



(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 I475987 B

(45) 公告日：中華民國 104 (2015) 年 03 月 11 日

(21) 申請案號：102116128

(22) 申請日：中華民國 102 (2013) 年 05 月 06 日

(51) Int. Cl. : A61K31/015 (2006.01)

A61K31/336 (2006.01)

A61K31/35 (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 (TW)；吳永昌 (TW)；張芳榮 (TW)；邱建智 (TW)；黃若雯 (TW)；黃光靖 (TW)；黃宣旻 (TW)

(74) 代理人：歐奉璋

(56) 參考文獻：

BMC Cancer 2010, 10:46, pp. 1-8

審查人員：吳敏翠

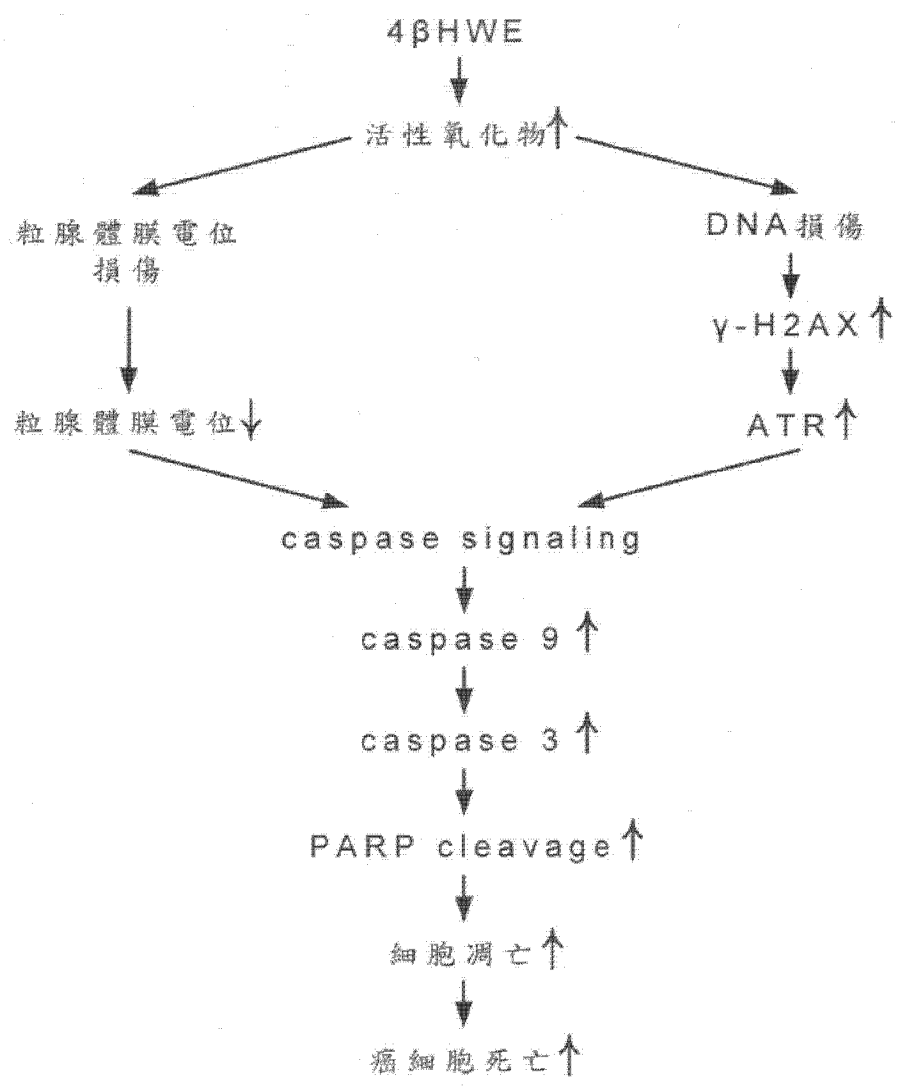
申請專利範圍項數：4 項 圖式數：8 共 24 頁

(54) 名稱

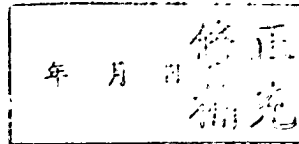
4 β-羥基睡茄內酯 E 化合物於製備供選擇性殺死口腔癌細胞之醫藥組成物之用途

(57) 摘要

一種 4 β-羥基睡茄內酯 E 化合物於製備供選擇性殺死口腔癌細胞之醫藥組成物之用途，係選用對癌症細胞具有選擇性殺死機制之 4 β-羥基睡茄內酯 E (4 β-hydroxywithanolide E, 4 β HWE) 化合物，其萃取成本低廉，可有效提高產能，藉選擇性殺死口腔癌之特性，除了可節省治療時間之外，亦可減少傷害正常細胞而有較佳之安全性。本發明所提之 4 β HWE 已建立標準純化步驟，製程穩定性高，不僅可單獨使用，亦可伴隨其他藥物使用。經由實驗萃取出之化合物 4 β HWE，已證實 4 β HWE 係對癌症細胞有高敏感性，但對正常細胞較少傷害之藥物，將其應用在口腔癌患者，可增加口腔癌化學預防與治療時之效率。



第8圖



申請日: 102.5.6

IPC分類: A61K 31/015 (2006.01)
A61K 31/33 (2006.01)
A61K 31/35 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)**【發明摘要】****【中文發明名稱】** 4 β -羥基睡茄內酯E化合物於製備供選擇性殺死口腔癌細胞之醫藥組成物之用途**【中文】**

一種4 β -羥基睡茄內酯E化合物於製備供選擇性殺死口腔癌細胞之醫藥組成物之用途，係選用對癌症細胞具有選擇性殺死機制之4 β -羥基睡茄內酯E (4 β -hydroxywithanolide E, 4 β HWE) 化合物，其萃取成本低廉，可有效提高產能，藉選擇性殺死口腔癌之特性，除了可節省治療時間之外，亦可減少傷害正常細胞而有較佳之安全性。本發明所提之4 β HWE已建立標準純化步驟，製程穩定性高，不僅可單獨使用，亦可伴隨其他藥物使用。經由實驗萃取出之化合物4 β HWE，已證實4 β HWE係對癌症細胞有高敏感性，但對正常細胞較少傷害之藥物，將其應用在口腔癌患者，可增加口腔癌化學預防與治療時之效率。

【指定代表圖】 第 8 圖

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 4β -羥基睡茄內酯E化合物於製備供選擇性殺死口腔癌細胞之醫藥組成物之用途

【技術領域】

本發明係有關於一種 4β -羥基睡茄內酯E化合物於製備供選擇性殺死口腔癌細胞之醫藥組成物之用途，尤指涉及一種至少包含一 4β -羥基睡茄內酯E (4β -hydroxywithanolide E, 4β HWE) 化合物，特別係指包括提供有效量之 4β HWE化合物以產生口腔癌細胞抑制者。

