

(由本局填寫)

承辦人代碼：	
大類：	
I P C 分類：	

A6
B6

本案已向：

國(地區) 申請專利，申請日期： 案號： 有 無主張優先權
 歐洲專利機構 1998年9月1日 98 116494.0 有 無主張優先權

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

有關微生物已寄存於： ，寄存日期： ，寄存號碼：

五、發明說明（1）

本發明係有關一種可與細胞膜上之細胞外受體產生生物上有效之交互作用的多勝肽組合物。該多勝肽以一種離子錯合物形式及兩性化合物的形式存在於該組合物中。本發明更進一步關於該組合物之使用。

使用兩性化合物做為藥物輸送系統素為諸此藝者所熟知（參見美國專利US-P 5,650,393；US-P 5,688,761；US-P 5,665,328；US-P 5,124,081；US-P 5,109,038）。介於表面活性物質及醫藥藥劑間之微胞型錯合物的形成亦已知用做促進該活性劑之經皮的及經膜的穿透力之實例（Tomlinson and Davis, J. Colloid. Interf., Sci. 74 (1980) 349）。頃亦知道，通常非離子形醫藥藥劑之生物膜通透特性比離子狀態醫藥藥劑之生物膜通透特性好（Cools and Jansen, J. Pharm. Pharmacol. 35 (1983) 689-691）。頃亦了解由於荷量分子（特別為多勝肽）其低脂質溶解度的關係（Hirai et al., Int. J. Pharm. 7(1991) 317-325），以多重離子形在存於生理性酸鹼值之多勝肽亦非處於輸送至作用點之最佳狀態（藥物輸送）。由Okada等人，J. Pharm. Sci 72 (1993) 75-78乙文中得知結合親脂性平衡離子至藥劑之離子部位之優點，其可增進與生物膜之交互作用，因此可促進通過小腸膜之蛋白質輸送。例如Hazzenga及Berner在J. Controlled Release 16 (1991) 77-88乙文中所述之兩性離子活性劑對徑皮的輸送方法之加強方法。

其他增進藥劑與生物膜交互反應的方法在（例如）Lee等人；Critical Rev. Therp. Drug Carrier Systems 8 (1991) 91-192, Morimoto et al., Arch. Int. Pharmacodyn. 3-2 (1989) 18-26及

(請先閱讀背面之注意事項再寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明（2）

Aungst, Int. J. Pharm. 33 (1986) 225-234, 等文中均有所描述。然而該等方法之目的皆集中在提昇該活性劑之壓水性，以促進該藥劑對生物膜如皮膚之穿透力，使其達到輸送該藥劑至細胞內之目的。使用在此處之表面活性物質之濃度已高於臨界微胞濃度(CMC, Womack et al., Biochim; Biophys. Acta 733 (1983) 210)。此類方法的一個缺點為使用高濃度的表面活性物質對細胞膜具有重大的影響，而且可能損害細胞膜。

由WO 94/08599中得知可製備活性劑的均質水溶液，徑由加入足夠量之陰離子洗滌劑以形成沈澱物，該沈澱物經單離後再溶於有機溶劑中，用做結合載體活性劑之製造。該包含陰離子洗滌劑和活性劑間錯合物之均質水溶液可用在全埋或分散該活性劑於固態基質之中。此外WO 94/08599亦提及可形成蛋白質及陰離子洗滌劑之錯合物，而且該活性劑可由蛋白質的控制性釋出而釋出。

頃了解可徑由將蛋白質共價結合至厭水性化合物如脂肪酸或類固醇之上以提高蛋白質之活性。然而此類方法非常複雜，而且由於結合化學反應的緣故可導至不均勻的產物(請參閱例如Ekrami, H.M. et al. FEBS Letters 371 (1995) 283-286, Pepinski, R.B. et al., J. Biol. Chem. 273 (1998) 14037-14045)。

本發明之目的在提供醫藥上有效之多勝肽的組合物，該組合物可增進其中所包含之多勝肽的活性。

該目的則藉由一種組合物(較佳者一種醫藥組合物)，其

(請先閱讀背面之注意事項再寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (3)

包含選自由刺蝟狀蛋白質，骨形態發生蛋白質，生長因子，促紅血球生成素，促血小板生成素，G-CSF，介百素及干擾素所組成的族群中之醫藥上有效之多勝肽予以達成。該組合物之特徵為另外包含一種兩性化合物。該多勝肽與該兩性化合物形成一種離子錯合物，該錯合物之形成不會促進該多勝肽之溶解度。該組合物不含任何有機溶劑。該組合物可藉由冷凍乾燥以達到貯存之目的。

在本發明之中，該多勝肽及該兩性化合物分別以在作用濃度的情況下溶於水溶液(較佳者緩衝水溶液)中。而該兩者物質僅能藉由離子交互作用而形成錯合物，使得該多勝肽變成厭水性的，如此一來更加惡化或至少沒有增進其水溶性。但意外的結果是在此情況之下，可明顯地增強此類多勝肽的活性。

根據本發明，該兩性化合物和多勝肽之量及比例以該包含離子錯合物之水性組合物為澄清液時為較佳之選擇。如果該組合物將做為直接投藥至患者的水溶液時，倘若該多勝肽及該兩性化合物間之錯合物形成導至混濁，則過濾該水溶液以得到澄清液。如果該組合物將在投藥至患者之前予以固定在載劑之上，則不需避免混濁之發生。

該醫藥上有效之多勝肽係為一種可呈現離子型而被細胞表面受體(細胞外受體)辨視並結合以發展其生物活性的多勝肽。此類多勝肽涵括生長因子(例如NGF, TGF- β , FGF, GDF, 類胰島素生長因子)，促紅血球生長素，促血小板生長素，G-CSF，干擾素如干擾 α -2b，介百素如介百素-2或

(請先閱讀背面之注意事項再寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (⁴)

介百素-12，骨形態發生蛋白質如BMP-2，或刺蝟狀蛋白質例如音速(sonic)，印度(indian)或沙漠(desert)刺蝟狀蛋白質。其中特佳為刺蝟狀蛋白質。根據本發明，喜使用之多勝肽之活性(活體外之療效及/或蛋白質活性)比較非錯合物之活性最佳者增加10倍或以上。該離子型多勝肽可藉由將其置於與其pK值相差至少0.5 pH單位的環境之下而得。

