

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 95140243

※ 申請日期：95-10-71

※IPC 分類：A61k 31/357 (2006.01)
A61k 36/74 (2006.01)
A61k 35/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

牛樟芝萃取物於抑制腫瘤細胞生長之應用

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

國鼎生物科技股份有限公司 / Golden Biotechnology Corporation

代表人：(中文/英文) 劉勝勇

住居所或營業所地址：(中文/英文)

台北縣淡水鎮中正東路二段 27-6 號 15 樓

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. 劉勝勇
2. 溫武哲
3. 鄒宛玲

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 camphorata*）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 camphorata*），又稱樟芝、牛樟菇、紅樟、紅樟芝、樟菰或樟窟內菰等，為臺灣特有種真菌，只生長於臺灣山區海拔 450~2000 公尺間之牛樟樹（*Cinnamoum kanehirai* Hay）的中空腐朽心材內壁上，因此是由樹幹內面生長出子實體。牛樟樹目前主要分佈於桃園、南投等山區，由於牛樟樹是台灣數量極為稀少的保育類樹種，加上人為的盜伐，使得寄生於其中方能生長之野生牛樟芝數量更形稀少，且由於其生長相當緩慢，生長期亦僅在六月至十月之間，因此價格非常昂貴。

牛樟芝之子實體為多年生，無柄，呈木栓質至木質，其外形多變，有板狀、鐘狀、馬蹄狀或塔狀。初時為扁平型，貼生於木材表面，之後其前緣會略為捲曲翹起，而呈板塊狀（層紋板狀）或如鐘乳石狀。牛樟芝頂部表面呈褐色至黑褐色，具不明顯的皺紋，有光澤，邊緣平而鈍，其腹面則為橘紅色或局部黃色，並有許多細孔。

此外，牛樟芝具有強烈的黃樟香氣，其曬乾後褪色成土黃白色，味極苦，民間將其用作解毒、保肝、抗癌之草藥。牛樟芝如同一般食藥用的蕈菇類，具有許多複雜的成分，已知的生理活性成分中，包括：多醣體（polysaccharides，如： β -葡聚醣）、三萜類化合物（triterpenoids）、超氧歧化酶（superoxide dismutase, SOD）、腺苷（adenosine）、蛋白質（含免疫球蛋白）、維生素（如：維生素B、菸鹼酸）、微量元素（如：鈣、磷及鋅等）、核酸、凝集素、胺基酸、固醇類、木質素以及血壓穩定物質（如：antodia acid）等，這些生理活性成分被認為具有抗腫瘤、增加免疫能力、抗過敏、抑制血小板凝集、抗病毒、抗細菌、抗高血壓、降血糖、降膽固醇以及保護肝臟等功能。

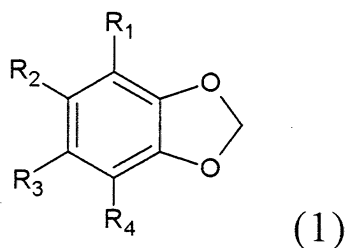
牛樟芝眾多成分中以三萜類化合物被研究的最多，三萜類化合物是由三十個碳元素結合成六角形或五角形天然化合物之總稱，牛樟芝所具之苦味即主要來自三萜類此成分。1995年時，Cherng等人發現牛樟芝子實體萃取物中含有三種新的以麥角甾烷（ergostane）為骨架的三萜類化合物：antcin A、antcin B與antcin C（Cherng, I. H., and Chiang, H. C. 1995. Three new triterpenoids from *Antrodia cinnamomea*. J. Nat. Prod. 58:365-371）。Chen等人以乙醇萃取樟芝子實體後發現zhankuic acid A、zhankuic acid B及zhankuic acid C等三種三萜類化合物（Chen, C. H., and Yang, S. W. 1995. New steroid acids from *Antrodia*

