

發明專利說明書 200423951

(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：92131904

※申請日期：92.11.13

※IPC 分類：A61K35/60

壹、發明名稱：(中文/英文)

從軟骨與軟骨細胞中製備出抗血管新生藥物的方法及其應用方法

METHOD OF PREPARING ANTI-ANGIOGENIC DRUG FROM CARTILAGE AND CHONDROCYTES AND METHODS OF USE

貳、申請人：(共 3 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

1. 汪明中/WONG, MING-CHUNG
2. 汪建平/WONG, KIN-PING
3. 汪顧兆今/WONG, ANNA S.K.

代表人：(中文/英文)

住居所或營業所地址：(中文/英文)

1. 美國加州聖地牙哥·卡利瑪迪巴倫納斯 4224 號
4224 Calle Mar De Ballenas, San Diego, CA 92130, USA
2. 美國加州佛雷斯諾·東庫斯街 1757 號
1757 E. Quincy Avenue, Fresno, CA 93720, USA
3. 香港九龍又一村花園街 7A 號 1 樓
7A Fa Po Street, 1/F, Yau Yat Chuen, Kowloon, Hong Kong

國籍：(中文/英文)

- 1.-3. 美國/USA

參、發明人：(共 3 人)

姓名：(中文/英文)

1. 汪明中/WONG, MING-CHUNG
2. 汪建平/WONG, KIN-PING
3. 汪顧兆今/WONG, ANNA S.K.

住居所地址：(中文/英文)

1. 美國加州聖地牙哥·卡利瑪迪巴倫納斯 4224 號
4224 Calle Mar De Ballenas, San Diego, CA 92130, USA
2. 美國加州佛雷斯諾·東庫斯街 1757 號
1757 E. Quincy Avenue, Fresno, CA 93720, USA
3. 香港九龍又一村花園街 7A 號 1 樓
7A Fa Po Street, 1/F, Yau Yat Chuen, Kowloon, Hong Kong

國籍：(中文/英文)

- 1.-3. 美國/USA

肆、聲明事項：

☐ 本案係符合專利法第二十條第一項 ☐ 第一款但書或 ☐ 第二款但書規定之期間，其日期為： 年 月 日。

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利 ☒ 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 美 國；2002,11,13；60/426,258

2.

3.

4.

5.

☐ 主張國內優先權（專利法第二十五條之一）：

【格式請依：申請日；申請案號數 順序註記】

1.

2.

☐ 主張專利法第二十六條微生物：

☐ 國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

玖、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

相關申請的對照檢索

5 本次申請符合美國法典第35卷119條(e)款有關美國國內臨時申請之規定，編號為No. 60/246,258，申請提出日期為2003年11月13日，申請內容通過對照檢索以並入本次公開披露之詳細資料。

發明領域

10 本發明涉及的內容為從鯊魚的軟骨組織和軟骨細胞中培養抗血管新生藥物的手段。

【先前技術】

發明背景

血管新生是形成新血管的基本過程。它是生殖、發育和創傷癒合等許多生理現象的重要步驟。在正常情況下，
15 血管生成都很有規律。然而，長期缺乏規律的血管新生也會導致許多疾病，包括癌症、固體腫瘤、風濕性關節炎、骨關節炎、牛皮癬、糖尿病視網膜病變、老年黃斑病變、血管再狹窄、卡波西氏肉瘤、白血病、腫瘤轉移、良性腫瘤、遺傳性出血性毛細血管擴張症、心肌血管新生、斑塊
20 新血管化、毛細血管擴張、血友病關節病症、血管纖維瘤、創傷肉芽、青光眼、角膜移植之排斥、動脈硬化、硬皮病、瘢痕瘤、炎症及胎兒受孕等。

例如，腫瘤的生長和轉移完全依賴于血管新生。大多數原發性固體腫瘤都要經過一段相當長的無血管時期，在

此期間腫瘤的生長明顯處於休眠狀態，最大也只能達到直徑1-2毫米左右。腫瘤生長到這樣大小之後，腫瘤細胞就可以通過簡單的被動擴散吸收必要的氧和其他營養物質。這些只能在顯微鏡下觀察到的腫瘤塊最後會“啓動”血管生成，它們利用四周成熟的宿主血管，催生出新的血管和毛細血管，而這些血管會朝著腫瘤塊的方向生長，並最終滲透進去。這使得腫瘤塊和血液轉移不斷擴散，將病痛的危險無情地散播到身體其他部位。在風濕性關節炎中，新生成的毛細血管侵入關節，破壞軟骨組織。而在糖尿病視網膜病變中，視網膜中形成新的毛細血管，侵入玻璃體和血液，並且最終導致失明(弗克曼1995年《自然醫學》1【1】期27-31頁；弗克曼與克萊格斯布魯恩1987年《科學雜誌》235期442-447頁；D·A·沃爾什1998年《風濕病學》38【2】期103-112頁；希爾利等1998年《人類生殖新知》4【5】期736-740頁)。

血管新生抑制劑和腫瘤治療

腫瘤生長可以通過阻止腫瘤血管新生加以限制或預防，特別是直接對準剛剛生成而且沒有完全成熟的血管內皮細胞。該方法可以預防腫瘤塊出現新的擴散，並使其持續萎縮至直徑約1-2毫米大小，這也是腫瘤塊在無血管供血的條件下存活的狀態。這樣的治療手段可以稱為“誘導休眠”，目的是以緩慢的方式控制疾病。

已經發表的相關文獻都曾詳細描述過鯊魚軟骨在醫學領域裏所具有的衆多功效，其中就包括其在血管生成方面

的特性。鯊魚軟骨提取物一直作為營養補充劑被開發及銷售。但對鯊魚軟骨可以有效治療晚期癌症的觀點仍然存在批評意見(請參閱米勒等1998年《臨床腫瘤學期刊》16期3649-3655頁)。

5 來自佛羅里達州薩拉索塔市莫特海洋實驗中心的卡爾·A·魯爾發現，有三種蛋白質可以從鯊魚軟骨中恢復，相信能夠起到阻礙腫瘤擴散甚至使其逐漸萎縮的作用，從而避免放射治療對人體的有害副作用(《洛杉磯時報》1990年8月27日B3版)。

10 杜邦(美國專利號6,028,118)和巴拉薩(美國專利號4,822,607)都詳細描述了各自發現的一種具有抗血管新生和消炎特性的鯊魚軟骨提取物以及提取方法和治療中的使用。但這兩項專利都未曾專門介紹其抗血管新生成分的構成和分子特性。杜邦和巴拉薩都直接從鯊魚軟骨這種有限
15 而不可再生的資源中直接進行提取。他們所獲得的固態或液態提取物都只能算是活性物質的“大雜燴”，而非已經分離出來的特效化合物。

而根據梁女士的研究報告，她所分離出的鯊魚軟骨提取物與魯爾、格魯伯、杜邦及巴拉薩等人提取的蛋白質不
20 同，相信應該是一種蛋白多糖(請參閱詹妮·梁1997年《從鯊魚軟骨中提取血管新生抑制劑的分離、分餾及評定》【學生論文】加州大學弗雷斯諾分校)。該提取物已通過內皮細胞化驗進行過血管新生特性方面的試驗。梁是從鯊魚軟骨中直接進行提取，具體過程是使用鋼制沖孔工具取出鯊魚

軟骨椎體的中心部分，然後將沖取的圓形部分冷凍乾燥，用攪拌機研磨成粉，最好用水進行提取(請參閱梁1997年同上文第9頁和34頁)。

然而，鯊魚是一種有限資源，很難大量獲取。因此非常有必要對鯊魚軟骨細胞進行人工培養，使其能夠重復培育並大量獲取。

格羅根和朗德曾經在這方面略有突破，他們從鯊魚和魷魚身上成功地培養出免疫細胞(格羅根和朗德1990年《維持並保證鯊魚和魷魚免疫細胞分裂繁殖的培育系統》，發表於《魚類生物學期刊》第36期633-642頁)。此外，哈特曼等也曾試圖培養多種鯊魚組織，但不包括軟骨(J·哈特曼等1992年《軟骨魚細胞初步培養的常規設置》，發表於《體外細胞發育生物學》28A期第77-79頁)。這些嘗試都沒有能夠成功，從生物體組織中獲取的細胞雖然開始顯示出一定的成長，但卻無法進入成熟期，而最終也都無法存活(請參閱C·奧哈拉1995年《從人工培養的鯊魚軟骨細胞中獲取的血管新生抑制劑》第12頁【學生論文】加州大學弗雷斯諾分校)。

