



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201130809 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 09 月 16 日

(21)申請案號：099105793

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 03 月 01 日

(51)Int. Cl.：

C07D311/02 (2006.01)

A61K31/352 (2006.01)

A61P37/08 (2006.01)

A61P11/00 (2006.01)

(71)申請人：中國醫藥大學(中華民國) CHINA MEDICAL UNIVERSITY (TW)

臺中市北區學士路 91 號

(72)發明人：李珍珍 LEE, CHEN CHEN (TW)；王建能 WANG, CHIEN NENG (TW)

(74)代理人：陳翠華

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：14 項 圖式數：16 共 38 頁

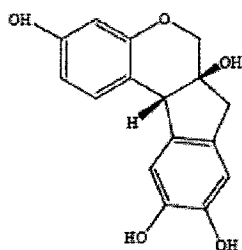
(54)名稱

用於抑制第二型 T 輔助細胞之細胞激素之生成及 / 或抑制趨化激素之生成之含蘇木素之醫藥組合物及其應用

PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING BRAZILIN FOR INHIBITING EXPRESSION OF CYTOKINES OF T HELPER CELL TYPE II AND/OR INHIBITING EXPRESSION OF CHEMOKINES AND USES OF THE SAME

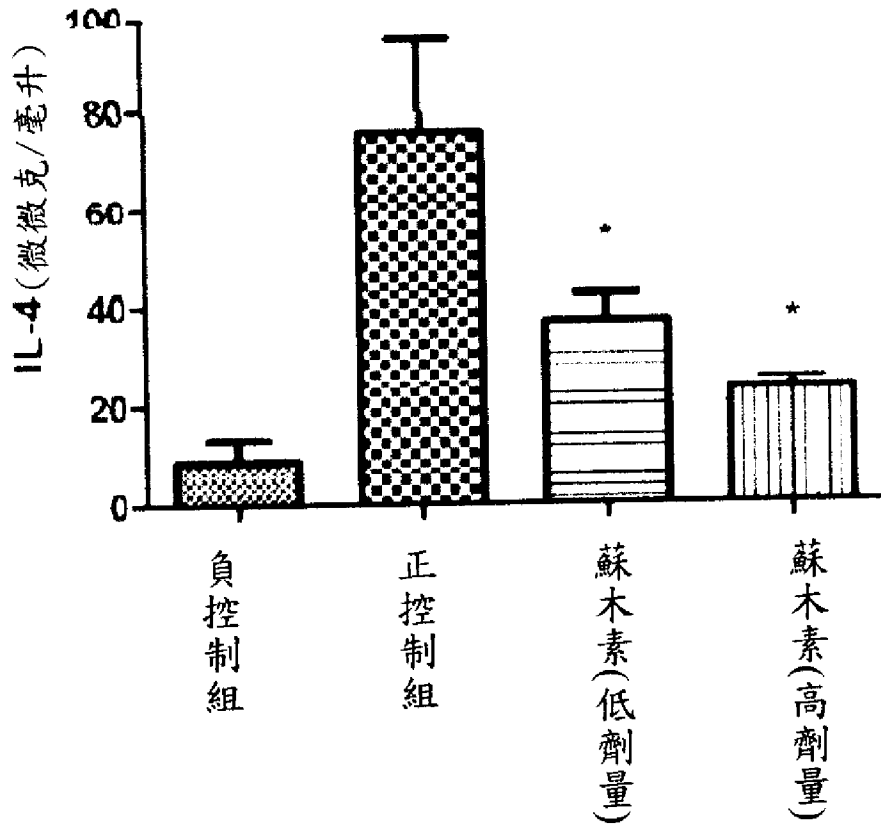
(57)摘要

一種用於抑制第二型 T 輔助細胞之細胞激素之生成及/或抑制趨化激素之生成之醫藥組合物，其係包含一有效量之活性成分，其中該活性成分係選自以下群組：式(I)化合物、其醫藥可接受鹽及酯、或前述之組合：



(I)。

一種使用式(I)化合物及/或其醫藥可接受鹽及/或酯在製造藥劑之應用。



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於蘇木素 (brazilin) 於抑制第二型 T 輔助細胞之細胞激素之生成及/或抑制趨化激素 (chemokine) 之生成之應用。

【先前技術】

過敏症係普遍性之疾病，程度較輕者包括由食物或昆蟲叮咬所引起的過敏，較嚴重者則包括異位性皮膚炎、過敏性鼻炎、氣喘等過敏性疾病。近數十年來，由於工業化與文明的進步，造成環境污染與人類飲食習慣改變，故全世界之過敏性疾病的發生率及嚴重程度皆有日益增加之趨勢。

就過敏性疾病之治療而言，目前仍以藥物控制的方式為主。儘管市面上已有抗過敏藥物，例如皮質類固醇 (corticosteroids)、抗組織胺劑 (anti-histamines) 及抗白三烯素 (anti-leukotrienes) 等，但仍有大約百分之五的過敏症病患無法經由使用該等藥物而有效控制病情。此外，該等藥物各具不同副作用，例如：皮質類固醇會造成體重增加、水腫、高血壓、鉀流失等；抗組織胺劑會引起嗜睡、頭痛、視力模糊等；抗白三烯素則會導致腸胃不適等等。再者，該等藥物的最大問題在於，一旦停止用藥，過敏症狀（例如發炎反應等）便會快速地復發，故無法用於長效性或持久性之治療。

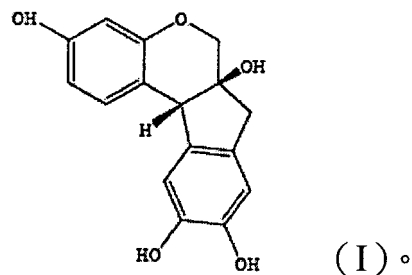
另一方面，過敏性疾病亦可經由服用中藥來進行治療。然而，目前市面上用於治療過敏性疾病之中藥多為複方，故於藥物之製備及藥量與藥效之控制上，仍存在許多問題。

鑒於西醫與中醫對於過敏症之治療方法，仍有前述缺點，是故，對於可有效治療過敏性疾​​病、副作用低、且易於製備之物質或醫藥組合物之需求仍持續存在。

本發明係針對上述需求所為之研究，本案發明人經由活體內 (*in vivo*) 及活體外 (*in vitro*) 之相關實驗，確認蘇木素可抑制第二型 T 輔助細胞 (T helper cell type II, Th2 cell) 之細胞激素之生成，以及抑制趨化激素 (chemokine) 之生成，且可經由調控根本之免疫機制，達成長效性控制或治療過敏性疾​​病之效果。

【發明內容】

本發明之一目的在於提供一種用於抑制第二型 T 輔助細胞 (T helper cell type II, Th2 cell) 之細胞激素之生成及/或抑制趨化激素 (chemokine) 之生成的醫藥組合物，其係包含一有效量之活性成分，其中該活性成分係選自以下群組：式 (I) 化合物、其醫藥可接受鹽及酯、或前述之組合：



本發明之另一目的在於提供一種使用式 (I) 化合物及/或其醫藥可接受鹽及/或酯在製造藥劑之應用，其中該藥劑係用於抑制第二型 T 輔助細胞之細胞激素之生成及/或抑制趨化激素之生成。

本發明之又一目的在於提供一種抑制第二型 T 輔助細胞之細胞

激素之生成及/或抑制趨化激素之生成的方法，其係包含對於有此需求之標的投以有效量之式 (I) 化合物及/或其醫藥可接受鹽及/或酯。

本發明之技術及較佳實施態樣，將描述於以下內容中，以供本發明所屬領域具通常知識者據以明瞭本發明之特徵。

【實施方式】

除非文中有另外說明，於本說明書中（尤其是在後述專利申請範圍中）所使用之「一」、「該」及類似用語應理解為包含單數及複數形式。此外，「細胞激素之生成」一語係包含細胞激素之產生、表現及釋放，且「趨化激素之生成」一語係包含趨化激素之產生、表現及釋放。

T 細胞在免疫機制中扮演關鍵之角色，且依據其分泌之細胞激素種類而定，可分化成二類細胞：第一型 T 輔助細胞（即 Th1 細胞），可產生干擾素- γ （interferon- γ ，IFN- γ ）及介白素-2（interleukin-2，IL-2）；第二型 T 輔助細胞（即 Th2 細胞）則可產生介白素-4（IL-4）、介白素-5（IL-5）、介白素-6（IL-6）及介白素-10（IL-10）。其中，Th1 細胞可幫助殺手細胞，並藉由分泌 IFN- γ 來活化巨噬細胞，以促進細胞性免疫反應，而 Th2 細胞則可協助 B 細胞產生過敏性抗體 IgE，並藉由分泌 IL-4 與 IL-5 來活化肥大細胞（mast cell）或嗜酸性白血球（eosinophil），使其分泌發炎介質，包括組織胺（histamine）、白三烯素（leukotriene）、前列腺素（prostaglandine）等。Th1 細胞與 Th2 細胞具有互相拮抗之關係，Th1 細胞釋放之 IFN- γ 會抑制 Th2 細胞，而 Th2 細胞釋放

