

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：95128515

※申請日期：95-10-19

※IPC 分類：

A61K 37/12 (2006.01)

A61L 27/60 (2006.01)

A61P 1/02 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

象牙質-齒髓複合物再生治療劑

THERAPEUTIC AGENT FOR USE IN REGENERATING DENTIN- DENTAL PULP
COMPOSITE

二、申請人：(共2人)

姓名或名稱：(中文/英文)

1. 國立大學法人大阪大學 / OSAKA UNIVERSITY
2. 科研製藥股份有限公司 / KAKEN PHARMACEUTICAL CO., LTD.

代表人：(中文/英文)

1. 宮原秀夫 / MIYAHARA, HIDEO
2. 乾四朗 / INUI, SHIRO

住居所或營業所地址：(中文/英文)

1. 日本國大阪府吹田市山田丘1番1號
1-1, Yamadaoka, Suita-shi, Osaka, Japan
2. 日本國東京都文京區本駒込二丁目28番8號
28-8, Honkomagome 2-chome, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan

國籍：(中文/英文) 1. 2. 日本國 / JAPAN

三、發明人：(共2人)

姓名：(中文/英文)

1. 村上伸也 / MURAKAMI, SHINYA
2. 島袋善夫 / SHIMABUKURO, YOSHIO

國籍：(中文/英文) 1. 2. 日本國 / JAPAN

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 日本國；2005 年 10 月 19 日；特願 2005-305076（主張優先權）

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於象牙質-齒髓複合物之再生治療劑，其可用於進行性蛀牙等之齒髓保存治療。

【先前技術】

蛀牙係由轉糖鏈球菌(*Streptococcus mutans*)及遠緣鏈球菌(*Streptococcus sobrinus*)等口內之產酸菌所引起之感染症之一，其為由於脫鈣與復鈣化間失去平衡而造成牙齒之實質缺損。目前，蛀牙範圍超越象牙質而達齒髓之牙齒之治療方法係採用將作為覆髓劑之氫氧化鈣製劑塗布於露出之齒髓，然後充填牙科用膠泥(cement)等之方法。但是，在該方法中，與氫氧化鈣相接之齒髓面產生壞死層，受到損傷之齒髓組織不會再生，而僅是在壞死層下方形成極少數第三象牙質(Tertiary dentin)。

象牙質及齒髓雖同為來自於間葉系幹細胞之組織，但前者為硬組織，後者為軟組織，因此向來被當做獨立的組織來處理。從近年的研究認知到該二者在發生學及機能上皆為統合的組織，因而將該二者總稱為「象牙質-齒髓複合物」。已知齒髓內之象牙母細胞(odontoblast)，其突起伸入象牙質之象牙細管而擔任外來刺激之感應器之角色，因此，象牙質-齒髓複合物之生理形態及機能與牙齒之生存有很大關係。基於此，如上述目前治療方法之預後實際上不佳。

鹼性纖維母細胞增殖因子(亦稱為鹼性纖維母細胞生

長因子，以下有時簡稱為 bFGF)係已經確認存在於腦下垂體、腦、網膜、黃體、腎上腺、腎、胎盤、前列腺、胸腺、軟骨肉瘤及巨噬細胞中之胜肽性細胞增殖因子(日本組織培養學會編，「細胞成長因子 Part II」，朝倉書店，1987年，第 15-20 頁)。鹼性纖維母細胞增殖因子係由於當初在 BALB/c3T3 細胞等纖維母細胞中顯示強增殖作用而被命名(D. Gospodarowicz, Nature, vol. 249, p.123(1974))，不過隨後已明白其會促進來自中胚葉之大部分細胞，尤其是血管內皮細胞之增殖(D. Gospodarowicz, National Cancer Institute Monograph, vol. 48, p.109(1978))，亦可促進骨骼肌之衛星細胞之增殖(R. E. Allen, Experimental Cell Research, vol. 152, p.154(1984))。近年來，亦進行有鹼性纖維母細胞增殖因子在臨床上應用於創傷治療、或鹼性纖維母細胞增殖因子應用於使用血管新生作用之血管修復等。

鹼性纖維母細胞增殖因子在試管中會誘導齒髓細胞之增殖，更具有調節齒髓細胞分化為象牙母細胞之調節作用(M. Nakashima, Archs Oral Biol., vol. 37(3), p.231-236(1992)及 K. Nakao, Biochem Biophys Res Commun, vol. 325, p.1052-1059(2004))；在活體中，TGF- β 1 雖對於修復象牙質之形成發揮明顯的效果，但就鹼性纖維母細胞增殖因子而言，未見到效果(D. Tziafas, Archs Oral Biol., vol. 43, p.431-444(1998)及 C.-C. Hu, J. Endodontics, vol. 24(11), p.744-751(1998))。

舉例言之，關於鹼性纖維母細胞增殖因子製劑，在國際公開第 94/27630 號公報中記載在治療骨疾病上有用之含有鹼性纖維母細胞增殖因子之交聯明膠凝膠製劑，在日本專利特開平 7-233085 號公報中記載鹼性纖維母細胞增殖因子及/或其同系物具有優異的軟骨組織新生或再生之促進效果，在軟骨組織修復上為有用。在日本專利特開平 7-17876 號公報中揭示含有鹼性纖維母細胞增殖因子及/或其同系物之牙周病治療劑。再者，在國際公開第 03/082321 號公報中揭示在牙周病之處置上有用之含有鹼性纖維母細胞增殖因子及/或其同系物之牙科用黏稠製劑。在日本專利特開平 7-17876 號公報中揭示之牙周病治療劑被期待可應用於蛀牙造成之缺損象牙質之再生(日本專利特開平 7-17876 號公報說明書段落[0035])。然而，在日本專利特開平 7-17876 號公報中對於起因於轉糖鏈球菌等產酸菌之蛀牙、以及咀嚼磨損或外傷所引起之齒質實質缺損之治療，並無任何明示或暗示，因此期望開發能根本治療起因於產酸菌之蛀牙、或是咀嚼磨損或外傷所引起之齒質實質缺損。

【發明內容】

本發明之目的係提供一種作用在存在於齒髓組織中之未分化間葉系幹細胞及象牙母細胞而可積極地再構築象牙質-齒髓複合物之藥劑。

本發明者等鑑於上述課題深入地檢討，結果發現藉由將鹼性纖維母細胞增殖因子投予至因蛀牙等而失去象牙質

-齒髓複合物之缺損部分或象牙質之缺損部分，不僅可誘導齒髓細胞之增殖，使齒髓組織再生，而且可使象牙母細胞之增殖及分化誘導加以活性化而新生新的象牙質，藉此可再構築具有原本機能之象牙質-齒髓複合物，於是完成本發明。

