

發明專利說明書

※申請案號：094135099

※IPC分類：

一、發明名稱：

用於抑制/治療腦腫瘤之醫藥組成物

PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR INHIBITING/TREATING BRAIN CANCER

二、中文發明摘要：

本發明提供抑制/治療腦腫瘤之醫藥組成物，包括正-亞丁基苯酞成分，可用於抑制腦腫瘤中癌細胞增生及移轉、抑制端粒酶活性、誘發細胞凋亡。

三、英文發明摘要：

The invention provides a pharmaceutical composition for inhibiting/treating brain cancer, comprising n-butylidenephthalide. The composition is effective in inhibiting cancer cell proliferation and migration, and effective in inhibiting telomerase activity, and inducing apoptosis of cancer cells in brain tumor.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第1圖

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

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】

[0001] 本發明主要關於抑制/治療腫瘤之醫藥組成物，特別是有關於抑制/治療腦腫瘤之醫藥組成物。

【先前技術】

[0002] 癌症為不正常之細胞增生，起因於細胞中基因變化之累積而賦予增生潛能。癌症治療主要於手術、化學療法、放射療法及近來之免疫療法。然及預防癌症之新方向。

[0003] 當歸(*Angelicae sinensis*; Dangqui)為傳統中國醫藥處方中，最常使用的藥物之一。當歸之傳統用途包括促進血液製造、保護肝臟、降低血婦女月經不正常之疼痛，及降低血膽固醇(Chinese Herbs, Shanghai Science and Technology Publication, Inc. Shanghai, China, Vol. 5, 1999)。

[0004] 中國專利CN1053747揭示製備傘科植物當歸(*Angelicae sinensis*(Oliv)Diels, ASD)及ASDP與ASDE作為佐劑之有效成份，且可使用作為遺傳重組免疫佐劑。於CN1109356中報導由當歸(*Angelicae sinensis*(Oliv)Diels, ASD)萃取之有效成份內酯類(ASDE)，可增強免疫抗原性(immunogenicity)，可作為免疫佐劑。Kumazawa等人提供由當歸之水草萃取物分離之免疫刺激性多醣類，由於其抗腫瘤活性而於帶有艾氏腹水細胞之老鼠中，觀察長，可作為具潛力之佐劑(Y. Kumazawa等人, Immunology, Vol. 47, p. 75, 1982)。然而，此先前技術文獻僅提供由當歸分離之多醣類，經由其免疫療法治療之一般性敘述，關於機制並無充足的證據。

【發明內容】

[0005] 本發明提供當歸之丙酮萃取物、氣仿萃取物、或己烷萃取物，以及由其所純化之成分，例如正-亞丁基苯酞(n-butylidenephthalide; BP)，細胞之端粒酶(Telomerase)活性，且進一步誘發其細胞凋亡而可用於治療惡性腫瘤(malignant neoplasms)。因此，當歸之丙酮萃取物、氣仿萃取物，以及由其所純化之成分，例如正-亞丁基苯酞，有潛力於製造癌症治療之醫藥品，且可經由其於細胞週期調節與端粒酶抑制性之活性，與化療藥物組合使用。

[0006] 因此，本發明之一目的係提供於腫瘤組織中，抑制癌細胞增生及移轉之方法。

[0007] 本發明之另一目的係提供抑制癌細胞端粒酶活性之方法。

[0008] 本發明之又一目的係提供誘發癌細胞凋亡(apoptosis)之方法。

[0009] 本發明之再一目的係提供當歸之丙酮萃取物、氣仿萃取物或己烷萃取物，以及由其所純化之成分，例如正-亞丁基苯酞，用於製造癌症治療醫藥及經由其於細胞週期調節與端粒酶抑制性之活性，與化療藥物組合作為佐劑。

【實施方式】

[0010] 本發明提供當歸之有機溶劑萃取物，由其所純化之成分，例如正-亞丁基苯酞(BP)，可抑制癌細胞端粒酶活性且進一步誘發癌細胞凋亡。因此增生且可用於癌症治療。

[0011] 當歸(*Angelicae sinensis*; Dangqui)長時間以來係使用於血液疾病與女性疾病。一般而言，係使用屬於傘科(family of Umbelliferae)之當歸(*sinensis*(Oliv)Diels)之乾燥根部。*Angelicae sinensis*(後文簡稱為AS)為此項技術領域中具有通常知識者所習知者。已知有多種技術用以萃取純化*Angelicae sinensis*之個別活性成分。*Angelicae sinensis*之有機溶劑萃取物可由此項技術領域中所慣用之任何標準程序獲得。根據本發明，*sinensis*係以丙酮、氣仿或己烷類萃取。本發明之一具體例中，*Angelicae sinensis*之經乾燥及粉末化之根莖部分(rhizomes)，使用丙酮作為萃取物為AS-A。再者，AS-A進一步使用氣仿萃取，製得萃取物為AS-C；且AS-A進一步使用己烷類萃取，製得萃取物AS-H。

[0012] *Angelicae sinensis*之活性成分可使用任何習知之技術，由*Angelicae sinensis*之有機溶劑萃取物中單離及/或純化。該等活性成分可由任何形式之*sinensis*中純化，特別是根莖部分。可使用於進一步純化之技術包括過濾、選擇性沉澱、使用有機溶劑萃取、使用水性溶劑萃取、管柱層析、高壓液相(HPLC)等。根據本發明，由*Angelicae sinensis*之有機溶劑萃取物中純化某些活性成分，例如葛本內酯(ligustilide)及正-亞丁基苯酞(n-butylidenephthalide)，該等活性成分可誘發腫瘤細胞凋亡(apoptosis)。本發明之一具體例中，正-亞丁基苯酞(BP)之E-及Z-幾何異構物加以單離且使用HPLC及NMR加以特徵化。

[0013] 端粒(telomeres)，為真核染色體之末端，係維持基因體之完整性所必需且於細胞成熟(aging)及不死亡(immortality)扮演重要角色(N. W. Kim, M. A. Piatyszek, K. R. Prowse, C. B. Harley, M. D. West, P. L. C. Ho, G. M. Coviello, W. E. Wright, S. L. Weinrich, J. W. Shay, science, 266, 2011)。端粒長度及其減少速率於器官與個體中多所變化。人類與老鼠之端粒長度有大的染色體內變化(large interchromosomal variation)且單一染色體可導致異常的染色體分離(chromosomal segregation)(L. L. Sandell, V. A. Zakian, Cell, 75, 729-739(1993))。因此，結論為端粒長度變化之調控在發展中扮演重要角色。顯然地，細胞具有對抗端粒之重要的減短及異常延伸兩者之保護系統。已確定端粒酶為端粒長度之調控者之一(G. B. Morin, Cell, 59, 521-529(1989))。因此，具有選擇性抑制端粒酶活性之任何化合物或物質，可抑制腫瘤生長且因此進一步誘發腫瘤細胞之

