200938207

# 發明專利說明書

（本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫）

※ 申請案號：97108479

※ 申請日期：97.3.11

※IPC 分類：A61K 31/722 (2006.01)
C07B 37/68 (2006.01)
C07D 327/02 (2006.01)

## 一、發明名稱：（中文/英文）

水溶性聚胺基醣衍生物用於提高血液中高密度脂蛋白的用途

## 二、申請人：（共 1 人）

**姓名或名稱：**（中文/英文）

聚和國際股份有限公司/ TAIWAN HOPAX CHEMS. MFG. CO., LTD.

**代表人：**（中文/英文）郭聰田/ KUO TSUNG-TIEN

**住居所或營業所地址：**（中文/英文）

813 高雄市左營區立文路 77 號 14 樓/ 14F, No. 77, Li Wen Rd., Kaohsiung 813, Taiwan, R.O.C.

**國　籍：**（中文/英文）　中華民國/ Taiwan, R.O.C.

## 三、發明人：（共 2 人）

**姓　名：**（中文/英文）

1. 魏一健/ WEI, I-CHIEN
2. 林珊瑩/ LIN, SHAN-YING

**國　籍：**（中文/英文）

1.2. 中華民國/ Taiwan, R.O.C.

## 四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項☐第一款或☐第二款規定之事實，其事實發生日期為：　年　月　日。

☐ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號　順序註記】

☐ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號　順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼　順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼　順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

## 九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種提高人體血液中高密度脂蛋白的方法，更進一步地，本發明係關於一種將水溶性聚胺基醣衍生物用於提高血液中高密度脂蛋白的用途。

【先前技術】

幾丁聚醣（chitosan）為幾丁質(chitin)之胺基多醣（aminopolysaccharide）之衍生物，多以貽貝類、蝦或蟹類之硬殼為原料或以特定黴菌所產生。目前已有許多研究皆曾指出幾丁聚醣在體重控制有一定的效用，其作用機制包括降低腸胃道中脂質的吸收並且影響膽固醇與其他固醇類之乳化與吸收。另外，幾丁聚醣也會降低腸胃道中膽酸之再吸收，進而降低血液中膽固醇值，然而，幾丁聚醣因其特殊之結構導致水溶性較差，限制了相關產品之開發與應用。近年來部分幾丁聚醣之研究致力於改善此問題，傳統之方法係先將有機或無機酸加入聚胺基醣中，使其溶解於水中，然而這將導致水溶液形成極酸的狀態，降低了其生物利用性，而提高溶液之 pH 值則會使聚胺基醣沈澱。也有研究係將磺酸基團接枝至聚胺基醣的分子結構中，但這些方法常造成起始物質的嚴重分解。

曾有研究指出不同黏度之幾丁聚醣對於大鼠血液中膽固醇與脂質過氧化狀態會有不同影響。雖然已有文獻指出幾丁質或幾丁聚醣具有降低血中膽固醇與調整脂蛋白之效用，然而皆係針對不可溶或低溶解度之幾丁聚醣。水

溶性之幾丁聚醣衍生物是否具有降血脂功能則需要進一步評估。

【發明內容】

有鑑於習知技術的缺失，本發明之目的在嘗試尋找一種可提高血液中高密度脂蛋白之改質聚胺基醣，藉此期望可找到預防罹患心血管疾病之方針。

為達上述目的，本發明之用於提高血液中高密度脂蛋白之醫藥組合物，該組合物中包含有效劑量之水溶性聚胺基醣衍生物，其中該水溶性聚胺基醣衍生物係取未改質之聚胺基醣經烴基磺內酯化物磺酸化後製得。

本發明也包含一種將水溶性聚胺基醣衍生物用於提高血液中高密度脂蛋白之用途，其中該水溶性聚胺基醣衍生物係取未改質之聚胺基醣經烴基磺內酯化物磺酸化後製得。

更進一步地，本發明也包含一種將水溶性聚胺基醣衍生物用於製備可提高血液中高密度脂蛋白之醫藥組合物的用途，其中該水溶性聚胺基醣衍生物係取未改質之聚胺基醣經烴基磺內酯化物磺酸化後製得。

