



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I639431 B

(45)公告日：中華民國 107 (2018) 年 11 月 01 日

(21)申請案號：106119658 (22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 06 月 13 日

(51)Int. Cl. : A61K31/7024 (2006.01) A61P27/02 (2006.01)
A61P35/00 (2006.01)(71)申請人：高雄醫學大學(中華民國) KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY (TW)
高雄市三民區十全一路 100 號(72)發明人：張訓碩 CHANG, HSUN SHUO (TW)；陳益昇 CHEN, IH SHENG (TW)；彭千柔
PENG, CHIEN JOU (TW)；王士維 WANG, SHIH WEI (TW)；湯智昕 TANG, CHIH
HSIN (TW)

(74)代理人：林文杰

(56)參考文獻：

Lee, Sung-Jin, et al. "1, 2, 3, 4, 6-Penta-O-galloyl-beta-D-glucose blocks endothelial cell growth and tube formation through inhibition of VEGF binding to VEGF receptor." *Cancer letters* 208.1 (2004): 89-94.

Cryan, Lorna M., et al. "1, 2, 3, 4, 6-Penta-O-galloyl-β-D-glucopyranose inhibits angiogenesis via inhibition of capillary morphogenesis gene 2." *Journal of medicinal chemistry* 56.5 (2013): 1940-1945.

Miyamoto, Kenichi, et al. "Relationship between the structures and the antitumor activities of tannins." *Chemical and pharmaceutical bulletin* 35.2 (1987): 814-822.

Niemetz, Ruth, and Georg G. Gross. "Oxidation of pentagalloylglucose to the ellagitannin, tellimagrandin II, by a phenol oxidase from *Tellima grandiflora* leaves." *Phytochemistry* 62.3 (2003): 301-306.

審查人員：陳世芹

申請專利範圍項數：5 項 圖式數：5 共 15 頁

(54)名稱

用於治療與血管新生相關的疾病之醫藥組合物

PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATING ANGIOGENESIS RELATED DISORDER

(57)摘要

本發明提供一種式 I 化合物用於製備治療與血管新生相關的疾病之醫藥組合物的用途，其中該醫藥組合物包含該式 I 化合物。該醫藥組合物透過抑制內皮前驅細胞的血管新生功能，以及在動物模式中亦展現優異的抗血管新生之效用。

The present invention provides the use of formula I in preparing pharmaceutical composition for treating angiogenesis related disorder, wherein the composition comprises the formula I. The pharmaceutical

composition inhibits the angiogenic function of endothelial progenitor cells, and exhibits the promising anti-angiogenic property in animal models.

指定代表圖：

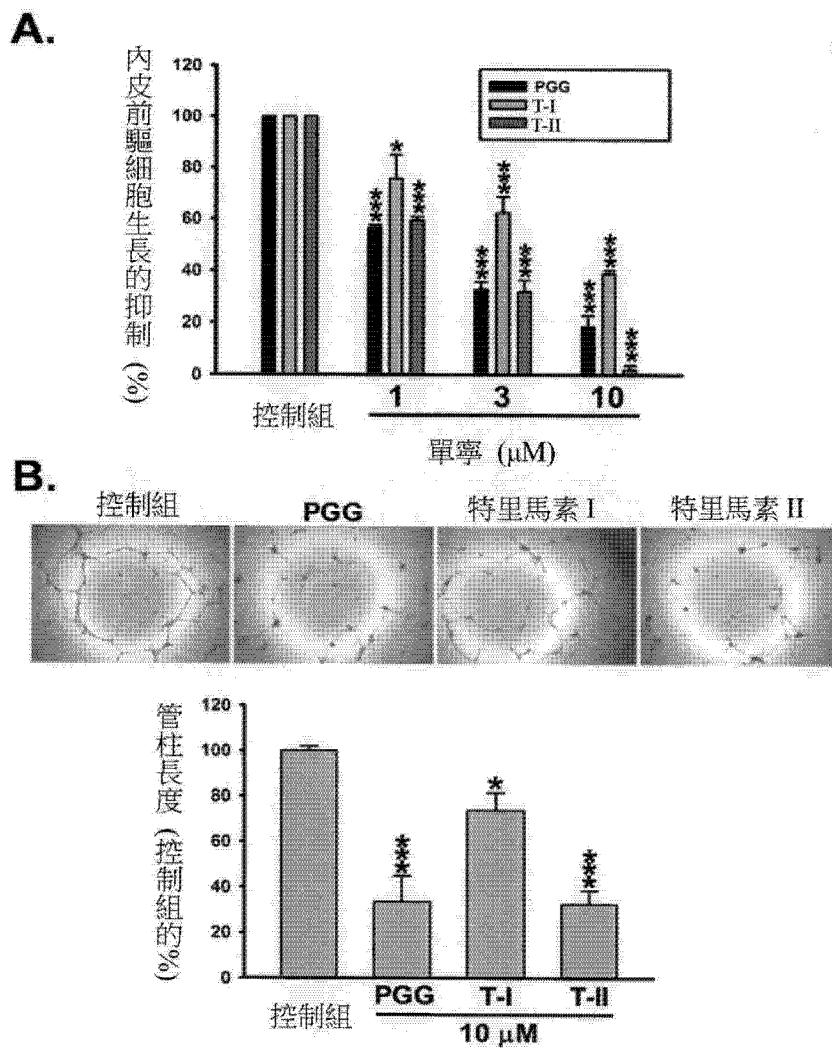
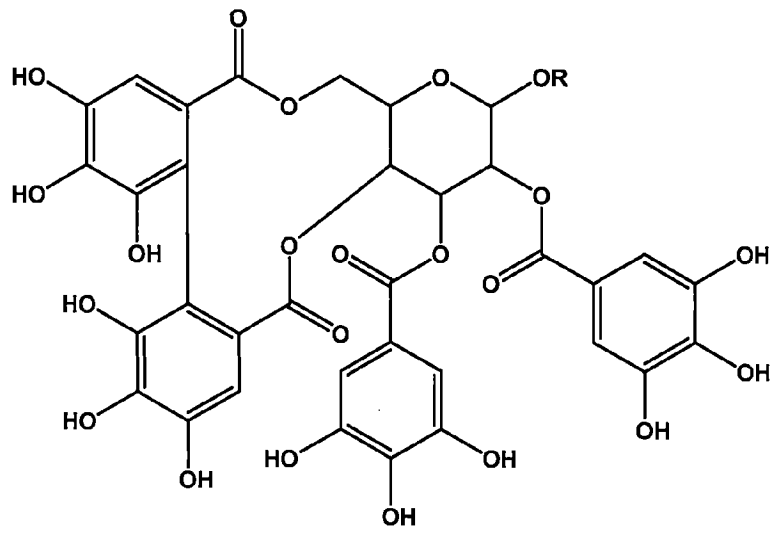


