



(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 201106965 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：099100292

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 01 月 07 日

(51)Int. Cl. : *A61K38/18 (2006.01)*

A61K38/43 (2006.01)

A61P25/00 (2006.01)

(30)優先權：2009/08/27 美國

12/548,434

(71)申請人：財團法人國家衛生研究院 (中華民國) NATIONAL HEALTH RESEARCH
INSTITUTES (TW)

苗栗縣竹南鎮科研路 35 號

(72)發明人：楊重熙 YANG, CHUNG SHI (TW)；王譽朝 WANG, YU CHAO (TW)；吳逸婷 WU,
YI TING (TW)

(74)代理人：蔡坤旺

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：20 項 圖式數：5 共 39 頁

(54)名稱

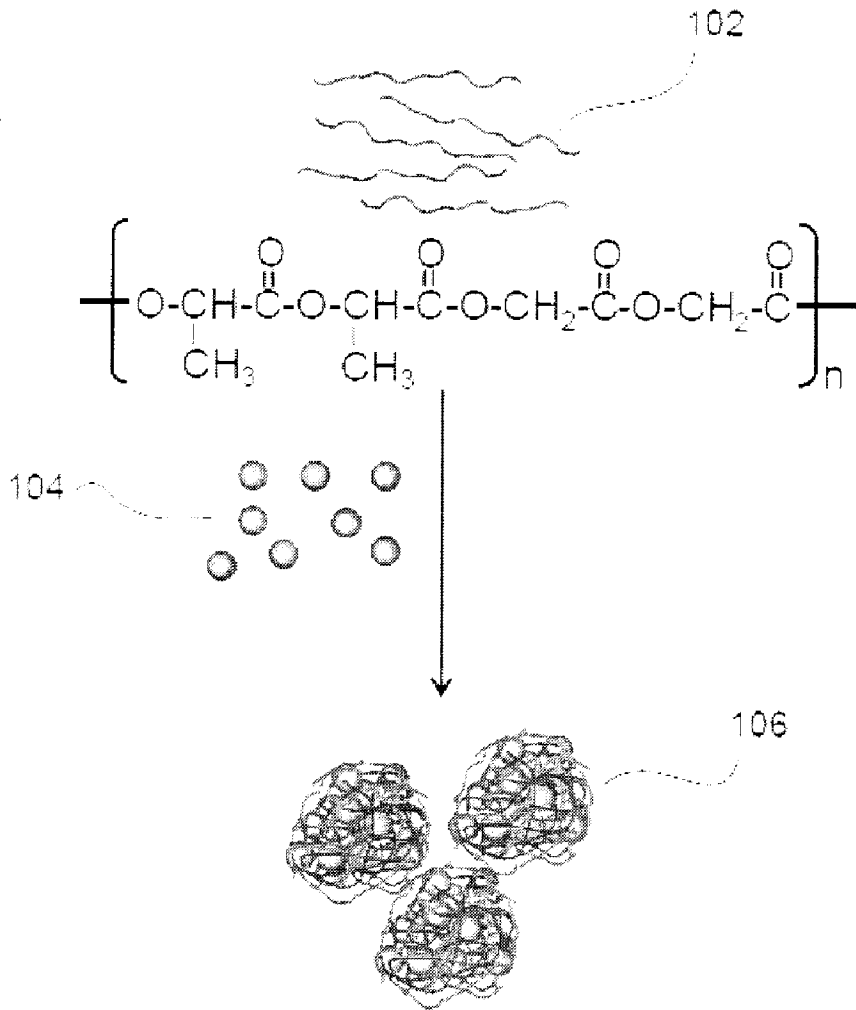
用於脊髓損傷的控制釋放多藥製劑配方

CONTROLLED RELEASE MULTIDRUG FORMULATIONS FOR SPINAL CORD INJURY

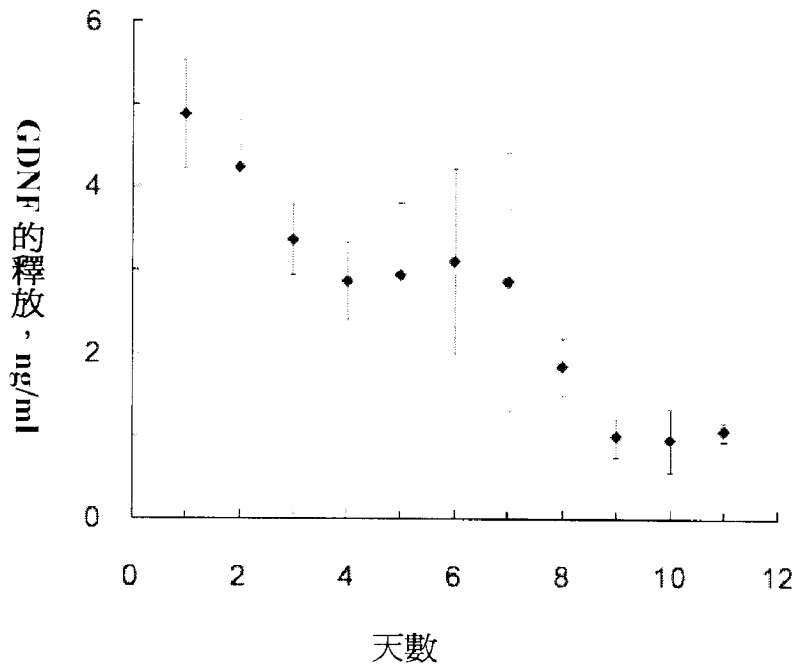
(57)摘要

一種改善脊髓損傷後肢體功能恢復的控制釋放多藥製劑配方，包括：a)一第一項組成物包含一第一項生物活性劑，其包覆於一第一項聚合物粒子中；b)一第二項組成物包含一第二項生物活性劑的，其包覆於一第二項聚合物粒子中，該第二項聚合物粒子包覆於第一項聚合物粒子中；c)亦可加上一第三項組成物包含一第三項生物活性劑，其包覆於第一或第二項聚合物粒子中，其中該第二項組成物之釋放順序須在第一項組成物之後，第一項生物活性劑為一神經營養因子，第二項生物活性劑則為一膠原蛋白合成抑制劑，第三項生物活性劑係選自由環腺酶單磷酸、一腺苷酸環化酶活化劑和一 Rho 抑制劑所組成的組群。

1A



1B





(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 201106965 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：099100292 (22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 01 月 07 日
(51)Int. Cl. : A61K38/18 (2006.01) A61K38/43 (2006.01)
A61P25/00 (2006.01)
(30)優先權：2009/08/27 美國 12/548,434
(71)申請人：財團法人國家衛生研究院 (中華民國) NATIONAL HEALTH RESEARCH
INSTITUTES (TW)
苗栗縣竹南鎮科研路 35 號
(72)發明人：楊重熙 YANG, CHUNG SHI (TW)；王譽朝 WANG, YU CHAO (TW)；吳逸婷 WU,
YI TING (TW)
(74)代理人：蔡坤旺
申請實體審查：有 申請專利範圍項數：20 項 圖式數：5 共 39 頁

(54)名稱

用於脊髓損傷的控制釋放多藥製劑配方

CONTROLLED RELEASE MULTIDRUG FORMULATIONS FOR SPINAL CORD INJURY

(57)摘要

一種改善脊髓損傷後肢體功能恢復的控制釋放多藥製劑配方，包括：a)一第一項組成物包含一第一項生物活性劑，其包覆於一第一項聚合物粒子中；b)一第二項組成物包含一第二項生物活性劑的，其包覆於一第二項聚合物粒子中，該第二項聚合物粒子包覆於第一項聚合物粒子中；c)亦可加上一第三項組成物包含一第三項生物活性劑，其包覆於第一或第二項聚合物粒子中，其中該第二項組成物之釋放順序須在第一項組成物之後，第一項生物活性劑為一神經營養因子，第二項生物活性劑則為一膠原蛋白合成抑制劑，第三項生物活性劑係選自由環腺酶單磷酸、一腺苷酸環化酶活化劑和一 Rho 抑制劑所組成的組群。

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明廣義而言係有關於藥物傳遞系統，而更特別地係關於一種控制釋放多藥傳遞系統。

【先前技術】

在美國大約有 20 萬名脊髓損傷 (SCI) 患者。脊髓損傷通常是由於患者因受機械外力導致脊髓神經軸突或神經纖維中斷。如果該脊髓受到擠壓、斷裂或挫傷，其神經軸突在物理上或生理上可能已經產生斷裂，因而使受到影響的軸突沿線無法再傳導神經電脈衝。事實上，可能有大量神經軸突及其相關細胞體因損傷而死亡，導致大腦與末梢神經間許多信號傳導喪失功能，造成不同患者產生不同程度的半身不遂或四肢癱瘓。

脊髓損傷的典型治療方法係以神經營養因子與生長因子刺激損傷部位倖存的神經與軸突分叉。由於脊髓損傷會導致大量神經細胞死亡，該結果在次級神經損傷的過程中扮演關鍵角色。因此採取神經保護措施以抑制細胞死亡及軸突機能不全，可避免脊髓損傷後導致其他相關功能的喪失。而在有關措施當中，神經營養素和抗發炎因子的應用，特別具有提升神經保護功能之成效。

