



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201034657 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 10 月 01 日

(21)申請案號：099108933

(22)申請日：中華民國 96 (2007) 年 01 月 08 日

(51)Int. Cl.：

A61K31/122 (2006.01)

A61K36/074 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(71)申請人：國鼎生物科技股份有限公司 (中華民國) GOLDEN BIOTECHNOLOGY CORPORATION (TW)

臺北縣淡水鎮中正東路 2 段 27 之 6 號 15 樓

(72)發明人：劉勝勇 (TW)；溫武哲 (TW)；鄒宛玲 (TW)；郭茂田 (TW)；張君綏 (TW)；黃俊鴻 (TW)；李雅嫻 (TW)；霍嘉恒 (TW)

(74)代理人：洪堯順

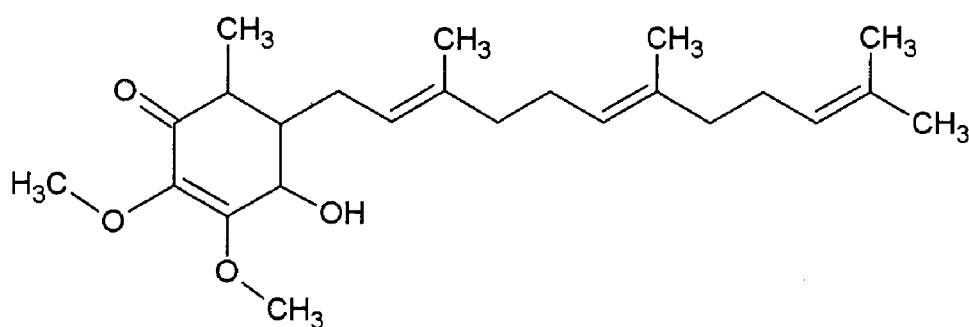
申請實體審查：有 申請專利範圍項數：10 項 圖式數：0 共 27 頁

(54)名稱

環己烯酮化合物

(57)摘要

本發明係關於一種新穎化合物及其用途，尤其係關於一種由牛樟芝萃取物中所分離出之 4-羥基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5(3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-環己烯酮 (4-hydroxy-2,3-dimethoxy-6-methyl-5(3,7,11-trimethyl-dodeca-2,6,10-trienyl)-cyclohex-2-enone) 及其於抑制腫瘤細胞生長之應用。本發明中，前述化合物係首見於牛樟芝中，其可應用於抑制乳癌、肝癌與攝護腺癌腫瘤細胞之生長，同時可作為抑制前述腫瘤細胞生長之醫藥組成物的成分，或進一步藉由其抗氧化活性應用於心血管疾病的預防或添加於健康飲食品當中。



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種新穎化合物，尤其係關於一種由牛樟芝（*Antrodia camphorata*）萃取物中所分離純化之化合物及其於抑制腫瘤細胞生長之應用。

【先前技術】

牛樟芝（*Antrodia camphorata*），又稱樟芝、牛樟菇、紅樟、紅樟芝、樟菰或樟窟內菰等，為臺灣特有種真菌，只生長於臺灣山區海拔 450~2000 公尺間之牛樟樹（*Cinnamoum kanehirai* Hay）的中空腐朽心材內壁上，因此是由樹幹內面生長出子實體。牛樟樹目前主要分佈於桃園、南投等山區，由於牛樟樹是台灣數量極為稀少的保育類樹種，加上人為的盜伐，使得寄生於其中方能生長之野生牛樟芝數量更形稀少，且由於其生長相當緩慢，生長期亦僅在六月至十月之間，因此價格非常昂貴。

牛樟芝之子實體為多年生，無柄，呈木栓質至木質，其外形多變，有板狀、鐘狀、馬蹄狀或塔狀。初時為扁平型，貼生於木材表面，之後其前緣會略為捲曲翹起，而呈板塊狀（層紋板狀）或如鐘乳石狀。牛樟芝頂部表面呈褐色至黑褐色，具不明顯的皺紋，有光澤，邊緣平而鈍，其腹面則為橘紅色或局部黃色，並有許多細孔。

此外，牛樟芝具有強烈的黃樟香氣，其曬乾後褪色成土黃白色，味極苦，民間將其用作解毒、保肝、抗癌之草藥。牛樟芝如同一般食藥用的蕈菇類，具有許多複雜的成分，已知的生理活性成分中，包括：多醣體（polysaccharides，如： β -葡聚醣）、三萜類化合物（triterpenoids）、超氧歧化酶（superoxide dismutase, SOD）、腺苷（adenosine）、蛋白質（含免疫球蛋白）、維生素（如：維生素 B、菸鹼酸）、微量元素（如：鈣、磷及鋇等）、核酸、凝集素、胺基酸、固醇類、木質素以及血壓穩定物質（如：antodia acid）等，這些生理活性成分被認為具有抗腫瘤、增加免疫能力、抗過敏、抑制血小板凝集、抗病毒、抗細菌、抗高血壓、降血糖、降膽固醇以及保護肝臟等功能。

