



(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 I621433 B

(45)公告日：中華民國 107 (2018) 年 04 月 21 日

(21)申請案號：105115823

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 05 月 20 日

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

A61K36/54 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(71)申請人：高雄醫學大學(中華民國) (TW)

高雄市三民區十全一路 100 號

(72)發明人：張學偉(TW)；陳中一(TW)；許世賢(TW)；湯人仰(TW)；楊惠萍(TW)；王慧如(TW)

(74)代理人：歐奉璋

(56)參考文獻：

Rong-Jyh Lin, et al., "Cytotoxic Compounds from the Stems of *Cinnamomum tenuifolium*." *Journal of Natural Products*, Vol 72, 2009, page 1816-1824.

HERDWIANI W., et al., "A REVIEW OF CINNAMON AS A POTENT ANTICANCER DRUG." *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, Vol 9, 2016, page 8-13.

審查人員：郭奕靚

申請專利範圍項數：4 項 圖式數：7 共 20 頁

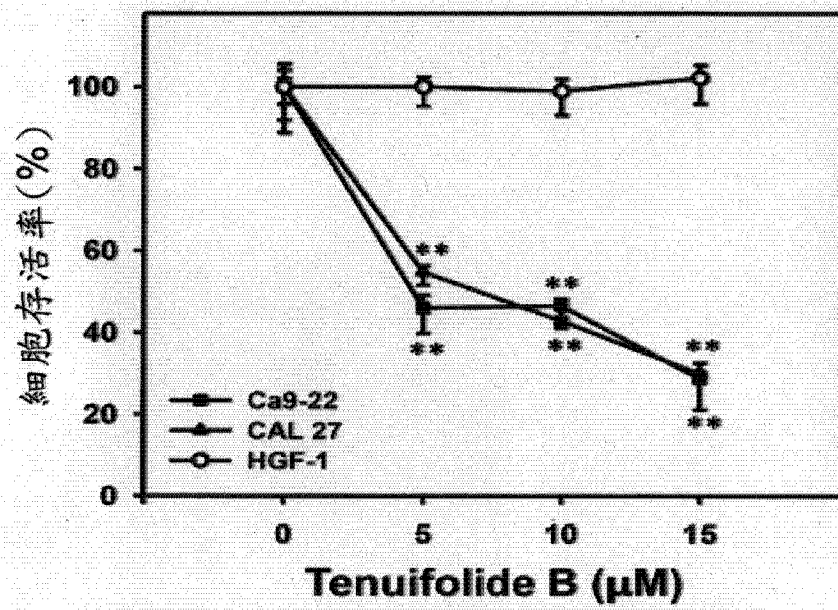
(54)名稱

Tenuifolide B 化合物於製備供選擇性殺死口腔癌細胞之醫藥組合物之用途

(57)摘要

一種 Tenuifolide B 化合物於製備供選擇性殺死口腔癌細胞之醫藥組合物之用途，係選用對癌症細胞具有選擇性殺死機制之 Tenuifolide B 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 Tenuifolide B 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 Tenuifolide B，已證實 Tenuifolide B 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 1 圖



公告本

申請日: 105/05/20

【發明摘要】

IPC分類: A61K 31/365 (2006.01)
A61K 36/54 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

【中文發明名稱】 Tenuifolide B 化合物於製備供選擇性殺死口腔癌細胞之醫藥組合物之用途

【中文】

一種Tenuifolide B化合物於製備供選擇性殺死口腔癌細胞之醫藥組合物之用途，係選用對癌症細胞具有選擇性殺死機制之Tenuifolide B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Tenuifolide B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Tenuifolide B，已證實Tenuifolide B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1圖

【代表圖之符號簡單說明】

無



公告本

申請日: 105/05/20

【發明摘要】

IPC分類: A61K 31/365 (2006.01)
A61K 36/54 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

【中文發明名稱】 Tenuifolide B 化合物於製備供選擇性殺死口腔癌細胞之醫藥組合物之用途

【中文】

一種Tenuifolide B化合物於製備供選擇性殺死口腔癌細胞之醫藥組合物之用途，係選用對癌症細胞具有選擇性殺死機制之Tenuifolide B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Tenuifolide B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Tenuifolide B，已證實Tenuifolide B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1圖

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 Tenuifolide B化合物於製備供選擇性殺死口腔癌細胞之醫藥組合物之用途

【技術領域】

本發明係有關於一種Tenuifolide B化合物於製備供選擇性殺死口腔癌細胞之醫藥組合物之用途，尤指涉及一種藉由ROS產生之天然藥物，特別係指可以提供有潛力之抗口腔癌治療者。

【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。例如，許多源於天竺桂屬（*Cinnamomum tenuifolium*）之粗萃物與相關化合物，被報導對於許多癌症細胞有抑制生長之效果，但是對口腔癌細胞方面仍然不清楚。依目前在我國與國際上含有Tenuifolide B化合物之產品觀之，其並無宣稱可以選擇性殺死口腔癌之藥物種類，可見Tenuifolide B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

以Tenuifolide B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Tenuifolide B化合物於製備供選擇性殺死口腔癌細胞之醫藥組合物之用途，用以評估Tenuifolide B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Tenuifolide B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，提供一種來自天竺桂屬（*Cinnamomum tenuifolium*）之Tenuifolide B，證實Tenuifolide B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。

為達以上之目的，本發明係一種Tenuifolide B化合物於製備供選擇性殺死口腔癌細胞之醫藥組合物之用途，其中該Tenuifolide B化合物之用途係用於製備治療口腔癌之醫藥組成物，包括提供有效量之Tenuifolide B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）。