根據本發明，該兩性化合物可知為一種陰離子，兩性離子或陽離子厭水性表面活化劑，脂肪酸，烷基磺酸鹽或脂質。較佳者，陰離子表面活化劑為陰離子洗滌劑如steroidic tensides如去氧膽酸鹽(deoxycholates)，膽酸鹽(cholates)；牛磺膽酸鹽(taurocholates)，牛磺去氧膽酸鹽(taurodeoxcholates)，脫氫膽酸鹽(dehydrocholates)(對陽離子多勝肽有用)；較佳者，兩性離表面活化劑有CHAPS(3[(3-膽醯胺基丙基)二甲基氨基]-1-丙烷磺酸)和兩性劑[®](Zwittergent[®])(N-十二烷基-N,N-二甲基-3-氨基-1-兩烷磺酸)；以及，較佳者，陽離子洗滌劑有1-溴十六烷基三甲基銨或1-氯十二烷基銨(可用在陰離子多勝肽)。較佳者，脂肪酸為脂肪酸類如棕櫚酸(十六烷酸)(可用在陽離子多勝肽)。較佳者，烷基磺酸鹽有烷基磺酸鹽如癸基磺酸鹽(可用在陽離子多勝肽)；較佳者，脂質為脂質如磷脂醯絲氨酸(對陰離子多勝肽有用)及磷脂酯(對陰離子多勝肽有用)。

在可轉變該多勝肽或厭水性的條件之下，將兩性化合物加入該組合物中以降低或至少不增進該多勝肽之水溶性。根據本發明，重要的是該多勝肽及兩性化合物以此方法形

(請先閱讀背面之注意事項再寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (5)

成水溶性離子錯合物。該錯合物中之多勝肽及兩性化合物的比例則根據所用的pH值和兩物質之pK值以及濃度比例之不同而定。較佳者，所使用的pK值與該多勝肽及其輔助物質的pK值相差至少二分之一pK單位。加入愈多兩性化合物則有愈多的兩性化合物結合至該多勝肽，而該錯合物之厭水性愈強。此可導致錯合物沈澱，進而產生不再完全溶於水的可溶及不溶之錯合物混合物。然而，加入非離子洗滌劑如polyxamer例如吐溫[®](Tween[®])可至少恢復部分錯合物之水溶性，或者，若需要可過濾該組合物。同樣地亦可加入非離子洗滌劑達可形成微胞之濃度。需注意的是所選擇的兩性化合物的種類及濃度，特別當蛋白質為多勝肽時，該多勝肽的分子架構維持在其自然活性型式，因此不會降低該多勝肽的之活性。通常加入超過10倍莫耳濃度的兩性化合物時，對此目的已足夠。較佳者，每毫升含5微克之蛋白質須加入0.001至0.05%(重量體積比)之兩性化合物。

根據本發明，若採用變性表面活化劑如硫酸十二酯鈉(SDS)，則僅可使用低濃度。已知SDS在高濃度時可使蛋白質變性，如此可促進該等蛋白質之水溶性，但會導至蛋白質變性並失去活性。如SDS一類的兩性化合物在高濃度亦可形成微胞，將其加入至本發明所要之錯合物之中會增加該多勝肽之水溶性。不論該兩性化合物是否引起該多勝肽之不必要變性，皆可使用諸此藝者習知之方法予以測定IR，CD及螢光分光等方法。

依據本發明，頃了解一種水溶性醫藥組合物係為一種基

(請先閱讀背面之注意事項再寫本頁)

裝
訂
線

五、發明說明 (⁶)

本上不涵括不溶物體，但包含醫藥上有效之多勝肽的組合物。根據本發明，頃了解，特別是一種不含可見混濁度的醫藥組合物。根據本發明，該多勝肽及表面活化劑之離子錯合物在其所使用的濃度之下完全溶於水，或將不溶之錯合物以過濾法去除，亦可能形成此類可溶性組合物。根據本發明，該水溶性組合物不含添加之有機溶液。然而在該組合物的處理方面可能需要使用小量之有機溶劑溶解此類兩性化合物如脂肪酸(最多達5%，較佳者，最多達該組合物體積的1%)。

本發明另外一個重點係為根據本發明製造水溶性醫藥組合物之方法。其特徵為該醫藥上有效之多勝肽及兩性化合物以經由多勝肽與輔助物質間之離子交互作用而形成之離子錯合物的濃度比例及pH值予以結合。而惡化或至少不增進該醫藥上有效之多勝肽之水溶性。

本發明進一步的主題重點係為根據本發明的醫藥組合物在人體或哺乳動物身上進行系統性或局部施藥之使用。

在一較佳之具體實例之中，使用一種刺蝟狀蛋白質做為醫藥組合物中的醫藥上有效之多勝肽。已知刺蝟狀蛋白質可經由共價厭氧性修飾予以改良(歐洲專利申請案號99108032.6)。

根據本發明，頃驚訝地發現刺蝟狀蛋白質的活性可經由刺蝟狀蛋白質與兩性化合物間所形成之離子化合物而提昇至可觀的程度。在一較佳之具體實例當中，該刺蝟狀蛋白質之活性(比較起由E. coli中製造的重組刺蝟狀蛋白質)得

(請先閱讀背面之注意事項再寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(7)

到 10 倍 或 以 上 之 活 性 提 升 。

因 此 ， 本 發 明 之 較 佳 主 題 係 為 一 種 含 由 刺 蟄 狀 蛋 白 質 及 兩 性 化 合 物 以 離 子 交 互 作 用 所 形 成 之 錯 合 物 之 醫 藥 組 合 物 ， 其 中 該 化 合 物 以 惡 化 或 至 少 不 增 加 該 刺 蟄 狽 蛋 白 賴 的 溶 解 度 之 濃 度 存 在 。

頃 了 解 刺 蟄 狽 (hh) 蛋 白 賴 係 為 一 族 分 泌 訊 號 蛋 白 賴 ， 其 負 責 胚 胎 發 生 過 程 中 許 多 架 構 之 形 成 (J. C. Smith, Cell 76 (1994) 193-196, N. Perrimon, Cell 80 (1995) 517-520, C. Chiang et al., Nature 33 (1996) 407, M.J. Bitgood et al., Curr. Biol. 6 (1996) 296, A. Vortkamp. et al., Science 273 (1996) 613, C.J. Lai et al., Development 121 (1995) 2349)。在 其 生 化 合 成 過 程 之 中 ， 經 過 訊 號 序 列 之 斷 截 及 自 動 催 化 斷 截 之 後 得 到 一 段 20 kD 之 N 端 部 位 產 物 及 一 段 25-kD 之 C 端 部 位 產 物 。 在 其 自 然 型 之 中 ， 該 N - 端 部 位 被 膽 固 醇 及 棕 檬 醇 修 飾 (J.A. Porter et al., Science 274 (1996) 255-259 and Pepinski et al., J. Biol. Chem 273 (1998) 14037-14045)。在 較 高 等 生 命 型 的 hh 族 中 則 包 含 至 少 3 個 成 員 ， 主 要 有 音 速 ， 印 度 及 沙 莫 hh (Shh, Ihh, Dhh; M Fietz et al., Development (Suppl.) (1994) 43-51)。在 以 原 核 及 真 核 蛋 白 賴 表 現 系 統 製 造 的 重 組 蛋 白 賴 後 經 發 現 該 等 刺 蟄 狽 蛋 白 賴 具 有 不 同 活 性 。 (M. Hynes et al., Neuron 15 (1995) 35-44 and T. Nakamura et al., Bio chem Biophys. Res. Comm. 237 (1997) 465-469)。