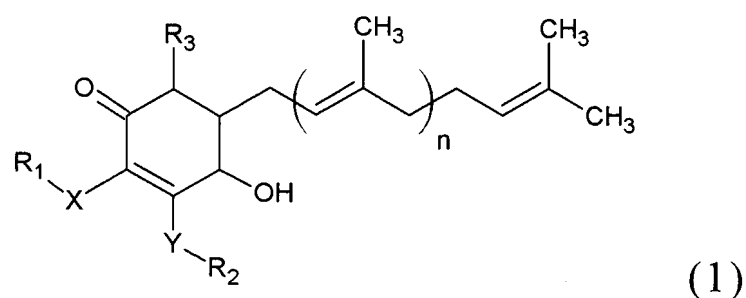
牛樟芝眾多成分中以三萜類化合物被研究的最多，三萜類化合物是由三十個碳元素結合成六角形或五角形天然化合物之總稱，牛樟芝所具之苦味即主要來自三萜類此成分。1995 年時，Cherng 等人發現牛樟芝子實體萃取物中含有三種新的以麥角甾烷（ergostane）為骨架的三萜類化合物：antcin A、antcin B 與 antcin C（Cherng, I. H., and Chiang, H. C. 1995. Three new triterpenoids from *Antrodia cinnamomea*. J. Nat. Prod. 58:365-371）。Chen 等人以乙醇萃取樟芝子實體後發現 zhankuic acid A、zhankuic acid B 及 zhankuic acid C 等三種三萜類化合物（Chen, C. H., and Yang, S. W. 1995. New steroid acids from *Antrodia*

cinnamomea, — a fungus parasitic on *Cinnamomum micranthum*. J. Nat. Prod. 58:1655-1661)。此外，Chiang 等人於 1995 年也由子實體萃取物中發現另外三種分別為倍半萜內酯（sesquiterpene lactone）與兩種雙酚類衍生物的新三萜類化合物，此即 antrocin, 4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯並二氧環（4,7-dimethoxy-5-methy-1,3-benzodioxole）與 2,2',5,5'-四甲氧基-3,4,3',4'-雙-亞甲二氧基-6,6'-二甲基聯苯（2,2',5,5'-teramethoxy-3,4,3',4'-bimethylenedioxy-6,6'-dimethylbiphenyl）（Chiang, H. C., Wu, D. P., Cherng, I. W., and Ueng, C. H. 1995. A sesquiterpene lactone, phenyl and biphenyl compounds from *Antrodia cinnamomea*. Phytochemistry. 39:613-616）。到了 1996 年，Cherng 等人以同樣分析方法再度發現四種新的三萜類化合物：antcin E、antcin F、methyl antcinate G、methyl antcinate H（Cherng, I. H., Wu, D. P., and Chiang, H. C. 1996. Triteroenoids from *Antrodia cinnamomea*. Phytochemistry. 41:263-267）；而 Yang 等人則發現了二種以麥角甾烷為骨架的新化合物 zhankuic acid D、zhankuic acid E，和三種以羊毛甾烷（lanostane）為骨架的新化合物：15 α -乙酰-去氫硫色多孔菌酸（15 α -acetyl-dehydrosulphurenic acid）、去氫齒孔酸（dehydroeburicoic acid）與去水硫色多孔菌酸（dehydrasulphurenic acid）（Yang, S. W., Shen, Y. C., and Chen, C. H. 1996. Steroids and triterpenoids of *Antrodia cinnamomea* — a fungus parasitic on *Cinnamomum*

micranthum. *Phytochemistry*. 41:1389-1392)。雖然由目前諸多之實驗可得知牛樟芝萃取物具有抑癌之功效（如前述Chen（1995）），但究為何種有效成分可達到抑制腫瘤細胞效果之研究，目前則仍處於試驗階段，並未有具體之有效成分發表，故若能將該萃取物進一步純化分析，找出其真正有效抑癌成分，對於人類癌症之治療實將產生莫大的助益。

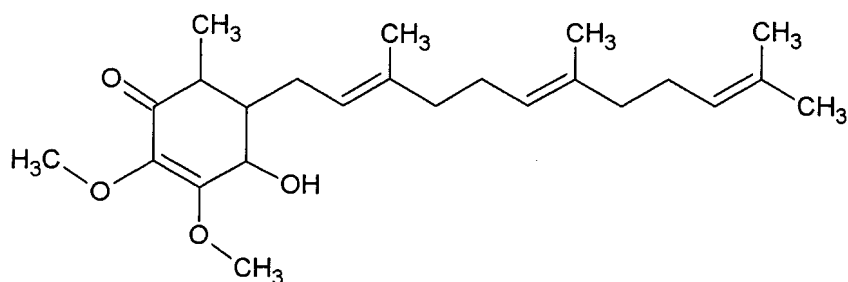
【發明內容】

為明瞭牛樟芝萃取物中究竟是何成分具有抑癌之效果，本發明由牛樟芝萃取物中分離純化出具式(1)結構式之新穎化合物；



其中，X係氧（O）或硫（S），Y係氧或硫；R₁係氫基（H）、甲基（CH₃）或（CH₂）_m-CH₃，R₂係氫基、甲基或（CH₂）_m-CH₃，R₃係氫基、甲基或（CH₂）_m-CH₃，m=1~12；n=1~12。

如式(1)結構式之化合物中，較佳者為如下所示式(2)之化合物：



(2)

式(2)之化合物，其化學名為 4-羥基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5 (3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-環己烯酮 (4-hydroxy-2,3-dimethoxy-6-methyl-5(3,7,11-trimethyl-dodeca-2,6,10-trienyl)-cyclohex-2-enone)，分子式為 $C_{24}H_{38}O_4$ ，外觀為淡黃色粉末狀，分子量為 390。

