



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I714812 B

(45)公告日：中華民國 110 (2021) 年 01 月 01 日

(21)申請案號：106139364

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 11 月 14 日

(51)Int. Cl. : A61K31/121 (2006.01)

A61P43/00 (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：羅怡卿 LO, YI CHING (TW)；吳勝男 WU, SHENG NAN (TW)；曾于庭 TSENG,

YU TING (TW)；張芳榮 CHANG, FANG RONG (TW)；吳永昌 WU, YANG

CHANG (TW)；菲勒普 費倫茨 FULOP, FERENC (HU)

(74)代理人：蔡清福；蔡馭理

審查人員：簡正芳

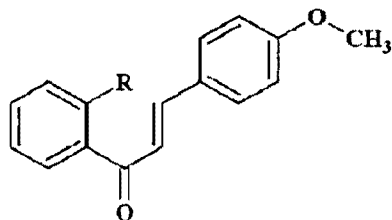
申請專利範圍項數：2 項 圖式數：11 共 36 頁

(54)名稱

查耳酮衍生物的用途

(57)摘要

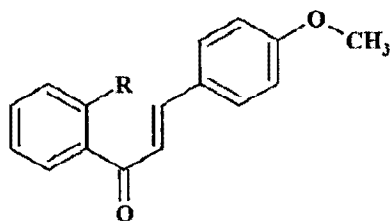
本發明關於一種用於抑制一生物樣品中一鉀離子通道之活性的套組，包括一鉀離子通道抑制劑，具有式 I 之化合物：



(式I)，

其中 R 選自由 OH、Cl、Br 及 I 所組成的群組其中之一。

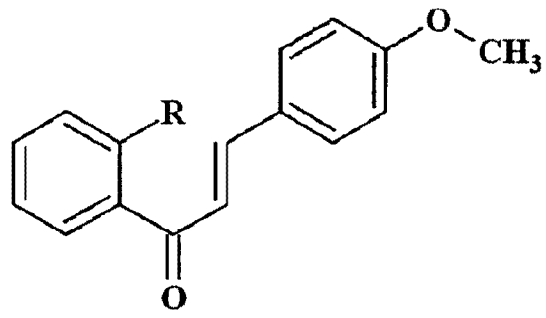
The present invention relates to a kit for inhibiting K⁺ channel activity in a biological sample, including a K⁺ channel inhibitor having a structure represented by formula I:



(I)，

wherein R is one selected from a group consisting of OH, Cl, Br and I.

特徵化學式：



(式I)

I714812

發明摘要

※ 申請案號：106139364

※ 申請日：106年11月14日

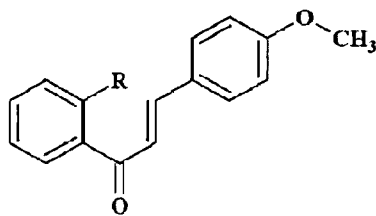
※IPC 分類：A61K 31/121 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

【發明名稱】

查耳酮衍生物的用途/Use of Chalcone Derivatives

【中文】

本發明關於一種用於抑制一生物樣品中一鉀離子通道之活性的套組，包括一鉀離子通道抑制劑，具有式I之化合物：

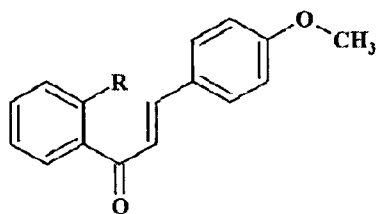


(式I)，

其中R選自由OH、Cl、Br及I所組成的群組其中之一。

【英文】

The present invention relates to a kit for inhibiting K^+ channel activity in a biological sample, including a K^+ channel inhibitor having a structure represented by formula I:



(I)，

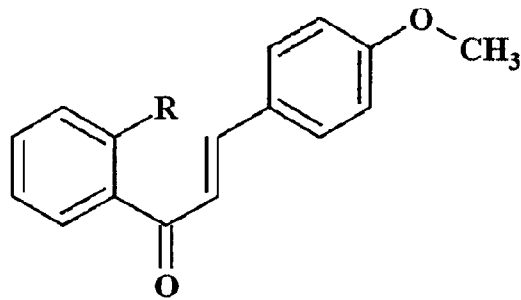
wherein R is one selected from a group consisting of OH, Cl, Br and I.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：無。

【本代表圖之符號簡單說明】：

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：



(式I)

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

查耳酮衍生物的用途/Use of Chalcone Derivatives

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種用於抑制離子通道活性的套組，特別關於一種用於抑制鉀離子通道活性的套組。

【先前技術】

【0002】 多型性神經膠母細胞瘤是一種預後不佳的癌症，其受害者的相對較短的預期壽命令人失望。已經越來越多地報導惡性神經膠質瘤細胞中固有的離子電流影響這些細胞的行為。早期報導已經證明，富含神經膠質瘤細胞或其他類型的腫瘤細胞的大型電導鈣離子(Ca^{2+})活化的鉀離子(K^+) (BK_{Ca}) 通道中對於功能表現的任何擾動，能夠誘導細胞凋亡並干擾惡性腫瘤的侵襲或進展。

【0003】 在許多細胞類型中表現的大型電導 Ca^{2+} 活化的 K^+ 通道 (BK_{Ca} 通道) 是獨特的離子通道系列，其具有所有 K^+ 選擇性通道的最大的單通道傳導，可以藉由膜去極化、細胞內 Ca^{2+} 升高或兩者而協同地被活化。 BK_{Ca} 通道的阻斷已被報導能夠抑制神經膠母細胞瘤的輻射誘導轉移和腦浸潤，因此開發有效的 BK_{Ca} 通道阻斷劑有助於延緩神經膠母細胞瘤的惡化。

【0004】 現有的 BK_{Ca} 抑制劑非洲蠍毒(iberiotoxin)用於治療癲癇，但卻難以確定其安全使用劑量，因此開發安全有效的 BK_{Ca} 抑制劑乃是優先考慮的一大課題。

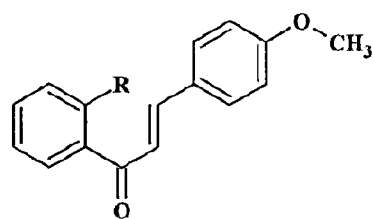
【0005】 本案申請人鑑於習知技術中的不足，經過悉心試驗與研究，並一本鍥而不捨之精神，終於構思出本案，能夠克服先前技術之不足，以下為本案之簡要說明。

【發明內容】

【0006】 本發明的目的在於提供新穎的鉀離子通道抑制劑，特別是針對大型電導鈣離子活化鉀離子(BK_{Ca})通道的抑制劑，以及提供抑制鉀離子通道的方法。

【0007】 爲了開發更安全有效的BK_{Ca}抑制劑，本發明研究查耳酮(chalcone)衍生物在13-06-MG神經膠質瘤細胞以及海馬迴神經元細胞中BK_{Ca}通道的抑制作用，作爲研究神經膠質瘤細胞、海馬迴神經元細胞、運動神經元細胞、血管平滑肌細胞、心臟纖維母細胞、冠狀動脈內皮細胞或其他膠質瘤細胞上BK_{Ca}通道之實驗試劑。

【0008】 因此，本發明提供一種用於抑制一生物樣品中之一鉀離子通道之活性的套組，包括一鉀離子通道抑制劑，具有式I之化合物：

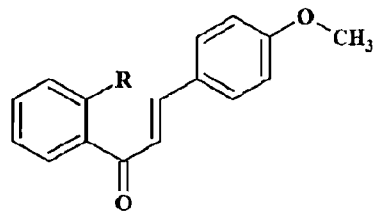


(式I)，

其中R選自由OH、Cl、Br及I所組成的群組其中之一。

【0009】 本發明另提出一種用於抑制一生物樣品中之一鉀離子通道之活性的方法。該方法包括使該生物樣品暴露於有效劑量的上述式I化合物。

【0010】 本發明另提出一種式I化合物的用途，用於抑制一生物樣品中之一鉀離子通道之活性，



(式I) ,

其中R選自由OH、Cl、Br及I所組成的群組其中之一。

【圖式簡單說明】

【0011】

第一圖為本發明查耳酮衍生物之化學結構，包括 AN07 (2-羥基-4'-甲氧基查耳酮)、CHA40 (2-氯-4'-甲氧基查耳酮)、AN7-13 (2-溴-4'-甲氧基查耳酮) 及 CHA79 (2-碘-4'-甲氧基查耳酮)。

第二圖(A)顯示 AN07 對於 13-06-MG 神經膠質瘤細胞中完整細胞 K^+ 電流 (I_K) 的效果，其中上圖為對照組(AN07 不存在)，下圖為實驗組(存在 $2 \mu\text{M}$ AN07)。最上面的部分表示所使用的電壓協定；箭頭處表示零電流。

第二圖(B)顯示對照組 (●) 與實驗組 (○細胞暴露於 $2 \mu\text{M}$ AN07) 中的 I_K 的平均電流(I)-電壓(V)關係； $n = 14-16$ ，每個點以平均值 \pm SEM 表示。

第二圖(C)為長條圖，顯示 AN07、AN07+9-菲酚及 AN07+柚皮素對於電流幅度的效果 (平均值 \pm SEM； $n = 11-14$)。當細胞從 -50mV 去極化至 $+50\text{mV}$ 時測量電流幅度。*代表與對照組之間差異有統計學意義，**代表與 AN07 ($2 \mu\text{M}$) 單獨組之間差異有統計學意義 ($P < 0.05$)，#代表與 AN07 ($5 \mu\text{M}$) 單獨組之間差異有統計學意義 ($P < 0.05$)。

第三圖(A)顯示 AN07 對於 13-06-MG 神經膠質瘤細胞 BK_{Ca} 通道活性的影響，左圖為對照組，右圖為 $5 \mu\text{M}$ AN07 實驗組。每張圖的下方部分顯示的是最上方的電流記錄在不同的放大時間尺度內獲得的電流記錄。向上

偏轉表示通道的開啓事件。

第三圖(B)為一曲線圖，顯示 AN07 對於 13-06-MG 神經膠質瘤細胞 BK_{Ca} 通道活性的濃度依賴效果，其中 BK_{Ca} 通道最大抑制百分比值和 IC₅₀ 值分別為 99% 和 4.6 μ M，Hill 係數為 1.05，每個點代表平均值 \pm SEM (n = 10-13)。

第四圖顯示 AN07 對於 BK_{Ca} 通道開啓可能性的影響，其中第四圖 A 為對照組，第四圖 B 為實驗組(5 μ M AN07)。在+60mV 測量的 BK_{Ca} 通道活性是從 1 分鐘的記錄中得出的。關閉狀態對應於 0 pA 處的峰。對照組及實驗組的平均電流分別為 8.75 及 8.68 pA。

