



(12) FASCICULE DE BREVET

- (11) N° de publication : **MA 31713 B1** (51) Cl. internationale : **A61K 31/365; A61K 36/06; A61P 35/00; C07D 493/22**
- (43) Date de publication : **01.09.2010**

-
- (21) N° Dépôt : **32718**
- (22) Date de Dépôt : **25.03.2010**
- (30) Données de Priorité : **08.10.2007 CN 200710162725.0**
- (86) Données relatives à l'entrée en phase nationale selon le PCT : **PCT/CN2008/070414 05.03.2008**
- (71) Demandeur(s) : **GOLDEN BIOTECHNOLOGY CORPORATION, 15F, No.27-6 Sec.2 Jhong-Jheng E.Rd. Danshuei Township Taipei Hsien Taiwan (CN)**
- (72) Inventeur(s) : **LIU, Sheng-Yun ; WEN, Wu-Che ; KUO, Mao-Tien**
- (74) Mandataire : **CABINET GHARS**

-
- (54) Titre : **EXTRAIT MYCELIEN DE L'ESPECE MYROTHECIUM DESTINE A L'INHIBITION DE LA CROISSANCE DE CELLULES TUMORALES**
- (57) Abrégé : LA PRÉSENTE INVENTION CONCERNE UN EXTRAIT MYCÉLIEN DE L'ESPÈCE MYROTHECIUM DESTINÉ À L'INHIBITION DE LA CROISSANCE DE CELLULES TUMORALES, SPÉCIALEMENT LA VERRUCARINE A ET LA VERRUCARINE J EXTRAITES DU MYCÉLIUM DE L'ESPÈCE MYROTHECIUM. LA VERRUCARINE A ET LA VERRUCARINE J SONT EMPLOYÉES POUR INHIBER LA CROISSANCE DES CELLULES DE CARCINOME HÉPATOCELLULAIRE HUMAIN HEP3B ET HEPG2, DES CELLULES DE CARCINOME PULMONAIRE HUMAIN A549 ET DES CELLULES DE CARCINOME PROSTATIQUE HUMAIN LNCAP ET DU-145 ET ELLES SONT EMPLOYÉES DANS LA COMPOSITION PHARMACEUTIQUE DESTINÉE À L'INHIBITION DE LA CROISSANCE DES CELLULES DE CARCINOME HÉPATOCELLULAIRE HUMAIN, DES CELLULES DE CARCINOME PULMONAIRE HUMAIN ET DES CELLULES DE CARCINOME PROSTATIQUE HUMAIN.

ABREGE

L'invention actuelle concerne le composé d'inhibition de la tumeur, en particulier au verrucarin A et verrucarin J isolés du *Myrothecium. Sp*, qui peut être utilisés pour interdire le développement des cellules du cancer y compris le cancer de poumon, le cancer hépatique et le cancer de la prostate. Dans l'invention actuelle, le verrucarin A et le verrucarin J sont appliqués pour interdire le développement des lignes Hep 3G et Hep 2G de la cellule du cancer hépatique humain, la ligne A549 de la cellule du cancer du poumon humain, et les lignes LNCaP et DU-145 de la cellule du cancer de la prostate, et qui peuvent être en outre utilisés comme des compositions pharmaceutiques pour interdire le développement des cancer y compris le cancer hépatique, le cancer de poumon et le cancer de la prostate.

FOND DE CETTE INVENTION

1. Domaine d'invention :

[0001] Cette invention se base sur une méthode d'utilisation d'un composé pour empêcher le développement du cancer, en particulier sur des isolés et purifiés de mycelium de *Myrothecium* sp. Qui peuvent être utilisés pour interdire le développement des cellules de cancer de poumon, cellule de cancer hépatique et cellule de cancer de la prostate

2. les maladies antérieures

[0002] Le cancer est devenu la première maladie la plus mortelle de puis le 20^{ème} siècle. Selon les statistiques fourniss par le département de santé de Taiwan en Juin in 2002, le malin cancer a été la première cause de mort parmi les dix premières causes de mort pour les vingt ans de puis 1982, avec un taux de mortalité de 147,86 par 100.000 de populations, et approximativement de 33,000 morts en 2001. Les recherches des composés anti-cancer efficaces et sans des effets ultérieures et graves sont de venues impératives.

