



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107613972 B

(45) 授权公告日 2020.11.24

(21) 申请号 201580080823.2

(22) 申请日 2015.06.18

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107613972 A

(43) 申请公布日 2018.01.19

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.12.11

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2015/081835 2015.06.18

(87) PCT国际申请的公布数据
W02016/201682 ZH 2016.12.22

(73) 专利权人 高雄医学大学
地址 中国台湾高雄市三民区十全一路100号

(72) 发明人 何美玲 张瑞根 吴顺成 张智翔

(74) 专利代理机构 广州文冠倪律知识产权代理
事务所(普通合伙) 44348
代理人 倪小敏 何锦标

(51) Int.Cl.

A61K 31/366 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

A61K 31/728 (2006.01)

A61K 38/39 (2006.01)

审查员 毛晓静

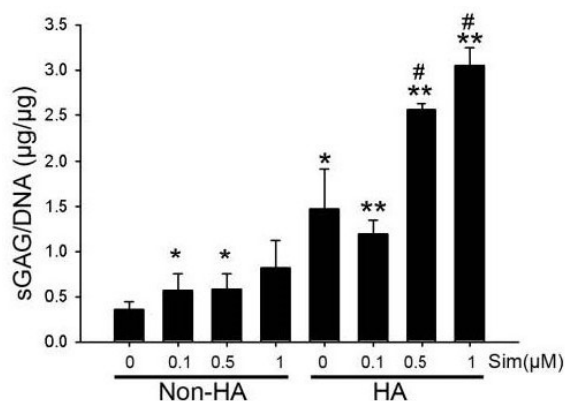
权利要求书1页 说明书10页
序列表3页 附图6页

(54) 发明名称

一种医药组合物用于制备促进软骨细胞生成的药物的用途

(57) 摘要

本发明系关于一种医药组合物用于制备促进软骨细胞生成的药物的用途,其中该医药组合物包含一玻尿酸混合物及一他汀(statin)类化合物。



1. 一种医药组合物用于制备治疗关节软骨的缺损的植入物的用途, 其中所述医药组合物包含三维水凝胶载体、玻尿酸、干细胞及他汀类化合物, 其中所述玻尿酸、所述干细胞及所述他汀类化合物被所述三维水凝胶载体所包覆, 其中所述玻尿酸及所述他汀类化合物诱导所述干细胞形成软骨细胞, 其中所述植入物用于植入至关节软骨的缺损部位内, 以治疗关节软骨的缺损; 其中, 所述干细胞为人类间质干细胞。

2. 如权利要求1所述的用途, 其中所述人类间质干细胞为人类脂肪干细胞。

3. 如权利要求1所述的用途, 其中所述他汀类化合物为辛伐他汀。

4. 如权利要求3所述的用途, 其中所述辛伐他汀为微球剂型。

5. 如权利要求1所述的用途, 其中所述医药组合物进一步抑制由所述干细胞形成的软骨细胞硬骨化。

6. 如权利要求5所述的用途, 其中所述软骨细胞硬骨化被抑制是通过抑制骨钙素的表达。

7. 如权利要求1所述的用途, 其中所述干细胞形成软骨细胞是通过增加骨形态蛋白2的表达。

8. 如权利要求1所述的用途, 其中所述干细胞形成软骨细胞是通过增加硫酸化葡萄糖胺聚糖的生成。

9. 如权利要求1所述的用途, 其中所述干细胞形成软骨细胞是通过促进软骨分化基因的表达, 其中所述软骨分化基因包含Sox-9、软骨蛋白聚糖或第二型胶原蛋白。

10. 如权利要求1所述的用途, 所述医药组合物中, 所述玻尿酸的重量百分比浓度为1%。

11. 如权利要求3所述的用途, 所述医药组合物中, 所述辛伐他汀的浓度为1 μM 。

一种医药组合物用于制备促进软骨细胞生成的药物的用途

技术领域

[0001] 本发明是关于一种医药组合物用于制备促进软骨细胞生成的药物的用途,特别是用包含玻尿酸及辛伐他汀的医药组合物以促进软骨细胞生成。

背景技术

[0002] 软骨组织是一种无血管、淋巴系统以及神经的结缔组织,主要为透明软骨(Hyaline Cartilage),而透明软骨主要是由软骨细胞、第二型胶原蛋白(type II collagen)、蛋白聚糖(proteoglycan)组成。一旦软骨组织受损,由于邻近软骨细胞的数目非常有限,不足以修复损伤,更何况还有受限于细胞外基质的包覆,难以迁移到受伤的部位的问题。目前已知的是,软骨自我修复所生成的新组织大多为纤维性软骨(fibrocartilage)组织,其主要是为第一型胶原蛋白(type I collagen)。由于纤维性软骨组织缺乏与软骨应有的生物力学特性且又无透明软骨的功能,因此会逐渐降解(degradation),难以使关节恢复到伤害前的正常运动状态。近年来,利用组织工程进行软骨组织修复的发展相当快速,此方式是利用软骨细胞或间质干细胞制造出具有活性及功能的关节软骨组织,使用间质干细胞做为细胞来源是目前公认较具潜力的方式,虽然间质干细胞具有可分化成软骨细胞的功能,但若要应用于关节软骨组织的修复,则需要使用诱导因子将间质干细胞诱导软骨分化,然而使用蛋白质类的诱导因子,价格昂贵、蛋白质变性或是携带病原体的问题。使用化学类的诱导因子,则有引起其它副作用的问题。骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)过去已经被报告可以诱导干细胞软骨化及诱导骨母细胞骨化,因此可以应用在关节软骨及骨组织工程。但是诱导BMP-2表达,用以修复关节软骨,也会有硬骨化的疑虑,在过去以干细胞大量表达BMP-2治疗软骨缺损的研究也发现虽然可以修复软骨缺损处,但修复处也发生骨刺生成的问题(Arthritis Rheum. Articular cartilage repair by gene therapy using growth factor-producing mesenchymal cells. 2003 Feb;48(2):430-41.)。但如何帮助干细胞大量表达BMP-2来修复软骨缺损处,同时避免BMP-2所造成的骨化是目前仍未解决的问题。

[0003] 他汀(Statin)类的临床药物,包含辛伐他汀(simvastatin),主要在临床上应用于降低血脂。此外也可以诱导软骨细胞表达BMP-2,软骨化基因(Collagen type II & Aggrecan)及软骨细胞外间质的合成。但他汀类的药物也可以诱导骨母细胞表达BMP-2来帮助骨化进行骨折修复。因此使用他汀的药物,虽然可以诱发BMP-2的表达以应用于软骨修复,但如何帮助干细胞大量表达BMP-2来修复软骨缺损处,同时避免BMP-2所造成的骨化是目前仍未解决的问题。

发明内容

[0004] 本发明以实验证实以含有玻尿酸的微环境配合辛伐他汀(simvastatin)处理脂肪干细胞,除了可以加强脂肪干细胞合成骨形态发生蛋白-2(BMP-2)、软骨分化基因(Sox-9、软骨蛋白聚糖(Aggrecan)及第二型胶原蛋白(Col II)、关节软骨的细胞外间质(sGAG),同

时也可以减少辛伐他汀所诱发的骨钙素(osteocalcin)的表达,可减少细胞硬骨化的产生,以应用于软骨缺损的修补。

[0005] 本发明除了发现以辛伐他汀配合玻尿酸具有诱导干细胞软骨化的功效,更进一步以纤维蛋白作成一三维水凝胶载体,以包覆玻尿酸及干细胞外,并将一含有辛伐他汀的微球(microsphere)加入该载体内,会更有效的促进BMP-2的表达,增加软骨化基因的表达量,及增强脂肪干细胞生成硫酸化葡萄糖胺聚糖(一种主要的关节软骨细胞外间质)的含量;并在迷你猪的软骨缺损的动物模式中,也发现该本组合(脂肪干细胞结合辛伐他汀及玻尿酸)的方式,具有修复关节软骨缺损的功效。

[0006] 本文中的用语“一”或“一种”系用以叙述本发明的组件及成分。此术语仅为了叙述方便及给予本发明的基本观念。此叙述应被理解为包括一种或至少一种,且除非明显地另有所指,表示单数时亦包括复数。

[0007] 本发明提供包含玻尿酸混合物及他汀类药物的医药组合物、剂量试剂盒、及治疗方法。

[0008] 本发明提供一种医药组合物用于制备促进软骨细胞生成的药物的用途,其中该医药组合物包含一玻尿酸(hyaluronan,HA)混合物及一他汀(statin)类化合物。

