

慢性伤口愈合组合物及其应用

技术领域

本发明涉及具有慢性伤口愈合功效的组合物及其应用。

5

背景技术

随着人口结构老化，慢性疾病已成为健康照护的主轴，其中慢性伤口的照护是非常重要的一环。慢性伤口是指伤口在经过合宜治疗经一预定的时间后，仍无法达到一般伤口结构上和外观上的愈合，迄今仍无有效的治疗药剂。慢性伤口种类包括长期卧床所造成的褥疮或压疮、糖尿病人的伤口溃疡、末梢血管阻塞的肢体坏疽、动脉或静脉障碍所引起的溃疡、癌症病人的不愈伤口、急性伤口感染所引起的慢性愈合不良等等。

类叶升麻苷(acteoside)存在于中草药的一种活性成分，具有脂肪酶抑制功效，已知具有抗菌、抗发炎、抗病毒、抗氧化、神经保护等活性。

类叶升麻苷被报导为有效的抗微生物成分，已知对于金黄葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)具有良好的抗菌功效(Guillermo 等人，1999, Journal of Ethnopharmacology 66(1): 75-8)。类叶升麻苷亦具有良好的抗发炎效果(Speranza 等人，2009, Journal of biological regulators and homeostatic agents 23(3): 189-95.)。此外，2016年01月06日公告的中国专利授权公告第103816169B号，揭示类叶升麻苷可用于制备防治血管性痴呆，对低糖低氧造成的细胞缺血缺氧具保护和治疗作用。又，2016年01月16日公开的中国台湾专利公开号第201601739号，提供一种桂花萃取物的制备方法，以类叶升麻苷为主要活性成分，具有抗氧化、皮肤保养、抗微生物及抗发炎等功效。但并未有任何报导可用于治疗慢性伤口愈合。

发明内容

本发明提供一种新颖的组合物，其具有慢性伤口愈合功效，主要由下列三组分组成：(1)一种抗发炎剂，选自类叶升麻苷、异类叶升麻苷及其组合组成的群，(2)一种收敛剂，选自没食子酸、次没食子酸、其盐类及其组合组成的群，以及(3)一种清凉剂，选自龙脑、薄荷脑及其组合组成的群，并视需要与一种或以上医药上可接受的载剂组合。

另一方面，本发明提供此组合物用于制备治疗慢性伤口药剂的用途。

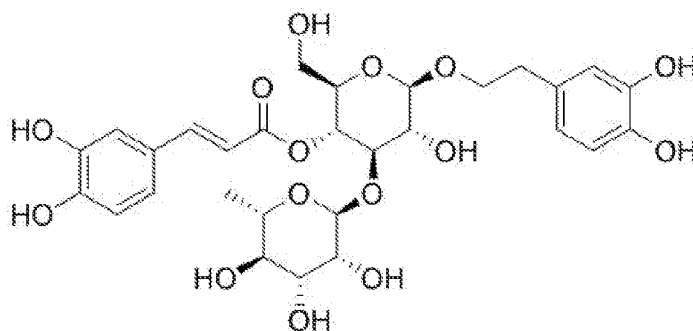
根据本发明的一实施例，慢性伤口指糖尿病伤口。

5 根据本发明的一实施例，其中三组分的当量配比为(1)抗发炎剂；(2)收敛剂；(3)清凉剂为 1:0.1-10:0.1-10。

根据本发明的一较佳实施例，其中三组分的当量配比为(1)抗发炎剂；(2)收敛剂；(3)清凉剂为 1:0.5-5:0.5-5。

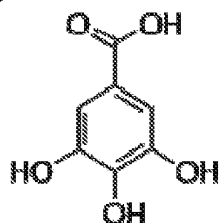
10 根据本发明的一特定实施例，其中三组分的当量配比为(1)抗发炎剂；(2)收敛剂；(3)清凉剂为约 1:1:1。

