



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201210583 A1

(43)公開日：中華民國 101 (2012) 年 03 月 16 日

(21)申請案號：100127765

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 08 月 04 日

(51)Int. Cl. : *A61K31/07 (2006.01)*

A61K31/203 (2006.01)

A61K38/48 (2006.01)

(30)優先權：2010/08/05 日本

2010-175920

2010/10/12 日本

2010-230020

(71)申請人：日東電工股份有限公司 (日本) NITTO DENKO CORPORATION (JP)

日本

(72)發明人：新津洋司郎 NIITSU, YOSHIRO (JP)；米田明弘 YONEDA, AKIHIRO (JP)；石渡裕
俊 ISHIWATARI, HIROTOSHI (JP)

(74)代理人：蔡坤財；李世章

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：9 項 圖式數：21 共 75 頁

(54)名稱

用以從纖維化組織再生正常組織之組成物

COMPOSITION FOR REGENERATING NORMAL TISSUE FROM FIBROTIC TISSUE

(57)摘要

本發明是關於一種用以從纖維化組織再生正常組織之醫藥組成物及方法，該醫藥組成物中含有
膠原蛋白減少物質。藉由本發明，而能夠從纖維化組織治療性地再生正常組織。



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201210583 A1

(43)公開日：中華民國 101 (2012) 年 03 月 16 日

(21)申請案號：100127765

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 08 月 04 日

(51)Int. Cl. : *A61K31/07 (2006.01)*

A61K31/203 (2006.01)

A61K38/48 (2006.01)

(30)優先權：2010/08/05 日本

2010-175920

2010/10/12 日本

2010-230020

(71)申請人：日東電工股份有限公司 (日本) NITTO DENKO CORPORATION (JP)

日本

(72)發明人：新津洋司郎 NIITSU, YOSHIRO (JP)；米田明弘 YONEDA, AKIHIRO (JP)；石渡裕
俊 ISHIWATARI, HIROTOSHI (JP)

(74)代理人：蔡坤財；李世章

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：9 項 圖式數：21 共 75 頁

(54)名稱

用以從纖維化組織再生正常組織之組成物

COMPOSITION FOR REGENERATING NORMAL TISSUE FROM FIBROTIC TISSUE

(57)摘要

本發明是關於一種用以從纖維化組織再生正常組織之醫藥組成物及方法，該醫藥組成物中含有
膠原蛋白減少物質。藉由本發明，而能夠從纖維化組織治療性地再生正常組織。

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明是關於一種用以從纖維化組織再生正常組織之組成物及方法。

【先前技術】

組織之纖維化，是由於下述原因而發生：以膠原蛋白為主的細胞外基質(matrix)於組織中過剩地產生並蓄積。組織在由於氧化壓力、缺氧狀態、發炎、細胞凋亡(apoptosis)等刺激而受到損傷時，會以細胞外基質來取代損傷組織以謀求修復，但重度損傷的情形及這樣的刺激轉為慢性的情形等情形中，細胞外基質的蓄積會過剩，以致組織無法充分達到其機能。纖維化在肝臟、胰臟、肺臟、腎臟、骨髓、心臟等各種臟器中都可見到，被認為可能與肌纖維母細胞等膠原蛋白生成細胞的疾病狀態有關。至今一直認為，纖維化是不可逆的現象，曾發生纖維化的組織將無法復原，但最近卻有數則報告顯示：纖維化是可逆的現象，若上述的纖維化刺激消失，則蓄積於組織中的細胞外基質就會減少（參照非專利文獻 1～3）。

然而，關於在病理性細胞外基質蓄積已經減少後的組織中具體而言發生了何種狀況，並無詳細的報告，關於在這樣的纖維化組織中是否發生正常組織的再生、或是否能夠發生正常組織的再生，至今也全然未知。

而且，組織的纖維化之中，不只有源自病毒感染、飲酒、藥物等的纖維化症等病因明確而能夠去除的纖維化，且也有：直接病因不明的纖維化症，例如特發性肝硬化、特發性肺纖維化症、特發性骨髓纖維化症等；或者其中也包括雖然知道直接病因但該病因的原因則不明的纖維化、或難以去除的纖維化，例如源自原發性膽汁性肝硬化、非酒精性脂肪肝炎（NASH）的肝纖維化症、原發性硬化性膽管炎等。存在著這種難以去除病因之纖維化的組織，是處於不停地暴露在纖維化刺激中的狀態，但在這樣的纖維化組織中是否能夠減少病理性的細胞外基質蓄積、或甚至能否再生組織，也是至今全然未知。

[先前技術文獻]

(非專利文獻)

非專利文獻 1：Issa et al., Gastroenterology. 2004;126(7):1795-808

非專利文獻 2：Iredale, J Clin Invest. 2007;117(3):539-48

非專利文獻 3：Sato et al., Nat Biotechnol. 2008;26(4):431-42

【發明內容】

[發明所欲解決之問題]

本發明的目的在於提供一種用以從存在著纖維化的組織治療性地再生正常組織之組成物及方法。

[解決問題之技術手段]

本發明人等在為了解決上述課題而持續專心研究中，發現即便在持續受到纖維化刺激的纖維化組織中也能夠減少蓄積於組織中的膠原蛋白，並且進而發現藉由去除蓄積於組織中的膠原蛋白而確保幹細胞能夠增殖、分化的空間，則能從纖維化組織再生正常組織，而完成了本發明。如同上述，已知若纖維化刺激消失則能夠減少蓄積於組織中的細胞外基質，但是，在持續受到纖維化刺激的纖維化組織中也能夠減少蓄積於組織中的膠原蛋白、以及藉由積極地去除蓄積於組織中的膠原蛋白則能夠從纖維化組織再生正常組織，均是至今全然未知的驚人發現。

因此，本發明是關於以下發明。

(1) 一種用以從纖維化組織再生正常組織之醫藥組成物，其含有膠原蛋白減少物質。

(2) 如上述(1)所述之醫藥組成物，其中該膠原蛋白減少物質是選自由下述所組成之群組：抑制由膠原蛋白生成細胞所致之膠原蛋白生成的物質、促進膠原蛋白分解的物質、以及將膠原蛋白分解阻礙物質加以抑制的物質。

(3) 如上述(1)或(2)所述之醫藥組成物，其中進而含有標靶藥物，該標靶藥物是針對纖維化組織中之膠原蛋白生成細胞。

(4) 如上述(3)所述之醫藥組成物，其中該標靶藥物是類視色素(retinoid)。

(5) 如上述(1)至(4)中任一項所述之醫藥組成物，其

中該纖維化組織持續受到纖維化刺激。

(6) 如上述(1)至(5)中任一項所述之醫藥組成物，其係用以在幹細胞之增殖、分化用的空間中再生纖維化組織，該空間是因蓄積於纖維化組織中的膠原蛋白減少所生成。

(7) 如上述(2)至(6)中任一項所述之醫藥組成物，其中該抑制由膠原蛋白生成細胞所致之膠原蛋白生成的物質，是選自由下述物質所組成之群組：TGF β (Transforming growth factor-beta，轉形生長因子 β)阻礙物質、HGF(Hepatocyte growth factor，肝細胞生長因子)或其生成促進物質、PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma，過氧小體增生物活化受體 γ)配體、血管收縮素阻礙物質、PDGF(Platelet-derived growth factor，血小板衍生生長因子)阻礙物質、鬆弛素或其生成促進物質、阻礙細胞外基質成分之生成或分泌的物質、細胞活性抑制物質、細胞增殖抑制物質、以及細胞凋亡誘導物質。

(8) 如上述(2)至(6)中任一項所述之醫藥組成物，其中該促進膠原蛋白分解的物質，是膠原蛋白酶或其生成促進物質。

(9) 如上述(2)至(6)中任一項所述之醫藥組成物，其中該將膠原蛋白分解阻礙物質加以抑制的物質，是TIMP(Tissue inhibitor of metalloproteinase，金屬蛋白酶組織抑制因子)阻礙物質。

[功效]

明顯可知，藉由本發明，可以從至今被認為不會發生正常組織再生的纖維化組織，再生正常組織。藉此，將能夠從纖維化組織治療性地再生正常組織，而能夠進行纖維化疾病之新穎的再生治療。

而且，藉由本發明則能夠治療持續地暴露在纖維化刺激中的纖維化組織，並實現包含了以往不存在有效治療法的纖維化疾病、及除了器官移植之外別無其他治療法的纖維化疾病在內之所有纖維化疾病的內科治療，因此可以期待對於醫療及動物醫療將有很大的貢獻。

【實施方式】

本發明是關於一種用以從纖維化組織再生正常組織之組成物，其含有膠原蛋白減少物質。

在本發明中，所謂的「膠原蛋白減少物質」，意思是指能夠減少蓄積於組織中之膠原蛋白的量的任意物質。在此並非企圖侷限於特定理論，而是認為在纖維化組織中的膠原蛋白蓄積的原因之一，可能是在於膠原蛋白的生成與分解之間的平衡偏向於生成側，所以膠原蛋白減少物質不只是抑制膠原蛋白生成的物質，也可以包含促進膠原蛋白分解的物質、或是將阻礙該物質之物質加以抑制的物質。因此，作為膠原蛋白減少物質並無限定，例如可舉出：抑制由膠原蛋白生成細胞所致之膠原蛋白生成的物質、促進膠原蛋白分解的物質、將膠原蛋白分解阻礙物質加以抑制的

物質。在本發明中的膠原蛋白並無特別限定，以例如 I、III、V 型膠原蛋白等有關纖維化的膠原蛋白為佳，特佳為在纖維化組織中存在最多量的 I 型膠原蛋白。

在本發明中，膠原蛋白生成細胞的意思是在纖維化組織中生成膠原蛋白的任意細胞，並無限定，例如包含了活性化星狀細胞、肌纖維母細胞等。活性化星狀細胞與肌纖維母細胞，被認為是纖維化組織中主要的膠原蛋白生成來源，其特徵為 α -SMA (α 平滑肌肌動蛋白 (α -smooth muscle actin)) 的表現。因此，本發明中的活性化星狀細胞與肌纖維母細胞，是藉由免疫染色等來鑑別，該免疫染色是使用經以能夠測出的方式標記之抗 α -SMA 抗體進行。

抑制由膠原蛋白生成細胞所致之膠原蛋白生成的物質，包括直接或間接地抑制與纖維化組織中之膠原蛋白蓄積相關的該細胞的物理性、化學性及／或生理性作用等的任意藥物，並無限定，例如包括：TGF β (Transforming growth factor-beta) 阻礙物質、HGF (Hepatocyte growth factor) 或其生成促進物質、PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) 配體、血管收縮素阻礙物質、PDGF (Platelet-derived growth factor) 阻礙物質、鬆弛素或其生成促進物質、阻礙細胞外基質成分之生成或分泌的物質、細胞活性抑制物質、細胞增殖抑制物質、細胞凋亡誘導物質等。

作為 TGF β 阻礙物質，並無限定，例如可舉出：切斷型 TGF β II 型受體 (Qi et al., Proc Natl Acad Sci U S A.

1999;96(5):2345-9)、可溶性 TGF β II 型受體(George et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(22):12719-24)、抗 TGF β 抗體等 TGF β 活性阻礙物質；針對 TGF β 的 RNAi(RNA 干擾)分子、核糖酶、反義核酸等 TGF β 生成阻礙物質、表現這些物質的載體(vector)、以及經以這些物質進行轉形(transformation)的細胞等。在本發明的一個態樣中，TGF β 阻礙物質會阻礙 TGF β 1 的活性及／或生成。

作為 HGF 或鬆弛素的生成促進物質，並無限定，例如可舉出：編碼有 HGF 或鬆弛素的核酸、含有該核酸的表現構成物(construct)、含有這些物質的表現載體、以及經以這些物質進行轉形的細胞等。

作為 PPAR γ 配體，並無限定，例如可舉出：15-去氧- Δ 12,14-前列腺素 J2 (15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2)、硝基亞麻油酸(nitrolinoleic acid)、氧化 LDL (Low density lipoprotein, 低密度脂蛋白)、長鏈脂肪酸、類二十烷酸(eicosanoid)之類的內因性配體，或是曲格列酮(troglitazone)、皮利酮(pioglitazone)、羅格列酮(rosiglitazone)、巴格列酮(balaglitazone)、利格列酮(rivoglitazone)等噻唑烷二酮(thiazolidinedione)類藥劑、非類固醇性消炎藥之類的外因性配體等。

作為血管收縮素阻礙物質，並無限定，例如可舉出：替米沙坦(telmisartan)、洛沙坦(losartan)、缬沙坦(valsartan)、坎地沙坦酯(candesartan cilexetil)、奧美沙坦酯(olmesartan medoxomil)、厄貝沙坦(irbesartan)等血管收

縮素受體拮抗物質等。血管收縮素包括了血管收縮素 I、II、III 及 IV。而且，作為血管收縮素受體，並無限定，例如可舉出血管收縮素 1 型受體（AT1）等。

作為 PDGF 阻礙物質，並無限定，例如可舉出：抗 PDGF 抗體等 PDGF 活性阻礙物質，或是針對 PDGF 的 RNAi 分子、核糖酶、反義核酸等 PDGF 生成阻礙物質、表現這些物質的載體、以及經以這些物質進行轉形的細胞等。

作為阻礙細胞外基質成分之生成或分泌的物質，並無限定，例如可舉出：抑制膠原蛋白、蛋白多醣、肌糖蛋白 (tenascin)、纖維連接蛋白 (fibronectin)、血小板活化蛋白 (thrombospondin)、造骨蛋白 (osteopontin)、骨連結蛋白 (osteonectin)、彈性蛋白等細胞外基質成分之表現的 RNAi 分子、核糖酶、反義核酸等的物質，或是顯性抑制突變體 (dominant negative mutant) 等具有顯性抑制效果的物質、表現這些物質的載體、以及經以這些物質進行轉形的細胞等。作為阻礙膠原蛋白之生成或分泌的藥物，並無限定，例如可舉出 HSP (Heat shock protein, 熱休克蛋白) 47 的阻礙物質，HSP47 也就是在各種類型之膠原蛋白的合成過程中所共通且為細胞內輸送及分子成熟化所必須而對膠原蛋白具特異性的分子伴侶蛋白 (chaperone)，而 HSP47 的阻礙物質則例如：針對 HSP47 的 RNAi 分子、核糖酶、反義核酸等 HSP47 表現阻礙物質，或是 HSP47 之顯性抑制突變體等具有顯性抑制效果的物質、表現這些物質的載體、以及經以這些物質進行轉形的細胞等。

作為細胞增殖抑制物質，並無限定，例如可舉出：烷
基化劑（例如依弗醯胺(ifosfamide)、尼莫司汀(nimustine)、
環磷醯胺、達卡巴仁(dacarbazine)、氮芥苯丙胺酸
(melphalan)、雷莫司汀(ranimustine)等)；抗腫瘤性抗生物
質（例如艾達黴素(idarubicin)、泛艾黴素(epirubicin)、道
諾黴素(daunorubicin)、艾黴素(doxorubicin)、哌喃艾黴素
(pirarubicin)、博來黴素(bleomycin)、培洛黴素
(peplomycin)、邁杜蔥酮(mitoxantrone)、絲裂黴素
C(mitomycin C)等)；代謝拮抗劑（例如吉西他濱
(gemcitabine)、依諾他濱(enocitabine)、阿拉伯糖基胞嘧啶
(cytarabine)、替加氟-尿嘧啶(tegafur-uracil)、替加氟-吉美
拉西-奧替拉西鉀(tegafur-gimeracil-oteracil potassium)調
配劑、氟鐵龍(doxifluridine)、羥基脲、氟尿嘧啶、胺甲葉
酸(methotrexate)、巯嘌呤(mercaptopurine)等)；伊妥普賽
(etoposide)、愛萊諾迪肯(irinotecan)、溫諾平(vinorelbine)、
歐洲紫杉醇(docetaxel)、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、長春新
鹼(vincristine)、長春地辛(vindesine)、長春花鹼(vinblastine)
等生物鹼；卡鉑定(carboplatin)、順鉑(cisplatin)、奈達鉑
(nedaplatin)等鉑錯合物；以及洛維汀(lovastatin)、辛維司
汀(simvastatin)等士他汀(statin)等。

作為細胞活性抑制物質，並無限定，例如可舉出鈉通
道阻礙物質等。

作為細胞凋亡誘導劑，並無限定，例如可舉出：複方
861(compound 861)、黴膠毒素(gliotoxin)、阿托伐他汀

(atorvastatin)等。

作為促進膠原蛋白分解的物質，並無限定，例如可舉出各種膠原蛋白酶或其生成促進物質等。作為膠原蛋白酶的例子，並無限定，例如可舉出 MMP (Matrix metalloproteinase, 基質金屬蛋白酶) 1、2、3、9、13、14 等 MMP 家族等。作為膠原蛋白酶的生成促進物質，並無限定，例如可舉出：編碼有膠原蛋白酶的核酸、含有該核酸的表現構成物、含有這些物質的表現載體、以及經以這些物質進行轉形的細胞等。

作為將促進膠原蛋白分解的物質加以阻礙的物質，並無限定，例如可舉出 TIMP (有 TIMP1 及 TIMP2 等)。因此，作為阻礙該物質的物質，並無限定，例如可舉出：針對 TIMP 的抗體等 TIMP 活性阻礙物質、針對 TIMP 的 RNAi 分子、核糖酶、反義核酸等 TIMP 生成阻礙物質、表現這些物質的載體、以及經以這些物質進行轉形的細胞等。

本發明中的 RNAi 分子，也包括：siRNA (small interfering RNA, 小干擾 RNA)、miRNA (micro RNA, 微 RNA)、shRNA (short hairpin RNA, 小髮夾 RNA)、ddRNA (DNA-directed RNA, DNA 介導之 RNA)、piRNA (Piwi-interacting RNA, Piwi 相互作用 RNA)、rasiRNA (repeat associated siRNA, 重複相關小干擾 RNA) 等 RNA 及這些 RNA 的變體。又，本發明中的核酸，包括 RNA、DNA、PNA (peptide nucleic acid, 肽核酸) 或這些的複合物。

在本發明中所謂的「纖維化組織」，意思是指蓄積有多

於正常量的以膠原蛋白為主的細胞外基質的組織。作為細胞外基質，除了膠原蛋白之外，並無限定，例如可舉出：蛋白多醣、肌糖蛋白、纖維連接蛋白、血小板活化蛋白、造骨蛋白、骨連結蛋白、彈性蛋白等。蓄積於組織中的膠原蛋白的量，例如可以藉由以組織中的羥脯胺酸的量為指標、或是對組織施以膠原蛋白染色（例如 Masson 三色染色法(Masson trichrome stain)、Azan 染色、天狼星紅染色(Sirius red staining)、彈性 van Gieson 染色(Elastica van Gieson stain)等）並進行影像解析等方式來定量。在本發明中之纖維化組織中的細胞外基質的量，可以相較於正常組織而為 5%以上、10%以上、25%以上、50%以上、100%以上、200%以上、300%以上、400%以上、或 500%以上。由於由活性化星狀細胞及／或肌纖維母細胞所致之膠原蛋白生成被認為會有助於組織的纖維化，所以本發明中的纖維化組織，典型的例子也包括活性化星狀細胞及／或肌纖維母細胞。只要是具有上述特徵，則纖維化組織可以是體內的任何組織，並無限定，例如包括：肝臟、胰臟、肺臟、腎臟、骨髓、聲帶、喉頭、口腔、心臟、脾臟、縱膈、後腹腔、子宮、皮膚、乳腺、腸道等。

因此，纖維化組織可以是各種臟器纖維化症的患部。作為臟器纖維化症的例子，並無限定，例如可舉出：肝纖維化症、肝硬化、聲帶瘢痕之形成、聲帶黏膜纖維化症、喉頭之纖維化、肺纖維化症、胰臟纖維化症、骨髓纖維化症、心肌梗塞、心肌梗塞後之心肌纖維化、心肌纖維化症、

心內膜心肌纖維化症、脾纖維化症、縱膈纖維化症、舌黏膜下纖維化症、腸道纖維化（例如發炎性腸病所伴隨的纖維化等）、後腹腔纖維化症、子宮纖維化症、硬皮症、乳腺纖維化症等。

