



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201319084 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 05 月 16 日

(21)申請案號：100141533

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 11 月 15 日

(51)Int. Cl. : C07K14/475 (2006.01)

A61K38/00 (2006.01)

A61P25/00 (2006.01)

(71)申請人：人類蛋白處理科學有限責任公司(法國) HUMAN PROTEIN PROCESS SCIENCES
SARL (FR)

法國

(72)發明人：布諾夫 席耶利 BURNOUF, THIERRY (FR)；蘇正堯 SU, CHENG YAO (TW)

(74)代理人：陳傳岳；郭雨嵐

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：18 項 圖式數：2 共 25 頁

(54)名稱

血小板源腦源性神經滋養因子濃厚液及其製備方法

PLATELET-DERIVED BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR CONCENTRATES AND
PREPARATION THEREOF

(57)摘要

本發明提供一種血小板源功能性天然腦源性神經滋養因子濃厚液，其中腦源性神經滋養因子之濃度 50-200 ng/ml 濃厚液，俾能廣泛地進行治療性或生理調節之應用。本發明亦提供一種由血小板製備血小板源功能性天然腦源性神經滋養因子濃厚液之製備方法，其中起始血小板濃厚液以溶劑/清潔劑混合物處理、油萃取並以陽離子交換管柱進行層析以獲得高含量之腦源性神經滋養因子。本發明又提供一種前述血小板源腦源性神經滋養因子濃厚液之用途，係用於治療中樞神經系統之神經相關疾病、誘發減重或降低糖尿病及/或修復神經組織。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：100141533

C07K 14/475 (2006.01)

※ 申請日：

100. 11. 15

※IPC 分類：

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

血小板源腦源性神經滋養因子濃厚液及其製備方法/
Platelet-Derived Brain-Derived Neurotrophic Factor
Concentrates and Preparation Thereof

二、中文發明摘要：

本發明提供一種血小板源功能性天然腦源性神經滋養因子濃厚液，其中腦源性神經滋養因子之濃度 50-200 ng/ml 濃厚液，俾能廣泛地進行治療性或生理調節之應用。本發明亦提供一種由血小板製備血小板源功能性天然腦源性神經滋養因子濃厚液之製備方法，其中起始血小板濃厚液以溶劑/清潔劑混合物處理、油萃取並以陽離子交換管柱進行層析以獲得高含量之腦源性神經滋養因子。本發明又提供一種前述血小板源腦源性神經滋養因子濃厚液之用途，係用於治療中樞神經系統之神經相關疾病、誘發減重或降低糖尿病及/或修復神經組織。

三、英文發明摘要：

The invention provides a blood platelet-derived functional natural brain-derived neurotrophic factor (BDNF) concentrate wherein the brain-derived neurotrophic factor has a concentration of 50-200 ng/ml and thereby being used widely in therapeutic application or physiological regulation. The invention also provides a method for

preparing a blood platelet-derived functional natural brain-derived neurotrophic factor concentrate from blood platelets in which the initial platelet concentrate is treated with a solvent/ detergent mixture, extracted with oil and treated with cation-exchange column chromatography to obtain an enriched brain-derived neurotrophic factor concentrate. A use of said brain-derived neurotrophic factor concentrate is further provided for treating neurological disorders of the central nervous system (CNS), inducing weight loss or decreasing diabetes and/or repairing nervous tissue.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：無。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明關於一種生長因子濃厚液、製備方法及用途，更具體地說，前述生長因子是指一種血小板源腦源性神經滋養因子。

【先前技術】

腦源性神經滋養因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) 為腦中含量最多之生長因子，其為神經滋養蛋白家族之一員。此外，由於它具有血管新生活性，又可稱為一種血管神經素 (angioneurin)。腦源性神經滋養因子在 1982 年首先於腦部均質物 (brain homogenates) 被鑑定出來，其來自於被稱為原腦源性神經滋養因子 (pro-BDNF) 的 32kDa 前驅物蛋白，此前驅物蛋白經 N-糖基化以及糖磺酸化 (glycosulfated)。確實，自神經元釋出後，pro-BDNF 的原區域 (pro-domain) 會被胞漿素 (plasmin) 或金屬蛋白酶進行蛋白質性切割 (proteolytically cleaved)，產生成熟的 BDNF (一種具 119 個胺基酸殘基且分子量為 13kDa 的多肽)。而 BDNF 的生物效果大多透過它結合至位在中樞神經系統 (CNS) 受體細胞之細胞膜上的高親和力 145 kDa 神經滋養性原肌凝蛋白相關激酶 B (TrkB) 受體來傳達。成熟形式的 BDNF 在成人 CNS 中數量多且被認為有相當大之生理關聯性。在啮齒動物模式中，BDNF 對啮齒動物之神經元的活性、功能及存活都有影響，而且這樣的影響是一輩子的，並可預防啮齒動物的神經性退化。

BDNF 的表現及/或功能的改變與各種神經性疾病、多發性硬化症及老化有關。BDNF 的含量程度與人類或模式動

物的行為改變有關。

低含量的 BDNF 與人類的精神性疾病（如：精神分裂、抑鬱以及自殺行為）有關。雖然 BDNF 在血漿中的預設半生期短、可能具副作用、且其在生理環境下通過血腦障壁的能力仍無法確定，但是對於使用 BDNF 本身或其模擬藥物（pharmacomimetics）作為治療性 TrkB 活化物的部分仍受到高度關注。