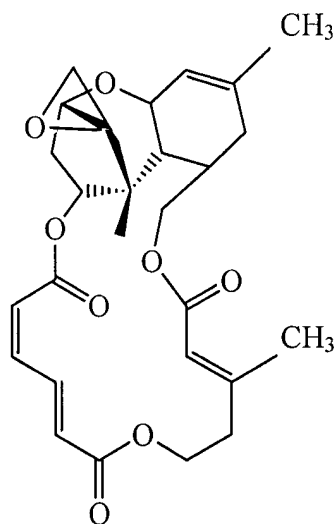
[0003] Les Trichothécènes appartiennent à la famille de sesquiterpènes avec des grandes activités physiologiques, qui se sont produits par beaucoup fungi y compris *Fusarium*, *Trichothecium*, *Trichoderma*, *Myrothecium*, *Cephalosporienne*, *Stachybotrys*, et *Cylindrocarpon*. Les études ont montrés que les trichothécènes exerce une activité contre les bactéries, et a une activité cytotatique dans les tubes d'essaie. Les composés Trichothecenes peuvent être classés suivant deux classes ; composés macrocyclique et composés non-macrocycliques et cette classification est basée sur la différence de leurs structures chimiques. Mycotoxines contiennent des trichothécènes macrocycliques tel que les verrucarins, roridins, satratoxin, vertisporin, et baccharinoid qui sont connues et signalés d'avoir des divers activités biologiques. Et ils interdisent le début de version de protéine et sur tout entraver la synthèse de protéine en s'attachant aux polysomes et aux 80S ribosomes dans les cellules eucaryotes. La plupart de ces mycotoxines

se sont utilisées dans les antibiotiques pour interdire la reproduction des bactéries, pour l'anti-flamation et pour immunomodulatory. Verrucarins, aussi nommés muconomycin et se sont produits par *Myrothecium* sp., peuvent être classifiés en Verrucarin A (muconomycin A), verrucarin J (muconomycin J), verrucarin K ...ainsi de suite suivant leurs structures chimiques. Les Verrucarins ont montrés qu'ils exercent une langue prévention de synthèse de protéine et de glycoprotéine et ayant une activité immunosuppressive. Des activités Antiviral contre les virus Newcastle et le virus mosaïque de tabac des verrucarins ou ils sont signalés.

[0004] À L'interdiction du cancer de poumon, le cancer hépatique et le cancer de la prostate n'ont pas été étudiés dans le prédit traitement des verrucarins. En conséquent, le traitement du cancer par le verrucarin a des effets positifs dans la thérapie de cancer du poumon le cancer hépatique et le cancer de la prostate chez l'homme.

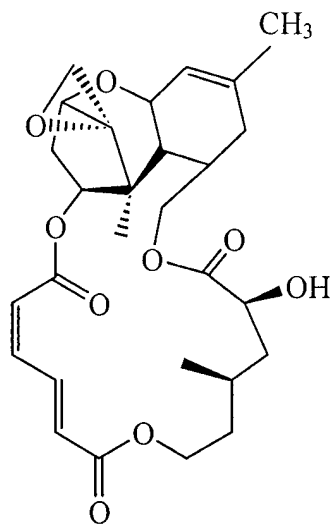
SOMMAIRE DE L'INVENTION

[0005] pour identifier les composés anti-tumoraux, l'invention se base sur les composés ayant la formules de structure suivante et qui sont isolés et purifiés des extraits de *Myrothecium* sp.



(1)

[0006] Le compose de la formule (1) est le verrucarin A (muconomycin B), avec une formule moléculaire de $C_{27}H_{32}O_8$, et un poids moléculaire de 484.



(2)

[0007] Le composé de la formule (2) est le verrucarin J (muconomycin B), avec la formule moléculaire $C_{27}H_{34}O_9$, le poids moléculaire 502.

[0008] Le composé de la formule (1) et la formule (2) dans l'invention actuelle sont purifiés des extraits de solvant organique de *Myrothecium* sp. Les composés organiques utilisées dans cette convention y compris, et autre que, les alcools, tel que le méthanol, l'éthanol, ou le Propanol, et de préférence. Tous autres liquides organiques adéquats qui peuvent extraire le composé de la formule (1) ou la formule (2) y compris l'esters tel que l'éthyle l'acétate, les alcanes tel que l'hexane, ou haloalcanes tel que le chlorométhane, chloroéthane peuvent être disposés.

[0009] L'invention actuelle fournit une méthode pour utiliser les composés précités de la formule (1) et de la formule (2) pour interdire le développement de la cellule de la tumeur. Plus précisément, cette méthode consiste à injecter une dose effective de composé pour inhiber plusieurs cellules de cancer y compris le cancer des poumons, le cancer hépatique, et le cancer prostate et qui résulte le ralentissement de développement des cellules de cancer, et en plus interdire la prolifération des cellules de cancer et diminue le risque de sa malignité. Par conséquent, la méthode d'usage de le compose de cette invention peut être appliqué dans les traitements du cancer des poumons, le cancer hépatique, le cancer de la prostate et autres.

[0010] En outre cette convention fournit une méthode d'usage des compositions pharmaceutiques contenant une dose efficace de formule de structure (1) et la formule de structure (2) pour le traitement de cancer de

poumon, le cancer hépatique et le cancer de la prostate pour accroître l'effet thérapeutique contre les cellules de cancer.

