



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I672138 B

(45) 公告日：中華民國 108 (2019) 年 09 月 21 日

(21) 申請案號：107106540

(22) 申請日：中華民國 107 (2018) 年 02 月 27 日

(51) Int. Cl. : A61K31/366 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(71) 申請人：高雄醫學大學 (中華民國) KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY (TW)

高雄市三民區十全一路 100 號

(72) 發明人：張學偉 CHANG, HSUEH WEI (TW)；許志宏 SHEU, JYH HORNG (TW)；湯人仰 TANG, JEN YANG (TW)；張詠婷 CHANG, YUNG TING (TW)；黃瓊瑤 HUANG, CHIUNG YAO (TW)

(74) 代理人：洪澄文；顏錦順

(56) 參考文獻：

Tetrahedron Letters No. 34, pp 2923 - 2926, 1977

審查人員：傅玉妃

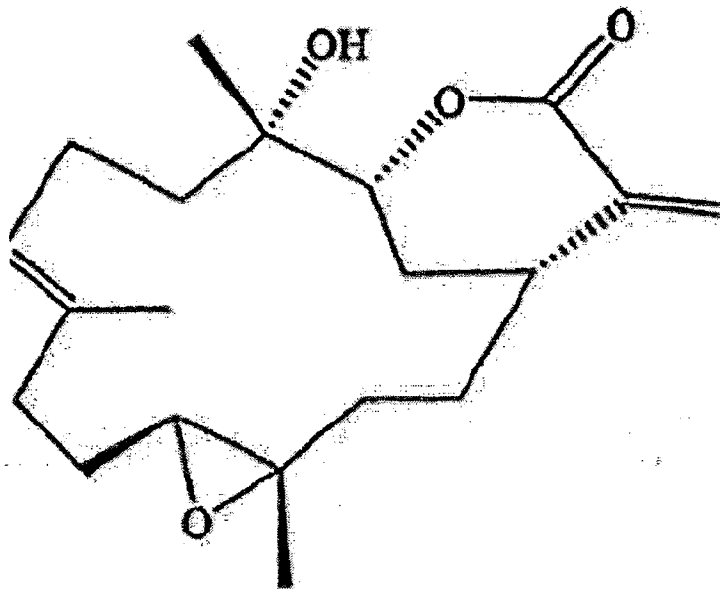
申請專利範圍項數：12 項 圖式數：7 共 46 頁

(54) 名稱

用於選擇性殺死口腔癌細胞之醫藥組合物及其活性成分之用途

(57) 摘要

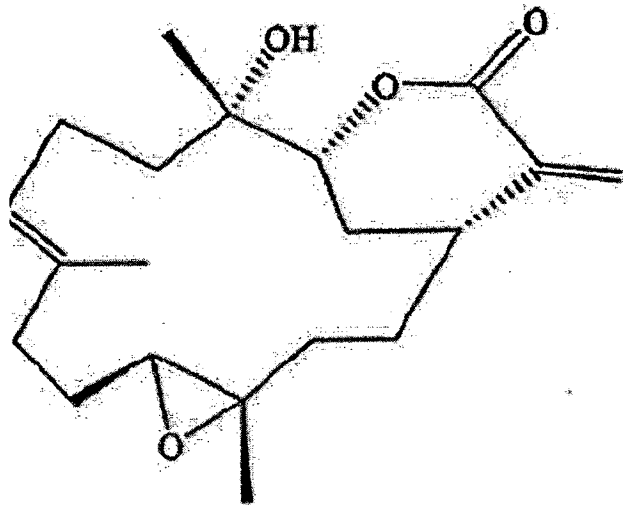
本發明提供一種如以下式(I)所示之化合物用於製備選擇性殺死一口腔癌細胞之藥物的用途，



式 (I) ，

其中式(I)所示之化合物為 sinularin，且其具有選擇性殺死該口腔癌細胞之功效。

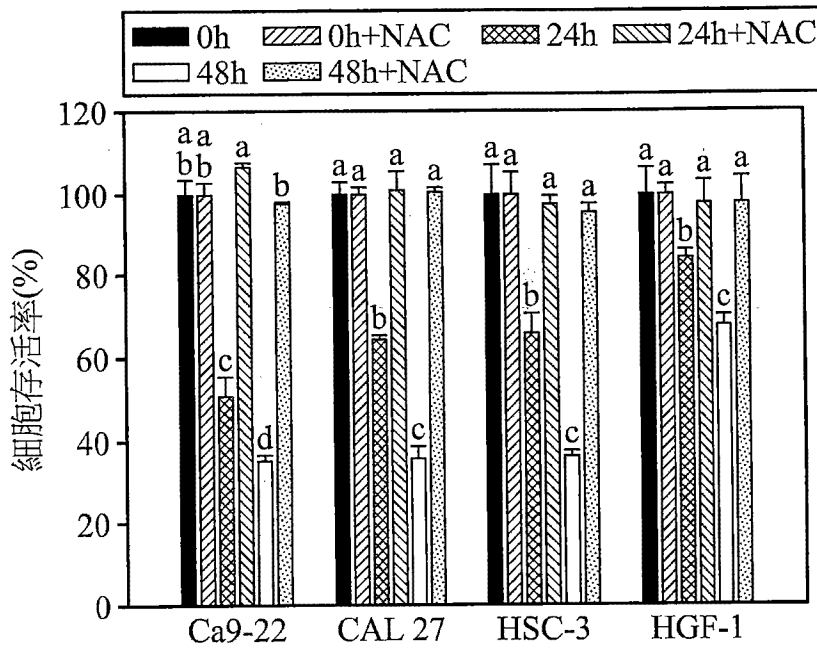
The present disclosure provides a use of a compound of formula (I) shown below in manufacturing a medicament selectively killing oral cancer cells:



formula (I),

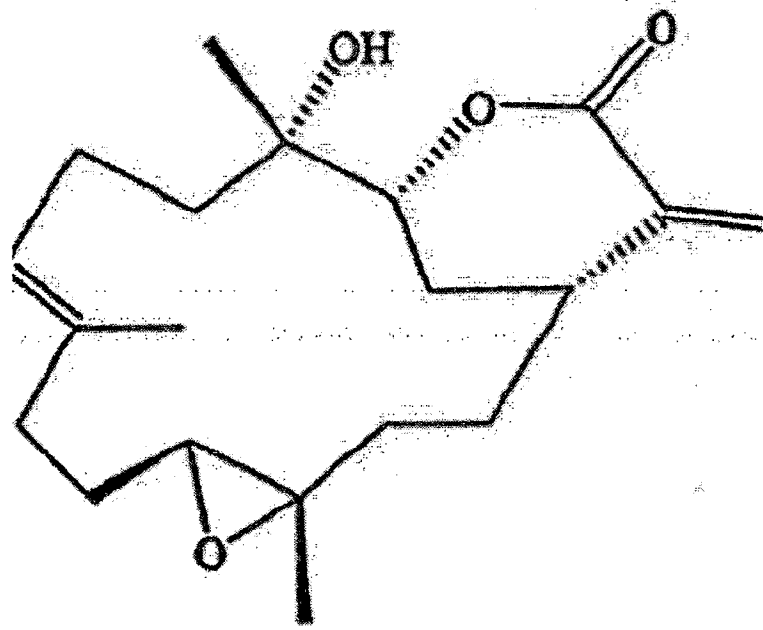
wherein the compound of the formula (I) is sinularin, which has an activity of selectively killing the oral cancer cells

指定代表圖：

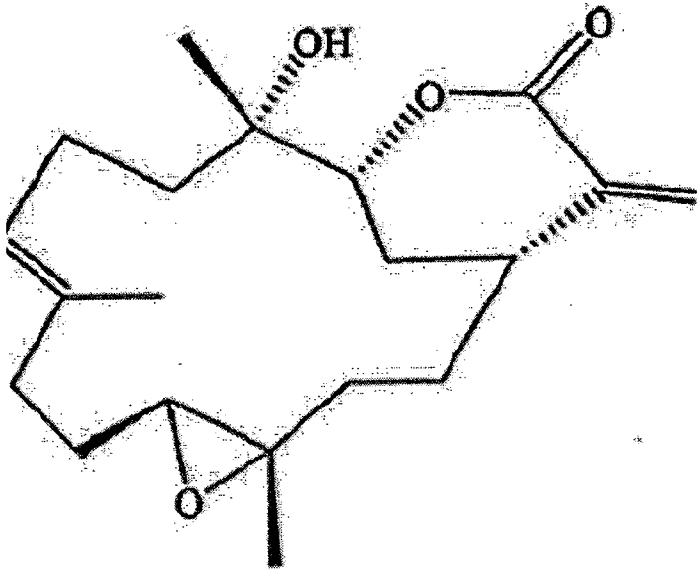


第 1B 圖

特徵化學式：



selectively killing oral cancer cells:



formula (I),

wherein the compound of the formula (I) is sinularin, which has an activity of selectively killing the oral cancer cells

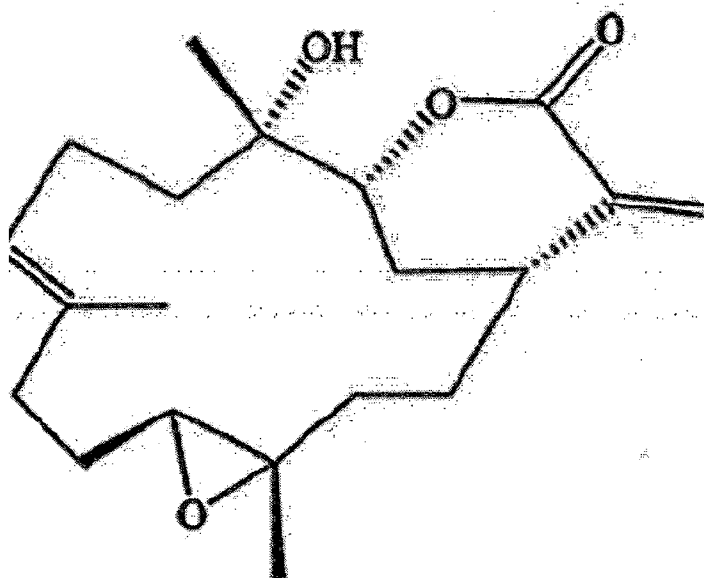
【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1B ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】 用於選擇性殺死口腔癌細胞之醫藥組合物及其活性成分之用途 / Pharmaceutical Composition for Selectively Killing Oral Cancer Cells and Use of the Active Ingredient thereof

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種治療癌症之醫藥組合物，且特別關於一種用於選擇性殺死口腔癌之醫藥組成物及其活性成分之用途。

【先前技術】

【0002】 一些海洋自然產物已被報導為能調節活性氧物種 (reactive oxygen species, ROS) 生成 (Farooqi AA, et al., Mar Drugs. 2014;12(11):5408-5424; Farooqi AA, et al., Tumour Biol. 2015;36(8):5743-5752; Lee JC, et al., Cancer cell Int. 2013;13(1):55)，以具有抗癌效果。以海藻為例，龍鬚菜 (*Gracilaria tenuistipitata*) 的甲醇和乙醇萃取物誘發口腔癌 Ca9-22 細胞的 ROS 媒介的細胞凋亡 (Yeh CC, et al., Molecules. 2012a;17(9):10916-10927; Yeh CC, et al., BMC Comp Altern Med. 2012b;12(1):142)、*Stoechospeumum marginatum* 的 spatane 雙萜類用於小鼠 B16F10 黑色素瘤細胞 (Velatooru LR, et al., Mol Carcinog. 2016;55(12):2222-2235) 和裙帶菜 (*Undaria pinnatifida*) 的褐藻膠 (fucoidan) 透過 ROS 媒介的細胞凋亡用於肝癌 SMMC-7721 細胞 (Yang L, et al., Mar Drugs.

