



(21)申請案號：099103086

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 02 月 02 日

(51)Int. Cl. : **C07J63/00 (2006.01)** **A61K31/56 (2006.01)**
 A61K31/365 (2006.01) **C07D313/08 (2006.01)**
 A61P29/00 (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：林忠男 LIN, CHUN NAN (TW)；涂皇堯 TU, HUANG YAO (TW)；黃阿梅 HUANG, A MEI (TW)；魏百祿 WEI, BAI LUH (TW)；顏金鳳 GAN, KIM HONG (TW)；侯自銓 HOUR, TZYH CHYUAN (TW)；楊世群 YANG, SHYH CHYUN (TW)；蒲永孝 PU, YEONG SHIAU (TW)；翁舷誌 WON, SHEN JEU (TW)

(74)代理人：蔡清福

(56)參考文獻：

CN 1682740A

CN 1887899A

CN 101157715A

審查人員：蔡榮哲

申請專利範圍項數：10 項 圖式數：9 共 0 頁

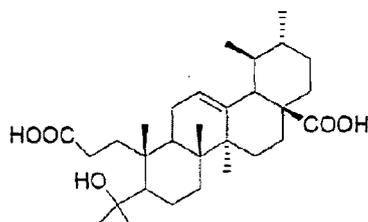
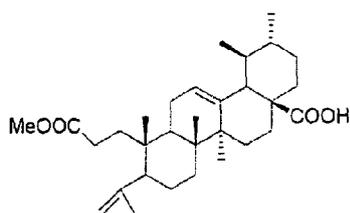
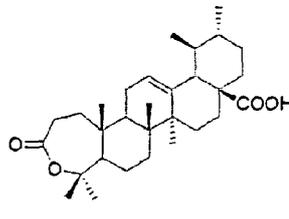
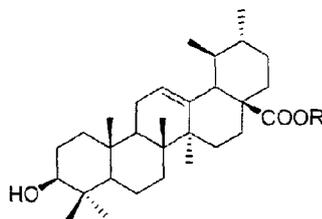
(54)名稱

熊果酸衍生物及其醫藥組合物

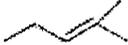
URSOLIC ACID DERIVATIVE AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION THEREOF

(57)摘要

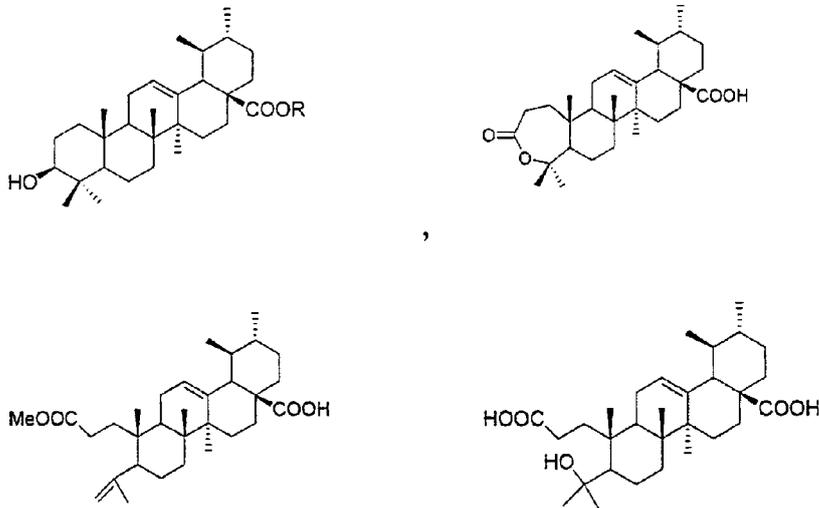
本發明係提供一種熊果酸衍生物及包含該熊果酸衍生物的醫藥組合物，其中該熊果酸衍生物之結構選自



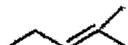
以及

其中之一，其中 R 係選自 C₅-C₁₂-烷基、CH(CH₃)₂、、醇基以及 CH₂COOC(CH₃)₃ 其中之一。

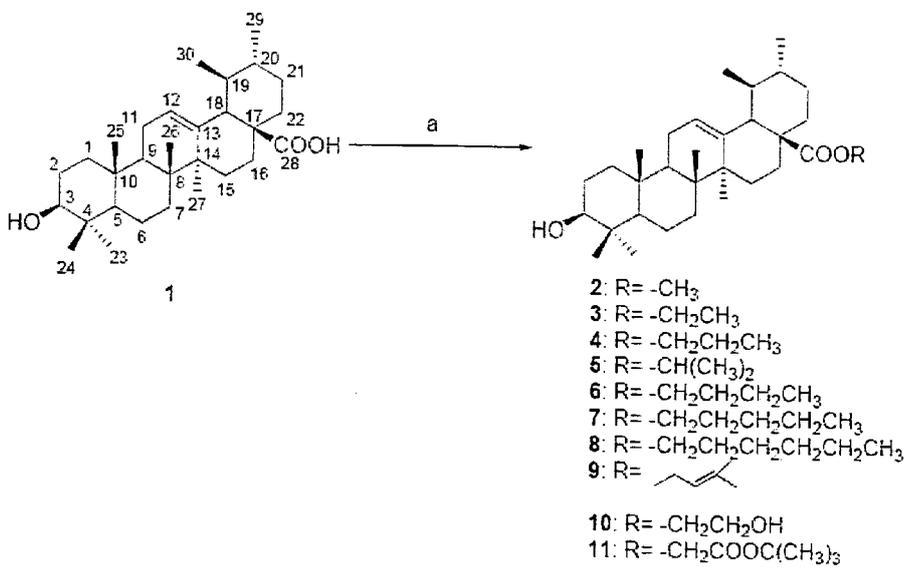
The present invention provides an ursolic acid derivative having the structure selected from a group consisting of



and

wherein R is one selected from a group consisting of C₅~C₁₂ alkyls, CH(CH₃)₂, , an alcohol group and CH₂COOC(CH₃)₃.

本代表圖為流程圖及化學結構，其中每個數字代表不同的化合物。



第一圖

公告本

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：99103086

※申請日期：99. 2. 2

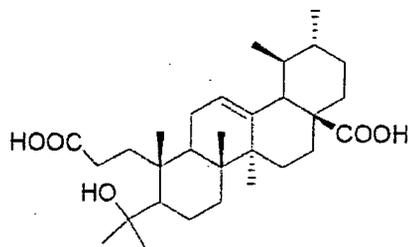
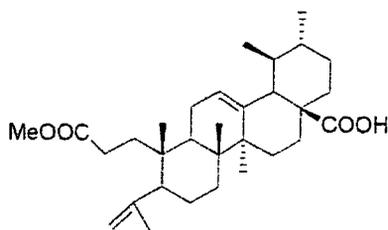
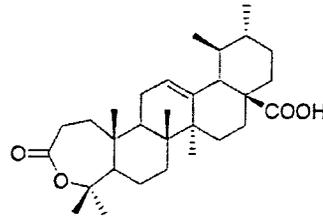
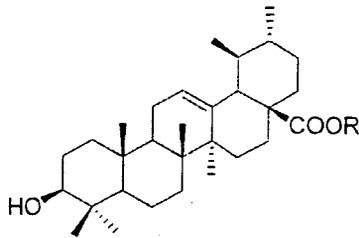
※IPC 分類：A61K 31/365

一、發明名稱：(中文/英文)

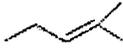
熊果酸衍生物及其醫藥組合物 / Ursolic Acid Derivative And
Pharmaceutical Composition Thereof

二、中文發明摘要：

本發明係提供一種熊果酸衍生物及包含該熊果酸衍生物的醫藥組合物，其中該熊果酸衍生物之結構選自

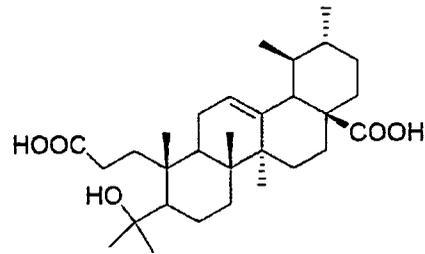
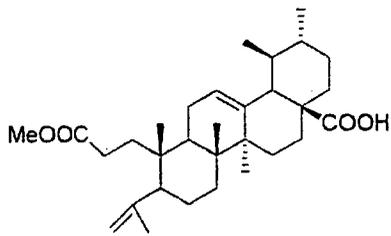
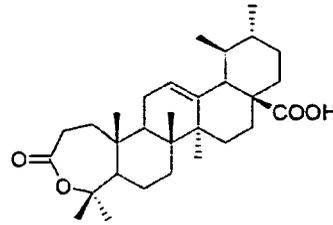
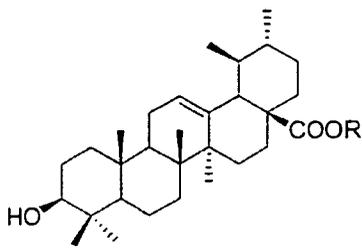


以及

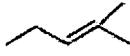
其中之一，其中 R 係選自 C₅-C₁₂-烷基、CH(CH₃)₂、、醇基以及 CH₂COOC(CH₃)₃ 其中之一。

三、英文發明摘要：

The present invention provides an ursolic acid derivative having the structure selected from a group consisting of



and

wherein R is one selected from a group consisting of $C_5 \sim C_{12}$ alkyls, $CH(CH_3)_2$, , an alcohol group and $CH_2COOC(CH_3)_3$.

