公告本

發明專利說明書

（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：97122699

※ 申請日期：97.6.18

※IPC 分類：A61K 36/07 (2006.01)
A61K 31/575 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

一、發明名稱：（中文/英文）

利用牛樟芝萃取物去氫硫色多孔菌酸(dehydrosulphurenic acid)以抑制腫瘤細胞生長之用途

二、申請人：（共 1 人）

姓名或名稱：（中文/英文）

財團法人台灣基督長老教會馬偕紀念社會事業基金會馬偕紀念醫院 / Mackay Memorial Hospital

代表人：（中文/英文）蔡正河

住居所或營業所地址：（中文/英文）

台北市 104 中山區中山北路二段 92 號 / No.92, Sec. 2, Zhongshan N Rd., Zhongshan District, Taipei City 104, Taiwan（R.O.C）

國　籍：（中文/英文）　中華民國/ R.O.C.

三、發明人：（共 3 人）

姓　名：（中文/英文）

1. 陳裕仁
2. 周正仁
3. 張東柱

國　籍：（中文/英文）

1.-3. 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：

☐ 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。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種化合物之應用，尤其係關於一種利用由牛樟芝（*Antrodia cinnamomea*）萃取物中所分離純化之化合物抑制腫瘤細胞生長之用途。

【先前技術】

牛樟芝(*Antrodia cinnamomea*)，屬於非褶菌目、多孔科之多年生蕈菌類，別名樟菇、紅樟或紅樟芝等，為台灣本土特有藥用真菌，其係腐生於唯一宿主牛樟樹（*Cinnamomum kanehirae*）之中空樹幹內壁。其子實體生長緩慢，再加上牛樟樹分布數量極為稀少，野生種牛樟芝得之不易，故更顯其彌足珍貴。在台灣民俗醫學上，牛樟芝為上好的解毒劑，對食物中毒、農藥中毒，均有良好的解毒作用，民間亦常用以治療肝病毒感染等肝臟相關疾病。

牛樟芝如同一般食藥用之蕈菇類，具有許多複雜的成分，且數種成分已被證實具有藥理及生物活性，其中分離自牛樟芝之萃取物與腺核甘(adenosine)可藉由分別抑制 c-jun 氨基末端激酶(C-jun kinase, JNK)與 p38 激酶(p38 kinase)的活性並活化腺核甘 A 受體，進而預防缺血誘發之 PC12 細胞凋亡

(Lu, M. K., Cheng, J. J., Lai, W. L., Lin, Y. J., and Huang, N. K. 2008. Fermented Antrodia cinnamomea extract protects rat PC12 cells from serum deprivation-induced apoptosis: the role of the MAPK family. *J.Agric.Food Chem.*, 56(3): 865-874)(Lu, M. K., Cheng, J. J., Lai, W. L., Lin, Y. R., and Huang, N. K. 2006. Adenosine as an active component of Antrodia cinnamomea that prevents rat PC12 cells from serum deprivation-induced apoptosis through the activation of adenosine A(2A) receptors. *Life Sci.*, 79(3): 252-258)；萃取自牛樟芝子實體之乙酸乙酯(ethyl acetate)可減弱人類肝癌細胞PLC/PRF/5PLC/PRF/5 之侵犯(invasion)，且其作用機制係與抑制 NF-kappa B 活性相關(Hsu, Y. L., Kuo, P. L., Cho, C. Y., Ni, W. C., Tzeng, T. F., Ng, L. T., Kuo, Y. H., & Lin, C. C. 2007. Antrodia cinnamomea fruiting bodies extract suppresses the invasive potential of human liver cancer cell line PLC/PRF/5 through inhibition of nuclear factor kappaB pathway. *Food Chem.Toxicol.*, 45(7): 1249-1257)；分離自牛樟芝之多醣體可藉由抑制血管內皮細胞生長因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)受體訊息傳導及血管新生，以抑制

cyclin D1 的表現(Cheng, J. J., Huang, N. K., Chang, T. T., Wang, D. L., & Lu, M. K. 2005. Study for anti-angiogenic activities of polysaccharides isolated from Antrodia cinnamomea in endothelial cells. *Life Sci.*, 76(26): 3029-3042)。

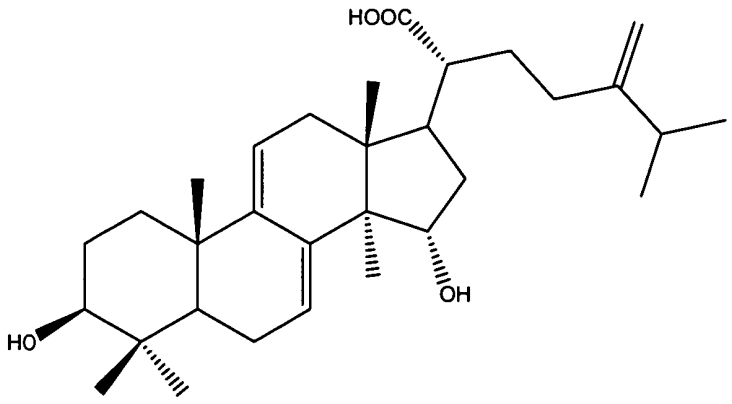
白血病(leukemia)俗稱血癌，位居兒童惡性腫瘤發生率首位，佔所有腫瘤的40%左右，其形成主因為白血球前驅細胞受遺傳、病毒感染、藥物等因素的影響，造成細胞異常增生。雖然目前臨床上治療有許多治療進展，然而治療時仍常有副作用大及高復發率所致無法完全治癒的困難。胰臟癌主要為胰管上皮細胞的腺癌，由於胰臟位處於後腹腔，癌症初期的症狀不明顯，檢查上也比較困難，同時由於此癌症具有高度復發以及遠處轉移的特性，以及其對傳統化療藥物與放射線治療之抗性，因此其在成人癌症中整體治療效果目前仍不理想，無法以手術切除者，整體五年存活率低於5 %，係為高致死率之惡性病。由於白血病以及胰臟癌治癒率低，因此能否開發副作用少且可有效治療該些癌症之新穎藥物仍是目前迫切需要解決的課題。

雖然由目前諸多報導可得知牛樟芝萃取物具有藥學治療功效，但迄今未有牛樟芝萃取物可用於抑制白血病以及胰

臟癌癌細胞之相關研究結果，且雖然其所含成分已陸續被分析出，但究竟萃取物中之何種有效成分可促成牛樟芝達到抑制腫瘤細胞效果，目前則仍處於試驗階段，並未有具體之相關有效成分發表，有待進一步實驗研究來釐清，故若能將牛樟芝萃取物進一步純化分析找出該萃取物中所含真正有效抑癌成分，並將其應用於抑制白血病與胰臟癌癌細胞生長上，對於人類白血病以及胰臟癌之治療實將產生莫大的助益。

【發明內容】

為研究出牛樟芝萃取物中所含可抑制癌細胞生長之有效成份，本發明係由牛樟芝萃取物中分離純化出具下列結構式之化合物：



(1)

如式（1）結構式之化合物，其化學名為 24-亞甲基羊毛甾烷 -7,9(11)- 二烯 -3β,15α- 二醇 -21- 酸 (24-methylenelanosta-7,9(11)-diene-3β,15α-diol-21-oic acid)，

又稱去氫硫色多孔菌酸（dehydrosulphurenic acid），分子式為 $C_{31}H_{48}O_4$，分子量為 484。

本發明中之去氫硫色多孔菌酸化合物係分離純化自牛樟芝子實體之有機溶劑萃取物，有機溶劑可包括醇類（例如甲醇、乙醇或丙醇）、酯類（例如乙酸乙酯）、烷類（例如己烷）或鹵烷（例如氯甲烷、氯乙烷），其中較佳者為乙醇，但並不以此為限，凡是可自牛樟芝萃取出去氫硫色多孔菌酸化合物之有機溶劑皆可應用於此。

去氫硫色多孔菌酸化合物係藉由誘發人類胰臟癌細胞 BxPc-3 產生細胞凋亡(apoptosis)，進而抑制其生長；去氫硫色多孔菌酸化合物對於人類白血病細胞 U937 之生長抑制機制，則係經由細胞凋亡以及有絲分裂障礙(mitotic catastrophe)之路徑。

