



(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 I577376 B

(45) 公告日：中華民國 106 (2017) 年 04 月 11 日

(21) 申請案號：105127395

(22) 申請日：中華民國 105 (2016) 年 08 月 26 日

(51) Int. Cl. : A61K31/365 (2006.01)

C07D307/83 (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)；張訓碩 CHANG, HSUN SHUO (TW)；黃旼儀 HUANG, MING YII (TW)；湯人仰 TANG, JEN YANG (TW)；陳益昇 CHEN, IH SHENG (TW)

(74) 代理人：洪澄文；顏錦順

(56) 參考文獻：

Cryptochinone F 的不對稱合成研究，蘭州大學碩士論文，張冰賓，2012-5-1。

黃酮類化合物抗病毒及抗炎活性研究，南京大學碩士論文，鄒春旻，2012-1-1。

審查人員：徐永任

申請專利範圍項數：18 項 圖式數：8 共 50 頁

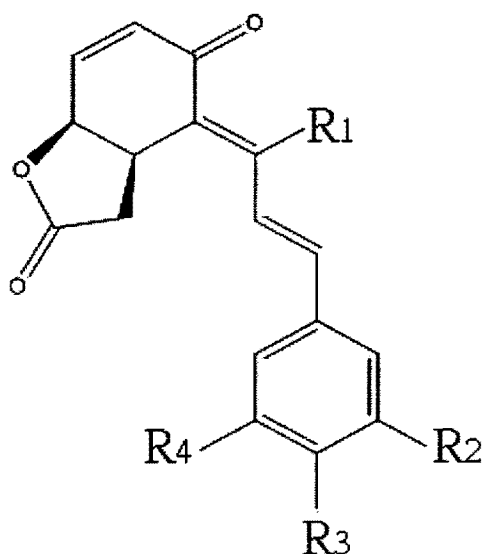
(54) 名稱

用於治療口腔癌之醫藥組成物及其活性成分之用途

PHARMACEUTICAL COMPOSITION AND USE OF THE ACTIVE INGREDIENT THEREOF

(57) 摘要

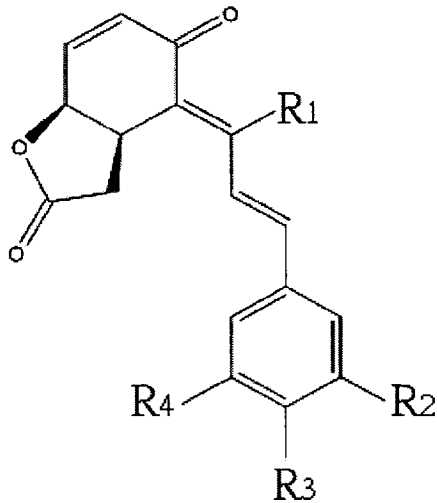
本發明提供一種用於治療口腔癌之醫藥組成物，包括：一有效量之如以下式(I)所示之化合物為活性成分：



式 (I) ，

其中， $R_1$  係擇自由以下所構成之群組：氫基、氫氧基、甲氧基、甲烷基、甲醛基與甲酸基； $R_2$  為氫基、氫氧基或甲氧基； $R_3$  為氫基、氫氧基或甲氧基； $R_4$  為氫基、氫氧基或甲氧基，且其中該式 (I) 所示之化合物具有選擇性殺死口腔癌細胞之功效；以及一藥學上可接受之載體或鹽類。

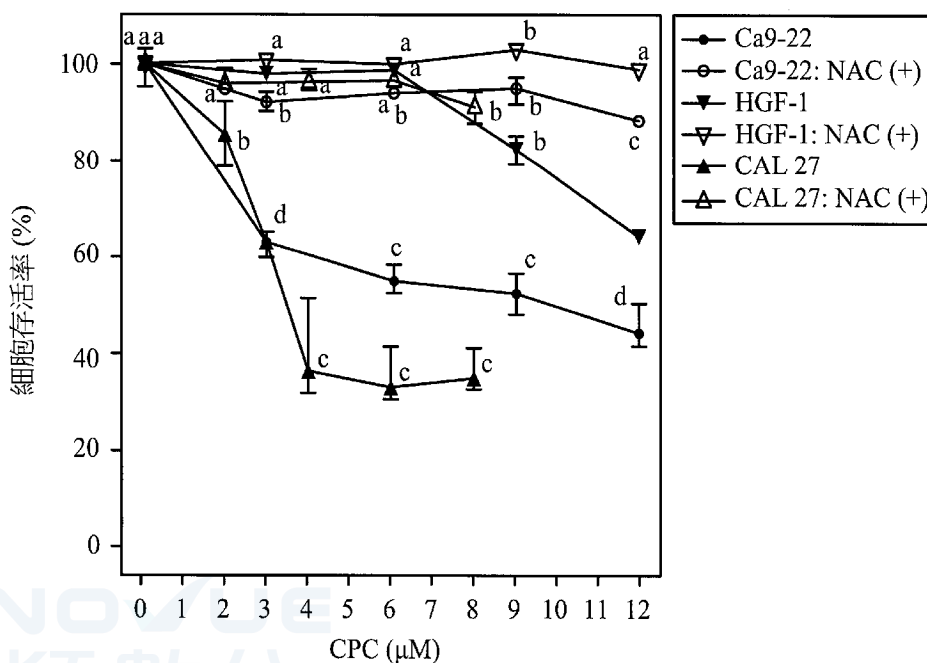
The present disclosure provides a pharmaceutical composition for treating oral cancer, including: an effect amount of a compound of Formula (I) shown as follows:



Formula (I),

wherein  $R_1$  is selected form a group consisting of hydrogen, hydroxyl, methoxyl, methyl, formyl and formic acid;  $R_2$  is hydrogen, hydroxyl or methoxyl;  $R_3$  is hydrogen, hydroxyl or methoxyl;  $R_4$  is hydrogen, hydroxyl or methoxyl, and wherein the compound of Formula (I) has an effect of selectively killing oral cancer cells; and a pharmaceutically acceptable carrier or salt.

指定代表圖：



第 1 圖

## 發明摘要

※ 申請案號： 105127395

※ 申請日： 105. 8. 26

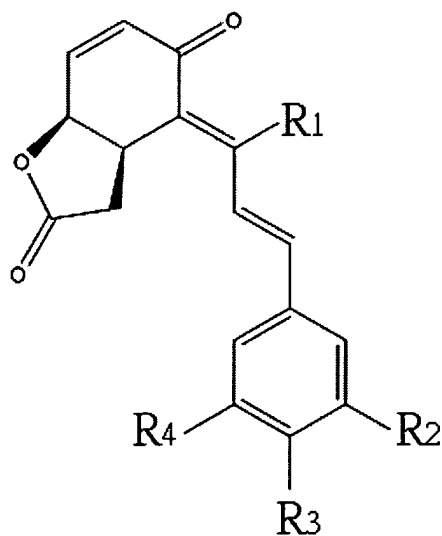
※IPC 分類：

A61K 31/365  
C07D 707/83  
A61P 35/00

【發明名稱】 用於治療口腔癌之醫藥組成物及其活性成分之用途 / Pharmaceutical composition and use of the active ingredient thereof

## 【中文】

本發明提供一種用於治療口腔癌之醫藥組成物，包括：一有效量之如以下式(I)所示之化合物為活性成分：

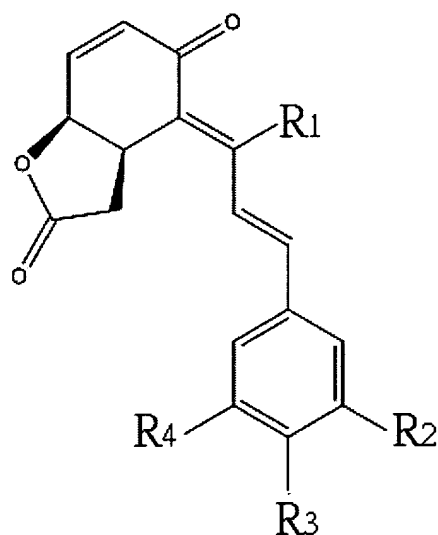


式(I)，

其中， $R_1$ 係擇自由以下所構成之群組：氫基、氫氧基、甲氧基、甲烷基、甲醛基與甲酸基； $R_2$ 為氫基、氫氧基或甲氧基； $R_3$ 為氫基、氫氧基或甲氧基； $R_4$ 為氫基、氫氧基或甲氧基，且其中該式(I)所示之化合物具有選擇性殺死口腔癌細胞之功效；以及一藥學上可接受之載體或鹽類。

## 【英文】

The present disclosure provides a pharmaceutical composition for treating oral cancer, including: an effective amount of a compound of Formula (I) shown as follows:



Formula (I),

wherein R<sub>1</sub> is selected from a group consisting of hydrogen, hydroxyl, methoxyl, methyl, formyl and formic acid; R<sub>2</sub> is hydrogen, hydroxyl or methoxyl; R<sub>3</sub> is hydrogen, hydroxyl or methoxyl; R<sub>4</sub> is hydrogen, hydroxyl or methoxyl, and wherein the compound of Formula (I) has an effect of selectively killing oral cancer cells; and a pharmaceutically acceptable carrier or salt.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）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】：

無。

# 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】** 用於治療口腔癌之醫藥組成物及其活性成分之用途/Pharmaceutical composition 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成物，且特別關於一種用於治療口腔癌之醫藥組成物及其活性成分之用途。

## 【先前技術】

**【0002】** 口腔癌為世界第六常見的癌症(Warnakulasuriya S, Oral Oncol 2009, 45(4-5):309-316; Petersen PE, Oral Oncol 2009, 45(4-5):454-460)。儘管口腔癌於臨床上容易偵測，但其經常被患者所忽略，而導致高死亡率(Myoung et al. 2003, Cancer Sci 94:215-220)。雖然數種口腔腫瘤標記已被報導(Yen CY, et al, Biomarkers 2009, 14(4):244-249; Yen CY, et al, Biomarkers 2013, 18(1):63-72)，然而這些努力係聚焦於偵測而非治療，且因此仍然需要有效之抗口腔癌療法。

**【0003】** 厚殼桂屬 (*Cryptocarya*) 植物 (樟科 (family Lauraceae)) 廣泛地被發現於熱帶與亞熱帶 (Davies-Coleman and Rivett 1989, Prog Chem Org Nat Prod 55:1-35)。其粗萃物已被證實具有抵抗癌症之抗增生能力。例如，*Cryptocarya griffithiana* 之葉與土楠 (*Cryptocarya concinna*) 之根的甲醇萃取

物可分別抑制人類HL60前骨髓性細胞白血病(promyelocytic leukemia)細胞(Ong CY, et al, *J Photochem Photobiol B* 2009, 96(3):216-222) 與 口腔癌細胞 (Huang HW, et al, *ScientificWorldJournal* 2014, 2014:180462) 的細胞增殖。  
*Cryptocarya obovata*之果實與樹幹樹皮(trunk bark)的乙醇萃取物則已被報導具有抵抗人類KB細胞之抗增殖功效(Dumontet V, et al, *J Nat Prod* 2004, 67(5):858-862)。

【0004】 數種來自厚殼桂屬植物之化合物已被發現具有多樣性的生物功能，即，經由烷基化黃酮(alkylated flavanones)的抗登革熱病毒(Allard PM, et al, *J Nat Prod* 2011, 74(11):2446-2453)、經由菲并吲哚啉生物鹼(phenanthroindolizidine alkaloids)的抗HIV (Wu TS, et al, *Nat Prod Commun* 2012, 7(6):725-727)、經由松屬素(pinocembrin)的抗結核(tuberculosis)(Chou TH, et al, *Chem Biodivers* 2011, 8(11):2015-2024)、經由(+)-N-甲基異衡州烏藥鹼((+)-N-methylisococlaurine)、芒籽寧(atherosperminine)與2-羥基-芒籽寧(2-hydroxy-atherosperminine)的抗瘧原蟲(plasmodial)(Nasrullah AA, et al, *Molecules* 2013, 18(7):8009-8017)、經由7',8'-dihydroobolactone的抗錐蟲(trypansomal)(Davis RA, et al, *Bioorg Med Chem Lett* 2010, 20(14):4057-4059)以及經由(2S)-5,7-二羥基黃酮((2S)-5,7-dihydroxyflavanone)與生松素B(cryptocaryanone B)的抗發炎(Feng R, et al, *Phytochemistry* 2012, 76:98-105)功能。

【0005】 近來，來自厚殼桂屬植物之化合物已被報導具對

於癌症具有抗增殖功效。例如，藉由來自 *Cryptocarya costata* 之 2',4'-二羥基-5',6'-二甲氧基查耳酮 (2',4'-dihydroxy-5',6'-dimethoxychalcone) 與 isodidymocarpin (Usman H, et al, *Z Naturforsch C* 2006, **61**(3-4):184-188) 以及來自 *Cryptocarya konishii* 之 desmethylinfectocaryone、infectocaryone 與單羥基-2-醯基苯乙酸酯 (cryptocaryone, CPC) 來抑制白血病細胞之增殖 (Kurniadewi F, et al, *J Nat Med* 2010, **64**(2):121-125)。在這些來自厚殼桂屬植物的化合物中，CPC 為在臺灣常見分布之常綠植物，土楠，的主要成分之一 (Liao JC: Lauraceae in Flora of Taiwan, 2nd ed. Editorial Committee of the Flora of Taiwan; Taipei, Taiwan 1996, 2:448-451)。

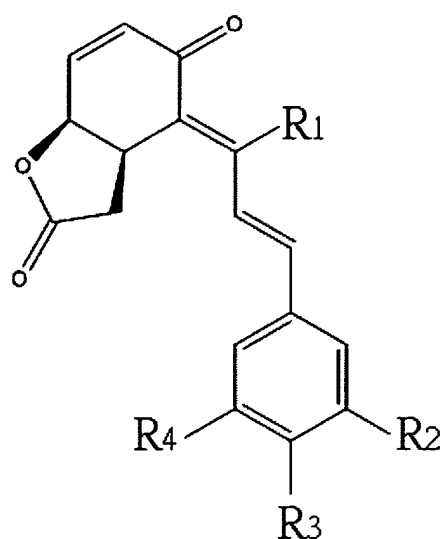
【0006】儘管 CPC，一種二氫查耳酮 (dihydrochalcone) 之抗癌功效，已被報導於一些癌症類型，例如鼠白血病 (murine leukemia) (Kurniadewi F, et al, *J Nat Med* 2010, **64**(2):121-125) 與前列腺癌 (prostate cancer) (Chen YC, et al, *J Urol* 2010, **183**(6):2409-2418)，然而，幾乎沒有研究提及其對於口腔癌的抗增殖功效。此外，仍不清楚 CPC 在癌細胞中的細胞殺死機制。