cinnamomea, - a fungus parasitic on *Cinnamomum micranthum*. J. Nat. Prod. 58:1655-1661)。此外，Chiang 等人於 1995 年也由子實體萃取物中發現另外三種分別為倍半萜內酯 (sesquiterpene lactone) 與兩種雙酚類衍生物的新三萜類化合物，此即 antrocin, 4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯並二氧環 (4,7-dimethoxy-5-methy-1,3-benzodioxole) 與 2,2',5,5'-四甲氧基-3,4,3',4'-雙-亞甲二氧基-6,6'-二甲基聯苯 (2,2',5,5'-teramethoxy-3,4,3',4'-bimethylenedioxy-6,6'-dimethylbiphenyl) (Chiang, H. C., Wu, D. P., Cherng, I. W., and Ueng, C. H. 1995. A sesquiterpene lactone, phenyl and biphenyl compounds from *Antrodia cinnamomea*. Phytochemistry. 39:613-616)。到了 1996 年，Cherng 等人以同樣分析方法再度發現四種新的三萜類化合物：antcin E、antcin F、methyl antcinate G、methyl antcinate H (Cherng, I. H., Wu, D. P., and Chiang, H. C. 1996. Triteroenoids from *Antrodia cinnamomea*. Phytochemistry. 41:263-267)；而 Yang 等人則發現了二種以麥角甾烷為骨架的新化合物 zhankuic acid D、zhankuic acid E，和三種以羊毛甾烷 (lanostane) 為骨架的新化合物：15 α -乙酰-去氫硫色多孔菌酸 (15 α -acetyl-dehydrosulphurenic acid)、去氫齒孔酸 (dehydroeburicoic acid) 與去水硫色多孔菌酸 (dehydrasulphurenic acid) (Yang, S. W., Shen, Y. C., and Chen, C. H. 1996. Steroids and triterpenoids of *Antrodia*

cinnamomea - a fungus parasitic on *Cinnamomum micranthum*. *Phytochemistry*. 41:1389-1392)。雖然由目前諸多之實驗可得知牛樟芝萃取物具有抑癌之功效(如前述 Chen (1995))，但究為何種有效成分可達到抑制腫瘤細胞效果之研究，目前則仍處於試驗階段，並未有具體之有效成分發表，故若能將該萃取物進一步純化分析，找出其真正有效抑癌成分，對於人類癌症之治療實將產生莫大的助益。

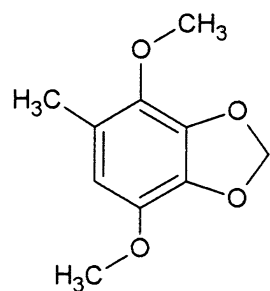
【發明內容】

為明瞭牛樟芝萃取物中究竟是何成分具有抑癌之效果，本發明由牛樟芝萃取物中分離純化出具下列結構式之化合物；

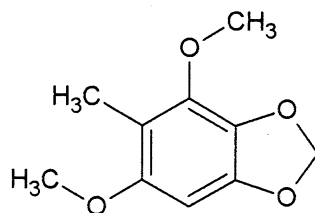


其中， R_1 、 R_2 、 R_3 與 R_4 係分別選自甲氧基 (OCH_3)、甲氧基、甲基 (CH_3) 與氫 (H) 其中之一。

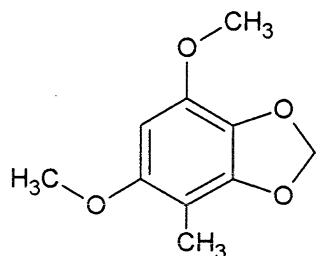
式(1)之化合物，其分子式為 $C_{10}O_4H_{12}$ ，淡黃色顆粒狀，分子量則為 196，包括如下所示式(2)、式(3)、式(4)、式(5)、式(6)或式(7)之化合物，



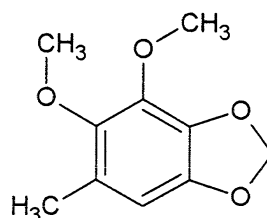
(2)



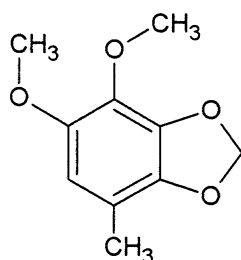
(3)



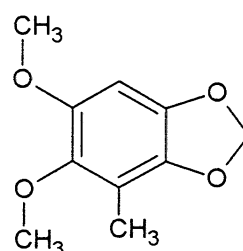
(4)



(5)



(6)



(7)

