



(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 I676482 B

(45)公告日：中華民國 108 (2019) 年 11 月 11 日

(21)申請案號：107109902 (22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 03 月 22 日

(51)Int. Cl. : A61K39/395 (2006.01) A61K31/713 (2006.01)

A61K31/519 (2006.01) A61K38/39 (2006.01)

A61P19/02 (2006.01) A61P19/08 (2006.01)

(30)優先權：2017/03/23 美國 62/475,397

(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：王昭仁 WANG, CHAU ZEN (TW)；陳崇桓 CHEN, CHUNG HWAN (TW)；周亮吟 CHOU, LIANG YIN (TW)；周妤 CHOU, YU (TW)；何美冷 HO, MEI LING (TW)；林逸翔 LIN, YI HSIUNG (TW)

(74)代理人：蔡清福；蔡馭理

(56)參考文獻：

CN 103965195A KR 20100060300A

WO 2013068836A1

Borza, Corina M., and Ambra Pozzi. "Discoidin domain receptors in disease." *Matrix Biology* 34 (2014): 185-192.Gao, Mingshan, et al. "Discovery and optimization of 3-(2-(Pyrazolo [1, 5-a] pyrimidin-6-yl) ethynyl) benzamides as novel selective and orally bioavailable discoidin domain receptor 1 (DDR1) inhibitors." *Journal of medicinal chemistry* 56.8 (2013): 3281-3295.

審查人員：劉建宏

申請專利範圍項數：5 項 圖式數：11 共 61 頁

(54)名稱

盤基蛋白結構域受體 1 的抑制劑及活化劑及其用途

(57)摘要

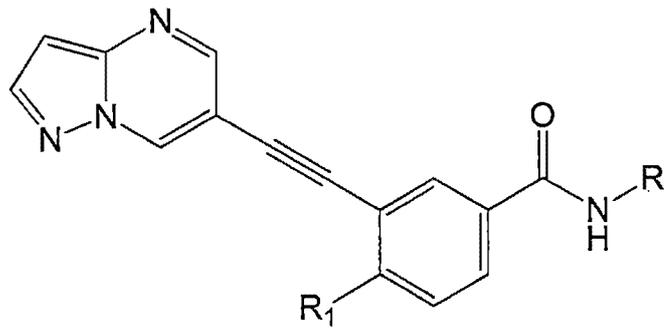
本發明涉及一種盤基蛋白結構域受體 1(DDR1)抑制劑之用途，其係用於製備預防或治療骨關節炎之藥物。本發明還涉及一種 DDR1 活化劑之用途，其係用於製備預防或治療軟骨內骨化異常相關病症之藥物。

The present invention involves a use of discoidin domain receptor 1 (DDR1) inhibitor for the manufacture of a medicament for preventing or treating osteoarthritis diseases. The present invention further involves a use of DDR1 activator for the manufacture of a medicament for preventing or treating achondroplasia-associated diseases.

特徵化學式：

I676482

TW I676482 B



I676482

發明摘要

【發明名稱】(中文/英文)

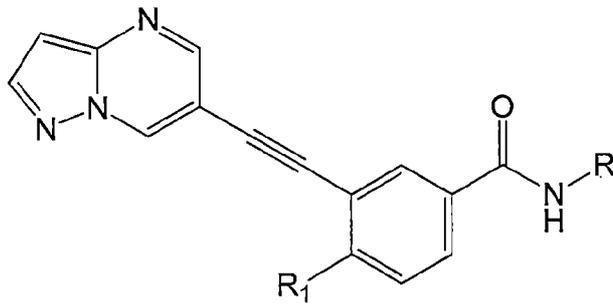
盤基蛋白結構域受體 1 的抑制劑及活化劑及其用途 / Discoidin
Domain Receptor 1 Inhibitor And Activator And Their Uses

【中文】

本發明涉及一種盤基蛋白結構域受體 1(DDR1)抑制劑之用途，其係用於製備預防或治療骨關節炎之藥物。本發明還涉及一種 DDR1 活化劑之用途，其係用於製備預防或治療軟骨內骨化異常相關病症之藥物。

【英文】

The present invention involves a use of discoidin domain receptor 1 (DDR1) inhibitor for the manufacture of a medicament for preventing or treating osteoarthritis diseases. The present invention further involves a use of DDR1 activator for the manufacture of a medicament for preventing or treating achondroplasia-associated diseases.

【代表圖】**【本案指定代表圖】：**無**【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)

盤基蛋白結構域受體 1 的抑制劑及活化劑及其用途 / Discoidin Domain Receptor 1 Inhibitor And Activator And Their Uses

【技術領域】

【0001】 本發明關於盤基蛋白結構域受體的抑制劑或活化劑，尤其是關於盤基蛋白結構域受體的抑制劑或活化劑的用途。

【先前技術】

【0002】 盤基蛋白結構域受體 (Discoidin Domain Receptor, DDRs) 包括 DDR1 和 DDR2，其是一種由膠原蛋白刺激的受體酪氨酸激酶 (receptor tyrosine kinase, RTK)。與其他 RTK 不同的是，DDR 在胞外區域中包含兩個盤狀結構域。DDR 被許多三螺旋膠原蛋白活化，這些膠原蛋白是胞外基質 (ECM) 中最豐富的組分。DDR1 在肺、腎、結腸、腦中的上皮細胞中廣泛表現，而 DDR2 主要在腎、皮膚、肺、心臟和結締組織中的間充質細胞，包括成纖維細胞、肌成纖維細胞、平滑肌和骨骼中表現。研究已顯示，DDR1 和 DDR2 均在基礎細胞過程 (如增殖、存活、分化、黏附和基質重塑) 中起重要作用。DDR1 和 DDR2 的失調 (deregulation) 涉及許多不同疾病，包括纖維化疾病、動脈粥狀硬化和癌症。雖然 DDR1 與 DDR2 屬同一家族，但是 DDR1 與 DDR2 為兩種功能不同之蛋白質，且負責活化 DDR1 與 DDR2 的配體 (ligand) 亦不相同。DDR1 可被所有亞型的膠原蛋白所活化，包括膠原蛋白第 I 型

至第 VI 型及第 VIII 型；然而配體相對限縮的 DDR2 只能被纖維型膠原蛋白第 I 型、第 III 型及第 X 型所活化。因此，DDR1 與 DDR2 的功能和用途和牽涉的訊號傳導路徑無法等同視之。

【0003】 骨關節炎（osteoarthritis，OA）是一種以關節軟骨退行性病變和繼發性骨質增生為特性的慢性關節疾病，好發於負重較大的膝關節、髖關節、腰骶部脊柱關節（Lumbosacral joint）及第一跖趾關節（First MIP joints）等部位，以及手部的遠端指間關節（DIP joints）、近端指間關節（PIP joints）。骨關節炎的主要成因是關節腔中缺少了黏性的滑液（關節液），導致原本應該充當骨關節中作為軟墊的軟骨不正常磨擦，造成破壞與退化。簡言之，骨關節炎是關節軟骨細胞的功能異常，終端分化及凋亡所導致。原發性亦稱為骨關節病、退行性關節炎、增生性關節炎、退化性關節炎、骨性關節炎等。骨關節炎分為原發性和繼發性。原發性骨關節炎發病原因不明，患者沒有創傷、感染、先天性畸形病史、遺傳性缺陷、全身代謝及內分泌異常。繼發性骨關節炎指由於先天性畸形（如先天性髖關節脫位）、創傷（如關節內骨折）、關節面後天性不平整（如骨的缺血性壞死）、關節不穩定（如關節囊或韌帶鬆弛）、關節畸形引起的關節面對合不良（如膝內翻、膝外翻）等原因，在關節局部原有病變的基礎上發生的骨關節炎。由於成體的關節軟骨細胞本來就很少增生，因此軟骨細胞增生減少在成體的關節影響較小，減少關節軟骨細胞終端分化及凋亡才是治療退化性關節炎的重要方向。目前治療骨關節炎（特別是退化性關節炎）的方式，僅有消極的以非類固醇（NSAIDs）止痛消炎、關節內注射玻尿酸或口服醣胺素製劑之輔助性治療，並無有效治療

骨關節炎（特別是退化性關節炎）之藥物，因此，研究及開發有效治療退化性關節炎的藥物或產品非常重要且具有強大的市場潛力。

【0004】 胎兒的大多數骨（如四肢骨、軀幹骨及顱底骨等）均主要以軟骨內成骨的方式發生。這種骨發生既包括與膜內成骨相似的發生過程，又包括軟骨的持續生長與退化，以及軟骨組織不斷被骨組織取代的特有發生過程，而且其發生、生長與改建穿插交錯的情況遠較膜內成骨複雜。軟骨發育不全是骨骼生長的一種遺傳性疾病，大多數是因為 FGFR-3 基因突變所致，由於其軟骨內骨化異常，導致身材矮小和肢體近端短小。軟骨內骨化異常亦可能由於創傷、發育障礙或其他疾病等原因所導致。目前已知 DDR1 在骨骼發育過程中扮演重要角色，然而目前 DDR1 於骨骼發育及軟骨發育過程中的相關作用機制仍不清楚。由於目前並無有效治療軟骨內骨化異常及軟骨發育不全症之藥物，僅能針對病程發展所帶來的不適進行治療或預防，因此，研究及開發有效治療軟骨內骨化異常及軟骨發育不全症的藥物或產品非常重要且具有強大的市場潛力。

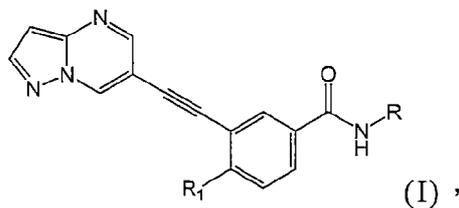
【0005】 本案申請人鑑於習知技術中的不足，經過悉心試驗與研究，並一本鍥而不捨的精神，終構思出本案，能夠克服先前技術的不足，以下為本案的簡要說明。

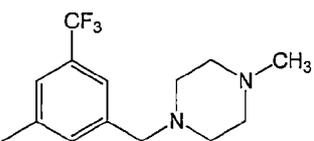
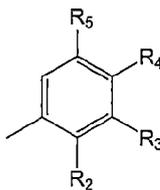
【發明內容】

【0006】 本案可提供預防或治療骨關節炎的藥物以及預防或治療軟骨內骨化異常相關病症之藥物。本發明亦提供一種 DDR1 抑制劑的用途，其能夠透過抑制 DDR1 功能及抑制 DDR1 路徑達成有

效減緩與治療骨關節炎，例如退化性關節炎。此外，本發明亦提供DDR1活化劑的用途，其可透過活化DDR1相關路徑來預防或治療軟骨內骨化異常相關病症。

【0007】 本案之目的之一為提供一種盤基蛋白結構域受體1 (DDR1) 抑制劑之用途，其係用於製備預防或治療骨關節炎之藥物。該DDR1抑制劑較佳是以式(1)表示之化合物或其藥理上可接受之鹽類：



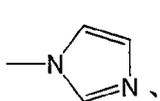
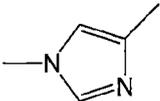
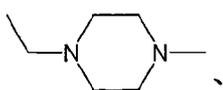
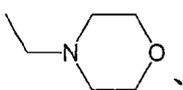
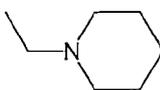
其中 R 選自 、、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、

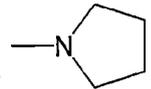
$-(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_{11}$ 及 $-\text{C}_5\text{H}_9$ 所組成的群組其中之一；

R_1 為 $-\text{CH}_3$ 或 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ；

R_2 選自 $-\text{H}$ 、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{X}$ 及 $-\text{OCH}_3$ 所組成的群組其中之一；

R_3 選自 $-\text{H}$ 、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{X}$ 、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$ 、

$-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、、、、、

以及  所組成的群組其中之一；

R_4 選自 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{X}$ 、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{H}$ 所組成的群組其中之一；以及

R_5 選自 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{X}$ 、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{H}$ 所組成的群組其中之

一，其中X為鹵素。

【0008】 本案的另一目的係提供用於預防或治療骨關節炎的方法，該方法包括將治療上有效量的DDR1抑制劑投藥至對其有需要的個體。

【0009】 本案之另一目的為提供一種盤基蛋白結構域受體1 (DDR1) 活化劑之用途，其係用於製備預防或治療軟骨內骨化異常相關病症之藥物。在一具體實施例中，該軟骨內骨化異常相關病症包含軟骨發育不全、軟骨生成減退 (hypochondroplasia)、致死性骨發育不全 (thanatophoric dysplasia)、侏儒症及其組合。

【0010】 本案之另一目的為提供包含DDR1抑制劑或DDR1活化劑的藥物組合物。

【圖式簡單說明】

【0011】 本發明的上述目的及優點在參閱以下詳細說明及附隨圖式之後對那些所屬技術領域中具有通常知識者將變得更立即地顯而易見。

【0012】 第1A圖示出軟骨母細胞之基因轉殖鼠 (a1(II)-Cre ; *Ddr1*^{flox/flox} mice) 的載體之合成。

【0013】 第1B圖示出用以辨認DDR1^{flox/flox}的軟骨母細胞之基因轉殖鼠 (a1(II)-Cre ; *Ddr1*^{flox/flox} mice) 的DNA電泳圖。

【0014】 第1C圖示出用以辨認Col1(II)-Cre/ERT的軟骨母細胞之基因轉殖鼠 (a1(II)-Cre ; *Ddr1*^{flox/flox} mice) 的DNA電泳圖。

【0015】 第1D圖示出軟骨母細胞之基因轉殖鼠的DDR1剔除後 (注射4OHT的CKO小鼠，以「CKO-4OHT」表示) 相較於對照

組（注射油的CKO小鼠，以「CKO-Oil」表示）型態變小。

【0016】 第1E圖以西方墨點法及對應統計圖示出相較於對照組（CKO-Oil），CKO-4OHT小鼠中DDR-1的蛋白質表現明顯受到抑制。

【0017】 第1F圖示出相對於對照組（CKO-Oil），CKO-4OHT小鼠中DDR-1的基因表現顯著受到抑制。

【0018】 第2A圖示出IP注射4-OHT後，*Ddr1*^{flox/flox}轉殖鼠（對照組，以「FF-4OHT」表示）及剔除*Ddr1*後的CKO-4OHT小鼠連續五週的跑步行為測試結果。

【0019】 第2B圖示出IP注射4-OHT後，*Ddr1*^{flox/flox}小鼠（對照組，以「FF-4OHT」表示）及剔除*Ddr1*後的CKO-4OHT小鼠以番紅O（safranin O）/固綠（fast green）染色的結果。番紅O/固綠染色可以直接觀察關節軟骨、軟骨下骨和骨組織的結構，經染色後，蛋白聚醣是紅色，膠原蛋白是藍色。

【0020】 第3A圖示出IP注射油的ACLT-OA/CKO小鼠（具有正常*Ddr1*，以符號「CKO-Oil-ACLT」表示）和注射4-OHT的ACLT-OA/CKO小鼠（剔除*Ddr1*，以符號「CKO-4OHT-ACLT」表示）連續五週的跑步行為測試結果。

【0021】 第3B圖示出CKO-Oil小鼠和CKO-4OHT小鼠進行ACLT-OA手術前後的負重測試（weight bearing）結果。

【0022】 第4圖示出IP注射油的CKO小鼠（具有正常*Ddr1*，以符號「CKO-Oil-Sham」表示）、IP注射油的ACLT-OA/CKO小鼠（具有正常*Ddr1*，以符號「CKO-Oil-ACLT」表示）和IP注射4-OHT的ACLT-OA/CKO小鼠（剔除*Ddr1*，以符號「CKO-4OHT-ACLT」表

示) 從術後1週到5週每週的負重測試結果。

【0023】 第5圖示出IP注射油的CKO小鼠(以符號「CKO-Oil/Sham」表示)、IP注射油的ACLT-OA/CKO小鼠(以符號「CKO-Oil/ACLT」表示)和IP注射4-OHT的ACLT-OA/CKO小鼠(以符號「CKO-4OHT/ACLT」表示)在解剖顯微鏡觀察下裸關節表面實際的磨損情況。圖中白色箭頭標記骨刺位置。

【0024】 第6A圖示出IP注射油的CKO小鼠(以符號「CKO-Oil-Sham」表示)、IP注射油的ACLT-OA/CKO小鼠(以符號「CKO-Oil-ACLT」表示)、IP注射4-OHT的正常CKO小鼠(以符號「CKO-4OHT-Normal」表示)和IP注射4-OHT的ACLT-OA/CKO小鼠(以符號「CKO-4OHT-ACLT」表示)以蘇木素-伊紅染色(H&E Stain)的結果觀察組織表面軟骨磨損的情況。

【0025】 第6B圖示出CKO-Oil-ACLT小鼠和CKO-4OHT-ACLT小鼠以番紅O/固綠染色的結果。箭頭表示蛋白聚醣(sGAG)的位置。

【0026】 第6C圖示出CKO-Oil-Sham小鼠、CKO-Oil-ACLT小鼠、CKO-4OHT-ACLT小鼠的脛骨關節軟骨經免疫組織化學染色法(IHC staining)染色以觀察哺乳動物雷帕黴素靶蛋白(mTOR)表現。