亦即，本發明提供下列項目：

[1] 一種象牙質-齒髓複合物之再生治療劑，係含有鹼性纖維母細胞增殖因子及/或其同系物以作為有效成分；

[2] 如上述[1]之再生治療劑，其中，鹼性纖維母細胞增殖因子係人類鹼性纖維母細胞增殖因子；

[3] 如上述[1]之再生治療劑，其係更含有載體(carrier)；

[4] 如上述[3]之再生治療劑，其中，載體係羥丙基纖維素或交聯明膠凝膠；

[5] 如上述[1]至[4]中任一項之再生治療劑，係使用於治療具有蛀牙、咀嚼磨損或外傷所造成之齒質實質缺損之牙齒；

[6] 如上述[5]之再生治療劑，其中，蛀牙係呈進行至齒髓之狀態；

[7] 一種鹼性纖維母細胞增殖因子及/或其同系物之用途，係用於製造如上述[1]至[6]中任一項之再生治療劑；

[8] 一種商業包裝物，係包含如上述[1]至[6]中任一項之再生治療劑以及有關該治療劑之記載物，該記載物記載「可將或應將該治療劑使用於象牙質-齒髓複合物之再生治療」；

[9] 一種象牙質-齒髓複合物之再生方法，包含將如上述[1]至[6]中任一項之再生治療劑投予至需要該再生治療劑之對象之步驟；

[10] 一種覆髓劑，係含有鹼性纖維母細胞增殖因子及/或其同系物以作為有效成分；

[11] 一種鹼性纖維母細胞增殖因子及/或其同系物之用途，係使用於製造如上述[10]之覆髓劑；

[12] 一種商業包裝物，係包含如上述[10]之覆髓劑以及有關該覆髓劑之記載物，該記載物記載「可將或應將該覆髓劑用於直接或間接覆髓」；

[13] 一種直接或間接的覆髓方法，係包含將如上述[10]之覆髓劑投予至需要該覆髓劑之對象之步驟。

【實施方式】

本發明係提供一種象牙質-齒髓複合物之再生治療劑，其含有鹼性纖維母細胞增殖因子及/或其同系物以作為有效成分。

在本發明中所謂象牙質-齒髓複合物係指可產生象牙質之齒髓組織及內包齒髓組織之象牙質兩者成為同一機能性單位時之複合結構物。

在本發明中所謂「再生治療」係指伴隨因蛀牙或咀嚼磨損而缺損之象牙質及象牙質-齒髓複合物之再生之治療形態。

鹼性纖維母細胞增殖因子(bFGF 或 FGF-2，以下簡稱為bFGF)以及其同系物係藉由從天然存在者或將經由基因重

組技術從微生物或培養細胞所產生者加以分離精製，或者將該等予以化學修飾或生物修飾而得到。

天然的 bFGF 例如為來自哺乳動物者。關於哺乳動物，可列舉人、猴、狗、豬、羊、牛、馬等。bFGF 可藉由公知之方法從此等哺乳動物得到，又，可使用市售者。本發明所用之 bFGF 特別以人類 bFGF 或其同系物為較佳。

在本發明之再生治療劑中，可使用 bFGF 之同系物作為有效成分。其中，所謂 bFGF 之同系物意指下述 [I] 或 [II] 之多肽。

[I] 由與在特定哺乳動物中所產生之 bFGF 實質上為相同之胺基酸序列所構成之多肽。所謂實質上為相同的胺基酸序列意指胺基酸序列中之 1 至 6 個胺基酸經他種胺基酸置換且具有 bFGF 之生物活性者。

[II] 在特定哺乳動物中所產生之 bFGF 之 N 末端及/或 C 末端，或者上述 [I] 之多肽之 N 末端及/或 C 末端加入追加的胺基酸片段所成之多肽。追加的胺基酸片段意指由 1 至 12 個胺基酸構成且無損於 bFGF 之生物活性或上述 [I] 之多肽之生物活性者。

人類 bFGF 為具 146 個胺基酸之多肽；在本發明之再生治療劑中，關於人類 bFGF 之同系物(上述 [I] 之同系物)，可使用例如日本專利特表平 2-504468 號公報中記載之具 146 個胺基酸之多肽。該多肽係人類 bFGF 之胺基酸序列之 69 位半胱胺酸(Cys)及 87 位半胱胺酸(Cys)分別經絲胺酸置換而成者。

又，關於上述[II]之同系物，可使用例如日本專利特表昭 63-500843 號公報中記載之具 155 個胺基酸之多肽。該多肽係於人類 bFGF 之 N 末端附加具 9 個胺基酸之片段而成者。

再者，亦可使用於 N 末端附加甲硫胺酸(Met)之具 147 個胺基酸之多肽，或日本專利特表昭 63-501953 號公報中記載之於 N 末端附加含 11 個胺基酸之片段之具 157 個胺基酸之多肽。

● 特佳之 bFGF，例如為曲弗明(Trafermin)(基因重組)。

在本發明之再生治療劑中，可使用單一種類之 bFGF，亦可將複數種併用。再者，如上述，bFGF 之同系物有複數種，此等同系物可分別單獨使用，亦可併用。

● 又，由於在身體中 bFGF 之存在量為極微量，加上為了在商業上安定地供給本發明之再生治療劑，因此以使用藉由基因重組技術在大腸菌等微生物或培養細胞中所產生之 bFGF 或其同系物為特佳。將用以產生 bFGF 或其同系物(此情況一般為上述[I]之多肽)之基因引進微生物或培養細胞中時，由該微生物或培養細胞所產生者，一般而言，係在 bFGF 之 N 末端及/或 C 末端，或者在上述[I]之多肽之 N 末端及/或 C 末端，附加有追加之胺基酸片段者，亦即為上述[II]之多肽。

本發明之再生治療劑，可依照通常之製劑技術，將 bFGF 及/或其同系物與醫藥上容許之載體(carrier)，例如溶劑、等張化劑、乳化劑、懸浮劑、安定化劑、增黏劑、

齒科領域所使用之充填劑等合用，製成黏稠製劑、凝膠劑、液劑、軟膏劑、乳劑、注入劑、貼布劑、注射劑、粉劑等。再者，可與支架材料(scaffold)組合使用。本發明之再生治療劑，具體而言，例如以黏稠製劑及凝膠劑為宜。以下，對於各個分別詳述。

當本發明之再生治療劑為黏稠製劑時(以下亦稱為本發明之黏稠製劑)，本發明之黏稠製劑所含之 bFGF 及/或其同系物之濃度只要可誘導象牙質-齒髓複合物之再生，並無特殊限定，例如，相對於黏稠製劑之總重量，通常為 0.0001 至 20 重量%，以 0.001 至 10 重量%為較佳，以 0.01 至 1 重量%為更佳，以 0.05 至 0.5 重量%為特佳。

