

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 45/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03156266.3

A61K 31/22 A61K 31/16

A61K 38/12 A61P 19/04

A61P 29/00 A61P 19/02

A61P 17/00 A61P 37/02

[43] 公开日 2005 年 3 月 9 日

[11] 公开号 CN 1589905A

[22] 申请日 2003.9.2 [21] 申请号 03156266.3

[71] 申请人 钟邑林

地址 台湾省台北市大安区四维路 160 巷 18 号 3 楼

[72] 发明人 钟邑林

[74] 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事务所

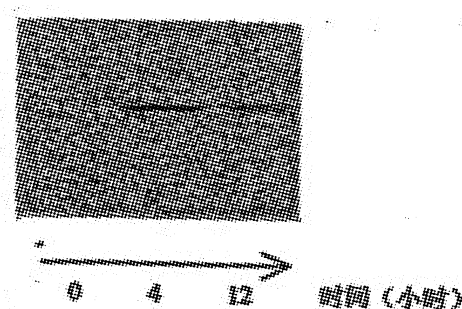
代理人 刘新宇

权利要求书 1 页 说明书 18 页 附图 19 页

[54] 发明名称 一种治疗结缔组织疾病的药学组合物及其用途

[57] 摘要

本发明涉及治疗结缔组织疾病的药学组合物及其用途，特别是涉及治疗由于免疫调节失常引发的疾病的药学组合物。该药学组合物包括组蛋白去乙酰基转移酶抑制物或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载体。抑制物或其盐的有效剂量占该药学组合物总重量的 0.1% ~ 50%。该组合物可显著抑制造成皮肤、关节及软组织发炎的结缔组织疾病的主要症状，预防皮肤溃疡、关节分解及软组织坏死与水肿的发生，同时也可阻断滑膜组织增生，维护骨与软骨结构，减少淋巴球浸润，抑制前炎症媒介物。本发明的药学组合物可在制备治疗结缔组织疾病包括治疗类风湿性关节炎、系统性红斑性狼疮、进行性系统性硬化症、修格连式干燥症、皮肤炎和混合性结缔组织病药物中应用。



1. 一种治疗结缔组织疾病的药学组合物，其特征在于包括：
组蛋白去乙酰基转移酶抑制物或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载体。
2. 权利要求 1 的药学组合物，其特征在于所述的组蛋白去乙酰基转移酶抑制物包括丙戊酸、毛斯达丁 A、丁酸苯酯、低朴第辛、穿普克辛 A、缩酚酸肽、澳杉弗利廷、或苯甲酰胺类。
3. 权利要求 1 的药学组合物，其特征在于所述的其药学上可接受的盐包括碱金属盐、碱土金属盐、或含有机碱的盐。
4. 权利要求 3 的药学组合物，其特征在于所述的碱金属盐为钠盐或钾盐；所述的碱土金属盐为钙盐或镁盐；所述的含有机碱的盐为铵盐、三乙基胺盐或乙醇胺盐。
5. 权利要求 1 的药学组合物，其特征在于所述的药学上可接受的载体为乳剂、凝胶、乳液、贴片、栓剂、粉末、脂肪体剂型、注射液、或点滴注入剂型。
6. 权利要求 2 的药学组合物，其特征在于所述的组蛋白去乙酰基转移酶抑制物为丁酸苯酯。
7. 权利要求 2 的药学组合物，其特征在于所述的组蛋白去乙酰基转移酶抑制物为毛斯达丁 A。
8. 权利要求 1~7 的任一药学组合物，其特征在于组蛋白去乙酰基转移酶抑制物或其药学上可接受的盐的有效剂量占该药学组合物总重量的 0.1%~50%。
9. 权利要求 1 的药学组合物的用途，其特征在于在制备治疗类风湿性关节炎药物中的应用。
10. 权利要求 1 的药学组合物的用途，其特征在于在制备治疗系统性红斑性狼疮药物中的应用。
11. 权利要求 1 的药学组合物的用途，其特征在于在制备治疗进行性系统性硬化症药物中的应用。
12. 权利要求 1 的药学组合物的用途，其特征在于在制备治疗修格连式干燥症药物中的应用。
13. 权利要求 1 的药学组合物的用途，其特征在于在制备治疗皮肤炎药物中的应用。
14. 权利要求 1 的药学组合物的用途，其特征在于在制备治疗混合性结缔组织病药物中的应用。

一种治疗结缔组织疾病的药学组合物及其用途

技术领域

本发明涉及治疗结缔组织疾病的药学组合物，特别是涉及治疗由于免疫调节失常引发的皮肤、关节及软组织炎症的药学组合物。

背景技术

结缔组织疾病通常是指一种免疫失常疾病，基因因素对于此种疾病常扮演重要角色，然而其致病原理至今仍未完全明了。结缔组织疾病都具有结缔组织的免疫学或炎症性改变的共有病症。一般常见的病症有关节炎或滑膜炎、胸膜炎、心肌炎、心内膜炎、心包炎、腹膜炎、脉管炎、肌炎、皮肤炎、肾炎、以及结缔组织的变化。结缔组织疾病实质上几乎牵涉所有脏器系统。疾病的进程常常是恶化期与缓解期交互发生。

在结缔组织疾病群中，类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis)可以说是炎症性关节炎中最常见的一种形式。受影响的关节的主要病理变化包括滑膜增生与血管翳生成、骨与软骨分解、T 与 B 淋巴球的血管内膜下浸润、以及由巨噬细胞与纤维母细胞分泌的前炎症媒介物的生产与诱导。间质性与类纤维母细胞的滑膜细胞会对于四周炎症性细胞激素产生反应性的增生，并且转为类肿瘤性质而造成不可逆的软骨与骨的分解。

Marks PA 等人研究显示组蛋白去乙酰基转移酶抑制物不论在活体内与活体外，对于细胞周期休止、细胞分化、或转形细胞的细胞凋零都有很强的诱导作用。组蛋白去乙酰基转移酶抑制物会造成组蛋白去乙酰基转移酶活性的抑制，并导致组蛋白的过乙酰化(Marks PA 等人, J. Natl. Cancer Inst. 2000; 92:1210-1216; Karmier OH 等人, Trends Endocrinol. Metab. 2001; 12:294-300)。结果将向上调节细胞周期抑制物如 p21、p27 及 p16 抑制炎症细胞激素如介白素-1、介白素-8、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、及转形生长因子- β (TGF- β) 的表现，但向下调节免疫刺激物如介白素-6、介白素-10、及 CD154 对 GAPDH 或 α -肌动蛋白无作用，这在 Lagger G.、Richon, V.M. 等人的文章中有报导 (Laggen G.,

EMBO. J. 2002; 21:2672-2681; Richon, V.M. 等人, Clin. Cancer Res. 2002; 8:662-667; Richon, V.M. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000; 97:10014-10019; Van Lint, C. 等人, Gene Expr. 1996, 5:245-243; Leoni, F. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002; 99:2995-3000; Huang, N. 等人, Cytokine, 1997; 9:27-36; Mishra 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001; 98:2628-2633; Segain, J.P. 等人, Gut, 2000; 47:397-403; Stockhammer, G. 等人, J. Neurosurg. 2000; 83:672-681)。

目前已知能够抑制组蛋白去乙酰基转移酶活性的化合物可根据结构差异性分为六类, 包括: 丁酸苯酯所属的短链脂肪酸类(short chain fatty acid class)、低朴第辛(音译 depudecin)所属的环氧化合物类(epoxide class)、穿普克辛 A(音译 trapoxin A)所属、具有一 2-氨基-8-酮基-9, 10-环氧基-癸酰基团的环四肽类(cyclic tetrapeptide class)、缩酚酸肽(depsipeptide)所属、缺乏一 2-氨基-8-酮基-9, 10-环氧基-癸酰基团的环四肽类(cyclic tetrapeptide class)、毛斯达丁 A 或澳杉弗利廷(音译 oxamflatin)所属的异羟肟酸类(hydroxamic acid class)、以及苯甲酰胺类(benzamide class)。但是至今仍然没有研发出有效或可治愈此类结缔组织疾病的药物, 所以现有药物对于患者治疗效果不佳, 而且治疗所需费用高、发病率高、甚至预期寿命变短。因此目前仍然对于预防皮肤、关节或软组织发生分解以及维持其功能的有效药物有迫切的需求。