藉由前述化合物，本發明係將其應用於抑制腫瘤細胞生長上，使能進一步用於治療癌症之醫藥組成份中，增益癌症之治療效果。本發明化合物得應用之範圍包括抑制白血病以及胰臟癌細胞等之生長，使該等腫瘤細胞無法迅速生長，進而抑制腫瘤之增生，延緩腫瘤之惡化，因此，可進一步利用於白血病以及胰臟癌等癌症之治療上。

另一方面，本發明中亦可將去氫硫色多孔菌酸化合物利用於治療白血病以及胰臟癌等醫藥組成物之成分中，藉以抑制該等腫瘤細胞的生長。前述醫藥組成物除包括有效劑量之去氫硫色多孔菌酸化合物外，尚可包括藥學上可接受的載體。載體可為賦形劑（如水）、填充劑（如蔗糖或澱粉）、黏合劑（如纖維素衍生物）、稀釋劑、崩解劑、吸收促進劑或甜味劑，但並未僅限於此。本發明醫藥組成物可依一般習知藥學之製備方法生產製造，將有效成分劑量之去氫硫色多孔菌酸化合物與一種以上之載體相混合，製備出所需之劑型，此劑型可包括錠劑、粉劑、粒劑、膠囊或其他液體製劑，但未以此為限。

以下將配合圖式進一步說明本發明的實施方式，下述所列舉的實施例係用以闡明本發明，並非用以限定本發明之範圍，任何熟習此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可做些許更動與潤飾，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

【實施方式】

首先取牛樟芝（*Antrodia cinnamomea*）子實體利用習知萃取方式，以水或有機溶劑進行萃取，藉以取得牛樟芝水萃取物或有機溶劑萃取物。其中，有機溶劑

可包括醇類（例如甲醇、乙醇或丙醇）、酯類（例如乙酸乙酯）、烷類（例如己烷）或鹵烷（例如氯甲烷、氯乙烷），但並不以此為限。其中較佳者為醇類，更佳者為乙醇。經萃取過後之牛樟芝有機溶劑粗萃取物，可進一步藉由各種管柱層析如:Diaion HP20，Silica gel，Sephadex LH-20 及逆相層析如 RP-C18 等加以分離純化，之後再對所得每一純質進行抑癌效果的測試。再針對具抑癌效果之分液藉由各種光譜數據如核磁共振(NMR)、質譜(MS)或紫外線光譜(UV)，比旋光值進行成分結構式分析，最終即發現本發明中如式(1)之去氫硫色多孔菌酸化合物係具有抑制不同癌症腫瘤細胞生長之效果。

為證實去氫硫色多孔菌酸化合物對腫瘤細胞生長之抑制效果，本發明中係以 MTT 分析法，根據美國國家癌症研究所（National Cancer Institute, NCI）抗腫瘤藥物篩檢模式，對包括白血病與胰臟癌等腫瘤細胞進行細胞存活率之測試，並藉由檢測去氫硫色多孔菌酸化合物處理癌細胞後之形態觀察以及細胞週期分布情形進一步了解去氫硫色多孔菌酸化合物對癌細胞之作用機制。由該些測試證實去氫硫色多孔菌酸化合物可降低白血病細胞（包括 U937）以及胰臟癌細胞（包括 BxPc-3）等之細胞生長率。此外，由形態學觀察結果可知去氫硫色多孔菌酸化合物所引發白血病癌細胞死亡之形態包含細

胞凋亡(apoptosis)及有絲分裂障礙(mitotic catastrophe)，而胰臟癌細胞形態經去氫硫色多孔菌酸化合物處理後，先有大量圓球狀細胞接著出現明顯凋亡現象。同時細胞週期之結果顯示去氫硫色多孔菌酸化合物會造成白血病癌細胞之週期初期呈現明顯 G_2/M 積堆，接續為 S 期之增加；經處理後之胰臟癌細胞週期則會停滯於 G_0/G_1 期。去氫硫色多孔菌酸化合物誘發白血病癌細胞生長抑制之可能途徑包含細胞凋亡與有絲分裂障礙。基於上述結果，可將去氫硫色多孔菌酸化合物應用於白血病與胰臟癌等腫瘤細胞之生長抑制上，並可進一步利用於白血病與胰臟癌等癌症之治療。茲對前述實施方式詳盡說明如下：

實施例 1：

去氫硫色多孔菌酸（dehydrosulphurenic acid）的分離

首先取約 200 克之牛樟芝（*Antrodia cinnamomea*）子實體，利用習知萃取方式，以水於 80℃下萃取 3 次，濃縮萃取液獲得 25.4 克之固體萃取物；剩下之子實體殘渣以乙醇加熱迴流(reflux)4 次，每次共約 6 小時，接著進行萃取物之過濾並使有機溶劑揮發。將乙醇濃縮物(51.8 克)懸浮於 1.5 升水中，並以體積比為 1:1 之二氯甲烷(dichloromethane)與水劃分之，藉以分為有機成份部份與水溶性成份部份。將該有機成份溶於甲醇中並區分為可溶於甲醇部份(38.1 克)以及不溶於甲醇部份(1.21 克)，可溶於甲醇部份則利用 Sephadex LH-20

管柱以甲醇為移動相進行成分分離，接著應用矽膠薄片置進甲苯/乙酸乙酯/乙酸溶媒系統展開的薄層層析法(Thin Layer Chromatography, TLC)所顯示的概況，將分離的結果分為 5 個分部(fraction)，再經矽膠柱層層析法(Column Chromatography)分離成 8 個次分部，其所用的沖提劑為甲醇溶劑以梯度比方式加入二氯甲烷溶劑中，其第 3 個分部(32.1 克)再溶解於甲醇並區分為可溶於甲醇部份(30.5 克)以及不溶於甲醇部份(1.1 克)，可溶於甲醇部份，其中第 3 次分部以高效液相層析(High Performance Liquid Chromatography System, HPLC)，使用 Cosmosil 5C18-AR-II 管柱及甲醇/水/乙酸溶劑系統，進而獲得去氫硫色多孔菌酸化合物。

去氫硫色多孔菌酸化合物之化學名為 24-亞甲基羊毛甾烷-7,9(11)-二烯-3β,15α-二醇-21-酸(24-methylenelanosta-7,9(11)-diene-3β,15α-diol-21-oic acid)，分子式為 $C_{31}H_{48}O_4$，分子量為 484，呈白色粉末狀。核磁共振（NMR）分析值則如下所示：[α]D +60.0°(c 0.25, MeOH); 1H NMR (300 MHz, pyridine-d5): δ 1.90 (2H, m, H-2), 3.43 (1H, t, *J* = 7.6 Hz, H-3), 1.32 (1H, m, H-5), 2.16 (2H, m, H-6), 6.48 (1H, br s, H-7), 5.39 (1H, d, *J* = 6.0 Hz, H-11), 2.37 (1H, H-12β), 2.70 (1H, H-12α), 4.75 (1H, dd, *J* = 5.9, 9.3 Hz, H-15), 1.09 (3H, s, H-18), 1.10 (3H, s, H-19), 2.23 (1H, H- 25), 1.01 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-26), 0.99 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-27), 4.85 (1H, br s, H-28a), 4.88 (1H, br s, H-28b), 1.42 (3H, s, H-29), 1.17 (3H, s, H-30), 1.12 (3H, s, H-31); 13C NMR (75

MHz, pyridine-d5): δ 36.9 (t, C-1), 28.7 (t, C-2), 78.0 (d, C-3), 39.4 (s, C-4), 49.8 (d, C-5), 23.6 (t, C-6), 122.3 (d, C-7), 142.0 (s, C-8), 147.1 (s, C-9), 38.0 (s, C-10), 116.3(d, C-11), 36.5 (t, C-12), 45.0 (s, C-13), 52.6 (s, C-14), 73.8 (d, C-15),39.6 (t, C-16), 46.5 (d, C-17), 16.9 (q, C- 18), 23.1 (q, C-19), 48.9 (d, C-20), 178.6 (s, C-21), 32.8 (t, C-22), 31.9 (t, C-23), 155.9 (s, C-24), 34.3 (d, C-25), 21.9 (q, C-26), 22.0 (q, C-27), 107.1 (t, C-28), 18.3 (q, C-29), 28.8 (q, C-30), 16.6 (q, C-31)。

