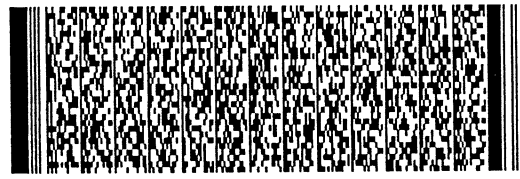


申請日期：	案號：
類別：G1C1N 37/48, G17K14/575, A61K39/22, C12C1/68.1/68	

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、發明名稱	中 文	用於治療冠狀循環系統老化過程之化合物的鑑別方法
	英 文	Method for identifying compounds for treating aging processes in the coronary circulatory system
二、發明人	姓 名 (中文)	1. 柯斯坦 2. 布希安 3. 雷居茲
	姓 名 (英文)	1. Evi Kostenis 2. Andreas Busch 3. Vera Regitz-Zagrosek
	國 籍	1. 德國 2. 德國 3. 德國
	住、居所	1. 德國法蘭克福城迪區街35號(Deutshherrnufer 35, 60594 Frankfurt am Main, Germany) 2. 德國凱黑城瓦德街83號(Waldplateau 83, 65779 Kelkheim, Germany) 3. 德國柏林城緬凱街6號(Meinekestr. 6, 10719 Berlin, Germany)
三、申請人	姓 名 (名稱) (中文)	1. 德國阿凡提斯藥品德意志有限公司
	姓 名 (名稱) (英文)	1. Aventis Pharma Deutschland GmbH
	國 籍	1. 德國
	住、居所 (事務所)	1. 德國法蘭克福城伯洛格街50號 (Bruningstraße 50, D-65926 Frankfurt am Main, Germany)
	代表人 姓 名 (中文)	1. 吉瑪斯 2. 費漢根
	代表人 姓 名 (英文)	1. Markus Jacobi 2. Hans-Jurgen Fischer



本案已向

國(地區)申請專利

申請日期

案號

主張優先權

德國 DE

2001/06/29 10131458.2

有

有關微生物已寄存於

寄存日期

寄存號碼

無



五、發明說明 (1)

本發明係關於修飾尿緊縮素 II 受體活性且藉此於冠狀循環系統老化過程中發揮影響之化合物的鑑別方法。

尿緊縮素 II (UII) 係一作用於血管上之胜肽，其產生的
5 血管擴張或血管收縮作用係取決於血管類型和有關種類，在
許多方面，其活性係與血管緊縮素 II (AII) 相當。尿緊縮素
II 及其受體 GPR14 係表現於人類冠狀循環系統中，例如內皮
細胞、冠狀動脈平滑肌細胞、心肌或冠狀動脈粥瘤內，因此
10 二者因子被認為在心血管組織中細胞階層和之後的病理生理
過程中具有重要的角色。尿緊縮素 II 已知為 GPR14 之天然配
位體，GPR14 係 GPCR (G 蛋白質偶合受體) 族群之一員。

於施行於麻醉猴子實驗中使用尿緊縮素 II 可導致血液動力學參數中戲劇性的改變，週邊抗性的增加以及心臟收縮力
15 的減弱和心臟輸出降低會導致冠狀循環系統衰退，相同情況
亦會發生於人類。

G 蛋白質偶合受體 (GPCRs) 在許多非常不同的生理過程中扮演主要的角色，假定在人類基因組中大約有 1000 個基
20 因編碼該受體家族，僅依處方得到之大約 40-50% 目前可得藥物係作為 GPCRs 的激動劑或拮抗劑，該等強調此種受體在產業上之重要角色完成了醫藥研究。由於該等蛋白質家族的大小和重要性以及鑒於許多 GPCRs 之生理配位體仍未知 (孤兒 GPCRs) 的事實，因此必須假定將來在尋找新穎藥物時，該

五、發明說明（2）

種受體將成為合適目標蛋白質最重要的蓄積之一。

GPCRs 組成位於細胞表面上之完全膜蛋白質家族，其係利用鳥糞嘌呤核苷酸連結蛋白質家族（稱為 G 蛋白質）由細胞外訊息物質（例如荷爾蒙、神經傳導物、胜肽和脂質）接受訊息，並傳遞該等訊息至細胞內部，如此其依據受體特異性、被活化的 G 蛋白質和細胞類型而活化許多的訊息傳遞途徑。所有的 GPCRs 多胜肽鏈皆摺疊為 7 條 α 螺旋而跨過磷脂雙層細胞膜，此 7 條膜的轉換產生了細胞外和細胞內圈環而能在細胞外連結配位體，且在細胞內耦合 G 蛋白質。因此，GPCRs 亦可稱為 7 條貫穿膜受體。

