



(21)申請案號：100139104

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 10 月 27 日

(51)Int. Cl. : A61K31/16 (2006.01) A61K31/215 (2006.01)
 C07C231/00 (2006.01) C07C237/26 (2006.01)
 C07C69/757 (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)；林凱偉 LIN, KAI WEI (TW)；黃阿梅 HUANG, A MEI (TW)；侯自銓 HOUR, TZYH CHYUAN (TW)；楊世群 YANG, SHYH CHYUN (TW)；蒲永孝 PU, YEONG SHIAU (TW)；張建國 CHANG, JAN GOWTH (TW)

(74)代理人：陳啟舜

(56)參考文獻：

TW 201105682

Maitraie et. al., "Synthesis, anti-inflammatory, and antioxidant activities of 18-glycyrrhetic acid derivatives as chemical mediators and xanthine oxidase inhibitors", *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2009), 17(7), p.2785-2792.

Csuk et, al., "Synthesis and antitumor activity of ring A modified glycyrrhetic acid derivatives.", *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2011, Vol. 46, p.5356-5369.

審查人員：陳成寶

申請專利範圍項數：2 項 圖式數：10 共 51 頁

(54)名稱

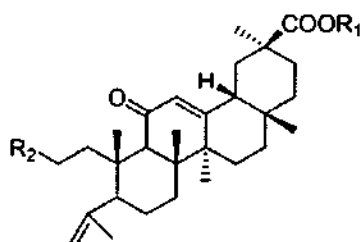
18β-甘草次酸衍生物及其用途

18β-GLYCYRRHETINIC ACID DERIVATIVES AND ITS USAGE THEREOF

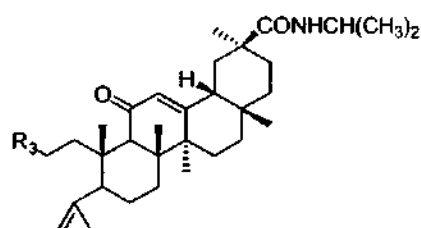
(57)摘要

本發明係揭示一種 18 β-甘草次酸衍生物及其用以製備殺死膀胱癌細胞藥物之用途，其中，該 18 β-甘草次酸衍生物係選自由下列式(I)或式(II)所組成之群組。

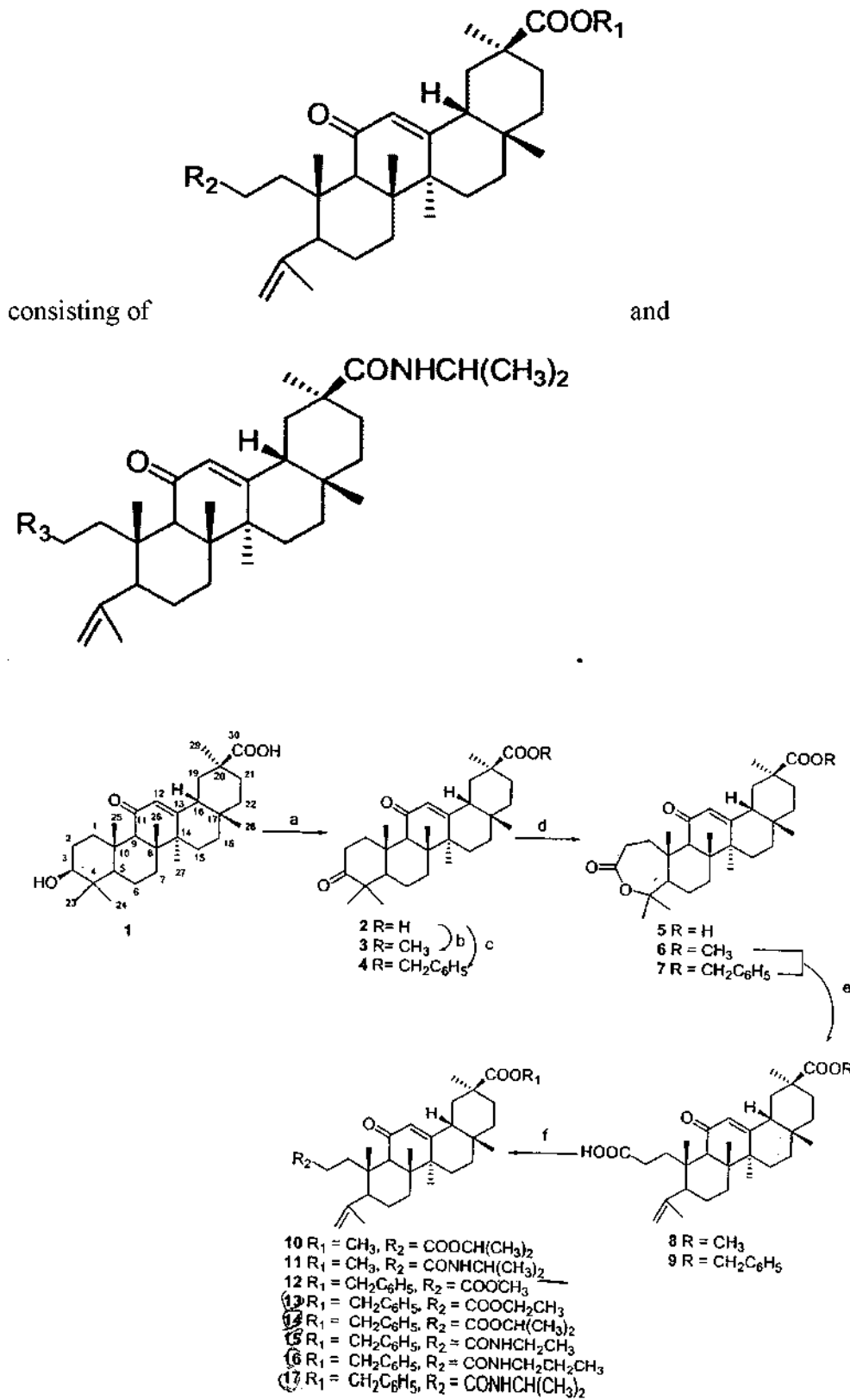
(I)



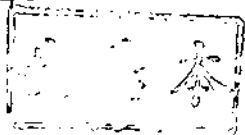
(II)



The present invention provides 18 β -glycyrrhetic acid derivatives and its usage of manufacturing drugs for killing bladder cancer cells thereof. The compound having the structure selected from a group



第 1 圖



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：100139104

A61K 31/16, (2006.01)

※申請日：100.10.27

※IPC 分類：

A61K 31/15, (2006.01)

C07C 231/00, (2006.01)

C07C 237/26, (2006.01)

C07C 69/157, (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

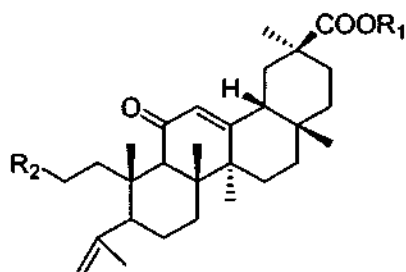
18 β -甘草次酸衍生物及其用途 / 18 β -Glycyrrhetic Acid
Derivatives and its Usage Thereof

A61P 35/00 (2006.01)

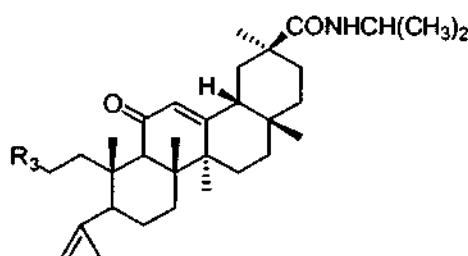
二、中文發明摘要：

本發明係揭示一種 18 β -甘草次酸衍生物及其用以製備殺死膀胱癌細胞藥物之用途，其中，該 18 β -甘草次酸衍生物係選自由下列式 (I) 或式 (II) 所組成之群組。

(I)

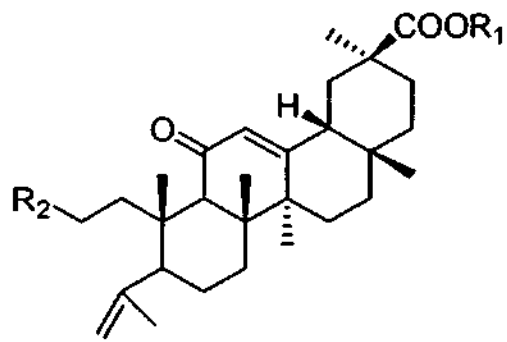


(II)

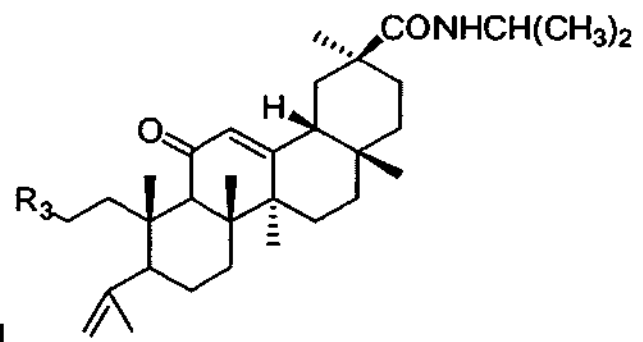


三、英文發明摘要：

The present invention provides 18 β -glycyrrhetic acid derivatives and its usage of manufacturing drugs for killing bladder cancer cells thereof. The compound having the structure selected from a group consisting of



and



四、指定代表圖：

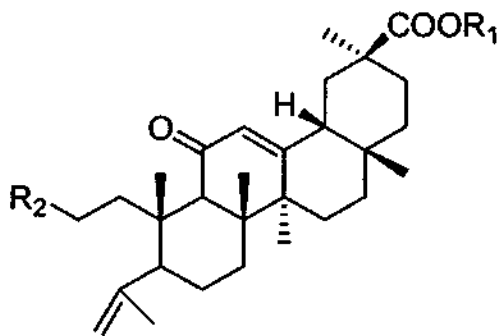
(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

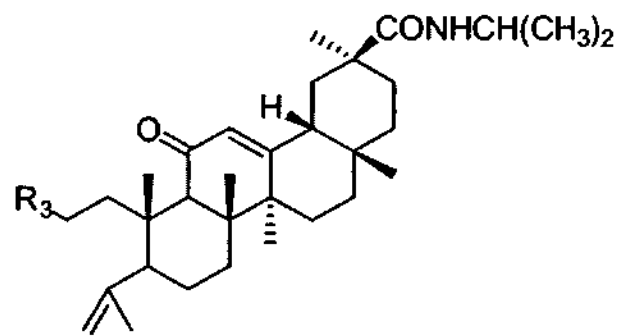
(無)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(I)



(II)



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種殺死癌細胞之化合物，特別係關於一種殺死癌細胞之 18β -甘草次酸 (18β -Glycyrrhetic acid) 衍生物。

【先前技術】

癌症的發生係由於細胞的基因發生改變，引起細胞不正常增生所形成的異常腫塊，並且該腫塊會壓迫到其他組織或器官，如該腫塊發生轉移，不正常增生的細胞藉由血管轉移到人體的其他部位即為惡性腫瘤，也就是俗稱的癌症。

一般來說，引發癌症的相關基因可分為二：一類為致癌基因 (Oncogene)，即該致癌基因發生活化表現時，會使正常細胞發生異常的增生現象，例如；另一類為抑癌基因 (Tumor suppressor gene)，即該抑癌基因係於正常細胞中表現，當該抑癌基因發生缺失或失活，使得正常細胞發生異常的增生現象。

目前殺死癌細胞可以經由抑制致癌基因的活化或促進抑癌基因的表現之機制達成，例如一種促凋亡蛋白 p53，當細胞中的 DNA 損傷，藉由活化的 p53 調節細胞週期，使細胞能夠停留於 G1 期或 G2 期，以進行 DNA 修復，若無法修復 DNA 者，該細胞則發生細胞凋亡，以避免具有非正常遺傳資訊的細胞存活及生長。

由於習用抗癌藥物必須抑制癌細胞的生長，因此，習

用抗癌藥物通常會對生物體造成許多副作用，如阿樂癌注射液（Cisplatin，*cis*-diamminedichloroplatinum II，簡稱CDDP），常用於治療卵巢癌、生殖細胞癌、頭頸癌、食道癌、肺癌、膀胱癌、子宮頸癌或子宮內膜癌等，然而，該Cisplatin常使癌症患者無法承受而停用藥物，例如嘔吐、貧血、掉髮，免疫方面會使服用Cisplatin的癌症患者，其淋巴球減少、血小板下降，甚至在長期服用後會造成神經毒性、末梢神經病變及中度骨髓抑制現象，且服用Cisplatin的癌症患者容易使肝腎功能指數上升，甚至最後發生抗藥性的現象而失去抑制癌細胞成長及擴散的作用。

因此，有必要提供一種與習用抗癌藥物具有協同作用的化合物，以製備成一種用以殺死癌細胞藥物之醫藥組合物，以改善該習用藥物對於生物體造成的肝腎毒性及抗藥性的問題。

【發明內容】

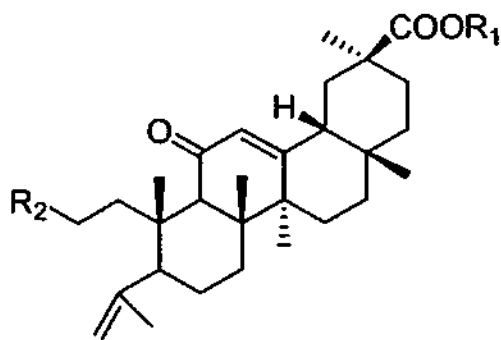
本發明之主要目的係提供一種殺死癌細胞之 18β -甘草次酸衍生物，其係藉由提升癌細胞 ROS，活化癌細胞之促凋亡蛋白 p53，降低癌細胞之 MMP，促癌細胞之凋亡。

本發明之又一目的係提供該 18β -甘草次酸衍生物之用途，係用以製備殺死膀胱癌細胞藥物之用途。

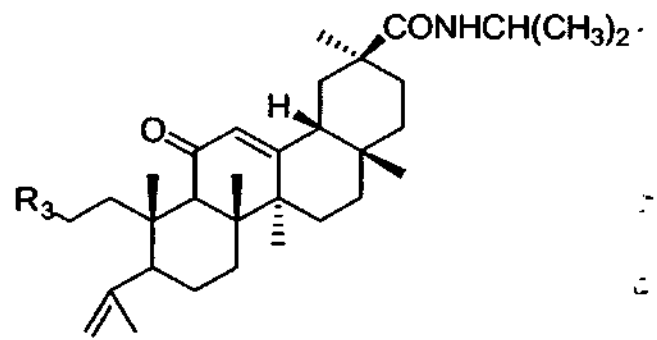
為達到前述發明目的，本發明所運用之技術內容包含有：

一種殺死癌細胞之 18β -甘草次酸衍生物，其係選自由式（I）及式（II）所組成之群組：

(I)



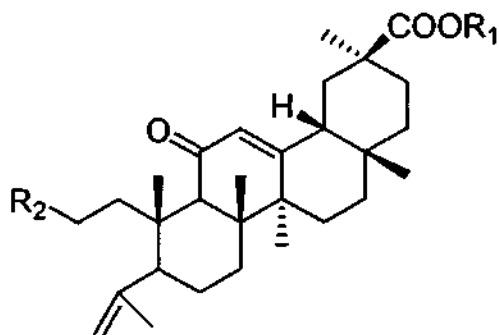
(II)



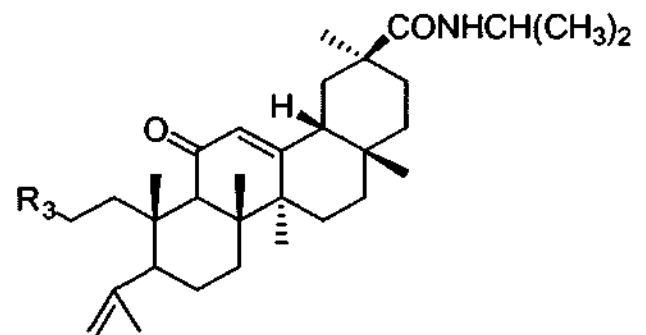
其中 R_1 選自 CH_3 及 $CH_2C_6H_5$ 其中之一， R_2 選自 $COOCH_3$ 、 $COOCH_2CH_3$ 、 $COOCH(CH_3)_2$ 、 $CONHCH_2CH_3$ 、 $CONHCH_2CH_2CH_3$ 及 $CONHCH_2(CH_3)_2$ 其中之一， R_3 選自 $COOCH_2CH_3$ 、 $COOCH(CH_3)_2$ 、 $CONHCH_2CH_3$ 、 $CONHCH_2CH_2CH_3$ 及 $CONHCH_2(CH_3)_2$ 其中之一。