於本發明上述實施例中，該Tenuifolide B化合物之有效量係指對處理細胞接收到之濃度介於0.1~15 μ M。

於本發明上述實施例中，該Tenuifolide B化合物係自一樟屬植物萃取而得。

於本發明上述實施例中，該樟屬植物係為一天竺桂（*Cinnamomum tenuifolium*）。

【圖式簡單說明】

第 1 圖，係本發明以Tenuifolide B對Ca9-22、CAL 27以及HGF-1之細胞存活率影響示意圖。

第 2 圖，係本發明利用Tenuifolide B處理Ca9-22細胞週期變化示意圖。

第 3 圖，係本發明利用Tenuifolide B誘導Ca9-22 細胞凋亡之程度示意圖。

第 4 圖，係本發明利用Tenuifolide B誘導Ca9-22 細胞凋亡之程度示意圖。

第 5 圖，係本發明利用DCFDA檢測Ca9-22之ROS增加程度示意圖。

第 6 圖，係本發明利用DiOC₂ (3)分析套組檢測Tenuifolide B對Ca9-22之MitoMP降低程度示意圖。

第 7 圖，係本發明利用 γ -H2AX評估Tenuifolide B對Ca9-22口腔癌細胞抗增殖造成之DNA損傷作用示意圖。

【實施方式】

本發明係一種Tenuifolide B化合物於製備供選擇性殺死口腔癌細胞之醫藥組合物之用途，至少包含一Tenuifolide B化合物，其包括對處理細胞提供濃度介於0.1~15 μ M有效劑量之Tenuifolide B以產生口腔癌細胞抑制作用，所述Tenuifolide B係取自於一樟屬植物之萃取物，且該樟屬植物係為一天竺桂（*Cinnamomum tenuifolium*）。

上述醫藥組合物中化合物Tenuifolide B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Tenuifolide B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Tenuifolide B對Ca9-22、CAL 27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、5、10及15 μ M等不同濃度之Tenuifolide B處理Ca9-22與CAL 27以及HGF-1細胞24小時之後，再使用ATP檢測Tenuifolide B對口腔癌細胞（Ca9-22與CAL 27）以及正常口腔細胞（HGF-1）之毒殺能力，亦即Ca9-22與CAL 27以及HGF-1三株細胞之存活率，其中資料平均值 \pm 標準偏差（n=4），且圖中星號表示三株細胞之間在採以相似Tenuifolide B濃度處理後之顯著差異（t檢定， $P < 0.001^{**}$ ）。

經細胞存活率（cell viability）之ATP分析結果顯示：Tenuifolide B對於兩種口腔癌細胞（Ca9-22與CAL 27）之存活率係受劑量影響而降低（ $P < 0.001$ ）。相反，正常口腔細胞（HGF-1）仍保持約100%之細胞存活率。由此可知，基於ATP分析，Tenuifolide B之增生抑制作用對Ca9-22與CAL 27口腔癌細胞有呈現劑量反應之關係，證實Tenuifolide B對於抗口腔癌係很有療效的，並且Tenuifolide B誘發口腔癌細胞（Ca9-22與CAL 27）之細胞存活率比正常口腔細胞（HGF-1）低，顯見具有可選擇性殺死癌細胞之潛力。

請參閱『第2圖』所示，係本發明利用Tenuifolide B處理Ca9-22細胞週期變化示意圖。如圖所示：本發明係利用0、5、10及15 μ M等不同濃度之Tenuifolide B處理Ca9-22細胞24小時之後，如圖中上方A部所示，使用流式細胞儀（flow cytometry）檢測Tenuifolide B處理Ca9-22

細胞之細胞週期之變化；而圖中下方B部分顯示A部分之subG1時期之定量分析結果，其資料平均值±標準偏差（n=3）。

經流式細胞儀分析結果顯示：在Tenuifolide B處理Ca9-22細胞中subG1時期之族群受劑量影響之方式於Tenuifolide B處理24小時後增加（ $P < 0.001$ ），證實Tenuifolide B誘發口腔癌Ca9-22細胞中subG1時期之族群增加。

請參閱『第3圖』所示，係本發明利用Tenuifolide B誘導Ca9-22細胞凋亡之程度示意圖。如圖所示：本發明利用annexin V/PI兩種染劑去偵測Tenuifolide B是否會造成口腔癌Ca9-22細胞進行細胞凋亡（apoptosis）。圖中上方A部分表示將Tenuifolide B以不同濃度（0、5、10及15 μM ）處理Ca9-22細胞24小時後，再雙染annexin V/PI，接著使用流式細胞儀檢測以Tenuifolide B處理Ca9-22細胞之細胞凋亡程度；圖中下方B部分表示annexin V (+)之區域包括annexin V (+)/PI (+)及annexin V (+)/PI (-)之分析，其資料平均值±標準偏差（n=3）。

經細胞凋亡之流式細胞儀分析結果顯示：細胞凋亡之定量分析主要為陽性反應(%)。通過計算annexin V陽性百分比，細胞凋亡水平（第3圖B部分）顯示Tenuifolide B處理Ca9-22細胞係以劑量關係方式顯著增加（ $P < 0.001$ ）。因此，證實subG1族群增加顯示Tenuifolide B處理Ca9-22細胞會誘導細胞凋亡之作用。

