潰瘍，特徵在於發作及緩解之循環。IBD最可被應用之模式可由在大鼠之結腸內注入2,4,6-三硝基苯磺酸(TNB)於乙醇及食鹽水溶液(Morris et al., Gastroenterology 96 : 795 - 803, 1989)而產生。單一投藥可啟動急性及慢性發炎，其持續達數週之久。然而，就藥理學而言，兔子結腸顯示出類似人類結腸正甚於大鼠(Gastroenterology 99 : 13424-1332, 1990)。

在所有實驗中使用雌的New Zealand白兔。動物以戊巴比妥靜脈內(i.v.)麻醉。由直腸插入嬰兒的餵食管，如此頂端可靠近肛門20公分，以注入TNB(0.6毫升：40毫克於25%乙醇／食鹽水中)。投予TNB一週後，兔子任意分成3個處理組。在此時，動物接受無處理，單獨的膠團(i.v.)或膠團paclitaxel(i.v.)。此每4天重覆一次共4次。

在研究過程中，兔子每週以內視鏡檢查，係在大體麻醉下利用兒科支氣管鏡，如上所誘導的。以內視鏡技術員(盲目的)依下列等級計傷害分數：0，無不正常；1，發炎，但未潰瘍；2，發炎及在1位置上潰瘍(<1公分)；3，2處以上的發炎及潰瘍或沿著結腸長度有一個主要部位之發炎及

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (¹⁹²)

潰瘍(>1公分)。

在最後一次處理後，兔子在24小時及1，2，4及6週時以Euthanol犧牲之。分離出整個結腸，割除並沿著逆-腸系膜邊緣打開，以食鹽水洗滌再置於含有抗生素之Hanks'平衡鹽溶液中。以立體顯微鏡檢查結腸，並如在內視鏡檢般相同之準則計分之。同樣的在屍體解剖時選擇結腸檢品，可來自明顯發炎且潰瘍的區域及來自由肛門至上升結腸整段中的正常結腸。組織固定在10%甲醛內，再處理以包埋於石蠟內；切出5公分段落，以蘇木素及嗜伊紅染色。玻片檢查是否有IBD組織病理學。

最初的實驗也可變化之，即在以TNB結腸內注射至兔子誘生結腸炎係採用口服paclitaxel。動物任意分成3組，接受無處理，單獨的溶媒或口服經調和之paclitaxel。

實例43

Paclitaxel在全身性紅斑狼瘡動物模式中之作用

以膠團paclitaxel處理雌的NZB/NZW F₁老鼠(B/W)來決定paclitaxel在全身性紅斑狼瘡上之作用。此老鼠株可發展出類似人類SLE之疾病。在1個月大時，這些老鼠和正常老鼠比較下有提高的脾B-細胞自主分泌性免疫球蛋白水平。在2個月大發生高的抗-ssDNA抗體水平。5個月時，免疫球蛋白沿著血管球毛細管壁累積。發生嚴重的血管球性腎炎，且到9個月大時有50%B/W老鼠會死亡。

A. 材料及方法

雌的B/W老鼠購自The Jackson Laboratory (Bar Harbor,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (¹⁹³)

ME, USA)。5個月大的雌B/W老鼠任意分成處理組及對照組。處理組接受低劑量連續的膠團paclitaxel(2.0毫克/公斤；每週3次，共10次注射)或高劑量"脈衝"或膠團paclitaxel(20毫克/公斤；4次，每週一次)。對照組僅接受對照用膠團。

在預定時間間隔下，犧牲年齡可相比之經paclitaxel處理及未處理之對照B/W老鼠，無菌地取出其脾臟，並製成單細胞懸液以做淋巴細胞計數之用。為鑑定出淋巴細胞之亞族群，於是進行螢光分析。利用ELISA決定細胞/百萬脾臟B-細胞自主分泌性免疫球蛋白數目(IgG，IgM，免疫球蛋白總數)或抗-ssDNA抗體。

由上文中可明白，雖然基於說明目的此中已詳述本發明的特異具體實例，但只要不偏離本發明之精義及範圍，此中仍可有各種變化。因此，本發明除了下文之申請專利範圍之外並不受限。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