2013;11(6):1961-1976)。以海洋海綿(marine sponge)為例，藉由用於血癌 HL 60 細胞之羊海綿屬 (*Ircinia sp.*) 的 10-acetylirciformonin B (Shih HC, et al., Mar Drugs. 2014;12(5):3072-3090)、用於神經膠母細胞瘤 (glioblastoma cancer) SF295 細胞之 *Jaspis stellifera* 的 stelletin B (Tang SA, et al., Mar Drugs. 2014;12(7):4200-4213) 和用於 U138G 神經膠瘤細胞 (glioma cell) 之 *Polymastia janeirensis* 的萃取出物 (da Frota ML, Jr., et al., Invest New Drugs. 2009;27(5):440-446) 誘發 ROS 媒介的細胞凋亡。

【0003】 在許多海洋資源中，指形軟珊瑚 (sinularia) 屬 (軟珊瑚科 (family: Alcyoniidae)) 的軟珊瑚是具有多樣的生物活性功能的雙萜類代謝物的豐富來源 (Ahmed AF, et al., J Nat Prod. 2004;67(12):2079-2082; Ahmed AF, et al., J Nat Prod. 2008;71(6):946-951; Hu Lc, et al., Mar Drugs. 2013;11(6):1999-2012; Huang KJ, et al., Molecules. 2013;18(3):2924-2933; Jiang CS, et al., Chin J Nat Med. 2014;12(11):853-856)。已經累積許多衍生自指形軟珊瑚的試劑的生物活性化合物和其抗癌效果。舉例而言，來自軟珊瑚中的柔軟指形軟珊瑚 (*Sinularia flexibilis*, *S. flexibilis*) 的 sinulariolide 已被報導能誘發人類膀胱癌 (Neoh CA, et al., Mar Drugs. 2012;10(12):2893-2911)、黑色素瘤 A375 (Li HH, et al., Mar Drugs. 2013;11(7):2625-2642) 和肝癌細胞 (Chen YJ, et al., Molecules. 2013;18(9):10146-10161) 的細胞凋亡。然而，對其它衍生自指形軟珊瑚的化合物，例如 sinularin (Weinheimer

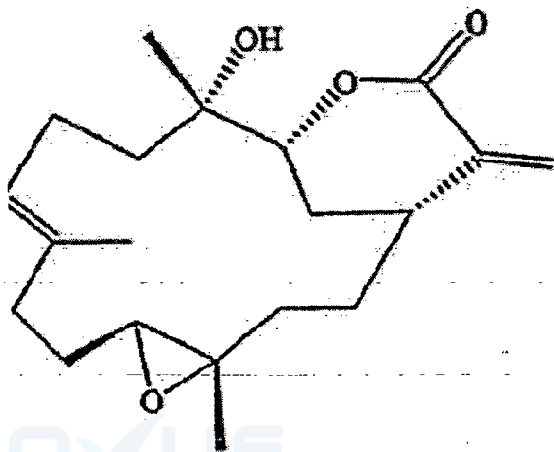
AJM, et al., Tetrahedron Lett. 1977;18(34):2923-2926)的抗癌研究仍然很少。

【0004】 sinularin，在1977年起初分離自軟珊瑚中的指形軟珊瑚，之後自細小指形軟珊瑚 (*S. manaarensis*) (Su JH, et al., J Nat Prod. 2006;69(8):1134-1139)，已報導為對人類類上皮癌 (epidermoid cancer) KB 細胞和對小鼠血癌 P388 細胞 (Weinheimer AJM, et al., Tetrahedron Lett. 1977;18(34):2923-2926)有抗癌功效。亦在人類黑色素瘤 A2058 細胞 (Su TR, et al., Electrophoresis. 2012;33(7):1139-1152)和人類胃癌 (gastric cancer) AGS 細胞 (Wu YJ, et al., Arch Oral Biol. 2016;66:147-154)中報導有抗癌功效。然而，sinularin 是否抑制口腔癌細胞的細胞增殖和其詳細機制尚未被報導。

【0005】 因此，sinularin 是否抑制口腔癌細胞的細胞增殖及其詳細機制值得被研究。

【發明內容】

【0006】 本發明提供一種如以下式 (I) 所示之化合物用於製備選擇性殺死口腔癌細胞之藥物的用途，



式 (I)，

其中式(I)所示之化合物為 *sinularin*，且其具有選擇性殺死口腔癌細胞之功效；以及一藥學上可接受的載體或鹽類。

【0009】 為了讓本發明之上述和其他目的、特徵、和優點能更明顯易懂，下文特舉較佳實施例，並配合所附圖示，作詳細說明如下：

【圖式簡單說明】

【0010】

第 1A 與 1B 圖顯示伴隨或不伴隨 *N*-乙醯半胱氨酸 (*N*-acetylcysteine, NAC) 前處理之 *sinularin* 處理的口腔癌細胞的細胞存活率。第 1A 圖顯示 *sinularin* 處理的細胞的細胞存活率。選擇口腔癌 (Ca9-22、HSC-3 和 CAL 27) 細胞和口腔正常 (HGF-1) 細胞。以 7.5、15、30 和 60 μM 之 *sinularin* 處理細胞 24 小時。數據顯示為平均值 \pm 標準差 (mean \pm SD) ($n = 3$)。 $p < 0.05-0.0001$ 。對以不同濃度之 *sinularin* 處理的相同細胞而言，無相同之小寫字母重複的數據標記 (data mark) (小寫字母；a 至 e) 代表顯著差異 (單因子 (one-way) 變異數分析 (analysis of variance, ANOVA) 與圖基 HSD 事後檢驗法 (Tukey's HSD Post Hoc Test))。即，在柱狀頂端無相同之小寫字母的不同處理為彼此顯著差異。第 1B 圖顯示 *sinularin* 處理細胞的細胞存活率和 NAC 效果。伴隨或不伴隨 4 mM NAC 前處理 1 小時，以 23.5 μM 的 *sinularin* 處理 Ca9-22、CAL 27、HSC-3 和 HGF-1 細胞 0、24 和 48 小時。數據顯示為平均值 \pm 標準差 ($n = 3$)。 $p < 0.0001$ 。無相同之小寫字母重複的數據標記 (小寫字母；a 至 e) 代表顯著差異 (以

單因子變異數分析與圖基HSD事後檢驗法檢驗相同細胞株的不同處理)。

第1C圖顯示sinularin的結構。

第2A與2B圖顯示伴隨或不伴隨NAC前處理之sinularin處理的口腔癌Ca9-22細胞的活性氧物種(reactive oxygen species, ROS)變化。伴隨或不伴隨4 mM NAC前處理1小時，以23.5 μ M的sinularin處理細胞0、2和6小時。第2A圖顯示sinularin處理的Ca9-22細胞的代表性以流式細胞術為依據的ROS圖形。以ROS(+)標記ROS陽性區。第2B圖顯示第2A圖中之ROS(+)強度的定量。數據顯示為平均值 \pm 標準差($n = 3$)。無相同之小寫字母重複的數據標記(小寫字母；a至d)代表顯著差異(單因子變異數分析與圖基HSD事後檢驗法)。即，在柱狀頂端無相同之小寫字母的不同處理為彼此顯著差異。 $p < 0.05-0.0001$ 。

第3圖顯示sinularin處理的口腔癌Ca9-22細胞的細胞形態。伴隨或不伴隨4 mM NAC前處理1小時的條件下，以23.5 μ M的sinularin處理細胞24和48小時。以100X放大率捕捉細胞影像。

第4A至4C圖顯示伴隨或不伴隨NAC前處理之sinularin處理的口腔癌Ca9-22細胞的細胞週期分析。伴隨或不伴隨4 mM NAC前處理1小時的條件下，以0、7.5、15、30和60 μ M的sinularin處理細胞24小時。第4A與4B圖顯示sinularin處理的Ca9-22細胞的代表性細胞週期圖形。細胞週期相(cell cycle phase)被標記。第4C圖顯示第4A與4B圖中的細胞週期

相百分比的定量。數據顯示為平均值±標準差($n = 3$)。在每一細胞相中，無重複的數據標記(小寫字母；a至f)代表顯著差異(單因子變異數分析與圖基HSD事後檢驗法)。即，在柱狀頂端無相同之小寫字母的不同處理為彼此顯著差異。 $p < 0.05-0.0001$ 。

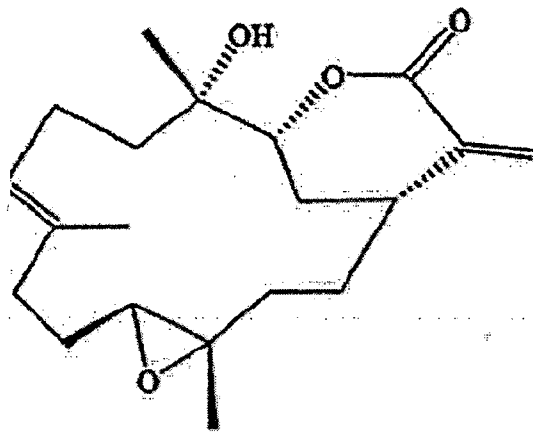
第5圖顯示在sinularin處理的Ca9-22細胞中，G2/M調節蛋白的表現。以23.5 μM sinularin處理細胞0、24和48小時。藉由西方點墨法(western blotting)，分析G2/M調控蛋白，例如週期素B1(cyclin B1)、p-週期素B1、cdc2和p-cdc2。選擇 β 肌動蛋白(β -actin)作為內控制(internal control)。

第6A至6C圖顯示伴隨或不伴隨NAC前處理之sinularin處理的口腔癌Ca9-22細胞的膜聯蛋白(annexin) V/碘化丙啶(propidium iodide, PI)的變化。伴隨或不伴隨4 mM NAC前處理1小時，以23.5 μM 的sinularin處理Ca9-22細胞一段時間(0至48小時)。第6A與6B圖顯示在sinularin處理的Ca9-22細胞中，膜聯蛋白V/碘化丙啶(PI)雙重染色(double staining)的代表性圖形。膜聯蛋白V(+)/碘化丙啶(+)和膜聯蛋白V(+)/碘化丙啶(-)被定義為細胞凋亡的膜聯蛋白V(+)。第6C圖顯示第6A與6B圖中的sinularin處理的Ca9-22細胞之以膜聯蛋白V為依據的細胞凋亡的統計。數據顯示為平均值±標準差($n = 3$)。無重複的數據標記(小寫字母；a至f)代表顯著差異(單因子變異數分析與圖基HSD事後檢驗法)。即，在柱狀頂端無相同之小寫字母的不同處理為彼此顯著差異。 $p < 0.05-0.0001$ 。

第7A至7C圖顯示於伴隨或不伴隨NAC前處理之sinularin處理的口腔癌Ca9-22細胞中，以半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(caspase)為依據之細胞凋亡。伴隨或不伴隨4 mM NAC前處理1小時，以23.5 μ M sinularin處理Ca9-22細胞0、24和48小時。第7A圖顯示sinularin處理的Ca9-22細胞之全半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(pancaspase)活性之以流式細胞術為依據的細胞凋亡圖形的代表性時程。第7B圖顯示第7A圖中的全半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶強度陽性(%)的定量分析。測量全半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(+)區域的百分比。數據顯示為平均值 \pm 標準差($n = 3$)。無重複的數據標記(小寫字母；a至c)代表顯著差異(單因子變異數分析與圖基HSD事後檢驗法)。即，在柱狀頂端無相同之小寫字母的不同處理為彼此顯著差異。 $p < 0.001$ 。第7C圖顯示sinularin處理的Ca9-22細胞中的細胞凋亡訊息傳遞蛋白的表現。藉由西方點墨法，分析細胞凋亡訊息傳遞蛋白的表現，例如裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3、8、9和PARP。選擇 β 肌動蛋白(actin)作為內控制(internal control)。

【實施方式】

【0011】 在本發明第一實施態樣中，提供一種如以下式(I)所示之化合物用於製備選擇性殺死口腔癌細胞的藥物之用途：



式(I)，其中式(I)所示之化合物為 sinularin。

【0012】 又，上述之式(I)所示之化合物可具有選擇性殺死癌細胞之功效，特別是口腔癌細胞。換言之，式(I)所示之化合物得以有效殺死癌細胞，而對正常細胞之傷害性較小，或甚至不具傷害。

【0013】 在一實施例中，上述式(I)所示之化合物可具有於口腔癌細胞中造成氧化壓力之功效。在又一實施例中，上述式(I)所示之化合物可具有使口腔癌細胞的細胞週期停滯之功效。在又另一實施例中，上述式(I)所示之化合物可具有使口腔癌細胞細胞凋亡之功效。在一些實施例中，上述口腔癌細胞的例子包含牙齦癌細胞及/或舌癌細胞等，但不限於此。此外，上述之式(I)所示之化合物也可具有於癌細胞中造成氧化壓力之功效。

【0014】 上述之式(I)所示之化合物可為自然產物或為人工合成，並無特別限制。

【0015】 在一實施例中，上述之式(I)所示之化合物可為獲自任何珊瑚的自然產物。上述珊瑚可包括指形軟珊瑚屬 (*Sinularia*) 珊瑚，但不限於此。指形軟珊瑚屬珊瑚的例子，可

包括，但不限於柔軟指形軟珊瑚 (*Sinularia flexibilis*) 和細小指形軟珊瑚 (*Sinularia manaarensis*) 等。在一特定實施例中，上述之式 (I) 所示之化合物係獲自柔軟指形軟珊瑚。

【0016】 在另一實施例中，上述之式 (I) 所示之化合物係為人工合成。

【0017】 又，在一實施例中，上述選擇性殺死口腔癌細胞的藥物除了任何前述式 (I) 所示之化合物，還可更包括與一藥學上可接受之載體或鹽類，但不限於此。

【0018】 在本發明之第二實施態樣中，本發明也提供一種任何前述式 (I) 所示之化合物於製備以氧化壓力為媒介之癌症治療藥物的用途。於本發明中，用語「以氧化壓力為媒介之癌症治療藥物」，係為具有增加癌細胞之氧化壓力的能力進而造成癌細胞死亡及/或減少增殖的一藥物。

