(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2015 年 10 月 29 日 (29.10.2015)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2015/161759 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 31/365 (2006.01) *A61K 9/10* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2015/076893

(22) 国际申请日: 2015 年 4 月 17 日 (17.04.2015)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
61/983,619 2014 年 4 月 24 日 (24.04.2014) US
62/023,205 2014 年 7 月 11 日 (11.07.2014) US

(71) 申请人: **长弘生物科技股份有限公司 (EVERFRONT BIOTECH INC.)** [CN/CN]; 中国台湾省新北市汐止区康宁街 169 巷 31 号 11 楼, Taiwan (CN)。

(72) 发明人: **林欣荣 (LIN, Shinn-zong)**; 中国台湾省新北市汐止区康宁街 169 巷 31 号 11 楼, Taiwan (CN)。 **韩鸿志 (HARN, Horng-jyh)**; 中国台湾省新北市汐止区康宁街 169 巷 31 号 11 楼, Taiwan (CN)。 **邱紫文 (CHIOU, Tzyy-wen)**; 中国台湾省新北市汐止区康宁街 169 巷 31 号 11 楼, Taiwan (CN)。 **邱郁涵 (CHIU, Yu-han)**; 中国台湾省新北市汐止区康宁街 169 巷 31 号 11 楼, Taiwan (CN)。

(74) 代理人: **北京汇智英财专利代理事务所（普通合伙） (BEIJING HC-IP AGENCY CO., LTD. (GENERAL PARTNERSHIP))**; 中国北京市海淀区大柳树路 17 号富海国际港 902, Beijing 100081 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) **Title**: STABLE PHARMACEUTICAL COMPOSITION

(54) **发明名称** : 稳定医药组合物

(57) **Abstract**: A stable pharmaceutical composition, containing: (a) a medium system, containing a first component, a second component, and a third component, wherein the first component is a phosphate buffer solution; the second component is selected from the group consisting of: vegetable oils, animal oils, fatty acids and a combination thereof; and the third component is selected from the group consisting of: polyethylene glycol, dimethyl sulfoxide, ethanol, polypropylene glycol, polysorbate, polyoxyethylated vegetable oil, ethyl acetate, hydroxyethyl 12-hydroxy stearate, vitamin E, polyethylene glycol succinate, and a combination thereof, and (b) n-butylidenephthalide (BP).

(57) **摘要**: 一种稳定医药组合物，包含：（a）一介质系统，包含第一成分、第二成分、及第三成分，该第一成分为磷酸盐缓冲液，该第二成分选自以下群组：植物油、动物油、脂肪酸及其组合，且该第三成分选自以下群组：聚乙二醇、二甲亚砜、乙醇、聚丙二醇、聚山梨醇酯、聚氧乙基化蔬菜油、乙酸乙酯、12-羟基硬酯酸羟乙酯、维生素 E 聚乙二醇琥珀酸酯、及其组合；以及（b）亚丁基苯酞（n-butylidenephthalide，BP）。

WO 2015/161759 A1

说 明 书

稳定医药组合物

技术领域

本发明是关于一种含有稳定存在的亚丁基苯酞（n-butylidenephthalide，BP）的稳定医药组合物，尤其关于一种可经由鼻内投药的含有稳定存在的亚丁基苯酞的稳定医药组合物，其有效于治疗恶性脑瘤。

背景技术

星状细胞瘤（astrocytoma）、退行性星状细胞瘤（anaplastic astrocytoma）、及多型恶性神经胶质瘤（glioblastoma multiforme，GBM）为常见的成人恶性脑瘤，其中又以多型恶性神经胶质瘤最常见、恶性度最高、侵犯能力最强。

恶性脑瘤具有高浸润性及高复发率、高致死率等特性，其治疗至今仍为医学上亟待解决的问题。目前治疗方式包括有外科手术、放射治疗及化学药物治疗等三种。以外科手术切除肿瘤虽可消灭大部分的肿瘤，但会伤害到其他正常脑组织，进而影响病患的行动和语言能力；放射治疗可局部杀死肿瘤，但亦会影响周遭的正常组织细胞；化学药物治疗则常常因血脑障壁（blood brain barrier，BBB）限制、毒性副作用大、或耐药性（drug resistance）等问题，无法获致良好治疗效果。鼻内投药方式为药物治疗中的新兴投药方法，其为非侵入式投药方法，可降低患者感染的风险，且药物经鼻腔吸入后，可经由鼻黏膜快速吸收而产生药效，不会受到肝脏首渡效应（first-pass effect）的代谢排除作用，此外

自鼻粘膜吸收的药物能绕行血脑障壁直达中枢神经系统，因而降低药物全身性毒性，效果优于口服投药或静脉注射投药。

亚丁基苯酞（n-butylidenephthalide，BP）为目前治疗恶性肿瘤的潜力新药，其为一种源自当归（Angelica sinensis）萃取物的成分，沸点为 139°C 至 142°C（5 毫米汞柱），因此在一般情况下为呈油状液体。目前已知亚丁基苯酞可用于治疗多种恶性肿瘤，包括多型恶性神经胶质瘤及乳腺恶性肿瘤。另有研究显示亚丁基苯酞亦可用于抑制运动神经元的自体吞噬（autophagy），例如 US 2014/0045765 A1 即揭露亚丁基苯酞及其代谢物可用于抑制运动神经元的自体吞噬，且可用于治疗肌萎缩侧索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis，ALS）。

然而，亚丁基苯酞虽可提供药效，但其为脂溶性物质而非水溶性物质，因此目前在应用上仍多有限制，包括在口服配方、注射配方及鼻内投药配方应用上的限制、临床应用的限制、以及在使用诸如大鼠等小动物的动物研究上的限制。

鉴于此，目前临床上需要一种亚丁基苯酞可稳定存在或溶解于其中的剂型，以提高亚丁基苯酞于生物体的利用率与改善其递送情况，并促进亚丁基苯酞的临床研究。本发明即针对前述需求所为的研发成果，通过一种介质系统以有效稳定亚丁基苯酞，从而更有效应用亚丁基苯酞。

发明内容

因此，本发明的一目的，在于提供一种医药组合物，包含：（a）一介质系统，包含第一成分、第二成分、及第三成分，该第一成分为磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline），该第二成分

选自以下群组：植物油、动物油、脂肪酸及其组合，且该第三成分选自以下群组：聚乙二醇、二甲亚砜（DMSO）、乙醇、聚丙二醇、聚山梨醇酯、聚氧乙基化蔬菜油（polyoxyethylated vegetable oil）、乙酸乙酯、12-羟基硬酯酸羟乙酯（2-hydroxyethyl 12-hydroxyoctadecanoate）、维生素 E 聚乙二醇琥珀酸酯（tocopheryl polyethylene glycol succinate）、及其组合；以及（b）存在于该（a）介质系统中的亚丁基苯酞（n-butylidenephthalide，BP）。

本发明的详细技术内容及部分实施态样，将描述于以下内容中，以供本发明所属领域具通常知识者据以明了本发明的特征。

附图说明

图 1A 为根据本发明的一实施态样的医药组合物的倒立式显微镜（IM）图（400 倍；比例尺：50 微米）；

图 1B 为根据本发明的一实施态样的医药组合物之扫描式场发射电子显微镜（FE-SEM）图（10000 倍；比例尺：1 微米）；

图 1C 为根据本发明的一实施态样的医药组合物的穿透式电子显微镜（TEM）图（80000 倍；比例尺：200 纳米）；

图 2A 图为根据本发明的不同实施态样的医药组合物及比较医药组合物于 4°C 低温下长时间储存前的照片；

图 2B 为根据本发明的不同实施态样的医药组合物及比较医药组合物于 4°C 低温下长时间储存后的照片；

图 3 显示根据本发明的不同实施态样的医药组合物（其中的介质系统组合不同）及比较医药组合物的活性的统计图，其中，纵轴为 GBM8401 细胞（即，人类恶性肿瘤细胞株）的存活率（以控

制组，即不含亚丁基苯酞的态样为 100%计），横轴为活性成分亚丁基苯酞的处理浓度；

图 4 显示储存时间对于根据本发明的医药组合物的活性的影响的统计图，其中，纵轴为 GBM8401 细胞的存活率（以控制组，即不含亚丁基苯酞之态样为 100%计），横轴为亚丁基苯酞的处理浓度；

图 5 为 Franz 扩散装置示意图；

图 6 显示施以不同投药治疗的大鼠存活率统计图；

图 7A 显示大鼠于种植肿瘤后施以不同治疗，在死亡之日或治疗第 37 天后的肿瘤生长情形的照片，其中，(A) 未经药物处理（大鼠死亡之日所取得）(B) BP 原液 160 毫克 / 公斤（第 37 天）(C) BP 原液 320 毫克 / 公斤（第 37 天）(D) 医药组合物 5 80 毫克 / 公斤（第 37 天）(E) 医药组合物 5 160 毫克 / 公斤（第 37 天）；

图 7B 显示大鼠于种植肿瘤后施以不同治疗，在治疗第 37 天后的肿瘤重量统计图；以及

图 7C 显示大鼠于种植肿瘤后施以不同治疗，在治疗第 37 天后的肿瘤体积统计图。

具体实施方式

以下将具体地描述根据本发明的部分具体实施态样；但是，在不背离本发明精神下，本发明尚可以多种不同形式的态样来实践，不应将本发明保护范围解释为限于说明书所陈述者。此外，除非文中有另外说明，于本说明书中（尤其是在后述专利申请范围中）所使用之「一」、「该」及类似用语应理解为包含单数及复数形式；以及在本说明书中「烃基」是指饱和直链或支链烃基，或具有一或多个 π 键的不饱和直链或支链烃基。

对于具有治疗效果的活性成分而言，其一通常应用型态为以液体剂型的方式投药，液体剂型中包含活性成分及介质，活性成分可溶于介质中或稳定存在于介质中。更具体言之，配合不同的投药途径需求（如口服、体细胞导入、或外用），将活性成分溶于介质中（若其可溶）或悬浮于介质中（若其不可溶）而形成一适合投药的溶液、悬浮液或乳化液（emulsion）。此外，就制备含有少量活性成分的固体剂型而言，通常先将活性成分溶解或悬浮于液体介质中，而后再以该溶有或悬浮有活性成分的液体介质进行固体剂型制备，以准确控制最终产物中的活性成分浓度（含量）。

