

發明專利說明書

(本申請書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：92112842

※申請日期：92年05月12日

※IPC分類：A61K 47/36

壹、發明名稱：

(中) 用於遞送成骨蛋白質之可注入的固態玻尿酸醣酸載體

(外) Injectable solid hyaluronic acid carriers for delivery of
osteogenic proteins

貳、申請人：(共 2 人)

1. 姓 名：(中) 衛斯公司

(外) Wyeth

代表人：(中) 1. 恩·萊恩

(外) 1. Ryan, M. Andrea

地 址：(中) 美國新澤西州馬迪遜吉羅達農場五號

(外) Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940, U.S.A.

國籍：(中英) 美國 U.S.A.

2. 姓 名：(中) 菲迪亞先進生物聚合物有限公司

(外) Fidia Advanced Biopolymers S.r.l.

代表人：(中) 1. 艾米里歐·莫利

(外) 1. Mauri, Emilio

地 址：(中) 義大利亞柏諾特米(帕瓦多)波特黛拉菲畢卡三B號

(外) Via Ponte della Fabbrica, 3/B, 35301 Abano Terme (Padova),
Italy

國籍：(中英) 義大利 ITALY

參、發明人：(共 2 人)

1. 姓 名：(中) 蕾貝卡·李

(外) Li, Rebecca H.

地 址：(中) 美國麻州貝德福雪爾巷十四號

(外) 14 Shire Lane, Bedford, MA 01730, U.S.A.

2. 姓 名：(中) 金賢東

(外) Kim, Hyun D.

地 址：(中) 美國麻州巴克斯福華盛頓街二六二號

(外) 262 Washington Street, Boxford, MA 01921, U.S.A.

肆、聲明事項：

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利 ☐ 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 美國 ; 2002/05/17 ; 60/381,590 ☒ 有主張優先權

(外) 262 Washington Street, Boxford, MA 01921, U.S.A.

肆、聲明事項：

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利 ☐ 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 美國 ; 2002/05/17 ; 60/381,590 ☒ 有主張優先權

(1)

玖、發明說明

【發明所屬之技術領域】

本標的發明係有關成骨蛋白質及其製藥配方之範疇。更詳言之，本標的發明涉及了包含玻糖醛酸衍生物及成骨蛋白質之可注入或可植入的固體製藥配方。

【先前技術】

自發性骨質疏鬆症為一種病因不詳的疾病，其特徵為骨質逐漸流失且脆性增加，導致骨折可能性顯著提高。在所有肌肉骨骼異常病症中最為普遍的就是骨質疏鬆症，其困擾了 56% 年過 45 歲的婦女 (Praemer et al., Musculoskeletal Conditions in the United States, American Academy of Orthopaedic Surgeons, Park Ridge, IL(1992))。因為其發生率隨年齡而遞增而且人口中老年人比率日增，所以骨質疏鬆症將隨著時間而更為普遍。骨質疏鬆症難以局部地治療，且目前還無痊癒的方法。最後且最重要地，骨質疏鬆症還與實質罹病率及死亡率有關。由於骨質疏鬆所造成最嚴重的骨折就是在髖關節部份近端股骨的骨折。其年發生率超過 30 萬件，故而髖部骨折實為近年來老年人最常發生的骨折。每六名高加索種婦女中就有一名在其一生中會發生髖部骨折 (Cummings et al., Arch Intern Med 149:2455-2459(1989))，且對於年達 90 歲以上者，此數據為每三人中就有一人如此。

髖部骨折時獨居在家的患者中，約有 20% 的患者在骨

(2)

折後有至少長達一年的時間係處於需長期照護的狀況下。在受傷後首一年度期間，他們的死亡率較年齡及性別相同的對照組高出約 15%(Praemer et al., 同上)。年老患者會有較高的近端股骨骨折發生率主要係與他們的近端股骨之骨質密度較低且較易跌倒有關。在近端股骨處與年齡相關的骨質流失情形與髌部骨折發生的風險係呈逆相關。在股骨狹窄區骨質密度每減少一個標準差(SD)則其用年齡因素校正過之髌部骨折的風險值就會增加 2.6 倍(95%CI 1.9-3.6)，且骨質密度為族群最低四分位數(quartile)之婦女與骨質密度為最高四分位數之婦女比較，其髌部骨折的風險值則高出 8.5 倍(Cummings et al., The Lancet 341:72-75 (1993))。髌部骨質與髌部骨折風險間的關係可用來篩選及鑑定具有骨折風險的患者。骨質低於髌部骨質峰值兩個標準差的患者即骨質過疏且已達“骨折閾值”。

近年來骨質疏鬆症的治療係系統性的（全身性的）。其包括了使用氟化物、雙膦酸鹽、降鈣素、雌激素類及孕激素類、睪固酮、維生素 D 代謝物及/或鈣。在美國，只有雌激素及艾倫卓耐特(alendronate，一種雙膦酸鹽)被用於患有骨質疏鬆之停經婦女以預防髌部骨折。任一種此等藥劑都需要持續地投藥達數年之久。

除了治療骨質疏鬆性的骨骼以外，於治療或預防骨質疏鬆相關的骨折時還需要例如局部投予成骨蛋白質。由於此一需求，雖然已有多樣及可用之載體物質以遞送成骨蛋白質，但是我們仍需要安全、有效且普遍可用的載體以對

(3)

骨骼缺損作局部的治療。據此，雖然此一領域中已有諸多實質的努力，其仍需要一種有效的方法以修復及/或治療骨質疏鬆或骨質減少的骨骼，且減少與骨質疏鬆相關之骨折的發生率及嚴重性或使其減至最低。

【發明內容】

本發明提供一種用來骨內遞送諸成骨蛋白質之可注入或植入之固體桿狀組成物。於一具體實例中，該組成物包含該成骨蛋白質及諸玻璃醛酸酯。於另一具體例中，該組成物可進一步含有一種骨吸收抑制劑如一種雙膦酸鹽。於再一具體例中，該組成物可進一步地包含一或多種賦形劑，如製藥可接受鹽、多醣、胜肽、蛋白質、胺基酸、人工合成聚合物、天然聚合物或界面活性劑。本發明之固體桿狀可注入或可植入之組成物可在投藥部位長期供應骨誘生劑。

本發明進一步提供諸多療法及組成物用以增進骨骼骨質及品質，且用以減少骨質疏鬆相關之骨折的發生率或嚴重性或使其減至最低。據此，本發明提供了可用來減少骨質疏鬆及骨質減少之骨頭發生骨折之方法及組成物。更特別地，本發明還包括了治療罹患骨質疏鬆症或具有其它骨質疏鬆或骨質減少病況之病徵之患者的療法。在本發明所提供之特別有效的較佳具體例中包含對如下幹骺端骨骼的治療，其包括了近端股骨(髖部)，近端肱骨(上臂)、遠端橈骨(手腕)及椎骨體(脊柱)，特別是該椎骨體處的治療。

(4)

該療法包含對一處骨質減少或疏鬆之骨骼部位，或者低骨質或低密度部位投予一種固態桿狀的組成物，該組成物包含有效份量之至少一種可以誘使骨頭生長或增進骨組織形成或減少該部位骨流失之活性劑。骨質一般係意指「骨骼礦物質含量」或以 BMC 表示，且係用公克來表示。骨密度一般係意指「骨骼礦物質密度」或以 BMD 表示，且係以每單位面積之公克數或每單位體積之公克數來表示。於一特殊具體例中，投藥的模式係採骨內注射。於諸展示用具體例中，該活性劑為一或多種選自蛋白質的轉化性生長因子- β (“TGF- β ”)超族之蛋白質，較佳地係選自骨形態發生蛋白質 (“BMPs”)，生長及分化因子 (“GDFs”)以及在此將更詳細說明之其它蛋白質。本發明之方法及組成物之優點係在於其對於骨質疏鬆症或骨質減少的骨頭提供了一種局部的治療，而非系統性的治療。本發明之再一優點為其使用成骨蛋白質作為活性劑，該等蛋白質可透過重組 DNA 技術來產製，故而可能可無限供應。本發明方法及組成物之再一優點為骨組織的再生會增加骨質/骨密度，提高骨骼強度，且因而可減少骨質疏鬆的嚴重性或骨質疏鬆損害的發生，最終可減少骨折的發生率。

