





I648257

# 發明摘要

公告本

※ 申請案號： 104144385

※ 申請日： 104/12/30

※IPC 分類：

C07C 49/753 (2006.01)  
A61K 31/122 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
A61K 36/07 (2006.01)  
B01D 15/08 (2006.01)

## 【發明名稱】(中文/英文)

牛樟芝化合物、製備方法及其用途

Compounds from *Antrodia camphorata*, method for preparing the same and use thereof

## 【中文】

本發明提供自牛樟芝萃取的化合物及其製備方法，以及牛樟芝化合物之取代基改造方法及其產物；此外，本發明另揭示前述牛樟芝化合物及取代基改造之化合物具有抑制血管新生之功效以及抑制多種癌細胞增生之功效，包括肝癌、腦癌、前列腺癌、乳癌、直腸結腸癌、和黑色素瘤，其抑制癌細胞增生之功效對於肝癌以及直腸結腸癌有更佳的效果，且經取代基改造的化合物其抑制效果較牛樟芝萃取之化合物有顯著地提升。

## 【英文】

The invention relates to bioactive compounds purified from mycelium of *Antrodia camphorata* and the manufacturing method thereof; and a method for treatment of cancers and angiogenesis-related disease by administrating an effective amount of the said compounds, wherein the cancers is liver cancer, brain cancer, prostate cancer, breast cancer, colorectal cancer, or melanoma. The anticancer effect of the compounds is enhanced by modification of substituent.

**【代表圖】**

**【本案指定代表圖】：** 第1圖

**【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】：**

## 發明專利說明書

106年6月30日修正本

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】(中文/英文)

牛樟芝化合物、製備方法及其用途

Compounds from *Antrodia camphorata*, method for preparing the same and use thereof

## 【技術領域】

【0001】 本發明係關於自牛樟芝純化之化合物、製備方法及其用途；特別指該化合物可用於抑制癌細胞增生以及血管新生，以達到治療癌症之效果。

## 【先前技術】

【0002】 牛樟芝(*Antrodia camphorata*，原先命名為*Antrodia cinnamomea*)一種寄生於牛樟樹(*Cinnamomum kanchirai* Hayata, Lauraceae)中空樹幹內的真菌，為台灣本地特有藥用真菌。在台灣民俗醫學上，樟芝是良好的解毒劑，可用於食物中毒或農藥中毒，民間亦常用以治療肝炎或肝臟相關疾病。因為其具有高度醫藥價值，但栽培不易且生長速度緩慢，因此現已有針對牛樟芝基因體學及代謝體學之研究(Lu *et al.* 2014 PNAS、Lin *et al.* 2011 J Agr Food Chem)，意圖對牛樟芝之醫藥用途及栽培方法有進一步認識。

【0003】 牛樟芝內含多種生物活性物質可用於醫藥用途，包含大分子的多醣和小分子的萜類。其中多醣以不同單醣單元組成存在，經光譜分析後具有大量1,3- $\beta$ -D-葡聚醣(1,3- $\beta$ -D-glucan)之成分。牛樟芝多醣已被報

導具有多種醫療用途，包括抑制血管新生(Yang *et al.* 2009 J Ethnopharmacol、Cheng *et al.* 2005 Life Sci)、抑制免疫(Meng *et al.* 2012 Nutrition)、調節免疫反應並抑制氣喘(Liu *et al.* 2010 Immunology)、抑制B型肝炎病毒(Lee *et al.* 2002 FEMS Microbiol Lett)、抑制癌細胞生長(Liu *et al.* 2004 Toxicol Appl Pharmacol、Lee *et al.* 2014 Food Funct)等；另已知安卓醣(antrodan)，一牛樟芝萃取之醣蛋白(glycoprotein、protein-bound polysaccharide)，具有避免肝臟損傷的功效(Ker *et al.* 2014 PLoS ONE、TW500628、US 7763723)。

**【0004】** 此外，三萜類(Triterpenoids)亦為牛樟芝主要醫藥用化合物，也是牛樟芝食用時苦味主要來源。早期Cherng *et al.*發表以麥角甾烷(ergostane)類之3種新穎三萜化合物：antcins A-C(Cherng *et al.* 1995 J Nat Prod)，以及另有4種新穎三萜化合物：antcins E-F、methyl antcinate G、methyl antcinate H(Cherng *et al.* 1996 Phytochemistry)；之後數十種牛樟芝三萜化合物已被報導具有之醫療功效，包括抑制癌細胞生長(Wu *et al.* 2010 J Nat Prod)、抑制免疫反應(Liaw *et al.* 2013 J Nat Prod)、治療肝癌或肝炎(Lien *et al.* 2014 Molecules)、抵抗疲勞(Huang *et al.* 2012 Evid Based Complement Altern Med)等。

**【0005】** 美國專利US7109232揭示自牛樟芝純化之5種新穎化合物以及其用途，包括抗發炎以及抗腫瘤；US7732482則揭示前述化合物具有抑制器官纖維化的功效。US7342137揭示一牛樟芝新穎化合物群組，其具有抑制多種癌細胞生長之功效。US7745647揭示自子實體分離之新穎二萜類化合物，其具有保護神經細胞之功效。US7994158揭示自牛樟芝純化之去