本案发明人研究后发现，亚丁基苯酞对于乙醇之溶解度最高，乙醇为其极佳的溶剂。其中，亚丁基苯酞于乙醇中的溶解度超过222毫克／毫升，但于聚乙二醇400、聚乙二醇300或聚丙二醇中的溶解度则仅为约70至120毫克／毫升。然而，有研究显示，婴幼儿因为醇脱氢酶（alcohol dehydrogenase）尚未成熟，并没有办法如成人般有效的代谢乙醇（可参见Zuccotti GV, Fabiano V. Safety issues with ethanol as an excipient in drugs intended for pediatric use. Expert Opin Drug Saf 2011; 10(4):499-502，该文献全文并于此处以供参考）。因此，若能以其他溶剂取代乙醇作为亚丁基苯酞的介质，或者可于介质中减少乙醇的用量，则将可大幅提高亚丁基苯酞的应用范围。

本发明人进一步研究发现，亚丁基苯酞可稳定存在于一特定介质系统中，即使长时间储存（室温下储存三天；4°C下储存三十天）仍可稳定存在于该介质系统中并保持活性，该介质系统进一步还可以提高亚丁基苯酞于生物体中的利用率，从而在相对低的

亚丁基苯酞用量下提供所欲治疗效果，减缓或免除不必要的副作用。

因此，本发明提供一种稳定医药组合物，该医药组合物包含（a）一介质系统以及（b）稳定存在于该（a）介质系统中的亚丁基苯酞。

亚丁基苯酞可由商业上购得（例如可购自长弘生物科技股份有限公司，台湾）、化学合成或由天然材料（例如：当归）中萃取分离而得。此外，于使用萃取分离所得的亚丁基苯酞以前，可进一步通过例如骤沸塔层析法（flash column chromatography）、高效液相层析法、或结晶法的纯化方法，以提高亚丁基苯酞的纯度。

于本发明医药组合物中，（a）介质系统包含第一成分、第二成分、及第三成分。该第一成分为磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline），该第二成分选自以下群组：植物油、动物油、脂肪酸及其组合，且该第三成分选自以下群组：聚乙二醇、二甲亚砜、乙醇、聚丙二醇、聚山梨醇酯、聚氧乙基化蔬菜油（polyoxyethylated vegetable oil）、乙酸乙酯、12-羟基硬酯酸羟乙酯（2-hydroxyethyl 12-hydroxyoctadecanoate）、维生素E聚乙二醇琥珀酸酯（tocopheryl polyethylene glycol succinate）、及其组合。

作为（a）介质系统的第一成分，磷酸盐缓冲液对细胞而言是等压的且无毒的。可于本发明医药组合物中采用任何合宜的磷酸盐缓冲液，其实例包括 NaCl（137 mM）与 KCl（2.7 mM）的组合的水溶液及 Na_2HPO_4（10 mM）、KH_2PO_4（1.8 mM）、NaCl（137 mM）

与 KCl（2.7 mM）的组合的水溶液，但不限于此。

作为（a）介质系统的第二成分，植物油的实例例如选自以下群组之一或多者：芥花油、椰子油、玉米油、棉籽油、橄榄油、棕榈油、花生油、菜籽油、红花籽油、芝麻油、大豆油、葵花油、杏仁油、腰果油、榛果油、胡桃油、山核桃油、松子油、开心果油及蓖麻油（castor oil）；动物油的实例例如选自以下群组之一或多者：鱼油、鱼肝油、猪油、牛油、羊油、鸡油、及鸭油；而脂肪酸可为饱和脂肪酸或不饱和脂肪酸（如顺式不饱和脂肪酸、单元不饱和脂肪酸、多元不饱和脂肪酸、反式不饱和脂肪酸等）。于本发明的部分实施态样中采用经修饰的蓖麻油作为第二成分，经修饰的蓖麻油的实例包括聚乙氧化蓖麻油（polyethoxylated castor oil）及氢化乙氧化蓖麻油，但不限于此。聚乙氧化蓖麻油亦称为甘油聚乙二醇蓖麻油酸酯（glycerol polyethyleneglycol ricinoleate），例如是商购可得的 Kolliphor® EL（旧名为 Cremophor® EL；BASF 公司）。Kolliphor® EL 是一种非离子型助溶剂及乳化剂，可通过反应氧化乙烯与蓖麻油而得。氢化乙氧化蓖麻油可通过反应氧化乙烯与氢化蓖麻油而得。氢化乙氧化蓖麻油的实例包括，聚氧乙烯氢化蓖麻油 40（polyoxyl 40 hydrogenated castor oil）及聚氧乙烯氢化蓖麻油 60（polyoxyl 60 hydrogenated castor oil），但不限于此。前者例如是 Kolliphor® RH 40（HLB=14-16；BASF 公司），后者例如是 Kolliphor® RH 60（HLB=15-17；BASF 公司）。

作为（a）介质系统的第三成分，聚山梨醇酯在市面上以「Tween」的名称销售，其实例包括聚山梨醇酯 20、聚山梨醇酯 80、聚山梨醇酯 85 等；聚氧乙基化蔬菜油在市面上以「Emulphor」

的名称销售；12-羟基硬酯酸羟乙酯在市面上的商品包括例如 BASF 公司的 Kolliphor® HS 15（亦即 Solutol® HS 15）；而维生素 E 聚乙二醇琥珀酸酯的实例则例如是 D-α-维生素 E 聚乙二醇琥珀酸酯 1000（D-α- tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate；HLB=13.2）。然而，适用为本发明医药组合物的（a）介质系统的第三成分，并不限于以上所举实例。

于本发明的部分实施态样中，（a）介质系统由磷酸盐缓冲液（第一成分）、聚乙氧化蓖麻油（第二成分）及选自以下群组的成分（第三成分）所组成的混合物：聚乙二醇、二甲亚砜、乙醇、聚丙二醇、及其组合。其中，特别在第三成分选自聚乙二醇、二甲亚砜、及乙醇时，可对亚丁基苯酞提供较佳的稳定效果，所提供的医药组合物于长时间储存仍可维持不分层且亚丁基苯酞仍可保持活性。尤其，在第三成分为聚乙二醇与二甲亚砜的组合或聚乙二醇与乙醇之组合的情况下，可进一步提高本发明医药组合物的亚丁基苯酞的药效，其中又以第三成分为聚乙二醇与二甲亚砜的组合时最佳。因此，于本发明医药组合物的（a）介质系统中，第三成分较佳选自以下群组：聚乙二醇、二甲亚砜、乙醇、及其组合，更佳为聚乙二醇与二甲亚砜的组合或聚乙二醇与乙醇的组合，尤佳为聚乙二醇与二甲亚砜的组合。

于本发明医药组合物中，作为组成（b）的亚丁基苯酞的浓度原则上并无特殊限制，只要可以稳定存在于（a）介质系统中即可。因此，当亚丁基苯酞溶解于（a）介质系统中，则亚丁基苯酞的含量以不高于其在（a）介质系统中的溶解度为原则；而当亚丁基苯酞分悬浮于（a）介质系统中，则亚丁基苯酞的含量以不产生分层

的用量为原则。在此原则下，于本发明的部分实施态样中，以每毫升（a）介质系统计，亚丁基苯酞的浓度为 0.001 毫克 / 毫升至 1500 毫克 / 毫升。

举例言之，如后附实施例所示，当使用磷酸盐缓冲液（[Na_2HPO_4]=10 mM；[KH_2PO_4]=1.8 mM；[NaCl]=137 mM 与[KCl]=2.7 mM）为第一成分、聚乙氧化蓖麻油为第二成分、以及聚乙二醇或聚乙二醇与二甲亚砜或乙醇的组合为第三成分，提供（a）介质系统时（参照实施例 1、5 及 6），作为组成（b）之亚丁基苯酞的用量在达到 1,000 毫克 / 毫升介质系统时仍可稳定存在于其中，故可确定在所提供的医药组合物中，亚丁基苯酞的含量至少可达 1,000 毫克 / 毫升介质系统。又例如，当使用磷酸盐缓冲液（[Na_2HPO_4]=10 mM；[KH_2PO_4]=1.8 mM；[NaCl]=137 mM 与[KCl]=2.7 mM）为第一成分、聚乙氧化蓖麻油为第二成分、以及乙醇与丙二醇的组合为第三成分提供（a）介质系统时，作为组成（b）的亚丁基苯酞的用量在达到 208 毫克 / 毫升介质系统时仍可稳定存在于其中，故可确定在所提供的医药组合物中，亚丁基苯酞的含量至少可达 208 毫克 / 毫升介质系统。

于本发明医药组合物的（a）介质系统中，本领域技艺人士于观得本案说明书揭露内容后，可视所选用的第一成分、第二成分、及第三成分而调整其等的用量比例。举例言之，第一成分与第二成分的体积比可为 1:2 至 20:1，例如 1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、8:1、10:1、13:1、15:1、17:1、20:1 等；而第一成分与第三成分的体积比可为 1：2 至 30：1，例如 1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、8:1、10:1、13:1、15:1、17:1、20:1、25:1、30：1 等。另外，

在第三成分为多种成分的混合物的情况中，混合物中各构成成分的比例可由使用者（如视各成分的性质）作选择。以采用乙醇与聚乙二醇的混合物作为第三成分为例，由于乙醇与聚乙二醇以任何比例均可均匀混合，故其混合比例并无特殊限制，可采用乙醇：聚乙二醇之体积比为例如 10：1 至 1：100，较佳 6：1 至 1：50，更佳 1：1 至 1：10 以混合二者。

举例言之，当以磷酸盐缓冲液（[Na_2HPO_4]=10 mM；[KH_2PO_4]=1.8 mM；[NaCl]=137 mM 与[KCl]=2.7 mM）为第一成分、聚乙氧化蓖麻油为第二成分、聚乙二醇为第三成分，则磷酸盐缓冲液与聚乙氧化蓖麻油脂体积比可为 3:0.5～5（例如：3:1），磷酸盐缓冲液与聚乙二醇的体积比可为 3:0.5～5（例如：3:1）。又例如，当以该磷酸盐缓冲液为第一成分、聚乙氧化蓖麻油为第二成分、聚乙二醇与二甲亚砜的组合为第三成分，则磷酸盐缓冲液与聚乙氧化蓖麻油的体积比可为 1～10：1（例如：5:1），磷酸盐缓冲液与聚乙二醇与二甲亚砜之组合的体积比可为 1～5：1（例如：3:1），而聚乙二醇与二甲亚砜的比可为 1～2：1～2（例如 1:1）。

于本发明的医药组合物中，组成（b）亚丁基苯酞溶于介质系统当中，或稳定存在于介质系统中，因此使得组合物可形成一适合于亚丁基苯酞的输送或投药的溶液、乳化液或悬浮液，例如使得医药组合物可通过口服、注射及/或鼻内投药的方式投药予需要的对象。