實施例 2：

體外抗白血病細胞之活性測試

為進一步測試去氫硫色多孔菌酸化合物對腫瘤細胞之抑制效果，本實施例將根據美國國家癌症研究所（NCI）抗腫瘤藥物篩檢模式進行之。取去氫硫色多孔菌酸化合物，加入含有人類白血病細胞U937(monoblastoid leukemic cell line)之培養液中，以進行腫瘤細胞存活率之測試。細胞存活率之測試可採習知之 MTT 分析法進行分析，而 U937 為組織淋巴瘤細胞，購自美國菌種保存中心(American Type Culture Collection, ATCC)，其係屬於人類白血病細胞系的一種，在造血過程中被分級為單核母細胞(monoblasts)。

MTT 分析法是一種常見用於分析細胞增生（cell proliferation）、存活率（percent of viable cells）以及

細胞毒性（cytotoxicity）的分析方法。其中，MTT（3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]2,5-diphenyltetrazolium bromide）為一黃色染劑，它可被活細胞吸收並被粒腺體中的琥珀酸四唑還原酶（succinate tetrazolium reductase）還原成不溶水性且呈藍紫色的 formazan，因此藉由 formazan 形成與否，即可判斷並計算細胞之存活率。

首先將人類白血病細胞 U937 置於含有牛血清(fetal calf serum, FCS)之 RPMI 1640 培養液中培養 24 小時，並使細胞維持於對數(exponential)生長狀態。將增生後之細胞，使用濃度分別為 0(控制組)、1.25、2.5、5、10 μg/ml 之去氫硫色多孔菌酸化合物（實驗組），於 37℃、5% CO_2 下培養 24-72 小時。其後，於避光的環境下於每一孔內加入 500 μg/ml 的 MTT，反應 4 小時後再於每一孔內加入 500 μl isopropanol 終止反應。最後以酵素免疫分析儀在 570 nm 吸光波長下測定其吸光值，藉以計算細胞的存活率。所得結果係以平均值±標準誤差值(SEM)表示之，並藉由 t 檢定(*t*-test)統計程式比對各實驗結果間差異，其中 *p* 值小於 0.05 代表具有統計上之顯著差異，其結果如第一圖所示。

由第一圖可知，於試驗第一天，藉由濃度為 1.25、2.5、5、10 μg/ml 之去氫硫色多孔菌酸化合物的作用，其可有效抑制人類白血病細胞 U937 之生長，且生長抑制率會隨去氫硫

色多孔菌酸化合物濃度增加而提升，至試驗第三天，各濃度去氫硫色多孔菌酸化合物對人類白血病細胞 U937 之生長抑制率皆超過 60%，且濃度為 5 與 10 μg/ml 之去氫硫色多孔菌酸化合物之生長抑制率可達約 95%以上，最高可達 98.9%，IC_{50} 約為 2 μg/ml(結果未示)。因此可證實牛樟芝萃取物中之去氫硫色多孔菌酸化合物確實能夠利用於白血病細胞生長之抑制，且其抑制作用係遵循劑量依賴性原則(dose-dependent manner)與時間依賴性原則(time-dependent manner)。

實施例 3：

體外抗胰臟癌細胞之活性測試

本測試亦係根據美國國家癌症研究所(NCI)抗腫瘤藥物篩檢模式進行，將分離純化之去氫硫色多孔菌酸化合物，加入含有人類胰臟癌細胞 BxPc-3 之培養液中，並採前述 MTT 分析法進行分析，藉以測試胰臟癌細胞存活率，其中，BxPc-3 屬於胰臟癌細胞系，購自美國菌種保存中心(ATCC)，其係為係為源自於人類胰腺癌之貼附型上皮細胞株。

首先將人類胰臟癌細胞 BxPc-3 培養於 DMEM 培養液中，此培養液尚包含：100 IU/ml 盤尼希林(penicillin；Invitrogen, Carlsbad, CA)、100 μg/ml 鏈黴素(Streptomycin；Invitrogen, Carlsbad, CA)、2 mM 麩醯胺酸(glutamine；

Invitrogen, Carlsbad, CA)以及 10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS；Atlanta Biologicals, Norcross, GA)。將增生後之細胞，使用濃度分別為 0(控制組)、5、10 μg/ml 之去氫硫色多孔菌酸化合物（實驗組），於 37℃、5% CO_2 下培養 24-72 小時。其後，於避光的環境下於每一孔內加入 500 μg/ml 的 MTT，反應 4 小時後再於每一孔內加入 500 μl isopropanol 終止反應。最後以酵素免疫分析儀在 570 nm 吸光波長下測定其吸光值，藉以計算細胞的存活率。所得結果係以平均值±標準誤差值(SEM)表示之，並藉由 t 檢定(*t*-test)統計程式比對各實驗結果間差異，其中 *p* 值小於 0.05 代表具有統計上之顯著差異，其結果如第二圖所示。

第二圖結果顯示，去氫硫色多孔菌酸化合物係可顯著抑制人類胰臟癌細胞 BxPc-3 之生長，且生長抑制率會隨去氫硫色多孔菌酸化合物濃度增加而提升，同時亦會隨作用時間增長而增進生長抑制率，至試驗第三天，濃度為 5 與 10 μg/ml 之去氫硫色多孔菌酸化合物之生長抑制率已超過 60%，最高可達 82.5%，IC_{50} 約為 5 μM(結果未示)。因此可證實牛樟芝萃取物中之去氫硫色多孔菌酸化合物確實能夠利用於人類胰臟癌細胞生長之抑制，且其抑制作用係遵循劑量依賴性原則與時間依賴性原則。

實施例 4：

腫瘤細胞經去氫硫色多孔菌酸化合物處理後之細胞週期分析

本試驗係利用流式細胞儀分析去氫硫色多孔菌酸化合物對人類白血病細胞U937與人類胰臟癌細胞BxPc-3之細胞增殖的影響。

取濃度為1.25、2.5、5、10 μg/ml之去氫硫色多孔菌酸化合物處理人類白血病細胞U937，以濃度為5與10 μg/ml之去氫硫色多孔菌酸化合物處理人類胰臟癌細胞BxPc-3，並分別以未經處理之U937以及BxPc-3作為控制組。取上述處理後之細胞，於4℃下以70%乙醇固定1小時，接著利用CycleTEST PLUS DNA套組(Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ)中提供之含有0.5 mg/ml 碘化丙錠(propidium iodide)與0.1 mg/ml RNAse之碘化丙錠溶液染色30分鐘，再以流式細胞儀（Flow cytometry, FACScalibur；Becton Dickionson）檢測該些細胞中的DNA含量，收集來自10^4細胞之資料並以ModFit(Becton Dickinson)軟體分析細胞週期之變化，其結果如第三圖與第四圖所示。

請參閱第三圖之結果，其顯示相較於未處理之控制組，於實驗第一天，經去氫硫色多孔菌酸化合物處理之人

類白血病細胞U937會於G2/M期呈現顯著之停滯(arrest)現象，而當去氫硫色多孔菌酸化合物濃度較高以及處理時間較長時(實驗第二及三天)，sub-G1細胞核族群比例有明顯增加趨勢，此表示去氫硫色多孔菌酸化合物會誘發細胞凋亡，多倍體(polyploid)細胞之比例亦會隨去氫硫色多孔菌酸化合物劑量的增加而增多，此結果指出可能形成多核細胞(multinucleated cell)。

請參閱第四圖，由該些結果可知經去氫硫色多孔菌酸化合物處理之人類胰臟癌細胞BxPc-3會出現顯著之G0/G1停滯，其sub-G1細胞核族群比例亦有明顯增加趨勢，但卻未出現如人類白血病細胞U937所觀察到具有多倍體細胞比例變化的現象，其係以低倍體(hypodiploid)細胞為主，此顯示人類胰臟癌細胞BxPc-3死亡之主要模式為細胞凋亡。

實施例 5：

經去氫硫色多孔菌酸化合物處理後之腫瘤細胞型態分析

將人類白血病細胞 U937 與人類胰臟癌細胞 BxPc-3 經去氫硫色多孔菌酸化合物處理 24-72 小時，以 Liu’ s 染色劑染色後，利用相位差倒立式顯微鏡直接觀察細胞外形的變