【0027】 第6D圖示出CKO-Oil-ACLT小鼠和CKO-4OHT-ACLT小鼠的脛骨關節軟骨經IHC染色以觀察第X型膠原蛋白表現,進一步確立減緩軟骨終端分化的情況。

【0028】 第7圖示出以骨關節炎軟骨病理變化評價系統(OARSI)對CKO-Oil-Sham小鼠、CKO-Oil-ACLT小鼠和CKO-4OHT-ACLT小鼠進行評分的結果(N=5)。

【0029】 第8A圖示出1週齡及2週齡的CKO-4OHT小鼠和CKO-Oil小鼠（對照組）的雙重染色-茜素紅（Alizarin Red）與阿利辛蘭AB染色(Alcian Blue)結果。茜素紅可以區分出應果的位置，而阿利辛蘭則可以檢測軟骨組織中的蛋白黏多糖含量。

【0030】 第8B圖示出第8A圖各組小鼠的椎骨、肩胛骨/前肢及後肢的雙重染色染色結果。

【0031】 第8C圖示出第8A圖各組小鼠的頭顱、下頷、鎖骨及肋骨/胸骨的雙重染色染色結果。

【0032】 第9A圖示出1週齡和2週齡的CKO-4OHT小鼠和CKO-Oil小鼠（對照組）的股骨和脛骨的二次骨化中心（圖式底部放大部分中，上箭頭表示股骨二次生長區，下箭頭表示脛骨二次生長區）。

【0033】 第9B圖示出1週齡的CKO-4OHT小鼠和CKO-Oil小鼠（對照組）脛骨近端的軟骨以蘇木素和伊紅（H&E）染色的結果（箭頭所示為二次骨化中心）。

【0034】 第9C圖示出1週齡的CKO-4OHT小鼠和CKO-Oil小鼠（對照組）脛骨近端的軟骨以番紅O/固綠染色的結果，經染色後，蛋白聚醣（代表軟骨區）呈現紅色，膠原蛋白呈現藍色（I字黑線示出CKO-4OHT小鼠和CKO-Oil小鼠近側脛骨的肥厚區厚度）。

【0035】 第9D圖示出4週齡的CKO-4OHT小鼠和CKO-Oil小鼠（對照組）的脛骨以番紅O/固綠染色後所測量的生長板長度（GPL）。

【0036】 第9E圖示出4週齡的CKO-4OHT小鼠和CKO-Oil小鼠（對照組）的脛骨以番紅O/固綠染色後所測量的生殖區厚度

(PZ)。

【0037】 第9F圖示出4週齡的CKO-4OHT小鼠和CKO-Oil小鼠（對照組）的脛骨以番紅O/固綠染色後所測量的肥大區厚度（HZ）。

【0038】 第10A圖示出1、2和4週齡的CKO-4OHT小鼠和CKO-Oil小鼠（對照組）脛骨生長板以Ki-67免疫組織化學染色以觀察增殖區（兩條點線之間為增殖區）。放大倍數為100倍，刻度棒為250 μ m。

【0039】 第10B圖示出以TUNEL檢測法檢測1週齡CKO-4OHT小鼠和CKO-Oil小鼠脛骨生長板軟骨細胞中的凋亡細胞。

【0040】 第10C圖示出以TUNEL檢測法檢測2週齡CKO-4OHT小鼠和CKO-Oil小鼠脛骨生長板軟骨細胞中的凋亡細胞（如黑點所示）。

【0041】 第11A圖示出CKO-4OHT小鼠和CKO-Oil小鼠產後4-5天軟骨中的第X型膠原蛋白基因表現。***表示與CKO-Oil組相比 $p < 0.01$ 。

【0042】 第11B圖示出1週齡CKO-4OHT小鼠和CKO-Oil小鼠脛骨的免疫組織化學染色，以蘇木素複染並在顯微鏡下觀察。PreHZ代表前增生區；HZ代表增生區；PZ代表肥大區；箭頭指出軟骨細胞。上面兩圖放大倍率為100倍，刻度棒為200 μ m；下面六圖放大倍率為400X，刻度棒為50 μ m。

【0043】 第11C圖示出使用高分辨率顯微CT所觀察到的4週齡CKO-4OHT小鼠和CKO-Oil小鼠（對照組）脛骨的三維骨骼結構，上兩圖示出三維視圖，下兩圖示出橫截面視圖。

【0044】 第11D圖示出4週齡CKO-4OHT小鼠和CKO-Oil小鼠（對照組）脛骨的皮質骨骨體積與總體積（BV/TV）百分比。

【0045】 第11E圖示出4週齡CKO-4OHT小鼠和CKO-Oil小鼠（對照組）脛骨的骨小梁厚度（Tb.Th）。

【0046】 第11F圖示出4週齡CKO-4OHT小鼠和CKO-Oil小鼠（對照組）脛骨的骨小梁數目（Tb.N）。

【0047】 第11G圖示出4週齡CKO-4OHT小鼠和CKO-Oil小鼠（對照組）脛骨的骨小梁距離（Tb.Sp）。

【實施方式】

【0048】 本案所提出的發明將可由以下的實施例說明而得到充分瞭解，使得所屬技術領域中具有通常知識者可以據以完成，然而本案的實施並非可由下列實施例而被限制其實施型態，所屬技術領域中具有通常知識者仍可依據除既揭露的實施例的精神推演出其他實施例，該等實施例皆當屬於本發明的範圍。

定義：

【0049】 除非在特定範例中另外限制，下列定義適用於整份說明書中所使用的用語。

【0050】 本文所使用之用語「化合物」意指本文所揭露之通用結構式所包含的任何化合物。本發明亦包含前驅藥物（prodrug）形式的化合物。本發明所描述之化合物的前驅藥物為在生理條件下（活體內）容易經歷化學變化以提供本發明之化合物的那些化合物。

【0051】 用語「鹵素」取代基為選自氯、溴、碘與氟的單價鹵素。

【0052】 用語「藥學上可接受之鹽類」意指具有母化合物所需要的藥理活性之化合物的鹽類。

【0053】 任何疾病或失調的「治療」意謂完全地或部分地防止或延遲疾病或失調或其跡象或症狀的發作；及/或部分或完全地治癒或改善疾病或失調及/或可歸因於該失調的不利影響。

【0054】 「治療有效量」意謂當給藥予治療疾病的病患時，足以實現此疾病的治療之化合物的量。該「治療有效量」將視化合物、給藥模式、疾病與其嚴重性以及待治療病患的年齡、體重等因素而改變。

【0055】 「CKO小鼠」意謂可於軟骨母細胞專一性剔除DDR1之基因的 $\alpha 1(\text{II})\text{-Cre}$ ； $Ddr1^{\text{flox/flox}}$ 小鼠，其是透過將 $Ddr1^{\text{flox/flox}}$ 轉殖鼠與 $\alpha 1(\text{II})\text{-collagen-Cre}$ 轉殖鼠雜交以產生 $\alpha 1(\text{II})\text{-Cre}$ ； $Ddr1^{\text{flox/+}}$ 小鼠，再將其後代雜交所獲得。換言之，CKO小鼠如同裝上基因剔除開關的小鼠，其可透過給予4-OHT來開啓剔除DDR1的開關，亦即於軟骨母細胞專一性剔除DDR1之基因（剔除DDR1的CKO小鼠簡稱「CKO-4OHT小鼠」或是「CKO-4OHT」）。給予油安慰劑的CKO小鼠無法開啓剔除DDR1的開關（簡稱「CKO-Oil小鼠」或是「CKO-Oil」）。

生物試驗

軟骨母細胞之基因轉殖鼠（ $\alpha 1(\text{II})\text{-Cre}$ ； $Ddr1^{\text{flox/flox}}$ mice）

【0056】 為避免使用全身性 $Ddr1$ 基因剔除鼠之干擾限制，發

明人使用基於Cre重組酶與loxP序列的Cre-LoxP系統首創具條件性剔除DDR1^{flox/flox}基因轉殖鼠模式。如第1A圖所示，在DDR1基因座的外顯子2和外顯子12兩端裝接loxP。將帶有兩端裝接loxP的Ddr1位點的靶向載體（P1253）和新黴素抗性（NeoR）匣電穿孔到源自129P2小鼠的胚胎幹（ES）細胞中。將含有Ddr1等位基因的ES細胞注射到C57BL/6胚胎的胚泡中以產生嵌合小鼠，將後代與翻轉酶（FLP）轉基因小鼠雜交以去除以FLP重組酶靶（FRT）序列標定的NeoR。雜交小鼠與C57BL/6株（C）回交12代，以產生Ddr1^{flox/flox}小鼠並進一步維持於C57BL/6J遺傳背景。a1(II) collagen-Cre ; -Ddr1^{flox/flox}小鼠是軟骨細胞特異性Ddr1缺陷小鼠。為了產生a1(II)-Cre ; Ddr1^{flox/flox}小鼠，Ddr1^{flox/flox}轉殖鼠與a1(II)-collagen-Cre轉殖鼠雜交以產生a1(II)-Cre ; Ddr1^{flox/+}小鼠，其後代雜交以獲得可於軟骨母細胞專一性剔除DDR1之基因轉殖鼠a1(II)-Cre ; Ddr1^{flox/flox}小鼠（於後文稱之為CKO小鼠）（參考第1B圖至第1C圖）。使用尾部基因體DNA經由聚合酶鍊式反應（PCR）進行基因分型。使用引子以PCR驗證3'loxP位點的存在。

【0057】 Cre-LoxP系統需要通過同源重組（HR）和誘導Cre重組酶表現，進行loxP位點的靶向整合（敲入）。將雌激素受體（estrogen receptor，簡稱ER）的配體結合區與Cre重組酶相融合，形成定位於胞漿中的融合蛋白（Cre-ER）。這樣就可以經由控制雌激素的注射時間，實現對基因重組時間特異性的調控。為了避免內源雌激素的幹擾，在人ER的配體結合域做一個點突變（G521R）就可以使Cre-ER只回應外源的人工合成雌激素（例如4-羥基三苯氧胺Tamoxifen，4-OHT）的誘導，命名為Cre-ERT。之後，另一

種激素受體的配體結合域 (ligand-binding domain, LBD) 突變體融合蛋白被證明對4-OHT具有遠高於Cre-ERT的敏感性，這種突變體即為Cre-ERT2，它帶有人ER LBD中的3個點突變：C400V/M543A/L544A。只需要將Cre-ERT2設計在組織特異性啟動子之後，並與flox小鼠交配，就可以藉由在特定時間點給予4-OHT來最終實現對靶基因的時空特異性敲除。換言之，Cre融合蛋白和人類雌激素受體ERT2的突變配體結合域，常用於外源的人工合成雌激素(4-OHT)對Cre重組酶活性的控制，4-OHT可促進CreERT2從細胞質到細胞核的易位，在那裡Cre可識別和重組嵌入基因組DNA的loxP位點。簡言之，4-OHT如同可啟動基因敲除的開關，在胚胎時期若有注射4-OHT的小鼠才會啟動基因敲除，沒有注射4-OHT的小鼠(胚胎時期注射橄欖油作為對照組)則沒有基因敲除發生。本文即使用4-OHT控制的基因剔除以用於評估DDR1基因缺失的直接影響。

I. 抑制DDR1可用於預防及治療骨關節炎

一、材料方法

CKO-Oil小鼠和CKO-4OHT小鼠

【0058】 將50mg 4-OHT粉末(T5648, Sigma-Aldrich, St, Louis, MO, USA)溶於50 μ l的DMSO中搖動過夜，以製備儲備液。操作濃度為4 mg/天/kg小鼠重量，溶於玉米油(C8267, Sigma-Aldrich)和DMSO為9:1的混合溶液中。在母鼠懷孕第21天以腹腔內(IP)注射第一次4-OHT(4 mg/天/kg小鼠重量)和黃體激素(P0130，

Sigma-Aldrich, 2mg/天/kg小鼠重量) 或橄欖油至胚胎。待小鼠出生後每天IP注射4-OHT (4 mg/天/kg小鼠重量) 至小鼠一周齡, 以得到1週齡注射4-OHT的CKO-4OHT小鼠及注射油的CKO-Oil小鼠。或者, 待小鼠出生後, 以連續5天每天IP注射4-OHT (4 mg/天/kg小鼠重量) 或油再休息2天的循環, 分別循環兩次和四次, 以分別得到2週齡和4週齡注射4-OHT的CKO-4OHT小鼠及注射油的CKO-Oil小鼠。

前十字韌帶切除(ACLT)誘導的退化性關節炎(ACLT-OA)

【0059】 爲了建立ACLT誘導的OA小鼠, 選用9週齡(已成年)的小鼠進行前十字韌帶切除的手術(對照組進行關節切開術, 以Sham表示), 以研究在OA進展的期間DDR1在軟骨細胞中所扮演的角色。在手術前5天以及進行前十字韌帶橫斷手術後2天, 以4 mg/day/kg小鼠體重的劑量, 給予連續5天腹腔注射(IP) 4-OHT (Sigma-Aldrich) 或給予注射橄欖油/載體兩次。

免疫組織化學染色法(IHC staining)

【0060】 免疫組織化學染色法是指在抗體上結合螢光或可呈色的化學物質, 利用免疫學原理中抗原和抗體間專一性的結合反應, 檢測細胞或組織中是否有目標抗原的存在, 此方式不只可以用來測知抗原的表現量也可觀察抗原所表現的位置。本文的IHC染色是經由使用Immuno Cruz染色系統(Santa Cruz Biotechnology Inc.)進行, 步驟如下。將所收集的脛骨置於10%福馬林溶液中固定、使用1%甲酸在4°C下脫礦、包埋在石蠟中、然後切成厚度爲5

μ m的切片。使脛骨切片進行脫蠟和補液。在含有0.1%蛋白酶K (P8107S, BioLabs, New England) 和2.5%透明質酸酶 (H4272, Sigma-Aldrich) 的1X磷酸鹽緩衝液 (PBS) 中進行10分鐘的抗原再呈現。於室溫下，將切片置於3%過氧化氫中10分鐘，之後，在含有5%牛血清白蛋白 (A2153, Sigma-Aldrich) 的1X PBS中於37°C培養1小時，以避免非特異性結合。以上述溶液稀釋一級抗體，接著加入脛骨切片於4°C隔夜反應。本試驗所使用一級抗體和其稀釋比例如下：抗Ki-67抗體，1:250 (AB9260, Millipore)；抗Sox-9抗體，1:250 (AB5535, Millipore)；抗第II型膠原蛋白抗體，1:250 (ab34712, abcam)；抗第X型膠原蛋白抗體，1:250 (LB-0092, Cosmo Bio Co LTD)；抗Ddr1抗體，1:250 (PA5-29316, Thermo Fisher Scientific Inc)；抗Ihh抗體，1:100 (TA334682, Origene)；抗PTHrP抗體，1:300 (ab52919, abcam)。以PBS清洗後再加入以1:400稀釋的二級抗體，於室溫下反應1小時。二級抗體可為過氧化物酶標記山羊抗兔IgG (peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-rabbit IgG, 125510, Jackson immunoresearch) 或是過氧化物酶標記山羊抗兔IgG (peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-mouse IgG, Jackson immunoresearch)。使用DAB呈色試劑套組 (ab64238, Abcam) 加強訊號，最終用蘇木素複染，並在顯微鏡下觀察。

定量實時PCR (RT-qPCR) 分析

【0061】 針對CKO-4OHT及CKO-Oil小鼠，在冰上取出4~5天大新生小鼠的肌肉和肌腱，只在解剖顯微鏡下保留長骨軟骨。以

TRIzol (Life Technologies) 提取總RNA，並使用SuperScript II第一鏈合成系統 (Invitrogen) 將總RNA轉譯成2mg cDNA。定量實時聚合酶鎖鍊反應 (qRT-PCR) 總共13 μ l的反應液中包括6.25 μ l含有100nM引子的SYBR Green Real time PCR Master Mix (Toyobo) 和1 μ l cDNA。反應過程中讓CFX連接至實時PCR檢測系統 (Bio-Rad)。

統計分析

【0062】 每個實驗重複至少三次，這些數據表示為來自每個實驗重複的結合數據的平均值 \pm 標準誤差 (SEM)。經由單向方差分析 (ANOVA) 評估統計學顯著性，並使用Scheffe's方法進行多重比較。(*) 和 (**) 表示 $p < 0.05$ 或 $p < 0.01$ ，兩者皆被認定為差異是顯著的。

二、CKO-Oil小鼠和CKO-4OHT小鼠模式

【0063】 爲了研究Ddr1剔除後是否會影響OA的進展，分別以注射油的CKO小鼠(以CKO-Oil表示，具有正常Ddr1)和注射4-OHT的CKO小鼠(以CKO-4OHT表示，其中Ddr1已剔除)進行後續試驗。參考第1D至1F圖，相較於對照組 (CKO-Oil小鼠)，軟骨母細胞Ddr1已剔除之基因轉殖鼠 (CKO-4OHT小鼠) 的基因表現和蛋白質表現都受到抑制，且型態變小。另外，以免疫組織化學染色法 (IHC) 染色後觀察到DDR1基因剔除後的CKO-4OHT小鼠並無表現DDR1 (圖未示)。誘導性軟骨細胞特異性Ddr1剔除鼠發生生長板變寬但是骨骼侏儒現象，其原因爲生長板軟骨細胞增生減