此外，由于亚丁基苯酞溶于或稳定存在于介质系统中，本发明医药组合物可促进使用诸如重量仅 25 克的小鼠或大鼠等小动物的动物研究。举例言之，在使用 25 克的小鼠作为动物模式研究亚

丁基苯酞的功效的实验中，一般需使用 2 至 3 微升（μL）的极微量的亚丁基苯酞，然而由于此量太过于微小，因此计量上相当困难。在此情况下，若使用本发明的医药组合物，则由于亚丁基苯酞稳定存在于介质中而为介质所稀释，故可将少量的活性成分亚丁基苯酞与大量的介质系统混合，以较大体积的本发明医药组合物来提供所欲的极微量亚丁基苯酞，如此，计量上将相对容易且精确。因此，本发明的医药组合物也可用于活性成分的固体剂型的制备，能准确控制最终产品中的活性成分浓度。

本发明医药组合物可通过简单混合（a）介质系统与（b）亚丁基苯酞的方式进行制备。在（b）亚丁基苯酞可溶于（a）介质系统的情况中，可直接将亚丁基苯酞添加至介质系统当中，使其溶解于其中；而在（b）亚丁基苯酞不可溶于（a）介质系统的情况中，则可在将亚丁基苯酞添加至介质系统中后施以一物理力（如振荡）以促进其混合，以提供亚丁基苯酞以微米微滴或纳米微滴的形式存在于其中的一稳定乳化液或悬浮液。

本发明医药组合物可视需要包含其他添加剂，只要这些添加剂或其他活性成分不会不利的影响（b）亚丁基苯酞的功效及其于（a）介质系统中的稳定性及／或溶解度。举例言之，可添加合宜用量的保存剂、防腐剂、抗菌剂、抗真菌剂等，以进一步提高所制得医药组合物的储存性；亦可于医药组合物中添加一或多种其他活性成分，例如抗氧化剂（如维他命 E、维他命 C、二丁基羟基甲苯（butylated hydroxytoluene，BHT）、丁基羟基甲氧苯（butylated hydroxyanisole，BHA））、化学药剂、免疫调节剂（immune modulators）等，以进一步加强所制得医药组合物的功

效或增加其运用灵活性。

兹以下列实施例进一步例示说明本发明。其中，所添加的亚丁基苯酞以体积计，但以密度为 1 克／毫升进行换算，得到对应的重量。以下等实施例仅提供作为说明，而非用以限制本发明的保护范围，本发明保护范围如所附申请专利权利要求所示。

实施例

1. 室温稳定性测试

1.1 测试方法

将医药组合物置于室温下一指定时间（三天或七天），观察其外观是否出现分层，未出现分层者记录为「V」，分层者记录为「X」，以区分外观稳定性优劣；以及，以如下条件利用液相层析质谱仪通过相对滞留时间（relative retention time，RRT）量测医药组合物中的不纯物含量。

仪器	Agilent 1260 系列
管柱	PLUS，C8，100×4.6 毫米，3.5 微米
管柱温度	45 °C
移动相	A：0.05%甲酸水溶液 B：0.05%甲酸丙稀腈溶液
梯度条件（B 之百分比）	0／5%；8／10%；12.0／100%
流速	1.5 毫升／分钟
注入体积	5 微升
样品温度	45 °C
UV 波长	254 纳米

1.2 医药组合物的制备

实施例 1

以表 1 所示比例，将 50 微升亚丁基苯酞（BP）（长弘生物科技股份有限公司；批号：F212TR12001）、10 微升聚乙二醇（PEG）（SIGMA 公司；批号：MKBG2152V；CAS 号：25322-68-3）与 10 微升聚乙氧化蓖麻油（Kolliphor® EL，下称『K-EL』；SIGMA 公司；

批号：BCBC54780；CAS 号：61791-12-6）混合，而后将 30 微升磷酸盐缓冲液（下称『PBS』；[Na_2HPO_4]=10 mM；[KH_2PO_4]=1.8 mM；[NaCl]=137 mM 与[KCl]=2.7 mM）滴加至所得混合物中，并快速振荡混合均匀成乳化液，制得医药组合物 1。

实施例 2

以与实施例 1 相同的方式制备医药组合物 2 的乳化液，但是改变各成分之用量比例，如表 1 所示。

实施例 3

以与实施例 1 相同的方式制备医药组合物 3 的乳化液，但是改以二甲亚砜（DMSO）作为第三成分，并改变各成分的用量比例，如表 1 所示。

实施例 4

以与实施例 1 相同的方式制备医药组合物 4 的乳化液，但是改变各成分的用量比例，如表 1 所示。

实施例 5

与实施例 1 相同的方式制备医药组合物 5 的乳化液，但是改以 PEG 与 DMSO 的组合作为第三成分，并改变各成分的用量比例，如表 1 所示。

实施例 6

以与实施例 1 相同的方式制备医药组合物 6 的乳化液，但是改以 PEG 与乙醇之组合作为第三成分，并改变各成分的用量比例，如表 1 所示。

比较例 1

以与实施例 1 相同的方式制备比较医药组合物 1 的乳化液，但

是不添加第二成分（K-EL）并改以 PEG 与 Kolliphor® HS 15（下称『HS 15』；BASF 公司；批号：14225516K0；CAS 号：61909-81-7）的组合作为第三成分，如表 1 所示。

表 1：不同医药组合物的组成体积百分比

医药组合物		1	2	3	4	5	6	比较 1
活性成分	BP	50	25	1.44	0.72	50	50	50
第一成分	PBS	30	65	83.56	84.28	30.5	30.5	30
第二成分	K EL	10	5	10	10	6.5	6.5	
第三成分	PEG	10	5			6.5	6.5	10
	DMSO			5	5	6.5		
	HS 15							10
	乙醇						6.5	

1.3 稳定性测试结果

以第 1.1 点所载方法观察医药组合物 1 至 6 及比较医药组合物 1 乳化液的外观并量测不纯物含量，以评估组合物的稳定性，结果记录于下表 2（乳化液外观）及表 3-1 至 3-7 与表 4，其中表 2 显示乳化液外观，表 3-1 至 3-7 分别显示医药组合物 1 至 6 及比较医药组合物 1 中的不纯物浓度（体积百分比）随储存时间的变化情形，表 4 则为由此计算而得的各组合物的亚丁基苯酞浓度维持率（体积百分比）变化情形。

表 2：室温下储存前后的外观

医药组合物	1	2	3	4	5	6	比较 1
配置完成时	V	V	V	V	V	V	V
室温储存 3 天后	V	V	V	V	V	V	X
室温储存 7 天后	X	V	V	V	X	X	X

表 3-1：医药组合物 1 的不纯物浓度（体积百分比）变化情形

RRT	RRT 0.7	RRT 0.86	RRT 0.89	RRT 0.9	总合

配置完成时	0.32	ND	ND	ND	0.32
室温储存3天后	0.36	ND	ND	0.3	0.66
室温储存7天后	0.43	0.25	0.08	0.84	1.60

*ND 代表仪器未检出。

表 3-2：医药组合物 2 的不纯物浓度（体积百分比）变化情形

RRT	RRT 0.7	RRT 0.86	RRT 0.89	RRT 0.9	总合
配置完成时	0.25	ND	ND	<0.05	0.25
室温储存3天后	0.73	ND	ND	1.24	1.97
室温储存7天后	0.43	0.23	0.10	0.71	1.47

表 3-3：医药组合物 3 的不纯物浓度（体积百分比）变化情形

RRT	RRT 0.7	RRT 0.8	RRT 0.86	总合
配置完成时	0.11	<0.05	<0.05	0.11
室温储存3天后	0.20	0.12	<0.05	0.32
室温储存7天后	0.42	0.15	0.11	0.68

表 3-4：医药组合物 4 的不纯物浓度（体积百分比）变化情形

RRT	RRT 0.7	RRT 0.8	RRT 0.86	总合
配置完成时	0.09	ND	<0.05	0.09
室温储存3天后	0.11	0.11	<0.05	0.22
室温储存7天后	0.19	0.16	0.07	0.42

表 3-5：医药组合物 5 的不纯物浓度（体积百分比）变化情形

RRT	RRT 0.7	RRT 0.86	RRT 0.89	RRT 0.9	总合
配置完成时	0.04	0.01	0.07	0.02	0.14
室温储存 3 天后	0.02	0.33	0.02	0.03	0.40
室温储存 7 天后	0.02	0.67	ND	0.02	0.71

表 3-6：医药组合物 6 的不纯物浓度（体积百分比）变化情形

RRT	RRT 0.7	RRT 0.86	RRT 0.89	RRT 0.9	总合
配置完成时	0.03	0.01	0.06	0.02	0.12
室温储存 3 天后	0.02	0.33	0.01	0.02	0.38

室温储存 7 天后	0.02	0.57	ND	0.02	0.61

表 3-7：比较医药组合物 1 的不纯物浓度（体积百分比）变化情形

RRT	RRT 0.7	RRT 0.86	RRT 0.9	总合
配置完成时	0.28	ND	ND	0.28
室温储存3天后	0.26	ND	0.2	0.46
室温储存7天后	0.32	0.21	0.36	0.89

表 4：活性成分（亚丁基苯酞）浓度维持率（体积百分比）变化情形

医药组合物	1	2	3	4	5	6	比较 1
配置完成时	99.68	99.75	99.89	99.91	99.22	99.25	99.72
室温储存 3 天后	99.34	98.03	99.68	99.78	98.73	98.77	99.54
室温储存 7 天后	98.40	98.53	99.32	99.58	98.30	98.48	99.11

由表 2 可知，本发明医药组合物在外观上可于室温下保持长达 3 天仍不会发生分层，尤其在部分态样中（实施例 2 至 4）甚至可于室温下保存 7 天而不发生分层；而由表 4 可知，本发明医药组合物即使经长时间储存，亚丁基苯酞浓度的变化极小，维持率非常优异。

上述结果显示，于本发明医药组合物具有优异的稳定性，活性成分可稳定存在于介质系统当中。其中，以每毫升介质系统计，医药组合物 1、5 及 6 中的活性成分亚丁基苯酞之浓度相当于约 1,000 毫克 / 毫升介质系统。

2. 医药组合物物理性质分析

2.1 分析方法

2.1.1 粒径、导电度及界面电位分析

将医药组合物乳化液配制成浓度 200 微克 / 毫升作为样品，再以高浓度纳米粒径及界面电位分析仪（Malvern Nano-ZS

ZEN-3600）分析样品的导电度、界面电位及所含乳化微粒的平均粒径大小。

2.1.2 黏度分析

采用 40 毫米 4 度的角锥-平板模具，取约 1 毫升的样品置入平行板间，使用 TA 仪器公司之 AR2000ex 系统（应力控制）的流变仪分析样品的粘度随应变率的变化关系与流变特性，以判断样品系牛顿流体（粘度不会随着剪应变率的增加而增加或减少）或非牛顿流体（粘度随着剪应变率的增加而增加或减少）。