第五圖(A)(B)顯示 AN07 對於 BK_{Ca} 通道的平均關閉時間的影響，其中對照組（第五圖(A)）的數據由總記錄時間 1 分鐘內的 388 次通道開啓的測量中獲得，而曝露於 5 μ M AN07 的實驗組(第五圖(B))的數據由總記錄時間 40 秒內 302 次通道開啓的測量而獲得。每個分佈圖中的虛線指出關閉狀態下的固定時間值。每個分佈圖被描繪為平方根對數圖，並且以實線顯示出指數曲線。

第五圖(C)為曲線圖，顯示對照組(實線)及 5 μ M AN07 實驗組(虛線)中時間及通道開啓可能性的關係。

第六圖(A)顯示 AN07 對於 13-06-MG 神經膠質瘤細胞 BK_{Ca} 通道的平均電流-電壓(I-V)關係的影響，圖中顯示對照組(●)及存在 5 μ M AN07 的實驗組(○)中 BK_{Ca} 通道的線性 I-V 關係 (平均值 \pm SEM；n = 12-14)。

第六圖(B)為一曲線圖，顯示 AN07 對於 BK_{Ca} 通道的相對開啓可能性與膜電位之間的關係，其中(●)為對照組而(○)為存在 5 μ M AN07 的實驗組 (平均值 \pm SEM；n = 11-14)，虛線表示 Boltzmann 函數的最佳擬合結果。

第七圖(A)顯示 AN07 對於以吡格列酮(pioglitazone)處理的 13-06-MG

膠質瘤細胞中 BK_{Ca} 通道活性的效果，圖中數據分別來自對照組 (a)、加入 $5 \mu M$ (b) 及 $20 \mu M$ AN07 的實驗組 (c)。

第七圖(B)為一長條圖，顯示不同濃度 AN07 對 13-06-MG 膠質瘤細胞中 BK_{Ca} 通道開啓可能性的影響 (平均值 \pm SEM; $n = 11$)，其中*代表與對照組比較之差異有統計學意義 ($P < 0.05$)。

第八圖(A)顯示AN07對於13-06-MG膠質瘤細胞中 IK_{Ca} 通道活性的影響，其中a~c分別為控制組、 $5 \mu M$ AN07及 $20 \mu M$ AN07的代表性的 IK_{Ca} 曲線，電流下降代表通道的開啓事件。

第八圖(B)為一長條圖，顯示AN07、AN07+TRAM-34及AN07+9-菲酚對 IK_{Ca} 通道開啓可能性的影響 (平均值 \pm SEM; $n = 13-14$)，其中TRAM組使用 $3 \mu M$ TRAM-34，9-Phen組使用 $10 \mu M$ 9-菲酚，且*代表與對照組比較之差異有統計學意義 ($P < 0.05$)。

第九圖(A)顯示AN07對於13-06-MG膠質瘤細胞中 K_{ir} 通道活性的效果，其中a~c分別為控制組、 $5 \mu M$ AN07及 $5 \mu M$ AN07+ $5 \mu M$ ML133的代表性單通道電流曲線，向下偏轉代表通道的開啓事件。

第九圖(B)為長條圖，顯示AN07、AN07+ML133及AN07+檳榔鹼對 K_{ir} 通道開啓可能性的影響 (平均值 \pm SEM; $n = 9-10$)，*代表與對照組比較之差異有統計學意義 ($P < 0.05$)。

第十圖(A)顯示AN7-13及CHA79對於13-06-MG膠質瘤細胞中 BK_{Ca} 通道開啓可能性的雙向效果，其中a~c分別為對照組、加入 $5 \mu M$ AN7-13後1分鐘及3分鐘的 BK_{Ca} 通道電流的代表性曲線，箭頭處表示零電流電平，而向上偏轉表示通道的開啓事件。

第十圖(B)及第十圖(C)為長條圖，分別顯示AN7-13及CHA79對通道開啓可能性的影響，圖中數據分別來自對照組 (a)、加入濃度為 $5 \mu M$ 的

AN7-13或CHA79後1分鐘 (b) 及3分鐘的實驗組 (c) (平均值 \pm SEM; n = 7-8), 其中*代表與對照組之差異有統計學意義 ($P < 0.05$), **代表與AN7-13或CHA79組相比之差異有統計學意義 ($P < 0.05$)。

第十一圖(A)顯示AN07對於mHippoE-14海馬迴神經元細胞BK_{Ca}通道活性的影響, 左圖為對照組, 右圖為5 μ M AN07實驗組。每張圖的下方部分顯示的是最上方的電流記錄在不同的放大時間尺度內獲得的電流記錄。向上偏轉表示通道的開啓事件。

第十一圖(B)為一長條圖, 顯示不同濃度AN07對mHippoE-14海馬迴神經元細胞中BK_{Ca}通道開啓可能性的影響, 其中*代表與對照組比較之差異有統計學意義 ($P < 0.05$)。

【實施方式】

【0012】 查耳酮 (1,3-二芳基-2-丙烯-1-酮) 是一類在植物中合成的開鏈黃酮類化合物。據報導, 查耳酮衍生物AN07 (2-羥基-4'-甲氧基查耳酮) 具有不同的生物學活性。在本發明中, 申請人研究了AN07、CHA40、AN7-13及CHA79等查耳酮衍生物(如第一圖所示)對人類神經膠質瘤細胞 (13-06-MG) 中離子電流的影響, 證明查耳酮衍生物AN07及CHA40藉由降低BK_{Ca}通道開啓的可能性來抑制BK_{Ca}通道的活性並降低I_K, AN7-13或CHA79對13-06-MG神經膠質瘤細胞中BK_{Ca}通道開啓的可能性產生雙向的刺激和抑制作用。本發明將於以下實驗例中進一步解釋與說明。

【0013】 實驗例1: AN07對於13-06-MG神經膠質瘤細胞中完整細胞K⁺電流 (I_K) 的效果

【0014】 第二圖(A)顯示AN07對於13-06-MG神經膠質瘤細胞中完整細胞K⁺電流 (I_K) 的效果, 第二圖(B)顯示第二圖A中平均電流(I)-電壓(V)

關係。利用完整細胞電流記錄來評估AN07是否可以對13-06-MG神經膠質瘤細胞中的離子電流產生影響。當細胞暴露於2 μM 的AN07時，在整個去極化電壓下電流幅度容易降低。洗掉化合物後， I_K 振幅恢復到 412 ± 31 pA ($n = 11$)。同樣地，在+40和+70 mV之間的電壓下測量的完整細胞 I_K 電導率從 13.9 ± 1.1 降低到 9.2 ± 0.8 nS ($n = 14$, $P < 0.05$)。

【0015】 第二圖(C)顯示AN07、AN07+9-菲酚及AN07+柚皮素對於電流幅度的效果。進一步評估AN07誘導的13-06-MG膠質瘤細胞中完整細胞 I_K 抑制的特性。在5 μM 的AN07持續存在下，進一步加入9-菲酚(中型傳導 Ca^{2+} 活化的 K^+ (IK_{Ca}) 通道活化劑)並未對AN07媒介的 I_K 阻斷作用產生任何作用。然而，柚皮素(大型電導 BK_{Ca} 通道的刺激劑)可逆轉AN07引起的電流幅度的降低。以上結果說明AN07誘導的完整細胞 I_K 的抑制可能主要來自其對 BK_{Ca} 通道活性的影響。

【0016】 實驗例2：AN07抑制13-06-MG神經膠質瘤細胞的 BK_{Ca} 通道活性

【0017】 利用單通道電流記錄來研究AN07是否以及如何改變這些細胞中 BK_{Ca} 通道的活性和動力學。第三圖(A)顯示AN07對於13-06-MG神經膠質瘤細胞 BK_{Ca} 通道活性的影響。在內向外配置中，當5 μM 的AN07加入水浴中時，通道活性顯著降低，結果表明AN07的存在顯著降低了通道開啓的可能性。第三圖(B)顯示AN07對於13-06-MG神經膠質瘤細胞 BK_{Ca} 通道活性的濃度依賴效果。進一步評估 BK_{Ca} 通道活性的濃度依賴性抑制。當細胞內表面暴露於AN07時， BK_{Ca} 通道開啓的可能性以濃度依賴性方式降低。AN07對通道開啓可能性的抑制作用所需的 IC_{50} 為 4.6 ± 0.4 μM ，濃度為200 μM 時抑制了這些細胞幾乎所有的通道活性。第四圖顯示AN07對於 BK_{Ca} 通道開啓可能性的影響。進一步以平均方差分析評估AN07對於單通道是否有

任何影響。儘管在這些細胞中具有降低通道開啓可能性的能力，但是無論AN07是否存在，BK_{Ca}通道的單通道振幅是相同的。

【0018】 實驗例3：AN07對於13-06-MG神經膠質瘤細胞BK_{Ca}通道動力行爲的效果

【0019】 第五圖(A)(B)顯示AN07對於BK_{Ca}通道的平均關閉時間的影響。進一步檢查和分析AN07對於BK_{Ca}通道的平均開啓及關閉時間的影響。在對照細胞中（即在不存在AN07的情況下），在兩個指數曲線中，平均關閉時間分別為 6.5 ± 0.9 及 63 ± 7 毫秒。AN07的加入可以顯著延長關閉狀態的時間至 12.2 ± 1.2 及 92 ± 8 毫秒。因此，儘管AN07不能抑制單通道振幅，但AN07對這些細胞中BK_{Ca}通道活性的抑制作用主要歸因於通道關閉時間的延長。

【0020】 第五圖(C)顯示對照組及5 μ M AN07實驗組中時間及通道開啓可能性的關係。如第五圖(C)所示，結果一致地表明，暴露於AN07期間，通道開啓可能性隨著時間明顯降低。暴露於AN07（5 μ M）後，6毫秒的通道開啓可能性從 0.0736 ± 0.0012 降低到 0.0052 ± 0.0007 （ $n = 9$ ， $P < 0.05$ ）。

【0021】 實驗例4：AN07對於13-06-MG神經膠質瘤細胞BK_{Ca}通道的單通道傳導不具效果

【0022】 第六圖(A)顯示AN07對於13-06-MG神經膠質瘤細胞BK_{Ca}通道的平均電流-電壓(I-V)關係的影響。進一步測量在+40和+130 mV之間的不同電壓下單一BK_{Ca}通道的幅度，在所檢查的整個電壓範圍內，比較AN07的添加與BK_{Ca}通道的I-V關係。在對照組中，BK_{Ca}通道的電流幅度(146 ± 3 pS ($n = 14$))與在AN07存在下測定的值(144 ± 2 pS, $n = 14$, $P > 0.05$)沒有差異。因此，從這些結果可以看出，將AN07投予細胞內表面不能改變BK_{Ca}通道的單通道電導；然而，它確實抑制13-06-MG神經膠質瘤細胞中的通道