【實施方式】

本發明之用於提高血液中高密度脂蛋白之醫藥組合物，該組合物中包含有效劑量之水溶性聚胺基醣衍生物，其中該水溶性聚胺基醣衍生物係取未改質之聚胺基醣經烴基磺內酯化物磺酸化後製得。

本發明所稱之『改質』係指將水溶性低之聚胺基醣經化學反應衍生後形成具水溶性之聚胺基醣衍生物，更詳述之，其係將帶有胺基官能基團之未改質的聚胺基醣於適當之有機溶劑中，於適當溫度下與一烴基磺內酯化合物反應，此時聚胺基醣結構中之胺基官能基將可依照預定之比例部分或全部地被烴基磺內酯化合物磺酸化。磺酸化反應後的改質水溶性聚胺基醣不溶於改質前所使用的有機溶劑中，因而可直接過濾得到水溶性聚胺基醣。

依據上述方法改質的聚胺基醣其分子結構長度將實質相同於未改質前，因為此一改質化學反應並不會水解聚胺基醣結構。

本發明所稱之『聚胺基醣』係指分子結構中具有胺基官能基之醣類聚合物，所謂未改質之聚胺基醣可源自天然界醣類聚合物或化學合成之分子，例如幾丁聚醣、醣胺聚多醣（glycosaminoglycans，GAG）等。

一般而言，未改質之聚胺基醣其分子量介於 300 至 1,500,000 之間，其係可進一步依據分子量大小細分為四種類型：(1)分子量低於 10,000 之非常低分子量分子；(2)分子量介於 10,000 至 35,000 之間的低分子量分子；(3)具有 35,000 至 140,000 之間的高分子量分子；及(4)具有分子量介於 140,000 至 1,500,000 之間的非常高分子量分子。

其中，幾丁聚醣依其型態又可區分為 $\alpha$-幾丁聚醣、$\beta$-幾丁聚醣、直鏈幾丁聚醣、分支幾丁聚醣等。這些幾丁聚醣可由天然來源（包含甲殼類外殼、昆蟲外骨骼及真菌的細胞壁）被純化的幾丁質經去乙醯化後製得。一般而

言幾丁聚醣之去乙醯化程度在 50%至 100%之間。經磺酸化之幾丁聚醣由於磺酸根官能基的作用使幾丁聚醣變得親水性。

當磺酸化之反應在一有機溶劑中進行且控制適當溫度時，將使烴基磺內酯連接至幾丁聚醣的醣單體上的胺基（$-NH_2$）上而非羥甲基($-CH_2OH$)上，一般而言，改質反應（即磺酸化反應）係在有機溶劑的迴流溫度（通常高於 45℃）下進行，且此時烴基磺內酯化合物（特別是 1,3-丙烷磺內酯不會因為有機溶劑內含有少量水就發生水解。

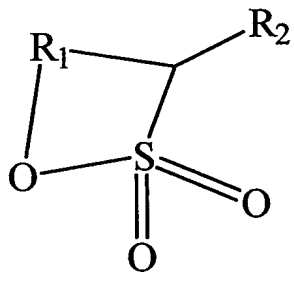
適合於磺酸化反應進行的有機溶劑具有極性的有機溶劑較適合於聚胺基醣的磺酸化反應，例如醇類、醚類、醇醚類或其混合物。具體態樣包含甲醇、乙醇、異丙醇、丁醇、甲氧基丙醇（methoxypropanol）或其混合物。一般而言，溶劑中可容許 10%以下的水的存在。