致使中樞神經系統 (CNS) 神經元細胞無法重生的原因在於某些生物活性分子抑制神經突觸的再生，因為來自髓鞘

的若干蛋白質抑制了突觸的增生。NogoA 即為第一個在寡突細胞和某些神經軸突表面被發現的蛋白質。其他抑制性蛋白質還包括髓鞘相關糖蛋白 (MAG)、寡突膠細胞髓鞘糖蛋白 (OMgp) 及多功能蛋白聚糖。

中樞神經受損後所形成的神經膠質疤係抑制軸突再生的另一個主因。結疤的過程涉及若干細胞並且由硫酸軟骨素蛋白多醣 (CSPG) 的合成與分泌所調控。脊髓損傷後一周內，CSPG 會快速堆積於損傷部位。一般認為 CSPG 內大量的葡萄胺聚醣 (GAG) 側鏈，阻斷了生長促進因子的作用，成為抑制軸突繼續延伸的主要原因。經有關生物體外及體內試驗結果顯示，如果先以軟骨素酶 ABC 裂解作用移除葡萄胺聚醣 (GAG)，軸突即可於硫酸軟骨素蛋白多醣 (CSPG) 培養基中生長。

由於在脊髓損傷後的不同階段中，多種抑制性分子對神經再生發生抑制作用，顯示出脊髓損傷為人們帶來一系列有待克服的治療與神經重生之難題。有效的治療通常需要即時適應脊髓損傷後病變部位微環境的動態變化。

迄今該項技藝仍需提出解決前述缺點及不適當性之方法，特別是有關於損傷部位施予一種可長時間連續釋放治療藥物之製劑配方。

【發明內容】

相關申請案之引用

本申請案主張美國正式申請案12/548,434，申請日為2009/8/27

，其內容係完整地以引用方式納入本文作為參考。

於一方面，本發明係關於一控制釋放多藥製劑配方，包括

a) 一第一項組成物包含一第一項生物活性劑，其包覆於一第一項聚合物粒子中；b) 一第二項組成物包含一第二項生物活性劑的，其包覆於一第二項聚合物粒子中，該第二項聚合物粒子包覆於第一項聚合物粒子中；c) 亦可加上一第三項組成物包含一第三項生物活性劑，其包覆於第一或第二項聚合物粒子中，該第二項組成物之釋放順序須在第一項組成物之後。

於再一方面，本發明係有關於哺乳動物脊髓損傷（SCI）後肢體功能恢復的改善方法，包括對哺乳動物脊椎內施以一有效劑量之控制釋放多藥製劑配方的給藥步驟，其包括：a) 一第一項組成物包含一第一項生物活性劑，其包覆於一第一項聚合物粒子中；b) 一第二項組成物包含一第二項生物活性劑，其包覆於一第二項聚合物粒子中，該第二項聚合物粒子包覆於第一項聚合物粒子中；c) 亦可加上一第三項組成物包含一第三項生物活性劑，其包覆於第一或第二項聚合物粒子中，該第二項組成物之釋放順序須在第一項組成物之後，第一項生物活性劑為一神經營養因子，第二項生物活性劑則為一膠原蛋白合成抑制劑，第三項生物活性劑係選自由環腺酶單磷酸、一腺苷酸環化酶活化劑和一 Rho 抑制劑所組成的組群，以改善哺乳動物肢體功能之恢復。

於本發明之一項具體態樣，第一項生物活性劑為一神經營

養因子，第二項生物活性劑則為一膠原蛋白合成抑制劑，第三項生物活性劑係選自由環腺酶單磷酸 (cAMP)、一腺苷酸環化酶活化劑和一 Rho 抑制劑所組成的組群。

於本發明之一項具體態樣，該神經營養因子係選自由神經膠細胞衍生神經營養因子 (GDNF)、大腦衍生神經營養因子 (BDNF)、鹼性纖維母細胞生長因子、神經生長因子 (NGF)、神經營養素 3 (NT3)、神經營養素 4 (NT4)、神經營養素 5 (NT5) 所組成的組群。該腺苷酸環化酶活化劑為垂體腺苷酸環化酶激化多肽 (PACAP)。該膠原蛋白合成抑制劑可以是軟骨素酶 ABC (ChABC)。

於本發明之另一項具體態樣，PACAP 係包覆於第一項聚合物粒子中。

於本發明之另一項具體態樣，該 Rho 激酶抑制劑係選自由 C3-二磷酸腺苷-核糖基轉移酶和 BA-210 (Cethrin®) 重組蛋白所組成的組群。

於本發明之另一項具體態樣，第一項聚合物粒子包覆一個以上的第二項聚合物粒子，該第二項聚合物粒子包覆含第二項生物活性劑之第二項組成物。

於本發明之另一項具體態樣，第一項生物活性劑為神經膠細胞衍生神經營養因子 (GDNF)，第二項生物活性劑為軟骨素酶 ABC (ChABC)，第三項生物活性劑則為垂體腺苷酸環化酶激化多肽 (PACAP)。

於本發明之另一項具體態樣，該第一項聚合物粒子包括一疏水性聚合物且第二項聚合物粒子包括一疏水性或一親水性聚合物。

於本發明之另一項具體態樣，該第一項聚合物粒子包含一親水性聚合物且第二項聚合物粒子包括一疏水性或一親水性聚合物。

於本發明之再另一項具體態樣，該第一項聚合物粒子係由聚乳酸乙醇酸共聚物 (PLGA)，或幾丁聚醣和硫酸葡聚醣所組成。

然而於本發明之另一項具體態樣，該第二項聚合物粒子係由聚乳酸乙醇酸共聚物 (PLGA)，或幾丁聚醣和硫酸葡聚醣所組成。

本發明之此等其他方面由下列較佳具體態樣，結合下列圖示之說明而彰顯出，然而在不偏離該揭示內容之新穎概念的精神及範圍下，可於其中進行變更與修改。

所提供之圖式列舉說明本發明之一或多項具體態樣，其與下述詳細說明一起，係用以解釋本發明之創作原理。若可能，於圖式中使用相同參考編號，來引述實施例中之相同或類似元件。

【實施方式】

在本發明所使用的特殊術語有其原本的意義，如下所用的某些特殊術語是提供熟悉該技藝者能更進一步了解本發明內

容。為了方便起見，一些特殊術語將會使用斜體字或引號標示出來，但這些被標示出來的部分並不會影響到特殊術語本身的範圍或意義，就如同在本文中未被標示的文字一樣，也就是說同樣的事情會有一個以上的說法。本發明之其他特色及優點將於下列實施範例中被進一步舉例與說明，而該實施範例僅作為輔助說明，並非用於限制本發明之範圍。

除非另有規定，本發明所涉及的科學和技術所用詞彙和一般普通技能所使用的詞彙相同，若在有所衝突的情況下，本發明將會給予名詞新的定義。

本發明所使用的“約略”、“大約”或“大概”廣義而言應意指，所給予數值或範圍之上下百分之二十，較佳是百分之十，且更佳地是百分之五的範圍內，在此所給予之數值數量為大約的意思，表示術語“約略”、“大約”或“大概”，並沒有明文強制規定。

本發明所使用的“親水性”，指對水具有強大的親和力。

本發明所使用的“疏水性”，則是指排斥、傾向於不結合、或無法溶解於水中。

本發明所使用的縮寫如下：SCI 為脊髓損傷，CS 是幾丁聚醣（甲殼素），DS 為硫酸葡聚醣，GDNF 為神經膠細胞衍生神經營養因子，ChABC 為軟骨素酶 ABC，PLGA 為聚乳酸乙醇酸共聚物，PVA 為聚乙烯醇，GFAP 是膠質纖維酸性蛋白，PE-Rh 則為磷脂醯乙醇胺-（麗斯胺羅丹明 B）。

實施例

無意於限制本發明之範圍，以下將呈現根據本發明各種實施例之例舉性儀器、裝置、方法和其相關結果。應注意，實施例中為了方便讀者閱讀所使用的標題或副標題，並不以任何方式限制本發明的範圍。此外，在本文中所提出和披露的某些理論，無論對錯與否，只要該創作是根據本發明所實施，不需考慮任何特定的理論或行動計畫，其都應被限制在本發明的範圍之內。

實施例 1

包覆生物活性劑的親水性奈米粒子之製備

選用幾丁聚醣 (CS) 和硫酸葡聚醣 (DS) 製備一親水性奈米粒子核，該奈米粒子核較一般常見的 CS 粒子核提供更牢固的實體結構。製備幾丁聚醣 (體積百分濃度 0.1%) 和硫酸葡聚醣 (體積百分濃度 0.1%) 溶液時，分別將 CS 溶解於乙酸、DS 溶於二次蒸餾水。實驗進行當中將乙酸濃度保持為 CS 的 1.75 倍，使 CS 溶於乙酸中。要將軟骨素酶 ABC (ChABC) 這類治療藥物包覆於一親水性奈米粒子中，須先將 5 個活性單位的 ChABC 溶解於 CS (1 ml) 或 DS (4 ml) 溶液中。把 CS (1 ml) 添加至 DS (4 ml) 溶液中並持續攪拌 15 分鐘，包覆 ChABC 的奈米粒子即自然成形。然後以 3000 rpm 對溶液混合物進行離心分離 5 分鐘以去除較大的顆粒或聚集，再以 40000 rpm 離心分離 30 分鐘，取得包覆治療藥物的 CSDS 奈米粒子。

