(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 101862365 A
(43)申请公布日 2010.10.20

(21)申请号 201010205334.4

(22)申请日 2004.11.12

(30)优先权数据
0326518.8 2003.11.13 GB

(62)分案原申请数据
200480033650.0 2004.11.12

(71)申请人 康普顿发展有限公司
地址 英国斯旺西

(72)发明人 艾弗·德尔姆·鲍恩
艾哈迈德·亚西涅·阿里

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
代理人 顾晋伟 彭鲲鹏

(51)Int.Cl.
A61K 36/328(2006.01)
A61K 31/015(2006.01)
A61K 31/01(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 14 页 附图 8 页

(54)发明名称

抗肿瘤萜类化合物

(57)摘要

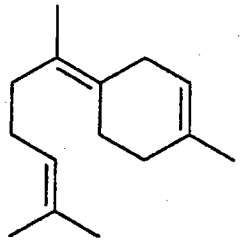
本发明涉及萜类化合物在治疗或预防癌症中的用途。本发明还涉及包含萜类化合物和药学上可接受的赋形剂、载体、辅药或赋形药的药物组合物。

CN 101862365 A

1. 香没药 (commiphora guidotti) 提取物在制造用于治疗或预防癌症的药物中的用途。

2. 一种治疗或预防癌症的方法，包括向需要这种治疗的患者施用有效剂量的香没药提取物。

3. γ - 红没药烯在制造用于治疗或预防癌症的药物中的用途，



γ - 红没药烯。

4. 一种治疗或预防癌症的方法，包括向需要这种治疗的患者施用有效剂量的 γ - 红没药烯。

5. 权利要求 3 的用途或权利要求 4 的方法，其中所述化合物的使用浓度为 0.2μM-100mM。

6. 一种药物组合物，包含 γ - 红没药烯以及药学上可接受的赋形剂、载体、辅药或赋形药。

7. 根据权利要求 6 的药物组合物，其配制成使所述组合物的单一单位剂量提供浓度为 0.2μM-100mM/ 单位剂量的 γ - 红没药烯。

8. 权利要求 3 的用途或权利要求 4 的方法，其中所述的癌症选自乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、结肠癌、肺癌、胰腺癌、肠癌、黑素瘤、睾丸癌、宫颈癌、纤维肉瘤、扁平细胞癌、白血病、星细胞瘤和神经胶质瘤。

抗肿瘤萜类化合物

[0001] 本申请是申请号为 200480033650.0 的中国专利申请的分案申请，原申请是国际申请 PCT/GB2004/004769 的中国国家阶段申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及萜类化合物在治疗或预防癌症中的用途。本发明还涉及包含萜类化合物和药学上可接受的赋形剂、载体、辅药或赋形药的药物组合物。

背景技术

[0003] 非洲灌木没药树 (commiphora molmol) 的树脂质产物没药具有治疗功用的长期民间历史。没药和香没药 (commiphora guidotti) 的药用背景主要基于古老的民间传说，发现常用在阿拉伯、印度和中国草药方中。在此已知其是无毒的，通常表现出抗炎、解热和愈合伤口的特性。其还广泛用于香料和调味品工业。其具体的抗肿瘤特性还没有被系统或科学地加以验证，虽然对于没药树的粗提物在小鼠中抗尤氏实体瘤的活性已有初步报道 (Al Harbi et al., Experimental Chemotherapy, 40, 337-347, 1994)。在许多用于治疗免疫障碍和抗血吸虫病 (schistosomiasis) 的草药方中也提到了该粗提物。

[0004] 没药和香没药的各化学组分的活性尚未得到分析。我们对提取物的初步化学分析表明它们是组成非常丰富的物质，包含约 300 种化合物。

[0005] 根据背景信息，没药在许多草药方中的应用是已知的，但是没有现有技术文献说明对来自没药的特定抗癌化合物的系统性鉴定。有几篇参考文献暗示了没药 (commiphora molmol) 粗提物抗小鼠肿瘤的功效 (Qureshi & Al Harbi et al., CancerChemotherapy and Pharmacology, 33, 130-138, 1993 ; 和 Al-Harbi et al., 1994 (同上))。

[0006] 国际专利申请 WO00/50053 描述了没药 (commiphora molmol) 与其他植物作为“癌症”经典草药治疗的用途，也是使用粗提物。另一申请 (Rao et al., J. Ethnopharmacology, 76, 151-154, 2001) 描述了没药对小鼠无毒性。

[0007] Tatman 等 (Cancer Letters, 175, 129-139, 2002) 公开了挥发性类异戊二烯有抗小鼠黑素瘤和人白血病细胞系的活性。

[0008] Leal 等 (J. Agric. Food. Chem., 51, 2520-2525, 2003) 公开了姜和姜黄提取物表现出抗癌活性。

[0009] Saleh 等 (Pharm. Pharmacol. Lett., 8, 97-99, 1998) 公开了芹菜的挥发物对人癌细胞系具有细胞毒性。

[0010] 美国专利 US-A-6, 486, 706 公开了 α - 和 β - 檀香醇 (santatol) 在治疗病毒所致肿瘤中的用途。

[0011] 美国专利 US-A-5, 602, 184 公开了所选择的萜烯对抗人癌细胞系的用途。

[0012] 美国专利申请 US 2002/0155522 公开了 β - 榄烯对抗肿瘤细胞的用途。

[0013] 国际 PCT 申请 WO 01/80868 公开了倍半萜混合物预防和治疗癌症的用途。

[0014] Itokawa 等 (Chem. Pharm. Bull., 33, 3488-3492, 1985) 描述了对红没药烯倍半萜

(bisabolene sesquiterpenoid) 抗肿瘤活性的研究。

[0015] 从没药和 / 或香没药获得的一系列化合物可以从通过 GC/MS 和 HPLC/MS 获得的化合物谱图或峰来进行测量。这些峰可以加以取样，以产生大量新的分子进行验证。所述工作的创新点包括 :1) 选择没药 (commiphora molmol) 和 Haddi 或香没药 (commiphora guidotti) 中未验证分子的生物药学丰富资源 ;2) 鉴定和表征来自那些没药提取物的新化合物的广泛资源 ;和 3) 使用特定 (凋亡) 生物分析法选择适于控制人肿瘤细胞系的无毒性化合物。

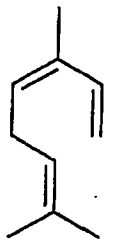
[0016] 现有技术文献没有公开来自没药或香没药的对人肿瘤具有抗癌活性的具体化合物。应该理解，存在对有效的抗癌症药物，尤其是对非癌细胞不具有毒性或具有有限毒性的药物的需求。本发明人鉴定了许多特异性诱导人肿瘤细胞凋亡但不诱导正常组织凋亡的具体化合物。

[0017] 目前使用药物如紫杉醇、泰素 (Paclitaxel) 和长春花碱 (Vinblastin) 的治疗导致损伤形式的炎性细胞死亡或坏死。凋亡是程序化细胞死亡的自然过程，所选择的针对凋亡的药物应导致很少的副作用或没有副作用。该方法的创新之处在于它选择良性作用机制，其对制药工业和最终的医疗行业都具有吸引力。该选择性方法已经揭示了无毒的抗癌药。

发明内容

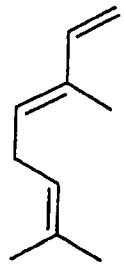
[0018] 根据本发明的第一方面，提供了化合物在制造用于治疗或预防癌症的药物中的用途，其中所述的化合物是萜或其氧化衍生物，所述萜选自 :

[0019]



I)

和

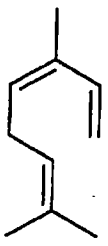


[0020] 顺式 - β - 罗勒烯 反式 - β - 罗勒烯 ;和

[0021] II) 红没药烯型的单环倍半萜。

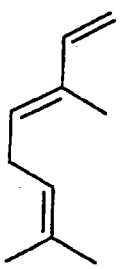
[0022] 根据本发明的第二方面，提供了治疗或预防癌症的方法，包括对需要这种治疗的患者施用有效剂量的化合物，其中所述化合物是萜或其氧化衍生物，所述萜选自 :

[0023]



I)

和



[0024] 顺式 - β - 罗勒烯 反式 - β - 罗勒烯 ;和

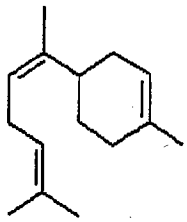
[0025] II) 红没药烯型的单环倍半萜。

[0026] 已经发现上述特定萜类化合物通过诱导人癌细胞凋亡而起抗癌药作用。

[0027] 所述化合物优选是反式 - β - 罗勒烯。

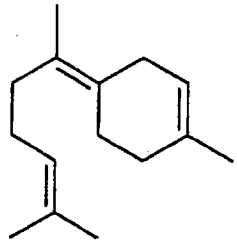
[0028] 红没药烯类型的代表性萜包括：

[0029]



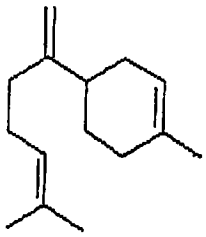
[0030] α - 红没药烯

[0031]



[0032] γ - 红没药烯

[0033]

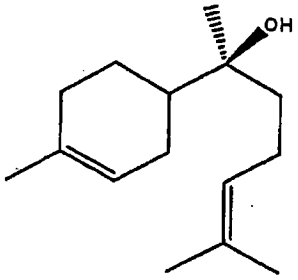


[0034] β - 红没药烯

[0035] 所述红没药烯类型的萜优选是 α - 红没药烯或 γ - 红没药烯。

[0036] 在本发明的一个优选实施方案中，所述萜是 α - 红没药醇。

[0037]



