



(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 I856252 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 09 月 21 日

(21)申請案號：110119899

(22)申請日：中華民國 110 (2021) 年 06 月 01 日

(51)Int. Cl. : A61K35/28 (2015.01)

A61P27/02 (2006.01)

(71)申請人：永立榮生醫股份有限公司 (中華民國) U-NEURON BIOMEDICAL INC. (TW)

新北市汐止區新台五路 1 段 99 號 18 樓之 5

(72)發明人：黃效民 HWANG, SHIAW-MIN (TW) ; 謝鎮安 HSIEH, CHEN-AN (TW) ; 林培正 LIN, PEI-CHENG (TW)

(74)代理人：鄭志玲

(56)參考文獻：

US 20080286378A1

US 20170100440A1

期刊 Costa A, et al. Comprehensive Profiling of Secretome  
Formulations from Fetal- and Perinatal Human Amniotic Fluid Stem  
Cells. Int J Mol Sci. 2021/04/02

審查人員：藍昇軒

申請專利範圍項數：9 項 圖式數：6 共 22 頁

(54)名稱

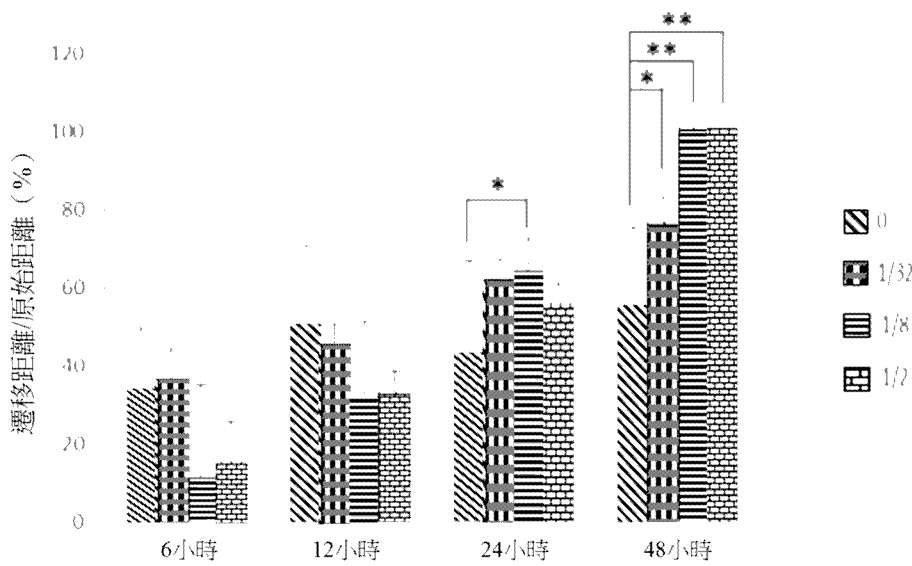
羊水幹細胞分泌體用於治療乾眼症的用途

(57)摘要

本文公開一種治療乾眼症或角膜傷口癒合的方法或醫藥組合物，包含對一有此需要的個體施用一治療有效量的羊水幹細胞分泌體。還提供羊水幹細胞分泌體在製備治療乾眼症或角膜傷口癒合藥物中之用途。

Disclosed herein is a method or a pharmaceutical composition for the treatment of dry eye disease or corneal wound healing, comprising administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of secretome of amniotic fluid stem cells. Also provided is a use of secretome of amniotic fluid stem cells for manufacturing a medicament for the treatment of dry eye disease or corneal wound healing.

指定代表圖：



【圖6】



I856252

## 【發明摘要】

【中文發明名稱】 羊水幹細胞分泌體用於治療乾眼症的用途

【英文發明名稱】 USE OF SECRETOME OF AMNIOTIC FLUID STEM

CELL IN THE TREATMENT OF DRY EYE DISEASE

## 【中文】

本文公開一種治療乾眼症或角膜傷口癒合的方法或醫藥組合物，包含對一有此需要的個體施用一治療有效量的羊水幹細胞分泌體。還提供羊水幹細胞分泌體在製備治療乾眼症或角膜傷口癒合藥物中之用途。

## 【英文】

Disclosed herein is a method or a pharmaceutical composition for the treatment of dry eye disease or corneal wound healing, comprising administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of secretome of amniotic fluid stem cells. Also provided is a use of secretome of amniotic fluid stem cells for manufacturing a medicament for the treatment of dry eye disease or corneal wound healing.

【指定代表圖】 圖6

【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】 羊水幹細胞分泌體用於治療乾眼症的用途

【英文發明名稱】 USE OF SECRETOME OF AMNIOTIC FLUID STEM

CELL IN THE TREATMENT OF DRY EYE DISEASE

### 【技術領域】

【0001】 本發明涉及羊水幹細胞分泌體在治療乾眼症以及治療角膜傷口癒合中之應用。

### 【先前技術】

【0002】 羊水細胞被用來作為常規產前診斷以檢測胎兒染色體是否異常。此外，在懷孕12週前的羊水中發現了一些具有造血前驅細胞特徵的小的有核細胞，表示這些細胞可能來自卵黃囊。自2004年至2006年間有些報導關於在羊水中成功分離並鑑定存在另一組幹細胞。這些羊水幹細胞被證明表現間質幹細胞以及神經幹細胞的特異性生物標記物，具有分化成骨骼、軟骨、脂肪，以及神經細胞的能力。經證實，羊水幹細胞在體外可大量穩定增殖，且增殖速度快於從成人骨髓及脂肪中得到的間質幹細胞，且無胚胎幹細胞的致瘤潛力。因此，羊水幹細胞具有應用於臨床醫學的潛力。

【0003】 乾眼症通常被稱為乾燥性角膜結膜炎。每年有數百萬人患有這種疾病，特別是由於電子產品的快速發展，這是當今引起乾眼症的最常見原因。乾眼症狀傳統上是透過眼瞼衛生、局部抗生素、四環素、去氧羥四環素、抗發炎化

合物（環孢素），或皮質類固醇來控制的，這些治療通常耗時、令人沮喪，且經常是無效的或效果各有不同。

【0004】 因此，需要開發一種能夠有效緩解症狀的新穎乾眼症治療劑。

#### 【發明內容】

【0005】 本文提供之一方面為治療一個體乾眼症之方法，包含對該個體施用一包含羊水幹細胞分泌體以及一醫藥上可接受的載體的之組合物；其中該分泌體係透過包含以下步驟之方法所製備：於一基礎培養基中培養羊水幹細胞24-72小時以得到一培養基；離心後收集該培養基的上清液，以及過濾該上清液以得到該分泌體。