奧哈拉和王曾經詳細報告過他們在人工培養的成年鯊魚軟骨細胞和培養基中分離出一種血管新生抑制劑的過程(請參閱C·奧哈拉1995年同上文及奧哈拉和王1996年《人工培養的鯊魚軟骨細胞分泌出的一種血管新生抑制劑》，加州州立大學弗雷斯諾分校)。但研究顯示，人工培養的細胞生長速度非常緩慢，因為軟骨細胞無法自行附在培養組織

的內壁上(請參閱體外研究小組1996年《體外生物學會期刊》32期第37頁《有關奧哈拉和王相關論著的報告》和奧哈拉1995年同上文)。為提高軟骨細胞的附著能力，他們使用了一種人造母體。這種方法雖然促進了細胞生長，但卻
5 無法達到可供實際使用的密度(請參閱奧哈拉1995年同上文、奧哈拉和王1996年同上文、以及體外研究小組1996年同上文)。根據這些研究，“鯊魚軟骨細胞培養可以產生某些具有抑制作用的因數，但迄今為止，完成鯊魚軟骨細胞體外培養的成功案例尚未出現”(請參閱奧哈拉和王1996
10 年以及體外研究小組同上文)。

此外，成年鯊魚的軟骨過於脆硬，容易碎裂。因此必須在培養之前先將其分解，以便釋放出軟骨細胞。在離解過程中，需要將軟骨浸泡于含有膠原酶的溶液裏直至出現分解，然後通過離心過濾將軟骨細胞從溶液中分離出來(請
15 參閱奧哈拉1995年及奧哈拉和王1996年同上文)。這種方法的風險在於可能破壞軟骨細胞的完整性並增加外界污染的幾率。

奧哈拉在其1995年論文中提出使用鯊魚胚胎作為軟骨細胞來源的建議，因為這樣做細胞分化變異的程度會有所
20 降低。但奧哈拉本人並未提供任何實踐操作的方法，也沒有涉及到更改初始材料可能導致的任何結果。

【發明內容】

發明概要

本發明的內容包括一種具有抗血管新生及消炎功效的

新型提取物及其提取方法。該提取物是從人工培養的軟骨細胞和軟骨細胞培養基中分離出來的，而前者來自鯊魚等軟骨魚綱動物的軟骨。此外，提取過程中還使用了一種新開發的專用細胞生長液。該提取物包含由蛋白多糖和糖蛋白組成的生物活性劑，分子量為1到10KD，其中碳水化合物約占95.5%，而蛋白質約占4.5%，活性物質則包含在碳水化合物當中。

在提取過程中，首先從軟骨魚綱動物或其胚胎上取出軟骨組織，對軟骨進行研磨使其釋放出軟骨細胞，人工培養軟骨細胞，最後將抗血管新生提取物從人工培養的軟骨細胞和/或培養基中分離出來。有一點不能忽略，用來培養軟骨細胞的專用生長液含有鯊魚的血清。

本發明還包括一種抑制內皮細胞生長的方法，即向細胞發出一定量的提取物，達到生長抑制的要求。本發明還包括一種抑制組織內部血管增生的方法，即向組織發出一定量的提取物，達到抗血管增生的要求。治療癌症和關節炎等多種疾病的方法在此也一併提及。

本發明介紹的軟骨細胞培養方法不需要使用能夠促進胚胎軟骨細胞的附著和生長的人造母體。軟骨細胞具有一定的附著能力，並且能夠在一周內出現匯合並形成塊體。這是一個令人意外的結果，因為來自鯊魚等成年軟骨魚綱動物的軟骨細胞如果不借助於人造母體就無法附著，而且使用人造母體後生長時間會加倍延長至60天，此後生長速度將有所減慢並需要新的瓊脂糖(請參閱奧哈拉1995年同

上文第49頁)。

此外，我們還開發出一種含有軟骨魚血清的專用細胞生長液。該血清從血液中濾出，含有軟骨細胞達到最佳生長效果所需的天然營養成分和荷爾蒙，其中包括一種副甲狀腺荷爾蒙相關蛋白質(PTHrp)，在軟骨細胞的分裂繁殖和分化變異過程中具有重要作用(請參閱來自加拿大圭爾夫市圭爾夫大學的J·格爾斯雷施特和J·A·穆西克在1998年7月17日美國軟骨魚學會大會上的摘要和陳述以及J·格爾斯雷施特和J·A·穆西克1999年發表於《實驗動物學期刊》第284期549-556頁的文章)。

使用胚胎軟骨魚的軟骨組織代替成年軟骨魚作為軟骨細胞的來源具有更多的優點。首先，成年軟骨魚的軟骨組織需要膠原酶幫助分解(請參閱奧哈拉1995年同上文第21頁)，而胚胎軟骨細胞則不需要借助於任何酶。這將明顯降低軟骨細胞的完整性遭到破壞或培養過程受到污染的風險。

圖式簡單說明

第1圖顯示從胚胎鯊魚軟骨中準備抗血管新生提取物的方法。

第2圖顯示準備鯊魚血清的方法。

第3A及3B圖顯示從軟骨細胞及軟骨細胞培養基中分離出血管新生抑制劑的方法。

【實施方式】

較佳實施例之詳細說明

在本次公佈的內容中，引用的各種文獻、專利及已發表的專利說明都以引文的方式表示，讀者可以一目了然。在本次公佈的內容中引用這些文獻、專利及已發表的專利說明目的是爲了更加完整地表述本項發明涉及的最高水
5 準。

本項發明在實踐操作中(除非另有特別說明)使用分子生物學(包括細胞重組技術)、微生物學、細胞生物學、生物化學和免疫學的傳統技術，均未超出目前科技發展的最高水準。這些技術將在文獻資料中予以詳細而完整的解釋。

10 相關定義

在本文中已對相關術語定義如下。

在專利說明及專利要求內容中，除非文中另行說明，否則所有單數形式均包含複數含義。例如，“某個細胞”雖然爲單數形式，但同樣包含該細胞的複數含義以及單數和
15 複數混合使用的含義。

在本文中，“含有”意指成分和方法既包括詳細列舉的各個要素，也並沒有將其他元素排除在外。當“基本上由……組成”用於成分和方法的定義時，它的含義中不應將其他與該化合物具有重要關係的元素排除在外。因此，一
20 種基本上由本文詳述的元素組成的成分不應將分離和提純方法中的微量污染物以及磷酸緩衝液、防腐劑及其他從藥物學理論上可以接受的載體排除在外。“由……組成”的含義中排除在外的內容不僅限於其他成分的微量污染物和本項發明中進行化合過程中的實際操作步驟。這些術語變化

所代表的具體內容都在本項發明的範疇之內。

包括酸鹼度、溫度、時間、濃度和分子量在內的所有數值及域值均為近似值，誤差為 ± 0.1 。儘管不是每次都明確提示，但所有數值前均帶有“大約”的字句，而且本文提到的試劑僅具有典型特徵，其等價物均為該研究領域內所熟知。

“分離”是指從組成物、細胞及其他與化合物天然結合的成分中單獨獲取。

“培養基”可用作單數或複數形式，它是指由各種不同物質組成的用於培養細胞生長的化合物。

“個體”或“宿主”為脊椎動物，最好是哺乳動物或人類。哺乳動物包括(但不僅限於)鼠類、猿猴類、人類、畜類、競技類動物及寵物。

“癌症”和“腫瘤”可用作單數或複數形式，它是指發生惡性病變並對宿主機體造成病患的細胞。原代癌細胞(即惡性病變部位附近獲得的細胞)可以通過組織檢查等先進的檢測手段與非癌細胞區別開來。本文中涉及的癌細胞定義不僅包括原代癌細胞，而且指源自癌細胞的任何細胞，包括轉移癌細胞、體外培養、以及源自癌細胞的細胞株。談到某種類型的癌症，通常是表示固體腫瘤，而“臨床可以發現”的腫瘤是指那些在腫瘤塊基礎上可以通過CAT掃描、磁共振成像(MRI)、X光、超聲波或觸診等診療手段發現的腫瘤。而單純依靠生化或免疫學手段發現的結果尚不足以符合本定義的要求。