发明内容

本发明的目的是提供一种治疗结缔组织疾病的药学组合物及其用途。这种药学组合物可显著抑制造成皮肤、关节及软组织发炎的结缔组织疾病的主要症状, 预防皮肤溃疡、关节分解、及软组织坏死与水肿的发生, 同时也可以阻断滑膜组织增生, 维护骨与软骨结构, 减少淋巴球浸润, 并且抑制前炎症媒介物。

上述发明目的通过下述技术方案得以实现。

本发明的治疗结缔组织疾病的药学组合物, 包括:

组蛋白去乙酰基转移酶抑制物或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载体。

组蛋白去乙酰基转移酶抑制物或其药学上可接受的盐的有效剂量

占该药学组合物总重量的 0.1%~50%。

组蛋白去乙酰基转移酶抑制物包括丙戊酸(valproic acid)、毛斯达丁 A(trichostatin A)、丁酸苯酯(phenyl butyrate)、低朴第辛(depudecin)、穿普克辛 A(trapoxin A)、缩酚酸肽(depsipeptide)、澳杉弗利廷(oxamflatin)、或苯甲酰胺类(benzamide)。

在本发明的实例中,组蛋白去乙酰基转移酶抑制物优选丁酸苯酯和毛斯达丁 A。丁酸苯酯抑制组蛋白去乙酰基转移酶的机制是属于毫摩尔浓度下的非竞争性机制;而毛斯达丁 A 则是组蛋白去乙酰基转移酶的专一性抑制物,即使在次微摩尔(sub-mM)范围下也具有抑制效果。

组蛋白去乙酰基转移酶抑制物药学上可接受的盐包括碱金属盐如钠盐或钾盐、碱土金属盐如钙盐或镁盐、或含有机碱的盐如铵盐、三乙基胺盐或乙醇胺盐。

本发明的药学组合物中药学上可接受的载体依服用方式的不同而采用不同的载体。在口服的情形下,可以软胶囊或硬胶囊、锭剂、颗粒、粉末、溶液、悬浮液等方式使用。在非口服的情形下,可以乳膏、油剂、凝胶、乳液、贴片、栓剂、脂肪体剂型、注射液、点滴注入剂型等使用,而维持持续性膜吸收是以固体、黏液、或悬浮液形式使用。本领域技术人员可选择适合各种载体、磨碎处理或悬浮剂的使用方式与使用剂型或配方。

本发明的药学组合物可以口服或非口服方式使用。

本发明的有效剂量,本领域技术人员可根据使用途径以及同时可能施行的治疗方法如其它抗炎症或抗肿瘤药剂的使用等而有所不同。对于任何特定个体(如人类、狗、或猫)有效剂量与治疗方法也根据种种其它因素而异,其它因素包括所使用特定化合物的活性、个体年龄、体重、一般健康状况、性别、饮食、使用时间、代谢速率、疾病严重程度与病程、以及病患对疾病的反应等;然而,一般而言,不论何种使用方式,有效剂量通常为 0.1% (重量) 到 50% (重量)。

本发明的治疗结缔组织疾病的药学组合物的制备方法为将组蛋白去乙酰基转移酶抑制物或其药学上可接受的盐与药学上可接受的载体按常规方法混合即可。

本发明的药学组合物可在制备治疗结缔组织疾病包括类风湿性关节炎、系统性红斑性狼疮、进行性系统性硬化症、修格连式干燥症、

皮肤炎和混合性结缔组织病等疾病的药物中应用。

本发明的组蛋白去乙酰基转移酶抑制剂可以在毛斯达丁 A 与丁酸苯酯、或其药学上可接受载体或盐类的外，更包括一成分，其具有抗炎症或抗肿瘤活性。

本发明的优点和效果：

本发明的组蛋白去乙酰基转移酶抑制物可以用药学上可接受的盐的形式使用，如此而来，本发明的化合物可以长期使用却又不会有影响药物作用的副作用。

本发明的丁酸苯酯与毛斯达丁 A 的试验结果发现，这类组蛋白去乙酰基转移酶抑制物对于由于自身免疫调节失常而在结缔组织发生的结缔组织疾病如滑膜增生，血管翳形成，骨与软骨分解，皮肤炎症、溃疡或纤维化，淋巴球浸润，以及前炎症媒介物的产生等具有抑制作用。

由于结缔组织疾病的特征为细胞周期失调，以及前炎症细胞激素异常反应。由实施例 12 与 13 的结果显示，丁酸苯酯与毛斯达丁 A 对于结缔组织疾病可以同时使细胞周期抑制物 p16 向上调节，也向下调节前炎症媒介物 $\text{TNF-}\alpha$ 。由此结果更可推知组蛋白去乙酰基转移酶抑制物对于治疗结缔组织疾病很有效。

下面结合具体实施方式进一步说明本发明的效果。

附图说明

图 1 是实施例 10 中以丁酸苯酯 (2mM) 处理在不同时间点的西方墨点法结果照片。

图 2 是实施例 10 中以毛斯达丁 A (200nM) 处理在不同时间点的西方墨点法结果照片。

图 3~图 5 是实施例 10 以抗乙酰化的组蛋白 H3 的抗体进行荧光染色照片；其中图 3 为阴性对照照片；

图 4 为以丁酸苯酯处理后的荧光染色照片；

图 5 为以毛斯达丁 A 处理后的荧光染色照片。

图 6 是实施例 10 丁酸苯酯对于由辅佐性关节炎来源的滑膜纤维母细胞会表现出剂量与时间依存性的生长抑制曲线图；

—■— 代表丁酸苯酯的浓度为 1mM 时的曲线；

- △— 代表丁酸苯酯的浓度为 2mM 时的曲线；
- 代表丁酸苯酯的浓度为 5mM 时的曲线。

图 7 是实施例 10 毛斯达丁 A 对于由辅佐性关节炎来源的滑膜纤维母细胞会表现出剂量与时间依存性的生长抑制曲线图；

- 代表毛斯达丁 A 的浓度为 100nM 时的曲线；
- △— 代表毛斯达丁 A 的浓度为 200nM 时的曲线；
- 代表毛斯达丁 A 的浓度为 300nM 时的曲线。