【0006】 於一具體實施例中，該上清液透過孔徑小於0.5  $\mu\text{m}$ 的過濾器過濾；較佳地，該孔徑小於0.22  $\mu\text{m}$ 。

【0007】 於一具體實施例中，該組合物為一醫藥組合物，其係局部施用於該個體的眼中，較佳以眼凝膠、滴眼液、洗眼液、點眼液、眼部插入物、眼膏或眼噴霧劑的形式施用。

【0008】 本文提供之另一方面為用於一個體的角膜上皮傷口癒合之方法，包含對該個體施用包含一治療有效量的如本文所公開之羊水幹細胞分泌體以及一醫藥上可接受的載體之組合物。

【0009】 於另一方面，本文提供一種用於治療乾眼症的醫藥組合物，包含羊水幹細胞分泌體以及一醫藥上可接受的載體；其中該分泌體係透過包含以下步驟之方法所製備：於一基礎培養基中培養羊水幹細胞24-72小時以得到一培養基；離心後收集該培養基的上清液，以及過濾該上清液以得到該分泌體。

【0010】於另一方面，本文提供一種用於角膜上皮傷口癒合的醫藥組合物，包含對一有此需要的個體施用一醫藥組合物，該醫藥組合物包含一治療有效量的如本文所公開之羊水幹細胞分泌體以及一醫藥上可接受的載體。

【0011】於又一方面，本文提供該羊水幹細胞分泌體在製備一用於治療乾眼症的藥物之用途。

【0012】於又一方面，本文提供該羊水幹細胞分泌體在製備用於角膜上皮傷口癒合的藥物之用途。

【0013】本發明還提供該羊水幹細胞分泌體在製備一乾眼症藥物之用途。

【0014】本發明還提供該羊水幹細胞分泌體在製備一角膜上皮傷口癒合藥物之用途。

【0015】本發明將透過以下實施例進一步說明。然而，應當理解的是，以下實施例僅用於說明之目的且不應被解釋為在實施中限制本發明。

#### 【圖式簡單說明】

【0016】當結合附圖閱讀時，將更好地理解本發明的前述概述以及以下詳細描述。為了說明本發明，在附圖中顯示目前較佳的具體實施例。

【0017】於圖式中：

【0018】圖1所示為實施例1實驗之示意時間軸。

【0019】圖2所示為根據圖1在第0天、第4天，以及第7天從實施例1中的每隻小鼠收集的淚液量的分佈（\* $p < 0.05$ ，相較於損傷組）。

【0020】圖3所示為根據圖1在第0天、第4天，以及第7天從實施例1中的每隻小鼠的眼睛上測量的淚膜破裂時間（tear break up time，TBUT）之曲線（\* $p < 0.05$ ，相較於損傷組）。

【0021】圖4所示為實施例1小鼠眼睛受到UVB損傷的角膜表面照片，包括（A）角膜混濁度之評估，（B）角膜平滑度，（C）角膜地圖，以及（D）角膜染色（Lissamine Green Stain）檢查；其中較高的評估分數代表較高的損害嚴重程度（\* $p < 0.05$ ，相較於損傷組）。

【0022】圖5所示為MTT測定結果，其說明實施例2中不同濃度AFSC分泌體處理與人類角膜上皮細胞在24、48、72小時活細胞數的相關性（\* $p < 0.05$ ，相較於濃度0）。

【0023】圖6所示為傷口癒合實驗結果，其說明AFSC分泌體處理後6、12、24，以及48小時後，人類角膜上皮細胞遷移效率（\* $p < 0.05$ ，\*\* $p < 0.001$ ，相較於濃度0）。

#### 【實施方式】

【0024】為使本發明之上述及其他技術內容、特徵及效果得以清楚地展示，以下具體實施例結合附圖閱讀。透過具體實施例之描述，本領域普通技術人員將清楚地了解本發明為實現上述方面所採用之技術方法及效果。

【0025】除非另有定義，否則本文中所有技術及科學術語具有與本發明內容所屬領域之普通技術人員通常理解的相同之定義。

【0026】在說明書及所附申請專利範圍中使用之單數形式「一」、「一個」以及「該」包括複數所指對象，除非上下文另有明確規定。於本申請中，除非另

有說明，否則使用「或」或者「以及」表示「及/或」。此外，術語「包括(including)」以及例如「包括(include)」、「包括(includes)」以及「包括(included)」等其他形式之使用並非限制性的。此處使用的章節標題僅用於組織目的，不應被解釋為限制所描述之主題。除非另有說明，本文所用材料均為市售材料，容易獲得。

**【0027】** 如本文所用，本文使用之「約」乙詞或類似用語係指測量的量，例如劑量，包括於一實施例中相對於一特定量的偏差 $\pm 15\%$ 或 $\pm 10\%$ ；於一較佳實施例中相對於一特定量的偏差 $\pm 5\%$ ；在另一較佳實施例中相對於一特定量的偏差 $\pm 1\%$ ；或於一最佳實施例中相對於一特定量的偏差 $\pm 0.1\%$ ；而數量所屬的物質之性質不受影響。

**【0028】** 如本文所用，本文所用之「疾病」乙詞係指需要醫學干預或需要醫學干預的情況之任何症狀、感染、病症或症候群。這種醫學干預可包括治療、診斷，及/或預防。

**【0029】** 「乾眼症(dry eye disease, DED)」、「乾眼症候群(dry eye syndrome, DES)」、「乾燥性角膜結膜炎(keratoconjunctivitis sicca, KCS)」等詞或簡稱「乾眼症」可互換使用，係指由淚液分泌減少或淚膜蒸發增加所引起之眼病。乾眼症可能是另一種導致乾眼症的潛在疾病之結果，例如，乾燥症候群(Sjogren's syndrome)、更年期或類風濕性關節炎。乾眼症亦可能是發炎反應的併發症之一。乾眼症亦可能是感染的結果，或藥物的副作用，或接觸可能會導致乾眼症的症狀或病症的毒素、化學品或其他物質。乾眼症可表現為本領域已知的一種或多種眼科臨床症狀，包括但不限於乾燥、異物感、灼熱、瘙癢、刺激、發紅、眼痛、視力模糊及/或視力下降。