在本文中，“抑制”是指推遲、延緩或阻止內皮細胞的生長、繁殖或細胞分裂或血管在組織內的形成。監測抑制功效的方法包括(但不僅限於)內皮細胞繁殖化驗、通過測定血液含量及測量血管床體積、以及定量測定血管結構的密度。當培養物質為細胞混合體時，監測新血管化的過程需要通過定量測量能夠體現內皮細胞特定指標的細胞加以完成，這些指標包括血管新生因數、蛋白水解酶、以及內皮細胞的特定細胞粘附分子等。

“合成”是指活性劑與另外一種惰性(如可發現的製劑或示蹤劑)或活性(如佐劑)化合物或成分的結合。

“藥物成分”包括活性劑與惰性或活性載體的結合物，並使該成分適用於體外或體內的診斷或治療。

在本文中，“藥物學可接受載體”的含義包含磷酸緩衝溶液、水、乳劑(如油/水乳劑或水/油乳劑)及各種濕潤劑等任何標準的藥物學載體。該成分還應包括穩定劑和防腐劑。有關載體、穩定劑和防腐劑的實例請參閱馬丁·雷明頓1975年《藥物學標準》第15版(麥克米倫出版公司，伊斯頓市)。

“有效量”是指能夠對有利或預期效果產生影響的充足數量。例如，治療數量指能夠獲得預期療效的數量。該數量可能與具有預防功效的數量相同或相異，後者是指能夠防止疾病發作或疾病症狀的必要數量。有效量可以通過一次或多次施用或服用得以完成。

本文涉及的“軟骨魚”或“魚”是指任何軟骨魚綱動物，

常見的有鯊魚、魷魚和鰻魚等。

本文用於鯊魚或其他軟骨魚的“成年”字句是指已自然分娩或為卵生物種時已產出幼體(即非妊娠階段)的鯊魚或其他軟骨魚。

5 英文“chondrocyte”指軟骨細胞。

“軟骨”指軟骨魚的整個內骨骼。

“抗血管新生”包括消炎特性。

本發明的內容涉及一種抗血管新生及消炎提取物以及獲得這種提取物的方法。該提取物可以從軟骨魚的軟骨組織經人工培養取得的軟骨細胞及軟骨細胞培養基中獲得。
10 本發明還涉及一種專用細胞生長液，用於培養那些能夠產出新提取物的細胞。該提取物包含由蛋白多糖和糖蛋白組成的生物活性劑，分子量為1到10KD，其中碳水化合物約占95.5%，而蛋白質約占4.5%，活性物質則包含在碳水化合物當中。
15 生物活性糖蛋白分子量也可為10KD左右。

本發明還涉及一種獲得提取物的方法。該提取物可以從鯊魚胚胎的軟骨組織釋放出的軟骨細胞或在培養基中人工培養的軟骨細胞中獲取。生物活性成分從軟骨細胞分泌到培養基中，然後可以從培養基或人工培養的軟骨細胞裏
20 分離出來。有一點不能忽略，用來培養軟骨細胞的專用生長液含有從軟骨魚血液中提煉出來的血清。

僅通過實例可知，分離出所需提取物的過程包括對培養基進行離心過濾以保留上層清液，然後使用篩檢程式對上層清液進行無菌化處理，最後將上層清液分餾，從而分

離出分子量1到10KD左右的提取物。

在提取過程中，首先從軟骨魚綱動物或其胚胎上取出軟骨組織，對軟骨進行研磨使其釋放出軟骨細胞，人工培養軟骨細胞，最後將抗血管新生提取物從人工培養的軟骨細胞和/或培養基中分離出來。有一點不能忽略，用來培養軟骨細胞的專用生長液含有鯊魚的血清。

另外一種方案是從軟骨魚胚胎的軟骨組織中分離出所需提取物，首先從軟骨魚胚胎上取出軟骨組織，對軟骨進行研磨使其釋放出軟骨細胞，將釋放出的軟骨細胞加水製成糊狀，把粘稠的軟骨細胞糊混入培養基中，並將混合物放置于組織培養板上。

需再次強調的是，該方案需要把粘稠的軟骨細胞糊混入培養基中並將軟骨細胞/培養基混合物放置于組織培養板上進行培養。

培養過程中需將軟骨細胞/培養基混合物放置于富含二氧化碳的環境中，以便增強軟骨細胞的附著力，而且在必要時需將軟骨細胞/培養基混合物從培育環境中取出，更換新鮮的培養基，以便利於軟骨細胞的生長。

還應當注意，培養過程中需將軟骨細胞/培養基混合物放置於二氧化碳含量達到5%左右而且溫度為37°C的環境中，並需將混合物在此環境下放置24到48小時左右。

在實際操作中，培養基中含有從軟骨魚血液中提煉出來的血清。

在另一方面，提取過程中還包括從培養板上釋放出軟

骨細胞/培養基混合物並重複培養軟骨細胞。

還有一方面，提取過程中還可以從培養板上釋放出軟骨細胞/培養基混合物並對混合物進行離心過濾以便將培養基從軟骨細胞中分離出來。

- 5 一方面，提取過程中還需對軟骨細胞進行速凍保存。速凍保存包括以下主要步驟：將軟骨細胞與冷凍培養基混合並在-80°C至-90°C的低溫下冷凍1天左右，然後將軟骨細胞與冷凍培養基的混合物放置在液氮中長期保存。與軟骨細胞混合的冷凍培養基可以含有從軟骨魚血液中提煉出來的血清。
- 10

- 本項發明還涉及到一種軟骨魚的軟骨細胞培養基，這種培養基含有從軟骨魚血液中提煉出來的血清，從軟骨魚的胚胎制取而成。應當注意，血清與軟骨細胞應當來自同一種軟骨魚，例如本次實驗中的血清與軟骨細胞就同樣來自鯊魚胚胎。
- 15

血清的準備過程包括首先過濾軟骨魚血液以便分離出淋巴液並濾走微粒，然後對淋巴液進行離心過濾並保留上層清液，將上層清液加熱以便降低酶的活性。培養基中可以加入有效數量的三甲胺N-氧化物和谷氨酸鹽。

- 20 本項發明的內容還包括一種通過向細胞施用具有生長抑制功效的一定數量的提取物來抑制內皮細胞生長的方法。發明還包括一種通過向組織施用具有抗血管增生功效的一定數量的提取物來抑制組織內血管增生的方法。活性成分可以通過口服、靜脈注射、腹腔注射、或透皮傳送施

用於個體。提取物可以經過加工以液體或粉末形式施用。

應當說明的是，個體為寵物、家畜或人類病人組群中挑選出來的動物。

本項發明還包括一種針對個體體內因血管增生引起的
5 機能紊亂的治療方法，該方法是向個體施用具有某種療效
的一定數量的提取物。這類身體機能紊亂包括(但不僅限於)
癌症、關節炎、因血管增生引起的皮膚病、糖尿病視網膜
病變、卡波西氏肉瘤、老年黃斑病變、血管再狹窄、毛細
血管擴張、青光眼、癥痕瘤、角膜移植之排斥、創傷肉芽、
10 血管纖維瘤、遺傳性出血性毛細血管擴張症、心肌血管新
生、以及硬皮病中的任意一種。但與此同時，抑制血管新
生會阻礙或抑制哺乳動物處於妊娠期的胎兒發育。

風濕性關節炎的發展與軟骨組織內的血管增生有直接
關係，正是後者直接導致了病情惡化。沃爾什在1998年發
15 表於《風濕病學》38(2)期第103-112頁的文章中指出，病理
性血管新生是導致風濕性關節炎發展的主要原因。我們可
以這樣設想，向患病部位定量施用有效數量的血管增生抑
制劑能夠緩解關節炎症狀，並且可能改善風濕性關節炎的
病情。

20 有的意見認為，糖尿病視網膜病變和老年黃斑病變都
可以通過血管增生抑制劑獲得有效的治療。眾所周知，糖
尿病視網膜病變是由視網膜內的血管惡性增生引起的，會
導致永久性失明。而老年黃斑病變也與惡性血管新生有
關，並同樣引起永久性視力喪失。根據預測，使用血管增

