



(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 I507201 B

(45)公告日：中華民國 104 (2015) 年 11 月 11 日

(21)申請案號：098143056

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 12 月 15 日

(51)Int. Cl. : A61K36/48 (2006.01)

A61P7/04 (2006.01)

(30)優先權：2008/12/15 美國

61/122,586

(71)申請人：醫科華股份有限公司(美國) ECOPHARM CORPORATION (US)

臺北市松山區復興北路 167 號 5 樓之 1

(72)發明人：安 錦華 AN, JINHUA (US)；費德勒 約翰 M FIDLER, JOHN M. (US)；慕瑟 約翰 H MUSSER, JOHN H. (US)

(74)代理人：王正利

(56)參考文獻：

WO 02/02607A2

審查人員：張子威

申請專利範圍項數：25 項 圖式數：6 共 64 頁

(54)名稱

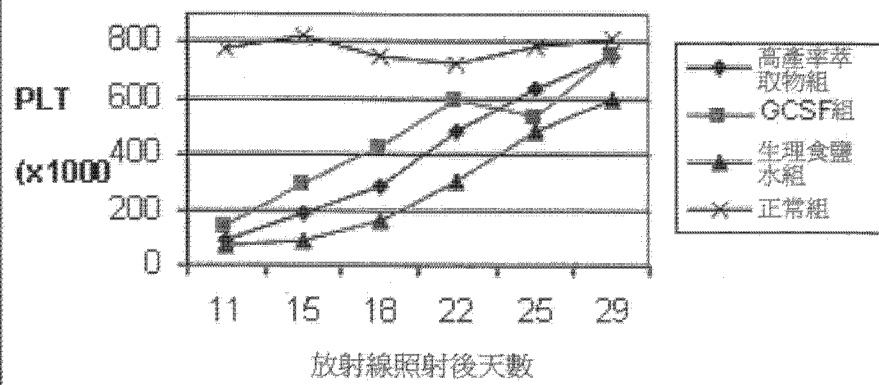
以包含黃耆萃取物之組成物治療自發性血小板缺少性紫斑症之技術

TREATING IDIOPATHIC THROMBOCYTOPENIC PURPURA WITH COMPOSITIONS
COMPRISING EXTRACTS OF ASTRAGALUS MEMBRANACEUS

(57)摘要

本發明內容一般相關於製備並使用包含黃耆萃取物之組成物之用途。該萃取物製備自黃耆，可包含經酸修飾之阿拉伯糖半乳聚糖蛋白質組成物，具有阿拉伯糖：半乳糖比例約 3.5：1 至約 5.0：1；約 5%至約 10%鼠李糖(rhamnose)；約 15%至約 20%半乳糖；以及約 10%至約 15%之葡萄糖。該組成物可用於治療自發性血小板缺少性紫斑症，並配製為此類治療之藥物。

The teachings provided herein generally relate to the preparation and uses of compositions comprising extracts of Astragalus membranaceus. The extracts are prepared from Astragalus membranaceus and can comprise, for example, an acid-modified arabinogalactan protein composition having an arabinose: galactose ratio ranging from about 3.5:1 to about 5.0:1, from about 5% to about 10% rhamnose, from about 15% to about 20% galactose, and from about 10% to about 15% glucose. The compositions can be used in the treatment of idiopathic thrombocytopenic purpura and the formulation of medicaments for such treatments.



第1圖

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：98143056

A61K 36/48 (2006.01)

※申請日：98.12.15

※IPC 分類：

A61P 7/04 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

以包含黃耆萃取物之組成物治療自發性血小板缺少性紫斑症之技術
 TREATING IDIOPATHIC THROMBOCYTOPENIC PURPURA WITH
 COMPOSITIONS COMPRISING EXTRACTS OF ASTRAGALUS
 MEMBRANACEUS

二、中文發明摘要：

本發明內容一般相關於製備並使用包含黃耆萃取物之組成物之用途。該萃取物製備自黃耆，可包含經酸修飾之阿拉伯糖半乳聚糖蛋白質組成物，具有阿拉伯糖：半乳糖比例約3.5:1至約5.0:1；約5%至約10%鼠李糖(rhamnose)；約15%至約20%半乳糖；以及約10%至約15%之葡萄糖。該組成物可用於治療自發性血小板缺少性紫斑症，並配製為此類治療之藥物。

三、英文發明摘要：

The teachings provided herein generally relate to the preparation and uses of compositions comprising extracts of *Astragalus membranaceus*. The extracts are prepared from *Astragalus membranaceus* and can comprise, for example, an acid-modified arabinogalactan protein composition having an arabinose:galactose ratio ranging from about 3.5:1 to about 5.0:1, from about 5% to about 10% rhamnose, from about 15% to about 20% galactose, and from about 10% to about 15% glucose. The compositions can be used in the treatment of idiopathic thrombocytopenic purpura and the formulation of medicaments for such treatments.

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：

(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：

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

交互參照相關申請案

本申請案之申請專利範圍係補充美國暫時專利申請案號61/122,586，於2008年12月15日提申，在此併入本案以作為參考資料。

發明領域

本發明內容一般相關於製備並使用包含黃耆萃取物之組成物之用途。

【先前技術】

發明背景

血小板或巨核細胞數量降低已知為血小板缺少症之症狀，此為數種疾病或療法會產生之症狀，會抑制骨髓功能、抑制造血功能，或導致血小板或巨核細胞數量降低。舉例而言，癌症病患通常會以化學療法或放射線療法治療，且會經歷血小板缺少症狀，增加出血的風險，而潛在性地限制了化療試劑之劑量。至少有二機制會產生血小板缺少症—(1)降低巨核細胞或血小板製造之機制；以及(2)自循環系統中分解或移除血小板之機制。

使用第二種機制之疾病範例之一為自發性血小板缺少性紫斑症(ITP)。ITP為一種自體免疫血液疾病，其特徵為免疫系統破壞血液中之血小板，導致不正常之低血小板量。該血小板之破壞係歸因於抗血小板自體抗體之存在，其中該抗體直接對抗病患之血小板。此低血小板量會導致容易

淤青、牙齦出血，以及較不常見的嚴重內出血。亦會發生鼻子、牙齦、腸胃道或尿道出血，腦出血為較不常見但可怕之併發症。

目前，ITP影響美國約200,000人，目前仍無治療方法。半數案例被分類為“自發性”，意指原因不明。術語“血小板缺少”係指血小板量降低，而術語“紫斑症”係指皮膚與黏膜上之紫色區域，如嘴部內襯，其中流血原因為血小板減少。術語“免疫性血小板性紫斑症”通常用於描述該症狀，其特異於該疾病之免疫特性，並包括已知原因與未知原因之情況。

ITP可經由藥物驅動，或與感染、懷孕或免疫疾病相關，如系統性紅斑性狼瘡。急性ITP最常發生於年輕孩童。男孩和女孩患病機率相同，症狀通常在病毒感染後出現。約85%之孩童會在1年內復原，問題不會再出現。當ITP持續6個月以上，則被認為是慢性，且慢性ITP可發生於任何年紀。ITP尖峰期為成人期，而女性發生率為男性的二至三倍。不幸的是，通常必須改變生活形態才能避免受傷流血。

在某些實施例中，標準ITP治療係使用高劑量之皮質類固醇。病患對於高劑量皮質類固醇有反應，但反應並不持久，且治療的耐受性差，具有明顯的副作用。皮質類固醇失效或無耐受性會導致必須選擇脾切除術，因為脾臟為血小板破壞的主要位置，當然會導致併發症。在某些實施例中，該治療包括投以潑尼松(prednisone)及/或第IV型免疫球蛋白，其他藥物如長春新鹼(vincristine)、咪唑硫嘌呤

(azathioprine)(IMURAN)、DANAZOL、還磷醯胺，以及環孢靈(cyclosporine)亦可使用。

熟習此技術領域者應瞭解到不正常的低血小板量已知起因於化療藥物或放射線療法。這些治療提供上述之第一機制，會抑制骨髓功能，降低巨核細胞之產生，進而降低血小板量。相反的，ITP之不正常低血小板量之第二機制，移除循環系統中之血小板，則是起因於產生結合至血小板之抗體。因此，熟習此技術領域者應瞭解到，需要一可治療血小板缺少症之組成物，不論是由於循環系統中製造巨核細胞或血小板至生物過程受損，或是由於ITP之抗體產生機制造成。

【發明內容】

發明概要

係於此揭示一種包含黃耆萃取物之製劑與用途。在某些實施例中，為一種包含高產率黃耆萃取物之組成物，其中該萃取物包含阿拉伯糖：半乳糖比例大於約3.5:1；約5%至約10%鼠李糖(rhamnose)；約15%至約20%半乳糖；約10%至約20%之半乳糖醛酸；以及約10%至約15%之葡萄糖。在某些實施例中，該高產率萃取物係使用第一流程製備，其包括自黃耆中分離出一粗產物，並以酸溫和處理該粗產物，該溫和處理包括施加酸至該粗產物上，其濃度為約0.05 M至約0.5 M，溫度範圍為約15°C至25°C，處理時間範圍為約1小時至約24小時。該酸之施加溫度與時間係經選擇，以獲得上述之阿拉伯糖：半乳糖比例、半乳糖含量、葡萄糖含

量，以及高產率。該高產率實質上高於使用第二流程製備之黃耆萃取物，該第二流程包括於特定溫度與時間下，施加酸至該粗萃取物上，以獲得阿拉伯糖：半乳糖比例小於約3.5:1、半乳糖約為20%-35%，以及葡萄糖小於約10%。在某些實施例中，酸處理步驟所使用之酸為三氯醋酸或氫氯酸。

在某些實施例中，該萃取物係分離自黃耆之根部。在這些實施例中，該黃耆(*Astragalus membranaceus*)為蒙古黃耆(*A. membranaceus* Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao)或莢膜黃耆(*A. membranaceus* (Fisch.) Bge)。在某些實施例中，該黃耆生長於中華人民共和國之內蒙古或山西省。此外，在某些實施例中，該黃耆植物之根部為約兩年生。

該萃取物組成物可不同，在某些實施例中，該萃取物具有重量平均分子量為至少100千道耳頓，具有至少80%重之碳水化合物，以及不超過2%重之蛋白質，具有阿拉伯糖：半乳糖比例範圍為約4.0:1至約4.5:1，具有水溶液pH值範圍為約4.5至約6.5，或其任意組合。

包含該萃取物之組成物可更包含一可刺激造血作用之試劑，或與一可刺激造血作用之試劑組合投藥。在某些實施例中，該試劑可選自於由顆粒細胞聚落刺激因子、顆粒細胞巨噬體聚落刺激因子、紅血球生成素與紅血球生成刺激蛋白質、血小板生成素、介白素-3，及其衍生物組成之族群。在某些實施例中，該組成物可為一種水性注射用配方，包含一治療有效劑量之該組成物，以及一水性注射用

賦形劑。

在某些實施例中，該萃取物包含阿拉伯糖：半乳糖比例範圍為約1.5:1至約3:1；約5%至約15%之阿拉伯糖；小於約1.5%之鼠李糖(rhamnose)；約3%至約7%之半乳糖；小於約4%之半乳糖醛酸；以及約70%至約90%之葡萄糖。在這些實施例中，該萃取物具有重量平均分子量範圍為20千道耳頓至60千道耳頓，水溶液pH值範圍為約4.5至約6.5，或其組合。

於此亦揭示一種刺激哺乳動物造血系統之方法。該方法包含投以該哺乳動物有效劑量之該組成物。在某些實施例中，該刺激包括增加血小板量、增加白血球量、增加淋巴細胞量，或其組合。

在某些實施例中，該方法更包含共投以第二活性試劑。在這些實施例中，該第二活性試劑為造血試劑。該第二活性試劑選自於由顆粒細胞聚落刺激因子、顆粒細胞巨噬體聚落刺激因子、紅血球生成素與紅血球生成刺激蛋白質、血小板生成素、介白素-3，及其衍生物組成之族群。

該哺乳動物可為任何哺乳動物，其中該組成物係用於投藥，不論是測試目的或治療目的。在某些實施例中，該哺乳動物為人類，以及在某些實施例中，該人類患有骨髓抑制症。該骨髓抑制為化學療法或放射線療法之後果。

本專利亦揭示製備該萃取物之方法。該方法包含自黃耆中分離出一粗萃取物，並以酸溫和處理該粗萃取物。該溫和處理包括施加該酸至該粗萃取物上，其濃度為約0.05 M

至約0.5 M，溫度範圍為約15°C至25°C，處理時間範圍為約1小時至約24小時。該酸之施加溫度與時間係經選擇，以獲得阿拉伯糖：半乳糖比例大於約3.5:1；約5%至約10%鼠李糖(rhamnose)；約15%至約20%半乳糖；約10%至約20%之半乳糖醛酸；以及約10%至約15%之葡萄糖；以及一高產率。該高產率實質上高於使用第二流程製備之黃耆萃取物，該第二流程包括於特定溫度與時間下，施加酸至該粗萃取物上，以獲得阿拉伯糖：半乳糖比例小於約3.5:1、半乳糖約為20%-35%，以及葡萄糖小於約10%。在某些實施例中，該阿拉伯糖：半乳糖比例範圍可降低為約4.0:1至約4.5:1、約3.75:1至約4.5:1、約3.8:1至約4.25:1，或其中之任一範圍。

於此亦揭示一種治療自發性血小板缺少性紫斑症之方法，其中該方法包含投以治療有效劑量之該萃取物至患有自發性血小板缺少性紫斑症之病患身上。在某些實施例中，該經酸修飾之阿拉伯糖半乳糖蛋白質組成物係與第二活性試劑組合投藥。在某些實施例中，該第二活性試劑選自於由顆粒細胞聚落刺激因子、顆粒細胞巨噬體聚落刺激因子、紅血球生成素與紅血球生成刺激蛋白質、血小板生成素、介白素-3，及其衍生物組成之族群。以及，在某些實施例中，該組成物可用於製造治療哺乳動物自發性血小板缺少性紫斑症之藥物，該治療係藉由投以治療有效劑量之該藥物而達成。