少，但是同時軟骨細胞的終端分化及凋亡也明顯減少，因此造成減少血管新生及骨母細胞的侵入生長板，進而減少骨化。

三、經腹腔注射4-OHT並不會影響正常關節以及影響誘導性軟骨細胞特異性 *Ddr1*剔除鼠關節軟骨的完整性

【0064】 第2A和2B圖示出IP注射4-OHT後，*Ddr1*^{flox/flox}轉殖鼠（對照組，以「FF-4OHT」表示）及剔除*Ddr1*後的CKO-4OHT小鼠連續五週的跑步行為測試結果及以番紅O/固綠染色的結果。從連續五週的跑步行為測試結果可以發現FF-4OHT小鼠和CKO-4OHT小鼠之間並沒有顯著差異。而從第2B圖的番紅O/固綠染色結果，結果證實相對於*Ddr1*^{flox/flox}轉殖鼠（對照組）的脛骨，剔除*Ddr1*後的CKO-4OHT小鼠的正常關節的軟骨完整性並沒有受到影響。

四、DDR1可以在ACLT-OA中扮演保護關節軟骨的角色

【0065】 後續分別以IP注射油的ACLT-OA/CKO小鼠（具有正常*Ddr1*，以符號「CKO-Oil-ACLT」表示）和注射4-OHT的ACLT-OA/CKO小鼠（剔除*Ddr1*，以符號「CKO-4OHT-ACLT」表示）中的脛骨關節軟骨的OA過程來探討其差異。第3A圖示出CKO-Oil-ACLT小鼠和CKO-4OHT-ACLT小鼠連續五週的跑步行為測試結果，由此測試結果可觀察手術後對小鼠行為模式的影響。如第3A圖所示，兩組小鼠僅在第1週的跑步行為有顯著差異，第2至5週的跑步行為測試並無顯著差異。第3B圖示出CKO-Oil小鼠和CKO-4OHT小鼠在ACLT手術前後的負重測試（weight bearing）結

果。由負重測試發現相較於CKO-Oil小鼠（控制組），CKO-4OHT小鼠在ACLT術後的負重能力較為穩定。由第3A圖及第3B圖可知DDR1可在ACLT所誘導的骨性關節炎中扮演保護關節軟骨的角色。

【0066】 第4圖示出IP注射油的經關節切開術CKO小鼠（具有正常Ddr1，以符號「CKO-Oil-Sham」表示）、IP注射油的ACLT-OA/CKO小鼠（具有正常Ddr1，以符號「CKO-Oil-ACLT」表示）和注射4-OHT（4 mg/天/kg小鼠體重）的ACLT-OA/CKO小鼠（剔除Ddr1，以符號「CKO-4OHT-ACLT」表示）從術後1週到5週每周的負重測試結果。從術後1週到5週追蹤每周的負重變化同樣的觀察到相較於CKO-Oil-ACLT組，CKO-4OHT-ACLT小鼠的負重測試的數值更接近於CKO-Oil-Sham控制組的數值，也就是CKO-4OHT剔除Ddr1的組別相較於沒有剔除Ddr1的Oil組別更能穩定關節的功能不受手術影響。

【0067】 爲了更深入的了解關節受到ACLT手術後的影響，在同樣有安排每週跑步測試及負重測試的第五週給予人道犧牲後，藉由解剖顯微鏡觀察裸關節表面實際的磨損情況。如第5圖所示，比較CKO-4OHT的實驗組別與注射油的控制組別（CKO-Oil/Sham和CKO-Oil/ACLT），剔除Ddr1的實驗組別在整體來說都是比較不容易有骨刺（白色箭頭標記位置）及因爲剔除前十字韌帶後所造成的關節走位等磨損情況。

【0068】 此外，將CKO-Oil-ACLT小鼠和CKO-4OHT-ACLT小鼠的關節軟骨透過石蠟包埋切片後，進行番紅O/固綠的染色，以觀察IP注射油及4-OHT所造成的型態差異。如第6A圖及第6B圖所

示，可以從切片染色中發現CKO-4OHT-ACLT小鼠的蛋白聚醣（sGAG，如第6B圖箭頭所示）的磨損、軟骨表面的磨損和缺失，並造成相鄰區域的軟骨細胞密度增加；且未治療（即未剔除Ddr1）的組別有5/6出現骨刺。相較於CKO-Oil-ACLT控制組，剔除Ddr1的CKO-4OHT-ACLT小鼠組別的脛骨關節軟骨顯示有較少的損傷，表示CKO-4OHT-ACLT小鼠組別呈現有效降低軟骨細胞凋亡化的趨勢。

【0069】 哺乳動物雷帕黴素靶蛋白（mammalian target of rapamycin, mTOR）是細胞生長和增殖的重要調節因數，研究顯示mTOR的過度表現與抑制自噬（autophagy）及軟骨細胞凋亡的增加密切相關，故亦與OA軟骨退化的推進有關。維持軟骨細胞的自噬可預防軟骨退變，是維持軟骨細胞生存的重要方式。如第6C圖所示，藉由以免疫組織化學染色法（IHC）觀察CKO-Oil-Sham小鼠、CKO-Oil-ACLT小鼠、CKO-4OHT-ACLT小鼠的脛骨關節軟骨，發現CKO-4OHT-ACLT小鼠具有減少mTOR表現的趨勢。mTOR的表現量下降代表細胞自噬的機率增加，可降低OA的發生機率。另外，藉由IHC染色觀察CKO-Oil-ACLT小鼠和CKO-4OHT-ACLT小鼠的脛骨關節軟骨的第X型膠原蛋白表現，X型膠原蛋白是軟骨終端分化的代表記號，由軟骨肥大區細胞特異表現合成的非微纖維形成性膠原蛋白，在目前對退化性關節炎的認知，認為第X型膠原蛋白會與疾病呈現正向的增加，故藉由觀察第X型膠原蛋白表現可進一步的確立剔除DDR1可以有效減緩關節炎的趨勢。如第6D圖的第X型膠原蛋白的表現所示，相較於CKO-Oil-ACLT控制組，發現CKO-4OHT-ACLT小鼠組別在關節軟骨呈現抑制肥大區細胞

的增生並降低第X型膠原蛋白的表現。在CKO-4OHT-ACLT小鼠觀察到降低軟骨細胞凋亡、減少mTOR表現和抑制肥大區細胞分泌第X型膠原蛋白，表示可促進維持軟骨細胞的自噬，這可改善ACLT-OA小鼠的軟骨細胞不易死亡並保護關節軟骨維持一定的軟骨量減緩關節炎。

【0070】 骨關節炎軟骨病理變化評價系統（OARSI）是用於對關節軟骨的損壞程度或OA嚴重度進行評分，對CKO-Oil-Sham小鼠、CKO-Oil-ACLT小鼠和CKO-4OHT-ACLT小鼠進行評分的結果示於第7圖。如第7圖所示，CKO-4OHT-ACLT小鼠的評分結果與CKO-Oil-Sham的正常小鼠相似，可以再次以定量結果證實在成鼠中關節專一性的剔除Ddr1（CKO-4OHT-ACLT）可以保護關節軟骨並有效降低退化性關節炎的機率。

【0071】 由第3A圖至第7圖的結果可知，透過前十字韌帶切除誘導的退化性關節炎(ACLT-OA)的標準小鼠模式，發現Ddr1剔除後的ACLT小鼠(CKO-4OHT-ACLT小鼠)有減少退化性關節炎的趨勢。詳言之，Ddr1剔除後的CKO-4OHT-ACLT小鼠較無軟骨表面的磨損和sGAG減少，而在關節軟骨則有抑制肥大區細胞分泌第X型膠原蛋白及降低軟骨細胞凋亡的情形。Ddr1剔除後的CKO-4OHT-ACLT小鼠的功能性測試(跑步測試及負重測試)結果亦顯示相較於CKO-Oil-ACLT正常小鼠，Ddr1剔除後的CKO-4OHT-ACLT小鼠能有較佳的跑步能力及負重能力。此外評斷OA嚴重度的OARSI評分表定量結果證實，Ddr1剔除後的CKO-4OHT-ACLT小鼠較無退化性關節炎。以上結果顯示，透過抑制軟骨細胞中DDR1的表現和作用，將有助於預防或治療退化性關

節炎，這是由現有技術中對於DDR1功能的了解所無法預期的新用途。

【0072】 雖然DDR1與DDR2屬同一家族，但是DDR1主要是促進軟骨細胞退化及凋亡，而DDR2主要是促進軟骨細胞MMP-13過度表現，是以DDR1和DDR2在調控軟骨細胞機制上並不相同，故上述透過抑制軟骨細胞中DDR1所能達到的各種效果並無法由任何已知的DDR2相關機制和功能所預期。也就是說，無法由DDR2的任何已知功能推及DDR1抑制劑可用於預防與治療骨關節炎，特別是退化性關節炎。

II. 活化DDR1可用於預防及治療軟骨內骨化異常相關疾病

一、材料方法

【0073】 在第II部分的相關試驗，將小鼠分為以下三組：(1) IP注射油的CKO小鼠（後文稱之CKO-Oil小鼠，其為對照組）、(2) IP注射4-OHT的*Ddr1*^{flox/flox}轉殖鼠（後文稱之FF-4OHT小鼠，其為對照組）、以及(3)IP注射4-OHT的CKO小鼠（後文稱之CKO-4OHT小鼠），每組在每個時間點N≥6。在第II部分的相關試驗中，與第I部分相同的材料方法不再贅述。

【0074】 在第II部分利用獨具的軟骨細胞特異性*Ddr1*基因剔除鼠（*a1(II)-Cre; Ddr1*^{flox/flox}小鼠）模式，可專一性的探討在骨骼發育及軟骨發育過程中DDR1所扮演的角色。

雙重染色（**Double staining**，茜素紅與阿利辛蘭AB染色）：

【0075】 於CKO-4OHT小鼠及CKO-Oil小鼠出生後1、2、4及8

週鼠齡時，暴露於CO₂而安樂死、將皮膚和內臟去除，然後在95%乙醇中固定過夜。之後，將小鼠浸泡於2%阿利辛蘭(Alcian Blue 8GX, A5268, Sigma-Aldrich)中2-3天，直到骨架的軟骨基質變成藍色。然後以0.5%KOH(60377, Sigma-Aldrich, LLC, 台灣)洗滌1個月，直至肌肉變透明。在2次蒸餾水中洗滌2天，然後浸泡於1%茜素紅S(Alizarin red S, A5533, Sigma-Aldrich)15分鐘使硬骨染色，最後在KOH中洗滌，直到肌肉完全透明，其後在顯微鏡下觀察。

微米級電腦斷層掃描 (micro-CT)：

【0076】 使用高分辨率微米級電腦斷層掃描 (micro-CT) 分析儀 (Skyscan 1076; Skyscan NV, Kontich, Belgium) 來掃描小鼠脛骨並進行3-D重建。在沒有濾鏡的情況下，於44kV X射線管電壓、222 μ A的電流和1150 ms掃描曝光時間的條件下，以9 μ m的等向三維重建解析度掃描脛骨。使用0 - 0.09的比例重建3-D影像以供分析使用 (NRecon version 1.6.1.7; Skyscan NV, Kontich, Belgium)。使用直接三維方法計算脛骨ROI (4 mm圓圈; 100次切割) 的2.0mm區域的3-D形態計量參數，包括皮質骨骨體積 (BV, mm³)，骨體積密度 (BV/TV, %)、骨厚度 (μ m)、骨小梁厚度 (Tb.Th, μ m)，骨小梁間距 (Tb.Sp, μ m)，骨小梁數目 (Tb.N, mm⁻¹) 和連接密度 (mm⁻³)。

以H&E染色和番紅O/固綠染色進行組織型態學分析

【0077】 將所收集的脛骨置於10%福馬林溶液中固定、使用1

%甲酸在4°C下脫鈣、包埋在石蠟中、然後切成厚度為5 μ m的切片。使用蘇木素（H3136，Sigma-Aldrich）和伊紅（318906，Sigma-Aldrich）將切片染色，以進行組織分析；或使用0.1%番紅O（HT90432，Sigma-Aldrich）和0.05%固綠（FCF）（2353-45-9，Sigma-Aldrich）將切片染色，用顯微鏡觀察檢測GAG。

TUNEL 染色

【0078】 將所收集的樣品置於10%福馬林溶液中固定、使用1%甲酸在4°C下脫鈣、包埋在石蠟中、然後切成厚度為5 μ m的切片。使用原位細胞死亡檢測試劑套組（ab206386，Abcam），並依照該商業套組中建議的方法步驟在軟骨處檢測凋亡細胞。為了定量TUNEL細胞，以Tissue FAXS計數棕色數量，每個試驗進行超過3次重複。

二、雙染色分析證實剔除Ddr1的CKO-4OHT小鼠在發育期間的骨骼發育不良

【0079】 組織化學分析法常被用來染色酸性多醣，如軟骨和其他身體結構中的糖胺聚醣。阿利辛蘭染色（Alcian Blue staining，又稱AB染色）中軟骨細胞周圍的酸性多醣呈深藍色或藍紫色，基質呈淡藍色。請參考第8A圖的AB染色結果，在外觀形態上，無論是1週齡或2週齡，相較於同齡的CKO-Oil小鼠（對照組），剔除Ddr1的CKO-4OHT小鼠型態顯著地較小。第8B和第8C圖的AB染色結果顯示，CKO-4OHT小鼠的阿利辛蘭染色（呈深藍色或藍紫色，代表軟骨區）在長骨如脛骨、股骨等區域軟骨分佈區域多

於對照組，拆開所有關節可觀察到CKO-4OHT小鼠相較於對照組，各式骨骼較小並且較短，此結果顯示CKO-4OHT小鼠骨化狀態不完全。事實上，CKO-4OHT小鼠在發育的過程中，自第2週開始到第10週，無論是外觀或是骨頭內部的組成（包含鎖骨、肋骨、脊柱、上肢、下肢）皆有延遲生長發育的趨勢。

三、軟骨細胞內Ddr1敲除在股骨和脛骨延遲二次骨化中心發育

【0080】 在骨骼發育期間，長骨（如椎骨，前肢，掌骨和後肢）經由軟骨內骨化過程發展，並且形成二次骨化中心。第9A圖示出1週齡和2週齡的CKO-4OHT小鼠和CKO-Oil小鼠（對照組）的股骨和脛骨的二次骨化中心（上箭頭表示股骨二次生長區，下箭頭表示脛骨二次生長區）。如第9A圖所示，在1週齡的對照組CKO-Oil小鼠可看到股骨和脛骨中的二次骨化中心（如箭頭所示），而1週齡的CKO-4OHT小鼠顯示出缺乏二次骨化中心或凋亡的二次骨化中心，並且在2週齡的CKO-4OHT小鼠中繼續延遲二次骨化中心發展。這些結果顯示Ddr1在軟骨細胞中的敲除延遲了股骨和脛骨的二次骨化中心的發展。

四、CKO-4OHT小鼠延遲脛骨的軟骨內骨化

【0081】 爲了評估發育期間的軟骨內骨化，收集1週齡小鼠的脛骨，並用10%福爾馬林溶液固定，隨後用石蠟包埋，然後切成5 μ m的厚度。樣品用蘇木素和伊紅（H&E）和番紅O/固綠染色。第9B圖和第9C圖分別示出1週齡的CKO-4OHT小鼠和CKO-Oil小鼠（對照組）（脛骨近端的軟骨以蘇木素和伊紅或是以番紅O/固綠染色的

結果。於脛骨近端，1週齡CKO-4OHT小鼠之阿利辛蘭（軟骨）染色區域明顯大於對照組。在1週齡的CKO-Oil小鼠脛骨近端的軟骨中部清楚地觀察到二次骨化中心（如第9B圖的箭頭所示），相對而言在CKO-4OHT小鼠的軟骨中部沒有觀察到二次骨化中心。番紅O/固綠染色的結果呈現於第9C圖，蛋白聚醣（代表軟骨區）呈現紅色，膠原蛋白呈現藍色。番紅O/固綠染色結果顯示，CKO-4OHT小鼠的近端脛骨相對於對照組的CKO-Oil小鼠具有更緻密的sGAG染色（蛋白聚醣）和更長的軟骨區（紅色），這表明CKO-4OHT小鼠中，在細胞外基質中合成蛋白多醣的軟骨細胞可能比對照組的CKO-Oil小鼠更活躍。相比之下，CKO-4OHT小鼠近側脛骨的肥厚區小於CKO-Oil小鼠的肥厚區(如第9C圖的I字黑線所示)。

【0082】 第9D圖至第9F圖示出4週齡的CKO-4OHT小鼠和CKO-Oil小鼠（對照組）脛骨以番紅O/固綠染色後所測量得到的生長板長度（GPL）、生殖區厚度（PZ）和肥大區厚度（HZ）。如第9D圖所示，進一步分析生長板，發現在4週齡CKO-4OHT小鼠脛骨的肥厚區有增長的生長板長度和不規則的細胞。

【0083】 因為更多的軟骨細胞出現在增殖區和肥大區，進一步分析在軟骨細胞是否有更多的增殖或更少的細胞死亡或兩者。Ki-67免疫組織化學染色可用以評估處於細胞週期所有活躍期的總增殖細胞的百分比。參考第10A圖中所示出兩條點線之間的增殖區，經由Ki67染色，發現相較於1週齡到4週齡的CKO-Oil小鼠，在CKO-4OHT小鼠脛骨生長板的增殖區中的染色較少。亦即，CKO-4OHT小鼠的增殖區比CKO-Oil小鼠的增殖區呈現更急劇的下降。此結果表明，CKO-4OHT小鼠生長板中更多的軟骨細胞不

