



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I400083B1

(45)公告日：中華民國 102 (2013) 年 07 月 01 日

(21)申請案號：098143881

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 12 月 21 日

(51)Int. Cl. : A61K38/17 (2006.01)

A61K47/48 (2006.01)

A61P1/02 (2006.01)

A61P31/04 (2006.01)

(30)優先權：2008/12/19 日本

2008-324524

2009/09/09 日本

2009-208631

(71)申請人：福島忠男 (日本) FUKUSHIMA TADAO (JP)

日本

瑪魯哈日魯食品股份有限公司 (日本) MARUHA NICHIRO FOODS, INC. (JP)

日本

(72)發明人：福島忠男 FUKUSHIMA, TADAO (JP)；早川徹 HAYAKAWA, TOHRU (JP)；岡畑
惠雄 OKAHATA, YOSHIO (JP)；御手洗誠 MITARAI, MAKOTO (JP)；庵原啟司
IOHARA, KEISHI (JP)；江成宏之 ENARI, HIROYUKI (JP)；關戶治知 SEKIDO,
HARUCHIKA (JP)

(74)代理人：周良謀；周良吉

(56)參考文獻：

JP 2001-327591A

US 2008/0139450A1

Fukushima T, et al. "Complexation of DNA with cationic polyamino
acid for biomaterial purposes" Journal of Oral Tissue Engineering
2008;6(1):24-32

審查人員：楊婷雅

申請專利範圍項數：9 項 圖式數：10 共 0 頁

(54)名稱

醫療用或牙科用材料

MEDICAL OR DENTAL MATERIALS

(57)摘要

藉由將魚精蛋白(protamine)、或其衍生物、水解物其中至少 1 種作為其有效成分，或將魚精蛋白、或其衍生物、水解物當中至少 1 種與陰離子性高分子的複合體作為有效成分，而製備醫療用或牙科用材料，可提供無副作用顧慮、安全性高的抗牙周病菌劑，且可提供除了顯示牙周病原菌的抗菌活性而且不溶於水且具良好賦形性之醫療用或牙科用材料。

This invention provides an anti periodontitis-causing microorganism agent that is highly safe and has no side effects and medical or dental materials that can make good water-insoluble excipients in addition to show antibacterial activity to periodontitis-causing microorganism by preparing the medical or dental materials with effective ingredients formed by at least one of protamin or its derivatives and hydrolysates, or from the complex of anionic high polymer and at least one of protamin or its derivatives and hydrolysates.

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於對於牙周病原菌顯示生長抑制活性之含有魚精蛋白、或其衍生物、水解物之抗牙周病菌劑，及關於含有由此等魚精蛋白、或其衍生物、水解物與陰離子性高分子形成之複合體的抗牙周病菌劑及醫療用或牙科用材料。

【先前技術】

牙周病除了涉及多數牙周病原菌以外，尚有寄主的原因或吸煙等生活習慣的原因而發病，據說日本國內成人有約 80%罹患。牙周病會使牙齒的支持功能下降，不僅會引起牙齒喪失伴隨的咀嚼功能障礙造成生活品質(QOL)下降，尚據報告會成為心臟循環系疾病(心內膜炎、冠狀動脈性心臟病)或肺炎、早產、產出低體重兒等全身性疾病的風險因子。因此，不僅是在高齡化嚴重的日本等許多國家的國民的生活品質提升，在其他臨床領域，牙周病的預防與治療所帶來的效果也非常大。

牙周病直接原因為牙周病原菌本身，或病原菌產生的蛋白酶，因為此等發生牙肉炎，且若進一步進展，發炎會擴展直到牙周組織成為牙周炎。牙周病原菌幾乎多為革蘭氏陰性偏性嫌氣性細菌，代表的病原菌有：*Porphyromonas gingivalis* 或 *Treponema denticola*、*Tannerella forsythensis*、*Prevotella intermedia*、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 等。

現在針對此等牙周病原菌的抗菌劑，已使用 β 內醯胺系、巨環內酯系、喹諾酮系抗菌劑，但是由於其抗菌力各有特徵，因此必需配合病原菌種類或牙周病的進行狀況而選擇或併用抗菌劑，另一方面，當投予量、投予次數增加時有時會有副作用的問題。因此，實際上成為牙周炎治療之主體者為牙菌斑或牙結石、牙根表面之內毒素等機械除去或外科性的發炎性組織的切除等，抗菌劑的投予除了在牙周炎急性發作時以外僅作為輔助性治療。

於此背景當中，有人報告從魚類的精囊(魚白)得到的係鹼性

蛋白質魚精蛋白，對於 *gingivalis* 菌產生的蛋白酶 argingipain 顯示有抑制活性(參照 Kotani M 等 5 人之「Inhibitory effects of protamines on proteolytic and adhesive activities of *Porphiromonas gingivalis*.」、Infection Immunity、1999 年、第 67 卷、第 9 號、p. 4917-4920)。又，有人揭示藉由含有魚精蛋白或其衍生物及妥內散酸(tranexamic acid)及/或 epsilon-胺基己酸，可有效抑制牙周病原菌造成的牙周炎(參照日本特開 2007-169201 號公報)。此等魚精蛋白一般作為食品保存料使用，由於安全性高，作為替代習知之殺菌劑、抗生素的藥劑係屬可期待。

另一方面，有人揭示魚精蛋白對於齲齒原因菌的轉糖鏈球菌(*Streptococcus mutans*)顯示生長抑制效果(參照日本特開平 11-228526 號公報)或顯示口腔內細菌之附著抑制效果(參照日本特開 2001-89436 號公報)。又，本案申請人等發現魚精蛋白的水解物對於引起口腔念珠菌症的念珠菌屬等真菌顯示抗真菌活性(參照日本特開 2008-133253 號公報)。

如此，已知魚精蛋白或其衍生物不只顯示抗菌作用，也顯示牙周病的發炎抑制作用，但是至今為止對於牙周病原菌本身的生長抑制作用尚為未知。又，由於魚精蛋白為水溶性，故認為於口腔內長時間維持對於牙周病原菌的生長抑制作用係屬困難。

另一方面，由於魚精蛋白為一種聚陽離子，已知會與陰離子性高分子產生靜電性鍵結，形成水不溶性的複合體。

與魚精蛋白同樣從魚類的精囊得到的 DNA，於 DNA 分子內有多數成為陰離子性鍵結要素的磷酸基，對於陽離子性物質顯示靜電性親和性，因此，能與此等陽離子性物質形成靜電性反應物。原本 DNA 分子欠缺賦形性且為水溶性，在活體內的代謝擴散速度的調整有其困難，但是有人揭示：藉由使 DNA 分子與陽離子性人工脂質靜電性鍵結，可製備水不溶性、自支持性的透明薄膜(參照日本特開平 8-239398 號公報)。

