

發明專利說明書

※申請案號：095143131

※IPC 分類：

一、發明名稱：

用於治療癌症之藥學組成物

A pharmaceutical composition for treating cancer

二、中文發明摘要：

一種用於治療癌症之藥學組成物，包括一有效量之二羥甲戊酸途徑(mevalonate pathway)抑制劑、一有效量之牛樟芝萃取物與一藥學上可接受的載體(carrier)。

三、英文發明摘要：

This invention relates to a method of treating cancer by administering to a subject in need thereof an effective amount of a mevalonate pathway inhibitor and an effective amount of an *Antrodia camphorata* extract.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第()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] 本發明有關於一種藥學組成物，且特別有關於一種治療癌症之藥學組成物。

【先前技術】

[0002] 癌症為一種致死疾病，其特徵為惡性組織的不正常團塊，起因於過度地細胞分裂。癌症細胞不具有正常細胞生長之限制，會侵入與佔領正常留給其他細胞的範圍。

[0003] 癌症治療的種類包括化學治療、手術、放射線以及這些治療的結合。化學治療通常包括使用一個或多個抑制癌細胞生長的化合物。雖然目前已經發展了許多癌症化療藥劑，但仍然需要更有效的化學治療。

【發明內容】

[0004] 本發明是基於發現樂瓦司他汀(lovastatin)(二羥甲戊酸途徑(mevalonate pathway)抑制劑)可顯著增強牛樟芝(*Antrodia camphorata*)(也稱為“*Taiwanofungus camphoratus*”)萃取物於抑制癌症細胞生長的功效。

[0005] 因此，本發明提供一種以二羥甲戊酸途徑抑制劑與牛樟芝萃取物來治療癌症的方法。二羥甲戊酸途徑抑制劑可為3-羥基-3-甲基戊二醯輔酶還原酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA(HMG-CoA)reductase)抑制劑，例如司他汀(statin)化合物(例如樂瓦司他汀(lovastatin)、辛伐司他汀(simvastatin)、阿托發他司汀(atorvastatin)、氟伐司他汀(fluvastatin)或普伐司他汀(pravastatin))。

[0006] 本發明另提供一組成物，其包含二羥甲戊酸途徑抑制劑、牛樟芝萃取物以及藥學上可接受之載體(carrier)。本發明更包括使用上述組成物來製備治療癌症之藥劑。