一種 18β -甘草次酸衍生物之用途，該 18β -甘草次酸衍生物係選自由式 (I) 及式 (II) 所組成之群組：

(I)



(II)



其中，該 18β -甘草次酸衍生物係用以製備殺死膀胱癌細胞藥物之用途。

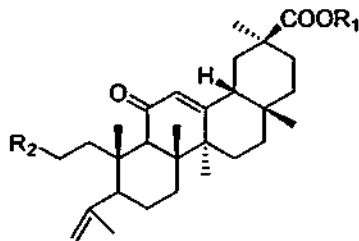
【實施方式】

為讓本發明之上述及其他目的、特徵及優點能更明顯易懂，下文特舉本發明之較佳實施例，並配合所附圖式，

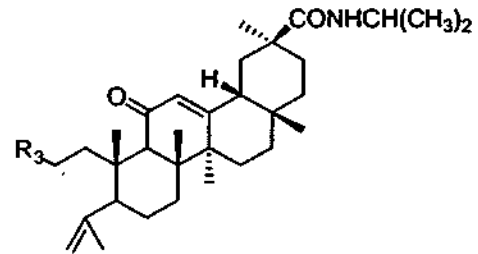
作詳細說明如下：

本發明提供一種殺死癌細胞的 18β -甘草次酸衍生物，其係選自由式 (I) 及式 (II) 所組成之群組：

(I)



(II)



其中 R_1 選自 CH_3 及 $CH_2C_6H_5$ 其中之一， R_2 選自 $COOCH_3$ 、 $COOCH_2CH_3$ 、 $COOCH(CH_3)_2$ 、 $CONHCH_2CH_3$ 、 $CONHCH_2CH_2CH_3$ 及 $CONHCH_2(CH_3)_2$ 其中之一， R_3 選自 $COOCH_2CH_3$ 、 $COOCH(CH_3)_2$ 、 $CONHCH_2CH_3$ 、 $CONHCH_2CH_2CH_3$ 及 $CONHCH_2(CH_3)_2$ 其中之一。

本發明又提供一種包含如上所述之 18β -甘草次酸衍生物之醫藥組合物，該醫藥組合物係用以殺死癌細胞，該醫藥組合物係藉由該等 18β -甘草次酸衍生物提升癌細胞中的 ROS 產生率，活化癌細胞的促凋亡蛋白 p53 後，使癌細胞的粒線體膜電位 (Mitochondrial membrane potential, 簡稱 MMP) 下降，促使癌細胞發生細胞凋亡，具有達到殺死癌細胞之功效，所述 18β -甘草次酸衍生物的製備方法說明如下。

第一實施例：化合物 10 及 11 之製備

請參照第 1 圖，其係本發明中用於合成 18β -甘草次酸衍生物之第一流程圖，其中每個數字代表不同的化合物。

本發明係選擇但不限定以自天然植物中萃取或人工合成的 18β -甘草次酸 (化合物 1) 為合成起始原料，氧化

形成一第一化合物。更詳言之，係以二甲基甲醯胺(dimethyl formamide，簡稱 DMF) 為溶媒，加入三氧化鉻(CrO_3) 在室溫下氧化 12 小時成為化合物 2 (步驟 a)。

本發明係將該第一化合物與一醇類化合物進行酯化反應，形成一第二化合物，其中，該第二化合物中 C-30 之官能基為烷基團；本實施例係將化合物 2 與含有硫酸(H_2SO_4) 作為催化劑之過量甲醇(CH_3OH) 溶液進行冷凝迴流(reflux) 反應 48 小時後，形成化合物 3 (步驟 b)，更詳言之，係將該化合物 2 之 C-30 上的氫原子以甲基取代後，形成該化合物 3。

本發明將該第二化合物形成一內酯化的第三化合物；本實施例係將化合物 3 (1 克，21 毫莫耳) 溶於 30 毫升二氯甲烷(CH_2Cl_2) 中，加入間氯過氧苯甲酸(*m*-CPBA，3.6 克 21.3 毫莫耳)，在室溫下避光反應 12 小時後，將該混合物溶液以氯仿稀釋，以 5% 碘化鉀及 5% 亞硫酸鈉溶液清洗後，以無水硫酸鈉乾燥，濃縮得到呈白色固體的化合物 6 (步驟 d)。

本發明將該第三化合物形成一變異型(*seco*-) 的第四化合物；本實施例係將化合物 6 溶於一合適的溶劑，例如異丙醇(isopropyl alcohol) 或二氯甲烷(CH_2Cl_2) 中，加入甲苯磺酸(*p*-toluenesulfonic acid，簡稱 *p*-TSA) 處理，將化合物 6 的內酯環打開，獲得化合物 8 (步驟 e)。

本發明係將該第四化合物以不同基團(如烷基團或胺基團) 進行酯化或醯胺化反應，而獲得一第五化合物，更詳言之，係將該第四化合物之 C-3 上的氫原子或氫氧基

團，以烷基團或胺基團取代後，形成該第五化合物，例如以鹵化烷類化合物的烷基團合成化合物 10 (3,4-*seco*-11-Oxo-18 β -olean-4 (23),12-dien- 3,30-dioic acid 3-isopropyl 30-methyl, ester) (步驟 f)，其中，該鹵化烷類化合物例如碘化乙烷或碘化異丙烷；或以胺基團 (amine moiety) 合成化合物 11 (3-Isopropyl carbamoyl-11-oxo-18 β -3,4-*seco*-olean-4 (23),12-diene 30- methyl ester) (步驟 f)。

舉例而言，本實施例之化合物 10 係以 80 毫克 (0.16 毫莫耳) 的化合物 8 與碘化異丙烷在丙酮與碳酸鉀的存在下，進行酯化反應，獲得一白色無結晶 (amorphous) 粉末 (86.2 毫克，0.16 毫莫耳，產率 100.0%)： $[\alpha]_D^{25}$ (c 0.1, 氯仿)。IR (film on NaCl) 1731、1657 cm^{-1} 。 ^1H NMR (氘代氯仿)： δ 0.82 (3H, s, Me-28)，1.15 (3H, s, Me-29)，1.16 (3H, s, Me-25)，1.17 (3H, s, Me-26)，1.21 (6H, d, $J=6.4\text{Hz}$, - $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)，1.38 (3H, s, Me-27)，1.76 (3H, s, Me-24)，2.60 (1H, td, $J=13.4, 6.0\text{Hz}$, H β -18)，3.70 (3H, s, - OCH_3)，4.70 (1H, br s, H-23)，4.90 (1H, br s, H-23)，4.95 (1H, m, - $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)，5.69 (1H, s, H-12)。 ^{13}C NMR (氘代氯仿)，請參照第 1 表。EI-MS (70 eV) m/z (% rel. int.)，540 [M]⁺ (63)。為 $\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{O}_5$ 計算 HR-EI-MS m/z ：540.3815。發現 540.3814。

本實施例之化合物 11 係以 212 毫克 (0.43 毫莫耳) 的化合物 8 與提供胺基團的異丙基胺 (isopropyl amine) 進行酯化反應，其中，以 1-乙基 3-二甲基氮丙基碳代二亞胺

(EDCI) 為活化劑，以 4-二甲氨基吡啶 (DMAP) 為催化劑反應後，獲得一白色無結晶粉末 (201.6 毫克, 0.37 毫莫耳, 產率 86.0%): $[\alpha]_D^{25} 10 (c 0.1, \text{氯仿})$ 。IR (film on NaCl) 3299、1727、1661 cm^{-1} 。 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 0.81 (3H, s, Me-28), 1.10 (3H, d, $J=6.8\text{Hz}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$), 1.11 (3H, d, $J=6.8\text{Hz}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$), 1.14 (6H, s, Me-26 及 29), 1.17 (3H, s, Me-25), 1.37 (3H, s, Me-27), 1.77 (3H, s, Me-24), 2.47 (1H, td, $J=13.2, 6.0\text{Hz}$, H β -18), 3.69 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 4.01 (1H, m, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4.73 (1H, br s, H-23), 4.90 (1H, br s, H-23), 5.48 (1H, d, $J=7.6\text{Hz}$, NH), 5.69 (1H, s, H-12)。 $^{13}\text{C NMR}$ (氘代氯仿), 請參照第 1 表。EI-MS (70eV) m/z (% rel. int.), 539 $[\text{M}]^+$ (70)。為 $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{NO}_4$ 計算 HR-EI-MS m/z : 539.3974, 發現: 539.3956。

第二實施例：化合物 13 至 17 之製備

請參照第 1 圖，本發明係選擇但不限定以第一實施例所獲得之化合物 2 為起始原料，將化合物 2 與一醇類芳香性化合物進行酯化反應，形成另一帶有芳香基團之第二化合物，特別係置換該化合物 2 中 C-30 之官能基；本實施例係將化合物 2 與含有二氯甲烷及 4-二甲氨基吡啶 (DMAP) 的苯甲醇 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{OH}$) 溶液中，以 1-乙基 3-二甲基氨基丙基碳代二亞胺 (EDCI) 為活化劑反應形成化合物 4 (步驟 c)，更詳言之，係將該化合物 2 之 C-30 上的氫原子以苯甲基取代後，形成該化合物 4。

本發明將該帶有至少一芳香基團的第二化合物，形成另一內酯化的第三化合物；本實施例係將化合物 4 溶於二

氯甲烷 (CH_2Cl_2) 中，加入間氯過氧苯甲酸 (*m*-CPBA) 作為內酯化之試劑，經過在室溫下反應 12 小時後，可得到另一具有芳香基團的第三化合物 (化合物 7) (步驟 d)。

本發明將該第三化合物形成另一變異型 (*seco*-) 的第四化合物；本實施例係將化合物 7 溶於一合適的溶劑中，例如異丙醇或二氯甲烷中，加入甲苯磺酸 (*p*-TSA) 處理，將化合物 7 的內酯環打開，獲得另一具有芳香基團的第四化合物 (化合物 9) (步驟 e)。

本發明係將該具有芳香基團的第四化合物進行酯化或醯胺化反應，而獲得另一具有芳香基團之第五化合物，更詳言之，係將該第五化合物之 C-3 上的氫原子以烷基團取代，或 C-3 上的氫氧基以胺基團取代後，形成該具有芳香基團之第五化合物，例如以鹵化烷基化合物之烷基團取代 C-3 以合成化合物 12 (3,4-*seco*-11-Oxo-18 β -olean-4(23), 12-dien-3,30- dioic acid 3-methyl-30-benzyl ester)、化合物 13 (3,4-*seco*-11-Oxo-18 β -olean-4(23),12-dien-3,30-dioic acid 3-ethyl,30-benzyl ester)、及化合物 14(3,4-*seco*-11-Oxo-18 β -olean-4(23),12-dien-3,30. dioic acid 3-isopropyl- 30-benzyl ester) (步驟 f)，以胺基團取代 C-3 以合成化合物 15(3-Ethyl carbamoyl-11-oxo-18 β -3,4-*seco*-olean-4(23),12-diene- 30- benzyl ester)、化合物 16 (3-Propylcarbamoyl-11-oxo-18 β - 3,4-*seco*-olean-4(23),12- diene 30-benzyl ester) 及化合物 17 (3-Isopropylcarbamoyl- 11-oxo-18 β -3,4-*seco*-olean-4(23), 12-diene 30-benzyl ester) (步驟 f)。

舉例而言，本實施例之化合物 13 係以 112 毫克 (0.20

毫莫耳)的化合物 9 與碘化乙烷(又稱乙基碘, ethyl iodide)在丙酮與碳酸鉀 (K_2CO_3) 的存在下進行酯化反應, 獲得一白色無結晶粉末(81.6 毫克, 0.13 毫莫耳, 產率 65.0%): $[\alpha]_D^{25}$ (c 0.5, $CHCl_3$)。IR (film on NaCl) 1727、1657、1579 cm^{-1} 。 1H NMR (氘代氯仿) δ 0.74 (3H, s, Me-28), 1.15 (3H, s, Me-29), 1.16 (6H, s, Me-25 and 26), 1.22 (3H, t, $J=7.2Hz$, $-CH_2CH_3$), 1.37 (3H, s, Me-27), 1.75 (3H, s, Me-24), 2.60 (1H, td, $J=13.2, 6.0Hz$, H β -18), 4.10 (2H, q, $J=7.2Hz$, $-CH_2CH_3$), 4.69 (1H, br s, H-23), 4.90 (1H, br s, H-23), 5.09 (1H, d, $J=12.4Hz$, $-OCHH-$), 5.20 (1H, d, $J=12.0Hz$, $-OCHH-$), 5.57 (1H, s, H-12), 7.37 (5H, m, 芳香質子)。 ^{13}C NMR (氘代氯仿), 請參照第 1 表。EI-MS (70eV) m/z (% rel. int.), 602 $[M]^+$ (21)。為 $C_{39}H_{54}O_5$ 計算 HR-EI-MS m/z : 602.3971。發現 602.3971。

本實施例之化合物 14 係以 100 毫克 (0.17 毫莫耳) 的化合物 9 與碘化異丙烷(又稱異丙基碘, isopropyl iodide)在丙酮與碳酸鉀 (K_2CO_3) 的存在下進行酯化反應, 獲得一白色無結晶粉末(49.4 毫克, 0.08 毫莫耳, 產率 47.1%): $[\alpha]_D^{25}$ (c 0.05, 氯仿)。IR (film on NaCl) 1727、1657、1631 cm^{-1} 。 1H NMR (氘代氯仿) δ 0.74 (3H, s, Me-28), 1.15 (3H, s, Me-29), 1.16 (6H, s, Me-25 及 26), 1.19 (6H, d, $J=6.4Hz$, $-CH(CH_3)_2$), 1.39 (3H, s, Me-27), 1.76 (3H, s, Me-24), 2.58 (1H, td, $J=13.2, 6.4Hz$, H β -18), 4.69 (1H, br s, H-23), 4.90 (1H, br s, H-23), 4.95 (1H, m, $-CH(CH_3)_2$), 5.09 (1H, d, $J=12.4Hz$, $-OCHH-$), 5.20 (1H, d, $J=12.4Hz$,

-OCHH-), 5.57 (1H, s, H-12), 7.38 (5H, m, 芳香質子)。
 ^{13}C NMR (氬代氯仿), 請參照第 1 表。EI-MS (70eV) m/z (% rel. int.), 616 $[\text{M}]^+$ (33)。為 $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_5$ 計算 HR-EI-MS m/z : 616.4127。發現 616.4136。

本實施例之化合物 15 係以 100 毫克 (0.17 毫莫耳) 的化合物 9 與提供胺基團的乙基胺 (ethyl amine) 進行酯化反應, 其中, 以 1-乙基 3-二甲基氮丙基碳代二亞胺 (EDCI) 為活化劑, 以 4-二甲氨基吡啶 (DMAP) 為催化劑, 獲得一白色無結晶粉末 (58.0 毫克, 0.097 毫莫耳, 產率 57.1%): $[\alpha]_{\text{D}}^{25} 11$ (c 0.35, CHCl_3)。IR (film on NaCl) 3299、1727、1657、1553 cm^{-1} 。 ^1H NMR (CDCl_3) δ 0.75 (3H, s, Me-28), 1.10 (3H, t, $J=7.2\text{Hz}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.14 (3H, s, Me-29), 1.15 (3H, s, Me-25), 1.16 (3H, s, Me-26), 1.36 (3H, s, Me-27), 1.77 (3H, s, Me-24), 2.49 (1H, td, $J=13.2, 6.0\text{Hz}$, H β -18), 3.23 (2H, m, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 4.74 (1H, br s, H-23), 4.90 (1H, br s, H-23), 5.09 (1H, d, $J=12.0\text{Hz}$, -OCHH-), 5.20 (1H, d, $J=12.0\text{Hz}$, -OCHH-), 5.58 (1H, s, H-12), 5.67 (1H, br s, NH), 7.36 (5H, m, 芳香質子)。
 ^{13}C NMR (CDCl_3), 請參照第 1 表。EI-MS (70eV) m/z (% rel. int.), 601 $[\text{M}]^+$ (36)。為 $\text{C}_{39}\text{H}_{55}\text{NO}_4$ 計算 HR-EI-MS m/z : 601.4131。發現 601.4131。