BDNF 具潛力的治療應用涵蓋 CNS 的主要疾病，包括：阿茲海默症、杭丁頓舞蹈症、帕金森氏症以及中風，因 BDNF 具抑制食慾的特性，也可用於體重降低、肥胖及糖尿病的治療。另外，將 BDNF 用於局部支架以修復脊髓損傷的治療應用也受到關注。

數種研究報導已指出血小板中存有大量的 BDNF，大部分可能來自血管內皮細胞的合成及血液循環的胞噬作用（internalization），而非來自原位血小板合成，這是因為巨核細胞（其為血小板的前驅物）不含 BDNF 的緣故。BDNF 是在血小板活化後釋放，可由其血清含量高於血漿含量 100 倍以上（約 10-27 ng/ml）所證實。一旦在血液凝結過程中受到促效劑刺激，血小板中所含的 BDNF 約有一半會在受傷位置釋放，可能造成含 TrkB 之神經組織的再生。

近來，申請人雖已研究對製備用於各種應用（如：幹細胞增殖）之病毒去活化血小板溶解物的可能性、以及組分化溶解物來得到可應用於治療軟或硬組織之富含血小板源生長因子（PDGF）或轉形生長因子- β 1 (TGF- β 1)之組分)的可能性。但針對 BDNF，在市面上仍未見到有效的 BDNF 濃厚液及其製備方法。

【發明內容】

有鑒於習知技術的不足，有必要加以研發改良。因此，本發明之一目的在於提供一種富含血小板源腦源性神經滋養因子濃厚液，俾能廣泛地進行治療性、修復性及生理調節之應用，並可進行濃縮步驟進一步提升此血小板源腦源性神經滋養因子之含量。

本發明之另一目的在於提供一種血小板源腦源性神經滋養因子濃厚液之製備方法及以該方法製備得出的血小板源腦源性神經滋養因子濃厚液，前述血小板源腦源性神經滋養因子濃厚液具有高含量之腦源性神經滋養因子。

本發明之另一目的在於提供一種前述血小板源腦源性神經滋養因子濃厚液之用途，其係用於製備治療神經相關疾病、誘發減重、降低糖尿病或修復神經損傷之藥劑。

為達上述目的，本發明提供一種血小板源腦源性神經滋養因子濃厚液，其中腦源性神經滋養因子之濃度 50-200 ng/ml 濃厚液。於一較佳實施樣態中，腦源性神經滋養因子之濃度為 70-150 ng/ml 濃厚液。於另一較佳實施樣態中，腦源性神經滋養因子之濃度 90-140 ng/ml 濃厚液。於又一較佳實施樣態中，前述血小板源腦源性神經滋養因子濃厚液之總蛋白含量為 0.5-2.5 mg/ml，較佳地為 1-2 mg/ml。

在較佳具體實施態樣中，前述血小板源腦源性神經滋養因子濃厚液包含血管內皮生長因子 (VEGF) 濃度為 0.5-5 ng/ml 濃厚液，轉形生長因子 (TGF- β) 濃度係低於 5ng/ml 濃厚液，胰島素樣生長因子 (IGF) 濃度係低於 5 ng/ml 濃厚液，且表皮生長因子 (EGF) 濃度係低於 0.2 ng/ml 濃厚液。於另一較佳實施樣態中，前述血小板源腦源性神經滋養因子濃厚液包含：血小板源生長因子 (PDGF) 濃度為 40-150 ng/ml 濃厚液。

在較佳具體實施態樣中，前述血小板源腦源性神經滋

養因子濃厚液係為病毒去活化之血小板源腦源性神經滋養因子濃厚液，以確保品質安全。

本發明並提供一種血小板源腦源性神經滋養因子濃厚液之製備方法，包括：

- (a) 提供一起始血小板濃厚液；
- (b) 將得自步驟(a)之濃厚液以一溶劑/清潔劑混合物處理；
- (c) 萃取得自步驟(b)之濃厚液，以獲得一萃取液；以及
- (d) 將得自步驟(c)之萃取液以一陽離子交換管柱進行層析，以獲得腦源性神經滋養因子濃厚液。

在較佳具體實施態樣中，前述製備方法進一步在步驟(a)之前包含一製備起始血小板濃厚液之初步步驟。更佳者，前述起始血小板濃厚液是藉由血小板分離術(apheresis)或血沉棕黃層(buffy-coat)分離法而從全血加以製備；又更佳者，前述起始血小板濃厚液為新鮮、過期、或過期且冷凍的狀態。

在較佳具體實施態樣中，前述溶劑選自由：二-或三烷基磷酸酯類、具有不同烷基鏈之二或三烷基磷酸酯類所組成之組群。例如，前述溶劑可為三正丁基磷酸酯(TnBP)或其類似物，但不僅限於此。

在較佳具體實施態樣中，前述清潔劑選自由：脂肪酸之聚氧乙烯衍生物、山梨糖醇酐之偏酯類(partial esters)、非離子性清潔劑、去氧膽酸鈉及磺基甜菜鹼類(sulfobetaines)所組成之組群。前述清潔劑的例示實施例包括：Triton X-45、Triton X-100 或 Tween 80，但不僅限於此。

