



(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 I448295 B

(45)公告日：中華民國 103 (2014) 年 08 月 11 日

(21)申請案號：100141688

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 11 月 15 日

(51)Int. Cl. : A61K36/54 (2006.01)

A61K31/365 (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：李志恒 LI, JIH HENG (TW) ; 黃阿梅 HUANG, A MEI (TW) ; 陳中一 CHEN, CHUNG

YI (TW) ; 連培榮 LIEN, PEI JUNG (TW) ; 劉瓊惠 LIU, CHIUNG HUI (TW)

(74)代理人：蔡清福

(56)參考文獻：

US 2009/0247480A1

Chen CY, et al."Cytotoxic Constituents of the Stems of Cinnamomum subavenium", J. Nat. Prod., 2007, 70 (1), pp 103-106.

審查人員：吳祖漢

申請專利範圍項數：11 項 圖式數：16 共 0 頁

(54)名稱

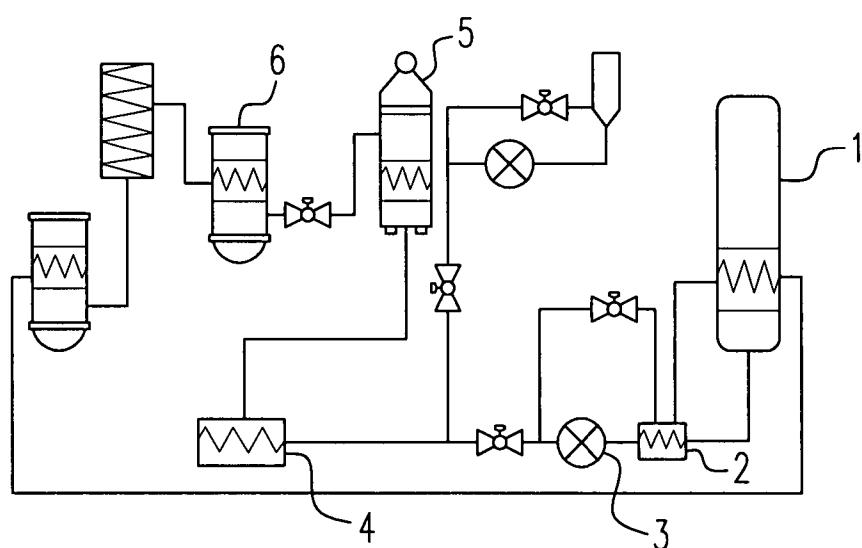
抗人類泌尿上皮癌之香桂超臨界萃取物、製備方法及用途

THE ANTI-HUMAN UROTHELIAL CARCINOMA OF SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE EXTRACT OF CINNAMOMUM SUBAVENIUM, AND THE PREPARATION PROCESS AND USES

(57)摘要

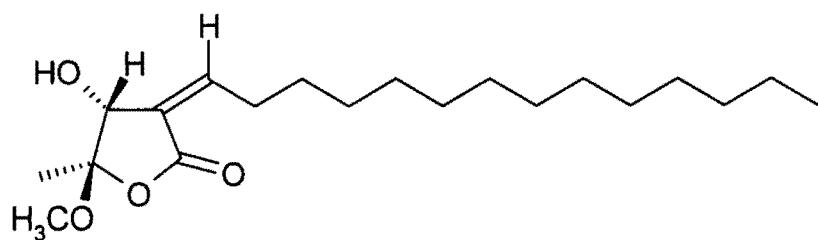
本發明揭示為一種香桂超臨界二氣化碳萃取物的方法，其係以乾燥的香桂莖部為材料，並以超臨界二氣化碳流體萃取粉碎為顆粒狀之香桂而得到萃取物，該香桂萃取物或其主要成分 subamolide A 可用於抑制人類泌尿上皮癌細胞之生長。此外，香桂萃取物(或 subamolide A)可協同性地與順雙氮雙氯鉑(或吉西他濱)抑制人類泌尿上皮癌細胞之生長。因此，香桂超臨界二氣化碳萃取物或 subamolide A 可單獨成為抗癌藥物，或是與順雙氮雙氯鉑(或吉西他濱)組合成為對抗與泌尿系統有關癌症之藥物組合物。

What is disclosed in the invention is a preparation method of a supercritical Cinnamomum subavenium extract, which is made from the material, the dried stem of *C. subavenium*. The extract is obtained by extracting *C. subavenium* which is pulverized as particles with supercritical carbon dioxide fluid. The *C. subavenium* extract or its active ingredient, subamolide A, can be used to inhibit the growth of human urothelial carcinoma cell lines. In addition, the *C. subavenium* extract (or subamolide A) is able to synergistically inhibit the growth of human urothelial carcinoma cell lines with cisplatin (CDDP) or gemcitabine (Gem). Therefore, the *C. subavenium* extract (or subamolide A) can be an anticancer drug alone, or forms a pharmaceutical composition with CDDP (or Gem) to treat with cancers in respect of urinary system.



- 1 . . . 二氣化碳儲存槽
- 2 . . . 預冷器
- 3 . . . 高壓液態泵
- 4 . . . 加熱器
- 5 . . . 超臨界萃取槽
- 6 . . . 氣液分離槽

第 1 圖



Subamolide A

告本

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：100141688

※申請日：100.11.15

※IPC分類：

A61K 36/54 (2006.01)

A61K 31/365 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

抗人類泌尿上皮癌之香桂超臨界萃取物、製備方法及用途 A61P 35/00 (2006.01)

THE ANTI-HUMAN UROTHELIAL CARCINOMA OF SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE EXTRACT OF *CINNAMOMUM SUBAVENIUM*, AND THE PREPARATION PROCESS AND USES

二、中文發明摘要：

本發明揭示為一種香桂超臨界二氧化碳萃取物的方法，其係以乾燥的香桂莖部為材料，並以超臨界二氧化碳流體萃取粉碎為顆粒狀之香桂而得到萃取物，該香桂萃取物或其主要成分 subamolide A 可用於抑制人類泌尿上皮癌細胞之生長。此外，香桂萃取物(或 subamolide A)可協同性地與順雙氨雙氯鉑(或吉西他濱)抑制人類泌尿上皮癌細胞之生長。因此，香桂超臨界二氧化碳萃取物或 subamolide A 可單獨成為抗癌藥物，或是與順雙氨雙氯鉑(或吉西他濱)組合成為對抗與泌尿系統有關癌症之藥物組合物。

三、英文發明摘要：

What is disclosed in the invention is a preparation method of a supercritical *Cinnamomum subavenium* extract, which is made from the material, the dried stem of *C. subavenium*. The extract is obtained by extracting *C. subavenium* which is pulverized as particles with supercritical carbon dioxide fluid. The *C. subavenium* extract or its active ingredient, subamolide A, can be used to inhibit the growth of human urothelial carcinoma cell lines. In addition, the *C. subavenium* extract (or subamolide A) is able to synergistically inhibit the growth of human urothelial carcinoma cell lines with cisplatin (CDDP) or gemcitabine (Gem). Therefore, the *C. subavenium* extract (or subamolide A) can be an anticancer drug alone, or forms a pharmaceutical composition with CDDP (or Gem) to treat with cancers in respect of urinary system.

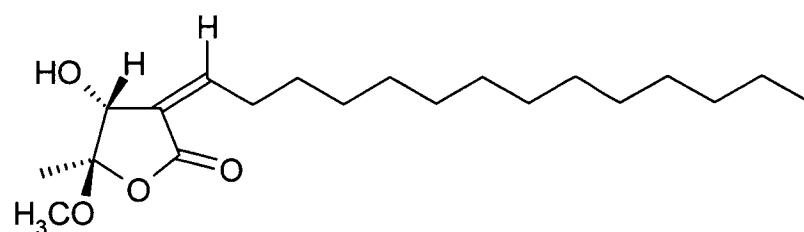
四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（一）圖

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

- 1 二氧化碳儲存槽
- 2 預冷器
- 3 高壓液態泵
- 4 加熱器
- 5 超臨界萃取槽
- 6 氣液分離槽

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本案係關於一種香桂萃取物，尤其是一種香桂超臨界萃取物、製備方法及其用途，該香桂超臨界萃取物可有效對抗人類泌尿上皮癌。

### 【先前技術】

香桂 (*Cinnamomum subavenium*) 為樟科 (Lauraceae) 樟屬 (*Cinnamomum genus*)，為生長於台灣海拔500至1000公尺森林之特有種，又稱為巒大桂 (*C. randaiense*)、山肉桂、土肉桂等。由於其樹皮及葉部均有芳香味，故稱為香桂。由香桂樹皮提煉的精油可作為化妝品之香精原料，而從香桂葉部提煉的葉油則可作為食品、香菸之原料，或作為殺蟲劑。在中藥上，香桂也被用於治療多種病痛，例如胃痛、胸痛、反常疼痛、疝氣、腹瀉、風濕、噁心及嘔吐等。

中華民國專利公開案第200924788號揭示一種殺菌劑組合物，其包含已被用於食品工業及作為抑菌之用的土肉桂精油及其他精油。該篇專利申請案僅揭示將包含土肉桂精油之精油進行調配，但並未揭示土肉桂精油的萃取方式及內含成分。