化，並以未經處理之細胞為控制組，其結果如第五圖與第六圖所示。

請參閱第五圖，由圖中細胞型態可觀察到人類白血病細胞U937經去氫硫色多孔菌酸化合物處理後，會誘發腫瘤細胞之細胞凋亡與有絲分裂障礙(mitotic catastrophe)；由第六圖之結果可知，經去氫硫色多孔菌酸化合物處理之人類胰臟癌細胞BxPc-3會呈現獨特之細胞型態變化，其中，於試驗第一天會出現圓球狀(balloon)之細胞型態，於試驗第二天後則可觀察到典型細胞凋亡之變化；其中，先前文獻亦報導，藉由TNF-α處理後處於細胞凋亡階段之類纖維母細胞(fibroblast-like cell)會出現圓球狀之細胞型態(Okamoto, K., Mizuno, M., Nakahara, N., Natsume, A., Yoshida, J., Mori, T., Hori, S., & Kobayashi, H. 2002. Process of apoptosis induced by TNF-alpha in murine fibroblast Ltk-cells: continuous observation with video enhanced contrast microscopy. *Apoptosis.*, 7(1): 77-86)，此說明去氫硫色多孔菌酸化合物可造成人類胰臟癌細胞BxPc-3之細胞凋亡。

實施例 6：

去氫硫色多孔菌酸化合物對腫瘤細胞核內DNA之影響

除前述型態外觀上的變化外，細胞凋亡發生時細胞亦會產生一些生化特性上的改變，包括細胞核染色質的濃集（chromatin condensation）、細胞皺縮裂解形成凋亡小體（apoptotic body）以及凋亡後期之DNA斷裂(internucleosomal cleavage of DNA)而在DNA電泳時形成DNA梯度(DNA ladder)等。因此為進一步確認去氫硫色多孔菌酸化合物抑制人類白血病細胞U937以及人類胰臟癌細胞BxPc-3生長係與細胞凋亡之何階段有關，本試驗利用DNA電泳檢測是否有細胞凋亡後期，細胞核內DNA裂解成梯度片段的產生。

取人類白血病細胞U937以及人類胰臟癌細胞BxPc-3經濃度為5 μg/ml之去氫硫色多孔菌酸化合物分別處理24、48與72小時，並以經4μM抗癌物質Camptothecin處理24小時之U937作為陽性對照組。取上述處理後之細胞，以0.5毫升細胞溶解緩衝液(lysis buffer)分解該些細胞，該緩衝液係含有pH為8.0之5 mM電泳緩衝液(Tris-borate, TBE)、0.25毫升Nonidet P-40以及1 mM EDTA，再加入RNase (Sigma, St. Louis, MO)至最終濃度為20 μg/ml，並置於37℃下反應1小時，進一步將細胞以300 μg/ml之proteinase K處理1小時，並分離出其DNA。將該DNA以1.5%電泳膠置於含1 μM EDTA之5 mM

TBE電泳緩衝液(pH 8.0)中進行電泳分析，接著將膠片以溴化醯液(Ethidium Bromide)染色，再於紫外光下觀察，其結果如第七圖所示。

由第七圖電泳結果顯示，相較於對照組所呈現之完整DNA片段，經去氫硫色多孔菌酸化合物處理之人類白血病細胞U937中的DNA皆明顯斷裂成梯度片段。此結果確認由去氫硫色多孔菌酸化合物誘發之U937細胞死亡模式係與細胞凋亡後期有關。此外，人類胰臟癌細胞BxPc-3之電泳結果並未觀察到DNA斷裂片段。(結果未示)

實施例 7：

腫瘤細胞經去氫硫色多孔菌酸化合物處理後粒線體膜電位(mitochondrial transmembrane potential)的變化

粒線體(Mitochondria)路徑係為目前已知誘發細胞凋亡的路徑之一，在細胞凋亡進行的時候，粒線體接受了細胞凋亡的刺激，會調節Bcl-2家族蛋白，造成粒線體內外膜不穩定，便會釋出凋亡因子(apoptigenic factors)，進而誘發細胞凋亡的發生。為探討去氫硫色多孔菌酸化合物誘使腫瘤細胞走向凋亡的作用機制，本試驗係檢測去氫硫色多孔菌酸化合物

對粒線體路徑中膜電位的影響。

將人類白血病細胞U937以濃度為5 μg/ml之去氫硫色多孔菌酸化合物處理16小時，並以經4μM抗癌物質Camptothecin處理16小時之U937作為陽性對照組，未經處理之細胞為控制組。將上述細胞以PBS清洗後，加入40 nM 3,3'-dihexyloxacarbocyanine($DiOC6_{(3)}$；Molecular Probes, Eugene, OR）於37℃下避光培養15分鐘，立刻以流式細胞儀分析之，並分別以波長為488 nm之激發光(excitation)與波長為530 nm之發射光(emission)偵測綠螢光密度，以此代表粒線體膜電位的變化，其結果如第八圖所示。

細胞凋亡過程中若受粒線體途徑影響，則粒線體的膜電位會下降。於第八圖結果中，相較於控制組與陽性對照組膜電位，其中陽性對照組抗癌物質Camptothecin之膜電位係下降約37.1%，經去氫硫色多孔菌酸化合物處理之人類白血病細胞U937並未呈現顯著下降趨勢，此表示去氫硫色多孔菌酸化合物所誘導腫瘤細胞走向凋亡的路徑，可能與粒線體途徑無關係。

實施例 8：

去氫硫色多孔菌酸化合物對由凋亡訊息受體傳導路徑（death receptor pathway）中與腫瘤細胞凋亡相關蛋白質的影響

凋亡訊息受體傳導路徑係為一種誘發細胞凋亡的訊息傳遞路徑，某些死亡因子(death factor)例如TNF-α等，與細胞膜上的死亡受體(death receptor, DR)如：TNF family形成鍵結，進而將死亡訊息發送到細胞內，誘發一連串凋亡事件產生。在整個細胞凋亡發生的過程中，會有一群對天門冬胺酸有特異性的蛋白酶：caspase包含caspases-3與caspase-8等被活化，並且對下游的蛋白如Poly(ADP-ribose)polymerase(PARP)產生水解作用，造成細胞凋亡的發生。為探討去氫硫色多孔菌酸化合物誘使腫瘤細胞走向凋亡的作用機制，本試驗係以西方墨點法檢測去氫硫色多孔菌酸化合物對凋亡訊息受體傳導路徑的影響。

將人類白血病細胞U937以濃度為5 μg/ml之去氫硫色多孔菌酸化合物分別處理0.5、1、2、4與16小時，並以經4μM抗癌物質Camptothecin處理16小時之U937作為對照組，未經處理之細胞為控制組。以bicinchoninic acid (BCA) assay套組(Pierce, Rockford, IL)萃取出上述細胞之蛋白質，取等量蛋白質(各樣品均取50μg)以10%SDS-PAGE於20 mA以及70-100

伏特之定電流下進行電泳，隨後將膠體上之蛋白質轉移到PVDF膜上。將PVDF膜以含有5 % 無脂牛奶(de-fatted milk)進行block後，加入對人類蛋白質具專一性的抗體包括：anti-Bcl-2、anti-Bax、anti-caspase 3、anti-caspase 8、anti-Cyclin B1 、anti-p-Chk2以及anti-Actin(該些抗體皆購自Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA)，並於室溫下反應3小時，再加入接有horseradish peroxidase之二級抗體(購自Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA)，最後以ECS系統（Enhanced chemiluminescence system；Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ）分析之，結果係如第九圖所示。

請參閱第九圖，由圖中可觀察到相較於控制組與對照組所示該些與細胞凋亡以及有絲分裂障礙相關之蛋白質表現量，經去氫硫色多孔菌酸化合物處理後之人類白血病細胞U937會微幅增進Bcl-2的表現量，而對Bax的表現量則無顯著影響，此外，腫瘤細胞中之caspase-3與caspase-8蛋白酶表現量並未因去氫硫色多孔菌酸化合物之處理而產生變化，且亦未出現PARP蛋白質被切割之片段；然而去氫硫色多孔菌酸化合物可向上調節週期素蛋白質cyclin B1的表現量，且增進Chk2的磷酸化，此顯示去氫硫色多孔菌