所有的 G 蛋白質耦合受體皆依據一般基本型態作用：細胞外配位體的連結導致受體蛋白質構造改變，藉此使後者與 G 蛋白質接觸，細胞內的 G 蛋白質媒介訊息傳遞串連最終會導致細胞產生生物反應。

G 蛋白質係異三聚物蛋白質，其由 α 、 β 和 γ 副單位組成，且由於脂質錨而位於細胞膜內側，活化的 GPCRs 與 G 蛋白質之耦合會引起 $G\alpha$ 副單位上 GDP/GTP 交換，以及異三聚物分離為 α 副單位和 $\beta\gamma$ 副單位，活化的 α 副單位和 $\beta\gamma$ 複合物二者皆可影響細胞內作用蛋白質。 $G_{\alpha s}$ 類型 G 蛋白質活化位於膜上的腺苷酸環化酶(AC)會導致例如 cAMP 細胞內含量的增加，而 $G_{\alpha i}$ 類型 G 蛋白質的活化會導致該含量的降低。 G_q 類型 G

五、發明說明 (3)

蛋白質可活化磷脂酶 C (PLC)，而催化肌醇 1,4,5-三磷酸酯 (IP3) 和二醯基甘油 (DAG) 的形成，該等分子交替地導致 Ca^{2+} 由細胞內貯存釋放或蛋白質激酶 C (PKC) 活化進一步作用於二者環境中。除了上述的 G 蛋白質類型 (Gai/s, Gq) 外
5 仍有其他類型存在，該等類型命名為 G16、G12/13 等。該等 G 蛋白質的多樣性反映了 GPCRs 具有之多數非常不同的作用。

小鼠的尿緊縮素 II 受體係揭示於 WO 00/75168 中，
10 GPR14 激動劑和拮抗劑之辨識方法同樣地揭示於例如 WO 99/40192 中。關於篩選方法之先前技藝至今仍未考慮可特定使用尿緊縮素 II 受體以尋找該等基因或基因產物參與細胞外基質合成、結構或分解之化合物的事實，因此，不可能由醫藥觀點足夠有效地搜尋可抵抗伴隨結締組織增加疾病之物
15 質。

因此，本發明係關於一種修飾尿緊縮素 II 受體活性之化合物的鑑別方法，如此修飾使涉及細胞外基質之結構、形成或分解之基因或基因產物之活性或含量被影響，其係藉由：

- 20 a) 使尿緊縮素 II 受體形成於其中之細胞為可取得的，
b) 使化學化合物係可取得的，
c) 使來自 a) 的細胞與來自 b) 的化學化合物接觸，
d) 以該等涉及細胞外基質之結構、形成或分解之基因或基因產物來判定來自 c) 之細胞基因或其基因產物的活性或含

五、發明說明(4)

量，

e) 比較來自 d) 之活性或含量和不與來自 b) 之化合物接觸的相對對照細胞相同基因或基因產物之活性或含量。

5 可取得以及尿緊縮素 II 受體形成於其中之細胞係以哺乳類細胞較佳，例如小鼠、大鼠、天竺鼠或朝鮮鼠，可取得的人類細胞係特佳。在一特佳具體實施例中，該細胞係心臟細胞。

10 方法中可取得的化學化合物係具有介於 100 和 50000 千道耳吞之間的分子量較佳，而介於 100 和 5000 千道耳吞之間特佳。

 方法中可取得之該等特性化學化合物係以天然產物、蛋白質、聚核苷酸、包含醣類的化合物或包含脂肪的化合物較佳，此外，該等化合物係尿緊縮素 II 較佳。

15

 根據發明方法欲確定其活性或含量之基因或相對基因產物係 Coll (膠原類型 1)、MMP2 (金屬蛋白酶類型 2)、TGFβ (變性生長因子β) 或 CTGF (結締組織生長因子) 基因或基因產物較佳。

