

公告本

發明專利說明書

101年4月3日修正替換頁

(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：94129642

※ 申請日期：94.8.30

※IPC 分類：A61K^{35/78}006.01)
A61P^{1/6} (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

風車草屬及相關植物之醫藥用途

PHARMACEUTICAL USE OF GRAPTOPETALUM AND RELATED PLANTS

二、申請人：(共2人)

姓名或名稱：(中文/英文)

1. 金鈺生命科學股份有限公司 / Nugentek LifeScience (TAIWAN) Co., LTD.

2. 台中榮民總醫院 / TAICHUNG VETERANS GENERAL HOSPITAL

代表人：(中文/英文)

1. 游汝謙 2. 雷永耀

住居所或營業所地址：(中文/英文)

1. 10595 臺北市松山區復興北路1號8樓之5

8F.-5, No.1, Fuxing N. Rd., Songshan Dist., Taipei City 105, Taiwan (R.O.C.)

2. 40705 台中市西屯區台中港路三段160號

No.160, Sec.3, Chung-Kang Rd., Taichung, Taiwan, R.O.C. 40705

國籍：(中文/英文)

1.2. 中華民國/R.O.C.

三、發明人：(共1人)

姓名：(中文/英文)

徐士蘭 / HSU, SHIH-LAN

國籍：(中文/英文)

中華民國/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：

美國、2004. 08. 31、10/931, 791

☐ 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。

五、中文發明摘要：

本發明係關於包括風車草屬 (*Graptopetalum*) 植物的組成物及其用途。風車草屬植物可保護動物使之對抗到肝臟疾病與例如發炎、脂肪變性、以及纖維樣變性的醫學病症。特別的，風車草屬植物會抑制活化的肝臟星狀細胞之增殖，而該細胞在肝臟纖維樣變性扮演一個重要的角色。風車草屬植物也具有抗-纖維樣變性活性以及會抑制肺臟成纖維細胞之增殖。因此，風車草屬植物除了為一種肝臟的預防與治療作用劑之外，其也有用於對抗肝臟之外的組織或器官（特別是肺臟、腎臟、與膀胱）之纖維樣變性或發炎。其他景天科 (*Crassulaceae*) 的植物，特別是擬石蓮花屬 (*Echeveria*) 植物，具有與風車草屬植物類似的效果。

六、英文發明摘要：

The present invention relates to compositions comprising *Graptopetalum* and uses thereof. *Graptopetalum* can protect animals from liver diseases and medical conditions, such as inflammation, steatosis, and fibrosis. In particular, *Graptopetalum* inhibits proliferation of activated hepatic stellate cells, which play a pivotal role in liver fibrosis. *Graptopetalum* also has anti-fibrosis activities as well as inhibits proliferation of lung

fibroblasts. Therefore, in addition to being a prophylactic and therapeutic agent for the liver, *Graptopetalum* is useful against fibrosis or inflammation of tissues or organs other than the liver, in particular lung, kidney, and bladder. Other plants in the family of Crassulaceae, particularly *Echeveria*, have similar effects as *Graptopetalum*.

七、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

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於風車草屬 (*Graptopetalum*) 植物及相關植物的治療性與預防性效果，特別是對肝臟-相關疾病與醫學病症的效果。

參考文獻

美國專利案案號 5,023,252。

Desmet, V.J., 等人 (1994). Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology* 19(6):1513-1520.

Friedman, S.L. (1993). The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanism and treatment strategies. *N Engl J Med*. 328(25):1828-1835.

Giladi, H., 等人 (2003). Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice. *Mol Ther*. 8(5):769-776.

Pines, M. (1997). Halofuginone, a specific inhibitor of collagen type I synthesis, prevents dimethylnitrosamine-induced liver cirrhosis. *J Hepatol*. 27(2):391-398.

Saller, R., 等人 (2001). The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs*. 61(14):2035-2063.

所有以上或於本申請案其他處引用的出版品、專利案、與專利申請案係以引用方式將其全文納入本文中，其與特別地與個別地指出每個個別的出版品、專利案申請案、或

專利案之揭示係以引用方式將其全文納入本文中程度相同。

【先前技術】

肝臟係一個多功能的器官。其基本功能可分成三個類型：（1）用於血液之儲存與過濾的血管功能，（2）牽涉身體大部分代謝系統的代謝功能，以及（3）負責膽汁形成的分泌與排泄的功能。肝臟主要的活性包括解毒與排除內生性與外生性的毒素兩者、胺基酸的去胺基作用與尿素的形成、透過糖原形成而調控血糖、生產血漿蛋白質、生產與分泌膽汁、以及吞噬來自內臟的（腸）循環的微粒物質。

由於肝臟扮演許多角色，當肝臟被損傷時，其各種功能會同時以不同組合的方式而被擾亂，其根據損傷的本質與位置。來自任何來源的肝臟損傷可導致肝臟再生、壞死（細胞死亡）、退化、發炎、纖維樣變性、或這些過程的組合。雖然肝臟具有強大的功能性預備，隨著越來越嚴重的傷害，肝臟功能的瓦解可具有會威脅生命的結果。肝硬化（一種常見的末期肝臟疾病）是西方世界十大死因之一。

儘管肝臟疾病的重大性與潛在嚴重性，治療方法卻受限制。許多種類的肝臟疾病導因於病毒（例如 A 型、B 型、C 型、D 型、與 E 肝炎），而有效的抗-病毒性治療係少的且通常造成潛在的嚴重副作用。其他肝臟疾病係導因於先前暴露至毒物（例如酒精性肝硬化與暴露至有毒植物，或環境性污染物）。在仍另一種例子中，肝臟疾病係導因於

瞭解甚少的各種因子之交互作用，這些因子包括遺傳性因子、環境性病徵、與免疫性統活性（自體免疫肝炎）。無論原因為何，對肝臟疾病的治療方法係由於兩個因子而複雜化。因為肝臟負責解毒，使用任何藥物可加重肝臟的負擔並導致病徵的惡化。進一步，肝臟纖維樣變性（其在許多肝臟疾病與病徵中發生）通常為不可逆的過程。結果，肝臟可使用的部分隨著纖維樣變性的進程而減少，導致依賴肝臟功能的其他器官之併發症的增加。

因此，一種對肝臟的醫療作用劑因該理想地預防纖維樣變性之發生以及發展。此外，亦需要一種不造成肝臟代謝負擔且具有極少或沒有副作用的作用劑。

【發明內容】

發明摘述

尤其，本發明提供包含風車草屬植物的組成物。發明人發現這種一般的植物可保護動物使之對抗造成肝臟的發炎與纖維樣變性、體重減少、脾臟腫脹、以及最終死亡的有毒物質。隨著投藥風車草屬植物，發炎與纖維樣變性明顯地被抑制，動物的體重、肝臟重量、與脾臟重量接近至正常，而存活率大大的改善。特別的，風車草屬植物抑制活化的肝臟星狀細胞之增殖，該細胞在肝臟纖維樣變性中扮演重要的角色。與這個觀察到的現象一致，風車草屬植物抑制膠原的累積並預防纖維樣變性發生或進展。此外，該組成物（即使是在高劑量時）沒有顯現可偵測到的副作用。擬石蓮花屬植物（*Echeveria*）具有類似的效果。

因此，本發明的一個方面提供包含風車草屬植物或擬石蓮花屬植物的醫藥組成物。該風車草屬植物可為任何風車草屬植物種或為任何形式的製備品。較佳的，該風車草屬植物種是風車草（*Graptopetalum paraguayense*）。類似的，擬石蓮花屬植物可為任何擬石蓮花屬植物種或為任何形式的製備品。較佳的，該擬石蓮花屬植物種是石蓮花（*Echeveria peacockii*）。該風車草屬植物或擬石蓮花屬植物較佳的係粹取物，特別是一一種或多種水性溶劑、非極性溶劑、醇類溶劑、或其等的混合物的粹取物。

該醫藥組成物可進一步包含醫藥上可接受的輔藥或載劑。該醫藥組成物亦可含有至少一種其他作用劑，特別是一種具有抗-發炎、抗-脂肪變性、抗-病毒、或抗-纖維樣變性活性的作用劑。例如，該作用劑可選自由熊葡萄葉素、檸檬粹取物、黃瓜粹取物、巰基琥珀酸（mercaptosuccinic acid）、巰基類糊精（mercaptodextran）、麴酸、麴酸的衍生物、維生素 C、對苯二酚、麩胱甘肽、半胱胺酸、桑椹粹取物、甘草粹取物、與熊葡萄粹取物所組成的群組。

醫藥組成物可被調配以用於任何適合的投藥途徑，較佳是口部或局部投藥。

本發明的另一個方面提供一種在患者中預防或治療肝臟疾病或醫學病症的方法，其包括將有效量的本文所述之醫藥組成物投藥至患者，其中該肝臟疾病或醫學病症係選自由肝臟發炎、肝臟脂肪變性、肝臟纖維樣變性、肝硬化、及 B 型肝炎所組成的群組。當用於肝臟纖維樣變性或肝硬

化時，較佳該組成物係能夠減低平滑肌 α -肌動蛋白的表現，特別是在肝臟星狀細胞中。

本發明的另一個方面提供一種抑制肝臟星狀細胞增殖的方法，其包括將肝臟星狀細胞與包含風車草屬植物或擬石蓮花屬植物的醫藥組成物接觸。本發明的又另一個方面提供一種選擇性殺死肝臟星狀細胞的方法，其包括將肝臟星狀細胞與包含風車草屬植物或擬石蓮花屬植物的醫藥組成物接觸。該肝臟星狀細胞較佳係位於哺乳類動物中，最佳係位於人類中。