圖 2

特徵化學式：



式I

I639431

發明摘要

※ 申請案號：106119658

※ 申請日：106/06/13

A61K 31/7024 (2006.01)

※IPC 分類：A61P 27/02 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

用於治療與血管新生相關的疾病之醫藥組合物/ PHARMACEUTICAL
COMPOSITION FOR TREATING ANGIOGENESIS RELATED DISORDER

【中文】

本發明提供一種式I化合物用於製備治療與血管新生相關的疾病之醫藥組合物的用途，其中該醫藥組合物包含該式I化合物。該醫藥組合物透過抑制內皮前驅細胞的血管新生功能，以及在動物模式中亦展現優異的抗血管新生之效用。

【英文】

The present invention provides the use of formula I in preparing pharmaceutical composition for treating angiogenesis related disorder, wherein the composition comprises the formula I. The pharmaceutical composition inhibits the angiogenic function of endothelial progenitor cells, and exhibits the promising anti-angiogenic property in animal models.

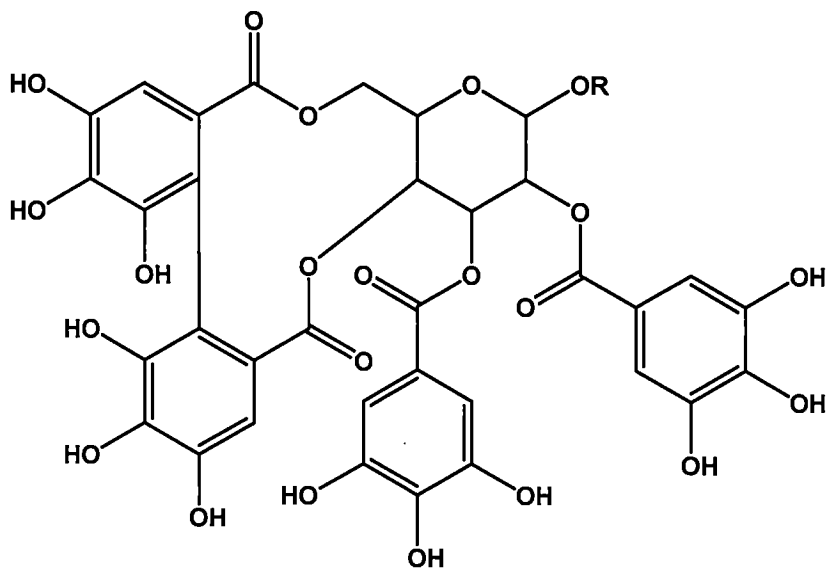
【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 2 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：



式I

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

用於治療與血管新生相關的疾病之醫藥組合物/ PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATING ANGIOGENESIS RELATED DISORDER

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種式I化合物用於製備治療與血管新生相關的疾病之醫藥組合物的用途。

【先前技術】

【0002】 血管新生(angio genesis) 係指在原來已存在的血管附近長出新生的血管的過程。血管新生已知在許多生理狀況扮演重要的功能，像是：胚胎發育、生殖、組織修復及骨質恆定。在正常生理機制下，可以藉由促進血管新生傳遞訊息刺激下所產生的反應。例如，在傷口癒合或女性生理週期的過程當中，會有可控制性且大約維持1-2週的血管新生反應。然而，病理性的血管新生則不受正常生理機轉所控制。血管新生的調控在人體具有相當重要平衡的角色，當血管新生過度進行或表現，可能會造成肥胖、牛皮癬、早產、子宮內膜異位、糖尿病視網膜病變、老年黃斑部病變(age-related macular degeneration; AMD)、風濕性關節炎及許多發炎相關疾病，或是加速腫瘤的惡化與轉移。此外，當血管新生作用不足時，也可能會因為凝血功能的缺損導致出血、中風、心血管疾病等的出現，甚至影響病患的傷口癒合。