[0011] Le composé de la formule (1) et / la formule (2) dans cette convention peuvent intégrées dans des compositions pharmaceutiques pour le traitement de cancer de poumon, le cancer hépatique, et le cancer prostate pour interdire le développement des cellules de la tumeur. Les composés pharmaceutiques ne comprennent pas seulement les composées de la formule (1) et/ou la formule (2), mes aussi les porteur acceptés dans la production des doses pharmaceutiques. les transporteurs y compris et non seulement les excipients tel que l'eau, les charges tel que le saccharose ou l'amidon, les liants tels que les dérivés de cellulose, déliant, désintégrant, amplificateurs d'absorption ou édulcorant. Le composé ingénieux peut être produits en mélangeant les composés de la formule (1) et les composés de la formule (2) au moins avec un transporteur par des méthodes agréées et connues dans le domaine technique et pharmaceutique, et qui peuvent être disposés , et non seulement, en poudre, tablettes, capsule, boulettes, granules, ou autre formulations liquides.

[0012] Cette convention est encore détaillée dans les figures et les exemples suivants. Ces exemples au dessous ne doivent pas, toutefois, limiter l'envergure de cette convention, il est envisagé que des modifications seront faites par des personnes professionnelles dans le domaine, et toutes modifications doiventt être conformes avec les objectif de cette invention et les limites des dispositions si jointes.

DESCRIPTION DETAILEE DE LA FORME PREFEREE

[0013] Le mycelia de *Myrothecium* sp. a été cultivé et récolté. et après le mycelia a été distillé avec un solvant organique pour obtenir des extraits du solvant organique de *Myrothecium* sp par les méthodes d'extraction les plus connues dans le domaine. Le solvant organique comprend et non seulement, l'alcool tel que le méthanol, éthanol ou le propanol, l'ester tel que l'acétate d'éthyle, l'alcane tel que l'hexane, ou le halo-alcane tel que le Chlorométhane, le chloroéthane. Parmi les quelles l'alcool est de préférence, et 945% d'éthanol et de grande préférence.

[0014] Les extraits du solvant organique de *Myrothecium* sp. Ont été soumis sous une chromatographie liquide de grande performance (CLGP) pour qu'ils soient isolés et purifiés. Toute fraction a été essayée et recouverte pour des activités biologiques. Les fractions actives avec les effets de l'anti-cancer ont été analysées pour la composition, et en outre essayé contres des différentes cellules de la tumeur. La proposition au dessus mène à l'identification des composés de la formule (1) et la formule (2), qui interdisent le développement des cellules de la tumeur du cancer de poumon, le cancer hépatique et le cancer de la prostate.

[0015]

Les composés de la formule (1) et la formule (2) ont été démontrés par les effets de l'anti-cancer en utilisant 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2, 5-bromure de diphenyltetrazolium (MTT) en analyse selon le tableau des agents anti-tumeur de l'institut national de cancer (INC) des instituts nationaux de santé aux états unies sur les taux de la survie des cellules en utilisant des de la cellule du cancer de poumon, du cancer hépatique, du cancer de la prostate et d'autres. Les analyses citées au dessus ont prouvé que le Verrucain A et le verrucarin J ont abaissé le taux de survie des ligne (A-549) de la cellule de cancer de poumon, les lignes (Hep 3B et Hep G2) de la cellule du carcinome hépatique et les lignes (LNCaP et DU- 145) de la cellule du cancer de la prostate, et au même temps, ont montré des faibles valeurs de inhibitory concentration (IC50). Par conséquent le verrucarin A et verrucarin J peuvent être utilisés dans la prévention de développement de cellule de cancer du poumon, de cancer hépatique et de cancer de la prostate et il peuvent être appliqués dans le traitement de cancer des poumons, le cancer hépatique et le cancer de la prostate et d'autres cancers. Les détails de ces exemples sont décrits comme suit:

Exemple 1

Culture de *Myrothecium* sp.

[0016] Le milieu du *Myrothecium* sp. A été préparé comme il est décrit au dessus. Le milieu contient 0.1-2 g de NaCl, 5-10g de peptone, 1-2 g d'extrait de levure, 3-10 g de gélose, 3-10 g de céréales (choisi de riz, blé, riz glouton ou maïs ou autres semblables), 1-2 g de source de nitrogène (NH₄NO₃ or

KNO_3), 1-3 g de source de charbon (glucose, fructose or saccharose), un peut du sel de phosphate, petite quantité d'ion métallique (magnésium ou calcium) dans 800-1000ml d'eau doubles distillé. Une Ph réglé entre 6,5 et 7,5 avec 1 Na OH ou 1 N Cl. Le milieu a été chauffé jusqu'au 120°C pendant 30mn dans un ballon conique avec des coton insérés. Le *Verrucaria* de *Myrothecium* ou l'ode de *Myrothecium rodium* a été incubé dans le frais milieu de culture dans hotte à flus laminaire et incubé à 20-30°C pendant de 4-8 semaines pour obtenir le mycelia de *Myrothecium* sp qui a été ramassé du sol sous les arbres des côtés des collines de montagne de neige de Taiwan, et identifié par le professeur Tseng Hsien-Hsiung de l'université nationale de Taiwan. Les sources microbiennes d'intérêt sont aussi comprises, et ne sont pas limitées aux prédicts accords et chaque accord est utilisé pour fournir le verrucarin A et le verrucarin J.