本發明中的肝纖維化症與肝硬化，不只是起因於 B 型與 C 型肝炎病毒等病毒感染、飲酒、脂肪肝、寄生蟲感染、先天性代謝異常、肝毒性物質等的肝纖維化症與肝硬化，而是也包括未鑑定出原因的肝纖維化症與肝硬化。因此，本發明中的肝硬化並無限定，例如也包括：Charcot 氏肝硬化、托德氏肝硬化(Todd's cirrhosis)、原發性膽汁性肝硬化、單葉性肝硬化、繼發性膽汁性肝硬化、阻塞性肝硬化、細膽管性肝硬化、膽汁性肝硬化、萎縮性肝硬化、營養性肝硬化、壞死後性肝硬化、肝炎後肝硬化、結節性肝硬化、混合型肝硬化、小結節性肝硬化、代償性肝硬化、大結節性肝硬化、中膈性肝硬化、特發性肝硬化、非代償性肝硬化、門脈周圍性肝硬化、門脈性肝硬化、酒精性肝硬化等。

本發明中的肺纖維化症，不限於狹義的肺纖維化症，而是也包括與間質性肺炎並存之廣義的肺纖維化症。本發明中的肺纖維化症，可以起因於任意的間質性肺炎，例如：病毒性肺炎、真菌性肺炎、黴漿菌肺炎等所伴隨的感染性間質性肺炎；類風濕性關節炎、全身性硬皮症、皮膚肌炎、多發性肌炎、混合性結締組織病（MCTD, Mixed connective tissue disease）等膠原病所伴隨的間質性肺炎；放射線曝露所伴隨的間質性肺炎；由博來黴素等抗癌劑、小柴胡湯

等中草藥、干擾素、抗生物質、巴拉刈(paraquat)等所致的藥劑性間質性肺炎；特發性肺纖維化症、非特異性間質性肺炎、急性間質性肺炎、特發性器質化肺炎、呼吸性細支氣管炎相關性間質性肺病、剝離性間質性肺炎、淋巴球性間質性肺炎等特發性間質性肺炎等，因此，亦包含了由這些間質性肺炎轉為慢性而成的肺纖維化症。

本發明中的骨髓纖維化症，不限於原發性骨髓纖維化症，也包括繼發性骨髓纖維化症。繼發性骨髓纖維化症並無限定，包括由下述情形所繼發的骨髓纖維化症：急性骨髓性白血病、急性淋巴性白血病、慢性骨髓性白血病、真性紅血球增加症、原發性血小板增多症、骨髓增生不良症候群、多發性骨髓腫瘤、惡性淋巴腫瘤、癌腫瘤、全身性紅斑性狼瘡、進行性全身性硬皮症等疾病；或是放射線照射等。

本發明中的腎纖維化症，可以起因於任意的間質性腎炎，例如：鏈球菌腎炎、葡萄球菌腎炎、肺炎球菌腎炎、水痘／B型肝炎／C型肝炎／HIV等所伴隨的病毒性腎炎、由瘧疾等的寄生蟲感染所致的腎炎、真菌性腎炎、黴漿菌腎炎等所伴隨的感染性間質性腎炎；全身性紅斑性狼瘡（狼瘡性腎炎）、全身性硬皮症（膠原病腎症）、修格連氏症候群(Sjogren's syndrome)等膠原病所伴隨的間質性腎炎；紫癍性腎炎、多發性動脈炎、快速進行性腎絲球腎炎等血管免疫疾病所伴隨的腎炎；放射線暴露所伴隨的間質性腎炎；由金製劑、NSAIDs (non-steroidal

anti-inflammatory drugs, 非類固醇抗發炎藥物)、青黴胺、博來黴素等抗癌劑、抗生物質、巴拉刈等所致的藥劑性間質性腎炎；由昆蟲螫傷、花粉、漆樹科植物等所致的過敏性腎炎；類澱粉變性腎炎；糖尿病性腎臟病；慢性腎絲球腎炎、惡性腎硬化症、多發性囊胞腎症等所伴隨的腎炎；腎小管間質性腎炎；妊娠中毒症或癌症所伴隨的腎炎；膜增生性腎絲球腎炎；IgA(immunoglobulin A, 免疫球蛋白A)腎臟病、混合型冷凝球蛋白(cryoglobulin)血症腎炎、古德巴斯德症候群(Goodpasture's syndrome)腎炎、韋格納肉芽腫(Wegener's granulomatosis)腎炎、急性間質性腎炎等特發性間質性腎炎等，因此，亦包含了由這些間質性腎炎轉為慢性而成的腎纖維化症。

在本發明的一個態樣中，纖維化組織是持續受到纖維化刺激的組織。在本發明中，纖維化刺激的意思是指會誘導纖維化的任意刺激，並無限定，例如包括：氧化壓力、缺氧狀態、發炎、細胞凋亡等（參照 Ghiassi-Nejad et al., Expert Rev Gastroenterol Hepatol. 2008;2(6):803-16）。作為這樣的組織，例如可舉出：產生慢性發炎的纖維化組織、不停暴露於細胞障礙性物質中的組織（例如由於膽管疾病等而發生膽汁阻塞的肝組織）等。而且，這樣的組織也包括罹患下述疾病的組織：直接病因不明的纖維化症，例如特發性肝硬化、特發性肺纖維化症、特發性骨髓纖維化症等；或者雖然知道直接病因但病因的原因則不明的纖維化、或難以去除的纖維化，例如起因於原發性膽汁性肝硬化

化、非酒精性脂肪肝炎（NASH）的肝纖維化症，以及原發性硬化性膽管炎、特發性肺纖維化症、起因於特發性間質性肺炎的肺纖維化症、原發性骨髓纖維化症、起因於特發性間質性腎炎的腎纖維化症、發炎性腸病（例如克隆氏症（Crohn's disease，局部性迴腸炎）、潰瘍性大腸炎等）、全身性硬皮症等。

在本發明中所謂的「從纖維化組織再生正常組織」，意思是使因纖維化而變質的組織至少回復到纖維化較為輕度的狀態。亦即，隨著纖維化的進行，組織會逐漸被取代為以細胞外基質為主的纖維組織，但將此流程逆轉而將所增生的纖維組織逐漸取代為原本的正常組織，則是本發明中所謂的從纖維化組織再生正常組織。因此，本發明中所謂的從纖維化組織再生正常組織，不只是使纖維化組織完全地回復到原本的狀態，也包括了使纖維化組織部分地回復到原本的狀態。正常組織的再生程度，可以是藉由生物檢體試樣等組織學檢查，依據組織結構之正常化、纖維組織所佔區域之縮小、正常組織所佔區域之擴大等來進行評估，在以本組成物處置之前發現起因於纖維化的生化指標異常時，也可以藉由該指標的改善來進行評估。

在本發明的一個態樣中，正常組織的再生，也可以是在因蓄積於纖維化組織中之膠原蛋白減少所生成的空間中，藉由幹細胞增殖、分化所產生。因此，本發明的一個態樣，是關於上述醫藥組成物，該醫藥組成物是用以在幹細胞之增殖、分化用的空間中再生纖維化組織，該空間是

因蓄積於纖維化組織中的膠原蛋白減少所生成。此處，對於幹細胞並無限定，例如包含：原本就存在於已纖維化之組織中的幹細胞（肝幹細胞、胰幹細胞、肺幹細胞、腎幹細胞、骨髓幹細胞、心臟幹細胞、脾臟幹細胞、子宮幹細胞、皮膚幹細胞、乳腺幹細胞、腸道幹細胞、間葉系幹細胞等）、或是從體內的其他地方移動過來的幹細胞，進而也包含治療性地投予的幹細胞等。又，「空間」則不只是組織內的空隙，也包括了細胞能夠擴大、增殖之有餘裕的空間，例如細胞之間的壓力減少的空間、具有柔軟性的空間等。

本發明之組成物，在一個態樣中，進而含有標靶藥物，該標靶藥物是針對纖維化組織中之膠原蛋白生成細胞。藉由含有標靶藥物，而能夠將以膠原蛋白生成細胞為標的之膠原蛋白減少物質特異性地輸送至膠原蛋白生成細胞也就是標的細胞，而提高所使用的膠原蛋白減少物質的效果，上述膠原蛋白減少物質並無限定，例如：阻礙細胞外基質成分之生成或分泌的物質、HGF 或其生成促進物質、MMP 或其生成促進物質、TIMP 阻礙物質、TGF β 生成阻礙物質、鬆弛素或其生成促進物質等。

在本發明的一個態樣中，針對膠原蛋白生成細胞的標靶藥物是類視色素。藉由類視色素所進行的標靶化機制雖然尚未完全查明，但可能是例如：與 RBP（retinol binding protein，視黃醇結合蛋白）特異性地結合的類視色素，透過位於纖維化組織中之膠原蛋白生成細胞的細胞表面上的某種受體而被攝入該細胞。類視色素能夠發揮作為針對膠

原蛋白生成細胞的標靶藥物的機能的事實，已經記載於 WO 2006/068232 號、日本特開 2009-221164 號、日本特開 2010-59124 號等文獻中。

類視色素是具有由 4 個類異戊二烯(isoprenoid)單元以頭接尾(head to tail)方式連結而成之骨架的化合物群中的一種(參照 G. P. Moss, "Biochemical Nomenclature and Related Documents," 2nd Ed. Portland Press, pp. 247-251 (1992))，維生素 A 則定性地顯示視黃醇之生物學活性，是類視色素的一般的描述符(descriptor)。作為本發明中所能夠使用的類視色素，並無特別限定，例如可舉出：視黃醇(包含全反式視黃醇(all-trans-retinol))、視黃醛、視黃酸(retinoic acid)(包含維 A 酸(tretinoin))、視黃醇與脂肪酸之酯、脂肪族醇類與視黃酸之酯、依曲替酯(etretinate)、異維 A 酸、阿達帕林(adapalene)、阿曲汀(acitretin)、他扎羅汀(tazarotene)、視黃醇棕櫚酸酯等類視色素衍生物；以及芬維 A 胺(Fenretinide)(4-HPR)、蓓薩羅丁(bexarotene)等維生素 A 類似物。

這些之中，從將特異性物質輸送至纖維化組織中之膠原蛋白生成細胞的效率的觀點而言，以下述為佳：視黃醇、視黃醛、視黃酸、視黃醇與脂肪酸之酯(例如乙酸視黃酯、棕櫚酸視黃酯、硬脂酸視黃酯、及月桂酸視黃酯等)、及脂肪族醇類與視黃酸之酯(例如視黃酸乙酯等)。

類視色素的包含順式、反式的全部異構物，均涵蓋於本發明的範圍中。類視色素亦有時經 1 種或 2 種以上的取

代基所取代。本發明中之類視色素，當然可以是被單離出之狀態者，也包括在溶解或混合於能將其溶解或保持之介質中的狀態下的類視色素。

本發明之組成物的上述態樣，可以僅由作為有效成分且以膠原蛋白生成細胞為標的之膠原蛋白減少物質、及作為標靶藥物之類視色素所構成，也可以包含與這些物質不同的其他攜帶體(carrier)構成成分。作為本態樣中的攜帶體構成成分，並無特別限定，可以使用在醫藥及／或藥學領域中已知的任意成分，以能至少包含類視色素、或是能與其結合的成分為佳。

作為此種成分，可舉出脂質，例如可舉出：甘油磷脂質(glycerophospholipid)等磷脂質類；神經鞘磷脂(sphingomyelin)等神經脂質類；膽固醇等固醇類；大豆油、罌粟子油(poppy seed oil)等植物油；礦物油；蛋黃卵磷脂等卵磷脂類；聚合物等，但並不限定於此等。其中，以能構成微脂粒的脂質為佳，例如：卵磷脂等天然磷脂質；二肉豆蔻醯磷脂醯膽鹼(DMPC)、二棕櫚醯磷脂醯膽鹼(DPPC)、二硬脂醯磷脂醯膽鹼(DSPC)等半合成磷脂質；二油基磷脂醯乙醇胺(DOPE)、二月桂醯磷脂醯膽鹼(DLPC)、膽固醇等。

作為特佳的成分，可舉出能迴避網狀內皮系統之捕捉的成分，例如可舉出：氯化 N-(α -三甲基銨基乙醯基)-二(十二烷基)-D-麩胺酸(TMAG)、N,N',N'',N'''-四甲基-N,N',N'',N'''-四棕櫚基精胺(spermine)(TMTPS)、三氟乙

酸 2,3-二油氧基-N-[2-(精胺羧醯胺)乙基]-N,N-二甲基-1-丙胺(DOSPA)、氯化 N-[1-(2,3-二油氧基)丙基]-N,N,N-三甲基胺(DOTMA)、氯化二(十八烷基)二甲基胺(DODAC)、溴化二(十二烷基)胺(DDAB)、1,2-二油氧基-3-三甲基胺基丙烷(DOTAP)、 3β -[N-(N',N'-二甲基胺基乙烷)胺甲醯基]膽固醇(DC-Chol)、1,2-二肉豆蔻醯氧基丙基-3-二甲基羥乙基胺(DMRIE)、氯化 O,O'-二(十四烷醯基)-N-(α -三甲基胺基乙醯基)二乙醇胺(DC-6-14)等陽離子性脂質。

本發明之攜帶體，也可以具有特定的立體結構。作為這樣的結構，並無限定，可以舉出直鏈狀或支鏈狀的線狀結構、薄膜狀結構、球狀結構等。因此，攜帶體並無限定，也可以具有微胞(micelle)、微脂粒、乳液(emulsion)、微球體(microsphere)、奈米球等任意的立體形態。

類視色素及／或有效成分對於攜帶體的結合或包含，可以是藉由化學性及／或物理性的方法使類視色素結合或包含於攜帶體而進行。而且，類視色素及／或有效成分對於攜帶體的結合或包含，也可以是藉由將類視色素及／或有效成分與攜帶體構成成分混合而進行。本發明之組成物中的類視色素的量，例如可以設作 0.01~1000 nmol/ μ l，以 0.1~100 nmol/ μ l 為佳。又，本發明之組成物中的有效成分的量，例如可以設作 1~10000 ng/ μ l，以 10~1000 ng/ μ l 為佳，或可以設作 1~1000000 μ g/kg 體重，以 10~100000 μ g/kg 體重為佳。類視色素或有效成分的量，可能會由於這

些成分的活性或組成物之投予路徑、投予頻率、投予對象等而脫離上述範圍，但此情形仍然涵蓋於本發明的範圍中。類視色素及／或有效成分對於攜帶體的結合或包含，可以在使有效成分承載於該攜帶體之前進行，也可以藉由將攜帶體構成成分、類視色素及有效成分同時混合等來進行，或者也可以藉由將在已承載有效成分之狀態下的攜帶體與類視色素混合來進行。因此，本發明亦關於一種用以從纖維化組織再生正常組織之醫藥組成物的製造方法，其包含一使類視色素結合於既有之任意的藥物結合攜帶體或藥物封入攜帶體的步驟，該些既有之藥物結合攜帶體或藥物封入攜帶體，是例如：DaunoXome^(R)、Doxil、Caelyx^(R)、Myocet^(R)等微脂粒製劑。

本發明之組成物的形態，只要能將所期望的有效成分搬運至作為標的之纖維化組織中的膠原蛋白生成細胞，則任何形態均可，並無限定，例如可採下述中任一形態：高分子微胞、微脂粒、乳液、微球體、奈米球等。在本發明中，從輸送效率之高低、可輸送物質的選擇性之廣泛度、或製劑之容易性等觀點而言，這些攜帶體形態之中以微脂粒的形態為佳，且其中又以含陽離子性脂質的陽離子性微脂粒為特佳。組成物為微脂粒形態的情形中，若考量類視色素對於攜帶體之結合或包含的效率性，則類視色素與微脂粒構成脂質之間的莫耳比，以 8：1～1：4 為佳，較佳為 4：1～1：2。

本發明之組成物，可以是於其內部包含有效成分、使

有效成分附著於其外部、或與有效成分混合。因此，本發明之組成物，可以採用微脂粒與有效成分之複合體，亦即採用 Lipoplex 的形態，也可以視投予路徑或藥物釋放方式等，來將上述組成物以適當的材料來被覆，例如以腸溶性的塗覆料或經時分解性的材料來被覆，或是亦可搭配適當的藥物釋放系統。

含有類視色素作為標靶藥物的情形，在本組成物中是以發揮作為標靶藥物的機能的態樣存在。此處，所謂發揮作為標靶藥物的機能，意思是指含有類視色素的組成物會比不含類視色素的組成物更迅速且／或大量地到達且／或被攝入纖維化組織中的膠原蛋白生成細胞也就是標的細胞，此情形可以藉由下述方式而容易地確認，例如：將標示有標記或含有標記的組成物添加至標的細胞的培養物，於規定時間後分析標記的存在部位。以構造而言，例如只要類視色素最遲於到達標的細胞為止前至少部分地暴露於組成物的外部，便可充分滿足上述要件。類視色素是否暴露於組成物之外部，可藉由下述方式進行評估：使組成物與下述物質接觸，例如視黃醇結合蛋白（RBP）等與類視色素特異性地結合的物質，並調查其對於組成物之結合的情形。

使類視色素最遲於到達標的細胞為止前至少部分地暴露於組成物的外部，例如可以藉由調節類視色素與攜帶體構成成分之間的調配比率等來達成。而且，利用微脂粒等脂質結構體作為攜帶體的情形中，例如可以使用下述手

法：在將脂質結構體與類視色素進行複合化時，先將脂質結構體稀釋於水性溶液中，接著將其與類視色素接觸、混合等。此時，類視色素也可以是呈現溶解於溶劑、例如 DMSO(dimethylsulfoxide，二甲基亞砜)等有機溶劑之中的狀態。在此，所謂的脂質結構體，意思是指具有任意的立體結構，例如具有線狀、薄膜狀、球狀等形狀，並含有脂質作為構成成分的結構體，並無限定，包含了微脂粒、微胞、脂質微球體、脂質奈米球、脂質乳液等。與標記微脂粒而成者相同的標靶藥物亦可以應用於其他藥物攜帶體的事實，例如已記載於 Zhao and Lee, Adv Drug Deliv Rev. 2004;56(8):1193-204、Temming et al., Drug Resist Updat. 2005;8(6):381-402 等。

本發明之組成物，除了膠原蛋白減少物質以外，也可以進而含有減少纖維化刺激之物質作為有效成分，也可以併用這樣的物質。作為減少纖維化刺激之物質，並無限定，例如可舉出：抗氧化劑、血液循環促進劑、消炎藥、抗病毒藥物、抗生素、抗寄生蟲藥、保肝藥、利膽藥、細胞凋亡抑制物質等。這些物質，可以視對象的組織或疾病狀態來適當選擇。

本發明之組成物，也可以含有標記。藉由進行標記，而能夠監控是否成功輸送至標的細胞、及標的細胞之增減等，不只是在試驗或研究層級上，在臨床層級上也很有用。標記可以選自發明所屬技術領域中具有通常知識者所習知的任意標記，例如：任意的放射性同位素、磁性體、與標

記物質結合的物質（例如抗體）、螢光物質、螢光團（fluorophore）、化學發光物質、及酵素等。標記可以是標示在本發明之組成物的至少 1 種構成成分上，例如在含有類視色素作為標靶藥物的情形中，標記可以是標示在有效成分、類視色素及攜帶體構成成分之中的 1 種或 2 種以上，也可以作為與這些成分不同的成分而含有於組成物中。

在本發明中，所謂的「纖維化組織中之膠原蛋白生成細胞用」或「纖維化組織中之膠原蛋白生成細胞輸送用」，意思是指適合將纖維化組織中之膠原蛋白生成細胞作為標的細胞來使用，這包括了例如：能夠比例如正常細胞之類的其他細胞更迅速、高效率且／或大量地將物質輸送至該細胞。例如，纖維化組織中之膠原蛋白生成細胞用的攜帶體、或纖維化組織中之膠原蛋白生成細胞輸送用的攜帶體，能夠以相較於其他細胞為 1.1 倍以上、1.2 倍以上、1.3 倍以上、1.5 倍以上、2 倍以上、甚至 3 倍以上的速度及／或效率，來將有效成分輸送至纖維化組織中之膠原蛋白生成細胞。本發明之組成物，藉由含有針對纖維化組織中之膠原蛋白生成細胞的標靶藥物，而能夠製成纖維化組織中之膠原蛋白生成細胞用、或纖維化組織中之膠原蛋白生成細胞輸送用的組成物。

本發明之組成物，可以使用作為醫藥（亦即醫藥組成物），可以藉包括經口及非經口之兩者的各種路徑來投予，並無限定，例如可舉出：經口、經腸、靜脈內、肌肉內、皮下、局部、肝內、膽管內、肺內、呼吸道內、氣管內、

支氣管內、經鼻、直腸內、動脈內、門脈內、心室內、骨髓內、淋巴結內、淋巴管內、腦內、腦脊液腔內、腦室內、經黏膜、經皮膚、鼻內、腹腔內及子宮內等路徑，並可以製作成適合於各投予路徑的劑型。這樣的劑型及製劑方法，可適當採用任意的習知者（例如參照由渡邊喜照等人編輯並由南江堂於 2003 年出版的標準藥劑學等）。