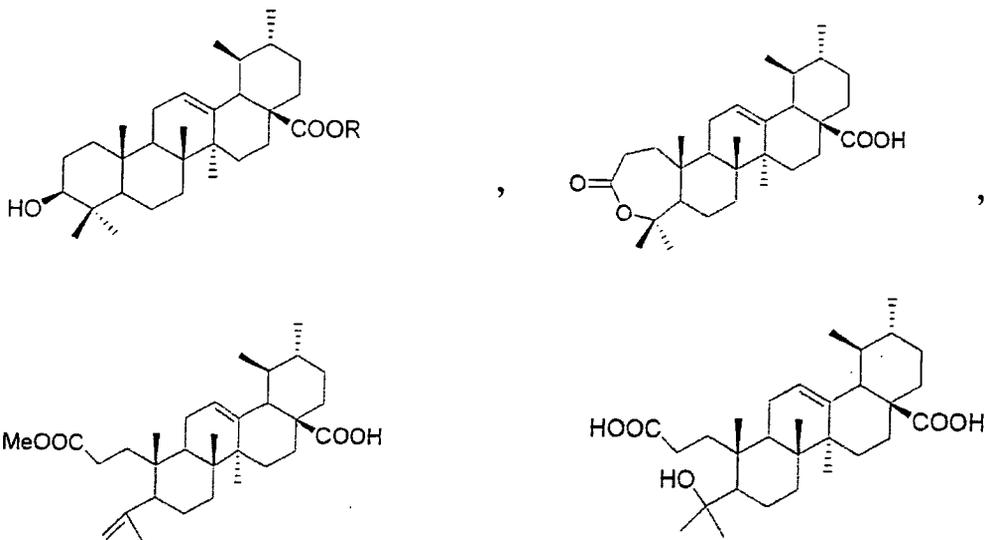
四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(一)圖。

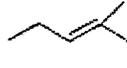
(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

本代表圖為流程圖及化學結構，其中每個數字代表不同的化合物。

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



以及

其中 R 係選自 C_5-C_{12} -烷基、 $CH(CH_3)_2$ 、、醇基及 $CH_2COOC(CH_3)_3$ 其中之一。

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種化合物及其醫藥組合物，特別是關於一種熊果酸衍生物及其醫藥組合物。

【先前技術】

植物界中存在豐富的三萜類 (triterpenoid)，其中熊果酸 (ursolic acid) 化合物被發現具有抗腫瘤、抗炎、抗病毒及抗氧化等活性。

活性氧化物 (reactive oxygen species, ROS) 導致各種細胞成分，例如去氧核糖核酸 (DNA)、脂質、蛋白質等的氧化，這些氧化作用可能造成細胞本體的損害而最終使細胞死亡。ROS 已被發現與一些疾病相關聯，包括各種型的非荷爾蒙依賴性癌症 (non-hormone dependent cancers)、動脈粥狀硬化、缺血再灌流傷害 (ischemic reperfusion injury)、神經退化疾病、慢性發炎疾病 (例如類風濕性或乾癬性關節炎)，以及一些潛在於老化過程本身的因子。ROS 也可能扮演訊息分子的角色，以及它們本身在細胞週期進行中的角色。

數種抗癌藥劑，例如三氧化二砷、阿黴素 (doxorubicin)、爭光黴素 (bleomycin)、順鉑 (cisplatin)、5-氟尿嘧啶 (5-Fu) 以及紫杉醇 (paclitaxel)，已被研究顯示在癌細胞中誘導 ROS 產生；已有各式各樣的機制被描述，包括呼吸鏈崩解，氧化還原循環，或是 p53 調節粒線

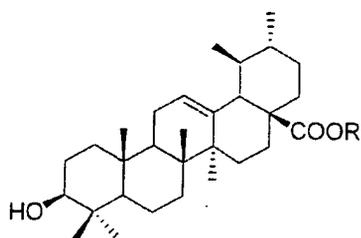
體氧化酶活化作用。

近來，數種化學結構和細胞毒素之關係被研究報導，然而熊果酸衍生物系列之結構與細胞毒素關係則仍未被揭示，有鑑於此，本案發明人致力於合成一系列熊果酸衍生物，並研究其抗癌活性與機制，對於研發抗癌藥物之生醫產業將具高度利用價值。

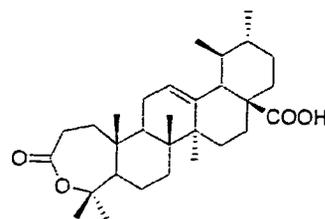
【發明內容】

本發明之一目的在於提供具有抗炎及抗癌活性的化合物及其醫藥組合物。

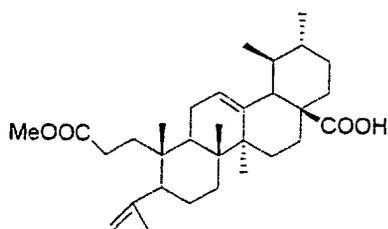
根據本發明之構想，係提供一種熊果酸衍生物，其結構選自



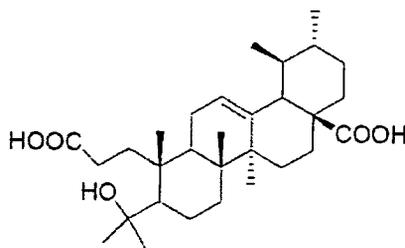
式 I



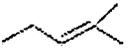
式 II



式 III



式 IV

其中之一，其中 R 係選自 C₅-C₁₂-烷基、CH(CH₃)₂、、醇基及 CH₂COOC(CH₃)₃ 其中之一。

根據上述構想，該 C₅-C₁₂-烷基例如為戊烷基或己烷

基，或本領域技術人士依本案所教示之化合物結構及合成方法所能預見的其他碳數更多的烷類取代基。

根據上述構想，該醇基例如為一乙醇基，或是本領域技術人士依本案所教示之化合物結構及合成方法所能預見的其他碳數更多的醇類取代基。

根據上述構想，本發明之熊果酸衍生物具備抗癌及抗發炎活性，可用於製備抑制癌症的醫藥組合物。

另一方面，本發明提供一種用於抑制癌症的醫藥組合物，其包含具有如式 I、式 II、式 III 及式 IV 其中之一的結構的化合物作為活性成份。

根據上述構想，該醫藥組合物更包含一醫藥上可接受載體。

此外，上述醫藥組合物可更包含另一抗癌藥物，且具有如式 I、式 II、式 III 及式 IV 其中之一的結構的化合物可增強該抗癌藥物之活性。

又一方面，本發明提供一種用於增加一細胞內的活性氧量的醫藥組合物，其包含一熊果酸衍生物，以及一醫藥上可接受載體。

根據上述構想，該細胞為一癌細胞。

本發明新合成之化合物本身為抗癌物質又具有抗炎性，且可增加其他臨床抗癌藥物之活性，對治療或預防癌症極具價值，並可減少臨床藥物之劑量，進而減低抗癌藥物之副作用。此外，本發明之化合物原料容易取得、產量高且成本低，開發為抗癌藥物能解決習知抗癌藥物昂貴或



不易取得的缺失。

【實施方式】

本發明提供一種具有抗發炎及抗癌活性的化合物，該化合物是一種熊果酸衍生物，所述化合物的合成方法說明如下。

實施例一：化合物 1-11 之製備

請參閱第一圖，其係本發明中用於合成新穎之熊果酸衍生物的一流程圖，其中每個粗體數字代表不同的化合物。

化合物 1 的原料係取自枇杷 (loquat, 學名 *Eriobotrya japonica*) 的樹葉，將 10 公斤左右的枇杷樹葉以甲醇萃取，將該甲醇萃取液於 50°C 以超音波震盪 90 分鐘；添加 1% 氫氧化鈉 (NaOH) 溶液於該萃取液中以形成鹽類並過濾之，以濃鹽酸 (c-HCl) 中和溶液以產生淡黃色固體，進一步將該淡黃色固體以矽膠管柱層析法予以分離純化並再結晶多次後，產生化合物 1 (21.9 g)。

以化合物 1 為合成起始原料，於丙酮中將化合物 1 與碳酸鉀 (K_2CO_3) 及其他各式各樣的烷基鹵化物反應；將反應混合物於室溫下隔夜攪拌；於減壓下將混合物濃縮乾燥，以水 (30 mL) 稀釋，並以二氯甲烷 (DCM) 萃取之；將有機相以硫酸鈉 (Na_2SO_4) 乾燥，過濾後於減壓下濃縮以產生粗產物；使用 EtOAc/n-hexane 管柱層析以純化該粗產物，以提供化合物 2-11。

於上述實施方式中，製備化合物 5、7、8、9、10、11

的實施例如下。

化合物 5 (Isopropyl 3 β -hydroxyurs-12-en-28-oate) : 使用異丙基碘作為烷基鹵化物來酯化化合物 1 (50 mg, 0.11 mmol) 之 C-17 位置的羧酸, 得到為白色固體的化合物 5 (49.2 mg, 0.10 mmol, 90%), $[\alpha]_D^{25} = +50$. IR (KBr): 3447, 1715 cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3): d 0.77 (3H, m, H-24), 0.82 (3H, s, H-25), 0.85 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-30), 0.91 (3H, s, H-26), 0.93 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-29), 0.98 (3H, s, H-27), 1.07 (3H, s, H-23), 1.16 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.19 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.21 (1H, d, $J = 11.2$ Hz, H-18), 3.21 (1H dd, $J = 10.8, 5.2$ Hz, H-3a), 4.91 (1H, m, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 5.24 (1H, t, $J = 4.0$ Hz, H-12). ^{13}C NMR (CDCl_3): d 15.5 (C-24), 15.6 (C-25), 17.0 (C-11), 17.3 (C-26), 18.3 (C-6), 21.2 (C-29), 21.7 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 21.8 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 23.3 (C-27), 23.4 (C-30), 24.1 (C-16), 27.2 (C-2), 28.0 (C-15), 28.1 (C-23), 30.7 (C-21), 33.2 (C-7), 36.6 (C-22), 36.9 (C-10), 38.6 (C-4), 38.7 (C-1), 38.9 (C-20), 39.1 (C-19), 39.6 (C-8), 42.1 (C-14), 47.6 (C-9), 47.7 (C-17), 52.8 (C-18), 55.2 (C-5), 66.9 ($-\text{COOCH}(\text{CH}_3)_2$), 79.0 (C-3), 125.5 (C-12), 138.1 (C-13), 176.9 (C-28). EIMS (70 eV) m/z (% rel. int.): 498 $[\text{M}]^+$ (3) 。 為 $\text{C}_{33}\text{H}_{54}\text{O}_3$ 計算 HREIMS : 498.4073 ; 發現 : 498.4071 。

