



(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 I845678 B

(45) 公告日：中華民國 113 (2024) 年 06 月 21 日

(21) 申請案號：109115849

(22) 申請日：中華民國 109 (2020) 年 05 月 13 日

(51) Int. Cl. :

A61K8/19 (2006.01)

A61K35/618 (2015.01)

A61P17/00 (2006.01)

A61K33/06 (2006.01)

A61K8/98 (2006.01)

A61Q19/08 (2006.01)

(30) 優先權：2019/05/13 法國

1904913

(71) 申請人：模里西斯商 MB P (模里西斯) 有限公司 (模里西斯) MBP (MAURITIUS) LTD.  
(MU)

模里西斯

(72) 發明人：康普拉斯 瑟杰 CAMPRASSE, SERGE (FR) ; 康普拉斯 喬治 CAMPRASSE,  
GEORGES (FR)

(74) 代理人：許世正

(56) 參考文獻：

FR 3037801A1

WO 99/52940A1

審查人員：蔡明秀

申請專利範圍項數：11 項 圖式數：0 共 60 頁

(54) 名稱

純化包含於海洋雙殼軟體動物的貝殼的有機礦物層中的分子的方法、包含此分子的組合物及其用途

(57) 摘要

本發明係一種方法，包含同時及/或依序的步驟，用於分離、萃取及/或純化在海洋雙殼軟體動物的貝殼的霰石有機礦物內層與方解石有機礦物外層中所含之全部或部分成分的步驟。

The present invention is a process comprising simultaneous and/or sequential steps for separating, extracting and/or isolating all or part of the components contained in the inner aragonitic organo-mineral layer and in the outer calcitic organo-mineral layer of the shells of marine bivalve molluscs.



I845678

**【發明摘要】****公告本**

**【中文發明名稱】** 純化包含於海洋雙殼軟體動物的貝殼的有機礦物層中的分子的方法、包含此分子的組合物及其用途

**【英文發明名稱】** PROCESS FOR ISOLATING MOLECULES CONTAINED IN THE ORGANO-MINERAL LAYERS OF THE SHELLS OF MARINE BIVALVE MOLLUSCS, COMPOSITION COMPRISING THE MOLECULES, AND USE THEREOF

**【中文】**

本發明係一種方法，包含同時及/或依序的步驟，用於分離、萃取及/或純化在海洋雙殼軟體動物的貝殼的霏石有機礦物內層與方解石有機礦物外層中所含之全部或部分成分的步驟。

**【英文】**

The present invention is a process comprising simultaneous and/or sequential steps for separating, extracting and/or isolating all or part of the components contained in the inner aragonitic organo-mineral layer and in the outer calcitic organo-mineral layer of the shells of marine bivalve molluscs.

**【指定代表圖】** 無。

**【代表圖之符號簡單說明】**

無。

【特徵化學式】

無。

**【發明說明書】**

**【中文發明名稱】** 純化包含於海洋雙殼軟體動物的貝殼的有機礦物層中的分子的方法、包含此分子的組合物及其用途

**【英文發明名稱】** PROCESS FOR ISOLATING MOLECULES CONTAINED IN THE ORGANO-MINERAL LAYERS OF THE SHELLS OF MARINE BIVALVE MOLLUSCS, COMPOSITION COMPRISING THE MOLECULES, AND USE THEREOF

**【技術領域】**

**【0001】** 本發明係關於同時及/或依序實施分離、萃取及/或純化在海洋雙殼軟體動物 (marine bivalve molluscs) 的貝殼的霰石有機礦物內層與方解石有機礦物外層中所含之全部或部分成分的步驟，海洋雙殼軟體動物例如：白蝶真珠蛤 (Pinctada Maxima)、黑蝶真珠蛤 (Pinctada Margaritifera)、Pinctada Martensi、阿古屋貝 (Pinctada Fucata)，以及巨碑磔蛤 (Tridacnae Gigas)、長碑磔蛤 (Tridacnae Maxima)、菱碑磔蛤 (Tridacnae Hippopus Hippopus)、扇碑磔蛤 (Tridacnae Derasa)、魔鬼碑磔蛤 (Tridacnae Tevaroa)、圓碑磔蛤 (Tridacnae Crocea)、鱗碑磔蛤 (Tridacnae Squamosa)、Tridacnae Porcelanus。這些萃取成分的結合或重組可使用於醫療器材的配方及治療導向的製劑，以用於骨科手術 (orthopaedic surgery)、微創手術 (minimally invasive surgery)、口腔及顎面手術 (stomatology and maxillofacial surgery)、皮膚

學（dermatology）、美容醫學（aesthetic medicine）及護膚品（dermocosmetics）。

【先前技術】

【0002】 如上所述之軟體動物的貝殼的霰石有機礦物內層之結構及物理化學組成包含兩個部分：礦物部分及有機部分。礦物部分由霰石生物晶體（aragonite biocrystal）組成，霰石生物晶體為準穩定（metastable）、多型（polymorphic）、生物（biogenic）型態且結晶成斜方晶系（orthorhombic system）的碳酸鈣；有機部分主要由蛋白質及非蛋白質成分、色素（黑色素、 $\beta$ 胡蘿蔔素等）、脂肪酸及總脂質組成，尤其是多不飽和脂肪酸。

【0003】 相同軟體動物的貝殼的方解石有機礦物外層亦由礦物部分及有機部分組成。礦物部分由方解石稜鏡組成（prisms of calcite），方解石稜鏡為另一多型型態且結晶成菱形晶系（rhombohedral system）的碳酸鈣；有機部分亦由可溶及不可溶的蛋白質及非蛋白質成分、色素及金屬組成。在與卟啉及酵素相關的金屬以及黑色素的含量方面，方解石有機礦物外層較霰石有機礦物內層更豐富。

【0004】 一般而言，如上所述之軟體動物的貝殼的霰石有機礦物內層與方解石有機礦物外層中所包含之活性分子，係透過冷水解（cold hydrolysis）萃取出蛋白質及非蛋白質成分。這些成分為可溶及不可溶的生物聚合物，生物聚合物包含蛋白質、多肽及多醣，以及生物單體、胺基酸及單醣。這些成分在生物上及藥

學上具有多種骨誘導 (osteogenic) 及治癒的性質。這些性質源自於與生長因子相關的醣蛋白的存在。然而，習知上用於萃取這些分子的方法不能萃取所有分子，特別是具有感興趣之性質的低分子量的分子，主要為抗仿生劑 (antibiomimetics)，例如醣胺，以及脂質及多不飽和脂肪酸，且別忘了還有色素、金屬酶及金屬卟啉。如上所述之軟體動物的貝殼的霰石有機礦物內層的有機部分已知除了其他之外，包含脂肪酸及總脂質 (軟脂酸、硬脂酸)；其為富含比例為 0.2% 至 3% 的多不飽和脂肪酸的天然海洋生物材料。這些大多為以羥化及非羥化的腦醯胺 (ceramides)、硫酸膽固醇、乙酸膽固醇、三酸甘油酯及 omega-3 脂肪酸為代表的極性及非極性化合物。

**【0005】** 已知脂肪酸具有抗發炎及免疫的特性，在某些腫瘤發展過程、類風濕性關節炎及自體免疫疾病中具有抑制的功能，這些脂質及脂肪酸可誘導絲聚蛋白 (filaggrin) 的過度表達，絲聚蛋白為皮膚表層的蛋白質且具有抑制膜轉麩醯胺酸酶 (membrane transglutaminase) 的特性 (涉及某些皮膚病的一組不可溶蛋白質聚合物)，因此可理解他們用於治療目的之製備的配方的優勢。

#### **【發明內容】**

**【0006】** 為此，需要一種方法以優化海洋雙殼軟體動物的貝殼的霰石有機礦物內層與方解石有機礦物外層中所包含之分子的純化。

**【0007】** 多虧了發明人，他們已透過一種方法回應此需求，此

方法可實施一連串的機械、聲學、物理及化學步驟以優化貝殼的霰石有機礦物內層與方解石有機礦物外層中所包含之分子的分離、純化及物理化學反應性，並加強其特性。

**【0008】** 因此，本發明之第一標的係純化包含於海洋雙殼軟體動物的貝殼的霰石有機礦物層及/或方解石有機礦物層中之分子的方法，此方法包含下列步驟：

(a) 研磨步驟，研磨霰石有機礦物層及/或方解石有機礦物層以獲得霰石粉末及/或方解石粉末；

(b) 熱滲濾步驟，對霰石粉末及/或方解石粉末進行熱滲濾以獲得：

一方面，飽和霰石溶液及/或飽和方解石溶液，飽和霰石溶液包含霰石液相及霰石固相，飽和方解石溶液包含方解石液相及方解石固相，以及

另一方面，霰石滲濾粉末及/或方解石滲濾粉末；

(c) 分離步驟，分離飽和霰石溶液及/或飽和方解石溶液以獲得：

一方面，霰石液相及/或方解石液相，以及

另一方面，霰石固相及/或方解石固相；以及

(d) 超臨界二氧化碳處理步驟，使用超臨界二氧化碳處理霰石滲濾粉末及/或方解石滲濾粉末以獲得：

一方面，經超臨界二氧化碳處理過的霰石粉末及/或經超臨界二氧化碳處理過的一方解石粉末，

另一方面，包含於該霰石有機礦物層及/或方解石有機礦物層中之全部或部分的多個可溶性分子。

**【0009】** 為了本發明之目的，「經超臨界二氧化碳處理過的霰石粉末」係指已去除包含於霰石有機礦物層的全部或部分可溶性分子的粉末。

**【0010】** 為了本發明之目的，「經超臨界二氧化碳處理過的方解石粉末」係指已去除包含於方解石有機礦物層的全部或部分可溶性分子的粉末。

**【0011】** 取決於生產物之方法，海洋雙殼軟體動物可選自白蝶真珠蛤 (*Pinctada Maxima*)、黑蝶真珠蛤 (*Pinctada Margaritifera*)、*Pinctada Martensi*、阿古屋貝 (*Pinctada Fucata*)、巨碑磔蛤 (*Tridacnae Gigas*)、長碑磔蛤 (*Tridacnae Maxima*)、菱碑磔蛤 (*Tridacnae Hippopus Hippopus*)、扇碑磔蛤 (*Tridacnae Derasa*)、魔鬼碑磔蛤 (*Tridacnae Tevaroa*)、圓碑磔蛤 (*Tridacnae Crocea*)、鱗碑磔蛤 (*Tridacnae Squamosa*)、*Tridacnae Porcelanus* 及其混合物。

**【0012】** 根據一實施例，在研磨步驟 (a) 之前，貝殼可先經過碾磨步驟以獲得：一方面，霰石有機礦物層，以及另一方面，方解石有機礦物層。在碾磨步驟之前可任選地進行貝殼預處理步驟，預處理步驟選自清潔、超音波處理、沖洗、殺菌、乾燥、浸漬於等張浴 (*isotonic bath*) 及其組合。

**【0013】** 根據一實施例，於碾磨步驟中所獲得及/或於研磨步



驟 (a) 中所使用之方解石有機礦物層可為粉末狀，並可具有介於 2 毫米與 500 微米之間的粒度 (particle size)。

【0014】 根據一具體實施例，可由行星式研磨 (planetary grinding) 進行研磨步驟 (a)。

【0015】 根據一更具體實施例，研磨步驟 (a) 的行星式研磨可包含一或多個循環，尤其是兩個循環。舉例而言，各行星式研磨循環可由乾式方法 (dry method) 或濕式方法 (wet method) 進行，尤其是第一研磨循環可由乾式方法進行，第二研磨循環可由濕式方法進行。

