

公告本

申請日期: 88.12.2	案號: 88127540
類別: A61K 9/06, 47/34	

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

I221777

一、發明名稱	中文	用於持續釋放蛋白質之多元醇/油懸浮物
	英文	POLYOL/OIL SUSPENSIONS FOR THE SUSTAINED RELEASE OF PROTEINS
二、發明人	姓名 (中文)	1. 梅瑞爾 勾登伯格 2. 單達興 3. 艾莉思 貝克曼
	姓名 (英文)	1. MERRILL GOLDENBERG 2. DAXIAN SHAN 3. ALICE BEEKMAN
	國籍	1. 加拿大 2. 中國 3. 美國
	住、居所	1. 美國加州千橡市雷克里福路3616號 2. 美國加州千橡市東山脊道1382號 3. 美國加州千橡市橡林道300號
三、申請人	姓名 (名稱) (中文)	1. 美商安美基公司
	姓名 (名稱) (英文)	1. AMGEN INC.
	國籍	1. 美國
	住、居所 (事務所)	1. 美國加州千橡市安美基中心大道1號
	代表人姓名 (中文)	1. 史帝芬 M. 歐喘
代表人姓名 (英文)	1. STEVEN M. ODRE	



本案已向

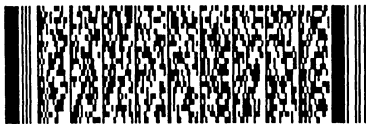
國(地區)申請專利	申請日期	案號	主張優先權
美國 US	1998/12/23	09/221, 181	有
美國 US	1999/11/23	09/448, 205	有

有關微生物已寄存於

寄存日期

寄存號碼

無



## 五、發明說明 (1)

### 相關專利申請參考文獻

本專利申請為1998年12月23日列檔之美國專利申請序號09/221,181案之後續部份，在此併為參考文獻。

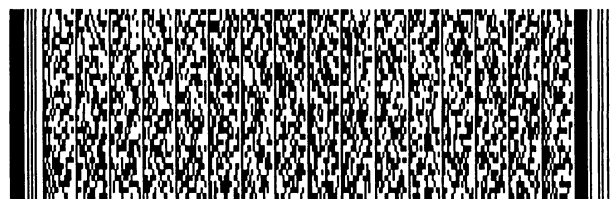
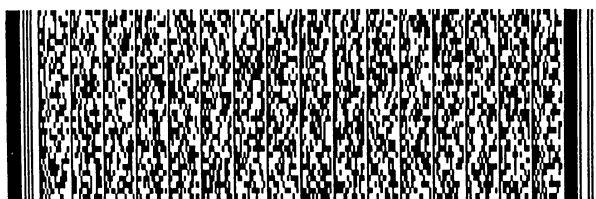
### 發明範圍

本發明係有關於含生物作用劑之多元醇/稠化油懸浮物之製備，該製備物可持續遞送生物作用劑。

### 發明背景

由於近年來基因及細胞工程技術之發展，於活體內顯現各種醫藥作用之蛋白質已可大量製造以供醫藥應用。該類醫藥蛋白質包含紅血球生成素(EPO)，新紅血球生成刺激蛋白質(NESP)、顆粒細胞集群-刺激因子(G-CSF)、干擾素( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、一致性)，腫瘤壞死因子接合蛋白質(TNFbp)、白細胞介素-1接受器拮抗劑(IL-1ra)、腦源性神經營養因子(BDNF)、角質細胞生長因子(KGF)、幹細胞因子(SCF)、巨核細胞生長分化因子(MGDF)、骨普羅提傑林(osteoprotegerin, OPG)、神經膠質細胞株衍生之神經營養因子(GDNF)、生長激素及肥胖蛋白質(OB蛋白質)。OB蛋白質亦稱為瘦素。

許多以醫藥蛋白質治療之疾病或病況須維持蛋白質濃度以達最佳療效。然而，由於大部分蛋白質醫藥組合物一般的生物半衰期都太短，因此必須頻繁的投藥。這些以各種間隔的重覆注射導致藥劑濃度波動，明顯影響病患的身體與財務負擔。由於許多病況對控制下的藥物濃度反應較佳，因此需要能控制釋放的藥劑以提供較長期持續的藥物

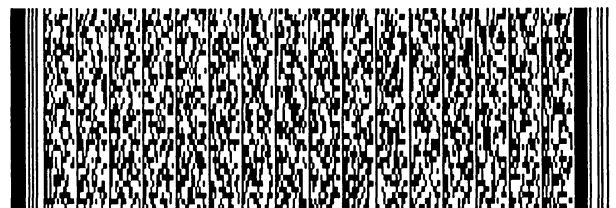
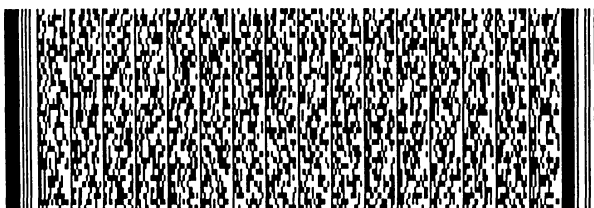


## 五、發明說明 (2)

釋出。該種持續-釋放藥劑可提供一種控制血中活性成分濃度的方法，從而提供病患加強的預防、治療或診斷效果，及較多的安全性、病患方便性與病患服從性。該可持續釋放組合物亦可節省劑量，並因而降低蛋白質之生產費用。不幸地，大部分蛋白質之不穩定性(如變性作用及暴露於熱、有機溶劑等而喪失生物活性)大大地限制持續-釋放調配物的發展及評價。

發展持續-釋放調配物之嘗試包括使用各種含作用成份之生物降解及非-生物降解聚合物(如聚(乳酸交酯-共-乙交酯))微粒子(見如懷斯(Wise)等人，*Contraception*, 8 : 227-234(1973年)；及哈親桑(Hutchinson)等人，*Biochem. Soc. Trans.*, 13 : 520-523 (1985年))，及各種可將作用劑(如蛋白質)併入聚合物微球體的已知技術(見於如美國專利第4,675,189號及其中所引用之參考資料)。可惜某些運用微粒子的持續釋放裝置仍遭遇許多問題，如：低捕捉效率、作用劑形成凝集、初期大量釋放但隨後卻低量釋出、以及作用劑不完全釋放。