再以蒸餾及去離子水清洗該包覆治療藥物的 CSDS 奈米粒子 2 次。

以 90 plus 雷射粒徑儀分析 CSDS 的平均粒徑及其粒徑分佈。其平均奈米粒子直徑為 260 ± 100 nm，顯示該粒徑分佈係出自該製備過程。有關分析研究曾指出，大多數 CSDS 奈米粒子直徑皆介於 215-350 nm。

其他親水性聚合核包括，但不侷限於，幾丁聚醣粒子、明膠粒子、澱粉粒子、瓊脂粒子和水凝膠。

實施例 2

包覆生物活性劑的疏水性奈米粒子之製備

選用一疏水性聚合物—聚乳酸乙醇酸共聚物 (PLGA)，製備一疏水性粒子。要包覆一個或一個以上的神經膠細胞衍生神經營養因子 (GDNF) 和垂體腺苷酸環化酶激活多肽 (PACAP) 等治療藥物，須將 50 μ l 的 GDNF，或 GDNF 及 PACAP 水溶液 (2 μ g/ml，溶於水) 緩慢滴入 500 μ l 的 PLGA (4 mg/ml，溶於不帶電的二氯甲烷有機溶劑) 溶液內。將該混合溶液在冰浴下超音波震盪 10 秒鐘，以形成第一項乳狀液 (油包水，即水／乳化於 PLGA 的治療藥物分子／有機溶劑)。隨即將第一項 (即油包水型態) 乳狀液滴入渦旋震盪中之 3 ml 的蔗糖溶液 (水中體積百分濃度 10%) 或聚乙烯醇 (PVA) 溶液 (水中體積百分濃度 0.5%) 中。將該混合溶液在冰浴下超音波震盪 20 秒鐘，以形成第二項乳狀液 (水包油包水，即以二次乳化

法形成：水／乳化於 PLGA 的治療藥物分子／乳化於 PVA 或蔗糖溶液的有機溶劑)。以真空減壓旋轉濃縮機去除有機溶劑，形成 PLGA 奈米粒子懸浮液，該奈米粒子各包覆一個或一個以上的治療藥物(如：GDNF 或 GDNF 加上 PACAP)，並以離心法純化。

圖 1A 之流程圖表示包覆鼠神經膠細胞衍生神經營養因子 (GDNF) 104 的 PLGA 粒子 106。包覆於 PLGA 奈米粒子中的 GDNF (PLGA-GDNF) (R&D Systems) 係以二次乳化法合成。將 25 微升(25 μ L) 的 GDNF 104 檸檬酸緩衝液(2 mg/ml, pH= 8) 緩慢地滴入 250 μ L 的 PLGA 102 (PLA:PGA= 50:50, 分子質量為 40,000-75,000, Sigma) 甲基氯 (2 mg/mL) 溶液中，然後在冰上以微電腦超音波破碎機進行超音波震盪 15 秒，即完成第一項乳狀液之製備。將該乳狀液移入 1.5 mL 的 10%蔗糖溶液，然後再以微電腦超音波破碎機 (MICROSON XL2000, MISONIX) 進行超音波震盪 20 秒，形成第二項乳狀液。然後馬上以真空減壓旋轉濃縮機 (EYELA) 去除有機溶劑。最後以高速離心分離 PLGA-GDNF 粒子 106，並將其存放於零下 80 $^{\circ}$ C 的條件下備用。

其他適合的疏水性聚合材料可以使用，但不侷限於，脂肪族聚酯類，如由一種或多種 α -羥基羧酸類(如乙醇酸、乳酸、2-羥基丁酸、valinic acid 和白氨酸)所合成之單質聚合物或共聚物，羥基二羧酸類(如蘋果酸)，羥基三羧酸類(如檸檬酸)，

或其混合物；聚- α -氰基丙烯酸酯類，如聚（甲基- α -氰基丙烯酸酯），聚（乙基- α -氰基丙烯酸酯），聚（丁基- α -氰基丙烯酸酯）；以及胺基酸聚合物，如聚谷氨酸酯或其混合物。上述生物可降解性聚合物的聚合反應方式可以團聯或接枝技術進行聚合反應。

實施例 3

包覆親水性粒子之疏水性粒子之製備

製備一藥物傳遞系統，該系統含有包埋於疏水性粒子內的親水性奈米粒子。在親水性奈米粒子溶液加入另一疏水性聚合物溶液之前，先讓包覆一個或一個以上治療藥物之親水性奈米粒子溶液與至少另一項治療藥物進行混合。例如，取包覆著 ChABC 的 CSDS 奈米粒子溶液 50 μ L，先與 GDNF 或 GDNF/PACAP 進行混合，再將其加入內含 PLGA（10 mg/ml）的二氯甲烷 500 μ L。將該混合溶液在冰浴下超音波震盪 10 秒鐘，以形成第一項乳狀液（即油包水乳狀液；包覆於 CSDS 奈米粒子中的 ChABC，GDNF 或 GDNF/PACAP 液體懸浮於 PLGA 液體中）。隨即將第一項乳狀液滴入 3 ml 渦旋震盪中的蔗糖溶液（體積百分濃度 10%）或 0.5% 聚乙烯醇（PVA）溶液中。將該混合溶液在冰浴下超音波震盪 20 秒鐘，形成第二項乳狀液（即水包油包水乳狀液；包覆於 CSDS 奈米粒子中的 ChABC，GDNF 或 GDNF/PACAP 液體懸浮於 PLGA 液體中，而 PLGA 又懸浮於蔗糖或 PVA 液體中）。以真空減壓旋轉濃縮

機去除有機溶劑，離心分離後，每一奈米粒子均含包覆於 PLGA 核殼中的 GDNF 或 GDNF/PACAP，且圍繞著包覆於 CSDS 奈米粒子中的 ChABC。

以 90 plus 雷射粒徑儀分析這些粒子的平均直徑及粒徑分佈。其粒徑約分佈於 455 至 625 nm 間，該平均直徑約為 530 ± 100 nm。根據本發明之實際需求，應用於藥物傳遞系統中的粒徑可在微米尺寸範圍內，如介於 1 至 2 微米。

圖 2A 為包覆親水性粒子之疏水性微米粒子 220 的製備過程。將幾丁聚醣 (CS) 210 和硫酸葡聚醣 (DS) 212 加入一帶正電的藥物 (如蛋白藥劑) 214 中，取得一包覆於 CSDS 奈米粒子中之藥物 216。在包覆於 CSDS 奈米粒子中之藥物 216 與 PLGA 102 結合之前，先將其與另一生物活性劑 218 進行混合，使 CSDS 被包覆於 PLGA 微米粒子中 220，該微米粒子內含包覆於 CSDS 中的藥物 216 與另一項生物活性劑 218。

圖 2B-2D 係以帶加速電壓 80 Kv，日本 Hitachi 生產的 H-7650 穿透式電子顯微鏡 (TEM) 取得的 CSDS 奈米粒子 (圖 2B) 成像，包覆 CSDS 奈米粒子的 PLGA 粒子成像 (圖 2C)，及未包覆 CSDS 奈米粒子的 PLGA 粒子 (圖 2D)。在穿透式電子顯微鏡觀測下，被包覆於 PLGA 粒子內部的 CSDS 奈米粒子成像，如圖 2C (箭號標示處) 所顯現之一位於內部的白色影像。圖 2D 中未包覆 CSDS 奈米粒子的 PLGA 粒子成像則顯現為深色。

實施例 4

包覆疏水性粒子之疏水性粒子之製備

製備一藥物傳遞系統，該系統含有包埋於疏水性粒子內的疏水性奈米粒子，在與另一疏水性聚合物溶液之前，先讓包覆一個或一個以上治療藥物之疏水性聚合奈米粒子溶液與至少另一項治療藥物進行混合。例如，取包覆 ChABC 的 PLGA 奈米粒子溶液 50 μL ，在將其加入內含 PLGA (10 mg/ml) 的二氯甲烷 500 μL 之前，先與 GDNF 或 GDNF/PACAP 進行混合。將該混合溶液在冰浴下超音波震盪 10 秒鐘，以形成第一項乳狀液 (即油包水乳狀液；包覆於 PLGA 奈米粒子中的 ChABC，GDNF 或 GDNF/PACAP 液體懸浮於 PLGA 液體中)。隨即將第一項乳狀液滴入 3 ml 渦旋震盪中的蔗糖溶液 (體積百分濃度 10%) 或 0.5% 聚乙烯醇 (PVA) 溶液中。將該混合溶液在冰浴下超音波震盪 20 秒鐘，形成第二項乳狀液 (即水包油包水乳狀液；包覆於 PLGA 奈米粒子中的 ChABC，GDNF 或 GDNF/PACAP 液體懸浮於 PLGA 液體中，而 PLGA 又懸浮於蔗糖或 PVA 液體中)。以真空減壓旋轉濃縮機去除有機溶劑，離心分離後，每一粒子均含包覆於 PLGA 核殼中的 GDNF 或 GDNF/PACAP，且圍繞著包覆於 PLGA 奈米粒子中的 ChABC。

圖 3A 為包覆疏水性粒子之疏水性微米粒子 **328** 的製備過程，位於內部的疏水性奈米粒子 **324** 包覆有一第一項生物活性劑 **322**，外部的微米粒子 **328** 則又包覆有一第二項生物活性劑