酸化合物對人類白血病細胞U937生長抑制作用可能係因有絲分裂期細胞死亡所造成。

綜上所述，由牛樟芝萃取物中所分離得之去氫硫色多孔菌酸化合物可有效抑制人類胰臟癌細胞BxPc-3以及人類白血病細胞U937。其中，由細胞週期及細胞型態觀察結果可知，去氫硫色多孔菌酸化合物係藉由誘發人類胰臟癌細胞BxPc-3產生細胞凋亡，進而抑制其生長；人類白血病細胞U937經去氫硫色多孔菌酸化合物處理後所誘發之生長抑制的機制則為細胞凋亡以及有絲分裂障礙，其對於粒線體路徑以及凋亡訊息受體傳導路徑中的caspase並無影響，且該有絲分裂障礙之傳導路徑係與有絲分裂其細胞停滯與檢查點(checkpoint)激酶活化有密切關聯性，同時前述結果中所示週期素蛋白質cyclin B1表現量的向上調節以及Chk2磷酸化的增加，說明去氫硫色多孔菌酸化合物所誘發有絲分裂期腫瘤細胞的死亡係與Chk2活化有關。

另一方面，本發明亦可將去氫硫色多孔菌酸化合物利用於治療胰臟癌與白血病等醫藥組成物之成分中，藉以抑制該等腫瘤細胞的生長，並助益於胰臟癌與白血病腫瘤之治療。前述醫藥組成物除包括有效劑量之

去氫硫色多孔菌酸化合物外，尚可包括藥學上可接受的載體。載體可為賦形劑（如水）、填充劑（如蔗糖或澱粉）、黏合劑（如纖維素衍生物）、稀釋劑、崩解劑、吸收促進劑或甜味劑，但並未僅限於此。本發明醫藥組成物可依一般習知藥學之製備方法生產製造，將去氫硫色多孔菌酸化合物有效成分劑量與一種以上之載體相混合，製備出所需之劑型，此劑型可包括錠劑、粉劑、粒劑、膠囊或其他液體製劑，但未以此為限。

【圖式簡單說明】

第一圖係本發明實施例人類白血病細胞 U937 於含有濃度分別為 1.25、2.5、5 與 10 μg/ml 去氫硫色多孔菌酸化合物之培養基中培養 24-72 小時後的生長抑制率結果圖。處理。垂直線代表三次獨立試驗之標準偏差值。

第二圖係本發明實施例人類胰臟癌細胞 BxPc-3 於含有濃度分別為 5 與 10 μg/ml 去氫硫色多孔菌酸化合物之培養基中培養 24-72 小時後的生長抑制率結果圖。垂直線代表三次獨立試驗之標準偏差值。

第三圖係本發明實施例經去氫硫色多孔菌酸化合物處理人類白血病細胞 U937 之細胞週期分析結果。(A)圖係第一至三天未經處理之控制組；(B)圖係經 1.25

μg/ml 去氫硫色多孔菌酸化合物處理一至三天；(C)圖係經 2.5 μg/ml 去氫硫色多孔菌酸化合物處理一至三天；(D)圖係經 5.0 μg/ml 去氫硫色多孔菌酸化合物處理一至三天；(E)圖係經 10.0 μg/ml 去氫硫色多孔菌酸化合物處理一至三天。

第四圖係本發明實施例經去氫硫色多孔菌酸化合物處理人類胰臟癌細胞 BxPc-3 之細胞週期分析結果。(A)圖係第二至三天未經處理之控制組；(B)圖係經 5.0 μg/ml 去氫硫色多孔菌酸化合物處理二至三天；(C)圖係經 10.0 μg/ml 去氫硫色多孔菌酸化合物處理二至三天。

第五圖係本發明實施例經去氫硫色多孔菌酸化合物處理人類白血病細胞 U937 之細胞型態分析結果。(A)圖係未經處理之控制組；(B)圖係經 5 μg/ml 去氫硫色多孔菌酸化合物處理一天；(C)圖係經 5μg/ml 去氫硫色多孔菌酸化合物處理二天；(D)圖係經 1.25μg/ml 去氫硫色多孔菌酸化合物處理三天。所有圖示之放大倍率皆相同；橫線表示 20 μm。

第六圖係本發明實施例經去氫硫色多孔菌酸化合物處理人類胰臟癌細胞 BxPc-3 之細胞型態分析結果。(A)圖係未經處理之控制組；(B)圖係經 10 μg/ml 去氫硫色多孔菌酸化合物處理一天；(C)圖係經 10 μg/ml 去氫硫色多孔菌酸化合物處理二天；(D)圖係經 10μg/ml 去氫硫色多孔菌酸化合物處理三天。所有圖示之放大倍率

第七圖係本發明實施例經去氫硫色多孔菌酸化合物處理人類白血病細胞 U937 之 DNA 電泳分析結果。圖中，M：DNA marker；1：抗癌物質 4μM Camptothecin 處理 24 小時；2：5 μg/ml 去氫硫色多孔菌酸化合物處理 24 小時；3：5 μg/ml 去氫硫色多孔菌酸化合物處理 48 小時；4：5 μg/ml 去氫硫色多孔菌酸化合物處理 72 小時。

第八圖係本發明實施例經去氫硫色多孔菌酸化合物處理人類白血病細胞 U937 之膜電位分析結果。圖中，灰色條區：未經處理之控制組；實心線：5 μg/ml 去氫硫色多孔菌酸化合物處理 16 小時；點狀線：4μM Camptothecin 處理 16 小時。

第九圖係本發明實施例經去氫硫色多孔菌酸化合物處理人類白血病細胞 U937 後，與細胞死亡相關蛋白質之表現量的分析結果。圖中，第一行：未經處理之控制組；第二行：4μM Camptothecin 處理 16 小時；第三行：5 μg/ml 去氫硫色多孔菌酸化合物處理 0.5 小時；第四行：5 μg/ml 去氫硫色多孔菌酸化合物處理 1 小時；第五行：5 μg/ml 去氫硫色多孔菌酸化合物處理 2 小時；第六行：5 μg/ml 去氫硫色多孔菌酸化合物處理 4 小時；第七行：5 μg/ml 去氫硫色多孔菌酸化合物處理 16 小時。

【主要元件符號說明】

無

五、中文發明摘要：

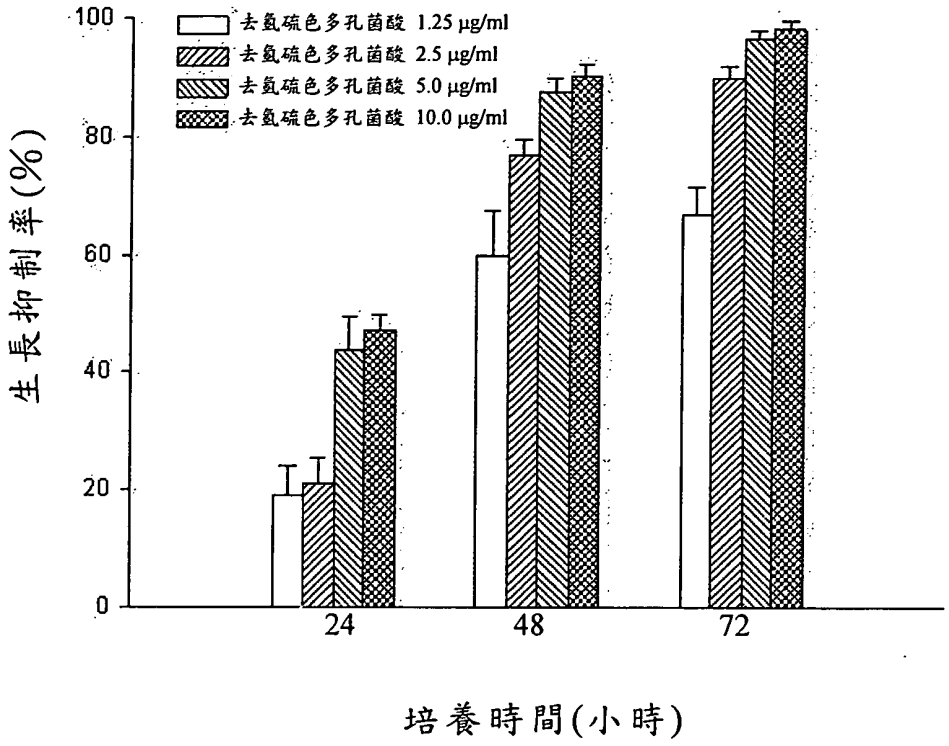
本發明係關於一種化合物之新用途，尤其係關於一種去氫硫色多孔菌酸（dehydrosulphurenic acid）於抑制腫瘤細胞生長之應用。本發明中，去氫硫色多孔菌酸（dehydrosulphurenic acid）可應用於抑制白血病與胰臟癌腫瘤細胞之生長，同時可應用於能抑制白血病與胰臟癌腫瘤細胞生長之醫藥組成物中。