图 8.1 和~图 8.2 是实施例 10 西方墨点法结果照片；

其中第 1 列为对照组(无处理组)，第 2 列为丁酸苯酯(2mM)处理组，第 3 列为毛斯达丁 A(200nM)处理组。

图 9.1~图 9.6 是实施例 11 以抗乙酰化的组蛋白 H3 的抗体进行的免疫荧光染色照片；

其中图 9.1 为第 1 天的对照组图；

图 9.2 为第 15 天的对照组图；

图 9.3 为丁酸苯酯处理组第 1 天的照片；

图 9.4 为丁酸苯酯处理组第 15 天的照片；

图 9.5 为毛斯达丁 A 处理组第 1 天的照片；

图 9.6 为毛斯达丁 A 处理组第 15 天的照片。

图 10.1~10.16 是实施例 11 中的一系列照片；

其中图 10.1 是踝与跖关节的侧视图(载体组)；

图 10.2 是踝与跖关节的侧视图(药剂处理组)；

图 10.3 是脚掌后视图(载体组)；

图 10.4 是脚掌后视图(药剂处理组)；

图 10.5 是矢状切面图(载体组)；

图 10.6 是矢状切面图(药剂处理组)；

图 10.7 是脚掌关节的显微切片照片(载体组)；

图 10.8 是脚掌关节的显微切片照片(药剂处理组)；

图 10.9 和图 10.13 是 40 倍视野下组织化学染色照片(载体组)；

1-骨；2-血管翳；3-关节腔；4-滑膜；

图 10.10 和图 10.14 是 40 倍视野下组织化学染色照片(药剂处理组)；

5-滑膜；6-关节腔；7-骨；

图 10.11 和图 10.15 是 100 倍视野下组织化学染色照片（载体组）；

图 10.12 和图 10.16 是 100 倍视野下组织化学染色照片（药剂处理组）。

图 11.1、图 11.3 和图 11.5 是实施例 11 中 10%（重量）丁酸苯酯处理组的组织化学染色照片；

其中 1-滑膜。

图 11.2、图 11.4 和图 11.6 是实施例 11 中 1%（重量）毛斯达丁 A 处理组的组织化学染色照片；

其中 2-滑膜。

图 12.1～图 12.12 是实施例 12 的组织化学染色照片；

其中图 12.1～图 12.6 为丁酸苯酯处理组；

图 12.7～图 12.12 为载体组；

图 12.1、图 12.3、图 12.5、图 12.7、图 12.9 和图 12.11 为 H&E 染色照片；

图 12.2、图 12.4、图 12.6、图 12.8、图 12.10 和图 12.12 为 p16 免疫组织化学染色照片；

图 12.1、图 12.2、图 12.7 和图 12.8 为 40 倍视野下染色照片；

图 12.3、图 12.4、图 12.9 和图 12.10 为 100 倍视野下染色照片；

图 12.5、图 12.6、图 12.11 和图 12.12 为 200 倍视野下染色照片；

其中 1、2、3、4、5-滑膜；6、8、10、12、14、16-血管翳；

7、9、11、13、15、17-软骨。

图 13.1～13.10 是实施例 13 中免疫组织化学染色照片；

其中图 13.1、图 13.3、图 13.5、图 13.7 和图 13.9 为载体组；

图 13.2、图 13.4、图 13.6、图 13.8 和图 13.10 为丁酸苯酯处理组；

图 13.1 和图 13.2 为关节在 40 倍视野下免疫组织化学染色照片；

其中 1-血管翳；2、3-滑膜；

图 13.3 和图 13.4 为关节在 100 倍视野下免疫组织化学染色照片；

其中 4-血管翳；5、6-滑膜；

图 13.5 和图 13.6 为皮下组织在 100 倍视野下免疫组织化学染色照片；

图 13.7 和图 13.8 为皮下组织在 200 倍视野下免疫组织化学染色照片；

图 13.9 为真皮在 100 倍视野下免疫组织化学染色照片；

图 13.10 为表皮在 100 倍视野下免疫组织化学染色照片。

图 14.1 是实施例 13 中毛斯达丁 A 对于发生结缔组织疾病的结缔组织中 p16 在 200 倍视野下的免疫组织化学染色照片。

图 14.2 是实施例 13 中毛斯达丁 A 对于发生结缔组织疾病的结缔组织中 TNF- α 在 200 倍视野下的免疫组织化学染色照片。

具体实施方式

下面结合一些实施例来进一步说明本发明，但这些实施例并非用以限定本发明的保护范围。

首先介绍本发明实施例所采用的化合物。

丁酸苯酯 (phenylbutyrate, 分子量 164.21) 为一天然、无毒、无色、无味的芳香族脂肪酸，纯化自哺乳动物尿液与血清中，已经被美国食品药品监督管理局 (FDA) 认可，可用于与天生尿素合成失败相关的高氮血症孩童，并且已经用于继发于高剂量化疗的高氮血症成年人。该药物会在肝脏与肾脏中代谢成为乙酸苯酯，继而与谷胺酸酰胺结合而形成苯乙酰谷氨酰胺 (phenylacetylglutamine)，该化合物将作为尿中排泄废弃氮的载体。丁酸苯酯也曾经被评估用于镰状细胞性贫血、 β -地中海贫血、囊肿纤维化、肾上腺脑白质障碍 (adrenal leukodystrophy)、以及血液性与非血液性恶性肿瘤等疾病的临床试验。

毛斯达丁 A (分子量 164.21) 为一氢氧氨酸，分离自吸水链霉菌 (*Streptomyces hygroscopicus*)，是用作为抗霉菌剂、抗肿瘤剂、以及抗原虫剂。

实施例 1

丁酸苯酯 (phenylbutyrate) 油质软膏的制备

将 470 克白色矿脂 (white petrolatum) (供货商:Riedel-de Haen)、25 克石蜡 50/52(市售)、以及 5 克丁酸苯酯(供货商:Merck) 置于一烧杯中混合并加热至 70℃ 形成一糊状物。将该糊状物于 400rpm 搅拌 1 小时, 并冷却至室温。

实施例 2

丁酸苯酯油质软膏的制备

将 65 克白色矿脂 (white petrolatum) (供货商:Riedel-de Haen)、15 克十八烷醇 (Riedel-de Haen)、260 克软石蜡 (Merck)、155 克液态石蜡 (Merck)、以及 5 克丁酸苯酯 (Merck) 置于一烧杯中混合并加热至 70℃ 形成一糊状物。将该糊状物于 400rpm 搅拌 1 小时, 并冷却至室温。

实施例 3

丁酸苯酯乳剂的制备

第一成分: 70 克 Tefose 63(市售)、20 克 Superpolystate(市售)、10 克 Coster 5000(市售)、15 克 Myriyol 318(市售)、以及 15 克 GMS SE (市售)于一烧杯中混合并加热至 70℃。

第二成份: 5.739 克丁酸苯酯化钠(供货商:Triple Crown America, Inc.)、0.125 克甲基戊酮 (methylparaben) (Merck)、0.075 克丙基戊酮 (propylparaben) (Merck)、以及 149.061 克去离子水于一烧杯中混合并加热至 70℃。

将第二成份缓慢地加入第一成分中并继续以 400 rpm 搅拌 5 分钟直到形成一混合物。将 2%_Stabileze QM (将 2 克 Stabileze QM (Merck) 溶于 98 克去离子水, 并于 70℃ 加热搅拌形成一糊状物, 并冷却至室温而制备得) 加入该混合物并搅拌 5 分钟。以 0.85%(重量)磷酸 (Merck) 调整混合物的 pH 值到 5.34, 并以 600 rpm 搅拌 20 分钟。混合物冷却至室温。

实施例 4

丁酸苯酯凝胶的制备

第一成分：10 克 Stabileze QM(Merck) 、232.035 克去离子水于一烧杯中混合并加热至 70℃。

第二成份：5.739 克丁酸苯酯化钠(供货商:Triple Crown America, Inc.)、0.125 克甲基戊酮(methylparaben)(Merck)、0.075 克丙基戊酮(propylparaben)(Merck)、232.035 克去离子水、以及 20 克 10% NaOH 于一烧杯中混合并加热至 70℃。

将第二成份缓慢地加入第一成分中并继续以 400 rpm 搅拌 20 分钟直到形成一混合物。将混合物冷却至室温。

实施例 5

丁酸苯酯凝胶的制备

第一成分：10 克 Stabileze QM(Merck) 、380.561 克去离子水于一烧杯中混合并加热至 70℃。

第二成份：5.739 克丁酸苯酯化钠(Triple Crown America, Inc.)、0.125 克甲基戊酮(methylparaben)(Merck)、0.075 克丙基戊酮(propylparaben)(Merck)、83.5 克 1, 2-丙二醇、以及 20 克 10% NaOH 于一烧杯中混合并加热至 70℃。

将第二成份缓慢地加入第一成份中并继续以 400 rpm 搅拌 20 分钟直到形成一混合物。将混合物冷却至室温。

实施例 6

丁酸丙酯缓释配方的制备

两种配方是如下表 1 的组合物。

表 1 两种缓释配方的组合物（单位：克）

组合物	配方编号	
	Tri-s-04	Tri-s-05
PF-127 (BASF Inc.)*	2	4
羧甲基纤维素钠	12	12
去离子水	82.8523	80.8523
丁酸苯酯钠	1.1477	1.1477
85%（重量）磷酸	2	2
pH	5.93	6.01

