



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110590971 A

(43)申请公布日 2019.12.20

(21)申请号	201910772055.7	<i>A61K 31/573</i> (2006.01)
(22)申请日	2014.08.27	<i>A61K 31/728</i> (2006.01)
(30)优先权数据		<i>A61P 29/00</i> (2006.01)
	61/871,352 2013.08.29 US	<i>A61P 37/08</i> (2006.01)
		<i>A61P 31/00</i> (2006.01)
(62)分案原申请数据		<i>A61P 37/06</i> (2006.01)
	201480035816.6 2014.08.27	
(71)申请人	爱禾公司	
	地址 美国内华达州	
(72)发明人	林华洋	
(74)专利代理机构	北京律诚同业知识产权代理 有限公司 11006	
	代理人 张燕华 祁建国	
(51)Int.Cl.		
	<i>C08B 37/08</i> (2006.01)	
	<i>A61K 47/61</i> (2017.01)	

权利要求书1页 说明书17页 附图8页

(54)发明名称

糖胺聚醣化合物及其医药组合物与用途

(57)摘要

本发明涉及一种化合物,其是由一药物与糖胺聚醣键结所形成,其中糖胺聚醣是以玻尿酸为例,且该药物是用于治疗疾病,例如发炎、自体免疫疾病、过敏、感染或癌症。本发明所述的经键结的化合物可通过糖胺聚醣作为药物传递载体而于疾病的标的位置增加药物的浓度,并通过CD44细胞表面受体与糖胺聚醣的相互作用以提高治疗效果及减少药物的全身性副作用。

1. 一种化合物,是由一糖胺聚糖以及一活性化合物所组成,其中所述活性化合物的一官能基与选自于由糖胺聚糖、糖胺聚糖衍生物以及糖胺聚糖盐类所组成的群组的羧基形成共价键结,且所述活性化合物是普赖苏浓。

2. 根据权利要求1所述的化合物,其中,所述共价键结是通过酰胺键或酯键直接键结。

3. 根据权利要求1所述的化合物,其中,所述活性化合物是通过一连接物与糖胺聚糖的羧基间接键结。

4. 根据权利要求3所述的化合物,其中,所述连接物是选自由己二酸二酰肼、多肽、胜肽、脂质、胺基酸以及含有直链或支链的脂肪族、芳香族或芳脂族的C2-C20二羧酸所组成的群组。

5. 根据权利要求1所述的化合物,其中,所述糖胺聚糖是玻尿酸。

6. 根据权利要求5所述的化合物,其中,所述玻尿酸的平均重量分子量为5千道尔顿至200万道尔顿。

7. 一种化合物用于制备治疗发炎的医药品的用途,其步骤包括施予受体如权利要求1至6任一项所述的有效剂量的化合物及其医药学上可接受的赋形剂。

8. 根据权利要求7所述的用途,其中,所述发炎是由感染、损伤、自体免疫疾病或过敏所引起。

9. 一种医药组合物,其包含至少一根据权利要求1至6任一项所述的化合物以及至少一赋形剂及/或稀释剂。

10. 根据权利要求9所述的医药组合物,其中,所述医药组合物是通过口服或可注射的方式施予。

糖胺聚糖化合物及其医药组合物与用途

[0001] 本申请为申请人根据母案申请(申请号:201480035816.6,申请日:2014年08月27日,发明名称:糖胺聚糖化合物及其医药组合物与用途)所提出的分案申请。

[0002] 交叉参考相关申请案

[0003] 本申请案主张于2013年08月29日提出申请的美国临时专利申请案第61/871,352号的优先权,所述专利申请案的说明书以引用的方式全文并入本文中。

技术领域

[0004] 本发明是关于一种化合物,其是由一糖胺聚糖以及一药物键结所形成;本发明亦关于包含该化合物的医药组合物;本发明亦关于所述的医药组合物用于治疗发炎的用途。

背景技术

[0005] 细胞外基质(extracellular matrix,ECM)是一种具有调节细胞功能以及相互作用以响应刺激的动态组合。其中一种细胞外基质大分子糖胺聚糖,其与生物体正常及不正常的生物过程有关,所述的生物过程包括细胞迁移(migration)、分化(differentiation)、增殖(proliferation)、免疫反应(immune response)和细胞骨架组织(cytoskeletal organization)。

[0006] 糖胺聚糖(glycosaminoglycans,GAGs)是由无支链且重复双糖单元(disaccharide units)所组成。这些双糖单元包含胺糖(amino sugar)[N-乙酰葡萄糖胺(N-acetylglucosamine)或N-乙酰半乳糖胺(N-acetylgalactosamine)],且双糖在大多数情况下是硫酸化(sulfated)。所述第二种糖通常是一种糖醛酸(uronic acid)[葡萄糖醛酸(glucuronic acid)或艾杜糖醛酸(iduronic acid)]。由于糖胺聚糖的糖残基(sugar residue)大部分是羧基(carboxyl group)或硫酸酯基(sulfate group)而使糖胺聚糖高度带负电荷,因此,糖胺聚糖具有很强的亲水性(hydrophilic)。糖胺聚糖具有高度延展的一致性,且形成的基质可用于空间填充和耐压缩力。糖胺聚糖可通过糖残基的键结类型以及硫酸酯基的数目和位置分为4大类,其包括:(1)玻尿酸(hyaluronan,HA)、(2)硫酸软骨素(chondroitin sulphate)及硫酸皮肤素(dermatan sulfate)、(3)硫酸乙酰肝素(heparan sulfate)及肝素(heparin)以及(4)硫酸角质素(keratan sulfate)。

[0007] 玻尿酸具有不同的英文名称(hyaluronic acid、hyaluronate或HA),其是一种最简单的糖胺聚糖,其是由交替重复的非硫化双糖单元,尤其是N-乙酰葡萄糖胺(N-acetylglucosamine)及葡萄糖醛酸(glucuronic acid)所组成,其分子量介于400道尔顿(Dalton, Da)至数百万道尔顿之间。玻尿酸于所有组织例如皮肤(skin)、软骨(cartilage)以及眼睛(eye)具有不同数量,并以流体形式存于成体动物,特别是早期胚胎。在关节软骨(articular cartilage),玻尿酸可形成一个大聚集对于软骨功能来说是非常重要的。此外,玻尿酸通过玻尿酸介导的移动受体(receptor for hyaluronan-mediated motility, RHAMM)以及CD44介导细胞移动性(cell motility)和免疫细胞的黏附(immune cell adhesion)。

[0008] 玻尿酸是由单一玻尿酸合成酶(hyaluronan synthetase,HAS)介导,并于细胞表面的内膜与生长聚合物挤压至细胞外部而被直接合成。相比之下,其他的糖胺聚糖是于细胞内合成[例如高尔基体(Golgi apparatus)],并与一些核心蛋白(core protein)关联,再通过胞吐作用(exocytosis)释放。在脊椎动物活体内组织中,通过外切糖苷酶(exoglycosidase)[即玻尿酸酶(hyaluronidase)]移除糖即可完成玻尿酸的降解(degradation)。哺乳动物型玻尿酸酶(mammalian-type hyaluronidases)同时具有水解和转糖苷酶(transglycosidase)活性以降解玻尿酸和软骨素。在结缔组织中,玻尿酸与水的水合作用形成可于组织之间形成空间,从而形成一个有利于细胞运动及增殖的环境。玻尿酸于生物现象诸如快速发展(rapid development)、再生(regeneration)、修复(repair)、胚胎发生(embryogenesis)、胚胎发育(embryological development),伤口愈合(wound healing)、血管新生(angiogenesis)以及肿瘤发生(tumorigenesis)扮演关键作用的角色。

[0009] CD44(也称作Pgp-1、Hermes-3、HCAM或ECMR III)是一种广泛表现且分子量介于8万5千道尔顿至9万道尔顿的糖蛋白。CD44是玻尿酸的主要细胞表面受体。尽管CD44也可辨识某些含有蛋白多糖的硫酸软骨素,但CD44与玻尿酸特异性地结合,且CD44在各种细胞及生理功能扮演重要角色,包括与玻尿酸的附着力(adhesion)、玻尿酸降解以及肿瘤转移(tumor metastasis)。CD44也被证明在细胞外基质的结合、细胞迁移、淋巴细胞激活(lymphocyte activation),淋巴细胞归巢(lymphocyte homing)和支气管平滑肌细胞增殖等扮演重要角色(Günthert et al.,1991,A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells,5;65(1):13-24)。CD44受体显示在细胞外结构的可变区域具有一种可选择性剪接的复杂模式,因此,CD44对于玻尿酸而言,似乎是一个特别重要的白细胞(leukocyte)受体,并可能在哮喘的发病机制扮演相当作用。此外,相较于抗体治疗的小鼠,对照组小鼠施予较高玻尿酸浓度可明显减少实验性哮喘产生,亦证实CD44于玻尿酸代谢的作用,特别是高分子量玻尿酸分解为发炎前低分子量形式。由于玻尿酸衍生的寡糖可结合并激活类Toll受体(Toll-like receptor),因此,对于抗CD44的治疗具有利显著正面的影响。

[0010] 玻尿酸-CD44相互作用可能在发育、发炎、T细胞的募集(recruitment)与活化、肺部炎症(lung inflammation)、肿瘤生长和转移中发挥重要作用。

[0011] 具有特定剔除的标准CD44及所有亚型(isoforms)的小鼠是正常发育。研究推测,CD44在类风湿关节炎(rheumatoid arthritis)以及T细胞外渗至组织发炎部位中扮演重要角色。CD44可能在小鼠过敏原诱导的气道炎中,招募发炎细胞而扮演重要的作用。CD44被认为在在调节慢性发炎症有重要的作用,显示CD44在独立地调节巨噬细胞活化与玻尿酸的相互作用具有关键作用(Dianhua Jiang,Hyaluronan in Tissue Injury and Repair,Annu.Rev.Cell Dev.Biol.2007;23:435-61)。

[0012] 控制发炎以及免疫反应是治疗广泛疾病的关键。CD44提供活化的淋巴细胞对血管内皮细胞和平滑肌细胞的黏附。此外,CD44的结合诱导活化发炎及血管细胞。玻尿酸是CD44主要配体(ligand),上调(upregulate)apoE缺陷小鼠动脉粥样硬化(atherosclerotic lesions)以及玻尿酸刺激细胞间黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1,VCAM-1)的低分子量发炎前形式表现以及初级主动脉平滑肌细胞(primary aortic smooth muscle cells)培养的增殖。而高分子量形式的玻尿酸可抑制平滑肌细胞增殖。半乳糖凝集

素-9 (Galectin-9, GAL-9) 可降低呼吸道过度敏感 (airway hyperresponsiveness, AHR) 以及Th2相关的呼吸道发炎。此外,施用半乳糖凝集素-9以及抗CD44单株抗体可抑制周边血Th2细胞浸润至呼吸道。有趣的是,半乳糖凝集素-9直接与CD44黏附分子结合并抑制与玻尿酸的相互作用。类似的概念,CD44-玻尿酸的相互作用介导T细胞进入肺部的迁移,半乳糖凝集素-9亦阻止BW5147小鼠T细胞通过CD44依赖 (CD44-dependent) 与HA黏附。结论即为通过调节细胞外基质的CD44依赖性白细胞辨识,半乳糖凝集素-9可抑制呼吸道发炎及AHR (Shigeki Katoh, et al., Galectin-9 Inhibits CD44-Hyaluronan Interaction and Suppresses a Murine Model of Allergic Asthma, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2007 Jul 1; 176 (1) : 27-35)。