[0009] 本文中所提“促进软骨细胞生成”一词包含但不限于是指促使细胞合成、代谢、表达或分泌与软骨分化有关的因子或激素,以使细胞形成软骨细胞。

[0010] 在一具体实施例中,该玻尿酸混合物包含一玻尿酸、纤维蛋白及一干细胞。在一较佳具体实施例中,该纤维蛋白形成一水凝胶。该纤维蛋白形成一三维水凝胶的支架结构,即一三维纤维蛋白水凝胶(3D fibrin hydrogel),以作为一载体,用以包覆该玻尿酸及该干细胞。

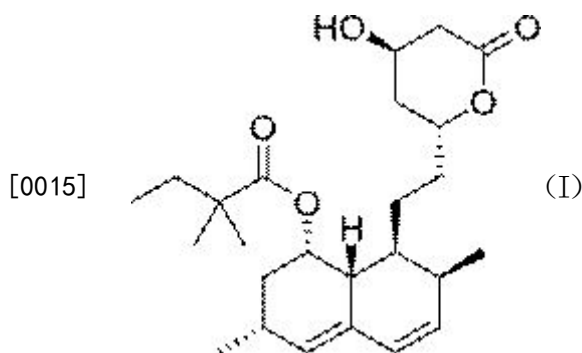
[0011] 本文所用“水凝胶(Hydrogel)”一词是指以水为分散介质的凝胶,其构成是由于具有网状交联结构的水溶性高分子中引入一部分疏水基团和亲水残基,亲水残基与水分子结合,将水分子连接在网状内部,而疏水残基遇水膨胀的交联聚合物。故凡是水溶性或亲水性的高分子,通过一定的化学交联或物理交联,都可形成水凝胶。水凝胶可分为物理凝胶和化学凝胶:(1)物理凝胶是通过物理作用力如静电作用、氢键、链的缠绕等形成的,这种凝胶是非永久性的,通过加热凝胶可转变为溶液,所以也被称为假凝胶或热可逆凝胶。许多天然高分子在常温下呈稳定的凝胶态,如k2型角叉菜胶、琼脂等;在合成聚合物中,聚乙烯醇(PVA)是一典型的例子,经过冰冻融化处理,可得到在60℃以下稳定的水凝胶;及(2)化学凝胶是由化学键交联形成的三维网络聚合物,是永久性的,又称为真凝胶。根据水凝胶大小形状的不同,有宏观凝胶与微观凝胶(微球)之分,根据形状的不同宏观凝胶又可分为柱状、多孔海绵状、纤维状、膜状、球状等,目前制备的微球有微米级及纳米级之分。

[0012] 本文所提“干细胞”一词是指一群具有细胞自我更新(self-renewal)、增生(proliferation)能力,同时能长期维持在未分化(undifferentiation)状态的细胞,并且在受到适当诱导刺激后可以分化成不同世系的细胞群及特定功能的组织的多重分化(multi-differentiation)特性。“人类间质干细胞”一词是指任何得自于人类间质组织的细胞且具有无限自行更新的能力并且可分化为多种细胞或是组织形式,例如但不限于脂肪间质干细胞、骨髓间质干细胞或脐带间质干细胞、脐带血间质干细胞、骨膜间质干细胞、滑膜间质干细胞及肌肉间质干细胞所构成群组之一。本发明的实施例是以人类脂肪间质干细胞

(或称人类脂肪干细胞(human adipose-derived stem cells,hADSCs))的实施例予以示范阐明,但本发明不受下述实施例所限制。在一具体实施例中,该干细胞包含一人类皮肤纤维母细胞(human dermal fibroblast)、一间质干细胞(mesenchymal stem cell)或一脂肪干细胞(adipose-derived stem cell)。在一较佳具体实施例中,该干细胞为人类脂肪干细胞(hADSCs)。

[0013] 在一具体实施例中,该玻尿酸的重量百分比浓度范围为0.1~10 %。在一较佳具体实施例中,该玻尿酸的重量百分比浓度范围为0.5~5 %。在一更佳具体实施例中,该玻尿酸的重量百分比浓度为1 %。

[0014] 在本文中“他汀(statin)类化合物”包含但不限于阿托伐他汀(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)、罗素伐他汀(rosuvastatin)或辛伐他汀(simvastatin)。在一较佳具体实施例中,该他汀类化合物为一辛伐他汀(simvastatin)。而该辛伐他汀(simvastatin)的结构式为式(I):



[0016] 在一具体实施例中,该辛伐他汀的浓度范围为0.1~10 μM 。在一较佳具体实施例中,该辛伐他汀的浓度范围为0.5~5 μM 。在一更佳具体实施例中,该辛伐他汀的浓度为1 μM 。在另一具体实施例中,该辛伐他汀为微球(microsphere)剂型。而微球的剂型可有效的控制辛伐他汀的浓度释放。

[0017] 因此本发明的医药组合物可用包含一具有玻尿酸及干细胞的纤维水凝胶,以及一含有辛伐他汀的微球的组成给予一个体,以促进其软骨生成或修复软骨缺损。另外,该含有辛伐他汀的微球更可直接加入于该具有玻尿酸及干细胞的纤维水凝胶一并给予该个体。

[0018] 此处所用“软骨缺损”包含但不限于指关节软骨退化,或基因突变或外力伤害而导致关节软骨缺损/磨损的疾病。而关节软骨广泛存在于骨的关节面、肋软骨、气管、耳郭、椎间盘等处。

[0019] 目前已知许多因子或触发剂可刺激软骨细胞的合成代谢,如胰岛素样生长因子-I(IGF-I)为滑液中的主要合成代谢生长因子,且刺激蛋白聚糖与胶原蛋白的合成;另外,骨形态发生蛋白(BMP)家族的成员(尤其BMP2、BMP4、BMP6及BMP7)及人类转化生长因子- β (TGF- β)家族的成员可诱导软骨细胞合成代谢刺激(Chubinskaya及Kuettner,2003)。同时近年来已鉴别出一种诱导软骨细胞的合成代谢刺激的化合物(US 6,500,854;EP 1 391 211)。因此,在一较佳具体实施例中,本发明的该促进软骨细胞生成的功效是通过增加或加强与刺激软骨细胞的合成代谢有关的因子或激素,以诱发细胞或干细胞软骨化。在一更佳具体实施例中,该促进软骨细胞生成是通过增加骨形态蛋白-2(BMP-2)的表达。

[0020] 另外,关节软骨的两种主要细胞外间质组成成分为蛋白聚糖(proteoglycan)及第二型胶原蛋白(Collagen type II,Col II)。而葡萄糖胺聚糖(glycosaminoglycan,GAG)是蛋白聚糖中的糖链部分,其结构特征具有硫酸化的二糖重复单位。第二型胶原蛋白及蛋白聚糖形成软骨的骨架,为软骨提供稳定性及弹性强度。除了作为组织的结构性骨架以外,细胞外基质(ECM)也通过细胞的讯息传导机制调节软骨细胞。此等复杂的交互作用在mRNA以及蛋白质表达的层面影响软骨细胞的基因表达,从而改变细胞的内部状态。此外,细胞外间质的降解通常与软骨的病理状态相关,此时,第二型胶原蛋白表达量减少,且基质金属蛋白酶(MMP)的活性增强。此外,TGF- β 1及IGF-I等生长因子与关节软骨细胞的细胞外基质的分泌与维持有关。故在一较佳具体实施例中,本发明的该促进软骨细胞生成的功效是通过增加细胞外间质的生成表达及相关刺激细胞外间质维持/合成的因子的表达,以诱发细胞或干细胞软骨化并形成软骨。于一更佳具体实施例中,该促进软骨细胞生成是通过增加硫酸化葡萄糖胺聚糖(sGAG)的生成。

[0021] 而软骨分化基因可诱使细胞软骨化,一般软骨分化基因包含但不限于Sox-9、软骨蛋白聚糖(aggrecan)或第二型胶原蛋白(collagen type II)。在一具体实施例中,该促进软骨细胞生成是通过促进软骨分化基因的表达,其中该软骨分化基因包含Sox-9、软骨蛋白聚糖(aggrecan)或第二型胶原蛋白(collagen type II)。

[0022] 本文所用的「表达」一词包含但不限于基因、RNA或蛋白质的表达。

[0023] 此外,大多数可刺激软骨细胞的合成代谢的化合物都有严重副作用,例如BMP-2表达过量导致骨刺生成,即硬骨化现象发生。因此,目前尚无不仅可刺激软骨细胞分化且无此等副作用的化合物。而一些成骨因子或诱使硬骨化的因子包含但不限于骨钙素(osteocalcin)。因此本发明除了通过加强各种与软骨生成有关的因子外以促进软骨细胞生成外,更可避免于软骨形成过程中会有硬骨化的现象产生。在一具体实施例中,该医药组合物进一步抑制生成的软骨细胞硬骨化。在一较佳具体实施例中,该抑制生成的软骨细胞硬骨化是通过抑制骨钙素(osteocalcin)的表达。