本實施例之化合物 16 係以 125 毫克 (0.22 毫莫耳) 的化合物 9 與提供胺基團的丙基胺 (propylamine) 進行醯胺化反應, 其中, 以 1-乙基 3-二甲基氮丙基碳代二亞胺 (EDCI) 為活化劑, 以 4-二甲氨基吡啶 (DMAP) 為催化劑,

獲得一白色無結晶粉末 (58.0 毫克, 0.097 毫莫耳, 產率 57.1%): $[\alpha]_D^{25}$ 15 (*c* 0.5, CHCl₃)。IR (film on NaCl) 3439、1724、1657、1513 cm⁻¹。¹H NMR (氘代氯仿) δ 0.75 (3H, s, Me-28), 0.90 (3H, t, *J*=7.6Hz, -CH₂CH₂CH₃), 1.14 (3H, s, Me-29), 1.15 (3H, s, Me-25), 1.16 (3H, s, Me-26), 1.36 (3H, s, Me-27), 1.49 (2H, q, *J*=7.2Hz, -CH₂CH₂CH₃), 1.77 (3H, s, Me-24), 2.49 (1H, td, *J*=13.2, 6.0Hz, H β -18), 3.16 (2H, dd, *J*=13.6, 6.0Hz, -CH₂CH₂CH₃), 4.74 (1H, br s, H-23), 4.90 (1H, br s, H-23), 5.09 (1H, d, *J*=12.4Hz, -OCHH-), 5.20 (1H, d, *J*=12.4Hz, -OCHH-), 5.73 (1H, br s, NH), 5.58 (1H, s, H-12), 7.36 (5H, m, 芳香質子)。¹³C NMR (氘代氯仿), 請參照第 1 表。EI-MS (70eV) *m/z* (% rel. int.), 615 [M]⁺ (36)。為 C₄₀H₅₇NO₄ 計算 HR-EI-MS *m/z*: 615.4287。發現 615.4283。

本實施例之化合物 17 係以 100 毫克 (0.17 毫莫耳) 的化合物 9 與提供胺基團的異丙基胺 (isopropyl amine) 進行醃胺化反應, 其中, 以 1-乙基 3-二甲基氨基丙基碳代二亞胺 (EDCI) 為活化劑, 以 4-二甲氨基吡啶 (DMAP) 為催化劑, 獲得一白色無結晶粉末 (58.0 毫克, 0.097 毫莫耳, 產率 57.1%): $[\alpha]_D^{25}$ 7 (*c* 0.25, CHCl₃)。IR (film on NaCl) 3306、1727、1657、1535 cm⁻¹。¹H NMR (CDCl₃) δ 0.75 (3H, s, Me-28), 1.10 (3H, d, *J*=6.8Hz, -CH(CH₃)(CH₃)), 1.12 (3H, d, *J*=6.8Hz, -CH(CH₃)(CH₃)), 1.14 (3H, s, Me-29), 1.15 (3H, s, Me-25), 1.16 (3H, s, Me-26), 1.36 (3H, s, Me-27), 1.77 (3H, s, Me-24), 2.46 (1H, td, *J*=13.2, 6.0Hz, H β -18), 4.00

(1H, m, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4.74 (1H, br s, H-23), 4.91 (1H, br s, H-23), 5.09 (1H, d, $J=12.4\text{Hz}$, $-\text{OCHH}-$), 5.20 (1H, d, $J=12.4\text{Hz}$, $-\text{OCHH}-$), 5.56 (1H, br s, NH), 5.58 (1H, s, H-12), 7.36 (5H, m, 芳香質子)。 ^{13}C NMR (CDCl_3), 請參照第 1 表。EI-MS (70eV) m/z (% rel. int.), 615 $[\text{M}]^+$ (42)。為 $\text{C}_{40}\text{H}_{57}\text{NO}_4$ 計算 HR-EI-MS m/z : 615.4288。發現 615.4286。

第三實施例：化合物 21 至 27 之製備

請參照第 2 及 3 圖，分別係本發明中用於合成 18β -甘草次酸衍生物之第二及第三流程圖，其中每個數字代表不同的化合物。本發明係選擇但不限定以第一實施例所獲得之內酯化的第三化合物（如化合物 5）為起始原料，以二氯甲烷為溶媒，並與一胺類化合物所提供之胺基團或苯胺基團進行醯胺化反應，形成一第六化合物（化合物 18、26）（步驟 g）。

本實施例係將化合物 5 與含有二氯甲烷及 4-二甲氨基吡啶 (DMAP) 的異丙基胺溶液中，以 1-乙基 3-二甲基氨基丙基碳代二亞胺 (EDCI) 為活化劑反應形成化合物 18，更詳言之，係將該化合物 5 之 C-30 上的氫氧基以一胺基團取代後，形成該化合物 18；本實施例另將化合物 5 與含有二氯甲烷及 4-二甲氨基吡啶 (DMAP) 的苯胺溶液中，以 1-乙基 3-二甲基氨基丙基碳代二亞胺 (EDCI) 為活化劑反應形成化合物 26。

請參照第 2 及 3 圖所示，本發明將該帶有一胺基團或苯胺基團的第六化合物，形成一變異型 (*seco-*) 且帶有胺

基團或苯胺基團的第七化合物（步驟 h）。

舉例而言，本實施例係將化合物 18（1 克，2.01 毫莫耳）溶於 30 毫升二氯甲烷（ CH_2Cl_2 ）中，加入甲苯磺酸（*p*-TSA）處理，將該化合物 18 的內酯環打開，獲得化合物 19；本實施例另將化合物 26（1 克，1.7 毫莫耳）溶於 30 毫升二氯甲烷（ CH_2Cl_2 ）中，加入甲苯磺酸（*p*-TSA）處理，將該化合物 26 的內酯環打開，獲得化合物 27。

請參照第 2 圖所示，本發明另將該變異型且帶有胺基團或苯胺基團的第七化合物（化合物 19）C-3 上進行酯化或醯胺化反應，而獲得另一帶有苯胺基團的第八化合物，其中，該帶有胺基團或苯胺基團的第八化合物之 C-3 上的官能基係烷基團或胺基團（步驟 i）。

舉例而言，本實施例將變異型（*seco*-）的化合物 19 溶於丙酮（acetone），並與一溶於丙酮之適當的鹵化烷類化合物及碳酸鉀（ K_2CO_3 ）溶液反應，形成化合物 20（30-Isopropylcarbamoyl-11 oxo-18 β -3,4-*seco*-olean-4(23),12-diene 3-methyl ester）、化合物 21（30-Isopropylcarbamoyl-11-oxo-18 β -3,4-*seco*-olean-4(23),12-diene 3-ethyl ester）及化合物 22（30-Isopropyl carbamoyl-11-oxo-18 β -3,4-*seco*-olean-4(23),12-diene 3-isopropyl ester），或者與溶於 EDCI 及 DMAP 之胺類溶液反應，形成化合物 23（30-Isopropylcarbamoyl-11-oxo-18 β -3,4-*seco*-olean-4(23),12-diene 3-ethyl carbamate）、化合物 24（30- Isopropyl carbamoyl-11-oxo-18 β -3,4-*seco*-olean-4(23),12- diene 3-

propyl carbamate) 及化合物 **25** (3,4-*seco*-11-Oxo-18 β -olean-4(23),12-dien-3,30-diisopropyl carbamate)。

本實施例之化合物 **21** 係取 100 毫克 (0.19 毫莫耳) 的化合物 **19**，以碳酸鉀 (K_2CO_3) 為催化劑，與碘化乙烷 (ethyl iodide) 進行反應，獲得一白色無結晶粉末 (27.3 毫克，0.049 毫莫耳，產率 25.8%)： $[\alpha]_D^{25}$ (*c* 0.25，氯仿)。
IR (film on NaCl) 3365、1735、1650 cm^{-1} 。 1H NMR (氘代氯仿)： δ 0.82 (3H, s, Me-28)，1.11 (3H, s, Me-26)，1.14 (3H, d, $J=6.4Hz$, $-CH(CH_3)(CH_3)$)，1.16 (3H, s, Me-25)，1.16 (3H, d, $J=6.4Hz$, $-CH(CH_3)(CH_3)$)，1.17 (3H, s, Me-29)，1.23 (3H, t, $J=7.2Hz$, $-CH_2CH_3$)，1.39 (3H, s, Me-27)，1.76 (3H, s, Me-24)，2.61 (1H, td, $J=13.2, 6.4Hz$, H β -18)，4.08 (2H, q, $J=7.2Hz$, $-CH_2CH_3$)，4.12 (1H, m, $-CH(CH_3)_2$)，4.70 (1H, br s, H-23)，4.90 (1H, br s, H-23)，5.33 (1H, d, $J=8.0Hz$, NH)，5.65 (1H, s, H-12)。 ^{13}C NMR (氘代氯仿)，請參照第 1 表。EI-MS (70eV) m/z (% rel. int.)：553 $[M]^+$ (62)。為 $C_{35}H_{55}NO_4$ 計算 HR-EI-MS m/z ：553.4131。發現 553.4133。

本實施例之化合物 **22** 係取 80 毫克 (0.15 毫莫耳) 的化合物 **19** 與碘化異丙烷 (isopropyl iodide) 在丙酮與碳酸鉀 (K_2CO_3) 的存在下進行反應，獲得一白色無結晶粉末 (73.3 毫克，0.13 毫莫耳，產率 86.7%)： $[\alpha]_D^{25}$ (*c* 1.0，氯仿)。
IR (film on NaCl) 3373、1727、1661 cm^{-1} 。 1H NMR (氘代氯仿)： δ 0.82 (3H, s, Me-28)，1.11 (3H, s, Me-29)，1.14 (3H, d, $J=6.8Hz$, $-CH(CH_3)(CH_3)$)，1.16 (3H, s,

Me-25), 1.16 (3H, d, $J=6.8\text{Hz}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$), 1.17 (3H, s, Me-26), 1.20 (6H, d, $J=6.4\text{Hz}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.39 (3H, s, Me-27), 1.76 (3H, s, Me-24), 2.59 (1H, td, $J=13.2, 6.4\text{Hz}$, $\text{H } \beta$ -18), 4.12 (1H, m, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4.69 (1H, br s, H-23), 4.90 (1H, br s, H-23), 4.95 (1H, m, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 5.34 (1H, d, $J=8.0\text{Hz}$, NH), 5.64 (1H, s, H-12)。 ^{13}C NMR (氘代氯仿), 請參照第 1 表。EI-MS (70eV) m/z (% rel. int.), 567 $[\text{M}]^+$ (64)。為 $\text{C}_{36}\text{H}_{57}\text{NO}_4$ 計算 HR-EI-MS m/z : 567.4288。發現 567.4269。

本實施例之化合物 23 係取 100 毫克 (0.19 毫莫耳) 的化合物 19, 與提供胺基團的乙基胺 (ethyl amine) 進行醯胺化反應, 其中, 以 1-乙基 3-二甲基氧丙基碳代二亞胺 (EDCI) 為活化劑, 以 4-二甲氨基吡啶 (DMAP) 為催化劑, 獲得一白色無結晶粉末 (59.3 毫克, 0.11 毫莫耳, 產率 58.0%): $[\alpha]_D^{25}$ (c 0.25, CHCl_3). IR (film on NaCl) 3292、1731、1653 cm^{-1} 。 ^1H NMR (氘代氯仿): δ 0.82 (3H, s, Me-28), 1.10 (3H, t, $J=7.2\text{Hz}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.11 (3H, s, Me-26), 1.15 (3H, d, $J=6.8\text{Hz}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$), 1.16 (3H, d, $J=6.8\text{Hz}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$), 1.16 (3H, s, Me-25), 1.17 (3H, s, Me-29), 1.39 (3H, s, Me-27), 2.51 (1H, td, $J=13.2, 6.0\text{Hz}$, $\text{H } \beta$ -18), 3.23 (2H, m, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 4.12 (1H, m, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4.74 (1H, br s, H-23), 4.90 (1H, br s, H-23), 5.34 (1H, t, $J=8.4\text{Hz}$, NH), 5.68 (1H, t, $J=4.0\text{Hz}$, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_3$), 5.68 (1H, s, H-12)。 ^{13}C NMR (氘代氯仿), 請參照第 1 表。EI-MS (70eV) m/z (% rel. int.), 552 $[\text{M}]^+$

(47) 為 $C_{35}H_{36}N_2O_3$ 計算 HR-EI-MS m/z : 552.4291。發現 552.4288。

本實施例之化合物 24 係取 100 毫克 (0.19 毫莫耳) 的化合物 19，與提供胺基團的丙基胺 (propyl amine) 進行醃胺化反應，其中，以 1-乙基 3-二甲基氨基丙基碳代二亞胺 (EDCI) 為活化劑，以 4-二甲氨基吡啶 (DMAP) 為催化劑，獲得一白色無結晶粉末 (46.1 毫克，0.081 毫莫耳，產率 42.6%)： $[\alpha]_D^{25}$ (c 0.25, 氯仿)。IR (film on NaCl) 3424、1735、1653 cm^{-1} 。 1H NMR (氘代氯仿)： δ 0.83 (3H, s, Me-28)，0.91 (3H, t, $J=7.2Hz$, $-CH_2CH_2CH_3$)，1.11 (3H, s, Me-26)，1.15 (3H, d, $J=6.8Hz$, $-CH(CH_3)(CH_3)$)，1.16 (3H, d, $J=6.8Hz$, $-CH(CH_3)(CH_3)$)，1.16 (3H, s, Me-25)，1.17 (3H, s, Me-29)，1.38 (3H, s, Me-27)，1.77 (3H, s, Me-24)，2.23 (2H, m, $-CH_2CH_2CH_3$)，2.51 (1H, td, $J=13.2, 6.0Hz$, H β -18)，3.16 (2H, dd, $J=13.2, 6.4Hz$, $-CH_2CH_2CH_3$)，4.12 (1H, m, $-CH(CH_3)_2$)，4.74 (1H, br s, H-23)，4.91 (1H, br s, H-23)，5.33 (1H, d, $J=8.4Hz$, NH)，5.67 (1H, s, H-12)，5.68 (1H, t, $J=4.0Hz$, $-NHCH_2CH_2CH_3$)。 ^{13}C NMR (氘代氯仿)，請參照第 1 表。EI-MS (70eV) m/z (% rel. int.)，566 $[M]^+$ (95)。為 $C_{36}H_{58}N_2O_3$ 計算 HR-EI-MS m/z : 566.4447。發現 566.4439。

本實施例之化合物 25 係取 100 毫克 (0.19 毫莫耳) 的化合物 19，與提供胺基團的異丙基胺 (isopropylamine) 進行醃胺化反應，其中，以 1-乙基 3-二甲基氨基丙基碳代二亞胺 (EDCI) 為活化劑，以 4-二甲氨基吡啶 (DMAP) 為催

化劑，獲得一白色無結晶粉末（61.4毫克，0.11毫莫耳，產率58.0%）： $[\alpha]_D^{25}$ (*c* 0.25, 氯仿)。IR (film on NaCl) 3439、1727、1650 cm^{-1} 。 ^1H NMR (氘代氯仿)： δ 0.80 (3H, s, Me-28)，1.11 (3H, s, Me-26)，1.12 (6H, d, $J = 6.8\text{Hz}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)，1.15 (3H, s, Me-29)，1.15 (6H, d, $J = 6.8\text{Hz}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)，1.17 (3H, s, Me-25)，1.38 (3H, s, Me-27)，1.79 (3H, s, Me-24)，2.48 (1H, td, $J = 13.2, 6.4\text{Hz}$, H β -18)，4.02 (1H, m, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)，4.12 (1H, m, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)，4.74 (1H, br s, H-23)，4.90 (1H, br s, H-23)，5.34 (1H, d, $J = 7.6\text{Hz}$, NH)，5.46 (1H, d, $J = 7.6\text{Hz}$, NH)，5.65 (1H, s, H-12)。 ^{13}C NMR (氘代氯仿)，請參照第1表。EI-MS (70eV) m/z (% rel. int.)，566 $[\text{M}]^+$ (89)。為 $\text{C}_{36}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{O}_3$ 計算 HR-EI-MS m/z ：566.4447。發現 566.4444。

根據本發明所獲得之化合物 10、11、化合物 13 至 17 及化合物 21 至 25，其碳譜 (^{13}C NMR) 測定的結果如第 1 表所示，而本發明所獲得之化合物 2 至 9、12、18 至 20、26 及 27 之碳譜之判定結果，乃參照 Maitraie D 等人於 Bioorg. Med. Chem. 期刊所發表的論文資料 (2009, 17, 2785)。