之 IL-4 或 IL-10 則會抑制 Th1 細胞產生 IFN- γ 。

因此，Th1 細胞與 Th2 細胞之間的交互作用會影響生理免疫反應，且與許多疾病有極大之相關性。舉例言之，已知過高的 Th2 細胞活性會導致過敏，進而引起過敏性疾病，例如呼吸道過敏，導致過敏性咳嗽或過敏性氣喘；此外，已有文獻證明，Th2 細胞之免疫反應的提升，會促進致癌物誘導大腸癌形成的作用（此可參見 Osawa *et al.* Predominant T helper type 2-inflammatory responses promote murine colon cancers. *Int J Cancer*. 2006. 118(9): 2232-6，其全文併於此處以供參考）。另一方面，若 Th1 細胞之活性過高，則會引起自體免疫功能異常。是故，若能調控 Th1 細胞與 Th2 細胞之間的免疫平衡，使二者活性維持於正常狀態，則可治療自體免疫疾病、改善過敏（包括過敏性咳嗽或過敏性氣喘）及抑制大腸癌。

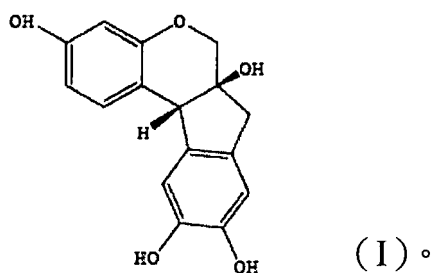
此外，於免疫機制中，免疫細胞所分泌之細胞激素亦包含趨化激素（chemokine），其依分子結構可分為 α -趨化激素（CXC 趨化激素）、 β -趨化激素（CC 趨化激素）、 γ -趨化激素（C 趨化激素）及 δ -趨化激素（CX₃C 趨化激素）。趨化激素具有趨化性（chemotactic），其可選擇性（或專一性）地吸引不同的免疫細胞至特定部位進行免疫反應；舉例言之，最普遍的兩種趨化激素， α -趨化激素與 β -趨化激素會分別吸引嗜中性白血球（neutrophil）與嗜酸性白血球等。

已知治療過敏性疾病之藥物包含皮質類固醇、抗組織胺劑及抗白三烯素等，其作用對象皆係肥大細胞或嗜酸性白血球所分泌之

發炎介質；換言之，該等藥物係針對 Th2 細胞之後段（或下游）免疫反應進行抑制調控，而非自過敏症之病源處進行治療。

本案發明人發現，蘇木素（brazilin）具有抑制 Th2 細胞之細胞激素之生成的活性，故可用以抑制 Th2 細胞之細胞激素之生成，自 Th2 細胞之免疫反應的初期階段即進行抑制調控，達成抑制過敏性疾病之病源的效果。另一方面，本案發明人亦發現，蘇木素具有抑制趨化激素之生成的活性，尤其可抑制 β -趨化激素之生成。如上所述， β -趨化激素會吸引嗜酸性白血球，而嗜酸性白血球與 Th2 細胞之免疫反應有關，是故，可使用蘇木素及/或其醫藥可接受之鹽及/或酯，經由抑制 β -趨化激素之生成，來抑制 Th2 細胞之免疫反應，達成治療過敏性疾病之效果。

因此，本發明提供一種用於抑制 Th2 細胞之細胞激素之生成及/或抑制趨化激素之生成之醫藥組合物，其係包含一有效量之活性成分，其中該活性成分係選自以下群組：式（I）化合物、其醫藥可接受鹽及酯、及前述之組合：



其中，式（I）化合物即蘇木素，其係來自蘇木科（the *Caesalpinaceae* family）植物，常用於布料染色及細胞染色等。

本發明之醫藥組合物可抑制 Th2 細胞之 IL-4 及 IL-5 細胞激素之至少一者的生成及/或抑制 β -趨化激素之生成。其中，蘇木素可抑

制 IL-4 之轉錄因子 c-maf 及 IL-5 之轉錄因子 GATA 結合蛋白 3 (GATA-3, GATA binding protein 3) 的表現，進而抑制 IL-4 及 IL-5 之蛋白質與 mRNA 的表現。尤其，蘇木素可抑制 eotaxin (CCL11) 之生成。eotaxin 係一種 β -趨化激素，相較於其他 β -趨化激素 (例如 CCL5)，其對嗜酸性白血球具有更強之選擇性。因此，經由抑制 eotaxin 之生成，本發明醫藥組合物可更專一性地抑制過敏性免疫反應。

由於本發明之醫藥組合物具有抑制 Th2 細胞之細胞激素及/或 β -趨化激素之生成的功效，故可經由調節 Th2 細胞之免疫反應，以治療過敏性疾病。其中，經由氣喘小鼠之動物試驗模式證實，蘇木素可有效減輕呼吸道過敏症狀，包括抑制呼吸道發炎及降低呼吸道阻力，說明本發明醫藥組合物可用於抗過敏性氣喘。

本發明另提供一種使用式 (I) 化合物及/或其醫藥可接受鹽及/或酯在製造藥劑之應用，其中該藥劑係用於抑制 Th2 細胞之細胞激素之生成及/或抑制趨化激素之生成。特定言之，該藥劑係用於抑制 IL-4 及 IL-5 細胞激素之至少一者的生成、以及抑制 β -趨化激素的生成，故具有治療過敏性疾病、抑制呼吸道發炎、降低呼吸道阻力、以及抗過敏性氣喘等功效。

可以任何合宜之方式施用本發明醫藥組合物，舉例言之，但不以此為限，可以口服、皮下或靜脈內等投藥方式施用之。該醫藥組合物可使用於獸醫與人類醫藥上，單獨或與醫藥佐劑一起使用。

以製備適於口服投藥之藥劑形式為例，可於本發明醫藥組合物中含有不會不利影響式 (I) 化合物活性之佐劑，例如：溶劑、油

性溶劑、稀釋劑、安定劑、吸收延遲劑、崩散劑、乳化劑、黏合劑、潤滑劑、吸濕劑等。舉例言之，溶劑可選自水及蔗糖溶液，稀釋劑可選自乳糖、澱粉及微晶纖維素，吸收延遲劑可選自幾丁聚醣及葡萄胺基聚醣，潤滑劑可選自碳酸鎂，油性溶劑可選自植物或動物油類，如橄欖油、葵花油及魚肝油等。可利用習知方法，將該組合物製成合宜的口服投藥形式，例如：錠劑、膠囊劑、顆粒劑、散劑、流浸膏劑、溶液劑、糖漿劑、懸液劑、乳劑、及酞劑等等。

至於具適於皮下或靜脈內投藥之藥劑形式，則可於本發明醫藥組合物中含有一或多種例如增溶劑、乳化劑、以及其他佐劑等成分，以製成如靜脈輸注液、乳劑靜脈輸注液、注射劑、乾粉注射劑、懸液注射劑、或乾粉懸液注射劑等。可能採用之溶劑例如：水、生理食鹽溶液、醇類（例如：乙醇、丙醇、或甘油等）、糖溶液（例如：葡萄糖或甘露糖溶液）、或前述之組合。

本發明醫藥組合物可視需要另含有調味劑、調色劑、著色劑等添加劑，以提高所得藥劑服用時的口適感及視覺感受；另可添加合理用量之保存劑、防腐劑、抗菌劑、抗真菌劑等，以改善所得藥劑的儲存性。

再者，可視需要於本發明醫藥組合物中併含一或多種其他活性成分，進一步加強本發明醫藥組合物之功效或增加製劑配方的運用靈活性與調配度。舉例言之，可於本發明醫藥組合物含有一或多種如下活性成分：皮質類固醇、抗組織胺劑及抗白三烯素，以及其他活性成分等，只要該其他活性成分對式 (I) 化合物之效益

沒有不利的影響即可。

可以一日一次、一日多次、或數日一次等不同投藥頻率施用本發明醫藥組合物，端視投予標的之需求而異。舉例言之，當使用於人體以抗過敏性氣喘時，藥劑之用量，以式 (I) 化合物計，為每天約 0.25 微克/公斤體重至約 2.5 微克/公斤體重，其中，該單位『微克/公斤體重』係指每公斤體重所須之投藥量。較佳地，該藥劑之用量，以式 (I) 化合物計，為每天約 0.30 微克/公斤體重至約 2.5 微克/公斤體重。惟，對於急性病患（如急性氣喘病患）而言，其用量可視實際需要而酌增至數倍或數十倍。