1562674

8611 81~C

公告本

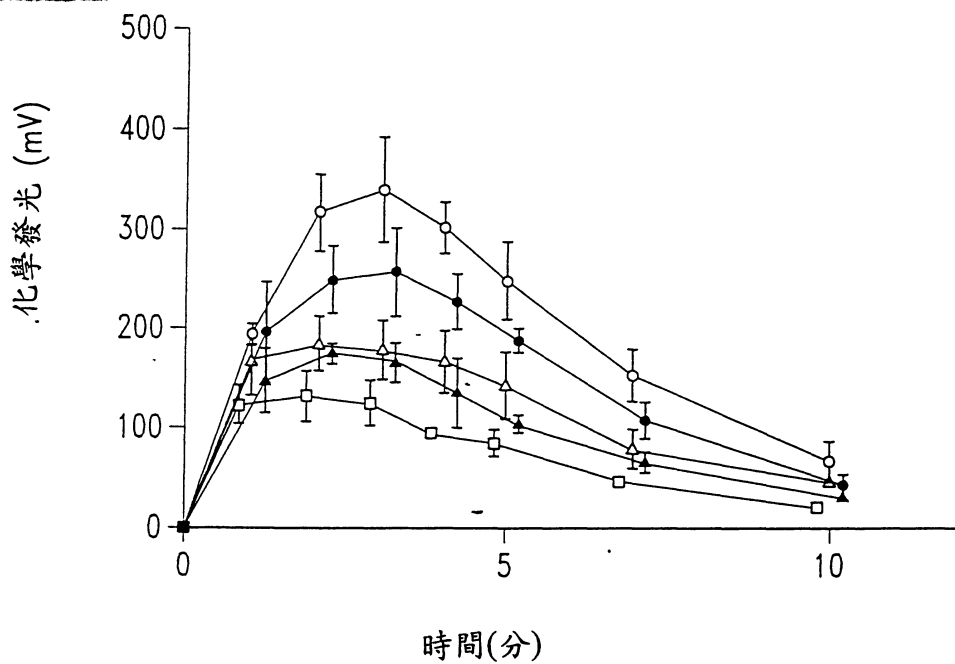


圖 1A

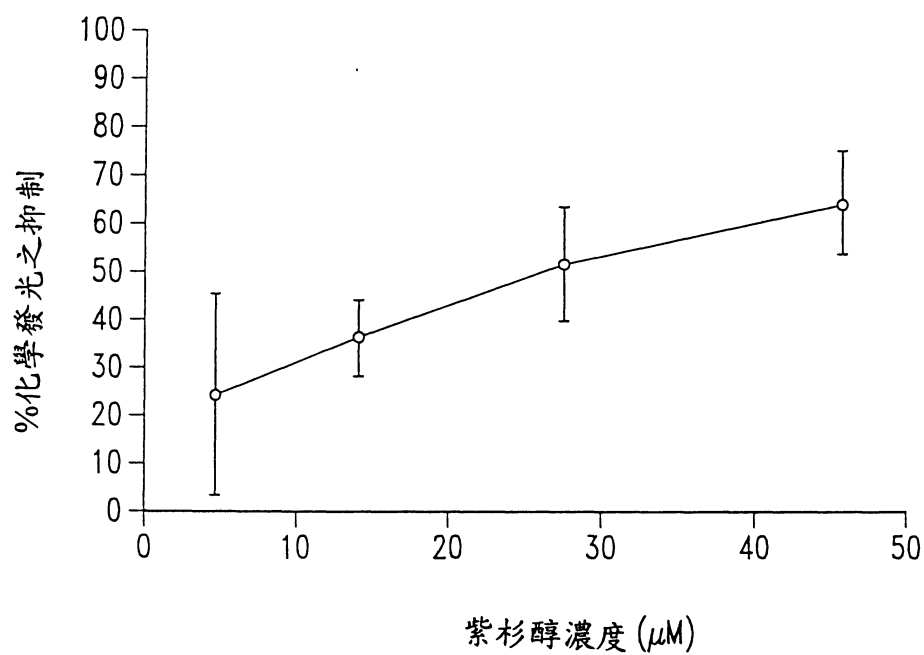


圖 1B

AlF_3 在組調理的酵母聚糖-誘生之嗜中性
球活化作用中之作用，以化學發光測度

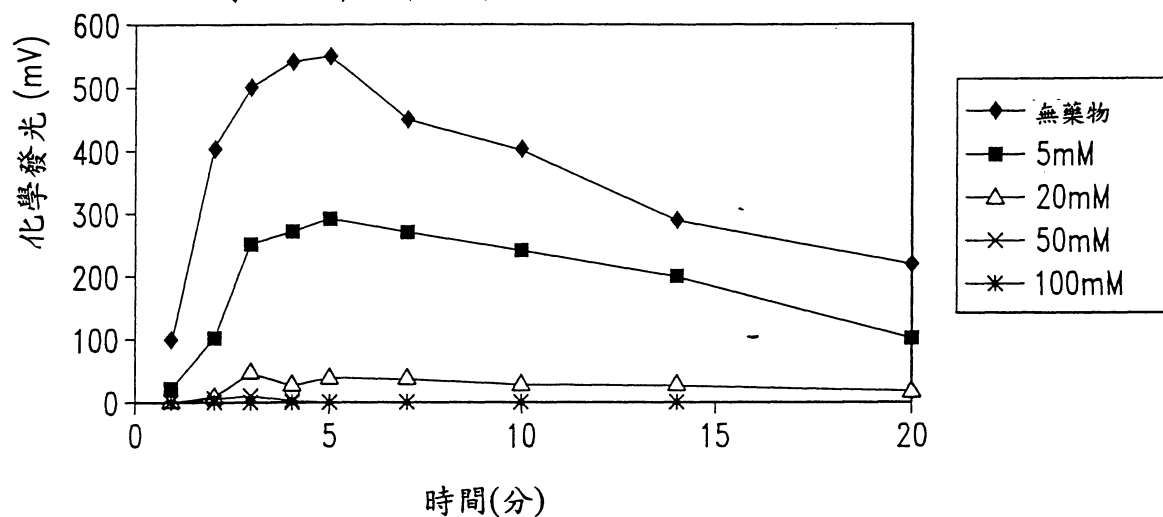


圖 1C

甘胺酸乙酯在經調理的酵母聚糖誘生之嗜中
性球活化作用中之作用，以化學發光測度之

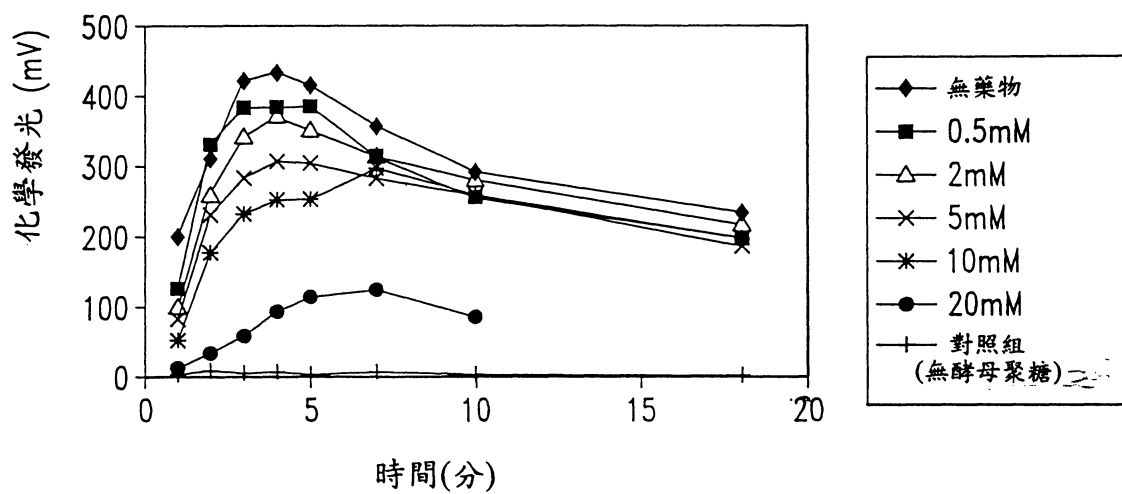


圖 1D

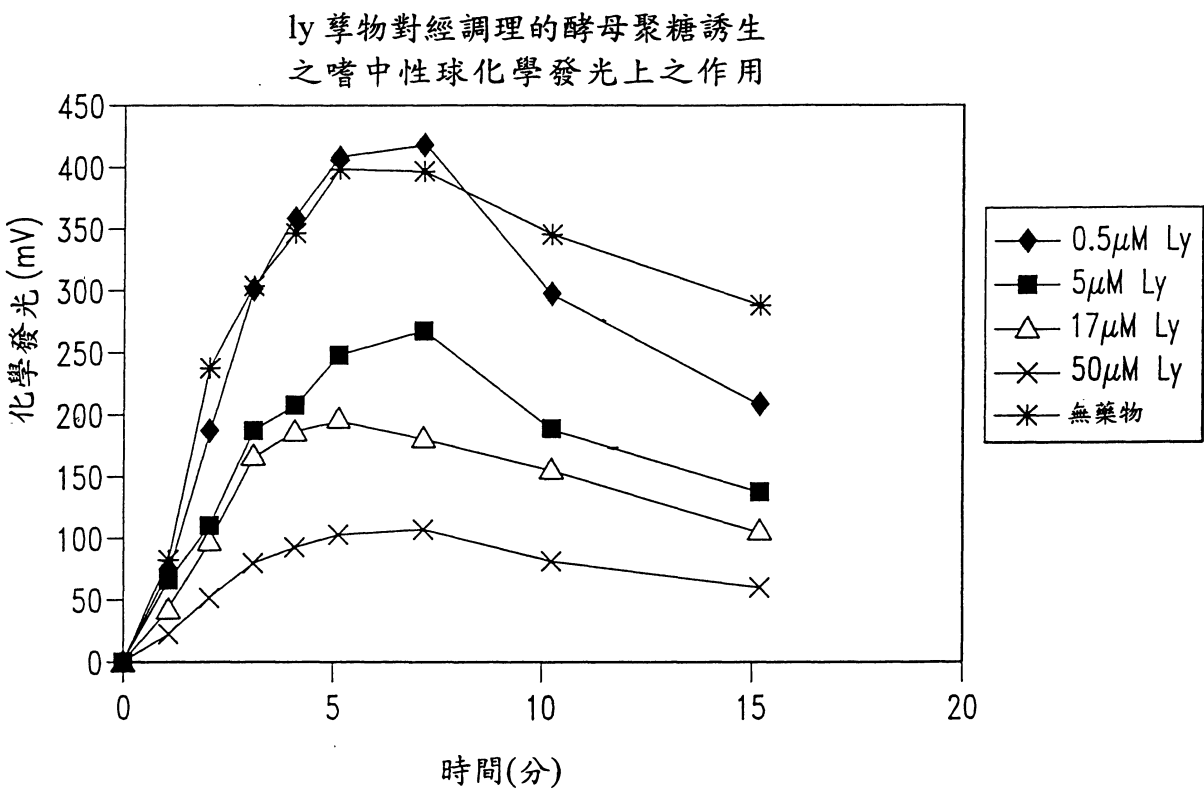


圖 1E

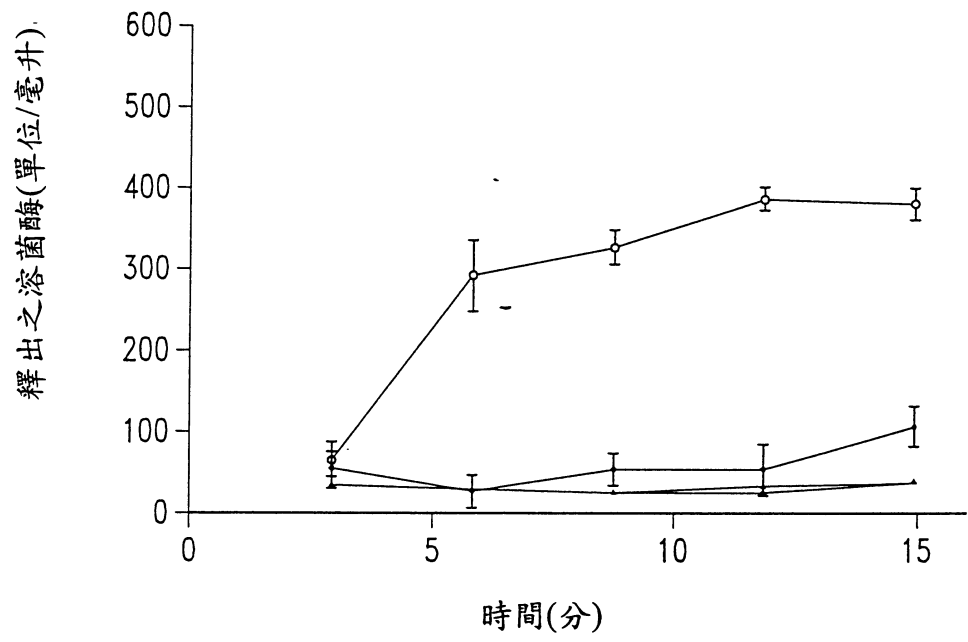


圖 2

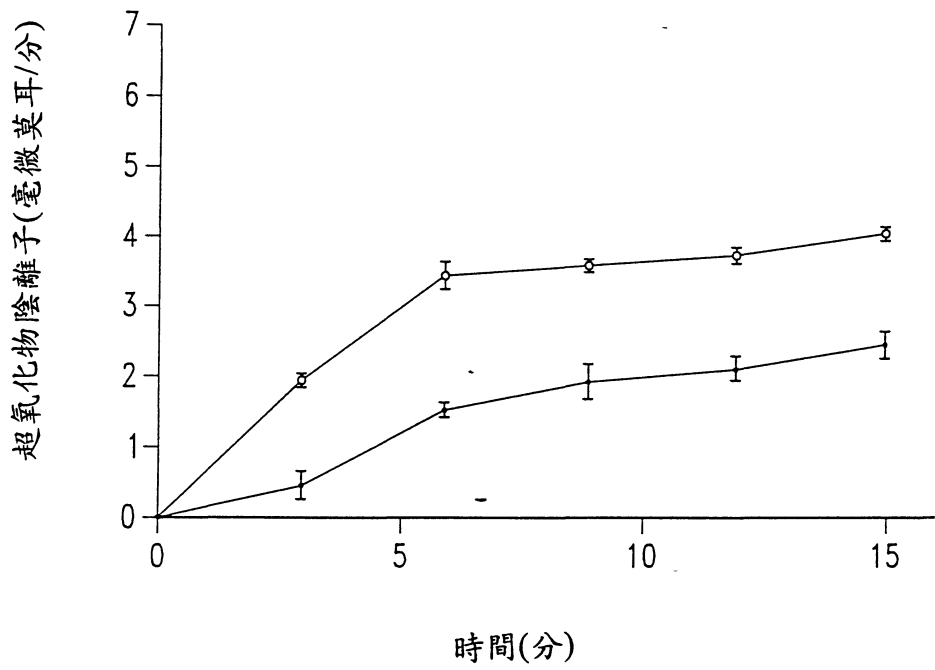


圖 3A

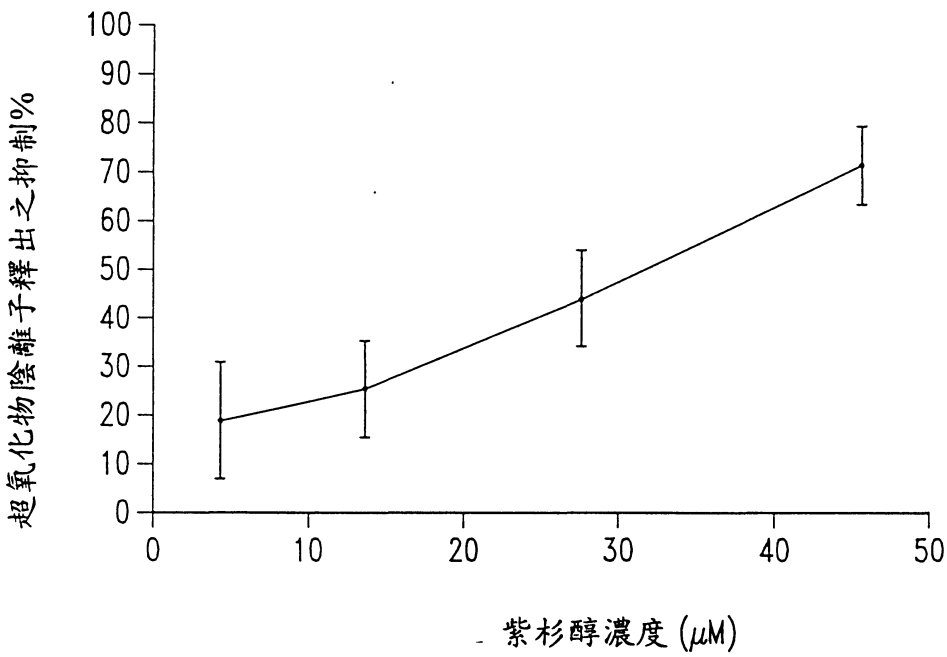


圖 3B

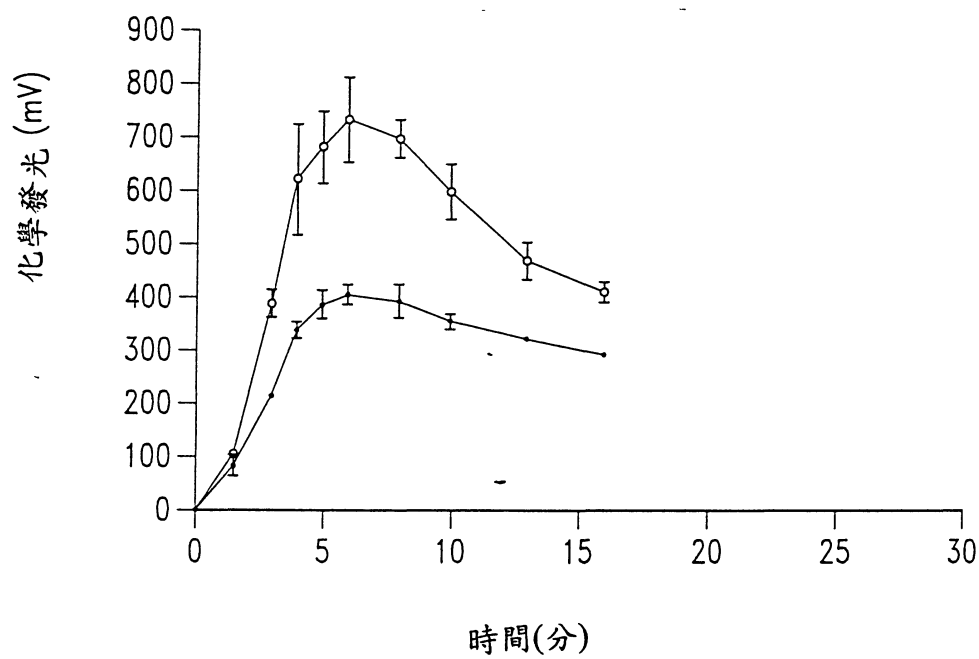


圖 4A

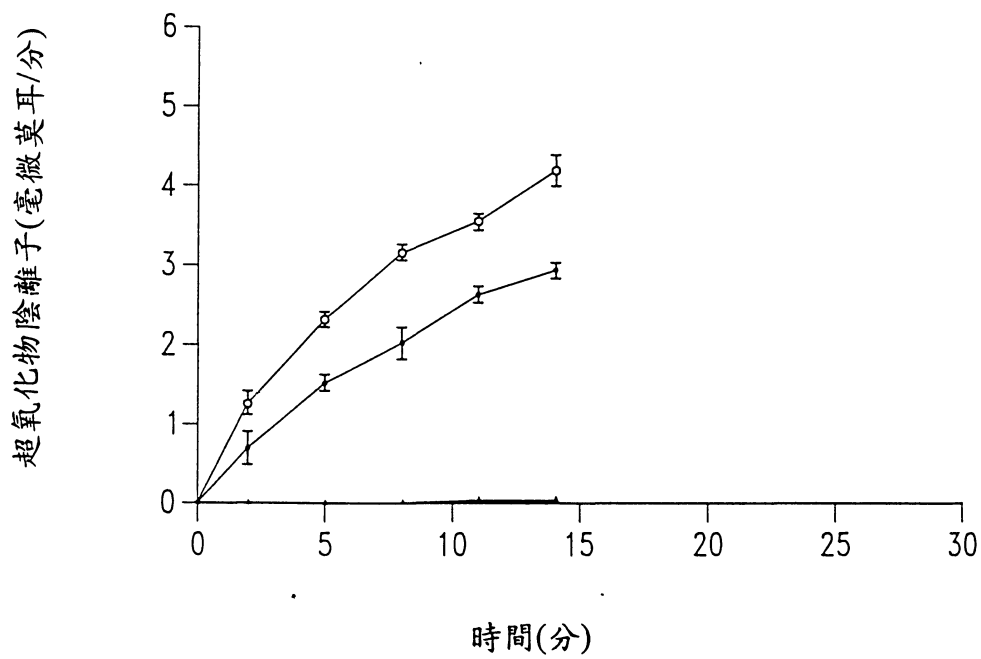


圖 4B

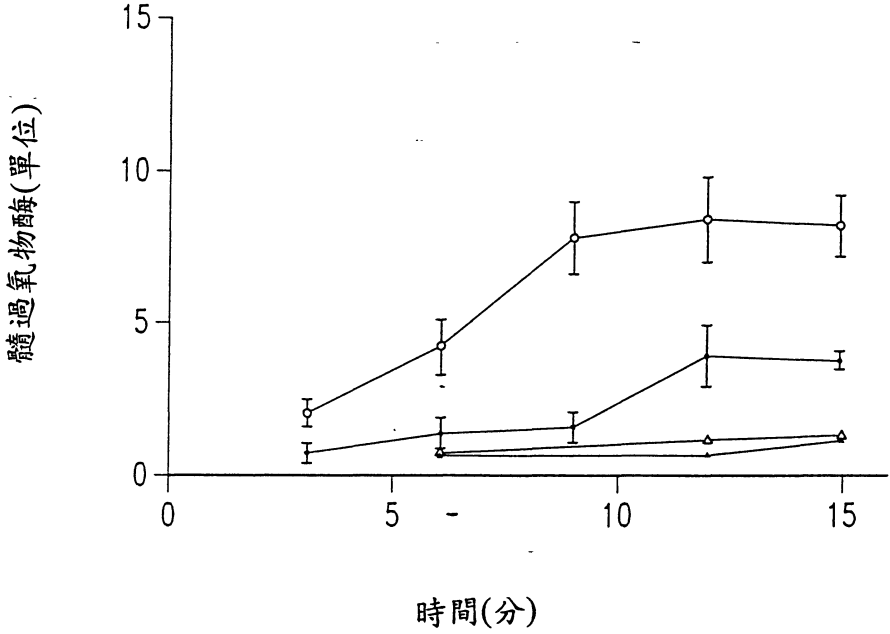


圖 5A

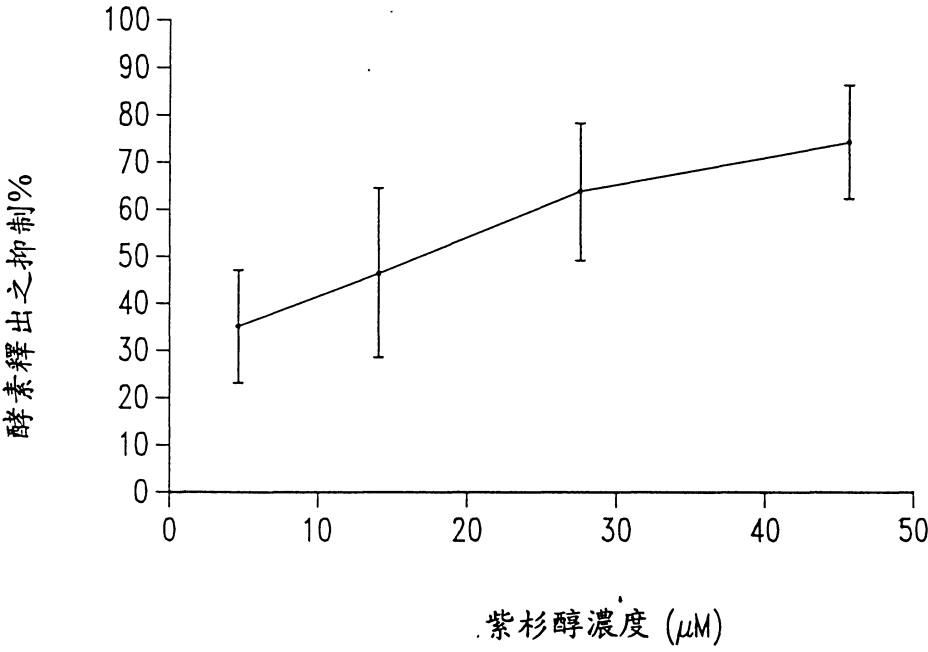


圖 5B

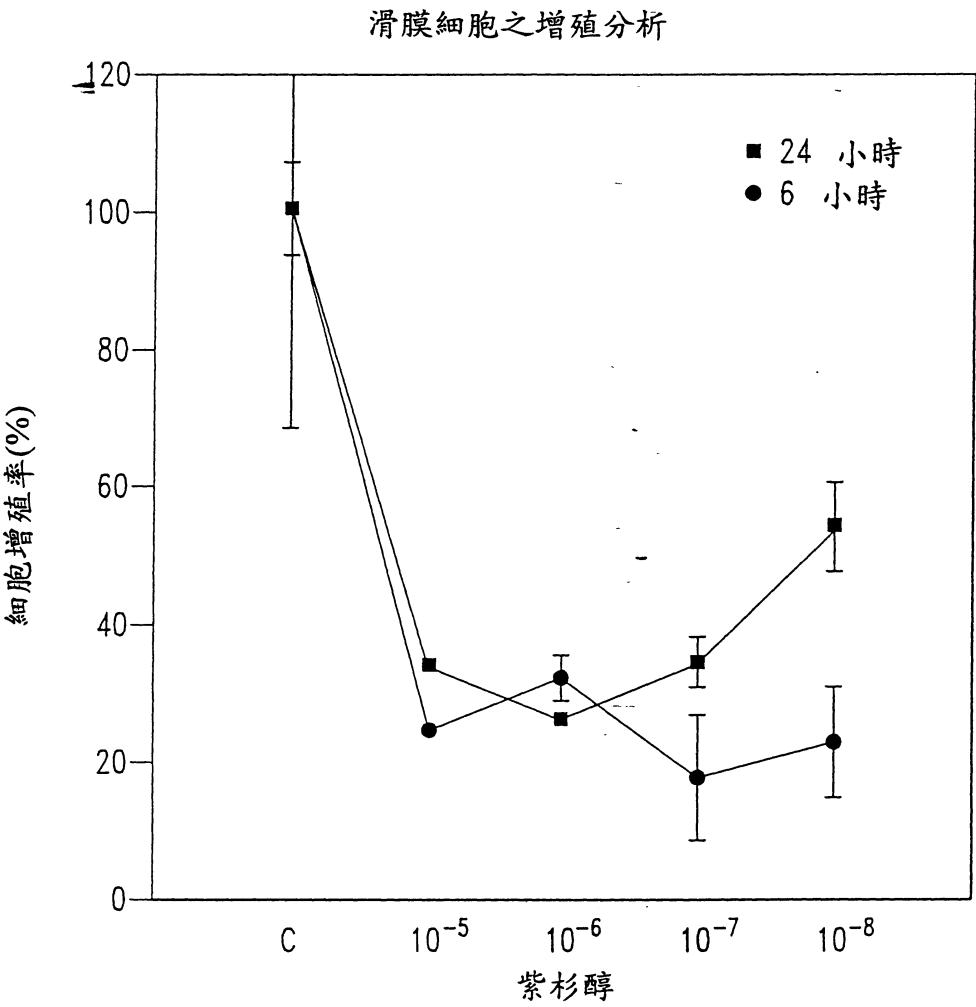


圖 6

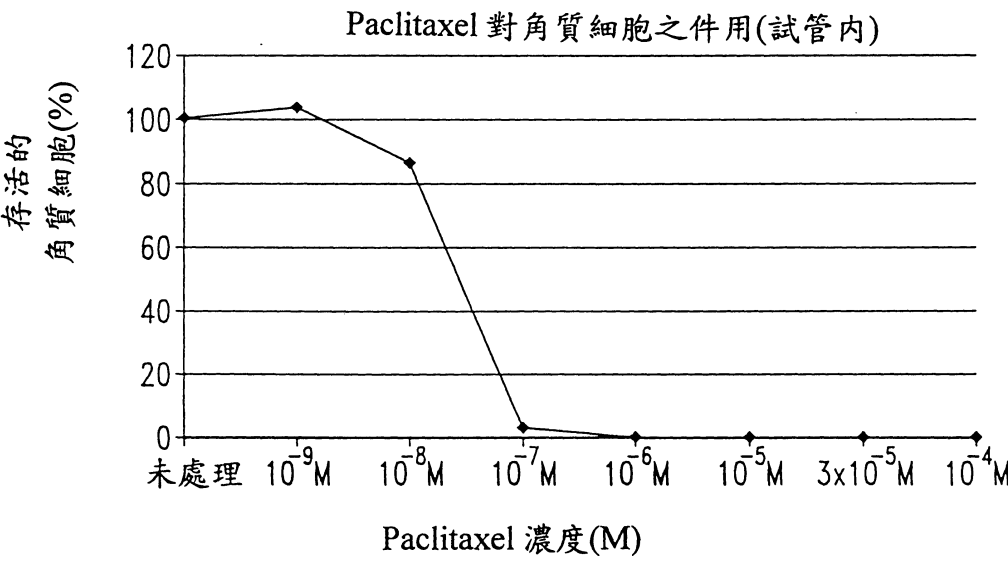


圖 7

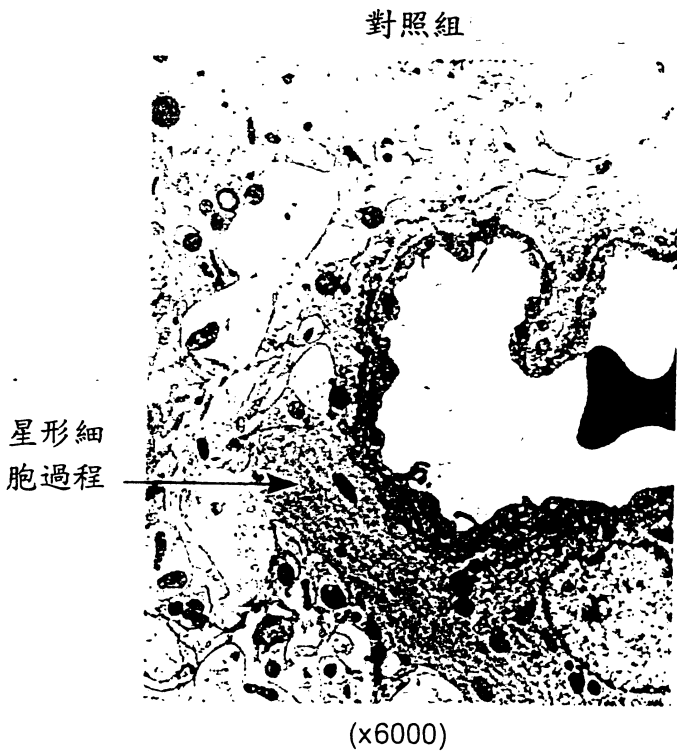


圖 8A

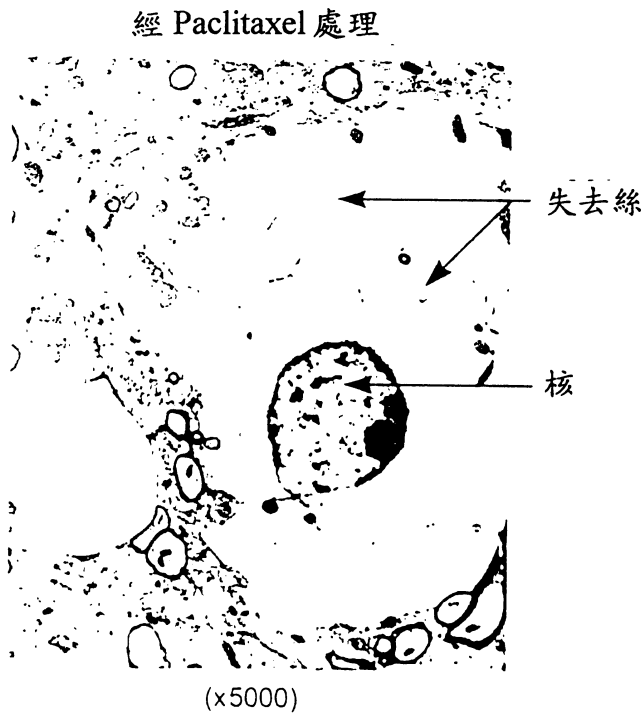


圖 8B

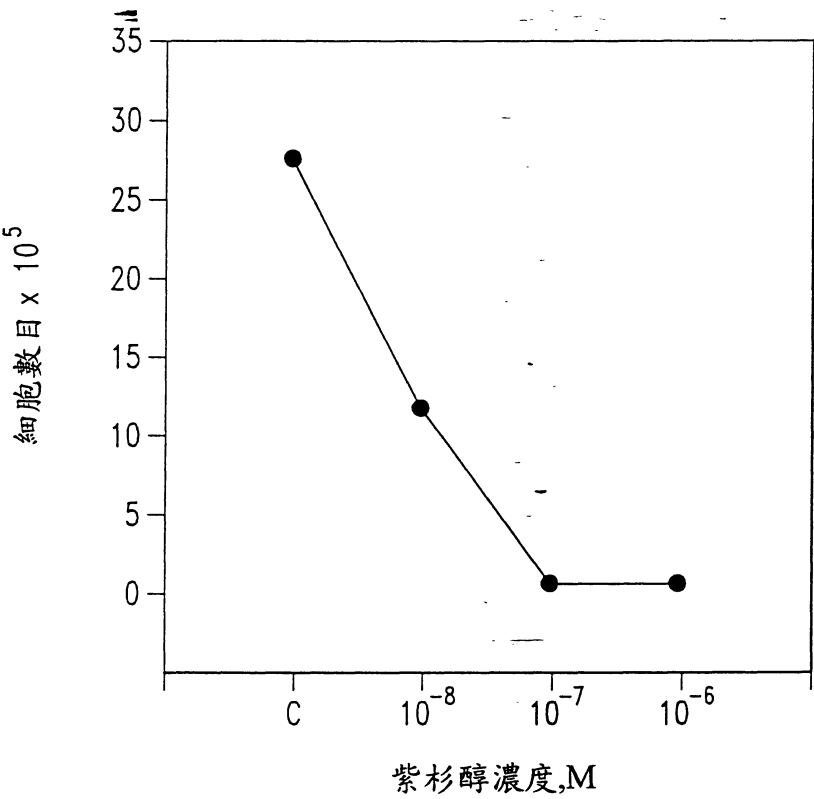


圖 9

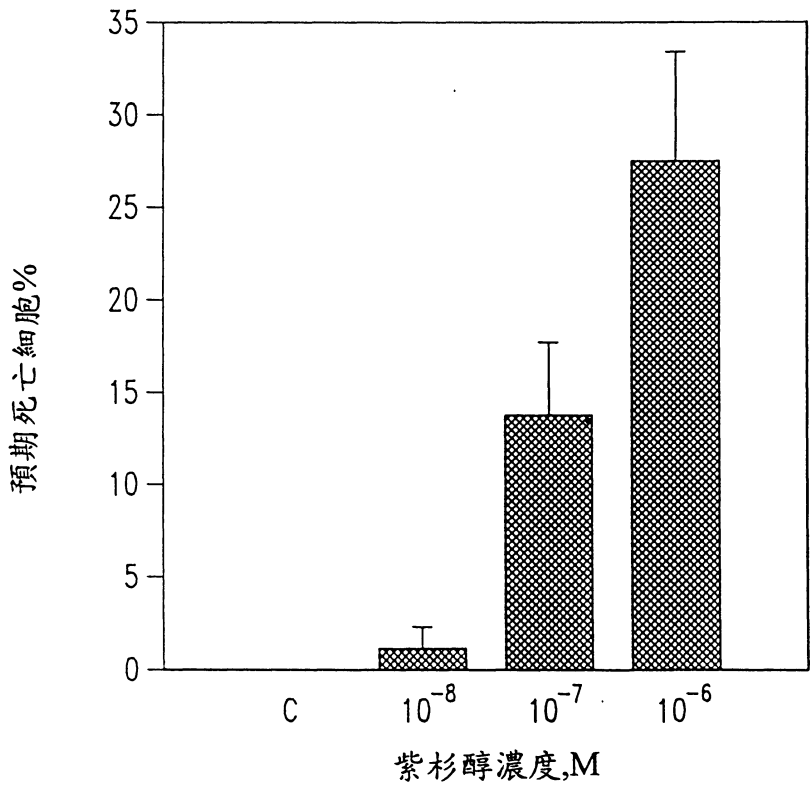


圖 10

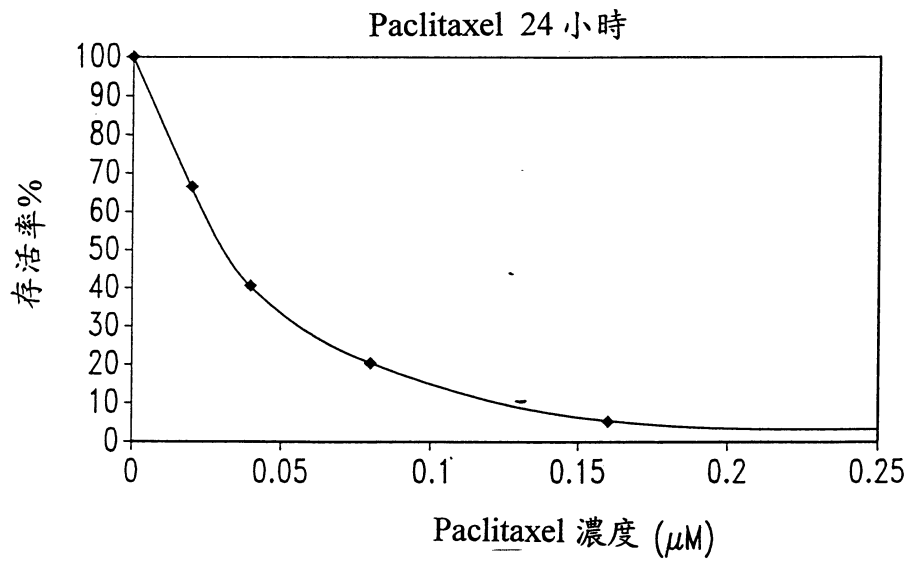


圖 11A

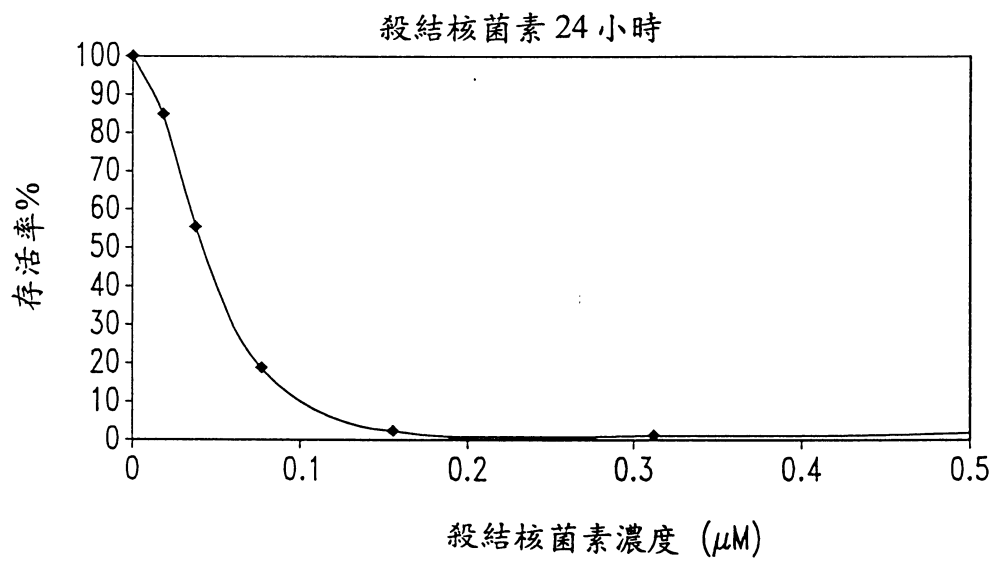


圖 11B

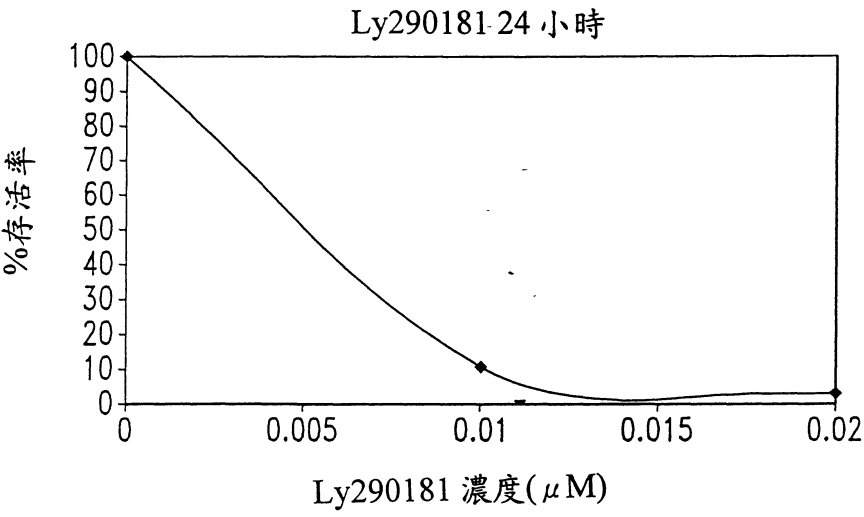


圖 11C

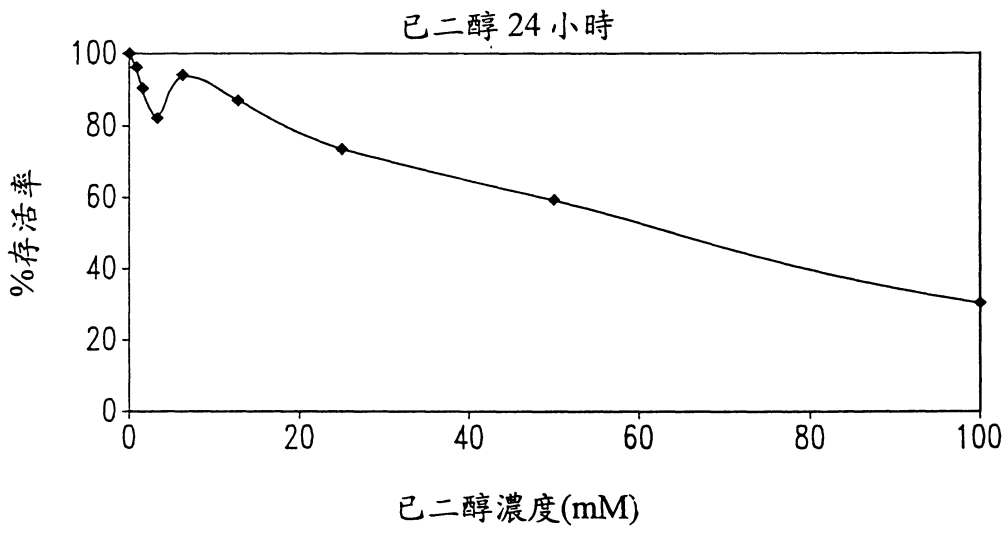


圖 11D

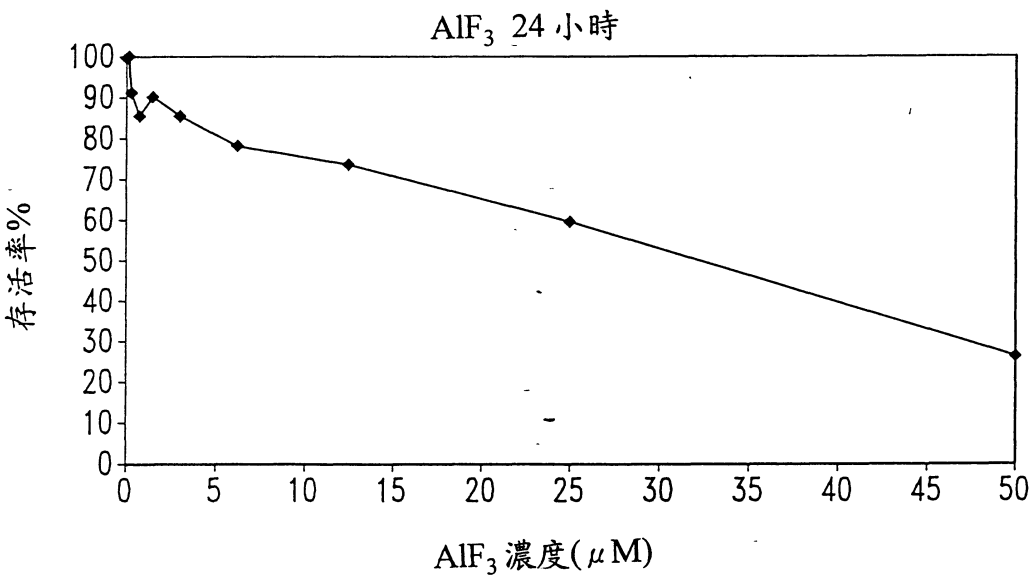


圖 11E

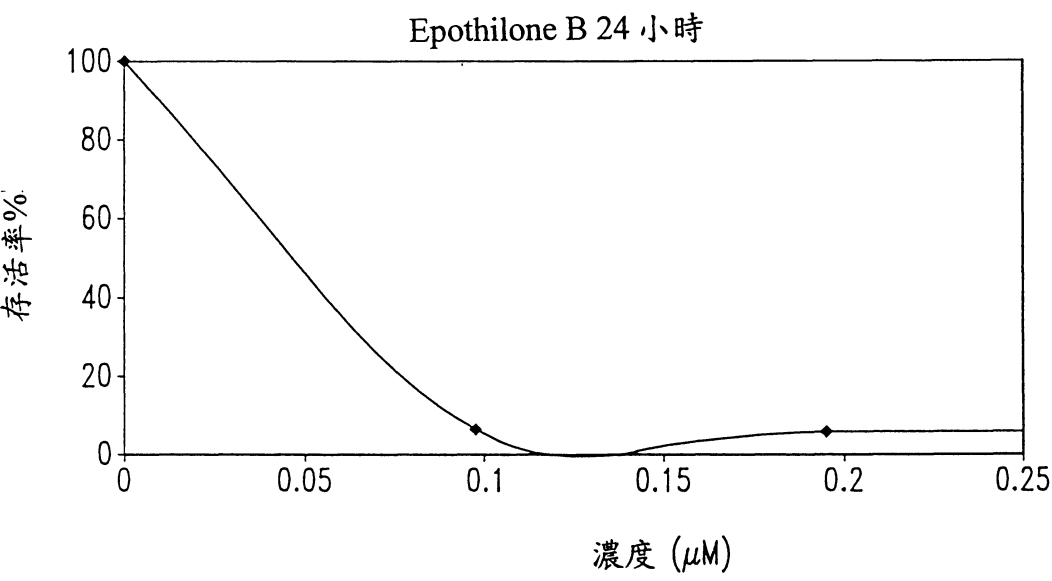


圖 11F

Ly 290181

膠原蛋白酶

GAPDH

IL-1(毫微克/毫升)	0	20	20	20	20	20
藥物 (M)	0	0	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}

圖 12A

2-甲基-2,4-戊二醇(己二醇)

膠原蛋白酶



GAPDH



IL-1(毫微克/毫升)	0	20	20	20	20	20
藥物 (M)	0	0	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴

圖 12B

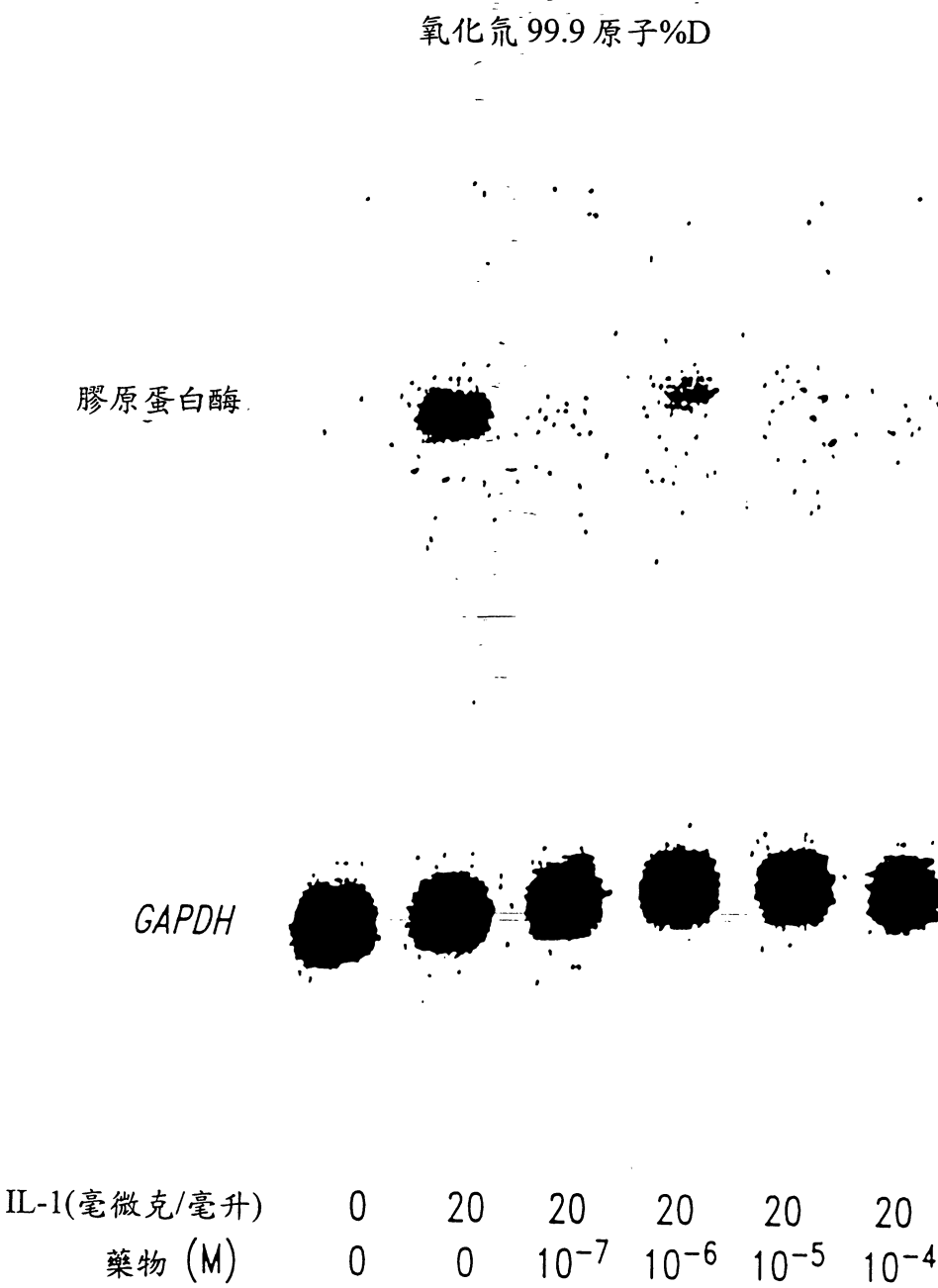


圖 12C

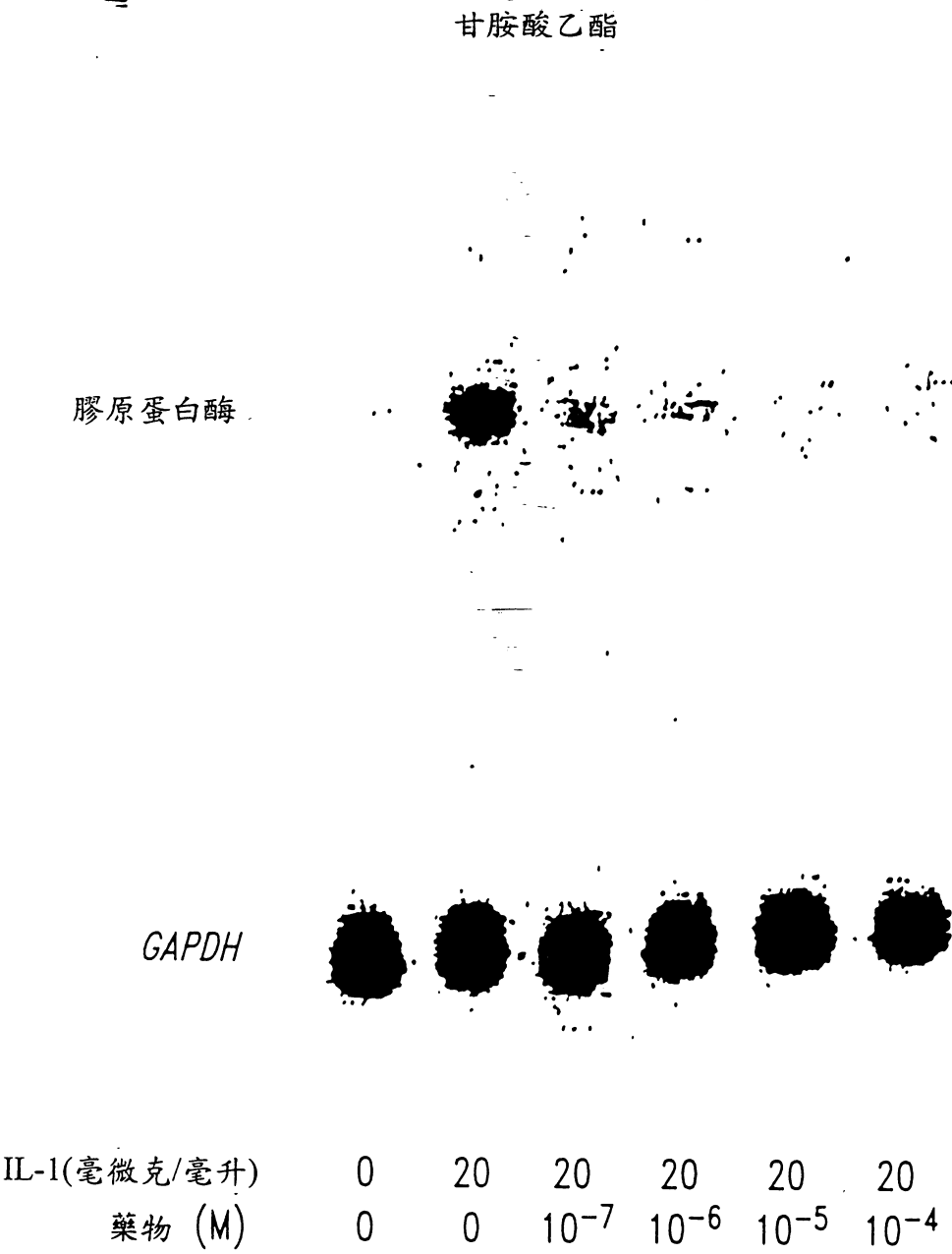


圖 12D

乙二醇雙
(琥珀醯亞胺琥珀酸酯)

膠原蛋白酶



GAPDH



IL-1(毫微克/毫升)	0	20	20	20	20	20
藥物 (M)	0	0	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}