本發明之黏稠製劑，以於 25℃ 使用 E 型黏度計測定時顯示約 20 至 25,000 mPa·s 之黏度之製劑為較佳，以約 1,000 至 20,000mPa·s 為更佳，以 3,000 至 15,000mPa·s 之黏度為特佳。若黏度在該範圍內，從投予後之局部貯留性觀點而言為較佳。

該黏度調整可藉由添加一般之增黏劑而進行。

關於增黏劑，若為製成溶液時只要可呈現例如上述之黏度(約 20 至 25,000mPa·s)、對於 bFGF 之安定性無不良影響且為藥學上容許之增黏劑，則可使用任意濃度之任意增黏劑。具體而言，可使用羥丙基纖維素、褐藻酸鈉、褐藻酸丙二醇酯、羧乙烯基聚合物、羧甲基纖維素鈉、透明質酸、透明質酸鈉、羥乙基纖維素、羥乙基甲基纖維素、羥丙基甲基纖維素、聚丙烯酸、聚丙烯酸鈉、聚丙烯酸部

分中和物、聚乙烯醇、甲基纖維素、黃原膠、軟骨素酸及軟骨素硫酸鈉。其中，若考慮對於 bFGF 之安定性之影響，以使用羥丙基纖維素(HPC)、透明質酸鈉、黃原膠及軟骨素硫酸鈉為較佳，尤其以羥丙基纖維素為特佳。

此等增黏劑之外，亦可使用阿拉伯膠、阿拉伯膠粉末、古亞膠(guar gum)、葡萄糖酸- δ -內酯、明膠、葡聚糖 70、糊精(dextrin)、黃蓍膠、黃蓍膠粉末、聚維酮(Povidone)、澱粉糖漿、松香、聚氧伸乙基(160)聚氧伸丙基(30)二醇、聚氧伸乙基(200)聚氧伸丙基(70)二醇及甲基乙烯基醚與馬來酸酐之共聚物等增黏劑。

本發明之黏稠製劑，係藉由例如國際公開第 03/082321 號公報記載之方法來調製。

上述羥丙基纖維素(HPC)較佳為纖維素之羥基丙基醚衍生物，定量經乾燥者時以含有 53.44 至 77.5%之羥丙基者(日本藥局方第 14 次修正版)為較佳。HPC 若溶於水則形成黏稠性液體；在製成水溶液之情況，於 25°C 使用 E 型黏度計測定時只要是呈現約 20 至 25,000mPa·s 之黏度之 HPC，則可以呈現上述黏度之濃度而使用任意分子量之 HPC。但是以使用於低濃度下呈現高增黏性且分子量約 100,000 至 500,000 者為較佳，以分子量為約 110,000 至 400,000 者為更佳。例如，在使用分子量約 110,000 至 150,000 之 HPC 時，可使用日本曹達股份公司製之 HPC-M，其用量以相對於本發明黏稠製劑總量之比例計，較佳為約 2 至 18 重量%，更佳為約 3 至 10 重量%。又，使用分子量

約 250,000 至 400,000 之 HPC 時，可使用日本曹達股份公司製之 HPC-H，其用量以相對於本發明黏稠製劑總重之比例計，較佳為約 1 至 9 重量%，更佳為約 2 至 6 重量%。在可達成上述黏度之範圍內，可將不同分子量之 HPC 適當地混合使用。

本發明之黏稠製劑可藉由在 bFGF 及/或其同系物中調配入上述增黏劑，溶解於溶解液，形成具有所規定黏度之溶液而調製。bFGF 及/或其同系物相對於本發明黏稠製劑總量之比例，如上述，為 0.0001 至 20 重量%，因而以成為上述比例之方式調配入 bFGF 及/或其同系物。又，較佳以使用水作為溶解液。增黏劑相對於本發明黏稠製劑總量之使用比率雖隨所用增黏劑之種類而異，但在溶液之狀態，可在呈現約 20 至 25,000 mPa·s 之黏度(E 型黏度計)之範圍內決定。例如，使用分子量約 110,000 至 150,000 之 HPC 作為增黏劑時，將增黏劑以成為約 2 至 18 重量%之比例，較佳成為約 3 至 10 重量%之比例溶解於溶解液中。又，使用分子量約 250,000 至 400,000 之 HPC 時，將增黏劑以成為約 1 至 9 重量%之比例，較佳成為約 2 至 6 重量%之比例溶解於溶解液中。

當本發明之再生治療劑為凝膠劑時(以下亦稱為本發明之凝膠劑)，本發明之凝膠劑以含有作為載體之明膠為較佳。

上述之明膠係在身體內可分解吸收之天然高分子，由於身體適應性優異，對於身體之刺激性小，所以作為緩釋

性載體亦佳。一般而言，由於明膠為水溶性，因此以使其成為不溶於水者為較佳。具體而言，以使用將明膠交聯處理成為水不溶性之交聯明膠凝膠為較佳。

成為交聯明膠凝膠之原料的明膠，無特殊限制，可為通常可獲得者。關於此等明膠，雖可列舉例如等電點 5 附近之經鹼處理之明膠(酸性明膠)、等電點 9 附近之經酸處理之明膠(鹼性明膠)等，但從與 bFGF 之親和性觀點而言，以等電點 5 附近之酸性明膠為較佳。明膠不只一種，可將原料或溶解性、分子量、等電點等物性不同者適當混合而使用。

用以將明膠交聯之交聯劑，只要是對於身體毒性為低者並無特殊限制，但以例如戊二醛、1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳化二亞胺鹽酸鹽或 1-環己基-3-(2-(N-嗎啉基乙基)碳化二亞胺-甲基-對甲苯磺酸鹽等水溶性碳化二亞胺、雙環氧化合物及福馬林等為較佳；以戊二醛及 1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳化二亞胺鹽酸鹽為特佳。

明膠可藉由熱處理或是紫外線照射或電子線照射而交聯。

載體係交聯明膠時，本發明之凝膠劑可藉由例如國際公開第 94/27630 號公報記載之方法調製。

本發明之凝膠劑所用之交聯明膠凝膠之形狀無特殊限制，例如為圓柱狀、角柱狀、片狀、盤狀、球狀、粒子狀、粒狀、糊狀等。在作為可注入之製劑時，以球狀、粒子狀、粒狀或糊狀者為較佳。