生抑制劑能夠防止血管新生的發作和持續，是治療這兩種病症的有效手段。

在感染牛皮癬的病人身上，牛皮癬的症狀與不斷擴大的血管新生也存在必然聯繫。我們可以這樣設想，增加血管新生抑制劑的有效數量將抵消這種血管反常增生的不良影響，從而防止牛皮癬症狀的出現。

本項發明還涉及一種篩選抑制血管增生的治療製劑的方法，包括用適當的細胞或組織樣本接觸該製劑(樣本A)，然後用另外的細胞或組織樣本接觸具有療效的一定數量的提取物(樣本B)，將樣本A的增生情況與樣本B進行比較，樣本A中抑制增生程度與樣本B相同或相似的任何製劑都是抑制血管增生或內皮細胞生長的治療製劑。接觸方式可以為體外或體內兩種。

本項發明還涉及一整套針對宿主體內因病理性血管增生引起的機能紊亂的治療方法，該方法是按照使用說明向宿主施用具有某種療效的一定數量的提取物。

材料與方法

獲取方法

第1圖為顯示從鯊魚胚胎軟骨組織中獲取抗血管新生提取物的方法的示意圖。相關步驟包括：1)從鯊魚胚胎上取出軟骨組織，2)對軟骨進行研磨使其釋放出軟骨細胞，3)人工培養軟骨細胞，最好使用含有鯊魚血清的專用細胞生長液，4)將抗血管新生提取物從人工培養的軟骨細胞和/或培養基中分離出來。

鯊魚屬於軟骨魚科動物，或稱為軟骨魚，因為其內骨骼完全由軟骨組成。儘管本次實驗以鯊魚作為軟骨細胞的主要來源，但我們相信包括鯊魚、魷魚和鰻魚在內的任何軟骨魚都可以使用。屬於軟骨魚科的白斑角鯊、陰影絨毛
5 鯊和淺海長尾鯊都特別適宜獲取胚胎軟骨細胞，因為它們數量眾多，便於捕捉。

一旦它們胚胎的內骨骼發育完成，就可以作為軟骨細胞的重要來源。使用這些胚胎軟骨細胞的最佳時期需根據物種不同而確定。白斑角鯊懷孕4至12個月期間為使用其胚
10 胎的最佳時間，因為從第四個月起胚胎的內骨骼就已經發育完成。這種鯊魚的胚胎數量各不相同，每頭鯊魚可懷孕1到10個胚胎。作為卵生魚種，陰影絨毛鯊胚胎的發育期根據水溫不同大約為7.5到10個月左右。

對於白斑角鯊這樣的胎生鯊魚來說，胚胎將從懷孕的
15 鯊魚體內直接取出，最好是在消毒條件下使用保護罩進行操作。不幸的是，目前這種獲取胚胎的方式常常導致母體的死亡，這主要是出於同情憐憫的目的。如果是陰影絨毛鯊這樣的卵生物種，打開受精卵就可以獲得胚胎，不需要犧牲母體的生命。

20 一旦獲得鯊魚胚胎，應將其內骨骼完整取出，並將骨骼周圍的肉、皮膚和其他器官清理乾淨。內骨骼經過簡單清理之後應放入消毒罩，以便進一步清潔和整理。

方案1

清理過的胚胎內骨骼應保存在含有羥乙基呱嗪-N-2乙

烷磺酸/氫氧化鈉、葡萄糖、氯化鈉、氯化鉀、磷酸氫二鈉、
 尿素和三甲胺N-氧化物的溶液中。更適宜儲存的溶液(以下
 簡稱“溶液B”)應大致由11.92克pH值為7.6的羥乙基呱嗪
 -N-2乙烷磺酸/氫氧化鈉、7.1克葡萄糖、15.84克氯化鈉、0.22
 5 克氯化鉀、0.81克磷酸氫二鈉、20克尿素和6克三甲胺N-氧
 化物組成。這樣的溶液可用來防止脫水，因為鯊魚長期生
 活在高鹽度環境下，因此其血液中含鹽濃度非常高。相信
 三甲胺N-氧化物可以使鯊魚的酶在如此高鹽度環境下繼續
 發揮作用(格羅根和朗德1990年同上文)。

10 胚胎內骨骼從保存溶液中取出後應在無菌的溶液B中
 漂洗乾淨。然後用刀將浸濕的內骨骼切成細微的小方塊，
 並將其研磨成顆粒細微的糊狀，可以使用消過毒的研鉢和
 杵槌。這樣可以釋放出胚胎內骨骼的軟骨細胞。

使軟骨細胞懸浮在5毫升改良過的最佳最低必須培養
 15 基(Opti-Mem)20E中，培養基中最好能夠含有來自鯊魚血清
 (下文詳述)的專用細胞生長液。使用吸量管可將軟骨細胞混
 入培養基。改良過的Opti-Mem 20E培養基成分更加適宜，
 每500毫升培養基大約應當含有：20毫升10X Opti-Mem培養
 基(可向美國Gibco BRL公司購買)；1.99克尿素；14.02克氯
 20 化鈉；2毫升青黴素和鏈黴素，均為每毫升500單位；2毫升
 濃度為7.5%的磷酸氫二鈉(這樣pH值可達到7.2)；含有1.4
 克三甲胺N-氧化物(氧化三甲胺)、2毫升200 mM谷氨酸鹽
 和5到20毫升經加熱降低活性處理的鯊魚血清組成的專用
 細胞生長液；以及將溶液稀釋至500毫升的二次蒸餾水。除

鯊魚血清之外，其他所有成分均可以向Gibco BRL和Sigma這樣的公司購買，並最好進行無菌過濾，然後存放在達到組織培養等級的無菌玻璃器皿中。

專用細胞生長液中經加熱降低活性處理的鯊魚血清可以為軟骨細胞提供2到3天的營養。氧化三甲胺可用來類比高鹽度水下生長環境中的正常生長條件(請參閱格羅根和朗德1990年同上文)，而且谷氨酸鹽也是細胞生長液中通常使用的一種必不可少的氨基酸，它能夠促進胚胎軟骨細胞的生長發育。鯊魚血清由鯊魚血液濾出的淋巴液(濾液)組成。圖2為顯示獲取鯊魚血清方法的示意圖。用來過濾鯊魚血液的微孔篩檢程式孔徑為100毫微米左右。過濾的目的是清除所有細菌和真菌微粒以及衣原體，減少血色素和內毒素數量，因為這些物質都將對細胞生長液造成影響。也可以使用孔徑達到50毫微米的更小的篩檢程式，以便進一步濾出血液中的所有病毒微粒。濾液在過濾之後需要經過離心過濾才能獲得由血清組成的上層清液。然後將上層清液加熱以便降低酶的活性，從而獲得加熱降低活性處理的鯊魚血清。所需熱量根據不同類型的鯊魚而隨之變化。依照最佳程式，使用淺海長尾鯊進行實驗時應將上層清液在68℃的溫度下加熱30分鐘左右。

相信使用鯊魚血清與奧哈拉使用的傳統胎牛血清(請參閱奧哈拉1995年同上文第101頁)相比更能夠促進細胞生長，因為前者含有最適宜鯊魚軟骨細胞生長的天然營養成分和激素。鯊魚血清還含有一種甲狀旁腺激素相關蛋白

(PTHrp)，這種激素在軟骨細胞的繁殖和分化變異過程中具有主要作用(請參閱J·格爾斯雷施特和J·A·穆西克在1998年7月17日美國軟骨魚學會大會上的摘要和陳述以及J·格爾斯雷施特和J·A·穆西克1999年同上文)。使用胚胎
5 鯊魚血清的效果優於成年鯊魚血清，因為前者與胚胎軟骨細胞的天然生長環境更為相似，而且能夠提供更加適合軟骨細胞生長的營養成分。