*PF-127 是组合物的基质，而羧甲基纤维素钠是增厚剂。
制备方法为将表 1 中的成分混合。

实施例 7

丁酸苯酯脂肪体配方的制备

于此种脂肪体配方，蛋黄卵磷脂(egg phosphatidylcholine, EPC)及胆固醇是作为等同-或不同-摩尔浓度的主要脂质成分。以不同脂肪：丁酸苯酯比例可获得多种含有丁酸苯酯的脂肪体。脂肪体是经由薄膜水合作用制备、并以膜挤压成形、且实际评估的。

实施例 8

毛斯达丁 A 软膏的制备

将 472.5 克白色矿脂(Riedel-de Haen)、27 克石蜡 50/52(市售)、以及 0.5 克毛斯达丁 A(Sigma)置于一烧杯中混合并加热至 70℃形成一糊状物。将该糊状物于 400 rpm 搅拌 1 小时，并冷却至室温。

实施例 9

毛斯达丁 A 软膏的制备

将 67.5 克白色矿脂(Riedel-de Haen)、16 克十八烷醇(Riedel-de Haen)、260.5 克软石蜡(Merck)、155.5 克液态石蜡(Merck)、以及 0.5 克毛斯达丁 A(Sigma)置于一烧杯中混合并加热至 70℃形成一糊状物。将该糊状物于 400 rpm 搅拌 1 小时，并冷却至室温。

实施例 10

组蛋白去乙酰基转移酶抑制物对辅佐性关节炎的滑膜纤维母细胞的生长影响

本发明的揭示主要是针对毛斯达丁 A 与丁酸苯酯对于一种结缔组织疾病模式，即辅佐性关节炎(adjutant arthritics)的治疗，但上述化合物的治疗仅是用于说明与验证本发明。

辅佐性关节炎是一种结缔组织疾病的动物模式，且已经建立并具有特定特征(Winter CA 等人, Arthritis Rheum. 1966,

9:394-404)。实验所采用体重约 150 ± 20 克的 Long Evans 大鼠与体重约 22 ± 2 克的源自 ICR 的雄性小鼠是由台湾美商泛球药理研究所 (MDS Pharma Service-Taiwan Ltd.) 动物育种中心取得。每 5 只小鼠所配置的空间为约 $45 \times 23 \times 15 \text{ cm}^3$ 大小。在对动物进行实验前, 是将动物饲养于美商泛球药理研究所的实验室内, 置于 APEC (Allentown Gaging, Allentown, NJ, USA) 笼子中, 并处于卫生环境下, 控制温度 ($22-24^\circ\text{C}$) 与湿度 (60-80%), 且于 12 小时光/暗周期至少一周。给予动物自由摄取小鼠的标准实验室饲料 (LabDiet 5001, USA) 与自来水。诸如饲养、实验进行中、以及处理实验结束后丢弃的动物等所有相关工作都是依照动物相关生物医学研究的国际指导原则 (the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals, CIOMS Publication No. ISBN 92 90360194, 1985) 进行。

将充分磨碎的死菌结核杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 悬浮液 (DIFCO, USA; 0.3 mg 于 0.1 ml 淡矿物油; 完全弗氏佐剂 CFA) 施打至右后脚掌的跖下部位, 此日定为第 1 天。后脚掌的体积的测量是于第 0 天 (CFA 处理前)、CFA 处理后第 1、5、10 与 15 天以 Plethsmometer (Cat. No. 7150, UGO BASILE, Italy) 与 Water cell (25 mm diameter, Cat. No. 7157, UGO BASILE, Italy) 测量右脚掌 (以 CFA 处理), 并于第 0、14、与 18 天测量左脚掌 (未以 CFA 处理); 大鼠于第一次施打前与施打后一小时测量体重。在 CFA 处理后 4 小时 (视为第 1 天) 以及的后第 5、10 与 15 天测量右后脚掌体积 (急性期); 并且在第 14 与 18 天测量对侧左脚掌体积 (延迟期)。本模式的炎症活性是以计算急性期与延迟期的数值而定。

在第 10 天由建立辅佐性关节炎的大鼠取得滑膜样品。收集的滑膜组织以 5 mg/ml 胶原蛋白 (Sigma) 与 DNase (Sigma) 消化, 并通过一金属丝网以制备分离的细胞。将细胞 (0.5×10^6) 分装至含有 10 ml RPMI 1640 培养液 (Gibco)、并添加 10% 胎牛血清、 2 mM 左旋谷胺酸酰胺、 50 U/ml 盘尼西林以及 50 mg/ml 链霉素的 10 公分培养盘中培养。当细胞生长至 90% 满时, 以胰蛋白-EDTA 溶液将细胞由培养盘移除以进行继代培养。用于试验的细胞是继代第 5 代的细胞。

由辅佐性关节炎来源、增殖的滑膜纤维母细胞以丁酸苯酯或毛

斯达丁 A 处理，再以最后 24 小时培养时加入的 ^3H -胸腺嘧啶核进行增殖的确认。所采用的药剂是将丁酸苯酯(Merck)溶解于灭菌水，并以 NaOH 调整 pH 至 7.2，或者将丁酸苯酯钠(Triple Crown, U.S.A)溶解于灭菌水，或是毛斯达丁 A(Sigma)溶解于乙醇。以含有 10mM Tris-HCl(pH6.5)、50mM 亚硫酸钠、1%Triton X-100、10mM MgCl_2 、以及 8.6%蔗糖的缓冲液、并采用一均质器，将细胞溶解以分离出滑膜纤维母细胞的细胞核。再以酸萃取法分离出组蛋白。接着，将分离的组蛋白(5 μg)以 15%聚丙烯酰胺-0.1%硫酸十二酯钠小型凝胶电泳分离，并转染至硝基纤维素滤膜。采用专一性辨认组蛋白 H3 的过乙酰化型的抗体(upstate biotechnology)侦测过乙酰化的组蛋白。

结果如图 1~图 7 所示，图 1 与图 2 是西方墨点法结果照片，显示丁酸苯酯与毛斯达丁 A 会诱发乙酰化组蛋白 H3 的累积；在未加入药剂前，乙酰化组蛋白 H3 无法被侦测出来，加入丁酸苯酯或毛斯达丁 A 的后 4 小时，会发现乙酰化组蛋白 H3 明显增加，到 12 小时时达到最大量，以后就会消退。此外，丁酸苯酯与毛斯达丁 A 亦会诱发乙酰化组蛋白 H4 的累积(数据未显示)。图 3~图 5 为以抗乙酰化的组蛋白 H3 的抗体进行免疫荧光染色的照片。免疫荧光染色是先将滑膜纤维母细胞以丁酸苯酯(2mM)或毛斯达丁 A(200nM)处理或不处理 6 小时，接着以 FITC 结合的抗乙酰化 H3 抗体染色。结果显示丁酸苯酯与毛斯达丁 A 皆会诱发乙酰化组蛋白的累积。另外，图 6 与图 7 显示丁酸苯酯与毛斯达丁 A 对于由辅佐性关节炎来源的滑膜纤维母细胞会表现出剂量与时间依存性的生长抑制。其结果是以相对于对照培养(无药物添加)组的 DNA 合成百分比值表示。并且每个数值是由两次实验取得三份样品的平均值 $\pm$ SE。另进行停药试验发现，组蛋白去乙酰基转移酶抑制物对于发生辅佐性关节炎的滑膜纤维母细胞的生长抑制较其对于正常滑膜纤维母细胞的生长抑制为强(数据未显示)，但组蛋白去乙酰基转移酶抑制物对于发生辅佐性关节炎的滑膜纤维母细胞的生长抑制是不可逆性的，而其对于正常滑膜纤维母细胞的生长抑制为可逆的(数据未显示)。此外，图 8.1 与图 8.2 为西方墨点法结果，显示丁酸苯酯(2mM)与毛斯达丁 A(200nM)处理 12 小时后会在由辅佐性关节炎来源的滑膜纤维母细胞诱发 p16 与 p21 这两种细胞周期抑制物的向上调节。第 1