於其它具體例中，該活性劑除了含有一或多種選自蛋白質 TGF- β 超族之蛋白質以外，還可以進一步包括一或多種輔助蛋白質，例如海局哈各 (Hedgehog)、諾金 (Noggin)、寇耳丁 (Chordin)、福雷日雷得 (Frazzled)、賽伯斯 (Cerberus) 及佛梨勢塔丁 (Follistatin)、可溶性 BMP

(5)

受器，或其它在此將進一步說明之蛋白質或劑。

本發明進一步提供諸方法以增加骨骼骨質及品質，且用以減少骨質疏鬆相關之骨折的發生或嚴重性或使其減至最低，其係投予一種含有至少一種成骨蛋白質的桿狀可注入組成物以及一種含有效份量之骨吸收抑制劑之第二組成物。含有骨吸收抑制劑之該第二組成物可在該成骨組成物投藥之前、之後或基本上同時地投予。

除了使骨質疏鬆的骨骼復原以外，本發明的組成物還可用來製成 BMPs 可注入配方劑，用以例如注射到關節處以治療及修復骨內缺損，軟骨缺損，抑制軟骨分解及促進軟骨修復。該等配方劑還可被注射到肌腱、韌帶及/或其它附著到骨骼的依附部位。BMPs 可注入配方劑亦可以在骨頭其它部位施用，例如骨囊腫、骨植入物、封閉或開放骨折及內脫位成骨處。

於一特殊具體例中，本發明之諸組成物係以如下製法來製得，該製法包含將一成骨蛋白質與一玻糖醛酸衍生物混合以形成一成骨混合物之步驟。然後該成骨混合物係藉著例如將該成骨混合物擠製到空氣中或一非溶劑如乙醇中，且加以乾燥來製得。本發明之該組成物可進一步包含一種骨吸收抑制劑及/或一種賦形劑，任一者或此二者均可被包含在該混合步驟中。

該玻糖醛酸衍生物可為天然或合成的玻糖醛酸或其改質物。玻糖醛酸為一種天然生成的多醣，其含有交替的 N-乙醯基-D-葡萄糖胺及 D-葡萄糖醛酸單醣單元以 β 1-4 鍵

(6)

鍵結在一起，且該雙糖單元係以 β 1-3 葡萄糖苷鍵連接在一起。其通常係以鈉鹽的形式產生且有約 50,000 到 8×10^6 範圍之分子量。該骨吸收抑制劑可為一種雙膦酸鹽，如艾倫卓耐特，希瑪卓耐特 (cimadronate)、克羅卓耐特 (clodronate)、EB-1053、艾特卓耐特 (etidronate)、艾本卓耐特 (ibandronate)、奈立卓耐特 (neridronate)、歐帕卓耐特 (olpadronate)、帕咪卓耐特 (pamidronate)、賴塞卓耐特 (risedronate)、泰盧卓耐特 (tiludronate)、YH 529、羅拉卓耐特 (zoledronate) 及其製藥可接受鹽類、酯類及其混合物。該賦形劑可為能安定及/或調制該(諸)活性成份之藥劑，如製藥可接受鹽類、多醣、胜肽、蛋白質、胺基酸、人工合成聚合物、天然聚合物及/或界面活性劑。該成骨蛋白質可呈固體或液體形式，且該玻糖醛酸衍生物及(諸)賦形劑可呈固體形式。模製可藉著將該成骨混合物擠製到空氣中或到一非溶劑如乙醇中來達成；乾燥作用可藉著空氣乾燥或冷凍乾燥來達成。長效型製劑可進一步含有一種骨吸收抑制劑如雙膦酸鹽。

本發明還提供一種製備可注入長效型製劑的方法，該方法包含的步驟有：混合一種成骨蛋白質與一種玻糖醛酸或玻糖醛聚糖 (hyaluronan)-為主的材料來製成一混合物，壓縮該混合物以製成一濃稠的成骨混合物，然後將該濃稠成骨混合物塑形成適於注射或植入體內的圓柱形桿狀固體。該塑形步驟可採行擠製、壓製、模製、鑽孔及/或切割等方法以形成圓柱形桿狀物。該可注入式的長效型製劑可

(7)

進一步地包括一種骨吸收劑如一種雙磷酸鹽，及一或多種賦形劑如前文所述者。

本發明可注入之固態骨誘生組成物可具有約 0.1 到 3.0 mm 的直徑，且以約 0.5 到 1.5 mm 為佳。該固態桿狀組成物的長度可在約 1 mm 到約 10 cm 之間，且以約 2 cm 到約 5 cm 為特佳。本發明組成物之高對直徑的比值可在約 1000:1 到約 1:1 的範圍。此比值可為約 1000:1，500:1，250:1，100:1，50:1，25:1，10:1，5:1，4:1，3:1，2:1 或 1:1。本發明該骨誘生組成物可為堅硬的(但不易碎)，方得以裝到習知針頭或針筒中且注射到骨內部位。該骨誘生組成物具有約 0.5 到 100%材料的密度，且較佳地為約 50 到 90%材料之密度。該組成物之巨孔隙度低且含水量低，其含有約 0.1 到約 10.0%水，且以約 0.1 到約 5%水量為特佳。活性成份對載體的比例可為約 0.001-0.90 克活性成份對約 1 克載體，且以約 0.1-0.3 克活性成份對約 1 克載體為特佳。該玻璃醛酸衍生物可部份或全部為酯，其可含有約 50%到約 100%玻璃醛酸酯化作用。

【實施方式】

本發明提供治療骨質疏鬆病徵及骨質減少病況(包括骨質樞鬆性骨骼損害)之患者之方法及組成物。此等患者之鑑別可藉著此技術習知的步驟來達成。此等步驟包括使用雙能量 X-光吸光測定法(DEXA)，Kilgus et al., J. Bone & Joint Surgery, 75-B: 279-287(1992); Markel et al., Acta

Orthop. Scand. 61:487-498 (1990);定量性電腦化 X 線斷層照相術 (QCT), Laval-Jeantet et al., J. Comput. Assist. Tomogr., 17:915-921 (1993); Markel, Calcif. Tissur Int. 49:427-432(1991));單光子吸光測定法, Markel et al., Calcif. Tissue Int. 48:392-399(1991);超音波傳播速率 (UTV); Heaney et al., JAMA 261:2986-2990 (1989); Langton et al., Clin. Phys. Physiol. Meas. 11:243-249 (1990); 及放射照相性評估, Gluer et al., J. Bone Min. Res. 9:671-677(1994)。鑑別出具有骨折風險之患者的其它方法還包括評估年齡相關因子如認知力, 以及以往是否曾發生過骨質疏鬆相關之骨折等 (Porter et al., BMJ 301:638-641(1990);Hui et al., J. Clin. Incest. 81:1804-1809(1988))。如上諸文獻併此以為參考。

此等方法包括在骨質疏鬆或骨質減少部位注入一種桿狀固態組成物, 該組成物包含一或多種經純化之成骨蛋白質以及一種作為載體之玻糖醛酸, 且該(等)成骨蛋白質可有效誘生骨骼的形成及/或維護骨骼。與現行之可注入配方劑不同地, 本發明之成骨組成物係以固體形式來投予, 藉此得以避免液體或黏稠性配方固有的缺點。例如使用液體或膠質配方時, 其骨誘生劑在促成骨誘生效果前可能就預先被體液稀釋了。本發明藉著採用一種在活體內分解緩慢的固態載體來排除此稀釋作用, 藉此使得活性成份得以長效、持久的釋出。進一步地, 與液態或黏稠性配方會由投藥部位移轉出去有所不同地, 本發明該固態組成物會被