第 1 表：化合物 10、11、13 至 17 及 21 至 25 的質譜結果

位置	10	11	13	14	15	16	17	21	22	23	24	25
C-1	23.5	23.8	23.8	23.8	23.8	23.8	23.8	23.8	23.8	23.8	23.8	23.8
C-2	31.4	32.2	31.4	31.4	32.0	32.0	32.1	31.4	31.4	32.0	32.1	32.1
C-3	173.4	172.4	173.9	173.4	173.2	173.2	172.3	174.6	173.4	173.2	173.3	172.4
C-4	146.6	146.6	146.6	146.6	146.6	146.6	146.6	146.5	146.5	146.6	146.6	146.6
C-5	38.8	39.0	38.7	38.8	39.0	39.0	39.0	38.8	38.8	39.0	39.0	39.0
C-6	29.7	31.1	28.4	29.7	31.3	31.3	31.1	28.6	29.7	29.5	29.5	29.5
C-7	34.3	35.7	34.4	34.3	35.6	35.7	35.6	34.4	34.3	35.6	35.7	35.7

位置	10	11	13	14	15	16	17	21	22	23	24	25
C-8	43.6	43.7	44.0	44.0	44.0	44.0	44.0	43.3	43.3	43.3	43.3	43.3
C-9	52.8	53.1	52.8	52.7	53.0	53.1	53.1	52.8	52.8	53.1	53.0	53.0
C-10	41.2	41.2	41.2	41.2	41.2	41.2	41.2	42.2	42.1	42.0	41.2	41.2
C-11	199.6	200.4	199.5	199.5	200.4	200.4	200.3	199.6	199.5	200.3	200.3	200.3
C-12	128.5	128.4	128.2	128.3	128.2	128.2	128.2	128.4	128.4	128.4	128.4	128.4
C-13	169.3	170.3	169.2	169.1	170.2	170.3	170.2	169.5	169.4	170.4	170.4	170.3
C-14	45.1	45.0	45.0	45.0	45.0	45.0	45.0	45.0	45.0	45.0	45.0	45.0
C-15	26.4	26.4	26.4	26.4	26.3	26.3	26.3	26.4	26.4	26.4	26.4	26.4
C-16	26.5	26.5	26.5	26.5	26.5	26.5	26.5	26.5	26.5	26.6	26.6	26.6
C-17	31.8	31.8	31.7	31.7	31.7	31.7	31.7	31.9	31.9	31.9	31.9	31.9
C-18	48.4	48.3	48.1	48.1	48.2	48.2	48.2	48.2	48.2	48.1	48.1	48.1
C-19	41.2	41.2	43.6	43.6	43.7	43.7	43.7	43.7	41.1	41.1	41.1	41.1
C-20	44.0	44.0	50.7	50.6	50.9	51.0	51.0	43.7	43.7	43.8	43.8	43.7
C-21	31.1	31.3	31.2	31.2	31.1	31.1	31.2	31.5	31.4	31.5	31.5	31.5
C-22	37.7	37.7	37.7	37.7	37.6	37.6	37.6	37.4	37.4	37.4	37.4	37.4
C-23	114.2	114.3	114.2	114.2	114.3	114.3	114.3	114.2	114.2	114.4	114.3	114.3
C-24	23.8	23.5	23.5	23.5	23.5	23.5	23.5	23.5	23.8	23.5	23.5	23.5
C-25	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	19.4	19.5	19.5	19.6	19.6	19.5
C-26	18.6	18.7	18.4	18.6	18.7	18.7	18.7	18.7	18.6	18.7	18.7	18.7
C-27	23.4	23.5	23.3	23.3	23.3	23.3	23.3	23.3	23.3	23.3	23.3	23.3
C-28	28.6	28.6	28.4	28.5	28.5	28.5	28.5	29.5	29.5	29.5	29.5	29.5
C-29	28.3	28.3	28.3	28.3	28.3	28.3	28.3	29.4	28.6	28.6	28.6	28.6
C-30	176.9	176.5	176.2	176.2	176.2	176.2	176.2	173.9	174.6	174.7	174.7	174.6
OCH ₃	51.8	51.8										
OCH ₂ CH ₃			60.2					60.3				
OCH ₂ CH ₃			14.2					14.2				
OCH ₂ CH ₂ CH ₃												
OCH ₂ CH ₂ CH ₃												
OCH ₂ CH ₂ CH ₃												
OCH(CH ₃) ₂	50.6			41.2					50.6			
OCH(CH ₃)(CH ₃)	21.8			21.8					21.8			
OCH(CH ₃)(CH ₃)	21.8			21.8					21.8			
OCH ₂			66.2	66.2	66.3	66.2	66.2					
1'			136.1	136.1	136.1	136.1	136.1					
2'			128.3	128.3	128.3	128.3	128.3					
3'			128.6	128.6	128.6	128.6	128.6					
4'			128.5	128.5	128.4	128.4	128.4					
5'			128.6	128.6	128.6	128.6	128.6					
6'			128.3	128.3	128.3	128.3	128.3					
NH-CH ₂ CH ₃					34.3					44.9		
NH-CH ₂ CH ₃					14.7					14.8		
NH-CH ₂ CH ₂ CH ₃						41.3					42.1	

位置	10	11	13	14	15	16	17	21	22	23	24	25
NH-CH ₂ CH ₂ CH ₃						22.8					31.3	
NH-CH ₂ CH ₂ CH ₃						11.4					11.4	
NH-CH(CH ₃) ₂		50.9					51.0	50.8	50.6	51.0	50.9	50.9
NH-CH(CH ₃) ₂												50.9
NH-CH(CH ₃)(CH ₃)		22.7					22.7	22.8	22.8	22.8	22.8	22.7
NH-CH(CH ₃)(CH ₃)		22.7					22.7	23.0	23.0	22.9	22.9	22.7
NH-CH(CH ₃)(CH ₃)												22.8
NH-CH(CH ₃)(CH ₃)												22.9

本發明之 18 β -甘草次酸衍生物係具有殺死癌細胞之作用，特別係藉由本發明 18 β -甘草次酸衍生物之製備方法係能夠用以大量生產該 18 β -甘草次酸衍生物，特別係指化合物 10、11、13 至 17 及 21 至 25 之製備方法，該等 18 β -甘草次酸衍生物係能夠藉由提升癌細胞中的 ROS 產生率，活化癌細胞的促凋亡蛋白 p53 後，使癌細胞的 MMP 下降，促使癌細胞發生細胞凋亡。

本發明 18 β -甘草次酸衍生物之製備方法，係藉由化學反應合成，有助於大量生產該等 18 β -甘草次酸衍生物，該等 18 β -甘草次酸衍生物與習用抗癌藥物共同施用於生物體，能夠達到降低習用抗癌藥物之副作用的功效。

為證實本發明之 18 β -甘草次酸衍生物係具有殺死癌細胞之作用，以購自美國菌種保存中心 (American Type Culture Collection, 簡稱 ATCC) 之人類膀胱癌細胞 NTUB1 (J. Formosan Med. Assoc. 1992; 91:608-13)、人類前列腺癌細胞 PC3 (編號為 CRL-1435) 或人類膀胱上皮正常細胞 SV-HUC1 (編號為 CRL-9520) 進行以下試驗：(A) 本發明 18 β -甘草次酸衍生物之半抑制濃度試驗、(B) 本發明 18 β -甘草次酸衍生物之細胞存活率試驗、(C) 本發明 18

β -甘草次酸衍生物與習用抗癌藥物之協同作用試驗、(D) 本發明 18 β -甘草次酸衍生物之活性氧物質產生率測試、(E) 本發明 18 β -甘草次酸衍生物與習用抗癌藥物之細胞凋亡率試驗、(F) 本發明 18 β -甘草次酸衍生物之粒線體膜電位測試及 (G) 促凋亡蛋白 p53 活化試驗。

本實施例係選用人類膀胱癌細胞 NTUB1(後簡稱膀胱癌細胞)、人類前列腺癌細胞 PC3(後簡稱前列腺癌細胞)及人類膀胱上皮正常細胞 SV-HUC1(後簡稱正常細胞)進行後續試驗，該等細胞株培養於一適當培養基中，待該等細胞株數量增殖至培養容器之七至八成滿，取一緩衝液，將增殖培養之細胞由該培養容器之器壁沖刷至該緩衝液中，以方便進行該細胞株之細胞計數，及試驗(A)至(G)之分析。

更詳言之，本實施例係選擇但不限定將該膀胱癌細胞或該前列腺癌細胞於含有 10%胎牛血清蛋白 (Fetal bovine serum, 簡稱 FBS) 之 RPMI 1640 培養基 (Roswell Park Memorial Institute medium, 該 RPMI 1640 培養基包含 100 unit/mL penicillin-G, 100 μ g/mL streptomycin, and 2 mM l-glutamine) 中增殖培養；本實施例係選擇但不限定將該正常細胞於含有 10% FBS 之 F12 培養基(該 F12 培養基包含 100 unit/mL penicillin-G, 100 μ g/mL streptomycin, and 2 mM l-glutamine) 中增殖培養。該三細胞株之培養條件為 5%二氧化碳氣體、溫度為 37 $^{\circ}$ C，待該等細胞株長至培養容器之七成滿，以一商用 EDTA 緩衝液 (Ethylene diamine tetra-acetic acid; MERCK) 重複沖洗該培養容器，以便將

貼壁生長的該等細胞沖刷至該 EDTA 緩衝液，並進行細胞計數。

(A) 本發明 18 β -甘草次酸衍生物之半抑制濃度試驗為證實本發明 18 β -甘草次酸衍生物(化合物 1 至 27) 抑制癌細胞之作用，本實施例係取一習用抗癌藥物 (Cisplatin) 作為正控制組 (第 A0+組)、化合物 1 至 27 分別為實驗組 (分別依序為第 A1 至 A27 組)，以及一組未與任何化合物或習用抗癌藥物共培養之組別為負控制組 (第 A0-組，以確認本實施例之癌細胞生長情況為正常)，進行癌細胞之半抑制濃度試驗 (IC₅₀)。更詳言之，本實施例係將膀胱癌細胞 (各組細胞數量約為 4×10⁵ cells/ml)，以 5%二氧化碳氣體、溫度為 37 °C 之條件與不同濃度之化合物或習用抗癌藥物共培養，製作不同濃度之化合物或習用抗癌藥物對於各組細胞之半抑制濃度的線性迴歸，以計算各化合物或習用抗癌藥物的半抑制濃度。

請參照第 2 表所示，係本實施例第 A0+、A1 至 27 組之半抑制濃度試驗結果，其中化合物 9 (2.34 ± 0.28 μ M)、化合物 12 (9.41 ± 2.72 μ M)、化合物 21 (19.44 ± 19.20 μ M)、化合物 23 (12.75 ± 2.10 μ M)、化合物 25 (4.76 ± 1.15 μ M) 及化合物 27 (3.31 ± 0.61 μ M) 之半抑制濃度為本實施例中較低者，因此，以下試驗係選擇本實施例中，半抑制濃度試驗所需濃度較低之化合物 12、化合物 20、化合物 21、化合物 23 或/及化合物 25 進行試驗 (B) 至 (G)。

第 2 表：本實施例各組別之 IC₅₀ 試驗結果 (單位： μ M)

組別	IC ₅₀ ± SD	組別	IC ₅₀ ± SD	組別	IC ₅₀ ± SD
----	-----------------------	----	-----------------------	----	-----------------------

A0+	3.27 ± 0.10	A1	27.31 ± 5.17	A2	18.57 ± 1.64
A3	56.5 ± 14.35	A4	20.23 ± 5.10	A5	73.54 ± 35.12
A6	24.28 ± 3.98	A7	57.61 ± 8.80	A8	20.72 ± 4.97
A9	2.34 ± 0.28	A10	25.30 ± 2.28	A11	31.35 ± 0.55
A12	9.41 ± 2.72	A13	27.76 ± 6.48	A14	18.20 ± 1.58
A15	42.74 ± 11.15	A16	49.39 ± 11.52	A17	30.12 ± 2.41
A18	25.66 ± 1.81	A19	17.47 ± 2.11	A20	13.12 ± 5.27
A21	19.44 ± 19.20	A22	29.17 ± 26.61	A23	12.75 ± 2.10
A24	>50	A25	4.76 ± 1.15	A26	15.95 ± 5.30
A27	3.31 ± 0.61				

由上表可知，本發明 18 β -甘草次酸衍生物中，化合物 1 至 27 皆具有抑制癌細胞生長之作用，其中，以化合物 19、20 及 25 為例，當 C-3 位置之官能基進行酯化反應 (esterification) 或醯胺化反應 (amidation) 後，而具有較長碳鏈之 C-3 取代基，其抑制癌細胞作用的效果越佳；當 C-3 及/或 C-30 位置以異丙基胺基取代後，亦具有更佳之癌細胞抑制作用；此外，本實施例中係以變異型的 18 β -甘草次酸衍生物具有較佳的癌細胞抑制作用。

由此可知，本發明 18 β -甘草次酸衍生物係能夠有效抑制癌細胞之 18 β -甘草次酸衍生物，具有提供一種開發有效抑制癌細胞之抗癌藥物功效。

(B) 本發明 18 β -甘草次酸衍生物之細胞存活率試驗為證實本發明 18 β -甘草次酸衍生物(化合物 1 至 27) 具有殺死癌細胞之作用，且其對於正常細胞不會造成毒殺

作用，本實施例係以 MTT 細胞活性染色法 (MTT assay) 分別測試本發明之化合物 21、化合物 23 及化合物 25 與膀胱癌細胞、前列腺癌細胞及正常細胞共培養後的細胞存活率。更詳言之，MTT 細胞活性染色法係利用活細胞粒線體中所含有之琥珀酸去氫酶 (Dehydrogenase) 可代謝溶於血癌細胞培養液中的黃色 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, 購自 Sigma Chemical Co.) 化合物，將 MTT 化合物中的 tetrazolium 轉為一藍色產物 formazan, 該 formazan 會堆積在細胞中，另以一 DMSO 溶液將 formazan 溶解，測量該 DMSO 溶液於波長 540 nm 處之吸光值，代表各組細胞之存活率，當活細胞數越多，則 540 nm 之吸光值越高。

本實施例分別取該三種細胞 (各 24 組) 與不同濃度之化合物 21、23 或 25 共培養，各組別細胞株分別與不同濃度之化合物進行培養 72 小時後，取 50 μ l 之 MTT 溶液 (2 mg MTT 化合物溶於 1 毫升 PB 緩衝溶液) 加入各組別中反應 3 小時，將各組別進行離心 (1000g, 10 分鐘) 後取其上清液，並分別加入 150 μ l 之 DMSO，以 MRX 分光光度計 (MRX microplate reader, DYNEXCO) 測量各組別之 540 nm 波長之吸光值，並以未與化合物共培養組別之吸光值為基準，換算成各組別之細胞存活率。

請參照第 4 圖所示，係本實施例之化合物 21 分別與該三種細胞共培養的細胞存活率長條圖，其中，以未與化合物 21 共培養之組別的細胞存活率設為 100%。該膀胱癌細胞與前列腺癌細胞之細胞存活率，係隨化合物 21 之濃度

增加而具有負相關，而該正常細胞之細胞存活率，則係隨化合物 21 之濃度增加而具有正相關，其中，當該化合物 21 之濃度為 10~30 μM ，該膀胱癌細胞之細胞存活率係低於 70%，該化合物 21 濃度為 30~50 μM ，其細胞存活率僅為 30%左右，而該正常細胞與化合物 21 共培養，則具有促進細胞生長的作用。

請參照第 5 圖所示，係本實施例之化合物 23 分別與該三種細胞共培養的細胞存活率長條圖，其中，以未與化合物 23 共培養之組別的細胞存活率設為 100%。該膀胱癌細胞與前列腺癌細胞之細胞存活率，係隨化合物 23 之濃度增加而具有負相關，而該正常細胞之細胞存活率，則係隨化合物 23 之濃度增加而具有正相關，其中，當該化合物 23 之濃度為 1~10 μM ，該膀胱癌細胞之細胞存活率約為 70%，該化合物 23 濃度為 30~50 μM ，其細胞存活率不到 10%左右，而該正常細胞與化合物 23 共培養，則具有促進細胞生長的作用。