氫硫色多孔菌酸(dehydrosulphurenic acid)對於腫瘤細胞，特別是血癌或是胰臟癌具有抑制效果。US7531627揭示一分子量為29kDa之牛樟芝新穎蛋白質ACA1，其具有促進免疫功效以及治療癌症之潛力。

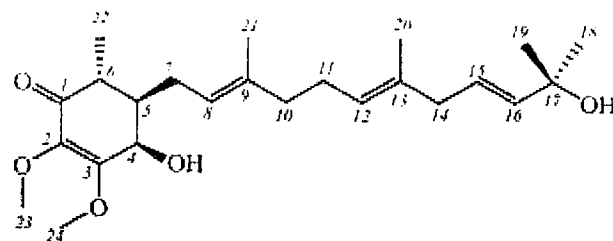
**【0006】** 牛樟芝抑制癌症之機制依據化合物之化學結構有所不同。Yeh *et al.*報導倍半萜內酯安卓幸(sesquiterpene lactone antrocin)可抑制JAK2/STAT3的訊息傳遞路徑，進而誘發細胞凋亡(apoptosis) (Yeh *et al.* 2013 Carcinogenesis)；Yang *et al.* 報導可使用牛樟芝可抑制HER-2/neu訊息傳導，並抑制卵巢癌 (Yang *et al.* 2013 J Ethnopharmacol)；Wang *et al.*則報導安卓奎諾爾D(antroquinonol D)可導致DNA去甲基化，並且具有抑制癌症之潛力 (Wang *et al.* 2014 J Agric Food Chem)。

**【0007】** 綜上所述，牛樟芝含有具有抗癌潛力的物質，並且已經證實對於多種癌症有效果，但對於是否尚存在新穎化合物，以及哪些化合物具有抗癌效果所知甚少。若能自牛樟芝中純化新穎化合物，並且分析其結構及功效，則可用於癌症之治療，對於開發新藥有所助益。

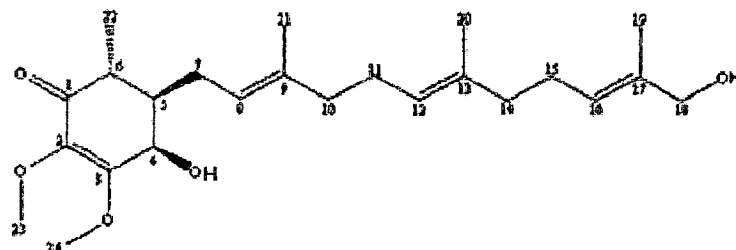
### **【發明內容】**

**【0008】** 本發明提供一種治療癌症之醫藥組合物，包含治療有效量之化合物，以及至少一種藥學上可接受之載劑、鹽類、或前驅藥物，該化合物係選自AC011、AC007-H1、AC009-H1、以及AC012-H1所組成之群組或前述化合物之至少二者任意組合；其中AC011、AC007-H1、AC009-H1、以及AC012-H1的結構式如下：

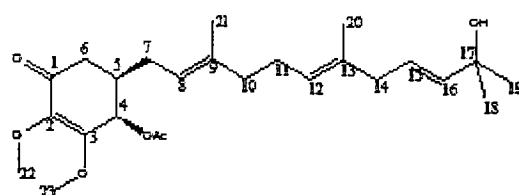
AC007-H1



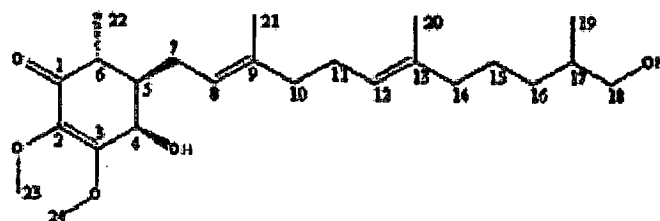
AC009-H1



AC011



AC012-H1



該化合物係牛樟芝液態發酵菌絲體經由正己烷回流萃取，再經矽膠管柱正向層析分離所得，層析分離的流動相依序使用正己烷/乙酸乙酯、二氯甲烷/丙酮、正己烷/丙酮。

【0009】 其中，該載劑包含賦形劑、稀釋劑、增稠劑、填充劑、黏結劑、崩解劑、潤滑劑、油性或非油性的基質、表面活性劑、懸浮劑、膠凝劑、佐劑、防腐劑、抗氧化劑、穩定劑、色素或香料。

