



(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 I351280B1

(45)公告日：中華民國 100 (2011) 年 11 月 01 日

(21)申請案號：098136423

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 10 月 28 日

(51)Int. Cl. : A61K31/352 (2006.01)

C07D493/02 (2006.01)

A61P31/14 (2006.01)

(30)優先權：2009/06/16

中華民國

098120040

(71)申請人：財團法人工業技術研究院(中華民國) INDUSTRIAL TECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE (TW)

新竹縣竹東鎮中興路 4 段 195 號

(72)發明人：李連滋 LEE, LAIN TZE (TW)；張秀鳳 CHANG, SHAU FENG (TW)；蔡蕙冰 TSAI, HUIPING (TW)；郭宗鏗 KUO, ZONG KENG (TW)；鍾振方 CHUNG, CHENFANG (TW)

(74)代理人：洪澄文；顏錦順

(56)參考文獻：

CN 101328202A

Yuen et al., 2006. Traditional Chinese medicine causing hepatotoxicity in patients with chronic hepatitis B infection: a 1-year prospective study. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 24(8), p1179-1186.Kim and Park, 2002. Cytotoxic anticancer candidates from natural resources. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 2(4), p485-537.Champagne et al., 1992. Biological activity of limonoids from the rutales. *Phytochemistry*, 31(2), p377-394.

申請專利範圍項數：18 項 圖式數：0 共 0 頁

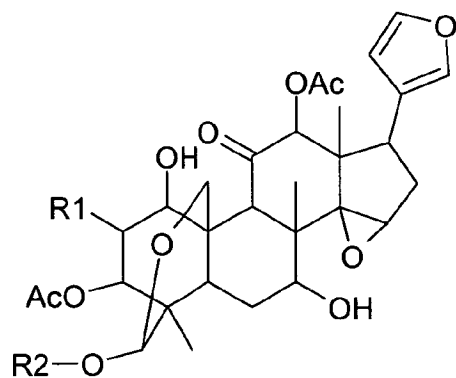
(54)名稱

抗 C 型肝炎之組合物、製備抑制 C 型肝炎病毒或治療 C 型肝炎之藥物的方法與類檸檬素化合物的用途

ANTI-HEPATITIS C COMPOSITION, METHOD FOR PREPARING A DRUG FOR INHIBITING HEPATITIS C VIRUSES OR TREATING HEPATITIS C AND USE OF A LIMONOID COMPOUND

(57)摘要

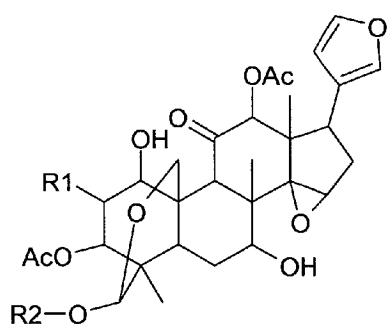
本發明提供一種抗 C 型肝炎之組合物，包括：一有效量之類檸檬素化合物，該類檸檬素化合物之分子式如式(I)所示：



式 (I)

，其中 R1 包括 H 或 OAc，而 R2 包括 H 或 $\text{COCH}(\text{CH}_3)_2$ ；以及一藥學上可接受之載體或鹽類，其中該抗 C 型肝炎之組合物用以抑制 C 型肝炎病毒或治療 C 型肝炎；本發明更包括一種製備抑制 C 型肝炎病毒或治療 C 型肝炎之藥物的方法。

The invention provides an anti-hepatitis C composition including: an effective mount of limonoid compound, wherein the structure of the limonoid compound is shown as structure (I):



structure(I)

，where R1 comprises H or OAc and R2 comprises H or $\text{COCH}(\text{CH}_3)_2$ ；and a pharmaceutically acceptable carrier or salt, wherein the anti-hepatitis C composition is used for inhibiting hepatitis C virus or treating hepatitis C; the invention also provides a method for preparing a drug for inhibiting hepatitis C viruses or treating hepatitis C.

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種抗 C 型肝炎之組合物，且特別關於一種包括一類檸檬素化合物之組合物，其可用以抑制 C 型肝炎病毒或治療 C 型肝炎。

【先前技術】

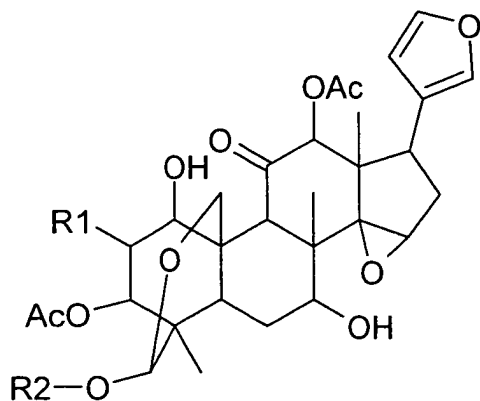
全世界有 2-3%（約三億人）人口感染 C 型肝炎，且每年以新增 300-400 萬例患者的速度蔓延。目前唯一被證實且核准之抗 C 型肝炎病毒藥物為甲型（阿爾發）干擾素 (α -Interferon)，而雷巴威林(ribavirin) 則是被證實且核准其有加強甲型干擾素之抗 C 型肝炎病毒療效。然而，二者皆會產生嚴重的副作用，且多有產生抗藥性的現象。

類檸檬素化合物的基本結構是三個六元環加上一個五元環，再用單鍵連接呋喃環(furan ring)所組成。主要存在於芸香科(Rutaceae)及楝科(Meliaceae)植物中。類檸檬素化合物中之川楝素(toosendanin)可由川楝(*Melia toosendan* Sieb. Et Zucc.)中分離出來，而川楝素(toosendanin)主要作為天然殺蟲劑，且目前也已知川楝素可誘導血癌細胞細胞凋亡(apoptosis)。另，也可由川楝子萃取出川楝素，而川楝子為川楝之乾燥成熟的果實，其可作為驅除蛔蟲與蟯蟲之中草藥。