本發明中式(1)、式(2)之化合物係分離純化自牛樟芝水萃取物或有機溶劑萃取物，有機溶劑可包括醇類（例如甲醇、乙醇或丙醇）、酯類（例如乙酸乙酯）、烷類（例如己烷）或鹵烷（例如氯甲烷、氯乙烷），但並不以此為限，其中較佳者為醇類，更佳者為乙醇。

藉由前述化合物，本發明係將其應用於抑制腫瘤細胞生長上，使能進一步應用於治療癌症之醫藥組成份中，增益癌症之治療效果。本發明化合物得應用之範圍包括對於乳癌腫瘤細胞、肝癌腫瘤細胞與攝護腺癌腫瘤細胞等細胞之生長產生抑制效果，使該等腫瘤細胞無法迅速生長，進而抑制腫瘤之增生，延緩腫瘤之惡化，因此，可進一步利用於乳癌、肝癌與攝護腺癌等癌症之治療。

另一方面，本發明中亦可將式(1)或/與式(2)之化合物利用於治療乳癌、肝癌與攝護腺癌等醫藥組成物之成分

中，藉以抑制該等腫瘤細胞的生長。前述醫藥組成物除包括有效劑量之式(1)或/與式(2)之化合物外，尚可包括藥學上可接受的載體。載體可為賦形劑（如水）、填充劑（如蔗糖或澱粉）、黏合劑（如纖維素衍生物）、稀釋劑、崩解劑、吸收促進劑或甜味劑，但並未僅限於此。本發明醫藥組成物可依一般習知藥學之製備方法生產製造，將式(1)或/與式(2)有效成分劑量與一種以上之載體相混合，製備出所需之劑型，此劑型可包括錠劑、粉劑、粒劑、膠囊或其他液體製劑，但未以此為限。

此外，由於本發明中之化合物同時具有抗氧化活性，因此亦可將之添加於保健食品、飲食品、醫藥品、化妝品當中，藉由其抗氧化能力達到預防心血管疾病或避免細胞突變等效用，使助益於施用人體之健康。

以下將配合圖式進一步說明本發明的實施方式，下述所列舉的實施例係用以闡明本發明，並非用以限定本發明之範圍，任何熟習此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可做些許更動與潤飾，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。

【實施方式】

首先取牛樟芝（*Antrodia camphorata*）菌絲體、子實體或二者之混合物，利用習知萃取方式，以水或有機溶劑進行萃取，藉以取得牛樟芝水萃取物或有機溶劑萃取物。其中，有機溶劑可包括醇類（例如甲醇、乙醇或丙醇）、

酯類（例如乙酸乙酯）、烷類（例如己烷）或鹵烷（例如氯甲烷、氯乙烷），但並不以此為限。其中較佳者為醇類，更佳者為乙醇。

經萃取過後之牛樟芝水萃取物或有機溶劑萃取物，可進一步藉由高效液相層析加以分離純化，之後再對每一分液（fraction）進行抑癌效果的測試。最後，則針對具抑癌效果之分液進行成分分析，將可能產生抑癌效果的成分再分別進一步做不同癌症腫瘤細胞之抑制效果測試。最終即發現本發明中如式(1)/式(2)之化合物係具有抑制不同癌症腫瘤細胞生長之效果，且該化合物經與習知文獻比對，並未曾發現於牛樟芝中，因此係一新穎之化合物。

為方便說明本發明，以下將以式(2)之 4-羥基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5（3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯）-2-環己烯酮化合物進行說明。此外，為證實 4-羥基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5（3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯）-2-環己烯酮化合物對腫瘤細胞生之抑制效果，本發明中係以 MTT 分析法，根據美國國家癌症研究所（National Cancer Institute, NCI）抗腫瘤藥物篩檢模式，對包括乳癌、肝癌與攝護腺癌等腫瘤細胞進行細胞存活率之測試。由該些測試證實，4-羥基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5（3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯）-2-環己烯酮對於乳癌腫瘤細胞（包括 MCF-7 與 MDA-MB-231）、肝癌腫瘤細胞（包括 Hep 3B 與 Hep G2）與攝護腺癌腫瘤細胞（包括 LNCaP 與 DU-145）等皆可降

低其存活率，相對之下並可同時降低生長半抑制率所需濃度（即 IC_{50} 值），因此得藉由 4-羥基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5（3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯）-2-環己烯酮，應用於包括乳癌、肝癌與攝護腺癌等腫瘤細胞之生長抑制上，而進一步可利用於乳癌、肝癌與攝護腺癌等癌症之治療。茲對前述實施方式詳盡說明如下：

實施例 1：

● 4-羥基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5（3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯）-2-環己烯酮的分離

將 100 克左右之牛樟芝菌絲體、子實體或二者之混合物，置入三角錐形瓶中，加入適當比例的水與醇類（70%~100%醇類水溶液），於 20~25℃ 下攪拌萃取至少 1 小時以上，之後以濾紙及 0.45 μm 濾膜過濾，收集萃取液。