其依序分別為 4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯並二氧環 (4, 7-dimethoxy-5-methy-1,3-benzodioxole, 式(2))、4,6-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯並二氧環 (4, 6-dimethoxy-5-methy-1,3-benzodioxole, 式(3))、4,6-二甲氧基-7-甲基-1,3-苯並二氧環 (4, 6-dimethoxy-7-methy-1,3-benzodioxole, 式(4))、4,5-二甲氧基-6-甲基-1,3-苯並二氧環 (4, 5-dimethoxy-6-methy-1,3-benzodioxole, 式(5))、4,5-二甲氧基-7-甲基-1,3-苯並二氧環 (4, 5-dimethoxy-7-methy-1,3-benzodioxole, 式(6)) 與 5,6-二甲氧基-4-甲基-1,3-苯並二氧環 (5, 6-dimethoxy-4-methy-1,3-benzodioxole, 式

(7))。

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，使能進一步應用包括於治療癌症之醫藥組成份中，增益癌症之治療效果。本發明對該化合物得應用之範圍包括對於乳癌腫瘤細胞、肝癌腫瘤細胞與攝護腺癌腫瘤細胞等細胞之生長抑制效果，使抑制該等腫瘤細胞之迅速生長，進而抑制腫瘤之增生，而延緩腫瘤之惡化。其中，較佳之化合物係式(2)之 4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯並二氧環 (4, 7-dimethoxy-5-methy-1,3-benzodioxole)。

另一方面，藉由本發明之應用，亦可將式(1)之化合物利用於治療乳癌、肝癌與攝護腺癌等醫藥組成物之成分中。

本發明中用以抑制腫瘤細胞生長如式(1)之化合物係分離純化自牛樟芝水萃取物或有機溶劑萃取物，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），但並不以此為限，其中較佳者為醇類。

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 camphorata*) 菌絲體、子實體或二者之混合物，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水萃取物或有機溶劑萃取物，可進一步藉由高效液相層析加以分離純化，之後再對每一分液（fraction）進行抑癌效果的測試。最後，則針對具抑癌效果之分液進行成分分析，將可能產生抑癌效果的成分再分別進一步做不同癌症腫瘤細胞之抑制效果測試。最終即發現本發明中如式(1)之化合物係具有抑制不同癌症腫瘤細胞生長之效果。

為方便說明本發明，以下將以式(2)之 4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯並二氧環化合物進行說明。為證實 4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯並二氧環化合物對腫瘤細胞生之抑制效果，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，對包括乳癌、肝癌與攝護腺癌等腫瘤細胞進行細胞存活率之測試。由該些測試證實，4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-

苯並二氧環對於乳癌腫瘤細胞（包括 MCF-7 與 MDA-MB-231）、肝癌腫瘤細胞（包括 Hep 3B 與 Hep G2）與攝護腺癌腫瘤細胞（包括 LNCaP 與 DU-145）等皆可降低其存活率，相對之下並可同時降低生長半抑制率所需濃度（即 IC_{50} 值），因此得藉由 4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯並二氧環，應用於包括乳癌、肝癌與攝護腺癌等腫瘤細胞之生長抑制上。茲對前述實施方式詳盡說明如下：

實施例 1：

體外抗乳癌腫瘤細胞之活性測試

本測試係根據美國國家癌症研究所（National Cancer Institute, NCI）抗腫瘤藥物篩檢模式，取 4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯並二氧環化合物，加入 MCF-7 與 MDA-MB-231 人類腫瘤細胞培養液中，進行腫瘤細胞存活性之測試。細胞存活性之測試可採習知之 MTT 分析法進行分析，而 MCF-7 與 MDA-MB-231 皆係人類之乳癌腫瘤細胞系。