【0003】 近年來發現血管新生和腫瘤之形成有密切的關係。當癌細胞形成腫瘤時，癌細胞本身或周圍的結締組織分泌血管新生因子，該因子會

促進血管內皮細胞(endothelial cells)發生下列變化：(1)腫瘤周遭結締組織的分解及破壞；(2)內皮細胞增生；(3)內皮細胞朝向分泌血管新生因子的位置移動；(4)內皮細胞重新組合，生成新生之血管。血管新生對於腫瘤形成相當重要，當腫瘤發展至一定大小後，必須生成新的血管以有效獲取養分、氧氣及排除廢物。血管新生對於腫瘤轉移亦相當重要，腫瘤細胞必需生成新的血管，以進入循環系統，進而轉移至其他器官組織；待腫瘤細胞到達其他器官組織後，必需生成新的血管，才能於該器官組織繼續生長。目前已證實幾乎所有的實體腫瘤及血管腫瘤之生長或轉移都必須依賴血管新生。因此若能抑制血管新生就能抑制上述腫瘤之形成或轉移。

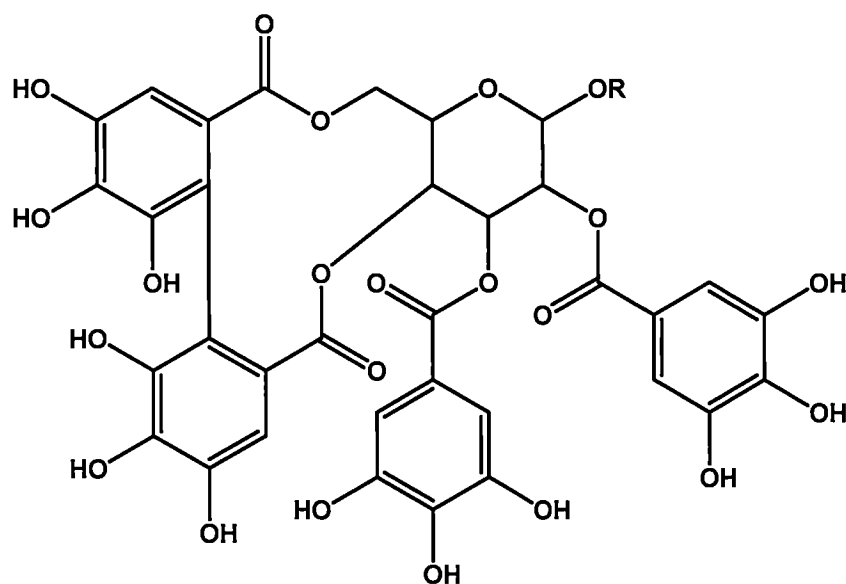
【0004】 目前約有19種血管新生抑制劑(angiogenesis inhibitor)在臨床上使用，而這些藥物所包含的適應症包含有：各種固態癌症(solid tumors)、老年性黃斑性退化(age related macular degeneration)、脈絡膜新生血管(choroidal neovascularization)、糖尿病性黃斑水腫(diabetic macular edema)、糖尿病視網膜病變(diabetic retinopathy)、眼部腫瘤(ocular neoplasm)、視網膜靜脈阻塞(retinal venous occlusion)、微血管擴張(telangiectasis)等相關疾病。由於血管新生與多種疾病相關，因此血管新生的抑制劑開發在目前與未來都是相當重要的研究方向與開發領域。

【0005】 內皮前驅細胞(endothelial progenitor cells; EPCs)可由骨髓中釋放，移動至缺血的組織，並與已存在的血管協同合作進行新生血管生成(neovascularization)。EPCs是循環中具有促進血管新生能力的一群細胞，其中後期內皮前驅細胞(late EPCs)已被證實本身可分化形成內皮細胞，架構血管的形成並促進血管新生作用。而前期內皮前驅細胞(early EPCs)則被發現

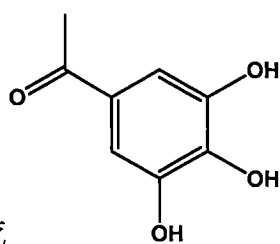
可釋放許多血管增生性細胞素(angiogenic cytokines) (像是VEGF與IL-8)來刺激周圍內皮細胞的功能，進而促進血管新生及脈管生成(vasculogenesis)。最近，EPCs已被報導可經由啟動「血管新生開關(angiogenic switch)」，調控早期癌症的生成及後期癌轉移的進行。許多的文獻也發現，EPCs可在眼部缺氧的組織中促進新生血管生成，造成老年黃斑部病變的惡化。這些研究顯示EPCs在病理性血管新生扮演重要角色，以EPCs為標的進行藥物研發將是探索抗血管新生藥物的新穎策略。

【發明內容】

【0006】 是以本發明提供一種式I化合物用於製備治療與血管新生相關的疾病之醫藥組合物的用途，其中該醫藥組合物包含該式I化合物，該式I化合物之化學結構如下：



式I，其中R為H(使式I



化合物為tellimagrandin I)或
II)。

(使式I化合物為tellimagrandin

【0007】 依據本發明，在一較佳實施例中，該醫藥組合物治療與血管新生相關的疾病係透過於體內抑制新生血管生成；在另一較佳實施例中，該醫藥組合物於體內抑制新生血管生成係透過抑制內皮前驅細胞的血管新生功能。

【0008】 依據本發明，在一較佳實施例中，該式I化合物係由台灣噴吶草中萃取而得。在另一較佳實施例中，該醫藥組合物更包括至少一種醫藥上可接受之載體、佐藥或賦形劑。該賦形劑包含但不限於惰性稀釋劑、成粒劑、崩解劑、黏合劑、潤滑劑、起泡混合物、染料或甜味劑。