[0024] 本发明亦提供一种治疗软骨缺损的方法,包含给予一治疗有效量的医药组合物于一个体的软骨缺损部位,其中该医药组合物包含一玻尿酸(hyaluronan,HA)混合物及一他汀(statin)类化合物。

[0025] 在一具体实施例中,该玻尿酸混合物包含一玻尿酸、纤维蛋白及一干细胞。在一较佳具体实施例中,该纤维蛋白形成一水凝胶。该纤维蛋白形成一三维水凝胶的支架结构,即一三维纤维水凝胶(3D fibrin hydrogel),以作为一载体,用以包覆该玻尿酸及该干细胞。

[0026] 于另一具体实施例中,该他汀(statin)类化合物为一辛伐他汀。本发明的他汀(statin)类化合物,如辛伐他汀,可覆埋于例如经由凝聚技术或经由界面聚合制备的微囊(例如分别为羟基甲基纤维素或明胶微囊,及聚-(甲基丙烯酸甲酯)微囊)中、胶体药物传递系统(例如微脂体、微球、微乳液、奈米粒子或奈米胶囊)中或于巨乳液中。在一较佳具体实施例中,该辛伐他汀为微球(microsphere)剂型。而微球的剂型可有效的控制辛伐他汀的浓度释放。

[0027] 此处所用“治疗有效量”一词是指化合物当投与个体以治疗疾病时足以实现对该疾病的该治疗的量。“治疗有效量”可视化合物、疾病及其严重性及欲治疗个体的年龄、体重等而变化。在一具体实施例中,该玻尿酸的治疗有效量范围为重量百分比浓度0.1~10%。在

一较佳具体实施例中,该玻尿酸的治疗有效量范围为重量百分比浓度0.5~5 %。在一更佳具体实施例中,该玻尿酸的治疗有效量为重量百分比浓度1 %。在另一具体实施例中,该辛伐他汀的治疗有效量范围为0.1~10 μM 。在一较佳具体实施例中,该辛伐他汀的治疗有效量范围为0.5~5 μM 。在一更佳具体实施例中,该辛伐他汀的治疗有效量为1 μM 。

[0028] “治疗”一词是指对任何疾病或病症的改善(也是指抑制疾病或降低其至少一个临床症状的显现、程度或严重性)。

[0029] 本文中用语“个体(subject)”一词是指动物。在一较佳具体实施例中,该个体是指哺乳动物。在一更佳具体实施例中,该个体是指人类。

[0030] 本发明的医药组合物可用医药技术中熟知的方式进行制备。一般而言,投与医药有效量的本发明的医药组合物。实际投与的医药组合物的剂量通常由医师按照如下相关情况确定,包括:欲处理的病状;所选投药途径;实际投与的化合物;个别患者的年龄、体重及反应;患者症状的严重性;及其类似因素。

[0031] 本发明的医药组合物较佳的授予个体的途径为关节内授予。本发明的医药组合物亦可以持续释放形式授予或自持续释放药物传递系统授予。

[0032] 本发明进一步提供一试剂盒,其包含一玻尿酸混合物及一他汀(statin)类化合物。

[0033] 在一具体实施例中,该玻尿酸混合物包含一玻尿酸(hyaluronan,HA)、纤维蛋白及一干细胞。在一较佳具体实施例中,该纤维蛋白形成一水凝胶。该纤维蛋白形成一三维水凝胶的支架结构,即一三维纤维水凝胶(3D fibrin hydrogel),以作为一载体,用以包覆该玻尿酸及该干细胞。

[0034] 在于另一具体实施例中,该他汀(statin)类化合物为一辛伐他汀。在一较佳具体实施例中,该辛伐他汀为微球(microsphere)剂型。

[0035] 在一具体实施例中,含有玻尿酸及干细胞的纤维水凝胶,以及含有辛伐他汀的微球可为分开的剂型,于使用时在一并给予使用。或者是将含有辛伐他汀的微球溶入于该纤维水凝胶中成为单一剂型后再行给予。

[0036] 本发明所提供的一种医药组合物用于制备促进软骨细胞生成的药物的用途,与其它常用技术相互比较时,更具有下列的优点:

[0037] (1)玻尿酸与他汀(statin)类化合物一并使用可显著且有效的加强与软骨生成或诱使细胞软骨化的相关因子,如骨形态蛋白(BMP)、软骨细胞外间质(如sGAG或Col II)、软骨分化基因(如Sox-9、软骨蛋白聚糖(aggrecan)或第二型胶原蛋白(collagen type II))等,故可应用于各种与软骨缺损/磨损有关的疾病的治疗上。

[0038] (2)目前市面上许多治疗软骨缺损或刺激软骨生长的药物或试剂,都会有引起硬骨化的疑虑,可能是因软骨化因子表达过量所导致。但本发明的医药组合物不仅可显著提高软骨生成或诱使细胞软骨化的相关因子的表达,更进一步抑制硬骨化因子的表达,如骨钙素的表达量下降,以避免硬骨化现象的发生。

附图说明

[0039] 图1为辛伐他汀(simvastatin)对培养于玻尿酸(HA)或无玻尿酸(Non-HA)涂布的孔内的人类脂肪干细胞(hADSCs)表达硫酸化葡萄糖胺聚糖(sGAG)的形成的影响(*和**:与无

玻尿酸及辛伐他汀处理组进行比较, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。#: 与以辛伐他汀处理组 (0 μM) 进行比较, $p < 0.01$ 。实验数量为3)。

[0040] 图2A为辛伐他汀对有以玻尿酸(HA)或无玻尿酸(Non-HA)培养的人类脂肪干细胞的软骨分化基因Sox-9表达的影响(与无玻尿酸组进行比较(Non-HA), ** $p < 0.01$ 。实验数量为4)。

[0041] 图2B为辛伐他汀对有以玻尿酸(HA)或无玻尿酸(Non-HA)培养的人类脂肪干细胞的软骨分化基因Aggrecan表达的影响(与无玻尿酸组进行比较(Non-HA), ** $p < 0.01$ 。实验数量为4)。

[0042] 图2C为辛伐他汀对有以玻尿酸(HA)或无玻尿酸(Non-HA)培养的人类脂肪干细胞的软骨分化基因Col II表达的影响(与无玻尿酸组进行比较(Non-HA), ** $p < 0.01$ 。实验数量为4)。

[0043] 图3A为辛伐他汀对有以玻尿酸(HA)或无玻尿酸培养的人类脂肪干细胞的骨形态发生蛋白-2(BMP-2)基因表达的影响(与无玻尿酸组(Non-HA)的第一天数据进行比较, ** $p < 0.01$ 。实验数量为4)。

[0044] 图3B为辛伐他汀对有以玻尿酸(HA)或无玻尿酸培养的人类脂肪干细胞的骨钙素(osteocalcin)基因表达的影响(与无玻尿酸组(Non-HA)的第一天数据进行比较, ** $p < 0.01$ 。实验数量为4)。

[0045] 图4为以辛伐他汀处理三维玻尿酸/纤维蛋白之水凝胶包覆的人类脂肪干细胞的硫酸化葡萄糖胺聚糖(sGAG)的形成表达结果分析(同一天的玻尿酸组(HA)与玻尿酸加辛伐他汀组(HA + Sim)进行比较, ** $p < 0.01$ 。实验数量为3)。

[0046] 图5为以辛伐他汀处理三维玻尿酸/纤维蛋白的水凝胶包覆的人类脂肪干细胞的第二型胶原蛋白(Col II)表达结果分析(同一天的玻尿酸组(HA)与玻尿酸加辛伐他汀组(HA + Sim)进行比较, ** $p < 0.01$ 。实验数量为3)。