20

 根據發明方法之基因或基因產物活性或含量係利用定量 PCR、利用酵素轉換或使用抗體來確定較佳。

五、發明說明（5）

本發明亦關於包含以先前描述根據發明之方法辨識化合物之藥物，該等藥物另包含藥物配方所需物質，該等藥物係用於治療冠狀循環系統疾病。

5

在一較佳具體實施例中，該等藥物化合物係具有 100 至 50000 千道耳吞之分子量，該等化合物之分子量係介於 100 和 5000 千道耳吞之間範圍特佳。

10 該等化合物係天然產物、蛋白質、聚核苷酸、包含醣類的化合物或包含脂肪的化合物較佳，該等化合物係尿緊縮素 II 更佳。

本發明另關於化合物之用途，其可以先前描述根據發明
15 之方法辨識，用以製造用於治療冠狀循環系統疾病之藥物，關於此點，冠狀循環系統疾病係例如心肌梗塞、心臟衰竭、老年心臟功能減退、冠狀血管疾病、血管病理改變（像是粥狀動脈硬化）或狹心症，特定包括與細胞外基質形成相關而該形成可能係病理改變之該等冠狀循環系統疾病，該等疾病
20 可進行而在老年人類特定扮演角色。在使用該等化合物之一較佳具體實施例中，化合物係具有介於 100 和 50000 千道耳吞之間的分子量，且在一特佳具體實施例中，具有介於 100 和 5000 千道耳吞之間的分子量。

五、發明說明(6)

修飾尿緊縮素 II 受體活性係指可誘發、增加、干擾或降低該受體媒介之訊息傳遞，尿緊縮素 II 受體活性可特定為尿緊縮素 II 激動劑或拮抗劑所修飾，然而，尿緊縮素 II 受體之修飾亦可使用稱為異位調控劑者來作用。尿緊縮素 II 之激動劑係一化合物，其可支持、維持或增加天然產生於特定細胞內之尿緊縮素 II 作用，但拮抗劑可減弱或消除此作用。尿緊縮素 II 受體之異位調控劑可為一化合物，其本身僅具有與受體之低度親和力，但可控制或抑制激動劑或拮抗劑作用。當特定細胞內有關之基因或基因產物活性或含量相較於對照組增加或減少時，基因或基因產物之活性或含量係受到影響的，之後對照組係由不受到導致影響該活性或含量之測量之相當細胞組成，關於此點，測量係特定認知將化合物與細胞接觸。上述觀念中之細胞可表示脊椎動物器官或組織之一或多個細胞，該等細胞可來自腦部、肺臟、肌肉、脂肪組織、結締組織或心臟或來自其他器官，該等細胞可以分離狀態存在或仍以組織型存在，特定而言，該等細胞亦包括來自細胞培養之細胞。脊椎動物之實例係大鼠、小鼠、朝鮮鼠、天竺鼠或和人類。

20 尿緊縮素 II 係一多胜肽，其在人類係由 11 個胺基酸組成，尿緊縮素 II 可做為非常有效的血管收縮荷爾蒙，在靈長類，其會引起系統性血管收縮、心肌收縮障礙以及總循環衰退。尿緊縮素 II 之作用係藉由 GPC 受體 GPR14 為媒介。GPR14 之序列已經揭示，例如國際申請案 WO 00/75168 中揭示小鼠

五、發明說明 (7)

GPR14 的序列，人類的重組尿緊縮素 II 受體係例如可由”Euroscreen”購得。

細胞外基質 (ECM) 在維持組織結構一致性中扮演主要的角色，ECM 環繞著組織結構或個別細胞，ECM 係由膠原、
5 非膠原性醣蛋白和蛋白多醣組成，其組合物在不同組織中具有差異，ECM 形成高度特異性、複雜且動態的網路。除了支撐功能外，其特別參與訊息傳遞、細胞分化、附著、再生和轉移。此外，ECM 在組織纖維化中扮演重要的角色，其應了解的是以結締組織增加浸潤之意義，其發生於例如連結心肌
10 梗塞後伴隨心臟損傷之瘢痕，或連結以有機溶劑或過度且持續的酒精中毒麻醉肝臟後之肺臟中纖維改變或肝臟中纖維改變。器官亦特別為老化過程行進、暫時事件結果或過度壓力結果之該等纖維化所影響。特定而言，細胞外基質形成作用之缺陷在纖維化中扮演重要的角色，纖維化係與傷口癒合過
15 程導致的過度密集瘢痕有關，器官像是心臟、腎臟、肝臟、肺臟、眼睛或皮膚皆可能受到影響。纖維化之特性為增加膠原之形成，以及作用器官功能之喪失。

膠原 (例如第一型膠原或第四型膠原)、海帶胺酸及其他
20 蛋白質係參與 ECM 的合成，視為屬於金屬蛋白酶群、絲胺酸蛋白酶群或半胱胺酸蛋白酶群之蛋白酶在 ECM 的分解中佔有一席之地。

金屬蛋白酶具有獨特的功能區。訊息序列、初功能區、

五、發明說明(8)