326。為使內部的疏水性奈米粒子 324 包覆第一項生物活性劑 322，須將 PLGA 102 加入第一項生物活性劑 322 中。該 PLGA 102 形成一疏水性粒子 324 並包覆著第一項生物活性劑 322。為使外部的疏水性微米粒子 328 包覆內部的疏水性奈米粒子 324 及一第二項生物活性劑 326，須將 PLGA 102 加入內部的疏水性奈米粒子混合物中 324 中，該奈米粒子包覆第一項生物活性劑 322 及第二項生物活性劑 326。該 PLGA 102 形成一微米粒子 328 並包覆著第一項生物活性劑 322 及第二項生物活性劑 326，其中第一項生物活性劑 322 係包覆於疏水性奈米粒子 324 中，第二項生物活性劑 326 係包覆於外部的疏水性微米粒子 328 中。

分析該粒子的平均直徑及粒徑分佈。其粒徑約分佈於 0.5 至 10 μm 間，該平均直徑約為 5 μm 。根據本發明之實際需求，應用於藥物傳遞系統中的粒徑可在微米尺寸範圍內，如約 1 至 2 μm 。

實施例 5

多相藥物包覆

將 200 微升 PLGA (100 mg/ml，溶於有機溶劑二氯甲烷) 和 PE-Rh (磷脂醯乙醇胺- (麗斯胺羅丹明 B)) (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，溶於有機溶劑二氯甲烷) 溶液滴入 2 ml 渦旋震盪中的聚乙烯醇 PVA 溶液 (水中體積百分濃度 0.5%)。該混合溶液在冰浴下超音波震盪 30 秒鐘，形成一乳狀液 (油包水，乳化於 PVA 溶液

中的 PLGA 與 PE-Rh/有機溶劑)。以真空減壓旋轉濃縮機去除有機溶劑，形成包覆 PE-Rh 的 PLGA 奈米粒子懸浮液，並以離心法純化。

取包覆 PE-Rh 的 PLGA 奈米粒子溶液 50 微升，加入內含 PLGA (10 mg/ml) 的二氯甲烷和香豆素 6 (5 $\mu\text{g/ml}$) 500 μL 。將該混合溶液在冰浴下超音波震盪 30 秒鐘，以形成第一項乳狀液 (即油包水乳狀液；包覆 PE-Rh 的 PLGA 奈米粒子液體懸浮於於 PLGA/香豆素 6 液體)。隨即將第一項乳狀液滴入 3 ml (體積百分濃度 0.5%) 渦旋震盪中的聚乙烯醇 (PVA) 溶液中。將該混合溶液在冰浴下超音波震盪 30 秒鐘，形成第二項乳狀液 (即水包油包水乳狀液；包覆 PE-Rh 的 PLGA 奈米粒子液體懸浮於於 PLGA/香豆素 6 液體，PLGA/香豆素 6 液體又懸浮於 PVA 液體中)。以真空減壓旋轉濃縮機去除有機溶劑，離心分離後，每一粒子均含包覆於 PLGA 核殼中的香豆素 6，且圍繞著包覆於 PLGA 奈米粒子中的 PE-Rh。

PR-Rh 紅螢光成像係經 532 nm 波長的雷射光激發後由共軛焦顯微鏡 (SPE, Leica) 觀測放射波長 580 nm 處，而香豆素 6 綠螢光則係經 488 nm 波長的雷射光激發後觀測放射波長 580 nm 處取得之成像。

圖 3B-3D 顯示包覆香豆素 6 和 PE-Rh 兩項螢光物的 PLGA 微米粒子，其中只有 PE-Rh 被包覆於 PLGA 奈米粒子中。香豆素 6 顯現為綠螢光，PE-Rh 則為紅螢光。圖 3C 及 3D 為圖

3B 方框範圍的放大圖示。圖 3C 影像係以激發綠螢光的激光與放射濾片成像，圖 3D 圖示則以激發紅螢光的濾片成像，圖 3B 圖示為圖 3C 與 3D 之全景。如圖 3B 所示，兩種螢光染劑完全分離，紅螢光影像於分離的粒子上，綠螢光則分佈在紅螢光外但被密封於微米粒子中。以綠螢光激發方框中的圖像，除了 4 個分離的小區塊之外，在微米粒子中觀測到綠螢光分子的分佈（圖 3C）。當以紅螢光激發後，即觀測到微米粒子中 4 個分離的粒子（圖 3D）。

實施例 6

體外釋放實驗與穩定度測試

PLGA-GDNF

進行 PLGA 粒子中的 GDNF 體外釋放實驗時，將其置於 37°C 條件下，以神經細胞無血清培養液（Life Technologies）培養。在 96 孔微量盤中加入 100 μg 的 PLGA-GDNF 奈米粒子，該奈米粒子懸浮於 20 mL 的培養液中，並在每個盤孔置入溶液。在預定的時間點上，從盤孔收集 80 μL 的溶液，然後以 ELISA 酵素免疫分析儀分析 GDNF 濃度。

PLGA-BSA

在 4°C 條件下，以 15000 rpm 對一定量且包覆 BSA 的奈米粒子懸浮液進行離心分離 30 分鐘。去除上清液後，將取得之包覆 BSA 的奈米粒子重新懸浮並培養於 5 ml 的 10 mM 磷酸緩衝溶液（pH 7.4）、100 mM 磷酸緩衝溶液或水中，每一實

驗組均在 37°C 條件下攪拌。在每次進行釋放實驗時，取含有 1 mg/ml BSA 濃度的奈米粒子。於特定的時間點當中，以 15000 rpm 對樣品進行離心分離，去除 5 ml 的懸浮液，再回補同樣體積的乾淨培養液。在不同時間點釋放的 BSA 總量則用蛋白質定量分析法測定。以溶於培養液中的新鮮 BSA 製做其校正曲線。所有的實驗均測量三個樣本。無包覆物的 CSDS 奈米粒子則培養於 37°C 條件下，並採相同的方式測量以做為實驗控制組樣本。

以 SDS-凝膠電泳分析法測量釋放後的 BSA 完整性，進行包覆 BSA 的奈米粒子穩定度測試。在採行 SDS-凝膠電泳分析前將釋放樣本凍乾以濃縮蛋白質。將凍乾的釋放樣本溶解於 50 μ L 含 0.1% 溴酚藍試劑和 20% 甘油的 Tris-甘胺酸 SDS-凝膠電泳緩衝液中。將溶解後達分子量標準值 (6.6-200 kDa) 的樣本溶液負載於 Tris-甘胺酸梯度凝膠 (8%-16%)。從無包覆物 CSDS 奈米粒子取得釋放培養液並以同樣的方式測量以做為控制組。凝膠電泳分析時採直立式電泳槽 Mini-Protein II cell (Bio-Rad Laboratories) 及電源供應器 Power PAC 300，以恆定電壓 (150 V) 作用 90 分鐘，分離膠體緩衝液含 25 mM Tris、192 mM 甘胺酸和 0.1% SDS，其 pH 值為 8.3。以含有 10% 乙酸和 25% 異丙醇的 0.1% 卡馬西藍 R-250 溶液對樣本條帶染色 30 分鐘，再以含 50% 乙酸的異丙醇溶液脫色一個晚上。凝膠上分離的 BSA 係以電泳凝膠影像統觀測 (Kodak Digital Science 1

D, Rochester, NY)。

實施例 7

脊髓損傷的治療

方法

脊髓挫傷與注射包覆治療藥物的疏水性粒子。根據前述之程序在老鼠身上以實驗方式誘發脊髓軸突損傷 (Yang et al., (2008) “Sustained intraspinal delivery of neurotrophic factor encapsulated in biodegradable nanoparticles following contusive spinal cord injury” *Biomaterials* 29, 4546-4553, 其內容係完整地以引用方式納入本文作為參考)。實驗過程簡述如下，對成年雌性 SD 鼠施行麻醉，並以 T9/T10 等級的椎板切除術使其脊髓暴露於外。再使重達 10-g 的棒子分別於 25 mm (中度 SCI) 和 50 mm (重度 SCI) 處掉落在以椎板切除術處理過的脊髓上，實驗中使用的裝置係由紐約大學所研發。外科手術進行期間，以恆溫器控釋的加熱板使母鼠直腸溫度維持在 37°C。

脊髓損傷造成後馬上進行奈米粒子注射。以容量為 5- μ L 的 Exmire 毛細管式微量注射器結合 31-gauge 針頭，並定位在 L1 的中線，然後以腦立體測定方式在脊髓硬膜下注射達 0.7-0.8 mm 處。PLGA-GDNF (2 μ g/5 μ L/注射；4 μ g/母鼠；n= 6) 或 PLGA 奈米粒子大約被注入損傷部位中心 406 的前端 402 和後端 404 (如圖 4A)。每次注射後先將針頭靜置於脊髓內 2 分鐘，以避免注射液體外漏至損傷部位外。然後成對放置實驗動物，

每天至少手工排空其膀胱兩次。此外，在動物進行脊髓損傷手術後每天施以抗生素（氨比西林，80 mg/kg/每天），持續一周。動物照護程序係依照成功大學動物實驗管理小組的實驗動物護理和使用指南，符合實驗動物福利法相關規定。

評估下肢運動功能。注射 PLGA 或 PLGA-GDNF 的動物之運動功能，每周均以雙盲法評估其 BBB 下肢運動量表。進行運動功能觀測時，將老鼠置於附有壓鑄塑膠板的開放空間中 4 分鐘。動物下肢運動恢復計數由 0 分（下肢無法運動）到 21 分（正常）。

