



(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 I564011 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 01 月 01 日

(21)申請案號：104119751

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 06 月 18 日

(51)Int. Cl. : A61K31/728 (2006.01) A61K31/366 (2006.01)

A61K35/28 (2015.01) A61P19/00 (2006.01)

(71)申請人：高雄醫學大學(中華民國) KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY (TW)

高雄市三民區十全一路 100 號

(72)發明人：何美玲 HO, MEILING (TW)；張瑞根 CHANG, JE KEN (TW)；吳順成 WU, SHUN CHENG (TW)；張智翔 CHANG, CHIH HSIANG (TW)

(74)代理人：林文杰

(56)參考文獻：

Bae Min Soo et al.; "Photo-cured hyaluronic acid-based hydrogels containing simvastatin as a bone tissue regeneration scaffold"; Biomaterials, 2011, 32, 8161-8171.

Yudoh Kazuo et al. "Statin prevents chondrocyte aging and degeneration of articular cartilage in osteoarthritis(OA)"; Aging, 2010, vol.2, no.12, pages 990-998.

審查人員：張榮興

申請專利範圍項數：11 項 圖式數：7 共 39 頁

(54)名稱

一種醫藥組合物用於製備促進軟骨細胞生成的藥物的用途

A PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREPARING A DRUG FOR PROMOTING THE GENERATION OF CHONDROCYTES

(57)摘要

本發明係關於一種醫藥組合物用於製備促進軟骨細胞生成的藥物的用途，其中該醫藥組合物包含一玻尿酸混合物及一史他汀(statin)類化合物。

The present invention is related to a pharmaceutical composition for a preparing a drug for promoting the generation of chondrocytes, wherein the pharmaceutical composition comprises a hyaaronan mixture and a statin compound.

指定代表圖：

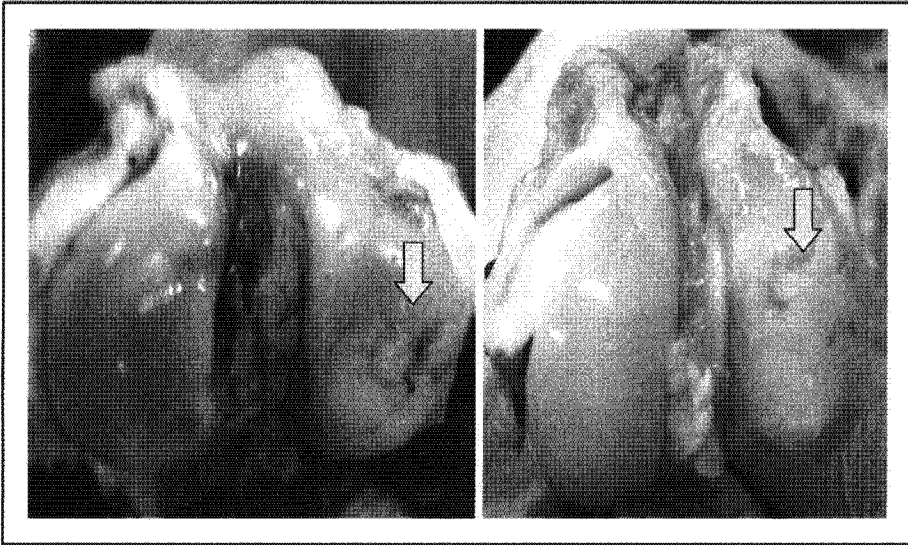
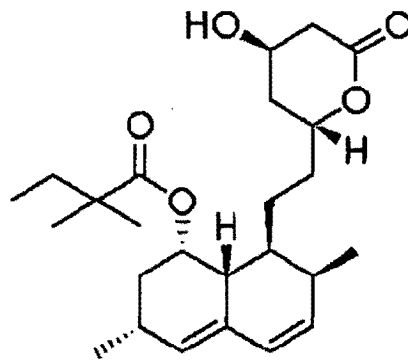


圖 7

特徵化學式：



公告本

## 發明摘要

※ 申請案號：104119751

※ 申請日：104. 6. 18

※IPC 分類：A61K31/728 (2006.01)  
 A61K31/366 (2006.01)  
 A61K35/28 (2015.01)  
 A61P19/00 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

一種醫藥組合物用於製備促進軟骨細胞生成的藥物的用途 /A  
 PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREPARING A DRUG FOR  
 PROMOTING THE GENERATION OF CHRONDROCYTES

【中文】

本發明係關於一種醫藥組合物用於製備促進軟骨細胞生成的藥物的用途，其中該醫藥組合物包含一玻尿酸混合物及一史他汀（statin）類化合物。

【英文】

The present invention is related to a pharmaceutical composition for a preparing a drug for promoting the generation of chondrocytes, wherein the pharmaceutical composition comprises a hyauronan mixture and a statin compound.

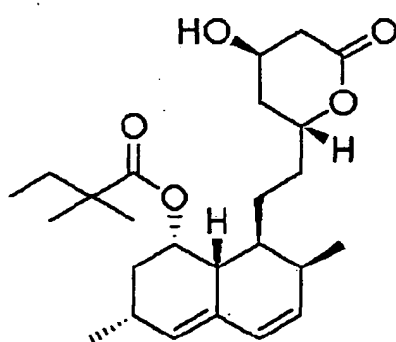
**【代表圖】**

**【本案指定代表圖】：**第（ 7 ）圖。

**【本代表圖之符號簡單說明】：**

無。

**【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：**



# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】(中文/英文)

一種醫藥組合物用於製備促進軟骨細胞生成的藥物的用途 /A  
PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREPARING A DRUG FOR  
PROMOTING THE GENERATION OF CHONDROCYTES

## 【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種醫藥組合物用於製備促進軟骨細胞生成的藥物的用途，特別是用包含玻尿酸及辛伐他汀之醫藥組合物以促進軟骨細胞生成。

## 【先前技術】

【0002】 軟骨組織是一種無血管、淋巴系統以及神經的結締組織，主要為透明軟骨 (Hyaline Cartilage)，而透明軟骨主要是由軟骨細胞、第二型膠原蛋白 (type II collagen)、蛋白聚糖 (proteoglycan) 組成。一旦軟骨組織受損，由於鄰近軟骨細胞的數目係非常有限，不足以修復損傷，更何況還有受限於細胞外基質的包覆，難以遷移到受傷的部位的問題。目前已知的是，軟骨自我修復所生成的新組織大多為纖維性軟骨 (fibrocartilage) 組織，其主要是為第一型膠原蛋白 (type I collagen)。由於纖維性軟骨組織缺乏與軟骨應有的生物力學特性且又無透明軟骨的功能，因此會逐漸降解 (degradation)，難以使關節恢復到傷害前的正常運動狀態。近年來，利用組織工程進行軟骨組織修復的發展相當快速，此方式是利用軟骨細胞或間質幹細胞製造出具有活性及功能的關節軟骨組織，使用間質幹細胞做為細

胞來源是目前公認較具潛力的方式，雖然間質幹細胞具有可分化成軟骨細胞之功能，但若要應用於關節軟骨組織的修復，則需要使用誘導因子將間質幹細胞誘導軟骨分化，然而使用蛋白質類的誘導因子，價格昂貴、蛋白質變性或是攜帶病原體之問題。使用化學類的誘導因子，則有引起其它副作用之問題。骨形態發生蛋白-2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2) 過去已經被報告可以誘導幹細胞軟骨化及誘導骨母細胞骨化，因此可以應用在關節軟骨及骨組織工程。但是誘導 BMP-2 表現，用以修復關節軟骨，也會有硬骨化之疑慮，在過去以幹細胞大量表現 BMP-2 治療軟骨缺損之研究也發現雖然可以修復軟骨缺損處，但修復處也發生骨刺生成之問題( Arthritis Rheum. Articular cartilage repair by gene therapy using growth factor-producing mesenchymal cells. 2003 Feb;48(2):430-41.)。但如何幫助幹細胞大量表現 BMP-2 來修復軟骨缺損處，同時避免 BMP-2 所造成的骨化是目前仍未解決之問題。

【0003】 史他汀 (Statin) 類的臨床藥物，包含辛伐他汀 (simvastatin)，主要在臨床上是應用於降低血脂。此外也可以誘導軟骨細胞表現 BMP-2，軟骨化基因 (Collagen type II & Aggrecan) 及軟骨細胞外間質的合成。但史他汀類的藥物也可以誘導骨母細胞表現 BMP-2 來幫助骨化進行骨折修復。因此使用史他汀的藥物，雖然可以誘發 BMP-2 之表現以應用於軟骨修復，但如何幫助幹細胞大量表現 BMP-2 來修復軟骨缺損處，同時避免 BMP-2 所造成的骨化是目前仍未解決之問題。

#### 【發明內容】

【0004】 本發明以實驗證實以含有玻尿酸之微環境配合辛伐他汀（simvastatin）處理脂肪幹細胞，除了可以加強脂肪幹細胞合成骨形態發生蛋白-2（BMP-2）、軟骨分化基因（Sox-9、軟骨蛋白聚糖（Aggrecan）及第二型膠原蛋白（Col II））、關節軟骨之細胞外間質（sGAG），同時也可以減少辛伐他汀所誘發之骨鈣素（osteocalcin）之表現，可減少細胞硬骨化的產生，以應用於軟骨缺損的修補。