然而目前仍未明確得知類檸檬素化合物是否能有效抑制 C 型肝炎。

【發明內容】

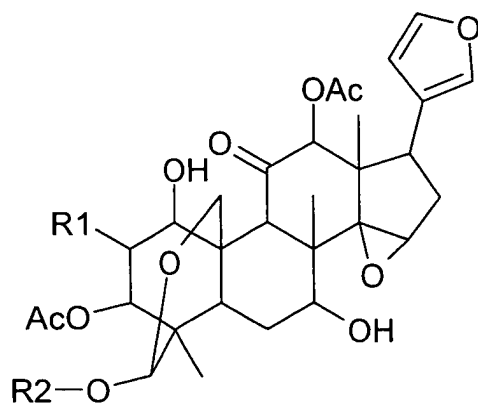
本發明提供一種抗 C 型肝炎之組合物，包括：一有效量之類檸檬素化合物，該類檸檬素化合物之分子式如式(I)所示：



式(I)

，其中 R1 包括 H 或 OAc，而 R2 包括 H 或 $\text{COCH}(\text{CH}_3)_2$ ；以及一藥學上可接受之鹽類或載體，其中該抗 C 型肝炎之組合物用以抑制 C 型肝炎病毒。

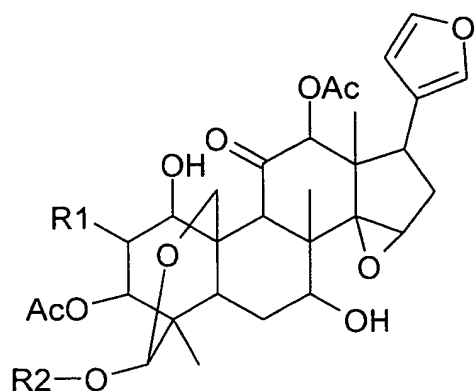
本發明也提供一種製備抑制 C 型肝炎病毒或治療 C 型肝炎之藥物的方法，其係使用一有效量之類檸檬素化合物做為該抑制 C 型肝炎病毒或治療 C 型肝炎之藥物之活性成分，該類檸檬素化合物之分子式如式(I)所示：



式(I)

，其中 R1 包括 H 或 OAc，而 R2 包括 H 或 $\text{COCH}(\text{CH}_3)_2$ 。

本發明另提供一種類檸檬素化合物在製備用於抑制 C 型肝炎病毒或治療 C 型肝炎之藥物的用途，該類檸檬素化合物之分子式如式(I)所示：



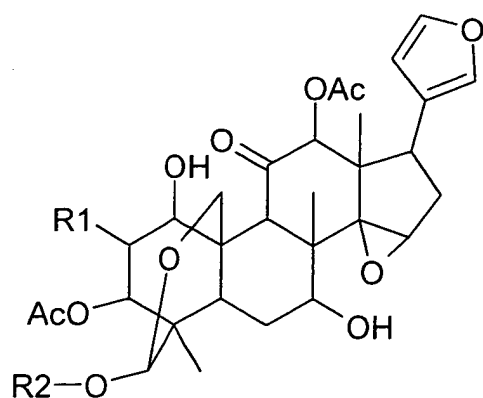
式(I)

，其中 R1 包括 H 或 OAc，而 R2 包括 H 或 $\text{COCH}(\text{CH}_3)_2$ 。

為了讓本發明之上述和其他目的、特徵、和優點能更明顯易懂，下文特舉較佳實施例，並配合所附圖示，作詳細說明如下：

【實施方式】

本發明係以含類檸檬素化合物之組合物做為抗 C 型肝炎之藥物，其可用以抑制 C 型肝炎病毒或治療 C 型肝炎。在一實施例中，上述組合物可包括一有效量之類檸檬素化合物與一藥學上可接受之載體或鹽類，其中類檸檬素化合物之分子式如式(I)所示：

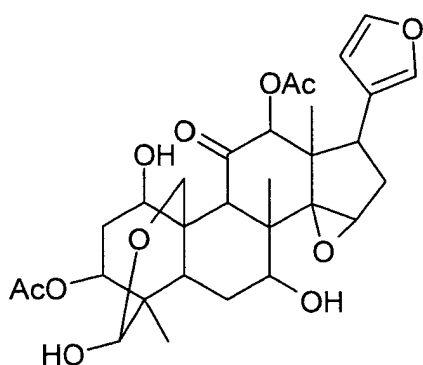


式(I)

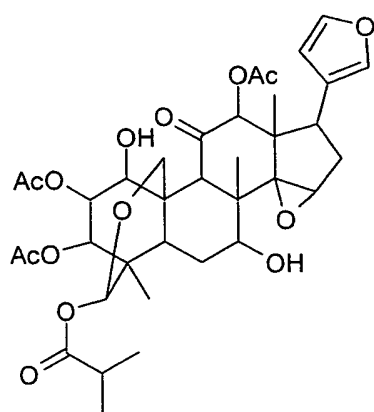
，且其中 R1 可包括 H 或 OAc，而 R2 可包括 H 或 $\text{COCH}(\text{CH}_3)_2$ 。

又上述之類檸檬素化合物可萃取自一植物材料，植物材料可包括川楝(*Melia toosendan* Sieb. Et Zucc.)或苦楝(*Melia azedarach* Linn.)。

而上述類檸檬素化合物可包括川楝素(toosendanin)或四降三萜 H(Trichilin H)。川楝素與四降三萜 H 之分子式分別如式(II)與式(III)與所示：



式(II)