請參照第 6 圖所示，係本實施例之化合物 25 分別與該三種細胞共培養的細胞存活率長條圖，其中，以未與化合物 25 共培養之組別的細胞存活率設為 100%。該膀胱癌細胞與前列腺癌細胞之細胞存活率，係隨化合物 25 之濃度增加而具有負相關，而該正常細胞之細胞存活率，則係隨化合物 25 之濃度增加而具有正相關，其中，當該化合物 25 之濃度為 0.3~5.0 μM ，該膀胱癌細胞之細胞存活率為 60~75%，該化合物 25 濃度為 10 μM ，其細胞存活率不到 20%，該化合物 25 濃度為 30~50 μM ，其細胞存活率甚至

接近 0%，而該正常細胞與化合物 25 共培養，則具有促進細胞生長的作用。

由上述可知，本發明 18 β -甘草次酸衍生物確實具有殺死癌細胞之作用，且對正常細胞不具有細胞毒性，係能夠有助於生物體抵抗癌細胞之生長，又不會傷害正常細胞，係具有幫助抗癌藥物開發之功效。

(C)本發明 18 β -甘草次酸衍生物與習用抗癌藥物之協同作用試驗

根據 Ping 等人於 2010 年 Urol. Oncol:Semin. Orig. Invest.期刊所發表之論文中，曾說明習用抗癌藥物 (Taxol) 與數種抗氧化物質 (如大豆異黃酮、維他命 E、兒茶素或吡咯烷二硫代氨基甲酸鹽等) 具有協同作用之理論，本發明 18 β -甘草次酸衍生物係與一習用抗癌藥物—Cisplatin 共同抑制並殺死癌細胞，並證實本發明 18 β -甘草次酸衍生物確實具有與習用抗癌藥物之協同作用，將該習用抗癌藥物與本發明 18 β -甘草次酸衍生物共同施用係能夠達到相當的癌細胞抑制效果，藉此能夠降低該習用抗癌藥物之施用劑量，以降低該習用抗癌藥物對於生物體造成的副作用 (例如腎毒性、抗藥性等)。

本實施例亦以 MTT 細胞活性染色法 (MTT assay) 測試本發明之化合物 12、化合物 20 及 Cisplatin 與膀胱癌細胞共培養後的細胞存活率。更詳言之，本實施例取 42 組該膀胱癌細胞，與不同濃度之化合物 12 及 Cisplatin 或化合物 20 及 Cisplatin 共培養 (各組別之共培養條件請參照第 3 表)，各組別細胞株分別與不同濃度之化合物進行培養 72

小時後，以試驗 (B) 所述之 MTT 細胞活性染色法計算成各組別之細胞存活率。

第 3 表：本實施例各組別之共培養條件

組別 (化合物 12)	組別 (化合物 20)	化合物 濃度 (μM)	Cisplatin 濃度 (μM)
第 C12-1-1 組	第 C20-1-1 組	0	0
第 C12-1-2 組	第 C20-1-2 組		5
第 C12-1-3 組	第 C20-1-3 組		10
第 C12-2-1 組	第 C20-2-1 組	1	0
第 C12-2-2 組	第 C20-2-2 組		5
第 C12-2-3 組	第 C20-2-3 組		10
第 C12-3-1 組	第 C20-3-1 組	3	0
第 C12-3-2 組	第 C20-3-2 組		5
第 C12-3-3 組	第 C20-3-3 組		10
第 C12-4-1 組	第 C20-4-1 組	5	0
第 C12-4-2 組	第 C20-4-2 組		5
第 C12-4-3 組	第 C20-4-3 組		10
第 C12-5-1 組	第 C20-5-1 組	10	0
第 C12-5-2 組	第 C20-5-2 組		5
第 C12-5-3 組	第 C20-5-3 組		10
第 C12-6-1 組	第 C20-6-1 組	30	0
第 C12-6-2 組	第 C20-6-2 組		5
第 C12-6-3 組	第 C20-6-3 組		10
第 C12-7-1 組	第 C20-7-1 組	50	0

第 C12-7-2 組	第 C20-7-2 組		5
第 C12-7-3 組	第 C20-7-3 組		10

請參照第 3 表所示之培養條件，並配合第 7 及 8 圖之細胞存活率長條圖，以不同濃度之 Cisplatin 與膀胱癌細胞共培養的情況下，在 0 μM 之 Cisplatin 組別（與化合物 12 共培養的組別係以第 C12-1-1 組為基準，化合物 20 共培養的組別係以第 C20-1-1 組為基準），其細胞存活率設為 100%，5 μM Cisplatin 組別（第 C12-1-2 組、第 C20-1-2 組）或 10 μM Cisplatin 組別（第 C12-1-3 組、第 C20-1-3 組）的細胞存活率降至 30% 以下，表示習用抗癌藥物確實對癌細胞具有毒殺作用。

而在第 C12-2-1 組至第 C12-5-3 組中，單純以 1~5 μM 之化合物 12 之組別，其細胞存活率約為 70~80%，表示其癌細胞抑制效果較弱，而濃度為 1~5 μM 之化合物 12 與 5 μM 或 10 μM Cisplatin 共培養，其細胞存活率便能達到 50% 以下，証實該化合物 12 確實能夠與 Cisplatin 發生協同作用，能降低 Cisplatin 的施用劑量，又能夠達到很好的癌細胞抑制作用；在第 C12-6-1 組至第 C12-7-3 組中，單以化合物 12 或者化合物 12 與 Cisplatin 共培養者，其細胞存活率皆能低於 40%，更證明本發明之化合物 12 本身即具有抑制並殺死癌細胞之效果，且與該習用抗癌藥物 Cisplatin 之抑制效果相當。

而在第 C20-2-1 組至第 C20-5-3 組中，單純以 1~5 μM 之化合物 20 之組別，其細胞存活率約為 60~75%，表示其癌細胞抑制效果較弱，而濃度為 1~5 μM 之化合物 20 與 5

μM 或 $10 \mu\text{M}$ Cisplatin 共培養，其細胞存活率便能達到 40% 以下，証實該化合物 20 確實能夠與 Cisplatin 發生協同作用，能降低 Cisplatin 的施用劑量，又能夠達到很好的癌細胞抑制作用；在第 C20-6-1 組至第 C20-7-3 組中，單以化合物 20 或者化合物 20 與 Cisplatin 共培養者，其細胞存活率皆能低於 40%，更證明本發明之化合物 20 本身即具有抑制並殺死癌細胞之效果，且與該習用抗癌藥物 Cisplatin 之抑制效果相當。

由上述可知，本發明 18β -甘草次酸衍生物確實具有與習用抗癌藥物之協同作用，將該習用抗癌藥物與本發明 18β -甘草次酸衍生物共同施用，不僅能夠具有抑制且殺死癌細胞之效果，又能夠降低該習用抗癌藥物之施用劑量，以降低該習用抗癌藥物對於生物體造成的副作用（例如腎毒性、抗藥性等）之功效。

(D) 本發明 18β -甘草次酸衍生物之活性氧物質產生率測試

活性氧物質 (Reactive oxygen species, 簡稱 ROS) 通常會造成細胞凋亡、調控部分基因的表現，或活化一連串的細胞訊息傳遞路徑。為證實本發明 18β -甘草次酸衍生物的癌細胞抑制作用係以刺激癌細胞中的 ROS 含量而達到其抑制效果，本實施例係藉由流式細胞儀量測各組別細胞中的 ROS 產生率。

更詳言之，本實施例係取 5 組膀胱癌細胞（各組細胞數量約為 8×10^5 cells/ml）分別與如第 4 表所示之條件共同培養 24 小時，在各組細胞與本發明 18β -甘草次酸衍生物

共培養結束前 30 分鐘，添加 10 μM 的脂溶性染劑 (2,7-dichlorofluorescein diacetate，簡稱 H_2DCFDA ，購自 Molecular Probes, Eugene, OR)，該脂溶性染劑進入到細胞內後，與脂酶 (Esterase) 反應後會分解成具有綠色螢光的 DCF 化合物 (2,7-dichlorofluorescein)，再以一流式細胞儀 (FACScan flow cytometer, Becton Dickinson) 測量波長為 525 nm 之吸光值，特別係測量細胞週期 M1 期中的 ROS 產生率。

第 4 表：本實施例各組別之共培養物及其 ROS 產生率

組別	共培養物	ROS 產生率 (%)
第 D1 組	—	47.4
第 D2 組	20 μM 之 Cisplatin	63.1
第 D3 組	1 mM 之 NAC	26.1
第 D4 組	10 μM 之化合物 25	66.1
第 D5 組	25 μM 之化合物 25	85.6

請參照第 4 表所示之 ROS 產生率結果，第 D1 組之未經任何處理之對照組，其 ROS 產生率為 47.4%，以 20 μM 之 Cisplatin 處理之第 D2 組，其 ROS 產生率增加到 63.1%，第 D3 組則係以一種 ROS 抑制劑—*N*-acetylcysteine (NAC) 處理之負控制組，其 ROS 產生率更低於該對照組，而以本發明之化合物 25 處理之第 D4 及 D5 組，其 ROS 產生率皆高於第 D1 組。

由上述可知，本發明 18 β -甘草次酸衍生物殺死癌細胞的作用，確實係與其刺激癌細胞產生較多的 ROS 相關。

(E) 本發明 18 β -甘草次酸衍生物與習用抗癌藥物之細胞凋亡率試驗

當癌細胞發生凋亡，通常係指癌細胞之細胞週期被停止在 G1 期到 S 期之間，為證實本發明 18 β -甘草次酸衍生物用以抑制癌細胞之作用是否與細胞週期的停滯 (cell cycle arrest) 有關，本實施例以流式細胞儀，測量各組別細胞與不同濃度之化合物 25、Cisplatin 或 NAC 之共培養後，各組別細胞週期的狀態。

更詳言之，本實施例係取 7 組膀胱癌細胞 (各組細胞數量約為 8×10^5 cells/ml) 分別與如第 5 表所示之條件共同培養 24 小時，收集各組別之細胞後，以 1 \times PBS 緩衝溶液沖洗後，以 4 $^{\circ}$ C 乙醇溶液於溫度 -20 $^{\circ}$ C 下固定各組細胞 24 小時後，再以 PBS 緩衝溶液清洗後，以 50 μ g/ml propidium iodide (簡稱 PI, 購自 Sigma, Co) 染劑與 50 μ g/ml RNase A (購自 Sigma, Co) 於室溫下共培養 30 分鐘，再以流式細胞儀 (FACScan flow cytometer, Becton Dickinson) 及分析軟體 (Cell Quest software) 計算各組別細胞之細胞週期。

第 5 表：本實施例各組別之細胞週期 (單位：%)

組別	共培養物	Sub-G1	G1	S	G2/M
第 E1 組	—	6.68	50.64	20.37	21.08
第 E2 組	20 μ M 之 Cisplatin	10.35	60.91	22.09	6.65
第 E3 組	25 μ M 之 化合物 25	20.39	49.51	12.69	12.68

第 E4 組	50 μ M 之 化合物 25	55.71	35.72	3.15	5.22
第 E5 組	75 μ M 之 化合物 25	78.39	14.69	2.79	4.00
第 E6 組	1 mM 之 NAC	2.66	44.41	29.18	20.18
第 E7 組	50 μ M 之 過氧化氫	9.48	27.15	23.84	20.18

請參照第 5 表所示可知，以 NAC（負控制組）及過氧化氫（正控制組）處理之組別，其細胞週期並未發生停滯現象，以化合物 25 處理之組別亦不會引起細胞週期停滯，但本發明之化合物 25 與該負控制組及該正控制組相較，化合物 25 確實可以引起各組細胞趨向於 Sub-G1 期，且 S 期之細胞量下降，該化合物 25 之濃度增加而使 Sub-G1 期細胞遞增，且 S 期細胞遞減，代表各組細胞之凋亡係藉由各組 Sub-G1 期與化合物 25 有關。

(F) 本發明 18 β -甘草次酸衍生物之粒線體膜電位測試

根據 Martin 等人於 2009 年 Plos One 期刊所發表之論文中，其推論當細胞中 ROS 產生過多會引起細胞中的粒線體膜電位(MMP)下降，造成粒線體功能失常(Mitochondrial dysfunction)。為證實本發明 18 β -甘草次酸衍生物係由於提高癌細胞之 ROS 產生率，進而造成癌細胞中的 MMP 下降，而達到抑制並殺死癌細胞之作用，本實施例係以一 JC-1

(5,5,6,6-tetrachloro- 1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolo carbocyanine iodide, 購自 Molecular Probes, Eugene, OR, USA) 螢光探針之聚集情形來判斷 MMP 的升降與否, 特別係當 MMP 較高時, 則該 JC-1 螢光探針將會發生聚集現象, 而形成 JC-1 探針聚集物 (JC-1 aggregates, 以 R1 簡稱) 而存在於細胞中, 而 MMP 較低時, 該 JC-1 螢光探針會以該 JC-1 探針單體 (JC-1 monomer, 以 R2 簡稱) 存在於細胞中, 並以一流式細胞儀測量該 JC-1 探針單體及 JC-1 探針聚集物之螢光量。

第 6 表: 本實施例各組別之共培養物及 R1、R2 百分率 (%)

組別	共培養物	R1	R2
第 F1 組	—	95.32	4.48
第 F2 組	CCCP	52.06	48.42
第 F3 組	10 μ M 之 化合物 25	94.14	5.45
第 F4 組	25 μ M 之 化合物 25	87.17	12.65
第 F5 組	50 μ M 之 化合物 25	55.65	44.07

請參照第 6 表所示, 係本實施例各組別之共培養物及其 R1 及 R2 百分率, 其中第 F1 組為未經任何處理之組別, 其 R1 百分率為 95.32%, R2 百分率為 4.48%, 該組別之 MMP 係正常條件; 第 F2 組為以 CCCP (carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone) 處理之正控制組, 該組別之 R1

百分率為 52.06%，R2 百分率為 48.42%，其係代表該組細胞之 MMP 受到破壞後的明顯下降趨勢；第 F3 至 F5 組係以化合物 25 處理之組別，其 R1 百分率係隨化合物 25 之濃度遞增而減少，而 R2 百分率則係隨化合物 25 之濃度遞增而增加，代表該化合物 25 確實具有誘發癌細胞之 MMP 下降之趨勢，藉此而抑制癌細胞生長。

根據試驗 (D) 至 (F) 可知，本發明 18β -甘草次酸衍生物確實能夠藉由提高癌細胞之 ROS 產生率，進而誘導癌細胞的 MMP 下降，使癌細胞生長受到抑制，因此，本發明 18β -甘草次酸衍生物係有效抑制癌細胞生長並殺死癌細胞之活性成分，具有應用於製備抗癌藥物之功效。

(G) 促凋亡蛋白 p53 活化試驗

根據 Son 等人於 2010 年 Toxicol. Appl. Pharmacol. 期刊所發表之論文中，說明當細胞 ROS 含量增加，會引起細胞中抑癌基因 p53 的表現，該抑癌基因 p53 係主要誘發細胞凋亡的基因之一。

為證實本發明 18β -甘草次酸衍生物殺死癌細胞之作用係與該抑癌基因 p53 有關，特別係由於細胞中 ROS 量增加而活化該抑癌基因 p53，進而達到抑制癌細胞生長之作用，本實施例係以西方墨點法 (Western blotting) 測量各組細胞中抑癌基因 p53 之表現量。

本實施例係將 9 組膀胱癌細胞請參照第 7 表所示，係以不同濃度之化合物 25 分別與 9 組膀胱癌細胞(各組細胞數量約為 8×10^5 cells/ml) 共培養 24 小時後之條件，分別自第 G1-1 至 G1-5 組及第 G2-1 至 G2-4 組中取出適量膀胱

癌細胞，以一定比例（較佳係 1:10）稀釋於一商用蛋白質抽取溶劑（Lysis buffer；Sigma），進行均質處理，造成各組細胞溶解、破裂，以獲得細胞內的蛋白質；再由一商用蛋白質定量套組（Protein Assay Kit；Invitrogen）分析由第 G1-1 至 G1-5 組及第 G2-1 至 G2-4 組細胞所抽取的蛋白質總量，取等量蛋白質，利用商用抗磷酸化抑癌基因 p53 多株抗體（Ser 15(9284)，購自 Cell Signaling, Beverly, MA, USA）、商用抗抑癌基因 p53 單株抗體（DO1，購自 Santa Cruz Biotechnology, CA, USA）進行西方墨點法分析，另以一商用抗肌動蛋白（ β -actin）多株抗體（NB660-501，購自 Novus Biologicals, Littleton, CO, USA）偵測該肌動蛋白表現量作為對照組。