[0013] CD44会在自体免疫疾病 (autoimmune disease) 中表现,例如全身性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE)、类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA), 修格兰症候群 (Sjögren's syndrome, SS, 又称干燥综合征)、炎症性肠疾病 (inflammatory bowel disease, IBD)、关节黏连性脊椎炎 (ankylosing spondylitis, AS)、牛皮癣性关节炎 (psoriatic arthritis)、牛皮癣 (psoriasis)、皮炎 (dermatomyositis, DM)、脉管炎 (vasculitis) 及贝赛特氏症 (Behcet's disease, BD)。全身性红斑狼疮是一种自体免疫性原型的疾病,影响多器官系统。越来越多的证据显示,玻尿酸与细胞表面受体CD44的相互作用在SLE介导的致病机制中扮演重要角色 (Yung S and Chan TM, The Role of Hyaluronan and CD44 in the Pathogenesis of Lupus Nephritis, Autoimmune Dis. Volume 2012 (2012), Article ID 207190, 9 pages)。类风湿关节炎 (RA) 是一种常见的自体免疫性疾病,导致患者的滑液关节 (synovial joints) 的发炎。虽然类风湿关节炎影响的人口约1%并被归类为一种自体免疫性疾病,但它诱发失去免疫耐受性 (tolerance) 的机制仍未被证实 (Patrick J. Mott, CD44 Antibodies and Immune Thrombocytopenia in the Amelioration of Murine Inflammatory Arthritis, PLoS One, 2013, 8 (6) : e65805)。修格兰症候群 (SS) 是与自体免疫性疾病更相关的疾病,例如,全身性红斑狼疮 (SLE) 和类风湿性关节炎 (RA), 科学及医学领域对于修格兰症候群严重落后,迄今仍在大量的候选基因中努力 (John A. Ice, Genetics of Sjögren's syndrome in the genome-wide association era, J Autoimmun. 2012 Aug; 39 (1-2) : 57-63)。关节黏连性脊椎炎 (AS) 是一种常见且好发于中轴骨 (axial skeleton) 的发炎性风湿性疾病,影响约0.2%人口。目前的诊断标准是依赖于临床和影像学复合变化,平均约需花5至10年的诊断。(Roman Fischer, 2011, Discovery of Candidate Serum Proteomic and Metabolomic Biomarkers in Ankylosing Spondylitis, Mol Cell Proteomics, 2012 Feb; 11 (2) : M111.013904)。结果推测,在慢性发症条件下,循环T淋巴细胞影响活化的CD44升高,即可能代表活化循环细胞的致病性重要的亚群可能对于自体免疫疾病或慢性发炎疾病活性提供了可靠的测量标记 (Estess P, et al., 1998, Functional activation of lymphocyte CD44 in peripheral blood is a marker of autoimmune disease activity, J Clin Invest. 1998 Sep 15; 102 (6) : 1173-82)。包括克隆氏症 (Crohn's disease, CD) 及溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 的炎症性肠疾病 (IBD) 的临床和免疫学特征与牛皮癣 (psoriasis) 的特征类似。全基因组关联研究 (genome-wide association studies, GWAS) 发现有常见的易感基因 (susceptibility

genes)。然而,流行病学评估数据却显示牛皮癣、牛皮癣性关节炎(psoriatic arthritis)与IBD之间风险关系是稀疏的(sparse)。此研究的目的是评估牛皮癣、牛皮癣性关节炎、克隆氏症和溃疡性结肠炎在美国妇女的事件的关联性。牛皮癣伴随牛皮癣性关节炎与克隆氏症的风险增加相关(Wen-Qing Li,2013,Psoriasis,psoriatic arthritis and increased risk of incident Crohn's disease in US women,Ann Rheum Dis.2013Jul;72(7):1200-5)。皮炎(DM)是一种结缔组织疾病相关的多发性肌炎(polymyositis,PM)(其特征在于肌肉和皮肤发炎),而皮炎最常影响皮肤和肌肉,它是一种全身性疾病,也可能会影响关节、食道、肺或少部分影响心脏。血管炎是一种破坏血管的发炎性疾病,无论是动脉和静脉都会受到影响。目前虽未深入了解血管炎的病理生理学,但已普遍得知血管炎的发炎症状(Henry S.Su,Vasculitis:Molecular Imaging by Targeting the Inflammatory Enzyme Myeloperoxidase,Radiology,2012Jan;262(1):181-90)。贝赛特氏症(BD)是唯一系统性血管炎并同时涉及任何大小的动脉及静脉,且常发于风湿病诊疗;在某些情况下,甚至产生重大的并发症而导致致命的后果(M.B.Owlia,2012,Behcet's Disease:New Concepts in Cardiovascular Involvements and Future Direction for Treatment,ISRN Pharmacol,2012:760484)。

[0014] 干扰素 α (Interferon alpha,IFN α)结合聚乙二醇(polyethylene glycol,PEG)已被广泛地用于丙型肝炎病毒(hepatitis C virus,HCV)感染的治疗,并作为一周一次注射制剂。然而,经结合PEG的干扰素 α 仅具有39%的低功效,且经反复注射后会引起副作用,其原因可能是由于聚乙二醇的非特异性的输送。因此,近来发展出特定标的的长效玻尿酸-干扰素 α (HA-IFN α)的结合物并用于HCV感染的治疗。玻尿酸-干扰素 α (HA-IFN α)结合物是由玻尿酸的醛基(aldehyde)与IFN α 的N端基团进行偶联反应所形成,在IFN α 的含量应控制在每单一玻尿酸链具有2至9分子,且生物交联(bioconjugation)效率高于95%。

[0015] 另有研究暗示CD44细菌和宿主细胞之间的相互作用会改变宿主细胞使它们更容易于感染。例如,化脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*),通过其富含玻尿酸的多醣胶囊(或细胞壁)与细胞附着。玻尿酸与CD44结合后,进而触发宿主细胞的蛋白酪氨酸磷酸化(tyrosine phosphorylation)以及细胞骨架重排(cytoskeletal rearrangements),并引起褶皱(ruffles)及伪足延伸(the extension of lamellipodia)。其结果是,由于紧密连接地的E-cadherin数量减少而使细胞间黏附变松,进而使细菌可进入上皮下组织(subepithelial tissue)。

[0016] PCT专利W094/09811案涉及一种CD44用于治疗发炎或检测癌症转移的用途,并显示在发炎情况中,CD44被上调(upregulated),且CD44胜肽(peptides)能抑制T细胞活化;但未说明可以CD44抑制转移,亦未说明CD44可用于抑制肿瘤生长或血管生成。世界专利W099/45942案涉及玻尿酸-结合蛋白和多肽(包括CD44)用于抑制癌症及血管生成相关疾病的用途,该专利案使用软骨连接蛋白(cartilage link protein)的转移抑制素(metastatin)片段(3万8道尔顿),以及从该片段衍生的玻尿酸-结合肽(HA-binding peptide)以抑制B16小鼠黑色素瘤(melanoma)以及Lewis肺癌的肺转移(pulmonary metastasis)。玻尿酸-结合肽可抑制B16黑色素瘤于鸡CAM的生长以及抑制内皮细胞于玻尿酸的迁移。在上述两篇文献中,玻尿酸-结合肽的用途及结合肽与玻尿酸的结合能力具有直接的关系。

[0017] 美国专利第8,192,744号涉及可溶性重组CD44玻尿酸结合区(soluble recombinant CD44hyaluronic acid binding domain,CD44HABD)可抑制鸡和老鼠体内的血管新生,从而可抑制各种原因的人类肿瘤生长;并涉及一种可溶性、非糖基化(non glycosylated)的CD44重组蛋白,以作为一种针对血管细胞表面受体的新的血管生成抑制剂。

[0018] 因此,现有技术仅涉及了CD44的潜在用途并涉及依赖于HA-CD44相互作用所产生的任何影响。所以,HA-CD44结合物的所有效用是直接依赖于它们本身与玻尿酸结合的能力。

[0019] 然而,有些药物仍无法成功与玻尿酸结合并进行进一步的试验,亦无法确认玻尿酸作为活性化合物的位置传递载体的潜在用途。特别的是,现有技术并无显示细胞表面受体CD44以及活性化合物结合玻尿酸的相互作用可被开发作为一个标的传递物,并用于有效治疗并改善CD44过度表现的疾病。

发明内容

[0020] 本发明的目的在于提供一种新的化合物,其化合物包括玻尿酸以及适用于位置传递的活性化合物,并可用于过度表现细胞表面受体CD44的疾病。

[0021] 故本发明提供一种糖胺聚糖与药物键结形成的化合物,其中该药物用于治疗与CD44过度表现呈现高相关的发炎性疾病。

[0022] 本发明提供一种化合物,其化合物是由一糖胺聚糖及一活性化合物所组成,其中糖胺聚糖及其衍生物或其盐类的羧基(carboxylic group)与活性化合物的一官能基形成共价键结(covalent conjugation),且活性化合物包括抗发炎药物(anti-inflammatory drug)、抗过敏(anti-allergy)以及类固醇(steroid)。

[0023] 较佳的,所述的糖胺聚糖是玻尿酸。

[0024] 较佳的,所述的化合物用于治疗发炎疾病。

[0025] 本发明更提供一种所述的化合物用于制备治疗癌症的医药品的用途,其中该化合物是由一糖胺聚糖及一活性化合物经键结所组成,其中活性化合物的一官能基与选自于由糖胺聚糖、糖胺聚糖衍生物以及糖胺聚糖盐类所组成的群组的羧基(carboxylic group)形成共价键结(covalent conjugation),且活性化合物是由希乐葆(Celecoxib)、非索非那定(Fexofenadine)、布地奈德(Budesonide)及普赖苏浓(Prednisolone)所组成,且该活性化合物用于治疗发炎以及用于所述治疗的制备。

[0026] 本发明更提供一种制备由一糖胺聚糖以及一活性化合物所组成的化合物的方法,其中活性化合物的一官能基与选自于由糖胺聚糖、糖胺聚糖衍生物以及糖胺聚糖盐类所组成的群组的羧基形成共价键结(covalent conjugation),且该活性化合物是由希乐葆(Celecoxib)、非索非那定(Fexofenadine)、布地奈德(Budesonide)及普赖苏浓(Prednisolone)所组成。

附图说明

[0027] 为了充分描述本发明,实施例以附图表示,这些图式是说明书的一部分,但附图图式不应被认为限制本案的范围。

[0028] 图1为将荧光玻尿酸施予正常结肠组织及受伤结肠组织所观察到的荧光指数柱状图(* $p < 0.05$),其中荧光指数=结肠组织以玻尿酸处理/正常结肠组织以磷酸盐缓冲溶液处理。

[0029] 图2为玻尿酸(HA)-染料化合物与不同时间点分别作用于HCT15细胞及HT29细胞的荧光图,其中图2A为HCT15细胞于6小时的细胞荧光图、图2B为HCT15细胞于12小时的细胞荧光图、图2C为HT29细胞于6小时的细胞荧光图、图2D为HT29细胞于12小时的细胞荧光图。

[0030] 图3为HA-Celecoxib化合物的结构图。

[0031] 图4为显示对照组(control,即脂多糖)、玻尿酸、希乐葆(即“Cele”)以及玻尿酸-希乐葆(即“HA-cele”)对于RAW264.7细胞的抗发炎效果;此处所指的发炎指标是前列腺素E2(PGE2)的变化含量百分比。