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。

首先將人類乳癌細胞 MCF-7 與 MDA-MB-231 分別於含有胎牛血清之培養液中培養 24 小時。將增生後之細胞以 PBS 清洗一次，並以 1 倍之胰蛋白酶-EDTA 處理細胞，隨後於 1,200 rpm 下離心 5 分鐘，將細胞沈澱並丟棄上清液。之後加入 10 ml 的新培養液，輕微搖晃使細胞再次懸浮，再將細胞分置於 96 孔微量盤內。測試時，分別於每一孔內加入 30、10、3、1、0.3、0.1 與 0.03 $\mu\text{g/ml}$ 牛樟芝乙醇萃取物（對照組）以及 4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯並二氧環（試驗組），於 37°C、5% CO_2 下培養 48 小時。其後，於避光的環境下於每一孔內加入 2.5 mg/ml 的 MTT，反應 4 小時後再於每一孔內加入 100 μl 的 lysis buffer 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，並推算出其生長半抑制率所需濃度（即 IC_{50} 值），其結果如表一所示。

表一：體外對乳癌腫瘤細胞存活率之測試結果

測試樣品	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
對照組(加入牛樟芝萃取物)	
MCF-7	11.461
MDA-MB-231	26.812
試驗組(加入式 2)	
MCF-7	1.721
MDA-MB-231	0.992

由表一中可知，藉由 4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯並二氧環的作用，其對於 MCF-7 人類乳癌腫瘤細胞之 IC_{50} 值為 $1.721 \mu\text{g/ml}$ ，對於 MDA-MB-231 人類乳癌腫瘤細胞之 IC_{50} 值則為 $0.992 \mu\text{g/ml}$ ，相較於牛樟芝萃取混合物所測得之 IC_{50} 值係低的多，因此可證實牛樟芝萃取物中之 4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯並二氧環確實能夠利用於乳癌腫瘤細胞生長之抑制。

實施例 2：

體外對乳癌腫瘤細胞輔助治療之活性測試

本測試同樣係根據美國國家癌症研究所的體外篩檢模式進行測試。首先，取人類乳癌細胞 MCF-7 與 MDA-MB-231，分別於含有胎牛血清之培養液中培養 24 小時後，將增生後之細胞以 PBS 清洗一次，並以 1 倍之胰蛋白酶-EDTA 處理細胞，隨後於 1,200 rpm 下離心 5 分鐘，將細胞沈澱並丟棄上清液。之後加入 10 ml 的新培養液，輕微搖晃使細胞再次懸浮。測試前，先加入 $0.0017 \mu\text{g/ml}$ 紫杉醇 (Taxol) 處理細胞 72 小時，再將細胞分置於 96 孔微量盤內，之後分別於每孔內加入 $0 \mu\text{g/ml}$ (對照組)，30、10、3、1、0.3、0.1 與 $0.03 \mu\text{g/ml}$ 的 4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯並二氧環(試驗組)，於 37°C 、5% CO_2 下培養 48 小時。其後，於避光的環境下於每一孔內加入 2.5 mg/ml 的 MTT，反應 4 小時後於每一孔內加入 $100 \mu\text{l}$ 的

lysis buffer 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，並推算出其生長半抑制所需濃度（即 IC_{50} 值），其結果如表二所示。

表二：體外對乳癌腫瘤細胞經紫杉醇輔助治療後抑制之測試結果

測試樣品	結果
對照組	細胞存活率 (%)
MCF-7 (0.0017 $\mu\text{g/ml}$ Taxol)	69 $\pm$ 1
MDA-MB-231 (0.0017 $\mu\text{g/ml}$ Taxol)	86 $\pm$ 1
試驗組	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
MCF-7 (0.0017 $\mu\text{g/ml}$ Taxol+式 2)	0.0007
MDA-MB-231 (0.0017 $\mu\text{g/ml}$ Taxol+式 2)	0.0009

由表二中可知，透過紫杉醇之協同作用，4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯並二氧環對於 MCF-7 人類乳癌腫瘤細胞之 IC_{50} 值降為 0.0007 $\mu\text{g/ml}$ ，對於 MDA-MB-231 人類乳癌腫瘤細胞之 IC_{50} 值亦降為約 0.0009 $\mu\text{g/ml}$ ，因此可證實牛樟芝萃取物中之 4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯並二氧環確實能夠利用於乳癌腫瘤細胞生長之抑制，且在紫杉醇之協同作用下，有更佳之抑制效果。

實施例 3：

體外抗肝癌腫瘤細胞之活性測試

本測試亦係根據美國國家癌症研究所抗腫瘤藥物篩檢模式進行，將 4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯並二氧環化合物，加入 Hep 3B 與 Hep G2 人類肝癌腫瘤細胞培養液中進行培養，藉以進行腫瘤細胞存活性之測試。