在較佳具體實施態樣中，前述步驟(b)之溶劑/清潔劑混合物中該溶劑及該清潔劑之個別最終濃度範圍為從 0.2 至 5 體積%，其係以該起始血小板濃厚液之體積為基礎計算。更佳者，前述個別最終濃度為 1 體積%。

在較佳具體實施態樣中，前述步驟(c)之萃取係以醫藥等級油來進行。更佳者，前述醫藥等級油之用量為 2-20 重量%，係以該起始血小板濃厚液與前述溶劑/清潔劑混合物之重量為基礎計算。前述醫藥等級油的例示實施例包含但不限於：天然油（例如：從植物或動物萃取出來的油）及結構類似的合成化合物組成之群。前述天然油包括但不限於蓖麻油（castor oil，或稱 ricinus oil）、大豆油、葵花油及棉籽油等；而前述合成化合物為合成性三酸甘油酯。合適的合成性三酸甘油酯包括三油精（triolein）、三硬脂精（tristearin）、三棕櫚精（tripalmitin）、三肉豆蔻精（trimyristin）、及其合併物。更佳者，前述醫藥等級油之用量為 10 體積%，其係以該起始血小板濃厚液之體積為基礎計算。

在較佳具體實施態樣中，前述陽離子交換管柱層析中常用陽離子交換管柱可為 SP 凝膠管柱(如：TOYOPEARL SP-650, TOYOPEARL SP-550, TOYOPEARL MegaCap™ SP-550EC, TSK-gel CM-STAT, SP-Sephadex, SP-Trisacryl 等)、CM 樹脂(如：CM-Sepharose, CM-Sephadex, CM-Trisacryl, CM-Fractogel, TSK gel CM, TSK gel CM-STAT, TOYOPEARL CM-650 等)或其他適合的陽離子交換管柱。於一較佳實施例中，前述陽離子交換管柱層析可以 SP-Sepharose 進行。又更佳者，可使用 SP-Sepharose 管柱，並以 0.7M NaCl 作為沖提液。

本發明另提供一種以前述方法製得之製備得出的血小

板源腦源性神經滋養因子濃厚液，具有高含量之腦源性神經滋養因子。

本發明又提供一種前述血小板源腦源性神經滋養因子濃厚液之用途，其用於製備治療神經相關疾病之一藥劑。前述神經相關疾病包括但不限於：巴金森氏症、阿茲海默氏症、杭丁頓舞蹈症、精神分裂症、中風、多發性硬化症、肌萎縮性側索硬化症、脊索損傷、認知失調 (cognitive dysfunction)、週邊神經病變、抑鬱症、精神疾病或其他相關疾病。

本發明之又一目的在於提供一種前述血小板源腦源性神經滋養因子濃厚液之用途，其用於製備修復神經組織之一藥劑。較佳地，此藥劑可以為一局部藥劑 (topical agent)。在較佳具體實施態樣中，可將此藥劑塗布於神經修復支架表面或作為神經修復支架的材料而用於修復脊髓損傷患者的神經，或者用於修復其他種類的神經。

在本發明中，使用下列的名詞定義，但應當理解，此定義僅用於幫助說明並解釋本發明之內容，並非將本發明之內容僅限於此。

本發明所使用之名詞「濃厚液」係指經純化、萃取或濃縮等步驟提高特定物質在某一溶劑中含量後之產物。例如：在本發明中的「血小板源腦源性神經滋養因子濃厚液」係指在某一溶劑中腦源性神經滋養因子含量 50-200 ng/ml 者。

本發明所使用之名詞「病毒去活化」係指在製造過程中通常以變性或化學方法修飾病毒抗原決定位 (epitopes)，去除病毒的活性。常用的去活化方式有化學或物理的方法，而方法的選擇則取決於其分子的結構及各病原體感染的程度。例如：酒精及福馬林能溫和地將蛋白變性所以亦

被廣泛的使用。

本文所述之「起始血小板濃厚液」可藉由血液分離術（指透過全血捐輸的血小板製備法）、細胞分離術（cytapheresis）或血小板分離術（plateletpheresis）標準程序（如參見 Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components, 13th edition (2007), edited by the Council of Europe）得出，且可藉由使用 MCS+（Haemonetics）、Trima Accell 或 COBE Spectra（Gambro）或 Amicus（Baxter）而得出。與透過血沉棕黃層分離法程序所得者相較之下，血小板分離術一般會從每個捐贈者身上得到較大的體積（相當於 300 ml 血小板濃厚液）。

適用於本文名詞「溶劑/清潔劑」中的「溶劑」係包括但不限於：為二-或三烷基磷酸酯類，如三-(n-丁基)磷酸酯、三-(t-丁基)磷酸酯、三-(n-己基)磷酸酯、三-(2-乙基己基)磷酸酯、三-(n-癸基)磷酸酯、二-(n-丁基)磷酸酯、二-(t-丁基)磷酸酯、二-(n-己基)磷酸酯、二-(2-乙基己基)磷酸酯、二-(n-癸基)磷酸酯及具有不同烷基鏈之二烷基磷酸酯類。可使用具有不同烷基鏈之二或三烷基磷酸酯類，例如二-(n-丁基)磷酸乙酯。特佳為三烷基磷酸酯為三-(n-丁基)磷酸酯（TnBP）。

