



(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 I694990 B

(45)公告日：中華民國 109 (2020) 年 06 月 01 日

(21)申請案號：108111104

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 03 月 29 日

(51)Int. Cl. : C07D311/22 (2006.01)

A61K31/352 (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)；張夢揚 CHANG, MENG-YANG (TW)；湯人仰 TANG, JEN-YANG (TW)；吳長益 WU, CHANG-YI (TW)；徐志文 SHU, CHIH-WEN (TW)；王聖傑 WANG, SHENG-CHIEH (TW)

(74)代理人：洪澄文

(56)參考文獻：

Chang, Meng-Yang et al., Temperature-Controlled Desulfonylative Condensation of α -Sulfonyl o-Hydroxyacetophenones and 2-Formyl Azaarenes: Synthesis of Azaaryl Aurones and Flavones, Journal of Organic Chemistry, vol.84, 20190111, pp.326-337

Chang, Meng-Yang et al., Stereocontrolled Synthesis of 3-Sulfonyl Chroman-4-ols, Journal of Organic Chemistry, vol.83, 20180615, pp. 6798-6804

審查人員：蔡明秀

申請專利範圍項數：9 項 圖式數：10 共 49 頁

(54)名稱

含新穎化合物之選擇性殺死口腔癌細胞之醫藥組合物及此化合物之用途

(57)摘要

本案提供一種新穎磺醯基苯并呋喃-4-酮化合物，以及含有此化合物之用於選擇性殺死口腔癌細胞之醫藥組合物，此醫藥組合物包括：一磺醯基苯并呋喃-4-酮化合物為活性成分；以及一藥學上可接受的載體或鹽類，化合物為 2-萘基-1-基甲基-3-(甲苯-4-磺醯基)苯并呋喃-4-酮，且其具有選擇性殺死該口腔癌細胞之功效。本案另提供一種磺醯基苯并呋喃-4-酮化合物用於製備選擇性殺死一口腔癌細胞之藥物的用途以及一種磺醯基苯并呋喃-4-酮化合物用於製備以氧化壓力為媒介之一癌症治療藥物的用途。

A novel sulfonyl chromen-4-ones compound and a pharmaceutical composition having the compound for selectively killing oral cancer cells are provided. The pharmaceutical composition includes a sulfonyl chromen-4-ones as an active ingredient and a pharmaceutically acceptable carrier or salt. The compound is 2-naphthalen-1-ylmethyl-3-(toluene-4-sulfonyl)chromen-4-one and has an effect of selectively killing the oral cancer cells. A use of a sulfonyl chromen-4-ones compound for manufacturing a medicament to selectively killing oral cancer cells and a use of a sulfonyl chromen-4-ones compound for manufacturing a cancer treatment medicament mediated by oxidative stress are also provided.

指定代表圖：

符號簡單說明：
無。

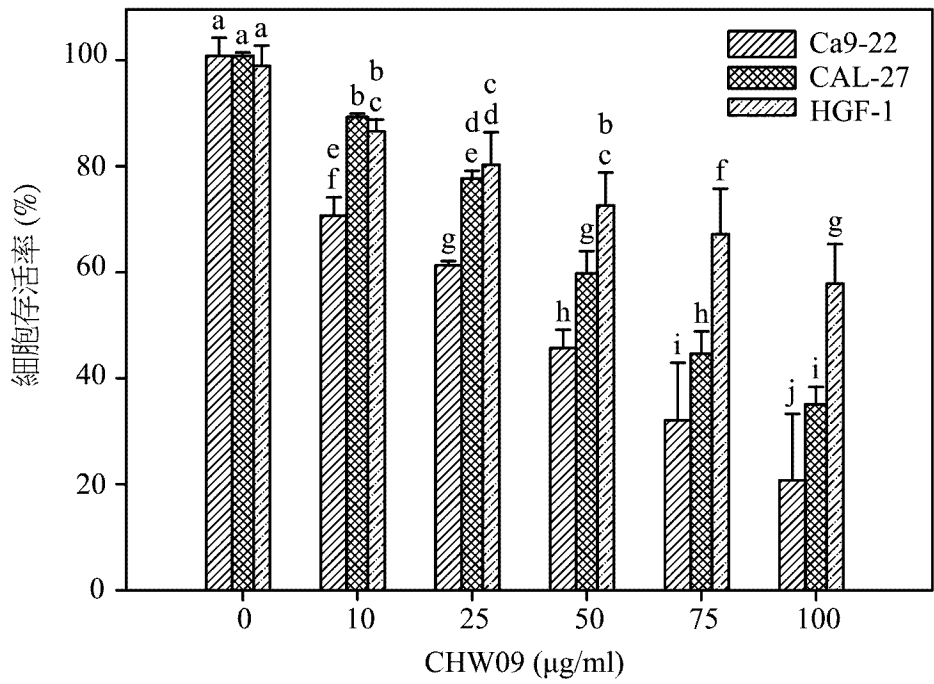
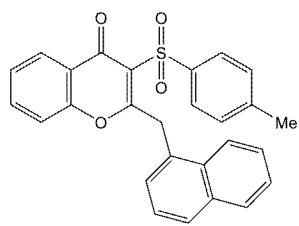


圖 1

特徵化學式：





I694990

【發明摘要】

【中文發明名稱】含新穎化合物之選擇性殺死口腔癌細胞之醫藥組合物及此化合物之用途

【英文發明名稱】PHARMACEUTICAL COMPOSITION

CONTAINING A NOVEL COMPOUND FOR SELECTIVELY
KILLING ORAL CANCER CELLS AND USE OF THE
COMPOUND THEREOF

【中文】

本案提供一種新穎磺醯基苯并哌喃-4-酮化合物，以及含有此化合物之用於選擇性殺死口腔癌細胞之醫藥組合物，此醫藥組合物包括：一磺醯基苯并哌喃-4-酮化合物為活性成分；以及一藥學上可接受的載體或鹽類，化合物為2-萘基-1-基甲基-3-(甲苯-4-磺醯基) 苯并哌喃-4-酮，且其具有選擇性殺死該口腔癌細胞之功效。本案另提供一種磺醯基苯并哌喃-4-酮化合物用於製備選擇性殺死一口腔癌細胞之藥物的用途以及一種磺醯基苯并哌喃-4-酮化合物用於製備以氧化壓力為媒介之一癌症治療藥物的用途。

【英文】

A novel sulfonyl chromen-4-ones compound and a pharmaceutical composition having the compound for selectively killing oral cancer cells are provided. The pharmaceutical composition includes a sulfonyl

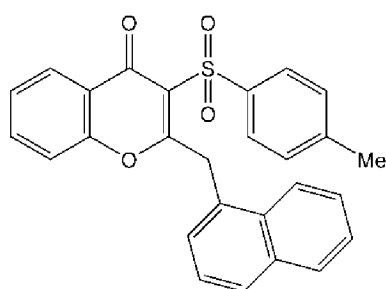
chromen-4-ones as an active ingredient and a pharmaceutically acceptable carrier or salt. The compound is

2-naphthalen-1-ylmethyl-3-(toluene-4-sulfonyl)chromen-4-one and has an effect of selectively killing the oral cancer cells. A use of a sulfonyl chromen-4-ones compound for manufacturing a medicament to selectively killing oral cancer cells and a use of a sulfonyl chromen-4-ones compound for manufacturing a cancer treatment medicament mediated by oxidative stress are also provided.

【指定代表圖】 圖 1

【代表圖之符號簡單說明】 無。

【特徵化學式】



【發明說明書】

【中文發明名稱】含新穎化合物之選擇性殺死口腔癌細胞之醫藥組合物及此化合物之用途

【英文發明名稱】PHARMACEUTICAL COMPOSITION
CONTAINING A NOVEL COMPOUND FOR SELECTIVELY
KILLING ORAL CANCER CELLS AND USE OF THE
COMPOUND THEREOF

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種新穎化合物，且特別關於一種含此化合物為活性成分之選擇性殺死口腔癌之醫藥組成物及此化合物醫藥用途。

【先前技術】

【0002】 癌症已經成為國人十大死因之首，癌症的治療或式控制其生長日漸重要。癌細胞是由正常細胞惡性化所造成的，因此仍保留正常細胞的一些代謝特性。近年來，雖然已有許多抗癌藥物被報導，然而，由於癌細胞與正常細胞具有種程度的相似性，因此抗癌藥物除了殺死癌細胞之外，也對正常細胞造成損傷。尋找能夠選擇性殺死癌症細胞的藥物成為重要的課題。

【0003】 功能性色酮(chromones)是天然氧化的雜環(oxygenated heterocycles)的主要組成之一。已有報導指出色酮

具有抗發炎及抗癌功能。例如，2-styrylchromone的同功異構物顯示對於K562淋巴癌細胞、HCT-15大腸癌細胞、A549肺癌細胞及KB表皮樣癌細胞具有抗癌效果。此外，有些功能性色酮顯示對於A549肺癌細胞具有誘導細胞凋亡(apoptosis)的功能。

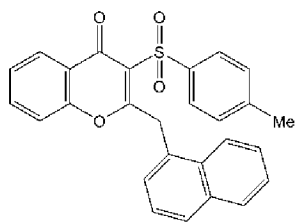
【0004】 色酮是進行結構修飾的良好化合物，能夠合成多種具有藥學上的活性的分子。由於能夠合成多樣性的結構，因此色酮被認為是藥物學的前導化合物。

【0005】 然而，在色酮家族中，具有雜原子-共軛基團(例如胺基、鹵化物、硫化物)骨架的分子相對稀少，特別是具有磺醯基(sulfonyl)取代基的色酮。然而，磺醯化合物有價值的生物活性，是製藥領域中的重要地取代基，例如磺胺類藥物。

【0006】 由於色酮是含氧雜環化合物，具有抗氧化功能。有些色酮能調節活性氧物質(reactive oxygen species, ROS)及活性氮物質(reactive nitrogen species, RNS)。而具有調節活性氧物質的色酮對於癌細胞的作用機制尚待研究。

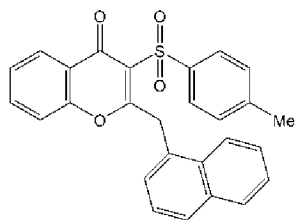
【發明內容】

【0007】 本揭露提供一種新穎磺醯基苯并吡喃-4-酮化合物，其中此化合物的分子式如以下的結構：



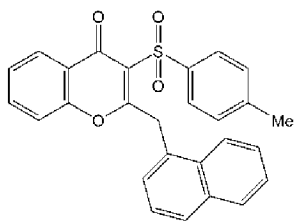
，化合物為2-萘基-1-基甲基-3-(甲苯-4-磺醯基) 苯并哌喃-4-酮。

【0008】 本揭露又提供一種用於選擇性殺死一口腔癌細胞之醫藥組合物，包括：一磺醯基苯并哌喃-4-酮化合物為活性成分；以及一藥學上可接受的載體或鹽類，其中化合物的分子式如以下的結構：



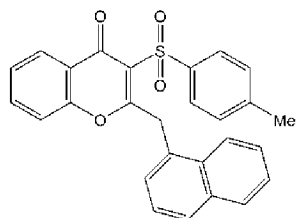
，其中該化合物為2-萘基-1-基甲基-3-(甲苯-4-磺醯基) 苯并哌喃-4-酮，且其具有選擇性殺死該口腔癌細胞之功效。

【0009】 本揭露另提供一種磺醯基苯并哌喃-4-酮化合物用於製備選擇性殺死一口腔癌細胞之藥物的用途，其中化合物的分子式如下所示：



，其中該化合物為2-萘基-1-基甲基-3-(甲苯-4-磺醯基) 苯并哌喃-4-酮，且其具有選擇性殺死該口腔癌細胞之功效。

【0010】 本揭露再提供一種磺醯基苯并呋喃-4-酮化合物用於製備以氧化壓力為媒介之一癌症治療藥物的用途，其中該化合物的分子式如下所示：



，其中，該化合物為2-萘基-1-基甲基-3-(甲苯-4-磺醯基) 苯并呋喃-4-酮，且其具有於一癌細胞中造成氧化壓力之功效。

【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】 圖1顯示以CHW09處理的口腔癌細胞和正常細胞的細胞存活率。使用CHW09 (0、10、25、50、75和100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)處理Ca9-22和CAL 27口腔癌細胞和HGF-1正常口腔細胞24小時。進行MTS測定以測定細胞存活率。數據是平均值 $\pm$ SD ($n = 3$)。不重複的小寫字母之數據標記代表具有顯著差異。

圖2A顯示以CHW09處理的Ca9-22口腔癌細胞週期的變化。以CHW09 (0、25和50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)處理細胞24小時。接著，使用流式細胞儀計算CHW09處理的Ca9-22細胞的7-氨基-放線菌素D

(7-aminoactinomycin D; 7AAD)強度，橫軸為訊號強度、縱軸為細胞數。

圖2B顯示圖2A之細胞週期劃分的細胞數比例之統計，數據是平均值 $\pm$ SD ($n = 3$)。不重複的小寫字母之數據標記代表具有顯著差異。

圖3A顯示以CHW09處理的Ca9-22口腔癌細胞凋亡的變化。以CHW09 (0、25和50 μ g/ml)處理細胞24小時。接著，使用流式細胞儀計算CHW09處理的Ca9-22細胞的膜聯蛋白V/7AAD。膜聯蛋白V(+)/7AAD(+)計算為細胞凋亡陽性(+)%，橫軸為膜聯蛋白V (annexin V)訊號強度、縱軸為7AAD訊號強度。

圖3B之細胞凋亡陽性(+) (%)的統計。數據是平均值 $\pm$ SD ($n = 3$)。不重複的小寫字母之數據標記代表具有顯著差異。

圖4A顯示經CHW09處理，或於CHW09處理前以Z-VAD-FMK進行前處理的Ca9-22口腔癌細胞的細胞凋亡蛋白的表現(裂解的細胞凋亡酶3、8、9和PARP)之西方墨點法的分析。以 β -肌動蛋白作為內部對照。