第 7 表：本實施例各組別之共培養物

組別	共培養物
第 G1-1 組	—
第 G1-2 組	10 μ M 之 Cisplatin
第 G1-3 組	10 μ M 之化合物 25
第 G1-4 組	25 μ M 之化合物 25
第 G1-5 組	50 μ M 之化合物 25
第 G2-1 組	—
第 G2-2 組	50 μ M 之化合物 25
第 G2-3 組	NAC
第 G2-4 組	50 μ M 之化合物 25 + NAC

請參照第 9 及 10 圖之西方墨點法之蛋白質染色結果

所示，本實施例係以膀胱癌細胞中 β -actin 的表現量為定量標準，分別比較各組膀胱癌細胞中抑癌基因 p53 及磷酸化抑癌基因 p53（簡稱 p-p53）的表現情況。

請參照第 9 圖所示，比較第 G1-1 至 G1-5 組之 p-p53 及 p53 之表現量，其中，第 G1-1 組係未經任何處理之組別；相較於第 G1-1 組，以 Cisplatin 處理之第 G1-2 組的 p-p53 明顯增加，而第 G1-3 至 G1-5 組的 p-p53 表現量係隨著化合物 25 之作用濃度增加而遞增，代表該化合物 25 確實能夠引發癌細胞之抑癌基因 p53 活化，而促使癌細胞凋亡。

請參照第 10 圖所示，比較第 G2-1 至 G2-4 組之 p-p53 及 p53 之表現量，其中，第 G2-1 組係未經任何處理之組別；相較於第 G2-1 組，以濃度為 50 μ M 之化合物 25 處理之第 G2-2 組，其 p-p53 表現量明顯增加，而以一 ROS 抑制劑（NAC）處理之第 G2-3 組，其 p-p53 表現量明顯被抑制，而第 G2-4 組係以濃度為 50 μ M 之化合物 25 及 NAC 同時處理，該組別之 p-p53 則稍有恢復，代表化合物 25 係具有提升癌細胞內的 ROS 含量的作用，並藉由該 ROS 產生率的提升而達到抑制癌細胞的作用。

由上述試驗（A）至（G）可知，本發明之 18 β -甘草次酸衍生物係藉由提升癌細胞中的 ROS 產生率，由 ROS 調控 p-p53 之活化，使癌細胞的 MMP 下降，促使癌細胞發生細胞凋亡，並且，本發明之 18 β -甘草次酸衍生物不會使癌細胞或正常細胞的細胞週期發生停滯，因此對於正常細胞不會具有毒殺作用；此外，本發明之 18 β -甘草次酸衍生物更可以與習用抗癌藥物發生協同作用，藉此降低

習用抗癌藥物之使用劑量，降低習用抗癌藥物對於生物體所造成的腎毒性或抗藥性的副作用，同時具有同樣的癌細胞抑制作用。

本發明之具有殺死癌細胞之 18β -甘草次酸衍生物係能夠用以製備成一種抗癌藥物，特別係與醫藥學上可接受之載劑或賦形劑組合形成一醫藥組成物，其中，該 18β -甘草次酸衍生物可以製備成任何方便施用於生物體之型式，如錠劑、膠囊、粉劑、粒劑或液劑等以供生物體服用或注射，該醫藥組成物另可以包含習用抗癌藥物—Cisplatin，以降低習用抗癌藥物之副作用。

本發明殺死癌細胞之 18β -甘草次酸衍生物係藉由提升癌細胞 ROS，由 ROS 調控 p-p53，降低癌細胞之 MMP，造成癌細胞凋亡，具有抑制癌細胞生長之功效。

本發明殺死癌細胞之 18β -甘草次酸衍生物的製備方法，其係利用化學反應合成而能夠大量生產，具有成本低且有利於藥物製程開發之功效。

本發明之殺死癌細胞之醫藥組合物，其係包含至少一種 18β -甘草次酸衍生物及一醫藥上可接受載體所形成之醫藥組合物，係能夠提供一種有效抑制癌細胞之抗癌藥物。

雖然本發明已利用上述較佳實施例揭示，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之內，相對上述實施例進行各種更動與修改仍屬本發明所保護之技術範疇，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】

第 1 圖：本發明合成 18 β -甘草次酸衍生物之第一流程圖。

第 2 圖：本發明合成 18 β -甘草次酸衍生物之第二流程圖。

第 3 圖：本發明合成 18 β -甘草次酸衍生物之第三流程圖。

第 4 圖：本實施例化合物 **21** 與三種細胞共培養之細胞存活率長條圖。

第 5 圖：本實施例化合物 **23** 與三種細胞共培養之細胞存活率長條圖。

第 6 圖：本實施例化合物 **25** 與三種細胞共培養之細胞存活率長條圖。

第 7 圖：本實施例化合物 **12** 與 Cisplatin 協同抑制三種細胞之細胞存活率長條圖。

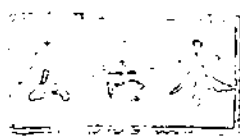
第 8 圖：本實施例化合物 **20** 與 Cisplatin 協同抑制三種細胞之細胞存活率長條圖。

第 9 圖：本實施例化合物 **25** 第 G1-1 至 G1-5 組之西方墨點法之蛋白質染色結果。

第 10 圖：本實施例化合物 **25** 第 G2-1 至 G2-4 組之西方墨點法之蛋白質染色結果。

【主要元件符號說明】

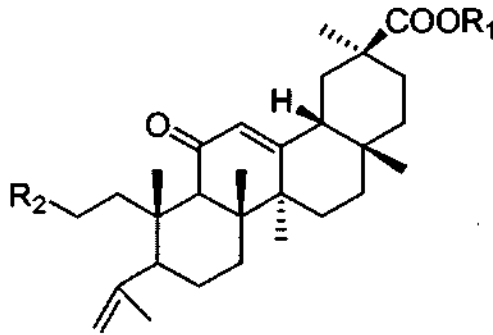
[無]



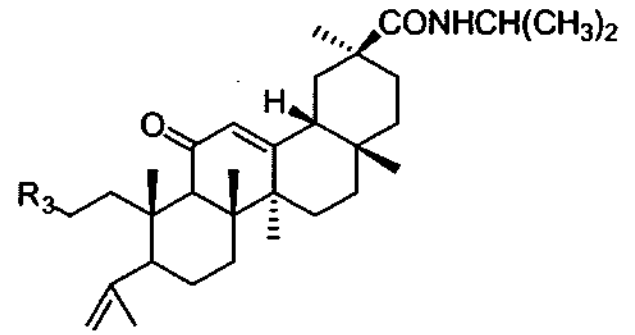
七、申請專利範圍：

- 1、一種 18β -甘草次酸衍生物，其係選自由式 (I) 及式 (II) 所組成之群組：

(I)



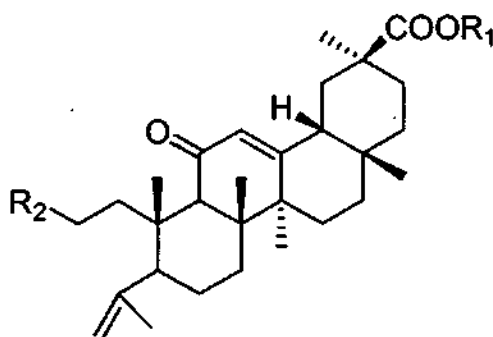
(II)



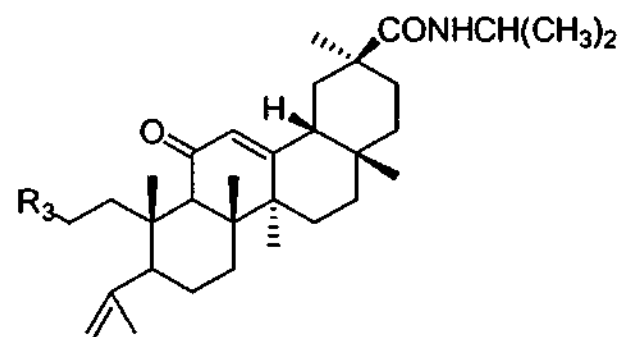
其中 R_1 係 CH_3 ，且 R_2 係 $COOCH(CH_3)_2$ 或 $CONHCH_2(CH_3)_2$ ；或者， R_1 係 $CH_2C_6H_5$ ，且 R_2 係 $COOCH_2CH_3$ 、 $COOCH(CH_3)_2$ 、 $CONHCH_2CH_3$ 、 $CONHCH_2CH_2CH_3$ 或 $CONHCH_2(CH_3)_2$ ；及 R_3 選自 $COOCH_2CH_3$ 、 $COOCH(CH_3)_2$ 、 $CONHCH_2CH_3$ 、 $CONHCH_2CH_2CH_3$ 及 $CONHCH_2(CH_3)_2$ 其中之一。

- 2、一種 18β -甘草次酸衍生物之用途，係用以製備殺死膀胱癌細胞藥物，該 18β -甘草次酸衍生物係選自由式 (I) 及式 (II) 所組成之群組：

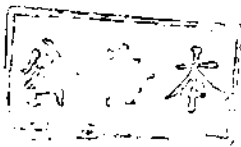
(I)



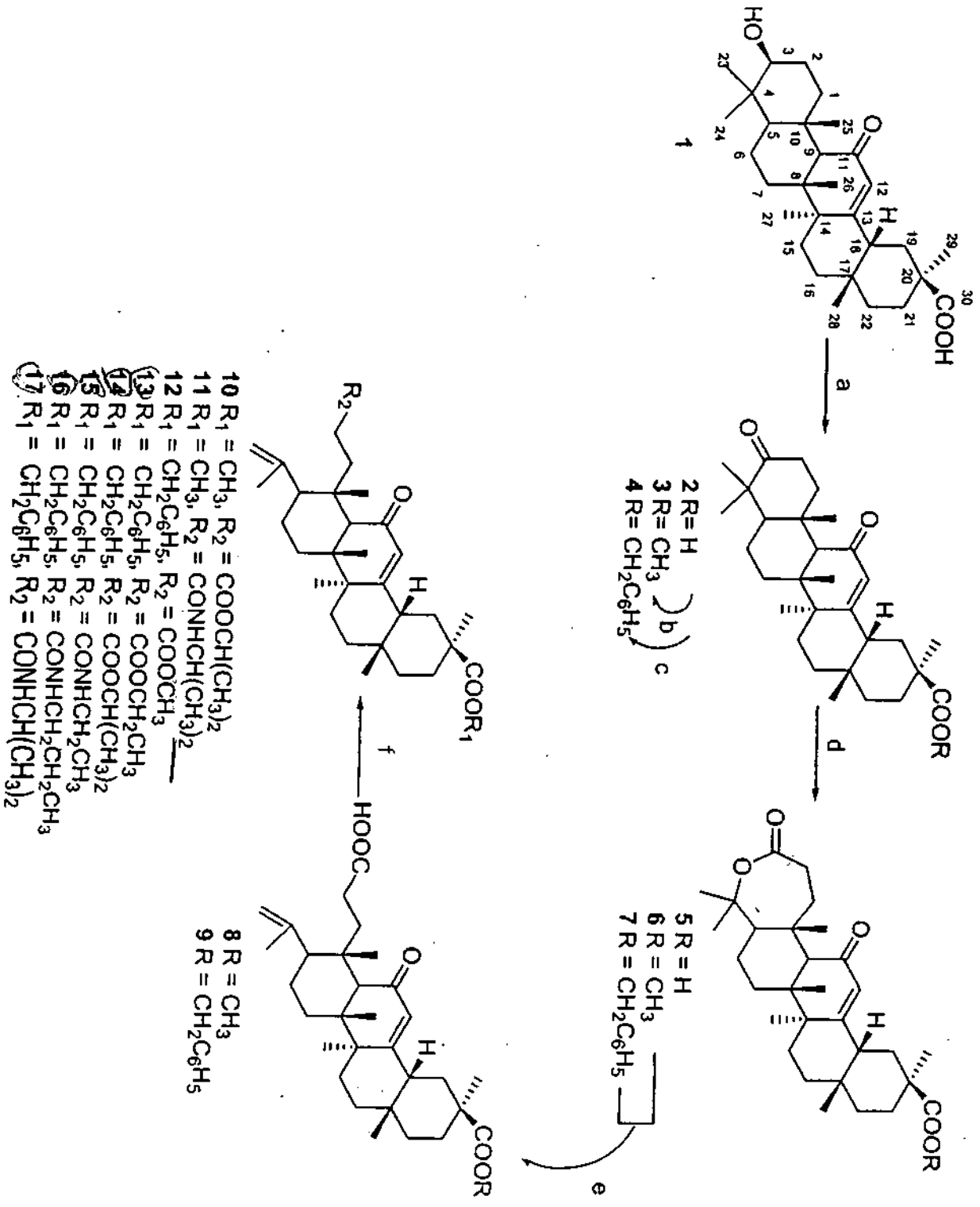
(II)



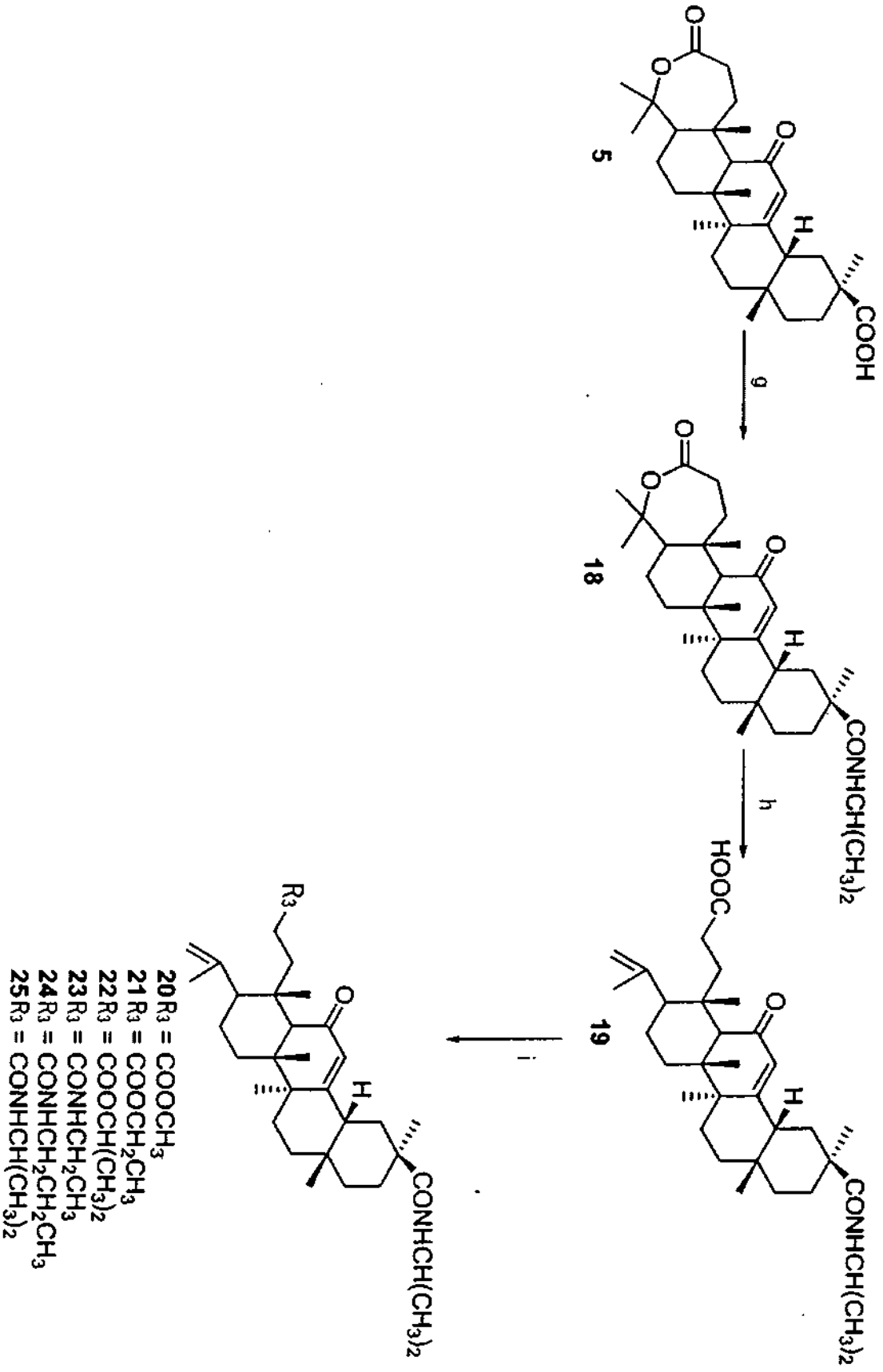
其中 R_1 係 CH_3 ，且 R_2 係 $COOCH(CH_3)_2$ 或 $CONHCH_2(CH_3)_2$ ；或者， R_1 係 $CH_2C_6H_5$ ，且 R_2 係 $COOCH_2CH_3$ 、 $COOCH(CH_3)_2$ 、 $CONHCH_2CH_3$ 、 $CONHCH_2CH_2CH_3$ 或 $CONHCH_2(CH_3)_2$ ；及 R_3 選自 $COOCH_2CH_3$ 、 $COOCH(CH_3)_2$ 、 $CONHCH_2CH_3$ 、 $CONHCH_2CH_2CH_3$ 及 $CONHCH_2(CH_3)_2$ 其中之一。