[0038] 特别优选的是，用在本发明第一方面或第二方面中的化合物选自上述的代表性化合物。可以在本发明的萜的通式中作微小改变，只要所改性的化合物具有抗癌活性即可。微小改变包括将侧链基团替换成认为不会破坏化合物活性的密切相关侧链基团，例如将 $-CH_3$ 替换成 $-CH_2CH_3$。本领域的技术人员非常清楚如何在不破坏化合物活性的情况下对通式所包括的萜类化合物进行适当的改变。

[0039] 特别优选的是，萜类化合物是反式－β－罗勒烯、γ－红没药烯或 α－红没药烯。

[0040] 用在本发明第一方面或第二方面中的化合物可以从 Detarium、海檀木属 (Ximenia)、蓼属 (Polygonum)、没药属 (Commiphora) 或乳香属 (Boswellia) 的植物获得。具体而言，所述化合物优选从植物 Detarium microcarpum、海檀木 (Ximeniaamericana)、Polygonum limbatum、没药 (Commiphora molmol)、香没药 (Commiphoraguidotti) 或乳香属物种获得。

[0041] 用在本发明第一方面或第二方面中的化合物可以通过从上述合适植物中分离而获得。具体而言，大多数化合物可以从没药或香没药分离。所述化合物可以使用任意合适的制备方法来分离。分离这些化合物的方法是本领域技术人员公知的，包括色谱方法如快速柱色谱和固相提取柱。可以使用核磁共振和质谱来鉴定各化合物。

[0042] 当用在本发明组合物中的化合物分离自植物时，存在基本无杂质的植物材料。基本无杂质的植物材料指存在的杂质植物材料少于 0.1％ (w/w)。

[0043] 用在本发明组合物中的化合物可以从商业来源获得，如 RC Treat Ltd（反式－β－罗勒烯和 γ－红末药烯）和 KIC Inc.（α－红没药醇）。本发明的化合物也可以使用常规的化学合成步骤合成。

[0044] 两种或多种萜类化合物可以一起用作抗癌药。另外，其他的抗癌药、治疗剂、标志物等也可以与根据本发明第一或第二方面的萜类化合物一起使用。

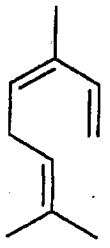
[0045] 术语“抗癌”药指可以用来防止或减缓癌症进程或可以减小肿瘤大小的药剂。

[0046] 根据本发明的第一和／或第二方面预防或治疗的癌症可以是任意癌症，但是优选人癌症。优选的癌症包括乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、结肠癌、肺癌、胰腺癌、肠癌、黑素瘤、睾丸癌、宫颈癌、纤维肉瘤、扁平细胞癌、白血病、星细胞瘤和神经胶质瘤。

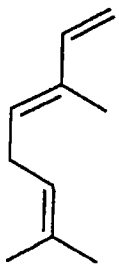
[0047] 已经发现用在本发明第一和第二方面中的化合物在癌细胞中比在相应正常细胞中诱导明显更高水平的凋亡。这意味着所述化合物在合适剂量下对癌细胞有显著活性。

[0048] 根据本发明的第三方面，提供了一种药物组合物，其包含萜类化合物或其氧化衍生物以及药学上可接受的赋形剂、载体、辅药或赋形药，其中所述的萜选自：

[0049]



I） 和



[0050] 顺式－β－罗勒烯 反式－β－罗勒烯；和

[0051] II）红没药烯型的单环倍半萜。

[0052] 优选所述萜类化合物如以上本发明第一和第二方面所限定。

[0053] 萜类化合物可以和药学上可接受的赋形剂、载体、辅药或赋形药一起递送到个体中。可以使用的药学上可接受的赋形剂、载体、辅药或赋形药包括但不限于氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白如人血清白蛋白、缓冲物质如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的部分甘油酯混合物、水、盐或电解质如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、氯化钠、锌

盐、胶体氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素基物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯 - 聚丙烯封端的聚合物和羊毛脂。

[0054] 药物组合物可以口服、胃肠外给药、通过吸入喷雾给药、局部给药、经直肠给药、口腔给药、阴道给药或通过埋植的储药器 (reservoir) 给药。优选的是，药物组合物通过注射给药。本文所用的术语“胃肠外”包括皮下、皮内、静脉内、肌肉内、关节内、滑膜内、膜内 (intrasternal)、鞘内、病变部位 (intralesional) 和颅内注射或输注技术。

[0055] 药物组合物可以以无菌注射制剂形式递送，例如作为无菌注射水性或油质悬液递送。该悬液可以根据本领域中已知的技术使用合适的分散剂或湿化剂 (例如 Tween80) 和悬浮剂来配制。无菌注射制剂也可以是存在于无毒胃肠外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌注射溶液或悬液，例如存在于 1,3- 丁二醇中的溶液。可以采用的可接受赋形药和溶剂有甘露醇、水、林格氏溶液和等渗氯化钠溶液。此外，传统上使用无菌且不易挥发的油作为溶剂或悬浮介质。为此，可以采用刺激性小的、不易挥发的油，包括单酸 - 或双酸 - 甘油酯。脂肪酸如油酸及其甘油酯衍生物可以用于制备注射剂，天然的药学上可接受的油如橄榄油或蓖麻油也可以用于制备注射剂，尤其是它们的聚氧乙基化形式。这些油溶液或悬液也可以含有长链醇稀释剂或分散剂，如 Ph.Helv 或类似的醇。

[0056] 本发明的药物组合物也可以作为流体给药，也可以栓剂形式进行直肠给药。栓剂可以由萜类化合物和合适的非刺激性赋形剂来配制，所述赋形剂在室温下是固体，但是在直肠温度下是液体，因此将在直肠中熔化以释放萜类化合物。这种材料包括但不限于可可脂、蜂蜡和聚乙二醇。

[0057] 当所希望的治疗涉及便于局部施用的区域或器官时，期望所述组合物的局部给药。为了局部施用到皮肤上，萜类化合物应使用局部施用的载体来配制，所述载体例如但不限于矿物油、液化石油、白凡士林 (white petroleum)、聚乙二醇、聚氧化乙烯、聚氧化丙烯化合物、乳化蜡和水。作为替代方案，萜类化合物可以用合适的乳剂或乳膏配制，或溶解在载体中。合适的载体包括但不限于矿物油、山梨聚糖单硬脂酸酯、聚山梨醇酯 60、十六烷基酯、蜡、十八烷醇 (cetearyl alcohol)、2- 辛基十二醇、苯甲醇和水。萜类化合物可以借助直肠栓剂配方或作为合适的灌肠剂配方局部施用到较下端肠道。

[0058] 本发明的药物组合物可以通过经鼻气溶胶或吸入剂给药。进行这样给药的合适组合物可以根据药物配制领域技术人员公知的技术制备，可以采用苯甲醇或其他防腐剂、增强生物利用度的吸收促进剂、碳氟化合物和 / 或本领域中已知的其他助溶剂和分散剂，制备成盐水形式的溶液。

[0059] 递送至患者的萜类化合物的精确量将取决于受试者癌症状态的严重程度、总体健康状况、年龄、体重和性别、饮食、给药时间和频次、反应敏感性和对治疗的耐受和反应。合适的量可以通过常规的实验来确定，这处于临床医生的判断能力之内。通常，有效剂量为 0.2μM-100mM，更优选 0.2μM-10μM。

[0060] 本发明的药物组合物可以和其他药物、药剂或标志物共同施用。

[0061] 本发明还提供了用在本发明第一方面中的治疗用的萜类化合物。

[0062] 本发明还提供了用在本发明第一方面中的萜类化合物用作体外抗癌药剂的用途。

[0063] 本发明还提供了香没药提取物在制造用于治疗或预防癌症的药物中的用途。

[0064] 本发明还提供了治疗或预防癌症的方法，包括向需要这种治疗的患者施用有效剂

量的香没药提取物。

[0065] 香没药提取物可以是任意提取物，优选它含有用于本发明第一方面中的至少一种化合物。优选所述提取物含有反式 -β- 罗勒烯、γ- 红没药烯和 α- 红没药烯中的至少一种。

[0066] 所述提取物优选是醇提取物，可以使用获得植物的醇提取物的标准步骤获得。具体而言，获得这种醇提取物的方法是本领域技术人员公知的。作为替代方案，优选植物材料是植物香精油的醇提取物。香精油是芳香性植物物质的挥发性有机组分。通常通过两种主要方法从植物中提取香精油，即蒸馏法（蒸汽、水或干馏）和冷压榨法。主要含油的植物提取物也可以使用溶剂、二氧化碳提取或氢氟烷来制备。植物提取物酊剂可以这样制备：将植物材料浸软并用含水的乙醇溶剂（70％ -90％乙醇的水溶液）提取，放置一段时间，然后滤去固体碎片。