【0016】 根據一實施例，研磨步驟 (a) 可由以下步驟進行：  
使霰石有機礦物層及/或方解石有機礦物層破碎以獲得破碎的霰石粉末及/或破碎的方解石粉末，接著  
研磨破碎的霰石粉末及/或破碎的方解石粉末以獲得霰石粉末及/或方解石粉末。

【0017】 根據一具體實施例，研磨破碎的霰石粉末及/或破碎的方解石粉末可由如上所述之行星式研磨進行。

【0018】 根據一實施例，破碎的霰石粉末及/或破碎的方解石粉末可具有介於 10 微米與 2 毫米之間的粒度。

【0019】 根據一實施例，於研磨步驟 (a) 中所獲得的霰石粉末及/或方解石粉末可具有介於 50 奈米與 300 微米之間的粒度。

【0020】 根據一實施例，熱滲濾步驟 (b) 可藉由濕篩方式 (wet sieving) 使用一液體來進行，此液體的溫度大於 30°C，尤其是從

35°C 至 75°C，尤其是從 40°C 至 50°C。

【0021】 根據一實施例，熱滲濾步驟（b）中所使用的液體為水溶液，尤其是包含甲醇的水溶液、包含尿素溶液的水溶液或其混合物。

【0022】 根據一具體實施例，水溶液可包含 1% 至 10% 的甲醇，尤其是 2% 至 7% 的甲醇，更尤其是 4.5% 至 5.5% 的甲醇。

【0023】 根據一具體實施例，熱滲濾步驟（b）可使用搖篩器進行，搖篩器包含：

蓋子，配有開口以容納用於液體進入的管子，

多個篩網，用以收集霰石滲濾粉末及/或方解石滲濾粉末，尤其是 2 至 10 個篩網，更尤其是 5 至 7 個篩網，甚至更尤其是 6 個篩網，兩個連續篩網的孔洞的孔徑在液體流動的方向上減少，

收集用底部，配有導管以收集飽和霰石溶液及/或飽和方解石溶液。

【0024】 根據一更具體實施例，搖篩器可包含 6 個篩網，這些篩網在液體流動的方向上具有 315 微米、250 微米、125 微米、45 微米、20 微米及 10 微米之孔徑。

【0025】 根據一實施例，霰石滲濾粉末及/或方解石滲濾粉末的粒度可大於在搖篩器的篩徑之中具有最小直徑的孔徑，尤其是粒度大於 10 微米，更尤其是 10 微米至 300 微米之粒度。

【0026】 根據一實施例，飽和霰石溶液的霰石液相可包含霰石有機礦物層中所包含之水溶性分子及脂溶性分子。

【0027】 根據一實施例，飽和霰石溶液的霰石固相可包含：

霰石有機礦物層所包含之不可溶分子，例如不可溶蛋白質及非蛋白質分子，以及

粉末，此粉末的粒度小於或等於在搖篩器的篩徑之中直徑為最小的孔徑，尤其是具有小於或等於 10 微米的粒度，尤其是從 50 奈米至 10 微米。

【0028】 根據一發明，飽和方解石溶液的方解石液相可包含方解石有機礦物層所包含之水溶性分子及脂溶性分子。

【0029】 根據一實施例，飽和方解石溶液的方解石固相可包含：

方解石有機礦物層所包含之不可溶分子，例如不可溶蛋白質及非蛋白質分子，以及

粉末，此粉末的粒度小於或等於在搖篩器的篩徑之中直徑為最小的孔徑，尤其是其粒度小於或等於 10 微米，尤其是從 50 奈米至 10 微米。

【0030】 根據一實施的較佳實施例，分離步驟（c）可藉由離心來進行，回收的液相稱為上清液，回收的固相稱為沉澱物。

【0031】 根據一實施例，霰石沉澱物粉末及/或方解石沉澱物粉末，尤其是霰石沉澱物粉末可經過球型化步驟（spheronisation step）。

【0032】 根據一實施例，霰石沉澱物及/或方解石沉澱物，尤其是方解石沉澱物，可經過超臨界二氧化碳處理步驟（d）。

【0033】 根據一實施例，超臨界二氧化碳處理步驟（d）可在包含以下元件的設備中實施：

用於氣態二氧化碳的入口及儲存槽，  
用於將氣態二氧化碳轉變成液態二氧化碳的冷凝器，  
液態二氧化碳儲存槽，  
用於將液態二氧化碳轉變成超臨界二氧化碳的熱轉換器，  
發生可溶性分子的萃取的反應器，以及  
一或多個萃取器。

【0034】 於超臨界二氧化碳處理步驟（d）所獲得的可溶性分子屬於可溶性聚合物、可溶性脂肪酸、可溶性脂質、可溶性色素及其混合物之中的一或多種。

【0035】 本申請案發明人所申請之 FR3037801 中所揭露的可溶性生物聚合物萃取步驟並不能獲得可溶性脂肪酸、脂質及色素。

【0036】 根據一具體實施例，經超臨界二氧化碳處理過的霰石粉末的粒度小於或等於霰石滲濾粉末的粒度，尤其是等於霰石滲濾粉末的粒度。

【0037】 根據一具體實施例，經超臨界二氧化碳處理過的方解石粉末的粒度小於或等於方解石滲濾粉末的粒度，尤其是等於方解石滲濾粉末的粒度。

【0038】 根據一具體實施例，在藉由離心進行分離步驟（c）之後，純化方法可包含下列步驟：

(e) 過濾步驟，過濾霰石上清液及/或方解石上清液以獲得經過過濾的霰石上清液及/或經過過濾的方解石上清液；

(f) 濃縮步驟，將經過過濾的霰石上清液及/或經過過濾的方解石上清液濃縮以獲得霰石濃縮物及/或方解石濃縮物；

(g) 超音波步驟，對霰石濃縮物及/或方解石濃縮物進行超音波處理以獲得霰石膠體乳液及/或方解石膠體乳液。

**【0039】** 根據一實施例，過濾步驟(e)可在矽藻土床(Celite bed)或膜上進行。

**【0040】** 根據一實施例，霰石濃縮物及/或方解石濃縮物可包含選自錳、鐵、鋅、鋇、鋇、鎂、銅、鋁、鎳、鈳、鉻、鉬及其混合物之至少一金屬。

**【0041】** 根據一實施例，可使用音極(sonotrode)以介於0千赫與200千赫之間的頻率進行超音波步驟(g)。

**【0042】** 根據一實施例，在超臨界二氧化碳處理步驟(d)之後，此方法可包含以下步驟：

(h) 冷酸水解步驟，將經超臨界二氧化碳處理過的霰石粉末及/或經超臨界二氧化碳處理過的方解石粉末進行冷酸水解，以萃取存在於經超臨界二氧化碳處理過的霰石粉及/或經超臨界二氧化碳處理過的方解石粉末中的多個不可溶分子；以及

(i) 清洗與高速離心步驟，清洗並高速離心以純化並回收不可溶分子。

**【0043】** 在冷酸水解步驟(h)及清洗與高速離心步驟(i)的

過程中所回收的不可溶分子為來自不可溶生物聚合物、不可溶有機色素及其混合物的一或多種。

**【0044】** 根據一實施例，冷酸水解步驟（h）可在以下條件進行：

在低於 10°C 下，尤其是低於 5°C，更尤其是介於 1°C 與 4°C 之間，以及

使用包含乙酸的水溶液，其 pH 為酸性，尤其是 6 以下，更尤其是 4.5 以下。

**【0045】** 根據一具體實施例，冷酸水解步驟（h）及清洗與高速離心步驟（i）可進行一次或多次。

**【0046】** 根據一實施例，接著可將回收的不可溶分子乾燥以獲得不可溶分子的乾燥萃取物。

**【0047】** 根據一更具體實施例，分別對霰石有機礦物層及方解石有機礦物層進行研磨步驟（a）以獲得霰石粉末及方解石粉末。

**【0048】** 根據一更具體實施例，分別對霰石粉末及方解石粉末進行熱滲濾步驟（b）以獲得：

一方面，飽和霰石溶液，另一方面，霰石滲濾粉末，以及

一方面，飽和方解石溶液，另一方面，方解石滲濾粉末。

**【0049】** 根據一更具體實施例，分別對飽和霰石溶液及飽和方解石溶液進行分離步驟（c）以回收：

一方面，霰石液相，另一方面，霰石固相，以及

一方面，方解石液相，另一方面，方解石固相。

**【0050】** 根據一更具體實施例，藉由離心分別對飽和霰石溶液及飽和方解石溶液進行分離步驟（c）以回收：

一方面，霰石上清液，另一方面，霰石沉澱物，以及  
一方面，方解石上清液，另一方面，方解石沉澱物。

**【0051】** 根據一更具體實施例，分別對霰石滲濾粉末及方解石滲濾粉末與方解石沉澱物的混合物進行超臨界二氧化碳處理步驟（d）。

**【0052】** 根據一具體實施例：

分別對霰石有機礦物層及方解石有機礦物層進行研磨步驟（a）以獲得霰石粉末及方解石粉末；

分別對霰石粉末及方解石粉末進行熱滲濾步驟（b）以獲得：

一方面，飽和霰石溶液，另一方面，霰石滲濾粉末，以及  
一方面，飽和方解石溶液，另一方面，方解石滲濾粉末；

藉由離心分別對飽和霰石溶液及飽和方解石溶液進行分離步驟（c）以回收：

一方面，霰石上清液，另一方面，霰石沉澱物，以及

一方面，方解石上清液，另一方面，方解石沉澱物；以及

分別對霰石滲濾粉末及方解石滲濾粉末與方解石沉澱物的混合物進行超臨界二氧化碳處理步驟（d）。

**【0053】** 根據一更具體實施例，分別對霰石上清液及方解石上清液進行過濾步驟（e）以獲得經過濾的霰石上清液及經過濾的方解石上清液。

【0054】 根據一更具體實施例，對經過濾的霰石上清液與經過濾的方解石上清液的混合物進行濃縮步驟（f）以獲得濃縮混合物。

【0055】 根據一更具體實施例，對濃縮混合物進行超音波步驟（g）以獲得膠體乳液混合物。

【0056】 根據一更具體實施例，對經超臨界二氧化碳處理過的霰石粉末與經超臨界二氧化碳處理過的方解石粉末的混合物進行冷酸水解步驟（h），以自經超臨界二氧化碳處理過的霰石粉末與經超臨界二氧化碳處理過的方解石粉末的混合物中萃取出不可溶分子。

【0057】 根據一更具體實施例，進行清洗與高速離心步驟（i），以純化並回收在冷酸水解步驟（h）中自經超臨界二氧化碳處理過的霰石粉末與經超臨界二氧化碳處理過的方解石粉末的混合物中萃取出的不可溶分子。

【0058】 根據一具體實施例：

分別對霰石上清液及方解石上清液進行過濾步驟（e）以獲得經過濾的霰石上清液及經過濾的方解石上清液；

對經過濾的霰石上清液與經過濾的方解石上清液的混合物進行濃縮步驟（f）以獲得濃縮混合物；

對濃縮混合物進行超音波步驟（g）以獲得膠體乳液混合物；

對經超臨界二氧化碳處理過的霰石粉末與經超臨界二氧化碳處理過的方解石粉末的混合物進行冷酸水解步驟（h），以自經超



臨界二氧化碳處理過的霰石粉末與經超臨界二氧化碳處理過的方解石粉末的混合物中萃取出不可溶分子；以及

進行清洗與高速離心步驟（i），以純化並回收在冷酸水解步驟（h）中自經超臨界二氧化碳處理過的霰石粉末與經超臨界二氧化碳處理過的方解石粉末的混合物中萃取出的不可溶分子。