[0047] 图6A为以辛伐他汀处理三维玻尿酸/纤维蛋白的水凝胶包覆的人类脂肪干细胞的软骨分化基因Sox-9的表达结果分析。

[0048] 图6B为以辛伐他汀处理三维玻尿酸/纤维蛋白的水凝胶包覆的人类脂肪干细胞的软骨分化基因对软骨蛋白聚糖(Aggrecan)的表达结果分析。

[0049] 图6C为以辛伐他汀处理三维玻尿酸/纤维蛋白的水凝胶包覆的人类脂肪干细胞的软骨分化基因Col II的表达结果分析。

[0050] 图7为以含有辛伐他汀及人类脂肪干细胞的三维玻尿酸/纤维蛋白的水凝胶处理迷你猪的膝关节的关节软骨缺损处的结果(箭头为膝关节修复的地方)。

具体实施方式

[0051] 本发明可能以不同的内容来实施, 并不仅限于下列文中所提及的实例。下列实施例仅作为本发明不同面向及特点中的代表。

[0052] 实施例1

[0053] 硫酸化葡萄糖胺聚糖(sGAG)是一种主要的关节软骨细胞外间质。为了测试辛伐他汀(Simvastatin)是否能促进人类脂肪干细胞(human adipose-derived stem cells, hADSCs)表达硫酸化葡萄糖胺聚糖(sGAG)及其较佳浓度为多少。本发明先制备玻尿酸

(hyaluronan, HA) 涂布的孔, 即将溶解于磷酸盐缓冲液 (PBS, 1% w/w) 之 1 ml 的玻尿酸涂布在 24 孔盘上, 于 37°C 下静置 48 小时, 随后用 PBS 洗涤两次。将人类脂肪干细胞接种于含有 500 μ l 的基础培养基, 且密度为 1×10^5 个细胞的孔中, 其中该基础培养基包含一 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), 并额外添加 5% 胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS), 1% 非必需氨基酸及 100 U/ml 青霉素/链霉素 (Gibco-BRL, Grand Island, NY) 中。于培养期间, 增添不同浓度 (0.1 to 1 μ M) 的辛伐他汀 (simvastatin) 于孔盘中, 且该培养基每两天更换一次。于培养后第 7 天, 收集细胞, 并透过 Blyscan 硫酸氨基聚糖检测试剂 (Biocolor, Antrim, UK) 用以进行二甲基亚甲基蓝 (dimethylmethylene blue, DMMB) 分析, 以及以 DNA 标准化硫酸化葡萄糖胺聚糖 (sGAG) 的形成。其结果显示于图 1 中。

[0054] 本发明测试在有无玻尿酸的情形下, 辛伐他汀对人类脂肪干细胞上的硫酸化葡萄糖胺聚糖 (sGAG) 的形成影响。图 1 所示, 在无玻尿酸 (Non-HA) 的情形下, 以 0.1~1 μ M 的辛伐他汀处理皆可促进人类脂肪干细胞上的 sGAG 的表达量 (0 μ M: 0.3 μ g/ μ g; 0.1 μ M: 0.5 μ g/ μ g; 0.5 μ M: 0.5 μ g/ μ g; 1 μ M: 0.7 μ g/ μ g); 而在 1% 玻尿酸的情形下, 并以 0.1~1 μ M 的辛伐他汀处理更可加强 sGAG 的表达量 (0 μ M: 1.4 μ g/ μ g; 0.1 μ M: 1.3 μ g/ μ g; 0.5 μ M: 2.5 μ g/ μ g; 1 μ M: 2.8 μ g/ μ g)。此实验显示在 1 % 的玻尿酸与 1 μ M 的辛伐他汀一起作用下可显著且较佳的促进干细胞表达 sGAG, 以诱使细胞软骨化, 利于软骨生成。

[0055] 实施例 2

[0056] 人类脂肪干细胞 (hADSCs) 分别培养于玻尿酸 (HA) 涂布及无涂布 (Non-HA) 的孔中, 且用或不用 1 μ M 的辛伐他汀 (simvastatin, SIM) 处理 1 至 5 天。因此本发明分为四个实验组: (1) 无玻尿酸 (Non-HA) 组: 人类脂肪干细胞培养于无涂布玻尿酸的孔中, 且无辛伐他汀 (1 μ M) 处理; (2) 无玻尿酸加辛伐他汀 (Non-HA + Sim) 组: 人类脂肪干细胞培养于无涂布玻尿酸的孔中, 但有以辛伐他汀 (1 μ M) 处理; (3) 玻尿酸 (HA) 组: 人类脂肪干细胞培养于涂布玻尿酸的孔中, 但无辛伐他汀 (1 μ M) 处理; 以及 (4) 玻尿酸加辛伐他汀 (HA + Sim) 组: 人类脂肪干细胞培养于涂布玻尿酸的孔中, 且以辛伐他汀 (1 μ M) 处理。

[0057] 在指定的天数收集细胞, 并利用实时 PCR (real-time PCR) 分析 BMP-2 和软骨分化基因 (chondrogenic genes) 的表达。透过下述厂商的指南, 并搭配使用 TRIzol 试剂 (Gibco BRL, Rockville, MD) 以萃取该些细胞的总 RNA (total RNA)。简而言之, 取 20 μ l 的反应体积, 其含 0.5 至 1 μ g 的总 RNA, 再利用 SuperScript First-Strand 合成系统 (Invitrogen) 反转录成 cDNA。利用 iQTM SYBR green[®] supermix (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA) 及定量实时 PCR 检测系统 (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA) 进行并监测实时 PCR 反应。该 cDNA 样本 (取 2 μ l 用于每次反应 25 μ l 的总体积中) 用于分析感兴趣的基因及以参考基因甘油醛 3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 作为对照组。每一个目标基因的表达量, 如先前所述, 计算为 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。对每个有兴趣的基因, 进行每一个实验样本的四个读值, 每个实验至少重复 3 次。外加应用引物组 (applied primer set) 如下: (1) 骨形态发生蛋白 -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) 第二型胶原蛋白 (Collagen type II, Col II) 的正向: CAA CAC TGC CAA CGT CCA GAT, 反向: TCT TGC AGT GGT AGG TGA TGT TCT; (4) 软骨蛋白聚糖 (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

GCGAC,反向:CCC TGT TGT TGC AGC CAA ATT C;以及(6)骨钙素(osteocalcin)的正向:GTG CAG AGT CCA GCA AAG GT,反向:CGA TAG GCC TCC TGA AAG C,其结果显示于图2及图3上。

[0058] 本发明先测试在有无玻尿酸的情形下,1 %的玻尿酸(HA)及1 μ M的辛伐他汀(Simvastatin)的组成是否可刺激软骨分化基因(如Sox-9、软骨蛋白聚糖(Aggrecan)及第二型胶原蛋白(Col II))的表达且其较佳浓度为何。图2A至2C所示,在无玻尿酸(Non-HA)的情形下,给予1 μ M的辛伐他汀皆未能有效的促进软骨化基因表达(Non-HA+Sim);但在有1 %玻尿酸的情形下,再给予1 μ M的辛伐他汀(HA+Sim)可得到较佳的软骨化基因的表达量,即提高Sox-9、Aggrecan及Col II的表达量。此实验显示出在1 %的玻尿酸与1 μ M的辛伐他汀一起作用下可显著且较佳的促进干细胞表达出软骨分化基因。

[0059] 本发明测试在有无玻尿酸的情形下,1%的玻尿酸及1 μ M的辛伐他汀的组成是否会刺激BMP-2及骨钙素(osteocalcin)的表达。如图3A所示,将无玻尿酸(Non-HA)组于第1天的BMP-2的表达量当成1作为比较,在无玻尿酸(Non-HA)的情形下,给予1 μ M的辛伐他汀(Non-HA+Sim)都未明显的促进BMP-2基因的表达(第1天:Non-HA组:1倍,Non-HA+Sim组:1.2倍;第3天:Non-HA:0.5倍,Non-HA+Sim组:0.8倍;第5天:Non-HA组:0.2倍,Non-HA+Sim组:1.1倍)。而在有1 %的玻尿酸情形下,并给予1 μ M的辛伐他汀(HA+Sim)则会发现BMP-2的表达量明显增加(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),此实验显示出在1 %的玻尿酸及1 μ M的辛伐他汀一起作用可促进干细胞大量表达BMP-2基因。

[0060] 另外在骨钙素(osteocalcin)基因表达量方面,在图3B中,将无玻尿酸组于第1天的骨钙素的表达量当成1来比较,在无玻尿酸(Non-HA)的情形下,给予1 μ M的辛伐他汀从第1天至第5天会明显促进骨钙素基因的表达,而在有HA的情形下(HA+Sim),给予1 μ M的辛伐他汀从第1天至第5天则可以有效减少由辛伐他汀(simvastatin)所诱发的骨钙素(osteocalcin)的表达。上述结果指出玻尿酸加辛伐他汀一起作用可降低骨钙素(osteocalcin)的表达,以减少硬骨化的产生。