[0014] 細胞凋亡為癌症治療之另一機制，已成為細胞生物學研究的最新領域。

[0015] 細胞凋亡進程的活化係由來自細胞內及細胞外刺激之多種信號調控。事實上，近年來的證據開始累積，多個(或全部)癌症化療劑藉由推進細胞凋亡而殺死腫瘤細胞。期望與細胞凋亡相關之新藥物更有效對抗具高增生速率之腫瘤。已篩選許多該等候選者以用於癌症治療(Ricardo Pe' rez-Toma's, I. Montaner, Esther Llagostera, Vanessa Soto-Cerrato. Biochemical Pharmacology, 66, 1447-1452(2003))。

[0016] 細胞凋亡由兩個通常使用之終點分析而偵測：細胞之形態改變(核染色質之濃縮、細胞凋亡體之形成)以及DNA片段化為大片段(300至50kbp)且而寡核苷酸片段化(oligonucleosomized fragment)(多個200bp)，其於瓊脂糖膠電泳呈現DNA帶之「階梯」(ladder)。雖然該等終點之觀測為細胞凋亡之終點，該等分析去定量族群中凋亡細胞之百分比。為此，本發明於固定細胞中添加螢光-生物素化核糖至DNA片段之終點過程期間，亦採用TUNEL分析(C. Piettea, *, Ce' dric Volantia, Annelies Vantieghe, Jean-Yves Yvette Habrakena, Patrizia Agostinis. Biochemical

- [0017] 對於藥物誘發之細胞凋亡之受體及粒線體途徑之相關分部已成為爭論之主題。取決於毒性藥物本身之種類、劑量及動力學或介於特定細胞種類間依賴於Fas/FasL途徑中信號之細胞種類。
- [0018] 細胞凋亡途徑可由不同點起始，例如細胞膜，經由死亡受體條節信號(受體途徑：Fas/FasL/caspase-8/caspase-3途徑)，粒線體(粒線體途徑/caspase-9/caspase-3途徑)及細胞週期調控(包含p53、Rb腫瘤抑制劑、p16及p21週期素(cyclin)激酶抑制劑及週期素/cdk細胞週期確認點)(Fulda, Matroulea, Klaus-Michael Debatin. Cancer Letter, 197, 131-135(2003))。
- [0019] 已有文獻報導，*Angelicae sinensis*之丙酮萃取物、氣仿草萃取物或己烷萃取物及其活性成分具有抗心絞痛(angina)、抗凝集及於心血管系統之特
- [0020] 驚訝地，本發明人於本發明中發現*Angelicae sinensis*之丙酮萃取物、氣仿草萃取物或己烷萃取物，由其純化之活性物質例如正-亞丁基苯酞，具
- [0021] 根據本發明，多種癌細胞株之生長係用以測試*Angelicae sinensis*之丙酮萃取物、氣仿草萃取物或己烷萃取物，由其純化之活性物質例如正-亞丁基苯酞等對癌細胞為毒性；其等抑制癌細胞之端粒酶活性(如第7圖所示)；其等壓抑癌細胞增生(如第2圖所示)及其等亦可誘發癌細胞凋亡(第3圖及第4圖)動物研究亦顯示其等有效於壓抑癌細胞生長(如第5圖及第6圖所示)。因此其等有潛力用以治療癌症，特別是人類惡性神經膠母細胞瘤(malignant glioblastoma)、結腸直腸癌、血癌、神經母細胞瘤、肝癌、乳癌、卵巢癌及肺癌。
- [0022] 本發明之*Angelicae sinensis*之丙酮萃取物、氣仿草萃取物或己烷萃取物、由其純化之活性成分及衍生物，可依照任何習知之投藥途徑予以投藥但不限於經口的、非經腸的、腹腔的(ip)、靜脈內的(iv)、肌肉內的(im)、皮下的(sc)、經肺的、穿皮的、經頰的、經鼻的、舌下的、經眼的、道的或其他途徑。熟習此項技術者應可輕易辨明提供所欲治療效果之投藥之任何劑量及頻率皆適用於本發明。於一較佳具體例中，其等可使用醫遞送所使用之方法而經口遞送。
- [0023] 於治療目標的，*Angelicae sinensis*之丙酮萃取物、氣仿草萃取物或己烷萃取物、由其純化之活性成分及衍生物，取決於投藥途徑，其形式可為囊、粒劑、凝膠、粉劑、無菌非經腸式溶液或懸浮液、定量噴霧或液體噴霧、或栓劑。為製備本發明之醫藥組成物，*Angelicae sinensis*之有機化之活性成分或衍生物，可根據習知醫藥組合技術與醫藥可接受載劑混合，其中該載劑取決於所欲投藥之製劑形式而可有寬廣範圍之形式。合適劑為此項技術領域中所熟知。某些醫藥可接受載劑之處方可見於由美國醫藥協會及英國醫藥協會(American Pharmaceutical Association and the Pharmaceutical Society of Great Britain)所出版的醫藥賦形劑手冊(The Hand Book of Pharmaceutical Excipients)中。舉例而言，錠劑、液或懸浮液亦可包含下述成分：醫藥可接受賦形劑或載劑，其為無毒性、惰性固體或半固體、稀釋劑、封裝物質(encapsulating material)、凝式之配方佐劑。溶液及懸浮液可含有佐劑，例如注射水、生理鹽水、聚乙二醇、甘油、聚丙二醇或其他合成溶劑；蛋白質例如血清白蛋白以增加例如苯甲醇或對羥基苯甲酸酯(methyl parabens)；抗氧化劑例如抗壞血酸或亞硫酸氫鈉；緩衝液例如醋酸鹽類、檸檬酸鹽類或磷酸鹽類及用試劑例如氯化鈉或右旋糖。溶液或懸浮液製劑可密封於安瓿、拋棄式注射器或玻璃或塑膠製之多劑量小瓶。
- [0024] 本發明之*Angelicae sinensis*之丙酮萃取物、氣仿草萃取物或己烷萃取物、由其純化之活性成分及衍生物，亦可作為佐劑與化療藥物例如放線菌素(actinomycin)、阿黴素(adriamycin)、Ara-C、平陽黴素(bleomycin)、卡姆斯丁(carmustin)、順鉑(cisplatin)、環磷醯胺(cyclophosphamide)(daunomycin)、絲裂黴素(mitomycin)、紫杉醇(taxol)、長春鹼(vinblastine)等併用。
- [0025] 本發明之*Angelicae sinensis*之丙酮萃取物、氣仿草萃取物或己烷萃取物、由其純化之活性成分及衍生物，亦可使用熟習此項技術者已知之任何投食組成物。
- [0026] 下列實施例僅用以詳細說明本發明但不意味限制本發明之範疇。
- [0027] *Angelicae sinensis*(Oliv.)之根莖部由Chung-Yuan公司(Taipei, Taiwan)提供且經Han-Ching Lin教授鑑定。植物切片之證據樣本存放於國防局。 *Angelicae sinensis*之經乾燥及粉末化之根莖部(12kg)使用丙酮(24L/次)萃取3次製得丙酮萃取物，名為AS-A。AS-A接著進行氣仿(24L/次)萃物於減壓下濃縮產生31.67g氣仿萃物(來自100g丙酮萃取物)，名為AS-C。使用己烷萃取AS-A獲得己烷萃物(AS-H)。正-亞丁基苯酞(BP) Synthesis公司(Newgate, Morecambe, UK)購得且使用時未進一步純化。BP之E-及Z-型使用管柱層析單離且使用HPLC及NMR特徵化。將其等溶解震盪培養1小時，於各體外試驗前儲存於4°C。
- [0028] 人類臍帶血管內皮細胞(human umbilical vascular endothelial cells; HUVECs)由Cascade Biologics公司(USA)購得。HUVECs維持於補充有10%FBS(Gibco BRL)及低血生長補充物(LSGS; Cascade Biologics公司, USA)之Medium 200(Cascade Biologics公司, USA)。人類皮膚纖維母細胞(fibroblasts; HDFs)由Cascade Biologics公司(USA)購得。HDFs維持於補充有10%FBS及低血生長補充物(LSGS; Cascade Biologics公司, USA)之106(Cascade Biologics公司, USA)。人類結腸腺癌細胞株HT-29由ATCC(Manassas, VA, USA)購得。HT-29維持於補充有10% FBS及100ng/ml青黴素鏈黴素(Life Technologies公司, Grand Island, NY, USA)之Dubecco's Modified Eagle Medium(DMEM; Gibco)。將細胞於60至80%密集度時回數生長(G1)細胞之增生分析。分注100 μ l細胞懸浮液至Falcon 96孔盤。密度為 6×10^3 細胞/孔於Medium 200(對HUVECs)、 9×10^3 細胞/孔於Medium 15x10³細胞/孔於DMEM(對HT-29)補充10%FBS。於培養箱(潮濕大氣，例如37°C，5%CO₂)預培養細胞24小時。添加各種濃度之毒性物10 μ l至盤之培養48小時。添加10 μ l之細胞計數套組-8(Cell Counting Kit-8; CCK-8; DOJINDO)溶液且於培養箱中培養細胞1至4小時。使用微孔盤測定儀，之參考波長，測定450nm之吸收度。
- [0029] 使用改良之異氰酸胍(guanidium isothiocyanate)(Trizol; Invitrogen)方法，由培養之基質細胞抽取總RNA。
- [0030] 均質化：藉由添加1ml trizol試劑至3.5cm直徑孔中，將細胞直接於6孔培養盤中溶解，且將細胞溶解物通過吸管(pipette)數次。
- [0031] 相分離：均質化之樣品於15至30°C培養5分鐘，以使核蛋白複合體(nucleoprotein complexes)完全解離。而後，每1ml trizol試劑添加0.2ml氯仿(Chloroform; Riedel-de-Haën)。將樣品瓶嚴密封套。樣品瓶以手劇烈震盪15秒且於15至30°C培養2至3分鐘。樣品於不超過12,000xg下，於2至8°C離心10分鐘，混合物分為下層紅色之酚-氯仿相、中間相(interphase)、及無色之上層水相。RNA獨有地保留於水相。
- [0032] RNA沉澱：將水相移至乾淨瓶中。水相與異丙醇(Fluka)混合沉澱RNA。於起始均質化所添加之Trizol試劑每1ml添加0.5ml異丙醇。樣品於15至30°C於不超過12,000xg下，於2至8°C離心10分鐘。
- [0033] RNA清洗：移除上清液。使用75%酒精清洗RNA沉澱一次，於起始均質化所添加之Trizol試劑每1ml使用至少1ml之75%酒精。震盪混合樣品且於不超過2至8°C離心5分鐘。
- [0034] 再溶解RNA：移除上清液後，乾燥RNA小粒。溶解RNA於無RNase之水中，且於55至60°C培養10分鐘。RNA儲存於-70°C。
- [0035] 測試人類腫瘤細胞株(MCF-7、CL1-5、HT-29、Caco-2)、人類臍帶血管內皮細胞(human umbilical vascular endothelial cells; HUVECs)、皮膚纖維母細胞(human dermal fibroblasts; HDFs)對*Angelicae sinensis*萃取物、蒿本內酯(ligustilide)、正-亞丁基苯酞(n-butylideneephthalide)之靈敏度。將DBTRG-05MG, BCM, HL-60及J5細胞，於37°C供給5%CO₂之潮濕大氣下，生長於含有10%胎牛血清及110ng/ml氫黴素及100ng/ml鏈黴素之培養基。將G5T/VGH、RG2、N18、SVEC及Balb/3T3細胞，於37°C供給5%CO₂之潮濕大氣下，生長於含有10%胎牛血清及100ng/ml氫黴素及100ng/ml鏈黴素之培養基。於各試驗前，使用PCR篩檢法排除受黴漿菌(mycoplasma)感染之培養細胞。
- [0036] 以不同濃度之*Angelicae sinensis*萃取物或其純化之活性成分處理對細胞存活之效果，以三重複之MTT分析進行評估。簡言之，將細胞(5×10^3 至 100μ l生長培養基之96-孔盤。使細胞附著24小時後，使用100 μ l之溶解於培養基之植物萃取物或活性成分進行處理。對照組含有 $\leq 0.02\%$ (v/v)之DMSO。於24、48及72小時後，含有藥物之培養基以50 μ l新鮮培養基置換，且於各孔之細胞於50 μ l之400 μ g/ml MTT培養6至8小時。而後移除培養基及MTT。對照組中添加100 μ l之DMSO以溶解可溶解成分。以MRX微量滴定盤冷光儀(DYNEX, USA)測定溶液於550nm之吸收度。未進行處理之細胞之吸收度視為100%。或活性成分對於GBM細胞生長速率之影響， 5×10^3 個指數生長細胞以不同濃度處理24、48及72小時。各測試物質之細胞毒性以IC₅₀質測定，其代表所需之藥物濃度。本研究之所有試驗均為三重複。