**【0059】** 根據一具體實施例：

分別對霰石有機礦物層及方解石有機礦物層進行研磨步驟（a）以獲得霰石粉末及解石粉末；

分別對霰石粉末及方解石粉末進行熱滲濾步驟（b）以獲得：

一方面，飽和霰石溶液，另一方面，霰石滲濾粉末，以及

一方面，飽和方解石溶液，另一方面，方解石滲濾粉末；

藉由離心分別對飽和霰石溶液及飽和方解石溶液進行分離步驟（c）以回收：

一方面，霰石上清液，另一方面，霰石沉澱物，以及

一方面，方解石上清液，另一方面，方解石沉澱物；

分別對霰石滲濾粉末及方解石滲濾粉末與方解石沉澱物的混合物進行超臨界二氧化碳處理步驟（d）；

分別對霰石上清液及方解石上清液進行過濾步驟（e）以獲得經過濾的霰石上清液及經過濾的方解石上清液；

對經過濾的霰石上清液與經過濾的方解石上清液的混合物進行濃縮步驟（f）以獲得濃縮混合物；

對濃縮混合物進行超音波步驟（g）以獲得膠體乳液混合物；

對經超臨界二氧化碳處理過的霰石粉末與經超臨界二氧化碳處理過的方解石粉末的混合物進行冷酸水解步驟（h），以自經超臨界二氧化碳處理過的霰石粉末與經超臨界二氧化碳處理過的方解石粉末的混合物中萃取出不可溶分子；以及

進行清洗與高速離心步驟（i），以純化並回收在冷酸水解步驟（h）中自經超臨界二氧化碳處理過的霰石粉末與經超臨界二氧化碳處理過的方解石粉末的混合物中萃取出的不可溶分子。

**【0060】** 根據一具體實施例，本發明之純化方法可獲得：

在分離步驟（c）的過程中所回收的霰石固相及/或方解石固相，霰石固相及/或方解石固相可能經球型化，

在超臨界二氧化碳處理步驟（d）中所獲得的可溶性分子，尤其是屬於可溶性聚合物、可溶性脂肪酸、可溶性脂質、可溶性色素及其混合物之中的一或多種，

在超音波步驟（g）中所獲得的霰石膠體乳液及/或方解石膠體乳液，或者

在冷酸水解步驟（h）及清洗與高速離心步驟（i）的過程中所回收的不可溶分子，尤其是來自不可溶生物聚合物、不可溶脂肪酸、不可溶脂質、不可溶色素及其混合物的一或多種。

**【0061】** 根據一具體實施例，本發明之純化方法可獲得：

在分離步驟（c）的過程中所回收的霰石固相，霰石固相選擇性經球型化，

在超音波步驟（g）中所獲得的膠體乳液混合物，

在超臨界二氧化碳處理步驟（d）中所獲得的可溶性分子，尤其是屬於可溶性聚合物、可溶性脂肪酸、可溶性脂質、可溶性色素及其混合物中的一或多種，以及

在冷酸水解步驟（h）及清洗與高速離心步驟（i）的過程中所回收的不可溶分子，尤其是來自不可溶生物聚合物、不可溶脂肪酸、不可溶脂質、不可溶色素及其混合物的一或多種。

**【0062】** 當藉由離心進行分離步驟（c）時，本發明之純化方法可獲得代替霰石固相的霰石沉澱物及/或代替方解石固相的方解石沉澱物，霰石沉澱物及/或方解石沉澱物選擇性經球型化。

**【0063】** 本發明之另一標的係一種組成物，包含：

在如上所述與純化方法相關之分離步驟（c）中所回收的霰石固相及/或方解石固相，霰石固相及/或方解石固相選擇性經球型化，以及

選自下列至少一成分：

在如上所述與純化方法相關之超臨界二氧化碳處理步驟（d）中所獲得的可溶性分子，尤其是來自可溶性聚合物、可溶性脂肪酸、可溶性脂質、可溶性色素及其混合物的一或多種，

在如上所述與純化方法相關之超音波步驟（g）中所獲得的霰石膠體乳液及/或方解石膠體乳液，以及

在冷酸水解步驟（h）及清洗與高速離心步驟（i）的過程中所回收的不可溶分子，尤其是來自不可溶生物聚合物、不可溶脂肪酸、不可溶脂質、不可溶色素及其混合物的一或多種。

**【0064】** 根據一具體實施例，組成物可包含：

在如上所述與純化方法相關之分離步驟（c）的過程中所回收的霰石固相，霰石固相選擇性經球型化，以及

選自下列至少一成分：

在如上所述與純化方法相關之超臨界二氧化碳處理步驟（d）中所獲得的可溶性分子，尤其是來自可溶性聚合物、可溶性脂肪酸、可溶性脂質、可溶性色素及其混合物的一或多種，

在如上所述與純化方法相關之超音波步驟（g）中所獲得的膠體乳液混合物，

在冷酸水解步驟（h）及清洗與高速離心步驟（i）的過程中所回收的不可溶分子，尤其是來自不可溶生物聚合物、不可溶脂肪酸、不可溶脂質、不可溶色素及其混合物的一或多種。

**【0065】** 根據一實施例，可混合這些化合物來產生組成物。

**【0066】** 根據一實施例，組成物亦可包含精油與植物油的混合物。

**【0067】** 根據一具體實施例，組成物包含：

在如上所述與純化方法相關之分離步驟（c）中所回收的霰石固相及/或方解石固相，霰石固相及/或方解石固相選擇性經球型化，

在如上所述與純化方法相關之超音波步驟（g）中所獲得的霰石膠體乳液及/或方解石膠體乳液。

**【0068】** 根據一更具體實施例，組成物包含：

在如上所述與純化方法相關之分離步驟(c)的過程中所回收的霰石固相，霰石固相選擇性經球型化，以及

在如上所述與純化方法相關之超音波步驟(g)中所獲得的膠體乳液混合物，

**【0069】** 根據一具體實施例，組成物包含：

在如上所述與純化方法相關之分離步驟(c)中所回收的霰石固相及/或方解石固相，霰石固相及/或方解石固相選擇性經球型化，

在如上所述與純化方法相關之超臨界二氧化碳處理步驟(d)中所獲得的可溶性分子，尤其是來自可溶性聚合物、可溶性脂肪酸、可溶性脂質、可溶性色素及其混合物的一或多種，以及

在如上所述與純化方法相關之超音波步驟(g)中所獲得的霰石膠體乳液及/或方解石膠體乳液。

**【0070】** 根據一更具體實施例，組成物包含：

在如上所述與純化方法相關之分離步驟(c)中所回收的霰石固相，霰石固相選擇性經球型化，

在如上所述與純化方法相關之超臨界二氧化碳處理步驟(d)中所獲得的可溶性分子，尤其是屬於可溶性聚合物、可溶性脂肪酸、可溶性脂質、可溶性色素及其混合物之中的一或多種，以及

在如上所述與純化方法相關之超音波步驟(g)中所獲得的膠體乳液混合物。

**【0071】** 根據一具體實施例，組成物包含：

在如上所述與純化方法相關之分離步驟 (c) 中所回收的霰石固相及/或方解石固相，霰石固相及/或方解石固相選擇性經球型化，

在如上所述與純化方法相關之超臨界二氧化碳處理步驟 (d) 中所獲得的可溶性分子，尤其是屬於可溶性聚合物、可溶性脂肪酸、可溶性脂質、可溶性色素及其混合物之中的一或多種，

在如上所述與純化方法相關之超音波步驟 (g) 中所獲得的霰石膠體乳液及/或方解石膠體乳液，以及

在冷酸水解步驟 (h) 及清洗與高速離心步驟 (i) 的過程中所回收的不可溶分子，尤其是來自不可溶生物聚合物、不可溶脂肪酸、不可溶脂質、不可溶色素及其混合物的一或多種。

**【0072】** 根據一更具體實施例，組成物包含：

在如上所述與純化方法相關之分離步驟 (c) 中所回收的霰石固相，霰石固相選擇性經球型化，

在如上所述與純化方法相關之超臨界二氧化碳處理步驟 (d) 中所獲得的可溶性分子，尤其是屬於可溶性聚合物、可溶性脂肪酸、可溶性脂質、可溶性色素及其混合物之中的一或多種，

在如上所述與純化方法相關之超音波步驟 (g) 中所獲得的膠體乳液混合物，以及

在冷酸水解步驟 (h) 及清洗與高速離心步驟 (i) 的過程中所回收的不可溶分子，尤其是來自不可溶生物聚合物、不可溶脂肪酸、不可溶脂質、不可溶色素及其混合物的一或多種。

【0073】 根據一具體實施例，本發明相關之組成物所包含之在分離步驟（c）中所回收的霰石固相可由在藉由離心而進行的分離步驟（c）中所獲得之霰石沉澱物取代，霰石沉澱物選擇性經球型化。

【0074】 根據一具體實施例，本發明相關之組成物所包含之在分離步驟（c）中所回收的方解石固相可由在藉由離心而進行的分離步驟（c）中所獲得之方解石沉澱物取代，方解石沉澱物選擇性經球型化。

【0075】 本發明之另一標的係一種如上所述之組成物，其用作為藥用品。

【0076】 本發明之另一標的係一種治療處理方法，其中將如上所述之組成物給予需要其之受試者。

【0077】 根據一實施例，所述治療處理係選自皮膚疾病的處理及皮膚疾病的預防。

【0078】 根據一實施例，所述皮膚疾病係選自皮炎（dermatitis）、皮膚病（dermatoses），例如白斑病（vitiligo）及乾癬（psoriasis）。

【0079】 根據一實施例，組成物可以局部的方式給藥。

【0080】 根據另一實施例，組成物亦可用作為骨骼替代物（bone substitute）、骨泥（cement）、植入物（implant）、骨合成器材（osteosynthesis devices）及治療上的醫療器材（medical device in therapy）。

【0081】 根據一實施例，骨骼替代物可選自可擠壓的骨骼替代物（**extrudable bone substitute**）、具有多孔膠原蛋白支持物的骨骼替代物、具有源自動物或人類之骨骼支架（**mineral screen**，亦指 **bone framework**）的骨骼替代物或其組合。其中，所述可擠壓的骨骼替代物尤其是包裝於真空注射器中。

【0082】 根據一實施例，骨泥選自在脊椎成形術（**vertebroplasty**）及氣球撐開術（**kyphoplasty**）中用於微創手術的可注射骨泥（**injectable cement**）、支架骨泥（**stent cement**）。

【0083】 本發明之另一標的係一種如上所述之組成物的非治療用途。

【0084】 本發明之另一標的係一種非治療處理方法，其中將如上所述之組成物施用於需要其之人。

【0085】 根據一實施例，組合物可用於美容，尤其是處理下垂（**ptosis**）、皮膚凹陷（**dermocutaneous depressions**）、深淺皺紋及預防身體老化。

【0086】 本發明之另一標的係一種如上所述之組合物作為培養基的用途，尤其是作為用於幹細胞或前驅細胞（**progenitor cell**）的成熟（**maturation**）及/或增生（**proliferation**）的培養基。