圖4B顯示經CHW09處理，或於CHW09處理前以NAC進行前處理的Ca9-22口腔癌細胞的細胞凋亡蛋白的表現(裂解的PARP)之西方墨點法的分析。以 β -肌動蛋白作為內部對照。

圖5A顯示以CHW09處理的Ca9-22口腔癌細胞的ROS變化。以CHW09 (0、25、50 μ g/ml)處理細胞24小時。之後使用流式細胞儀偵測ROS的螢光強度。橫軸為訊號強度、縱軸為細胞數。

圖5B顯示圖5A之ROS陽性(+)強度(%)的統計。數據是平均值 $\pm$ SD (n = 3)。不重複的小寫字母之數據標記代表具有顯著差異。

圖6A顯示以CHW09處理的Ca9-22口腔癌細胞的MMP變化。以CHW09 (0、25、50 μ g/ml)處理細胞24小時。之後使用流式細胞儀偵測MMP的螢光強度。橫軸為訊號強度、縱軸為細胞數。

圖6B顯示圖6A之MMP陰性(-)強度(%)的統計。數據是平均值 $\pm$ SD (n = 3)。不重複的小寫字母之數據標記代表具有顯著差異。

圖7A顯示以CHW09處理的Ca9-22細胞之線粒體超氧化物(MitoSOX)產生的變化。以CHW09 (0、25、50 μ g/ml)處理細胞24小時。之後使用流式細胞儀偵測ROS的螢光強度。圖中顯示預先處理或不處理mito-TEMPO的Ca9-22細胞的模式。橫軸為訊號強度、縱軸為細胞數。

圖7B顯示圖7A之線粒體超氧化物陽性(+)強度(%)的統計。數據是平均值 $\pm$ SD (n = 3)。

圖8A顯示以CHW09處理的Ca9-22口腔癌細胞的 γ H2AX變化。以CHW09 (0、25、50 μ g/ml)處理細胞24小時。之後使用流式細胞儀偵測 γ H2AX的螢光強度。橫軸為訊號強度、縱軸為細胞數。

圖8B顯示圖8A之 γ H2AX陽性(+)強度(%)的統計。數據是平均值 $\pm$ SD (n = 3)。不重複的小寫字母之數據標記代表具有顯著差異。

圖8C顯示以CHW09處理的Ca9-22口腔癌細胞的磷酸化 γ H2AX蛋白的西方墨點法的分析。以 β -肌動蛋白作為內部對照。

圖9A顯示以CHW09處理的Ca9-22口腔癌細胞的8-OxodG變化。以CHW09 (0、25、50 $\mu\text{g/ml}$)處理細胞24小時。之後使用流式細胞儀偵測8-OxodG的螢光強度。橫軸為訊號強度、縱軸為細胞數。

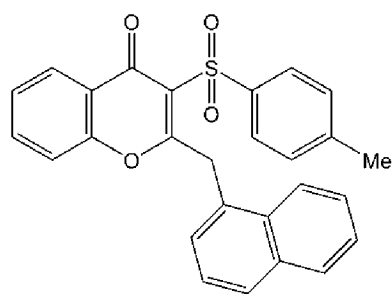
圖9B顯示圖9A之8-OxodG陽性(+)強度(%)的統計。數據是平均值 $\pm$ SD ($n = 3$)。不重複的小寫字母之數據標記代表具有顯著差異。

圖10顯示以CHW09處理及/或X-ray處理的口腔癌細胞和正常細胞的細胞存活率。使用CHW09 (10 $\mu\text{g/ml}$)及/或X-ray (12 Gy)處理Ca9-22和CAL 27口腔癌細胞和HGF-1正常口腔細胞24小時。進行MTS測定以測定細胞存活率。數據是平均值 $\pm$ SD ($n = 3$)。不重複的小寫字母之數據標記代表具有顯著差異。

【實施方式】

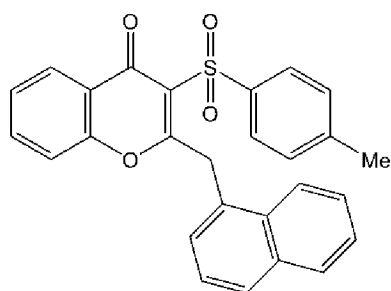
【0013】 於本發明中，藉由於色酮骨架中導入磺醯基的取代基，以人工合成一新穎磺醯基苯并呋喃-4-酮(sulfonyl chromen-4-ones)之色酮類化合物，並探討此種色酮對於癌細胞之影響。

【0014】 根據上述在本發明第一實施態樣中，提供一種新穎磺醯基苯并呋喃-4-酮化合物，此化合物的分子式如以下結構：



，其為2-萘基-1-基甲基-3-(甲苯-4-磺醯基) 苯并哌喃-4-酮
(2-naphthalen-1-ylmethyl-3-(toluene-4-sulfonyl)chromen-4-one)。

【0015】 又，在本發明第二實施態樣中，提供一種用於選擇性殺死口腔癌細胞之醫藥組合物，上述醫藥組合物可包括但不限於，一磺醯基苯并哌喃-4-酮化合物為活性成分與一藥學上可接受的載體或鹽類，而上述化合物的分子式如以下的結構：



其中化合物為2-萘基-1-基甲基-3-(甲苯-4-磺醯基) 苯并哌喃-4-酮，且其具有選擇性殺死該口腔癌細胞之功效。

【0016】 又，上述磺醯基苯并哌喃-4-酮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，化合物能夠有效殺死癌細胞，而對正常細胞之傷害性較小，或甚至不具傷害。

【0017】 在一實施例中，上述所示之化合物可具有於癌細胞中造成氧化壓力之功效，特別是口腔癌細胞。在另一實施例中，上述所示之化合物可具有使癌細胞細胞產生活性氧物質及/或超氧化物、產生DNA傷害及/或氧化性DNA傷害之功效，特別是口腔癌細胞。

胞。在又另一實施例中，上述所示之化合物可具有使癌細胞細胞凋亡之功效，特別是口腔癌細胞。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。

【0018】 上述所示之化合物可為人工合成，並無特別限制。

【0019】 在一實施例中，上述醫藥組合物可用於一治療口腔癌的方法，該方法可與X-ray的照射併用。在於此特定實施例中，上述醫藥組合物與X-ray的結合治療之醫藥組合物的使用劑量比醫藥組合物單獨施用時減少或相同，及/或上述X-ray與醫藥組合物的結合治療之X-ray使用劑量比X-ray單獨施用時減少或相同。上述醫藥組合物與X-ray的結合治療，相較於分別單獨施用，可具有較佳殺死癌細胞功效。

又，於此特定實施例中，於醫藥組合物與X-ray之結合治療中，醫藥組合物與X-ray具有協同功效。再者，於此特定實施例中，於上述癌症治療藥物之製備中的用途中，所述癌症包括口腔癌，但不限於此。

於本揭露中，用語「有效劑量」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。

【0020】 在一實施例中，上述X-ray的照射的劑量可為約2~20 Gy，例如約8~15 Gy。

【0021】 在特定實施例中，醫藥組合物與X-ray之結合治療時，醫藥組合物的劑量與X-ray的照射劑量具有一個劑量比，例如可為1:0.5~1:2($\mu\text{g/ml}$:Gy)，1:0.8~1:1.5($\mu\text{g/ml}$:Gy)，例如可為約1:1.2($\mu\text{g/ml}$:Gy)。

【0022】 又，於前述醫藥組合物與X-ray之結合治療中，醫藥組合物的投予與X-ray的照射的先後次序並無特殊限制。例如，醫藥組合物的投予可在X-ray的照射之前，又或者，醫藥組合物的投予可在X-ray的照射之後，或者醫藥組合物的投予與X-ray的照射可同時進行。

【0023】 在本揭露第三實施態樣中，提供一種化合物用於製備選擇性殺死一口腔癌細胞之藥物的用途，此化合物的結構式如同前述，且具有選擇性殺死口腔癌細胞之功效。上述藥物可進一步包括藥學上可接受之載體及/或鹽類。

【0024】 上述第三實施態樣之選擇性殺死口腔癌細胞之藥物具有如同第二實施態樣之選擇性殺死口腔癌細胞之醫藥組合物的效果。包括選擇性殺死癌細胞、於癌細胞中造成氧化壓力、使癌細胞細胞產生活性氧物質及/或超氧化物、產生DNA傷害及/或氧化性DNA傷害、使癌細胞細胞凋亡等。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。上述藥物可與X-ray併用以殺死口腔癌細胞，關於併用之相關說明同第二實施態樣之醫藥組合物所述。

【0025】 在本揭露第四實施態樣中，提供一種化合物用於製備以氧化壓力為媒介之癌症治療藥物的用途。此化合物的結構式如同前述，且具有於癌細胞中造成氧化壓力之功效。上述藥物可進一步包括藥學上可接受之載體及/或鹽類。

【0026】 上述第四實施態樣之治療以氧化壓力為媒介之癌症治療藥物具有如同第二實施態樣之選擇性殺死口腔癌細胞之醫藥組

合物的效果。包括選擇性殺死癌細胞、於癌細胞中造成氧化壓力、使癌細胞細胞產生活性氧物質及/或超氧化物、產生DNA傷害及/或氧化性DNA傷害、使癌細胞細胞凋亡等。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。上述藥物可與X-ray併用以殺死口腔癌細胞，關於併用之相關說明同第二實施態樣之醫藥組合物所述。

【0027】 於本揭露中，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/或減少增殖的藥物。

【0028】 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)。

【0029】 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、鋁或銻鹽。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、麩胺酸鹽胺。

【0030】 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。

【0031】 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。

【0032】 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。

【0033】 製備例

A. 材料與方法

1. 細胞培養物

人類口腔癌細胞株，來自牙齦癌 (Ca9-22) 以及來自舌癌 (CAL 27) 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珠 (HGF-1) 購自 ATCC。

細胞之培養基為於常規配方 (Gibco, Grand Island, NY, USA) 中添加了 10% 之胎牛血清 (FBS)、青黴素 (penicillin) 100 units/ml、鏈黴素溶液 (streptomycin) 100 µg/ml、建他黴素

(gentamicin) 50 $\mu\text{g/ml}$ 、兩性黴素 B (amphotericin B) 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 。將細胞培養於37°C且含5% CO_2 及適當濕度的培養箱中。

【0034】 2. 磺醯基苯并哌喃-4-酮之合成

於室溫下，將150 mg (1.1 mmol)之碳酸鉀(K_2CO_3)加入含有0.5 mmol 之 1-(2- 羥基 苯 基)-2-(甲 苯 -4- 磺 醯 基) 乙 酮 (1-(2-hydroxyphenyl)-2-(toluene-4-sulfonyl) ethanone)的10 ml乙腈溶液中，以形成一反應混合物。在室溫下，將反應混合物攪拌5分鐘。接著於反應混合物中加入含有60 mg (0.5 mmol)之萘-2-基-乙酸-酸酐(Naphthalen-2-yl-acetic anhydride)之乙腈溶液(5 ml)。於抽氣櫃中，攪拌2小時。將溶液冷卻至室溫，並將溶液濃縮。將殘餘物用水稀釋，並以20 ml的二氯甲烷(CH_2Cl_2)進行萃取，一共萃取三次。將三次所得到的萃取液(有機層)合併，以鹽水洗滌、乾燥過濾後，在減壓蒸發下得到粗產物。

接著以二氧化矽膠進行純化獲得具有磺醯基取代基之色酮 CHW09。將此色酮化合物溶解於二甲基亞砷(DMSO)溶液中。

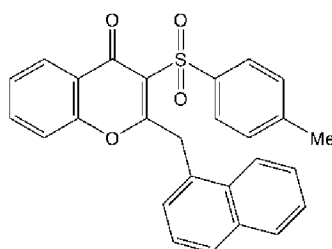
將所得到的色酮化合物進行核磁分析，其高解析度質譜 (ESI, M^++1) 理論值 $\text{C}_{27}\text{H}_{21}\text{O}_4\text{S}$ 441.1161，測定值 441.1166。氫核磁共振光譜(400 MHz, CDCl_3): δ 8.05 (dd, $J = 1.6, 8.0$ Hz, 1H), 7.91-7.88 (m, 2H), 7.67-7.63 (m, 1H), 7.50-7.37 (m, 6H), 7.30 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.17-7.12 (m, 3H), 4.64 (d, $J = 14.0$ Hz, 1H), 4.19 (d, $J = 13.6$ Hz, 1H), 2.39 (s, 3H)。碳核磁共振光譜(100 MHz, CDCl_3): δ 160.11, 153.26, 145.25, 140.60,

136.40, 133.54, 132.26, 131.03, 130.29, 129.87 (2x), 129.37, 128.75, 128.71, 128.03, 127.88 (2x), 127.28, 126.99, 126.21, 125.29, 124.51, 124.17, 118.53, 117.03, 57.34, 21.58。

【0035】 證實此化合物為2-萘基-1-基甲基-3-(甲苯-4-磺醯基)

苯 并 哌 喃 -4- 酮

(2-Naphthalen-1-ylmethyl-3-(toluene-4-sulfonyl)chromen-4-one)，後續為了簡化將其命名為CHW09。



【0036】 3.統計方法

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)。不重複的小寫字母之數據標記代表具有顯著差異。

【0037】 [實施例1] 經CHW09處理之口腔癌細胞與正常細胞的細胞存活率

【0038】 藉由基於粒線體還原酶活性的MTS分析法(CellTiter 96® Aqueous One Solution, Promega, Madison, WI, USA)來量測細胞存活率。將Ca9-22、CAL 27以及HGF-1細胞以每孔 4×10^3 個細胞接種於96孔盤中，每孔的培養液為0.1 ml。以控制組(DMSO)或不同濃度的CHW09處理細胞24小