根据本发明的实施例，其中该抗发炎剂为具有下列式 I 结构的类叶升麻苷或其异构物：



式I。

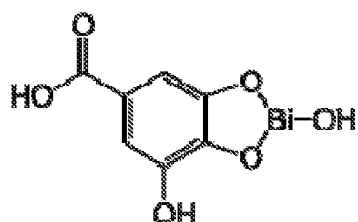
15 根据本发明的实施例，其中该收敛剂为具有下列式 II 结构的没食子酸：



式II。

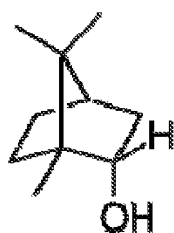
根据本发明的实施例，其中该收敛剂为没食子酸或次没食子酸的盐类，较佳为铋盐。

20 根据本发明的最佳实施例，其中该收敛剂为具有下列式 IIa 结构的次没食子酸铋：



式IIa。

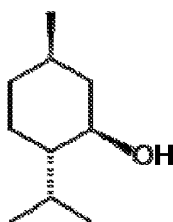
根据本发明的实施例，其中该清凉剂为具有下列式 IIIa 结构的龙脑：



式IIIa。

5

根据本发明的实施例，其中该清凉剂为具有下列式 IIIb 结构的薄荷脑：



式IIIb。

再一方面，本发明提供一种具有治疗慢性伤口愈合功效的医药组合物，主要由下列三组分组成：(1) 类叶升麻苷，(2) 次没食子酸铋，以及(3) 龙脑，并视需要与一种或以上医药上可接受的载剂组合。

根据本发明，其中该医药组合物中三组分的当量配比为(1) 类叶升麻苷：(2) 次没食子酸铋：(3) 龙脑为 1:0.1-10:0.1-10；较佳为 1:0.5-5:0.5-5。

根据本发明的一实施例，其中该医药组合物中三组分的当量配比为(1) 类叶升麻苷：(2) 次没食子酸铋：(3) 龙脑为约 1: 1: 1。

根据本发明，该医药组合物包含重量比(1) 0.05%-10%的类叶升麻苷，(2) 0.05%-10%的次没食子酸铋，及(3) 0.02%-5%的龙脑，以及医药上可接受载体。

本发明的这些及其它方面，可藉由以下的较佳具体实施例的描述以及图式，得以更为明晰；即便其中可能会有变化或修饰，但不背离

本发明所揭示的新颖观念的精神及范畴。

附图说明

前文所述以及实施方式可通过附图达到更好的说明效果。为了加强本发明的说明，将适当的实施例的图式列举于此。

图 1 显示本发明组合物针对高糖(20mM)环境培养 HaCaT 细胞 48 小时促进细胞增生的结果 (Con :对照组; A 16.0 μ M; B0 18.8 μ M; BSG 14.2 μ M; B0 18.8 μ M +A 16.0 μ M; BSG 14.2 μ M +A 16.0 μ M; B0 18.8 μ M + BSG 14.2 μ M; A11 (A 16.0 μ M + B0 18.8 μ M + BSG 14.2 μ M) ; *显示差异显著, $p < 0.05$)。

图 2 显示本发明组合物(A11, A 16.0 μ M + B0 18.8 μ M + BSG 14.2 μ M)针对低糖(5mM)与高糖(25mM)环境培养 HaCaT 细胞 48 小时细胞增生的比较, *显示差异显著, $p < 0.05$ (5: 5mM 葡萄糖; 25: 25mM 葡萄糖; 5+A11: 5mM 葡萄糖并添加本发明组合物(A 16.0 μ M + B0 18.8 μ M + BSG 14.2 μ M)); 25+A11: 25mM 葡萄糖并添加本发明组合物(A 16.0 μ M + B0 18.8 μ M + BSG 14.2 μ M))。

图 3A 显示本发明组合物(A11)与对照组等于高糖(25mM)环境培养 HaCaT 细胞 48 小时细胞迁移的影像(Con :对照组; B0 18.8 μ M; BSG 14.2 μ M; B0 18.8 μ M +A 16.0 μ M; BSG 14.2 μ M +A 16.0 μ M; B0 18.8 μ M + BSG 14.2 μ M; A11 (A 16.0 μ M + B0 18.8 μ M + BSG 14.2 μ M))。