【0009】 依據本發明，與血管新生相關的疾病包含但不限於各種固態癌症、牛皮癬、早產、子宮內膜異位、老年性黃斑性退化、脈絡膜新生血管、糖尿病性黃斑水腫、糖尿病視網膜病變、眼部腫瘤、視網膜靜脈阻塞、微血管擴張、風濕性關節炎及許多發炎相關疾病等。

【圖式簡單說明】

【0010】

圖1顯示式I化合物的萃取步驟。

圖 2 顯示 1,2,3,4,6- 四 -O- 沒食子醯基 - β -D- 葡萄糖 (1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucose, PGG)、特里馬素I (tellimagrandin I) (T-I)與特里馬素II (tellimagrandin II) (T-II)在人類內皮前驅細胞中對細胞增生與管柱形成的影響。A顯示於第48小時，使用磺基羅丹明B(Sulforhodamine, SRB)分析法於所述的濃度下，PGG、特里馬素I與特里馬素II抑制人類內皮前驅細胞之細胞生長呈濃度相關性。B顯示於第24小時，使用管柱形成分析法測得所述的單寧(10 μ M)抑制人類內皮前驅細胞之

類微血管結構。五個獨立實驗之數據係以平均值±平均值標準誤差表示。與控制組相比，*表示 $p < 0.05$ ；***表示 $p < 0.001$ 。

圖3顯示特里馬素II (T-II)抑制人類內皮前驅細胞之管柱形成呈濃度相關性且不具細胞毒性作用。A為人類內皮前驅細胞以所述濃度之PGG與特里馬素II處理24小時，接著以位相差顯微鏡紀錄管柱形成之變化。B顯示於第24小時，使用乳酸脫氫酶(lactate dehydrogenase, LDH)分析法測得所述濃度之特里馬素II(除了30 μM 外)並未在人類內皮前驅細胞中誘導乳酸脫氫酶的釋放。五個獨立實驗之數據係以平均值±平均值標準誤差表示。與控制組相比，*表示 $p < 0.05$ ；**表示 $p < 0.05$ ；***表示 $p < 0.001$ 。

圖4顯示使用雞胚絨毛尿囊膜(chorioallantoic membrane, CAM)分析法測得特里馬素II阻斷血管生成之功效。蕾莎瓦(Sorafenib)為一種多重激酶抑制劑，於體內抗血管新生分析法中做為正調控。

圖5顯示特里馬素II在基質膠塞(Matrigel plug)模式中減弱微血管形成之功效。蕾莎瓦(Sorafenib)為一種多重激酶抑制劑，於體內抗血管新生分析法中做為正調控。

【實施方式】

【0011】 式I化合物的萃取步驟

圖1顯示式I化合物的萃取步驟。將臺灣噴吶草之全草洗淨後烘乾(1 kg)，在常溫下，以甲醇浸泡3天，共3次。所得之萃取液經減壓濃縮後，得甲醇抽出物(125 g)。將甲醇抽出物用乙酸乙酯/水 (1:1, v/v) 進行分液分配，得乙酸乙酯層(38.4 g)、水層 (70 g)及不溶物 (5.3 g)。取乙酸乙酯層用正相管柱層析以矽膠 (silica gel; MERCK®)、RP-18 (MERCK®) 及分子篩

(SEPHADEX® LH-20; Pharmacia)等材質做為固定相進行管柱層析，配合中壓液相層析儀 (MPLC)、再結晶技術與製備型薄層層析法 (preparative TLC) 等方法達到分離及純化獲得PGG (21.9 mg)、特里馬素I (2.0 mg)與特里馬素II (356 mg)，並進行1D、2D-NMR光譜解析決定結構，再利用質譜、紫外光分析儀、紅外光分析儀、旋光光度計等進一步確認結構。