【先前技術】

口腔癌係全球第六大常見癌症，其高發病率與死亡率，部分原因係由於其相對化療效果不佳。由於口腔癌在正常細胞中具有高細胞毒性，使得各種抗口腔癌藥物發展至今之治療應用非常有限。

大多數殺死癌症細胞之治療用藥物同時也對正常細胞有細胞毒性，因而限制其臨床應用，使得選擇性治療在癌症上成爲一很重要之議題。理想之癌症治療藥物係能夠對癌症細胞具高敏感性但對正常細胞較少傷害之藥物；然而，現階段臨床上，這種藥物卻很少見。因此，發展選擇性抗癌藥物係很急迫且艱困之挑戰。

現今在市面上超過60%之抗癌藥物皆由天然物取得。其中祕魯酸漿 (*Physalis peruviana*) 又稱黃金莓，係一種茄科食用植物，早前廣泛地被使用在民俗療法中，例如治療瘧疾、氣喘、肝炎及風濕等。而先前有研究指出，酒精萃取之祕魯酸漿具有抗氧化，

以及抑制肝癌細胞生長之效果。曾被證實祕魯酸漿衍生之 4β -hydroxywithanolide E (4β HWE) 對人類肺癌細胞具有細胞凋亡與抑制作用，該 4β HWE係源自植物C(28)之甾體內酯，具有強效抗癌特性。其他withaferin，如withaferin A，據說也在許多類型之癌症，包括乳癌、黑色素瘤以及白血病中誘導細胞凋亡。

由於最近之研究越來越多之證據顯示，選擇性活化細胞凋亡可改善癌症化療之效果。爲了提高調整癌細胞凋亡之潛能，一種研究方法係使用可選擇性殺死腫瘤細胞，但對正常細胞具有低毒性之withanolides。然而，細胞凋亡誘導withanolides之潛在用途，如 4β HWE與withaferin A目前尚無作爲選擇性殺傷之研究，且亦無揭露使用在抗口腔癌甚至選擇性抗口腔癌之能力。故，一般習用者係無法符合使用者於實際使用時於抗口腔癌治療方法上取得更安全、更有效之選擇性殺傷效果之所需。

【發明內容】

本發明之主要目的係在於，克服習知技藝所遭遇之上述問題並提供一種至少包含一 4β HWE化合物於製備供選擇性殺死口腔癌細胞之醫藥組成物之用途，用以評估 4β HWE對於癌症細胞之選擇性殺死之潛在效能及其相關機制。

本發明之次要目的係在於，提供一種包括提供有效量之 4β HWE化合物以產生口腔癌細胞抑制者。

本發明之另一目的係在於，提供一種來自祕魯酸漿之 4β HWE，證實 4β HWE係對癌症細胞高敏感性但對正常細胞較少傷害之藥物，可增加口腔癌化學預防與治療時之效率者。

爲達以上之目的，本發明係一種4 β -羥基睡茄內酯E化合物於製備供選擇性殺死口腔癌細胞之醫藥組成物之用途，至少包含4 β HWE化合物，其包括提供有效量之4 β HWE化合物以產生口腔癌細胞抑制。

於一較佳實施例中，上述醫藥組成物中4 β HWE化合物，其相對於人類口腔正常細胞（human normal gingiva fibroblast，HGF-1）選擇性地殺死人類口腔癌細胞（gingival carcinoma，Ca9-22）。

於一較佳實施例中，上述4 β HWE化合物之有效量係指對處理細胞接收到之濃度介於0.1~10 μ g/ml。

於一較佳實施例中，上述4 β HWE化合物係自一茄科植物萃取而得，且該茄科植物係爲一秘魯酸漿。

【圖式簡單說明】

第1圖，係本發明以4 β HWE對Ca9-22以及HGF-1之細胞存活率影響示意圖。

第2圖，係本發明利用DCFDA檢測Ca9-22以及HGF-1之ROS增加程度示意圖。

第3圖，係本發明利用DiOC₂(3)分析套組檢測4 β HWE對Ca9-22以及HGF-1之MMP降低程度示意圖。

第4圖，係本發明利用彗星-核萃取法實驗檢測4 β HWE造成鹼基氧化傷害之程度示意圖。

第5圖，係本發明利用 γ -H2AX評估4 β HWE對細胞造成之DNA雙股斷裂程度示意圖。

第 6 圖，係本發明利用 4 β HWE 誘導 HGF-1 以及 Ca9-22 細胞凋亡之程度比較示意圖。

第 7 圖，係本發明測試 4 β HWE 誘導 Ca9-22 以及 HGF-1 之細胞凋亡路徑示意圖。

第 8 圖，係本發明之 4 β HWE 對 Ca9-22 之影響示意圖。

【實施方式】

本發明係一種 4 β - 羥基睡茄內酯 E 化合物於製備供選擇性殺死口腔癌細胞之醫藥組成物之用途，至少包含一 4 β - 羥基睡茄內酯 E (4 β -hydroxywithanolide E, 4 β HWE) 化合物，其包括對處理細胞提供濃度介於 0.1~10 μ g/ml 有效劑量之 4 β HWE 以產生口腔癌細胞抑制作用，所述 4 β HWE 係取自於一茄科植物之萃取物，且該茄科植物係為一秘魯酸漿 (Physalis peruviana)。

上述醫藥組成物中化合物-4 β HWE 相對於人類口腔正常細胞 (human normal gingiva fibroblast, HGF-1) 具有可選擇性地殺死人類口腔癌細胞 (human gingival carcinoma, Ca9-22)，接下來提供本發明評估所述 4 β HWE 對於癌症細胞之選擇性殺死與闡述其相關機制之較佳實施例。

請參閱『第 1 圖』所示，係本發明以 4 β HWE 對 Ca9-22 以及 HGF-1 之細胞存活率影響示意圖。如圖所示：本發明係利用 0、1、2、5 及 10 μ g/ml 等不同濃度之 4 β HWE 處理 24 以及 48 小時之後，再使用 MTS(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium) assay 檢測 4 β HWE 對 Ca9-22 以及 HGF-1 這兩株細胞之毒殺能力，亦即 Ca9-22 以及 HGF-1 兩株細胞之存活率，其中