图 3B 显示本发明组合物(A11)与对照组等于高糖(25mM)环境培养 HaCaT 细胞 48 小时, 以对造组细胞细胞为 1.0, 相对于其他实验组细胞增生比的比较 (Con :对照组; A 16.0 μ M; B0 18.8 μ M; BSG 14.2 μ M; B0 18.8 μ M +A 16.0 μ M; BSG 14.2 μ M +A 16.0 μ M; B0 18.8 μ M + BSG 14.2 μ M; A11 (A 16.0 μ M + B0 18.8 μ M + BSG 14.2 μ M))。

图 4 显示本发明组合物与对照组对 HDF 细胞以 IL - 1 β 处理测定 Collagen III、MMP-1、Collagen I、TFG- β 等蛋白浓度变化的比较。

图 5 显示病例 1(糖尿病及中风病人, 男, 77 岁)伤口愈合过程, 第 0 天伤口大小为 4cm x 3cm x 0.5 cm(A), 第 18 天伤口明显开始收口(B), 第 33 天伤口为 1.5cm x0.5cm x 0.2 cm(图 C), 第 79 天伤口完全愈合(D)。

图 6 显示病例 2(糖尿病及中风病人, 男, 77 岁)伤口愈合过程, 第 0 天伤口大小为 15cm x 11cm x 2 cm(A), 第 75 天伤口为 5.5cm x11cm x1 cm(B), 第 103 天伤口为 3cm x2cm x0.5 cm(C), 第 140 天伤口完全

愈合(D)。

图 7 显示病例 3(糖尿病及肺癌病人, 女, 82 岁), 第 0 天伤口大小为 2.5cm x 1cm x 0.5 cm(A), 第 17 天伤口为 1.5cm x 1cm x 0.2 cm(B), 第 90 天伤口完全愈合(C)。

5

具体实施方式

本发明说明中的用词通常具有在本技术领域、在本发明内容中、及各用语所在的特定内容中的原始意义。

10 本文所使用的「一」一词, 如未特别指明, 是指至少一个(一个或一个以上)的数量。

于本文中所使用的名词「慢性伤口」指伤口在经过合宜治疗经一预定的时间后, 仍无法达到一般伤口结构上和外观上的愈合。慢性伤口种类包括长期卧床所造成的褥疮或压疮、糖尿病伤口溃疡、末梢血管阻塞的肢体坏疽、动脉或静脉障碍所引起的溃疡、癌症病人的不愈伤口、急性伤口感染所引起的慢性愈合不良。根据本发明, 本发明组合物显示对于慢性伤口的皮肤症状伤口具有愈合的效果, 尤其是对糖尿病伤口特别有效。

于本文中所使用的名词「治疗」, 包括「处理」或「促进」的意思, 意指改善症状。

20 于本文中所使用的名词「患者」包含人类、及动物, 特别是哺乳动物。

于本文中所使用的名词「医药上可接受的载剂」指一般医药上常用的技术可用于制备医药组合物的稀释剂、赋形剂及其类似物。根据本发明, 可调制成药剂、化妆品或医药材料的形式。根据本发明, 可制成局部方式涂敷的形式, 例如, 喷雾形式。喷雾形式包含喷剂及液剂; 或半固体或固体形式, 较佳为具有动态黏度大于水者的固体形式。适当配方包括但不限于悬浮液、乳化液、乳膏、软膏、擦剂等。较佳者, 呈软膏形式。本发明医药组合物不论呈何种形式, 亦可含有润肤剂、香料或颜料, 以提高其对于各种用途的可接受性。

30 于本文中所使用的名词「治疗有效量」, 意指在症状处理上可有效治疗伤口的剂量。可依患者或伤口之需, 依一般医药上常用的技术或临床知识使用适当剂量, 并可依照施予的方式及治疗的情况, 包括年龄、体重、症状、治疗效果、施用方式及治疗时间调整。

本发明提供一种具有慢性伤口愈合功效的组合物, 主要由下列三

组分组成：(1)一种抗发炎剂，选自类叶升麻苷、异类叶升麻苷及其组合组成的群，(2)一种收敛剂，选自没食子酸、次没食子酸、其盐类及其组合组成的群，以及(3)一种清凉剂，选自龙脑、薄荷脑及其组合组成的群，并视需要与一种或以上医药上可接受的载剂组合。本发明亦提供此组合物用于制备治疗慢性伤口药剂的用途，尤指糖尿病伤口。