【0087】 根據一實施例，用作為培養基的組成物可包含：

在如上所述與純化方法相關之分離步驟（**c**）中所回收的霰石固相及/或方解石固相，霰石固相及/或方解石固相選擇性經球型化，



在如上所述與純化方法相關之超臨界二氧化碳處理步驟（d）中所獲得的可溶性分子，尤其是屬於可溶性聚合物、可溶性脂肪酸、可溶性脂質、可溶性色素及其混合物之中的一或多種，以及在如上所述與純化方法相關之超音波步驟（g）中所獲得的霰石膠體乳液及/或方解石膠體乳液。

**【0088】** 根據一實施例，用作為培養基的組成物可包含：

在如上所述與純化方法相關之藉由離心進行的分離步驟（c）中所回收的霰石沉澱物及/或方解石沉澱物，霰石沉澱物及/或方解石沉澱物選擇性經球型化，

在如上所述與純化方法相關之超臨界二氧化碳處理步驟（d）中所獲得的可溶性分子，尤其是屬於可溶性聚合物、可溶性脂肪酸、可溶性脂質、可溶性色素及其混合物之中的一或多種，以及在如上所述與純化方法相關之超音波步驟（g）中所獲得的霰石膠體乳液及/或方解石膠體乳液。

**【0089】** 本發明之另一標的係另一組合物，包含：

在如上所述與純化方法相關之超臨界二氧化碳處理步驟（d）中所獲得的可溶性分子，尤其是屬於可溶性聚合物、可溶性脂肪酸、可溶性脂質、可溶性色素及其混合物之中的一或多種，

在如上所述與純化方法相關之超音波步驟（g）中所獲得的霰石膠體乳液及/或方解石膠體乳液。

**【0090】** 根據一具體實施例，另一組成物可包含：

在如上所述與純化方法相關之超臨界二氧化碳處理步驟（d）中所獲得的可溶性分子，尤其是來自可溶性聚合物、可溶性脂肪酸、可溶性脂質、可溶性色素及其混合物的一或多種，

在如上所述與純化方法相關之超音波步驟（g）中所獲得的膠體乳液混合物。

**【0091】** 本發明之另一標的係一種如上所述之另一組成物，其用作為藥用品。

**【0092】** 本發明之另一標的係一種治療處理方法，其中將如上所述之另一組成物給予需要其之受試者。

**【0093】** 根據一實施例，治療處理選自慢性自體免疫疾病（chronic autoimmune pathologies）。

**【0094】** 根據一實施例，慢性自體免疫疾病可為類風濕性關節炎（rheumatoid arthritis）、Crohn氏症（Crohn's disease）、動脈硬化（arteriosclerosis）、第二型糖尿病、僵直性脊椎炎（ankylosing spondylitis）、潰瘍性結腸炎（ulcerative colitis）、乾癬（psoriasis）、乾癬性關節炎（psoriatic arthritis），尤其是乾癬。

**【0095】** 根據一實施例，另一組成物可以肌肉注射（intramuscular）、靜脈注射（intravenous）及/或皮下注射（subcutaneous）的方式給藥。

#### **【圖式簡單說明】**

**【0096】** 無。

**【實施方式】**

**【0097】** 本發明由實施霰石粉末及方解石粉末的熱滲濾步驟 (b) 的方法組成，霰石粉末及方解石粉末就是在研磨步驟 (a) 中磨碎成粉末的貝殼的霰石有機礦物內層及方解石有機礦物外層。由熱滲濾步驟 (b) 所得之飽和溶液可接著經過分離步驟 (c)，分離步驟 (c) 藉由離心進行，隨後選擇性進行濃縮步驟 (f) 及超音波步驟 (g)。經熱滲濾步驟 (b) 處理的全部或部分粉末經過超臨界二氧化碳處理步驟 (d)。在熱滲濾步驟 (b) 及超臨界二氧化碳處理步驟 (d) 中保留的霰石粉末及方解石粉末，以及藉由將霰石有機礦物層及/或方解石有機礦物層的熱滲濾步驟 (b) 所得之溶液離心來進行分離步驟 (c) 而產生的粉末 (以下稱作霰石沉澱物及/或方解石沉澱物)，可經過冷酸水解步驟 (h)。

**【0098】 貝殼的預處理**

**【0099】** 將軟體動物相關之貝殼在清潔之後進行超音波處理，舉例而言，在具有殺菌消毒劑、UC38 型之殺病毒製劑 (virucidal preparation) 之 50°C 的自然水溶液中處理 30 分鐘。如此處理的貝殼接著被沖洗，舉例而言，使用溫度約為 50°C 的自來水，接著於 2.5% 穩定的次氯酸鈉溶液浸漬 30 分鐘，使用自來水沖洗 5 分鐘。然後於手術用 Calbenium® 溶液浸漬 1 小時，以氣流乾燥，接著包裝於可高壓殺菌袋 (autoclavable bag)。

**【0100】** 接著，貝殼經過一或多次殺菌步驟。殺菌步驟可由三個連續的「藥用傳染性蛋白顆粒 (Medical prion)」殺菌所組成，

其各在 132°C 進行 85 分鐘。經殺菌的貝殼可接著於氣流中乾燥並保留。

**【0101】** 貝殼可浸漬於等張的「海洋漿 (marine plasma)」浴中。若貝殼離開海洋環境太久及/或經過連續處理，礦物成分可能會被改變，此步驟可有利於初始水與貝殼的霰石有機礦物層與方解石有機礦物層的礦物成分重新平衡 (re-equilibrate)。此浸漬步驟可持續長達 48 小時。舉例而言，等張的「海洋漿」的礦物成分可如下：鈉 12.88 毫克/升、溴 66.3 毫克/升、鋅 0.083 毫克/升、鉀 493 毫克/升、磷 0.707 毫克/升、鈣 442 毫克/升、鎂 1.29 毫克/升、銅 0.007 毫克/升。接著將貝殼風乾並保留。

**【0102】** 貝殼的碾磨、破碎及研磨步驟 (a)

**【0103】** 為了分開處理貝殼的霰石有機礦物層及方解石有機礦物層，方解石有機礦物層會先經過碾磨步驟。此碾磨步驟可使用粗粒金剛石碾磨輪 (coarse-grained diamond milling wheel) 來進行，舉例而言，在溫度介於 2°C 與 4°C 之間在經過濾且冷卻的海水水流下進行。接著獲得顆粒大小為 2 毫米至 500 微米的粉狀碾磨產物。經去除方解石有機礦物層的霰石有機礦物層與碾磨產物一起保留。

**【0104】** 可在 FRITSCH Pulverisette 1 Premium Line 氧化鋯顎 (zirconium oxide jaw) 與壁磨機 (wall grinder) 中使霰石有機礦物層破碎，直到獲得顆粒大小為 10 微米至 2 毫米的破碎的霰石粉末。

【0105】 破碎的霰石粉末可接著由行星式研磨進行研磨。行星式研磨可使用銦碗（zirconium bowl）與銦球（zirconium ball）進行。舉例而言，將 25 個直徑 20 毫米的銦球與 300 克的破碎的霰石粉末放置於事前在負 30°C 冷凍 24 小時之兩個容量各為 500 毫升的銦碗中。將碗放入 FRITSCH Pulverisette 5 PL 型行星式研磨機的研磨腔進行 2 次研磨循環，各循環以 400 rpm 進行 5 分鐘。

【0106】 為了使研磨優化並防止粉末阻塞於碗壁及球面，第二次研磨循環可以濕式進行，舉例而言，添加具有高沸點及低蒸氣壓之液體型態的添加劑，例如注射用水（water for injection，WFI）或諸如異丙醇或乙醇之醇類。

【0107】 冷藏介於 2°C 與 4°C 之間的注射用水可加入各碗中，直到獲得黏度為 3.5 MPa 的膠體溶液。在第二次研磨循環結束時，可獲得並保留粒度介於 50 奈米與 300 微米之間的霰石粉末。

【0108】 這些操作尤其使生物晶體自霰石有機礦物層的礦物部分分離並斷裂。

【0109】 方解石有機礦物層的碾磨產物可經過與霰石有機礦物層的碾磨產物所經過之研磨步驟相同的研磨步驟，在研磨步驟結束時，亦可獲得粒度介於 50 奈米與 300 微米之間的方解石粉末。

【0110】 在經過熱滲濾步驟之前，可使用 25 kGy 之伽瑪射線對由研磨所獲得之霰石粉末與方解石粉末殺菌。

【0111】 熱滲濾步驟（b）

【0112】 熱滲濾係透過可濕萃取 ( wet extraction ) 可溶性成分之可滲透介質 ( permeable medium ) 的過濾方法。

【0113】 熱滲濾優異的原因有二。一方面，研磨後之霰石粉末的光學顯微鏡觀察顯示不同直徑的顆粒的黏聚物 ( agglomerates ) 被有機殘留物 ( organic residues ) 黏結在一起。另一方面，舉例而言，在甲醇的存在下熱滲濾可溶解霰石有機礦物層的有機部分中結合蛋白質的脂質。

【0114】 此現象可由霰石有機礦物層的組成的結構及物理化學性質來解釋。

【0115】 溶解性測試顯示，這些具有黏著性質的有機殘留物由霰石有機礦物層及方解石有機礦物層的可溶及不可溶、晶體內 ( intracrystalline ) 及層間 ( interlamellar ) 的有機成分組成。熱滲濾可清洗霰石粉末，在霰石滲濾粉末的顯微鏡觀察下，可恢復其閃亮的外觀。滲濾可藉由濕篩方式 ( wet sieving ) 進行。

【0116】 濕篩方式可使用 Filtra 型搖篩器進行，Filtra 型搖篩器從頂部到底部包含：

蓋子，配有開口以容納用於水進入的管子，

6 個篩網，從頂部到底部的篩孔直徑：315、250、125、45、20 及 10 微米，

收集用底部，配有導管以收集來自滲濾的水。

【0117】 搖篩器的參數設定為最大振幅，震動時間約 5 分鐘。

【0118】 取 500 克至 1 公斤之一定量的霰石粉末放置於上部

篩網以製做厚度可變的可滲透過濾層；懸掛於搖篩器上方的儲存槽裝有 45°C 之注射用水，在其中加入 5% 甲醇以便溶解脂質。根據另一實施例，在滲濾之前，可加入濃度為 4 莫耳/升的尿素溶液作為離散劑（chaotropic agent）至注射用水，以便裂解高分子量的蛋白質。將溶液噴灑於粉末，粉末表現如同過濾膜，其過濾能力藉由搖篩器的震動產生渦流（vortex）來優化。

【0119】 在熱滲濾步驟（b）中，較小直徑的霰石粉末顆粒可藉由注射用水溶液從具有最大直徑的第一篩網運送至依其直徑設置的下層篩網，下至具有最小直徑的最後篩網。舉例而言，最後篩網的直徑可為 10 微米，其可留下具有直徑大於 10 微米的顆粒，並使小於及等於 10 微米的顆粒通過。

【0120】 滲濾產物係由液相及固相組成的飽和溶液，液相包含霰石有機礦物層之全部或部分的水溶性及脂溶性成分，固相包含霰石有機礦物層的不可溶成分及直徑小於或等於最後篩網的直徑的霰石顆粒，尤其是 50 奈米至 10 微米。