【0005】 本發明除了發現以辛伐他汀配合玻尿酸具有誘導幹細胞軟骨化的功效，更進一步以纖維蛋白作成一三維水凝膠載體，以包覆玻尿酸及幹細胞外，並將一含有辛伐他汀的微球（microsphere）加入該載體內，會更有效的促進 BMP-2 之表現，增加軟骨化之基因之表現量，及增強脂肪幹細胞生成硫酸化葡萄糖胺聚糖（一種主要的關節軟骨細胞外間質）之含量；並於迷你豬之軟骨缺損的動物模式中，也發現該本組合（脂肪幹細胞結合辛伐他汀及玻尿酸）的方式，具有修復關節軟骨缺損之功效。

【0006】 本文中的用語「一」或「一種」係用以敘述本發明之元件及成分。此術語僅爲了敘述方便及給予本發明之基本觀念。此敘述應被理解爲包括一種或至少一種，且除非明顯地另有所指，表示單數時亦包括複數。

【0007】 本發明提供包含玻尿酸混合物及史他汀類藥物的醫藥組合物、劑量套組、及治療方法。

【0008】 本發明提供一種醫藥組合物用於製備促進軟骨細胞生成的藥物的用途，其中該醫藥組合物包含一玻尿酸（hyaluronan，HA）混合物及一史他汀（statin）類化合物。

【0009】 本文中所提「促進軟骨細胞生成」一詞包含但不限於係指促使細胞合成、代謝、表現或分泌與軟骨分化有關的因子或激素，以使細胞形成軟骨細胞。

【0010】 於一具體實施例中，該玻尿酸混合物包含一玻尿酸、纖維蛋白及一幹細胞。於一較佳具體實施例中，該纖維蛋白形成一水凝膠。該纖維蛋白形成一三維水凝膠的支架結構，即一三維纖維水凝膠（3D fibrin hydrogel），以作為一載體，用以包覆該玻尿酸及該幹細胞。

【0011】 本文所用「水凝膠（Hydrogel）」一詞係指以水為分散介質的凝膠，其構成是由於具有網狀交聯結構的水溶性高分子中引入一部分疏水基團和親水殘基，親水殘基與水分子結合，將水分子連接在網狀內部，而疏水殘基遇水膨脹的交聯聚合物。故凡是水溶性或親水性的高分子，通過一定的化學交聯或物理交聯，都可形成水凝膠。水凝膠可分為物理凝膠和化學凝膠：（1）物理凝膠是通過物理作用力如靜電作用、氫鍵、鏈的纏繞等形成的，這種凝膠是非永久性的，通過加熱凝膠可轉變為溶液，所以也被稱為假凝膠或熱可逆凝膠。許多天然高分子在常溫下呈穩定的凝膠態，如 k2 型角叉菜膠、瓊脂等；在合成聚合物中，聚乙烯醇（PVA）是一典型的例子，經過冰凍融化處理，可得到在 60℃ 以下穩定的水凝膠；及（2）化學凝膠是由化學鍵交聯形成的三維網路聚合物，是永久性的，又稱為真凝膠。根據水凝膠大小形狀的不同，有宏觀凝膠與微觀凝膠（微球）之分，根據形狀的不同宏觀凝膠又可分為柱狀、多孔海綿狀、纖維狀、膜狀、球狀等，目前製備的微球有微米級及納米級之分。

【0012】 本文所提「幹細胞」一詞係指一群具有細胞自我更新（self-renewal）、增生（proliferation）能力，同時能長期維持在未分化（undifferentiation）狀態的細胞，並且在受到適當誘導刺激後可以分化成不同世系的細胞群及特定功能的組織的多重分化（multi-differentiation）特性。

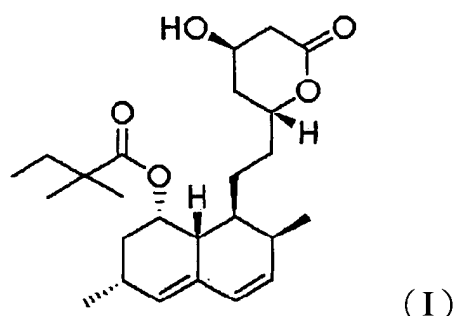
「人類間質幹細胞」一詞是指任何得自於人類間質組織的細胞且具有無限自行更新的能力並且可分化為多種細胞或是組織形式，例如但不限於脂肪間質幹細胞、骨髓間質幹細胞或臍帶間質幹細胞、臍帶血間質幹細胞、骨膜間質幹細胞、滑膜間質幹細胞及肌肉間質幹細胞所構成群組之一。本發明之實施例係以人類脂肪間質幹細胞（或稱人類脂肪幹細胞（human adipose-derived stem cells, hADSCs））的實施例予以示範闡明，但本發明不受下述實施例所限制。於一具體實施例中，該幹細胞包含一人類皮膚纖維母細胞（human dermal fibroblast）、一間質幹細胞（mesenchymal stem cell）或一脂肪幹細胞（adipose-derived stem cell）。於一較佳具體實施例中，該幹細胞為人類脂肪幹細胞（hADSCs）。

【0013】 於一具體實施例中，該玻尿酸的重量百分比濃度範圍為 0.1~10 %。於一較佳具體實施例中，該玻尿酸的重量百分比濃度範圍為 0.5~5 %。於一更佳具體實施例中，該玻尿酸的重量百分比濃度為 1 %。

【0014】 本文中「史他汀（statin）類化合物」包含但不限於阿托伐他汀（atorvastatin）、西立伐他汀（cerivastatin）、氟伐他汀（fluvastatin）、洛伐他汀（lovastatin）、美伐他汀（mevastatin）、匹伐他汀（pitavastatin）、普伐他汀（pravastatin）、羅素他汀（rosuvastatin）或辛伐他汀（simvastatin）。

於一較佳具體實施例中，該史他汀類化合物為一辛伐他汀（simvastatin）。

而該辛伐他汀（simvastatin）之結構式為式（I）：



【0015】 於一具體實施例中，該辛伐他汀的濃度範圍為 0.1~10  $\mu\text{M}$ 。於一較佳具體實施例中，該辛伐他汀的濃度範圍為 0.5~5  $\mu\text{M}$ 。於一更佳具體實施例中，該辛伐他汀的濃度為 1  $\mu\text{M}$ 。於另一具體實施例中，該辛伐他汀為微球（microsphere）劑型。而微球的劑型可有效的控制辛伐他汀的濃度釋放。

【0016】 因此本發明的醫藥組合物可用包含一具有玻尿酸及幹細胞的纖維水凝膠，以及一含有辛伐他汀的微球之組成給予一個體，以促進其軟骨生成或修復軟骨缺損。另外，該含有辛伐他汀的微球更可直接加入於該具有玻尿酸及幹細胞的纖維水凝膠一併給予該個體。

【0017】 此處所用「軟骨缺損」包含但不限於係指關節軟骨退化，或基因突變或外力傷害而導致關節軟骨缺損/磨損的疾病。而關節軟骨廣泛存在於骨的關節面、肋軟骨、氣管、耳郭、椎間盤等處。

【0018】 目前已知許多因子或觸發劑可刺激軟骨細胞之合成代謝，如胰島素樣生長因子-I（IGF-I）為滑液中之主要合成代謝生長因子，且刺激

蛋白聚糖與膠原蛋白之合成；另外，骨形態發生蛋白（BMP）家族之成員（尤其 BMP2、BMP4、BMP6 及 BMP7）及人類轉化生長因子- $\beta$ （TGF- $\beta$ ）家族之成員可誘導軟骨細胞合成代謝刺激（Chubinskaya 及 Kuettner,2003）。同時近年來已鑑別出一種誘導軟骨細胞之合成代謝刺激之化合物（US 6,500,854；EP 1 391 211）。因此，於一較佳具體實施例中，本發明的該促進軟骨細胞生成之功效係藉由增加或加強與刺激軟骨細胞之合成代謝有關的因子或激素，以誘發細胞或幹細胞軟骨化。於一更佳具體實施例中，該促進軟骨細胞生成係藉由增加骨形態蛋白-2（BMP-2）的表現。

【0019】 另外，關節軟骨之兩種主要細胞外間質組成成分為蛋白聚糖（proteoglycan）及第二型膠原蛋白（Collagen type II，Col II）。而葡萄糖胺聚糖（glycosaminoglycan，GAG）是蛋白聚糖中的糖鏈部分，其結構特徵具有硫酸化的二糖重複單位。第二型膠原蛋白及蛋白聚糖形成軟骨之骨架，為軟骨提供穩定性及彈性強度。除了作為組織之結構性骨架以外，細胞外基質（ECM）亦藉由細胞之訊息傳導機制調節軟骨細胞。此等複雜的交互作用在 mRNA 以及蛋白質表現之層面影響軟骨細胞之基因表現，從而改變細胞之內部狀態。此外，細胞外間質之降解通常與軟骨之病理狀態相關，此時，第二型膠原蛋白表現量減少，且基質金屬蛋白酶（MMP）之活性增強。此外，TGF- $\beta$ 1 及 IGF-I 等生長因子與關節軟骨細胞之細胞外基質之分泌與維持有關。故於一較佳具體實施例中，本發明的該促進軟骨細胞生成之功效係藉由增加細胞外間質的生成表現及相關刺激細胞外間質維持/合成的因子的表現，以誘發細胞或幹細胞軟骨化並形成軟骨。於一更佳具體實