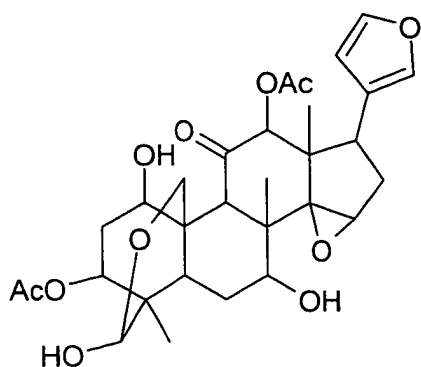
式(III)。

C 型肝炎病毒細胞複製系統(HCV replicon system)已為 C 型肝炎研究領域中目前週知且所公認接受並使用之新藥篩選研究的方法(V. Lohmann et al., 1999, *Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in hepatoma cell line*, Science. Vol. 285, 110-113 ; R. Bartenschlager, 2002, *Hepatitis C virus replicons: potential role for drug development*, Nature Reviews/Drug Discovery. Vol. 1, 911-916 ; J. M. Vorlijk et al., 2003, *A replicon-based bioassay for the measurement of interferons in patients with chronic hepatitis C*, Journal of Virological Methods. 110:201-209) 。 Huh-luc/neo-ET 細胞為帶有 I389luc-ubi-NS3-3'/ET 構築基因(gene construct)的 C 型肝炎病毒細胞複製系統。此 C 型肝炎病毒細胞複製系統可藉由 C 型肝炎病毒的內部核糖體進入位點(internal ribosome entry site, IRES)轉譯而表現螢火蟲冷光酵素(firefly luciferase)-泛素(ubiquitin)-新黴素磷酸轉移酶(neomycin phosphotransferase)之聚合蛋白質，以及藉由腦心肌炎病毒(Encephalomyocarditis virus, EMCV)的內部核糖體進入位點轉譯而表現 C 型肝炎病毒非結構性蛋白質(NS3-5B)包含蛋

白酶(protease)、解旋酶(helicase)及聚合酶(polymerase)多蛋白。當 C 型肝炎病毒的內部核糖體進入位點或 C 型肝炎病毒非結構性蛋白質組成之複製複合體(replication complex)受到測試化合物影響時，螢火蟲冷光酵素活性也會改變。因此，本發明類檸檬素化合物抑制 C 型肝炎病毒之功效可藉由在類檸檬素化合物存在下，Huh-luc/neo-ET 細胞表現螢火蟲冷光酵素活性之強度來測定。

上述類檸檬素化合物於 Huh-luc/neo-ET 細胞中，對 50% C 型肝炎病毒複製之抑制濃度(IC_{50})至少小於約 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ，較佳為約 0.045 $\mu\text{g/ml}$ 。又類檸檬素化合物對 50% 細胞之致死濃度(CC_{50})與對 50% C 型肝炎病毒複製之抑制濃度(IC_{50})的比值至少大於約 100，較佳為大於約 2500。

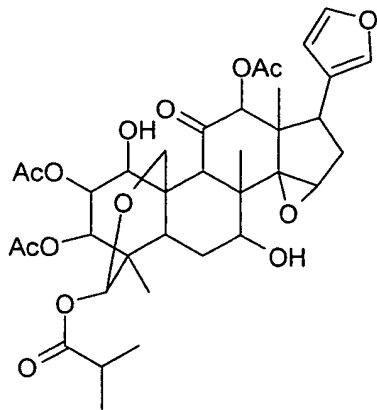
在一實施例中，上述類檸檬素化合物可包括川楝素，其分子式如式(II)所示：



式(II)。

而川楝素可萃取自一植物材料，植物材料可包括川楝或苦楝。而川楝素於 Huh-luc/neo-ET 細胞中，對 50% C 型肝炎病毒複製之抑制濃度(IC_{50})至少小於約 0.05 $\mu\text{g/ml}$ ，又川楝素對 50% 細胞之致死濃度(CC_{50})與對 50% C 型肝炎病毒複製之抑制濃度(IC_{50})的比值至少大於約 2500。

在另一實施例中，上述類檸檬素化合物可包括四降三萜 H，其分子式如式(III)所示：



式(III)。

而四降三萜 H 可萃取自一植物材料，植物材料可包括川棟或苦棟。而四降三萜 H 於 Huh-luc/neo-ET 細胞中，對 50% C 型肝炎病毒複製之抑制濃度(IC_{50})至少小於約 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ，又四降三萜 H 對 50%細胞之致死濃度(CC_{50})與對 50% C 型肝炎病毒複製之抑制濃度(IC_{50})的比值至少大於約 100。

而前述藥學上可接受之載體可包括，但不限於溶劑、分散媒(dispersion medium)、套膜(coating)、抗菌與抗真菌試劑與一等滲透壓與吸收延遲(absorption delaying)試劑等與藥學投予相容者。對於不同的給藥方式，可利用一般方法將藥學組合物配置成劑型(dosage form)。

前述藥學上可接受之鹽類可包括，但不限於鹽類包括無機陽離子，例如，鹼金屬鹽類，如鈉、鉀或胺鹽，鹼土金屬鹽類，如鎂、鈣鹽，含二價或四價陽離子之鹽類，如鋅、鋁或銦鹽。此外，也可是為有機鹽類，如二環己胺鹽類、甲基-D-葡萄糖胺，胺基酸鹽類，如精胺酸、離胺酸、

組織胺酸、麩胺酸鹽胺。

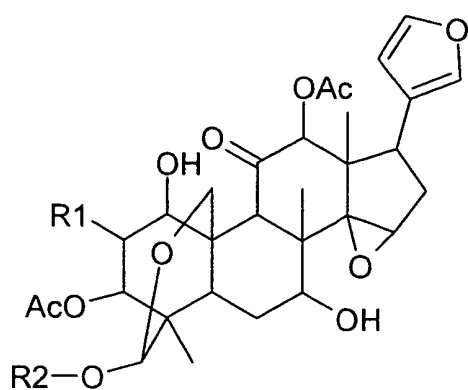
組合物之給藥可以口服、非口服、經由吸入噴霧 (inhalation spray) 或藉由植入貯存器 (implanted reservoir) 的方式。非口服可包括 (subcutaneous)、皮內 (intracutaneous) 靜脈內 (intravenous)、肌肉內 (intramuscular)、關節內 (intraarticular) 動脈 (intraarterial)、滑囊 (腔) 內 (intrasynovial)、胸骨內 (intrasternal) 蜘蛛膜下腔 (intrathecal)、疾病部位內 (intraleaional) 注射以及灌注技術。

口服成分的形式可包括，但不限定於，藥錠、膠囊、乳劑 (emulsions)、水性懸浮液 (aqueous suspensions)、分散液 (dispersions) 與溶液。

於本發明中，亦可包括一種抑制 C 型肝炎病毒或治療 C 型肝炎的方法。此抑制 C 型肝炎病毒或治療 C 型肝炎的方法包括對於一需要之病患投予一有效量之抗 C 型肝炎組合物，而此抗 C 型肝炎組合物包括上述之類檸檬素化合物與一藥學上可接受之載體或鹽類。而適合之載體或鹽類如上所述。