【0019】 在一實施例中，上述本發明以氧化壓力為媒介之癌症治療藥物可具有於癌細胞中產生活性氧物種之功效。在又一些實施例中，上述本發明以氧化壓力為媒介之癌症治療藥物可具有使癌細胞之細胞週期停滯的功效。在又另一實施例中，上述本發明以氧化壓力為媒介之癌症治療藥物可具有使癌細胞細胞凋亡之功效。在又另一實施例中，上述本發明以氧化壓力為媒介之癌症治療藥物可具有選擇性殺死癌細胞之功效。

【0020】 又，在一實施例中，上述以氧化壓力為媒介之癌症治療藥物除了任何前述式 (I) 所示之化合物，還可更包括與一藥學上可接受之載體或鹽類，但不限於此。

【0021】 再者，上述以氧化壓力為媒介之癌症治療藥物可

治療之癌症並無任何限制，例如可治療口腔癌及/或乳癌等。在一實施例中，上述以氧化壓力為媒介之癌症治療藥物係可為口腔癌治療藥物。上述口腔癌包括牙齦癌及/或舌癌，但不限於此。

【0022】 在本發明之第三實施態樣中，本發明也提供一種用於選擇性殺死口腔癌細胞之醫藥組合物。

【0023】 上述用於選擇性殺死口腔癌細胞之醫藥組合物可包含如任何前述之如式(I)所示之化合物為活性成分，和藥學上可接受之載體或鹽類。

【0024】 在一實施例中，上述本發明用於選擇性殺死口腔癌細胞之醫藥組合物可具有於口腔癌細胞中造成氧化壓力之功效。在另一實施例中，上述本發明用於選擇性殺死口腔癌細胞之醫藥組合物可具有於口腔癌細胞中產生活性氧物種之功效。在又一實施例中，上述本發明用於選擇性殺死口腔癌細胞之醫藥組合物可具有使口腔癌細胞之細胞週期停滯之功效。在又另一實施例中，上述本發明用於選擇性殺死口腔癌細胞之醫藥組合物可具有使口腔癌細胞細胞凋亡之功效。在一些實施例中，上述口腔癌細胞包含牙齦癌細胞及/或舌癌細胞。

【0025】 上述藥學上可接受之載體可包括，但不限於溶劑、分散媒(dispersion medium)、套膜(coating)、抗菌與抗真菌試劑與一等滲透壓與吸收延遲(absorption delaying)試劑等與藥學投予相容者。對於不同的給藥方式，可利用一般方法將醫藥組合物配製成劑型(dosage form)。

【0026】 又，上述藥學上可接受之鹽類可包括，但不限於

鹽類包括無機陽離子，例如，鹼金屬鹽類，如鈉、鉀或胺鹽，鹼土金屬鹽類，如鎂、鈣鹽，含二價或四價陽離子之鹽類，如鋅、鋁或鉛鹽。此外，也可是為有機鹽類，如二環己胺鹽類、甲基-D-葡萄糖胺，胺基酸鹽類，如精胺酸、離胺酸、組織胺酸、麩胺酸鹽類。

【0027】 本發明醫藥組合物或藥物給藥可以口服、非口服或藉由植入貯存器(implanted reservoir)的方式。非口服可包括皮下(subcutaneous)、皮內(intracutaneous)、靜脈內(intravenous)、肌肉內(intramuscular)、關節內(intraarticular)、動脈(intraarterial)、滑囊(腔)內(intrasynovial)、胸骨內(intrasternal)、蜘蛛膜下腔(intrathecal)、疾病部位內(intralesional)注射以及灌注技術。

【0028】 口服成分的形式可包括，但不限定於，藥錠、膠囊、乳劑(emulsions)、水性懸浮液(aqueous suspensions)、分散液(dispersions)與溶液。

【0029】 本發明之醫藥組合物或藥物可投予至植物或動物等。上述可包括魚類、兩棲類、爬蟲類、禽類、哺乳動物等，但不限於此。哺乳動物的例子可包括，但不限於，貓、狗、牛、馬、豬、人類等。在一實施例中，醫藥組合物或藥物可投予至人類。

【0030】 實施例

【0031】 A. 材料與方法

【0032】 1. 細胞培養物與藥物資訊

【0033】 來自牙齦癌(Ca9-22)和舌癌(CAL 27及HSC-3)的人

類口腔癌細胞株分別購自健康科學研究資源銀行(Health Science Research Resources Bank, HSRRB)(日本大阪)與美國菌種保存中心(American Type Culture Collection, ATCC; 美國, 維吉尼亞州(Virginia, USA))。正常人類牙齦纖維母細胞株(HGF-1)購自ATCC。

【0034】 如先前文獻(Chang YT, et al., Arch Oral Biol. 2016;66:147-154)所述, 使用常規配方(Gibco, Grand Island, NY, USA)和胎牛血清, 將細胞培養於37°C且含5% CO₂之潮濕的空氣中。

【0035】 如先前文獻(Su TR, et al., Electrophoresis. 2012;33(7):1139-1152 及 Su JH, et al., J Nat Prod. 2006;69(8):1134-1139)所述, 將冷凍乾燥(lyophilize)的細小指形軟珊瑚(溼重2.2 kg)粉碎, 並且以乙酸乙酯(1 L/次, 共5次)徹底萃取。無溶劑的乙酸乙酯萃取物(20.2 g)通過矽膠管柱層析(Si gel CC), 並以在乙酸乙酯中之正己烷洗提(梯度0至100%), 產生28個分餾(fraction)。以正己烷-乙酸乙酯(10:1)洗滌分餾16, 且藉由使用的正己烷-丙酮(8:1)的正相高效能液相層析(normal-phase high performance liquid chromatography)對分餾16層析, 產生sinularin (25 mg)。sinularin (參閱第1C圖)分離自柔軟指形軟珊瑚(*Sinularia flexibilis*)和細小指形軟珊瑚(*Sinularia manaarensis*), 並且溶於二甲基亞砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)中, 用於細胞處理。控制組和不同濃度的sinularin的DMSO的濃度皆相同(0.2%, v/v)。挑選*N*-乙醯半胱氨酸(*N*-acetylcysteine, NAC) (Sigma; St. Louis, MO, USA)作

為施用 sinularin 之前的前處理。

【0036】 2. 細胞存活率

【0037】 如先前文獻 (Chiu CC, et al, *PLoS One* 2013, 8(5):e64739) 所述，藉由四唑化合物 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) 分析法 (CellTiter 96® Aqueous One Solution, Promega, Madison, WI, USA) 來量測細胞存活率。以每孔 4×10^3 個細胞且每孔 0.1 mL 的培養液接種細胞於 96 孔盤中。以控制組 (DMSO) 或不同濃度的 sinularin 處理細胞 24 小時。最後，細胞與 MTS 試劑於 37°C 反應 60 分鐘，接著以 ELISA 讀取儀 (EZ Read 400 Research, BioChrom, Holliston, MA, USA) 量測於 490 nm 的吸收。

【0038】 3. 胞內活性氧物種 (reactive oxygen species, ROS) 的確認

【0039】 挑選 ROS 反應染劑二氯螢光素二乙酸酯 (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA)。以每孔 2×10^5 個細胞 / 2 mL 培養液的密度，將細胞接種於 6 孔盤中生長隔夜。在 sinularin 處理 2 或 6 小時之後，將細胞和於磷酸鹽緩衝液 (phosphate-buffered saline, PBS) 中之 100 nM 的 H₂DCF-DA 於 37°C 中反應 30 分鐘。在收集和沖洗之後，細胞重新懸浮於 PBS 中，使用 Accuri C6 流式細胞儀 (Becton-Dickinson, Mansfield, MA, USA) 及其內建軟體偵測 ROS。

【0040】 4. 細胞週期分析

【0041】 如先前文獻 (Chiu CC, et al, *J Agric Food Chem*

2011, 59(8):4288-4293) 所述，藉由碘化丙啶 (propidium iodide, PI; Sigma, St. Louis, MO, USA) 來偵測 DNA 含量 (DNA content)。以每孔 2×10^5 個細胞和 2 mL 培養基，將細胞接種於 6 孔盤中。在接種隔夜之後，以不同濃度的 sinularin 培養非同步的貼附細胞 24 小時。在收集、固定及離心之後，細胞團塊 (cell pellet) 和於磷酸鹽緩衝液 (PBS) 中之 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PI 於室溫及暗處中，培養 15 分鐘。最後，透過流式細胞儀分析 (BD Accuri™ C6) 確認細胞週期分布 (cell cycle distribution)。

【0042】 5. 用於分析 G2/M 停滯訊息傳遞的西方點墨法

【0043】 藉由許多 G2/M 訊息傳遞蛋白的西方點墨法，進一步量測 G2/M 停滯。將 30 μg 的蛋白溶解產物回溶於 10% SDS-PAGE，轉印至 PDVF 膜 (Pall Corporation, Port Washington, NY, USA)，且以於 Tris 緩衝液 (tris-buffered saline) 和 Tween-20 中的 5% 脫脂牛奶，進行蛋白質阻斷。接著，將膜與 1:1000 至 1:5000 稀釋的一級抗體 (購自 Signalway Antibody LLC., College Park, MD, USA 的 cdc2 (Ab-161) 抗體 (#21152) 兔 mAb; p-cdc2 (磷酸-Thr161) 抗體 (#11134); 週期素 B1 多株抗體 (#40802); p-週期素 B1 (磷酸-Ser126) 多株抗體 (#12193)，或 mAb- β -肌動蛋白 (選植株 AC-15) (#A5441; Sigma)) 一起培養，且與其相符的二級抗體一起培養。藉由 WesternBright™ ECL HRP 基質 (#K-12045-D50, Advansta, Menlo Park, CA, USA)，放大訊號。

【0044】 6. 藉由膜聯蛋白 (annexin)V/碘化丙啶 (PI) 之細胞凋亡 (apoptosis) 分析

【0045】 如先前文獻 (Chiu CC, et al., J Agric Food Chem.

2011;59(8):4288-4293 及 Su CC, et al., Mar Drugs. 2014;12(10):5295-5315)所述，藉由膜聯蛋白 V/碘化丙啶方法 (PharMingen, San Diego, CA, USA)評估細胞凋亡。以每孔 2×10^5 個細胞和 2 mL 培養基，將細胞接種於 6 孔盤中。以 DMSO 或 23.5 μM 的 sinularin 處理細胞 12、24、36 或 48 小時。細胞與 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的膜聯蛋白 V-螢光異硫氰酸鹽 (fluorescein isothiocyanate) 和 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的碘化丙啶反應，以進行流式細胞儀 (Becton-Dickinson) 分析。

【0046】 7. 藉由全半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (pancaspase) 之細胞凋亡分析

【0047】 也可藉由一般的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶活化 (caspase activation)，來偵測細胞凋亡 (Kaufmann SH, et al, *Methods* 2008, 44(3):262-272)。藉由通用半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶活性分析套組 (generic caspase activity assay kit) (Fluorometric-Green; ab112130) (Abcam, Cambridge, UK) 來偵測半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1、3、4、5、6、7、8 與 9 的活化。簡而言之，以每孔 2×10^5 個細胞和 2 mL 的培養基的密度，將細胞接種於 6 孔盤中。隔夜之後，以 DMSO 或 23.5 μM 的 sinularin 培養細胞 24 或 48 小時，接著與 2 μL 的 500X TF2-VAD-FMK 在 5% CO_2 的培養箱中，於 37°C 反應 2 小時。在 PBS 清洗之後，細胞重新懸浮於 0.5 mL 的分析緩衝液中，立即以流式細胞術 (Beckman coulter cytomics FC500, Boulevard Brea, CA, USA) 及 FlowJo 軟體 (Ashland, Oregon, USA) 分析。

【0048】 8. 藉由半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶的西方點墨法之

細胞凋亡分析

【0049】除了不同的一級抗體外，剩餘的步驟與上述用於分析G2/M停滯蛋白的西方點墨法相同。包含裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶8(Asp391)(18C8)的兔單株抗體的一級抗體和在細胞凋亡抗體取樣器套組 (apoptosis antibody sampler kit)(裂解的多聚ADP-核糖聚合酶(PARP)(Asp214)(D64E10)XP®;來自Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA之裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(Asp175)(5A1E)和裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶9(Asp330)(D2D4))中的兔單株抗體，以1:1000稀釋來使用並與其相應的二級抗體偶聯。

【0050】 9. 統計學分析

【0051】以平均值±標準差呈現數據。以單因子(one-way)變異數分析(analysis of variance, ANOVA)與圖基HSD事後檢驗法(Tukey HSD Post Hoc Test)來分析群組差異(JMP® 12 software)。具有小寫字母但沒有重複的數據標記代表顯著差異。

【0052】 B. 結果

【0053】 1. Sinularin處理的口腔癌細胞的細胞存活率及NAC前處理的效果

【0054】第1A圖顯示sinularin (第1C圖)處理的三種口腔癌細胞(Ca9-22、HSC-3及CAL 27)的細胞存活率(%)以劑量-反應方式劇烈下降。相較之下，口腔正常HGF-1細胞的細胞存活率只些微下降。Sinularin對口腔癌Ca9-22及CAL 27細胞之IC₅₀值