[0037] 表 1. 不同 *Angelicae sinensis* 有機溶劑萃取物、BP 及其衍生物於不同細胞株之細胞毒性 (IC₅₀)

		細胞毒性 (IC ₅₀)				
		正常細胞		癌細胞		
		HUVEC	HDF	Caco-2	MCF-7	RG2
萃取物 (μ g/ml)	AS-A	91.85	>100	>100	92.06	6.83
	AS-C	44.19	85.08	51.17	>100	7.22
	AS-H	>100	66.55	>100	62.42	30.49
	BP	>100 (>532 μ M)	300 (1596 μ M)	>20 (>106 μ M)	>20 (>106 μ M)	4 (7.45 μ M)
	BP-E 型	>100 (>532 μ M)	>100 (>532 μ M)			>20 (>106 μ M)
	BP-Z 型	>100 (>532 μ M)	65.25 (347 μ M)			>20 (>106 μ M)

HUVEC: 人類臍帶血管內皮細胞 HDF: 人類皮膚纖維母細胞 Caco-2: 人類結腸
MCF-7: 人類乳癌細胞 RG2: 老鼠惡性神經膠質瘤 (rat malignant glioma)

[0038] 表 2. *Angelicae sinensis* 之有機溶劑萃取物及 BP 於不同細胞株之細胞毒性 (IC₅₀)