2.1.3 显微结构分析

以经纯水稀释 500 倍的医药组合物作为样品，分别以倒立式显微镜（IM）、扫描式场发射电子显微镜（FE-SEM）及穿透式电子显微镜（TEM）观察其显微结构。

2.2 医药组合物的制备

实施例 7 至 11

以与实施例 1 相同的方式制备医药组合物 7 至 11，但是调整介质系统及活性成分的组成如表 5 所示。其中以每毫升介质系统计，医药组合物 7 至 11 中活性成分亚丁基苯酞的浓度分别约为 105 毫克 / 毫升介质系统（医药组合物 7）、156 毫克 / 毫升介质系统（医药组合物 8）、208 毫克 / 毫升介质系统（医药组合物 9）、163 毫克 / 毫升介质系统（医药组合物 10）及 111 毫克 / 毫升介质系统（医药组合物 11）。

表 5：不同医药组合物的组成体积百分比

医药组合物		1	5	6	7	8	9	10	11	比较 1
活性	BP	50	50	50	9.5	13.5	17.2	14	10	50

成分										
第一成分	PBS	30	30.5	30.5	60.2	43	27.6	30	60	30
第二成分	K EL	10	6.5	6.5	15.1	21.6	27.6	28.7	15	
第三成分	PEG	10	6.5	6.5						10
	DMSO		6.5					27.3	15	
	HS 15									10
	乙醇			6.5	11.4	16.4	20.6			
	丙二醇				3.8	5.5	7			

2.3 分析结果

2.3.1 粒径、界面电位及导电度分析结果

以第 2.1.1 点所载方法分析亚丁基苯酞原液（BP 原液）、医药组合物 1 及 5 至 11 与比较医药组合物 1 的导电度、界面电位及所含乳化微粒之平均粒径大小，并将结果记录于下表 6。如表 6 所示，本发明医药组合物中所含之亚丁基苯酞微粒系尺寸介于 29.89 纳米至 1.22 微米之间的细小微粒，且界面电位介于-6.80 至-1.55 毫伏（mV）之间，导电度介于 12.1 至 14.93 毫西门子／公分（mS／cm），此显示其为水包油（O／W）型式的乳化液。表 6

配方	尺寸（纳米）	界面电位（毫伏）	导电度（毫西门子／公分）
BP 原液		0.38	0.02
医药组合物 1	1223.21	4.41	12.5
医药组合物 5	518.70	5.65	12.7

医药组合物 6	320.75	6.60	12.7
医药组合物 7	80.05	3.65	14.1
医药组合物 8	112.78	2.41	12.3
医药组合物 9	29.89	2.52	12.1
医药组合物 10	143.79	1.55	12.7
医药组合物 11	96.28	2.02	12.7
比较医药组合物 1	318.31	6.80	12.6

2.3.2 粘度分析结果

以第 2.1.2 点所载方法分析亚丁基苯酞原液、医药组合物 1 及 5 至 11 与比较医药组合物 1 的粘度，并计算其平均黏度，结果记录于下表 7。如表 7 所示，亚丁基苯酞原液及医药组合物的粘度均呈现粘度随着剪应变率的增加而减少的现象，因此均属非牛顿流体中的剪切变稀流体（shear thinning liquid）；此外，各医药组合物的粘度介于 0.62×10^{-2} 至 10.89×10^{-2} 帕·秒（Pa.s）之间。

表 7

配方	平均黏度（$\times10^{-2}$ 帕·秒）±标准差（SD）
BP 原液	1.57±0.01
医药组合物 1	10.89±0.59
医药组合物 5	6.96±0.69
医药组合物 6	4.56±0.37
医药组合物 7	0.99±0.02
医药组合物 8	8.69±0.13
医药组合物 9	9.58±0.23

医药组合物 10	1.99±0.06
医药组合物 11	0.62±0.02
比较医药组合物 1	4.49±0.30

2.3.3 显微结构分析结果

以第 2.1.3 点所载方法分析医药组合物 5 之显微结构，结果如图 1A、图 1B 及图 1C 所示，其中图 1A 为医药组合物 5 的 IM 图（400 倍；比例尺：50 微米），图 1B 为医药组合物 5 的 FE-SEM 图（10,000 倍；比例尺：1 微米），且图 1C 为医药组合物 5 的 TEM 图（80,000 倍；比例尺：200 纳米）。由图 1A 至图 1C 的结果可知，于本发明医药组合物中，活性成分（亚丁基苯酞）的颗粒尺寸为纳米级至微米级的微粒，且具有大致为球形的型态。

3. 医药组合物的体外试验

3.1 分析对象

实验组：医药组合物 1、医药组合物 5 及医药组合物 6

控制组：比较医药组合物 1

3.2 分析方法

3.2.1 低温稳定性测试

将医药组合物置于 4°C 冰箱储存 30 天后，拍照并观察是否出现分层，并与刚制备完成时的医药组合物作外观比较。

3.2.2 毒杀试验（IC_{50}值）

将 GBM 8401 细胞（即，人类恶性脑瘤细胞株）以每孔 6×10^3 的细胞数目培养在 96 孔培养盘中，接着以亚丁基苯酞原液或不同医药组合物进行处理，历时 24 小时。其中，活性成分亚丁基苯酞的处理浓度分别为 0 微克 / 毫升（控制组）、12.5 微克 / 毫升、25

微克／毫升、50 微克／毫升、100 微克／毫升及 200 微克／毫升。随后以 MTT（3-(4,5-cimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide）细胞存活测试方法分析各医药组合物对于 GBM 8401 细胞的存活的半抑制浓度（half maximal inhibitory concentration，IC_{50}），以评估毒杀效果。

3.2.3 毒杀效果稳定度试验

将医药组合物 5 分批分别于 4°C 下储存 0、7、14、30 或 60 天。将 GBM 8401 细胞以每孔 6×10^3 的细胞数目培养在 96 孔培养盘中，并以经储存不同时间的医药组合物 5 进行处理，历时 24 小时，随后以 MTT 细胞存活测试方法分析该经不同天数储存的医药组合物 5 对于 GBM 8401 细胞的存活的半抑制浓度（IC_{50}），以评估储存时间对于医药组合物的毒杀效果的影响。其中，活性成分亚丁基苯酞的处理浓度分别为 0 微克／毫升（控制组）、12.5 微克／毫升、25 微克／毫升、50 微克／毫升、100 微克／毫升及 200 微克／毫升。

3.2.4 体外人工纤维膜穿透试验

利用如图 5 所示的 Franz 扩散装置（三美玻璃仪器行）估计亚丁基苯酞原液及不同医药组合物穿透人工纤维膜的能力，以模拟其穿透鼻腔粘膜的情形，其中，此装置之扩散表面积大约有 4.5 平方公分，且接受池的容量约 23 毫升。

具体试验方法包括：（i）将人工纤维膜裁切成适当大小，并置于 Hepes（4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid）缓冲液（118 mM NaCl＋1.2 mM $MgSO_4$＋4.8 mM KCl＋5.5 mM D-葡萄糖＋2.5 mM $CaCl_2$＋20 mM Hepes）中浸泡 10 分钟；（ii）

于供给池中加入 2 毫升的亚丁基苯酞原液或浓度为 3 毫克 / 毫升的医药组合物；（iii）于接受池中加入 Hepes 缓冲液，并采用磁力搅拌（转速：300 rpm）方式搅拌之；（iv）在温度 37 ℃下进行试验，并每间隔 1 小时由接受池的取样管取样 1 毫升，同时补回已加温的 Hepes 缓冲液 1 毫升；（v）以分光光度计测量取样所得的溶液于 310 纳米波长下的吸收光谱，并计算亚丁基苯酞的浓度，共测量 10 小时；以及（vi）分别利用以下公式 1 及 2 计算求得有效穿透值（Permeability coefficient，P_{eff}）与流量（Flux，J）。

$$P_{eff}=\frac{V}{AC_0}\frac{dc}{dt}$$

Karasulu et al., 2008）公式 1

$$J=\left(\frac{dc}{dt}\right)\frac{V}{A}$$

公式 2

V：接受池的容量（毫升）
C_0：初始供给的药物浓度（微克 / 毫升）
P_{eff}：有效穿透率（公分 / 秒）
J：流量（微克 / 平方公分·秒）
A：扩散表面积（平方公分）
$\left(\frac{dc}{dt}\right)$：稳定状态下，浓度随时间的变化（微克 / 毫升秒）

3.2.5 体外人体细胞株穿透试验

将 RPMI 2650 细胞（即，人类鼻中膈鳞状细胞株）接种于涂布有胶原蛋白之孔径为 0.4 微米的细胞隔膜盘（cell insert）中，并培养 2 天，使细胞在细胞隔膜上形成细胞单层膜（monolayer）。接着，将细胞隔膜盘转移到已加入 1.5 毫升 Hepes 缓冲液的 12 孔盘中，再于细胞隔膜盘中加入 0.5 毫升的含亚丁基苯酞原液或医药组合物的 Hepes 缓冲液。然后，将 12 孔盘置于 37 ℃、5%CO_2的

培养箱中培养，每间隔 1 小时，分别收集 12 孔盘内的缓冲液，并以分光光度计测量其于 310 纳米波长下的吸收光谱，计算亚丁基苯酞或医药组合物浓度，共测量 6 小时，并利用前述公式 1 及公式 2，计算求得有效穿透（P_{eff}）与流量（J）。

3.3 试验结果

3.3.1 低温稳定性测试结果

以第 3.2.1 点所载方法测试医药组合物 1、比较医药组合物 1、医药组合物 5 及医药组合物 6 于低温下的稳定性，结果如图 2A 图及图 2B 所示，其中图 2A 图及图 2B 分别为储存前及储存后的照片。由图 2A 及 2B 图可知，本发明医药组合物（医药组合物 1、5 及 6）在 4°C 低温下长时间储存（长达 30 天）前后外观不会有显著变化且不会分层，而非本发明医药组合物（比较医药组合物 1）在 4°C 低温下储存后则有明显分层的现象。前述结果显示，本发明医药组合物的稳定性优异。

3.3.2 毒杀试验结果：以第 3.2.2 点所载方法对亚丁基苯酞原液、医药组合物 1、比较医药组合物 1、医药组合物 5 及医药组合物 6 进行毒杀试验，结果如图 3 及表 8 所示。由图 3 可知，相较于控制组，GBM 8401 细胞的存活率系随着活性成分亚丁基苯酞的剂量提高而下降，且各医药组合物中，以医药组合物 5 的毒杀效果最好，其抑制 GBM 8401 细胞的存活的 IC_{50} 为 28.20 微克 / 毫升。