分別為23.5及36.6 μM 。由於HSC-3細胞在測試的最高劑量時，未達到 IC_{50} ，因此選擇其之 IC_{40} 值(60%存活率)來代表其細胞毒性，亦即27.5 μM 。

【0055】 藉由引入活性氧物種(ROS)清除劑(scavenger)，N-乙醯半胱胺酸(*N*-acetylcysteine, NAC)，探討氧化壓力(oxidative stress)在藥物治療中的角色。(Chan WH, et al., *Toxicol Lett* 2006, 167(3):191-200; Hung JH, et al., *Environ Toxicol.* 2015, PMID: 26370073; Lien JC, et al., *Environ Toxicol.* 2016, PMID: 26822499; Shieh JM, et al, *PLoS One* 2014, 9(6):e99242)。第1B圖顯示三種癌細胞(Ca9-22、CAL 27及HSC-3)和正常口腔細胞(HGF-1)中，沒有sinularin後處理的NAC前處理組與未處理控制組沒有顯著差異。值的注意的是，在24和48小時處理時，NAC前處理顯著地解救在三種口腔癌細胞和一種口腔正常細胞中 sinularin 所誘發的抗細胞增殖(antiproliferation)(第1B圖)($p < 0.05-0.0001$)。

【0056】 2. Sinularin處理的口腔癌Ca9-22細胞之ROS生成及NAC前處理的效果

【0057】 第2A圖(上側)顯示口腔癌Ca9-22細胞在sinularin處理2和6小時之後的流式細胞術圖形。Sinularin(23.5 μM)處理之Ca9-22細胞的相對的ROS陽性染色隨著時間增加(第2B圖)。第2A圖(下方)顯示NAC對sinularin誘發的ROS生成之影響的流式細胞術圖形。在NAC前處理(第2B圖)之後，sinularin誘發的ROS產生隨著時間減少。

【0058】 3. Sinularin處理的口腔癌Ca9-22細胞之細胞形態

及NAC前處理的效果

【0059】 第3圖顯示sinularin處理的口腔癌Ca9-22細胞隨著時間的細胞形態變化。在24和48小時的sinularin處理之後，細胞凋亡的形態特徵，例如凋亡體(apoptotic body)及細胞萎縮，為可見的。相較之下，NAC前處理能夠預防這些細胞凋亡形態。

【0060】 4. Sinularin處理的口腔癌Ca9-22細胞之細胞週期變化及NAC前處理的效果

【0061】 伴隨或不伴隨NAC前處理的口腔癌Ca9-22細胞的sinularin誘發之細胞週期變化的細胞週期分佈的圖形顯示於第4A和4B圖(分別在上方和下方)。相較於控制組，sinularin處理的Ca9-22細胞的G1族群減少。相較於控制組，sinularin處理的Ca9-22細胞的G2/M族群增加，顯示sinularin使口腔癌細胞停滯在G2/M相。相較於僅以sinularin處理，在NAC前處理之後(第4C圖)，sinularin誘發之G2/M停滯減少。

【0062】 5. Sinularin處理的口腔癌Ca9-22細胞的G2/M調控蛋白及NAC前處理的效果

【0063】 週期素(cyclin)和CDK為細胞週期檢查點的調控訊息傳遞蛋白。在G2相期間，cdc2(CDK1)之調控殘基的磷酸化(蘇胺酸-161，Thr-161)直接活化週期素B1與cdc2複合體，且使細胞進入有絲分裂(Stark GR, et al., Reviews and Model Systems. Totowa, NJ; Humana Press; 51-82)。當週期素B1與cdc2複合體的活性受到藥物處理抑制時，細胞可能停滯於G2/M相(Carmazzi Y, et al., Cell Prolif. 2012;45(6):545-556)。為了驗證sinularin誘發的G2/M累積，在第0、24和48小時評估在sinularin

處理之 Ca9-22 細胞中的 G2/M 調控蛋白，例如週期素 B1 和 cdc2。如第 5 圖所示，相較於控制組，磷酸化之週期素 B1 (p-週期素 B1；絲胺酸 126) 和 p-cdc2 (Thr161) 的表現為以時間依賴方式被 sinularin 減少。相較之下，NAC 前處理隨著時間增強在 sinularin 處理的 Ca9-22 細胞中的 p-週期素 B1 和 p-cdc2 的表現。

【0064】 6. Sinularin 處理的口腔癌 Ca9-22 細胞的以膜聯蛋白 V/碘化丙啶為依據之細胞凋亡及 NAC 前處理的效果

【0065】 為了透過流式細胞術檢驗細胞凋亡，分析 sinularin 處理的口腔癌 Ca9-22 細胞的膜聯蛋白 V/碘化丙啶圖形 (第 6A 和 6B 圖，上方)。第 6C 圖顯示，在 36 小時內，sinularin (23.5 μ M) 處理的 Ca9-22 細胞之膜聯蛋白 V 陽性的強度百分比為時間依賴地增加。延長的藥物接觸 (48 小時) 亦維持高原量 (plateau level) 的細胞凋亡。

【0066】 第 6A 與 6B 圖 (下方) 顯示 NAC 前處理對 sinularin 誘發之細胞凋亡的影響的膜聯蛋白 V/碘化丙啶圖形。NAC 前處理 (第 6C 圖) 顯示，相較於只有 sinularin，由 sinularin 誘發之膜聯蛋白 V 陽性強度的增加為顯著地隨時間回復。

【0067】 7. Sinularin 處理的口腔癌 Ca9-22 細胞的藉由半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (caspase) 之細胞凋亡及 NAC 前處理的效果

【0068】 為了更進一步檢驗用於 sinularin 處理的口腔癌 Ca9-22 細胞的細胞凋亡的程度，提供半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1、3、4、5、6、7、8 及 9 之通用活性 (Yeh CC, et al., *Molecules*. 2012a; 17(9): 10916-10927) 之以流式細胞術為依據的全半胱氨酸

酸天冬氨酸蛋白酶圖形(第7A圖，上方)。第7B圖顯示 sinularin (23.5 μ M)處理之 Ca9-22細胞的全半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶陽性強度的百分比為以時間依賴方式增強。第7A圖下方顯示NAC前處理對 sinularin誘發之細胞凋亡的影響的全半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶圖形。相較於只有 sinularin，NAC前處理(第7B圖)顯示，由 sinularin誘發之全半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶陽性強度的增加為顯著地隨時間回復。

【0069】 為了檢驗在 sinularin處理之 Ca9-22細胞中的特定細胞凋亡訊息傳遞蛋白的參與，例如裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3、8和9及裂解的多聚ADP-核糖聚合酶(poly(ADP-ribose) polymerase, PARP)，進行細胞凋亡訊息傳遞蛋白的時程變化。如第7C圖所示，於 Ca9-22細胞中，在 sinularin之處理24和48小時的處理下，裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶9劇烈地增加。相較之下，在伴隨NAC前處理之 sinularin的48小時處理下，裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶9些微地增加。於 Ca9-22細胞中，在 sinularin之24小時處理下，裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶8增加，但在NAC前處理下，其維持基本水平。於 Ca9-22細胞中，在 sinularin之24和48小時處理下，裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3增加。相較之下，在伴隨NAC前處理之 sinularin的處理48小時處理下，裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3些微地增加。於 Ca9-22細胞中，在 sinularin之48小時處理下，裂解的PARP增加。相較之下，在伴隨NAC前處理之 sinularin之48小時處理，裂解的PARP些微地減少。

【0070】 C. 討論

【0071】 在本發明研究中，評估 sinularin 於對口腔癌細胞的抗細胞增殖效果和氧化壓力的參與。亦檢驗 sinularin 處理的口腔癌細胞中的 ROS 生成、G2/M 停滯、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3、8 和 9 的活性及細胞凋亡。

【0072】 Sinularin 對人類類上皮癌 (epidermoid cancer) KB 細胞和對小鼠血癌 P388 細胞的 IC_{50} 值分別為 0.9 和 3.29 μM (Weinheimer AJM, et al., Tetrahedron Lett. 1977;18(34):2923-2926)。亦在人類黑色素瘤 A2058 細胞 (Su TR, et al., Electrophoresis. 2012;33(7):1139-1152) 和人類胃癌 AGS 細胞 (Wu YJ, et al., Arch Oral Biol. 2016;66:147-154) 中報導有抗癌效果，亦即，在 24 小時處理，sinularin 的 IC_{50} 值分別為 9.28 和 17.73 μM 。

【0073】 在本發明研究中，發現 sinularin 對口腔癌 Ca9-22 細胞的 IC_{50} 值為 23.5 μM 。Sinularin 對口腔癌 CAL 27 和 HSC-3 細胞的 IC_{40} 值分別為 24.94 和 27.5 μM 。這些結果顯示，不同癌細胞種類可能有對 sinularin 有不同的敏感性。

【0074】 再者，正常口腔 HGF-1 細胞較不會受到 sinularin 的傷害，且在最高濃度 (60 μM) 的處理之下，具有至少 80% 的存活率。這顯示，sinularin 可能選擇性殺死口腔癌細胞但對正常口腔細胞幾近無害或僅有輕微之傷害。sinularin 的選擇性殺死其它癌症的效果需要進一步的探討。

【0075】 癌細胞通常是因為檢查點 (checkpoint) 缺陷而導致不正常的細胞增殖。然而，可藉由活化藥物誘發之細胞週期停滯的檢查點，部分地解決此細胞增殖的問題 (Kastan MB, et al.,

Nature. 2004; 432 (7015):316-323)。舉例而言，許多藥物已被報導出能藉由ROS訊息傳遞，來誘發G2/M停滯，以抑制癌細胞增殖，例如在骨癌(osteosarcoma)中的erianin (Wang H, et al., Cell Death Dis. 2016; 7(6):e2247)、在子宮頸癌中的asperlin (He L, et al., Biochem Biophys Res Commun. 2011;409(3):489-493)、在肺癌細胞中的physalin A (Kang N, et al., Mol Cell Biochem. 2016;415(1-2):145-155)和口腔癌細胞中的聚乙烯吡咯(polyenylpyrrole)衍生物(Hua KF, et al., PLoS One. 2013;8(6):e67603)。類似地，本發明研究發現sinularin誘發ROS生成和G2/M停滯，導致口腔癌細胞的細胞凋亡。

【0076】 已有報導，藥物誘發G2/M停滯和細胞凋亡的細胞與subG1累積有關或無關。舉例而言，類黃素(flavonoid)檉柳黃素(tamarixetin)處理的人類血癌細胞誘發具有subG1累積之G2/M停滯和細胞凋亡(Nicolini F, et al., Mol Carcinog. 2014;53(12):939-950)。其細胞凋亡是以膜聯蛋白V/碘化丙啶分析為依據，且達到約20%的膜聯蛋白V陽性。相較之下，已有報導，許多藥物誘發G2M停滯和細胞亡，但沒有可偵測到的subG1累積，例如在骨癌中的erianin (Wang H, et al., Cell Death Dis. 2016; 7(6):e2247)、在肺癌H446和H1688細胞中的吳茱萸鹼(evodiamine)(Fang C, et al., PLoS One. 2014;9(12):e115204)、在肺癌A549細胞中的魏察白曼陀羅素(withametelin)(Rao PC, et al., Tumour Biol. 2016;37(9):12579-12587)和A375細胞中的二芳基吡啶衍生物(diarylpyrazole derivative)(AM251)(Carpi S, et al., Anticancer

Drugs. 2015;26(7):754-762)。類似地，本發明之研究發現，在24小時處理的口腔癌細胞中，sinularin誘發無可偵測到的subG1累積之G2/M停滯和細胞凋亡，此細胞凋亡是透過流式細胞術(膜聯蛋白V/碘化丙啶及全半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶分析)和西方點墨法來確認(半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3、8、9和PARP)。基本上，subG1累積可能來自細胞凋亡之細胞所遺失的DNA。然而，很有可能的，G2/M停滯之細胞所遺失的DNA只將DNA含量(DNA content)移至S或G1相，且可能沒有顯示subG1峰。或者，藥物誘發的細胞凋亡之細胞可能需要更多時間給subG1累積(Chen BH, et al., J Agric Food Chem. 2011;59(6):2284-2290)。舉例而言，在24和48小時，查耳酮衍生物(chalcone derivative)Ch1誘發具有極少量subG1的G2/M停滯，但在72小時出現劇烈的subG1累積(Kello M, et al., Life Sci. 2006;150:32-38)。

【0077】 在本發明之研究中，確認了氧化壓力在參與sinularin處理之口腔癌細胞中的角色。NAC前處理顯示，sinularin誘發的細胞死亡、ROS生成、G2/M停滯和細胞凋亡(全半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶活化、膜聯蛋白V染色和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶表現)被NAC所回復。因此，口腔癌細胞的sinularin誘發之G2/M停滯和細胞凋亡是受到氧化壓力媒介。