【0030】如本文所用，「分泌體」乙詞，亦稱為「條件培養基」，係指在培養細胞時從細胞分泌到細胞環境（進入培養基中）的蛋白質的全部（或集合）。

【0031】如本文所用，「幹細胞」乙詞為分化為構成組織的各個細胞之前的未分化細胞之總稱，且幹細胞具有透過特定分化刺激分化為特定細胞之能力。根據本發明，用於製備本發明分泌體之細胞為羊水幹細胞。

【0032】如本文所用，「組合物」乙詞係指由多於一種活性成分的混合或組合產生的產品，並且包括該活性成分的固定及非固定組合。「固定組合」乙詞係指活性成分與某種助劑都以單一實體或劑量之形式同時給予患者。「非固定組合」乙詞係指將該活性成分以及某種助劑作為單獨的實體同時、並行或依序給予患者，沒有特定的干預時間限制，其中這種施用方式在患者體內提供了兩種藥劑的有效含量。後者也適用於雞尾酒療法，例如，三種或更多種活性成分的施用。

【0033】根據本發明，本文所用之「醫藥組合物」乙詞係指一治療有效量的羊水幹細胞分泌體或條件培養基以及可選擇的一醫藥上可接受的載體。

【0034】本文所用之「醫藥上可接受的」乙詞係指在合理的醫學判斷範圍內，藥物適合與服用該藥物的個體（如人類）的組織接觸使用，沒有過度毒性、刺激、過敏反應或其他問題或併發症，並具有合理的益處/風險比。每個載體必須與其他成分相容才是「可接受的」。

【0035】本文所用之「載體」乙詞係指具有輔助細胞或組織吸收活性成分功能的無毒化合物或藥劑。載體選自例如，賦形劑、佐劑、稀釋劑、填充劑，或增積劑、造粒劑、包覆劑、釋放控制劑、黏合劑、崩解劑、潤滑劑、防腐劑、界面活性劑、抗氧化劑、緩衝劑、懸浮劑、增稠劑、穩定劑或其他用於醫藥組合物的載體。載體的實例包括，但不限於，聚乙烯醇、聚維酮、羥丙基甲基纖維素、

泊洛沙姆、羥乙基纖維素環糊精、羧甲基纖維素(carboxymethylcellulose, CMC)、磷酸鹽緩衝鹽水(phosphate buffered saline, PBS)、水、乳化劑(例如油及水乳化劑),或潤濕劑。可根據需要或便利性添加張力調節劑。它們包括,但不限於,鹽類,特別是氯化鈉、氯化鉀、甘露醇以及甘油,或任何其他合適的眼科可接受的張力調節劑。可使用各種緩衝劑以及調節pH的方法,只要所得製劑為眼科可接受的。因此,緩衝液包括醋酸鹽緩衝液、檸檬酸鹽緩衝液、磷酸鹽緩衝液,以及硼酸鹽緩衝液。根據需要,酸或鹼可用於調節這些製劑的pH值。類似地,用於本發明之眼科可接受的抗氧化劑包括,但不限於,焦亞硫酸鈉、硫代硫酸鈉、乙醯半胱胺酸、丁基化羥基苯甲醚以及丁基化羥基甲苯。可包含在眼用製劑中的其他賦形劑成分為螯合劑及抗生素。較佳的螯合劑為乙二胺四乙酸二鈉,儘管亦可使用其他螯合劑代替之或與其結合使用。可用於本發明之抗生素的非限制性實例包括硫酸曲美普林(trimethoprim)/硫酸多黏菌素B、加替沙星(gatifloxacin)、鹽酸莫西沙星(moxifloxacin)、妥布黴素(tobramycin)、太古盤寧素(teicoplanin)、萬古黴素(vancomycin)、阿奇黴素(azithromycin)、克拉黴素(clarithromycin)、阿莫西林(amoxicillin)、青黴素(penicillin)、胺苄青黴素(ampicillin)、羧苄青黴素(carbenicillin)、環丙沙星(ciprofloxacin)、左氧氟沙星(levofloxacin)、阿米卡星(amikacin)、健大黴素(gentamicin)、康黴素(kanamycin)、新黴素(neomycin),以及鏈黴素(streptomycin)。

【0036】如本文所用,「有效量」或「治療有效量」等詞係指施用的藥劑或化合物的量足夠到在一定程度上緩解所治療的疾病或病症的一種或多種症狀。結果可為減少及/或減輕疾病的徵狀、症狀或原因,或生物系統的任何其他所需改變。例如,用於治療用途的一「有效量」為提供臨床上顯著減少疾病的症

狀所需的包含本文公開的胜肽或蛋白質的組合物的量。在任何個別情況下，適當的「有效」量可使用技術來確定，例如劑量遞增研究。

【0037】如本文所用，「治療（treat）」、「治療（treating）」或「治療（treatment）」等詞包括減輕、緩和或改善一疾病或病症的至少一種症狀、預防額外的症狀、抑制疾病或病症，例如阻止疾病或病症的發展、緩解該疾病或病症、導致該疾病或病症消退、緩解由該疾病或病症引起的一病症、或預防性及/或治療性地停止該疾病或病症的症狀。

【0038】本發明提供一種包含羊水幹細胞分泌體的組合物；其中該分泌體係透過包含以下步驟的方法所製備：於一基礎培養基中培養羊水幹細胞24-72小時；收集並離心該基礎培養基的上清液，以及過濾該上清液以得到該分泌體。

【0039】於一具體實施例中，該上清液透過孔徑小於0.5  $\mu\text{m}$ 的過濾器過濾。較佳地，該過濾器的孔徑為0.45  $\mu\text{m}$ 、0.3  $\mu\text{m}$ ，或0.22  $\mu\text{m}$ 。

【0040】於一具體實施例中，該組合物為一醫藥組合物，其進一步包含一醫藥上可接受的載體。

【0041】根據本發明，一種治療乾眼症之方法包含對一有此需要的個體施用一包含羊水幹細胞分泌體的醫藥組合物。

【0042】根據本發明，一種角膜上皮傷口癒合之方法包含對一有此需要的個體施用一包含羊水幹細胞分泌體的醫藥組合物。

【0043】於一實施例中，將該醫藥組合物局部施用於該個體的眼睛。

【0044】於一具體實施例中，該醫藥組合物為一眼科製劑的形式，例如眼凝膠、滴眼液、洗眼液、點眼液、眼部插入物、眼膏或眼噴霧劑。

【0045】本發明還提供羊水幹細胞分泌體在製備乾眼症藥物之用途。

【0046】 本發明還提供羊水幹細胞分泌體在製備角膜上皮傷口癒合藥物之用途。

【0047】 透過以下實施例進一步說明本發明，提供這些實施例是為了演示而非限制。

#### 【0048】 實施例

##### 【0049】 實施例1

【0050】 治療性羊水幹細胞（amniotic fluid stem cells，AFSC）透過包含以下步驟的方法獲得：從合格細胞庫，例如工作細胞庫（working cell bank，WCB）解凍細胞並在MSC NutriStem® XF培養基（無血清/無異種）中培養該細胞。將AFSCs在基礎培養基（ $\alpha$ -最低必需培養基）中進一步培養48小時以收集AFSC的條件培養基。