本發明亦提供抑制在哺乳類動物中之 B 型肝炎病毒表面抗原的表現，其包括將該醫藥組成物投藥至該哺乳類動物。該哺乳類動物較佳係人類。

除了之外風車草屬植物與擬石蓮花屬植物之外，其他在景天科 (Crassulaceae) 的多肉植物也可以相同於此處所述的方式使用。景天科包括以下屬：熊掌草屬 (Adromischus)、銀麟草屬 (Aeonium)、Aichryson、落地生根屬 (Bryophyllum)、觀葉景天屬 (Chiastophyllum)、銀波錦屬 (Cotyledon)、肉葉草屬 (Crassula)、Cremnophila、Diamorpha、達德利蓮屬 (Dudleya)、擬石蓮花屬、風車草屬、綠卵屬 (Greenovia)、八寶屬 (Hylotelephium)、Hypagophytum、卷絹屬 (Jovibarba)、長壽花屬 (Kalanchoe)、Kitchingia、Lenophyllum、Meterostachys、魔男景天屬 (Monanthes)、瓦松屬 (Orostachys)、厚葉草屬 (Pachyphytum)、

Perrierosedum、Pistorinia、Prometheum、合景天屬 (Pseudosedum)、紅景天屬 (Rhodiola)、瓦蓮屬 (Rosularia)、Sedella、景天屬 (Sedum)、長生草屬 (Sempervivum)、石蓮屬 (Sinocrassula)、Tacitus、Telmissa、Thompsonella、奇峰錦屬 (Tylecodon)、種臍屬 (Umbilicus)、與塔蓮屬 (Villadia)。風車草屬與擬石蓮花屬係實行本發明較佳的屬。

本發明的其他方面提供使用風車草屬植物或其相關植物治療或預防其他組織與器官 (例如肺臟、腎臟、與膀胱) 的纖維樣變性或發炎的方法。

【實施方式】

發明詳述

本發明係針對包含風車草屬植物及/或相關植物的組成物，以及其用途。風車草屬植物可保護動物使之對抗造成肝臟之發炎與纖維樣變性、體重減輕、脾臟膨脹、以及最終死亡的有毒物質。特別的，風車草屬植物抑制活化的肝臟星狀細胞之增殖，該細胞在肝臟纖維樣變性扮演重要的角色。風車草屬植物的抗-纖維樣變性活性不限於肝臟。風車草屬植物亦抑制肺臟成纖維細胞的增殖，並保護動物使之抵抗造成肺臟之發炎與纖維樣變性的有毒物質。因此，風車草屬植物係一種預防與治療作用劑，特別是對組織纖維樣變性的預防與治療作用劑。與風車草屬植物相關的植物可以相同的方式使用。

在進一步詳細敘述本發明之前，本申請案中所使用的

術語係如下定義，除非另加指明。

定義

「風車草屬植物」用於本文中係指任何風車草屬的植物，或其一部份或數部分。該植物部分可包括（但不限於）葉、花、莖、根、果實、與種子。此術語亦包含植物或部分的經改變形式，例如粉末、粹取物、乾燥粹取物、均質物、細粒、或沈澱物。本發明亦涵蓋多於一種的風車草屬植物或其部分之組合。風車草屬植物較佳係風車草。

「擬石蓮花屬植物」用於本文中係指任何擬石蓮花屬的植物，或其一部份或數部分。該植物部分可包括（但不限於）葉、花、莖、根、果實、與種子。此術語亦包含植物或部分的經改變形式，例如粉末、粹取物、乾燥粹取物、均質物、細粒、或沈澱物。本發明亦涵蓋多於一種的擬石蓮花屬植物或其部分之組合。擬石蓮花屬植物較佳係石蓮花。

一「粹取物」係一種藉由將所欲粹取的物質浸泡或混合於溶劑中所獲得的溶液。典型地，粹取物係藉由乾燥風車草屬植物並接著切碎或磨碎乾燥的物質而製備。粹取過程可接著在選擇適合的溶劑的幫助而進行，典型地是水、乙醇、乙醇/水混合物、甲醇、丙醇、異丙醇、丁醇、異丁醇、丙酮、己醇、石油醚、或其他有機溶劑，並藉由（例如）離析、滲濾、再滲濾、逆流粹取、渦輪粹取、或二氧化碳高超臨速（溫度/壓力）粹取的方法而進行。粹取物可接著進一步蒸發而因此濃縮以產生軟的粹取物及/或最

終的乾燥粹取物，其係藉由（例如）噴霧乾燥、真空乾燥、流體床乾燥、冷凍乾燥的方法。較佳地，粹取物係藉由不煮沸風車草屬植物或其相關植物而製備。亦較佳的是不使用油以粹取植物。

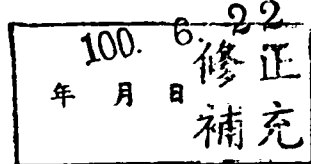
「預防」一種疾病或醫學病症意指在該疾病或醫學病症發生之前預防該疾病或醫學病症之症狀的顯現。

「治療」一種疾病或醫學病症意味在該疾病或醫學病症發生後減少或完全移除該疾病或醫學病症之症狀。

一種「肝臟疾病或醫學病症」係一種包含肝臟或其任何部分的損傷之疾病或醫學病症。肝臟疾病與醫學病症包括（但不限於）肝臟纖維樣變性、肝硬化、慢行肝炎（例如 A、B、C、D、E、或其他型）、非酒精性脂肪過多肝臟、酒精性脂肪過多肝臟、與肝臟腫瘤（特別是肝癌（肝臟的 carcinoma））。

一「有效量」是一種作用劑的量，其足夠達到所欲的目的。例如，一治療肝硬化之風車草屬植物有效量係一種足以減低或移除肝硬化症狀（與風車草屬植物不存在時症狀的發展相比）的量。一給定作用劑的有效量會因各種因子而改變，例如作用劑的本質、投藥的途徑、欲接受作用劑的動物之大小與物種、與投藥的目的。熟習該項技術者可以根據本文之揭示與在技藝中已建立的方法憑經驗地決定在各個例子中的有效量。

術語「單位劑量形式」意指適合用作單元劑量而用於人類患者或其他哺乳類動物之實質上分離的單位，每個單



14. 15. 16. 18. 26-40

第 094129642 號專利申請案 (100 年 6 月)

修正後無劃線之說明書替換頁

位包括預先決定的風車草屬植物量，其被算出與適合的醫藥賦形劑結合時會產生所欲的效果。

風車草屬植物對纖維樣變性與發炎的效果

風車草屬植物係一種多肉的植物，其具有排列成玫瑰狀的葉子。風車草屬包括 12 個種，其包括風車草（鬼植物 (Ghost Plant)）、棒錘玉蓮（*G. amethystinum*）、小卵薰衣草）、美麗蓮，貝拉（*G. bellum*）（亦稱作 *Tacitus bellus*）、以及 *G. macdougallii*。

為了測試風車草對受損傷之肝臟的效果，吾人使用肝臟損害之動物模型。因此，將大鼠以有毒化學品二甲基亞硝胺（DMN）注射，其造成肝臟的發炎與纖維樣變性。肝臟功能在這些動物中降低，此降低係由各種生化參數指出。體重與肝臟重量兩者皆降低，而脾臟重量增加，而這些動物大部分在數週內死亡。相反的，除了 DMN 之外又接受風車草的大鼠有幾乎正常的身體與肝臟重量，而牠們的脾臟並沒有腫脹（實施例 1）。這些動物大部分都存活下來，而牠們的肝臟功能指數（包括麩胺酸草乙酸轉胺酶（GOT）、麩胺酸丙酮酸轉胺酶（GPT）、凝血酶原時間（PT）、血小板、膽紅素與白蛋白水平）係相對正常的（實施例 2）。因此，風車草大量地減少 DMN 對肝臟的有害效果。平行測試一種已知的對肝臟之治療性作用劑，水飛薊素（Saller 等人，2001），以作為陽性控制組。水飛薊素也能夠增加動物存活、身體與肝臟重量、以及肝臟功能。然而，風車草甚至比水飛薊素

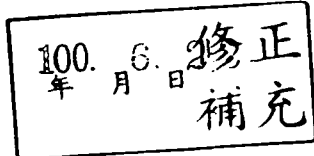
更為有效。

修正
補充
100 年 6 月 2 日

已知 DMN 會造成肝臟發炎與纖維樣變性。事實上，以 DMN 處理三週之後，在組織化學分析中，肝臟顯示大量的壞死與發炎細胞的滲透（實施例 3）。另一方面，也接受風車草的大鼠只有極少或沒有壞死或滲透，象徵風車草可用於治療或預防發炎。

亦測試風車草對肝臟纖維樣變性的效果。在 DMN 處理之後，在肝臟表面上觀察到纖細的、一致的顆粒狀。顯微鏡分析顯示在肝臟中類似肝硬化之結構：在格力孫鞘 (Glisson' s sheath) 的纖維性結締組織成分、假小葉 (pseudolobule) 形成、纖維變性性隔膜之形成、以及增厚的連接中央區域之網狀蛋白纖維。以 DMN 與水飛薊素兩種處理的動物仍然顯現強烈的小葉中心性與門靜脈周的纖維狀結締組織之堆積。相反的，接受風車草的 DMN 處理大鼠之肝臟只顯示溫和的連結纖維樣變性，在門靜脈周與小葉中央區域皆顯示減少的纖維樣變性，且顯示減少的肝臟腺泡畸形（實施例 4）。

在纖維變性的肝臟中，細胞外基質會累積。細胞外基質水平的增加對纖維樣變性進一步發展是重要的，而纖維樣變性最終導致肝臟肝硬化。由於膠原係在細胞外基質中的一個主要成分，吾人因此測定以 DMN 單獨處理的動物或以 DMN 與風車草結合處理的動物之膠原含量。雖然在控制組大鼠肝臟中只有非常少水平的膠原堆積，經 DMN 處理大鼠在小葉與大纖維狀隔膜周圍顯示大量膠原，其象



徵嚴重纖維樣變性的發生。纖維樣變性的定量分析顯示風車草與水飛薊素處理顯著減少 DMN 誘發的肝臟膠原含量個別達 80% 與 25% (實施例 5)。

特殊的肝臟細胞 (肝臟星狀細胞 (HSC)) 係在纖維變性的肝臟中細胞外基質增加的原因。在正常的肝臟中, HSC (其本質為脂細胞) 係類視色素的主要儲存倉庫。這些細胞可由含有維生素 A 之明顯的細胞內小滴而辨識。在活化後, HSC 進行細胞增殖而增加的纖維生成導致纖維樣變性 (參見, 例如, Friedman, 1993)。由於活化的 HSC (與休止的 HSC 相反) 產生大量的平滑肌 α -肌動蛋白 (α -SMA) mRNA 與蛋白質, 因此 α -SMA 係活化的 HSC 與肝臟纖維樣變性之標記。如預期的, 對 α -SMA 之強烈的、專一的染色在經 DMN 處理之肝臟的中心周圍的區域觀察到。此 α -SMA 之 DMN 誘發性表現係大量地被口部投藥風車草或水飛薊素抑制, 其中風車草比水飛薊素更有效 (實施例 6)。總結來說, 這些結果因此象徵風車草可減少或預防肝臟纖維樣變性, 其可能透過其對 HSC 之效果。