時。接著，使細胞與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。將結果顯示於圖1。

【0039】 圖1顯示以CHW09處理的2種口腔癌細胞(Ca9-22及CAL 27)以及口腔正常HGF-1細胞的細胞存活率(%)。由圖1可知，以濃度為0、10、25、50、75及100 $\mu\text{g/ml}$ 的CHW09分別處理24小時之後，Ca9-22及CAL 27口腔癌細胞的細胞存活率劑量依賴性地下降，分別為Ca9-22為100、70、61、44、29、19(%)；CAL 27為100、88、77、60、45、34(%)。相較之下，HGF-1細胞的細胞存活率只些微下降，其為100、86、81、73、69、56(%)。在24小時處理時間的情況下，CHW09對口腔癌Ca9-22細胞之 IC_{50} 值為40 $\mu\text{g/ml}$ 。因此選擇比 IC_{50} 值低及高的25及50 $\mu\text{g/ml}$ 進行後續實驗。

【0040】 [實施例2]細胞週期分析

【0041】 以DNA染劑7-胺基放射菌素(DNA dye 7-aminoactinomycin，7AAD)(Biotium Inc.，Hayward，CA)進行細胞週期分析。將經CHW09處理後的Ca9-22細胞固定後，於37°C、培養於1 $\mu\text{g/ml}$ 7AAD中30分鐘，之後以磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS buffer)懸浮細胞。之後以流式細胞儀(Accuri C6)進行分析。將結果顯示於圖2A，將細胞週期統計數據的表格顯示於圖2B。

【0042】 圖2顯示，以濃度分別為0、25及50 $\mu\text{g/ml}$ 的CHW09處理後之Ca9-22細胞，其G1時期的細胞比例分別為30、40、

43(%)。由圖2B可知，CHW09稍微增加處於G1時期的細胞，但在統計上無顯著差異。

【0043】 [實施例3] 藉由膜聯蛋白(annexin)V/7AAD之細胞凋亡(apoptosis)分析

【0044】 藉由膜聯蛋白V (Strong Biotech Corp, Taipei, Taiwan)/7AAD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0、25、50 $\mu\text{g/ml}$ 的CHW09處理細胞24小時。將細胞置於最後濃度為10 $\mu\text{g/ml}$ 的膜聯蛋白V-螢光異硫氰酸鹽(fluorescein isothiocyanate)和最後濃度為1 $\mu\text{g/ml}$ 的7AAD反應30分鐘，以流式細胞儀(Accuri C6)進行分析。將結果顯示於圖3A，橫軸為膜聯蛋白V訊號強度，縱軸為7AAD訊號強度。膜聯蛋白V陽性及7AAD陽性判斷為細胞凋亡陽性(+)，將細胞凋亡陽性(+)的統計數據的表格顯示於圖3B。

【0045】 圖3B顯示，經由0、25、50 $\mu\text{g/ml}$ CHW09處理的Ca9-22細胞之細胞凋亡(+)百分比分別為4、8、8%。顯示處理CHW09能夠造成細胞凋亡。

【0046】 [實施例4] CHW09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。

【0047】 為了更進一步檢驗經CHW09處理的口腔癌Ca9-22細胞的細胞凋亡的程度，以西方墨點法檢驗裂解的細胞凋亡酶(半胱氨酸天冬氨酸特異蛋白酶)3、8、9和裂解的多聚ADP-核糖聚合酶(poly(ADP-ribose) polymerase, PARP)，選擇 β 肌動蛋白(β -actin)作為內控制(internal control)。

樣本的處理如下，以0、25、50 μg/ml CHW09處理Ca9-22細胞24小時，並且分別以濃度為25 μM之細胞凋亡抑制劑Z-VAD-FMK (Selleckchem.com；Houston，TX)進行前處理2小時，以及濃度為2 mM的自由基捕捉劑N-乙醯半胱胺酸(N-acetylcysteine，NAC)(Sigma；St. Louis，MO)進行前處理1小時。之後，將經處理的細胞經過通常的收集細胞步驟後，以溶解緩衝液(Lysis buffer)萃取蛋白質。

西方墨點法簡述如下，將所萃取之蛋白質以電泳槽進行電泳分析，並將電泳膠片中之蛋白質轉印(transfer)至PVDF膜之後，以含有5%脫脂奶粉之Tris 緩衝液進行封閉過夜。之後分別以辨認特定抗原之一級抗體偵測抗原以及與一級抗體對應之二級抗體進行偵測。所使用的一級抗體及使用條件如下表所示。之後以呈色劑(ECL HRP)進行呈色。將結果顯示於圖4A及圖4B。

[表1]

一級抗體	廠牌	稀釋倍率
裂解的半胱胺酸天冬胺酸蛋白酶8 Cleaved caspase-8 (Asp391)(18C8)	Cell signaling Technology	1:1000
裂解的半胱胺酸天冬胺酸蛋白酶3 Cleaved caspase-3 (Asp175)(5A1E)	Cell signaling Technology	1:1000
裂解的半胱胺酸天冬胺酸蛋白酶9 Cleaved caspase-9 (Asp330)(d2D4)	Cell signaling Technology	1:1000
裂解的PARP	Cell signaling	1:1000

Cleaved PARP(Asp214)(D64E10)	Technology	
β -肌動蛋白(clone AC-15)	Sigma-Aldrich	1:5000

【0048】 圖4A顯示，經由25、50 $\mu\text{g/ml}$ CHW09處理的Ca9-22細胞之裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3、8、9和裂解的PARP的蛋白質的量隨著CHW09的處理濃度而上升。但是以細胞凋亡抑制劑Z-VAD-FMK進行前處理的組別，則抑制此現象。由圖4A可知，處理CHW09能夠造成細胞凋亡。圖4B顯示，經由25、50 $\mu\text{g/ml}$ CHW09處理的Ca9-22細胞之裂解PARP的蛋白質的量隨著CHW09的處理濃度而上升。但是以自由基捕捉劑NAC進行前處理的組別，則抑制此現象。

【0049】 [實施例5] 胞內活性氧物質(reactive oxygen species，ROS)的確認

【0050】 ROS反應染劑二氯螢光素二乙酸酯(2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, $\text{H}_2\text{DCF-DA}$)(Sigma-Aldrich，St. Louis，MQ，USA)能夠與ROS反應並形成可偵測的螢光分子。將經藥物處理的細胞置於最後濃度為100 nM之 $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ (溶於PBS)處理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)及其內建軟體偵測螢光強度，定義為ROS強度。將結果顯示於圖5A。並將數據顯示於圖5B。相對的ROS陽性的定義條件是以不添加藥物處理之對照組中，

將細胞族群的螢光強度分隔為左右各50%時的螢光強度值為基準，螢光強度大於上述基準值定義為ROS陽性(亦即，右邊的區域)。

【0051】 如圖5B所示，0、25、50 μ g/ml CHW09處理的Ca9-22細胞的相對的ROS陽性染色比例(mean%)分別為50%、55%及75%。顯示細胞中的ROS隨著CHW09的劑量增加而增加，推論CHW09能夠誘發細胞產生ROS。

【0052】 [實施例6] 胞內粒線體膜電位(Mitochondrial membrane potential, MMP)的確認

【0053】 已有報導指出陽離子花青染料(cationic cyanine dyes)會因應膜電位而累積在細胞中，並且也有報導指出膜電位變化與細胞凋亡相關。因此使用含有花青素染劑DiOC₂(3)(3-ethyl-2-[3-(3-ethyl-2(3H)-benzoxazolylidene)-1-propenyl]-benzoxazolium iodide)及CCCP(carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone)的套組(Invitrogen, San Diego, CA, USA)進行胞內粒線體膜電位的確認。

將經藥物處理的細胞置於最後濃度為20 nM之DiOC₂(3)(溶於培養基)處理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)及其內建軟體偵測螢光強度，定義為MMP強度。將結果顯示於圖6A。並將數據顯示於圖6B。相對的MMP陰性的定義條件是以不添加藥物處理之對照組中，將細胞族群的螢光強度分隔為左

右各50%時的螢光強度值為基準，螢光強度小於上述基準值定義為MMP陰性(亦即，左邊的區域)。

【0054】 如圖6B所示，0、25、50 μ g/ml CHW09處理的Ca9-22細胞的相對的MMP陰性染色比例(mean%)分別為50%、76%及87%。顯示細胞中的MMP隨著CHW09的劑量增加而降低，推論CHW09能夠增加細胞粒線體的去極化，而造成細胞的氧化壓力。

【0055】 [實施例7] 胞內粒線體超氧化物(Mitochondrial superoxide, MitoSOX)的確認

【0056】 使用MitoSOXTMRed套組(Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, USA)進行胞內粒線體超氧化物的確認。

將經藥物處理的細胞置於最後濃度為5 μ M的MitoSOX共同培養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)及其內建軟體偵測螢光強度，定義為MitoSOX強度。將結果顯示於圖7A，並將數據顯示於圖7B。相對的MitoSOX陽性的定義條件是以不添加藥物處理之對照組中，將細胞族群的螢光強度分隔為左右各50%時的螢光強度值為基準，螢光強度大於上述基準值定義為MitoSOX陽性(亦即，右邊的區域)。

【0057】 如圖7B所示，經0、25、50 μ g/ml CHW09處理的Ca9-22細胞的相對的MitoSOX陽性染色比例(mean%)分別為

50%、71%及70%。顯示細胞中的MitoSOX隨著CHW09的劑量增加而增加，推論CHW09能夠增加細胞超氧化物的累積，而造成細胞的氧化壓力。並且，以粒線體超氧化物抑制物 mito-TEMPO(Cayman chemical, Ann Arbor, MI, USA)、20 μ M 進行前處理1小時的組別中，經0、25、50 μ g/ml CHW09處理的Ca9-22細胞的相對的MitoSOX陽性染色比例(mean%)分別為50%、58%及52%，比未經處理mito-TEMPO的組別大幅減少。上述結果更加證實，經由CHW09處理能夠造成細胞中的粒線體超氧化物堆積，造成細胞的氧化壓力。

【0058】 [實施例8]細胞內DNA傷害的確認

【0059】 γ H2AX是一種DNA雙股斷裂的標記(DNA double strand break marker)，因此偵測細胞中 γ H2AX的含量，即可反映出細胞中DNA傷害的程度。為了確認經由CHW09處理造成的細胞的氧化壓力之效果，進行細胞內DNA傷害的確認。

具體而言，將經藥物處理的細胞以70%乙醇固定，並以BSA-T-PBS溶液(含有1%牛血清白蛋白(bovine Serum Albumin, BSA)與0.2% Triton X-100之PBS)(Sigma)清洗。於離心後，於4°C將細胞重新懸浮於含有2 μ l之抗磷酸化-組蛋白(Histone) H2A.X (Ser 139)之單株抗體(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)之100 μ l的BSA-T-PBS溶液中，培育1小時。在清洗後，於室溫將細胞重新懸浮於含有2 μ l之Alexa Fluor 488-標記之二次抗體(Jackson Laboratory, Bar

Harbor, ME, USA)之100 μ l的BSA-T-PBS溶液，培育30分鐘。在收取細胞之後，將細胞重新懸浮於含有5 μ g/ml之碘化丙啶之PBS中，並以流式細胞儀(BD Accuri™ C6)進行分析，偵測螢光強度，定義為 γ H2AX強度。將結果顯示於圖8A，並將 γ H2AX陽性數據顯示於圖8B。相對的 γ H2AX陽性的定義條件以不添加藥物處理之對照組中，將細胞族群的螢光強度分隔為左右各50%時的螢光強度值為基準，螢光強度大於上述基準值定義為 γ H2AX陽性(亦即，右邊的區域)。

並且，也以西方墨點法偵測經藥物處理後之細胞中的 γ H2AX的蛋白質的量。西方墨點法除了將一級抗體換成磷酸化-組蛋白H2A.X(Ser139)(Santa Cruz Biotechnology)之外，以與實施例4相同方法進行，在此不再贅述。將結果顯示於圖8C。

【0060】 如圖8B所示，0、25、50 μ g/ml CHW09處理的Ca9-22細胞的相對的 γ H2AX陽性染色比例(mean%)分別為50%、52%及55%。顯示細胞中的磷酸化 γ H2AX的含量隨著CHW09的劑量增加而增加，推論CHW09能夠增加細胞的氧化壓力，且造成DNA的損傷。且由圖8C之西方墨點法亦顯示經25、50 μ g/ml CHW09處理的Ca9-22細胞的磷酸化 γ H2AX蛋白質的量增加。

【0061】 [實施例9]細胞內的氧化壓力的DNA傷害的確認

【0062】 當細胞暴露在活性氧物質(ROS)的情況下時，ROS攻擊DNA分子中的鳥嘌呤鹼基，會產生8-氧代-2'-去氧鳥苷

(8-oxo-2'-deoxyguanosine, 8-OxodG), 因此8-OxodG可作為DNA因ROS損傷的指標。

【0063】 使用偵測8-OxodG之套組OxyDAN分析套組(no. 500095; EMD Millipore, Darmstadt, Germany), 依照套組所附的說明書進行細胞染色, 並以流式細胞儀(BD Accuri™ C6)進行分析偵測螢光強度, 定義為8-OxodG強度。將結果顯示於圖9A, 並將數據顯示於圖9B。相對的8-OxodG陽性的定義條件是以不添加藥物處理之對照組中, 將細胞族群的螢光強度分隔為左右各50%時的螢光強度值為基準, 螢光強度大於上述基準值定義為8-OxodG陽性(亦即, 右邊的區域)。

【0064】 如圖9B所示, 0、25、50 µg/ml CHW09處理的Ca9-22細胞的相對的8-OxodG陽性染色比例(mean%)分別為50%、52%及62%。顯示細胞中的8-OxodG的含量隨著CHW09的劑量增加而增加, 推論CHW09能夠增加細胞的氧化壓力, 且造成DNA的損傷。