改良後的培養基和粘稠狀軟骨細胞糊應放置在康寧組織培養24-培養盤上的各培養槽內，在二氧化碳濃度為5%和
10 37°C溫度下培育24至48小時，直到軟骨細胞產生附著力。如有必要，應使用真空抽取的方式將用過的培養基換成新培養基(根據生長狀況通常每2到3天更換一次)。添加培養基的數量要根據培養器皿的大小而定(組織培養盤上每個培養槽大約0.5毫升，而組織培養瓶內則添加3至5毫升)。細胞
15 生長過程中應定期查看其匯合程度(即培養盤表面完全被細胞覆蓋時可通過掃描顯微鏡進行觀察)。培養過程中的第一步是將軟骨細胞與培養基混合，在此之後大約1周時間內即達到匯合程度。出現匯合現象(一個培養盤中每毫升增加到 10^8 個細胞)時，加入胰島素解除細胞與盤底的附著。這些
20 細胞便可以重複培養、分裂、儲存或重新使用、分析或進一步提取並分離出血管新生抑制劑。

經過培養和胰蛋白酶化之後，軟骨細胞可以通過離心分離(最好在4°C溫度下以每分鐘1000轉的速度旋轉5分鐘)加以濃縮，分離出的固體物質可以重新懸浮在水中。重新

懸浮在水裏的這部分物質之後可以凍幹，以便除去更多的水分，從而將軟骨細胞冷凍乾燥，以後可以根據需要重新與水化合。以下將討論另外一種使用、分析或進一步提取並分離出抗血管新生成分的程式。

- 5 爲了在胰蛋白酶化之後進行重複培養，細胞最好能夠在二氧化碳濃度爲5%和37°C溫度下培育5分鐘，然後分裂到不同的組織培養盤上。這時需要再次增加新的培養基以便促進細胞生長。如有必要，該程式可重複進行。

從理論上說，一份胚胎鯊魚軟骨的樣本可以培養出無
10 限量的軟骨細胞，但這取決於該樣本上分離並生長出的細胞是否具有強壯的生命力。有些細胞株的生命力要強于其他同伴。

如果能夠發育出比較成功的細胞株，這份樣本應在-80°C的低溫下速凍保存，以便將來再次使用，而其餘的細胞
15 可以繼續生長和使用。將細胞速凍也能夠保證在任何突發情況下照常提供胚胎軟骨細胞。

爲了對某些細胞進行速凍保存，應當在細胞達到匯合階段時通過胰蛋白酶化將其從培養基中取出，並且需要進行離心過濾，然後與冷凍培養基混合。混合物經冷凍後可
20 以在-80至-90°C的低溫下長期保存。該冷凍培養基約含10%的二甲基亞砷(DMSO)和90%的鯊魚血清。相信鯊魚血清在重新培養冷凍細胞方面相當有益。整個冷凍過程需在冰點溫度以下(~0°C)進行以保持細胞生命力。

爲防止污染，避免因操作不當導致人工培養的軟骨細

胞活動出現任何退化，最好儘快將半成品放置在4℃的溫度下進行保存。此外，整個過程都應儘量實現無菌化操作以避免污染。

血管新生抑制劑的分離

- 5 分離出的軟骨細胞和培養基裏都存在血管新生抑制劑，因為軟骨細胞也會分泌血管新生抑制劑到培養基裏。經過過濾和分離，抑制劑只會以1-10 kd的分餾物形式存在，分子量約為10 kd左右。抑制劑的成分包括含95.5%碳水化合物和4.5%蛋白質的蛋白多糖或糖蛋白、含有局部碳水化合物
- 10 的硫酸角質蛋白、以及縮氨酸單位。此外，碳水化合物與縮氨酸之間很可能形成N-糖苷結合。相信抑制劑的能效與其濃度有很大關係，而且對過高或過低的pH值非常敏感。

- 第3A圖顯示了通過胰蛋白酶化和離心過濾(參見第1圖)
- 15 將軟骨細胞從培養基中分離出之後從中提煉抑制劑的方法。首先，分離出的軟骨細胞應進行細胞溶解以便釋放出有效成分。完成這一步驟需要將細胞懸浮在濃度為0.5%-1%的Triton X-100活化劑和磷酸緩衝液(PBS)(Sigma公司出品)中，然後將溶液放在冰上5到15分鐘，再次進行離心過濾(在
- 20 臺式離心分離機上以14,000轉的速率轉動2分鐘)以便清除液態提取物中的細胞殘骸。然後應對液態提取物進行分餾，可以使用微孔過濾膜分離出1到10kd的分餾物。

第3B圖顯示了通過胰蛋白酶化和離心過濾(參見第1圖)將人工培養的軟骨細胞從培養基中分離出之後再從剩餘的

培養基中提煉抑制劑的方法。首先，需要再次對培養基進行離心過濾(在4°C溫度下以10,000轉的速率轉動30分鐘左右)以便甩出凝結劑。然後使用0.2微米的篩檢程式對培養基進行過濾消毒，並使用微孔過濾膜對其分餾，分離出1到5 10kd的分餾物。

通過凝膠過濾層析技術可以進一步從1到10kd的分餾物中分離出分子量為10 kd的成分。首選的方法是將一個直徑為1.5釐米的玻璃管柱裝滿高度為30釐米的Sephacryl S-300 HR丙烯葡聚糖凝膠(Sigma公司出品)，並使用PBS或10 二次蒸餾水等緩衝液對其進行平衡。1毫克1至10kd的樣本可以在2毫升同樣的緩衝液中溶解，將此樣本加入玻璃管柱。每小時使用15毫升同樣的緩衝液即可實現洗提並獲得2毫升的分餾成分。使用凝膠過濾分子量參照標準(Sigma公司出品)對管柱進行校準。也可以使用鹽酸胍(GuHCl)(~6M)15 作為緩衝液。在這種情況下，獲得的分餾物可以在二次蒸餾水中進行透析(1,000 MW, Spectra 7)以便清除鹽分。

相信分子之間相互作用以形成多分子簇的聚合作用將會阻止通過上述分餾和凝膠過濾所進行的分離。用來分離出1至10kd分餾物的分餾操作將會導致該範圍內某些分子的丟失，因為這些分子會產生聚合從而超出此範圍。分離20 10kd成分也會導致聚合分子發生類似的丟失現象。在凝膠過濾中使用鹽酸胍將有助於溶解這些聚合物。也可以在最初1至10kd分子的分餾過程中使用鹽酸胍減少聚合現象。不過，相信鹽酸胍的作用過於強烈，會降低化合物的質量。

因此，蒸餾水和PBS應該是首選緩衝液。

培養胚胎鯊魚軟骨細胞與培養成年鯊魚軟骨細胞兩種方法之間的對比

目前已發表的文獻中基本上介紹的都是從成年鯊魚軟骨組織中培養軟骨細胞的方法。這種方法需要建立人工的生長環境以便在軟骨細胞開始生長之前培養其附著力和滲透力(請參閱奧哈拉1995年同上文、奧哈拉和王1996年同上文)。根據奧哈拉的研究，使用瓊脂糖培養細胞的附著力需要2到3周的時間，這也是一種最佳的人工生長環境。這些細胞的倍增時間約為60天，在此之後其生長速度會有所下降(請參閱奧哈拉1995年同上文第49頁)。一旦生長速度出現下降，含有這些細胞的瓊脂糖就必須倒入另外一個裝有新鮮瓊脂糖的培養盤中。此外，使用瓊脂糖會增加細胞釋放的難度(請參閱奧哈拉1995年同上文第53頁)。

另一方面，本項發明中培育的胚胎軟骨細胞不需要依靠人工的生長環境使其能夠附著在組織培養器皿的內壁上，而且其生長速度與成年鯊魚的軟骨細胞相比也顯著提高(大約1周左右)。相信是因為胚胎軟骨組織仍然處於生長和發育階段。所以它還含有許多健康生長和發育所必需的酶、生長激素和其他信號因數。而成年的軟骨組織已經發育完成，處於相對平衡甚至逐漸退化的階段，所以它所含有的這類因數從數量和種類上都無法同前者相比。此外，使用含有鯊魚血清的專用細胞生長液相信也可以進一步提高軟骨細胞的生長速度。

由於成年鯊魚的軟骨組織脆硬易碎，在處理過程中很可能破壞軟骨細胞的完整性。成年鯊魚的軟骨組織需要用刀切開之後使用攪拌機進行研磨，而不應使用研臼和杵槌。研磨後的軟骨組織須經溶解使其軟化至可以培養出個體細胞的程度。要達到這一目標，需要對軟骨組織施用含有膠原酶的溶液(請參閱奧哈拉1995年同上文第21頁)。根據軟骨的大小可將其在溶液中浸泡30分鐘到12小時不等，使其可以充分溶解。然後對溶液進行離心過濾，分離出細胞之後將溶液完全倒掉，將其餘的細胞微粒重新懸浮在改良後的Opti-Mem 20E培養基。