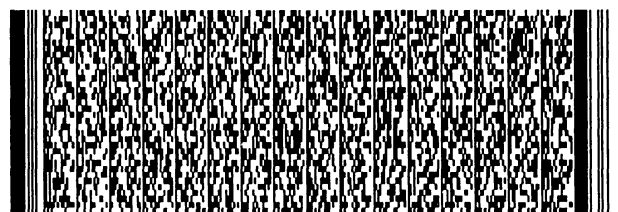
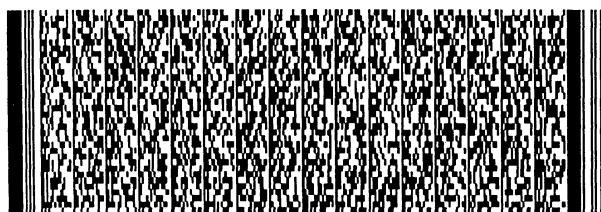
其它裝填藥物的聚合物裝置也被研究用於長期、各種疾病之治療，同樣亦指向衍生自 $\alpha$ 羧酸之聚合物，特別係外消旋及光學活性型式之乳酸、以及乙醇酸、及其共聚物。這些聚合物已商品化且經FDA-認證系統接受，如路普隆迪帕(Lupron Depot™)，其由可注射微粒子組成，可釋放路普羅來得(leuprolide)乙酸鹽約30天以治療攝護腺癌症。



## 五、發明說明 (3)

使用該聚合物所發現的各種問題包括：某些大分子無法通過基質擴散而出、藥物變質及分解(如因使用有機溶劑引起之變性作用)、對生物之刺激(如因使用有機溶劑所引起之副作用)、低生物降解力(如以多功能醇或多功能羧酸聚合物之縮聚作用所形成者，即軟膏)、及低降解速率。

有各種油基調配物曾被描述過。威爾可(Welch)於美國專利第2,491,537號中揭露使用油懸浮物(膠化蔬菜油)以提供24小時釋放青黴素。巴克華爾特(Buckwalter)於美國專利第2,507,193號中揭露使用懸浮於以5%硬脂酸鋁(AIMS)膠化之花生油中的普羅卡因(procaine)青黴素，在兔子身上可釋放達11日。安協爾(Anschel)於美國專利第2,964,448號中揭露存在以AIMS膠化的蔬菜油中之鬆弛激素懸浮物。安協爾所報告的鬆弛效果持續5-7日，並且揭露了藉加熱處理含AIMS之懸浮物可達成更長的作用期(達23日)。雅瑪西拉(Yamahira)等人於美國專利第4,855,134號揭露了與醫藥可接受生物降解載劑(如明膠)混合之引朵美莎信(indomethacin)或干擾素之持續-釋放製備物。米契爾(Mitchell)於美國專利第5,411,951號中所揭露之組合物，其中金屬-締合生長激素係存在於生物相容的油中，並示範該組合物可經腸胃道外投藥延長在動物體內釋放生長激素的時間。佛固桑(Ferguson)等人於美國專利第4,977,140號中所揭露之持續釋放調配物中包含了牛生長激素、臘及油。瑞秋特(Reichert)等人於W0 96/18417揭露了包含結晶G-CSF及蔬菜油混合物之醫藥組合物。



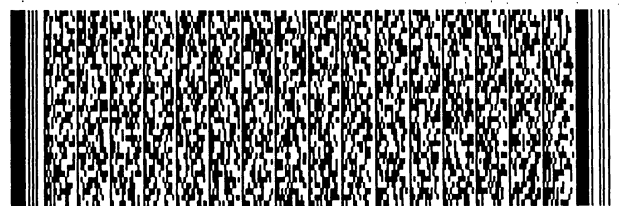
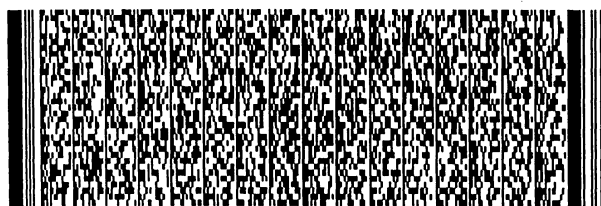
## 五、發明說明 (4)

亦有一些報告討論嘗試發展利用容易聚集之蛋白質來作為遞送藥物系統。如葛羅得司開(Grodsky)等人於美國專利第4,371,523號中描述使用抗-聚集劑，如麩胺酸及/或天門冬酸，來形成胰島素調配物。布雷克雪爾(Blackshear)等人於美國專利第4,439,181號中描述在將水性蛋白質激素溶液導入藥物遞送系統前先與甘油或其它多元醇混合。維格尼斯(Wigness)等人於PCT專刊W0 85/02118中描述使用甘油來預防蛋白質沉澱於藥物遞送系統中；以及阿山(Azain)等人於EP專刊0 374 120 A2中描述穩定的生長激素組合物，在其它許多可用物質當中，其係利用一穩定多元醇來達成目的。

除了上述方法的研究發展，仍需要研發可達成更多方面應用及更有效持續-釋放之方法的醫藥調配物，以供臨床應用。許多重組或天然蛋白質有益於持續長期釋放，故可提供更有效之臨床結果。

人類重組G-CSF選擇性刺激嗜中性球是一種用於對抗感染之白血球細胞。目前市售有菲爾葛拉斯提(Filgrastim<sup>®</sup>)，是一種可用於治療用途之重組G-CSF。各種不同狀況下之G-CSF結構已被廣泛研究；路(Lu)等人，J. Biol. Chem. 267, 8770-8777(1992)。

G-CSF很不穩定且對環境因素如溫度、濕度、氧氣及紫外線相當敏感。且由於其厭水特性，G-CSF很難調配，此因於長期貯存時會形成二聚物及高階(higher order)聚集(廣泛範圍)。G-CSF非常容易聚集，特別是在中性pH值



## 五、發明說明 (5)

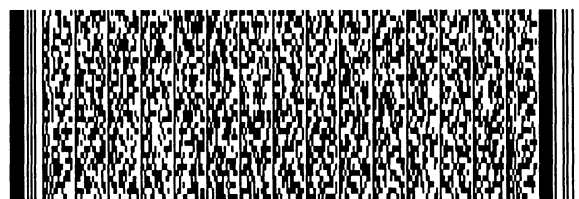
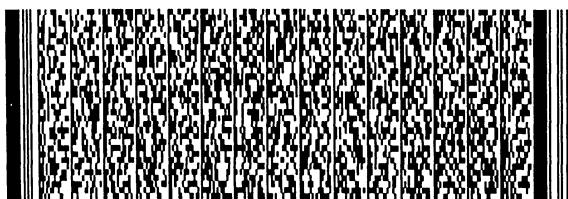
中、高鹽度及高溫(即生理血清狀況下)。這種不穩定性使得經由慣用遞送系統來持續釋放(至少一週期間)困難重重，且事實上，該種系統通常充其量僅能提供數天的釋放作用。