● 將前述收集之牛樟芝萃取液，利用高效能液相層析儀 (High Performance Liquid chromatography)，以 RP18 的層析管(column)進行分析，並以甲醇(A)及 0.1%~0.5%醋酸水溶液(B)做為移動相(mobile phase)（其溶液比例係：0~10 分鐘，B 比例為 95%~20%；10~20 分鐘，B 比例為 20%~10%；20~35 分鐘，B 比例為 10%~10%；35~40 分鐘，B 比例為 10%~95%），在每分鐘 1 ml 之速度下沖提，同時以紫外-可見光全波長偵測器分析。

將 25 分鐘至 30 分鐘之沖提液收集濃縮即可得淡黃色粉末狀之固體產物，此即 4-羥基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5 (3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-環己烯酮。經分析，其分子式為 $C_{24}H_{38}O_4$ ，分子量 390，熔點 (m.p.) 為 $48^{\circ}\text{C} \sim 52^{\circ}\text{C}$ 。核磁共振 (NMR) 分析值則如下所示：
 $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta(\text{ppm})$ ：1.51、1.67、1.71、1.75、1.94、2.03、2.07、2.22、2.25、3.68、4.05、5.07 與 5.14。
 $^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta(\text{ppm})$ ：12.31、16.1、16.12、17.67、25.67、26.44、26.74、27.00、39.71、39.81、40.27、43.34、59.22、60.59、120.97、123.84、124.30、131.32、135.35、135.92、138.05、160.45 與 197.12。

經將 4-羥基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5 (3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-環己烯酮與化學式資料庫比對後，並未發現與前述相同之化合物結構，因此，此化合物係一新穎且前所未見之化合物。

實施例 2：

體外抗乳癌腫瘤細胞之活性測試

為進一步測試實施例 1 中所發現化合物對腫瘤細胞之抑制效果，本實施例將根據美國國家癌症研究所 (National Cancer Institute, NCI) 抗腫瘤藥物篩檢模式，首先取實施例 1 中所分離之 4-羥基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5 (3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-環己烯酮化合物，加入 MCF-7 與 MDA-MB-231 人類腫瘤細胞培養液中，進行腫瘤細胞存

活性之測試。細胞存活性之測試可採習知之 MTT 分析法進行分析，而 MCF-7 與 MDA-MB-231 皆係人類之乳癌腫瘤細胞系。

MTT 分析法是一種常見用於分析細胞增生（cell proliferation）、存活率（percent of viable cells）以及細胞毒性（cytotoxicity）的分析方法。其中，MTT（3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]2,5-diphenyltetrazolium bromide）為一黃色染劑，它可被活細胞吸收並被粒腺體中的琥珀酸四唑還原酶（succinate tetrazolium reductase）還原成不溶水性且呈藍紫色的 formazan，因此藉由 formazan 形成與否，即可判斷並計算細胞之存活率。

首先將人類乳癌細胞 MCF-7 與 MDA-MB-231 分別於含有胎牛血清之培養液中培養 24 小時。將增生後之細胞以 PBS 清洗一次，並以 1 倍之胰蛋白酶-EDTA 處理細胞，隨後於 1,200 rpm 下離心 5 分鐘，將細胞沈澱並丟棄上清液。之後加入 10 ml 的新培養液，輕微搖晃使細胞再次懸浮，再將細胞分置於 96 孔微量盤內。測試時，分別於每一孔內加入 30、10、3、1、0.3、0.1 與 0.03 $\mu\text{g/ml}$ 牛樟芝乙醇萃取物（對照組，未經純化分離之總萃取物）以及 4-羥基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5（3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯）-2-環己烯酮（試驗組），於 37°C 、5% CO_2 下培養 48 小時。其後，於避光的環境下於每一孔內加入 2.5 mg/ml 的 MTT，反應 4 小時後再於每一孔內加入 100 μl 的 lysis buffer 終止

反應。最後以酵素免疫分析儀在 570 nm 吸光波長下測定其吸光值，藉以計算細胞的存活率，並推算出其生長半抑制率所需濃度（即 IC_{50} 值），其結果如表一所示。

表一：體外對乳癌腫瘤細胞存活率之測試結果

測試樣品	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
對照組(加入牛樟芝萃取物)	
MCF-7	11.132
MDA-MB-231	25.812
試驗組(加入式 2)	
MCF-7	0.852
MDA-MB-231	1.031

由表一中可知，藉由 4-羥基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5(3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-環己烯酮的作用，其對於 MCF-7 人類乳癌腫瘤細胞之 IC_{50} 值為 $0.852 \mu\text{g/ml}$ ，對於 MDA-MB-231 人類乳癌腫瘤細胞之 IC_{50} 值則為 $1.031 \mu\text{g/ml}$ ，相較於牛樟芝萃取混合物所測得之 IC_{50} 值係低的多，因此可證實牛樟芝萃取物中之 4-羥基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5(3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-環己烯酮確實能夠利用於乳癌腫瘤細胞生長之抑制。