此技術領域者在讀完以下說明後應瞭解到，該概念可

延伸至其他實施例，依據申請專利範圍，申請專利範圍中所列出者，以及申請專利範圍中所引用之術語。

圖式簡單說明

第1圖顯示BALB/c小鼠對於高產率萃取物之反應，在依據某些實施例，投以次致死劑量之放射線後。

第2圖顯示絲裂黴素(mitomycin)誘發之血小板缺少，依據實施例注射7天後。

第3圖顯示自經放射線照射BALB/c小鼠回收白血球細胞，在依據實施例投以高產率萃取物後。

第4圖顯示自經放射線照射BALB/c小鼠回收血小板之回收率，當依據實施例共注射高產率萃取物與G-CSF。

第5圖顯示自經放射線照射BALB/c小鼠回收白血球之回收率，當依據實施例共注射高產率萃取物與G-CSF。

第6圖顯示台灣臨床試驗之流程圖，其中該病患們被診斷出患有慢性自發性血小板缺少症，依據美國血液學會(ASH)指南所定義。

【實施方式】

較佳實施例之詳細說明

本發明係揭示一種包含黃耆萃取物之製劑與用途。在某些實施例中，該萃取物可用於骨髓抑制下刺激造血作用；刺激IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IFN- γ 、GM-CSF或G-CSF之產生；刺激白血球之產生；刺激患有嗜中性白血球減少症、白血球減少症、單核細胞減少症、貧血，或血小板缺少症之哺乳動物之免疫及/或造血系統。該萃取物可用於治

療由於暴露於細胞毒性試劑或放射線後所產生之症狀，不論是意外或療程之一部分，其中該症狀包括但不侷限於，造血細胞受損、抑制或移除，為骨髓抑制或免疫反應之結果。這些症狀可藉由使用於此提供之治療方法減輕，其中該症狀包括如惡質症、嘔吐，藥物戒斷症狀。此類萃取物之範例可見於如美國專利號6,991,817與WO200100682，在此併入本案以作為參考資料。

該萃取物可刺激造血活性，因而增加血球之製造。該萃取物，舉例而言，可增加血小板量並可有效治療血小板缺少症，該症狀為接受癌症治療之病患最常見到的。然而，血小板缺少症有數種其他原因，如免疫性疾病與病毒性疾病。免疫疾病之一範例為ITP，病毒性疾病之一範例為HIV，或慢性肝炎。該藥物之投藥亦可導致血小板缺少症，其可見血小板量降低，為該藥物之副作用，為該藥物抑制骨髓功能之結果。抗發炎藥物、心臟病藥物、抗生素，已經辨識為血小板缺少症之一原因。生理情況，如脾腫大，會導致血小板缺少症，因為脾腫大會捕捉並破壞血小板。免疫系統疾病，如狼瘡與類風濕病亦會導致血小板缺少症。

因此，該萃取物可用於治療血小板缺少症，例如，不論是由於免疫疾病或骨髓抑制所產生。該萃取物亦可用於刺激白血球之製造。於此所描述之組成物與方法可刺激造血作用，並誘發巨核細胞與其他白血球之增生與飽和。於此所描述之組成物與方法可刺激血小板、巨核細胞與其他白血球細胞之製造、增生與飽和，並加速其回收，在由於

病症或其他治療所造成之生成抑制或破壞或自循環系統中移除後。此技術領域者在瀏覽完本份揭示後應可更佳瞭解本發明申請專利範圍。

於此所提供之萃取物可幫助恢復免疫系統對於感染或免疫抑制症狀之反應，並於B型肝炎中保護肝細胞。此外，該萃取物可合理地預期可刺激較成熟造血細胞之初代造血前驅細胞之生長與活性。此外，該萃取物可幫助增進正在進行療程之效果，藉由增強病患對於感染之抵抗性，藉由刺激病患之造血作用，對抗會降低投藥處理之感染，或降低治療強度。

製備具有Ara:Gal範圍為約1.5:1至約3:1，並具有平均分子量範圍為約20K道耳頓至約60K道耳頓之黃耆萃取物(“經純化萃取物”)

於此係描述該萃取物如何自黃耆中分離出並純化。在某些實施例中，二年生黃耆之根係為該組成物之一良好來源。在許多實施例中，該根可來自如生長於中華人民共和國之內蒙古或山西省之蒙古黃耆(*A. membranaceus* Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao)或莢膜黃耆(*A. membranaceus* (Fisch.) Bge)。

黃耆萃取物一般係衍生自無菌處理之薄片或根部乾燥切片。該製備包括切下乾燥根，以超微過濾水搓洗，並以抗感染溶液清洗，如70%之酒精。將該根切片，並於無菌條件下乾燥以產生“飲片”，於此亦稱之為“乾淨飲片”。該萃取物包含阿拉伯糖半乳聚糖蛋白質，以及相關之多糖，

分離自該飲片，使用流程包括施加水萃取溶劑，溫度為至少80-100°C。

該萃取溶劑可為水，且可選擇性地包括共萃取物，如鹼金屬鹽類。該鹼金屬鹽類包括如二氫磷酸鉀或二氫磷酸鈉。該共萃取物可為，如0.5 M KH_2PO_4 濃縮液，pH為約4.5)。

該萃取溶劑係於特定溫度下施加至飲片上一段時間，以及萃取該根所需之萃取循環數。典型之流程包括三個萃取循環，每一循環持續約3小時，並施加溫度約100°C之萃取溶液，在某些實施例中，該飲片一開始係以熱鹽水溶液清洗，如0.5 M KH_2PO_4 ，pH為4.5，溫度為約100°C，清洗約30分鐘。在某些實施例中，所有製備飲片之步驟皆於無菌狀態下進行，包括使用滅菌裝備與試劑。

之後該萃取溶劑經濃縮，此可於真空下，溫度範圍為約60°C至約70°C進行，達到濃度為1L每公斤飲片。該濃縮液亦可使用超微過濾法製備，如使用具100千道耳頓排除過濾器之超微過濾。

之後該萃取物係使用低級醇類自該濃縮萃取溶劑中沈澱出。該低級醇類可為如乙醇。在某些實施例中，該乙醇可加至該溶液中而成濃度約70%之乙醇，於室溫下產生沈澱。在某些實施例中，該沈澱物首先係使用較低濃度約35%之乙醇於第一沈澱步驟中，之後使用較高濃度約70%之乙醇於第二沈澱步驟中。用於沈澱步驟中之低級醇類濃度範圍為20%-30%、30%-40%、40%-50%、50%-60%、60%-70%、70%-80%、80%-90%，或其中之任一濃度。

該醇類清洗步驟可重複以更進一步純化。舉例而言，該沈澱物可以更多低級醇類清洗，其中典型之清洗包括如以95%乙醇清洗三次。之後將該沈澱物懸浮於水中，其濃度適用於下一步處理，如約18-20%重量/體積。可再次加入溶於水中之低級醇類沈澱，以移除非水溶性之其他材料。上清液可經較高濃度之低級醇沈澱出。該較高濃度之低級醇可為如40-80%之乙醇，以及在某些實施例中，60-70%之乙醇，以產生粗萃取沈澱物，其包含阿拉伯糖半乳聚糖蛋白質，以及相關之多糖。

該粗萃取物再次溶於水中並乾燥。適當之乾燥過程可包括此技術領域者所熟知之步驟，其可預防過度加熱，可包括如噴霧乾燥、真空乾燥、冷凍乾燥、臨界點乾燥、溶劑交換，以及類似方法。該粗萃取物亦可再溶於水中或水性溶液中，其中該粗萃取物進行適當超微過濾而濃縮。在某些實施例中，該適當之超微過濾液濃度為約2%。之後該粗萃取物可經超微過濾，以進一步移除低分子量之物質，並降低溶液體積，其中該超微過濾系統可具有5千道耳頓分子量排除值。

在某些實施例中，該粗萃取物可為白色至灰白色粉末，或淡黃色粉末，並可溶於水中成至少約100 mg/mL。在某些實施例中，該粉末為可溶於水中，至少約200 mg/mL。該粉末顯示出乾燥時重量損失小於約15%，具有內毒素含量小於約0.5 EU/mg，以及在某些實施例中，具有內毒素含量小於約0.3 EU/mg。

該粗萃取物可經離子交換層析法更進一步純化。該組成物再溶於水溶液中，並進行適當之超微過濾濃縮，一般濃度為約2%。再溶解之組成物之後進行超微過濾，以進一步移除低分子量之物質，並降低溶液體積。可使用上述之5千道耳頓分子量移除超微過濾系統。超微過濾之滯留物係經陽離子交換管柱沖提，如SP Sepharose陽離子交換管柱，平衡於20 mM NaOAc緩衝液，pH 5.20中。該陽離子交換管柱之沖提物再經陰離子交換管柱沖提，如Q Sepharose陰離子交換管柱，平衡於相同之NaOAc緩衝液中。

該陰離子交換管柱之沖提物可(1)直接使用於其他形式萃取物之製備中，如此所述；(2)經濃縮並乾燥，以形成粗萃取物，其可維持為適於製備經純化萃取物之中間物狀態；或(3)直接用於純化萃取物。

在製備經純化萃取物時，該粗萃取物可經微過濾，使用適當之除菌過濾器，如0.1 μm 過濾器，以及超微過濾，以去除溶液中之鹽類，並再次降低其體積。在某些實施例中可使用8千道耳頓分子量移除超微過濾。超微過濾中之滯留液為濃縮液，百分比濃度可使用折射計測量。在某些實施例中，該滯留液係濃縮至濃度約20-26%，於50-60°C。該經濃縮滯留液之後經低級醇類沈澱。在某些實施例中，該低級醇類可為乙醇，其加入至濃度為約80-90%。沈澱物可經更進一步清洗，其中該典型之清洗包括以無水乙醇清洗沈澱物三次。之後該沈澱物乾燥，得經純化萃取物。在某些實施例中，該沈澱物之乾燥可使用如真空烘箱，溫度為

約60-70℃。

為了降低由本製程獲得之各批次萃取物間之差異，材料可於萃取製程之一或多個步驟中摻合。在某些實施例中，該製程包括摻合粗原料、摻合“飲片”，摻合製程中其他中間物，或其組合。

經純化萃取物之組成物可使用氣相層析法測定，使用三甲基矽烷衍生物之甲醇化組成物萃取物，使用此技術領域者所知之標準分析技術。在某些實施例中，該經純化萃取物含有Ara量範圍為約5%至約15%、約5%至約12%、約5%至約10%、約10%至約15%，或其中之任一範圍；Rha量小於約1%至1.5%；GalA量小於約4%；Gal量範圍為約3%至約7% Gal、約3%至約5%、約4%至約6%，或其中之任一範圍；Glc量範圍為約70%至約90%、自約70%至約85%、自約75%至約80%，自約85%至約90%，或其中之任一範圍。所有百分比皆表示為mol %。

經純化萃取物之Ara:Gal比例範圍自約1.5:1至約3:1。在某些實施例中，該Ara:Gal比例範圍自約1.5:1至約1.75:1、自約1.75:1至約3:1，或其中之任一組合。

該經純化萃取物具有重量平均分子量範圍為約20千道耳頓至約60千道耳頓。在某些實施例中，該分子量範圍為約25千道耳頓至約40千道耳頓、自約27千道耳頓至約35千道耳，或其中之任一組合。

此外，該經純化萃取物具有灰份含量小於約2%重，重金屬含量小於約10 ppm重，羥基脯胺酸含量小於約0.1%。

在某些實施例中，該羥基脯胺酸含量小於約0.05%、小於約0.03%，或其中之一範圍。

該經純化萃取物實質上不含內毒素，具有內毒素含量小於1.0 EU/mg，經Endospecy測定[Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan]。在某些實施例中，該內毒素含量小於0.5 EU/mg、小於0.3 EU/mg，或其中之一範圍。以及，該經純化萃取物可溶於水中，至少20 mg/ml，並具水溶液pH值範圍自約4.5至約6.5。

在某些實施例中，該萃取包含阿拉伯糖：半乳糖比例範圍為約1.5:1至約3:1；自約5%至約15%之阿拉伯糖；小於約1.5%鼠李糖(rhamnose)；自約3%至約7%之半乳糖；小於約4%之半乳糖醛酸；以及自約70%至約90%之葡萄糖。在這些實施例中，該萃取物具有重量平均分子量範圍自約20千道耳頓至約60千道耳頓，水溶液pH範圍自約4.5至約6.5，或其組合。

製備具有Ara:Gal範圍為約2:1至約4:1，並具有平均分子量範圍大於約100K道耳頓之黃耆萃取物(“高MW萃取物”)

一般而言，此範例之萃取物為經純化萃取物之較高分子量形式，其中該萃取物具有重量平均分子量至少100千道耳頓。在其他優點中，這些萃取物具有較低體積。這些較高分子量萃取物一般而言使用該經純化萃取物製備流程而製備，沖提自該陰離子交換管柱，可直接使用粗萃取物或經純化萃取物(“經純化萃取物或其中間產物”)。

使用100 K分子量排除超微過濾系統，自經純化萃取物

或其中間產物製備高MW萃取物。例如，陰離子交換管柱之沖提物可直接加至該100 K分子量排除超微過濾系統中，滯留液經濃縮、沈澱並選擇性進一步清洗與乾燥，每一步驟皆使用上述製備經純化萃取物之方法進行。

在某些實施例中，該高MW萃取物含有Ara量範圍自約45%至約75%、約50%至約75%、約50%至約65%、約55%至約60%，或其中之任一範圍；Rha量範圍自約2%至約4%、約2%至約3%，或其中之任一範圍；GalA量範圍自約4%至約6%、自約4%至約5%，或其中之任一範圍；Gal量範圍為約8%至約25%、約10%至約20%、約12%至約18%，或其中之任一範圍；Glc量範圍自約5%至約25%、自約7%至約20%、自約10%至約15%，或其中之任一範圍。所有百分比皆以mol %表示。