活性。

【0023】 實驗例5：AN07誘發13-06-MG神經膠質瘤細胞BK_{Ca}通道活化曲線的偏移

【0024】 進行另一組單通道記錄，以評估AN07對BK_{Ca}通道活性的抑制作用是否存在電壓依賴性。第六圖(B)顯示AN07對於BK_{Ca}通道的相對開啓可能性與膜電位之間的關係。使用非線性回歸分析，通過玻爾茲曼方程式(Boltzmann equation)得出了添加或不添加AN07的BK_{Ca}通道的膜電位及相對開啓可能性之間的關係。在對照組中， $n_p = 0.99 \pm 0.01$ ， $V_{1/2} = +58.4 \pm 1.6$ mV， $q = 2.02 \pm 0.11$ 元素電荷(e，n = 11)，而在AN07存在下， $n_p = 0.56 \pm 0.03$ ， $V_{1/2} = +78.5 \pm 1.9$ mV， $q = 2.06 \pm 0.11e$ (n = 11)。因此，從這些結果可以看出，AN07不僅使這些通道的最大開啓可能性降低了1.8倍，而且還將活化曲線顯著地偏移到更高的膜電位(約增加20 mV)。相比之下，在該化合物的存在下，活化曲線的門控電荷幾乎沒有變化或沒有變化。結果，當細胞暴露於AN07時，活化BK_{Ca}通道所需的自由能差異顯著地從 2.72 ± 0.12 提高到 3.72 ± 0.14 Kcal (n = 11， $P < 0.05$)。

【0025】 實驗例6：AN07對於以吡格列酮(pioglitazone)處理的13-06-MG神經膠質瘤細胞中BK_{Ca}通道的效果

【0026】 已知吡格列酮為PPAR- γ 活化劑，在以吡格列酮(10 μ M)預處理的13-06-MG膠質瘤細胞中進行了一組額外的實驗。第七圖(A)顯示AN07對於以吡格列酮(pioglitazone)處理的13-06-MG膠質瘤細胞中BK_{Ca}通道活性的效果；第七圖(B)顯示不同濃度AN07對13-06-MG膠質瘤細胞中BK_{Ca}通道開啓可能性的影響。在經吡格列酮處理的13-06-MG神經膠質瘤細胞中，AN07誘導的BK_{Ca}通道活性的抑制效果保持不變。例如，由於這些細

胞培養在高 K^+ 溶液中並保持在+60mV，所以AN07(5 μ M)的添加能夠將BK $_{Ca}$ 通道活性從 0.014 ± 0.003 抑制至 0.007 ± 0.001 ($n = 11$) (約50%， $P < 0.05$)。在5 μ M AN07持續存在的情況下，隨後加入的柚皮素(10 μ M)顯著逆轉其對BK $_{Ca}$ 通道的抑制效果。因此，AN07媒介的13-06-MG神經膠質瘤細胞中BK $_{Ca}$ 通道的抑制效果不太可能歸因於其對PPAR- γ 的活化。

【0027】 實驗例7：AN07無法影響13-06-MG神經膠質瘤細胞中型傳導經 Ca^{2+} 活化的(IK $_{Ca}$)通道的活性

【0028】 膠質瘤細胞在功能上表現另一類 Ca^{2+} 活化的 K^+ 通道，即IK $_{Ca}$ 通道。因此，進行下一組實驗來評估AN07是否對13-06-MG膠質瘤細胞中這些IK $_{Ca}$ 通道的開啓有任何影響。第八圖(A)顯示AN07對於13-06-MG膠質瘤細胞中IK $_{Ca}$ 通道活性的影響，AN07(5 μ M)的添加對IK $_{Ca}$ 通道的活性影響最小(0.043 ± 0.007 [對照組])與 0.042 ± 0.007 [5 μ M AN07]， $n = 12$ ， $P > 0.05$)。然而，如第八圖(B)所示，在5 μ M AN07持續存在時，隨後添加的TRAM34(3 μ M)或9-菲酚(10 μ M)可以分別顯著降低或增加通道開啓可能性。已知TRAM-34可阻斷IK $_{Ca}$ 通道，而9-菲酚可以增強這些通道的活性。因此，與BK $_{Ca}$ 通道不同，這些細胞中IK $_{Ca}$ 通道的活性顯然抵抗了AN07造成的阻斷效果。

【0029】 實驗例8：AN07對於13-06-MG神經膠質瘤細胞內向整流 K^+ (Kir)通道不具效果

【0030】 由於另一類型的 K^+ 通道(即Kir通道)也被認為具有功能地表現在神經膠質瘤細胞中，因此本發明也調查AN07是否對這些通道的活性的產生影響。第九圖(A)顯示AN07對於13-06-MG膠質瘤細胞中Kir通道活性的效果。類似於AN07對IK $_{Ca}$ 通道的影響，實驗顯示AN07的存在無法改變這些細胞中Kir通道的活性。也就是說，Kir通道開啓的可能性在5 μ M AN07存

在和不存在時沒有顯著差異 (0.0281 ± 0.005 [對照組] 相對於 0.0028 ± 0.004 [存在 $5 \mu\text{M}$ AN07], $n = 9$, $P > 0.05$)。然而, 如第九圖(B)所示, 當AN07存在時, 進一步添加ML133 ($10 \mu\text{M}$) 或檳榔鹼 ($10 \mu\text{M}$) 顯著地抑制平均約60%的Kir通道活性。因此, 結果表明, AN07對於13-06-MG膠質瘤細胞中完整細胞 I_K 的作用主要是由於其對 BK_{Ca} 通道的抑制。

【0031】 實驗例9: 其它查耳酮衍生物對於13-06-MG神經膠質瘤細胞 BK_{Ca} 通道活性的效果

【0032】 第十圖(A)顯示AN7-13及CHA79對於13-06-MG膠質瘤細胞中 BK_{Ca} 通道開啓可能性的雙向效果; 第十圖(B)及第十圖(C)分別顯示AN7-13及CHA79對通道開啓可能性的影響。本發明也檢查並比較了其他查耳酮衍生物 (即AN7-13、CHA40和CHA79) 對 BK_{Ca} 通道活性的影響。有趣的是, AN7-13或CHA79被發現產生雙向反應, 即初始增加, 然後持續抑制 BK_{Ca} 通道活性。例如, 在細胞中加入AN7-13 ($5 \mu\text{M}$) 後1分鐘, 通道開啓的可能性顯著但短暫地由基線 0.043 ± 0.009 增加至 0.068 ± 0.011) ($n = 7$, $P < 0.05$)。然而, 加入AN7-13後3分鐘, 單一通道幅度無變化, 通道活性降低至 0.018 ± 0.006 ($n = 7$, $P < 0.05$)。在CHA79 ($5 \mu\text{M}$) 存在下得到類似的結果。另一方面, 與AN07類似, CHA40 ($5 \mu\text{M}$) 對通道開啓可能性產生相同程度的抑制作用。

【0033】 實驗例10: AN07抑制mHippoE-14海馬迴神經元細胞的 BK_{Ca} 通道活性

【0034】 第十一圖(A)顯示AN07對於mHippoE-14海馬迴神經元細胞 BK_{Ca} 通道活性的影響; 第十一圖(B)顯示不同濃度AN07對mHippoE-14海馬迴神經元細胞中 BK_{Ca} 通道開啓可能性的影響。利用單通道電流記錄來研究AN07是否以及如何改變這些細胞中 BK_{Ca} 通道的活性和動力學。在內向外配

置中，當5 μM 的AN07加入水浴中時，通道活性顯著降低，結果表明AN07的存在顯著降低了通道開啓的可能性。AN07（5 μM ）的添加能夠將BK_{Ca}通道活性從0.011抑制至0.005（約54%， $P < 0.05$ ）。

【0035】 本發明中提供查耳酮衍生物在13-06-MG神經膠質瘤細胞中之完整細胞電流記錄及單通道分析等數據，證明查耳酮衍生物AN07藉由降低BK_{Ca}通道開啓的可能性來抑制BK_{Ca}通道的活性並降低 I_K ，AN7-13或CHA79對13-06-MG神經膠質瘤細胞中BK_{Ca}通道開啓的可能性產生雙向的刺激和抑制作用。這些查耳酮衍生物對於BK_{Ca}通道的抑制作用在數分鐘內發生，代表這些查耳酮衍生物很可能與關閉的通道結合並將其阻斷、或者具有與關閉通道結合的高親和力，更凸顯本發明查耳酮衍生物在對於神經膠母細胞瘤治療上之優勢。

【0036】 由以上實驗結果可知，查耳酮衍生物AN07對於BK_{Ca}通道的抑制作用，是造成BK_{Ca}通道平均關閉時間延長的主要原因，但卻未改變BK_{Ca}通道的平均開啓時間。另一個值得注意的現象是，加入AN07後，BK_{Ca}通道的活化曲線往更多的去極化電位移動，使活化這些通道所需的自由能更高，這些結果顯示AN07對BK_{Ca}通道的抑制是電壓依賴的、並且與濃度相關。藉由本發明中查耳酮衍生物對於BK_{Ca}通道作用機制的研究，可將查耳酮衍生物作為BK_{Ca}通道阻斷劑或抑制劑，以供生技製藥產業發展其它更廣泛之用途。

【0037】 有鑑於此，本發明提供一種用於抑制一生物樣品中之一鉀離子通道(特別是BK_{Ca}通道)之活性的套組，即將本發明中之查耳酮衍生物(包括AN07、CHA40、AN7-13及CHA79)作為鉀離子通道抑制劑，搭配必要

之溶劑、稀釋劑、載劑、說明書等等，作為研究鉀離子通道之實驗試劑。在此套組中，可包括一或多種上述的查耳酮衍生物，例如單獨使用查耳酮衍生物AN07、或者使用AN07搭配AN7-13。由於本發明中之AN7-13及CHA79對BK_{Ca}通道活性產生雙向反應，使用AN07搭配AN7-13時，可藉由不同的作用機制影響BK_{Ca}通道的活性。

【0038】 由於BK_{Ca}通道表現於膠質瘤細胞(包括神經膠質瘤細胞)、海馬迴神經元細胞、運動神經元細胞、血管平滑肌細胞、心臟纖維母細胞及冠狀動脈內皮細胞，本發明之上述套組可作為上述細胞BK_{Ca}通道之實驗試劑。

【0039】 本發明亦關於一種用於抑制一生物樣品中之一鉀離子通道之活性的方法；及所揭示之式I化合物的用途。使膠質瘤細胞(包括神經膠質瘤細胞)、海馬迴神經元細胞、運動神經元細胞、血管平滑肌細胞、心臟纖維母細胞或冠狀動脈內皮細胞暴露於有效劑量的式I化合物，該式I化合物為查耳酮衍生物(AN07、CHA40、AN7-13及/或CHA79)，其可作為BK_{Ca}通道抑制劑。根據本發明實施例，查耳酮衍生物AN07、CHA40、AN7-13及/或CHA79可用於抑制BK_{Ca}通道的開啓、延長BK_{Ca}通道的關閉時間、使鉀離子電位去極化以及在開啓BK_{Ca}通道數分鐘之後關閉BK_{Ca}通道。