實施例 3：

體外對乳癌腫瘤細胞輔助治療之活性測試

本測試同樣係根據美國國家癌症研究所的體外篩檢模式進行測試。首先，取人類乳癌細胞 MCF-7 與 MDA-MB-231，分別於含有胎牛血清之培養液中培養 24 小

時後，將增生後之細胞以 PBS 清洗一次，並以 1 倍之胰蛋白酶-EDTA 處理細胞，隨後於 1,200 rpm 下離心 5 分鐘，將細胞沈澱並丟棄上清液。之後加入 10 ml 的新培養液，輕微搖晃使細胞再次懸浮。測試前，先加入 0.0017 $\mu\text{g/ml}$ 紫杉醇 (Taxol) 處理細胞 72 小時，再將細胞分置於 96 孔微量盤內，之後分別於每孔內加入 0 $\mu\text{g/ml}$ (對照組)，30、10、3、1、0.3、0.1 與 0.03 $\mu\text{g/ml}$ 實施例 1 中所分離之 4-羥基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5 (3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-環己烯酮 (試驗組)，於 37°C、5% CO_2 下培養 48 小時。其後，於避光的環境下於每一孔內加入 2.5 mg/ml 的 MTT，反應 4 小時後於每一孔內加入 100 μl 的 lysis buffer 終止反應。最後以酵素免疫分析儀在 570 nm 吸光波長下測定其吸光值，藉以計算細胞的存活率，並推算出其生長半抑制所需濃度 (即 IC_{50} 值)，其結果如表二所示。

表二：體外對乳癌腫瘤細胞經紫杉醇輔助治療後抑制之測試結果

測試樣品	結果
對照組	細胞存活率 (%)
MCF-7 (0.0017 $\mu\text{g/ml}$ Taxol)	65 $\pm$ 1
MDA-MB-231 (0.0017 $\mu\text{g/ml}$ Taxol)	76 $\pm$ 3
試驗組	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
MCF-7 (0.0017 $\mu\text{g/ml}$ Taxol+式 2)	0.009
MDA-MB-231 (0.0017 $\mu\text{g/ml}$ Taxol+式 2)	0.011

由表二中可知，透過紫杉醇之協同作用，4-羥基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5(3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-環己烯酮對於 MCF-7 人類乳癌腫瘤細胞之 IC_{50} 值降為 0.009 $\mu\text{g/ml}$ ，對於 MDA-MB-231 人類乳癌腫瘤細胞之 IC_{50} 值亦降為約 0.011 $\mu\text{g/ml}$ ，因此可證實牛樟芝萃取物中之 4-羥基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5(3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-環己烯酮確實能夠利用於乳癌腫瘤細胞生長之抑制，且在紫杉醇之協同作用下，有更佳之抑制效果。

實施例 4：

體外抗肝癌腫瘤細胞之活性測試

本測試亦係根據美國國家癌症研究所抗腫瘤藥物篩檢模式進行，將實施例 1 中所分離之 4-羥基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5(3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-環己烯酮化合物，加入 Hep 3B 與 Hep G2 人類肝癌腫瘤細胞培養液中進行培養，藉以進行腫瘤細胞存活性之測試。

首先將人類肝癌細胞 Hep 3B 與 Hep G2 分別於含有胎牛血清之培養液中培養 24 小時。將增生後之細胞以 PBS 清洗一次，並以 1 倍之胰蛋白酶-EDTA 處理細胞，隨後於 1,200 rpm 下離心 5 分鐘，將細胞沈澱並丟棄上清液。之後加入 10 ml 的新培養液，輕微搖晃使細胞再次懸浮，再將細胞分置於 96 孔微量盤內。測試時，分別於每一孔內加入 30、10、3、1、0.3、0.1 與 0.03 $\mu\text{g/ml}$ 之牛樟芝乙醇萃取物（對照組，未經純化分離之總萃取物）以及 30、10、3、

1、0.3、0.1 與 0.03 $\mu\text{g/ml}$ 之 4-羥基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5 (3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-環己烯酮 (試驗組)，於 37°C 、5% CO_2 下培養 48 小時。其後，於避光的環境下於每一孔內加入 2.5 mg/ml 的 MTT，反應 4 小時後再於每一孔內加入 100 μl 的 lysis buffer 終止反應。最後以酵素免疫分析儀在 570 nm 吸光波長下測定其吸光值，藉以計算細胞的存活率，並推算出其 IC_{50} 值，其結果如表三所示。

表三：體外對肝癌腫瘤細胞抑制之測試結果

測試樣品	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
對照組(加入牛樟芝萃取物)	
Hep 3B	5.121
Hep G2	18.631
試驗組(加入式 2)	
Hep 3B	0.005
Hep G2	1.679

由表三中可知，藉由 4-羥基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5 (3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-環己烯酮的作用，其對於 Hep 3B 人類肝癌腫瘤細胞之 IC_{50} 值降為 0.005 $\mu\text{g/ml}$ ，對於 Hep G2 人類肝癌腫瘤細胞之 IC_{50} 值則降為 1.679 $\mu\text{g/ml}$ ，相較於牛樟芝萃取混合物所測得之 IC_{50} 值係低的多，因此可證實牛樟芝萃取物中之 4-羥基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5 (3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-環己烯酮確實能夠利用於肝癌腫瘤細胞生長之抑制。