圖 12E

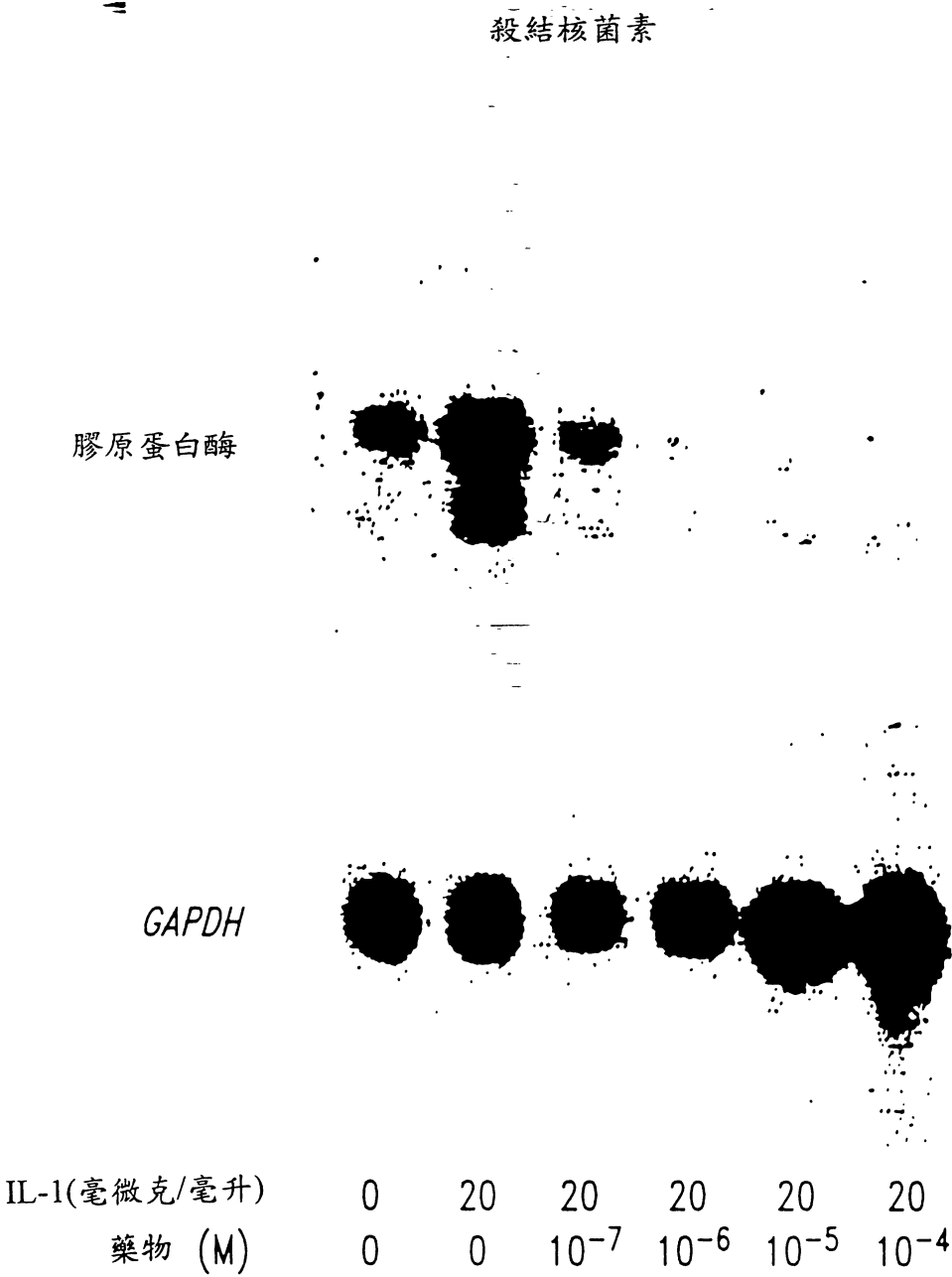


圖 12F

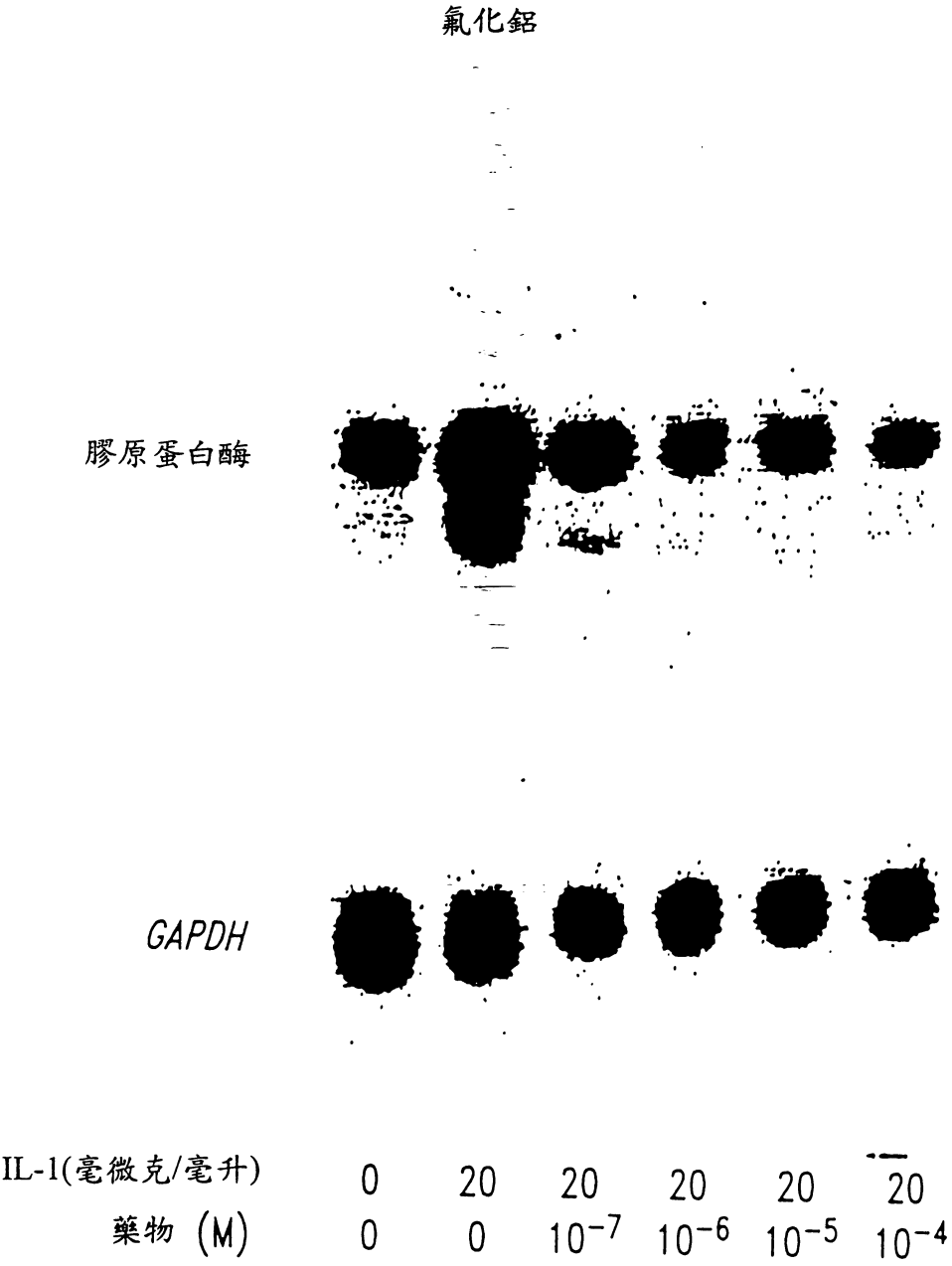


圖 12G

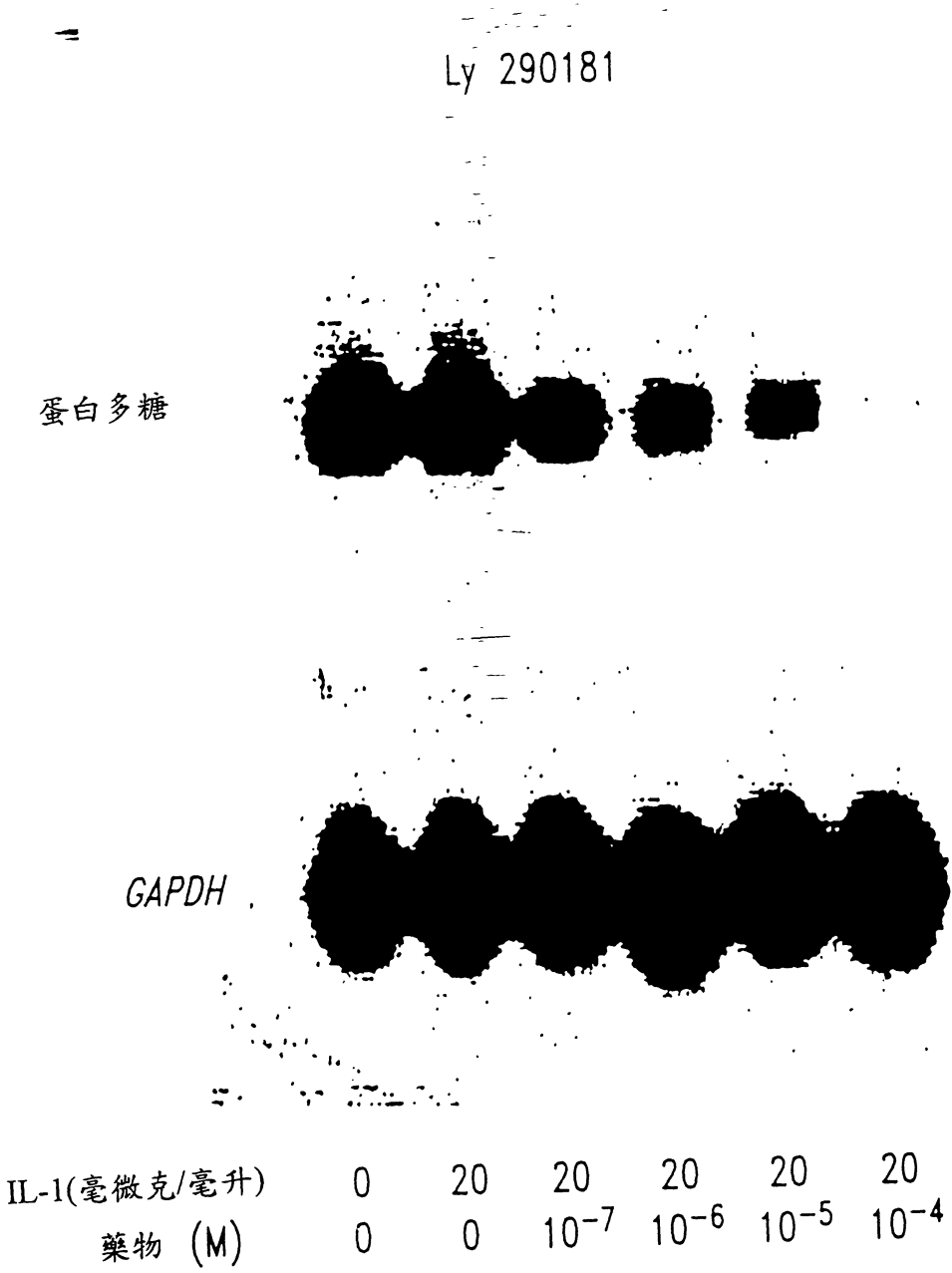


圖 13A

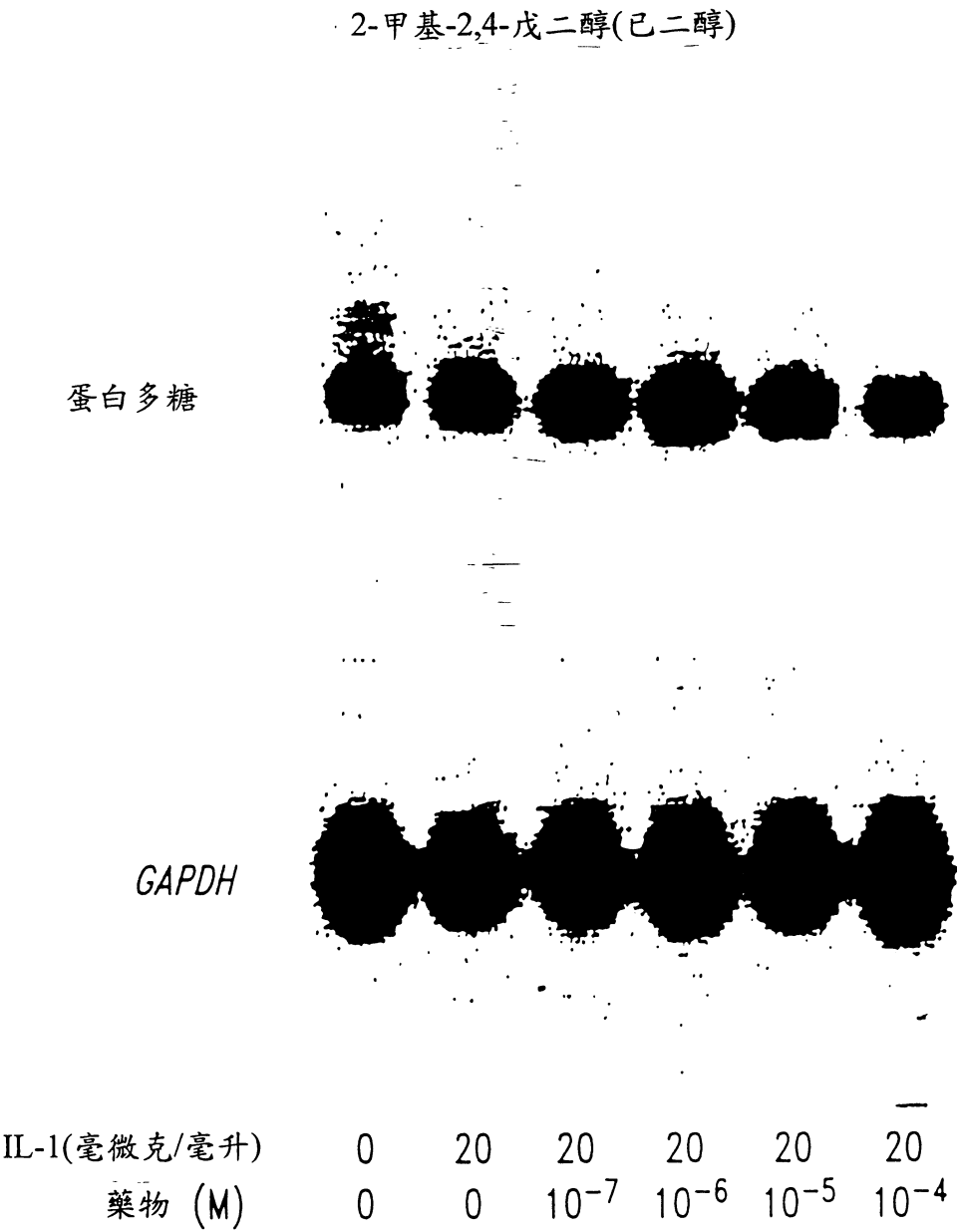


圖 13B

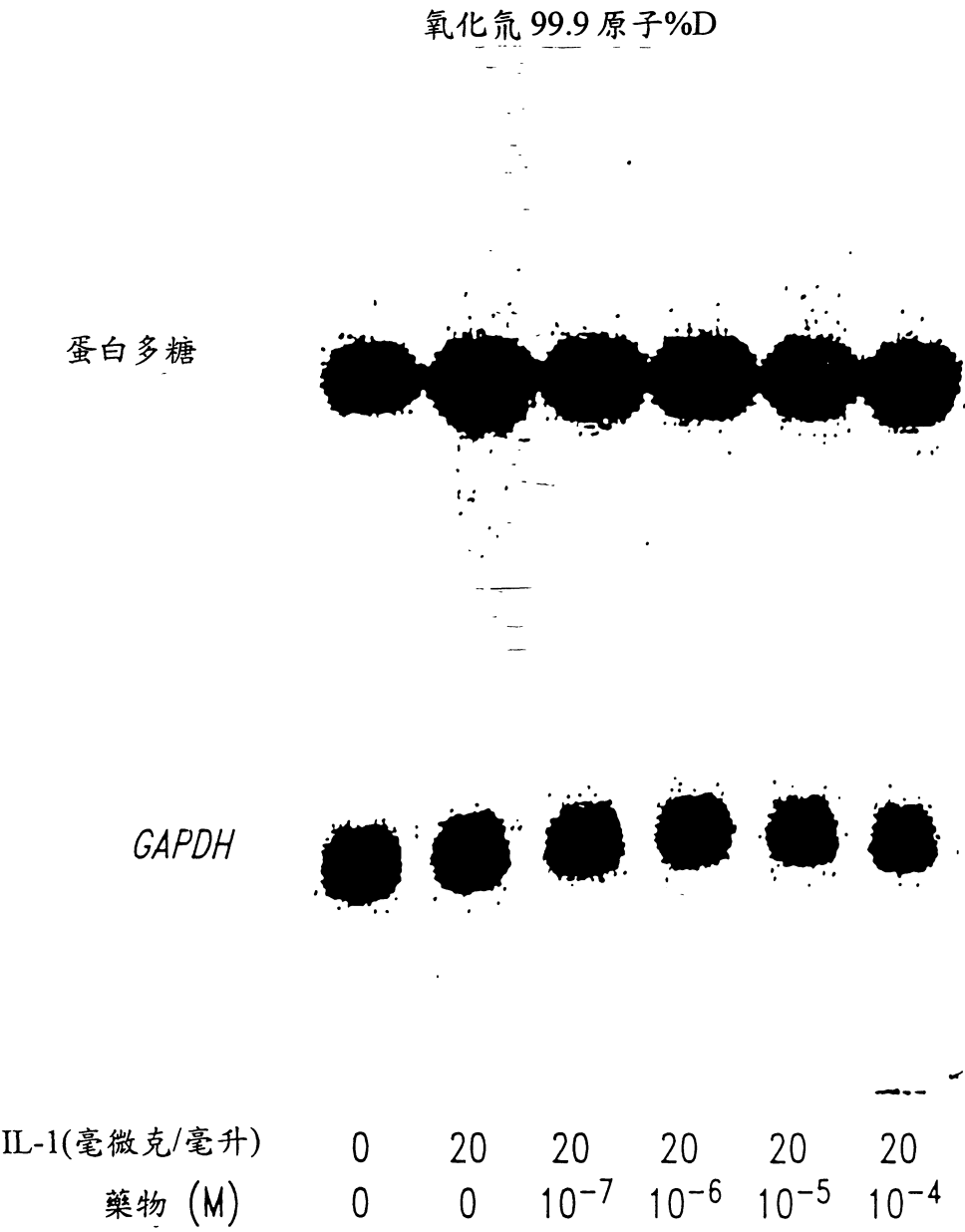


圖 13C

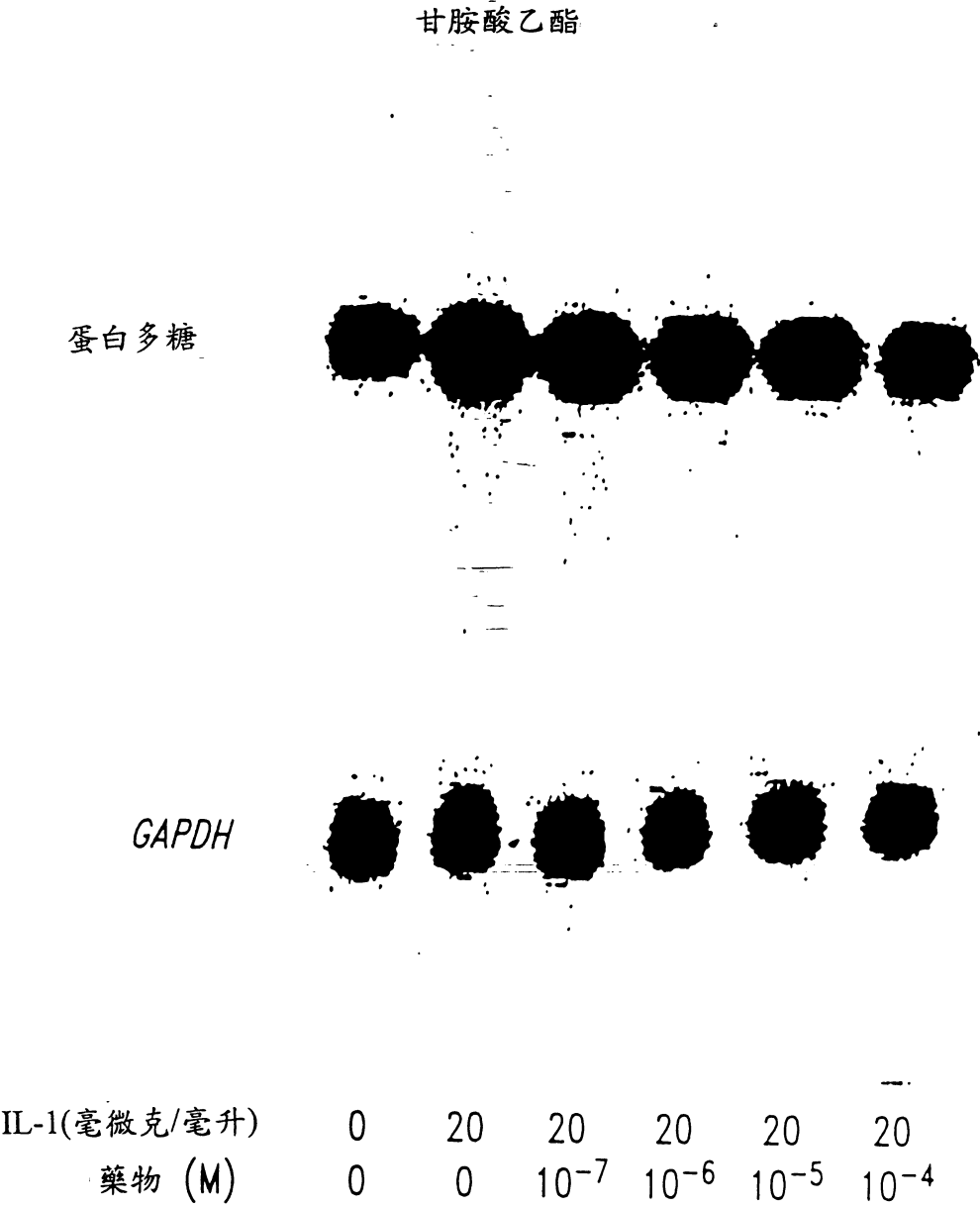


圖 13D

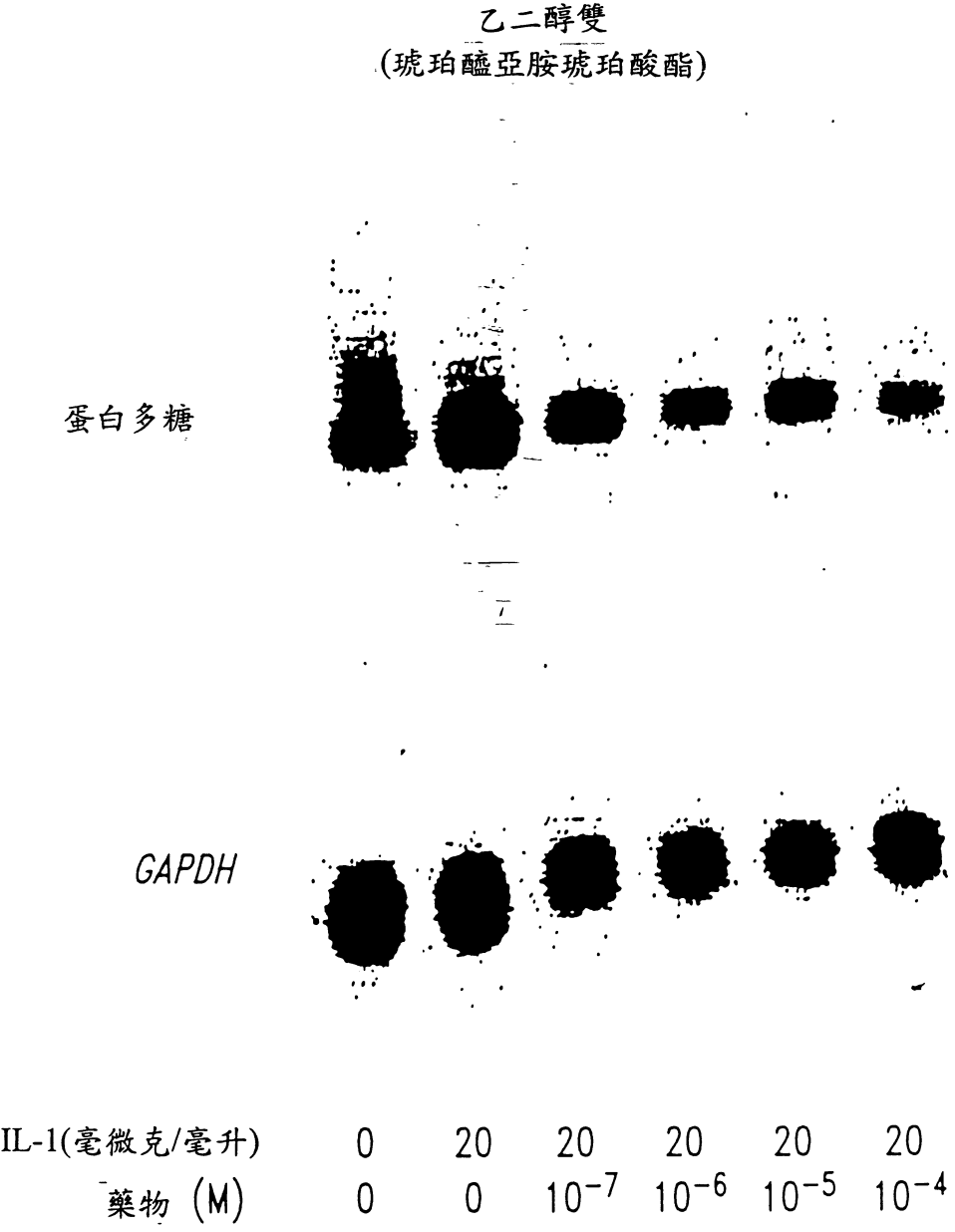


圖 13E

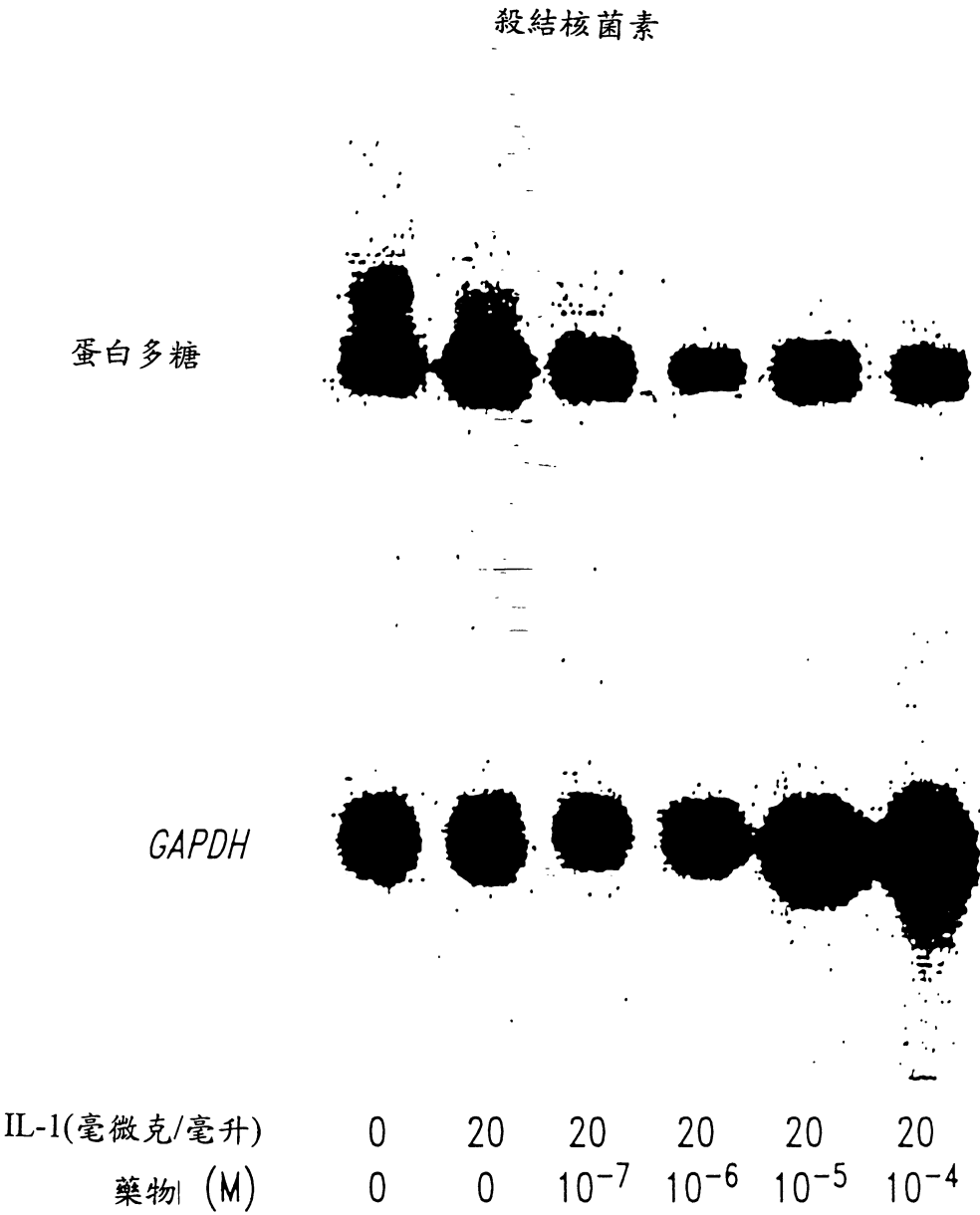


圖 13F

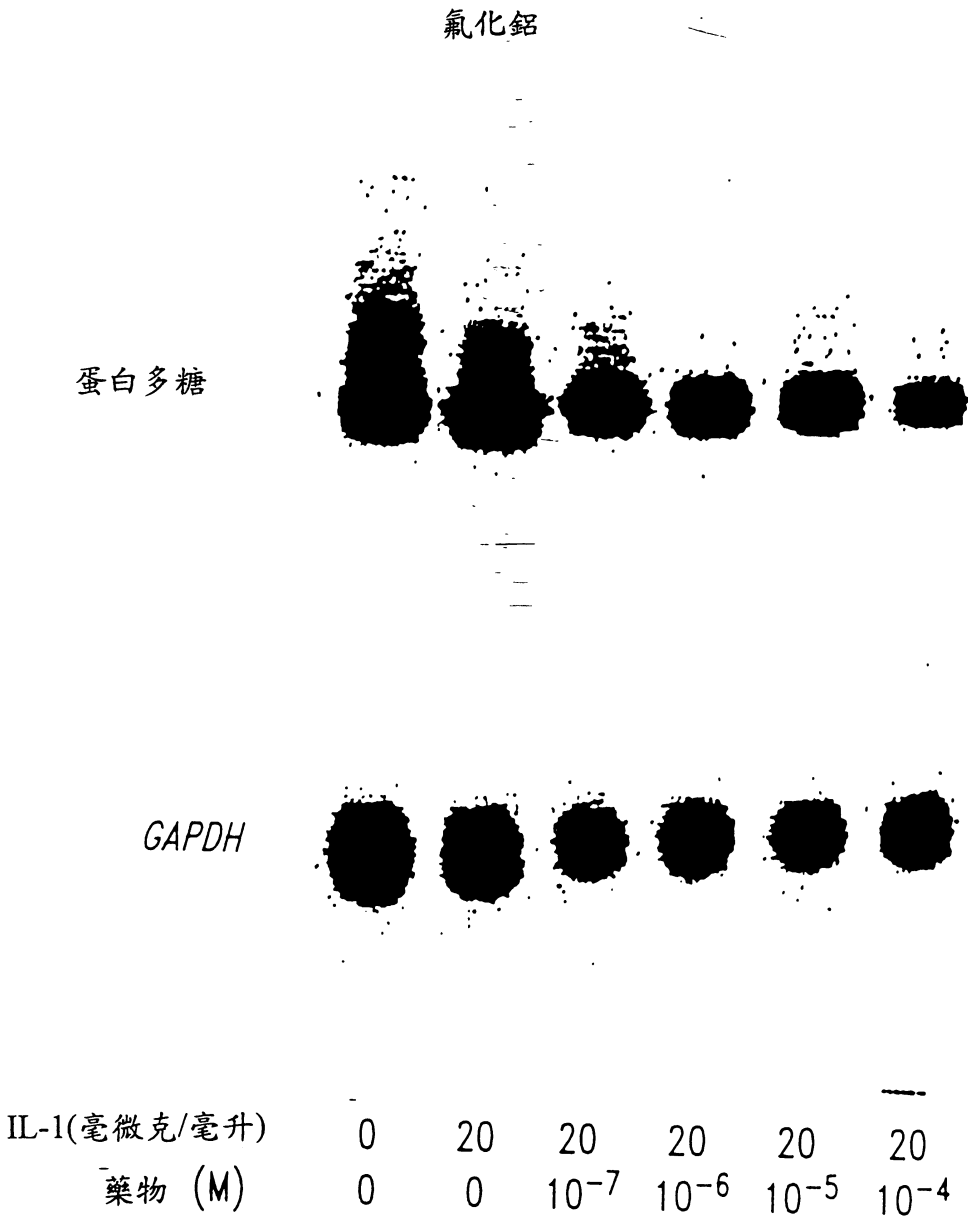


圖 13G

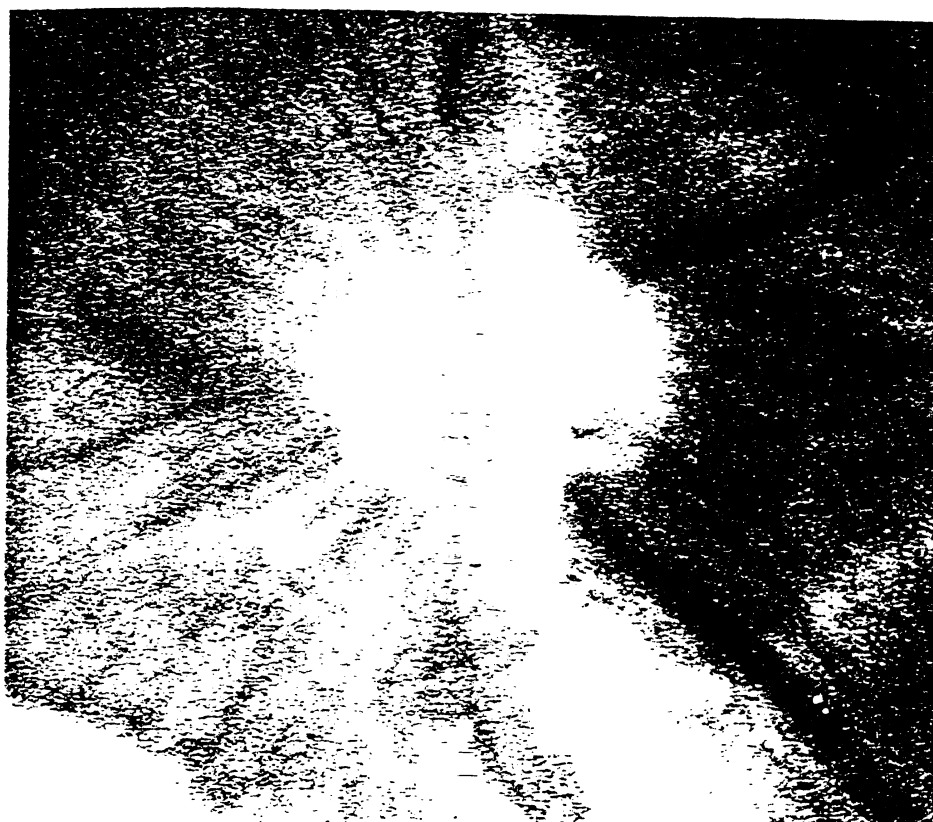


圖 14A

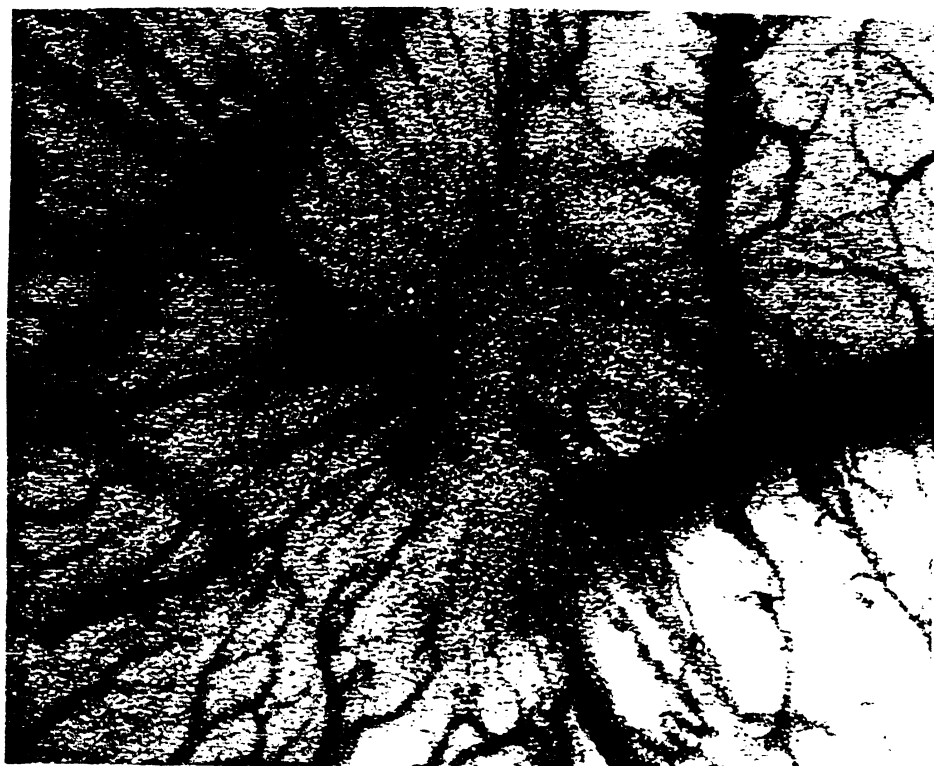


圖 14B



圖 14C

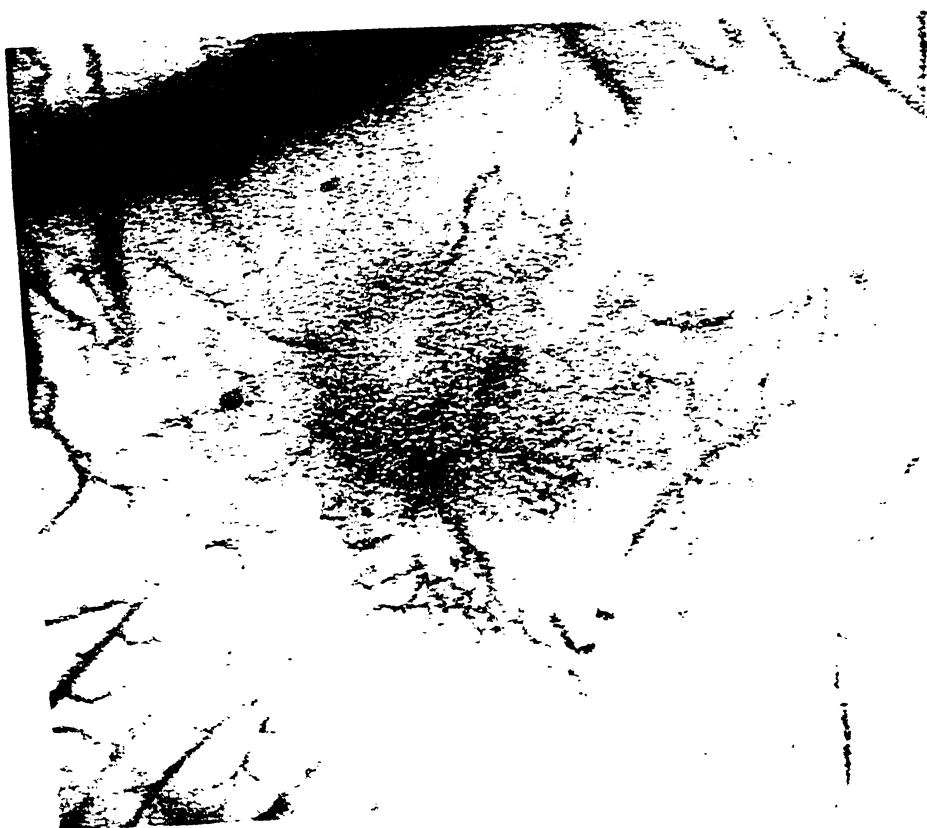


圖 14D

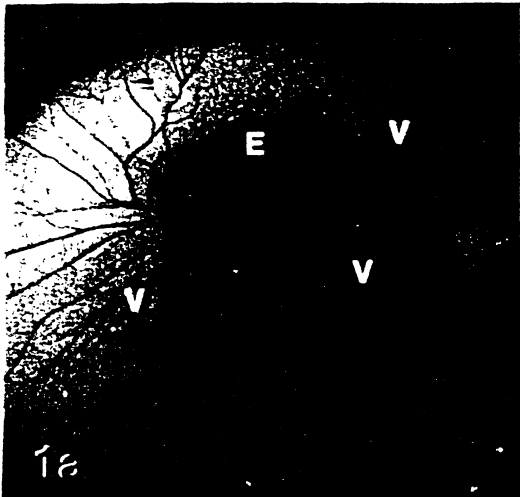


圖 15A



圖 15B

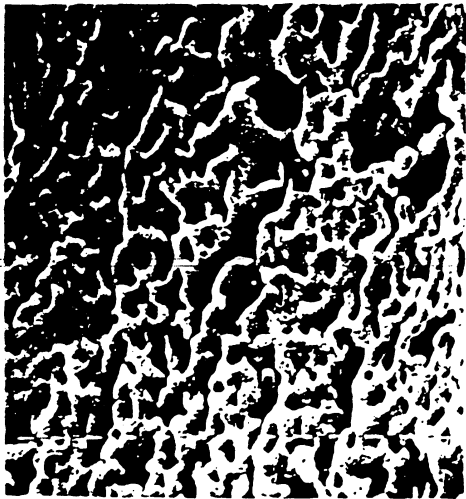


圖 15C

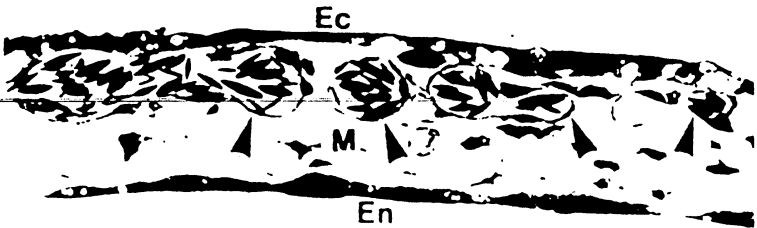


圖 15D



圖 15E

填加 BMOV 之糊劑在老鼠
MDAY-D2 腫瘤重量上之作用

腫瘤重量(克)				
	對照組	25% BMOV	30% BMOV	35% BMOV
	1.68	1.05	--	--
	1.01	0.48	--	--
	0.96	0.20	--	--
	0.91	0.14	--	--
	1.23	0.80	--	--
平均值標	1.16	0.53	--	--
準 偏 差	0.32	0.39	--	--
	1.15	--	0.02	0.36
	1.12	--	0.17	0.50
	1.04	--	0.13	0.15
	2.05	--	1.40	0.69
	1.02	--	0.37	0.16
	2.25	--	0.20	0.00
mean	1.57	--	0.38	0.31
st dev	0.53	--	0.51	0.25

圖 16



圖 16A



圖 16B

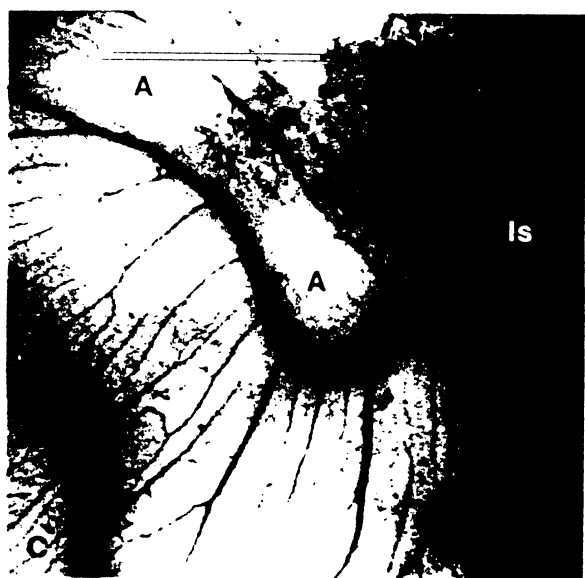


圖 16C

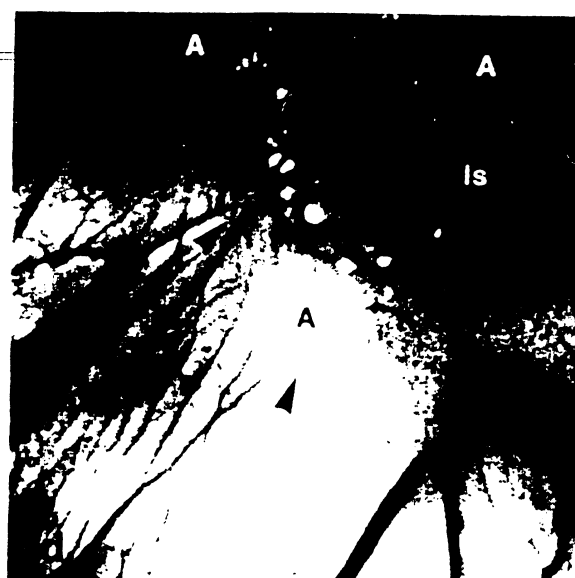


圖 16D

填加 BMOV 之 PCL:MeEG 糊
劑在老鼠 RIF-1 腫瘤上之作用

動物	處理	腫瘤重量(克)		
		第 4 天	第 5 天	第 6 天
1	對照組	0.462	0.226	--
2	對照組	0.131	0.146	0.114
3	對照組	0.133	0.173	0.233
4	對照組	0.000	0.024	0.027
5	對照組	0.122	0.148	0.161
6	對照組	0.173	0.078	0.164
7-12	5% BMOV	0.000	0.000	0.000

圖 17

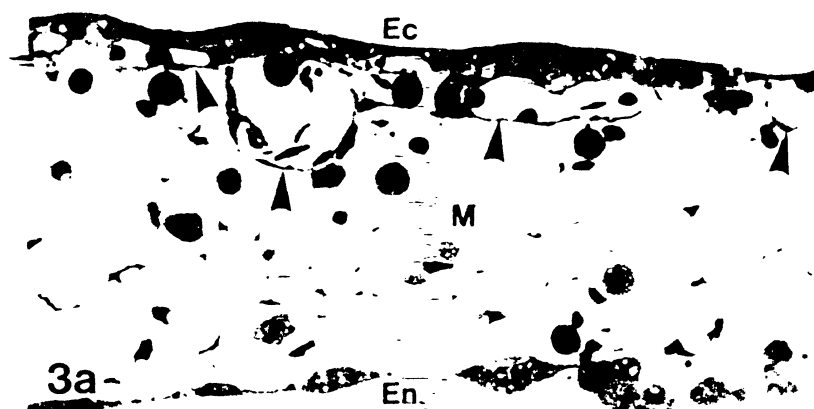


圖 17A

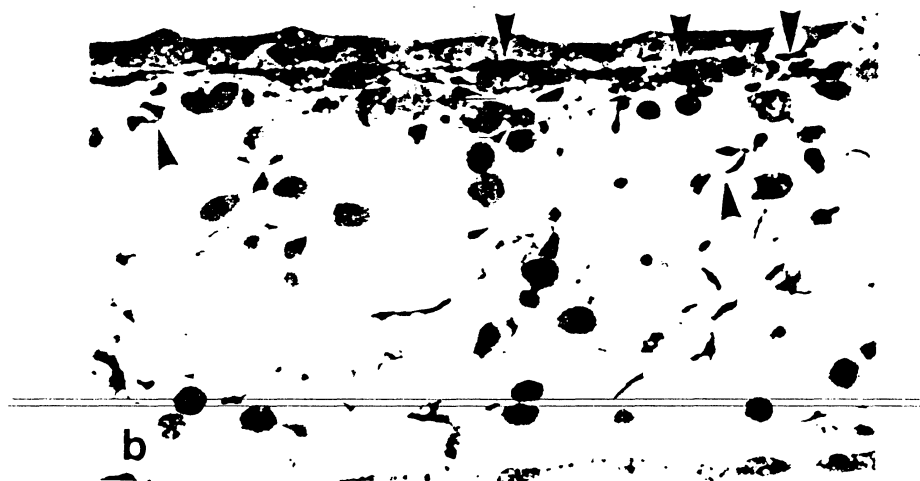


圖 17B

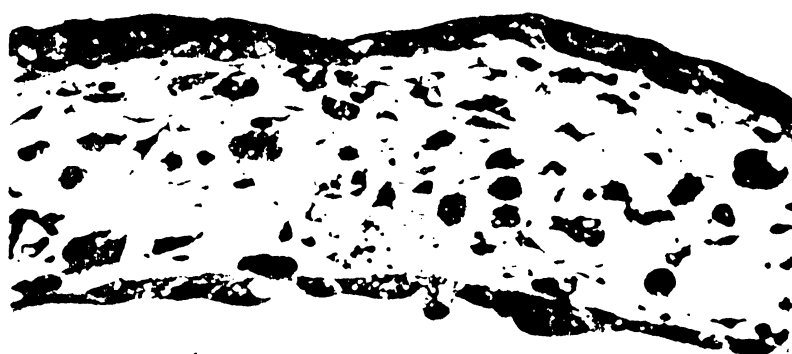


圖 17C

圖 18A



圖 18B

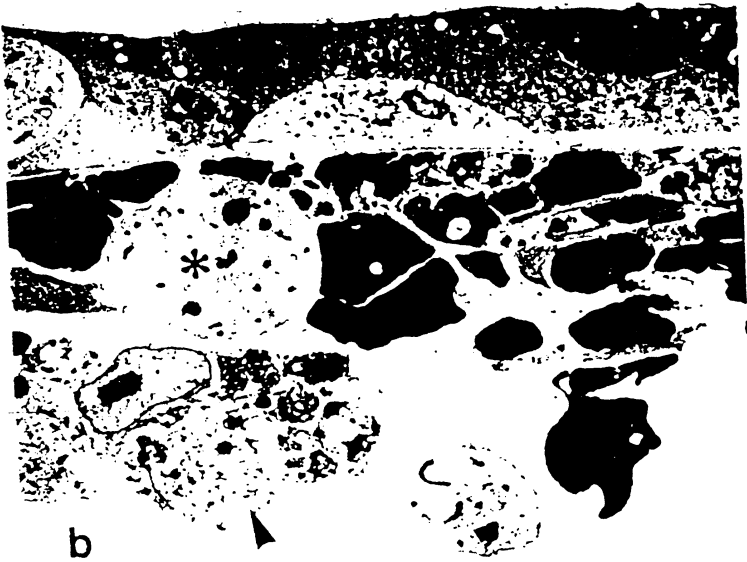


圖 18C

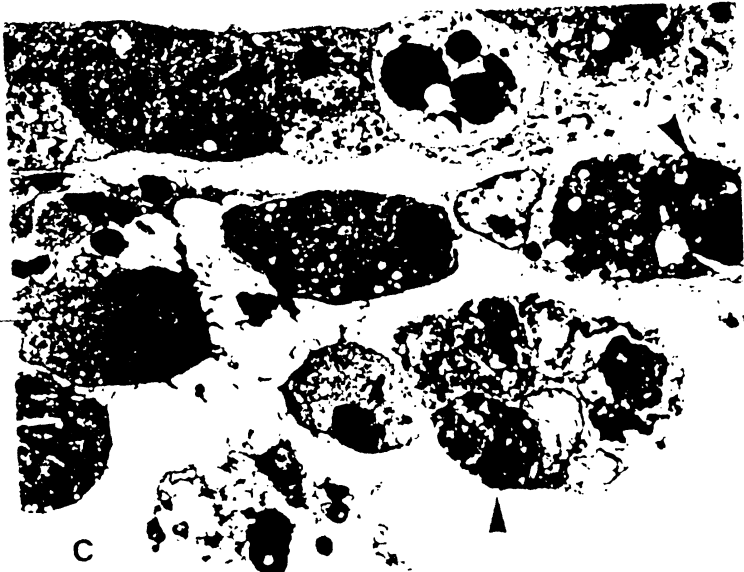


圖 19A

c-FOS 表現：
北方 RNA 雜交法

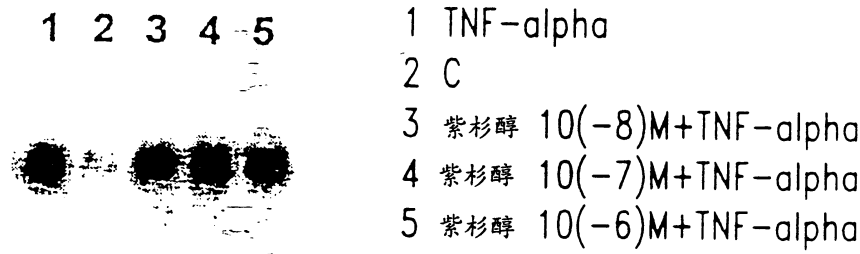


圖 19B

RNA 凝膠電泳

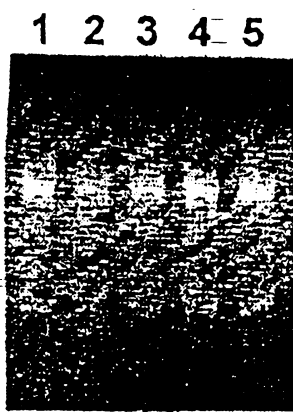
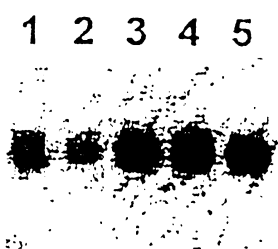
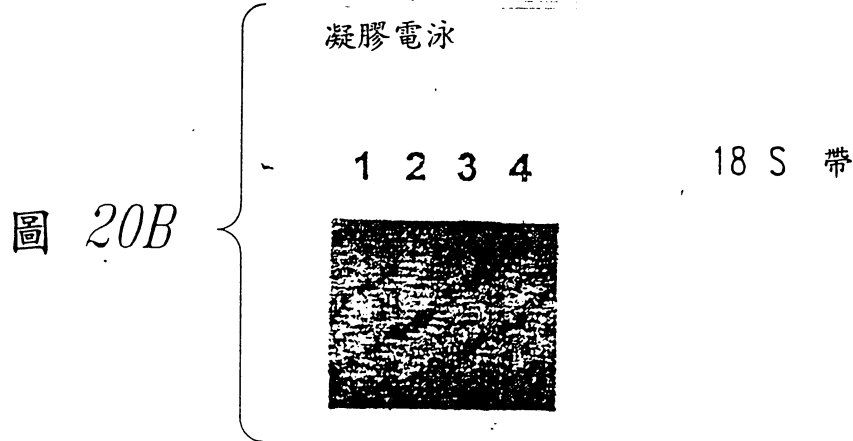
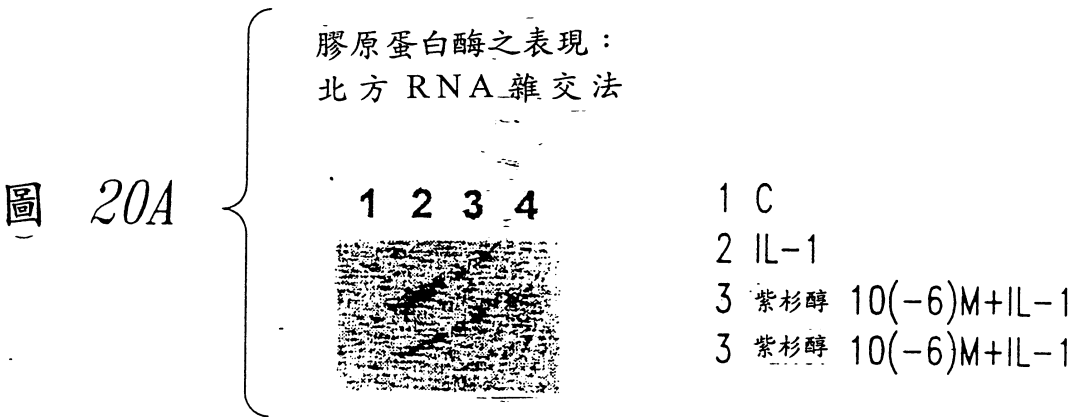