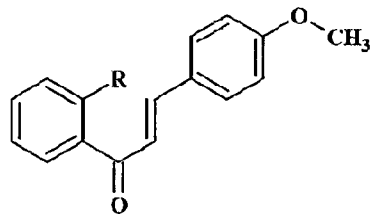
【0040】 透過本發明的方法，不僅解決了現有BK_{Ca}抑制劑難以確定安全使用劑量的問題，更因為BK_{Ca}通道是治療高血壓、尿失禁、哮喘、冠心病及缺血性腦中風等疾病的潛在藥物標靶，尋找合適的BK_{Ca}通道抑制劑將有助於治療腦部及心血管疾病藥物之研究開發。

【0041】 由於富含神經膠質瘤細胞或其他類型的腫瘤細胞的BK_{Ca}通

道中對於功能表現的任何擾動，能夠誘導細胞凋亡並干擾惡性腫瘤的侵襲或進展，因此本發明的查耳酮衍生物也可能作為減緩神經膠母細胞瘤惡化之潛在藥物。另一方面，本發明的查耳酮衍生物也適合用於治療由於鉀離子通道過度活化所引起之疾病，包括癲癇、神經痛、阿茲海默氏症等等。

【0042】實施例

1. 一種用於抑制一生物樣品中之一鉀離子通道之活性的套組，包括：一鉀離子通道抑制劑，具有式I之化合物：



(式I)，

其中R選自由OH、Cl、Br及I所組成的群組其中之一。

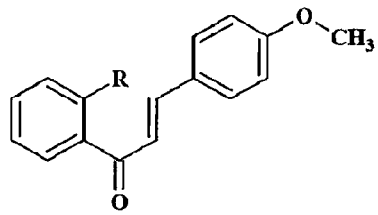
2. 如實施例1所述之套組，其中該生物樣品為一膠質瘤細胞、一海馬迴神經元細胞、一運動神經元細胞、一血管平滑肌細胞、一心臟纖維母細胞及一冠狀動脈內皮細胞其中之一，該膠質瘤細胞包括神經膠質瘤細胞。

3. 如實施例1或2所述之套組，其中該鉀離子通道為大型電導鈣離子活化鉀離子通道(large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel, BK_{Ca} channel)。

4. 如實施例1-3任一項所述之套組，其中該鉀離子通道抑制劑為一雙向調控劑。

5. 如實施例1-4任一項所述之套組，其中R為Br及I其中之一。

6. 用於抑制一生物樣品中之一鉀離子通道之活性的方法，包括：使該生物樣品暴露於有效劑量的式I化合物：



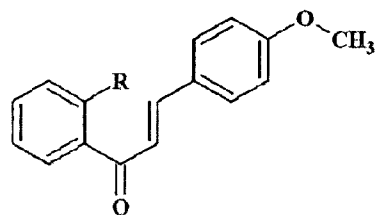
(式I)，

其中R選自由OH、Cl、Br及I所組成的群組其中之一。

7. 如實施例6所述之方法，其中該生物樣品為一膠質瘤細胞、一海馬迴神經元細胞、一運動神經元細胞、一血管平滑肌細胞、一心臟纖維母細胞及一冠狀動脈內皮細胞其中之一，該膠質瘤細胞包括神經膠質瘤細胞。

8. 如實施例6或7所述之方法，其中該鉀離子通道為大型電導鈣離子活化鉀離子通道(large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel, BK_{Ca} channel)。

9. 一種式I化合物的用途，用於抑制一生物樣品中之一鉀離子通道之活性，



(式I)，

其中R選自由OH、Cl、Br及I所組成的群組其中之一。

10. 如實施例9所述的用途，其中該式I化合物用於抑制該鉀離子通道的開啓、延長該鉀離子通道的關閉時間、使鉀離子電位去極化以及在開啓該鉀離子通道數分鐘之後關閉該鉀離子通道至少其中之一。

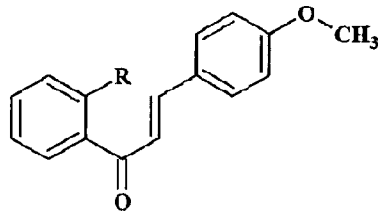
【0043】 本發明時屬難能的創新發明，深具產業價值，援依法提出申請。此外，本發明可以由本領域技術人員做任何修改，但不脫離如所附申請專利範圍所要保護的範圍。

【符號說明】

無。

申請專利範圍

1. 一種式I化合物的用途，用於製備抑制一生物樣品中之一鉀離子通道之活性之藥物，其中該生物樣品為一神經膠質瘤細胞及一海馬迴神經元細胞其中之一，且該鉀離子通道為大型電導鈣離子活化鉀離子通道 (large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel, BK_{Ca} channel)，

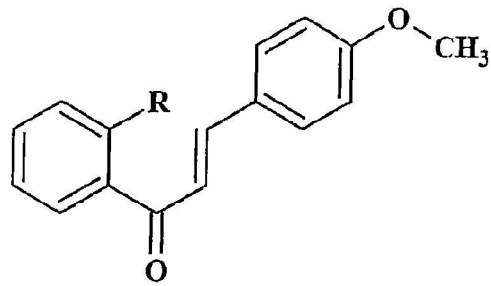


(式I)，

其中R選自由OH、Cl、Br及I所組成的群組其中之一。

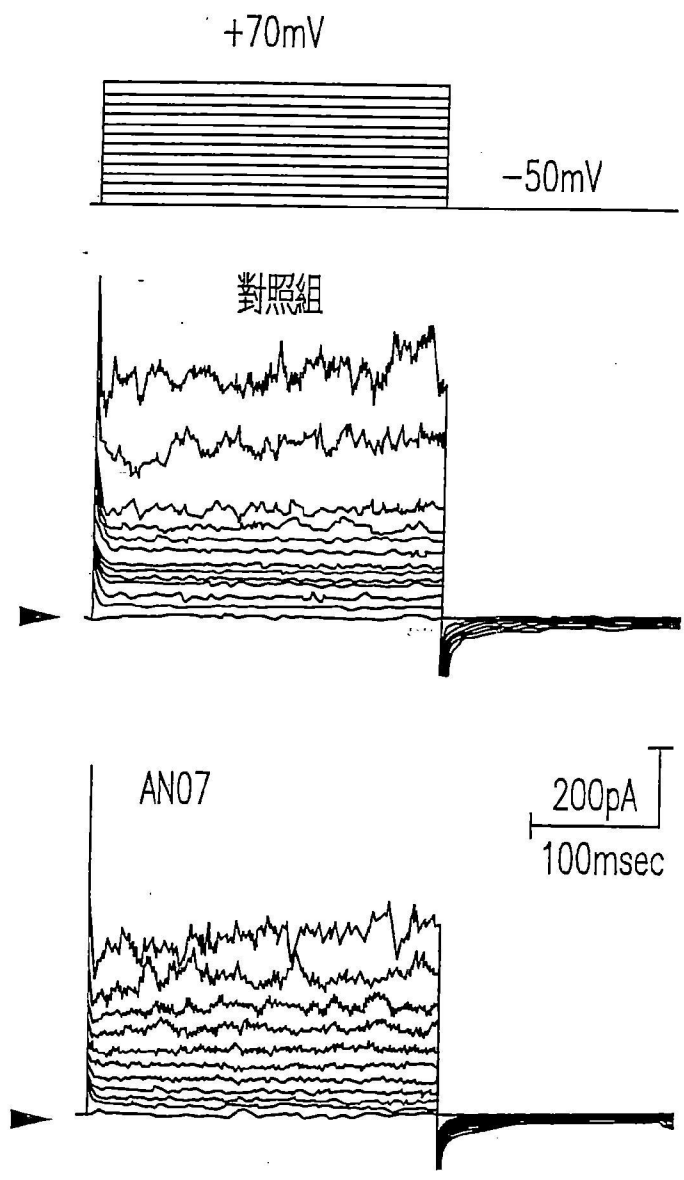
2. 如申請專利範圍第1項所述之用途，其中該式I化合物用於抑制該鉀離子通道的開啓、延長該鉀離子通道的關閉時間、使鉀離子電位去極化以及在開啓該鉀離子通道數分鐘之後關閉該鉀離子通道至少其中之一。