附图说明

[0067] 参照附图通过举例的方式提供下列实施例，并不以任何方式限制本发明。

[0068] 图 1 示出生长培养基中加和不加 667μg/ml 没药 (C.molmol) 和 Haddi 提取物的人成纤维肉瘤细胞的生长曲线。

[0069] 图 2 示出生长培养基中加和不加 667μg/ml 没药和 Haddi 提取物的 S180 肉瘤细胞的生长曲线。

[0070] 图 3 示出没药的乙醇提取物对 S180 人成纤维肉瘤细胞系的细胞毒作用。

[0071] 图 4 示出没药的乙醇提取物对 HT1080 人成纤维肉瘤细胞系的细胞毒作用。

[0072] 图 5 示出 Haddi 的己烷提取物对 S180 成纤维肉瘤系的细胞毒作用。

[0073] 图 6 示出 Haddi 的己烷提取物对 HT1080 人成纤维肉瘤细胞系的细胞毒作用。

[0074] 图 7 示出反式 -β- 罗勒烯对肿瘤细胞系的细胞毒作用。

[0075] 图 8 示出反式 -β- 罗勒烯对 HT1080 肿瘤细胞系的细胞毒作用。

[0076] 图 9 示出 γ- 红没药烯对 S180 肿瘤细胞系的细胞毒作用。

[0077] 图 10 示出 γ- 红没药烯对 HT1080 肿瘤细胞系的细胞毒作用。

[0078] 图 11 示出用 5μM 红没药烯处理 12 小时的 HT1080 人成纤维肉瘤细胞中凋亡性细胞死亡的诱导。

[0079] 图 12 示出没药的乙醇提取物对正常成纤维细胞的影响。

[0080] 图 13 示出 Haddi 的己烷提取物对正常成纤维细胞的影响。

[0081] 图 14 示出用 5μM 红没药烯处理 12 小时的混合组织培养物。

[0082] 图 15 示出用 100μM 反式 -β- 罗勒烯处理 12 小时的混合组织培养物。

具体实施方式

[0083] 实施例

[0084] 图 1. 生长曲线分析提供关于在体外一段时间内细胞系生长模式的主要信息

[0085] 验证了没药乙醇提取物和 Haddi 己烷提取物对 S180 细胞系和人成纤维肉瘤 HT1080 细胞系的细胞死亡诱导性质。以前的实验结果已经表明 667μg/ml 的两种提取物溶液用作细胞死亡诱导剂是有效的。细胞密度为 5×10^4 细胞 /ml 的细胞悬液原种从已有

的细胞培养物产生。48 个烧瓶加以标记并接种 5ml 的该细胞悬液——每天 2 个对照 / 未处理烧瓶，2 个没药乙醇提取物烧瓶，2 个 Haddi 己烷提取物烧瓶，进行 8 天实验。所有的烧瓶都在 37℃和 5% CO_2 的条件下培养。第 4 天，更换所有剩余烧瓶中的培养基。未处理培养基用于更换对照烧瓶，提取物浓度为 667μg/ml 的培养基用于更换相关处理的烧瓶。选择第 4 天作为处理日，是因为这是生长曲线中指数生长期的第一天。在生长曲线中这一时间点进行处理将完全表现出没药乙醇提取物和红没药己烷提取物诱导转化细胞系中细胞死亡的能力。使用类似的方案来培养人成纤维肉瘤细胞系 HT1080。在该情况下，生长较为缓慢，当第 7 天汇合时用提取物处理细胞（参见图 1）。

[0086] 根据标准方案在每天的同一时间进行每天的细胞计数。简而言之，通过移液操作除去所有培养基。然后将烧瓶用 2ml PBS 洗两次，以从烧瓶中除去尽可能多的细胞碎片（这将有助于细胞计数）。最后的烧瓶洗涤使用 1ml Tris-EDTA 进行，这是非常迅速的洗涤，只是为了中和剩余的培养基。然后小心移除所有的液体，接着向烧瓶中再加入 1ml Tris-EDTA。将这些烧瓶于 37℃和 5% CO_2 条件下孵育 2-5 分钟，以确保所有的细胞都已脱离烧瓶。从第 4 天起，使用 2ml Tris-EDTA 而使细胞计数更轻松，因为细胞数已经显著增加。通过轻柔吹吸来混合细胞悬液，以确保均匀，然后将样品置于血细胞计数器中，在光学显微镜下进行细胞计数。对每个烧瓶总共计数 4 次。计算平均值，用于绘制生长曲线（图 1 和 2）。

[0087] 图 2 清楚示出 :S180 细胞表现出典型的 S 形生长曲线。在第 0 天和第 3 天之间细胞非常缓慢地从 5×10^4 细胞 /ml 增加至 21.1×10^4 细胞 /ml。第 3 天至第 6 天是指数生长期，这时细胞密度增加 10 倍，达到 240×10^4 细胞 /ml，该期间细胞密度增加一倍的时间约为 24 小时。第 6 天和第 7 天之间观察到平台期，这时细胞数保持相对恒定，然后在第 8 天开始下降。细胞数的这种下降是由于细胞培养物中空间和营养物的耗尽。

[0088] 用 Haddi 己烷提取物处理的细胞直到第 4 天（处理日）都表现正常。第 5 天观察到细胞数从第 4 天的 68.6×10^4 细胞 /ml 下降至 1.8×10^4 细胞 /ml。细胞数继续平稳下降，在第 8 天达到 0。这清楚证明了 Haddi 己烷提取物诱导快速生长的转化细胞系中的细胞死亡的能力，因为细胞在正常情况下预期直到第 6 天都会持续生长。

[0089] 没药乙醇提取物也观察到是 S180 细胞的有效细胞死亡诱导剂。并且，直到第 4 天 S180 细胞都遵照典型的生长模式。第 4 天处理之后，细胞数从 47.9×10^4 细胞 /ml 下降到第 5 天的 12.8×10^4 细胞 /ml。细胞数的减少以比 Haddi 己烷提取物更慢的速度进行。

[0090] 图 1 示出在第 7 天向生长培养基中加入 667μg/ml 的没药乙醇提取物和 Haddi 己烷提取物之后人 HT1080 成纤维肉瘤细胞的类似应答。未处理细胞直至第 13 天都持续生长良好，而经没药和 Haddi 处理的细胞系在数目上从第 7 天开始快速下降。

[0091] 2. 对用没药乙醇提取物和 Haddi 己烷提取物处理的 S180 肉瘤细胞和 HT1080 人成纤维细胞肉瘤细胞系的 MTT 分析

[0092] MTT 分析法是测定细胞群活力的有效、定量且高度可靠的比色分析法。活细胞的线粒体酶能够将 3-(4,5- 二甲基 -2- 噻唑)-2,5- 二苯基溴化四唑 (MTT) 从黄色水溶性化合物代谢成水不溶性的紫色产物甲臜 (formazan)，这是该分析法的化学基础。所产生甲臜的量与测试群体中活细胞的数目直接成比例。形成的甲臜产物可以溶解在二甲基亚砜 (DMSO) 中，使得能够通过分光光度法对所得产物进行定量。含有大量活细胞的群体将产生高水平

的甲臜产物，因此用 DMSO 溶解时将产生深紫色溶液，而多数为死细胞的细胞群体将产生无色溶液。光吸收量（波长 575nm）可利用以下计算公式转化成细胞毒性％：

[0093]

$$\frac{[\text{对照吸收}-\text{测试吸收}]}{\text{对照吸收}} \times 100 = \text{细胞毒性\%}$$

[0094] 实验方案

[0095] 选择两个转化细胞系即 S180 鼠肉瘤细胞和 HT1080 人成纤维肉瘤细胞进行 MTT 分析。细胞以 2×10^5 细 /ml 的密度接种到 96 孔微滴定板上，于 37℃和 5％ CO_2 条件下孵育 24 小时，然后进行处理。向板的外缘孔中加入 200μl PBS，以减少从含细胞的孔中的蒸发损失。

[0096] 在该研究中，我们验证了没药乙醇提取物和 Haddi 己烷提取物对转化细胞的细胞毒性。向培养基中加入提取物，每个细胞系用 1333μg/ml 处理。进行系列稀释，以获得一系列逐渐稀释浓度的待验证提取物。遵照相同的程序配制相同浓度的 staurosporine 和乙醇溶液。在研究中引入具有明确细胞毒性的物质 staurosporine，以提供比较提取物细胞毒性的基准。进行乙醇对照是因为提取物在加入培养基之前需要事先溶于乙醇中，当提取物含有多数不溶解于单纯培养基的有机分子时－该对照确保不是乙醇导致观察到的任何细胞死亡。

[0097] 将 100μl 的各浓度的各提取物 / 对照加到标记的微滴定板中的 3 个独立孔中。在未处理对照孔中加入 100μl 培养基，所有孔的总计终体积均为 200μl。进行 3 个相同的重复，24、48 和 72 小时后进行测试。在读板之前所有的板都在 37℃和 5％ CO_2 条件下孵育。

[0098] 所需时间（即 24、48 或 72 小时）后，将 20μl MTT 溶液（5mg/ml）加到每个孔中（除仅含 PBS 的孔）。然后将板放回孵箱（相同的条件下）再孵育 4 小时。MTT 对光敏感，因此所有的板都用箔覆盖，以使对光的暴露最小。4 小时后，从孔中洗出所有的培养基（小心不要破坏甲臜晶体），向每孔中加入 200μl DMSO。用移液器小心混合以确保完全溶解。然后将所有的板在分光光度计上读取 575nm 处的光吸收。这在加入 DMSO 之后立即进行。结果参见图 3-6。

[0099] 也使用相同的方法验证 Haddi 提取物的已鉴定组分的影响。因此，使用 MTT 分析法验证 Haddi 提取物的两个主要组分反式－β－罗勒烯和 γ－红没药烯，以评价它们对肿瘤细胞细胞毒性和存活力的影响，参见表 7-10。

[0100] 图 3-6 示出了没药乙醇提取物和 Haddi 己烷提取物对 S180 成纤维肉瘤细胞系和 HT1080 人成纤维肉瘤细胞系的细胞毒作用。没药和 Haddi 提取物都导致细胞毒性随时间的剂量依赖性增加。发现通常没药的作用比 Haddi 提取物的作用更平缓。没药提取物在 24 小时后表现出逐渐增加的细胞死亡，而 Haddi 提取物从较低剂量开始就导致较快速的细胞死亡。

[0101] 反式－β－罗勒烯和 γ－红没药烯对 S180 和 HT1080 肿瘤细胞系的细胞毒作用示于图 7-10 中。

[0102] 还验证了反式－β－罗勒烯、γ－红没药烯和 α－红没药醇对 MM6 细胞（单核细胞

白血病细胞系）和 A375 细胞的细胞毒作用。结果示于下表 5-10 中。

[0103] 表 1. 24、48 和 72 小时后反式 -β- 罗勒烯对 S180 细胞的细胞毒性的测定

[0104]