首先將人類肝癌細胞 Hep 3B 與 Hep G2 分別於含有胎牛血清之培養液中培養 24 小時。將增生後之細胞以 PBS 清洗一次，並以 1 倍之胰蛋白酶-EDTA 處理細胞，隨後於 1,200 rpm 下離心 5 分鐘，將細胞沈澱並丟棄上清液。之後加入 10 ml 的新培養液，輕微搖晃使細胞再次懸浮，再將細胞分置於 96 孔微量盤內。測試時，分別於每一孔內加入 30、10、3、1、0.3、0.1 與 0.03 $\mu\text{g/ml}$ 之牛樟芝乙醇萃取物(對照組)以及 30、10、3、1、0.3、0.1 與 0.03 $\mu\text{g/ml}$ 之 4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯並二氧環(試驗組)，於 37°C、5% CO_2 下培養 48 小時。其後，於避光的環境下於每一孔內加入 2.5 mg/ml 的 MTT，反應 4 小時後再於每一孔內加入 100 μl 的 lysis buffer 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，並推算出其 IC_{50} 值，其結果如表三所示。

表三：體外對肝癌腫瘤細胞抑制之測試結果

測試樣品	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
對照組(加入牛樟芝萃取物)	
Hep 3B	6.112

Hep G2	18.931
試驗組(加入式 2)	
Hep 3B	0.016
Hep G2	2.462

由表三中可知，藉由 4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯並二氧環的作用，其對於 Hep 3B 人類肝癌腫瘤細胞之 IC_{50} 值為 $0.016\mu\text{g/ml}$ ，對於 Hep G2 人類肝癌腫瘤細胞之 IC_{50} 值則為 $2.462\mu\text{g/ml}$ ，相較於牛樟芝萃取混合物所測得之 IC_{50} 值係低的多，因此可證實牛樟芝萃取物中之 4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯並二氧環確實能夠利用於肝癌腫瘤細胞生長之抑制。

實施例 4：

體外對肝癌腫瘤細胞輔助治療之活性測試

本測試同樣係根據美國國家癌症研究所的體外篩檢模式進行測試。首先，取人類肝癌細胞 Hep 3B 與 Hep G2，分別於含有胎牛血清之培養液中培養 24 小時後，將增生後之細胞以 PBS 清洗一次，並以 1 倍之胰蛋白酶-EDTA 處理細胞，隨後於 1,200 rpm 下離心 5 分鐘，將細胞沈澱並丟棄上清液。之後加入 10 ml 的新培養液，輕微搖晃使細胞再次懸浮。測試前，先於 Hep 3B 細胞株試驗加入 $0.0043\mu\text{g/ml}$ Lovastatin，而於 Hep G2 細胞株試驗加入 $0.0017\mu\text{g/ml}$ 紫杉醇 (Taxol)，處理細胞 72 小時，再

將細胞分置於 96 孔微量盤內，之後分別於每孔內加入 0 $\mu\text{g/ml}$ (對照組)，30、10、3、1、0.3、0.1 與 0.03 $\mu\text{g/ml}$ 之 4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯並二氧環(試驗組)，於 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 下培養 48 小時。其後，於避光的環境下於每一孔內加入 2.5 mg/ml 的 MTT，反應 4 小時後於每一孔內加入 100 μl 的 lysis buffer 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，並推算出其 IC_{50} 值，其結果如表四所示。

表四：體外對肝癌腫瘤細胞經紫杉醇輔助治療後抑制之測試結果

測試樣品	結果
對照組	細胞存活率 (%)
Hep 3B (0.0043 $\mu\text{g/ml}$ Lovastatin)	69 $\pm$ 1
Hep G2 (0.0017 $\mu\text{g/ml}$ Taxol)	86 $\pm$ 1
試驗組	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Hep 3B (0.0043 $\mu\text{g/ml}$ Lovastatin+式 2)	0.0007
Hep G2 (0.0017 $\mu\text{g/ml}$ Taxol +式 2)	0.0129

