

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2017 年 7 月 13 日 (13.07.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/117774 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 31/365 (2006.01) A61K 9/20 (2006.01)
A61P 1/02 (2006.01) A61K 9/08 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2016/070376

(22) 国际申请日: 2016 年 1 月 7 日 (07.01.2016)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 长弘生物科技股份有限公司 (EVER-FRONT BIOTECH INC.) [CN/CN]; 中国台湾省新北市汐止区康宁街 169 巷 31 号 11 楼, Taiwan (CN)。

(72) 发明人: 韩鸿志 (HARN, Horng-jyh); 中国台湾省台北市北投区行义路 128 号 2 楼, Taiwan (CN)。邱紫文 (CHIOU, Tzyy-wen); 中国台湾省花莲县花莲市中和街 143 号 3 楼, Taiwan (CN)。林欣荣 (LIN, Shinn-zong); 中国台湾省台中市北区英才路 102 巷 195 号, Taiwan (CN)。

(74) 代理人: 北京汇智英财专利代理事务所 (普通合伙) (BEIJING HC-IP AGENCY CO., LTD.(GENERAL PARTNERSHIP)); 中国北京市海淀区大柳树路 17 号富海国际港 902, Beijing 100081 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) Title: USE OF BUTYLIDENEPHTHALIDE

(54) 发明名称: 亚丁基苯酞的应用

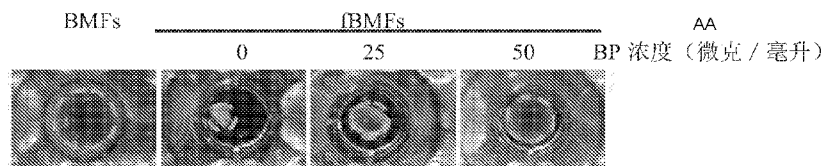


图 5A

AA BP CONCENTRATION (MICROGRAM/ML)

(57) Abstract: Disclosed is the use of an active ingredient in the manufacture of a medicament, wherein the active ingredient is selected from the group consisting of butylidenephthalide (BP), a pharmaceutically acceptable salt thereof, and a combination thereof, and wherein the medicament is used for the prevention and/or treatment of oral submucous fibrosis (OSF) and may be used in the form of an injection, lozenge, oral solution, or smearing preparation.

(57) 摘要: 一种使用一活性成分于制造一药剂的用途, 其中该活性成分选自以下群组: 亚丁基苯酞(butylidenephthalide, BP)、其医药上可接受的盐、及前述的组合, 其中该药剂是用于预防及/或治疗口腔粘膜下纤维化症(oral submucous fibrosis, OSF)且可以一针剂、锭剂、口服液、或涂抹剂的形式使用。



WO 2017/117774 A1

亚丁基苯酞的应用

技术领域

本发明是关于使用亚丁基苯酞以预防及 / 或治疗口腔粘膜下纤维化症 (oral submucous fibrosis, OSF) 的应用。

背景技术

口腔粘膜下纤维化症为一种口腔癌的癌前病变 (pre-cancerous condition), 但并非口腔癌, 主要特征在于口腔粘膜下组织和深层结缔组织的发炎反应以及纤维化现象, 若是不及时加以治疗, 极有可能进一步演变成口腔癌。

流行病学的研究指出, 嚼食槟榔是造成口腔粘膜下纤维化症最主要的原因, 病灶常见于颊粘膜、其次是腭部 (Palatal portion) 与臼齿后区, 患部黏膜首先会变白, 接着反复出现溃疡或水泡, 最后粘膜会失去弹性, 造成患者无法将口张大, 严重影响进食、刷牙、口腔检查与治疗等日常口腔功能。病灶若发生于口咽之间的软腭部位, 可能导致吞咽困难、悬雍垂萎缩或变形。患者口内常有灼热、刺痛、干涩的感觉, 对辛辣、热等食物极度敏感, 但味觉却是减退。

目前并没有可有效预防及 / 或治疗口腔粘膜下纤维化症的药物, 通常系依赖类固醇注射来减少胶原蛋白在口腔黏膜下组织中的含量、或是经由外科手术或雷射来切除病变组织。然而, 类固醇注射仅可减缓症状, 并不能治愈口腔粘膜下纤维化症, 且经常伴随着月亮脸、变胖、水牛肩、骨质疏松、皮肤变薄、水肿、容

易感染、青春痘、长不高、血糖上升、感染率增加、口腔霉菌感染、体毛增多、伤口愈合力变差等副作用。此外，经由外科手术或雷射外科手术及雷射切除较大的病变组织后，伤口愈合时容易收缩而形成疤痕，需要考量张口受限以及美观的问题，于此，口腔外科医师会考虑以植皮的方式补救，但是植皮的部位会有遮掩早期复发病变的隐忧。以外科手术或雷射对年长的患者或病灶太大的患者进行治疗时，更是要考虑手术的伤害性、病人身体抵抗力与生活品质的问题。

有鉴于上述关于口腔粘膜下纤维化症治疗的问题，目前医药界仍致力于开发可预防及 / 或治疗口腔粘膜下纤维化症的药物。本案发明人研究后发现，亚丁基苯酞可有效抑制口腔粘膜下组织细胞进行上皮间质转换 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)、抑制口腔粘膜下组织细胞分化成肌纤维母细胞 (myofibroblasts)、及抑制肌纤维母细胞的活化，故可抑制口腔粘膜下组织的胶原蛋白累积、抑制口腔粘膜下组织细胞间质内的收缩，用于提供预防及 / 或治疗口腔粘膜下纤维化症的药物。

发明内容

本发明的一目的，在于提供一种使用一活性成分于制造一药剂的用途，其中该活性成分是选自以下群组：亚丁基苯酞 (butylidenephthalide, BP)、其医药上可接受的盐、及前述的组合，且该药剂是用于预防及 / 或治疗口腔粘膜下纤维化症 (oral submucous fibrosis, OSF)。较佳地，该药剂为一针剂、锭剂、口服液、或涂抹剂。