化合物 7 (Pentyl 3 β -hydroxyurs-12-en-28-oate) : 使用戊烷基碘作為烷基鹵化物來酯化化合物 1 (50 mg, 0.11 mmol) 之 C-17 位置的羧酸, 得到為白色固體的化合物 7 (48.5 mg, 0.09 mmol, 84%), $[\alpha]_D^{25} = +38$. IR (KBr): 3447, 1718 cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3): d 0.75 (3H, s, H-25), 0.77 (3H, s, H-24), 0.85



(3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-30), 0.91 (3H, s, H-26), 0.91 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0.93 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-29), 0.98 (3H, s, H-27), 1.07 (3H, s, H-23), 2.22 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-18), 3.21 (1H, dd, $J = 10.8, 4.8$ Hz, H-3a), 3.97 (2H, m, $-\text{COOCH}_2-$), 5.23 (1H, t, $J = 3.6$ Hz, H-12). ^{13}C NMR (CDCl_3): d 14.0 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 15.4 (C-24), 15.6 (C-25), 17.0 (C-11), 17.1 (C-26), 18.3 (C-6), 21.2 (C-29), 22.3 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 23.3 (C-27), 23.5 (C-30), 24.2 (C-16), 27.2 (C-2), 28.0 (C-15), 28.1 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 28.2 (C-23), 28.3 ($-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$), 30.7 (C-21), 33.0 (C-7), 36.7 (C-22), 36.9 (C-10), 38.6 (C-1), 38.7 (C-4), 38.9 (C-20), 39.1 (C-19), 39.5 (C-8), 42.0 (C-14), 47.5 (C-9), 48.0 (C-17), 52.8 (C-18), 55.2 (C-5), 64.3 ($-\text{COOCH}_2-$), 79.0 (C-3), 125.5 (C-12), 138.2 (C-13), 177.6 (C-28). EIMS (70 eV) m/z (% rel. int.): 526 $[\text{M}]^+$ (3)。為 $\text{C}_{35}\text{H}_{58}\text{O}_3$ 計算 HREIMS: 526.4385 ; 發現 : 526.3910 。

化合物 8 (Hexyl 3 β -hydroxyurs-12-en-28-oate) : 使用己基碘作為烷基鹵化物來酯化化合物 1 (50 mg, 0.11 mmol) 之 C-17 位置的羧酸, 得到為白色固體的化合物 8 (26.5 mg, 0.05 mmol, 45%) , $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +34$. IR (KBr): 3446, 1718 cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3): d 0.75 (3H, s, H-25), 0.77 (3H, s, H-24), 0.86 (3H, t, $J = 7.6$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0.88 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-30), 0.91 (3H, s, H-26), 0.93 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-29), 0.98 (3H, s, H-27), 1.07 (3H, s, H-23), 2.22 (1H, d, $J = 11.2$ Hz, H-18), 3.21 (1H, dd, $J = 9.6, 4.8$ Hz, H-3a), 3.97 (2H,

m, $-\text{COOCH}_2-$), 5.23 (1H, t, $J = 3.6$ Hz, H-12). ^{13}C NMR (CDCl_3): d 14.0 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 15.4 (C-24), 15.6 (C-25), 17.0 (C-11), 17.1 (C-26), 18.3 (C-6), 21.2 (C-29), 22.6 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 23.3 (C-27), 23.5 (C-30), 24.2 (C-16), 25.7 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 27.2 (C-2), 28.0 (C-15), 28.1 (C-23), 28.5 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 30.7 (C-21), 31.4 ($-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$), 33.0 (C-7), 36.7 (C-22), 36.9 (C-10), 38.6 (C-1), 38.7 (C-4), 38.9 (C-20), 39.1 (C-19), 39.5 (C-8), 42.0 (C-14), 47.5 (C-9), 48.0 (C-17), 52.8 (C-18), 55.2 (C-5), 64.3 ($-\text{COOCH}_2-$), 79.0 (C-3), 125.5 (C-12), 138.2 (C-13), 177.6 (C-28). EIMS (70 eV) m/z (% rel. int.): 540 $[\text{M}]^+$ (5). 為 $\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{O}_3$ 計算 HREIMS : 540.4542 ; 發現 : 540.4538 。

化 合 物 9 (3'-Methyl-2'-butenyl 3 β -hydroxyurs-12-en-28-oate) : 使用 1-溴-3-甲基-2-丁烯作為 烷基鹵化物來酯化化合物 1 (50 mg, 0.11 mmol) 之 C-17 位置的羧酸, 得到為白色固體的化合物 9 (17.5 mg, 0.03 mmol, 30%), $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +36$. IR (KBr): 3447, 1720 cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3): d 0.75 (3H, s, H-25), 0.77 (3H, s, H-24), 0.85 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-30), 0.92 (3H, s, H-26), 0.94 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-29), 0.99 (3H, s, H-27), 1.07 (3H, s, H-23), 1.68 (3H, s, $-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.74 (3H, s, $-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 2.23 (1H, d, $J = 11.2$ Hz, H-18), 3.23 (1H, dd, $J = 10.8, 4.8$ Hz, H-3a), 4.48 (1H, dd, $J = 10.4, 7.2$ Hz, $-\text{COOCHH}-$), 4.51 (1H, dd, $J = 10.4, 7.6$ Hz, $-\text{COOCHH}-$), 5.24 (1H, t, $J = 4.0$ Hz, H-12),

5.30 (1H, t, $J = 7.6$ Hz, $-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$). ^{13}C NMR (CDCl_3): d 15.4 (C-24), 15.6 (C-25), 17.0 (C-11), 17.1 (C-26), 18.0 ($-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 18.3 (C-6), 21.2 (C-29), 23.3 (C-27), 23.5 (C-30), 24.2 (C-16), 25.8 ($-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 27.2 (C-2), 28.0 (C-15), 28.1 (C-23), 30.7 (C-21), 33.1 (C-7), 36.6 (C-22), 37.0 (C-10), 38.6 (C-1), 38.7 (C-4), 38.8 (C-20), 39.1 (C-19), 39.5 (C-8), 42.1 (C-14), 47.6 (C-9), 48.0 (C-17), 52.9 (C-18), 55.2 (C-5), 61.0 ($-\text{COOCH}_2-$), 79.0 (C-3), 119.1 ($-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 125.5 (C-12), 138.1 ($-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 138.2 (C-13), 177.5 (C-28). ESIMS (70 eV) m/z (% rel. int.): 547。為 $\text{C}_{35}\text{H}_{56}\text{O}_3\text{Na}$ 計算 HRESIMS : 547.4127 ; 發現 : 547.4123。

化合物 **10** (2'-Hydroxyethyl 3 β -hydroxyurs-12-en-28-oate) : 使用 2-氯乙醇作為烷基鹵化物來酯化化合物 **1** (50 mg, 0.11 mmol) 之 C-17 位置的羧酸，得到為白色固體的化合物 **10** (28.5 mg, 0.06 mmol, 52%)， $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +35$. IR (KBr): 3433, 1718 cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3): d 0.76 (3H, s, H-25), 0.77 (3H, s, H-24), 0.86 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-30), 0.91 (3H, s, H-26), 0.94 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-29), 1.01 (3H, s, H-27), 1.09 (3H, s, H-23), 2.24 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-18), 3.21 (1H, dd, $J = 11.2, 4.8$ Hz, H-3a), 3.79 (2H, m, $-\text{COOCH}_2-$), 4.08 (1H, ddd, $J = 11.6, 5.6, 3.2$ Hz, $-\text{CHHOH}$), 4.20 (1H, ddd, $J = 11.6, 6.0, 3.6$ Hz, $-\text{CHHOH}$), 5.26 (1H, t, $J = 3.6$ Hz, H-12). ^{13}C NMR (CDCl_3): d 15.4 (C-24), 15.6 (C-25), 17.0 (C-11), 17.1 (C-26), 18.3 (C-6), 21.1 (C-29), 23.3 (C-27), 23.5 (C-30), 24.2 (C-16),

27.2 (C-2), 27.9 (C-15), 28.1 (C-23), 30.6 (C-21), 33.0 (C-7), 36.7 (C-22), 36.9 (C-10), 38.6 (C-1), 38.7 (C-4), 38.8 (C-20), 39.1 (C-19), 39.5 (C-8), 42.2 (C-14), 47.5 (C-9), 48.3 (C-17), 53.0 (C-18), 55.2 (C-5), 61.4 ($-\text{CH}_2\text{OH}$), 66.0 ($-\text{COOCH}_2-$), 79.0 (C-3), 125.3 (C-12), 138.9 (C-13), 177.9 (C-28). EIMS (70 eV) m/z (% rel. int.): 500 $[\text{M}]^+$ (3)。為 $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_4$ 計算 HRESIMS : 500.3865 ; 發現 : 500.3863 。