吾人將 HSC 培養於風車草中以測定風車草對 HSC 作用之可能的機制。結果顯示風車草以基於時間與劑量的方式抑制 HSC 增殖。培養幾天之後, HSC 型態改變, 自培養容器分離, 並死亡 (實施例 7)。相反的, 肝細胞 (其以相同的方式培養) 並未被顯著的影響。因此, 風車草對 HSC 為選擇性的毒性。

因此, 本發明提供一種在患者中治療或預防肝臟纖維

樣變性或肝硬化的方法，其藉由將有效量的風車草屬植物投藥至患者。風車草屬植物的量較佳是足夠減少膠原形成、抑制 HSC 增殖、及/或在患者肝臟中抑制 α -SMA mRNA 或蛋白質表現。患者可以在任何肝臟纖維樣變性跡象明顯前開始接受風車草屬植物；或者，患者可以在肝臟纖維樣變性或甚至肝硬化開始之後接受風車草屬植物。幾乎所有慢性肝臟病症最終皆造成肝硬化。因此，風車草屬植物可用於改善各種肝臟疾病或病症（包括慢性肝炎（例如 A、B、C、D、E、或其他型）、非酒精性脂肪肝、酒精性脂肪肝、與肝臟腫瘤（特別是肝癌））的症狀。

本發明的另一方面提供一種使用風車草屬植物以抑制 HSC 增殖的方法。HSC 增殖可藉由計算 HSC 數目、測定 HSC 的生化標記（例如 α -SMA mRNA 或蛋白質表現）、測定膠原水平、或任何其他技藝中已建立的方法而測量。

本發明另一個方面提供一種在患者之肝臟中預防或治療發炎的方法，其包括將有效量的風車草屬植物投藥至患者。本發明涵蓋風車草屬植物之單獨使用或與其他抗-發炎的作用劑結合使用。這些其他抗-發炎的作用劑可包括（但不限於）糖皮質素、乙醯水楊酸、伊布普洛（ibuprofen）、環戊烯攝護腺素（cyclopentenone prostaglandin）、倍半帖內酯（sesquiterpene lactone）、柳酸磺胺吡啶（sulfasalazine）、氯菲安明（chlorpheniramine maleate）、克雷滿汀（clemastine）、與脫氧精脲素

(deoxyspergualin) 。 當風車草屬植物與至少一種其他抗-發炎的作用劑結合投藥時，風車草屬植物與其他作用劑可混合在一個組成物中以投藥至患者，或它們可以分開投藥。

吾人進一步發現風車草可抑制 B 型肝炎病毒表面抗原的表現（實施例 8）。由於干擾 B 型肝炎病毒表面抗原之表現已被顯示會抑制 B 型肝炎病毒複製（參見，例如 Giladi 等人，2003），因此風車草也可用於抑制病毒的複製。本發明因此提供一種在患者中治療或預防 B 型肝炎病毒感染的方法，其包括將有效量的風車草屬植物投藥至患者。風車草屬植物可單獨使用或與其他抗一病毒作用劑合併使用。這些其他抗一病毒作用劑可包括（但不限於）干擾素、拉美芙定（lamivudine, 3TC）、阿德福偉（adefovir）、雷巴威林（ribavirin）、對有興趣病毒的專一性抗體、與其組合。當風車草屬植物與至少一種其他抗一病毒作用劑結合投藥時，風車草屬植物與其他作用劑可混合在一個組成物中以投藥至患者，或它們可以分開投藥。

本發明涵蓋風車草屬植物用於治療或預防其他組織或器官（例如肺臟、腎臟、膀胱、或類似者）的纖維樣變性的用途。因此，投藥風車草屬植物（例如藉由本文所述方法）可減少或預防組織中細胞外基質物質之不正常累積。類似的，風車草屬植物也可用於在肝臟之外的組織或器官中治療或預防發炎。實施例 10 與 11 展示風車草對

肺臟成纖維細胞增殖與肺臟纖維樣變性/發炎之抑制性效果。

接受根據本發明風車草屬植物的患者較佳是哺乳類動物，更佳是選自由人類、非人類靈長類、犬科動物、鼠科動物、嚙齒目動物、馬科動物、豬、牛科動物與綿羊所組成之群組之哺乳類動物，且最佳為人類。較佳的，患者係具有肝臟疾病或醫學病症，或具有得到肝臟疾病或醫學病症之危險。如果（例如）患者常常消耗高於正常水平的酒精、具有慢性肝臟疾病或病症之家族病史、預期需要輸血、或易於暴露至肝炎病毒或危險物質，則患者具有得到肝臟疾病或醫學病症的危險。

風車草屬植物不具有可偵測的副作用。如實施例 7 所顯示，即使長時間暴露至高劑量的風車草屬植物也不會對實驗動物造成任何重大的損傷。因此，此對於患者使用風車草屬植物作為日常使用之健康/營養食物特別有興趣。因此，風車草屬植物可與食物或飼料混合、製成飲料、以錠劑、膠囊、藥丸、藥粉、或類似者的形式服用。為了易於日常消費，可製備包含風車草屬植物粉末的小包，其可輕易的製成飲料。本發明亦涵蓋包含風車草屬植物的甜餅乾、鹹餅乾、糕餅、洋芋片、或其他點心。一般來說，所建議的每日風車草屬植物劑量相當於自 0.1 克至 30 克的整顆風車草屬植物（濕種）每公斤體重。劑量較佳是 0.3 至 20，更佳是 0.5 至 15 克，且甚至更佳是 1 至 10 克（每公斤體重）。

雖然風車草屬植物較佳的投藥途徑是口部投藥，風車草屬植物可使用任何其他方法投藥。例如，風車草屬植物可皮下地、血管內地、靜脈內地、腹膜內地、局部地、鼻內地或肺地的投藥。

吾人進一步發現擬石蓮花屬植物（一種相關於風車草屬植物的植物）具有類似於本文所述之效果。擬石蓮花屬與風車草屬兩者皆為景天科中的屬。景天科為一種多肉的、柔軟的且耐寒的植物科，其包括以下屬：熊掌草屬（*Adromischus*）、銀麟草屬（*Aeonium*）、*Aichryson*、落地生根屬（*Bryophyllum*）、觀葉景天屬（*Chiastophyllum*）、銀波錦屬（*Cotyledon*）、肉葉草屬（*Crassula*）、*Cremnophila*、*Diamorpha*、達德利蓮屬（*Dudleya*）、擬石蓮花屬、風車草屬、綠卵屬（*Greenovia*）、八寶屬（*Hylotelephium*）、*Hypagophytum*、卷絹屬（*Jovibarba*）、長壽花屬（*Kalanchoe*）、*Kitchingia*、*Lenophyllum*、*Meterostachys*、魔男景天屬（*Monanthes*）、瓦松屬（*Orostachys*）、厚葉草屬（*Pachyphytum*）、*Perrierosedum*、*Pistorinia*、*Prometheum*、合景天屬（*Pseudosedum*）、紅景天屬（*Rhodiola*）、瓦蓮屬（*Rosularia*）、*Sedella*、景天屬（*Sedum*）、長生草屬（*Sempervivum*）、石蓮屬（*Sinocrassula*）、*Tacitus*、*Telmissa*、*Thompsonella*、奇峰錦屬（*Tylecodon*）、種臍屬（*Umbilicus*）、與塔蓮屬（*Villadia*）。本發明亦涵蓋使用其他景天科的多肉植物取代風車草屬植物及/或

擬石蓮花屬植物，或與風車草屬植物及/或擬石蓮花屬植物結合使用。例如，本發明之預防性或治療性組成物可包括風車草屬植物，以及視需要包括一種或更多種來自景天科的植物，較佳是來自擬石蓮花屬，更佳是石蓮花。

組成物

本發明也包括醫藥組成物，其包括風車草屬植物作為活性成分以及醫藥上可接受的載劑或賦形劑。如以上所述，其他來自景天科的多肉植物可用於取代風車草屬植物，或與風車草屬植物合併使用。因此，雖然包含風車草屬植物之組成物的製備與用途係如下所述，本發明涵蓋其他來自景天科的多肉植物以相同的方法使用之用途。

在製造本發明之組成物時，風車草屬植物通常與賦形劑混合，以賦形劑稀釋，或封入可為膠囊、小袋、紙、或其他形式之容器的載劑中。當醫藥上可接受的賦形劑作為稀釋劑時，其可為固體的或半固體的，或液體的物質，其可作為活性成分的媒介、載劑或基質。因此，該組成物可為以下形式：錠劑、藥丸、藥粉、藥片、小袋、膠囊、酏劑、懸浮劑、乳劑、溶液、糖漿、氣霧劑（為固體或於液體基質）、包含（例如）活性化合物達 10 重量百分比之藥膏、軟及硬明膠膠囊、栓劑、無菌可注射之溶液、以及無菌包裝之藥粉。

一些適合的賦形劑的例子包括乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、澱粉、亞拉伯樹膠、磷酸鈣、褐藻酸鹽、黃耆樹膠、明膠、矽酸鈣、微晶質纖維素、聚乙烯吡咯烷

酮、纖維素、無菌水、糖漿、與甲基纖維素。調配物可額外包括潤滑作用劑，例如滑石、硬脂酸鎂、與礦物油；濕潤作用劑；乳化與懸浮作用劑；保存作用劑，例如甲基-與丙基羥基-苯甲酸鹽；增甜作用劑；與香味作用劑。本發明之組成物可調配以在藉由技藝中已知的方法投藥至患者後，提供快速的、維持的或延遲的活性成分釋放。