本发明的另一目的，在于提供一种使用预防及 / 或治疗口腔粘膜下纤维化症 (oral submucous fibrosis, OSF) 的医药组合物，其包含一有效量的活性成分以及一医药上可接受的载剂，其中该活性成分是选自以下群组：亚丁基苯酞 (butylidenephthalide, BP)、其医药上可接受的盐、及前述的组合。较佳地，该医药组合物为一针剂、锭剂、口服液、或涂抹剂。

本发明的又一目的，在于提供一种预防及 / 或治疗口腔粘膜下纤维化症 (oral submucous fibrosis, OSF) 的方法，其包含于有需要的个体中投予有效量的活性成分，其中该活性成分是选自以下群组：亚丁基苯酞 (BP)、其医药上可接受的盐、或前述的组合。其中，该活性成分可以一针剂、锭剂、口服液、或涂抹剂的形式施用到该个体。

本发明的详细技术内容及部分具体实施态样，将描述于以下内容中，以供本发明所属领域具通常知识者据以明了本发明的特征。

附图说明

图1为显示经不同浓度的亚丁基苯酞 (BP) 处理的正常口腔颊粘膜的初代纤维母细胞 (buccal mucosal fibroblasts, BMFs; 包括「BMF-1 (即, ◆)」及「BMF-2 (即, ■)」) 以及纤维化的口腔颊粘膜的初代纤维母细胞 (fibrotic buccal mucosal fibroblasts, fBMFs; 包括「fBMF-1 (即, ▲)」及「fBMF-2 (即, ▨)」) 的相对存活率 (%) 的曲线图;

图2A、2B为显示以即时定量聚合酶链锁反应 (Quantitative

real-time polymerase chain reaction, Q-PCR) 分析经不同浓度的亚丁基苯酐 (BP) 处理的 fBMF-1 或 fBMF-2 的 *Twist*、*Snail*、及 *ZEB1* 基因的相对表现量 (倍数) 的长条图, 其中图 2A 是 fBMF-1 的结果, 图 2B 则是 fBMF-2 的结果;

图 3A 为显示 BMFs 及经不同浓度的亚丁基苯酐 (BP) 处理的 fBMFs 自上层盘移行至下层盘的情形的照片图, 其中染有紫色的部分即为细胞;

图 3B 为显示 BMFs (包括 BMF-1 (蓝色长条)、以及 BMF-2 (红色长条)) 以及经不同浓度的亚丁基苯酐 (BP) 处理的 fBMFs (包括 fBMF-1 (蓝色长条)、以及 fBMF-2 (红色长条)) 的相对移行能力 (%) 的长条图;

图 4A、4B 为显示以即时定量聚合酶链锁反应 (Q-PCR) 分析经不同浓度的亚丁基苯酐 (BP) 处理的 fBMF-1 或 fBMF-2 的 α -SMA、*Colla1*、及 *S100A4* 基因的相对表现量 (倍数) 的长条图, 其中图 4A 是 fBMF-1 的结果, 图 4B 则是 fBMF-2 的结果;

图 5A 为显示 BMFs 以及经不同浓度的亚丁基苯酐 (BP) 处理的 fBMFs 引起胶体收缩的情形的照片图, 其中, 绿色虚线所圈选的范围即系该胶体; 以及

图 5B 为显示胶体经由 BMFs (包括 BMF-1 (蓝色长条)、以及 BMF-2 (红色长条)) 以及经不同浓度的亚丁基苯酐 (BP) 处理的 fBMFs (包括 fBMF-1 (蓝色长条)、以及 fBMF-2 (红色长条)) 诱导收缩后的相对胶体面积 (%) 的长条图。

具体实施方式

以下将描述根据本发明的部分具体实施态样; 但是, 在不背

离本发明精神下，本发明尚可以多种不同形式的态样来实践，不应将本发明保护范围解释为限于说明书所陈述者。此外，除非文中有另外说明，于本说明书中（尤其是在后述专利申请范围中）所使用的「一」、「该」及类似用语应理解为包含单数及复数形式。另，本说明书中所使用的「约」、「大约」或「近乎」等词，实质上代表与所述的数值相差在20%以内者，较佳在10%以内者，且更佳在5%以内者。

于本说明书中，所谓「预防(prevention、prevent、preventing、preventive、及prophylaxis)」，是指将在疾病或病症发病之前，使其发病或恶化得以回避、减至最小、或变得困难的能力；所谓「治疗」，是指包括根除、去除、逆转、缓和、改善、或控制一疾病或病症；所谓「有效量」或「治疗有效量」，是指投予至个体时，可有效至少部分改善怀疑个体的病情的化合物用量；所谓「个体」是指哺乳动物，哺乳动物可为人类或非人动物。

经研究证实，在口腔粘膜下纤维化的过程中，口腔粘膜下的组织细胞会进行上皮间质转换(epithelial-mesenchymal transition, EMT)，并分化成为肌纤维母细胞(myofibroblasts)。其中，当细胞进行上皮间质转换(EMT)时，细胞中的*Twist*、*Snail*、及*ZEB1*等基因会高度表现，同时细胞与细胞之间的极性会渐渐丧失，且细胞的移行能力增加而容易爬行及侵袭，参与组织纤维化。肌纤维母细胞是一种会表现 α -SMA、*Colla1*、及*S100A4*等标记基因且具备高度移动性的细胞，其活化后会分泌过多的胞外基质(extracellular matrix, ECM)，例如纤网蛋白(Fibronectin)、胶原蛋白(Collagen)，并诱导组织细胞间质内的收缩，因而促进

组织纤维化。亦经证实，过多的胞外基质累积亦与口腔粘膜下纤维化症的发生密切相关。前述可参见例如：The role of epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma and oral submucous fibrosis. *Clin Chim Acta*. Aug; 383(1-2): 51-56 (2007)、Oral submucous fibrosis: An update on etiology and pathogenesis-A review. *Rama Univ J Dent Sci*. Mar; 2(1): 24-33 (2015)、Oral submucous fibrosis: Review on aetiology and pathogenesis. *Oral Oncol*. Jul; 42(6):561-568 (2006)、以及 Molecular pathogenesis of oral submucous fibrosis- a collagen metabolic disorder. *J Oral Pathol Med*. Jul; 34(6):321-328 (2005)，该等文献的全文并于此处以供参考。