【0065】 [實施例10]藥物結合X-ray之細胞存活率

【0066】 近年來, 放射線治療(Radiotherapy, RT)已經成為治療惡性腫瘤的重要手段之一。由於放射線治療能夠定位在腫瘤的區域, 因此, 將藥物搭配放射線治療能夠達到低劑量高效果的治療效果。

將Ca9-22及HGF-1細胞分別照射或不照射X-ray (12 Gy)(6 MV photon linear accelerator (Elekta Axesse; Stockholm,

Sweden))後，置於最後濃度為10 $\mu\text{g/ml}$ 之CHW09處理24小時或不以CHW09處理24小時之後，使用與實施例1相同的方法測量細胞存活率，將結果顯示於圖10。

【0067】 如圖10所示，單獨以最後濃度是10 $\mu\text{g/ml}$ 之CHW09處理的Ca9-22細胞的細胞存活率為 $87.25 \pm 1.14\%$ ；單獨照射X-ray的Ca9-22細胞存活率為 $86.54 \pm 0.33\%$ 。相對於此，處理CHW09且照射X-ray的Ca9-22細胞的存活率為 $73.48 \pm 0.27\%$ 。由此結果可知，併用CHW09及X-ray具有協同作用(synergistic)。並且，處理CHW09且照射X-ray的HGF-1細胞的存活率為 $84.97 \pm 3.08\%$ ，相對於Ca9-22細胞的存活率具有顯著差別。有上述實驗可知，併用CHW09及X-ray可選擇性的殺死口腔癌細胞。

【0068】 由上述結果可知經由CHW09處理，誘導細胞產生ROS、降低MMP、增加粒線體超氧化物等氧化壓力，並且造成DNA傷害及氧化性DNA傷害，最終導致細胞凋亡。

並且相較於正常細胞，CHW09會造成口腔癌細胞更低的生存率，亦即，CHW09能夠選擇性的殺死口腔癌細胞。

此外，將CHW09與X-ray合併使用具有協同作用，能夠以比單獨使用時更低的劑量，有效殺死口腔癌細胞。

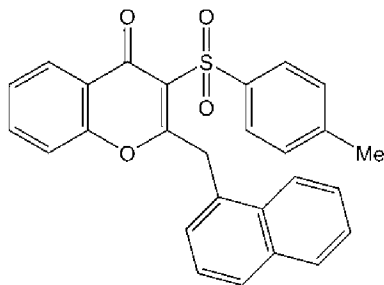
【0069】 雖然本發明已以較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作些許之更動與潤飾，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

【符號說明】

【0070】 無。

【發明申請專利範圍】

【第1項】 一種新穎磺醯基苯并呋喃-4-酮化合物，其中該化合物的分子式如以下的結構：



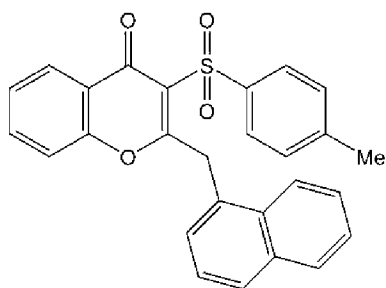
，該化合物為2-萘基-1-基甲基-3-(甲苯-4-磺醯基) 苯并呋喃-4-酮。

【第2項】 一種用於選擇性殺死一口腔癌細胞之醫藥組合物，包括：

一磺醯基苯并呋喃-4-酮化合物為活性成分；以及

一藥學上可接受的載體或鹽類，其中

該化合物的分子式如以下的結構：



，其中

該化合物為2-萘基-1-基甲基-3-(甲苯-4-磺醯基) 苯并呋喃-4-酮，

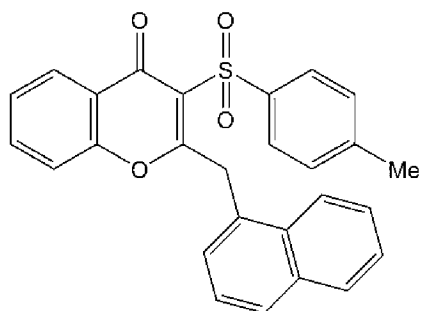
且其具有選擇性殺死該口腔癌細胞之功效。

【第3項】 如申請專利範圍第2項所述之用於選擇性殺死一口腔癌細胞之醫藥組合物，其中該口腔癌細胞包括一牙齦癌細胞及/或一舌癌細胞。

【第4項】 如申請專利範圍第2項所述之用於選擇性殺死一口腔癌細胞之醫藥組合物，其中該選擇性殺死一口腔癌細胞之醫藥組合

物係用於一治療口腔癌之方法中，而於該方法中，該醫藥組合物係與 X-ray 照射併用來選擇性殺死口腔癌細胞。

【第5項】 一種磺醯基苯并呋喃-4-酮化合物用於製備選擇性殺死一口腔癌細胞之藥物的用途，其中該化合物的分子式如下所示：

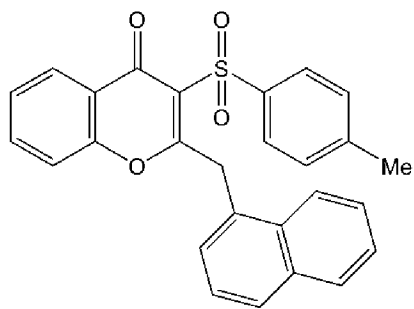


，其中

該化合物為 2-萘基-1-基甲基-3-(甲苯-4-磺醯基) 苯并呋喃-4-酮，且其具有選擇性殺死該口腔癌細胞之功效。

【第6項】 如申請專利範圍第5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。

【第7項】 一種磺醯基苯并呋喃-4-酮化合物用於製備以氧化壓力為媒介之一口腔癌治療藥物的用途，其中該化合物的分子式如下所示：



，其中

該化合物為 2-萘基-1-基甲基-3-(甲苯-4-磺醯基) 苯并呋喃-4-酮，且其具有於一癌細胞中造成氧化壓力之功效。

【第 8 項】 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治療藥物的用途，其中該化合物具有選擇性殺死一口腔癌細胞之功效。