使用膠原酶等溶解製劑會產生幾個問題。首先，它有可能破壞軟骨細胞的完整性並增加污染的風險。如果軟骨組織在溶液中浸泡時間過長也會導致過度溶解。此外，增加額外的設備、化學品和操作步驟也會使成本上升。不僅如此，成年軟骨組織較硬，所以最初開始清洗的時候更加不便。

與此相反，胚胎軟骨組織不需要進行溶解，因為它本身就很柔軟，具有出眾的延展性。只要通過簡單的切割並使用研臼和杵槌進行研磨就足以釋放出軟骨細胞。

20 使用更先進的抑制劑治療身患腫瘤的老鼠

根據梁1997年同上文中介紹的方法從成年長角鯊的軟骨組織提取物中分離出的1到10分餾物曾經在老鼠身上做過實驗，這只老鼠在頸部長了一個顯眼的腫瘤，最初的直徑約為3釐米。研究人員對它進行了為期3個月的觀察，在

此期間這只老鼠喝的水裏每毫升含有1毫克提取物。

這種每毫升含有1毫克提取物的溶液最初在三個星期內服用4毫升之後，腫瘤開始萎縮。經過4個星期，老鼠的行為和活動出現了明顯好轉，腫瘤變黑並繼續萎縮。8個星期之後，腫瘤與最初的大小相比已經萎縮了超過一半(直徑約為1.5釐米)。而經過10周的時間，腫瘤已經萎縮到0.5釐米，而且老鼠的行為和活動出現了顯著改善。在研究結束的第13周，腫瘤依然在繼續萎縮，而老鼠則表現得非常活躍。

10 本此研究的結果總結如下：

使用鯊魚軟骨組織提取物進行治療的時間(周)	腫瘤大小(直徑)
0	~3
5	~1.5
10	~0.5

在老鼠身上進行的其他實驗也顯示，服用成年鯊魚軟骨細胞提取物可以使老鼠的壽命最少延長12%。

胚胎鯊魚提取的製劑可以用於之前那些製劑使用的範圍。不過新製劑在生產方面效率更高，而且更加實用，相信新製劑所具有的抑制特性絕不低於之前使用的其他製劑。

抑制劑可以通過不同形式使用，包括靜脈注射等溶液形式以及粉末形式。可以使用血管新生抑制劑進行治療的病症包括癌症、實體腫瘤、風濕性關節炎、骨關節炎、牛皮癬、糖尿病視網膜病變、老年黃斑病變、血管再狹窄、卡波西氏肉瘤、白血病、腫瘤轉移、良性腫瘤、遺傳性出血性毛細血管擴張症、心肌血管新生、斑塊新血管化、毛

細血管擴張、血友病關節病症、血管纖維瘤、創傷肉芽、青光眼、角膜移植排斥、動脈硬化、硬皮病和癍痕瘤等。此外，抗血管新生製劑還可用於消炎、抗溶膠原、體內抗腫瘤增生擴散、以及直接體外抗腫瘤增生擴散(請參閱杜邦美國專利號6,028,118)。由於血管新生是胎兒發育的重要因素，因此抗血管新生製劑也可能會用於節育(請參閱N·克勞伯等人1997年《抗血管新生抑制劑可抑制女性生殖過程中的一些重要因素》AGM-1470《國家醫學雜誌》第3(4)期443-446頁)。

10 儘管上述發明已經通過說明和實例進行了詳細的描述，但在這一領域內其他專業人士的眼裏，還需進一步的優化和改進。因此，本文所做的描述和例證不應被視為對本項發明涉及範圍的限制，這一點我們也在附加的申請專利中進行了必要的闡述。

15 **【圖式簡單說明】**

第1圖顯示從胚胎鯊魚軟骨中準備抗血管新生提取物的方法。

第2圖顯示準備鯊魚血清的方法。

第3A及3B圖顯示從軟骨細胞及軟骨細胞培養基中分離出血管新生抑制劑的方法。

【圖式之主要元件代表符號表】

(無)

伍、中文發明摘要：

這是一種從軟骨魚類動物胚胎的軟骨組織中提取的抗血管新生和抗炎症提取物，以及一種培養和提取該物質的方法。該提取物通過培養鯊魚或鯊魚胚胎的軟骨細胞獲得。此外，還有一種專用細胞生長液用於軟骨細胞的培養從而獲得該提取物，這種生長液含有軟骨魚類動物血液提取的血清。

陸、英文發明摘要：

A new anti-angiogenic and anti-inflammatory extract derived from the cartilage of embryonic cartilaginous fish, and a method for producing the extract has been developed. The extract is derived by culturing the chondrocytes from shark or shark embryo. Additionally, a specialized growth media containing serum from the blood of a cartilaginous fish has been developed for culturing the chondrocytes to produce the extract.

拾、申請專利範圍：

1. 一種用於在哺乳動物體內抑制血管新生或治療炎症的方法，其包含向該哺乳動物傳輸一有效量的從軟骨魚類胚胎之軟骨組織分離出的一生物活性提取物。
- 5 2. 如申請專利範圍第1項之方法，其中對於血管新生的抑制會阻止或抑制哺乳動物胎兒的發育。
3. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該軟骨魚類動物是鯊魚。
4. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該生物活性提取物
10 含有糖蛋白或蛋白多糖，分子量為約1到約10 kd。
5. 如申請專利範圍第4項之方法，其中該糖蛋白或蛋白多糖具有一為約10 kd之分子量。
6. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該生物活性提取物
15 是從鯊魚胚胎的軟骨組織所釋放的軟骨細胞中分離出來的。
7. 如申請專利範圍第6項之方法，其中該軟骨細胞係培養在培養基中。
8. 如申請專利範圍第7項之方法，其中該生物活性提取物是從該培養基中分離出來的。
- 20 9. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該生物活性提取物是藉由從該胚胎中取出軟骨組織並從上述軟骨組織釋放出軟骨細胞分離而成的。
10. 如申請專利範圍第9項之方法，其中還包含培養該軟骨細胞。

11. 如申請專利範圍第10項之方法，其中還包含從該軟骨細胞中分離出該生物活性提取物。
12. 如申請專利範圍第10項之方法，其中還包含從一培養基中分離出該生物活性提取物。
- 5 13. 如申請專利範圍第10項之方法，其中該培養步驟還包含使用含有從軟骨魚類動物血液中提取的血清的生長培養基。
14. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該生物活性提取物以液態形式施用。
- 10 15. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該生物活性提取物以粉末形式施用。
16. 一種生物活性化合物，其具有一為約1到10kd之表觀分子量，並能夠在哺乳動物體內抑制血管新生或治療炎症，該生物活性化合物可從一軟骨魚類胚胎的軟骨組織中分離而成。
- 15 17. 如申請專利範圍第16項的化合物，其可藉由以下步驟製備：
 - a)從一軟骨魚類的胚胎中取出軟骨組織；
 - b)對該軟骨組織進行研磨以便釋放出軟骨細胞，製成含有經釋出之軟骨細胞的糊狀形式；
 - 20 c)將該軟骨細胞糊混入一培養基，並將該混合物放入一組織培養盤，以便對該等軟骨細胞進行培養。
18. 如申請專利範圍第16項的化合物，其具有一為約10kd之分子量。

19. 如申請專利範圍第16項的化合物，其中該化合物為蛋白多糖或糖蛋白。
20. 如申請專利範圍第16項的化合物，其中該化合物為約4.5%的蛋白質。
- 5 21. 一種用以製備一生物活性提取物的方法，該生物活性提取物可供用於在哺乳動物體內治療血管新生或炎症，該方法包含以下步驟：
- a)從一軟骨魚類的胚胎中取出軟骨組織；
- b)對該軟骨組織進行研磨以便釋放出軟骨細胞，製
- 10 成含有經釋出之軟骨細胞的糊狀形式；
- c)將該軟骨細胞糊混入培養基，並將軟骨細胞/培養基混合物放入組織培養盤，以便對該等軟骨細胞進行培養。
- 15 22. 如申請專利範圍第21項之方法，其中該培養步驟還包含：
- a)在富含二氧化碳的環境中培育該軟骨細胞/培養基混合物，以加強軟骨細胞的附著力；
- b)將該軟骨細胞/培養基混合物從該培育環境中取出；
- 20 20 c)必要時需換掉用過的培養基並加入新鮮的培養基，以供軟骨細胞生長所需。
23. 如申請專利範圍第22項之方法，其中該培育步驟包含：
- a)將該軟骨細胞/培養基混合物放入二氧化碳濃度為5%而溫度為37°C的環境中；