施例中，該促進軟骨細胞生成係藉由增加硫酸化葡萄糖胺聚糖（sGAG）的生成。

【0020】 而軟骨分化基因可誘使細胞軟骨化，一般軟骨分化基因包含但不限於 Sox-9、軟骨蛋白聚糖（aggrecan）或第二型膠原蛋白（collagen type II）。於一具體實施例中，該促進軟骨細胞生成係藉由促進軟骨分化基因的表現，其中該軟骨分化基因包含 Sox-9、軟骨蛋白聚糖（aggrecan）或第二型膠原蛋白（collagen type II）。

【0021】 本文所用的「表現」一詞包含但不限於基因、RNA 或蛋白質的表現。

【0022】 此外，大多數可刺激軟骨細胞之合成代謝之化合物都有嚴重副作用，例如 BMP-2 表現過量導致骨刺生成，即硬骨化現象發生。因此，目前尚無不僅可刺激軟骨細胞分化且無此等副作用之化合物。而一些成骨因子或誘使硬骨化的因子包含但不限於骨鈣素（osteocalcin）。因此本發明除了藉由加強各種與軟骨生成有關的因子外以促進軟骨細胞生成外，更可避免於軟骨形成過程中會有硬骨化的現象產生。於一具體實施例中，該醫藥組合物進一步抑制生成的軟骨細胞硬骨化。於一較佳具體實施例中，該抑制生成的軟骨細胞硬骨化係藉由抑制骨鈣素（osteocalcin）的表現。

【0023】 本發明亦提供一種治療軟骨缺損的方法，包含給予一治療有效量的醫藥組合物於一個體的軟骨缺損部位，其中該醫藥組合物包含一玻尿酸（hyaluronan，HA）混合物及一史他汀（statin）類化合物。

【0024】 於一具體實施例中，該玻尿酸混合物包含一玻尿酸、纖維蛋白及一幹細胞。於一較佳具體實施例中，該纖維蛋白形成一水凝膠。該纖維蛋白形成一三維水凝膠的支架結構，即一三維纖維水凝膠（3D fibrin hydrogel），以作為一載體，用以包覆該玻尿酸及該幹細胞。

【0025】 於另一具體實施例中，該史他汀（statin）類化合物為一辛伐他汀。本發明的史他汀（statin）類化合物，如辛伐他汀，可覆埋於例如經由凝聚技術或經由界面聚合製備之微囊（例如分別為羥基甲基纖維素或明膠微囊，及聚-(甲基丙烯酸甲酯)微囊）中、膠體藥物傳遞系統（例如微脂體、微球、微乳液、奈米粒子或奈米膠囊）中或於巨乳液中。於一較佳具體實施例中，該辛伐他汀為微球（microsphere）劑型。而微球的劑型可有效的控制辛伐他汀的濃度釋放。

【0026】 此處所用「治療有效量」一詞意謂化合物當投與個體以治療疾病時足以實現對該疾病之該治療的量。「治療有效量」可視化合物、疾病及其嚴重性及欲治療個體之年齡、體重等而變化。於一具體實施例中，該玻尿酸的治療有效量範圍為重量百分比濃度 0.1~10 %。於一較佳具體實施例中，該玻尿酸的治療有效量範圍為重量百分比濃度 0.5~5 %。於一更佳具體實施例中，該玻尿酸的治療有效量為重量百分比濃度 1 %。於另一具體實施例中，該辛伐他汀的治療有效量範圍為 0.1~10  $\mu\text{M}$ 。於一較佳具體實施例中，該辛伐他汀的治療有效量範圍為 0.5~5  $\mu\text{M}$ 。於一更佳具體實施例中，該辛伐他汀的治療有效量為 1  $\mu\text{M}$ 。

【0027】 「治療」一詞意指任何疾病或病症係指改善疾病或病症（亦即

抑制疾病或降低其至少一個臨床症狀之顯現、程度或嚴重性)。

【0028】 本文中用語「個體 (subject)」一詞係指動物。於一較佳具體實施例中，該個體係指哺乳動物。於一更佳具體實施例中，該個體係指人類。

【0029】 本發明的醫藥組合物可用醫藥技術中熟知之方式進行製備。一般而言，投與醫藥有效量之本發明的醫藥組合物。實際投與之醫藥組合物之劑量通常由醫師按照如下相關情況確定，包括：欲處理之病狀；所選投藥途徑；實際投與之化合物；個別患者之年齡、體重及反應；患者症狀之嚴重性；及其類似因素。

【0030】 本發明之醫藥組合物較佳之投予個體的途徑為關節內投予。本發明之醫藥組合物亦可以持續釋放形式投予或自持續釋放藥物傳遞系統投予。

【0031】 本發明進一步提供一套組，其包含一玻尿酸混合物及一史他汀 (statin) 類化合物。

【0032】 於一具體實施例中，該玻尿酸混合物包含一玻尿酸 (hyaluronan, HA)、纖維蛋白及一幹細胞。於一較佳具體實施例中，該纖維蛋白形成一水凝膠。該纖維蛋白形成一三維水凝膠的支架結構，即一三維纖維水凝膠 (3D fibrin hydrogel)，以作為一載體，用以包覆該玻尿酸及該幹細胞。

【0033】 於另一具體實施例中，該史他汀 (statin) 類化合物為一辛

伐他汀。於一較佳具體實施例中，該辛伐他汀為微球（microsphere）劑型。

【0034】 於一具體實施例中，含有玻尿酸及幹細胞的纖維水凝膠，以及含有辛伐他汀的微球可為分開的劑型，於使用時在一併給予使用。或者是將含有辛伐他汀的微球溶入於該纖維水凝膠中成為單一劑型後再行給予。

【0035】 本發明所提供之一種醫藥組合物用於製備促進軟骨細胞生成的藥物的用途，與其他習用技術相互比較時，更具有下列之優點：

【0036】 （1）玻尿酸與史他汀（statin）類化合物一併使用可顯著且有效的加強與軟骨生成或誘使細胞軟骨化的相關因子，如骨形態蛋白（BMP）、軟骨細胞外間質（如 sGAG 或 Col II）、軟骨分化基因（如 Sox-9、軟骨蛋白聚糖（aggrecan）或第二型膠原蛋白（collagen type II））等，故可應用於各種與軟骨缺損/磨損有關的疾病之治療上。

【0037】 （2）目前市面上許多治療軟骨缺損或刺激軟骨生長的藥物或試劑，都會有引起硬骨化的疑慮，可能是因軟骨化因子表現過量所導致。但本發明的醫藥組合物不僅可顯著提高軟骨生成或誘使細胞軟骨化的相關因子的表現，更進一步抑制硬骨化因子的表現，如骨鈣素的表現量下降，以避免硬骨化現象的發生。

### 【圖式簡單說明】

【0038】 圖 1 為辛伐他汀（simvastatin）對培養於玻尿酸（HA）或無玻尿酸（Non-HA）塗佈的孔內之人類脂肪幹細胞（hADSCs）表現硫酸化

葡萄胺聚糖 (sGAG) 之形成的影響 (\*和\*\*：與無玻尿酸及辛伐他汀處理組進行比較，\*  $p < 0.05$ ；\*\*  $p < 0.01$ 。#：與以辛伐他汀處理組 (0  $\mu\text{M}$ ) 進行比較， $p < 0.01$ 。實驗數量為 3)。

【0039】 圖 2 為辛伐他汀對有以玻尿酸 (HA) 或無玻尿酸 (Non-HA) 培養的人類脂肪幹細胞之軟骨分化基因 (Sox-9、Aggrecan 及 Col II) 表現的影響 (與無玻尿酸組進行比較 (Non-HA)，\*\*  $p < 0.01$ 。實驗數量為 4)。

【0040】 圖 3 為辛伐他汀對有以玻尿酸 (HA) 或無玻尿酸培養的人類脂肪幹細胞之骨形態發生蛋白-2 (BMP-2) 及骨鈣素 (osteocalcin) 基因表現的影響 (與無玻尿酸組 (Non-HA) 的第一天數據進行比較，\*\*  $p < 0.01$ 。實驗數量為 4)。

【0041】 圖 4 為以辛伐他汀處理三維玻尿酸/纖維蛋白之水凝膠包覆的人類脂肪幹細胞之硫酸化葡萄胺聚糖 (sGAG) 的形成表現結果分析 (同一天的玻尿酸組 (HA) 與玻尿酸加辛伐他汀組 (HA + Sim) 進行比較，\*\*  $p < 0.01$ 。實驗數量為 3)。

【0042】 圖 5 為以辛伐他汀處理三維玻尿酸/纖維蛋白之水凝膠包覆的人類脂肪幹細胞之第二型膠原蛋白 (Col II) 表現結果分析 (同一天的玻尿酸組 (HA) 與玻尿酸加辛伐他汀組 (HA + Sim) 進行比較，\*\*  $p < 0.01$ 。實驗數量為 3)。