【0007】最近，反應性含氧物種 (reactive oxygen species ROS) 產生已被報導涉及來自 *Corema album* 之二氫查耳酮對於結腸癌 (colon cancer) 細胞所誘發之細胞毒性 (Leon-Gonzalez AJ, et al, *Nat Prod Commun* 2013, **8**(9):1255-1256)。因此，反應性含氧物種產生與 CPC 對於口腔癌細胞的作用之間的關聯性值得被研究。

【發明內容】



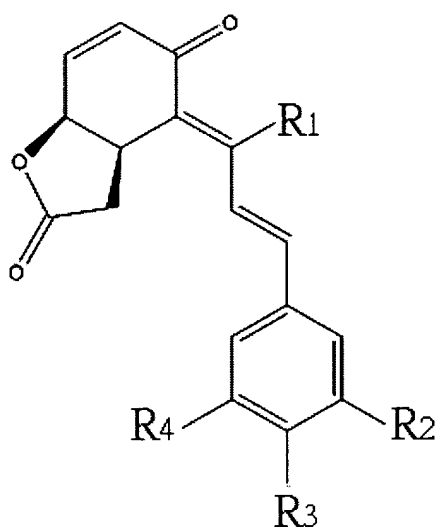
【0008】 本發明提供一種用於治療口腔癌之醫藥組成物，包括：一有效量之如以下式(I)所示之化合物為活性成分：



式(I)，

其中， $R_1$ 係擇自由以下所構成之群組：氫基、氫氧基、甲氧基、甲烷基、甲醛基與甲酸基； $R_2$ 為氫基、氫氧基或甲氧基； $R_3$ 為氫基、氫氧基或甲氧基； $R_4$ 為氫基、氫氧基或甲氧基，且其中該式(I)所示之化合物具有選擇性殺死口腔癌細胞之功效；以及一藥學上可接受之載體或鹽類。

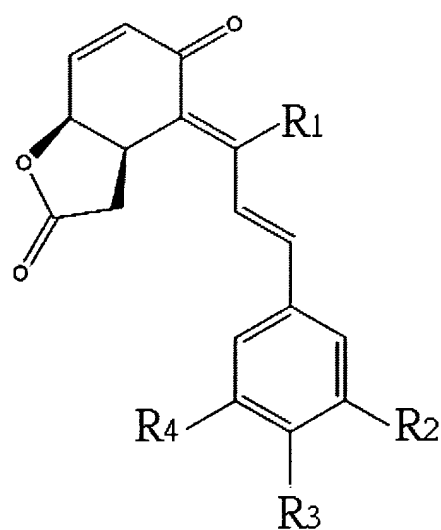
【0009】 本發明也提供如以下式(I)所示之化合物於製備一治療口腔癌之藥物的用途：



式(I)，

其中，R<sub>1</sub>係擇自由以下所構成之群組：氫基、氫氧基、甲氧基、甲烷基、甲醛基與甲酸基；R<sub>2</sub>為氫基、氫氧基或甲氧基；R<sub>3</sub>為氫基、氫氧基或甲氧基；R<sub>4</sub>為氫基、氫氧基或甲氧基，且其中該式(I)所示之化合物具有選擇性殺死口腔癌細胞之功效。

【0010】 如以下式(I)所示之化合物於製備一以氧化壓力為媒介之癌症治療藥物的用途：



式(I)，

其中，R<sub>1</sub>係擇自由以下所構成之群組：氫基、氫氧基、甲

氧基、甲烷基、甲醛基與甲酸基； $R_2$ 為氫基、氫氧基或甲氧基； $R_3$ 為氫基、氫氧基或甲氧基； $R_4$ 為氫基、氫氧基或甲氧基，且其中該式(I)所示之化合物具有選擇性殺死癌細胞之功效。

【0011】 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】

#### 【0012】

第1圖顯示，單羥基-2-醯基苯乙酸酯(cryptocaryone, CPC)處理之口腔癌細胞的細胞存活率與N-乙醯半胱氨酸(N-acetylcystein, NAC)前處理的作用。選擇口腔癌(Ca9-22與CAL 27)細胞與口腔正常(HGF-1)細胞。伴隨或不伴隨2 mM NAC前處理1小時，將Ca9-22與HGF-1細胞以3、6、9與12  $\mu$ M之CPC來處理，並將CAL 27細胞以2、4、6與8  $\mu$ M之CPC來處理，進行24小時培養。藉由MTS分析來測量細胞存活率。數據顯示為平均值 $\pm$ 標準差(mean  $\pm$  SD)(n = 6)。對於不同濃度之相同藥劑處理，無相同之小寫字母重疊的數據標記(data marks)(a至d)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 HSD Post Hoc Test))。

第2A與2B圖顯示，CPC處理之口腔癌Ca9-22細胞的sub-G1累積與NAC前處理的作用。伴隨或不伴隨2 mM NAC前處理1小時，將Ca9-22細胞以0、3、6、9與12  $\mu$ M之CPC來處理24小時。第2A圖顯示CPC處理之Ca9-22細胞的代表性流式

細胞術 (flow cytometry) 的細胞週期分布輪廓 (cell cycle distribution profiles)。細胞週期相 (cell cycle phases) 為加底線於各圖塊中。第 2B 圖顯示，第 2A 圖中之 subG1 百分比的定量分析 (quantification analysis)。數據顯示為平均值  $\pm$  標準差 ( $n = 3$ )。對於不同濃度之相同藥劑處理，無相同之小寫字母重疊的數據標記 (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)。

第 3A 與 3B 圖顯示，CPC 處理之口腔癌 Ca9-22 細胞的膜聯蛋白 (annexin) V/碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 依據之細胞凋亡與 NAC 前處理的作用。伴隨或不伴隨 2 mM NAC 前處理 1 小時，將 Ca9-22 細胞以 0、3、6、9 與 12  $\mu$ M 之 CPC 來處理 24 小時。第 3A 圖顯示，CPC 處理之 Ca9-22 細胞流式細胞術之膜聯蛋白 V/碘化丙啶 (PI) 雙重染色 (double staining) 的代表性結果。於各圖塊中，膜聯蛋白 V (+)/碘化丙啶 (+) 以及膜聯蛋白 V (+)/碘化丙啶 (-) 被計算為細胞凋亡 (+)。第 3B 圖顯示於第 3A 圖中之 CPC 處理之 Ca9-22 細胞之細胞凋亡的定量分析。數據顯示為平均值  $\pm$  標準差 ( $n = 3$ )。對於不同濃度之相同藥劑處理，無相同之小寫字母重疊的數據標記 (a 與 b) 代表顯著差異 (單因子變異數分析與圖基 HSD 事後檢驗法)。

第 4A 與 4B 圖顯示，CPC 處理之口腔癌 Ca9-22 細胞的一般半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (generic caspase) 依據之細胞凋亡與 NAC 前處理的作用。伴隨或不伴隨 2 mM NAC 前處理 1 小時，將 Ca9-22 細胞以 0、3、6、9 與 12  $\mu$ M 之 CPC 來處理 24 小

時，之後並以 1  $\mu$ l 500X TF2-VAD-FMK來染色。第4A圖顯示，CPC處理之Ca9-22細胞之流式細胞術之TF2-VAD-FMK染色的代表性結果。於各圖塊中，右側指出全半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(pancaspase, Pan)陽性區域。第4B圖顯示，全半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶螢光強度的定量分析。數據顯示為平均值 $\pm$ 標準差( $n = 3$ )。對於不同濃度之相同藥劑處理，無相同之小寫字母重疊的數據標記(a至e)代表顯著差異(單因子變異數分析與圖基HSD事後檢驗法)。

第5A與5B圖顯示，CPC處理之口腔癌Ca9-22細胞的反應性含氧物種(reactive oxygen species, ROS)產生與NAC前處理的作用。伴隨或不伴隨2 mM NAC前處理1小時，將Ca9-22細胞以0、3、6、9與12  $\mu$ M之CPC來處理6與12小時。第5A圖顯示，CPC處理之Ca9-22細胞之流式細胞術的代表性反應性含氧物種輪廓。於各圖塊中，右側指出反應性含氧物種陽性區域。第5B圖顯示，於第5A圖中之相對反應性含氧物種強度的定量分析。數據顯示為平均值 $\pm$ 標準差( $n = 3$ )。對於不同濃度之相同藥劑處理，無相同之小寫字母重疊的數據標記(a至e)代表顯著差異(單因子變異數分析與圖基HSD事後檢驗法)。

第6A與6B圖顯示，CPC處理之口腔癌Ca9-22細胞之粒線體膜電位(mitochondrial membrane potential, MitoMP)的去極化(depolarization)與NAC前處理的作用。伴隨或不伴隨2 mM NAC前處理1小時，將Ca9-22細胞以0、3、6、9與12  $\mu$ M之CPC來處理24小時。第6A圖顯示，CPC處理之Ca9-22細胞

之流式細胞術的粒線體膜電位的輪廓。於各圖塊中，右側指出MitoMP陽性區域。第6B圖顯示，於第6A圖中之相對MitoMP強度的定量分析。數據顯示為平均值 $\pm$ 標準差( $n = 3$ )。對於不同濃度之相同藥劑處理，無相同之小寫字母重疊的數據標記(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)。

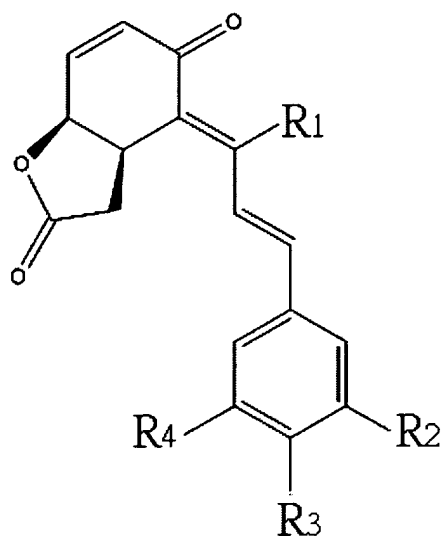
第7圖顯示，於CPC處理之口腔癌Ca9-22細胞中之 $\gamma$ H2AX依據的DNA損傷與NAC前處理的作用。伴隨或不伴隨2 mM NAC前處理1小時，將Ca9-22細胞以0、3、6、9與12  $\mu$ M之CPC來處理24小時。第7A圖顯示，CPC處理之Ca9-22細胞之代表性流式細胞術依據的DNA雙股斷裂(DNA double strand break, DSB)輪廓。於各圖塊中，虛線指出 $\gamma$ H2AX陽性區。第7B圖顯示，於CPC處理之Ca9-22細胞中之 $\gamma$ H2AX依據之DNA損傷的倍數變化(fold changes)定量分析。數據顯示為平均值 $\pm$ 標準差( $n = 3$ )。對於不同濃度之相同藥劑處理，無相同之小寫字母重疊的數據標記(a至e)代表顯著差異(單因子變異數分析與圖基HSD事後檢驗法)。

第8圖顯示，人類口腔癌細胞之CPC誘發細胞殺死之假設機制的概要圖。於口腔癌細胞(Ca9-22)中的變化以粗箭頭指出，例如氧化壓力(oxidative stress)的增加、DNA損傷與細胞死亡。向上之箭頭指出在本發明之研究之各分析中的增加。不同之分析顯示於括號中。具有“?”符號之粗箭頭為未在本發明之研究中檢驗。

#### 【實施方式】

【0013】 在本發明一實施態樣中，提供一種用於治療口腔癌之醫藥組成物。

【0014】 上述用於治療口腔癌之醫藥組成物可包括，但不限於一有效量之如以下式(I)所示之化合物為活性成分，與一藥學上可接受之載體或鹽類：



式(I)。

【0015】 於式(I)中， $R_1$ 的例子可包括，但不限於，氫基、氫氧基、甲氧基、甲烷基、甲醛基、甲酸基等，又， $R_2$ 可為氫基、氫氧基、甲氧基等，但不限於此，而 $R_3$ 則可為氫基、氫氧基、甲氧基等，但不限於此，且 $R_4$ 可例如為氫基、氫氧基、甲氧基等，但不限於此。

【0016】 於本發明中，用語「有效量」係指能夠殺死癌細胞之最低量或者為能使患者病症緩和之最低劑量。

【0017】 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。

【0018】 此外，上述之式(I)所示之化合物也可具有增加癌細胞中之氧化壓力的功效。

【0019】 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。

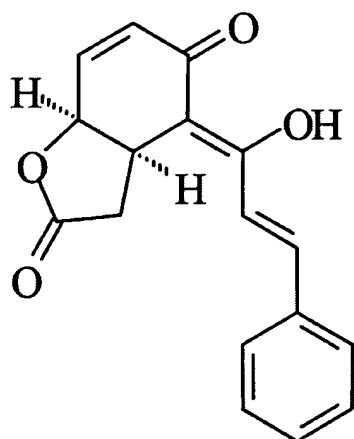
【0020】 在一實施例中，上述之式(I)所示之化合物可為獲取自一植物之任何部位的自然產物。上述植物可包括厚殼桂屬(*Cryptocarya*)植物，但不限於此。而厚殼桂屬植物的例子，可包括，但不限於土楠(*Cryptocarya concinna*)、厚殼桂(*Cryptocarya chinensis*)、菲律賓厚殼桂(*Cryptocarya elliptifolia*)、硬殼桂(*Cryptocarya chingii*)、叢花厚殼桂(*Cryptocarya densiflora*)等。在一特定實施例中，上述之式(I)所示之化合物係為獲自土楠之根。

【0021】 在另一實施例中，上述之式(I)所示之化合物係為人工合成。

【0022】 又，在一實施例中， $R_1$ 可為氫氧基。在另一實施例中， $R_2$ 可為氫基。在又另一實施例中， $R_3$ 可為氫基。又，在另一實施例中， $R_4$ 可為氫基。

【0023】 在一特定實施例中，式(I)化合物為單羥基-2-醯基苯乙酸酯(cryptocaryone, CPC)，其分子式如以下式(II)所示：





式(II)。

【0024】而上述之式(II)所示之化合物也可為自然產物或為人工合成，並無特別限制。

【0025】在一實施例中，上述之式(II)所示之化合物可為獲取自一植物之任何部位的自然產物。上述植物可包括，但不限於，厚殼桂屬植物。厚殼桂屬植物則可包括，土楠、厚殼桂、菲律賓厚殼桂、硬殼桂、叢花厚殼桂等，但不限於此。在一特定實施例中，上述之式(II)所示之化合物係為獲自土楠之根。