圖 19C

殺結核菌素之表現





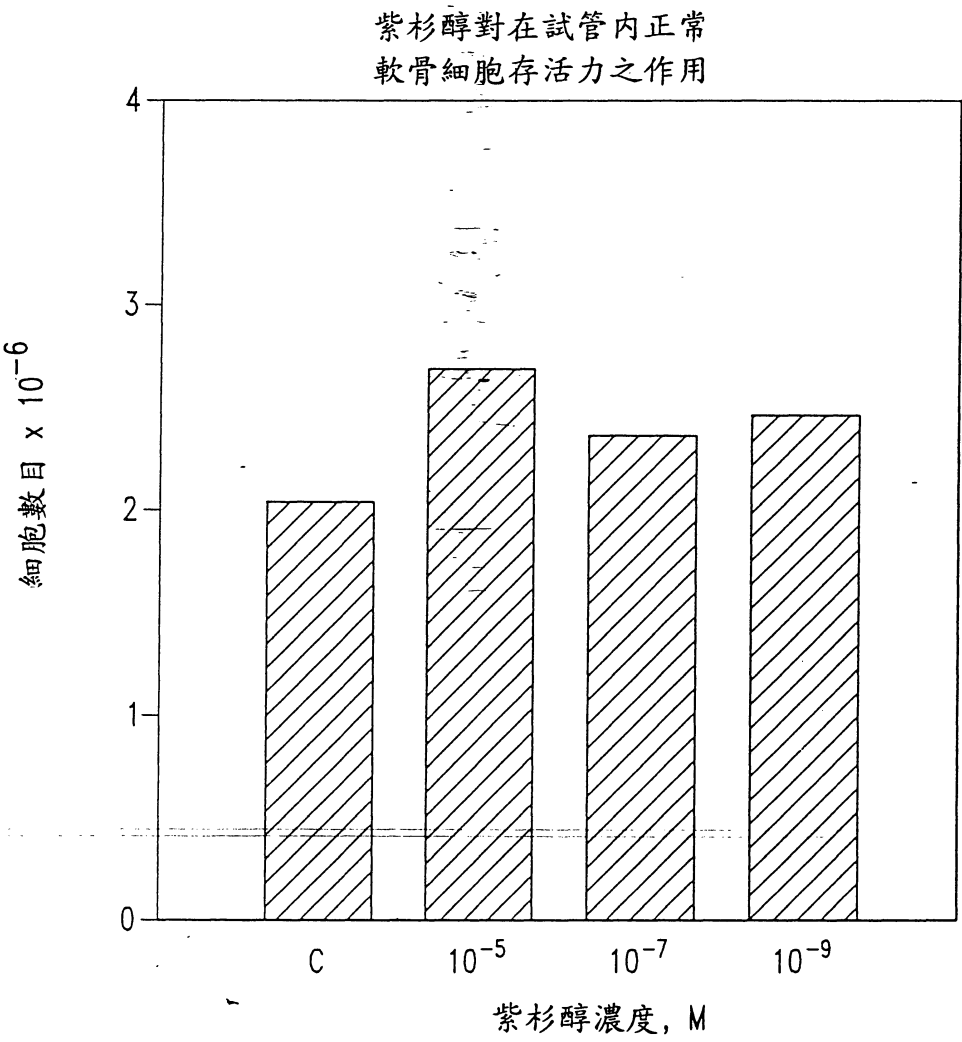


圖 21

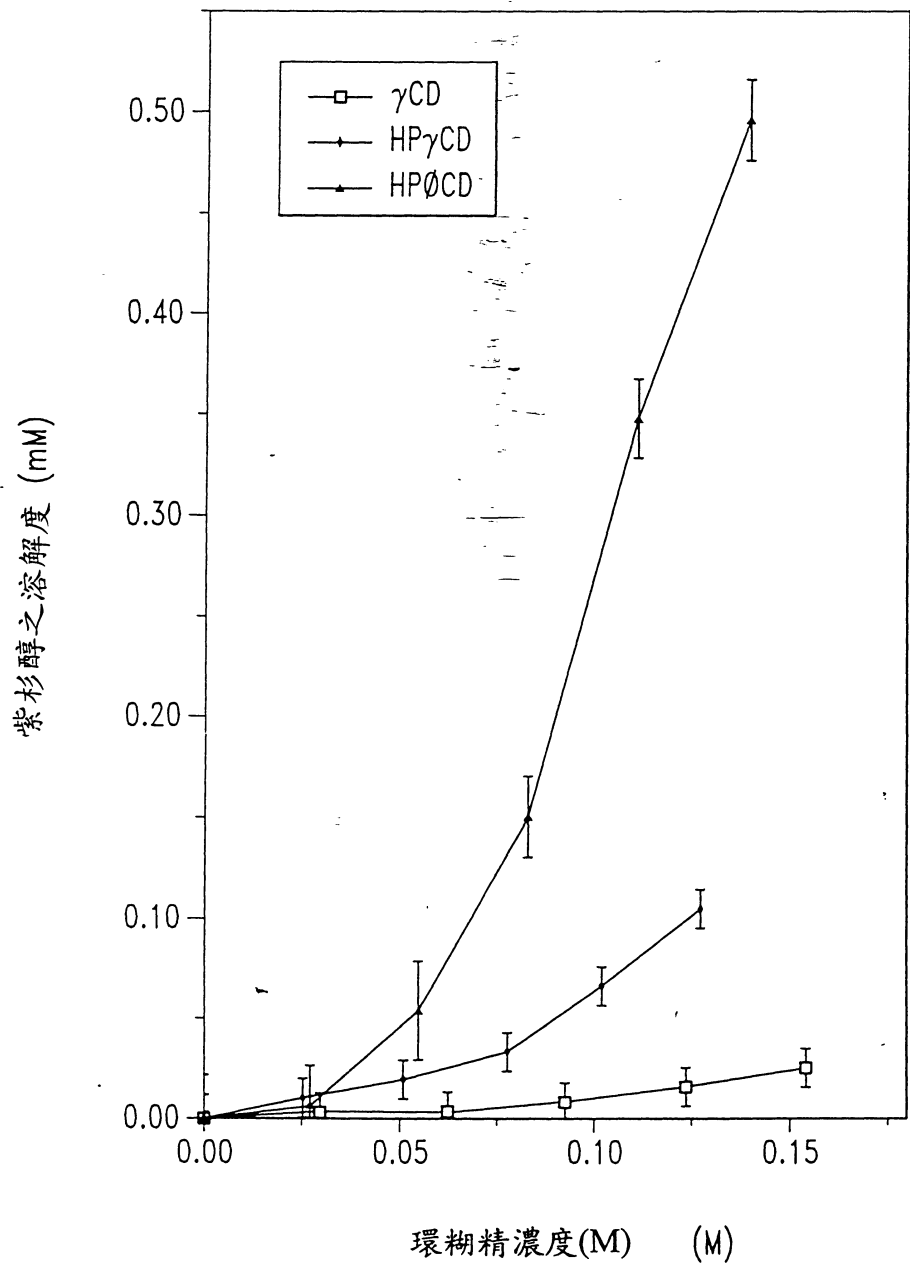


圖 22

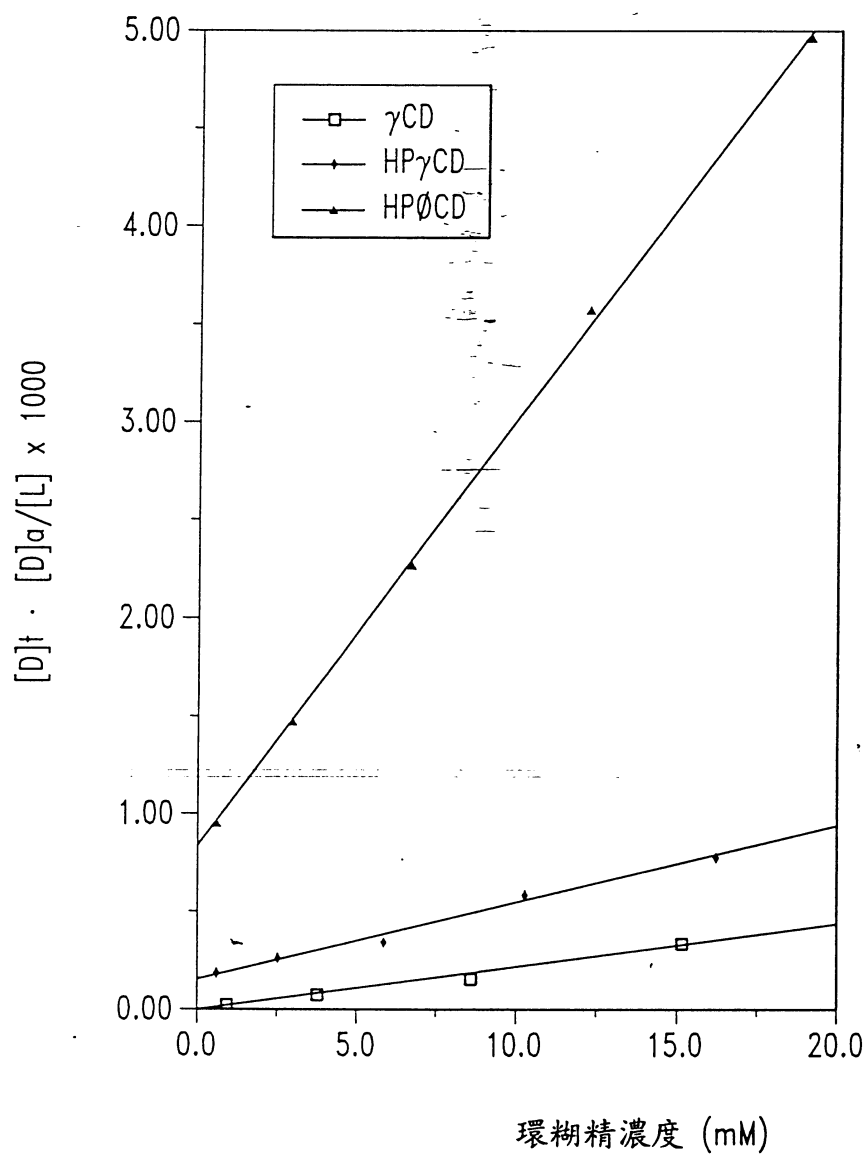


圖 23

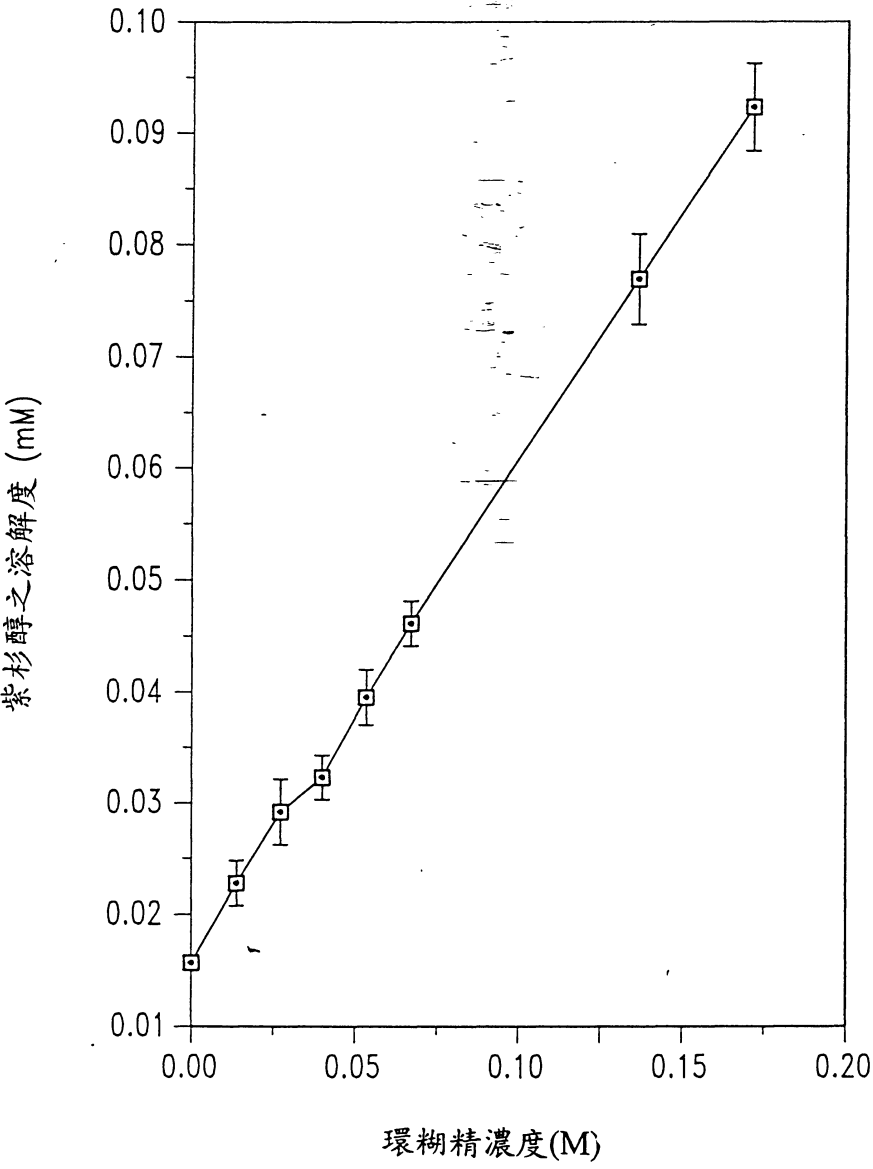


圖 24

PDLLA-PEG-PDLLA 之熔點，焓，分子
量(M_n)聚合度分佈(M_w/M_n)及特性黏度

PDLLA-PEG-PDLLA PEG 含量	熔點 Temp. ^a , °C	ΔH^a , J/g	M_n^b , $\times 10^{-4}$	M_w/M_n^b	$[\eta]^c$, dl/g
100%	61.8	184.8	0.8 ^d	--	--
70%	50.2	72.2	2.1	1.21	0.27
40%	46.3	42.8	4.5	3.5	0.29
30%	None	None	5.9	2.95	1.0
20%	None	None	5.1	2.96	1.45
10%	None	None	11	2.38	1.5
taxol	212	59.3	--	--	--
20% taxol loaded	212.1	5.6	--	--	--
copolymer (30%PEG)					

a : 以 DSC 偵測

b : 相較於聚苯乙烯標準品以 gpc 偵測

c : 在 25 °C 之 $CHCl_3$ 中

d : 以廠商供應之數據

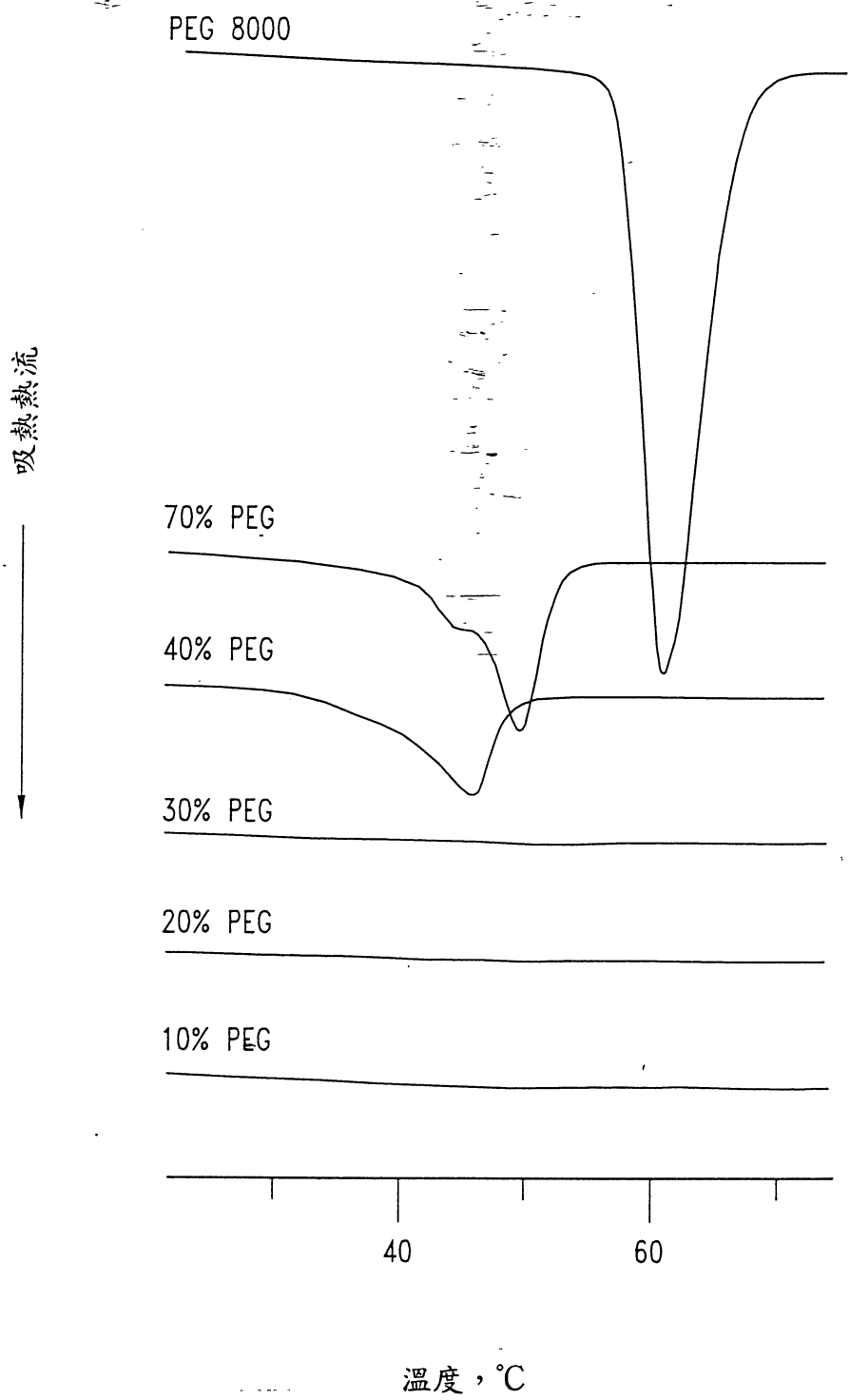


圖 26

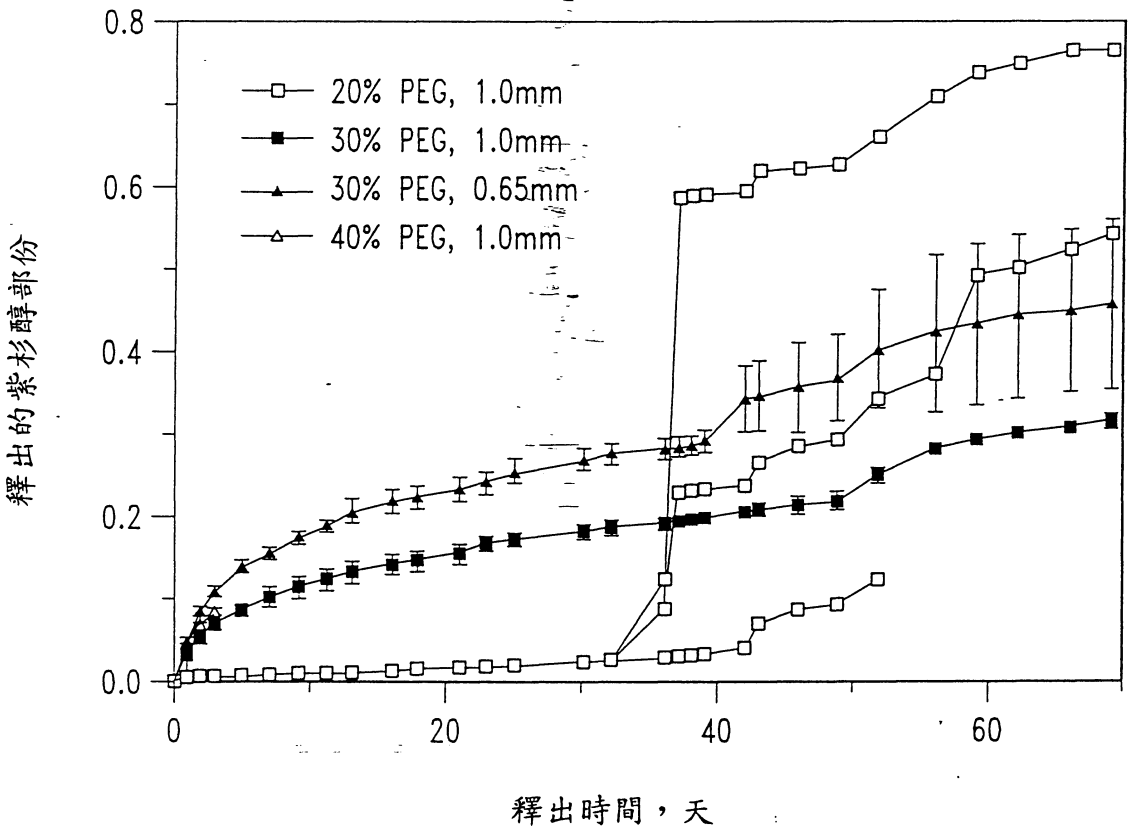


圖 27

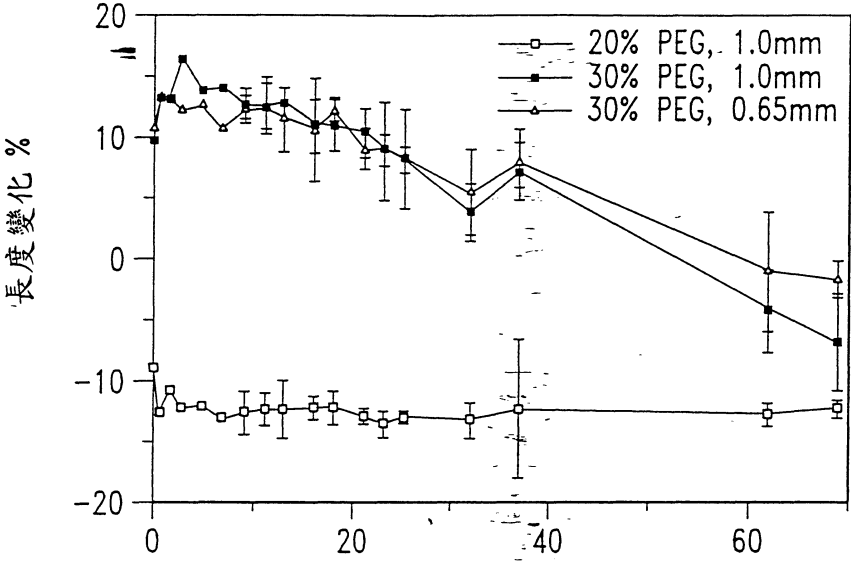


圖 28A

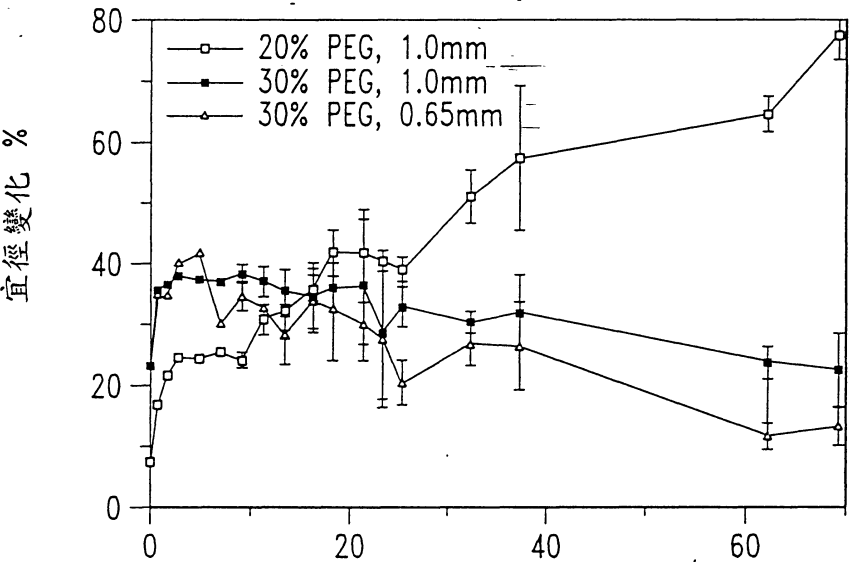


圖 28B

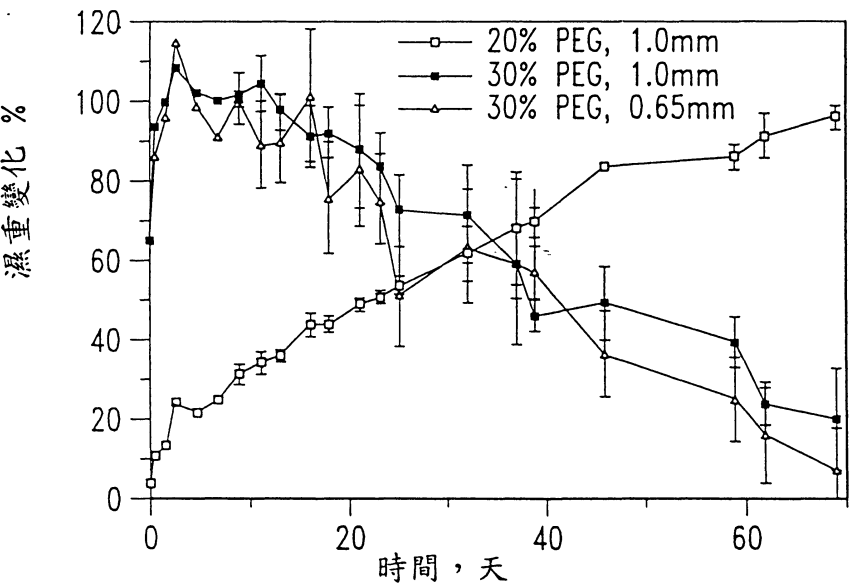


圖 28C

在釋放至 PBS 白蛋白 37°C 緩衝溶液過程中，
PDLLA-PEG-PDLLA 圓筒(填加有 0%Paclitaxel)
之質量損失及聚合物組成的變化失去的乾重%

°C

樣品 ²	時間，天	Dry wt. loss, %	1.65/5.1 ^b	3.6/5.1 ^b
20% PEG-1mm	0	0	3.51	1.65
20% PEG-1mm	32	7.9	—	—
20% PEG-1mm	69	19.2	3.63	0.68
30% PEG-1mm	0	0	3.39	3.91
30% PEG-1mm	32	28.9	—	—
30% PEG-1mm	69	45.5	4.3	0.56
30% PEG-0.65mm	0	0	3.39	3.91
30% PEG-0.65mm	32	26.7	—	—
30% PEG-0.65mm	69	57.5	5.8	0.21

a : PDLLA-PEG-PDLLA 共聚物圓筒顯出 PEG 含量及其直徑

b : ¹H-NMR 在 CDCl₃ 中測度； 1.65/5.1 代表在 1.65ppm(由於在 PDLLA 中之-CHCH₃-)中 5.1ppm(由於 PDLLA 中之-CH*CH₃-)下峰面積之比例；
3.6/5.1 代表在 3.6ppm(由於 PEG 中之-CH₂*CH₂-)及 5.1ppm, 卜之峰面積比例。