較 佳 者 ， 使 用 音 速 ， 印 度 或 沙 漠 hh (Fietz. M. et al. Development (Suppl.) (1994) 43-51)。較 佳 者 ， 使 用 EMBL 資 料

五、發明說明(8)

庫所登載，序號L38518的hh蛋白質。刺蝟狀蛋白質家族的胺基酸序列具有顯著的同質性，因此亦喜於表現編碼前所提及具80%或大於80%同質性之音速刺蝟狀蛋白質的核酸。較佳者，以國際申請案號No. WO 99/28454及歐洲專利申請案號99108032.6中所述之實例使用刺蝟狀蛋白質。

人類音速刺蝟狀之前體蛋白質係由在EMBL資料庫序號L38518中所述之序列的胺基酸1-462所組成。該胺基酸1-23代表訊號勝肽，胺基酸24-197代表成熟的訊號部位，胺基酸32-197代表縮短8個胺基酸的訊號部位，而胺基酸198-462代表在自動蛋白水解斷截後之自動處理C-端部位。

較佳者，頃了解，醫藥上有效的刺蝟狀蛋白質對神經細胞具神經性效應，較佳者或骨作用及/或骨之引發(Osteoinduction)，較佳者，特別為軟骨生成及/或軟骨引發(Chondroinduction)，如Kinto等人在FEBS Letters, 404 (1997) 319-323乙文所述之骨之引發，如Miao等人在J. Neurosci. 17 (1997) 5891-5899乙文所述對神經細胞之影響，及Stott等人在J. Cell Sci. 110 (1997) 2691-2701乙文所述之軟骨細胞之引發。

根據本發明，需要高濃度的刺蝟狀蛋白質水溶液作為以該錯合物塗層或包埋的載體母質。因而使該載體母質在局部上具足夠醫藥上有效之應用。結果顯示在醫藥上可使用之載劑較佳者應包含刺蝟狀蛋白質濃度在0.1-10毫克/毫升或以上之載劑。刺蝟狀蛋白質本質上非常難溶。然而，頃驚訝地發現在包含精胺酸或精胺酸離子的溶液之中刺蝟狀

(請先閱讀背面之注意事項再寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(9)

蛋白質之水溶性被澈底提昇，而且在低濃度(<1毫克/毫升或較少)時hh蛋白質的穩定性亦提高。因此，較佳者，可在其水溶液及與載劑結合之錯合物中加入精胺酸或精胺酸離子。

頃了解，本發明中的刺蝟狀蛋白質之活性為鹼性磷酸酶之活性(表現鹼性磷酸酶之刺激)，在哺乳動物細胞中該多勝肽可引發鹼性磷酸酶(鹼性磷酸酶測試之活性)。在此方法中，使用含胎牛血清之培養液培養老鼠纖維母細胞源。接著加入過濾無菌之樣本，在ca. 5天後予以溶胞，使用斷裂色原受質的方法(pNP, p-氮酚)(J. Asahina, Exp. Cell. Res. 222 (1996) 38-47 and T. Nakamura (1997))。測定溶胞中之鹼性磷酸酶。

根據本發明，該醫藥組合物包含醫藥上有效量之hh蛋白質，並可有系統地投藥或較佳者，局部性投藥。較佳者，使用本發明之蛋白質與其他刺蝟狀蛋白質家族或骨生長因子例如骨形態發生蛋白質(BMPs)(Wozney et al. Cell. Mol. Biol of Bone, Bone Morphogenetic Proteins and their Gene Expression (1993) Academic Press Inc., 131-167)；或甲狀旁腺荷爾蒙(Karablis et al., Genes and Development 8 (1994) 277-289)或類胰島素因子(IGF-I or II)或轉化生長因子家族(TGF- β , GDF)等合併使用。根據本發明，若需要該錯合物亦可包含其他蛋白質。

因此，本發明進一步的主題係有關較佳之刺蝟狀蛋白質水溶性醫藥組合物之製造，經由在可形成離子錯合物的情

(請先閱讀背面之注意事項再寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (10)

況下結合該刺蝟狀蛋白質與一種兩性化合物之方法。

本發明的另一主題係有關根據本發明的刺蝟狀蛋白質錯合物之使用以製備醫藥組合物。在該組合物中，該錯合物充作該組合物之基本成份，並且視需要可與適宜的其他醫藥輔助物質結合，較佳者，置於緩衝水溶液之中。進一步較佳之具體實例為根據本發明之刺蝟狀蛋白質錯合物存在於溶解和沈澱型混合物之中或僅於沈澱型之中，如此可延遲刺蝟狀蛋白質之釋放或使用在活體內定點之局部應用。作用部位蛋白質之釋放方面，混合型醫藥調配物比完全溶解型醫藥調配物慢。

而且，較佳者，加入輔助物質如氯化鈉，糖(甘露醇，蔗糖，乳糖，葡萄糖，蔗糖，海藻糖，以20-100毫克/毫升為較佳)或胺基酸如甘胺酸或精胺酸，甲硫胺酸，光胱胺酸以及抗氧化劑如EDTA，檸檬酸，硫甘油，乙醯光胱胺酸，聚乙二醇(重量比1-10%)，抗發炎劑，局部麻醉劑，抗生素及/或穩定劑以製備該醫藥組合物。

在進一步的較佳之具體實例之中，根據本發明之刺蝟狀蛋白質之醫藥組合物較佳者包含蘇拉明，此有益於其利用。

該醫藥組合物可包含其他醫藥輔助物質，而且較佳者經冷凍乾燥。

較佳之具體實例為該醫藥組合物含濃度0.1-10毫克/毫升，較佳者0.1-5毫克/毫升之刺蝟狀蛋白質。

較佳之具體實例為該醫藥組合物另外包含醫藥上可接受之緩衝液，該緩衝液具生物相容性，較佳者其範圍在pH 4

(請先閱讀背面之注意事項再寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (11)

到 pH 10之間，特別以 pH 6至 pH 8之間較佳。該緩衝液的濃度較佳者為 10-500 毫莫耳/升，更佳者為 10-100 毫莫耳/升。頃預期所選擇之鹽濃度之高離子力不會影響該錯合物之形成。