適用於本文名詞「溶劑/清潔劑」中的「清潔劑」係包括但不限於：脂肪酸之聚氧乙烯衍生物、山梨糖醇酐之偏酯類（例如品名為「Tween 80」（也稱為「聚山梨醇酯 80 (polysorbate 80)」）、「Tween 20」之市售產品）及非離子性清潔劑（如以下列品名販售的氧乙基化之烷基酚：「Triton X-100」或「Triton X-45」）。進一步考慮的清潔劑是去氧膽酸鈉及磺基甜菜鹼類，如 N-十二基-N,N-二甲基-2-銨-1-乙烷磺酸鹽（N-dodecyl-N,N- dimethyl-2-ammonio-1-ethane

sulphonate)。特佳清潔劑為「Triton X-45」、「Triton X-100」及「Tween 80」。

本文所述的「萃取」得自步驟(c)之濃厚液係指前述溶劑及/或清潔劑可藉由以醫藥等級油進行油萃取及/或其他方法（如管柱層析）而從生物性流體中萃出，如此則濃厚液中的溶劑及/或清潔劑已被除去，並獲得待進行下一步驟的萃取液。

本文所述之「層析法」是指利用化合物在靜相與流動相之間的分佈差異以分離混合物的方法。其中靜相可以是固體或者是吸附在惰性擔體（support）表面的液體，而動相可以為液體或者氣體，是一種高效率分離混合物的方法。而「管柱層析」係指在各種材質（較常見者為玻璃）管柱中，裝填已經用沖提劑潤濕的吸附性固態填充物，例如矽膠或礬土，作為靜相，要分離的混合物由管柱頂端載入，再以液態沖提液（eluent）作為流動相，利用化合物與靜相之間的吸附力及化合物與沖提劑間溶解度的差異，造成各成分物被沖提的速率不同，而達到區帶分離的目的。

在本發明中，可用的管柱包含反相（疏水性交互反應）基質、或蛋白吸附基質如離子交換（陰離子及陽離子）基質及親和力（如免疫-親和力或固定化肝素）基質、或尺寸排除（size-exclusion）基質。由於BDNF所帶電荷的考量，較佳之基質為陽離子基質，如SP-Sepharose。而C18係一般用於工業規模層析的較佳選擇，亦可將tC18二氧化矽裝填材料列入考慮。這些吸附物質係在前述溶劑及清潔劑於前緣部分（breakthrough fraction）洗提出來的時候用來與BDNF作結合。

如本文所使用之名詞：「治療」，係包括預防特定疾病或症狀，或減輕特定之疾病或症狀及/或防止或消除該病症。

於無進一步限定下，使用本文中的藥劑所治療的對象，係指包含任何恆溫脊椎類之馴養動物(包括例如不限於下列家畜：馬、貓、狗及其他寵物)、哺乳動物及人類。

【實施方式】

接著，本發明之實施例依下列例子詳細描述，但不限於此。本發明之上述及其他目的、特徵及優點將因以下敘述及後附圖式而變得更加清楚。

材料及方法

血小板濃厚液及血小板缺乏血漿 (platelet poor plasma) 的收集及控制

PC 係徵得志願捐贈者同意後使用 MCS+分離術系統 (Haemonetics Corporation, Braintree, MA) 收集而來。如習知方法進行細胞計數。(論文中僅以此描述，請提供詳細步驟) PC 樣品於 6000 g 離心 30 分鐘，使血小板沉澱成團，而製備出血小板缺乏血漿 (platelet poor plasma)。

血小板濃厚液的處理

血小板濃厚液 (約 300 ml) 的處理整理於第一圖。所有評估過程中，捐贈之 PC 首先以 1% (v/v) 的三正丁基磷酸酯 (TnBP; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 以及 1% (v/v) Triton X-45 (Sigma Chemicals, St-Louis, MI, USA) 在 25°C 輕微攪拌下處理 1 hr，以誘使血小板溶解，接著以 10% (v/v) 大豆油 (Sigma) 萃取並在 20 - 25°C 以 6000 g 離心 10 min。獲得的上清液接著以下列管柱之一進行層析：十八烷(C18) 疏水性交互作用管柱(C18; 125Å; 多孔性; 55 - 105 μ m; Waters Corporation, Guyancourt, France)、SP-Sepharose (GE

Healthcare, Piscatawa, NJ, USA)管柱、二乙基胺基乙基-瓊脂糖凝膠(DEAE-sepharose)(GE Healthcare)管柱，或以活性碳(3M/Cuno, St. Paul, MN, USA.)處理。這些組分 (fraction) 的樣本冷凍於-20°C 以下，直到要進行分析為止。

ELISA、蛋白、TnBP、Triton X-45 測試

樣品在 37°C 解凍並在一小時內分析。以定量固相三明治 ELISA (Quantikine Human BDNF Immunoassay; R&D Systems; Minneapolis, MN)測定 BDNF，其使用針對在 Sf 21 昆蟲細胞中表現之人類 BDNF 的抗體，其亦可辨識自然的人類 BDNF。在測試前，樣品以 Calibrator 稀釋劑 RD6P 進行稀釋。將 100 μ l 的測試稀釋劑 RD1S 與 50 μ l 的樣品加入每一盤孔中。覆蓋孔盤並將之在室溫下培養 2 h，再使 100 μ l 的 BDNF 共軛結合物在室溫下培養 1 h。使用 400 μ l 清洗緩衝液 (Wash Buffer) 來清洗盤孔兩次，並於室溫加入 200 μ l 受質溶液 (Substrate Solution) 培養 30 分鐘。盤孔經避光保護。在每一盤孔中加入 50 μ l 停止溶液 (Stop Solution)，並使用微滴定盤讀取儀來測定 450 nm 之吸光值。此測試中的最小可偵測的劑量小於 20 pg/ml。將 BDNF 的含量對總血小板數量(10^6 個血小板/ml)進行標準化，其含量以 pg/ 10^6 個血小板表示。所有測定以前述方法進行。

