

申請日期	P0.4.11
案 號	P0108680
類 別	A61K 31/02, 31/375, 31/30; A61P 9/10

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書
新 型

一、發明 名稱	中 文	13-HODE作為血管生物相容性之調節劑及細胞增生抑制劑之用途
	英 文	USE OF 13-HODE AS A REGULATOR OF VASCULAR BIOCOMPATIBILITY AND AN INHIBITOR OF CELL HYPERPLASIA
二、發明 人	姓 名	1. 麥可 邦嘉安 MICHAEL BUCHANAN 2. 大衛 郝羅賓 DAVID HORROBIN
	國 籍	均加拿大
	住、居所	1. 加拿大安大略省漢米頓市西主街12000號2N22C室 2. 英國蘇格蘭安倫橋肯尼威斯路50號考夫特力
三、申請人	姓 名 (名稱)	加拿大商1411198奧大利歐公司 1411198 ONTARIO LIMITED
	國 籍	加拿大
	住、居所 (事務所)	加拿大安大略省多倫多市約克街150號400室
	代 表 人 姓 名	道格拉斯 N. 迪斯 DOUGLAS N. DEETH

I287447

(由本局填寫)

承辦人代碼：

大類：

I P C 分類：

A6

B6

本案已向：

國(地區) 申請專利，申請日期： 案號： ，☐有 ☐無主張優先權

加拿大 2000年4月7日 2,304,906 ☐有 ☒無主張優先權

有關微生物已寄存於： ，寄存日期： ，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明(1)

發明範圍

本發明係關於調節血管內皮生物相容性以及抑制在管壁(VW)官能障礙和/或受傷後，管壁(VW)細胞和其他型態細胞的增生。更特定而言，本發明係關於13-羥基十八基-9Z, 11E-二烯酸(13-HODE)營養和藥學製劑以及其在復原血管內皮細胞生物相容性之用途，藉此使血管系統在急性病理生理學反應期間對循環的血液成分較無反應，並在VW刺激、官能障礙或受傷後的期間減少慢性增生細胞反應。

發明背景

細胞-細胞間交互作用在大多數疾病(包括心血管疾病、癌症和移轉、感染以及發炎)的發生扮演重要的角色。當前抗血栓治療的缺點和限制，以及本發明的優點將於下文之心血管疾病中討論。然而，這些討論也與其他疾病的狀態有關。

心血管疾病：治療和預防-技藝陳述

心血管疾病是西方社會病態和死亡的主因，而抽菸、高血脂、高血壓和糖尿病會使疾病更加惡化。近四十年來，我們社會採取了許多對策以降低心血管疾病，像是促進更健康的生活型態(特別是關於抽菸和飲食)。儘管如此，每年仍然有多於600000件的經皮徹照冠狀血管成形術(PTCA)和外科侵入法(例如只有在北美做過的冠狀動脈繞道移植(CABG))在心血管疾病患者進行以改善(心)血管血流。雖然這些方法對許多患者有益，但這些益處卻是有限且短暫

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(2)

的，而且VW狹窄會再發生(RITA試驗參與者，1993年；Kirklin JW等人，1989年)。舉例而言，儘管有急性肝制凝素治療，接著在PTCA後六個月期間再持續以阿斯匹靈(ASA)治療±口服抗凝劑，仍然有25-30%的患者在PTCA後六個月內發生再狹窄。給與肝制凝素係加速抗凝血酵素III(ATIII)抑制凝血酵素，藉以預防纖維蛋白原分裂為纖維蛋白以及隨後的纖維蛋白血塊形成；給予ASA係進行血小板環氧化酶的乙醯化，藉以抑制前列凝素 $A_2(TxA_2)$ 的生成，使得血小板對前血栓形成的刺激較無反應；給予口服抗凝劑(例如香豆定)係降低維生素K依存性前凝血劑的含量，藉以降低可用於血栓形成的前凝血劑受質含量。因此，現行治療心血管疾病的方法為破壞血小板功能和/或凝血以做為預防心臟和血管疾病(再)發生的方式，但是其卻無法修復本身的缺陷，若經嘗試則後者可使病患回復為正常健康狀態。

現今計畫逆轉心血管疾病的方法僅有使用脂肪降低劑(其可降低形成動脈粥狀硬化損害的風險)，以及基因療法。前者方法也可提供一些益處，但是，同樣地其卻無法"修補"基本的問題。事實上，基因療法可能從事於修復基本缺陷的問題，但心血管疾病的基因療法仍未成熟，而且也有複雜副作用的風險(Libby和Ganz P，1997年)。

因此需要一種不但可以矯正疾病問題基本起因，而且也可以預防疾病發作的治療方法。本發明係關於13-HODE之用途，其係用來調節血液細胞/管壁本身的相容性，提供了

五、發明說明(β)

比現今抗血栓療法更有效的方法來治療和預防像是心血管方面的疾病。

調節VW生物相容性的理論基礎

爲了更加了解調節VW生物相容性的理論基礎及其優於現今抗血栓治療法之處，因此，以下將陳述現今抗血栓策略背後的理論基礎和其明顯的限制性。其依次將強調一些構成調節管壁生物相容性概念之見識以及本發明使用13-HODE治療和預防心血管疾病的新穎方法。

調節VW生物相容性

1. 管壁狹窄和栓塞：

血管狹窄和之後的栓塞問題是所有醫學問題中最重要之一，其可產生非常廣泛的疾病，最爲熟知的是冠狀、腦以及周邊動脈阻塞。當然，研究該動脈阻塞在人類的早期發展是非常困難且也許是不可能的。感覺健康的人們不會傾向於接受侵入性的步驟，而該步驟可依次在出現臨床徵狀之前偵測出疾病的開始。然而，一般接受動脈以一方法(像是血管成形術)清除或部分清除栓塞物質後的再狹窄過程，在許多方面可能與問題原始發展有關的過程相似。因此，在血管成形術後或是管壁受傷後之血管再狹窄和栓塞，廣泛被用來作為包含原發性和次發性動脈栓塞整個系列事件的模式。

血管再狹窄的發生被認為是合併血管內膜的平滑肌細胞(SMC)增生、SMC合成和分泌胞外基質，以及VW重建的結果(Schwartz SM等人，1995年；Strauss BH等人，1994

五、發明說明(⁴)

年；Chervu A，Moore WS，1990年；Bocan TMA，Guyton JR，1985年)。發生SMC本身的增生係對管壁受傷時產生凝血酵素之細胞分裂功效，對附著於VW受傷部位血小板分泌之血小板衍生生長因子(PDGF)，以及對被活化之內皮細胞所分泌之細胞分裂素的反應(Bocan TMA，Guyton JR，1985年；Chen LB，Buchanan JM，1975年；Ross R，1993年；Bretschneider E等人，1997年；Fischman DL等人，1994年；Grandaliano G等人，1998年；Stouffer GA等人，1998年)。

多形核白血球(PMNs)和單核白血球/巨噬細胞也會侵入VW受傷部位，活化凝血和血小板，藉此擴大增生過程(Alexander RW，1994年；Mallory GA等人，1939年；Mehta JL等人，1998年)。此外，侵入的單核白血球會分化成巨噬細胞，攝取脂肪、鈣和其他血液衍生成分，藉此形成更複雜的粥狀動脈硬化斑(Chervu A，Moore WS，1990年；Bocan TMA，Guyton JR，1985年)。因此，有多樣細胞-細胞間之交互作用以引起和維持血管內膜的增生以及之後的再狹窄(Ross R，1993年；Schwartz RS，1998年；Cicala C，Cirino G，1997年)。

與血液成分和管壁間交互作用有關之所有事件健康狀況下會發生對受傷和感染的反應，但卻不會導致(心)血管疾病。然而，當這些血液成分/VW間交互作用被擴大時(例如引發平滑肌細胞增生、血小板/纖維蛋白血栓形成和VW增生)，則會開始引起(心)血管疾病。

五、發明說明(⁵)

2. VW受傷、修復和重建：

最近的研究辯論，在臨床上血管內膜管壁本身的增生，以及受傷後管壁的重建對之後管壁再狹窄的相對貢獻。Lafont, Post, Mintz等人辯稱管壁重建與內部的彈力層擴張或收縮有關，其在PTCA後對再狹窄的貢獻較血管內膜增生為大(Lafont A等人，1995年；Post MJ等人，1994年)。由於以血管支架增加冠狀動脈直徑可降低血管再造的需求(Fischman DL等人，1994年；Grandaliano G等人，1998年)，因此濱血管支架(Benestent)的結果和壓力研究宣稱是與此論證一致。由於在未狹窄VW中的SMC衍生之膠原較狹窄管壁中多(因而假定有較多的SMCs)，因此Coats等人亦同意此觀點(Coats WD等人，1997年；McGee MP等人，1995年)。反對者則預測是否增生是再狹窄的主要原因。Coats等人提出，我們目前抑制再狹窄之抗血栓療法不如預期有效，是因為該治療法主要集中於抑制SMC增生。然而，這些結論並不認為增生SMCs的異質性及其可以合成不同的母質(Frid MG等人，1997年)，或是SMC膠原的合成會受到內皮細胞存在(或不存在)影響的事實。特定而言，內皮細胞會抑制SMC蛋白質的合成，特別是第三型膠原(Myers PR, Tanner MA, 1998年)。反之則不然。已知在第一次受傷VW之增生血管內膜中的細胞外母質含有豐富的彈力蛋白，而在第二次受傷VW之增生血管內膜中的細胞外母質則含有豐富的膠原(Buchanan MR, Brister SJ, 1998年)(Capron L等人，1997年)。此外，上述引用的臨床研究

五、發明說明(⁶)

係以傷害之複雜性而需血管支架的病患進行。該等病患的再狹窄比例為不需血管支架的PTCA病患之四倍(Antoniucci D等人, 1998年)。需血管支架的PTCA病患之治療法亦顯著不同於不需血管支架的PTCA病患(Antoniucci D等人, 1998年)。這些不同處可能會影響之後在基礎和臨床末期的結果。更可能的是再狹窄中SMC增生和VW重建之相對角色, 取決於受傷的種類以及所使用之抗血栓療法。