例如，作為適合於經口投予的劑型，並無限定，可舉出：散劑、顆粒劑、錠劑、膠囊、液劑、懸浮劑、乳劑、凝膠劑、糖漿等，又，作為適合於非經口投予的劑型，則可舉出溶液性注射劑、懸浮性注射劑、乳化性注射劑、使用時調製型注射劑等注射劑。非經口投予用製劑，可以是水性或非水性之等張性無菌溶液或懸浮液的形態。

本發明之組成物，可以用任一形態來給予，但從保存安定性的觀點而言，較佳為能夠於使用時調製的形態，例如能夠在醫療現場或附近，由醫師及／或藥劑師、護士、或其他醫務人員等進行調製的形態來提供。此時，本發明之組成物，是以 1 個或 2 個以上的容器來提供，該容器含有本發明之組成物之必要構成要素的至少一個，並且本發明之組成物是在使用之前，例如 24 小時前以內、較佳為 3 小時前以內、以及更佳為正要使用前調製。於調製之際，可適當地使用在調製場所中通常可取得的試劑、溶劑、調劑器具等。

因此，本發明又關於一種組成物的調製套組，其包含 1 個或 2 個以上的容器，該容器是單獨或組合地含有：有

效成分、及／或任意的標靶藥物或攜帶體構成物質，本發明亦有關於以此種套組形態來提供之組成物的必要構成要素。本發明之套組，除了上述之外，亦可含有關於本發明之組成物的調製方法或投予方法等的說明書，或 CD、DVD 等電子記錄媒體等。又，本發明之套組雖然亦可包含用以完成本發明之組成物的全部構成要素，但並不一定需含有全部的構成要素。因此，本發明之套組中，亦可不含有在醫療現場或實驗設施等通常可取得的試劑或溶劑，例如無菌水、生理食鹽水、或葡萄糖溶液等。

本發明是進而關於一種用以從纖維化組織再生正常組織之方法，其包含一將有效量的本發明之組成物或膠原蛋白減少物質投予至需要其之對象的步驟。此處，所謂的有效量，例如是抑制纖維化組織中之膠原蛋白等細胞外基質之量增加的量，以減少細胞外基質之量的量為佳，更佳為在纖維化組織中引起正常組織再生的量。

細胞外基質之量，可以藉由各種手法來定量，並無限定，例如藉由細胞外基質之特殊染色影像的影像解析、或細胞外基質標識物(marker)的測定等來進行定量。例如，膠原蛋白可以藉由測定羥脯胺酸等膠原蛋白標識物之量來定量，或藉由對組織施以膠原蛋白染色（例如 Masson 三色染色法、Azan 染色、天狼星紅染色、彈性 van Gieson 染色等）後進行影像解析等方式來定量。相較於未投予本發明之組成物的情形，在纖維化組織中之細胞外基質的減少率例如可以是 10% 以上、20% 以上、30% 以上、40% 以上、50%

以上、60%以上、70%以上、甚至75%以上。此處，未投予本發明之組成物的情形，不只是未進行投予的情形，而是也包括投予下述組成物的情形（所謂的陰性對照）：除了僅有媒介物(vehicle)而未含有效成分以外均相當於本發明組成物的組成物；在本發明之組成物含有標靶藥物時除了未含標靶藥物以外均相當於本發明組成物的組成物等。又，正常組織之再生，可以藉由組織學上的觀察、或是將已標記的幹細胞投予至纖維化組織之後追蹤調查該幹細胞等來進行評估。

上述有效量，以不發生超過由投予所得之利益的不良影響的量為佳。這樣的量可藉由下述試驗來適當地決定：使用培養細胞等的試管內(in vitro)試驗；或者在小鼠、大鼠、狗或豬等模式動物(model animal)進行的試驗，這些試驗方法為發明所屬技術領域中具有通常知識者所熟知。而且，本發明之方法所使用的藥物的用量，是發明所屬技術領域中具有通常知識者所熟知，或可以是藉由上述試驗等來適當地決定。作為纖維化的模式動物，可以利用下述各種模式的動物：由四氯化碳(CCl_4)、豬血清、二甲基亞硝胺(DMN)、甲硫胺酸-膽鹼缺乏飼料(methionine-choline deficient diet, MCDD)、刀豆球蛋白A(Con A)、膽管結紮等所致之肝硬化模式；由博來黴素(BLM)等所致之肺纖維化症模式；由二丁基二氯化錫(Dibutyltin dichloride)等所致之胰纖維化症模式；血小板生成素(TPO)基因轉殖小鼠(Leukemia Research 29: 761-769, 2005)等的骨髓

纖維化症模式等。

本發明之方法中所投予的組成物或膠原蛋白減少物質之具體用量，能夠考慮關於需要處置之對象的各種條件後決定，該些條件是例如症狀的嚴重度、對象的一般健康狀態、年齡、體重、對象的性別、飲食、投予的時期及頻率、所併用的醫藥、對治療的反應性、及對治療的遵從性等。

投予路徑是包括經口及非經口之兩者的各種路徑，例如包括：經口、經腸、靜脈內、肌肉內、皮下、局部、肝內、膽管內、肺內、呼吸道內、氣管內、支氣管內、經鼻、直腸內、動脈內、門脈內、心室內、骨髓內、淋巴結內、淋巴管內、腦內、腦脊液腔內、腦室內、經黏膜、經皮膚、鼻內、腹腔內及子宮內等路徑。

投予頻率則是依照所使用之組成物的性狀、或上述般的對象的條件而異，例如可以是1日多次（亦即1日2、3、4次或5次以上）、1日1次、每數日（亦即每2、3、4、5、6、7日等）1次、1週內數次（例如1週內2、3、4次等）、每1週1次、每數週（亦即每2、3、4週等）1次。

在本發明之方法中，用語「對象」的意思是指任意的生物個體，較佳為動物、更佳為哺乳動物、且更佳為人之個體。在本發明中，雖然對象可以是健康或罹患某種疾病者，但典型的例子意思是指具有纖維化組織、或是具有組織會纖維化之風險的對象。作為這樣的對象，並無限定，例如可舉出：已罹患上述臟器纖維化症、或具有罹患之風險的對象，或是組織受到纖維化刺激、或有受到刺激之風

險的對象等。

本發明進而關於一種用以從纖維化組織再生正常組織之方法，其包含一減少纖維化組織中之膠原蛋白的步驟、及／或一在纖維化組織中生成細胞增殖、分化用的空間的步驟。

在本方法中，纖維化組織中之膠原蛋白的減少、及細胞增殖、分化用的空間的生成，可以藉由將本發明組成物或上述膠原蛋白減少物質投予至纖維化組織中而進行。

[實施例]

以下述實施例進而詳細地說明本發明，但這些實施例僅為例示，絕對並非用以限定本發明。在以下的實施例中，數據是以平均值（±標準差）的形式顯示。與對照組及其他組的多重比較，是藉由 Dunnett 檢定 (Dunnett's test) 來進行。

[實施例 1] VA-lip siRNA 之製備

(1) siRNA 之製備

以人類 HSP47 的大鼠同源基因、gp46 (GenBank Accession No. M69246) 的鹼基序列為標的之 siRNA (北海道 System Science 公司，札幌，日本)，其正義鏈及反義鏈是使用以下的序列，上述人類 HSP47 也就是膠原蛋白 (I ~ IV 型) 的共通分子伴侶蛋白。

A: GUUCCACCAUAAGAUGGUAGACAACAG (從 gp46 之鹼基序列上的第 757 個鹼基開始的正義鏈 siRNA，序列

編號 1)

B : GUUGUCUACCAUCUUAUGGUGGAACAU (反義鏈 siRNA, 序列編號 2)

使用下述序列作為 siRNArandom (又稱為 siRNAscramble)。

C : CGAUUCGCUAGACCGGCUUCAUUGCAG (正義鏈 siRNA, 序列編號 3)

D : GCAAUGAAGCCGGUCUAGCGAAUCGAU (反義鏈 siRNA, 序列編號 4)

在數個實驗中，使用了在 5'末端結合有 6'-羧基螢光素 (6-FAM) 或螢光素異硫氰酸酯 (FITC) 的正義鏈。這些序列已經在 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool, 基本區域排序搜尋工具)檢索中確認了與已知的其他大鼠 mRNA 不具有相同性。

(2) VA-lip siRNA 之製備

自北海道 System Science 公司 (札幌, 日本) 購入陽離子性微脂粒 (LipoTrust) 來作為陽離子性脂質, 該陽離子性微脂粒是以 4:3:3 的莫耳比含有氯化 O,O'-二(十四烷醯基)-N-(α -三甲基銨基乙醯基)二乙醇胺 (DC-6-14)、膽固醇、及二油基磷脂醯乙醇胺 (DOPE)。微脂粒是藉由在使用前於攪拌條件下在經冷凍乾燥的脂質混合物中添加再蒸餾水 (DDW), 而製備為 1mM (DC-6-14) 的濃度。將溶解於 DMSO 中之 200 nmol 的維生素 A (視黃醇, Sigma 公司, USA) 與微脂粒懸浮液 (DC-6-14 為 100 nmol), 於

1.5 ml 管中以 25℃ 一邊攪拌、一邊進行混合，以製備 VA（維生素 A）結合微脂粒。在室溫下，一邊攪拌視黃醇結合微脂粒溶液、一邊在其中添加 siRNA_{g46} 溶液（在 DDW 中為 580 pmol/ μ l），以製備承載 siRNA_{g46} 之 VA 結合微脂粒（VA-lip-siRNA_{g46}）。siRNA 與 DC-6-14 的莫耳比為 1:11。為了獲得適合在試管內使用的用量，將 VA-lip siRNA 以磷酸緩衝生理食鹽水（PBS）進行再配製（reconstitution）。

[實施例 2] 於肝纖維化模式大鼠中進行的再生治療實驗

（1）肝纖維化模式大鼠之製作

肝纖維化模式大鼠，是對雄性 SD(Sprague-Dawley，史道二氏)大鼠（體重 150~200 g）（Slc Japan 公司，靜岡，日本）施以總膽管結紮而製作，將結紮後第 28 日的個體提供於本實驗。在本模式大鼠中，由於總膽管結紮而導致發生膽汁阻塞，肝組織呈現持續地暴露在纖維化刺激中的狀態。

（2）GFP(green fluorescent protein，綠色螢光蛋白)標記大鼠肝幹細胞之製備

GFP 標記大鼠肝幹細胞，是自 4 週齡的 GFP 基因導入大鼠（Slc Japan 公司）的肝臟取得。首先，對 GFP 基因導入大鼠灌注 EGTA(ethylene glycol tetraacetic acid，乙二醇四乙酸酯)溶液及膠原蛋白酶溶液之後，摘取肝臟，將所摘取之肝臟細切之後以細胞篩網(cell strainer)（孔徑為 100 μ m）過濾。於所獲得之細胞懸浮液中添加 Hank 平衡鹽溶

液 (HBSS) + 0.25% 牛血清白蛋白 (BSA) 溶液，於 4°C 以 500 rpm 離心 2 分鐘。取上清液，於 4°C 以 1300 rpm 離心 5 分鐘。去除上清液之後，對沈澱物添加 MACS^(R) (Magnetic Activating Cell Sorting, 磁力活化細胞分類) 緩衝液 (Miltenyi Biotec 公司, Auburn, CA, USA) 並混合。計算細胞數之後，使用 FITC 結合小鼠抗 CD45 抗體 (BD Pharmingen)、兔抗 CD133 多株抗體 (Abcam 公司)、及小鼠抗 EpCAM (epithelial cell adhesion molecule, 上皮細胞黏著分子) 單株抗體 (Santa Cruz 公司) 來進行 MACS^(R)，取 CD133 陽性、EpCAM 陽性、CD45 陰性細胞，而使用於本實驗中作為大鼠肝幹細胞。

(3) 肝纖維化模式大鼠之處置

將 (2) 中製備的 GFP 標記肝幹細胞，以在 200 μ l 的 DME/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (杜爾貝可改良伊格爾培養基)/Nutrient F-12 Ham) 培養基中為 2×10^6 個的濃度，局部移植至 (1) 所製作的肝纖維化模式大鼠中。

從肝幹細胞移植後的第 24 小時起，每隔 1 日、共計 12 次，以尾靜脈投予：維生素 A 結合微脂粒內包 siRNA_{Agp46} (VA-lip siRNA_{Agp46}) 或作為對照 (mock) 的 VA-lip siRNA_{scramble}。所投予的 siRNA 的濃度，是使用相對於大鼠體重為 0.75 mg/kg 的濃度。維生素 A、微脂粒 (LipoTrust, 北海道 System Science 公司, 札幌, 日本) 及 siRNA 的莫耳比是設為 11.5 : 11.5 : 1。

(4) 組織染色

在(3)之第12次投予 VA-lip siRNA_{Agp46} 結束後之24小時後(亦即總膽管結紮後第52日),摘取經移植表現了 GFP 之肝幹細胞的總膽管結紮大鼠的肝臟。用 OCT(Optimal Cutting Temperature, 最佳切割溫度)複合物(冰凍切片包埋劑)來包埋所摘取的肝臟之後,製作冷凍切片。以4%聚甲醛(paraformaldehyde)來固定肝臟切片。部分的切片是藉由一般方法來進行 Azan 染色。對其他部分的切片,以含5%山羊血清之 PBS 進行阻斷(blocking),以 PBS 清洗之後,使用下述抗體於 4°C 進行反應一個晚上:小鼠抗 α 平滑肌動蛋白(α -SMA)單株抗體(Sigma 公司)、小鼠抗神經膠質纖維酸性蛋白(GFAP)單株抗體(Sigma 公司)、兔抗白蛋白多株抗體(MP Biomedicals 公司)、小鼠抗 CK19 單株抗體(Novocastra 公司)或小鼠抗血管內皮鈣黏素(ve-CAD, Vascular Endothelial Cadherin)單株抗體(Santa cruz 公司)。以 PBS 清洗之後,於室溫下與 Alexa555 標記山羊抗小鼠 IgG 抗體或 Alexa555 標記山羊抗兔 IgG 抗體(均來自 Invitrogen 公司)進行反應 60 分鐘。以 PBS 清洗之後,使用 ProLong^(R) Gold with DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole, 4',6-二脒基-2-苯基吲哚)(Invitrogen 公司)來封入,以螢光顯微鏡進行觀察。部分的切片,在與 α -SMA 抗體(Dako 公司)進行反應之後,不進行與山羊抗兔抗體之反應,而是以二胺基聯苯胺(DAB)進行顯色,再進一步以蘇木素(hematoxylin)進行細胞核染色。

[結果]

第 1 圖是顯示從受試大鼠摘取之肝臟的外觀及其代表性切片的 Azan 染色影像。投予 VA-lip siRNA scramble 的組中，肝臟萎縮且表面不平整，組織中則可見到在 Azan 染色影像中被染色為藍色的細胞外基質大範圍地蓄積，肝小葉的結構也很凌亂。相對於此，在投予 VA-lip siRNA Agp46 的組中，並未見到外觀性的萎縮，表面平滑，組織中則幾乎未見到細胞外基質蓄積，可見到其纖維化區域相較於 VA-lip siRNA scramble 投予組而明顯地縮小。而且，可以明確地辨識到從中央靜脈起放射狀地散列著竇狀隙 (sinusoid) 的正常肝小葉結構已經恢復。

第 2 圖是 α -SMA 抗體的 DAB 染色影像。藍色的部分是表示以蘇木素染色的細胞核，深褐色的部分是 α -SMA 陽性區域。 α -SMA 已知是作為活性化星狀細胞的標識物，被認為在 α -SMA 陽性區域存在有活性化星狀細胞。在 VA-lip siRNA Agp46 投予組中，可見到活性化星狀細胞相較於 VA-lip siRNA scramble 組而顯著減少。

第 3 圖是顯示在 GFP 標記肝幹細胞移植部位中之 DAPI 及 GFP 的螢光影像。VA-lip siRNA Agp46 投予組中在約 80% 的區域中可見到 GFP 的顯色，相較於此，VA-lip siRNA scramble 投予組中則幾乎未觀察到 GFP 的顯色。

第 4 圖是 GFP 標記肝幹細胞移植部位的明視野影像與 GFP 螢光影像。在 VA-lip siRNA scramble 投予組中，特別是在血管周圍等處，由於細胞外基質的沉積而導致細胞的

形狀模糊，竇狀隙也雜亂地散列，相對於此，在 VA-lip siRNA_{Agp46} 投予組中，可見到清晰的細胞形狀以及從中央靜脈起放射狀地散列的竇狀隙結構。而且，在 VA-lip siRNA_{scramble} 投予組中並未見到 GFP 的顯色，相對於此，在 VA-lip siRNA_{Agp46} 投予組中則在組織整體均可見到 GFP 的顯色。

第 5 圖是將 VA-lip siRNA_{Agp46} 投予組中的 DAPI、GFP 之螢光影像與由 GFAP 抗體所得之螢光染色影像互相比較的照片（第 5A 圖的倍率是 200 倍，第 5B 圖的倍率是 400 倍）。GFAP 是一種已知是作為休止狀態之肝臟星狀細胞的標識物的蛋白質。表現了 GFAP 的細胞並未表現 GFP。

第 6 圖是以倍率 200 倍來將在 VA-lip siRNA_{Agp46} 投予組中的 DAPI、GFP 之螢光影像與由 α -SMA 抗體所得之螢光染色影像互相比較的照片。表現了 α -SMA 的細胞並未表現 GFP。第 5 圖及第 6 圖的結果，暗示了肝臟星狀細胞並非來自肝幹細胞的細胞。

第 7 圖是以倍率 200 倍來將在 VA-lip siRNA_{Agp46} 投予組中的 DAPI、GFP 之螢光影像與由白蛋白抗體所得之螢光染色影像互相比較的照片。白蛋白是肝臟實質細胞的標識物，表現了 GFP 的細胞，大多數也表現了白蛋白。

第 8 圖是以倍率 200 倍來將在 VA-lip siRNA_{Agp46} 投予組中的 DAPI、GFP 之螢光影像與由 CK19 抗體所得之螢光染色影像互相比較的照片。CK19 是膽管上皮細胞的標識物，構成膽管的 CK19 陽性細胞中，表現了 GFP。

第 9 圖是將 VA-lip siRNA_{g46} 投予組中的 DAPI、GFP 之螢光影像與由 ve-CAD 抗體所得之螢光染色影像互相比較的照片(第 9A 圖的倍率是 200 倍,第 9B 圖的倍率是 400 倍)。ve-CAD 已知是作為血管上皮細胞的標識物,在表現了 GFP 的部分細胞之中,觀察到表現了 ve-CAD 的細胞。

第 10 圖是以倍率 200 倍來將在 VA-lip siRNA_{g46} 投予組之未進行細胞移植的部位中的 DAPI、GFP 之螢光影像與由白蛋白抗體所得之螢光染色影像互相比較的照片。在未進行細胞移植的部位中,並未觀察到 GFP 表現細胞。

[討論]

表現 GFP 的細胞是來自所移植之肝幹細胞的細胞,所以表示藉由投予 VA-lip siRNA_{g46},在細胞移植部位中,纖維化區域縮小,且肝幹細胞也分化為肝臟實質細胞、膽管上皮細胞、及血管上皮細胞,藉此再生正常的肝臟組織。亦即,明顯可知,藉由投予 VA-lip siRNA_{g46} 所進行的治療,不僅會治癒肝纖維化症,也會誘發肝臟再生。而且,在 VA-lip siRNA_{scramble} 投予組中無法檢測出肝幹細胞之事實(第 3 圖),暗示了由 VA-lip siRNA_{g46} 所造成的纖維化區域縮小,是與肝幹細胞的增殖、分化有深切的關連。

[實施例 3] 由 VA 所造成的星狀細胞特異性輸送

(1) 大鼠胰臟星狀細胞(PSC)之單離

依照已知方法(Apte et al. Gut 1998;43:128-133),使用濃度梯度離心法來單離出大鼠胰臟星狀細胞(PSC)。

純度是以免疫細胞化學法來分析，免疫細胞化學法是使用下述來進行：顯微鏡觀察、內源性 VA 的本身螢光、以及針對肌間線蛋白(desmin)之單株抗體(1:25, Dako 公司)，上述肌間線蛋白也就是肌肉肌動蛋白交聯蛋白質。細胞的存活率是以錐蟲藍(trypan blue)排除來分析。細胞純度及存活率均超過 95%。細胞是在添加 10%胎牛血清(FBS)的伊思考夫改良杜爾貝可培養基(Iscove's modified Dulbecco's medium, IMDM)中，於 37°C、95%空氣/5%CO₂的加濕環境下培養。