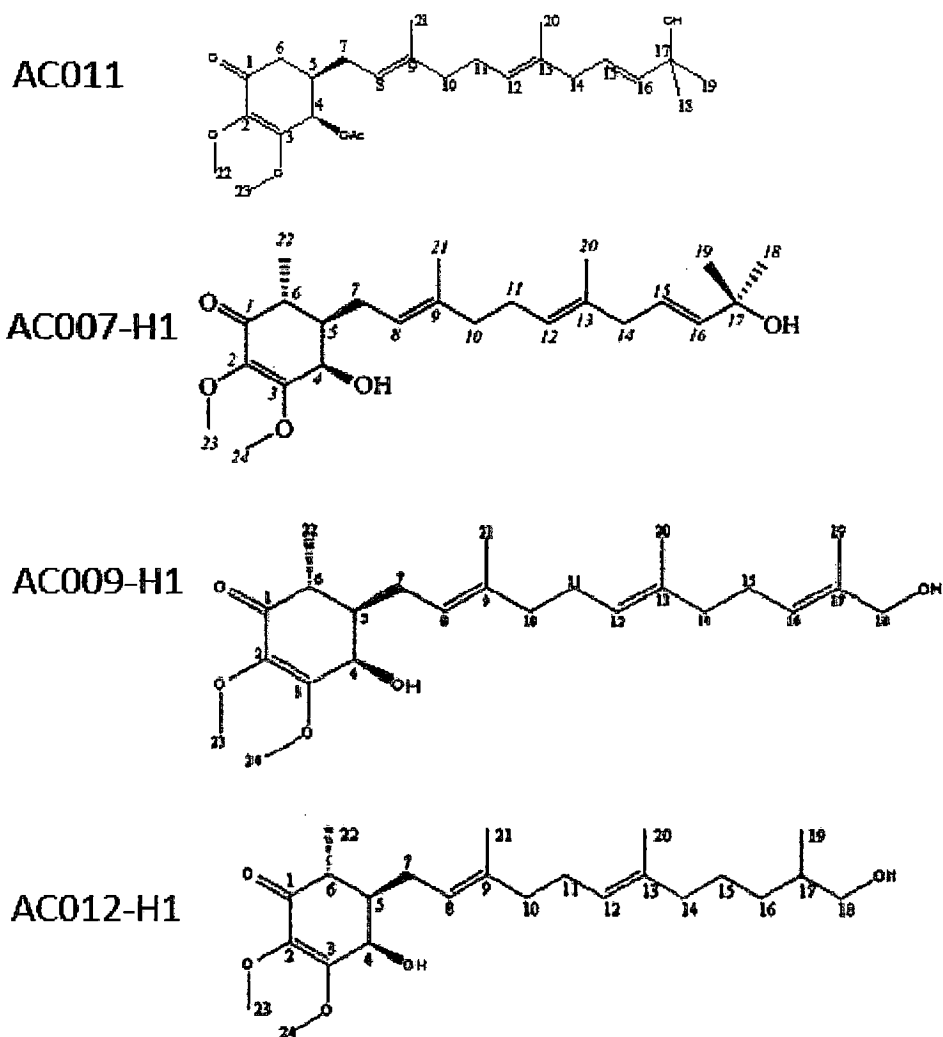
【0010】 其中，該醫藥組合物係藉由抑制癌細胞增生以致治療。

【0011】 其中，該醫藥組合物係以靜脈注射、皮下注射、口服、或塗抹方式施予患者。



【0012】 其中，該醫藥組合物之劑型包含溶液、乳劑、懸浮液、粉末、錠劑、油劑、軟膏、口含錠、膠囊。

【0013】 本發明另提供一種化合物用於製備治療癌症之醫藥組合物之用途，該治療癌症之醫藥組合物包含治療有效量之化合物；該化合物係選自於由AC011、AC007-H1、AC009-H1和AC012-H1所組成的群組；其中AC011、AC007-H1、AC009-H1、AC012-H1的結構式如下：

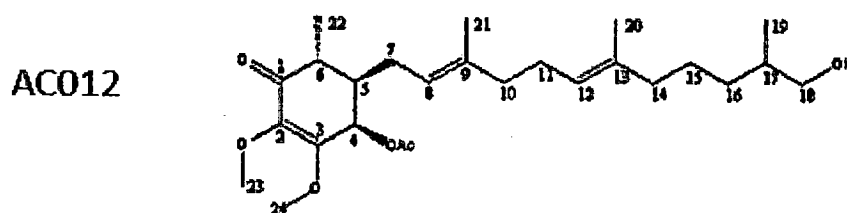
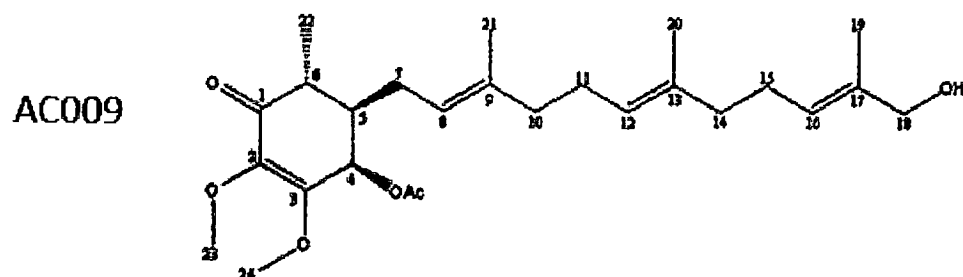