高MW萃取物中之Ara:Gal比例範圍自約2:1至約4:1。在某些實施例中，該Ara:Gal比例範圍自約2:1至約3.75:1、約2.5:1至約3.5:1、約2.5:1至約3:1、約3:1至約4:1，或其中任一範圍。

該高MW萃取物具有重量平均分子量大於100千道耳頓。在某些實施例中，該高MW萃取物具有重量平均分子量範圍自約100千道耳頓至約350千道耳頓。在某些實施例中，該分子量範圍自約100千道耳頓至約300千道耳頓、約125千道耳頓至約275千道耳頓、約150千道耳頓至約250千道耳頓、約200千道耳頓至約275千道耳頓，或其中之任一範圍。

此外，該高MW萃取物具有灰份含量小於約2%重，重金屬含量小於約20 ppm重，以及羥基脯胺酸含量大於約0.2%，在某些實施例中，範圍自約0.2%至約0.3%。

高MW萃取物係實質上不含內毒素，具有內毒素含量小於1.0 EU/mg，經Endospecy測定[Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan]。在某些實施例中該內毒素含量小於0.5 EU/mg、小於0.3 EU/mg，或其中之任一範圍。該經純化萃取物可溶於水中至10 mg/ml，並具有水溶液pH值範圍自約4.5至約6.5。

該高MW萃取物含有約95%碳水化合物，包括醣化該阿拉伯醣半乳聚醣蛋白質之蛋白質核心之醣類，以及約5%蛋白質，其中該羥基脯胺酸量約為20%之總胺基酸含量。

製備具有Ara:Gal範圍為約3.5:1至約5.0:1，並具有平均分子量範圍大於約100K道耳頓之黃耆萃取物(“高產率萃取物”)

經酸修飾之萃取物係揭示於美國專利號6,991,817。一般而言，此範例之萃取物係經增進，至少一理由為其提供了活性萃取物之實質上較高產率形式。在某些實施例中，該高產率萃取物可使用製備高MW萃取物之流程製備，並包括此範例中所描述之溫和酸處理。

該製程包括分離該粗萃取物，並以酸溫和處理該粗萃取物，該溫和處理包括施加酸至粗萃取物，於濃度範圍自約0.05 M至約0.5 M、自約0.01 M至約1.0 M、自約0.05 M至約0.1 M，或其中之任一範圍。該製程使用之處理溫度範圍

自約15°C至25°C，處理時間範圍自約1小時至約24小時。處理時間可增加至24小時，在某些實施例中，至較佳水解技術所需要之時間長度。施加酸之溫度與時間係經選擇，以獲得阿拉伯糖：半乳糖比例大於3.5:1，以及其他組成物特徵，如半乳糖含量約15%至約20%，葡萄糖含量約10%至約15%，以及高產率。

該產率實質上高於使用不同製程所得之黃耆萃取物產率，其包括施加酸至粗萃取物上，於特定溫度與時間下，以獲得阿拉伯糖：半乳糖比例小於3.5:1、20%-35%之半乳糖，以及小於約10%葡萄糖。該高產率萃取物之產率可高出3%-30%、高出5%-25%、高出10%-20%、高出10%-15%、高出15%-20%、高出20%-30%，或其中之任一範圍。該高產率萃取製程會製造出阿拉伯糖：半乳糖比例範圍自約3.5:1至約5.0:1，並得到高於於此揭示之其他製程製備之萃取物，其產生具有阿拉伯糖:半乳糖比例為3.5:1或更低之萃取物。

該溫和酸處理係經選擇以保留多醣鏈，如確認有足夠之水解，達到希望之純度與高產率。在某些實施例中，該酸可包含礦物酸、有機酸或其組合。在某些實施例中，該有機酸為弱有機酸。在某些實施例中，該酸包含三氯醋酸、氫氟酸，或其組合。在某些實施例中，該酸包含甲酸、醋酸、檸檬酸，或其組合。在某些實施例中，該酸包含硼酸、磷酸、氫氟酸，或其組合。

在某些實施例中，該溫和酸處理包括使用氫氟酸濃度

範圍自約0.01 M至約0.5 M。在某些實施例中，該氫氯酸可經取代，或使用於與過氯酸、氫碘酸、氫溴酸、硫酸、硝酸，或其組合物組合使用。在某些實施例中，該酸可包括有機酸，選自於由二氯醋酸、順丁烯二酸、草酸、水楊酸、三氯醋酸、甲基磺酸、三氟醋酸、苯基磺酸，或其組合物組成之族群。此技術領域者應可立即選出適當之濃度與條件。

在某些實施例中，該酸濃度可為約1.0 M或更低、約0.5 M或更低、約0.3 M或更低、約0.2 M或更低、約0.1 M或更低、約0.05 M或更低、約0.01 M或更低，或其中之任一範圍。在某些實施例中，該酸濃度範圍自約0.1 M至約0.5 M、自約0.2 M至約0.4 M、自約0.2 M至約0.3 M，或其中之任一範圍。在某些實施例中，該反應時間範圍自約0.5小時至約10小時、自約1小時至約8小時、自約2小時至約7小時、自約2小時至約5小時、自約2小時至約3小時，或其中任一範圍。

該高產率產物之後可進一步純化，使用上述超微過濾系統與離子交換流程。進一步純化移除其他鹽類與低分子量物質，並可降低溶液體積。

在某些實施例中，該高產率萃取物含有Ara量範圍自35%至約65%、約50%至約65%、約50%至約60%、約40%至約60%，或其中之任一範圍；Rha量範圍自約5%至約10%、約5%至約8%、約6%至約9%，或其中之任一範圍；GalA量範圍自約10%至約20%、自約10%至約18%、自約12%至約16%，或其中之任一範圍；Gal之量範圍自約15%至約25%、

約15%至約20%、約18%至約21%，或其中之任一範圍；Glc之量小於約10%，自約1%至約8%、自約2%至約6%，或其中之任一範圍。所有百分比皆表示為mol %。

該高產率萃取物中之Ara:Gal比例大於約3.5:1。在某些實施例中，該Ara:Gal比例範圍自約3.5:1至約4.5:1、自約4.0:1至約4.5:1、自約3.5:1至約4:1、自約3.75:1至約4.5:1，或其中之任一範圍。

該高產率萃取物具有重量平均分子量大於100千道耳頓。在某些實施例中，該分子量範圍自約100千道耳頓至約350千道耳頓。在某些實施例中，該分子量範圍自約100千道耳頓至約300千道耳頓、約125千道耳頓至約275千道耳頓、約150千道耳頓至約250千道耳頓、約200千道耳頓至約275千道耳頓，或其中之任一範圍。

此外，該高產率萃取物具有灰份含量小於約2%重、重金屬含量小於約20 ppm重，羥基脯胺酸含量小於約1.0%。

該高產率萃取物實質上不含內毒素，具有內毒素含量小於1.0 EU/mg，如同Endospecy所測定[Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan]。在某些實施例中，該內毒素含量小於0.5 EU/mg、小於0.3 EU/mg，或其中之任一範圍。以及，該經純化萃取物可溶於水中成至少10 mg/ml溶液，並具有水溶液pH值範圍自約4.5至約6.5。

該萃取物可包含80%之葡聚糖，具有蛋白質，並可含有微量之脂肪。在某些實施例中，部分萃取物具有尖峰分子量為約350千道耳頓，相對於普魯藍多醣(pullulan)尺寸，

表示具有較大之分子量，其中該部分萃取物具有尖峰分子量約75千道耳頓，表示具有較小之分子量。具有較大分子量之部分之重量平均分子量為約260千道耳頓，而具有較小分子量之部分則為約120千道耳頓。其聚合度分佈性範圍為約1至約5、自約1.5至約3.5，或其中之任一組合。

在某些實施例中，該萃取物包含阿拉伯醣:半乳糖比例大於約3.5:1；自約5%至約10%之鼠李醣(rhamnose)；自約15%至約20%之半乳糖；自約10%至約20%之半乳糖醛酸；以及自約10%至約15%之葡萄糖。

此技術領域者應瞭解到上述所提供之萃取物製備步驟可經變化，以達到相同或類似之結果。在某些實施例中，可使用依序式離子交換層析步驟。在某些實施例中，該離子交換層析法可以批次方式進行，使用相同或類似之離子交換樹脂。單獨之陰離子與陽離子樹脂，可用於替代同時具有陰離子與陽離子交換功能之混合床樹脂。在某些實施例中，該離子交換之純化可發生於該製程之不同點，包括在溫和酸處理之前或之後，超過濾薄膜之分子量排除尺寸之選擇可變化。

於此揭示包含該萃取物之組成物可更進一步包含可刺激造血作用之試劑，或與可刺激造血作用之試劑組合投藥。在某些實施例中，該試劑選自於由顆粒細胞聚落刺激因子、顆粒細胞巨噬體聚落刺激因子、紅血球生成素與紅血球生成刺激蛋白質、血小板生成素、介白素-3，及其衍生物組成之族群。在某些實施例中，該組成物可為水性注

射配方，包含治療有效劑量之該組成物，以及水性注射賦形劑。

用途與投藥方法

該組成物可提供治療及/或預防效果，用於治療疾病，或減輕個體中該疾病之一或多種症狀。術語“個體”以及“病患”可交換使用，係指一動物如哺乳動物，包括但不侷限於非靈長類如母牛、豬、馬、貓、狗、大鼠與小鼠；以及靈長類如猴子或人類。

於此所提供之組成物可投至多種療法，包括如刺激造血作用；誘發聚合細胞之增生與成熟；刺激IL-1- β 、IL-6、TNF- α 、IFN- γ 、GM-CSF或G-CSF之產生；刺激白血球、嗜中性白血球之製造與作用，治療嗜中性白血球缺少症、白血球缺少症、單核球缺少症、貧血或血小板缺少症。該組成物亦可幫助加速自細胞毒性試劑或放射線暴露，包括意外或非治療性暴露，以及治療性暴露下恢復。

於此係揭示一種刺激哺乳動物造血系統之方法。該方法包含投以含有此述萃取物之治療有效劑量組成物至一哺乳動物上。在某些實施例中，該刺激包括增加血小板量、增加白血球量、增加淋巴球量，或其組合。

在某些實施例中，該方法更包含與一第二活性試劑共投藥。在這些實施例中，該第二活性試劑可為造血試劑。該第二活性試劑選自於由顆粒細胞聚落刺激因子、顆粒細胞巨噬體聚落刺激因子、紅血球生成素與紅血球生成刺激蛋白質、血小板生成素、介白素-3，及其衍生物組成之族

群。

在許多實施例中，該哺乳動物可為任一哺乳動物，其中該組成物係投藥用於測試或治療用途。在某些實施例中，該哺乳動物為人類，在某些實施例中，該人類患有骨髓抑制。該骨髓抑制可為化療或放射線療法之結果。

於此亦提供一種治療自發性血小板缺少性紫斑症之方法，其中該方法包含投以有效劑量之萃取自黃耆之阿拉伯醣半乳聚醣蛋白質組成物，至患有自發性血小板缺少性紫斑症之病患身上。在某些實施例中，該經酸修飾之阿拉伯醣半乳聚醣蛋白質組成物係與第二活性試劑組合投藥。在某些實施例中，該第二活性試劑選自於由顆粒細胞聚落刺激因子、顆粒細胞巨噬體聚落刺激因子、紅血球生成素與紅血球生成刺激蛋白質、血小板生成素、介白素-3，及其衍生物組成之族群。

此份揭示亦包括一種包含該萃取物之醫藥組成物，其量可治療及/或預防一疾病，及/或減輕該疾病之症狀。

組成物中所用之萃取物量可因各種因素變化，如疾病種類、年紀、性別以及個體重量。藥劑處方可經調整，以使治療反應最佳化。在某些實施例中，可投以單一劑量；隨著時間分數次投藥；該劑量可成比例降低或增加；或任一組合，依據治療情況之迫切性，以及此技術領域者所知之因素。應注意到，該劑量可隨著待減輕症狀之嚴重度變化。藥劑處方可隨時間調整，依據個體需要，以及投藥或指導投以該組成物之專業人員判斷，此述之劑量範圍為示

範性，並不限劑量之範圍，該範圍係由醫師選擇。

術語“投藥”或“投以”係指一方法，將該組成物加至個體之細胞或組織上，不論是體內或體外，以診斷、預防、治療或減輕疾病之症狀。在一範例中，一化合物可非經腸胃體內投藥至一個體中。在另一範例中，一化合物可藉由體外將該化合物與個體細胞組織結合而投藥，用於目的如，但不侷限於，決定該組成物之利用率與藥效之試驗中。當該化合物與一或多種活性試劑組合加至個體中時，術語“投藥”或“投以”可包括依序或同時加入該化合物與另一試劑，如上述之任何試劑。本發明之一醫藥組成物係配製為可與投藥路徑相容。投藥路徑之範例包括，但不侷限於，非經腸胃路徑如靜脈內、皮內、肌肉內與皮下注射；口服；吸入；鼻內；經皮；經黏膜；以及直腸投藥。

本發明化合物之“有效劑量”可用於描述治療有效劑量或預防有效劑量。有效劑量亦可為可減輕疾病症狀之量。“治療有效劑量”係指該劑量與期間可有效達到希望治療結果之量，亦指可引發組織、系統或個體之生物或藥物反應之活性成分、前藥或醫藥試劑之量，由研究人員、獸醫、醫師或其他臨床人員判定，可為達到希望效果之治療計畫之一部分。在某些實施例中，該治療有效劑量需要投以可有效減輕一或多種疾病症狀、預防疾病進展，或使疾病退化之量。在一實施例中，治療特徵為發炎之發炎疾病或自體免疫疾病，治療有效劑量較佳係指該醫療試劑量可提供可測量反應之至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至

少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%，或至少 100% 希望之組成物作用。術語“治療”係指投以一或多種於此揭示之治療或預防試劑。

“預防有效劑量”係指達到希望之預防結果所需之有效劑量與期間，如預防或抑制血小板或白血球下降之嚴重度，或降低該下降之最低點。一般而言，預防劑量係於疾病發作前，或於疾病發作初期投至個體，以預防或抑制疾病或疾病之症狀。預防有效劑量可小於、大於或等於治療有效劑量。