又，此公報揭示的 DNA/脂質複合體薄膜，可使活體高分子

DNA 分子保持規則的雙螺旋構造，各種低分子化合物插入 (intercalate) 到雙螺旋構造的 DNA 鹼基的間隙，或同樣的低分子化合物基團鍵結 (group binding) 到 DNA 具有的 2 個溝 (主溝、副溝)，而藉由使藥效成分插入及/或基團鍵結發明了醫療用材料的製造方法 (參照日本特開 2001-327591 號公報)。

本案發明人等，著眼於已作為醫療用及/或牙科用材料利用的幾丁聚糖為陽離子性物質，發明：DNA 分子與幾丁聚糖之複合體保持 DNA 特有的雙螺旋構造且為水不溶性，具有活體親和性、抗菌性及良好賦形性 (參照日本特開 2005-2892522 號公報)。又，發明藉由使 DNA/幾丁聚糖複合體懸浮在磷酸緩衝液中，輕易地成形為絲狀、球狀、碟狀的方法 (參照日本特開 2007-97884 號公報)、於加熱下進行加壓成形所得的薄膜的製造方法 (參照日本特開 2008-110952 號公報)。此等 DNA/幾丁聚糖複合體及其成形物，由於具有優異的生物適應性及活體安定性，作為醫療用及/或牙科用材料係可期待。

但是，當將 DNA/幾丁聚糖複合體埋入大鼠皮下，確認在埋入初期產生視為急性發炎反應的嗜中性球，作為殺菌劑或抗生素仍有效果不完美的問題。所以，希望有比起幾丁聚糖顯示更為優異之生物適應性與抗菌作用的與陽離子性物質的複合體。又，於牙科領域希望開發對於牙周病菌具有抗菌活性的素材。

【發明內容】

<發明欲解決之問題>

本發明係有鑑於上述習知技術而生，本發明之第 1 目的在於提供無副作用顧慮、高安全性的抗牙周病菌劑，本發明之第 2 目的在於提供一種牙科用材料及/或醫療用材料，除了顯示牙周病原菌之抗菌活性，尚不溶於水且具有良好賦形性，且具有高生物適應性。

<解決課題之方式>

本發明中，第 1 發明 (以下記載為第 1 發明) 中，本案發明人

等經過努力研究，發現到：魚精蛋白或其衍生物或水解物對於牙周病菌顯示抗菌活性。魚精蛋白在利用作為食品保存料已有實績，已知對於人體的安全性高，由此得到作為替代以往的殺菌劑、抗生素的素材，於預防及治療牙周病為有效。

本發明中，第 2 發明(以下記載為第 2 發明)發現魚精蛋白或或其衍生物或水解物與陰離子性高分子的複合體，除了對於牙周病菌顯示抗菌活性，對於水為不溶性且賦形性優異，基於此等複合體於口腔內可長時間有效預防及治療牙周病的見解，完成第 2 發明。

本發明中，第 3 發明(以下記載為第 3 發明)著眼於第 2 發明中的作為陰離子性高分子的 DNA，發現顯示習知的 DNA 化合物無法得到的抗菌作用及高生物適應性，作為牙科用材料及/或醫療用材料可期待的見解。

即，本發明第 1 發明之抗牙周病菌劑，含有魚精蛋白、或其衍生物、水解物當中至少 1 種為有效成分，對於牙周病原菌呈現生長抑制作用。

本發明第 2 發明之抗牙周病菌劑，含有魚精蛋白、或其衍生物、水解物當中至少 1 種的有效成分與陰離子性高分子以靜電鍵結的複合體，不溶於水且具有賦形性，對於牙周病原菌呈現生長抑制作用。

本發明第 3 發明之醫療用或牙科用材料，含有魚精蛋白、或其衍生物、水解物當中至少 1 種的有效成分與陰離子性高分子以靜電鍵結之複合體，不溶於水且具有賦形性，對於牙周病原菌呈現生長抑制作用。

<發明之效果>

依照本發明，可提供一種抗牙周病菌劑，直接抑制口腔內之牙周病原菌生長，且對於人體的安全性高，故作為牙周病之預防、治療劑有效。又，與陰離子性高分子之化合物，對水為不溶且具有優異的賦形性，故能於口腔內長時間有效抑制牙周病原菌的生長。

本發明的複合體中，魚精蛋白/DNA 複合體由於生物適應性及活體內的安定性優異，尤其賦形性優異，因此可利用於作為牙周組織再生誘導(GTR)膜、骨再生誘導(GBR)法、抗菌性假牙塗佈劑、其他口腔內用抗菌劑、止血劑、各種衛生用品等。又，魚精蛋白/DNA 複合體可將低分子化合物插入或基團鍵結，故可支持成長因子(b-FGF、BMP 等)或抗生物質等藥物，送達到患部等必要處，能作為供給的傳遞系(DDS)用的膜、薄膜、襯墊材、或塗覆材。又，不僅是牙科用材料，也可多樣化利用作為再生醫療用之支架材(scaffold material)、創傷被覆材料、感染防止膜、癒合防止膜、移植材料等醫療用材料。

【實施方式】

＜實施發明之形態＞

其次詳細說明本發明。

魚精蛋白或其衍生物、水解物對於以 *Porphyromonas gingivalis* 或 *Prevotella intermedia* 為代表之至少1種牙周病原菌顯示抗菌活性，藉由於口腔內作為抗牙周病菌劑，可得到牙周病預防、緩和、或治療等效果。

魚精蛋白係於鮭魚、鯡魚、鱒魚等魚類之精子核中以鍵結於DNA之核魚精蛋白的形式存在的強鹼性蛋白質，視原料不同，稱為例如salmine (鮭魚)、clupeine (鯡魚)等，構造各有若干不同，但任一的魚精蛋白都可使用。

魚精蛋白衍生物，係指魚精蛋白與無機酸、或有機酸之鹽，或與無機鹼、或有機鹼之鹽。酸或鹼可視鹽的用途選擇，若考慮在食品、化粧品、醫藥品等的用途，較佳為以下列舉的藥學上可容許的鹽。酸加成鹽，例如與：鹽酸鹽、硝酸鹽、硫酸鹽、甲磺酸鹽、對甲苯磺酸鹽，更佳為草酸、丙二酸、琥珀酸、馬來酸、或富馬酸等二羧酸之鹽，又，與乙酸、丙酸、或丁酸等單羧酸之鹽等。又，適於形成本發明得到之胜肽化合物之鹽的無機鹼，例如：氨、鈉、鋰、鈣、鎂、鋁等的氫氧化物、碳酸鹽及重碳酸鹽