安置且維持在骨頭生長所需部位以發揮促進骨頭生長的作用。典型地，該組成物必保持在該部位由約 7 天達約六個月之久。如果該組成物在時機未達前便瀰散開來，那麼將可能不會產生所需的骨骼促生效果或者所形成的骨骼將無法具有所需強度。最後，雖然本發明之組成物係以固態形式來投予，不過其被製成桿狀圓柱體，令其更適於注射或植入體內。(相較使用液態或膠凝形式)固態桿狀物的使用可大幅地舒解習知骨內注射期間誘發栓塞時手術的複雜性。由於藥物於高濃度固態桿狀載體注射時的體積遠小於將相同劑量分散成液態或膠凝形式所需的體積，所以在加壓注射大量體積的液體/膠凝載體而造成骨內骨碎片、脂肪或栓塞置換的潛在可能性，在使用固態載體時會降低。該組成物可用任何習知的方式來施用到骨骼生長所需部位，包括透過已知的皮下注射針頭或針筒來引入。

本發明組成物係藉著混合成骨蛋白質、玻糖醛酸載體及任意的賦形劑來製成，其將視所用玻糖醛酸起始材料為黏稠狀液體/凝膠或糊狀物而定。而後所產生的質塊會被塑形成圓柱形桿狀物且加以乾燥。該塑形作用可藉著使用任何一種習知的技術如模製、壓製、鑽孔及/或切割來達成。於一較佳具體例中，該成骨混合物係被裝入且通過一皮下注射器的轂端被擠製出來。該材料被擠製成連續的圓柱體桿狀物，於室溫下乾燥且被分割成小塊、可注入的桿狀物。

如果該玻糖醛酸起始材料為一種厭水性固體如 Hyaff-

(10)

11®，那麼該玻糖醛酸會先被溶解在一種有機溶劑中以形成一溶液。該有機溶劑可為製藥可接受溶劑如 N-甲基吡咯烷酮 (NMP) 或二甲基亞 (DMSO)，較佳為 NMP。該溶液可含有約 1 到約 50%(w/v) 玻糖醛酸，較佳為約 5 到約 20%(w/v)，且最佳為約 10%(w/v) 玻糖醛酸。該乾燥的粉末狀成骨蛋白質則以約 1 到約 50%(w/w) 的濃度，較佳地約 20%(w/w) 的濃度分散在該玻糖醛酸溶液中，且任意的賦形劑 (如胺基酸、糖、鹽、界面活性劑、聚合物等) 係以約 1 到約 50%(w/w) 的濃度，較佳地為約 20 到約 40%(w/w) 的濃度加入。本發明的組成物可進一步地包含一種骨吸收抑制劑，其可呈乾燥粉末或可溶形式，個別地或與該成骨蛋白質成份共同地納入該混合步驟中。

如果該玻糖醛酸起始材料係呈親水形式如 Hyaff-1165®，該玻糖醛酸可與含有任意賦形劑之水性緩衝液混合在一起直到該物質具有糊狀稠度。該糊狀物質可含有約 1 到約 40%(w/v) 玻糖醛酸，較佳為約 5 到約 30%(w/v)，且最佳為約 15 到約 20%(w/v) 玻糖醛酸。於一示範性具體例中，該糊狀物質含有約 18.75%(w/v) 玻糖醛酸。而後在成形前，將乾粉狀成骨蛋白質混入該玻糖醛酸糊狀物中。另一種方式則不將該玻糖醛酸起始材料與含任意賦形劑之水性緩衝液混合在一起，而將該玻糖醛酸起始材料與含有可溶性成骨蛋白質及任意賦形劑的水性緩衝液混合在一起，直到該物質具有糊狀稠度或呈現出黏稠狀液體或凝膠外貌。該組成物可進一步地包含一種骨吸收抑制劑，其可呈

乾燥粉末或可溶形式，個別地或與該成骨蛋白質成份共同地納入該混合步驟中。

一旦諸成份已被混合成糊狀物或黏性液體或凝膠時，則該成骨材料會被裝載到一圓柱形模具、可透空氣或氣體的管具(如矽橡膠或 Teflon®/FEP)、或擠製型裝置如注射器中。在水溶性玻糖醛酸之例中，如果成形步驟係採用一注射器時，係將該注射器的推桿插入且施加足夠的壓力，而後在乾燥表面上擠製出長條狀的糊狀物。於不溶於水的玻糖醛酸之例中，長條狀的凝膠被擠製到可讓該物質沉澱的非溶劑性浴池中。而後使用切割工具如剃刀、小刀等切割成小片以形成可注入的桿狀組成物。於切割後，該桿狀組成物會藉著例如空氣乾燥或冷凍乾燥來烘乾。

本發明亦提供一種製備長效型可注射製劑的方法，其包含將一種成骨蛋白質、一種玻糖醛酸或玻糖醛聚糖-為主之材料混合以形成一種濃稠的成骨混合物，而後將該濃稠的成骨混合物塑形成一種適於注射或植入體內的固態圓柱形桿狀物。

該活性劑可為選自習知的轉化性生長因子- β (TGF- β)之蛋白質超族的蛋白質，該超族包括了苯丙酸諾龍、抑制素及骨形態發生蛋白質(BMPs)。更詳言之，該活性劑包括了至少一種選自 BMPs 之蛋白質次群的蛋白質，其已被揭露出具有成骨活性以及其它生長及分化類型的活性。此等 BMPs 包括了 BMP 蛋白質 BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6 及 BMP-7(揭露於例如美國專利第

(12)

5,108,922;5,013,649;5,116,738;5,106,748;5,187,076; 及 5,141,905 號); BMP-8(揭露於 PCT 公告第 WO91/18098 號); BMP-9(揭露於 PCT 公告第 WO93/00432 號); BMP-10(揭露於 PCT 申請案第 WO94/26893 號); BMP-11(揭露於 PCT 申請案第 WO94/26892 號); BMP-12 或 BMP-13(揭露於 PCT 申請案第 WO95/16035 號); BMP-15(揭露於美國專利第 5,635,372 號); BMP-16(揭露於美國專利第 6,331,612 號)。其它可用來作為本發明活性成份之 TGF- β 蛋白質包括了 Vgr-2(Jones et al., Mol. Endocrinol. 6:1961-1968), 其任一種生長及分化因子(GDFs), 其包括說明於 PCT 申請案 WO94/15965 , WO94/15949 , WO95/01801 , WO95/01802 , WO94/21681 , WO94/15966 , WO95/10539 , WO96/01845 , WO96/02559 等。同樣可用於本發明的有 BIP(揭示於 WO94/01557);HP00269(揭示於 JP 公告號 7-250688);及 MP52(揭示於 PCT 申請案第 WO93/16099 號)。所有上述申請案揭露之內容併此以為參考。目前較佳用於本發明之 BMPs 次群包括了 BMP-2、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-10、BMP-12 及 BMP-13。於一展示用具體例中, 該活性成份為 BMP-2, 其序列係揭示在美國專利第 5,013,649 號, 該揭露內容併此以為參考。此技術中所知之其它 BMPs 及 TGF- β 蛋白質亦可使用。

該活性劑可藉重組技術產製, 或從一蛋白質組成物中純化出來。該活性劑, 若為 TGF- β 如一種 BMP 或其它二聚體蛋白質, 可為均二聚體, 或為與它種 BMPs 組成之異

二聚體(例如由 BMP-2 及 BMP-6 單體所組成的異二聚體)，或為與 TGF- β 超族其它成員如苯丙酸諾龍、抑制素及 TGF- β 1 所組成的二聚體(例如由一種 BMP 單體及 TGF- β 超族相關成員所組成的異二聚體)。此等異二聚體蛋白質實例係述於例如已公開之 PCT 專利申請案第 WO93/09229，該專利說明書併此以為參考。