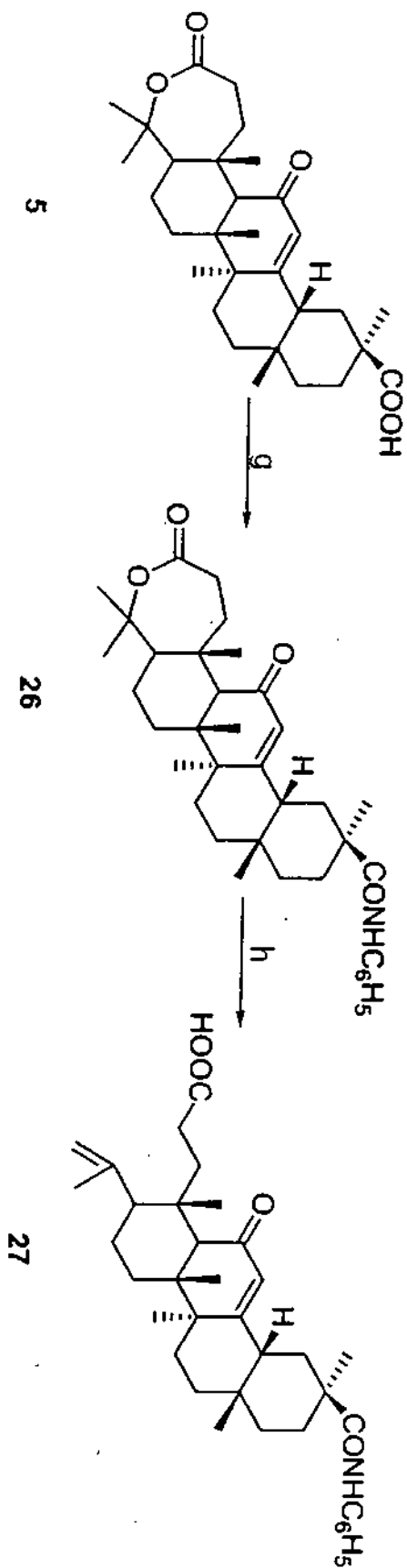
八、圖式：



第 1 圖

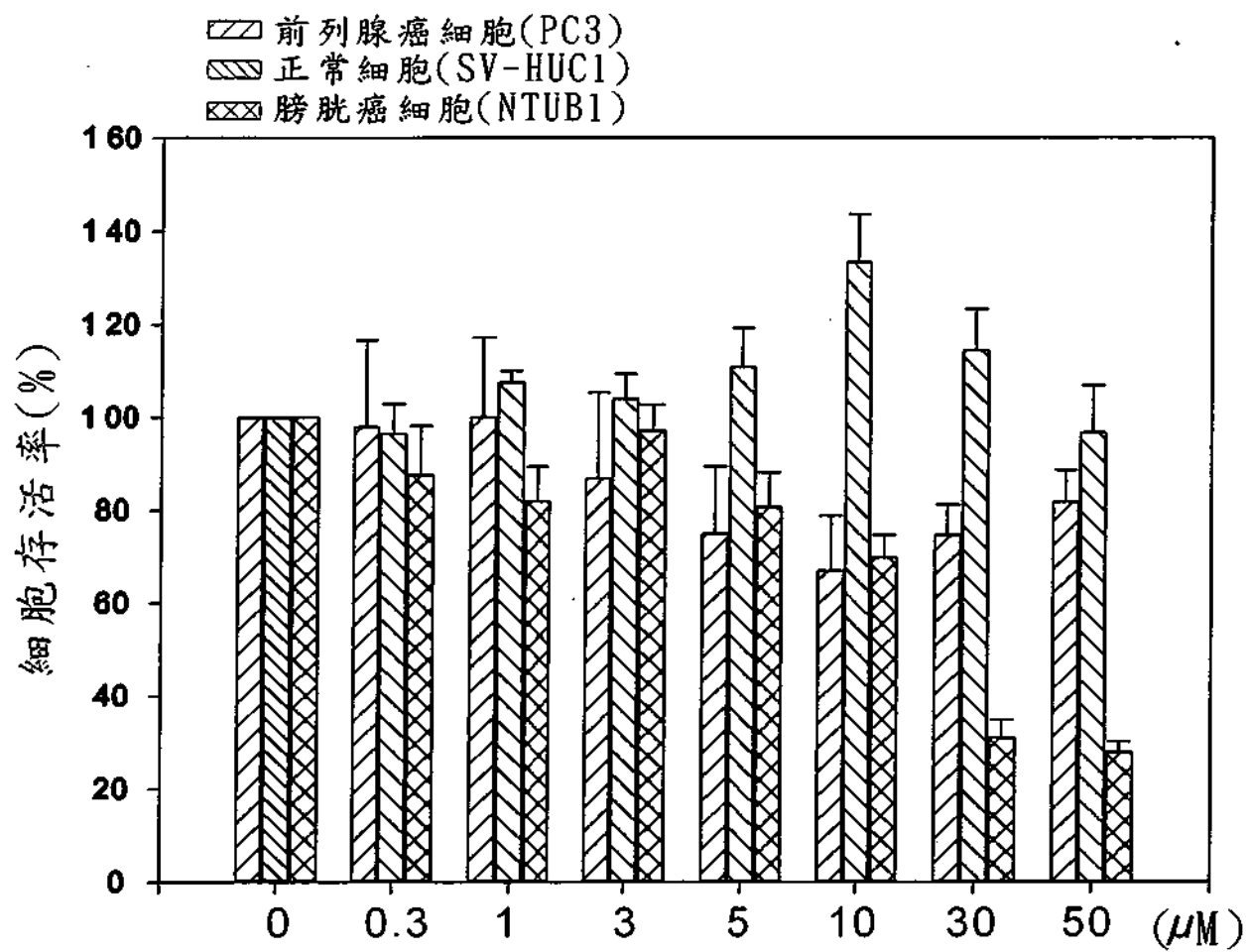


第 2 圖

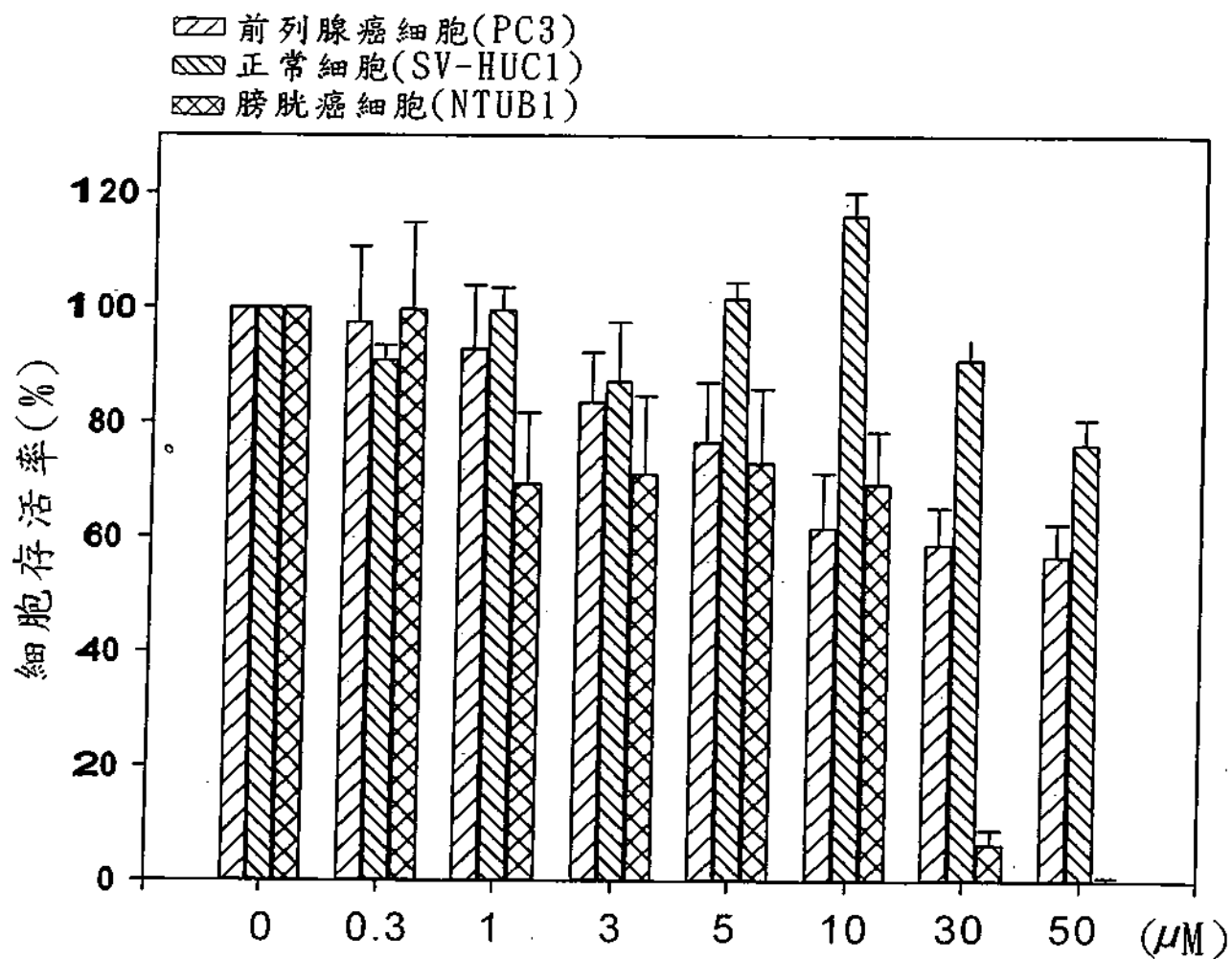


第 3 圖

101年3月7日修正替換本

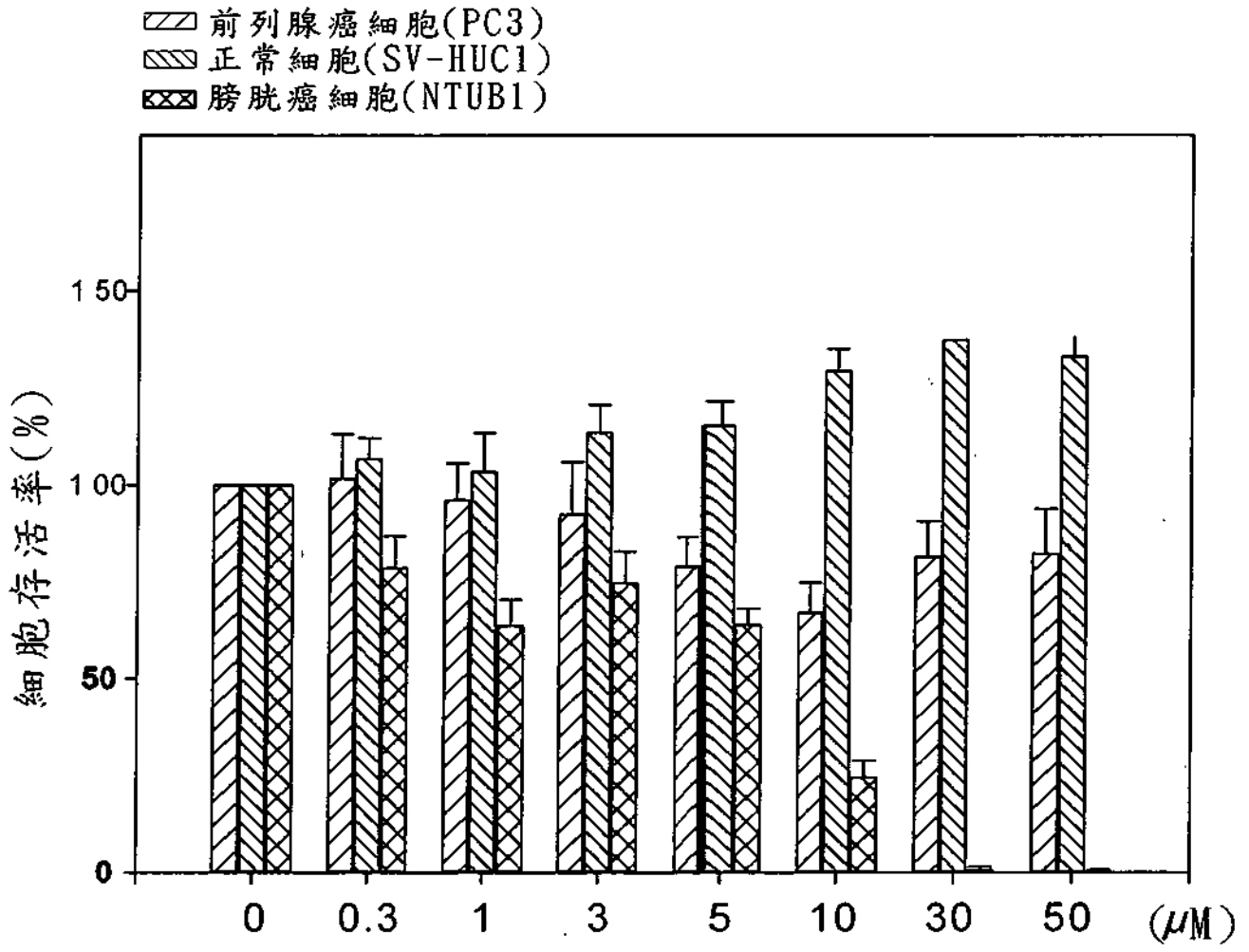


第 4 圖

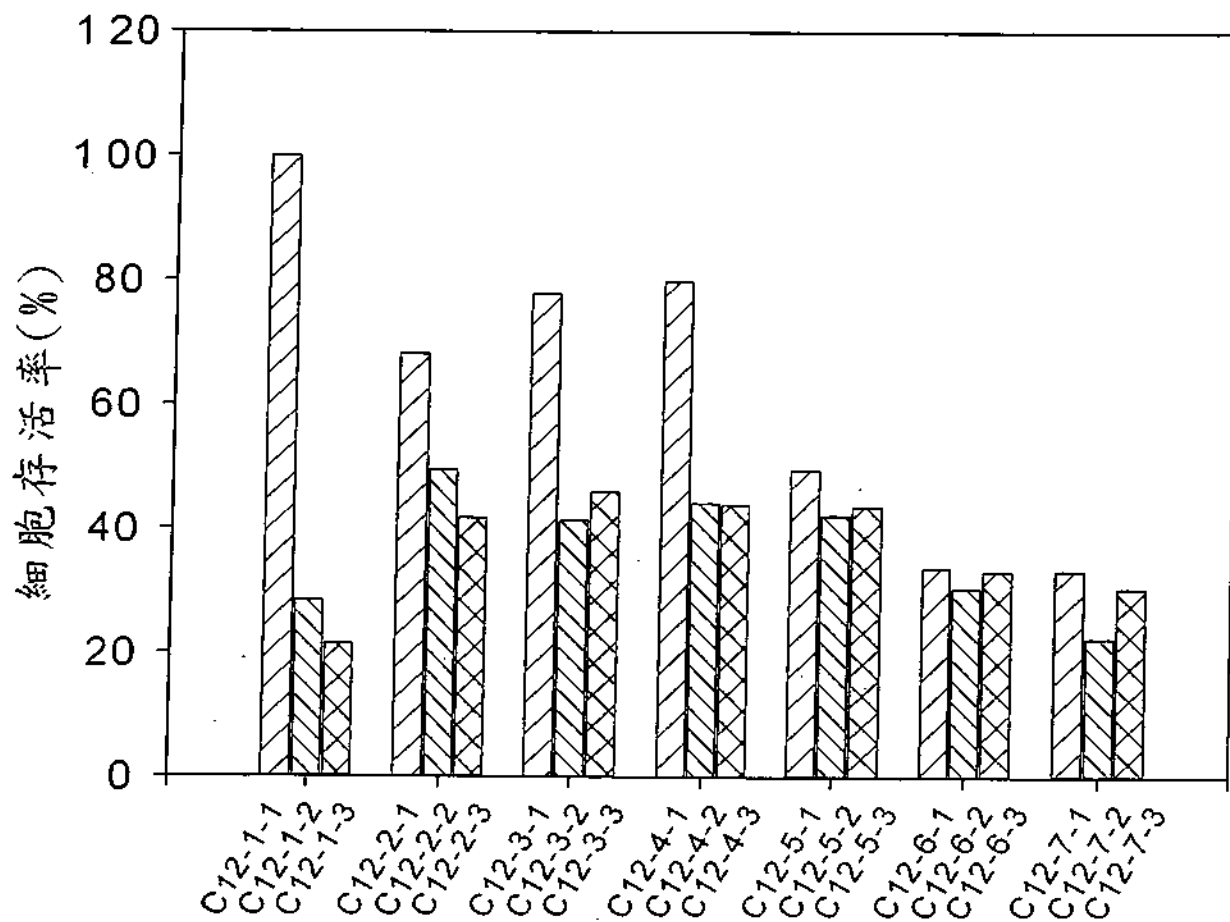


第 5 圖