3. 血液細胞/受傷管壁間之交互作用：

正常情況下, VW是無血栓形成的, 因此可與循環血液生物相容。當VW受傷時, 會極易形成血栓, 受傷的靜脈和動脈會在介質及血管內膜中表現組織因子。受傷後, 該表現會隨著時間而增加。組織因子之表現在未受傷VW中是最低的(Channon KM等人, 1997年)。組織因子之表現會進一步因侵入受傷部位的PMN和/或單核球/巨噬細胞而增加, 該增加量是取決於PMN和/或單核球/巨噬細胞CD18整合素之表現(Channon KM等人, 1997年; McGee MP等人, 1995年)。VW組織因子的表現活化了廣泛分布於富含SMC之VW組織中的凝血酵素原(McBane RD等人, 1997年)。凝血酵素正向調節內皮細胞PDGF受體之表現, 因此促進SMC的增生(Grandaliano G等人, 1998年; DiCorleto PE, Bowen-Pope DF, 1983年), 以及血小板的活化。被活化的血小板會分泌 TxA_2 (其可促進血管緊縮)、PDGF(其可促進SMC分裂)、以及凝血原, 其可加速凝血(Pakala R等人, 1997年), 連接至受傷VW中的血小板相關因子Xa/Va活性

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(⁷)

亦使其極易形成血栓，後者的影響可持續>96小時(Ghigliotti G等人，1998年)。因此，該多種事件的可經由使用抗血栓療法予以處置，該療法目標為凝血、血小板功能和發炎，且其目標亦可為VW血栓形成本身。直到今天，後者之方法實際上是不存在的。

4. 抗凝血療法和VW增生：

許多研究證實，肝制凝素可抑制實驗上引起之活體外和活體內SMC的增生(Castellot JJ Jr等人，1984年；Clowes AW，Clowes MM，1986年；Ferrell M等人，1992年；Hanke H等人，1992年)。此顯示了肝制凝素應可預防SMC增生以及之後的臨床上再狹窄化，然而，臨床上發生再狹窄化不用肝制凝素治療。目前認為凝血酵素可被保護免於受ATIII抑制，而當凝血酵素與纖維蛋白或受傷VW表面之其他成分連結時，肝制凝素可促進此功效(Okwusidi JI等人，1991年；Okwusidi JI等人，1990年；Hogg PJ，Jackson CM，1989年；Bar-Shavit R等人，1989年)。此外，表面連結之凝血酵素維持其活性，不顧抗凝血治療而促進系統性過度凝血(Ghigliotti G等人，1998年；Brister SJ等人，1993年；Wells J等人，1994年；Gill JB等人，1993年)。因此，表面連結之凝血酵素可活化血小板、SMC增生以及更多未受抑制之凝血作用。亦有證據顯示SMC對重複受傷之增生反應，與SMC對首次受傷之增生反應相比，其對肝制凝素治療是較不敏感的(Capron L等人，1997年；Geary RL等人，1995年)。

五、發明說明(8)

5. 抗血小板療法和增生：

極少證據顯示抗血小板療法本身可降低SMC增生。無疑地，ASA在降低患有種種心血管疾病患者之猝發、心肌梗塞以及短暫的局部出血發作之危險是有效的(阿斯匹靈試驗共同成果(Aspirin Trialists' Collaboration)，1994年)。然而，ASA之總危險降低率只有25%(阿斯匹靈試驗共同成果，1994年)。雖然，此危險降低率在統計學上是顯著的，但充其量此降低率只是中等的。

同時，ASA可能只對特定族群的病患是有用的(Buchanan MR, Brister SJ, 1995年；Grotemeyer K-H等人，1993年；Grotemeyer K-H, 1993年)。此可能部分是因為在ASA攝取後，血小板對各種刺激反應的廣泛差異(Mueller MR等人，1997年)。在二年後，ANA的功效亦是有限的而且只有極少之功效(阿斯匹靈試驗共同成果，1994年)。

可阻斷血小板糖蛋白IIb/IIIa(GPIIb/IIIa)受體之替代抗血小板劑已被提出作為ASA較佳的替代品。EPILOG研究證實以c7E3阻斷GPIIb/IIIa受體，可降低進行PTCA之病患的急性局部缺血併發症(EPILOG研究者，1997年)。相似的結果可在PRISM研究中得到，其係利用雅瑞縮(Aggrastat，一種非胜肽之GPIIb/IIIa拮抗劑)(血小板受體抑制於局部缺血徵候群之處理(PRISM)試驗研究者(The Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management (PRISM) Study Investigators)，1998年)。結果也顯示與ASA相比，這些短半衰期($t^{1/2}$)化合物可以防止任何的出血副作用。然而，

五、發明說明(9)

出血論點仍在爭議中。更重要的是，就像阿斯匹靈一樣，僅有極少之臨床證據顯示這些化合物可抑制長期的增生。

根據最近研究，並不令人感到驚訝的是血小板功能抑制劑在預防增生和再狹窄化上，僅有極少之功效。特定而言，Sirois等人使動物血小板減少，然後損傷其動脈。血小板減少症會持續短或長的時間，之後他們的血小板數會回復至正常值。雖然在長期血小板缺少的動物體內，其開始VW增殖延緩，但是SMC增生之潛力並不會完全被抑制。因此，在所有動物，不論其是否為血小板缺少，其內側的SMC PDGR- β 受體之表現皆受到正向調控。結果，當血小板數回復正常時，SMC增生以及之後的血管內膜增生就開始了(Sirois MG等人，1997年)。這些資料不但強調調節急性血小板/VW間交互作用，在抑制慢性血管內膜增生上的必要性，同時也顯示在任何限定的時期內，單獨抑制血小板是不可能具有持續功效的。

6. 當前抗血栓療法之限制：

雖然所有如上引用之研究皆在實驗和臨床上清楚地指出，以種種方法來減弱粥狀動脈硬化發展之不同時期的臨床功效，但這些方法皆不能預防疾病發作或幫助疾病復原。此外，以上所提到的所有治療方法皆是藉由減緩凝血、血小板功能和/或受傷管壁修之間接作用。結果，所有接受目前建議之抗血栓療法的病患皆變成止血失常，因此有極大的出血風險。所以，顯然需要一更好的抗血栓療法，其可預防和/或逆轉血管疾病，且沒有任何不良副作用

五、發明說明⁽¹⁰⁾)

即能達成這些功效。

7. 13-HODE VW生物相容性和增生：

可能除了經由配合降低脂肪和膽固醇攝取，以企圖減少VW脂肪堆積及VW上脂肪層的形成外，藉由改變VW生物相容性以預防VW增生的概念並未直接地被考慮。大多數的嘗試是較集中於分離、重組合成以及之後的利用VW成分來改變血液組成物特性。舉例而言，實驗和臨床資料二者皆顯示內皮細胞衍生之一氧化氮、組織胞漿素原活化物以及前列環素，能用在治療有急性血栓栓塞發生風險之病患(Gershlick AH等人，1994年；Zerkowski H-R等人，1993年；GUSTO研究者，1993年)。其功效正如抗血小板和抗凝血療法，是以血小板功能、VW直徑和血栓溶解為目標，藉此減緩止血和凝血。再者，請注意，此等只有在VW受傷或活化後才會產生，而且在調節健康、受傷或疾病的VW本身之內部生物相容性質上只有極少功效。

13-HODE在身體許多不同的細胞和組織中產生，特別是健康VW的血管內皮細胞和皮膚表皮細胞。13-HODE是經由已知酵素15-脂氧化酶作用於飲食必需脂肪酸(亞油酸)而形成的。第一步是氧化亞油酸以產生13-氫過氧基十八基-9Z, 11E-二烯酸(13-HODE)，之後再還原為13-HODE。13-HODE是重要的訊息傳遞分子，存在短暫並可藉由許多不同的刺激活化其合成(Buchanan MR等人，1985年；Haas TA等人，1990年；Weber E等人，1990年；Bertomeu M-C等人，1990年；Brister SJ等人，1990

五、發明說明⁽¹¹⁾)

年；Buchanan MR，Bastida E，1988年；Cho Y，Ziboh VA，1994年；Mari I，1998年；Kang L-T等人，1999年；Pongracz J，Lund JM，1999年；Friendrichs等人，1999年；Cho Y，Ziboh VA，1994年)。13-HODE的許多功效是經由抑制蛋白激酶(PK)(特別是PKC和細胞分裂活化PK(MAP激酶))而調節。

13-HODE是油狀液體，其可與根源脂肪酸(亞油酸)以相同的方式嵌入一系列的複合分子(包括磷脂和三酸甘油酯)中(Spiteller G，1998年；Fang X等人，1999年)。未嵌入複合脂肪的13-HODE會很快地被氫化和 β 氧化作用所代謝(Bronstein JC，Bull AW，1993年；Hecht，Spiteller G，1998年)。

幾乎所有被設計用來研究13-HODE功效之試驗，皆包含測量改變內源性13-HODE產量，或在活體外培養的細胞中加入外源性13-HODE(以不同的形式)的效果。在過去，只有很少的研究是測量以口服或非經腸方式投與動物或人類13-HODE時之功效。該限制部分是由於大量製造13-HODE的困難度，以及其對科學團體的可用性。因此，活體內研究之13-HODE需要量是非常昂貴的。其次，一般相信13-HODE就像許多的訊息分子一樣，是不安定且很快被代謝的。也因為預期沒有經口投藥的物質可到達作用之目標部位，所以認為進行包含經口投藥13-HODE的研究是浪費時間和金錢的。

然而，一些研究顯示經口投藥13-HODE在活體內是具有

五、發明說明(¹²)

生物相關功效的。Streber的專利敘述使用13-HODE和其他相關脂肪酸抑制芳香酶，其可將雄激素轉換為雌激素。該治療之目的為作用於任何由雌激素引起的疾病，像是乳癌以及一些可能類型的良性前列腺增生。然而，請注意，由Streber的專利所提出之所有證據皆是以活體外得到的資料為基礎，並無實驗證明其發明可真正作用於活體內。此外，Streber並無提出任何關於投藥方法的細節，或任何材料可被製成配方之實行細節(雖然聲明可使用"錠劑、膠囊或糖衣錠")。最後，每日劑量的特定範圍由100至1000毫克，較佳是在200到500毫克的範圍內(Streber AS，羥基-十八基二烯酸用來治療雌激素依賴疾病，美國專利第5,102,912號，1992年4月)。