【0014】 其中，該癌症係選自前列腺癌、肝癌、黑色素瘤、腦癌、直腸結腸癌所組成之群組。

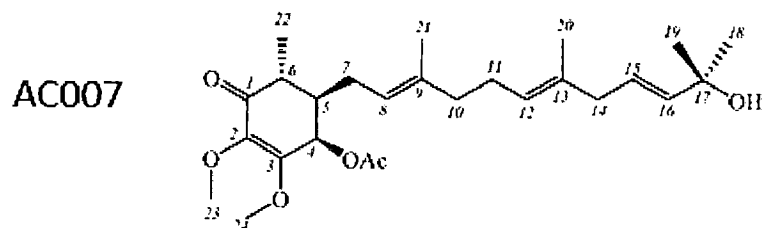
【0015】 其中，於較佳實施方式，該癌症係直腸結腸癌和肝癌。

【0016】 其中，該醫藥組合物係以靜脈注射、皮下注射、口服、或塗抹方式施予患者。

【0017】 本發明另提供一種化合物用於製備治療癌症之醫藥組合物的用途，該治療癌症之醫藥組合物包含治療有效量之化合物；該化合物係選自於由AC009和AC012所組成的群組；其中該癌症係選自於由前列腺癌、黑色素瘤、腦癌、肺癌和直腸結腸癌所組成之群組；其中AC009、AC012的結構式如下：

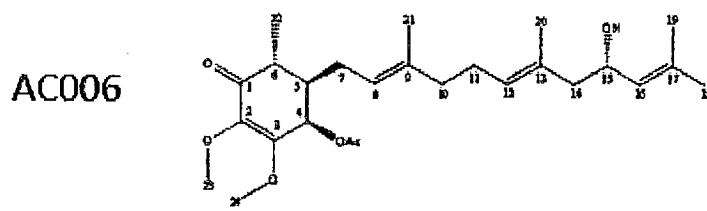


【0018】 本發明另提供一種化合物用於製備治療癌症之醫藥組合物的用途，該治療癌症之醫藥組合物包含治療有效量之化合物；該化合物係AC007；其中該癌症係選自於由黑色素瘤、腦癌和直腸結腸癌所組成之群組；其中AC007的結構式如下：



【0019】 本發明另提供一種化合物用於製備治療癌症之醫藥組合物

的用途，該治療癌症之醫藥組合物包含治療有效量之化合物；該化合物係 AC006；其中該癌症係選自於由黑色素瘤和腦癌所組成之群組；其中 AC006的結構式如下：



【0020】 本發明另提供一種製備具生物活性之化合物及其衍生物的方法，包括以下步驟：

取 70-230 孔洞之矽膠(silica gel) (70-230mesh)與菌絲體重量 1:1(w/w)填充管柱，以 *n*-Hexane /乙酸乙酯( Ethyl acetate)梯度沖提，沖出物分成分層(fraction) F1、F2 與 F3，梯度分別為 17-22%% Ethyl acetate、23-27% Ethyl acetate 及 28-33% Ethyl acetate，將 F3 依停留時間(retention time)順序分成三個區段 F3-1~F3-3；

取 F3-1 使用移動相為二氯甲烷/丙酮( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /Acetone)以矽膠管柱層析分離(極性由 50:1 到 20:1 梯度沖提)，取 40:1-15:1 之區段，進一步使用正相 MPLC 半製備管柱以 *n*-Hexane / Ethyl acetate (4:1)分離純化得到化合物 AC006；

將 F3-2 以正相 MPLC 矽膠管柱，使用移動相  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ / Acetone 梯度分離(100%:0% to 70%: 30%)，取 95%:5%至 85%:15%區段分成 3 個區段 F3-2-1 至 F3-2-3；

將 F3-2-3 進一步分離純化，使用移動相 *n*-hexane/Acetone(100%:0% to 0%:100%)以矽膠管柱層析，取 *n*-hexane/Acetone=90/10 至 70/30 之區段繼續以移動相 *n*-hexane/Ethyl acetate(100%:0% to 0%:100%)以矽膠管柱

層析於 *n*-hexane/Ethyl acetate=60/40 獲得 AC007；

F-3-3 以正相 MPLC 矽膠管柱，使用移動相 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Acetone (100%:0% to 0%:100%) 梯度沖提分離，取 90%:10% to 70%:30% 分成 5 個區段 F3-3-1 至 F3-3-5；將 F-3-3-5(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Acetone=73/27 的區段)進一步分離純化，使用移動相 *n*-hexane/Acetone(95%:5% to 50%:50%)以矽膠管柱取 85%:15% to 70%:30%之區段層析分成 5 個區段 F3-3-5-1 至 F3-3-5-5；

取 F3-3-5-1(*n*-hexane/Acetone=90/10-80/20)進一步以逆相 MPLC C-18 管柱分離純化，移動相以 1%甲酸水溶液/Methanol= 35%/65%至 20%/80% 為梯度，取 28%/72%-22%/78%的區段進一步使用移動相 *n*-hexane/Ethyl acetate=80%:20%至 50%:50%以矽膠管柱層析，於 *n*-hexane/Ethyl acetate=75%:25%-65%:35%得到 AC012；

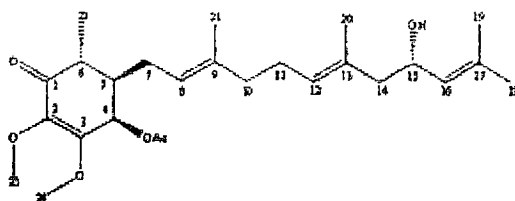
取 F3-3-5-3 以逆相 MPLC C-18 矽膠管柱分離純化，移動相為 1%甲酸水溶液/Methanol= 25/75 等梯度以 15 毫升/分鐘流度沖提，取以 AC009 為主之區段(停留時間 130-170 分鐘)進一步純化，使用移動相 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Ethyl acetate 以 silica gel 梯度沖提(90%:0% to 0%:100%)管柱層析，於 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Ethyl acetate=80%/20%- 60%/40%得到 AC009；