由于组织细胞的上皮间质转换（EMT）及肌纤维母细胞的活化与口腔粘膜下纤维化密切相关，咸信若能抑制口腔粘膜下组织细胞进行上皮间质转换（EMT）、抑制口腔粘膜下组织细胞分化成肌纤维母细胞、及 / 或抑制肌纤维母细胞的活化，即可有效抑制胞外基质过度累积、抑制组织细胞间质内的收缩，而可预防及 / 或治疗口腔粘膜下纤维化症。前述可参见例如：Betac1-driven alkaloid up-regulates keratinocyte alphavbeta6 integrin expression and promotes oral submucous fibrosis. *J Pathol*. Feb; 223(3): 366-377 (2011)、Arecoline-induced myofibroblast transdifferentiation from human buccal mucosal fibroblasts is mediated by ZEB1. *J Cell Mol Med*. Apr; 18(4): 698-708 (2014)、以及 Elevation of S100A4 expression in buccal mucosal fibroblasts by arecoline: involvement in

the pathogenesis of oral submucous fibrosis. *PLoS One*. 8(1): e55122 (2013), 该等文献之全文并于此处以供参考。

本案发明人研究发现, 对于纤维化的口腔粘膜下组织细胞, 若以亚丁基苯酐 (BP) 进行处理, 可有效抑制该组织中的细胞进行上皮间质转换 (EMT), 尤其可抑制该细胞表现 *Twist*、*Snail*、及 *ZEB1* 等基因、及抑制该细胞的爬行与侵袭, 故可达到抑制口腔粘膜下组织纤维化的效果。

本案发明人另发现, 以亚丁基苯酐 (BP) 对纤维化的口腔粘膜下组织细胞进行处理, 可有效抑制该组织中细胞分化成肌纤维母细胞、及抑制肌纤维母细胞活化, 尤其可抑制该组织细胞表现 α -SMA、*Col1a1*、及 *S100A4* 等基因、及抑制组织细胞间质内的收缩, 而可达到抑制口腔粘膜下组织纤维化的效果。

因此, 本发明是关于提供预防及 / 或治疗口腔粘膜下纤维化症的药剂、医药组合物、及方法。其中, 该药剂的制造是使用一活性成分, 该医药组合物包含一有效量的活性成分以及一医药上可接受的载剂, 该方法包含将有效量的活性成分投予至有需要的个体中。根据本发明的药剂、医药组合物、及方法, 该活性成分是选自以下群组: 亚丁基苯酐 (BP)、其医药上可接受的盐、或前述的组合。

于本发明的药剂、医药组合物、及方法中, 该医药上可接受的盐的例子包含但不限于: 碱金属盐类, 如钠盐及钾盐; 碱土金属盐类, 如钙盐、镁盐及钡盐; 过渡金属盐类, 如锌盐、铜盐、铁盐、钴盐、钛盐、钒盐; 铝盐; 锡盐; 烷醇胺盐类如二乙醇胺盐、2-氨基-2-乙基-1,3-丙二醇盐、及三乙醇胺盐; 杂环胺盐类如吗

福林盐 (morpholine salts)、哌嗪盐 (piperazine salts)、及哌啶盐 (piperidine salts); 以及碱胺盐类如铵盐、精胺酸盐、离胺酸盐、及组胺酸盐等。较佳地, 于本发明的药剂、医药组合物、及方法中所使用的活性成分是亚丁基苯酞 (BP)。

当使用本发明的药剂或医药组合物以预防及 / 或治疗口腔粘膜下纤维化症时, 该药剂或医药组合物可视所欲的投药形式而呈对应的合宜剂型。举例言之, 但不以此为限, 该药剂或医药组合物可经由皮内、肌肉、腹膜内、静脉、皮下、口服、皮肤、以及黏膜等投药途径而投予至有需要的个体。

以适于皮内、肌肉、腹膜内、静脉、皮下等投药途径的剂型为例, 本发明的药剂或医药组合物可以针剂的型式提供, 但不以此为限。举例言之, 该针剂的例子是包括静脉输注液、乳剂静脉输注液、干粉注射剂、悬液注射剂、以及干粉悬液注射剂, 但不以此为限。此外, 可将该药剂或医药组合物制备成一注射前固体, 以可溶于其他溶液或悬浮液中的剂型、或可乳化的剂型提供该注射前固体, 并于投予至该有需要的个体之前, 将该注射前固体溶于其他溶液或悬浮液中、或将其乳化, 提供所欲的注射剂。

以适于口服投药的剂型为例, 本发明所提供的药剂或医药组合物可以例如锭剂、丸剂、胶囊剂、颗粒剂、散剂等固体型式、或是例如口服液、糖浆剂、酏剂 (spirit)、酏剂 (elixir)、酏剂 (tincture) 等液体型式提供, 但不以此为限。

以适于皮肤、黏膜等投药途径的剂型为例, 本发明药剂或医药组合物可以例如乳液、乳霜、凝胶 (水凝胶)、膏状物 (分散膏、软膏) 等涂抹剂、漱口剂、洗剂、喷雾剂、或是贴剂 (贴片) 的

型式提供，但不以此为限。

较佳地，本发明的药剂及医药组合物是以针剂、锭剂、口服液、或涂抹剂的型式提供。

于本发明中，视投药途径及 / 或投药形式而定，可选用合宜的医药上可接受的载剂以提供本发明药剂，另外，亦可于本发明医药组合物中包含一医药上可接受的载剂。举例言之，该医药上可接受的载剂的例子包含但不限于：溶剂（缓冲液、水、食盐水、葡萄糖（dextrose）、甘油、乙醇或其类似物、及前述的组合）、油性溶剂、稀释剂、安定剂、吸收延迟剂、崩散剂、乳化剂、抗氧化剂、粘合剂、结合剂、增粘剂、增溶剂、分散剂、悬浮化剂、润滑剂、吸湿剂、固体载剂（例如淀粉、及皂土（bentonite））。