該活性劑可進一步地含有其它的成份如海局哈各(Hedgehog)、福雷日雷得(Frazzled)、寇耳丁(Chordin)、諾金(Noggin)、賽伯斯(Cerberus)及佛梨勢塔丁(Follistatin)蛋白質等、此等蛋白質家族一般說明在 Sasai et al., Cell, 79:779-790(1994)(寇耳丁);PCT 專利公告第 WO94/05800(諾金);及 Fukui et al., Dev. Biol. 159:131-139(1993)(佛梨勢塔丁)。海局哈各蛋白質係述於 WO96/16668, WO96/17924 及 WO95/18856。福雷日雷得蛋白質家族為晚近才發現的蛋白質家族，其與福立日雷得(Frizzled)之受器蛋白質家族的細胞外結合區域有高同質性。福立日雷得家族的基因及蛋白質係述於 Wang et al., J. Biol. Chem. 271:4468-4476(1996)。該活性劑可包含其它溶解性受器，如述於 PCT 專利公告第 WO95/07982 之截去頂端之可溶性受器。從 WO95/07982 的教示中，熟悉此技術者將了解到可從多種其它受器蛋白質來製得該等截去頂端的可溶性受器。此等物質同樣地包含在本發明的範圍內。上述文獻併此以為參考。

在此所用之活性劑的份量為足以有效地增加目前或滲

(14)

透性前驅細胞或其它細胞之成骨活性的份量，且其份量將視所欲治療之損害處的大小及性質而定。通常，每立方公分所需材料遞送之蛋白質份量為約 0.1 到約 500mg 的範圍，較佳地為約 10 到約 300mg，特佳地為 150 到約 250mg。

在實施本發明時，可用來作為載體之材料包括具有所需剛性之製藥可接受物質，其與骨形態發生蛋白質混合及乾燥後形成之組成物具有適當的處理特性，可用來注入或植入骨質疏鬆或骨質減少之骨骼部位。在固態載體中併入骨形態發生蛋白質可使得該蛋白質在患病或損害部位停留足夠的時間，使得該蛋白質能增加哺乳動物滲透性前驅細胞或其它細胞之成骨再生活性的其它自然速度，並形成一些空間讓新組織得以生長並可讓細胞作向內生長。該載體亦可以適當的時間間隔在患病或損害部位處讓該骨形態發生蛋白質被釋放出來，以最適化地提升該等前驅細胞的成骨再生活性。該等載體在嚴重的骨質疏鬆骨骼處亦可作為骨架以誘生新骨質的形成。

於示範性具體例中，載體家族包括玻糖醛酸酯或玻糖醛聚糖為主的材料。在此使用時，術語“玻糖醛酸”、“玻糖醛聚糖-為主材料”及“玻糖醛酸衍生物”係交錯地使用著，以意指玻糖醛酸(如下文所定義地)及其鹽類如鈉、鉀、鎂、鈣等鹽類。在模製及乾燥後，該玻糖醛酸載體係呈適於注射或植入的形式，如下文詳細說明之圓柱體桿狀物。此等桿狀物堅硬地足以承受被載裝到習知的皮下注射用針

頭及注射器中，以及注射到骨內間隙內。雖然堅硬，不過該玻糖醛酸爲主的載體材料還具有高抗張強度及低碎裂性。本發明之固態桿狀組成物具有相對高的材料密度(30-100%)，巨孔隙度小，含水量低。

玻糖醛酸天然地存在多種不同的組織中，包括滑液、玻璃樣液、人類臍帶及雞冠等。其爲結締組織如皮膚、肌腱、肌肉及軟骨等之細胞內基質的主要成份。除了對此等組織細胞提供機械性支撐以外，玻糖醛酸還可以促進其它重要的生物功能，包括水合、潤滑、細胞移動及分化(參見例如 Balazs et al., *Cosmetics & Toiletries* 5(84):8-17)。玻糖醛酸可從天然組織如雞冠中萃取出來，或藉重組方法來產製。藉著萃取所得到之玻糖醛酸的分子量範圍一般在八百萬到一千三百萬之間。此種多醣很不安定且很容易因多種物理性(機械性或輻射)因素及化學劑而被分解掉。所以，一般的純化步驟通常係製得低分子量玻糖醛酸的水解性餾份(參考 Balazs et al., 出處同上)。

在此使用時，該術語”玻糖醛酸”係指一種酸性的多醣，其含有 D-葡糖醛酸及 N-乙醯基-D-葡糖胺部份，不論其分子量如何而且還包括了不同分子量餾份的混合物及其衍生物。玻糖醛酸的衍生物包括例如透過酯化、交聯、硫化等作用化學性修改的玻糖醛酸。該等玻糖醛酸可爲一種酯，例如述於 Jeanloz et al., *B. Biol. Chem.* 186:495-511(1950); Jager et al., *J. Bacteriology* 1065-1067; *Biochem. J.* 167:711-716(1997); Jeanloz et al., *J. Biol.*

(16)

Chem. 194:141-150(1952); 或 Jeanloz wt al., Helvetica Chimica Acta 35:262-271(1952)之文獻中之玻糖醛酸甲酯。

於一示範性具體例中，該玻糖醛酸為一種與脂族、芳香族、芳脂族、環脂族或醚系環狀醇形成的玻糖醛酸酯，其中該酸的局部或所有羧基已被酯化，如述於美國專利第 5,336,767 號之玻糖醛酸衍生物，其全部併此以為參考。玻糖醛酸起始材料可為於 2000 年十月 13 日提出且正在審理中之美國專利申請案第 09/687,283 號中所描述者，該案全部併此以為參考。詳細地，該玻糖醛聚糖-為主的材料係固體物質如非織墊、氈、片、粉、海綿及微球，其係由義大利之 Fidia Advanced Biopolymers, Abano Terme 公司以 Hyaff® 商標販售著。Hyaff®材料係述於例如美國專利案第 4,851,521;4,965,353 及 5,202,431;及 EP 0 216 453 號，所有此等文獻全部併此以為參考。該 Hyaff®材料為玻糖醛酸酯類，其具有一個或多個酯基團的組合(如苯甲基、乙基、丙基、戊基、或較大分子如氫可體松或甲基潑尼松)，以及不同程度的酯化作用(如部份酯化或完全酯化)。Hyaff®的部份酯化材料係以範圍 50-99%的酯化百分率來表示(例如 Hyaff-11p65®及 Hyaff-11p80®)，而完全酯化係指 100%酯化的玻糖醛酸(如以 Hyaff-11®表示)。除了提供本發明組成物所需的處理特性以外，Hyaff®材料還可以提供操控(諸)活性成份的生體可利用性及吸收動力學之方法(參考例如美國專利第 6,339,074; 6,232,303; 及

6,066,340 號，所有此等專利全部併此以爲參考)。

於另一示範性具體例中，該玻糖醛聚糖-爲主的起始材料爲非纖維纖維，其包括了玻糖醛酸酯及天然聚合物、天然聚合物之半合成衍生物及/或合成聚合物之纖維混合物。該混合物含有約 1 到約 100%玻糖醛酸。可用於本發明之天然聚合物包括但不限於骨膠原，或骨膠原與葡糖胺葡聚糖的共沉澱物；纖維素；多醣類如殼質、殼聚糖、果膠或果酸、瓊脂、瓊脂糖、黃原膠、膠凝聚糖(gellan)、藻酸或藻酸鹽、多甘露聚糖或多葡聚糖、澱粉及天然膠。可用於本發明之天然聚合物之半合成衍生物包括例如天然聚合物如骨膠原再交聯結合了例如醛類或醛先質、二羧酸或其鹵化物、二胺等，以及纖維素、藻酸、澱粉、玻糖醛酸、殼質或殼聚糖、膠凝聚糖、黃原膠、果膠或果酸、多葡聚糖、多甘露聚糖、瓊脂、瓊脂糖、天然膠及葡糖胺基葡聚糖的衍生物。合成性聚合物包括例如聚動酸(polyactic acid)、聚乙醇酸、聚二噁烷、聚佛司發林(polyphosphazenes)、聚索佛樹脂(polysulfone resins)、聚烏拉坦樹脂、及其共聚物及衍生物。可用於本發明之非纖維纖維材料的實施例以及製造此等材料的方法係述於 1996 年五月 28 日核准之美國專利第 5,520,916 號，其全文併此以爲參考。