圓柱狀、角柱狀、片狀、盤狀之交聯明膠凝膠可藉由在明膠水溶液中添加交聯劑水溶液，或在交聯劑水溶液中添加明膠，然後流入期望形狀之鑄型，進行交聯反應而調製。又，可在已成形之明膠凝膠原樣中，或於乾燥後添加交聯劑水溶液。為了停止交聯反應，可與乙醇胺、甘胺酸等具有胺基之低分子物質接觸，或者添加 pH2.5 以下之水溶液。將所得到之交聯明膠凝膠以蒸餾水、乙醇、2-丙醇（以下稱為 IPA）、丙酮等洗淨，供凝膠劑調製用。

● 得到之交聯明膠凝膠之含水率為 50 至 99w/w%。其中，所謂之凝膠含水率表示相對於濕潤時凝膠之總重，凝膠中水分重量之比例。

糊狀交聯明膠凝膠可用與上述圓柱狀、角柱狀、片狀或盤狀之交聯明膠凝膠之調製方法為類似之方法調製。

交聯反應條件雖可適當地選擇，但以反應溫度為 0 至 40℃，反應時間為 1 至 48 小時為較佳。

● 如上述而得到之交聯明膠凝膠亦可予以減壓乾燥或凍結乾燥。

凍結乾燥，例如藉由將交聯明膠凝膠加入蒸餾水中，然後於液態氮中凍結 30 分鐘以上或於 -80℃ 凍結 1 小時以上後，在凍結乾燥機中乾燥 1 至 3 日而進行。

調製交聯明膠凝膠時，明膠與交聯劑之濃度雖可依據期望之含水率而適當地選擇，但以明膠濃度為 1 至 100 w/v%，交聯劑濃度為 0.01 至 100w/v%(相當於 1 至 5400mM)為較佳。

交聯明膠凝膠可藉由改變原料明膠及交聯劑之濃度而達到期望之含水率。為了提高含水率，可將明膠濃度及交聯劑濃度同時降低；相反地為了降低含水率，可同時提高明膠濃度及交聯劑濃度。

為了使 bFGF 負載在如上述所調製之交聯明膠凝膠中，使 bFGF 滴入並浸滲於交聯明膠凝膠，或使交聯明膠凝膠懸浮於 bFGF 水溶液並使其再膨潤。

可負載於交聯明膠凝膠之 bFGF 之量，隨著交聯明膠凝膠之含水率而異，一般而言，1 mg 交聯明膠凝膠可負載 0.1 至 500 μ g。

再者，緩釋期間，bFGF 之釋出量等隨著交聯明膠凝膠之含水率、所用明膠之等電點等物性、製劑所負載之 bFGF 之量、所投予之部位等各種條件而異。

如上述所得到之本發明凝膠劑亦可予以凍結乾燥。在予以凍結乾燥時，例如藉由於液態氮中凍結 30 分鐘以上或於 -80°C 凍結 1 小時以上後，在凍結乾燥機中乾燥 1 至 3 日而進行。

將本發明之凝膠劑製成可注射製劑時，可適當地懸浮於注射用精製水、生理食鹽水、緩衝液等媒介。關於緩衝液，可列舉磷酸緩衝液、醋酸緩衝液、檸檬酸緩衝液等。再者，需要時可適當地調配入製造可注射製劑時所通常使用之分散劑、界面活性劑、等張化劑、pH 調整劑、無痛化劑、安定劑、保存劑、著色劑等。

藉由在本發明之再生治療劑中含有載體，可使 bFGF

及/或其同系物被安定地保持，可定量且均一地塗布低含量之 bFGF 及/或其同系物，而製成局部貯留性優異之製劑。

本發明之再生治療劑具有優異的象牙質-齒髓複合物再生作用，可適用於治療具有因蛀牙、咀嚼磨損或外傷等所引起之齒質實質缺損之牙齒，甚至蛀牙進行至齒髓之重度齲齒的治療。又，本發明之再生治療劑不僅適用於人類，亦可適用於其他哺乳動物(例如小鼠、大鼠、倉鼠、兔子、貓、狗、牛、羊、猴子等)之象牙質-齒髓複合物再生治療。

藉由本發明之再生治療劑所再生之象牙質-齒髓複合物，與採用氫氧化鈣製劑等既存藥劑之象牙質-齒髓相比，更為接近生理形態。又，藉由本發明之再生治療劑所再生之象牙質-齒髓複合物，與採用氫氧化鈣製劑等既存藥劑之象牙質-齒髓相比，以更接近生理機能而為較佳。

所謂「生理形態」意指天生之象牙質-齒髓複合物所具有之形態。具體而言，藉由本發明之再生治療劑而再生之象牙質-齒髓複合物，係象牙質位於蛀牙窩洞側，齒髓位於先天之齒髓側，且象牙母細胞之突起伸向象牙質方向之複合物。所謂「生理機能」係指天生之象牙質-齒髓複合物所具有之機能。具體而言，係構成內襯琺瑯質而可抵抗咬合力之牙齒，同時於蛀牙、咀嚼磨損時作為施加於牙齒之機械性刺激或化學性刺激之感應器之機能。由於已知在天生之象牙質-齒髓複合物中，齒髓內之象牙母細胞之突起伸長至象牙質之象牙細管中，擔任外來刺激之感應器之角色，因此具有該形態之由本發明之再生治療劑所再生之象牙質

-齒髓複合物亦可具有天生之象牙質-齒髓複合物所具有之機能。再者，雖然已知藉由氫氧化鈣製劑亦可形成一些象牙質，但該再生止於齒髓內之第三象牙質，無法構成象牙質-齒髓複合物之生理形態。

又，本發明提供一種象牙質-齒髓複合物之再生方法，該再生方法包含將本發明之再生治療劑投予至需要該再生治療劑之對象的步驟。其中，所謂「需要該再生治療劑之對象」係指具有蛀牙、咀嚼磨損或外傷等所引起之齒質實質缺損之牙齒，甚至具有蛀牙進行至齒髓之重度齲齒的對象。該等對象不僅包含人類，亦包含其他哺乳動物(例如小鼠、大鼠、倉鼠、兔子、貓、狗、牛、羊、猴子等)。

本發明之再生治療劑之投予方法雖無特殊限定，但以局部投予至露髓面或象牙質缺損底部為較佳。例如列舉以附有20至24G大小之注射針的注射筒取出適量之本發明之再生治療劑，投予至露髓面或象牙質缺損底部之方法等。亦可將本發明之再生治療劑預先充填於如簡易型注射器具之套組製品之貯存部分而進行投予。

本發明之再生治療劑之投予量雖可隨著對象、疾病嚴重程度、對象之體重或年齡等而適當地變更，但一般而言，在人類之情況，為填滿露髓面或象牙質缺損底部之量。投予次數雖亦視病例、每次處理之投予量而定，但通常為約1至2次。