(2) VA-lip siRNA_gp46-FAM 的細胞內分佈分析

將大鼠 pPSC (初級胰臟星狀細胞, primary PSC) 播種於 Lab-Tek 腔室蓋玻片(Lab-Tek chamber cover glass)上並使其為每個腔室成為 1×10^4 個。將 VA-lip siRNA_gp46-FAM 或 Lip siRNA_gp46-FAM 添加至細胞，並使最終 siRNA 濃度成為 50 nM。以含有 10%FBS 之 DMEM 將細胞培養 30 分鐘，將培養基更換為新鮮的培養基。在處理後 30 分鐘及 2 小時，以 PBS 將細胞清洗 3 次，以 4%聚甲醛於 25°C 處理 15 分鐘而進行固定。固定後，以 PBS 將細胞清洗 3 次，於 ProLong^(R) Gold with DAPI (Invitrogen 公司) 中暴露 1 分鐘而進行細胞核染色。使用螢光顯微鏡 (Keyence 公司, BZ-8000) 來分析 FAM 標記 siRNA_gp46 的細胞內局部存在情形。

(3) VA-lip siRNA_gp46-FAM 之 FACS (Fluorescence-activated Cell Sorter, 螢光活化細胞分類計)

分析

在 10%FBS 存在下，以 VA-lip siRNA_{gp46}-FAM (50nM 的 siRNA) 處理大鼠 pPSC (1×10^4 個)，並培養 30 分鐘。為了進行阻斷分析 (blocking assay)，在添加 VA-lip siRNA_{gp46}-FAM 之前，先以小鼠抗 RBP 抗體 (10 μ g/ml, BD Pharmingen) 或小鼠 IgG₁ 也就是陰性對照 (10 μ g/ml, Dako 公司) 將 1×10^4 個細胞處理 30 分鐘。使用 FACScalibur with CellQuest 軟體 (Becton Dickinson 公司) 來分析經 VA-lip siRNA_{gp46}-FAM 處理之細胞的平均螢光強度 (MFI)。

(4) 西方墨點法

為了評估 siRNA_{gp46} 的基因抑制 (knockdown) 效果，而進行西方墨點法實驗。具體而言，是將分別經以 VA-lip siRNA_{gp46} (1 nM、5 nM、50 nM)、VA-lip siRNA_{random} (50 nM) 及 Lip siRNA_{gp46} (50 nM) 處理 30 分鐘之 PSC 的蛋白質萃取物以 4/20 SDS (sodium dodecyl sulfate, 十二烷基硫酸鈉)-聚丙稀醯胺凝膠來分離，轉印至硝基纖維素膜上，以針對 HSP47 (gp46) 之抗體 (Stressgen) 或針對 β -肌動蛋白之抗體 (Cell Signaling 公司) 來偵測 (probe) 之後，以結合有過氧化酶之抗體 (Oncogene Research Product 公司, Boston, MA) 標記為二級抗體。最後，以 ECL 西方墨點法檢測系統 (Amersham Life Science 公司, Arlington Heights, IL) 使細胞可見化。

又，為了確認 gp46 之表現抑制的持續時間，以 VA-lip

siRNA_{Agp46} (50 nM) 將 PSC 進行 30 分鐘處理之後，再培養 24 小時、48 小時、72 小時及 96 小時，之後萃取蛋白質，然後與以 VA-lip siRNA_{Random} (50 nM) 處理 30 分鐘後的細胞，一起如同上述般地進行西方墨點法實驗。

(5) 膠原蛋白生成之定量

以在含 10%FBS 之 DMEM 中為 5×10^4 個／孔(well)的密度，將大鼠 pPSC 播種於 6 孔之組織培養盤。經 24 小時之培養後，以 VA-lip siRNA_{Agp46} (50 nM 之 siRNA) 或 VA-lip siRNA_{Random} (50 nM 之 siRNA) 將大鼠 pPSC 進行處理。在含有 10%FBS 之 DMEM 中將細胞培養 30 分鐘，之後將培養基更換為新鮮的培養基。處理 72 小時之後，以 PBS 將細胞清洗 3 次，依照已知方法 (Williams et al. Gut 2001;49:577-583)，以天狼星紅(Biocolor 公司，Belfast，UK)將沉積於孔中的膠原蛋白加以染色。將未結合的染料清洗去除，並使結合複合物溶解於 0.5%的氫氧化鈉中。以 540 nm 的吸光光度分析來將膠原蛋白進行定量，將結果以相對於未處理之對照組的百分率來表示。

[結果]

第 11 圖表示被 FAM 標記之 siRNA 的細胞內分佈的螢光影像。左邊的 2 個圖是經以 VA-lip siRNA_{Agp46}-FAM 處理之 PSC 的螢光影像，右邊的 2 個圖是經以 Lip siRNA_{Agp46}-FAM 處理之 PSC 的螢光影像。上面的 2 個圖分別是在處理後 30 分鐘之後的影像，下面的 2 個圖是在處理後 2 小時之後的影像。在 VA-lip siRNA_{Agp46}-FAM 處理組

中，在處理後 30 分鐘在細胞質內觀察到模糊的顆粒狀圖案的 FAM 的綠色螢光，在處理後 2 小時則在細胞核周邊區域觀察到較濃的顆粒狀圖案。相較於此，在 Lip siRNA_{gp46}-FAM 處理組中，在處理後 30 分鐘並未觀察到綠色螢光，在處理後 2 小時則在細胞核周邊有模糊的螢光。

第 12 圖是表示 FACS 分析之結果的圖表。由上起依序分別表示未處理組、Lip siRNA_{gp46}-FAM 處理組、VA-lip siRNA_{gp46}-FAM 處理組、VA-lip siRNA_{gp46}-FAM + RBP 抗體處理組、Lip siRNA_{gp46}-FAM + RBP 抗體處理組的結果。FACS 分析的結果，在 VA-lip siRNA_{gp46}-FAM + RBP 抗體處理組中，相較於 VA-lip siRNA_{gp46}-FAM 處理組，其螢光強度是被抑制在與 Lip siRNA_{gp46}-FAM 處理組相同程度，這暗示著 VA-lip siRNA_{gp46} 被 PSC 攝入的方式，是屬於 RBP 受體媒介性質的攝入方式。

第 13A 圖表示出顯示由濃度所造成之抑制效果差異的西方墨點法之結果。經 VA-lip siRNA_{gp46} 處理過的細胞中，可觀察到 gp46 的表現隨著 VA-lip siRNA_{gp46} 之濃度而被抑制，在 50 nM 中其表現幾乎完全被抑制，相對於此，在 VA-lip siRNA_{random} 組及 Lip siRNA_{gp46} 組中則並未觀察到 gp46 的表現受抑制的情形。

第 13B 圖表示確認抑制效果持續時間的西方墨點法的結果。以 VA-lip siRNA_{gp46} 處理的情形中，直到處理後培養 72 小時的細胞為止，均可觀察到 gp46 顯著地受到抑制。因此可以確認到，gp46 的表現抑制效果會持續至處理後至

少 72 小時為止。

第 14 圖是將未處理細胞以及分別經以 VA-lip siRNA_{gp46} 及 VA-lip siRNA_{random} 處理之細胞在 72 小時後的膠原蛋白生成量來加以定量而得的圖表。經以 VA-lip siRNA_{gp46} 處理的情形中，相較於未處理細胞及經以 VA-lip siRNA_{random} 處理之細胞，可確認到顯著抑制膠原蛋白生成的情形。

[討論]

由上述結果可知，在試管內，VA-lip siRNA_{gp46} 會藉由 RBP 受體媒介性質的攝入方式而被特異地攝入至 PSC 中而抑制 gp46 之表現，結果顯著地抑制膠原蛋白之生成。這暗示 VA-lip siRNA_{gp46} 能夠在患有胰臟纖維化症的胰臟中減少膠原蛋白。

[實施例 4] 在胰臟纖維化模式大鼠中的再生治療實驗

(1) 胰臟纖維化模式大鼠之製作

使用體重為 150~200 g 的雄性 Lewis 大鼠 (Charles River 公司)。依照已知方法 (Inoue et al. Pancreas 2002;25:e64-70)，使二丁基二氯化錫 (DBTC) 溶解於 1 份乙醇中之後，與 2 份甘油及 2 份二甲基亞砷 (DMSO) 混合而製備溶液 (DBTC 溶液)，再使用針筒自大鼠右頸動脈投予相當於 5 mg (DBTC) / kg (體重) 的量。

(2) 大鼠胰臟及其他組織中的 VA-lip siRNA_{gp46}-FITC 之活體內 (in vivo) 局部存在

在從 DBTC 投予開始 43 日之後，觀察到嚴重的胰臟纖維化時，對 DBTC 處置大鼠自尾靜脈投予 $1 \mu\text{g/g}$ 體重的 VA-lip siRNA_{Agp46}-FITC 或 Lip siRNA_{Agp46}-FITC。投予是在常壓下進行，每隔 1 日投予 3 次，每次投予 0.75 mg/kg 的 siRNA。在最後一次投予的 24 小時之後，藉由灌注生理食鹽水而將大鼠犧牲，摘取胰臟及其他臟器（肝臟、肺臟、脾臟及視網膜）。將臟器標本以 10% 聚甲醛加以固定，使用 Azan-Mallory 染色法將石蠟包埋切片加以染色。藉由分別使用了抗 α -SMA 單株抗體（1:1000，Sigma 公司）、抗 CD68 抗體（1:500，Dako 公司）及抗 FITC 抗體（1:500，Abcam 公司）的葡聚糖聚合物法，以及藉由 Envision Kit（Dako 公司）來進行免疫組織染色，接著進行藉由 DAB（和光純藥工業公司，大阪，日本）所進行的顯色及藉由吉爾氏蘇木素 (Gill's Hematoxylin) 染色液（和光純藥工業公司）所進行的細胞核染色。

（3）西方墨點法

為了評估活體內的由 siRNA_{Agp46} 所進行之表現抑制的持續時間，對於靜脈內投予 VA-lip siRNA_{Agp46} 後 0、1、2、3、4 日之後從胰臟取得的蛋白質萃取物，與實施例 3 之（4）同樣地進行西方墨點法。

（4）活體內的 siRNA_{Agp46} 處置

將 3 組大鼠（每組 $n=6$ ）用於組織學評估。於 DBTC 投予 43 日之後，分別以 PBS、VA-lip siRNA_{random} 及 VA-lip siRNA_{Agp46} 投予 10 次（ 0.75 mg/kg 的 siRNA，每隔 1 日投

予 3 次) 將各組進行處置。全部的投予均是在常壓下自尾靜脈以 1 μ l/g 體重的量來進行。將胰臟以 10% 聚甲醛來固定，並以石蠟包埋後，使用 Azan-Mallory 染色法及蘇木素-伊紅(hematoxylin-eosin)染色法將切片加以染色。藉由使用了抗 α -SMA 單株抗體 (1:1000, Sigma 公司) 的葡聚糖聚合物法，以及藉由 Envision Kit (Dako 公司) 來進行免疫組織染色，接著進行藉由 DAB (和光純藥工業公司，大阪，日本) 所進行的顯色及藉由吉爾氏蘇木素染色液 (和光純藥工業公司) 所進行的細胞核染色。為了將由 Azan-Mallory 染色法、蘇木素-伊紅染色法及 α -SMA 所造成的染色區域正確地定量，對各大鼠胰臟切片均隨機選擇 6 個低倍率視野 ($\times 100$)，以顯微鏡 (Axioplan 2, Carl Zeiss 公司) 進行觀察。藉由使用了數位電視攝影系統 (Axiocam High Resolution color, Carl Zeiss 公司) 的錄影記錄系統來拍攝數位影像。使用自動軟體分析程式 (KS400, Carl Zeiss 公司) 來決定數位顯微鏡照片中藉由 Azan-Mallory 染色法及 α -SMA 所染色之區域的比例。

(5) 羥脯胺酸分析

羥脯胺酸的含量，是依據已知方法 (Weidenbach et al. Digestion 1997;58:50-57)，藉由 Weidenbach 法來決定。簡潔說來，是將胰臟的細胞破碎物以 3000 rpm 離心 15 分鐘，再使沈澱塊(pellet)在 6N 的 HCl 中以 16 小時、96°C 完全地水解，並將 pH 調節至 6.5~7.5 之後，再度離心(以 3000 rpm 離心 15 分鐘)。使 25 μ l 的等分試樣(aliquot)於 60°C 中乾

燥，使沈澱物溶解於 1.2 ml 的 50%異丙醇中，以 200 ml 的含 0.56%氯胺 T 溶液(chloramine T Solution) (Sigma 公司)之乙酸-檸檬酸緩衝液在 pH 6.0 中進行培養。於 25°C 培養 10 分鐘之後，添加 1 ml 的 Ehrlich 試劑，於 50°C 中將混合物培養 90 分鐘。冷卻後，測量 560 nm 波長的吸光度。

(6) 胰臟細胞破碎物中的膠原蛋白酶活性

膠原蛋白酶活性的測量，是藉由已知方法(Iredale et al. J.Clin.Invest. 1998;102:538-549)的變化方法來進行。簡潔說來，是將摘取自野生型大鼠及胰臟纖維化模式大鼠且經液態氮冷凍的胰臟，在含有絲胺酸蛋白酶阻礙劑及硫醇蛋白酶(thiol protease)阻礙劑 (PMSF 0.1 mM、亮抑酶肽(leupeptin) 10 μ M、胃酶抑素 A (pepstatin A) 10 μ M、抑肽酶(aprotinin) 25 μ g/ml、碘乙醯胺 0.1 mM) 的樣品緩衝液 (50 mM Tris、pH 7.6、0.25% Triton X-100、0.15 M NaCl、10 mM CaCl_2) 中且在冰上進行破碎。將細胞破碎物以 4°C、14000 g 離心 30 分鐘，並去除細胞殘屑及蛋白質凝集物。使用 EnzCheck Collagenase Assay Collagen Conjugate kit (Molecular Probes 公司)，並依照使用說明書來決定胰臟細胞破碎物中的膠原蛋白酶活性。使用適當的陰性對照及陽性對照 (細菌性膠原蛋白酶) 同時進行分析，以每 mg 蛋白質所分解膠原蛋白的螢光 (以相較於血清白蛋白標準的 280 nm 光學濃度來決定) 來表示結果。

[結果]

關於在胰臟之各連續區段(section)中將活性化星狀細

胞及 siRNA_{gp46}-FITC 進行免疫染色的結果，VA-lip siRNA_{gp46}-FITC 投予組中，在聚集了活性化星狀細胞（ α -SMA 陽性的細胞）的區域中鑑別到 FITC 陽性的細胞，相對於此，Lip siRNA_{gp46}-FITC 投予組中則僅在 α -SMA 陽性區域中鑑別到極少數的 FITC 陽性細胞（第 15A 圖及第 15B 圖）。

在 α -SMA 陽性區域中的 FITC 陽性細胞，也可以在肝臟標本中觀察到（第 15C 圖）。此結果，與藉由 DBTC 不僅能誘導胰臟纖維化且也能誘導肝硬化的認知一致。在大鼠的包括肺臟及脾臟在內的其他臟器中，浸潤有巨噬細胞的區域（CD68 陽性細胞）中僅有極少數的經 FITC 染色的細胞（第 15D 圖及第 15E 圖），這暗示著是由巨噬細胞所造成的 siRNA_{gp46}-FITC 之非特異性攝入。視網膜在 FITC 染色中為陰性（第 15F 圖），此結果與在肝硬化中使用 VA-lip siRNA_{gp46}-FAM 的認知一致。此情形，被認為可能是由於血液視網膜屏障的穿透性低，所以眼球建構了獨立的系統。

進行西方墨點法的結果，可確認到即便在活體內的情形中，由 siRNA_{gp46} 所獲得的抑制 gp46 表現的效果也至少可持續 3 日（第 16A 圖及第 16B 圖）。

以 Azan-Mallory 染色法來評估進行了 10 次 VA-lip siRNA_{gp46} 投予的 DBTC 處置大鼠。結果，相對於對照組標本，VA-lip siRNA_{gp46} 投予組的標本中，藉由電腦影像分析而決定的纖維化區域顯著減少（ $P < 0.01$ ）（第 17B 圖）。此結果與顯示在 VA-lip siRNA_{gp46} 投予組之胰臟中

羥脯胺酸明顯受到抑制的數據（第 17C 圖）一致。

為了評估 VA-lip siRNA_{Agp46} 處置後之大鼠胰臟中的星狀細胞變化，而將 VA-lip siRNA_{Agp46} 處置後之大鼠的胰臟標本進行 α -SMA 染色，結果，相較於經處置 Lip siRNA_{Agp46} 及經處置 PBS 之大鼠，經處置 VA-lip siRNA_{Agp46} 之大鼠的 α -SMA 陽性細胞數顯著減少（第 18A 圖及第 18B 圖）。

藉由投予 VA-lip siRNA_{Agp46} 來抑制來自 PSC 之新的膠原蛋白分泌進而改善纖維化，可能是與來自發炎細胞及 PSC 本身的膠原蛋白酶有關，因此，依據此推論而測量野生型大鼠及經 VA-lip siRNA_{Agp46} 處置之 DBTC 處置大鼠的胰臟細胞破碎物中的膠原蛋白酶活性，結果顯示於下表。

[表 1] 大鼠胰臟細胞破碎物中的膠原蛋白酶活性

膠原蛋白酶活性 (螢光 / mg蛋白質之任意單位)			
正常大鼠	20500±300	] N.S.	] N.S.
DBTC大鼠 (第29日)	26300±700		
DBTC大鼠 (第57日)	25400±1000		

數值為平均值±標準偏差 (各組n=5)

如同表 1 所示，DBTC 處置大鼠中的膠原蛋白酶活性與野生型大鼠的膠原蛋白酶活性幾乎相等。

將經 VA-lip siRNA_{Agp46} 處置及經 Lip siRNA_{Agp46} 處置之 DBTC 處置大鼠在第 65 日時的胰臟標本的蘇木素-伊紅染色影像加以比較，則在 VA-lip siRNA_{Agp46} 處置大鼠中，即使並不完全，仍然可觀察到明顯的胰臟組織正常化，相

對於此，在 Lip siRNA_{gp46} 處置大鼠中則並未見到組織正常化（第 19A 圖）。此情形與經 VA-lip siRNA_{gp46} 處置之 DBTC 處置大鼠的胰臟重量轉趨正常的情形（第 19B 圖）一致。

[討論]

有鑑於上述結果，可知藉由以 VA-lip siRNA_{gp46} 進行處置，siRNA_{gp46} 會被特異性地攝入活性化胰臟星狀細胞（aPSC）中而抑制 gp46 的表現，結果抑制來自 aPSC 的膠原蛋白分泌，藉此對胰臟纖維化的改善發揮顯著效果。進而，可能是起因於膠原蛋白分泌減少，而可觀察到 aPSC 顯著減少。而且需特別說明的是，本發明證明了藉由以 VA-lip siRNA_{gp46} 進行處置，不僅可以改善胰臟纖維化，也會誘導胰臟組織再生。若連同上述實施例 2 中的結果一起考量，則這些結果顯示出，藉由減少在纖維化組織中所蓄積的膠原蛋白，而能夠無組織特異性地從纖維化組織再生正常組織。

[實施例 5] 幹細胞之增殖、分化用空間的重要性

將活性化肝臟星狀細胞（aHSC）與各種密度的肝臟前驅細胞共同培養，以探討細胞周圍有無空間對於肝臟前驅細胞之分化所造成的影響。作為肝臟前驅細胞，是使用上述實施例 2 之（2）中所獲得的 GFP 標記大鼠肝幹細胞，作為 aHSC 則是使用將摘取自 SD 大鼠的 HSC 加以培養並繼代 1 次的細胞。aHSC 是如同下述般摘取、培養。首先，

對 SD 大鼠灌注 EGTA 溶液及膠原蛋白酶溶液之後，摘取肝臟，將所摘取的肝臟細切之後，以細胞篩網(孔徑為 100 μm)過濾。於所獲得之細胞懸浮液中添加 HBSS+0.25% BSA 溶液，於 4°C 以 500 rpm 離心 2 分鐘。取上清液，於 4°C 以 1300 rpm 離心 5 分鐘。去除上清液之後，添加 HBSS+0.25% BSA 溶液，並添加 28.7% Nycodenz 溶液 (Axis Shield 公司，Oslo, Norway) 且使 Nycodenz 濃度成為 13.2% 而加以混合。疊層以 HBSS+0.25% BSA 溶液之後，以 4°C、1400 $\times$ g 離心 20 分鐘。離心結束後，取中間層，使用 Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) + 10% 胎牛血清 (FBS) 培養基，培養 5 日。培養第 5 日時進行繼代培養，將該細胞使用於本實驗。