吾等所知的真正描述亞油酸之氫氧衍生物係藉以下討論之本發明以外的經驗，來經口投藥之任何實驗的唯一研究為Kaminakai等人(日本專利第7-291862號碼，1995年11月7號)。然而，彼等只是順便提到13-HODE，在其實驗中真正為了專利使用而製造出的亞油酸氫氧衍生物是不同的脂肪酸，亦即9-羥基-10(E)-12(Z)十八基二烯酸(9-HODE)，其在核磁共振光譜中描述(顯示於專利的圖2)，並在文內被述為實驗中真正製造和研究的物質。這些實驗包括利用經口投與之9-HODE影響植入小鼠腹腔中180肉瘤的活動。彼等提出在腫瘤生長速率上抑制功效的報告，但所需的最少有效劑量為55毫克/公斤/天。

Buchanan等人公佈了特定專注於改變VW生物相容性來

五、發明說明(¹³)

預防血栓生成之唯一 13-HODE 研究。其之前的研究證實健康的 VW 細胞會持續轉換亞油酸，亦即當內皮無血栓生成或是與循環血液生物相容時 (Buchanan MR 等人，1985 年)。細胞內的亞油酸會經由脂氧化酶途徑代謝為 13-HODE (Hass TA 等人，1990 年)。

其亦公佈：

i) 在健康和血栓生成情況下，內源性 VW 13-HODE 在調節 VW 生物相容性中扮演了重要的角色。舉例而言，在動物和人類中，VW 細胞的血栓生成會隨著 VW 中 13-HODE 含量成反比例改變。因此，在動物和人類體內增加內源性 13-HODE 之含量會導致降低 VW 細胞血栓生成 (Weber E 等人，1990 年；Bertomeu M-C 等人，1990 年；Brister SJ 等人，1990 年；Buchanan MR，Brister SJ，1994 年)；和受傷後血小板/VW 間交互作用的減少 (Weber E 等人，1990 年；Bertomeu M-C 等人，1990 年；Buchanan MR，Brister SJ，1994 年)；以及

ii) 13-HODE 負向調控玻璃連結蛋白 (vitronectin) 受體辨識配位體的能力，藉此降低其對玻璃連結蛋白、纖維連結蛋白 (fibronectin) 和纖維蛋白 (原) 的黏著性 (Buchanan MR 等人，1998 年)。

一般認為在這些 13-HODE 保護功效下的機制包括了抑制蛋白激酶 (PK)，特別是 PKC 和細胞分裂活化 PK (MAP 激酶)。

重要的是強調在這些所有的研究中，其目標總是操控內

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (14)

源性合成或瓦解，來提升13-HODE內源性產量。這些研究皆不考慮以外源性投與13-HODE來操控VW 13-HODE含量，其以一系列包含投與配生丁(Persantine)([雙嘧啶胺醇(dipyridamole)])，其為磷二酯酶抑制物，且被認為可能會調節內源性13-HODE之代謝)的實驗清楚地證實。

在這些實驗中，證實了一種包含增加VW 13-HODE含量和降低SMC增生的抗血栓療法。兔子在第一次或第二次VW受傷前以配生丁處理(1毫克/公斤/天，共7天)，4星期後測量血管內膜SMC的增生。配生丁是根據其會抑制磷二酯酶基而給與的，藉此增加VW cAMP含量(Weber E等人，1990年；Haas TA等人，1990年)。增加的VW cAMP會增加VW亞油酸的轉換，以及之後的VW 13-HODE合成，其交互地與受傷時降低的血小板/VW間交互作用相關(Weber E等人，1990年)。配生丁治療抑制了VW受傷後4週的SMC增生。而在這些動物的血小板功能並未改變。

這些研究與在受傷的同時VW 13-HODE的增加可降低VW血栓形成之發現一致，如此減少了長期的血管內膜增生以及之後的VW再狹窄化。再者，此方法並不會像現今臨床使用之方法減緩正常的止血和凝血。

13-HODE，抗發炎療法和VW增生

早在1939年時，發炎已被公認為血栓進行的中間部分(Mallory GA等人，1939年)，但卻未在理論基礎上考慮其作為我們現今的抗血栓療法。然而，有令人信服的證據為減少特定的發炎反應提供了明顯的幫助。舉例而言，單核

五、發明說明⁽¹⁵⁾)

球/巨噬細胞和PMN表現整合素CD11/CD18(ICAM)，而且在其活化時可釋放細胞激素(Peracchia R等人，1997年；Yasukawa H等人，1997年；Turek JJ等人，1998年)，如此交互地刺激i)在其他細胞像是血小板、內皮細胞和SMC內 β_3 整合素的表現(Blanks JE等人，1998年；Golino P等人，1997年)；ii)組織因子活化(McGee MP等人，1995年)；以及iii)PDGF表現(Rubin P等人，1998年；Panek RL等人，1997年)。由血小板而來的脂肪部分以引起單核球/巨噬細胞的分化和生長來加強這些反應(Ammon C等人，1998年)。巨噬細胞與受傷VW間的交互作用，脂肪累積導致了更為複雜的粥狀動脈硬化傷害的形成(Ross R，1993年；Post MJ等人，1994年)。限制單核球/巨噬細胞ICAM的表現可顯著降低VW增生(Golino P等人，1997年；Nageh MR等人，1997年；Natori S等人，1997年)。其他人發現不同劑量的放射物($^{90}\text{Sr}/\text{Y}$ 或 ^{192}Ir)，其可選擇性地傷害單核球/巨噬細胞功能，同時亦可在齧齒類和兔子模式中降低VW增生(Rubin P等人，1998年；Panek RL等人，1997年；William DO，1998年；Kipshidze N等人，1998年)。在先前臨床研究利用血管內照射之SCRIPPS試驗中，進行PTCA的35個病患之再狹窄速率為11%，明顯低於在相當非放射對照組中所看到的37%再狹窄速率(Williams DO，1998年)。這些資料提供直接的證據，其顯示改變發炎反應也會影響血管內膜增生以及之後的VW再狹窄。

Buchanan等人的研究顯示引發負面作用的發炎細胞並不

五、發明說明⁽¹⁶⁾)

是PMN。事實上，PMN可在VW受傷時血液細胞/VW間交互作用之部位，藉由提供13-HODE的來源以降低VW血栓形成(Buchanan MR，1989年；Buchanan MR等人，1993年)。其他人主張PMN衍生的氧基促成與局部缺血相關的傷害(Shen J等人，1996年)，但與長期的增生無關。PMN亦會分泌類一氧化氮因子，其可抑制血小板功能以及血管緊縮(Cerletti C等人，1992年)。另一方面，正常的單核球/巨噬細胞並不會合成13-HODE(Shen J等人，1996年；Shen J等人，1995年)，然而有趣的是，Shen等人在已分化的巨噬細胞中正向調控15-脂氧化酶可發現13-HODE合成的增加，此增加與巨噬細胞脂肪堆積的減少有關。Fan等人亦發現富含亞油酸和 γ 亞麻酸(分別為13-HODE和PGE₁的受質)之巨噬細胞可刺激細胞內SMC cAMP，接續則會減少SMC增生(Fan YY等人，1997年)。最後，13-HODE抑制PAF(血小板活化因子)引發的PMN和單核球/巨噬細胞之去顆粒作用以及ICAM表現(Cerletti C等人，1992年)，因此預防了之後依賴整合素的細胞-細胞和細胞-配位體間的交互作用。

近來13-HODE之研究

以上的資料顯示內源性的VW 13-HODE於健康和血栓形成的情況下，在調節VW生物相容性方面皆扮演重要的角色，因此13-HODE為有用的抗血栓劑。然而，任何發展此概念的進展皆受到缺少或缺乏任何可直接正向調控VW細胞、PMN或其他相關細胞合成13-HODE之作用劑的阻礙。

五、發明說明¹⁷)

雖然配生丁是產生先前資料有用的工具，但卻為磷二酯酶極弱且可逆行之抑制劑。以亞油酸(13-HODE的受質)補充心血管疾病患者飲食，亦可有效地證實其提升13-HODE含量之益處，然而，此方法需要病患攝取每日劑量為20克或是更多的豐富亞油酸膠囊，而且此治療有不想要的副作用(包括卡路里攝取增加)。

驚人的結果

迄今，致力於此領域的研究者已專注在利用調節內源性13-HODE的製造、避開會抑制其合成的因子、以及/或提供可增加13-HODE合成之作用劑(包含亞油酸)以維持健康內皮細胞功能的想法。一般認為若以經口投與，則只有非常少量純的13-HODE可到達VW內皮目標部位，因此將會沒有生物活性，但最近這些想法出人意料地經試驗證實是錯誤的。特別的是，發現經口投與13-HODE確實可到達預定的目標部位，而且仍具有生物活性，除此之外，可以經口投與之13-HODE的合適賦形劑已經確認，最驚人的是，經口投與13-HODE有益的功效可以相當低的劑量來達成。

本發明的該等和其他目的以及優點，對熟習此項技藝者在閱讀以下敘述和附加之申請專利範圍後，將會是很顯而易見的。

發明概述

本發明係關於降低或抑制細胞和VW增生以及回復VW生物相容性的方法，其包含對需要此治療的動物或人類投與13-羥基十八基-9Z, 11E-二烯酸(13-HODE)，其劑量可以

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明⁽¹⁸⁾)

有效降低或抑制VW血栓形成，其中該化合物是經口投與。

本發明亦係有關上述之方法，其中該藥學組合物包含的13-HODE為其自由型，或是帶有藥學上可接受之載劑、輔助劑或賦形劑。

載劑、輔助劑或賦形劑可為一、二或三酸甘油酯、玉米、向日葵、紅花、棉子、葡萄子、橄欖、月見草、琉璃苣、魚體和魚肝油或是包含16-26個碳原子以及一或多個雙鍵之脂肪酸的酯類。這些酯類可為乙基二十五酸(乙基-EPA)、油酸、亞油酸、 α 亞油酸、硬脂酸、 γ 亞油酸、二同 γ 亞油酸、花生四烯酸、鯊油酸或二十二己酸(DHA)。