請參閱『第4圖』所示，係本發明利用Tenuifolide B誘導Ca9-22細胞凋亡之程度示意圖。如圖所示：本發明利用pancaspase分析Tenuifolide B是否會造成口腔癌Ca9-22細胞進行細胞凋亡。將Tenuifolide B以不同濃度（0、5、10及15 μM ）處理Ca9-22細胞24小時，且隨後以TF2-VAD-FMK染色。圖中上方A部分表示使用流式細胞儀基於

pancaspase染色分析Tenuifolide B處理Ca9-22細胞之細胞凋亡程度；圖中下方B部分表示pancaspase螢光強度之定量分析主要為陽性反應(%)，其資料平均值±標準偏差 (n=3)。

經細胞凋亡之流式細胞儀分析結果顯示：Tenuifolide B處理Ca9-22細胞之pancaspase強度分佈為陽性反應(%)，且以高劑量之Tenuifolide B處理Ca9-22細胞具有明顯增加 (P<0.001) 細胞凋亡之陽性反應。因此，使用pancaspase活性測定證實annexin V強度增加顯示Tenuifolide B處理Ca9-22細胞會誘導細胞凋亡之作用。

請參閱『第5圖』所示，係本發明利用DCFDA檢測Ca9-22之ROS增加程度示意圖。如圖所示：為了證實Tenuifolide B能夠誘發口腔癌Ca9-22細胞內之活性氧化物 (Reactive Oxygen Species, ROS) 增加，本發明使用DCFDA染劑檢測Ca9-22細胞內之ROS含量。主要係將Tenuifolide B以不同濃度 (0、5、10及15 μ M) 處理Ca9-22細胞24小時後。圖中上方A部分表示使用流式細胞儀分析以Tenuifolide B處理Ca9-22細胞內之ROS含量；圖中下方B部分表示ROS強度之定量分析主要在DCFDA陽性反應(%)，其資料平均值±標準偏差 (n=3)。

經檢測結果顯示：通過計算Ca9-22細胞之DCFH-DA陽性螢光強度之百分比並以對照組調整，Ca9-22之ROS含量係隨著Tenuifolide B之處理劑量增高而增加 (P<0.001)，證實Tenuifolide B會誘導癌細胞內之ROS產生，因此Tenuifolide B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。

請參閱『第6圖』所示，係本發明利用DiOC₂ (3)分析套組檢測Tenuifolide B對Ca9-22之MitoMP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偵測Tenuifolide B對口腔癌Ca9-22細胞之粒線體膜電位 (MitoMP) 降低程度。主要係將Tenuifolide B以不同濃度(0、5、10及15 μ M)處理Ca9-22細胞24小時後，使用DiOC₂(3)分析套組檢測MitoMP變化。圖中上方A部分表示使用流式細胞儀分析以Tenuifolide B處理Ca9-22細胞之MitoMP變化；圖中下方B部分表示MitoMP強度之定量分析主要為陰性反應(%)，其資料平均值 \pm 標準偏差 (n=3)。

經檢測結果顯示：通過計算圖中A部分DiOC₂(3)陰性(%)反應之百分比並以對照組調整，所述MitoMP陰性反應(%)逐漸在Tenuifolide B處理Ca9-22細胞呈劑量關係方式增強 (P <0.001)。因此，MitoMP水平在Tenuifolide B處理後顯著減少，證明Tenuifolide B會誘導Ca9-22之粒線體膜受損。

請參閱『第7圖』所示，係本發明利用 γ -H2AX評估Tenuifolide B對Ca9-22口腔癌細胞抗增殖造成之DNA損傷作用示意圖。如圖所示：由於 γ -H2AX含量在DNA雙股斷裂時會大量表現，所以本發明使用流式細胞儀與西方墨點法檢測 γ -H2AX含量來評估Tenuifolide B對口腔癌Ca9-22細胞造成之DNA雙股斷裂程度。主要係將Tenuifolide B以不同濃度(0、5、10及15 μ M)處理Ca9-22細胞24小時後，圖中左側A部分表示使用流式細胞儀檢測 γ H2AX含量；圖中右側B部分表示流式細胞儀檢測 γ -H2AX強度之定量分析主要為陽性反應(%)；圖中下方C部分更進一步利用西方墨點法檢測 γ -H2AX含量。其中 β -肌動蛋白被用作內部對照組。實驗一式三份進行。

由流式細胞測量術檢測Ca9-22細胞在Tenuifolide B誘導下之 γ -H2AX/PI染色結果顯示：Tenuifolide B以不同濃度處理Ca9-22細胞之

γ -H2AX陽性反應強度係以劑量關係方式增加 ($P < 0.001$)。此外，以西方墨點法檢測Ca9-22細胞在Tenuifolide B處理過24小時後，細胞內 γ -H2AX大量增加代表DNA有產生雙股斷裂，並且隨著Tenuifolide B濃度增高而增加。此實驗證實了DNA雙股斷裂參與其中，Tenuifolide B會誘導DNA受損。

由上述各實驗結果可知，利用ATP（偵測細胞內 ATP 含量，作為細胞存活率或生長速率指標）分析，發現Tenuifolide B對於兩種口腔癌細胞（Ca9-22與CAL 27）可以呈劑量關係地抑制癌細胞生長，即 IC_{50} 值在24hr時，分別為1.93及2.41 μ M，但較不傷害正常口腔細胞（HGF-1）。利用流式細胞儀分析subG1之累積、annexin V之染色與pancaspase分析，均發現Tenuifolide B可以劑量性地誘發口腔癌細胞（Ca9-22）之細胞凋亡。同時，Tenuifolide B也誘發ROS產生與粒線體去極化。利用流式細胞儀以及西方墨點法分析 γ H2AX也發現Tenuifolide B也可以誘發DNA傷害。這些Tenuifolide B誘發之細胞反應如細胞存活率、細胞凋亡、氧化壓力、粒線體膜電位改變與DNA傷害。顯示氧化壓力對於Tenuifolide B誘發口腔癌細胞之死亡，扮演重要角色。