老鼠海馬迴 (mouse hippocampus) 的製備

以習知方法製備老鼠海馬迴。簡言之，在犧牲動物之後，在添加 0.5%CHAPS (Amersham Biosciences, Saclay, France)、蛋白抑制劑(Complete, Roche Diagnostics, Meylan, France) 以及磷酸酶抑制劑(125nM 岡田酸 (okadaic acid) 及 1mM 正鈳酸鈉, Sigma)的 300 μ l 的冰冷 RIPA 緩衝液

(Pierce, Thermo Fisher Scientific, Brebières, France)中以 Teflon potter 組織研磨器加以均質化並以超音波處理。樣品在 4°C 輕微搖動 1h 後，將在 4°C 以 12000g 離心 20 分鐘。移除並保留上清液。對沉澱後的團塊進行同樣的程序，將此上清液與前述保留的上清液兩者匯集在一處。

十二烷基磺酸鈉-聚丙烯醯胺膠凝電泳 (SDS- PAGE) 及西方墨點法分析

在非還原及還原條件下以習知方法進行 SDS-PAGE，使用購自 Invitrogen (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, USA) 的梯度膠體、藥劑和電泳系統。使用 Novex® Sharp Pre-Stained Protein Molecular Weight Standard (Invitrogen) 以進行分子量評估。用於西方墨點法分析的樣品在還原環境下製備 (NuPage 樣品緩衝液與樣品還原劑, Invitrogen) 並在 100°C 加熱 10 分鐘。接著，將 15µg 蛋白載於 4-12% NuPAGE Novex 膠體 (Invitrogen) 以進行 SDS-PAGE，並進一步轉染至硝化纖維膜。重組人類 BDNF (rh-BDNF; PetroTech, Rocky Hill, NJ, USA) 及老鼠海馬迴萃取物係作為陽性控制組 (positive controls)。將膜浸於含 5% 脫脂奶粉的 TNT 溶液中並以下列抗體共同培養：BDNF (1/1000; Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、pro-BDNF (1/1000; Chemicon, Millipore, Billerica, MA) 及 TrkB (1/1000; BD Biosciences, Le Pont de Claix, France)。使用高感度底片 (hyperfilms) 及化學冷光套組 (ECL, Amersham Biosciences) 將訊號顯現出來。

結果

各種材料中的 BDNF 含量

在起始 PC 材料中的平均血小板數量為 $1050 \pm 142 \times 10^6$ 個血小板/ml。參見表一，在血小板貧乏血漿中的平均 BDNF 含量約為 0.06 ng/ml，而在 PC 中約為 2.90 ng/ml (或 2.7 pg/ 10^6 個血小板)。相較於 PPP 及 PC，經 S/D 處理之 PC 中的平均 BDNF 分別增加約 900 倍及 20 倍，達 56 ng/ml (或 53 pg/ 10^6 個血小板)，且在油萃取及離心過程中維持穩定。在 C18 管柱層析過程中，BDNF 回收率超過 70% (數據未示)，且由於層析平衡緩衝液之緣故，平均濃度降至約 29.5 ng/ml。BDNF 與 SP-Sepharose 陽離子交換樹脂 (SP-Sepharose cation exchanger) 強力結合，且其於在層析前緣 (chromatographic breakthrough) (3.4 ng/ml, 注射量的 15%) 中的含量低。使用含 0.7M 氯化鈉的緩衝液進行沖提，所得 BDNF 之平均濃度為 137 ng/ml，且其自 SP-管柱回收的回收率平均為 82 %。當在 PC 及經 S/D 處理之 PC 中的平均蛋白含量為約 60 及 65 mg/ml 時，顯示在 SP 沖提物中的 BDNF 純化因子分別為 > 3200 及 >170 倍。相反地，在 DEAE-Sepharose 陰離子交換樹脂上基本上沒有 BDNF 吸收，大多會在層析前緣 (chromatographic breakthrough) 回收 (約 21 ng/ml)，僅少數於沖提物中回收 (3.21 ng/ml)。BDNF 幾乎完全被活性碳吸收。在 C18 前緣及 SP 沖提物中的 TnBP 及 Triton X-45 含量小於 2ppm。

表一 在血漿、血小板濃厚液中的 BDNF 與總蛋白含量、以及在 S/D 處理、油萃取及離心、在 C18 吸附基質、SP-Sepharose、或 DEAE-Sepharose 或活性炭處理後之各種血小板溶解物中的 BDNF 與總蛋白含量（至少三次實驗的結果）

	血漿	PC	經 S/D- 處理的 PC	油萃取和 離心之後	C18 前 緣	SP-層析		DEAE 層析		活性炭 過濾液
						前緣	0.7 M NaCl 沖提液	前緣	1M NaCl 沖提液	
BDNF, ng/ml	0.06 +/- 0.01	2.90+/- 0.70	56.16 +/- 2.43	51.12 +/- 2.91	29.54 +/- 2.96	3.42 +/- 0.34	137.37 +/- 29.3	20.99 +/- 4.56	3.21 +/- 0.67	0.87 +/- 0.16
總蛋白 質 mg/ml	59.5 +/- 2.8	61.5 +/- 2.4	64.8 +/- 2.5	62.8 +/- 3.5	37.5 +/- 4.3	21.5 +/- 3.7	1.0 +/- 0.6	17.5 +/- 5.9	3.8 +/- 0.6	61.8 +/- 4.8