實施例 5：

體外對肝癌腫瘤細胞輔助治療之活性測試

本測試同樣係根據美國國家癌症研究所的體外篩檢模式進行測試。首先，取人類肝癌細胞 Hep 3B 與 Hep G2，分別於含有胎牛血清之培養液中培養 24 小時後，將增生後之細胞以 PBS 清洗一次，並以 1 倍之胰蛋白酶-EDTA 處理細胞，隨後於 1,200 rpm 下離心 5 分鐘，將細胞沈澱並丟棄上清液。之後加入 10 ml 的新培養液，輕微搖晃使細胞再次懸浮。測試前，先於 Hep 3B 細胞株試驗加入 0.0043 $\mu\text{g/ml}$ Lovastatin，而於 Hep G2 細胞株試驗加入 0.0017 $\mu\text{g/ml}$ 紫杉醇 (Taxol)，處理細胞 72 小時，再將細胞分置於 96 孔微量盤內，之後分別於每孔內加入 0 $\mu\text{g/ml}$ (對照組)，30、10、3、1、0.3、0.1 與 0.03 $\mu\text{g/ml}$ 實施例 1 中所分離之 4-羥基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5 (3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-環己烯酮 (試驗組)，於 37°C、5% CO_2 下培養 48 小時。其後，於避光的環境下於每一孔內加入 2.5 mg/ml 的 MTT，反應 4 小時後於每一孔內加入 100 μl 的 lysis buffer 終止反應。最後以酵素免疫分析儀在 570 nm 吸光波長下測定其吸光值，藉以計算細胞的存活率，並推算出其 IC_{50} 值，其結果如表四所示。

表四：體外對肝癌腫瘤細胞經紫杉醇輔助治療後抑制之測試結果

測試樣品	結果
------	----

對照組	細胞存活率 (%)
Hep 3B (0.0043 $\mu\text{g/ml}$ Lovastatin)	61 $\pm$ 3
Hep G2 (0.0017 $\mu\text{g/ml}$ Taxol)	81 $\pm$ 2
試驗組	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
Hep 3B (0.0043 $\mu\text{g/ml}$ Lovastatin+式 2)	0.002
Hep G2 (0.0017 $\mu\text{g/ml}$ Taxol +式 2)	0.008

由表四中可知，透過 Lovastatin 及紫杉醇之協同作用，4-羥基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5 (3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-環己烯酮對於 Hep 3B 人類肝癌腫瘤細胞之 IC₅₀ 值降為 0.002 $\mu\text{g/ml}$ ，對於 Hep G2 人類肝癌腫瘤細胞之 IC₅₀ 值亦降為約 0.008 $\mu\text{g/ml}$ ，因此可證實牛樟芝萃取物中之 4-羥基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5 (3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-環己烯酮確實能夠利用於肝癌腫瘤細胞生長之抑制，且在紫杉醇之協同作用下，有更佳之抑制效果。

實施例 6：

體外抗攝護腺癌腫瘤細胞之活性測試

本測試亦係根據美國國家癌症研究所抗腫瘤藥物篩檢模式進行，將實施例 1 中所分離之 4-羥基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5 (3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-環己烯酮化合物，加入 LNCaP 與 DU-145 人類攝護腺癌腫瘤細胞培養液中進行培養，藉以進行腫瘤細胞存活性之測試。

首先將人類攝護腺癌細胞 LNCaP 與 DU-145 分別於含有胎牛血清之培養液中培養 24 小時。將增生後之細胞以

PBS 清洗一次，並以 1 倍之胰蛋白酶-EDTA 處理細胞，隨後於 1,200 rpm 下離心 5 分鐘，將細胞沈澱並丟棄上清液。之後加入 10 ml 的新培養液，輕微搖晃使細胞再次懸浮，再將細胞分置於 96 孔微量盤內。測試時，分別於每一孔內加入 30、10、3、1 與 0.3 $\mu\text{g/ml}$ 牛樟芝乙醇萃取物(對照組，未經純化分離之總萃取物)以及 30、10、3、1 與 0.3 $\mu\text{g/ml}$ 由實施例 1 所分離之 4-羥基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5 (3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-環己烯酮(試驗組)，於 37°C、5% CO_2 下培養 48 小時。其後，於避光的環境下於每一孔內加入 2.5 mg/ml 的 MTT，反應 4 小時後再於每一孔內加入 100 μl 的 lysis buffer 終止反應。最後以酵素免疫分析儀在 570 nm 吸光波長下測定其吸光值，藉以計算細胞的存活率，並推算出其 IC_{50} 值，其結果如表五所示。

表五：體外對攝護腺癌腫瘤細胞抑制之測試結果

測試樣品	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
對照組(加入牛樟芝萃取物)	
LNCaP	11.491
DU-145	41.392
試驗組(加入式 2)	
LNCaP	2.378
DU-145	1.812

由表五中可知，藉由 4-羥基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5 (3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-環己烯酮的作用，

其對於 LNCaP 人類攝護腺癌腫瘤細胞之 IC_{50} 值降為 2.378 $\mu\text{g/ml}$ ，對於 DU-145 人類攝護腺癌腫瘤細胞之 IC_{50} 值則降為 1.812 $\mu\text{g/ml}$ ，相較於牛樟芝萃取混合物所測得之 IC_{50} 值係低的多，因此可證實牛樟芝萃取物中之 4-羥基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5 (3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-環己烯酮確實能夠利用於攝護腺癌腫瘤細胞生長之抑制。