视需要地，可将本发明的药物或医药组合物封装于微脂体、微粒子、或微胶囊等药物输送系统中，再投予至有需要的个体，以提高药物或医药组合物中的活性成分的输送效率，只要构成该药物输送系统的成分对该活性成分（即，亚丁基苯酐（BP）、其医药上可接受的盐、或前述的组合）的所欲效益没有不利的影响即可。

视需要地，亦可于本发明所提供的药剂或医药组合物中另含有合宜用量的添加剂，例如可提高该药剂或医药组合物于服用时的口适感及视觉感受的调味剂（例如蔗糖）、调色剂、着色剂等，以及可改善该药剂或医药组合物的稳定性及储存性的缓冲剂、保存剂、防腐剂、抗菌剂、抗真菌剂等。此外，该药剂或医药组合物可视需要另含一或多种其他活性成分（例如类固醇），或者与含该一或多种其他活性成分的药物并用，以进一步加强该药剂或医

药组合物的功效或增加制剂配方的运用灵活性与调配度，只要该其他活性成分对本发明的活性成分（即，亚丁基苯酐（BP）、其医药上可接受的盐、或前述的组合）的所欲效益没有不利的影响即可。

可以一日一次、一日多次、或数日一次等不同频率施用本发明所提供的药剂或医药组合物，端视投予个体的年龄、体重、及健康况状而异。举例言之，当以口服方式施用至一个体以预防及/或治疗口腔粘膜下纤维化症时，以亚丁基苯酐（BP）计，其用量为每天约5毫克/公斤体重至约500毫克/公斤体重，较佳为每天约10毫克/公斤体重至约120毫克/公斤体重，更佳为每天约20毫克/公斤体重至约90毫克/公斤体重，其中，该单位『毫克/公斤体重』是指每公斤体重个体所须的投药量。但是，对于急性患者而言，其用量可视实际需要而酌增，例如增加至数倍或数十倍。

此外，亦可将本发明所提供的药剂或医药组合物与以下之一者并用，以预防及/或治疗口腔粘膜下纤维化症：外科手术治疗、及雷射治疗。

根据本发明的预防及/或治疗口腔粘膜下纤维化症的方法中，有关该活性成分（即，亚丁基苯酐（BP）、其医药上可接受的盐、或前述的组合）的投予途径、投予形式、适用剂量、以及相关治疗的应用，均如上述的说明。

兹以下列实施例进一步例示说明本发明。其中该等实施例仅提供作为说明，而非用以限制本发明的保护范围。本发明保护范围如权利要求书所限定的范围所示。

实施例

[制备实施例]:

A. 细胞的培养

将二组取自正常口腔颊粘膜的初代纤维母细胞 (buccal mucosal fibroblasts; 以下简称为「BMF-1」及「BMF-2」; 或统称为「BMFs」)、以及二组取自纤维化的口腔颊粘膜的初代纤维母细胞 (fibrotic buccal mucosal fibroblasts; 以下简称为「fBMF-1」及「fBMF-2」; 或统称为「fBMFs」), 分别进行以下处理: 以每孔 2×10^4 的细胞数分别接种 (seed) 于24孔盘中, 并培养至8分满 (即, 达到80% confluence), 再分别以不同浓度 (0、12.5、25、50、100、或200微克 / 毫升) 的亚丁基苯酐 (BP) 进行处理, 历时48小时。

B. 细胞总RNA (Total RNA) 的萃取

以胰蛋白酶 (trypsin) 使[制备实施例]A所提供的各组细胞悬浮后, 分别进行以下步骤: (i) 离心 (1000 rpm、5分钟) 后去除上清液; (ii) 加入1毫升的TRIzol试剂 (购自Invitrogen Life Technologies公司), 混合均匀后, 置于室温下静置5分钟; (iii) 加入100微升的BCP (bromochloropropane) 并上下摇晃使其混和均匀, 再置于室温下静置5分钟; (iv) 离心 (Eppendorf离心机、F45-30-11转子、4° C、12000 rpm、15分钟) 后将上层液体移至新的离心小管, 并于其中加入异丙酮 (isopropanol) 混和均匀, 再置于室温下静置5分钟; (v) 离心 (Eppendorf离心机、F45-30-11转子、4° C、12000 rpm、10分钟) 后去除上清液, 再以500微升的75%酒精清洗沉淀于管底的RNA; (vi) 离心 (室温、12000 rpm、

5分钟)后去除酒精层,并置于抽风柜中风干;以及(vii)以20微升的经焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)处理的水回溶RNA沉淀物,以测量其于260奈米波长下的吸光值,并计算RNA浓度。

实施例1: 评估亚丁基苯酞(BP)的细胞毒性

取[制备实施例]A所提供之各组细胞,分别进行以下步骤:(i)去除24孔盘中的上清液,再于各孔中加入500微升的3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide,简称MTT)缓冲液(最终浓度为0.5毫克/毫升);(ii)将孔盘放置于37°C、5% CO₂的培养箱中作用,历时3个小时;(iii)去除上清液后,分别于各孔中加入1000微升的异丙醇,并将孔盘放置于震荡器(shaker)上摇晃,历时10分钟;以及(iv)从各孔取200微升的混合溶液至96孔盘中,以分光光度计测定其于570奈米波长下的吸光值,并换算成各组细胞的相对存活率(%),结果示于图1。

由图1可知,于培养液中添加浓度为50微克/毫升以下的亚丁基苯酞(BP),对正常颊黏膜的初代纤维母细胞(BMFs)以及纤维化颊黏膜的初代纤维母细胞(fBMFs)的生长皆不会有影响。因此,后续的实验是以浓度为0至50微克/毫升的亚丁基苯酞(BP)进行。

实施例2: 分析亚丁基苯酞(BP)于抑制口腔粘膜下组织细胞进行上皮间质转换(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的效益

A. 上皮间质转换 (EMT) 的标记基因的表现量

已知细胞在进行上皮间质转换(EMT)的过程中, *Twist*、*Snail*、及 *ZEB1*等基因的表现量会增加, 故该等基因被视为上皮间质转换(EMT)的标记基因。本实验是通过即时定量聚合酶链锁反应(Quantitative real-time polymerase chain reaction, Q-PCR), 探讨亚丁基苯酐(BP)是否会影响 *Twist*、*Snail*、及 *ZEB1*等基因在口腔颊粘膜组织细胞中的表现。