[0032] 图5为玻尿酸-己二酸二酰肼-布地奈德(HA-ADH-Budesonide)化合物的结构图。

[0033] 图6为显示对照组(即“ctrl”)、脂多糖(LPS)、玻尿酸、玻尿酸与酯多糖(即“HA+LPS”)、布地奈德(即“bude”)、布地奈德与酯多糖(即“bude+LPS”)、玻尿酸-己二酸二酰肼-布地奈德(即“HA-bude”)以及玻尿酸-己二酸二酰肼-布地奈德与酯多糖(即“HA-bude+LPS”)对于RAW264.7细胞的抗发炎效果;此处所指的发炎指标是一氧化氮(nitrite,NO)的变化含量百分比。

[0034] 图7为玻尿酸-己二酸二酰肼-非索非那定(HA-ADH-Fexofenadine)的结构图。

[0035] 图8为显示对照组、脂多糖(LPS)、玻尿酸、非索非那定(即“Fexo”)以及玻尿酸-非索非那定(即“HA-Fexo”)对于RAW264.7细胞的抗发炎效果;此处所指的发炎指标是前列腺素E2(PGE2)的变化含量百分比。

[0036] 图9为玻尿酸-己二酸二酰肼-普赖苏浓(HA-ADH-Prednisolone)化合物的结构图。

[0037] 图10为显示对照组、脂多糖(LPS)、玻尿酸、普赖苏浓(即“Pred”)以及玻尿酸-普赖苏浓(即“HA-Pred”)对于RAW264.7细胞的抗发炎效果;此处所指的发炎指标是前列腺素E2(PGE2)的变化含量百分比。

[0038] 图11为显示对照组(载体,即“vehicle”)、普赖苏浓(即“Pred”)、玻尿酸-普赖苏浓(即“HA-Pred”)以及玻尿酸、对于类风湿性关节炎的治疗效果;此处所指的发炎指标是爪子厚度,大鼠于实验的第1天至13天被诱导产生类风湿性关节炎,第14天开始施予各组治疗,其中数据是通过无母数统计分析(non-parametric statistics)计算而得,且* $p < 0.05$ vs对照组;# $p < 0.05$ vs普赖苏浓组以及 $^{\&}p < 0.05$ vs玻尿酸组。

[0039] 图12为显示对照组(载体)、普赖苏浓(即“Pred”)、玻尿酸-普赖苏浓(即“HA-Pred”)以及玻尿酸、对于类风湿性关节炎的治疗效果;此处所指的发炎指标是脚踝周长,大鼠于实验的第1天至13天被诱导产生类风湿性关节炎,第14天开始施予各组治疗,其中数据是通过无母数统计分析计算而得,且* $p < 0.05$ vs对照组;# $p < 0.05$ vs普赖苏浓组以及 $^{\&}p < 0.05$ vs玻尿酸组。

具体实施方式

[0040] 以下配合图式及本发明的较佳实施例,进一步阐述本发明为达成预定发明目的所采取的技术手段。

[0041] 普遍来说,药物无论经口服或注射至循环系统必须直接到达其标的治疗区域,由

于基于安全性考虑,药物浓度及特异性于标的位置并没那么高,因此药物对于目标疾病和正常器官的效果是非常类似的。

[0042] 为了改善治疗效果以及具有良好的安全性,一种策略是修饰药物,并将药物与载体共价键结后,使其对于疾病区域更具有标的选择性(target-selective),且抗肿瘤治疗领域中认为以上事项须加以改善。

[0043] 为了达成此目的,本发明通过玻尿酸及其受体CD44的相互作用以标的的传送活性物质。

[0044] 本发明通过维持相对高浓度的药物于目标位置以及正常组织为器官以建立对于玻尿酸的长期研究及实验。

[0045] 从本发明的结果已在实施例中完全地描述并在下文简要总结。

[0046] 本发明结果显示,相较于正常组织,具有不同平均分子量(average molecular weights)的玻尿酸于受伤组织具有较高的黏附指数,且低平均分子量玻尿酸比高平均分子量玻尿酸具有较佳黏附效果。如图1所示,比较3种不同平均分子量的玻尿酸于黏附于受伤组织的效果,其中35万道尔顿玻尿酸的荧光指数相较于其它两种平均分子量的玻尿酸来的高(平均分子量为2百万道尔顿(dalton, Da)的玻尿酸以及平均分子量为1百万道尔顿的玻尿酸)。另外,1百万道尔顿的玻尿酸无论在正常的或受伤的结肠组织的黏附效果(即荧光指数)皆高于2百万道尔顿的玻尿酸,此结果证实了玻尿酸可以特异地(specifically)黏附在发炎部位,并促使本发明的发明人通过玻尿酸黏附于组织的特性及其细胞表面受体CD44相互作用,以维持糖胺聚糖与其他化合物的键结。因此,通过玻尿酸与药物结合以验证玻尿酸是否可作为标的的传送载体以将药物传送至富含CD44的位置。如前所述,当CD44过度表现于发炎、感染或癌症时,由于玻尿酸的配体可附着受体CD44,因此相关的药物可以很容易地到达并保持在目标位置且维持相对高浓度。基于玻尿酸于发炎部位的附着效果或富含CD44的位置,相对浓度较高的药物可聚集于标的位置以及提升其治疗效果,进而降低药物使用量以具有较佳的安全性。为了证实药物或染料是否成功结合以及进一步验证玻尿酸附着效果,本发明将染料与玻尿酸结合后,分别作用于细胞株以及小鼠。图2A和图2B分别是HCT15细胞(具有较少CD44表现的结肠直肠癌细胞株)于不同时间点上的荧光图;图2C和图2D分别是HT29细胞(具有较多CD44表现的结肠腺癌细胞株)于不同工作点上的荧光图。并由HT29细胞(图2C和图2D)的结果显示,玻尿酸-染料已成功键结并附着于HT29的较多CD44表现区域(图2C),甚至进入HT29细胞(图2D)。这表示本发明所述的方法是有效的,也意味着药物或染料可与玻尿酸键结以及玻尿酸具有与CD44结合的能力。

[0047] 游离染料以及玻尿酸-染料的黏附试验是通过小鼠尾静脉注射游离染料以及玻尿酸-染料并观察4星期进行实验。在游离染料的结果显示,此两种具有不同CD44表现的肿瘤细胞的黏附结果并无任何差异,其中HT29细胞的附着面积的比例为50.15%,而HCT15细胞是49.86%。然而,当玻尿酸-染料注射于小鼠尾静脉中,较多CD44表现的HT29细胞呈现出显著玻尿酸-染料,但较少CD44表现的HCT15细胞呈现的结果相当有限,其中HT29细胞的附着面积的比例为74.15%,而HCT15细胞的附着面积的比例为25.85%。因此,结果证明,当染料与玻尿酸结合后,由于玻尿酸与富含CD44的位置相结合而使得染料浓度增加。

[0048] 与CD44表现高度相关的疾病包括癌症、感染及发炎。在本发明的较佳的实施例中,所述的感染包括,但不限于病毒、细菌、真菌、原生动物(protozoa)、多细胞寄生虫

(multicellular parasites) 以及病原性蛋白颗粒(异常蛋白)。这些病原体是疾病流行的原因,即没有病原体就不会有感染疫情发生。在本发明较佳的实施例中,感染性疾病包括下呼吸道感染、HIV/AIDS、腹泻性疾病、结核病(tuberculosis)、疟疾(malaria)、麻疹(measles)、百日咳(pertussis)、破伤风(tetanus)、脑膜炎(meningitis)、梅毒(syphilis)、B型肝炎(hepatitis B)、败血症(sepsis)及热带病(tropical diseases)。发炎性异常是一大群疾病包括多种人类疾病。在本发明较佳的实施例中,发炎性疾病,包括痤疮(acne vulgaris)、过敏性疾病、哮喘(asthma)、自体免疫疾病、乳糜泻(ceeliac disease)、慢性前列腺炎(chronic prostatitis)、肾小球肾炎(glomerulonephritis)、超敏反应(hypersensitivities)、发炎性肠病(inflammatory bowel diseases)、骨盆炎性疾病(pelvic inflammatory disease)、再灌注损伤(reperfusion injury)、类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)、结节病(sarcoidosis)、移植排斥反应(transplant rejection)、脉管炎(vasculitis)及间质性膀胱炎(interstitial cystitis)。

[0049] 依据本发明,用语“药物”、“化合物”或“药剂(agent)”包含抗气喘药(anti-asthma drug)、抗组织胺药(anti-histamine drug)、抗感染药(anti-infection drug)、抗炎药、抗过敏药、抗病毒药(anti-virus drug)、免疫抑制剂(immunosuppressant),非固醇类抗炎药物(non-steroidal anti-inflammatory drug, NSAID)及类固醇。较佳的,所述的药物为抗过敏药、抗感染药、抗消炎药以及类固醇。大多数抗过敏的药物可被分为抗组胺剂、抗发炎剂、去充血剂(decongestant)及类固醇,例如非索非那定、西替利嗪(cetirizine)、缩苯酸氯菲安明(chlorpheniramine maleate)、假麻黄碱(pseudoephedrine)及布地奈德。大多数抗感染的药物,可被分为局部抗发炎(即使用于皮肤或粘膜而不进入血流以及不会在肝脏代谢)或全身性抗感染(即通过口服或注射给药以治疗内部器官感染)。大多数抗发炎的药物可以分为固醇类抗炎药物、非固醇类抗炎药物、COX-2拮抗剂及类固醇。

[0050] 在较佳的实施例中,药物较佳为抗气喘药、抗真菌药、抗组织胺药、抗发炎药、抗病毒药、非固醇类抗炎药物以及类固醇。在另一较佳的实施例中,与玻尿酸结合的抗气喘药,包括沙丁胺醇(salbutamol);与玻尿酸结合的非固醇类抗炎药物包括尼美苏来(Nimesulide)、希乐葆、美洛西卡(Meloxicam)、双氯芬酸(Diclofenac)及匹洛西卡(Piroxicam);与玻尿酸结合的抗过敏药物包括非索非那定;与玻尿酸结合的抗真菌药物包括两性霉素B(Amphotericin B);与玻尿酸结合的抗病毒药物,包括利巴韦林(Ribavirin);与玻尿酸结合的非固醇类抗炎药物,包括布地奈德及普赖苏浓;此外,COX-2拮抗剂包括希乐葆。

[0051] 本发明的目的是将玻尿酸与药物结合或键结、连接物(linker)或间隔物(spacer)的有无,并通过玻尿酸的羧基(carboxyl group)、羟基(hydroxyl group)或氨基(amino group)以于特定时间及位置达成所欲的效果。因此,玻尿酸用于作为标的运输载体以携带药物至富含CD44的特定部位,其具有较佳的治疗效果和安全性。

[0052] 依据本发明,“连接物”或“间隔物”是指连接化合物两端的有机部分。连接物通常包括一直链或一原子例如氧或硫、一个单元例如双硫(SS)、胺(NH)、一氧化碳[C(O)]、酰胺[C(O)NH]、一氧化硫(SO)、二氧化硫(SO₂)、磺胺(SO₂NH)或链原子例如取代(substituted)或未取代的烷基(unsubstituted alkyl group)、一个或多个亚甲基(methylenes)可由氧(O)、硫(S)、一氧化硫(SO) 二氧化硫(SO₂)、胺(NH)、胺(NH₂)或一氧化碳[C(O)]中断或终止。

本发明所述的连接物或间隔物可以不存在,亦可于药物与HA之间提供任何化学化合物,或以化学性、酶或自发地分解,其也包含至少一种用于连接药物的氨基(amino group)、硫醇基(thiol group)、更多羧基等。连接物或间隔物可以是多肽(polypeptide)、胜肽(peptide)或脂质。

[0053] 较佳的,所述的连接物或间隔物是含有直链或支链的脂肪族(aliphatic)、芳香族(aromatic)或芳脂族(araliphatic)的C2-C20二羧酸(dicarboxylic acids)、胺基酸或胜肽。