Exemple 2

Isolation du compose par des activités d'anti cancer

[0017] Cent grams de mycelia de *Myrothecium* sp. De l'exemple 1 sont mis dans un ballon. Une quantité adéquate de 95% alcool a été ajoutée au ballon est agitée à 20-25 °C durant au moins une heure. La solution a été filtrée par un filtre d'une membrane de 0.45 μm et le filtrat (solution filtré) a été disposé comme extrait. Le solvant organique utilisé y compris, et non seulement, les alcools tel que le méthanol, l'éthanol ou le Propanol, et l'éthanol est de préférence

[0018] Le filtrat de *Myrothecium* sp. A été soumis sous les analyses de la chromatographie en phase liquide à haute performance (CLGP) avec colonne de gel de silice. La phase mobile est composée d'Hexane et d'acétate d'éthyle (AE) la colonne effluente a été contrôlée par un détecteur visible UV. Dix fractions ont été essayées pour les activités biologiques. Les compositions des Fractions contenant les activités biologiques ont été analysées. Séparation avecdes différentes ratios d'acétone sur ces fractions produisent des composés de la formule (1) et des composés de la formule (2). Le composé de la formule (1) est le verrucarin A après l'analyse, qui montre la formule moléculaire $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_8$ dont lamasse moléculaire est 484. Le composé de la formule 2 est le verrucari J après l'analyse, qui présente une formule moléculaire $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{O}_9$ ayant une masse moléculaire de 502.

Example 3Analyse dans tes tubes d'essai de l'activité de l'anti-tumeur dans un organisme non vivant sur le cancer hépatique

[0019] Les expert de l'institut national du cancer (INC) se sont consacrés à tester l'effet de l'anti-cancer de verrucarin A et verrucarin J sur cette invention. Le verrucarin A et Le verrucarin J isolés dans l'exemple 1 sont ajoutés au milieu de culture des cellules de cancer hépatique, Hep 3B ou Hep 2G pour déterminer le survie de la cellule de cancer par l'essaie de MTT. L'essaie de MTT est fait pour évaluer le taux de la survie des cellules. Les cellules du cancer hépatique Hep 3B (sous un nombre d'accession BCRC 60434) et Hep G2 (sous un nombre d'accession de BCRC 60025), ont été obtenus du centre de recherche et de collection bio-ressources de l'institut de recherche et de développement de l'industrie alimentaire.

[0020] L'essaie de MTT est utilisé souvent pour analyser la prolifération des cellules, le pourcentage des cellules viables et la cytotoxicité. MTT (3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2, 5-diphényl bromure de tetrazolium) est jaune teinte, et il peut être absorbé par les cellules vivantes et transformé aux produit de formosan insolubles par succinate tetrazolium reductase das mitochondria. Développement des produits de formosan dans des cellules viables et donc peuvent être utilisé évaluer et déterminer le taux de survie des cellules.

[0021] Les cellules de cancer hépatique humain, Hep 3B et Hep G2, sont implantées dans un milieu contenant un sérum bovin pendant 24 heures. Les cellules proliférées ont été lavées une fois par PBS, et puis traitées par 1x Trypsine-EDTA et centrifugées à 1,200 rpm pendant 5 Minutes. Le liquide sunatant a été enlevé et la cellule de la pilule a été suspendu autre fois dans 10ml de milieu de culture par des petites agitations. La cellule a été mise dans un puis -96. Tous les extraits de *Myrothecium* sp. (le groupe de contrôle, les extraits totaux de l'éthanol de *Morythcium* sp. Sans les purifications de CLGP), ou verrucarin A et verrucarin J (la groupe expérimentale) ont été ajouté à chacun de ces puis par les concentrations suivantes : 100, 30, 10, 3, 1, 0.3, 0.1 and 0.03 ng/ml, respectivement. les cellules ont été incubés à 37°C dans 5% CO₂ pendant 48 heures. La teinte MTT a été ajouté à une concentration de 2.5 mg/ml à chaque puis couvert et obscure pendant 4 heures, puis 100 μ l du tampon de lyse pour arrêter la réaction. Par la suite,

l'absorption est mesurée par un analyseur immune-essai d'enzyme à 570 nm pour la mesure des cellules viables et pour déterminer le taux de la survie des cellules. la moitié de la valeur de la concentration inhibiteur (IC₅₀) de la groupe de contrôle et de la groupe expérimentale a été aussi calculé est présentée dans le tableau 1.