首先, 取[制备实施例]B所提供的总RNA(各组取1微克), 进行反转录作用, 以提供互补去氧核糖核酸(cDNA)。接着, 以基因定量系统(PRISM ABI7700 Sequence Detecting System, 购自美国Applied Biosystems公司)搭配特定基因的引子(如下表1所示)进行即时定量聚合酶链锁反应(Q-PCR), 以分析 *Twist*、*Snail*、及 *ZEB1*等基因在经不同浓度(0、25、或50微克/毫升)的亚丁基苯酐(BP)处理的fBMFs(包括fBMF-1、fBMF-2)中的表现。最后, 以未经亚丁基苯酐(BP)处理的细胞的结果为基准, 计算各组的相对基因表现量(倍数), 结果示于图2。

表1

基因名称	引子之核苷酸序列	序列编号
<i>Twist</i>	(顺向引子) GGGAGTCCGAGTCTTACGA	SEQ ID NO:1
	(反向引子) AGACCGAGAAGCGTAGCTG	SEQ ID NO:2
<i>Snail</i>	(顺向引子) GCAGCTATTTAGCCTCCTG	SEQ ID NO:3
	(反向引子) GTTCTGGGAGACACATCGGT	SEQ ID NO:4
<i>ZEB1</i>	(顺向引子) AGCAGTGAAAGAGAAGGGAATGC	SEQ ID NO:5
	(反向引子) GGTCTCTTCAGGTGCCTCAG	SEQ ID NO:6

由图2的结果可知, 不论是fBMF-1或fBMF-2, *Twist*、*Snail*、

及 *ZEB1* 等基因的表现皆明显随着亚丁基苯酞 (BP) 的浓度提高而下降。前述结果显示, 亚丁基苯酞 (BP) 可有效抑制口腔粘膜下组织细胞进行上皮间质转换 (EMT), 故可用于预防及 / 或治疗口腔粘膜下组织的纤维化。

B. 口腔粘膜下组织细胞的爬行能力与侵袭能力

本研究进一步以穿透式细胞移行试验系统 (Transwell® system, 购自英国Corning公司) 搭配孔径大小为8微米的聚碳酸酯滤膜 (polycarbonate membrane, 购自英国Corning公司), 探讨亚丁基苯酞 (BP) 是否可抑制口腔粘膜下组织细胞的爬行能力与侵袭能力。

首先, 于下层盘 (lower chamber) 加入含有10% FBS (胎牛血清) 的培养液, 并将该聚碳酸酯滤膜装置置于一细胞培养盘的底部, 此称为上层盘 (upper chamber)。另一方面, 取[制备实施例]A中的BMF-1、BMF-2、fBMF-1、fBMF-2细胞 (各取 2×10^4 个细胞), 分别与含有0、25、或50微克 / 毫升之亚丁基苯酞 (BP) 但不含血清的培养液 (250微升) 混合均匀, 再将混合溶液注入上层盘装置中。接着, 将该穿透式细胞移行试验系统放置于培养箱中培养, 诱使细胞移行, 历时24小时。将该穿透式细胞移行试验系统取出, 将未自上层盘膜面移行至下层盘膜面的细胞移除后, 以4%的聚甲醛 (paraformaldehyde) 固定该聚碳酸酯滤膜 (10分钟), 并以0.1%结晶紫 (crystal violet) 进行染色。最后, 将该聚碳酸酯滤膜小心切下放置于载玻片上, 于显微镜下以100倍的放大倍率进行观察 (各组皆观察5个不同视野)、拍照纪录, 并以未经亚丁基苯酞 (BP) 进行处理的BMFs的结果为基准, 将该膜上的

细胞数目换算成细胞的相对移行能力(%)。前述实验是进行三重复，且结果是示于图3A、3B，其中，图3A中染有紫色的部分即是自上层盘移行至下层盘的细胞，图3B则是将该三重复实验的结果平均而得到的细胞相对移行能力(%)。

由图3A、3B的结果可知，相较于「BMFs组」，「fBMFs组」自上层盘移行至下层盘的细胞明显较多。然而，在「fBMFs组」组中，若细胞是先经亚丁基苯酐(BP)处理，则自上层盘移行至下层盘的细胞是明显随着亚丁基苯酐(BP)的浓度提高而减少。前述结果显示，相较于正常的口腔粘膜下组织细胞，纤维化的口腔粘膜下组织细胞具有较强的爬行能力与侵袭能力，容易进行上皮间质转换(EMT)，而亚丁基苯酐(BP)可有效抑制口腔粘膜下组织细胞的爬行能力与侵袭能力。此即，亚丁基苯酐(BP)可有效抑制口腔粘膜下组织细胞进行上皮间质转换(EMT)，故可用于预防及/或治疗口腔粘膜下组织的纤维化。

实施例3：分析亚丁基苯酐(BP)于抑制口腔粘膜下组织细胞分化成肌纤维母细胞的效益

已知在组织发生纤维化的过程中，组织中的细胞会分化、转变成肌纤维母细胞，而 α -SMA、*Colla1*、及*S100A4*等基因系肌纤维母细胞的标记基因。因此，本实验是通过即时定量聚合酶链锁反应(Q-PCR)，探讨亚丁基苯酐(BP)是否会抑制 α -SMA、*Colla1*、及*S100A4*等基因在纤维化口腔颊粘膜组织的细胞中的表现。

取[制备实施例]B所提供的总RNA(各组取1微克)，进行反转录作用，以提供互补去氧核糖核酸(cDNA)。接着，以基因定量系统(PRISM ABI7700 Sequence Detecting System，购自美国

Applied Biosystems公司) 搭配特定基因的引子(如下表2所示) 进行即时定量聚合酶链锁反应(Q-PCR), 以分析 α -SMA、*Colla1*、及*S100A4*等基因在经不同浓度(0、25、或50微克/毫升)的亚丁基苯酐(BP)处理的fBMFs(包括fBMF-1、fBMF-2)中的表现。最后, 以未经亚丁基苯酐(BP)处理的细胞的结果为基准, 计算各组的相对基因表现量(倍数), 结果示于图4。