六、英文發明摘要：

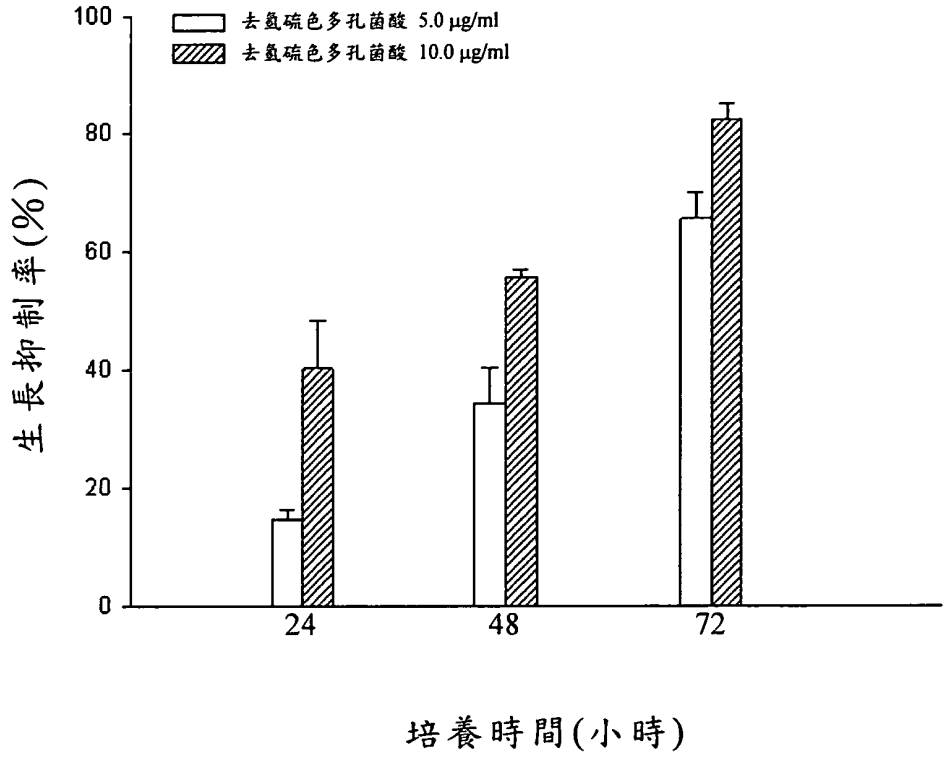
The present invention relates to a new application of a compound, in particular to the use of dehydrosulphurenic acid for inhibiting the growth of cancer cells. Dehydrosulphurenic acid of the invention can be applied in inhibiting the growth of cancer cells, such as leukemia and pancreatic cancer; and be used as a pharmaceutical composition to inhibit the tumor growth.

公告本

十一、圖式：


去氫硫色多孔菌酸 1.25 μg/ml
去氫硫色多孔菌酸 2.5 μg/ml
去氫硫色多孔菌酸 5.0 μg/ml
去氫硫色多孔菌酸 10.0 μg/ml
生長抑制率(%)
100
80
60
40
20
0
24
48
72
培養時間(小時)

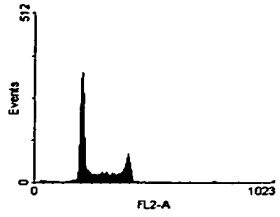
第一圖


去氫硫色多孔菌酸 5.0 μg/ml
去氫硫色多孔菌酸 10.0 μg/ml
生長抑制率(%)
100
80
60
40
20
0
24
48
72
培養時間(小時)

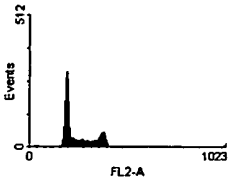
第二圖

A.

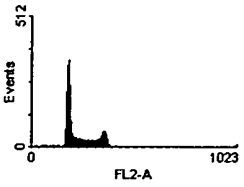
第一天



第二天

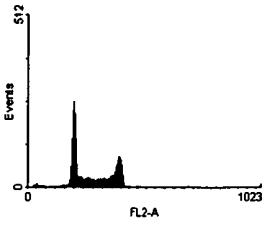


第三天

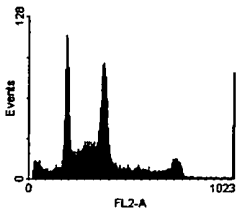


B.

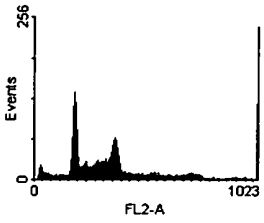
第一天



第二天

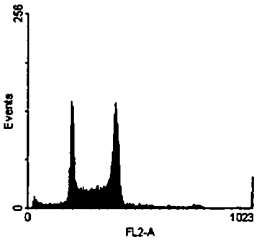


第三天

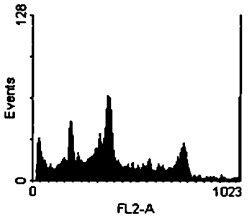


C.

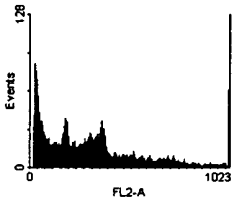
第一天



第二天



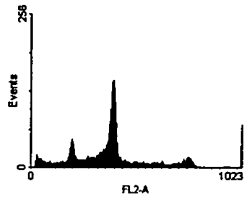
第三天



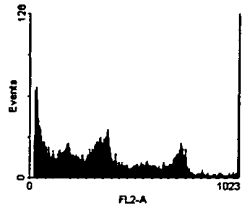
第三圖

D.

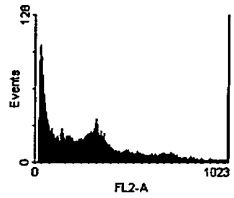
第一天



第二天

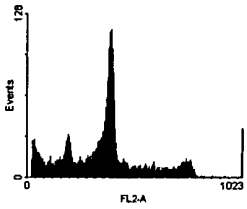


第三天

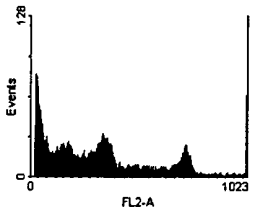


E.

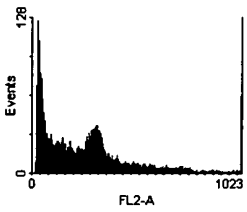
第一天



第二天



第三天



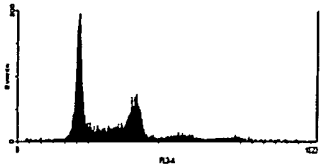
第三圖(接續)

A.

第二天

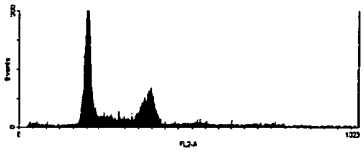


第三天

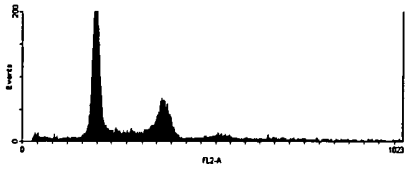


B.

第二天

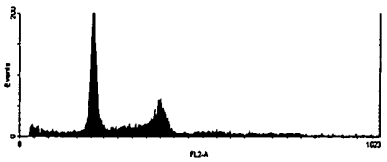


第三天

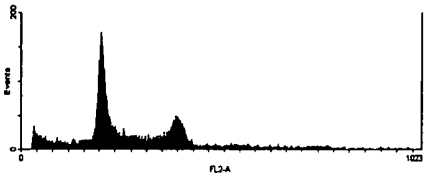


C.