中華民國專利公開案第200914036號揭示一種驅防鋸蠻之皮膚外用劑，包含土肉桂、檳榔子等主要成分。但並未揭示土肉桂之製備方法或其內含之化合物。

由於先前技術並未揭示香桂之成分及其製備方法，本領域技術人士並無法善用香桂成分於醫療、化妝品等領域。

本案申請人鑑於習知技術中的不足，經過悉心試驗與研究，並一本鍥而不捨之精神，終構思出本案，能夠克服先前技術的不

足，以下為本案之簡要說明。

### 【發明內容】

本案發明人為了由香桂中萃取各種化合物，且為避免有機溶劑的使用及殘留與減少萃取過程之能源消耗，使用超臨界二氧化碳流體萃取香桂，而獲得以 subamolide A 為主要成分之多種化合物，香桂超臨界二氧化碳萃取物能有效用於抑制泌尿上皮癌細胞之生長、用於治療癌症。此外，將煙化劑(例如順雙氮雙氯鉑(cisplatin))及核苷酸類似物(例如吉西他濱(gemcitabine))分別與香桂超臨界二氧化碳萃取物共同使用，或者將煙化劑及核苷酸類似物分別與 subamolide A 共同使用，則可協同性地抑制泌尿上皮癌細胞之生長。因此，煙化劑與香桂超臨界二氧化碳萃取物(或 subamolide A)可單獨配製成一種藥物組合物，而核苷酸類似物與香桂超臨界二氧化碳萃取物(或 subamolide A)則可配製成另一種藥物組合物，而用於治療人類泌尿上皮癌細胞或與泌尿系統有關之癌症。

因此，本發明提供一種製備香桂萃取物的方法，該方法包括下列步驟：(a)乾燥一香桂；(b)粉碎該香桂為顆粒；以及(c)以一超臨界二氧化碳萃取該顆粒，獲得該香桂萃取物，該香桂萃取物包括 subamolide A。

其中，步驟(b)的操作條件包括萃取壓力介於 150 巴至 350 巴之間、萃取溫度介於 45°C 至 55°C 之間、超臨界二氧化碳之流速介於 4 公升/小時至 6 公升/小時之間以及原料填充密度介於 250 公克/公升至 320 公克/公升之間；而最佳的操作條件包括萃取壓力 250 巴、萃取溫度 45°C、超臨界二氧化碳之流速 4 公升/小時以及原料填充密度 320 公克/公升。本發明可採用香桂莖部為原料來加

以乾燥。

本發明另提供一種根據前述方法所製備的藥物萃取物，其用於治療或抑制癌細胞生長，該藥物萃取物包括：第一成分，其包括 subamolide A；以及第二成分，係包含單萜類化合物、倍半萜類化合物、倍半萜類衍生物、飽和脂肪酸、丁內脂類化合物、植物固醇、三萜類化合物、植物甾酮及其組合。

本發明另提供一種藥物組合物，包括具有一有效量之 subamolide A 以及具有另一有效量之煙化劑。

本發明另提供一種藥物組合物，包括具有一有效量之 subamolide A 以及具有另一有效量之核苷酸類似物。

本發明另提供一種藥物組合物，包括：香桂萃取物，其具有一有效量之 subamolide A；以及具有另一有效量之煙化劑。

本發明另提供一種藥物組合物，包括：香桂萃取物，其具有一有效量之 subamolide A；以及具有另一有效量之核苷酸類似物。

根據上述構想，香桂萃取物可為以超臨界二氧化碳流體萃取香桂而製備的香桂超臨界二氧化碳萃取物或是以甲醇萃取香桂而製備的香桂甲醇萃取物。

### 【實施方式】

本案所提出之發明將可由以下的實施例說明而得到充分瞭解，使得熟習本技藝之人士可以據以完成之，然而本案之實施並非可由下列實施例而被限制其實施型態，熟習本技藝之人士仍可依據除既揭露之實施例的精神推演出其他實施例，該等實施例皆當屬於本發明之範圍。

#### 實施例：

本發明的香桂萃取物(或稱為香桂甲醇萃取物)或香桂超臨界

二氣化碳萃取物可用於抑制泌尿上皮癌細胞之生長、用於治療癌症。替代性地，香桂萃取物或香桂超臨界二氣化碳萃取物中的主要成分 subamolide A 可被製備成為用於抗癌之藥物萃取物。替代性地，具有有效量的 subamolide A 及具有有效量的其他成分亦可被製備成用於抗癌之藥物萃取物。

香桂萃取物或香桂超臨界二氣化碳萃取物可與煙化劑(alkylating analog，為抗癌藥物)協同性地抑制泌尿上皮癌細胞之生長。替代性地，香桂萃取物或香桂超臨界二氣化碳萃取物中的 subamolide A 可與煙化劑協同性地抑制泌尿上皮癌細胞之生長。

香桂萃取物或香桂超臨界二氣化碳萃取物可與核昔酸類似物(nucleoside analog，為抗癌藥物)協同性地抑制泌尿上皮癌細胞之生長。替代性地，香桂萃取物或香桂超臨界二氣化碳萃取物中的 subamolide A 可與核昔酸類似物協同性地抑制泌尿上皮癌細胞之生長可與核昔酸類似物協同性地抑制泌尿上皮癌細胞之生長。

本發明用語，例如萃取物、化合物、煙化劑、類似物、藥物組合物、萃取物之成分等，在使用上均具有一有效量，其是指對毒殺細胞具有最低有效量、一範圍區間內之有效量、或是最高有效量。

煙化劑包括但不限於順雙氯雙氯鉑(cisplatin)、順式-1,1-環丁烷二羧酸二氯鉑(卡鉑, carboplatin)、益樂鉑(oxaliplatin)等。核昔酸類似物包括但不限於去氧腺昔類似物(deoxyadenosine analog)、去氧胞昔類似物(deoxycytidine analog，例如吉西他濱(gemcitabine))、去氧鳥昔類似物(deoxyguanosine analog)、去氧胸昔類似物(deoxythymidine analog)、去氧尿昔類似物(deoxyuridine analog)、6-巯基嘌呤(6-thiohypoxanthine)及 5-氟尿嘧啶(fluorouracil)等。

實驗與結果：

## 一、香桂超臨界二氣化碳萃取物之製備及分析：

本發明的香桂萃取物係以超臨界二氣化碳萃取香桂而製備。可採用的香桂莖部為原料來萃取。首先，將 5 公斤乾燥後的香桂莖部以機械或物理方式粉碎為平均約 1~2 mm 之顆粒。接著，利用田口品質實驗法的直交表(orthogonal array)排列組合進行實驗設計。本發明選用三水準直交表中的  $L_9(3^4)$  進行實驗排列組合，並決定 4 種控制因子。控制因子 A 為萃取壓力，控制因子 B 為萃取溫度，控制因子 C 為超臨界二氣化碳之流體質量流率，控制因子 D 為原物料填充密度。而決定各控制因子之水準數如下：萃取壓力分別為 150、250 以及 350 巴；萃取溫度分別為 45、50 以及 55°C；超臨界二氣化碳之流體質量流率分別為 4、5 以及 6 公升/小時；原物料填充密度分別為 250、285 以及 320 克/公升。

接著，請參閱第 1 圖的設備示意圖，將粉碎後之香桂顆粒置於超臨界萃取槽 5 內，以超臨界二氣化碳流體進行固態萃取。二氣化碳儲存槽 1 內的二氣化碳經過預冷器 2 預冷後，再經過高壓液態泵 3 及加熱器 4，設定前述控制因子(操作壓力為 150~350 巴、溫度為 45°C~55°C，流速為 4 公升/小時~6 公升/小時)使二氣化碳進入超臨界萃取槽 5。經固態萃取後的香桂超臨界二氣化碳萃取物與超臨界二氣化碳流體進入氣液分離槽 6 中，在氣液分離槽 6 下方出口收集香桂超臨界二氣化碳萃取物。藉由改變壓力與溫度，使超臨界二氣化碳流體改變其相態為氣態而降低香桂超臨界二氣化碳萃取物之溶解度，使香桂超臨界二氣化碳萃取物與超臨界二氣化碳流體分離，而達到氣液分離。氣態的二氣化碳再經壓縮後送回二氣化碳儲存槽 1 中回收使用。

以本領域技術人士所熟知的氣相層析串聯質譜(GC-MS)分析香桂超臨界二氣化碳萃取物可獲得 34 種組成物，如表 1 所示。其

可分類為單萜類化合物(例如：丁香酚)、倍半萜類化合物(例如： $\alpha$ -單澄茄油烯、 $\alpha$ -香柑油烯、反式- $\alpha$ -香柑油烯、 $\gamma$ -欖香烯、 $\beta$ -菖蒲二烯、 $\alpha$ -姜烯、順式- $\alpha$ -紅沒藥烯、 $\beta$ -紅沒藥烯、 $\beta$ -姜黃烯、 $\delta$ -紫穗槐烯、反式- $\alpha$ -紅沒藥烯)、倍半萜類衍生物(例如：柏木烷、 $\alpha$ -姜黃烯、橙花叔醇、氧化石竹烯、律草烯-1,2-環氧化物、庫貝醇、 $\tau$ -單橙茄醇、 $\alpha$ -單橙茄醇、*epi*- $\beta$ -單橙茄醇、*epi*- $\beta$ -紅沒藥醇、*epi*- $\alpha$ -紅沒藥醇、 $\alpha$ -沒藥醇、1,10-二氫諾卡酮)、飽和脂肪酸(例如：棕櫚酸乙酯)、丁內脂類化合物(isolinderanolide B、linderanolide B、secosubamolide、subamolide A)、植物固醇(例如： $\beta$ -谷甾醇、 $\gamma$ -谷甾醇)、三萜類化合物(例如：白樺脂醇)、植物甾酮(例如：谷甾酮)。

由於香桂超臨界二氧化碳萃取物係由香桂萃取而得，前述化合物種類或其包含的成分的種類及含量受不同氣候、溫度、濕度、雨水量、種植環境、土壤、收成季節等因素所影響，因此，每一批次之香桂超臨界二氧化碳萃取物的成分、比例均有差異。本領域技術人員基於本發明均可以這些化合物的種類及成分任意地調製出包含 subamolide A 及/或其他成分的藥物萃取物。