等。與有機鹼之鹽，例如：如甲胺、二甲胺、三乙胺的單、二及三烷基胺鹽、單、二及三羥基烷基胺鹽、胍鹽、N-甲基葡萄糖胺糖鹽等。

魚精蛋白之水解物，係將魚精蛋白藉由酸、鹼、蛋白質分解酵素、或此等的組合水解者，但希望係使用蛋白質分解酵素水解。水解方法，更細節如下。於魚精蛋白中加入去離子水，加入氫氧化鈉或鹽酸，將pH調整為酵素的最適pH。加溫至酵素之最適溫度後，添加酵素，一面攪拌一面進行酵素反應。反應結束後，將反應液加溫至80~100℃維持5~60分鐘使加熱失活，並調整pH成中性區後，將反應液冷凍乾燥，得到魚精蛋白分解物。

以上述方法製備的魚精蛋白分解物，由於將魚精蛋白完全分解後者幾乎未顯示抗菌性，故希望進行部分分解使得分子量分布在500~4,000的範圍。

可用於魚精蛋白的水解的蛋白質分解酵素，例如芽孢桿菌屬(*Bacillus*) (例如 *Bacillus subtilis*、*Bacillus thermoproteolyticus*、*Bacillus licheniformis*等)產生的酵素、麴菌屬(*Aspergillus*) (例如 *Aspergillus oryzae*、*Aspergillus niger*、*Aspergillus mellens*等)產生的酵素、根霉菌屬(*Rhizopus*) (例如 *Rhizopus Niveus*、*Rhizopus delemar*等)產生之酵素、胃蛋白酶、胰酶(pancreatin)、木瓜酶等。此等酵素可單獨使用，或組合2種以上使用。又，蛋白質分解酵素分類為：專一性認識蛋白質的內部序列並切斷的內切胜肽酶，以及從末端起每1~2個胺基酸殘基切斷的外切胜肽酶。因此，視需要藉由組合內切胜肽酶及外切胜肽酶，可產生各種胜肽鏈。以酵素水解時，係對基質添加酵素0.001~10%，並將溶液於使用的酵素的最適pH水解。

本發明之抗牙周病菌劑，係提供一種組成物，使用魚精蛋白或魚精蛋白衍生物、或魚精蛋白之水解物其中至少1種作為其有效成分，及視需要由擔體、稀釋劑、各種添加劑等副成分中選擇的成分。針對牙周病原菌的抗菌劑中含有的擔體或副成分(係視用途典型上於藥學上可容許者)，視用途或形態可適當為不同，例如：

水、各種有機溶劑、各種緩衝液其他充填劑、增量劑、黏結劑、附濕劑、表面活性劑、賦形劑、色素、香料等。

其次，本發明的抗牙周病菌劑可為複合體的形態，該複合體為係有效成分的魚精蛋白、魚精蛋白衍生物及魚精蛋白的水解物當中至少 1 種及與陰離子性高分子的靜電性反應物。該複合體對於牙周病菌具有抗菌活性，且不溶於水且具有賦形性。使用此複合體可得到醫療用或牙科用材料。

成為上述複合體之原料的陰離子性高分子，可選擇藻膠酸、藻膠酸鹽類或藻膠酸衍生物、DNA、RNA、果膠、鹿角菜膠、吉蘭膠，或聚羧酸可選擇羧基甲基纖維素、羧基甲基直鏈澱粉、聚麩胺酸等陰離子性聚胺基酸、羧基甲基澱粉、玻尿酸、聚丙烯酸、聚甲基丙烯酸等，聚硫酸可由硫酸葡聚糖、肝素、硫酸乙醯肝素 (heparin sulfate)、硫酸軟骨素、硫酸角質素、硫酸皮膚素 (dermatan sulfate)、聚乙基硫酸鉀等中選擇，可選擇該等當中的 1 至多種化合物。藻膠酸鹽類或藻膠酸衍生物，例如：藻膠酸鈉、藻膠酸丙二醇酯、藻膠酸寡糖等，但不限於此等。

此等之中，使用 DNA 作為陰離子之複合體，於形成複合體的至少一部分 DNA 保有 DNA 特有的雙螺旋構造，且該複合體對水實質上不具有溶解性，且具有生物適應性，為作為醫療用或牙科用材料尤佳的材料。

DNA 可利用天然來源的 DNA 及合成 DNA。天然來源的 DNA，例如：細菌病毒的 λ 噬菌體 DNA、大腸菌染色體 DNA、小牛胸腺 DNA、鮭魚、鯡魚、鱒魚等魚類精子 DNA。又，合成 DNA，例如可：使用 poly(dA)、poly(dT)、poly(dG)、poly(dC)、poly(dA-dT)、poly(dG-dC) 等以合成裝置合成之鹼基序列不同的各種合成 DNA；可使用 poly(A)、poly(T)、poly(G)、poly(U)、poly(A-T)、poly(G-U) 等以合成裝置合成之鹼基序列不同的各種合成 RNA；可使用 poly(dG)、poly(U)、poly(G)、poly(dC)、poly(dA-dT)、poly(A-T) 等 DNA/RNA 雜交體以合成裝置合成之具有互補鹼基對的 DNA/RNA 雜交體。此等可視需要單獨使用或組合使

用。

DNA 的分子量不特別限制，可保持某程度的雙螺旋構造即可。DNA 的分子量，可使用 10bp~30,000bp 的 DNA，但是若分子量過大，則水溶液製備有困難，反之，若分子量過小，則複合體的回收率減低，更佳為希望使用在 300bp~7,000bp 具有分子量分布的中心的 DNA。

如此的 DNA，具有形成雙螺旋的 4 種鹼基[胞嘧啶(C)、鳥嘌呤(G)、腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T)]鍵結各種基團(例如末端具有含磷酸之基團的基團)等的構造，此 DNA 全體顯示例如因為鍵結於上述末端之磷酸基等所得的陰離子性。

如此的 DNA 本身為具有雙螺旋構造的股狀物，又，由於此 DNA 溶於水，此 DNA 本身沒有成形性。利用 DNA 具有陰離子性，而藉由使陰離子性的 DNA 與陽離子性的聚陽離子化合物以靜電反應，可得到 DNA/聚陽離子複合體。藉由成為複合體，DNA 實質上不溶於水。又，對於有機溶劑的溶解性也減低。

以 DNA 作為陰離子使用之複合體，可藉由將 DNA，與魚精蛋白、魚精蛋白衍生物及魚精蛋白水解物當中至少 1 種於水性介質中反應而製備。例如，藉由將 DNA 的水溶液添加到攪拌中的魚精蛋白水溶液，可使此等反應。

DNA，與魚精蛋白、魚精蛋白衍生物及魚精蛋白水解物當中至少 1 種的配合比，可視此複合體的用途選擇。例如，可從 1/9 至 9/1、更佳為 1/1 至 1/1.5(重量比)的範圍選擇。