由表四中可知，透過 Lovastatin 及紫杉醇之協同作用，4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯並二氧環對於 Hep 3B 人類肝癌腫瘤細胞之 IC_{50} 值降為 0.0007 $\mu\text{g/ml}$ ，對於 Hep G2 人類肝癌腫瘤細胞之 IC_{50} 值亦降為約 0.0129 $\mu\text{g/ml}$ ，因此可證實牛樟芝萃取物中之 4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯並

二氧環確實能夠利用於肝癌腫瘤細胞生長之抑制，且在紫杉醇之協同作用下，有更佳之抑制效果。

實施例 5：

體外抗攝護腺癌腫瘤細胞之活性測試

本測試亦係根據美國國家癌症研究所抗腫瘤藥物篩檢模式進行，將 4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯並二氧環化合物，加入 LNCaP 與 DU-145 人類攝護腺癌腫瘤細胞培養液中進行培養，藉以進行腫瘤細胞存活性之測試。

首先將人類攝護腺癌細胞 LNCaP 與 DU-145 分別於含有胎牛血清之培養液中培養 24 小時。將增生後之細胞以 PBS 清洗一次，並以 1 倍之胰蛋白酶-EDTA 處理細胞，隨後於 1,200 rpm 下離心 5 分鐘，將細胞沈澱並丟棄上清液。之後加入 10 ml 的新培養液，輕微搖晃使細胞再次懸浮，再將細胞分置於 96 孔微量盤內。測試時，分別於每一孔內加入 30、10、3、1 與 0.3 $\mu\text{g/ml}$ 牛樟芝乙醇萃取物(對照組)以及 30、10、3、1 與 0.3 $\mu\text{g/ml}$ 4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯並二氧環(試驗組)，於 37°C、5% CO_2 下培養 48 小時。其後，於避光的環境下於每一孔內加入 2.5 mg/ml 的 MTT，反應 4 小時後再於每一孔內加入 100 μl 的 lysis buffer 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，並推算出其 IC_{50} 值，其結果如表五所示。

表五：體外對攝護腺癌腫瘤細胞抑制之測試結果

測試樣品	IC ₅₀ (μg/ml)
對照組(加入牛樟芝萃取物)	
LNCaP	45.47
DU-145	30.15
試驗組(加入式 2)	
LNCaP	4.46
DU-145	2.21

由表五中可知，藉由 4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯並二氧環的作用，其對於 LNCaP 人類攝護腺癌腫瘤細胞之 IC₅₀ 值為 4.46 μg/ml，對於 DU-145 人類攝護腺癌腫瘤細胞之 IC₅₀ 值則為 2.21 μg/ml，相較於牛樟芝萃取混合物所測得之 IC₅₀ 值係低的多，因此可證實牛樟芝萃取物中之 4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯並二氧環確實能夠利用於攝護腺癌腫瘤細胞生長之抑制。

實施例 6：

體外對攝護腺癌腫瘤細胞輔助治療之活性測試

本測試同樣係根據美國國家癌症研究所的體外篩檢模式進行測試。首先，取人類攝護腺癌細胞 LNCaP 與 DU-145，分別於含有胎牛血清之培養液中培養 24 小時後，將增生後之細胞以 PBS 清洗一次，並以 1 倍之胰蛋白酶-EDTA 處理細胞，隨後於 1,200 rpm 下離心 5 分鐘，

將細胞沈澱並丟棄上清液。之後加入 10 ml 的新培養液，輕微搖晃使細胞再次懸浮。測試前，先於 LNCaP 細胞株試驗加入 0.0017 $\mu\text{g/ml}$ 紫杉醇，而於 DU-145 胞株試驗加入 0.0043 $\mu\text{g/ml}$ 紫杉醇分別處理細胞 72 小時，再將細胞分置於 96 孔微量盤內，之後分別於每孔內加入 0 $\mu\text{g/ml}$ (對照組)，30、10、3、1、0.3、0.1 與 0.03 $\mu\text{g/ml}$ 之 4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯並二氧環(試驗組) 之 4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯並二氧環，於 37°C、5% CO_2 下培養 48 小時。其後，於避光的環境下於每一孔內加入 2.5 mg/ml 的 MTT，反應 4 小時後於每一孔內加入 100 μl 的 lysis buffer 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，並推算出其 IC_{50} 值，其結果如表六所示。