浓度 (mM)	细胞毒性% 24 小时	48 小时	72 小时
250	92± 0	95 ± 0	95 ± 0
200	87± 3	95 ± 1	95 ± 0
150	82± 7	87 ± 5	87 ± 5
100	69± 11	82 ± 7	88 ± 4
50	19± 3	28 ± 4	22 ± 5

[0105] • n = 3，重复 3 次

[0106] 表 2. 24、48 和 72 小时后反式 -β- 罗勒烯对 HT1080 细胞的细胞毒性的测定

[0107]

浓度 (mM)	细胞毒性% 24 小时	48 小时	72 小时
250	67± 2	90 ± 0	90 ± 1
200	62± 2	90 ± 0	90 ± 1
150	43± 8	71 ± 10	64 ± 12
100	16± 6	33 ± 5	15 ± 3
50	1± 5	0 ± 2	-5 ± 3

[0108] • n = 3，重复 3 次

[0109] 表 3. 24、48 和 72 小时后 γ- 红没药烯对 S180 细胞的细胞毒性的测定

[0110]

浓度 (mM)	细胞毒性% 24 小时	48 小时	72 小时
250	89±0	89±1	86±1
200	90±0	93±1	89±1
150	92±0	93±1	91±1
100	93±0	95±0	94±0
50	93± 1	95±0	94±0

[0111] • n = 3，重复 3 次

[0112] 表 4. 24、48 和 72 小时后 γ- 红没药烯对 HT1080 细胞的细胞毒性的测定

[0113]

浓度 (mM)	细胞毒性% 24 小时	48 小时	72 小时
250	78± 2	89 ± 1	81 ± 2
200	87± 1	92 ± 1	88 ± 1
150	87± 1	93 ± 0	90 ± 0
100	90± 0	94 ± 1	91 ± 0
50	90± 0	94 ± 0	92 ± 0

[0114] • n = 3，重复 3 次

[0115] 从这些数据明显可见反式 - β - 罗勒烯和 γ - 红没药烯对培养物中生长的 S180 成纤维肉瘤细胞和人肿瘤细胞具有细胞毒性，表现为抗肿瘤药。罗勒烯在 200mM 以上的浓度下导致近乎 100％的肿瘤细胞死亡，红没药烯在约 50mM 的浓度下有效。两种药物都诱导凋亡（见以下章节）。罗勒烯被美国食品与药品监督管理局列为香料，并批准用作食品添加剂，其对哺乳动物无毒。

[0116] 表 5. 24、48 和 72 小时后反式 - β - 罗勒烯对 MM6 细胞（单核细胞白血病细胞系）的细胞毒性的测定

[0117]

	细胞毒性%		
浓度 (μM)	24 小时	48 小时	72 小时
368	57	67	67
184	46	57	60
92	32	24	12
42	15	-30	-18

[0118] 表 6. 24、48 和 72 小时后反式 - β - 罗勒烯对 A375 细胞（人皮肤黑素瘤细胞系）的细胞毒性的测定

[0119]

	细胞毒性%		
浓度 (μM)	24 小时	48 小时	72 小时
368	29	35	31
184	7	8	-10
92	-11	-25	-31
46	7	-2	-33

[0120] 表 7. 24、48 和 72 小时后 γ - 红没药烯对 MM6 细胞的细胞毒性的测定

[0121]

	细胞毒性%		
浓度 (μM)	24 小时	48 小时	72 小时
10	45	67	78
2.5	51	70	78
0.25	49	68	80
0.13	3	-37	13

[0122] 表 8. 24、48 和 72 小时后 γ - 红没药烯对 A375 细胞的细胞毒性的测定

[0123]

	细胞毒性%		
浓度 (μM)	24 小时	48 小时	72 小时
10	23	64	77
2.5	15	55	71
0.25	10	7	50
0.13	15	5	13

[0124] 化学品 γ - 红没药烯是有效的抗肿瘤药，在低至 0. 25 μ M 的浓度下对两种肿瘤细胞类型均诱导高度的细胞死亡。

[0125] 表 9. 24 和 72 小时后 γ - 红没药醇对 MM6 细胞的细胞毒性的测定

[0126]

	细胞毒性%	
浓度 (μM)	24 小时	72 小时
10	33	49
2.5	46	51
0.25	48	54
0.13	48	53

[0127] 表 10. 24、48 和 72 小时后 γ - 红没药醇对 A375 细胞的细胞毒性的测定

[0128]

	细胞毒性%	
浓度 (μM)	24 小时	72 小时
225	31	41
112	10	26
56	-27	10
28	-2	1

[0129] 化学品 α - 红没药醇是有效的抗肿瘤药，在低至 0. 13 μ M 的浓度下对 MM6 肿瘤细胞诱导高度的细胞死亡。对于 A375 细胞需要较高浓度 (225 μ M) 来启动细胞死亡。用没药乙醇提取物和 Haddi 己烷提取物处理的 HT1080 细胞凋亡的膜联蛋白 V 的生物分析

[0130] 使用膜联蛋白 V 生物分析法区分通过凋亡途径死亡的细胞和通过坏死死亡的细胞。了解罗勒烯和红没药烯如何导致细胞死亡是关键的。如果化合物导致坏死性死亡，它们将具有非常小的用作治疗药的潜力。这是因为坏死细胞破裂并将其内容物释放到周围环境中，从而导致对临近的非靶细胞潜在有害的炎性应答。另一方面，凋亡产生自然孤立形式的细胞自杀，其不导致炎症。

[0131] 膜联蛋白 V 生物分析法利用凋亡细胞质膜中的早期变化，在此期间，磷脂酰丝氨酸 (PS)，一种膜结合磷脂，从双层膜的内表面转位到外表面，从而使 PS 与环境相接触。该变化发生在膜出泡之前，远早于 DNA 片段化，从而使之成为早期凋亡细胞的理想标志物。膜联蛋白 V 是对 PS 具有高亲和性的 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白。在该研究中，膜联蛋白 V 偶联于称作 FITC 的荧光标记物，以产生膜联蛋白 V-FITC 偶联物。FITC 通过荧光显微镜观察时发出具有深绿 / 黄色的荧光。因此，早期凋亡细胞将在其质膜上结合膜联蛋白 V-FITC，发出绿 / 黄色荧光，而晚期凋亡细胞将在胞浆和膜上都发出绿 / 黄色荧光。

[0132] 为了鉴定坏死细胞，使用另一种染色剂碘化丙啶 (PI)。PI 是 DNA 嵌入剂，对细胞的染色质进行染色，并发出红 / 橙色荧光。由于 PI 不能穿过完整的质膜，它仅对具有受损膜的细胞，即变漏的坏死或晚期凋亡细胞的染色质进行染色。

[0133] 使 HT1080 细胞以 1×10^6 细胞 /ml 的细胞密度、于 37℃和 5% CO_2 条件下生长在 12 孔板的盖片 (cover-slip) 上。一旦建立，这些培养物就用 0. 2% 提取物溶液 (存在于 2 μ l 乙醇中的 2 μ l 提取物和 996 μ l 培养基) 处理 24 小时。还在相同条件下进行未处理对照。

[0134] 根据生产商的方案进行膜联蛋白 V-FITC 和 PI 染色 (Oncogene™ ResearchProducts, Boston USA)。去除所有的生长培养基，将细胞用 1ml PBS 洗一次，向细胞中加入 500 μ l 结合缓冲液。将 10 μ l 培养基结合剂 (含有 $CaCl_2$ 作为钙源，因为膜联蛋白 V-PS 结合是 Ca^{2+} 依赖性的) 和 1. 25 μ l 膜联蛋白 V-FITC 加入孔中。然后在室温 (～ 22℃) 避光孵育 15 分钟。吸除所有的培养基，向细胞加入 500 μ l 冷的结合缓冲液。加入

10μl 碘化丙啶溶液。

[0135] 从孔中取出盖片，并使用 Vectashield™ 安装介质以细胞面朝下安装到载玻片上。立即在荧光显微镜下使用 FITC 和罗丹明滤片以 25 倍放大倍数来观察细胞。

[0136] 实施例

[0137] 下面的膜联蛋白 V 测试显示 12 小时期间对用 5μM 红没药烯处理的 HT1080 人成纤维肉瘤细胞中凋亡性细胞死亡的诱导。细胞发出绿色荧光（图中显示为白色）表明进入了凋亡，凋亡是一种程序化的细胞死亡（见图 11）。

[0138] 用 100μM 罗勒烯处理的 S180 成纤维肉瘤细胞和 HT1080 人成纤维肉瘤细胞在 12 小时期间观察到了类似的结果。

[0139] 迄今所测试的各化合物是香没药或 Haddi 的主要组分。至于分离和验证没药或 molmol 的主要组分还要做许多工作。从这一方面说，尤其将关注 furanosesquiterpenoid 抗肿瘤特性的验证，其中某些 furanosesquiterpenoid 仍待鉴定和分析。

[0140] 正常成纤维细胞

[0141] 对照培养物中生长的正常成纤维细胞显示凋亡细胞非常低的常态发生率，计数的总共 400 个细胞中凋亡细胞为 3%，而正常活细胞为 97%。当正常成纤维细胞生长在含 666μg/ml 的没药乙醇提取物的培养基中时，产生的凋亡细胞远少于 S180 和 HT1080 肿瘤细胞系，从孵育 6 小时后的 4.5% 凋亡细胞增加至 24 小时后的 32%。当细胞生长在含 234μg/ml 没药乙醇提取物的培养基时，观察到较低百分比的凋亡细胞，从孵育 6 小时后的 6.25% 增加至孵育 24 后的 19.25%。见图 12。