圖式

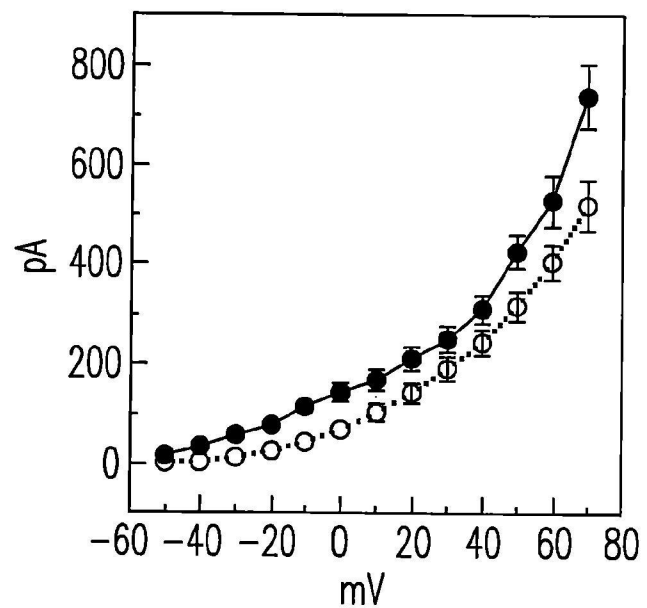


R=OH	AN07
R=Cl	CHA40
R=Br	AN7-13
R=I	CHA79

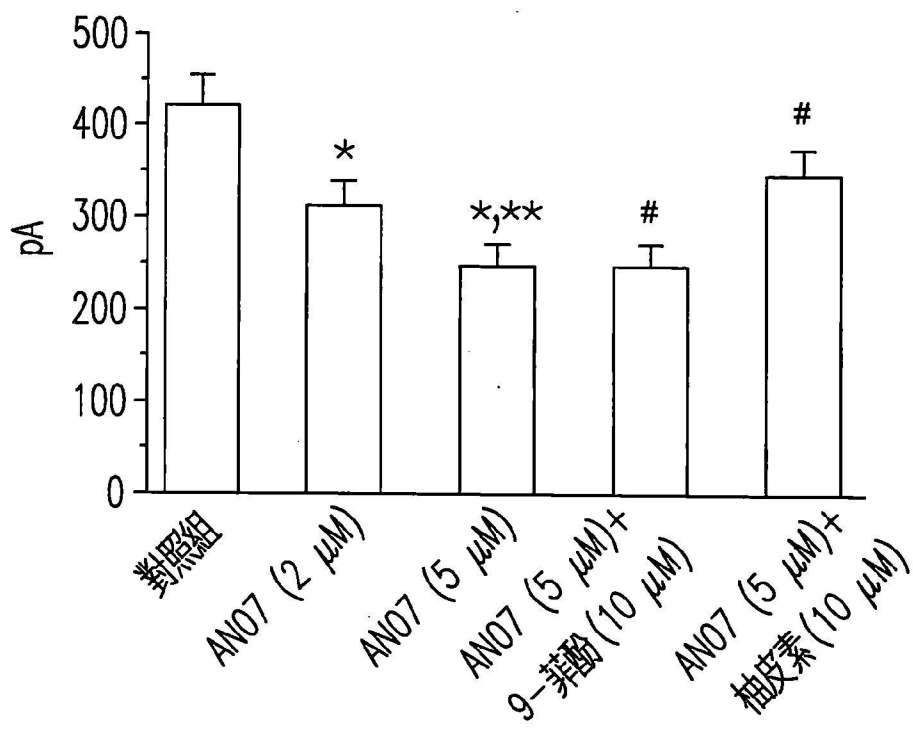
第一圖



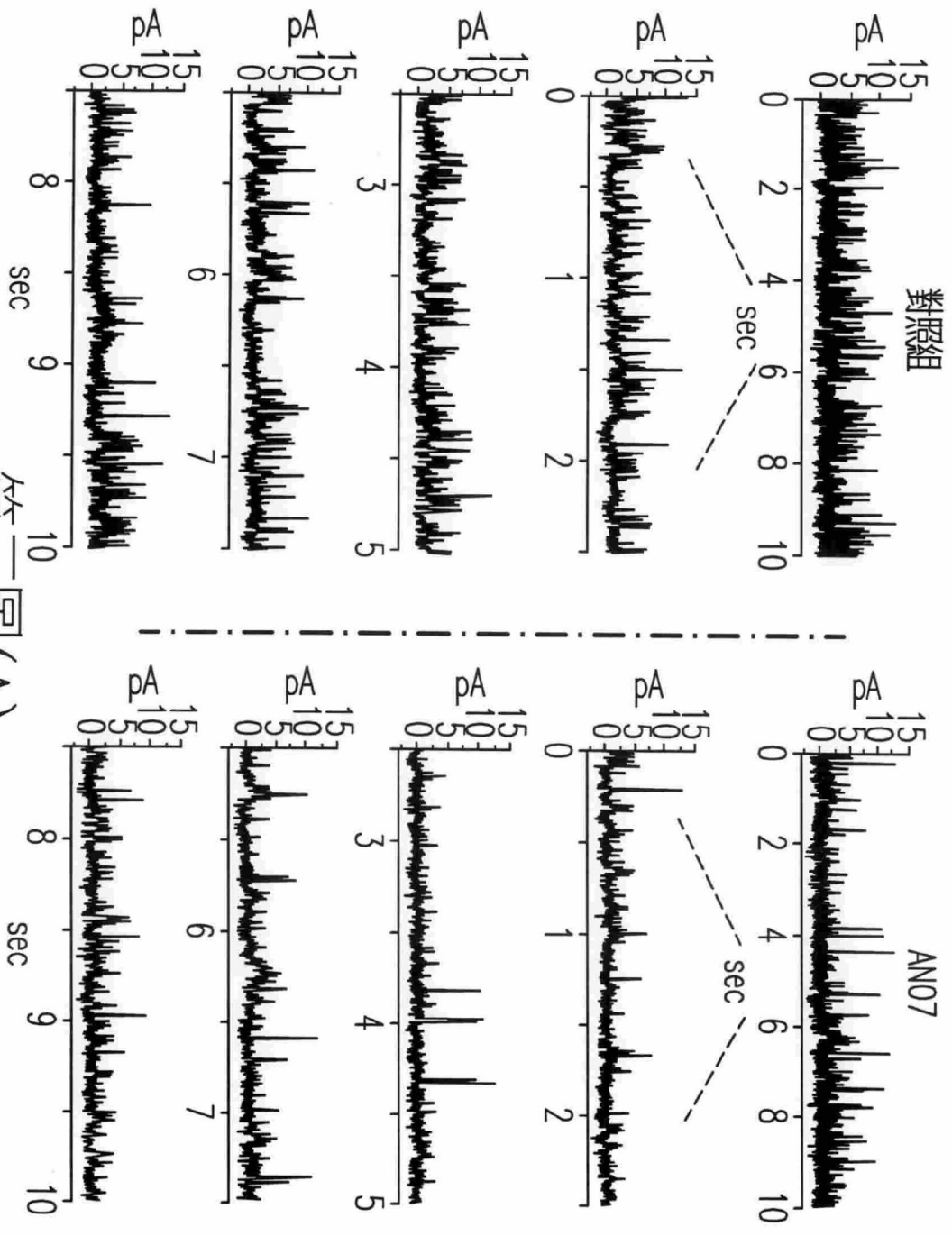
第二圖(A)



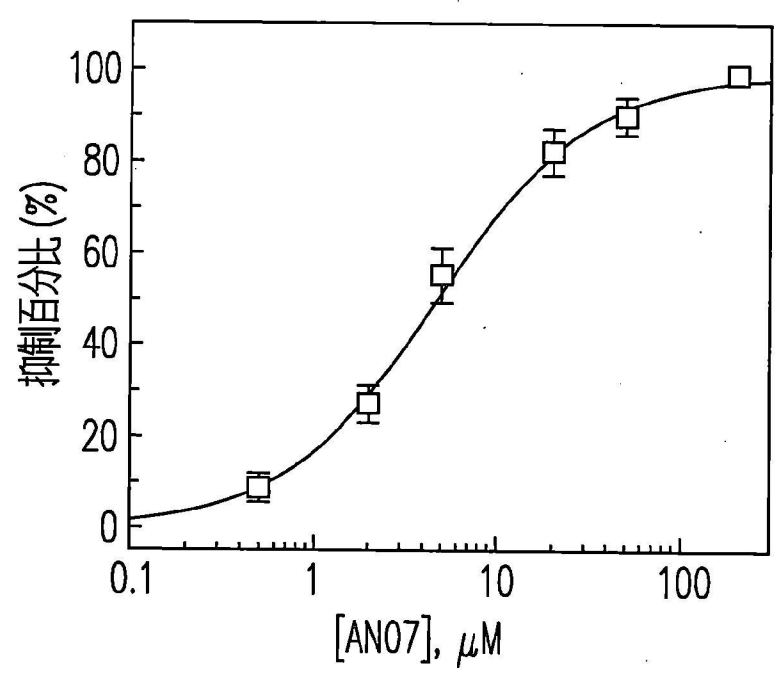
第二圖(B)



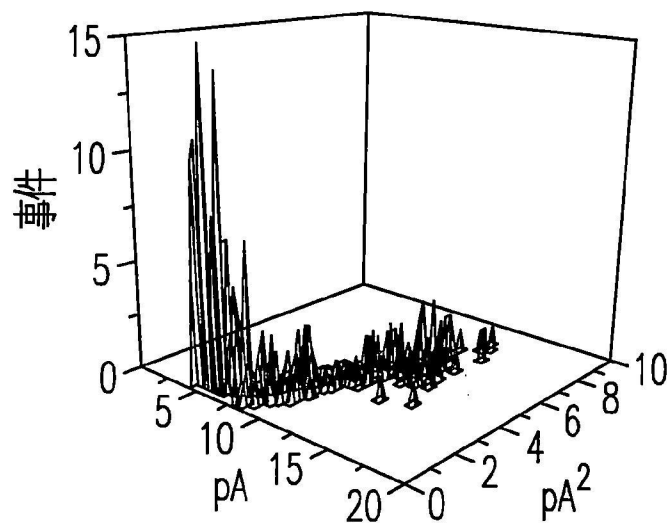
第二圖(C)



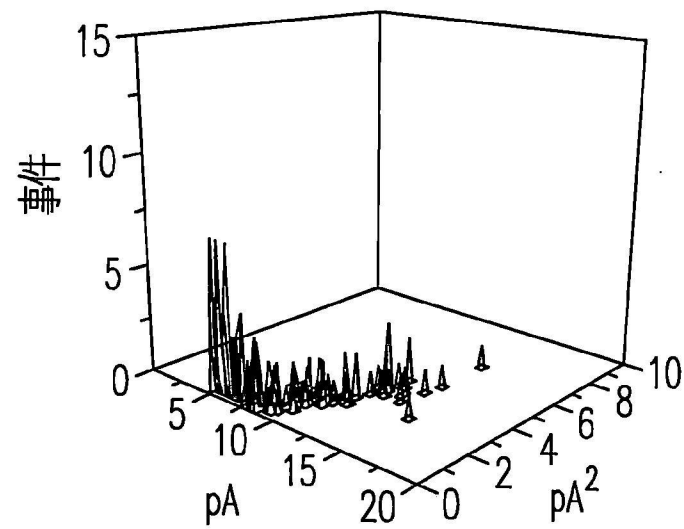
第三圖 (A)



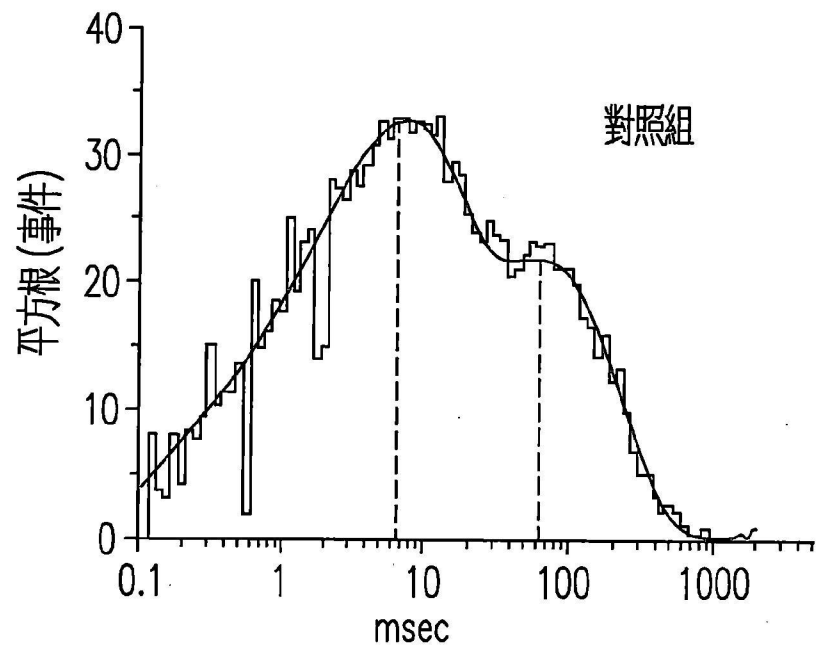
第三圖(B)