催化功能區和 C 端類凝血酵素功能區在許多不同的家族成員中係保守的。MMP2 和 MMP9 包含額外的類纖維黏連蛋白功能區，MMP2 亦已知為膠酶 A，膠原 I、II、IV、V、VII、X、XI 和 XIV、彈力蛋白、纖維黏連蛋白、明膠和海帶胺酸係
5 MMP2 受質。TGFβ 訊息途徑和 CTGF 之活化係活化細胞外基質蛋白質（像是第一型膠原）基因之重要過程，因此，CTGF 亦稱為纖維性細胞激素。

細胞之提供包含其製備、培養和之後的處理，提供係為
10 例如由器官或組織來製備合適的細胞物質或繁殖合適的細胞株或微生物所影響，不同的適當營養培養基皆可用於培養，細胞係保持於對有機體極佳之溫度，其中使用之特定生長培養基係加入適當的防腐劑、抗生素、酸鹼指示劑、血清成分、血清、輔助物質或其他物質。製備、培養和之後處理的方法
15 係描述於標準做法中（實例：基礎細胞培養；Ed. J. M. Davis；IRL Press；1994）。

合適的細胞係哺乳類細胞較佳，該等細胞可包含原始細胞或細胞株，該等細胞之實例係來自哺乳類器官（例如腦部、
20 肌肉、脂肪組織、結締組織、心臟、肺臟、肝臟、腎臟、血管、荷爾蒙腺體等）之原始細胞，細胞可為神經細胞、肌肉細胞、脂肪細胞、纖維母細胞、白血球、肺臟細胞、肝臟細胞、腎臟細胞或其他類型的細胞。合適的細胞株係 CHO、HEK 293、COS、小鼠 3T3 或 hela 細胞或其他類型的細胞較佳。可

五、發明說明 (9)

能使用酵母菌細胞較佳。

特定而言，化學化合物係可由化學合成或由生物物質分離化學物質而取得。生物物質包含活的或非活的細胞，或該
5 等細胞之成份。

為了化學性合成化合物或由生物細胞分離物質，熟習者可賴於常規方法，該等方法係熟習者可於參考書像是”有機合成工作書”(1995; John Wiley & Sons; ISBN 3-527-30187-9)、“
10 藥物合成之有機化學”(1998; John Wiley & Sons; ISBN 0-471-24510-0)或”天然來源的生物活性化合物”(2001; Taylor & Francis; ISBN 0-7484-0890-8)中獲得的。由合成或分離得到的化合物可加至溶於適當溶劑之溶液中，適當的溶劑包含水、緩衝物質(例如 Tris、Hepes、Mops 等)、單價和/或二價
15 離子(例如 K^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等)、酸類(例如鹽酸、硫酸、甲酸、乙酸等)、苛性鹼(例如氫氧化鈉等)、醇類(例如甲醇、乙醇和甘油)、清潔劑(例如十二烷基硫酸鈉等)、有機溶劑(例如甲醯胺、丙酮、二甲亞砜等)，以及其他成分，特別係用於溶解或穩定化。用於發明方法之化學化合物應係
20 穩定以用作 GPCR 配位體。

該特性之化合物可特定由脊椎動物之組織或器官(像是內皮細胞組織、心臟組織、腦部組織、血液、血清或血漿)中得到。

五、發明說明 (10)

熟習者可使用來自實驗室之常規方法將化學化合物與該細胞株接觸，接觸係作用於例如錐形瓶、測試管或微量管中或於微量盤上。為了接觸，可能使用定溫培養箱，其中可能設定例如 30°C 或 37°C 的恆溫，以及固定的 CO₂ 條件或大氣溼度條件，接觸亦可特定作用於裝備（其係為此目的指定於實驗室機器人中）內。接觸可能發生於不同的期間，持續由數秒，經過數分鐘，高至數小時。各例子中欲選擇之條件取決於受體、細胞株及化學化合物。