[0054] 连接物于本发明的作用在于建构玻尿酸与所述药物之间的桥臂(arm)或间隔。当连接物介于玻尿酸与所述药物之间时,与玻尿酸键结的一侧是通过酰胺(amide)、羧基、羟基(hydroxyl group)或胺基(amino group)与玻尿酸键结,与所述药物键结的一侧则是以任何可能的共价键结(covalent conjugation)。

[0055] 当连接物或间隔物是二羧酸(dicarboxylic acid)时,该羧酸基团与药物形成的酯键(ester bond)可能是玻尿酸的羟基基团。当连接物或间隔物是二酰肼(dihydrazide)时,胺基可能会与玻尿酸的游离羧基形成酰胺键(amide bond)。较佳的,所述的连接物或间隔物是具有琥珀酸的药物(succinic acid to drug),具有己二酸二酰肼(adipic dihydrazide,ADH)的玻尿酸。

[0056] 在较佳的实施例中,本发明更提供一种化合物,其化合物是由一糖胺聚糖及一活性化合物键结所组成,其中活性化合物的一官能基与糖胺聚糖及其衍生物或其盐类的羧基形成共价键结,其中糖胺聚糖是玻尿酸,且活性化合物选自于抗发炎药、抗过敏药及类固醇所组成的群组。

[0057] 较佳的,所述的活性化合物是抗发炎药时,其包括希乐葆(一种COX-2拮抗剂);所述的发炎药包括非索非那定;所述的类固醇包括布地奈德及普赖苏浓;活性化合物可通过连接物,与玻尿酸的羧基及活性物质的胺基直接或间接键结。

[0058] 在另一较佳的实施例中,无论是直接或是通过连接物之间键结,玻尿酸的羧基与活性物质可形成酰胺键或酯键。

[0059] 在间接键结中,连接物是选自由二酰肼(dihydrazide)、己二酸二酰肼(adipic dihydrazide)、多肽、胜肽、脂质、胺基酸或含有直链或支链的脂肪族、芳香族或芳脂族的C2-C20二羧酸所组成的群组。

[0060] 在另一较佳的实施例中,玻尿酸的平均重量分子量介于5千道尔顿至200万道尔顿,且玻尿酸具有至少40%的羧基参与反应。

[0061] 为了用于治疗由感染、损伤、自体免疫疾病(例如类风湿关节炎)或过敏所引起的急性或慢性发炎,本发明所述的较佳药物剂型包括以一赋形剂及/或稀释剂配制可用于口或循环系统可使用的剂型。较佳的,所述的口服药物剂型是选自于由固体剂型、溶液、片剂及胶囊所组成的群组,其中溶液包括,但不限于悬浮液;其中片剂,包括但不限于控释片剂(controlled-release tablet);其中胶囊,包括但不限于肠溶涂胶囊(enteric-coated capsule)。更佳的,所述的循环系统或全身给药形式是选自于由静脉注射(introvenous, IV)、肌肉注射(intra-muscle, IM)和皮下注射(subcutaneous, SC)所组成的群组。

[0062] 本发明将进一步通过下面的实施例来做说明,但应明了的是,该等实施例仅为说明之用,而不应被视为本发明在实施上的限制。

[0063] 实施例

[0064] 实施例1玻尿酸在结肠组织的黏附力(透过第三版IVIS图像系统)

[0065] 步骤:

[0066] 1. 将0.25克高重量平均分子量玻尿酸钠粉末(标示为HHA,高重量平均分子量,分子量:2百万道尔顿,购自Freda)及0.25克低重量平均分子量玻尿酸钠粉末(标示为LHA,低重量平均分子量,分子量:35万道尔顿,购自Freda)分别加入50毫升(mL)磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)中,以形成浓度为0.5%的溶液,接着搅拌6小时直到粉末完全溶解。0.25克中重量平均分子量玻尿酸钠粉末(标示为MHA,中重量平均分子量,分子量:1百万道尔顿,购自Freda)加入50毫升(mL)磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)中,接着搅拌6小时直到粉末完全溶解

[0067] 2. 荧光玻尿酸(fluorescent HA,HA-f)是由下列方式制备:(1)将0.39克MES游离酸[2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid,购自Calbiochem]溶解于100毫升二次水中;(2)A溶液:将65毫克(mg)的荧光胺粉末(fluoresceinamine powder)(异构物I,购自Fluka)溶于9mg的95%酒精溶液中,然后在避光下搅拌10分钟;(3)B溶液:将359mg EDC粉末[N-(3-Dimethylamino propyl)-N-ethyl carbodiimide hydrochloride,购自Sigma]溶于步骤1的9mL MES缓冲液,然后搅拌10分钟;(4)C溶液:216mg NHS粉末(N-Hydroxysuccinimide,购自Sigma)溶于9mL MES缓冲液,然后搅拌10分钟;(5)将3mL A溶液缓慢地滴入50mL 0.5%的玻尿酸溶液,然后在避光下搅拌10分钟;(6)将3mL B溶液及5mL C溶液分别滴入步骤(5)的溶液,然后在避光下搅拌10分钟;(7)将0.02M MES缓冲液缓慢地滴入步骤(6)的溶液直到体积达到100毫升,然后在室温并避光下搅拌24小时;(8)将反应后的产物倒入透析管中(分子量:12000至14000),以5公升(L)的二次水作为透析液,然后在4℃并避光下搅拌5天,期间每12小时换一次透析液,直到透析液中没有荧光为止;(9)透析后的液体以50mL塑料离心管分装,接着保存在-20℃冰箱过夜,之后在避光下以冷冻干燥机干燥;(10)干燥的荧光玻尿酸粉末保存在-20℃冰箱;(11)将50mg荧光玻尿酸粉末缓慢地加入10mL磷酸盐缓冲液中,然后搅拌6小时,直到粉末完全溶解。

[0068] 3. 将7周至8周大的SD大鼠(Sprague-Dawley)的结肠组织切下后,以磷酸盐缓冲液冲洗,再切成3公分至4公分,最后浸泡在磷酸盐缓冲液中。

[0069] 4. 以牙刷纵向刷结肠组织20次以制备受伤的结肠组织,并将受伤的结肠组织浸泡在磷酸盐缓冲液中。

[0070] 5. 将正常与受伤的结肠组织放入12孔培养盘中,每孔分别加入1mL的0.5%荧光玻尿酸溶液,然后在室温下摇晃2小时。过多的荧光玻尿酸溶液在2小时后以微吸管吸除,再浸泡至磷酸盐缓冲液10分钟后,移除磷酸盐缓冲液。重复上述步骤三次。

[0071] 6. 将干净的结肠组织的衬里组织(lining tissue)朝上放置在12孔培养盘中,然后放在活体分子影像是统(in vivo image system,IVIS,购于XENOVEN公司)的平台(dock)上。出厂参数是设定为荧光绿蛋白(green fluorescent protein,GFP),激发(excitation)波长设定为465纳米(nm),而发射(emission)波长设定为500nm,影像再由软件捕捉。

[0072] 7. 所有显示的数值是指观察的平均数。组织学指数(histological index)是利用学生t检定(Student's t-test)分析。

[0073] 结果:图1显示荧光指数的定量及排列结果。正常结肠组织的荧光指数定义为1。其

他结肠组织再依据定义的数值作校准。结果显示相同重量平均分子量的玻尿酸，黏附在受伤的结肠组织明显比在正常结肠组织多 ($P < 0.01$)。比较三种不同重量平均分子量玻尿酸黏附在受伤结肠组织的结果后，被吸收的35万道尔顿玻尿酸的荧光指数明显高过其他二种玻尿酸(2百万与1百万道尔顿)。此外，不论在正常结肠组织或受伤结肠组织中，被吸收的1百万道尔顿玻尿酸的荧光指数高过2百万道尔顿玻尿酸。

[0074] 实施例2玻尿酸-染料(HA-dye)结合作用过程以及玻尿酸-染料于活体外(in vitro)影像

[0075] HA-dye结合作用的整个过程必须避光条件下进行。

[0076] 1.合成玻尿酸(HA)-己二酸二酰肼(adipic dihydrazide,ADH)包括以下步骤:

[0077] (1)重量平均分子量为34万道尔顿、50mg玻尿酸加入水中,以形成浓度为每毫升4毫克(mg/mL)的溶液。

[0078] (2)将超过5倍的114.8mg的ADH加入前述玻尿酸溶液中。

[0079] (3)加入0.1N的氢氯酸(hydrochloric acid,HCl)将酸碱值(pH值)调整至4.75。

[0080] (4)接着,将1当量(25.1mg)的EDC加入前述步骤3的溶液中,并以0.1N的HCl将pH值维持在4.75。

[0081] (5)经过15分钟后,加入0.1N氢氧化钠(sodium hydroxide,NaOH)以停止反应并将pH值调整为7.0,以获得一混合物。

[0082] (6)将该混合物倒入透析管中(分子量:3500),以100毫莫耳(mM)的氯化钠(sodium chloride,NaCl)彻底透析,再以25%乙醇(EtOH)循环4次,最后一次再以水循环。将透析后的溶液以0.2微米(μm)乙酸纤维素膜过滤,再快速冷冻并冷冻干燥。

[0083] (7)ADH的取代度(substitution degree)由氢核磁共振光谱图(^1H nuclear magnetic resonance, ^1H NMR)测量。

[0084] 2.合成HA-ADH-荧光异硫氰酸盐(fluorescein isothiocyanate,FITC)包括以下步骤:

[0085] (1)将88mg、DS=36%的HA-ADH溶解于35mL水中。

[0086] (2)将9.5mg FITC溶解于10mL二甲亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO)。

[0087] (3)将步骤1的HA-ADH溶液与步骤2的FITC溶液混合。

[0088] (4)于室温历经48小时后,将步骤3的混合溶液以0.3莫耳(M)氯化钠以及纯水以及截留分子量(molecular weight cut-off,MWCO)为12000至14000的透析袋交替透析3天。

[0089] (5)将步骤4的透析液冷冻干燥2天。

[0090] (6)FITC的取代度由用紫外光谱测定。

[0091] 3.HA-dye于活体外(in vitro)影像

[0092] (1)将 1×10^5 人类大肠癌细胞株HT29细胞以及HCT15细胞[CD44阳性细胞,CD44positive cell]培养于3.5公分细胞培养盘。

[0093] (2)将前述 $1\mu\text{M}$ of HA-dye(HA为34万道尔顿)分别于指定时间加入细胞培养盘。

[0094] (3)历经培养后,以PBS清洗细胞并以3.7%甲醛(formaldehyde)固定细胞。

[0095] (4)以共轭焦显微镜(confocal microscopy)观察HA-dye与细胞的表现。

[0096] 结果显示:HCT15细胞(图2A和图2B)以及HT29细胞(图2C和图2D)的附着部位以及染料的量。结果显示染料已成功与玻尿酸结合,且玻尿酸加强于HT29细胞的富含CD44位置

的HA-dye浓度,且HT29细胞因较HCT15细胞具有较多的CD44而具有较强的荧光。亦证明了HA-dye可以进入细胞(图2D)。HA-dye施予HT29细胞(含较多CD44)6小时后以及12小时后,分别产生积聚(accumulation)以及内化(internalization)现象。但在HCT15细胞(含较少CD44)中于HA-dye施予6小时或12小时后并没有观察到此现象。

[0097] 实施例3合成玻尿酸-希乐葆(Celecoxib)化合物

[0098] 合成HA-Celecoxib化合物的步骤如以下所示:

[0099] (1) 将100mg玻尿酸(分子量为1万道尔顿至70万道尔顿)溶解于25mL的DD水。

[0100] (2) 将0.8eq四丁基氢氧化铵(tetrabutylammonium hydroxide, TBA-OH)加入前述(1)所得的玻尿酸溶液中并搅拌16小时。

[0101] (3) 将前述(2)溶液干燥已获得HA-TBA白色固体。

[0102] (4) 将前述(3)40mgHA-TBA溶于DD水,并加入30mg EDC粉末以及18mg NHS粉末并于室温搅拌5分钟。

[0103] (5) 4mg Celecoxib溶解于2mL DMSO中。

[0104] (6) 将前述(4)及(5)混合并于室温搅拌72小时,以获得一混合物。

[0105] (7) 将前述(6)所获得的混合物以2:1的DMSO:DD于透析袋(MWCO为1200至1400)透析,并换3次溶液。

[0106] (8) 再将前述(7)以0.3M NaCl于透析袋(截流分子量(MWCO)为1200至1400)透析,并于1天换2次溶液。

[0107] (9) 将前述(8)去水并冻干后以获得HA-Celecoxib。

[0108] 结果显示:图3显示HA-Celecoxib化合物结构。

[0109] 实施例4HA-Celecoxib于活体外(In vitro)对于RAW 264.7细胞的抗发炎效果

[0110] 步骤如以下所示:

[0111] (1) RAW 264.7细胞以每孔 1×10^6 (1000 μ L)细胞接种于24孔盘,且于5%CO₂、37℃的环境培养24小时。

[0112] (2) 将培养液换成包含10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的DMEM,且细胞分别培养于以下所述剂量的培养液中4小时:100nM Celecoxib、等同于100nM Celecoxib的HA-Celecoxib或4.9 μ g/mL HA,接着再以1 μ g/mL脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)培养24小时。

[0113] (3) 收集培养液以测量前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2)。

[0114] (4) 96孔盘(wells-plate) (购自Nunc公司)内涂覆有羊多株小鼠IgG二级抗体。

[0115] (5) 将等份细胞培养液加入前述孔盘中与一级PGE2单株抗体以及示踪剂(tracer) PGE2-乙酰胆碱脂酶(acetylcholinesterase)于黑暗且室温下过夜放置。

[0116] (6) 隔天将培养液吸出,并以100 μ L洗涤液(购自于美国Cayman Chemical公司, Ann Arbor)冲洗5次。

[0117] (7) 将200 μ L Elman氏试剂加入前述(6)的孔盘中,并在室温下培养60分钟至90分钟远离直射光。

[0118] (8) 将前述(7)孔盘旋转或摇晃以减少所需显色的时间。

[0119] (9) 于波长412nm读取吸光值。

[0120] (10) 通过PGE2标准曲线来计算各样品的PGE2浓度。

[0121] (11) PGE₂量百分率作为各样品PGE₂的浓度,且其中一样品由LPS处理的组别作为对照组,并将使此值乘以100。

[0122] (12) PGE₂的实际量估计为1370ng/mL并作为有LPS处理的对照组。

[0123] 结果显示:如图4所示,LPS成功诱导发炎,并PGE₂的量作为指标。单独施予药物(Celecoxib)具有治疗作用;然而,HA与Celecoxib结合(HA-cele)比单独施予药物具有较佳的治疗效果。

[0124] 实施例5合成玻尿酸-己二酸二酰肼-布地奈德(HA-ADH-Budesonide)化合物

[0125] 合成HA-ADH的步骤如以下所示:

[0126] (1) 将50mg玻尿酸溶解于水中形成浓度为4mg/mL。

[0127] (2) 将5倍过量的(114.8mg)ADH加入到前述(1)的溶液中,以形成一混合物。

[0128] (3) 将0.1N的HCl加入至该混合物以将pH值调节至4.75。

[0129] (4) 1当量(25.1mg)固体的EDC加入前述(3)中。

[0130] (5) 历经15分钟后,加入0.1N NaOH以调节pH值至7.0并停止反应。

[0131] (6) 将前述(5)所得产物转移到经预处理的透析管(MWC0为3500)并以100mM NaCl彻底透析,再以25%乙醇/水进行4次循环,最后以水透析。然后将溶液通过0.2 μ m的醋酸纤维素膜(cellulose acetate membrane),再经快速冷冻并冷冻干燥过滤。

[0132] (7) 以¹H NMR以测定ADH的取代度。

[0133] 合成HA-ADH-Budesonide的步骤如以下所示:

[0134] (1) HA-ADH-Budesonide琥珀酸盐(succinate)是由Budesonide琥珀酸盐的羧基与HA-ADH的胺基经由EDC和NHS化学键结所形成。

[0135] (2) 7.4mg Budesonide琥珀酸溶解于1mL的DMSO中,并用含有14.5 μ mol的EDC和14.5 μ mol的NHS的1mL纯水进行反应5分钟,以形成混合液。

[0136] (3) 将混合液以滴加方式加到含有20mg HA-ADH的助溶剂(8mL水:DMSO=1:1(V/V))中。

[0137] (4) 将前述(3)于室温(约30 $^{\circ}$ C)搅拌24小时。

[0138] (5) 将前述(4)的溶液放入(MWC0为12000-14000)的透析袋中以0.3M NaCl及水交替使用透析3天。

[0139] (6) 将前述(5)的溶液冷冻干燥2天并保存于4 $^{\circ}$ C。

[0140] (7) 通过¹H-NMR测定取代度。

[0141] 结果显示:图5显示HA-ADH-Budesonide的化合物结构。

[0142] 实施例6HA-ADH-Budesonide于活体外(In vitro)对于RAW 264.7细胞的抗发炎效果

[0143] 步骤如以下所示:

[0144] (1) 使RAW 264.7细胞以无酚红培养液(购自于澳洲Gibco-BRL,Vienna公司)悬浮并调整至106/mL,再分别培养于以下所述剂量的培养液中4小时:10 μ M Budesonide、378 μ g/mL HA以及等同于10 μ M Budesonide的HA-ADH-Budesonide

[0145] (2) 接着再以1 μ g/mL LPS培养24小时。

[0146] (3) 仅以培养液处理的组别作为负对照组,以LPS(1 μ g/mL)处理的组别作为正对照组。

[0147] (4) 移除培养液,并以格里斯反应(Griess-reaction)测定一氧化氮(nitric oxide)累积后的iNOS活性。

[0148] (5) 将100 μ L格里斯试剂(Griess reagent)(其包含有1%磺胺(sulfanilamide)、2.5%的磷酸(phosphoric acid)中含有0.1%盐酸萘乙二胺(naphthyl ethylenediamine dihydrochloride)加入到100 μ L的培养上清液并以酵素连结免疫微孔板(ELISA microplate reader)(购自于美国SpectraMax[®]公司M2e多模式检测仪)于波长550nm检测显色。

[0149] (6) 以亚硝酸钠(sodium nitrite)溶解于不含酚红的培养液中,并经连续稀释以做成标准曲线。

[0150] 结果显示:如图6所示,HA+LPS的组别以及HA-bude+LPS(“HA-bude”即为“HA-ADH-Budesonide”)相较于单独施予LPS、bude.+LPS(即Budesonide+LPS)具有治疗效果。此处所指的发炎指标是亚硝酸盐(nitrite)。

[0151] 实施例7合成玻尿酸-己二酸二酰肼-非索非那定(HA-ADH-Fexofenadine)化合物

[0152] 合成HA-ADH-Fexofenadine的步骤如以下所示:

[0153] (1) HA-ADH-Fexofenadine是由Fexofenadine的羧基与HA-ADH的胺基经由EDC和NHS化学键结所形成。

[0154] (2) 7.4mg Fexofenadine溶解于1mL的DMSO中,并用含有73.3 μ mol的EDC和73.9 μ mol的NHS的1mL纯水进行反应5分钟,以形成混合液。

[0155] (3) 将混合液以滴加方式加到含有20mg HA-ADH的助溶剂(8mL水:DMSO=1:1(V/V))中。

[0156] (4) 将前述(3)于室温(约30 $^{\circ}$ C)搅拌24小时。

[0157] (5) 将前述(4)的溶液放入(MWC0为12000-14000)的透析袋中以0.3M NaCl及水交替使用透析3天。

[0158] (6) 将前述(5)的溶液冷冻干燥2天并保存于4 $^{\circ}$ C。

[0159] (7) 通过¹H-NMR测定取代度。

[0160] 结果显示:图7显示HA-ADH-Fexofenadine的化合物结构。

[0161] 实施例8HA-ADH-Fexofenadine于活体外(In vitro)对于RAW 264.7细胞的抗发炎效果

[0162] 步骤如以下所示:

[0163] (1) RAW 264.7细胞以每孔 1×10^6 (1000 μ L)细胞接种于24孔盘,且于5%CO₂、37 $^{\circ}$ C的环境培养24小时。

[0164] (2) 将培养液换成包含10%FBS的DMEM,且细胞分别培养于以下所述剂量的培养液中4小时:100 μ M Fexofenadine、等同于100 μ M Fexofenadine的HA-ADH-Fexofenadine或2.96 μ g/mL HA,接着再以1 μ g/mL LPS培养24小时。

[0165] (3) 收集培养液以测量前列腺素E2(prostaglandin E2,PGE2)。

[0166] (4) 96wells-plate内涂覆有羊多株小鼠IgG二级抗体。

[0167] (5) 将等份细胞培养液加入前述孔盘中与一级PGE2单株抗体以及示踪剂PGE2-乙酰胆碱脂酶于黑暗且室温下过夜放置。

[0168] (6) 隔天将培养液吸出,并以100 μ L洗涤液冲洗5次。

- [0169] (7) 将200 μ L Elman氏试剂加入前述(6)的孔盘中,并在室温下培养60分钟至90分钟远离直射光。
- [0170] (8) 将前述(7)孔盘旋转或摇晃以减少所需显色的时间。
- [0171] (9) 于波长412nm读取吸光值。
- [0172] (10) 通过PGE2标准曲线来计算各样品的PGE2浓度。
- [0173] (11) PGE2量百分率作为各样品PGE2的浓度,且其中一样品由LPS处理的组别作为对照组,并将使此值乘以100。
- [0174] (12) PGE2的实际量估计为1370ng/mL并作为有LPS处理的对照组。
- [0175] 结果显示:如图8所示,单独施予药物(Fexofenadine)具有治疗作用;然而,HA与Fexofenadine结合(“HA-fexo”即为“HA-ADH-Fexofenadine”)比单独施予药物具有较佳的治疗效果。
- [0176] 实施例9合成玻尿酸-己二酸二酰肼-普赖苏浓(HA-ADH-Prednisolone)化合物
- [0177] 合成Prednisolone 21-半酯(hemiester):
- [0178] (1) 1g (2.77mmol) Prednisolone溶液与1.125克琥珀酸酐(succinic anhydride) (12.55mmol) 于8mL吡啶pyridine室温下搅拌,以形成一混合物。
- [0179] (2) 历经24小时后,将混合物倒入含有25g冰、25mL水及10mL且浓度为0.1N的盐酸中。
- [0180] (3) 通过过滤收集分离的晶体,以水洗涤、干燥后,再用甲苯(toluene)使其再结晶(recrystallize),并过夜再次干燥。
- [0181] (4) 将前述(3)所制得的半酯经¹H-NMR谱测量。
- [0182] 合成HA-ADH-Prednisolone hemiester:
- [0183] (1) 溶液1:将14mg EDC (73.3 μ mol) 及8.5mg NHS (73.9 μ mol) 加入1mL水中。
- [0184] (2) 溶液2:将6.4mg Prednisolone hemiester (14.5 μ mol) 溶于1mL DMSO中。
- [0185] (3) 溶液3:20mg HA-ADH (DS=31%) (ADH:14.5 μ mol) 溶于8mL的共溶剂中(水:DMSO=1:1)。
- [0186] (4) 混合溶液1与溶液2,搅拌5分钟即可活化Prednisolone hemiester的羰基,并形成一混合物。
- [0187] (5) 5分钟后,将前述(4)的混合物逐滴加入(速率为1mL/min)溶液3中并搅拌混合。
- [0188] (6) 将前述(5)所得的混合液于室温(约30 $^{\circ}$ C)搅拌24小时。
- [0189] (7) 将前述(6)所得的溶液以MWC0为12000至14000透析袋及0.3M氯化钠/纯水交替使用透析3天。
- [0190] (8) 将前述(7)所得的溶液冷冻干燥2天。
- [0191] (9) 通过¹H-NMR测量HA-ADH-Prednisolone的取代度。
- [0192] 结果显示:如图9所示,HA-ADH-Prednisolone化合物的结构。
- [0193] 实施例10HA-ADH-Prednisolone于活体外(In vitro)对于RAW 264.7细胞的抗炎效果
- [0194] 步骤如以下所示:
- [0195] (1) RAW 264.7细胞以每孔 1×10^6 (1000 μ L) 细胞接种于24孔盘,且于5%CO₂以及37 $^{\circ}$ C的环境培养24小时。