【0051】 隨後，將自細胞培養中收集的條件培養基以2,000 rpm的速度離心約10分鐘，以0.22  $\mu$ m濾膜過濾除去細胞殘留物，得到AFSC的分泌體，保存於-20°C冰箱中備用。

##### 【0052】 實施例2

【0053】 本實施例採用UVB照射誘導乾眼症動物模型，根據實驗結果評估羊水幹細胞分泌體治療乾眼症的效果。

##### 【0054】 材料與方法

【0055】 於本實施例中使用雌性ICR白化小鼠（BioLASCO公司）作為動物模型。本實驗在小鼠5至6週齡時開始。ICR小鼠分為6組，每組包括6隻小鼠（n=6）：

1. 健康對照組（空白組）：以0.9%生理鹽水滴眼處理；

2. 陽性對照組（損傷組）：以0.9%生理鹽水滴眼液以及UVB處理造成損傷；
3. 1/5羊水幹細胞分泌體（1/5D組）：以UVB處理造成損傷，並以稀釋1/5的羊水幹細胞（AFSC）分泌體處理；
4. 1/5羊水幹細胞分泌體（1/5D組）：以UVB處理造成損傷，並以稀釋1/5的AFSC分泌體以滴眼方式處理；
5. 1/10羊水幹細胞分泌體（1/10D組）：以UVB處理造成損傷，並以稀釋1/10的AFSC分泌體以滴眼方式處理；
6. 1/20羊水幹細胞分泌體（1/20D組）：以UVB處理造成損傷，並以稀釋1/20的AFSC分泌體以滴眼方式處理；
7. 人工淚液對照組（Artificial tear，AFT組）：以0.9%人工淚液（ALLERGAN公司）以滴眼方式處理，並以UVB處理造成傷害。

【0056】自乾眼誘導開始前3天起，根據所提出的方案在每天10:00以及17:00對所有小鼠施用滴眼劑。UVB照射自第1天至第7天連續進行，其中UVB的強度為 $0.72 \text{ J/cm}^2$ 。

【0057】實驗的示意時間軸如圖1所示。於第0天、第4天，以及第7天收集淚液，測量淚液量的變化；於第0天、第4天，以及第7天還測量了每隻小鼠的淚膜破裂時間（tear break up time，TBUT）。

【0058】於第8天犧牲小鼠並進一步進行組織病理學分析。

#### 【0059】結果

【0060】測量自每隻小鼠收集的淚液量，結果如圖2所示。如圖2所示，以AFSC分泌體治療的組別淚液分泌效能提高，尤其是在第7天以1/10D治療的組別。相較於陽性對照組（損傷組），在第4天及第7天以AFSC分泌體（1/5D、1/10D，

以及1/20D)處理的組別的改善顯示出統計學顯著性( $p<0.05$ )。相較之下，雖然人工淚液(AFT)治療的小鼠在第7天表現出顯著改善，但相較於AFSC分泌體，人工淚液在改善淚液分泌方面的功效仍然較低。

【0061】測量每隻小鼠的淚膜破裂時間(TBUT)，結果如圖3所示。如圖3所示，除健康對照組外，各組的TBUT逐漸下降，直至第7天。然而，在第4天及第7天，以AFSC分泌體(1/5D、1/10D，以及1/20D)處理的組別的TBUT得到改善，相較於陽性對照組顯示出統計學顯著性( $p<0.05$ )。雖然結果沒有明顯的劑量依賴性效應，但相較於AFT組，以AFSC分泌體處理的組別的淚膜穩定性維持效果更高。

【0062】角膜表面攝影包括評估角膜混濁度之評估、角膜平滑度、角膜地圖，以及角膜染色(Lissamine Green Stain)檢查，其中較高的評估分數代表較高的損害嚴重程度。攝影結果如圖4所示。

【0063】如圖4所示，以AFSC分泌體處理的組別的角膜損傷均有所減輕。特定而言，以AFSC分泌體處理的組別的角膜混濁度降低，這也顯示出統計學顯著性( $p<0.05$ )。此外，角膜平滑度、角膜地圖，以及角膜染色(Lissamine Green Stain)檢查也顯示出以AFSC分泌體治療後的改善效果。

【0064】此外，儘管AFT在本文中作為比較並且也顯示出改善效果，但如圖4所示，以AFT治療的改善效果較差，因此結果顯示AFSC分泌體為AFT的潛在替代品。

【0065】將包括角膜、淚腺以及瞼板腺(亦稱為瞼腺)等眼組織進行組織染色和IHC染色。

【0066】 H&E染色顯示細胞的形態並指示組織的完整性。IHC的對象包括Cox-2、p63、PCNA、NFκ-B、p53，以及4-HNE。Cox-2以及NFκ-B為免疫反應及發炎反應的調節劑。P63以及PCNA為細胞增殖及繁殖的調節劑。p53為一種凋亡因子。4-HNE與氧化壓力有關。

【0067】 表1所示為角膜組織中Cox-2、p63，以及PCNA的H&E染色以及IHC染色的定量結果。（標記「+」表示健康程度。）如表1所示，以AFSC分泌體處理可有效緩解角膜組織在UVB損傷後的發炎反應，增強細胞增殖，其中p63以及PCNA的表現升高但Cox-2的表現降低。以下評估各組的分數：空白組 > 1/10 D組 > 1/5 D組 > 1/20 D組 > AFT組 > 損傷組。

表1

| 組織 | 染色    | 空白組    | 損傷組 | 1/5D 組 | 1/10D 組 | 1/20D 組 | AFT 組 |
|----|-------|--------|-----|--------|---------|---------|-------|
| 角膜 | H&E   | ++++++ | +   | ++++   | +++++   | +++     | ++    |
|    | Cox-2 | ++++++ | +   | +++    | +++++   | ++++    | ++    |
|    | p63   | ++++++ | +   | +++++  | ++++    | +++     | ++    |
|    | PCNA  | ++++++ | +   | +++++  | ++++    | +++     | ++    |