雖然對於 TGF- β 蛋白質的成骨潛力已了解甚多，不過近來的研究報告卻顯示局部投予特定的骨誘生劑如 BMP-2 會在投藥部位激起暫時性的骨破壞活性。由 BMP

引起、在新骨形成前之此一反應被稱為”暫時性的骨吸收現象”。

已知能抑制骨吸收作用的藥劑在不抑制後續的骨生成作用下對於延緩或減少局部投予 BMP 所伴生的初始骨吸收作用扮演著重要的角色。臨床上，雙膦酸鹽治療法已顯示出能大量減少骨翻新指數 (indices of bone turnover)，增加骨礦物質密度，且對於骨質減少的婦女能降低髖部及脊椎骨折風險 (參考例如 Fleisch, J. Bisphosphonates In Bone Disease, From the Laboratory to The Patient, 3rd Ed., Parthenon Publishing (1997)，其全文併此以為參考)。所以，在此一具體例中，係使用一種骨吸收抑制劑如雙膦酸鹽與骨誘生劑共投藥，以預防或減少骨內遞送 BMP 時伴生的初始骨吸收作用。雙膦酸鹽的共投予會阻斷此種不良的吸收相，同時讓骨增生效果仍繼續產生。

雖然有這樣治療上的益處，不過雙膦酸鹽在口服時於消化道中的吸收不佳。為了克服此種不良生體可利用率的問題，已採用靜脈內投予的方法；然而，由於投藥時間及頻率，此種方式既昂貴又不便。本發明則藉著將該雙膦酸鹽併入載體中，且將之直接遞送到需作用的部位而克服了此等缺點。

於本發明一具體例中，骨吸收抑制劑被併入該可注入之骨誘生組成物中作為第二活性成份。該骨吸收抑制劑可在模製與乾燥前先與該成骨蛋白質、玻糖醛酸載體及/或任意的(諸)賦形劑混合在一起。然後終混合物會藉著例如

擠製到非溶劑或空氣中來成形。

於本發明再一具體例中，該骨吸收抑制劑係先後地或同時與該成骨組成物投予。根據此一具體例，該成骨組成物可被局部投予到需要骨頭生長或修復的特殊區域，而該骨吸收抑制劑可於個別的遞送媒體中同時或先後投予。所以，該骨吸收抑制劑可在持久釋出型載體中藉著注射或手術植入來直接注入或植入到需治療的部位。該載體可為任何製藥可接受的載體，在此技術中已有種類廣泛的載體為人所習知且可採用(參考例如 Martin, E. W., Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co.最近一版)，其全部併此以為參考)。較佳地該載體為持久釋出型載體，最佳地為前文所述的玻糖醛酸酯或玻糖醛聚糖-為主的材料。目前較佳的載體為製成固態桿狀物者，如本文其它部份所說明般。

在此使用時，術語“骨吸收抑制作用”係指預防骨質流失作用，特別係指對於破骨細胞形成或活動使得既存骨骼經直接或間接更新而被移除掉之現象進行抑制。所以，在此使用時，術語“骨吸收抑制劑”係指能防止或抑制破骨細胞形成或活動造成骨直接或間接更新時骨質流失現象的藥劑。

在此使用時，“雙膦酸鹽”係指有關的雙膦酸及鹽類，以及雙膦酸鹽的不同結晶及非晶形態。於一特殊具體例中，該雙膦酸鹽係選自艾倫卓耐特(alendronate)，希瑪卓耐特(cimadronate)、克羅卓耐特(clodronate)、EB-1053、艾

特卓耐特(etidronate)、艾本卓耐特(ibandronate)、奈立卓耐特(neridronate)、歐帕卓耐特(olpadronate)、帕咪卓耐特(pamidronate)、賴塞卓耐特(risedronate)、泰盧卓耐特(tiludronate)、YH 529、羅拉卓耐特(zoledronate)及其製藥可接受鹽類、酯類、酸類及其混合物。

骨吸收抑制劑在此使用的份量為可有效抑制或預防破骨細胞形成或活動進行骨直接或間接更新時初始骨質流失之份量，初始該骨質流失的現象通常隨著局部投予 BMP 而發生。所需的確切份量將視所欲治療之損害的大小及性質，以及所遞送成骨劑的份量而定。通常，遞送之磷酸鹽的份量為每立方公分材料有約 1 到約 3000mg 的份量，特佳為約 10 到約 100mg，示範性的份量為約 100 到約 500mg。施用部位較佳為局部性的(骨內)，不過也可以採用其它非經腸路徑如肌肉內或皮下投予進行系統性運送。

可用於本發明組成物之額外的添加劑或賦形劑包括但不限於製藥可接受鹽、多醣、胜肽、蛋白質、胺基酸、人工合成聚合物、天然聚合物及/或界面活性劑。此等賦形劑為配方技術所習知能安定及/或調制(諸)活性成份的釋出。可使用的聚合物包括例如述於美國專利第 5,171,579 號者，其所有揭示併此以為參考。合成性聚合物或界面活性劑包括但不限於普魯羅尼克(pluronics)，如 Poloxamer 407 凝膠，其為一群水溶性 ABA 類型阻斷性界面活性劑共聚物，且顯示獨特的逆向熱膠凝作用。其它有用的合成聚合物包括聚交酯及聚乙二醇，包括有聚(交酯)/聚(乙二

醇)，聚乙炔吡咯烷酮(PVP)、聚(乙二醇)、聚氧乙炔氧化物、羧乙炔基聚合物及聚(乙炔醇)。天然聚合物包括但不限於藻酸鈉、殼聚糖、骨凝膠、明膠、玻糖醛聚糖、及纖維素材料如羥基纖維素。其它有用的賦形劑還包括胜肽、蛋白質及胺基酸。

於本發明一具體例中，該賦形劑係呈粉末形式，其而後會與該(諸)活性成份一起混入已溶解之 Hyaff-11®於有機溶劑中，且被擠製到乙醇(非溶劑)中以形成桿狀物，然後該等桿狀物會被清洗及乾燥。終組成物可能會含有一種賦形劑或多種賦形劑的組合，該等賦形劑較佳地為一種鹽類、糖類(如蔗糖)及/或胺基酸(如甘胺酸及/或麩胺酸)。本發明之組成物可含有約 1 到約 60%(w/w)胺基酸，約 1 到約 60%(w/w)糖類，及約 1 到約 60%(w/w)合成聚合物。於本發明另一具體例中，其配方含有約 20-50%(w/w)胺基酸及/或約 5-50%(w/w)糖類及/或約 20-50%(w/w)合成聚合物。

本發明之可注射組成物可採任何臨床可接受的注射方式投予。多種市售的注射器都可用於本發明，且可用來投予本發明之組成物。例如，可用的適當注射器有 Calasept®注射器 [JS Dental Manufacturing, Ridgefield CT]，其含有無菌的氫氧化鈣糊狀物於等張食鹽水溶液，於一非吸出式或改良型吸出式匣式注射器中；Henke-Ject®吸出式注射器及 Hypo®牙科注射器/針頭 [Smith & Nephew MPL, Franklin Park, IL]；骨內針，來自 MPL, Inc.,

Chicago IL]; 及 Luer-Lok® 注射器 [Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ], 都為可用於本發明之適當注射器。任何可用於處理及遞送可注入桿狀物之注射器及/或可用 obdurator 擠出者都可使用。

於本發明一具體例中，該固態桿狀組成物係以一種適當大小及類型的皮下針經皮或動手術地預置在所選定的解剖位置上來作骨內運輸。皮下針的經皮置入可利用習知的解剖界標以手觸診來完成，不論有無使用螢光鏡用眼輔助置入均可。螢光鏡亦可搭配手術植入法，於手術前及/或同時使用以置入該皮下針。