本發明另一項具體實例為根據本發明包埋於載劑中並且包含該錯合物之醫藥組合物具生物相容性，而且可作為(例如)植入劑。較佳者，該載劑為聚合物，該聚合物

- 當該醫藥蛋白質包埋於載劑中時，不會使該刺蝟蛋白質變性，
- 其平均分子量為至少 10,000 Da。

此類聚合物涵括(例如玻璃酸，膠原蛋白，藻朊酸鹽或有機聚合物如 PLGA(聚交酸及乙醇酸之共聚合物)或其衍生物。若該錯合包埋於載體之中，該錯合物不必像如述之水性醫藥組合物一般完全溶於水溶液之中。當該結合載體之錯合物進行身體上之局部應用時，較佳者，該刺蝟狀多勝肽錯合物存在於骨或軟骨之中，從錯合物中可慢慢地釋放其可溶型蛋白質，因此可發展其所需之生物活性。

本發明進一步的主題係有關根據本發明中固定(反向結合至在與生物相容之載劑之醫藥組合物，該醫藥組合物可用在人體或動物身上的局部應用。此類生物相容載劑有(例如)玻璃酸，膠原蛋白，藻朊酸或有機聚合物如 PLGA或其衍生物。

根據本發明之錯合物，較佳者，置於一種生物相容載劑之上，其中該載劑可在活體內局部釋放該活性錯合物。此

(請先閱讀背面之注意事項再寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (12)

類調配物特別適宜做為修護骨及軟骨缺陷；但亦可用在修護神經缺陷或做為系統化運輸。

根據本發明之醫藥組合物，較佳者，包含一種本質上作為架構物質之聚合物。較佳者，該聚合物對細胞亦具有黏連之功能。此類架構物質如膠原蛋白。

在進一步的具體實例之中，當進行局部性投藥時，根據本發明之醫藥組合物可用來降低在所要的作用部位以外區域的副作用。不完全固定或不具極短的局部半生期之醫藥上有效之多勝肽的局部投藥可能導致該多勝肽之擴散，或至少部分多勝肽越過所要的作用部位而導致不要之系統性作用。此類不要的系統性效應可因本發明而大量地減少或甚至避免。該方法適於用在其離子錯合物比其非錯合物形多勝肽增加10倍或以上活性之多勝肽之上時，其中該錯合物比非錯合物多勝肽在緩衝水溶液中具較低之溶解度。較佳者，此類多勝肽為刺蝟狀蛋白質，胞質及生長激素如NGF。

根據本發明，較佳者，使用本方法進行局部性應用之多勝肽錯合物及兩性化合物之量為在錯合物中之多勝肽呈現相對應於其活體內的療效劑量(有效劑量)的活性。必須慎選該錯合物之量，因此當該錯合物因為在生理條件下(例如血液中)被稀釋10-20倍而發生分解時，該多勝肽之活性僅有該療效劑量的20%或更少。因此根據本發明，在此類錯合物之局部性應用之中，該醫藥上有效之多勝肽呈現其完全療效。例如當該多勝肽為骨生長因子如細胞靜止素時

(請先閱讀背面之注意事項再寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (16)

解 20 分鐘。將整個細胞製備置於塑膠培養盤培養 2 小時以除去污染性細胞如纖維母細胞。纖維母細胞及其他非神經細胞會黏連至該組織培養盤，但在此情況之下神經細胞不會附著在該受質之上。以收集上層液的方式收集"乾淨的"神經細胞，並且殖入以聚鳥氨酸/昆布胺酸塗層的塑膠盤(48 洞)中，細胞密度為 10,000 個細胞 / 洞，培養基為含 5% FBS 的 HAM's F14 培養基。NGF 的劑量反應曲線之滴定由大約 1 微微克 / 毫升至 15 微克 / 毫升。神經培養活性之定量則以計數在以不同 NGF 配方培養 48 小時之後所發育的神經突比核周質直徑大兩倍的活性已分化之神經元而得。採用兩次已分化神經元之測定的平均值相對於 NGF 測試配方濃度為數據作圖，及在數種不同配方中所測得之半最高值(halfmaximal) 的刺激活性(表一)。

(請先閱讀背面之注意事項再寫本頁)

裝

訂

線

表 1

NGF 配方(EC50)之半最高值的刺激活性

配方	EC50(微微克/毫升)
NGF(沒有添加物)	75
NGF(添加 0.006% 之去氧膽酸鈉)	17
NGF(添加 0.02% 之去氧膽酸鈉)	10

該等數據清楚顯示，當配方中含親兩性的添加物時(在本文為去氧膽酸鈉)，該 NGF 之專一性活性則會增加。

實例 4

含去氧膽酸鹽之醫藥組合物

在製備醫藥組合物方面，將 100 毫升存在於 50 毫莫耳 / 升

五、發明說明 (17)

Tris緩衝液，pH 7.4 中的濃度為 5 毫克 / 毫升或 1 毫克 / 毫升之 Hshh(人類音速刺蝟狀蛋白質)水溶液以不含去氧膽酸鹽之配方水溶液在 4°C 之下透析 24 小時。透析之後，經攪拌以製得含 1 毫克 / 毫升或 5 毫克 / 毫升 Hshh 之配方水溶液的水性醫藥組合物，同時加入來自儲備液的去氧膽酸鈉。該水溶液以過濾方式滅菌並貯存於 4°C 之下。取 0.05 至 2 毫升之該水溶液做為人體或動物之注射之用。

4.1 在水性磷酸鹽緩衝液中的離子性厭水化的刺蝟狀蛋白質配方(低去氧膽酸鈉)

配方水溶液：

NaCl	150 毫莫耳 / 升
磷酸鈉緩衝液	10 毫莫耳 / 升
去氧膽酸鈉	0.05% (重量 / 體積)
pH	7.4

4.2 在水性磷酸鹽緩衝液中的離子性厭水化的刺蝟狀蛋白質配方(高去氧膽酸鈉)

配方水溶液：

NaCl	150 毫莫耳 / 升
磷酸鈉緩衝液	10 毫莫耳 / 升
去氧膽酸鈉	0.1% (重量 / 體積)
pH	7.4

4.3 在低離子強度之磷酸鹽緩衝液中的離子性厭水化刺蝟狀蛋白質配方(低去氧膽酸鈉)

配方水溶液：

(請先閱讀背面之注意事項再寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (18)

NaCl	30毫莫耳/升
磷酸鈉緩衝液	20毫莫耳/升
去氧膽酸鈉	0.05%(重量/體積)
pH	6.5

4.4 在低離子強度之磷酸鹽緩衝液中的離子性厭水化刺蝟
狀蛋白質配方(高去氧膽酸鈉)