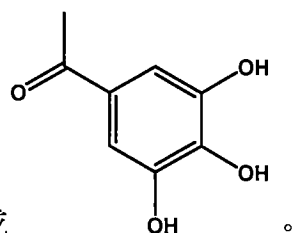
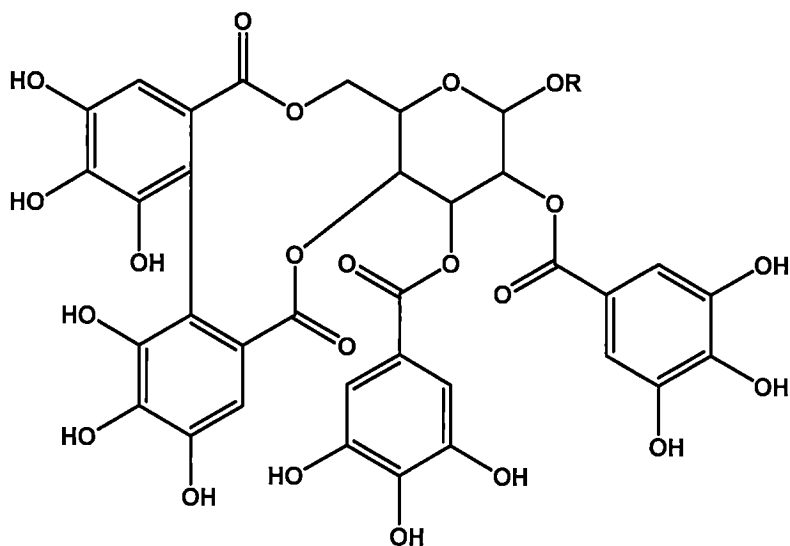
【0012】 臺灣噴吶草(*Mitella formosana* (Hay.) Masam.)是虎耳草科(Saxifragaceae)的多年生草本，為臺灣固有種植物。本發明由臺灣噴吶草萃取出化合物，利用生物活性導向分離試驗，發現三種單寧類化合物PGG、特里馬素I與特里馬素II呈濃度相關性抑制內皮前驅細胞的增生作用，其中又以主量化合物特里馬素II效果最強(圖2A)。經由管柱形成分析，證實此三個化合物(10 μ M)具有不同程度抑制內皮前驅細胞管柱形成的作用(圖2B)。其中，PGG及特里馬素II呈濃度相關性抑制管柱形成，臨床抗癌藥物蕾莎瓦在此作為實驗正對照組(圖3A)。此外，特里馬素II在10-20 μ M作用濃度不會造成乳酸脫氫酶釋放，顯示特里馬素II在內皮前驅細胞抑制血管新生的作用不是經由細胞毒性而來(圖3B)。接著，我們利用絨毛尿囊膜-血管新生(CAM-angiogenesis)及基質膠塞模式兩個動物模式驗證特里馬素II於體內的抗血管新生效果，圖4顯示特里馬素II呈濃度相關性地在雞胚胎中抑制新生血管的生成，圖5則顯示特里馬素II有效抑制動物體內的微血管生成。這些結果顯示，特里馬素I與特里馬素II為新穎的血管新生抑制劑，在活體動物中具有阻斷血管新生作用。

【0013】 過去的文獻及發表並未揭露特里馬素I與特里馬素II抑制血管新生的效用，本發明首次證實特里馬素I與特里馬素II具有在動物體內及

體外模式抑制血管新生的作用。綜合上述可知臺灣噴吶草中的成分特里馬素I與特里馬素II具有獨特性及良好的開發條件與價值，能夠運用於血管新生相關疾病的治療。

申請專利範圍

1. 一種式I化合物用於製備治療與血管新生相關的疾病之醫藥組合物的用途，其中該醫藥組合物包含該式I化合物，該式I化合物之化學結構如下：



其中R為H或

2. 如申請專利範圍第1項之用途，其中該醫藥組合物治療與血管新生相關的疾病係透過於體內抑制新生血管生成。
3. 如申請專利範圍第2項之用途，其中該醫藥組合物於體內抑制新生血管生成係透過抑制內皮前驅細胞的血管新生功能。
4. 如申請專利範圍第1項之用途，其中該式I化合物係由台灣噴吶草萃取而得。
5. 如申請專利範圍第1項之用途，其中該醫藥組合物更包括至少一種醫藥上可接受之載體、佐藥或賦形劑。