化 合 物 11 (*tert*-Butoxycarbonylmethyl 3 β -hydroxyurs-12-en-28-oate) : 使用氯乙酸叔丁酯作為烷基鹵化物來酯化化合物 1 (50 mg, 0.11 mmol) 之 C-17 位置的羧酸，得到為白色固體的化合物 11 (38.9 mg, 0.07 mmol, 62 %) , $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +20$. IR (KBr): 3447, 1733 cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3): d 0.72 (3H, s, H-25), 0.78 (3H, s, H-24), 0.86 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-30), 0.91 (3H, s, H-26), 0.94 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-29), 0.98 (3H, s, H-27), 1.08 (3H, s, H-23), 1.45 (9H, s, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.25 (1H, d, $J = 11.2$ Hz, H-18), 3.21 (1H, dd, $J = 9.6, 3.6$ Hz, H-3a), 4.42 (2H, m, $-\text{COOCH}_2-$), 5.25 (1H, t, $J = 3.6$ Hz, H-12). ^{13}C NMR (CDCl_3): d 15.4 (C-24), 15.6 (C-25), 16.9 (C-26), 17.0 (C-11), 18.3 (C-6), 21.2 (C-29), 23.3 (C-27), 23.5 (C-30), 24.2 (C-16), 27.2 (C-2), 28.0 ($-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$), 28.0 ($-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$), 28.1 (C-23), 29.7($-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$), 30.6 (C-21), 33.0 (C-7), 36.5 (C-22), 36.9 (C-10), 38.6 (C-1), 38.7 (C-4), 38.8 (C-20), 39.1 (C-19), 39.5 (C-8), 42.0 (C-14), 47.6 (C-9), 48.0 (C-17), 52.7 (C-18), 55.2 (C-5), 60.9 ($-\text{COOCH}_2-$), 79.0



(C-3), 125.7 (C-12), 138.0 (C-13), 167.1 ($-\text{CH}_2\text{CO}-$), 176.7 (C-28). EIMS (70 eV) m/z (% rel. int.): 570 $[\text{M}]^+$ (6)。為 $\text{C}_{36}\text{H}_{58}\text{O}_5$ 計算 HRESIMS : 570.4283 ; 發現 : 570.4291。

實施例二：化合物 12-17 之製備

請參閱第二圖，其係本發明中用於合成新穎之熊果酸衍生物的另一流程圖，其中每個數字代表不同的化合物。

將化合物 1 中 A 環之 C-3 位置的羥基以各種不同的酐 (anhydride) 來處理，例如無水醋酸或各種羧酸，以形成化合物 12-17，反應助劑例如為二環己基碳二亞胺 (DCC)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) 或吡啶。

於上述實施方式中，製備化合物 12-17 的實施例如下：將化合物 1 (50 mg, 0.11 mmol) 溶解於不同的酐 (1 mL) 和吡啶 (1 mL) 中，於室溫下攪拌該溶液 6 小時；於反應混合物中加入水 (10 mL)，並以 DCM (15 mL \times 3) 分離；將該有機溶液以硫酸鈉乾燥並於減壓下濃縮以產生粗產物；使用矽膠管柱層析法 (以 EtOAc/*n*-hexane 洗提) 純化該粗產物，以得到化合物 12-17。

實施例三：化合物 18-24 之製備

請參閱第三圖，其係本發明中用於合成新穎之熊果酸衍生物的又一流程圖，其中每個數字代表不同的化合物。

於二甲基甲醯胺 (DMF) 中以三氧化鉻 (CrO_3) 或硫酸 (H_2SO_4) 氧化化合物 1 以生成 3-酮基化合物 18 (步驟 a)。

化合物 20 (4-Hydroxy-3,4-*seco*-ursan-12-en-28-oic acid

3,4 lactone) 的製備 (步驟 c) : 將在氯仿 (CHCl_3 , 10 mL) 中化合物 **18** (150 mg, 0.3 mmol) 與 70-75% 之間氯過氧苯甲酸 (*m*-CPBA, 200 mg, 0.8-0.9 mmol) 的混合物於室溫下攪拌 72 小時; 加入更多的氯仿 (20 mL) 並以碘化鉀水溶液 (5%)、亞硫酸鈉水溶液、水、碳酸氫鈉水溶液沖洗有機層; 以氯仿 (30 mL \times 3) 萃取該溶液, 以硫酸鈉乾燥, 並於真空中濃縮以產生粗產物; 使用矽膠管柱層析法 (以 EtOAc/DCM (1:6) 洗提) 純化該粗產物, 以獲得為白色粉末之化合物 **20** (91 mg, 0.19 mmol, 59%), $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +49$. IR (KBr): 3448, 1756, 1714 cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3): d 0.80 (3H, s, H-25), 0.85 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-30), 0.95 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-29), 1.01 (3H, s, H-26), 1.07 (3H, s, H-27), 1.26 (3H, s, H-24), 1.28 (3H, s, H-23), 2.20 (1H, d, $J = 11.2$ Hz, H-18), 5.25 (1H, t, $J = 3.6$ Hz, H-12). ^{13}C NMR (CDCl_3): d 13.6 (C-25), 16.8 (C-26), 17.0 (C-11), 19.7 (C-24), 20.8 (C-27), 21.1 (C-30), 23.3 (C-29), 23.9 (C-6), 24.0 (C-16), 27.9 (C-15), 29.6 (C-7), 30.5 (C-21), 31.8 (C-2), 36.6 (C-22), 37.0 (C-9), 38.8 (C-20), 39.0 (C-19), 42.1 (C-14), 45.3 (C-8), 47.9 (C-17), 52.5 (C-5), 55.2 (C-18), 74.9 (C-4), 125.3 (C-12), 138.1 (C-13), 175.8 (C-3), 182.8 (C-28). EIMS (70 eV) m/z (% rel. int.): 470 $[\text{M}]^+$ (2.3)。為 $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_4$ 計算 HREIMS : 470.3395 ; 發現 : 470.2825 。

於室溫下, 在無水的甲醇/苯 (MeOH/benzene) 中以三甲基矽重氮甲烷 (TMSCHN_2) 酯化化合物 **18**, 以產生化



合物 **19** (步驟 b)。

以濃硫酸 ($c\text{-H}_2\text{SO}_4$) 作為催化劑，於適量的甲醇中裂解內脂化合物 **20** 以產生斷鍵型化合物 (*seco*-compound) **21** (步驟 d)；在甲醇中以氫氧化鉀 (KOH) 裂解內脂化合物 **20** 以產生斷鍵型化合物 **22** (步驟 e)。化合物 **21**、**22** 的詳細製備流程說明如下。

化合物 **21** (Methyl 3,4-*seco*-ursan-4(23),12-dien-28-oic 3-*oat*)：將在氯仿 (10 mL) 中化合物 **18** (100 mg, 0.2 mmol) 與 70-75% 之 *m*-CPBA (100 mg, 0.4-0.5 mmol) 的混合物於室溫下攪拌 72 小時；將該混合物於減壓下濃縮至乾燥，加入甲醇 (10 mL) 和濃硫酸 (3 滴)，並於室溫下攪拌 24 小時；再次將該混合物於減壓下濃縮至乾燥，以碳酸氫鈉水溶液沖洗，以氯仿 (20 mL \times 3) 萃取，以硫酸鈉乾燥，並於真空中濃縮以產生粗產物；使用矽膠管柱層析法 (以 EtOAc/*n*-hexane (1:3) 洗提) 純化該粗產物，以獲得為白色粉末之化合物 **21** (22.0 mg, 0.05 mmol, 21%)， $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +8$ 。IR (KBr): 3461, 1735, 1693 cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3): d 0.82 (3H, s, H-27), 0.86 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-30), 0.92 (3H, s, H-25), 0.94 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-29), 1.09 (3H, s, H-26), 1.72 (3H, s, H-24), 2.25 (1H, d, $J = 11.2$ Hz, H-18), 3.65 (3H, s, $-\text{COOCH}_3$), 4.64 (1H, s, $-\text{C}=\text{CHH}$), 4.86 (1H, s, $-\text{C}=\text{CHH}$), 5.26 (1H, t, $J = 3.2$ Hz, H-12). ^{13}C NMR (CDCl_3): d 17.0 (C-11), 17.2 (C-26), 19.5 (C-25), 21.1 (C-29), 23.4 (C-27), 23.4 (C-24), 23.5 (C-30), 24.0 (C-16), 24.3 (C-6), 28.0

(C-15), 28.5 (C-2), 30.6 (C-21), 31.6 (C-1), 33.9 (C-7), 36.7 (C-22), 37.7 (C-9), 38.8 (C-20), 39.1 (C-19), 39.2 (C-8), 39.2 (C-10), 42.4 (C-14), 48.0 (C-17), 50.3 (C-5), 51.6 (–COOCH₃), 52.6 (C-18), 113.6 (C-23), 125.7 (C-12), 137.9 (C-13), 147.3 (C-4), 174.6 (C-28), 183.4 (C-3). EIMS (70 eV) *m/z* (% rel. int.): 484 [M]⁺ (23)。為 C₃₁H₄₈O₄ 計算 HREIMS : 484.3552 ; 發現 : 484.3549。