【0043】 圖 6 為以辛伐他汀處理三維玻尿酸/纖維蛋白之水凝膠包覆的人類脂肪幹細胞之軟骨分化基因 (Sox-9、Aggrecan 及 Col II) 表現結果

分析。

【0044】 圖 7 為以含有辛伐他汀及人類脂肪幹細胞之三維玻尿酸/纖維蛋白的水凝膠處理迷你豬的膝關節之關節軟骨缺損處之結果（箭頭為膝關節修復的地方）。

### 【實施方式】

【0045】 本發明可能以不同的內容來實施，並不僅限於下列文中所提及的實例。下列實施例僅作為本發明不同面向及特點中的代表。

#### 【0046】 實施例 1

【0047】 硫酸化葡萄糖胺聚糖（sGAG）是一種主要的關節軟骨細胞外間質。為了測試辛伐他汀（Simvastatin）是否能促進人類脂肪幹細胞（human adipose-derived stem cells, hADSCs）表現硫酸化葡萄糖胺聚糖（sGAG）及其較佳濃度為何。本發明先製備玻尿酸（hyaluronan, HA）塗佈的孔，即將溶解於磷酸鹽緩衝液（PBS, 1% w/w）之 1 ml 的玻尿酸塗佈在 24 孔盤上，於 37°C 下靜置 48 小時，隨後用 PBS 洗滌兩次。將人類脂肪幹細胞接種於含有 500  $\mu$ l 之基礎培養基，且密度為  $1 \times 10^5$  個細胞之孔中，其中該基礎培養基包含一 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)，並額外添加 5% 胎牛血清（Fetal bovine serum, FBS），1% 非必需氨基酸及 100 U/ml 青黴素/鏈黴素（Gibco-BRL, Grand Island, NY）中。於培養期間，增添不同濃度（0.1 to 1  $\mu$ M）的辛伐他汀（simvastatin）於孔盤中，且該培養基每兩天更換一次。於培養後第 7 天，收集細胞，並透過 Blyscan 硫酸氨基聚糖檢測試劑

(Biocolor, Antrim, UK) 用以進行二甲基亞甲基藍 (dimethylmethylen blue, DMMB) 分析, 以及以 DNA 標準化硫酸化葡萄糖胺聚糖 (sGAG) 的形成。其結果顯示於圖 1 中。

【0048】 本發明測試在有無玻尿酸的情形下, 辛伐他汀對人類脂肪幹細胞上之硫酸化葡萄糖胺聚糖 (sGAG) 的形成影響。圖 1 所示, 在無玻尿酸 (Non-HA) 的情形下, 以  $0.1\sim 1\ \mu\text{M}$  的辛伐他汀處理皆可促進人類脂肪幹細胞上之 sGAG 的表現量 ( $0\ \mu\text{M}: 0.3\ \mu\text{g}/\mu\text{g}; 0.1\ \mu\text{M}: 0.5\ \mu\text{g}/\mu\text{g}; 0.5\ \mu\text{M}: 0.5\ \mu\text{g}/\mu\text{g}; 1\ \mu\text{M}: 0.7\ \mu\text{g}/\mu\text{g}$ ); 而在 1% 玻尿酸的情形下, 並以  $0.1\sim 1\ \mu\text{M}$  的辛伐他汀處理更可加強 sGAG 的表現量 ( $0\ \mu\text{M}: 1.4\ \mu\text{g}/\mu\text{g}; 0.1\ \mu\text{M}: 1.3\ \mu\text{g}/\mu\text{g}; 0.5\ \mu\text{M}: 2.5\ \mu\text{g}/\mu\text{g}; 1\ \mu\text{M}: 2.8\ \mu\text{g}/\mu\text{g}$ )。此實驗顯示出在 1 % 的玻尿酸與  $1\ \mu\text{M}$  的辛伐他汀一起作用下可顯著且較佳的促進幹細胞表現 sGAG, 以誘使細胞軟骨化, 利於軟骨生成。

#### 【0049】 實施例 2

【0050】 人類脂肪幹細胞 (hADSCs) 分別培養於玻尿酸 (HA) 塗佈及無塗佈 (Non-HA) 之孔中, 且用或不用  $1\ \mu\text{M}$  的辛伐他汀 (simvastatin, SIM) 處理 1 至 5 天。因此本發明分為四個實驗組: (1) 無玻尿酸 (Non-HA) 組: 人類脂肪幹細胞培養於無塗佈玻尿酸之孔中, 且無辛伐他汀 ( $1\ \mu\text{M}$ ) 處理; (2) 無玻尿酸加辛伐他汀 (Non-HA + Sim) 組: 人類脂肪幹細胞培養於無塗佈玻尿酸之孔中, 但有以辛伐他汀 ( $1\ \mu\text{M}$ ) 處理; (3) 玻尿酸 (HA) 組: 人類脂肪幹細胞培養於塗佈玻尿酸之孔中, 但無辛伐他汀 ( $1\ \mu\text{M}$ ) 處理; 以及 (4) 玻尿酸加辛伐他汀 (HA + Sim) 組: 人類脂肪幹細胞培養於

塗佈玻尿酸之孔中，且以辛伐他汀（1  $\mu$ M）處理。

【0051】 於指定的天數收集細胞，並利用即時 PCR（real-time PCR）分析 BMP-2 和軟骨分化基因（chondrogenic genes）的表現。透過下述廠商的指南，並搭配使用 TRIzol 試劑（Gibco BRL, Rockville, MD）以萃取該些細胞之總 RNA（total RNA）。簡而言之，取 20 $\mu$ l 的反應體積，其含 0.5 至 1  $\mu$ g 之總 RNA，再利用 SuperScript First-Strand 合成系統（Invitrogen）反轉錄成 cDNA。利用 iQ<sup>TM</sup> SYBR green<sup>®</sup> supermix（Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA）及定量即時 PCR 檢測系統（Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA）進行並監測即時 PCR 反應。該 cDNA 樣本（取 2  $\mu$ l 用於每次反應 25  $\mu$ l 的總體積中）用於分析感興趣的基因及以參考基因甘油醛 3-磷酸脫氫酶（GAPDH）作為對照組。每一個目標基因的表現量，如先前所述，計算為  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。對每個有興趣的基因，進行每一個實驗樣本的四個讀值，每個實驗至少重複 3 次。外加引子組（applied primer set）如下：（1）骨形態發生蛋白-2（BMP-2）的正向（forward）：CGAATGACTGGATTGTGGCT，反向（reverse）：TGAGTTCTGTCGGGACACAG；（2）Sox-9 的正向：CTT CCG CGA CGT GGA CAT，反向：GTT GGG CGG CAG GTA CTG；（3）第二型膠原蛋白（Collagen type II，Col II）的前向：CAA CAC TGC CAA CGT CCA GAT，反向：TCT TGC AGT GGT AGG TGA TGT TCT；（4）軟骨蛋白聚糖（Aggrecan）的正向：ACA CGT GGG GAC AGT ATT GG，反向：GTG GAA AGA TGC GGT GGT TT；（5）GAPDH 的正向：TCT CCT CTG CAT TCA ACA GCG 交流，反向：CCC TGT TGT TGC AGC CAA ATT C；以及（6）骨鈣

素 (osteocalcin) 的正向：GTG CAG AGT CCA GCA AAG GT，反向：CGA TAG GCC TCC TGA AAG C，其結果顯示於圖 2 及圖 3 上。

【0052】 本發明先測試在有無玻尿酸的情形下，1 %的玻尿酸 (HA) 及 1  $\mu$ M 的辛伐他汀 (Simvastatin) 的組成是否可刺激軟骨分化基因 (如 Sox-9、軟骨蛋白聚糖 (Aggrecan) 及第二型膠原蛋白 (Col II)) 的表現且其較佳濃度為何。圖 2A 至 2C 所示，在無玻尿酸 (Non-HA) 的情形下，給予 1  $\mu$ M 的辛伐他汀皆未能有效的促進軟骨化基因表現 (Non-HA+Sim)；但在有 1 %玻尿酸的情形下，再給予 1  $\mu$ M 的辛伐他汀 (HA+Sim) 可得到較佳的軟骨化基因的表現量，即提高 Sox-9、Aggrecan 及 Col II 的表現量。此實驗顯示出在 1 %的玻尿酸與 1  $\mu$ M 的辛伐他汀一起作用下可顯著且較佳的促進幹細胞表現出軟骨分化基因。