以 5×10^4 個／孔的密度，將 aHSC 播種於細胞培養薄膜 (Cell Culture Insert) (孔徑為 0.4 μm ，BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) 上，使用 DMEM+10%FBS 培養基在培養箱內以 37°C、5%CO₂ 培養 48 小時。播種 aHSC 的 2 日後，以 1×10^4 個／孔 (低密度) 或 5×10^5 個／孔 (鋪滿培養 (confluent)) 的密度，將肝臟前驅細胞播種於內含以 I 型膠原蛋白覆蓋之蓋玻片 (IWAKI 公司，東京，日本) 的 24 孔盤 (BD Falcon)。接著，將含有 aHSC 的上述細胞培養薄膜插入 24 孔盤的孔中，在培養箱內以 37°C、5%CO₂ 共同培養 10 日 (培養基是使用：DME/F12+10%FBS+ITS (10 mg/L 胰島素 + 5.5 mg/L 運鐵蛋白 + 0.67 $\mu\text{g/L}$ 絲胺酸) + 0.1 μM 地塞米松 (dexamethasone) + 10 mM 菸鹼醯胺 + 50 $\mu\text{g/ml}$

β - 巯 乙 醇 + 2 mM L- 麩 胺 酸 + 5 mM Hepes(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, 4-(2-羥基乙基)-1-哌啶乙磺酸)。

共同培養第 10 日時，以抗白蛋白抗體（兔多株抗體，MP Biomedicals 公司）進行免疫染色，使用倒立顯微鏡（Nikon 公司）以 100 倍的倍率拍攝白蛋白陽性集落 (colony)，再使用 NIS-Elements 軟體（Nikon 公司）根據所獲得的影像來計算白蛋白陽性集落的面積。結果顯示於第 20 圖。

在其他實驗中，在共同培養第 10 日時，使用 Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System（Takara 公司，東京，日本），並用微量盤分析儀 (Microplate Reader) (Bio-Rad Laboratories 公司，Hercules, CA, USA) 來進行細胞增殖之測定。結果顯示於第 21 圖。

由第 20 圖顯示的結果可明顯得知，若將 aHSC 與以低密度播種的肝臟前驅細胞共同培養，則肝臟前驅細胞會分化為大量的白蛋白陽性的肝臟實質細胞，但若肝臟前驅細胞是鋪滿培養，則僅有極少數會分化為肝臟實質細胞。另外，單獨培養肝臟前驅細胞時，並不會分化為白蛋白陽性的肝臟實質細胞。而且，如同第 21 圖所示，也明顯可知，以與上述同樣的密度播種肝臟前驅細胞時，鋪滿培養條件的細胞的增殖能力低於低密度條件的細胞。

由以上的結果可理解到，活性化星狀細胞會誘導幹細胞之增殖、分化，以及幹細胞周圍有無物理性空間會對於

幹細胞之增殖、分化造成重要的影響。若一併考量上述各實施例的結果，則顯示出，藉由膠原蛋白減少物質使纖維化組織中的纖維組織縮小，而使幹細胞周圍產生空間，結果將使得幹細胞增殖、分化，並再生正常組織。

【圖式簡單說明】

第 1 圖是顯示從受試大鼠摘取之肝臟的全體外觀及其代表性切片的 Azan 染色影像的照片。

第 2 圖是顯示在從受試大鼠摘取之肝臟的代表性切片中， α -SMA 局部存在的照片。

第 3 圖是顯示在肝幹細胞移植部位中，DAPI 及 GFP 局部存在的螢光影像。

第 4 圖是肝幹細胞移植部位的明視野影像與 GFP 螢光影像。

第 5A 圖是將 VA-lip siRNA_{gfp46} 投予組中的 DAPI、GFP 之螢光影像與由 GFAP 抗體所得之螢光染色影像互相比較的照片（倍率 200 倍）。

第 5B 圖是將 VA-lip siRNA_{gfp46} 投予組中的 DAPI、GFP 之螢光影像與由 GFAP 抗體所得之螢光染色影像互相比較的照片（倍率 400 倍）。

第 6 圖是以倍率 200 倍來將在 VA-lip siRNA_{gfp46} 投予組中的 DAPI、GFP 之螢光影像與由 α -SMA 抗體所得之螢光染色影像互相比較的照片。

第 7 圖是以倍率 200 倍來將在 VA-lip siRNA_{gfp46} 投予組中的 DAPI、GFP 之螢光影像與由白蛋白抗體所得之螢光染色影像互相比較的照片。

第 8 圖是以倍率 200 倍來將在 VA-lip siRNA_{gfp46} 投予組中的 DAPI、GFP 之螢光影像與由 CK19 抗體所得之螢光染色影像互相比較的照片。

第 9A 圖是將 VA-lip siRNA_{gp46} 投予組中的 DAPI、GFP 之螢光影像與由 ve-CAD 抗體所得之螢光染色影像互相比較的照片（倍率 200 倍）。

第 9B 圖是將 VA-lip siRNA_{gp46} 投予組中的 DAPI、GFP 之螢光影像與由 ve-CAD 抗體所得之螢光染色影像互相比較的照片（倍率 400 倍）。

第 10 圖是以倍率 200 倍來將在 VA-lip siRNA_{gp46} 投予組之未移植肝幹細胞的部位中的 DAPI、GFP 之螢光影像與由白蛋白抗體所得之螢光染色影像互相比較的照片。

第 11 圖是顯示大鼠胰臟星狀細胞中被 FAM 標記之 siRNA 的細胞內分佈的螢光影像。

第 12 圖是表示關於被攝入至大鼠胰臟星狀細胞中之 siRNA 的 FACS 分析之結果的圖表；由上方起依序分別表示未處理組、Lip siRNA_{gp46}-FAM 處理組、VA-lip siRNA_{gp46}-FAM 處理組、VA-lip siRNA_{gp46}-FAM + RBP 抗體處理組、Lip siRNA_{gp46}-FAM + RBP 抗體處理組的結果。

第 13 圖是顯示藉由 siRNA_{gp46} 來抑制大鼠胰臟星狀細胞中之 gp46 表現的西方墨點法影像；A 是顯示由 VA-lip siRNA_{gp46} 之濃度所造成的抑制效果的差異，B 是表示抑制效果的持續時間。

第 14 圖是將未處理細胞以及分別經以 VA-lip siRNA_{gp46} 及 VA-lip siRNA_{random} 處理之細胞在 72 小時後的膠原蛋白生成量來加以定量而得的圖表。

第 15 圖是顯示 VA-lip siRNA_{gp46} 對於 DBTC 處置大

鼠中之胰臟星狀細胞的特異性輸送的照片；A 及 B 分別是以 VA-lip siRNA_{gp46}-FITC 及 Lip siRNA_{gp46}-FITC 每 1 日處置 3 次之大鼠的胰臟切片的由抗 α -SMA 抗體及抗 FITC 抗體所得的免疫染色影像；右側的 a~d 的染色影像，是左側染色影像中以相對應之記號來表示的區域的放大影像。C 是以 VA-lip siRNA_{gp46}-FITC 每 1 日處置 3 次之大鼠肝臟切片的由 Azan-Mallory 染色、抗 α -SMA 抗體染色或抗 FITC 抗體染色所得之染色影像；D~F 是將靜脈內投予 VA-lip siRNA_{gp46}-FITC 後 24 小時後之大鼠的肺、脾臟及視網膜，以抗 CD68 抗體或抗 FITC 抗體染色而得的染色影像。

第 16 圖是顯示在 DBTC 處置後第 14 日投予 VA-lip siRNA_{gp46}(siRNA 0.75 mg/kg)之大鼠的 VA-lip siRNA_{gp46} 投予後第 0、1、2、3 及 4 日在胰臟中的 gp46 蛋白質之表現的圖。A 是表示胰臟細胞破碎物的西方墨點法結果，B 是表示以 β -肌動蛋白加以標準化的定量濃度分析之結果。

第 17 圖是顯示在 DBTC 誘導性胰臟纖維化症中的 VA-lip siRNA_{gp46} 之效果的圖；A 是表示投予 10 次 VA-lip siRNA_{gp46}、Lip siRNA_{gp46} 或 PBS 之後的 DBTC 處置大鼠的胰臟切片的 Azan-Mallory 染色影像；B 是將在 A 的 Azan-Mallory 染色影像中顯示陽性的區域藉由電腦影像分析來加以定量而得的圖表；數據是由從每組 6 隻之大鼠中隨機抽出的 6 個視野來計算，並以平均值 $\pm$ 標準差來表示；C 是表示胰臟中之羥脯胺酸的含量的圖表。數據是以平均

值 $\pm$ 標準差來表示。

第 18 圖是顯示在 DBTC 誘導性胰臟纖維化症中之 VA-lip siRNA_{Agp46} 的效果的圖；A 是表示在 VA-lip siRNA_{Agp46} 處置後之 DBTC 處置大鼠的胰臟中的 α -SMA 染色影像；B 是將 A 中之 α -SMA 陽性區域藉由電腦影像分析來加以定量而得的圖表；數據是由從每組 6 隻之大鼠中隨機抽出的 6 個視野來計算，並以平均值 $\pm$ 標準差來表示。

第 19 圖是顯示藉由 VA-lip siRNA_{Agp46} 從纖維化胰臟組織再生正常組織的圖；A 是對於 DBTC 處置大鼠投予 10 次 VA-lip siRNA_{Agp46}（右）及 Lip siRNA_{Agp46}（左）之後的胰臟的蘇木素-伊紅染色影像；下圖是上圖之 a 及 b 區域的各自的放大圖；B 是表示 DBTC 處置大鼠之胰臟重量的圖表。

第 20 圖是顯示幹細胞周圍有無空間對於幹細胞之分化所造成影響的圖表；縱軸是顯示白蛋白陽性集落的面積。

第 21 圖是顯示幹細胞周圍有無空間對於幹細胞之增殖所造成影響的圖表；縱軸是顯示幹細胞的增殖率的指標。

【主要元件符號說明】

無

PI-14661-JP Sequence Listing.txt
序列表SEQUENCE LISTING

<110> 日東電工股份有限公司
<120> 用以從纖維化組織再生正常組織之組成物
<130> F2468NDFM
<150> JP2010-175920
<151> 2010-08-05
<150> JP2010-230020
<151> 2010-10-12
<160> 4
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 27
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> gp46 siRNA 正義股
<400> 1
guuccaccau aagaugguag acaacag 27

<210> 2
<211> 27
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> gp46 siRNA 反義股
<400> 2
guugucuacc aucuuauugu ggaacau 27

<210> 3
<211> 27
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> siRNArandom 正義股
<400> 3
cgauucgcu gaccggcuuc auugcag 27

<210> 4
<211> 27
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> siRNArandom 反義股
<400> 4
gcaaugaagc cggucuagcg aaucgau 27

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫；惟已有申請案號者請填寫)

※ 申請案號：100127765

※ 申請日期：2011 年 8 月 4 日

※IPC 分類：

A61k 31/67 (2006.01)

A61k 31/203 (2006.01)

A61k 38/48 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

用以從纖維化組織再生正常組織之組成物

COMPOSITION FOR REGENERATING NORMAL TISSUE FROM
FIBROTIC TISSUE

二、中文發明摘要：

本發明是關於一種用以從纖維化組織再生正常組織之醫藥組成物及方法，該醫藥組成物中含有膠原蛋白減少物質。藉由本發明，而能夠從纖維化組織治療性地再生正常組織。

三、英文發明摘要：

The present invention relates to a pharmaceutical composition and a method for regenerating a normal tissue from a fibrotic tissue, wherein the pharmaceutical composition comprises a collagen-reducing material. The normal tissue can be therapeutically regenerated from the fibrotic tissue according to the present invention.

七、申請專利範圍：

1. 一種用以從纖維化組織再生正常組織之醫藥組成物，其含有膠原蛋白減少物質。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之醫藥組成物，其中該膠原蛋白減少物質是選自由下述所組成之群組：抑制由膠原蛋白生成細胞所致之膠原蛋白生成的物質、促進膠原蛋白分解的物質、以及將膠原蛋白分解阻礙物質加以抑制的物質。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述之醫藥組成物，其中進而含有標靶藥物，該標靶藥物是針對纖維化組織中之膠原蛋白生成細胞。
4. 如申請專利範圍第 3 項所述之醫藥組成物，其中該標靶藥物是類視色素。
5. 如申請專利範圍第 1 項至第 4 項中任一項所述之醫藥組成物，其中該纖維化組織持續受到纖維化刺激。
6. 如申請專利範圍第 1 項至第 4 項中任一項所述之醫藥組成物，其係用以在幹細胞之增殖、分化用的空間中再生纖維化組織，該空間是因蓄積於纖維化組織中的膠原蛋白

減少所生成。

7. 如申請專利範圍第 2 項至第 4 項中任一項所述之醫藥組成物，其中該抑制由膠原蛋白生成細胞所致之膠原蛋白生成的物質，是選自由下述物質所組成之群組：TGF β 阻礙物質、HGF 或其生成促進物質、PPAR γ 配體、血管收縮素阻礙物質、PDGF 阻礙物質、鬆弛素或其生成促進物質、阻礙細胞外基質成分之生成或分泌的物質、細胞活性抑制物質、細胞增殖抑制物質、以及細胞凋亡誘導物質。

8. 如申請專利範圍第 2 項至第 4 項中任一項所述之醫藥組成物，其中該促進膠原蛋白分解的物質，是膠原蛋白酶或其生成促進物質。

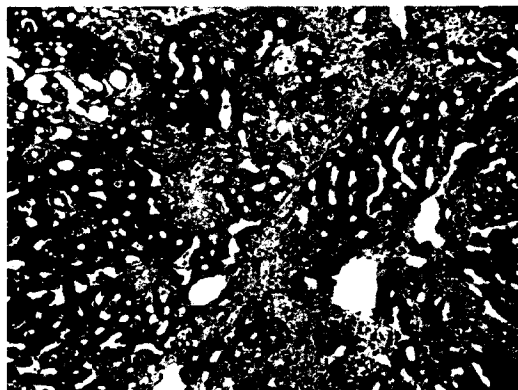
9. 如申請專利範圍第 2 項至第 4 項中任一項所述之醫藥組成物，其中該將膠原蛋白分解阻礙物質加以抑制的物質，是 TIMP(金屬蛋白酶組織抑制因子)阻礙物質。

八、圖式：

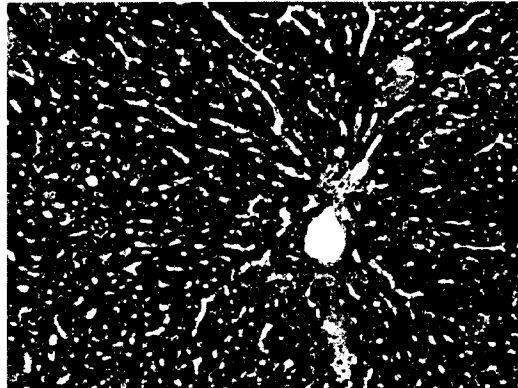
第1圖

對於膽管結紮大鼠之肝幹細胞移植及使用VA-lip siRNA_{g46}之治療

VA-lip siRNA_{scramble}



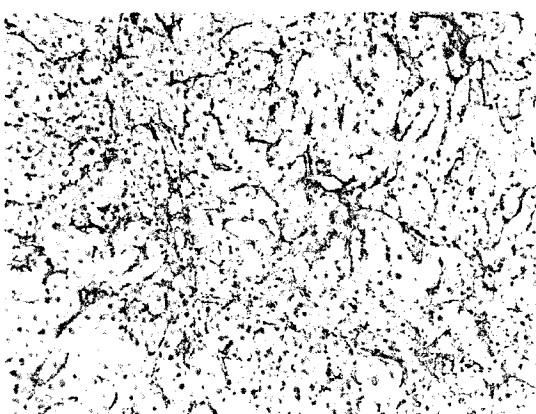
VA-lip siRNA_{g46}



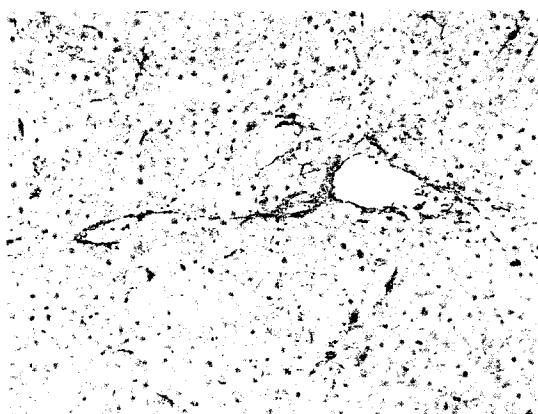
第2圖

α -SMA染色

VA-lip siRNA_{scramble}

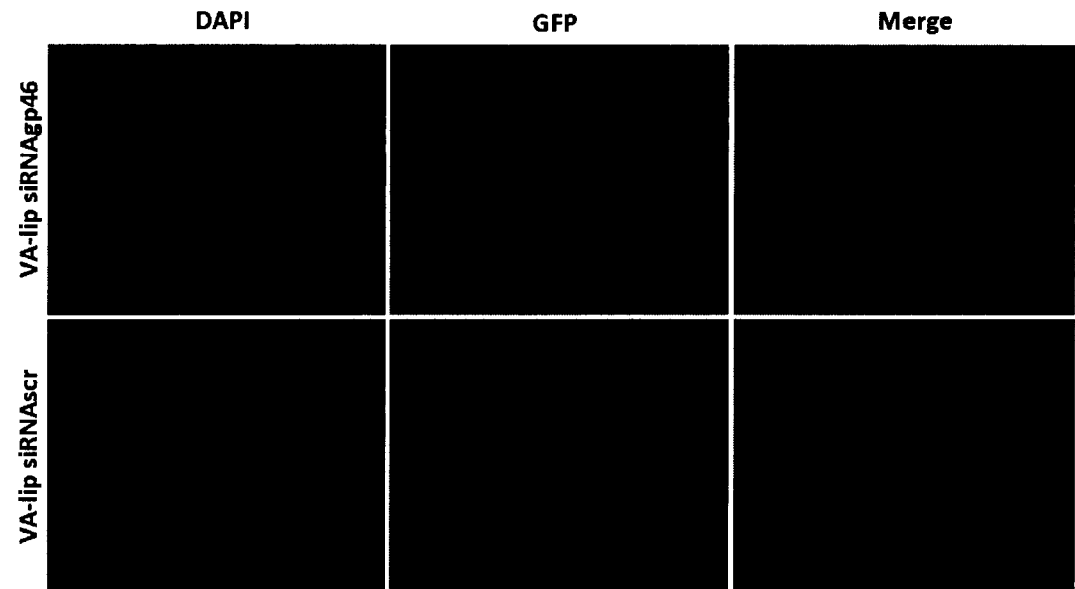


VA-lip siRNA_{g46}



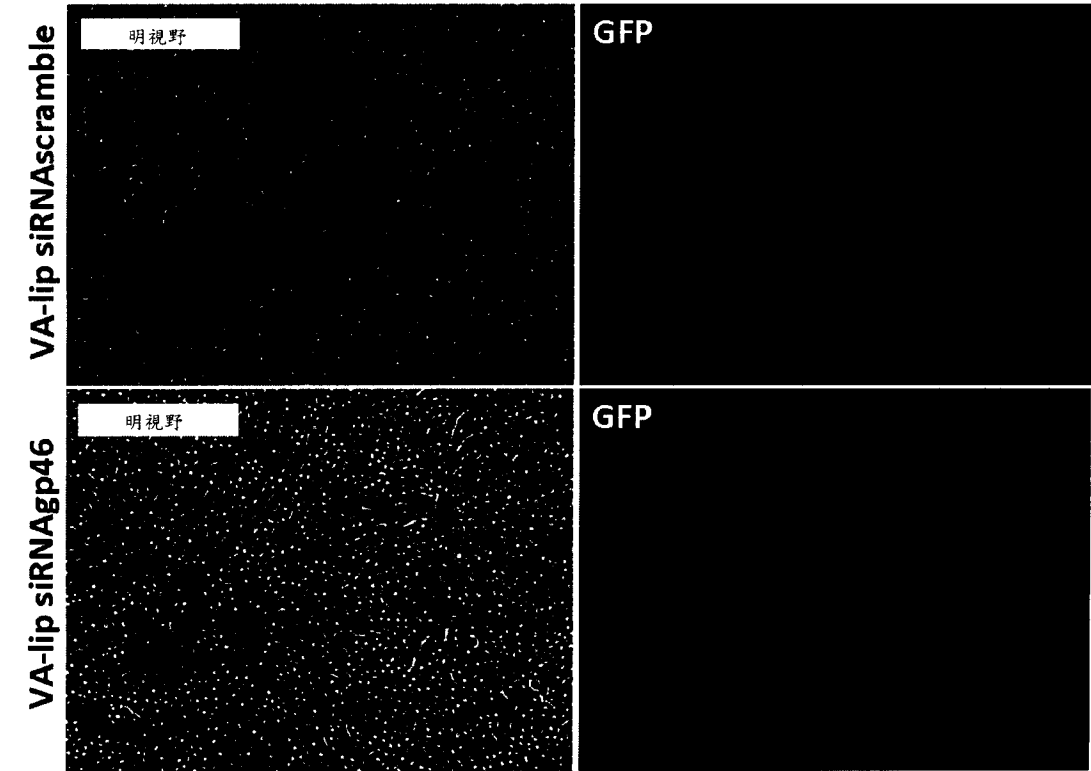
第3圖

對於經移植來自GFP轉殖大鼠的肝幹細胞之BDL大鼠，藉由VA-lip siRNA_{Agp46}所進行之治療
動物：BDL大鼠（經移植分離自GFP轉殖大鼠的肝幹細胞）
siRNA：siRNA_{Agp46}，siRNA_{scramble}
siRNA之投予次數：12次