本發明目的之一係製造一種含G-CSF之製備物，其可持續釋放G-CSF。該製備物的生產可使用含G-CSF之甘油/油懸浮物來達成，而且很重要地，使用這些G-CSF/甘油/油懸浮物之醫藥組合物可使生物利用率增加、保護蛋白質、降解減少，並可緩慢釋放、增加蛋白質穩定性及效力。很重要地，本發明之醫藥組合物提供一種簡單、快速且便宜的控制性重組蛋白質之釋放方法，可達成有效預防、治療或診斷結果。

發明說明

本發明係有關於含生物作用劑之穩定、延長-釋放可注射懸浮物之製備。本發明係起源於觀察到G-CSF粉末懸浮於甘油時很穩定，而且當懸浮物更進一步懸浮於稠化油時能保持穩定(如含低百分比單硬脂酸鋁之芝麻油、或臘)，從而提供一種穩定、延長-釋放可注射製備物。很重要地，在此所述之方法可廣泛應用於其它蛋白質(或其類似物)、以及G-CSF。

於一具體實施例中，本發明提供了醫藥組合物，其包括有效量之合併入多元醇/稠化油懸浮物的生物作用劑(biologically active agent, BAA)，該生物作用劑可為粉末或水溶液型式，且該懸浮物可持續-釋放生物作用



## 五、發明說明 (6)

劑。

於另一具體實施例中，本發明提供一種對溫血動物以腸胃道外投予BAA/甘油/油懸浮物之方法，其中該懸浮物係以皮下注射、或肌肉注射投藥，且該生物作用劑係由懸浮物以控制下的速率釋出達至少一週或一週以上。

本發明更進一步有關於製備持續-釋放上述BAA/多元醇/油懸浮物之可注射醫藥組合物的方法。主要具體實施例包括：(a) 將BAA懸浮於多元醇以形成BAA/多元醇懸浮物；及(b) 將該BAA/多元醇懸浮物懸浮於包含稠化油、或臘之混合物中，以形成BAA/多元醇/油懸浮物。

本發明更進一步有關於包含該調配物之預先充填注射器。

本發明亦有關於使用在此所述之穩定、延長-釋放可注射性製備物來治療病患之方法。

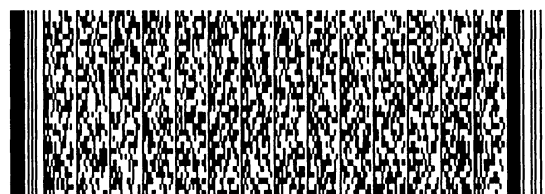
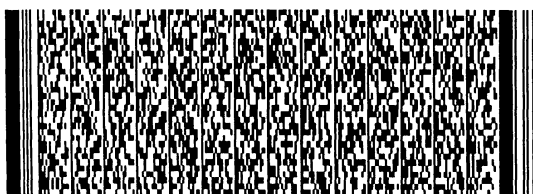
#### 發明詳述

在此所用之下列詞句意義如下：

"生物降解"係定義為多元醇/油載體於活體內會侵蝕或降解或吸收或代謝而形成較小的非-毒性成分。

"生物相容"係定義為油及其增稠劑及其它賦形劑對聚肽或所治療人類無不可容忍之副作用。

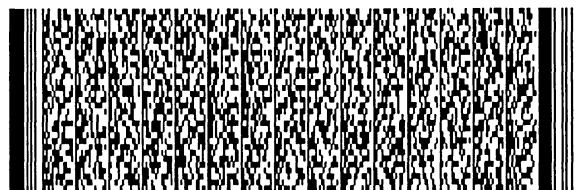
"腸胃道外投藥"係定義為任何除消化道外之投藥途徑，包含如皮下注射、肌肉注射、腦脊髓膜內投藥、眼內投藥、關節內投藥、經肺投藥、鼻腔投藥、直腸及經耳投藥。



## 五、發明說明 (7)

在此所用之生物作用劑係指基因重組或天然發生之蛋白質，無論是人類或動物的，可用於預防、治療或診斷應用。生物作用劑可為天然、合成、半合成或其衍生物。此外，本發明生物作用劑可為聚乙二醇化(PEGylated)或與水溶性加合物(如碳水化合物(如糊精))結合。廣泛的生物作用劑皆列入考慮。其包含(但不限於)激素、細胞介素、造血因子、生長因子、抗肥胖因子、營養因子、消炎因子、及酵素(美國專利第4,695,463號中有更多實用生物作用劑實例)。熟於該技藝者可毫無困難的將所需生物作用劑於本發明之組合物中運用，因本發明之組合物亦可包含小型有機或有機金屬化合物。

該類蛋白質可包含(但不限於)顆粒-集群刺激因子(G-CSF's)(見美國專利第4,810,643、4,999,291、5,581,476、5,582,823號、及PCT專刊第94/17185號，其連同圖形在此皆併為參考文獻)、干擾素(見美國專利第5,372,808、5,541,293、4,897,471、及4,695,623號，其連同圖形在此皆併為參考文獻)、白細胞介素(見美國專利第5,075,222號，其連同圖形在此皆併為參考文獻)、紅血球生成素(見美國專利第4,703,008、5,441,868、5,618,698、5,547,933、及5,621,080號，其連同圖形在此皆併為參考文獻)、幹細胞因子(PCT專刊第91/05795、92/17505及95/17206號，其連同圖形在此皆併為參考文獻)、骨普羅提傑林(PCT專刊第97/23614號，其連同圖形在此皆併為參考文獻)、新紅血球生成刺激蛋白質(NESP)



## 五、發明說明 (8)

(PCT 專刊第94/09257號，其連同圖形在此皆併為參考文獻)及瘦素(OB蛋白質)。

以下為運用G-CSF之實際用例，如上所述，G-CSF係一種用於治療造血障礙之治療用蛋白質。一般來說，用於本發明實用上之G-CSF可為由哺乳動物組織分離型式，或亦可為化學合成方法之產物或經基因或cDNA選殖之原核或真核宿主之外源性DNA序列表現物或藉DNA合成獲得之產物。適當原核宿主包括各種細菌(如大腸桿菌(*E. coli*))；適當真核宿主包括酵母(如啤酒酵母(*S. cerevisiae*))及哺乳動物細胞(如中國倉鼠(*Chinese hamster*)卵巢細胞、猴子細胞)。依應用宿主不同，G-CSF表現產物可與哺乳動物或其它真核碳水化合物進行糖基化，或其可為非-糖基化。G-CSF表現產品亦可包含初始甲硫胺酸胺基酸殘基(於位置-1)。本發明詳細考慮了任何及所有該型式G-CSF之用途，但重組G-CSF，尤其是衍生自大腸桿菌者，總體而言較適合商業之最佳用途。