【0053】 本發明測試在有無玻尿酸的情形下，1%的玻尿酸及 1  $\mu$ M 的辛伐他汀的組成是否會刺激 BMP-2 及骨鈣素 (osteocalcin) 的表現。如圖 3A 所示，將無玻尿酸 (Non-HA) 組於第 1 天的 BMP-2 的表現量當成 1 作為比較，在無玻尿酸 (Non-HA) 的情形下，給予 1  $\mu$ M 的辛伐他汀 (Non-HA+Sim) 都未明顯的促進 BMP-2 基因的表現 (第 1 天：Non-HA 組：1 倍，Non-HA+Sim 組：1.2 倍；第 3 天：Non-HA：0.5 倍，Non-HA+Sim 組：0.8 倍；第 5 天：Non-HA 組：0.2 倍，Non-HA+Sim 組：1.1 倍)。而在有 1 %的玻尿酸情形下，並給予 1  $\mu$ M 的辛伐他汀 (HA+Sim) 則會發現 BMP-2 的表現量明顯增加 (第 1 天：HA：0.5 倍，HA+Sim：2.8 倍；第 3 天：HA：1.9 倍、HA+Sim：5 倍；第 5 天：HA：0.4 倍，Non-HA+Sim：2.1 倍)，此

實驗顯示出在 1 %的玻尿酸及 1  $\mu$ M 的辛伐他汀一起作用可促進幹細胞大量表現 BMP-2 基因。

【0054】 另外在骨鈣素 (osteocalcin) 基因表現量方面，在圖 3B 中，將無玻尿酸組於第 1 天之 osteocalcin 的表現量當成 1 來比較，在無玻尿酸 (Non-HA) 的情形下，給予 1  $\mu$ M 的辛伐他汀從第 1 天至第 5 天會明顯促進 osteocalcin 基因的表現，而在有 HA 的情形下 (HA+Sim)，給予 1  $\mu$ M 的辛伐他汀從第 1 天至第 5 天則可以有效減少由辛伐他汀 (simvastatin) 所誘發之 osteocalcin 的表現。上述結果指出玻尿酸加辛伐他汀一起作用可降低骨鈣素 (osteocalcin) 的表現，以減少硬骨化的產生。

#### 【0055】 實施例 3

【0056】 每 30  $\mu$ L 的懸浮於 1 %玻尿酸中之人類脂肪幹細胞 ( $5 \times 10^6$  個細胞) 與 120  $\mu$ l 的纖維蛋白 (fibrin) 溶液 (100 mg/ml) 混合，然後放置在鐵氟隆模具 (teflon mold) (深度為 5.5 mm 及直徑為 5.5mm) 中。將 40  $\mu$ l 的溶於 40 mM 氯化鈣 ( $\text{CaCl}_2$ ) 之牛凝血酶 (bovine thrombin, 300 U/ml) 之溶液中加入至模具中，並充分與細胞/纖維蛋白溶液混合。將該混合物在室溫下培養 15 分鐘至形成一水凝膠 (hydrogel)。待水凝膠形成後，將該三維纖維水凝膠載體 (3D fibrin hydrogel carrier) 包含人類脂肪幹細胞及玻尿酸 (玻尿酸/纖維蛋白之水凝膠) 從鐵氟隆模具中移出，再移至 24 孔盤中，並以 1 ml 的基礎培養基 (DMEM)，其中該基礎培養基包含一 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)，並額外添加 5% 胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS)，1% 非必需氨基酸及 100 U/ml 青黴素/鏈黴素

(Gibco-BRL, Grand Island, NY) 中。該人類脂肪幹細胞 (hADSCs) 培養於玻尿酸/纖維蛋白之水凝膠中，並用或不用  $1\ \mu\text{M}$  的辛伐他汀處理 7 或 14 天。因此本發明分為兩個實驗組：(1) 玻尿酸 (HA) 組：人類脂肪幹細胞於玻尿酸/纖維蛋白之水凝膠中培養，但不以辛伐他汀 ( $1\ \mu\text{M}$ ) 處理；及 (2) 玻尿酸加辛伐他汀 (HA + Sim) 組：人類脂肪幹細胞於玻尿酸/纖維蛋白之水凝膠中培養，並以辛伐他汀 ( $1\ \mu\text{M}$ ) 處理。於第 7 及 14 天，收集水凝膠，並於  $60^\circ\text{C}$  下培養於木瓜蛋白酶溶液 (papain solution,  $300\ \mu\text{g/ml}$ ) 18 小時。然後將每個實驗組中所得的  $50\ \mu\text{l}$  的細胞萃取物進行檢測 sGAG 合成的 DMMB 分析法或使用 Type II Collagen Detection Kit (Chondrex Inc. WA, USA) 進行第二型膠原蛋白分析，其結果顯示圖 4 及圖 5。

【0057】 在以三維玻尿酸水凝膠包覆的情形下，給予  $1\ \mu\text{M}$  的辛伐他汀 (simvastatin) 的組成是否有效的促進間質幹細胞生成兩種主要的細胞外間質，即硫酸化葡萄糖胺聚糖 (sGAG) 及第二型膠原蛋白 (Collagen type II, Col II)。在 sGAG 表現量方面，於第 7 天時，玻尿酸 (HA) 組為  $14\ \mu\text{g}/\mu\text{g}$ ，玻尿酸加辛伐他汀 (HA + Sim) 組為  $18\ \mu\text{g}/\mu\text{g}$ ；而於第 14 天時，玻尿酸組為  $14\ \mu\text{g}/\mu\text{g}$ ，玻尿酸加辛伐他汀組為  $30\ \mu\text{g}/\mu\text{g}$  (如圖 4 所示)。在 Col II 表現量方面，於第 7 天時，玻尿酸 (HA) 組為  $2\ \text{pg}/\mu\text{g}$ ，玻尿酸加辛伐他汀 (HA + SIM) 組為  $6\ \text{pg}/\mu\text{g}$ ；而於第 14 天時，玻尿酸組為  $6.5\ \text{pg}/\mu\text{g}$ ，玻尿酸加辛伐他汀組為  $27\ \text{pg}/\mu\text{g}$  (如圖 5 所示)。上述結果顯示出在三維玻尿酸/纖維蛋白之水凝膠包覆下之情況下，給予  $1\ \mu\text{M}$  的辛伐他汀 (HA+Sim) 可以有效的促進幹細胞表現出兩種主要的細胞外間質 (sGAG 及 Col II)。

【0058】 另外，本發明進一步利用玻尿酸/纖維蛋白之水凝膠培養所述人類脂肪幹細胞，並用或不用  $1\ \mu\text{M}$  的辛伐他汀處理 1 至 5 天，以分析軟骨分化基因 (Sox-9、軟骨蛋白聚糖 (Aggrecan) 及第二型膠原蛋白 (Col II)) 之表現情況。故本發明分為兩個實驗組：(1) 玻尿酸 (HA) 組：人類脂肪幹細胞於玻尿酸/纖維蛋白之水凝膠中培養，但不以辛伐他汀 ( $1\ \mu\text{M}$ ) 處理；及 (2) 玻尿酸加辛伐他汀 (HA + Sim) 組：人類脂肪幹細胞於玻尿酸/纖維蛋白之水凝膠中培養，並以辛伐他汀 ( $1\ \mu\text{M}$ ) 處理。於指定天數收集細胞，並藉由即時 PCR 分析軟骨分化基因之表現，其結果顯示於圖 6。

【0059】 在三維玻尿酸之水凝膠包覆的情形下，給予  $1\ \mu\text{M}$  的辛伐他汀是否能有效地促進間質幹細胞較佳地表現軟骨化基因。如圖 6A 至 6C 所示，在幹細胞於三維玻尿酸/纖維蛋白之水凝膠包覆下，並給予  $1\ \mu\text{M}$  的辛伐他汀 (HA+Sim) 可得到較佳的軟骨化基因的表現，即提高 Sox-9、Aggrecan 及 Col II 的表現量。此實驗顯示出在三維玻尿酸之水凝膠包覆下，給予  $1\ \mu\text{M}$  的辛伐他汀可得到較佳的促進幹細胞表現軟骨分化基因之效果。

#### 【0060】 實施例 4

【0061】 將 40 mg 的辛伐他汀 (Merck & Company, Rahway, NJ, USA) 溶解在 1 ml 的乙醇 (ethanol)，然後再與 1.5 ml 的 0.1N 之 NaOH 混合。將辛伐他汀儲備溶液 (stock solution) 加熱至  $50^{\circ}\text{C}$  維持 2 小時後，在用 1 N 的鹽酸 (HCl, pH= 7.4, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) 中和 pH 值，使之成為 10 mM 的儲備溶液。透過水包油包水的雙重乳化 (water-in-oil-in-water (w/o/w) double emulsion) 技術製備微球

(microsphere)。簡而言之，將 16 mg 的羥基磷灰石 (HAp) 粉末溶解於磷酸鹽緩衝溶液 (PBS)，以形成第一水相 (water-phase) 溶液。250  $\mu$ l 的辛伐他汀儲備溶液、50 mg 的界面活性劑 Span 80 及 PLGA (聚乳酸甘醇酸) 50/50 (P2191, 分子量：30,000–60,000, Sigma-Aldrich) 於二氯甲烷 (dichloromethane) 溶液中混合，以形成油相。將第一水相溶液和油相溶液相互混合，並以 1000 rpm 攪拌 15 分鐘，以形成第一油包水 (w/o) 之乳化溶液。將第一油包水 (w/o) 之乳化溶液加入至 20 ml 的第二水相溶液，並與 1% (w/v) 的二氯甲烷 (dichloromethane) 溶液一起混合，以形成第二重乳化 (w/o/w) 溶液。第二重乳化 (w/o/w) 懸浮溶液於室溫下攪拌 30 分鐘以硬化該微球。於攪拌過程中抽器是必要的以蒸發二氯甲烷並固化該微球。最後，該微球透過離心方式收集，並用 0.1 % 的聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol) 洗滌三次，再於冷凍乾燥機中凍乾。