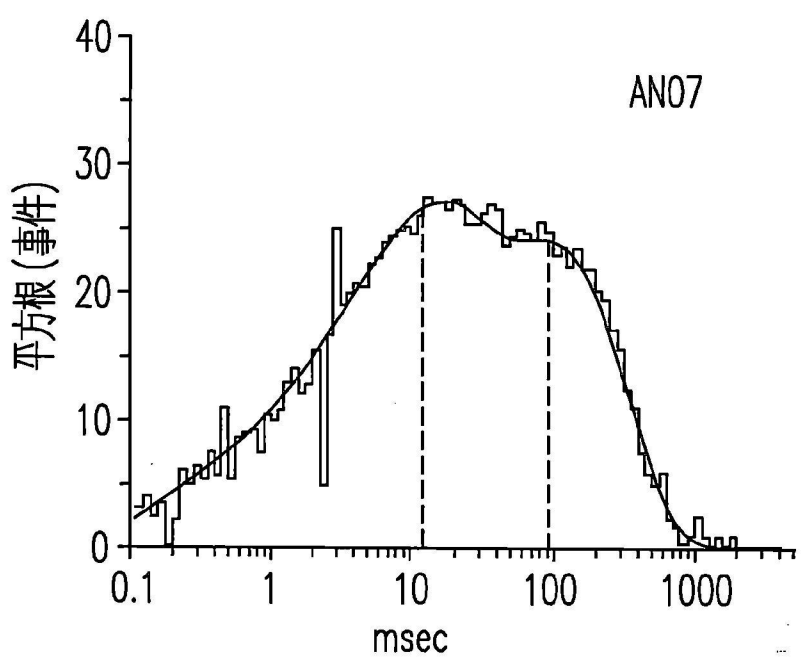
第四圖(A)



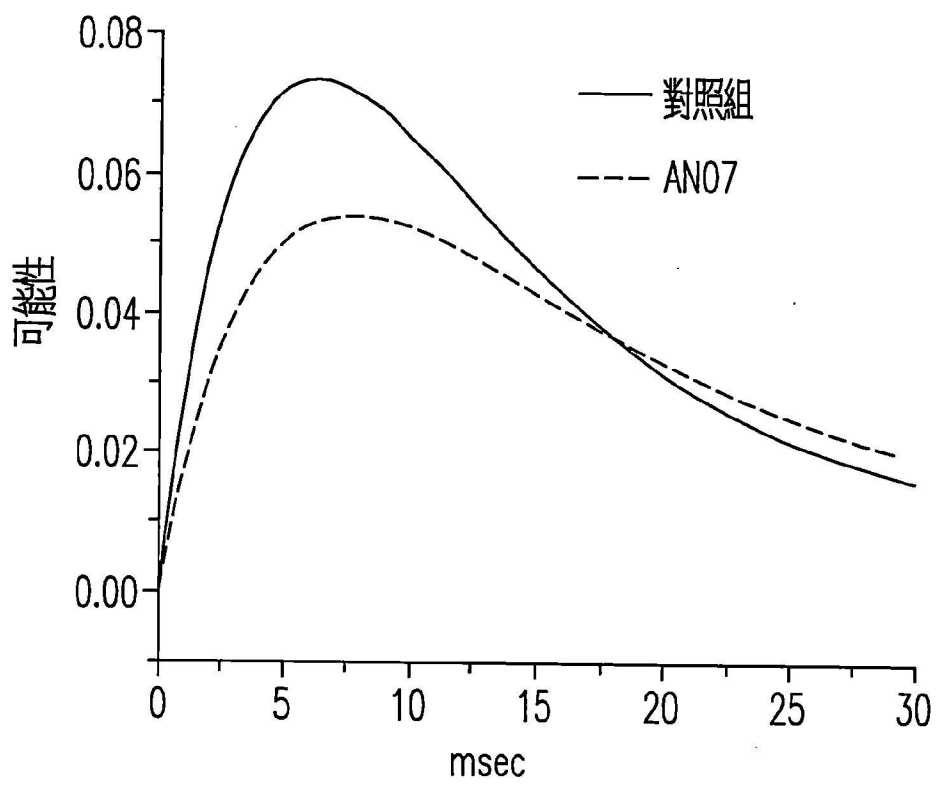
第四圖(B)



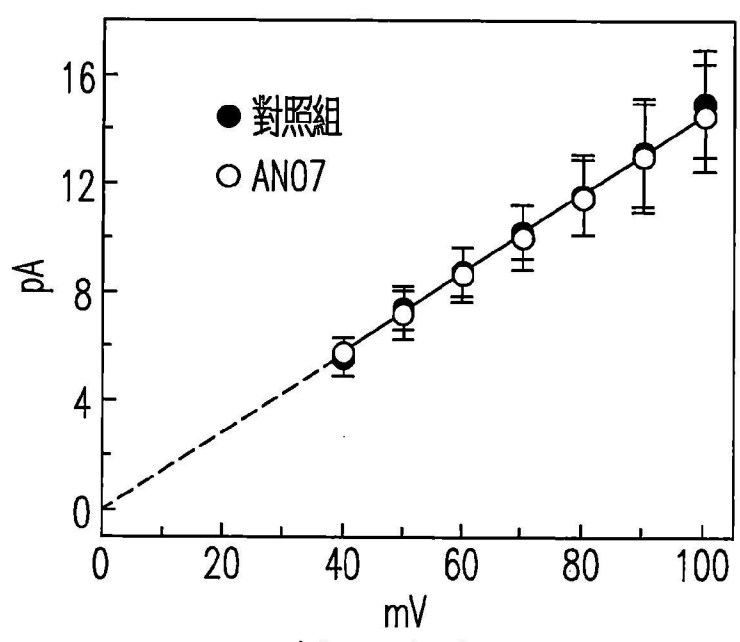
第五圖(A)



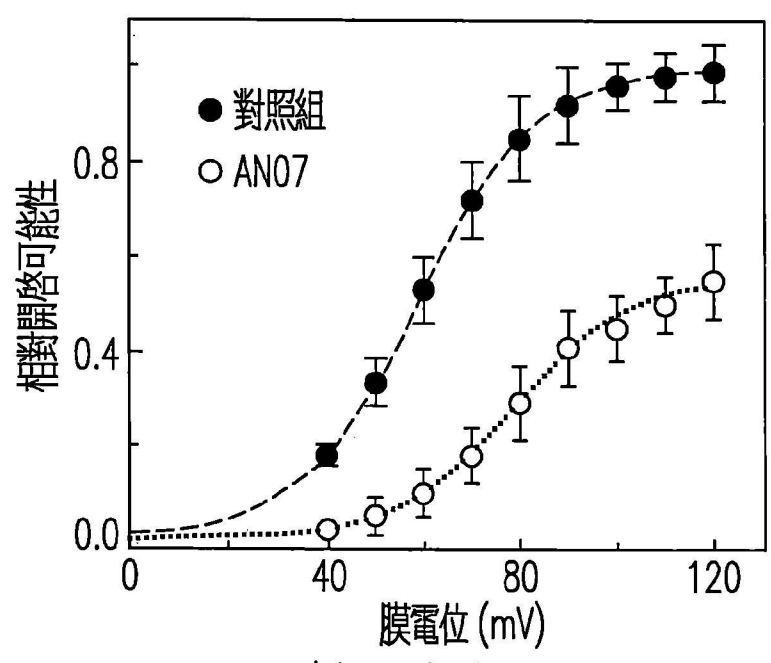
第五圖(B)



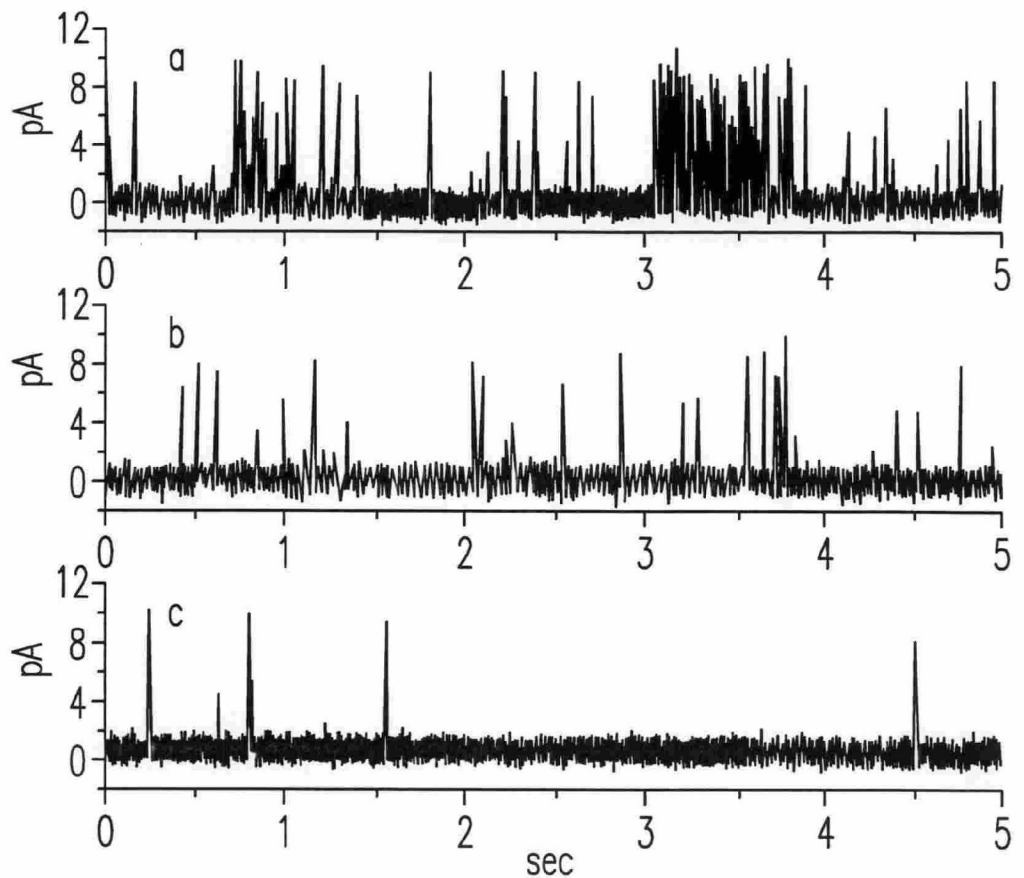
第五圖(C)