【0026】在一實施例中，上述本發明用於治療口腔癌之醫藥組成物可具有於一口腔癌細胞中造成氧化壓力之功效。在另一實施例中，上述本發明用於治療口腔癌之醫藥組成物可具有使一口腔癌細胞細胞凋亡之功效。在又另一實施例中，上述本發明用於治療口腔癌之醫藥組成物可具有造成一口腔癌細胞DNA損傷之功效。

【0027】在本發明之一第二實施態樣中，本發明也提供一種任何前述式(I)所示之化合物於製備一治療口腔癌之藥物的用途。

【0028】在一實施例中，上述治療口腔癌之藥物可具有於

一口腔癌細胞中造成氧化壓力之功效。在另一實施例中，上述治療口腔癌之藥物可具有使一口腔癌細胞細胞凋亡之功效。在又另一實施例中，上述治療口腔癌之藥物可具有造成一口腔癌細胞DNA損傷之功效。

**【0029】** 又，在一實施例中，上述治療口腔癌之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。

**【0030】** 在本發明之一第三實施態樣中，本發明也提供一種任何前述式(I)所示之化合物於製備一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。

**【0031】** 在一實施例中，上述以氧化壓力為媒介之癌症治療藥物可具有使一癌細胞細胞凋亡之功效。在又另一實施例中，上述以氧化壓力媒介之為癌症治療藥物可具有造成一癌細胞DNA損傷之功效。

**【0032】** 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。

**【0033】** 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、結腸癌、前列腺癌等。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一口腔癌治療藥物。

**【0034】** 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)。

【0035】 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，鹼土金屬族鹽類，如鎂、鈣鹽，含二價或四價陽離子之鹽類，如鋅、鋁或銦鹽。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、麩胺酸醯胺。

【0036】 本發明醫藥組合物或藥物給藥可以口服、非口服、經由吸入噴霧(inhalation spray)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。

【0037】 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。

【0038】 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。

【0039】 實施例

【0040】 A. 材料與方法

【0041】 1. 植物材料與分離

【0042】 土楠由共同發明人陳益昇所鑑定，而其根係於2004年5月收集於臺灣屏東縣牡丹鄉。已將證據標本(voucher specimen) (Chen 6153)寄存於高雄醫學大學，藥學院，藥學系之標本館。將經乾燥之土楠的根(7.7 Kg)切片並於室溫進行冷甲醇萃取(cold methanol-extraction)三次。之後將所獲得之溶液於減壓下進行蒸發以獲得甲醇萃取物(800 g; 產率: 甲醇萃取物 / 經乾燥之根 = 10.4%) (Huang HW, et al, *ScientificWorldJournal* 2014, 2014:180462)。如先前文獻所述(Chen YC, et al, *J Urol* 2010, 183(6):2409-2418)，單羥基-2-醯基苯乙酸酯(cryptocaryone, CPC) (5.7 g; 產率: CPC/甲醇萃取物 = 0.7%) 係分離自土楠的根。簡而言之甲醇萃取物被劃分(partitioned)於氯仿(chloroform)/水(1:1)之間以產生氯仿區段(fraction)與水區段。將區段接受矽膠管柱色層分析(chromatography)並以一梯度之氯仿-甲醇洗滌以產生13個區段(A-1至A-13)。之後從區段A-3(氯仿-甲醇100:1)獲得CPC，且藉由光譜分析(spectral analyses)來確認CPC之結構。

【0043】 2. 細胞培養物與化合物

【0044】 兩種人類口腔癌細胞株(Ca9-22 (Chiu CC, et al, *PLoS One* 2013, 8(5):e64739)與CAL 27 (Jiang L, et al, *Oral*

*Oncol* 2009, 45(11):e204-207)) 為分別購自理研生物資源中心 (RIKEN BioResource Center) 之細胞銀行 (Cell Bank) (日本筑波市) 與美國菌種保存中心 (American Type Culture Collection, ATCC) (美國, 維吉尼亞州, 馬納薩斯) (Manassas Virginia, USA), 並培養於添加 10% 胎牛血清 (Gibco)、100 U/ml 青黴素 (penicillin)、100 µg/ml 鏈黴素 (streptomycin) 與 0.03% 麩醯胺酸 (glutamine) 之 DMEM/F12 (3:2) 培養基 (Gibco, Grand Island, NY, USA)。

● 【0045】 正常牙齦纖維母細胞細胞株 (gingival fibroblast cell line) (HGF-1) 為購自美國菌種保存中心並維持於含有具有 1 mM pyruvate 之相似添加的 DMEM 培養基 (Gibco, Grand Island, NY, USA)。

● 【0046】 將細胞 37°C 培養於含 5% CO<sub>2</sub> 之潮濕的空氣。N-乙酰半胱氨酸 (N-acetylcystein, NAC) 購自 Sigma (St. Louis, MO, USA) 用於在施用 CPC 之前的前處理。於此研究中使用之口腔癌 (Ca9-22 與 CAL 27) 細胞的繼代數目 (passage numbers) 分別為 15-22 與 8-15。

● 【0047】 3. 細胞存活率

● 【0048】 如先前文獻 (Chiu CC, et al, *PLoS One* 2013, 8(5):e64739) 所述, 藉由使用 CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (Promega Corporation, Madison, WI, USA) 來確認細胞存活率。分別將兩種口腔癌細胞株 (Ca9-22 與 CAL 27) 以每孔接種  $1 \times 10^5$  個細胞與將 HGF-1 細胞以每孔  $4 \times 10^4$  個細胞接種於一 6-孔盤。在接種 24 小時之後 5

將細胞以在指示濃度之CPC培養24小時，且藉由一ELISA reader於490 nm來確認細胞存活率。

【0049】 4.細胞週期分布(cell cycle distribution)的確認

【0050】 添加碘化丙啶(propidium iodide, PI) (Sigma, St Louis, MO, USA)以染色出細胞DNA含量(cellular DNA content)(Chen BH, et al, *J Agric Food Chem* 2011, 59(6):2284-2290)。簡單而言，將每孔 $3 \times 10^5$ 個細胞接種於6孔盤中隔夜培養，且之後以載劑(0.05% DMSO)或3、6、9、12  $\mu\text{M}$ 之CPC處理24小時。在收取細胞並將其以PBS清洗兩次之後，將細胞以70%乙醇隔夜固定。隨後，於黑暗中在37°C將細胞團塊(cell pellets)重新懸浮於50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 碘化丙啶試劑中達30分鐘。經由一流式細胞儀(flow cytometer) (BD Accuri™ C6; Becton-Dickinson, Mansfield, MA, USA)與BD Accuri™ C6 software (version 1.0.264)評估來細胞週期分布(cell cycle distribution)。

【0051】 5. 藉由膜聯蛋白(annexin) V/碘化丙啶(PI)之細胞凋亡(apoptosis)測定

【0052】 藉由膜聯蛋白V (Strong Biotect Corporation, Taipei, Taiwan) /碘化丙啶(PI) (Sigma, St Louis, MO, USA)來偵測細胞凋亡(Chiu CC, et al, *J Agric Food Chem* 2011, 59(8):4288-4293)。簡單而言，將每孔 $3 \times 10^5$ 個細胞接種於6孔盤中培養24小時，且之後以載劑或指定濃度之CPC處理24小時。之後將細胞以含有2  $\mu\text{l}$ 之膜聯蛋白V-螢光異硫氰酸鹽(fluorescein isothiocyanate, FITC)儲存液(0.25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )與2  $\mu\text{l}$ 之

PI儲存液(1 mg/ml)之100  $\mu$ l結合緩衝溶液(binding buffer)培養30分鐘。最後，以400  $\mu$ l PBS來重新懸浮細胞以進行流式細胞術分析(flow cytometry analysis) (BD Accuri™ C6; Becton-Dickinson)。

**【0053】** 6.：藉由全半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(pancaspase)活性之細胞凋亡的測定

**【0054】** 細胞凋亡也藉由半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶活化(caspase activation)的測量來偵測(Kaufmann SH, et al, *Methods* 2008, 44(3):262-272)。於此研究中，如先前文獻所述(Yeh CC, et al, *Molecules* 2012, 17(9):10916-10927)，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)(Abcam, Cambridge, UK)來測定全半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶1、3、4、5、6、7、8與9)的一般活化。

**【0055】** 簡而言之，接種Ca9-22細胞為 $3 \times 10^5$ 個細胞每孔於6孔盤中，以2 ml培養基。隔天，以CPC處理Ca9-22細胞24小時，之後添加2  $\mu$ l之500X TF2-Val-Ala-Asp (VAD)-氟甲基酮(fluoromethyl ketone, FMK) (TF2-VAD-FMK)，並將細胞培養於37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 2小時。將細胞以PBS清洗兩次並重新懸浮於0.5 ml之分析緩衝溶液(assay buffer)以用即時流式細胞術測量(immediate flow cytometry measurement)(BD Accuri™ C6; Becton-Dickinson)。

**【0056】** 7.細胞內反應性含氧物種(reactive oxygen species, ROS)的測定



【0057】 使用染劑二氯螢光素二乙酸酯 (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA) 藉由其螢光改變來偵測反應性含氧物種 (Yeh CC, et al, *BMC Complement Altern Med* 2012)。於6孔盤中每孔接種在2 ml培養基中之於 $3 \times 10^5$ 之密度的細胞，24小時。添加不同濃度之CPC至Ca9-22細胞，3小時。在以PBS清洗後，將於PBS中之100 nM二氯螢光素二乙酸酯至添加於6孔盤中的細胞，於細胞培養箱中達30分鐘。在胰蛋白酶處理(trypsinization)、PBS清洗與離心之後，將細胞團塊重新懸浮於1 ml PBS中，用於流式細胞術分析(flow cytometry analysis) (BD Accuri™ C6; Becton-Dickinson)及其軟體。

【0058】 8. 粒線體膜電位 (mitochondrial membrane potential, MitoMP)的測定

【0059】 如先前文獻 (Yen CY, et al, *Mutat Res* 2012, 747(2):253-258; Yu FS, et al, *J Dent Res* 2011, 90(2):168-174) 所述，使用MitoProbe™ DiOC2(3) assay kit (Invitrogen, Eugene, OR, USA) 以分析粒線體膜電位。簡單而言，於6孔盤中每孔接種在2 ml培養基中之於 $3 \times 10^5$ 之密度的細胞，24小時。在CPC處理之後，每孔添加10  $\mu$ l之10  $\mu$ M DiOC2(3)並培養於一細胞培養箱中，30分鐘。在收取細胞之後，將細胞重新懸浮於1 ml PBS中，用於流式細胞術分析(flow cytometry analysis) (BD Accuri™ C6; Becton-Dickinson)。

【0060】 9. 藉由 $\gamma$ H2AX/PI之DNA損傷的測定

【0061】 如先前文獻 (Yen et al. 2015, *BMC Complement*



Altern Med 15:94)所述，藉由流式細胞術來偵測DNA雙股斷裂 (DNA double strand break, DSB)標記。簡而言之，將CPC處理之細胞固定於70%乙醇中，以BSA-T-PBS溶液（1%牛血清白蛋白 (bovine Serum Albumin, BSA)與0.2% Triton X-100於PBS中；Sigma）清洗，並培養於4°C，1小時於含有2 μl之抗p-組蛋白 (Histone) H2A.X (Ser 139)之單株抗體 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)之100 μl的BSA-T-PBS溶液中。清洗細胞並將細胞重新懸浮於含有2 μl之Alexa Fluor 488-標記之二次抗體 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA)之一1:50稀釋物中以於室溫染色30分鐘。最後，將細胞重新懸浮於20 μg/ml之碘化丙啶於PBS中，用於流式細胞術分析 (BD Accuri™ C6; Becton-Dickinson)。

#### 【0062】 10. 統計學分析

【0063】 使用JMP® 10 software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)來分析具有不同濃度之相同藥物處理的群組差異。沒有相同的小寫字母重疊代表顯著差異 (Chiu CC, et al, PLoS One 2013, 8(5):e64739)。

#### 【0064】 B. 結果

##### 【0065】 1. CPC之抗增殖評估與NAC前處理的作用

【0066】 在MTS分析（第1圖）中，於指定濃度之CPC的兩種口腔癌細胞（Ca9-22與CAL 27）的細胞存活率(%)為劑量-反應地 (dose-responsively)降低（ $P < 0.05-0.001$ 相較於載劑）。相對地，口腔正常HGF-1細胞的細胞存活率在CPC控制於3與5

$\mu\text{M}$ 是相似的，但細胞存活率在9與12  $\mu\text{M}$ 時下降。CPC對於口腔癌Ca9-22與CAL 27細胞之 $\text{IC}_{50}$ 值分別為9.87與3.45  $\mu\text{M}$ ，而在相同CPC處理下之CPC-處理的口腔正常HGF-1細胞中並未偵測 $\text{IC}_{50}$ 。

**【0067】** NAC，一反應性含氧物種清除劑(scavenger)，通被用來確認於藥物誘發反應性含氧物種媒介之作用(drug-induced ROS-mediated effects)中的氧化壓力(oxidative stress)的角色(Chan WH, et al, Toxicol Lett 2006, 167(3):191-200; Shieh JM, et al, PLoS One 2014, 9(6):e99242; Lee WC, et al, ScientificWorldJournal 2015, 2015:620826; Lin MH, et al, Oral Oncol 2010, 46(11):822-828)。執行NAC前處理以檢驗CPC-誘發細胞死亡中之氧化壓力的可能角色，其顯示出相較於控制組完全解救於口腔癌細胞與正常細胞中之CPC誘發之抗增殖(第1圖)。

**【0068】** 2. CPC之sub-G1累積評估與NAC前處理的作用

**【0069】** 口腔癌Ca9-22細胞之CPC-誘發細胞週期變化的分布輪廓顯示於第2 A圖(上方)中。在CPC處理(第2B圖)之後，CPC(0-12  $\mu\text{M}$ )處理之Ca9-22細胞之sub-G1族群劑量-反應地增加( $P < 0.001$ )。相對地，CPC處理之Ca9-22細胞的G0/G1與G2/M族群幾乎劑量-反應地降低( $P < 0.001$ )。