在另一方面，本發明還可提供一製備抑制 C 型肝炎病毒或治療 C 型肝炎之藥物的方法。

而於此方法中，係使用一有效量之類檸檬素化合物作為抑制 C 型肝炎病毒或治療 C 型肝炎之藥物的活性成分。類檸檬素化合物之分子式如式(I)所示：

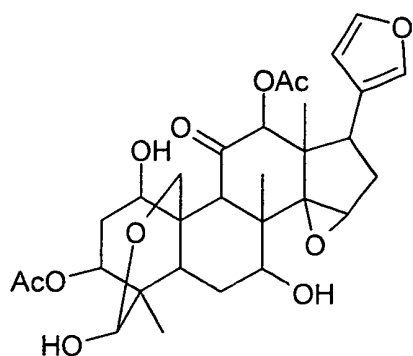


式(I)

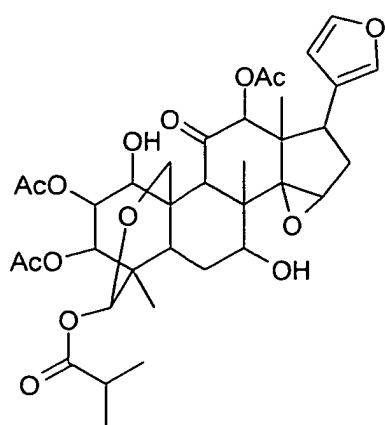
，且其中 R1 可包括 H 或 OAc，而 R2 可包括 H 或 $\text{COCH}(\text{CH}_3)_2$ 。而經 C 型肝炎病毒細胞複製系統測試顯示，類檸檬素化合物於 Huh-luc/neo-ET 細胞中，對 50% C 型肝炎病毒複製之抑制濃度(IC_{50})至少小於約 $0.5 \mu\text{g/ml}$ ，較佳為約 $0.045 \mu\text{g/ml}$ 。又類檸檬素化合物對 50%細胞之致死濃度(CC_{50})與對 50% C 型肝炎病毒複製之抑制濃度(IC_{50})的比值至少大於約 100，較佳為大於約 2500。

上述之類檸檬素化合物可萃取自一植物材料，植物材料可包括川楝或苦楝。

又，上述類檸檬素化合物可包括川楝素或四降三萜 H。川楝素與四降三萜 H 之分子式分別如式(II)與式(III)與所示：

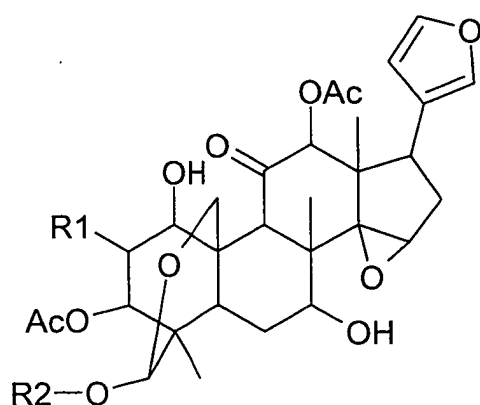


式(II)



式(III)。

此外，又在另一方面，本發明更可提供一種類檸檬素化合物在製備用於抑制 C 型肝炎病毒或治療 C 型肝炎之藥物的用途。上述類檸檬素化合物之分子式如式(I)所示：



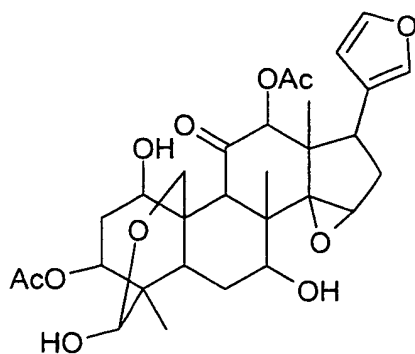
式(I)

，且其中 R1 可包括 H 或 OAc，而 R2 可包括 H 或 $\text{COCH}(\text{CH}_3)_2$ 。經 C 型肝炎病毒細胞複製系統測試顯示，上述類檸檬素化合物於 Huh-luc/neo-ET 細胞中，對 50% C 型肝炎病毒複製之抑制濃度(IC_{50})至少小於約 $0.5 \mu\text{g/ml}$ ，較佳為約 $0.045 \mu\text{g/ml}$ 。又類檸檬素化合物對 50%細胞之致死濃度(CC_{50})與對 50% C 型肝炎病毒複製之抑制濃度(IC_{50})的比值至少大於約 100，較佳為大於約 2500。

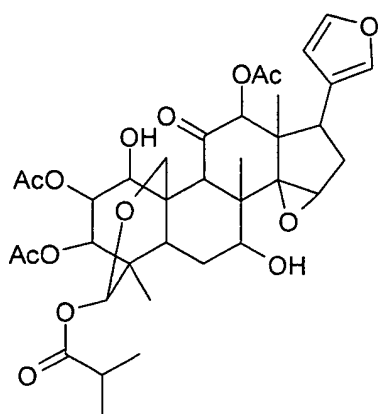
而，上述之類檸檬素化合物可萃取自一植物材料，植

物材料可包括川楝或苦楝。

另外，上述類檸檬素化合物可包括川楝素或四降三萜 H。川楝素與四降三萜 H 之分子式分別如式(II)與式(III)與所示：



式(II)



式(III)。

【實施例】

實施例 1

自植物材料萃取抑制 C 型肝炎病毒之有效成分

取 5.96 g 之川楝子酒精萃取物溶於甲醇與水之混合溶劑 20 毫升中，並分別用正己烷、乙醚、二氯甲烷與乙酸乙酯各 15 毫升萃取 2-3 次，以分別獲得正己烷層萃取液、乙醚層萃取液、二氯甲烷層萃取液與乙酸乙酯層萃取液。將

各層萃取液分別濃縮乾燥後分別獲得正己烷層分萃物、乙醚層分萃物、二氯甲烷層分萃物與乙酸乙酯層分萃物，將其分別以 Huh-luc/neo-ET 細胞 (C 型肝炎病毒細胞複製系統) 來測試其抑制 C 型肝炎病毒之活性。