茲以下列具體實施態樣以進一步例示說明本發明。其中該些實施態樣僅提供作為說明，而非用以限制本發明之範疇。

[實施例 1] *in vitro* 試驗

實驗 A、細胞培養

於此實施例中，評估蘇木素對於 Th2 細胞之細胞激素的影響。所使用之藥品與試劑為：蘇木素，購自 EMD chemical Inc.，Darmstadt，德國；脂多醣（LPS，lipopolysaccharides，來自 *Escherichia coli* 055:B5）、卵白蛋白（OVA，ovalbumin）、巴豆醇-12-肉豆蔻酸鹽 13-醋酸鹽（PMA，phorbol-12-myristate 13-acetate）、及環腺嘌呤核苷單磷酸（cAMP，cyclic adenosine monophosphate），購自 Sigma Chemical，St. Louis，密蘇里州，美國；RPMI-1640 培養基、DMEM 培養基、漢克斯平衡鹽溶液（HBSS Hank's balanced salt solution）、盤尼西林、鏈黴素、L-麩胺酸、及

胎牛血清 (FBS, fetal bovine serum), 購自 Invitrogen, Carlsbad, 加州, 美國。

首先, 於 37°C 之含有 5 體積%二氧化碳之培養箱中, 將 EL-4 小鼠 T 淋巴瘤細胞 (lymphoma cell, 購自 ATCC, Manassas, 維吉尼亞州, 美國) 培養於 DMEM 培養基 (含有 10 重量%經熱去活之胎牛血清) 中, 並以 1:3 之比率繼代培養。

接著, 以 5×10^5 細胞/毫升之密度, 將 T 淋巴瘤細胞種至六孔培養皿內, 並於零分鐘時, 以 1 微升/每毫升細胞培養液之添加量, 將不同濃度 (0.3、1、3、10、或 30 毫莫耳濃度) 的蘇木素添加至細胞培養液中, 再將細胞置入培養箱中培養。30 分鐘後, 以 1 微升/每毫升細胞培養液之添加量, 將 5 微克/毫升 PMA 和 250 毫莫耳濃度 cAMP 添加至細胞培養液中, 以刺激 T 淋巴瘤細胞之 IL-4 及 IL-5 表現。於細胞培養過程中, 利用錐藍排除分析法 (trypan blue exclusion assay) 觀察蘇木素對細胞存活率之影響, 結果如表 1 及第 1 圖所示。

表 1

蘇木素濃度 (微莫耳濃度)	*細胞存活率(%)
0	100.0 ± 5.738
0.3	102.8 ± 6.895
1	106.5 ± 1.190
3	101.5 ± 4.226
10	111.5 ± 5.126
30	98.17 ± 8.439
PMA + cAMP	102.0 ± 3.416
0.3	115.9 ± 6.968
1	107.4 ± 3.829
3	109.0 ± 3.764
10	100.8 ± 3.257

30	104.7 ± 2.495
----	---------------

*平均值±標準誤差，取樣數≥3。

自表 1 及第 1 圖可看出，蘇木素對 EL-4 T 淋巴瘤細胞之生長沒有影響，故說明其不具細胞毒性。

實驗 B、蛋白質分析

於 4°C 下，以磷酸鹽緩衝液 (PBS, phosphate buffer saline) 清洗由實驗 A 得到的 T 淋巴瘤細胞，再添加 200 微升溶胞緩衝液(包含 50 毫莫耳濃度三羥甲基氨基甲烷-鹽酸 (Tris-HCl) 緩衝液、1 重量% NP-40、150 毫莫耳濃度氯化鈉、1 毫莫耳濃度乙二醇雙(2-氯乙基醚)四乙酸 (EGTA)、1 毫莫耳濃度苯基甲基磺醯化氟 (PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride)、1 毫克/毫升 leupeptin(N-乙醯基-白胺醯基-白胺醯基-精胺酸基)、1 毫克/毫升 pepstatin (胃蛋白酶抑制劑)、pH 7.4 之 0.5 毫莫耳濃度 NaVO₄)，靜置於 4°C 下達 30 分鐘後，於 12,000 轉/分鐘之轉速及 4°C 之溫度下進行離心 20 分鐘，並收集上清液。

以 BCA 蛋白質測試套組 (Pierce, Rockford, 伊利諾州, 美國) 定量上述上清液中之蛋白質。細胞核蛋白質之製備則係利用 NE-PERTM 套組 (Pierce, Rockford, 伊利諾州, 美國)，並參照製造商之產品說明進行萃取而取得。

接著，進行西方點墨法 (western blotting)。將蛋白質與 4X 蛋白質樣品緩衝液 (包含 pH6.8 之 31.25 毫莫耳濃度 Tris-HCl、1% 十二烷基磺酸鈉 (SDS)、25% 巯乙醇 (mercaptoethanol)、0.00625% 溴酚藍 (bromophenol blue)、及 50 體積% 甘油 (glycerol)) 以 3 :

1 體積比之比例混合後，以 95°C 之水浴加熱 5 分鐘。將蛋白質樣品加入至 10% SDS-PAGE 膠體中，以 80 伏特至 150 伏特電壓進行電泳後，再轉印至聚偏二氟乙烯膜（PVDF membrane，polyvinylidene fluoride microporous membrane）上，隨後將轉漬膜浸置於阻隔緩衝液（blocking blocking，包含 5% 脫脂牛奶、10 毫莫耳濃度 Tris-base、100 毫莫耳濃度氯化鈉、pH 7.5 之 0.1% 吐溫-20（Tween 20））中。30 分鐘後，以 TBST 緩衝液（包含 10 毫莫耳濃度 Tris-base、100 毫莫耳濃度氯化鈉、pH 7.5 之 0.1% Tween 20）清洗轉漬膜，再添加 GATA-3、c-maf 及 T-bet 之一級抗體（購自 Santa Cruz Biotechnology, Inc.，加州，美國），並於室溫下作用 2 小時。接著，清洗轉漬膜，再添加經山葵過氧化酵素標定（horseradish peroxidase-labeled）之二級抗體，並於室溫下作用 1 小時。最後，使用化學螢光（chemiluminescence）試劑（購自 PerkinElmer Life Science, Inc.，波士頓，麻薩諸塞州，美國）使底片感光，以偵測 GATA-3、c-maf 及 T-bet 蛋白質的表現。

另一方面，利用酵素連結免疫吸附（ELISA，enzyme-linked immunosorbent assay）套組（R&D Systems, Inc.，美國）分析上述細胞上清液中 IFN- γ 、IL-4、IL-5、及 eotaxin 等細胞激素的表現，結果係如表 2、表 3、第 2 圖及第 3 圖所示。

於實驗 B 及以下實驗 C 中，所有實驗數據皆以『平均值±標準誤差』呈現，並利用 one-way ANOVA 及 Newman-keuls 事後檢定方法分析統計差異，且 $p < 0.05$ 係視為有統計差異。

表 2

蘇木素濃度 (微莫耳濃度)	IL-4 濃度 (微微克/毫升)
控制組	4.541 ± 0.3480
0.3	2.569 ± 0.1160
1	5.353 ± 1.276
3	5.469 ± 0.1160
10	7.093 ± 0.3480
30	4.715 ± 0.9859
PMA + cAMP 控制組	27.42 ± 0.8208
0.3 + PMA + cAMP	23.93 ± 2.214
1 + PMA + cAMP	22.49 ± 1.969
3 + PMA + cAMP	23.45 ± 2.693
10 + PMA + cAMP	23.13 ± 2.297
30 + PMA + cAMP	18.71 ± 1.206 ***

相較於 PMA + cAMP 控制組，*: p<0.05，**: p<0.01，***: p<0.001，平均值±標準誤差，取樣數 ≥ 3。

表 3

蘇木素濃度 (微莫耳濃度)	IL-5 濃度 (微微克/毫升)
控制組	9.881 ± 2.473
0.3	5.925 ± 3.462
1	0.2422 ± 0.2422
3	0.2422 ± 0.2422
10	1.474 ± 0.9891
30	0.0 ± 0.0
PMA + cAMP 控制組	3179 ± 167.9
0.3 + PMA + cAMP	2480 ± 515.9
1 + PMA + cAMP	2580 ± 402.8
3 + PMA + cAMP	2345 ± 392.6
10 + PMA + cAMP	1809 ± 337.9 *
30 + PMA + cAMP	1292 ± 531.6 *