取 F3-3-5-4(*n*-hexane/Acetone=76/24)以逆相 HPLC C-18 矽膠管柱分離純化，移動相為 1%甲酸水溶液/Methanol =25%:75% 等梯度沖提，純化產物為 AC011；

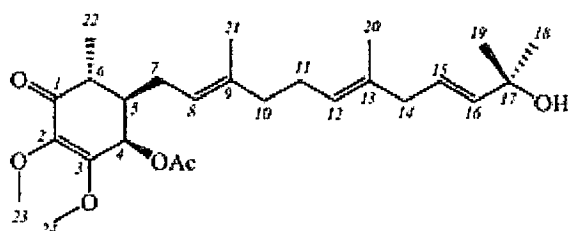
其中該 AC006、AC007、AC009、AC011、AC012 即具生物活性之化合物；

其中 AC006、AC007、AC009、AC011、AC012 的結構式如下：

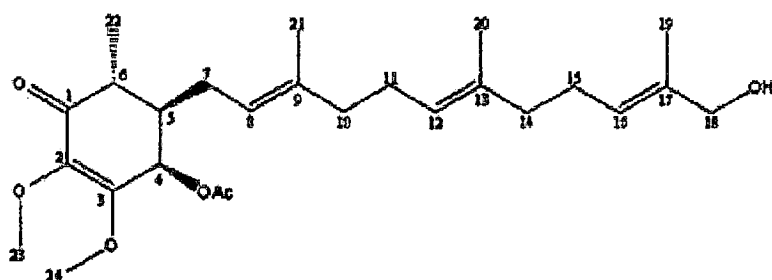
AC006



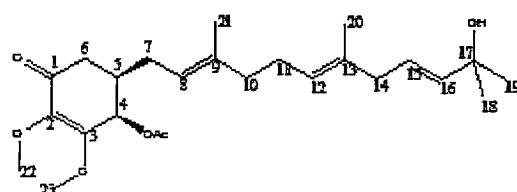
AC007



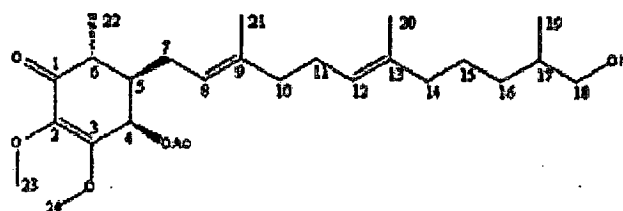
AC009



AC011



AC012



【0021】 其中，於較佳實施方式，該生物活性之化合物可進一步用於製備其C4為經基取代基之衍生物，包含以下步驟：

以 1 莫耳當量之甲醇水解該生物活性之化合物；

水解反映完成後加入安柏萊特樹脂並用濾紙過濾後得到中間產物；

該中間產物利用矽膠管柱層析，以正己烷與乙酸乙酯為移動項，沖提比例為正己烷/乙酸乙酯 4:1 至 1:1，約於沖提比例 1:1 時收集產物；

該產物以逆相 HPLC 以及 C18 半製備管柱純化，以甲醇/FA 緩衝液沖提梯度 75:25 等梯度沖提，可得 C4 為羥基取代基之衍生物。

### 【圖式簡單說明】

#### 【0022】

第一圖係本發明萃取物AC012抑制血管新生的能力；分別於EPC細胞培養中加入(A)控制組、(B)AC012 0.1 $\mu$ g/ml、(C)AC012 0.3 $\mu$ g/ml、(D)AC012 1 $\mu$ g/ml。

### 【實施方式】

【0023】 本說明書中所述之所有技術性及科學術語，除非另外有所定義，皆為該所屬領域具有通常技藝者可共同瞭解的意義。本發明係以下面的實施例予以示範闡明，但僅為例示而非限制，本發明不受下述實施例所限制。除非另有說明，本發明所用之材料皆市售易於取得，下列僅為示例可取得之管道。

【0024】 術語「治療」、「用於治療」以及其類用語係指稱延緩、改善、減少、或逆轉患者所罹患之可診斷病症以及該病症造成之相關症狀的方法以及預防該病症或任何其所屬之相關症狀的方法。

【0025】 術語「藥學上可接受」係指稱物質或組合物必須與其藥學上調配物之其他成分相容，且不加劇患者之症狀。

【0026】 本發明提供之化合物或組合物係可利用本發明所屬技術領域具有通常知識者所詳知的技術，將本案所提供之化合物或組合物、與至

少一藥學上可接受之載劑(vehicle)，製備一適用本發明組合物之劑型。其中該劑型包含但不限於：溶液、乳劑、懸浮液、粉末、錠劑、口含錠、藥片、口嚼膠、膠囊以及其他類似或適用本發明之劑型。

【0027】 術語「藥學上可接受之載劑」包含一或多種選自於下列的成分類型：溶劑、乳化劑、懸浮劑、分解劑、黏結劑、賦形劑、安定劑、螯合劑、稀釋劑、膠凝劑、防腐劑、潤滑劑、表面活性劑、及其他類似或適用於本發明之載劑。