表2

基因名称	引子之核苷酸序列	序列编号
α -SMA	(顺向引子) AGCACATGGAAAAGATCTGGCACC	SEQ ID NO:7
	(反向引子) TTTTCTCCCGGTGGCCTTG	SEQ ID NO:8
<i>Colla1</i>	(顺向引子) GGGTGACCGTGGTGAGA	SEQ ID NO:9
	(反向引子) CCAGGAGAGCCAGAGGTCC	SEQ ID NO:10
<i>S100A4</i>	(顺向引子) GAGCTGCCAGCTTCTTG	SEQ ID NO:11
	(反向引子) TGCAGGACAGGAAGACACAG	SEQ ID NO:12

由图4的结果可知, 不论是fBMF-1或fBMF-2, α -SMA、*Colla1*、及*S100A4*等基因的表现皆明显随着亚丁基苯酐(BP)的浓度提高而下降。前述结果显示, 亚丁基苯酐(BP)具有抑制口腔粘膜下组织细胞分化成肌纤维母细胞的效益, 故可抑制口腔粘膜下组织的胶原蛋白累积, 有效预防及/或治疗口腔粘膜下组织的纤维化。

实施例4: 分析亚丁基苯酐(BP)于抑制口腔黏膜下组织细胞间质内收缩的效益

取[制备实施例]A中的BMF-1、BMF-2、fBMF-1、fBMF-2细胞, 分别将前述细胞溶于0.5毫升的浓度为2毫克/毫升的胶原蛋白溶液(购自Sigma-Aldrich)中, 再将各该混合溶液移至24孔盘, 并置于37°C、5% CO₂的培养箱中作用2小时, 使胶原蛋白胶体凝结,

所获得的胶体分别称为「BMFs组」、以及「fBMFs组」。接着，将凝结的胶体脱离培养盘，加入0.5毫升的含有不同浓度（0、25、或50微克 / 毫升）的亚丁基苯酞（BP）的细胞培养液进行培养，历时48小时后，观察各组胶体收缩的情形、拍照记录，并使用影像分析软体ImageJ(美国，国立卫生研究院)，以未经亚丁基苯酞(BP)处理的「BMFs组」的胶体面积为基准，计算各组的相对胶体面积(%)。结果示于图5A、5B，其中，图5A显示各组细胞所引起的胶体收缩的情形，而图5B是显示各组的相对胶体面积(%)。

由图5A、5B可知，相较于「BMFs组」，「fBMF组」的胶体面积明显较小，此即，胶体明显有收缩的现象。然而，在「fBMFs组」当中，若胶体中的细胞是先经亚丁基苯酞（BP）处理，则该胶体收缩的现象会明显改善，且改善的程度是随着亚丁基苯酞（BP）的浓度上升而增加。前述结果显示，亚丁基苯酞（BP）可有效抑制肌纤维母细胞的活化，而抑制肌纤维母细胞诱导的组织细胞间质内收缩。

由以上实验结果可知，亚丁基苯酞（BP）可有效抑制口腔粘膜下组织细胞进行上皮间质转换（EMT）、抑制口腔粘膜下组织细胞分化成肌纤维母细胞、抑制肌纤维母细胞的活化，故可抑制口腔粘膜下组织的胶原蛋白累积、抑制口腔粘膜下组织细胞间质内的收缩。

权 利 要 求 书

1. 一种使用一活性成分于制造一药剂的用途，其中该活性成分是自选自以下群组：亚丁基苯酐（butylidenephthalide, BP）、其医药上可接受的盐、及前述的组合，且该药剂是用于预防及 / 或治疗口腔粘膜下纤维化症（oral submucous fibrosis, OSF）。
2. 如权利要求1所述的用途，其中该药剂是用于抑制口腔粘膜下组织细胞进行上皮间质转换（epithelial-mesenchymal transition, EMT）。
3. 如权利要求2所述的用途，其中该药剂是用于抑制口腔粘膜下组织细胞的爬行能力与侵袭能力。
4. 如权利要求1所述的用途，其中该药剂是用于抑制口腔粘膜下组织细胞分化成肌纤维母细胞。
5. 如权利要求1所述的用途，其中该药剂是用于抑制肌纤维母细胞的活化。
6. 如权利要求1至5中任一项所述的用途，其中该药剂是用于抑制口腔粘膜下组织细胞间质内的收缩。
7. 如权利要求6所述的用途，其中该药剂为一针剂、锭剂、口服液、或涂抹剂。
8. 如权利要求1至5中任一项所述的用途，其中该药剂为一针剂、锭剂、口服液、或涂抹剂。