這些發現讓本發明對於Tenuifolide B之選擇性殺死機制明瞭，證實Tenuifolide B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，來自樟屬植物（*Cinnamomum tenuifolium*）之Tenuifolide B為首選來源。其特色包含如下所述：

(1)時間：Tenuifolide B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Tenuifolide B之植物材料成本低廉，利用商業化可以提高產能。

(3)安全：Tenuifolide B具有選擇性殺死口腔癌之特性，同時減少傷害正常細胞較無安全顧慮，有助於商品販售之區隔。

(4)品質管制：Tenuifolide B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：許多天竺桂屬之植物活性成分中，本發明Tenuifolide B係第一個宣稱可以選擇性殺死口腔癌。

(6)潛力：Tenuifolide B之單獨使用將可以減少副作用，節省醫療與藥物資源，可大為節省成本，增加價格競爭空間；Tenuifolide B亦具有搭配不同的試劑或處理之潛力，可以增加產值。

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，提高商業化之產值，進一步擴大產品機能。綜合上述效益，可提供業者市場較強之競爭性。

綜上所述，本發明係一種Tenuifolide B化合物於製備供選擇性殺死口腔癌細胞之醫藥組合物之用途，可有效改善習用之種種缺點，經由實驗萃取出之Tenuifolide B化合物，已證實Tenuifolide B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。