【0068】 表2展示了淚腺組織中Cox-2、p53以及NFκ-B的H&E染色以及IHC染色的定量結果。如表2所示，以AFSC分泌體處理可有效緩解淚腺組織中在UVB損傷後的發炎反應以及抑制細胞凋亡，其中Cox-2、p53，以及NFκ-B的表現降低。以下評估各組的分數：空白組 > 1/10 D組 > 1/5 D組 = 1/20 D組 > AFT組 > 損傷組。

【0069】 表2

| 組織 | 染色  | 空白組    | 損傷組 | 1/5D 組 | 1/10D 組 | 1/20D 組 | AFT 組 |
|----|-----|--------|-----|--------|---------|---------|-------|
|    | H&E | ++++++ | +   | ++++   | +++++   | +++     | ++    |

|    |       |        |   |       |       |      |    |
|----|-------|--------|---|-------|-------|------|----|
| 淚腺 | Cox-2 | ++++++ | + | +++   | +++++ | ++++ | ++ |
|    | NFκ-B | ++++++ | + | +++++ | ++++  | +++  | ++ |
|    | p53   | ++++++ | + | +++++ | ++++  | +++  | ++ |

【0070】 表3展示了瞼板腺組織中Cox-2、4-HNE，以及NFκ-B的H&E染色以及IHC染色的定量結果。如表3所示，以AFSC分泌體處理可有效緩解瞼板腺組織中在UVB損傷後的發炎反應並減少氧化壓力，其中 Cox-2、4-HNE，以及NFκ-B 的表現減少。以下評估各組的分數：空白組 > 1/10 D組 > 1/5 D組 > 1/20 D組 > AFT組 > 損傷組。

【0071】 表3

| 組織  | 染色    | 空白組    | 損傷組 | 1/5D 組 | 1/10D 組 | 1/20D 組 | AFT 組 |
|-----|-------|--------|-----|--------|---------|---------|-------|
| 瞼板腺 | H&E   | ++++++ | +   | ++++   | +++     | +++++   | ++    |
|     | Cox-2 | ++++++ | +   | ++++   | +++++   | +++     | ++    |
|     | NFκ-B | ++++++ | +   | ++++   | +++++   | +++     | ++    |
|     | 4-HNE | ++++++ | +   | ++++   | +++++   | +++     | ++    |

【0072】 由表1至表3可見，以AFSC分泌體處理能夠維持細胞組織的完整性、緩解發炎反應、挽救細胞凋亡、增強UVB損傷後的增殖，顯示AFSC的分泌體應該是恢復及修復眼組織，如角膜的有效試劑。

【0073】 實施例3

【0074】 於本實施例中，以AFSC的分泌體處理人類角膜上皮細胞並觀察其作用。

【0075】 材料與方法

【0076】 AFSC條件培養基的獲得方法與實施例1相同，此處不再贅述。

【0077】 將人類角膜上皮細胞（Human corneal epithelial cells，HCEC）（Thermo Fisher公司）於角質細胞無血清培養基（serum free medium，SFM）（Thermo Fisher公司）中於37°C及5% CO<sub>2</sub>條件下培養。

【0078】 為了獲得細胞懸浮液，去除培養基並以3 ml DPBS（Dulbecco的磷酸鹽緩衝鹽水）洗滌細胞。去除DPBS後加入1 ml 0.05%胰蛋白酶，於37°C下放置5-7分鐘。

【0079】 在顯微鏡下確認細胞呈圓形分離後，將細胞懸浮於2 ml培養基中以減弱胰蛋白酶的反應。

【0080】 取出20 µl懸浮液，加入等體積的台盼藍與該懸浮液混合。之後，取出10 µl混合物並在細胞計數器上計數細胞數。

【0081】 進行MTT測定以評估AFSC分泌體對角膜細胞的影響。MTT測定是用於評估細胞代謝活性以及存活力的比色測定。在特定條件下，NAD（P）H-依賴性細胞氧化還原酶可以反映存在的活細胞數量。這些酶能夠將四唑鎢染劑MTT 3-（4，5-二甲基噻唑-2-基）-2,5-二苯基溴化四唑還原為不溶性的甲臍，其係呈紫色。

【0082】 HCEC 置於96孔盤中，每孔8，000個細胞。加入100 µl培養基，將細胞培養24小時。之後，將細胞以不同濃度的100 µl AFSC分泌體溶液（1/2、1/8，以及1/32稀釋）處理，並分別繼續培養24、48，以及72 小時。

【0083】 按上述規定時間結束培養後，更換培養基為200 µl MTT溶液，放置3小時進行反應。MTT溶液進一步以DMSO代替以溶解晶體。在ELISA讀取儀下分析細胞以檢測波長570 nm下的吸光度。

【0084】 另一方面，進行傷口癒合試驗。 $1.6 \times 10^5$ 個細胞在12孔盤中培養24小時，每孔含有1 ml培養基。培養結束後，以200  $\mu$ l移液器吸頭在孔底劃3條線。然後去除培養基，以DPBS洗滌細胞，然後加入500  $\mu$ l培養基。在100X顯微鏡下觀察並拍照記錄細胞遷移的起始狀態（0小時）。

【0085】 隨後，加入不同濃度（1/2、1/8，以及1/32 稀釋）的500  $\mu$ l AFSC分泌體溶液。在細胞遷移開始後6、12、24，以及48小時進一步觀察並拍照。根據以下公式計算遷移距離：

$$\text{距離} = [(D_0 - D_n) / D_0] \times 100\%$$

其中D0為0小時刮痕寬度，Dn為6、12、24、48小時後刮痕寬度。

【0086】 所有實驗結果均表示為平均值  $\pm$  SD（標準偏差）。同質性檢驗的統計採用單因子獨立變異數分析（One way ANOVA），每個時間點的顯著性採用 Scheffe氏事後檢定方法進行。P<0.05表示有統計學顯著性；p<0.001表示高統計顯著性。

## 【0087】 結果

【0088】 MTT試驗結果顯示AFSC分泌體對人類角膜細胞的影響如圖5所示，說明以不同濃度AFSC分泌體處理以及在24、48、72小時細胞活力的相關性。

【0089】 如圖5 所示，OD<sub>570</sub>的吸光度（細胞活力）隨著AFSC分泌體含量的增加而增加。提高存活力的效率也隨著AFSC分泌體的含量而增加。在所有組別中，以1/2稀釋的AFSC分泌體處理的組別顯示出最顯著的改善。