Tableau 1 résultat de L'essai de survie des activités anti-tumeur des cellules de cancer hépatique dans un milieu artificiel

examples		IC ₅₀ (ng/ml)	
		Hep3B	HepG2
Groupe de contrôle	Extraits brutes de <i>Myrothecium sp.</i>	23.81	45.89
Groupe expérimental	verrucarin A	2.31	10.21
	verrucarin J	3.12	13.31

[0022] On déduit des résultats du tableau 1 que, verrucarine A et verrucarine J peuvent efficacement abaisser le taux de survie des la lignes Hep 3B et Hep G2 de la cellule du cancer hépatique humain. La valeur de IC₅₀ de verrucarine A et verrucarine J en vers le Hep a été respectivement 2.31ng/ml et 3.12 ng/ml , qui a été 90.3% et 86.9% moins que la valeur de IC₅₀, 23.81 ng/ml des extraits brutes de *Myrothecium sp.* La valeur IC₅₀ de verrucarine A et de verrucarine J en vers Hep G2. La valeur IC₅₀ de verrucarine A et verrucarine J pour Hep G2 est respectivement de 10.21 ng/ml et de 13.31 ng/ml et qui est 77.75 % et 71 % moins que les extraits brutes de myrothecium sp. En plus, les cellules de cancer hépatique traitées par le verrucarine J, et donc une baisse concentration de verrucarine A a montré une valeur plus faible de IC₅₀ que est cellules traités par le verrucarine J, donc une concentration de verrucarine A a été nécessaire pour interdire le développement de la moitié des cellules de cancer. Le verrucarine A un effet d'interdiction de développement des cellules de cancer hépatique plus grande que celle du verrucarine J.

Example 4Essai dans les tubes de survie des activités de l'anti-tumeur du cancer de poumon

[0022] Les experts de INC ont été aussi engagée à tester les effets de l'anti-cancer des poumons de verrucarin A et de verrucarin J dans l'invention. Verrucarin A et verrucarin J isolés à l'exemple 2 ont été ajouté au milieu de culture de la cellule A549 du cancer du poumon humain pour analyser la survie de la cellule de tumeur, et les taux de la survie du cancer des poumons ont été analysés par l'essai de précité MTT. La cellule A549 du cancer de poumon a été obtenue du centre bio-ressources de collection et de recherche (CRCB) de l'institut de recherche et développement de l'industrie alimentaire son nombre d'accès est BCRC 60074.

[0023] La cellule A549 de cancer de poumon humain a été cultivée dans un milieu contenant un sérum de bovin foetal pendant 24 heures. Les cellules proliférées ont été lavées une fois par PBS, puis exposées à 1x Trypsine-EDTA et centrifugées à 1,200 rpm pendant 5 minutes. Le surnatant a été enlevé et la pilule de la cellule a été suspendue autre fois dans 10 ml de frais milieux de culture par des douces agitations. les cellules ont été mises dans la puis 96. Les extraits brutes de *Myrothecium* sp. (le groupe de contrôle, extrait total d'éthanol sans purification de CLPG), ou verrucarin A et verrucarin J (le groupe expérimental) ont été ajoutés aux puis avec les concentrations suivantes: respectivement, 100, 30, 10, 3, 1, 0.3, et 0.1 ng/ml. Les cellules ont été développées à 37°C dans un incubateur de 5% de CO₂ pendant 48 heures. la teinte de MTT a été ajoutée à une concentration de 2.5 mg/ml dans chaque puis pendant 4 heures, et puis 100µl du tampon de lyse pour arrêter la réaction. Les plaques se sont montrées dans le lecteur ELISA à un longueur d'onde de 570 nm pour déterminer le taux de survie. La moitié de la valeur d'inhibitory concentration est aussi calculée et dressée dans le tableau suivant n°2.

Tableau 2 résultats d'essaie dans les tubes de la survie des activités de l'anti-tumeur des cellules de cancer de poumon.

exemples		IC ₅₀ (ng/ml)
		A549
Groupe de Contrôle	Extraits bruts de <i>Myrothecium</i> sp.	52
Groupe expérimental	verrucarin A	1.12
	verrucarin J	2.34

[0025] Les résultats du tableau 2 montrent que Verrucari A et verrucarín J peuvent effectivement abaisser le taux de survie de la ligne cellulaire A549 de cancer de poumon humain. Les valeurs de IC₅₀ au Hep 3B ont été respectivement de 1.12 ng/ml et de 2.34 ng/ml, elles ont été de 97.85% et 95.5 % plus faibles que les valeurs des extraits brutes de *Myrothecium* (52 ng/ml). Le verrucarrins A et le Verrucarín J ont montrée des valeurs plus faible de IC₅₀ que celles du groupe du contrôle. Et par conséquent le verrucarín A et le verrucarín J peuvent être utilisés pour ralentir le développement des cellules de cancer de poumon humain. Et en plus les cellules de cancer traitées par le verrucarín ont montré une valeur IC₅₀ plus faible que les cellules traitées par le verrucarín J, et donc, une concentration faible de verrucarín A est exigée pour interdire le développement de la moitié des cellules de poumon. Ce qui signifie que le verrucarín A a une effet d'interdiction plus grande que le verrucarín J sur le développement des cellules de cancer de poumon.