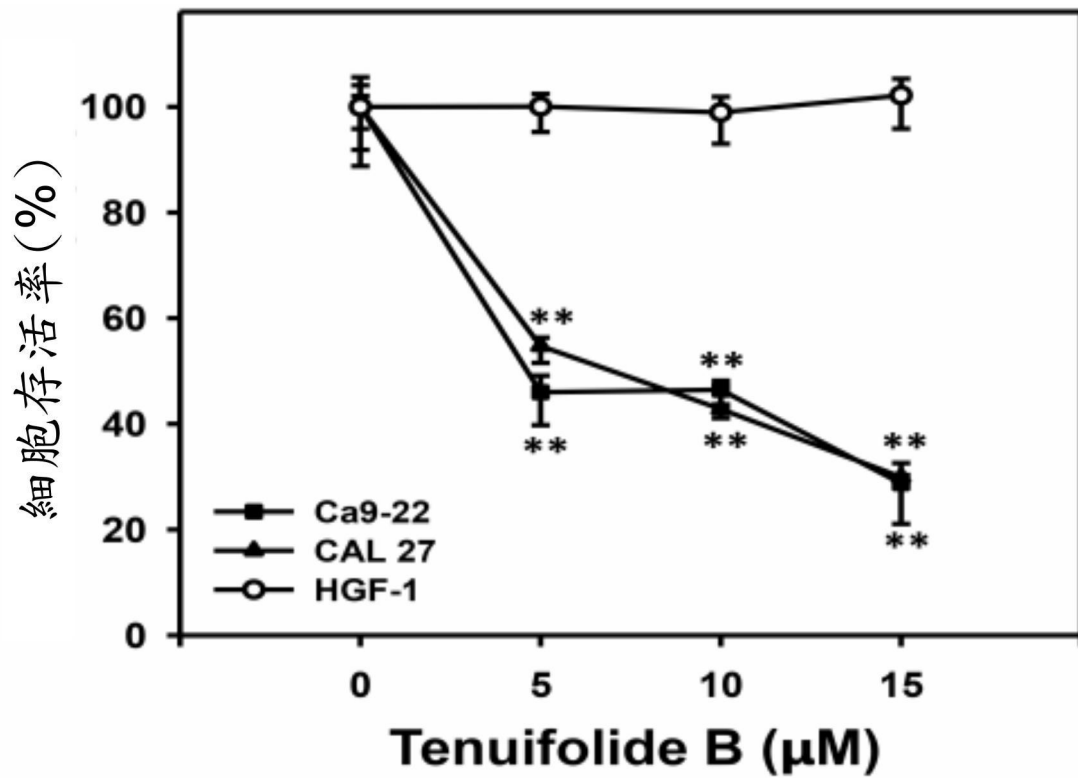
【符號說明】

無

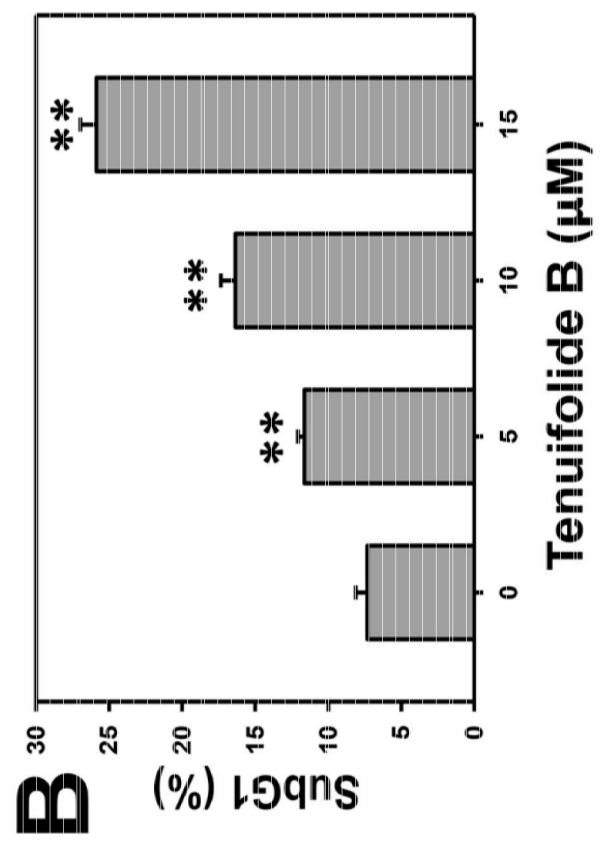
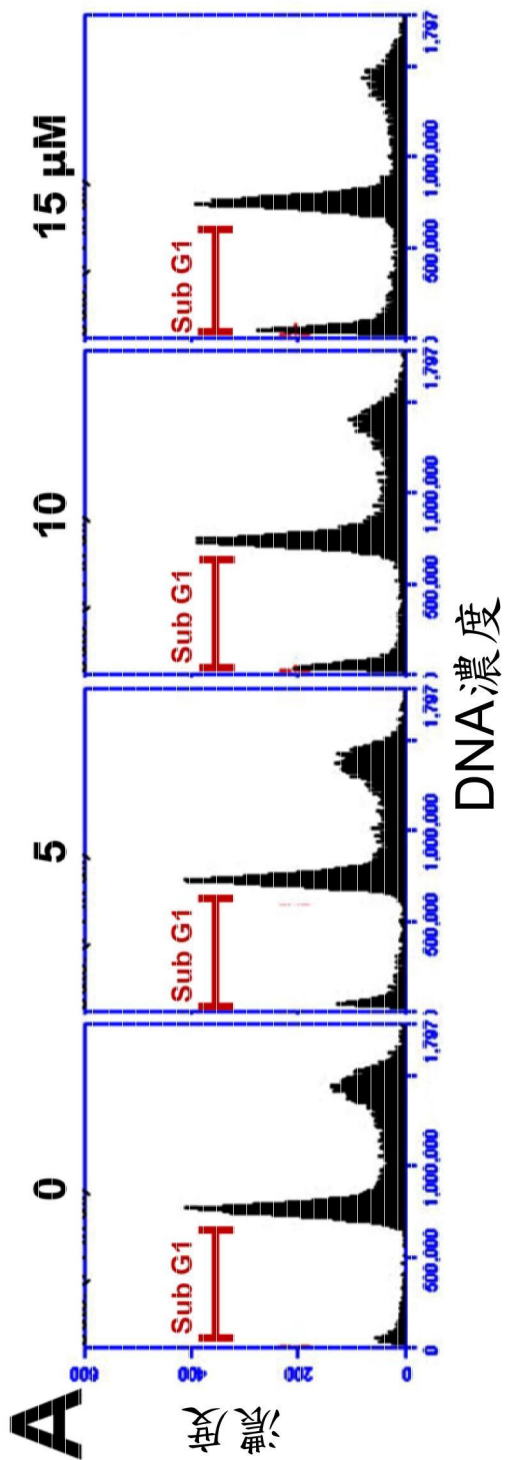
【發明申請專利範圍】

- 【第1項】 一種Tenuifolide B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Tenuifolide B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Tenuifolide B化合物之用途，其中，該Tenuifolide B化合物之有效量係指對處理細胞接收到之濃度介於0.1~15 μ M。
- 【第3項】 依申請專利範圍第1項所述之Tenuifolide B化合物之用途，其中，該Tenuifolide B化合物係自一樟屬植物萃取而得。
- 【第4項】 依申請專利範圍第3項所述之Tenuifolide B化合物之用途，其中，該樟屬植物係為一天竺桂（*Cinnamomum tenuifolium*）。