曾有報告某些G-CSF類似物具有生物功能，這些物質亦可以化學方式修改，如加上一或多個聚乙二醇分子。美國專利第4,810,643號中有報告G-CSF類似物。其它曾報告具有生物活性之G-CSF類似物的實例見如AU-A-76380/91、EP 0 459 630、EP 0 272 703、EP 0 473 268及EP 0 335 423，但報告中對所揭露的每一類似物之活性並無表示。同樣可見AU-A-10948/92、PCT 94/00913及EP 0 243 153。當然，若當需要治療非人類之哺乳動物時，可使用



## 五、發明說明 (9)

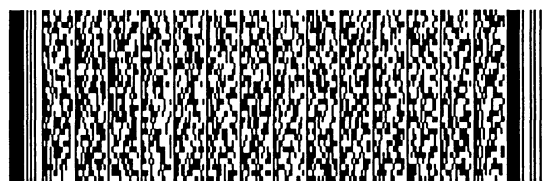
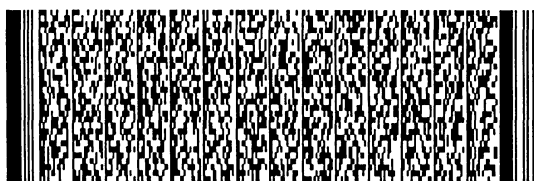
重組非人類G-CSF，如重組鼠、牛、犬等之G-CSF。見如PCT WO 9105798及PCT WO 8910932。

用於本發明製備物之G-CSF種類可選自於前面所提到之PCT專刊第94/17185號中所描述者，在此並將其全文列為參考文獻。成熟之重組甲硫胺醯基人類G-CSF之174個胺基酸序列在此以序列辨識號碼(SEQ ID NO):1呈現，其中成熟蛋白質之第一個胺基酸係蘇胺酸(T)(於位置1)且甲硫胺醯基殘基係位於位置-1(未包含於下列序列)。

## 序列辨識號碼：1

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

然而，任何本G-CSF部分中，位置-1之甲硫胺醯基殘基皆可能不出現。



## 五、發明說明 (10)

用於本發明製備物之G-CSF亦包含上述某些含有取代胺基酸的蛋白質，這些取代胺基酸依其酸性、電荷、厭水性、極性、大小或任何其它熟悉此技藝者所知之特性而成為"保留性"。這些物質皆列於下表1。概見於克列頓(Creighton), Proteins, passim (W.H. Freeman and Company, N.Y., 1984)；福特(Ford)等人，Protein Expression and Purification 2：95-107 (1991)，在此皆併為參考文獻。

表 1  
保留性取代胺基酸

鹼性：	精胺酸 離胺酸 組織胺酸
酸性：	麩胺酸 天門冬酸
極性：	麩胺醯胺 天門東素
厭水性：	白胺酸 異白胺酸 纈胺酸
氣味：	苯丙胺酸 色胺酸 酪胺酸
小型：	甘胺酸 丙胺酸 絲胺酸 蘇胺酸 甲硫胺酸

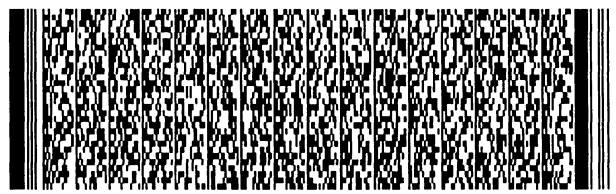
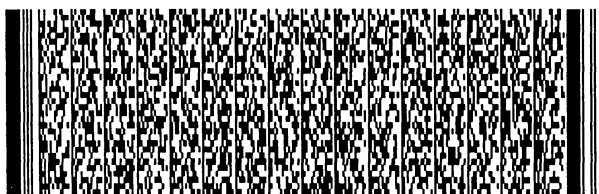


## 五、發明說明 (11)

此外，生物作用劑亦可包含(但不限於)胰島素、胃泌素、激乳素、促腎上腺皮質激素(ACTH)、甲狀腺刺激激素(TSH)、促黃體生成激素(LH)、促濾泡激素(FSH)、人絨毛膜促性腺激素(HCG)、腸動素、干擾素( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ )、白細胞介素(IL-1及IL-12)、腫瘤壞死因子(TNF)、腫瘤壞死因子-結合蛋白質(TNF-bp)、腦源性神經營養因子(BDNF)、神經膠質細胞源性之神經營養因子(GDNF)、神經營養因子3(NT3)、成纖維細胞生長因子(FGF)、神經營養生長因子(NGF)、胰島素-類生長因子(IGFs)、巨噬細胞集群刺激因子(M-CSF)、顆粒巨噬細胞集群刺激因子(GM-CSF)、巨核細胞源性之生長因子(MGDF)、角質細胞生長因子(KGF)、血小板生成激素、血小板源性之生長因子(PGDF)、集群刺激生長因子(CSFs)、骨成形蛋白質(BMP)、超氧化物歧化酶(SOD)、組織胞漿素原活化劑(TPA)、尿激素、生長激素、鏈球菌激西每及血管舒緩素。在此所用之蛋白質一詞，包含肽、聚肽、一致性分子、其類似物、衍生物或混合物。

用於製備本發明持續-釋放組合物之BAA可為溶液或粉末型式，並且先與多元醇(如甘油)混合。BAA可為存於甘油中或溶於或懸浮於甘油水溶液中之粉末型式。長期貯存BAA於懸浮物時添加足量多元醇以穩定(如預防聚集)BAA。

其它可考慮使用之生物相容C-4至C-19多元醇包含(但不限於)，C-4：丁四醇；C-5：阿拉伯糖、木糖、核糖；C-6：肌醇、果糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、C-12：麥

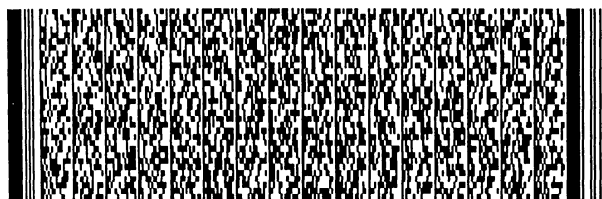


## 五、發明說明 (12)

芽糖及蔗糖。若使用之多元醇係固體型式，應先將其製備成水性或有機水溶液或藉加熱或壓力使液化，再與BAA混合。使用之多元醇濃度較佳範圍為由5%-90%，更佳由10%-50%，而最佳由10%-30%重量百分比。於較佳之具體實施例中，其中的生物作用劑係G-CSF，而多元醇係甘油，所使用的水性甘油為20%。於其它僅有少量或無水份存在之較佳具體實施例中，20%甘油係相對於調配物總量而言。

用於本發明之油係生物相容，低酸性且實質上無酸敗之憂。此種油可選自如芝麻子油、芥花油、番紅花油、蓖麻油、棉子油、橄欖油、花生油、葵花子油、油酸乙酯、含 $\alpha$ -生育酚之維生素E及其衍生物、及密格來歐(Miglyol) 812。