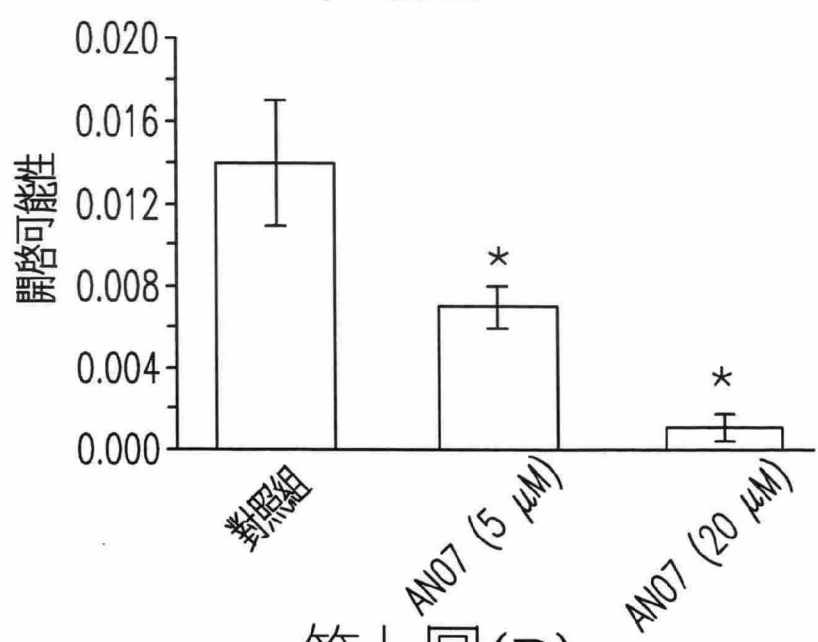
第六圖(A)



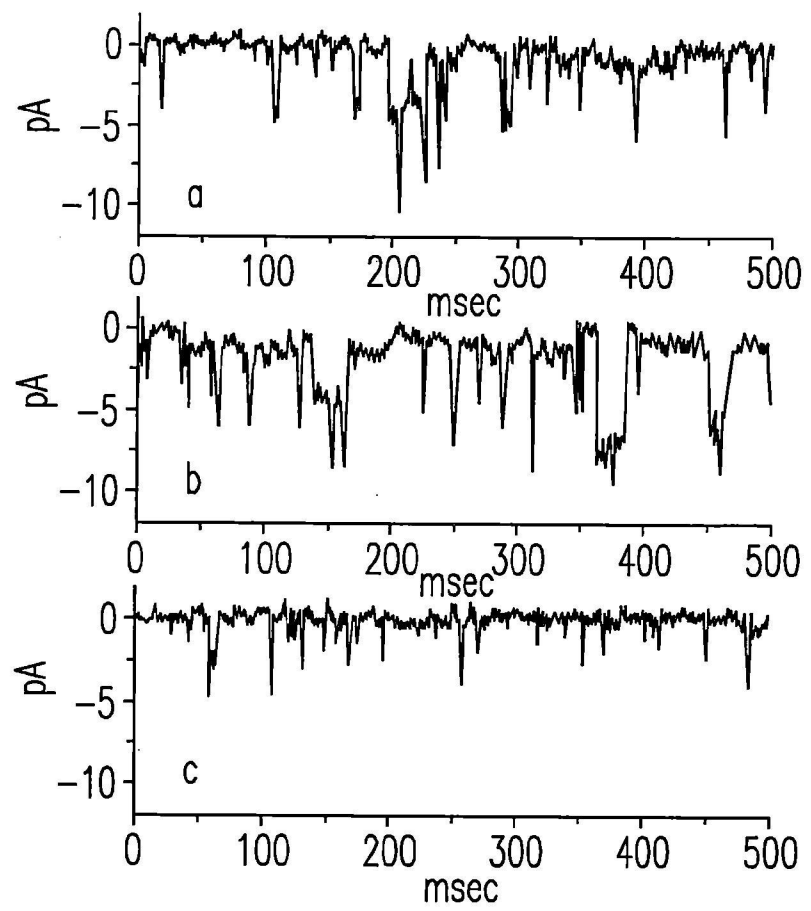
第六圖(B)



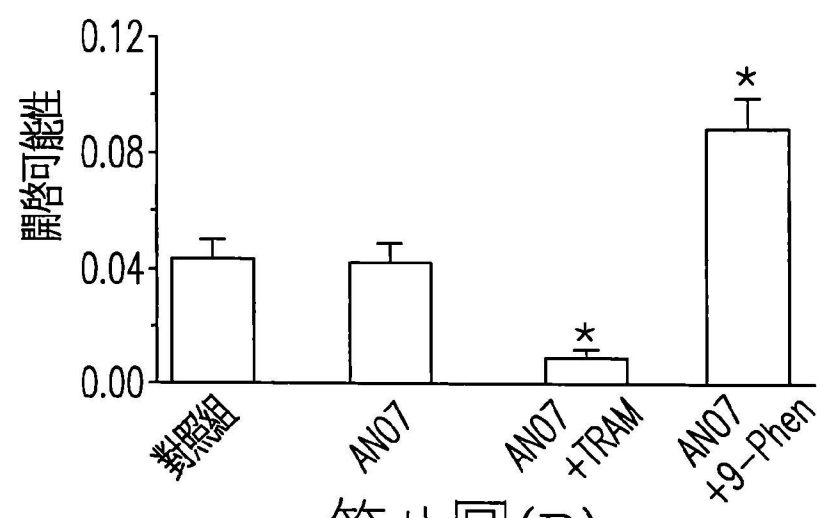
第七圖(A)



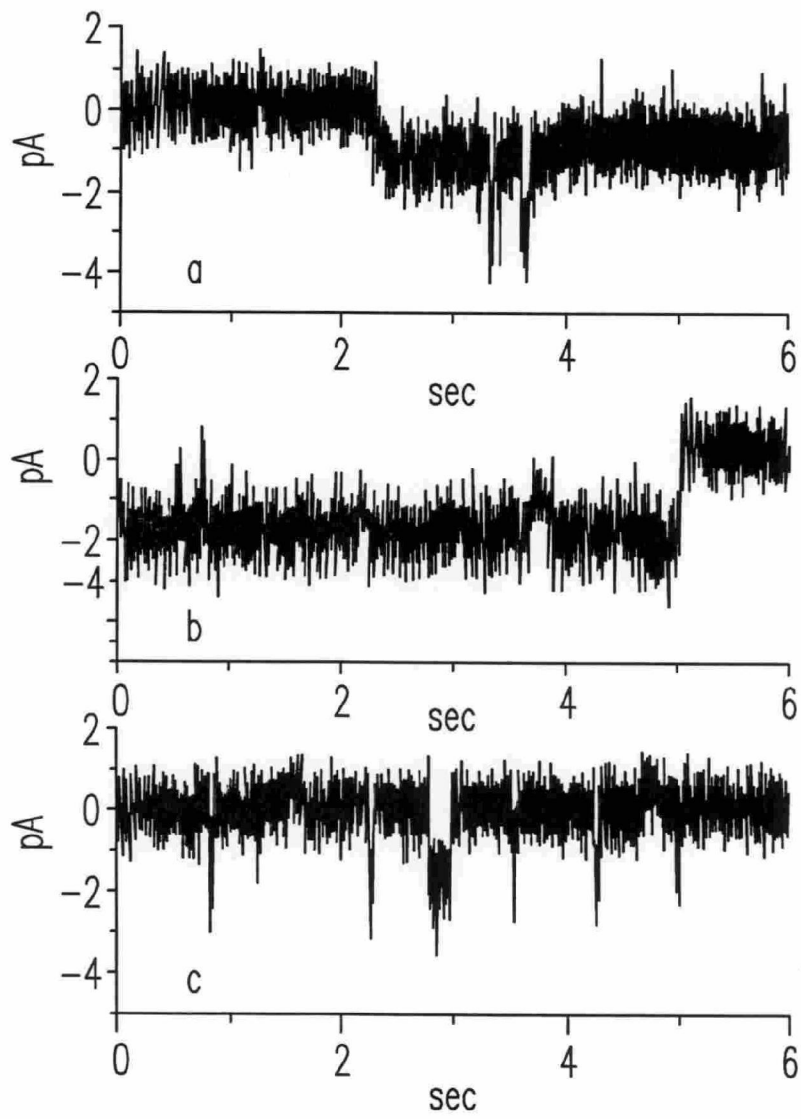
第七圖(B)



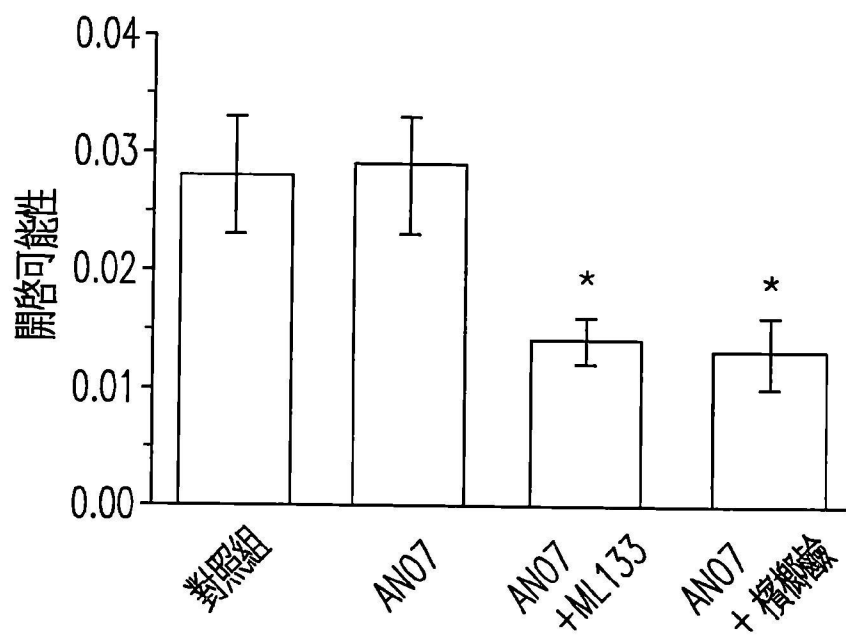
第八圖(A)