是源自增殖區的增殖。因此發明人以標記核酸末端從而檢測DNA片段的TUNEL檢測法檢測細胞凋亡，進而評估軟骨細胞死亡情況。第10B圖和第10C圖分別示出以TUNEL檢測法檢測1週齡和2週齡CKO-4OHT小鼠和CKO-Oil小鼠脛骨生長板軟骨細胞中的凋亡細胞（如黑點所示）。由第10C圖2週齡小鼠的檢測結果可看出，在肥大區中，CKO-4OHT小鼠的TUNEL染色少於CKO-Oil小鼠的染色（如第10C圖中箭頭所示）。由第10A圖至第10C圖可知，敲除Ddr1會減少骨骼發育中的軟骨細胞終末分化。

【0084】 在生長板中調節軟骨內骨化的反饋回路包括甲狀旁腺激素相關蛋白（PTHrP）、印度刺蝟（Ihh）蛋白（Indian hedgehog）和Bcl-2。PTHrP維持增殖性軟骨細胞的功能並抑制軟骨細胞朝肥大分化。分別提取CKO-4OHT小鼠和CKO-Oil小鼠產後4-5天的軟骨來檢測X型膠原蛋白、Ihh蛋白和PTHrP基因表現。相對mRNA量是以每個PCR產物的閾值循環（Ct）值來計算並且使用比較Ct方法歸一化至GAPDH的位準。將對照組CKO-Oil小鼠的基因表現的相對值設置為1，並且所有其他量轉化為比值。如第11A圖所示，相對於CKO-Oil小鼠的X型膠原蛋白，CKO-4OHT小鼠的X型膠原蛋白顯著降低。此外，相對於CKO-Oil小鼠，CKO-4OHT小鼠的Ihh基因表現顯著降低，而PTHrP基因表現顯著提高至超過四倍（圖未示出）。

【0085】 第11B圖示出1週齡CKO-4OHT小鼠和CKO-Oil小鼠脛骨的免疫組織化學染色，X型膠原蛋白是軟骨細胞外基質進行的軟骨形成標記。由第11B圖可知，CKO-4OHT小鼠增生區（HZ）中X型膠原蛋白染色劑可減少前增生區（PreHZ）（如箭頭所指）和軟

骨細胞（如箭頭所指）細胞膜的細胞外基質。軟骨內骨化期間，Ihh將反饋控制PTHrP釋放，故Ihh染色顯示CKO-4OHT小鼠肥厚區的表現明顯低於對照組（圖中未示）。另外，CKO-4OHT小鼠增生區的PTHrP增加（圖中未示）。由上述可知CKO-4OHT組小鼠中的X型膠原蛋白染色比2週齡的CKO-Oil小鼠更少。這些結果表明Ddr1的敲除可能會延遲增殖區軟骨細胞的終末分化，進而導致4-OHT注射的CKO-4OHT組小鼠脛骨的軟骨內骨化之延遲。此外，因較少的軟骨細胞凋亡並且沒有增殖細胞的增加，故CKO-4OHT小鼠中的生長板長度增加。可以得到的結果是，CKO-4OHT小鼠中生長板的軟骨細胞凋亡較少，終末分化較少。

五、使用微米級電腦斷層掃描(Micro-CT)量化CKO-4OHT小鼠脛骨的骨骼發育不良

【0086】藉由使用高分辨率顯微CT分析4週齡CKO-4OHT小鼠和CKO-Oil小鼠（對照組）的脛骨的三維微架構，結果示於第11C圖。重建脛骨的3-D微CT圖像，並計算3-D形態參數。在脛骨中，CKO-4OHT小鼠的三維視圖（第11C圖的右上圖）和橫截面視圖（第11C圖的右下圖）的重建3-D圖像顯示其尺寸小於CKO-Oil小鼠（對照組）。此外，CKO-4OHT小鼠的脛骨的平均距離減少。相較於CKO-Oil小鼠（對照組），CKO-4OHT小鼠的脛骨顯示出皮質骨骨體積比總體積的百分比（BV/TV，即骨體積密度）和骨小梁厚度（Tb.Th）顯著下降，而骨小梁數目（Tb.N）與骨小梁間距（Tb.Sp）沒有顯著差異（如第11D圖至第11G圖所示）。由上述結果可知，剔除Ddr1基因在軟骨細胞中會降低BV/TV以及骨小梁厚度，而不影

響骨小樑數目與骨小樑之間的距離。上述證據顯示剔除DDR1後將會使得骨頭的結構變的更加的脆弱並且產生骨質疏鬆的問題。

【0087】 由第8A圖至第11G圖所示出第II部分的相關試驗顯示以下結果。骨骼發育過程中DDR1正向調控膜內骨化及軟骨內骨化過程中軟骨細胞的功能。於軟骨細胞中剔除Ddr1基因可抑制軟骨細胞退化成為肥大軟骨細胞，過程中軟骨細胞累積在軟骨區而不進行鈣化成硬骨，導致軟骨內骨化異常（軟骨不全症）以至於骨骼發育遲緩。因此，DDR1基因剔除會造成骨骼發育異常之侏儒鼠型態及軟骨發育不全症型態。進一步機制研究結果顯示DDR1基因剔除會抑制軟骨細胞退化、肥大及細胞凋亡，進而造成骨骼發育異常及軟骨發育不全。試驗結果顯示DDR1於骨與軟骨發育早期與晚期具有重要角色，透過調控此活化DDR1相關路徑可用來預防甚至治療骨骼侏儒之骨異常及軟骨發育不全症。由於表現正常Ddr1基因（對照組）可進行正常軟骨內骨化而不會發生軟骨不全症及骨骼發育遲緩，因此透過應用活化DDR1路徑進行相關基因療法、相關製備藥劑或相關製備抗體，可用於預防或治療軟骨內骨化異常及軟骨發育不全症。

【0088】 本發明提供一種盤基蛋白結構域受體1(DDR1)抑制劑之用途，其係用於製備預防或治療骨關節炎之藥物。利用抑制DDR1功能，將能有效減緩關節軟骨細胞的終端分化及凋亡進而治療或預防骨關節炎，特別是退化性關節炎。前述骨關節炎包括骨關節炎損傷、前十字韌帶損傷、退化性關節炎及其組合。以下描述一些DDR1抑制劑的範例，但DDR1抑制劑並不限於所列舉範例。前述藥劑可單獨使用或與共同抑制劑併用。

【0089】 在一具體實施例中，DDR1抑制劑可為多核苷酸，其與編碼人類DDR1蛋白之多核苷酸或其互補股雜交，且包含至少15個核苷酸。本發明之多核苷酸較佳地是專一性與編碼本發明多胜肽之DNA雜交的多核苷酸。此類多核苷酸包括探針、引子、核苷酸及核苷酸衍生物（例如反意寡核苷酸及核酵素（ribozyme）），其與編碼本發明多胜肽之DNA雜交或其互補股形成專一性雜交。前述反意寡核苷酸較佳地是對應DDR1核苷酸序列中至少15個連續核苷酸。「反意寡核苷酸」一詞在此指，不僅是具有與一DNA或mRNA特定區域完全互補之核苷酸者，也包含具有一或多個配對錯誤之核苷酸者，只要此反意寡核苷酸可專一性地與DDR1之核苷酸序列雜交。本發明之反意寡核苷酸衍生物經由與編碼本發明多胜肽之DNA或mRNA結合而作用於生產本發明多胜肽之細胞，抑制此DNA或mRNA之轉錄或轉譯，促進此mRNA之退化，並抑制本發明多胜肽之表現，進而抑制此多胜肽之功能。

【0090】 同時，如有需要，上述衍生物可經由添加賦形劑、等滲壓劑、穩定劑、防腐劑、止痛劑等，配製成藥片、藥粉、顆粒、膠囊、微脂粒膠囊、注射劑、溶劑、滴劑及冷陳乾燥劑。這些可經由一般熟知方法配製。

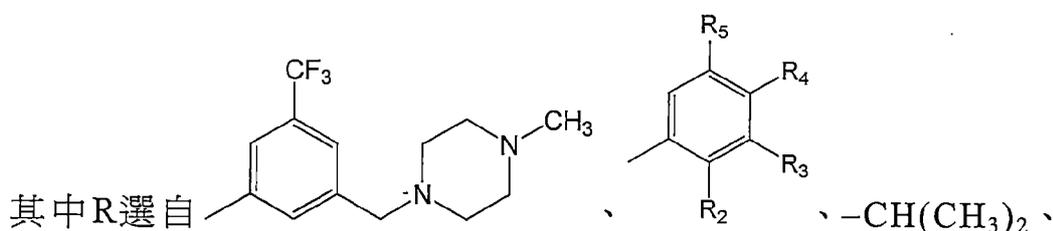
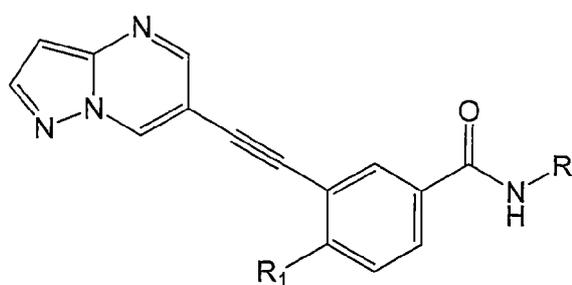
【0091】 上述反意寡核苷酸衍生物可直接用在患者生病的部位，或經由注射進血管以達到生病的部位。反意基質（antisense-mounting medium）也可用於增加持續性及薄膜穿透性，例如微脂類、聚-L-離胺酸（poly-L-lysine）、脂質、膽固醇、脂球粒（lipofectin），或其衍生物。

【0092】 在一具體實施例中，DDR1抑制劑可為小干擾RNA

(siRNA), 其包含互補於DDR1核苷酸序列之順意核苷酸股及反意核苷酸股之組合。使用標準技術將siRNA引進細胞, 包含以DNA作為模板以轉錄RNA者。上述siRNA包含編碼人類DDR1蛋白之多核苷酸的順意核苷酸序列及反意核苷酸序列。此siRNA係被建構使得單一轉錄產物(雙股RNA)同時具有標的基因的順意及互補之反意序列, 例如U字形分子(hairpin)。此方法係用於改變細胞之基因表現, 意即重新調節DDR1的表現量。在標的細胞中siRNA與DDR1轉錄物之結合導致此細胞之蛋白產量的降低。此寡核苷酸之長度最少為10個核苷酸且可以和天然轉錄物的長度一樣長。較佳地是, 此寡核苷酸為19-25個核苷酸長。最佳地是, 此寡核苷酸短於75、50、或25個核苷酸長。siRNAs之核苷酸序列可由本領域人員熟知的siRNA電腦軟體設計。

【0093】 核酸干擾之所以受到製藥產業界的廣泛重視是由於核酸干擾所具有的許多特殊性。它可尋找到其他方式不可能實現的藥靶: 在RNA層次阻止疾病相關蛋白的表現。這一點不同於現在大多數其他在蛋白質方面發揮功能的藥物。從傳統意義上而言, 核酸干擾藥物與小分子藥物類似都屬於抑制劑, 但發揮作用的機理卻不相同。核酸干擾藥物是透過抑制藥靶基因表現量而發揮效用, 這不僅具有更強的靶向性, 且有希望產生更有潛能的藥物, 能夠增加核酸干擾療法的內在創新優勢。同時, 核酸干擾藥物還能夠與傳統的小分子藥物和單抗藥物協同使用, 以期達到更好的治療效果。

【0094】 在一具體實施例中, DDR1抑制劑包括以式(I)表示的化合物及其藥理上可接受之鹽類:

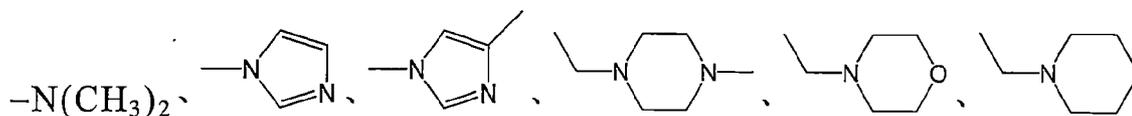


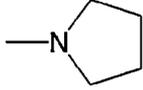
$-(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_{11}$ 及 $-\text{C}_5\text{H}_9$ 所組成的群組其中之一；

R_1 為 $-\text{CH}_3$ 或 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ；

R_2 選自 $-\text{H}$ 、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{X}$ 及 $-\text{OCH}_3$ 所組成的群組其中之一；

R_3 選自 $-\text{H}$ 、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{X}$ 、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$ 、

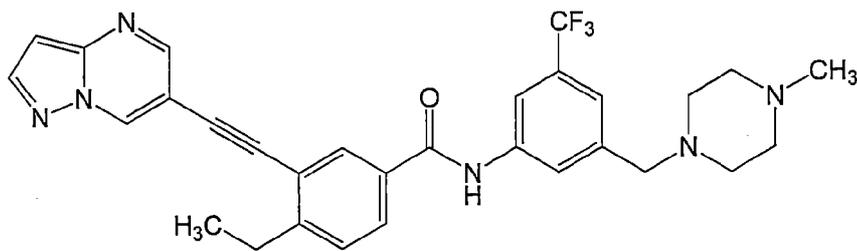


以及  所組成的群組其中之一；

R_4 選自 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{X}$ 、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{H}$ 所組成的群組其中之一；以及

R_5 選自 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{X}$ 、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{H}$ 所組成的群組其中之一，其中X為鹵素。

【0095】 在一較佳實施例中，DDR1抑制劑為



【0096】 在一具體實施例中，DDR1抑制劑包括DDR1特異性抑制性抗體，其可包含全長抗體、抗體可變區結構域、Fab片段、Fab'片段、F(ab)₂片段、Fv片段、Fabc片段及/或具有部分Fc域之Fab片段。

【0097】 本發明亦提供DDR1活化劑的用途，其係用於製備預防或治療軟骨內骨化異常相關病症之藥物。該藥物可透過活化DDR1相關路徑來預防或治療軟骨內骨化異常相關病症。軟骨內骨化異常相關病症包括軟骨發育不全、軟骨生成減退 (hypochondroplasia)、(致死性骨發育不全) thanophoric dysplasia)、侏儒症等。以下描述一些DDR1活化劑的範例，但DDR1活化劑並不限於所列舉範例。前述藥劑可單獨使用或與共活化劑併用。

【0098】 在一具體實施例中，DDR1活化劑是膠原蛋白，特別是第I型膠原蛋白至第VI型膠原蛋白及第VIII型膠原蛋白的至少其中之一。由於纖維型膠原蛋白是DDR2活化劑，而非DDR1活化劑，故前述DDR1活化劑較佳是不包含纖維型膠原蛋白，例如第I型纖維型膠原蛋白、第III型纖維型膠原蛋白和第X型纖維型膠原蛋白。

【0099】 在一具體實施例中，DDR1活化劑是DDR1特異性活化性抗體，其可包含全長抗體、抗體可變區結構域、Fab片段、Fab'片段、F(ab)₂片段、Fv片段、Fabc片段及/或具有部分Fc域之Fab片

段。

【0100】 本案的一具體實施例係提供包含DDR1抑制劑或活化劑的藥物組合物，所述藥物組合物隨選地與一藥學上可接受的佐劑或載體混合。所述藥物組合物另可包含其他醫藥活性劑。在一些實施方案中，藥物組合物被配製成以如下方式施用：吸入、腹腔內、靜脈內、肌肉內、皮下、腦脊髓膜內、腦室、口服、腸內、腸胃外、鼻內、真皮、皮下、局部、舌下、經口含化（transbuccally）、經由導管、經由灌洗、經由持續輸注、經由輸注、經由吸入、經由注射、經由局部遞送或經由局部灌注。在一些實施方案中，藥物組合物被配製成經口施用。在一些實施方案中，藥物組合物被配製為單位劑量。

【0101】 本發明醫藥組合物合適的製劑單元形式，可以是口服固體製劑或注射用給藥製劑。口服固體製劑可以是片劑、膠囊劑、滴丸劑、顆粒劑中的任意一種。注射用給藥製劑可以是小水針劑、粉針劑、輸液中的任意一種。本發明的製劑單元形式，較佳為注射製劑，更佳為注射用小水針或粉針劑。

【0102】 在一具體實施例中，前述醫藥組成物可單獨投藥或與其他藥劑共同投藥，依藥學上例行方法實施投藥療程（regime）。

【0103】 在一具體實施例中，前述醫藥組成物包含藥學上可接受的載體或介質，例如賦型劑、穩定化劑、溶解助劑、乳化劑、懸浮劑、緩衝劑、等滲劑、抗氧化劑或保存劑等藥學上可接受的物質。以下列舉範例，但本發明並不限定於此，可以使用本領域公知載體或介質。作為賦型劑，較佳是澱粉或乳糖等本身不具有藥理作用的賦形劑。穩定化劑包含白蛋白、明膠、山梨糖醇、甘