表 1、以氣相層析串聯質譜分析香桂超臨界二氧化碳萃取物之成分

編號	化合物	KI <sup>a</sup>	KI <sup>b</sup>	百分比 <sup>c</sup>	鑑定方式 <sup>d</sup>
1	丁香酚(Eugenol)	1341	1341	1.29	MS, KI
2	$\alpha$ -單澄茄油烯( $\alpha$ -Cubebene)	1363	1360	0.48	MS, KI
3	柏木烷(Cedr-8-ene)	1401	1405	0.28	MS, KI
4	$\alpha$ -香柑油烯( $\alpha$ -Bergamotene)	1394	1394	0.17	MS, KI
5	反式- $\alpha$ -香柑油烯 ( <i>trans</i> - $\alpha$ -Bergamotene)	1423	1423	0.68	MS, KI
6	$\gamma$ -欖香烯( $\gamma$ -Elemene)	1438	1433	1.31	MS, KI
7	$\beta$ -菖蒲二烯( $\beta$ -Acoradiene)	1442	1440	0.36	MS, KI
8	$\alpha$ -姜黃烯( $\alpha$ -Curcumene)	1470	1470	6.27	MS, KI

9	α-姜烯(α-Zingiberene)	1495	1495	1.66	MS, KI
10	順式-α-紅沒藥烯 ( <i>Cis</i> -α-bisabolene)	1494	1494	0.66	MS, KI
11	β-紅沒藥烯(β-Bisabolene)	1500	1500	4.66	MS, KI
12	β-姜黃烯(β-Curcumene)	1503	1503	0.56	MS, KI
13	δ-紫穗槐烯(δ-Amorphene)	1499	1499	1.03	MS, KI
14	反式-α-紅沒藥烯 ( <i>trans</i> -α-Bisabolene)	1523	1530	1.79	MS, KI
15	橙花叔醇(Nerolidol)	1549	1550	0.36	MS, KI
16	氧化石竹烯(Caryophyllene oxide)	1551	1549	0.86	MS, KI
17	律草烯-1,2-環氧化物 (Humulene-1,2-epoxide)	1581	1580	0.73	MS, KI
18	庫貝醇(Cubenol)	1603	1601	2.79	MS, KI
19	τ-華橙茄醇(τ-Cadinol)	1626	1625	2.00	MS, KI
20	α-華橙茄醇(α-Cadinol)	1628	1628	0.84	MS, KI
21	<i>epi</i> -β-華橙茄醇 ( <i>epi</i> -β-Cadinol)	1641	1644	1.74	MS, KI
22	<i>epi</i> -β-紅沒藥醇 ( <i>epi</i> -β-Bisabolol)	1669	1672	14.79	MS, KI
23	<i>epi</i> -α-紅沒藥醇 ( <i>epi</i> -α-Bisabolol)	1688	1687	0.78	MS, KI
24	α-沒藥醇(α-Bisabolol)	1690	1691	0.57	MS, KI
25	1,10-二氫諾卡酮 (1,10-Dihydro nootkatone)	1756	1761	0.63	MS, KI
26	棕櫚酸乙酯(Ethyl palmitate)	1982	1983	0.61	MS, KI
27	Isolinderanolide B	2291	-	10.29	MS
28	Linderanolide B	2326	-	1.22	MS
29	Secosubamolide	2410	-	3.42	MS

30	Subamolide A	2427	-	35.10	MS, ST
31	β-谷甾醇(β-Sitosterol)	3317	-	1.28	MS
32	γ-谷甾醇(γ-Sitosterol)	3363	-	0.39	MS
33	白樺脂醇(Betulin)	3380	-	0.13	MS
34	谷甾酮(Sitostenone)	3487	-	0.30	MS

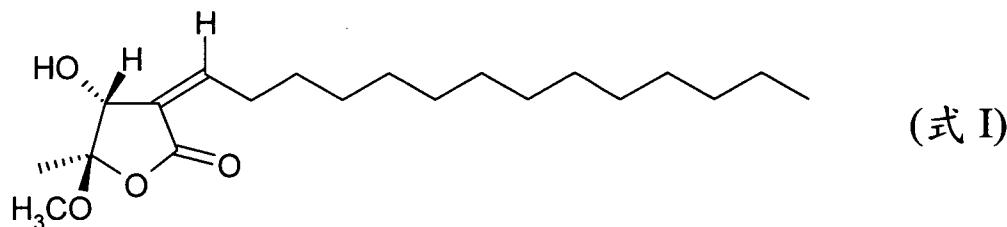
<sup>a</sup> 在 DB-5MS 管柱中相對於正烷類(n-alkanes, C<sub>10</sub>-C<sub>40</sub>)的 Kovats 指數

<sup>b</sup> 在 DB-5MS 管柱中的參考 Kovats 指數

<sup>c</sup> 在 Thermo Xcalibur<sup>TM</sup> 資料分析程式中由積分波峰區域計算的相對百分比

<sup>d</sup> 基於質譜比較、在參照 DB-5MS 管柱時共同引入標準及 Kovats 指數，所進行之鑑定

由表 1 可得知 subamolide A [(3Z,4R,5R)-3-tetradecylidene-4-hydroxy-5-methoxy-5-methylbutanolide], 式 I, 含量 35.1%為香桂超臨界二氧化碳萃取物之主要成分。



本發明以田口直交法之 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)直交表進行實驗設計，建立最佳化之操作條件為萃取壓力 150 巴、萃取溫度 45°C、超臨界二氧化碳之流體質量流率 4 公升/小時、原物料填充密度 250 克/公升。而由訊號雜音比(Signal to noise ratio; SN ratio)得知影響香桂超臨界二氧化碳萃取物之產率的主要因素依序為：超臨界二氧化碳之流體質量流率、萃取溫度、原物料填充密度、萃取壓力，其所預測之最佳操作條件為：萃取壓力 250 巴、萃取溫度 45°C、超臨界二氧化碳之流體質量流率 4 公升/小時、原物料填充密度 320 克/公升。上述兩種操作條件，所得之產率分別為 7.7%與 7.8%，顯示兩

種實驗方法所建立之操作條件相近，確認實驗結果與所預期的訊號雜音比相差範圍小於 5，亦即所選擇之實驗條件成立，且超臨界萃取產率為 5.39%，優於有機溶媒萃取率 1.54%。

將依據前述製備方法所獲得的香桂超臨界二氣化碳萃取物進行細胞毒殺試驗。請參閱第 2 圖，發現香桂超臨界二氣化碳萃取物對人類泌尿上皮癌細胞株 NTUB1 具有最佳之細胞毒殺活性 ( $IC_{50} = 0.67 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$ )，而對正常泌尿上皮細胞株 SV-HUC-1 之細胞毒殺活性則為  $IC_{50} = 14.1 \pm 1.15 \mu\text{g/mL}$ ，香桂超臨界二氣化碳萃取物可選擇性地作用於 NTUB1 癌細胞，而非正常細胞。

## 二、香桂萃取物之製備：

此外，另可由香桂莖部萃取出 subamolide A (純度高於 90%)。簡言之，在室溫下以甲醇萃取風乾乾燥的莖部，將以減壓濃縮獲得的甲醇萃取物再懸浮於水中，再以三氯甲烷分餾以獲得溶於三氯甲烷之分餾物及溶於水之分餾物。三氯甲烷可溶性分餾物在矽膠上使用正己烷-乙酸乙酯-甲醇混合物作為沖提液而進行色層分析，且分成 5 個次分餾物。第二分餾物再進行矽膠管柱層析，並使用正己烷-乙酸乙酯以製備型薄層色層分析進行純化，獲得 subamolide A。將 subamolide A 溶解於二甲基亞碸(DMSO)並儲存於-20°C。

## 三、統計分析：

以下實驗結果之數值以平均±標準差表示，在針對多組比較的 ANOVA 及針對兩組比較的學生 t-試驗之後，以邦弗朗尼 (Bonferroni) t-試驗進行統計分析， $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$  及  $***P < 0.001$  被認為具有統計上顯著性。

## 四、以 MTT 試驗法分析 Subamolide A 對不同癌細胞株之細胞殺作用：

化合物之細胞毒殺作用是使用二甲基噻唑煙基二苯四唑溴化物 (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT) 試驗法進行。簡言之，將細胞以  $1 \times 10^3$  cells/well 密度植入 96 孔盤並在藥物處理前隔夜培養於 37°C。之後將細胞培養於 37°C 無或有不同濃度(0.3、1、3、6、9、12、15 及 20  $\mu\text{M}$ )之 subamolide A 下 72 小時。之後，每個孔洞加入 50  $\mu\text{L}$  MTT (在 PBS 中 2 mg/mL) 並反應 4 小時。接著於  $1000 \times g$  離心 10 分鐘，移除培養液且每個孔洞加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO。於 540 nm 波長的吸收光譜測定存活細胞比例。細胞存活率是以存活比例和未處理之對照組表示。每組之 IC<sub>50</sub> 值以中位數抑制分析來計算並以平均±標準差(SD)來表示。而兩種化合物的組合效果則以中位數效應分析來分析。為了評估生長抑制的組合效果，採用相對應的組合指數(CI)，其小於 1、等於 1 或大於 1 分別代表協同作用、加成效應或拮抗效應。

請參閱第 3 圖，其為 subamolide A 對人類泌尿上皮癌細胞株之細胞毒殺作用示意圖。當與前列腺癌細胞 PC3 (IC<sub>50</sub> =  $10.10 \pm 0.67 \mu\text{M}$ ) 和人類泌尿上皮細胞 SV-HUC-1 (IC<sub>50</sub> =  $18.10 \pm 1.03 \mu\text{M}$ ) 分別相較，subamolide A 能顯著地降低泌尿上皮癌細胞 NTUB1 (IC<sub>50</sub> =  $7.26 \pm 0.67 \mu\text{M}$ ) 及 T24 (IC<sub>50</sub> =  $7.60 \pm 0.96 \mu\text{M}$ ) 之生長。因此，往後的實驗將研究 subamolide A 對 NTUB1 細胞的抗癌機制。如第 3 圖所示，在 72 小時處理後，NTUB1 及 T24 細胞之生長隨 subamolide A 劑量增加而降低，而 subamolide A 對 PC3 及 SV-HUC-1 細胞之細胞毒殺作用較低。