列为对照组(无处理组)样品、第2列为丁酸苯酯处理组样品、以及第3列为毛斯达丁A处理组样品。当药物停用时,在两种来源的纤维母细胞 p21 马上就向下调节,但在发生辅佐性关节炎的滑膜纤维母细胞 p16 却仍维持高量(数据未显示)。此结果显示 p16 的诱导在发生辅佐性关节炎的滑膜纤维母细胞是特征性的。

实施例 11

局部使用丁酸苯酯与毛斯达丁A对于发生结缔组织疾病的皮肤、关节与软组织炎症的抑制效果

如实施例 10 所述的方法建立结缔组织疾病的动物模式。每组采用 5 只 Long Evans 大鼠,且每只体重约为 150 ± 20 克。接着,将 10% 丁酸苯酯乳剂与 1% 毛斯达丁 A 软膏分别以每只脚掌 200mg 与 10mg 的剂量、每天两次局部施与大鼠,并持续 18 天。在第一次施与前述药剂后,将充分磨碎的死菌结核杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)悬浮液(DIFCO, USA; 0.3mg 于 0.1ml 淡矿物油;完全弗氏佐剂 CFA)施打至右后脚掌的跖下部位,此日定为第 1 天。后脚掌的体积的测量是于第 0 天(CFA 处理前)、CFA 处理后第 1、5、10 与 15 天以 Plethsmometer (Cat. No. 7150, UGO BASILE, Italy)与 Water cell (25 mm diameter, Cat. No. 7157, UGO BASILE, Italy)测量右脚掌(以 CFA 处理),并于第 0、14、与 18 天测量左脚掌(未以 CFA 处理);大鼠于第一次处理前与最后一次处理后一小时测量体重。本模式的炎症活性是以计算急性期(右后脚掌体积)与延迟期(对侧左后脚掌体积)的数值而定。以 CFA 注射载体对照大鼠也是在第 0 与 18 天测量体重,CFA 注射载体对照大鼠通常在这段实验期间会增重约 20 至 10 克。判断显著差异是以相对于载体处理对照组有 30%或以上脚掌体积减少为准。

表 2 的结果显示,10% (重量) 丁酸苯酯乳剂与 1% (重量) 毛斯达丁 A 软膏对于发生结缔组织疾病的皮肤、关节、与软组织皆具有局部抗炎症效果,可以防止或减缓关节分解、皮肤溃疡、软组织水肿、纤维化与坏死,并维持肢体功能。

表 2 抗炎症活性

(A) 急性期(单侧踝关节)

化合物	途径	剂量	相对载体处理组的抑制率			
			% 第 0-1 天	% 第 0-5 天	% 第 0-10 天	% 第 0-15 天
10% (重量) 丁酸苯酯乳 剂	局部	200mg/ 脚 掌×2×18	16	18	(40)	(31)
1% (重量) 丁酸苯酯乳 剂	局部	200mg/ 脚 掌×2×18	-5	1	6	-5
乳剂载体	局部	200mg/ 脚 掌×2×18	--	--	--	--
1% (重量) 毛斯达丁 A 软膏	局部	10mg/ 脚 掌 ×2×18	22	29	(50)	(41)
软膏载体	局部	10mg/ 脚 掌 ×2×18	--	--	--	--
0.5% (重量) CMC*	口服	10mg/ 公 斤 ×5	--	--	--	--
氢化可的松	口服	30mg/ 公 斤 ×5	(35)	(35)	(39)	23

(B) 延迟期(对侧踝关节)

化合物	途径	剂量	相对载体处理组的抑制率%		
			第 0-14 天	第 0-18 天	第 14-18 天
10% (重量) 丁酸苯酯乳 剂	局部	200mg/ 脚 掌×2×18	6	4	0
1% (重量) 丁酸苯酯乳 剂	局部	200mg/ 脚 掌×2×18	6	4	0
乳剂载体	局部	200mg/ 脚 掌×2×18	--	--	--
1% (重量) 毛斯达丁 A 软膏	局部	10mg/ 脚 掌×2×18	7	6	0
软膏载体	局部	10mg/ 脚 掌×2×18	--	--	--
0.5% (重量) CMC*	口服	10mg/ 公 斤×5	--	--	--
氢化可的松	口服	30mg/ 公 斤×5	(30)	27	20

* CMC 为 0.5%羧基甲基纤维素(carboxymethylcellulose), 与氢化可的松(hydrocortisone)可由 Sigma(USA)购得。

注: 表 2 中数字加括号代表有显著差异。

参考表 2 可了解, 采用系统性、即口服使用氢化可的松进行临床治疗结缔组织疾病急性期。在第 1 天, 氢化可的松有显著地抑制效果, 然而在第 10 天后的效果减低。0.5%羧基甲基纤维素是氢化可的松的赋形剂, 在此用作为对照组。相反地, 10%丁酸苯酯乳剂与 1%毛斯达丁 A 软膏开始时的效果并不显著, 但是在第 10 天开始会分别有 40%与 50%的抑制效果, 到了第 15 天还分别维持有 31%与 41%的抑制效果。而由

于 1%丁酸苯酯不如 10%丁酸苯酯有效果，也显示出丁酸苯酯的作用是具有剂量反应性的关系。

在表 2 中，氢化可的松的系统性抑制效果有部分显示于延迟期（即左脚掌），然而丁酸苯酯与毛斯达丁 A 并不显著。结果显示本发明的局部配方的确具有局部而非系统性效果，因此对于局部施用于体表区域很有用。

图 9.1~图 9.6 为萤光染色照片，显示以 10%丁酸苯酯乳剂或 1%毛斯达丁 A 软膏可于活体内诱发乙酰化组蛋白。由萤光染色 (Santa Cruz) 结果显示，在第 1 与 15 天，对于发生结缔组织疾病的软组织施用丁酸苯酯或毛斯达丁 A 显示具有增加乙酰化组蛋白 H3 的作用。

图 10.1~图 10.16 为一系列照片，显示丁酸苯酯或毛斯达丁 A 在抑制结缔组织疾病上具有相似的效果。左侧图(图 10.1、图 10.3、图 10.5、图 10.7、图 10.9、图 10.11、图 10.13 与图 10.15)为载体组；右侧图(图 10.2、图 10.4、图 10.6、图 10.8、图 10.10、图 10.12、图 10.14 与图 10.16)为药剂处理组。图 10.1 与图 10.2 为踝与跖关节的侧视图，比较后发现治疗组的踝关节与跖关节水肿情形有受抑制的现象。图 10.3 与图 10.4 为脚掌后视图，在治疗组的跖部皮肤伤口复原较为改善，上述皮肤伤口是由于注射死菌结核杆菌至跖下部位以诱发结缔组织疾病而产生的。图 10.5 与图 10.6 为矢状切面图，显示在载体组的脚掌关节结构有水肿与受破坏的情形，而治疗组维持完整。图 10.7 与图 10.8 为显微切片照片，确认在治疗组中血管翳形成受到抑制、软组织水肿也减轻、且关节也维持完整。图 10.9 与图 10.10 为组织化学照片(放大倍数为 40 倍)，显示载体组发生严重滑膜增生、血管翳形成与关节分解，而在治疗组仅有中度滑膜增生且无血管翳形成现象。图 10.11 与图 10.12 为高倍放大照片(放大倍数为 100 倍)，显示发生结缔组织疾病的软骨与骨受到破坏，但以组蛋白去乙酰基转移酶治疗后维持完整。图 10.13 与图 10.14 为组织化学照片(放大倍数为 40 倍)，显示载体组有严重真皮水肿、皮下厚纤维化与微脓肿生成、以及分散性淋巴浸润，但是治疗组显示正常真皮结构、且只有小的局限性淋巴聚集，没有水肿现象。图 10.15 与图 10.16 为高倍放大照片(放大倍数为 100 倍)，显示载体组在皮下组织有分散性淋巴浸润与纤维化，而治疗组只有局限性淋巴聚集，且肌肉束与结缔组织仍可分辨。