10 基因或其基因產物之活性或含量可參考關於其啟動子之基因活性、產生之 RNA 和 mRNA 含量，以及酵素活性或基因編碼之蛋白質含量。不同的方法（像是 PCR 或雜交技術）皆可用於確定細胞內 mRNA 含量。特定而言，熟習者可得之 PCR 技術係真實時間（real time）PCR 系統，其係為不同的供
15 應者商業性出售，該等供應者之實例係 Applied Biosystems、Bio-Rad、Cepheid、Cortett Research、Roche Molecular Biochemicals 和 Stratagene。真實時間 PCR 系統屬於熟習者的商業工具。用於確定 RNA 含量之合適的雜交技術實例為點墨雜交法和北方雜交法，二者技術皆利用來自二分離的單股形成雙股核酸分子，其係藉由鹼基配對完成，其中一股係固定
20 於支撐表面上，而另一可動股係具有放射性或其他特性之標記，其可為相對輕易地偵測，熟習者係熟悉雜交技術，特定而言，其可於標準手冊像是“分子生物學現行方法”（Fred M. Ausubel、Roger Brent、Robert E. Kingston、David D. Moore、

五、發明說明 (11)

J. G. Seidman、John A. Smith、Keven Struhl 編輯，John Wiley & Sons, Inc.，紐約，2001) 中找到。

蛋白質之活性或含量可利用其酵素活性或使用特定抗體
5 來決定。在酵素活性的例子中，可決定特定酵素關於其受質
之轉換，其包括建立確保酵素關於酸鹼值、輔因子、離子環
境、溫度和受質濃度最佳活性條件之試驗，並使測量可在正
比於轉換 (turnover) 之範圍內進行。受質之轉換可利用例如
10 將放射性標記前驅物嵌入聚分子內或片段化放射性標記聚分
子為分解產物，之後分離分解產物且確定個別放射性含量來
決定。當抗體用於決定蛋白質含量時，熟習者係使用像是南
方雜交法、RIA (放射免疫法)、ELISA (酵素連結免疫吸附
法) 等之技術。熟習者亦可於先前提及的”分子生物學現行方
法”中找到執行該等偵測方法之詳細的實際指示。在藥劑中，
15 化合物係與相容的賦形劑以醫藥組合物型式存在較佳，當
然，就賦形劑必須良好相容的方面來說，其係與組合物中其
他成分相容且對病患健康無害。賦形劑可以係固體或液體或
二者，且與化合物以單一劑型 (例如錠劑) 製成配方較佳，
其可包含 0.05% 至 95% 重量的活性化合物。

20

根據發明之醫藥組合物可利用任何已知的醫藥方法製
造，其必須包含將成分與醫藥相容性載劑物質和/或輔助物質
混合。根據發明之醫藥組合物係適用於口服、直腸、局部、
經口 (例如舌下) 和非經腸胃 (例如皮下、肌肉內、皮內或

五、發明說明 (12)

靜脈內) 投藥者。

為了達到預期生物功效所需之化合物含量取決於許多因素，像是選擇的特定化合物、預期用途、投藥類型以及病患

5 的臨床狀況，以下提及之含量資料係關於配位體。

一般而言，每日劑量範圍係每日每公斤體重 0.3 毫克至 100 毫克 (典型上係 3 毫克至 50 毫克)，例如 3-10 毫克/公斤 /日。例如，靜脈內劑量範圍可由每公斤 0.3 毫克至 1.0 毫克，
10 該劑量可適當地以每公斤每分鐘 10 奈克至 100 奈克注射投藥，為此目的之合適的注射溶液可包含例如每毫升 0.1 奈克至 10 毫克 (典型上係 1 奈克至 10 毫克)。單一劑型可包含例如 1 毫克至 10 公克的活性化合物，因此，用於注射之安瓶可包含例如 1 毫克至 100 毫克，而口服投藥之單一劑型配方像是
15 錠劑或膠囊可包含例如 1.0 至 1000 毫克 (典型上係 10 至 600 毫克)。

縮寫

AII	血管緊縮素 II
Col I	膠原酵素 I
Con	對照
MMP2	基質金屬蛋白酶 II
UII	尿緊縮素 II

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (13)

實例

1. 由人類心臟分離並培養纖維母細胞

纖維母細胞係如"細胞和組織研究"286, 145-153 (1996) 所述由人類心臟中分離出，96-98% 的最終細胞培養係由纖維母細胞所組成。為了實行此步驟，將心臟組織切成小塊，並於 37°C 下培養在包含 2 毫克/毫升膠原酵素和 2 毫克/毫升 dispase 之 KHB (Krebs Henseleit 緩衝液) 中 20 分鐘 3 次，合併均質液且之後離心。將沉降物溶解於 10 毫升 KHB 中，細胞於各例子中以 2 至 3 毫升的部分加至無覆蓋的塑膠容器中，以包含 4.5 毫克/公升葡萄糖和 10% FCS (胎牛血清) 之 DMEM (Dulbecco' s 改良 Eagle's 培養基) 將體積加至 10 毫升。37°C 培養 1 小時後，以 PBS (磷酸鹽緩衝食鹽水) 清洗細胞二次，且之後培養於 37°C 5% CO₂ 中大約 4-8 週直至達到 90% 全滿，在 4 週期間，各例子中之後伴隨另二次的繼代培養。用於本實驗之細胞係於第二次繼代培養後且於 70% 至 90% 全滿時使用 (大約分離後 3 個月)。