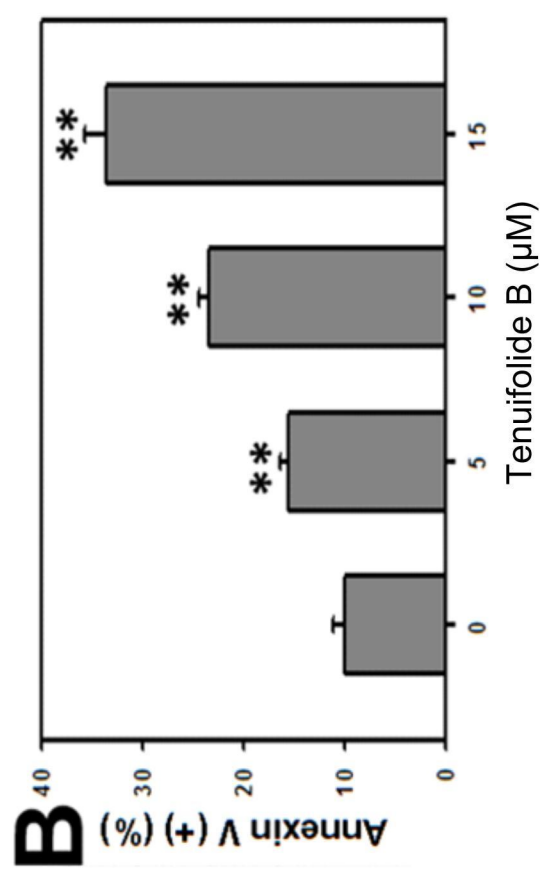
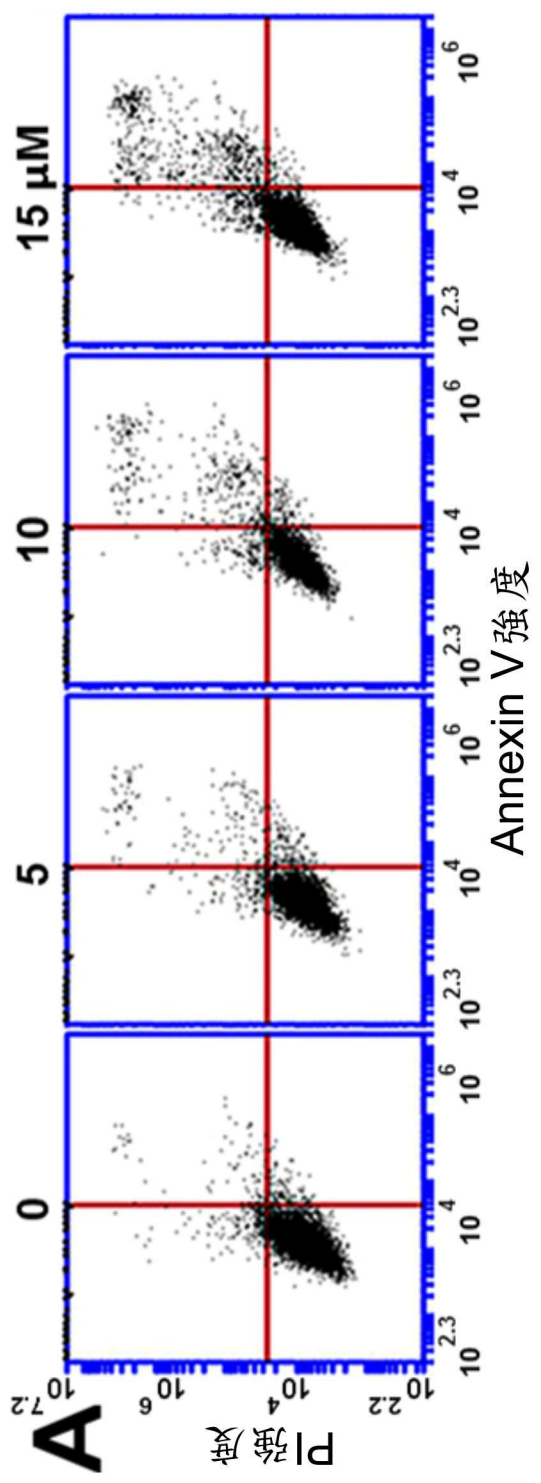
【發明圖式】



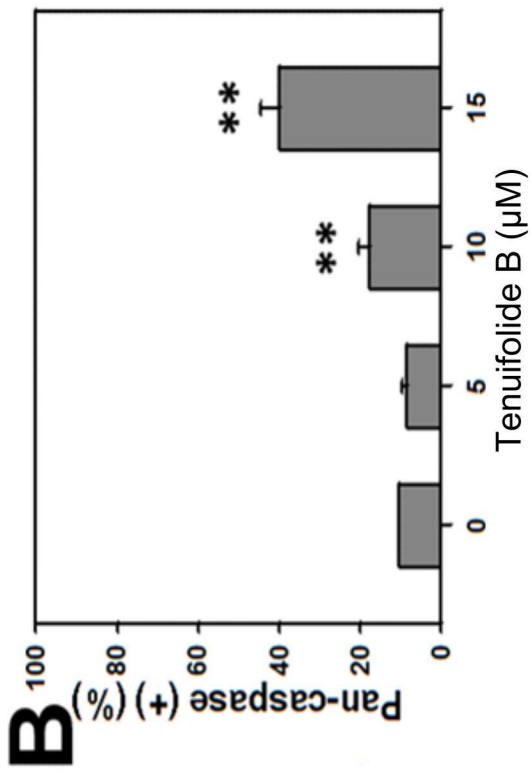
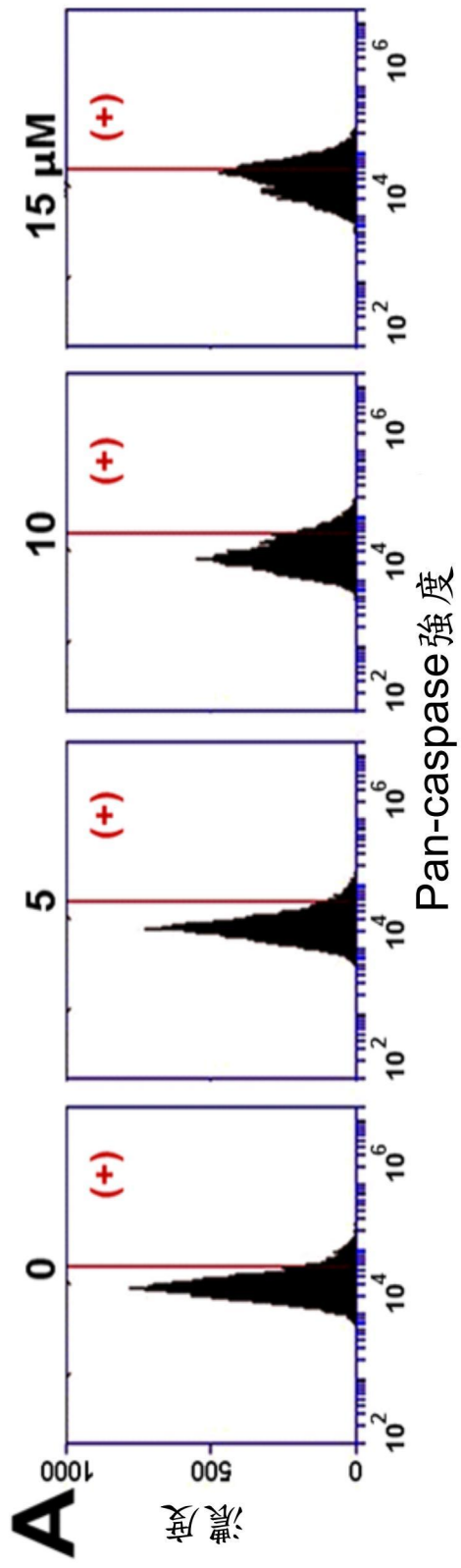
第 1 圖