實施例 7：

體外對攝護腺癌腫瘤細胞輔助治療之活性測試

本測試同樣係根據美國國家癌症研究所的體外篩檢模式進行測試。首先，取人類攝護腺癌細胞 LNCaP 與 DU-145，分別於含有胎牛血清之培養液中培養 24 小時後，將增生後之細胞以 PBS 清洗一次，並以 1 倍之胰蛋白酶-EDTA 處理細胞，隨後於 1,200 rpm 下離心 5 分鐘，將細胞沈澱並丟棄上清液。之後加入 10 ml 的新培養液，輕微搖晃使細胞再次懸浮。測試前，先於 LNCaP 細胞株試驗加入 0.0017 $\mu\text{g/ml}$ 紫杉醇，而於 DU-145 胞株試驗加入 0.0043 $\mu\text{g/ml}$ 紫杉醇分別處理細胞 72 小時，再將細胞分置於 96 孔微量盤內，之後分別於每孔內加入 0 $\mu\text{g/ml}$ (對照組)，30、10、3、1、0.3、0.1 與 0.03 $\mu\text{g/ml}$ 於實施例 1 中所分離之 4-羥基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5 (3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-環己烯酮(試驗組)，於 37°C、5% CO_2 下培養 48 小時。其後，於避光的環境下於每一孔內加入 2.5 mg/ml 的 MTT，反應 4 小時後於每一孔內加入 100 μl 的 lysis buffer 終止反應。最後以酵素免疫分析儀在 570 nm 吸光波

長下測定其吸光值，藉以計算細胞的存活率，並推算出其 IC_{50} 值，其結果如表六所示。

表六：體外對攝護腺癌腫瘤細胞經紫杉醇輔助治療後抑制之測試結果

測試樣品	結果
對照組	細胞存活率 (%)
LNCaP (0.0017 μ g/ml Taxol)	56 $\pm$ 3
DU-145 (0.0043 μ g/ml Taxol)	70 $\pm$ 2
試驗組	IC_{50} (μ g/ml)
LNCaP (0.0017 μ g/ml Taxol+式 2)	0.961
DU-145 (0.0043 μ g/ml Taxol+式 2)	0.515

由表六中可知，透過紫杉醇之協同作用，4-羥基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5 (3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-環己烯酮對於 LNCaP 人類攝護腺癌腫瘤細胞之 IC_{50} 值降為 0.961 μ g/ml，對於 DU-145 人類攝護腺癌腫瘤細胞之 IC_{50} 值亦降為約 0.515 μ g/ml，相較於牛樟芝萃取混合物所測得之 IC_{50} 值係低的多，因此可證實牛樟芝萃取物中之 4-羥基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5 (3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-環己烯酮確實能夠利用於攝護腺癌腫瘤細胞生長之抑制，且在紫杉醇之協同作用下，有更佳之抑制效果。

實施例 8：

體外抗氧化活性之試驗

一般抗氧化活性之測試，係利用人類低密度脂蛋白（human low density lipoprotein, LDL），加入銅離子（ Cu^{2+} ）與待測樣本進行氧化反應，檢測 LDL 上二烯之反應結果後，以維生素 E 之水溶性類似物 Trolox 作為對照（Trolox 濃度為 $2\ \mu\text{M}$ 時，其效力值訂為標準值 1.0），計算出待測樣本之抗氧化活性。

首先準備二次純水(控制組)，並配製 5 mM 磷酸鈉緩衝溶液（sodium phosphate buffer, SPB）、 $1\ \mu\text{M}$ 與 $2\ \mu\text{M}$ 的 Trolox (對照組)及 $40\ \mu\text{g/ml}$ 由實施例 1 中所分離之 4-羥基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5（3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯）-2-環己烯酮（試驗組）。利用酵素法測得低密度膽固醇濃度(LDL-C)後，利用 5 mM SPB 將 LDL 稀釋至 $0.10\sim 0.25\ \text{mg/ml}$ 間。取 96 孔的石英微量盤，於其中先加入 $100\ \mu\text{l}$ 之 LDL，再分別加入前述預定濃度的 Trolox 及由實施例 1 中所分離之化合物，之後再分別加入 CuSO_4 溶液以啟動氧化反應(每一 $250\ \mu\text{l}$ 孔中的銅(II)濃度為 $5.0\ \mu\text{M}$)，最後將該微量盤置於酵素免疫微量盤分析儀（ELISA reader）中進行檢測。酵素免疫微量盤分析儀檢測波長設為 $232\ \text{nm}$ ，溫度設為 37°C ，偵測時間為 12 小時，採樣間隔時間為 15 分鐘，其結果如表七所示。

表七：體外抗氧化活性之測試結果

測試樣品	Tlag(分)	$\Delta\text{Tlag}(\text{分})$	效力值
H_2O (控制組, Tlag_0)	185		
$1\ \mu\text{M}$ Trolox (對照組)	266	81	0.48
$2\ \mu\text{M}$ Trolox	344	159	1.00

40 µg/mL 式 2	439	208	1.30
--------------	-----	-----	------

註 1：Tlag(分)係指在吸收光波長為 234 nm 下，延滯期(lag phase)與連鎖期(propagation phase)的交差點；ΔTlag(分)係指各測試樣品 Tlag 時間與 Tlag₀ 時間的差值。

註 2：效力值>0.5 時，表示其具抗氧化作用。

由表七中可知，4-羥基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5（3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯）-2-環己烯酮具有 1.30 之效力值，其比具抗氧化能力之標準值 0.5 高出甚多，亦即，其具有相當之抗氧化能力，因此可用作保健食品、飲食品、醫藥品、化妝品當中之成分，藉由其抗氧化能力達到預防心血管疾病或避免細胞突變等效用，使對於施用之人體健康產生莫大的助益。