本發明亦包括含有13-HODE和脂溶性抗氧化劑(像是抗壞血酸棕櫚酸酯、生育酚以及含有卵磷脂之抗壞血酸)的藥學組合物。

再者，本發明係關於包含13-HODE以及添加劑(其係選自聚集劑、分散劑、滲透壓調節鹽、緩衝劑、甘味料和色素組成之群)的藥學組合物。

本發明之藥學組合物或13-HODE可以營養組合物型投與，或是以選自錠劑、糖衣錠、膠囊、顆粒、栓劑、溶液、懸浮液和冷凍乾燥組合物組成之群之型投與。如上所述之藥學組合物(其中13-HODE之每日劑量等於或少於100毫克)亦為本發明的一部分。

再者，本發明係關於包含13-HODE和 ω -3脂肪酸(像是

五、發明說明(19)

EPA、DHA或是任何EPA或DHA之衍生物，如乙基-EPA或乙基-DHA)的藥學組合物。

本發明包含經由 ω -3脂肪酸解決內源性13-HODE合成受抑制的方法，其係將13-HODE嵌入 ω -3脂肪酸的配方中。

本發明方法和13-HODE藥學組合物可用來治療心血管或腦血管疾病、發炎或自體免疫疾病、細菌、病毒、黴菌或原蟲類感染、呼吸性疾病、胃腸疾病、腎或尿道疾病、皮膚病、神經或精神疾病、生殖系統疾病、糖尿病、X徵候群或任何糖尿病之併發症、與過度活化之蛋白激酶相關的疾病、以及與內皮功能不正常相關的疾病。

本發明之方法和13-HODE的藥學組合物可用來治療和/或預防癌症或癌症的移轉蔓延。

本發明其他和進一步之優點和特色，對熟習此項技術者在了解本發明以下的詳細敘述連同附圖後，將變得顯而易見。

圖式簡述

附圖中：

圖1說明以100至1000微克/公斤/天的13-HODE(懸浮於玉米油，上層；或EPA，下層)口服治療之兔子在1至7天體內無細胞血漿中13-HODE含量。

圖2說明由0至100微克/公斤/天口服治療7天之兔子體內得到的VW中13-HODE含量。13-HODE是懸浮於玉米油(上層)或EPA(下層)，並於第1至7天給與。

圖3說明在0至1000微克/公斤/天口服治療7天之兔子體

五、發明說明²⁰)

內，懸浮於玉米油中的13-HODE在受傷VW之VW面積增加上的效果。

圖4說明以100至1000微克/公斤/天的13-HODE(懸浮於玉米油，上層；或EPA，下層)口服治療之兔子，在1至7天體內無細胞血漿中13-HODE含量。

圖5說明在0至1000微克/公斤/天口服治療7天之兔子體內，懸浮於玉米油(上層)或EPA(下層)中的13-HODE在受傷VW之VW面積增加上的效果。

圖6說明13-羥基十八基-9Z, 11E-二烯酸(13-HODE)之特性。

發明詳述和較佳具體實施例

本發明係說明一種在需要治療的哺乳類或人類體內降低或抑制VW增生，以及回復VW生物相容性之方法，該方法為投與13-羥基十八基-9Z, 11E-二烯酸(13-HODE)，該13-HODE之劑量可有效降低或抑制VW血栓形成。

本發明亦特別說明在動物和人類投與外源式13-HODE對VW受傷的血管反應之有益功效，該有益功效包括預防和治療VW增生，以及促進VW疾病回復。

如之前所討論的，13-HODE是調節VW生物相容性(因此減弱了頑強的血液組合物/VW間交互作用)的因子之一。其可經由數種方式進行，其中之一可能是減少玻璃連結蛋白受體的表現和活化。最近幾年發現VW生物相容性的不正常與極多種疾病相關，包括感染、許多類型的心血管問題以及發炎相關問題、纖維變性、缺乏正常代謝調控

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(²¹)

(Vallance 等人，1997年)和癌症細胞移轉。這些所有的疾病中，血管內皮細胞的活化導致正常血管通透屏障的缺失、白血球附著分子的表現、VW表面血栓反應的改變，多種細胞激素的製造以及HLA抗原的正調控(Hunt BJ, Jurd KM)。內皮細胞的活化和受傷可能導致或加劇多種疾病。

本發明經由13-HODE以有利的方向來調節內皮功能，因此幾乎在包含醫學各個方面的多種疾病上具有良好功效。事實上，特別有趣的是在本發明中投與外源性13-HODE可以彌補任何受抑制之內源性13-HODE合成，其可經由投與 ω -3脂肪酸(像是 α 亞油酸、鯊油酸以及特別是EPA和二十二己酸(DHA)(Miller和Ziboh，如上))而產生。EPA和DHA具有許多所希望的作用，但有時投與EPA和DHA的臨床結果並不如預期的有利，正如在血管成形術後企圖預防閉塞的例子(Cairns等人，如上)。因此共同投與13-HODE和EPA、DHA或其他 ω -3脂肪酸特別有用。

根據本發明的組合物可作成經口投與之配方，因此，組合物可以是錠劑、膠囊、懸浮液、乳劑和溶液型。

經口使用之配方包括錠劑，其包含活性成分以及無毒的藥學上可接受賦形劑之混合物。舉例來說，此賦形劑可為無作用的稀釋劑，像是碳酸鈣、氯化鈉、乳糖、磷酸鈣或磷酸鈉；粒化劑和分解劑，像是馬鈴薯澱粉或藻酸；接合劑，像是澱粉、動物膠或金合歡膠；以及潤滑劑，像是硬脂酸鎂、硬脂酸或滑石。其他藥學上可接受之賦形劑為著

五、發明說明⁽²²⁾)

色劑、調味料、塑形劑、保濕劑等。這些錠劑可為無塗膜或用已知技術塗覆膜層，以視需要延緩在胃腸道中的分解和吸收，並因此提供長時期的持久作用。舉例來說，可使用一種時間延緩材料，像是單硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。

經口使用之配方也可為咀嚼錠劑，或是硬膠囊，其中該活性成分是與無作用的固體稀釋劑混合，像是碳酸鈣、磷酸鈣或高嶺土；或是軟膠囊，其中該活性成分是與水或油性基質混合，像是花生油、液體石蠟或橄欖油。經由加水以製備水溶性懸浮液之粉末、分散粉末或顆粒亦為本發明方便的劑型。懸浮液配方係提供活性成分和分散劑或潮濕劑、懸浮劑以及一或多種防腐劑的混合物。舉例來說，適合的分散劑或潮濕劑為天然的磷脂(像是卵磷脂)、或環氧乙烷和脂肪酸的濃縮產物、來自脂肪酸和己醇或己醇酐之長鏈脂肪族醇和部分酯類(像是聚氧乙烯硬脂酸酯、聚氧乙烯山梨糖醇單油酸酯、聚氧乙烯山梨糖單油酸酯等)。舉例來說，適合的懸浮劑為羧甲基纖維鈉、甲基纖維、藻酸鈉等。

藥學上可接受之載劑或賦形劑可包括乳化劑、抗氧化劑、緩衝劑、防腐劑、保濕劑、滲入加強劑、螯合劑、凝膠形成劑、軟膏基質、香水以及皮膚保護劑。乳化劑的例子為天然膠，像是金合歡膠或黃耆膠，天然磷脂(像是大豆卵磷脂)和山梨糖單油酸衍生物。抗氧化劑的例子為丁基羥基苯甲醚(BHA)、抗壞血酸及其衍生物、生育酚及其衍生

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(²³)

物以及半胱胺酸。防腐劑的例子為對氧苯甲酸酯和氯苄烷銨。保濕劑的例子為甘油、丙二醇、山梨糖醇和尿素。滲入加強劑的例子為丙二醇、DMSO、三乙醇胺、N,N-二甲基乙醯胺、N,N-二甲基甲醯胺、2-四氫吡咯酮及其衍生物、四氫糠醇和Azone.RTM。螯合劑的例子為EDTA鈉、檸檬酸和磷酸。凝膠形成劑的例子為卡玻波(Carbopol)、纖維素衍生物、膨潤土、藻酸鹽、動物膠和PVP。軟膏基質的例子為蜂蠟、鏈烷烴、鯨蠟基棕櫚酸酯、植物油、脂肪酸山梨糖酯(Span)、聚乙二醇、脂肪酸山梨糖酯和環氧乙烷間的濃縮產物(像是聚氧乙烯山梨糖單油酸酯(Tween))。以上所提組合物之配方和製備為熟習藥學配方技藝者所熟知。特別的配方可在"瑞明同(Remington)的藥學科學"中找到。

本發明之飲食組合物可作成乳化劑的形式，例如醬油、美乃滋或人造奶油。

本發明之一具體實施例係關於為了治療功效(將於下討論)，投與藥學組合物與藥學上可接受之載劑。

在本發明之最佳具體實施例中，13-HODE的藥學組合物是經口投與，且其為包含13-HODE和選自玉米、向日葵、紅花、棉子、葡萄子、橄欖、月見草、琉璃苣、魚體、魚肝油、乙基二十五酸、油酸、亞油酸、 α 亞油酸、硬脂酸、 γ 亞油酸、二同 γ 亞油酸、花生四烯酸、鯊油酸和二十二己酸(DHA)組成之群之載劑的組合產物。

在另一較佳具體實施例中，本發明之藥學組合物為包含

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明⁽²⁴⁾

13-HODE與玉米油以大約1:3至1:100比例組合之組合產物。舉例而言,50毫克的13-HODE可與450毫克的玉米油混合。

在另一具體實施例中,本發明之藥學組合物為包含13-HODE與酯類載體以大約1:3至1:100比例組合之組合產物。

在另一具體實施例中,本發明之藥學組合物為包含13-HODE和16-26個碳原子脂肪酸(其帶有一或多個雙鍵)乙酯(像是乙基油酸酯、乙基亞油酸酯、乙基-EPA或乙基-DHA)之組合產物。