資料平均值±標準偏差 (n=3)。

經細胞存活率之MTS assay實驗結果顯示：對於四個不同之組群（Ca9-22在24小時、Ca9-22在48小時、HGF-1在24小時、以及HGF-1在48小時）在相同藥物濃度中，4βHWE不論在24小時或者48小時，皆具有毒殺口腔癌細胞（Ca9-22）之潛力，但對於正常口腔細胞（HGF-1）卻僅有較少之影響；其中Ca9-22這株口腔癌細胞會隨著4βHWE之濃度（0、1、2、5及10 μg/ml）增加而使存活率下降，以10 μg/ml濃度之4βHWE處理細胞24小時以及48小時後為例，其細胞存活率分別些微地下降至26.56±2.22%以及16.01±2.38%，此外，其IC₅₀在24小時以及48小時後分別為3.6以及1.9 μg/ml。而HGF-1正常口腔細胞雖然也會隨著4βHWE之濃度提高而使存活率些微下降，同樣以10 μg/ml濃度之4βHWE處理細胞24小時以及48小時後為例，其細胞存活率分別些微地下降至89.02 ± 1.17%以及65.42 ± 2.26%，然而與Ca9-22相較之下，顯然口腔癌細胞Ca9-22之存活率下降較口腔正常細胞HGF-1快，並且，在4βHWE處理HGF-1正常細胞中，不管到了24小時或48小時皆無測量到IC₅₀。由此可知，4βHWE之增生抑制作用對Ca9-22口腔癌細胞有呈現劑量反應與時間依賴性之關係，證實4βHWE對於抗口腔癌係很有療效的，並且具有可選擇性殺死癌細胞之潛力。

接著，本發明將藉由偵測細胞內之活性氧化物（Reactive Oxygen Species, ROS），評估4βHWE是否會選擇性地增加細胞內之ROS含量。

請參閱『第2圖』所示，係本發明利用DCFDA檢測Ca9-22以及HGF-1之ROS增加程度示意圖。如圖所示：爲了證實4βHWE能夠誘

導細胞內之ROS增加，本發明使用DCFDA染劑檢測Ca9-22以及HGF-1細胞內之ROS含量。第2圖主要係將4βHWE之IC₅₀濃度以3.6 μg/ml分別處理Ca9-22以及HGF-1於不同時間（0、2、4及5 hr）後，使用DCFDA檢測ROS變化，而將兩株細胞之ROS增加程度量化後所得之曲線圖。ROS強度之定量分析主要在DCFDA陽性反應（%），圖中星號表示兩株細胞之間在採以相似4βHWE濃度處理後之顯著差異（t檢定，P<0.0001**）。

經檢測結果顯示：Ca9-22之ROS含量係隨著4βHWE之處理時間增高而增加；HGF-1之ROS含量雖然也隨4βHWE處理時間增加而增高，但卻依然比Ca9-22還要低。證實4βHWE會誘導癌細胞內之ROS產生，因此4βHWE誘導了細胞內之ROS路徑，利用氧化傷害造成選擇性殺死癌細胞，符合一般殺死癌細胞中設計規範之一。

由於細胞內ROS增加通常會影響粒線體功能之缺失，因此本發明也檢測粒腺體膜電位（Mitochondria membrane potential, MMP）之變化。

請參閱『第3圖』所示，係本發明利用DiOC₂(3)分析套組檢測4βHWE對Ca9-22以及HGF-1之MMP降低程度示意圖。如圖所示：如果粒線體受到氧化傷害，那麼維持粒線體膜電位之能力也會不穩健，造成粒線體膜電位去極化。本發明利用DiOC₂(3)染劑以及流式細胞儀來分析4βHWE是否會傷害粒線體造成粒線體膜電位下降。第3圖主要係將4βHWE以不同濃度（0、1、2及5 μg/ml）分別處理Ca9-22以及HGF-1細胞24小時後，使用DiOC₂(3)分析套組檢測MMP變化，而將兩株細胞之MMP降低程度量化後所得之曲線圖。MMP強度之定量分析，其資料平均值±標準偏差（n=3），且

圖中星號表示兩株細胞之間在採以相似 4β HWE濃度處理後之顯著差異 (t檢定, $P<0.0005^{**}$)。

經檢測結果顯示: Ca9-22在最高濃度之 4β HWE ($5\ \mu\text{g/ml}$) 處理24小時之後, 粒線體膜電位下降到40%以下; 而HGF-1在最高濃度之 4β HWE ($5\ \mu\text{g/ml}$) 處理24小時之後, 則為90%以上。此實驗顯現隨著 4β HWE濃度之增加, 口腔癌細胞 (Ca9-22) 維持粒線體膜電位 (MMP) 之能力比正常口腔細胞 (HGF-1) 下降的多, 證明 4β HWE會誘導Ca9-22之粒線體膜受損, 對HGF-1之影響則較小。

DNA受損 (DNA damage) 之形式有很多種, 氧化傷害為其中一種, 由於 4β HWE結構中含有許多氧原子以及羥基, 因此本發明接下來評估 4β HWE是否會造成Ca9-22以及HGF-1之DNA受損以及檢測是否由氧化造成之DNA受損彗星-核萃取法 (Comet-Nuclear Extract) 實驗測試。

請參閱『第4圖』所示, 係本發明利用彗星-核萃取法實驗檢測 4β HWE造成鹼基氧化傷害之程度示意圖。如圖所示: 本發明利用彗星-核萃取法與細胞流式分析儀為基礎之 γ -H2AX/propidium iodide (PI) 分析法, 來測試 4β HWE在短時間內是否會對這兩株細胞造成氧化傷害。第4圖主要係將 4β HWE以不同濃度 (0、0.5、1、2及 $5\ \mu\text{g/ml}$) 分別處理Ca9-22以及HGF-1細胞2小時後, 使用彗星-核萃取法檢測細胞拖尾情況, 而將兩株細胞之拖尾程度量化後所得之曲線圖。以單細胞凝膠電泳檢測 4β HWE處理Ca9-22及HGF-1細胞之損傷DNA尾部百分含量, 其資料平均值 \pm 標準偏差 ($n=50$), 且圖中星號表示兩株細胞之間在

採以相似 4β HWE濃度處理後之顯著差異 (t檢定, $P < 0.0001^{**}$)。

經細胞拖尾量化結果顯示：口腔癌細胞Ca9-22在 4β HWE最高濃度 $0.5\ \mu\text{g/ml}$ 造成之DNA damage或許係由於氧化傷害，而正常口腔細胞HGF-1則幾乎無損害。另外，此實驗結果也顯示，口腔癌細胞Ca9-22在最高濃度 $0.5\ \mu\text{g/ml}$ 造成較正常口腔細胞HGF-1多之氧化傷害。因此該實驗顯現在Ca9-22口腔癌細胞之DNA傷害有劑量關係且較正常細胞嚴重，證實 4β HWE或許係由於氧化傷害造成選擇性毒殺。

由於很多因素能夠造成細胞之DNA雙股斷裂 (DNA double strand breaks, DSBs)，如果修復不夠，可能會經由不同路徑導致細胞凋亡。經上述實驗，觀察到 4β HWE能夠誘導細胞凋亡，產生DSBs現象，因此接下來本發明將檢測此DNA損害是否為最嚴重之DNA雙股斷裂。