**【0070】** 抵抗CPC-誘發之細胞週期變化之NAC前處理作用的分布輪廓顯示於第2A圖(下方)中。在NAC前處理，即，NAC + CPC(第2B圖，右側)之後，相較於僅CPC處理(第2B圖，左側)與未處理之控制組，CPC誘發之細胞週期變化如上

所述回復至正常分布。

**【0071】** 3. CPC之膜聯蛋白V/碘化丙啶(PI)根據的細胞凋亡評估與NAC前處理的作用

**【0072】** 為了更進一步確認細胞凋亡的角色，CPC處理之口腔癌Ca9-22細胞之膜聯蛋白V/碘化丙啶(PI)輪廓經由流式細胞術來顯現(第3A圖，上方)。第3B圖中，CPC(0-12  $\mu$ M)處理之Ca9-22細胞之膜聯蛋白V-陽性強度的族群為劑量-反應地增加( $P < 0.05-0.001$ )。

**【0073】** 抵抗CPC誘發之細胞凋亡之NAC前處理作用的膜聯蛋白V/碘化丙啶(PI)輪廓也被顯示於第3A圖(下方)中，在NAC前處理，即，NAC + CPC(第3B圖)之後，相較於僅CPC處理與未處理之控制組，CPC誘發之細胞凋亡變化如上所述回復至正常程度。

**【0074】** 4. CPC之全半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶依據的細胞凋亡評估與NAC前處理的作用

**【0075】** 為了更進一步確認細胞凋亡的角色，CPC處理之口腔癌Ca9-22細胞之全半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶輪廓經由流式細胞術來顯現(第4A圖，上方)。於第4B圖中，CPC(0-12  $\mu$ M)處理之Ca9-22細胞之全半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-陽性強度的族群為劑量-反應地增加( $P < 0.001$ )。

**【0076】** 抵抗CPC誘發之細胞凋亡之NAC前處理作用的全半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶輪廓也被顯示於第4A圖(下方)中，在NAC前處理，即，NAC + CPC(第4B圖)之後，相較於僅CPC處理與未處理之控制組，CPC誘發之細胞凋亡變化如上所述回

復至正常程度。

**【0077】** 5. CPC之反應性含氧物種產生的評估與NAC前處理的作用

**【0078】** 累積之證據顯示，反應性含氧物種產生之藥物與自然產物可導致細胞凋亡(Yen CY, et al, *Oral Oncol* 2011, 47(5):345-351; Han MH, et al, *PLoS One* 2013, 8(5):e63425; Raj L, et al, *Nature* 2011, 475(7355):231-234; Ding H, et al, *Nutr Cancer* 2009, 61(3):348-356)。

**【0079】** 為了確認反應性含氧物種於CPC誘發之細胞死亡作用中的角色，將一反應性含氧物種染色染劑 (DCFH-DA)施用於流式細胞術。第5A圖顯示CPC處理之 Ca9-22細胞於3小時培養之反應性含氧物種的輪廓。在CPC處理之後，CPC (0-12  $\mu$ M)處理之Ca9-22細胞的相對反應性含氧物種陽性染色為劑量反應地增加( $P < 0.001$ ) (第5B圖)。

**【0080】** 抵抗CPC誘發之反應性含氧物種產生之NAC前處理作用的反應性含氧物種染色輪廓也被顯示於第5A圖(下方)中。在NAC前處理，即，NAC + CPC(第5B圖)之後，相較於僅CPC處理與未處理之控制組，CPC誘發之反應性含氧物變化如上所述回復至正常程度。

**【0081】** 6. CPC之粒線體膜電位的評估與NAC前處理的作用

**【0082】** 為了確認粒線體膜電位於CPC誘發之作用中的角色，將一粒線體膜電位敏感染色染劑(DiOC2(3))施用於流式細胞術。第6A圖顯示CPC處理之Ca9-22細胞於24小時培養之粒線

體膜電位染色的輪廓。在CPC處理之後，CPC (0-12  $\mu$ M)處理之Ca9-22細胞的相對粒線體膜電位陽性染色為劑量-反應地降低 ( $P < 0.001$ ) (第6B圖)。

【0083】 抵抗CPC誘發之粒線體膜電位變化之NAC前處理作用的粒線體膜電位染色輪廓也被顯示於第6A圖(下方)中。在NAC前處理，即，NAC + CPC(第6B圖)之後，相較於僅CPC處理與未處理之控制組，CPC誘發之粒線體膜電位變化如上所述回復至接近正常程度。

【0084】 7. CPC之 $\gamma$ H2AX/PI依據的DNA損傷評估與NAC前處理的作用

【0085】 為了更進一步檢驗DNA損傷於CPC誘發之作用中的角色，選擇DNA雙股斷裂標記( $\gamma$ H2AX)用於流式細胞術中。第7A圖顯示CPC處理之Ca9-22細胞於24小時培養之 $\gamma$ H2AX/PI染色輪廓。在CPC處理之後，CPC (0-12  $\mu$ M)處理之Ca9-22細胞的 $\gamma$ H2AX陽性染色為劑量-反應地降低 ( $P < 0.001$ ) (第7B圖)。

【0086】 抵抗CPC誘發之DNA損傷之NAC前處理作用的 $\gamma$ H2AX染色輪廓也被顯示於第7A圖(下方)中。在NAC前處理，即，NAC + CPC(第7B圖)之後，相較於僅CPC處理與未處理之控制組，CPC誘發之 $\gamma$ H2AX變化如上所述回復至接近正常程度。

【0087】 C. 討論

【0088】 來自厚殼桂屬(*Cryptocarya*)植物之化合物被認為具有多樣性之生物功能，包括對於數種之癌症的抗增生效果。然而，其對於口腔癌之影響幾乎未被提及。本發明之研究檢驗

來自土楠 (*Cryptocarya concinna*) 之 CPC 的可能的抗口腔癌功效並探究詳細探究藥物反應機制。

**【0089】** 1. CPC 之選擇性殺死

**【0090】** 數種抗口腔癌藥物對於正常細胞具有傷害性副作用，因此，限制了它們的臨床應用，且抗癌治療理想地應具有選擇性細胞殺死作用 (Chiu CC, et al, *PLoS One* 2013, 8(5):e64739; Raj L, et al, *Nature* 2011, 475(7355):231-234)。於本發明之研究中，發現 CPC 毒殺兩種口腔癌細胞，但對於口腔正常細胞為較少傷害性 (第 1 圖)。因此，CPC 具有選擇性殺死口腔癌細胞的潛力。

**【0091】** 2. CPC 之藥物敏感性 (drug sensitivity) 的比較

**【0092】** 最近 CPC 已被報導抑制前列腺癌 (prostate cancer) 細胞的增殖，其中，藉由 SRB 分析 IC<sub>50</sub> 值於 48 小時為 1.6 至 3.4  $\mu\text{M}$  (Chen YC, et al, *J Urol* 2010, 183(6):2409-2418)。來自小西氏厚殼桂 (*C. konishii*) 之 CPC 被發現抑制 murine leukemia P-388 細胞的增殖，其中藉由 MTT 分析 IC<sub>50</sub> 值於 48 小時為 0.04  $\mu\text{M}$  (Kurniadewi F, et al, *J Nat Med* 2010, 64(2):121-125)。CPC 也被報導為在 KB 細胞株中之抗增殖的活性化合物，其藉由 MTT 分析 IC<sub>50</sub> 值於 3 天為 1.8  $\mu\text{M}$  (Dumontet V, et al, *Tetrahedron* 2001, 57:6189-6196)。然而，KB 細胞最近被發現為人類子宮頸癌 (cervical cancer) HeLa 細胞而非口腔上皮癌 (oral epidermal carcinoma) 細胞 (Masters J, *Carcinogenesis* 2002, 23(2):371)。

**【0093】** 因此，CPC 之抗口腔癌功效仍為大部分未知。於本



發明之研究中，首次發現CPC具有抵抗口腔癌細胞之抗增殖功，且對於口腔癌Ca9-22與CAL 27細胞，CPC之於24小時藉由MTS分析的IC50 值分別為11.63與3.91  $\mu\text{g/ml}$ 。

**【0094】** 3. 於CPC研究中之細胞凋亡的角色

**【0095】** 本發明研究提供於口腔癌Ca9-22細胞中之CPC的細胞凋亡作用的證據，如subG1累積、膜聯蛋白V/碘化丙啶(PI)染色與全半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶分析（第2至4圖）。細胞凋亡與抗細胞凋亡蛋白質的基因表現藉由西方墨點法(western blot)或PCR可進一步被確認。例如，本發明研究發現Ca9-22細胞之細胞凋亡蛋白，聚(ADP-核糖)聚合酶(poly(ADP-ribose) polymerase, PARP $\gamma$ )( Yen YH, et al, *Molecules* 2014, **19**(11):18721-18732)與CAL 27細胞之抗細胞凋亡蛋白，BCL2(Belka C, et al, *Int J Radiat Biol* 2002, **78**(8):643-658)在CPC處理後分別被向上與向下調（資料未顯示）。

**【0096】** 在未來，關p53、p21、p27與phospho p53的工作為更具額外價值以更進一步發現CPC對於細胞凋亡途徑的詳細作用。相似地，CPC也據說誘發細胞凋亡於人類前列腺癌PC3細胞中，根據subG1累積、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(caspase)-8與3的裂解(cleavage)、於細胞膜上死亡受體(death receptor) DR5的累積與Mcl-1表現的向上調控(Chen YC, et al, *J Urol* 2010, **183**(6):2409-2418)。然而，並未提及CPC處理之PC3細胞之氧化壓力的角色。相對地，本發明之研究於下一段落討論於CPC處理之口腔癌細胞中之氧化壓力的牽連性。

**【0097】** 4. 於二氫查耳酮(dihydrochalcone)研究中之氧化

## 壓力的角色

【0098】 CPC為一種二氫查耳酮，其被顯示可殺死口腔癌細胞（第1圖）。相似地，來自牙買加櫻桃(*Muntingia calabura*)的二氫查耳酮（2',4'-二羥基-3'-甲氧基二氫查耳酮(2',4'-dihydroxy-3'-methoxydihydrochalcone)與(-)-3'-甲氧基-2',4',β-三羥基二氫查耳酮（((-)-3'-methoxy-2',4',beta-trihydroxydihydrochalcone)）已被報導對於鼠白血病(murine leukemia)P-388細胞與人類結腸癌(colon cancer) HT-29細胞為具毒殺性的(Chen JJ, et al, *Planta Med* 2005, 71(10):970-973)。來自葡萄牙黑莓(*Corema album*)的二氫查耳酮（2',4'-二羥基二氫查耳酮(2',4'-dihydroxydihydrochalcone)與2'-甲氧基-4'-羥基二氫查耳酮(2'-methoxy-4'-hydroxydihydrochalcone)）已被報導對於結腸癌HT-29細胞為具毒殺性的(Leon-Gonzalez AJ, et al, *Nat Prod Commun* 2013, 8(9):1255-1256)，而其細胞殺死作用被NAC前處理所減低(Leon-Gonzalez AJ, et al, *Nat Prod Commun* 2013, 8(9):1255-1256)。

【0099】 相同地，本發明研究發現，NAC前處理可抑制CPC誘發之反應性含氧物種產生（第5圖）與粒線體去極化(mitochondrial depolarization)（第6圖）。又，本發明研究也發現CPC誘發之subG1累積、細胞凋亡(膜聯蛋白V與caspase活性)與DNA損傷被NAC前處理所減低（第2-4與7圖）。這些發現指出氧化壓力可牽涉於這些二氫查耳酮之細胞毒殺活性中。此外，氧化壓力可誘發自噬(autophagy)與細胞凋亡(Farooqi AA,



et al, *Mar Drugs* 2014, **12**(11):5408-5424)。於未來，其成為研究它們個別對口腔癌細胞之CPC-誘發之抗增殖的根據，藉由抑制子 (inhibitors)，如 3-甲基腺嘌呤 (3-methyladenine)/ 氯奎 (chloroquine)(Palmeira dos Santos C, et al, *J Cancer Res Clin Oncol* 2014, **140**(6):909-920)與 Z-VAD-FMK)( Callus BA, et al, *Cell Death Differ* 2007, **14**(1):73-78)來調整自噬與細胞凋亡。

【0100】然而，一些二氫查耳酮可具有不同之細胞反應。例如，新橘皮苷二氫查耳酮(neohesperidin dihydrochalcone)，為藉由新橘皮苷(neohesperidin)之氫化(hydrogenation)所產生的一無營養甜味劑(sweetening agent)，顯示抗氧化特性以抑制次氯酸(hypochlorous acid)誘發之DNA損傷與細胞死亡(Choi JM, et al, *Biol Pharm Bull* 2007, **30**(2):324-330)，並於*in vivo*與*in vitro*兩者皆抑制四氯化碳(carbon tetrachloride)誘發之氧化損傷(oxidative damage)(Hu L, et al, *Chem Biol Interact* 2014, **213**:51-59)。因此，二氫查耳酮之功能可具有雙重功能且取決於其化學特性，即反應性含氧物種產生或清除。

#### 【0101】D. 結論

【0102】最後，本發明之研究證明CPC可抑制口腔癌細胞之細胞增殖，並使口腔癌細胞細胞凋亡，但其對於正常口腔細胞傷害性較小。此細胞殺死機制包括反應性含氧物種產生、粒線體去極化與DNA損傷，而其可因NAC前處理而被挽救。因此，這些結果指出，根據細胞株研究，CPC具有用於氧化壓力媒介之口腔癌治療的抗癌潛力（第8圖）。於未來，用於探究*in vivo*機制之*in vivo*方法將提供CPC的具體證據。

【0103】 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】**

【0104】

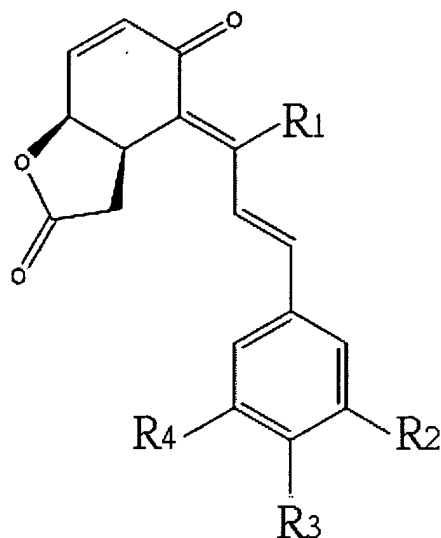
無。

## 申請專利範圍

公告本

1. 一種如以下式 (I) 所示之化合物於製備一治療口腔癌之藥物的用途：

106年1月20日修正本



式 (I) ，

其中， $R_1$ 係擇自由以下所構成之群組：氫基、氫氧基、甲氧基、甲烷基、甲醛基與甲酸基； $R_2$ 為氫基、氫氧基或甲氧基； $R_3$ 為氫基、氫氧基或甲氧基； $R_4$ 為氫基、氫氧基或甲氧基，