【第 9 項】 如申請專利範圍第 8 項所述之化合物用於製備以氧化壓力為媒介之一口腔癌治療藥物的用途，其中該口腔癌包括一牙齦癌及/或一舌癌。

【發明圖式】

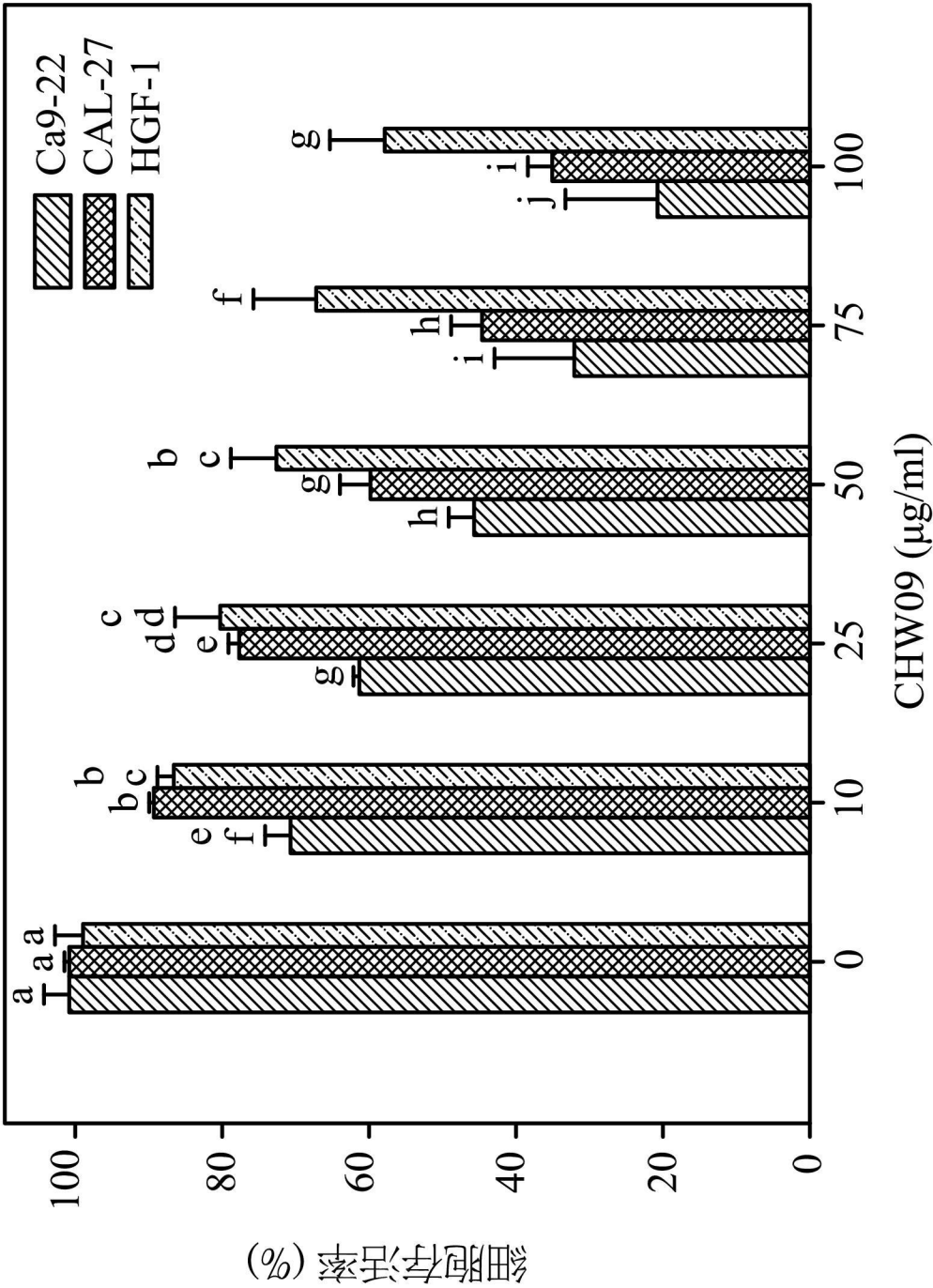


圖 1

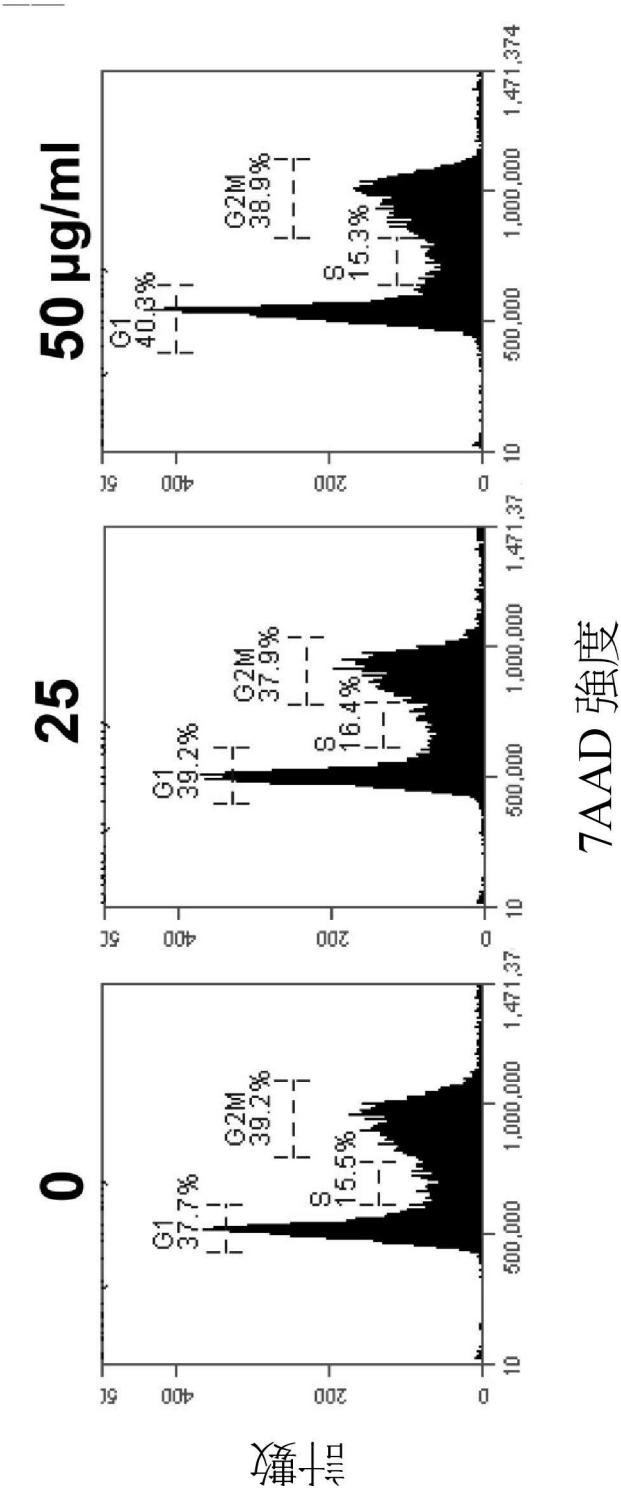


圖 2A

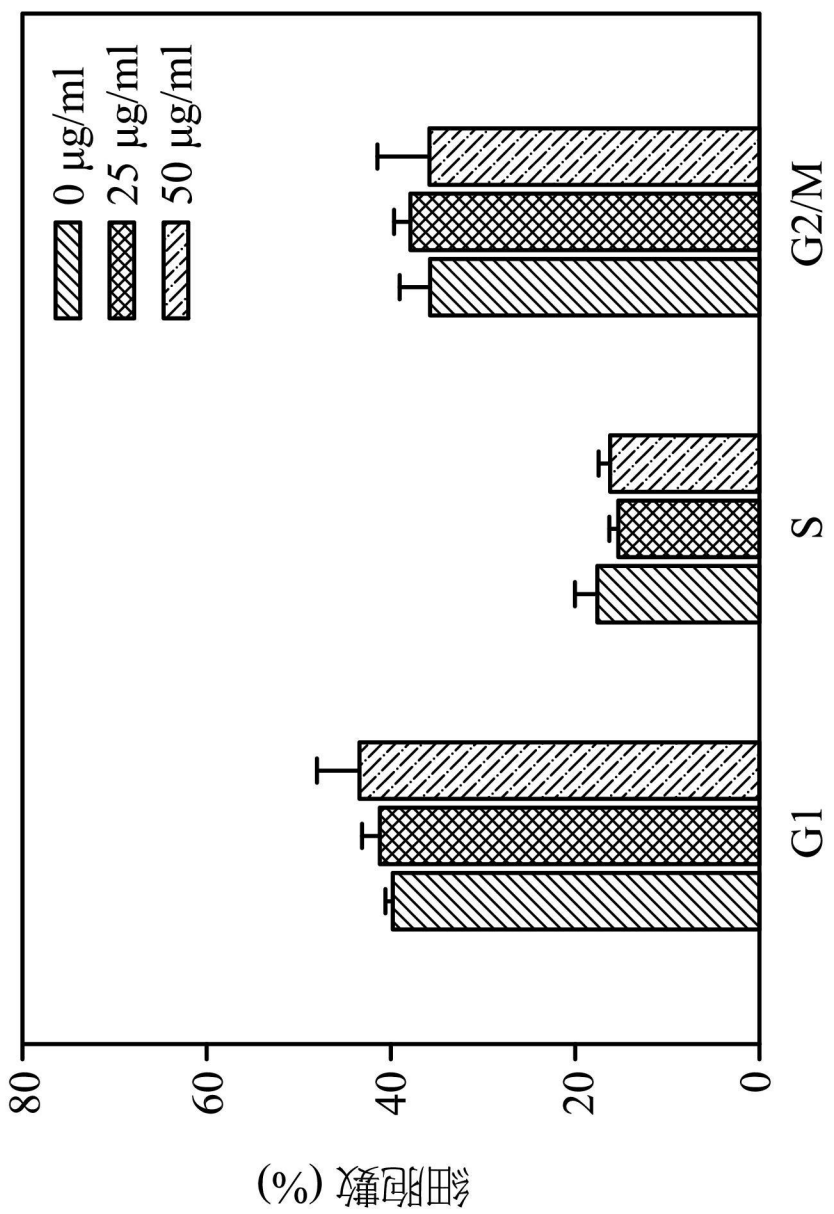


圖 2B

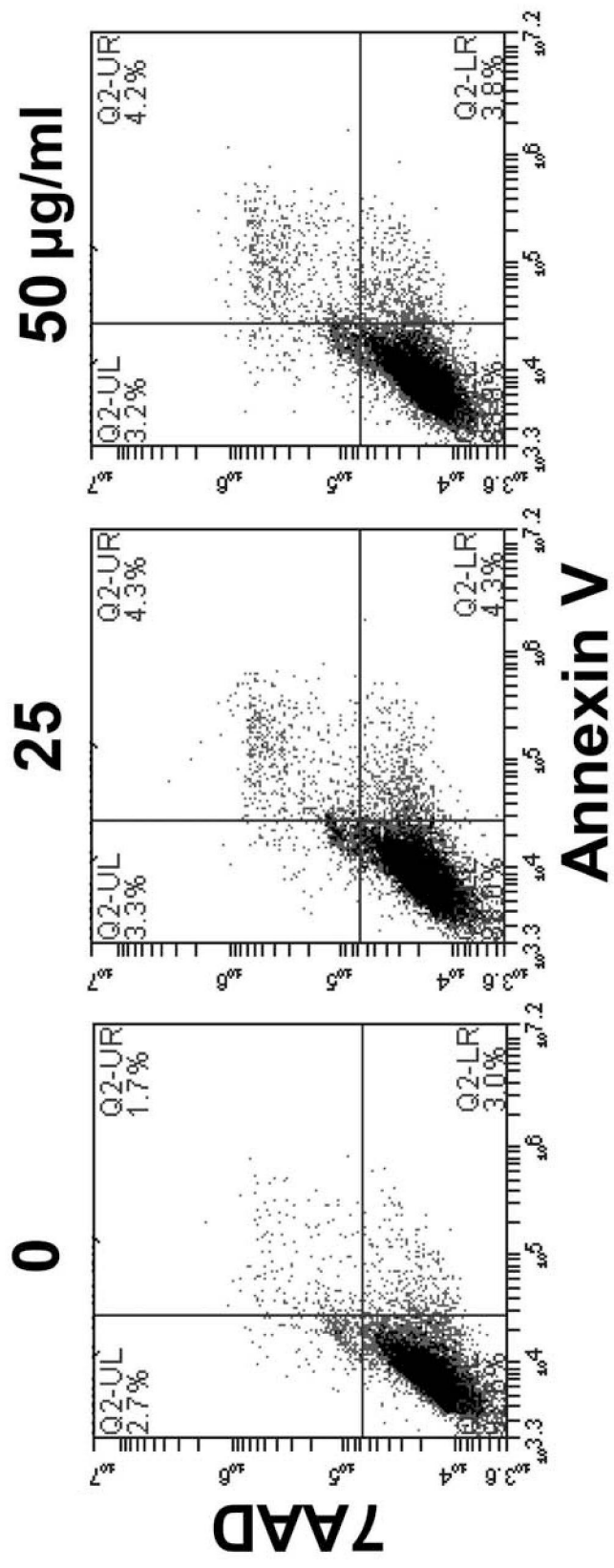