【0078】 D. 結論

【0079】 最後，本發明之研究證明，透過ROS生成和G2/M停滯，sinularin可表現出對口腔癌細胞有抗細胞增殖和細胞凋亡的效果。半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3、8、9和PARP亦受到

sinularin活化。再者，NAC前處理可回復G2/M停滯的改變、ROS生成、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶的活化和細胞凋亡。因此，氧化壓力可能在sinularin誘發的選擇性殺死口腔癌細胞中扮演重要的角色。此選擇性殺死的特性顯示sinularin為對口腔癌的潛力抗癌藥物。

【0080】 雖然本發明已以較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作些許之更動與潤飾，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。

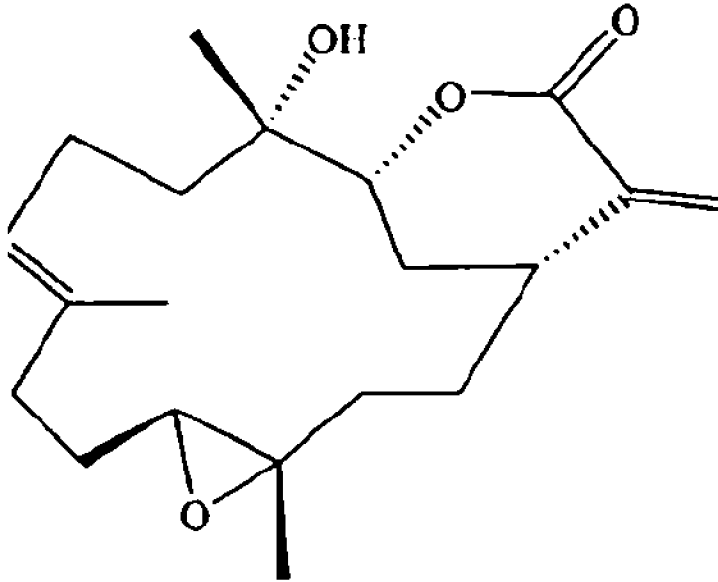
【符號說明】

【0081】

無。

申請專利範圍

1. 一種如以下式 (I) 所示之化合物用於製備選擇性殺死一口腔癌細胞之藥物的用途，



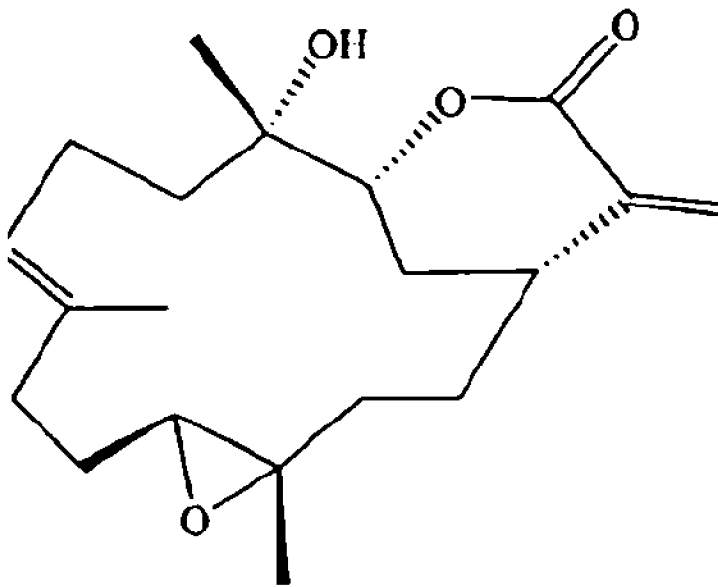
式 (I) ，

其中該式 (I) 所示之該化合物為 *sinularin*，且其具有選擇性殺死該口腔癌細胞之功效。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述之化合物用於製備選擇性殺死一口腔癌細胞之藥物的用途，其中該式 (I) 所示之該化合物具有於該口腔癌細胞中造成氧化壓力之功效。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述之化合物用於製備選擇性殺死一口腔癌細胞之藥物的用途，其中該式 (I) 所示之該化合物具有於該口腔癌細胞中產生活性氧物種之功效。
4. 如申請專利範圍第 1 項所述之化合物用於製備選擇性殺死一口腔癌細胞之藥物的用途，其中該式 (I) 所示之該化合物具有使該口腔癌細胞之細胞週期停滯的功效。
5. 如申請專利範圍第 1 項所述之化合物用於製備選擇性殺

死一口腔癌細胞之藥物的用途，其中該式(I)所示之該化合物具有使該口腔癌細胞細胞凋亡之功效。

6. 如申請專利範圍第1項所述之化合物用於製備選擇性殺死一口腔癌細胞之藥物的用途，其中該口腔癌細胞包括一牙齦癌細胞及/或一舌癌細胞。
7. 一種如以下式(I)所示之化合物用於製備以氧化壓力為媒介之一口腔癌症治療藥物的用途，



式(I)，

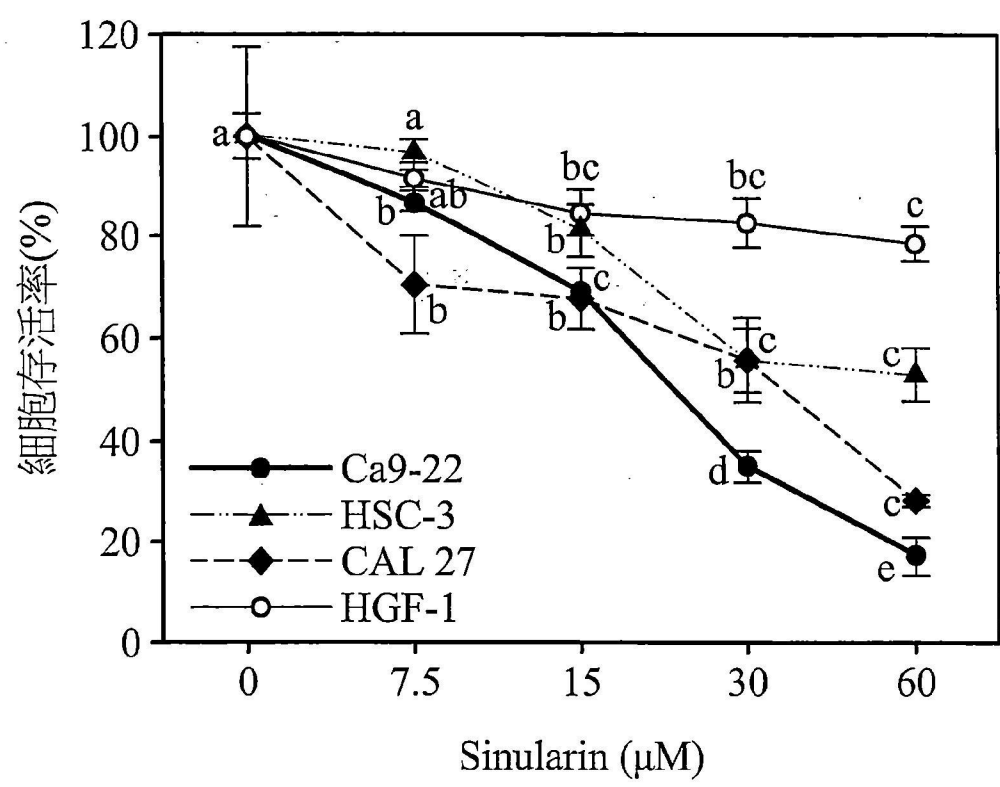
其中該式(I)所示之該化合物為 *sinularin*，且其具有於一口腔癌細胞中造成氧化壓力之功效。

8. 如申請專利範圍第7項所述之化合物用於製備以氧化壓力為媒介之一口腔癌症治療藥物的用途，其中該式(I)所示之該化合物具有於該口腔癌細胞中產生活性氧物種之功效。
9. 如申請專利範圍第7項所述之化合物用於製備以氧化壓力為媒介之一口腔癌症治療藥物的用途，其中該式(I)所示之該化合物具有使該口腔癌細胞之細胞週期停滯的功

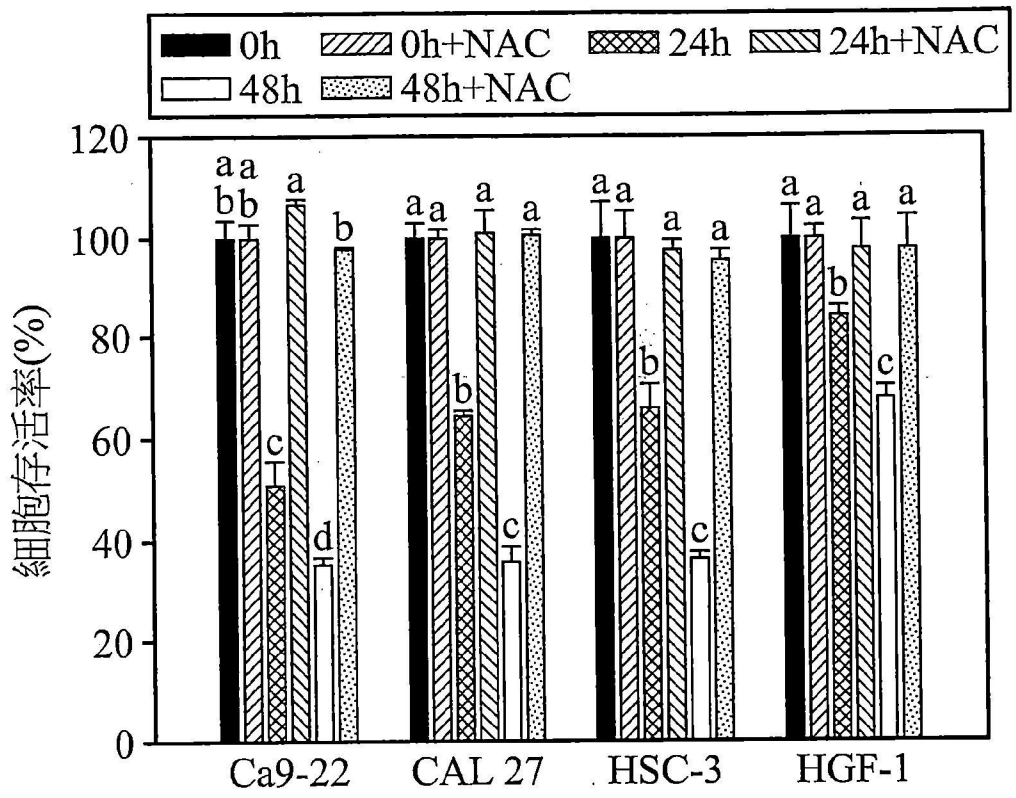
效。

10. 如申請專利範圍第 7 項所述之化合物用於製備以氧化壓力為媒介之一口腔癌症治療藥物的用途，其中該式 (I) 所示之該化合物具有使該口腔癌細胞細胞凋亡之功效。
11. 如申請專利範圍第 7 項所述之化合物用於製備以氧化壓力為媒介之一口腔癌症治療藥物的用途，其中該式 (I) 所示之該化合物具有選擇性殺死該口腔癌細胞之功效。
12. 如申請專利範圍第 7 項所述之化合物用於製備以氧化壓力為媒介之一口腔癌症治療藥物的用途，其中該口腔癌包括一牙齦癌及/或一舌癌。