相較於 PMA + cAMP 控制組，*: p<0.05，**: p<0.01，***: p<0.001，平均值±標準誤差，取樣數 ≥ 3。

自表 2、表 3、第 2 圖及第 3 圖可看出，蘇木素可抑制 Th2 細胞之細胞激素 IL-4 及 IL-5 之蛋白質的表現。

實驗 C、mRNA 分析

利用即時聚合酶連鎖反應 (real-time PCR) 定量分析 IL-4、IL-5、GATA-3、c-maf、及 T-bet 之 mRNA 的表現，其係於萃取出實驗 A 之細胞中之 RNA (利用 RNA 純化套組) 後，將其反轉錄成 cDNA，再使用 ABI PRISM 7700 序列偵測儀 (Applied Biosystems, Foster City, 加州, 美國) 分析 mRNA 之基因表現。PCR 之條件為：50°C，2 分鐘；95°C，10 分鐘；60°C，1 分鐘；重覆循環四十次。以門檻循環 (threshold cycle, 或稱閾值 (Ct)) 表示每個基因的表現量，並以內生性控制組 (endogenous control) 之次黃嘌呤鳥嘌呤磷酸核糖轉移酶 (HPRT, hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase) 基因之表現量做為 mRNA 表現量之校正。結果係如表 4 至表 8、第 4 圖至第 8 圖所示。

表 4

蘇木素濃度 (微莫耳濃度)	IL-4 mRNA 表現程度
控制組	1.066 ± 0.04998
PMA + cAMP	2.662 ± 0.1964
0.3	2.228 ± 0.4786
1	2.028 ± 0.1794
3	2.136 ± 0.2671
10	1.835 ± 0.2712
30	1.478 ± 0.1441**

相較於 PMA + cAMP 控制組，*: p<0.05，**: p<0.01，***: p<0.001，平均值±標準誤差，取樣數 ≥ 3。

表 5

蘇木素濃度 (微莫耳濃度)	IL-5 mRNA 表現程度
控制組	1.053 ± 0.08942
PMA + cAMP	1261 ± 97.18

0.3	1397 ± 172.2
1	1225 ± 47.23
3	1009 ± 77.66
10	926.2 ± 40.70 *
30	594.8 ± 252.9 ***

相較於 PMA + cAMP 控制組，*: p<0.05，**: p<0.01，***: p<0.001，平均值±標準誤差，取樣數 ≥ 3。

表 6

蘇木素濃度 (微莫耳濃度)	GATA-3 mRNA 表現程度
控制組	1.018 ± 0.07240
PMA + cAMP	3.699 ± 0.2105
0.3	3.960 ± 0.1234
1	3.036 ± 0.5622
3	2.663 ± 0.6056
10	1.812 ± 0.1538 **
30	1.434 ± 0.2530 ***

相較於 PMA + cAMP 控制組，*: p<0.05，**: p<0.01，***: p<0.001，平均值±標準誤差，取樣數 ≥ 3。

表 7

蘇木素濃度 (微莫耳濃度)	c-maf mRNA 表現程度
控制組	1.004 ± 0.02337
PMA + cAMP	2.913 ± 0.1499
0.3	3.388 ± 0.2410
1	3.318 ± 0.1177
3	2.846 ± 0.2632
10	1.826 ± 0.6278 **
30	1.302 ± 0.1868 ***

相較於 PMA + cAMP 控制組，*: p<0.05，**: p<0.01，***: p<0.001，平均值±標準誤差，取樣數 ≥ 3。

表 8

蘇木素濃度 (微莫耳濃度)	T-bet mRNA 表現程度
控制組	1.017 ± 0.06221
PMA + cAMP	1.084 ± 0.09578
0.3	1.073 ± 0.1762

1	1.036 ± 0.1666
3	1.052 ± 0.09226
10	1.068 ± 0.1171
30	1.054 ± 0.05147

相較於 PMA + cAMP 控制組，*: $p < 0.05$ ，**: $p < 0.01$ ，***: $p < 0.001$ ，平均值 ± 標準誤差，取樣數 ≥ 3 。

由表 4 至表 8、第 4 圖至第 8 圖可看出，蘇木素可抑制 Th2 細胞之細胞激素 IL-4 及 IL-5 之 mRNA 的表現。此外，蘇木素抑制 IL-4 之轉錄因子 c-maf 及 IL-5 之轉錄因子 GATA-3 之 mRNA 的表現，但不抑制 INF- γ 之轉錄因子 T-bet 之 mRNA 的表現，顯示蘇木素係抑制 Th2 細胞之細胞激素之生成，而不抑制 Th1 細胞之細胞激素之生成。因此，此結果說明蘇木素於 Th1/Th2 細胞之免疫平衡中，可抑制過高的 Th2 細胞之免疫反應，故可用於治療過敏性疾病。

[實施例 2] *in vivo* 試驗

實驗 D、氣喘小鼠之動物模式試驗

於實施例 2 中，利用以卵白蛋白 (OVA) 作為過敏原之氣喘小鼠模式，進行 *in vivo* 試驗。

小鼠致敏之實驗步驟係如第 9 圖所示 (此可參見 Lee *et al.*, Lentiviral-mediated GATA-3 RNAi decreases allergic airway inflammation and hyperresponsiveness. *Molecular Therapy* 2008; 16:60-65, 該文獻全文併於此處以供參考)。首先，將 50 微克卵白蛋白 (以 2 毫克鋁礬 (Alum, AlumImject, Pierce Chemical, Rockford, 伊利諾州, 美國) 作為佐劑) 以腹腔注射 (intraperitoneal injection, i.p.) 方式注射至 6 至 8 週大之 BALB/c 雌鼠 (國家實驗

動物中心)體內。分別於第 0、14、及 28 天，以相同劑量之卵白蛋白注射小鼠。於第 41 天及第 42 天之卵白蛋白投藥前，以腹腔注射或氣管滴入 (intratracheal instillation, i.t.) 之方式給予小鼠不同劑量之蘇木素 (高劑量：430 微克/小鼠；低劑量：43 微克/小鼠)。於第 42 至 44 天，將 100 微克卵白蛋白溶於 40 微升 PBS，並以鼻腔滴入 (intranasal instillation, i.n.) 方式將其投予小鼠 (1 天 1 次，連續 3 天)。於第 45 天，觀察小鼠呼吸道反應 (airway hyperresponsiveness)。於第 46 天，犧牲小鼠並進行以下實驗 E 至 G。於上述實驗過程中，注意投予小鼠蘇木素後，是否會引起毒性反應。於此試驗中，以經投予 OVA 之小鼠作為正控制組，且以未經投予 OVA 之小鼠作為負控制組。

實驗 E、組織病理試驗

於實驗 D 中，最後一次將卵白蛋白滴入小鼠鼻腔中達 24 小時後，犧牲小鼠，並自小鼠眼窩採血。接著，立即自小鼠支氣管插管，並以 1 毫升不含鈣鎂離子之 HBSS 緩衝液灌洗小鼠肺部三次後，收集肺泡沖洗液。將肺泡沖洗液以 400g 之轉速，於 4°C 下離心 10 分鐘。將離心後所得到之細胞再次懸浮於 1 毫升 HBSS 緩衝液中，再以血球計 (hemocytometer) 計算細胞總數。

接著，以細胞離心製備 (cytocentrifuged preparations) 之方式將細胞固定於玻璃片上，再進行劉氏染色 (Liu's stain, 此可參見 Lee *et al.*, Lentiviral-mediated GATA-3 RNAi decreases allergic airway inflammation and hyperresponsiveness. *Molecular Therapy* 2008; 16:60-65, 該文獻全文併於此處以供參考) 以計算各種細胞之數

目。細胞數目係以 300 顆細胞中，巨噬細胞、淋巴細胞、嗜中性白血球及嗜酸性白血球各自所佔之數目來計算，並根據其標準型態來分類，以及觀察發炎細胞入侵肺部的情形。結果係如係如表 9 至表 12 及第 10 圖所示。

組織病理實驗之部分，即係於取得肺泡沖洗液後，立即取下肺臟，並以中性福馬林固定。以石蠟包埋肺臟組織後，將其切成 5 微米厚之切片，此切片以蘇木紫/伊紅 (H&E, hematoxylin/eosin) 染色，並在顯微鏡下觀察發炎細胞 (或免疫細胞) 入侵之情形，結果係如第 11 圖 (原始顯微鏡圖放大 200 倍) 所示。

表 9

蘇木素濃度 (微莫耳濃度)	巨噬細胞數目($\times 10^4$)
負控制組	5.381 ± 2.053
正控制組	38.46 ± 6.110
低劑量	41.67 ± 6.885
高劑量	34.25 ± 4.970

表 10

蘇木素濃度 (微莫耳濃度)	嗜酸性白血球數目($\times 10^4$)
負控制組	1.351 ± 1.101
正控制組	32.36 ± 2.800
低劑量	$21.39 \pm 1.491 *$
高劑量	$10.52 \pm 4.543 **$