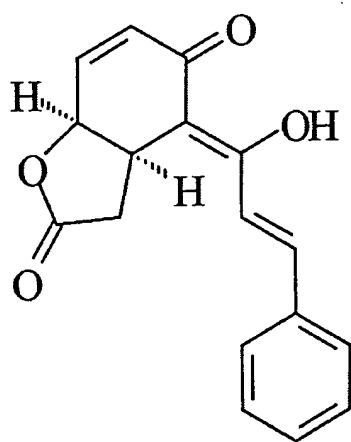
且其中該式 (I) 所示之化合物具有選擇性殺死口腔癌細胞之功效。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述之用途，其中於該式 (I) 化合物中， $R_1$ 為氫氧基。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述之用途，其中於該式 (I) 化合物中， $R_2$ 為氫基。
4. 如申請專利範圍第 1 項所述之用途，其中於該式 (I) 化合物中，

物中， $R_3$ 為氫基。

5. 如申請專利範圍第1項所述之用途，其中於該式(I)化合物中， $R_4$ 為氫基。

6. 如申請專利範圍第1項所述之用途，其中於該式(I)化合物為單羥基-2-醯基苯乙酸酯，其分子式如以下式(II)所示：



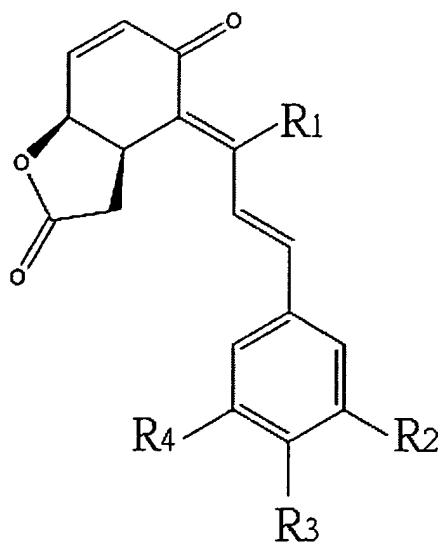
式(II)。

7. 如申請專利範圍第1項所述之用途，其中該治療口腔癌之藥物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1項所述之用途，其中該治療口腔癌之藥物具有使一口腔癌細胞細胞凋亡之功效。

9. 如申請專利範圍第1項所述之用途，其中該治療口腔癌之藥物具有造成一口腔癌細胞DNA損傷之功效。

10. 一種如以下式(I)所示之化合物於製備一以氧化壓力為媒介之癌症治療藥物的用途：



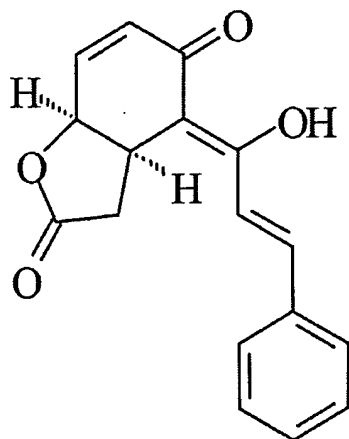
式(I)，

其中，R<sub>1</sub>係擇自由以下所構成之群組：氫基、氫氧基、甲氧基、甲烷基、甲醛基與甲酸基；R<sub>2</sub>為氫基、氫氧基或甲氧基；R<sub>3</sub>為氫基、氫氧基或甲氧基；R<sub>4</sub>為氫基、氫氧基或甲氧基，

且其中該式(I)所示之化合物具有選擇性殺死口腔癌細胞之功效。

11. 如申請專利範圍第10項所述之用途，其中於該式(I)化合物中，R<sub>1</sub>為氫氧基。
12. 如申請專利範圍第10項所述之用途，其中於該式(I)化合物中，R<sub>2</sub>為氫基。
13. 如申請專利範圍第10項所述之用途，其中於該式(I)化合物中，R<sub>3</sub>為氫基。
14. 如申請專利範圍第10項所述之用途，其中於該式(I)化合物中，R<sub>4</sub>為氫基。
15. 如申請專利範圍第10項所述之用途，其中於該式(I)化合物為單羥基-2-醯基苯乙酸酯，其分子式如以下式(II)

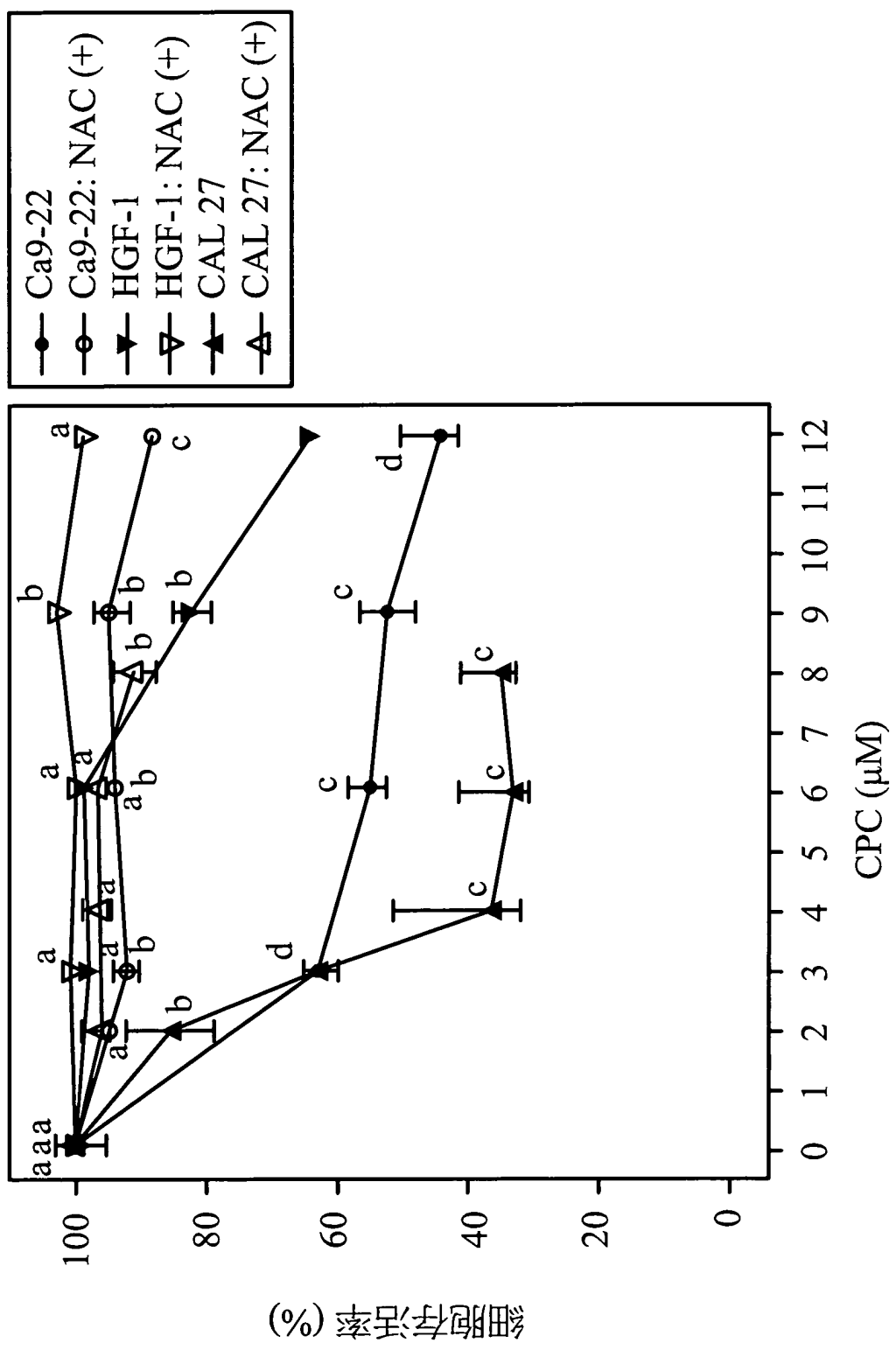
所示：



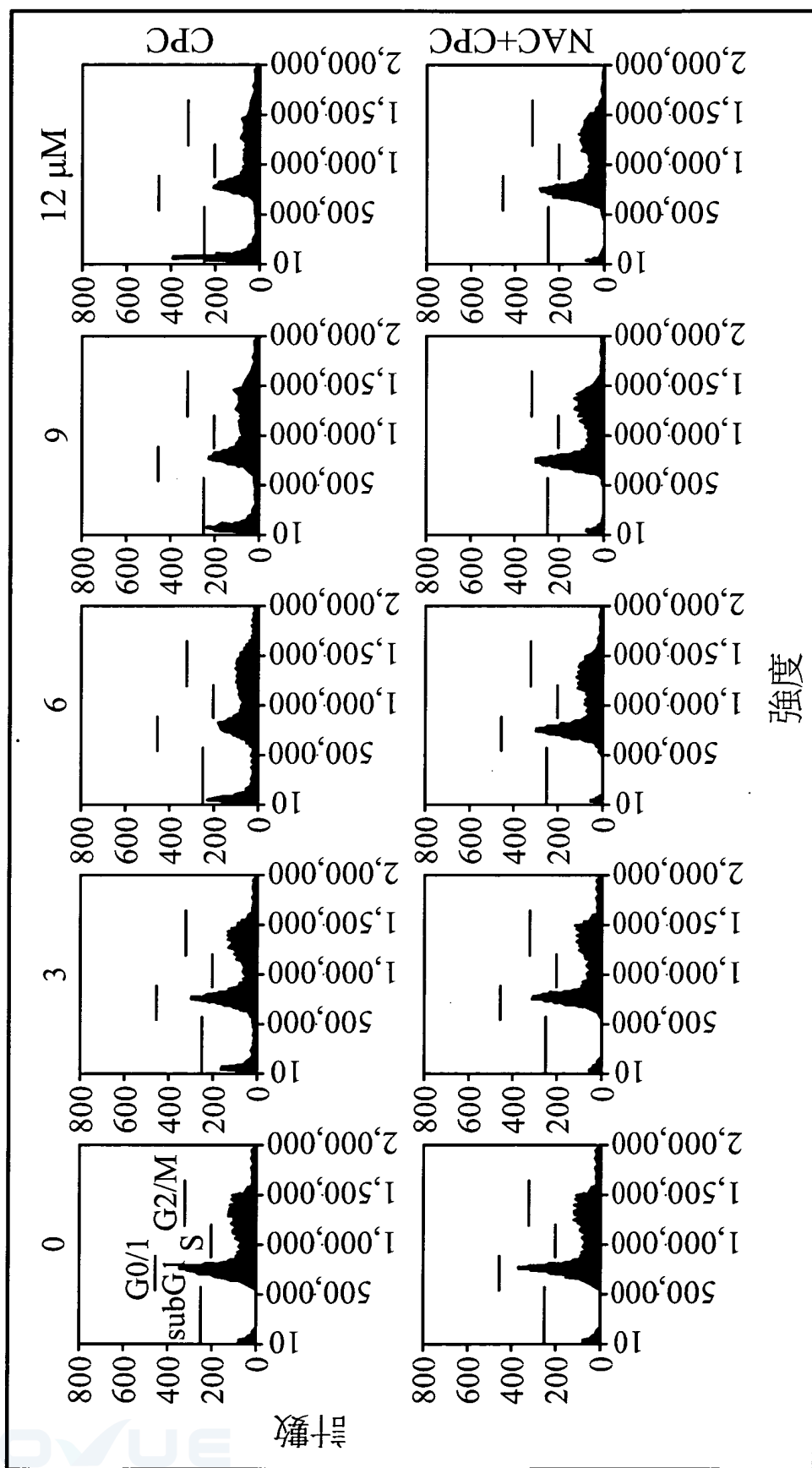
式(II)。

16. 如申請專利範圍第10項所述之用途，其中該以氧化壓力為媒介之癌症治療藥物具有使一癌細胞細胞凋亡之功效。
17. 如申請專利範圍第10項所述之用途，其中該以氧化壓力為媒介之癌症治療藥物具有造成一癌細胞DNA損傷之功效。
18. 如申請專利範圍第10項所述之用途，其中該以氧化壓力為媒介之癌症治療藥物為一口腔癌治療藥物。