藉由使 DNA，與魚精蛋白、魚精蛋白衍生物及魚精蛋白水解物當中至少 1 種在水性介質中反應，產生複合體的沉澱。將此沉澱以水或各種緩衝液清洗，視需要，再以水洗，將多餘的水分以離心分離等除去後乾燥，可得複合體的乾燥物。乾燥可視目的適當選擇常溫乾燥法、加熱乾燥法、凍結乾燥法、減壓乾燥法等乾燥方法。

沉澱清洗用的緩衝液，可由以下當中選擇：Tris 緩衝液、硼酸緩衝液、HEPES 緩衝液、乙酸緩衝液、檸檬酸緩衝液、甘胺酸緩

衝液、巴比妥酸緩衝液、鄰苯二甲酸緩衝液、二甲酸(cacodylic acid)緩衝液、碳酸緩衝液、Bis-Tris 緩衝液、Bis-Tris-丙烷緩衝液、MES 緩衝液、ADA 緩衝液、PIPES 緩衝液、ACES 緩衝液、氯化可拉命(coramine chloride)緩衝液、BES 緩衝液、MOPS 緩衝液、TES 緩衝液、HEPPS 緩衝液、Tricine 緩衝液、甘胺酸鹽胺緩衝液、Bicine 緩衝液、TAPS 緩衝液、CHES 緩衝液、CAPS 緩衝液、磷酸緩衝液等。緩衝液的濃度或 pH 也可自由選擇使得到目的 DNA/魚精蛋白複合體的性狀或物性。

可將此方式得到之複合體乾燥物視需要粉碎，依目的成形為膠漿狀、凝膠狀、糊狀、股狀、棒狀、球狀、碟狀、薄膜狀等各種形態利用。此複合體由於未破壞 DNA 的雙螺旋構造，幾乎完全保留，因此使用此複合體能穩定 DNA 的機能並以良好效率利用。

以 DNA 作為陰離子使用之複合體，可藉由於其中加入例如適量的水並以研鉢捏合，視捏合時間可成為膠漿狀、凝膠狀，又可成為顯示黏著性之糊狀等可輕易成形的狀態。

又，以 DNA 作為陰離子使用的複合體的膠漿狀物，以注射器擠出到磷酸緩衝液中，可得到股狀成形物。又，充填於視目的之模具，可輕易得到棒狀、或球狀、碟狀等各種形狀的成形物。

以 DNA 作為陰離子使用的複合體的薄膜狀成形物，可藉由將此複合體的乾燥粉末、或膠漿狀、棒狀、球狀、碟狀成形物使用加熱成形機加壓而得到。又，可藉由將上述魚精蛋白/DNA 複合體成形物以研鉢使薄薄地延伸，而輕易形成為透明的薄膜。

使用上述加熱成形機製作薄膜時之溫度，可視薄膜成形用材料做各種設定，但更佳為於室溫(例如、 $15^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$) $\sim 120^{\circ}\text{C}$ 的範圍選擇。又，薄膜成形時的擠製壓力可從 $2 \sim 20\text{MPa}$ 的範圍選擇。加壓時間，可為得到所望物性之薄膜的程度，若為上述溫度及擠製壓力，則可於例如 $1 \sim 10$ 分鐘完成薄膜化。更佳為，藉由進行 $5 \sim 10$ 分鐘的擠製，製作為牢靠且不易破的薄膜。薄膜厚度，可藉由擠製時的溫度、壓力、加壓時間調節，依照本方法，可得到約 $1 \sim 100\mu\text{m}$ 之膜厚的透明複合體薄膜。

本發明之牙科用材料，可於達成使喪失的牙周組織再生的組織再生誘導(GTR)法中作為GTR膜利用。其中，含有DNA作為陰離子的複合體的牙科用材料，活體親和性(適合性)優異，作為GTR膜的構成成分尤佳。GTR膜，遮蔽於缺損部位先導增殖的上皮組織，係為了達成齒槽骨、齒根膜、齒莖質等再生的環境形成材料。此膜會在活體中留置一定期間，因此宜以活體親和性高的素材形成，又，更佳為對於牙周病菌等具有抗菌性。如此的膜，使用以膠原蛋白或聚乳酸為基材的吸收性膜及使用氟樹脂之非吸收性膜。本發明之由以DNA作為陰離子的複合體的薄膜狀、或凝膠狀、糊狀賦形物構成的GTR膜，活體親和性高，比起以往的膜能長時間安定使用。又，使用本發明之牙科用材料製造的GTR膜，可較使用以往的吸收性膜時的再生期間設定為更長。

又，本發明之牙科用材料，藉由形成例如膠漿狀或凝膠狀、糊狀賦形物，可作為假牙等的抗菌性塗布劑、或清洗劑。其中，由於以DNA作為陰離子之複合體在活體內的安定性優異，故比起以往的假牙劑塗佈，可能長時間發揮對於牙周病菌等的抗菌效果。

以DNA作為陰離子之複合體中，DNA具有的陰離子性基即磷酸基的一部分與魚精蛋白具有的陽離子性基靜電鍵結而展現所望的賦形性，但是，DNA分子中殘留有未與魚精蛋白鍵結的多數磷酸基。利用此DNA中的磷酸基，與骨形成因子或成長因子靜電鍵結，可作為此等細胞介素或抗生物質等的載體使用。又，利用DNA的雙螺旋構造所為的插入或基團鍵結，可作為藥劑的載體。

骨形成因子及成長因子，只要可載持於以DNA作為陰離子的複合體，即無特別限制可使用。例如，骨形成因子舉例有骨形成蛋白質(BMP)、重組人類骨形成蛋白質(rhBMP)、成長因子舉例有纖維母細胞增殖因子(FGF)、轉形增殖因子beta(TGF— β)、上皮增殖因子(EGF)、類胰島素增殖因子(IGF)、血小板來源增殖因子(PDGF)、血管內皮細胞增殖因子(VEGF)、神經營養因子(NGF)等，可使用其中至少1種。

又，將以DNA作為陰離子使用之複合體，與粉末狀或顆粒狀磷

酸鈣以捏揉等方法混合，可得到具賦形性之混合物。此混合物的形成，可視需要追加適量水分或磷酸緩衝液，成為具有賦形性的膠漿狀。此混合物的形成可使磷酸鈣顆粒或粉末帶有賦形性。即，將以DNA作為陰離子之複合體與磷酸鈣顆粒及粉末的混合物充填於模具，藉此可成形為自由形狀，又，藉由充填於注射器並擠出，可充填於複雜形狀的骨缺損部。又，將膠漿狀混合物製成所望形狀後進行乾燥處理，可固定混合物的所望形狀。此混合物可應用於牙周組織再生療法中的牙周組織(具體而言，齒槽骨、齒根膜、齒莖質)的再生誘導劑或再生促進劑、或骨缺損部的骨形成誘導或促進為目的的骨補填材，但不限此等用途。