### 五、Subamolide A 誘導 NTUB1 細胞之細胞凋亡：

如第 4 圖(a)所示，以 1、5 及 10  $\mu\text{M}$  subamolide A 分別處理 NTUB1 細胞 ( $3 \times 10^5$  cells/well) 24 小時並以流式細胞技術分析後，相較於未處理之對照組，sub-G1 細胞凋亡之比例隨 subamolide A

劑量增加而增加(對應於 1、5 及 10  $\mu\text{M}$  subamolide A 分別為 5%、10.8%及 21.9% sub-G1 週期)。

## 六、細胞內活性氧之定量分析：

活性氧(reactive oxygen species, ROS)的產生以流式細胞儀加以分析。簡言之，將細胞植入 6 孔盤，在收集細胞前將 10  $\mu\text{L}$  二氯螢光雙醋酸鹽(dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA)加至經處理的細胞 30 分鐘。以胰蛋白消化收集細胞，並以 PBS 清洗。以流式細胞儀結合 525 nm 帶通濾波器分析細胞內之二氯螢光(2',7'-dichlorofluorescein)。活性氧生產效率(M1 比例)以“(在 M1 之處理樣本計數-在 M1 之對照組計數)/在 M1 之對照組計數×100”表示。

活性氧已知可導致廣泛的適應性細胞反應，取決於活性氧之含量，範圍由暫時性之生長抑制到永久性之生長抑制、細胞凋亡、壞死(necrosis)等。在此，評估 subamolide A 對 NTUB1 細胞及 SV-HUC-1 細胞之細胞內活性氧含量。

請參閱第 4 圖(b)，在 10  $\mu\text{M}$  subamolide A 處理下，當與對照組比較時，NTUB1 細胞之活性氧 M1 比例為 $-14.7 \pm 0.99\%$ ，而 SV-HUC-1 細胞之活性氧 M1 比例為 $-11.6 \pm 1.41\%$ 。Subamolide A 導致細胞內活性氧含量(M1 比例)顯著的降低，而隨著 subamolide A 濃度增加，在兩種細胞株均觀察到相似的變化；意即，Subamolide A 在 NTUB1 及 SV-HUC-1 細胞株均降低活性氧之產生。此結果指出細胞內活性氧含量的改變在這些細胞中並未使細胞毒殺作用有差異。

## 七、以粒腺體膜電位(MMP, $\Delta\psi_m$ )測定粒腺體之細胞凋亡路徑：

粒腺體膜電位高低是以親脂性陽離子 JC-1 ( $5,5',6,6'$ -tetrachloro- $1,1',3,3'$ -tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide) 螢

光染劑來測定。簡言之，以前述的實驗條件將細胞植入培養盤並進行藥物處理。在收集細胞前，將 JC-1 螢光染劑( $1 \mu\text{M}$ )加至細胞 30 分鐘。以胰蛋白消化收集細胞，並以 PBS 清洗。以流式細胞儀及軟體立刻分析紅色區域(細胞經 JC1 染色後呈聚集，R1 區域)及綠色區域(細胞經 JC1 染色後呈單體，R2 區域)。

為了驗證 subamolide A 是否藉由破壞粒腺體之凋亡路徑而引起細胞毒殺作用，在經 subamolide A 處理之 NTUB1 細胞測量其粒腺體膜電位( $\Delta\psi_m$ )的改變。結果發現，經 JC-1 染色後的 NTUB1 細胞由聚集形式(紅色螢光；R1)轉變為單體形式(綠色螢光；R2)(結果未示出)，其指出  $10 \mu\text{M}$  subamolide A 的處理將導致粒腺體功能的破壞(3.52%相較於 52.04%)。

此外，請參閱第 5 圖(a)及第 5 圖(b)，當粒腺體膜電位降低時，subamolide A 正向調節 Bax 及反向調節 Bcl-2 蛋白表現，導致在  $10 \mu\text{M}$  subamolide A 作用時 Bax/Bcl-2 比例增加兩倍。一致性地，細胞色素 c 由粒腺體釋出至細胞質中(在  $10 \mu\text{M}$  subamolide A 作用時達到 2.3 倍)(第 5 圖(c))。此外，隨著 subamolide A 濃度增加，pro-caspase 3 表現量降低且出現全長 116 kDa 之 PARP 蛋白，表示 caspase 3 被活化且 PARP 被切割，證實 subamolide A 所誘導的細胞凋亡是經由活化粒腺體凋亡訊息路徑。

## 八、Subamolide A 在 NTUB1 細胞之細胞凋亡之影響：

請參閱第 6 圖(a)之西方墨點圖譜， $10 \mu\text{M}$  subamolide A 在 NTUB1 細胞活化了 ERK1/2 蛋白表現，但並無活化 p38 或 JNK 蛋白表現。而 subamolide A 可誘導 NTUB1 細胞之 p53 蛋白表現及 p53 在第 15 個胺基酸位置(serine 15)的磷酸化，表示 p53 在由 subamolide A 調節的細胞凋亡的誘導是具有關鍵性地位(第 6 圖(b))。

## 九、Subamolide A 與順雙氮雙氯鉑或吉西他濱之組合對 NTUB1 細胞之細胞毒殺作用：

順雙氮雙氯鉑(cisplatin, CDDP)及吉西他濱(gemcitabine, Gem)為市售之化療藥物，其對 NTUB1 細胞(實驗開始種植細胞數： $1 \times 10^3$  cells/well)作用 72 小時後的  $IC_{50}$  值分別為  $3 \mu\text{M}$  及  $8 \text{nM}$  (結果未示出)。請參閱第 7 圖(a)，將 subamolide A (0、1、5 及  $10 \mu\text{M}$ )與順雙氮雙氯鉑(1 及  $3 \mu\text{M}$ )(或者與吉西他濱(2 及  $8 \text{nM}$ ))進行組合而共同作用於 NTUB1 細胞(實驗開始種植細胞數： $1 \times 10^3$  cells/well)連續 3 天，並以 MTT 試驗法測定細胞存活率及計算組合指數，結果發現，subamolide A 與順雙氮雙氯鉑(或者 subamolide A 與吉西他濱)均有效且顯著地抑制 NTUB1 細胞之生長(第 7 圖(a)、(b)、(c)及(d))，表示 subamolide A 與順雙氮雙氯鉑(或者 subamolide A 與吉西他濱)對泌尿上皮癌細胞(例如 NTUB1 細胞)有協同作用。

由於 subamolide A 為香桂超臨界二氣化碳萃取物的主要成分，本領域技術人士將含有 subamolide A 的香桂超臨界二氣化碳萃取物與順雙氮雙氯鉑，或者將含有 subamolide A 的香桂超臨界二氣化碳萃取物與吉西他濱共同處理泌尿上皮癌細胞，將比個別藥物處理泌尿上皮癌細胞獲得更佳的抑制效果。

前述實驗係分別選擇數個 Subamolide A 及順雙氮雙氯鉑(或吉西他濱)的濃度進行組合，以分析其協同作用。但本領域的技術人士均可任意地根據前述實驗條件，調整 Subamolide A 及順雙氮雙氯鉑(或吉西他濱)的濃度，而施用於 NTUB1 細胞或其他細胞株，或者依照實驗動物技術而施用於適當生理條件(如體重、年齡、性別、疾病狀態等)及實驗條件的動物上。例如，於針對密度  $1 \times 10^3$  cells/well 之 NTUB1 細胞數的細胞實驗中，調整 subamolide A 的濃度為低於  $1 \mu\text{M}$ 、介於  $1$  至  $10 \mu\text{M}$  或高於  $10 \mu\text{M}$ ；調整順雙氮雙氯

鉑的濃度為低於  $1 \mu\text{M}$ 、介於  $1$  至  $3 \mu\text{M}$  或高於  $3 \mu\text{M}$ ；以及調整吉西他濱的濃度為低於  $2 \mu\text{M}$ 、介於  $2$  至  $8 \mu\text{M}$  或高於  $8 \mu\text{M}$ 。於動物實驗上，則依據動物之體重、年齡、性別、疾病狀態等條件施用：(1)適當量的 Subamolide A 及順雙氮雙氯鉑(或吉西他濱)；(2)適當量的香桂甲醇萃取物(含適當量之 Subamolide A)及順雙氮雙氯鉑(或吉西他濱)；或(3)適當量的香桂超臨界二氣化碳萃取物(含適當量之 Subamolide A)及順雙氮雙氯鉑(或吉西他濱)。更甚者，本領域的技術人士亦可換算得到施用於人體的適當量的 Subamolide A(香桂甲醇萃取物或香桂超臨界二氣化碳萃取物)及順雙氮雙氯鉑(或吉西他濱)。含有適當量之 Subamolide A 及適當量之順雙氮雙氯鉑(或吉西他濱)的藥物組合物可施用於動物細胞及動物身上，動物包括人、齧齒類動物、或其他哺乳類動物等。

此外，請參閱第 8 圖(a)及第 8 圖(b)，可發現香桂超臨界二氣化碳萃取物在濃度  $1$  及  $2 \mu\text{g}/\text{mL}$  以下亦可協同性地增加順雙氮雙氯鉑( $1 \mu\text{M}$ )與吉西他濱( $2 \text{nM}$ )於 NTUB1 細胞中之細胞毒殺活性，其協同性地影響優於 subamolide A。