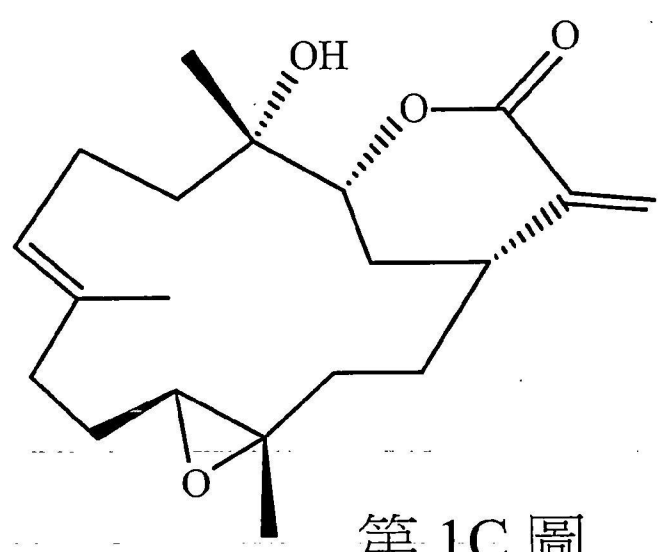
圖式



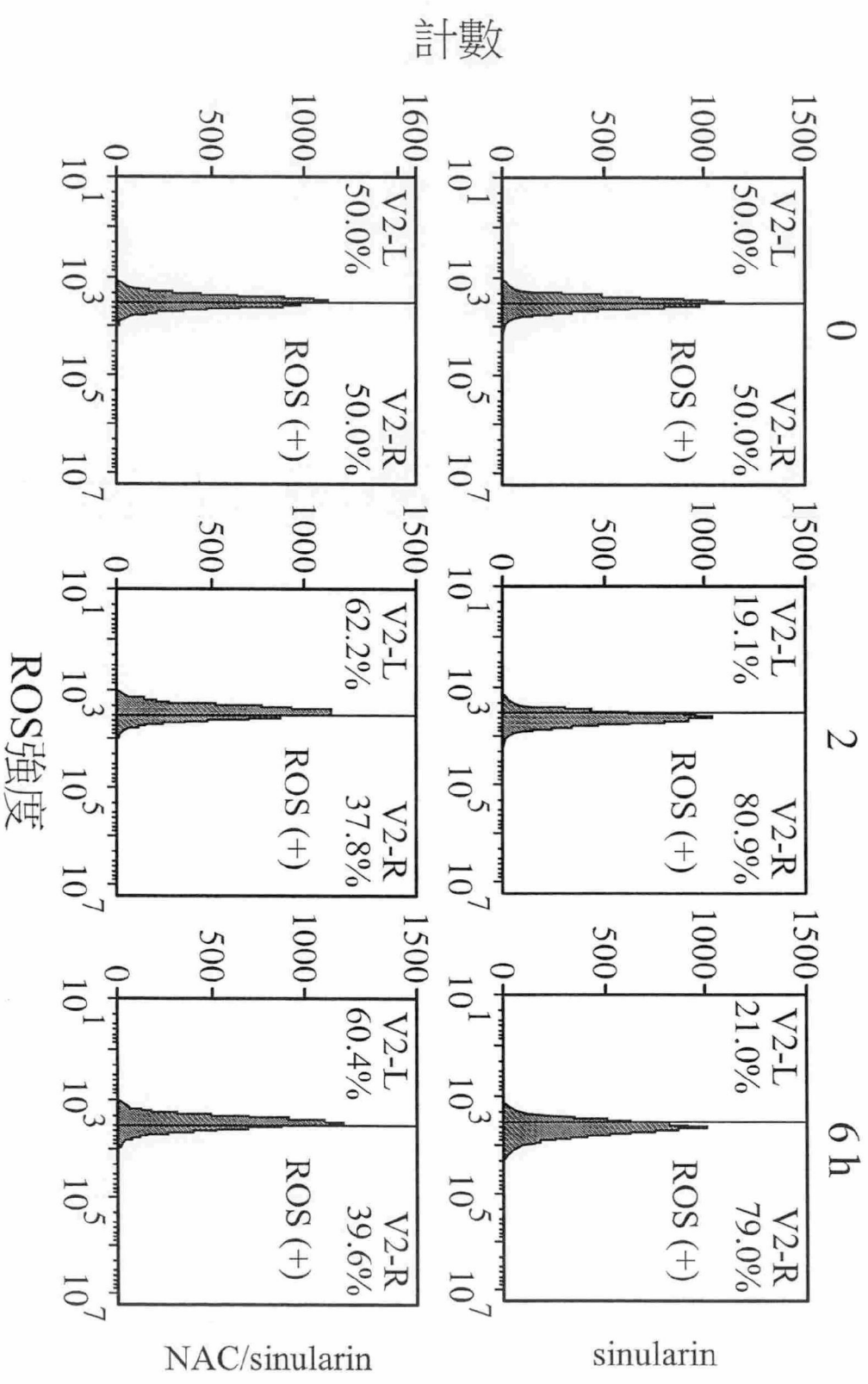
第 1A 圖



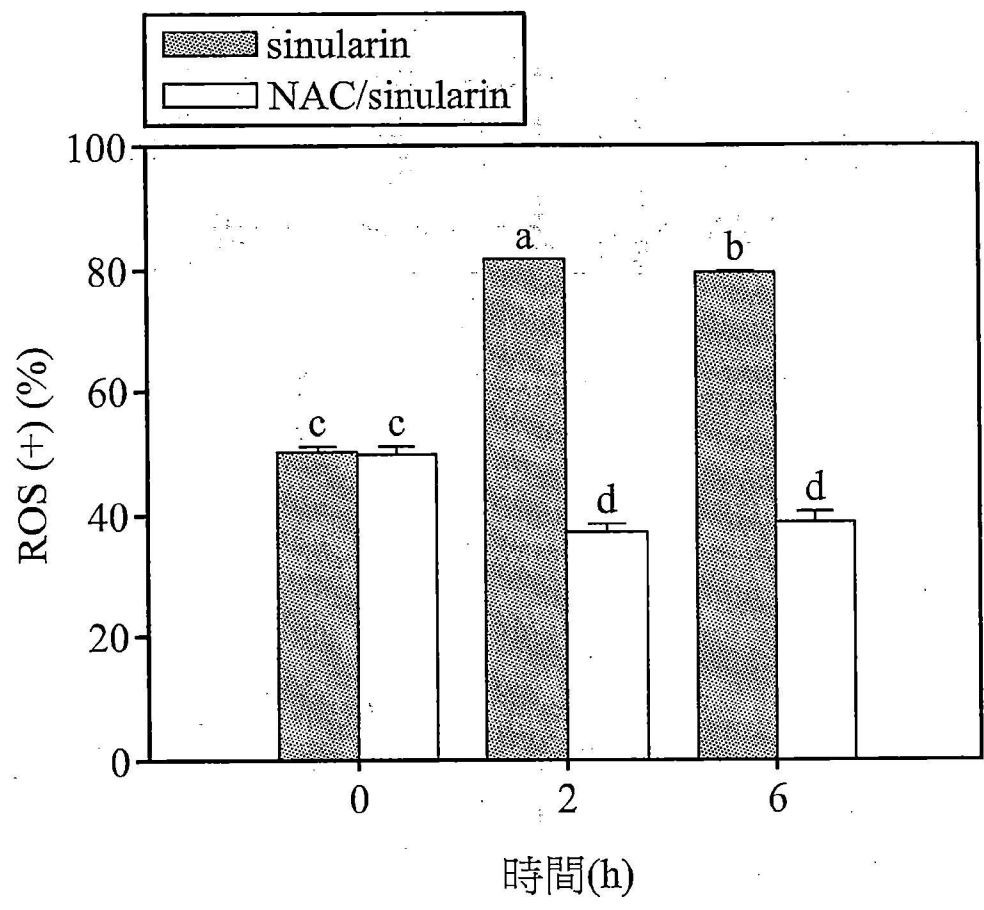
第 1B 圖



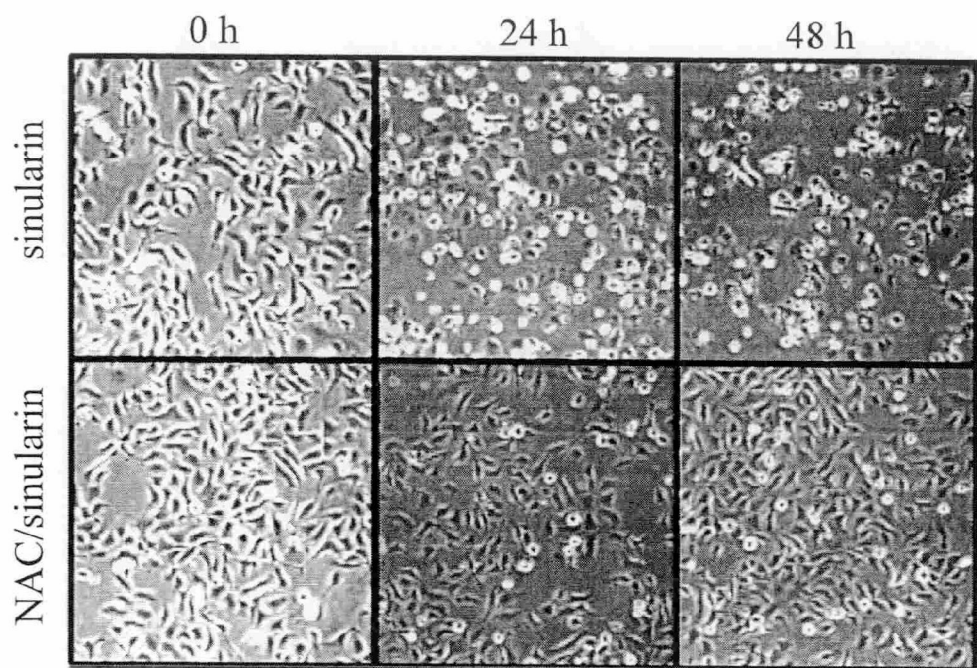
第 1C 圖



第 2A 圖



第 2B 圖



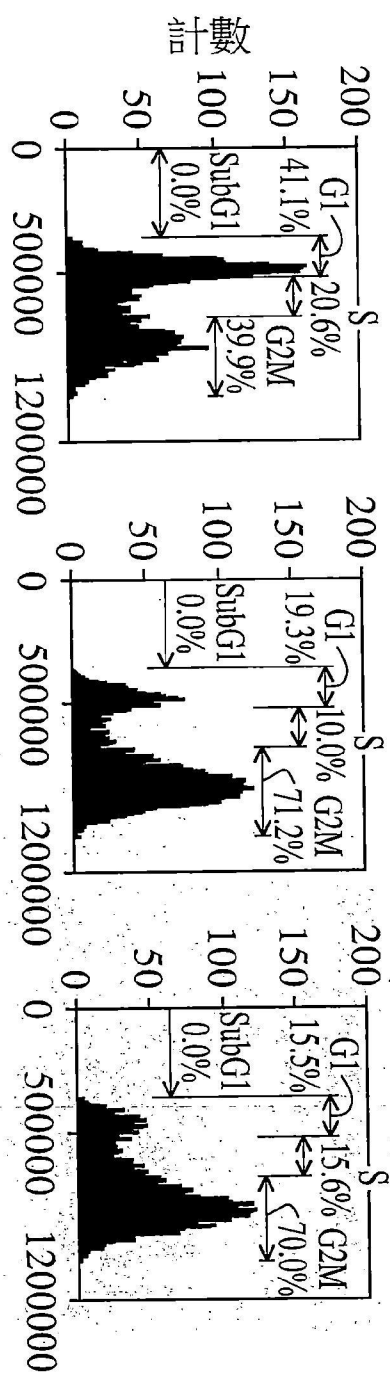
第 3 圖

控制組

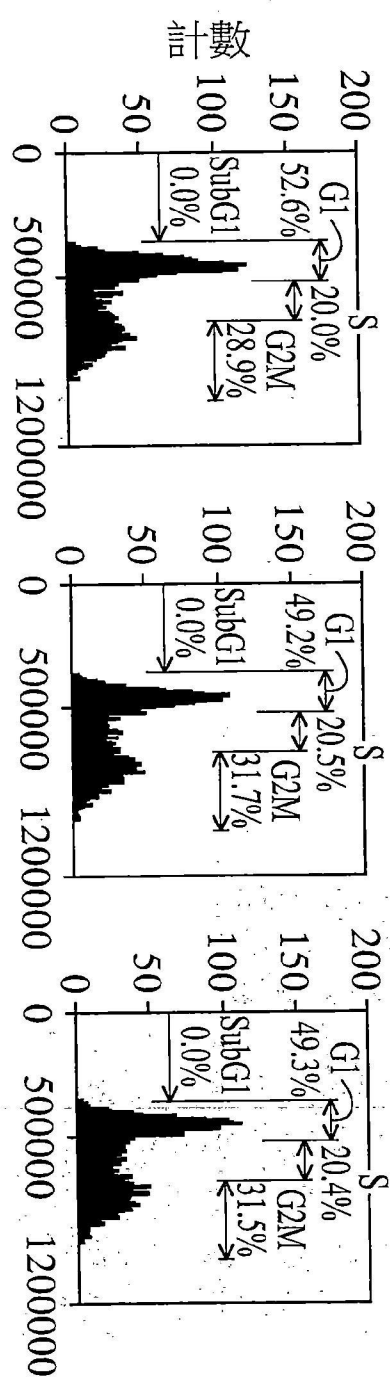
3.75

7.5 μ M

sinularin

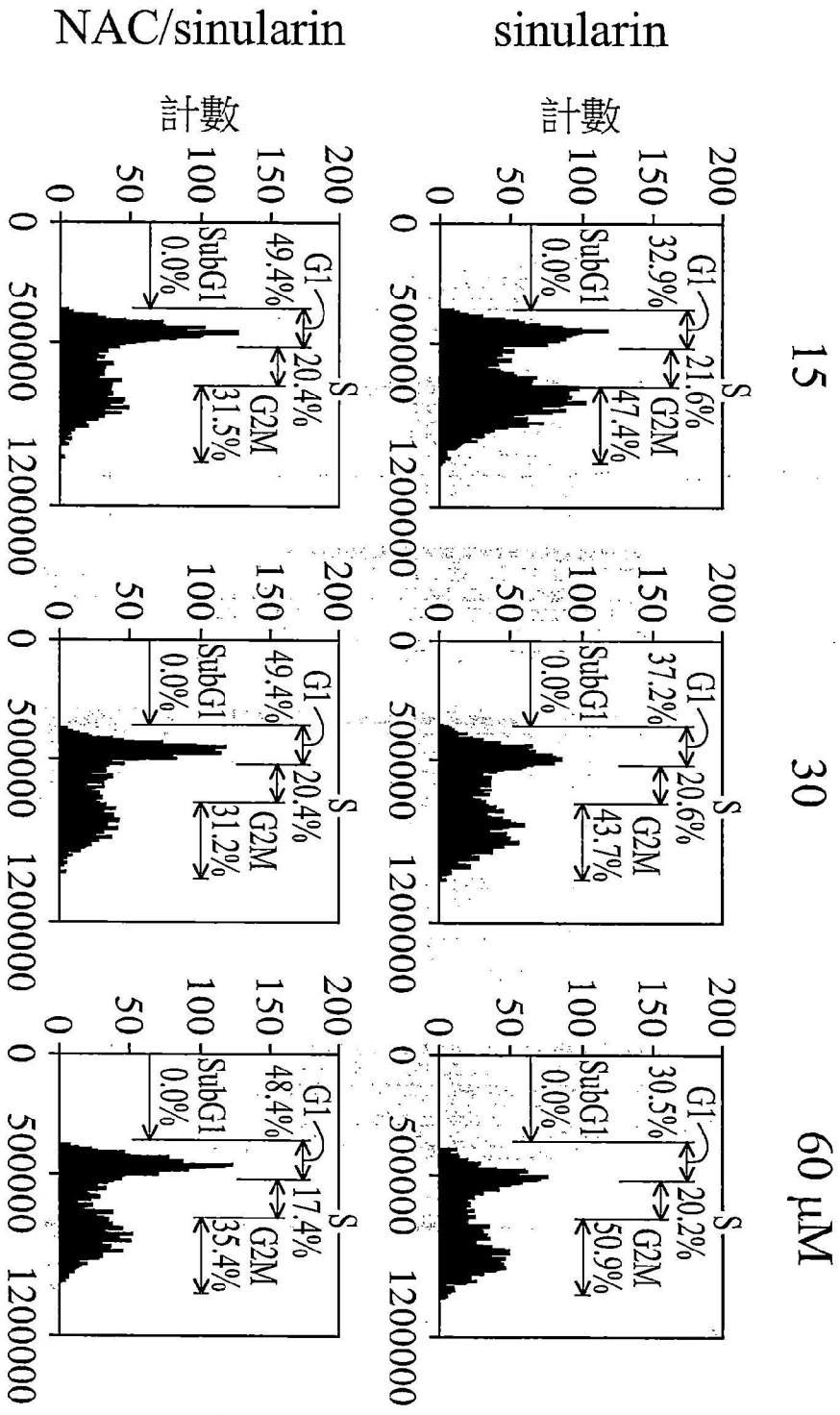