[0061] 实施例3

[0062] 每30 μ L的悬浮于1 %玻尿酸中的人类脂肪干细胞(5×10^6 个细胞)与120 μ L的纤维蛋白(fibrin)溶液(100 mg/ml)混合,然后放置在铁氟隆模具(teflon mold)(深度为5.5 mm及直径为5.5mm)中。将40 μ L的溶于40 mM氯化钙(CaCl_2)的牛凝血酶(bovine thrombin, 300 U/ml)的溶液中加入到模具中,并充分与细胞/纤维蛋白溶液混合。将该混合物在室温下培养15分钟至形成一水凝胶(hydrogel)。待水凝胶形成后,将该三维纤维水凝胶载体(3D fibrin hydrogel carrier)包含人类脂肪干细胞及玻尿酸(玻尿酸/纤维蛋白的水凝胶)从铁氟隆模具中移出,再移至24孔盘中,并以1 ml的基础培养基(DMEM),其中该基础培养基包含一DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium),并额外添加5% 胎牛血清(Fetal bovine serum,FBS),1%非必需氨基酸及100 U/ml青霉素/链霉素(Gibco-BRL, Grand Island, NY)中。该人类脂肪干细胞(hADSCs)培养于玻尿酸/纤维蛋白的水凝胶中,并用或不用1 μ M的辛伐他汀处理7或14天。因此本发明分为两个实验组:(1)玻尿酸(HA)组:人类脂肪干细胞于玻尿酸/纤维蛋白的水凝胶中培养,但不以辛伐他汀(1 μ M)处理;及(2)玻尿酸加辛伐他汀(HA + Sim)组:人类脂肪干细胞于玻尿酸/纤维蛋白的水凝胶中培养,并以辛伐他汀(1 μ M)处理。于第7及14天,收集水凝胶,并于60 $^{\circ}$ C下培养在木瓜蛋白酶溶液中(papain

solution, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 18 小时。然后将每个实验组中所得的 50 μl 的细胞萃取物进行检测 sGAG 合成的 DMMB 分析法或使用 II 型胶原蛋白检测设备 (Type II Collagen Detection Kit Chondrex Inc. WA, USA) 进行第二型胶原蛋白分析, 其结果显示在图 4 及图 5 中。

[0063] 在以三维玻尿酸水凝胶包覆的情形下, 给予 1 μM 的辛伐他汀 (simvastatin) 的组成是否有效的促进间质干细胞生成两种主要的细胞外间质, 即硫酸化葡萄糖胺聚糖 (sGAG) 及第二型胶原蛋白 (Collagen type II, Col II)。在 sGAG 表达量方面, 于第 7 天时, 玻尿酸 (HA) 组为 14 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$, 玻尿酸加辛伐他汀 (HA + Sim) 组为 18 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$; 而于第 14 天时, 玻尿酸组为 14 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$, 玻尿酸加辛伐他汀组为 30 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ (如图 4 所示)。在 Col II 表达量方面, 于第 7 天时, 玻尿酸 (HA) 组为 2 $\text{pg}/\mu\text{g}$, 玻尿酸加辛伐他汀 (HA + SIM) 组为 6 $\text{pg}/\mu\text{g}$; 而于第 14 天时, 玻尿酸组为 6.5 $\text{pg}/\mu\text{g}$, 玻尿酸加辛伐他汀组为 27 $\text{pg}/\mu\text{g}$ (如图 5 所示)。上述结果显示出在三维玻尿酸/纤维蛋白的水凝胶包覆下的情况下, 给予 1 μM 的辛伐他汀 (HA+Sim) 可以有效的促进干细胞表达出两种主要的细胞外间质 (sGAG 及 Col II)。

[0064] 另外, 本发明进一步利用玻尿酸/纤维蛋白的水凝胶培养所述人类脂肪干细胞, 并用或不用 1 μM 的辛伐他汀处理 1 至 5 天, 以分析软骨分化基因 (Sox-9、软骨蛋白聚糖 (Aggrecan) 及第二型胶原蛋白 (Col II)) 的表达情况。故本发明分为两个实验组: (1) 玻尿酸 (HA) 组: 人类脂肪干细胞于玻尿酸/纤维蛋白的水凝胶中培养, 但不以辛伐他汀 (1 μM) 处理; 及 (2) 玻尿酸加辛伐他汀 (HA + Sim) 组: 人类脂肪干细胞于玻尿酸/纤维蛋白的水凝胶中培养, 并以辛伐他汀 (1 μM) 处理。于指定天数收集细胞, 并藉由实时 PCR 分析软骨分化基因的表达, 其结果显示在图 6 中。

[0065] 在三维玻尿酸的水凝胶包覆的情形下, 给予 1 μM 的辛伐他汀是否能有效地促进间质干细胞较佳地表达软骨化基因。如图 6A 至 6C 所示, 在干细胞于三维玻尿酸/纤维蛋白的水凝胶包覆下, 并给予 1 μM 的辛伐他汀 (HA+Sim) 可得到较佳的软骨化基因的表达, 即提高 Sox-9、Aggrecan 及 Col II 的表达量。此实验显示出在三维玻尿酸的水凝胶包覆下, 给予 1 μM 的辛伐他汀可得到较佳的促进干细胞表达软骨分化基因的效果。

[0066] 实施例 4

[0067] 将 40 mg 的辛伐他汀 (Merck & Company, Rahway, NJ, USA) 溶解在 1 ml 的乙醇 (ethanol), 然后再与 1.5 ml 的 0.1N 之 NaOH 混合。将辛伐他汀储备溶液 (stock solution) 加热至 50 $^{\circ}\text{C}$ 维持 2 小时后, 在用 1 N 的盐酸 (HCl, pH= 7.4, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) 中和 pH 值, 使之成为 10 mM 的储备溶液。透过水包油包水的双重乳化 (water-in-oil-in-water (w/o/w) double emulsion) 技术制备微球 (microsphere)。简而言之, 将 16 mg 的羟基磷灰石 (HAp) 粉末溶解于磷酸盐缓冲溶液 (PBS), 以形成第一水相 (water-phase) 溶液。250 μl 的辛伐他汀储备溶液、50 mg 的界面活性剂 Span 80 及 PLGA (聚乳酸甘醇酸) 50/50 (P2191, 分子量: 30,000-60,000, Sigma-Aldrich) 于二氯甲烷 (dichloromethane) 溶液中混合, 以形成油相。将第一水相溶液和油相溶液相互混合, 并以 1000 rpm 搅拌 15 分钟, 以形成第一油包水 (w/o) 的乳化溶液。将第一油包水 (w/o) 的乳化溶液加入至 20 ml 的第二水相溶液, 并与 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) 悬浮溶液于室温下搅拌 30 分钟以硬化该微球。在搅拌过程中抽器是必要的以蒸发二氯甲烷并固化该微球。最后, 该微球透过离心方式收集, 并用 0.1 % 的聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol) 洗涤三次, 再于冷冻干燥机中冻干。

[0068] 所有的实验动物由台东动物繁殖中心(TAPS)提供。动物在手术前,以肌肉注射(IM injection)方式注射0.15 mg/kg的克他明(Ketamine)及镇静剂xylazine进行麻醉。于手术过程中,以5%的吸入性麻醉剂(inhalational Isoflurane)给予动物以维持麻醉。故将迷你猪进行麻醉后,并于其左腿上进行手术。利用骨环锯(trephine bur)于左腿的内髌(medial condyles)上制造出全厚软骨缺损(full-thickness cartilage defects)(直径为6 mm),但不穿透软骨下硬骨(subchondral bone)。于手术后,将含有1 mg的辛伐他汀的微球的玻尿酸/纤维蛋白的水凝胶将植入至软骨缺损部位,并从胫骨获得骨膜以覆盖于缺损部位的上方以缝合修复结构。最后,手术伤口部位会一层一层地进行缝合。手术后,透过口服方式给予动物止痛药Ultracet(Tramadol 37.5mg/Acetaminophen 325mg),一天一次,一次两锭,持续5天。于第12周通过观察以监测治疗的功效。

[0069] 如图7所示,将三维玻尿酸的水凝胶,其包含间质干细胞及含有辛伐他汀(Simvastatin)的微球(microsphere),施予迷你猪的关节软骨缺损部位,可以发现在12周后,该部位的关节软骨缺损情况明显改善。上述结果代表着三维玻尿酸的水凝胶包覆的间质干细胞及含有辛伐他汀的微球具有修复并改善关节软骨缺损的功效。