[0007] 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，作詳細說明如下：

【實施方式】

[0008] 二羥甲戊酸途徑抑制劑可增強牛樟芝萃取物於抑制癌症細胞生長的功效。因此，可使用較低劑量的牛樟芝即可得到渴望的治療效果。

- [0009] 本發明為一治療癌症的方法，係將一有效量之二羥甲戊酸途徑(mevalonate pathway)抑制劑與有效量之牛樟芝(*Antrodia camphorata*)萃取物投予所需之病患。這裡所使用的措辭“治療”是指將包括活性藥劑(active agent)的組成物給予一病患(此病患具有癌症、癌症的症狀或傾向於癌症的體質)以治癒、恢復、減輕、緩和、改變、治療、改善、改進或影響疾病、疾病的症狀或傾向於疾病的體質為目的。此處使用的“有效量(an effective amount)”指每個活性藥劑(其根據給予一個或其他多個活性藥劑)具有治療功效的量。有效量的改變(藉由熟知此技藝人士認定)是根據給藥的途徑、輔藥使用(excipient usage)以及與其他共同使用(co-usage)的活性藥劑。
- [0010] 此處之“癌症”意指細胞腫瘤。癌症細胞具有自主生長(autonomous growth)的能力，即在不正常的狀態或條件下迅速增值細胞生長。此處所指之癌症係包含所有種類之細胞不當增生(cancerous growth)或致癌過程(oncogenic processes)、轉移性的組織或惡性轉換之細胞、組織或器官(與組織病理學型態無關)或侵入階段。癌症的例子包括，但不限定於：癌症(carcinoma)與惡性肉瘤(sarcoma)，例如血癌(leukemia)、惡性肉瘤(sarcoma)、惡性骨肉瘤(osteosarcoma)淋巴瘤(lymphomas)、黑色素瘤(melanoma)、神經膠質瘤(glioma)、嗜鉻細胞瘤(pheochromocytoma)、肝惡性腫瘤(hepatoma)、卵巢癌(ovarian cancer)、皮膚癌(skin cancer)、睪丸癌(testicular cancer)、胃癌(gastric cancer)、胰臟癌(pancreatic cancer)、腎臟癌(renal cancer)、乳癌(breast cancer)、前列腺癌(prostate cancer)、大腸癌(colorectal cancer)、頭部與頸部的癌症、腦癌(brain cancer)、食道癌(esophageal cancer)、膀胱癌(bladder cancer)、腎上腺皮質癌(adrenal cortical cancer)、肺癌(lung cancer)、支氣管癌(bronchus cancer)、子宮內膜癌(endometrial cancer)、鼻咽癌(nasopharyngeal cancer)、子宮頸或肝癌(cervical or liver cancer)以及未知起始位置的癌症。
- [0011] “二羥甲戊酸途徑抑制劑”是指一化合物，其抑制二羥甲戊酸途徑的任何酵素(例如HMG-CoA還原酵素)，因此封鎖了此途徑。其於二羥甲戊酸途徑中可與酵素結合以發揮抑制活性或可以非直接方式來抑制酵素。上述抑制劑的例子為司他汀(statin)化合物(例如樂瓦司他汀(lovastatin)、辛伐司他汀(simvastatin)、阿托發司他汀(atorvastatin)、氟伐司他汀(fluvastatin)或普伐司他汀(pravastatin))。
- [0012] 二羥甲戊酸途徑已為本技術領域所熟知。參見，例如，*Biochemical pathways: An atlas of biochemistry and molecular biology* ; Ed. Gerhard Michal, Wiley-Spektrum, 1998.。
- [0013] 二羥甲戊酸途徑抑制劑可為市售之商品。例如樂瓦司他汀(lovastatin)與辛伐司他汀(simvastatin)為Merk & Co. 所註冊之Zocor[®]與Mevacor[®]的活性藥劑。阿托發司他汀(atorvastatin)、氟伐司他汀(fluvastatin)與普伐司他汀(pravastatin)分別為Pfizer、Novartis與Bristol-Myers Squibb所註冊之Lipitor[®]、Lescol[®]與Pravachol[®]的活性藥劑。
- [0014] “牛樟芝萃取物”指自牛樟芝(一真菌類)萃取出的物質，牛樟芝為市售之傳統中藥。為取得牛樟芝萃取物，可使用本技術領域中眾所周知的萃取技術。例如可將經乾燥與研磨之牛樟芝懸浮在一溶劑或者兩種或多種溶劑之混合液於一足夠長的時間。適合的溶劑的例子包括，但不限定為：水、甲醇、乙醇、二氯甲烷(methylene chloride)、三氯甲烷(chloroform)、丙酮(acetone)、醚類(ether)(例如乙醚(diehl ether))與酯類(ester)(例如乙酸乙酯(ethyl acetate))與己烷(hexane)。之後移除固體殘餘物(例如藉由過濾)得到一溶液，其可直接使用或者將其烘乾得到固體萃取物。
- [0015] 在本發明之治療方法中，牛樟芝萃取物與二羥甲戊酸途徑抑制劑可同時給藥(例如給予包含二羥甲戊酸途徑抑制劑與牛樟芝萃取物兩者之組成物)或分開給藥(例如先給予包含二羥甲戊酸途徑抑制劑之組成物，再給予包含牛樟芝萃取物之組成物，反之亦可)。兩個活性藥劑中的任一個，可單獨給藥，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。此處所使用之“非口服”指皮下(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(intraleaional)與頭顱內(intracranial)注射以及灌注技術。
- [0016] 口服成分的形式包括，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。藥錠一般所使用的載體