【0062】 所有的實驗動物由台東動物繁殖中心 (TAPS) 提供。動物於手術前，以肌肉注射 (IM injection) 方式注射 0.15 mg/kg 的克他明 (Ketamine) 及鎮靜劑 xylazine 進行麻醉。於手術過程中，以 5% 的吸入性麻醉劑 (inhalational Isoflurane) 給予動物以維持麻醉。故將迷你豬進行麻醉後，並於其左腿上進行手術。利用骨環鋸 (trephine bur) 於左腿的內髌 (medial condyles) 上製造出全厚軟骨缺損 (full-thickness cartilage defects) (直徑為 6 mm)，但不穿透軟骨下硬骨 (subchondral bone)。於手術後，將含有 1 mg 的辛伐他汀之微球的玻尿酸/纖維蛋白之水凝膠將植入至軟骨缺損部位，並從脛骨獲得骨膜以覆蓋於缺損部位的上方以縫合修復結構。最

後，手術傷口部位會一層一層地進行縫合。手術後，透過口服方式給予動物止痛藥 Ultracet (Tramadol 37.5mg/Acetaminophen 325mg)，一天一次，一次兩錠，持續 5 天。於第 12 周藉由觀察以監測治療的功效。

【0063】 如圖 7 所示，將三維玻尿酸之水凝膠，其包含間質幹細胞及含有辛伐他汀 (Simvastatin) 的微球 (microsphere)，施予迷你豬的關節軟骨缺損部位，可以發現在 12 週後，該部位的關節軟骨缺損情況明顯改善。上述結果代表著三維玻尿酸之水凝膠包覆的間質幹細胞及含有辛伐他汀的微球具有修復並改善關節軟骨缺損之功效。

【0064】 列詳細說明係本發明之一較佳實施方式之具體說明，然其並非用以限定本創作，故任何熟習此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內作些許之等效實施或變更，均應包含至本發明之申請專利範圍內。

#### 【符號說明】

無。

#### 【生物材料寄存】

無。

【序列表】

<110> 高雄醫學大學

<120> 一種醫藥組合物用於製備促進軟骨細胞生成的藥物的用途

<130> 2425-KMU-TW

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 1

cgaatgactg gattgtggct

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 2

tgagttctgt cgggacacag 20

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 3

cttccgcgac gtggacat 18

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 4

gttgggcggc aggtactg 18

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 5

caacactgcc aacgtccaga t 21

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 6

tcttgcagtg gtaggtgatg ttct 24

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 7

acacgtgggg acattagtgg 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 8

gtggaatgca gaggtggttt 20

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 9

tctcctctgc attcaacagc gac 23

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 10

ccctgttgct gtagccaaat t 21

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 11

gtgcagagtc cagcaaaggt 20

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 12

cgataggcct cctgaaagc 19

## 申請專利範圍

105年9月26日 修正  
補充

1. 一種醫藥組合物用於製備誘發幹細胞分化成軟骨細胞且不分化成硬骨細胞的藥物的用途，其中該醫藥組合物包含一玻尿酸（hyaluronan，HA）混合物及一史他汀（statin）類化合物，其中該醫藥組合物是透過抑制骨鈣素（osteocalcin）的表現使該幹細胞不分化成硬骨細胞。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述的用途，其中該玻尿酸混合物包含一玻尿酸、纖維蛋白及一幹細胞。
3. 如申請專利範圍第 2 項所述的用途，其中該纖維蛋白形成一水凝膠。
4. 如申請專利範圍第 2 項所述的用途，其中該幹細胞為人類脂肪幹細胞（hADSCs）。
5. 如申請專利範圍第 1 項所述的用途，其中該史他汀類化合物為一辛伐他汀（simvastatin）。
6. 如申請專利範圍第 5 項所述的用途，其中該辛伐他汀為微球劑型。
7. 如申請專利範圍第 1 項所述的用途，其中該誘發幹細胞分化成軟骨細胞係藉由增加骨形態蛋白 2（BMP-2）的表現。
8. 如申請專利範圍第 1 項所述的用途，其中該誘發幹細胞分化成軟

骨細胞係藉由增加硫酸化葡萄糖胺聚糖（sGAG）的生成。

9. 如申請專利範圍第 1 項所述的用途，其中該誘發幹細胞分化成軟骨細胞係藉由促進軟骨分化基因的表現，其中該軟骨分化基因包含 Sox-9、軟骨蛋白聚糖（aggrecan）或第二型膠原蛋白（collagen type II）。
10. 如申請專利範圍第 2 項所述的用途，其中該玻尿酸的重量百分比濃度為 1 %。
11. 如申請專利範圍第 5 項所述的用途，其中該辛伐他汀的濃度為 1  $\mu\text{M}$ 。