於一示範性具體例中，首先先將一條導引線(通常被稱為 "k-線")經皮插入所欲解剖的位置以作為該皮下針的導引物。該皮下針會被插放到該導引線的上方，然後該導引線會被移除掉且只留下皮下針於該部位。而後該固態桿狀組成物會被插入該皮下針的韌端。於填入該組成物後，第二條導引線會被插入該針內，其係用來將該固態組成物推擠到針頭的頂端。然後該針頭會被移除掉，但留下導引線來將該組成物固定在骨內所需部位。最後，導引線會被移除掉且於該處留下了該固體組成物。於另一具體例中，本發明該固態桿狀組成物係先被預置在該針筒內。於被放置到所需的解剖位置後，將注射器推桿推入筒身內，當此裝置被取出時就在所需位置留下了該固態桿狀組成物。

於本發明一具體例中，係用骨形態發生蛋白質來作為治療骨質疏鬆的骨誘生劑。能從此種治療獲益的患者可利

用任何一或多種標準步驟鑑定出來，其包括了使用雙能量 X-光吸裝測定法 (DEXA)、定量性電腦化 X 線斷層照相術 (QCT)、單光子吸光測定法、超音波傳播速率及 / 或放射照相性評估等來測量骨質 / 骨密度。此等步驟能提供臨床工作人員骨質疏鬆或骨質減少性骨損害的部位及嚴重性之資訊。除了確定需治療之損害處的位置以外，臨床工作人員還可以利用該等資訊來選擇適當的投藥模式以及患者所用之骨誘生劑的劑量。

於本發明另一具體例中，係使用骨形態發生蛋白質來作為內脫位成骨作用過程中的骨誘生劑。此種過程為植入骨誘生劑後的另一種節段骨再生作用。於傳統的節段骨修復中，該骨誘生劑及載體係被放置在在母骨兩端間形成的損害處。為了使得骨骼形成得以發生，該骨誘生劑必須在該損害處有足夠的滯留時間以便刺激分化出足夠數量的成骨細胞來支持新骨的形成。該內脫位成骨作用的過程係在已內脫位之母骨兩端間製造一處再生建構物，該處係高度血管化且含有大量會分化成成骨細胞的間充質幹細胞族群。所以相對於在節段損害處內誘生骨形成，該再生建構物呈現出一種更理想的環境，更適於細胞分化生長因子如 rhBMP-2 來刺激且快速誘生骨的形成。

該內脫位成骨作用的過程開始為一段潛伏初期，其可讓欲內脫位的骨端間形成纖維狀的連接。於此潛伏期後，該等骨端會以臨床上人類為每天最多 1 mm 的控制速度來緩慢地內脫位。一旦再生物形成且骨端被內脫位而分開適

當長度時，則需要一段長時間的鞏固期來讓該再生物形成骨骼。此段為時長達四到六個月的鞏固期常伴有極高的罹病率。一種常見的併發症為發生針痕感染，這是由於在這段很長的時間內必需將用以造成內脫位作用的外固定器留在原位的緣故。此外，由於需長期配戴著外固定器所以必會造成生活方式改變且對心理有極大影響。除了外固定器的併發症以外，還有一些患者並沒有恰當地形成再生物，而使得骨的統合延遲甚或不發生。由於再生物含有豐富的細胞族群且在內脫位初期便已高度血管化，故而骨形態發生蛋白質的使用就可以在內脫位成骨作用之正常的長鞏固期期間加速骨形成的速度。藉著延伸與骨骼伴生的軟組織來加速內脫位期則是很有用的。內脫位成骨作用產生的細胞亦可被採收以作為引發成骨作用的細胞源。此等細胞還可被培育而製成永生的細胞株。若有需要，此等細胞還可以用例如 CTLA4 受器 [美國專利第 5,434,131 號] 或 CTLA4 配體或 B7 單株抗體 [WO96/40915] 的化學劑來處理使其免疫耐受化。此種免疫耐受化的方法及材料係揭露在如上參考資料中，且包含了共轉染或此等因子的處理。此等參考完獻併此以為參考。

除了治療骨質疏鬆及封閉性骨折以外，本發明之桿狀組成物亦可施用在其它骨部位上如骨囊腫及損害處。諸等可注入的固體組成物亦可投藥到非骨部位，如投藥到肌腱、受損的軟骨組織、韌帶及/或其依附到骨骼上的依附部位。

雖然前述的討論係關於單一骨誘生組成物的投予，不過本發明意圖涵蓋多種活性成份例如前文所述的雙磷酸鹽組成物以個別的配方劑來共投藥。多種活性成份可個別地或組合地，同時地或先後地以個別的遞送媒體來運輸。

治療計劃將根據所提出的臨床指南以及多種不同的患者變數(如體重、年齡及性別)及臨床表現(如受傷程度、受傷部位等)來決定。

本發明的標的組成物可讓治療有效份量之骨誘生蛋白質被遞送到需要軟骨及/或骨骼形成的受傷部位。該等配方劑可用在剛骨折時及不癒合性骨折、脊柱融合術及矯形外科學中的骨損害修復術的中作為自體骨移植的替代方法；於骨髓炎中讓骨再生；且在牙科領域中用於牙槽脊增大、牙週損害及拔牙牙槽處。當用來治療骨髓炎或用於具有些為感染的骨骼修復時，該成骨蛋白質可與抗生素一起使用。所選用的抗生素可以降低感染但對於骨形成只有最小的副作用。可用在本發明組成物之較佳抗生素包括了萬古黴素及慶大黴素。該抗生素可呈任何製藥可接受形式，如萬古黴素鹽酸鹽或慶大黴素硫酸鹽。該抗生素較佳的濃度為約 0.1 mg/mL 到約 10.0 mg/mL。製藥可接受形式(如不含熱原、適當 pH 值及等張性、無菌等)之配方劑的傳統製法為此技術技藝所習知且可應用在本發明的配方中。

本發明之固體桿狀組成物亦可組合其它藥物、生長因子、胜肽、蛋白質、細胞素、寡核苷酸、反意義寡核苷酸、DNA 及聚合物。此等化合物可藉著將它們與該玻糖醛

酸載體混合在一起或藉著共價依附到該載體上被加入到組成物中。該玻糖醛酸組成物也可以與編碼 BMPs 之 DNA 以及及編碼 BMPs 蛋白質之基因轉導或轉染之細胞一起使用。

如下實施例係用以顯示本發明且於任何情況下並無限制。其修改、變化及些微改進都涵括在本發明範圍內。

實施例 1: Hyaff-11 桿狀物之配方

製備可注入之 100%酯化 Hyaff-11 桿狀組成物(直徑 1 mm)且評估重組人類骨形態發生蛋白質-2(rhBMP-2)之滯留時間及骨形成效能。該桿狀組成物含有 Hyaff-11®玻糖醛聚糖爲主的材料作爲載體，兩種劑量(參考表 1)的 rhBMP-2 作爲活性成份，以及不同份量的賦形劑以調控釋出動力學。與此實施例中所用之賦形劑係用乾粉形式的麩胺酸或緩衝鹽類所組成。緩衝鹽類含有 0.5%蔗糖、2.5%甘胺酸、5 mM L-麩胺酸、5 mM NaCl，及 0.01%聚山梨醇酯 80。該 Hyaff-11®爲主的組成物係使用逆相製程來製成桿狀。簡要地，將 rhBMP-2 及賦形劑(麩胺酸鹽及緩衝鹽類)混合到預溶解化 Hyaff-11®粒狀物(10% w/v)於有機溶劑 N-甲基吡咯烷酮(NMP)中，使用一注射器及一導管(如 16-規格)來擠製到過量乙醇(非溶劑)中，逆相 1 小時，清洗且乾燥。該乾燥步驟係由 24 小時空氣乾燥且繼而 24 小時冷凍乾燥步驟所組成。擠製作用係使用計量化的注射器幫浦，較佳以 0.2 ml/分鐘注射率來進行。製備如下 Hyaff-11®

(27)