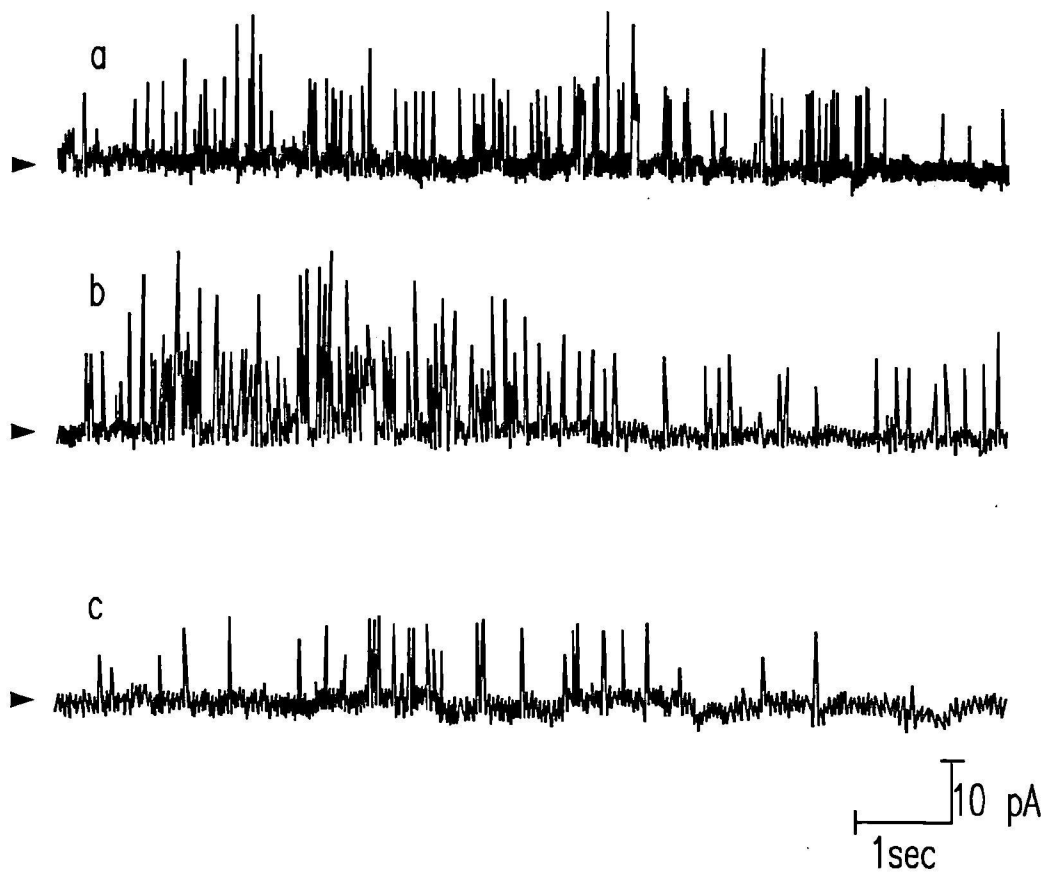
第八圖(B)



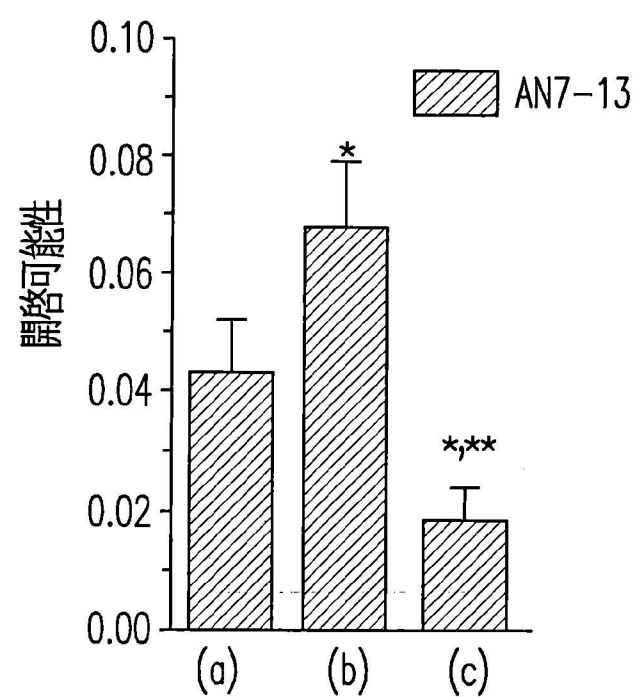
第九圖(A)



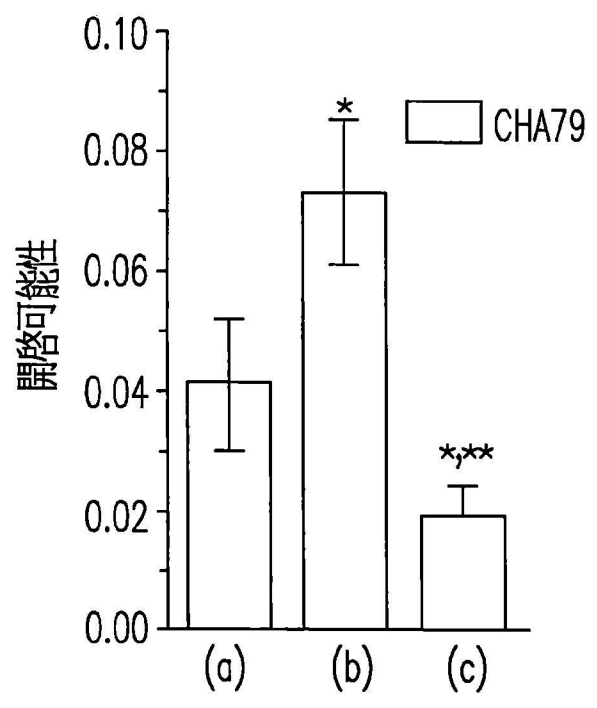
第九圖(B)



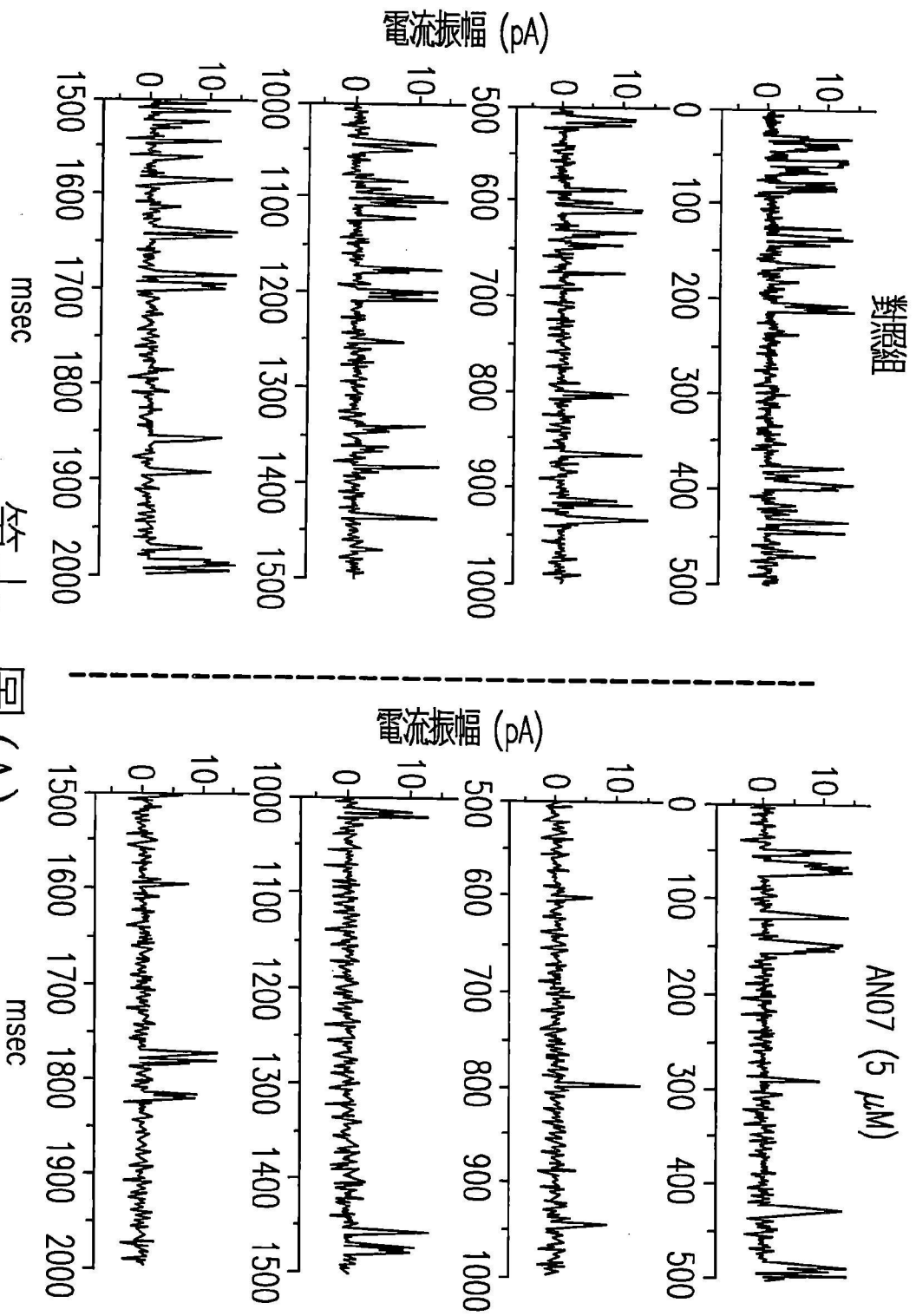
第十圖(A)



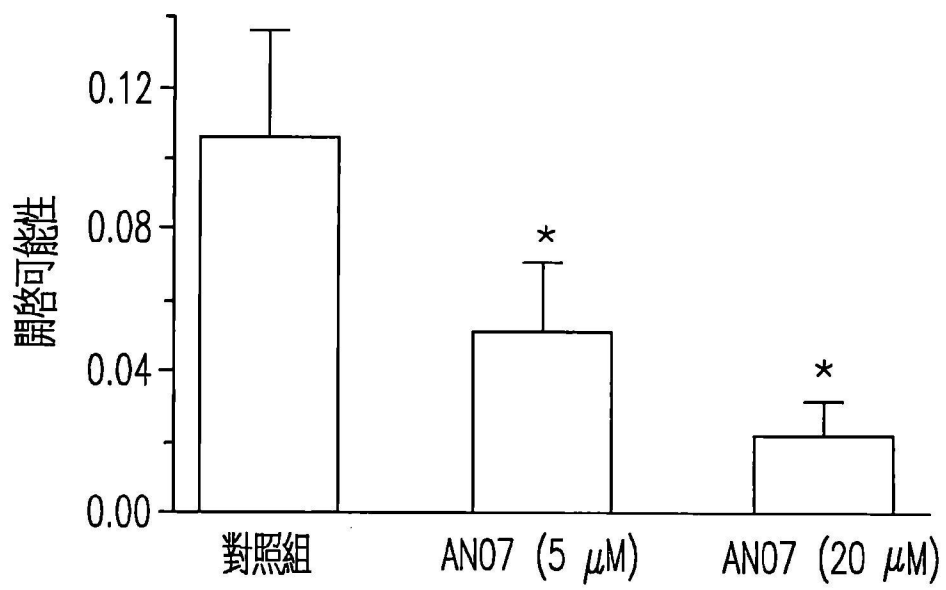
第十圖(B)



第十圖(C)



第十一圖 (A)



第十一圖 (B)