本發明實屬難能的創新發明，深具產業價值，援依法提出申請。此外，本發明可以由本領域技術人員做任何修改，但不脫離如所附申請專利範圍所要保護的範圍。

### 【圖式簡單說明】

第 1 圖為本發明的香桂超臨界二氣化碳萃取物之設備示意圖。

第 2 圖為香桂超臨界二氣化碳萃取物對人類泌尿上皮癌細胞株 NTUB1 及正常泌尿上皮細胞株 SV-HUC-1 之細胞毒殺活性。

第 3 圖為 subamolide A 抑制人類泌尿上皮癌細胞株 NTUB1 及 T24、人類前列腺癌細胞株 PC3 及正常泌尿上皮細胞株

SV-HUC-1 之細胞存活率。

第 4 圖(a)為以 subamolide A 處理 NTUB1 細胞後之各個細胞週期之比例。

第 4 圖(b)為以 subamolide A 處理 NTUB1 及 SV-HUC-1 細胞後之細胞內活性氧 M1 比例之變化示意圖。

第 5 圖(a)為以 subamolide A 處理 NTUB1 細胞後之細胞蛋白表現變化之西方點漬圖譜。

第 5 圖(b)及第 5 圖(c)分別為以 subamolide A 處理 NTUB1 細胞後之(b) Bax/Bcl-2 比例之變化倍數以及(c)細胞色素 c 之變化倍數示意圖。

第 6 圖(a)及第 6 圖(b)為以 subamolide A 處理 NTUB1 細胞後之西方點漬圖譜。

第 7 圖(a)及第 7 圖(b)分別為以 subamolide A 及順雙氮雙氯鉑對 NTUB1 細胞作用 24、48 及 72 小時之組合式細胞毒殺作用之(a)細胞存活率以及(b)組合指數。組合指數以 Calcusyn 軟體執行中位數效應分析(median-effect analysis)而得。

第 7 圖(c)及第 7 圖(d)分別為以 subamolide A 及吉西他濱對 NTUB1 細胞作用 24、48 及 72 小時之組合式細胞毒殺作用之(a)細胞存活率以及(b)組合指數。組合指數以 Calcusyn 軟體執行中位數效應分析(median-effect analysis)而得。

第 8 圖(a)及第 8 圖(b)分別為以香桂超臨界二氧化碳萃取物(內含主成分 subamolide A)及順雙氮雙氯鉑(或吉西他濱)對 NTUB1 細胞作用 24 小時之組合式細胞毒殺作用之(a)細胞存活率以及(b)組合指數。組合指數以 Calcusyn 軟體執行中位數效應分析(median-effect analysis)而得。

【主要元件符號說明】

- 1 二<sup>化</sup>碳儲存槽
- 2 預冷器
- 3 高壓液態泵
- 4 加熱器
- 5 超臨界萃取槽
- 6 氣液分離槽

公告本

103年6月23日修正本

**七、申請專利範圍：**

P.19-20

1. 一種製備一香桂萃取物的方法，該方法包括下列步驟：

(a) 乾燥一香桂；

(b) 粉碎該香桂為複數個顆粒；以及

(c) 以一起臨界二氣化碳萃取該複數個顆粒，獲得該香桂萃取物，該香桂萃取物包含 subamolide A，其中，該超臨界二氣化碳的操作條件包括流速介於 4 公升/小時至 6 公升/小時之間以及原料填充密度介於 250 公克/公升至 320 公克/公升之間。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述的方法，其中該步驟(b)的操作條件包括萃取壓力介於 150 巴至 350 巴之間以及萃取溫度介於 45°C 至 55°C 之間。

3. 如申請專利範圍第 2 項所述的方法，其中該步驟(b)的操作條件還包括萃取壓力 250 巴、萃取溫度 45°C、該超臨界二氣化碳之流速 4 公升/小時以及原料填充密度 320 公克/公升。

4. 如申請專利範圍第 1 項所述的方法，其中該步驟(a)更包括步驟  
(a1) 乾燥該香桂的莖部。

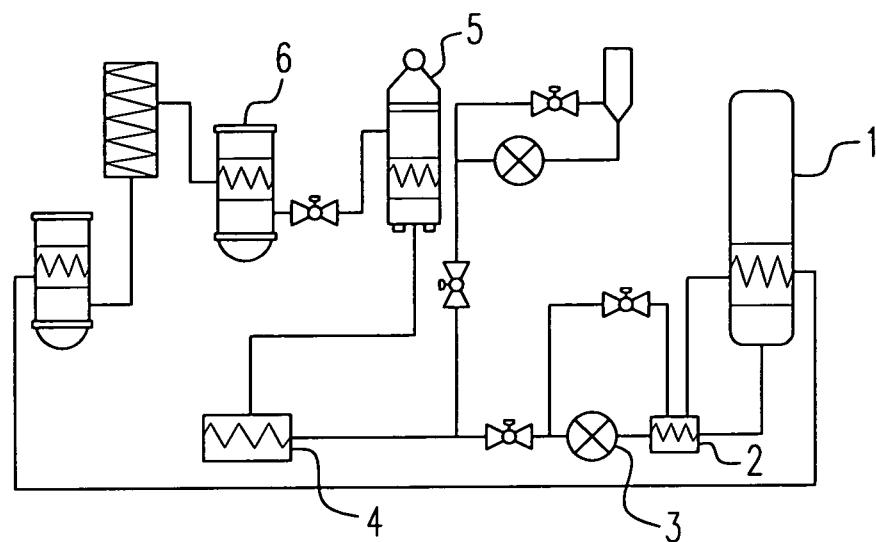
5. 一種根據申請專利範圍第 1 項所述的方法所製備用於抑制一人類泌尿上皮癌細胞生長的一藥物萃取物之用途，該藥物萃取物包括：一第一成分，包括 subamolide A；以及  
一第二成分，係選自由一單萜類化合物、一倍半萜類化合物、一倍半萜類衍生物、一飽和脂肪酸、一丁內脂類化合物、一植物固醇、一三萜類化合物、一植物甾酮及其組合所組成的群組其中之一。

6. 一種以 subamolide A 及一煙化劑用於製備抑制一人類泌尿上皮癌細胞生長的藥物組合物之用途，其中該 subamolide A 具有一第一有效量及該煙化劑具有一第二有效量。

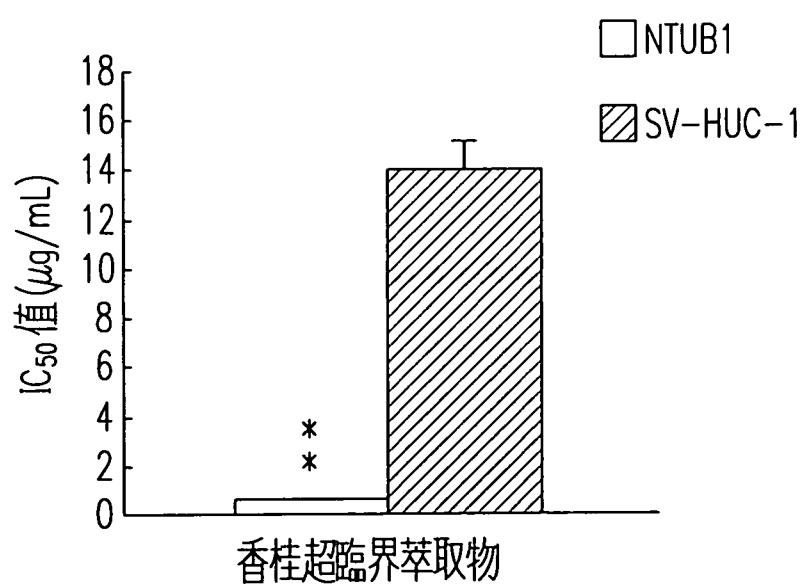
7. 一種以 subamolide A 及一核苷酸類似物用於製備抑制一人類泌尿上皮癌細胞生長的藥物組合物之用途，其中該 subamolide A 具有一第一有效量及該核苷酸類似物具有一第二有效量。
8. 如申請專利範圍第 6 及 7 項中任一項所述之用途，其中該 subamolide A 係以一超臨界二氧化碳流體萃取一香桂而製備。
9. 一種以一香桂萃取物及一煙化劑用於製備抑制一人類泌尿上皮癌細胞生長的藥物組合物之用途，其中該香桂萃取物包含具有一第一有效量之 subamolide A 及該煙化劑具有一第二有效量。
10. 一種以一香桂萃取物及一核苷酸類似物用於製備抑制一人類泌尿上皮癌細胞生長的藥物組合物之用途，其中該香桂萃取物包含具有一第一有效量之 subamolide A 及該核苷酸類似物具有一第二有效量。
11. 如申請專利範圍第 9 及 10 項中任一項所述之用途，其中該香桂萃取物還為一香桂超臨界二氧化碳萃取物或一香桂甲醇萃取物，該香桂超臨界二氧化碳萃取物係以一超臨界二氧化碳流體萃取一香桂而製備，該香桂甲醇萃取物是以一甲醇萃取該香桂而製備。