在某些實施例中，該投藥可為口服。在其他實施例中，該投藥可為皮下注射。在其他實施例中，該投藥可為靜脈內注射，使用無菌等張水性緩衝液。在另一實施例中，該投藥可包括一溶解劑與局部麻醉劑，如利諾卡因 (lignocaine)，以減緩注射位置之不適感。在其他實施例中，該投藥可為非經腸胃，以使投藥方式容易且一致。

該化合物可以藥劑單位形式投藥。術語“藥劑單位”係指不連續、預定量之化合物，可以單位劑量投至個體。預定量之活性化合物可經選擇，以產生希望之療效，並可與醫藥上可接受之載體一同投藥。每一單位劑量之預定量取決於數種因素，包括但不侷限於(a)活性化合物之獨特特徵與待達成之特定療效，以及(b)產生與投以此類藥劑單位本身之限制。

“醫藥上可接受之載體”為一稀釋劑、佐劑、賦形劑或載劑，與該組成物一同投藥。醫藥上可接受之載體係經美國或聯邦當局核准，或列於U.S. Pharmacopeial Convention上者，或一般使用於個體之已知來源。

該醫藥載體包括任一及所有生理上可相容之溶劑、分散介質、塗佈、抗細菌與抗黴菌試劑、等張與吸收延遲試劑，以及類似物。醫藥載體之範例包括但不侷限於，無菌液體，如水、油、脂質如磷脂質與糖脂質。這些無菌液體包括，但不侷限於，衍生自石油、動物油、植物油或合成來源，如花生油、大豆油、礦物油、芝麻油及類似物。水為靜脈內投藥之較佳載體。生理食鹽水溶液、水性葡萄糖與甘油溶液，亦可作為液體載體，尤其是用於注射溶液。

適當之醫藥賦形劑包括，但不侷限於，澱粉、蔗糖、惰性聚合物、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明膠、麥芽糖、米、麵粉、白堊、矽膠、硬脂酸鈉、單硬脂酸甘油酯、滑石、氯化鈉、脫脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇及類似物。組成物亦包含少量之濕潤劑、乳化劑、pH緩衝劑，或其組合。該組成物可為溶液、懸浮液、乳液、藥錠、藥片、膠囊、粉末、持續釋放配方及類似物形式。口服配方包括標準載體如醫藥級甘露醇、乳糖、澱粉、硬脂酸鎂、糖精鈉、纖維素、碳酸鎂，及類似物。請見Martin, E.W. Remington's Pharmaceutical Sciences。補充用活性化合物亦可加入該組成物中。

在某些實施例中，該載體適用於非經腸胃投藥。在其

他實施例中，該載體適用於靜脈內、腹膜內、肌肉內、舌下或口服投藥。在其他實施例中，該醫藥上可接受之載體可包含醫藥上可接受之鹽類。

用於非經腸胃投藥之醫藥配方可包括微脂體。微脂體與乳化物為傳送載劑或載體，特別適用於疏水性藥物。取決於治療試劑之生物穩定性，亦可使用其他使蛋白質穩定之策略。此外，亦可將藥物置於標靶藥物傳送系統中投藥，如，於塗覆有標靶特異性抗體之微脂體中。該微脂體會結合至標靶蛋白質上，並被表現有該標靶蛋白質之細胞選擇性吸收。

治療組成物一般在製造與儲存條件下必須為無菌且穩定。該組成物可配製為溶液、微乳化物、微脂體或其他適用於高藥物濃度之有序結構。在某些實施例中，該載體可為一溶劑或分散介質，包括但不侷限於水；乙醇；多醇類如甘油、丙二醇、液態聚乙二醇，及類似物；以及其組合。適當之流動性可以多種方式維持，如使用外衣如卵磷脂，維持分散需要之粒徑，並使用界面活性劑。

在某些實施例中，可使用之等張試劑為如蔗糖、多醇類包括但不侷限於，甘露醇、山梨糖醇、甘油與其組合；以及氯化鈉。可於組成物中加入持續吸收特性，藉由加入會延遲吸收之試劑，如單硬脂酸鹽類、明膠以及緩慢釋放聚合物。載體可用於保護活性化合物對抗快速釋放，此類載體包括但不侷限於，植入物之控制釋放配方以及微囊化傳送系統。可使用生物可分解與生物相容性聚合物，如乙

烯乙酸乙烯共聚物、聚酸酐、聚乙醇酸、膠原蛋白、聚正酯、聚乳酸、聚己內酯、聚乙醇酸共聚物(PLG)，及類似物。此類配方一般可使用此技術領域者已知之方法製備。

化合物可以懸浮液方式投藥，如注射用油狀懸浮液。親脂性溶劑或載劑包括，但不侷限於，脂肪油如芝麻油；合成脂肪酸酯，如油酸乙酯或三酸甘油酯；以及微脂體。可用於注射之懸浮液亦可包含可增加懸浮液黏稠度之物質，如羧基甲基纖維素鈉、山梨糖醇或葡聚糖。選擇性地，懸浮亦可包含穩定劑或可增加化合物溶解度之試劑，並可允許製備高濃度溶液者。

在一實施例中，無菌且可注射之溶液可藉由將有效量活性化合物溶於溶劑中，加入任一上述希望之額外成分或成分組合物，之後過濾並滅菌該溶液而製備。在另一實施例中，分散液可藉由加入活性化合物至含有分散介質與任一上述希望之額外成分或成分組合物之無菌載劑中而製備。可製備為無菌粉末，用於無菌注射溶液中，藉由真空乾燥、冷凍乾燥或其組合，產生含有該活性成分與任一希望之額外成分之粉末。此外，該額外成分可來自一單獨製備之無菌、經過濾溶液。在另一實施例中，該萃取物可與一或多種可增進該萃取物之溶解度之額外化合物組合製備。

在某些實施例中，該化合物可以吸入投藥，經由噴霧或霧化器，其內包含一適當之推進劑，如二氯二氟甲烷、三氯氟化甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳，或其組合。在

一範例中，用於加壓氣霧之藥劑單位可經由定量閥傳送。在另一實施例中，明膠製成之膠囊與卡匣可用於吸入器中，並可配製為含有該化合物之粉末化混合物與適當之粉末基底，如澱粉或乳糖。

在某些實施例中，醫療或預防有效量之組成物濃度範圍自約0.001 nM至約0.10 M；自約0.001 nM至約0.5 M；自約0.01 nM至約150 μ M；自約0.01 nM至約500 μ M；自約0.01 nM至約1000 μ M，或其中之任一範圍。在某些實施例中，該組成物之投藥量範圍自約0.001 mg/kg至約500 mg/kg；自約0.005 mg/kg至約400 mg/kg；自約0.01 mg/kg至約300 mg/kg；自約0.01 mg/kg至約250 mg/kg；自約0.1 mg/kg至約200 mg/kg；自約0.2 mg/kg至約150 mg/kg；自約0.4 mg/kg至約120 mg/kg；自約0.15 mg/kg至約100 mg/kg；自約0.15 mg/kg至約50 mg/kg；自約0.5 mg/kg至約10 mg/kg，或其中之任一範圍，其中該人體平均體重係假設為約70 kg。

本發明涵蓋持續釋放配方，用於一或多種試劑之投藥。在某些實施例中，該持續釋放配方可降低此類試劑投藥至個體之劑量及/或頻率。

在某些實施例中，本發明萃取物之有效量範圍為，如自約10 mg/日至約1000 mg/日、自約50 mg/日至約500 mg/日、自約100 mg/日至約250 mg/日，或其中之任一組合，用於具平均體重之人體。用於治療惡病質、嘔吐或藥物戒斷症狀，或修飾生物反應，或保護B型肝炎中之肝細胞，類似之劑量應為醫療有效性。此技術領域者經由一般技術與本

說明書可決定本發明組成物之醫療有效量，用於特定疾病。

該組成物可以注射藥物配方投藥。在某些實施例中，該配方可包含萃取物與水性注射用賦形劑之組合物。適當之水性注射用賦形劑範例為此技術領域者已知，且其與配製該配方之方法可見於標準參考文獻中如 Alfonso AR: Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton Pa., 1985。適當之水性注射用賦形劑包括水、生理食鹽水溶液、葡萄糖水溶液，及類似物，選擇性含有溶解增強劑，用於經酸修飾之阿拉伯糖半乳聚糖蛋白質組成物，如3至10%甘露醇或其他糖類，3至10%甘胺酸或其他胺基酸。

一般而言，當以造血試劑投藥時，該萃取物可以皮下、肌肉內、腹膜內或靜脈內注射投藥。在某些實施例中，可使用靜脈內投藥，且可為連續式靜脈內灌注，經數分鐘至1小時或更久，如約15分鐘。投藥量範圍可相當廣，取決於配方形式、單位劑量大小、賦形劑種類，以及其他此技術領域者已知之因素。該配方可包含如自約0.001%至約10% (w/w)、自約0.01%至約1%、自約0.1%至約0.8%，或其中之任一範圍，而其餘部分則包含賦形劑或賦形劑群。

在某些實施例中，該萃取物可與至少一其他醫療試劑共投藥，依據待治療疾病狀態，尤其是可刺激造血作用之另一試劑，如紅血球生成素、血小板生成素、顆粒細胞聚落刺激因子(G-CSF)、IL-3，及類似物。在某些實施例中，醫療或預防有效劑量之萃取物可投藥範圍為自約0.001

mg/kg至約500 mg/kg；自約0.005 mg/kg至約400 mg/kg；自約0.01 mg/kg至約300 mg/kg；自約0.01 mg/kg至約250 mg/kg；自約0.1 mg/kg至約200 mg/kg；自約0.2 mg/kg至約150 mg/kg；自約0.4 mg/kg至約120 mg/kg；自約0.15 mg/kg至約100 mg/kg；自約0.25 mg/kg至約75 mg/kg；自約0.5 mg/kg至約50 mg/kg，或其中之任一範圍，其中該人體平均體重係假設為約70 kg。

該萃取物可互相組合或與其他試劑組合。在某些實施例中，該試劑可於特定時間點投藥，可變化為約15分鐘、30分鐘、1小時、2小時、4小時、8小時、12小時、18小時、24小時、48小時或1週。在某些實施例中，至少一試劑為可刺激造血系統之試劑。在其他實施例中，該試劑包括抗增生劑、抗腫瘤新生劑、抗有絲分裂劑、抗發炎劑、抗血小板劑、抗凝血劑、抗纖維蛋白劑、抗血栓劑、抗生素、抗過敏劑、抗氧化劑，以及任一前藥、共同藥物、代謝物、類似物、同類物、同質物、衍生物、鹽類與其組合物。

於此揭示之萃取物可，如與造血試劑組合投藥，其為治療有效劑量。造血試劑為一可刺激造血作用之分子。造血試劑之範例包括，但不侷限於，顆粒細胞聚落刺激因子(G-CSF)、顆粒細胞巨噬體聚落刺激因子(GM-CSF)、紅血球生成素與紅血球生成刺激蛋白質、血小板生成素、介白素-3，及其衍生物組成之族群。G-CSF之範例包括但不侷限於非格司亭(filgrastim)(NEUPOGEN)，及其衍生物如PEGFILGRASTIM。GM-CSF之範例包括沙格司亭

(sagramostim)(LEUKINE)。紅血球生成素之範例包括伊波丁(epoetin) alfa (EPREX)。紅血球生成刺激蛋白質之範例為達依波丁(darbepoetin) alfa (NESP, ARANESP)。

該造血試劑可與此述之萃取物結合投藥，可投予30分鐘、1小時、2小時、4小時、8小時、12小時、18小時、1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、2週、3週、4週、6週、3個月、6個月、1年，或任一組合，或此技術領域者認為必要的時間。該試劑可共投藥、依序投藥或循環投藥至個體。循環療法涉及投以第一試劑一段預定期間，投以第二試劑一段預定時間，並重覆此循環，用於任一目的，如增強治療效果。該試劑亦可同時投藥。術語“同時”並未限制於在同一時間點投以試劑，而指該試劑可依序並於一時間間隔內投藥，而使該試劑群可共同作用，提供額外之助益。每一試劑皆可單獨或共同投藥，使用適當之裝置投予該試劑或試劑群。

在某些實施例中，G-CSF係與此述之萃取物組合投藥，使用任一此技術領域者已知有效之投藥劑量、時間與方法。該G-CSF可為NEUPOGEN，如投以劑量範圍自約0.1 $\mu\text{g/kg}$ 至約1 mg/kg 、自約0.5 $\mu\text{g/kg}$ 至約500 $\mu\text{g/kg}$ 、自約1 $\mu\text{g/kg}$ 至約250 $\mu\text{g/kg}$ 、自約1 $\mu\text{g/kg}$ 至約100 $\mu\text{g/kg}$ 、自約1 $\mu\text{g/kg}$ 至約50 $\mu\text{g/kg}$ ，或其中之任一範圍。

製造元件

本發明係提供一種製造元件，其涵蓋完成、包裝好並經標示之醫藥產品。該製造元件包括適當之藥劑單位形

式，置於小管或其他容器中，如玻璃小管或其他可密封之容器。在適用於非經腸胃投藥之藥劑形式中，該活性成分如一或多種試劑，包括此述之萃取物，為無菌並適用於無顆粒溶液之投藥。換言之，本發明包含非經腸胃溶液與冷凍乾燥粉末二者，每者皆為無菌，後者適用於在注射前重新配製。此外，該單位藥劑形式可為適用於口服、經皮、局部或黏膜傳送之固體。

在某些實施例中，該單位藥劑形式適用於靜脈內、肌肉內、局部或皮下傳送。因此，本發明包含適用於每一傳送路徑之溶液，較佳為無菌。傳送之試劑濃度與量係包含於此。

與任一醫藥產品組合，該包裝材料與容器係經設計，以於儲存與運送期間保護產品之穩定性。此外，該製造元件可包括使用說明或其他資訊，其可建議使用者如醫師、技術人員或病患有關如何正確投以該組成物，作為該疾病之預防性、治療性或減緩性治療。在某些實施例中，該說明可指示或建議一劑量，其包括但不侷限於，實際劑量與監測流程。