請參閱『第5圖』所示，係本發明利用 γ -H2AX評估 4β HWE對細胞造成之DNA雙股斷裂程度示意圖。如圖所示：由於 γ -H2AX含量在DNA雙股斷裂時會大量表現，所以本發明使用 conjugated-FITC/PI 雙染檢測 γ -H2AX含量來評 4β HWE造成之DNA雙股斷裂程度。第5圖主要係將 4β HWE以不同濃度 (0、1、2及 $5\ \mu\text{g/ml}$) 分別處理Ca9-22以及HGF-1細胞24小時後，使用 conjugated-FITC/PI 雙染檢測 γ -H2AX含量，而將兩株細胞之 γ -H2AX含量量化後所得之曲線圖。以 γ -H2AX染色之細胞流式分析 4β HWE處理Ca9-22及HGF-1細胞DNA受損之倍數變化之定量分析，其資料平均值 \pm 標準偏差 (n=2及3)，且圖中星號表示兩

株細胞之間在採以相似 4β HWE濃度處理後之顯著差異（t檢定， $P < 0.0005^{**}$ ）。

由流動式細胞測量術（Flow Cytometry）之螢光量顯示：口腔癌細胞Ca9-22在 4β HWE誘導下，細胞內 γ -H2AX大量增加代表DNA有產生雙股斷裂，並且隨著 4β HWE濃度增高而增加；而正常口腔細胞HGF-1之DNA雙股斷裂沒有口腔癌細胞Ca9-22嚴重，顯然 4β HWE誘導Ca9-22之 γ -H2AX之含量較HGF-1多。此實驗證實了DNA雙股斷裂參與其中， 4β HWE會誘導DNA受損。

為求證 4β HWE毒殺口腔癌細胞Ca9-22之能力是否係由於 4β HWE能夠誘導口腔癌細胞Ca9-22細胞凋亡，因此本發明接下來檢測細胞膜上之磷脂醯絲胺酸（Phosphatidylserine, PS）。

請參閱『第6圖』所示，係本發明利用 4β HWE誘導HGF-1以及Ca9-22細胞凋亡之程度比較示意圖。如圖所示：本發明利用Annexin V/PI兩種染劑去偵測 4β HWE是否會造成HGF-1以及Ca9-22這兩種細胞進行細胞凋亡。圖中左側A部分表示將 4β HWE以不同濃度（0、1、2及5 μ g/ml）分別處理Ca9-22以及HGF-1細胞24小時後，再染annexin V/PI，接著使用flow cytometry檢測PS外翻之現象，圖表顯示早期以及晚期之細胞凋亡（Apoptosis）還有細胞壞死（necrosis）之分布，上為HGF-1細胞，下為Ca9-22細胞；圖中右側B部分表示比較兩株細胞以不同 4β HWE濃度誘導細胞凋亡之程度。

雙染之結果可以分成四象限，左下之區域為健康之細胞，而左上之區域為細胞壞死之比例；另外，右下以及右上之區域則為早期

與晚期之細胞凋亡數。從Annexin V/PI雙染實驗結果顯示：經過不同濃度之4 β HWE (0、1、2及5 μ g/ml) 處理24小時之後，HGF-1正常口腔細胞以及Ca9-22癌細胞皆會進行細胞凋亡。在最高濃度之4 β HWE (5 μ g/ml) 處理下可以得知，HGF-1正常口腔細胞之細胞凋亡程度為9.5%，而Ca9-22則為38.77%，代表4 β HWE誘導Ca9-22進行細胞凋亡較HGF-1多。因此，4 β HWE能夠毒殺口腔癌細胞Ca9-22也許係因為誘導了口腔癌細胞Ca9-22之細胞凋亡；在相同劑量下，4 β HWE也能夠誘導正常口腔細胞HGF-1進行細胞凋亡，但是卻較口腔癌細胞Ca9-22少。

由於細胞凋亡會在細胞內進行一些分子傳遞之路徑，例如caspase3、caspase9、以及PARP-1為其中一條路徑，因此本發明更進一步地利用西方墨點法 (western blot) 去檢測4 β HWE是否會誘導caspase-9、caspase-3以及PARP-1這些細胞凋亡訊息傳遞路徑，藉此分析這些蛋白質是否會因為4 β HWE而增加表現量。

請參閱『第7圖』所示，係本發明測試4 β HWE誘導Ca9-22以及HGF-1之細胞凋亡路徑示意圖。如圖所示：本發明利用western blot檢測細胞凋亡路徑之下游分子：caspase-9、caspase-3以及PARP-1。由實驗結果顯示，在不同濃度之4 β HWE (0、1、2及5 μ g/ml) 處理24小時之後，這些蛋白質之表現量在Ca9-22皆高於HGF-1，表示4 β HWE會在Ca9-22這株細胞裡活化此條細胞凋亡路徑，亦即4 β HWE活化了口腔癌細胞Ca9-22之caspase-9、caspase-3以及PARP-1，但在正常口腔細胞HGF-1裡較無口腔癌細胞Ca9-22顯著。因此，該實驗證明了4 β HWE的確會誘導口腔癌細胞Ca9-22進行細胞凋亡。

請參閱『第 8 圖』所示，係本發明之 4 β HWE 對 Ca9-22 之影響示意圖。如圖所示：當 4 β HWE 處理之後，4 β HWE 會誘導細胞內 ROS 產生，造成 DNA 雙股斷裂，使 γ -H2AX 大量表現，並且使粒線體受損，導致粒線體膜電位下降，另外，本發明亦發現 4 β HWE 會誘導 Ca9-22 進行細胞凋亡，並且誘導細胞內進行細胞凋亡路徑，活化 caspase-9、caspase-3 以及 PARP1；然而，4 β HWE 卻對 HGF-1 產生較小之影響，進而使 4 β HWE 對 Ca9-22 口腔癌細胞達到選擇性細胞凋亡之作用。

由上述各實驗可發現，比較 4 β HWE 處理後之口腔癌細胞株 Ca9-22 與正常口腔纖維母細胞株 HGF-1 之存活率、氧化逆境、DNA 傷害與細胞凋亡。在 24hr 與 48hr 時，Ca9-22 細胞數目急劇減少而 HGF-1 細胞則只有輕微減少。又 4 β HWE 處理 Ca9-22 之 IC_{50} 值在 24hr 與 48hr 時，分別為 3.6 與 1.9 μ g/ml。使用 4 β HWE 做癌症選擇性殺死化學治療時，發現與活性氧化物有時間依賴性增加，且與粒線體膜電位減低有劑量關係。使用彗星-核萃取法與細胞流式分析儀為基礎之 γ -H2AX /propidium iodide (PI) 分析法，發現在 Ca9-22 口腔癌細胞之 DNA 傷害有劑量關係且較正常細胞嚴重。在低劑量與高劑量時，4 β HWE 較易於干擾 Ca9-22 細胞週期進行，使 subG1 時期之族群增加，並分別造成暫止於 G1 與 G2/M 期。透過 Annexin V/PI 分析、磷酸化 ataxia-telangiectasia-and Rad3-related protein (p-ATR) 增加、caspase 9/caspase 3 被切割程度與 poly ADP-ribose polymerase (PARP) 之誘發，更驗證 4 β HWE 對 Ca9-22 口腔癌細胞有選擇性細胞凋亡之作用。