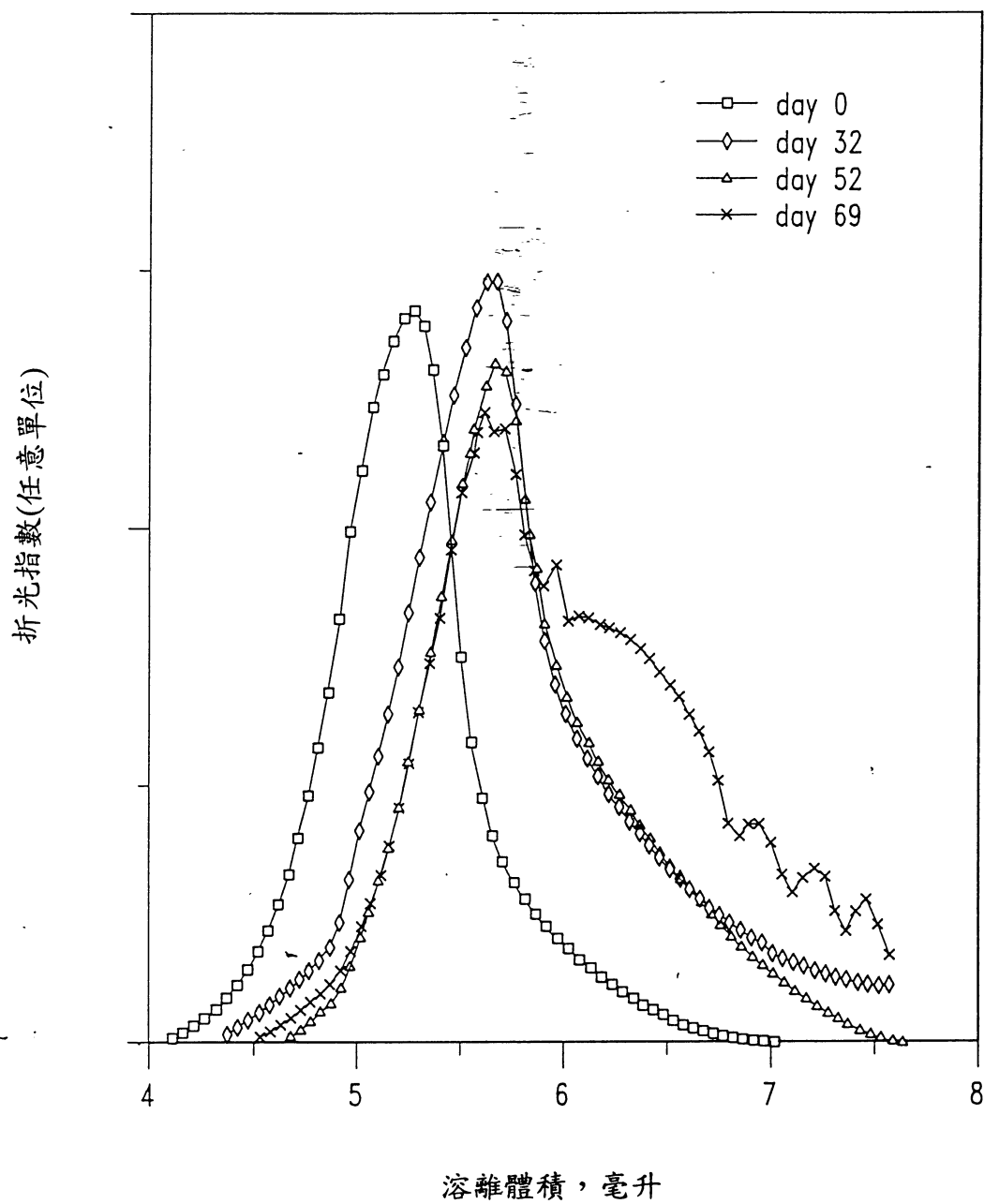


圖 30



圖 31A



圖 31B

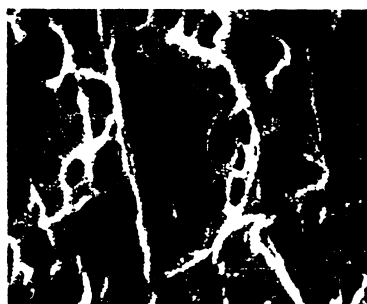


圖 31C



圖 31D

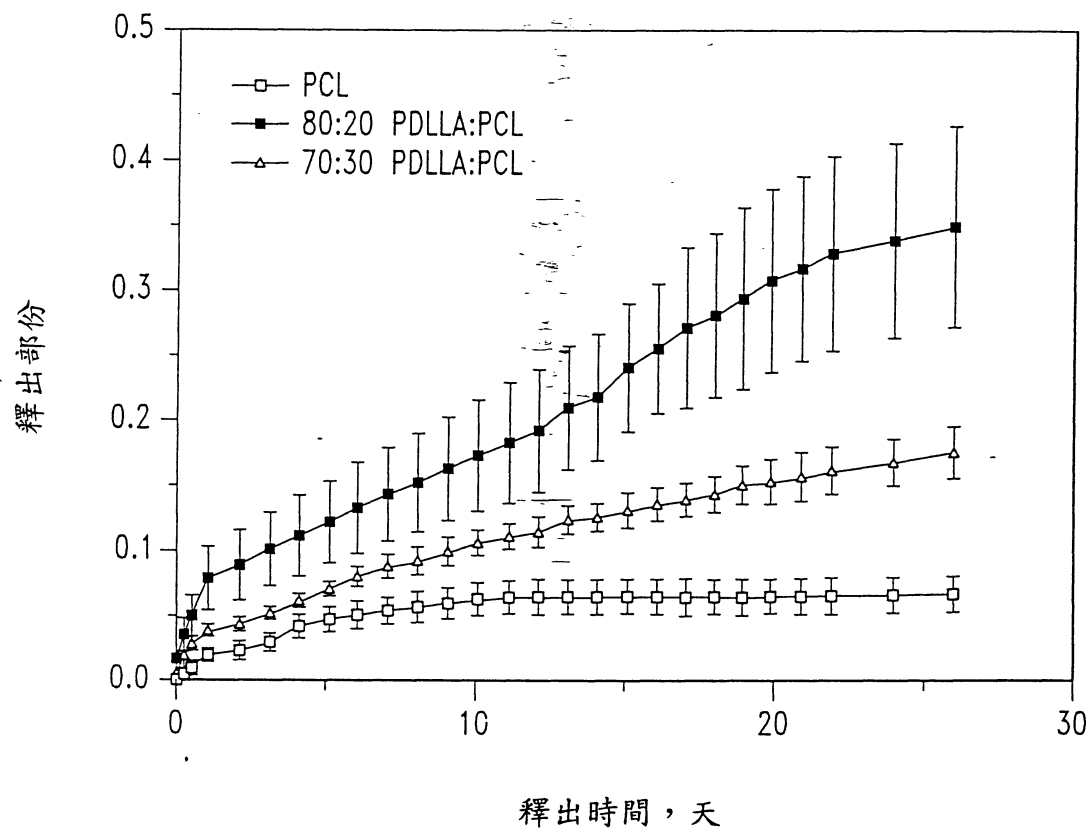


圖 32

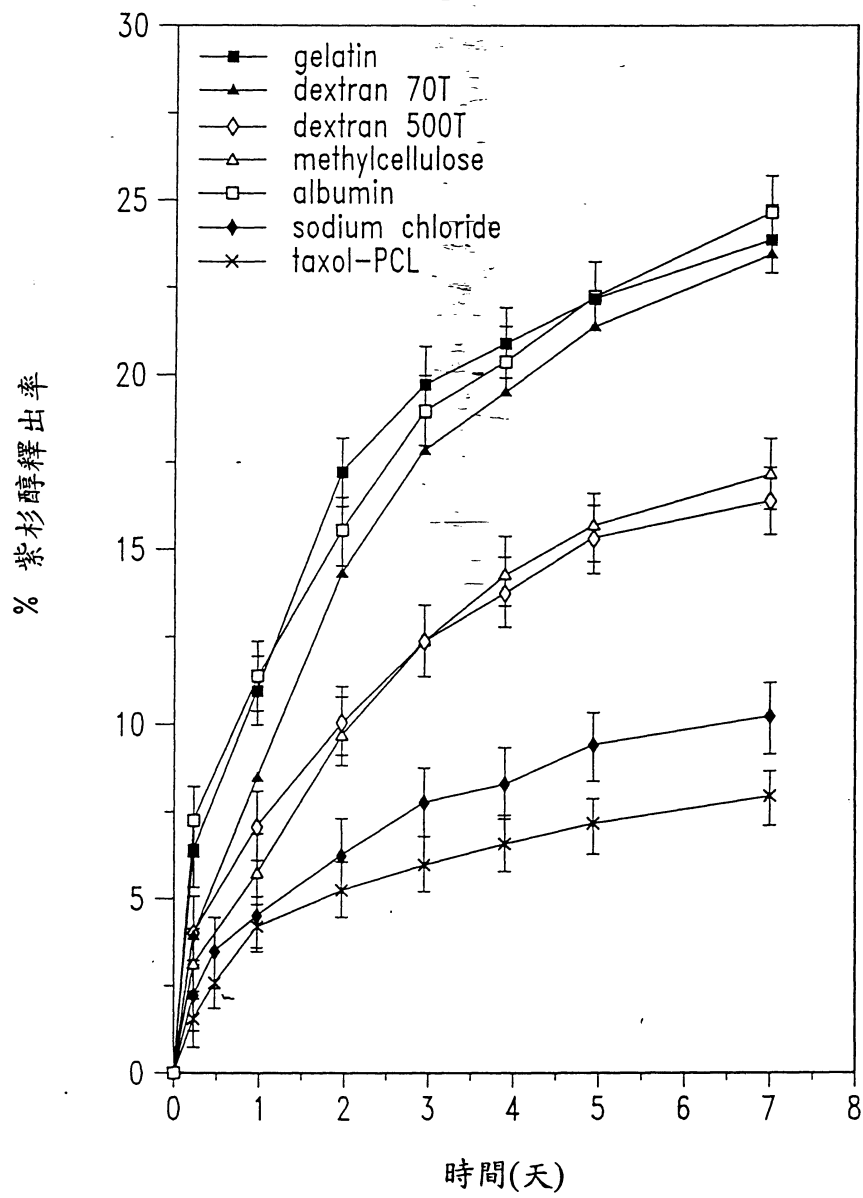


圖 33

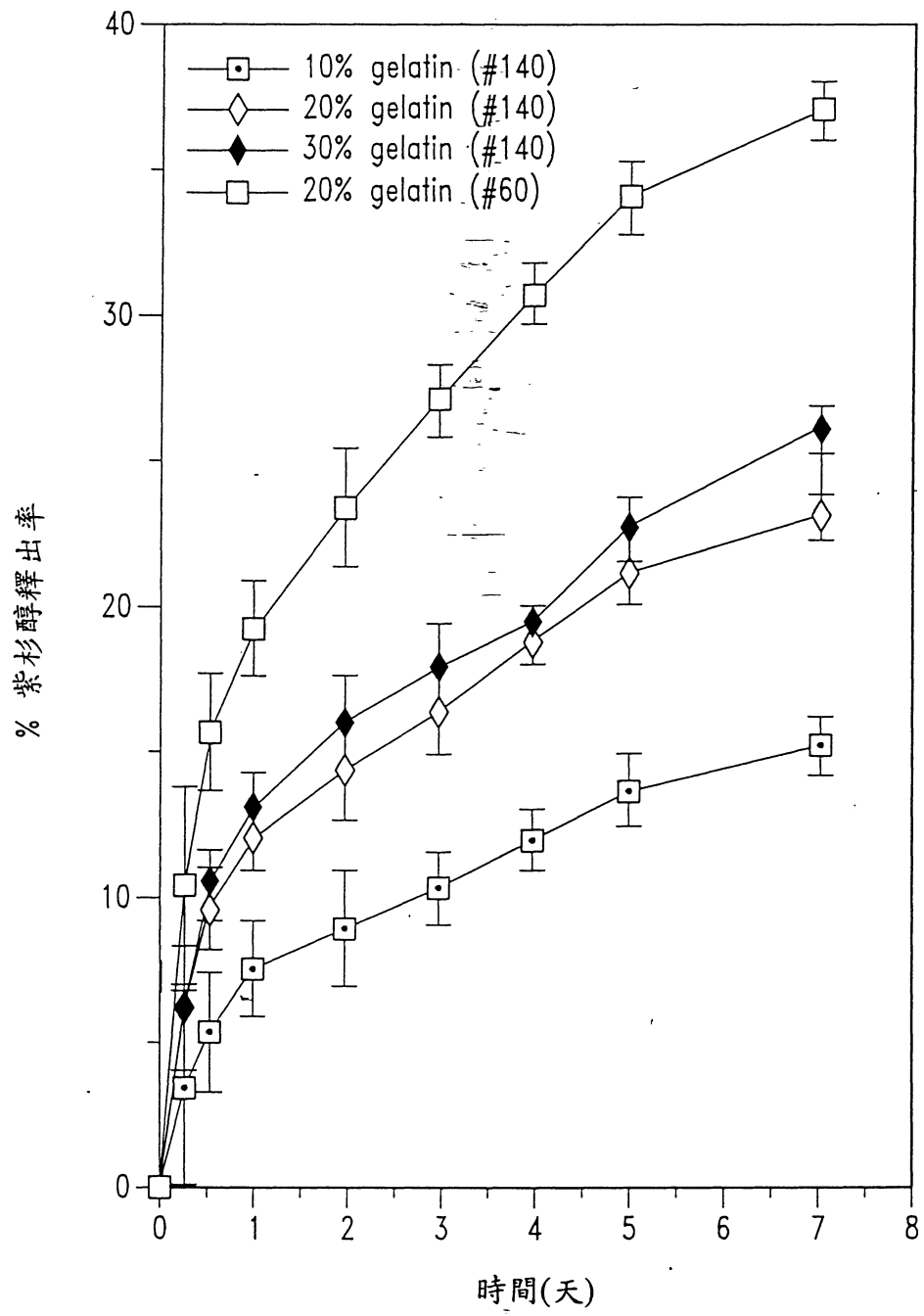


圖 34

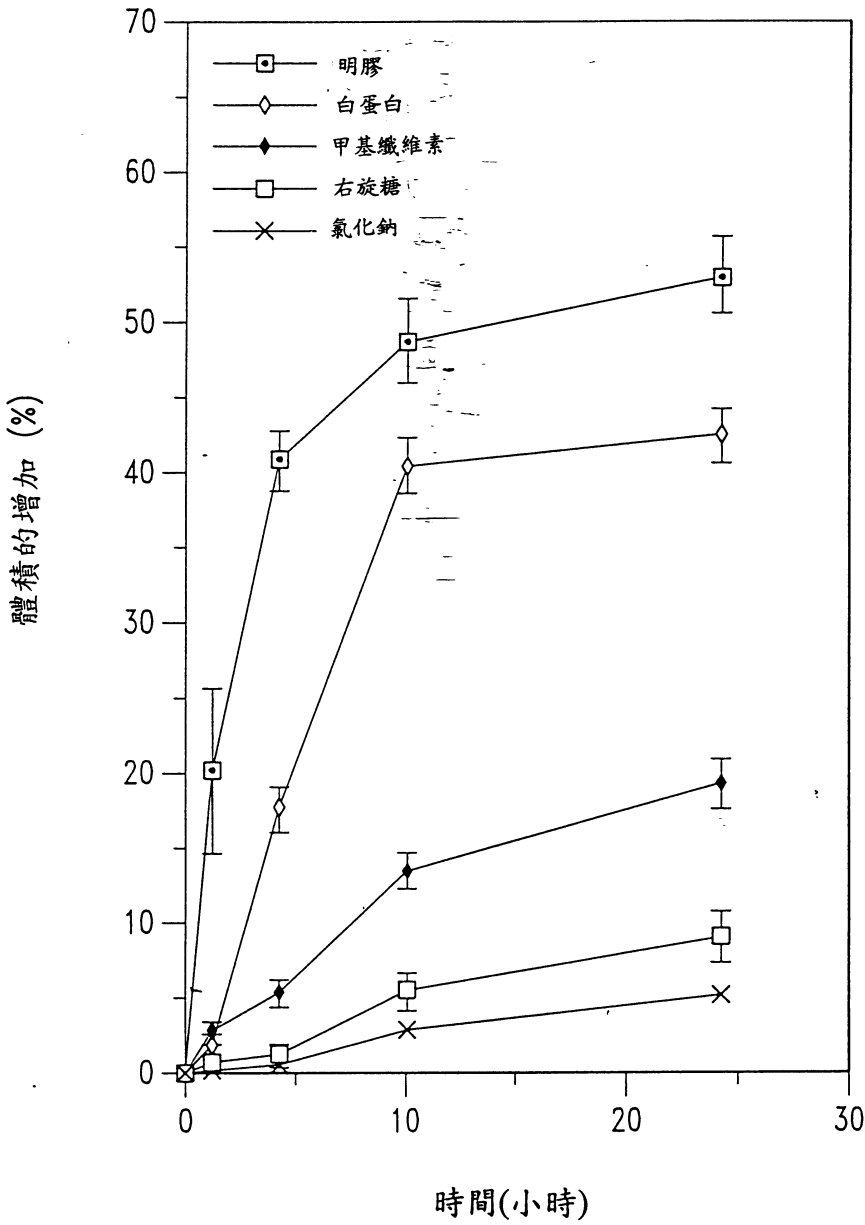


圖 35A

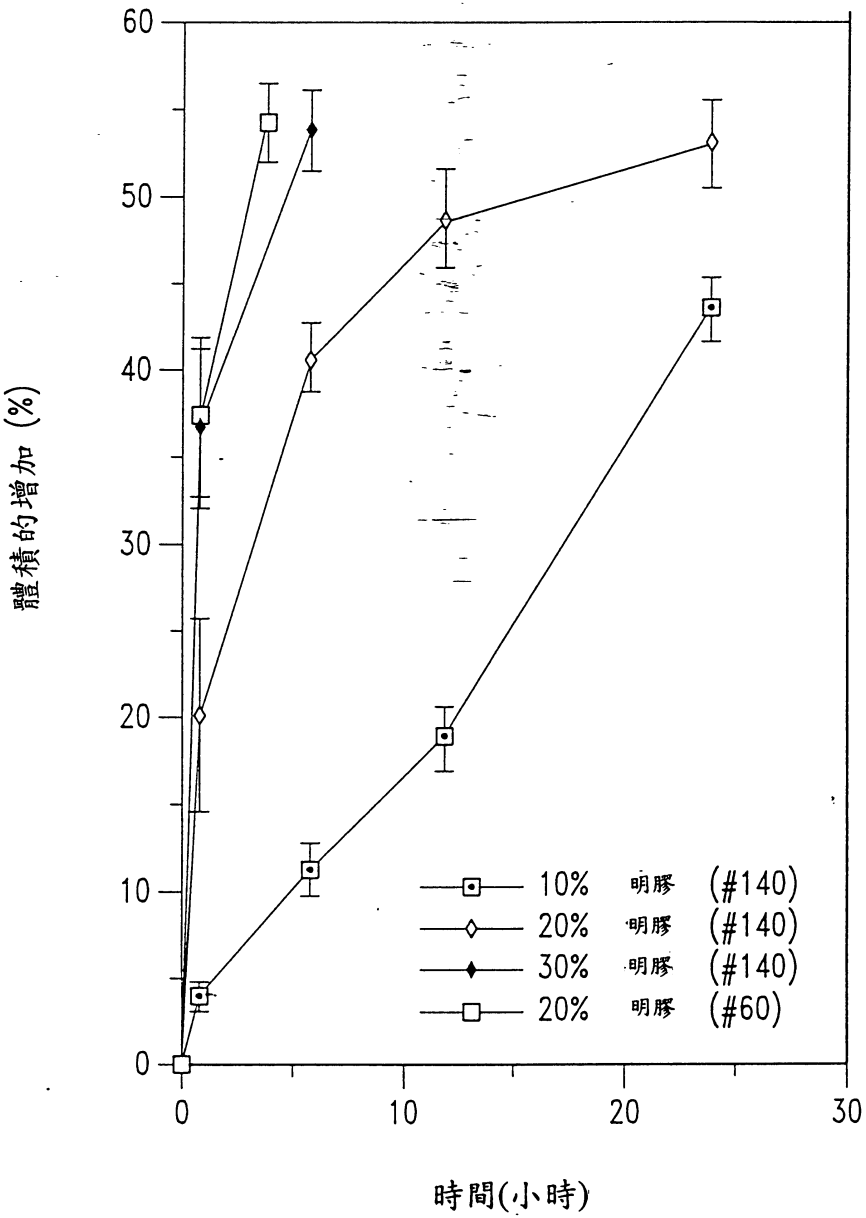


圖 35B

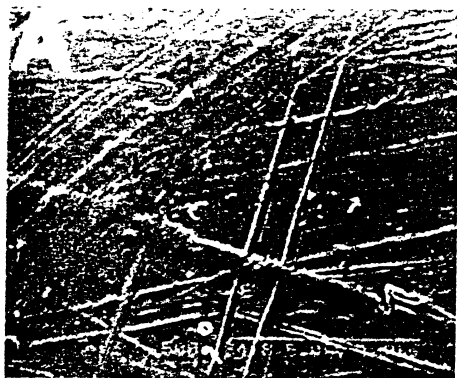


圖 36A

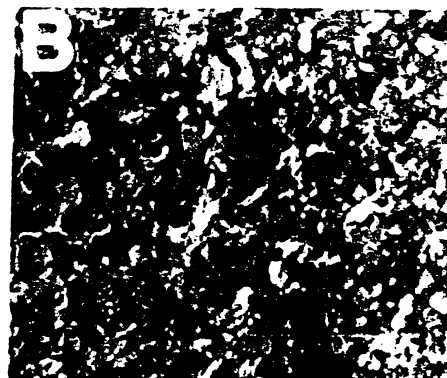


圖 36B



圖 36C

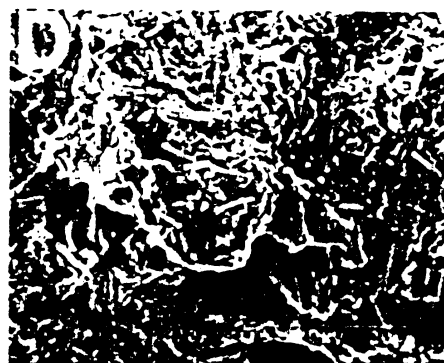


圖 36D



圖 37B



圖 37A

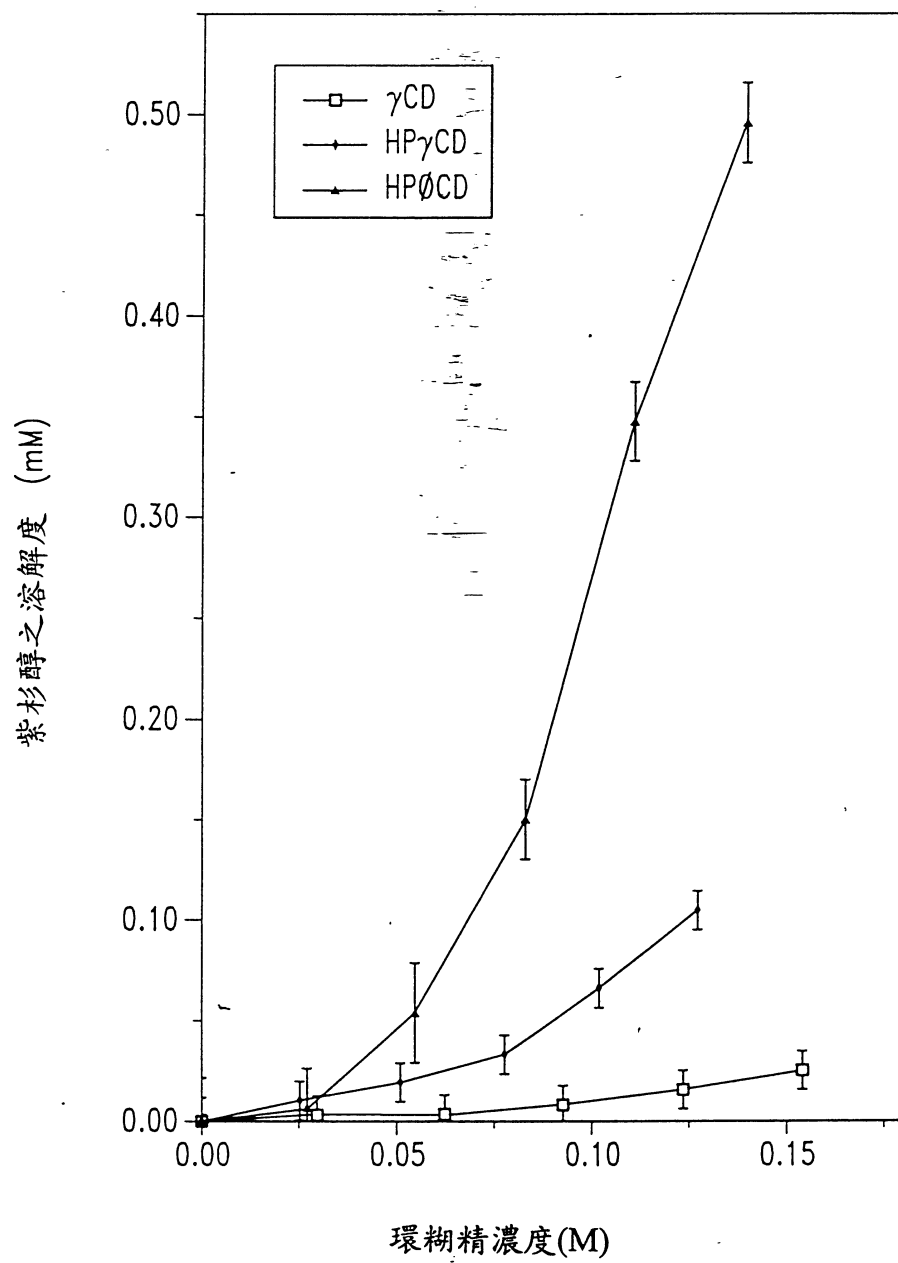


圖 38

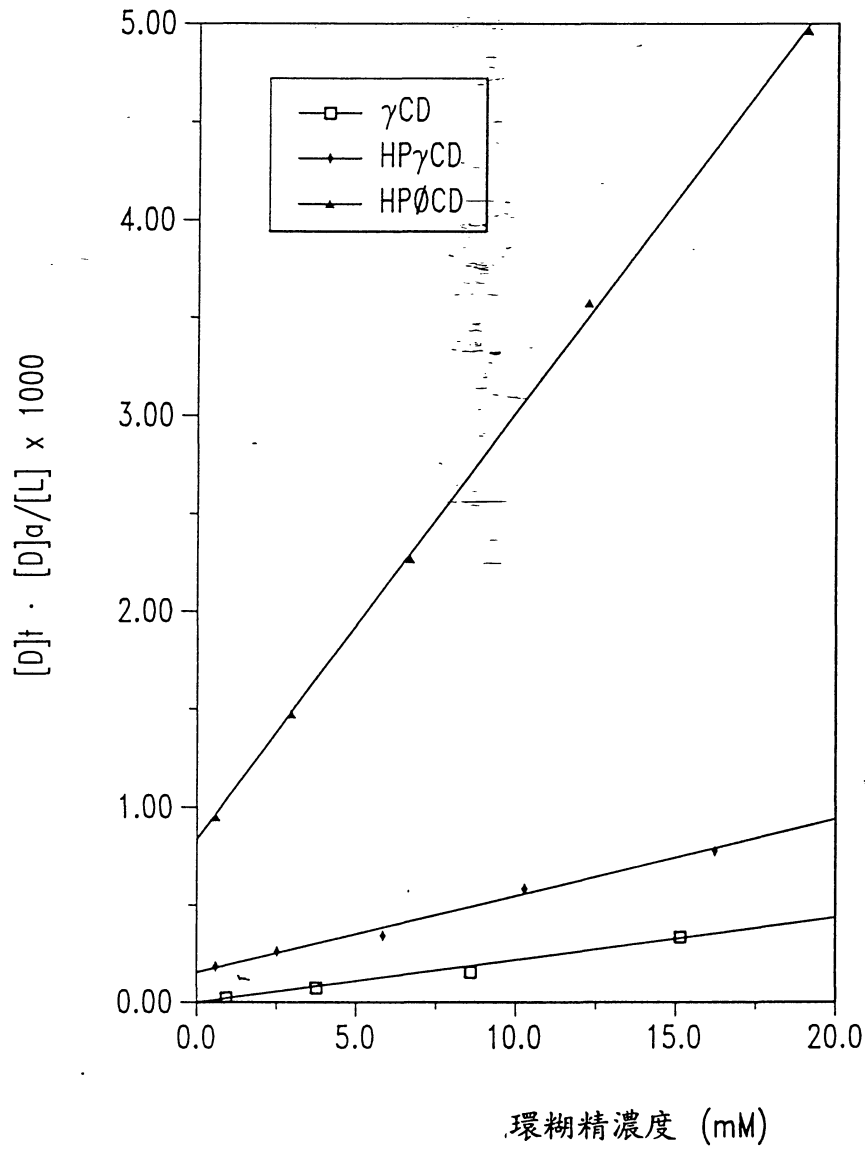


圖 39

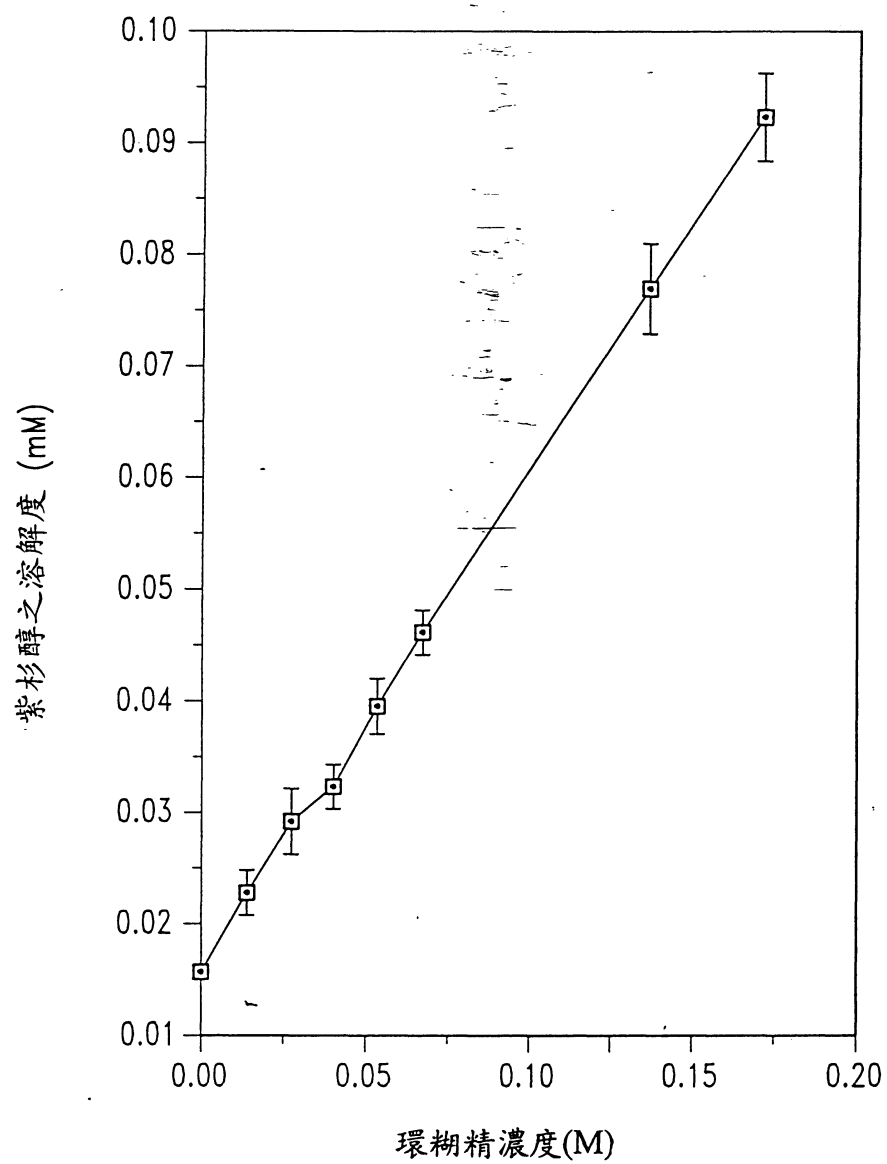


圖 40

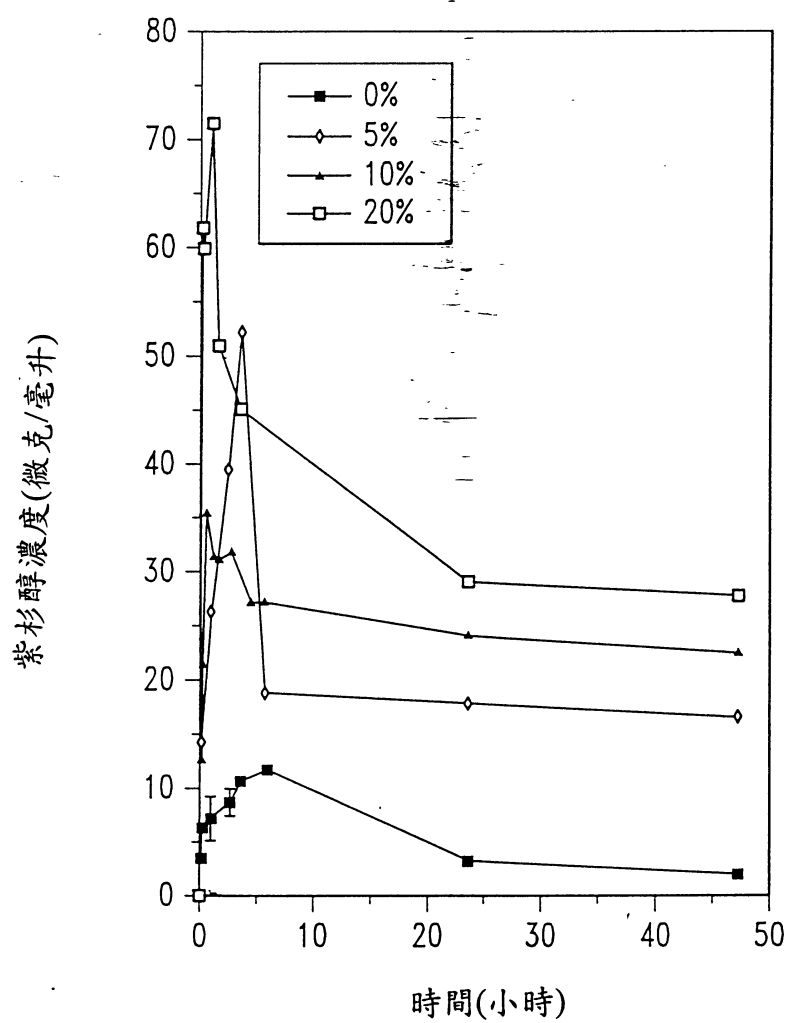


圖 41

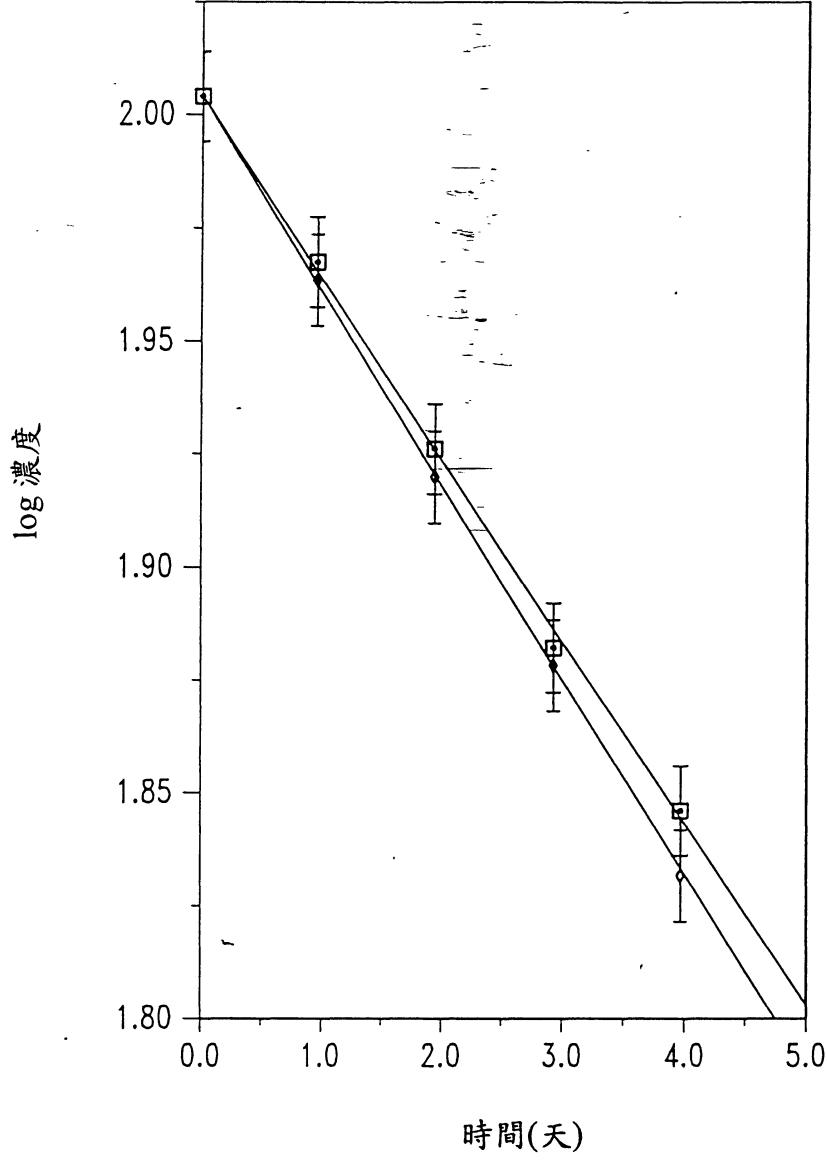


圖 42

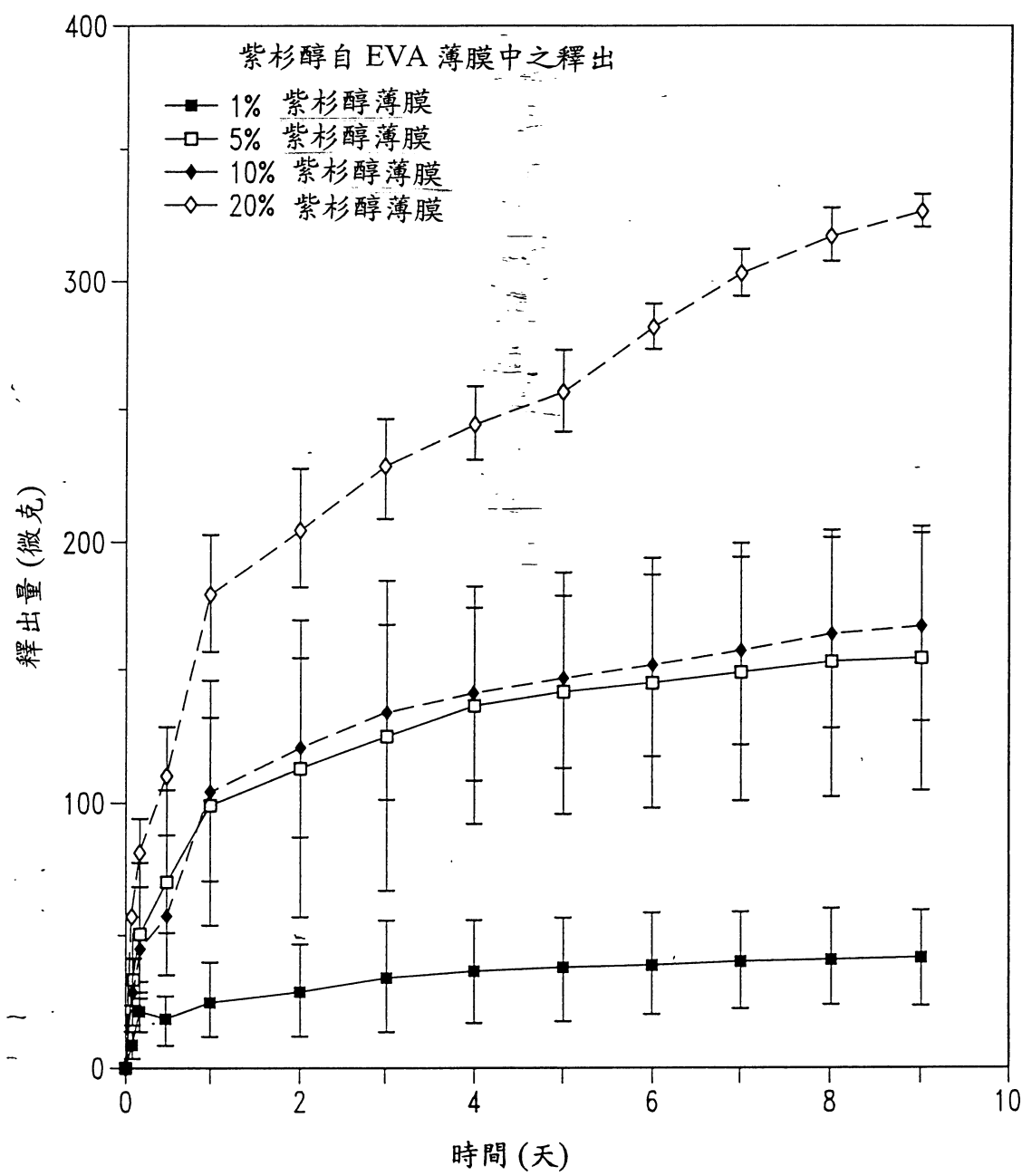


圖 43A

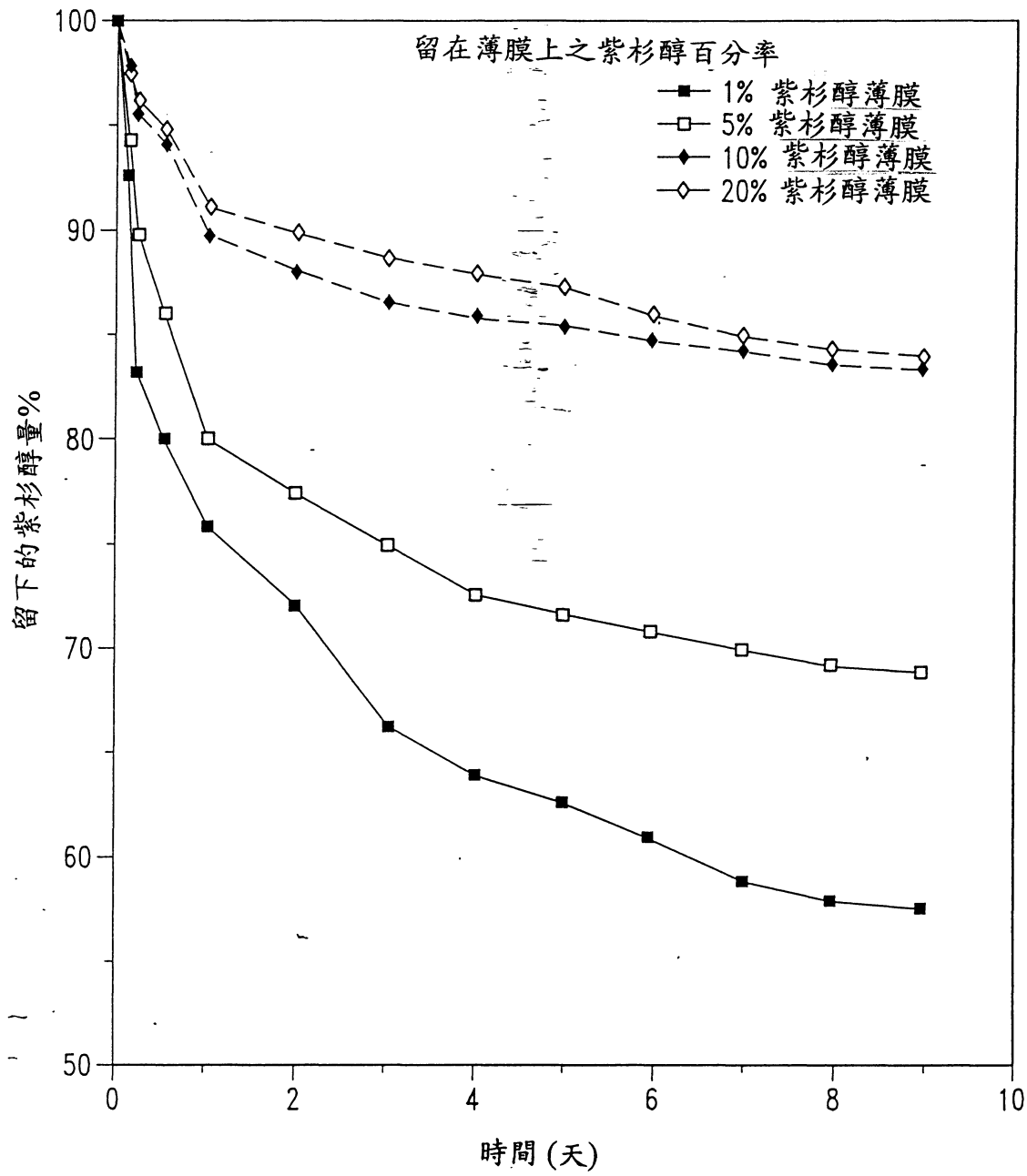


圖 43B

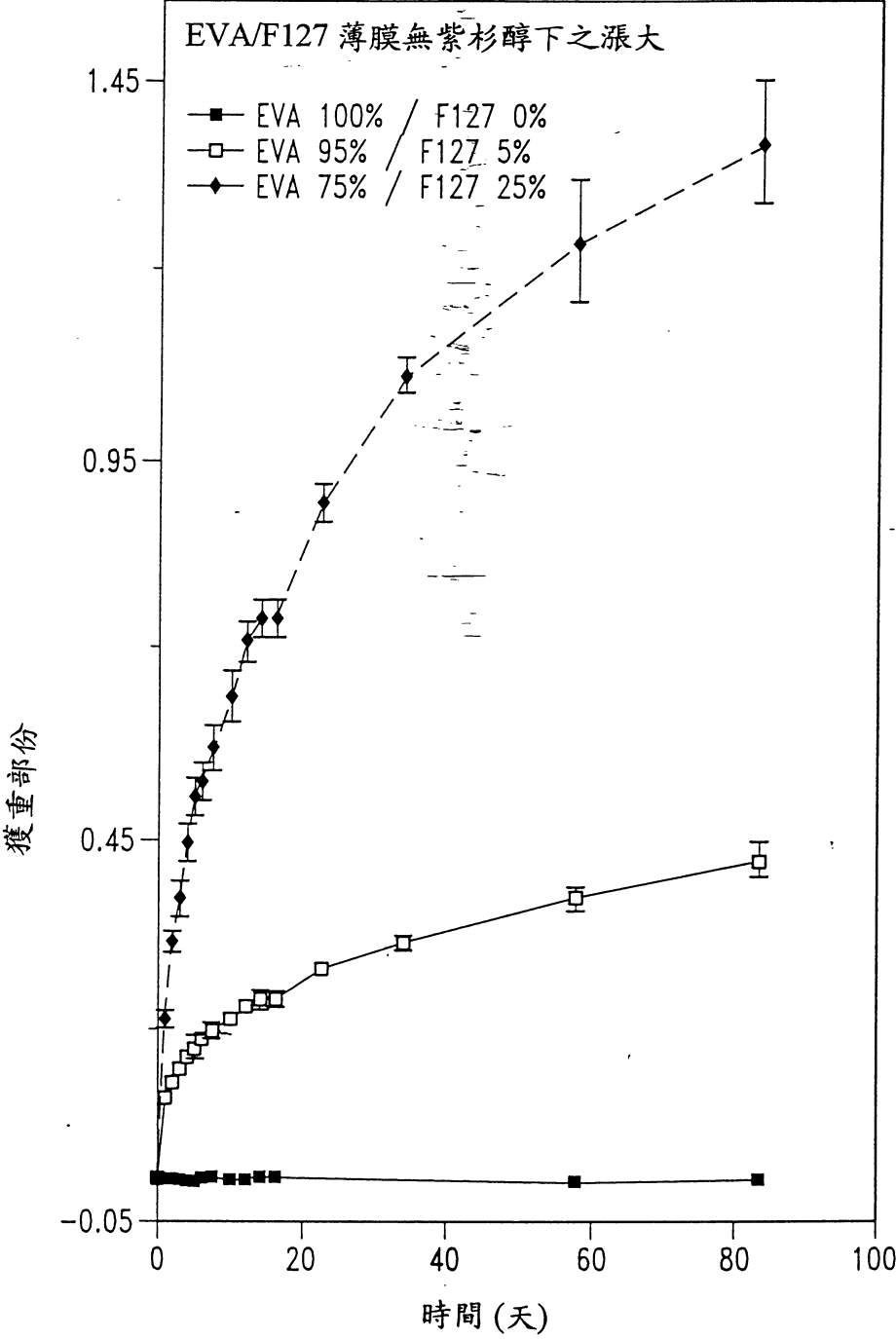


圖 43C

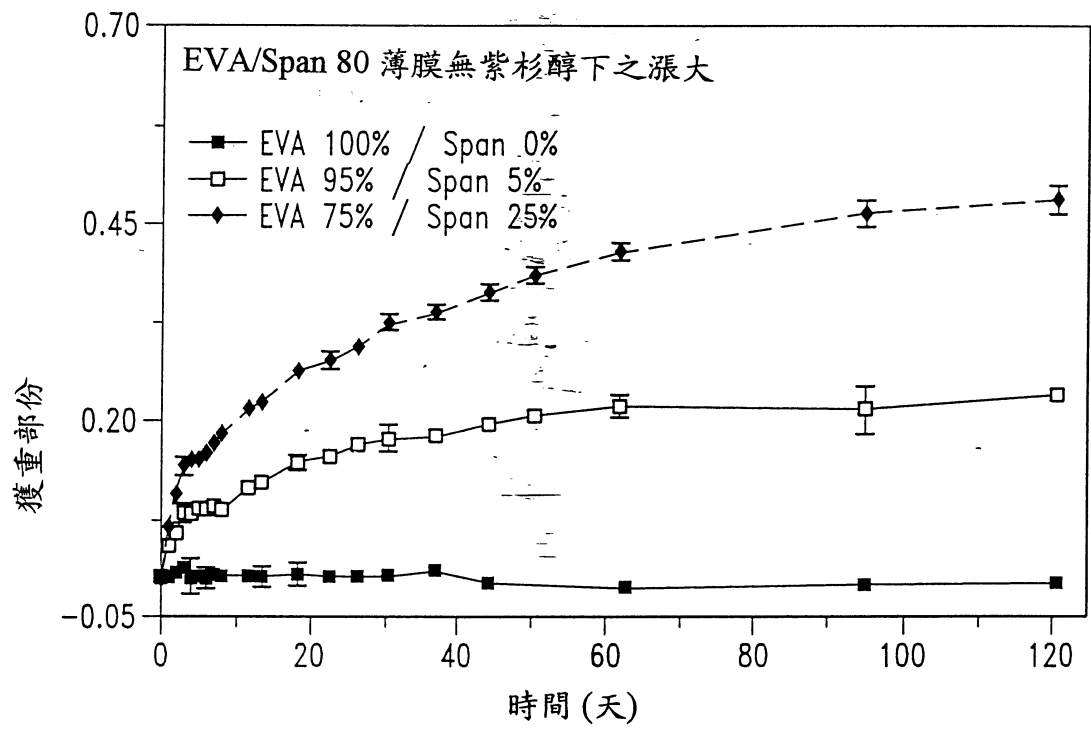


圖 43D

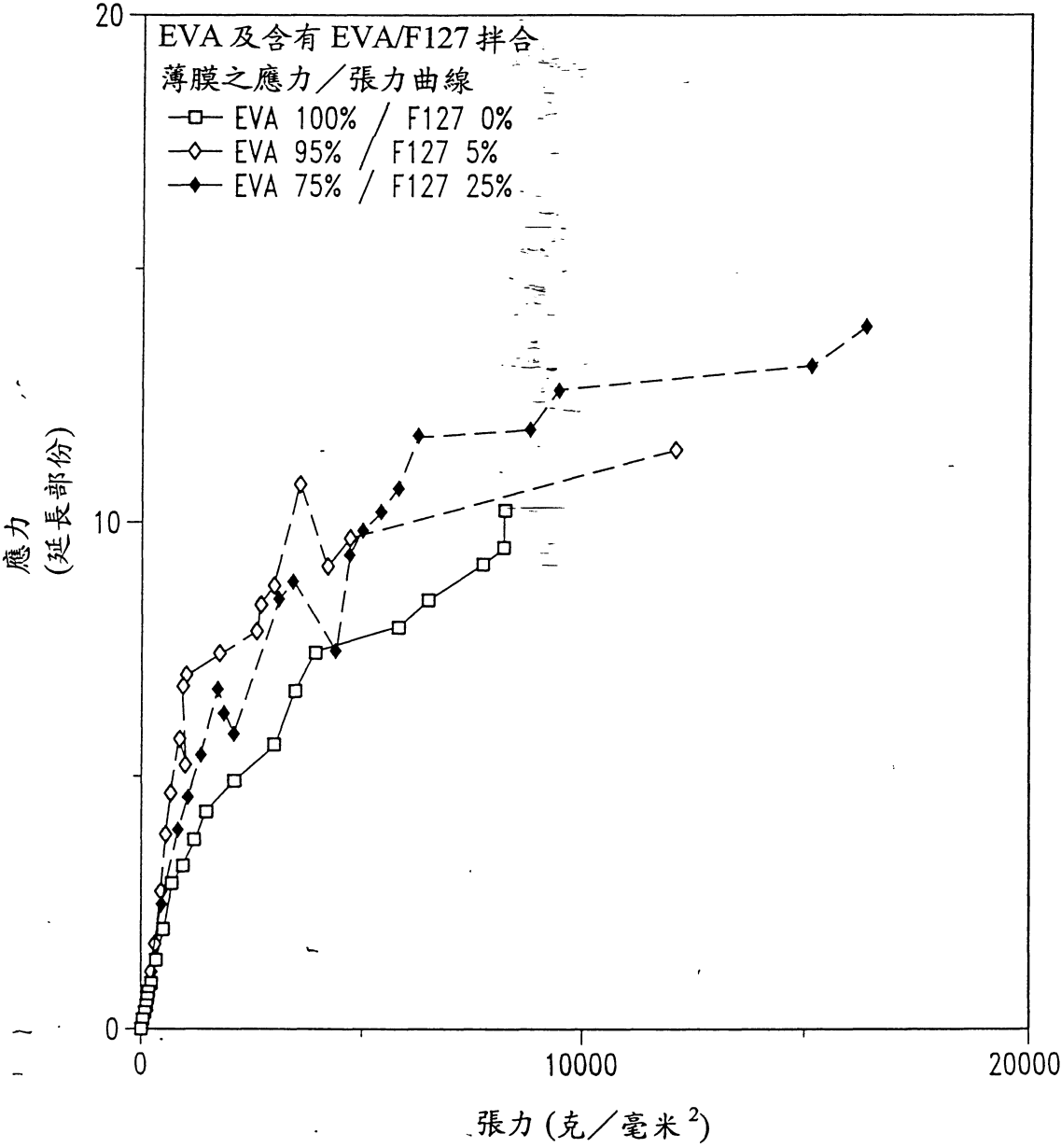


圖 43E

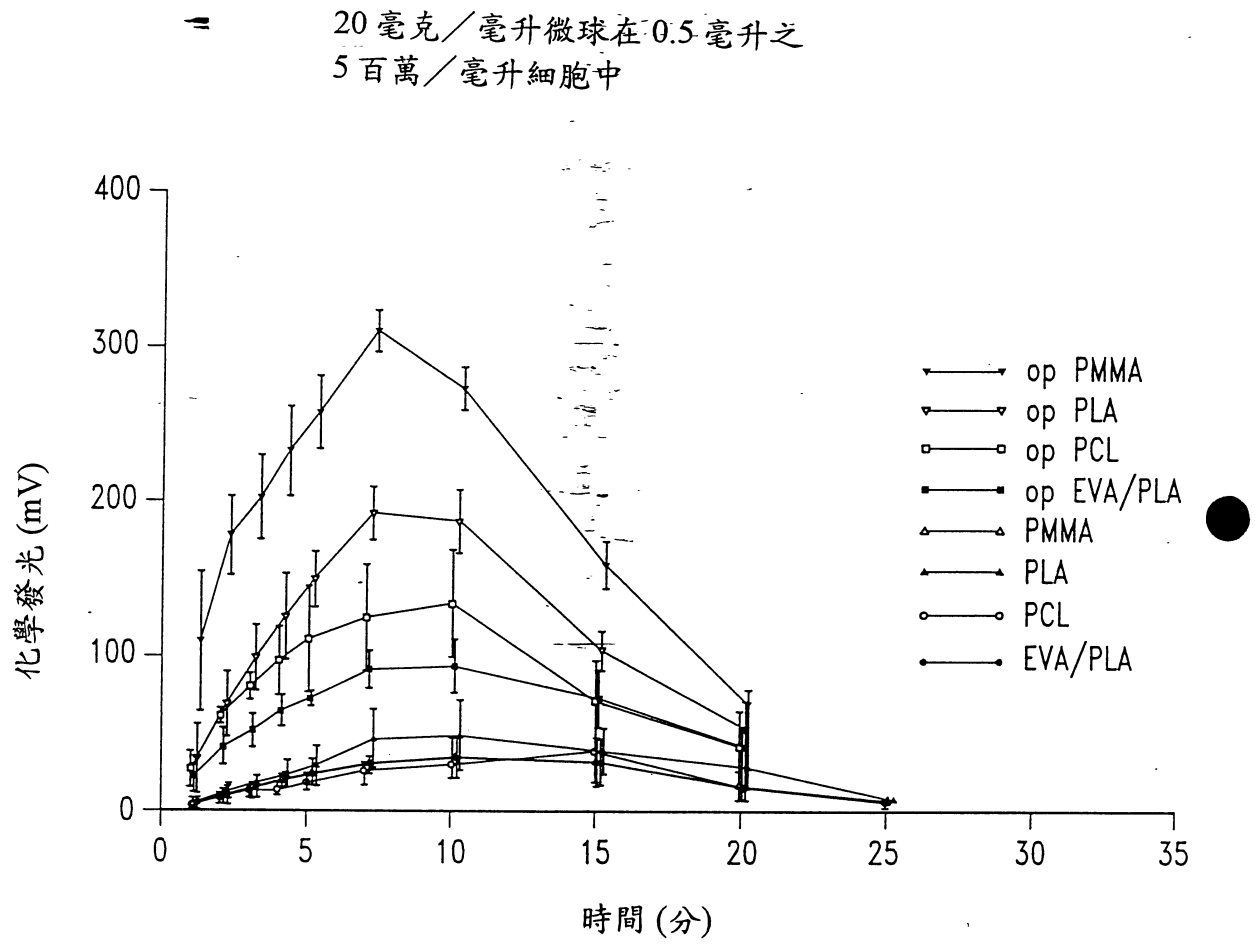


圖 44

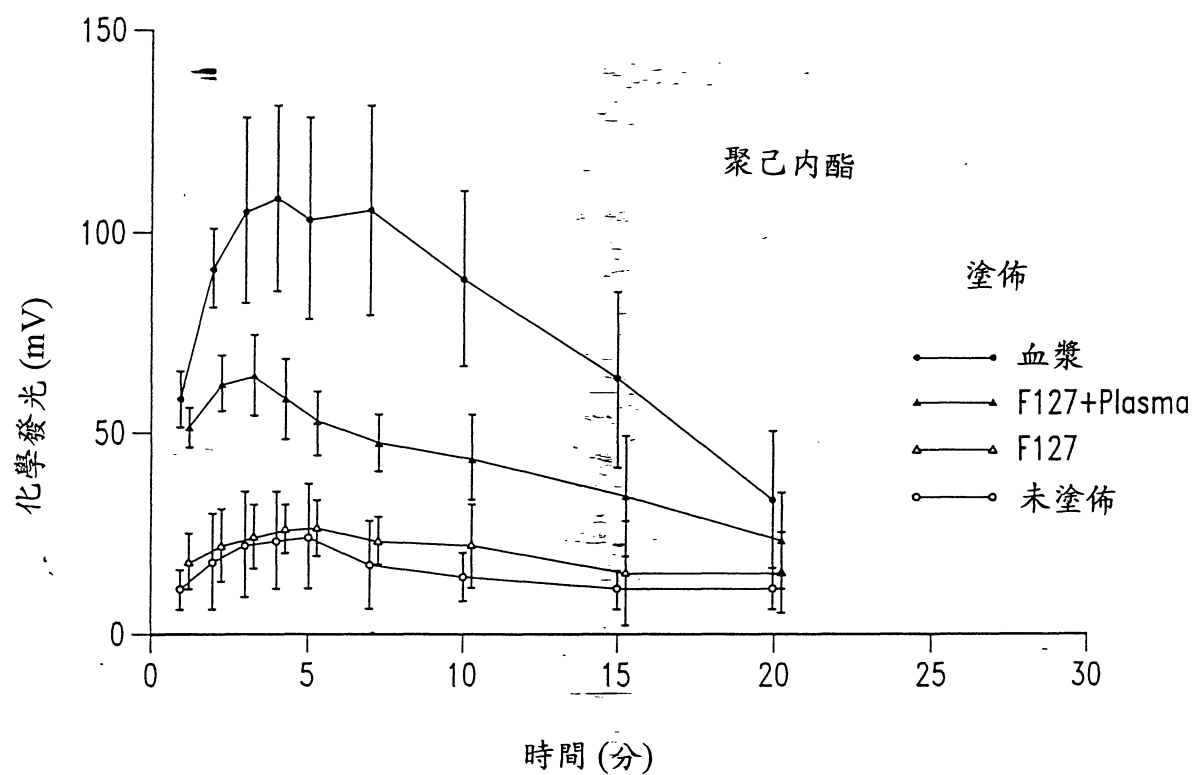


圖 45

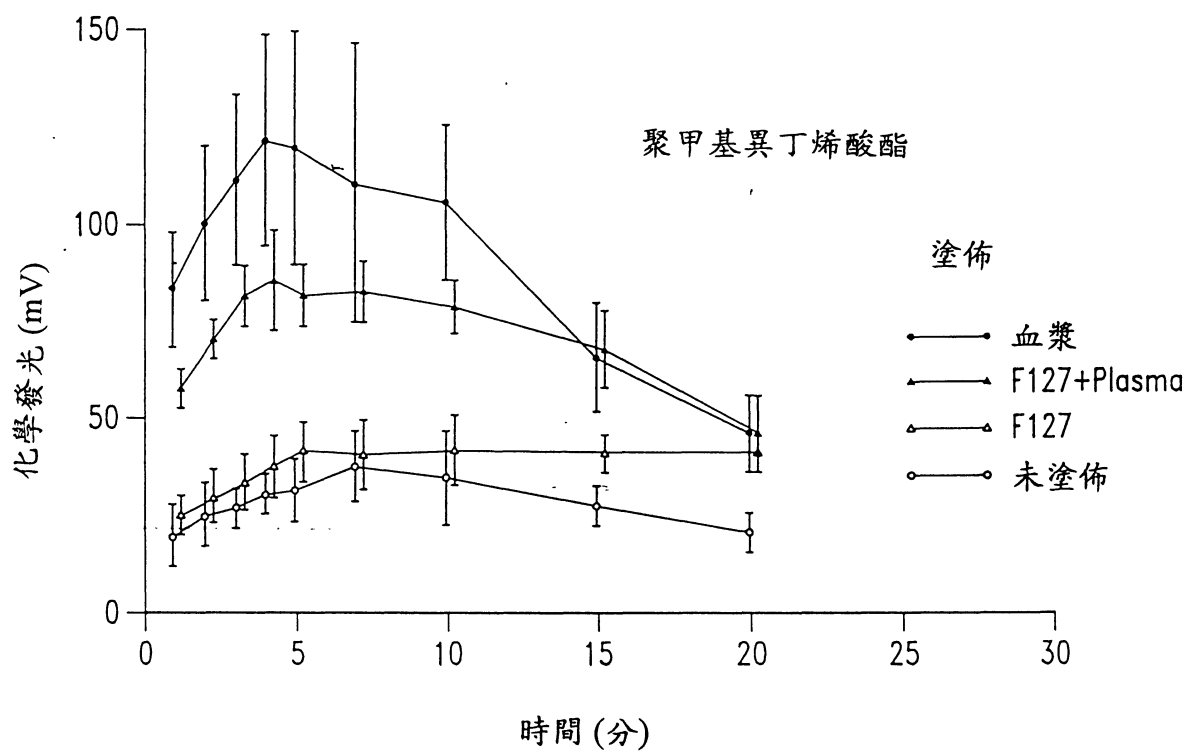