2. 以血管緊縮素 II 和尿緊縮素 II 由人類心臟刺激纖維母細胞

用於細胞培養技術之試劑係得自 Gibco BRL Life Technologies，在各例子中加入最終濃度高達 0.1 微莫耳濃度之血管緊縮素 II 或尿緊縮素 II 前，首先將所有的細胞保持於 37°C 包含 4000 毫克/公升葡萄糖、2 毫莫耳濃度 L-穀胺醯胺、盤尼西靈/鏈黴素 100 微克/0.1 毫克/毫升和 0.1% BSA (牛血清白蛋白) 之無血清的 DMEM 中。6 小時後，由細胞中製備 RNA。

五、發明說明 (14)

3. 利用真實時間 PCR 來定量特定的 RNA

RNA 係使用氯胍以標準方法來分離。

使用反轉錄酶 (10 單位/奈克 RNA) 由各樣品中將 500 奈克 RNA 轉錄為 DNA。為了分解 DNA，將總體積包含大約 5 8-10 微克的 RNA 與 DNase I 共同培養，使用 Roche Molecular Biochemicals 供應的 LightCycler 和 Fast Start SYBR Green RT-PCR 套組來定量 RNA，來自其他公司 (像是 Applied Biosystems、Bio-Rad 或 Stratagene) 之類似套組亦適用於相同目的。類似於序列辨識號碼 1 和 2 之引子係用作 Col I 之引子，而類似於序列辨識號碼 3 和 4 之引子係用作 MMP2 之引子，類似於序列辨識號碼 5 和 6 之引子係用作 GAPDH 之引子作為對照，類似於序列辨識號碼 7 和 8 之引子係用作 TGFβ 之引子，且類似於序列辨識號碼 9 和 10 之引子係用作 CTGF 之引子。首先，反應皆保持固定於 95°C 10 分鐘，之後伴隨 40 個循環，各循環包含 95°C 10 秒、60°C 5 秒和 72°C 12 秒之培養。融解曲線係用於確定反應之特異性，使用 GAPDH mRNA 作為對照來等量化。

4. 誘導參與心臟纖維母細胞中基底膜合成的基因

20 由三個人類心臟中分離纖維母細胞，並用於第一次的繼代培養，將細胞培養至大約 80% 全滿，無血清再保持 24 小時，且在各例子之二重複試驗中以 1 微莫耳濃度尿緊縮素 II、1 微莫耳濃度血管緊縮素 II 或緩衝液物質作為對照刺激 6 小時。使用 LightCycler™ 以真實時間 PCR 定量 mRNA (膠原 1、

五、發明說明 (15)

基質金屬蛋白酶 2、TGFβ1 和 CTGF)，使用 GAPDH (甘油
醛-3-磷酸鹽去氫酶) mRNA 作為標準參考物。真實時間 PCR
(真實時間聚合酶連鎖反應) 可能用於定量確定特定核酸，
該技術係以使用螢光染劑合併反轉錄 RNA 聚合酶連鎖反應
5 為基礎，目前已有不同的試驗套組供應，例如系統可由
Applied Biosystems、Bio-Rad、Cepheid、Carbett Research、
Roche Molecular Biochemicals 或 Stratagene 購得。

以尿緊縮素 II 刺激會導致膠原 1、MMP2、TGFβ1 和 CTGF
10 的 mRNA 顯著增加：

	Col 1	MMP 2	TGFβ1	CTGF
Con	0.56+/-0.1	0.43+/-0.2	0.60+/-0.09	0.45+/-0.27
UII	0.92+/-0.3*	0.65+/-0.3*	0.81+/-0.1*	0.88+/-0.2*
AII	0.56+/-0.27	0.22+/-0.1	0.71+/-0.07	0.34+/-0.9

*相對於對照組，p<0.05

該等 RNA 的產生證實了尿緊縮素 II 及其受體對血管和心
臟中基質合成與組織改造具有極大的重要性，因此關於心臟
更新，相對的激動劑和拮抗劑係具有極大之醫藥價值，特別
15 係在心臟病發作後之疾病區域為了防止、避免或回復心臟組
織的 siccatrization，或降低心臟衰竭或心臟官能不全發展之目
的，而且特別係與高血壓或阻塞性肺部疾病相關者。血管緊
縮素 II 係腎酵素-血管緊縮素系統之主要作用分子，該胜肽荷