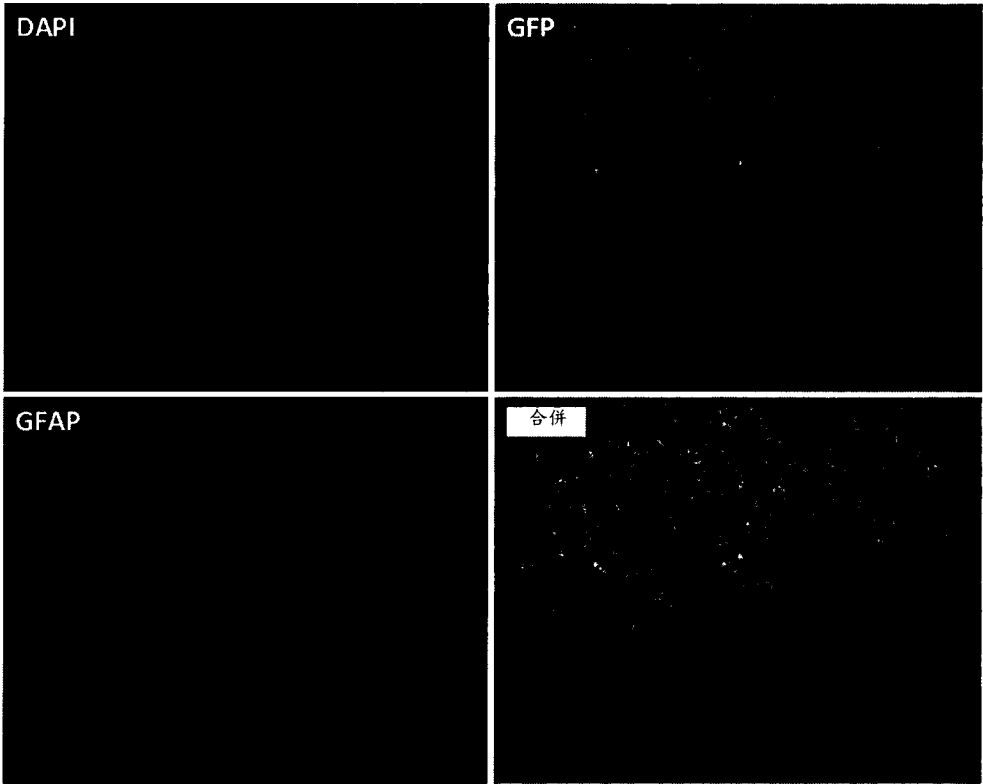
第4圖

對於膽管結紮大鼠之肝幹細胞移植及使用VA-lip siRNA_{Agp46}之治療



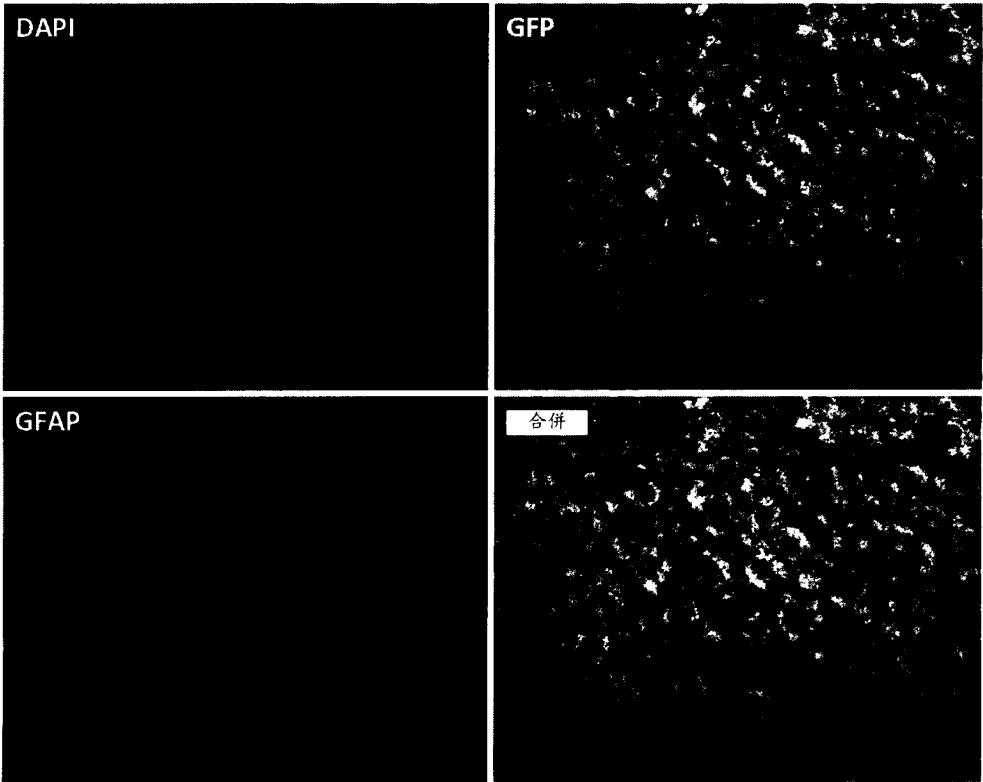
第5A圖

對於經移植來自GFP轉殖大鼠的肝幹細胞之BDL大鼠，藉由VA-lip siRNA_{gfp46}所進行之治療
VA-lip siRNA_{gfp46} (x200) 細胞移植部位：GFAP (休止狀態之HSCs標識物)



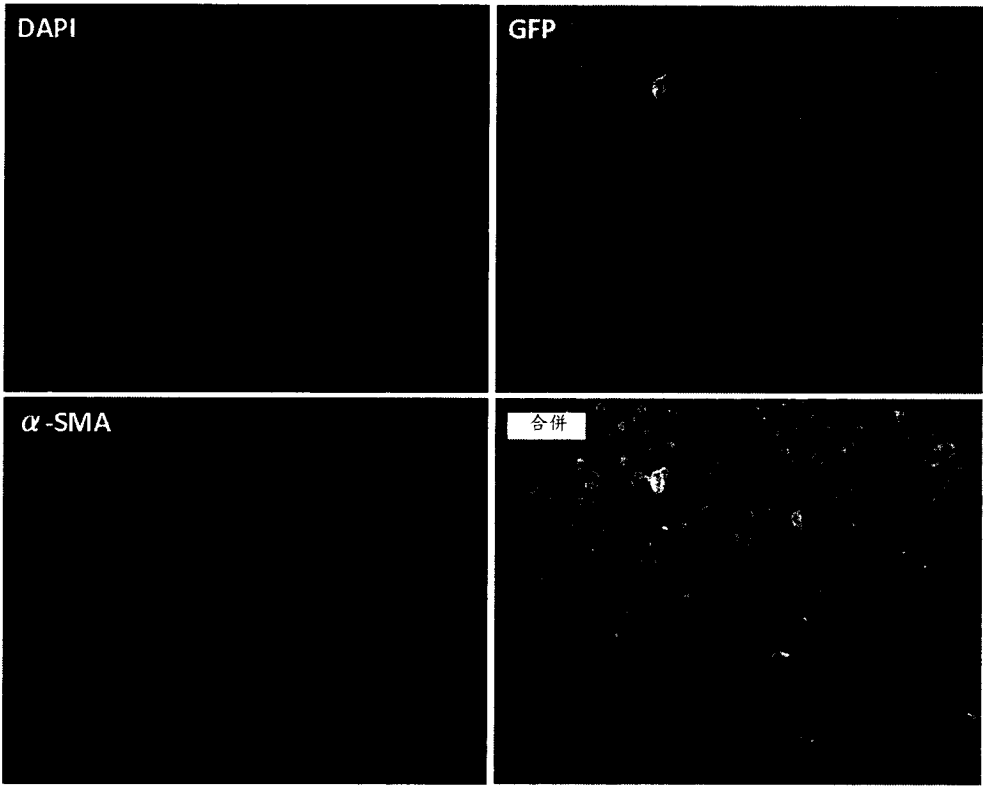
第5B圖

對於經移植來自GFP轉殖大鼠的肝幹細胞之BDL大鼠，藉由VA-lip siRNA_{gfp46}所進行之治療
VA-lip siRNA_{gfp46} (x400) 細胞移植部位：GFAP (休止狀態的HSCs標識物)



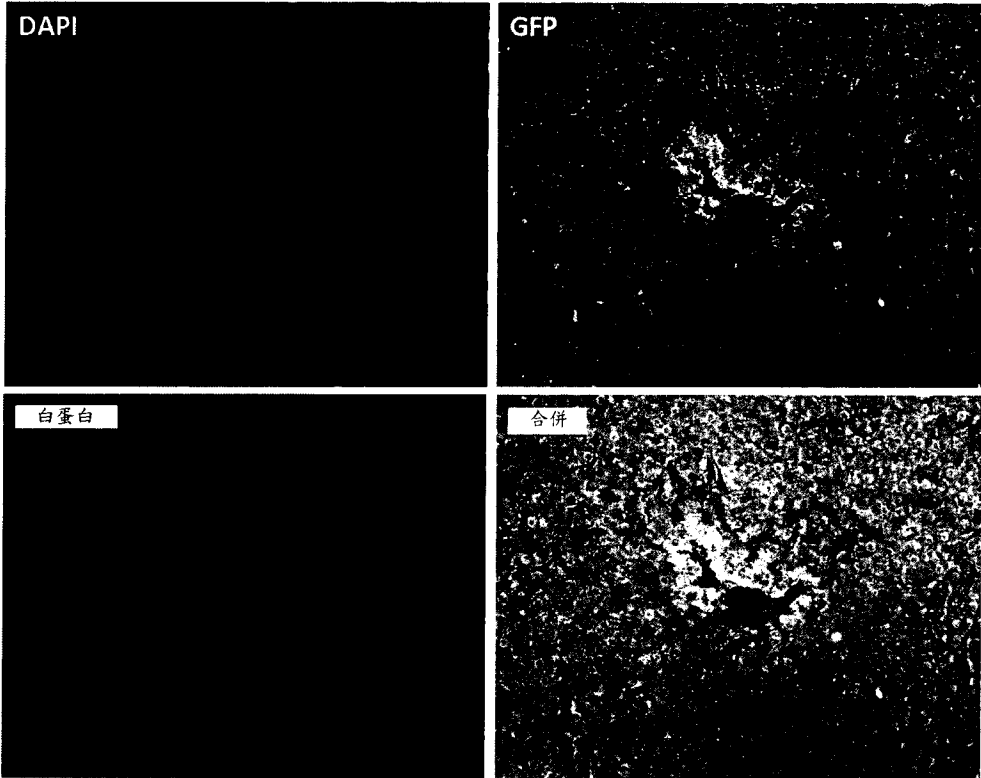
第6圖

對於經移植來自GFP轉殖大鼠的肝幹細胞之BDL大鼠，藉由VA-lip siRNA_{g46}所進行之治療
VA-lip siRNA_{g46} (x200) 細胞移植部位：α-SMA (活性化的HSCs標識物)



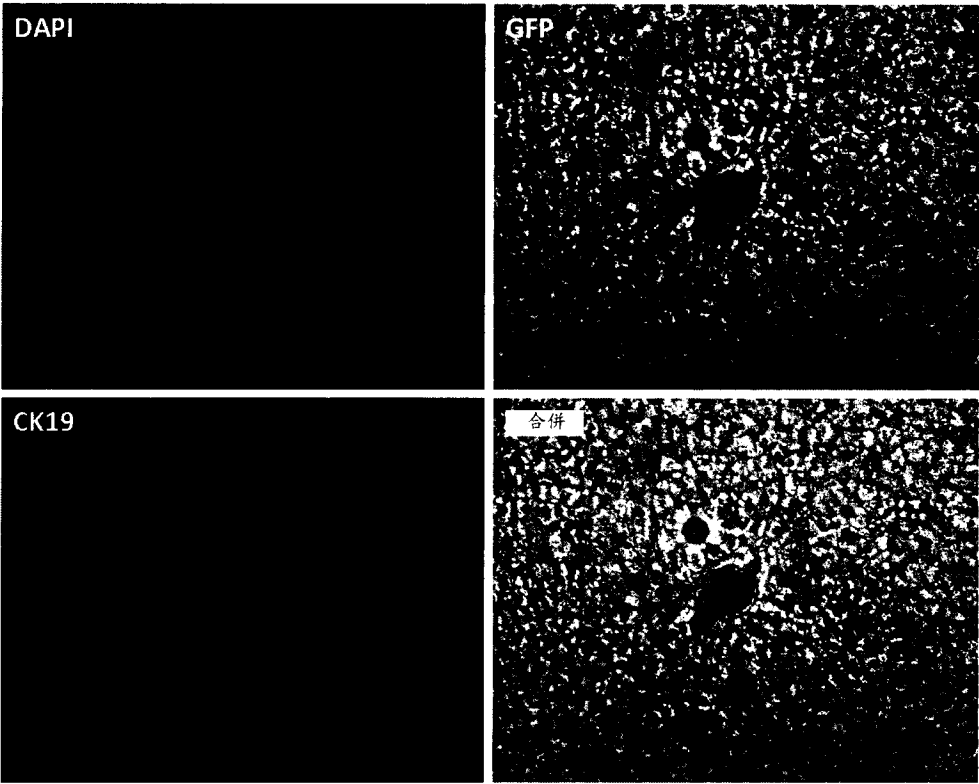
第7圖

對於經移植來自GFP轉殖大鼠的肝幹細胞之BDL大鼠，藉由VA-lip siRNA_{g46}所進行之治療
VA-lip siRNA_{g46} (x200) 細胞移植部位：白蛋白 (肝細胞標識物)



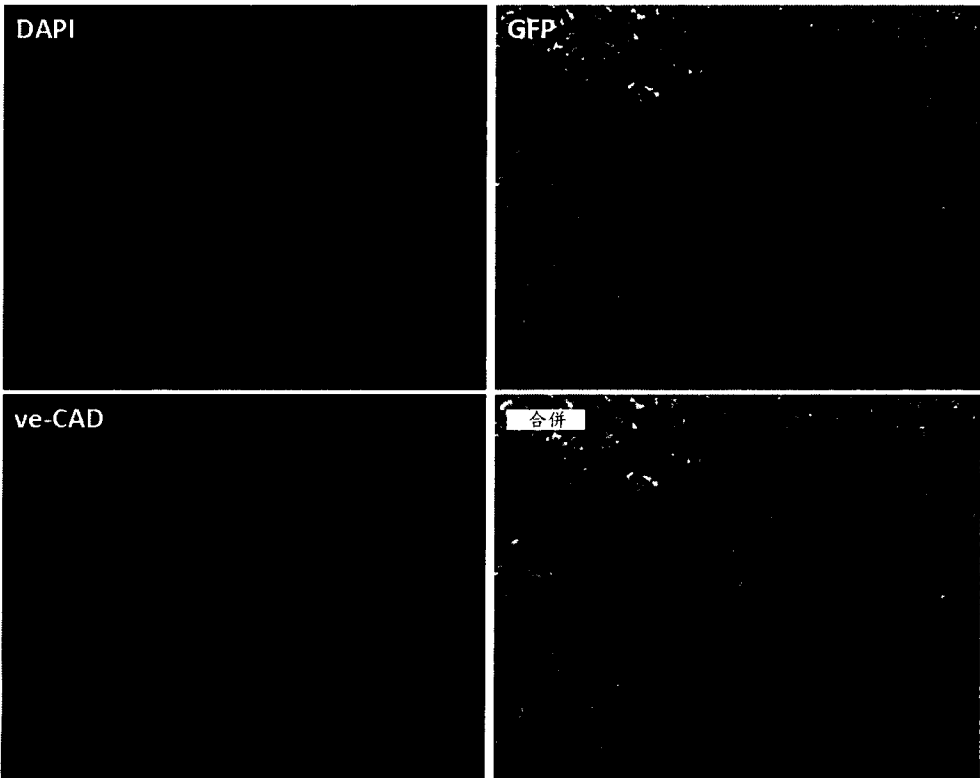
第8圖

對於經移植來自GFP轉殖大鼠的肝幹細胞之BDL大鼠，藉由VA-lip siRNA_{g46}所進行之治療
VA-lip siRNA_{g46} (x200) 細胞移植部位：CK19 (膽管上皮細胞標識物)



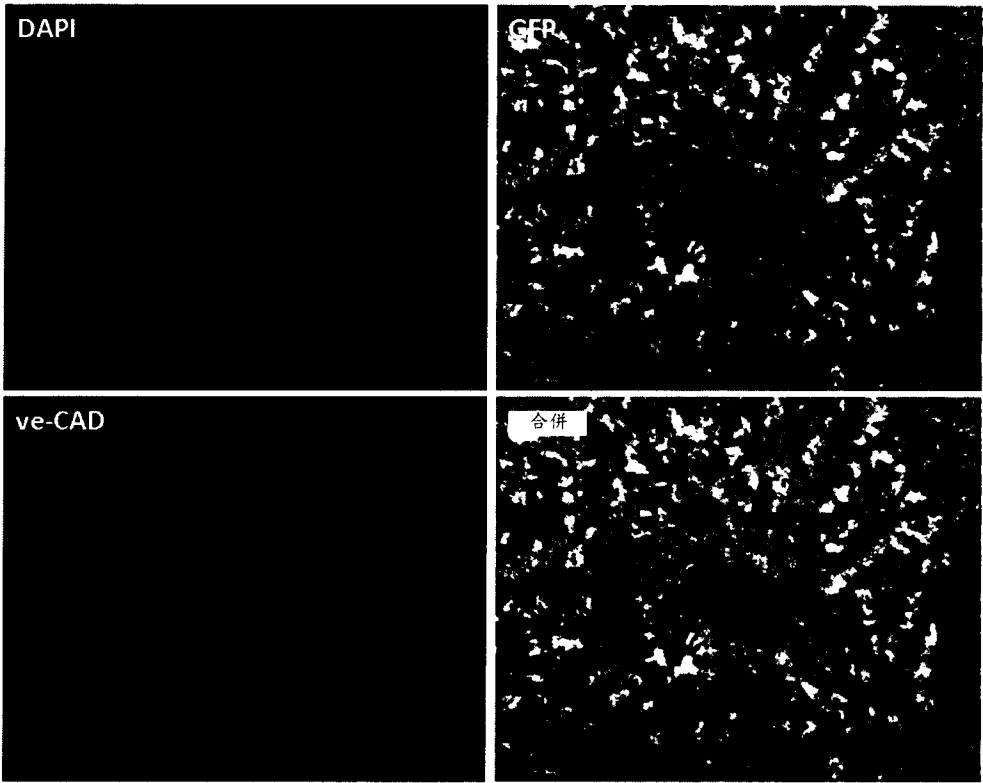
第9A圖

對於經移植來自GFP轉殖大鼠的肝幹細胞之BDL大鼠，藉由VA-lip siRNA_{g46}所進行之治療
VA-lip siRNA_{g46} (x200) 細胞移植部位：ve-CAD (血管內皮細胞標識物)