磷酸鈣可列舉：羥磷灰石(HA)、磷酸三鈣(α -TCP, β -TCP)、磷酸氫鈣二水合物(DCPD)、磷酸八鈣(OCP)、磷酸四鈣(TeCP)、碳酸磷灰石(CAP)等，可使用該等其中至少1種。

又，以DNA作為陰離子之複合體，不僅是作為上述牙科用材料，也可藉由形成薄膜、襯墊材、塗覆材，將其作為再生醫療用之支架材(scaffold material)、創傷被覆材料、或感染防止膜或癒合防止膜，作為使移植時的活體親和性提高，或抑制活體對於異物之活體反應的醫療用材料。

<實施例>

其次舉實施例對於實施本發明之最佳形態詳細記載，但是本發明不限於以下實施例。又，以下實施例使用之微生物及細胞可由公眾來源取得。例如，*Prevotella intermedia*(ATCC25611)、*Porphyromonas gingivalis*(ATCC33277、小鼠來源纖維母細胞 L-929(實施例 3)、MC3T3-E1 細胞(小鼠來源造骨細胞狀細胞)(實施例 5)，可由住商 Pharmaceutical International(股)之細胞株・微生物株・基因庫由公眾取得。

[實施例 1]

(魚精蛋白鹽酸鹽、及其水解物對牙周病菌之抗菌活性)

(a)試樣

狗鮭(*Oncorhynchus Keta*)的精囊來源的魚精蛋白鹽酸鹽

(Proserve；瑪魯哈日魯食品(股)製)、將上述魚精蛋白鹽酸鹽以 Bromelain天野酶製(股))作用得到之水解物(HAP100；瑪魯哈日魯食品(股)製)、將同樣魚精蛋白鹽酸鹽以高溫蛋白酶(天野酶(股)製)作用得到的水解物(高溫蛋白酶分解物)作為試樣。又，高溫蛋白酶分解物，係製備如下：於上述Proserve(瑪魯哈日魯食品(股)製)50g加入去離子水80mL，加入氫氧化鈉調整為pH8.0後，加溫至65℃，添加高溫蛋白酶(天野酶(股)製)0.4g，攪拌2小時同時進行酵素反應，反應完成後將反應液加溫至95℃，使加熱失活30分鐘，調整為pH8.5後，將反應液冷凍乾燥。此時，高溫蛋白酶分解物之重量平均分子量(Mw)為3,587Da。

(b)抗菌活性之判定方法

使用精製水製備試樣的2倍(w/v)稀釋系列溶液，其次，於滅菌・溶解後於保持在50±1℃的PEA卡布魯塞拉(音譯)HK瓊脂培養基(極東製藥工業(股)製)將各稀釋系列溶液添加1/9量並充分混合後，分注到培養皿並使固化，作為感受性測定用平板。其次，將 *Porphyromonas gingivalis* JCM8525 以增菌用培養基於37±1℃、進行5~7日嫌氣培養後，使用GAM波依榮(音譯)培養基(日水製藥(股)製)調整成為菌數約10⁶cfu(菌落形成單位(colony forming unit))/mL，作為接種用菌液。將接種用菌液使用樹脂製接種環(內徑約1mm)以約2cm畫線塗抹在上述感受性測定用平板，於37±1℃進行5~7日嫌氣培養。經過既定時間培養後，就阻止菌生長的最低濃度定為最小生長阻止濃度(MIC)。

(c)試驗結果

MIC之結果如表1。此結果顯示魚精蛋白之水解物(bromelain分解物及高溫蛋白酶分解物)的MIC為1,250ppm，魚精蛋白(Proserve)為625ppm，Proserve比起分解物有較高效果。

【表1】對試驗菌的最小生長抑制濃度(MIC)

試驗菌	對象	MIC(ppm)
	Proserve	625



Porphyromonas gingivalis	HAP100(bromelain 分 1250 解物)
	高溫蛋白酶分解物 1250

[實施例 2](魚精蛋白/DNA 複合體之抗菌性)

(a)試樣

使用狗鮭的白子來源的魚精蛋白硫酸鹽(Proserve；瑪魯哈日魯(股)食品製)的 57%(w/v)水溶液，及同樣狗鮭的精囊來源的 DNA(分子量分布之中心為 300bp、瑪魯哈日魯(股)食品製)的 0.5%(w/v)水溶液。將魚精蛋白硫酸鹽水溶液 0.875g 以 100mL 的滅菌蒸餾水稀釋，與 DNA 溶液 100mL 混合，使魚精蛋白硫酸鹽與 DNA 的重量為 1：1，攪拌 1 小時。以離心分離回收沉澱物後，水洗，再度離心分離，回收沉澱物作為魚精蛋白/DNA 複合體(未乾燥品)。將此魚精蛋白/DNA 複合體(未乾燥品)進一步冷凍乾燥，得到魚精蛋白/DNA 複合體 0.61g。又，魚精蛋白/DNA 複合體的回收率以重量%計算，為 61%(w/w)。將試樣粉碎，添加適量水後，填入模具。脫模後再度冷凍乾燥，製作成直徑約 5mm、厚度約 1mm 的圓盤狀試樣。

(b)抗菌性之評價方法

抗菌試驗，係將試樣靜置於均勻塗抹試驗菌液的瓊脂等培養基，以觀察是否有細菌的抑制生長的生長抑制帶形成試驗以定性進行。評價抗菌性的菌，為黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大腸菌(*Escherichia coli*)、牙周病菌(*Porphyromonas gingivalis*、及 *Prevotella intermedia*)。均可由公眾來源得到。

(c)試驗結果

試驗結果如圖 1~4。針對黃色葡萄球菌，觀察到魚精蛋白/DNA 複合體試樣的周邊有菌的生長抑制圈。又，針對大腸菌，在試樣周邊觀察有抑制圈。又，針對 2 種牙周病菌，在試樣周邊觀察到抑制圈。

[實施例 3](魚精蛋白/DNA 複合體之細胞毒性試驗)

(a)試樣

使用與實施例 2(a)以相同方法製備的魚精蛋白/DNA 複合體。將粉碎後的粉末過篩，回收 45~100 μ m 的粉末，作為試樣。又，試樣經過放射線滅菌(1.9sec、20KGy、Dynamitron、IBA)後使用。