表六：體外對攝護腺癌腫瘤細胞經紫杉醇輔助治療後抑制之測試結果

測試樣品	結果
對照組	細胞存活率 (%)
LNCaP (0.0017 $\mu\text{g/ml}$ Taxol)	55 $\pm$ 1
DU-145 (0.0043 $\mu\text{g/ml}$ Taxol)	71 $\pm$ 1
試驗組	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
LNCaP (0.0017 $\mu\text{g/ml}$ Taxol+式 2)	1.16
DU-145 (0.0043 $\mu\text{g/ml}$ Taxol+式 2)	0.71

由表六中可知，透過紫杉醇之協同作用，4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯並二氧環對於 LNCaP 人類攝護腺癌腫瘤細胞之 IC_{50} 值降為 $1.16 \mu\text{g/ml}$ ，對於 DU-145 人類攝護腺癌腫瘤細胞之 IC_{50} 值亦降為約 $0.71 \mu\text{g/ml}$ ，相較於牛樟芝萃取混合物所測得之 IC_{50} 值係低的多，因此可證實牛樟芝萃取物中之 4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯並二氧環確實能夠利用於攝護腺癌腫瘤細胞生長之抑制，且在紫杉醇之協同作用下，有更佳之抑制效果。

【圖式簡單說明】

無

【主要元件符號說明】

無

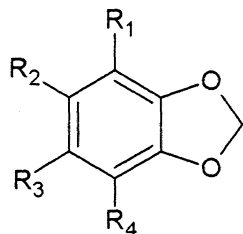
五、中文發明摘要：

本發明係關於一種化合物之新用途，尤其係關於一種 4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯並二氧環 (4,7-dimethoxy-5-methy-1,3-benzodioxole) 於抑制腫瘤細胞生長之應用。本發明中，4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯並二氧環可應用於抑制乳癌、肝癌與攝護腺癌腫瘤細胞之生長，同時可應用於包括於抑制乳癌、肝癌與攝護腺癌腫瘤細胞生長之醫藥組成物中。

六、英文發明摘要：

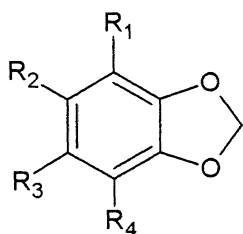
十、申請專利範圍：

- 1、一種將具有下列結構式之化合物利用於抑制乳癌腫瘤細胞生長之應用：



- 其中， R_1 、 R_2 、 R_3 與 R_4 係分別選自甲氧基 (OCH_3)、甲氧基、甲基 (CH_3) 與氫 (H) 其中之一。
- 2、如申請專利範圍第 1 項所述將該化合物利用於抑制乳癌腫瘤細胞生長之應用，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 2 項所述將該化合物利用於抑制乳癌腫瘤細胞生長之應用，其中該化合物係由牛樟芝之水萃取物所分離製得。
- 4、如申請專利範圍第 2 項所述將該化合物利用於抑制乳癌腫瘤細胞生長之應用，其中該化合物係由牛樟芝之有機溶劑萃取物所分離製得。
- 5、如申請專利範圍第 4 項所述將該化合物利用於抑制乳癌腫瘤細胞生長之應用，其中該有機溶劑係選自酯類、醇類、烷類或鹵烷所組成的族群。
- 6、如申請專利範圍第 5 項所述將該化合物利用於抑制乳癌腫瘤細胞生長之應用，其中該醇類係乙醇。

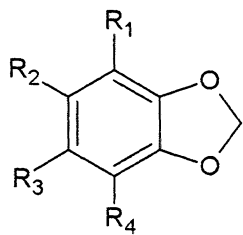
- 7、如申請專利範圍第 1 項所述將該化合物利用於抑制乳癌腫瘤細胞生長之應用，其中該化合物係 4,7-二甲氧基-5 甲基-1,3-苯並二氧環(4,7-dimethoxy-5-methy-1,3-benzodioxole)。
- 8、如申請專利範圍第 1 或 7 項所述將該化合物利用於抑制乳癌腫瘤細胞生長之應用，其中該乳癌腫瘤細胞係 MCF-7 或 MDA-MB-231 細胞系。
- 9、一種將具有下列結構式之化合物利用於抑制肝癌腫瘤細胞生長之應用：