[0070] 列详细说明为本发明之一较佳实施方式的具体说明,然其并非用以限定本创作,故任何熟习此技艺者,在不脱离本发明的精神和范围内作些许的等效实施或变更,均应包含至本发明的申请专利范围内。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 高雄医学大学
- [0003] <120> 一种医药组合物用于制备促进软骨细胞生成的药物的用途
- [0004] <130> 14197PCT
- [0005] <160> 12
- [0006] <170> PatentIn version 3.5
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 20
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 人工序列
- [0011] <220>
- [0012] <223> 引物
- [0013] <400> 1
- [0014] cgaatgactg gattgtggct 20
- [0015] <210> 2
- [0016] <211> 20
- [0017] <212> DNA
- [0018] <213> 人工序列
- [0019] <220>
- [0020] <223> 引物
- [0021] <400> 2
- [0022] tgagttctgt cgggacacag 20
- [0023] <210> 3
- [0024] <211> 18
- [0025] <212> DNA
- [0026] <213> 人工序列
- [0027] <220>
- [0028] <223> primer
- [0029] <400> 3
- [0030] cttccgcgac gtggacat 18
- [0031] <210> 4
- [0032] <211> 18
- [0033] <212> DNA
- [0034] <213> 人工序列
- [0035] <220>
- [0036] <223> 引物
- [0037] <400> 4
- [0038] gttgggcggc aggtactg 18

[0039]	<210> 5
[0040]	<211> 21
[0041]	<212> DNA
[0042]	<213> 人工序列
[0043]	<220>
[0044]	<223> 引物
[0045]	<400> 5
[0046]	caacactgcc aacgtccaga t 21
[0047]	<210> 6
[0048]	<211> 24
[0049]	<212> DNA
[0050]	<213> 人工序列
[0051]	<220>
[0052]	<223> primer
[0053]	<400> 6
[0054]	tcttgcagtg gtaggtgatg ttct 24
[0055]	<210> 7
[0056]	<211> 20
[0057]	<212> DNA
[0058]	<213> 人工序列
[0059]	<220>
[0060]	<223> 引物
[0061]	<400> 7
[0062]	acacgtgggg acattagtgg 20
[0063]	<210> 8
[0064]	<211> 20
[0065]	<212> DNA
[0066]	<213> 人工序列
[0067]	<220>
[0068]	<223> 引物
[0069]	<400> 8
[0070]	gtggaatgca gaggtggttt 20
[0071]	<210> 9
[0072]	<211> 23
[0073]	<212> DNA
[0074]	<213> 人工序列
[0075]	<220>
[0076]	<223> 引物
[0077]	<400> 9

[0078]	tctcctctgc attcaacagc gac 23
[0079]	<210> 10
[0080]	<211> 21
[0081]	<212> DNA
[0082]	<213> 人工序列
[0083]	<220>
[0084]	<223> 引物
[0085]	<400> 10
[0086]	ccctgttgct gtagccaaat t 21
[0087]	<210> 11
[0088]	<211> 20
[0089]	<212> DNA
[0090]	<213> 人工序列
[0091]	<220>
[0092]	<223> 引物
[0093]	<400> 11
[0094]	gtgcagagtc cagcaaaggt 20
[0095]	<210> 12
[0096]	<211> 19
[0097]	<212> DNA
[0098]	<213> 人工序列
[0099]	<220>
[0100]	<223> 引物
[0101]	<400> 12
[0102]	cgataggcct cctgaaagc 19