甘油/油懸浮物亦含"增稠劑"或"膠凝劑"，其可做為阻止懸浮物之水合作用，使油之黏性或黏彈性更強，並因而降低投藥後BAA由懸浮物釋放之速率且亦增加BAA之穩定性，以及增加懸浮物一體之物理穩定性(即預防各相分離)。該類藥劑包含有機酸之多價金屬鹽(如月桂酸、棕櫚酸、硬脂酸及其類似物之鋁鹽、鋅鹽、鎂鹽或鈣鹽)，及含油物質(如臘及高黏性油)，及有機或無機填充物(如聚合物及鹽類)。單硬脂酸鋁及二硬脂酸鋁及白臘為特佳之藥劑。該藥劑通常濃度(基於油之重量)介於約0.1%至約99%間，較典型為介於約0.5%及約90%間，而金屬鹽類則更典型為0.5%至20%間。為確保該藥劑不會增加懸浮物黏性



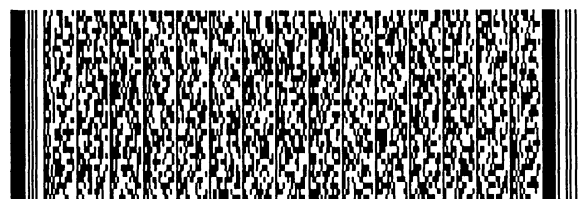
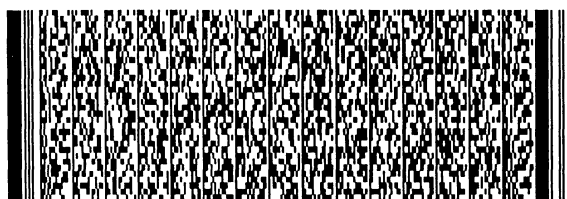
## 五、發明說明 (13)

而導致懸浮物無法經由注射器注射，其比例相當重要。至於高黏性調配物則可考慮植入物。

甘油/油懸浮物可更進一步包含表面作用劑或乳化劑以穩定甘油/油懸浮物且預防其分離。該表面作用劑或乳化劑可為離子型或非離子型，且可選自如史班(Span) 40、史班80、普魯羅尼克斯(Pluronic<sup>®</sup>)、及蛋卵磷脂、或其混合物，較佳之HLB(親水-親脂平衡)為1-10，更佳為2-8，且更佳為4-8。表面作用劑亦有助於將油散佈於生物環境中。表面作用劑通常佔油之重量百分比的0.1%至50%，較佳為0.2%至20%，且更佳為0.5%至10%。某些物質，如氫化蔬菜油可同時作用為甘油懸浮物之增稠劑及穩定劑。

製備本發明之BAA/甘油/油懸浮物可先將生物作用劑(粉末型式)懸浮於實質純甘油溶液，以形成BAA/甘油懸浮物，再將該BAA/甘油懸浮物懸浮於含純油溶液或是懸浮有或溶有"膠凝劑"的油溶液中。油(含膠凝劑)可能先需加熱(同時混合)以確定膠凝劑完全溶於油中。製備BAA調配物可將BAA溶化或懸浮於水性甘油溶液(較佳含表面作用劑)中，並將溶液混合至油(較佳含表面作用劑)中，且水性甘油較佳為緩衝至穩定之pH值(如G-CSF為酸性)。液相較佳含中至高度HLB之表面作用劑，而油相較佳含低HLB之表面作用劑。於本發明，中度至高度HLB係約大於8，且低HLB係約低於8。

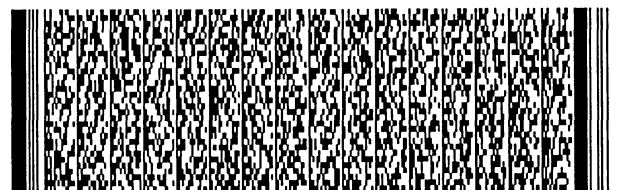
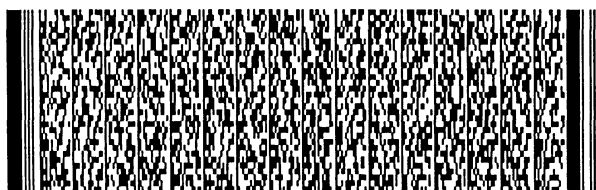
一般地，包括於本發明之醫藥組合物包含有效量之生物



## 五、發明說明 (14)

作用劑、或衍生產品(如沉澱物)，以及醫藥可接受稀釋劑、防腐劑、安定劑、乳化劑、抗氧化劑(如抗壞血酸及維生素E)、投藥需用之佐劑及/或載劑。(見於PCT 97/01331，其在此併入參考文獻)。對所需生物作用劑之最理想醫藥調配物可由熟於該技藝者依投藥途徑、所需劑量及釋放期間來決定。示範性醫藥組合物係揭露於雷鳴頓醫藥科學(Remington's Pharmaceutical Sciences(馬克出版公司(Mack Publishing Co.)，第18版，伊斯頓(Easton)，賓州，1435-1712頁(1990年))。本發明醫藥組合物特別適合胃腸道外投藥，如肌肉注射、皮下注射、或腹膜內注射。

本發明組合物之治療用法依所使用之生物作用劑而定。熟於該技藝者可毫無困難地利用本發明使用所需生物作用劑以供所需之治療用途。該類藥劑之治療用法於下列文獻中詳細提出，所有文獻連同圖形在此皆併為參考文獻。治療用法包含(但不限於)使用蛋白質，如顆粒-集群刺激因子(見美國專利第4,999,291、5,581,476、5,582,823、4,810,643號及PCT專刊第94/17185號，其連同圖形在此皆併為參考文獻)、干擾素(見美國專利第5,372,808、5,541,293號，其連同圖形在此皆併為參考文獻)、白細胞介素(見美國專利第5,075,222號，連同圖形在此做為參考資料)、紅血球生成素(見美國專利第4,703,008、5,441,868、5,618,698、5,547,933、及5,621,080號，其連同圖形在此皆併為參考文獻)、幹細胞因子(PCT專刊第

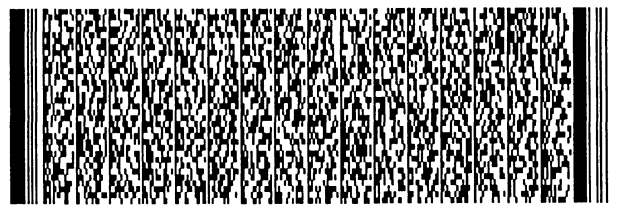
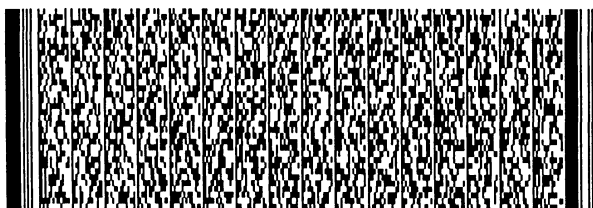