圖式

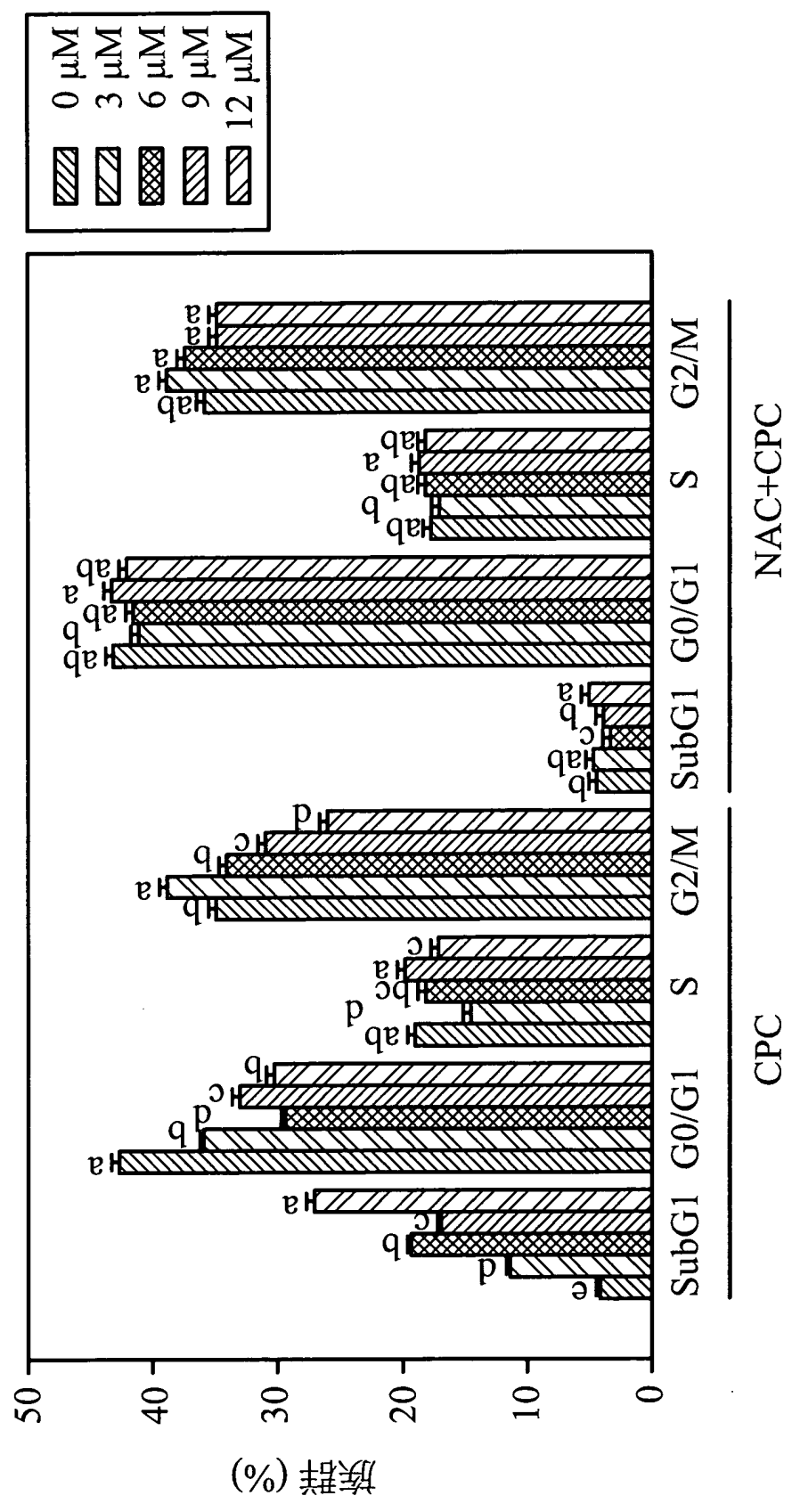


第 1 圖

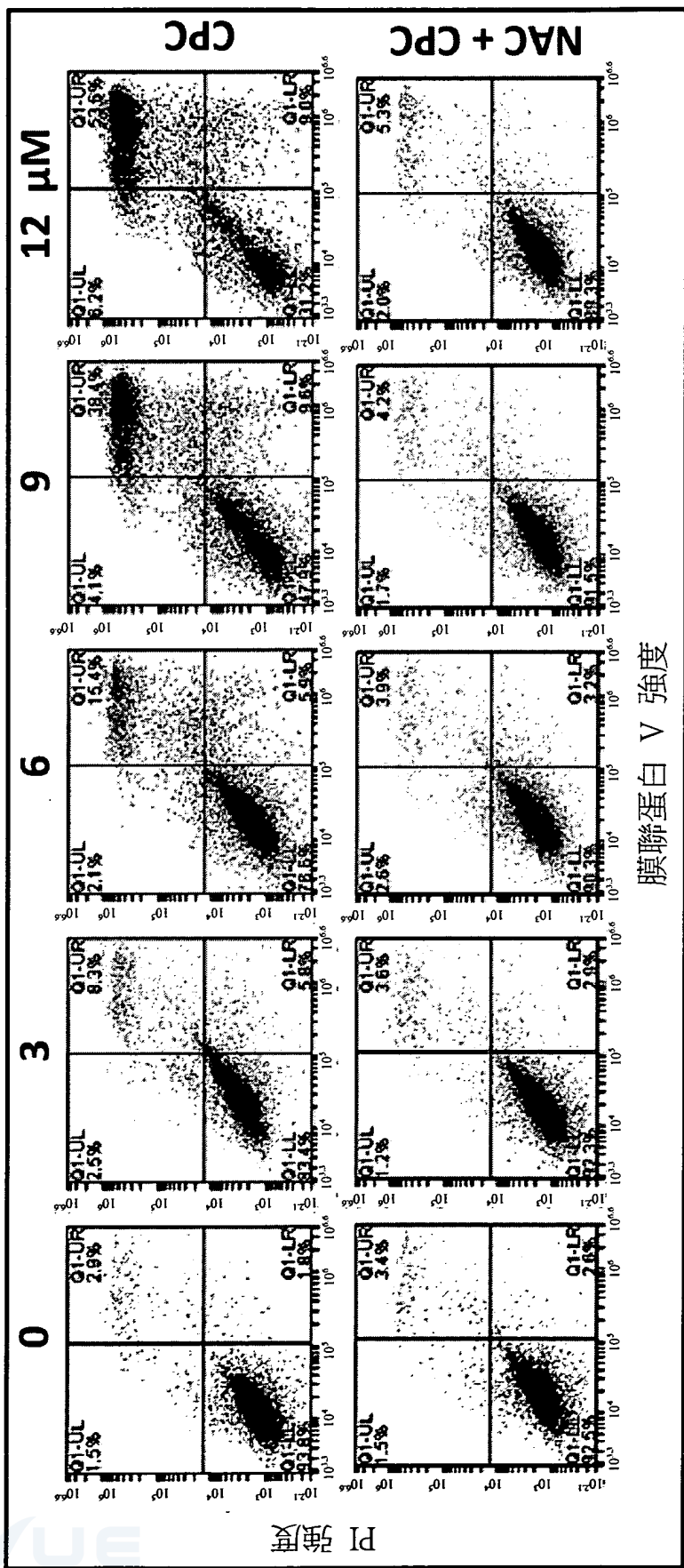


第2A圖

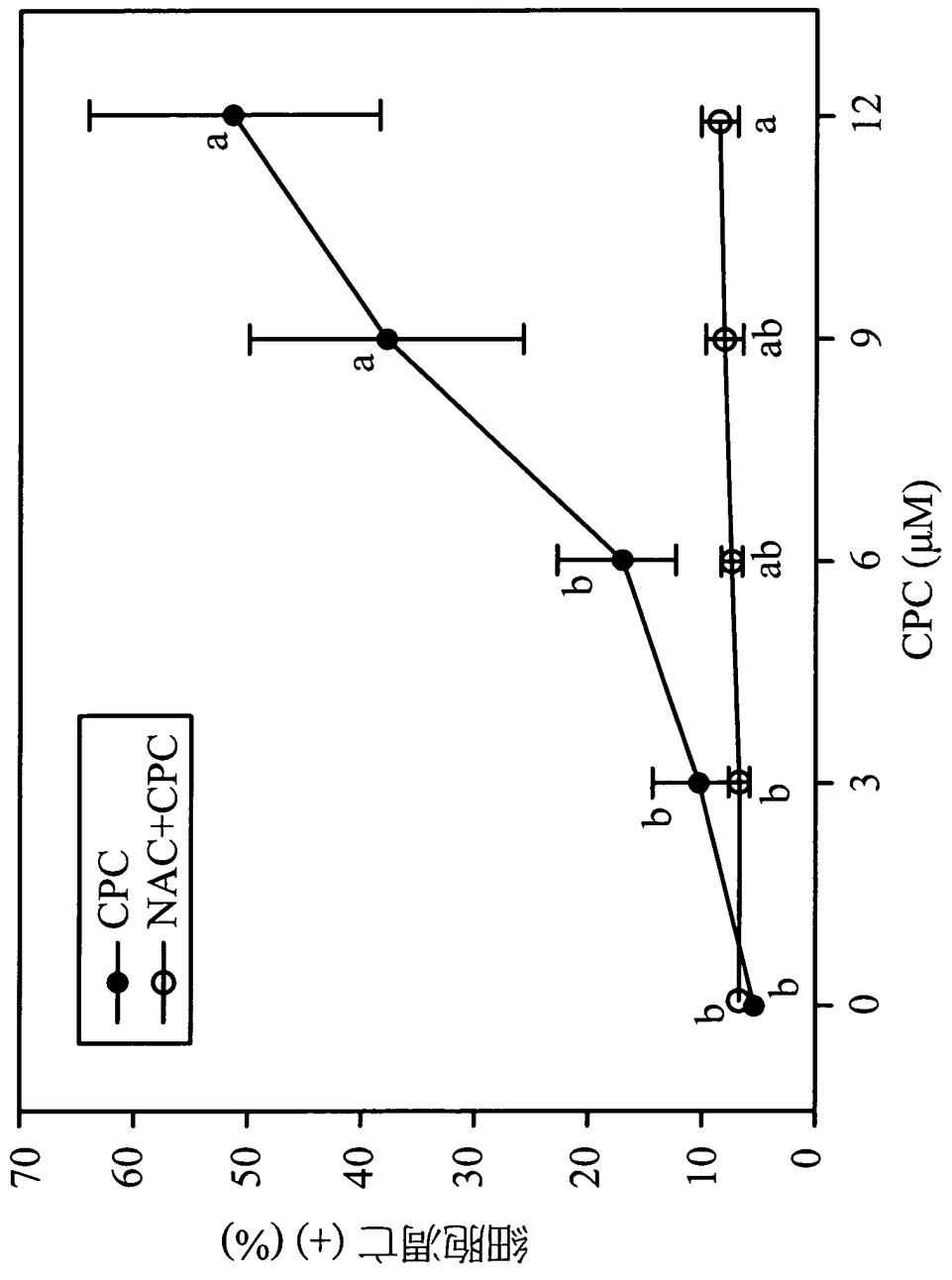




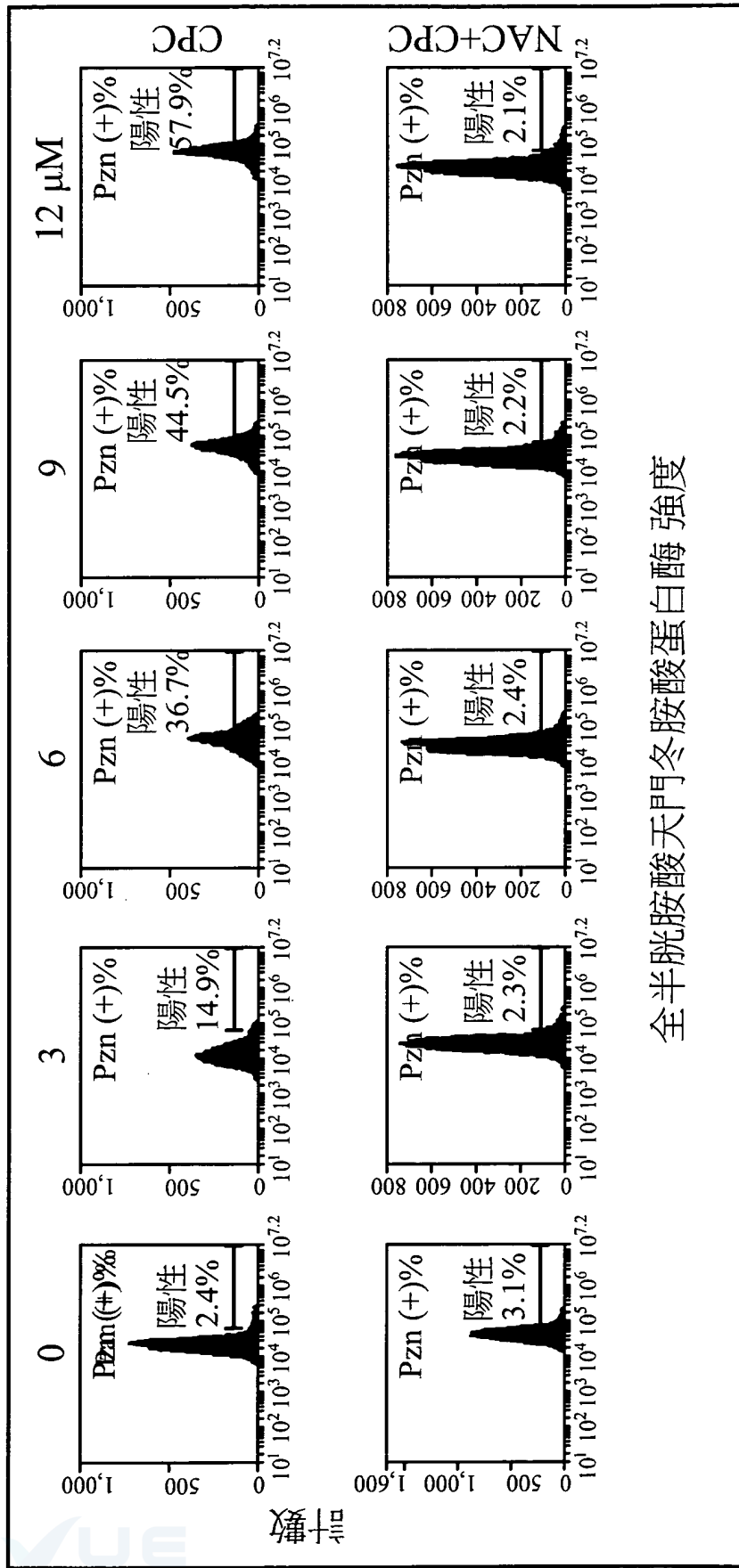
第 2B 圖



第 3A 圖