圖式

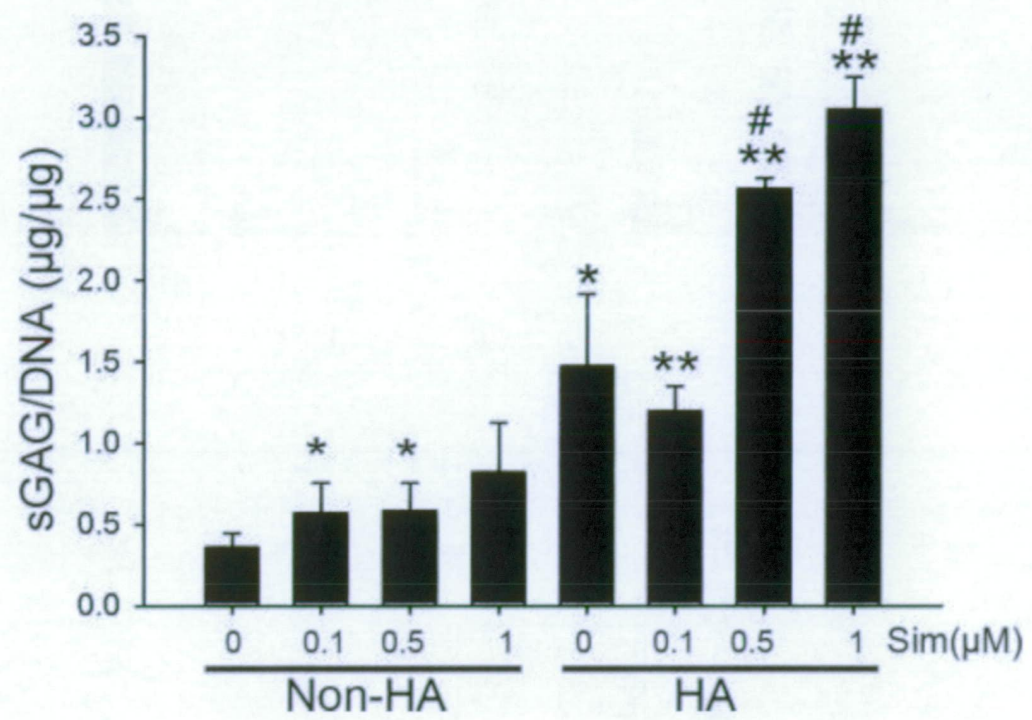


圖 1

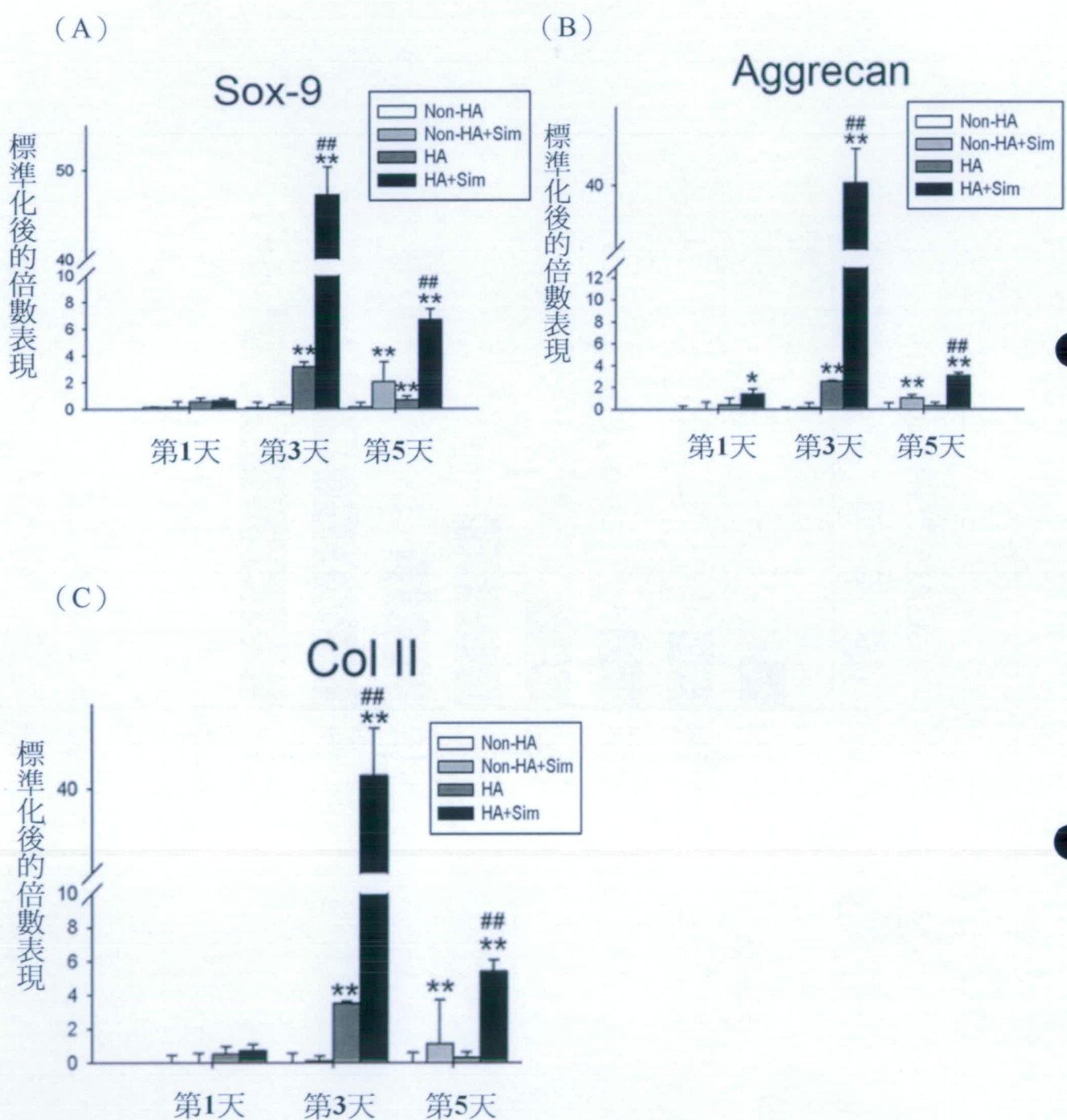
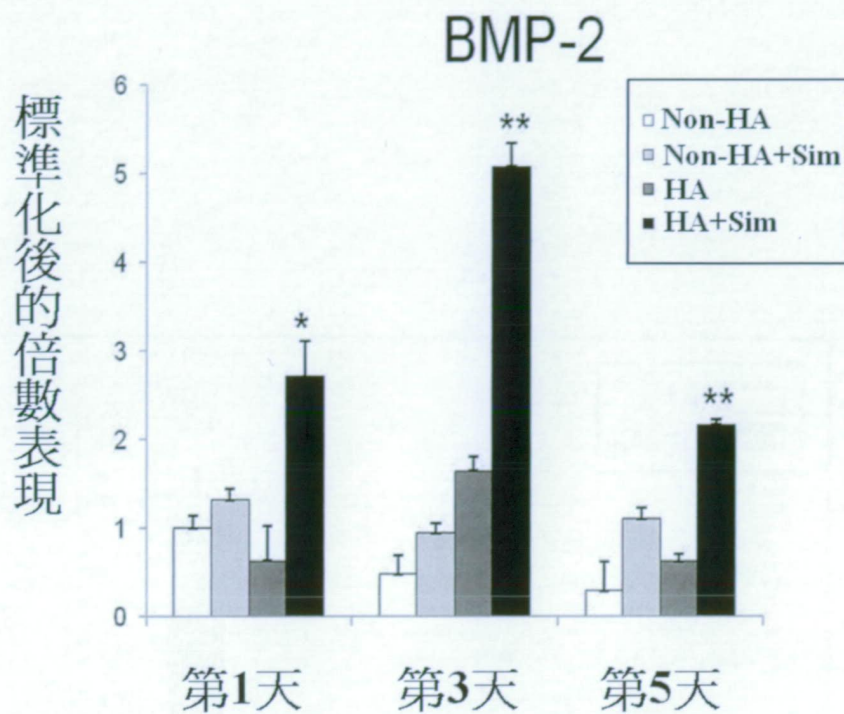


圖 2

(A)



(B)