表 8

配方	IC_{50}（微克 / 毫升）±SD
BP原液	85.32±1.70
医药组合物1	95.29±6.73

医药组合物5	28.10±2.71
医药组合物6	81.97±5.87
比较医药组合物1	62.34±6.36

3.3.3 毒杀效果稳定度试验结果

以第 3.2.3 点所载方法对医药组合物 5 进行毒杀效果稳定度试验，结果如图 4 所示。由图 4 可知，相较于控制组，不论医药组合物 5 的储存时间如何，经处理后的各组 GBM 8401 细胞的存活率仍保持着随着活性成分亚丁基苯酞的剂量提高而下降的规律。前述结果显示，医药组合物 5 对恶性脑瘤细胞的毒杀效果并不会受到储存时间的影响，为一稳定的配方。

3.3.4 体外人工纤维膜穿透试验结果

以第 3.2.4 点所载方法对亚丁基苯酞原液、医药组合物 1、比较医药组合物 1、医药组合物 5 及医药组合物 6 进行体外人工纤维膜穿透试验，结果记录于下表 9。由表 9 可知，医药组合物 5 和医药组合物 6 的有效穿透率（P_{eff}）最高，而亚丁基苯酞原液的有效穿透率最低。前述结果显示，相较于亚丁基苯酞原液，本发明医药组合物的穿透能力明显较佳，其中又以医药组合物 5 和医药组合物 6 的穿透能力为最佳。

表 9

配方	流量（10^{-3}微克／平方公分·秒）± SD	决定系数（r^2）±SD	P_{eff}（10^{-6}公分／秒）±SD
BP原液	2.29±0.23	0.97±0.02	0.76±0.08
医药组合物1	2.71±0.25	0.85±0.04	0.98±0.14
医药组合物5	11.60±0.19	0.96±0.02	3.85±0.06
医药组合物6	11.6±0.88	0.97±0.01	3.85±0.29

比较医药组合物1	11.20±0.42	0.92±0.06	3.57±0.30

3.3.5 体外人体细胞株穿透试验结果

以第 3.2.5 点所载方法对亚丁基苯酞原液、医药组合物 1、比较医药组合物 1、医药组合物 5 及医药组合物 6 进行体外人体细胞株穿透试验，结果记录于下表 10。由表 10 可知，医药组合物 6 的有效穿透率（P_{eff}）最高，而亚丁基苯酞原液的有效穿透率最低。前述结果显示，相较于亚丁基苯酞原液，本发明医药组合物穿透细胞的能力明显较佳，其中又以医药组合物 5 及 6 的穿透细胞的能力为佳。

表 10

配方	流量（10^{-3}微克／平方公分·秒）±SD	决定系数（r^2）±SD	P_{eff}（10^{-6}公分／秒）±SD
BP原液	0.33±0.02	0.99±0.01	1.65±0.09
医药组合物1	0.92±0.05	0.99±0.00	4.60±0.24
医药组合物5	1.63±0.37	0.95±0.02	8.16±1.85
医药组合物6	1.46±0.87	0.97±0.04	9.95±2.76
比较医药组合物1	1.42±1.38	0.98±0.01	7.31±4.32

4. 医药组合物的动物实验

4.1 实验方法

于大鼠颅内植入 9L（即，大鼠恶性脑瘤细胞株）肿瘤组织，待颅内生成肿瘤后再进行药物治疗试验。试验方法包括：（i）利用 400 毫克／公斤体重的水合氯醛（chloral hydrate）（Sigma-Aldrich 公司）麻醉大鼠，待其昏迷后，将大鼠头部毛发剃除，并将大鼠保持固定于鼠脑定位仪（Lab Standard™ Stereotaxic Instrument）上；（ii）以大剪将头皮剪开以露出头盖骨，以脑部囟门（bregma）为中心，向右 3 毫米，向下 5 毫

米，到定位钻孔处，利用钻孔器将头盖骨磨出 5 毫米直径的空洞；（iii）用镊子夹取预先准备好的 9L 肿瘤组织（1×1×1 立方毫米）并植入脑内 3 毫米深处，静置 1 分钟待血液凝固后取出镊子，并于空洞处涂上骨腊，最后将大鼠头皮缝合，并给予抗生素；（iv）待植入肿瘤组织后第 7 天，随机分组如下表 11，并利用微量吸管吸取药物（亚丁基苯酞原液或医药组合物 5）滴进大鼠鼻腔中，进行鼻内投药治疗，连续投药 30 天，并于期间记录大鼠体重及死亡只数；以及（v）取下肿瘤，利用电子式游标卡尺来测量肿瘤的长和宽，并且用下列公式 3 计算肿瘤之总体积，同时测量肿瘤重量，将测得之数值绘制成长条图与曲线图，以判断治疗成效。

表 11

组别	治疗方式
控制组	未给予药物治疗（*n=8）
负对照组	鼻内投药之BP原液（80毫克 / 公斤）（n=3）
	鼻内投药之BP原液（160毫克 / 公斤）（n=6）
	鼻内投药之BP原液（320毫克 / 公斤）（n=3）
实验组	鼻内投药之医药组合物5（80毫克 / 公斤）（n=5）
	鼻内投药之医药组合物5（160毫克 / 公斤）（n=3）

*「n」为各组大鼠只数

$$\text{肿瘤体积（立方毫米）} = \frac{\text{长} \times \text{宽}^2}{2} \qquad \text{公式 3}$$

4.2 动物实验结果

以第 4.1 点所载方法进行动物实验，实验结果如图 6 及图 7A 至 7C 所示。由图 6 及图 7A 至 7C 可知，相较于控制组，亚丁基苯酞原液（160 毫克 / 公斤）及亚丁基苯酞原液（320 毫克 / 公斤）皆具有抑制肿瘤生长的效果。前述结果显示，经由鼻内投予 BP 原液，确实可提供治疗恶性肿瘤的效果。

由图 6 及图 7A 至 7C 亦可知，经鼻内投予亚丁基苯酞原液（160 毫克 / 公斤）与医药组合物 5（80 毫克 / 公斤）30 天后，该二组大鼠具有明显提升且相似的存活率、以及明显下降且相似的肿瘤体积及肿瘤重量。此结果显示，本发明医药组合物中的亚丁基苯酞的有效剂量，只需要亚丁基苯酞原液的有效剂量的一半，即可达到相同的治疗效果。

由图 7B、7C 可知，投予医药组合物 5（160 毫克 / 公斤）30 天后，该组肿瘤重量可减少约 92%（图 7B），而肿瘤体积可减少约 94%（图 7C）。前述结果显示，本发明医药组合物 5（160 毫克 / 公斤）具有优异的治疗恶性肿瘤的效果。

以上体外及动物实验结果皆显示，将亚丁基苯酞制成如本发明的医药组合物，可提高鼻内投药后活性成分穿透鼻腔粘膜的效率，加乘其治疗效果，尤其是治疗恶性脑瘤的功效。

上述实施例仅用以例示说明本发明的原理及功效，而非用于限制本发明。任何熟于此项技艺之人士均可在不违背本发明的技术原理及精神的情况下，对上述实施例进行修改及变化。因此，本发明的权利保护范围应如所附申请专利权利要求所界定。

权 利 要 求 书

1. 一种稳定医药组合物，包含：

（a） 一介质系统，包含第一成分、第二成分、及第三成分，该第一成分为磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline），该第二成分选自以下群组：植物油、动物油、脂肪酸、及其组合，且该第三成分选自以下群组：聚乙二醇、二甲亚砜、乙醇、聚丙二醇、聚山梨醇酯、聚氧乙基化蔬菜油（polyoxyethylated vegetable oil）、乙酸乙酯、12-羟基硬酯酸羟乙酯（2-hydroxyethyl 12-hydroxyoctadecanoate)、维生素E聚乙二醇琥珀酸酯（tocopheryl polyethylene glycol succinate)、及其组合；以及

（b）亚丁基苯酞（n-butylidenephthalide，BP)。

2. 如权利要求1所述的组合物，其中该植物油选自以下群组：芥花油、椰子油、玉米油、棉籽油、橄榄油、棕榈油、花生油、菜籽油、红花籽油、芝麻油、大豆油、葵花油、杏仁油、腰果油、榛果油、胡桃油、山核桃油、松子油、开心果油、蓖麻油（castor oil）及其组合；且该动物油选自以下群组：鱼油、鱼肝油、猪油、牛油、羊油、鸡油、鸭油及其组合。

3. 如权利要求 1 所述的组合物，其中该第二成分为经修饰的蓖麻油（modified castor oil)。

4. 如权利要求3所述的组合物,其中该经修饰的蓖麻油为聚乙氧化蓖麻油（polyethoxylated castor oil)，且该第三成分选自以下

群组：聚乙二醇、二甲亚砜、乙醇、聚丙二醇、及其组合。

5. 如权利要求 4 所述的组合物，其中该第三成分选自以下群组：聚乙二醇、二甲亚砜、乙醇、及其组合。

6. 如权利要求 5 所述的组合物，其中该第三成分为聚乙二醇与二甲亚砜的组合或聚乙二醇与乙醇的组合。

7. 如权利要求 6 所述的组合物，其中该第三成分为聚乙二醇与二甲亚砜的组合。

8. 如权利要求 1 至 7 中任一项所述的组合物，其中以每毫升（a）介质系统计，（b）亚丁基苯酞的浓度为 0.001 毫克 / 毫升至 1500 毫克 / 毫升。

9. 如权利要求 1 至 7 中任一项所述的组合物，其中于（a）介质系统中，第一成分与第二成分的体积比为 1:2 至 20:1，且第一成分与第三成分的体积比为 1：2 至 30：1。