相較於正控制組，*: $p < 0.05$ ，**: $p < 0.01$ ，***: $p < 0.001$ ，平均值 \pm 標準誤差，取樣數 ≥ 10 。

表 11

蘇木素濃度 (微莫耳濃度)	淋巴細胞數目($\times 10^4$)
負控制組	0.09375 ± 0.03786
正控制組	0.8951 ± 0.4381

低劑量	0.7421 ± 0.2902
高劑量	0.8106 ± 0.3015

表 12

蘇木素濃度 (微莫耳濃度)	嗜中性白血球數目(x10 ⁴)
負控制組	0.0500 ± 0.03371
正控制組	0.3248 ± 0.1675
低劑量	0.6476 ± 0.2759
高劑量	0.2178 ± 0.1799

自表 10 及第 10 圖可看出，蘇木素可降低小鼠肺部中嗜酸性白血球的數量，故說明其可抑制 Th2 細胞之免疫反應。此外，由第 11 圖可看出蘇木素可減輕發炎細胞之浸潤/侵入，故可抑制發炎反應。

實驗 F、細胞激素分析

將實驗 E 中所收集之肺泡沖洗液以 400g 之轉速，於 4°C 下離心 10 分鐘。收集上清液後，利用 ELISA 套組 (R&D Systems, Inc., 美國) 分析 eotaxin、IL-4、IL-5、及 IFN- γ 之表現。結果係如表 13 至表 16 及第 12 圖至第 15 圖所示。

表 13

蘇木素濃度 (微莫耳濃度)	IL-4 濃度(微微克/毫升)
負控制組	9.302 ± 3.918
正控制組	75.60 ± 19.04
低劑量	36.76 ± 5.490 *
高劑量	23.01 ± 2.327 *

相較於正控制組，*: p<0.05，**: p<0.01，***: p<0.001，平均值±標準誤差，取樣數≥10。

表 14

蘇木素濃度 (微莫耳濃度)	IL-5 濃度(微微克/毫升)
負控制組	23.68 ± 4.254
正控制組	100.4 ± 12.38
低劑量	70.65 ± 6.510 *
高劑量	52.10 ± 6.223 ***

相較於正控制組，*: p<0.05，**: p<0.01，***: p<0.001，
平均值±標準誤差，取樣數 ≥ 10。

表 15

蘇木素濃度 (微莫耳濃度)	Eotaxin 濃度(微微克/毫升)
負控制組	4.140 ± 1.204
正控制組	32.35 ± 2.635
低劑量	18.64 ± 3.784 ***
高劑量	12.61 ± 1.334 ***

相較於正控制組，*: p<0.05，**: p<0.01，***: p<0.001，
平均值±標準誤差，取樣數 ≥ 10。

表 16

蘇木素濃度 (微莫耳濃度)	IFN- γ 濃度(微微克/毫升)
負控制組	4.719 ± 1.398
正控制組	4.967 ± 1.695
低劑量	3.598 ± 1.218
高劑量	4.288 ± 0.868

相較於正控制組，*: p<0.05，**: p<0.01，***: p<0.001，
平均值±標準誤差，取樣數 ≥ 10。

自表 13 至表 16 及第 12 圖至第 15 圖可看出，蘇木素可抑制 Th2 細胞之細胞激素 IL-4 及 IL-5 之生成，但對 Th1 細胞之細胞激素 IFN- γ 沒有影響，此實驗結果說明蘇木素於 Th1/Th2 細胞之免疫平衡中，可抑制過高的 Th2 免疫反應，故可用於治療過敏性疾病。此外，蘇木素可抑制 β -趨化激素 eotaxin 之生成，說明其可經由抑

制 β -趨化激素之生成來抑制 Th2 細胞之免疫反應，進而達成治療過敏性疾病之效果。

實驗 G、呼吸阻力測定

呼吸阻力測定係參考 Glaab 等人的方法來進行侵入式身體體積測量 (invasive body plethysmography)，此可參見 Glaab *et al.*, Repetitive measurements of pulmonary mechanics to inhaled cholinergic challenge in spontaneously breathing mice. *J Appl Physiol*, 2004;97:1104-1111，該文獻全文併於此處以供參考。此方法係觀察經投予甲基膽素 (methacholine) 之小鼠，其肺部呼吸阻力的增加情形。

首先，以 70 至 90 毫克/公斤體重之戊巴比妥鈉 (pentobarbital sodium，購自 Sigma) 麻醉 BALB/c 小鼠，將小鼠氣管切出開口，並利用以電腦控制的小動物呼吸器 (ventilator，Harvard Rodent Ventilator，model 683，Southnatick，麻薩諸塞州，美國) 讓小鼠進行體外換氣 (150 呼吸/分鐘)，維持潮氣量 (tidal volume) 於 0.3 毫升，及終端吐氣正壓為 3 至 4 公分-H₂O。將 PE-50 管子插入小鼠食道至胸部位置，連接至一壓力傳感器 (pressure transducer，LDS GOULD，Valley View，俄亥俄州，美國)，並紀錄肺部壓力、流速、容積改變。使用軟體 (Model PNM-PCT100W，LDS PONEMAH Physiology Platform，LDS GOULD) 分析呼吸阻力。利用霧化器製造甲基膽素噴霧，並將其送至呼吸器再投予小鼠，實驗數據則係扣除接入氣管切口管子的呼吸阻力 (0.45 公分 H₂O.s.ml⁻¹)。其中，呼吸阻力 (pulmonary resistance) RL 值之比例=進行甲基膽素

噴霧投藥後之 RL 值/進行磷酸鹽緩衝液噴霧投藥後之 RL 值。實驗結果係如表 17 至表 20 及第 16 圖所示。

表 17

蘇木素濃度 (微莫耳濃度)	甲基膽素 3.125(毫克/毫升) 呼吸道阻力 Rrs (公分 H ₂ O/毫升)
負控制組	1.720 ± 0.2131
正控制組	3.205 ± 0.3745
低劑量	2.237 ± 0.1567
高劑量	2.535 ± 0.1251

相較於正控制組，*: p<0.05，**: p<0.01，***: p<0.001，平均值±標準誤差，取樣數≥5。

表 18

蘇木素濃度 (微莫耳濃度)	甲基膽素 6.25(毫克/毫升) 呼吸道阻力 Rrs (公分 H ₂ O/毫升)
負控制組	1.930 ± 0.2508
正控制組	3.319 ± 0.4910
低劑量	2.206 ± 0.06650
高劑量	2.680 ± 0.1676

相較於正控制組，*: p<0.05，**: p<0.01，***: p<0.001，平均值±標準誤差，取樣數≥5。

表 19

蘇木素濃度 (微莫耳濃度)	甲基膽素 12.5(毫克/毫升) 呼吸道阻力 Rrs (公分 H ₂ O/毫升)
負控制組	2.118 ± 0.2981
正控制組	3.806 ± 0.4552
低劑量	2.432 ± 0.1259
高劑量	3.247 ± 0.1368

相較於正控制組，*: p<0.05，**: p<0.01，***: p<0.001，平均值±標準誤差，取樣數≥5。

表 20

蘇木素濃度 (微莫耳濃度)	甲基膽素 25(毫克/毫升) 呼吸道阻力 Rrs (公分 H ₂ O/毫升)
負控制組	2.306 ± 0.3270
正控制組	4.120 ± 0.5254

低劑量	2.869 ± 0.1831***
高劑量	3.691 ± 0.1542***

相較於正控制組，*：p<0.05，**：p<0.01，***：p<0.001，平均值±標準誤差，取樣數≥5。

由表 17 至表 20 及第 16 圖可看出，蘇木素可減輕小鼠呼吸道之阻力，故可用於治療過敏性氣喘。

上述實施例僅係用以例示說明本發明之原理及功效，而非用於限制本發明。任何熟於此項技藝之人士均可在不違背本發明之技術原理及精神的情況下，對上述實施例進行修改及變化。因此，本發明之權利保護範圍應如後述之申請專利範圍所列者。

【圖式簡單說明】

第 1 圖所示為 EL-4 T 淋巴瘤細胞之細胞存活率的直條圖；

第 2 圖所示為 EL-4 T 淋巴瘤細胞內之 IL-4 濃度的直條圖；

第 3 圖所示為 EL-4 T 淋巴瘤細胞內之 IL-5 濃度的直條圖；

第 4 圖所示為 EL-4 T 淋巴瘤細胞內之 GATA-3 之 mRNA 濃度的直條圖；

第 5 圖所示為 EL-4 T 淋巴瘤細胞內之 c-maf 之 mRNA 濃度的直條圖；

第 6 圖所示為 EL-4 T 淋巴瘤細胞內之 T-bet 之 mRNA 濃度的直條圖；

第 7 圖所示為 EL-4 T 淋巴瘤細胞內之 IL-4 之 mRNA 濃度的直條圖；

第 8 圖所示為 EL-4 T 淋巴瘤細胞內之 IL-5 之 mRNA 濃度的直條圖；

第 9 圖所示為氣喘小鼠之動物模式試驗的流程圖；

第 10 圖所示為 BALB/c 小鼠之肺泡沖洗液內各種免疫細胞的統計直條圖；

第 11 圖所示為 BALB/c 小鼠之肺臟組織切片的 H&E 染色圖；

第 12 圖所示為 BALB/c 小鼠之肺泡沖洗液內 IL-4 濃度的直條圖；

第 13 圖所示為 BALB/c 小鼠之肺泡沖洗液內 IL-5 濃度的直條圖；

第 14 圖所示為 BALB/c 小鼠之肺泡沖洗液內 eotaxin 趨化激素濃度的直條圖；

第 15 圖所示為 BALB/c 小鼠之肺泡沖洗液內 IFN- γ 濃度的直條圖；以及

第 16 圖所示為 BALB/c 小鼠之呼吸道阻力測定的曲線圖。

【主要元件符號說明】

無。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：99105793

C07D 311/02 (2006.01)