再者，本發明提供包含本發明之再生治療劑及記載物之商業包裝物。該記載物記載「可將或應將本發明之再生

治療劑使用於象牙質-齒髓複合物之再生治療」。

將本發明之再生治療劑投予至象牙質-齒髓複合物之缺損部分或象牙質之缺損部分時，如後述之實施例 1 所示，引發如覆蓋缺損部分之硬組織之形成及顯著的血管新生。又，如實施例 2 所示，投予至未伴隨露髓之象牙質缺損部分時，引起保持象牙質-齒髓複合物形態之象牙質之新生(第三象牙質)。因此本發明提供一種覆髓劑，其含有鹼性纖維母細胞增殖因子及/或其同系物以作為有效成分。

其中，所謂「覆髓」意指直接覆髓及間接覆髓。所謂「直接覆髓」係指保護露髓之非感染性齒髓及促進齒髓之硬組織形成能力，以圖閉鎖露出部分，而「間接覆髓」係指將由於因深層性蛀牙等使象牙質軟化及形成窩洞而變薄之健康窩底象牙質加以被覆，以保護齒髓免受物理化學的刺激或感染，並進而促進修復象牙質(第三象牙質)之形成。

本發明之覆髓劑中所含之作為有效成分之 bFGF 及/或其同系物，可使用與本發明之再生治療劑相同者。

本發明之覆髓劑中所含之 bFGF 及/或其同系物之濃度雖無特殊限定，但相對於覆髓劑之總重量，通常為 0.0001 至 20 重量%，以 0.001 至 10 重量%為較佳，以 0.01 至 1 重量%為更佳，以 0.05 至 0.5 重量%為特佳。

本發明之覆髓劑，與以往所用之氫氧化鈣製劑相比，具有將更接近生理形態及機能之象牙質-齒髓複合物加以再生之優異作用，因而適合用於作為覆髓劑，以保護具有因象牙質-齒髓複合物之蛀蝕、咀嚼磨損或外傷等所引起之

齒質實質缺損之牙齒之齒髓。

再者，本發明提供一種直接或間接覆髓之方法，該方法包含將本發明之覆髓劑投予至需要該覆髓劑之對象的步驟。關於對象及投予方法等，可列舉與本發明之再生治療劑相同者。

本發明之覆髓劑之投予量，雖隨著對象、疾病嚴重程度、對象之體重或年齡等而可適當地變更，但一般而言，在人類的情況，為填滿露髓面或象牙質缺損底部之量。投予量雖隨病例、每次處置之投予量而定，但通常為約 1 至 2 次。

再者，本發明提供一種包含本發明之覆髓劑及記載物之商業包裝物。在該記載物中記載「可將或應將本發明之覆髓劑使用於直接或間接覆髓」。

在本說明書中所列舉之包含專利說明書之所有刊物中所記載之內容，在本說明書中藉由引用之方式，以與其全文所明示者相同之程度納入本說明書中。

實施例

以下雖使用實施例詳述本發明，但本發明不受以下實施例所限。

實施例 1

(方法)

將以羥丙基纖維素(HPC;日本曹達股份公司製)作為基劑且含 0.089 重量%之 bFGF (科研製藥股份公司製)的標準品、或是以交聯明膠凝膠作為基劑且含 0.4 重量%之 bFGF

(科研製藥股份公司製)的標準品、及以交聯明膠凝膠作為基劑且含有 Dycal($\text{Ca}(\text{OH})_2$ 製劑; Calk 製)的標準品供應實驗。再者, 標準品係藉由國際公開第 03/082321 號公報及國際公開第 94/27630 號公報記載之方法調製。

在動物實驗中, 使用 1 歲之雌米格魯犬(Beagle dog)。在克太拉(ketalar)及戊巴比妥鈉(nembutal)之靜脈內麻醉下, 用鑽石棒在上下顎之犬齒唇面形成窩洞, 並用 1/2 圓棒穿孔入齒髓, 以使之露髓。以生理食鹽水洗淨、止血, 乾燥後將標準品添加於露髓面, 窩洞於底塗・黏結處理後, 用光聚合型樹脂進行充填。未處理或只使用基劑者做為陰性對照組。處置後之動物用一般食物飼育, 於 1 個月後進行拔牙。將拔去之牙齒以緩衝之 4%三聚甲醛溶液固定, 以甲酸・檸檬酸鈉脫鈣液脫鈣後, 依照通常之方法製作組織切片並施行 HE 染色, 然後檢討在病理組織學上 bFGF 使象牙質-齒髓複合物再生之效果。

(結果)

使用以交聯明膠凝膠作為基劑之標準品, 檢討 bFGF 對於象牙質形成之影響(第 1 圖)。檢討係以第三象牙質之形成做為指標, 分 5 階段進行(-: 未見到第三象牙質形成者; ±: 幾乎未見到第三象牙質形成者; +: 見到少量第三象牙質形成者; 2+: 見到中等量第三象牙質形成者; 3+: 見到顯著量第三象牙質形成者。未處理時, 雖然在 45%受試者中見到第三象牙質之形成, 但其形成程度幾乎皆為+之程度。又, 用 Dycal 處理時, 只有 21.4%見到第三象牙

質之形成。但是用 bFGF 處理時，有 50% 形成新生象牙質，且全為 2+ 或 3+，可見象牙質的形成顯著。由以上可知，藉由 bFGF 處理，第三象牙質之形成有清晰可見之傾向。再者，使用 HPC 作為基劑時，亦得到同樣的結果（未揭示數據）。

使用以交聯明膠凝膠作為基劑之標準品，用光學顯微鏡 ($\times 20$) 觀察象牙質-齒髓複合物之再生（第 2 圖）。未處理時，未觀察到硬組織形成且在齒髓組織中觀察到血管擴張（第 2 圖 (A)）。只用交聯明膠凝膠處理時，觀察到少量硬組織形成及血管擴張（第 2 圖 (B)）。用 bFGF 處理時，觀察到如覆蓋缺損部分之方式而形成硬組織及顯著的血管新生。又，觀察到顯著的象牙質硬組織之形成，以及觀察到伴隨著一部分硬組織之形成，豐富的結締組織形成直至缺損象牙質深層部分（第 2 圖 (C)）。靠近新生象牙質處觀察到與正常像幾乎相同的象牙母細胞狀細胞之配列，可見到生理性的象牙質-齒髓複合物之再生。用 Dycal 處理時，雖然觀察到少量硬組織形成，但在面對缺損部分之齒髓組織中觀察到血管擴張及顯著的細胞浸潤，而呈現嚴重的炎症現象（第 2 圖 (D)）。再者，使用 HPC 作為基劑時，亦得到相同的結果（未揭示數據）。