## 五、發明說明 (15)

91/05795、92/17505及95/17206號，其連同圖形在此皆併為參考文獻)、OB蛋白質(見於PCT專刊第96/40912、96/05309、97/00128、97/01010及97/06816號，其連同圖形在此皆併為參考文獻)、新穎紅血球生成刺激蛋白質(PCT專刊第94/09257號，其連同圖形在此皆併為參考文獻)、及小分子藥物。此外，本發明組合物亦可用於製造一或多種藥劑，以供治療或改善該生物作用劑欲治療之病況。

當關注於G-CSF時，治療顯示可有效治療炎症性腸疾。如有報告一名患有局部性迴腸炎(Crohn's disease)及腸/皮膚瘻管之青春期男孩於所有標準療法失敗後以G-CSF(filgrastim)治療有反應；樊(Vaughn)及莊姆(Drumm)，New England, Journal of Medicine, 340(3):239-240(1999)。亦有報告以G-CSF長期高劑量療法於結腸炎可能具有消炎作用；荷密斯(Hommes)等人，Clin Exp. Immunol., 106:529-533(1996)。因此可想像得到本發明之含G-CSF懸浮物亦可有效治療炎症性腸疾。

熟於該技藝者可藉投藥及觀察所需療效來確定有效劑量。對G-CSF來說，較佳劑量介於約0.01微克G-CSF部份/公斤體重/日及10毫克G-CSF部份/公斤體重/日之間的懸浮調配物可獲得所需療效。有效劑量可利用診斷工具、經過一段時間來決定。如可先以血液(或血漿或血清)中G-CSF量之測量診斷來決定內源性G-CSF蛋白質濃度。該診斷工具可為抗體分析型式，如抗體三明治分析。首先將內源性



## 五、發明說明 (16)

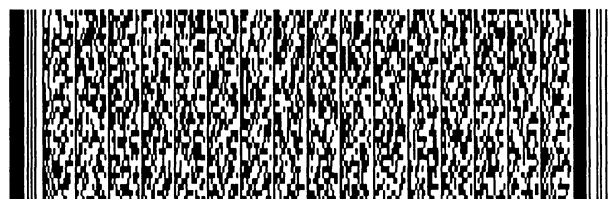
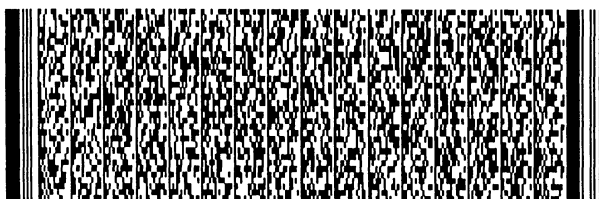
G-CSF 蛋白質定量，並決定基線。根據整個療程中不斷的內源性及外源性G-CSF蛋白質部份定量(即蛋白質、類似物或見於體內之衍生物，不論自體產生或來自投藥者)來決定治療劑量。劑量可因此依療程而不同，如最初使用相當高的劑量，直到見到療效，再使用較低劑量以維持療效。或者，整個療程中監測嗜中性球濃度。調整劑量以最低注射頻率來維持所需嗜中性球計數濃度。

下列實例更完整說明本發明，並非欲限制其範圍。

實例1

本實例描述藉噴霧-乾燥製備G-CSF粉末。

將G-CSF溶液(~2.75毫克/毫升，加上5%山梨糖醇，存於0.58毫當量HCl中)置於透析管(光譜實驗室(Spectrum Lab Inc.)，平寬為 $18 \pm 2$ 毫米，直徑11.5毫米，1.0毫升/公分)中，且於4°C下以水(pH 3.25)透析24小時。於透析時，共換水四次。透析過之G-CSF溶液(~1100毫升)再置於超濾室中，並對溶液施加氣壓。2小時後，收集到約300毫升濃縮G-CSF溶液，經由0.2毫米過濾單元過濾。最終G-CSF溶液之濃度為9.134毫克/毫升。以布奇(BUCHI) 190迷你噴霧乾燥器(布靈克曼協會(Brinkmann Institute))進行噴霧-乾燥，而噴霧-乾燥器的所有玻璃器皿先以去離子水，再以無菌水，再以乙醇沖洗。噴霧乾燥器之入口氣流為450標準升/小時，且G-CSF溶液之餵料速率為1.0毫升/分鐘。由290毫升初始G-CSF溶液中可獲得G-CSF粉末(2.640克，82.7% G-CSF)。



## 五、發明說明 (17)

實例2

本實例描述G-CSF/甘油懸浮物的製備以及利用G-CSF/甘油懸浮物來製備G-CSF/甘油/油調配物的方法。

步驟1. 首先製備G-CSF/甘油懸浮物，將105.4毫克G-CSF噴霧乾燥粉末(如實例1所描述法製備)及2.401毫升甘油置於研鉢中，並研磨混合物直到無粗糙顆粒。

步驟2. 再製備稠化油懸浮物，將45.67克芝麻油(可羅達公司(Croda, Inc.))及1.91克單硬脂酸鋁(AIMS)(福祿克(Fluka))置於125毫升歐倫麥耳氏(erlenmeyer)燒瓶中，並以磁鐵攪拌子於室溫下混合20分鐘，再於氮氣中、165-170°C攪拌加熱。持續攪拌2小時，再將混合物冷卻至室溫，產生乳白色膠狀稠化油(3% AIMS)。

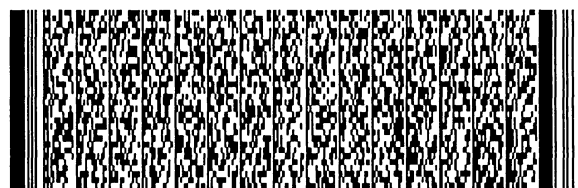
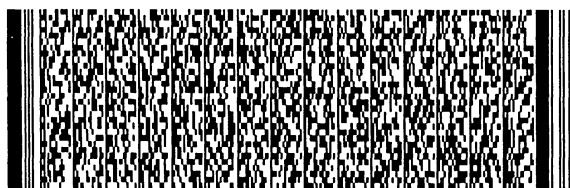
步驟3. 將1毫升G-CSF/甘油懸浮物及4毫升稠化油置於研鉢中一同研磨至充分混合。運用前將懸浮物(G-CSF/20%甘油/3% AIMS/油)貯存於4°C無菌試管中。