(b)細胞毒性之評價方法

細胞使用可由公眾取得的小鼠來源的纖維母細胞 L-929。以含有 10%胎牛血清(Invitrogen(股)製)的 α -MEM 培養基(Dulbecco's modified Eagle's medium)製成 1×10^4 cell/mL 的細胞懸浮液，各分注 2mL 到 6 井多孔盤的各井。於 37°C 培養 24 小時後，將培養液更換為含有試樣 1、2、4mg 的 α -MEM 培養基 2mL，再培養 5 日。培養 5 日後，將培養液更換為含有 0.4mL 的 CellTiter 96(R) Aqueous MTS(promega(股))的培養基 2mL，於 37°C 培養 2 小時後，測定 492nm 的吸光度，求得細胞生存率(相對於未添加試樣的對照群的比率)。又，試驗進行 $n=5$ ，取平均。

(c)試驗結果

細胞毒性試驗之結果如表 2 所示。於 0.5~2.0mg/mL 的濃度，細胞生存率非常高，確認魚精蛋白/DNA 複合體未顯示細胞毒性。

【表 2】細胞毒性試驗的結果

試樣	試樣濃度(mg/ml)	細胞生存率(%)
魚精蛋白/DNA 複合體	0.5	107.6 $\pm$ 5.3
	1.0	106.0 $\pm$ 3.7
	2.0	98.5 $\pm$ 2.8

[實施例 4](魚精蛋白/DNA 複合體之活體親和性之評價)

(a)試樣

使用與實施例 2(a)以相同方法製備的魚精蛋白/DNA 複合體。將魚精蛋白/DNA 複合體放入內徑 5mm、厚度 0.5mm 的鐵氟龍模具，將雙面以鐵氟龍板夾持並冷凍乾燥，製作直徑約 5mm、厚度約 1mm 的圓盤狀試樣。試樣經過放射線滅菌(1.9sec、20KGy、Dynamitron、IBA)後使用。

(b)生物適應性之評價方法

將 SPF 大鼠(specific pathogen free rat、雄性、6 週大)的背部皮下切開，埋入試樣。於一定期間(3、10 日)之後，採取組織並進行 HE 染色(蘇木素洋紅染色)。

(c)試驗結果

結果的組織圖如圖 5、6 所示。埋入 3 日後，試樣以周圍被肉芽組織包圍的狀態存在於皮下組織，與周圍的正常組織完全區分。埋入的試樣被片段化，以小片(塊)的形式存在，小片周圍確認有少量嗜中性球浸潤，此等觀察結果認為係由於試樣埋入所造成之極輕度的活體的急性發炎反應。又，未確認有伴隨試樣埋入引起的感染等。埋入 10 日後，皮下的埋入部全部取代為肉芽組織。由於多核巨細胞的吞噬反應造成的埋入試樣的片斷化進展，組織學上呈現典型的異物肉芽腫的樣子。肉芽組織的纖維化進展，推測將來埋入材料會消失，由於完全器質化(取代為纖維性結締組織)而完成反應。埋入 3、10 日後的組織學觀察中，暗示使用的魚精蛋白/DNA 複合體對於活體的親和性極良好。

[實施例 5](魚精蛋白/DNA/碳酸磷灰石複合體作為骨芽細胞增殖支架材之評價)

(a)試樣

對於與實施例 2(a)以相同方法製備的魚精蛋白/DNA 複合體(未乾燥品)，以重量基準加入 60%的碳酸磷灰石及適量水並混合，使用鐵氟龍模具製作內徑 5mm、厚度 1mm 的圓盤狀試樣。

(b)評價方法

將試樣浸泡在 α -MEM 培養基，接種 MC3T3-E1 細胞。培養 6 小時後，取出試樣，以 PBS 緩衝液清洗試樣表面。之後，將黏著在試樣的細胞進行肌動蛋白染色。

(c)試驗結果

螢光染色的細胞影像如圖 7。觀察到細胞黏著於魚精蛋白/DNA/碳酸磷灰石複合體表面的樣子，確認該複合體成為骨芽細胞增殖的支架。

[實施例 6](魚精蛋白/DNA/碳酸磷灰石複合體對大鼠頭骸骨

缺損部的埋入試驗)

(a)試樣

對於與實施例 2(a)以相同方法製備的魚精蛋白/DNA 複合體(未乾燥品)，以重量基準加入 60%的碳酸磷灰石，與適量水一起混合後，使用鐵氟龍模具製作內徑 5mm、厚度 1mm 的圓盤狀試樣。

(b)評價方法

於 SP 大鼠(specific pathogen free rat、雄性、6 週大)的頭骨以取骨器(trephine bar)(直徑 5mm)形成骨缺損。埋入試樣，埋入 1 個月後，於 1.5 個月後及 2 個月後將大鼠犧牲，各使用 X 射線 CT 裝置(ScanXmate-RB090SS150、Comscantecno 公司製)拍攝頭骸骨缺損部的斷層影像，確認骨形成過程是否在進行。

(c)試驗結果

試樣埋入 1 個月後，於矢狀方向及冠狀方向的 CT 掃描影像認為有不透影像，形成骨狀組織(圖 8(A)及(B))。試樣埋入 1.5 個月後，於矢狀方向的影像未認為與 1 個月後有差異(圖 9(A))，但由冠狀方向的影像觀察到比起 1 個月後，有骨狀組織形成進行的樣子(圖 9(B))。試樣埋入 2 個月後，於矢狀方向的影像，認為從試樣埋入周邊部往中心部形成骨狀組織(圖 10(A))，於冠狀方向之影像，觀察到比起 1.5 個月後，骨狀組織更進一步形成的樣子(圖 10(B))。

【圖式簡單說明】

圖 1 顯示魚精蛋白/DNA 複合體對於黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)形成抑制圈。

圖 2 顯示魚精蛋白/DNA 複合體對大腸菌(*E. coli*)形成抑制圈。

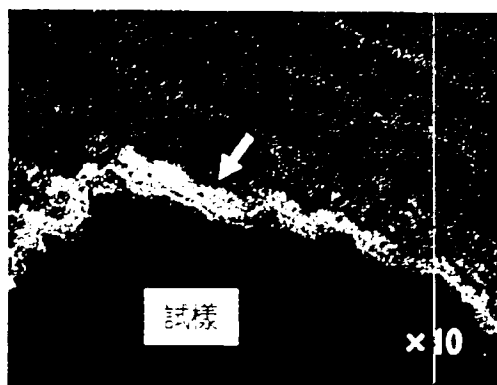
圖 3 顯示魚精蛋白/DNA 複合體對牙周病菌(*Porphyromonas gingivalis*)形成抑制圈。