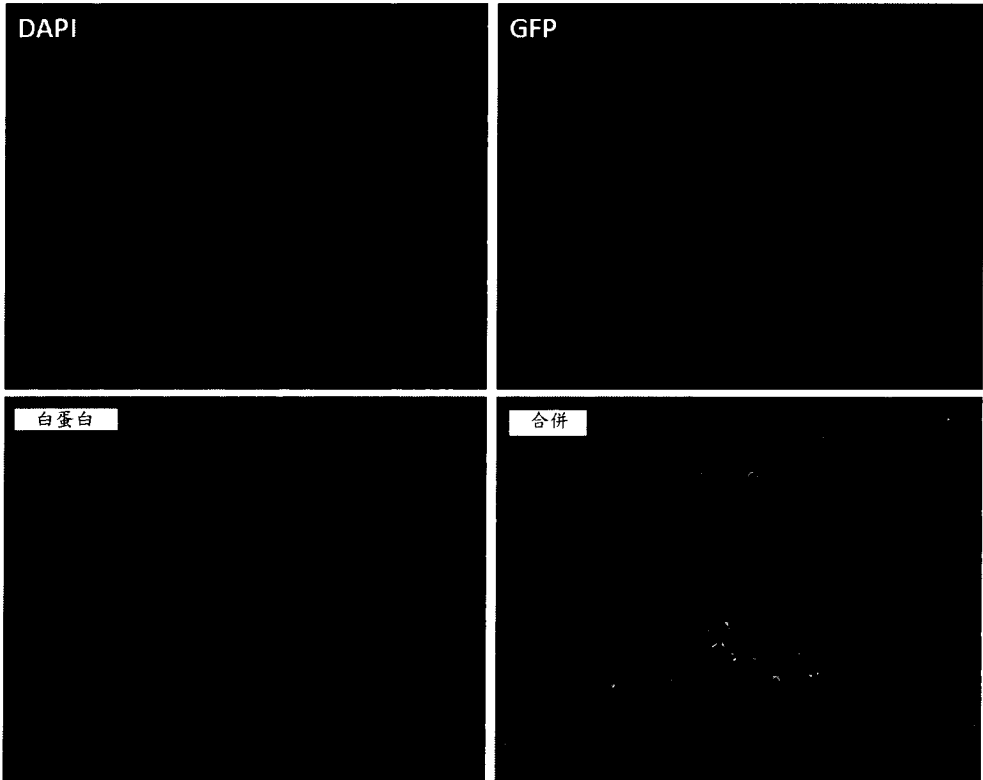
第9B圖

對於經移植來自GFP轉殖大鼠的肝幹細胞之BDL大鼠，藉由VA-lip siRNA_{g46}所進行之治療
VA-lip siRNA_{g46} (x400) 細胞移植部位：ve-CAD (血管內皮細胞標識物)

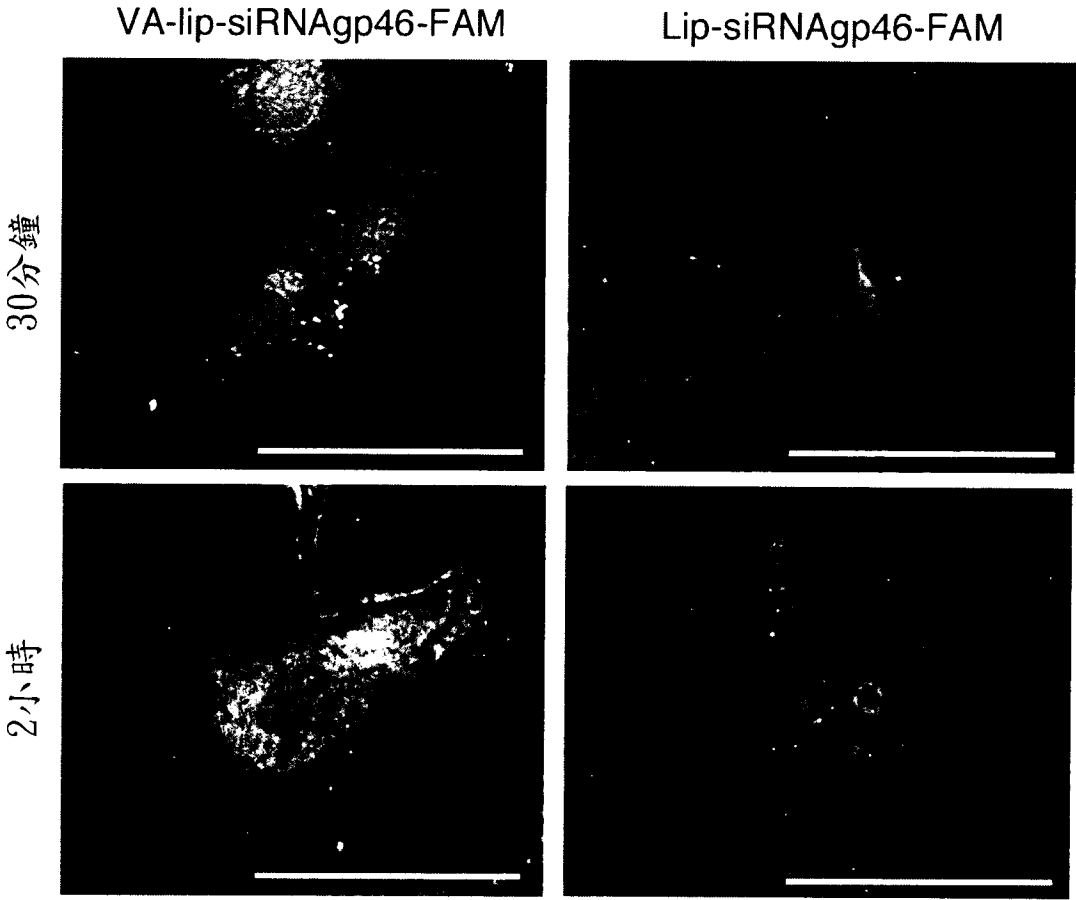


第10圖

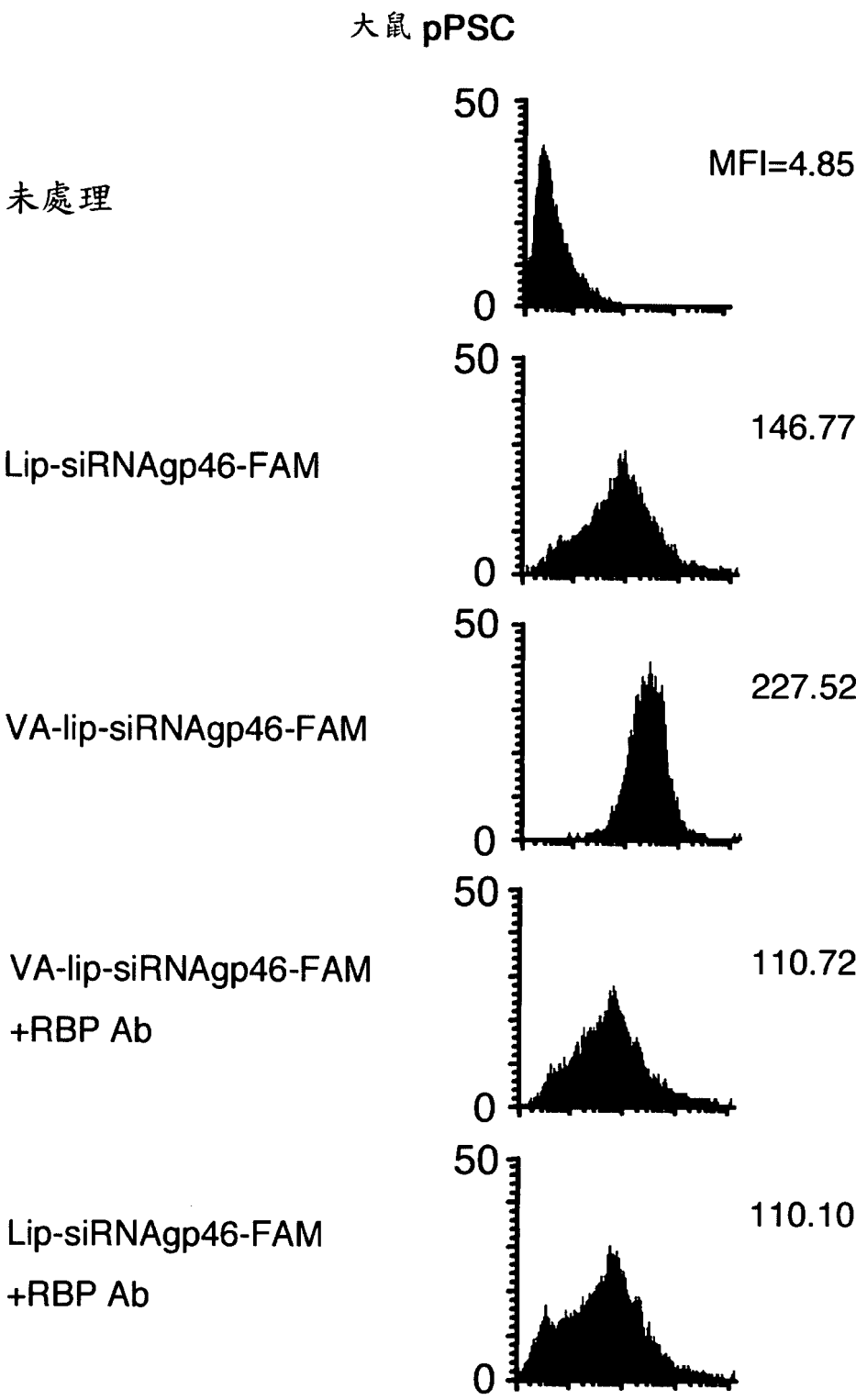
對於經移植來自GFP轉殖大鼠的肝幹細胞之BDL大鼠，藉由VA-lip siRNA_{g46}所進行之治療
VA-lip siRNA_{g46} (x200) 細胞移植部位以外的區域