為了製備固體組成物（例如錠劑），將主要的活性成分與醫藥賦形劑混合以形成一固體的前調配組成物，其包含一本發明化合物之均質混合物。當稱這些前調配組成物為均質時，其意指該活性成分係平均的分散在組成物中，使組成物可容易地細分成同等有效的單位劑量形式，例如錠劑、藥丸、與膠囊。

本發明之錠劑或藥丸可經塗覆或否則經合成，以提供一種能夠有延長作用之優點的劑量形式。例如，錠劑或藥丸可包括一內部劑以及一外部劑成分，其中後者係以包裹前者之形式。該兩種成份可藉由一腸溶層分開，該腸溶層可抵抗在胃中的崩解並使內部成分能夠完整的達到十二指腸或延遲地釋放。許多物質可用作這種腸溶層或塗覆，這些物質包括數種聚合酸以及聚合酸與例如蟲膠、乙醯化醇類、與醋酸纖維素之物質的混合物。

本發明組成物可併入以供口部投藥或注射投藥之液體形式包括水性溶液、適合的具香味之糖漿、水性或油性懸浮劑、與有可食用油（例如玉米油、棉花子油、芝麻油、椰子油、或花生油）之具香味的乳化劑、以及酞劑及類似

的醫藥上之媒介。

用於吸入或吹入的組成物，包括在醫藥上可接受的水性或有機溶劑或其混合物中之溶液或懸浮液以及藥粉。該液體或固體組成物可包括如本文所述之適合的醫藥上可接受的賦形劑。較佳的，組成物係藉由口部或鼻部呼吸路徑投藥以用於局部的或全身的效果。較佳醫藥上可接受的溶劑之組成物可使用不活性氣體而霧狀化。霧狀化溶液可直接從霧狀化裝置吸入，或霧狀化裝置可連接至一臉部面具帳棚狀物或間歇正壓力呼吸機器。溶液、懸浮液、或藥粉組成物可自以適合的方法遞送調配物之裝置投藥，其較佳為口部投藥或鼻部投藥。

本發明之方法所使用的另一個較佳的調配物使用穿皮遞送裝置（「貼片」）。這種穿皮貼片可用以提供以受控制的量連續或不連續注入風車草屬植物。用於遞送醫藥作用劑的穿皮貼片之構築與使用係於技藝中廣為人知。參見，例如，美國專利案號 5,023,252，其以引用方式併入本文中。可構築這種貼片以用於醫藥作用劑之連續的、間歇的、或經要求的遞送。

其他用於本發明之適合的調配物可在雷明頓醫藥科學（Remington's Pharmaceutical Sciences）中找到。

醫藥組成物可以便利套組的方式提供，其中必須的物質被包裝入適合的容器中。該組成物可以單劑或多劑（即，多於一劑）的方式投藥。該多劑可同時投藥或連續（例如，跨越一段數天或數週的期間）投藥。該組成物較佳係調配

成單位劑量形式，每劑量包括相等的量，其為約 1 至 500 公克風車草屬植物整株植物（濕重）。

本發明進一步涵蓋將本發明之組成物可與以下已知藥劑共同投藥：抗-發炎的作用劑、抗-脂肪變性作用劑、抗-病毒、或抗-纖維樣變性作用劑。此外，其他普通用於保護肝臟的物質（例如水飛薊素）亦可與風車草屬植物組成物共同使用。所有這些作用劑或物質可與風車草屬植物混合在同一個組成物中或分開投藥。

以下實施例係提供以說明本發明並應理解其不以任何方式限制本發明的範圍。

實施例

在以下實施例中，以下縮寫具有以下意義。未定義的縮寫之意義為其等一般被接受之意義。

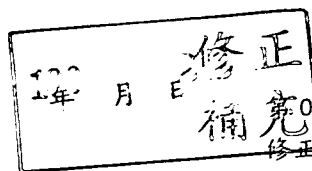
°C	=	攝氏度
hr	=	小時
min	=	分鐘
sec	=	秒鐘
μM	=	微莫耳濃度
mM	=	毫莫耳濃度
M	=	莫耳濃度
L 或 l	=	公升
ml	=	毫升
μl	=	微升
G 或 g	=	公克

mg	=	毫克
μg	=	微克
DMEM	=	度比寇之經修改的依格耳基質 (Dulbecco's modified Eagle's medium)
EGF	=	表皮生長因子
FBS	=	胎牛血清
MEM	=	經修改的依格耳基質 (modified Eagle's medium)
PBS	=	磷酸鹽緩衝食鹽水
PDGF	=	血小板衍生之生長因子
PEO	=	聚氧化乙烯 (polyethylene oxide)

材料及方法

試劑

DMN 與水飛薊素係得自席格瑪公司 (Sigma Comp 任何, 聖路易斯, 美國密蘇里州)。抗-α-SMA 與抗-類型 I 膠原抗體係購自卡爾生化-莫克 (Calbiochem-Merck, 劍橋, 美國麻薩諸塞州)。快速綠 (Fast Green) 係購自克爾 BDH 化學 (Curr, BDH Chemical, 加拿大), 而蘇木色素/伊紅染色試劑係得自席格瑪公司 (聖路易斯, 美國密蘇里州)。GOT、GPT、膽紅素、與白蛋白的套組係得自和光 (Wako, 東京, 日本)。有機溶劑係購自席格瑪化學公司 (Sigma Chemical Co., 聖路易斯, 美國密蘇里州)。華特門 (Whatman) 一號濾紙係購自費雪科學 (Fisher Scientific, 費耳龍 (Fair Lawn), 美國紐約)。



第094129642號專利申請案(100年6月)
修正後無劃線之說明書替換頁

風車草之製備

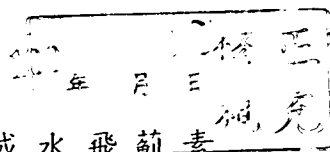
風車草係購自台灣的一個地方藥草農場。風車草係以蒸餾水清洗並以空氣乾燥過夜，接著以冷凍乾燥機於 -50°C 冷凍乾燥。風車草接著係磨成粉末(100網眼)、凍乾、並在使用前儲存在 4°C 密封狀態下。除非另加指明，風車草粹取物係藉由以下方式製備：將風車草粉末溶解於水中並緩緩地加入乙醇至最終濃度80%。在以 $1400\times g$ 離心20 min之後，將上清液以 $0.22-\mu\text{m}$ 過濾器過濾並於轉動蒸發器中蒸發至乾燥。以乙醇處理後之風車草粹取物回收率係65% (w/w)。將已乾燥的粹取物溶於水中至濃度為 50 mg/ml 以作為儲存溶液。儲存溶液接著被稀釋成適當的工作溶液。

動物

重量300至500g的雄性斯普雷格—多爾雷(Sprague-Dawley)大鼠係購自國家實驗動物繁殖與研究中心，國家科學委員會，台灣。所有的實驗皆按照國家實驗動物繁殖與研究中心之指導方針進行。

準備大鼠作為肝臟損害與纖維樣變性的動物模型

肝臟損害與纖維樣變性模型大鼠係如之前所報導的方式藉由將投藥DMN而準備(Pines等人, 1997)，其方法有稍做修改。簡單的說，以磷酸鹽緩衝溶液食鹽水(PBS)稀釋DMN並在每週頭三日腹膜內(i.p.)注射大鼠，每日 7 mg/kg ，共進行三週。控制組接受單獨注射PBS。



投藥風車草或水飛薊素

七十二隻大鼠被隨機地分成如以下之四個實驗組 (每組 $n = 18$) :

(1) PBS-水 (腹膜內注射 PBS 與口部施予水) ;

(2) DMN-水 (腹膜內注射 DMN 與口部施予水) ;

(3) DMN-風車草 (腹膜內注射 DMN 與第一次 DMN 注射一週之後口部投藥風車草) ; 與

(4) DMN-水飛薊素 (腹膜內注射 DMN 與第一次 DMN 注射一週之後口部投藥水飛薊素) 。

風車草粉末或水飛薊素係溶解於水中並每天口部給予 1 g/kg 體重 (風車草粉末) 的劑量或 0.4 g/kg 體重 (水飛薊素) 的劑量五週 (在第一次 DMN 注射七天之後開始) 。控制組動物只接受同樣體積的蒸餾水。處理六週之後, 秤重大鼠並犧牲之, 收集其等之血液樣本以供測定生化指標 (包括 GOT、GPT、膽紅素、凝血酶原時間、白蛋白、與血小板數目) , 並切出肝臟與脾臟、秤重、並以甲醛固定以進行組織化學研究。

肝臟之組織病理學檢查

肝臟樣本係以經磷酸鹽緩衝之甲醛固定, 包埋於石蠟中, 並蘇木色素-伊紅染色。成膠原與非成膠原蛋白質之差示性染色之進行, 係以 0.1% 天狼星紅 (Sirius red) 與 0.1% 快速綠作為對比染色於苦味酸進行。藉由此方法, 膠原被染色成紅色。纖維樣變性與結構改變之程度係以半定量方式評分, 其是由一獨立的病理學家以盲目的方式如

之前所述使用來自各組的肝臟製備物進行(Desmet 等人, 1994)。肝臟組織切片係使用顯微鏡(Olympus IX70, Japan)照相。

實施例 1

風車草預防由 DMN 誘發的身體與肝臟重量減輕

為測定風車草對肝臟損害與纖維樣變性之效果，使用 DMN（一種已知的對肝臟之毒性物質）建立一個動物模型。動物如材料與方法所述接受 DMN，接著被給予風車草並測定其效果。風車草屬植的效果亦與水飛薊素（其具有已知為肝臟保護性）的效果比較。正常的動物（其沒有接受 DMN）係用作為控制組。

口部投藥風車草對大鼠（其有或無接受腹膜內 DMN 注射）身體與肝臟重量的效果，係如表 1 顯示。與控制組（PBS—水組）大鼠相比，以 DMN 處理造成大鼠身體與肝臟重量重大的減少（DMN—水組）。口部餵食風車草明顯地預防這個 DMN-所介導的大鼠身體與肝臟重量減少（DMN—風車草組）；風車草也減少 DMN-所介導的大鼠脾臟重量增加。在正常控制組大鼠中未觀察到身體、肝臟、或脾臟重量之改變。這些結果象徵風車草顯著的減少 DMN 的有害衝擊。