根据本发明的实施例显示，本发明组合物对于高糖环境下培养的细胞增生及迁移具有显著的增进功效，但单一组成分或任二组合则并无功效。尤其本发明组合物对于低糖环境培养相对并无增进功效，显示本发明组合物对于糖尿病伤口愈合的特殊功效，进一步可支持其慢性伤口愈合的功效。

根据本发明，可依一般传统技术制备适当含量的组合物，其中实施例可包括各成分的当量范围是：

- (1) 抗发炎剂：1；
- (2) 收敛剂：0.1-10；较佳为 0.5-5。
- (3) 清凉剂：0.1-10；较佳为 0.5-5。

根据本发明的一特定实施例，其中三组分的当量配比为(1)抗发炎剂：(2)收敛剂：(3)清凉剂为约 1:1:1。

本发明议题提供一种具有治疗慢性伤口愈合功效的医药组合物，主要由下列三组分组成：(1)类叶升麻苷，(2)次没食子酸铋，以及(3)龙脑，并视需要与一种或以上医药上可接受的载剂组合。即如商标为糖足乐 7™ (NuDFC7™) 尚未上市的商品。

根据本发明，其中该医药组合物中三组分的当量配比为(1)类叶升麻苷：(2)次没食子酸铋：(3)龙脑为 1:0.1-10:0.1-10；较佳为 1:0.5-5:0.5-5。其中的特定实施例为约 1:1:1。

根据本发明，其中该医药组合物包含重量比(1)0.05%-10%类叶升麻苷，(2) 0.05%-10%的次没食子酸铋，(3) 0.02%-5%的龙脑，以及医药上可接受载体。

根据本发明的一实施例，其中该医药组合物包含重量比(1) 0.1%-5%的类叶升麻苷，(2) 0.06%-6%的次没食子酸铋，及(3) 0.03%-3%的龙脑，以及医药上可接受载体。

根据本发明的一较佳实施例，其中该医药组合物包含(1) 0.3%-5%的类叶升麻苷，(2) 0.5%-5%的次没食子酸铋，及(3) 0.5%-1%的龙脑，以及医药上可接受载体。

根据本发明，其中该组合物可包含一适当赋形剂而制成外用药剂

形式、化妆品形式或医药材料形式的组合物。

根据本发明，其中该组合物尚包含一治疗剂，例如其他抗发炎剂、抗菌剂或其他治疗药剂。

5 以上述发明说明以及下列实施例说明本发明，但并非用以限制本发明的范围。

实施例

药剂：(1) 类叶升麻苷 (Acteoside, 以 A 为代号)：购自美国 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。

10 (2) 次没食子酸铋 (Bismuth subgallate, 以 BSG 为代号)：美国 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。

 (3) 龙脑 (Borneol, 以 B0 为代号)：美国 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。

根据本发明可依下列组成制备组合物：

组成分	抗发炎剂	收敛剂	清凉剂
当量配比范围	1	0.1-10	0.1-10
特定成分	类叶升麻苷	次没食子酸铋	龙脑
重量比范围	0.05%-10%	0.05%-10%	0.02%-5%
组合物制备例1 (重量比)	0.05%	0.025%	0.02%
组合物制备例2 (重量比)	0.3%	0.5%	0.5%
组合物制备例3 (重量比)	5%	5%	1%
组合物制备例4 (重量比)	1%	4%	0.1%
组合物制备例5 (重量比)	10%	1%	0.05%

15

进行以下细胞实验的本发明组合物各组份含量为：

- (1)类叶升麻苷(A) 16.0 μM (0.01 μg/μl)，即 0.1%；
(2)次没食子酸铋(BSG) 14.2 μM (0.0056 μg/μl)，即 0.056%；