第11圖

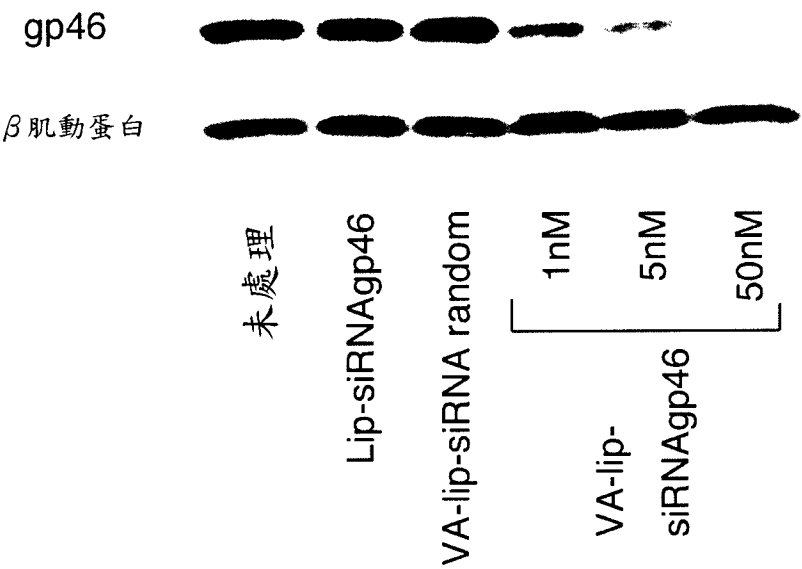


第12圖

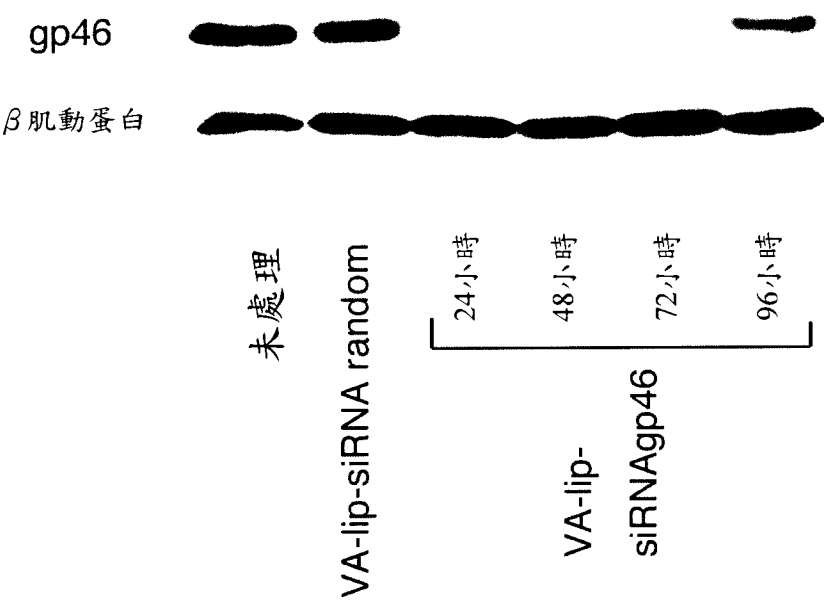


第13圖

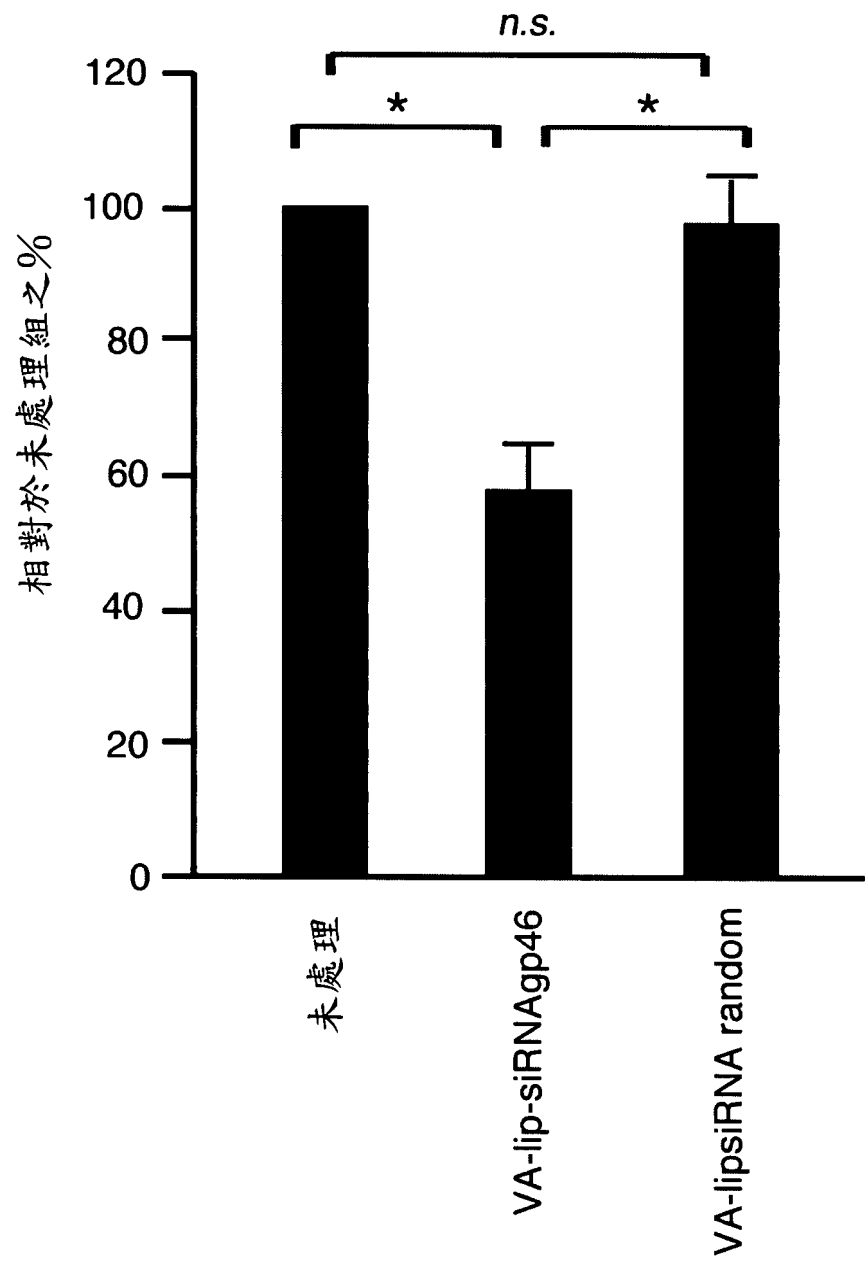
A



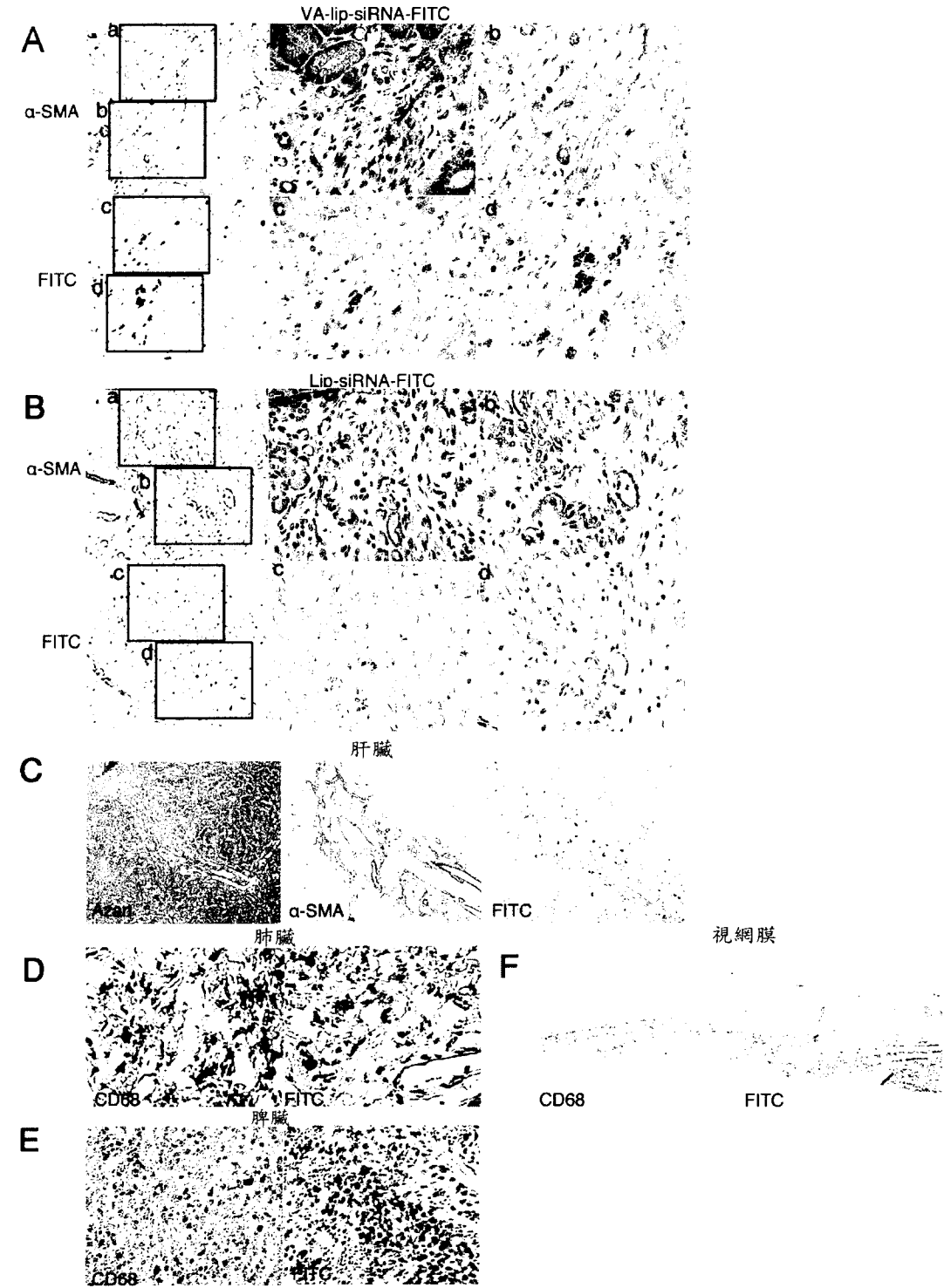
B



第14圖

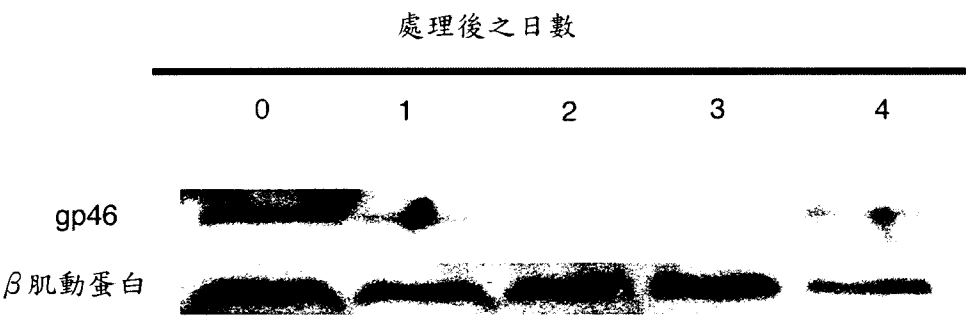


第15圖

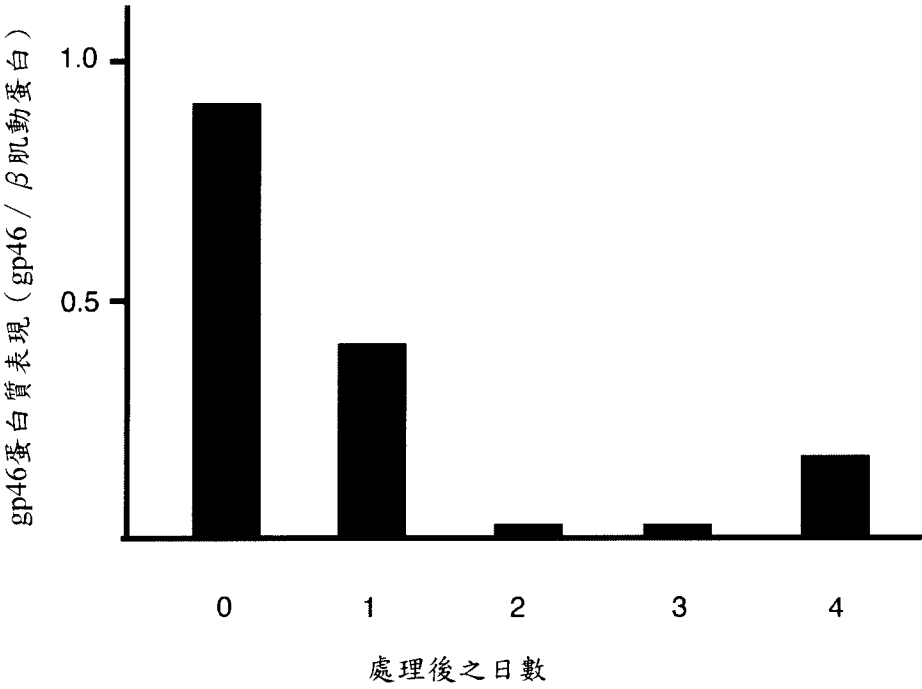


第16圖

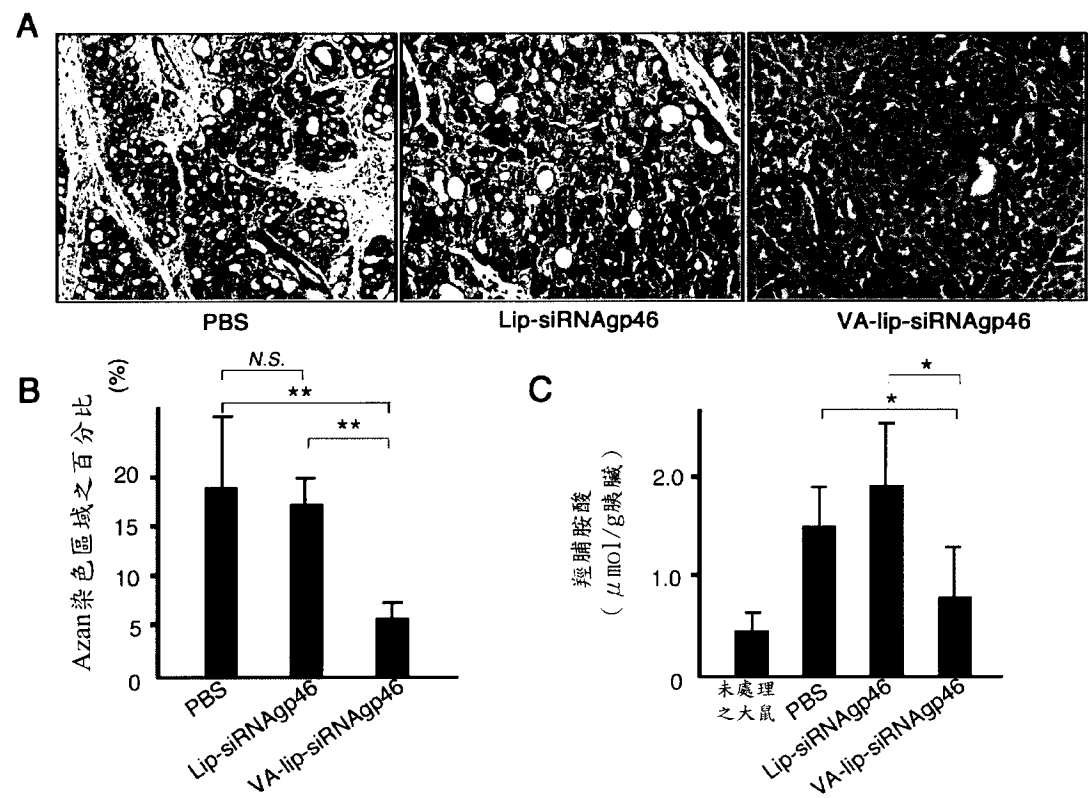
A



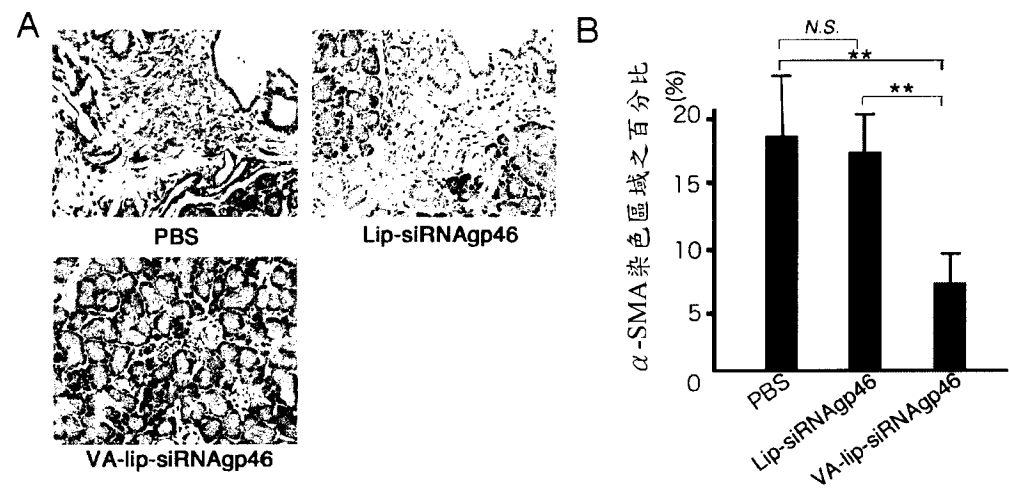
B



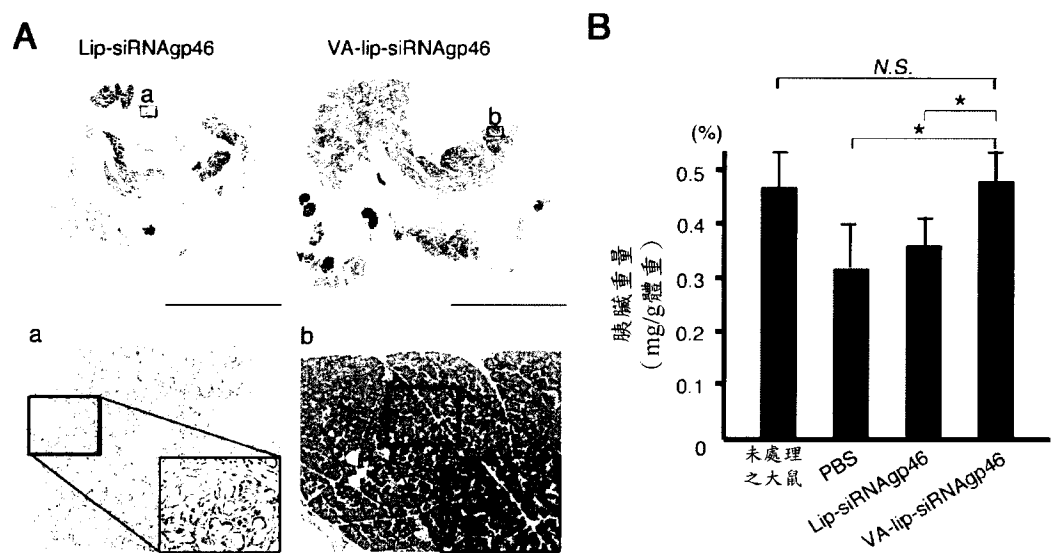
第17圖



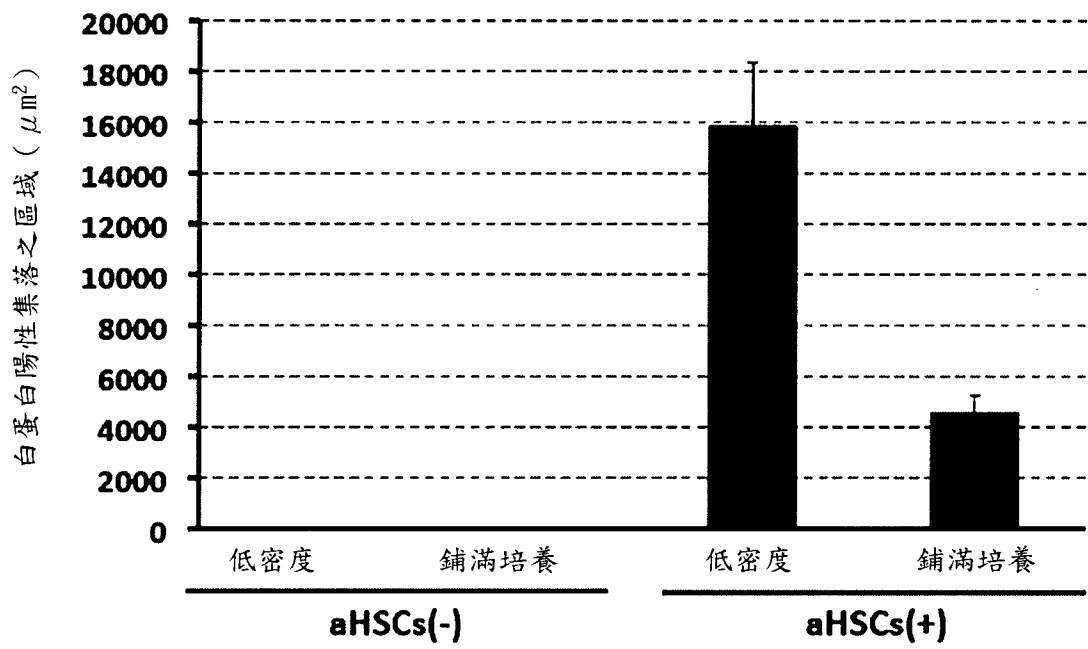
第18圖



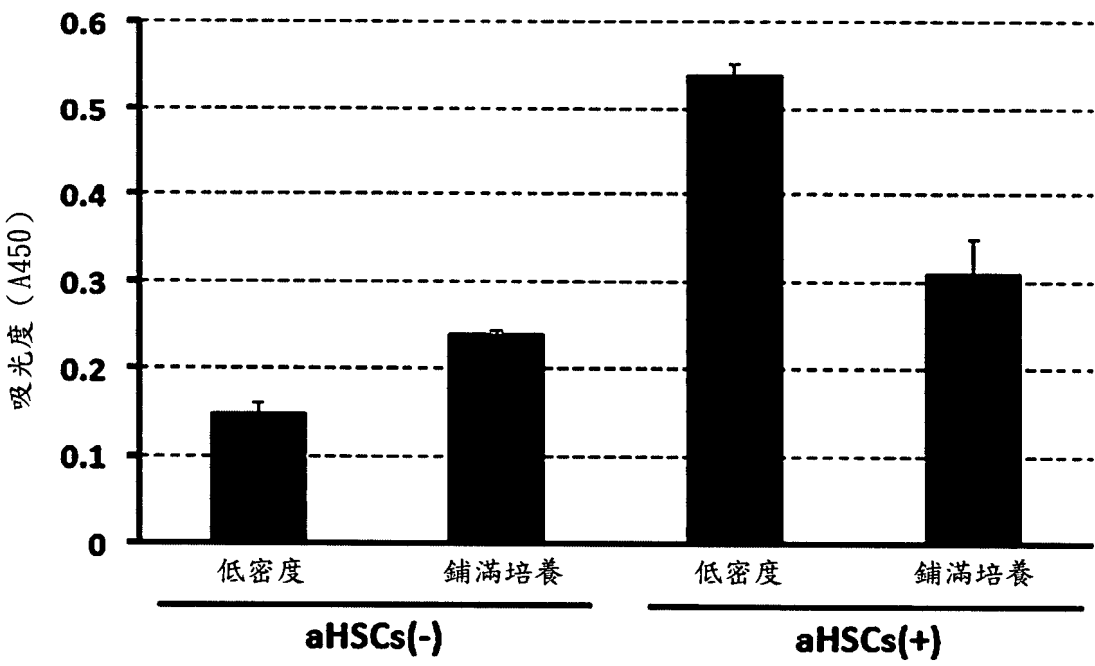
第19圖



第20圖



第21圖



四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：無。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：無。

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

中該纖維化組織持續受到纖維化刺激。

(6) 如上述 (1) 至 (5) 中任一項所述之醫藥組成物，其係用以在幹細胞之增殖、分化用的空間中從纖維化組織再生正常組織，該空間是因蓄積於纖維化組織中的膠原蛋白減少所生成。

(7) 如上述 (2) 至 (6) 中任一項所述之醫藥組成物，其中該抑制由膠原蛋白生成細胞所致之膠原蛋白生成的物質，是選自由下述物質所組成之群組：TGF β (Transforming growth factor-beta，轉形生長因子 β) 阻礙物質、HGF (Hepatocyte growth factor，肝細胞生長因子) 或其生成促進物質、PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma，過氧小體增生物活化受體 γ) 配體、血管收縮素阻礙物質、PDGF (Platelet-derived growth factor，血小板衍生生長因子) 阻礙物質、鬆弛素或其生成促進物質、阻礙細胞外基質成分之生成或分泌的物質、細胞活性抑制物質、細胞增殖抑制物質、以及細胞凋亡誘導物質。

(8) 如上述 (2) 至 (6) 中任一項所述之醫藥組成物，其中該促進膠原蛋白分解的物質，是膠原蛋白酶或其生成促進物質。

(9) 如上述 (2) 至 (6) 中任一項所述之醫藥組成物，其中該將膠原蛋白分解阻礙物質加以抑制的物質，是 TIMP (Tissue inhibitor of metalloproteinase，金屬蛋白酶組織抑制因子) 阻礙物質。

[功效]

化、非酒精性脂肪肝炎（NASH）的肝纖維化症，以及原發性硬化性膽管炎、特發性肺纖維化症、起因於特發性間質性肺炎的肺纖維化症、原發性骨髓纖維化症、起因於特發性間質性腎炎的腎纖維化症、發炎性腸病（例如克隆氏症（Crohn's disease，局部性迴腸炎）、潰瘍性大腸炎等）、全身性硬皮症等。

在本發明中所謂的「從纖維化組織再生正常組織」，意思是使因纖維化而變質的組織至少回復到纖維化較為輕度的狀態。亦即，隨著纖維化的進行，組織會逐漸被取代為以細胞外基質為主的纖維組織，但將此流程逆轉而將所增生的纖維組織逐漸取代為原本的正常組織，則是本發明中所謂的從纖維化組織再生正常組織。因此，本發明中所謂的從纖維化組織再生正常組織，不只是使纖維化組織完全地回復到原本的狀態，也包括了使纖維化組織部分地回復到原本的狀態。正常組織的再生程度，可以是藉由生物檢體試樣等組織學檢查，依據組織結構之正常化、纖維組織所佔區域之縮小、正常組織所佔區域之擴大等來進行評估，在以本組成物處置之前發現起因於纖維化的生化指標異常時，也可以藉由該指標的改善來進行評估。

在本發明的一個態樣中，正常組織的再生，也可以是在因蓄積於纖維化組織中之膠原蛋白減少所生成的空間中，藉由幹細胞增殖、分化所產生。因此，本發明的一個態樣，是關於上述醫藥組成物，該醫藥組成物是用以在幹細胞之增殖、分化用的空間中從纖維化組織再生正常組織，該空間是

鼠中之胰臟星狀細胞的特異性輸送的照片；A及B分別是以 VA-lip siRNA_{gp46}-FITC 及 Lip siRNA_{gp46}-FITC 每隔 1 日處置 3 次之大鼠的胰臟切片的由抗 α -SMA 抗體及抗 FITC 抗體所得的免疫染色影像；右側的 a~d 的染色影像，是左側染色影像中以相對應之記號來表示的區域的放大影像。C 是以 VA-lip siRNA_{gp46}-FITC 每隔 1 日處置 3 次之大鼠肝臟切片的由 Azan-Mallory 染色、抗 α -SMA 抗體染色或抗 FITC 抗體染色所得之染色影像；D~F 是將靜脈內投予 VA-lip siRNA_{gp46}-FITC 後 24 小時後之大鼠的肺、脾臟及視網膜，以抗 CD68 抗體或抗 FITC 抗體染色而得的染色影像。

第 16 圖是顯示在 DBTC 處置後第 14 日投予 VA-lip siRNA_{gp46}(siRNA 0.75 mg/kg)之大鼠的 VA-lip siRNA_{gp46} 投予後第 0、1、2、3 及 4 日在胰臟中的 gp46 蛋白質之表現的圖。A 是表示胰臟細胞破碎物的西方墨點法結果，B 是表示以 β -肌動蛋白加以標準化的定量濃度分析之結果。

第 17 圖是顯示在 DBTC 誘導性胰臟纖維化症中的 VA-lip siRNA_{gp46} 之效果的圖；A 是表示投予 10 次 VA-lip siRNA_{gp46}、Lip siRNA_{gp46} 或 PBS 之後的 DBTC 處置大鼠的胰臟切片的 Azan-Mallory 染色影像；B 是將在 A 的 Azan-Mallory 染色影像中顯示陽性的區域藉由電腦影像分析來加以定量而得的圖表；數據是由從每組 6 隻之大鼠中隨機抽出的 6 個視野來計算，並以平均值 $\pm$ 標準差來表示；C 是表示胰臟中之羥脯胺酸的含量的圖表。數據是以平均

七、申請專利範圍：

1. 一種用以從纖維化組織再生正常組織之醫藥組成物，其含有膠原蛋白減少物質。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之醫藥組成物，其中該膠原蛋白減少物質是選自由下述所組成之群組：抑制由膠原蛋白生成細胞所致之膠原蛋白生成的物質、促進膠原蛋白分解的物質、以及將膠原蛋白分解阻礙物質加以抑制的物質。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述之醫藥組成物，其中進而含有標靶藥物，該標靶藥物是針對纖維化組織中之膠原蛋白生成細胞。
4. 如申請專利範圍第 3 項所述之醫藥組成物，其中該標靶藥物是類視色素。
5. 如申請專利範圍第 1 項至第 4 項中任一項所述之醫藥組成物，其中該纖維化組織持續受到纖維化刺激。
6. 如申請專利範圍第 1 項至第 4 項中任一項所述之醫藥組成物，其係用以在幹細胞之增殖、分化用的空間中從纖維化組織再生正常組織，該空間是因蓄積於纖維化組織中

的膠原蛋白減少所生成。

7. 如申請專利範圍第 2 項至第 4 項中任一項所述之醫藥組成物，其中該抑制由膠原蛋白生成細胞所致之膠原蛋白生成的物質，是選自由下述物質所組成之群組：TGF β 阻礙物質、HGF 或其生成促進物質、PPAR γ 配體、血管收縮素阻礙物質、PDGF 阻礙物質、鬆弛素或其生成促進物質、阻礙細胞外基質成分之生成或分泌的物質、細胞活性抑制物質、細胞增殖抑制物質、以及細胞凋亡誘導物質。

8. 如申請專利範圍第 2 項至第 4 項中任一項所述之醫藥組成物，其中該促進膠原蛋白分解的物質，是膠原蛋白酶或其生成促進物質。

9. 如申請專利範圍第 2 項至第 4 項中任一項所述之醫藥組成物，其中該將膠原蛋白分解阻礙物質加以抑制的物質，是 TIMP(金屬蛋白酶組織抑制因子)阻礙物質。