使用以交聯明膠凝膠作為基劑之標準品，用高倍率光學顯微鏡觀察象牙質-齒髓複合物之再生（第 3 圖）。用 bFGF 處理時，觀察到硬組織之形成顯著（第 3(A) 圖）($\times 40$)，且分化成象牙質（第 3(B) 圖）($\times 200$)。又，用 Dycal 處理時，

硬組織形成量少(第 3(C)圖($\times 200$))。再者，使用 HPC 作為基劑時，亦得到相同的結果(未揭示數據)。

實施例 2

(方法)

將以羥丙基纖維素(HPC;日本曹達股份公司製)作為基劑且含 0.089 重量%之 bFGF (科研製藥股份公司製)的標準品供應實驗。動物實驗與實施例 1 同樣地進行，形成象牙質缺損時，在未露髓下，將標準品添加至象牙質缺損底部，以檢討未伴隨露髓時 bFGF 使象牙質-齒髓複合物再生之效果。

(結果)

與實施例 1 同樣，縱使未伴隨露髓，藉由 bFGF 處理仍可觀察到保持象牙質-齒髓複合物形態之象牙質之新生(第三象牙質)。

產業上之可利用性

本發明之再生治療劑，具有齒髓細胞之增殖誘導、齒髓組織之再生、象牙母細胞之增殖及分化誘導、象牙質之再生(第三象牙質)作用。在以往再生治癒無望之重度蛀牙治療中，藉由使用本發明之再生治療劑，象牙質-齒髓複合物之再生成為可能，因此可期待回復咀嚼機能或知覺之理想蛀牙治療。藉由本發明之再生治療劑所再生之象牙質-齒髓複合物可維持牙齒之強度、耐蝕性、審美性、接著性等。結果使用本治療劑之方法可劃時代地延長永久齒之壽命。

本發明之再生治療劑由於可再生具有生理形態及/或機能的象牙質-齒髓複合物，因此可成為回復咀嚼機能或知覺之蛀牙治療劑。又，本發明之覆髓劑由於可將接近生理形態及/或機能之象牙質-齒髓複合物加以再生，因此適合作為將具有因蛀牙、咀嚼磨損或外傷等所引起之齒質實質缺損之牙齒之齒髓加以保護之覆髓劑而使用。

本申請案係以在日本所申請之專利申請案 2005-305076(申請日：2005 年 10 月 19 日)為基礎，該案內容全部包含於本案說明書中。

【圖式簡單說明】

第 1 圖係表示 bFGF 對於象牙質形成之影響之圖。-：沒有見到第三象牙質形成者；±：幾乎未見到第三象牙質形成者；+：見到少量第三象牙質形成者；2+：見到中等量第三象牙質形成者；3+：見到顯著第三象牙質形成者。

第 2 圖係在狗齒髓露髓術後之象牙質-齒髓複合物之再生試驗中，(A)無處理、(B)只有交聯明膠凝膠處理、(C)bFGF 處理、(D)Dycal 處理之標本於 HE 染色後之光學顯微鏡照片。

第 3 圖係在狗齒髓露髓術後之象牙質-齒髓複合物之再生試驗中，(A)至(B)bFGF 處理及(C)Dycal 處理之標本於 HE 染色後之高倍率光學顯微鏡照片。(C)之箭頭表示齒髓中所形成之象牙質。

第 4 圖係在未伴隨露髓之狗象牙質缺損部分手術後之象牙質-齒髓複合物之再生試驗中，經 bFGF 處理之標本於

HE 染色後之光學顯微鏡照片。

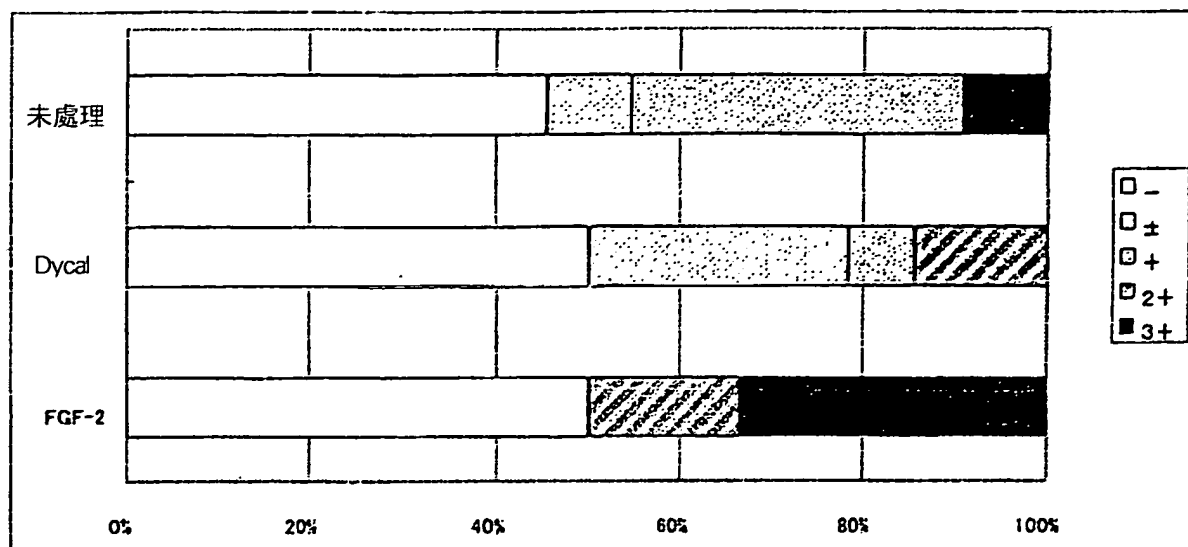
五、中文發明摘要：

本發明係提供一種包含鹼性纖維母細胞增殖因子及/或其同系物以作為有效成分之象牙質-齒髓複合物之再生治療劑。又，本發明亦提供一種包含鹼性纖維母細胞增殖因子及/或其同系物以作為有效成分之覆髓劑。