	AS-A (μ g/ml)	AS-C (μ g/ml)	AS-H (μ g/ml)	BP (μ g/ml)
A549	90-100			8-12 (42.6-63.8 μ M)
AT12	100			10-15 (53.2-79.8 μ M)
J5	70-90			15-20 (79.8-106.4 μ M)
HCT15	80-100			25-30 (133.0-160.0 μ M)
HT-29	21-94	20	30	15-97 (79.8-516.0 μ M)
CL1-5	29	22	28	>100 (>532 μ M)
DBTRG-05MG	40-110	44	>400	7-10 (37.2-53.2 μ M)
G5T/VGH	50-223	46-60		
N18	111	35		
BCM	300	142	>400	
HL-60	367	173		
RG2	35	30		1.4 (7.45 μ M)
SVEC	76	86		
Balb/3T3	38	>400	>400	>300 (>1596 μ M)

A549、AT12: 人類肺腺癌細胞株 (AT12 及 AT549 為抗一紫杉醇次選殖株) J5: 人類
HCT15: 人類結腸腺癌細胞株 HT-29: 人類結腸腺癌細胞株 CL1-5: 人類肺腺癌 DBTRG-05MG: 人類多形性神經膠質母細胞瘤細胞株 G5T/VGH: 人類
質母細胞瘤細胞株 N18: 神經母細胞瘤 BCM: 人類乳癌 HL-60: 人類前骨髓性血癌細胞 RG2: 老鼠惡性神經膠質瘤 SVEC: SV40 轉移老鼠淋巴結內皮
老鼠纖維母細胞

[0039] 表 3. HUVEC 之 ETS-1、MMP-2、細胞移轉 (migration) 及管形成 (tube formation) 之測試結果

		抑制性			
		RT-PCR		移轉	管形成
		ETS-1	MMP-2		
萃取物 (μ g/ml)	AS-A	1	1	30	30
	AS-C	30	30	1	10
	AS-H	100	100	30	10
	BP	53.13 (282.6 μ M)	159.4 (847.9 μ M)		53.13 (282.6 μ M)
	BP-E 形	159.4	-		-
	BP-Z 形	159.4	531.3		159.4

[0040] 相較於正常細胞 (HUVEC 及 HDF), 正-亞丁基苯酚 (BP) 及當歸萃取物 (AS-A、AS-C、AS-H) 對人類腫瘤細胞株 (表 1 及表 2) 一般皆顯示較低之 IC₅₀。人類腫瘤細胞顯示強的細胞毒性效果。BP 亦對兩個抗紫杉醇之人類肺腺癌細胞、人類肝癌細胞及人類結腸腺癌細胞具有毒性。

[0041] AS-C 及 BP 對腦腫瘤細胞株之 IC₅₀ 分別為 35 至 60 μ g/ml 及 1.4 至 10 μ g/ml, 而對正常細胞株 (HDF) 為 85 至 300 μ g/ml ($p < 0.0001$)。

[0042] 於正常細胞中, 血管內皮細胞 (IC₅₀ = 44.2 ± 0.1 μ g/ml) 比纖維母細胞 (IC₅₀ = 85.1 μ g/ml) 對 AS-C 較敏感 ($p < 0.05$)。

[0043] 亦測試卡姆斯丁 (carmustin) (BCNU) 及紫杉醇之抑制效果。結果顯示 GBM 腫瘤對卡姆斯丁並不敏感 (IC₅₀ > 100 μ g/ml), 但 DBTRG-05MG 及 G5T/VGH 醇敏感 (分別為 IC₅₀ = 61.0 ± 3.3 μ g/ml 及 IC₅₀ < 0.1 μ g/ml)。然而, 紫杉醇於血管內皮細胞引發非常高的細胞毒性 (IC₅₀ < 0.1 μ g/ml), 大大高於引發者。以 AS-C 或 BP 處理後, 可於 72 小時期間內於不同時間點, 觀察到 GBM 細胞 (DBTRG-05MG) 脫離且漂浮於培養基。GBM 細胞脫離及漂浮之細胞且隨著劑量增加 (於 BP 之情況中, 於 3 小時觀察到)。

[0044] 於進行 AS-C 或 BP 處理後之 GBM 細胞脫離及漂浮可歸因於腫瘤細胞之型態改變。於上述試驗中, 使用 BCUN (卡姆斯丁) 作為系統對照。

[0045] 腦腫瘤細胞株 DBTRG-05MG 及 G5T/VGH 與稀釋劑培養於生長培養基。於各測試組及對照組, 添加 DMSO 且含量低於 0.02% (v/v)。於 AS-C 及 BP 之處理 70 μ g/ml 之 AS-C 及 400 μ M 之 BP。將所有樣品培養 48 小時。細胞週期分布之分析係使用碘化丙啶 (propidium iodide; PI) 將 DNA 染色進行。簡言之 2 × 10⁶ 個細胞脫離 (detachment)。離心脫離的細胞及漂浮死亡的細胞且以 10ml 之冷 1 × PBS (Life Technologies 公司) 清洗二次。吸取上清液, 將細胞之 1 × PBS 後, 添加 200 μ l 之 PI 溶液 (50 μ g/ml PI + 0.05mg/ml RNase A; Sigma Chemical 公司), 將細胞於 4°C 冷藏隔夜。於 DNA 分析前, 細胞至少 1 小時。染色後, 使用 FACScan (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, California, USA) 及 CellQuest 分析軟體於 20,000 總細胞 DNA。G₀/G₁ 時期設開於 M1 (×2); G₂/M 時期設開於 M2 (×2); 總細胞設開於 M3; S 時期為 M3 - (M1 (×2) + M2 (×2)); 次 G₁ 時期 (凋亡細胞) 設開於 M4。

[0046] 細胞週期分析顯示, 於 GBM 細胞中, 70 μ g/ml 之 AS-C 及 400 μ M 之 BP 增加細胞週期累積於 G₀/G₁ 時期 (>90%)。第 1 圖顯示於 AS-C 處理 12 小時至 48 小時細胞週期累積於 G₀/G₁ 時期同時減少 S 時期 ($p < 0.05$, $p < 0.005$)。