[0142] 正常成纤维细胞成长在对照培养基中的独立实验中，显示凋亡细胞的稍常态发生率，计数的总共 400 个细胞中凋亡细胞为 2.25%，而正常活细胞为 97.75%。当正常成纤维细胞生长在含 666μg/ml 的 Haddi 己烷提取物的培养基中时，产生的凋亡细胞远少于 S180 和 HT1080 肿瘤细胞系，从孵育 6 小时后的 16% 凋亡细胞增加至 24 小时后的 37%。当细胞生长在含 201μg/mlHaddi 己烷提取物的培养基时，观察到较低百分比的凋亡细胞，从孵育 6 小时后的 11% 增加至孵育 24 后的仅 25.5%。见图 13。

[0143] 注意到 Haddi 己烷提取物在导致 S180 肿瘤细胞凋亡方面比没药乙醇提取物表现稍好。没药乙醇提取物和 Haddi 己烷提取物处理在 HT1080 人成纤维肉瘤细胞中凋亡细胞百分比上产生非常类似的结果。差异不显著。

[0144] 明显可见两种提取物都在转化的成纤维肉瘤细胞中产生比在正常成纤维细胞中明显更高水平的凋亡。这意味着这些提取物在合适剂量下对肿瘤细胞具有特异活性。

[0145] 在对罗勒烯和红没药烯的特异应答方面也获得了类似的结果。此外，当处理含成纤维细胞和肿瘤细胞的混合培养物时，正常成纤维细胞表现为存活，而肿瘤细胞凋亡。

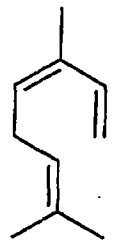
[0146] 该实验结果示于图 14，其中混合组织培养物用 5μM 红没药烯处理 12 小时。注意到扁平的成纤维细胞存活，而肿瘤细胞化为凋亡小体。在图 15 中，混合组织培养物用 100μM 罗勒烯处理 12 小时。注意到成纤维细胞铺展开来，而肿瘤细胞化为凋亡小体。

[0147] 以上引用的所用文献都通过引用并入本文。

[0148] 以下内容对应原申请权利要求书中的技术方案。

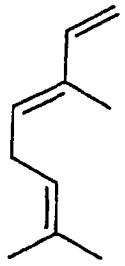
[0149] 1. 化合物在制造用于治疗或预防癌症的药物中的用途，其中所述的化合物是萜或其氧化衍生物，所述萜选自：

[0150]



I）

和

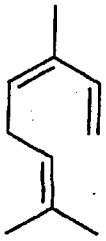


[0151] 顺式 - β - 罗勒烯 反式 - β - 罗勒烯 ;以及

[0152] II) 红没药烯型的单环倍半萜。

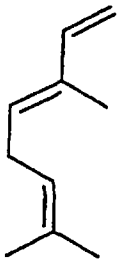
[0153] 2. 一种治疗或预防癌症的方法，包括向需要这种治疗的患者施用有效剂量的化合物，其中所述化合物是萜或其氧化衍生物，所述萜选自 :

[0154]



I）

和



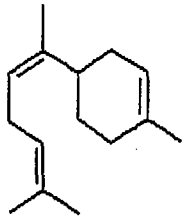
[0155] 顺式 - β - 罗勒烯 反式 - β - 罗勒烯 ;以及

[0156] II) 红没药烯型的单环倍半萜。

[0157] 3. 根据项 1 的用途或权利要求 2 的方法，其中所述的化合物是反式 - β - 罗勒烯。

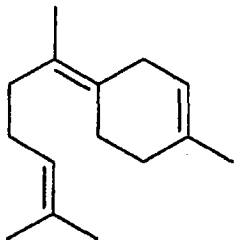
[0158] 4. 根据项 1 的用途或权利要求 2 的方法，其中所述的化合物是

[0159]



[0160] α - 红没药烯或

[0161]



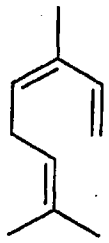
[0162] γ - 红没药烯。

[0163] 5. 根据项 1 的用途或权利要求 2 的方法，其中所述化合物的使用浓度为 0.2μM-100mM。

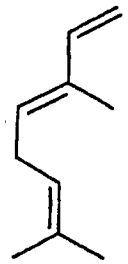
[0164] 6. 一种药物组合物，包含萜类化合物或其氧化衍生物以及药学上可接受的赋形

剂、载体、辅药或赋形药，其中所述的萜选自：

[0165]



I）



和

[0166] 顺式 -β- 罗勒烯 反式 -β- 罗勒烯；以及

[0167] II）红没药烯型的单环倍半萜。

[0168] 7. 根据项 6 的药物组合物，其配制成使所述组合物的单一单位剂量提供浓度为 0.2μM-100mM/ 单位剂量的萜类化合物。

[0169] 8. 根据项 1 的用途或权利要求 2 的方法，其中所述的癌症是乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、结肠癌、肺癌、胰腺癌、肠癌、黑素瘤、睾丸癌、宫颈癌、纤维肉瘤、扁平细胞癌、白血病、星细胞瘤和神经胶质瘤。

[0170] 9. 香没药 (commiphora guidotti) 提取物在制造用于治疗或预防癌症的药物中的用途。

[0171] 10. 一种治疗或预防癌症的方法，包括向需要这种治疗的患者施用有效剂量的香没药提取物。

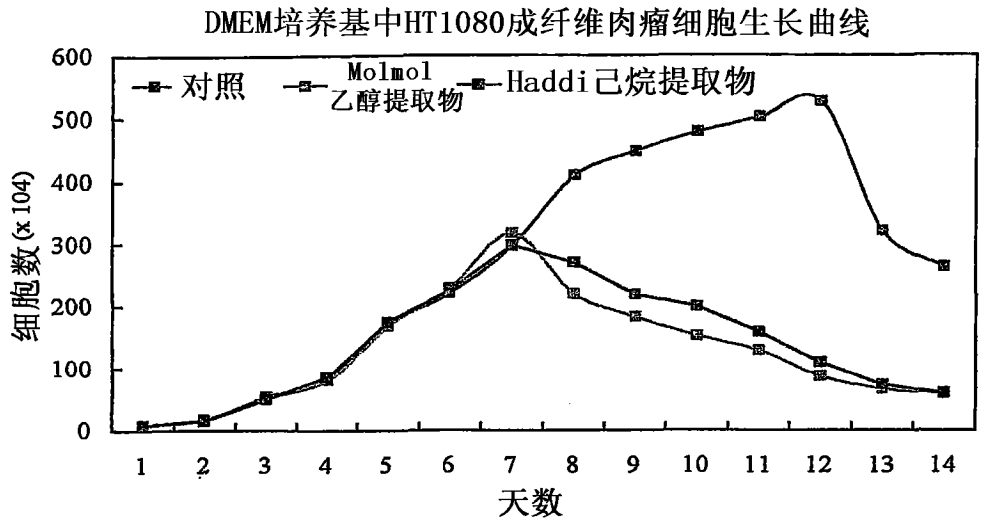

DMEM培养基中HT1080成纤维肉瘤细胞生长曲线
对照
Molmol
乙醇提取物
Haddi己烷提取物
细胞数(x104)
600
500
400
300
200
100
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
天数

图 1

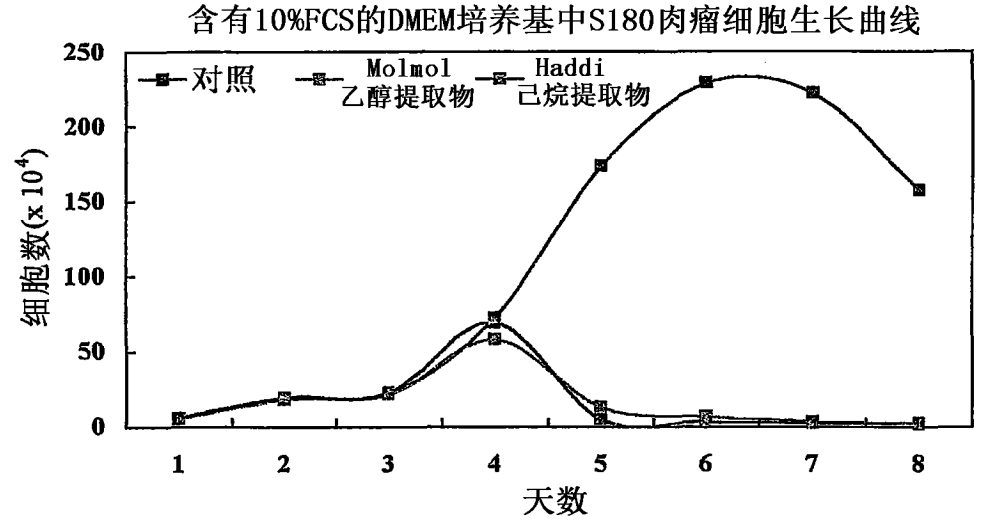

含有10%FCS的DMEM培养基中S180肉瘤细胞生长曲线
对照
Molmol
乙醇提取物
Haddi
己烷提取物
细胞数(x 10⁴)
250
200
150
100
50
0
1
2
3
4
5
6
7
8
天数