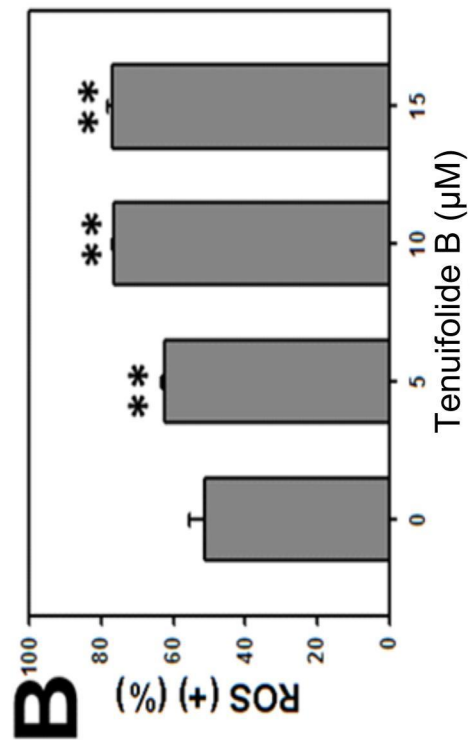
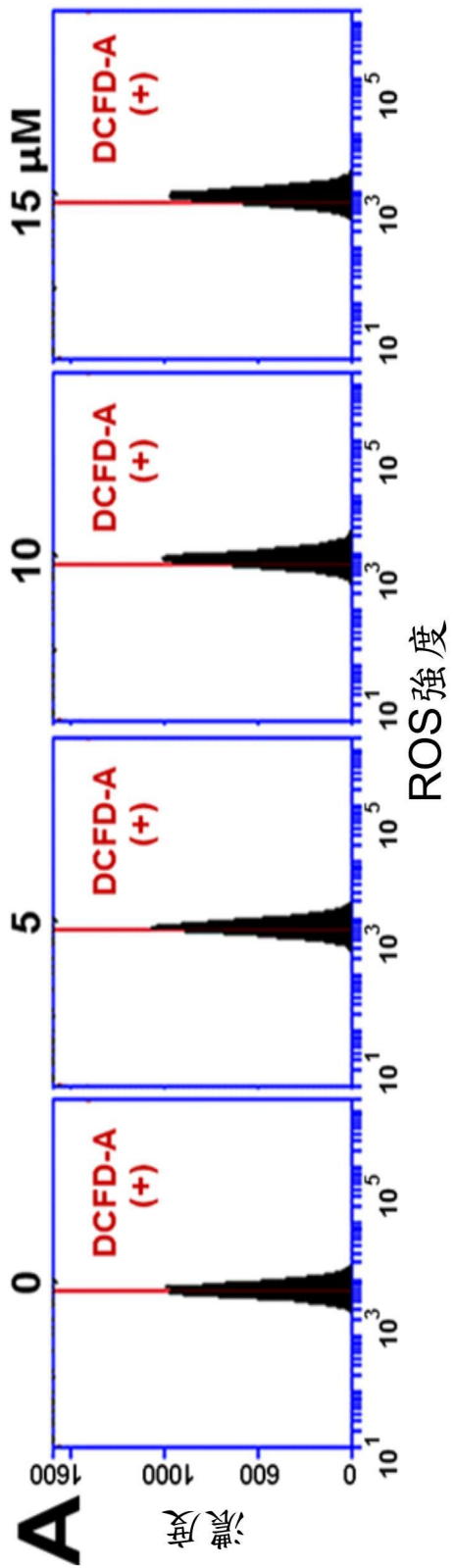
第 2 圖