組織製備與免疫螢光檢測法。在實驗動物心臟內灌注 0.9% 冷氯化鈉（平均每隻母鼠 400 ml），再灌注含 0.4% 多聚甲醛的 0.1 M 磷酸緩衝液（每隻母鼠 500 ml）。移除後的脊髓，以後固定方式置於 4% 多聚甲醛中一夜，然後以超低溫保護於蔗糖重量百分濃度達 30% 的 PBS 中一天。將包括中心部位大約 2 cm 的脊髓包埋於組織包埋液 Tissue Tek OCT (Miles) 中，縱向切除 20 μ m 的切片。該組織以磷酸緩衝液漂洗 3 次後，再以 Nuclear Red 或 DAPI 染色。

以 PBS 漂洗組織切片 3 次後，再將其與含 5% 正常山羊血清的 PBS 與 0.1% Triton X-100 培養 30 分鐘，增加組織的滲透性及降低非特異性結合。初級兔抗體，抗-神經纖維蛋白（anti-neurofilament，為一神經元標記物）-200 kDa（NF; Sigma），anti-Iba 1（抗-微小神經膠細胞，為一微小神經膠細胞

標記物)(Wako)，和 anti-GFAP (抗-膠質纖維酸性蛋白，為一神經膠細胞標記物)(Chemicon)，以 1:200 倍數稀釋，與切片培養於 4°C 條件下一夜。再以 PBS 漂洗後，於室溫下以生物素標定的次級抗體培養切片 1 小時，漂洗後在室溫下與螢光-抗生物素蛋白培養 45 分鐘。將經免疫標記的切片以後染色方式加上 DAPI 染劑，以顯現其細胞核。實驗採裝備冷卻式電荷耦合元件系統的 Nikon E-800 顯微鏡成像。

結果

PLGA 奈米粒子中 GDNF 的體外釋放圖顯示，該釋放作用可持續超過 7 天 (圖 1B)。在重度脊髓損傷發生後於受傷的脊髓注射 PLGA 以及 PLGA-GDNF 的運動功能恢復效果則如圖 4B 所示。每 2-3 天均以 BBB 下肢運動量表評估其下肢運動功能，直到第 31 天。施以 PLGA 的母鼠運動功能只有些微進展。第一週時其分數只有 1.3 ± 0.2 ，第二週時則為 2.7 ± 0.3 ，最後第 31 天時才只有進步到 3.9 分。然而施行 PLGA-GDNF 的母鼠分數表現則有顯著提升。其第一週分數即改善至 3.7 ± 0.9 ，第二週為 8.4 ± 1.1 ，第 31 天時則為 9.5 ± 0.8 。該結果明顯優於只施以 GDNF 藥物之表現，且與重量步伐足跡結果相吻合。

在免疫螢光檢查法中發現，接受 PLGA-GDNF 治療的 SCI 鼠脊髓損傷部位，有被神經纖維蛋白染色且呈現細長完好的神經纖維束 (圖 4D 箭號標示處)，但在接受 PLGA 藥物治療的實驗動物身上，只有少數完好的神經纖維片斷 (圖 4C 箭頭標示

處)。該結果顯示 PLGA-GDNF 可於脊髓神經元上誘發較好的神經保護作用，對於受到重度 SCI 的實驗鼠下肢功能恢復而言為一重要因素。然而在形態觀察檢試結果方面，無論施以 PLGA 或 PLGA-GDNF 藥物，SCI 鼠的脊髓損傷部位被染色的 Iba 1 微小神經膠細胞都呈現了多種型態（圖 5A 及 5B，箭號標示阿米巴樣 Iba 1⁺微小神經膠細胞，箭頭則標示呈分歧狀的 Iba 1⁺微小神經膠細胞）。此外，在神經末梢區域亦觀測到由 GFAP 免疫反應所誘發的星狀細胞堆積（圖 5F 與 5G）。相較於假冒（亦即無損傷）的脊髓（圖 5E），不管施以 PLGA 或 PLGA-GDNF 藥物，在損傷的脊髓上都出現明顯過度生長的星狀細胞（圖 5C 與 5D，箭號標示處）。據本研究結果指出，在受損脊椎內投以 PLGA-GDNA 藥物，並無顯著活化神經膠細胞之效果。

本研究結果表明，包覆於 PLGA 奈米粒中的 GDNF 對於重度 SCI 的實驗性治療具有顯著的成效。此外，經 PLGA 負載的 GDNF 可以連續性釋放。在 SCI 受損部位附近注射 PLGA-GDNF 可對倖存的神經元產生保護作用，並且有助於肢體運動功能的恢復。

本發明係有關於一控制釋放多藥，其可改善脊髓損傷（SCI）後肢體功能的恢復，該製劑配方包括：a) 一第一項組成物包含一第一項生物活性劑，其包覆於一第一項聚合物粒子中；b) 一第二項組成物包含一第二項生物活性劑，其包覆於

一第二項聚合物粒子中，該第二項聚合物粒子包覆於第一項聚合物粒子中；c) 亦可加上一第三項組成物包含一第三項生物活性劑，其包覆於第一或第二項聚合物粒子中，該第二項組成物之釋放順序須在第一項組成物之後，第一項生物活性劑為一神經營養因子，第二項生物活性劑則為一膠原蛋白合成抑制劑，第三項生物活性劑係選自由環腺酶單磷酸、一腺苷酸環化酶活化劑和一 Rho 抑制劑所組成的群組 (Thuret et al., (2006) “Therapeutic interventions after spinal cord injury” Nature Reviews, Neuroscience Vol7: 628-643，其內容係完整地以引用方式納入本文作為參考)。

前述對於本發明較佳實施例之描述，僅為用以說明及敘述的目的，而非用用限制本創作。熟悉該技藝者將可體會本創作可能使用於很多形式、結構和材料的修改。

所選擇及描述之具體態樣與實施例，係為解釋本發明之原理及其實際的應用，以使熟悉該項技藝者能夠應用本發明及各種實施態樣，且能依其所預期的特別用途進行各種適合之修改。其他具體實施例在不脫離本發明之精神及範圍下，對於熟悉該項技藝者是顯而易知的。因此，本發明之範圍應由後附申請專利範圍所界定，而非受限於前述的說明及實施例。

於本發明說明中引用及論述某些參考文獻，其可包括專利案、專利申請案及各種公開文獻。此等參考文獻之引用及論述僅用以闡明本發明之說明，而非認可此類文獻係屬本發明內容

之“先前技藝”。所有於本說明書中引用及論述之參考文獻，係完整地以引用方式納入本文，並且在一定程度上，每個參考資料均各別地被引用至參考文獻中。

【圖式簡單說明】

圖 1A 為一概要圖式，說明包覆如神經膠細胞衍生神經營養因子 (GDNF) 之生物活性劑於 PLGA 粒子中之製程。

圖 1B 則表示包覆於 PLGA 中的 GDNF 長時間釋放圖。

圖 2A 為一概要圖示，說明依據本發明之一項具體態樣如何製備一控制釋放多藥製劑配方。

圖 2B-2D 為穿透式電子顯微鏡 (TEM) 之成像。圖 B：CSDS 奈米粒子；圖 C：包覆於 PLGA 粒子中的 CSDS 奈米粒子 (箭號)；圖 D：PLGA 奈米粒子。

圖 3A 為一概要圖示，說明依據本發明之另一項具體態樣如何製備一控制釋放多藥製劑配方。

圖 3B-3D 共軛焦顯微鏡成像，顯示依據本發明之另一項具體態樣所說明的控制釋放多藥製劑配方。圖 B：圖 C 與 D 之全景；圖 C：香豆素 6；圖 D：磷脂醯乙醇胺。比例尺為：10 μm 。

圖 4A 為脊髓挫傷後 PLGA-GDNF 注射位置圖。

圖 4B 表示 SCI 鼠在注射 PLGA 和 PLGA-GDNF 藥物後運動功能表現分數。

圖 4C 為 SCI 鼠注射 PLGA 後其脊髓神經纖維蛋白染色顯微成像。比例尺：50 μm 。

圖 4D 為 SCI 鼠注射 PLGA-GDNF 後其脊髓神經纖維蛋白染色顯微成像。比例尺：50 μm 。

圖 5A 為 SCI 鼠注射 PLGA 後其脊髓微小神經膠細胞 Iba 1 染色顯微成像。比例尺：50 μm 。

圖 5B 為 SCI 鼠注射 PLGA-GDNF 後其脊髓微小神經膠細胞 Iba 1 染色顯微成像。比例尺：50 μm 。

圖 5C 為 SCI 鼠注射 PLGA 後其脊髓膠質纖維酸性蛋白染色顯微成像。比例尺：50 μm 。

圖 5D 為 SCI 鼠注射 PLGA-GDNF 後其脊髓膠質纖維酸性蛋白染色顯微成像。比例尺：50 μm 。

圖 5E 為無損傷之 SCI 鼠脊髓膠質纖維酸性蛋白染色顯微成像。比例尺：50 μm 。

圖 5F 為無損傷之 SCI 鼠注射 PLGA 後脊髓膠質纖維酸性蛋白染色顯微成像。比例尺：50 μm 。

圖 5G 為無損傷之 SCI 鼠注射 PLGA-GDNF 後脊髓膠質纖維酸性蛋白染色顯微成像。比例尺：50 μm 。

【主要元件符號說明】

- 102 聚乳酸乙醇酸共聚物 (PLGA)
- 104 神經膠細胞衍生神經營養因子 (GDNF)
- 106 PLGA-GDNF 粒子
- 210 幾丁聚醣 (CS)
- 212 硫酸葡聚醣 (DS)
- 214 帶正電的藥物
- 216 包覆有硫酸葡聚醣的幾丁聚醣粒子
- 218 生物活性劑
- 220 包覆親水性粒子之疏水性微米粒子
- 322 第一項生物活性劑
- 324 內部的疏水性奈米粒子
- 326 第二項生物活性劑
- 328 包覆內部疏水性粒子之外部的疏水性微米粒子
- 402 脊髓軸突損傷部位中心前端
- 404 脊髓軸突損傷部位中心後端
- 406 脊髓軸突損傷部位中心