配方水溶液：

NaCl	30毫莫耳/升
磷酸鉀緩衝液	20毫莫耳/升
去氧膽酸鈉	0.1%(重量/體積)
pH	6.5

實例 5

在含脂質，脂肪酸或類固醇的磷酸鹽緩衝液中的離子性
厭水化刺蝟狀蛋白質之醫藥組合物。

在製備醫藥組合物方面，將100毫升存在於50毫莫耳/升
Tris緩衝液，pH 7.4 中的 Hshh(1毫克/毫升或5毫克/毫升)
水溶液以不含脂質，脂肪酸或膽酸鹽的配方水溶液在4°C
下透析24小時。透析之後，加入來自儲備液中的磷脂酸
(0.01克)，磷酯絲氨酸(0.01克)，棕櫚酸(0.01克)，膽酸鹽
(0.05克)，牛磺去氧膽酸鹽(0.05克)或牛磺膽酸鹽(0.05克)
，攪拌以製得含1毫克/毫升或2毫克/毫升 Hshh 配方水溶液
的水性醫藥組合物。該水溶液經過濾滅菌後貯存於4°C 之
下。取0.05至2毫升之該水溶液用在人體或動物之注射。

五、發明說明 (19)

配方水溶液

NaCl	150毫莫耳/升
磷酸鈉緩衝液	10毫莫耳/升
磷脂	0.01%(重量/體積)
pH	7.4

配方水溶液

NaCl	100毫莫耳/升
磷酸鈉緩衝液	10毫莫耳/升
磷脂絲胺酸	0.01%(重量/體積)
pH	7.4

配方水溶液

NaCl	150毫莫耳/升
磷酸鉀緩衝液	20毫莫耳/升
棕櫚酸鈉	0.01%(重量/體積)
pH	7.4

配方水溶液

NaCl	150毫莫耳/升
磷酸鈉緩衝液	10毫莫耳/升
膽酸鹽	0.05%(重量/體積)
pH	7.4

配方水溶液

NaCl	100毫莫耳/升
磷酸鈉緩衝液	10毫莫耳/升
牛磺去氧膽酸鈉	0.05%(重量/體積)

(請先閱讀背面之注意事項並寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (20)

pH	7.4
配方水溶液	
NaCl	150毫莫耳/升
磷酸鉀緩衝液	20毫莫耳/升
牛礦膽酸鈉	0.05%(重量/體積)
pH	7.4

實例 6

存在於精胺酸緩衝液中的離子性厭水化骨形態蛋白質(BMP-2)之醫藥組合物

在製備該醫藥組合物方面，將100毫升含0.4毫克/毫升BMP-2的水性溶液以含500毫莫耳/升精胺酸的10毫莫耳/升磷酸鉀緩衝液pH 6.0在4°C之下透析24小時。透析之後，加入來自儲備液的棕櫚酸(0.01g)或去氧膽特或牛礦去氧膽特(0.05 g)，接著攪拌以製得含0.4毫克/毫升BMP的配方水溶液之水性醫藥組合物成份。該水溶液以過濾法滅菌並貯存在4°C之下。取0.05至2毫升的水溶液用以注射人或動物。

配方水溶液

精胺酸	500毫莫耳/升
磷酸鉀緩衝液	10毫莫耳/升
去氧膽酸鈉	0.05%(重量/體積)
pH	6.0

配方水溶液

精胺酸	500毫莫耳/升
磷酸鉀緩衝液	10毫莫耳/升

五、發明說明 (21)

棕櫚酸鈉	0.01%(重量/體積)
pH	6.0
配方水溶液	
精胺酸	500毫莫耳/升
磷酸鉀緩衝液	10毫莫耳/升
去氧牛磺膽酸鈉	0.05%(重量/體積)
pH	6.0

實例 7

存在於精酸鹽緩衝液中的離子性厭水化介百素-2之醫藥組合物

在製備該醫藥組合物方面，將100毫升存在於50毫莫耳/升Tris緩衝液(pH 7.4)中，含1至2百萬IU介百素-2的水溶液以不含兩性化合物的配方水溶液在4°C之T透析24小時。在透析之後加入來自儲備液的去氧膽酸鹽(0.05克)，磷脂絲胺酸(0.01克)或棕櫚酸鈉(0.01克)，接著攪拌以製得含1或2百萬IU介百素-2之配方水溶液的水性醫藥組合物。該水溶液以過濾法滅菌並貯存在4°C之下。取0.05至2毫升的水溶液用以注射人或動物。

配方水溶液

NaCl	150毫莫耳/升
磷酸鈉緩衝液	10毫莫耳/升
去氧膽酸鹽	0.05%(重量/體積)
pH	7.4
配方水溶液	

(請先閱讀背面之注意事項
寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (22)

NaCl	150毫莫耳/升
磷酸鈉緩衝液	10毫莫耳/升
磷脂絲胺酸	0.01%(重量/體積)
pH	7.4
配方水溶液	
NaCl	150毫莫耳/升
磷酸鉀緩衝液	20毫莫耳/升
棕櫚酸鈉	0.01%(重量/體積)
pH	7.4

實例 8

存在於磷酸鹽緩衝液中的離子性厭水化介百素 - 阿爾法 (alpha) 之醫藥組合物

在製備該醫藥組合物方面，將 100 毫升存在於 50 毫莫耳/升 Tris 緩衝液 (pH 7.4) 中，含 4 百萬或 4 千萬 IU 之介百素 - α 2b 的水溶液以不含兩性物質的配方水溶液在 4 °C 之下透析 24 小時。在透析之後加入來自儲備液的去氧膽酸鹽 (0.05 g)，磷脂絲胺酸 (0.01 g) 或去氧牛磺酸酸鹽 (0.05)。接著攪拌以製得含 4 百萬或 4 千萬 IU 之介百素 - α 2b 配方水溶液的水性醫藥組合物。該水溶液以過濾法滅菌並貯存在 4 °C 之下。取 0.05 至 2 毫升的水溶液用以注射人或動物。

配方水溶液

NaCl	150毫莫耳/升
磷酸鈉緩衝液	10毫莫耳/升
去氧膽酸鹽	0.05%(重量/體積)

(請先閱讀背面之注意事項並寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (23)

pH 7.4

配方水溶液

NaCl 100毫莫耳/升

磷酸鈉水溶液 20毫莫耳/升

磷脂絲胺酸 0.01%(重量/體積)

pH 7.4

配方水溶液

NaCl 150毫莫耳/升

磷酸鉀水溶液 20毫莫耳/升

去氧牛礦膽酸鈉 0.05%(重量/體積)

pH 7.4

實例 9

存在於乙酸緩衝液中的離子性厭水化人類NGF之醫藥組合物

在製備該醫藥組合物方面，在100毫升存在於100毫莫耳/升乙酸鈉緩衝液(pH 6.0)中，令1至2毫克/毫升人類NGF的水溶液中加入來自儲備液的去氧膽酸鹽(0.05克)，磷脂(0.01 g)或去氧牛礦膽酸鹽(0.05 g)，接著攪拌以得到該水性醫藥組合物。該水溶液以過濾法滅菌並貯存在4°C之下。取0.05至2毫升該水溶液作為注射人或動物之用。