如表 2 与图 11.1~图 11.6 所示, 1%毛斯达丁 A 软膏比 10%丁酸苯酯乳剂的效力更强。对于淋巴球浸润、软组织水肿以及滑膜增生的抑制, 在 1%毛斯达丁 A 软膏处理组的效果都比在 10%丁酸苯酯乳剂处理组更佳。

实施例 12

丁酸苯酯抑制物在发生结缔组织疾病的炎症侵入性滑膜对于细胞周期调节物的效用

由于滑膜增生与血管翳生成可被 1%毛斯达丁 A 软膏与 10%丁酸苯酯乳剂抑制, 因此萃取滑膜组织中蛋白质, 研究 p16 与 p21 是否会被诱导表现。结果发现在没有药剂处理的正常与辅佐性关节炎, 不论是 p16 或 p21 都没有表现。然而, 在药剂处理组的辅佐性关节炎的滑膜组织, 从第 1 天开始, p16 就有持续诱发表现的现象, 而 p16 与 p21 在有药剂处理的正常滑膜组织细胞仍没有被诱导, 可见对于活体内的正常组织生长, 1%毛斯达丁 A 软膏或 10%丁酸苯酯乳剂都没有作用。

图 12.1~图 12.12 为低倍至高倍的 H&E 染色以及免疫组织化学染色照片, 其中图 12.1~图 12.6 为丁酸苯酯处理组; 显示细胞周期调节物 p16 在发生结缔组织疾病的滑膜有向上调节的现象, 且在丁酸苯酯治疗后, 血管翳生成有受到抑制, 只是滑膜处仍有少数淋巴球浸润。

图 12.7~图 12.12 为载体组图; 显示在结缔组织疾病中严重滑膜增生与血管翳生成会破坏关节的软骨与骨。相反地, 比起治疗组的滑膜, 在载体组侵入性滑膜并没有染出细胞周期调节物 p16。

由上述可知, 丁酸苯酯在发生结缔组织疾病的滑膜母细胞会诱发细胞周期休止, 而预防血管翳生成与关节分解。

实施例 13

丁酸苯酯对于发生结缔组织疾病的结缔组织的前炎症媒介物的作用

如图 13.1~图 13.10 所示, 在载体组中, 肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 在发生结缔组织疾病的皮肤、皮下组织以及关节的炎症区域广泛分布, 但是在丁酸苯酯治疗组的皮肤只有染出少量 TNF- α 。此结果显示丁酸苯酯可以在发生结缔组织疾病的结缔组织(包括关节边缘的滑膜、皮下组织、真皮、以及表皮)抑制前炎症媒介物 TNF- α 。

此外，毛斯达丁 A 也有与丁酸苯酯相同的效果，可以对 p16 向上调节，并对 TNF- α 向下调节。如图 14.1 所示，毛斯达丁 A 在关节腔内衬的薄滑膜可以向上调节 p16 的表现，但是，在发生结缔组织疾病的软组织并没有染出 TNF- α （如图 14.2）。

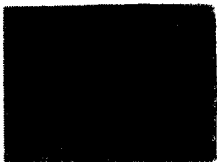
由实施例 12 与 13 的结果显示，丁酸苯酯与毛斯达丁 A 对于结缔组织疾病可以同时使细胞周期抑制物 p16 向上调节，也向下调节前炎症媒介物 TNF- α 。由此结果更可推知组蛋白去乙酰基转移酶抑制物对于治疗结缔组织疾病很有效，因该病的特征为细胞周期失调，以及前炎症细胞激素异常反应。

而由本发明以上所述的实施例可了解，由组蛋白去乙酰基转移酶抑制物制备的药可用来治疗包括类风湿性关节炎、系统性红斑性狼疮、进行性系统性硬化症、修格连式干燥症、皮炎以及混合性结缔组织病，所以本发明的药物组合物在制备治疗以上由于改变免疫调控的自体免疫失常而造成皮肤、关节、及软组织炎症的结缔组织疾病是一新颖、且有治疗潜力的药物。



0 4 12 时间 (小时)

图 1



0 4 12 时间 (小时)