表 1

處理六週後的身體、肝臟、脾臟重量與存活數目				
	存活數目	體重 (g)	肝臟重量 (g)	脾臟重量 (g)
控制組	18	556.5 ± 11.3 (n=18)	24.0 ± 1.4 (n=18)	1.0 ± 0.0 (n=18)
DMN	5	439.5 ± 10.6 (n=5)	14.0 ± 2.8 (n=5)	2.0 ± 0.2 (n=5)
DMN-GP	12	528.5 ± 7.8 (n=12)	23.0 ± 1.2 (n=12)	1.0 ± 0.2 (n=12)
DMN-水 飛薊素	10	472.0 ± 14.1 (n=10)	19.5 ± 1.4 (n=10)	1.5 ± 0.2 (n=10)

n, 組中大鼠存活的數目

此外，在六週之後，DMN-處理組中 18 隻大鼠中 13 隻死亡，DMN-水飛薊素-處理組中 18 隻大鼠中 8 隻死亡，而口部餵食風車草之 DMN-處理組中 18 隻大鼠中只有 6 隻死亡(圖 1)。所有沒有以 DMN、風車草、或水飛薊素處理的控制組大鼠(每組 18 隻)皆存活。因此，風車草有效地保護動物對抗 DMN 的毒性，並比水飛薊素更有效。

實施例 2

風車草對血清膽紅素、白蛋白、血小板與凝血酶原時間的效果

為進一步研究風車草對肝臟功能的效果，吾人測量肝臟功能的指數。如表 2 所顯示，共投藥風車草預防了以 DMN 處理之後之血清 GOT 與 GPT 水平的增加。此外，與正常控制組相比，在以 DMN 處理的大鼠中血清膽紅素水平與凝血酶原時間增加。然而，每日口部投藥風車

草在以 DMN 處理的大鼠中顯著的預防膽紅素增加與白蛋白減少。此外，以 DMN 處理導致血清血小板明顯的減少以及凝血酶原時間明顯地延長。相反的，在 DMN-風車草處理組中，凝血酶原時間的改善極大，而血小板數目一致性較高。

表 2

處理六週後的血清 GOT、GPT、PT、PLT、膽紅素、與白蛋白水平						
	GOT (U/L)	GPT (U/L)	PT (sec)	PLT ($10^3/\mu\text{l}$)	膽紅素 ($\mu\text{mole/L}$)	白蛋白 (g%)
控制組 (n=18)	83.0 $\pm$ 15.5	51.0 $\pm$ 11.3	12.1 $\pm$ 0.4	925.0 $\pm$ 49.4	0.13 $\pm$ 0.01	4.9 $\pm$ 0.3
DMN (n=5)	651.5 $\pm$ 41.7	273.5 $\pm$ 13.4	19.8 $\pm$ 1.1	171.0 $\pm$ 85.5	1.27 $\pm$ 0.04	3.2 $\pm$ 0.2
DMN-GP (n=12)	149.5 $\pm$ 2.1	71.0 $\pm$ 11.3	13.9 $\pm$ 1.4	818.0 $\pm$ 66.5	0.14 $\pm$ 0.02	4.9 $\pm$ 0.2
DMN-水 飛薊素 (n=10)	459.4 $\pm$ 37.6	217.5 $\pm$ 34.6	17.6 $\pm$ 1.2	334.3 $\pm$ 41.5	1.00 $\pm$ 0.04	3.5 $\pm$ 0.4

GOT, 麩胺酸草乙酸轉胺酶

GPT, 麩胺酸丙酮酸轉胺酶

PT, 凝血酶原時間

PLT, 血小板

n, 該組中生存大鼠之數目

因此，風車草顯著的加強肝臟功能。

實施例 3

在 DMN 投藥後風車草對發炎與壞死反應之效果

由於 DMN 誘發性肝臟損害被認為包括於發炎反應中，吾人接著提出以下問題：風車草是否在 DMN 中毒後預防在肝臟中的壞死或發炎反應。結果顯示，在 DMN 處理後過了三週之肝臟中，在中心周圍與中央地帶區域(具有發炎的細胞之滲透)觀察到大量壞死。然而，共投藥風車

草預防 DMN 誘發性壞死與發炎。因此，風車草可大量地預防在肝臟中的壞死與發炎反應。

實施例 4

在 DMN 處理之大鼠中藉由風車草預防肝臟成纖維

腹膜內投藥 DMN 造成肝臟表面上之一致的細粒。顯微鏡分析顯示在接受 DMN 六週的動物之肝臟中類似肝硬化的結構模式：在格力孫鞘之纖維性結締組織成分、假小葉形成、纖維變性性隔膜之形成、以及增厚的連接中央區域之網狀蛋白纖維。以 DMN 與水飛薊素兩者處理的動物仍然顯現強烈的小葉中心性與門靜脈周的纖維狀結締組織之堆積。相反的，接受風車草五週的 DMN 處理大鼠 (DMN-風車草組) 之肝臟只顯示溫和的連結性纖維樣變性、減少在門靜脈周與小葉中心性區域兩者之纖維樣變性、與減少肝臟腺泡之變形。因此，風車草可用以減少肝臟之成纖維、其係在肝硬化中的關鍵發展。

實施例 5

風車草減少肝臟膠原與羥基脯胺酸含量

在一個纖維變性的肝臟中，細胞外基質會累積。增加水平的細胞外基質對纖維樣變性之進一步進展係重要的，而纖維樣變性最終導致肝臟肝硬化。由於膠原係在細胞外基質中一主要的成分，吾人因此測定單獨以 DMN 處理之動物或以 DMN 和風車草組合處理的動物之膠原含量。

肝臟中膠原的含量係藉由快速綠染色測定。經 DMN 處

理的大鼠顯示在肝臟中的膠原纖維含量與圍繞小葉之膠原束逐漸與明顯的增加，造成大量纖維狀隔膜，其象徵嚴重纖維樣變性的開始。在經 DMN—水飛薊素—處理的大鼠中，肝臟膠原含量亦明顯的高於健康的控制組的肝臟膠原含量。然而，這些膠原束(在本文所使用的染色方法中被染色成紅色)的增厚，在經 DMN—風車草—處理動物中明顯減少。在控制組大鼠的肝臟中只有非常低水平的膠原堆積。以影像分析技術定量分析纖維樣變性顯示風車草與水飛薊素處理顯著地減少 DMN 誘發性肝臟膠原含量各自達 80% 與 25%。

肝臟纖維樣變性亦使用羥基脯胺酸定量。吾人發現 DMN 處理組的羥基脯胺酸含量(820 ± 31 微克/g)顯著的高於 DMN—風車草—處理組的羥基脯胺酸含量 (558 ± 53 微克/g)、DMN—水飛薊素—處理組的羥基脯胺酸含量(749 ± 72 微克/g)、與控制組的羥基脯胺酸含量(498 ± 22 微克/g)。

與前兩個實施例一致，這些結果證實風車草明顯地預防肝臟纖維樣變性。

實施例 6

風車草在 DMN—處理大鼠中之抑制 α -SMA 表現接著，吾人測量 α -SMA (一個活化的 HSC 之指標) 的表現。在一個纖維變性的肝臟中，細胞外基質會累積。細胞外基質水平的增加對纖維樣變性之進一步進展為重要，而纖維樣變性最終導致肝硬化。特別的肝臟細胞(肝臟星狀細胞(HSC))為細胞外基增加的原因。由於活化的 HSC

(與休止的 HSC 相反)產生大量的平滑肌 α -肌動蛋白(α -SMA) mRNA 與蛋白質，故 α -SMA 係活化的 HSC 與肝臟纖維樣變性的一個指標。

α -SMA 係藉由在第一次投藥 DMN 後六週免疫組織化學染色肝臟而測量。如預期的，在經 DMN 處理的肝臟之中心周圍區域中觀察到對 α -SMA 之強烈的、專一的染色。此 α -SMA 之 DMN-誘發性表現係大量地藉由口部投藥風車草或水飛薊素而抑制，而風車草比水飛薊素更有效。如預期的，來自接受媒介控制組的大鼠之肝臟顯示對 α -SMA 之陰性染色。再次的，這些發現象徵風車草預防肝臟中的成纖維反應。

實施例 7

風車草粹取物對培養之大鼠肝臟星狀細胞之抗增值效果

吾人製備各種風車草粹取物以測定風車草對肝臟星狀細胞之活性。粹取物係如下製備：

粗水性粹取物

冷凍乾燥風車草的整株植物並將其磨碎。五公克粉狀物質以 250 毫升水於 25°C 在轉動搖動器上以 100 rpm 粹取 2 小時。在冷凍乾燥之後粹取物之顏色為粉紅色。

水-酒精粹取物

上述之粗水性粹取物以活性炭 (0.036 g/mL 粹取物) 攪動 30 min。接著將混合物以華特門 1 號濾紙過濾，以蒸餾水洗滌兩次，並以 0.6 L 50% EtOH 粹取。過濾與真空

100. 年 月 日 修正
補充第 094129642 號專利申請案 (100 年 6 月)
修正後無劃線之說明書替換頁

蒸發之後，得到 300 mg 的暗褐色膏狀乾燥乙醇粹取物。主要的成分係醣苷、寡聚棒單寧(gallotannin)、與類黃酮。亦偵測到萜類(Terpenoid) 與皂素。該暗褐色膏狀物會溶於水中且部分溶於甲醇中。分析來自甲醇的沈澱物，而其包括多醣類與醣蛋白。

乙醇粹取物

在以 50%乙醇粹取之後，上述之活性炭接著以 0.6 L 95%乙醇粹取。過濾並真空蒸發之後，得到 200 mg 乾乙醇粹取物。這個暗褐色膏狀物的主要成分係類黃酮與萜類。