(carrier)包括乳糖與玉米澱粉。一般也將潤滑劑(lubricating agent)，例如硬脂酸鎂(magnesium stearate)加至藥錠中。用於膠囊形式的稀釋劑(diluents)包括乳糖與經乾燥的玉米澱粉。當口服給藥為水性懸浮液或乳劑時，可懸浮或溶解有效成分(active ingredient)於與乳化或懸浮劑結合的油相(oily phase)。如果需要，可加入特定甜味、調味與著色劑。

- [0017] 本發明之組成物亦可配製成無菌注射成分(例如，水或油的懸浮液)，例如利用本技術領域中已知的技術使用適合的分散或增溼劑(例如Tween 80)與懸浮劑。無菌注射調劑也可以將無菌注射溶液或懸浮液加入無毒性非口服之稀釋劑或溶劑，例如1,3丁二醇(1,3-Butanediol)中。可使用的載具(vehicles)與溶劑包括甘露糖醇(mannitol)、水、林格氏液(Ringer's solution)與等滲透壓氯化鈉溶液。此外，無菌、固定油常作為溶劑或懸浮媒介(例如合成的單一或雙-甘油酯(glycerides))。脂肪酸，例如油酸(oleic acid)與其甘油酯衍生物亦可用在注射劑的調製，其為天然藥學上可接受的油，例如橄欖油、蓖麻油(castor oil)，特別是於其聚氧乙基化的(polyoxyethylated)變化形式。這些油溶液或懸浮液也可包含一長鏈醇類稀釋劑或分散劑，或者羧基甲基纖維素(carboxymethyl cellulose)或類似的分散劑。
- [0018] 本發明之組成物亦可根據此技術領域中所熟知的技術來配製成吸入成分。例如可製成鹽類溶液，利用苯甲醇(benzyl alcohol)或其他適合的防腐劑、增強生物可利用性(bioavailability)的吸附促進劑、碳氟化合物(fluorocarbon)及/或其他本技術領域中熟知的助溶或分散劑來配製。
- [0019] 本發明之組成物亦可配製成一局部使用成分(topical composition)，以用於油、藥膏、藥水、軟膏以及類似的形式。適合的載體包括蔬菜或礦物油、白色凡士林(white petrolatum, white soft paraffin)、支鏈性脂肪或油、動物脂肪與高分子量醇類(大於C12)。較佳的載體為可溶解有效成分之載體。如果需要，不但可包含乳化劑、安定劑、濕潤劑，也可包含給予顏色與顏色與香味的藥劑。此外，可使用皮膚滲透增強劑(transdermal penetration enhancer)於這些局部配方(topical formulation)中。有關增強劑的使用可參考U. S. 3, 989, 816與U. S. 4, 444, 762。較佳者，可從礦物油、自身乳化蜂蠟(self-emulsifying beeswax)與水的混合物，於其中混合溶解於少量油(例如杏仁油)中的有效成分以配製藥膏，例如包括約40份水、約20份蜂蠟、約10份礦物油與約1份杏仁油。軟膏的配製可藉由將於蔬菜油(例如杏仁油)之有效成分的溶液與溫的白色凡士林混合以及使混合物冷卻。上述軟膏的例子之一包括重量百分比約30%杏仁油與約70%白色凡士林。
- [0020] 用於藥學組成物的載體必須是“可接受的”，其與配方的有效成分相容(以及較佳為具有穩定有效成分之能力)以及不對病患有害。例如，助溶劑(例如環狀糊精(cyclodextrins)) (其與一個或多個萃取物的活性化合物形成特定更可溶解的複合物)，為了有效成分的傳送而作為藥理學上的輔藥。其他載體的例子包括膠狀二氧化矽(colloidal silicon dioxide)、硬脂酸鎂、纖維素、烷基硫酸鹽(sodium lauryl sulfate)與D & C Yellow # 10。
- [0021] 上述方法可更包括提供放射線給予被治療的病患。使用放射線的方法可為游離輻射(ionizing radiation)或非游離輻射(non-ionizing radiation)。游離輻射具有足夠的能量與原子反應，使電子脫離其軌道，導致原子帶電或“離子化(ionizing)”。包括 γ 射線、X-射線、中子、電子、 α 顆粒與 β 顆粒的輻射。非游離輻射是電磁輻射，其不具有足夠的能量使電子脫離其軌道。包括紫外線、可見光、遠紅外線。微波與無線電波的輻射。提供放射線給予病患於牛樟芝萃取物與二羥甲戊酸途徑抑制劑的給藥之後。
- [0022] 可使用適合的*in vitro* 分析來初步估計牛樟芝萃取物與二羥甲戊酸途徑抑制劑之組合於抑制癌症細胞生長的功效。藉由*in vivo* 分析可進一步檢測此之組合於治療癌症的功效。例如，可將其給予一具有癌症的動物(例如一小鼠模型)以及之後記錄其治療的影響。根據此結果，可決定一適當的劑量與給藥方式。
- [0023] 【實施例】
- [0024] 將牛樟芝經空氣乾燥及研磨(由偉翔生物技術開發股份有限公司(台北，台灣)所提供)。將300 g研磨後的真菌懸浮於6 L的95%乙醇中。將此懸浮液於室溫攪拌48小時，之後以4A濾紙(Toyo Roshi, Japan)進行過濾以移除不溶殘餘物。以500 ml的95%乙醇清洗殘餘物。收集濾出液以及藉由減壓濃縮裝置(rotary evaporator)於40-45°C將濾出液濃縮至起始體積的1/10。在室溫於氮氣下蒸發濃縮液至乾燥，以提供重37.4 g的萃取物。