图 2

Molmol乙醇提取物作用于S180肉瘤细胞24、48和72小时的细胞毒性%

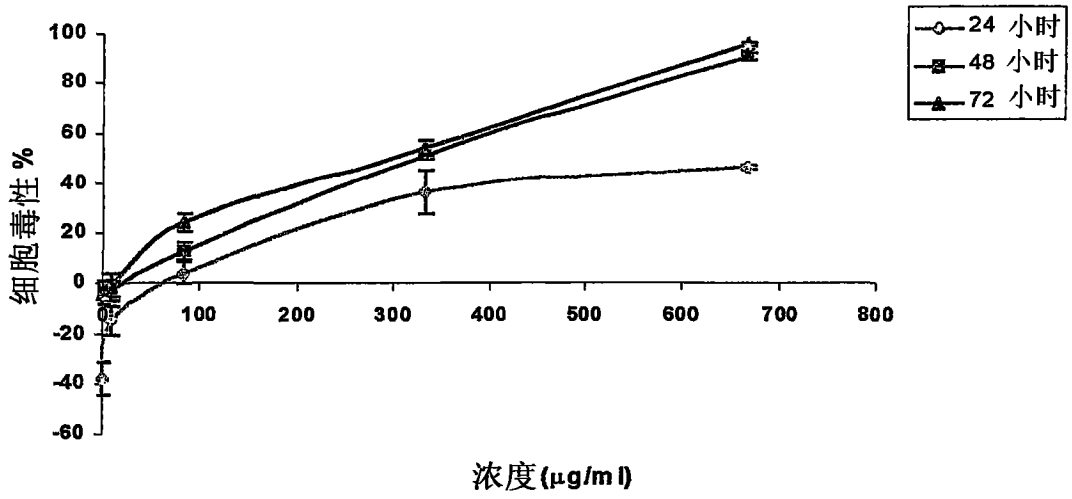


图 3

Molmol乙醇提取物作用于HT1080
成纤维肉瘤细胞24、48和72小时的细胞毒性%

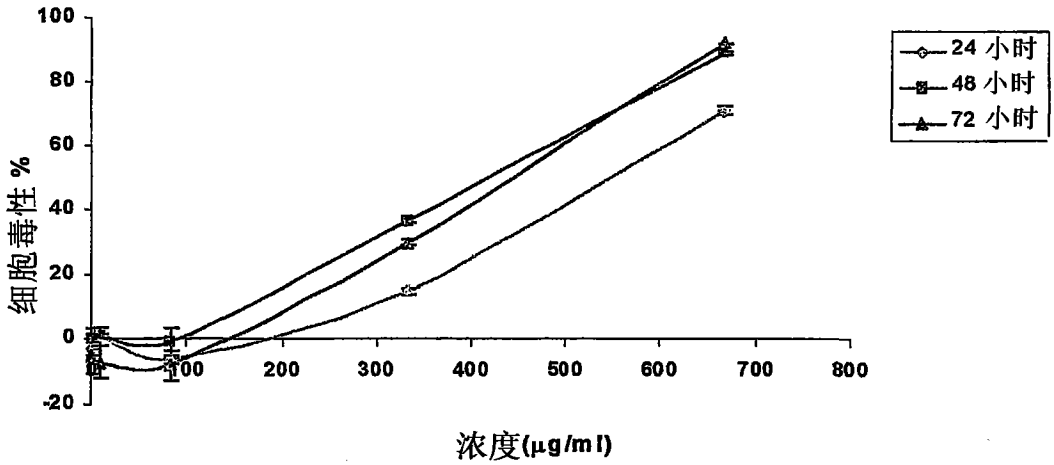


图 4

Haddi己烷提取物作用于S180肉瘤细胞24、48和72小时的细胞毒性%

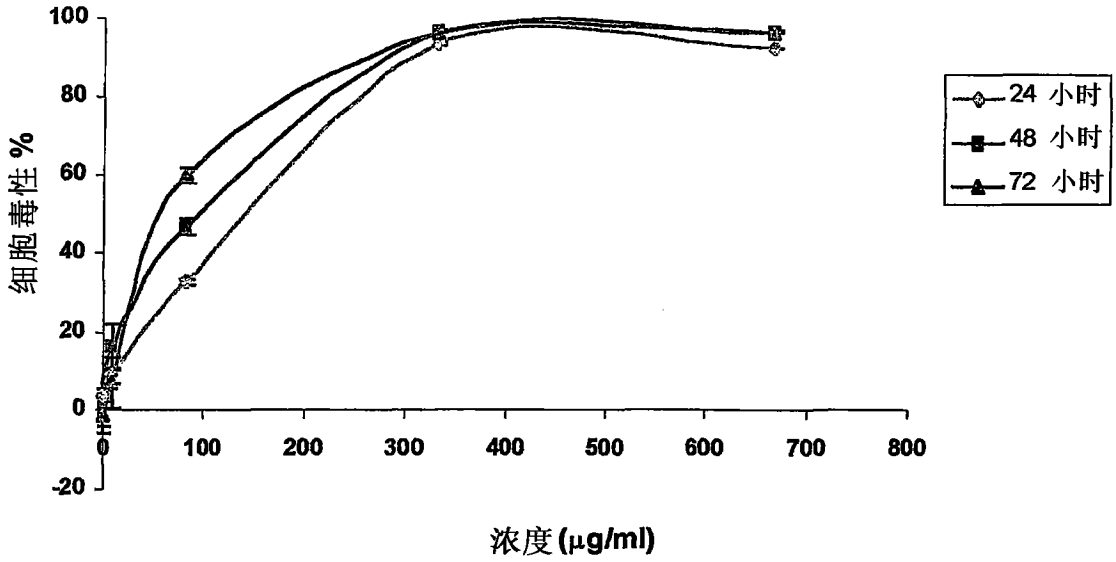


图 5

Haddi己烷提取物作用于HT1080成纤维肉瘤细胞24、48和72小时的细胞毒性%

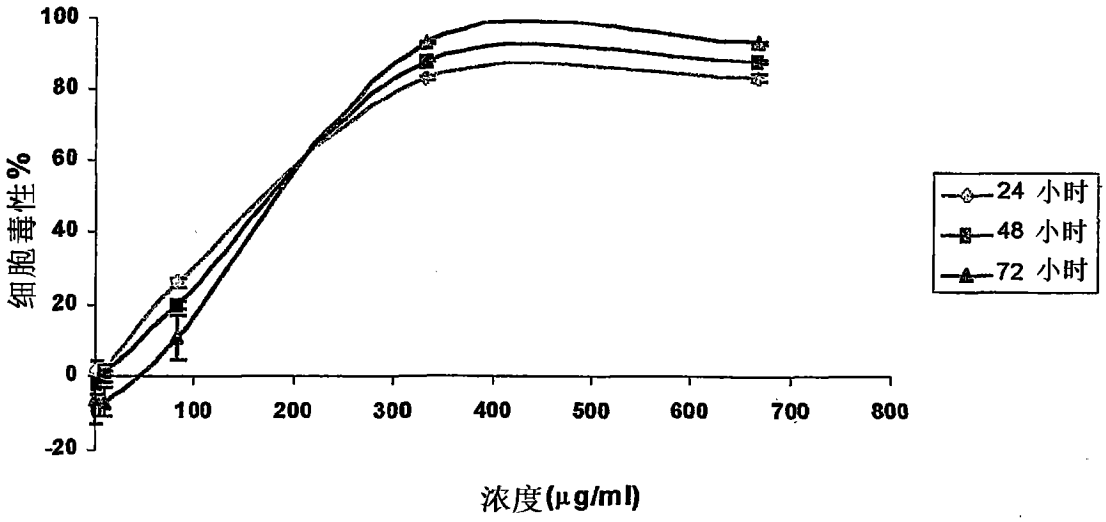


图 6

24、48和72小时后罗勒烯细胞毒性的测定(MTT分析法),使用S180细胞

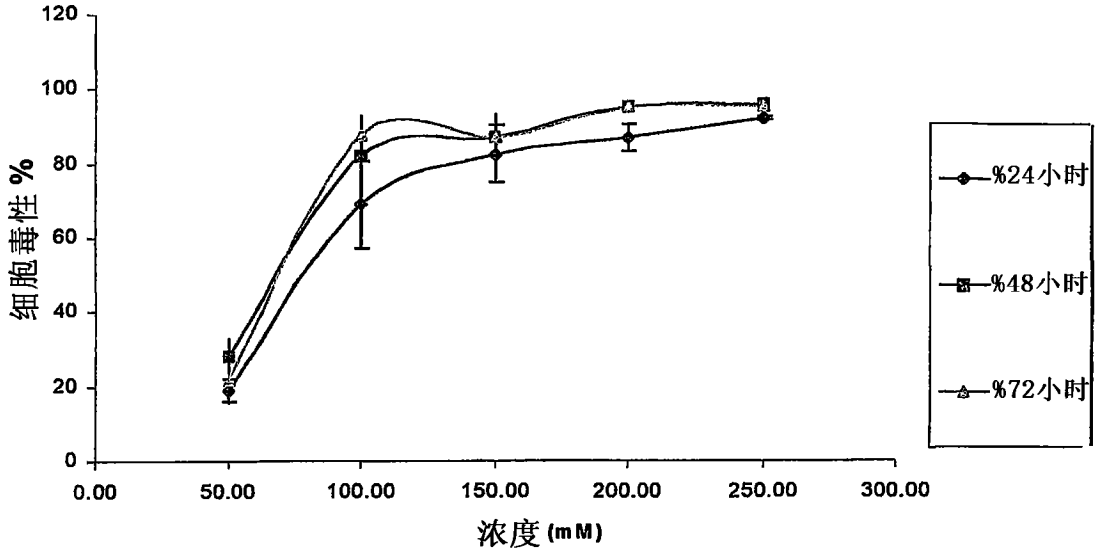