公告本

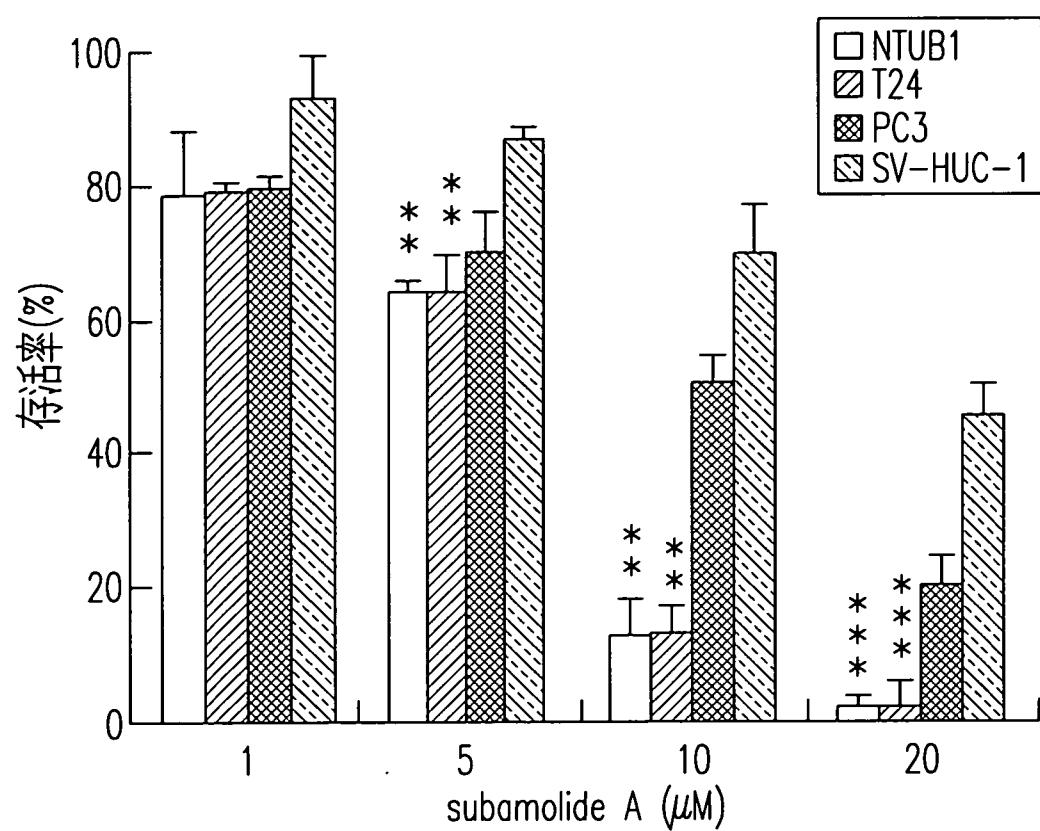
八、圖式：



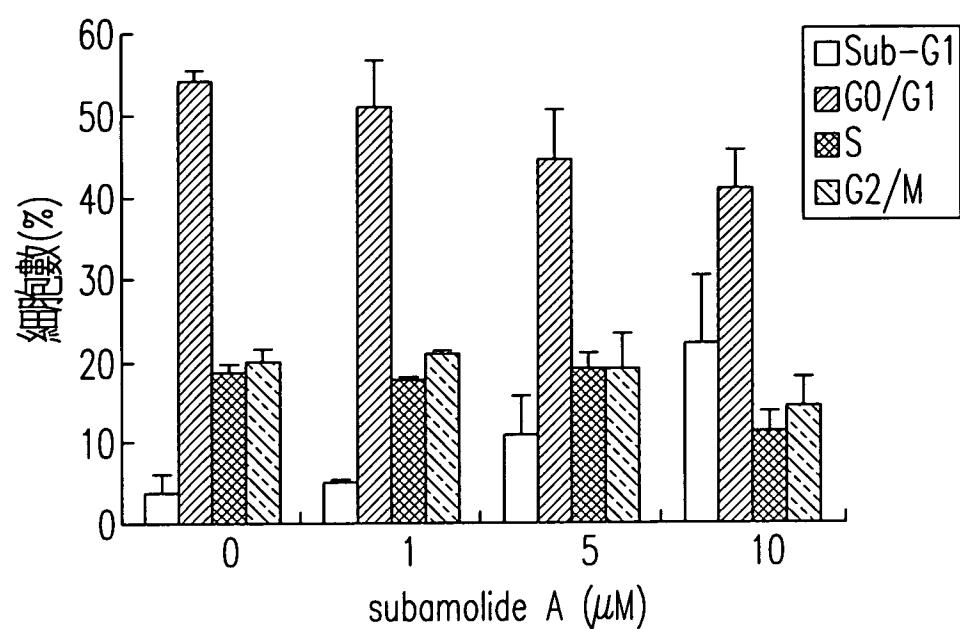
第 1 圖



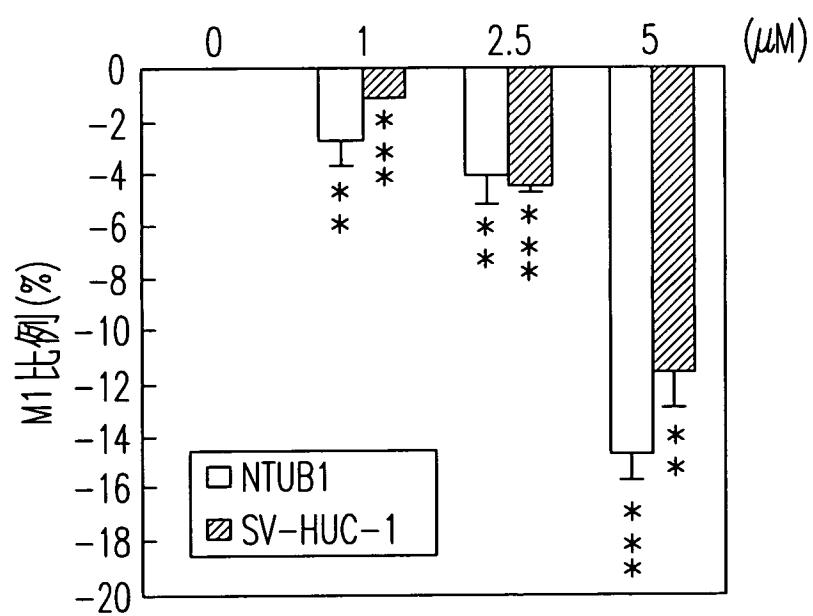
第 2 圖



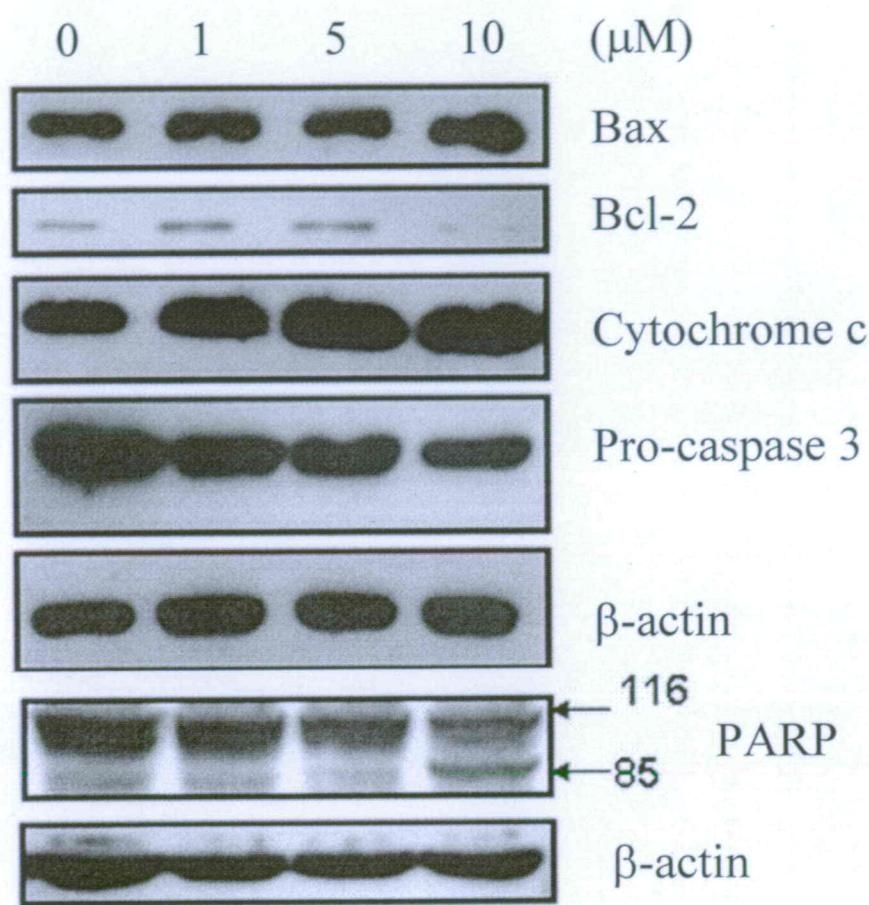
第3圖



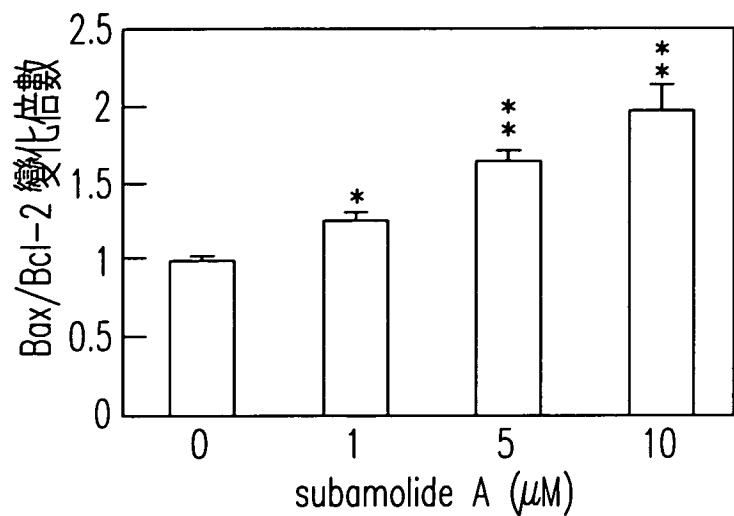
第4圖(a)