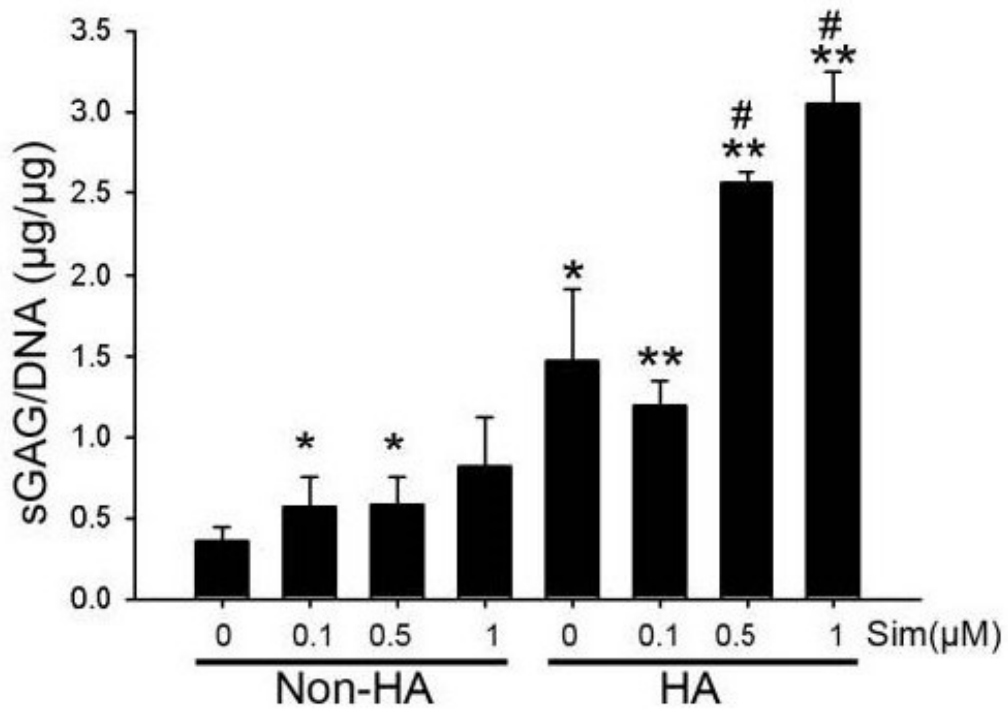


图1

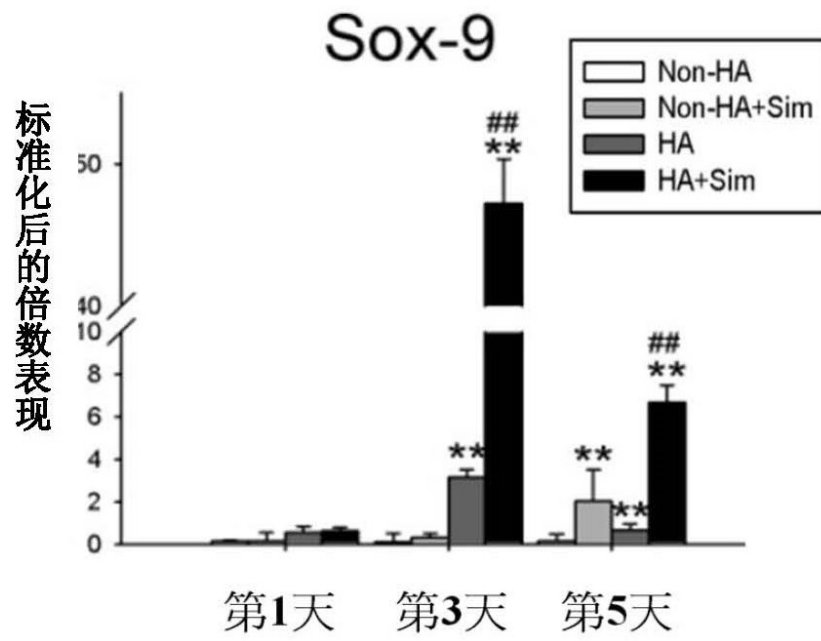


图2A

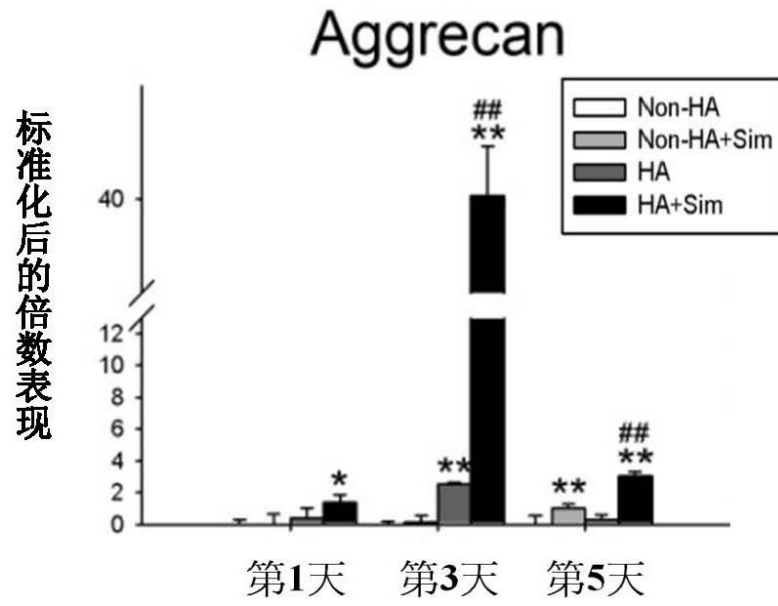


图2B

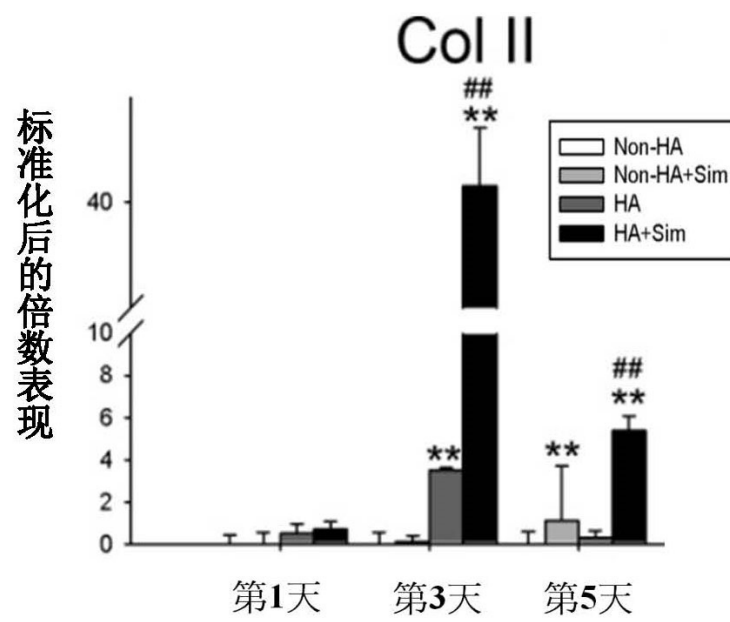


图2C

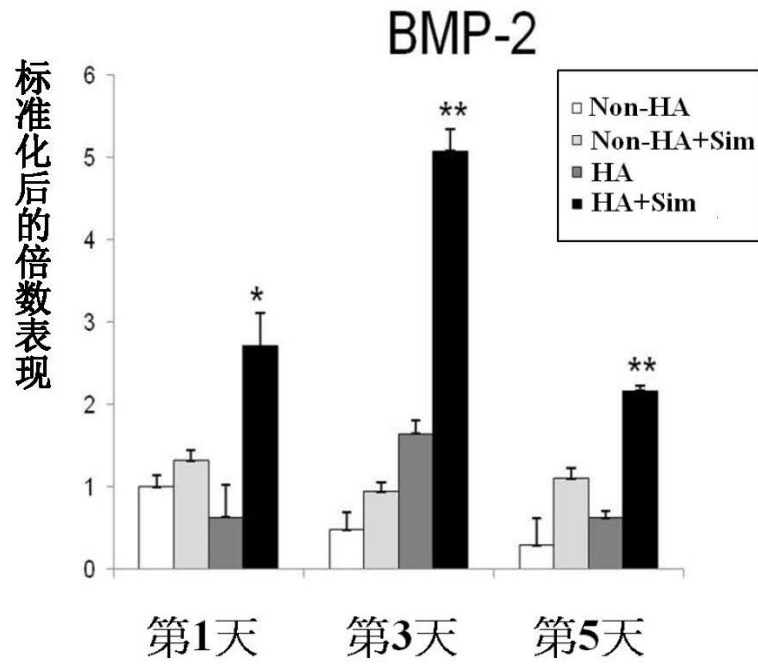


图3A

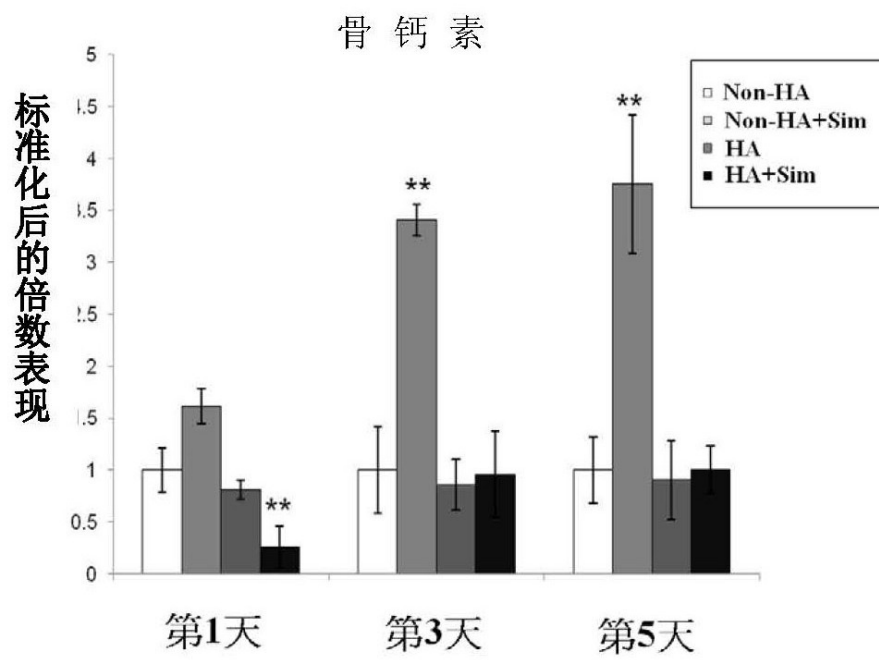


图3B