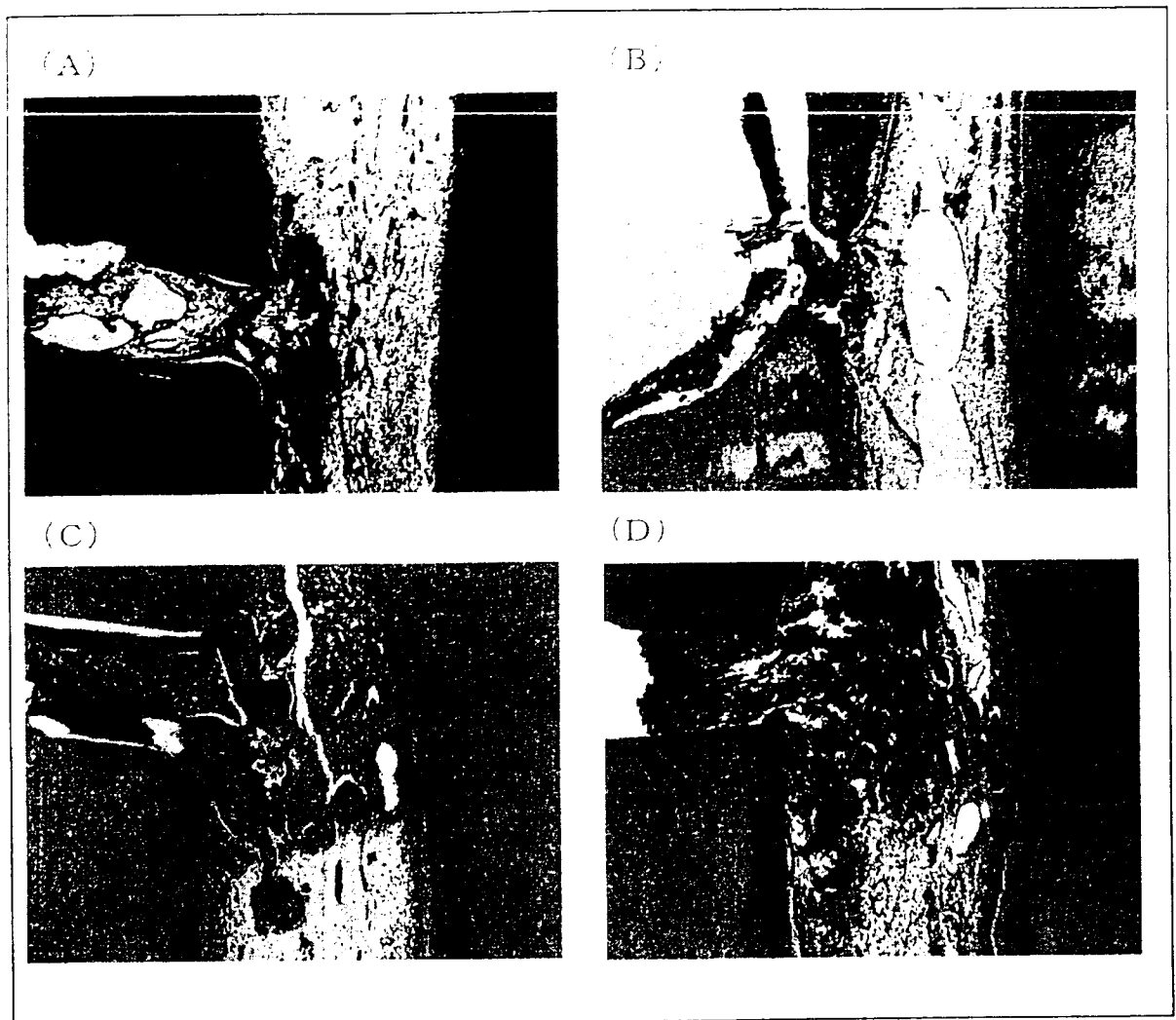
六、英文發明摘要：

The present invention provides a therapeutic agent for use in regenerating dentin-dental pulp composite, comprising a basic fibroblast growth factor and/ or homologues thereof as the active ingredient. The present invention also provides a dental-pulp capping agent, comprising a basic fibroblast growth factor and/ or homologues thereof as the active ingredient.