【0121】 熱滲濾步驟（b）亦產生包含霰石顆粒的霰石滲濾粉末，霰石顆粒的直徑大於最後篩網的直徑，尤其是大於 10 微米。

【0122】 熱滲濾步驟（b）可以相同的方式施用於由方解石有機礦物層的研磨步驟（a）所得之方解石粉末。

【0123】 分離步驟（c）

【0124】 為了自熱滲濾步驟（b）所得之飽和溶液中分離液相及固相，可對飽和溶液施以分離步驟（c）以回收：一方面，液相，

另一方面，固相。舉例而言，分離步驟（c）可藉由離心來進行，回收的液相稱為上清液，回收的固相稱為沉澱物。於此僅描述此示例，但本領域具有通常知識者可知如何實施不同於離心之分離技術以進行此分離步驟（c）。

【0125】 藉由離心進行的分離步驟（c）可在裝有 4 個離心籃（basket）的 2 公升 Lisa 型離心機（Lisa-type centrifuge）中進行，離心籃能夠容納各含有 300 毫升溶液的 4 個小瓶（vial）。轉速可增加至 18000 rpm，溫度設為 5°C，旋轉時間設為 20 分鐘。

【0126】 霰石沉澱物及/或方解石沉澱物可乾燥，例如在 25°C 烤箱中 12 小時。霰石沉澱物及/或方解石沉澱物可具有介於 10 微米及 50 奈米之間的粒度，並可包含不可溶蛋白質及非蛋白質成分。霰石沉澱物可接著經球型化並保留，以用於透過 25 kGy 伽瑪射線之殺菌。方解石沉澱物可保留。

【0127】 離心分離步驟（c）可進行一次或多次。

【0128】 超臨界二氧化碳處理步驟（d）

【0129】 已知感興趣的可溶性分子通常大多為晶體內的（intracrystalline），無論是霰石或方解石的碳酸鈣生物晶體，皆需要透過酸水解才能溶解。為此，本發明包含超臨界二氧化碳處理步驟（d）。

【0130】 已知二氧化碳在處於超臨界狀態時具有非常特別的性質：擴散係數（diffusivity coefficient），其為萃取相當低分子量及非極性的可溶性成分以及脂肪的可能性，且不產生汙染殘留



物。超臨界二氧化碳對病毒及細菌亦具有消毒劑性質。此外，共溶劑（co-solvent）的添加會增加超臨界二氧化碳的溶劑能力（solvent power）。超臨界二氧化碳亦具有低的黏度係數並缺乏表面張力，低的黏度係數及表面張力的缺乏可使其穿透能力增加，霰石及方解石生物晶體的物理化學性質以及對氣體而言具可穿透性之霰石及方解石的親水性生物材料可促使二氧化碳的穿透能力增加，尤其是超臨界二氧化碳。

**【0131】** 用於超臨界二氧化碳處理的反應器的設備包含 5 個主要元件：

用於氣態二氧化碳的入口及儲存槽，

用於將氣態二氧化碳轉變為液態二氧化碳的冷凝器，

液態二氧化碳儲存槽，

用於將液態二氧化碳轉變為超臨界二氧化碳的熱轉換器，

萃取可溶性分子的反應器，以及

一或多個萃取器。

**【0132】** 超臨界二氧化碳處理步驟（d）可依下列方法施用於霰石滲濾粉末：

在連接有超臨界二氧化碳轉換器之適當尺寸的反應器中，放入在熱滲濾步驟（b）之後於篩網收集的霰石滲濾粉末。當轉換器的閥開啟以釋放超臨界二氧化碳時，超臨界二氧化碳注射至反應器，於反應器中發生萃取反應以萃取感興趣之分子（可溶性聚合物、脂肪酸、脂質、色素）。在出口處，在一或二個連接於反應

器的萃取器中依據其特性回收溶解的物質，降低溫度與壓力使其以乾燥型態沉澱。二氧化碳離開時再度變成氣態，並經回收以用於新的萃取循環。

【0133】 結果，一方面，經超臨界二氧化碳處理過的霰石粉末，以及另一方面，來自霰石有機礦物層的可溶性成分，可接著使用 25 kGy 伽瑪射線殺菌並保留。

【0134】 超臨界二氧化碳處理步驟（d）可以相同的方式施用於方解石滲濾粉末，並選擇性施用於方解石沉澱物。

【0135】 過濾步驟（e）

【0136】 在藉由離心進行分離步驟（c）之後，霰石上清液及/或方解石上清液可在過濾步驟（f）中過濾，以獲得經過濾的霰石上清液及/或經過濾的方解石上清液，接著保留經過濾的霰石上清液及/或經過濾的方解石上清液。

【0137】 舉例而言，過濾步驟（f）可在矽藻土床（Celite bed）或膜上進行。

【0138】 濃縮步驟（f）

【0139】 經過濾的霰石上清液及/或經過濾的方解石上清液可被濃縮，舉例而言，使用 Buchi 型旋轉蒸發儀（Rotavapor）在 40°C、加熱燒瓶轉速為 10 rpm、真空度為 23.33 mbar 的條件下進行濃縮。

【0140】 濃縮步驟（f）產生霰石濃縮物及/或方解石濃縮物，其具有高達 1/4 的濃縮係數（concentration factor）。此濃縮物可

具有從黃色到橘色、從紅色到棕色或灰色的他色色彩（allochromatic colouring）變化，顏色是由於含有金屬之色素的存在而產生，金屬即錳、鐵、鋅、鋇、鋇、鎂、銅、鋁、鎳、鈳、鉻、鉬。

【0141】 超音波步驟（g）

【0142】 有利地，透過聲化學（sonochemistry）施以超音波步驟（g），可改變並優化由濃縮步驟（f）所得之霰石濃縮物及/或方解石濃縮物的物理化學性質。

【0143】 超音波處理係一種在液態介質中使用機械波及聲波方法，使用如音極（sonotrode），依濃縮物的初始黏度以介於 20 千赫與 200 千赫之間的頻率進行。有利地，超音波處理可觸發並加速反應，因此改變並加強活性可溶性分子的藥理（pharmacological）性質及藥效（pharmacodynamic）性質。

【0144】 實際上，空穴現象（cavitation）造成高反應性之羥化自由基的形成，此導致反應產率改善，感興趣之分子彼此反應時間減少，部分感興趣之分子的抗自由基性質呈指數性增強。

【0145】 欲處理之溶液可放置於超音波槽中，在超音波槽中音極的尖端以離表面及壁面至少 1 公分的方式浸漬，以避免電弧（electric arcs）形成。

【0146】 超音波步驟（g）可進行 30 分鐘，之後可觀察到濃縮物的黏度增加。由於物理化學改變及膠原成分的重組，濃縮物呈穩定膠體乳液形態。膠體乳液可接著透過微過濾器

( microfiltration )、殺菌過濾器 ( sterilising filtration ) 或 25 kGy 伽瑪射線來殺菌。產物可保存於 5°C。

【0147】 冷酸水解步驟 ( h ) 與清洗與高速離心步驟 ( i )

【0148】 為了收集包含於經超臨界二氧化碳處理過的霰石粉末及/或經超臨界二氧化碳處理過的方解石粉末中之生物聚合物及其他不可溶成分，經超臨界二氧化碳處理過的霰石粉末及/或經超臨界二氧化碳處理過的方解石粉末可接著進行冷酸水解。

【0149】 經超臨界二氧化碳處理過的霰石粉末及經超臨界二氧化碳處理過的方解石粉末可混合並放置於適當容量之裝有 2°C 無熱原水 ( pyrogen-free water ) 的冷藏水解反應器中。可事先調整離子強度，以弱化可能的離子、礦物介質/蛋白質的交互作用。將 0.5 莫耳氯化鈉加入溶液攪拌 30 分鐘，即依據比例 1 公斤粉末比 25 公升水與 5 公升氯化鈉。舉例而言，接著以 18000 g 進行第一次離心。將沉澱物收集於適當量之無熱原水，在其中以相同比例 ( 1 公斤粉末比 25 公升水與 5 公升 80% 乙酸 ) 加入 80% 乙酸。在穩定攪拌下將整體保持於介於 1°C 與 4°C 之間的溫度且 pH 低於 4.5。獲得使用無熱原水稀釋以打散的乳液；使用草酸檢查未溶解之碳酸鈣的存在與否。透過網 ( gauze ) 並藉由傾析 ( decantation ) 消除未溶解之碳酸鈣。在此步驟中，獲得不可溶蛋白質與其他成分的懸浮物，包含不可溶色素，將其連續地離心，例如以 18000 g。將離心沉澱物在攪拌下再次收集於相同量之 5% 稀釋乙酸，以溶解任何碳酸鈣殘留物。將離心沉澱物於相同量之無熱原水清洗

兩次並藉由添加氫氧化鈉溶液將 pH 調整為 7。

**【0150】** 每次清洗後進行高速離心，最後獲得不可溶蛋白質的濕糊狀物 (wet paste)，將其透過冷凍乾燥或噴霧乾燥來乾燥。獲得的乾燥產物研磨成具有介於 10 微米與 50 奈米之間之粒度的灰色粉末，使用 25 kGy 伽瑪射線殺菌並保留之。

**【0151】** 最後這些不同的步驟可獲得：

經球型化之霰石顆粒之經殺菌的粉末，其具有介於 50 奈米與 10 微米之間的粒度，其源自於在霰石粉末的熱滲濾步驟 (b) 之後藉由離心進行的分離步驟 (c) 中回收的沉澱物，

膠體乳液，其源自於超音波步驟 (g)，其由可溶性聚合物、可溶性有機色素 (β 胡蘿蔔)、金屬、金屬蛋白、金屬酶、生長因子、醣蛋白、醣胺、多不飽和脂質及脂肪酸組成，

生物聚合物及可溶性有機色素，其源自於超臨界二氧化碳處理步驟 (d)，以及

所謂支撐性與結構性之不可溶的生物聚合物、自冷酸水解步驟 (h) 與清洗與高速離心步驟 (i) 回收的不可溶色素。

**【0152】** 所有這些萃取出物旨在全部或部分用於醫療器材的配方、治療目的之製備，以用於骨科手術、微創手術、口腔及顎面手術、皮膚學、美容醫學及護膚產品的配方。

**【0153】** 以下非限制性示例說明如上所述之本發明的應用。

**【0154】** [ 示例 ]

**【0155】** 示例 1：用於關節成形術 (arthroplasty) 之填補用骨

泥 ( *sealing cement* ) 的配方

【0156】 已知 髖、肩、膝或任何其他關節的骨關節炎 ( *osteoarthritis* ) 係由於老化及關節限制的結合作用之最常見的關節病理。

【0157】 這是由於在關節表面的軟骨層 ( *cartilage coating* ) 磨損，逐漸惡化導致疼痛及功能性陽痿 ( *functional impotence* )，例如發生於髖疾病的那些，最終需要義肢 ( *prosthesis* )。義肢通常由植入於髌骨 ( *iliac bone* ) 之髖臼 ( *acetabulum* ) 的半球狀蓋 ( *hemispherical cup* )、植入於股軸 ( *femoral shaft* ) 並結束於半球狀頭部 ( *hemispherical head* ) 的主幹 ( *stem* ) 組成。這兩個部分透過聚乙烯或陶瓷插入物連結 ( *articulate* ) 在一起。股義肢 ( *femoral prosthesis* ) 的主幹及蓋 ( *cup* ) 通常使用基於甲基丙烯酸甲酯的手術用骨泥來填補或固定。