圖式

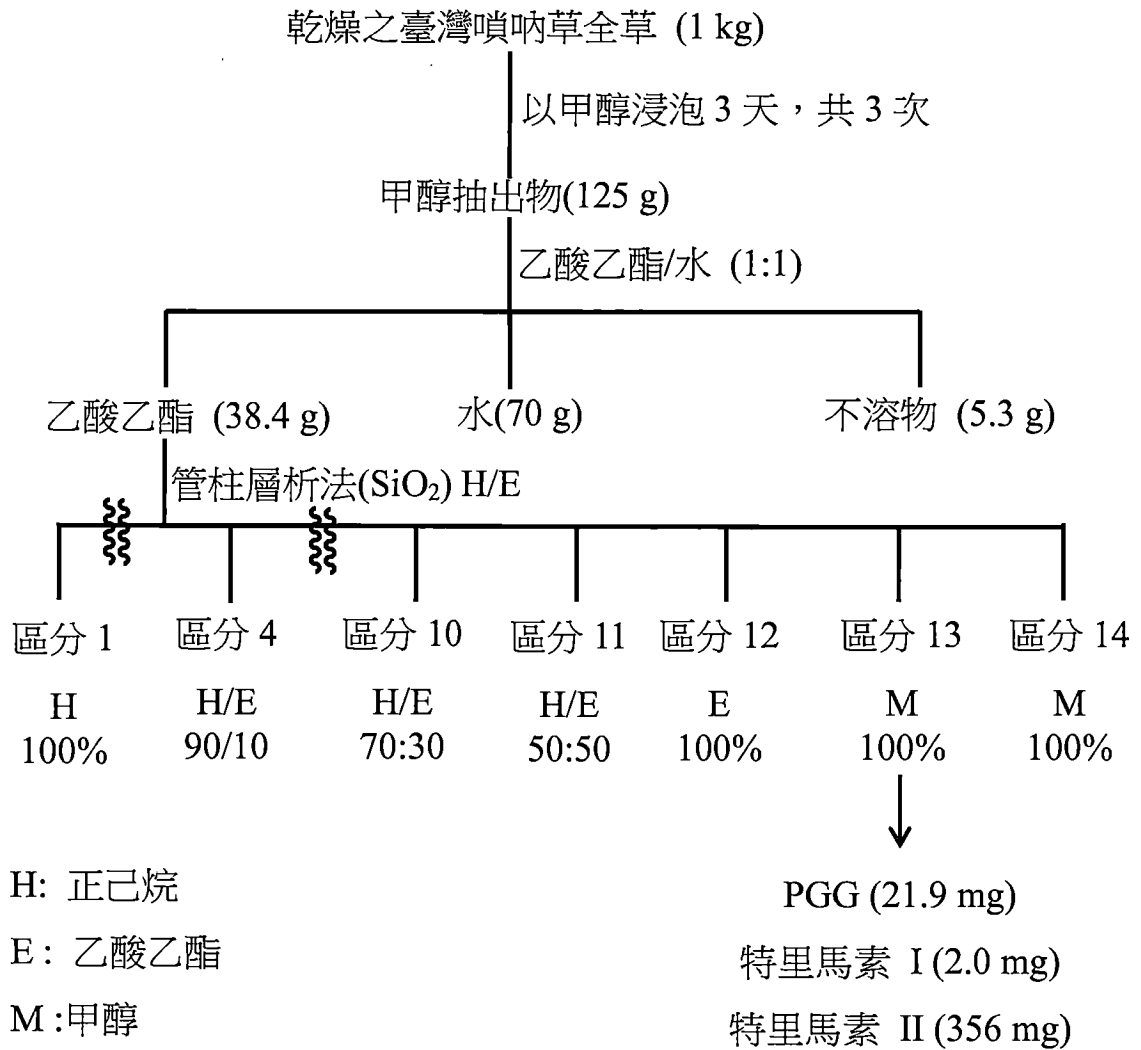


圖 1

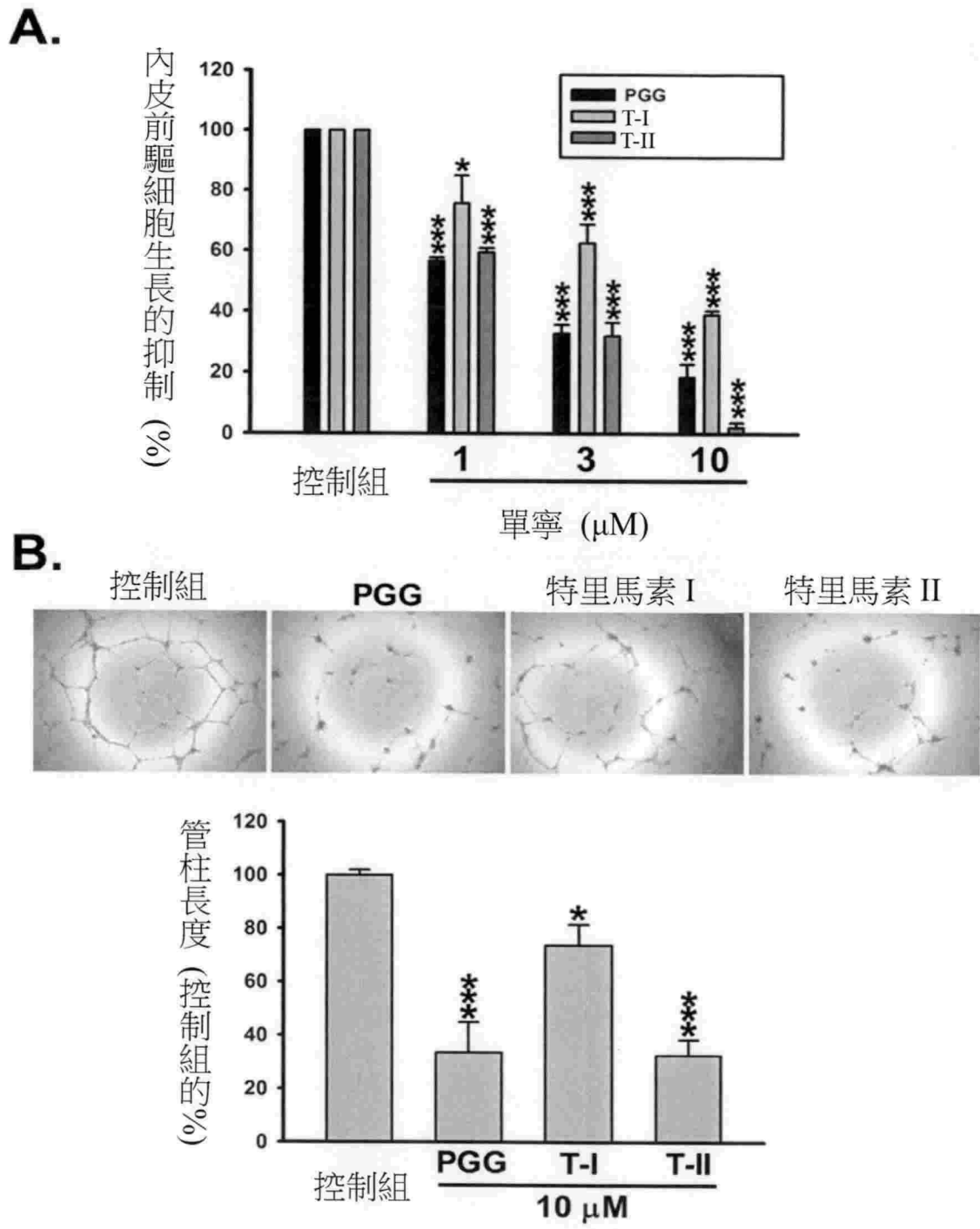


圖 2