結果顯示所得乙醚層分萃物 (1.113 g)，具抑制 C 型肝炎病毒複製之活性，其對 50% C 型肝炎病毒複製之抑制濃度 (IC_{50}) 為 $0.68 \pm 0.11 \mu\text{g/ml}$ 。

取 1.1g 之乙醚層分萃物，以開放式層析管柱 (充填 33 克矽膠， $2.2 \times 25.3\text{cm}$)，並以不同混合比例之正己烷與丙酮做為移動相來進行分離，將乙醚層粗分為許多片段，經由活性測試選定活性成分之區段，再以逆相半製備型層析管柱，以水與乙腈為移動相分離出兩化合物。之後對此兩化合物進行光譜與質譜分析。

第一化合物之光譜分析結果顯示：

$^1\text{H NMR}$ (500MHz, CD_3OD): 7.39 (s, 1H); 7.19 (s, 1H); 6.16 (s, 1H); 5.34 (s, 1H); 5.20 (s, 1H); 4.71 – 4.24 (m, 5H); 3.80 (s, 1H); 3.58–3.31 (m, 1H); 2.90 – 2.54 (m, 4H); 2.19–1.89 (m, 8H); 1.37–1.33 (3H); 1.14–1.11 (3H); 0.84 (s, 3H)。

第一化合物之質譜分析結果顯示：

LC-MS/MS: 621 $[\text{M}+2\times\text{Na}]^+$; 598 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 558 $[\text{M}-\text{O}]^+$, 498 $[\text{M}-\text{O}-\text{OAc}]^+$; 438 $[\text{M}-\text{O}-2\times\text{OAc}]^+$ 。

因此確認第一化合物為川棟素 (toosendanin)。

而第二化合物之光譜分析結果顯示：

¹HNMR(500MHz, CD₃OD): 7.40 (s, 1H); 7.20(s, 1H); 6.16(s, 1H); 5.77(s, 1H); 5.47(s, 1H); 5.37(s, 1H); 5.34(s, 1H); 4.52(s, 1H); 4.53 – 4.31(m, 2H); 3.82 (s, 1H); 3.578 (m, 1H); 2.96-2.87 (m, 2H); 2.48 -2.50(m, 1H); 2.20(m, 2H); 2.08(sm, 2H); 1.99 (s,3H); 1.93 (s,3H); 1.90 (s,3H); 1.34-1.29(3H); 1.17-1.13(m,3H); 0.95–0.88(m,6H); 0.83(s, 3H)。

第二化合物之質譜分析結果顯示：

LC-MS/MS : 749[M+2×Na]⁺ ; 726[M+Na]⁺ ; 635[M-furan]⁺ ; 616[635-COCH(CH₃)₂]⁺ ; 558[616-OAc]⁺。

因此確認第二化合物為四降三萜 H(Trichilin H)。

實施例 2

1. 川楝素對 Huh-luc/neo-ET 細胞之毒性測試

將 Huh-luc/neo-ET 細胞以密度 2.5×10^4 個細胞/100 μ l/孔接種於 96 孔細胞培養盤(Corning Incorporation COSTAR, 3599)中，置於細胞培養箱(NUAIR nu-5510)進行培養。

隔天將川楝素樣品以 DMEM 培養液分別稀釋成濃度為 28.73 μ g/ml、9.57 μ g/ml、3.19 μ g/ml、1.06 μ g/ml、0.35 μ g/ml、0.11 μ g/ml、0.039 μ g/ml 與 0.013 μ g/ml，或者稀釋為 114.92 μ g/ml、38.33 μ g/ml、12.77 μ g/ml、4.25 μ g/ml、1.42 μ g/ml、0.46 μ g/ml、0.16 μ g/ml 與 0.057 μ g/ml 等不同稀釋濃度之川楝素培養液，並將 96 孔盤中原始培養液以真空幫浦(DOAT-704AA)吸除，過程中須注意不可吸到細胞。

再將上述濃度之川楝素培養液以 100 μl /孔的量分別加入上述含有細胞之 96 孔細胞培養盤做為實驗組，而對照組則為細胞加入未經任何處理之培養液。

培養二天後將培養液移除，再以 100 μl 之 1x PBS (1 mM KH_2PO_4 , 10 mM Na_2HPO_4 , 137 mM NaCl , 2.7 mM KCl) 清洗兩次，觀察是否有樣品沈澱並記錄之。之後移除 PBS，每孔加入含有 0.5 mg/ml MTT (Sigma, M2128) 的培養液 50 μl ，置於二氧化碳細胞培養箱中培養 1 小時後，加入 150 μl 之 DMSO (Riedel-de Haën, 60153)，以搖擺震盪器 (KS shaker Type 670) 將紫色沉澱搖勻後以連續波長微孔盤分析系統 (Molecular Devices, SPECTRAMAX 190) 中，測細胞量於 560 nm 波長的吸光值。

以對照組之平均吸光值代表 100% 之細胞的存活率 (%)，來計算加入各種不同濃度之樣品之實驗組細胞的存活率 (%)。細胞存活率計算公式為：(實驗組吸光值/對照組吸光值) $\times 100\%$ 。以各實驗組之樣品濃度對細胞存活率作 xy 散佈圖，可求得 R^2 值超過 0.9 之趨勢線公式。

以 $y = 50$ 代入此公式所產生之 x 即為造成 50% 細胞死亡的樣品濃度 (CC_{50})，或以 $y = 85$ 代入此公式所產生之 x 即為造成 15% 細胞死亡的樣品濃度 (CC_{15})。因樣品特性，僅利用樣品濃度為 3.19 $\mu\text{g/ml}$ 、1.06 $\mu\text{g/ml}$ 、0.35 $\mu\text{g/ml}$ 、0.11 $\mu\text{g/ml}$ 與 0.039 $\mu\text{g/ml}$ 之實驗組所產生之趨勢線公式計算 CC_{15} 值。結果如表 1 所示。川楝素對 50% 細胞之致死濃度 (CC_{50}) 大於 114.8 $\mu\text{g/ml}$ ，對 15% 細胞之致死濃度 (CC_{15}) 為 0.34 $\mu\text{g/ml}$ 。

細胞的存活率達 85%以上時視為該樣品於此濃度下 (CC_{15} 值以下的濃度) 對細胞無毒性。選擇無毒性之濃度進行 Huh-luc/neo-ET 細胞之螢火蟲冷光活性測試 (詳述如下)。