【0028】 前述組合物中，亦可依需適宜地添加一或多種以上製劑領域內通常使用之溶解輔助劑、緩衝劑、著色劑、調味劑等。

【0029】 術語「藥學上可接受之賦形劑」包括但不限於，聚合物、樹脂、增塑劑、填料、潤滑劑、稀釋劑、黏合劑、崩解劑、溶劑、共一溶劑、界面活性劑、防腐劑、甜味劑、調味劑、藥學級的染料或顏料、及黏度劑至少一者。

【0030】 術語「醫藥組合物」係指稱一固體或液體組成物，其形式、濃度和純度程度適合投予給患者，在投予之後，其可誘發所欲生理變化；醫藥組成物為無菌及/或非發熱性者(non-pyrogenic)。

【0031】 術語「有效量」係指稱產生、造成預期之生物體反應所必須之劑量，且非以治療痊癒所需為定量。本發明所屬技術領域具通常知識者可理解，醫藥組合物之有效量可視諸如下列等因素而變化：期望生物終點、擬遞送生物活性劑、囊封基質(encapsulating matrix)之組成、目標組織等等。

實施例1 牛樟芝化合物之製備

【0032】 牛樟芝液態發酵菌絲體以正己烷(*n*-hexane)回流萃取(reflux) 2次，每次1-3小時；抽氣過濾後，合併兩次*n*-hexane萃取液；取70-230孔洞之矽膠(silica gel) (70-230mesh)與菌絲體重量1:1(w/w)填充管柱，以*n*-Hexane / 乙酸乙酯(Ethyl acetate)梯度沖提，沖出物分成分層(fraction) F1、F2與F3，梯度分別為17-22% Ethyl acetate、23-27% Ethyl acetate及28-33% Ethyl acetate，將F3依停留時間(retention time)順序分成三個區段F3-1~F3-3。

【0033】 取F3-1使用移動相為二氯甲烷/丙酮( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /Acetone)以矽膠管柱層析分離(極性由50:1到20:1梯度沖提)，取40:1-15:1之區段，進一步使用正相HPLC(Medium pressure liquid chromatography)半製備管柱以*n*-Hexane / Ethyl acetate (4:1)分離純化得到化合物AC006。

【0034】 將F3-2以正相MPLC(Medium pressure liquid chromatography)矽膠管柱，使用移動相 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ / Acetone梯度分離(100%:0% to 70%: 30%)，取95%:5%至85%:15%區段分成3個區段；將F3-2-3進一步分離純化，使用移動相*n*-hexane/Acetone(100%:0% to 0%:100%)以矽膠管柱層析，取*n*-hexane/Acetone=90/10至70/30之區段繼續以移動相*n*-hexane/Ethyl acetate(100%:0% to 0%:100%)以矽膠管柱層析於*n*-hexane/Ethyl acetate=60/40獲得AC007。

【0035】 F-3-3以正相MPLC 矽膠管柱，使用移動相 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /Acetone (100%:0% to 0%:100%) 梯度沖提分離，取90%:10% to 70%:30%分成5個區段；將F-3-3-5( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /Acetone=73/27的區段)進一步分離純化，使用移動相*n*-hexane/Acetone(95%:5% to 50%:50%)以矽膠管柱取85%:15% to 70%:30%之區段層析分成5個區段；取F3-3-5-1(*n*-hexane/Acetone=90/10-80/20)進一步以逆



相MPLC C-18管柱分離純化，移動相以1%甲酸水溶液/Methanol= 35%/65%至20%/80%為梯度，取28%/72%-22%/78%的區段進一步使用移動相n-hexane/Ethyl acetate=80%:20%至50%:50%以矽膠管柱層析，於n-hexane/Ethyl acetate=75%:25%-65%:35%得到AC012。

【0036】 取F3-3-5-3以逆相(reverse phase) MPLC C-18矽膠管柱分離純化，移動相為1%甲酸水溶液/Methanol= 25/75 等梯度(isocratic)以15毫升/分鐘流度沖提，取以AC009為主之區段(停留時間130-170分鐘)進一步純化，使用移動相CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Ethyl acetate以silica gel 梯度沖提(90%:0% to 0%:100%)管柱層析，於CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Ethyl acetate=80%/20%- 60%/40%得到AC009。

【0037】 取F3-1並以逆相 MPLC C-18矽膠管柱分離純化，移動相為1%甲酸水溶液/Methanol= 25%/75%為移動相等梯度沖提，純化產物為AC-05-01。

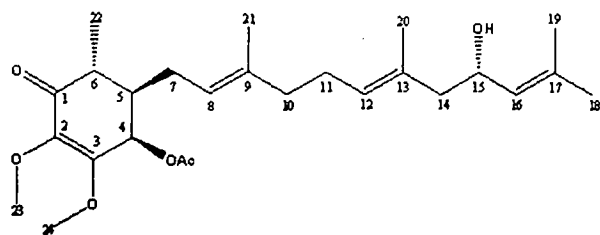
【0038】 取F3-3-5-4(*n*-hexane/Acetone=76/24)以逆相HPLC C-18矽膠管柱分離純化，移動相為1%甲酸水溶液/Methanol =25%:75% 等梯度沖提，純化產物為 AC011。