【0158】 考量當使用基於甲基丙烯酸甲酯的手術用骨泥 ( 定型反應 ( *setting reaction* ) 的溫度升高於  $70^{\circ}\text{C}$  ) 有時因骨泥的老化及收縮會遇到的術後併發症，併發症通常在無骨泥的情況下以再填補義肢或有時以固定義肢來結束；為了透過植入物周圍的骨骼再生以達成生理機械錨定 ( *physiological mechanical anchorage* )，有時植入物本身會以有利於再生過程的合成生物材料覆蓋。

【0159】 為此，此示例為具有以下百分配方 ( *centesimal formulation* ) 的填補用骨泥：

在藉由離心進行的分離步驟 (c) 中獲得並經球型化之霰石粉末 ( 粒度介於 50 奈米與 10 微米之間 ) 95 克 ,  
碳酸化的碳酸鈣 4 克 ,  
磷酸氫鈉 1 克 ,  
在超音波步驟 (g) 中獲得之膠體乳液 90 毫升 ,  
羧基甲基纖維素鈉 5 克。

**【0160】** 由於下列理由，使用粒度介於 50 奈米與 10 微米之間經球型化的霰石粉末為合理的：球型化最初旨在確保較佳的骨泥的注射性與流動性並促進骨傳導 ( osteo-conduction ) 所需之具有 10 至 100 微米孔洞之相互連接的孔隙產生。

**【0161】** 已知骨泥填補劑一旦乾燥則必須具有至少等於接收骨的抗壓強度 ( compressive strength ) 。已知霰石有機礦物層在壓縮方面的楊氏模數 ( Young's modulus ) 為 141 MPa , 骨皮質 ( cortical bone ) 在壓縮方面的楊氏模數為 131 MPa , 因此可理解相較於習知骨泥，此骨泥非常適合提供較佳的錨定 ( anchorage ) 與負載分布 ( load distribution ) 以及較佳的抵抗力。

**【0162】** 由於在碳酸化過程中碳酸鈣獲得的可塑性、黏著性及凝聚性質，在骨泥配方中出現碳酸化的碳酸鈣為合理的。

**【0163】** 可溶性與不可溶蛋白質，作為刺激細胞分化與增生以及骨生成 ( osteogenesis ) 的「訊號 ( signal ) 」分子，在建構骨骼結構上扮演關鍵角色。碳酸化之碳酸鈣的添加對整體提供可塑性、黏著性及延展性 ( malleability ) ，由霰石顆粒的球型化亦有

利於提供上述性質，這使得處理與插入更容易。

【0164】 定型加速劑 ( setting accelerator ) 的添加可改變製備時間，即最初定型時間與最終定型時間。在超音波步驟 ( g ) 中獲得的膠體乳液加入至混合物，可獲得勻相且穩定的糊狀物之流體。

【0165】 骨泥用以示例性填補在小腿 ( calf ) 的股軸 ( femoral shaft ) 中的支架主幹 ( stent stem ) 。術後 X 射線顯示在義肢主幹周圍有緻密化 ( densification ) ，其特徵為出現碳酸鈣，其為霰石有機礦物內層之礦物成分的主要成分，在骨泥轉化成新骨骼的過程中緻密化會逐漸減少且與接收骨的骨骼合併。接著義肢會表現如同固定的義肢。

【0166】 在 4 個月時進行的活體組織切片 ( biopsies ) 顯示在義肢主幹周圍出現新生成的骨骼，且皮質 ( cortex ) 沒有變薄，表示骨泥轉化成自體的疏鬆骨 ( cancellous bone ) 及骨皮質 ( cortical bone ) 。

【0167】 這些發現可由以下物質的出現來解釋：除了其他之外，具有「類 BMP2 ( BMP2-like ) 」效應及其骨誘導性質之低分子量醣蛋白、具有抗仿生性質的胺基糖苷 ( aminoglycoside ) 、色素、胺基酸及包含醣胺聚醣 ( glycosaminoglycans ) 之蛋白質。

【0168】 示例 2：用於修復骨關節義肢 ( osteoarticular prostheses ) 之可變形的骨骼替代物

【0169】 已知在髖、肩或膝之義肢修復的過程中，由於需要進行移除所有殘留骨泥的方法，移除殘留的甲基丙烯酸甲酯骨泥會



造成骨骼結構嚴重分解（decay）。重建骨合成（reconstructive osteosynthesis）使用自體移植物（autologous graft）或使用合成骨骼替代物，合成骨骼替代物不排除使用手術用骨泥以填補義肢。

【0170】 這就是為什麼此示例為骨骼替代物的原因，此骨骼替代物不僅用以填充由需要進行進入程序（access procedure）所造成之物質流失，亦用以填補新的義肢。此示例之骨骼替代物的配方如下：

在藉由離心進行的分離步驟（c）中獲得並經球型化之霰石粉末（粒度介於 10 微米與 200 微米之間）85 克，

在超臨界二氧化碳處理步驟（d）中獲得之可溶性生物聚合物 2.5 克，

在冷酸水解步驟（h）與清洗與高速離心步驟（i）中獲得之不可溶生物聚合物 2.5 克，

碳酸化的碳酸鈣 5 克，

在超音波步驟（g）中獲得之膠體乳液 75 毫升，

磷酸氫鈉 5 克。

【0171】 選擇霰石粉末的粒度分析（granulometry）以利於產生開放且相互連接的孔隙，孔隙有利於快速的骨傳導，骨傳導與骨骼替代物的骨誘導性質相關，亦與抗仿生性質相關。

【0172】 已出現骨骼替代物的多種用途的示例。

【0173】 舉例而言，在因葡萄球菌敗血症（staphylococcal sepsis）所致之髓釘（medullary nail）破裂後未能緩解肱骨骨折

(**humerus fracture**) 且在肘部 (**elbow**) 產生像瘻管一樣的凹陷 (**fistulate**) 之後，在關鍵臨床案例中住院病人恢復。

**【0174】** 在移除骨折的骨科材料、修整壞死組織並放置骨合成板 (**osteosynthesis plate**) 之後，在不使用預防性抗生素 (**antibiotic prophylaxis**) 的情況下，使用骨骼替代物。

**【0175】** 在使用之前已透過微生物負載測試 (**microbial load test**) 對根據本發明之產品證實抗仿生性質，其展現對微生物增生的抑制，特別是對白色念珠菌 (**Candida albicans**)、巴西麴菌 (**Aspergillus brasiliensis**)、金黃色葡萄球菌 (**Staphylococcus aureus**)、綠膿桿菌 (**Pseudomonas aeruginosa**)、枯草桿菌 (**Bacillus subtilis**) 之菌種。

**【0176】** 術後追蹤顯示感染發作 (**infectious episode**) 的鎮定作用 (**sedation**)，在 3 個月的術後 X 射線顯示骨骼組織恢復至原本的狀態。

**【0177】** 骨骼替代物亦使用於另一關鍵臨床案例的醫院環境中，此關鍵臨床案例為在使用髓釘及於兩年內進行兩次嘗試髂骨移植物 (**iliac graft**) 之骨科治療失敗後之股骨的下三分之一 (15 公分長) 的粉碎小碎片骨折 (**comminuted small fragment fracture**) 的治療的恢復，伴隨以下臨床表現：橫紋肌溶解 (**rhabdomyolysis**)、昏迷及生命維持。在放置外部固定肌 (**external fixator**)、移除骨科材料及腐骨 (**bone sequestration**) 之後，將示例性之骨骼替代物塑形成具有失去物質之尺寸的圓柱狀，並放置於遠端碎片與近端

碎片之間。術後 4 個月可單腳支撐，7 個月步態接近正常。放射性控制顯示不僅正常厚度之骨皮質重建，亦在恢復的股骨之近端碎片與遠端碎片之間髓管（**medullary canal**）的滲透性。

【0178】 這些所有觀察結果皆強調骨骼替代物的骨誘導特性，以及骨傳導與抗仿生特性，其能力取決於受試者的局部系統性調控。

【0179】 本發明人亦提出骨骼替代物在微創手術、氣球撐開術（**kyphoplasty**）、脊椎成形術（**vertebroplasty**）、骨質疏鬆症（**osteoporosis**）之治療、骨折及椎體壓迫（**vertebral compression**）上的用途。

【0180】 在臨床上，儘管手術部位潮濕，但在 37°C 之體溫下仍可觀察到骨骼替代物的快速硬化。

【0181】 另一方面，骨骼替代物的凝聚性、可塑性及黏著性質極大地限制由反混合（**demixing**）所致之血管滲漏（**vascular leakage**）的可能性。

【0182】 示例之骨骼替代物亦可用於顎面手術及口腔。

【0183】 示例 3：用於嚴重難治性皮膚病之治療的局部製劑

【0184】 已知某些類型的皮膚病有時對於任何治療皆為難治的，皮膚病例如發展成塊狀之肘部及頭皮的乾癬，治療包含局部皮質類固醇（**topical dermocorticoid**）。這就是為什麼本發明人提出適用於斑塊狀乾癬（**plaque psoriasis**）的製劑。事實上，角質生成（**keratogenesis**）的加速產生皮膚角質層（**stratum corneum**）無

限制增厚，導致增生角蛋白斑塊（hyperplastic keratin plaque）形成，增生角蛋白斑塊防止局部穿透（topical penetration）。

【0185】 示例之局部製劑的配方為：

在藉由離心進行的分離步驟（c）中獲得並經球型化之霰石粉末（粒度為 50 奈米至 10 微米）20 克，

在超臨界二氧化碳處理步驟（d）中獲得之可溶性生物聚合物 2 克，

尿素 5 克，

尿囊素（allantoin）10 克，

柳酸（salicylic acid）3 克，

在超音波步驟（g）中獲得之膠體乳液 60 毫升，

精油與植物油的混合物 1 毫升，

賦形劑 W/O q.s.100 克。

【0186】 用於示例之局部製劑的精油與植物油的混合物的配方如下：

*Lavandula angustifolia* 1 毫升，

*Chamaemelum nobile* 1 毫升，

*Melaleuca alternifolia* 1 毫升，

*Helychrisum italicum* 1.5 毫升，

*Juniperus oxycedrus* 1 毫升，

*Myrtus communis* 1.5 毫升，

*Argania spinose* 20 毫升，

*Persea Americana* 50 毫升，

*Borago officinalis* 10 毫升，

Wheat germ 13 毫升。

【0187】 具體上，製備包含 20 克之霰石粉末、2 克之可溶性生物聚合物、30 毫升之膠體乳液的溶液直到獲得凝膠（gel），將凝膠保持於介於 2°C 與 5°C 之間的溫度。

【0188】 亦製備包含 5 克之尿素、10 克之尿囊素、3 克之柳酸及 30 毫升之膠體乳液的混合物。

【0189】 將整體混合 30 分鐘直到完全溶解，接著於 25°C 烤箱放置 24 小時，每 6 小時攪拌一次以控制二氧化碳的釋放。接著將所有成分放置於攪拌機中以混合 1 小時。

【0190】 示例 4：用於治療白斑病（vitiligo）的局部製劑

【0191】 已知白斑病為非傳染性且嚴重的皮膚病，其難以治療且耗時，具有非常顯著的心理社會影響，其影響世界人口的 0.5% 至 2%，其發展為不可預測的。白斑病由區域性或全身性之斑塊擴散造成皮膚的脫色（depigmentation）。由於產生皮膚主要色素之黑色素的黑色素細胞（melanocytes）消失而以白色斑塊的外觀表現。

【0192】 治療可能性是有限的。從 UVB 的使用至皮質類固醇及生物相似藥（biosimilar）、局部製劑以及作為最後手段之黑色素細胞手術移植或薄皮移植（thin skin graft）。至今對於白斑病尚無有效的普遍治療方法。此外，提出的治療方法大多具有難堪