其中，以甲醇為溶劑可因其極性而提供額外的優點，特別是甲醇會使不論分子量低或高之幾丁聚醣產生膨潤效果（swollen），使烴基磺內酯化合物可穿透至其中與尚未改質的醣單體反應。也由於磺酸化反應趨勢的明顯差異而使磺酸化反應幾乎發生在醣單體的胺基上而非羥甲基上。以甲醇作為溶劑進行幾丁聚醣磺酸化改質的反應溫度可在 25℃至 67℃間進行。此外，1-甲氧基-2-丙醇特別適合分子量非常低的幾丁聚醣的改質反應來使用。

如同前述曾提及，磺酸化反應較佳地係於有機溶劑之迴流溫度下進行，更精確地說法，磺酸化反應之迴流溫度係與有機溶劑之種類，以及其與幾丁聚醣之混合物之沸點

相關。例如甲醇作為有機溶劑時，迴流溫度約在 65～67℃，正丁醇作為有機溶劑時之迴流溫度約在 117～120℃，異丙醇作為有機溶劑時之迴流溫度約在 82～85℃，而 1-甲氧基-2-丙醇作為有機溶劑時之迴流溫度則約在 110～115℃之間。

本發明所稱之烴基磺內酯（alkyl/alkenyl sultone）可區分為烷基磺內酯（alkyl sultone）及烯基磺內酯（alkenyl sultone），其係可利用下式化學式(I)所示之結構表示之：




(I)，

其中，$R_1$ 係選自 $-(CH_2)_x-$ 或 -CH=CH-，X 係為 2，3 或 4；及 $R_2$ 係選自 H 或 $C_1$ 至 $C_3$ 烷基。

烴基磺內酯化合物之具體態樣包含，但不限於 1,3-丙烷磺內酯、1,3-丙烯磺內酯、1,4-丁烷磺內酯、2,4-丁烷磺內酯或其混合物。

以 1,4-丁烷磺內酯為例，當使用正丁醇或 1-甲氧基-2-丙醇為溶劑，在 110℃至 130℃間迴流 6～8 小時候，可得產率為 55%～92%之水溶性幾丁聚醣。

當可輕易理解的是，烴基磺內酯的選擇與用量係可根據所欲製得之水溶性幾丁聚醣的磺酸化程度以及性質來決定，所製得之水溶性幾丁聚醣可利用傳統之純化方法，例如過濾或結晶等由有機溶劑中移出，而未被磺酸化之胺

基則可使該水溶性幾丁聚醣進一步處理應用於各種領域。

本發明包含將水溶性聚胺基醣衍生物用於提高血液中高密度脂蛋白之用途，其中該水溶性聚胺基醣衍生物係取未改質之聚胺基醣經烴基磺內酯化物磺酸化後製得。

其中，水溶性聚胺基醣、其製備方法以及磺內酯化物之定義係如前述。

更進一步地，本發明包含將水溶性聚胺基醣衍生物用於製備可提高血液中高密度脂蛋白之醫藥組合物的用途，其中該水溶性聚胺基醣衍生物係取未改質之聚胺基醣經烴基磺內酯化物磺酸化後製得。

同樣地，水溶性聚胺基醣、其製備方法以及磺內酯化物之定義係如前述。

以下實施態樣係用於進一步了解本發明之優點，並非用於限制本發明之申請專利範圍。

**實施例 1. 製備水溶性幾丁聚醣**

取 161 克之高分子量幾丁聚醣（分字量約 140,000）並置放於一燒瓶中，將 700 毫升的甲醇加入施以攪拌。之後加熱攪拌燒瓶中之混合物後於 65～67℃之迴流溫度下下緩慢滴入 122 克 1,3-丙烷磺內酯。待所有 1,3-丙烷磺內酯被加入後，將混合物迴流四小時，之後將燒瓶冷卻至室溫後，以過濾方式收集產物並以甲醇潤洗數次，而後置於真空烘箱中乾燥過夜。經乾燥後秤重得到 282 克，產率為 99.7%之經烷基磺酸化幾丁聚醣。