五、發明說明 (16)

爾蒙可導致許多不同的生理作用，因此，血管緊縮素 II 係參與改變週邊抗性，其可行使對腎臟功能之作用，且特別調控鈉的再吸收，此外，其可作為生長因子。

5 5. 使用尿緊縮素以誘發人類心臟纖維母細胞中的膠原合成

將人類心臟纖維母細胞由 7 個擴張性心肌病變導致之心臟官能不全末期經移植之 (explanted) 人類心臟中分離出，亦由健康捐贈者心臟中產生 4 個細胞製備物。如先前所述，將纖維母細胞分離於無菌 10 公分 Petri 盤中並培養，培養大約 12 週後，細胞達到第二次繼代培養係大約 80% 全滿，此時撤回血清 48 小時，且之後以 UII、Ang II、TNF α 、TGF β 、UII+TNF α (各 10^{-7} 莫耳/公升) 或緩衝液 (對照) 刺激細胞不同時間 (6 和 24 小時之間)，以二重複或三重複完成確定。刺激後，清洗細胞，以 1 毫升 PBS 由 Petri 盤中移除細胞，且離心於 Eppendorf 管中 (100 轉，5 分鐘，4°C)。丟棄上清液，加入 100 微升溶解緩衝液 (Nonidet P40 0.5%，SDS 0.5%) 至約 50 微升細胞中，並將混合物再培養於冰上 20 分鐘。再一次離心溶解液 (20 分鐘，1400 轉，4°C)，並將上清液用於之後的實驗中。利用 BCA (二辛可酸) 試驗確定蛋白質，將均質液稀釋至蛋白質濃度為 2 微克/微升。將來自所有心臟纖維母細胞中的前膠原第一型 C-胜肽利用可購得的固相 ELISA 試驗 (TaKaRa Biomedicals, Shuzo Co, Ltd.) 於 96 孔微量盤中確定，根據製造商指示執行試驗。完成時並無發現與人類纖維黏連蛋白、透明質蛋白、海帶胺酸、第一型膠原或第三型

五、發明說明 (17)

膠原有交互反應。前膠原第一型 C-胜肽之數值係利用 10-640 奈克/毫升之標準曲線確定，標準物係由製造商提供。將對照 (緩衝液) 所得之刺激吸收值設定於 100%，刺激細胞之吸收值係相對於相同心臟所得之對照值，在各例子中，來自二重複或三重複確定之平均值係用於計算，雙邊未配對的 t 試驗係用於統計學評估在對照細胞和心臟官能不全細胞中刺激反應之比較。

在來自罹患心臟衰竭心臟之 explanted 心臟纖維母細胞中，前膠原 I 蛋白質係於 UII (對照的 173 $\pm$ 42%)、Ang II (205 $\pm$ 67%) 和 TGF β (202 $\pm$ 52%) 刺激後增加，且 TNF α 係增加較低量 (139 $\pm$ 26%) (表 1)。當增加係時間決定時，6 小時後已可觀察到，相反地，膠原蛋白質含量在以相同胜肽刺激之捐贈者心臟纖維母細胞中並無改變：UII (對照的 98%)、Ang II (88%)、TGF β (97%) 和 TNF α (86%)。在以 UII 和 TNF α 刺激後，對照心臟細胞和罹患心臟官能不全心臟細胞間之差異係統計學上有意義的，當使用 AngII 和 TGF β 時，亦可觀察到相同的傾向。

20 表 1

心臟官能不全 (EFH) 末期中來自心臟之纖維母細胞中膠原的合成

五、發明說明 (18)

心臟 (編號)	時間 (小時)	Contr. (吸收，對照組%)	AngII	TGFβ	UII	TNFα	UII+TNF
1	24h	100	142	166	198	166	
4	24h	100	471	377	458	262	
10	5h	100	94	142	102	67	
11	5h	100	113	123	243	91	
12	12h	100	-	-	117	107	128
13	12h	100	-	-	165	126	139
14	12h	100	-	-	226	190	218
MV		100	205	202	173	139	162
SEM			67	52	42	26	18

對照心臟中膠原合成 (contr.)