化合物 **22** (3,4-*seco*-Ursan-4-hydroxy-12-en-3,28-dioic acid) : 將化合物 **20** (30 mg, 0.06 mmol) 於 5% 的氫氧化鉀甲醇溶液 (methanolic KOH) 中於室溫下靜置 48 小時 ; 加壓移除有機層 ; 於混合物中加入水 (10 mL) , 以 EtOAc (10 mL × 3) 萃取以產生粗產物 ; 使用管柱層析法 (以丙酮 : DCM (1 : 3) 和甲醇洗提) 純化該粗產物 , 以獲得為白色粉末之化合物 **22** (15 mg, 0.03 mmol, 48%) , $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +35$. IR (KBr): 3447, 1690 cm⁻¹. ¹H NMR (CD₃OD): d 0.89 (3H, d, *J* = 6.4, H-30), 0.91 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, H-29), 0.97 (3H, s, H-25), 1.10 (3H, s, H-26), 1.14 (3H, s, H-27), 1.25 (3H, s, H-24), 1.27 (3H, s, H-23), 2.22 (1H, d, *J* = 11.6, H-18), 2.30 (1H, m, Ha-2), 2.49 (1H, m, Hβ-2), 5.27 (1H, t, *J* = 3.6 Hz, H-12). ¹³C NMR (CD₃OD): d 17.7 (C-26), 17.8 (C-11), 18.1 (C-25), 20.6 (C-29), 21.6 (C-6), 23.4 (C-27), 23.8 (C-30), 24.1 (C-16), 28.3 (C-24), 29.2 (C-15), 30.4 (C-2), 31.8 (C-21), 32.7 (C-7), 33.7 (C-23), 35.7 (C-22), 38.1 (C-20), 40.1 (C-19), 40.6 (C-10), 42.1 (C-14), 43.8 (C-8), 49.0 (C-17), 52.9 (C-18), 53.0

(C-5), 54.4 (C-9), 76.2 (C-4), 127.2 (C-12), 139.4 (C-13), 181.7 (C-28 and C-3). ESIMS (70 eV) m/z : 511 $[M+Na]^+$ 。為 $C_{30}H_{48}O_5Na$ 計算 HREIMS : 511.3399 ; 發現 : 511.3402 。

將斷鍵型化合物 **22** 於甲醇中與硫酸反應以產生斷鍵型化合物 **23** (步驟 f) 。

於室溫下，在無水的甲醇/苯中以 $TMSCHN_2$ 酯化斷鍵型化合物 **23**，以產生化合物 **24** (步驟 g) 。

實施例四：化合物 1-24 的抗癌活性測試

本實施例中研究化合物 **1-24** 對人類膀胱癌細胞 (NTUB1) 之毒性分析，並使用順鉑作為正向對照組。

本發明之化合物的細胞毒性分析係採用 MTT 試驗。將 NTUB1 細胞株維持於含有 10% 胎牛血清(FBS)、100 unit/ml 青黴素 G (penicillin-G)、100 μ g/ml 鏈黴素 (streptomycin) 以及 2 mM 麩胺酸 (L-glutamine) 的 RPMI 1640 培養基中；將這些細胞培養於 37°C、含有 5% CO_2 的潮濕空氣中。

這些細胞被培植於密度為 1800 cells/well 的 96-well 培養皿中，並且在暴露於藥物之前於 37°C 培養隔夜；接著於濃度分級的測試化合物（沒有或帶有各種濃度的順鉑）的存在下，於 37°C 培養這些細胞 72 小時。在培養週期之尾端，於培養皿的每一 well 中加入 50 μ L 的 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium, 2 mg/mL 於 PBS 中) 並使之反應 3 小時。接著將培養皿離心 (1000g) 10 分鐘，移除培養基，並於每一 well 加入 150 μ L

的 DMSO。存活細胞的比例係使用 MRX (DYNEXCO) 的微量盤分析儀，以 540 nm 的吸收光譜來測定；實驗組培養皿中細胞的存活力係以其相對於對照組培養皿之存活細胞數量的百分比來表示。每一群組的 IC_{50} 值係經由中效分析 (median-effect analysis) 來計算，並以平均值 \pm 標準差 (SD) 來表示。

請參考表一，其標示出化合物 1-24 對 NTUB1 的細胞毒性分析結果，其中 IC_{50} 值單位為 μM ，並以平均值 \pm 標準差 ($n = 5$) 來表示。將化合物 1-24 或順鉑分別溶解於 DMSO 中，並以含有 0.1% DMSO 的培養基稀釋；對照組細胞則以含有 0.1% DMSO 的培養基處理之；使用順鉑作為正向對照組。當最高濃度無法達到 50% 抑制作用時，以最高濃度之抑制百分比示之，括號內的數字表示抑制百分比。

表一

化合物	IC_{50}
順鉑	3.27 ± 0.10
1	29.44 ± 1.90
2	37.13 ± 0
3	13.45 ± 0
4	18.28 ± 0
5	7.97 ± 0.48
6	15.64 ± 1.31
7	27.79 ± 1.63
8	26.16 ± 2.51
9	10.93 ± 2.01
10	19.53 ± 0
11	$>30 \mu\text{M}$ (64.85%)
12	14.27 ± 2.14
13	$>30 \mu\text{M}$ (72.53%)
14	$>30 \mu\text{M}$ (76.47%)
15	11.94 ± 0



16	30.98 ± 4.14
17	8.65 ± 2.89
18	21.44 ± 15.50
19	29.57 ± 4.65
20	>30 μM (63.91%)
21	>30 μM (62.77%)
22	>30 μM (56.04%)
23	25.49 ± 1.46
24	15.63 ± 1.82

如表一所示，化合物 1 和其衍生物對 NTUB1 細胞均顯現出顯著的細胞毒性活性；以甲基鹵化物來酯化化合物 1、18 之 C-17 位置的羧酸所得到的化合物 2、19 的細胞毒性活性較低；對化合物 21 的酯化，例如化合物 24，則提高了對 NTUB1 細胞的毒性活性。

以增加烷基鏈之鹵化物來酯化化合物 1 之 C-17 位置的羧酸所得到的化合物 3-8、10 以及以異戊二烯基 (prenyl) 鹵化物來酯化化合物 1 所得到的化合物 9 均顯示出較化合物 2 強之對 NTUB1 的細胞毒性活性；化合物 3 之 C-17 位置乙基酯的羥基化，例如化合物 10，則減弱其對 NTUB1 之細胞毒性活性。

對化合物 1 之 C-3 位置的羥基的乙醯化加強其細胞毒性活性，而將化合物 1 之 C-3 位置羥基修飾為琥珀酯的化合物 17，更有效地增強了其對 NTUB1 之細胞毒性活性。

增加酯化物的碳鏈減弱其細胞毒性效力，而增加酯化物之相同碳鏈的不飽和性質，例如化合物 15，則增強其細胞毒性效力。

化合物 1、2 之 C-3 位置羥基被氧化酮基的化合物 18、19 增加其細胞毒性，而衍生自化合物 18 的內脂化合物 20

以及衍生自化合物 20 的 3,4 鍵斷鍵化合物 21、22 則減弱了其細胞毒性；而衍生自 3,4 鍵斷鍵化合物 22 的化合物，例如化合物 23，則顯示強效細胞毒性活性，且其雙甲基脂化合物，例如化合物 24，更展現出對細胞生長的加強抑制效果。

本發明之實驗結果顯示，C-3、C-17 位置被取代而成為具雙甲基之脂類組成物並經由裂解 A 環而得之 3,4 鍵斷鍵型化合物，展現出對 NTUB1 之細胞生長有較強及濃度依賴性的抑制效力。

實施例五：化合物 5、17、23 的抗癌活性分析

此外，為了進一步評估化合物 1 和其衍生物之細胞毒性效力與誘導癌症細胞死亡之機制，於本發明實施例中研究化合物 5、17、23 對 PC3 及 A549 細胞之毒性分析，以與這些化合物對 NTUB1 之毒性分析結果作比較。

以類似於實施例四之 MTT 試驗流程來分析 5、17、23 對 NTUB1、PC3 及 A549 細胞毒性活性。請參閱第四圖 (A) 至第四圖 (C)，其分別為化合物 5、17、23 對 NTUB1、PC3 及 A549 細胞的毒性分析結果；其中細胞的存活力係以不同濃度的化合物處理細胞 72 小時後以前述 MTT 試驗法來評估；橫軸代表化合物濃度，縱軸則為細胞存活力（相對於對照組存活細胞數的百分比）；圖中顯示的數據係代表一實驗重複實施三次的平均值 \pm 標準差 ($n=3$)；與對照組相互比較之 p 值，*代表 $p < 0.05$ ，**代表 $p < 0.01$ ，以及***代表 $p < 0.001$ 。

如第四圖 (A) 至第四圖 (C) 所示，化合物 5、17、

23 對 NTUB1、PC3 及 A549 細胞的毒性活性差異不大，化合物 5、17、23 於濃度 50 μM 時對這三種人類癌症細胞株的細胞毒性效力相似。

實施例六：化合物 5、7-11、20、21 的抗發炎活性分析

本實施例藉由對大鼠的嗜中性球細胞或肥大細胞所釋放的化學媒介物質的抑制作用，來判斷不同化合物的抗發炎活性。

請參考表二，其為本發明之數種新穎化合物對於大鼠嗜中性球堆積亞硝酸根離子(實驗 A)、產生過氧化離子(實驗 B)之抑制作用，以及對於大鼠腹膜肥大細胞所釋放之 β -葡萄糖苷酸酶(β -Glucuronidase)的抑制作用的實驗結果；當最高濃度無法達到 50% 抑制作用時，以最高濃度 (30 μM) 之抑制百分比示之。

表二

媒介物質 化合物	IC ₅₀ (μM)		
	實驗 A NO ₂ ⁻	實驗 B 過氧化離子	實驗 C β -葡萄糖苷酸酶
5	45.3 ± 7.0 %		
7	29.8 ± 3.3 %	10.8 ± 2.2	
8		11.5 ± 0.9	
9	45.2 ± 5.9 %	6.1 ± 1.9	
10	33.1 ± 7.2 %		
11	21.7 ± 6.5		
20	41.0 ± 9.6 %		
21	15.6 ± 2.5		29.3 ± 2.1 %
正向對照組	5.0 ± 1.5	7.3 ± 0.6	12.4 ± 1.6