組合物：

人類NGF 1毫克/毫升

乙酸鈉緩衝液 100毫莫耳/升

去氧膽酸鹽 0.05%(重量/體積)

(請先閱讀背面之注意事項
及寫本頁)

裝訂

線

五、發明說明 (25)

List of References

- Asahina, J., Exp. Cell. Res. 222 (1996) 38-47
 Aungst, Int.J.Pharm. 33 (1986) 225-234
 Bitgood, M.J. et al., Curr. Biol. 6 (1996) 296
 Chiang, C. et al., Nature 383 (1996) 407
 Cools and Jansen, J.Pharm.Pharmacol. 35 (1983) 689-691
 Ekrami, J.M. et al. FEBS Letters 371 (1995) 283-286
 European Patent Application No. 99108032.6
 Fietz, M. et al., Development (Suppl) (1994) 43-51
 Hazzenga and Berner, J. Controlled Release 16 (1991) 77-88
 Hirai et al., Int.J.Pharm. 7 (1991) 317-325
 Hynes, M. et al., Neuron 15 (1995) 35-44
 Karablis et al., Genes and Development 8 (1994) 277-289
 Kinto et al., FEBS Letters, 404 (1997) 319-323
 Lai, C.J. et al., Development 121 (1995) 2349
 Lee et al., Critical Rev.Therap. Drug Carrier Systems 8 (1991) 91-192
 Miao et al., J. Neurosci. 17 (1997) 5891-5899
 Morimoto et al., Arch.Int. Pharmacodyn. 302 (1989) 18-26
 Nakamura, T. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 237 (1997) 465-469
 Okada et al., J.Pharm.Sci. 72 (1993) 75-78
 Pepinski, R.B. et al., J.Biol.Chem. 273 (1989) 14037-14045
 Perrimon, N., Cell 80 (1995) 517-520
 Porter, J.A. et al., Science 274 (1996) 255-259
 Smith, J.C., Cell 76 (1994) 193-196
 Stott et al., J. Cell Sci. 110 (1997) 2691-2701
 Tomlinson and Davis, J. Colloid.Interf., Sci. 74 (1980) 349
 US-P 5,650,393
 US-P 5,109,038
 US-P 5,124,081
 US-P 5,665,328
 US-P 5,688,761
 Vortkamp, A. et al., Science 273 (1996) 613
 WO 99/28454
 Womack et al., Biochim. Biophys. Acta 733 (1983) 210
 Wozney et al., Cell. Mol. Biol. of Bone, Bone Morphogenetic Proteins and their Gene Expression, (1993) Academic Press Inc. 131-167