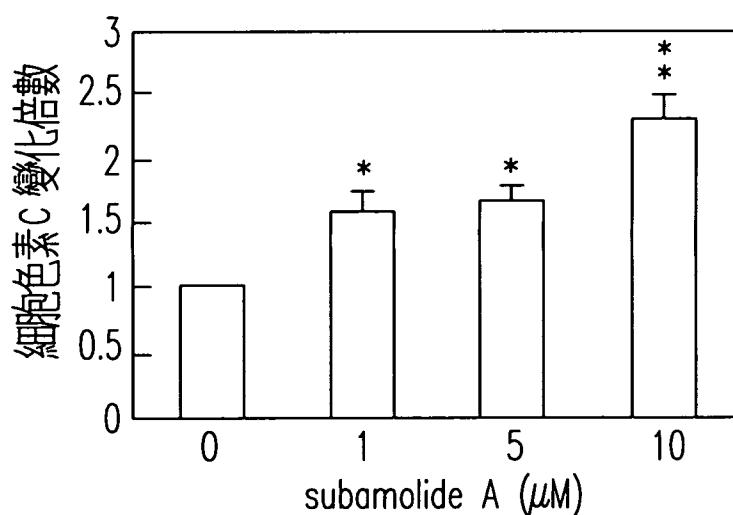
第4圖(b)



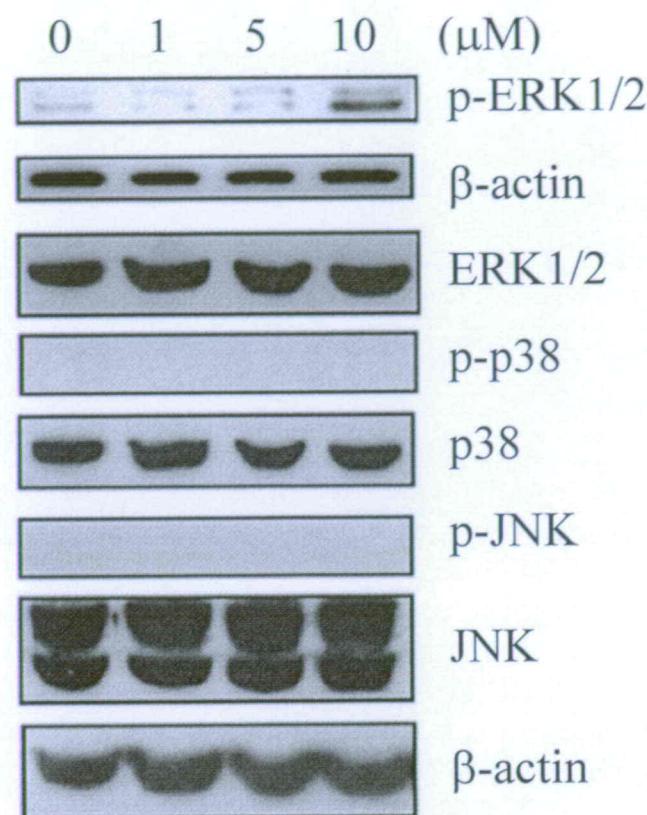
第5圖(a)



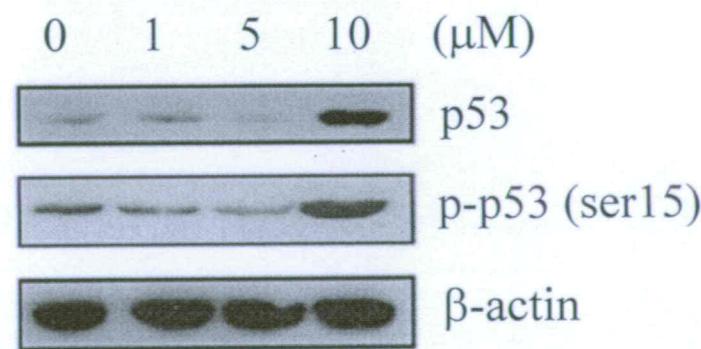
第5圖(b)



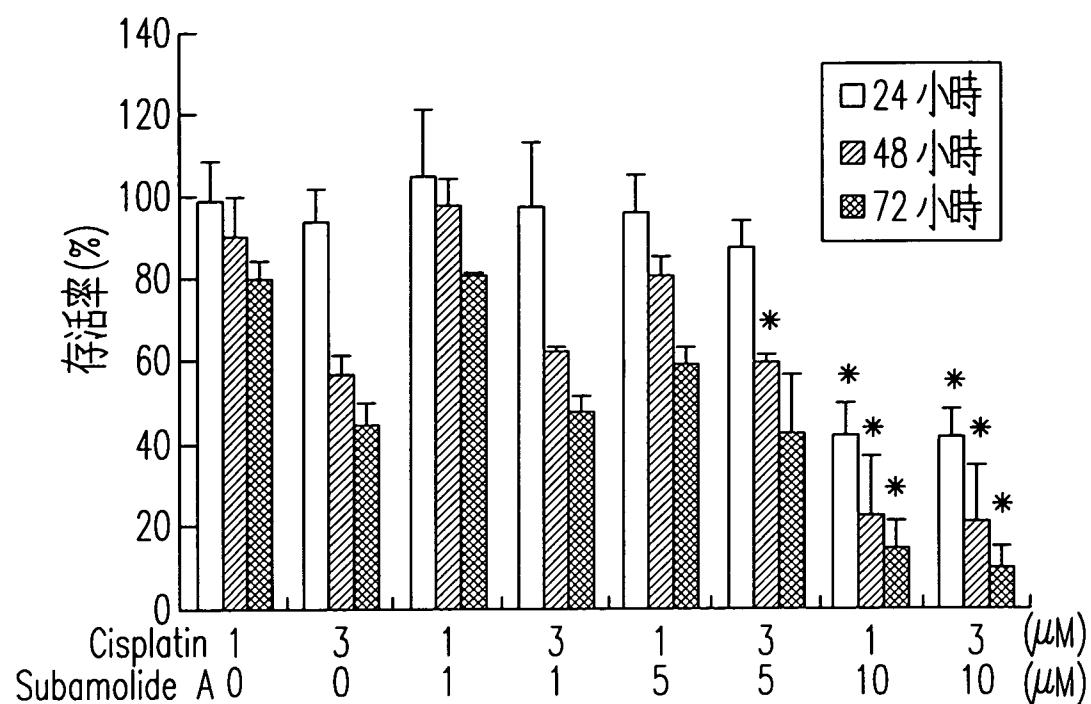
第5圖(c)



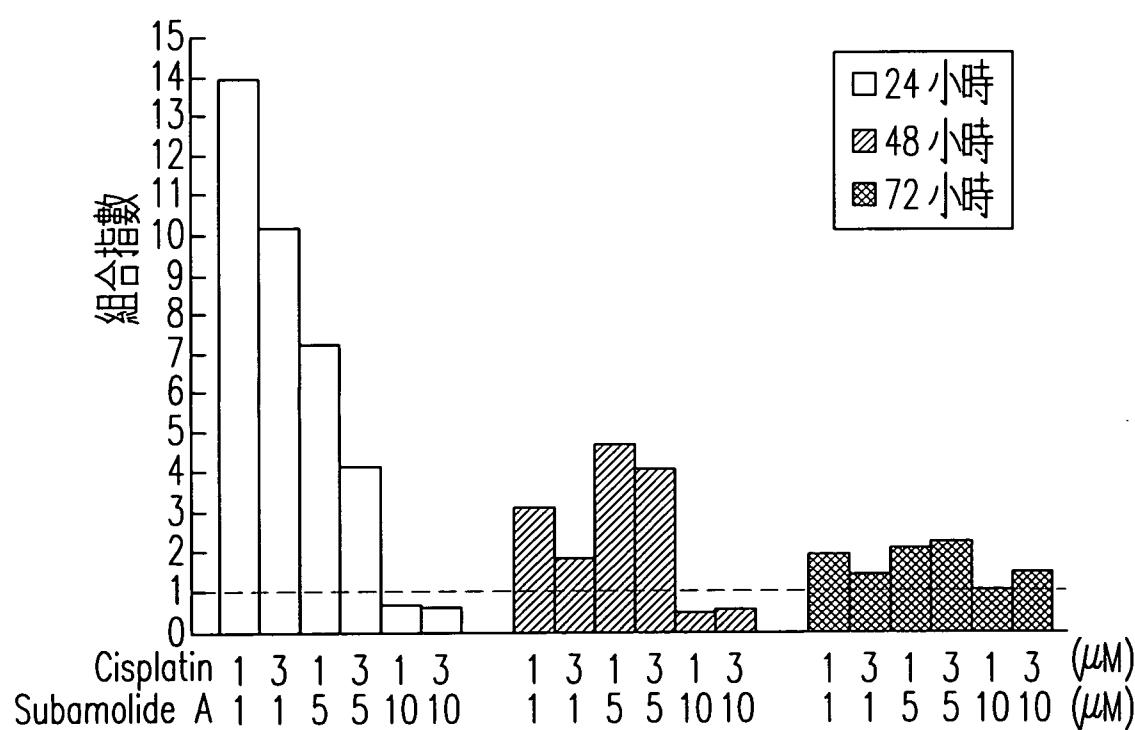
第6圖(a)