露醇、乳糖、蔗糖、海藻糖、麥芽糖、葡萄糖等，較佳為蔗糖或海藻糖。溶解助劑包含乙醇、甘油、丙二醇、聚乙二醇等。乳化劑包含卵磷脂、硬脂酸鋁或倍半油酸失水山梨糖醇酯等。懸浮化劑包含聚乙二醇、聚乙烯基吡咯烷酮 (PVP) 或羧甲纖維素 (CMC) 等。等滲劑包含氯化鈉、葡萄糖等。緩衝劑包含檸檬酸鹽、乙酸鹽、硼酸或磷酸鹽等。抗氧化劑包含抗壞血酸、亞硫酸氫鈉、焦亞硫酸鈉等。保存劑包含苯酚等。

【0104】 前述醫藥組成物包含DDR1抑制劑時，可另外包含骨關節疾病中常使用的公知藥劑，例如關節疾病治療劑、抗發炎劑、鎮痛劑、骨再生劑、骨吸收抑制劑、抗生素或成長劑等。上述藥劑可以組合1種或2種以上。

【0105】 前述關節疾病治療劑包含關節軟骨細胞外基質分解拮抗劑、腎上腺皮質激素劑或硫酸軟骨素鈉、透明質酸 (hyaluronic acid, HA) 等關節軟骨的保護劑、或p21活性化激酶 (PAK) 拮抗劑。抗炎症劑包含甾體性抗炎症劑或非甾體性抗炎症劑 (NSAIDs) 等。甾體性抗炎症劑包含地塞米松、可的松，氫可的松等。非甾體性抗炎症劑包含阿司匹林、布洛芬、萘普生、二氯芬酸、吲哚美辛、萘丁美酮、苯基丁氮酮、吡唑 啉酮等。鎮痛劑包含NSAID、啡肽、強啡肽、腦啡肽、可待因、二氫可待因、右旋丙氧芬等。骨吸收抑制劑包含雌激素劑、降鈣素及雙磷酸鹽。抗生素包含青黴素類抗生素、頭孢烯類抗生素、氨基糖苷類抗生素、大環內酯類抗生素、四環素類抗生素、肽類抗生素等抗生素。成長劑包含成骨因子 (BMP)、骨增殖因子 (BGF)、來自血小板的增殖因子 (TGF)、鹼性纖維芽細胞增殖因子 (bFGF)、胰島素、胰島素樣增殖因子 (IGF) 或轉化增殖因子 (TGF) 等。

【0106】 本發明前述醫藥組合物較佳是標靶醫藥組合物，其可被遞送至目標細胞、目標組織或器官，且其在這些部位的比例相對高於在血液循環、淋巴系統以及其他細胞、組織和器官中的比例。當實現上述情境時，即可提升標靶醫藥組合物的療效，且其副作用與毒性的數值和嚴重性都會降低。相較於非標靶醫藥組合物，以標靶醫藥組合物的形式來投遞藥物時，可發揮療效的應用濃度可能較低。因此，可在較低的劑量下施用治療用的藥物或是醫藥組合物而不會減損其有效性，但卻能同時降低其副作用與毒性。

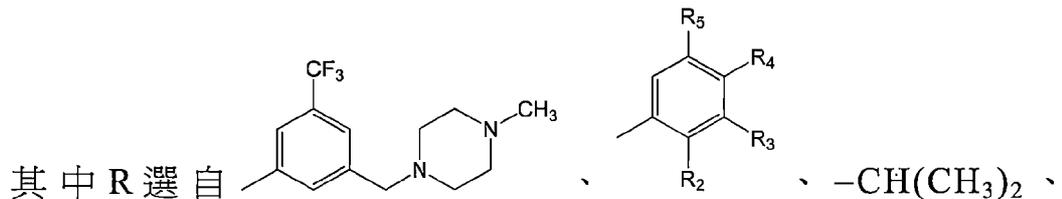
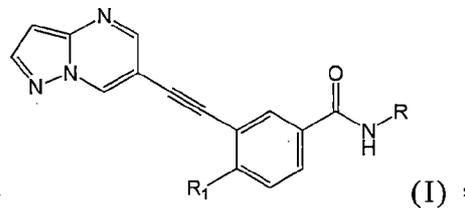
【0107】 本發明實屬難能的創新發明，深具產業價值，援依法提出申請。此外，本發明可以由所屬技術領域中具有通常知識者做任何修改，但不脫離如所附申請專利範圍所要保護的範圍。

【符號說明】

【0108】 無

申請專利範圍

1. 一種盤基蛋白結構域受體1(DDR1)抑制劑之用途，其係用於製備預防或治療骨關節炎之藥物，其中該DDR1抑制劑並非一盤基蛋白結構域受體2(DDR2)抑制劑。
2. 如申請專利範圍第1項所述的用途，其中該DDR1抑制劑包括DDR1抑制性抗體、小干擾核酸(siRNA)及反義核酸的其中之一。
3. 如申請專利範圍第1項所述的用途，其中該DDR1抑制劑包括以式(I)表示的化合物或其藥理上可接受之鹽類：

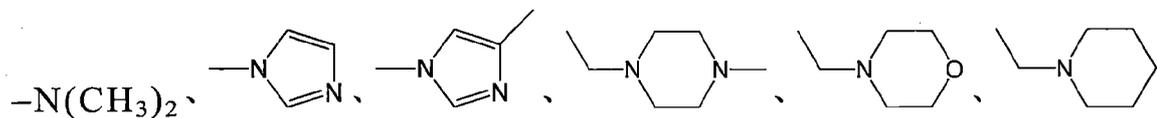


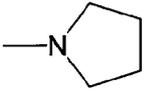
$-(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_{11}$ 及 $-\text{C}_5\text{H}_9$ 所組成的群組其中之一；

R_1 為 $-\text{CH}_3$ 或 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ；

R_2 選自 $-\text{H}$ 、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{X}$ 及 $-\text{OCH}_3$ 所組成的群組其中之一；

R_3 選自 $-\text{H}$ 、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{X}$ 、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$ 、



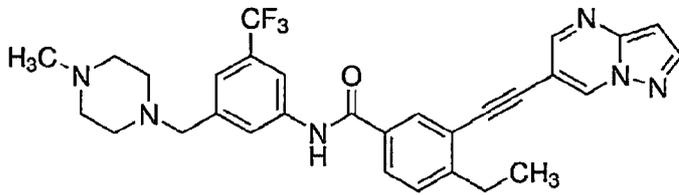
以及  所組成的群組其中之一；

R_4 選自 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{X}$ 、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{H}$ 所組成的群組其中之

一；以及

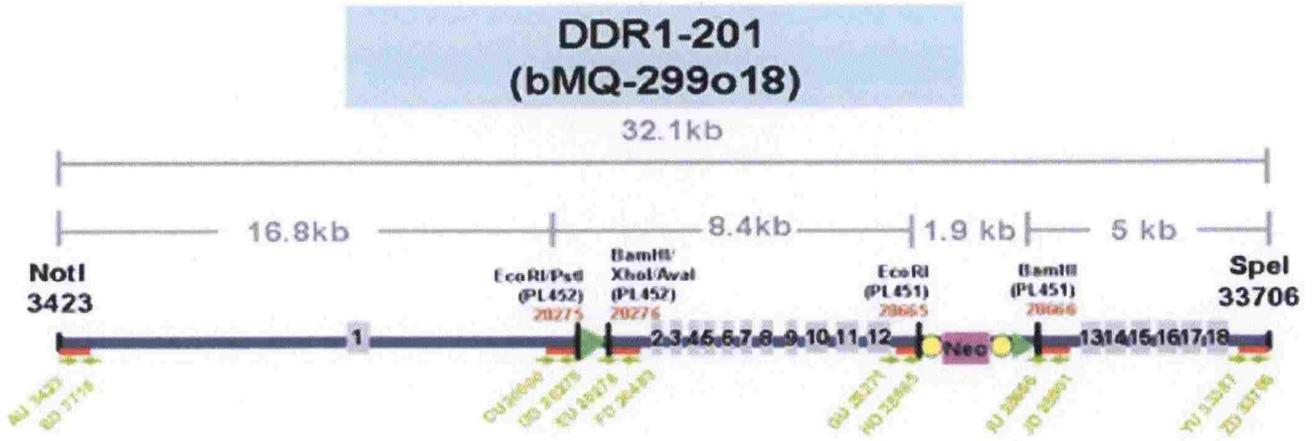
R_5 選自 $-CH_3$ 、 $-X$ 、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-H$ 所組成的群組其中之一，其中X為鹵素。