[0196] (2) 将培养液换成包含10%FBS的DMEM,且细胞分别培养于以下所述剂量的培养液中4小时:86.7 μ M Prednisolone、等同于86.7 μ M Celecoxib的HA-ADH-Prednisolone或70 μ g/mL HA,接着再以1 μ g/mL LPS培养24小时。

[0197] (3) 收集培养液以测量前列腺素E2 (prostaglandin E2, PGE2)。

[0198] (4) 96wells-plate内涂覆有羊多株小鼠IgG二级抗体。

[0199] (5) 将等份细胞培养液加入前述孔盘中与一级PGE2单株抗体以及示踪剂PGE2-乙酰胆碱脂酶于黑暗且室温下过夜放置。

[0200] (6) 隔天将培养液吸出,并以100 μ L洗涤液(购自于美国Cayman Chemical公司,Ann Arbor)冲洗5次。

[0201] (7) 将200 μ L Elman氏试剂加入前述(6)的孔盘中,并在室温下培养60分钟至90分钟远离直射光。

[0202] (8) 将前述(7)孔盘旋转或摇晃以减少所需显色的时间。

[0203] (9) 于波长412nm读取吸光值。

[0204] (10) 通过PGE2标准曲线来计算各样品的PGE2浓度。

[0205] (11) PGE2量百分率作为各样品PGE2的浓度,且其中一样品由LPS处理的组别作为对照组,并将使此值乘以100。

[0206] (12) PGE2的实际量估计为1370ng/mL并作为有LPS处理的对照组。

[0207] 结果显示:如图10所示,单独施予药物(Prednisolone)具有治疗作用;然而,HA与Prednisolone结合(“HA-pred”即为“HA-ADH-Prednisolone”)比单独施予药物具有较佳的治疗效果。

[0208] 实施例11HA-ADH-Prednisolone于活体内(In vivo)治疗类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)的效果

[0209] 步骤如以下所示:

[0210] (1) 将30只8周大Sprague-Dawely (SD) 大鼠(购自于台湾BioLASC0公司)随机分成4组(其中9只大鼠施予安慰剂,9只大鼠施予Prednisolone,6只大鼠施予HA-ADH-Prednisolone以及6只大鼠施予玻尿酸),且每两只大鼠放同一笼并于台湾动物科技研究所(Institute of Taiwan Animal Technology)。

[0211] (2) 将0.1mL弗氏完全佐剂(complete Freund's adjuvant,浓度为10mg/mL,购自于Chondrex公司),其含有10mg/mL热灭活(heat-killed)的分枝杆菌(mycobacterium)以皮下注射方式(subcutaneously)注射于大鼠的右后肢的脚垫(footpad)。

[0212] (3) 针头应插入脚垫的皮肤下并朝向脚踝的位置。

[0213] (4) 于注射后30分钟内观察严重且急性发炎,并观察3天至4天的峰值,且持续20天至25天。

[0214] (5) 大鼠在佐剂诱导的关节炎(adjuvant-induced arthritis, AIA)的第14天,以静脉注射皆为10mg/kg的Prednisolone或HA-Prednisolone,或以生理盐水作为对照组。

[0215] (6) 大鼠于治疗的第20天牺牲,并分离组织。

[0216] 测量类风湿性关节炎:

[0217] 爪子厚度和脚踝周长:通过光标卡尺(caliper)以测量大鼠爪子厚度,其中光标卡尺的种类例如数字光标卡尺(Mitutoyo digimatic caliper,购自于三丰公司)。通过量测2

垂直的直径以测量脚踝周长,其中外侧直径(latero-lateral diameter)为a,前后侧径为b,且脚踝周长计算公式如下:

$$[0218] \quad 2\pi\sqrt{(a^2 + b^2)/2}。$$

[0219] 结果显示:如图11所示,类风湿性关节炎已被成功诱导。于开始施予药物的期间(14天),单独施予玻尿酸的组别与对照组(载体)比较,其大鼠的爪子厚度具有相同的趋势。单独施予药物(Prednisolone)显示治疗效果。然而,当药物与玻尿酸结合后(即HA-Prednisolone),其治疗效果比单独施予药物较好,并且具有统计学意义。此外,如图12所示,由脚踝周长的变化来看,单独施予玻尿酸甚至会加重类风湿性关节炎的症状。