2. 測試螢火蟲冷光活性以評估川楝素抑制 C 型肝炎病毒複製之效果

Huh-luc/neo-ET 細胞以 2.5×10^4 個細胞/100 μ l/孔的密度接種於 96 孔細胞培養板(Corning Incorporation COSTAR, 3599)中, 分別與濃度為 0.15 μ g/ml、0.075 μ g/ml、0.038 μ g/ml、0.019 μ g/ml 與 0.0085 μ g/ml 之川楝素共培養後兩天。之後以 100 μ l 之 1 $\times$ PBS(1 mM KH_2PO_4 , 10 mM Na_2HPO_4 , 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl)清洗兩次後吸除 PBS。加入 35 μ l 之 1 $\times$ 被動細胞分解緩衝溶液(passive lysis buffer)(Promega, E1941)後以搖擺震盪器(KS shaker Type 670)震盪 10 分鐘後將細胞均勻打散。

吸取 30 μ l 的細胞液至測螢火蟲冷光用之 96 孔白盤(NUNC, 236108), 再依序分別加入 40 μ l 之冷光分析緩衝液(21.5 mM $MgCl_2$, 3.7 mM ATP, 0.1 M KH_2PO_4)以及 20 μ l 之冷光受質(1 mM D-Luciferin), 並在加入受質後立即以微盤冷光儀(Berthold, MPL4)測量其冷光的活性(Rlu/s)。

以對照組的冷光活性為標準來計算各樣品實驗組的抑制 C 型肝炎病毒效率(inhibition rate(%))。抑制率(inhibition rate)(%)的計算公式為: $\{[(\text{對照組冷光活性}) - (\text{實驗組冷光活性})] / (\text{對照組冷光活性})\} \times 100\%$ 。在樣品經過連續稀

釋並測定其於不同濃度時的抑制 C 型肝炎病毒複製效率後，以 grafit5 軟體(Erithacus Software)計算出樣品抑制 50% 病毒複製效率時的樣品濃度(IC₅₀)。

每次實驗時，除使用 0.5 ng/ml 與 0.1 ng/ml 的 PEG IFN alpha-2a 作為 IC₅₀ 的正對照組(positive control)，同時也使用 1 µg/ml 的環孢素 A(cyclosporin A, CsA)作為 IC₅₀ 的正對照組(positive control)。

結果顯示於表 1。川棟素對 50% C 型肝炎病毒複製之抑制濃度(IC₅₀)為 0.045±0.004 µg/ml，另外亦計算出川棟素對 90% C 型肝炎病毒複製之抑制濃度(IC₉₀)為 0.35 µg/ml。

實施例 3

1. 四降三萜 H 對 Huh-luc/neo-ET 細胞之毒性測試

實驗步驟同實施例 2，測試樣品以四降三萜 H 取代。其中四降三萜 H 樣品以 DMEM 培養液分別稀釋成濃度為 50 µg/ml、25 µg/ml、8.33 µg/ml、2.78 µg/ml、0.93 µg/ml、0.31 µg/ml、0.1 µg/ml 與 0.03 µg/ml 之四降三萜 H 培養液。

結果如表 1 所示。四降三萜 H 對細胞之 50%致死濃度(CC₅₀)大於 50 µg/ml，15%致死濃度(CC₁₅)為 0.7 µg/ml。

2. 測試螢火蟲冷光活性以評估四降三萜 H 抑制 C 型肝炎病毒複製之效果

實驗步驟同實施例 2，測試樣品以四降三萜 H 取代。Huh-luc/neo-ET 細胞分別與濃度為 0.75 µg/ml、0.5 µg/ml、

0.25 $\mu\text{g/ml}$ 與 0.125 $\mu\text{g/ml}$ 四降三萜 H 共培養。

結果顯示於表 1。四降三萜 H 對 50% C 型肝炎病毒複製之抑制濃度(IC_{50})為 $0.48 \pm 0.10 \mu\text{g/ml}$ ，對 90% C 型肝炎病毒複製之抑制濃度(IC_{90})為 0.9 $\mu\text{g/ml}$ 。

表 1、測試樣品之細胞毒性與抑制 C 肝病毒複製效率

樣本	CC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	CC_{15} ($\mu\text{g/ml}$)	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	IC_{90} ($\mu\text{g/ml}$)	EW ($\text{CC}_{50}/\text{IC}_{50}$)
川棟素	>114	0.34	0.045 ± 0.004	0.35	>2531.6
四降三萜 H	>50	0.7	0.48 ± 0.10	0.9	>104.2

CC_{50} ：50%細胞死亡之藥物濃度。

CC_{15} ：15%細胞死亡之藥物濃度。

IC_{50} ：抑制 50%細胞內 C 肝病毒複製之藥物濃度。

IC_{90} ：抑制 90%細胞內 C 肝病毒複製之藥物濃度。

有效係數(EW)：50%細胞死亡之藥物濃度/抑制 50%細胞內 C 肝病毒複製之藥物濃度。

雖然本發明已以較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作些許之更動與潤飾，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

【圖式簡單說明】

無。

【主要元件符號說明】

無。

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：98136423

A61K31/352 (2006.01)

※申請日：98.10.28

※IPC 分類：C07D 493/02 (2006.01)

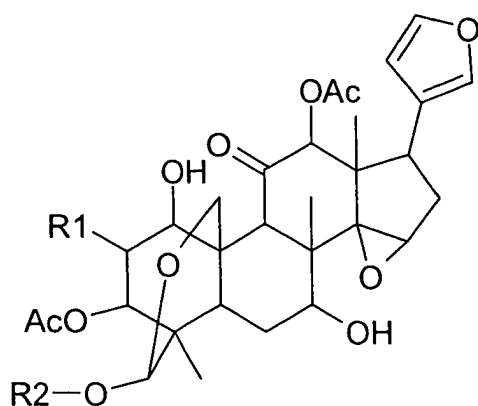
一、發明名稱：(中文/英文)

A61P31/14 (2006.01)

抗 C 型肝炎之組合物、製備抑制 C 型肝炎病毒或治療 C 型肝炎之藥物的方法與類檸檬素化合物的用途 /
 Anti-hepatitis C composition, method for preparing a drug for inhibiting hepatitis C viruses or treating hepatitis C and use of a limonoid compound