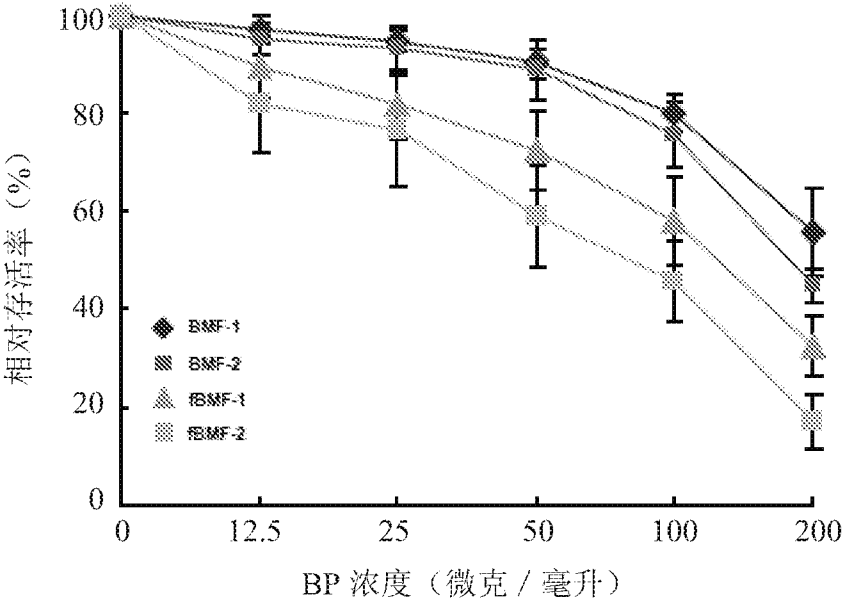


图 1

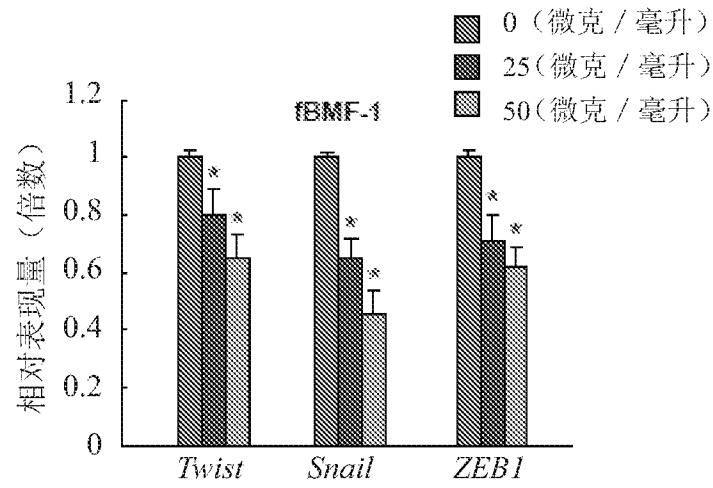


图 2A

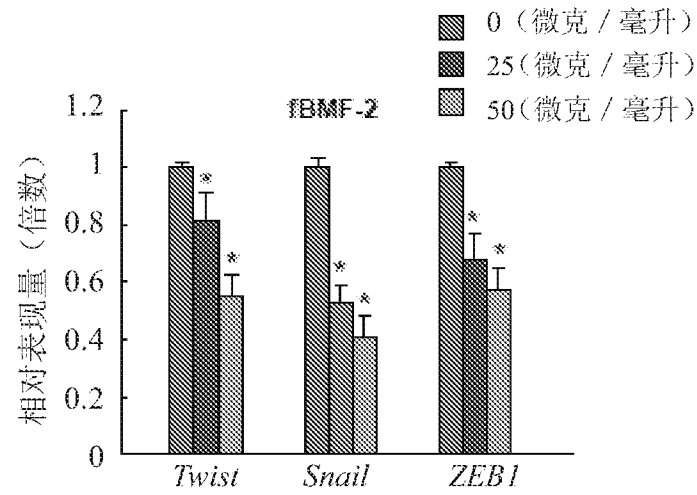


图 2B

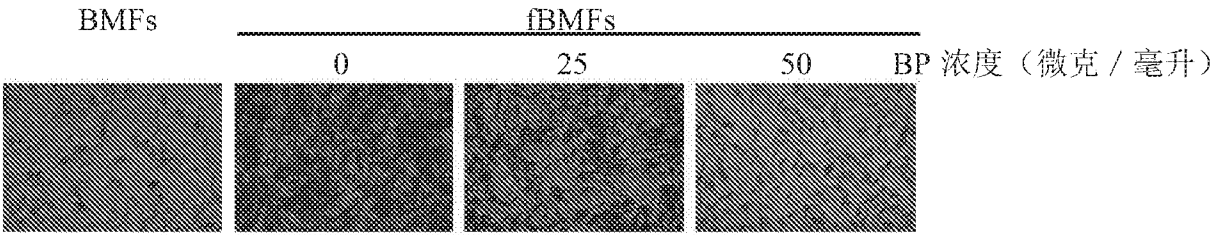


图 3A

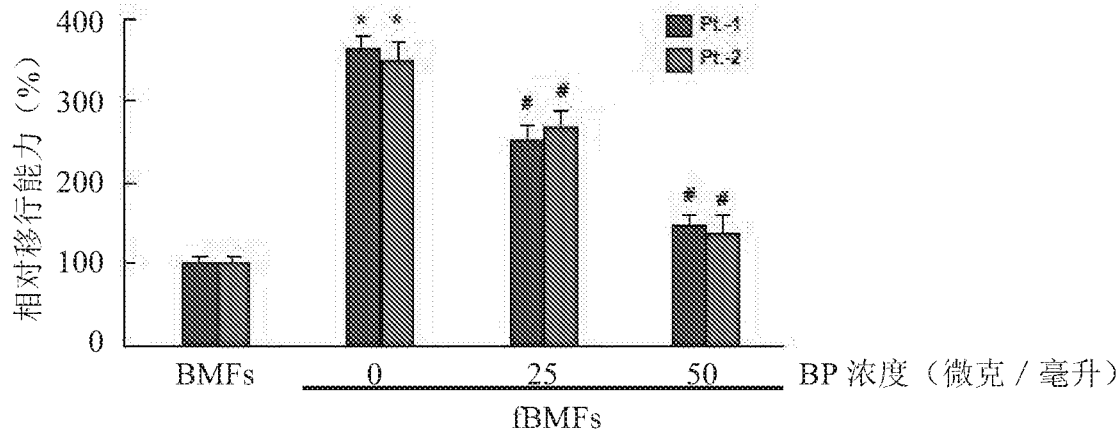


图 3B

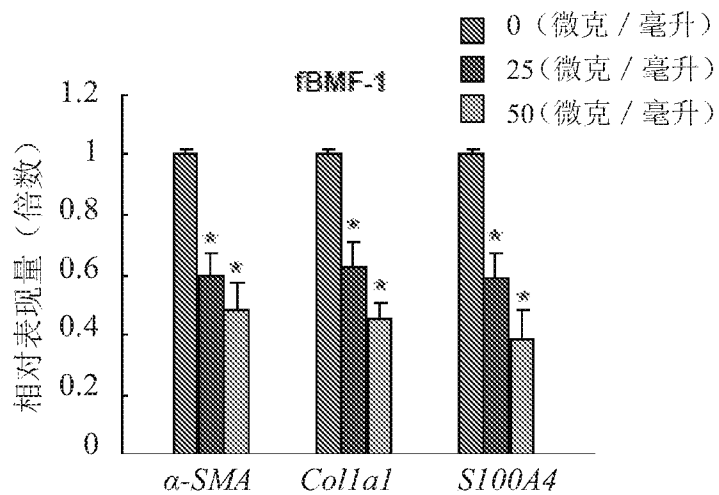


图 4A

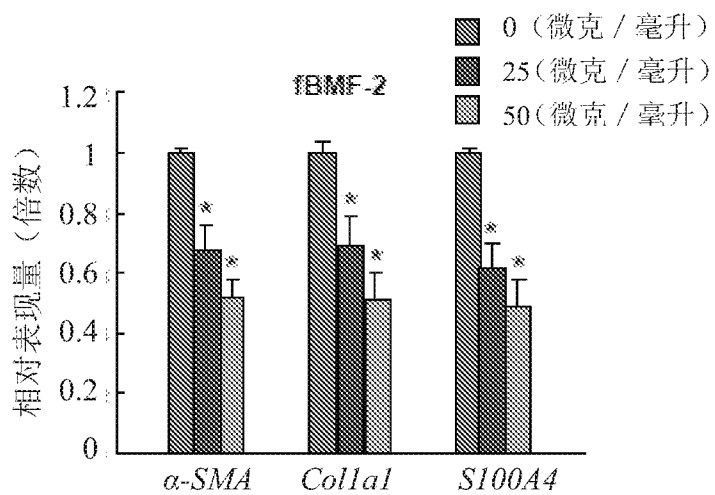


图 4B

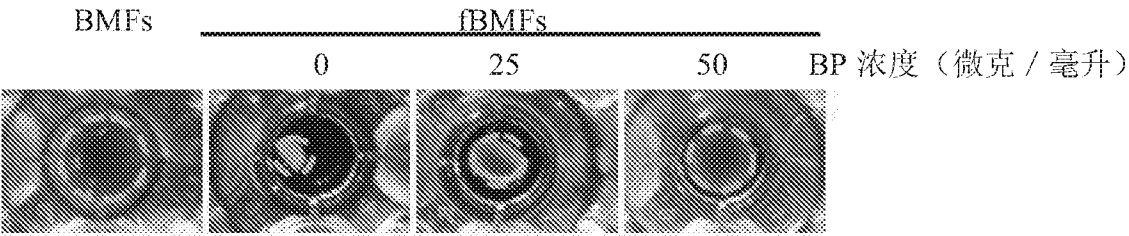


图 5A

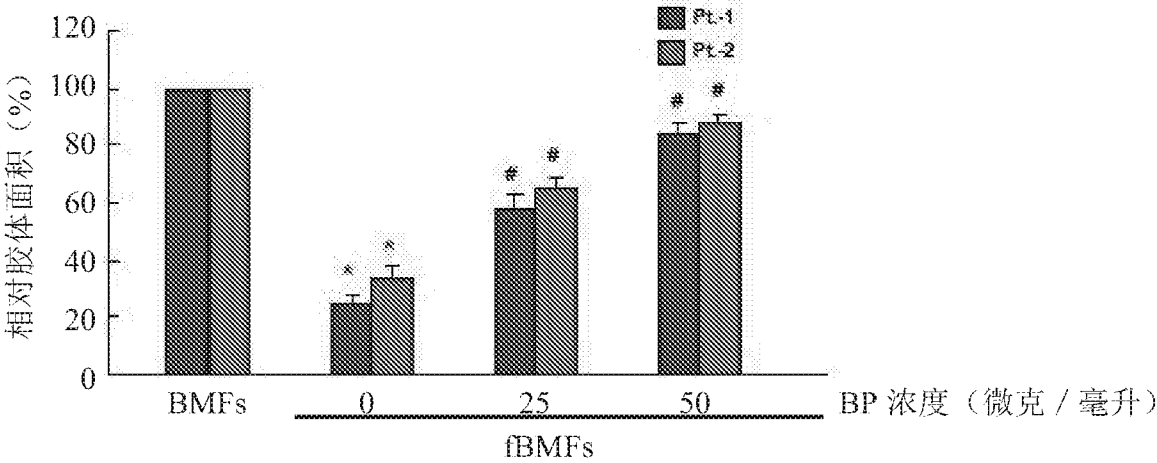


图 5B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/070376**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

A61K 31/365 (2006.01) i; A61P 1/02 (2006.01) i; A61K 9/20 (2006.01) i; A61K 9/08 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CPRS, CHINESE PHARMACEUTICAL PATENT DATABASE (CTCPMPD), CNKI, CHINA PHARMACEUTICAL ABSTRACTS, WPI, EPODOC, STN: oral mucosa, butylidene phthalide, oral submucous

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 104042606 A (HAWKING BIOLOGICAL TECHNOLOGY CO., LTD.), 17 September 2014 (17.09.2014), the whole document, especially claims 1, 2 and 13-16	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

02 August 2016 (02.08.2016)

Date of mailing of the international search report

24 August 2016 (24.08.2016)

Name and mailing address of the ISA/CN:

State Intellectual Property Office of the P. R. China