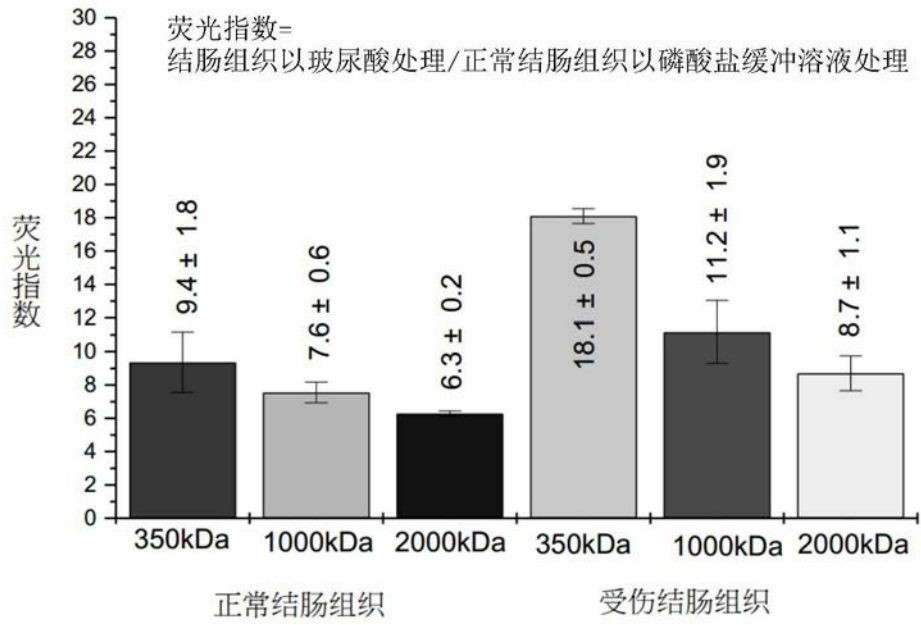


图1

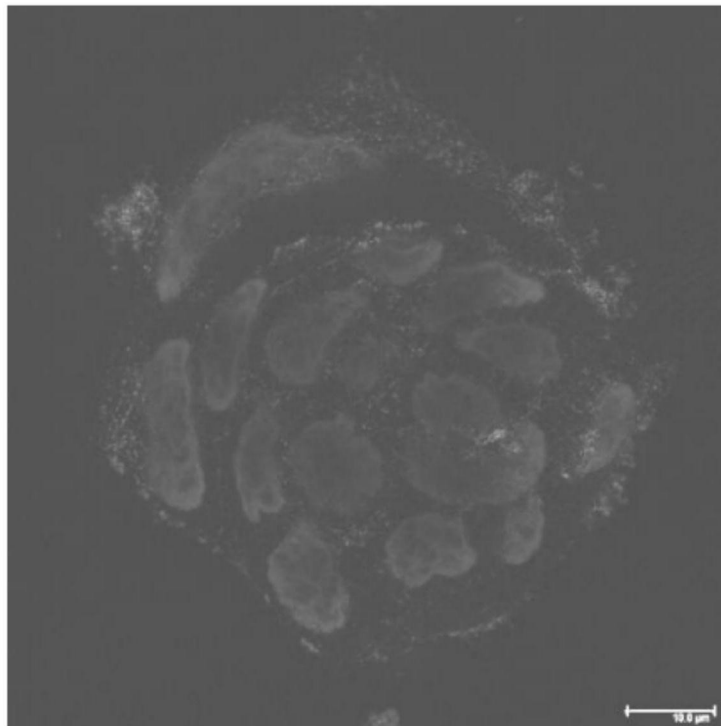


图2A

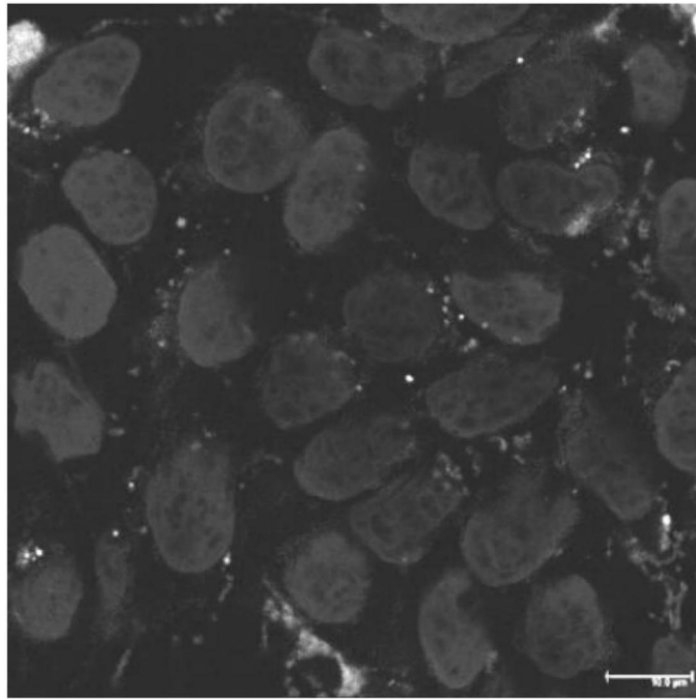


图2B

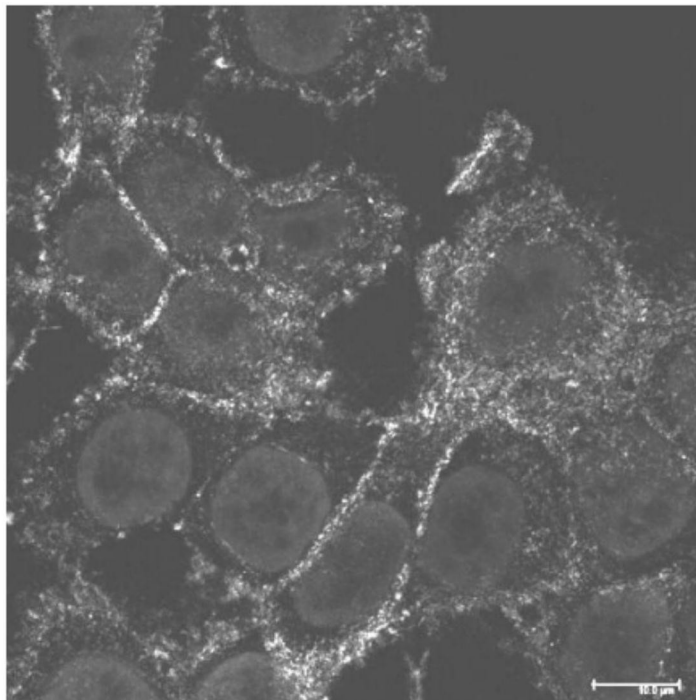


图2C

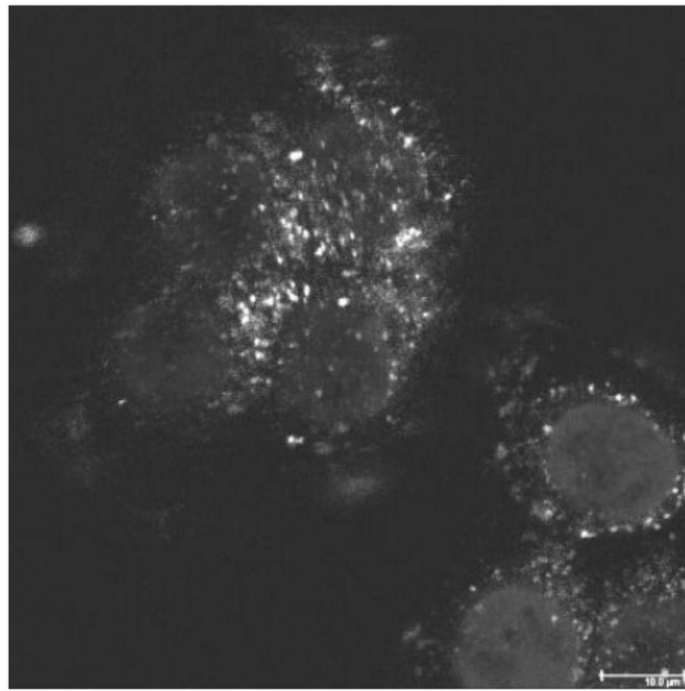


图2D

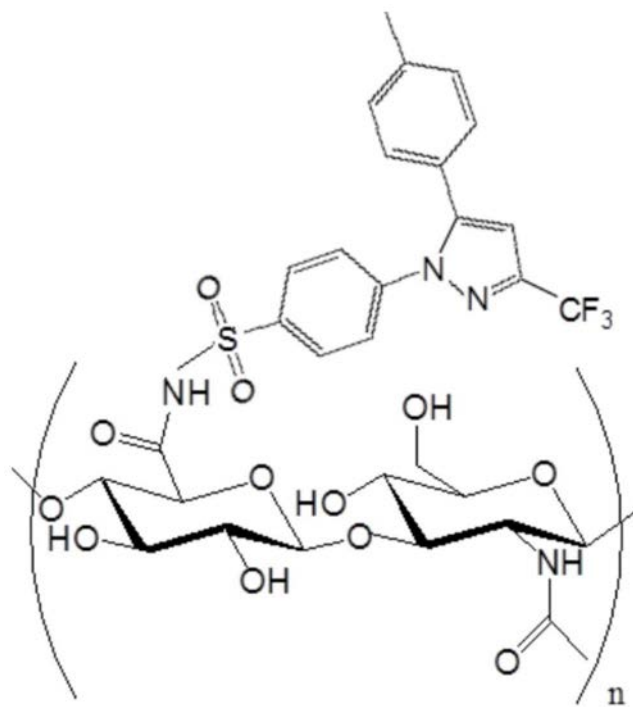


图3

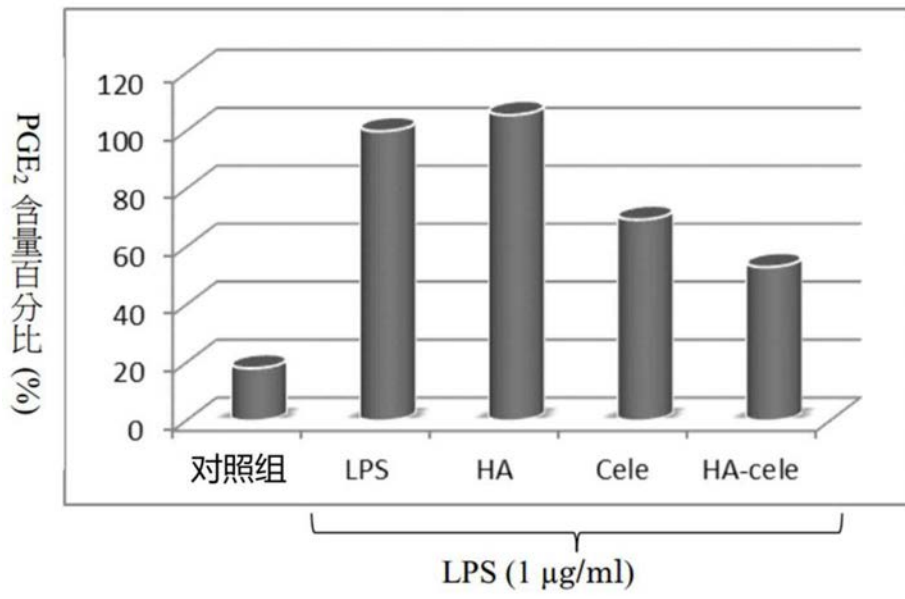


图4

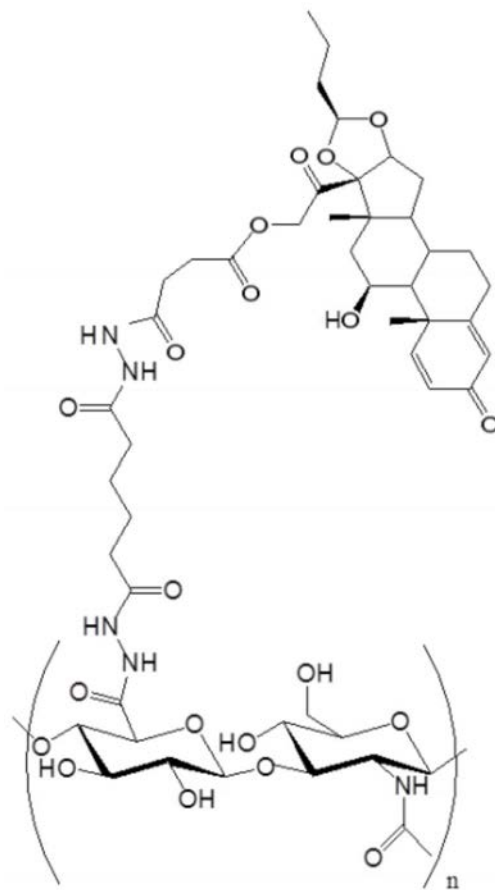