NAC/sinularin



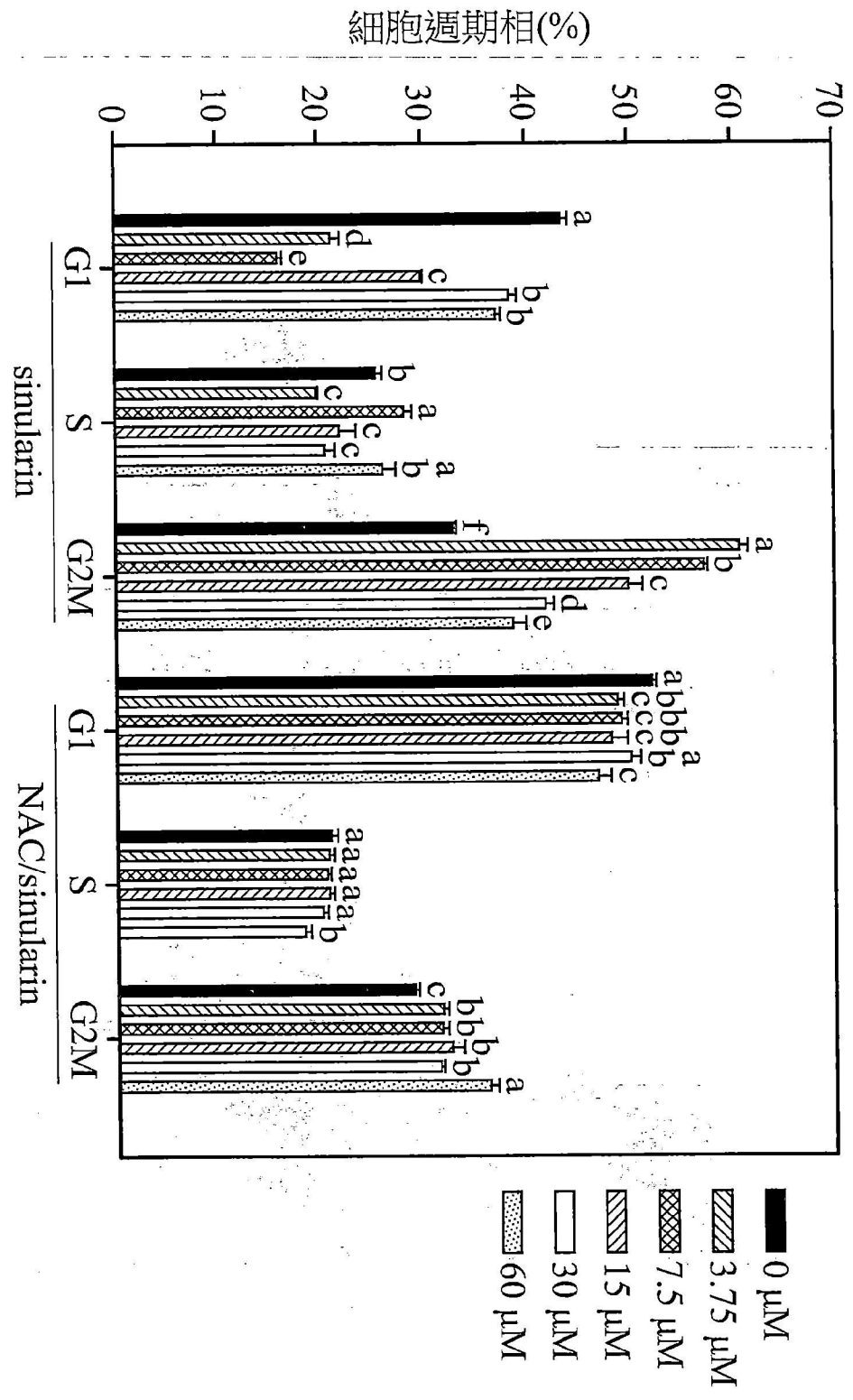
DNA含量

第4A圖

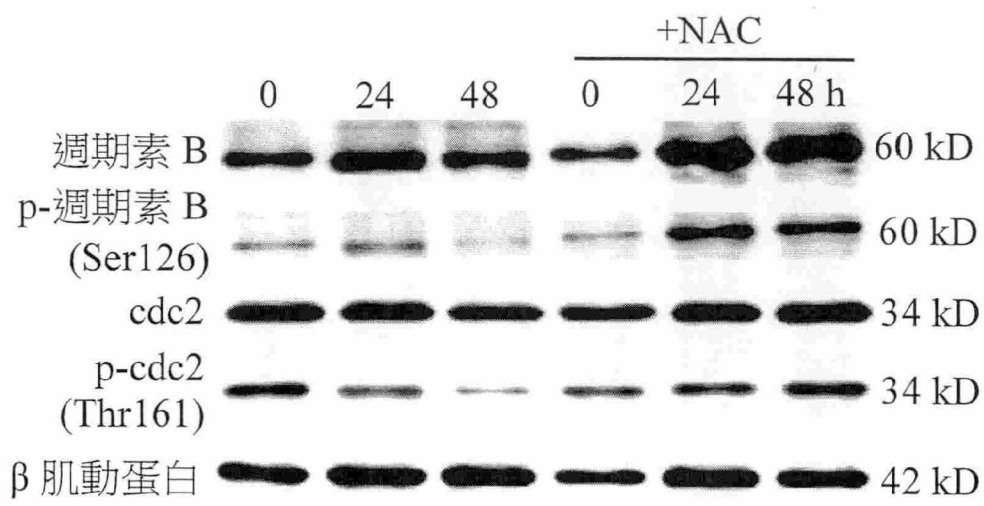


DNA含量

第4B圖

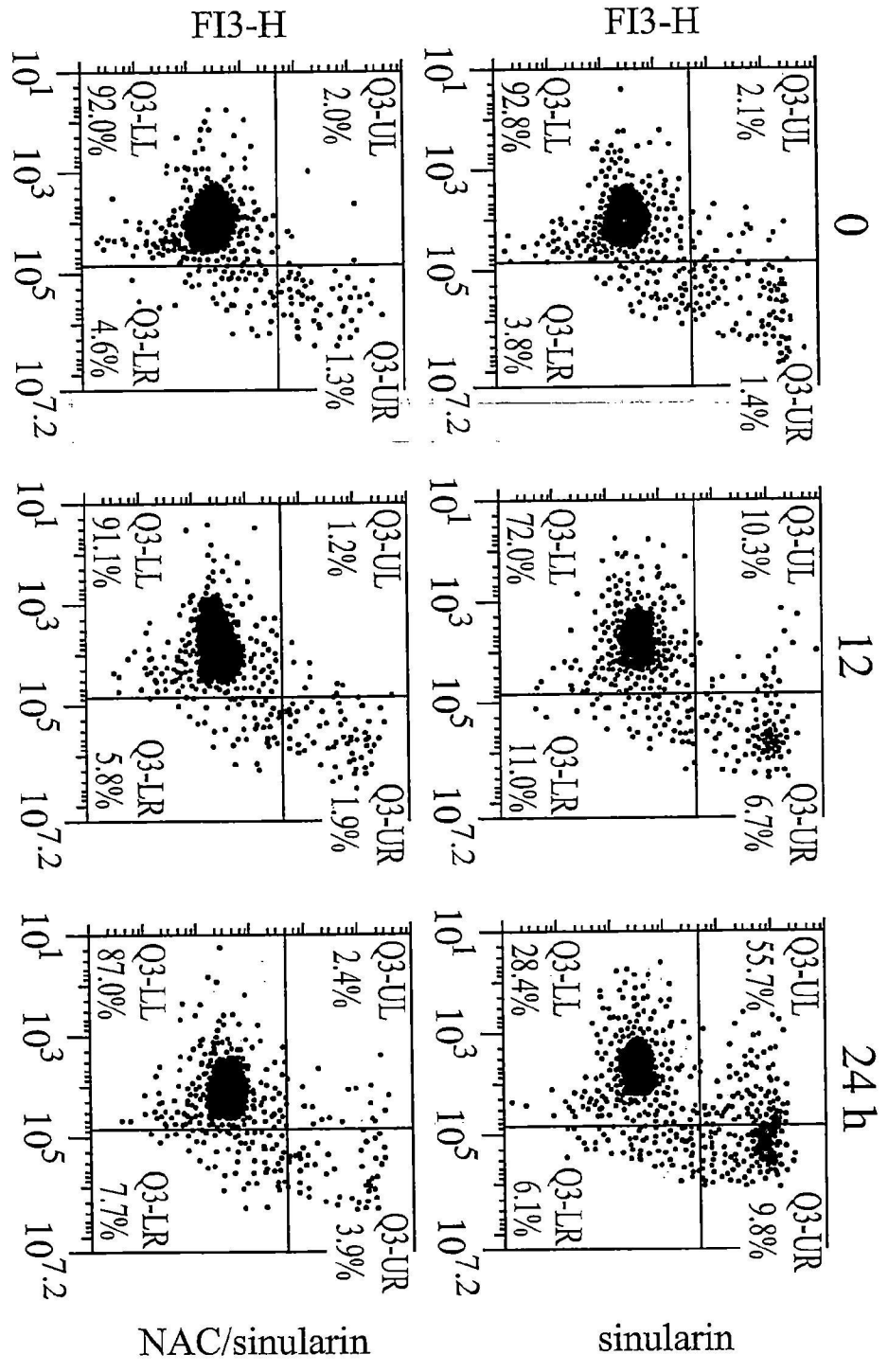


第 4C 圖



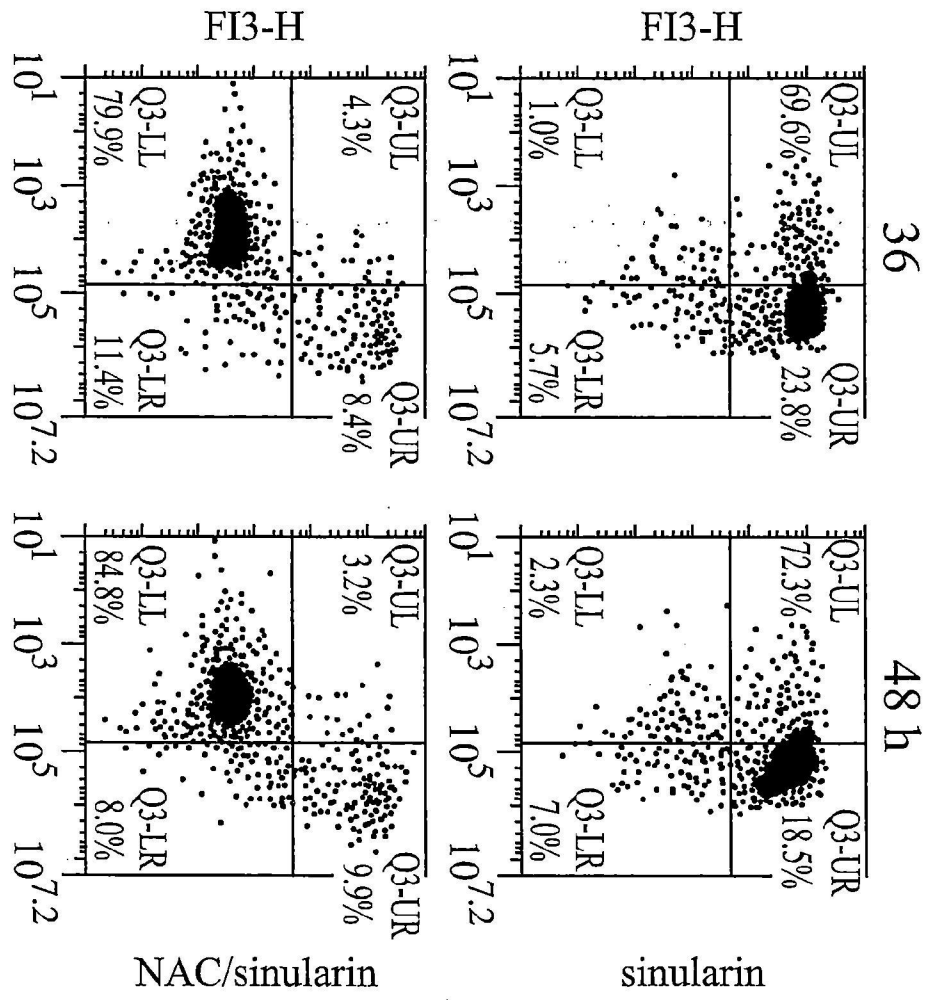
第 5 圖

碘化丙啶



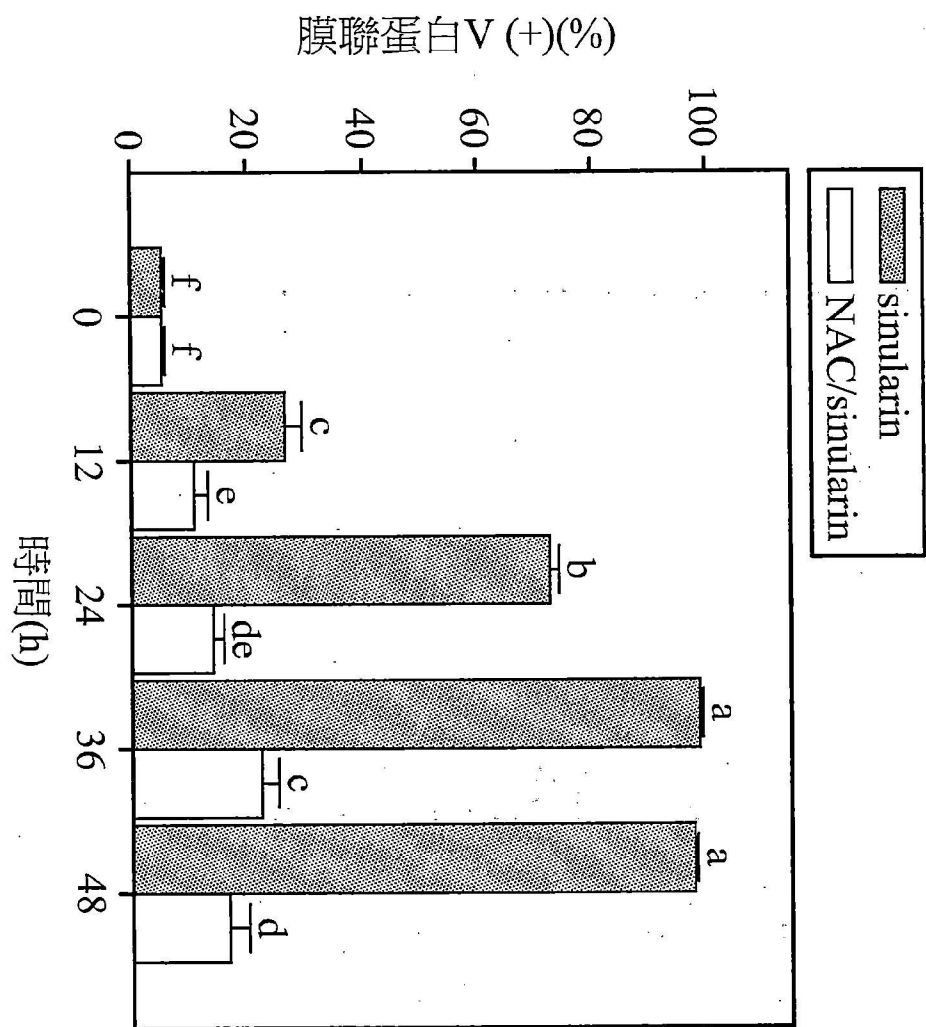
膜聯蛋白 V
第 6A 圖

碘化丙啶



膜聯蛋白 V

第 6B 圖

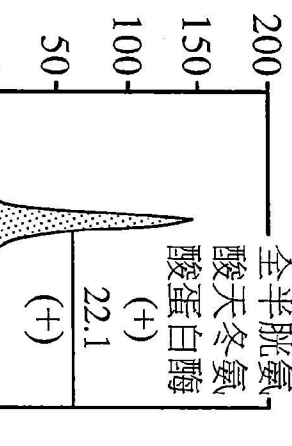
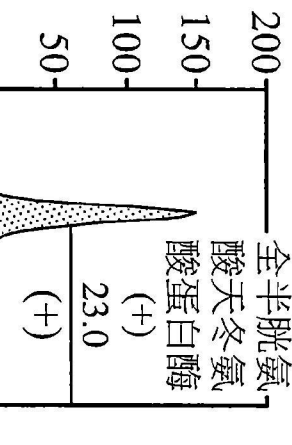