图 7

24、48和72小时后罗勒烯细胞毒性的测定(MTT分析法),使用HT1080细胞

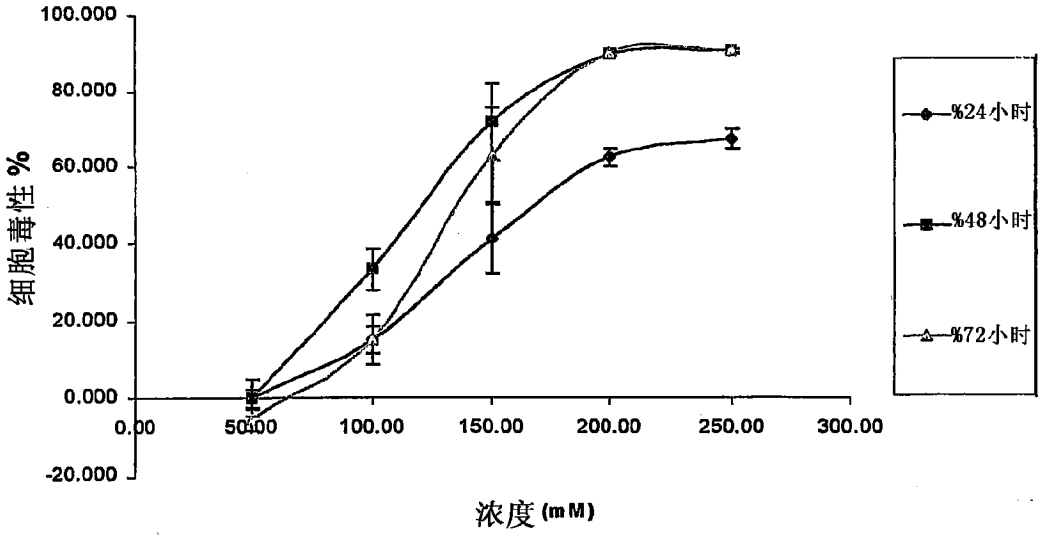


图 8

24、48和72小时后γ-红没药烯细胞毒性的测定(MTT分析法),使用S180细胞

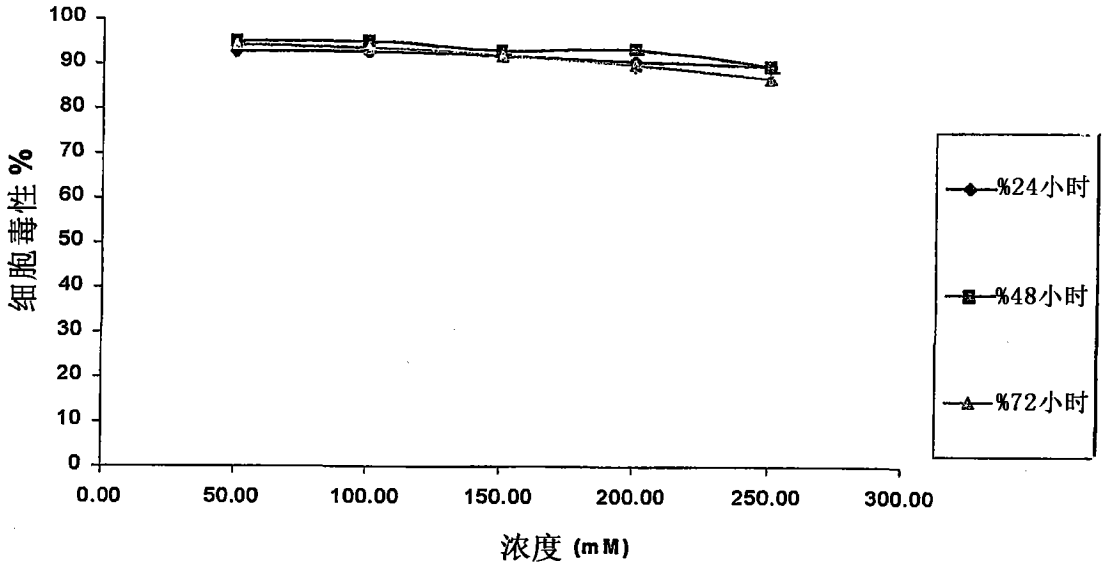


图 9

24、48和72小时后γ-红没药烯细胞毒性的测定,使用HT1080细胞

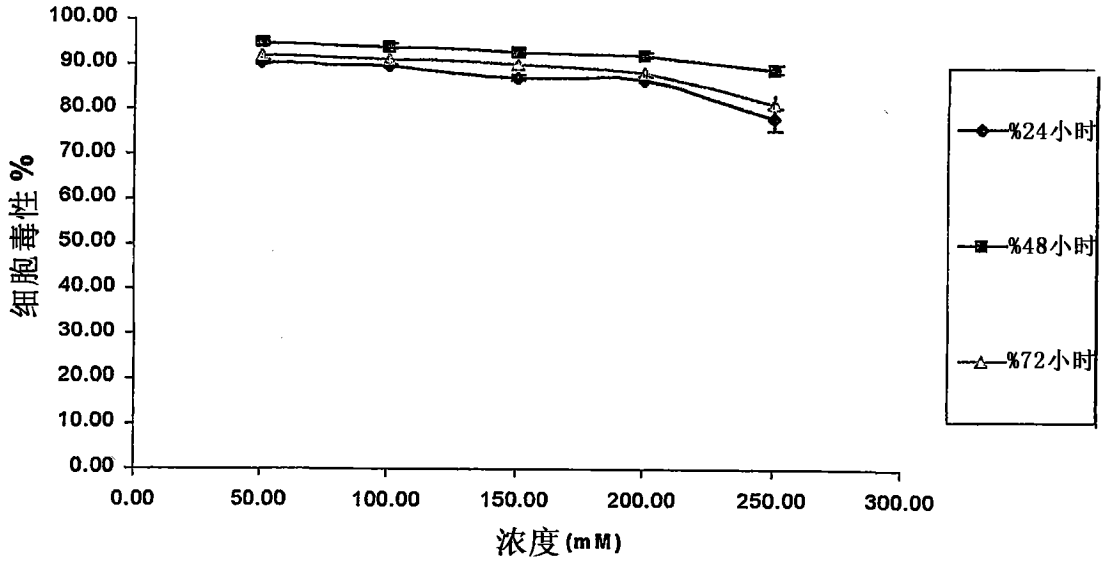


图 10

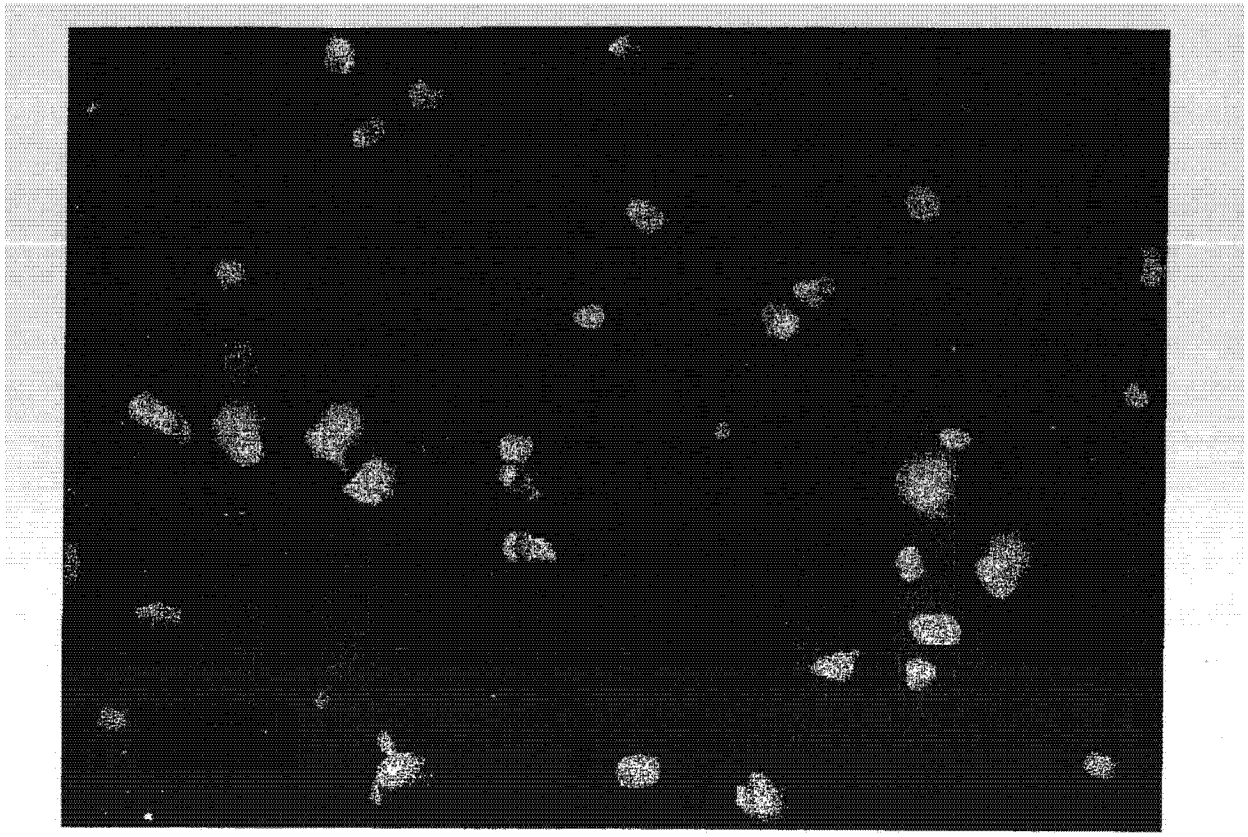


图 11

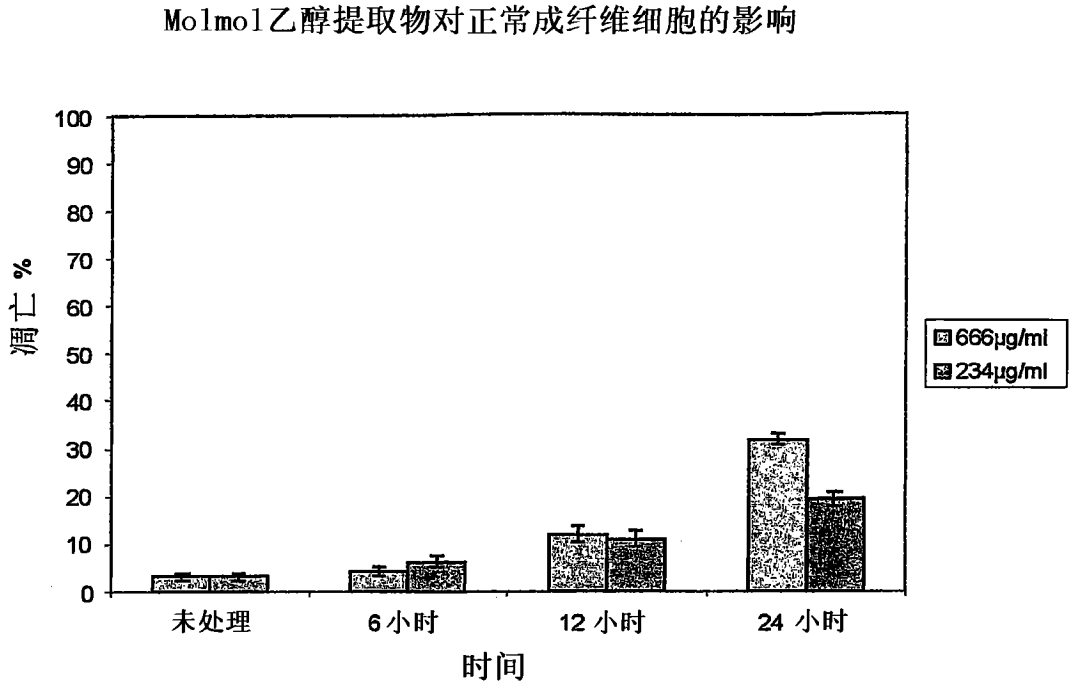

Molmol乙醇提取物对正常成纤维细胞的影响
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