Exemple 5

Essaie dans les tubes de survie de l'anti-tumeur sur l'activité de cancer des cellules de la prostate

[0024] Selon les expert de INC de l'institut national de santé aux états unies, le prédit essaie MTT est accéléré par l'addition de verrucarín A et verruacrin J respectivement aux cellules LNCaP et DU-145 de la tumeur de cancer de la prostate humaine.

[0025] Le cancer de la prostate est formé dans les cellules hepythialles de la glande de la prostate, et dépend sur l'androgène dans son premier cycle de développement. A l'origine toutes les cellules du cancer de la prostate sont

dépendantes de l'androgène. Et qui peuvent être traitées par la thérapie de la privation d'androgène. LNCaP présente ce type de cancer de prostate dans un stage initial. Ce pendant 33% des maladies vont connaître son réapparition, et la quantité de sécrétion d'androgène sera plus faible. Finalement le cancer réapparus passe à la prostate de cancer dépendante de l'androgène, qui n'a plus de traitement efficace jusqu'à maintenant Du-145 représente ce type de cellule de cancer. Les deux LNCaP et DU-145, ont été retirés de donnés du centre de recherche et de collection bio-ressources (CRCB) de l'institut de recherche et de développement de l'industrie alimentaire avec deux nombres d'accès respectives CCRC 60088 et CCRC 60348.

Les cellules de cancer hépatiques humain, LNCaP et DU-145, ont été cultivées dans un milieu contenant le sérum de foetal pendant 24 heures. Les cellules proliférées ont été lavées une fois par PBS, et puis traitées par 1x Trypsine –EDTA et centrifugées à 1,200 rpm pendant 5minute. Le surnatant a été enlevé et la pilule de la cellule a été remise en suspension dans 10 ml de frais milieux de culture par des douces agitations. Les cellules ont été mises dans des puis 96. L'eau (groupe de contrôle négative), 4.2 ng/ml de Taxol (contrôle positif), 100, 10, 0.1, et 0.001 ng/ml des extraits brutes de *Myrothecium*. sp (groupe de contrôle expérimental, extraits brutes de *Myrothecium* .sp sans purification de CLGP) ou 100, 10 , 0.1, et 0.001de verrucarin A et verrucarin J ont été (groupe expérimental) ont été ajoutés respectivement aux deux puis. Les cellules ont été incubées dans à 37°C dans un incubateur CO₂ pendant 48 heures. La tenture de MTT a été ajoutée en concentration de 2.5 mg/ml à chaque puis à incuber obscure pendant 4heures, et puis 100 µl de teinture de lyse a été ajouté pour arrêter la réaction. Les indications des plaques ont été montrées dans un lecteur ALISA par longueur d'onde de 570nm pour déterminer les taux de survie (%). La moitié des valeurs IC₅₀ de concentration d'inhibition maximales ont été aussi calculées et dressées dans les tableaux 3 et 4.

Tableau 3 figure les résultats de l'essaie in vitro de la survie des activités de l'anti-tumeur de des cellules du cancer de la prostate.

échantillons		IC ₅₀ (ng/ml)	
		LNCaP	DU-145
Groupe de Contrôle expérimental	extraits brutes de <i>Myrothecium</i> sp.	29.31	33.16
Groupe expérimental	verrucarin A	2.85	0.02
	verrucarin J	0.31	0.28

[0026] Les résultats du tableau 3 montrent que le taux de la survie des LCaP et DU-145 a été énormément réduit par les effets de Verrucarine A et verrucarine J. pendant que les cellules du cancer de la prostate DU-145 traitées avec le verrucarine J. les valeurs IC₅₀ de verrucarine A et du verrucarine J en pour LNCaP ont été respectivement de 2.85 ng/ml et de 0.31 ng/ml, et donc de 99.93% et 99.16% plus faible que la valeur IC₅₀ du groupe de contrôle expérimental (33.16ng/ml). Par conséquent le verrucarine A et le verrucarine J de *myrothecium* .sp peuvent être appliqués pour interdire le développement des cellules du cancer de la prostate, qui ont montrés des valeurs IC₅₀ plus faibles que celles des extraits brutes. En plus, les cellules du cancer de la prostate LNCaP traitées par le verrucarine J ont montrées des valeurs IC₅₀ plus faibles que les cellules traitées par le verrucarine A, donc le verrucarine J a des effets d'interdiction plus grandes que le verrucarine A sur le développement des cellules LNCaP du cancer de la prostate. . ce pendant les cellules Du-145 du cancer de la prostate traitées par le verrucarine A ont montré des valeurs de IC₅₀ plus faibles que les cellules traitées par le verrucarine J, et donc le verrucarine A a des effet d'interdiction plus grande que le verrucarine J sur le développement des cellules DU-145 du cancer de la prostate.

Tableau 4 effets du verrucarin A et verrucarin J sur le développement de la cellule DU-145 du cancer de la prostate.