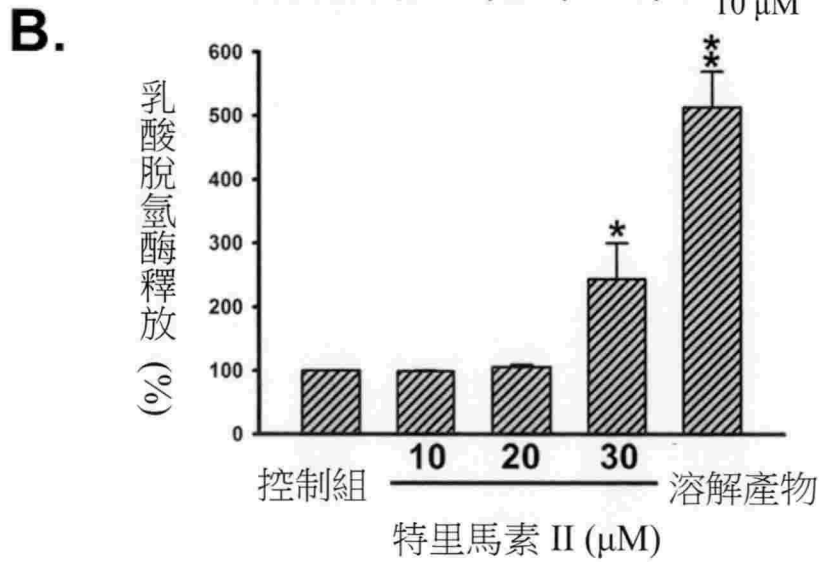
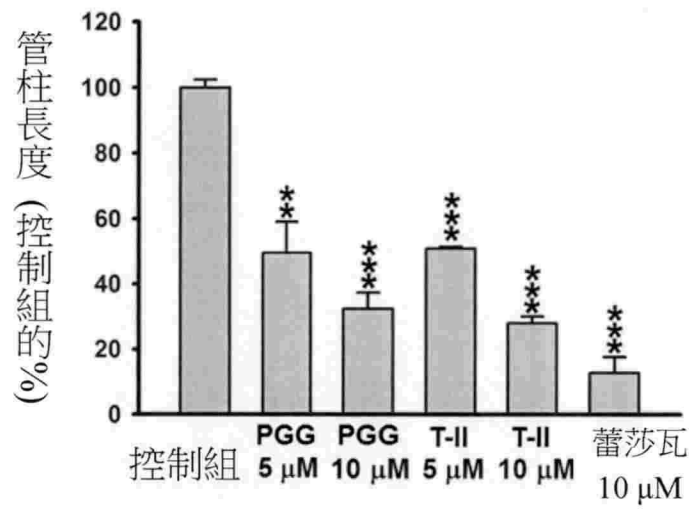
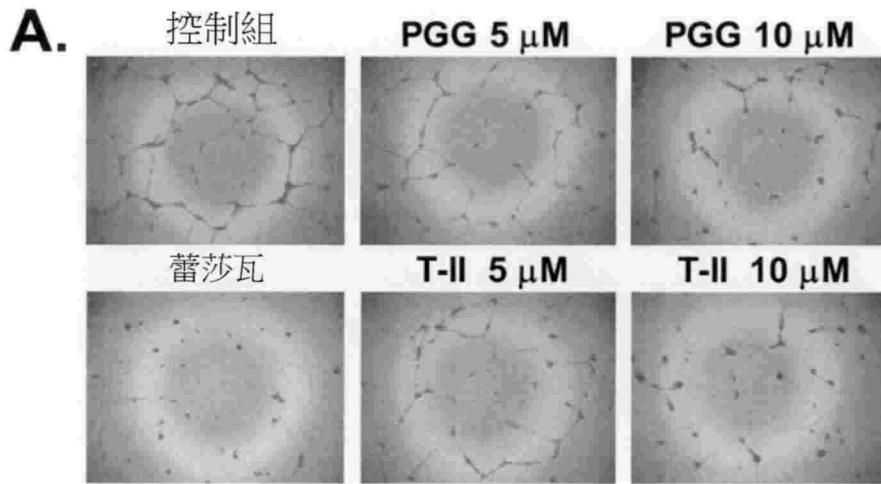