再者,本發明具體實施例之藥學組合物包含的13-HODE,其在與載劑混合之前已嵌入適當磷脂的Sn1或Sn2位置。

在本發明之另一最佳具體實施例中,藥學組合物包含了13-HODE和 ω -3脂肪酸(像是EPA、DHA、EPA和DHA衍生物、乙基-EPA和乙基-DHA)。

當以醫學方法治療或預防與VW生物相容性不正常相關之疾病、障礙或不正常的身體狀態,包括心血管或腦血管病、發炎或自體免疫、呼吸、胃腸、腎、皮膚、神經和精神疾病以及癌症,投與這些組合物是有效的。可投與本發明之藥學組合物來治療或預防疾病的例子包括第一型、第二型和第二型前驅糖尿病、X徵候群(Cosentino F, Lucher TF, 1998年; Steinberg AD, 1997年)、許多類型的發炎疾病(包括類風濕性關節炎、骨關節炎和自體免疫疾病

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(²⁵)

(Perretti M, 1997年))、細菌或是原蟲之感染(像是瘧疾和睡眠病)、可產生內毒素的黴菌感染(Gerrity等人, 1976年)、鐮刀型細胞疾病和相關的血紅素疾病(Lubin BH, 1997年)、腎臟病(Clausen等人, 1999年)、發炎性腸病(Binion DG等人, 1998年)、懷孕期高血壓和產前子癰(Endresen MJR等人, 1998年)、正常老化(Hashimoto M等人, 1999年)、痴呆(Iadecola C等人, 1999年)、視網膜局部缺血和年齡相關的肌肉退化(Gidday JM, Zhu Y, 1998年; Wada M等人, 1999年)、癌症以及特別的癌症移轉和血管生成(Pinedo HM等人, 1998年; Shureigi I等人, 1999年; Baron Ja等人, 1998年; Hazelton D等人, 1999年)、所有類型的心血管疾病(Kanani PM等人, 1999年)、所有類型的高血脂症和粥狀動脈硬化(Lefer DJ, Granger DN, 1999年; Mombouli J-V, 1999年; Blann AD, 1999年; Brown BG, Zhao X-Q, 1998年; Freedman JE, Loscalzo J, 1997年; Abe Y, 1998年)、移植(Labarrere CA等人, 1997年)、肺動脈高血壓(Higenbottom TW, Laude EA, 1998年)、高血壓和心臟衰竭(Boulanger CM, 1999年)、以及雷諾氏徵候群(Edwards CM等人, 1999年)。除此之外, 本發明亦可治療內皮功能因吸煙而受傷之吸煙者(Motoyama T等人, 1997年), 其係針對食用高脂肪餐的正常人(Plotnick GD等人, 1997年), 以及出生體重較輕或有心臟病風險表面健康的人(Goodfellow J等人)、出生體重較輕的健康年輕成人內皮功能的損傷(Ridker PM等人, 1998

五、發明說明(26)

年)、在表面健康的人體內可溶性細胞間吸附因子1的血漿濃度以及未來心肌梗塞的風險(Lancet, 1998年)。

投與劑量取決於個別病患的狀況、藥物指示、藥物的物理和化學穩定性、所需功效的毒性以及投與的選擇途徑(Robert Rakel, 科諾特現今治療編輯(1995年, W.B. Saunders公司, 美國))。

本發明以下的實例是以特定圖式來呈現。然而, 應了解, 本發明並不限於之後實例中的特定細節。

實例1

確認13-HODE之適當賦形劑

13-HODE為無色或是極淡的黃色油狀液體。如之前所描述的, 13-HODE可在身體內被代謝, 或是完全轉換為種種可能的複雜脂肪, 包括三酸甘油酯、二酸甘油酯、單酸甘油酯、膽固醇酯以及許多不同類型的磷脂。作為藥物, 13-HODE可單獨使用, 溶於不同的載劑, 或是嵌入甘油酯、酯類、磷脂或帶有任何適當載劑的其他分子。13-HODE與甘油酯、丙二醇的酯類、乙酯和磷脂是以共價鍵結合, 而且任何其他在身體內可將13-HODE以具有生物活性的形式釋放之分子或賦形劑皆在於本發明中。

實際上真正的問題是, 13-HODE具活性的每日劑量範圍為50至1000微克/公斤/天。此範圍的低劑量端100微克/公斤/天在兔子體內顯示是具有高度生物活性的。轉換為70公斤的人則為7毫克/天的劑量。由於體重/身體表面積比例之原因, 給予人類的劑量時常比給予動物的劑量少許多, 因

五、發明說明⁽²⁷⁾

此5毫克或更少的每日劑量亦是可能的。調配如此低劑量之油狀液體配方為一問題。其可合併於錠劑物質，做成錠劑並塗覆，或是以熟習此項技藝者所熟知的方法做成微膠囊。然而，13-HODE最方便和最佳劑型，及安定不會被分解型是將13-HODE溶於三酸甘油酯載劑或酯類中。咸發現玉米油是一種特別有用的稀釋液，而且13-HODE可以迅速、方便地與玉米油以一定比例混合，舉例而言，從1：3到1：100。其他的三酸甘油酯油像是植物油，包括向日葵、紅花、大豆、月見草、琉璃苣、椰子或棕櫚油、或是棉子、葡萄子、橄欖，為此目的也可能使用魚體或魚肝油。為此目的特別有用的酯類為帶有16-26個碳原子以及在鏈上有一或多個雙鍵之脂肪酸的酯類。根據發現乙基-EPA特別合適，但相當的脂肪酸酯類，像是油酸、亞油酸、 α 亞油酸、硬脂酸、 γ 亞油酸、二同 γ 亞油酸、花生四烯酸、鯊油酸和DHA為所有可用來攜帶13-HODE的酯類實例。

之後，這些製備物可再做進一步處理以得到最終劑型。這些油可以直接攝取、添加適當的抗氧化劑或調味料、或是利用熟習項技藝者所熟知的乳化劑或調味料將其改變為美味的、調味過的乳劑。一種特別有價值的劑型為軟膠囊或連結硬膠囊，或是用瓊脂或其他適合物質做成的相似膠囊。

當前唯一易於得到的13-HODE供給物為實驗室試劑用途非常昂貴的毫克量。純物質的特性顯示於圖6。如今可以利

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(²⁸)

用大豆脂氧化酶或具相似特異性之酵素來大量製備，這些酵素可將亞油酸代謝為13-HODE，此反應可在含有冷卻和攪拌系統、酸鹼值、氧氣(溶氧量，DOC)以及溫度探針的適當管柱內進行。反應首先以0.1M硼酸鹽緩衝液充電，然後使其冷卻至100°C以下，之後以氧氣清淨緩衝液直到DOC值到達100%。將大豆脂氧化酶以大約2500U/公升的速率加入，之後攪拌混合物並規律地以氧氣清淨以維持DOC值為100%，之後將1/1溶解於酒精中的十八基-9Z, 12Z-二烯酸以大約10克/公升的速率加入，然後此反應以氧氣覆蓋維持壓力正常，並強烈攪拌，讓反應繼續進行，每隔15分鐘以紫外線分析來監控，並以薄層色層分析來確定亞油酸和13-HODE間的轉換。

反應完成時，管柱以氮氣沖洗並以大約3.3克/公升的速率加入硼氫化鈉來還原，還原步驟完成時，混合物以檸檬酸酸化至酸鹼值為6，之後加入反相矽土(OD53)並攪拌，讓混合物於室溫在氮氣下持續攪拌過夜，矽土吸收了13-HODE，可過濾矽土來回收，以水清洗，然後用乙腈經多次清洗將產物洗出，之後洗掉溶劑，並以二乙酯和亞甲基二氯經由管柱色層分析法來純化粗製油以產生純的13-HODE，其為黏性淡黃色油狀物質。之後這些材料可依之前討論的做成配方。

在一些實驗的處理下使用玉米油是因為之前發現懸浮於玉米油中的亞油酸會促使其被VW選擇性地攝入(Bertomeu M-C等人，1990年)。在其他的實驗中使用海洋魚油(特別

(請先閱讀背面之注意事項再寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明⁽²⁹⁾)

是海洋油鯊或純度97%的乙基二十五酸(乙基-EPA))是因爲海洋魚油像是鮭魚、沙丁或其他油亦適合來維持13-HODE的穩定度。乙基-EPA在治療上最爲重要，因爲除了作用於VW內皮細胞上，EPA還有許多合適的作用，像是抑制血小板凝集、降低三酸甘油酯含量以及減少發炎反應。然而，它也會抑制內源性13-HODE的生成，這可能是負面的功效(Miller CC, Ziboh VA, 1990年; Gimenez-Arnau A等人, 1997年)。

EPA的抑制效果可能有助於解釋事實上爲何EPA預期合適的心血管功效無法實現。舉例而言，持續的EPA治療無法降低閉塞冠狀動脈以血管成形術開啓後的再狹窄(Cairns JA等人, 1996年)。

材料與方法：

完全使用紐西蘭白兔(雄雌各半；2.5-2.9公斤)。兔子以懸浮於玉米油或乙基二十五酸(EPA)中純的13-HODE 100、400或1000微克/公斤/天，或相當體積的任一懸浮賦形劑(總體積1毫升)治療7天。收集治療前、期間和之後的一系列血液檢體以評估血漿中13-HODE的含量。於第7天時終止治療，同時兔子給與皮下注射阿卓凡(Atravet)、凱他敏(Ketamine)、凡卓芬(Vetrepham)和甘吡咯溴(glycopyrolate)組合物以麻醉之。被麻醉的兔子其二條頸動脈在兩個暫時的結紮間分離出來，首先做近端的結紮，之後讓血液排出此區域，然後再做遠端的結紮。24號血針連上裝滿無菌生理食鹽水的管子，並與壓力計相接，再插

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(³⁰)