- [0025] 以 *in vitro* 分析來估計牛樟芝萃取物與二羥甲戊酸途徑抑制劑之組合於抑制癌症細胞增殖的功效。
- [0026] 溶解上述製備之牛樟芝萃取物於95%乙醇中以形成濃度為100 mg/ml的貯存液(stock solution)。另製備一100% DMSO之樂瓦司他汀(lovastatin)貯存液(10mM)。使用前先以包含10%胎牛血清(完全的DMEM(complete DMEM))的Dulbecco' s Modified Eagle Medium稀釋至所需的濃度。
- [0027] 將Hep G2肝惡性腫瘤細胞放置於96孔培養盤(culture plate)(2000細胞/孔)，以及將其隔夜培養於100 μ l的完全DMEM中。將50 μ l包含牛樟芝萃取物(40–320 μ g/ml)之完全DMEM等量樣品與每50 μ l包含樂瓦司他汀(lovastatin)(2–16 μ M)之完全DMEM等量樣品同時加入培養盤的不同孔中。另外，控制組則只加入100 μ l的完全DMEM。於培養6天之後，以磺酰羅丹明B(sulforhodamine B)(一蛋白質結合染劑)分析測定每孔中的細胞數目。簡單地說，固定細胞於10%三氯醋酸(trichloroacetic acid)中，與以0.4%磺酰羅丹明B將其染色。染色20分鐘後再以1%乙酸清洗，之後，將與細胞結合的磺酰羅丹明B溶解於10 mM的Tris base中。以微量滴定盤檢測器(microtiter plate reader)在562 nm下測定吸光值(optical density)。
- [0028] 上述之方法亦用來測試DBTRG–05 MG神經膠質瘤細胞、CL1–0肺腫瘤細胞與PC12嗜鉻細胞瘤等等細胞對牛樟芝萃取物與樂瓦司他汀(lovastatin)之組合的敏感性。
- [0029] 結果顯示，樂瓦司他汀與牛樟芝萃取物於抑制Hep G2、DBTRG–05 MG、CL1–0與PC12細胞生長顯示出顯著的協同作用。例如樂瓦司他汀(2 μ M)與牛樟芝萃取物(20 μ g/ml)抑制Hep G2細胞生長分別只有11.5%與2.8%，但上述兩者之組合抑制細胞生長達99.3%。此外從施予上述組合中存活的細胞表現示出顯著的皺縮型態。
- [0030] 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。