圖 46

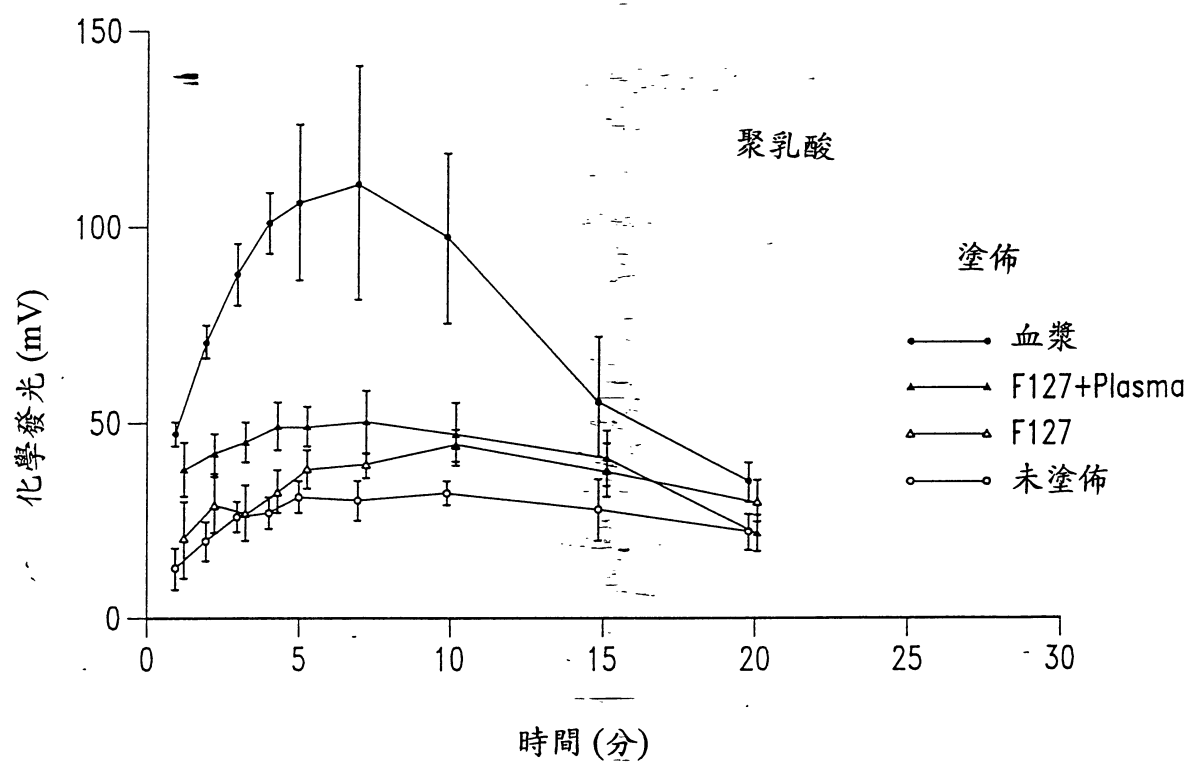


圖 47

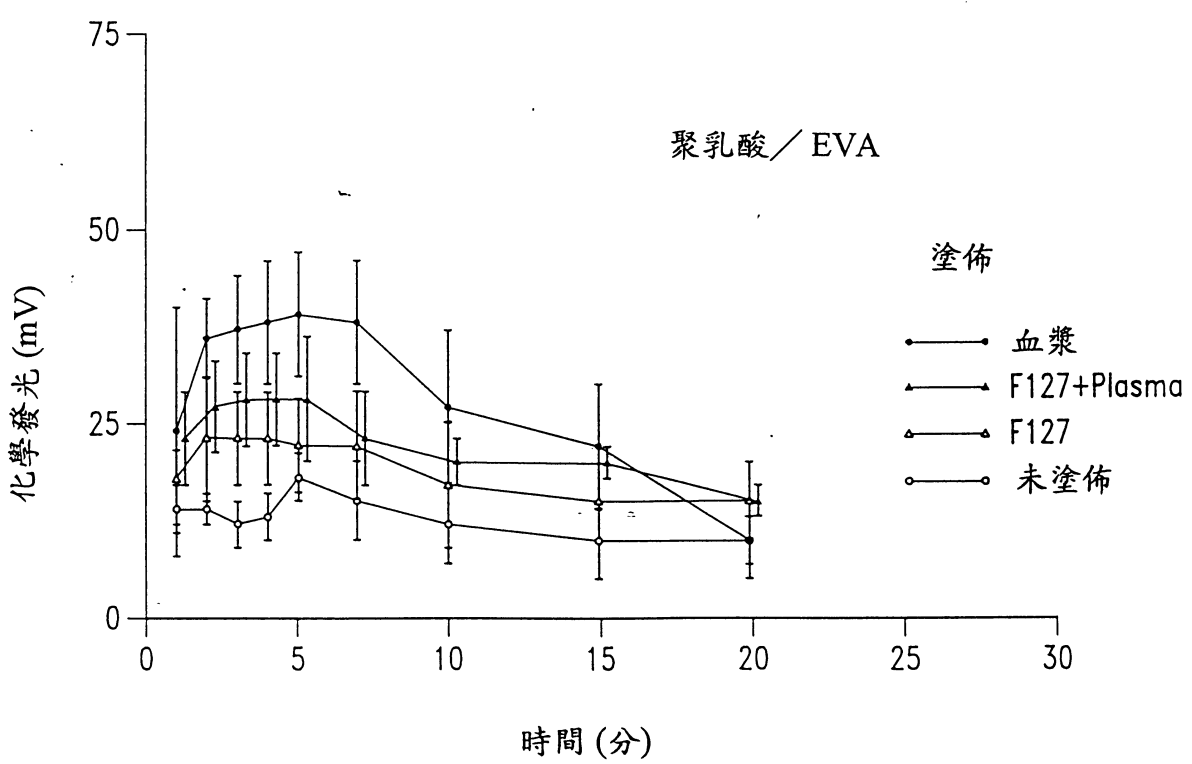


圖 48

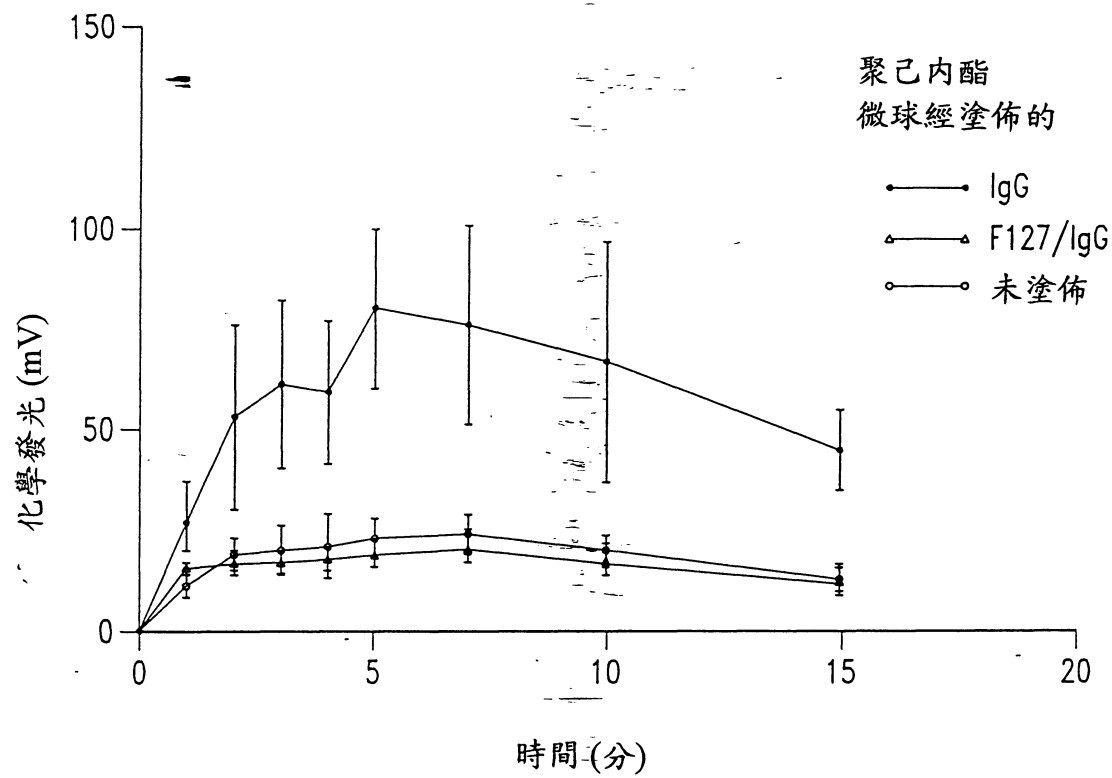


圖 49

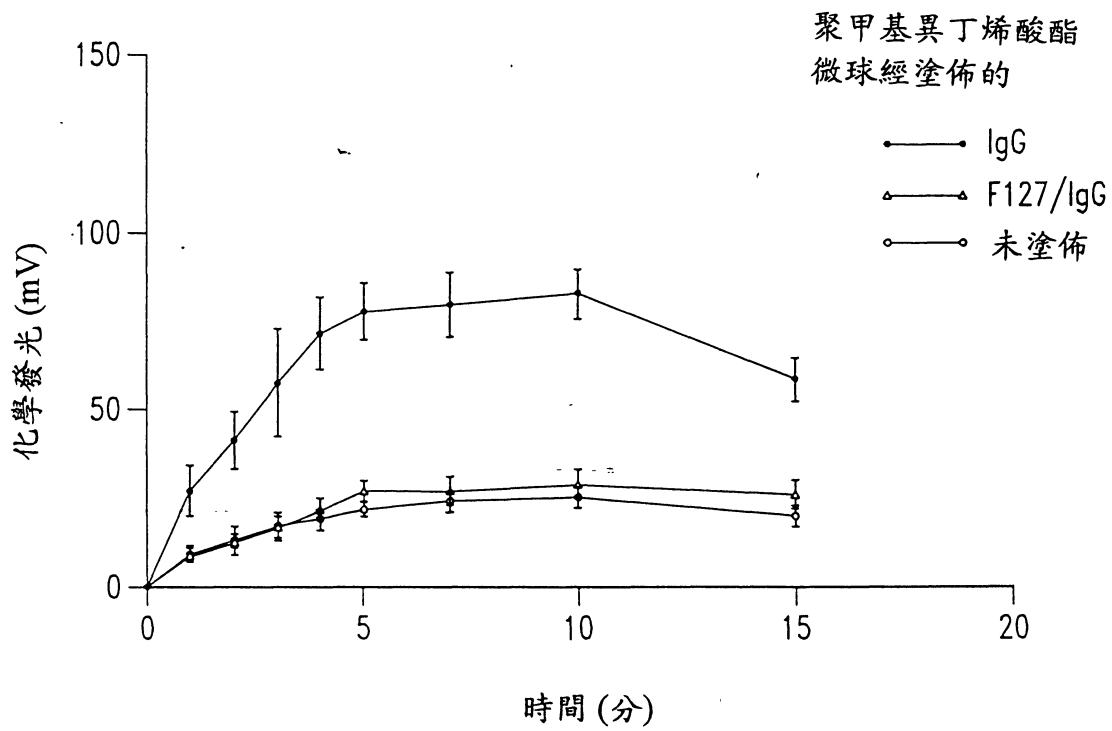


圖 50

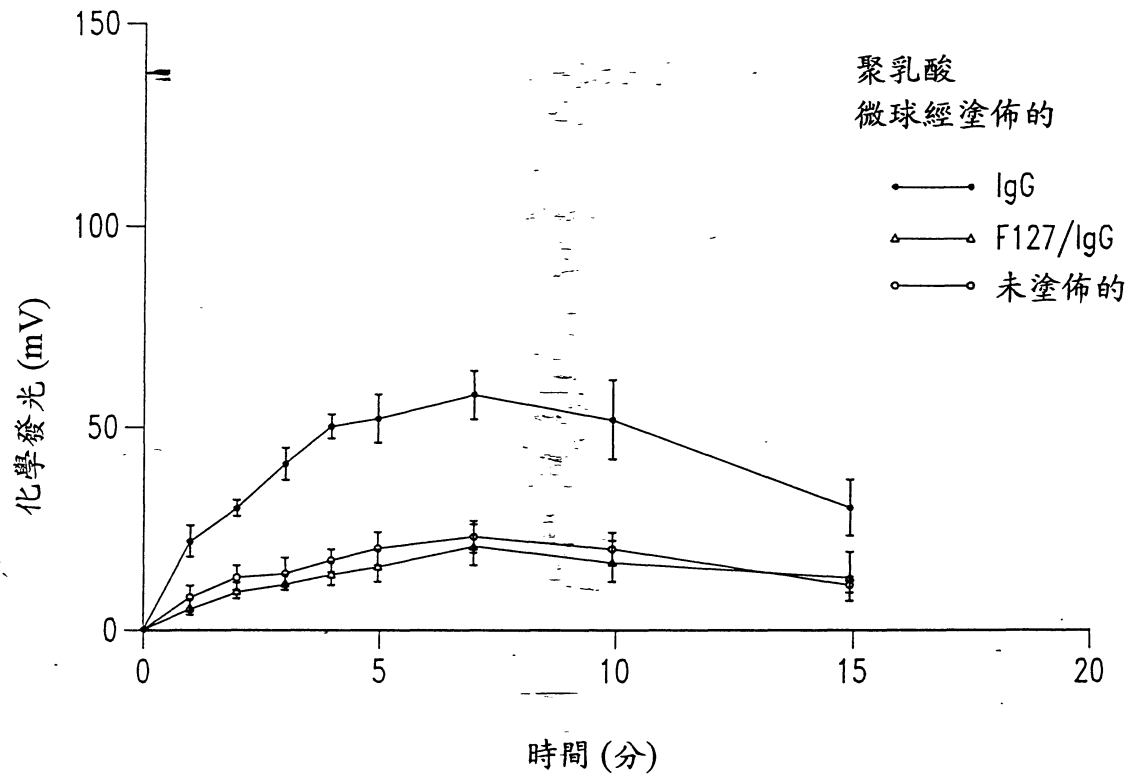


圖 51

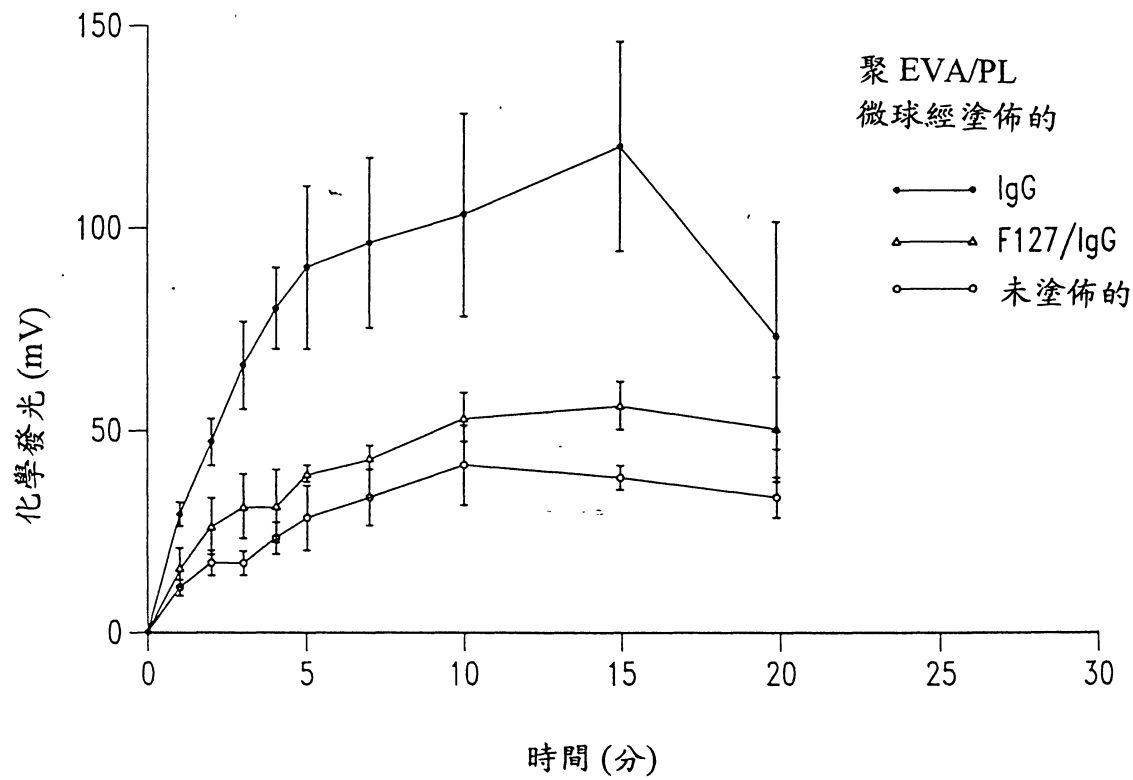


圖 52

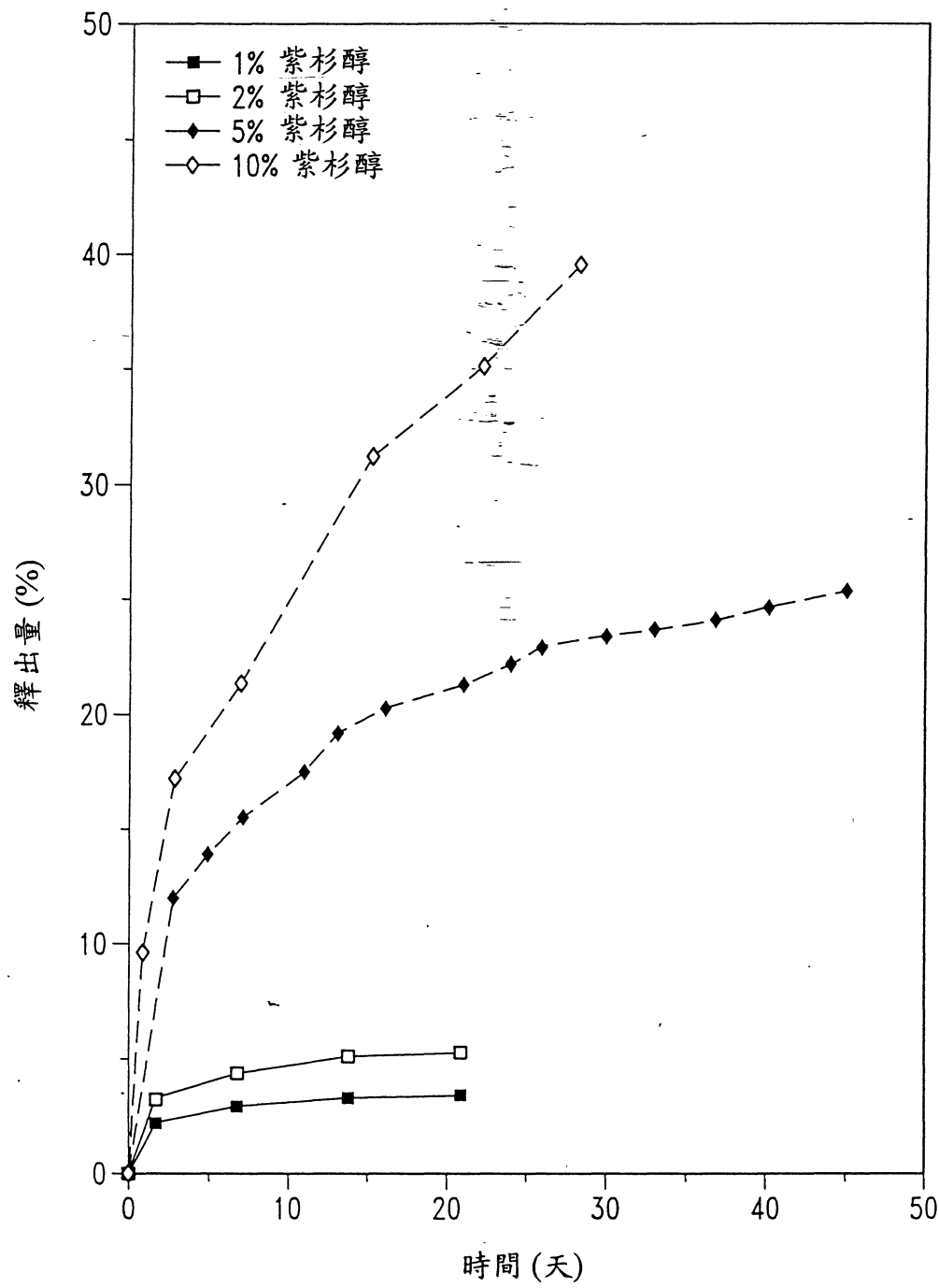


圖 53A

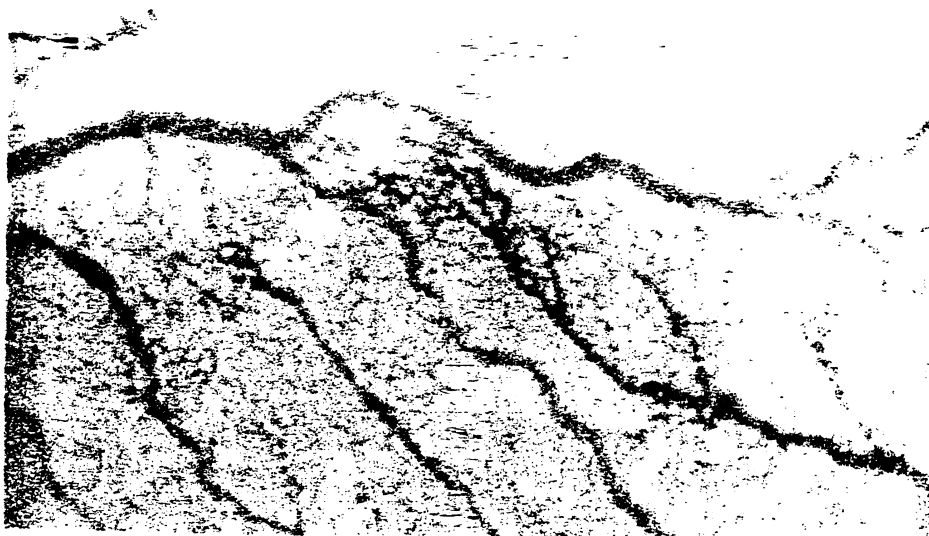


圖 53B

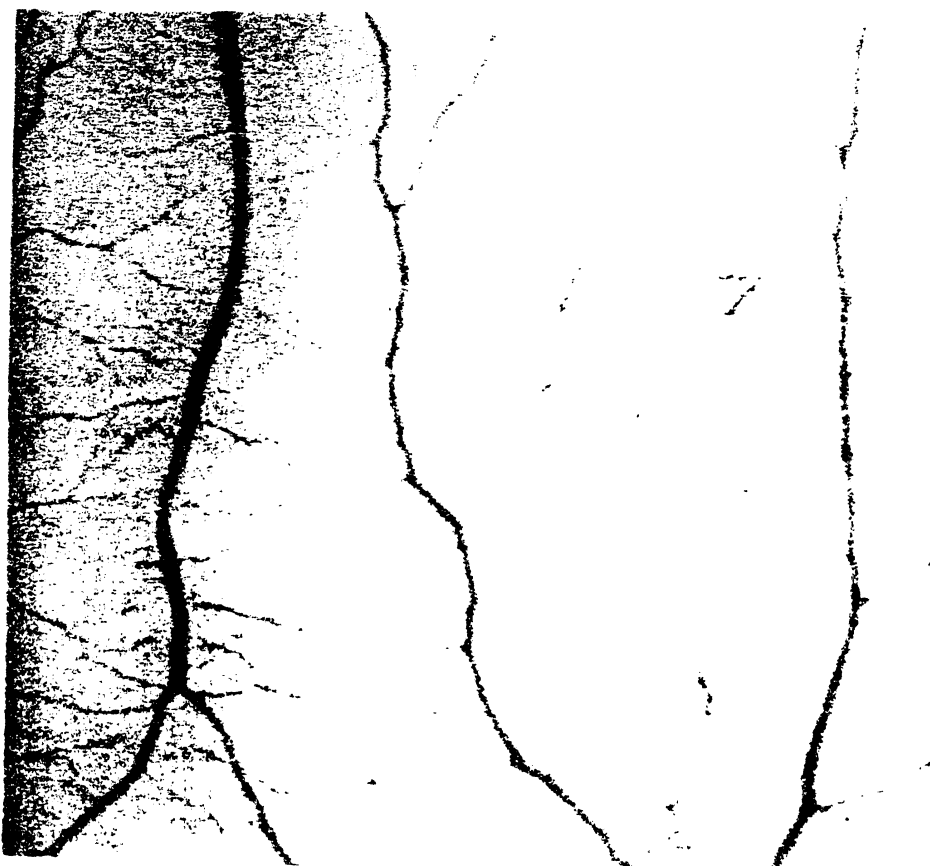


圖 53C

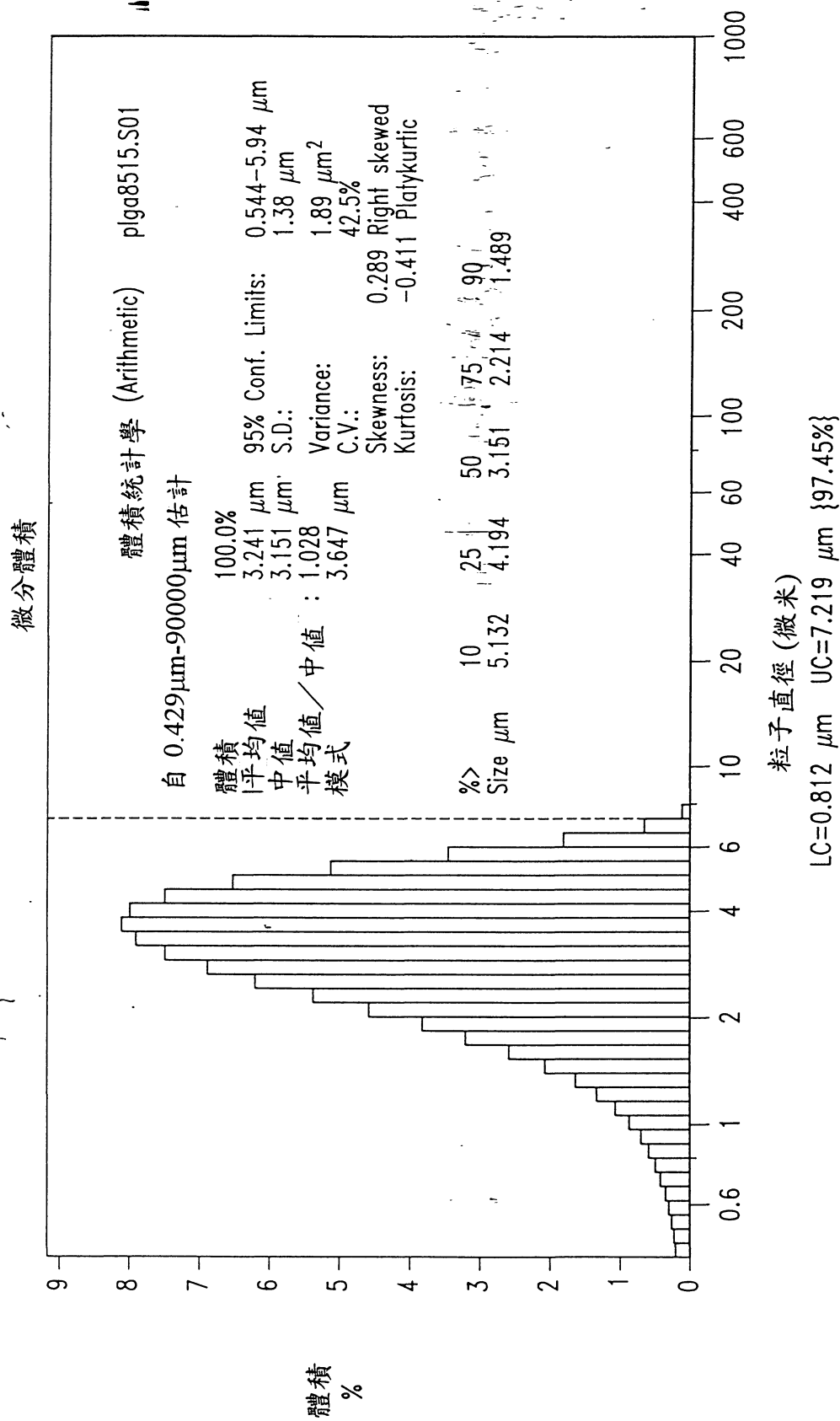


圖 54

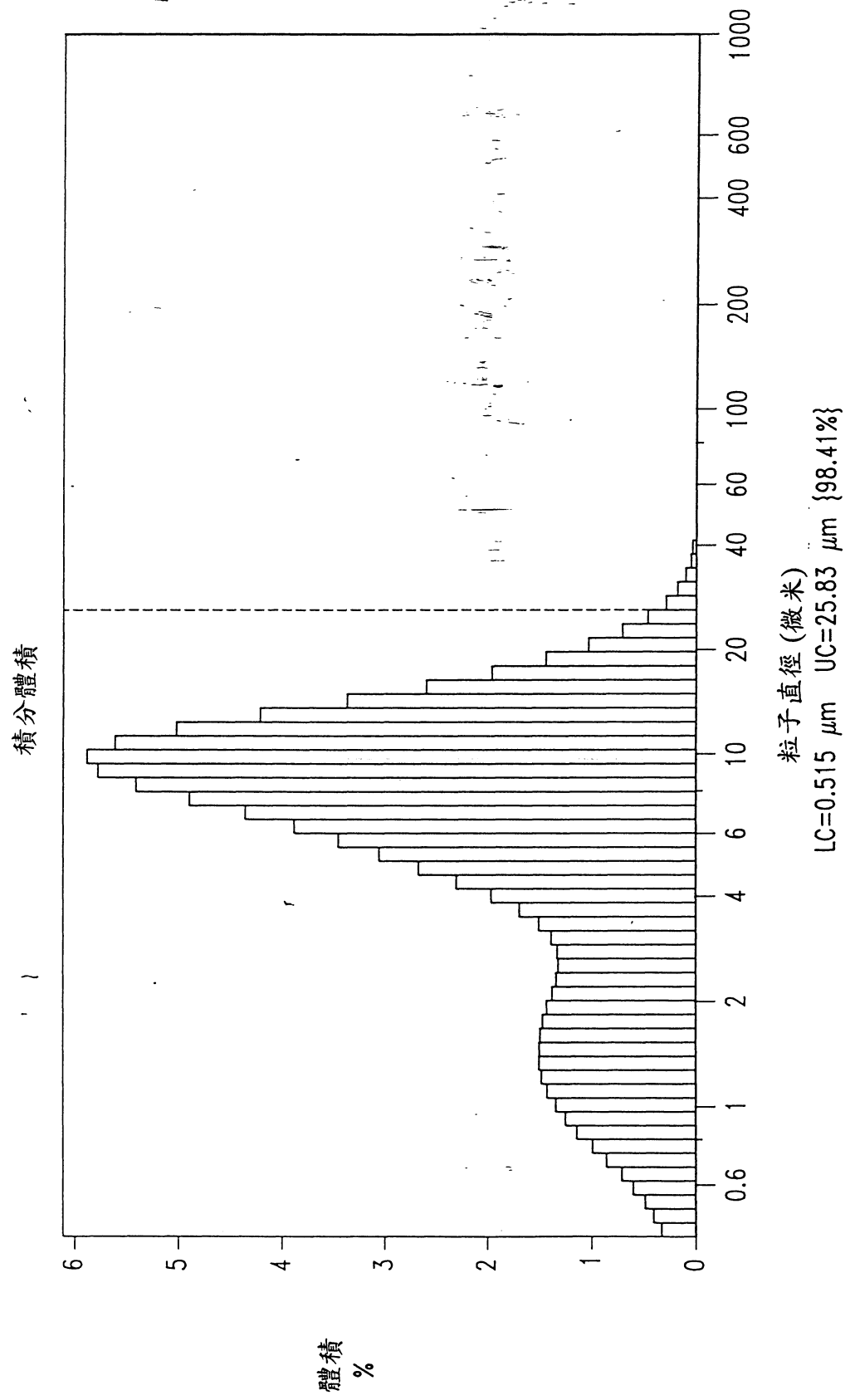


圖 55

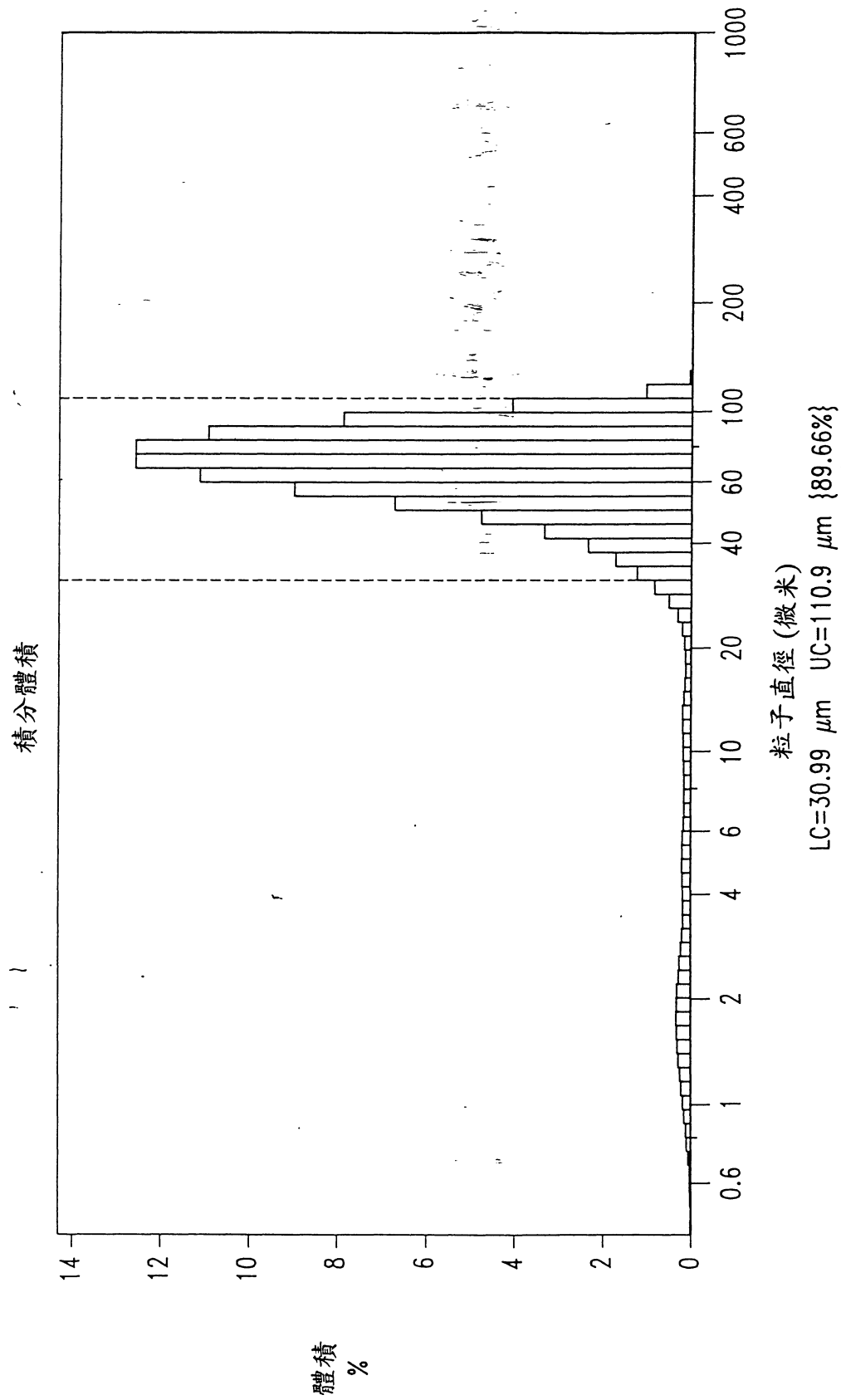


圖 56

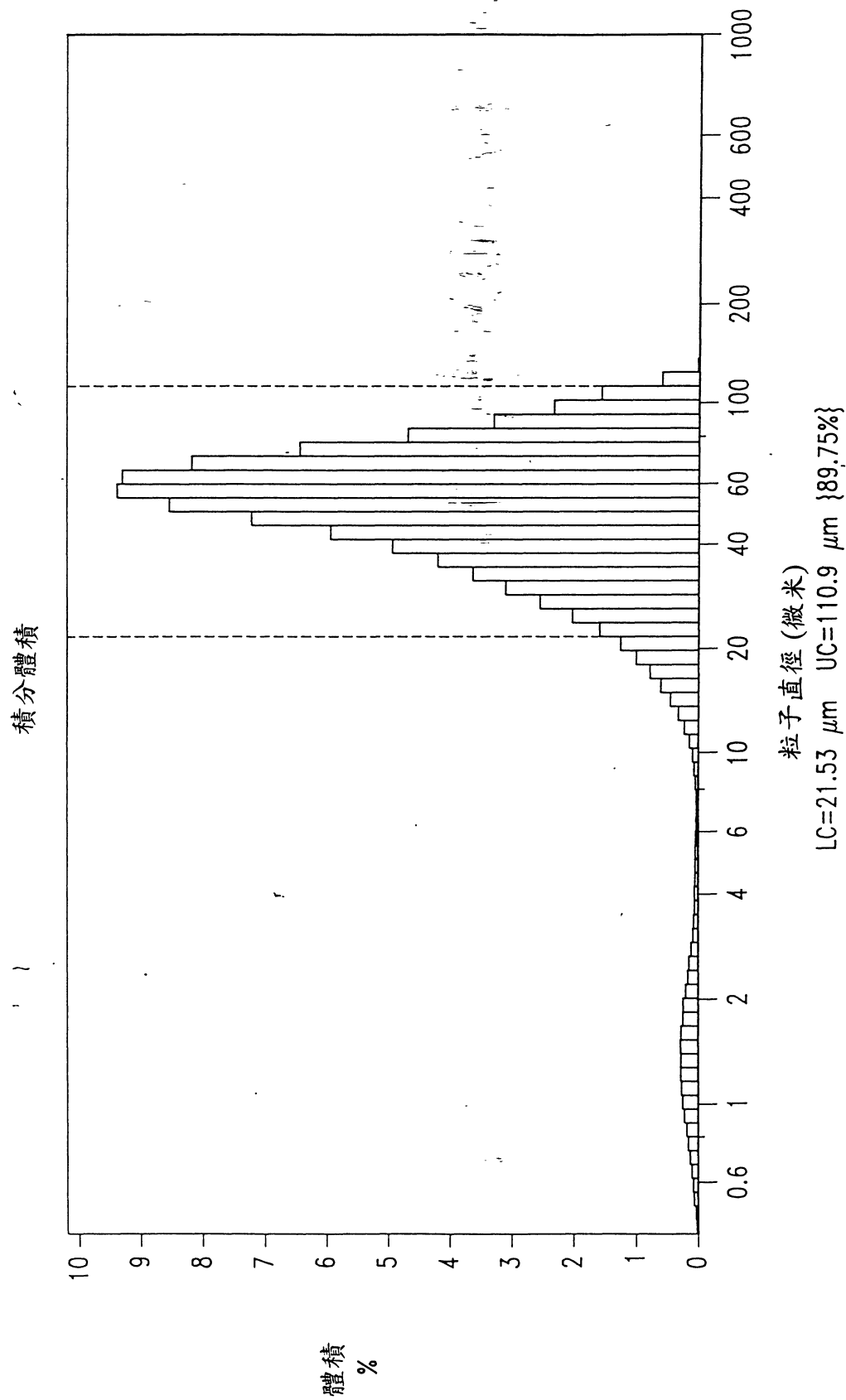


圖 57

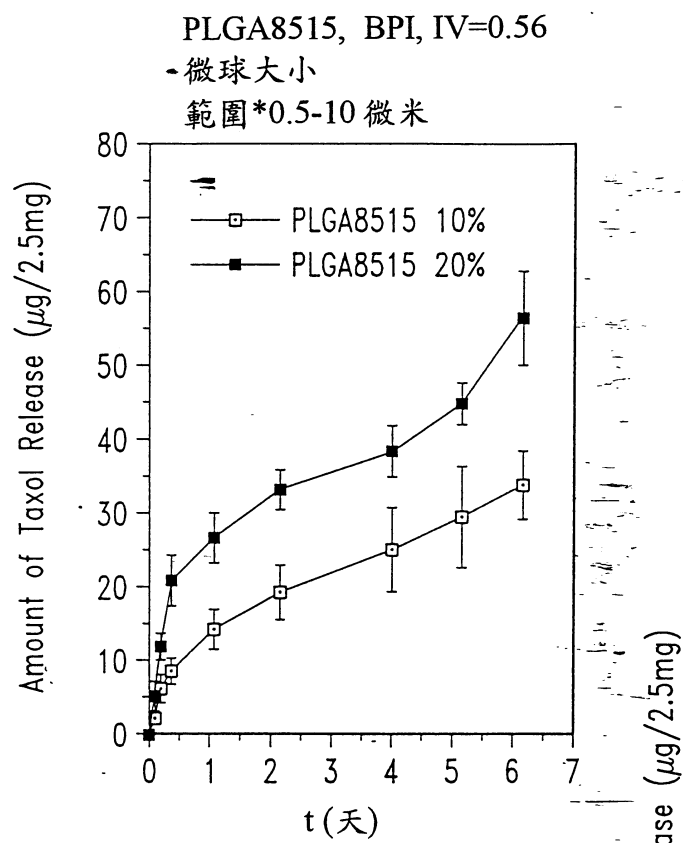


圖 58A

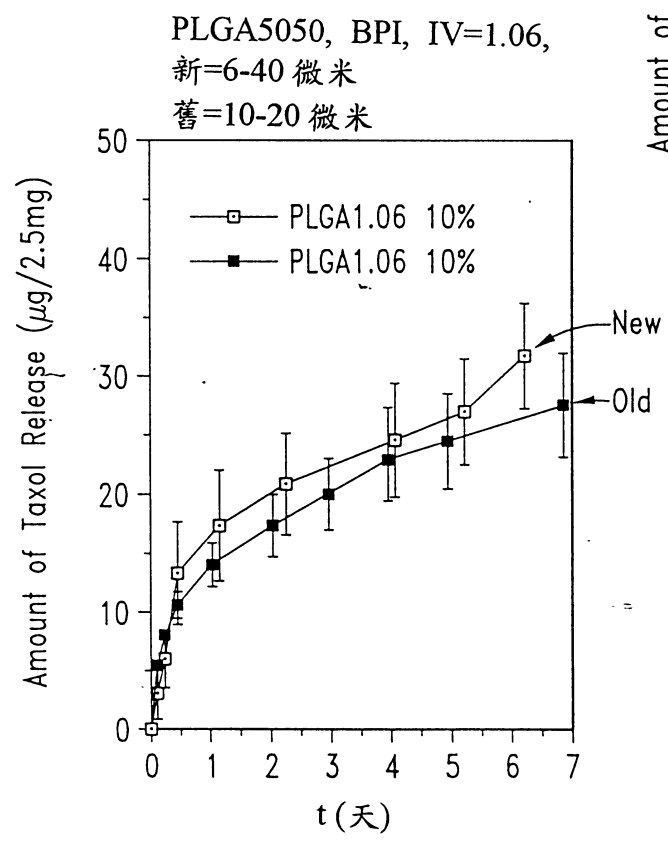


圖 58C

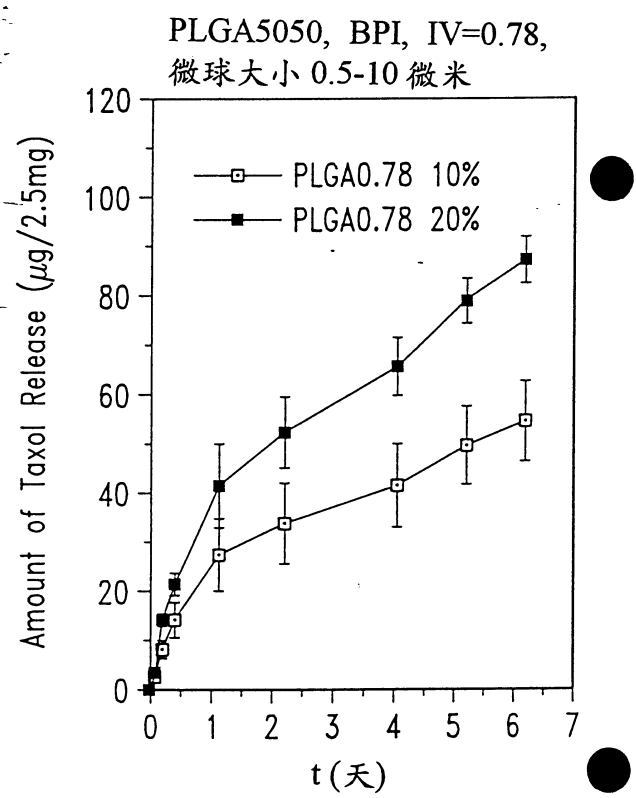


圖 58B

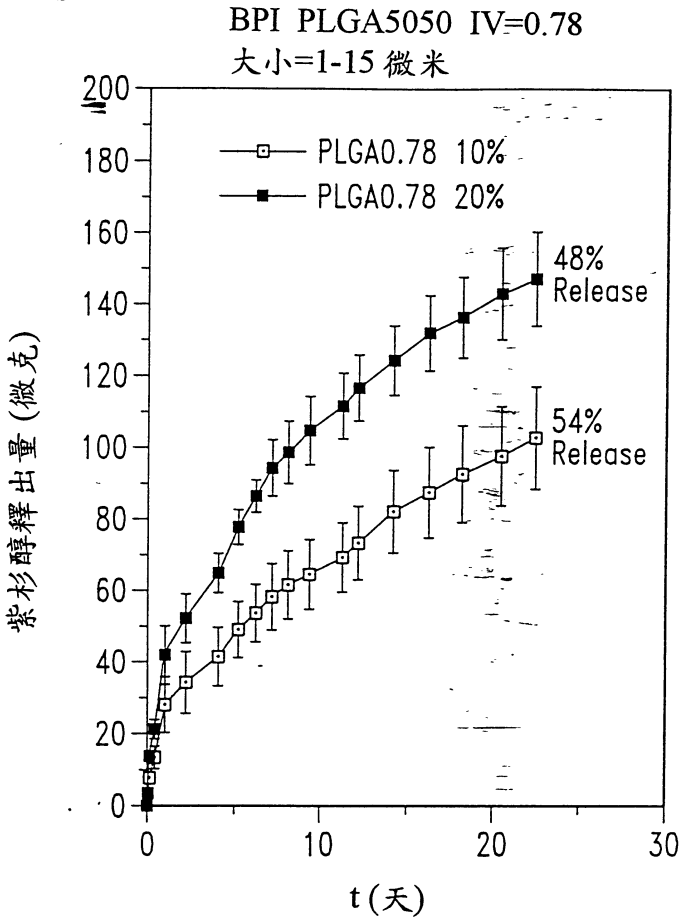


圖 59A

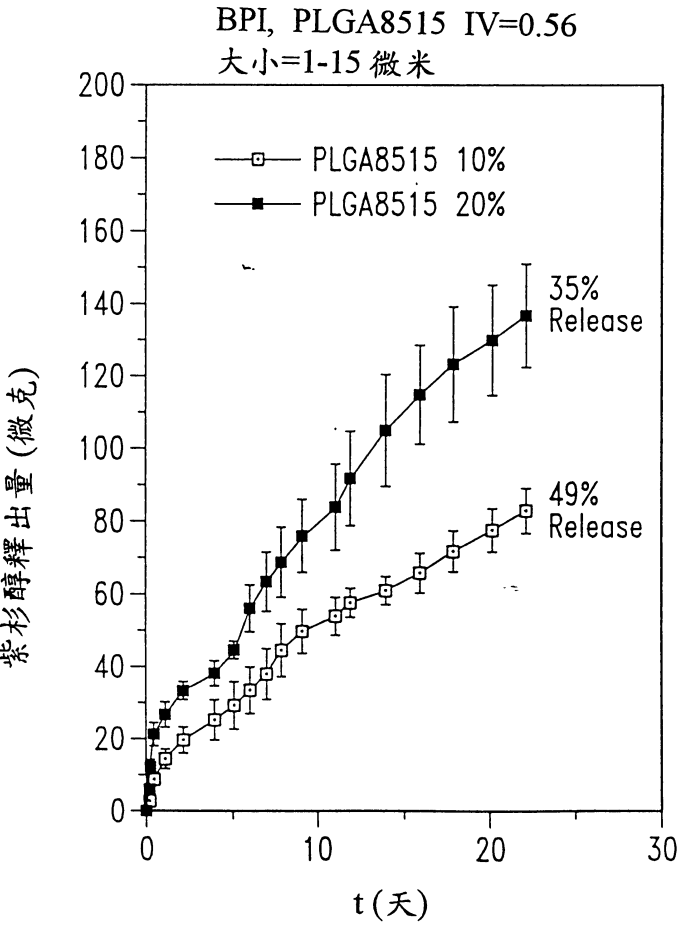
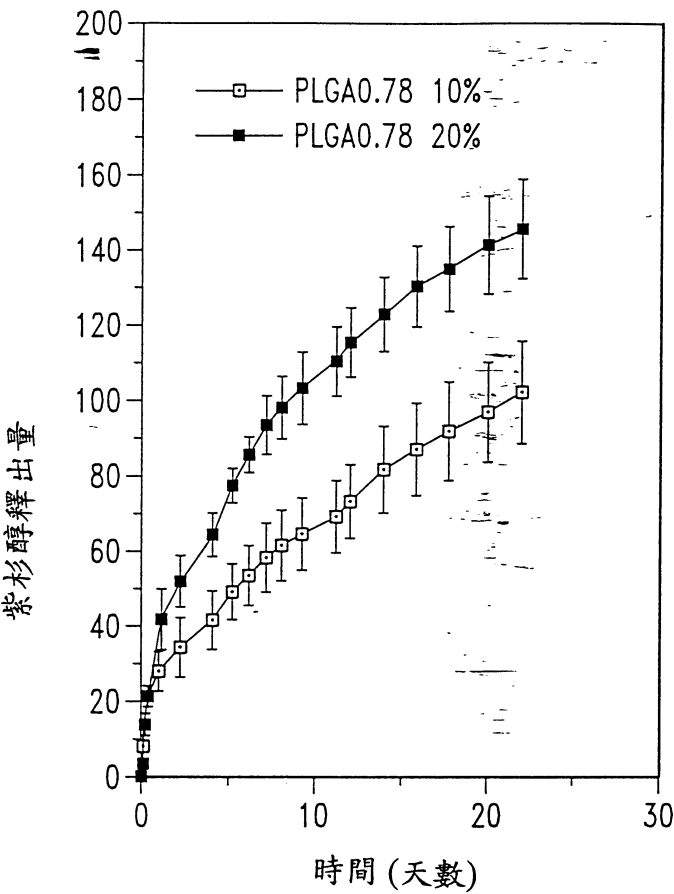
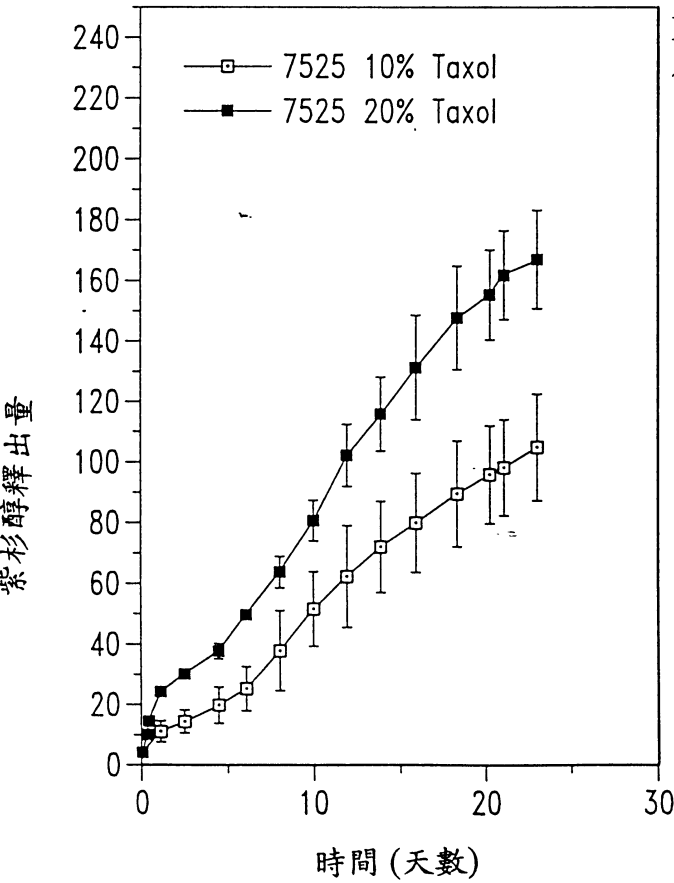


圖 59B



PLGA5050, IV=0.78, Paclitaxel
微球大小=1-10 微米

圖 60A



PLGA7525, IV=0.55, Microsphere
微球大小=1-10 微米

圖 60B

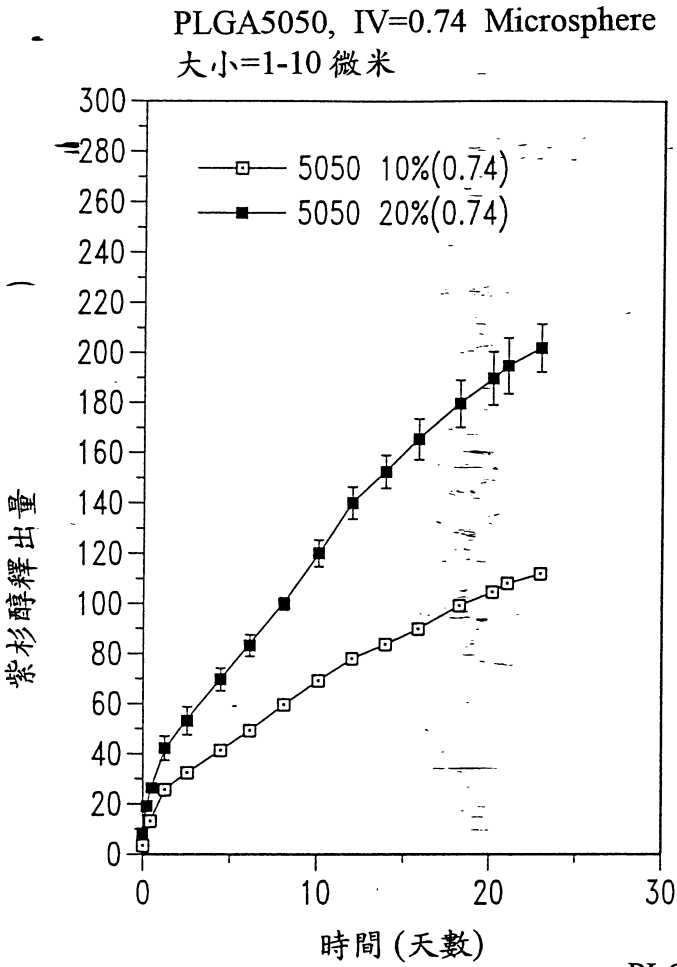


圖 61A

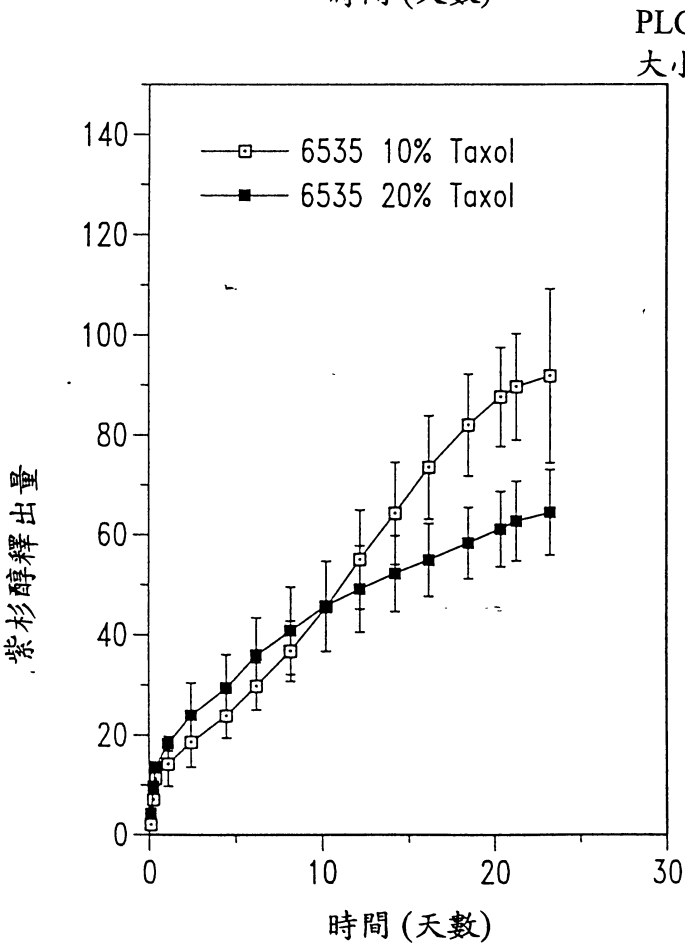