表二中的實驗 A 係分析本案化合物對於以 PMA 活化劑刺激之大鼠嗜中性球產生亞硝酸根離子的抑制效果，並

以 iNOS 抑制劑(N-(3-(aminomethyl)benzylamide, 1400W) 作為正向對照組。本實驗係經由根據格里斯反應 (Griess reaction) 測量亞硝酸鹽濃度，以測定細胞媒介物質中一氧化氮的產生。

表二中的實驗 B 係分析本案化合物對於以 PMA 刺激之大鼠嗜中性球產生過氧化離子之抑制效果；於本實驗中，自大鼠分離出其周邊血液的嗜中性球，並將其懸浮於 HBSS 中。以 DMSO 或藥物預先靜置培養嗜中性球懸浮液，接著加入超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 或 HBSS；最後在反應混合物中的 DMSO 體積小於或等於 0.5 %。加入細胞色素 c (cytochrome c) 後，以 3 nM 的 PMA 活化劑刺激嗜中性球 30 分鐘，根據可被過氧化酶抑制的 cytochrome c 減少程度來判斷化合物對於產生過氧化離子的抑制作用。實施例 B 係以三氟拉 (trifluoperazine) 作為正向對照組。

表二中的實驗 C 係分析本案化合物對於以肥大細胞脫顆粒劑 (compound 48/80) 刺激之大鼠肥大細胞所釋放之 β -葡萄糖苷酸酶 (β -Glucuronidase) 的抑制效果，並以麥帕克林 (mepacrine) 作為正向對照組。於放血之大鼠 (Sprague-Dawley, 250-300 克) 的腹腔注射肝素化之泰洛氏溶液 (Tyrode solution)。於腹腔按摩後，取得腹膜液細胞並將其分離於在不含葡萄糖之泰洛氏溶液中 38% 的 BSA 中；細胞微粒於具有 0.1% BSA 的泰洛氏溶液中沖洗並懸浮至 1×10^6 cell/mL；接著將細胞懸浮液於 37°C 以 DMSO 或藥

物預先靜置培養，最後在反應混合物中的 DMSO 體積小於或等於 0.5%。於加入 compound 48/80 的 15 分鐘後，懸浮於表層的 β -葡萄糖苷酸酶可被測定；將細胞懸浮液以 Triton X-100 處理後，測量 β -葡萄糖苷酸酶之總量，並計算其釋放百分比。

實施例七：熊果酸衍生物的抗癌與抗發炎機制分析

本實施例以化合物 5、23 為例，研究熊果酸衍生物在 NTUB1 細胞中對細胞內的 ROS 量及細胞週期進行的影響。

如背景技術所述，研究顯示 ROS 誘導演化中的細胞凋亡或壞死，誘導或抑制許多基因的表現，並且可活化細胞的訊號傳遞。ROS 造成廣範圍的適應性細胞反應，從短暫性生長停滯到永久性生長停滯、凋亡或壞死，其視 ROS 的量而定；這些反應使組織除去 ROS 造成的損傷或移除受損害的細胞。

將細胞分別曝露於 10 μ M 順鉑、40 μ M 化合物 5、20 μ M 化合物 23 以及 50 μ M 化合物 23 中 24 小時，實驗結果顯示化合物 5、23 造成細胞內 ROS 量的顯著增加，而此種效果係會被 N-乙酰基半胱氨酸 (NAC，一種硫醇類抗氧化劑) 所抑制。此外，將細胞分別曝露於 10 μ M 順鉑、20 和 40 μ M 化合物 5 以及 20 和 50 μ M 化合物 23 中 48 小時，同樣也造成細胞內 ROS 量的顯著增加，然而此實施例中此種效果不會被 NAC 抑制。

由於細胞的增生和分化係特定於細胞週期的 G1 階段與 G1/S 交接期，致癌基因的細胞週期經由標定 G1 階段行

進的特定調節子而發揮其最大效用。

正向對照組順鉑、化合物 5、17、23 對癌症細胞週期行進的影響，係在以碘化丙錠 (propidium iodide, PI) 染色的 NTUB1 細胞中使用螢光活化細胞分類 (fluorescence-activated cell sorting, FACS) 分析法來測定。

培養 8×10^{15} 的細胞並以不同濃度的順鉑和化合物 5、17、23 處理 24 或 48 小時；這些細胞經由胰蛋白酶化 (trypsinization) 後取出，以 $1 \times$ PBS 沖洗，並固定於 -20°C 的冰冷甲醇中；隔夜靜置培養後，以 PBS 沖洗細胞，以於 PBS 中的 $50 \mu\text{g/mL}$ 碘化丙錠和 $50 \mu\text{g/mL}$ 核糖核酸 A (RNase A) 於室溫靜置培養 30 分鐘。細胞週期的每一階段中的細胞片段係使用 FACScan 流式細胞儀以及 Cell Quest 軟體 (Becton Dickinson) 來分析。

對於細胞內 ROS 的定量分析，亦採用前述液流式細胞分析法。細胞如前述方式被培養和處理後，在取出之前加入 10 微莫耳 (micromolar) 的螢光染劑 DCFH-DA (Molecular Probes, Eugene, OR) 30 分鐘；經由胰蛋白酶化收集細胞，並以 PBS 沖洗；然後立即以 FACScan 流式細胞儀以 525 nm 帶通濾波器 (Becton Dickinson) 分析細胞內 DCF (2',7'-dichlorofluorescein) 的綠螢光。

實驗結果顯示，以 10、20 μM 順鉑處理細胞 24 小時導致細胞於 G1 階段的劑量依存性的累積，並伴隨 sub-G1 階段族群增加；以 20、40 μM 化合物 5 以及 20、50 μM 化合物 23 處理 24 小時，結果誘導於 G1 階段劑量依存性的停止，



並伴隨細胞凋零死亡的增加；當以 20-40 μM 化合物 17 處理 24 小時，結果在 sub-G1 階段細胞累積之前誘導 G2/M 抑制。

此外，以 10 μM 順鉑處理細胞 48 小時導致 S 階段抑制，而以 20-40 μM 化合物 5 及 20-50 μM 化合物 23 處理 48 小時，則於 sub-G1 階段細胞累積之前抑制 G2/M 階段。

已知細胞的 ROS 對於細胞的存活係必要的，但其對細胞的作用則相當複雜；實驗顯示，低濃度的過氧化氫會造成許多腫瘤細胞株增生的適度提高，然而較高的量則會導致細胞緩慢生長、細胞週期抑制以及凋亡甚至壞死。

以化合物 5 處理細胞 24 和 48 小時，分別展現出誘導 G1 階段與導致細胞週期停止於 G2/M 階段，並且增加細胞中 ROS 的量。

上述實驗結果顯示，化合物 5 對細胞週期的抑止及誘導細胞凋亡的機制與 ROS 相關聯；以 20、40 μM 化合物 17 處理 24 小時，結果在 sub-G1 階段細胞累積之前誘導 G2/M 抑制；以 20、50 μM 化合物 23 處理細胞 24 小時誘導 ROS 的增量和 G1 階段抑止；實驗結果也顯示化合物 23 對 G1 階段抑止的誘導作用係起因於化合物 23 於細胞中誘導 ROS 的增量。

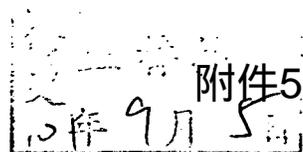
實施例八：熊果酸衍生物於細胞中抑制微管聚合之效果

此外，對於微管聚合 (tubulin polymerization) 的抑制已被研究出與各種癌症細胞株中 G2/M 階段細胞週期抑制有關，因此於此實施例中以化合物 23 處理細胞 48 小時，

進一步研究本發明化合物是否會對活體中微管結構產生作用。微管形成現象的分析係以間接免疫螢光染色法來分析。

上述實施例的實驗流程如下：將培養在蓋玻片 (coverslip) 上的 NTUB1 細胞不以任何化合物處理以作為對照組；另分別以 10 nM 泰克索 (taxol) 及 50 μ M 化合物 23 處理 24 小時。之後，將細胞以 2% 的甲醛/PBS 固定 20 分鐘，以 PBS 及冷甲醇 (-20°C) 沖洗 3 分鐘；以 PBS 沖洗後，細胞被加入於 PBS 中的抗 α 微管 (anti- α -tubulin) 單株抗體 (Sigma 公司)，並於室溫下靜置培養 3 小時；然後使用 PBS 沖洗細胞，並使用 Rho 結合二次抗體 (Rhodamine-conjugated secondary antibody) 於室溫下暗房中再次靜置培養 1 小時；之後，以 PBS 沖洗後，將蓋玻片置於 80% 甘油的 PBS 中，並以 Axioskop 2 plus 螢光顯微鏡檢視之。

請參閱第五圖 (A) 至第五圖 (C)，為上述實驗結果以 Axioskop 2 plus 螢光顯微鏡觀察到的細胞微管圖。第五圖 (A) 為對照組，顯示未被化合物處理的 NTUB1 細胞經由細胞質擴散染色以及細胞核周圍密集的被染色；第五圖 (B) 為以泰克索處理的細胞，結果顯示特別的微管束，其可能起因於硬質微管網路的穩定化；第五圖 (C) 為以化合物 23 處理的細胞，結果顯示化合物 23 經由抑制微管聚合來阻止活體中微管形成；化合物 23 在 NTUB1 細胞內培養 48 小時後，增加細胞 ROS 量並啟動微管聚合抑制而導致細胞 G2/M 期停止及凋亡。