图 2



图 3



图 4



图 5

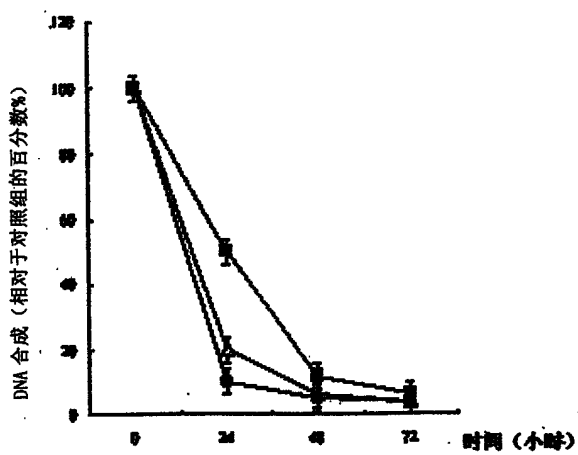


图 6

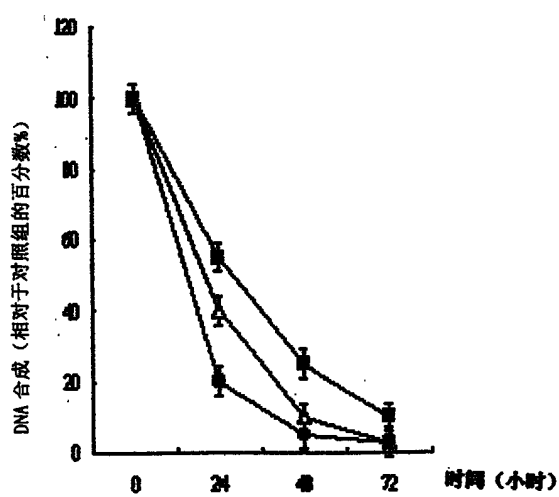


图 7

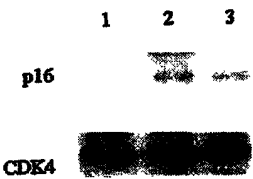


图 8.1

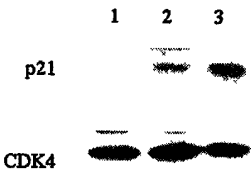


图 8.2

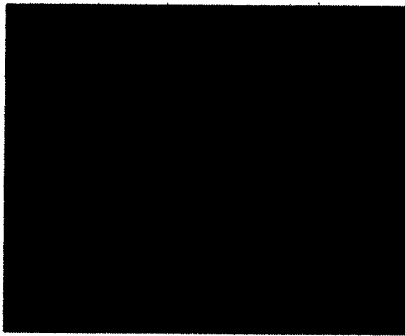


图 9.1

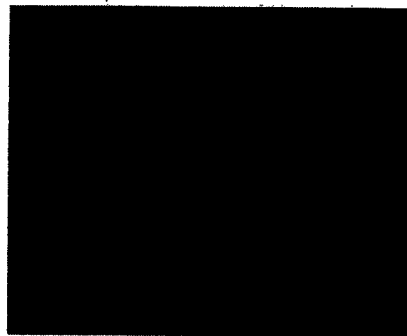


图 9.2



图 9.3



图 9.4

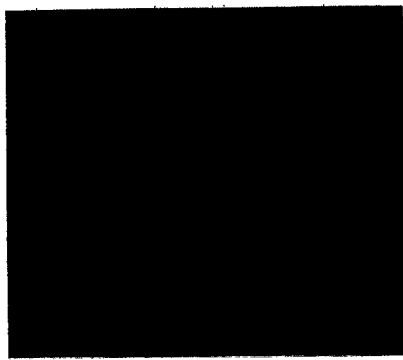


图 9.5



图 9.6

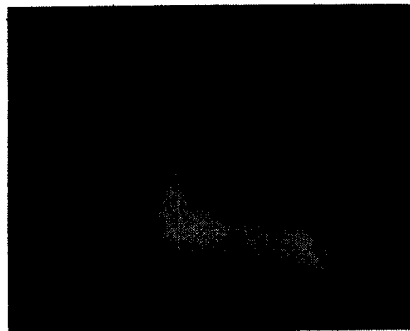


图 10.1



图 10.2

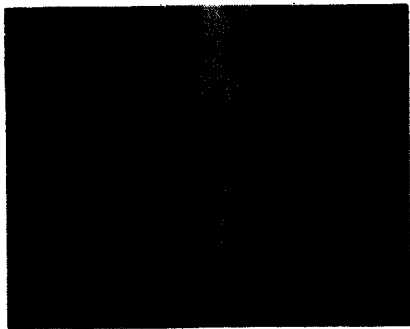


图 10.3

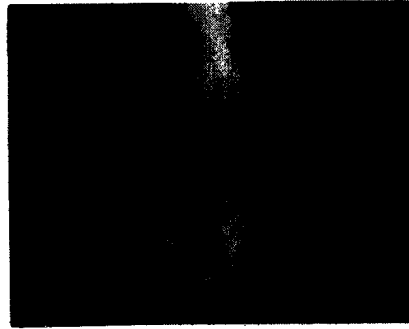


图 10.4

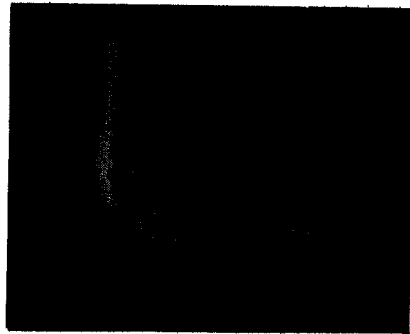


图 10.5

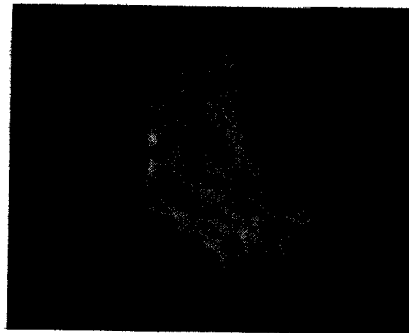


图 10.6

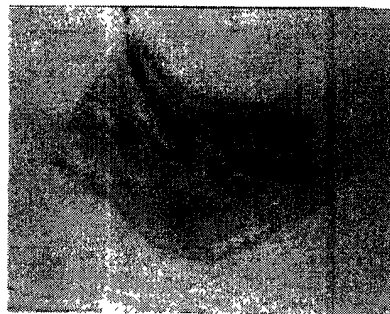


图 10.7

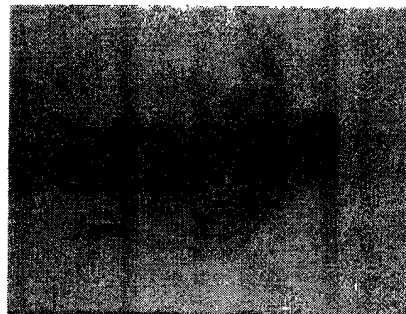


图 10.8

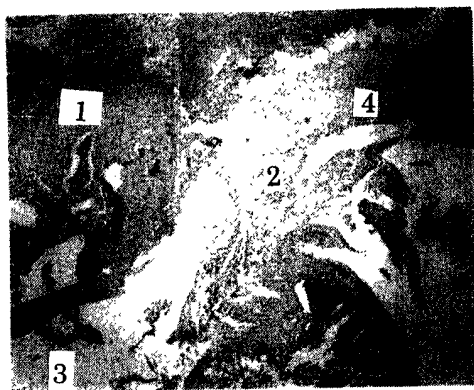


图 10.9

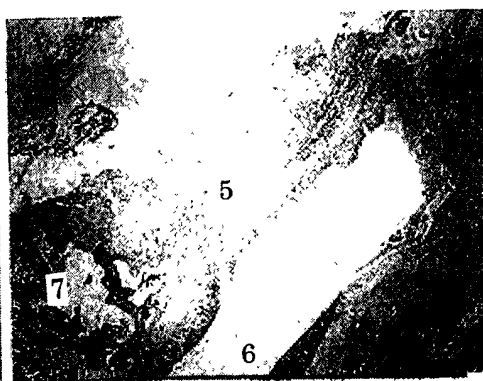


图 10.10



图 10.11

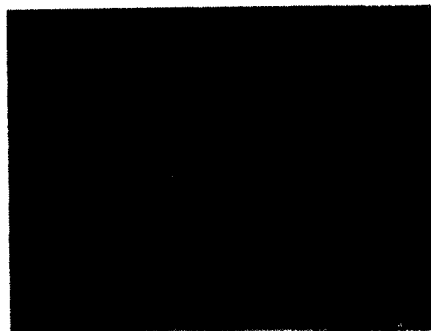


图 10.12

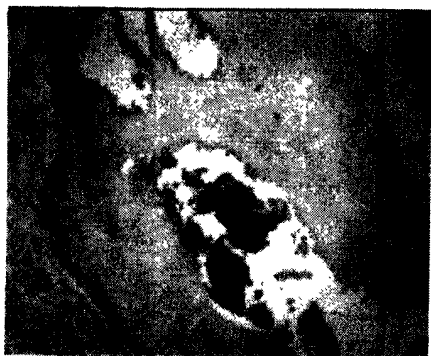


图 10.13

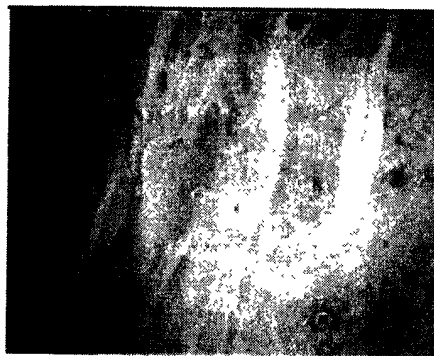


图 10.14



图 10.15

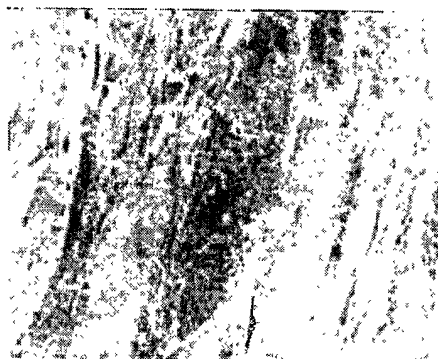