丙酮粹取物

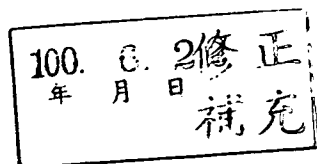
在以 95%乙醇粹取之後，以 0.6 L 乙氰粹取上面最後一段所述之活性炭，接著以 0.6 L 70%丙酮粹取。將粹取物結合在一起、過濾之並真空蒸發之以產生 50 mg 乾燥的丙酮粹取物。其主要的成分為寡聚棒單寧、類黃酮、皂素、與三萜類(triterpenoid)。這個暗褐色膏狀物溶於水、乙醇、以及甲醇。

三氯甲烷粹取物

在如上面最後一段所述以丙酮粹取之後，以 0.6 L 三氯甲烷粹取該活性炭。在過濾與真空蒸發之後，得到暗褐色膏狀物的乾燥丙酮粹取物。其主要成分是類黃酮、皂素、與三萜類。該暗褐色膏狀物係不溶於水且部分溶於丙酮中。該丙酮沈澱物為白色。

粗甲醇粹取物

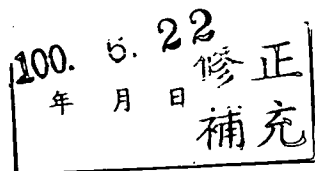
冷凍乾燥風車草的整株植物並磨碎之。以 250



毫升甲醇於 25°C 在轉動搖動器上以 100 rpm 兩小時粹取五公克的粉末物質兩次。過濾並真空蒸發粹取物。所得產物係部分溶於水。該水溶性部分包含 200 毫克的淡紅色類黃酮、而水不溶性部分包含 400 毫克類黃酮與三萜。

測試風車草部分對 HSC 增殖之效果。在六天的培養期間，細胞數目自 $1.2 \pm 0.3 \times 10^5$ ($n=9$) 增加至 $3.6 \pm 0.5 \times 10^5$ ($n=9$) 個細胞每槽孔。風車草粹取物以根據劑量以及根據時間的方式抑制了 HSC 細胞生長。將高劑量的風車草粗粹取物 (500 微克/毫升) 加入所培養之活化的大鼠 HSC 與肝細胞中五天後，導致 HSC 顯著的型態改變，其以光學顯微鏡判斷。因此，HSC 自具有明顯細胞-細胞介面之扁平成纖維細胞性表型改變成與基礎分離的、型態為圓形的細胞，其在培養瓶底部留下明顯細胞外基質網路系統。相反的，風車草的粗粹取物在相同劑量下對肝細胞幾乎沒有效果。因此，風車草對 HSC 較具有毒性且最終導致細胞死亡 (圖 2)。無意明限制於理論，此選擇性細胞毒性效果可能為風車草之抗-纖維變性活性的基礎。

測定各種風車草粹取物 (包括如上所述之水粹取物、水-乙醇粹取物、乙醇粹取物、甲醇粹取物、丙酮粹取物、與三氯甲烷粹取物) 之抗-增殖效果。如圖 3 中所顯示，所有所測試的風車草粹取物皆對肝臟星狀細胞顯現細胞毒性效果，象徵所有這些粹取物皆具有抗-纖維變性活性。



風車草的安全性係藉由進一步的實驗而測定。每天口部投藥高劑量的風車草 (5 g/kg 體重) 共 90 天並未在大鼠中造成任何明顯的不好副作用，且在對肝臟組織切片進行檢查時沒有死亡或肝臟損傷的證據。此外，與控制組或經低劑量風車草處理組 (1 g/kg) 相比，這些經風車草處理的大鼠並未顯現任何重大的在體重、肝臟重量、或血清 GOT、GPT、膽紅素、與白蛋白水平之改變 (數據未顯示)。因此，雖然風車草有效的地殺死活化的肝臟星狀細胞，即使在高劑量下，其對於正常細胞是安全的。

實施例 8

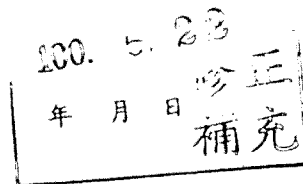
HbsAg 表現之抑制

風車草對 B 型肝炎病毒的效果係使用人類肝癌 Hep3B 與 HepA2 細胞測試，該等細胞結構性地表現 B 型肝炎病毒表面抗原 (HbsAg)。在於風車草粹取物中培養 Hep3B 與 HepA2 細胞之後，以 ELISA 分析測試 HbsAg 的表現水平。如圖 4 所示，以 250 μ g/ml 風車草處理顯著地減少自 Hep3B 與 HepA2 細胞的 HbsAg 分泌，各自達到 75% 與 40%。因此，風車草可用於抑制 B 型肝炎病毒複製。

實施例 9

風車草對臨床病患之效果

十四個病患被診斷具有肝臟脂肪變性 (10 為男性，4 為女性，；平均年齡 49 歲)。該診斷係藉由超音波照相



第 094129642 號專利申請案 (100 年 6 月)

修正後無劃線之說明書替換頁

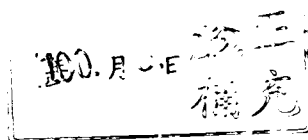
確認，而在所有病患中超音波照像皆顯示肝臟脂肪變性。該等病患每日接受口部劑量 60—200 mg/公斤體重的風車草(乾粉末)共六個月並再次以超音波照相測試。其結果顯示幾乎所有病患皆完全的自肝臟脂肪變性回復。因此，風車草對具有脂肪肝臟的病患非常有效。

此外，風車草顯著的改善具有輕微或中度肝臟纖維樣變性之病患的生化標記。例如，在一個研究中，風車草在 16 個病患中(11 個男性，5 個女性，平均年齡 52 歲)之 11 個人裡顯著地減少血清 GOT、GPT、與膽紅素之水平，且其提高血清白蛋白的水平。根據其等的超音波照相影像，亦發現風車草在許多病患中顯著的減少肝臟纖維樣變性。此外，風車草改善了四個具有末期肝硬化的病患(3 個男性，1 個女性，平均年齡 51 歲)之生活品質。

實施例 10

風車草對肺臟纖維樣變性的效果

肺臟成纖維細胞之分離：將肺臟組織的磨碎碎片以在含有 0.5 mM EDTA 的漢克平衡食鹽溶液(Hanks' balanced salt solution)中之膠原酶(0.5 mg/毫升)與 DNase (0.05mg/ml) 消化 1 小時。細胞以通過聚醯胺耐龍篩過濾而自經消化組織分離、以離心法收集、並以基質洗滌一次。在再懸浮於含有 10% FCS 的 DMEM 之後，將細胞接種至培養盤中。三代之後，培養物含有幾乎 100%的肺臟成纖維細胞。以各種風車草粹取物處理原代培養肺臟成



纖維細胞五天。在培養之後，使用台盼藍染料排除方法 (Trypan blue dye exclusion method) 直接計算細胞數目。

結果顯示所有所測試的風車草粹取物皆以根據劑量的方式抑制肺臟成纖維細胞的細胞生長 (圖 5)。對肺臟成纖維細胞的抗－增殖效果因此可作為風車草在肺臟中之抗－纖維變性活性的基礎。

實施例 11

風車草對肺臟的效果

使用一撲類惡 (bleomycin)－誘發性肺臟纖維樣變性動物模型以研究風車草對肺臟的效果。雄性 C57BL/6 小鼠 (6－8 週大) 以克他明麻醉並以氣管注射給予 0.15 U/kg 撲類惡 (布雷諾克森 (Blenoxane); 席格瑪－阿爾德里奇 (Sigma－Aldrich), 聖路易斯, 密蘇里州, 美國) 或無菌食鹽水。暴露至撲類惡 1、3、7、14、21 天後犧牲小鼠以分析。在另一個實驗中，以撲類惡處理之小鼠每日給予口部投藥 1 g/kg 體重的風車草粉末或水直到犧牲。用於此研究的動物係為台灣台中榮民總醫院的實驗動物管理與使用委員會所認同。

在實驗最後，隨機的選擇來自每個處理組的五隻動物以對其肝臟進行組織學評估，其方法如下。犧牲之後，將肺臟組織以經緩衝的 10% 福馬林溶液固定 48 h，並包埋於石蠟中。接著將組織切成 3 μ m 的切片，以蘇木色素與伊紅染色，並測試發炎細胞滲透與肺臟纖維樣變性。評分肺



臟纖維樣變性的標準係如下：0 級＝正常肺臟；1 級＝肺泡或細支氣管壁微量纖維性增厚；2 級＝增加的纖維樣變性，其對肺臟結構有明確的損傷與纖維條帶或小纖維性團的形成；以及 3 級＝肺臟結構嚴重變形與大型纖維性區域。

所有的小鼠皆生存直至殺死時，但只以撲類惡處理的小鼠患有重大的體重減少以及比以風車草處理的小鼠病症更嚴重。在組織學研究中，來自撲類惡/水組的肺臟顯示擴散且明顯的發炎細胞之滲透，以及增加的肺泡壁增厚，其有典型的纖維變性改變。相反的，來自撲類惡/風車草組的肺臟顯示較少的纖維變性損害與局部性發炎細胞滲透。來自風車草組（其未接受撲類惡）的肺臟並未顯示任何可辨認的損害，象徵風車草本身不會造成任何肺臟的改變。對撲類惡/風車草組的肺臟纖維樣變性之評分(1.4 ± 0.5)顯著的低於撲類惡/水組的肺臟纖維樣變性之評分(2.6 ± 0.4)。正常控制組（食鹽水/水）與風車草組（食鹽水/風車草）的各自大約 0 與 0。

這些結果與實施例 10 的結果一致，其象徵風車草抑制肺臟成纖維細胞的增殖。因此，風車草係對對抗肺臟的纖維樣變性與發炎有效。

已揭示數個本發明的具體態樣。無論如何，應瞭解可進行各種修改而不會偏離本發明的精神與範圍。

【圖式簡單說明】

圖 1 顯示接受媒介控制（控制組）、DMN 與風車草屬

植物 (DMN-GP)、DMN 與水飛薊素水飛薊素 (DMN-水飛薊素)、或只有 DMN 的大鼠生存之數目。

圖 2 顯示未加工的風車草粹取物對培養的大鼠肝臟星狀細胞的抗增殖效果。將大鼠肝臟星狀細胞培養於 250 或 500 微克/毫升的風車草未加工粹取物中，並每天計算存活的細胞之數目。所顯示的存活率係與未接受風車草之控制組細胞相比之百分存活率。