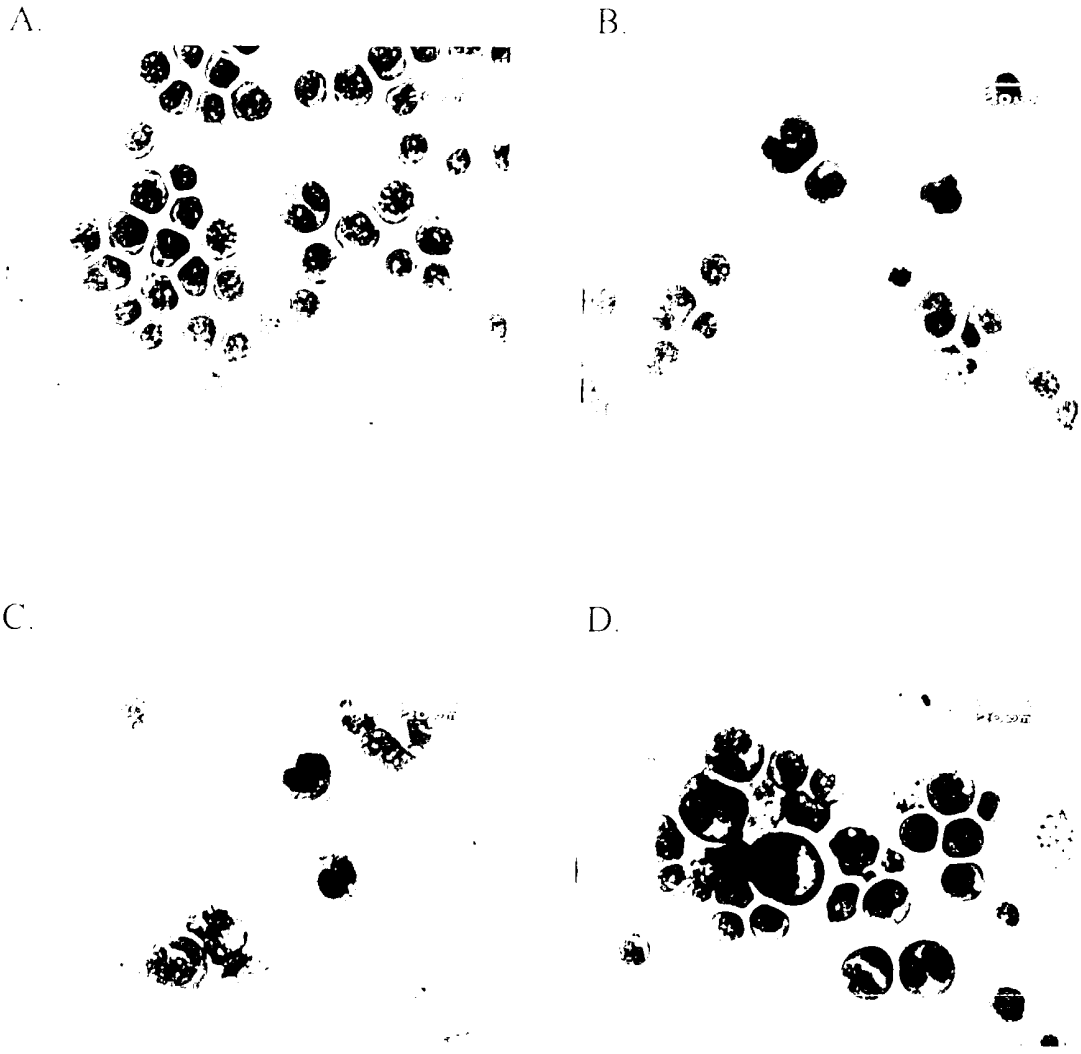
第二天



第三天

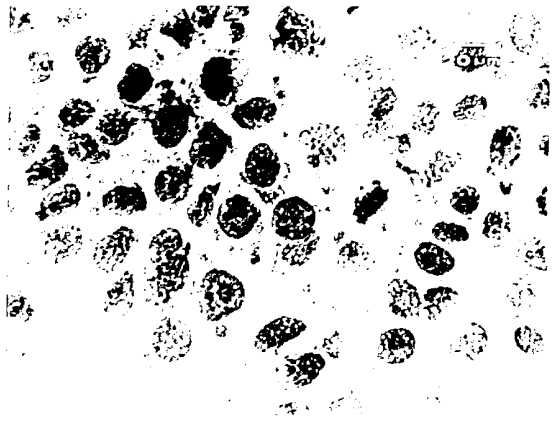


第四圖

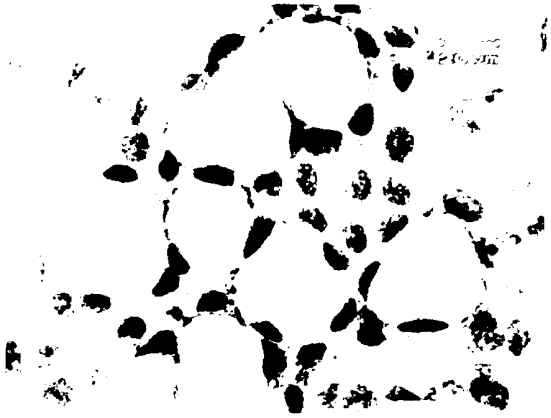


第五圖

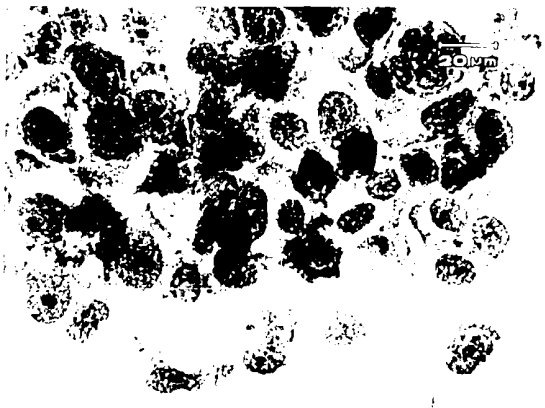
A.



B.



C.



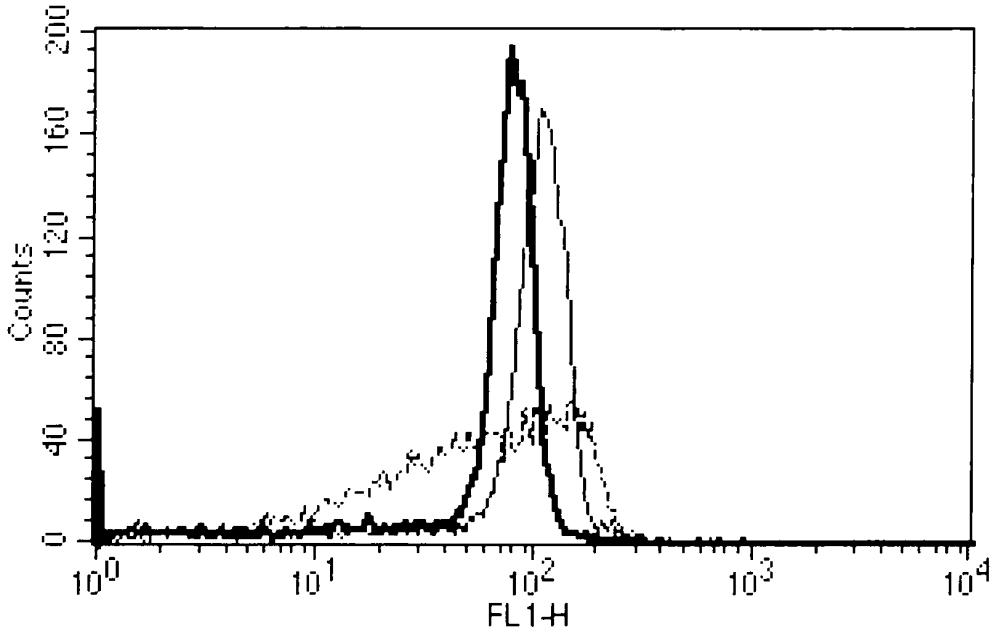
D.