※申請日：99.3.1

※IPC 分類：

A61K 31/352 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

A61P 37/08 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

用於抑制第二型 T 輔助細胞之細胞激素之生成及/或抑制趨化激素

之生成之含蘇木素之醫藥組合物及其應用/PHARMACEUTICAL

COMPOSITIONS CONTAINING BRAZILIN FOR INHIBITING

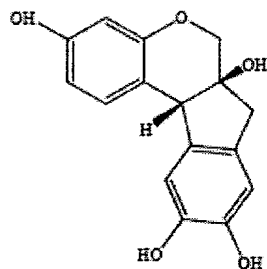
EXPRESSION OF CYTOKINES OF T HELPER CELL TYPE II

AND/OR INHIBITING EXPRESSION OF CHEMOKINES AND

USES OF THE SAME

二、中文發明摘要：

一種用於抑制第二型 T 輔助細胞之細胞激素之生成及/或抑制趨化激素之生成之醫藥組合物，其係包含一有效量之活性成分，其中該活性成分係選自以下群組：式 (I) 化合物、其醫藥可接受鹽及酯、或前述之組合：

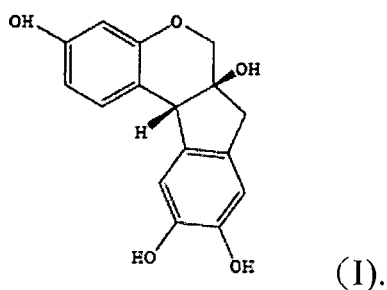


(I)。

一種使用式 (I) 化合物及/或其醫藥可接受鹽及/或酯在製造藥劑之應用。

三、英文發明摘要：

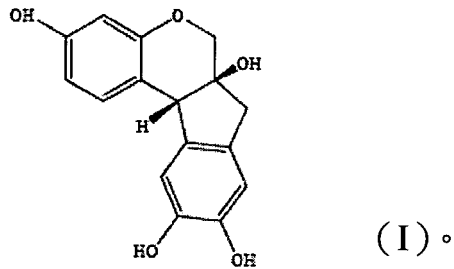
A pharmaceutical composition for inhibiting the expression of cytokines of T helper cell type II (Th2 cell) and/or inhibiting the expression of chemokines is provided, wherein the pharmaceutical composition comprises an effective amount of an active component, and the active component is selected from a group consisting of a compound of formula (I), pharmaceutically acceptable salts and esters of the compound, and combinations thereof:



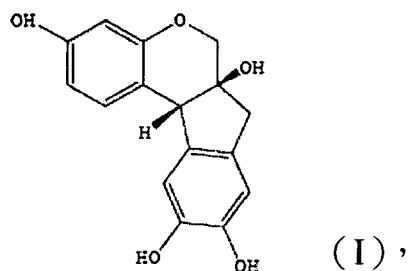
Also provided are uses of the compound of formula (I), and/or the pharmaceutically acceptable salts and/or esters thereof in the manufacture of a medicament.

七、申請專利範圍：

1. 一種用於抑制第二型 T 輔助細胞 (T helper cell type II, Th2 cell) 之細胞激素之生成及/或抑制趨化激素 (chemokine) 之生成之醫藥組合物，其係包含一有效量之活性成分，其中該活性成分係選自以下群組：式 (I) 化合物、其醫藥可接受鹽及酯、及前述之組合：



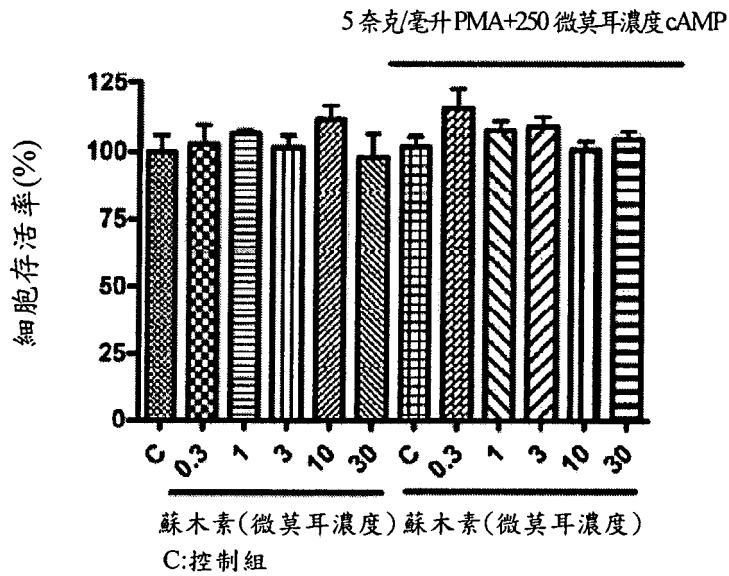
2. 如請求項 1 所述之醫藥組合物，其中該細胞激素係介白素-4 (IL-4, Interleukin-4) 及介白素-5 (IL-5, Interleukin-5) 之至少一者，且該趨化激素係 β -趨化激素。
3. 如請求項 2 所述之醫藥組合物，其中該趨化激素係 eotaxin (CCL11)。
4. 如請求項 1 至 3 中任一項所述之醫藥組合物，其係用於治療過敏性疾病。
5. 如請求項 4 所述之醫藥組合物，其係用於抑制呼吸道發炎或降低呼吸道阻力。
6. 如請求項 5 所述之醫藥組合物，其係用於抗過敏性氣喘。
7. 一種使用下式 (I) 化合物及/或其醫藥可接受鹽及/或酯在製造藥劑之應用：



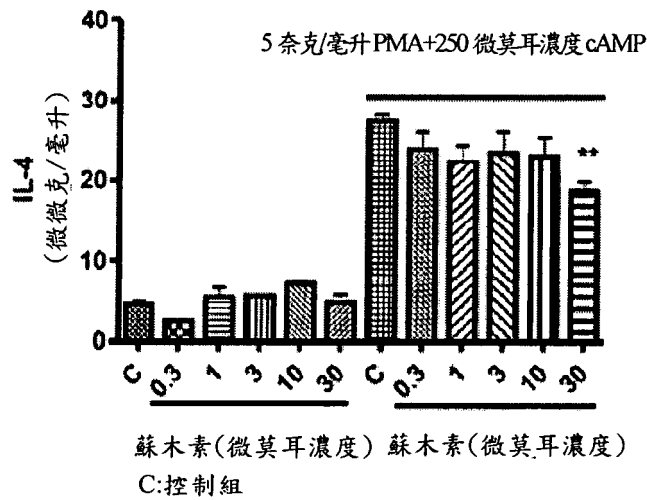
其中該藥劑係用於抑制第二型 T 輔助細胞之細胞激素之生成及/或抑制趨化激素之生成。

8. 如請求項 7 所述之應用，其中該細胞激素係介白素-4 及介白素-5 之至少一者，且該趨化激素係 β -趨化激素。
9. 如請求項 8 所述之應用，其中該趨化激素係 eotaxin(CCL11)。
10. 如請求項 7 至 9 中任一項所述之應用，其中該藥劑係用於治療過敏性疾病。
11. 如請求項 10 所述之應用，其中該藥劑係用於抑制呼吸道發炎或降低呼吸道阻力。
12. 如請求項 11 所述之應用，其中該藥劑係用於抗過敏性氣喘。
13. 如請求項 7 所述之應用，其中該藥劑之用量，以式 (I) 化合物計，為每天約 0.25 微克/公斤體重至約 2.5 微克/公斤體重。
14. 如請求項 13 所述之應用，其中該藥劑之用量，以式 (I) 化合物計，為每天約 0.30 微克/公斤體重至約 2.5 微克/公斤體重。