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： 99100292

※ 申請日： 99.1.7 ※IPC 分類：

A61K^{38/18}

A61K^{38/43}

A61P^{25/06}

一、發明名稱：(中文/英文)

用於脊髓損傷的控制釋放多藥製劑配方

Controlled release multidrug formulations for spinal cord injury

二、中文發明摘要：

一種改善脊髓損傷後肢體功能恢復的控制釋放多藥製劑配方，包括：a) 一第一項組成物包含一第一項生物活性劑，其包覆於一第一項聚合物粒子中；b) 一第二項組成物包含一第二項生物活性劑的，其包覆於一第二項聚合物粒子中，該第二項聚合物粒子包覆於第一項聚合物粒子中；c) 亦可加上一第三項組成物包含一第三項生物活性劑，其包覆於第一或第二項聚合物粒子中，其中該第二項組成物之釋放順序須在第一項組成物之後，第一項生物活性劑為一神經營養因子，第二項生物活性劑則為一膠原蛋白合成抑制劑，第三項生物活性劑係選自由環腺酶單磷酸、一腺苷酸環化酶活化劑和一 Rho 抑制劑所組成的組群。

三、英文發明摘要：

A controlled release multidrug formulation for improving locomotor recovery after spinal cord injury comprising: (a) a first composition comprising a first bioactive agent, encapsulated within a first polymeric particle; (b) a second composition comprising a second bioactive agent, encapsulated within a second polymeric particle, wherein the second polymeric particle is encapsulated within the first polymeric particle; and (c) a third composition comprising a third bioactive agent, encapsulated within either the first or the second polymeric particle, wherein the second composition is released subsequently to the release of the first composition, and wherein the first bioactive agent is a neurotrophic factor, the second bioactive agent is a collagen synthesis inhibitor, and the third bioactive agent is selected from the group consisting of cyclic AMP (cAMP), an adenylate cyclase activator and a Rho inhibitor.

七、申請專利範圍：

1. 一種用於改善哺乳動物脊髓損傷 (SCI) 後肢體功能恢復的醫藥組成物，其包含一有效劑量之包括下列組成物的控制釋放多藥製劑配方：
 - a) 一第一項組成物包含第一項生物活性劑，其包覆於一第一項聚合物粒子中；
 - b) 一第二項組成物包含第二項生物活性劑，其包覆於一第二項聚合物粒子中，該第二項聚合物粒子包覆於第一項聚合物粒子中；及
 - c) 視需要地一第三項組成物包含第三項生物活性劑，其包覆於該第一或第二項聚合物粒子中，其中該第二項組成物之釋放順序須在第一項組成物之後，且第一項生物活性劑為一神經營養因子，第二項生物活性劑則為一膠原蛋白合成抑制劑，第三項生物活性劑係選自由環腺酶單磷酸、腺苷酸環化酶活化劑和 Rho 抑制劑所組成的群組，以及一醫藥上可接受之載劑或賦形劑。
2. 根據申請專利範圍第 1 項之醫藥組成物，其中該第一項生物活性劑係選自由神經膠細胞衍生神經營養因子 (GDNF)、大腦衍生神經營養因子 (BDNF)、鹼性纖維母細胞生長因子、神經生長因子 (NGF)、神經營養素 3 (NT3)、神經營養素 4 (NT4)、及神經營養素 5 (NT5) 所組成的組群。
3. 根據申請專利範圍第 1 項之醫藥組成物，其中該第一項生物活性劑為神經膠細胞衍生神經營養因子 (GDNF)，該第二項生物

活性劑為軟骨素酶 ABC (ChABC)，該第三項生物活性劑為垂體腺苷酸環化酶激活多肽 (PACAP)。

4. 根據申請專利範圍第 1 項之醫藥組成物，其中該第一項聚合物粒子包覆一個以上包覆有第二項組成物的第二項聚合物粒子，且該第二項組成物包含第二項生物活性劑。
5. 根據申請專利範圍第 1 項之醫藥組成物，其中該第一項聚合物粒子係由聚乳酸乙醇酸共聚物 (PLGA) 或幾丁聚醣和硫酸葡聚醣所組成。
6. 根據申請專利範圍第 1 項之醫藥組成物，其中該第二項聚合物粒子係由 PLGA 或幾丁聚醣和硫酸葡聚醣所組成。
7. 根據申請專利範圍第 1 項之醫藥組成物，其中該第一項聚合物粒子包含一疏水性聚合物，且第二項聚合物粒子包含一疏水性或一親水性聚合物。
8. 根據申請專利範圍第 1 項之醫藥組成物，其中該第一項聚合物粒子包含一親水性聚合物，且第二項聚合物粒子包含一疏水性或一親水性聚合物。
9. 一種控制釋放多藥製劑配方，其包括：
 - a) 一包含第一項生物活性劑之第一項組成物，其包覆於一第一項聚合物粒子中；
 - b) 一包含第二項生物活性劑之第二項組成物，其包覆於一第二項聚合物粒子中，其中該第二項聚合物粒子包覆於第一項聚合物粒子中；
 - c) 亦可加上一包含一第三項生物活性劑之第三項組成物，其包覆於第一或第二項聚合物粒子中，其中該第二項組成物之釋

放順序須在第一項組成物之後。

10. 根據申請專利範圍第 9 項之製劑配方，其中該第一項生物活性劑為一神經營養因子，該第二項生物活性劑為一膠原蛋白合成抑制劑，且該第三項生物活性劑係選自由環腺酶單磷酸 (cAMP)、一腺苷酸環化酶活化劑和一 Rho 抑制劑所組成的組群。
11. 根據申請專利範圍第 10 項之製劑配方，其中該神經營養因子係選自由神經膠細胞衍生神經營養因子 (GDNF)、大腦衍生神經營養因子 (BDNF)、鹼性纖維母細胞生長因子、神經生長因子 (NGF)、神經營養素 3 (NT3)、神經營養素 4 (NT4)、神經營養素 5 (NT5) 所組成的組群。
12. 根據申請專利範圍第 10 項之製劑配方，其中該膠原蛋白合成抑制劑為軟骨素酶 ABC (ChABC)。
13. 根據申請專利範圍第 10 項之製劑配方，其中該腺苷酸環化酶活化劑為垂體腺苷酸環化酶激化多肽 (PACAP)。
14. 根據申請專利範圍第 13 項之製劑配方，其中該 PACAP 係包覆於該第一項聚合物粒子中。
15. 根據申請專利範圍第 10 項之製劑配方，其中該 Rho 激酶抑制劑係選自由 C3-二磷酸腺苷-核糖基轉移酶和 BA-210 重組蛋白所組成的組群。
16. 根據申請專利範圍第 9 項之製劑配方，其中該第一項聚合物粒子係由 PLGA 組成，且該第二項聚合物粒子係由 PLGA 或幾丁聚醣和硫酸葡聚醣所組成。
17. 根據申請專利範圍第 9 項之製劑配方，其中該第一項聚合物粒

子係由 PLGA 或幾丁聚醣和硫酸葡聚醣所組成。

18. 根據申請專利範圍第 9 項之製劑配方，其中該第一項聚合物粒子包覆一個以上包覆有第二項組成物的第二項聚合物粒子，且該第二項組成物包含第二項生物活性劑。
19. 根據申請專利範圍第 9 項之製劑配方，其中該第一項生物活性劑為神經膠細胞衍生神經營養因子 (GDNF)，該第二項生物活性劑為軟骨素酶 ABC (ChABC)，且該第三項生物活性劑為垂體腺苷酸環化酶激活多肽 (PACAP)。
20. 根據申請專利範圍第 9 項之製劑配方，其中該第一項聚合物粒子包含一疏水性聚合物，且第二項聚合物粒子包含一疏水性或一親水性聚合物。