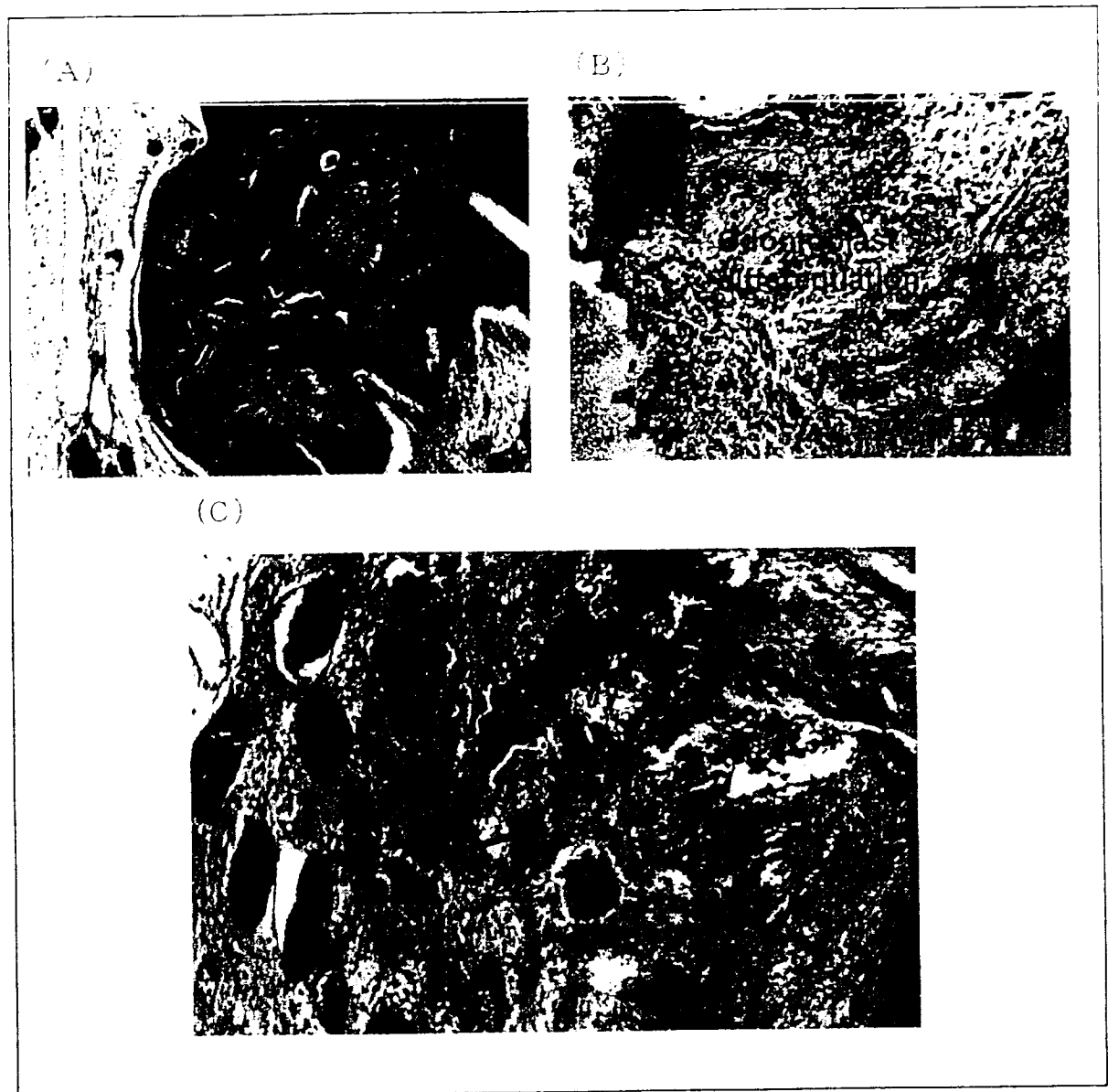
公告本



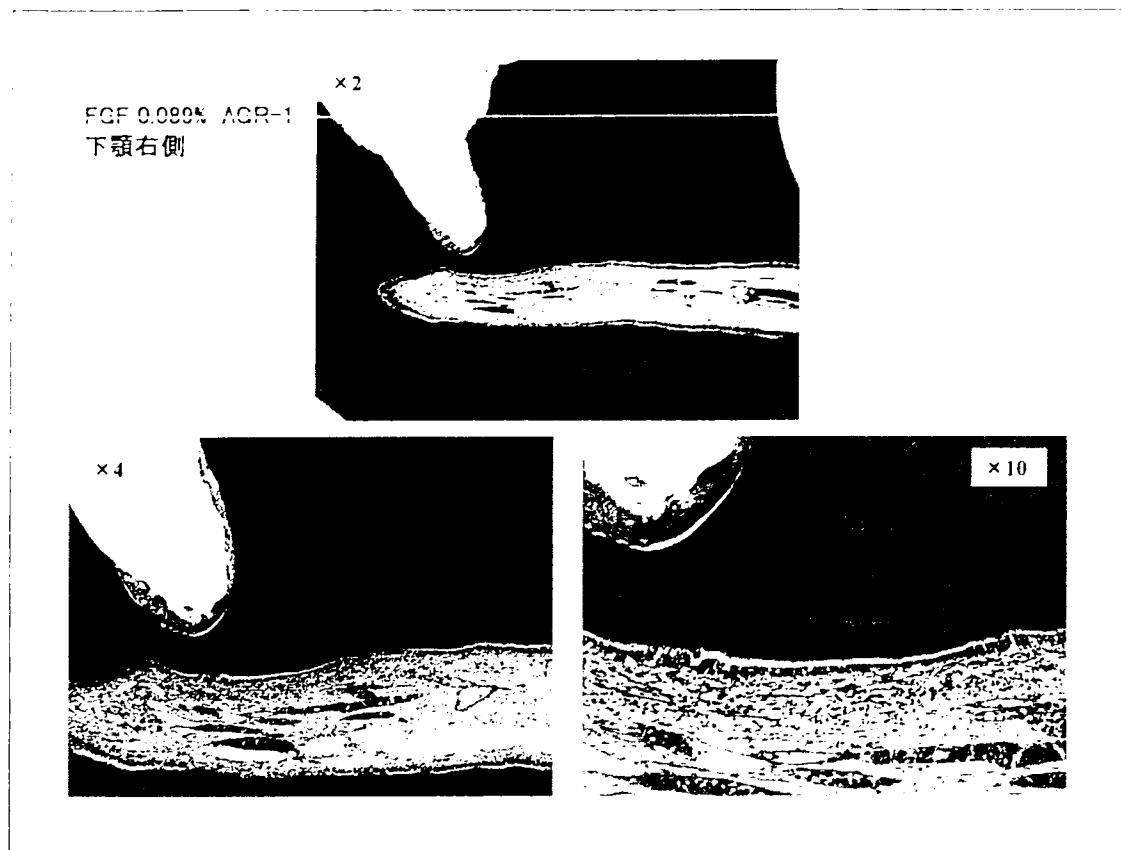
第1圖



第2圖



第3圖



第4圖

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

該代表圖無元件符號及其所代表之意義。

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

本案無代表之化學式。

十、申請專利範圍：

1. 一種象牙質-齒髓複合物之再生治療劑，係含有鹼性纖維母細胞增殖因子及/或其同系物以作為有效成分，前述同系物係下述[I]或[II]之多肽，
[I]由鹼性纖維母細胞增殖因子之胺基酸序列中的 1 至 6 個胺基酸經他種胺基酸置換且具有鹼性纖維母細胞增殖因子之生物活性的胺基酸序列所成之多肽；或
[II]於鹼性纖維母細胞增殖因子之 N 末端及/或 C 末端、或上述[I]之多肽之 N 末端及/或 C 末端，加入由 1 至 12 個胺基酸所成之追加的胺基酸片段，且無損於鹼性纖維母細胞增殖因子之生物活性或上述[I]之多肽之生物活性之多肽。
2. 如申請專利範圍第 1 項之再生治療劑，其中，該鹼性纖維母細胞增殖因子係人類鹼性纖維母細胞增殖因子。
3. 如申請專利範圍第 1 項之再生治療劑，其中，進一步含有載體(carrier)。
4. 如申請專利範圍第 3 項之再生治療劑，其中，載體係羥丙基纖維素或交聯明膠凝膠。
5. 如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之再生治療劑，其中，係使用於治療具有蛀牙、咀嚼磨損或外傷所造成之齒質實質缺損之牙齒。
6. 如申請專利範圍第 5 項之再生治療劑，其中，該蛀牙係呈進行至齒髓之狀態。
7. 一種鹼性纖維母細胞增殖因子及/或其同系物之用途，

係用於製造申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項之再生治療劑，前述同系物係下述[I]或[II]之多肽，

[I]由鹼性纖維母細胞增殖因子之胺基酸序列中的 1 至 6 個胺基酸經他種胺基酸置換且具有鹼性纖維母細胞增殖因子之生物活性的胺基酸序列所成之多肽；或

[II]於鹼性纖維母細胞增殖因子之 N 末端及/或 C 末端、或上述[I]之多肽之 N 末端及/或 C 末端，加入由 1 至 12 個胺基酸所成之追加的胺基酸片段，且無損於鹼性纖維母細胞增殖因子之生物活性或上述[I]之多肽之生物活性之多肽。

8. 一種商業包裝物，包含如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項之再生治療劑以及有關該治療劑之記載物，該記載物記載「可將或應將該治療劑使用於象牙質-齒髓複合物之再生治療」。
9. 如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項之再生治療劑或申請專利範圍第 7 項之用途，係一種覆髓劑。
10. 一種商業包裝物，包含申請專利範圍第 9 項之覆髓劑以及有關該覆髓劑之記載物，該記載物記載「可將或應將該覆髓劑用於直接或間接覆髓」。