圖 61B

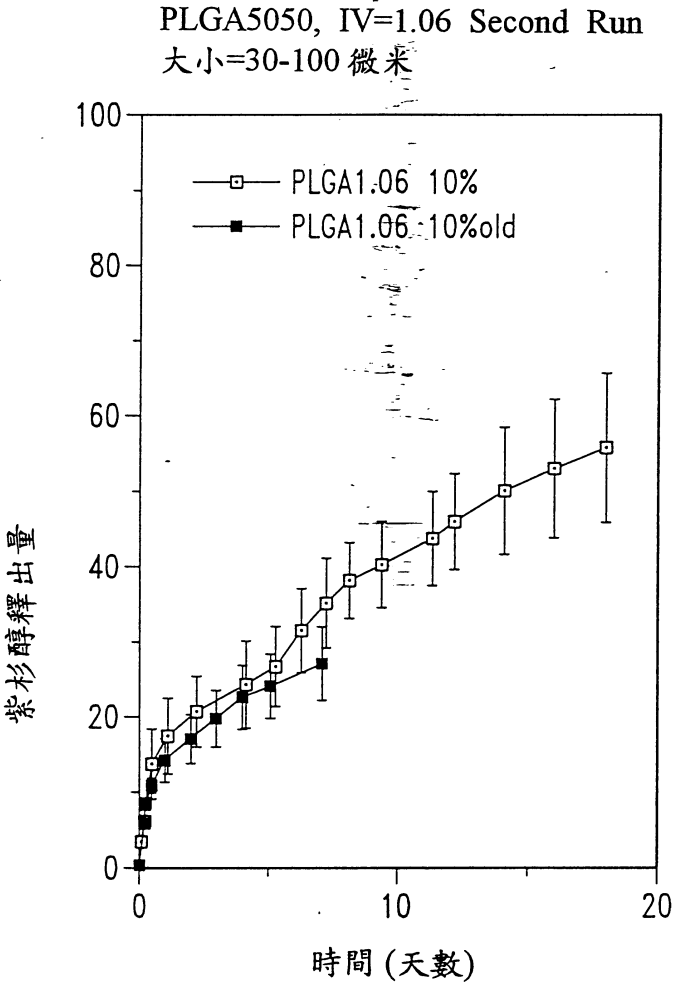


圖 61C

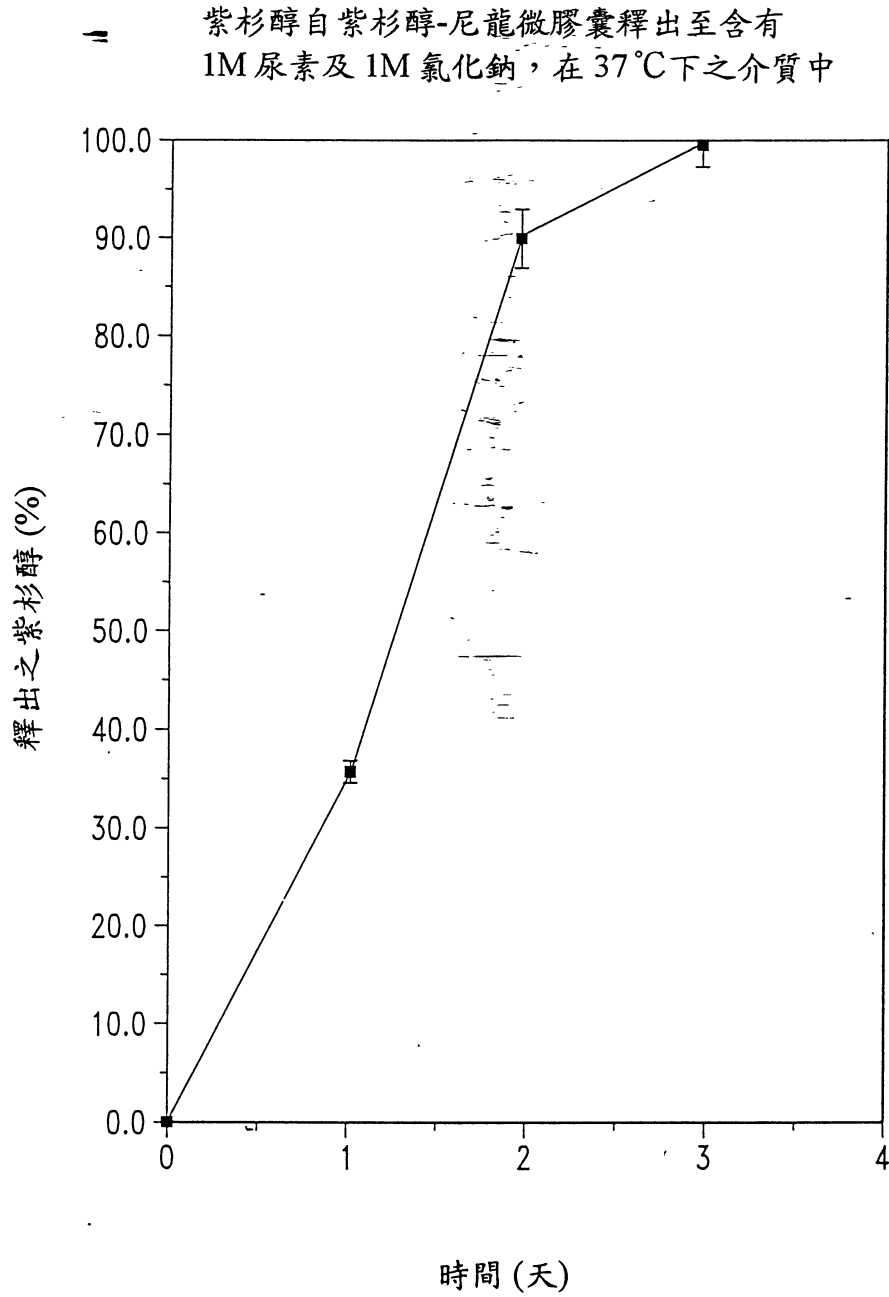


圖 62

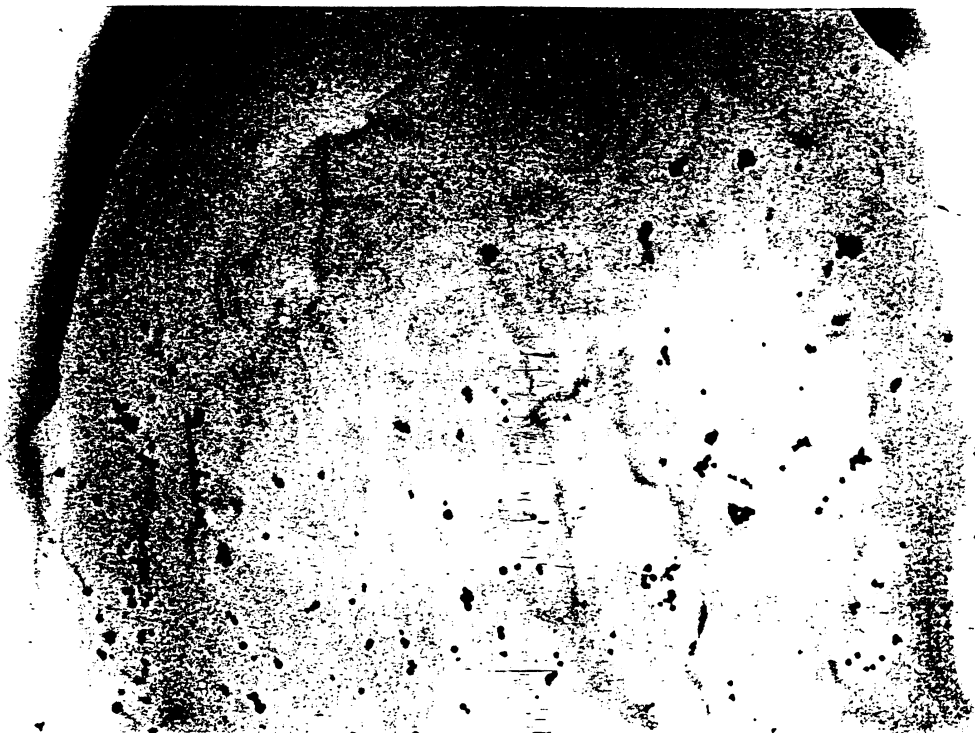
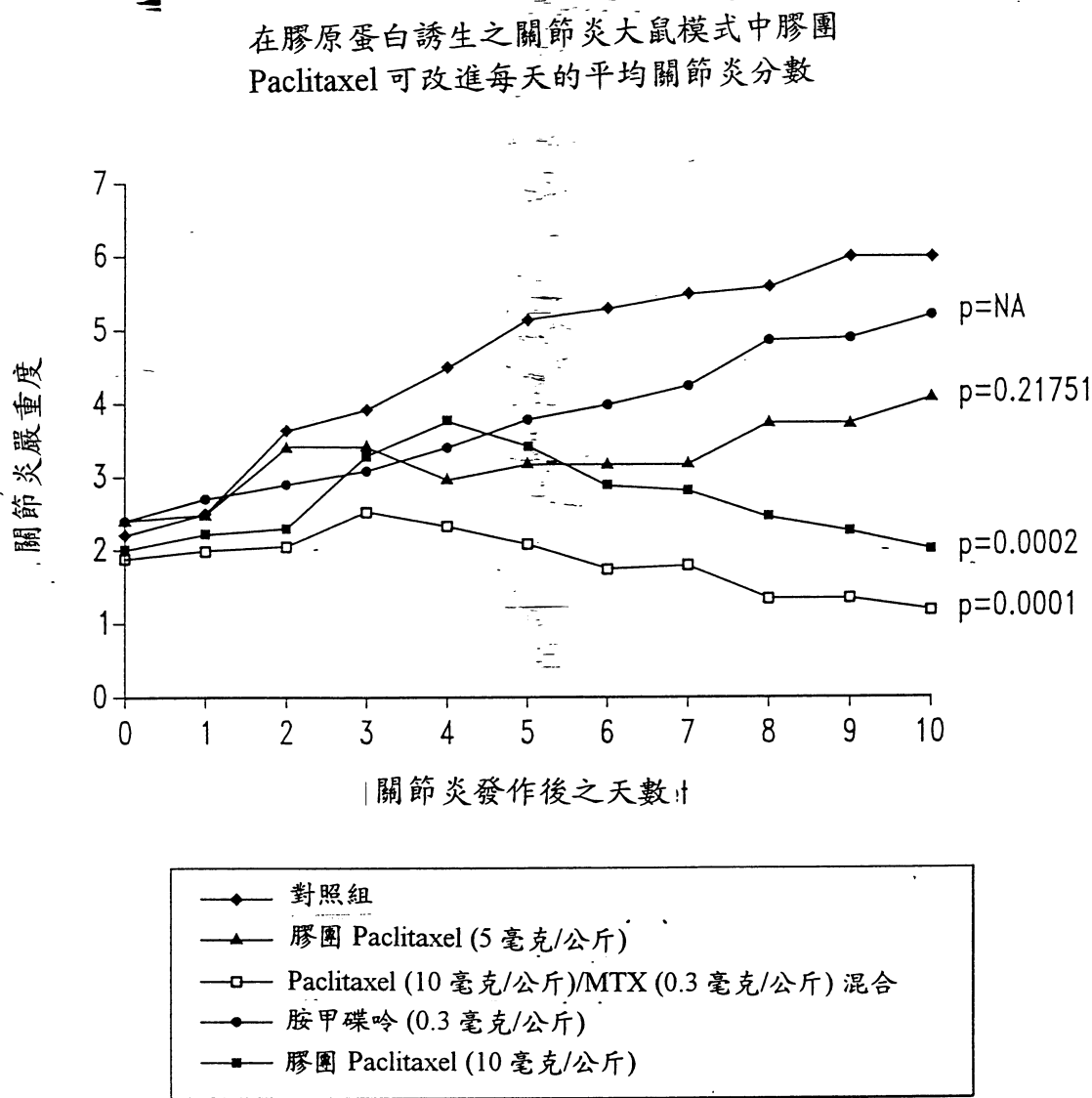


圖 63B



圖 63A



- 在膠原蛋白誘生之關節炎 (CIA) 大鼠模式中，於關節炎發作後評估 10 天疾病之臨床症狀
- 對照組及胺甲碟呤動物在臨床症狀上均有逐漸的增加，而接受 10 毫克/公斤膠團 Paclitaxel 的動物在第 10 天證明有顯著的臨床改進
- 在研究末了，利用 t-試驗顯示，在與胺甲碟呤 (MTX)-處理的及 CIA 對照大鼠比較時，10 毫克/公斤的 Paclitaxel 在關節炎症狀上有顯著的減少

圖 64

膠團 Paclitaxel 可改進膠原蛋白-誘生的
關節炎大鼠模式

Photograph
為處理的照片



經 Paclitaxel 處理



X-ray
未處理之 X 光片



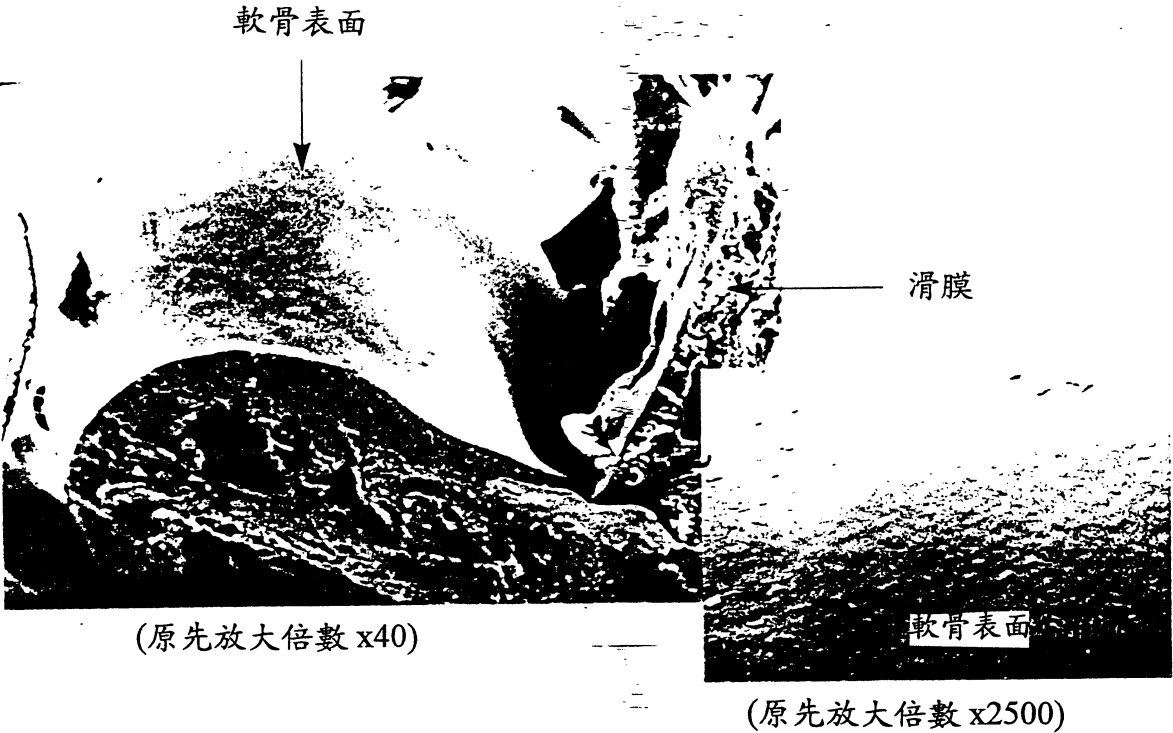
經 Paclitaxel 處理過



- 於 II 型膠原蛋白免疫接種後 28 天照相。對照組只接受溶媒，而經 Paclitaxel 處理組第二天接受 1 毫克/公斤膠團 Paclitaxel，始自關節炎發作日 (第 9 天) 至第 19 天。
- 在對照組的動物呈現以下證據：軟組織腫漲，關節空間變窄，骨質破壞及骨膜新骨形成，而經 Paclitaxel 處理的動物在 X 光片上有幾乎正常的關節特色

圖 65

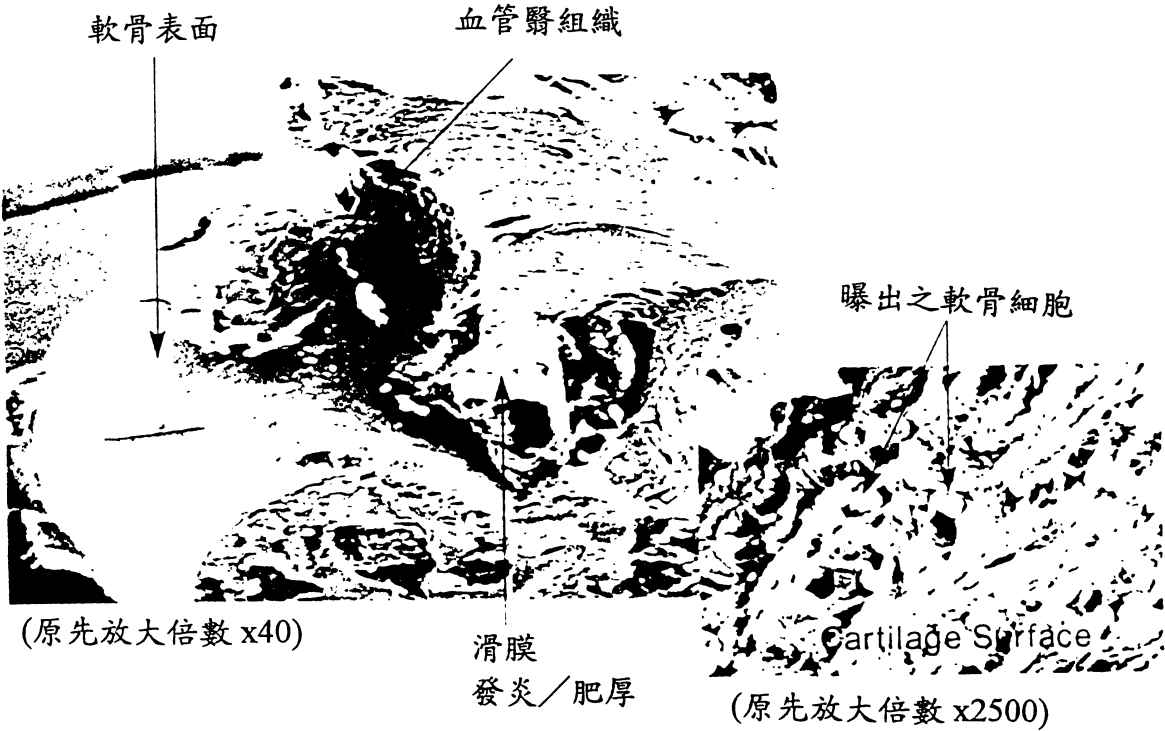
正常大鼠腳踝關節之掃描電子顯微照片



- 正常動物之軟骨表面經處理以進行掃描電子顯微鏡檢。
- 掃描電子顯微照片說明正常的關節表面，特徵為平滑的完整軟骨基質，為薄的滑膜襯裏所包圍。

圖 66A

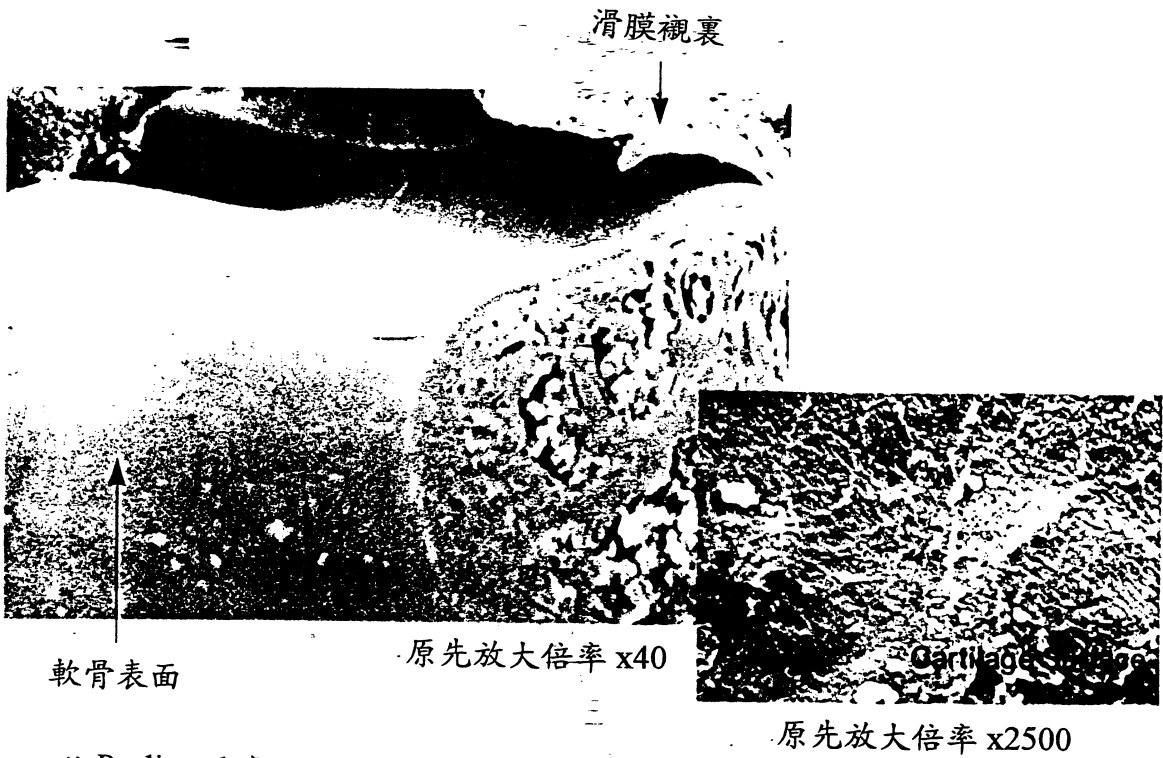
在膠原蛋白-誘生之關節炎模式中，
大鼠腳踝關節之掃描電子顯微照片



- 膠原蛋白-誘生的關節炎關節之掃描電子顯微鏡相片，其特徵是經浸蝕的軟骨表面及發炎的滑膜。軟骨基質表面被水解，暴露出軟骨細胞或一旦占據可排空隙空(插圖)

圖 66B

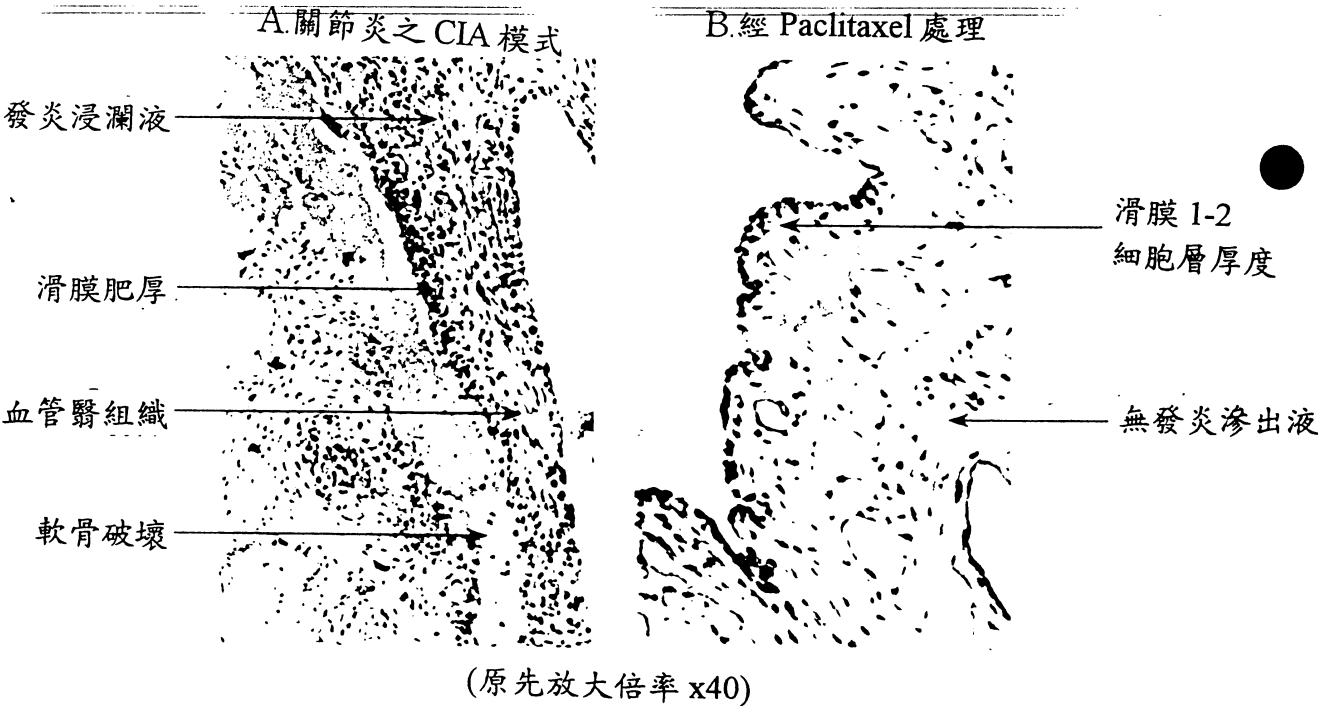
在膠團 Paclitaxel-處理之膠原蛋白-誘生之關節
- 炎模式中，大鼠踝關節之掃描電子顯微相片