- [0047] 凋亡細胞之死亡係使用原位細胞死亡偵測套組(*In Situ* Cell Death Detection Kit, POD(Roche, Germany))分析。DNA染色質之型態特徵之變化，操作步驟係根據製造商之指示進行。簡言之，將細胞培養於培養皿且分別以AS-C(70 μ g/ml)及BP(5至800 μ g/ml)處理72小時後分析。於AS-C及集懸浮細胞。於對照組中，收集脫離及漂浮細胞。而後，於室溫下，於生理鹽水包復之載玻片上，使用3.7%甲醛固定細胞15分鐘，以1xPBS清洗。3% H_2O_2 降低內生性過氧化酶之活性後培養於冷滲透液(permeabilization solution; 0.1% Triton X-100+0.1%檸檬酸鈉)。細胞以1xPBS再清洗。37°C下，與末端去氧核糖核苷酸轉移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)-介導之dUTP缺口標示(nicks labeling)(TUNEL)反應混合物。後，細胞以1xPBS清洗一次，使用碘化丙啶(PI)復染(counterstain)以進行細胞計數。於凋亡之定量中，結果以螢光顯微鏡(Nikon, Kawasaki, Japan)偵測。
- [0048] 當相較於未處理之細胞時，幾乎所有於AS-C及BP處理組之GBM細胞都發現有進行中之凋亡。以AS-C處理之細胞凋亡由螢光顯微鏡偵測(400x)，染色及點化丙啶細胞復染，且於明視野下觀察。同樣地，於GBM細胞中，BP誘發之細胞凋亡係使用TUNEL方法及使用碘化丙啶作為復染劑而估算。於細胞暴露至BP(5至800 μ M)48小時。結果示於第2圖。可發現，相較於未處理之細胞(對照組)，於BP處理組之GBM細胞之凋亡率較高。
- [0049] DBTRG-05MG細胞(人類GBM細胞)使用AS-C(70 μ g/ml)處理0、6、12、24及48小時。於另一測試中，DBTRG-05MG細胞使用BP(400 μ M)處理0、1.5、5、12、24、48小時。細胞小粒(cell pellets)復懸浮於溶解緩衝液(10mM Tris-HCl, pH7.5, 1mM EGTA, 0.5%CHAPS, 10%(v/v)甘油, 5mM β -2-巰乙醇及0.5%巰基氯化物)且於冰上培養30分鐘後，於4°C下，13000rpm離心20分鐘。使用BCA蛋白質分析套組(Pierce, Rockford, IL)，根據製造商之指示測定蛋白質濃度。細胞溶解物(20 μ g/lane)於10至12%之SDS-PAGE(Bio-Rad, Hercules, CA)進行电泳。轉移蛋白質至聚伸乙烯基氟化物(PVDF)膜(Ambio Lifesciences, Piscataway, NJ)。於室溫下，使用5%脫脂牛奶作為封阻劑(blocking agent)遮蔽該膜1小時後，分別與下述抗體培養2小時：Fas(FL-335)、Fas-L(C-178)、caspase 3(H-277)、caspase 8(H-134)、caspase 9(H-170)、Bax(B-9)、p16(F-12)、p21(F-5)、p53(DO-1; 1/100稀釋)(Santa Cruz Biotechnology公司, CA, USA)、phospho-p53(Ser15; 1/2000稀釋)及phospho-Rb(Ser795; 1/2000稀釋)(Cell Signaling Technology, MA, USA)。偵測抗體辨識，係將膜分別與結合有(conjugated)辣根過氧化酶(horseradish peroxidase)之抗-老鼠、抗-兔子、抗-羊抗體(1/1000稀釋; Santa Cruz Biotechnology公司, CA, USA)，於室溫培養1小時，且使用ECL Plus化學冷光系統(Amersham, Arlington Heights, IL)偵測。每一測試樣品，作為系統對照組之SDS-PAGE膠帶皆為二重複製備，而含有同量蛋白質；並使用科羅西藍(comassie blue)染色該對照組電泳膠。於西方墨點分析法。帶(band)之強度係使用GS-800 Calibrated Imaging Densitometer(Quantity One 4.0.3軟體; Bio-Rad)以密度測定法分析。AS-C顯著增加GBM細胞之Fas表現(1至159倍)，對Fas-L則無影響。此外，偵測死亡受體誘發之凋亡相關之caspase-8之活化。結果顯示pro-caspase-8之活化，於AS-C處理6小時後，僅些微增加，而活化之caspase-8之量，於AS-C處理6小時後，大幅增加(參見第3a圖)。
- [0050] 測定p53及Rb蛋白質之磷酸化作用且結果顯示AS-C於處理6小時後增加磷酸化之p53蛋白質。再者，總p53蛋白質量於6小時增加之後逐漸減低。然蛋白質於6小時減低，且於AS-C處理12小時後成為無法偵測。該等結果顯示，AS-C可啟動細胞週期確認點機制。依序測定於AS-C處理之GBM細胞p21及Bax之量，且發現所有該等三種蛋白質於AS-C處理後皆增加(參照第3b圖)。
- [0051] 最後，亦測定procaspase-9及procaspase-3之活化。於AS-C處理6小時後，procaspase-9及procaspase-3二者皆大幅活化。
- [0052] 於BP之情況中，結果顯示BP 400 μ M大幅增加Fas之表現(由1.5小時5.2倍至48小時27.9倍)，而壓抑Fas配位體於GBM細胞之表現(參照第3d圖)。
- [0053] 亦發現BP增加caspase-8之活化，於48小時增加至137.9，但procaspase-8減低(參照第3d圖)。
- [0054] 於BP-誘發細胞凋亡之粒線體途徑之角色研究中，顯示BP誘發Bax及AIF之表現，其分別於48小時增加16倍及2.4倍，且活化之caspase-9於48小時procaspase-9減低(參照第3e圖)。亦發現caspase-3增加而procaspase-3減低(參照第3d圖)。
- [0055] 於BP-誘發細胞凋亡之細胞週期途徑之角色研究中，顯示BP增加p53、p21及p16之表現，其於48小時分別為1.4倍、2.3倍及3.1倍。增加之p53磷酸化時為5.2倍且於48小時為9.2倍，但降低之Rb磷酸化作用於48小時為0.2倍(參照第3f圖)。於此研究中，使用 β -actin作為內對照(internal control)。
- [0056] 總結言之，可推論由BP壓力所誘發之細胞凋亡信號傳導途徑之略圖模式，其由死亡受體、粒線體及細胞週期途徑所組成。
- [0057] 使用RG2細胞(大鼠GBM)及DBTRG-05MG細胞(人類GBM)於動物試驗以偵測AS-C及BP之抗腫瘤活性。由國家實驗室動物中心(Taipei, Taiwan)獲得雄鼠260g及雌性Foxn1 nu/nu老鼠(10至12週齡)。所有步驟皆符合慈濟大學實驗動物中心之標準操作程序(花蓮，台灣)。動物維持於無病原物條件實驗室動物膳食加以餵食。分別製備DBTRG-05MG細胞(人類GBM)及RG2細胞(大鼠GBM)，於裸鼠進行異種移植(xenograft)及大鼠同種異體性(allograft)。
- [0058] 將同樣之F344大鼠分為兩組(6/組)，於後背皮下植入 1×10^6 RG2細胞。動物由植入腫瘤細胞點之遠距離處(>2cm)，於腫瘤細胞植入第3、6及9日後以雙角規形夾(caliper)測定且體積計算為LxHxWx0.52。於腫瘤體積超過25cm³時犧牲動物且以犧牲之天數作為動物之最後存活天數。
- [0059] 結果顯示，相較於未處理組(對照組)，AS-C處理組對於腫瘤生長具有顯著抑制作用(p<0.05)(第4圖)。於第26天分別之腫瘤平均尺寸為對照組20.1mm³，AS-C處理組為11.5±0.7cm³。相較於對照組，AS-C處理組之存活率顯著延長(40±2.7天相對於30±2.1天; p<0.0001)(第5圖)。
- [0060] AS-C以劑量500mg/kg皮下注射，於大鼠未發現藥物相關毒性，可由體重及存活器官之組織學分析加以佐證。
- [0061] 將裸鼠分為兩組(6/組)，植入s.c. 5×10^6 DBTRG-05MG細胞，且於腫瘤細胞植入5天後投藥AS-C(i.p. 500mg/kg/day)、AS-C(s.c. 500mg/kg/day)。腫瘤尺寸以雙角規形夾(caliper)測定且體積計算為LxHxWx0.52。於老鼠體內腫瘤體積超過1000mm³時犧牲動物且以犧牲之天數作為動物之最後存活天數。
- [0062] 結果顯示，相較於未處理組，以AS-C i.p. (500mg/kg)及AS-C s.c. (500mg/kg)處理組顯著壓抑腫瘤生長(p<0.005)。腫瘤尺寸之平均值於第38天為849.9±150.1mm³，於AS-C i.p. (500mg/kg)處理組為295.5±25.3mm³，於AS-C s.c. (500mg/kg)處理組為155.1±56.4mm³。結果示於第7圖。
- [0063] AS-C對於原位腫瘤之毒性效果，係以RG2細胞測定。同種大鼠分為二組(6/組)，植入i.c. (紋狀體) 5×10^4 RG2細胞，且於腫瘤細胞植入後第4、5、6、7、8天後投藥AS-C(i.p. 500mg/kg/day)或載劑s.c. 處理。使用於慈濟醫院之具有回波平面造影功能(echo-planar imaging capability)(Signa LX 3.8, General Electric, Wisconsin, USA)的3-T單位MRI(General E0065ric, Wisconsin, USA)測定及計算腫瘤體積。簡言之，使用水合氯醛(400mg/ml, 1ml/100g)將大鼠麻醉。使用快速旋轉回波平面(fast spin echo)進行功能性MRI掃描，回波平面擷取序列之重複時間為6000msec，回波時間為102msec，基質影像為256x256x5cm，且平面內解析度為80 μ m。每隻大鼠每19.5秒持續6.5分鐘獲得20片，每片為1.5mm厚。
- [0066] 於MRI影像數據中發現，相較於未處理組，處理組之腫瘤體積顯著減少(p<0.05)(第6圖)。平均腫瘤體積於第14及16天之對照組70.8±4.8mm³及120.5±12.1mm³，AS-C處理組為46.2±3.6mm³及99.5±9.5mm³。
- [0067] 於此試驗中，使腫瘤生長至大尺寸以促進臨床條件之腫瘤之手術移除為不可接受之選擇。
- [0068] 如上所述，於裸鼠後背植入s.c. DBTRG-05MG細胞(5×10^6)。僅當腫瘤體積 ≥ 250 mm³時，將帶有腫瘤之老鼠以單一劑量之AS-C(500mg/kg)或載劑s.c. 處理10天後，使用H&E組織染色測定於腫瘤之細胞毒性後，犧牲動物。觀察組織切片且於光學顯微鏡50x及400x放大下照相。
- [0069] 組織學分析之照片顯示，AS-C誘發核降解、空泡細胞質及腫瘤細胞塊之腫瘤細胞死亡。相對地，對照組之腫瘤細胞生長良好且可見於AS-C處理組之腫瘤塊中發現。
- [0070] 大鼠分為二組(6/組)，植入i.c. (紋狀體) 5×10^4 RG2細胞，且於腫瘤細胞植入後第4、5、6、7及8天後5個劑量，隨機以BP(300mg/kg/day)或載劑s.c. 處理。以MRI測定及計算腫瘤體積。MRI係藉由使用具有回波平面造影功能(echo-planar imaging capability)(Signa LX 3.8, General Electric, Wisconsin, USA)之3-T單位(General E0072ric, Wisconsin, USA)執行。簡言之，使用水合氯醛(400mg/ml, 1ml/100g)將大鼠麻醉。使用快速旋轉回波平面(fast spin echo)進行功能性MRI掃描，回波平面擷取序列之重複時間為6000msec，回波時間為102msec，基質影像為256x256，視域為5x5cm，且平面內解析度為80 μ m。每隻大鼠每19.5秒持續6.5分鐘獲得20片(每片為1.5mm厚)。最後，測定及計算各組之全腫瘤尺寸(mm³)。
- [0073] 如上述使用MRI掃描及回波平面造影計算，結果顯示，相較於未處理組，BP處理組之腫瘤體積顯著減少(p<0.05)(第8圖)。於第8圖之各欄表示平均值±SE(*: p<0.05; **: p<0.001)。平均腫瘤體積於第14及16天之對照組分別為69.9±4.81mm³及126.43±11.07mm³；於BP處理組分別為46.6±1.8mm³及91.68±8.3mm³。MRI造影數據顯示，相較於對照組，BP處理組之原位腫瘤體積具有較小區域。
- [0074] 動物(Foxn1裸鼠)分為六組(6/組)，皮下植入(s.c.) 1×10^6 DBTRG-05MG細胞，且於腫瘤細胞植入後第4、5、6、7及8天後5個劑量，隨機以BPs.c. (500、800mg/kg/day)或載劑s.c. 於遠離腫瘤植入點處(>2cm)處理。每2天測定腫瘤尺寸及計算腫瘤體積。腫瘤超過1000mm³時犧牲動物。未犧牲之動物存活至200天。
- [0075] 結果顯示，相較於未處理組，BP-處理組具有顯著之腫瘤生長壓抑(第9圖); 300mg/kg/day組之p<0.005，且腫瘤生長抑制性之程度為劑量依附性。
- [0076] 第10圖之存活圖之對數範圍(Log-rank)(Mantel-Cox)比較顯示，以BP處理之帶有異種移植皮下人類GBM之裸鼠之存活期，延長至200天。