西方墨點法

請參考第二圖，在證實 S/D 處理對萃取 BDNF 的能力後，使用抗 BDNF 抗體的西方墨點分析顯示可輕易地在血小板片段中測得成熟的 BDNF。強反應條帶顯示在 SP-0.7 M NaCl 沖提物中可觀察到高 BDNF 濃縮現象。陽性控制組（rhBDNF 及老鼠海馬迴萃取物）亦可獲得此一反應。在更長的暴露時間下，亦可於起始 PC 及 SP-前緣中測得少量的 BDNF。（數據未示）。蛋白標記顯示血小板 BDNF 的分子量約為 13kDa。使用抗-原 BDNF (anti-pro-BDNF)及抗-TrkB 抗體進行的西方墨點法並未顯示任何反應條帶（數據未示）。

本發明實施例揭示了人類血小板中能獲取大量的 BDNF，這與其他研究是一致的。實施例中檢驗了製備病毒去活化血小板衍生之 BDNF 的可行性。在實施例的血小板缺乏血漿中，BDNF 的平均含量僅約為 0.06 ng/ml，而在 PC 中則為 2.9 ng/ml，此數據與先前研究中發現 BDNF 在血漿中之含量約為 0.1 ng/ml 的數據一致。而在其他先前研究中發現，未罹患神經性疾病或憂鬱症的正常個體血漿中 BDNF 的含量範圍為 7-27 ng/ml。但本發明的 BDNF 含量在經 S/D 處理後增加了約 20 倍，達 56 ng/ml(53 pg/ 10^6 個血小板)，此數據比起目前已知來自正常個體富含血小板血漿中的含量 6 pg/ 10^6 個血小板高出相當多。此一增加現象與發明人先前研究的觀察一致，即 TnBP 及 Triton X-45 處理會將血小板細胞膜的脂質化合物溶解而使生長因子釋放。此一觀察資料建議未來較佳應採用以經 S/D 處理的血小板將 BDNF 萃取最佳化，來進行 BDNF 血小板含量與神經性疾病之相關性的研究。

在各種評估方式中，實施例顯示了以陽離子交換 SP-Sepharose 層析法製備高濃縮 BDNF 組份的可行性。此可行性證實先前的發現，即來自腦部或血小板的 BDNF 可結合至陽離子交換樹脂如 CM-纖維素或 CM-Sepharose。在他人的先前研究中使用 CM-Sepharose 及 0.5M NaCl 能由 BDNF 沖提物製備出 30 ng/ml 的血小板萃取物，純化係數為 50 倍。藉由 S/D 處理與 SP-Sepharose 層析法，在本實施例的條件下能達成較高的濃度和純化係數，能分別增加 BDNF 萃取的產率並改善層析選擇性及回收率。使用抗 BDNF 抗體進行西方墨點分析確認 SP-沖提物中 BDNF 的顯著濃縮作用。為了移除 SD 反應劑至低於 < 10-100 ppm 程度（如同病毒去活化 S/D 處理的臨床等級產物），以 10 倍管柱體積的平衡緩衝液清洗，達殘餘含量至 < 2ppm。不需預清洗沖提步驟，以 0.7 M NaCl 緩衝液沖提 BDNF。如有需要進行功能性實驗研究，可以含較低 NaCl 含量的緩衝液居間清洗促使 BDNF 純度改善。

SDS-PAGE 及西方墨點法顯示此經 S/D 處理的血小板 BDNF 具有明顯約為 13kDa 的分子量。無證據顯示有原 BDNF 存在於任何血小板萃取物中，暗示神經滋養蛋白專以成熟型態存在於血小板中。實施例中未有 BDNF 的主要受體 TrkB 存在任何實施例之血小板組份中的證據。然而，血小板上 BDNF - TrkB 自泌環（autocrine loop）的存在已在血小板活化中 BDNF - TrkB 途徑所扮演之角色方面的研究中一併確認。

本發明顯示人類血小板中含有大量成熟 BDNF，其可經萃取、經 S/D 處理並以陽離子交換層析法純化出超過 100 倍的量的。雖應執行正式的病毒安全性測試（viral validation），但考慮到在廣泛條件下進行 S/D 病毒去活化處

理的有效性已被充分證明，此 BDNF 濃縮組份針對血生脂套膜病毒 (blood-born lipid-enveloped viruses) 仍是安全的，而針對非脂套膜病毒安全性所進行的 PC 之 NAT 測試及奈米過濾可增加對非脂套膜病毒安全性。本發明建議此一製備法對一系列疾病的 BDNF 功能特性之活體外或實驗評估是有效的，且對神經細胞修復或再生也是有效的。天然血小板衍生 BDNF 組份可顯現出目前實驗模式中所用之 rh-BDNF 所沒有的轉譯後修飾功能，這方面的利用則是另一種評估生理功能性的價值。