本發明得由熟習此技藝之人士任施匠思而為諸般修飾，然皆不脫如附申請專利範圍所欲保護者。

【圖式簡單說明】

第一圖為一流程圖，其係說明本發明合成化合物 2-11 之流程，其中每個粗體數字代表不同的化合物；

第二圖為一流程圖，其係說明本發明合成化合物 12-17 之流程，其中每個數字代表不同的化合物；

第三圖為一流程圖，其係說明本發明合成化合物 18-24 之流程，其中每個數字代表不同的化合物；

第四圖 (A) 顯示化合物 5 對 NTUB1、PC3 及 A549 細胞的毒性活性；

第四圖 (B) 顯示化合物 17 對 NTUB1、PC3 及 A549 細胞的毒性活性；

第四圖 (C) 顯示化合物 23 對 NTUB1、PC3 及 A549 細胞的毒性活性；及

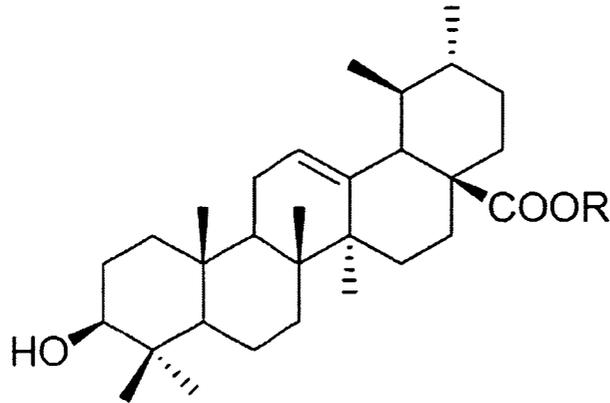
第五圖 (A) 至第五圖 (C)，為化合物於細胞中抑制微管聚合之實驗結果，係以螢光顯微鏡觀察到的細胞微管圖。

【主要元件符號說明】

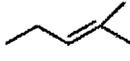
無。

七、申請專利範圍：

1. 一種熊果酸 (ursolic acid) 衍生物，其具有如式 I 之結構：



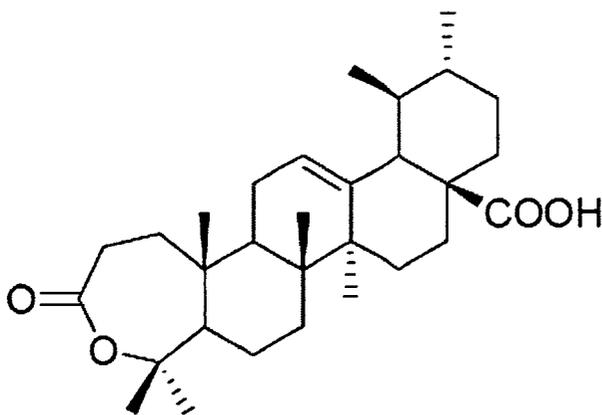
式 I

其中 R 選自 C_5-C_{12} -烷基、 $CH(CH_3)_2$ 、、醇基及 $CH_2COOC(CH_3)_3$ 其中之一。

2. 如申請專利範圍第 1 項的熊果酸衍生物，其中該 C_5-C_{12} -烷基係選自 $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$ 和 $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$ 其中之一。

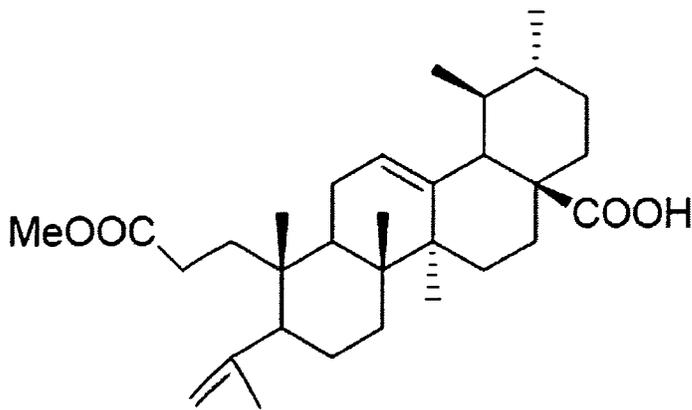
3. 如申請專利範圍第 1 項的熊果酸衍生物，其中該醇基為 CH_2CH_2OH 。

4. 一種熊果酸衍生物，其結構選自下列其中之一：



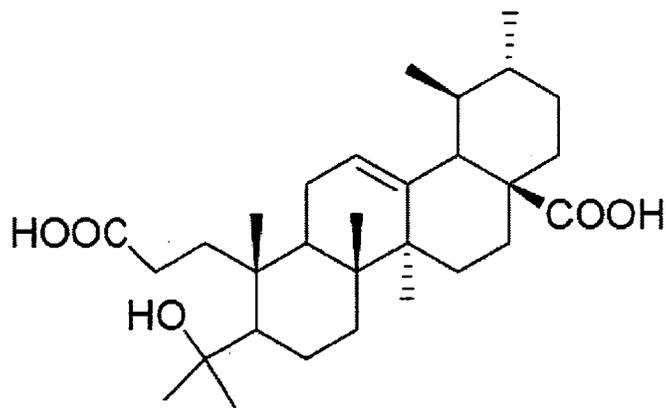
式 II，

2011.10.11



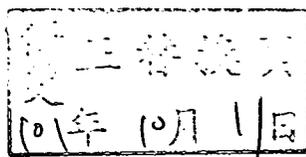
式 III

，及



式 IV。

5. 如申請專利範圍第 1 項或第 4 項的熊果酸衍生物，其具有抗癌及抗發炎活性。
6. 一種如申請專利範圍第 1 項或第 4 項之熊果酸衍生物的使用途，其係用於製備抑制癌症的醫藥組合物。
7. 一種用於抑制癌症的醫藥組合物，其包含具有如申請專利範圍第 1 項中式 I 或如申請專利範圍第 4 項中式 II、式 III 及式 IV 其中之一的結構的化合物作為活性成份；以及一醫藥上可接受載體。
8. 如申請專利範圍第 7 項的醫藥組合物，更包含一抗癌藥物，

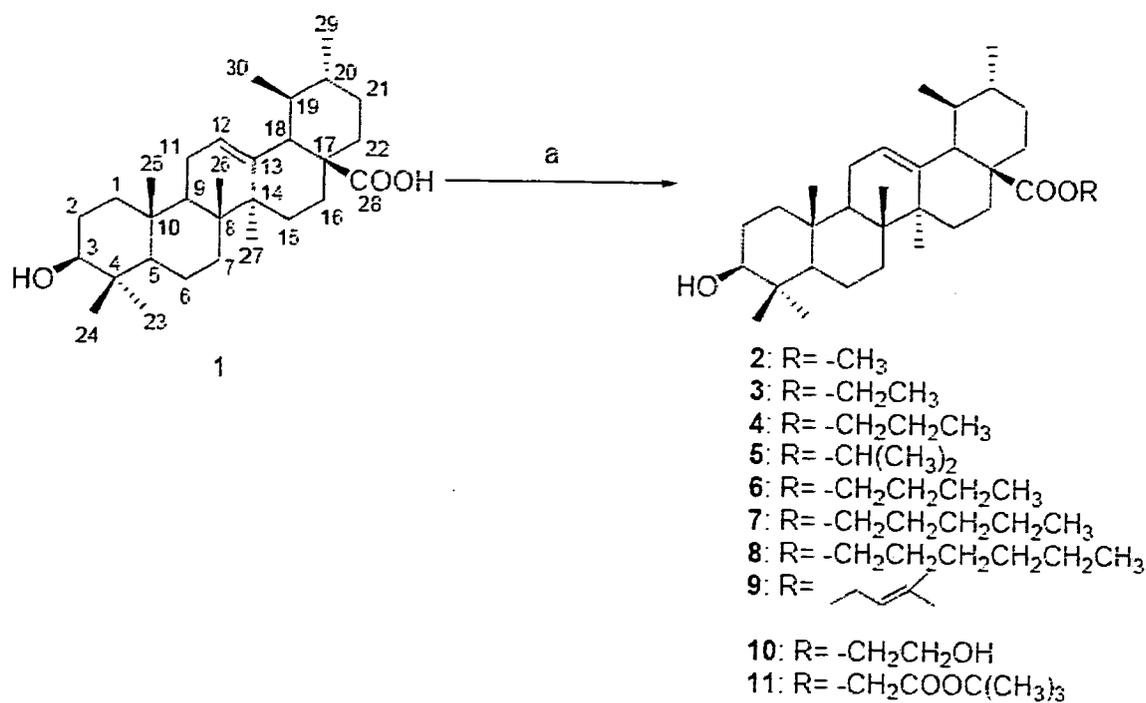


且該化合物增強該抗癌藥物之活性。

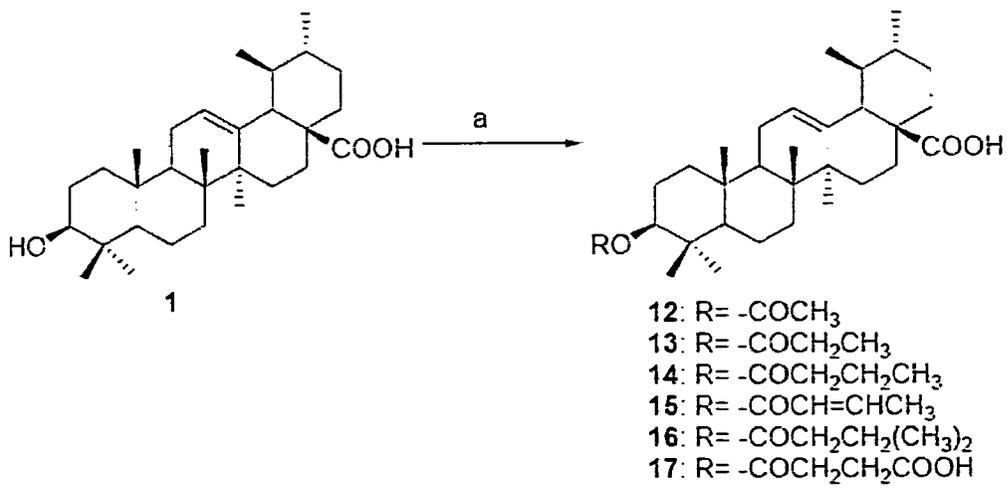
9. 一種用於增加一細胞的活性氧量的醫藥組合物，其包含具有如申請專利範圍第 1 項中式 I 或如申請專利範圍第 4 項中式 II、式 III 及式 IV 其中之一的結構的一熊果酸衍生物，以及一醫藥上可接受載體。
10. 如申請專利範圍第 9 項的醫藥組合物，其中該細胞為一癌細胞。