入分離的區域。然後此區域會充滿生理食鹽水使其壓力為600毫米汞柱，如此維持5分鐘。緩和壓力並移除血針和結紮，藉此使血流回復。不需任何手工操作，針頭穿刺部位的流血終止可在3分鐘內達成。切口以000普羅林(proline)縫合。這些兔子以肌肉注射叔丁啡(Temgesic)來減少疼痛，並以12.5毫克貝萃(Baytril)當作抗生素，之後讓其恢復。受傷步驟導致內皮露出，以及在1小時內暴露血栓表面於回復的血流，接著SMC增生和血管內膜增生，其第4週為停滯期，並可持續12週(Buchanan MR, Brister SJ, 1998年；Buchanan MR等人，1999年)。

2、4或12週之後再將這些兔子麻醉，並再次分離其受傷的頸動脈。收集受傷和未受傷之頸動脈區域，並經組織學處理以評估VW的增生。收集並處理其他VW區域及血液檢體以評估VW和血漿中13-HODE含量。

結果

血漿中13-HODE含量：以懸浮於玉米油中100微克/公斤/天的13-HODE治療後7天，其血漿中13-HODE含量增加三倍(圖1，上方方格)，提高13-HODE劑量至1000微克/公斤/天並無進一步功效。在14至21天內，血漿中的13-HODE含量回到接近對照組之量。雖然當13-HODE懸浮於乙基-EPA中時分析所有治療組含量，其血漿內13-HODE的絕對含量均較低，但是仍可見到相似的結果(圖1，下方方格)，儘管這二種懸浮賦形劑治療組間，其血漿中13-HODE含量在劑量相關增加上並無顯著差異。

五、發明說明⁽³¹⁾

VW 中 13-HODE 含量：兔子以懸浮於玉米油中的 13-HODE 治療，並在結束治療後 28 天測量，其體內 VW 中的 13-HODE 含量也有劑量相關的增加(圖 2，上方方格)。這些資料指出儘管結束治療，VW 中的 13-HODE 含量仍繼續升高。如 Fang 等人所證實的(1999 年)，這可能是因為 13-HODE 嵌入複合的脂肪中。

當 13-HODE 懸浮於乙基-EPA 中可見到相似的結果(圖 2，下方方格)，但是同樣地，在所有治療組含量的分析中，其 VW 內 13-HODE 的絕對含量均較低。既然 VW 中 13-HODE 含量理所當然的為內源性和外源性 13-HODE 測定值，那麼可能如 Miller 和 Ziboh 所描述的(1990 年)，在乙基-EPA 治療組中所見到的較低 VW 13-HODE 含量反應了內源性 13-HODE 合成的抑制。

生物學功效：以純的 13-HODE 所做之起始研究中，在受傷後第 2 和第 4 週測定的 VW 13-HODE 顯著增加會伴隨著血管內膜增生顯著的降低。例如，以 1000 微克/公斤/天 13-HODE 治療的兔子體內，其血管內膜的增生在第 2 和第 4 週分別為 8% 和 16%，相較於以安慰劑治療的兔子在第 2 和第 4 週分別為 18% 和 38% 的增生(p 小於 0.002)(圖 3)。此外，在 13-HODE 治療動物體內血管內膜增生減低，以致於第 12 週時幾乎無法偵測到血管內膜的增生($>3\%$ ， p 小於 0.01)。這是第一個證實純的 13-HODE 會抑制 VW 血管內膜增生的直接證據。值得注意的是，那些動物的無細胞血漿中 13-HODE 含量不但在治療的 3 天內會有顯著之提升，而且儘管

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明³²)

在7天後我們終止了13-HODE的治療，其仍然可以維持提升4週(圖4)。後者的資料顯示，經口投與13-HODE是很好吸收的，具有長的半生期，而且在臨床上是較易監控的。後者的資料也顯示我們，顯著的較低劑量13-HODE在預防VW血管內膜增生是有效的。

實例2

連續7天給與兔子100微克/公斤/天懸浮於玉米油或乙基-EPA中的13-HODE，可顯著地抑制血管內膜VW的增生(p小於0.001)(圖5)。VW中13-HODE的提升和VW增生的抑制比起試圖間接提升13-HODE含量(例如給予其前驅物亞油酸或配生丁)所能達到的要高了許多。相較之下，當病患每日攝取3.2克亞油酸(二十個膠囊)共30天，其VW中13-HODE含量只增加了二倍(Buchanan MR, Brister SJ, 1994年)，而當兔子以相當於臨床使用劑量的配生丁治療時，其VW中13-HODE含量也只增加了30%至50%(Weber E等人, 1990年)。血小板/受傷VW間的交互作用在這二個例子中皆下降了二倍以上。

這些最近的資料證實其功效(亦即抑制血管內膜增生)可藉由驚人的低劑量13-HODE來達成增生減低。目前尚未有其他抗血栓治療具有此能力。根據早期研究，這些功效的達成並不需傷害血小板功能及凝血(Weber E等人, 1990年; Bertomeu M-C等人, 1990年; Brister等人, 1990年)，而在任何的實驗動物觀察中均未偵測到出血的缺陷。

實驗結論：由這些實驗可做出以下的結論：

五、發明說明(³³)

1. 由於濃縮的 13-HODE 會到達血管組織和其他組織，所以當經口給與時可以有效預防 VW 增生，其具有生物活性，而且可以恢復 VW 生物相容性。
2. 具有生物活性之 13-HODE 劑量是驚人的低。
3. 三酸甘油酯和酯油為 13-HODE 的合適賦形劑。
4. 13-HODE 在 VW 上的生物功效是非常好的，其包括了預防和治療 VW 增生，以及促進 VW 疾病的恢復。

實例 3

13-HODE 和三酸甘油酯油(特別是玉米油)使用比例為 1：3 至 1：100 間，甚至可以高到 1：1000。舉例而言，50 毫克的 13-HODE 可與 450 毫克玉米油在軟性膠囊或連結硬膠囊中混合，或是 5 毫克可與 100 毫克的月見草油或其他適合的油類在相似類型膠囊中混合。

實例 4

如實例 3 中所用的組合物，但其中的油類是直接以液體來投藥，而且用適當的方式調味，例如用檸檬。

實例 5

如實例 3 中所用的組合物，但其中油類是利用適當的乳化和調味與水混合，以形成在水乳狀液中 5% 至 40% 的油類。

實例 6

如實例 3 至 5 中所用的組合物，但其中的油類是與酯混合，特別是帶有一或多個雙鍵 16-18 個碳脂肪酸的乙酯。油酸乙酯、亞油酸乙酯、乙基-EPA 和乙基-DHA 為 13-HODE 適當載劑的例子。

五、發明說明 (³⁴)

實例 7

如實例 3 至 6，但其中 13-HODE 在與載劑混合之前先嵌入單、雙或三酸甘油酯中。

實例 8

如實例 3 至 6，但其中 13-HODE 在與載劑混合之前先嵌入適當磷脂的 Sn1 或 Sn2 部位中。

實例 9

如實例 3 至 6，但其中 13-HODE 嵌入任何適當的載劑分子中，其可讓 13-HODE 送入具有生物活性的目標部位，像是血管內皮。

雖然本發明的最佳具體實施例已在此描述，但熟習此項技藝者會了解經由本發明所能造成之變化，而該變化並不會悖離反本發明的精神或所附申請專利的範圍。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

四、中文發明摘要（發明之名稱：13-HODE作為血管生物相容性之調節劑及細胞增生抑制劑之用途）

本發明係關於調節血管內皮生物相容性以及管壁官能障礙和/或受傷後，抑制管壁細胞和其他型態細胞的增生。更特定而言，本發明係關於13-羥基十八基-9Z, 11E-二烯酸(13-HODE)之營養和藥學製劑以及其在降低或抑制管壁增生和復原管壁生物相容性之用途。

英文發明摘要（發明之名稱：USE OF 13-HODE AS A REGULATOR OF VASCULAR BIOCOMPATIBILITY AND AN INHIBITOR OF CELL HYPERPLASIA）

This invention relates to the regulation of vascular endothelium biocompatibility and to the inhibition of vessel wall cell and other types of cell hyperplasia following vessel wall dysfunction and/or injury. More particularly, the invention relates to the dietetic and pharmaceutical preparations of 13-hydroxyoctadeca-9Z, 11E-dienoic acid (13-HODE) and its use in reducing or inhibiting vessel wall hyperplasia and restoring vessel wall biocompatibility.