所屬領域之技術人員當可了解，在不違背本發明精神下，依據本案實施態樣所能進行的各種變化。因此，顯見所列之實施態樣並非用以限制本發明，而是企圖在所附申請專利範圍的定義下，涵蓋於本發明的精神與範疇中所做的修改。

【圖式簡單說明】

第一圖為血小板濃厚液分離流程圖。

第二圖為使用起始 PC 的 anti-BDNF 進行西方墨點法之實驗結果。重組人類 BDNF 及老鼠海馬迴萃取物作為陽性控制組。在 SD-PC 中可測得 BDNF 且在 SP-沖提物中作為強反應條帶。在更高的暴露時間下，可於起始 PC 及 SP-前緣中測得平坦條帶。分子量標記顯現在血小板中以成熟形式存在的 BDNF 具有 13kDa 的分子量。圖像以化學發光方式可見化。

【主要元件符號說明】

無

七、申請專利範圍：

1. 一種血小板源腦源性神經滋養因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 濃厚液，其中腦源性神經滋養因子之濃度為 50-200 ng/ml 濃厚液
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之血小板源腦源性神經滋養因子濃厚液，其包含血管內皮生長因子 (VEGF) 濃度係低於 5 ng/ml 濃厚液，轉形生長因子 (TGF- β) 濃度係低於 5ng/ml 濃厚液，胰島素樣生長因子 (IGF) 濃度係低於 5 ng/ml 濃厚液，且表皮生長因子 (EGF) 濃度係低於 0.2 ng/ml 濃厚液。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述之血小板源腦源性神經滋養因子濃厚液，其係為病毒去活化之血小板源腦源性神經滋養因子濃厚液。
4. 一種血小板源腦源性神經滋養因子濃厚液之製備方法，包括：
 - (a) 提供一起始血小板濃厚液；
 - (b) 將得自步驟(a)之濃厚液以一溶劑/清潔劑混合物處理；
 - (c) 萃取得自步驟(b)之濃厚液，以獲得一萃取液；以及
 - (d) 將得自步驟(c)之萃取液以一陽離子交換管柱進行層析，以獲得腦源性神經滋養因子濃厚液。
5. 如申請專利範圍第 4 項所述之製備方法，其進一步在步驟(a)之前包含一製備起始血小板濃厚液之初步步驟。
6. 如申請專利範圍第 5 項所述之製備方法，其中該起始血小板濃厚液係藉由血小板分離術 (apheresis) 或血沉