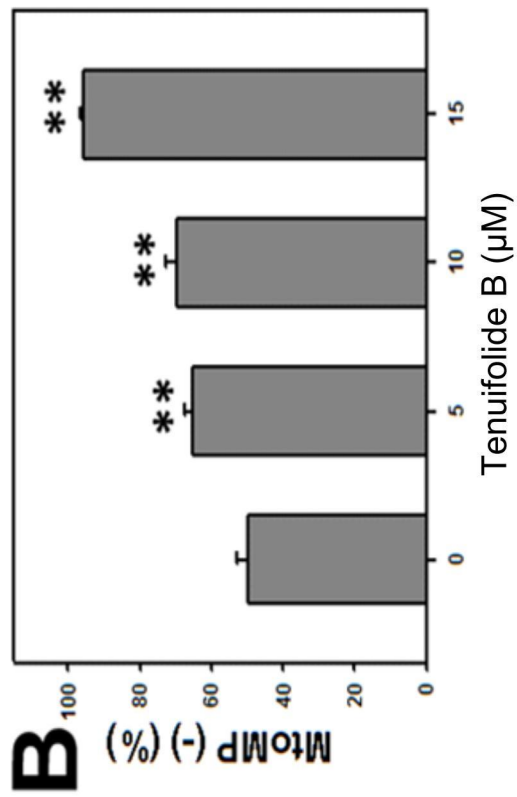
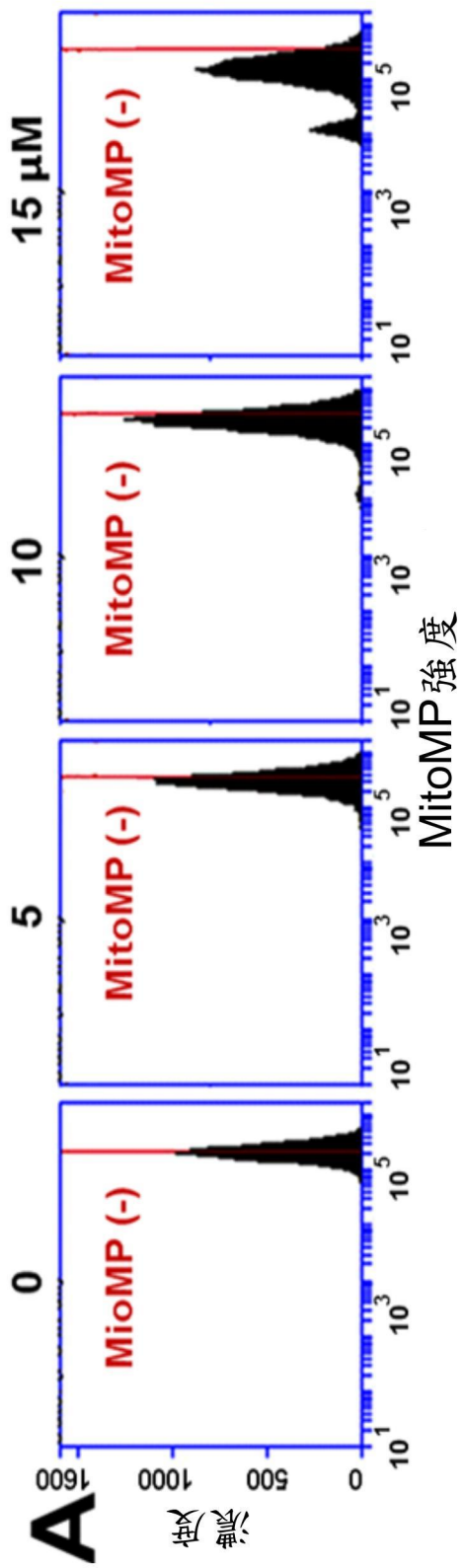
第 3 圖



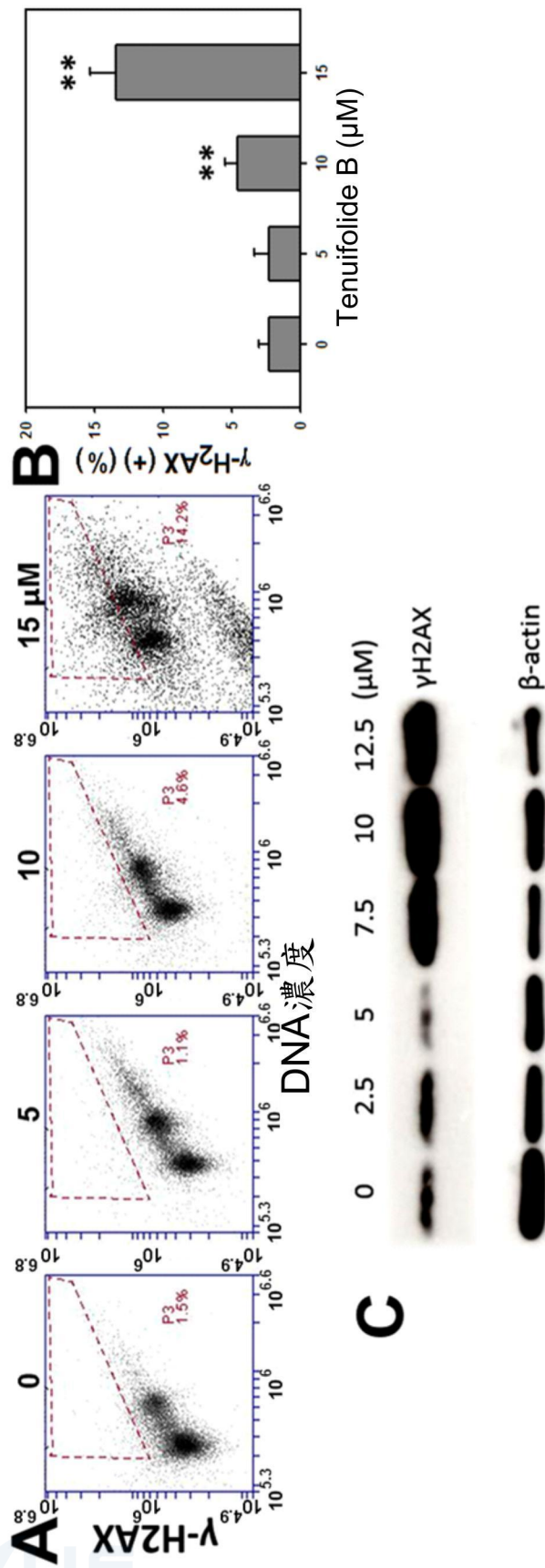
第4圖



第5圖



第6圖



第7圖