二、中文發明摘要：

本發明提供一種抗 C 型肝炎之組合物，包括：一有效量之類檸檬素化合物，該類檸檬素化合物之分子式如式(I)所示：



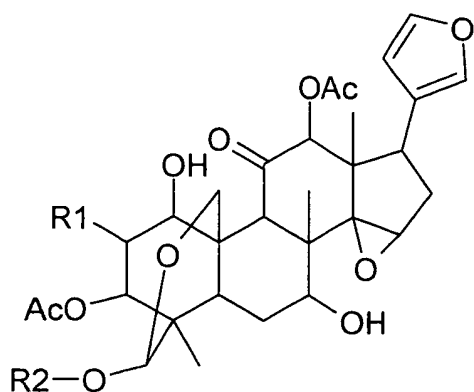
式(I)

，其中 R1 包括 H 或 OAc，而 R2 包括 H 或 $\text{COCH}(\text{CH}_3)_2$ ；以及一藥學上可接受之載體或鹽類，其中該抗 C 型肝炎之組合物用以抑制 C 型肝炎病毒或治療 C 型肝

炎；本發明更包括一種製備抑制 C 型肝炎病毒或治療 C 型肝炎之藥物的方法。

三、英文發明摘要：

The invention provides an anti-hepatitis C composition including: an effective amount of limonoid compound, wherein the structure of the limonoid compound is shown as structure (I):



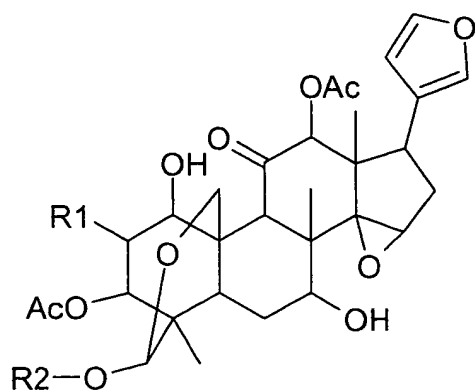
structure(I)

, where R1 comprises H or OAc and R2 comprises H or $\text{COCH}(\text{CH}_3)_2$; and a pharmaceutically acceptable carrier or salt, wherein the anti-hepatitis C composition is used for inhibiting hepatitis C virus or treating hepatitis C; the invention also provides a method for preparing a drug for inhibiting hepatitis C viruses or treating hepatitis C.

七、申請專利範圍：

1.一種抗 C 型肝炎之組合物，包括：

一有效量之類檸檬素化合物，該類檸檬素化合物之分子式如式(I)所示：



式(I)

，其中 R1 包括 H 或 OAc，而 R2 包括 H 或 $\text{COCH}(\text{CH}_3)_2$ ；以及

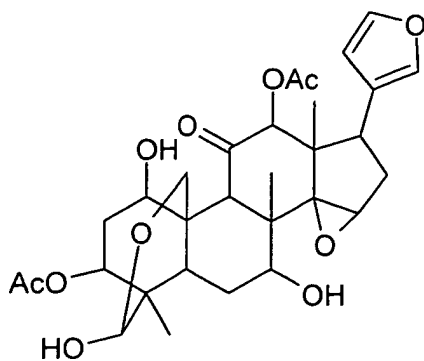
一藥學上可接受之載體或鹽類，

其中該抗 C 型肝炎之組合物用以抑制 C 型肝炎病毒或治療 C 型肝炎。

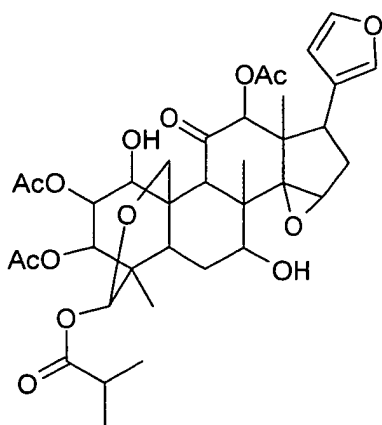
2.如申請專利範圍第 1 項所述之抗 C 型肝炎之組合物，其中該類檸檬素化合物係萃取自一植物材料。

3.如申請專利範圍第 2 項所述之抗 C 型肝炎之組合物，其中該植物材料包括川楝或苦楝。

4.如申請專利範圍第 1 項所述之抗 C 型肝炎之組合物，其中該類檸檬素化合物包括川楝素(toosendanin)或四降三萜 H(Trichilin H)，而該川楝素與四降三萜 H 之分子式分別如式(II)與式(III)所示：

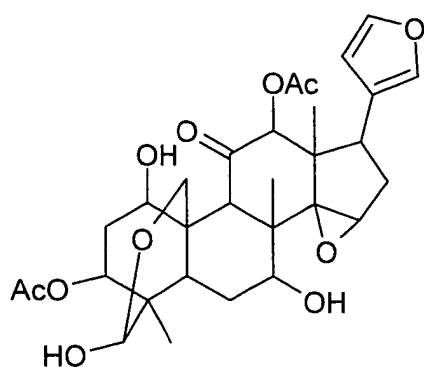


式(II)