及

20

- (3)龙脑(B0) 18.8 μM (0.0029 μg/μl)，即 0.029%。
细胞培养(Cell culture)：

将人类皮肤原纤细胞(human dermal fibroblast, HDF cells)或皮肤角质细胞(human keratinocytes, HaCaT cells), 培养于 37℃ 的潮湿培养箱中, 在空气为 5%二氧化碳及 95%氧气的环境下, 放置在 Dulbecco 氏修饰 Eagle 培养基 (DMEM) 中, 并添加葡萄糖、10%胎牛血清、100 IU/mL 盘尼西林、100 μ g/mL 链霉素、2mM 丙酮酸钠和 1%非必须氨基酸(NEAA)。该培养基每两天更换一次。进行继代培养时, 在以 0.1%胰蛋白酶 (Trypsin) -EDTA 混合液作用后, 收集细胞并以 1:10 的比例稀释重新培养。使用于研究中的细胞, 代数介于 12 至 40 代之间。在以药物处理前 24 小时, 开始种植细胞并放置 24 小时。对照组维持于培养基并添加药物。在此培养条件下, 不影响细胞生长与分化。

实例 1 细胞生长分析 (Cell Proliferation Assay)

以 HaCaT 细胞 3×10^5 培养于标添加 25 mM 的葡萄糖, 培养于 12 孔的培养皿培养 48 小时。细胞生长及存活状态以 CCK-8 试剂套组 (Dojindo Molecular Technologies, Kumamoto, Japan) 进行分析, 在每格中加入 5 μ L CCK-8 溶液并于 37° C 下培养一小时, 再用分亮度计 Microplate reader (SpectraMax, Molecular Device, USA) 测定 450 nm 吸收, 样本与对照组数值相比进行实验结果分析。测试的实验组包括:

- (1) Con :对照组;
- (2) A 16.0 μ M;
- (3) BO 18.8 μ M;
- (4) BSG 14.2 μ M;
- (5) BO 18.8 μ M + A 16.0 μ M;
- (6) BSG 14.2 μ M + A 16.0 μ M;
- (7) BO 18.8 μ M + BSG 14.2 μ M;
- (8) A11 (A 16.0 μ M + BO 18.8 μ M + BSG 14.2 μ M)。

培养 48 小时候的细胞增生结果如图 1, 显示本发明组合物(A11; A 16.0 μ M + BO 18.8 μ M + BSG 14.2 μ M)最佳, 提供不可预期的显著促进细胞增生功效($p < 0.05$), 但单一组成分则无效果, 或任二者的组合效果不如三者的组合。

实例 2 低糖与高糖环境细胞培养分析比较 (Comparison in Cell Proliferation Assay)

以 HaCaT 细胞 3×10^5 培养于添加 5mM、25 mM 的葡萄糖，培养于 12 孔的培养皿 48 小时，添加本发明组合物 (A11: A $16.0 \mu\text{M}$ + B0 $18.8 \mu\text{M}$ + BSG $14.2 \mu\text{M}$) 观察其细胞增生状况。

- 5 培养 48 小时后的细胞增生结果如图 2，显示本发明组合物 (A $16.0 \mu\text{M}$ + B0 $18.8 \mu\text{M}$ + BSG $14.2 \mu\text{M}$) 对高糖培养 (25 mM) 的细胞增长有显著的相乘增进功效，但对低糖 (5 mM) 的细胞增生并无显著促进功效。

实例 3 细胞迁移分析 (Cell Migration Assay)

10

以 HaCaT 细胞 1×10^5 培养于添加 25 mM 的葡萄糖，培养于 24 孔的培养皿 48 小时，添加如下列的药物，观察其细胞迁移状态：

Con : 对照组；

BO $18.8 \mu\text{M}$ + A $16.0 \mu\text{M}$ ；

- 15 BSG $14.2 \mu\text{M}$ + A $16.0 \mu\text{M}$ ；

BO $18.8 \mu\text{M}$ + BSG $14.2 \mu\text{M}$ ；

A11: A $16.0 \mu\text{M}$ + BO $18.8 \mu\text{M}$ + BSG $14.2 \mu\text{M}$ 。

- 48 小时培养后的各组细胞迁移结果影像如图 3A，并以对照组结果为 1，与其他组比较如图 3B，显示本发明组合物 (A $16.0 \mu\text{M}$ + BO $18.8 \mu\text{M}$ + BSG $14.2 \mu\text{M}$) 对高糖培养 (25 mM) 的细胞迁移有促进功效，但 BO $18.8 \mu\text{M}$ 、BSG $14.2 \mu\text{M}$ 、或三组分的任二组合则无促进功效，可推知本发明组合物对于糖尿病伤口愈合具有不可预期的治疗效果，并进一步支持其慢性伤口愈合的效果。