【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；惟已有申請案號者請填寫)

※申請案號：99108933

※申請日期：96.1.8

※IPC 分類：A61K 31/22 (2006.01)

原申請案號：096100680

A61K 36/074 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

環己烯酮化合物

A61P 35/00 (2006.01)

二、中文發明摘要：

本發明係關於一種新穎化合物及其用途，尤其係關於一種由牛樟芝萃取物中所分離出之 4-羥基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5 (3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯)-2-環己烯酮 (4-hydroxy-2,3-dimethoxy-6-methy-5(3,7,11-trimethyl-dodeca-2,6,10-trienyl)-cyclohex-2-enone) 及其於抑制腫瘤細胞生長之應用。本發明中，前述化合物係首見於牛樟芝中，其可應用於抑制乳癌、肝癌與攝護腺癌腫瘤細胞之生長，同時可作為抑制前述腫瘤細胞生長之醫藥組成物的成分，或進一步藉由其抗氧化活性應用於心血管疾病的預防或添加於健康飲食品當中。

三、英文發明摘要：

七、申請專利範圍：

- 1、一種化合物，該化合物係 4-羥基-2,3-二甲氧基-6-甲基-5 (3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯) -2-環己烯酮 (4-hydroxy-2,3-dimethoxy-6-methy-5(3,7,11-trimethyl -dodeca-2,6,10-trienyl)-cyclohex-2-enone)。
- 2、如申請專利範圍第 1 項所述之該化合物，其係分離自牛樟芝。
- 3、一種將如申請專利範圍第 1 項所述化合物利用於製備抑制乳癌腫瘤細胞生長之藥物的應用。
- 4、如申請專利範圍第 3 項所述之應用，其中該乳癌腫瘤細胞係 MCF-7 或 MDA-MB-231 細胞系。
- 5、一種將如申請專利範圍第 1 項所述化合物利用於製備抑制肝癌腫瘤細胞生長之藥物的應用。
- 6、如申請專利範圍第 5 項所述之應用，其中該肝癌腫瘤細胞係 Hep 3B 或 Hep G2 細胞系。
- 7、一種將如申請專利範圍第 1 項所述化合物利用於製備抑制攝護腺癌腫瘤細胞生長之藥物的應用。
- 8、如申請專利範圍第 7 項所述之應用，其中該攝護腺癌腫瘤細胞係 LNCaP 或 DU145 細胞系。
- 9、一種將如申請專利範圍第 1 項所述之化合物利用於製備具抗氧化活性之藥物的應用。

- 10、一種利用於抑制腫瘤細胞生長之醫藥組成物，包括一有效劑量如申請專利範圍第 1 項所述之化合物以及一藥學上可接受之載體，其中該腫瘤細胞係選自乳癌、肝癌或攝護腺癌之腫瘤細胞。

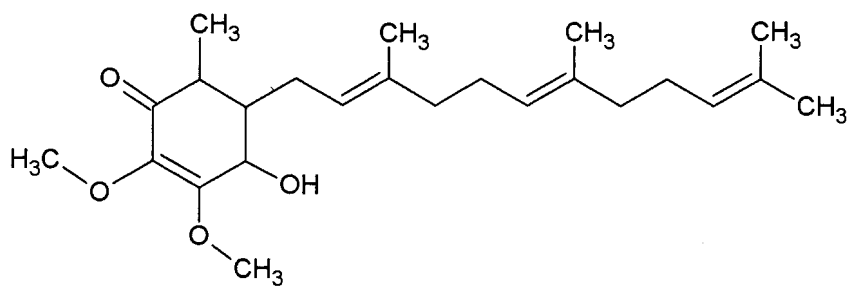
四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（無）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

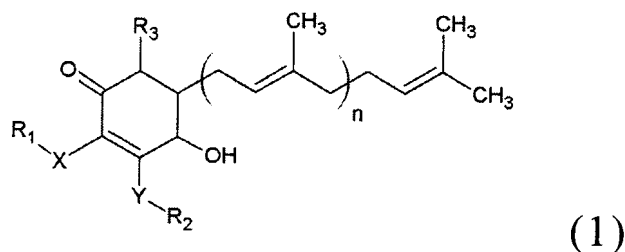
五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



micranthum. Phytochemistry. 41:1389-1392)。雖然由目前諸多之實驗可得知牛樟芝萃取物具有抑癌之功效(如前述 Chen (1995))，但究為何種有效成分可達到抑制腫瘤細胞效果之研究，目前則仍處於試驗階段，並未有具體之有效成分發表，故若能將該萃取物進一步純化分析，找出其真正有效抑癌成分，對於人類癌症之治療實將產生莫大的助益。

【發明內容】

為明瞭牛樟芝萃取物中究竟是何成分具有抑癌之效果，本發明由牛樟芝萃取物中分離純化出具式(1)結構式之新穎化合物；



其中，X 係氧 (O) 或硫 (S)，Y 係氧或硫；R₁ 係氫基 (H)、甲基 (CH₃) 或 (CH₂)_m-CH₃，R₂ 係氫基、甲基或 (CH₂)_m-CH₃，R₃ 係氫基、甲基或 (CH₂)_m-CH₃，m = 1 ~ 12；n = 1 ~ 12。

如式(1)結構式之化合物中，較佳者為如下所示式(2)之化合物：