【0039】 其中該萃取物AC006、AC007、AC009、AC011、AC012 即為牛樟芝具有抗癌活性之化合物。

#### 實施例2 牛樟芝化合物之化學結構分析

【0040】 前述純化之化合物，以光譜分析方法辨認其化學結構，包含使用1D/2D NMR以及質譜儀。該化合物結構分析結果如下所示：

##### 實施例2.1

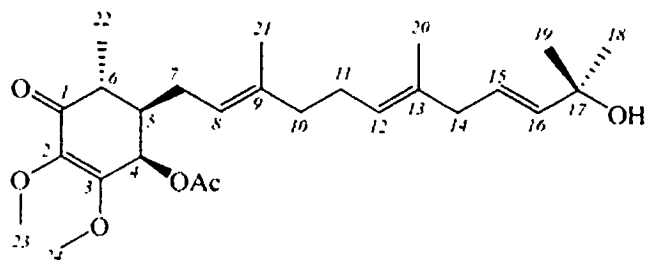


AC006

【0041】 EIMS,  $m/z$  471.2701  $[M+Na]^+$ ;  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ )

$\delta$  5.77 (1H, d,  $J = 3.2$  Hz, H-4), 5.18 (1H, t,  $J = 5.6$  Hz, H-12), 5.16 (1H, t,  $J = 6.4$  Hz, H-8), 5.11 (1H, dt,  $J = 1.6, 8.8$  Hz, H-16), 4.43 (1H, q,  $J = 6.8$ , H-15), 4.00 (3H, s, H-24), 3.62 (3H, s, H-23), 2.53 (1H, m, H-6), 2.29 (1H, m, H-7a), 2.24 (2H, m, H-14), 2.11 (2H, m, H-11), 2.10 (3H, s, -OAc), 2.08 (1H, m, H-10a), 2.02 (1H, m, H-7b), 1.94 (1H, m, H-10b), 1.92 (1H, m, H-5), 1.71 (3H, d,  $J = 1.2$  Hz, H-18), 1.66 (3H, d,  $J = 1.2$  Hz, H-19), 1.64 (3H, s, H-20), 1.58 (3H, s, H-21), 1.18 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-22);  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  199.2 (s, C-1), 171.6 (s, -COCH<sub>3</sub>), 160.7 (s, C-3), 138.9 (s, C-2), 138.8 (s, C-9), 134.9 (s, C-17), 132.9 (s, C-13), 129.6 (d, C-16), 128.4 (d, C-12), 122.2 (d, C-8), 70.4 (d, C-4), 68.1 (d, C-15), 61.2 (q, C-23), 60.4 (q, C-24), 49.2 (t, C-14), 44.4 (d, C-5), 42.6 (d, C-6), 40.9 (t, C-10), 28.1 (t, C-7), 27.6 (t, C-11), 26.1 (q, C-18), 21.0 (q, -COCH<sub>3</sub>), 18.5 (q, C-19), 16.8 (q, C-20), 16.5 (q, C-21), 13.3 (q, C-22).

## 實施例2.2

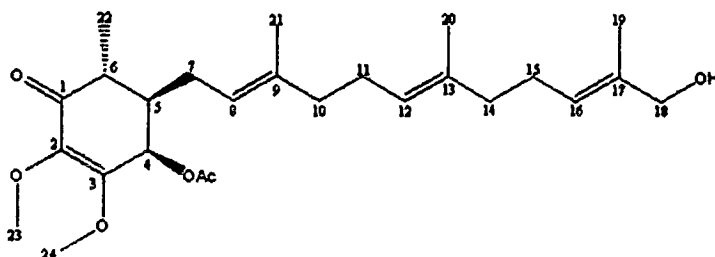


AC007

【0042】 EIMS,  $m/z$  471.2690  $[M+Na]^+$ ;  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ )

$\delta$  5.76 (1H, d,  $J = 3.1$  Hz, H-4), 5.57 (1H, m, H-16), 5.55 (1H, m, H-15), 5.16 (1H, t,  $J = 7.3$  Hz, H-12), 5.15 (1H, t,  $J = 7.1$  Hz, H-8), 3.99 (3H, s, H-24), 3.61 (3H, s, H-23), 2.52 (1H, m, H-6), 2.27 (1H, m, H-7a), 2.11 (2H, m, H-11), 2.10 (3H, s, -OAc), 2.02 (1H, m, H-7b), 2.00 (2H, m, H-10), 1.93 (1H, m, H-5), 1.59 (3H, s, H-20), 1.58 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-14), 1.57 (3H, s, H-21), 1.25 (3H, s, H-19), 1.25 (3H, s, H-18), 1.17 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-22);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  199.1 (s, C-1), 171.4 (s, -COCH<sub>3</sub>), 160.6 (s, C-3), 140.5 (d, C-16), 138.9 (s, C-2), 138.7 (s, C-9), 135.1 (s, C-13), 126.2 (d, C-15), 126.1 (d, C-12), 122.1 (d, C-8), 71.1 (s, C-17), 70.3 (d, C-4), 61.1 (q, C-23), 60.2 (q, C-24), 44.2 (d, C-5), 43.5 (t, C-14), 42.5 (d, C-6), 40.8 (t, C-10), 30.0 (q, C-18), 30.0 (q, C-19), 28.0 (t, C-7), 27.5 (t, C-11), 20.8 (q, -COCH<sub>3</sub>), 16.3 (q, C-21), 16.1 (q, C-20), 13.1 (q, C-22).