- b)將該混合物在該環境中放置24到48小時。
24. 如申請專利範圍第21項之方法，其中該培養基包括源自於一軟骨魚類之血液的血清。
25. 如申請專利範圍第21項之方法，其中還包含：
- 5 a)從培養盤中釋放出該軟骨細胞/培養基混合物；
- b)重新培養該等軟骨細胞。
26. 如申請專利範圍第21項之方法，其中還包含：
- a)從培養盤中釋放出軟骨細胞/培養基混合物；以及
- b)對該混合物進行離心過濾以便使培養基與軟骨
- 10 細胞相分離。
27. 如申請專利範圍第26項之方法，其中還包含對軟骨細胞進行速凍保存。
28. 如申請專利範圍第27項之方法，其中該速凍保存包含：
- a)將軟骨細胞與冷凍培養基混合並在約-80°C至約
- 15 -90°C下保存約1天；以及
- b)將軟骨細胞與冷凍培養基的混合物貯入液態氮中進行長期保存。
29. 如申請專利範圍第27項之方法，其中該等軟骨細胞與含有源自於軟骨魚類血液的血清的冷凍培養基相混合。
- 20 30. 如申請專利範圍第26項之方法，其中還包含將分子量為約1到約10 kd的分餾物從軟骨細胞中分離出來。
31. 如申請專利範圍第30項之方法，其中該分餾物按以下步驟進行分離：
- a)溶解軟骨細胞以便釋放其內部成分；

b)對軟骨細胞進行分餾以便分離出1到10 kd的分餾物。

32. 如申請專利範圍第30項之方法，其中還包含將分子量為約10kd的成分通過凝膠過濾而從該分餾物中分離出來。

5 33. 如申請專利範圍第26項之方法，其中還包含將分子量為約1到約10kd的分餾物從培養基中分離出來。

34. 如申請專利範圍第33項之方法，其中該分餾物按以下步驟進行分離：

a)對培養基進行離心過濾並保留上層清液；

10 b)對上層清液進行過濾消毒；

c)對上層清液進行分餾以便分離出分子量為約1到約10kd的分餾物。

35. 如申請專利範圍第34項之方法，其中還包含將分子量為約10kd的成分通過凝膠過濾而從該分餾物中分離出來。

15 36. 一種用於培養軟骨魚類之軟骨細胞的培養基，該培養基包含源自於一軟骨魚類之血液的血清。

37. 如申請專利範圍第36項之培養基，其中該培養基所包含的血清來自軟骨魚類動物的胚胎。

38. 如申請專利範圍第36項之培養基，其中該培養基所包含的血清和軟骨細胞都來自同一種軟骨魚類動物。

20 39. 如申請專利範圍第36項之培養基，其中該培養基所包含的血清和軟骨細胞都來自鯊魚胚胎。

40. 如申請專利範圍第36項之培養基，其中該培養基所包含的血清係藉由以下步驟來製備：

- a)對血液進行過濾以便分離出淋巴液並清除微粒；
 - b)對該淋巴液進行離心過濾並保留上層清液；
 - c)對上層清液進行加熱從而降低其中酶的活性。
41. 如申請專利範圍第36項之培養基，其還包含有：
- 5 a)三甲胺N-氧化物；
- b)谷氨酸鹽。
42. 一種用以在一個體上治療一與病理性新血管化有關的
疾病的方法，其包含將一治療有效量之如申請專利範圍
第16項的化合物施用至該個體。
- 10 43. 如申請專利範圍第42項之方法，其中該病症係選自於由
下列所構成之群組中：癌症、關節炎症狀、因血管增生
引起的皮膚病、糖尿病視網膜病變、卡波西氏肉瘤、老
年黃斑病變、血管再狹窄、毛細血管擴張、青光眼、癬
痕瘤、角膜移植排斥、創傷肉芽、血管纖維瘤、遺傳性
15 出血性毛細血管擴張症、心肌血管新生與硬皮病。
44. 如申請專利範圍第43項之方法，其中該病症為一選自於
由風濕性關節炎和骨關節炎所構成之群組中的關節炎
症狀。
45. 如申請專利範圍第42項之方法，其中施用的方式包括口
20 服、靜脈注射、腹膜注射和透皮送藥。
46. 如申請專利範圍第42項之方法，其中該個體為動物。
47. 如申請專利範圍第46項之方法，其中該動物係選自於由
寵物、家畜或人類病人所構成之群組中。
48. 一種用以篩選出具有抑制血管增生的療效製劑的方

法，其包含：

a)將該製劑與適當細胞或組織之一樣本接觸；

b)將該適當細胞或組織之另一樣品與一治療有效量之如申請專利範圍第4項的提取物相接觸；

5 c)對步驟(a)的樣本生長和步驟(b)的樣本生長進行比較，且其中步驟(a)中任何能與步驟(b)中的樣本相同或相似程度地抑制生長的製劑都是一種能夠抑制新血管化或內皮細胞生長的製劑。

49. 如申請專利範圍第48項之方法，其中該接觸可以為活體內或活體外。

10

50. 一種用於在一宿主身上治療與病理性新血管化有關的疾病的套組，其包含一治療有效量之如申請專利範圍第16項的化合物，以及使用說明。

51. 如申請專利範圍第50項之套組，其中該病症係選自於由下列所構成之群組中：癌症、關節炎症狀、因血管增生引起的皮膚病、糖尿病視網膜病變、卡波西氏肉瘤、老年黃斑病變、血管再狹窄、毛細血管擴張、青光眼、瘢痕瘤、角膜移植排斥、創傷肉芽、血管纖維瘤、遺傳性出血性毛細血管擴張症、心肌血管新生以及硬皮病。