這些發現讓本發明對於 4 β HWE 之選擇性殺死機制明瞭，證實 4 β

HWE係對癌症細胞高敏感性但對正常細胞較少傷害之藥物，可增加口腔癌化學預防與治療時之效率。尤其是，來自祕魯酸漿之 4β HWE為首選來源。其特色包含如下所述：

(1)時間： 4β HWE選擇性殺死口腔癌之特性非常實用，可節省治療時間。

(2)成本：萃取 4β HWE之植物材料成本低廉，利用商業化可以提高產能。

(3)安全： 4β HWE選擇性殺死口腔癌之特性，減少傷害正常細胞較無安全顧慮。

(4)品質管制： 4β HWE純化已建立標準步驟，可確保不同批產品均有相同品質。

(5)新穎性：許多withanolide中，本發明 4β HWE係第一個宣稱可以選擇性殺死口腔癌。

(6)潛力： 4β HWE可單獨使用，也有伴隨其他藥物使用之潛力。

藉此達到可加速商業化應用於臨床癌症治療（可抑制癌症細胞生長），同時減少傷害正常細胞之副作用。

綜上所述，本發明係一種 4β -羥基睡茄內酯E化合物於製備供選擇性殺死口腔癌細胞之醫藥組成物之用途，可有效改善習用之種種缺點，經由實驗萃取出之 4β -羥基睡茄內酯E（ 4β -hydroxywithanolide E, 4β HWE）化合物，已證實 4β HWE係對癌症細胞有高敏感性，但對正常細胞較少傷害之藥物，將其應用在口腔癌患者，可增加口腔癌化學預防與治療時之效率，進而使本發明之產生能更進步、更實用、更符合使用者之所須，確已符合發明專利申請之要件，爰依法提出專利申請。

惟以上所述者，僅為本發明之較佳實施例而已，當不能以此限定本發明實施之範圍；故，凡依本發明申請專利範圍及發明說明書內容所作之簡單的等效變化與修飾，皆應仍屬本發明專利涵蓋之範圍內。

【符號說明】

無

年 月 日 修正
補充

公告本

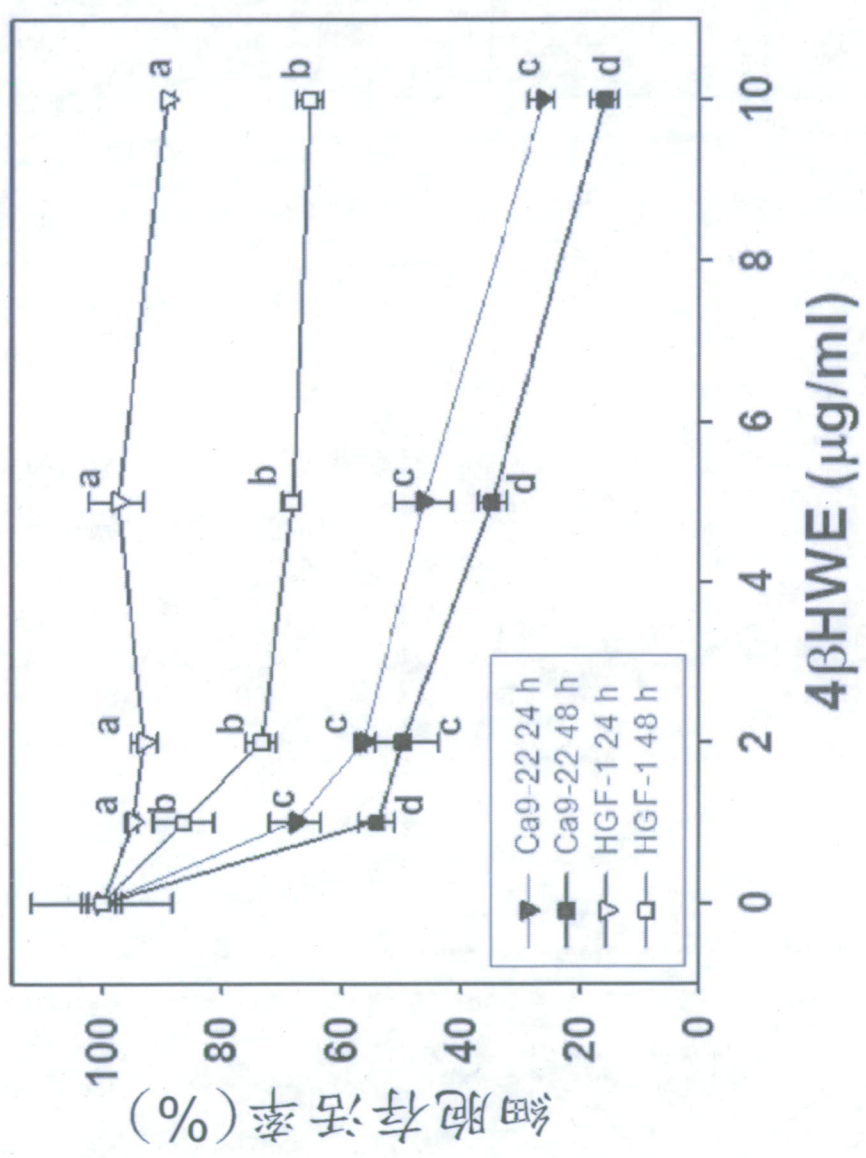
【發明申請專利範圍】

- 【第1項】 一種 4β -羥基睡茄內酯E (4β -hydroxywithanolide E, 4β HWE) 化合物之用途，其係用於製備治療口腔癌之醫藥組成物，包括提供有效量之 4β HWE以產生口腔癌細胞抑制，用以相對於人類口腔正常細胞 (human normal gingiva fibroblast, HGF-1) 選擇性地殺死人類口腔癌細胞 (human gingival carcinoma, Ca9-22)。
- 【第2項】 依申請專利範圍第1項所述之用途，其中，該 4β HWE化合物之有效量係指對處理細胞接收到之濃度介於 $0.1\sim 10\ \mu\text{g/ml}$ 。
- 【第3項】 依申請專利範圍第1項所述之用途，其中，該 4β HWE化合物係自一茄科植物萃取而得。
- 【第4項】 依申請專利範圍第3項所述之用途，其中，該茄科植物係為一祕魯酸漿 (Physalis peruviana)。