式(III)。

5.如申請專利範圍第 1 項所述之抗 C 型肝炎之組合物，其中該類檸檬素化合物包括川楝素，而該川楝素分子式如式(II)所示：

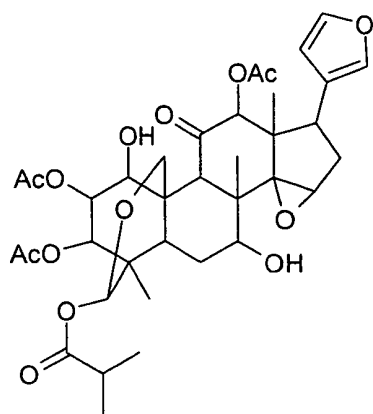


式(II)。

6.如申請專利範圍第 5 項所述之抗 C 型肝炎之組合物，其中該川楝素係萃取自一植物材料。

7.如申請專利範圍第 6 項所述之抗 C 型肝炎之組合物，其中該植物材料包括川楝或苦楝。

8.如申請專利範圍第 1 項所述之抗 C 型肝炎之組合物，其中該類檸檬素化合物包括四降三萜 H，而該四降三萜 H 之分子式如式(III)所示：

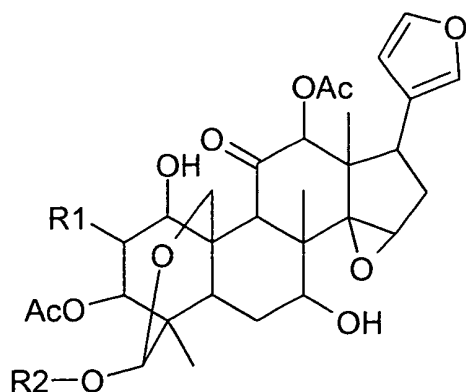


式(III)。

9.如申請專利範圍第 8 項所述之抗 C 型肝炎之組合物，其中該四降三萜 H 係萃取自一植物材料。

10.如申請專利範圍第 9 項所述之抗 C 型肝炎之組合物，其中該植物材料包括川棟或苦楝。

11.一種製備抑制 C 型肝炎病毒或治療 C 型肝炎之藥物的方法，其係使用一有效量之類檸檬素化合物做為該抑制 C 型肝炎病毒或治療 C 型肝炎之藥物之活性成分，該類檸檬素化合物之分子式如式(I)所示：



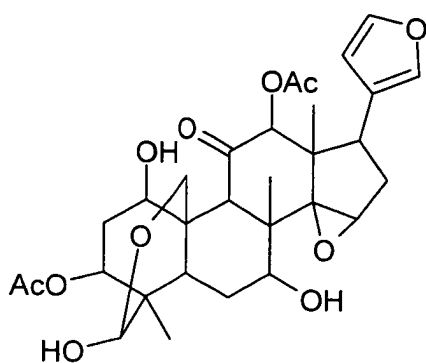
式(I)

，其中 R1 包括 H 或 OAc，而 R2 包括 H 或 $\text{COCH}(\text{CH}_3)_2$ 。

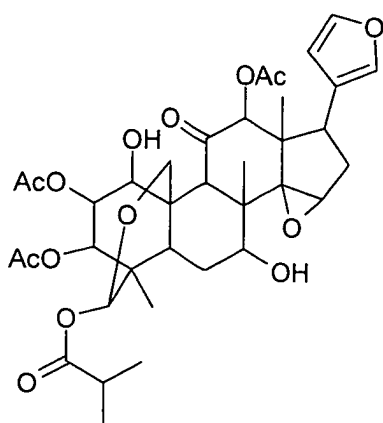
12.如申請專利範圍第 11 項所述之製備抑制 C 型肝炎病毒或治療 C 型肝炎之藥物的方法，其中該類檸檬素化合物係萃取自一植物材料。

13.如申請專利範圍第 12 項所述之製備抑制 C 型肝炎病毒或治療 C 型肝炎之藥物的方法，其中該植物材料包括川楝或苦楝。

14.如申請專利範圍第 11 項所述之製備抑制 C 型肝炎病毒或治療 C 型肝炎之藥物的方法，其中該類檸檬素化合物包括川楝素或四降三萜 H，而該川楝素與四降三萜 H 之分子式分別如式(II)與式(III)所示：

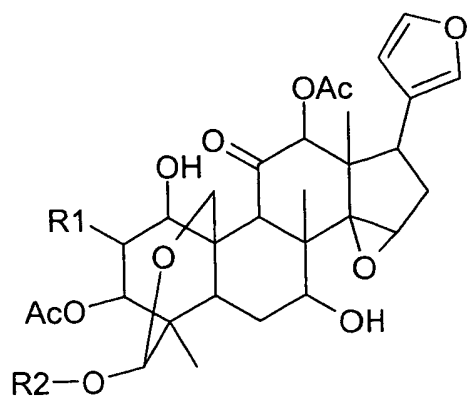


式(II)



式(III)。

15. 一種類檸檬素化合物在製備用於抑制 C 型肝炎病毒或治療 C 型肝炎之藥物的用途，該類檸檬素化合物之分子式如式(I)所示：



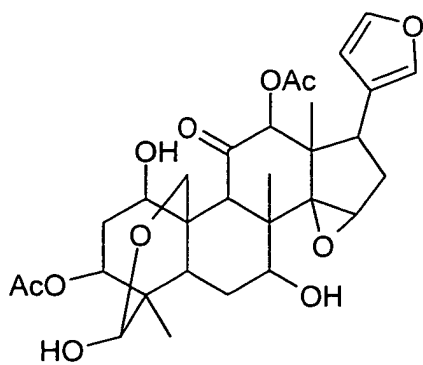
式(I)

，其中 R1 包括 H 或 OAc，而 R2 包括 H 或 $\text{COCH}(\text{CH}_3)_2$ 。

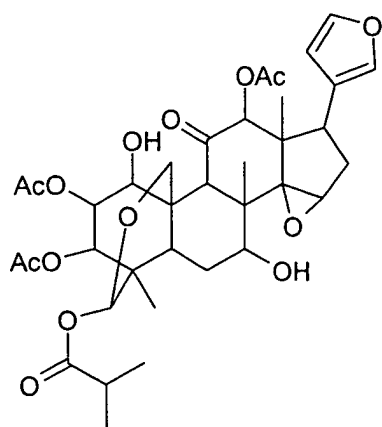
16. 如申請專利範圍第 15 項所述之類檸檬素化合物在製備用於抑制 C 型肝炎病毒或治療 C 型肝炎之藥物的用途，其中該類檸檬素化合物係萃取自一植物材料。

17. 如申請專利範圍第 16 項所述之類檸檬素化合物在製備用於抑制 C 型肝炎病毒或治療 C 型肝炎之藥物的用途，其中該植物材料包括川楝或苦楝。

18. 如申請專利範圍第 15 項所述之類檸檬素化合物在製備用於抑制 C 型肝炎病毒或治療 C 型肝炎之藥物的用途，其中該類檸檬素化合物包括川楝素或四降三萜 H，而該川楝素與四降三萜 H 之分子式分別如式(II)與式(III)所示：



式(II)



式(III)。

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：無。

(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：