15

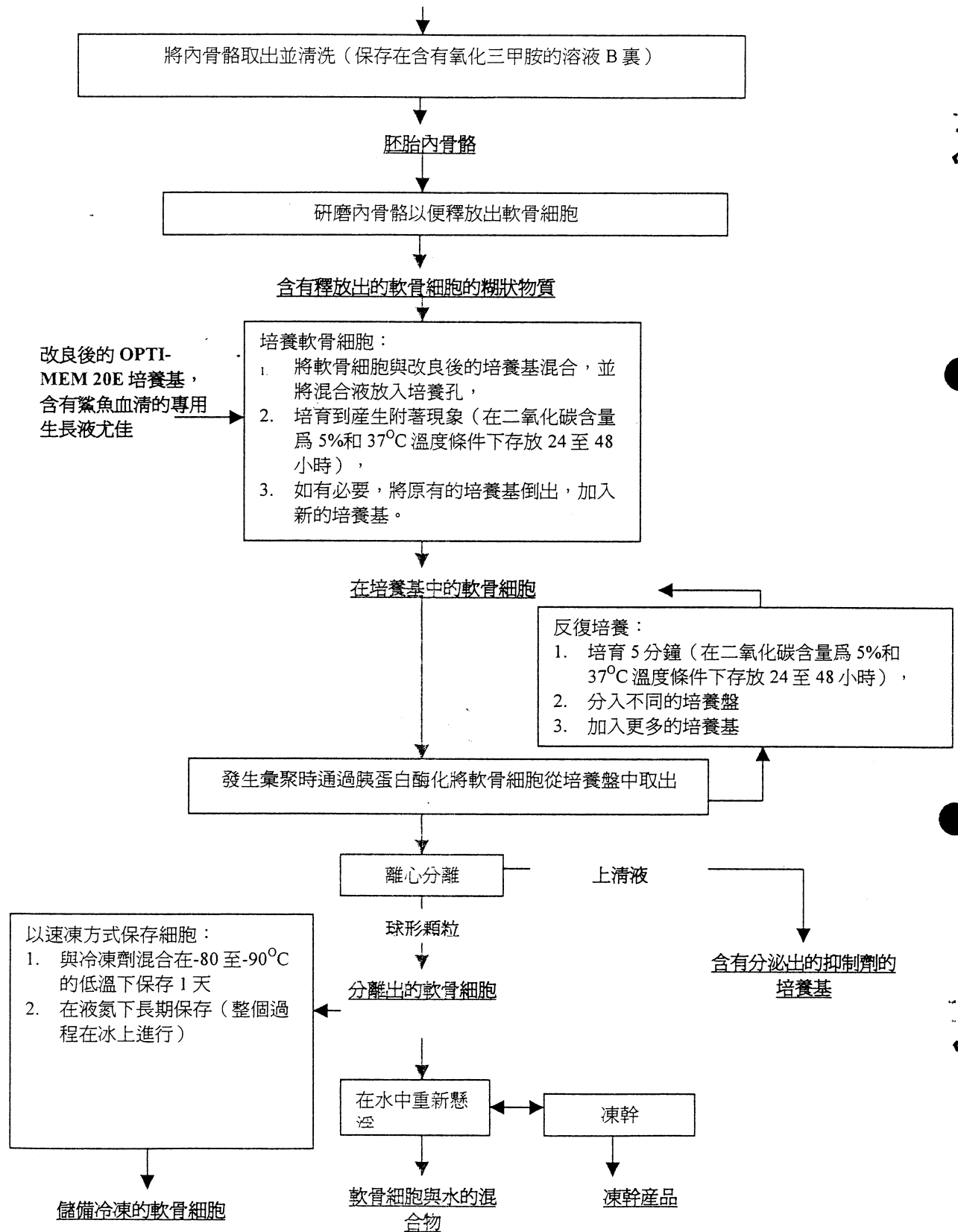
52. 如申請專利範圍第50項之套組，其中該病症為一選自於由風濕性關節炎和骨關節炎所構成之群組中的關節炎病症。

20

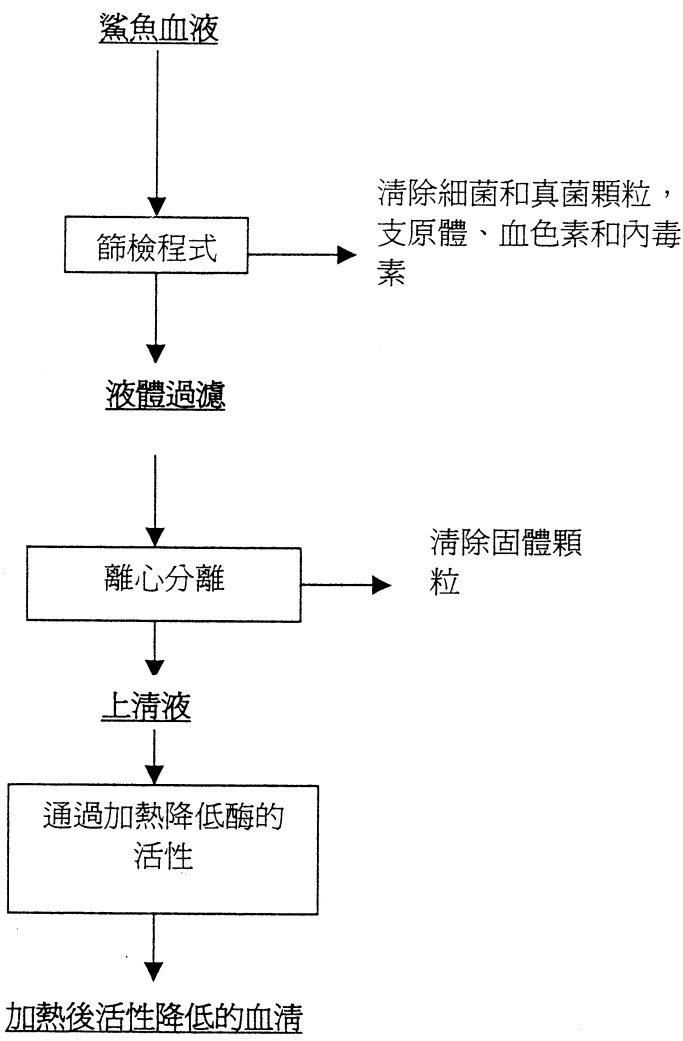
92131904

第 1 圖

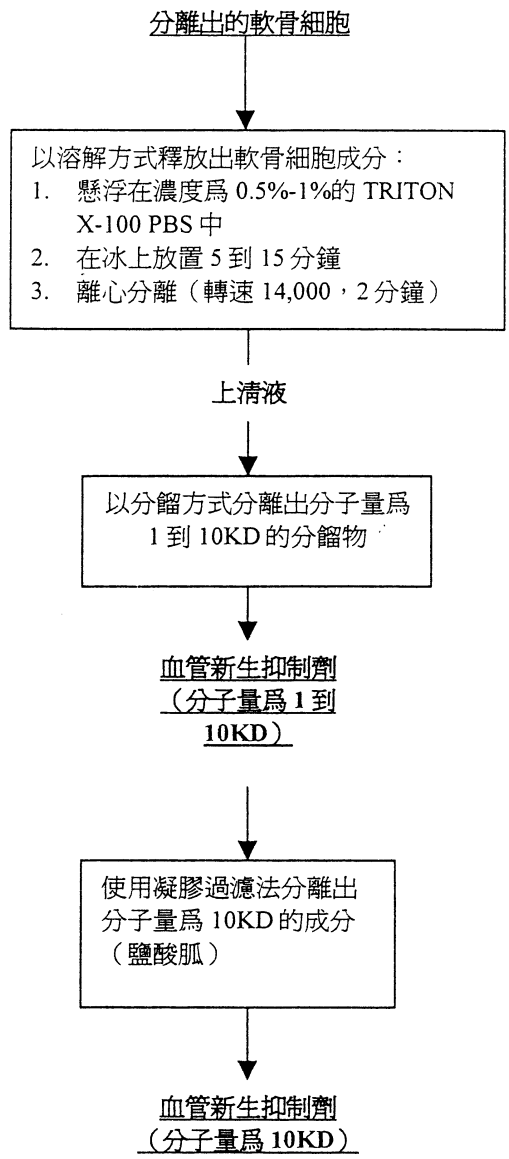
鯊魚或其他軟骨魚擁有發育完成的內骨骼的胚胎



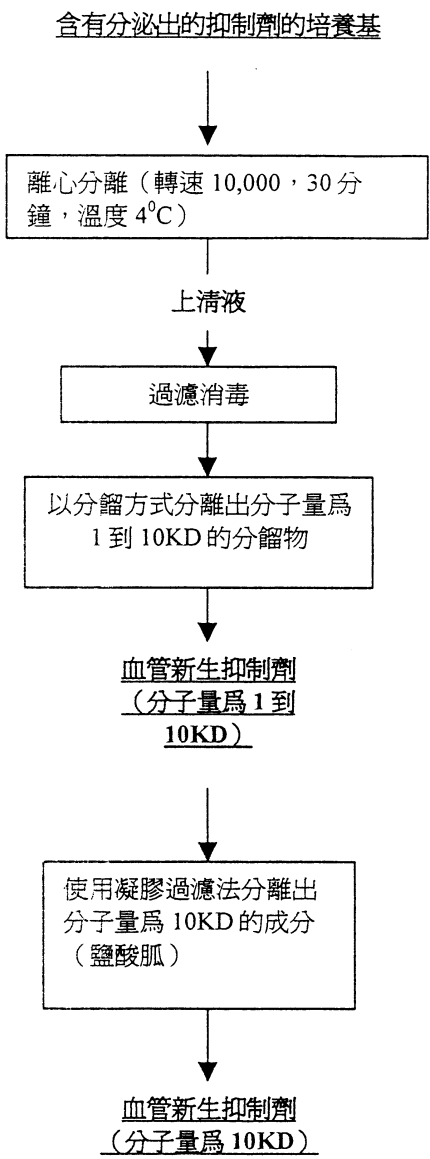
第 2 圖



第 3A 圖



第 3B 圖



柒、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件代表符號簡單說明：

(無)

捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)