- 25 实例 4 发炎反应实验分析

抑制 IL - 1β 诱导的发炎反应分析

- 培养的 HDF 细胞 ($1 \times 10^5/\text{well}$)，添加细胞发炎因子 IL - 1β (10 ng/mL) 以评估这些药物抑制 IL - 1β 诱导发炎的情形。细胞培养于 24 孔的培养皿 48 小时，并同时添加如下列的药物，观察细胞在发炎状态影响蛋白质表达的情形，这些蛋白质包含受发炎状态而上调的基质金属蛋白酶 (如 MMP-1 或 MMP-9)；以及受发炎而下调的 TGF- β 因子以及其下游信息路径所控制的胶原蛋白 (collagen I 或 Collagen 9) 的表达：

Con : 对照组 (无 IL - 1β 处理)；

- 35 Con : 对照组 (IL - 1β 处理)；

BO : $18.8 \mu\text{M}$ ；

BSG: 14.2 μ M;

A: 16.0 μ M

BO +A: BO 18.8 μ M + A 16.0 μ M;

BSG +A: BSG 14.2 μ M + A 16.0 μ M;

5 BO +BSG: BO 18.8 μ M + BSG 14.2 μ M;

All: BO 18.8 μ M + BSG 14.2 μ M +16.0 μ M。

其结果如图 4, 显示各组分及其组合对于添加 IL - 1 β 诱导发炎反应下, 不同组分的组合个蛋白质分泌量的影响, 显示三组分的组合对于 TGF- β 因子以及其下游的胶原蛋白(Collgen I 和 Collgen III)有
10 明显的促进功效, 并对受发炎诱导的 MMP-1 具有明显的抑制功效, 显示三组分的组合对于伤口愈合的功效远优于任一组分或其二组分的组合。

实例 5 人体临床结果

15 将本发明组合物(A 16.0 μ M + BO 18.8 μ M + BSG 14.2 μ M)对不同病人进行每日敷药, 观察伤口愈合情形, 三位病人伤口愈合的结果如图 5、6 和 7。并整理结果如下。

(1) 病例 1

糖尿病及中风病人, 男, 77 岁。经治疗, 左脚跟伤口愈合过程照片如图 5, 第 0 天原伤口大小为 4cm x 3cm x 0.5 cm(A), 经治疗第 18
20 天伤口明显开始收口(B), 第 33 天伤口缩小为 1.5cm x0.5cm x 0.2 cm(C), 第 79 天伤口完全愈合(D), 显示本发明组合物对于糖尿病伤口有明显的治疗效果。

(2) 病例 2

25 糖尿病病人, 男, 77 岁。经治疗, 右脚跟伤口愈合过程照片如图 6, 第 0 天原伤口大小为 15cm x 11cm x 2 cm(A), 经治疗第 75 天伤口缩小为 5.5cm x11cm x1 cm(B), 第 103 天伤口愈合, 伤口大小为 3cm x2cm x0.5 cm(C), 第 140 天伤口完全愈合(D), 显示本发明组合物对于糖尿病伤口有明显的治疗效果, 持续治疗中。

(3) 病例 3

30 糖尿病及肺癌病人, 女, 82 岁, 长期卧床有褥疮。经治疗, 伤口愈合过程照片如图 7, 第 0 天原伤口大小为 2.5cm x 1cm x 0.5 cm(A), 经治疗第 17 天伤口明显开始收口, 伤口缩小为 1.5cm x1cm x 0.2 cm(B), 第 90 天伤口完全愈合(C), 显示本发明组合物对于褥疮有显
35 显的治疗效果。

虽然本发明以较佳实施例披露如上，然其并非用以限定本发明，任何熟习本发明技术者，当可在不脱离本发明的精神和范围内，作些许的更动与润饰，则应属本发明权利要求所界定的保护范围。