No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao

Haidian District, Beijing 100088, China

Facsimile No.: (86-10) 62019451

Authorized officer

GE, JiaTelephone No.: (86-10) **62089166**

International application No.
PCT/CN2016/070376

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2009)

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/070376

A. 主题的分类

A61K 31/365(2006.01)i; A61P 1/02(2006.01)i; A61K 9/20(2006.01)i; A61K 9/08(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CPRS, 中国药物专利数据库(CTCPD), CNKI, 中国药理学文摘库, WPI, EPODOC, STN:亚丁基苯酐, 丁烯基苯酐, 口腔粘膜, butylidene phthalide, oral submucous

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 104042606 A (国钦生物科技股份有限公司) 2014年 9月 17日 (2014 - 09 - 17) 全文, 尤其是权利要求1-2, 13-16	1-8

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2016年 8月 2日

国际检索报告邮寄日期

2016年 8月 24日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

葛嘉

传真号 (86-10)62019451

电话号码 (86-10)62089166

国际申请号	PCT/CN2016/070376
-------	-------------------

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	104042606	A	2014年 9月 17日	TW	201434465	A	2014年 9月 16日
				EP	2974723	A1	2014年 9月 17日
				WO	2014139318	A1	2014年 9月 18日
				US	2014271568	A1	2014年 9月 18日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)