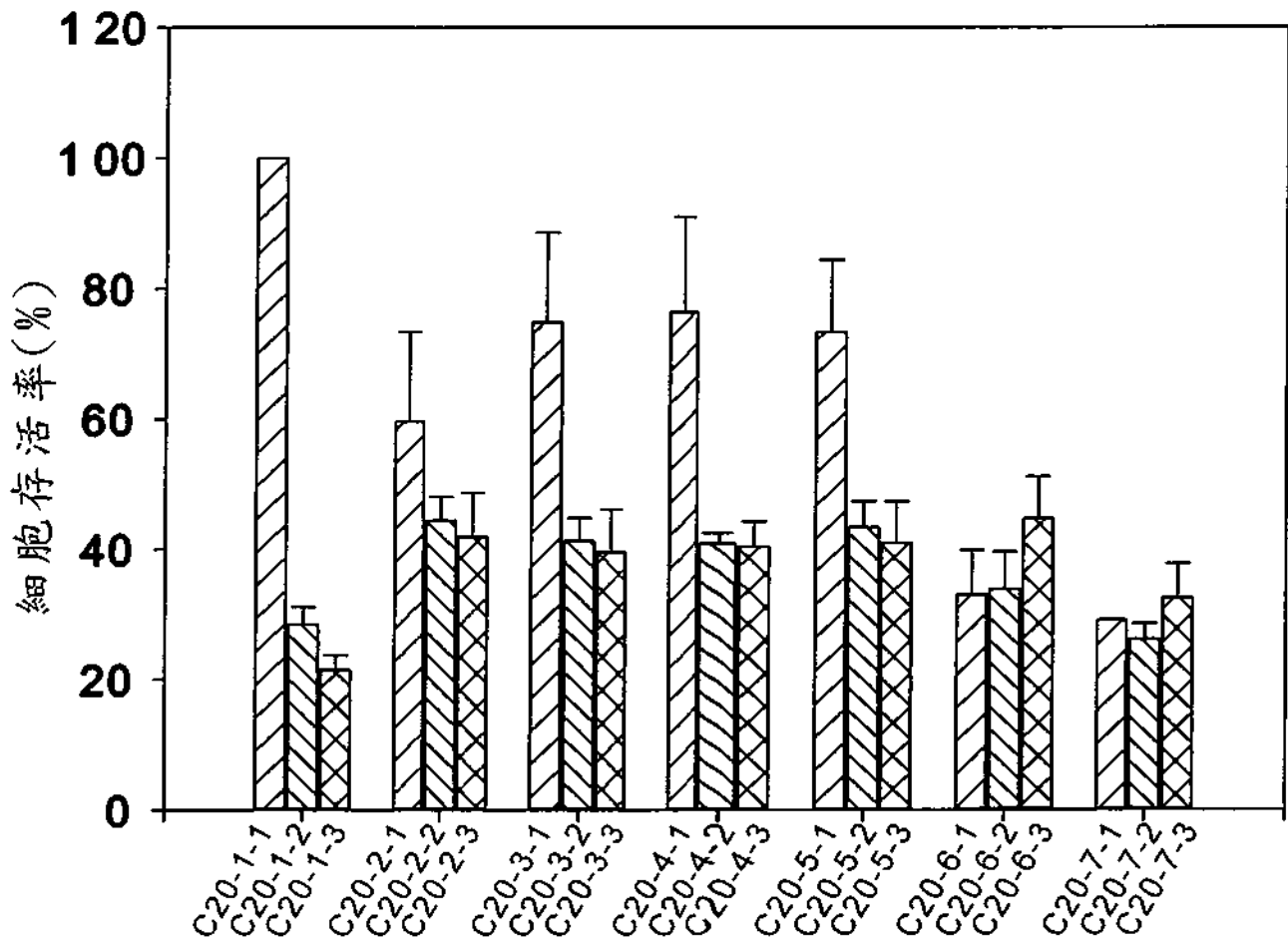
101年3月7日修正替換本



第 6 圖

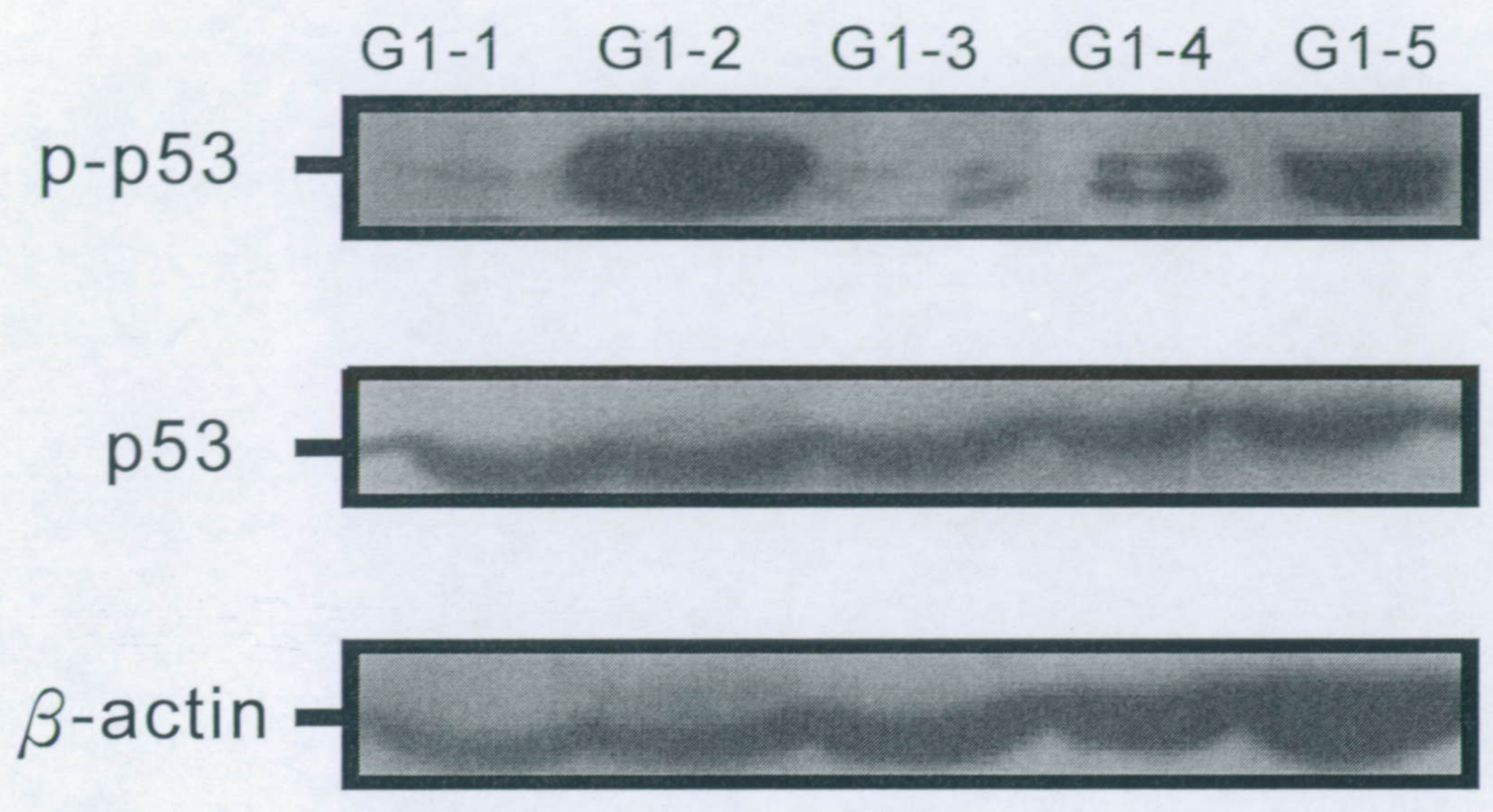


第 7 圖

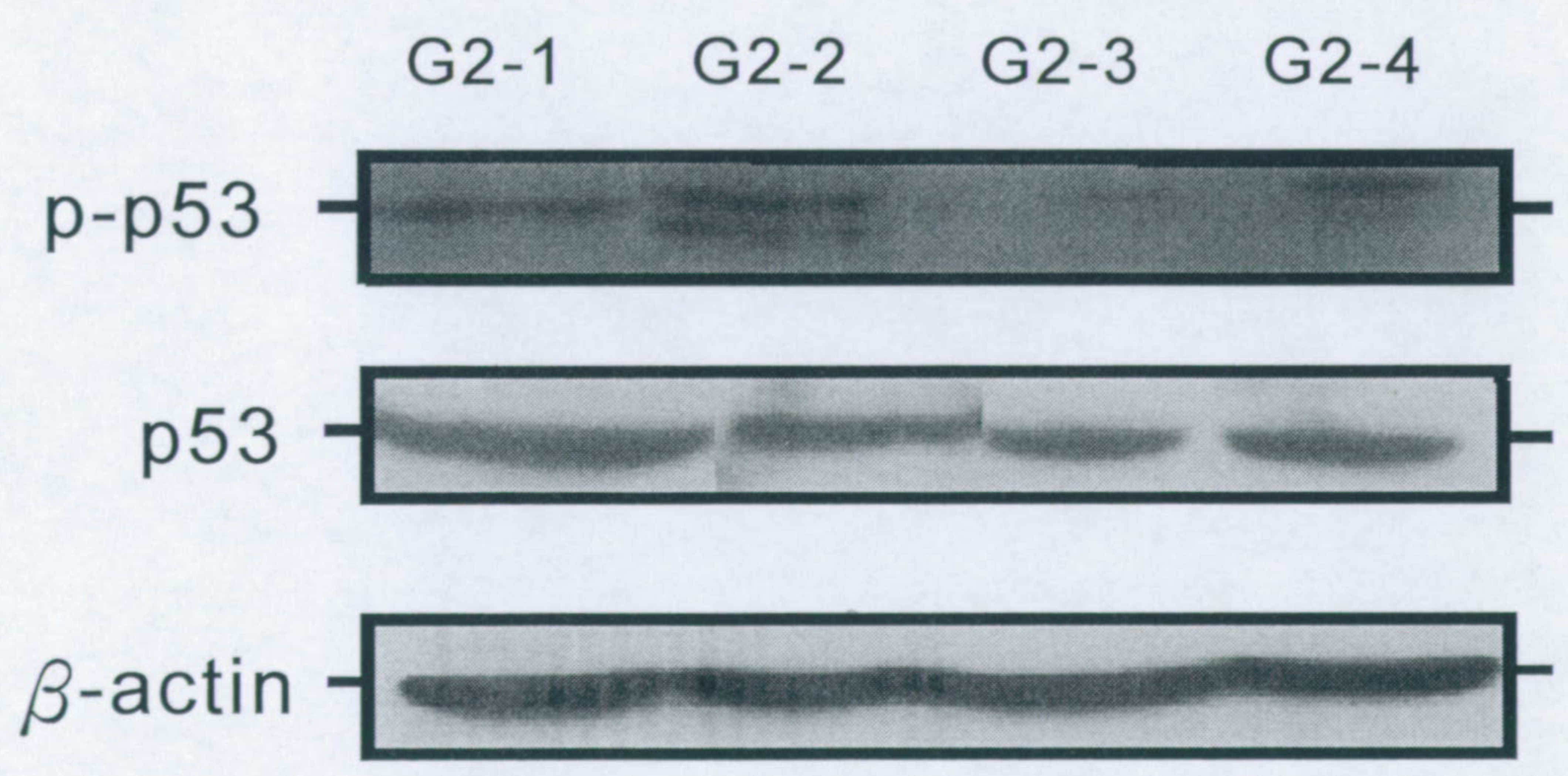


第 8 圖

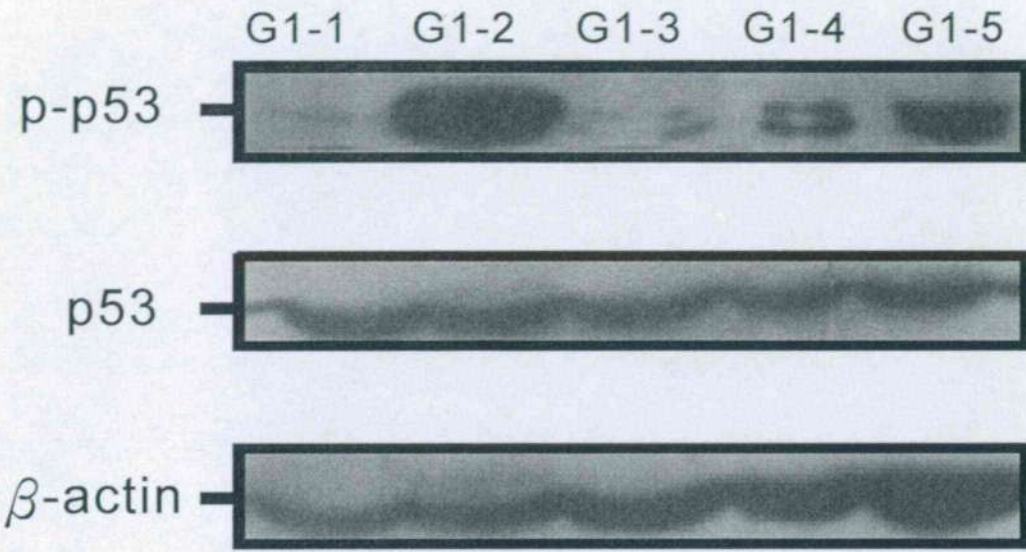
101年3月7日修正替換本



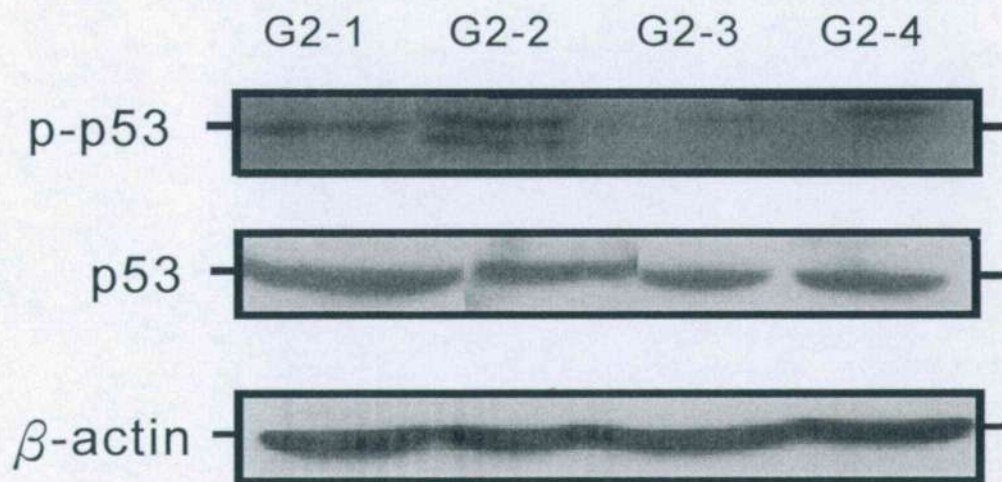
第 9 圖



第 10 圖



第 9 圖



第 10 圖