## 實施例 2. 改質前後幾丁聚醣對倉鼠之影響

倉鼠飼養與餵食

四週齡離乳之雄性倉鼠係購自財團法人國家實驗研究院實驗動物中心，將購得之倉鼠依體重隨機分組飼養於塑膠飼養籠中，控制 12 小時晝/夜循環，溫度 25±1℃，自由飲水與食用正常飲食（標準組，記為『ND』；AIN-93G；ICN Biomedicalsm，Costa Mesa，CA，USA），一週後將標準組以外之倉鼠改餵食高脂肪高膽固醇飲食（high fat and cholesterol diet，記為『HFCD』；AIN-93G modified high-fat diet），飲食配方可參下表一

表一、飲食配方（g/100g）

| 內容物 | ND | HFCD |
|---|---|---|
| Casein | 20 | 20 |
| Sucrose | 10 | 10 |
| Cornstarch | 41.2486 | 26.2486 |
| Maltodextrin | 13.2 | 13.2 |
| L-Cystein | 0.3 | 0.3 |
| Cellulose | 5.0 | 5.0 |
| Soybean Oil | 5.0 | 20.0 |
| t-butylhydroquinone | 0.0014 | 0.0014 |
| Mineral Mix #210025 | 3.5 | 3.5 |
| Vitamin Mix #310025 | 1.0 | 1.0 |
| Choline Bitartrate | 0.25 | 0.25 |
| Cholesterol | 0.5 | 0.5 |

除一般進食外，並於實驗組每週一、三、五、六固定灌食 5 或 10mg/kgBW 之幾丁質（分別記為 LCH 及 HCH）

或 5 或 25mg/kgBW 之水溶性幾丁聚醣（分別記為 LMCH 及 HMCH），同時在 HFCD 組中部分倉鼠合併餵食降血脂藥物 probucol（記為 HFCD+P）。

飼養期間每日進行體重與進食量之記錄。

倉鼠之犧牲、採樣與分析

實驗動物於七週後於犧牲前先禁食 12 小時，之後利用二氧化碳窒息法將其犧牲後，立刻由肝門靜脈採取血液樣品並搭配使用 EDTA 作為抗凝血劑，血液樣品於 4℃ 環境中以 300g 之離心力離心 10 分鐘以取得血清樣品，以進行肝功能（AST、ALT）與血清脂質（TC、TG、LDL-cholesterol、HDL-cholesterol）分析。

獲得之數據以 SAS 電腦統計軟體進行變異數分析（analysis of variance，簡稱 ANOVA），同時配合 Tukey's test 進行統計分析，以分析實驗數據間是否達到顯著性差異（$p<0.05$）。

結果

一、生長變化與肝功能

利用幾丁質（CH）或水溶性幾丁聚醣（MCH）餵食之倉鼠，其體重增加量、肝臟、心臟、脾臟與腎臟相對於體重之相關重量皆與 ND 組無差異，顯示餵食幾丁質或水溶性幾丁聚醣對倉鼠之進食、生長與重要臟器都不會造成負擔影響。