爲主的組成物：Hyaff-11®, 20%(w/w)rhBMP-2，及40%(w/w)羧胺酸鹽(即，40/40/20 (w/w) Hyaff-11®/羧胺酸鹽/rhBMP-2); Hyaff-11®, 60%(w/w) rhBMP-2/緩衝鹽類(即，40/60 (w/w) Hyaff-11®/rhBMP-2)及 Hyaff-11®, 20%(w/w)rhBMP-2，及20%(w/w)羧胺酸鹽(即，60/20/20 (w/w) Hyaff-11®/緩衝鹽類/rhBMP-2)。藉著在與 Hyaff-11組合前先將該蛋白質配方脫鹽可以獲得高劑量 rhBMP-2。通常會將已乾燥的桿狀物切成1或2公分小段以作進一步評估。該桿狀物的理論性藥量係示於表1。最佳的投藥模式係以配備有 obduator 的 16-規格皮下針來將該固態桿狀物注射到骨內部位。

表 1

用於可注入 Hyaff®桿狀配方的 rhBMP-2 劑量

配方	理論值	
	(微克BMP-2/ 毫克桿狀物)	(毫克BMP-2/ 公分桿狀物)
40/40/20 (w/w)		
Hyaff-11®/羧胺酸鹽/rhBMP-2	200	1.5
40/60 (w/w) Hyaff-11®/rhBMP-2	71	0.5
60/20/20 (w/w)		
Hyaff-11®/緩衝鹽類/rhBMP-2	200	1.3
80/20(w/w)Hyaff-11p65®/ rhBMP- 2	200	1.2
40/60(w/w)Hyaff-11p65®/ rhBMP-2	400	2.4

實施例 2: Hyaff-11p65® 桿狀物之配方

製備可注入之 65% 酯化 Hyaff-11p65 桿狀組成物 (直徑 1 mm) 且評估 rhBMP-2 之滯留時間及骨形成效能。該桿狀組成物含有 Hyaff-11p65® 玻璃醛聚糖為主的材料作為載體以及兩種劑量 (參考表 1) 的 rhBMP-2 作為活性成份。Hyaff-11p65 為主之組成物包括了 20% (w/w) rhBMP-2 (即, 80/20 (w/w) Hyaff-11p65®/rhBMP-2) 或 40% (w/w) rhBMP-2 (即, 60/40 (w/w) Hyaff-11p65®/rhBMP-2) 兩種, 其係藉著將脫鹽之 rhBMP-2 及 Hyaff-11p65® 非織墊呈乾燥形式混合在一起, 接著水合成非織墊重量之 18.75% (w/v), 攪拌到白色且有糊狀黏稠性, 移到一注射器中, 透過一導管 (如 16-規格) 來擠製, 且乾燥。此種方法的一種變化方式為透過一導管來將該糊狀物擠製成桿狀形式, 冷凍該桿狀物 (於 -80°C 或液態氮下), 插進一直徑略大的管子 (如 14-規格導管) 中, 且乾燥。該乾燥步驟係由 24 小時空氣乾燥且繼而 24 小時冷凍乾燥步驟所組成。桿狀物製備的另一種方法包括了將該 Hyaff-11p65® 糊狀物置入內徑 1.5 mm 之矽橡膠或 Teflon®/FeP 管子中, 接著乾燥。較佳的投藥模式係用配備有 obturator 之 16-規格皮下針來將該等固態桿狀物推送到骨內部位。

實施例 3: 活體外特性

所有桿狀組成物都為堅硬、直線形、可握持且能透過 16-規格針來注入。Hyaff-11® 桿狀組成物的掃描式電子顯

微照片 (SEM) 顯示其一般呈固態、緻密且很平滑，不過 Hyaff-11p65® 桿狀組成物的掃描式電子顯微照片 (SEM) 則顯示其內緻密地填充著固有非纖維纖維墊的短纖維片段。該等桿狀組成物內 rhBMP-2 的生物活性係藉著將 rhBMP-2 從該組成物中萃取出來且測量其誘使鼠 W-20-17 間質細胞內鹼性磷酸酶 (一種骨骼標記物) 表現的能力來測量。來自 Hyaff-11® 及 Hyaff-11p65® 桿狀組成物的 rhBMP-2 都具有生物活性。

實施例 4: 活體內局部生體分佈

活體內 rhBMP-2 滯留時間輪廓範圍係使用 Hyaff-11® 及 Hyaff-11p65® 桿狀組成物來取得。1 cm 桿狀組成物 (如實施例 1 及實施例 2 所述來製備) 之 rhBMP-2 的局部滯留時間係在兔遠端股骨骨內模式採用 ^{125}I -rhBMP-2 及加馬射線閃爍法來評估 (第 1 圖)。含有 Hyaff-11® (而非 Hyaff-11p65®) 的配方不論其 BMP-2 劑量或賦形劑為何，都能緩慢且持續地釋出 rhBMP-2。與使用加馬射線消毒之羧胺酸鹽賦形劑相比，藉環氧乙烯來消毒羧胺酸鹽賦形劑會使得該等配方之活性成份在最初 3 天略有突然釋出的現象。80/20 (w/w) Hyaff-11p65®/rhBMP-2 組成物則提供 rhBMP-2 最快速的釋放動力特性。

實施例 5: 效能及生物相容性

該 Hyaff-11® 為主的組成物 (非 Hyaff-11p65®)，如前

文所述來製備，係於大鼠皮下(腹側胸廓)及骨內(遠端股骨)投藥後兩週來評估其生物相容性及骨形成的效能。在骨內投藥及皮下投藥時所用桿狀組成物之長度分別為 2 mm 及 10 mm。皮下部位投藥時的放射照片及組織分析顯示在含 rhBMP-2 之桿狀組成物附近有骨形成發生，表示該 rhBMP-2/Hyaff-11®桿狀物具有骨誘生性(資料並未顯示)。皮下及骨內部位投藥都表現出極小的發炎反應，表示該玻璃醛酸/BMP-2 組成物具有良好的生物相容性。我們還額外地將該 Hyaff-11®及 Hyaff-11p65®組成物注射到兔遠端股骨內，7 週後由組織學特性(資料未顯示)觀察到在骨內空隙有新生骨骼形成，特別在 80/20 (w/w) Hyaff-11p65®/rhBMP-2 及 40/40/20 (w/w) Hyaff-11®/羧胺酸鹽/rhBMP-2 配方之例尤為顯著。在卵巢已切除之狒狒的遠端橈骨內注射 80/20 (w/w) Hyaff-11p65®/rhBMP-2 桿狀配方會使其小梁骨體積較未經治療的對照組在組織學上有 30%相對增加值(資料未顯示)。

【圖式簡單說明】

第 1 圖為顯示兔遠端股骨(骨內)模式中不同玻璃醛酸/rhBMP-2 組成物之 BMP-2 局部滯留時間的圖式。

伍、中文發明摘要

發明之名稱：用於遞送成骨蛋白質之可注入的固態玻璃
醛酸載體

本發明揭示一種可注入或可植入之桿狀配方以遞送成骨蛋白質。該配方含有玻璃醛酸衍生物及成骨蛋白質，及任意的賦形劑及活性成份如骨吸收抑制劑。同時還揭露製造可注入之桿狀藥學組成物之方法及使用該成骨組成物來治療骨質疏鬆及/或骨質減少骨骼之方法。