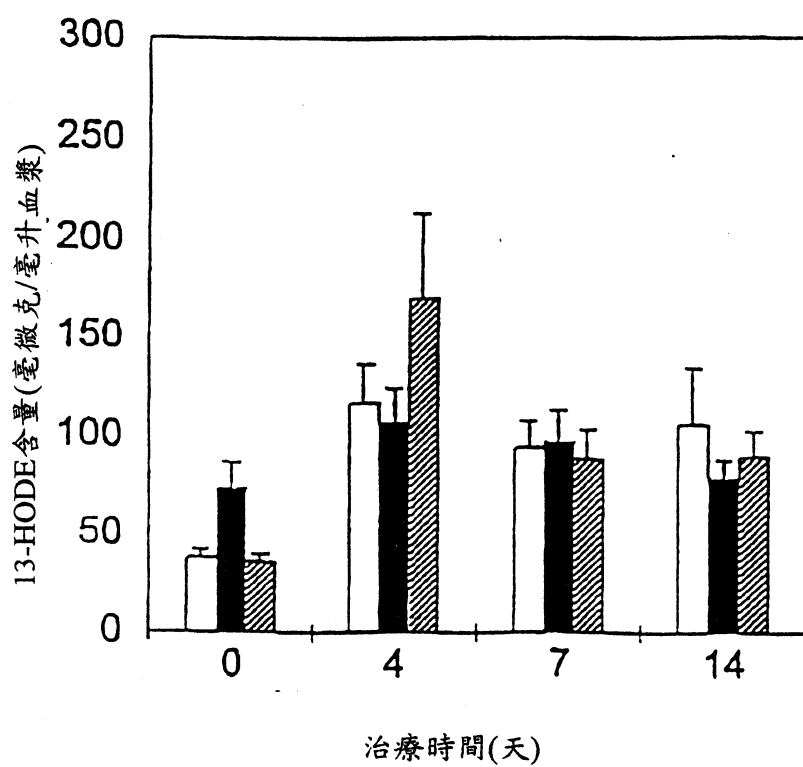
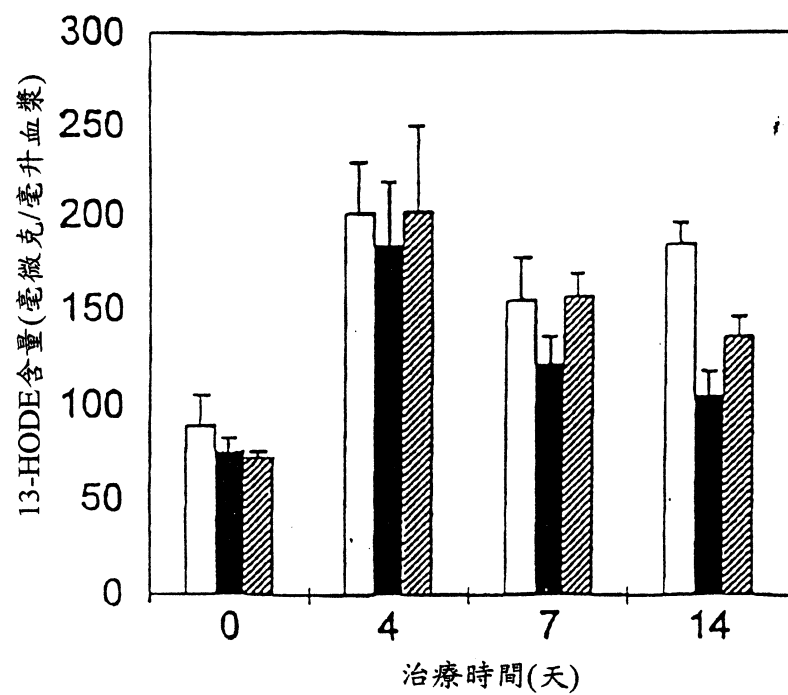


圖 1

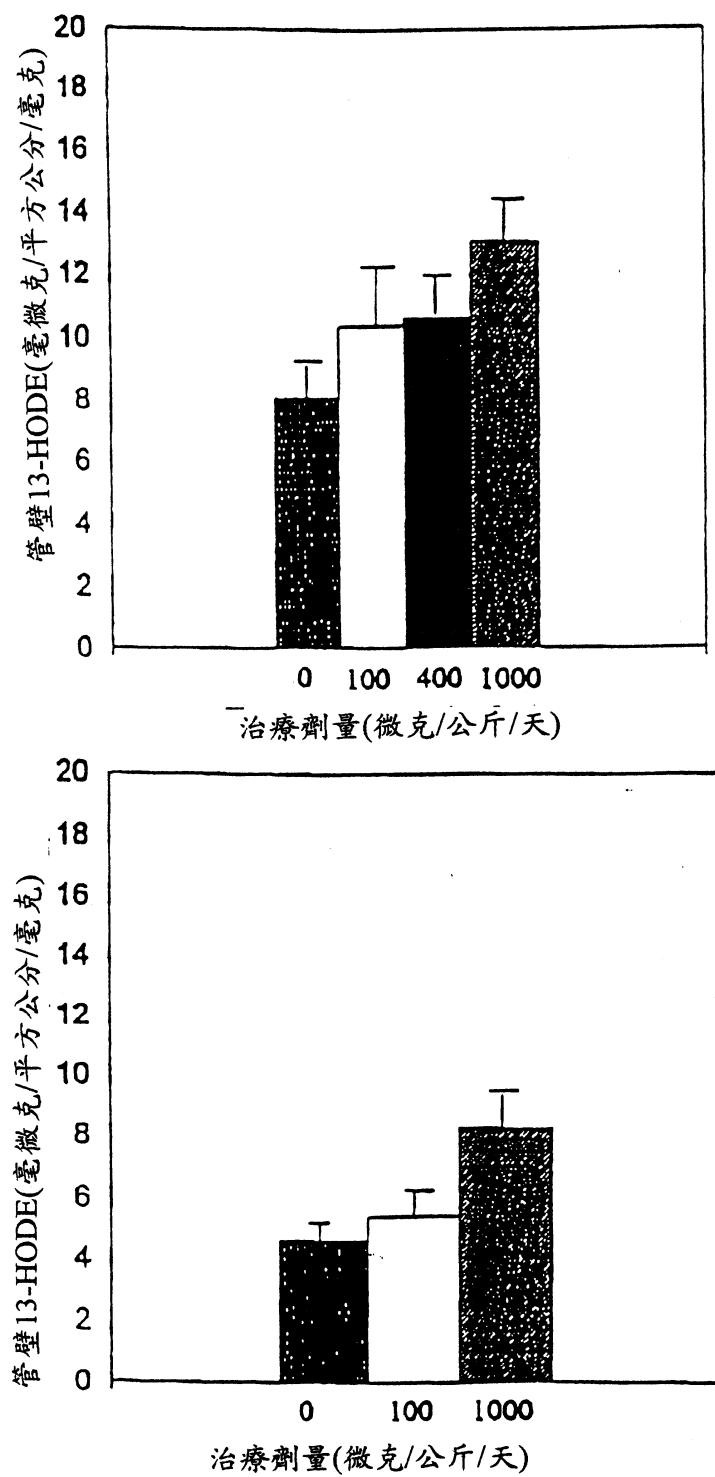


圖 2

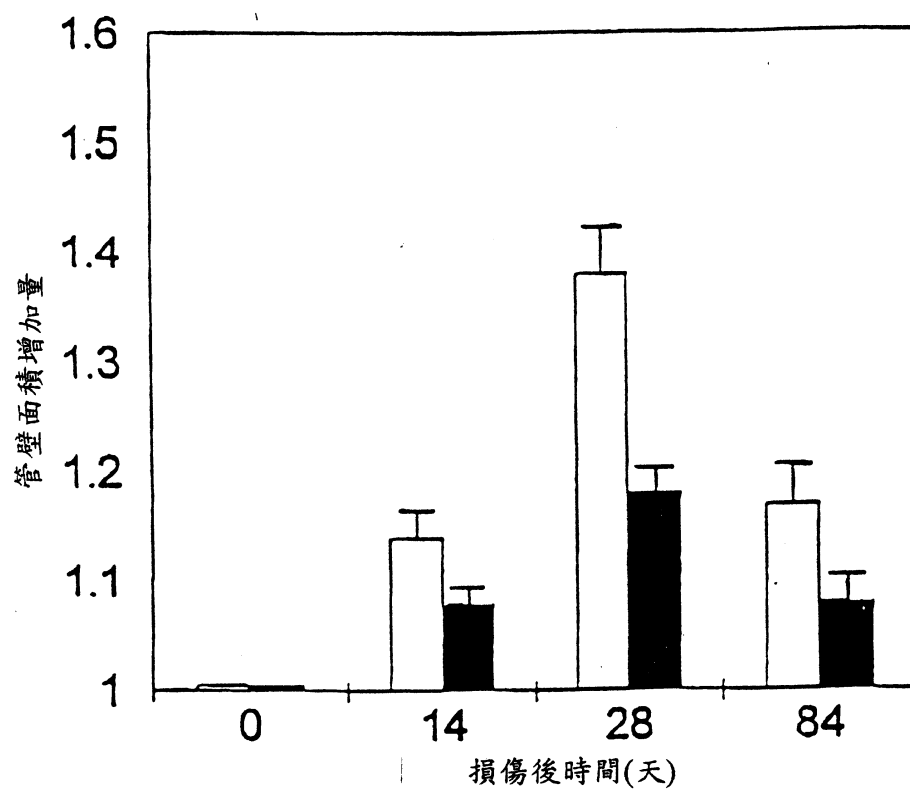


圖3

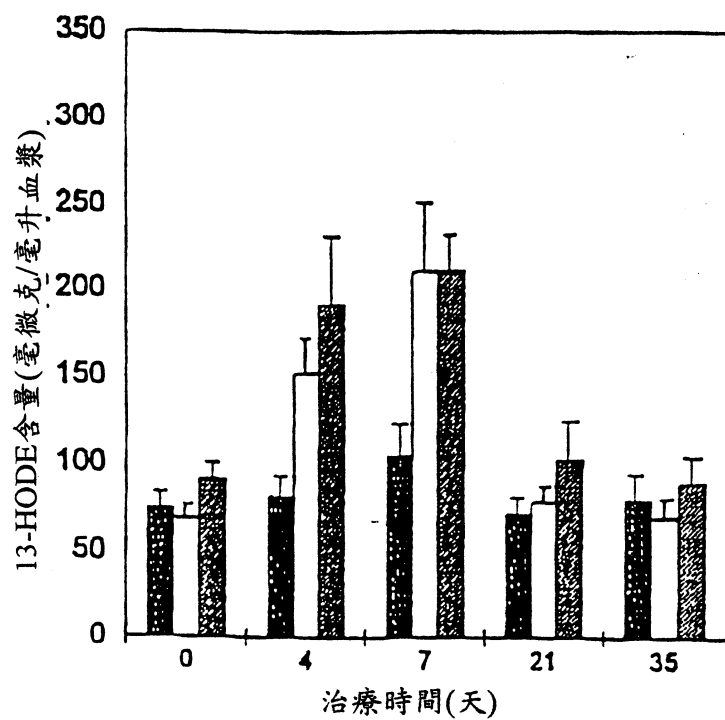
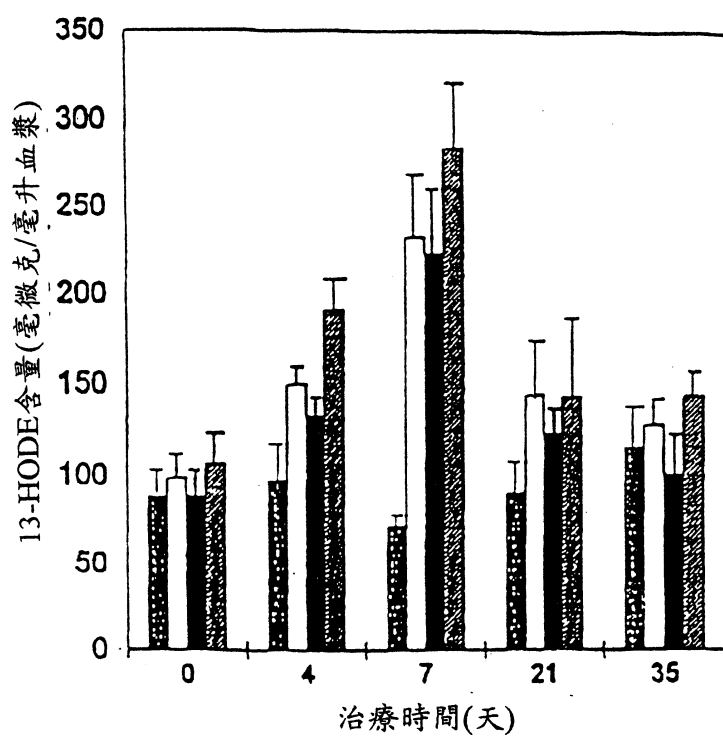