實例3

本實例描述G-CSF/含甘油黏性油懸浮物的製備，其更進一步含L-抗壞血酸及表面作用劑。

藉加熱及攪拌混合物將L-抗壞血酸(50毫克)溶於1毫升甘油溶液。於冷卻至室溫後，將抗壞血酸/甘油溶液與GCSF粉末(45.3毫克)及史班80(250毫升)混合。

將如上述製備之3.75毫升稠化油(3%AIMS)加至G-CSF/抗壞血酸/甘油混合物一起研磨產生黏性油懸浮物(G-CSF/20%甘油+抗壞血酸/史班80/3% AIMS/油)。



## 五、發明說明 (18)

實例4

本實例顯示以7%白臘稠化之油的製備法。

製備稠化之7%臘/油(使用如實例2所述之方法,步驟2),於氮氣中、160°C下加熱白臘(4.49克)及芝麻油(59.65克)混合物2小時。

實例5

本實例顯示使用7%臘做為增稠劑,以不同的甘油濃度來製備各種含G-CSF-油調配物。

製備物1: 將G-CSF粉末(27.6毫克)及甘油(600微升)於研鉢混合並研磨直到無可見粗糙顆粒。再將如實例4所述製備之2.4毫升稠化7%臘/油加至GCSF/甘油懸浮物。將混合物以研鉢研磨、研碎以產生黏性油調配物(G-CSF/20%甘油/7%臘)。

製備物2: 將GCSF粉末(45.3毫克)與1.00毫升抗壞血酸/甘油溶液(如實例3所述製備)混合,再加入4.0毫升稠化7%臘/油。將所產生之混合物一起研磨,產生黏性油調配物(G-CSF/20%甘油+抗壞血酸/7%臘)。

製備物3: 將G-CSF粉末(27.3毫克)及甘油(450微升)於研鉢混合研磨至無可見之粗糙顆粒。再將如實例4所述製備之2.55毫升稠化7%臘/油加至GCSF/甘油懸浮物中。將混合物以研鉢研磨、研碎以產生黏性油調配物(G-CSF/15%甘油/7%臘)。

製備物4: 將G-CSF粉末(27.5毫克)及甘油(750微克)於研鉢中混合研磨直到無可見之粗顆粒。再將如實例4所述



## 五、發明說明 (19)

製備之2.25毫升稠化7%臘/油加至GCSF/甘油懸浮物中。將混合物以研鉢研磨、研碎以產生黏性油調配物(G-CSF/25%甘油/7%臘)。

實例6

本實例顯示以10%白臘稠化G-CSF/甘油油之製備法。

製備稠化10%臘/油(使用如實例2所述方法,步驟2),將白臘(6.5克)及芝麻油(58.5克)混合物於氮氣中、160°C、加熱2小時。

混合GCSF粉末(27.4毫克)及甘油(600微升),並將2.40毫升稠化油(10%臘)加至GCSF/甘油懸浮物中。研磨混合物以產生黏性油調配物(G-CSF/20%甘油/10%臘)。

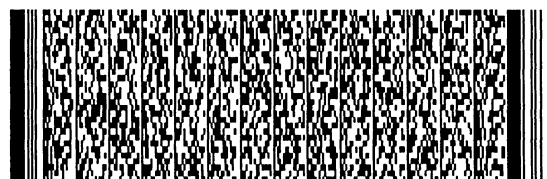
實例7

本實例描述於活體內測試實例2-6中所製備之懸浮物。

以30毫克/公斤的劑量將各種含G-CSF懸浮物及控制組(皮下)注射至脾臟切除鼠(BDF1)一次。數日後分析鼠血。3% AIMS油(30毫克/公斤)中之G-CSF粉末(-甘油);甘油(30毫克/公斤)中之G-CSF粉末;溶於水(30毫克/公斤)之G-CSF粉末;以及1X PBS做為控制組。資料總結如下表1。

表1

調配物	嗜中性球計數( $10^6$ /毫升)		
	第3日	第5日	第7日
1X PBS	2.0	2.0	2.0
pH 3.25水(+ 5%山梨糖醇)中之G-CSF	2.0	2.0	2.0
甘油中之G-CSF	3.5	2.0	2.0



## 五、發明說明 (20)

3% AIMS/油中之G-CSF (-甘油)	1.5	1.5	1.5
G-CSF/20%甘油3% AIMS/油	24	33	19
G-CSF/20%甘油抗壞血酸/ 史班80 3% AIMS/油	18.1	23.8	8.7
G-CSE/20%甘油7%臘/油	27	40.2	10.3
G-CSF/15%甘油7%臘/油	32.4	36	8.1
G-CSF/25%甘油7%臘/油	24.6	38.2	13.9
G-CSF/20%甘油10%臘/油	33.6	56.9	25.6

如表1資料所示，多元醇/稠化油懸浮物可提供持續釋放G-CSF至少一週的期間。而重要的是未添加多元醇，G-CSF即無法在油中傳遞。

實例8

本實例顯示以甘油-硬脂酸酯稠化之油的製備法。

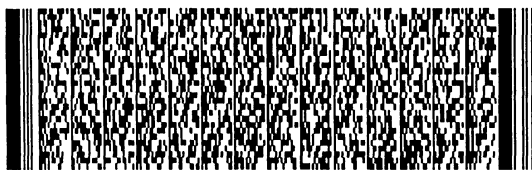
製備物1：將甘油-三硬脂酸酯(1.00克)、甘油-單硬脂酸酯(4.00克)、及芝麻油(45.00克)置於瓶中且於氮氣中、160℃下、加熱2小時。再將混合物漩流冷卻至室溫。獲得白色稠化油。

製備物2：將甘油-單硬脂酸酯(0.80克)及芝麻油(9.20克)置於瓶中，於氮氣中、160℃下加熱2小時。再將混合物漩流冷卻至室溫。獲得白色稠化油。

實例9

本實例描述如何使用芝麻油及較黏性氫化蔬菜油混合物來製備稠化油。

將芝麻油(6.00毫升)及氫化蔬菜油(34.00毫升)置於瓶



## 五、發明說明 (21)

中且將混合物於氮氣中、 $160^{\circ}\text{C}$ 下加熱2小時。混合物冷卻至室溫後可獲得稠化油。

實例10

本實例顯示如何製備油懸浮物中之G-CSF/甘油；其中的油含有芝麻油及氫化蔬菜油混合物，而氫化蔬菜油可稠化混合物。

製備物1：混合GCSF粉末(10.0毫克)及甘油(0.20毫升)，再加入油混合物(氫化油/芝麻油= 5/3, 0.80毫升)。將混合物以研鉢一同研磨、研碎以產生黏性懸浮物調配物。將該調配物裝入注射器備用。