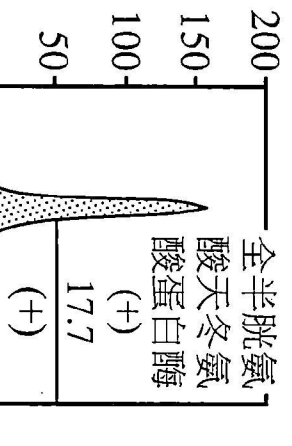
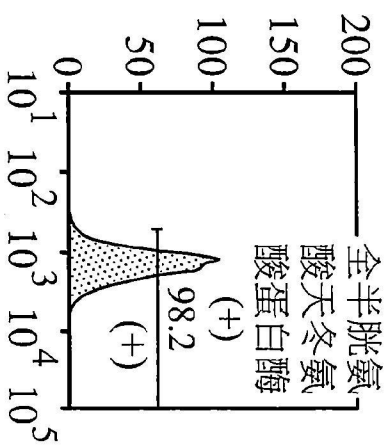
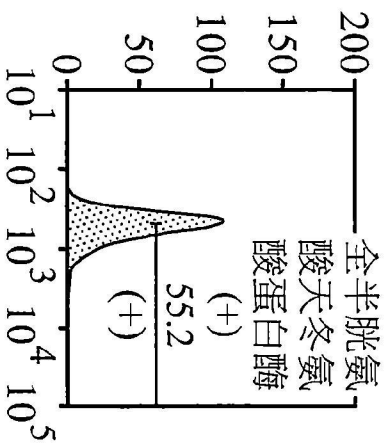
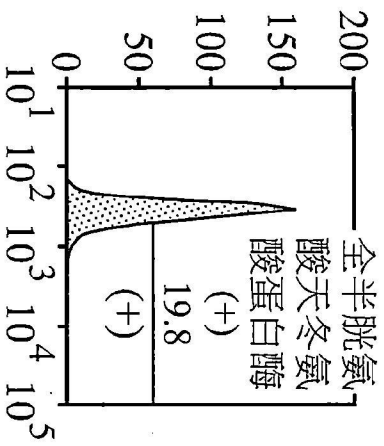


第 6C 圖

控制組

24

48h

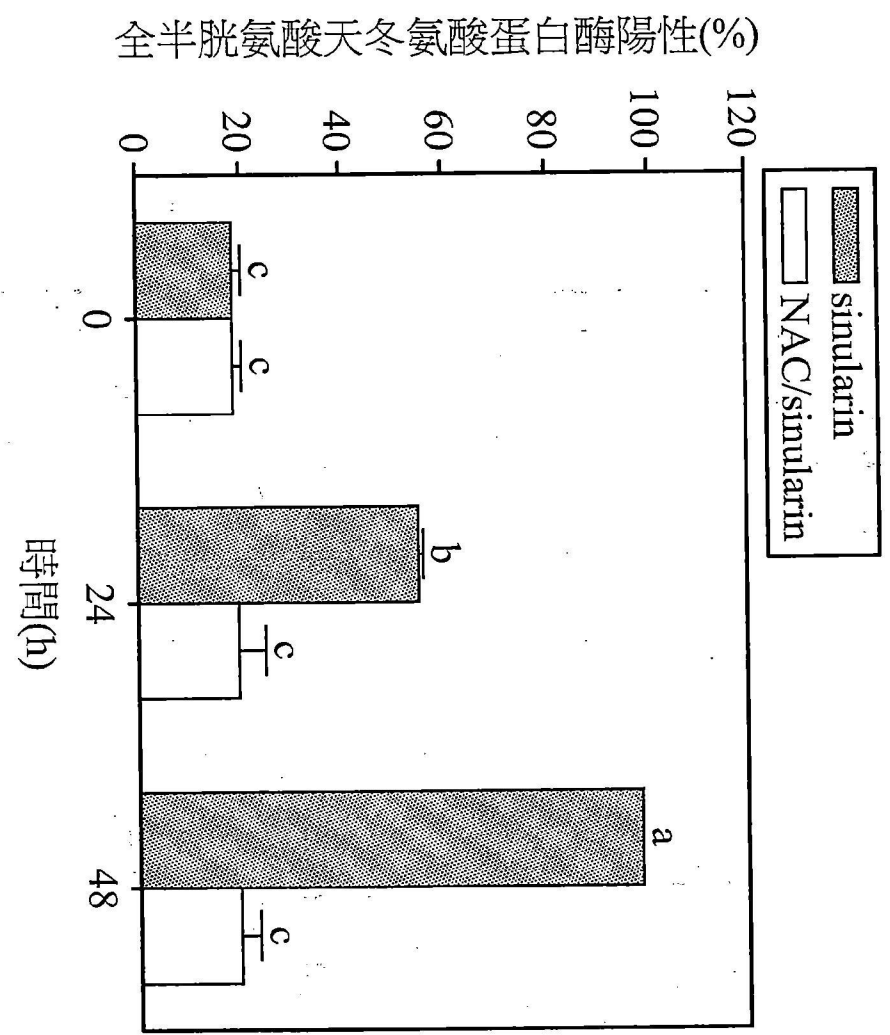


sinularin

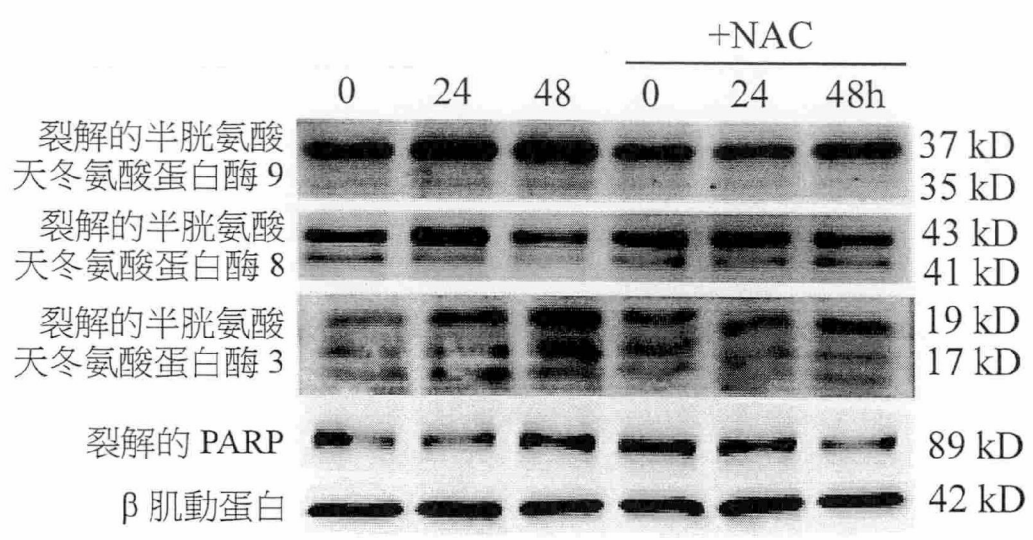
NAC/sinularin

全半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶強度

第7A圖



第 7B 圖



第 7C 圖