[0077] 端粒酶活性係使用揭示於文獻之改良之端粒酶重複擴增方法(telomere repeat amplification protocol; TRAP)進行分析。使成小粒(pelleted) 200 μ l之冰冷溶解緩衝液(10mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM EGTA, 0.5%CHAPS, 10%[v/v]甘油, 5mM β -2-巰乙醇及0.1mM苯基甲基磺醯基氟化物)且於後, 於4°C下, 以13,000 \times g離心20分鐘。上清液萃取物使用BCA蛋白質分析套組(Pierce, IL, USA)定量蛋白質。TRAP分析法係使用TRAPeze端粒酶偵測劑(Intergen公司, Purchase, NY, USA)進行且步驟根據製造商之標準程序進行。簡言之, 將含有0.5 μ g蛋白質之萃取物之體積添加至50 μ l之含有0.1 μ g (TS)引子(5' -AATCCGTCGAGCAGAGTT-3')、0.1 μ g之TSK1模板(內標準)、0.1 μ g之反義寡核苷引子(RP)、2U Takara TaqDNA聚合酶(Takara Shuwa公司, Japan)、20mM Tris-HCl, pH8.3, 1.5mM MgCl₂, 63mM KCl, 0.005%(v/v)Tween 20, 1mM EGTA, 50 μ M之各去氧核糖三磷酸鹽(dNTPs)、及1.25 μ Ci 3000Ci/mmol(PerkinElmer Life Science, BoSton, MA, USA)之反應混合物中。該反應混合物於94°C培養2.5分鐘再於DNA熱循環機(GeneAmp PCR System 2400, PerkinElmer公司, Norwalk, CT, USA)擴增30個循環之聚合酶鏈鎖反應於94°C 30秒、59°C 30秒及72°C 90秒。TRAP產物解析於12.5%(v/v)非變性泳(PAGE)於含有54mM Tris-HCl, pH8.0, 54mM硼酸及1.2mM EDTA之緩衝液中。電泳膠於濾紙上乾燥1小時後, 於-80°C使用增強板(intensifying screen)底片(Bio-Max MR, Kodak Rochester, NY, USA)。TRAP分析DNA階梯產物之信號強度, 係使用Bio-Profil Biolight造影分析軟體V2000.01(Vulcan Instruments, France)定量及比較。