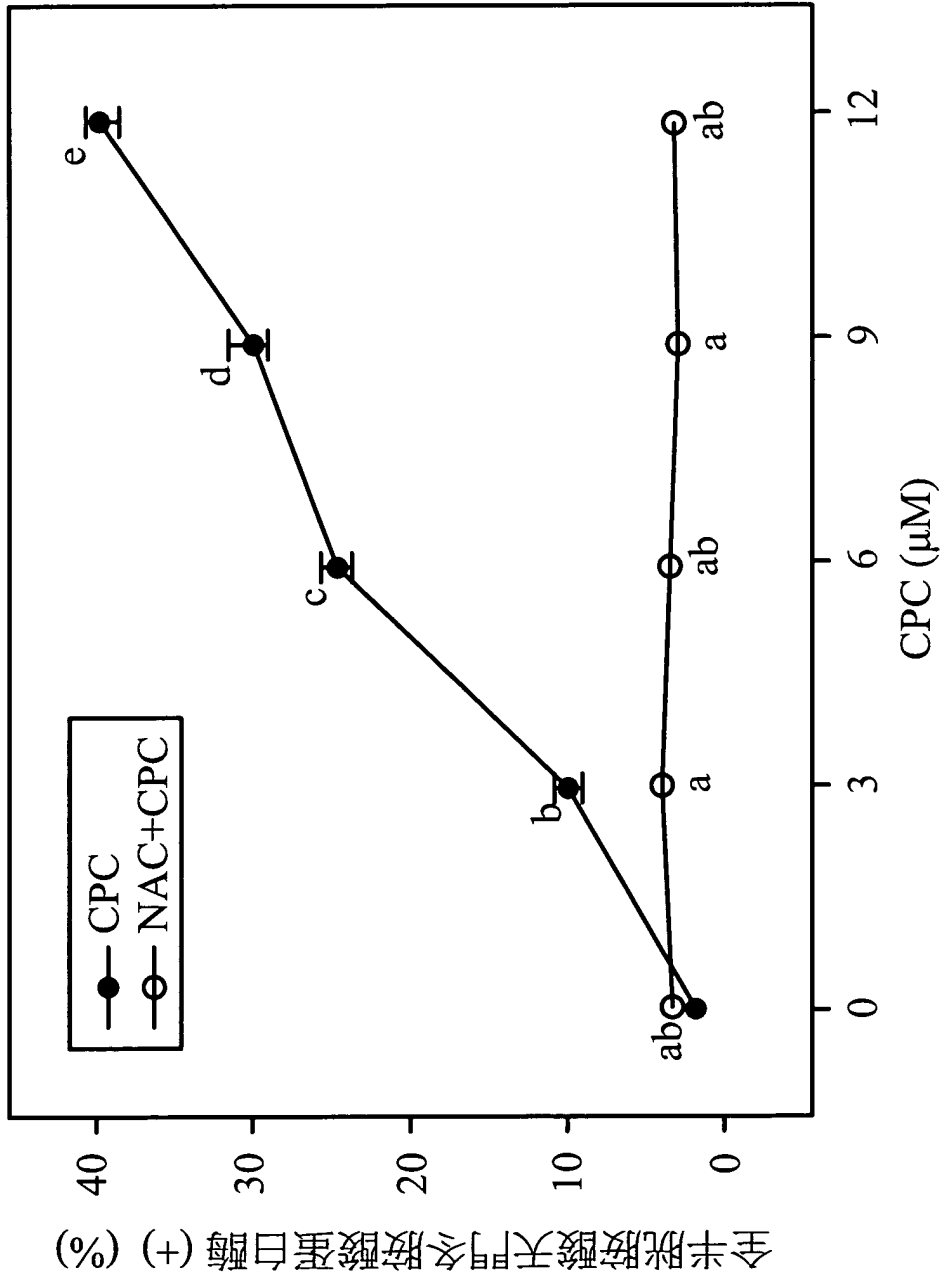


第3B圖

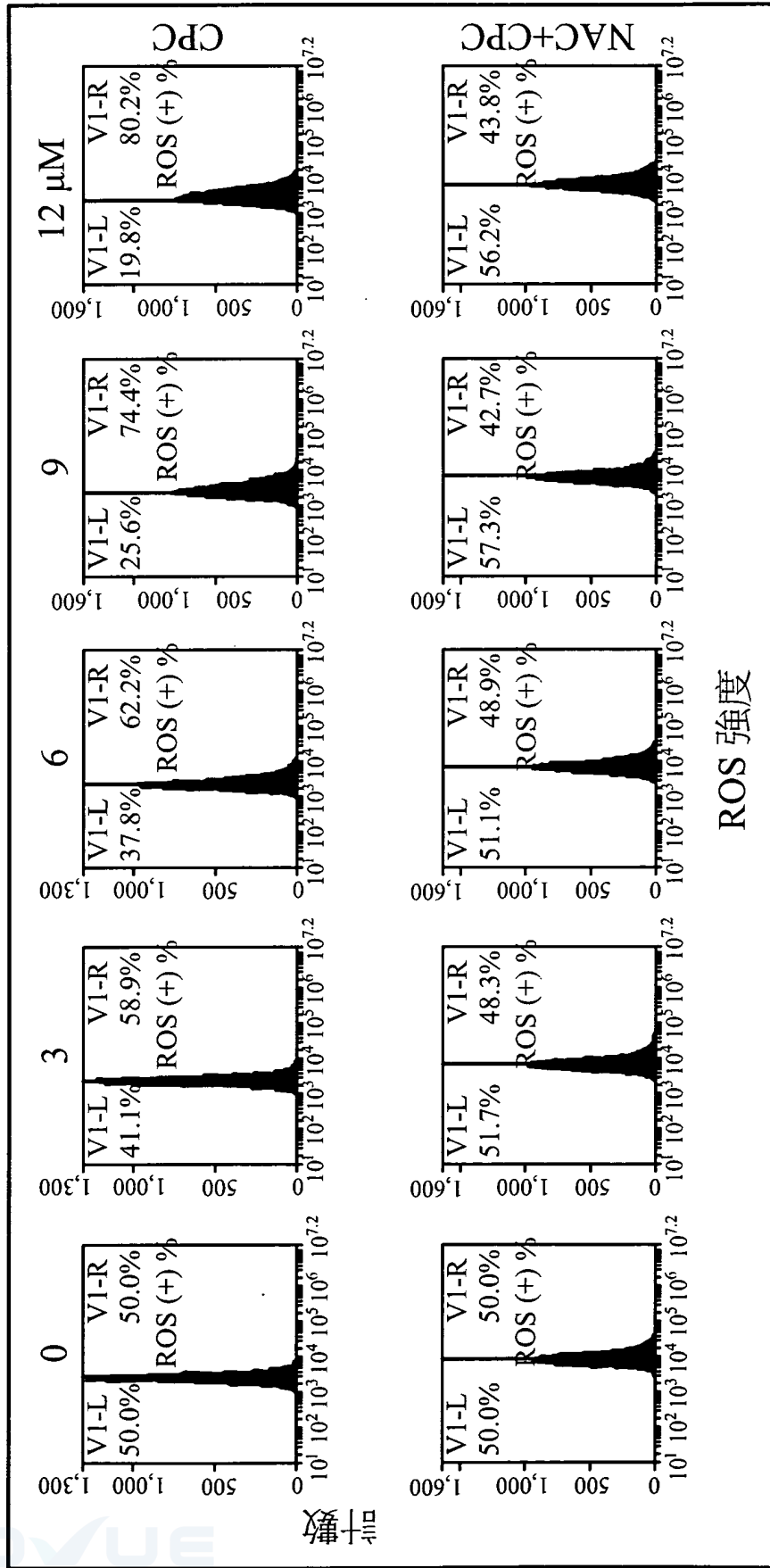


全半胱胺酸天門冬胺酸蛋白酶強度

第4A圖

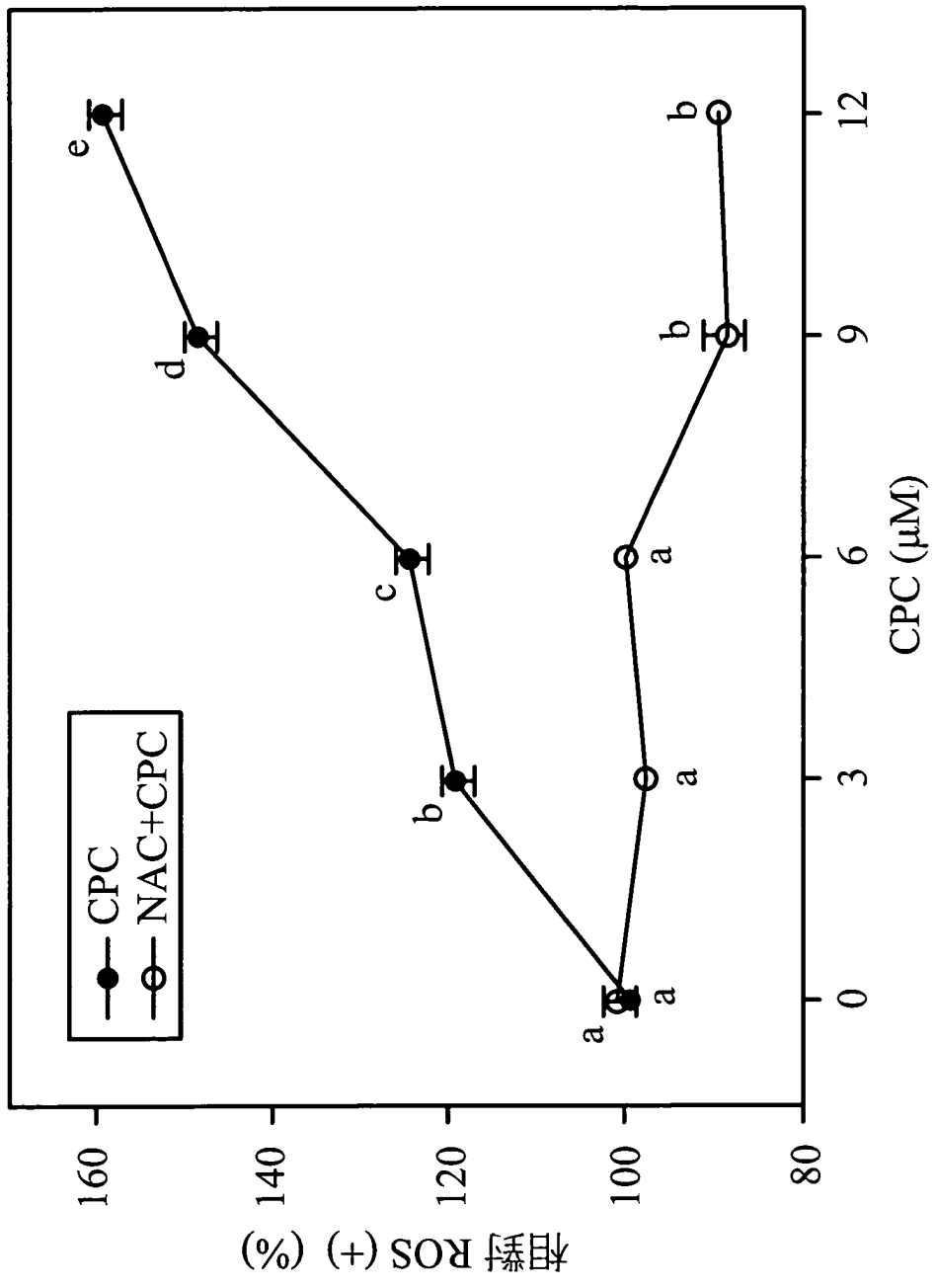


第4B圖

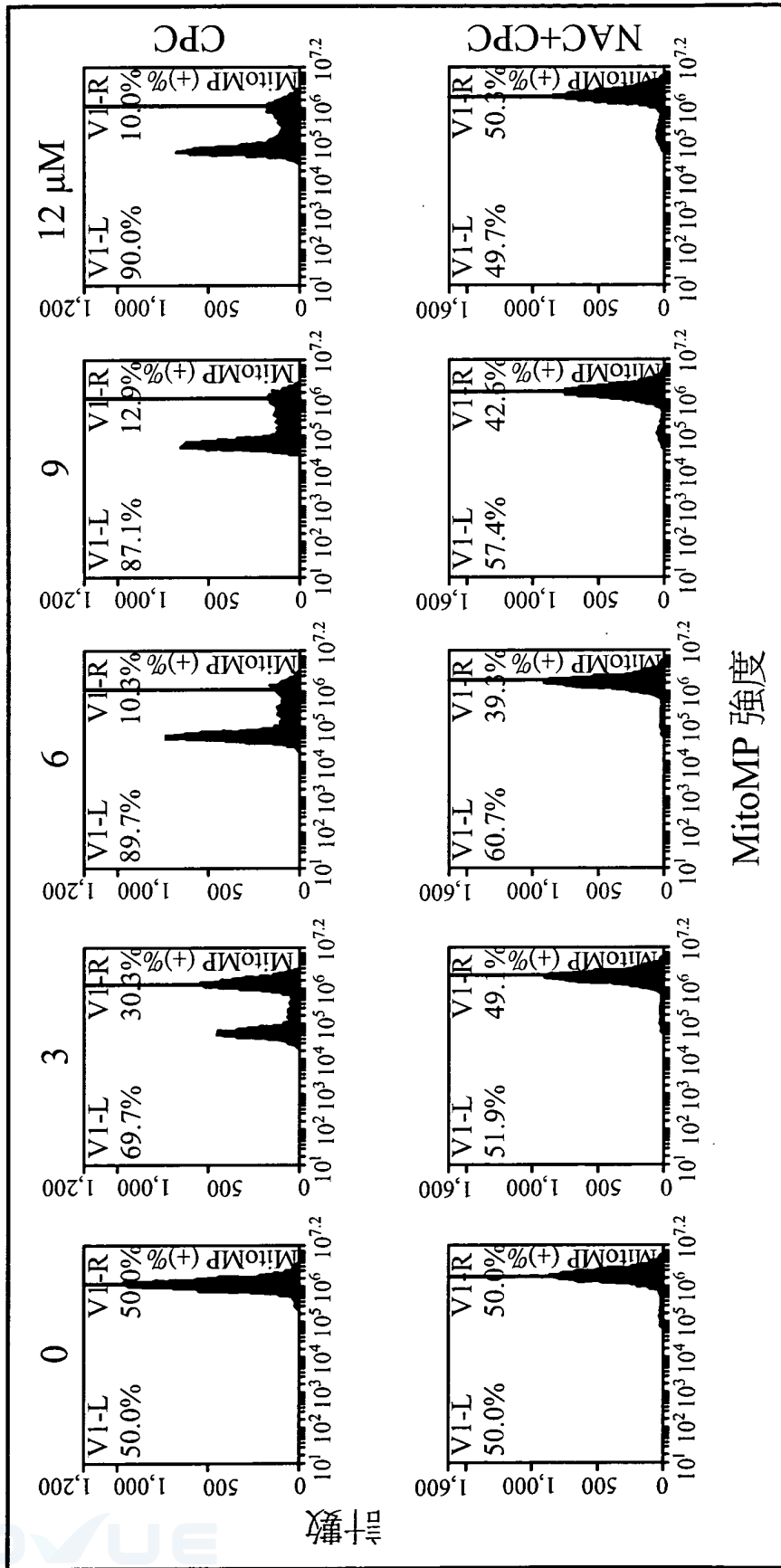


ROS 強度

第 5A 圖