或嚴重的副作用。此外，由於角質細胞（*keratinocyte*）的脆弱性，其會突發地在摩擦區域因微創傷而被去除，故白斑病通常伴隨皮膚表面的薄化與改變。由於在成熟方面功能異常，由於與基膜（*basement membrane*）及相鄰角質細胞的凝聚性與黏著性的問題，黑色素細胞及毛囊（*hair bulb*）亦會消失，毛囊為黑色素的儲存槽。

【0193】 考量白斑病的生理病理學，本發明人提出局部製劑，旨在以誘導所有類型之幹細胞成熟、召集（*recruitment*）、增生及分化的方式來改變皮膚區域（*dermocutaneous zone*）的代謝，尤其是黑色素細胞、角質細胞及纖維母細胞（*fibroblast*）。

【0194】 局部代謝誘導亦透過由毛細血管新生（*capillary angiogenesis*）所致之皮膚的逐漸再上色（*progressive recoloration*）來表現。

【0195】 示例之局部製劑的配方如下：

在藉由離心進行的分離步驟（*c*）中獲得並經球型化之霰石粉末（粒度為 50 奈米至 10 微米）20 克，

在超臨界二氧化碳處理步驟（*d*）中獲得的可溶性生物聚合物 2 克，

在冷酸水解步驟（*h*）與清洗與高速離心步驟（*i*）中獲得之不可溶生物聚合物 5 克，

在超音波步驟（*g*）中獲得之膠體乳液 40 毫升，

精油與植物油的混合物 0.5 毫升，

尿素 5 克，

賦形劑 O/W q.s. 100 克。

【0196】 具體上，將 20 克之經球型化的霰石粉末、2 克可溶性生物聚合物、5 克之不可溶生物聚合物、30 毫升之膠體乳液混合直到獲得凝膠，將凝膠保持於介於 2°C 與 5°C 之間的溫度。

【0197】 亦製備 5 克之尿素及 10 毫升之膠體乳液，將其混合 30 分鐘直到完全溶解。

【0198】 接著將所有成分於攪拌機中混合 1 小時，將所得之製劑於 25°C 烤箱放置 24 小時，每 6 小時攪拌一次以控制二氧化碳的釋放。

【0199】 局部製劑的成分，除了其他之外，為具有類 BMP 性質的低分子量的醣蛋白，包含 TNF $\beta$ 、EGF、TGF $\beta$ ，其在表皮（epidermis）之基底層（basal layer）的所有細胞系之合成、增生、成熟上具有生物活性，特別是黑色素細胞。其亦天然包含自由色素（free pigment）以及黑色色素（melanic pigment），自由色素如作為維生素 A 的前驅物之  $\beta$  胡蘿蔔素，其在黑色素的合成扮演重要的角色；黑色色素與卟啉及酶相關，以金屬卟啉、金屬酶的形式，其參與生物組織的呈色。

【0200】 另一方面，示例之局部製劑的精油與植物油的混合物，每 100 毫升具有以下配方：

Evening primrose 45 毫升，

Wheat germ 50 毫升，

Piperine 1 毫升，

Helycrisum italicum 1 毫升，

Melaleuca alternifolia 1 毫升，

Lavandula angustifolia 1 毫升，

Salvia officinalis 1 毫升。

【0201】 這些萃取物旨在加強根據本發明之局部製劑之成分的所有性質。

【0202】 觀察到霰石粉末包含黑色素合成所需之幾乎所有胺基酸，包含酪胺酸 (tyrosine) 及半胱胺酸 (cysteine)。與超純鈣 (ultra-pure calcium) 相關之所有這些要素，在減輕發炎、增強局部免疫系統、外皮 (tegument) 的再上色 (recoloration) 及成分的生物利用度 (bioavailability) 上發揮基本作用。

【0203】 局部製劑之天然化合物的藥理性質及交互作用亦對黑素體 (melanosomes) 的刺激與增殖以及對存在於黑素體的基質黑色素 (matrix melanin) 到周圍角質細胞的轉移具有作用，其確保表皮群 (epidermal population) 的移轉 (turnover) 以及作為黑色素之儲存槽之毛囊 (hair follicles) 的再生。

【0204】 另一方面，已知在超音波處理之後包含於膠體乳液之感興趣的可溶性分子藉由防止單重氧 ( $^1\text{O}_2$ ) 結合至多不飽和脂肪酸的雙鍵來抑制脂質過氧化，可溶性分子例如與生長因子或細胞介素 (cytokines) 相關之低分子量的蛋白質，其亦具有多效性質 (pleiotropic)。一般而言，其具有防止這些酸、蛋白質及生物



分子變質的效果，變質會導致產生對皮膚表面有害之新的自由基。

**【0205】** 局部製劑建議使用於未受任何先前治療的白斑病；然而，在老的白斑病或已接受反覆治療而無可見效果者的情況下，其通常造成黑色素細胞及角質細胞的移轉以及毛囊的消失，為了引起本發明之局部製劑之更活性及更深的穿透，直到基底層，可將本發明之局部製劑的應用與醫用離子電滲裝置（*iontophoresis device*）結合，其原理為透過電極產生低強度的電流施加於皮膚來促進可解離產物的經皮穿透，造成離子在根據電極極性而選擇的方向上的轉移。

**【0206】** 示例 5：用於矯正皺紋及皮膚凹陷的美容製劑

**【0207】** 本發明人提出根據本發明之組成物的美容用途，用於矯正下垂（*ptosis*）、皮膚凹陷（*dermocutaneous depression*）、深淺皺紋及預防身體老化。

**【0208】** 示例之組成物的配方如下：

在藉由離心進行的分離步驟（c）中獲得並經球型化之霰石粉末（粒度為 10 至 45 微米）29 克，

在超臨界二氧化碳處理步驟（d）中獲得之可溶性生物聚合物 1 克，

羧基甲基纖維素鈉凝膠 70 毫升，其由以下組成：

在超音波步驟（g）中獲得之膠體乳液 68 毫升，以及

羧基甲基纖維素鈉 2 克。

**【0209】** 具體上，首先製備羧基甲基纖維素鈉溶液：將 68 毫

升之膠體乳液、2 克之羧基甲基纖維素鈉放入混合器中。將混合物攪拌 20 分鐘並於 5°C 之冷環境下放置 12 小時直到形成凝膠。

【0210】 在此階段結束時，將 29 克之經球型化的霰石粉末及 1 克之可溶生物聚合物接著與 70 毫升之先前獲得之凝膠混合。

【0211】 組成物包裝於 1 毫升的注射器中，並具有 0.4 毫米 /20 毫米之螺紋針頭，接著將其雙重包裝並以 25 kGy 之伽瑪射線殺菌。

【0212】 將組成物注射至在皮膚下垂處之深或淺的皺紋，除了豐滿(volumising)性質外，誘導刺激纖維母細胞之成熟與增生，產生負責皮膚滋潤、柔軟和緊緻的第一型膠原蛋白。

【0213】 由於其物理化學組成，組成物具有顯著的優勢，其天然成分導致疼痛及術後發炎現象不存在。再者，示例的組成物取決於受試者的局部系統性調節並在很長的一段時間內產生矯正效果。

【0214】 示例 6：保護性助曬 (tan-accelerating) 皮膚美容製劑

【0215】 曬黑 (Tanning) 係皮膚對由陽光造成之傷害的防禦及適應反應，更精確而言，係對 UVA 與 UVB 射線，透過增加由黑色素細胞產生的黑色素使皮膚變色，這就是曬黑。於陽光下過度曝曬會造成系統失控，產生的氧化壓力引起曬傷、過敏、色素沉澱 (pigmentation spot)、燒傷、皮膚老化，且別忘了反覆的過度曝曬最後會造成細胞中的 mRNA 變化，其會導致變質及皮膚癌。

【0216】 為此，已發展保護性產品，其包含多種類型的成分，幫助黑色素細胞對抗氧化壓力並產生更多黑色素。每個個體產生或多或少的黑色素，其依種族及皮膚類型分布不均。由黑色素細胞產生的黑色素有兩種，黑色的真黑色素（*eumelanins*）與紅黃色的棕黑色素（*pheomelanins*）。真黑色素對陽光傷害更具抵抗力，具有黑色或棕色皮膚的個體會產生較大量的真黑色素，棕黑色素則產生於具有淺色及紅色皮膚的個體中，棕黑色素會因太陽傷害而更快速變化且保護皮膚免於由陽光造成的氧化壓力的能力較弱。

【0217】 在根據本發明之方法的說明中，本發明人強調多不飽和脂肪酸、酪胺酸及半胱胺酸的存在，其促進黑色素、金屬酶的合成，其在皮膚變色中發揮基本作用，細胞介素強化局部免疫系統，在刺激黑色素細胞的過程中產生基質黑色素。

【0218】 為此，用於製備防曬乳的示例之組成物具有以下配方：

在藉由離心進行的分離步驟（c）中獲得並經球型化之霰石粉末（粒度介於 50 奈米與 10 微米之間）10 克，

在冷酸水解步驟（h）與清洗與高速離心步驟（i）中獲得之不可溶生物聚合物 5 克，

在超臨界二氧化碳處理步驟（d）中獲得之可溶性生物聚合物 1 克，

在超音波步驟（g）中獲得之膠體乳液 20 毫升，

濃縮可可椰子溶液（*concentrated Coco Nucifera solution*）10

毫升，

棕櫚酸抗壞血酯（*Ascorbyl palmitate*）0.05 毫升，

賦形劑 q.s. 100 毫升。

【0219】 具體上，製備 10 克之經球型化的霰石粉末、5 克之不可溶生物聚合物、1 克之可溶性生物聚合物、20 毫升之膠體乳液、10 毫升之濃縮可可椰子溶液、0.05 毫升之棕櫚酸抗壞血酯。將混合物放置於攪拌機中並混合 1 小時。接著加入賦形劑至混合物，整體混合 1 小時直到獲得乳膏狀（*cream*）。

【0220】 在實驗條件下，防曬係數（*protection factor*）介於 10 與 40 之間。

【0221】 對十二個從紅髮至金髮之淺色皮膚的個體測試此組成物，這些個體照射陽光總是會產生紅斑（*erythema*），甚至燒傷且缺乏曬黑。在夏季陽光下經歷 10 天並施用示例之組成物，可使得所有受試個體不僅避免紅斑或燒傷發生，亦確保由刺激黑色素生成所致之均勻曬黑。

【0222】 本發明之方法的步驟可獲得包含於如上述軟體動物的貝殼的霰石有機礦物內層及方解石有機礦物外層中的全部活性分子。

【0223】 示例 7：製造用於生物治療的可注射溶液

【0224】 已知由解剖學（*anatomy*）、病理生理學（*pathophysiology*）、生殖（*reproduction*）及與其棲地的交互作用（*biotope*）的研究可知，本專利所記載之雙殼軟體動物透過合

成有機及無機成分來建構他們的貝殼，依據下述兩個連續過程，有機及無機成分被分泌於套膜外腔（**extra-pallial cavity**）以形成套膜外液體（**extra-pallial fluid**），兩個連續過程包含運送離子、合成醣蛋白的第一細胞過程以及第二物理化學過程。

【0225】 作為這些過程的結果，在霰石內層及方解石外層發現如本專利所述之所有活性分子，因此在霰石內層發現生長因子、低分子量醣蛋白（8 至 50 kDa）、間白素（**interleukins**）、趨化介素（**chemokines**）、TNF（源自共同祖先基因（**common ancestral gene**）的群組）、TGF、前列腺素（**prostaglandins**）等。