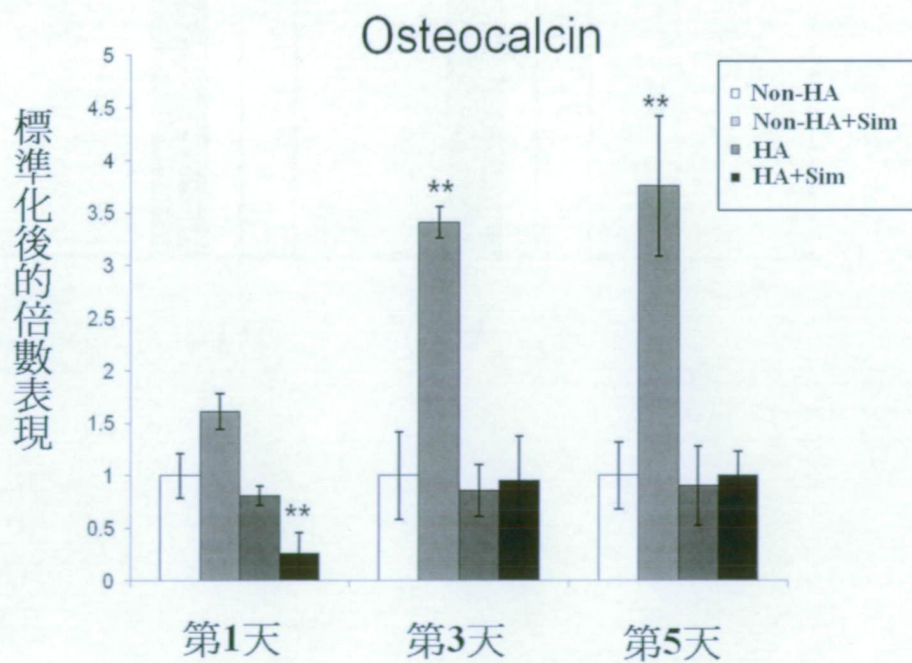


圖 3

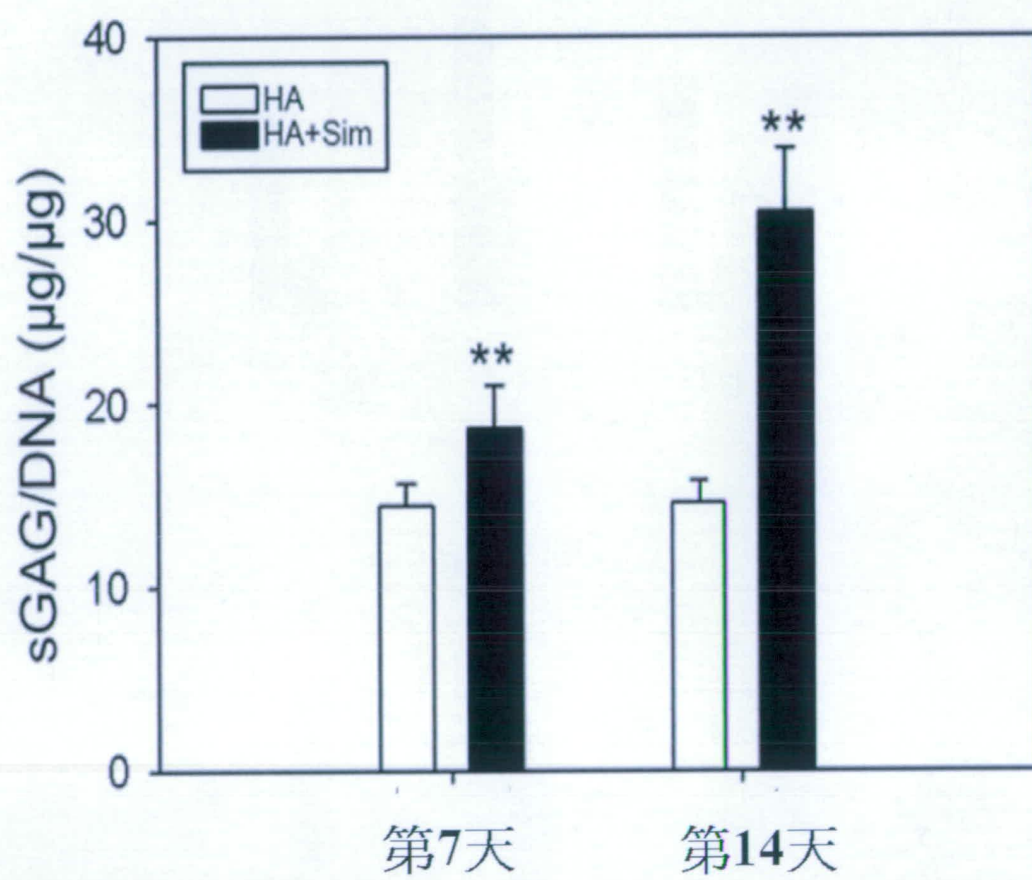


圖 4

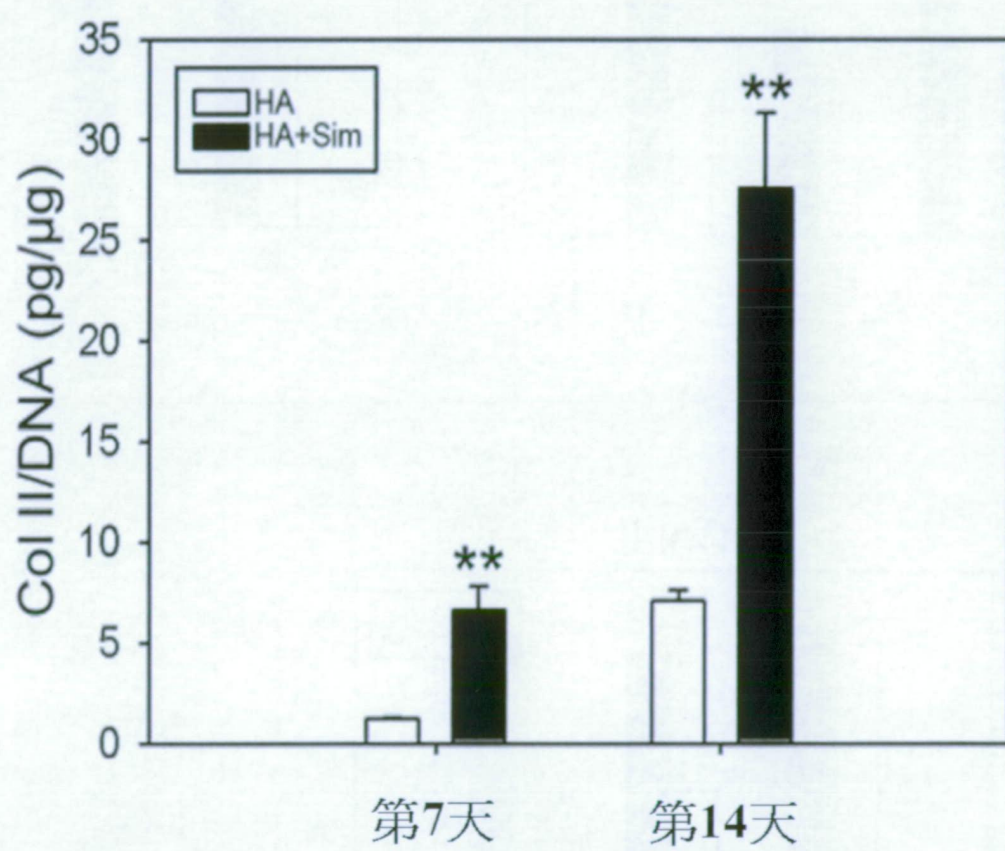


圖 5

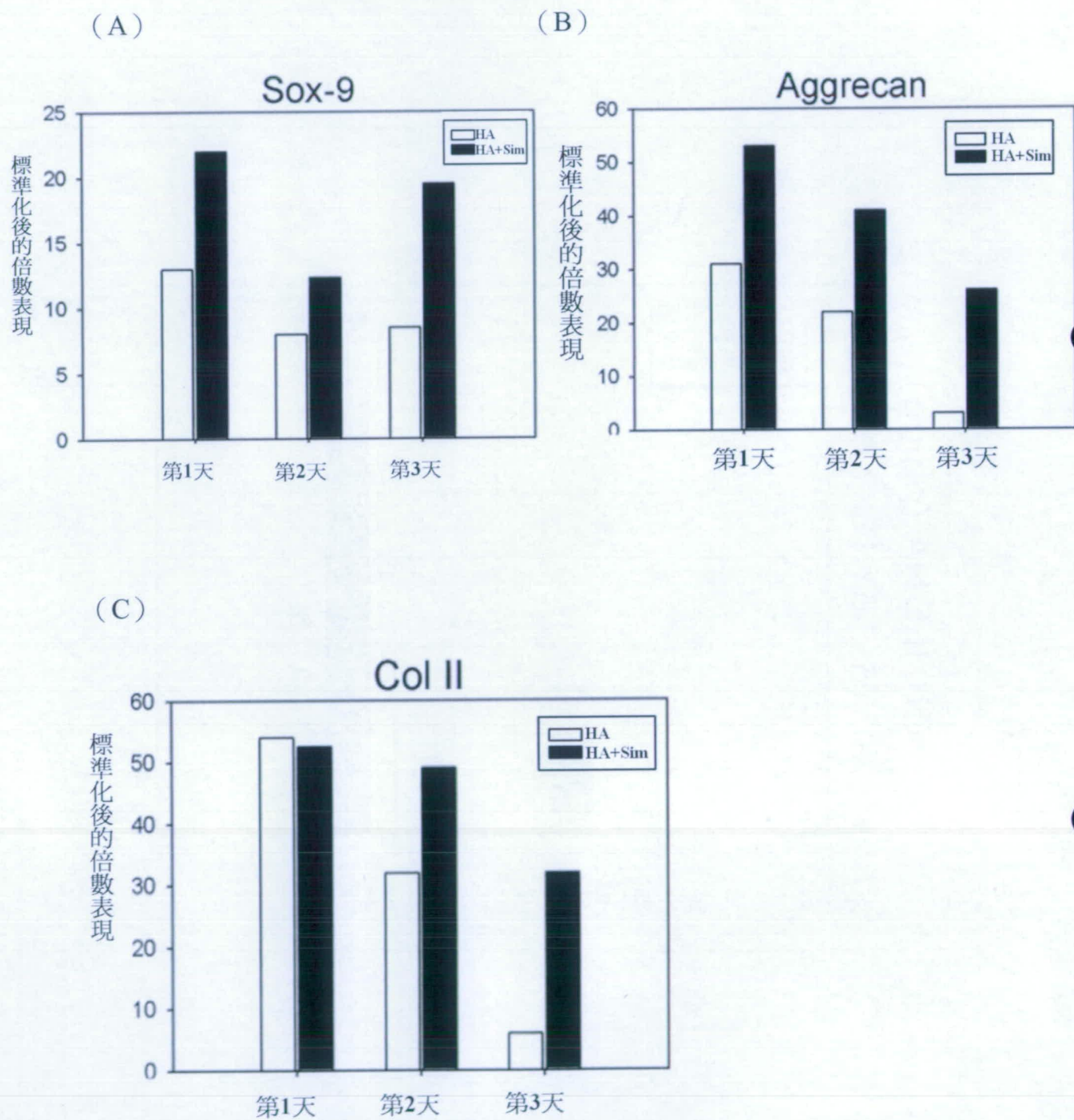


圖 6

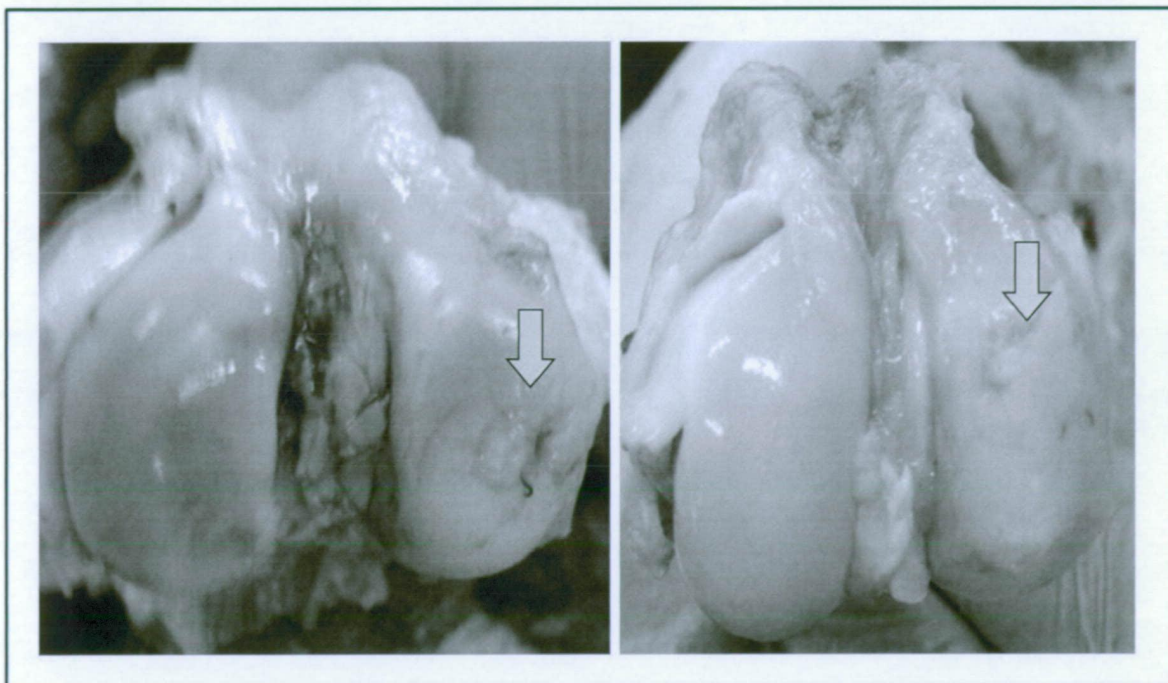


圖 7