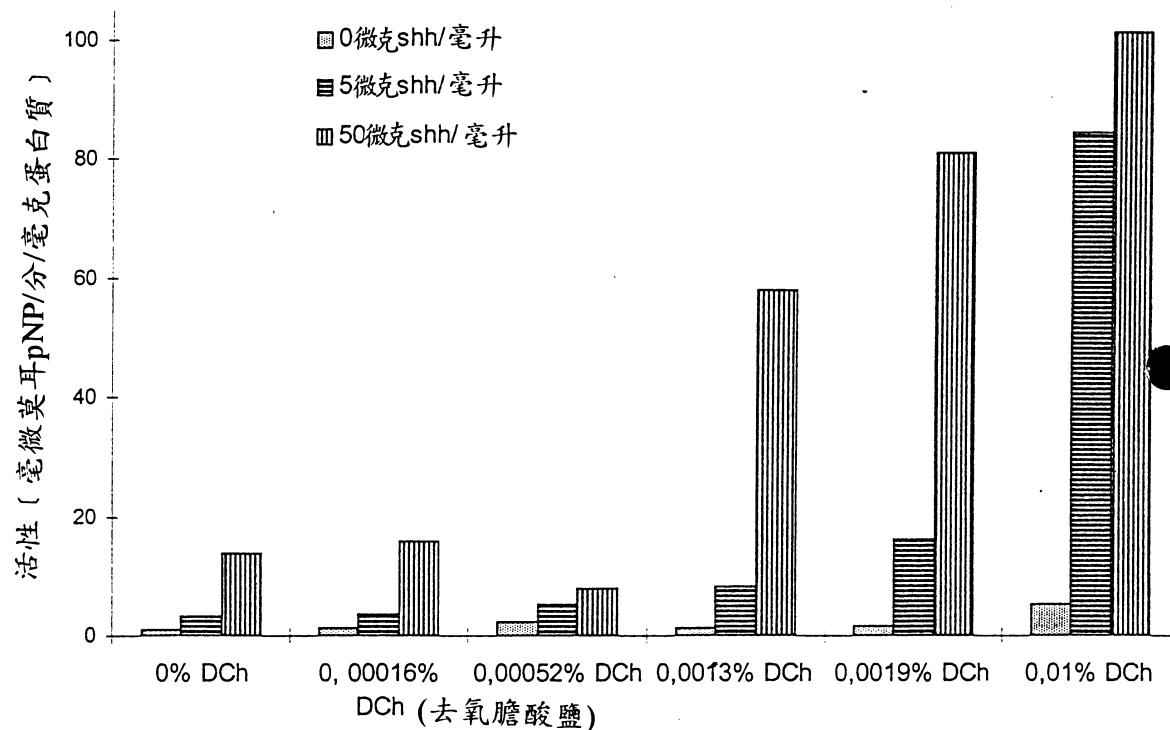


圖 1

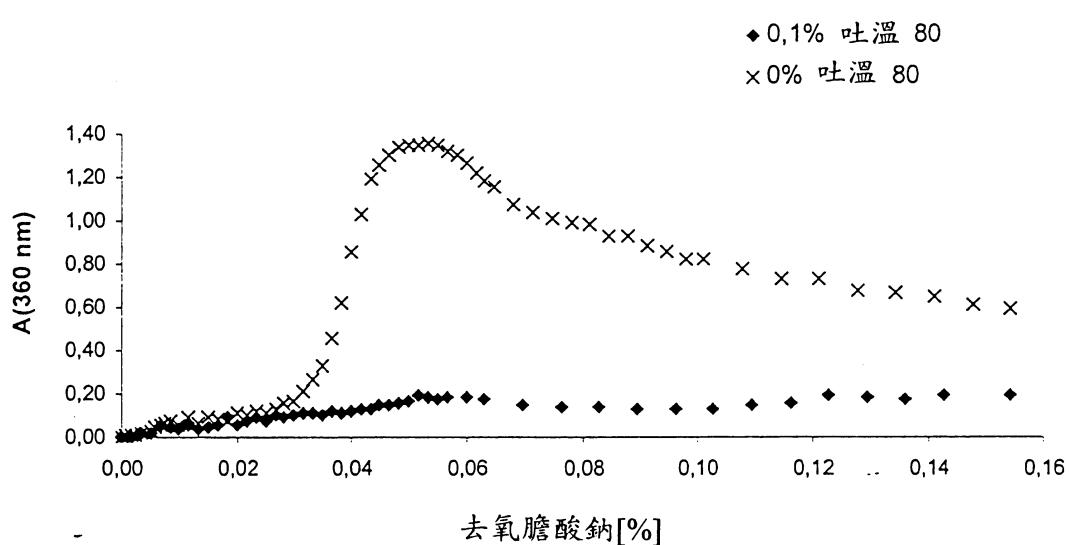
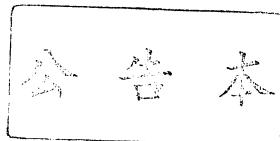


圖 2



申請日期	88.8.18
案 號	088114073
類 別	A61K 47/48

A4
C4

570805

中文說明書替換頁(92年9月)

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、發明 新型 名稱	中 文	離子錯合物中之水溶性醫藥組合物
	英 文	“WATER-SOLUBLE PHARMACEUTICAL COMPOSITION IN AN IONIC COMPLEX”
二、發明 創作人	姓 名	亞玻璃 帕帕迪米楚
	國 稷	德國
	住、居所	德國畢契爾市貝契街38a號
三、申請人	姓 (名 稱)	瑞士商赫孚孟拉羅股份公司
	國 稷	瑞士
	住、居所 (事務所)	瑞士貝士勞市格蘭山查街124號
代表人 姓 名	1. 菲杜林. 克勞士納 2. 羅蘭. 包爾	

裝
訂
線

五、發明說明 (13)

，其局部性骨生長發生在所要的作用位置上，或當該多勝肽為一種腫瘤致死劑(tumoricidal agent)時所引發之自動死之效應。當該錯合物由作用點擴散之後，該錯合物在生理條件下被稀釋而擴散到作用點以外，因此導致錯合物之分解。此結果導致該錯合多勝肽濃度之降低和非錯合多勝肽濃度之提昇。由於非錯合多勝肽之活性比錯合多勝肽之活性明顯的小，在作用點以外的部分其療效亦降低。

本發明進一步之主題係有關根據本發明之醫藥組合物在人類之局部應用之使用，其特徵為該錯合物之投藥量為之可展現相對應於其療效劑量之活性該錯合多勝肽的，其中相同量之非錯合型多勝肽則展現 20% 或更少的療效劑量活性。

本發明進一步的主題係有關作為人類局部投藥之醫藥組合物之製備過程，其特徵為醫藥上有效之多勝肽與兩性化合物經離子交互作用所形成之錯合物作為基本成份，其中該成份以可惡化該醫藥上有效之多勝肽的水溶解度的濃度存在，並且該錯合物之投藥量為可展現相對應於其療效劑之活性之該錯合多勝肽之量，但相同量之非錯合型多勝肽則展現 20% 或更少的療效劑量活性。

下列實例，出版物及圖形進一步闡述本發明，其保護之範圍則來自申請專利範圍。頃了解所描述之方法係以實例提及，即使經過修飾之後仍可適用於敘述本發明之主題。

實例 1

五、發明說明 (14)

細胞測試中不同刺蝟狀蛋白質配方之分析：鹼性磷酸酶之引發

在 96 洞微滴定盤的每個洞中放入 5000 個來自鼠科間葉 pluripotent 細胞系 C3H10T1/2 (ATCC CCL-226) 之細胞。將該等細胞放置於含 DMEM，2 毫莫耳濃度穀醯胺酸，100 IU 盤尼西尼 / 毫升，100 微克鏈黴素 / 毫升和 10% 之胎牛血清的培養基中。第二天，以不同濃度配方 (分別含 0, 0.00016, 0.00052, 0.0013, 0.0019 或 0.01% 之去氫膽酸鈉) 包含人類 shh (0.5 或 50 微克 / 毫升) 的培養基取代原來之培養基，或者直接加入不同配方之刺蝟狀蛋白質。該測試在 5 天後停止。倒掉上清液後以 PBS 清洗細胞一次。使用 50 微升之 0.1% 氣核表面活化劑 (商品名) X-100 溶解細胞並冷凍在 -20°C 之下。解凍之後取 25 微升之分量係蛋白質定量以及測量鹼性磷酸酶之活性之用。

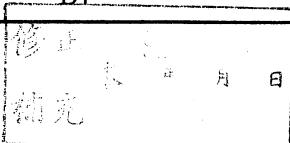
根據廠商皮爾斯 (Pierce) 之指示所進行之蛋白質定量：

將 75 微升之再蒸餾水加入混合物中，接著加入 100 微升之 BCA 蛋白質試劑 (皮爾斯，微 BCA，No. 23225)。60 分鐘之後在 550 毫微米吸收光之下測量其吸收值。

根據廠商 Sigma 之指示測該鹼性磷酸酶之活性：

將 100 微升之反應緩衝劑 (Sigma 221) 加入該混合物中。將一個受質膠囊 (sigma 104-40) 溶於 10 毫升之水中，以吸量管取 100 微升之受質溶液至該測試混合物之中。在 405 毫微米吸收光之下測量其吸收值。在反應時，鹼性磷酸酶將 P- 磷

五、發明說明 (15)



酯硝基苯酯轉化成P-硝基苯酚(pNP)。經由標準曲線法將所測得的吸收值轉換成pNP之毫微莫耳數。

不同配方之刺蝟狀蛋白質之活性以每毫克蛋白質，每分鐘所產生之毫微莫耳濃度之pNP的方式繪成圖1。該圖顯示，在相同的蛋白質濃度之下，所測試的刺蝟狀蛋白質配方之活性隨去氧膽酸鹽的濃度上升而明顯地上升。

實例2

hshh(二聚物)之厭氣性離子對之滴定

將重組人類速刺蝟狀蛋白質(二聚物，0.8毫克/毫升於50毫莫耳濃度Tris-Cl, pH 7.4或於0.1%吐溫80劑，50毫莫耳濃度Tris-Cl, pH 7.4中)與逐漸提昇濃度的去氧膽酸鈉混合。測量在360毫微米吸收光的吸收值作為濁度指標(包含離子性蛋白條一洗滌劑錯合物的不溶性集團之形成)。由圖2清楚可見發生在Ca 0.04%去氧膽酸鈉以上的不溶性集團的轉變過程。不溶性集團之形成可因0.1%之吐溫80之存在而大力避免掉。該吸收值底線不因稀釋而被修正。