八、圖式：

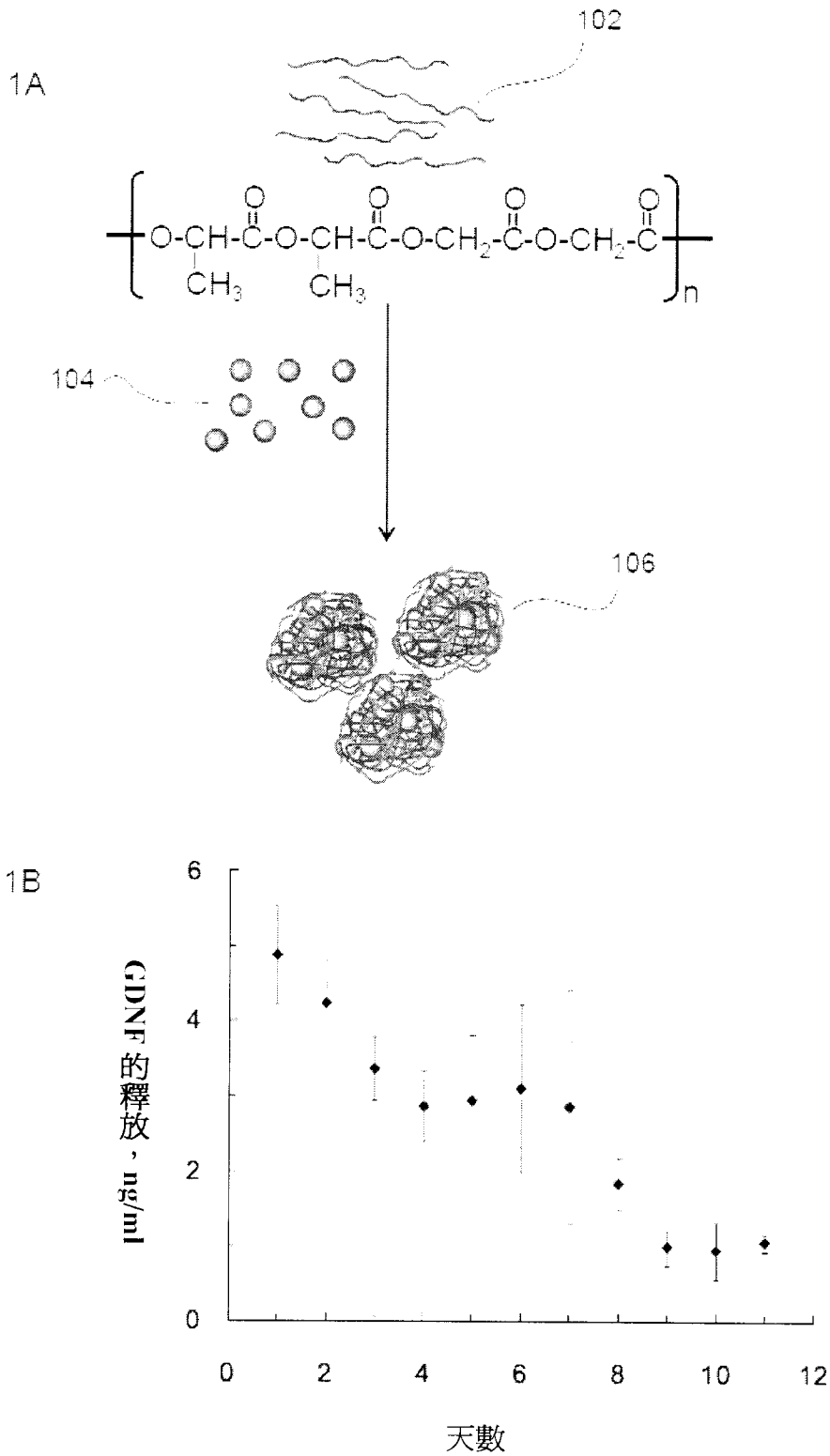


圖 1

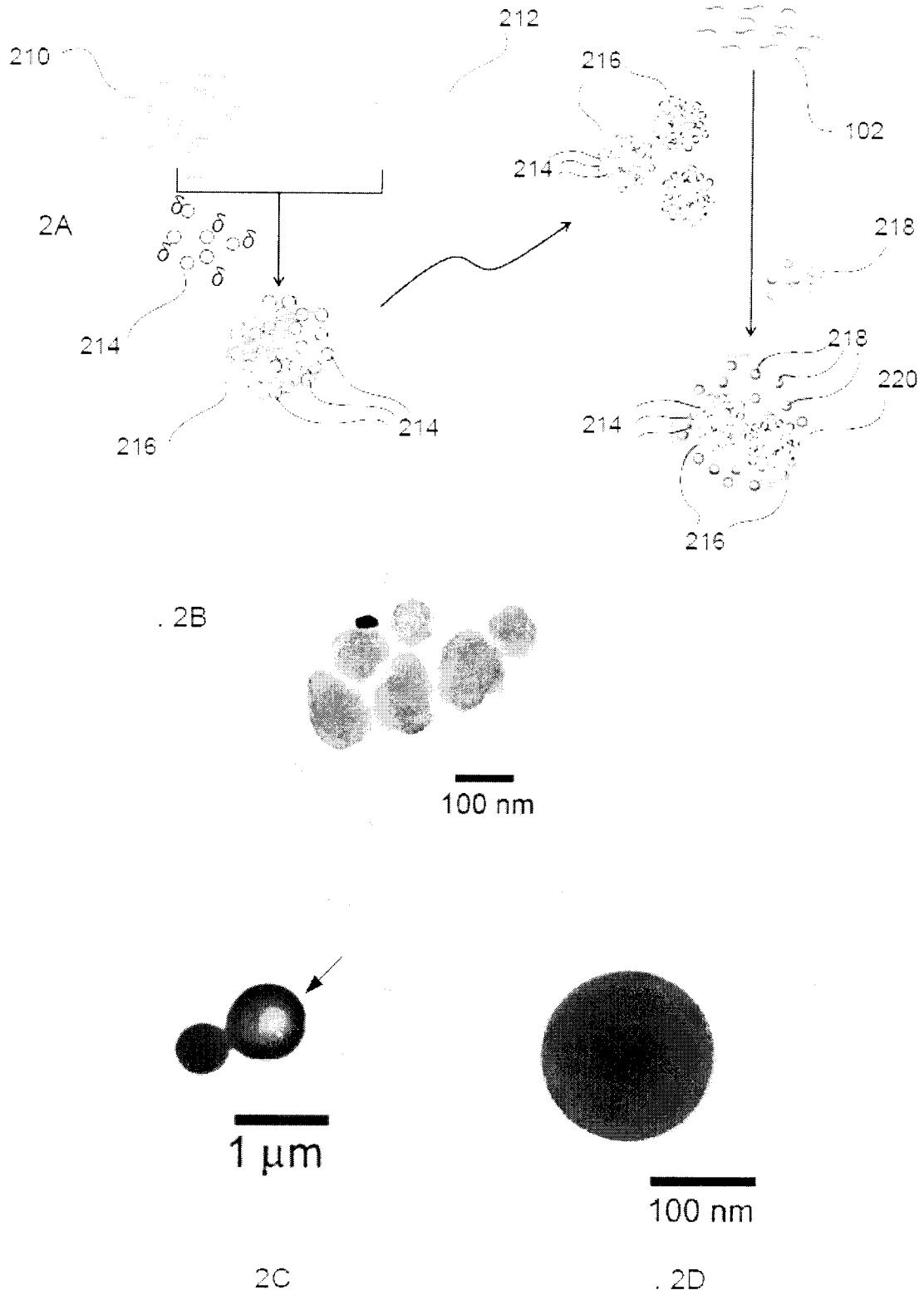
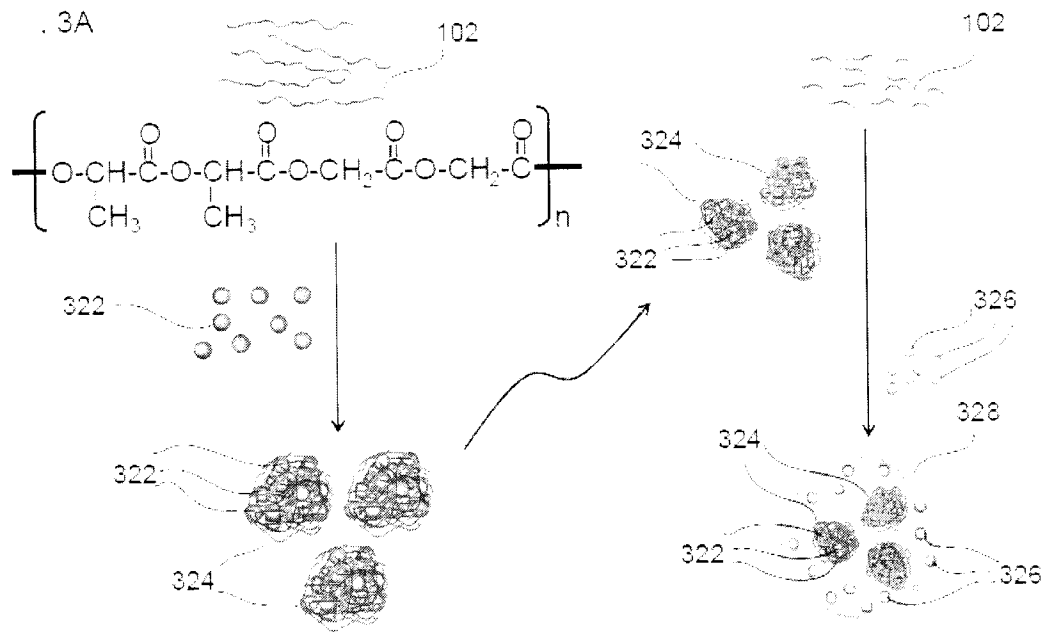
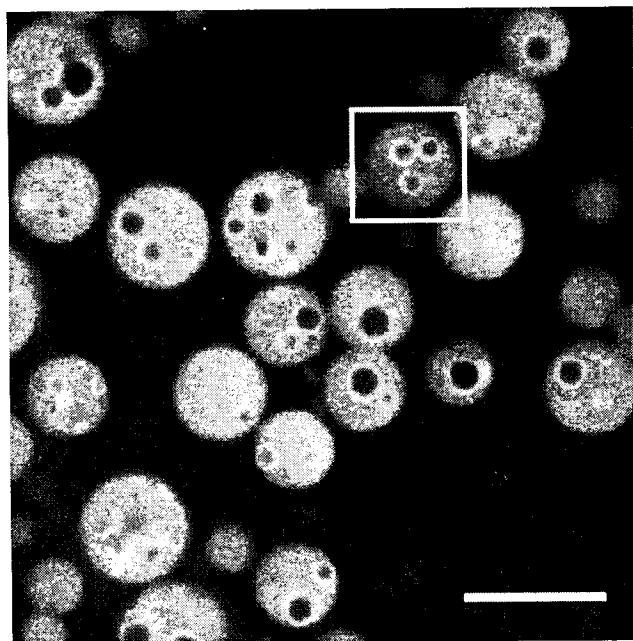