[0078] 數據以平均值 \pm SD或SE表示。統計顯著性使用Student's t-test分析。將p值<0.05認為顯著。存活使用對數範圍(Mantel-Cox)測試比較。中間時間Kaplan-Meier分析計算。

[0079] 雖然以具體例說明本發明, 但於此技術中具有通常知識者應可加以進行多種改變及變化。而應了解本發明並不受限於所說明之特定形式, 所有改動均落入於本發明之範疇且落入於後文所定義之申請專利範圍中。

【圖式簡單說明】

[0080] 第1圖為細胞週期分析之結果圖, 顯示以70 μ g/ml AS-C(當歸之氣仿萃取物), 處理GBM細胞(DBTRG-05M)(*p<0.05), 增加細胞週期累積於G0/G1期, 同時減少S時期。於G5T/VGH細胞亦顯示相同結果(未圖示)。

[0081] 第2圖為5至800 μ M之BP(正-亞丁基苯醌)誘發GBM腫瘤細胞(DBTRG-05MG)凋亡之效果圖, 係以TUNEL方法計算, 使用碘化丙啶(propidium iodide)染色劑(*p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005)。

[0082] 第3a至3c圖為AS-C誘發之凋亡途徑之分析結果圖, 70 μ g/ml(其中係使用DBTRG-05MG細胞株)。

[0083] 第3d至3f圖為BP誘發之凋亡途徑之分析結果圖, 400 μ M(其中係使用DBTRG-05MG細胞株)。

[0084] 第4圖為AS-C處理(500mg/kg)帶有皮下GBM腫瘤(RG-2)之老鼠之腫瘤尺寸之抑制效果圖(p<0.05)。

[0085] 第5圖顯示經AS-C處理之老鼠之存活率(劑量-500mg/kg)顯著延長(p<0.0001)(相較於對照組), 其中係使用DBTRG-05MG細胞株。

[0086] 第6圖顯示AS-C處理(500mg/kg)老鼠原位GBM腫瘤(RG2)體積之生長之抑制效果(*p<0.05, **p<0.001)。

[0087] 第7圖顯示AS-C處理(500mg/kg由腹腔或皮下投藥)老鼠移植腫瘤生長之抑制效果(p<0.005), 其中係使用DBTRG-05MG細胞株。

[0088] 第8圖顯示BP處理(300mg/kg)老鼠原位GBM腫瘤(RG2)體積之抑制效果, 使用回波平面造影功能, 以MRI成像計算(*p<0.05, **p<0.001)。

[0089] 第9圖顯示不同劑量BP處理(70至800mg/kg)老鼠移植腫瘤生長之抑制效果(p<0.005), 其中係使用DBTRG-05MG細胞株。

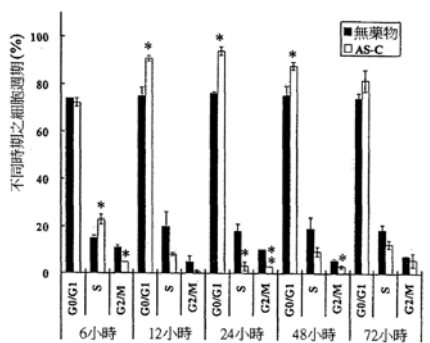
[0090] 第10圖顯示BP處理(70至800mg/kg)帶有移植腫瘤(皮下DBTRG-05MG)之裸鼠之存活期間之延長效果(p<0.001)。

【主要元件符號說明】

七、申請專利範圍：

1. 一種抑制腦腫瘤中癌細胞增生及移轉之醫藥組成物, 係包含正-亞丁基苯醌(n-butylideneephthalide)及其醫藥可接受之賦形劑或載體。
2. 一種誘發腦腫瘤中癌細胞之細胞凋亡之醫藥組成物, 係包含正-亞丁基苯醌及其醫藥可接受之賦形劑或載體。
3. 一種治療腦腫瘤之醫藥組成物, 係包含正-亞丁基苯醌及其醫藥可接受之賦形劑或載體。
4. 一種治療腦腫瘤之醫藥組成物, 係包含做為佐劑(adjutant)之正-亞丁基苯醌。