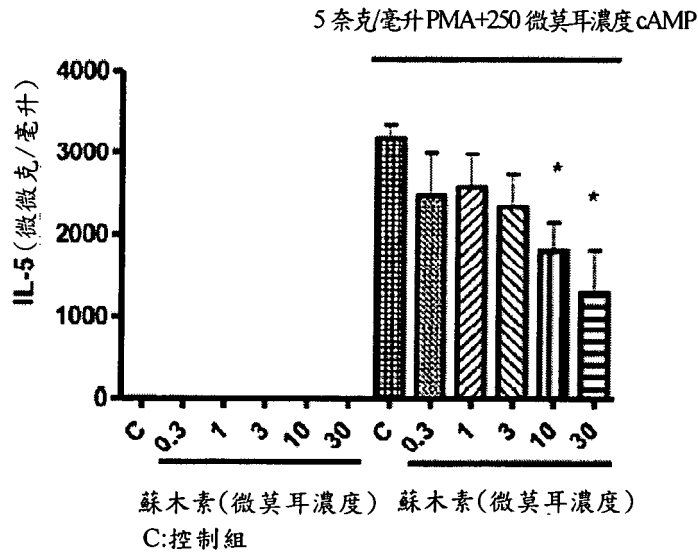
八、圖式：



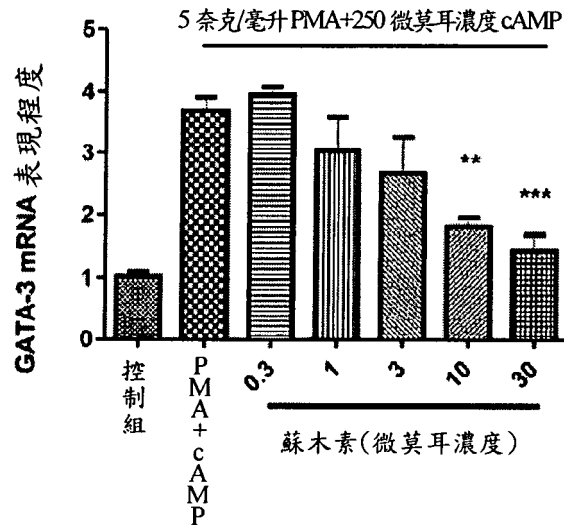
第 1 圖



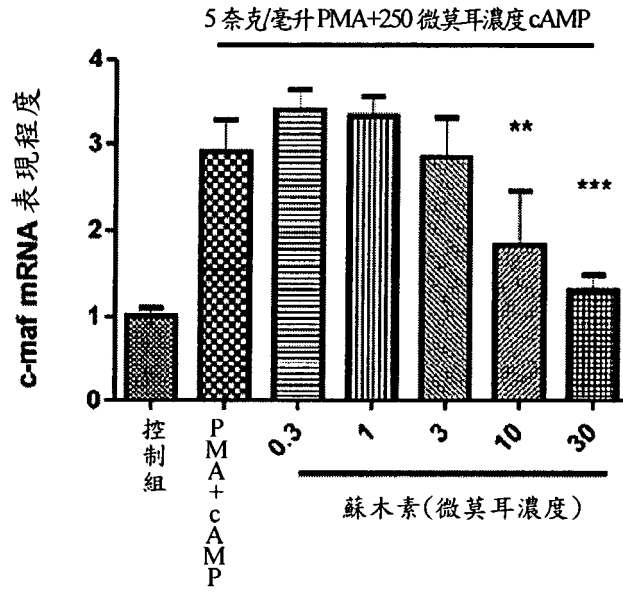
第 2 圖



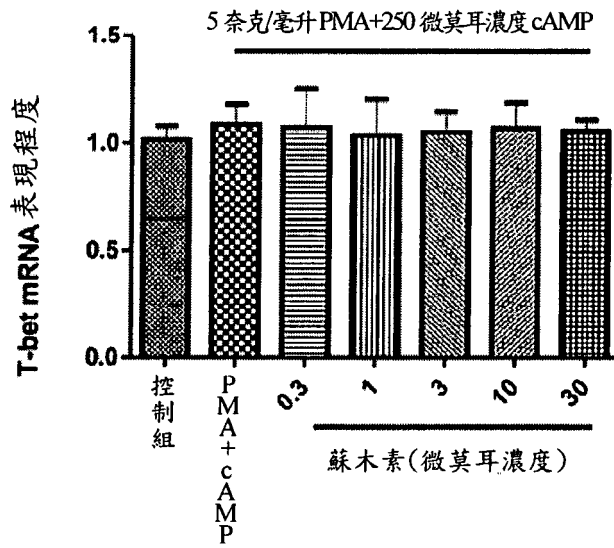
第 3 圖



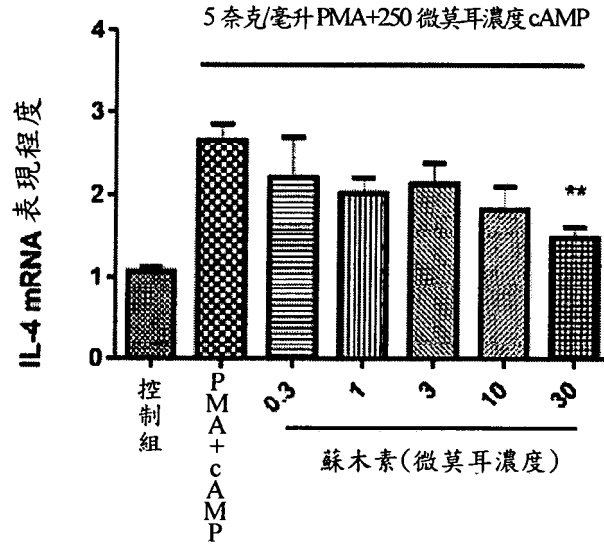
第 4 圖



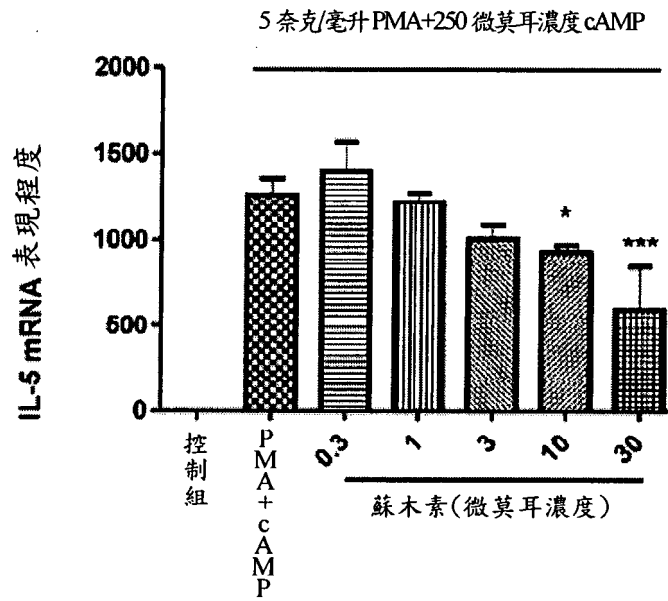
第 5 圖



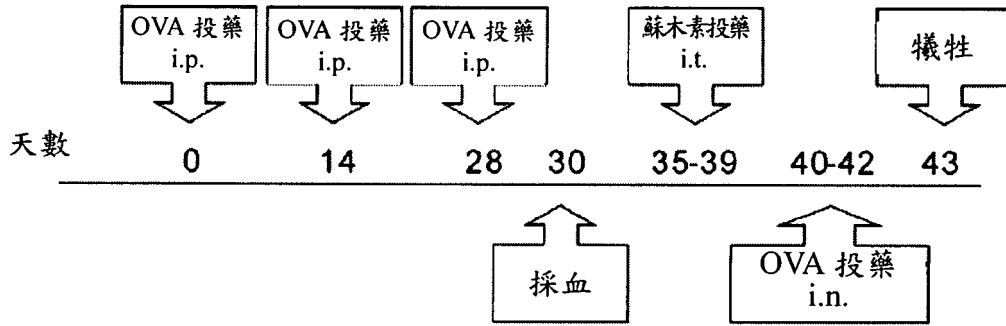
第 6 圖



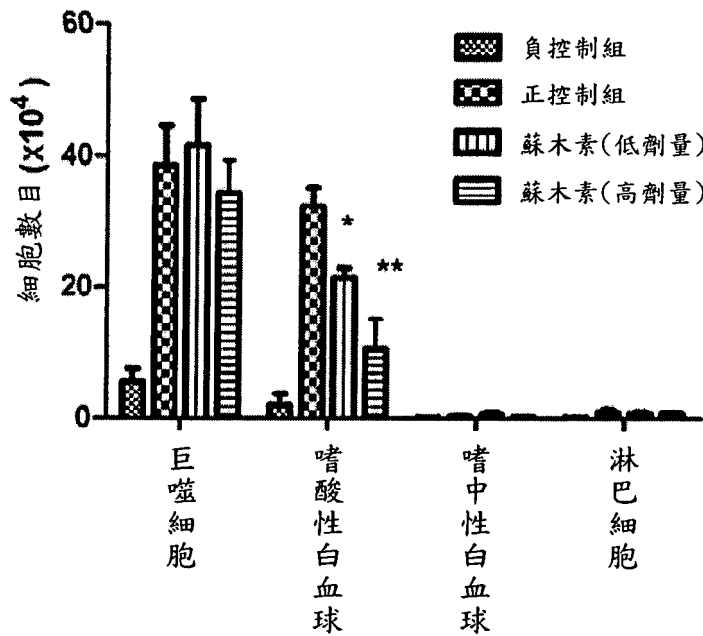
第 7 圖



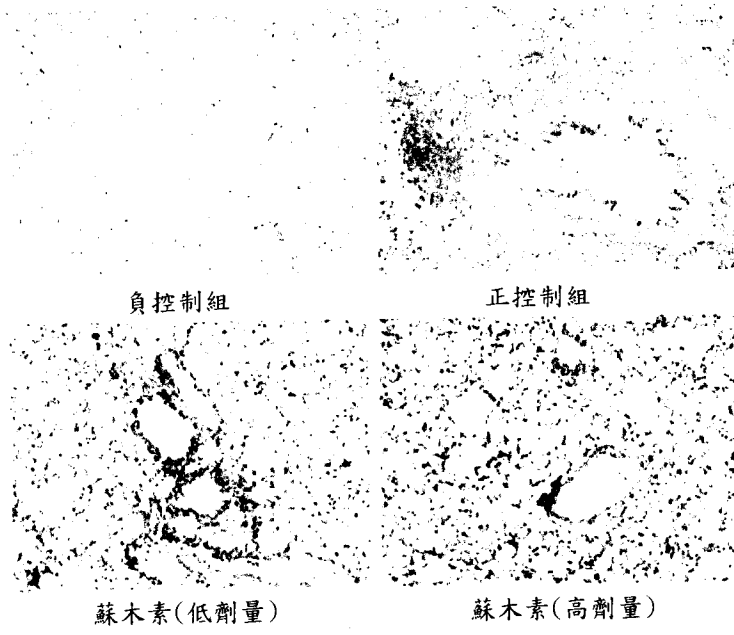