製備物2：混合GCSF粉末(10.3毫克)及甘油(0.20毫升)，再加入油混合物(氫化油/芝麻油= 3/17, 0.8毫升)。將該混合物以研鉢一起研磨、研碎以產生黏性懸浮調配物。將本調配物裝至注射器備用。

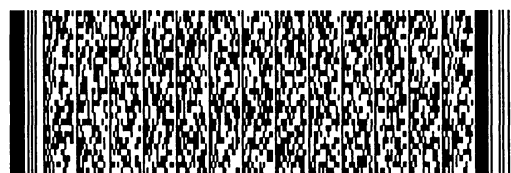
實例11

本實例顯示如何使用硬脂酸、十八烷醇、及其混合物做為增稠劑+G-CSF/甘油來製備稠化油。

製備物1：將硬脂酸(1.00克)及芝麻油(9.00克)置於瓶中並將混合物於氮氣中、 $160^{\circ}\text{C}$ 下加熱2小時。冷卻至室溫後搖動混合物成為黏性稠化油。

製備物2：將十八烷醇(1.00克)及芝麻油(9.00克)置於瓶中並將混合物於氮氣中、 $160^{\circ}\text{C}$ 下加熱2小時。冷卻至室溫後搖動混合物成為黏性稠化油。

製備物3：將十八烷醇(0.50克)、硬脂酸(0.50克)、及



#### 五、發明說明 (22)

芝麻油(9.00克)置於瓶中並將混合物於氮氣中、160℃下加熱2小時。冷卻至室溫後搖動混合物成為黏性稠化油。

製備物4：混合G-CSF粉末(9.8毫克)及甘油(0.20毫升)，再加入0.80毫升稠化油(10%十八烷醇)。混合物研磨10分鐘產生油調配物，裝入1毫升注射器備用。

製備物5：混合G-CSF粉末(10.3毫克)及甘油(0.20毫升)，再加入0.80毫升稠化油(10%增稠劑，十八烷醇/硬脂酸=3/1)。將混合物研磨10分鐘產生油調配物，裝入1毫升注射器備用。

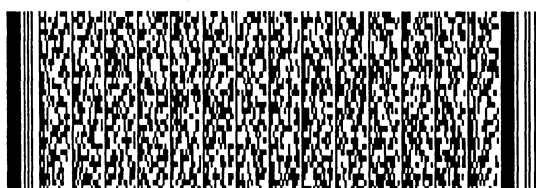
#### 實例12

本實例顯示如何製備含G-CSF之水性甘油的油乳化調配物，其中G-CSF係混合於水性甘油相中。

液相包含12.7毫克/毫升G-CSF、50%甘油、1%(重量/體積)普魯羅尼克(Pluronic)F68、10毫當量醋酸鹽(pH 4.0)及0.44毫當量HCl。油相則包含存於玉米油中的1%普魯羅尼克L101混合物。以佛提斯漢地歇爾(Virtis Handishear)均化器將此二相50:50及70:30之混合物均化45秒以形成個別之乳化調配物。

#### 實例13

本實例係以類似實例2方法製備，但G-CSF劑量改為約10毫克/公斤。於單次注射後嗜中性球至少升高一週。



四、中文發明摘要 (發明之名稱：用於持續釋放蛋白質之多元醇/油懸浮物)

本發明係有關於含生物作用劑之多元醇/稠化油懸浮物之製備，該製備物可持續遞送生物作用劑。所述之蛋白質/甘油/油懸浮物顯示可持續釋放蛋白質(如G-CSF)長達至少一週。

英文發明摘要 (發明之名稱：POLYOL/OIL SUSPENSIONS FOR THE SUSTAINED RELEASE OF PROTEINS)

The present invention relates to the preparation of polyol/thickened oil suspensions containing a biologically active agent, for the sustained delivery of the biologically active agent. The described protein/glycerol/oil suspensions show sustained release of protein, e.g., G-CSF, of up to at least one week.



## 六、申請專利範圍

1. 一種持續釋放之醫藥組合物，其包括併入於多元醇／油懸浮物之顆粒細胞集群刺激因子(G-CSF)，其中該懸浮物含增稠劑；且其中該組合物係藉下列方法製備，包括：

(a) 將G-CSF粉末懸浮於多元醇中，以形成G-CSF／多元醇混合物；

(b) 將該G-CSF／多元醇混合物懸浮於含稠化油之混合物中，以形成G-CSF／多元醇／油懸浮物；其中該多元醇於懸浮物中之水平以重量計介15%至30%之範圍內。

2. 如申請專利範圍第1項之組合物，其中該生物相容多元醇係選自甘油、丁四醇、阿拉伯糖、木糖、核糖、肌醇、果糖、半乳糖、麥芽糖、及蔗糖。

3. 如申請專利範圍第1項之組合物，其中該增稠劑係選自有機酸之多價金屬鹽類、臘及高黏性油。

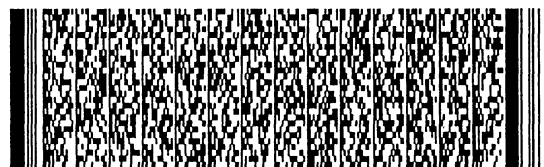
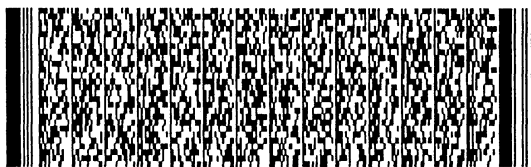
4. 如申請專利範圍第3項之組合物，其中該增稠劑係單硬脂酸鋁。

5. 如申請專利範圍第3項之組合物，其中該增稠劑係白臘。

6. 如申請專利範圍第1項之組合物，其中該油係選自芝麻油、蓖麻油、棉子油、芥花油、番紅花油、橄欖油、花生油、葵花子油、 $\alpha$ -生育酚、及油酸乙酯。

7. 一種製備G-CSF／多元醇／油懸浮物之持續釋放醫藥組合物之方法，其包括：

(a) 將G-CSF粉末懸浮於多元醇中，以形成G-CSF／多元醇混合物；



## 六、申請專利範圍

(b) 將該G-CSF / 多元醇混合物懸浮於含稠化油之混合物中，以形成G-CSF / 多元醇 / 油懸浮物；其中該多元醇於懸浮物中之水平以重量計介15%至30%之範圍內。

8. 如申請專利範圍第1項之持續釋放醫藥組合物，係對溫血動物作腸胃道外投藥用，其中該組合物係以皮下注射或肌肉注射投藥，且G-CSF係由懸浮物以控制之速率釋出至該動物，釋出期間達一週或以上。