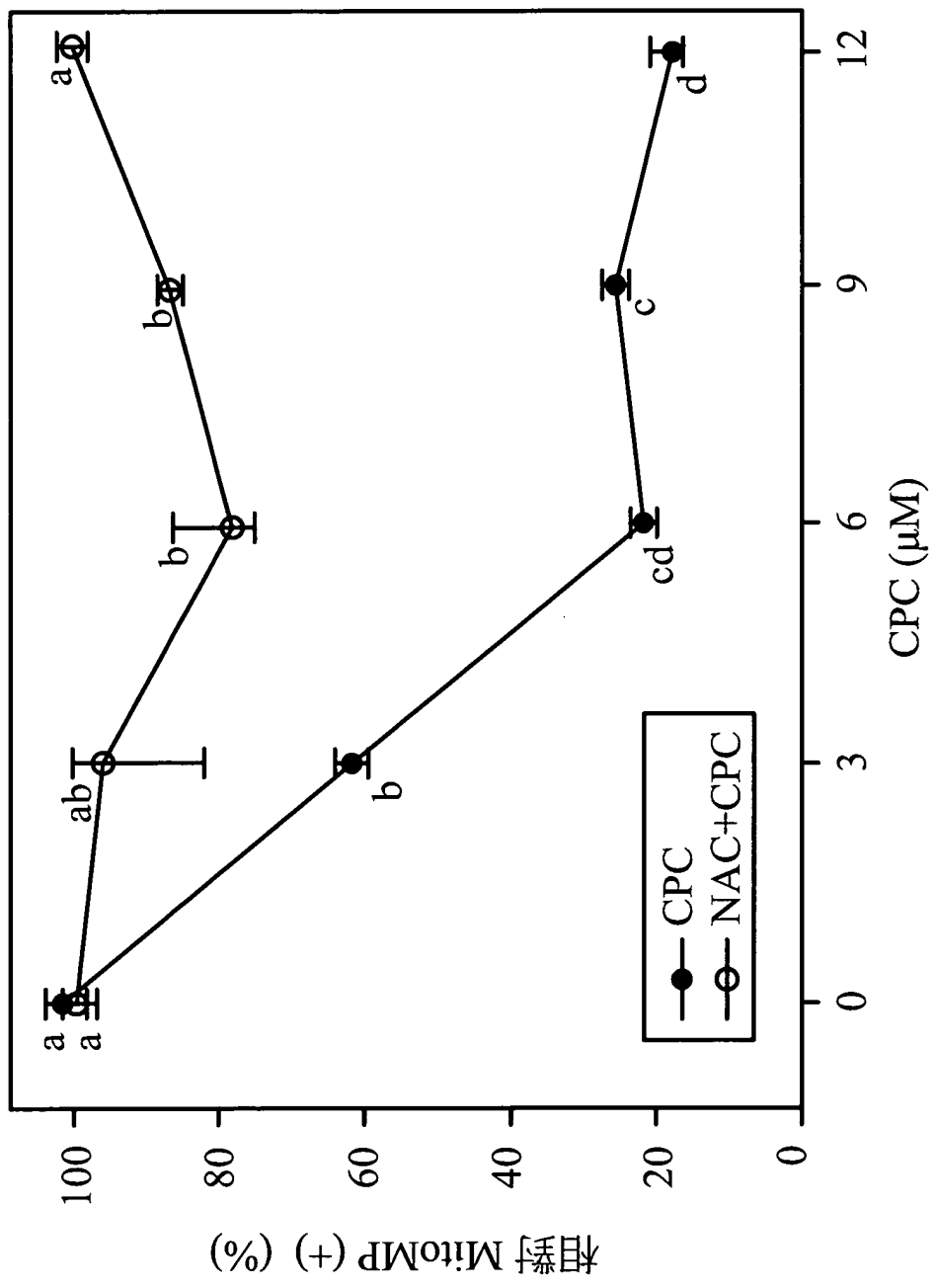
第 5B 圖



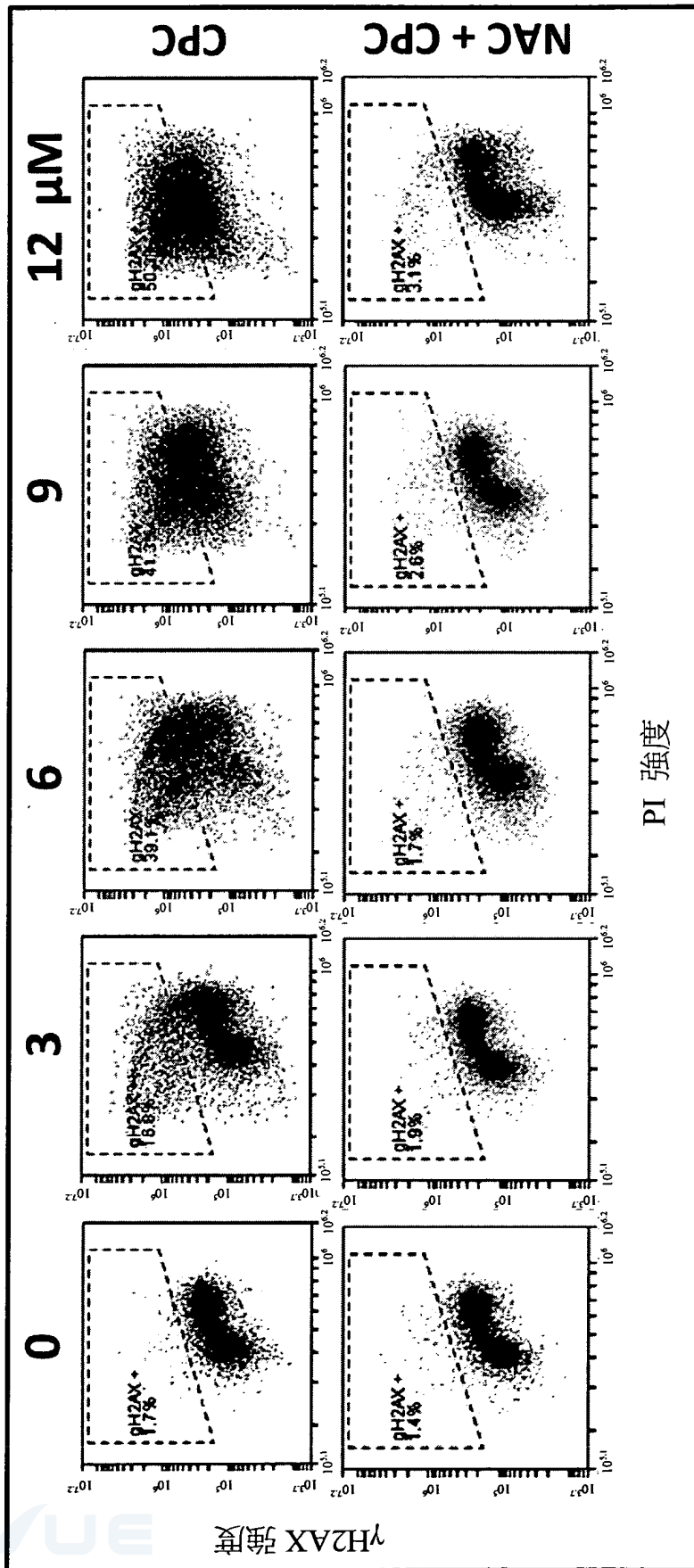
MitoMP 強度

第 6A 圖

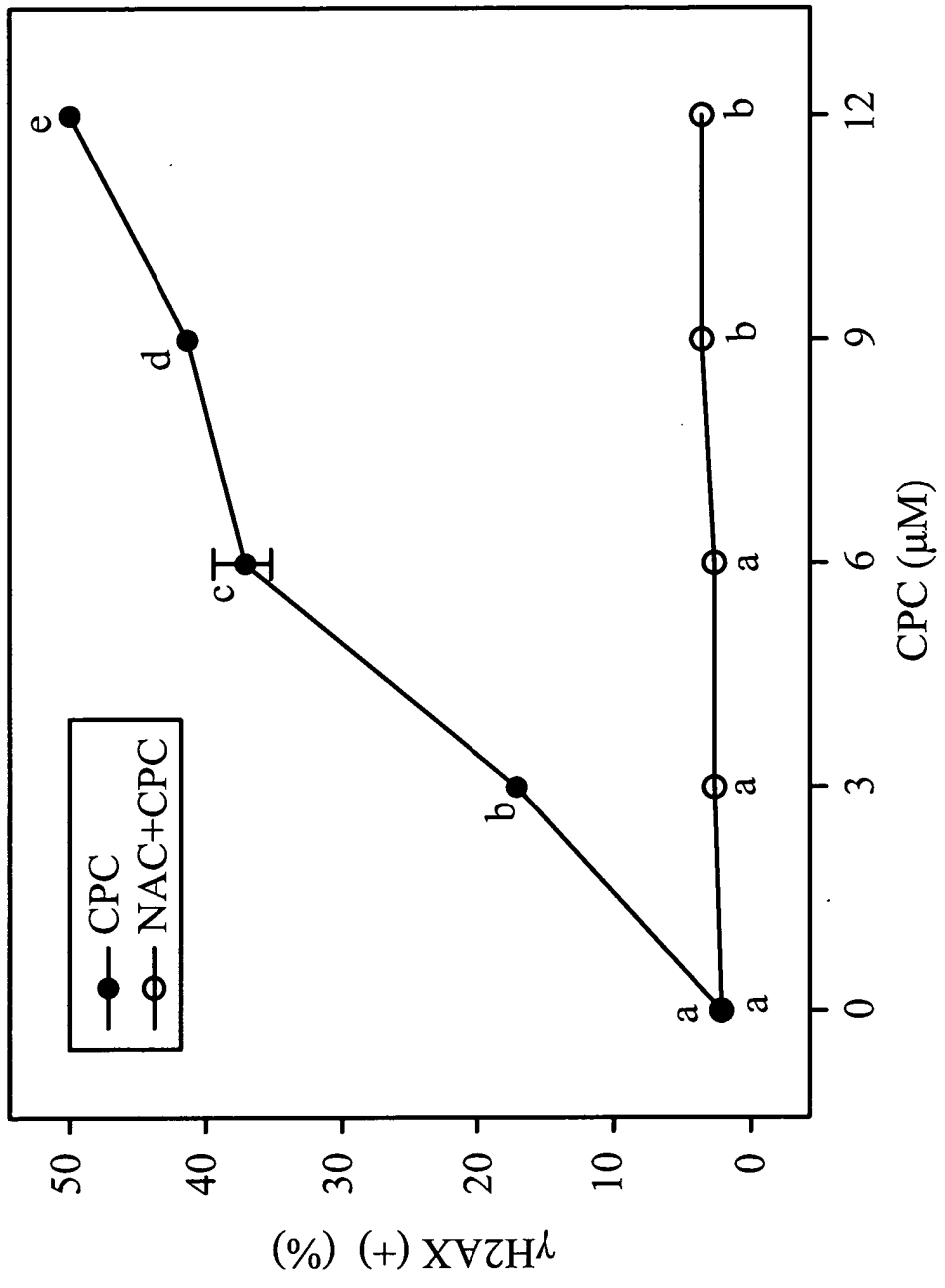




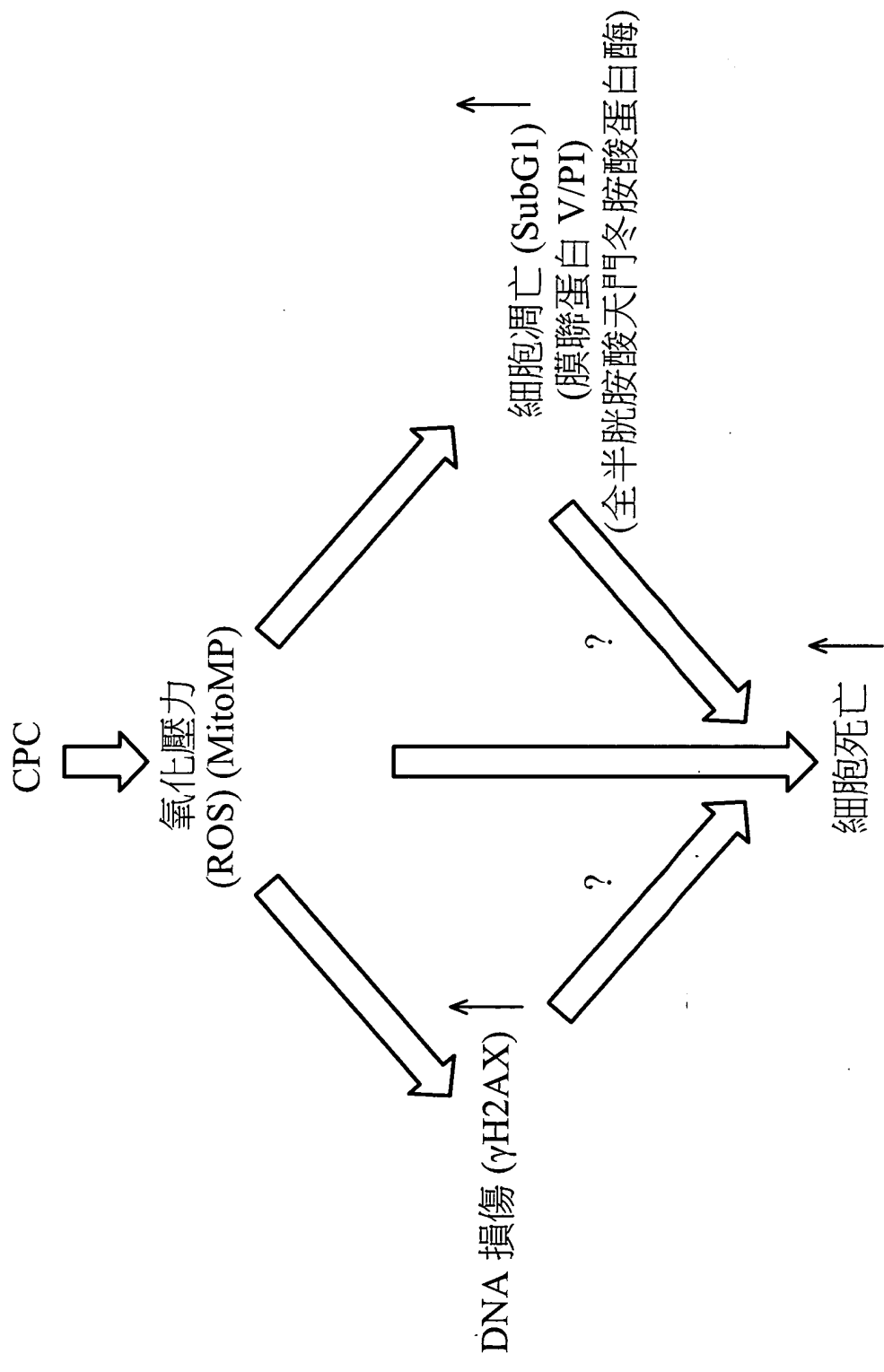
第6B圖



第 7A 圖



第 7B 圖



第 8 圖