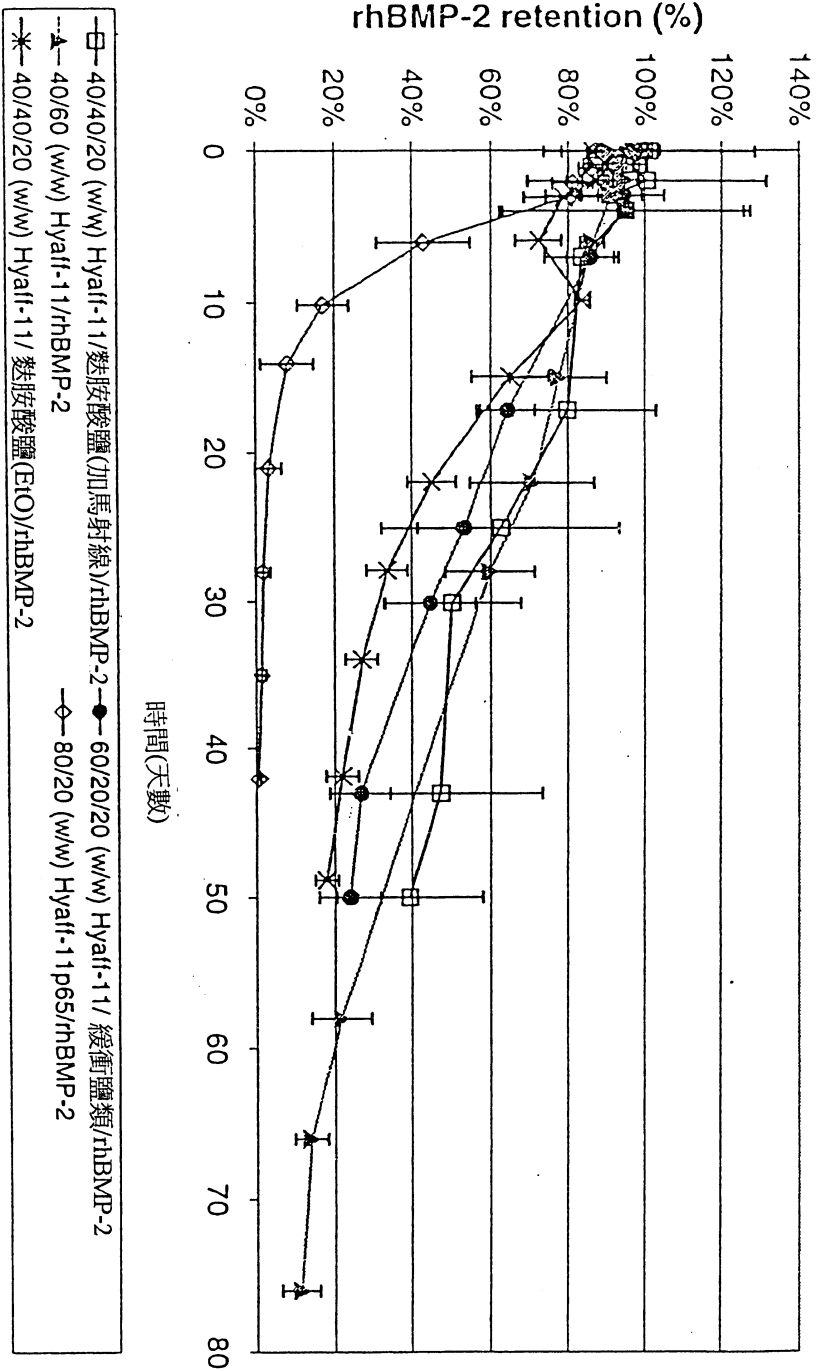
陸、英文發明摘要

發明之名稱：

**INJECTABLE SOLID HYALURONIC ACID CARRIERS
FOR DELIVERY OF OSTEOGENIC PROTEINS**

An injectable or implantable rod-shaped formulation is disclosed for delivery of osteogenic proteins. The formulation comprises hyaluronic acid derivatives and osteogenic proteins, and optional excipients and active ingredients such as a bone resorption inhibitor. Methods of making injectable rod-shaped pharmaceutical compositions and methods of using the osteogenic compositions to treat osteoporotic and/or osteopenic bone are also disclosed.

公告本



第1圖

柒、(一)、本案指定代表圖爲：第1圖

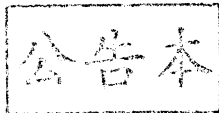
(二)、本代表圖之元件代表符號簡單說明：

無

捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

(1)



年95.7月05日修(更)正本

拾、申請專利範圍

附件 2A :

第 92112842 號專利申請案

中文申請專利範圍替換本

民國 95 年 7 月 5 日修正

1. 一種可注入遞送重組成骨蛋白質-2 (rhBMP-2) 之組成物，包含比例為 1:4 至 3:2 之 rhBMP-2 及玻璃醛聚糖為主的材料，其中該組成物係呈圓柱形桿狀以適於以固體狀態注入體內。

2. 如申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該玻璃醛聚糖為主的材料為 Hyaff 11p65。

3. 如申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該玻璃醛聚糖為主的材料為 Hyaff 11。

4. 如申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該圓柱形桿狀物之直徑介於約 1.0 到 1.5 mm。

5. 如申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該圓柱形桿狀物之長度介於約 2mm 到約 2cm。

6. 如申請專利範圍第 1 項之組成物，進一步含有選自麩胺酸及緩衝鹽類之賦形劑。

7. 一種用以治療骨質疏鬆症之組成物，其係以包含如下步驟之製程來製得：

(a) 混合比例為 1:4 至 3:2 之 rhBMP-2 及玻璃醛聚糖為主的材料以形成一成骨混合物；

(b) 將該成骨混合物塑形且乾燥成適於以固體狀態注

(2)

入體內之圓柱形桿狀物。

8. 如申請專利範圍第 7 項之組成物，其中該製程進一步包含將該 rhBMP-2 及玻糖醛聚糖為主的材料與一種選自麩胺酸、及緩衝鹽類之賦形劑混合在一起。

9. 如申請專利範圍第 7 項之組成物，其中該玻糖醛聚糖為主的材料係藉著將不可溶或部份可溶之玻糖醛聚糖為主的材料之顆粒或非織墊予以水合或溶解而製得。

10. 如申請專利範圍第 7 項之組成物，其中該混合步驟包含將該 rhBMP-2 及玻糖醛聚糖為主的材料與一溶劑混合在一起；且其中將成骨混合物塑形且乾燥成圓柱形桿狀物的步驟包含了將該成骨混合物擠製到一非溶劑中。

11. 如申請專利範圍第 10 項之組成物，其中該溶劑為 N-甲基吡咯烷酮(NMP)，該非溶劑為乙醇。

12. 如申請專利範圍第 10 項之組成物，其中該溶劑為水性緩衝液，該非溶劑為空氣。

13. 如申請專利範圍第 7 項之組成物，其中塑形及乾燥該成骨混合物的步驟包含將該成骨混合物擠製到空氣中且乾燥。

14. 如申請專利範圍第 7 項之組成物，其中該圓柱形桿狀物之直徑介於約 1.0 到 1.5 mm。

15. 如申請專利範圍第 7 項之組成物，其中該圓柱形桿狀物之長度介於約 2mm 到約 2cm。

16. 一種製造可注入、桿狀長效型組成物之方法，其包含：

(3)

(a) 將比例為 1：4 至 3：2 之 rhBMP-2 與玻糖醛聚糖為主的材料混合在一起，以製成一種成骨混合物；

(b) 將該成骨混合物模製成一種桿狀產物；且

(c) 乾燥步驟(b)之桿狀產物。

17. 如申請專利範圍第 16 項之方法，其中該步驟(a)另包含將該 rhBMP-2 及玻糖醛聚糖為主的材料與一種選自麩胺酸與緩衝鹽類之賦形劑混合在一起。

18. 如申請專利範圍第 16 項之方法，其中該步驟(a)包括將該玻糖醛聚糖為主的材料溶解到 N-甲基吡咯烷酮(NMP)之溶解化作用。

19. 如申請專利範圍第 16 項之方法，其中該步驟(a)包括將該玻糖醛聚糖為主的材料水合到水性緩衝液之水合作用。

20. 如申請專利範圍第 16 項之方法，其中該步驟(b)之模製步驟包括將該成骨混合物擠製到乙醇中。

21. 如申請專利範圍第 16 項之方法，其中該步驟(b)之模製步驟包括將該成骨混合物擠製到空氣中且乾燥。

22. 一種包含有效份量如申請專利範圍第 1 至 15 項中任一項之成骨組成物的組成物之應用，用於製備治療有骨骼損害之哺乳動物之藥物。

23. 一種包含有效份量成骨組成物的組成物之應用，其中該成骨組成物包含 rhBMP-2 及一玻糖醛聚糖為主的材料，用於製備治療有骨骼損害之哺乳動物之藥物，且該組成物係呈圓柱體桿狀形式。

(4)

24. 如申請專利範圍第 23 項之應用，其中該骨骼損害為骨質疏鬆或骨質減少之骨骼。