4. 如申請專利範圍第3項所述的用途，其中該DDR1抑制劑為



5. 如申請專利範圍第1項所述的用途，其中該骨關節炎係選自骨關節炎損傷、前十字韌帶損傷、退化性關節炎及其組合所組成的群組其中之一。

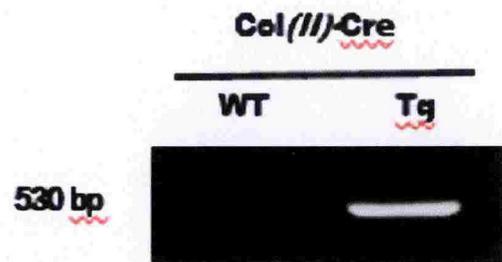
圖式



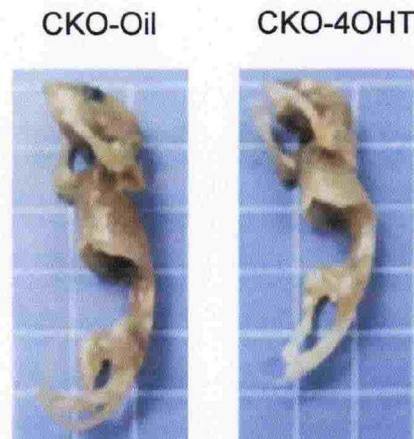
第 1A 圖



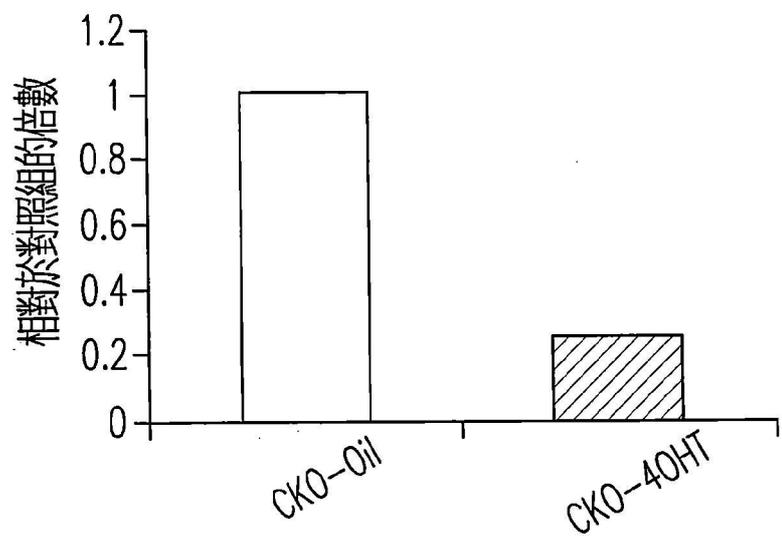
第 1B 圖



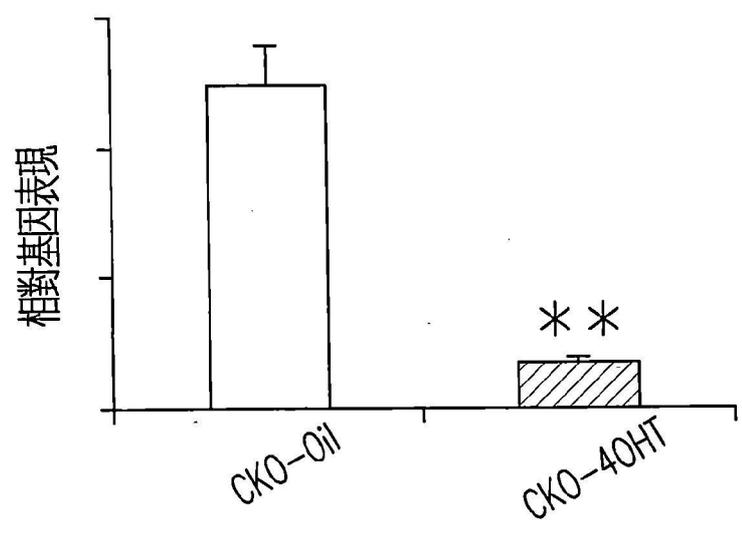
第 1C 圖



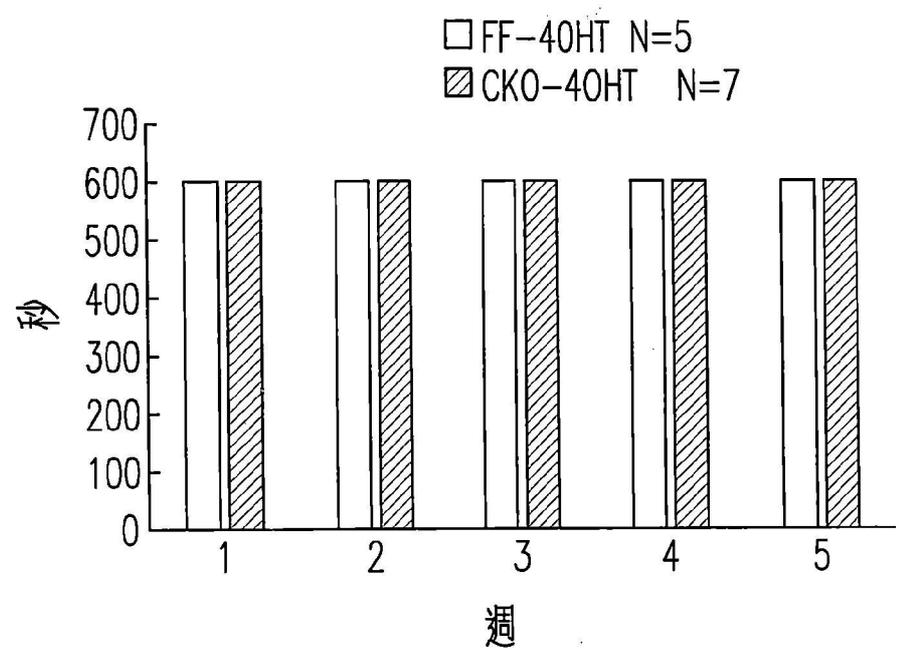
第 1D 圖



第1E圖

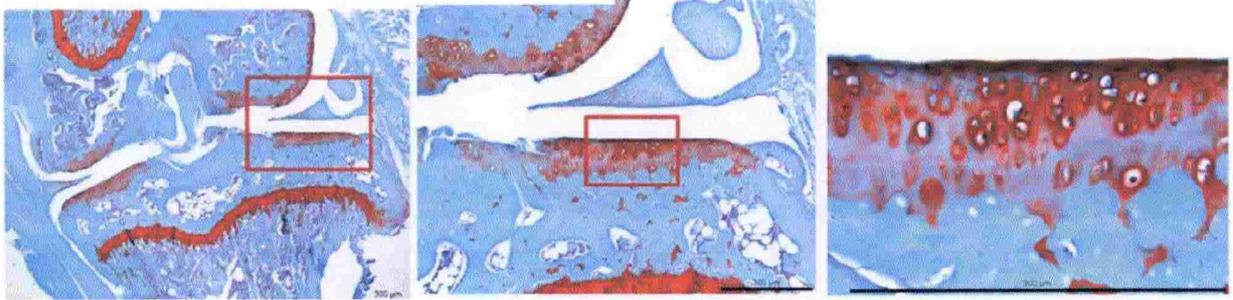


第1F圖

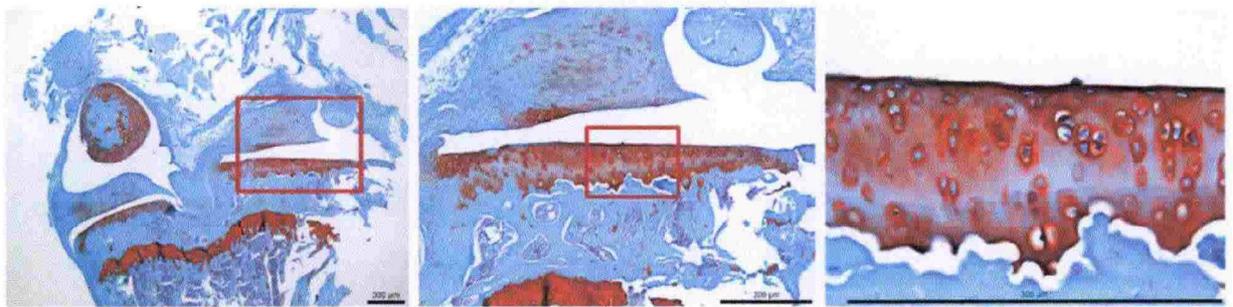


第2A圖

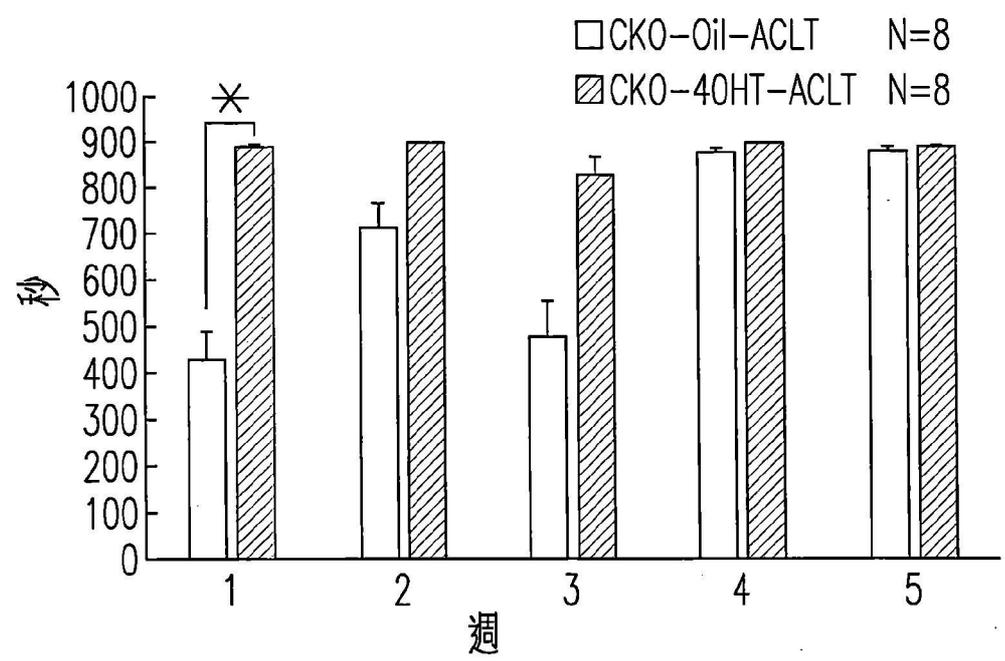
FF-4OHT



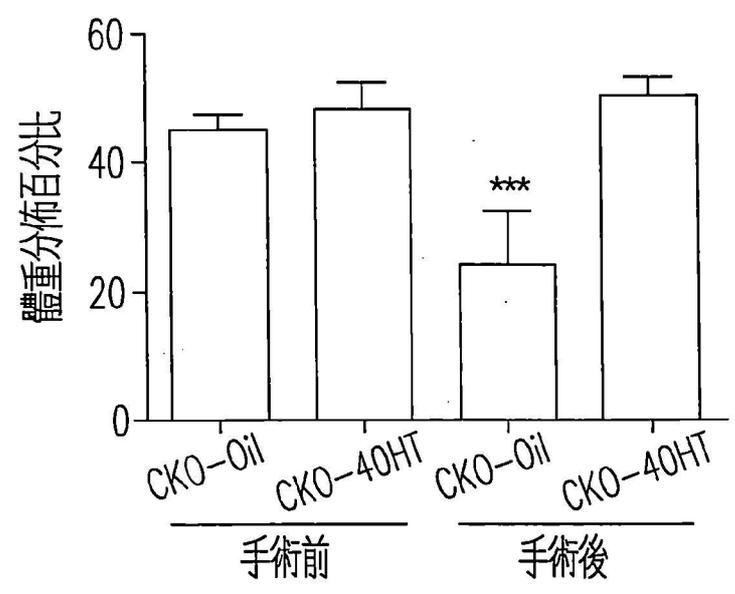
CKO-4OHT



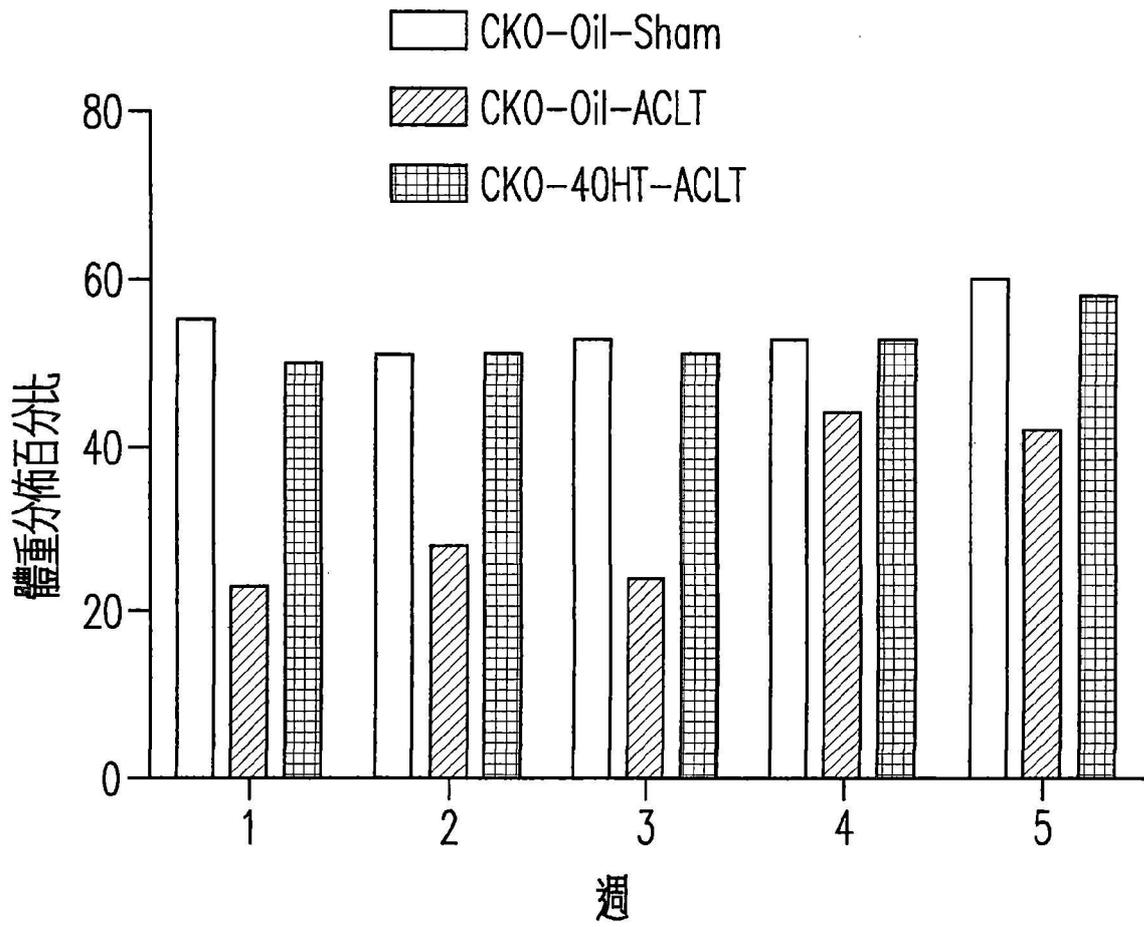
第 2B 圖



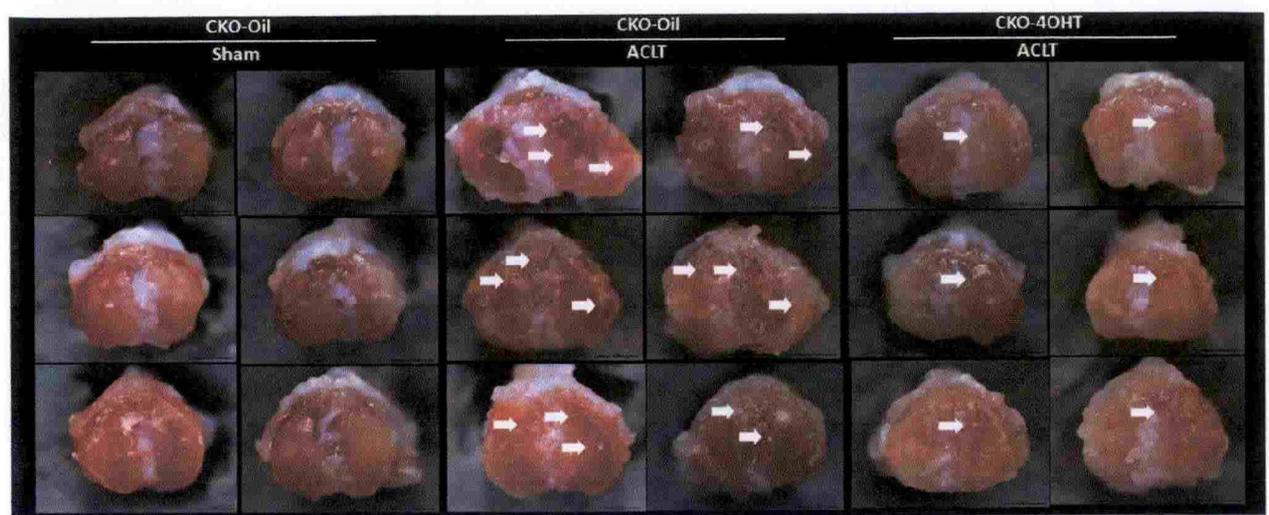
第3A圖



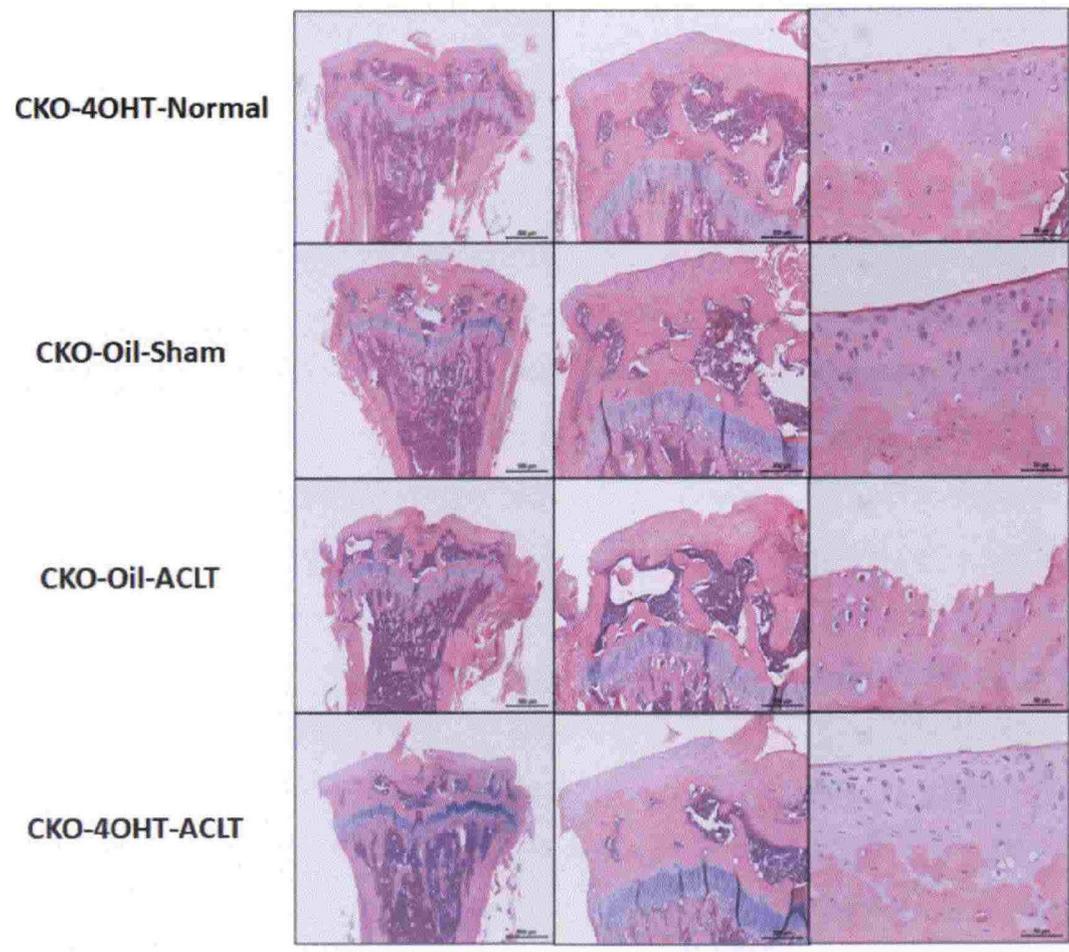
第3B圖