凋亡 %
未处理
6 小时
12 小时
24 小时
时间
666μg/ml
234μg/ml

图 12

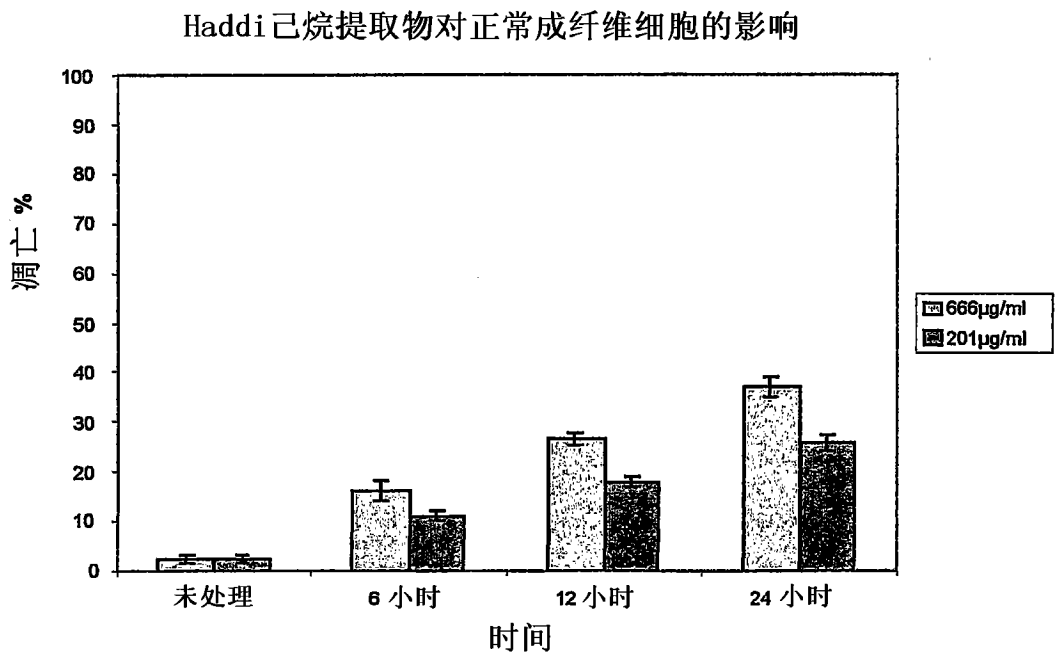

Haddi己烷提取物对正常成纤维细胞的影响
凋亡 %
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
未处理
6 小时
12 小时
24 小时
时间
666μg/ml
201μg/ml

图 13

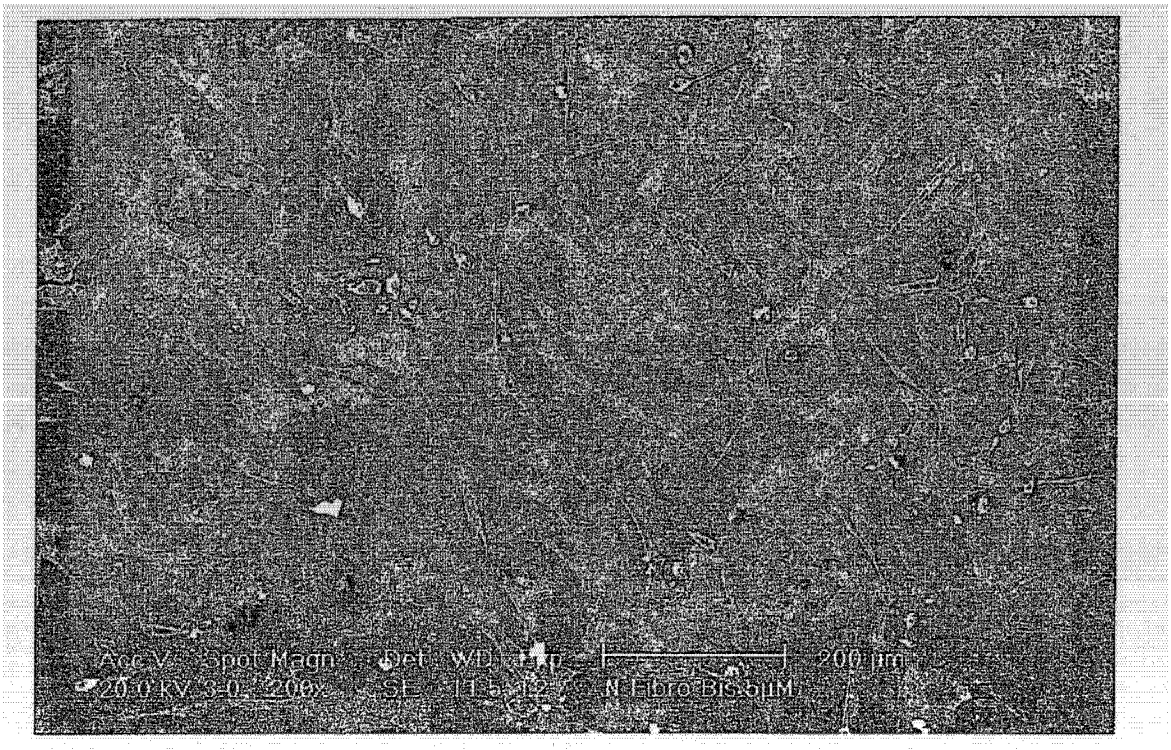

200 µm

图 14

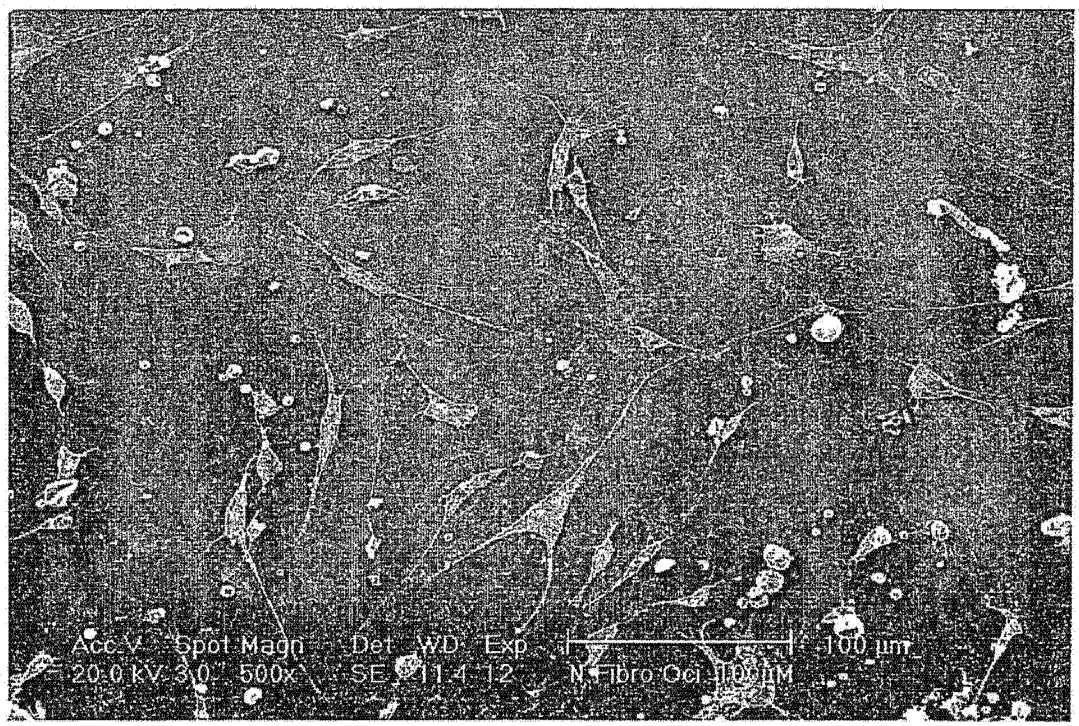

Acc.V Spot Magn Det WD Exp 100 µm
20.0 kV 3.0 500x SE 11.4 12 N Fibro Oci 100µM

图 15