其中， R_1 、 R_2 、 R_3 與 R_4 係分別選自甲氧基 (OCH_3)、甲氧基、甲基 (CH_3) 與氫 (H) 其中之一。

- 10、如申請專利範圍第 9 項所述將該化合物利用於抑制肝癌腫瘤細胞生長之應用，其中該化合物係由牛樟芝萃取物所分離製得。
- 11、如申請專利範圍第 10 項所述將該化合物利用於抑制肝癌腫瘤細胞生長之應用，其中該化合物係由牛樟芝之水萃取物所分離製得。
- 12、如申請專利範圍第 10 項所述將該化合物利用於抑制肝癌腫瘤細胞生長之應用，其中該化合物係由牛樟芝之有機溶劑萃取物所分離製得。

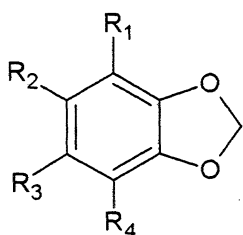
- 13、如申請專利範圍第 12 項所述將該化合物利用於抑制肝癌腫瘤細胞生長之應用，其中該有機溶劑係選自酯類、醇類、烷類或鹵烷所組成的族群。
- 14、如申請專利範圍第 13 項所述將該化合物利用於抑制肝癌腫瘤細胞生長之應用，其中該醇類係乙醇。
- 15、如申請專利範圍第 9 項所述將該化合物利用於抑制肝癌腫瘤細胞生長之應用，其中該化合物係 4,7-二甲氧基-5 甲基-1,3-苯並二氧環(4,7-dimethoxy-5-methy-1,3-benzodioxole)。
- 16、如申請專利範圍第 9 或 15 項所述將該化合物利用於抑制肝癌腫瘤細胞生長之應用，其中該乳癌腫瘤細胞係 Hep 3B 或 Hep G2 細胞系。
- 17、一種將具有下列結構式之化合物利用於抑制攝護腺癌腫瘤細胞生長之應用：



其中， R_1 、 R_2 、 R_3 與 R_4 係分別選自甲氧基 (OCH_3)、甲氧基、甲基 (CH_3) 與氫 (H) 其中之一。

- 18、如申請專利範圍第 17 項所述將該化合物利用於抑制攝護腺癌腫瘤細胞生長之應用，其中該化合物係由牛樟芝萃取物所分離製得。

- 19、如申請專利範圍第 18 項所述將該化合物利用於抑制攝護腺癌腫瘤細胞生長之應用，其中該化合物係由牛樟芝之水草萃取物所分離製得。
- 20、如申請專利範圍第 18 項所述將該化合物利用於抑制攝護腺癌腫瘤細胞生長之應用，其中該化合物係由牛樟芝之有機溶劑萃取物所分離製得。
- 21、如申請專利範圍第 20 項所述將該化合物利用於抑制攝護腺癌腫瘤細胞生長之應用，其中該有機溶劑係選自酯類、醇類、烷類或鹵烷所組成的族群。
- 22、如申請專利範圍第 21 項所述將該化合物利用於抑制攝護腺癌腫瘤細胞生長之應用，其中該醇類係乙醇。
- 23、如申請專利範圍第 17 項所述將該化合物利用於抑制攝護腺癌腫瘤細胞生長之應用，其中該化合物係 4,7-二甲氧基-5 甲基-1,3-苯並二氧環(4,7-dimethoxy-5-methy-1,3-benzodioxole)。
- 24、如申請專利範圍第 17 或 23 項所述將該化合物利用於抑制攝護腺癌腫瘤細胞生長之應用，其中該乳癌腫瘤細胞係 LNCaP 或 DU145 細胞系。
- 25、一種將包括具有下列結構式化合物之醫藥組成物利用於抑制腫瘤細胞生長之應用：



其中， R_1 、 R_2 、 R_3 與 R_4 係分別選自甲氧基 (OCH_3)、甲氧基、甲基 (CH_3) 與氫 (H) 其中之一；而該腫瘤細胞係選自乳癌、肝癌或攝護腺癌之腫瘤細胞。

200819125

十一、圖式：無

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：

無