圖 3A

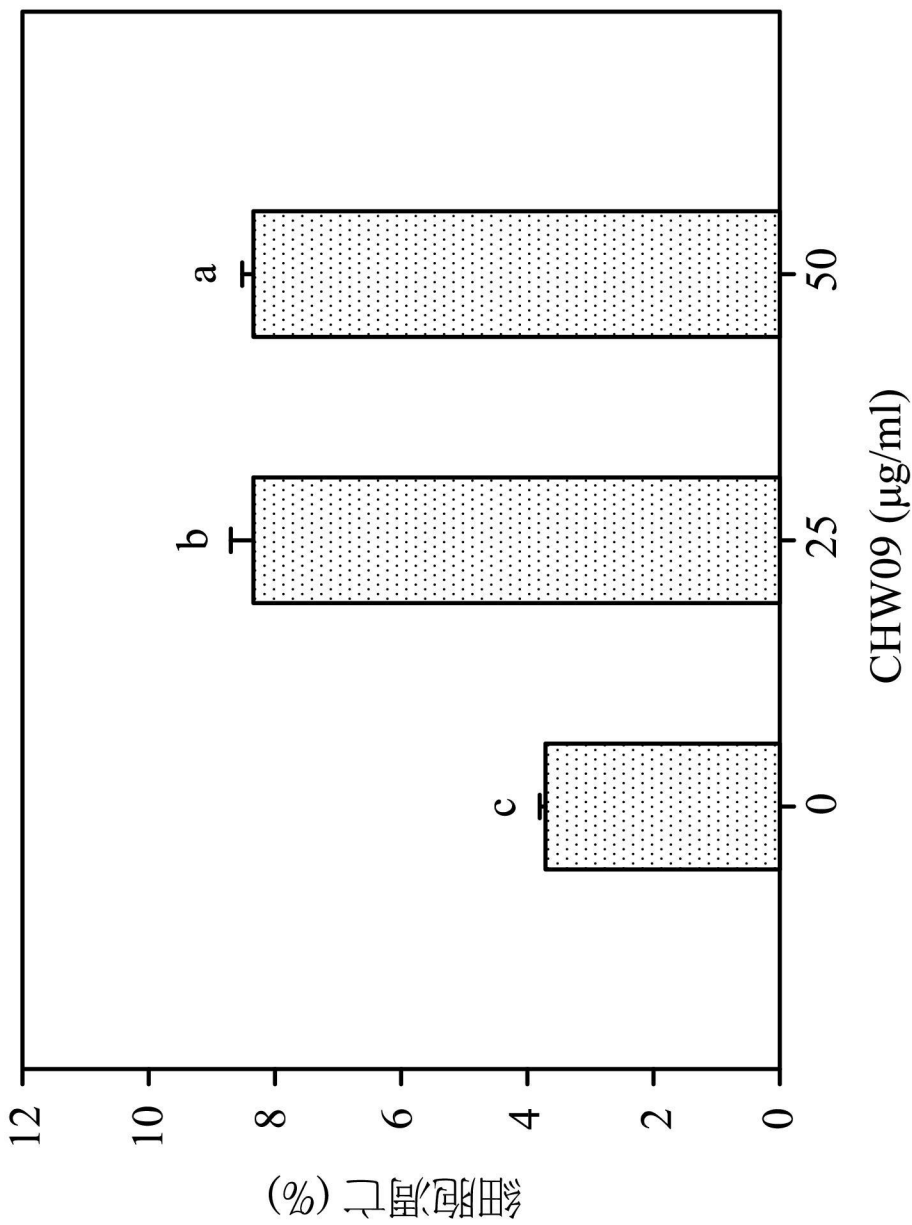


圖 3B

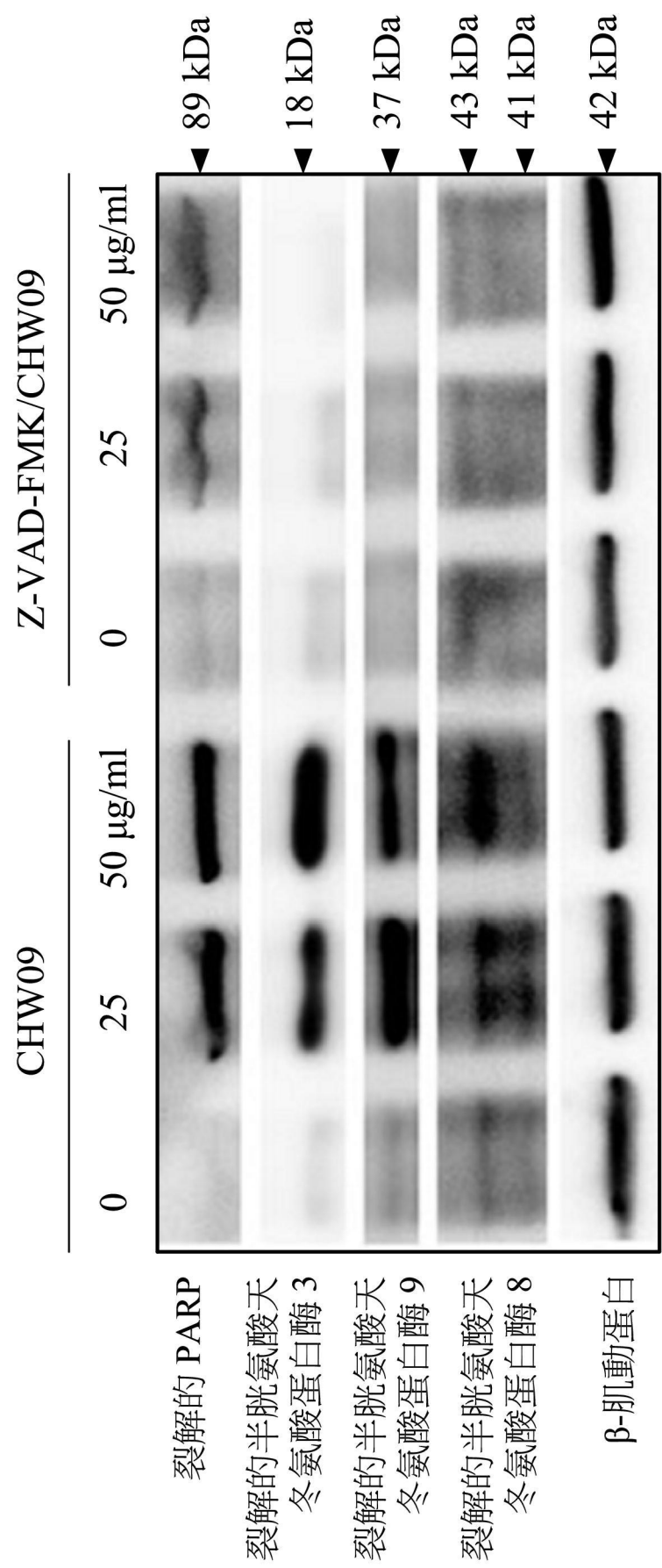


圖 4A

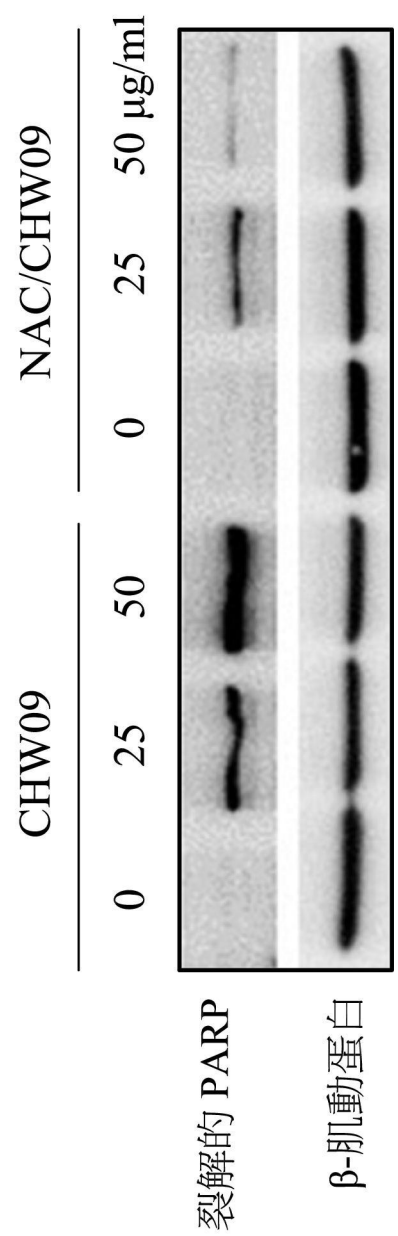


圖 4B

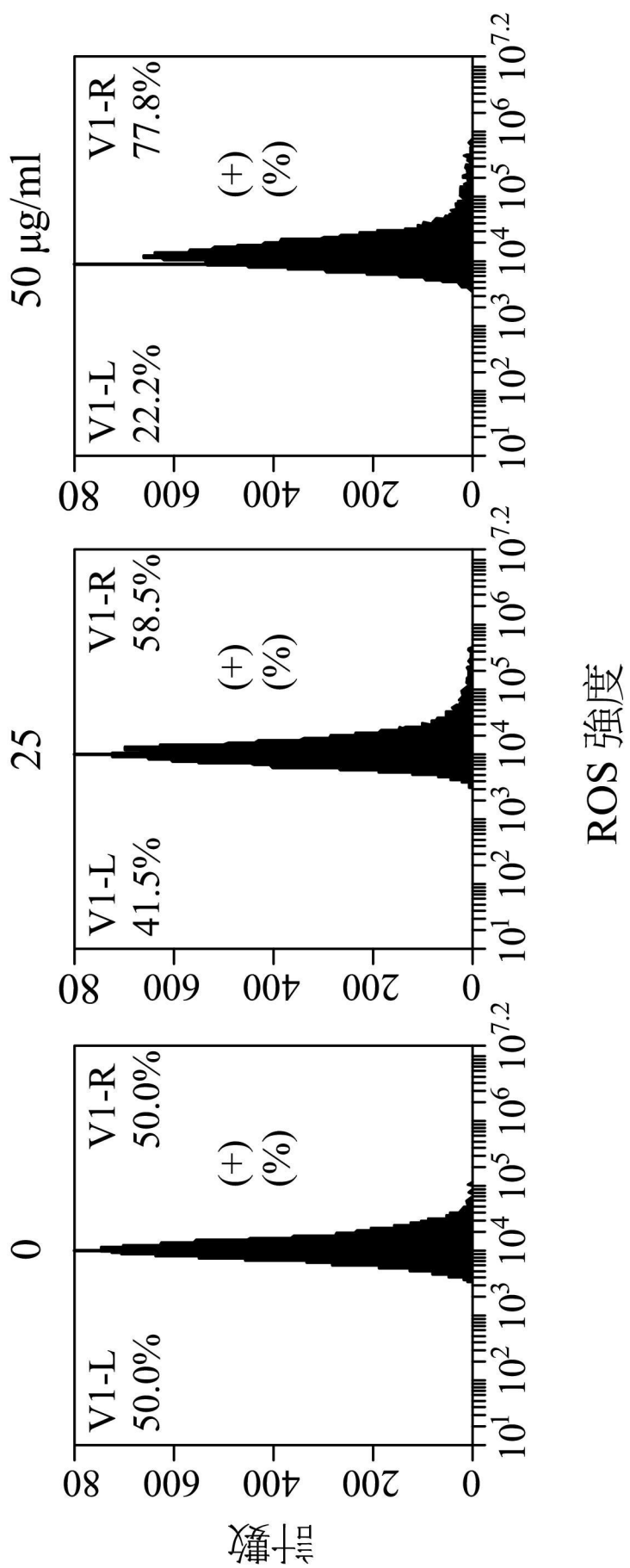


圖 5A

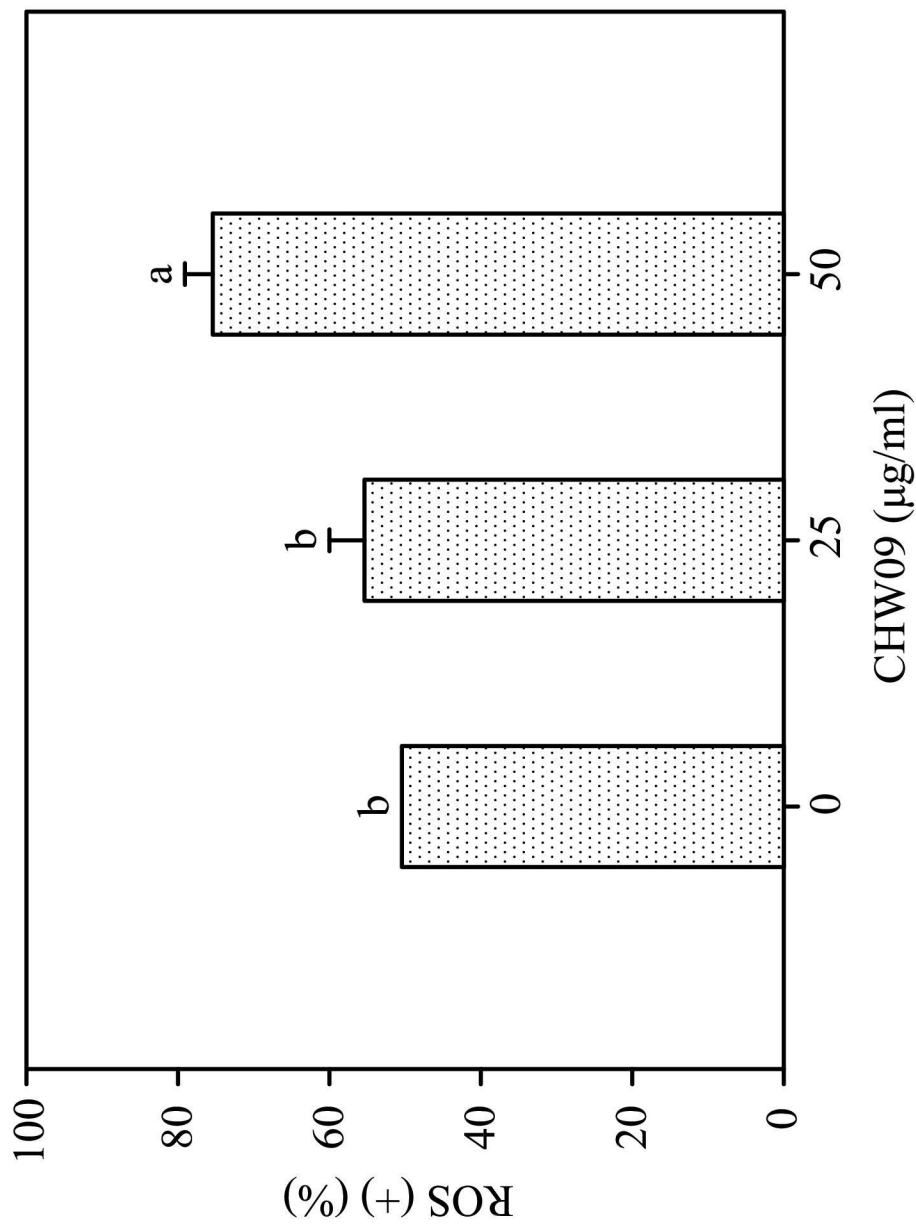