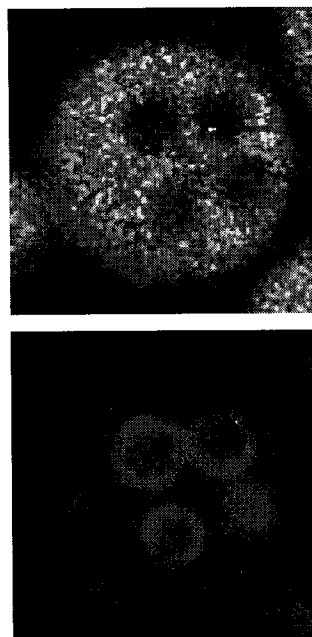
圖 2



3B



3C



3D

圖 3

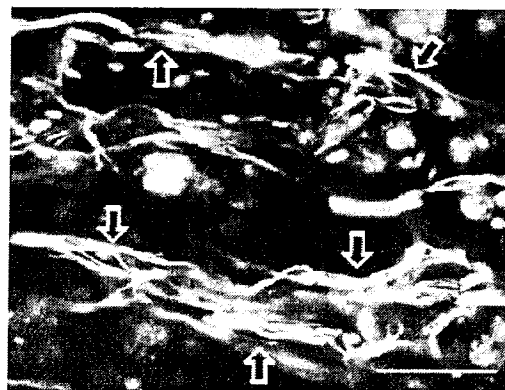
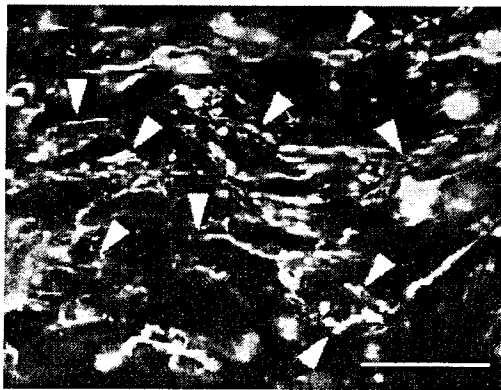
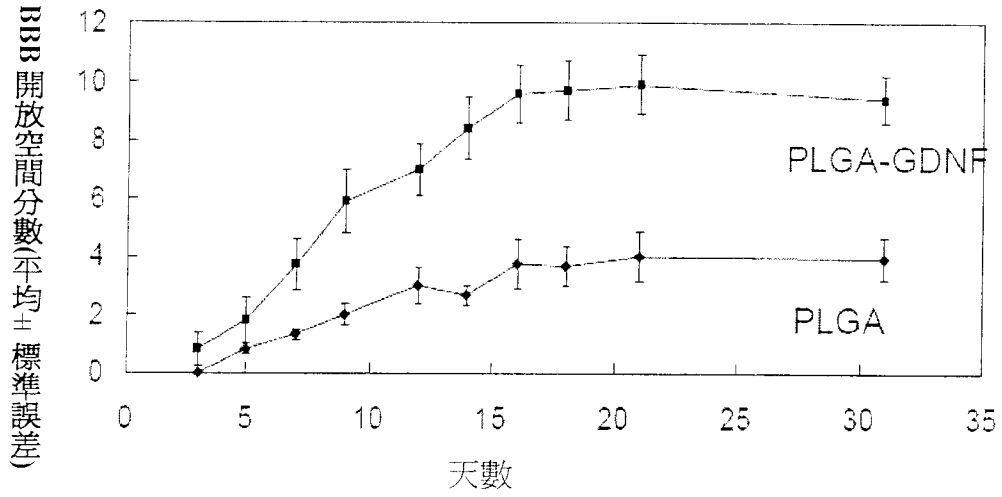
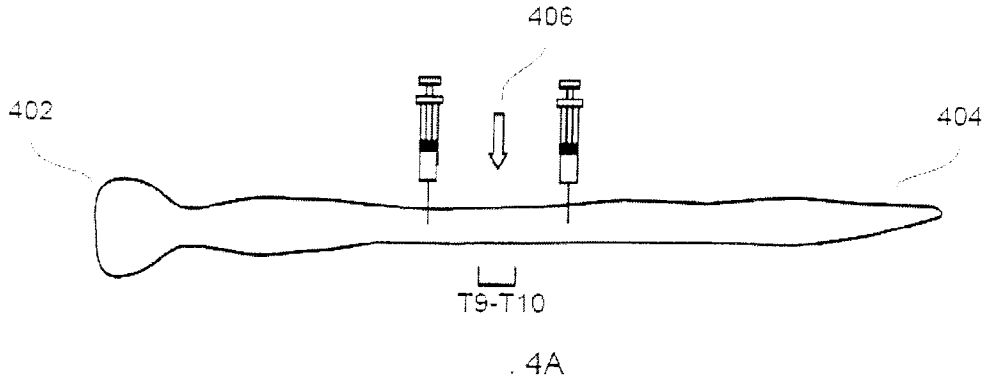
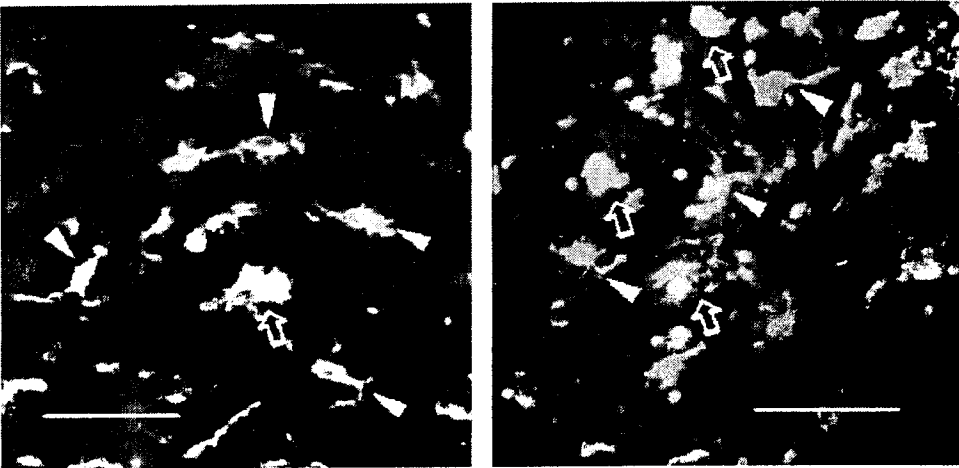
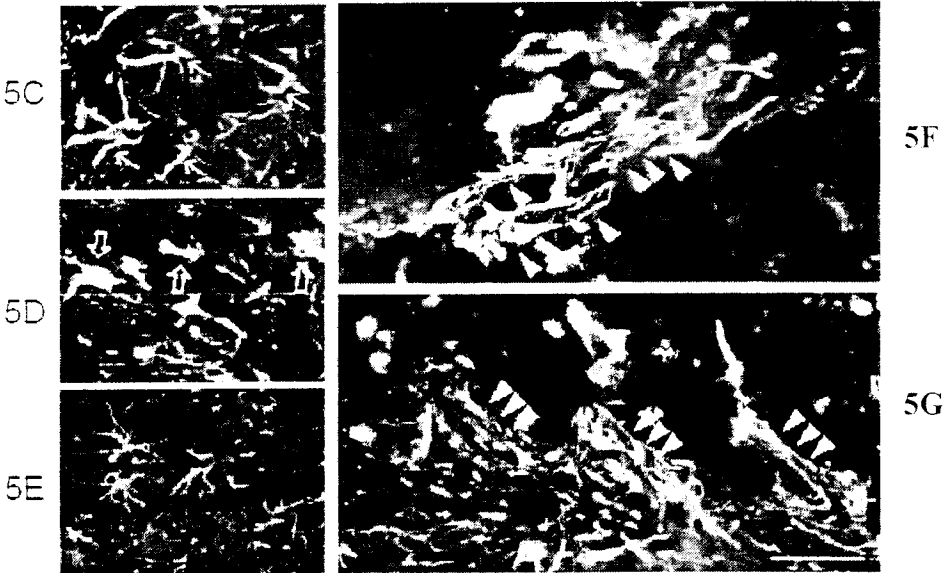


圖 4



5A

5B



5C

5F

5D

5G

5E

圖 5

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 1 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

102 聚乳酸乙醇酸共聚物 (PLGA)

104 神經膠細胞衍生神經營養因子 (GDNF)

106 PLGA-GDNF 粒子

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：