说 明 书 附 图

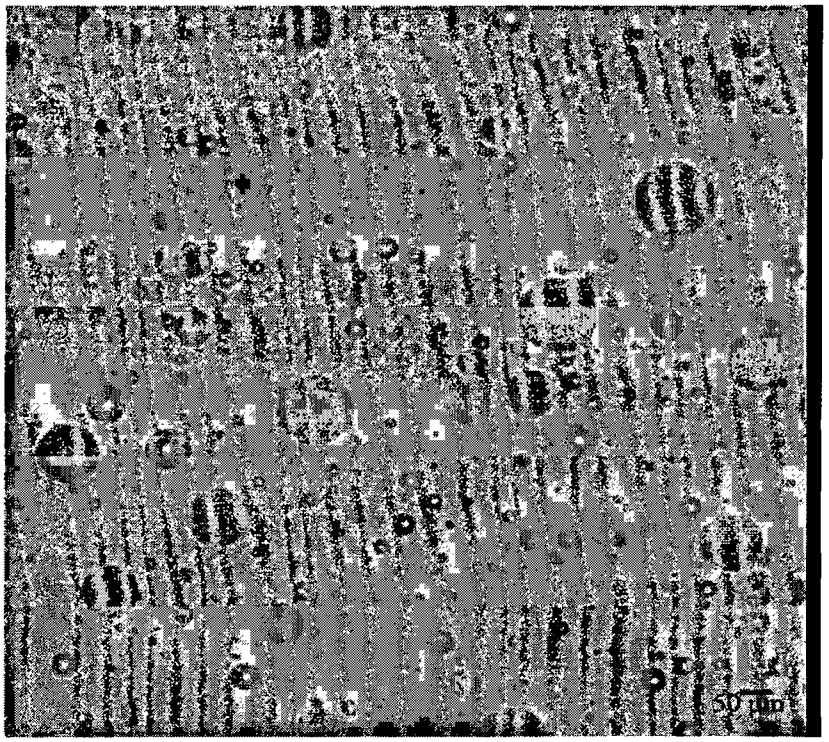

图 1A

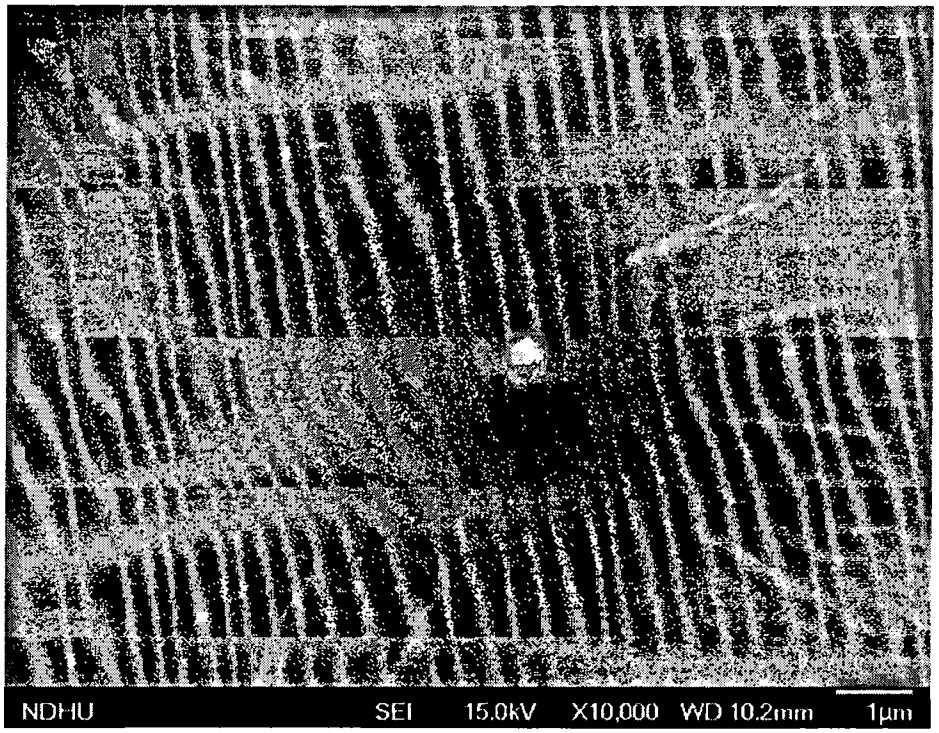

图 1B

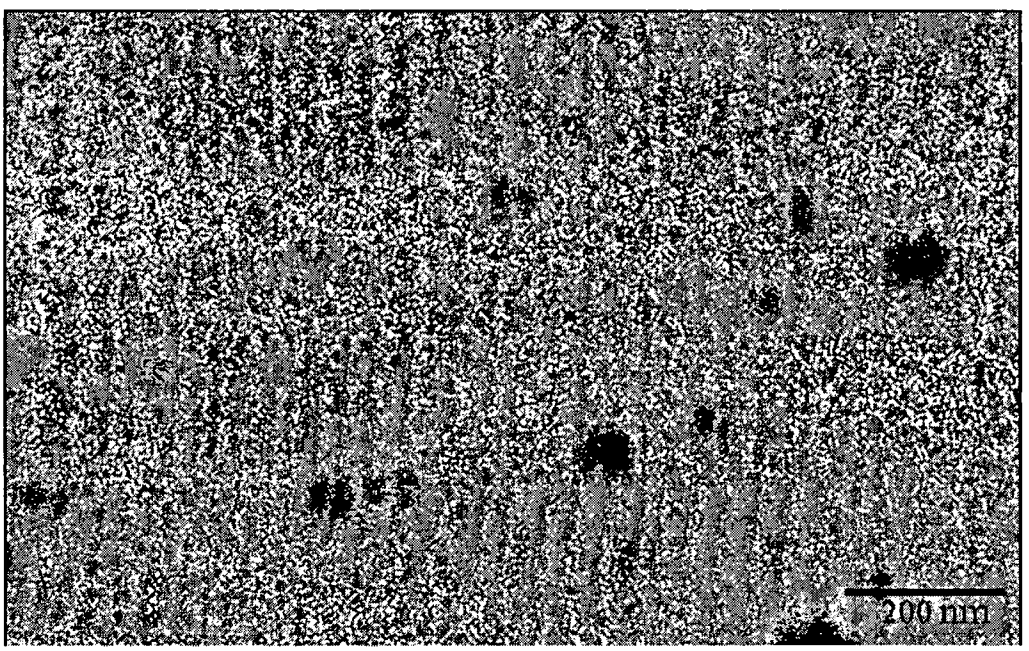

图 1C

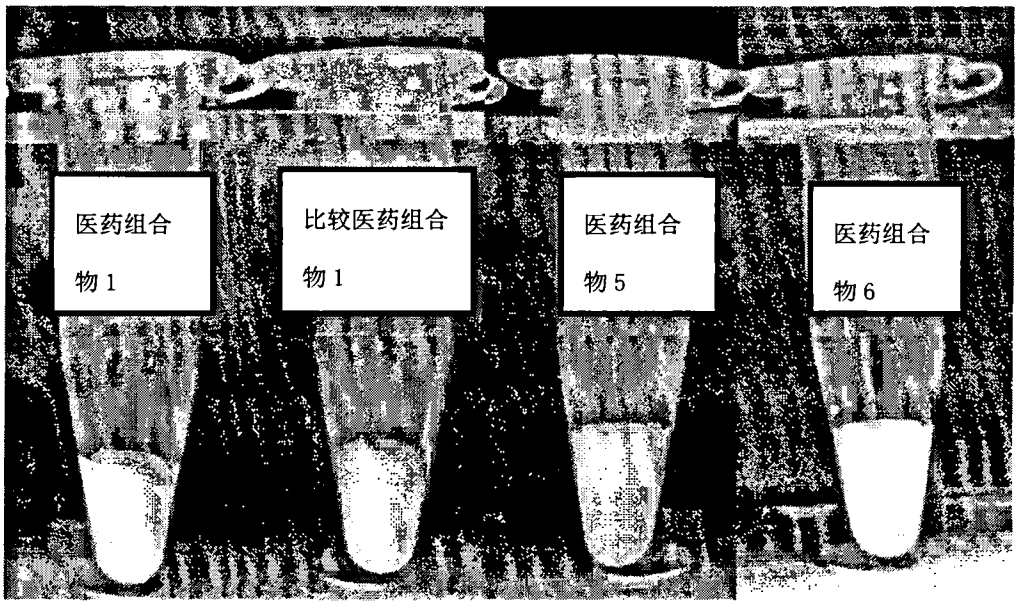
医药组合物 1
比较医药组合物 1
医药组合物 5
医药组合物 6

图 2A

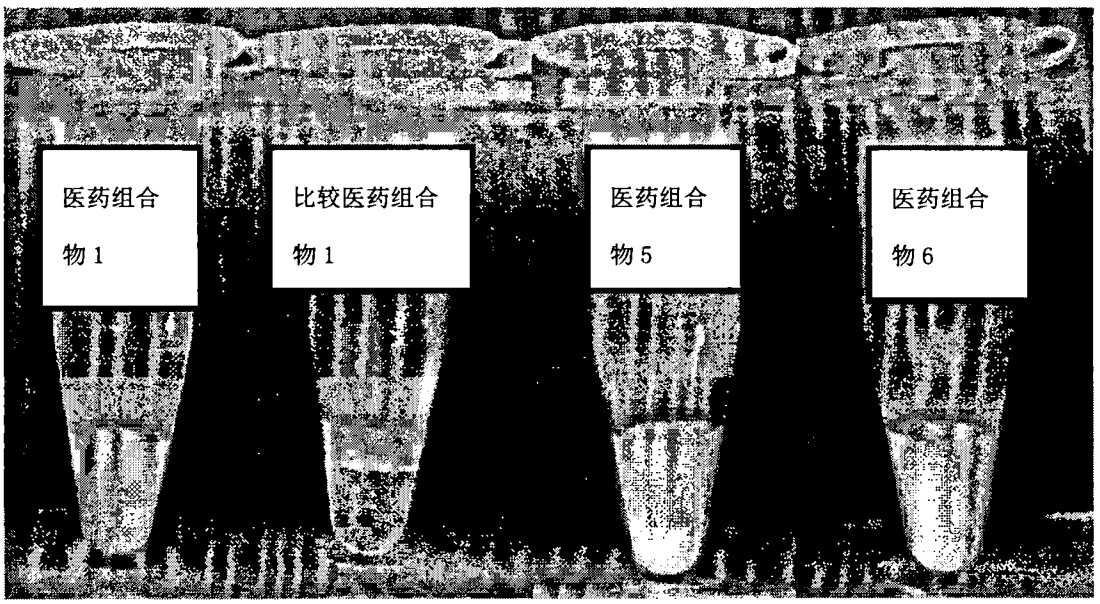
医药组合物 1
比较医药组合物 1
医药组合物 5
医药组合物 6

图 2B

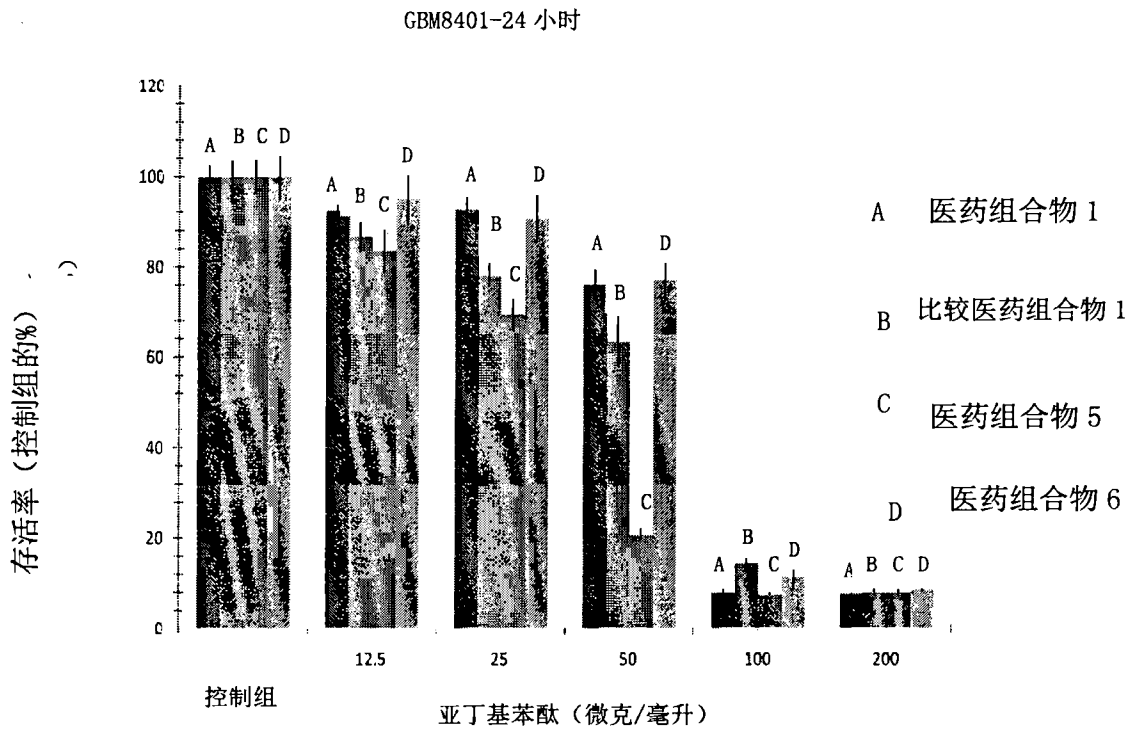
GBM8401-24 小时
存活率（控制组的%）
120
100
80
60
40
20
0
A B C D
12.5
25
50
100
200
控制组
亚丁基苯酞（微克/毫升）
A 医药组合物 1
B 比较医药组合物 1
C 医药组合物 5
D 医药组合物 6

图 3