在其他實施例中，該說明可包括資訊物件，指示出投以該組成物可能會產生副作用，包括但不侷限於過敏反應，如過敏性反應。該資訊物件應指示出該過敏反應可能僅為輕微搔癢性疹子，或可為嚴重症狀包括紅皮病、血管炎、過敏反應、Steven-Johnson症及類似症狀。該指示物件應指出該過敏反應可能會致命，且可發生於當外來蛋白質

進入人體時。該資訊物件應指出這些過敏反應可為蕁麻疹或疹子，並發展為致命之系統性反應，並可在暴露不久後發生，如10分鐘內。該資訊物件可更指出該過敏反應會導致個體經歷皮膚感覺異常、低血壓、喉頭水腫、精神狀態改變、面部或咽喉血管性水腫、呼吸道阻塞、支氣管痙攣、蕁麻疹與搔癢、血清病、關節炎、過敏性腎炎、腎絲球腎炎、顱部動脈炎、嗜伊紅血球過多，或其組合。

在某些實施例中，該製造元件可包含一或多個包裝材料，如箱子、瓶子、管、小管、容器、噴霧器、吹藥器、靜脈內(I.V.)袋、封包，及類似物；一試劑之至少一單位藥劑形式，包含此述之萃取物，置於包裝材料中。在其他實施例中，該製造元件亦可包括使用該組成物作為預防性、治療性或減緩性治療之說明。

在其他實施例中，該製造元件可包含一或多個包裝材料，如箱子、瓶子、管、小管、容器、噴霧器、吹藥器、靜脈內(I.V.)袋、封包，及類似物；以及第一組成物，包含該試劑之至少一單位藥劑形式，包含此述之萃取物，置於包裝材料中；以及一第二組成物，包含第二試劑如醣胺聚醣、磷脂質、聚(二醇)，或此述之其他生物活性試劑，前藥、共同藥物、代謝物、類似物、同類物、同質物、衍生物、鹽類與其組合物。在其他實施例中，該製造元件亦可包括使用該組成物作為該疾病之診斷性、預防性、治療性或減緩性治療之說明。

不受限於任何理論或作用機制，下述範例係提供更進

一步之說明。應瞭解到有數種變化包含於此技術領域中，且各範例並非用於提供申請專利範圍之限制。

範例1 製備具有Ara:Gal範圍約1.5:1至約3:1且平均分子量範圍約20K道耳頓至約60千道耳頓之黃耆萃取物(“經純化萃取物”或EP011)

經純化萃取物具有20-60千道耳頓分子量與70-90%葡萄糖組成物。

經純化萃取物由內蒙古之黃耆根部飲片製得。乾燥根部(300 kg)係以去離子水，之後以超微濾水清洗，加工成飲片。移除表面髒污處，並將根部切成厚2-5 mm之飲片。飲片隨即除菌並乾燥。

飲片(200 kg)於3噸級液萃儀中萃取3次，係於100°C下進行3小時。收集所得之水性萃取物，並於60-70°C下減壓濃縮30-40倍。所得水萃取物以70%乙醇沈澱兩次及35%乙醇沈澱一次。乙醇沈澱物溶於水中並噴霧乾燥，產生多醣體中間物。

多醣體中間物(3.0 kg)溶於水中、微過濾、超微過濾，而後先以陽離子交換管柱純化，接著進行陰離子交換管柱純化。希望之沖提物於最終濃縮前進行微過濾與超微過濾。濃縮物最後冷凍乾燥成團塊狀，摻合後產生經純化萃取物。

經純化之萃取物含有葡聚糖(glucans)、鼠李半乳糖醛(rhamnogalacturonans ; RGs)、阿拉伯糖半乳聚糖(arabinogalactans ; AGs)與阿拉伯糖半乳聚糖蛋白(AGPs)之

糖蛋白，分子量介於20,000-60,000道耳頓之間，之多醣體。本藥物係無味，幾乎白色之非晶形粉末。易溶於水及pH值4.5-6.5之生理食鹽水中，微溶於低濃度乙醇，且不溶於有機溶劑如丙酮。

係使用結合TMS-GLC之糖基-殘基組成物分析、GLC-MS之甲基化糖基-鏈結組成物分析、¹H-NMR光譜分析、AA分析儀之胺基酸組成物分析與大小排除HPLC之分子量分佈分析，鑑定並闡釋經純化萃取物所含之多醣體與糖蛋白之構造。藉由糖組成分析，可知主要糖基殘基為葡萄糖基(60-85 mole%)、阿拉伯糖基(5-20 mole%)與半乳糖基(5-15 mole%)殘基。少量(2-5 mole%)的半乳糖醛酸(glacturonic acid)與鼠李糖(rhamnose)亦出現於產物中。糖基-鏈結分析顯示，葡萄糖基殘基之主要糖基鏈結為末端、4-、6-與4,6-鏈結；阿拉伯糖殘基為末端、5-、3-與3,5-鏈結；半乳糖基殘基為末端、3-、6-與3,6-鏈結；半乳糖醛酸為4-鏈結；以及鼠李糖基殘基為2-鏈結。胺基酸組成分析顯示本產物糖蛋白富含Hyp、Asp、Thr、Ser、Glu、Pro、Gly、Ala、Val與Lys殘基。

經純化萃取物之分析

糖基-殘基組成物分析列於表1。經純化萃取物之多醣體主要包含葡萄糖基、阿拉伯糖與半乳糖基殘基。僅少量之鼠李糖(rhamnose)與半乳糖醛酸存在於經純化萃取物中。經純化萃取物之糖基-殘基組成物鑑定，係以GLC分析過-o-三甲基矽烷化甲基苷(per-*O*-trimethylsilylated methyl

glycosides)。衍生物之分離係利用J&W Scientific DB-1管柱(0.25 mm x 30 m)，並結合HP-5890氣相層析儀。

表1. 經純化萃取物之醣基-殘基組成物

醣基-殘基	Ara	Rha	GalA	Gal	Glc
於經純化萃取物中之Mole%	8.1	0.6	2.0	5.4	83.9

依據表2所示之醣基-鏈結組成及¹H-NMR光譜分析，可知本產物主要之多醣體為1,4-鏈結葡聚糖，具有某些程度之分支位於骨架殘基上之位置6。經純化萃取物之其他多醣體為阿拉伯糖半乳聚糖及鼠李半乳糖醛，係彼此相互交聯。醣基-鏈結以甲基化分析法鑑定。樣本溶於Me₂SO中，並以丁基鋰與碘化甲烷進行甲基化。經甲基化樣本以SepPak C18層析匣純化，其中uronosyl殘基上之羧甲基團以三乙基溴氫化鋰還原。隨後製成部分甲基化之aldotols並以HP 5971 MSD-5890 GLC (結合GLC-MS)分析。

表2. 經純化萃取物之醣基-鏈結組成

醣基-鏈結	Mole%	醣基-鏈結	Mole%
末端Araf	6.2	6-鏈結glcp	0.9
5-鏈結araf	2.8	4,6-鏈結glcp	4.5
3-鏈結araf	0.3	末端galp	1.5
3,5-鏈結araf	0.5	3-鏈結galp	0.4
2-鏈結rha	0.6	6-鏈結galp	0.6
末端glcp	12.0	3,6-鏈結galp	0.3
4-鏈結glcp	68.2	4-鏈結galA	0.9

胺基酸組成物分析列於表3，顯示Hyp、Asp、Thr、Ser、Glu、Gly、Ala與Lys為經純化萃取物蛋白成分之主要胺基

酸殘基。經純化萃取物之胺基酸組成分析係利用 Beckman 6300 胺基酸分析儀結合膠原蛋白水解物分析法。樣本於 110 °C 下以 6 N HCL 水解 24 小時，稀釋並注入 HPLC 系統。

表 3. 經純化萃取物之胺基酸組成

胺基酸殘基	Mole%	胺基酸殘基	Mole%
Hyp	9.7	Val	4.5
Asp	14.4	Met	0.4
Thr	8.9	Ile	2.1
Ser	8.9	Leu	3.1
Glu	11.0	Tyr	1.0
Pro	4.2	Phe	1.0
Gly	9.7	His	2.1
Ala	9.0	Lys	8.1
Cys	0.3	Arg	2.0

移除內毒素在經純化萃取物製備過程中相當重要，因為產物之投藥途徑為注射法。本產物之多醣體構造類似內毒素 LPS。因此，重點為開始製備時內毒素之移除，而非過程中之移除。

範例 2 具備高產率、Ara:Gal 範圍由約 3.5:1 至約 5.0:1 且平均分子量大於約 100K 道耳頓(“高產率萃取物”或 EP011AM)之黃耆萃取物之製備

使用溫和酸性條件產生 Ara:Gal 比率 >3.5，且相較於本發明所揭示經純化萃取物更高產率之萃取物，或高分子量之萃取物。在某些實施例中，Ara:Gal 比率維持在 5.0 以內，並具備高產率。

經純化萃取物由內蒙古之黃耆根部飲片製得。乾燥根

部(300 kg)係以去離子水，之後以超微濾水清洗，加工成飲品。移除表面髒污處，並將根部切成厚2-5 mm之飲品。飲品隨即除菌並乾燥。

飲品先於100°C下以0.5 M KH_2PO_4 萃取3小時，隨後於100°C下以水萃取3小時並重複萃取。收集萃取物並離心及超微過濾。所得溶液經離心、35%乙醇初步沈澱，隨後再以80%乙醇沈澱。將80%乙醇沈澱物溶於水並噴霧乾燥，得到一粗產物。

粗產物首先以SP陽離子交換層析管柱純化，隨後通過Q陰離子交換層析管柱。沖提物進行超微過濾。

濃縮後，所得沖提物於22°C下以鹽酸(濃度0.3 M)水解3小時。該高產率萃取物經中和反應、超微過濾與冷凍乾燥後，得產率3.3%，以粗萃取物為基礎。

高產率萃取物之分析

醣基-殘基組成物係以TMS-甲基苷衍生物之GLC分析法鑑定。Ara、Gal、GalA與Glc為藥物中之主要醣殘基。醣基-殘基組成分析結果如表4所示。

表4. 高產率萃取物之醣基-鏈結組成

醣基-殘基	Mol%
Ara	57.0
Rha	8.2
Xyl	2.7
GalA	13.8
Gal	13.1
Glc	4.7
4-O-Me-GlcA	0.4

值得注意的是，Ara:Gal比率為4.35。蛋白質含量係以BCA蛋白質微分析法測定。高產率萃取物之蛋白質含量列於表5。

表5. 高產率萃取物之蛋白質含量

樣本	蛋白質含量(%)
AGP-P-05	0.67

高產率萃取物中羥基脯胺酸之含量係以比色分析法測定並列於表6。

表6. 高產率萃取物之羥基脯胺酸含量

樣本	Hyp (%)
AGP-P-05	0.34

範例3 使用溫和酸性條件萃取增加產率

本範例顯示，可用萃取物之產率可使用溫和酸條件而增加。初次萃取物之製備條件為0.5 M HCl、22°C下水解6小時；並且，第一萃取物之產率係與於22°C，0.3M HCl之溫和酸性條件水解3小時而產生之第二萃取物與第三萃取物相較。表7顯示使用溫和條件之產率實質增加情形。

表7 使用溫和條件所得之萃取物產率增加情形

	第一萃取物 0.5M HCl, 6 hrs, 22°C	第二萃取物 0.3M HCl, 3 hrs, 22°C	第三萃取物 0.5M HCl, 3 hrs, 22°C
Ara:Gal	2.9:1	4.3:1	4.0:1
蛋白質含量 (BCA, %)	1.01%	0.67%	0.64
內毒素含量 (Endospecy, EU/mg)	0.52	0.43	0.27
hyP含量	0.42	0.34	0.35
產率 (粗萃取物百分比)	2.4	3.3 (32%增加)	3.1 (24%增加)

範例4 接受次致死照射之哺乳動物投予經純化萃取物之血小板數目增加情形

本範例顯示，經純化萃取物可刺激次致死劑量X光射線照射之哺乳類動物血小板量。本實驗使用BALB/c小鼠，部分小鼠於第0天接受500 cGy之次致死劑量X光射線，導致血小板數目降低及血小板缺少症。血小板量之測量組別為：(a)正常小鼠，未接受任何照射或投予經純化萃取物；(b)控制組小鼠，接受X光射線並伴隨腹腔注射生理食鹽水；(c)實驗組小鼠，接受X光射線並伴隨溶於生理食鹽水之250 mg/kg經純化萃取物，始於第0天照射日並持續至第14天，每週注射5劑共10劑；以及(d)實驗組小鼠，接受X光射線並伴隨100 mg/kg/日之經純化萃取物，始於第0天照射日並持續至第25天之每日投藥。

以溶於生理食鹽水之250 mg/kg經純化萃取物投藥，始於第0天照射日並持續至第14天，每週皮下注射5劑共10劑，該接受次致死X光射線實驗小鼠之血小板數目減少情況於第10天首度測得。比較控制組與實驗組小鼠，其在第0天照射日接受100 mg/kg/日經純化萃取物，並持續至第25天，該經純化萃取物顯示出可於第14天增加血液中血小板數目，第14天後，血液中低血小板數之EP011-治療小鼠與控制組之差異增加，且持續明顯直到第25天。因此，經純化萃取物可增加次致死劑量照射小鼠血液中之血小板數目，提高放射線治療後之血小板回復率。