圖 4 顯示魚精蛋白/DNA 複合體對牙周病菌(*Prevotella intermedia*)形成抑制圈。

圖 1



×1

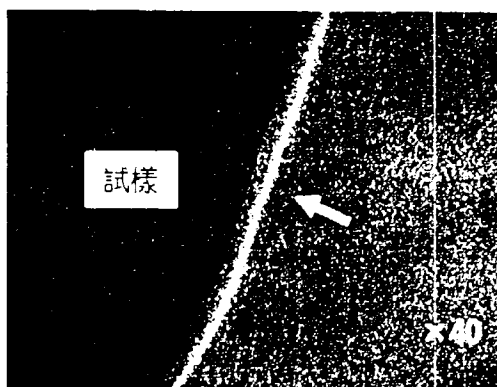


×10

圖 2

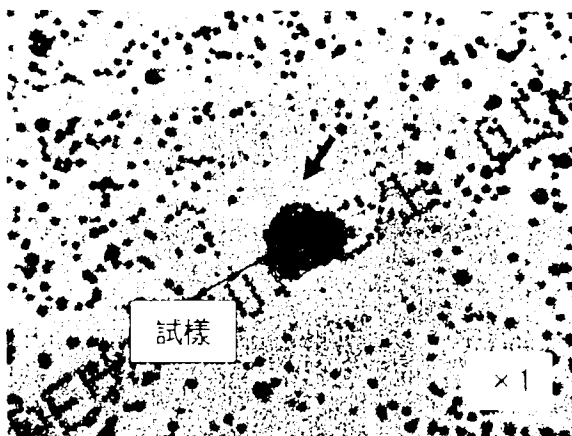


×1



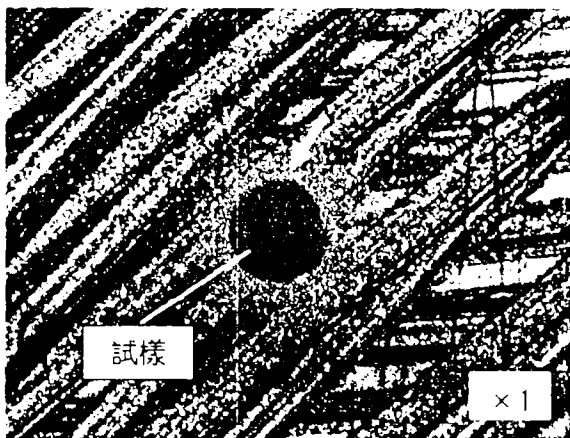
×40

圖 3



×1

圖 4



×1

圖 5



圖 6

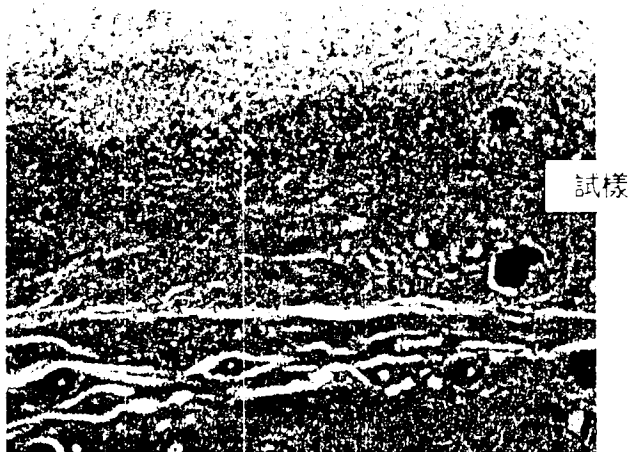
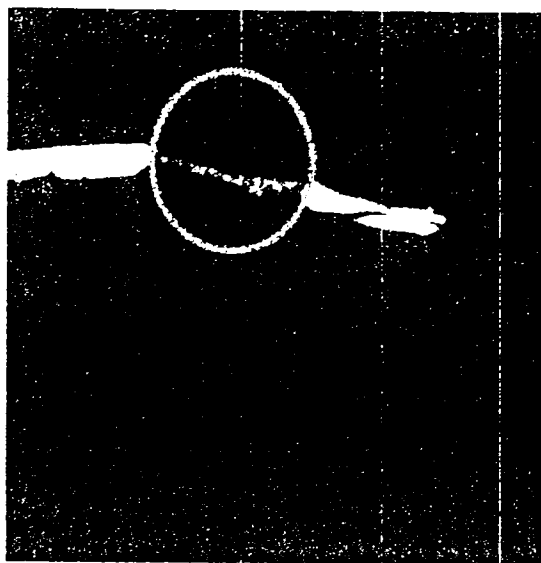
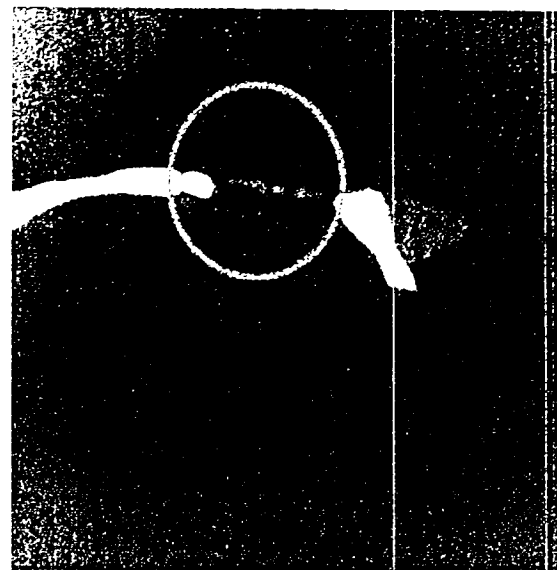


圖 7



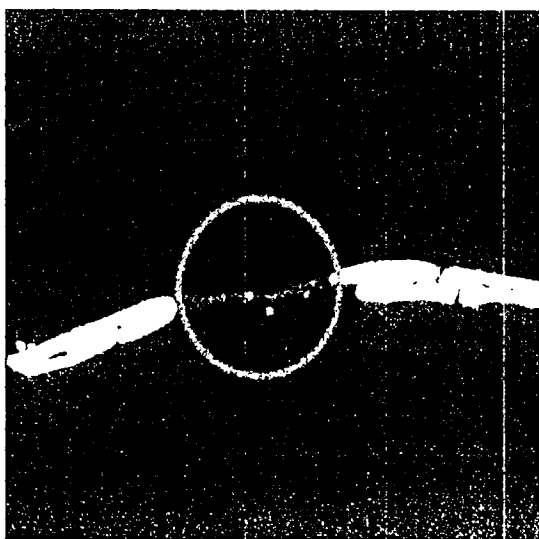


(A)

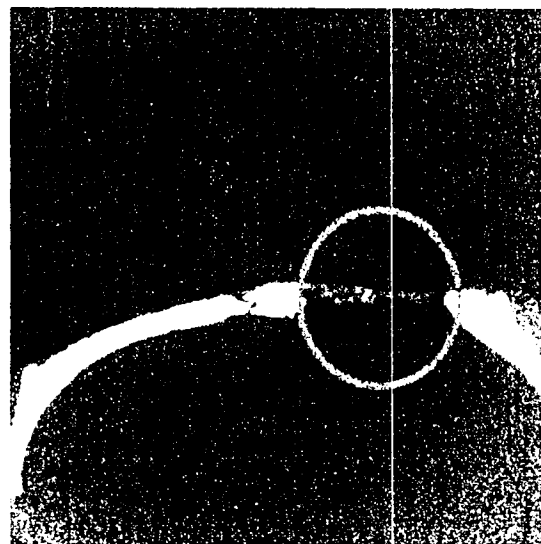


(B)