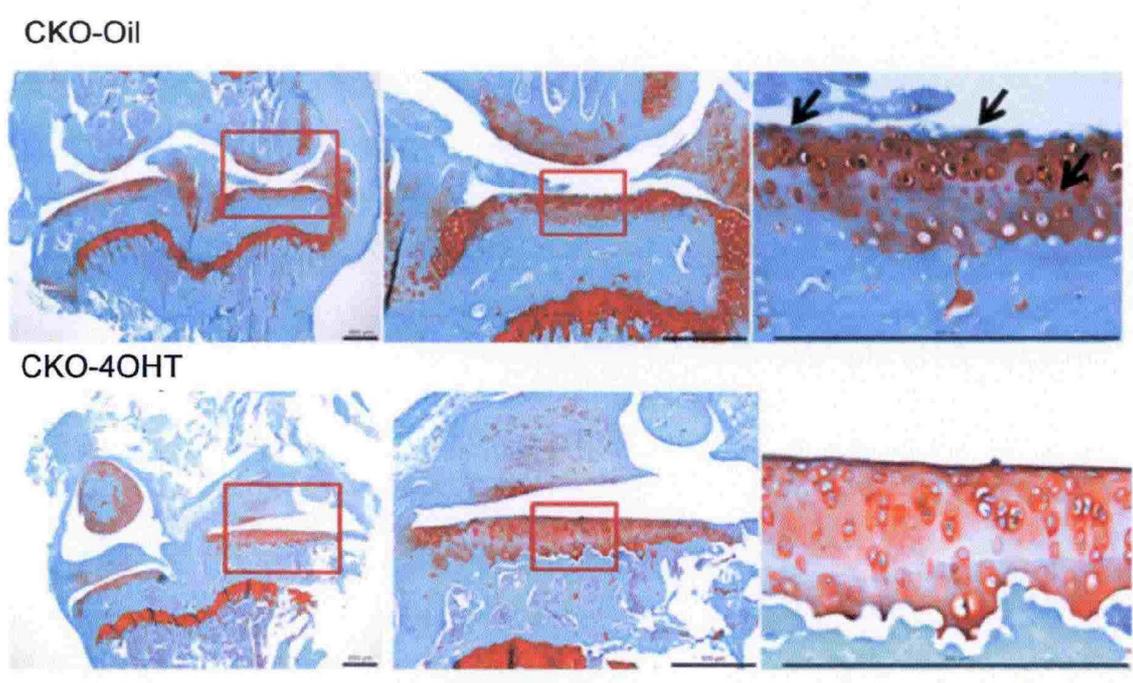
第 4 圖



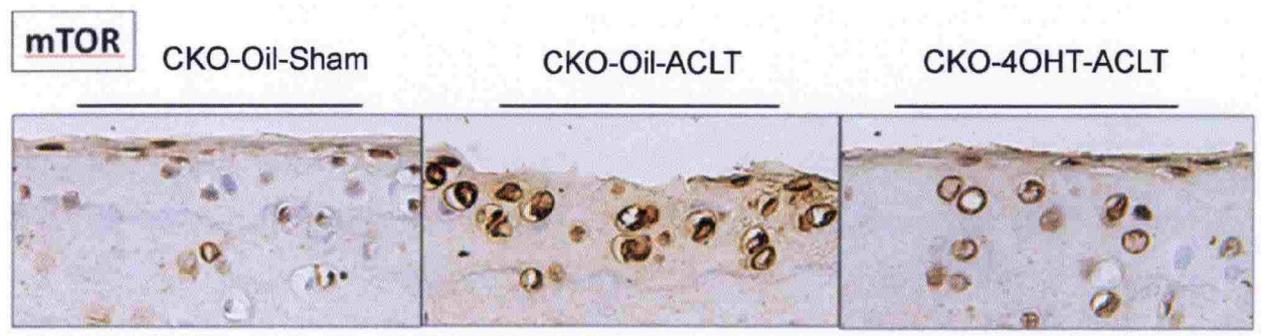
第 5 圖



第 6A 圖

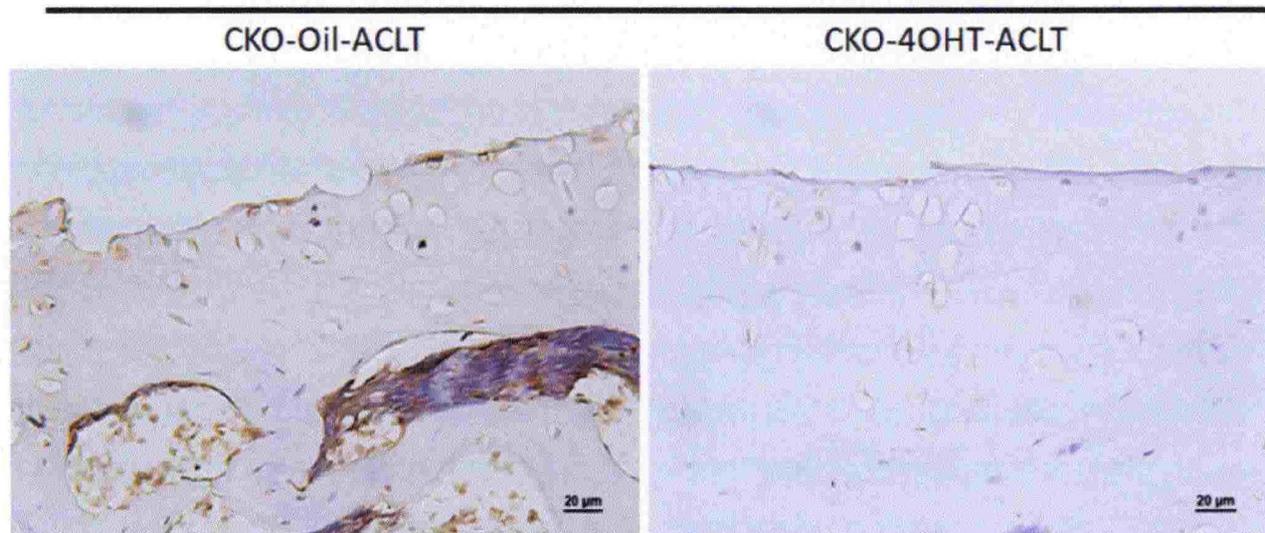


第 6B 圖

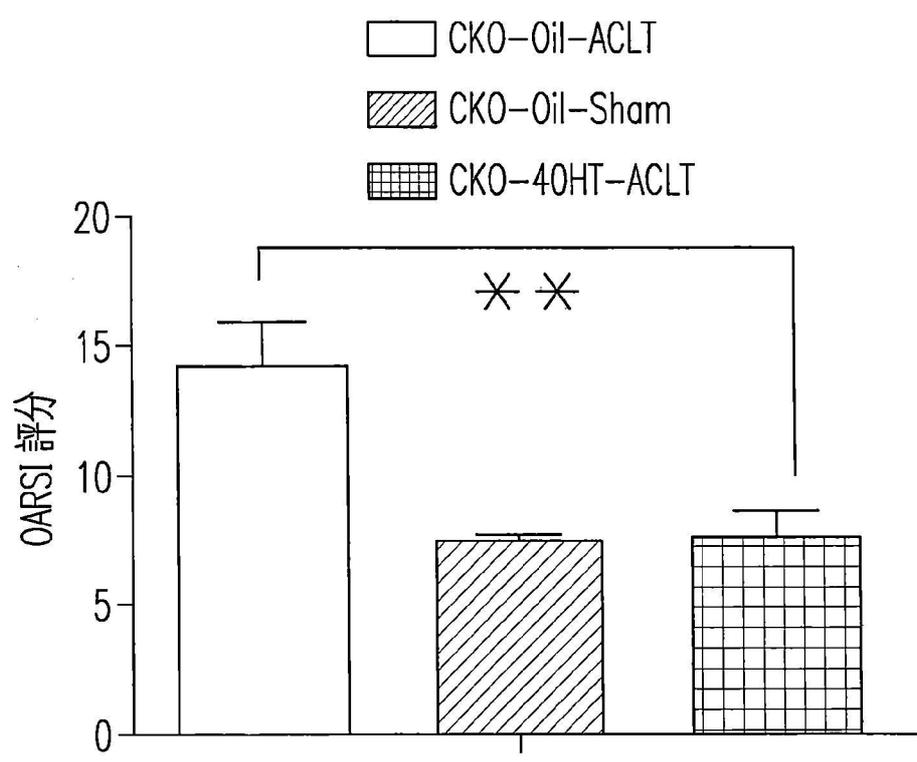


第 6C 圖

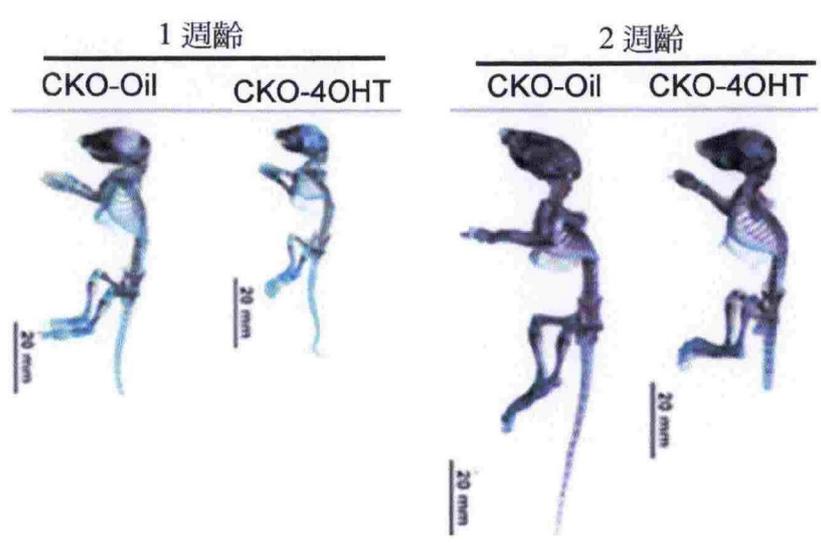
第 X 型



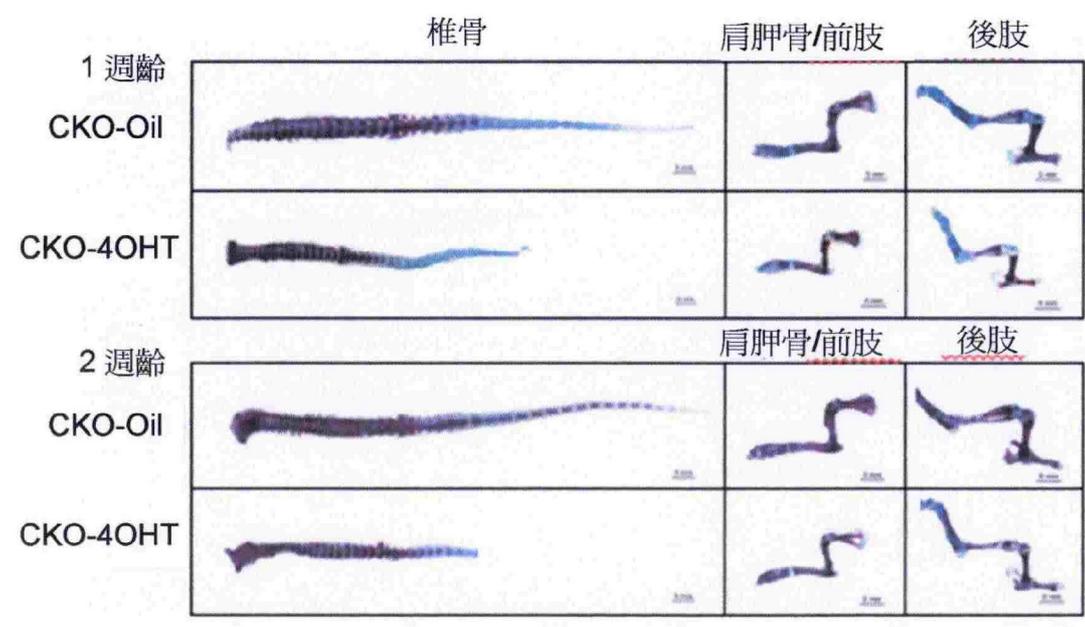
第 6D 圖



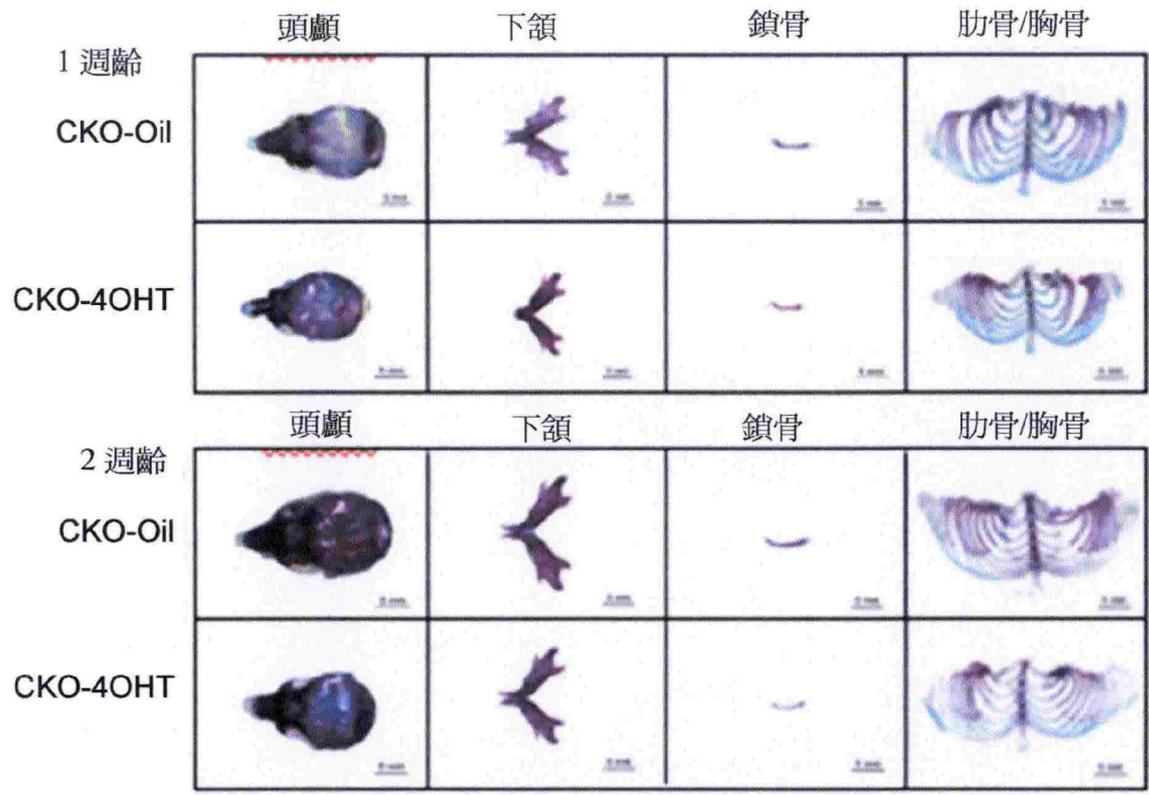
第7圖



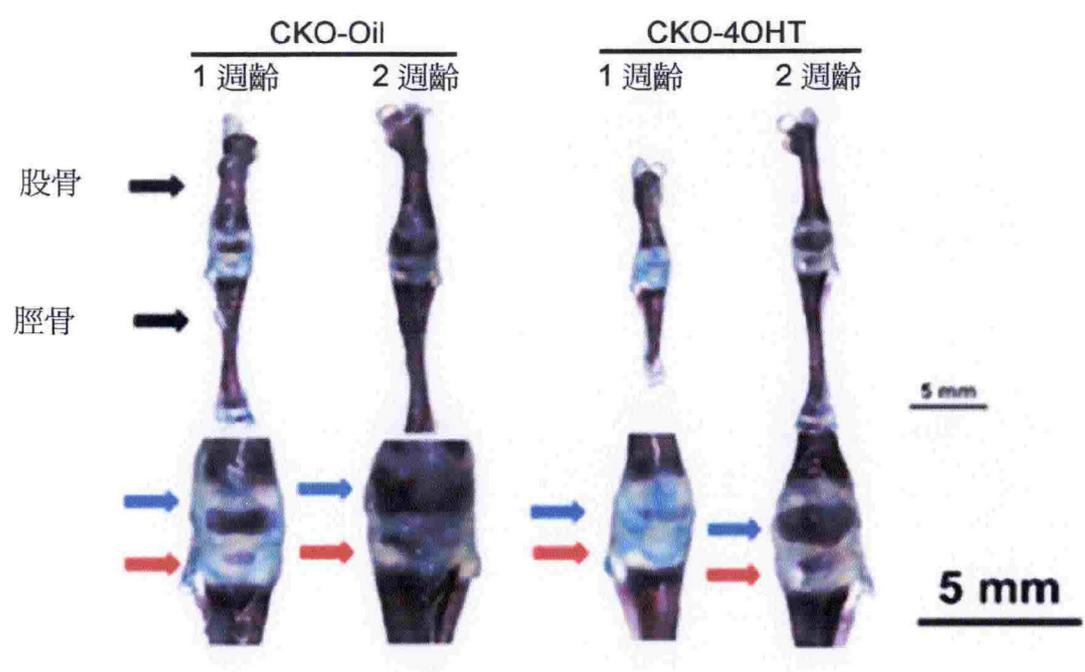
第 8A 圖



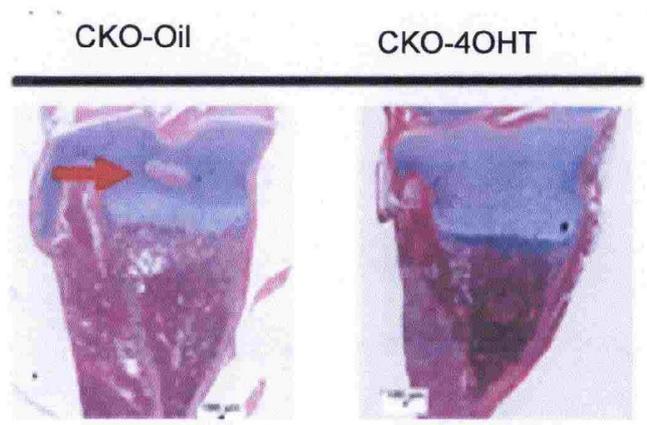
第 8B 圖



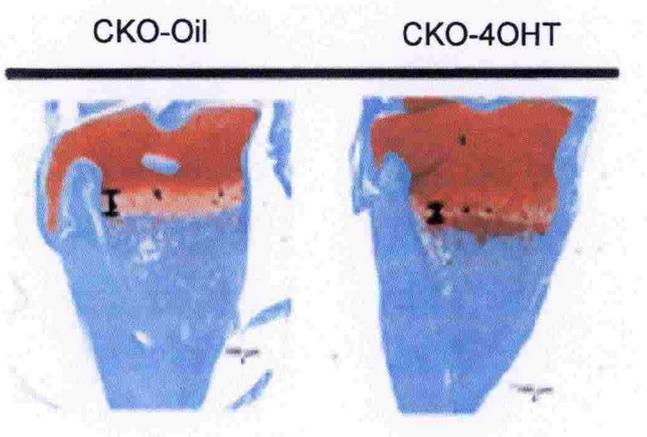
第 8C 圖



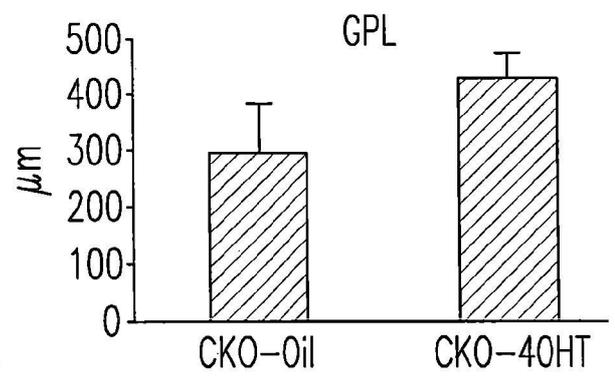
第 9A 圖



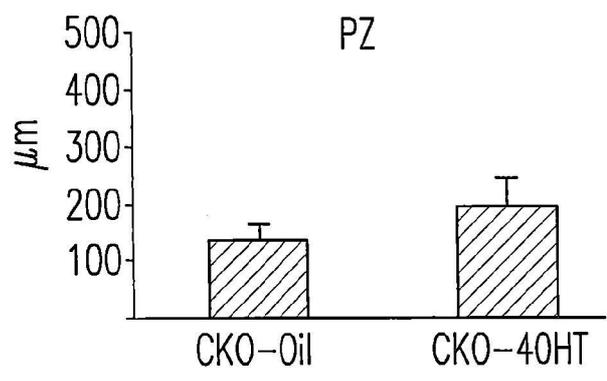
第 9B 圖



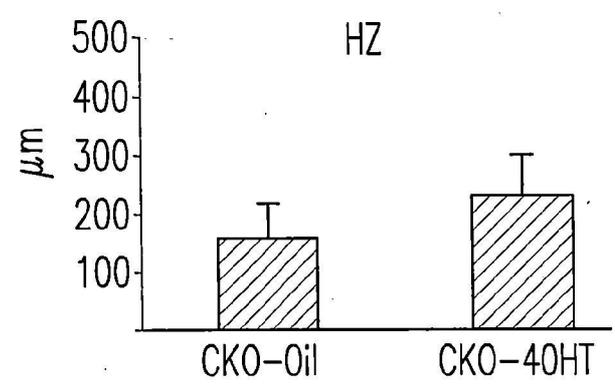
第 9C 圖



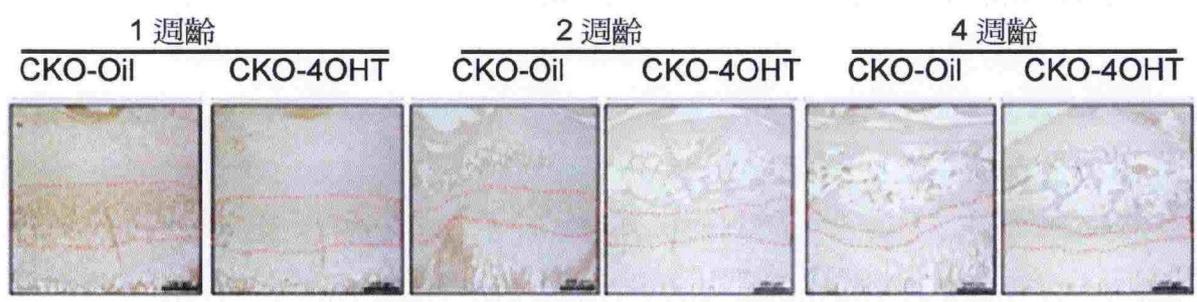