图 10.16



图 11.1



图 11.2



图 11.3



图 11.4

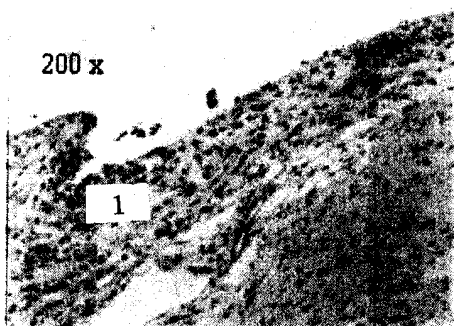


图 11.5



图 11.6

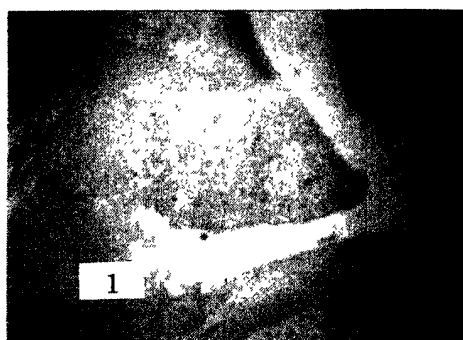


图 12.1



图 12.2

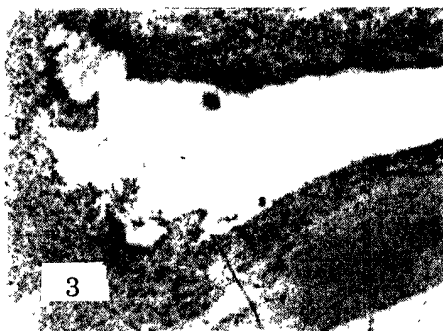


图 12.3

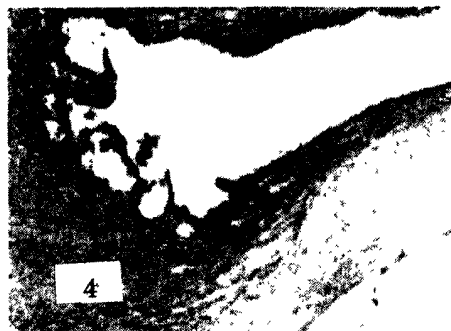


图 12.4

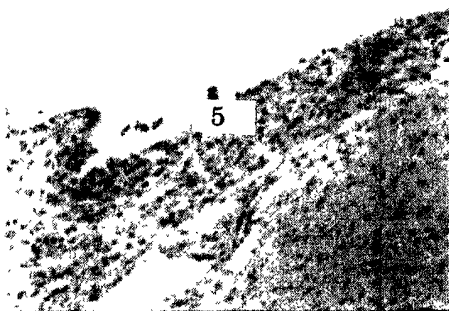


图 12.5

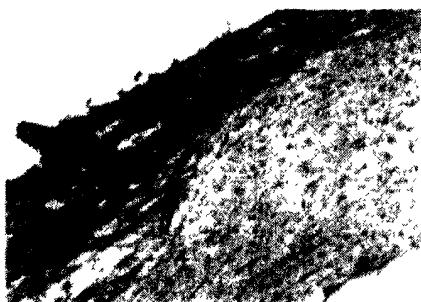


图 12.6

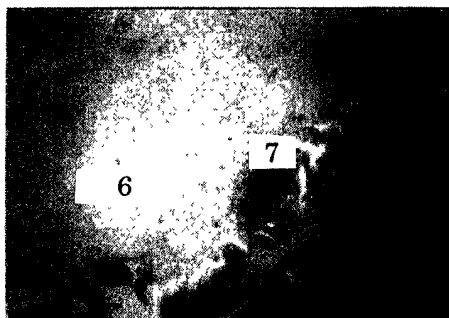


图 12.7

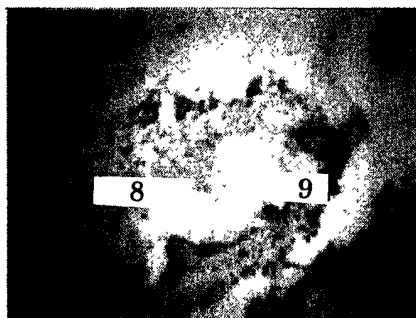


图 12.8

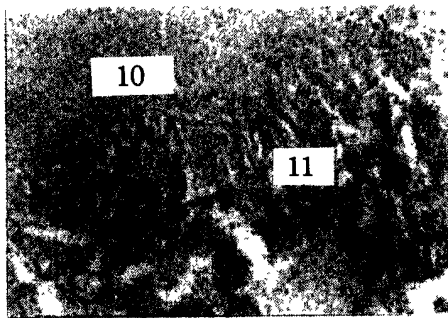


图 12.9

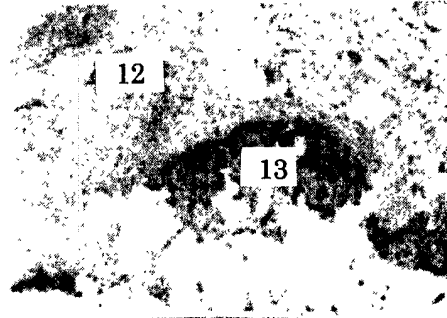


图 12.10

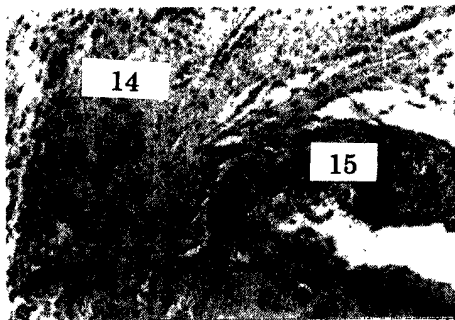


图 12.11

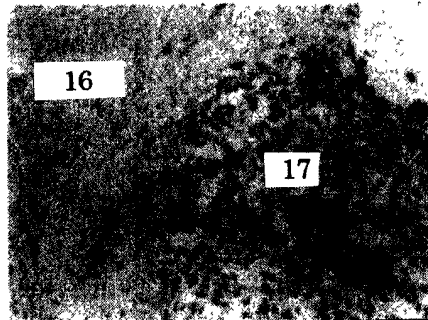


图 12.12

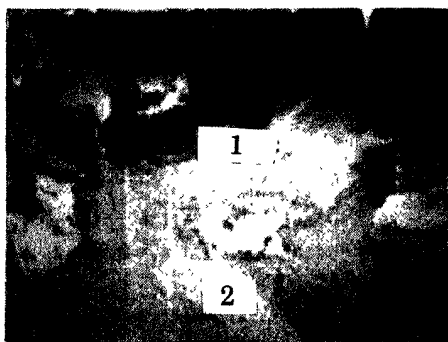


图 13.1

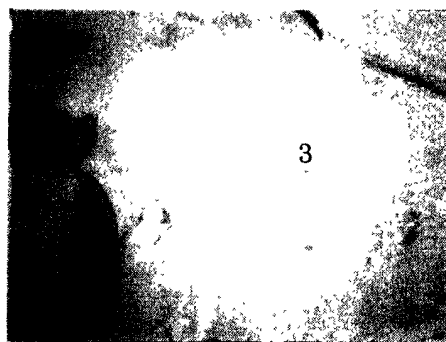


图 13.2

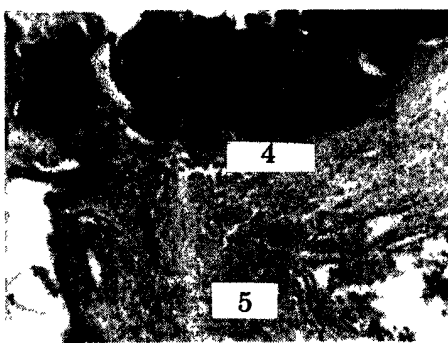


图 13.3



图 13.4



图 13.5



图 13.6

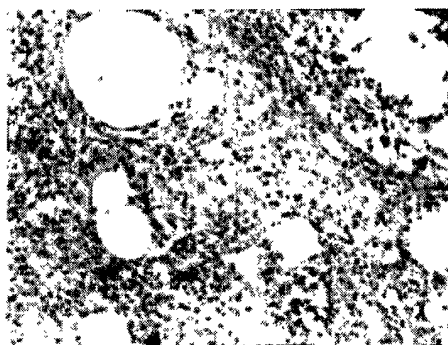


图 13.7

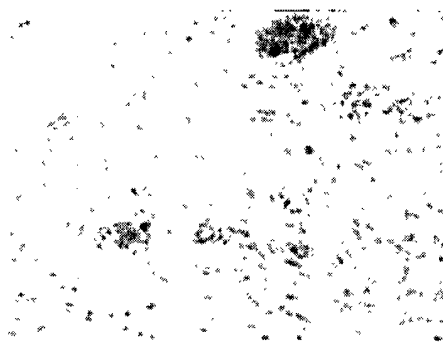


图 13.8



图 13.9

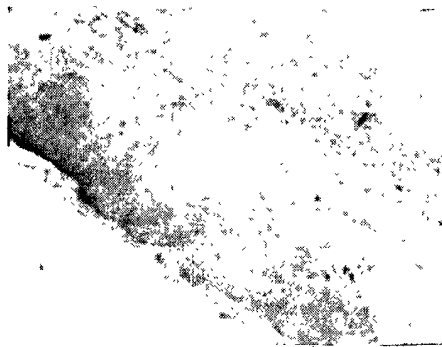


图 13.10



图 14.1



图 14.2