圖 4

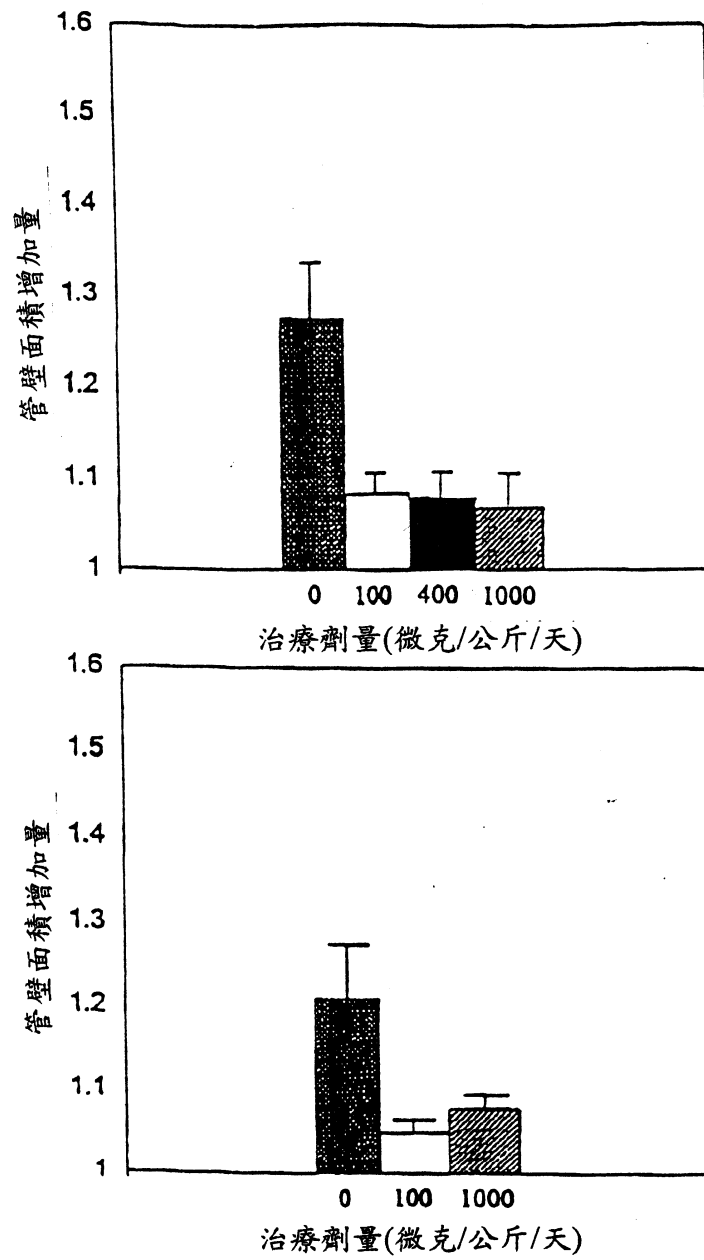


圖 5

六、申請專利範圍

1. 一種用於降低當 ω -3脂肪酸口服施用至受體時所產生之內源性13-HODE合成抑制作用之醫藥組合物，其包括其中含有13-HODE之 ω -3脂肪酸調配物。
2. 如申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其係用於需要降低或抑制細胞增生以及回復管壁生物相容性治療的哺乳類或人類，其包括可有效降低或抑制管壁血栓形成用量之13-羥基十八基-9Z, 11E-二烯酸(13-HODE)，其中13-HODE是以包含13-HODE和 ω -3脂肪酸之醫藥組合物形式使用。
3. 如申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中該 ω -3脂肪酸為選自EPA、DHA、EPA衍生物、DHA衍生物或其組合所構成之群中。
4. 如申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中該 ω -3脂肪酸為乙基-EPA、乙基-DHA或兩者。
5. 一種用於降低內源性13-HODE合成抑制作用之口服醫藥組合物，其包含自由形式之13-羥基十八基-9Z, 11E-二烯酸(13-HODE)及至少一種選自EPA、DHA、EPA衍生物和DHA衍生物所構成之群中之 ω -3脂肪酸。
6. 如申請專利範圍第5項之口服醫藥組合物，其進一步包含醫藥上可接受之載劑。
7. 如申請專利範圍第5項之口服醫藥組合物，其中13-HODE的每日劑量為等於或少於100毫克。
8. 如申請專利範圍第6項之口服醫藥組合物，其中該載劑為一、二或三酸甘油酯。

六、申請專利範圍

9. 如申請專利範圍第6項之口服醫藥組合物，其中該載劑為選自玉米、向日葵、紅花、棉子、葡萄子、橄欖、月見草、琉璃苣、魚體和魚肝油組成之群中。
10. 如申請專利範圍第6項之口服醫藥組合物，其中該載劑為包含16-26個碳原子以及一或多個雙鍵之脂肪酸的酯類。
11. 如申請專利範圍第6項之口服醫藥組合物，其中該載劑為選自乙基二十五酸(乙基-EPA)、油酸、亞油酸、 α 亞油酸、硬脂酸、 γ 亞油酸、二同 γ 亞油酸、花生四烯酸、鯊油酸和二十二己酸(乙基-DHA)組成之群中。
12. 如申請專利範圍第5項之口服醫藥組合物，其中該組合物是以選自錠劑、糖衣錠、膠囊、顆粒、溶液、懸浮液和冷凍乾燥組合物組成之群之形式投與。
13. 如申請專利範圍第5項之口服醫藥組合物，其中該組合物進一步包含選自抗壞血酸棕櫚酸酯、生育酚以及卵磷脂存在下的抗壞血酸組成之群之脂溶性抗氧化劑。
14. 如申請專利範圍第5項之口服醫藥組合物，其中該組合物進一步包含選自聚集劑、分散劑、滲透壓調節鹽、緩衝劑、甘味料和色素組成之群之添加劑。
15. 如申請專利範圍第5項之口服醫藥組合物，其中該 ω -3脂肪酸為選自乙基-EPA或乙基-DHA組成之群中。
16. 一種可增加生物體血管壁13-HODE的內源性含量之口服醫藥組合物，其包含自由形式之13-HODE及醫藥可接受鹽。
17. 一種13-HODE於製備增加哺乳動物或人類血管壁13-

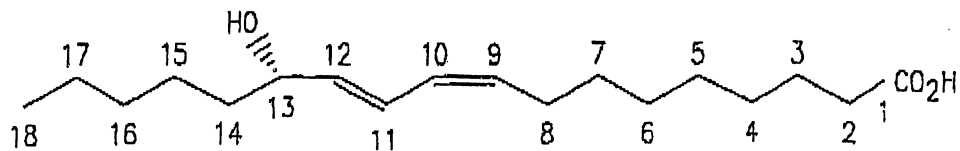
六、申請專利範圍

HODE 含量之藥物之用途。

18. 如申請專利範圍第17項之用途，其中13-HODE係經含有13-HODE、醫藥可接受載劑、輔劑或賦形劑之醫藥組合物投與。

裝
訂
線

第090108680號專利申請案
中文圖式替換頁(96年4月)



原子核磁共振光譜(270百萬赫；CDCl₃)

δ (ppm) 6.5(1H, dd, H_{11} , $J_{11,10}=11\text{Hz}$, $J_{11,12}=15.2\text{Hz}$), 6.0(1H, t, H_{10} , $J_{10,9}=J_{10,11}=11\text{Hz}$), 5.7(1H, dd, H_{12} , $J_{12,11}=15.2\text{Hz}$, $J_{12,13}=6.8\text{Hz}$), 5.4(1H, dt, H_9 , $J_{9,8}=7.7\text{Hz}$, $J_{9,10}=10.8\text{Hz}$), 4.1(1H, m, H_{13}), 2.4(2H, t, H_2 , $J_{2,3}=7.3\text{Hz}$), 2.2(2H, m, H_8), 1.6(4H, m, H_3 , H_{14}), 1.3(14H, m, H_{17} , H_{16} , H_{15} , H_7 , H_6 , H_5 , H_4) and 0.9 (3H, t, H_{18} , $J_{18,17}=6.7\text{Hz}$).

碳-13核磁共振光譜(67.8百萬赫；CDCl₃)

δ (ppm) 179.3(C_1), 135.6(C_{12}), 132.6(C_9), 127.8(C_{10}), 125.8(C_{11}), 72.9(C_{13}), 37.1-22.4(C_{17} , C_{16} , C_{15} , C_{14} , C_8 , C_7 , C_6 , C_5 , C_4 , C_3 , C_2) and 13.9(C_{18}).

紅外線光譜

3500-2500/公分(廣泛O-H範圍)和1709/公分(C=O範圍)

紫外線光譜(酒精溶液)

$\lambda_{\text{max}}=232\text{nm}$ ($\epsilon \approx 25,000 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$)

可溶於酒精，亞甲基二氯

不溶於己烷，水

圖 6