圖 3

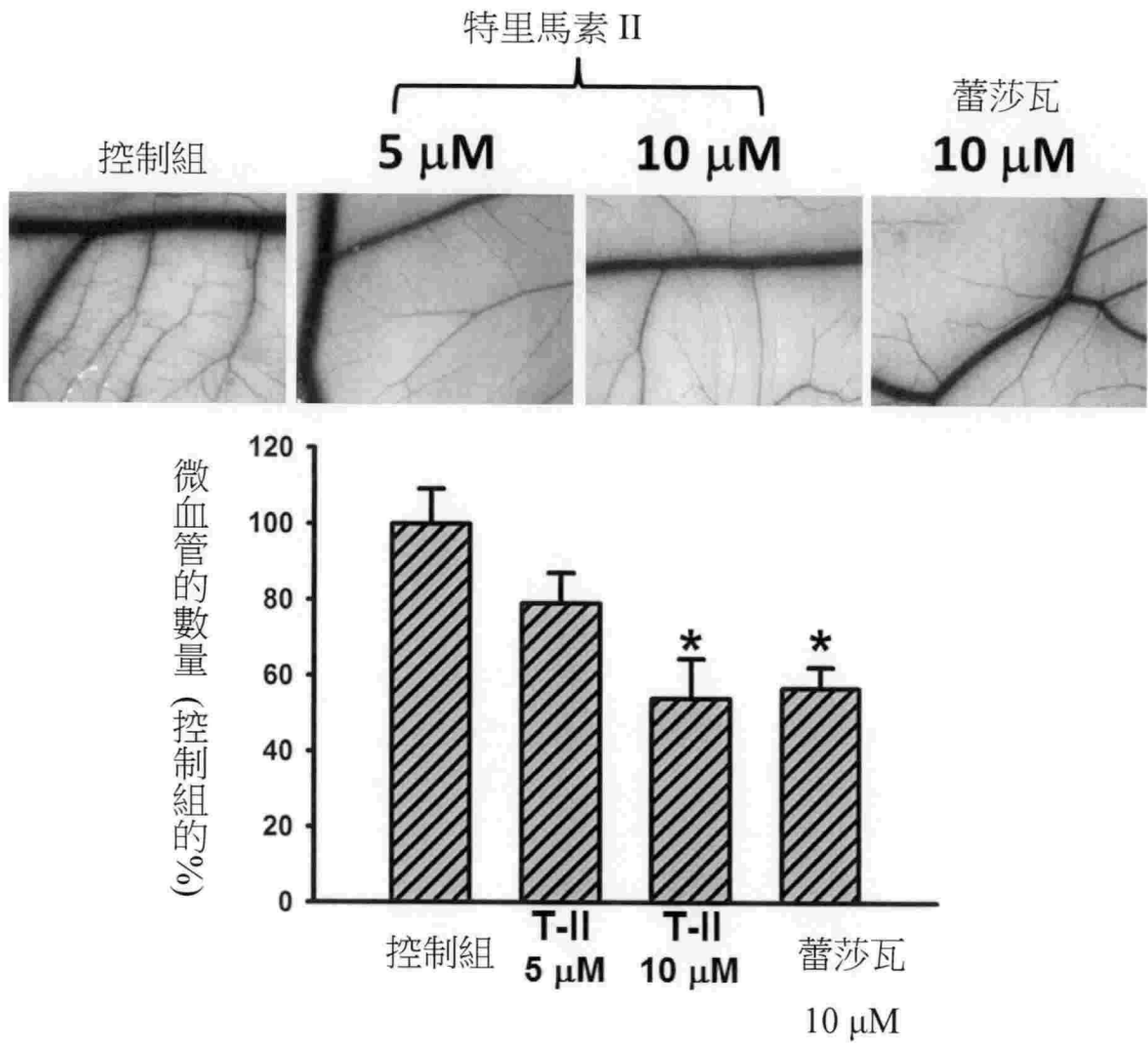


圖 4

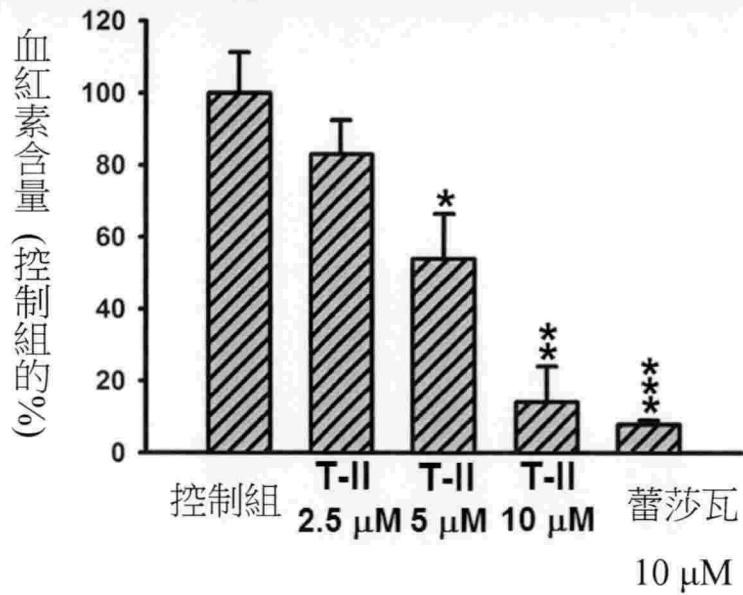
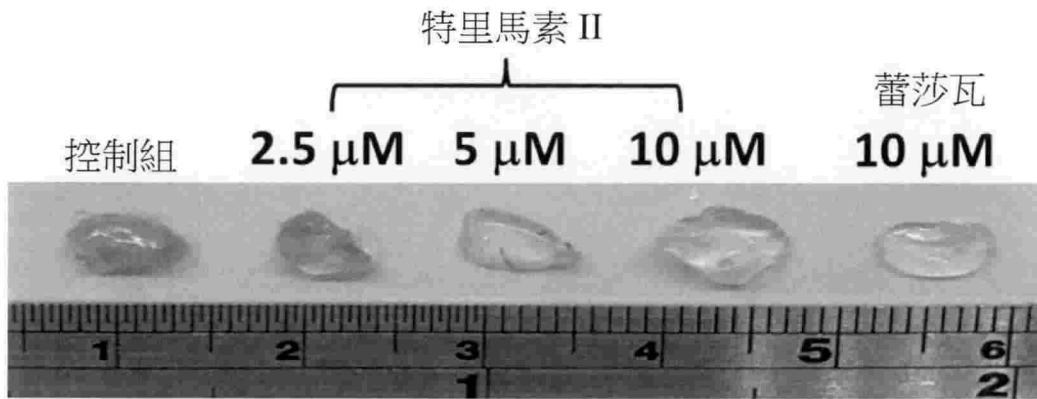


圖 5