公告本

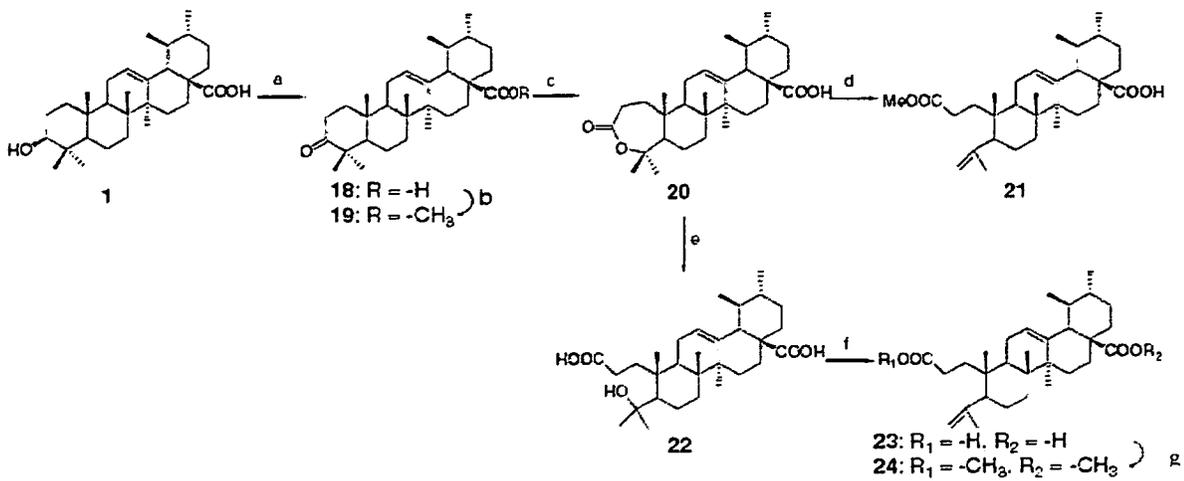
八、圖式：



第一圖

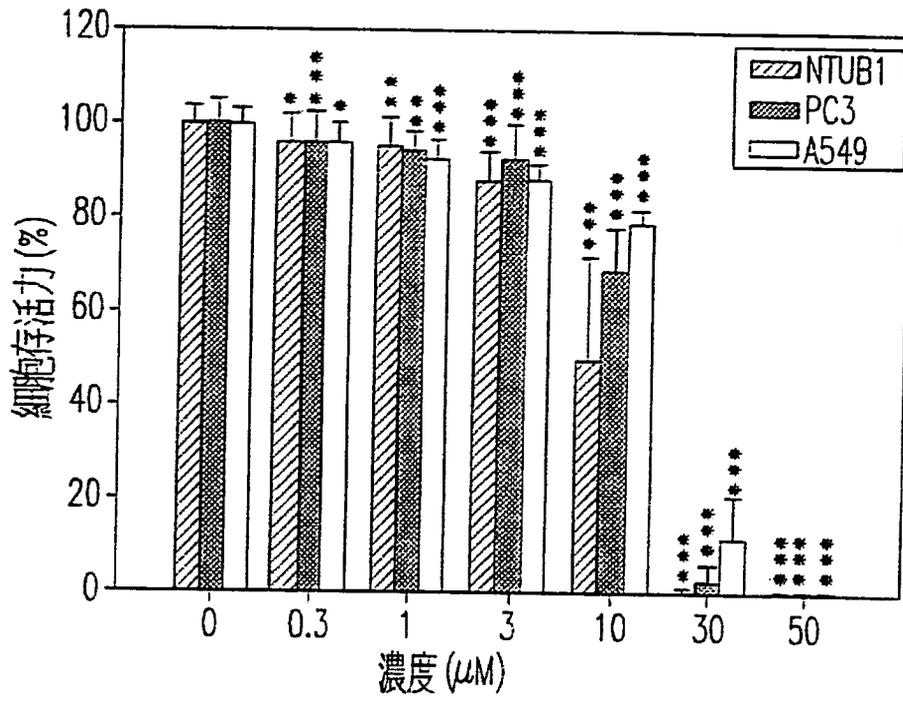


第二圖

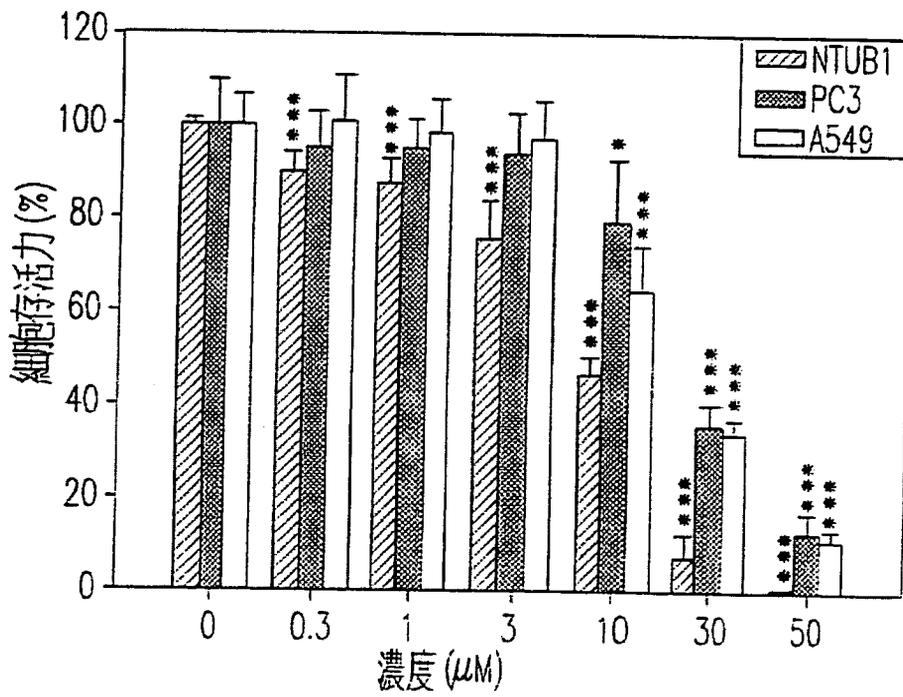


第三圖

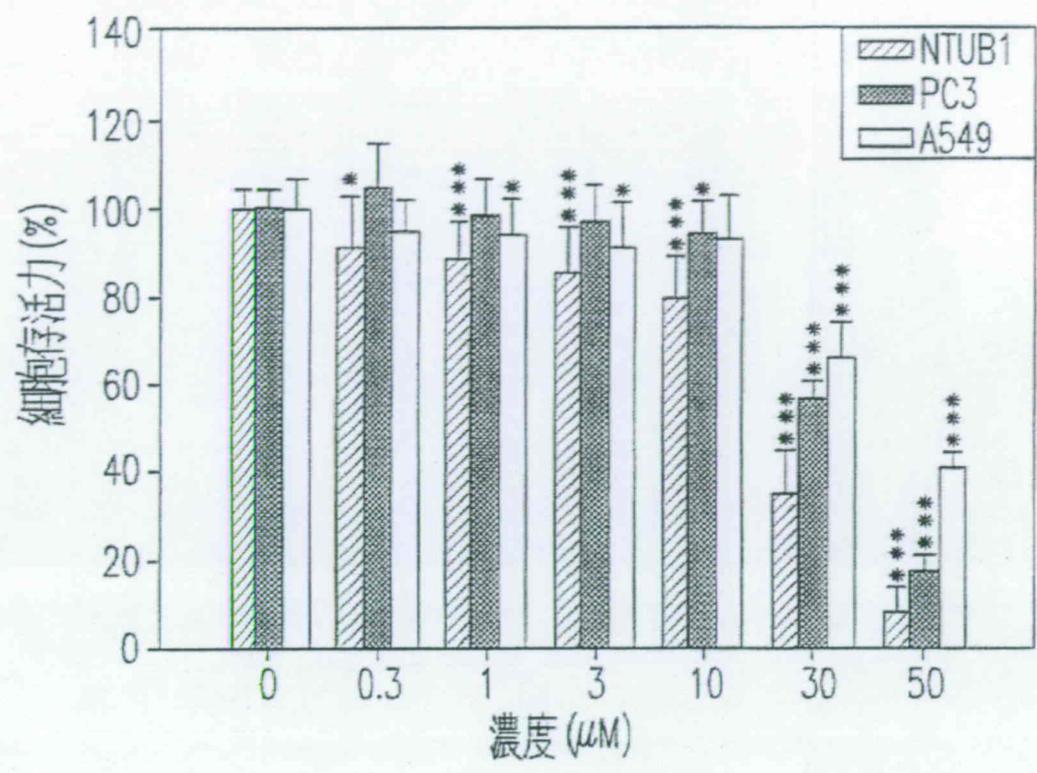




第四圖(A)



第四圖(B)



第四圖(C)



第五圖(A)

第五圖(B)

第五圖(C)