【0090】 傷口癒合試驗的結果顯示AFSC分泌體對角膜細胞遷移的影響，如圖6所示，說明以AFSC分泌體處理6、12、24，以及48小時的遷移效率。

【0091】如圖 6 所示，未以AFSC分泌體處理的組別（陰性對照組）在0至48小時內有輕微且不顯著的遷移。反之，AFSC分泌體在24至48小時內遷移明顯。此外，以1/2以及1/8稀釋的AFSC分泌體處理的組別在48小時顯示出大約100%的遷移，表明刮痕的寬度幾乎完全恢復，以1/32稀釋的AFSC分泌體處理的組別顯示大約80%的遷移。

【0092】由本實施例之結果觀之，AFSC的分泌體能夠提高人類角膜細胞的存活率以及活力，並提高人類角膜細胞的遷移效率。因此，AFSC的分泌體顯示出作為乾眼症藥物的潛在治療功效。

【0093】雖然這裡已經顯示並描述本發明之較佳實施例，但是對於本領域技術人員來說顯而易見的是，這些實施例僅提供為示例並可以組合實施。在不脫離本發明的情況下，本領域技術人員現在將想到許多變化、改變，以及替換。應當理解的是，在實踐本發明時可採用對本文所描述之本發明的實施例的各種替代。以下申請專利範圍的目的在限定本發明之範圍，並且由此涵蓋在這些請求項及其等同物的範圍內的方法及結構。

【符號說明】無

【生物材料寄存】無

## 【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種羊水幹細胞的分泌體在製備治療乾眼症的藥物之用途，其中該分泌體係透過包含以下步驟之方法製備：於一基礎培養基中培養羊水幹細胞24-72小時以得到一培養基；離心後收集該培養基的上清液；以及過濾該上清液以得到該分泌體，其中該上清液透過孔徑0.22  $\mu\text{m}$ 至小於0.5  $\mu\text{m}$ 的過濾器過濾。

【請求項2】 如請求項1所述之用途，其中將該藥物適於局部施用於一個體的眼睛。

【請求項3】 如請求項2所述之用途，其中該藥物為眼凝膠、滴眼液、洗眼液、點眼液、眼部插入物、眼膏或眼噴霧劑的形式。

【請求項4】 一種如請求項1中所述之方法製備得到之分泌體在製備用於角膜上皮傷口癒合的藥物之用途。

【請求項5】 如請求項4所述之用途，其中該藥物適於局部施用於一個體的眼睛。

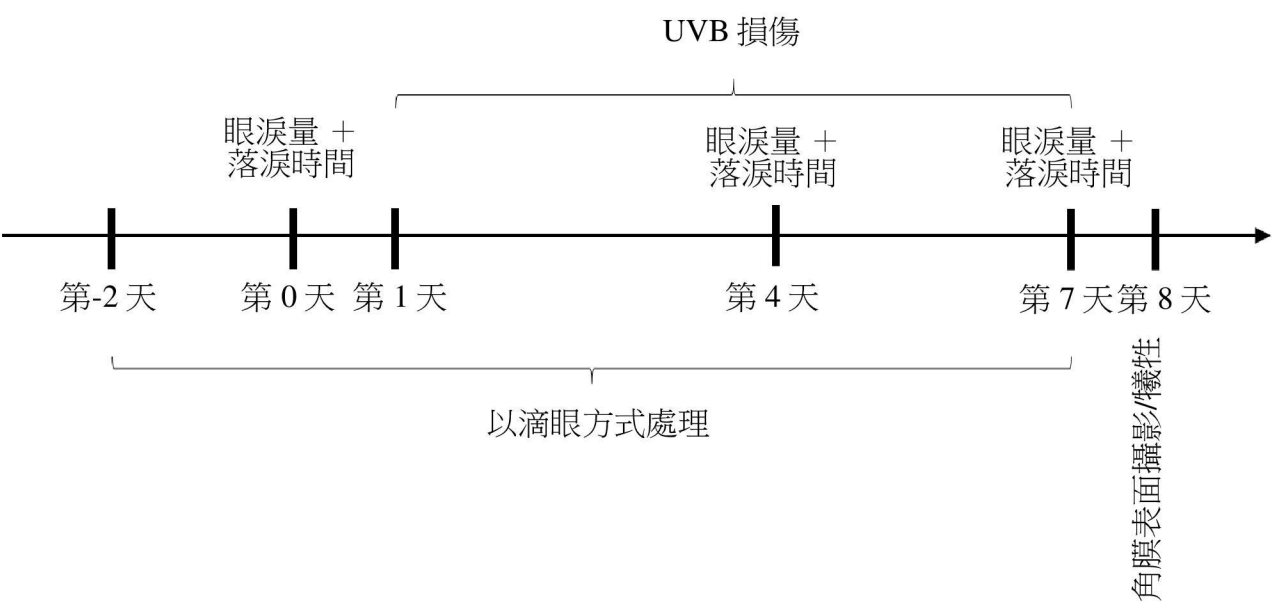
【請求項6】 如請求項5所述之用途，其中該藥物為眼凝膠、滴眼液、洗眼液、點眼液、眼部插入物、眼膏或眼噴霧劑的形式。

【請求項7】 一種用於治療乾眼症或角膜上皮傷口癒合的醫藥組合物，包含羊水幹細胞的分泌體以及一醫藥上可接受的載體；其中該分泌體係透過包含以下步驟之方法製備：於一基礎培養基中培養羊水幹細胞24-72小時以得到一培養基；離心後收集該培養基的上清液；以及過濾該上清液以得到該分泌體，其中該上清液透過孔徑0.22  $\mu\text{m}$ 至小於0.5  $\mu\text{m}$ 的過濾器過濾。