範例5 接受次致死照射之哺乳類動物單獨投予高產率萃取物及結合造血試劑投藥之血小板數目增加情形

本範例顯示，高產率萃取物可刺激500 cGy次致死劑量X光射線照射之哺乳類動物血小板量。本實驗使用BALB/c小鼠，部分小鼠於第0天接受500 cGy之次致死劑量X光射線。血小板量之測量組別為：(a)正常小鼠，未接受任何照射或投予高產率萃取物；(b)控制組小鼠，接受X光射線並伴隨腹腔注射生理食鹽水；(c)實驗組小鼠，接受X光射線並伴隨溶於生理食鹽水之250 mg/kg高產率萃取物；(d)實驗組小鼠，接受X光射線並伴隨100 mg/kg/日之高產率萃取物；(e)實驗組小鼠，接受X光射線並伴隨50 mg/kg/日之高產率萃取物；以及(f)實驗組小鼠，接受X光射線並伴隨G-CSF治療。高產率萃取物係於第0-4天每日皮下注射，隨後三週為每週三次，係於第7-9天、第14-16天及第21-23天投予高產率萃取物。

依據某些實施例，第1圖顯示BALB/c小鼠於次致死劑量照射後，投予高產率萃取物所產生的血小板變化。由第1圖可知，X光射線導致血小板數目減少，血小板缺少症於照射10天後發生。投以溶於生理食鹽水之250 mg/kg高產率萃取物，始於第0天且每週注射5劑共10劑。高產率萃取物可較生理食鹽水控制組提前3-5日有效回復50%正常血小板數目，因此，本治療可增加次致死劑量照射小鼠血液中之血小板數目，並提高放射線治療後之血小板回復率。G-CSF (NEUPOGEN)之功效示於第1圖，作為比較之用。

範例6 接受化學治療之哺乳類動物，單獨投予高產率萃取物與造血試劑組合投藥之血小板數目增加情形

本範例顯示，投予高產率萃取物可加速回復因化學治療造成的血小板缺少症，並刺激血小板表現。

血小板之測量組別為：(a)正常小鼠，未接受任何化學治療或投予高產率萃取物；(b)控制組小鼠，接受靜脈注射化學治療並伴隨腹腔注射生理食鹽水；(c)實驗組小鼠，接受化學治療並伴隨皮下注射溶於生理食鹽水之200 mg/kg高產率萃取物；(d)實驗組小鼠，接受化學治療並伴隨皮下注射溶於生理食鹽水之250 mg/kg高產率萃取物；(e)實驗組小鼠，接受化學治療並伴隨皮下注射溶於生理食鹽水之400 mg/kg高產率萃取物；(d)實驗組小鼠，接受化學治療並伴隨溶於生理食鹽水之200 μ g G-CSF；以及(e)實驗組小鼠，接受化學治療並伴隨皮下注射溶於生理食鹽水之250 mg/kg高產率萃取物及溶於生理食鹽水之200 μ g G-CSF。

本實驗使用BALB/c小鼠，並靜脈注射兩次4 mg/kg絲裂黴素(mitomycin) C (MMC)，第-1天與第0天各一次。小鼠同時連續7天皮下注射250 mg/kg/日之高產率萃取物，係始於第0天至第6天。

依據某些實施例，第2圖顯示BALB/c小鼠注射絲裂黴素(mitomycin) 7日後可誘發血小板缺少症。在第26天實驗終止時，僅給予生理食鹽水之控制組小鼠可回復60%正常血小板數目或約 $300 \times 10^3/\mu\text{L}$ ，然而處理高產率萃取物之實驗組小鼠約第10天即達到60%正常血小板數目並於第19天

回復100%正常血小板數目，其中正常血小板數目約 $500 \times 10^3/\mu\text{L}$ 。因此，高產率萃取物可回復化療型血小板缺少症之血小板數目。

高產率萃取物可加速血小板或巨核細胞於化療暴露後之回復。雖然第2圖強調與先前化療與萃取物用量之類似結果，由未顯示數據得知，處理MMC可於第3天減少血小板數目，並於第10天達到最低點25%基礎血小板數。控制組小鼠僅處理生理食鹽水，可於第24天回復約50%基礎血小板數，然而以200-400 mg/kg/日之高產率萃取物處理之實驗組小鼠，則於第10天即回復約40-50%基礎血小板數，之後血小板數持續回復。於第21天，以400 mg/kg/日高產率萃取物處理之小鼠之血小板達到100%基礎血小板量，然而僅接受生理食鹽水之控制組小鼠則仍維持約50%基礎血小板量。相較於第0天之控制組小鼠，接受高產率萃取物小鼠可縮短6天之血小板減少症發生時間。

在第2圖中，小鼠自第0天開始注射7劑溶於生理食鹽水之200 μg G-CSF (NEUPOGEN)，或自第0天開始皮下注射7劑溶於生理食鹽水之250 mg/kg高產率萃取物與200 μg NEUPOGEN。結果顯示，相較於任一單獨處理組別，高產率萃取物與NEUPOGEN之組合可加速血小板數回復，此組合治療可迅速於第10天達到正常血小板數目。有趣的是，高產率萃取物與組合治療兩者均優於單獨處理G-CSF之組別，其於第26天實驗終止時尚未達正常血小板數。然而，結合G-CSF與高產率萃取物可於約第9天達到正常血小板

數，其早於單獨高產率萃取物之組別。

因此，以高產率萃取物投予化療型血小板缺少症哺乳類動物，可至少(1)減少嚴重性血小板缺少症，係指血小板數目 $<200 \times 10^9/L$ ；(2)消除血小板數目最低點時之血小板低下症狀；(3)縮短血小板低下症狀時間；(4)加速血小板回復率，並具備劑量依賴效應；以及(5)經由共同投予G-CSF，明顯提高血小板數回復率。

範例7 藉由投予接受次致死照射之哺乳類動物高產率萃取物，刺激白血球細胞產生

本範例顯示，高產率萃取物可用於刺激哺乳類動物暴露放射線後白血球細胞之回復，該照射可抑制骨髓功能或造血作用。就本身而言，萃取物有助於白血球細胞減少之情況，否則哺乳類動物將易於受感染。

本範例顯示，高產率萃取物可刺激次致死劑量X光射線照射之哺乳類動物白血球細胞回復。本實驗使用BALB/c小鼠，部分小鼠於第0天接受500 cGy之次致死劑量X光射線，導致血小板數目降低及血小板缺少症。細胞數目之測量組別為：(a)正常小鼠，未接受任何照射或投予高產率萃取物；(b)控制組小鼠，接受X光射線並伴隨腹腔注射生理食鹽水；(c)實驗組小鼠，接受X光射線並伴隨溶於生理食鹽水之250 mg/kg經純化萃取物，始於第0天照射日並持續至第14天，每週注射5劑共10劑；以及(d)實驗組小鼠，接受X光射線並伴隨溶於生理食鹽水之200 μ g G-CSF，始於第0天照射日並持續至第26天。

依據某些實施例，第3圖顯示投予高產率萃取物後，接受次致死劑量照射之BALB/c小鼠白血球細胞回復情況。照射7-10天後出現嚴重白血球缺少症，其中小鼠白血球細胞數目約600-1000/ μ l。高產率萃取物可於約第21-25天誘發白血球細胞回復，而僅處理生理食鹽水之控制組小鼠之白血球細胞數則未於實驗終止時回復。另一計數顯示高產率萃取物亦可誘發淋巴細胞之回復。

因此，比較第3圖與第2圖，發現在處理次致死量X光射線之BALB/c小鼠身上，高產率萃取物可加速白血球細胞復原，縮短白血球缺少症(leukopenia)之持續時間，並增加血小板數目。

範例8 經輻射誘發之血小板缺少症哺乳類動物共同投予高產率萃取物與刺激造血作用試劑之血小板數目回復情形

本範例顯示，共同投予高產率萃取物與G-CSF可刺激受次致死劑量照射BALB/c小鼠之血小板產生。

本實驗使用BALB/c小鼠。部分小鼠於第0天接受500 cGy之次致死劑量X光射線。血小板之測量組別為：(a)正常小鼠，未接受任何照射或投予高產率萃取物；(b)控制組小鼠，接受X光射線並伴隨腹腔注射生理食鹽水；(c)實驗組小鼠，接受X光射線並伴隨皮下注射溶於生理食鹽水之250 mg/kg/日之高產率萃取物，始於第0天照射日並連續注射7日；(d)實驗組小鼠，接受X光射線並伴隨皮下共同注射溶於生理食鹽水之250 mg/kg/日之高產率萃取物與1 μ g/kg G-CSF，始於第0天照射日並連續注射7日；以及(f)實驗組

小鼠，接受X光射線並伴隨皮下共同注射溶於生理食鹽水之250 mg/kg/日高產率萃取物與100 μ g/kg G-CSF，始於第0天照射日並連續注射7日。

依據某些實施例，第4圖顯示共同注射高產率萃取物與G-CSF於受照射BALB/c小鼠之血小板數回復率。小鼠共同注射高產率萃取物與1 μ g/kg G-CSF或100 μ g/kg G-CSF之回復率幾乎相同。在兩組中，小鼠於第15天回復至約50%正常血小板數，而僅接受高產率萃取物小鼠則於第18天回復至約50%正常血小板數。相較之下，控制組小鼠直到約第22天才達到50%正常血小板數。

範例9 照射次致死劑量X光射線之哺乳類動物共同投予高產率萃取物與刺激造血作用試劑之白血球細胞回復增加情形

本範例顯示，共同投予高產率萃取物與G-CSF可刺激受次致死劑量照射BALB/c小鼠之白血球細胞產生。

本實驗使用BALB/c小鼠。部分小鼠於第0天接受500 cGy之次致死劑量X光射線。血小板之測量組別為：(a)正常小鼠，未接受任何照射或投予高產率萃取物；(b)控制組小鼠，接受X光射線並伴隨腹腔注射生理食鹽水；(c)實驗組小鼠，接受X光射線並伴隨皮下注射溶於生理食鹽水之250 mg/kg/日之高產率萃取物，始於第0天照射日並持續至第14天，每週注射5劑共10劑；(d)實驗組小鼠，接受X光射線並伴隨皮下共同注射溶於生理食鹽水之250 mg/kg/日之高產率萃取物與100 μ g/kg G-CSF，始於第0天照射日並持續至第14天，每週注射5劑共10劑；以及(e)實驗組小鼠，接受X光

射線並伴隨皮下共同注射溶於生理食鹽水之250 mg/kg/日之高產率萃取物與1 µg/kg G-CSF，始於第0天照射日並持續至第14天，每週注射5劑共10劑。

依據某些實施例，第5圖顯示共同注射高產率萃取物與G-CSF於受照射BALB/c小鼠之白血球細胞數回復率。放射線使白血球細胞明顯減少。單獨注射高產率萃取物之白血球細胞回復速率緩慢。並且，雖未顯示於第5圖，小鼠共同注射高產率萃取物與1 µg/kg G-CSF或100 µg/kg G-CSF之回復率幾乎相同。共同注射可於第15天造成正常白血球細胞之短暫樹突化，而單獨給予高產率萃取物則誘發回復50%正常數目。由第18天至實驗終止，共同投藥組與高產率萃取物單獨投藥組之間差異很小。兩種治療均顯示60%正常數量，並於第29天完全回復正常。控制組小鼠僅給予生理食鹽水，其於第29天顯示40%正常白血球細胞數。

範例10 台灣ITP病患之治療

本發明所揭示之經純化萃取物係用於治療不間斷、開放標示、多中心且劑量發現之人體試驗，並具有兩個平行試驗族群。本發明萃取物安全性與功效之評估對象係患有慢性自發性血小板缺少症之個體。本試驗於兩個台灣的前導醫學中心進行。

第6圖顯示台灣進行之臨床試驗流程圖，其中病患被診斷出患有慢性自發性血小板缺少症，係依據The American Society of Hematology (ASH)指導方針。ASH指導方針包括，如第6圖所示，利用納入與排除標準進行至少六個月的

篩選605。以及，在六週試驗期間，所有病患皆被允許服用皮質類固醇(corticosteroid)或其他試驗前已許可之治療。本試驗更包含隨機分派610每位病患為四個試驗組中的任一組。

本試驗更包含開始兩週內投予615經純化萃取物：(處方1) 靜脈輸注500mg萃取物約3小時(2.5至3.5小時)且每週連續五天；或者，(處方2)靜脈輸注500mg萃取物約3小時(2.5至3.5小時)且每週三天。下一步驟包括評估620反應：(1)若病患血小板數目於第15天提升或高於 $75 \times 10^9/L$ 且低於 $450 \times 10^9/L$ ，則治療包括中斷620萃取物之投藥兩週；以及(2)若病患血小板數目未於第15天提升或高於 $75 \times 10^9/L$ 且低於 $450 \times 10^9/L$ ，則治療包括繼續萃取物之投藥兩週。

試驗第五及第六週期間，追蹤病患是否拒絕625萃取物之投藥。於試驗期間之任何時間點，若血小板數目提高至 $450 \times 10^9/L$ 或更多，則病患停止接受任何萃取物並持續偵測直到試驗結束630。若出現嚴重出血，會進行救援治療包括IVIG、類固醇或血小板輸液並記錄。其他非ITP相關之必要治療皆被允許。

依據研究結果，本發明萃取物係安全且可有效增加ITP病患之血小板數目。

範例11 中國ITP病患之治療

經純化萃取物係用於中國之慢性且頑固性ITP案例研究。病患被診斷出患有ITP數年，且無有效治療方法包括脾切除術(splenectomy)。病患以毗定索隆(prednisolone)或曲安

縮松(triamcinolone)治療數年以維持血小板數目，並有多起出血記錄。於治療末段，病患每天以曲安縮松(triamcinolone)結合本發明萃取物(250 mg/day)投藥兩週。兩週治療期後，如表8所示，病患血小板數目由 $44\times10^9/L$ 回復至 $110\times10^9/L$ 。

表 8.