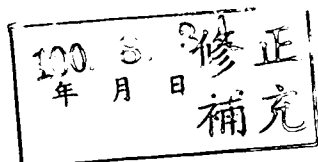
圖 3 顯示各種風車草粹取物對培養的大鼠肝臟星狀細胞的抗增殖效果。將大鼠肝臟星狀細胞培養於所指出的風車草粹取物中，並每日計算存活細胞的數目。所顯示的存活率係與未接受風車草之控制組細胞相比之百分存活率。

圖 4 顯示培養在所指出濃度的風車草粹取物中的 Hep3B 或 HepA2 細胞之 HbsAg 表現水平。

圖 5 顯示各種風車草粹取物對培養的小鼠肺臟成纖維細胞的抗增殖效果。將原代培養的肺臟成纖維細胞培養於所指出的風車草粹取物中，並在培養五日後計算存活細胞的數目。所顯示的存活率係與未接受風車草之控制組細胞相比之百分存活率。

【主要元件符號說明】

無



公告本

中華民國第 094129642 專利申請案
修正後無劃線之申請專利範圍替換本(100 年 8 月 31 日)

1. 一種用於製備預防或治療肝臟疾病或醫學病症藥物的醫藥組成物，其包括風車草 (*Graptopetalum paraguayense*) 萃取物，其中該肝臟疾病或醫學病症係選自由肝臟發炎、肝臟脂肪變性、肝臟纖維樣變性、肝硬化、以及 B 型肝炎所組成的群組，且該萃取物係一種一或多種水性溶劑、乙醇、丙酮、甲醇、或其混合物的萃取物。

2. 根據申請專利範圍第 1 項的醫藥組成物，進一步包括一醫藥上可接受的賦形劑或載劑。

3. 根據申請專利範圍第 1 或 2 項的醫藥組成物，其適合以口部或局部投藥。

4. 一種風車草 (*Graptopetalum paraguayense*) 萃取物用於製備預防或治療肝臟疾病或醫學病症藥物的用途，其中該肝臟疾病或醫學病症係選自由肝臟發炎、肝臟脂肪變性、肝臟纖維樣變性、肝硬化、以及 B 型肝炎所組成的群組，且該萃取物係一種一或多種水性溶劑、乙醇、丙酮、甲醇、或其混合物的萃取物。

5. 根據申請專利範圍第 4 項的用途，其中該肝臟疾病或醫學病症係肝臟發炎。

6. 根據申請專利範圍第 4 項的用途，其中該肝臟疾病或醫學病症係肝臟纖維樣變性。

7. 根據申請專利範圍第 4 項的用途，其中平滑肌 α -肌動蛋白的表現係減少的。

8. 根據申請專利範圍第 7 項的用途，其中平滑肌 α -肌

動蛋白在肝臟星狀細胞中的表現係減少的。

9. 根據申請專利範圍第 4 項的用途，其中該肝臟疾病或醫學病症係肝硬化。

10. 根據申請專利範圍第 4 項的用途，其中該肝臟疾病或醫學病症係 B 型肝炎。

11. 根據申請專利範圍第 4 項的用途，其中該肝臟疾病或醫學病症係肝臟脂肪變性。

12. 一種風車草 (*Graptopetalum paraguayense*) 萃取物用於製備抑制肝臟星狀細胞增殖藥物的用途，其中該萃取物係一種一或多種水性溶劑、乙醇、丙酮、甲醇、或其混合物的萃取物。

13. 根據申請專利範圍第 12 項的用途，其中該肝臟星狀細胞係位於哺乳類動物。

14. 根據申請專利範圍第 13 項的用途，其中該哺乳類動物係人類。

15. 一種風車草 (*Graptopetalum paraguayense*) 萃取物用於製備選擇性殺死肝臟星狀細胞藥物的用途，其中該萃取物係一種一或多種水性溶劑、乙醇、丙酮、甲醇、或其混合物的萃取物。

16. 根據申請專利範圍第 15 項的用途，其中該肝臟星狀細胞係位於哺乳類動物。

17. 根據申請專利範圍第 16 項的用途，其中該哺乳類動物係人類。

18. 一種風車草 (*Graptopetalum paraguayense*) 萃取物用於製備抑制 B 型肝炎病毒表面抗原表現藥物的用途，其中該萃取物係一種一或多種水性溶劑、乙醇、丙酮、甲醇、或其混合物的萃取物。

19. 根據申請專利範圍第 18 項的用途，其中 B 型肝炎病毒複製係在哺乳類動物中被抑制。

20. 根據申請專利範圍第 19 項的用途，其中該哺乳類動物係人類。

21. 一種風車草 (*Graptopetalum paraguayense*) 萃取物用於製備預防或治療肺臟之纖維樣變性或發炎藥物的用途，其中該萃取物係一種一或多種水性溶劑、乙醇、丙酮、甲醇、或其混合物的萃取物。