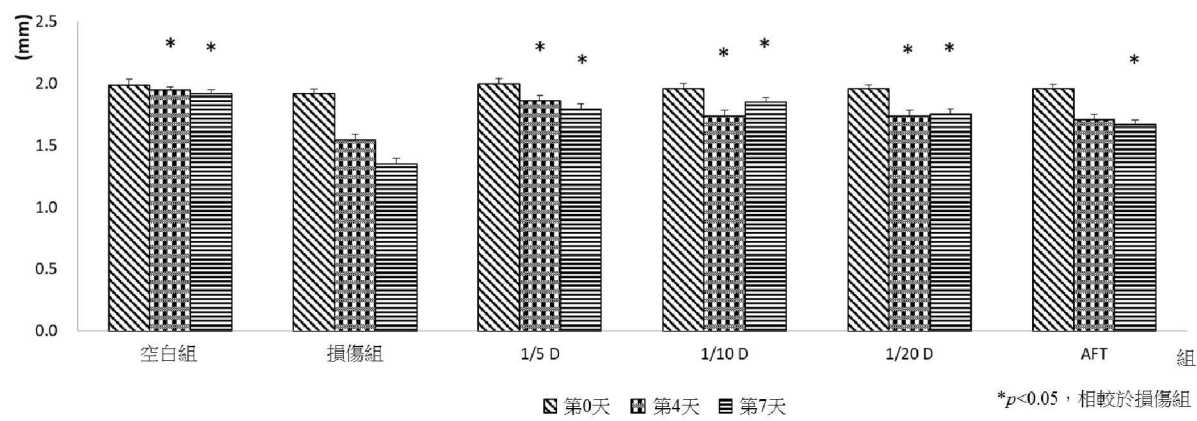
【請求項8】 如請求項7所述之醫藥組合物，其適於局部施用於一個體的眼睛。

【請求項9】 如請求項8所述之醫藥組合物，其為眼凝膠、滴眼液、洗眼液、點眼液、眼部插入物、眼膏或眼噴霧劑的形式。

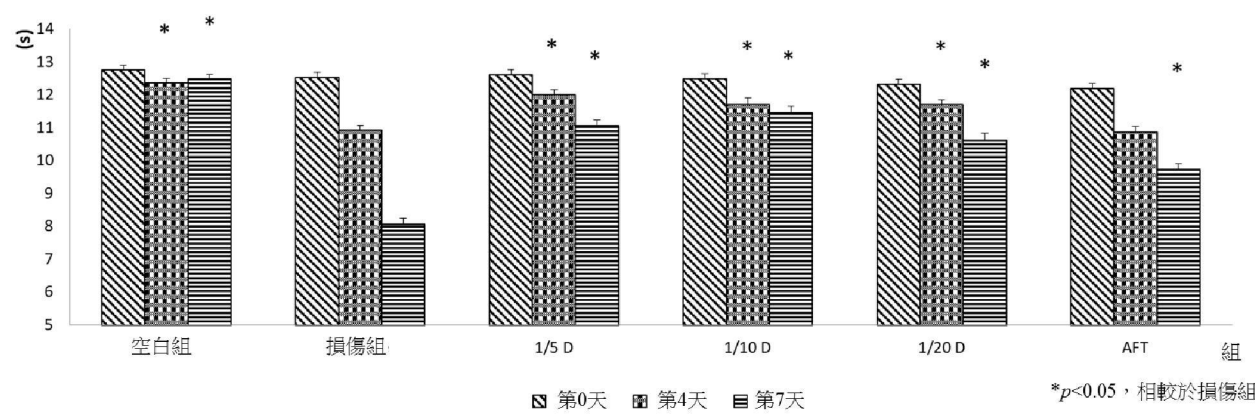