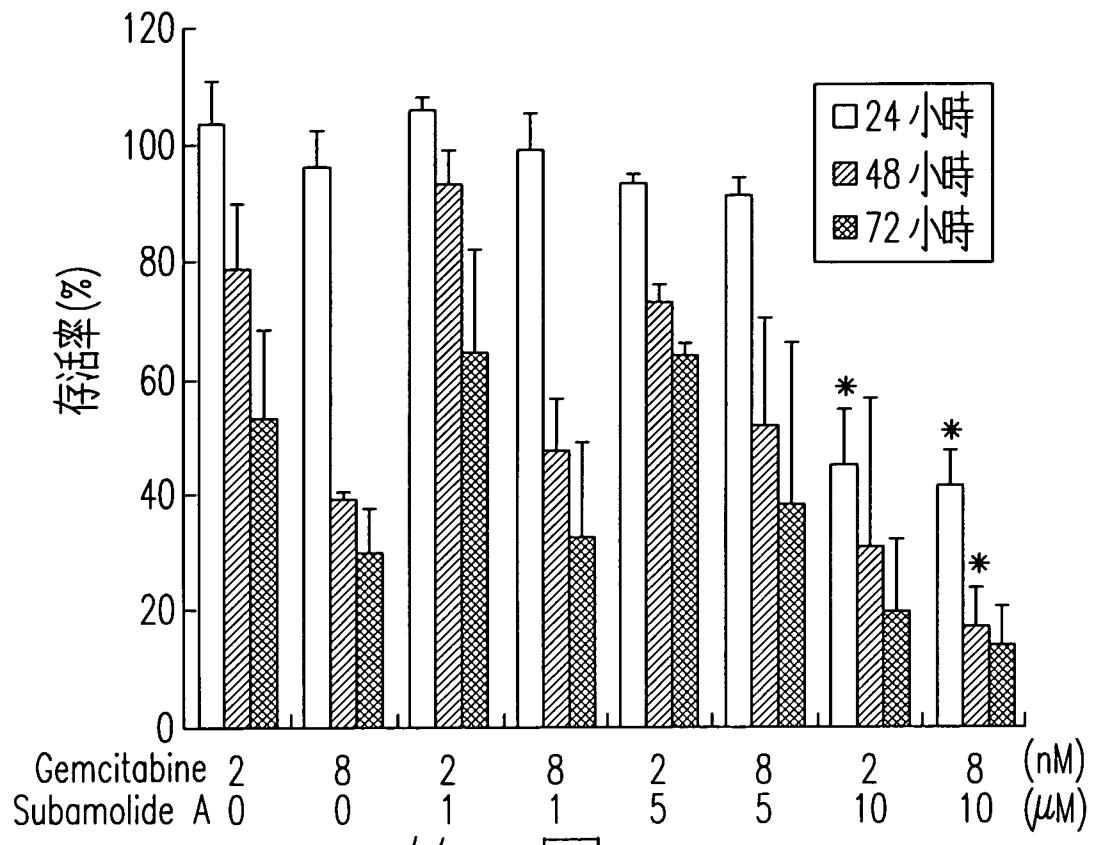
第6圖(b)



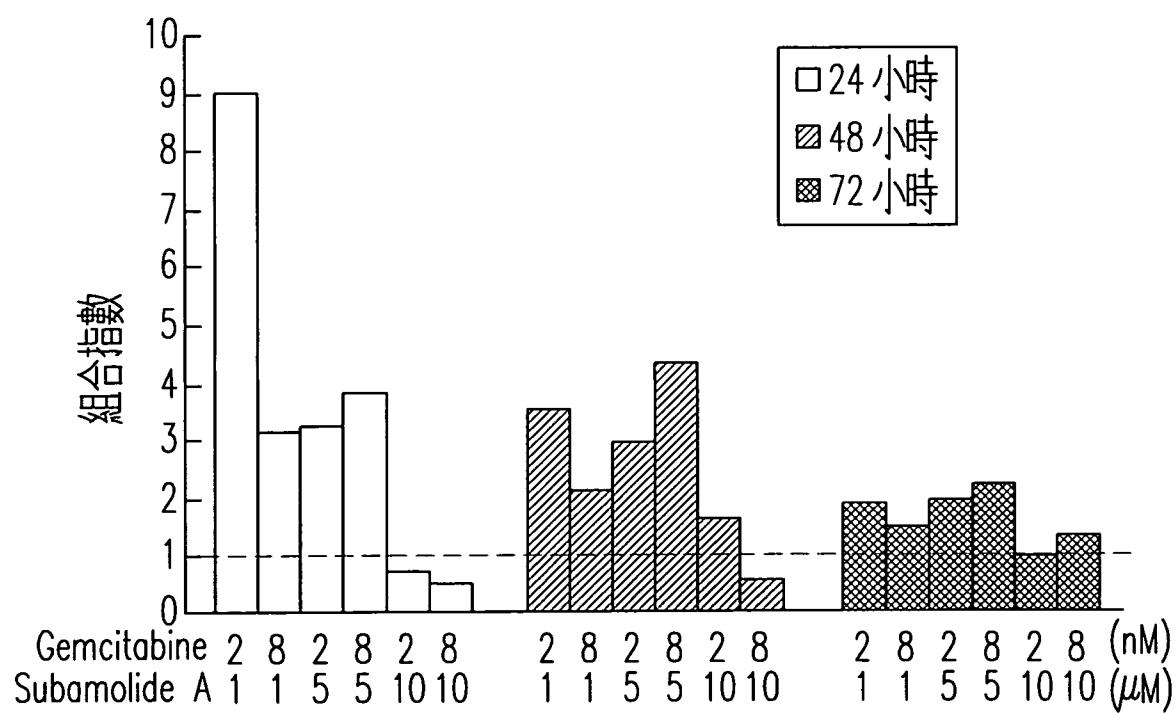
第 7 圖(a)



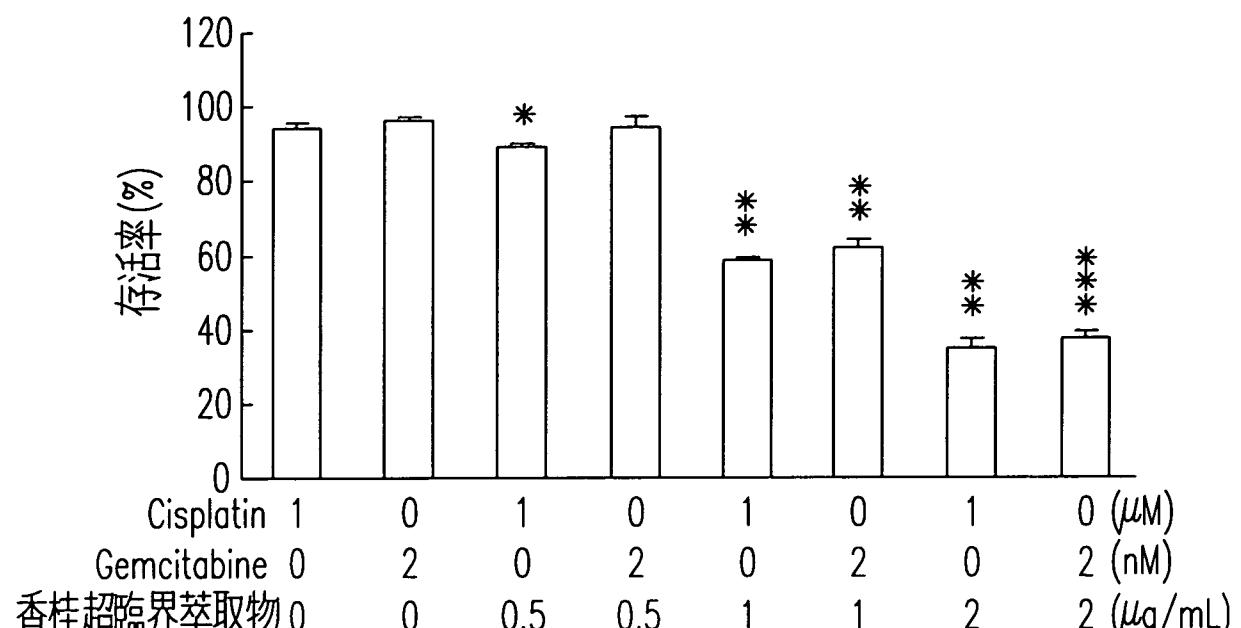
第 7 圖(b)



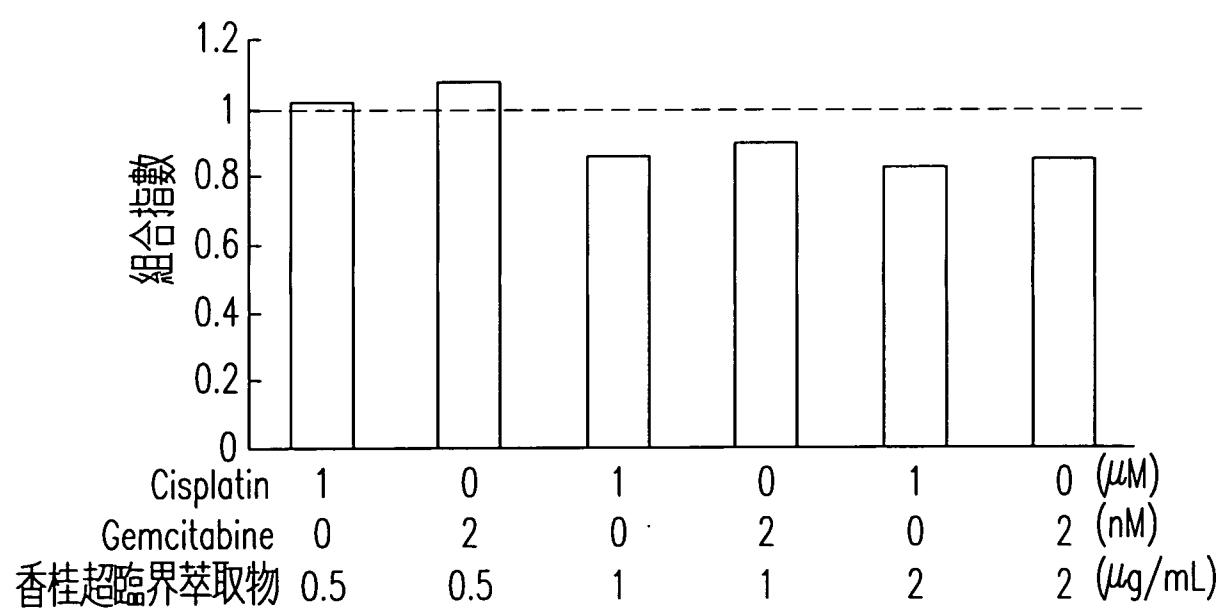
第7圖(c)



第7圖(d)



第 8 圖(a)



第 8 圖(b)