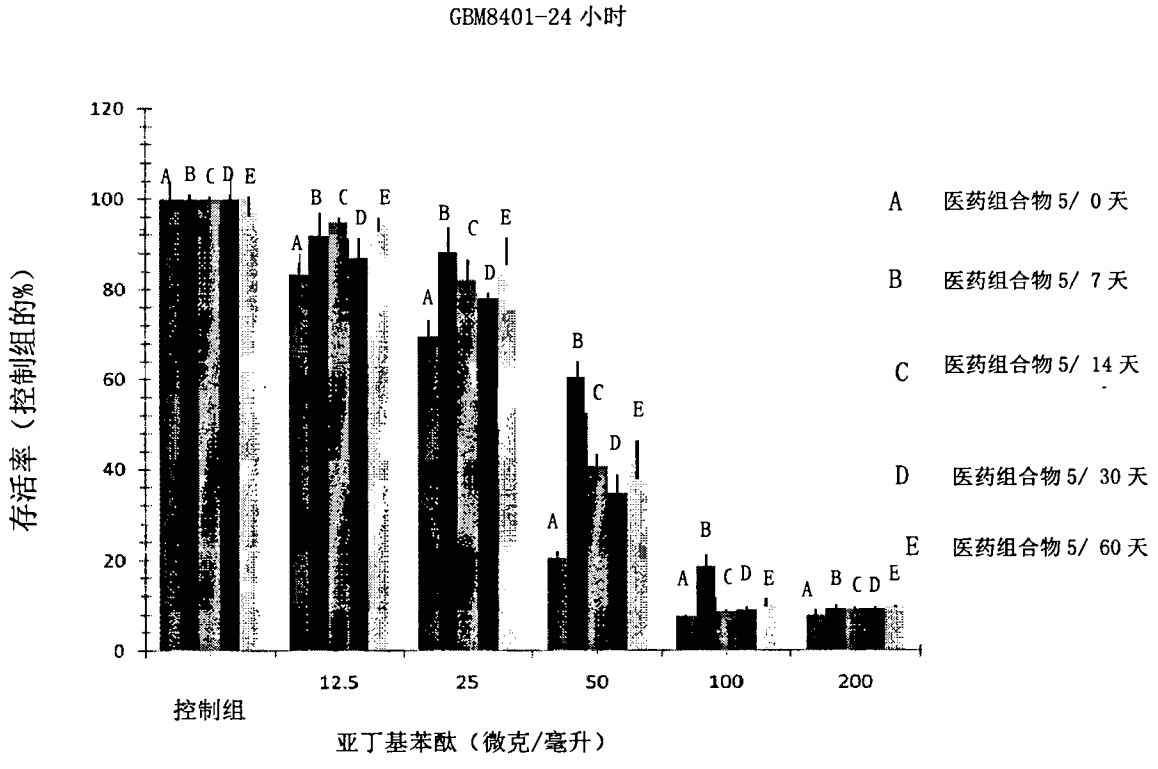
GBM8401-24 小时
存活率（控制组的%）
120
100
80
60
40
20
0
A B C D E
12.5
25
50
100
200
控制组
亚丁基苯酞（微克/毫升）
A 医药组合物 5/ 0 天
B 医药组合物 5/ 7 天
C 医药组合物 5/ 14 天
D 医药组合物 5/ 30 天
E 医药组合物 5/ 60 天

图 4

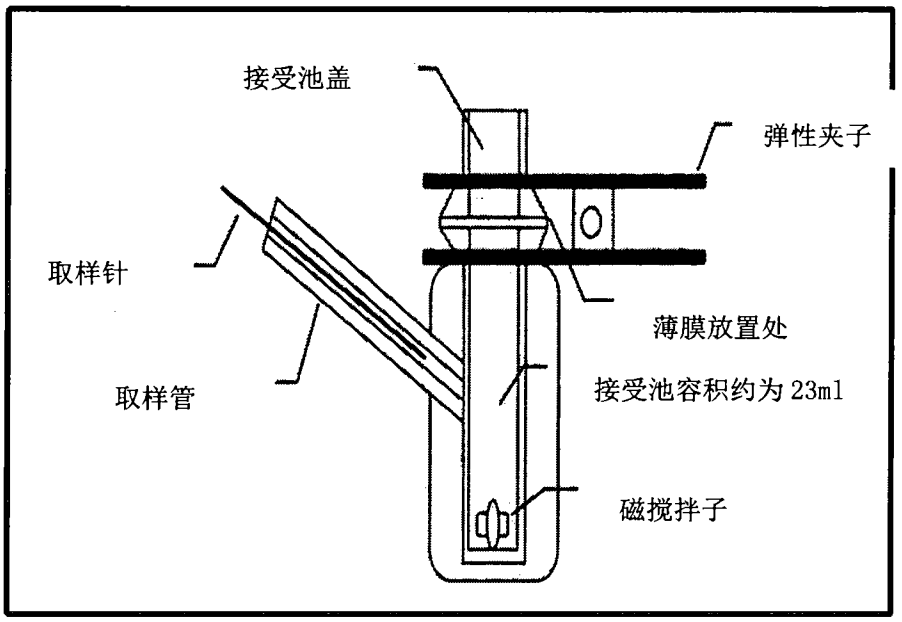
接受池盖
弹性夹子
取样针
薄膜放置处
取样管
接受池容积约为 23ml
磁搅拌子

图 5

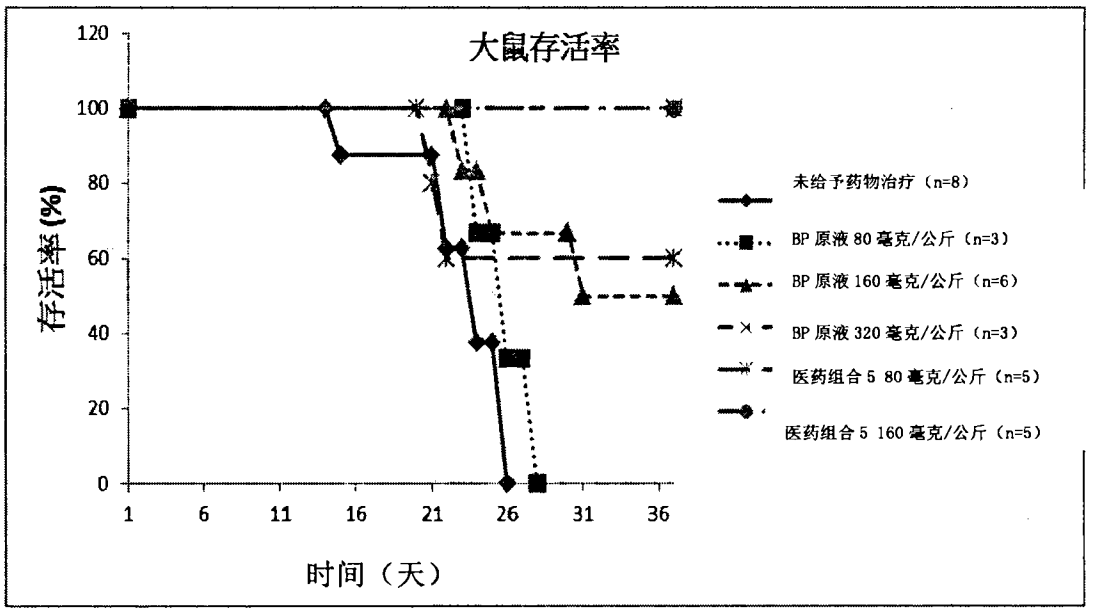
大鼠存活率
存活率(%)
120
100
80
60
40
20
0
1
6
11
16
21
26
31
36
时间（天）
未给予药物治疗（n=8）
BP 原液 80 毫克/公斤（n=3）
BP 原液 160 毫克/公斤（n=6）
BP 原液 320 毫克/公斤（n=3）
医药组合 5 80 毫克/公斤（n=5）
医药组合 5 160 毫克/公斤（n=5）