【發明圖式】



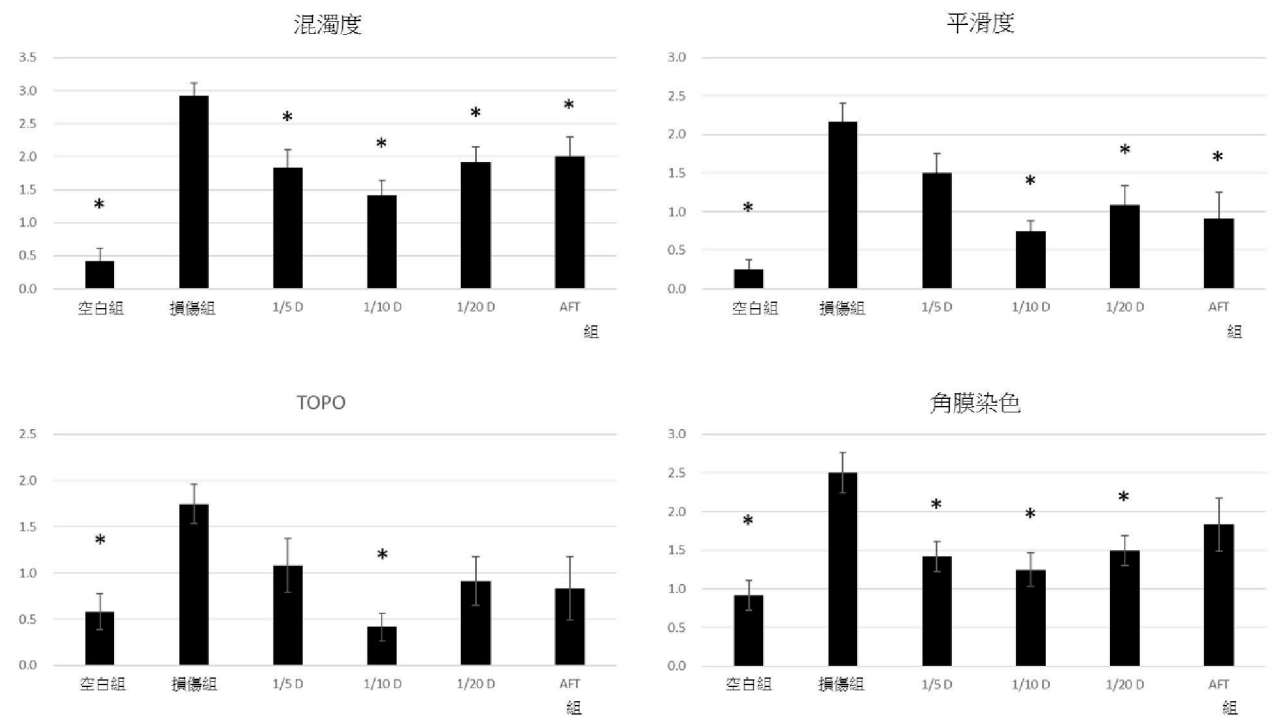
【圖1】



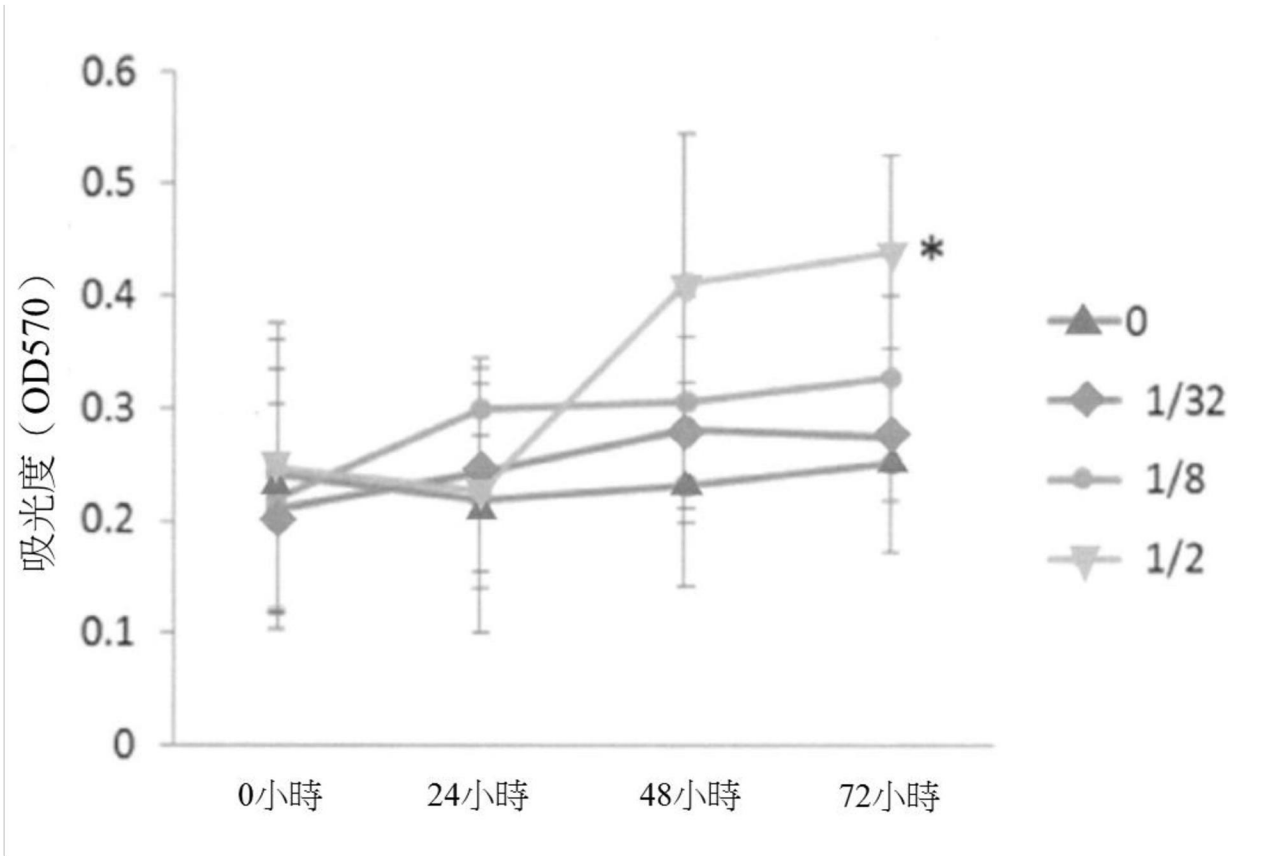
【圖2】



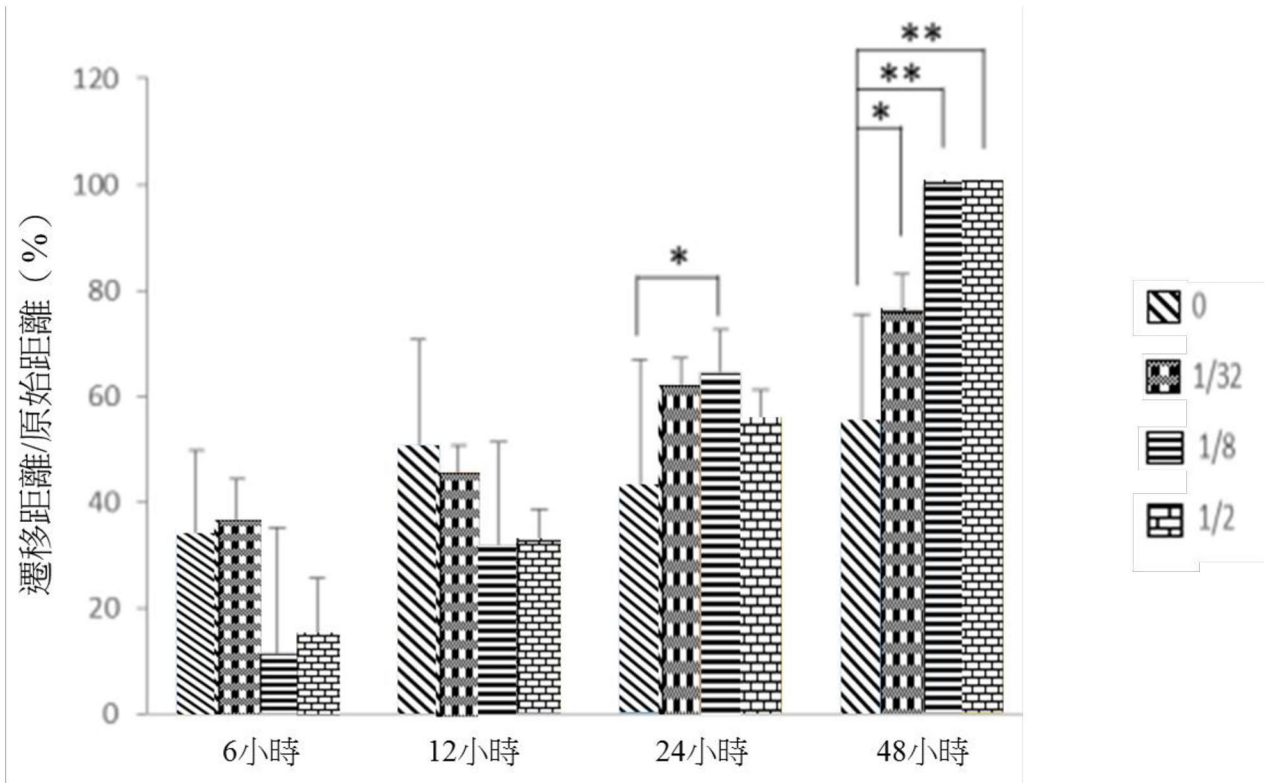
【圖3】



【圖4】



【圖5】



【圖6】