échantillons		Concentration (ng/ml)	Taux de survie de la cellule (%)
Groupe de contrôle négatif	eau		100
Contrôle positif	Taxol	4.2	63.88
Groupe de contrôle expérimental 1	Extraits brutes de <i>Myrothecium</i> sp.	100	20.60
		10	91.01
		1	94.30
		0.1	101.31
Groupe expérimental	verrucarin A	100	16.96
		10	17.07
		1	16.99
		0.1	21.01
		0.01	72.31
		0.001	94.33
		verrucarin J	100
	10		18.95
	1		19.93
	0.1		81.11
	0.01		101.30
	0.001		100.21

[0027] Le tableau 4 montre que le développement de la cellule DU-145 du cancer de la prostate a été réduit par l'effet du verrucarin A et verrucarin J. Par rapport au groupe de contrôle, le taux de survie des cellules de cancer a été réduit à 20 % à l'usage de verrucarin A et verrucarin J en concentration 1ng/ml à 100 ng/ml. Les taux de survie des cellules ont été réduits à l'addition de concentration des extraits brutes de *Myrothecium* sp., ou verrucarin A et verrucarin J. Au contre, les taux de survie des cellules ont augmentés lorsque la concentration utilisée a été diminuée. Lorsque la concentration du groupe de contrôle et de groupe expérimental a été diminuée à 10ng/ml, le taux de survie de la cellule a été augmenté à 91.01% à l'addition des extraits brutes de *Myrothecium* sp. , pendant que le taux de servie de la cellule a resté au

bout de 19% quant le verrucarine A et verrucarine J sont respectivement ajoutés. Verrucarine A et verrucarine J se sont montrées des ingrédients actifs pour l'interdiction des cellules DU-145 du cancer de la prostate. De plus, le taux de la survie de la cellule a été 63.88% quand elle a été traitée par 402 ng/ml de Taxol, pendant que le taux de survie de la cellule a été réduit à 20% quand la concentration utilisée de verrucarine A et verrucarine J a été rangée de 1ng/ml à 10 ng/ml. Ce qui montre une énorme effet d'interdiction de la cellule du cancer de la prostate humaine de verrucarine A et de verrucarine J par apport au taxol. Et des effets d'interdiction importants ont été observés même lorsque la concentration utilisée est devenue assez faible que 0.1ng/ml et 1ng/ml.

[0028] En outre, les taux de survie de la cellule ont été similaires quand la concentration de verrucarine A et verrucarine J ont été au dessus de 1 ng/ml (rangé de 1 ng/ml à 10ng/ml). Et après, tous les deux ont montré des effets anti-cancer similaires aux mêmes concentrations. Ce pendant le verrucarine (A) a des grands effets d'interdiction de développement de la cellule DU-145 de la prostate humaine que le verrucarine J quand la concentration utilisée est plus faible que 0.1ng/ml (rangée entre 0.001ng/ml et 0.1 ng/ml).

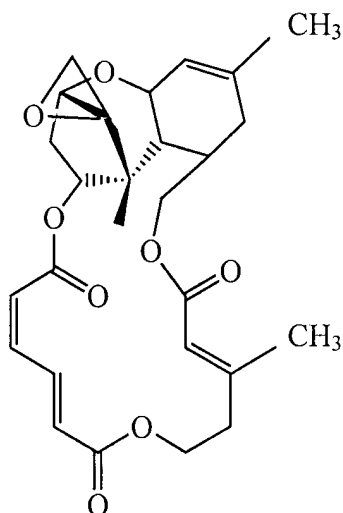
[0029] En bref, verrucarine A et verrucarine J purifiés des extraits de *Myrothecium* sp. Peuvent efficacement interdire le développement des cellules LNCaP et DU- 145 du cancer de la prostate avec des différentes caractéristiques. Et par conséquent le verrucarine A et verrucarine J peuvent être utiliser pour interdire le développement de la cellule LNCaP du cancer de la prostate dépendante de l'androgène et aussi pour interdire le développement de la cellule DU-145 indépendante d'androgène du cancer de la prostate. Et ceci est fiable à la thérapie du cancer de la prostate et du cancer récurrent de la prostate.

[0030] En outre le verrucarine A et verrucarine J peuvent être incorporés, dans des compositions pharmaceutiques. Les compositions pharmaceutiques ne comprennent pas seulement le composé actif de verrucarine A et verrucarine J, mais aussi les porteurs acceptés en pharmacie. Des exemples des porteurs comprennent, et non seulement, excipients des diluants, des intégrants, amplificateurs d'absorption, édulcorants. Le composé inventé peut être produit en mélangeant le verrucarine A et le verrucarine J de

Myrothecium .sp avec ou moins un porteur suivant les méthodes consenties et connues dans le domaine technique de la pharmacie, et que peut être produit en forme de poudre, tablettes, capsules, pilules, granules, ou autres formulations liquides, mais ne se limitent pas à ces formules. L'objectif de l'invention actuelle consiste à traiter la tumeur et interdire le développement des cellules du cancer peut être accomplis.