22. 根據申請專利範圍第 21 項的用途，其中該藥物係以口部投藥。

23. 根據申請專利範圍第 21 項的用途，其中該藥物係以注射投藥。

公告本

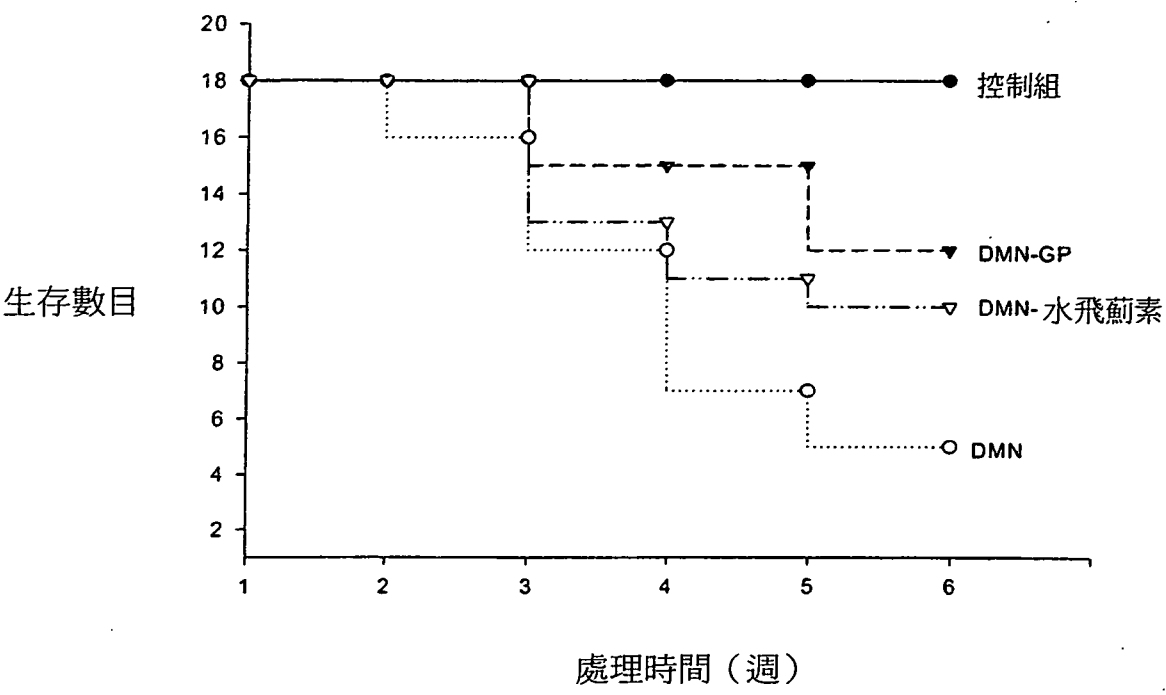


圖 1

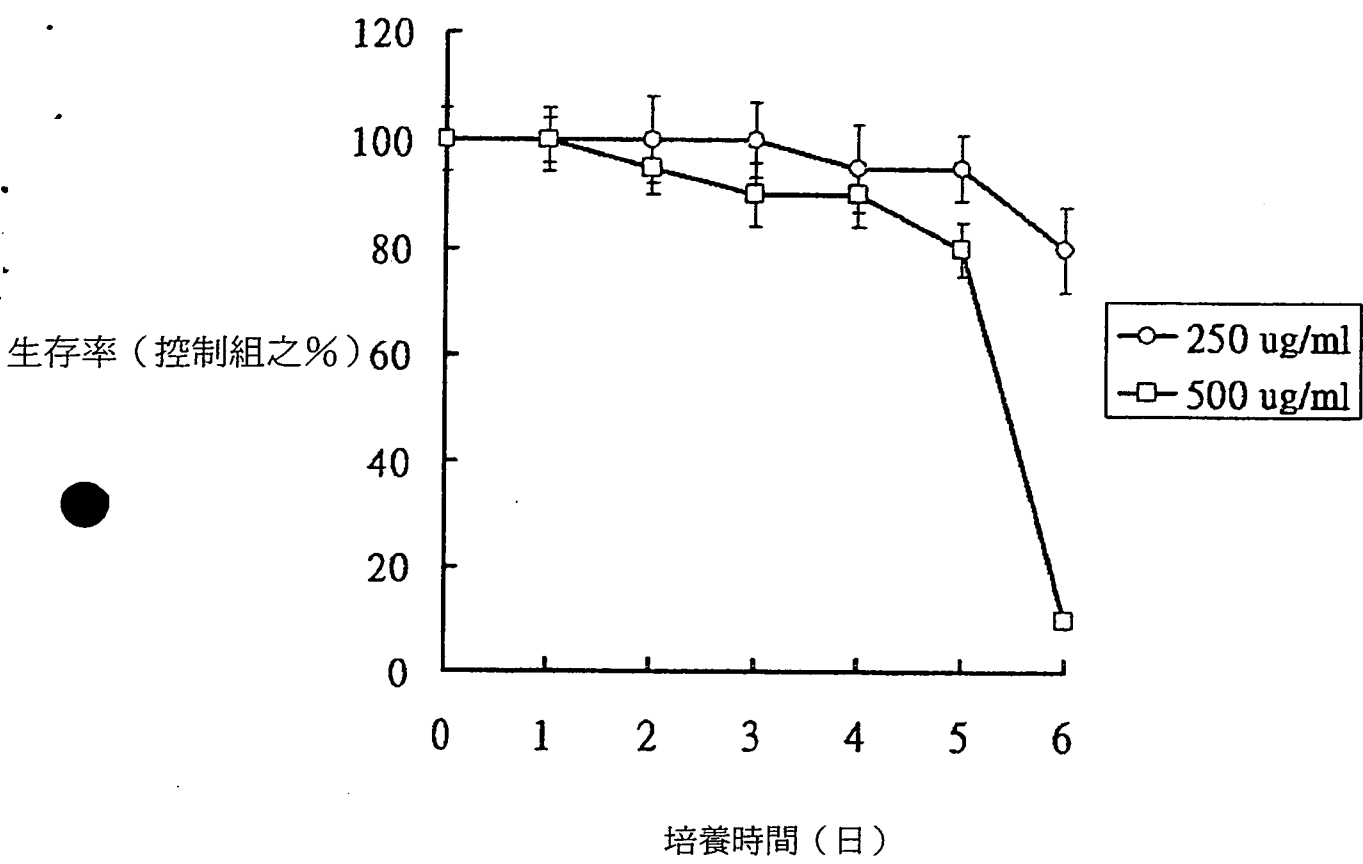


圖 2

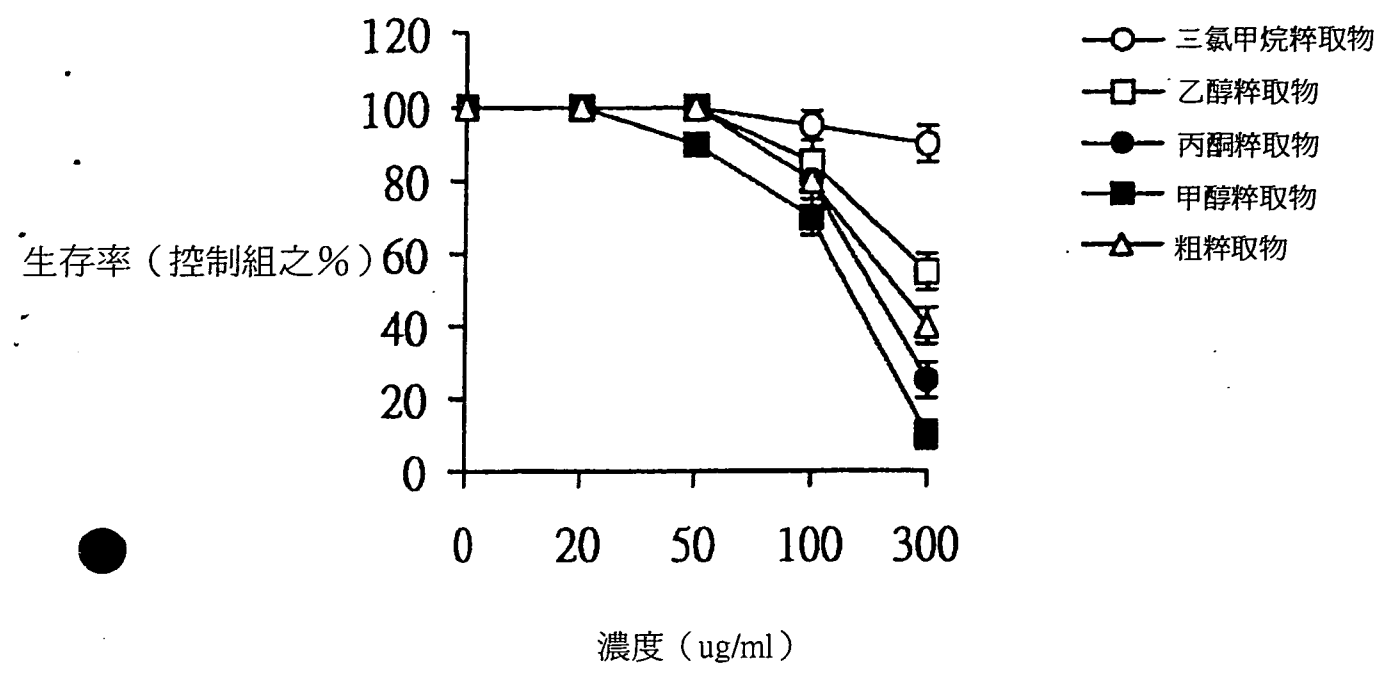


圖 3

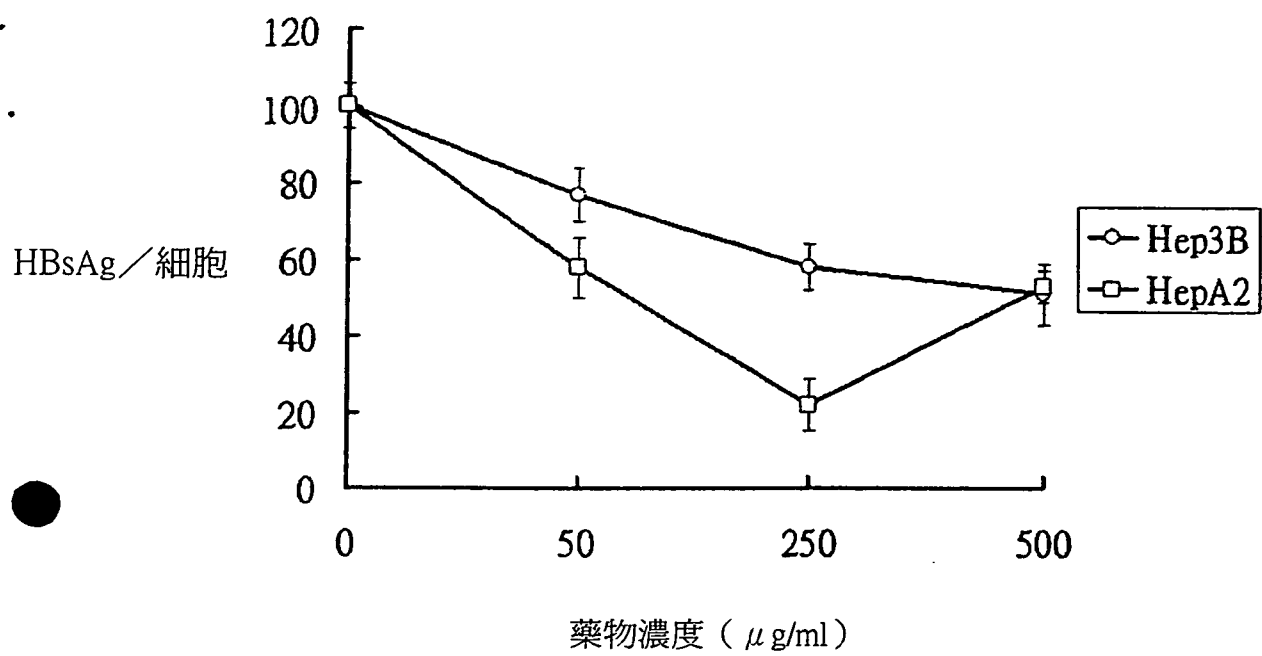


圖 4

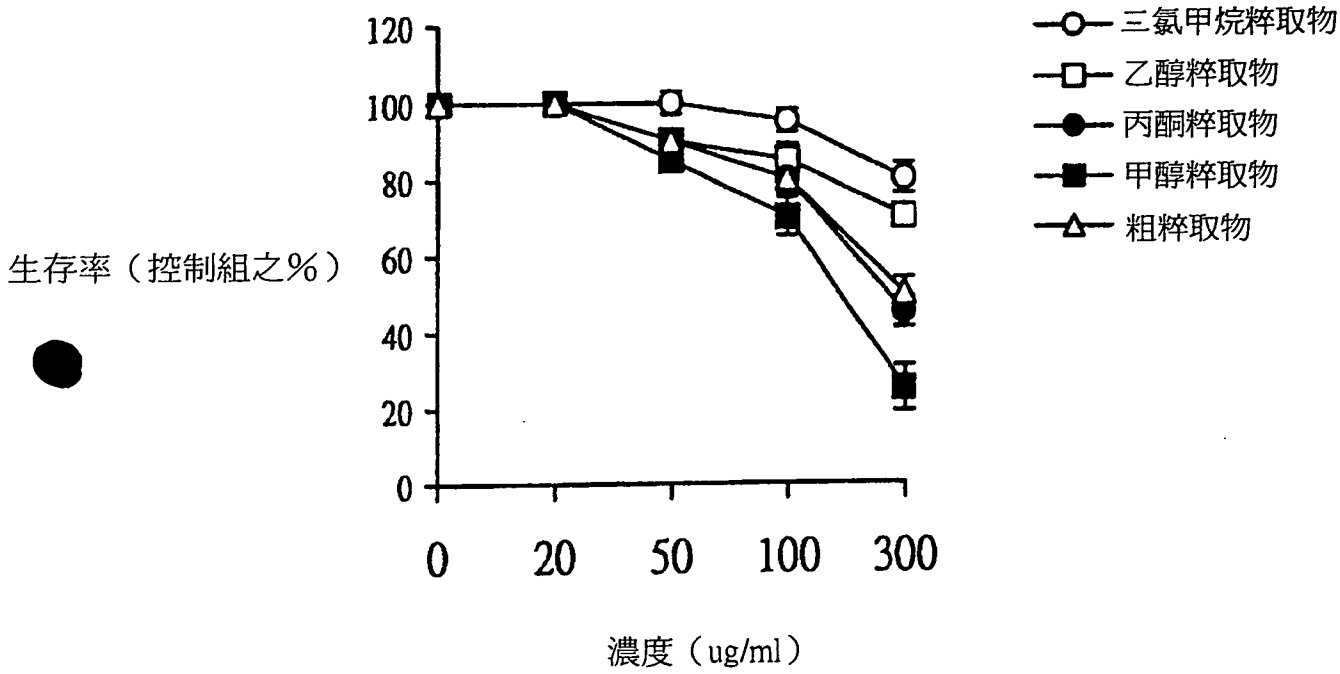


圖 5