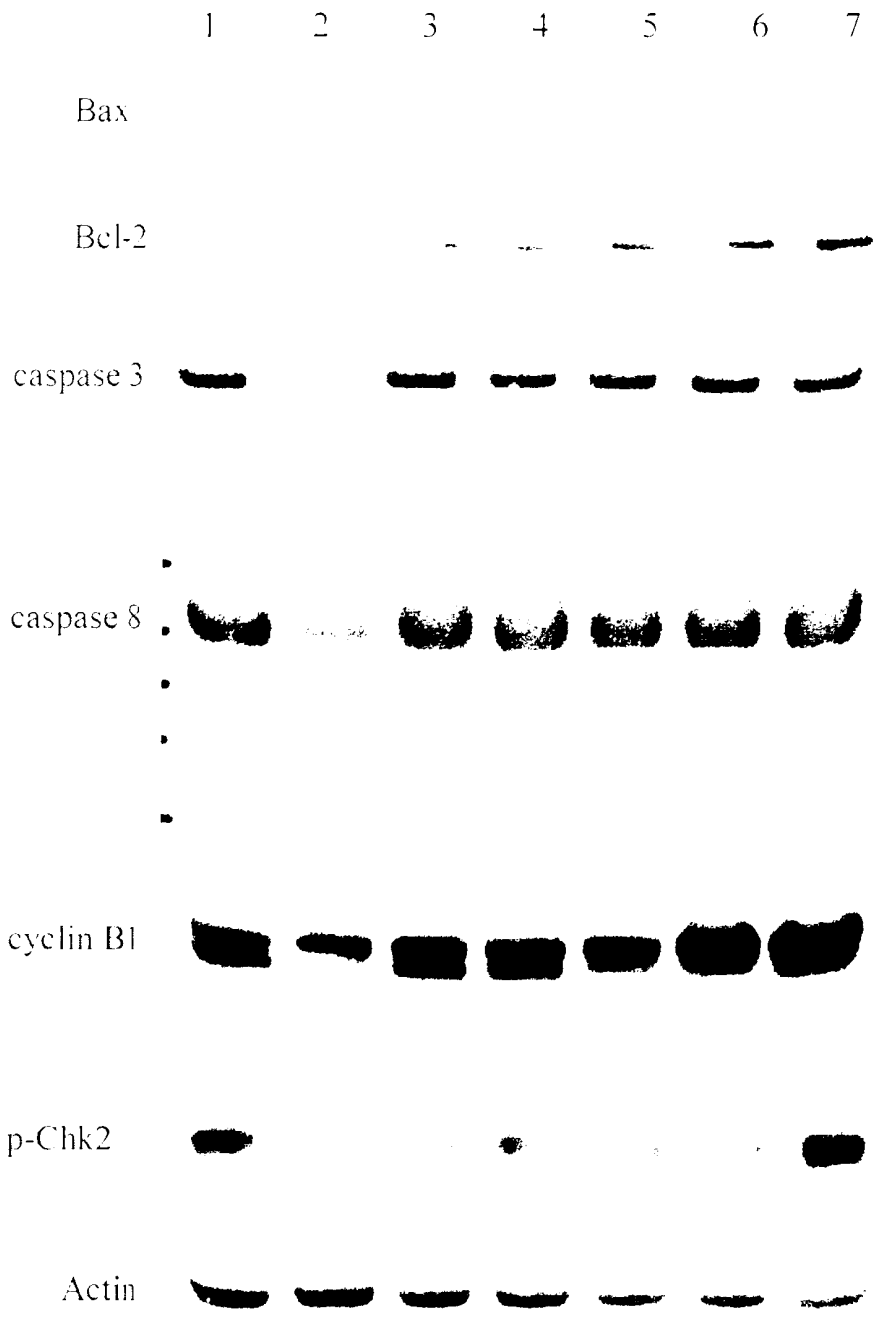
第六圖



第七圖



第八圖



第九圖

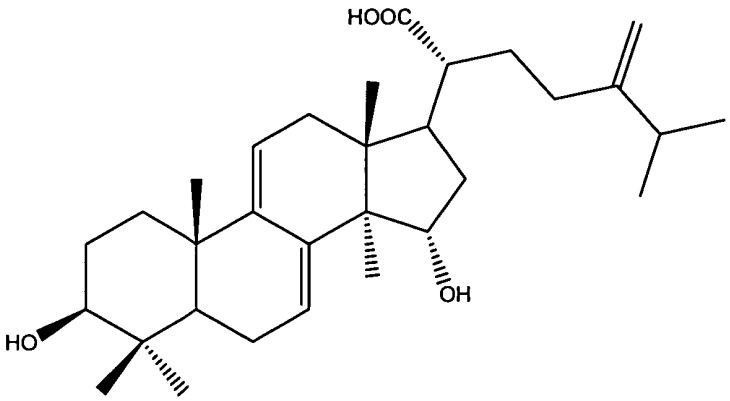
七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（無）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：

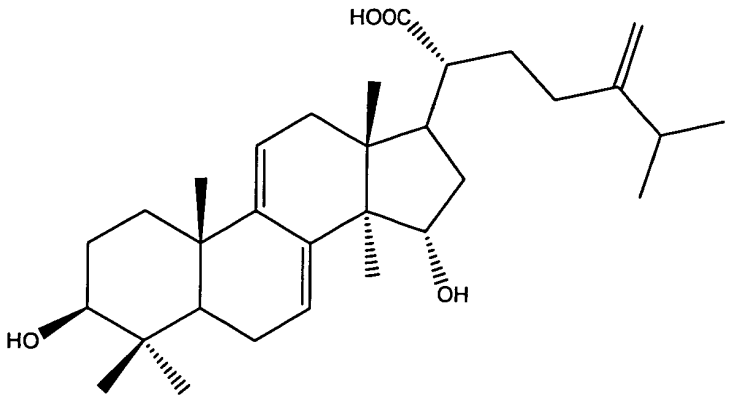


100年8月26日修(更)正本

公告本

十、申請專利範圍：

1、一種具有下列結構式之化合物用以製備抑制腫瘤細胞生長之藥物之用途，其中該腫瘤細胞係為胰臟癌之腫瘤細胞。



2、如申請專利範圍第 1 項所述之用途，其中該化合物係由牛樟芝萃取物所分離製得。

3、如申請專利範圍第 1 項所述之用途，其中該化合物係去氫硫色多孔菌酸（dehydrosulphurenic acid）。

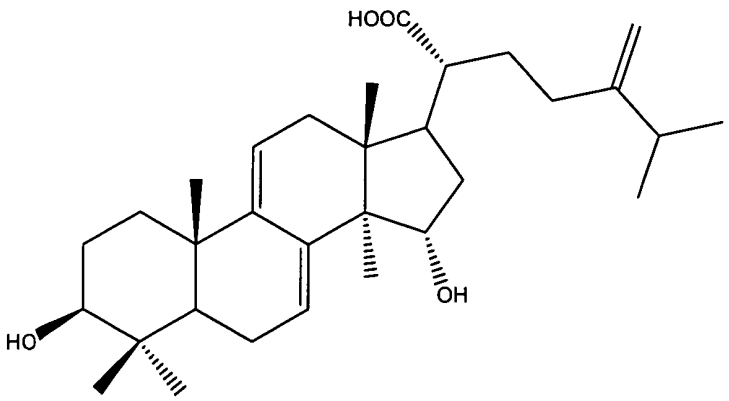
4、如申請專利範圍第 1 或 3 項所述之用途，其中該化合物係藉由細胞凋亡(apoptosis)以抑制胰臟癌腫瘤細胞之生長。

5、如申請專利範圍第 1 或 3 項所述之用途，其中該胰臟癌腫瘤細胞係 BxPc-3 細胞株。

6、如申請專利範圍第 1 項所述之用途，其中該化合物係藉由細胞凋亡(apoptosis)以抑制胰臟癌腫瘤細胞之生長。

7、如申請專利範圍第 6 項所述之用途，其中該化合物係藉由使胰臟癌腫瘤細胞之 G0/G1 細胞週期呈現停滯(arrest)，並使 sub-G1 細胞核族群比例增加，以誘發細胞凋亡。

8、一種抑制腫瘤細胞生長之醫藥組成物，其係包括一有效劑量具有下列結構式之化合物以及一藥學上可接受之載體，其中該腫瘤細胞係為胰臟癌之腫瘤細胞。



9、如申請專利範圍第 8 項所述之醫藥組成物，其中該化合物係由牛樟芝萃取物所分離製得。

10、如申請專利範圍第 8 項所述之醫藥組成物，其中該化合物係去氫硫色多孔菌酸（dehydrosulphurenic acid）。

11、如申請專利範圍第 8 或 10 項所述之醫藥組成物，其中該胰臟癌腫瘤細胞係 BxPc-3 細胞系。

12、如申請專利範圍第 8 項所述之醫藥組成物，其中該化合物係藉由細胞凋亡(apoptosis)以抑制胰臟癌腫瘤細胞之生長。

13、如申請專利範圍第 12 項所述之醫藥組成物，其中該化合物係藉由使胰臟癌腫瘤細胞之 G0/G1 細胞週期呈現停滯(arrest)，並使 sub-G1 細胞核族群比例增加，以誘發細胞凋亡。