至於判斷肝功能之 AST 與 ALT 活性亦與 ND 組無差

異，顯示餵食幾丁質或水溶性幾丁聚醣不影響倉鼠之肝功能。

二、血脂變化

下表二係為倉鼠血液中各血脂成分之數據統計分析

表二、倉鼠血脂成分統計分析（mg/dl）

| 成分 / 組別 | 三酸甘油脂 | 膽固醇 | 高密度脂蛋白-膽固醇 | 低密度脂蛋白-膽固醇 |
|---|---|---|---|---|
| ND | 25.7± 5.51 [b] | 140.8±22.40 [c] | 116.0±19.27 [c] | 26.2±4.82 [c] |
| HFCD | 43.8± 6.08 [a] | 276.4± 7.40 [a] | 176.0± 9.30 [b] | 76.4±5.02 [a] |
| HFCD＋P | 26.6± 5.80 [b] | 224.5±19.02 [b] | 194.4±18.89 [ab] | 60.5±7.42 [b] |
| HFCD＋LCH | 25.8± 6.65 [b] | 237.2±17.61 [b] | 188.7±13.84 [ab] | 65.4±7.83 [b] |
| HFCD＋HCH | 27.9±11.19 [b] | 236.5± 6.57 [b] | 193.6±14.46 [ab] | 65.5±3.21 [b] |
| HFCD＋LMCH | 18.7± 2.31 [b] | 245.1±31.80 [b] | 185.6±13.45 [ab] | 64.4±9.48 [b] |
| HFCD＋HMCH | 29.3± 3.30 [b] | 237.6± 7.96 [b] | 200.0±28.07 [a] | 61.3±3.30 [b] |

ND:normal diet contain, HFCD: high fat and cholesterol diet, P: probucol 1mg/kg BW probucol LCH: 5mg/kg BW chitosan, HCH: 10mg/kg BW chitosan, LMCH: 5mg/kg BW modified chitosan, HMCH: 25mg/kg BW chitosan.

由上表可知，餵食高膽固醇食物（HFCD）之倉鼠其各項與血脂相關之數值皆顯著上升，倘配合降血脂藥物或者幾丁質使用，可將高密度脂蛋白提升，但是當餵食高膽固醇飲食配合水溶性幾丁聚醣食用後，其提升效果較配合降血脂藥或幾丁質食用顯著。

綜上所述，水溶性幾丁聚醣較固態之幾丁質或幾丁聚醣比較，除了流動性佳，其水可溶性佳之特性適合添加於流體食物或飲品之中，且有效提升血液中高密度脂蛋白。

**其他實施態樣**

在本說明書中所揭露的所有特徵都可能與其他方法

結合，本說明書中所揭露的每一個特徵都可能選擇性的以相同、相等或相似目的特徵所取代，因此，除了特別顯著的特徵之外，所有的本說明書所揭露的特徵僅是相等或相似特徵中的一個例子。

雖然本發明已以較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟悉此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作各種之更動與潤飾。

## 五、中文發明摘要：

本發明係關於一種將水溶性聚胺基醣衍生物用於提高血液中高密度脂蛋白之用途，其係將以烴基磺內酯化合物（alkyl/alkenyl sultone）將未改質之聚胺基醣磺酸化，可使該衍生化之聚胺基醣具有水溶性，將其以口服方式供實驗鼠食用後可提高實驗鼠血液中之高密度脂蛋白。

## 六、英文發明摘要：

## 十、申請專利範圍：

1. 一種用於提高血液中高密度脂蛋白之醫藥組合物，該組合物中包含有效劑量之水溶性聚胺基醣衍生物，其中該水溶性聚胺基醣衍生物係取未改質之聚胺基醣經烴基磺內酯化物磺酸化後製得。

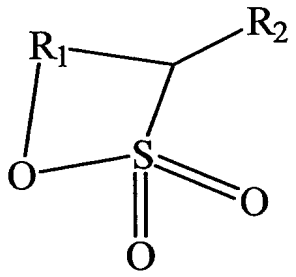
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之組合物，其中前述未改質之聚胺基醣其分子量介於 300 至 1,500,000 之間。