- 以 Paclitaxel 處理的膠原蛋白-誘生關節炎動物，其關節表面保持完整，且軟骨基質外觀上大體正常，即使在高放大倍率下 (插圖)。在 Paclitaxel 處理組中 (10 毫克/公斤) 未見血管翳組織之形成及骨膜之肥厚

圖 66C

膠團 Paclitaxel 可改進膠原蛋白-誘生之關節炎
大鼠模式中之組織病理

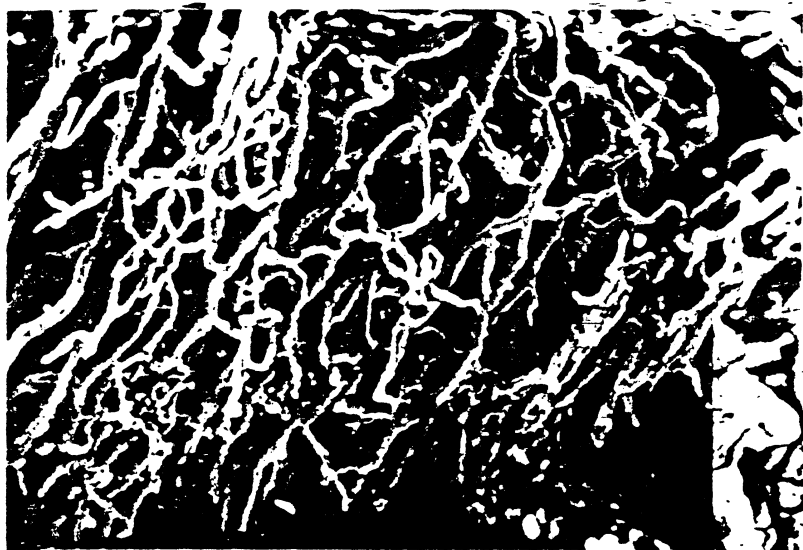


- 膠原蛋白-誘生之關節炎 (CIA)，組織學特徵在於顯著的滑膜肥厚，滑膜發炎細胞之浸潤及血管翳組織，以及軟骨的破壞 (A)。
- 在經 Paclitaxel 處理的動物中，滑膜似乎正常，僅有 1-2 層滑膜襯裏細胞且無發炎細胞滲出液 (B)。

圖 67

類風溼關節炎之膠原蛋白-誘生之關節炎大鼠
模式中滑膜之血管生成

滑膜血管分布之浸蝕鑄型



(原先放大倍率 x160)

生長中之閉合末端毛細管突出物

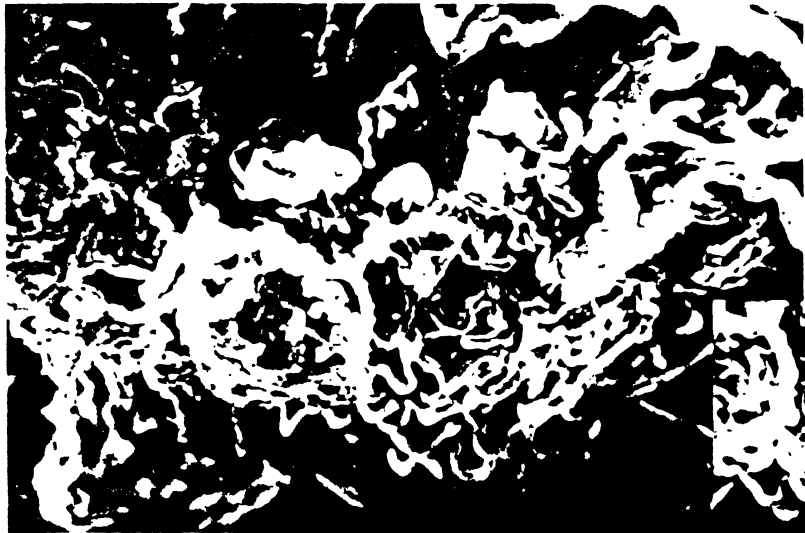


(原先放大倍率 x640)

- 製備滑膜血管分布之浸蝕鑄型，係將 Mercocox 聚合物注入膠原蛋白-誘生關節炎 (CIA) 大鼠之頸動脈中，於聚合化作用後再水解周圍的組織
- CIA 浸蝕鑄型之掃描電子顯微鏡檢顯示閉合末端之毛細管突出物 (特徵為血管生成刺激作用) 突向關節空間

圖 68A

滑膜血管分布之浸蝕鑄型



(原先放大倍率 x160)

成熟的毛細管環



(原先放大倍率 x320)

- 經 Paclitaxel 處理之膠原蛋白-誘生關節炎動物之浸蝕鑄型顯示滑膜血管排列在成熟的毛細管環中，特徵為靜止狀態。

圖 68B

在膠原蛋白-誘生關節炎大鼠模式中
Paclitaxel 抑制滑膜血管生成

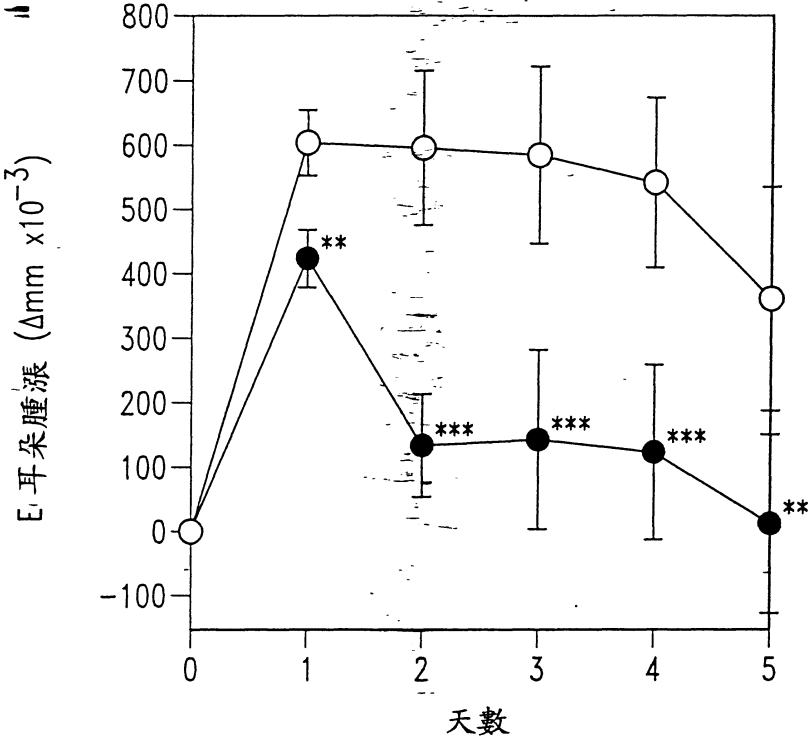


圖 69

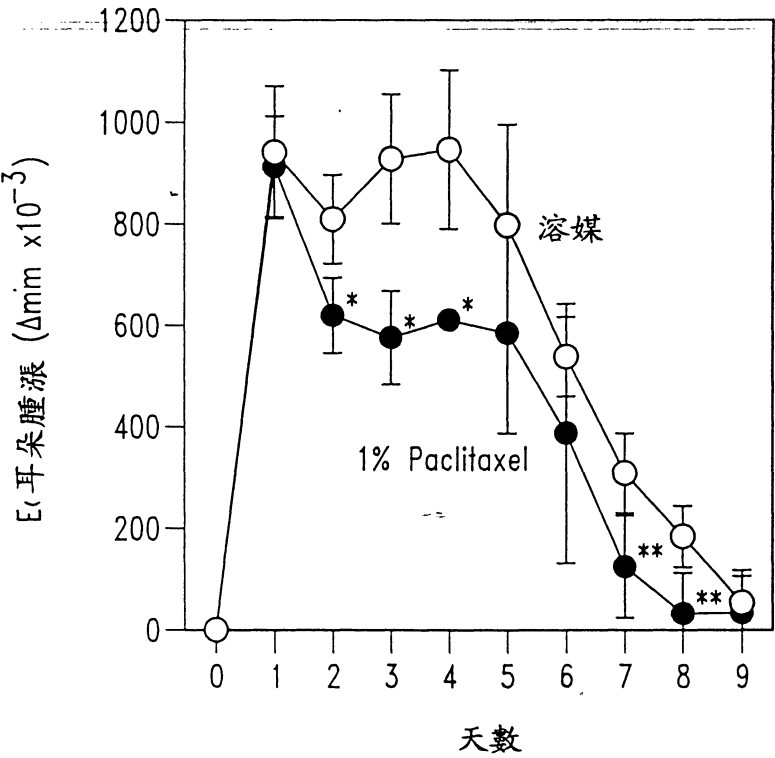


圖 70

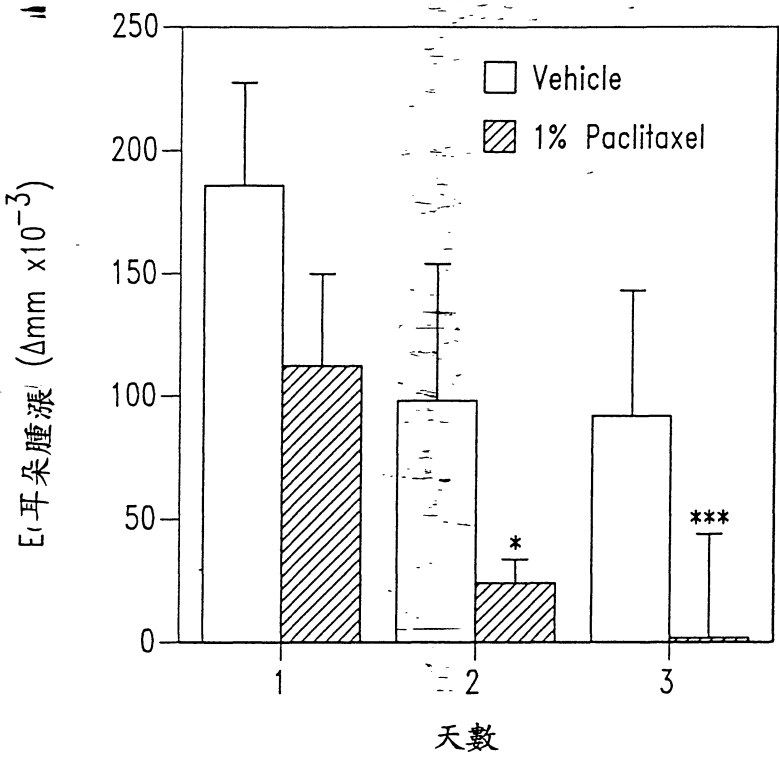


圖 71

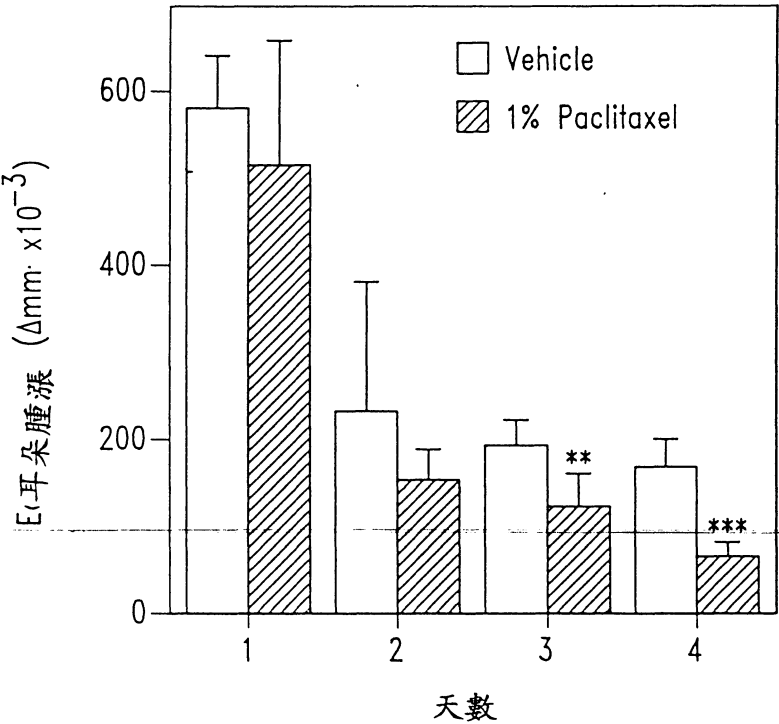


圖 72

左耳：
以單獨
的溶媒
局部處理



右耳：
預先以
10%局部
paclitaxel
調和物處理

圖 73

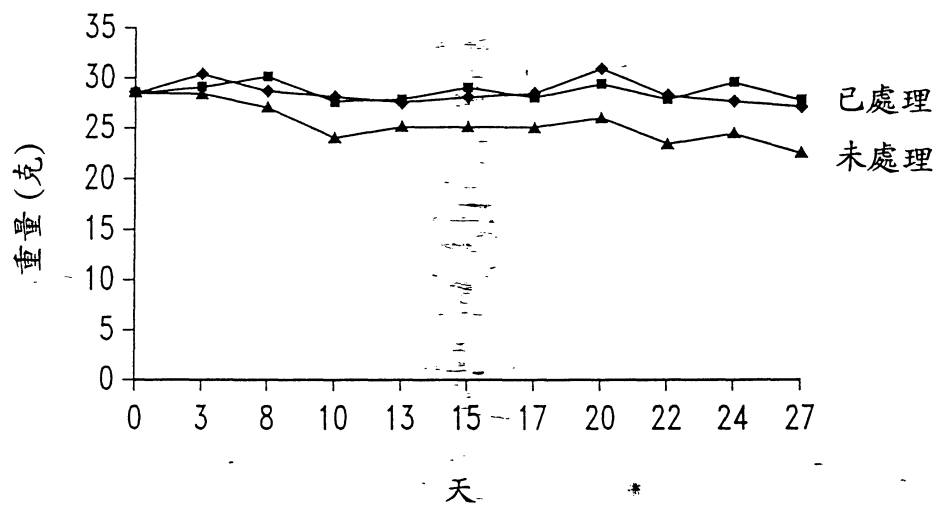


圖 74

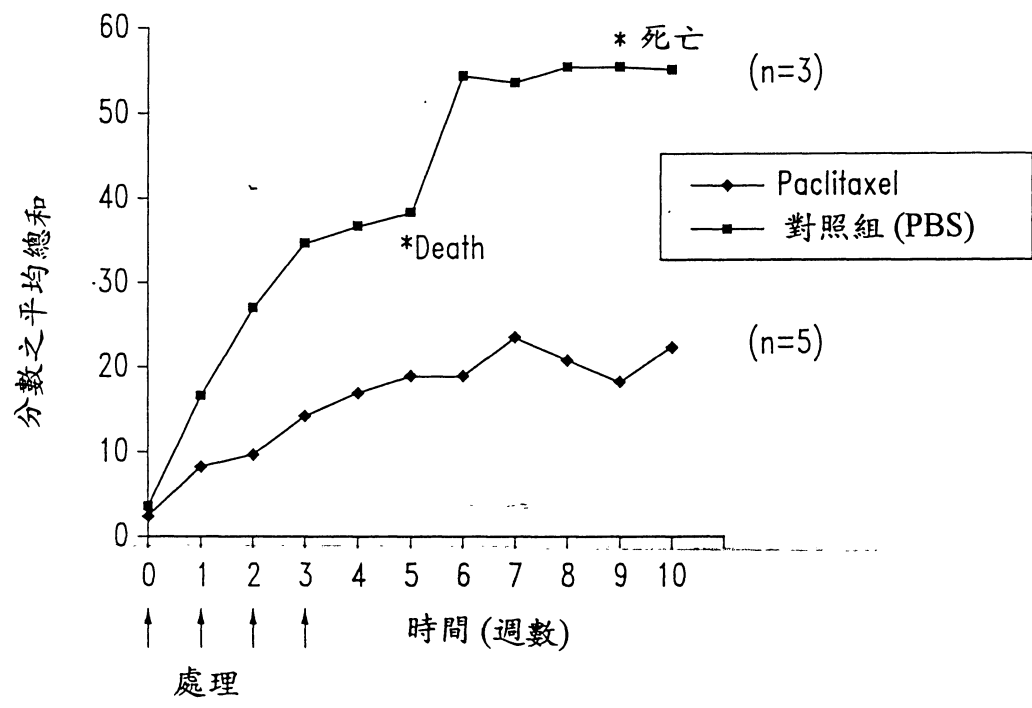


圖 75

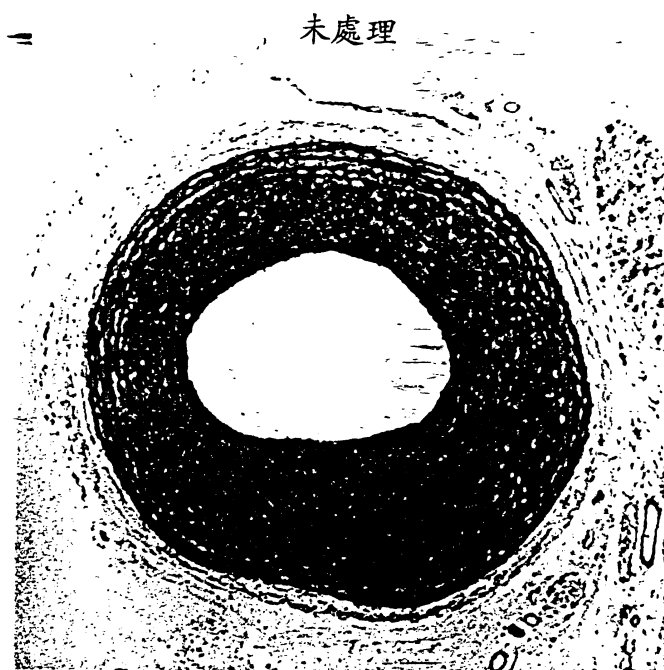


圖 76A

新血管內膜肥厚
(傷害後 14 天)

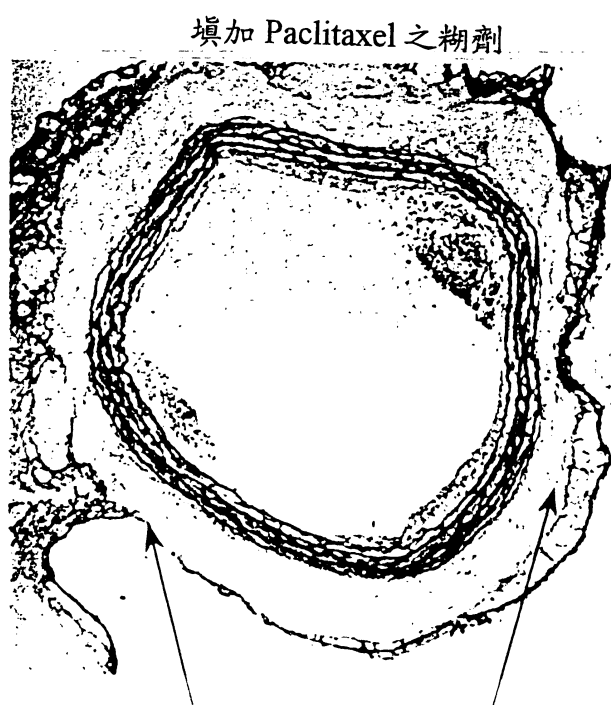


圖 76B

應用至動脈外膜之糊劑
(傷害後 14 天)

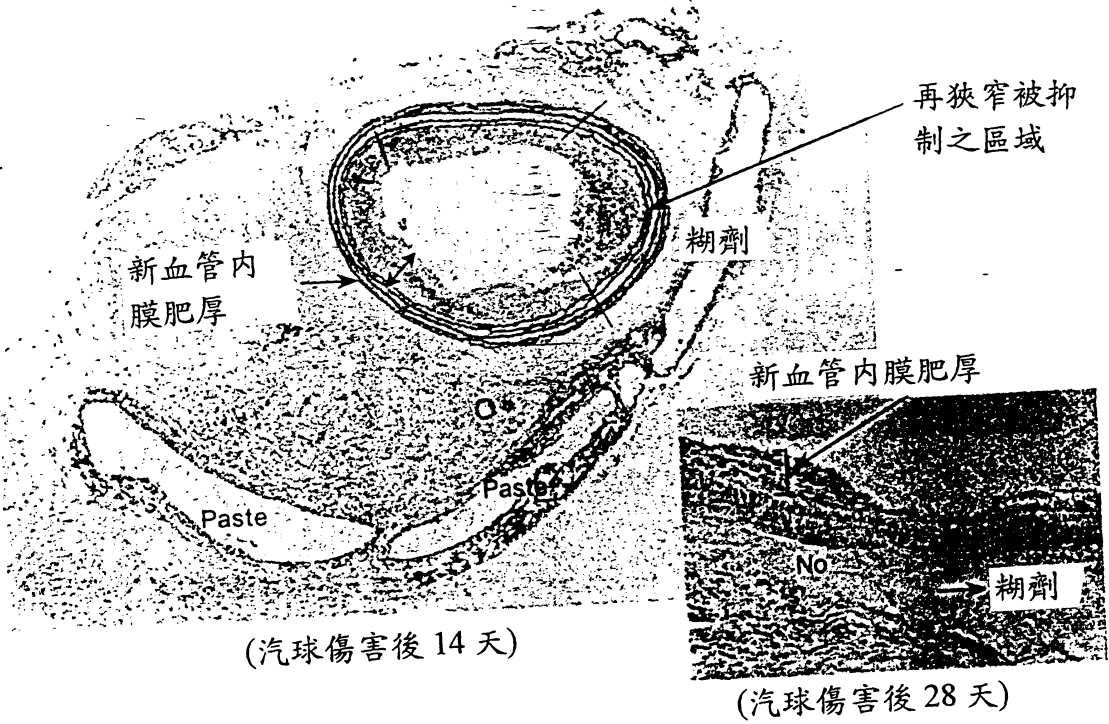
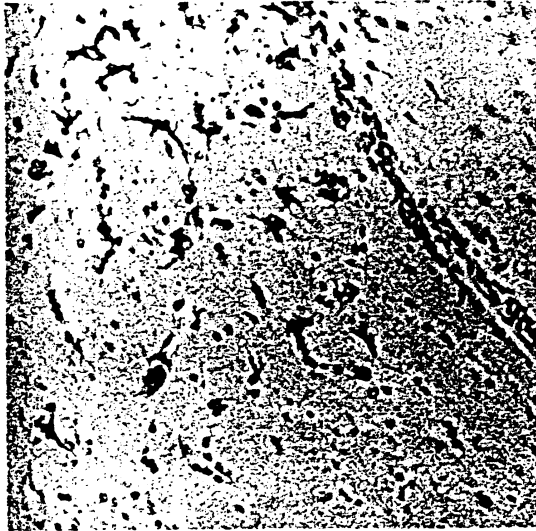


圖 77

圖 78A



正常老鼠

圖 78B



導入外來基因
之對照組



導入外來基因
並經 Paclitaxel 處理

圖 78C

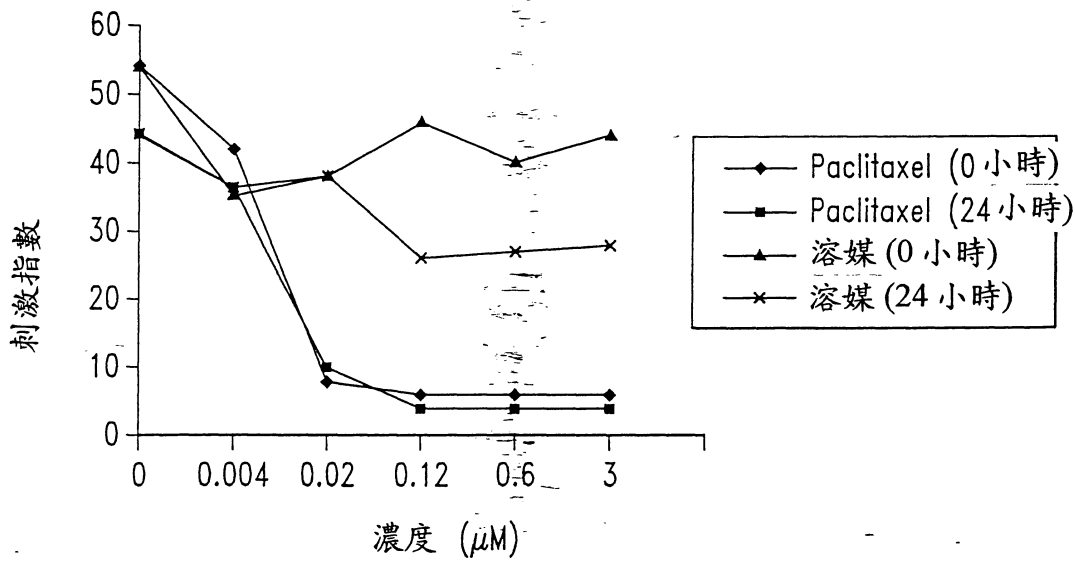


圖 79A

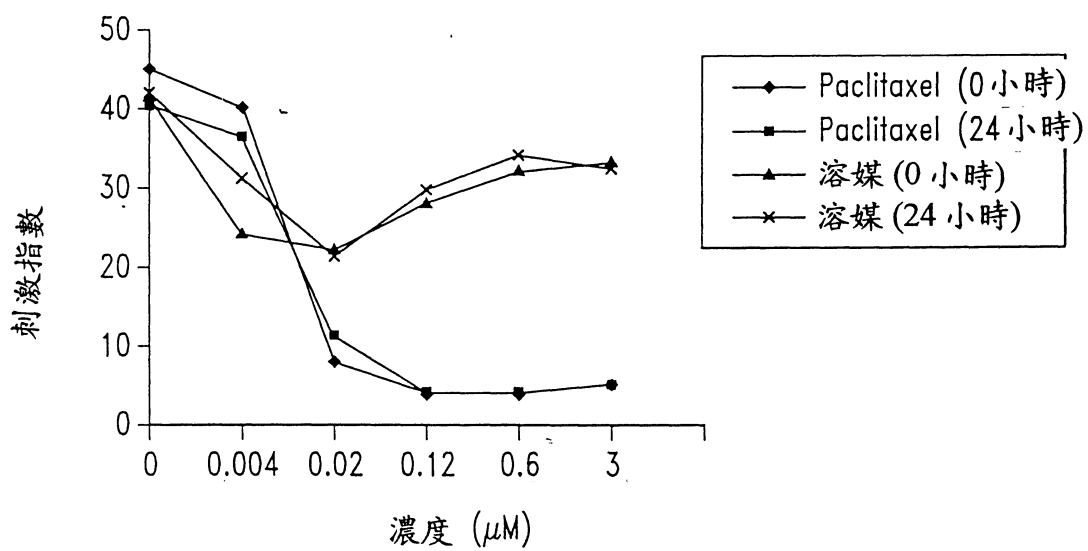


圖 79B

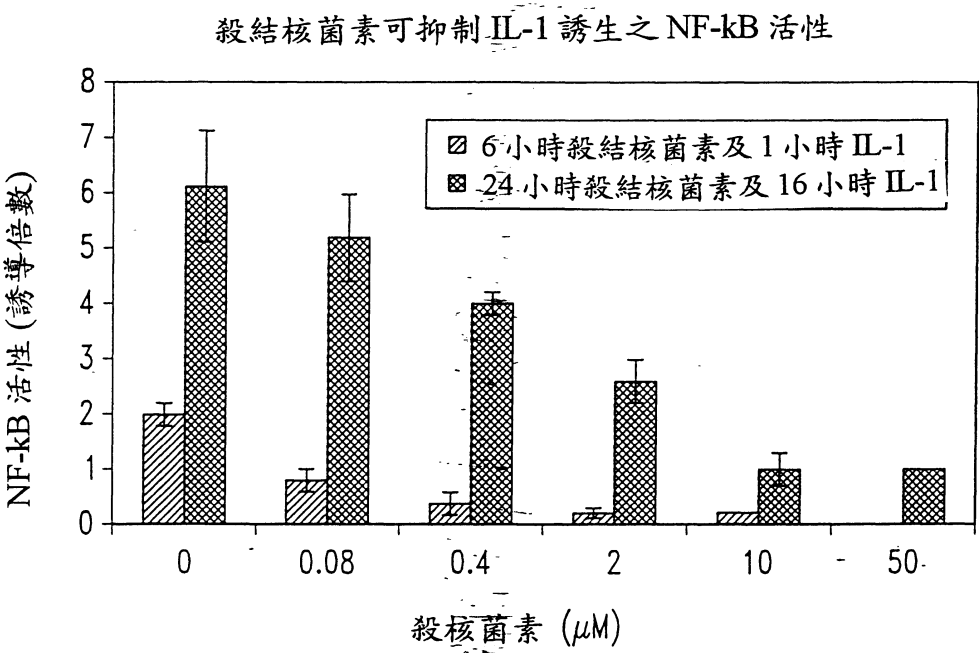


圖 80A

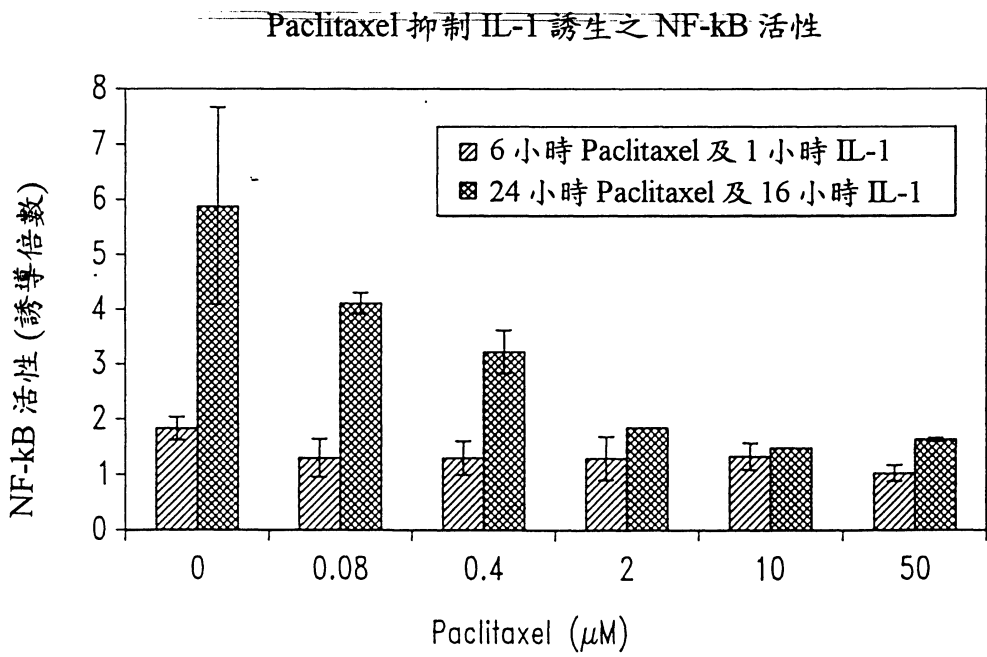


圖 80B

殺結核菌素可抑制 TNF 誘生之 NF-kB 活性

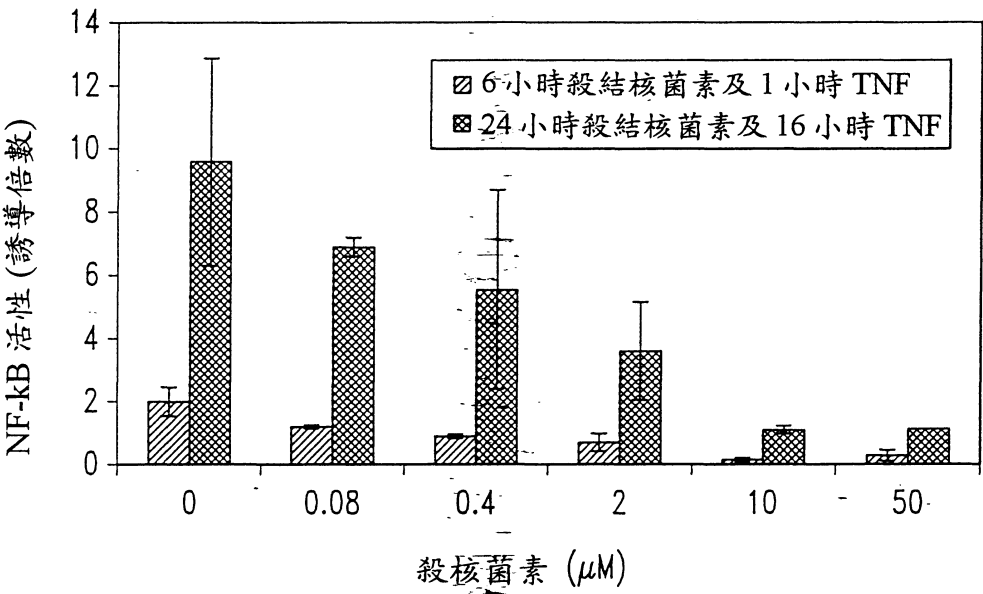


圖 80C

Paclitaxel 抑制 TNF 誘生之 NF-kB 活性

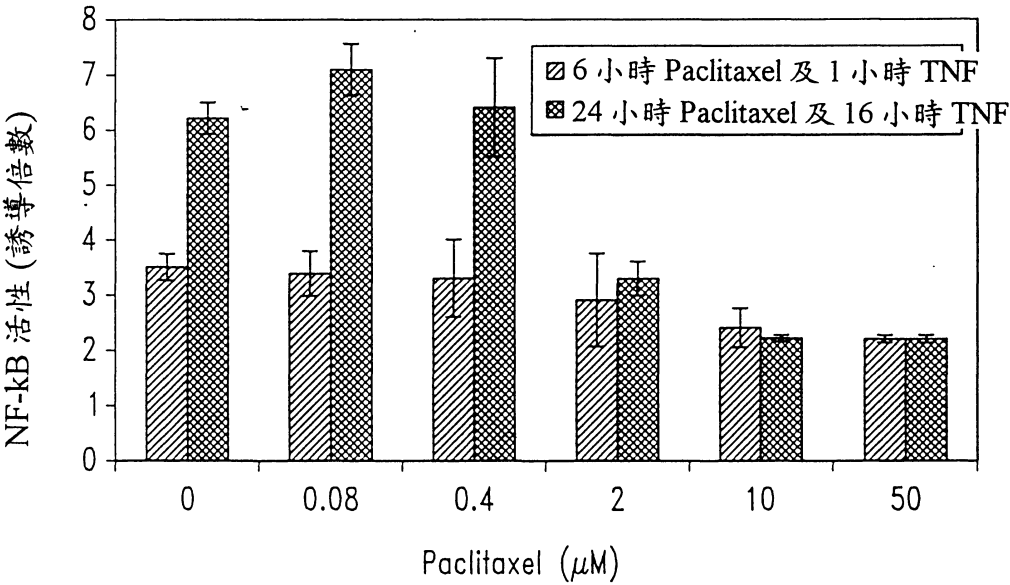


圖 80D

公告本

申請日期	86.12.02
案 號	086118104
類 別	A61K31/00

修正
補充
本92年3月A4
C4

562674

(以上各欄由本局填註)

中文說明書替換頁(92年3月)

發 明 專 利 說 明 書

一、發明 名稱	中 文	治療或預防發炎性疾病之組合物
	英 文	COMPOSITIONS FOR TREATING OR PREVENTING INFLAMMATORY DISEASES
二、發明人 創作	姓 名	威廉 L. 漢特
	國 籍	加拿大
	住、居所	加拿大英屬哥倫比亞區溫哥華番亭頓街525號
三、申請人	姓 名 (名 稱)	加拿大商安吉泰奇製藥公司
	國 籍	加拿大
	住、居所 (事務所)	加拿大英屬哥倫比亞區溫哥華瑪利安西北路6660號
	代 表 人 姓 名	

五、發明說明⁽³³⁾修正
補充
本92年7月1日

Bristol. 1987 ; Arshady, J. Controlled Release 17 : 1-22, 1991 ; Pitt. Int. J. Phar. 59 : 173 - 196, 1990 ; Holland et al., J. Controlled Release 4 : 155 - 0180, 1986)。非可生物降解之聚合物代表性實例包括聚(乙烯-醋酸乙烯酯)("EVA")共聚物，矽氧橡膠，丙烯酸系聚合物(聚丙烯酸，聚甲基丙烯酸，聚甲基異丁烯酸，聚烷基氰基丙烯酸)，聚乙烯，聚丙烯，聚醯胺(尼龍6,6)，聚胺甲酸乙酯，聚(酯胺甲酸乙酯類)，聚(醚胺甲酸乙酯類)，聚(酯-尿素)，聚醚類(聚(環氧乙烷)，聚(環氧丙烷)，Pkuronics及聚(丁二醇))，矽氧橡膠及乙烯基聚合物(聚乙烯吡咯啉酮，聚(乙烯醇)，聚(醋酸乙烯酯))。聚合物也可發展，或為陰離子性(如藻酸鹽，鹿角葉膠，羧甲基纖維素及聚(丙烯酸)，或陽離子性(如脫乙醯殼多糖，聚-L-賴胺酸，聚乙烯亞胺，及聚(烯丙基胺))(大體上見，Dunn et al., J. Applied Polymer, Sci, 50 : 353 - 365, 1993 ; Cascone et al., J. Materials Sci. : Materials in Medicine 5 : 770 - 774, 1994 ; Shiraishi, et al., Biol. Pharm. Bull. 16(11) : 1164 - 1168, 1993 ; Thacharodi及Rao, Int'l J. Pharm. 120 : 115-118, 1995 ; Miyazaki et al., Int'l, J. Pharm. 118 : 257-263, 1995)。特佳之聚合載劑包括聚(乙烯-醋酸乙烯酯)，聚(D,L-乳酸)寡聚物及聚合物，聚(L-乳酸)寡聚物及聚合物，聚(乙醇酸)，乳酸及乙醇酸之共聚物，聚(己內酯)，聚(戊內酯)，聚酞類，聚(己內酯)，或聚(乳酸)與聚乙二醇之共聚物(如MePEG)，及其拌合物。

四、中文發明摘要(發明之名稱：治療或預防發炎性疾病之組合物：)

本發明提出治療或預防發炎疾病之組合物，如牛皮癬或多發性硬化，此組合物包括抗-微小管作用物，其類似物或衍生物。

英文發明摘要(發明之名稱：)
COMPOSITIONS FOR TREATING OR PREVENTING
INFLAMMATORY DISEASES

The present invention provides compositions for treating or preventing inflammatory diseases such as psoriasis or multiple sclerosis, comprising an anti-microtubule agent, or analogue or derivative thereof.

六、申請專利範圍
公告本

補充 192 年 7 月 2 日

1. 一種治療或預防牛皮癬的醫藥組合物，其包括治療有效劑量之抗-微小管作用物及聚合物載劑，其中該抗-微小管作用物是paclitaxel，或其類似物或衍生物。
2. 根據申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中該組合物係局部投予。
3. 根據申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中該組合物係皮膚內投予。
4. 根據申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中該組合物係全身投予。
5. 根據申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中該聚合物形成微球。
6. 根據申請專利範圍第5項之醫藥組合物，其中該微球形成為具有0.5至200微米間之平均大小。
7. 根據申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中該聚合物載劑是乳酸及乙醇酸之共聚物。
8. 根據申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中該聚合物載劑包括聚(己內酯)。
9. 根據申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中該聚合物載劑包括聚(乳酸)。
10. 根據申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中該聚合物載劑是聚(乳酸)及聚(己內酯)之共聚物。
11. 根據申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中該聚合物載劑包括聚乙炔乙二醇。
12. 根據申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中該聚合物載劑包括乙炔醋酸乙炔酯。
13. 根據申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中該聚合物

六、申請專利範圍

載劑係二嵌段或三嵌段共聚物。

14. 根據申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中該聚合物載劑包括胺甲酸乙酯。
15. 根據申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中該聚合物載劑包括纖維素。
16. 根據申請專利範圍第15項之醫藥組合物，其中該纖維素包括乙基羥乙基纖維素。
17. 一種治療或預防牛皮癬的醫藥組合物，其包括治療有效劑量之抗-微小管作用物及穿透增強劑，其中該抗-微小管作用物是paclitaxel，或其類似物或衍生物。
18. 根據申請專利範圍第17項之醫藥組合物，其中該穿透增強劑包括肉豆蔻酸異丙酯。
19. 根據申請專利範圍第17項之醫藥組合物，其中該穿透增強劑包括Transcutol[®]。
20. 一種治療或預防牛皮癬的醫藥組合物，其包括治療有效劑量之抗-微小管作用物及乙二醇，其中該抗-微小管作用物是paclitaxel，或其類似物或衍生物。
21. 根據申請專利範圍第20項之醫藥組合物，其中該乙二醇是乙烯乙二醇或乙氧基二乙二醇。
22. 根據申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中該paclitaxel，或其類似物或衍生物包括該組合物之0.1%至1%重量比。
23. 根據申請專利範圍第1至22項中任一項之醫藥組合物，其中該paclitaxel，或其類似物或衍生物是paclitaxel。