心臟 (編號)	時間 (小時)	Contr. (吸收，對照組%)	AngII	TGFβ	UII	TNFα
3	6h	100	84	84	103	81
3	12h	100	92	123	80	92
5	6h	100	88	71	106	77
6	6h	100	-	110	104	92
MV		100	88	97	98	86
SEM			2	12	6	4

p (EFH 相對於對照組) 0.3 0.16 0.05 0.02

5 (編號): 心臟的的內部編碼號

四、中文發明摘要（發明之名稱：

用於治療冠狀循環系統老化過程之化合物的鑑別方法

本發明係關於以涉及影響細胞外基質之結構、形成或分解之基因或基因產物鑑別修飾尿緊縮素 II 受體活性之化合物的方法。

5

10

英文發明摘要（發明之名稱：

Method for identifying compounds for treating aging processes

15 in the coronary circulatory system

The invention relates to a method for identifying a compound which modifies the activity of the urotensin II receptor, with genes or gene products which are involved in the structure, formation or breakdown of the extracellular matrix being
20 influenced.

六、申請專利範圍

專利申請案第 91114101 號
ROC Patent Appln. No.91114101
修正後無劃線之申請專利範圍中文本替換頁 - 附件(一)
Amended Claims in Chinese - Encl. (I)

5

(民國 94 年 6 月 17 日送呈)
(Submitted on June 17, 2005)

1. 一種修飾尿緊縮素 II 受體活性之化合物的鑑別方法，
如此修飾使涉及細胞外基質之結構、形成或分解之基因
10 或基因產物之活性或含量被影響，其中
 - a) 使尿緊縮素 II 受體形成於其中之細胞為可取得的，
 - b) 使化學化合物為可取得的，
 - c) 使來自 a) 的細胞與來自 b) 的化學化合物接觸，
 - 15 d) 之後，以該等涉及細胞外基質之結構、形成或分解之基因產物來判定來自 c) 之細胞基因或其基因產物的活性或含量，其中該基因產物係選自 Col 1、MMP 2、TGFβ1 和 CTGF 之群，
 - e) 比較來自 d) 之活性或含量和不與來自 b) 之化合物
20 接觸的相對對照細胞相同基因或基因產物之活性或含量。
2. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中可取得的細胞係哺乳類細胞。
3. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之方法，其中可取得的細胞係人類細胞。
25
4. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之方法，其中可取得的細胞係心臟細胞或纖維母細胞。
5. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之方法，其中可取得之化

六、申請專利範圍

- 合物具有介於 100 和 50000 千道耳吞之間的分子量。
6. 如申請專利範圍第 5 項之方法，其中分子量係介於 100 和 5000 千道耳吞之間。
7. 如申請專利範圍第 5 項之方法，其中化合物係天然產物、蛋白質、聚核苷酸、包含醣類的化合物或包含脂肪的化合物。
8. 如申請專利範圍第 7 項之方法，其中化合物係尿緊縮素 II。
9. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之方法，其中根據 d)或 e) 之判定係利用定量 PCR 來完成。
10. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之方法，其中根據 d)或 e) 之判定係利用酵素轉換來完成。
11. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之方法，其中根據 d)或 e) 之判定係利用抗體來完成。
12. 一種用於治療冠狀循環疾病之醫藥組成物，其包含以如申請專利範圍第 1 至 11 中任一項之方法辨識之化合物，以及藥物配方所需之其他物質。
13. 如申請專利範圍第 12 項之醫藥組成物，其中化合物的分子量係介於 100 和 50000 千道耳吞之間。
14. 如申請專利範圍第 13 項之醫藥組成物，其中分子量係介於 100 和 5000 千道耳吞之間。
15. 如申請專利範圍第 12 至 14 項中任一項之醫藥組成物，其中化合物係天然產物、蛋白質、聚核苷酸、包含醣類的化合物或包含脂肪的化合物。

六、申請專利範圍

16. 如申請專利範圍第 15 項之醫藥組成物，其中化合物係尿緊縮素 II。
17. 一種以如申請專利範圍第 1 至 11 項中任一項之方法辨識之化合物於製造用以治療冠狀循環疾病之藥物之用途。
- 5 18. 如申請專利範圍第 17 項之用途，其中化合物的分子量係介於 100 和 50000 千道耳吞之間。
19. 如申請專利範圍第 17 項或第 18 項之用途，其中化合物的分子量係介於 100 和 5000 千道耳吞之間。
- 10 20. 如申請專利範圍第 17 項之用途，其中化合物係天然產物、蛋白質、聚核苷酸、包含醣類的化合物或包含脂肪的化合物。
21. 如申請專利範圍第 18 項之用途，其中化合物係尿緊縮素 II。