圖 5B

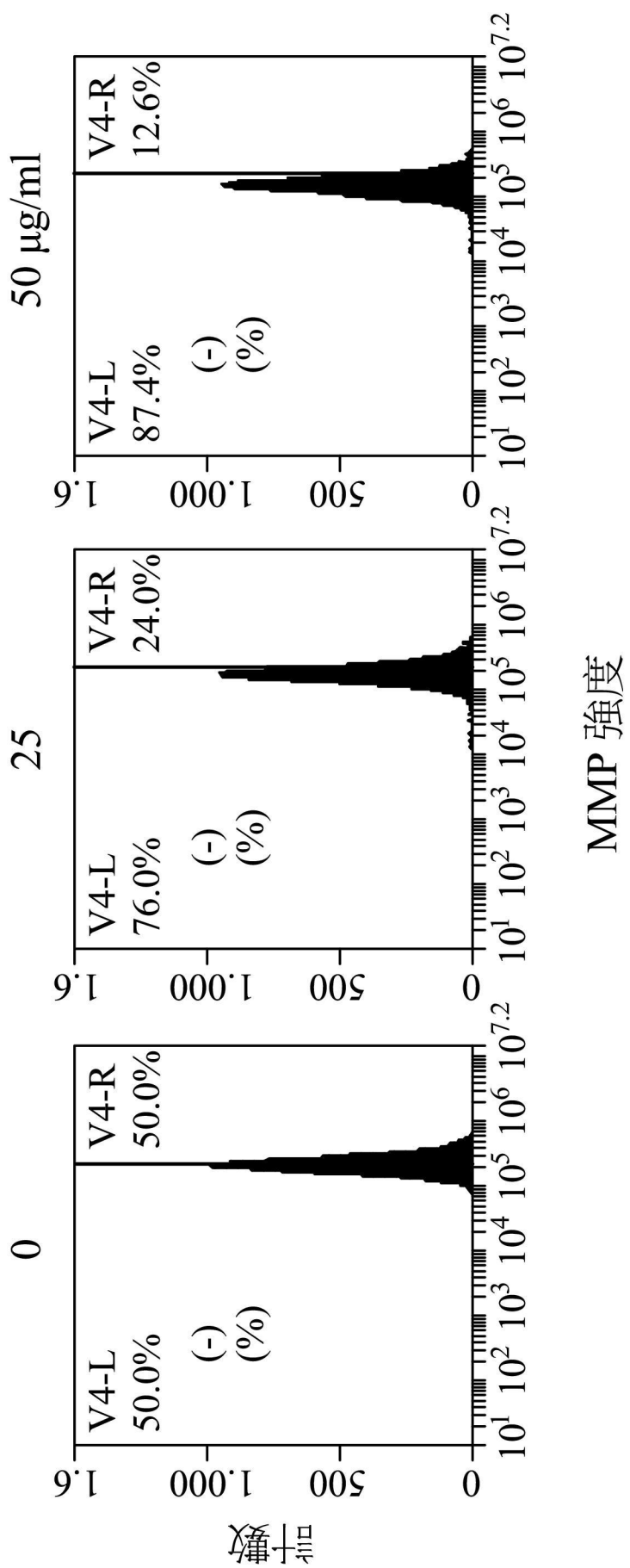


圖 6A

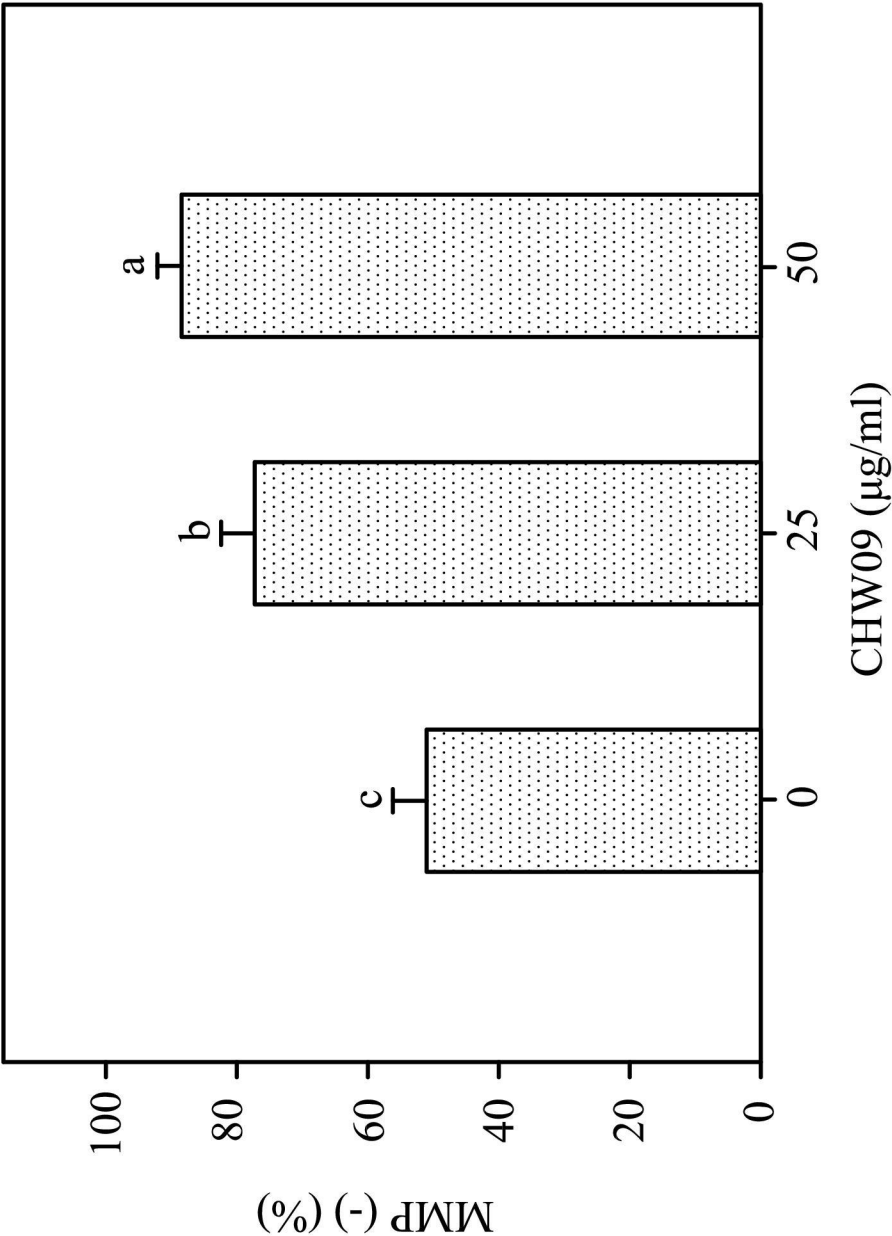


圖 6B

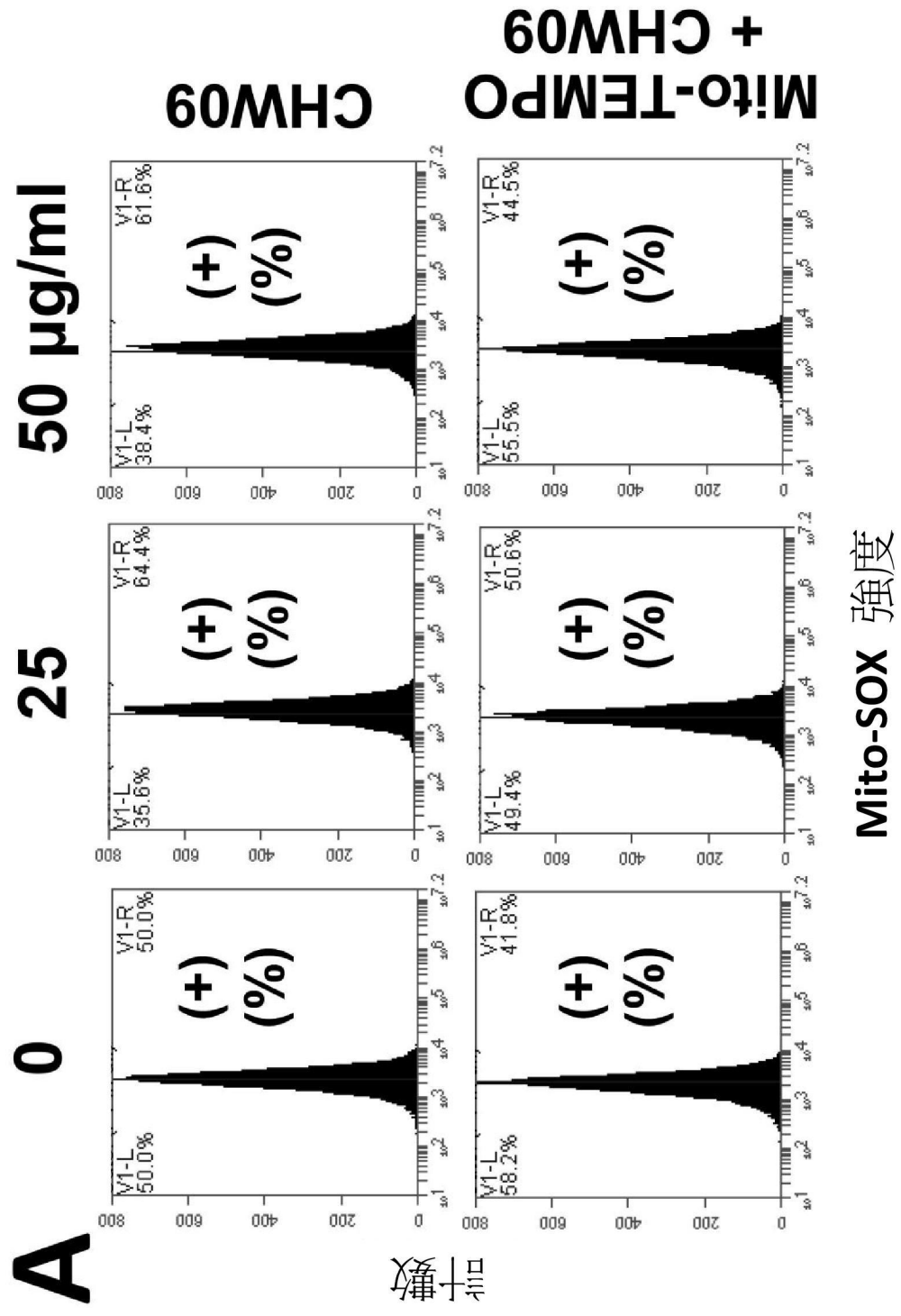


圖 7A

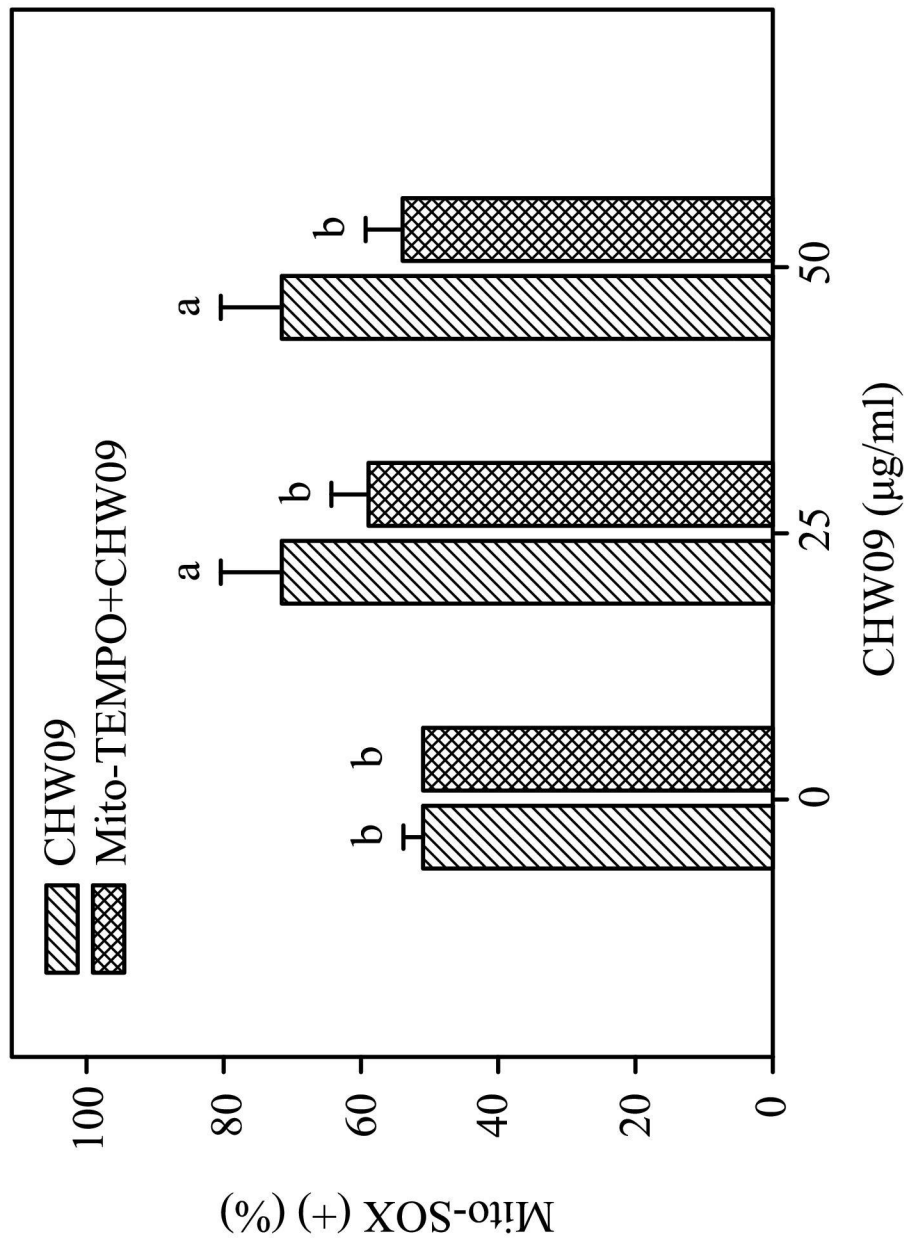


圖 7B

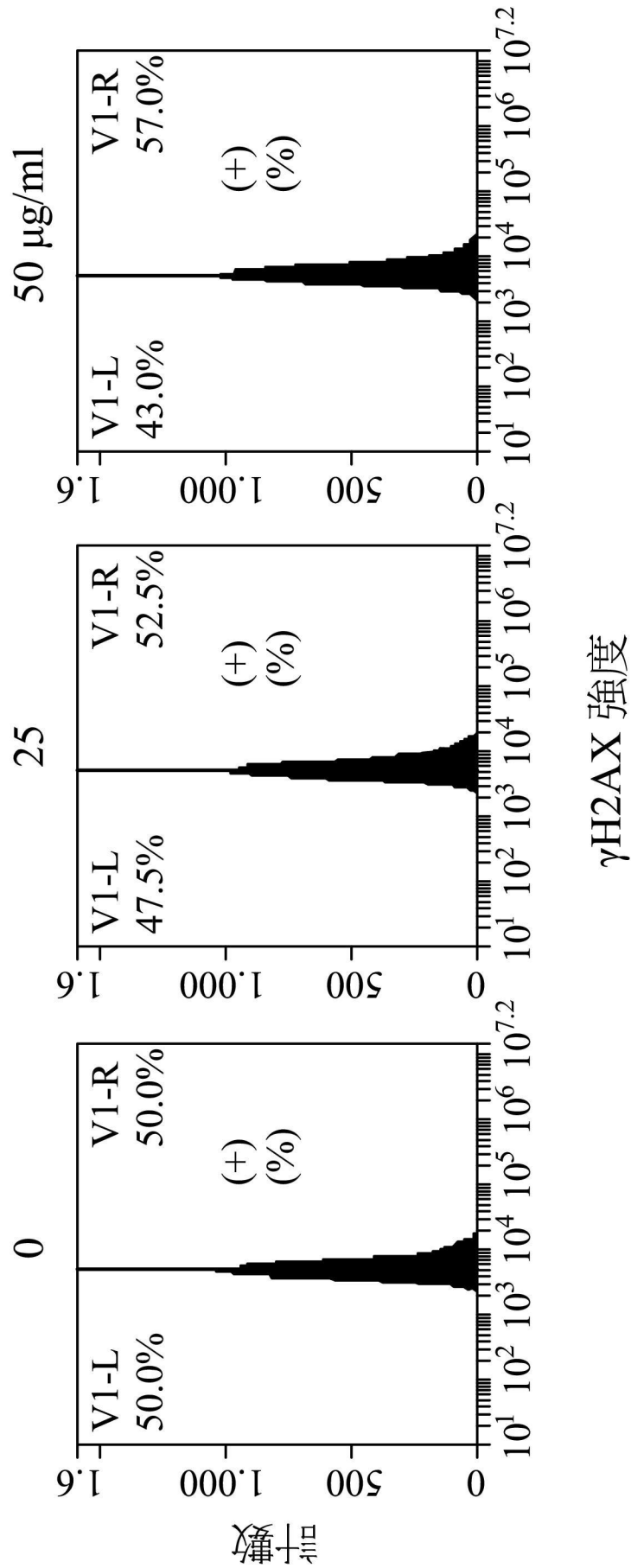