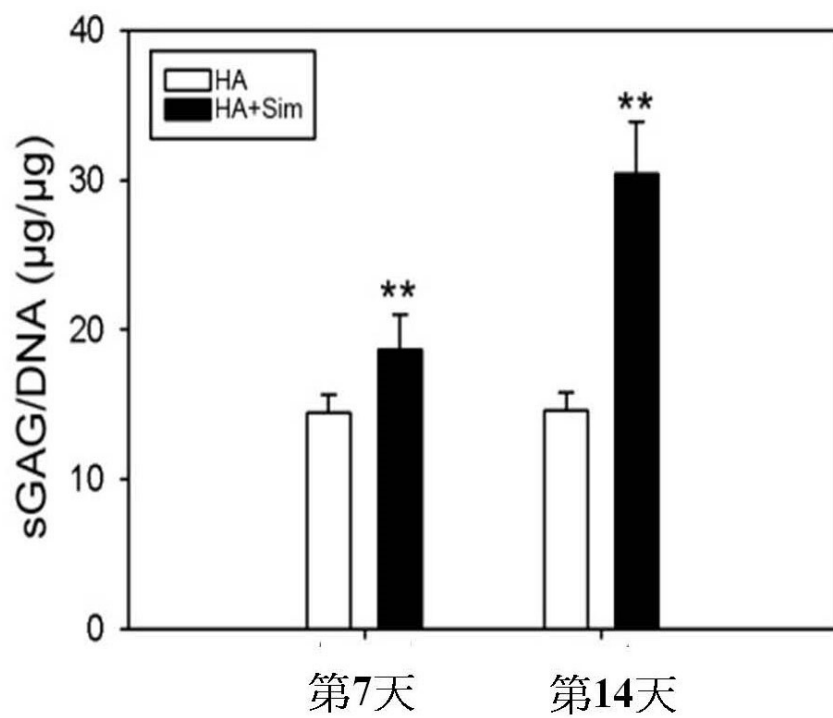


图4

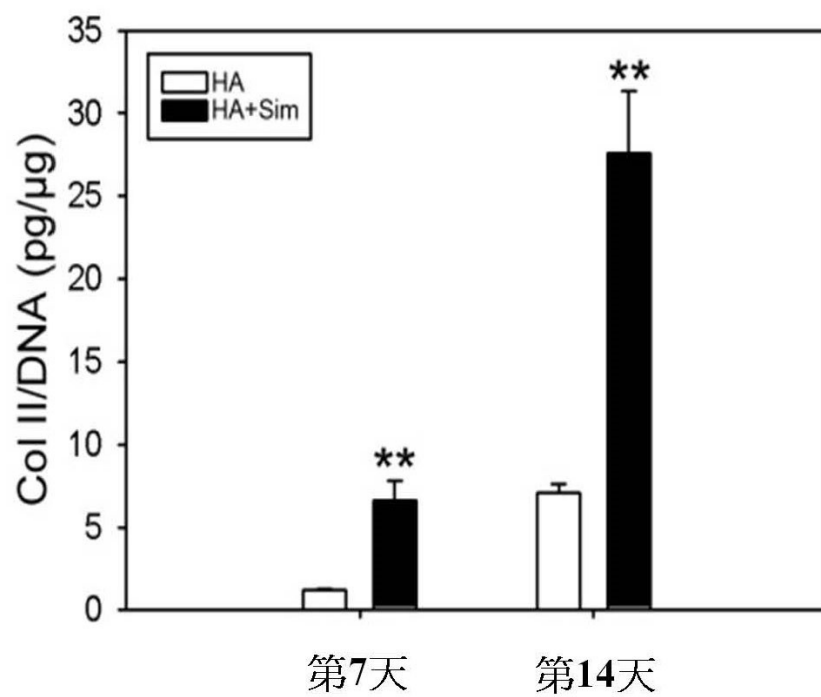


图5

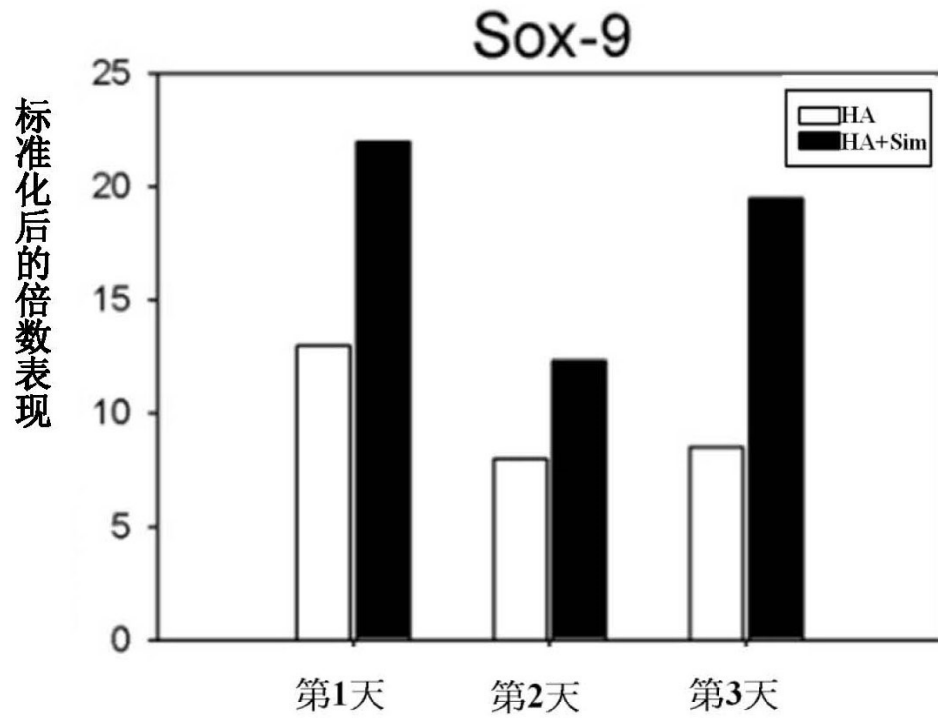


图6A

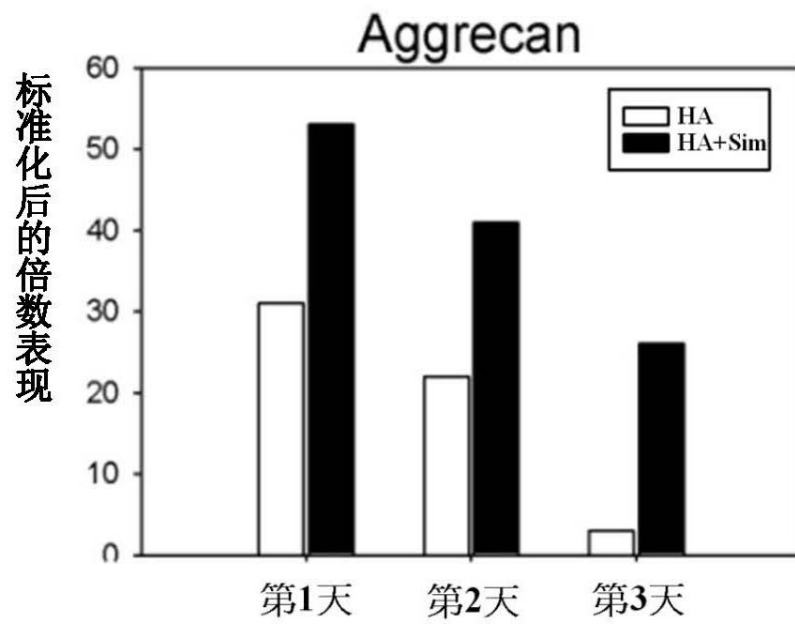


图6B

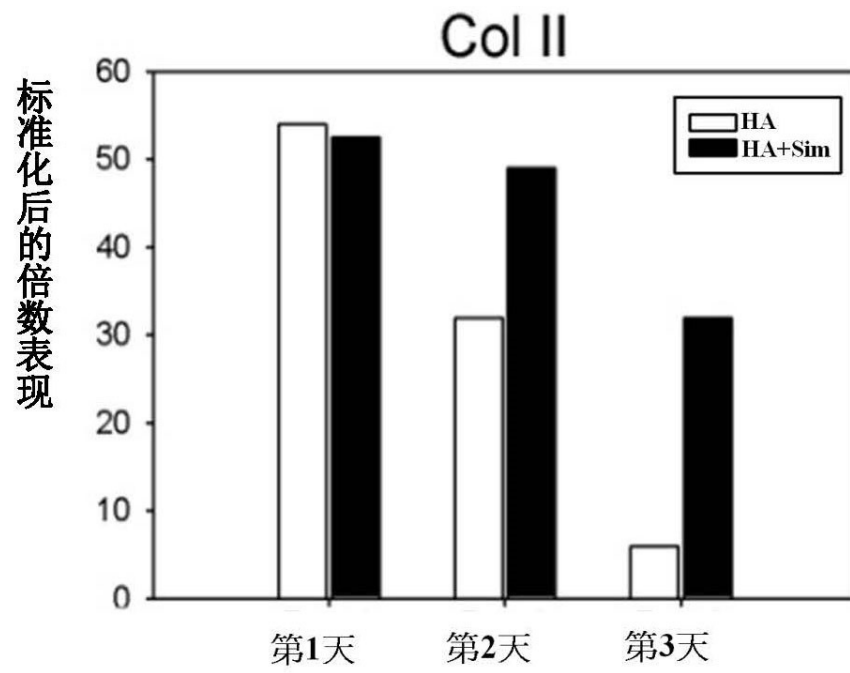


图6C

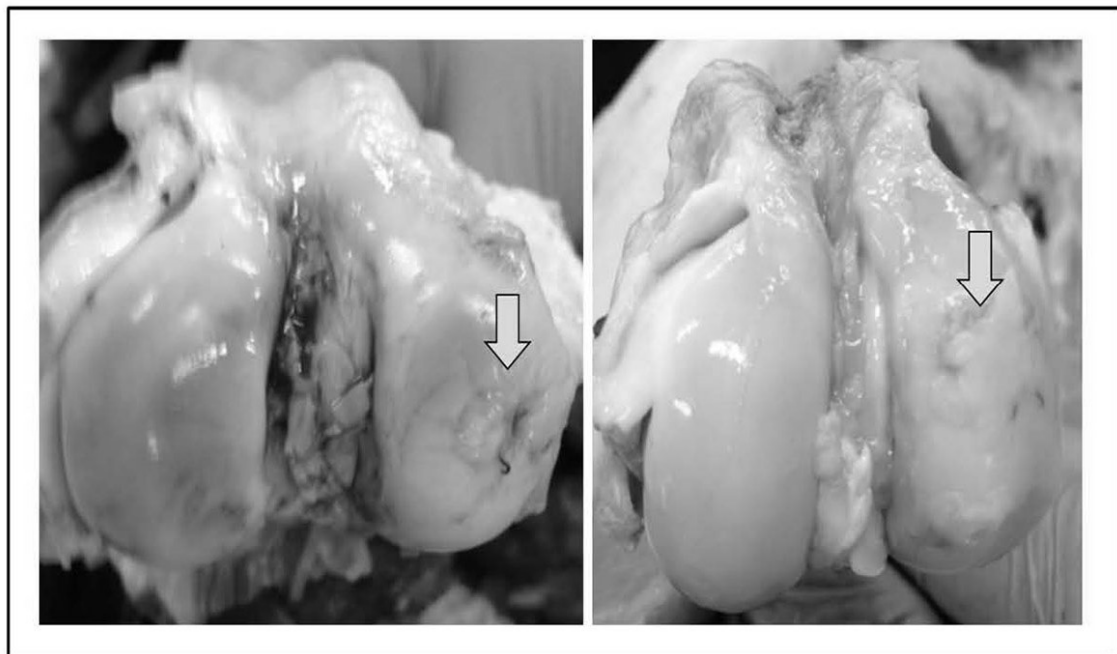


图7