圖 8

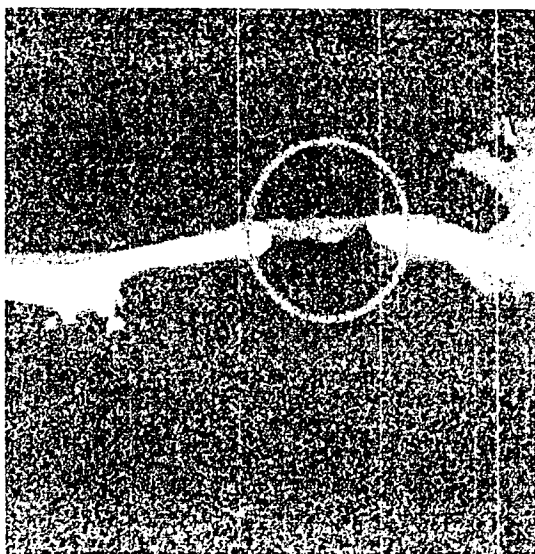


(A)

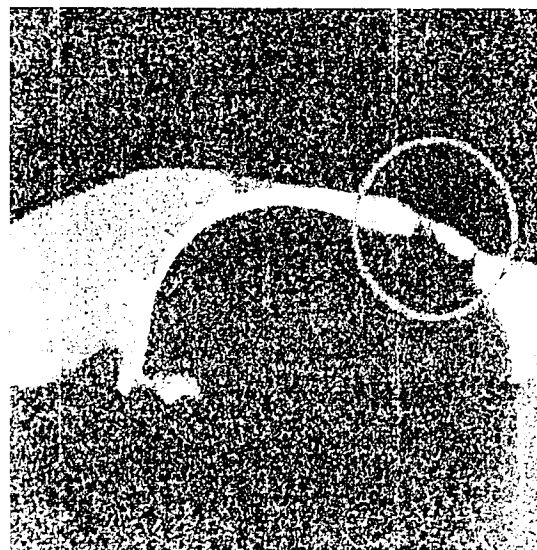


(B)

圖 9



(A)



(B)

圖 10

圖 5 顯示魚精蛋白/DNA 複合體埋入大鼠皮下 3 日後之組織切片圖。

圖 6 顯示魚精蛋白/DNA 複合體埋入大鼠皮下 10 日後之組織切片圖。

圖 7 顯示魚精蛋白/DNA/碳酸磷灰石複合體表面所附著之骨芽細胞的染色圖。

圖 8 顯示魚精蛋白/DNA/碳酸磷灰石複合體埋入 1 個月後，大鼠頭骨缺損部之 X 射線 CT 影像，(A)為大鼠頭骨缺損部於矢狀方向之 X 射線 CT 影像，(B)為大鼠頭骨缺損部於冠狀方向之 X 射線 CT 影像。

圖 9 顯示魚精蛋白/DNA/碳酸磷灰石複合體埋入 1.5 個月後，大鼠頭骨缺損部之 X 射線 CT 影像，(A)為大鼠頭骨缺損部於矢狀方向之 X 射線 CT 影像，(B)為大鼠頭骨缺損部於冠狀方向之 X 射線 CT 影像。

圖 10 顯示魚精蛋白/DNA/碳酸磷灰石複合體埋入 2 個月後之大鼠頭骨缺損部之 X 射線 CT 影像，(A)為大鼠頭骨缺損部於矢狀方向之 X 射線 CT 影像，(B)為大鼠頭骨缺損部於冠狀方向之 X 射線 CT 影像。

【主要元件符號說明】

無

發明專利說明書

公告本

(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：98143881

A61K 3817 (2006.01)

※申請日：98.12.21

※IPC 分類：

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 1/02 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

醫療用或牙科用材料/

MEDICAL OR DENTAL MATERIALS

二、中文發明摘要：

藉由將魚精蛋白(protamine)、或其衍生物、水解物其中至少 1 種作為其有效成分，或將魚精蛋白、或其衍生物、水解物當中至少 1 種與陰離子性高分子的複合體作為有效成分，而製備醫療用或牙科用材料，可提供無副作用顧慮、安全性高的抗牙周病菌劑，且可提供除了顯示牙周病原菌的抗菌活性而且不溶於水且具良好賦形性之醫療用或牙科用材料。

三、英文發明摘要：

This invention provides an anti periodontitis-causing microorganism agent that is highly safe and has no side effects and medical or dental materials that can make good water-insoluble excipients in addition to show antibacterial activity to periodontitis-causing microorganism by preparing the medical or dental materials with effective ingredients formed by at least one of protamin or its derivatives and hydrolysates, or from the complex of anionic high polymer and at least one of protamin or its derivatives and hydrolysates.

公告本

七、申請專利範圍：

1. 一種醫療用或牙科用材料，其特徵在於：
含有魚精蛋白、或其衍生物、水解物當中至少 1 種的有效成分與 DNA 以靜電鍵結成的複合體，
具有選自於膠漿狀、凝膠狀、有黏性的糊狀及粉末的形狀，
且不溶於水且用以誘導或促進骨形成的賦形性及抗菌性。
2. 如申請專利範圍第 1 項之醫療用或牙科用材料，其具有生物適應性，且可使藥效成分藉由插入及/或基團鍵結方式而納入於 DNA 中。
3. 如申請專利範圍第 2 項之醫療用或牙科用材料，其中，於 DNA 中納入有藥效成分。
4. 如申請專利範圍第 3 項之醫療用或牙科用材料，其中該藥效成分為骨形成因子或成長因子。
5. 如申請專利範圍第 1 項之醫療用或牙科用材料，更包含磷酸鈣。
6. 如申請專利範圍第 5 項之醫療用或牙科用材料，其具有可充填於骨缺損部或齒槽骨缺損部的賦形性。
7. 如申請專利範圍第 5 項之醫療用或牙科用材料，其中，於 DNA 中納入有藥效成分。
8. 如申請專利範圍第 7 項之醫療用或牙科用材料，其中，該藥效成分為骨形成因子或成長因子。
9. 如申請專利範圍第 1 至 8 項中任一項之醫療用或牙科用材料，其中，該有效成分對 *Porphyromonas gingivalis* 及 *Prevotella intermedia* 呈現生長抑制作用。

八、圖式：

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