图5

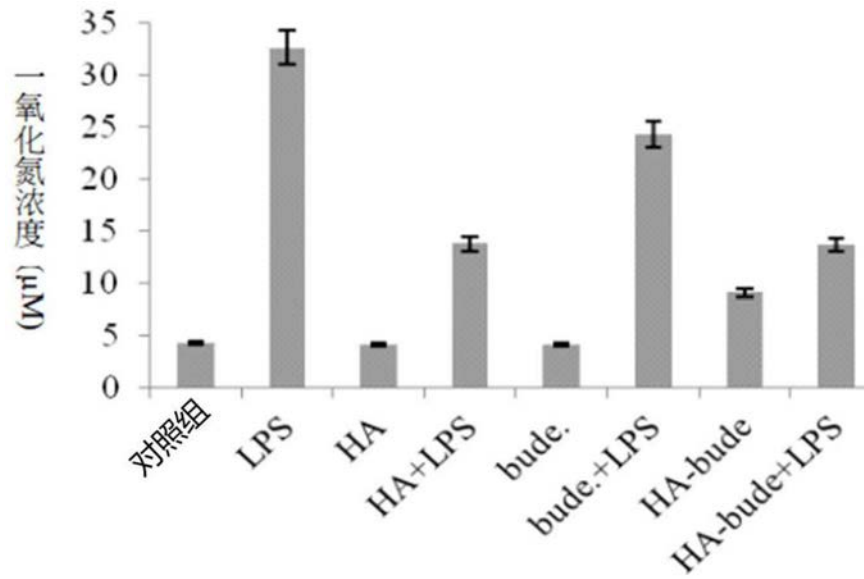


图6

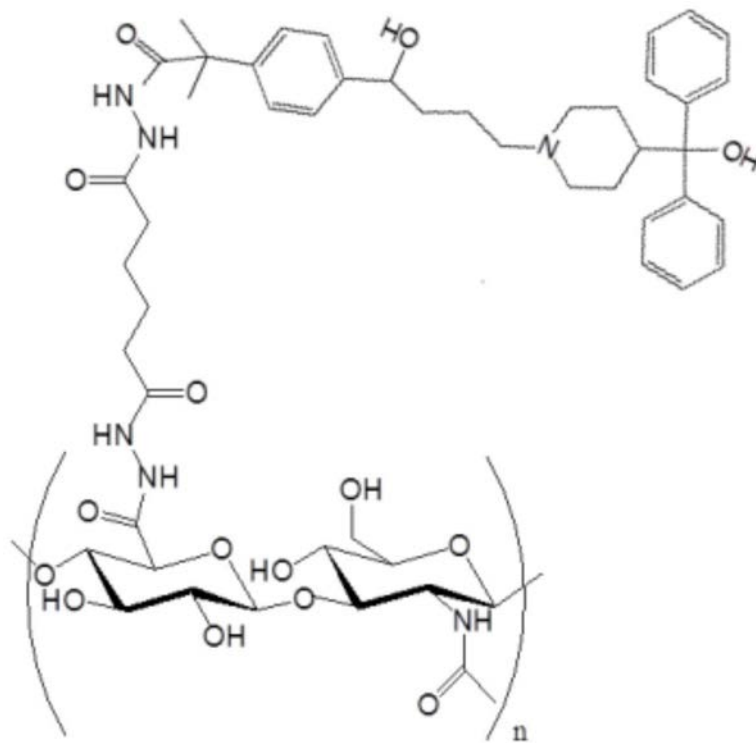


图7

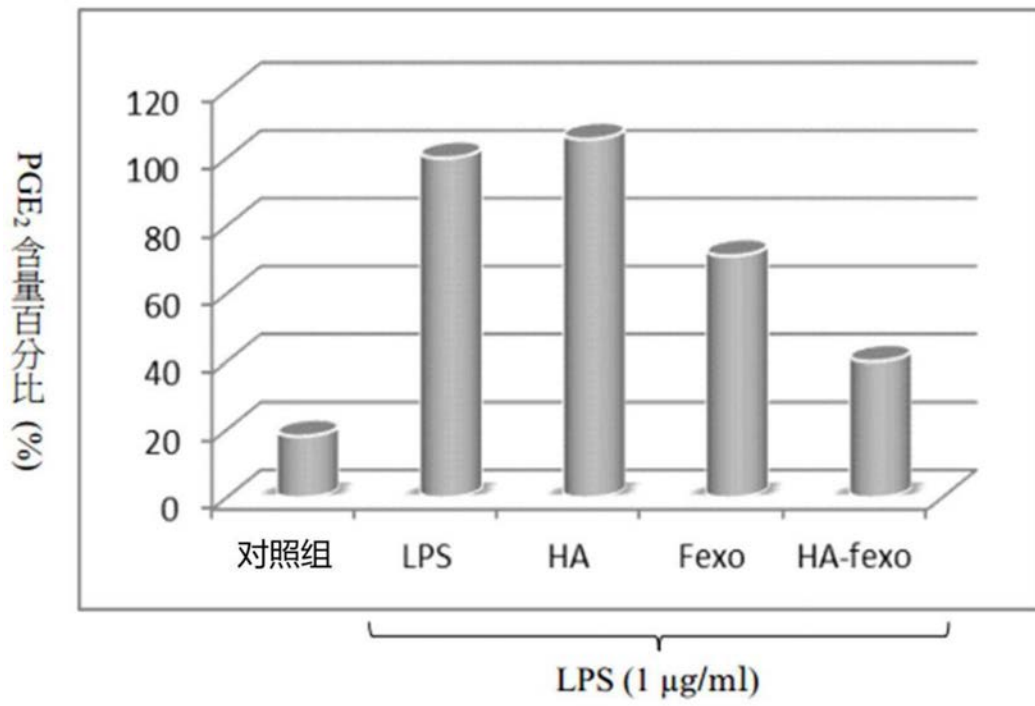


图8

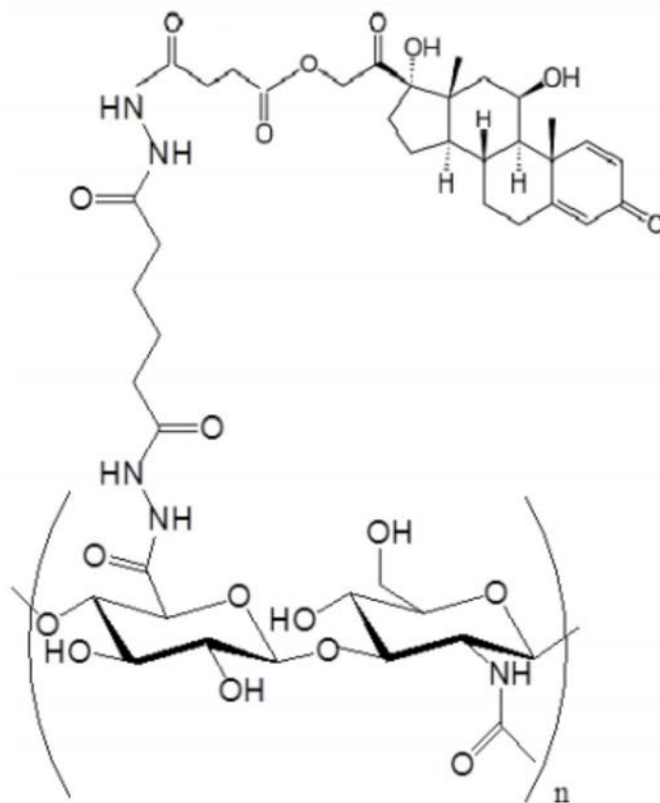


图9

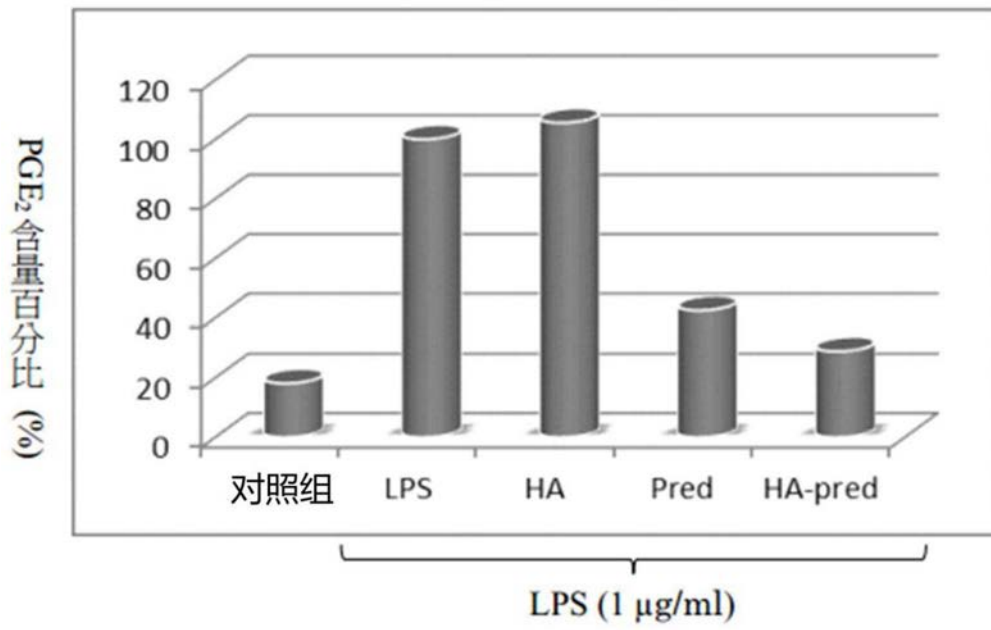


图10

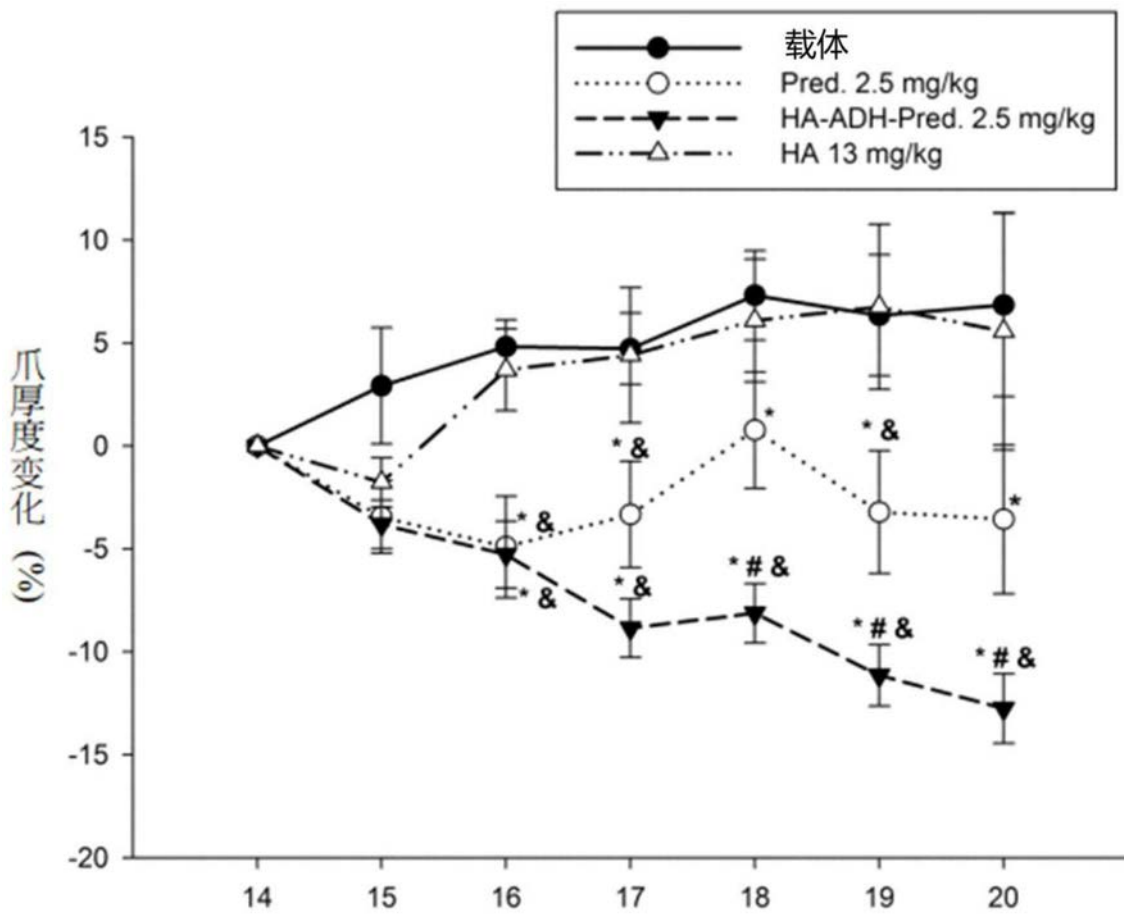


图11

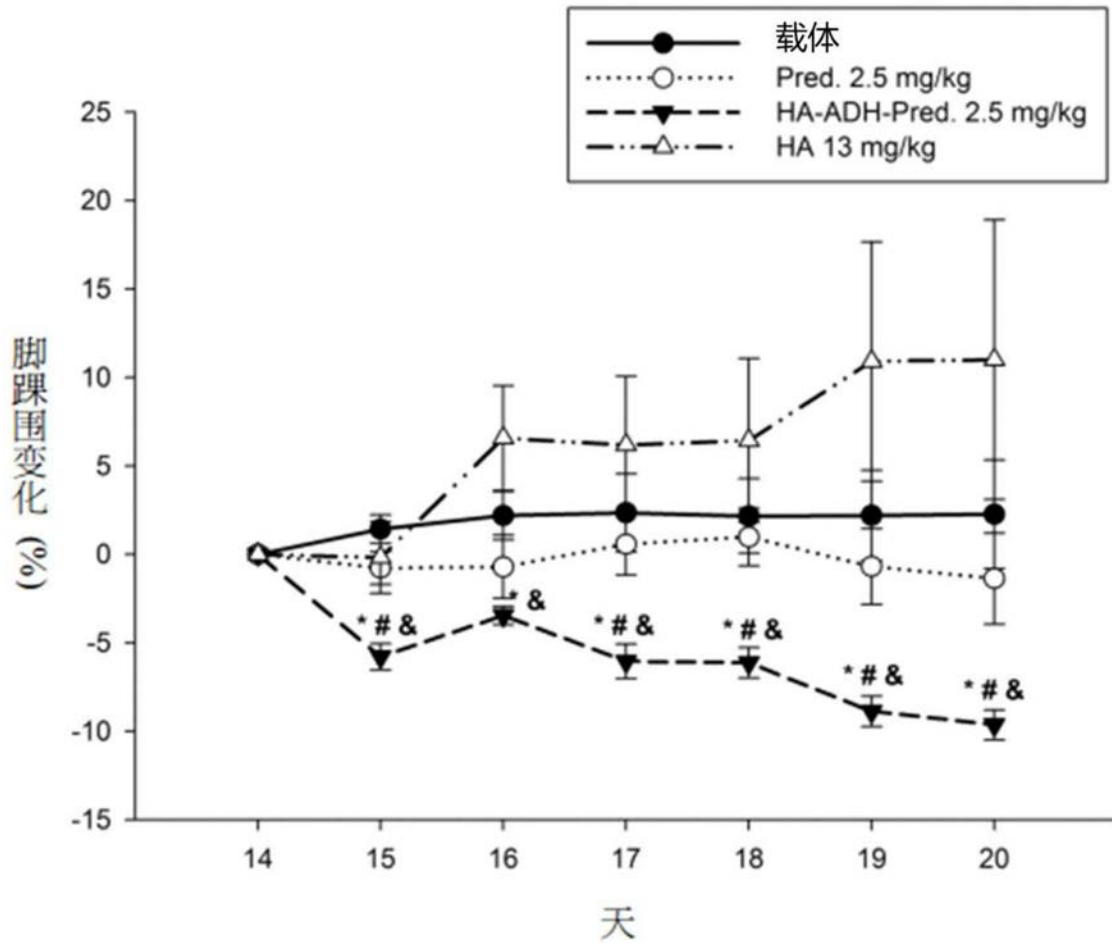


图12