第9D圖



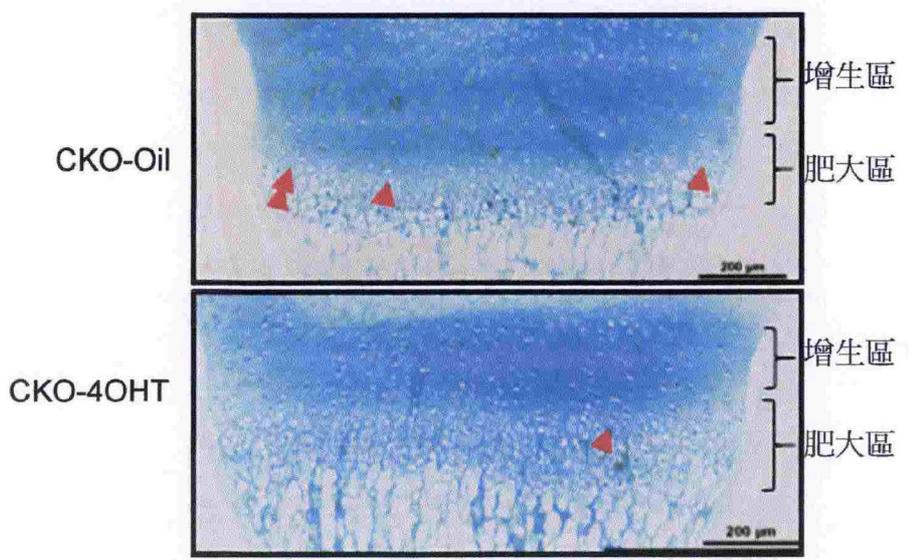
第9E圖



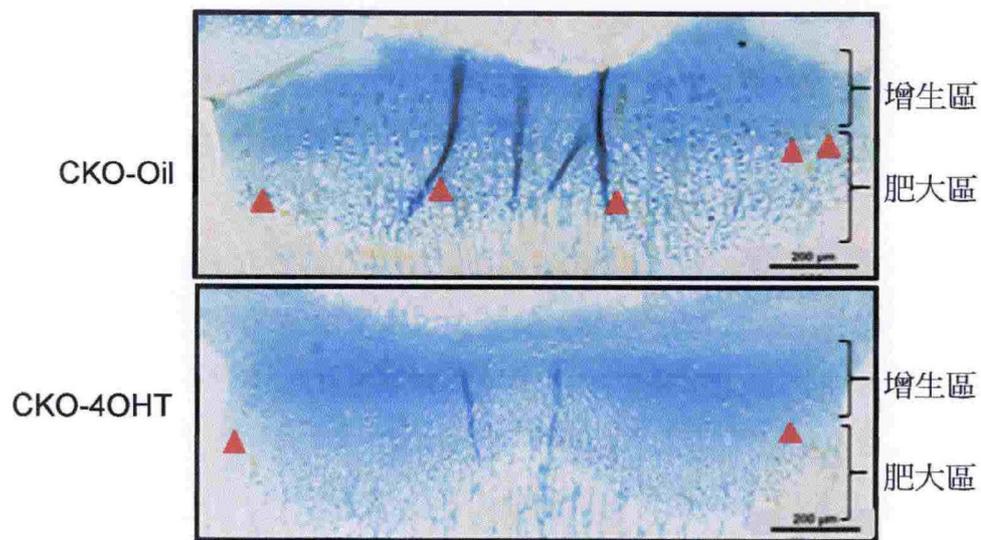
第9F圖



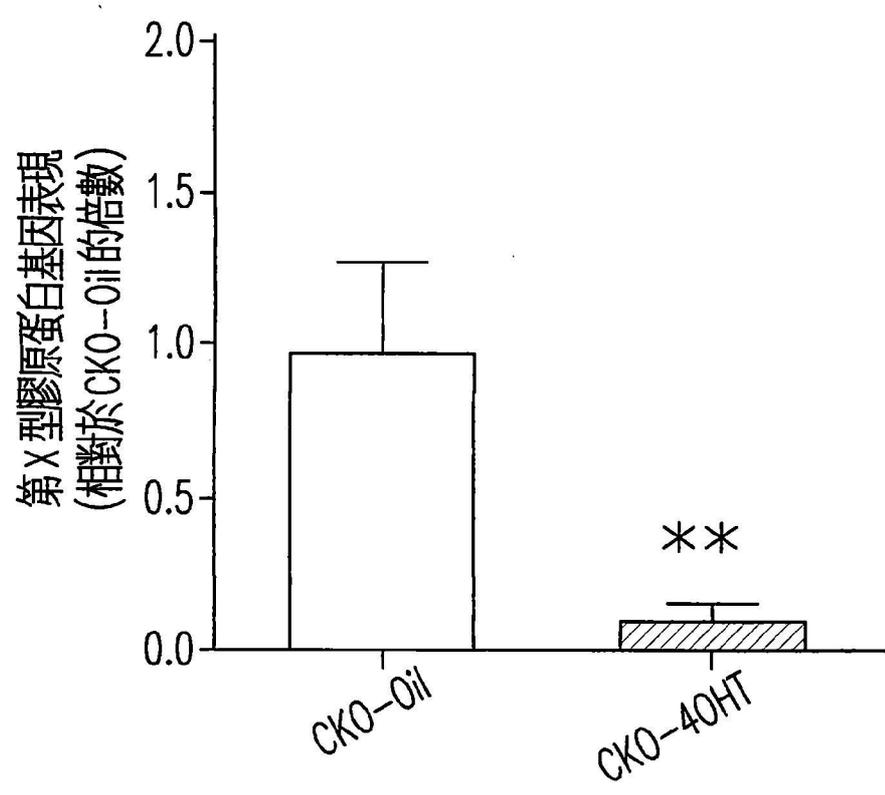
第 10A 圖



第 10B 圖



第 10C 圖

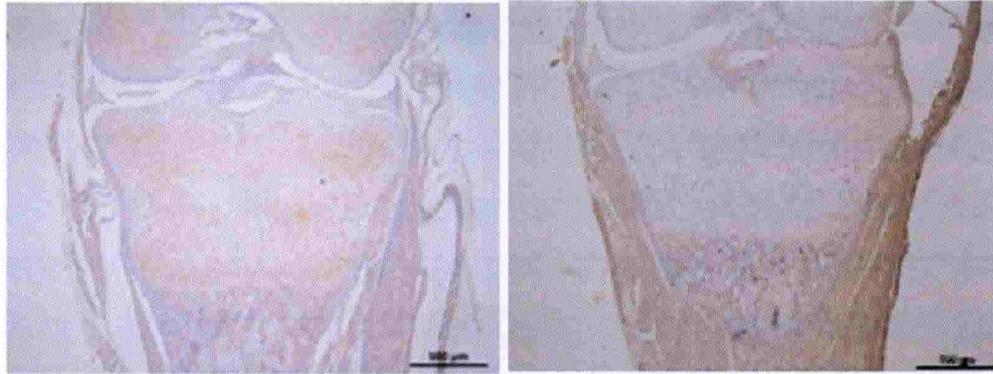


第11A圖

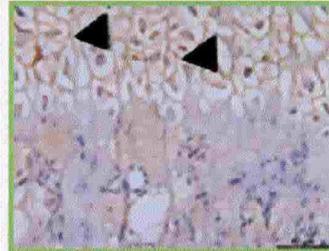
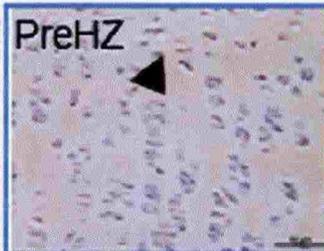
第 x 型膠原蛋白

CKO-Oil

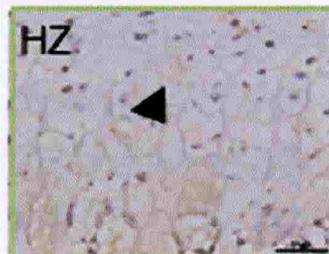
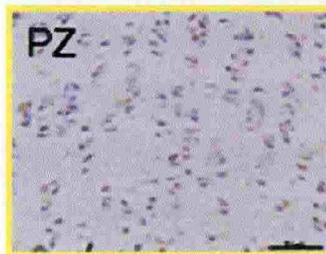
CKO-4OHT



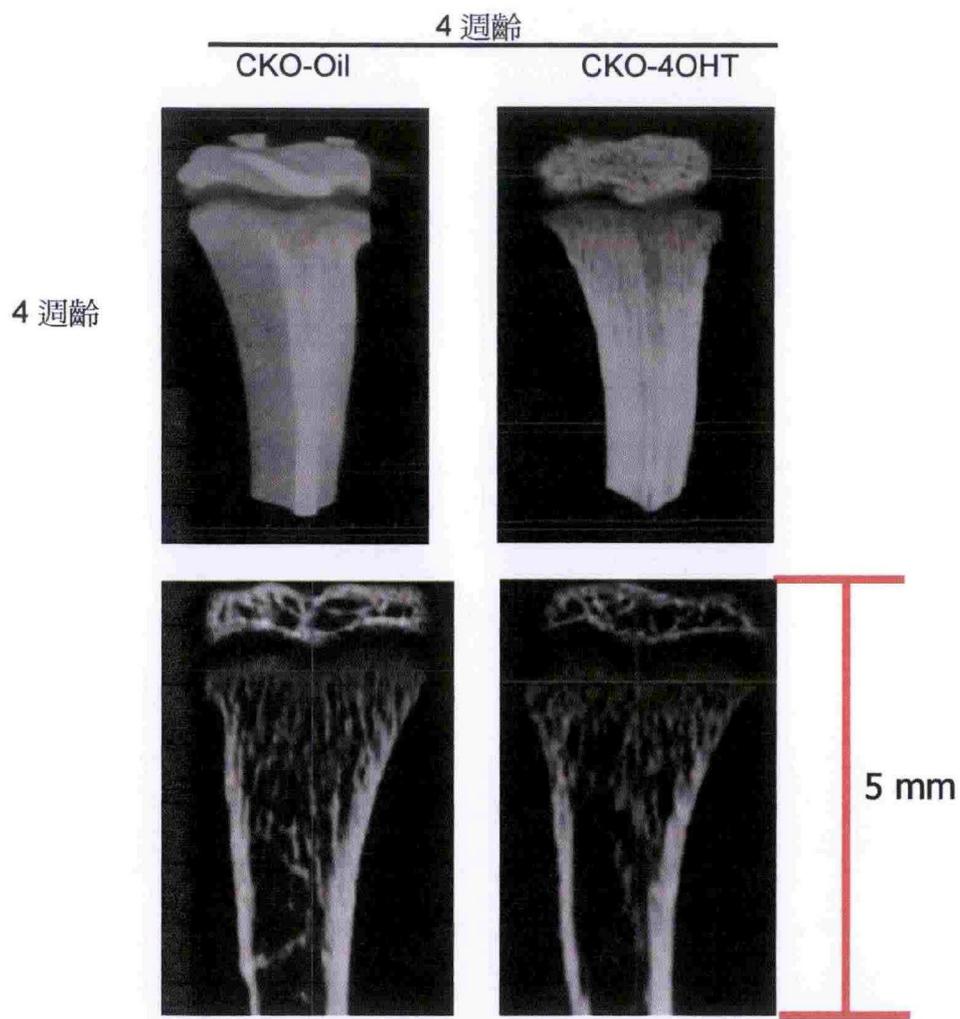
CKO-Oil



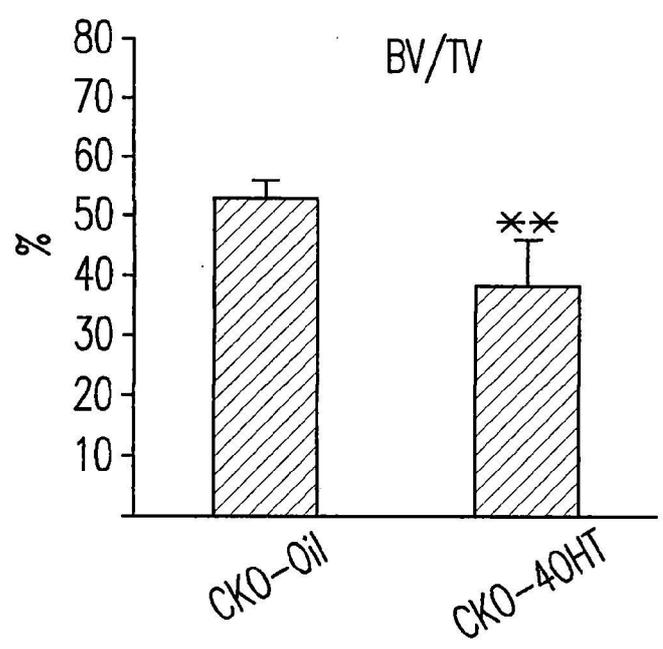
CKO-4OHT



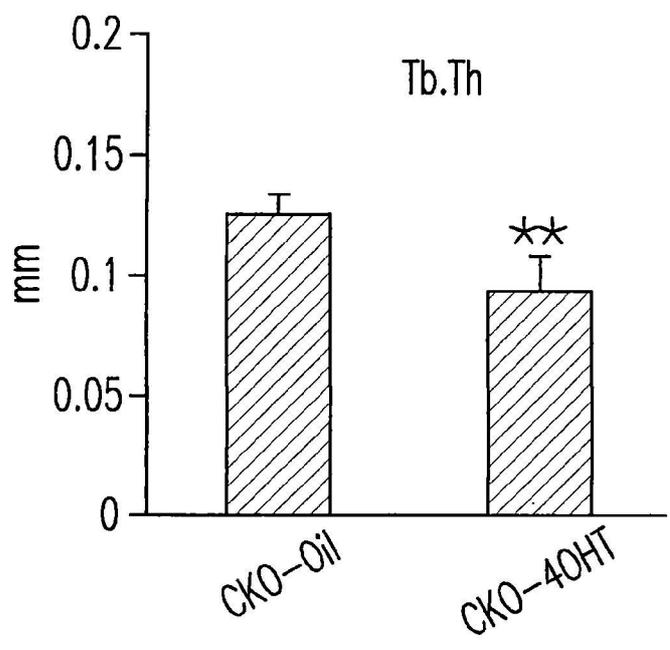
第 11B 圖



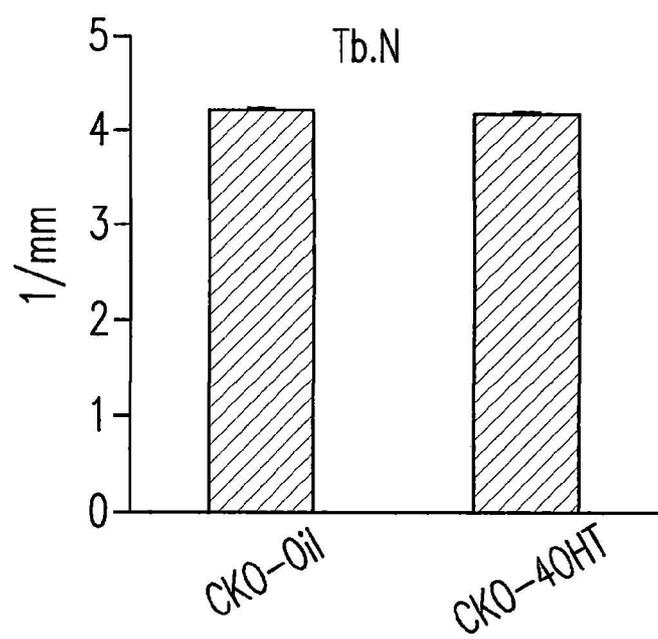
第 11C 圖



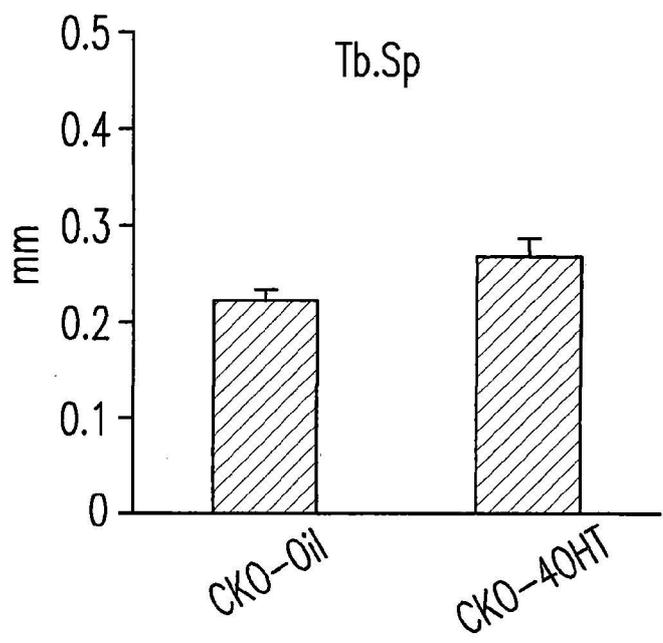
第11D圖



第11E圖



第11F圖



第11G圖