圖 8A

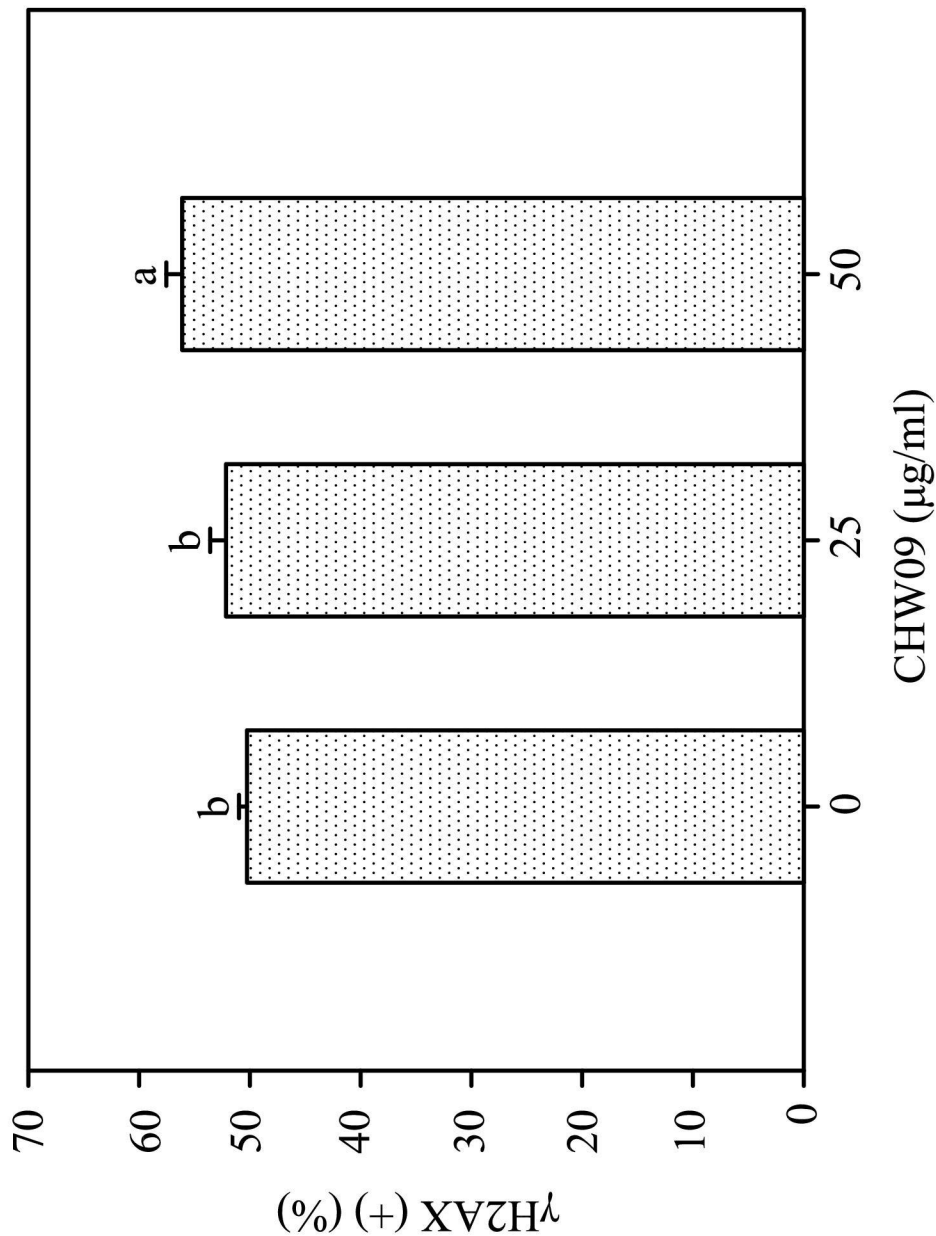


圖 8B

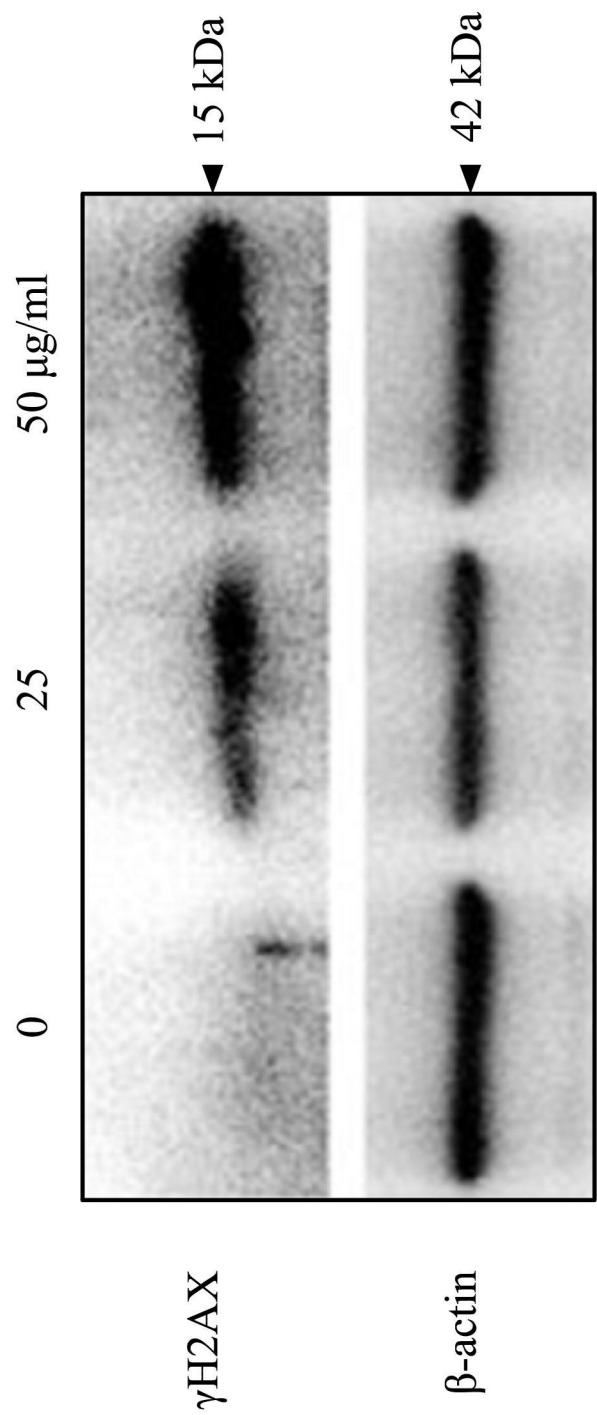


圖 8C

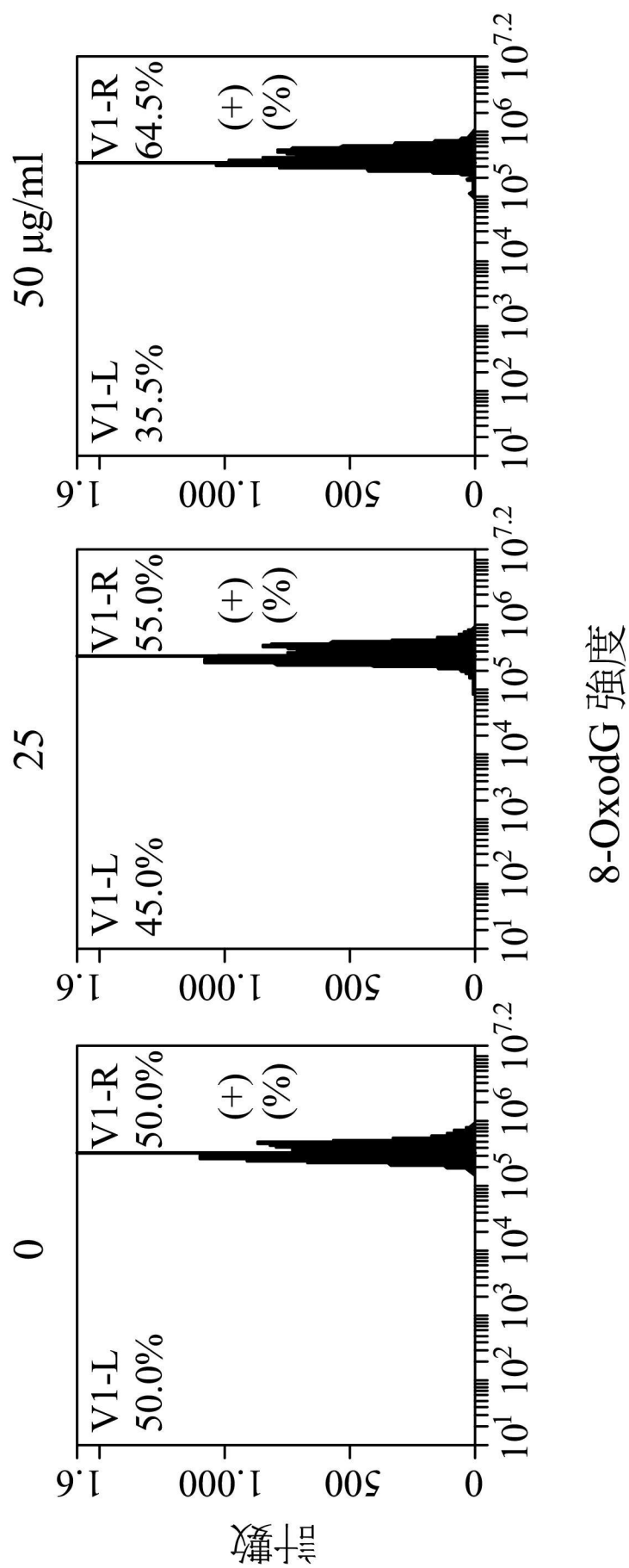


圖 9A

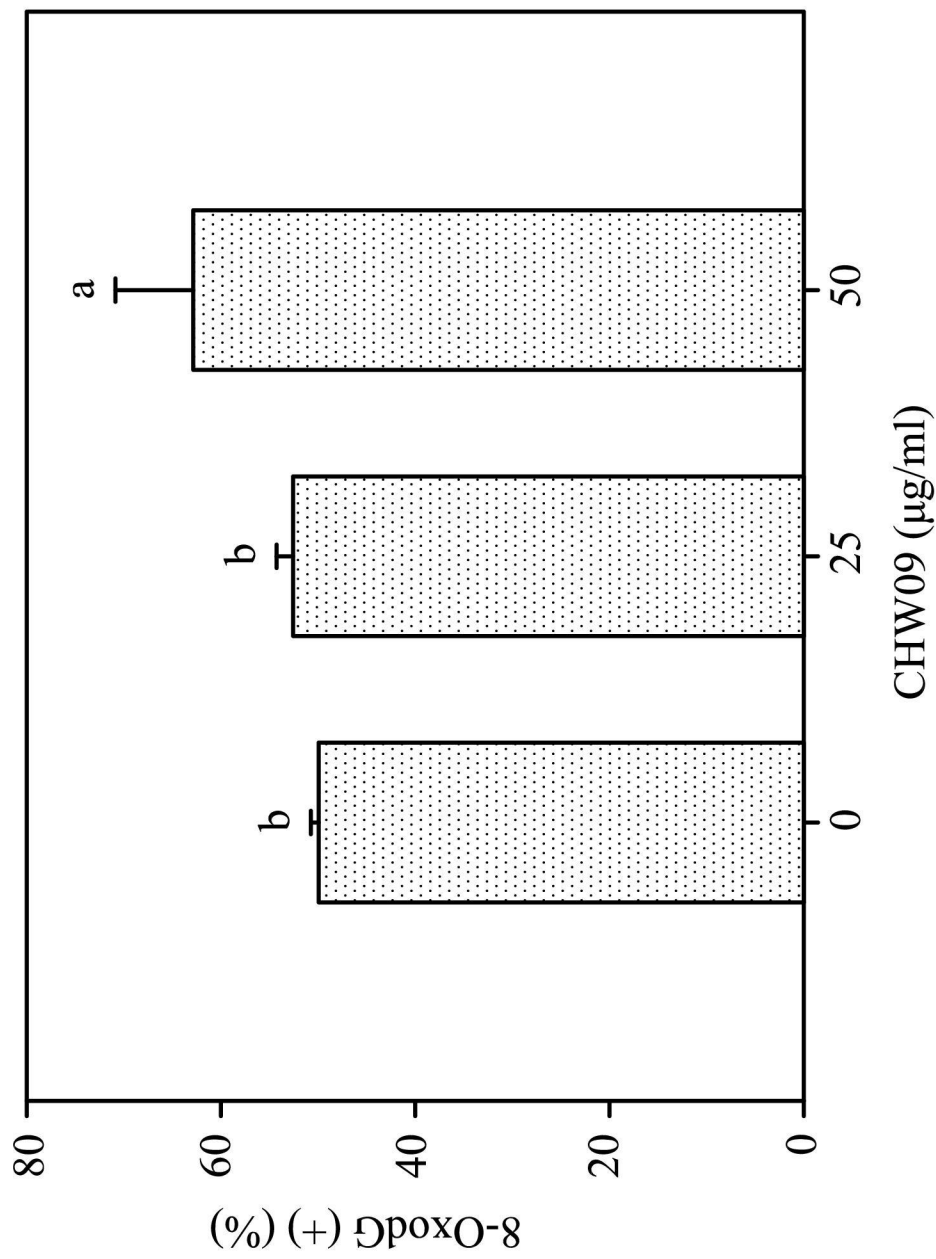


圖 9B

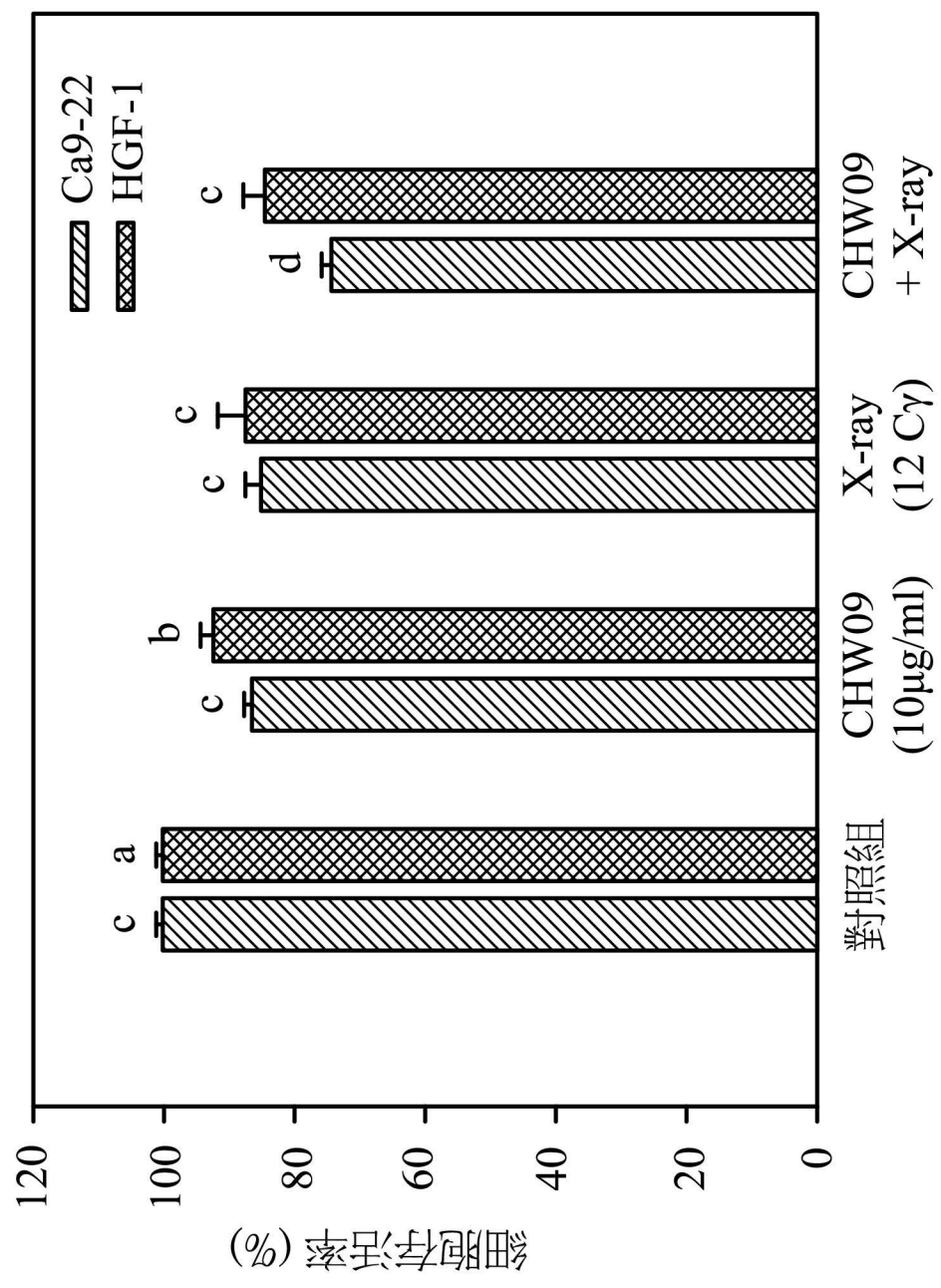


圖 10