第 8 圖



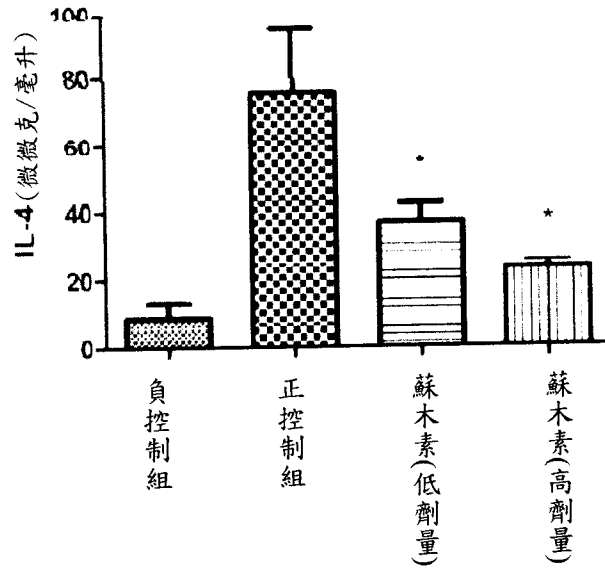
第 9 圖



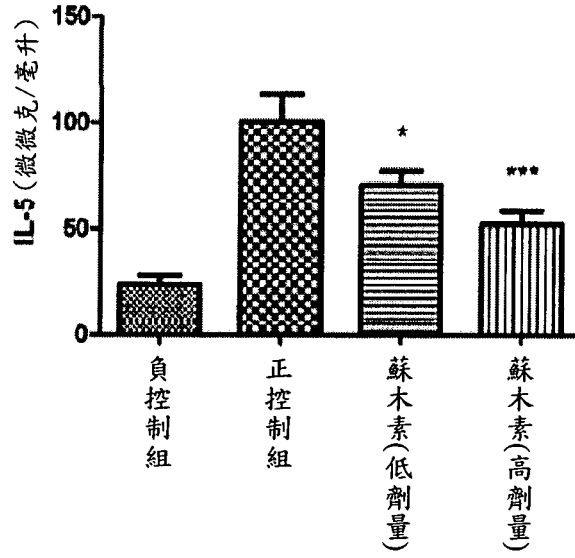
第 10 圖



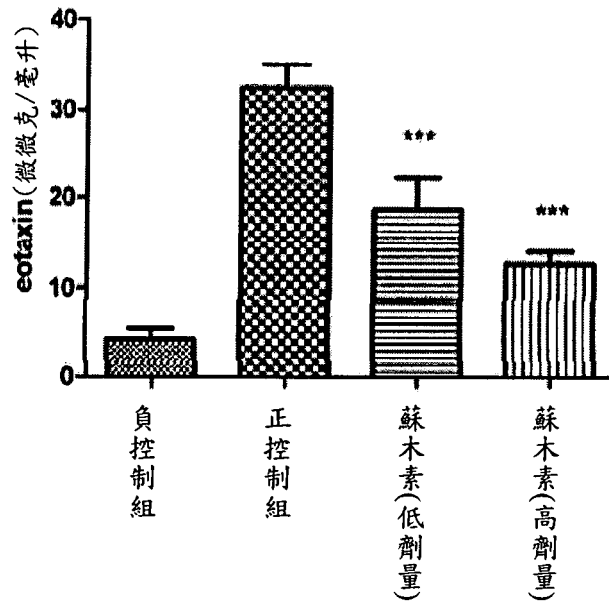
第 11 圖



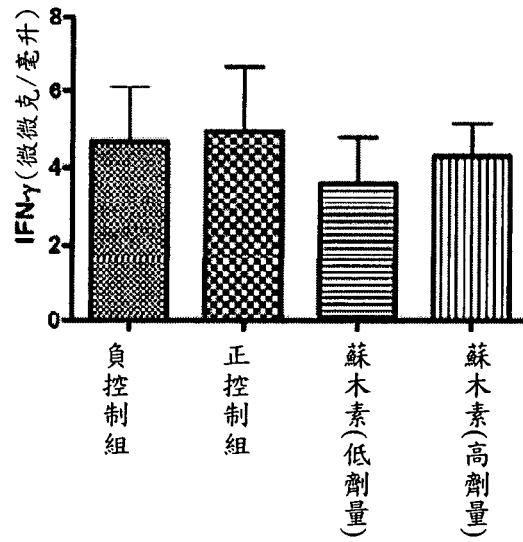
第 12 圖



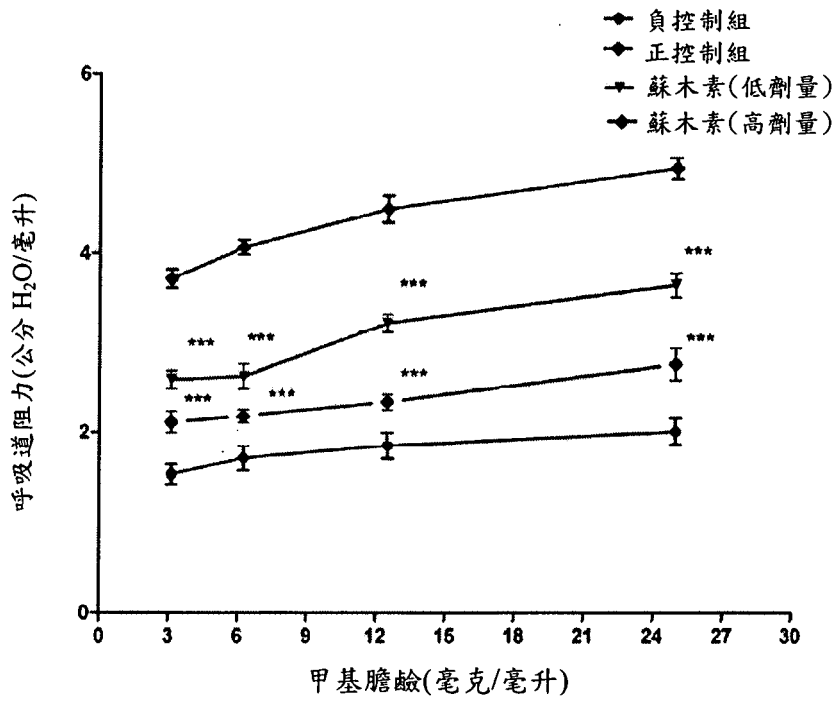
第 13 圖



第 14 圖



第 15 圖



第 16 圖

四、指定代表圖：

- (一)本案指定代表圖為：第(12)圖。
- (二)本代表圖之元件符號簡單說明：無。

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