年	第1年	第2年	第3年	第4年
治療	毗定索隆(prednisolone) 2.5mg	毗定索隆(prednisolone) 1.25mg	毗定索隆(prednisolone) 5mg	曲安縮松(triamcinolone) 4mg
血小板數目	$29\times10^9/L$	$24\times10^9/L$	$26\times10^9/L$	$44\times10^9/L$

年	第5年，二月	
	第1週	第2週
治療	曲安縮松(triamcinolone) 4mg + PG2	曲安縮松(triamcinolone) 4mg + PG2
血小板數目	$79\times10^9/L$	$110\times10^9/L$

年	第5年，二月	
	第1週	第2週
治療	曲安縮松(triamcinolone) 4mg + PG2	曲安縮松(triamcinolone) 4mg + PG2
血小板數目	$71\times10^9/L$	$81\times10^9/L$

年	第5年，三月		
	PG2治療前	第1週	第2週
治療	毗定索隆(prednisolone) 5mg + PG2	毗定索隆(prednisolone) 5mg + PG2	毗定索隆(prednisolone) 5mg + PG2
血小板數目	$108\times10^9/L$	$118\times10^9/L$	數據未顯示

本發明結果提供了一個相較於以往類固醇治療更好的回復效果，並顯示具有三個月之持續功效。當血小板數目達到正常時，額外給予本發明萃取物兩週。隨後三個月期間，血小板數目並未過量，其具有顯著性，因本發明萃取

物會產生自我回饋機制以控制血小板數目之過量。

範例11 ITP病患之治療 – 個案研究

本研究之目的為評估經純化萃取物對於慢性自發性血小板缺少症(ITP)個別病患之功效與安全性，包含持續6個月或更久之IPT治療病患。本研究係開放性、隨機之世代研究。主要指標為血小板數目之變化。

一名女性病患 (R01001)，被診斷出患有ITP超過10年，並以毗定索隆(prednisolone) (10mg QD)進行治療。該病患接受每週5天、為期4週之經純化萃取物治療，所得結果如表9所示。

表9.

日期	試驗時間表	血小板數目($10^3/\text{ul}$)
2008-11-24	篩選	8,000
2008-12-01	第1天	10,000 (基線值)
2008-12-08	第8天	8,000
2008-12-15	第15天	12,000
2008-12-22	第22天	8,000
2008-12-29	第29天	12,000
2009-01-12	第43天	23,000

應瞭解到，以經純化之萃取物治療後，血小板數目達到基線值之兩倍並回復至23,000，可視為對本治療之良好反應。無不良情況發生。

一名46歲之女性病患(R02001)，被診斷出患有ITP超過5年，並以毗定索隆(prednisolone) (20mg QD)進行治療。該病患接受每週5天、為期3週之經純化萃取物治療，所得結果如表10所示。



表 10.

日期	試驗時間表	血小板數目($10^3/\text{ul}$)
2008-12-30	第1天	3,000 (基線值)
2009-01-05	第8天	7,000
2009-01-12	第15天	4,000
2009-01-19	第22天	5,000
2009-02-02	第29天	11,000
2009-02-17	第43天	6,000

應瞭解到，以經純化之萃取物治療後，血小板數目回復至11,000。無不良情況發生。

一名61歲之男性病患 (R01002)，被診斷出患有ITP超過10年，並以毗定索隆(prednisolone) (10mg QD)進行治療。該病患接受每週3天、為期2週之經純化萃取物治療，所得結果如表11所示。

表 11.

日期	試驗時間表	血小板數目($10^3/\text{ul}$)
2009-05-18	第1天	37,000 (基線值)
2009-05-25	第8天	11,000
2009-06-01	第15天	84,000
2009-06-03	第17天	58,000
2009-06-08	第22天	55,000
2009-06-15	第29天	31,000
2009-06-29	第43天	14,000

應瞭解到，以經純化之萃取物治療後，血小板數目由37,000回復至84,000，可視為對本治療之良好反應。無不良情況發生。

最終，一名60歲之女性病患 (R02002)，於四年前被診斷出患有ITP，並以毗定索隆(prednisolone) (15mg QD)進行治療。該病患接受每週3天、為期3週之經純化萃取物治療(持續治療中)，所得結果如表12所示。

表12.

日期	試驗時間表	血小板數目($10^3/\text{ul}$)
2009-07-06	第1天	8,000 (基線值)
2009-07-13	第8天	6,000
2009-07-20	第15天	54,000
		不良情況
2009-07-06	第1天	過敏反應
2009-07-08	第3天	皮膚出疹

應瞭解到，以經純化之萃取物治療後，血小板數目由8,000回復至54,000，可視為對本治療之良好反應。

【圖式簡單說明】

第1圖顯示BALB/c小鼠對於高產率萃取物之反應，在依據某些實施例，投以次致死劑量之放射線後。

第2圖顯示絲裂黴素(mitomycin)誘發之血小板缺少，依據實施例注射7天後。

第3圖顯示自經放射線照射BALB/c小鼠回收白血球細胞，在依據實施例投以高產率萃取物後。

第4圖顯示自經放射線照射BALB/c小鼠回收血小板之回收率，當依據實施例共注射高產率萃取物與G-CSF。

第5圖顯示自經放射線照射BALB/c小鼠回收白血球之回收率，當依據實施例共注射高產率萃取物與G-CSF。

第6圖顯示台灣臨床試驗之流程圖，其中該病患們被診斷出患有慢性自發性血小板缺少症，依據美國血液學會(ASH)指南所定義。

【主要元件符號說明】

- | | |
|------------|------------|
| 605...篩選 | 620...評估 |
| 610...隨機分派 | 625...拒絕投藥 |
| 615...投藥 | 630...試驗結束 |

七、申請專利範圍：

1. 一種包含黃耆之一根部萃取物之組成物，其中該萃取物包含：

阿拉伯糖：半乳糖比例範圍為約4.0:1至約5.0:1；

約5%至約10%之鼠李糖(rhamnose)；

約15%至約20%之半乳糖；

約10%至約20%之半乳糖醛酸；

不超過2wt%之蛋白質；以及

約10%至約15%之葡萄糖；

其中，該萃取物係使用第一流程製備，其包括自黃耆中分離出一粗萃取物，並以酸溫和處理該粗萃取物，該溫和處理包括施加酸至該粗萃取物，其濃度為約0.3M至約0.5M，溫度範圍為約15 °C至25 °C，處理時間範圍為約1至3小時，其中施加該酸之溫度與時間係經選擇，以獲得阿拉伯糖：半乳糖比例、半乳糖含量、葡萄糖含量，以及高產率；以及

其中，第一流程製備該萃取物之產率實質上高於使用第二流程製備之黃耆萃取物產率，該第二流程包括於經選擇之溫度與時間下，施加酸至該粗萃取物，以獲得阿拉伯糖：半乳糖比例小於約3.5:1、約20%-35%之半乳糖，以及小於約10%之葡萄糖。

2. 如申請專利範圍第1項之組成物，其中該黃耆 (*Astragalus membranaceus*) 為蒙古黃耆 (*A. membranaceus* Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao) 或莢膜黃耆 (*A. membranaceus* (Fisch.) Bge)。
3. 如申請專利範圍第1項之組成物，其中該黃耆生長於中華人民共和國之內蒙古或山西省。
4. 如申請專利範圍第2項之組成物，其中該根部係來自於為約兩年之黃耆植物。
5. 如申請專利範圍第1項之組成物，具有重量平均分子量為至少100千道耳頓。
6. 如申請專利範圍第1項之組成物，具有至少80 wt%之碳水化合物。
7. 如申請專利範圍第1項之組成物，其中該酸為三氯醋酸或氫氯酸。
8. 如申請專利範圍第1項之組成物，其中該組成物之pH值範圍為約4.5至約6.5。
9. 如申請專利範圍第1項之組成物，更為可刺激造血作用之試劑。
10. 如申請專利範圍第1項之組成物，更為選自於由顆粒細胞聚落刺激因子、顆粒細胞巨噬體聚落刺激因子、紅血球生成素與紅血球生成刺激蛋白質、血小板生成素、介白素-3，及其衍生物所組成族群之試劑。

11. 一種水性可注射組配物，包含一治療上有效量之如申請專利範圍

第1項之組成物，以及一水性可注射賦形劑。

12. 一種製備如專利申請範圍第1項之萃取物的方法，步驟為：

自黃耆中分離出一粗萃取物，並以酸溫和處理該粗萃取物；以及溫和處理包括施加酸至該粗萃取物，其濃度範圍為約0.3M至約0.5M，溫度範圍為約15 °C至25 °C，處理時間範圍為約1至3小時，其中施加該酸之溫度與時間係經選擇，以獲得阿拉伯糖：半乳糖比例範圍為約4.0:1至約5.0:1；約5%至約10%之鼠李糖(rhamnose)；約15%至約20%之半乳糖；約10%至約20%之半乳糖醛酸；約10%至約15%之葡萄糖；以及不超過2wt%之蛋白質。

13. 一種包含黃耆萃取物之組成物在製備治療自發性血小板缺少性紫斑症之醫藥組成物的用途，其中該組成物包含：

阿拉伯糖：半乳糖比例約4.0:1至約5.0:1；

約5%至約10%之鼠李糖(rhamnose)；

約15%至約20%之半乳糖；

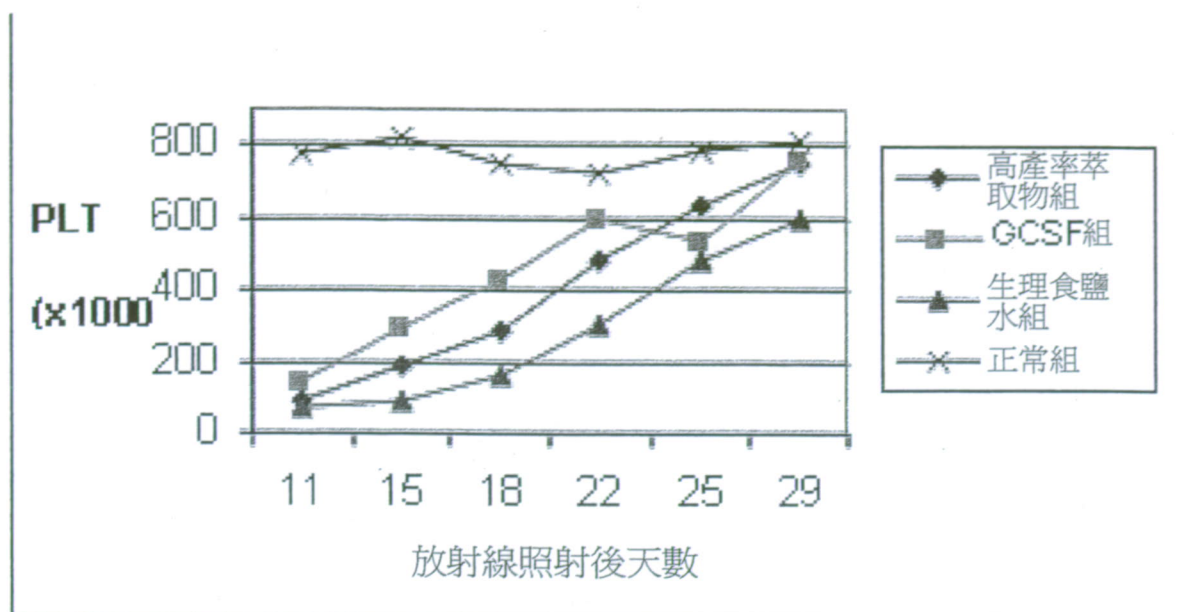
約10%至約20%之半乳糖醛酸；

不超過2wt%之蛋白質；以及

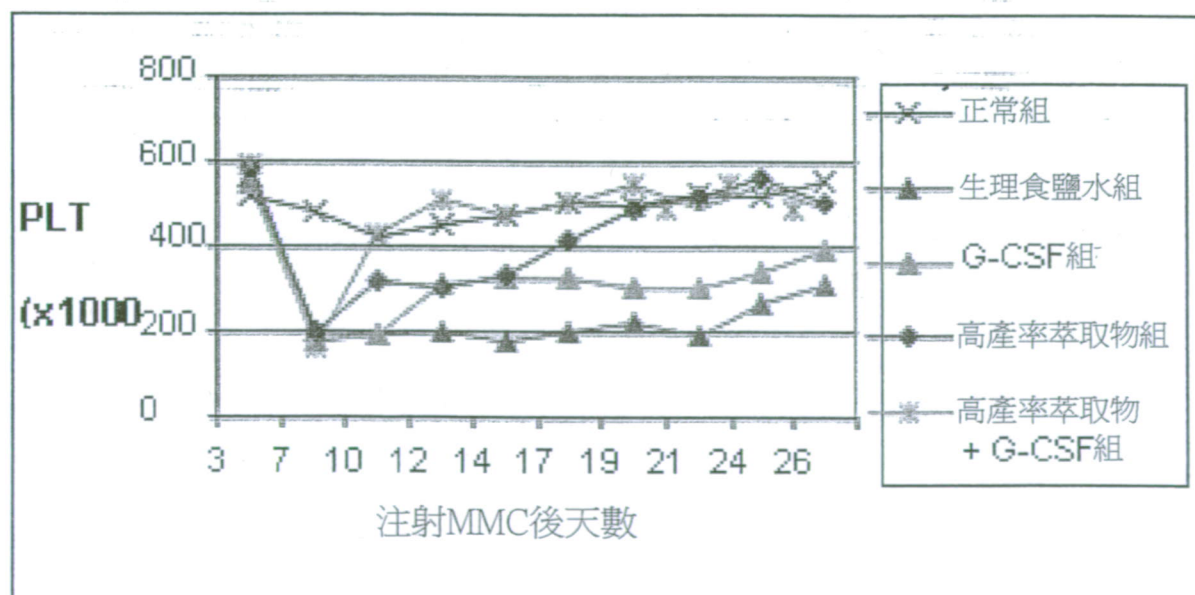
約10%至約15%之葡萄糖。

14. 如申請專利範圍第13項之用途，可進一步包含一第二活性劑，其中該第二活性劑聯合給予酸改性阿拉伯半乳聚糖蛋白組合物。
15. 如申請專利範圍第14項之用途，其中該第二活性劑選自顆粒細胞集落刺激因子、顆粒細胞巨噬細胞集落刺激因子、紅血球生成素和紅血球生成刺激蛋白、血小板生成素、白細胞介素-3以及其衍生物的藥劑。
16. 如申請專利範圍第15項之用途，其中該第二活性劑為顆粒細胞集落刺激因子。
17. 如申請專利範圍第13項之用途，其中該阿拉伯糖半乳糖蛋白組合物的重均分子量為至少100千道爾頓。
18. 如申請專利範圍第13項之用途，其中該阿拉伯糖半乳糖蛋白組合物被酸改性包括
- 阿拉伯糖：半乳糖比例為約4.0:1至約5.0:1；
- 約5%至約10%的鼠李糖；
- 約15%至約20%的半乳糖；
- 約10%至約20%的半乳糖醛酸；
- 不超過2 wt%之蛋白質；以及
- 約10%至約15%的葡萄糖。