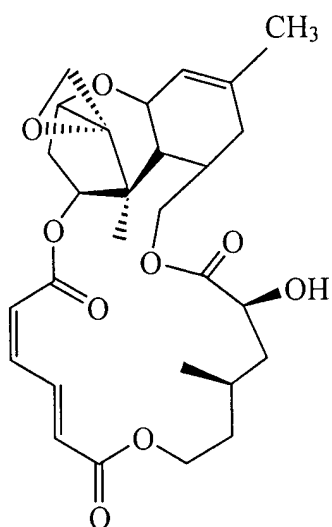
REVENDEICATIONS:

1. Une méthode pour interdire les cellules de cancer, y compris:
Donner de doses effectives du composé ayant la formule suivante pour interdire le développement des cellules du cancer hépatique, les cellules du cancer de poumon et les cellules du cancer de la prostate.



2. La méthode est telle qu'elle est indiquée dans la première disposition, en ceci le composé est isolé du Mycelium de *myrothecium* .sp
3. La méthode telle qu'elle est indiquée dans la disposition, en ceci les cellules du cancer hépatiques sont de la ligne de la cellule Hep 3B ou de la ligne de la cellule Hep G2.
4. La méthode et telle qu'elle est indiquée dans la disposition 3, en ceci la moitié de la concentration maximale d'inhibition IC_{50} de la ligne cellulaire Hep 3B du cancer hépatique est de 2.31ng/ml..
5. La méthode et telle qu'elle est indiquée dans la disposition 3, en ceci la moitié de la concentration maximal d'inhibition IC_{50} de la ligne HepG2 de la cellule du cancer hépatique est de 10.21 ng/ml.
6. La méthode et telle qu'elle est indiquée dans la disposition 1, en ceci les cellules du cancer du poumon sont de la ligne cellulaire A549.
7. La méthode tel qu'il est indiqué dans la disposition 6, en ceci la moitié de la concentration maximale d'inhibition IC_{50} de la ligne A549 de la cellule du cancer du poumon est de 1.12 ng/ml.
8. La méthode et telle qu'elle est indiquée dans la disposition 1, en ceci les cellules du cancer de la prostate sont de des lignes cellulaires LNCaP et DU-145.

9. La méthode et telle qu'elle est indiquée dans la disposition 8, en ceci la moitié de la concentration maximale d'inhibition IC_{50} de la ligne cellulaire LNCaP est de 2.85 ng/ml.
10. La méthode et telle qu'elle est indiquée dans la disposition 8, la moitié de la concentration maximale d'inhibition IC_{50} de la ligne cellulaire DU-145 est de 0.02ng/ml.
11. Un composé pharmaceutique utilisé pour interdire le développement des cellules de cancer, qui comprend une dose active du composé indiqué dans la disposition 1 et un porteur accepté en médecine, en ceci les cellules du cancer sont sélectionnées du groupe y compris le cancer hépatique, le cancer du poumon ou le cancer de la prostate.
12. Une méthode d'interdire les cellules du cancer, y compris :
Donner une dose effective du composé ayant les formules suivantes pour interdire le développement de les cellules du cancer hépatique, les cellules du cancer de la prostate ou les cellules du cancer des poumons



13. La méthode et telle qu'elle est indiquée dans la disposition 12, en ceci le composé est isolé de mycelium de *Myrothecium* sp.
14. La méthode telle qu'elle est indiquée dans la disposition 12, en ceci les cellules du cancer hépatique sont de la ligne cellulaire Hep 3B ou de la ligne cellulaire HepG2.
15. La méthode et telle qu'elle est indiquée dans la disposition 14, en ceci la moitié de la concentration maximale d'inhibition IC_{50} de la ligne cellulaire

Hep3B du cancer hépatique est de 3.12ng/ml.

16. La méthode et telle qu'elle est indiquée dans la disposition 14, en ceci la moitié de la concentration maximale IC_{50} d'inhibition de la ligne de la cellule HepG2 du cancer hépatique est 13.31ng/ml.
17. La méthode telle qu'elle est indiquée dans la disposition 12, en ceci les cellules du cancer de poumon est de la ligne de la cellule A549.
18. La méthode telle qu'elle est indiquée dans la disposition 17, en ceci la moitié de la concentration maximale d'inhibition IC_{50} de la ligne A549 de la cellule du cancer de poumon est de 2.34 ng/ml.
19. La méthode telle qu'elle est indiquée dans la disposition 12, en ceci les cellules du cancer de la prostate sont de la ligne de la cellule LNCaP ou de la ligne de la cellule DU-145.
20. La méthode telle qu'elle est indiquée dans la disposition 19, en ceci la moitié de la concentration maximale IC_{50} est de la ligne DU-145 de la cellule du cancer de la prostate est de 0.28ng/ml.
21. Une composition pharmaceutique utilisée pour interdire le développement des cellules du cancer, qui comprennent une dose active du composé tel, qu'il est indiqué dans la disposition 12 et un porteur acceptable en pharmacie, en ceci les prédites cellules de cancer sont choisies du groupe y compris le cancer hépatique, le cancer de poumon et le cancer de la prostate.