【圖式簡單說明】

【主要元件符號說明】

七、申請專利範圍：

1. 一種用於治療癌症之藥學組成物，包括一有效量之二羥甲戊酸途徑(mevalonate pathway)抑制劑、一有效量之牛樟芝萃取物與一藥學上可接受的載體(carrier)。
2. 如申請專利範圍第1項所述之用於治療癌症之藥學組成物，其中該癌症包括癌症(carcinoma)與惡性肉瘤(sarcoma)。
3. 如申請專利範圍第2項所述之用於治療癌症之藥學組成物，其中該癌症包括白血病(leukemia)、惡性肉瘤(sarcoma)、惡性骨肉瘤(osteosarcoma) 淋巴瘤(lymphomas)、黑色素瘤(melanoma)、神經膠質瘤(glioma)、嗜鉻細胞瘤(pheochromocytoma)、肝惡性腫瘤(hepatoma)、卵巢癌(ovarian cancer)、皮膚癌(skin cancer)、睪丸癌(testicular cancer)、胃癌(gastric cancer)、胰臟癌(pancreatic cancer)、腎臟癌(renal cancer)、乳癌(breast cancer)、前列腺癌(prostate cancer)、大腸癌(colorectal cancer)、頭部與頸部的癌症、腦癌(brain cancer)、食道癌(esophageal cancer)、膀胱癌(bladder cancer)、腎上腺皮質癌(adrenal cortical cancer)、肺癌(lung cancer)、支氣管癌(bronchus cancer)、子宮內膜癌(endometrial cancer)、鼻咽癌(nasopharyngeal cancer)、子宮頸或肝癌(cervical or liver cancer)與未知起始位置的癌症。
4. 如申請專利範圍第1項所述之用於治療癌症之藥學組成物，其中該二羥甲戊酸途徑抑制劑為3-羥基-3-甲基戊二醯輔酶還原酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA(HMG-CoA) reductase)抑制劑。
5. 如申請專利範圍第4項所述之用於治療癌症之藥學組成物，其中該3-羥基-3-甲基戊二醯輔酶還原酶抑制劑為司他汀(statin)化合物。
6. 如申請專利範圍第5項所述之用於治療癌症之藥學組成物，其中該司他汀化合物為樂瓦司他汀(lovastatin)、辛伐司他汀(simvastatin)、阿托發司他汀(atorvastatin)、氟伐司他汀(fluvastatin)或普伐司他汀(pravastatin)。
7. 如申請專利範圍第6項所述之用於治療癌症之藥學組成物，其中該司他汀化合物為樂瓦司他汀。
8. 如申請專利範圍第1項所述之用於治療癌症之藥學組成物，其中該牛樟芝萃取物是以乙醇萃取牛樟芝所得。

9. 如申請專利範圍第8項所述之用於治療癌症之藥學組成物，其中該二羥甲戊酸途徑抑制劑為3-羥基-3-甲基戊二醯輔酶還原酶抑制劑。
10. 如申請專利範圍第9項所述之用於治療癌症之藥學組成物，其中該3-羥基-3-甲基戊二醯輔酶還原酶抑制劑為司他汀化合物。
11. 如申請專利範圍第10項所述之用於治療癌症之藥學組成物，其中該司他汀化合物為樂瓦司他汀、辛伐司他汀、阿托發司他汀、氟伐司他汀或普伐司他汀。
12. 如申請專利範圍第11項所述之用於治療癌症之藥學組成物，其中該司他汀化合物為樂瓦司他汀。

八、圖式：