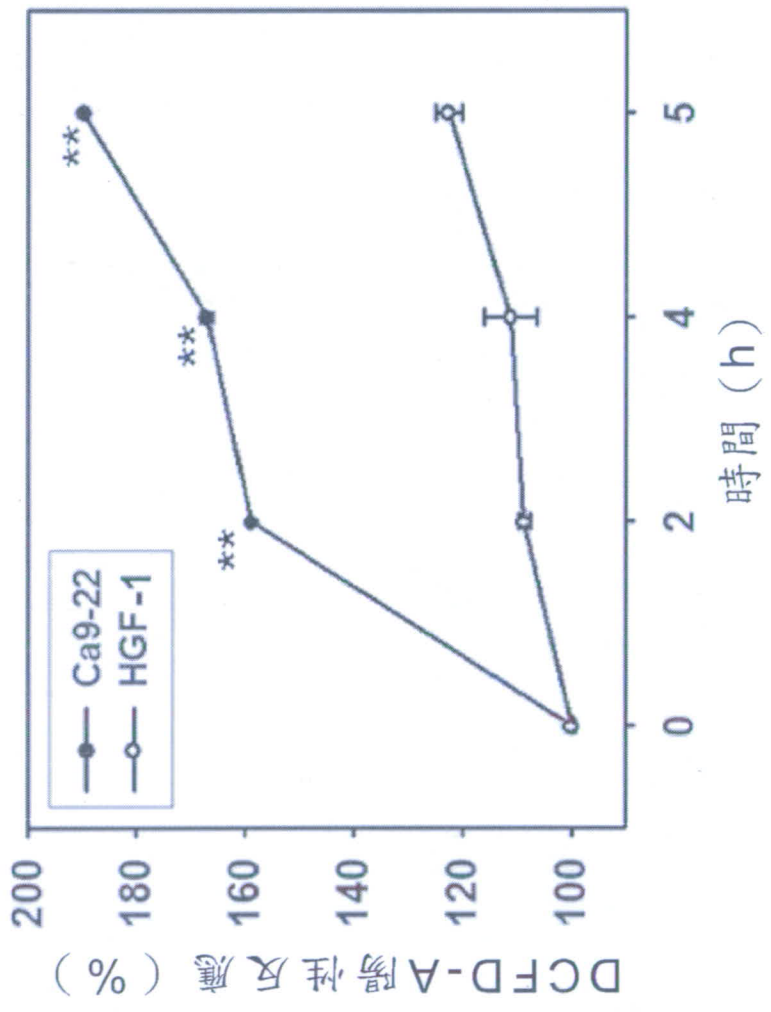
【發明圖式】

公告本

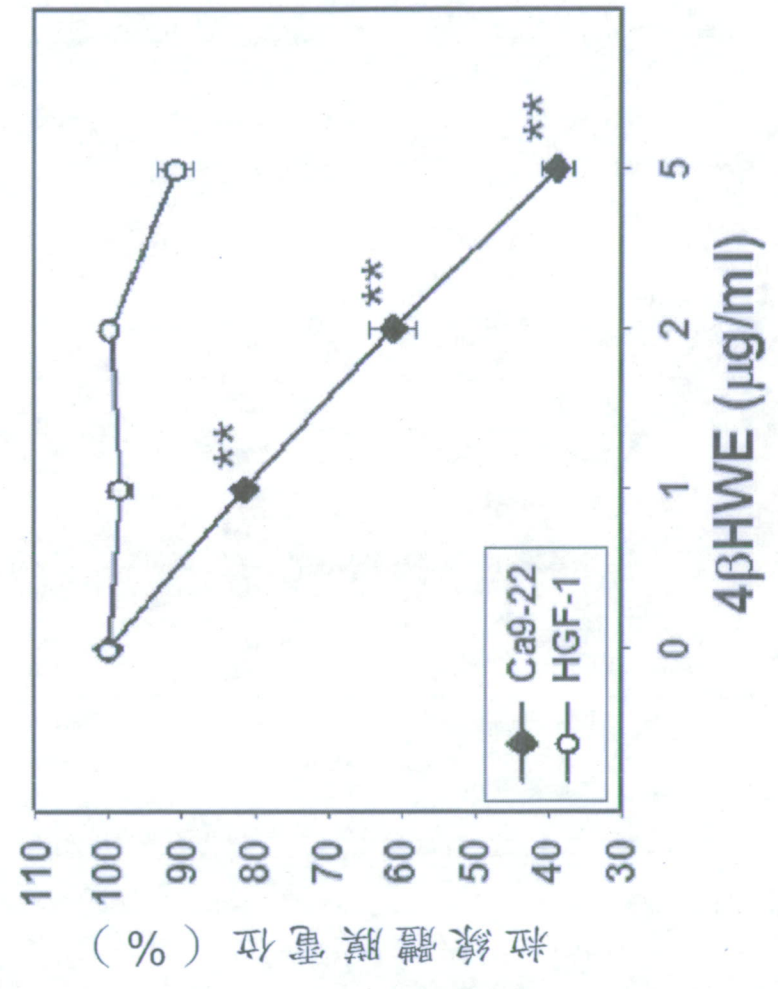
修正
補充
年 月 日