實例3

NGF配方在生物活性檢定之分析：脊髓背根神經節神經發展之檢定

經由脊髓背根神經節(DRG)之活體外神經發展的形態測定分析測定NGF的生物活性。簡言之，自E7-E8雞胚解剖的腰部DGF，去除周圍的結締組織並且經由火燒的光滑的玻璃吸管予以碾製分解，接著在37°C之下以0.1%胰蛋白酶分

裝
訂
線

五、發明說明 (24)

pH	6.0
人類NGF	2毫克/毫升
乙酸鈉緩衝液	100毫莫耳/升
磷脂	0.01%(重量/體積)
pH	6.0
人類NGF	1毫克/毫升
乙酸鈉緩衝液	100毫莫耳/升
去氧牛磺膽酸鈉	0.05%(重量/體積)
pH	6.0

實例 10

含刺蝟狀蛋白質之藻朊酸鹽凝膠之製備

取 1 等分實例 4.1 的配方水溶液，加入水性藻朊酸鈉儲備溶液 (1% 重量 / 體積) (Pronova Biopolymer, 挪威)，以可形成膠狀藻朊酸鹽蛋白質混合物的方式攪拌。取 0.05 至 2 毫升該凝膠直接用作可注射之基質。

實例 11

含 BMP-2 之膠原蛋白混合物之製備

將 100 微升之實例 6 之配方水溶液一滴一滴地加至大小為 $10 \times 10 \times 3$ 毫米的膠原蛋白海棉體 (Helistat, Integra Life Science, 美國)。將該裝載載劑予以冷凍 (-70°C) 並乾燥。該海棉體及局部使用作為骨折之癒合之用。

圖式簡要說明

圖 1. 顯示在提高去氧膽酸鹽 (deoxycholate) 濃度的條件之下，以 shh 測試引發細胞中鹼性磷酸酶之相關性。

圖 2. 顯示集團形成與去氧膽酸鹽濃度之相關性。

四、中文發明摘要（發明之名稱：離子錯合物中之水溶性醫藥組合物）

一種水溶性組合物，其包含選自由刺蝟狀蛋白質，骨形態發生蛋白質，生長因子，促紅血球生成素，促血小板生成素，G-CSF，介百素和干擾素所組成族群中之醫藥上有效之多胜肽離子錯合物，其特徵為該組合物另外包含一種兩性化合物，該多胜肽及該兩性化合物形成一種離子錯合物，所形成之離子錯合物不會加強該多胜肽之溶解度，但適於提昇該多胜肽之活性及/或延遲其釋放。

英文發明摘要（發明之名稱：“WATER-SOLUBLE PHARMACEUTICAL COMPOSITION IN AN IONIC COMPLEX”）

A water-soluble composition containing a complex of an ionic pharmaceutically effective polypeptide selected from the group consisting of hedgehog proteins, bone morphogenetic proteins, growth factors, erythropoietin, thrombopoietin, G-CSF, interleukins and interferons, characterized in that said composition contains, in addition, an amphiphilic compound, said polypeptide and said amphiphilic compound forming an ionic complex, whereby the forming of the complex does not enhance the solubility of said polypeptide, is suitable for increasing the activity of the polypeptide and/or for the delayed release of the polypeptide.

六、申請專利範圍



1. 一種用於增進活性之離子錯合物水性組合物，其包含選自由刺蝟狀蛋白質，骨型態發生蛋白質，生長因子，促紅血球生成素，促血小板生成素，G-CSF，介白素和干擾素所組成族群中之醫藥上有效之多胜肽，其特徵為該組合物包含，加上，選自由如去氧膽酸鹽、膽酸鹽、牛磺膽酸鹽、牛磺去氧膽酸鹽及脫氫膽酸鹽之陰離子表面活化劑，3[(3-膽醯胺基丙基)二甲基氨基]-1-丙烷磺酸(CHAPS)及N-十二烷基-N,N-二甲基-3-胺基-1-丙烷磺酸(Zwittergent®)之兩性表面活化劑，1-溴十六烷基三甲基銨及1-氯十二烷基銨之陽離子洗滌劑，棕櫚酸之脂肪酸，癸基磺酸鹽之烷基磺酸鹽，及磷脂醯絲氨酸及磷脂酯之脂質所組成之群之兩性化合物以外，該多胜肽及該兩性化合物形成離子錯合物，因此所形成之錯合物不會如同非錯合多胜肽加強溶解度，且其中該組合物的pH值與該多胜肽及表面活性劑的pK值相差至少半個pH單位。
2. 根據申請專利範圍第1項之組合物，其為冷凍乾燥型。
3. 根據申請專利範圍第2項之組合物，其中該錯合物固定在生物相容性載劑之上。
4. 根據申請專利範圍第3項之組合物，其中該錯合物存在於一種溶解及沈澱型混合物之中。
5. 根據申請專利範圍第1至4項中任一項之組合物，其中

裝訂

六、申請專利範圍

該多勝肽為刺蝟狀蛋白質。

6. 根據申請專利範圍第1至4項中任一項之組合物，其中該兩性化合物為去氧膽酸鹽。
7. 一種作為人類局部應用之醫藥組合物之製備方法，其中選自由刺蝟狀蛋白質，骨型態發生蛋白質，生長因子，促紅血球生長因子，促血小板生長因子，G-CSF，介白素及干擾所組成族群中之醫藥上有效之多勝肽和兩性化合物經由離子交互作用而形成之錯合物被用作基本組成分，其中輔助化合物以不增強該多勝肽之水溶解度之濃度存在，且該兩性化合物係選自由如去氧膽酸鹽、膽酸鹽、牛磺膽酸鹽、牛磺去氧膽酸鹽及脫氫膽酸鹽之陰離子表面活化劑，3[(3-膽醯胺基丙基)二甲基氨基]-1-丙烷磺酸(CHAPS)及N-十二烷基-N,N-二甲基-3-氨基-1-丙烷磺酸(Zwittergent®)之兩性表面活化劑，1-溴十六烷基三甲基銨及1-氯十二烷基銨之陽離子洗滌劑，棕櫚酸之脂肪酸，如癸基磺酸鹽之烷基磺酸鹽，及磷脂醯絲氨酸及磷脂酯之脂質所組成之群。
8. 根據申請專利範圍第7項之方法，其特徵為該錯合物固定在一種生物相容性載劑之上。

裝訂線