3. 如申請專利範圍第 1 項所述之組合物，其中前述未改質之聚胺基醣係為幾丁聚醣。

4. 如申請專利範圍第 3 項所述之組合物，其中前述幾丁聚醣之去乙醯化程度介於 50%至 100%之間。

5. 如申請專利範圍第 1 項所述之組合物，其中前述烴基磺內酯化物係選自烷基磺內酯或烯基磺內酯。

6. 如申請專利範圍第 5 項所述之組合物，其中前述烴基磺內酯化物具有以下化學式(I)所示之結構：




(I)，

其中，

$R_1$ 係選自 $-(CH_2)_x-$ 或 -CH=CH-，X 係為 2，3 或 4；及

$R_2$ 係選自 H 或 $C_1$ 至 $C_3$ 烷基。

7. 如申請專利範圍第 6 項所述之組合物，其中前述烴基磺內酯化物係為 1,3-丙烷磺內酯、1,3-丙烯磺內酯、

1,4-丁烷磺內酯、2,4-丁烷磺內酯或其混合物。

8.一種將水溶性聚胺基醣衍生物用於提高血液中高密度脂蛋白之用途，其中該水溶性聚胺基醣衍生物係取未改質之聚胺基醣經烴基磺內酯化物磺酸化後製得。

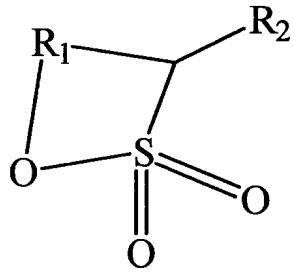
9. 如申請專利範圍第 8 項所述之用途，其中前述未改質之聚胺基醣其分子量介於 300 至 1,500,000 之間。

10.如申請專利範圍第 8 項所述之用途，其中前述未改質之聚胺基醣係為幾丁聚醣。

11.如申請專利範圍第 10 項所述之用途，其中前述幾丁聚醣之去乙醯化程度介於 50%至 100%之間。

12.如申請專利範圍第 8 項所述之用途，其中前述烴基磺內酯化物係選自烷基磺內酯或烯基磺內酯。

13.如申請專利範圍第 12 項所述之用途，其中前述烴基磺內酯化物具有以下化學式(I)所示之結構：




(I)，

其中，

$R_1$ 係選自 $-(CH_2)_x-$ 或 -CH=CH-，X 係為 2，3 或 4；及

$R_2$ 係選自 H 或 $C_1$ 至 $C_3$ 烷基。

14.如申請專利範圍第 13 項所述之用途，其中前述烴基磺內酯化物係為 1,3-丙烷磺內酯、1,3-丙烯磺內酯、1,4-丁烷磺內酯、2,4-丁烷磺內酯或其混合物。

15.一種將水溶性聚胺基醣衍生物用於製備可提高血液中高密度脂蛋白之醫藥組合物的用途，其中該水溶性聚胺基醣衍生物係取未改質之聚胺基醣經烴基磺內酯化物磺酸化後製得。

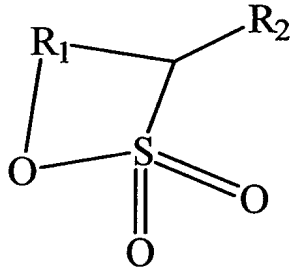
16.如申請專利範圍第15項所述之用途，其中前述未改質之聚胺基醣其分子量介於300至1,500,000之間。

17.如申請專利範圍第15項所述之用途，其中前述未改質之聚胺基醣係為幾丁聚醣。

18.如申請專利範圍第17項所述之用途，其中前述幾丁聚醣之去乙醯化程度介於50%至100%之間。

19.如申請專利範圍第15項所述之用途，其中前述烴基磺內酯化物係選自烷基磺內酯或烯基磺內酯。

20.如申請專利範圍第19項所述之用途，其中前述烴基磺內酯化物具有以下化學式(I)所示之結構：




(I)，

其中，

$R_1$係選自$-(CH_2)_x-$或-CH=CH-，X係為2，3或4；及

$R_2$係選自H或$C_1$至$C_3$烷基。

21.如申請專利範圍第20項所述之用途，其中前述烴基磺內酯化物係為1,3-丙烷磺內酯、1,3-丙烯磺內酯、1,4-丁烷磺內酯、2,4-丁烷磺內酯或其混合物。

## 七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（　　）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明:

無

## 八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無