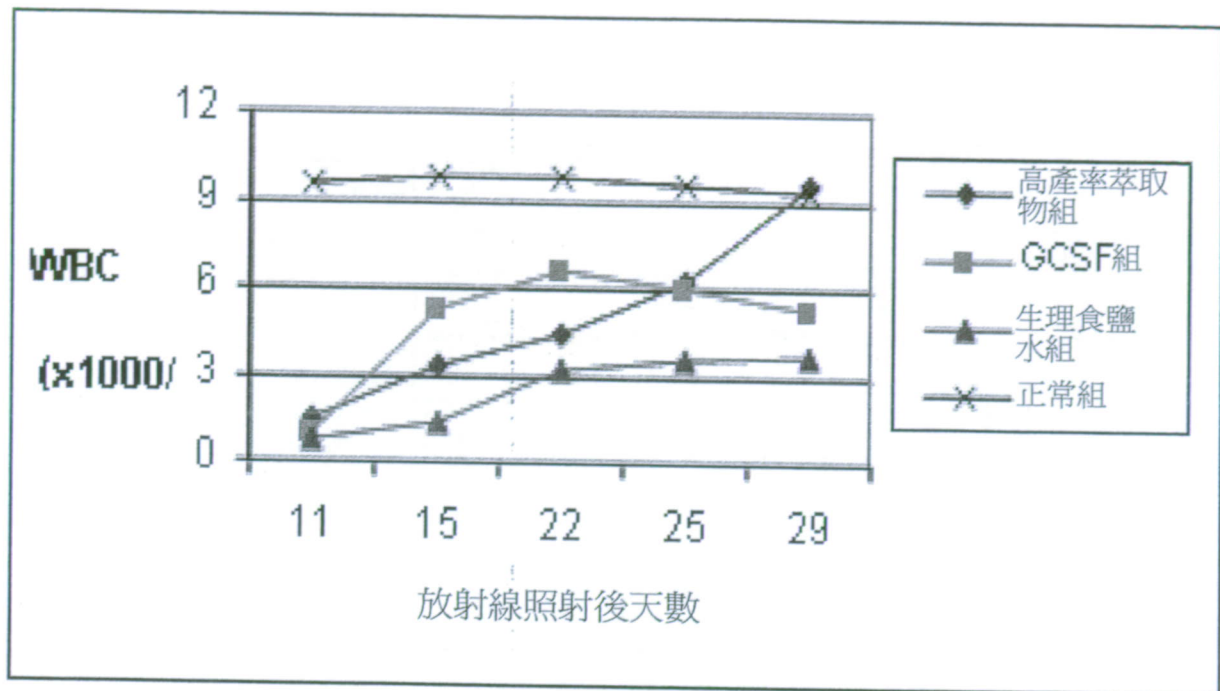
- 19.如申請專利範圍第18項之用途，其中所述酸改性阿拉伯半乳聚糖蛋白的阿拉伯糖：半乳糖比例為約4.0：1至約4.5：1。
- 20.如申請專利範圍第18項之用途，可進一步包含一第二活性劑，其中該第二活性劑聯合給予酸改性阿拉伯半乳聚糖蛋白組合物。
- 21.如申請專利範圍第19項之用途，其中該第二活性劑選自顆粒細胞集落刺激因子、顆粒細胞巨噬細胞集落刺激因子、紅血球生成素和紅血球生成刺激蛋白、血小板生成素、白細胞介素-3以及其衍生物的藥劑。
- 22.如申請專利範圍第20項之用途，其中該第二活性劑為顆粒細胞集落刺激因子。
- 23.如申請專利範圍第18項之用途，其中該阿拉伯糖半乳糖蛋白組合物的重均分子量為至少100千道爾頓。
- 24.一種包含黃耆萃取物之組成物在製備治療自發性血小板缺少性紫斑症之醫藥組成物的用途，其特徵在於以靜脈注射每天1次之500mg的黃耆萃取物約3小時至3.5小時且每週3天至5天；其中該醫藥組合物係包含如專利範圍第11項之水性可注射組配物。
- 25.一種包含黃耆萃取物之組成物在製備治療自發性血小板缺少性紫斑症之醫藥組成物的用途，其特徵在於以靜脈注射每天1次之250mg的黃耆萃取物及曲安縮松(triamcinolone)；其中該醫藥組合物係包含如專利範圍第11項之水性可注射組配物。



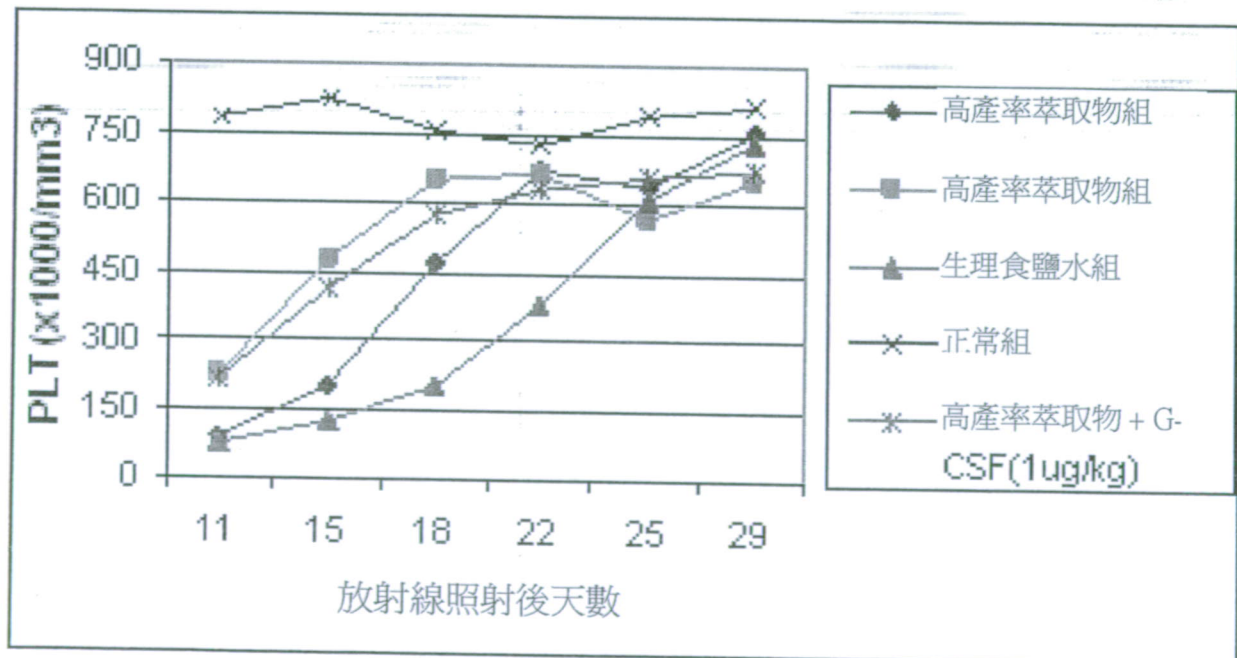
第1圖



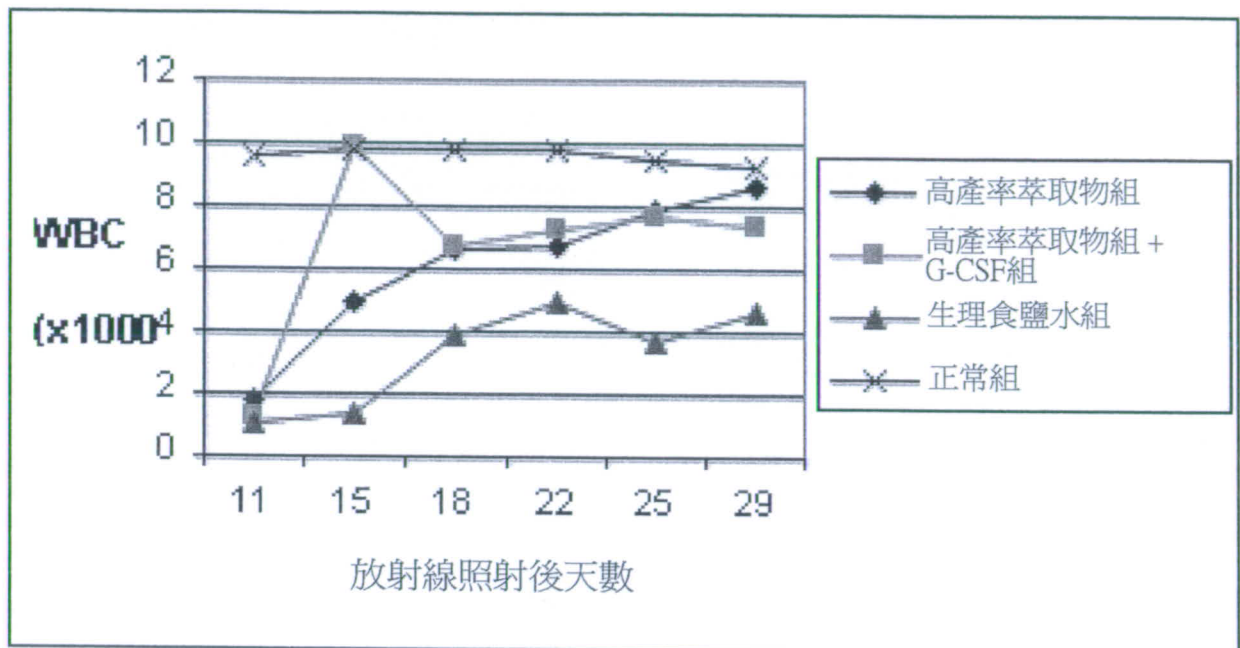
第2圖



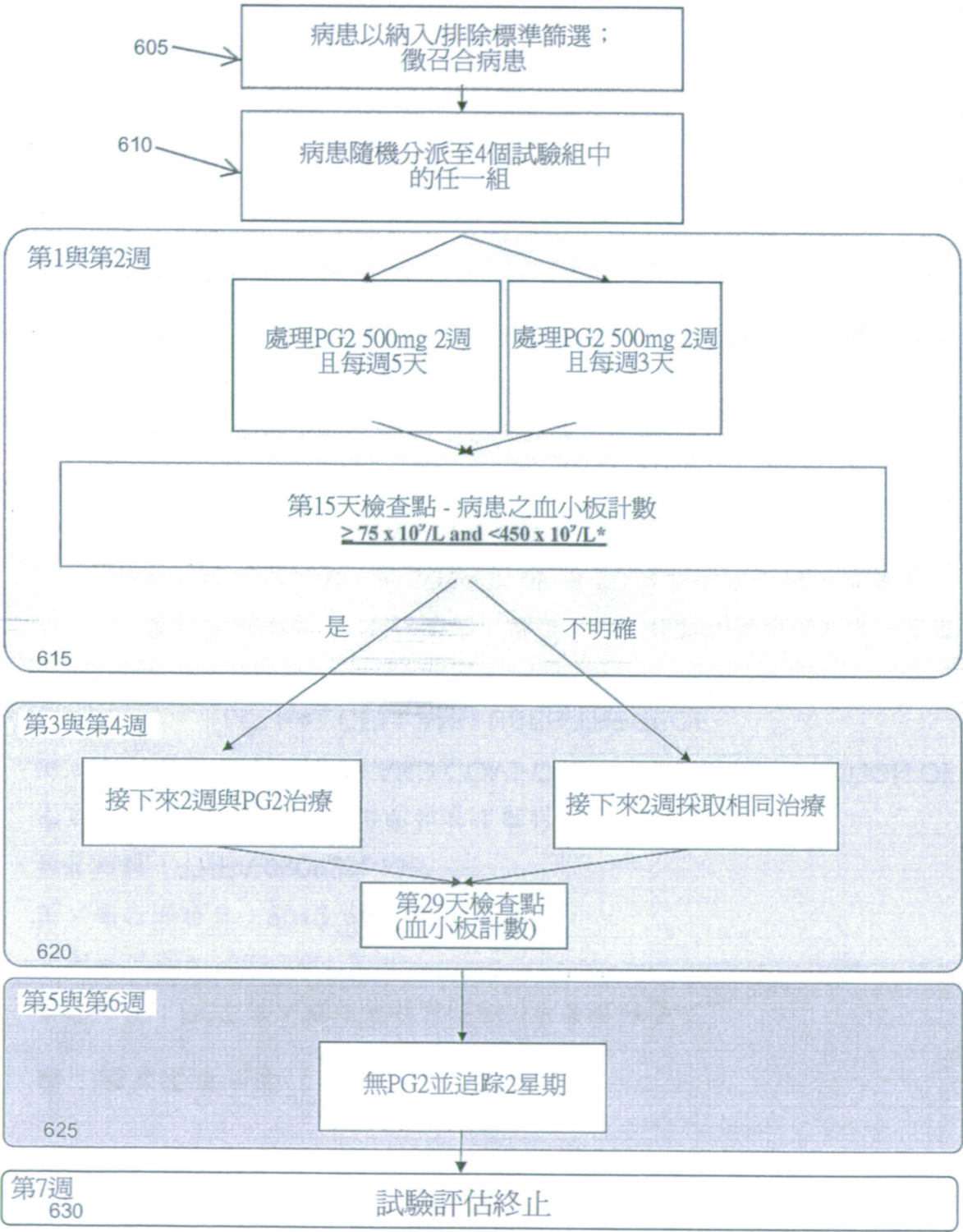
第3圖



第4圖



第5圖



第6圖