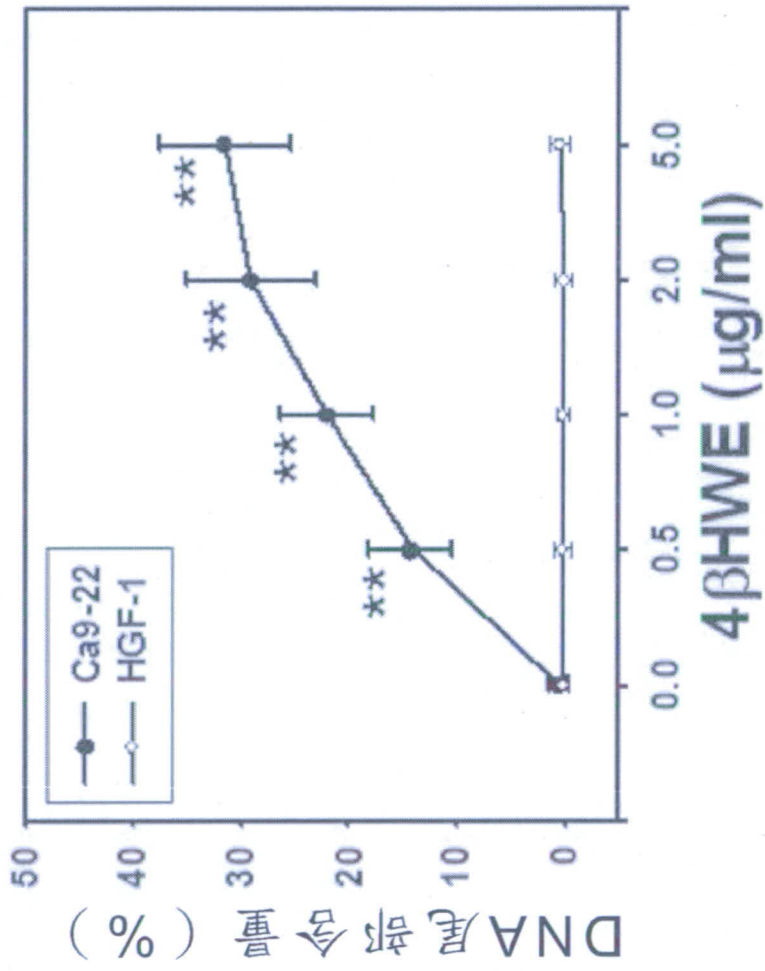
第 1 圖



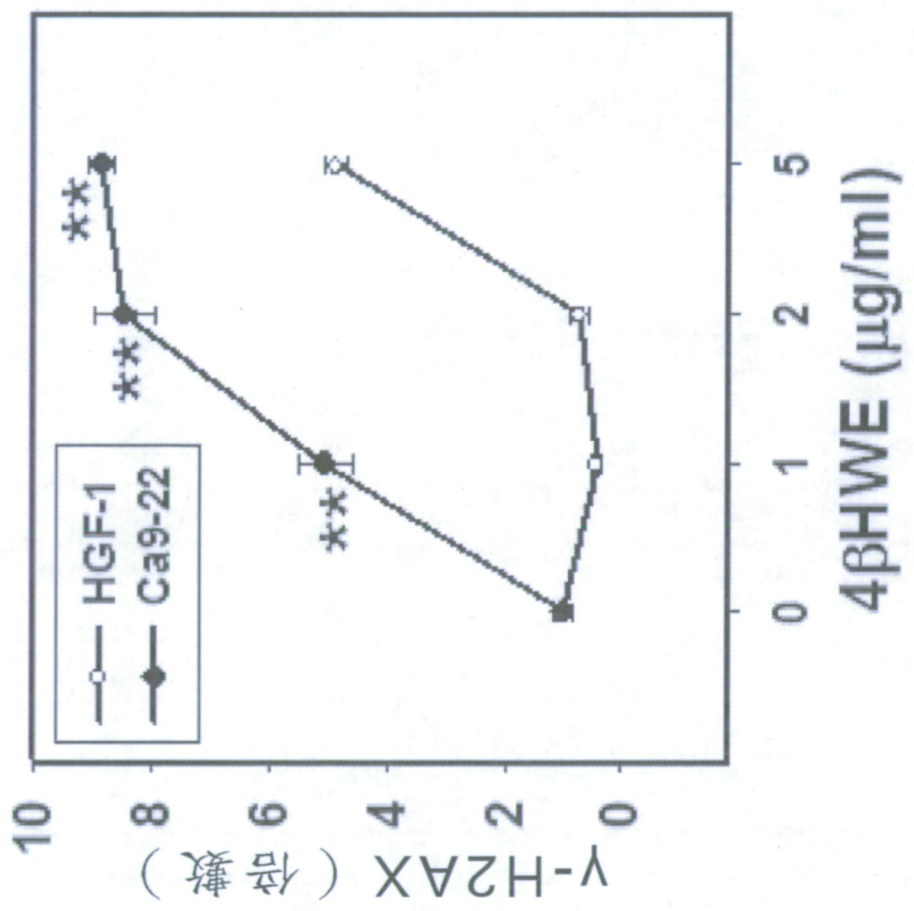
第2圖



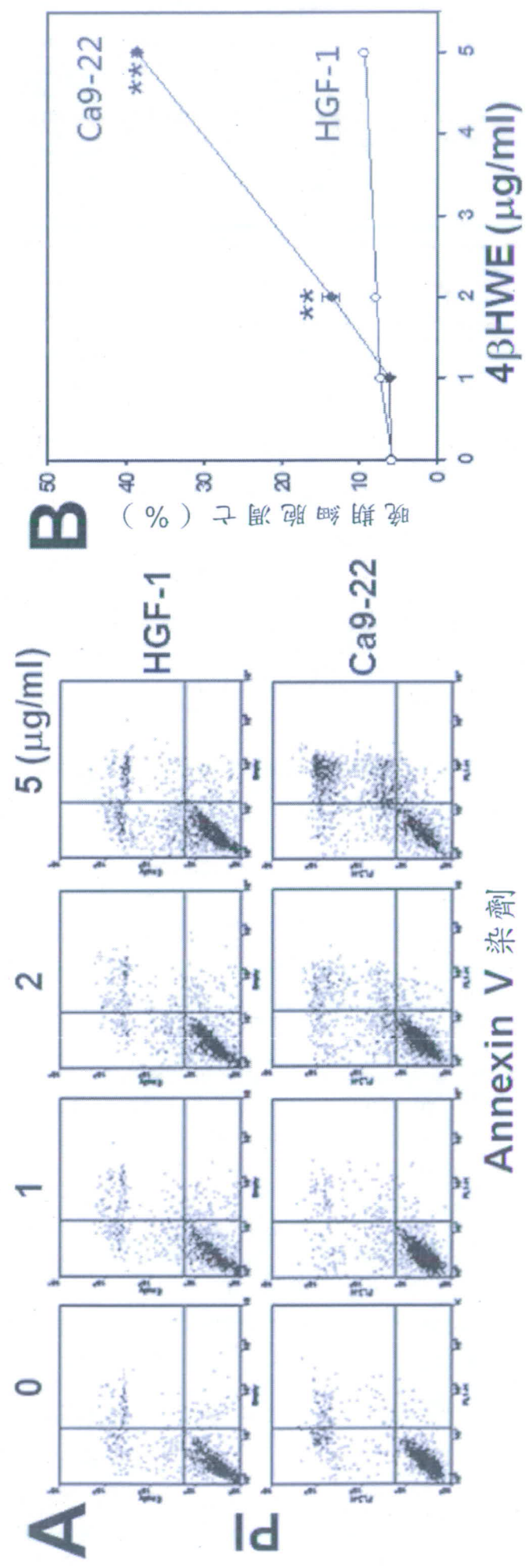