图 6

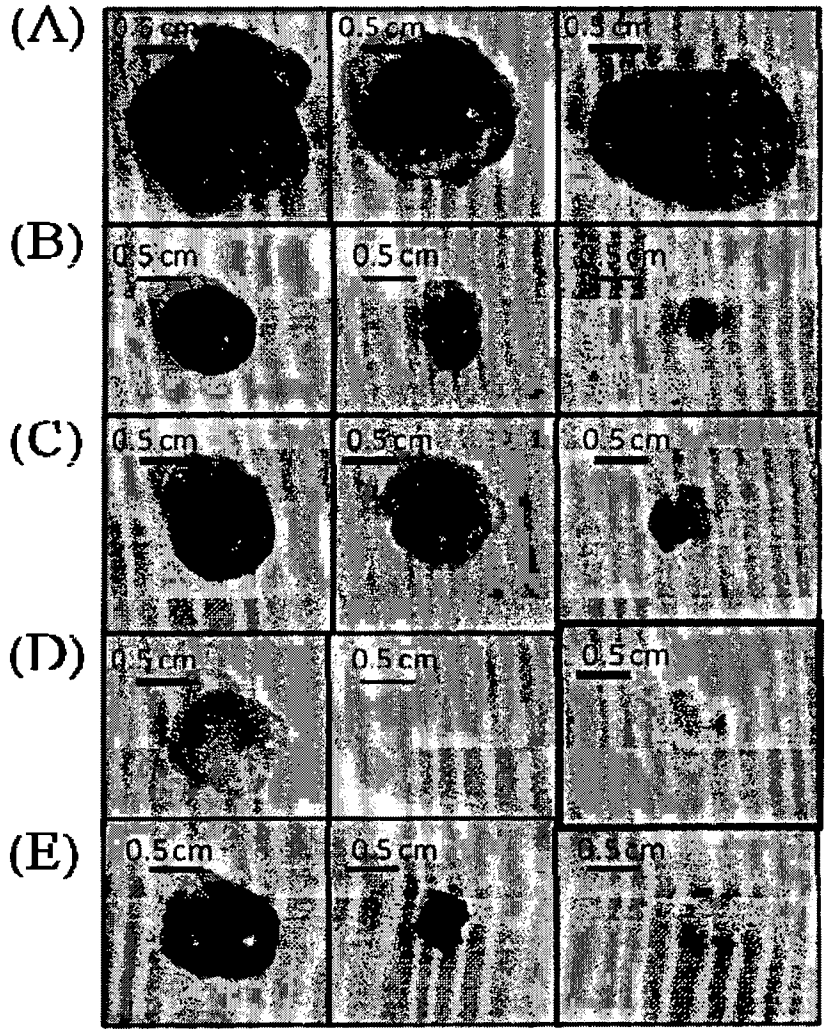
(A)
(B)
(C)
(D)
(E)
0.5 cm

图 7A

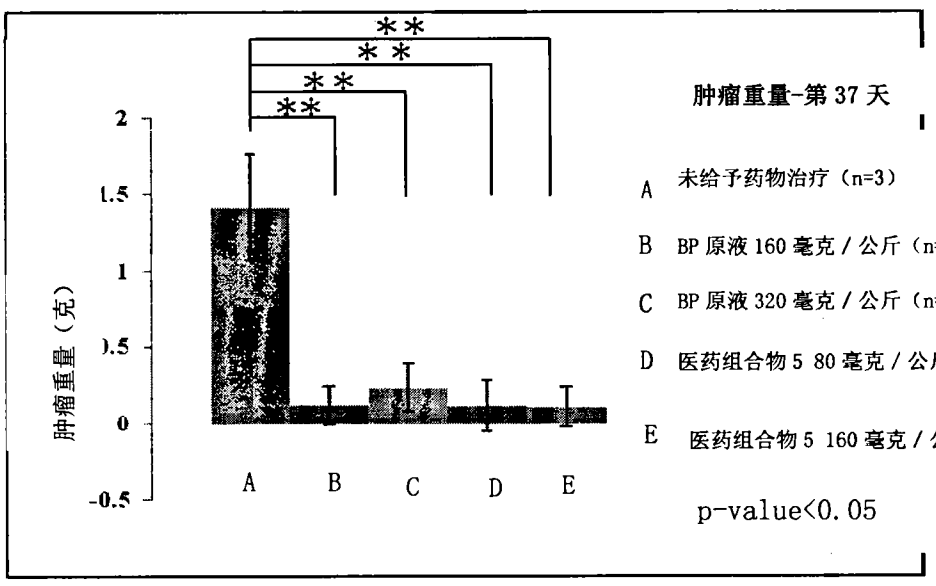
**
**
**
**
肿瘤重量（克）
2
1.5
1
0.5
0
-0.5
A
B
C
D
E
肿瘤重量-第 37 天
A 未给予药物治疗（n=3）
B BP 原液 160 毫克 / 公斤（n=3）
C BP 原液 320 毫克 / 公斤（n=3）
D 医药组合物 5 80 毫克 / 公斤（n=3）
E 医药组合物 5 160 毫克 / 公斤
p-value<0.05

图 7B

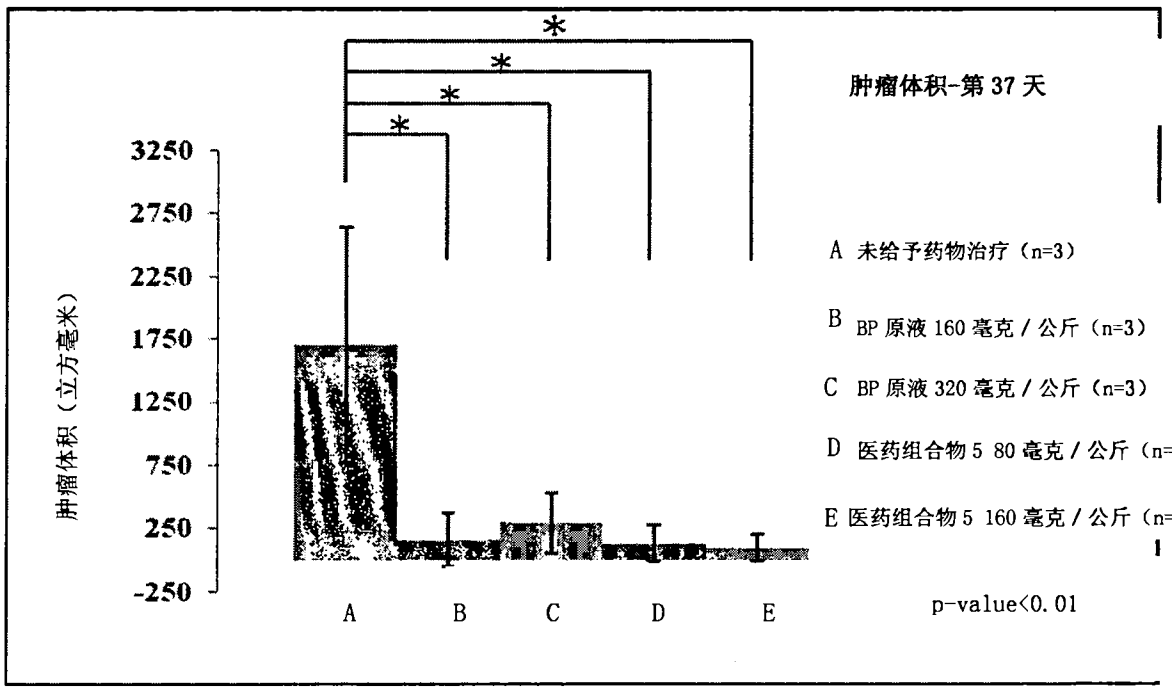
肿瘤体积-第 37 天
肿瘤体积（立方毫米）
3250
2750
2250
1750
1250
750
250
-250
A
B
C
D
E
A 未给予药物治疗（n=3）
B BP 原液 160 毫克 / 公斤（n=3）
C BP 原液 320 毫克 / 公斤（n=3）
D 医药组合物 5 80 毫克 / 公斤（n=3）
E 医药组合物 5 160 毫克 / 公斤（n=3）
p-value<0.01

图 7C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2015/076893

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/365 (2006.01) i; A61K 9/10 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNTXT; CNABS; SIPOABS; TWTXT; CNKI, China Pharmaceutical Abstracts, Chinese Pharmaceutical Patent Database, DWPI, EPODOC, CA, Embase: phthalide, dimethylsulfoxide, vegetable oil, ethanol, fatty acid, ethyl ester, polysorbate, tween, polypropylene glycol, polyethylene glycol, butylidenephthalide, phosphate, oil, acid

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 1943606 A (BUDDHIST TZU CHI GENERAL HOSPITAL), 11 April 2007 (11.04.2007), description, page 5, line 4 to page 6, line 6	1-9
A	CN 103565797 A (CHINA MEDICAL UNIVERSITY), 12 February 2014 (12.02.2014), description, paragraphs 0031, 0038-0039 and 0044	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
15 July 2015 (15.07.2015)	**21 July 2015 (21.07.2015)**
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer **LEI, Yaolong** Telephone No.: (86-10) **62412194**

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2015/076893

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1943606 A	11 April 2007	CN 1943606 B	12 May 2010
		HK 1100484 A1	17 September 2010
CN 103565797 A	12 February 2014	TW 201406740 A	16 February 2014
		US 2014045765 A1	13 February 2014
		US 8729026 B2	20 May 2014
		CN 103565797 B	13 May 2015
		TW I460168 B	11 November 2014

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2015/076893

A. 主题的分类

A61K 31/365(2006.01)i; A61K 9/10(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

CNTXT;CNABS;SIPOABS;TWTXT;CNKI,中国药学文摘库，中国药物专利数据库，DWPI,EPODOC,CA,Embase:苯酞，二甲亚砜，蔬菜油，乙醇，苯酞，磷酸盐，脂肪酸，乙酯，聚山梨醇，吐温，油，聚丙二醇，聚乙二醇，butylidenephthalide,phosphate,oil, acid

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 1943606 A (财团法人佛教慈济综合医院) 2007年 4月 11日 (2007-04-11) 说明书第5页第4行-第6页第6行	1-9
A	CN 103565797 A (中国医药大学) 2014年 2月 12日 (2014-02-12) 说明书第0031，0038-0039，0044段	1-9

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2015年 7月 15日	2015年 7月 21日

ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 中国 传真号 (86-10)62019451	雷耀龙 电话号码 (86-10)62412194

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2015/076893

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	1943606	A	2007年 4月 11日	CN	1943606	B	2010年 5月 12日
				HK	1100484	A1	2010年 9月 17日
CN	103565797	A	2014年 2月 12日	TW	201406740	A	2014年 2月 16日
				US	2014045765	A1	2014年 2月 13日
				US	8729026	B2	2014年 5月 20日
				CN	103565797	B	2015年 5月 13日
				TW	I460168	B	2014年 11月 11日