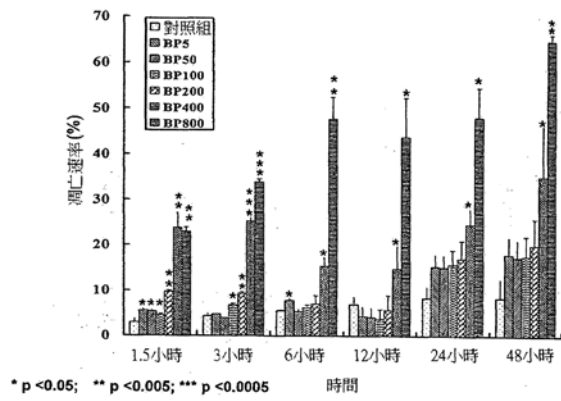
八、圖式：



*, p < 0.05; **, p < 0.005; ***, p < 0.0001

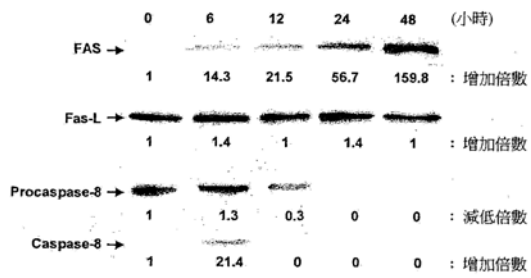
第1圖

第1圖



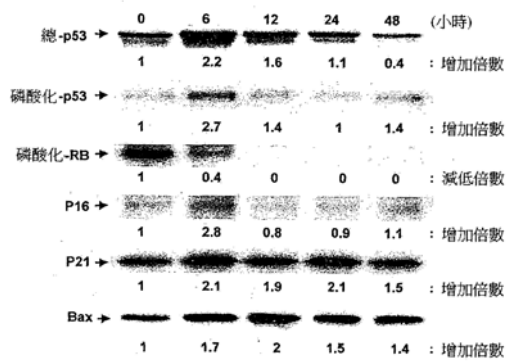
第 2 圖

第 2 圖



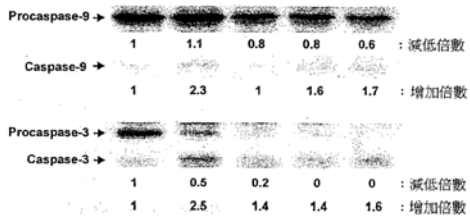
第 3a 圖

第 3a 圖



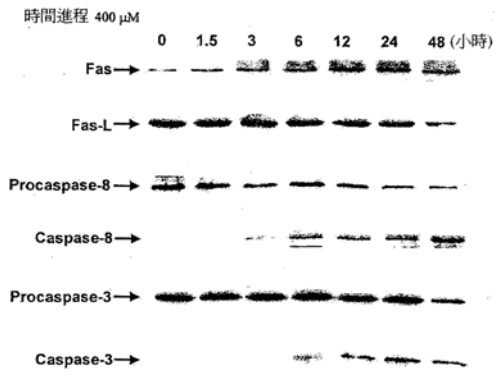
第 3b 圖

第 3b 圖



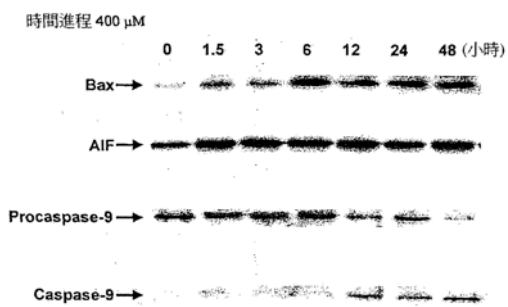
第 3c 圖

第 3c 圖



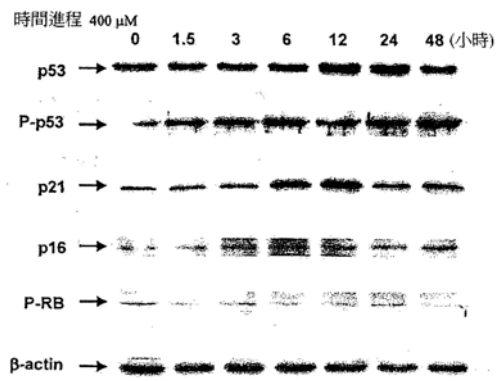
第 3d 圖

第 3d 圖



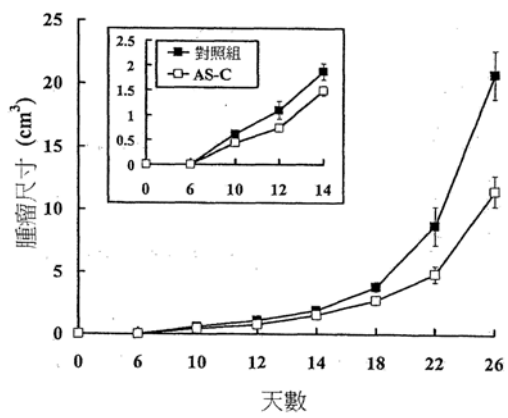
第 3e 圖

第 3e 圖



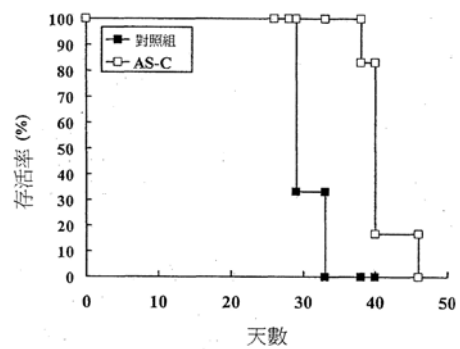
第 3f 圖

第 3f 圖



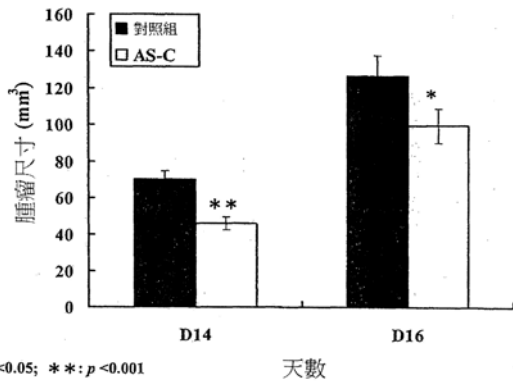
第 4 圖

第 4 圖



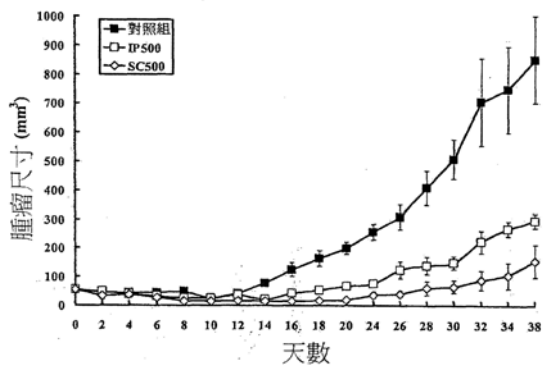
第 5 圖

第 5 圖



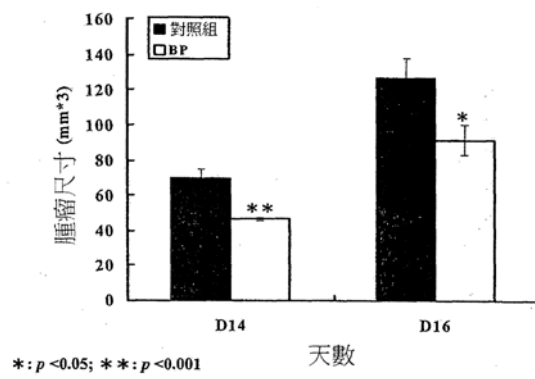
第 6 圖

第 6 圖



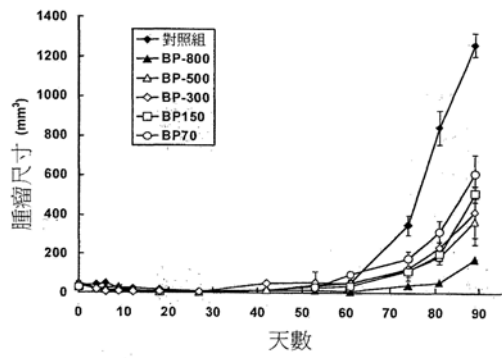
第 7 圖

第 7 圖



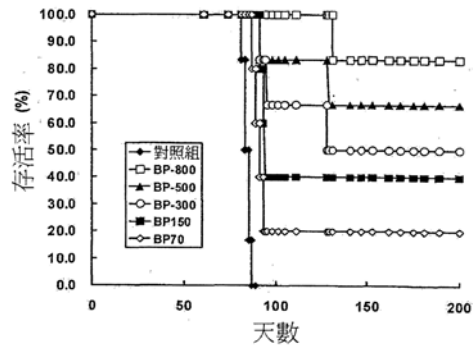
第 8 圖

第 8 圖



第9圖

第9圖



第10圖

第10圖