【0226】 臨床前及臨床觀察似乎說明包含於上述軟體動物的霰石有機礦物層及方解石有機礦物層的有機部分中之間白素透過變得局部系統性地依賴於接收宿主而具有旁分泌（**paracrine**）作用。源自於上述雙殼軟體動物之免疫防禦的代謝活性的這些細胞介素被發現於套膜外液體，且為這些軟體動物之霰石內層及方解石外層的部分可溶性分子。

【0227】 這就是為什麼本發明人提出一種可注射溶液，其可用於生物治療方法，尤其是某些慢性自發性發炎病理，例如類風濕性關節炎、Crohn 氏症、動脈硬化、第二型糖尿病、僵直性脊椎炎、潰瘍性結腸炎、嚴重乾癬及乾癬性關節炎。

【0228】 已知乾癬起因於彼此活化之角質細胞、樹突細胞（**dendritic cell**）及 T 型淋巴球（**T-lymphocytes**）之間的交互作用。由 TNF $\alpha$ 、IL-23 及 IL-17 這三種細胞類型產生的發炎性細胞

介素，由於其產生之細胞介素風暴（**cytokine storm**），其在病理上為優勢的。這三種細胞介素的活化有利於乾癬的出現與延續，乾癬的延續的病原（**aetiology**）為多因素的。免疫生物治療具有阻斷這三種細胞介素的作用的性質。由於抗細胞介素的單株抗體，這些治療方法阻斷細胞介素的作用，單株抗體旨在透過防止 IL-23 以及間白素 IL-17 和 IL-22 的產生來抑制樹突細胞的功能。

**【0229】** 在治療發炎疾病上，已證明生物治療試劑為有效的，但並非沒有副作用，如最近的統合分析（**meta-analysis**）報導潛伏性結核病（**latent tuberculosis**）及淋巴瘤（**lymphoma**）的再活化、非典型伺機性感染（**atypical and opportunistic infections**）、病毒感染（**viral infections**）（帶狀皰疹（**shingles**））、B 型或 C 型肝炎（**hepatitis**）、髓鞘脫失（**demyelinating**）、腫瘤（**neoplastic**）、心血管（**cardiovascular**）、肝毒性（**hepatotoxicity**）、血球減少（**cytopenia**）、高膽固醇血症（**hypercholesterolemia**），以及注射位置反應（**injection site reactions**）及肺部和消化併發症。

**【0230】** 熱滲濾、離心、濃縮、超音波處理及超臨界二氧化碳處理步驟可萃取諸如細胞介素及生長因子之活性分子。這些分子具有多效性質，其決定多種表現型特徵及局部系統性活性，參與組織恆定調控（**tissue homeostasis regulation**），尤其是抗發炎，對於常見於多種病理之發炎的細胞介素，例如 TNF $\alpha$ 、間白素 IL-23、IL-17。

**【0231】** 此示例之肌肉注射、靜脈注射及/或皮下注射生物治

療溶液可配製如下：

在超臨界二氧化碳處理步驟（d）中獲得之可溶性生物聚合物 2 克，

在超音波步驟（g）中獲得之膠體乳液 q.s. 100 毫升。

【0232】 具體上，將可溶性生物聚合物加入至膠體乳液，接著於 25°C 烤箱放置 12 小時，每 6 小時攪拌一次直到完全溶解。將整體包裝於以 25 kGy 伽瑪射線殺菌之捲曲的安瓿（ampoules）。

【0233】 示例 8：用於動物及人類之幹細胞及前驅細胞的成熟與增生的培養基

【0234】 已知組織、器官及系統的建構、生長及修復取決於不同的生長因子或細胞介素的作用，首先由幹細胞標記（stem cell marker）感知，再由前驅細胞。

【0235】 亦已知多能的幹細胞產生用於不同組織、器官及系統的多種細胞系。前驅細胞為幹細胞的進階階段，儘管分裂特性有限，但其為組織修復的基礎，且由於其降低的移動性，故可在目標組織附近找到。

【0236】 體外研究已強調包含於上述軟體動物的霏石內層及方解石外層的有機部分中之可溶性分子的增強作用。

【0237】 因此，本發明人亦提出用於動物及人類之幹細胞及前驅細胞的成熟與增生的培養基。

【0238】 此培養基包含：

在藉由離心進行的分離步驟（c）中獲得並經球型化之霏石粉

末（粒度為 50 奈米至 10 微米）5 克，

在超臨界二氧化碳處理步驟（d）中獲得的可溶性生物聚合物  
2 克，

葡萄糖 0.4 克，

自體人類血清 2 毫升，以及

在超音波步驟（g）中獲得的膠體乳液 q.s.100 克。

**【0239】** 具體上，將此培養基放置於生物反應槽，生物反應槽可為有氧或無氧，將自體前驅細胞、肌肉或骨膜（periosteal）前驅細胞引入其中並增殖，培養 0 至 15 天。

**【0240】** 具體上，前驅細胞由活體組織切片（biopsies）而獲得，以通常方式由酶消化（enzymatic digestion）來萃取。在培養後，製劑可使用於供體受試者以用於適應症（indication），例如所有類型的組織再生：嚴重燒傷、大規模傷口、肌肉破壞、物質大量流失、牙周病（periodontal diseases）。其可透過注射或微創手術的方式在常規的手術中使用。

**【0241】** 示例 9：製造用於「口服（per os）」給藥的膠囊

**【0242】** 為了在注射治療上述病理症狀後繼續透過「口服」給藥治療，本發明人提出下列組成物：

霰石粉末 60 克，

可溶性生物聚合物 1 克，

不可溶生物聚合物 2 克，

西印度櫻桃粉末（acerola powder）10 克，以及



膠體乳液 q.s. 100 克。 .

【0243】 具體上，將霰石粉末、可溶性及不可溶生物聚合物及西印度櫻桃粉末與膠體乳液混合。將混合物混合 10 分鐘，接著於 30°C 烤箱放置 3 小時直到獲得黏度為  $10^2 \text{ Pa}\cdot\text{s}$  的糊狀物。

【0244】 將整體包裝於具有延遲溶解性、容量為 0.8 毫升之抗酸性的蔬菜膠囊（vegetable capsules）。

【符號說明】

【0245】 無。

## 【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種純化包含於一海洋雙殼軟體動物的一貝殼的一霰石有機礦物層及/或一方解石有機礦物層中之分子的方法，該方法包含下列步驟：

(a) 一研磨步驟，研磨該霰石有機礦物層及/或該方解石有機礦物層以獲得一霰石粉末及/或一方解石粉末；

(b) 一熱滲濾步驟，對該霰石粉末及/或該方解石粉末進行熱滲濾以獲得：

一方面，一飽和霰石溶液及/或一飽和方解石溶液，該飽和霰石溶液包含一霰石液相及一霰石固相，該飽和方解石溶液包含一方解石液相及一方解石固相，以及

另一方面，一霰石滲濾粉末及/或一方解石滲濾粉末；

(c) 一分離步驟，分離該飽和霰石溶液及/或該飽和方解石溶液以回收：

一方面，該霰石液相及/或該方解石液相，以及

另一方面，該霰石固相及/或該方解石固相；以及

(d) 一超臨界二氧化碳處理步驟，使用超臨界二氧化碳處理該霰石滲濾粉末及/或該方解石滲濾粉末以獲得：

一方面，經超臨界二氧化碳處理過的該霰石粉末及/或經超臨界二氧化碳處理過的該方解石粉末，

另一方面，包含於該霰石有機礦物層及/或該方解石有機礦物層中之全部或部分的多個可溶性分子，

其中該熱滲濾步驟 (b) 係藉由濕篩方式使用溫度大於 30°C 的一液體來進行，

其中該熱滲濾步驟 (b) 中使用的該液體為包含甲醇的一水溶液、包含尿素溶液的一水溶液或其混合物。

【請求項2】 如請求項 1 所述之方法，其中該海洋雙殼軟體動物選自白蝶真珠蛤、黑蝶真珠蛤、Pinctada Martensi、阿古屋貝、巨碑礫蛤、長碑礫蛤、菱碑礫蛤、扇碑礫蛤、魔鬼碑礫蛤、圓碑礫蛤、鱗碑礫蛤、Tridacnae Porcelanus 及其混合物。

【請求項3】 如請求項 1 或 2 所述之方法，其中該分離步驟 (c) 係藉由離心來進行，回收的該霰石液相及/或回收的該方解石液相稱為一霰石上清液及/或一方解石上清液，回收的該霰石固相及/或回收的該方解石固相稱為一霰石沉澱物及/或一方解石沉澱物。

【請求項4】 如請求項 3 所述之方法，在藉由離心進行該分離步驟 (c) 之後，更包含下列步驟：

(e) 一過濾步驟，過濾該霰石上清液及/或該方解石上清液以獲得一過濾霰石上清液及/或一過濾方解石上清液；

(f) 一濃縮步驟，將該過濾霰石上清液及/或該過濾方解石上清液濃縮以獲得一霰石濃縮物及/或一方解石濃縮物；

(g) 一超音波步驟，對該霰石濃縮物及/或該方解石濃縮物進行超音波處理以獲得一霰石膠體乳液及/或一方解石膠體乳液。

【請求項 5】 如請求項 1 或 2 所述之方法，在該超臨界二氧化碳處理步驟（d）之後，更包含下列步驟：

（h）一冷酸水解步驟，將經超臨界二氧化碳處理過的該霰石粉末及/或經超臨界二氧化碳處理過的該方解石粉末進行冷酸水解，以萃取存在於經超臨界二氧化碳處理過的該霰石粉及/或經超臨界二氧化碳處理過的該方解石粉末中的多個不可溶分子；以及

（i）一清洗與高速離心步驟，清洗並高速離心以純化並回收該些不可溶分子。

【請求項 6】 一種包含海洋雙殼軟體動物的貝殼的有機礦物層中的分子的組成物，包含：

在如請求項 1 所述之該分離步驟（c）中所回收的該霰石固相及/或該方解石固相，以及

至少一成分選自：

在如請求項 1 所述之該超臨界二氧化碳處理步驟（d）中所獲得的該些可溶性分子，

在如請求項 4 所述之該超音波步驟（g）中所獲得的該霰石膠體乳液及/或該方解石膠體乳液，以及

在如請求項 5 所述之該冷酸水解步驟（h）及該清洗與高速離心步驟（i）中所回收的該些不可溶分子。

【請求項 7】 如請求項 6 所述之包含海洋雙殼軟體動物的貝殼的有機礦物層中的分子的組成物，其用作為藥用品。

【請求項8】 一種如請求項 6 所述之組成物作為用於幹細胞或前驅細胞的成熟及/或增生的培養基的用途。

【請求項9】 一種如請求項 6 所述之組成物的用途，其係用於製備矯正下垂、皮膚凹陷、深淺皺紋及/或防止身體老化之藥物。

【請求項10】 一種包含海洋雙殼軟體動物的貝殼的有機礦物層中的分子的組成物，包含：

在如請求項 1 所述之該超臨界二氧化碳處理步驟（d）中所獲得的該些可溶性分子，以及

在如請求項 4 所述之該超音波步驟（g）中所獲得的該霰石膠體乳液及/或該方解石膠體乳液。

【請求項11】 如請求項 10 所述之包含海洋雙殼軟體動物的貝殼的有機礦物層中的分子的組成物，其用作為藥用品。