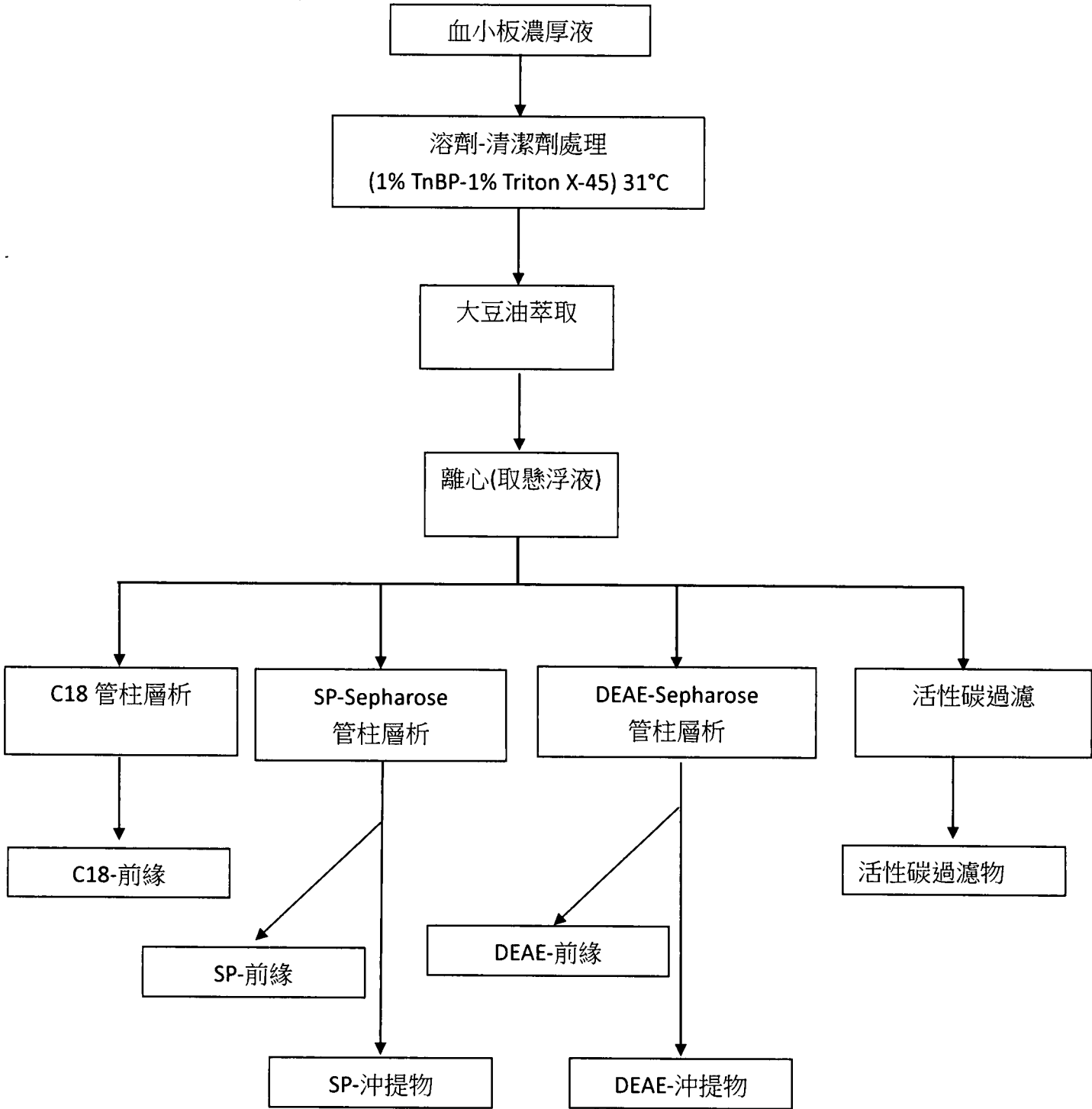
棕黃層 (buffy-coat) 分離法而從全血加以製備。

7. 如申請專利範圍第 4 項所述之製備方法，其中該起始血小板濃厚液係為新鮮、過期、或過期且冷凍的狀態。
8. 如申請專利範圍第 4 項所述之製備方法，其中該溶劑係選自由：二-或三烷基磷酸酯類、具有不同烷基鏈之二或三烷基磷酸酯類所組成之組群。
9. 如申請專利範圍第 4 項所述之製備方法，其中該清潔劑係選自由：脂肪酸之聚氧乙烯衍生物、山梨糖醇酐之偏酯類 (partial esters)、非離子性清潔劑、去氧膽酸鈉及磺基甜菜鹼類 (sulfobetaines) 所組成之組群。
10. 如申請專利範圍第 4 項所述之製備方法，其中步驟(b)之溶劑/清潔劑混合物中該溶劑及該清潔劑之個別最終濃度範圍為從 0.2 至 5 體積%，其係以該起始血小板濃厚液之體積為基礎計算。
11. 如申請專利範圍第 4 項所述之製備方法，其中步驟(c)之萃取係以醫藥等級油來進行。
12. 如申請專利範圍第 11 項所述之製備方法，其中前述醫藥等級油之用量為 2-20 重量%，係以該起始血小板濃厚液與前述溶劑/清潔劑混合物之重量為基礎計算。
13. 如申請專利範圍第 4 項所述之製備方法，其中步驟(d)之陽離子交換管柱係為 CM 樹脂或 SP 凝膠管柱。
14. 如申請專利範圍第 13 項所述之製備方法，其中陽離子交換管柱為 SP-Sepharose。
15. 一種以如申請專利範圍第 4 項所述之方法製備得出的血小板源腦源性神經滋養因子濃厚液。
16. 一種血小板源腦源性神經滋養因子濃厚液之用途，其

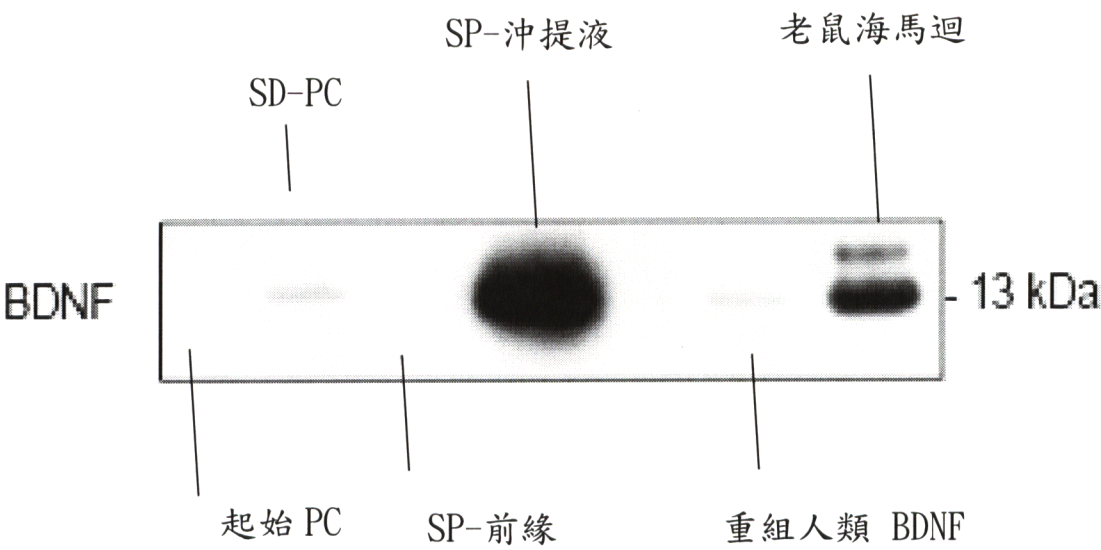
用於製備治療神經相關疾病之一藥劑。

17. 如申請專利範圍第 14 項所述之用途，其中，該神經相關疾病係選自：巴金森氏症、阿茲海默氏症、杭丁頓舞蹈症、精神分裂症、中風、多發性硬化症、肌萎縮性側索硬化症、脊索損傷、抑鬱症、精神疾病、認知失調（cognitive dysfunction）及週邊神經病變所組成之組群。
18. 一種血小板源腦源性神經滋養因子濃厚液之用途，其用於製備修復神經組織之一藥劑。

八、圖式：



第一圖



第二圖