第 3 圖



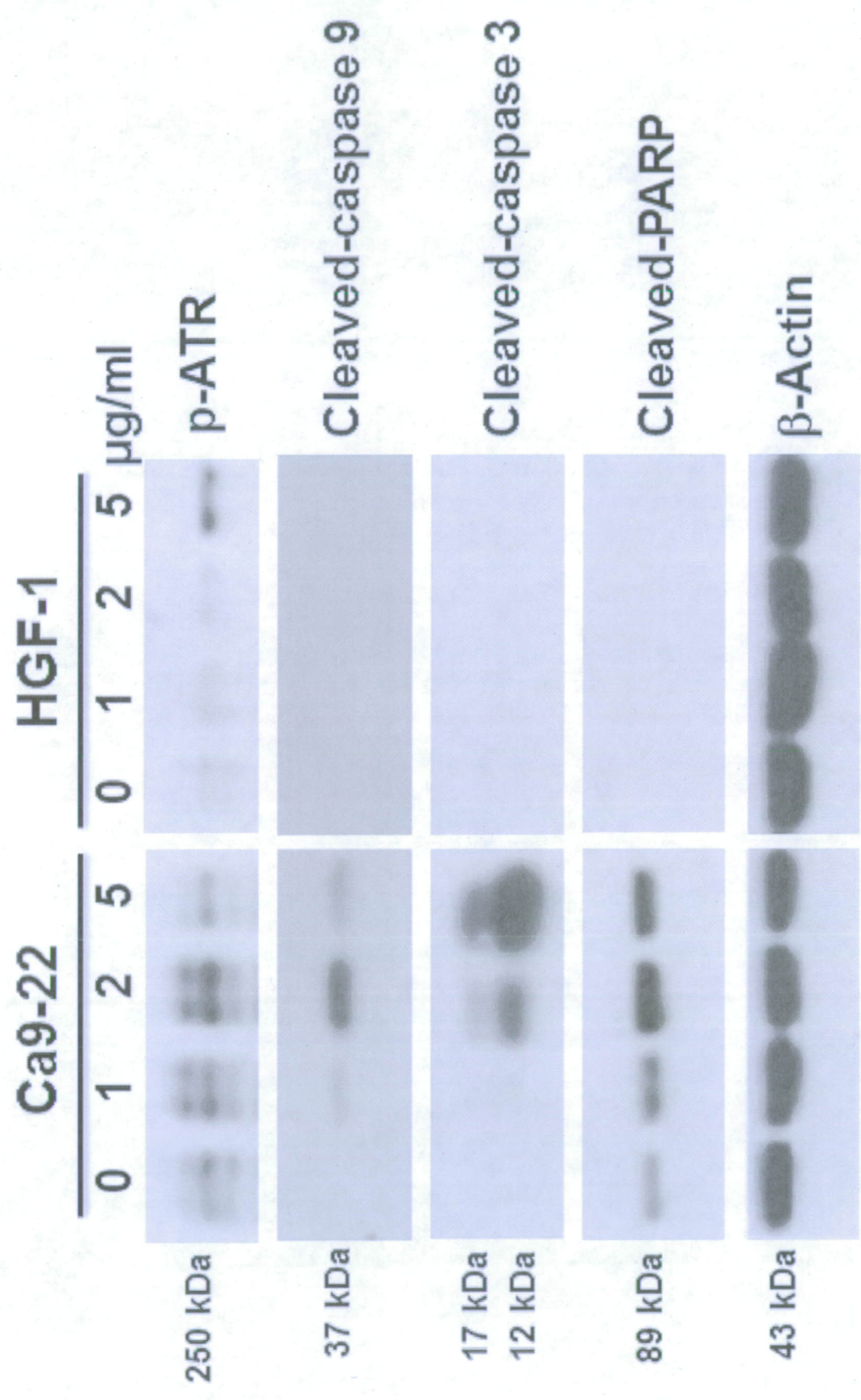
第4圖



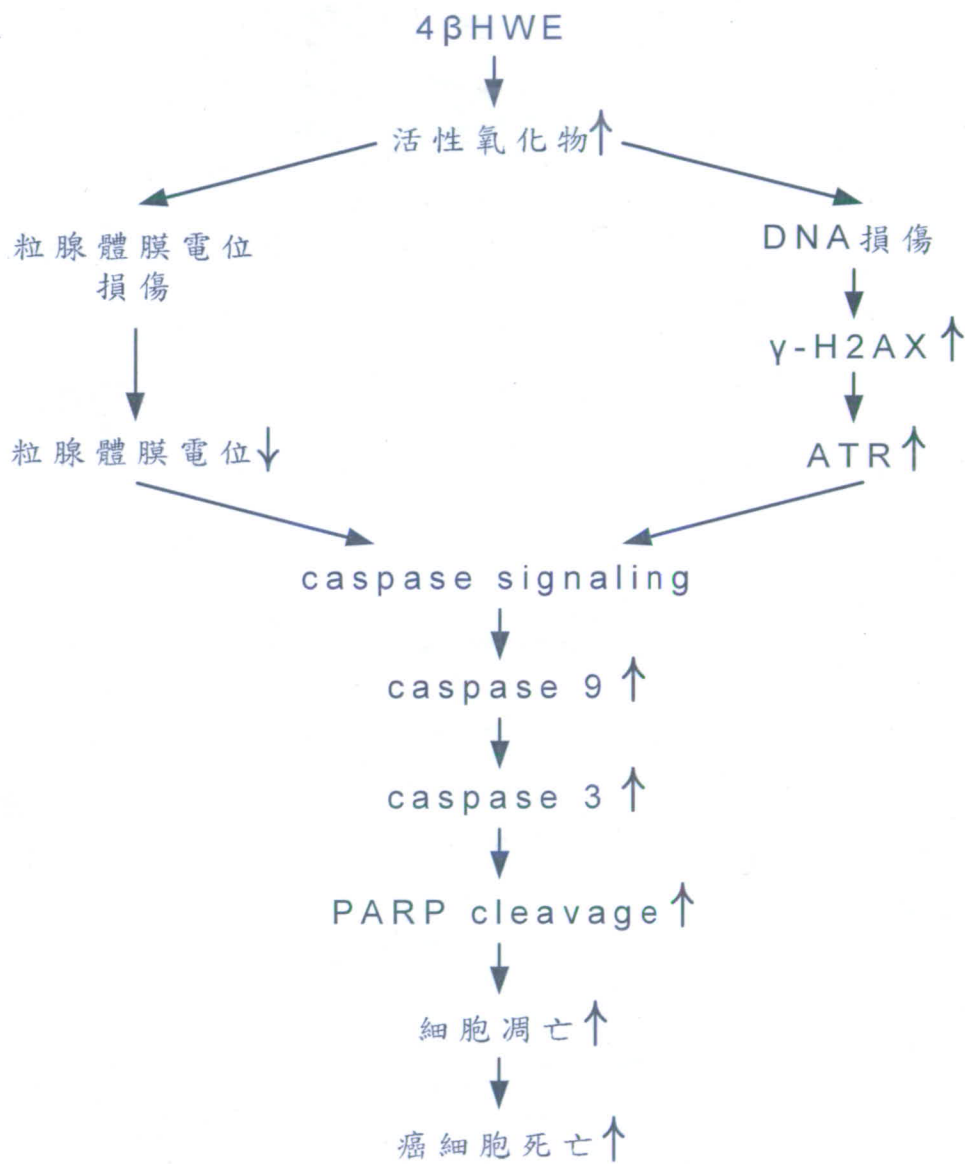
第5圖



第6圖



第 7 圖



第 8 圖