### 實施例2.3

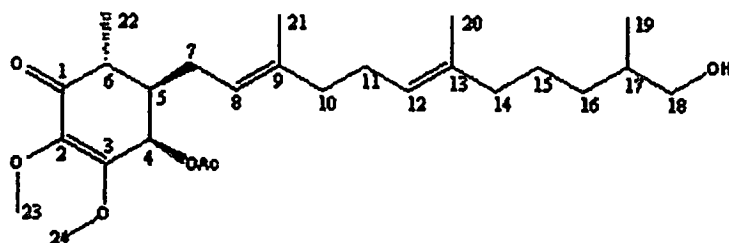


AC009

【0043】 EIMS,  $m/z$  471.26498 [ $\text{M}+\text{Na}$ ]<sup>+</sup>;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  5.77 (1H, d,  $J = 3.2$  Hz, H-4), 5.39 (1H, td,  $J = 7.2, 1.2$  Hz, H-16), 5.16 (1H, td,  $J = 7.2, 0.8$  Hz, H-12), 5.16 (1H, td,  $J = 7.2, 0.8$  Hz, H-8), 4.00 (3H, s, H-23), 3.91 (2H, s, H-18), 3.62 (3H, s, H-24), 2.53 (1H, m, H-6), 2.28 (1H, m, H-7a), 2.14 (2H, m, H-11), 2.14 (2H, m, H-15), 2.10 (3H, s, -OAc), 2.04 (1H, m, H-7b), 2.03 (2H, m, H-10), 2.03 (2H, m, H-14), 1.92 (1H, m, H-5), 1.64

(3H, s, H-19), 1.62 (3H, s, H-20), 1.58 (3H, s, H-21), 1.18 (3H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-22);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  199.2 (s, C-1), 171.6 (s, -COCH<sub>3</sub>), 160.8 (s, C-3), 138.9 (s, C-2), 138.8 (s, C-9), 136.0 (s, C-13), 136.0 (s, C-17), 126.7 (d, C-16), 125.7 (d, C-12), 122.2 (d, C-8), 70.5 (d, C-4), 69.1 (t, C-18), 61.3 (q, C-24), 60.4 (q, C-23), 44.4 (d, C-5), 42.6 (d, C-6), 41.0 (t, C-10), 40.7 (t, C-14), 28.1 (t, C-7), 27.6 (t, C-16), 27.5 (t, C-11), 21.0 (q, -COCH<sub>3</sub>), 16.5 (q, C-21), 16.3 (q, C-20), 13.9 (q, C-19), 13.1 (q, C-22).

#### 實施例2.4



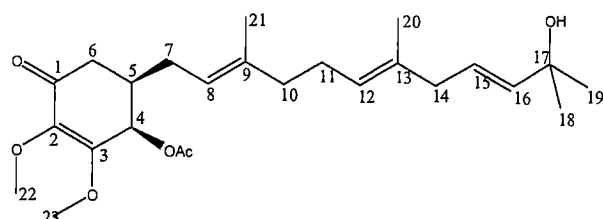
AC012

【0044】 EIMS,  $m/z$  473.2846  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

$\delta$  5.77 (1H, d,  $J = 3.2$  Hz, H-4), 5.16 (1H, t,  $J = 7.6$  Hz, H-8), 5.13 (1H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-12), 4.00 (3H, s, H-24), 3.62 (3H, s, H-23), 3.38 (1H, d,  $J = 10.2$  Hz, H-18a), 3.31 (1H, d,  $J = 5.6$  Hz, H-18b), 2.53 (1H, m, H-6), 2.26 (1H, m, H-7a), 2.13 (2H, m, H-11), 2.10 (3H, s, -OAc), 2.04 (1H, m, H-7b), 2.00 (2H, m, H-10), 1.96 (2H, m, H-14), 1.93 (1H, m, H-5), 1.60 (3H, s, H-20), 1.58 (3H, s, H-21), 1.56 (1H, m, H-17), 1.36 (2H, m, H-15), 1.06 (2H, m, H-16), 1.06 (3H, d,  $J = 4.8$  Hz, H-22), 0.90 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-19);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  198.9 (s, C-1), 171.3 (s, -COCH<sub>3</sub>), 160.5 (s, C-3), 138.7 (s, C-9), 138.6 (s, C-2), 136.2 (s, C-13), 125.3 (d, C-12), 122.0 (d, C-8), 70.3 (d, C-4), 68.4 (t, C-18), 61.1 (q, C-23), 60.2 (q, C-24), 44.2 (d, C-5), 42.5 (d, C-6), 41.0 (t, C-14), 40.9

(t, C-10), 36.8 (d, C-17), 34.0 (t, C-16), 28.0 (t, C-7), 27.4 (t, C-11), 26.5 (t, C-15), 20.9 (q, -COCH<sub>3</sub>), 17.2 (q, C-19), 16.4 (q, C-21), 16.0 (q, C-20), 13.2 (q, C-22).

### 實施例2.5

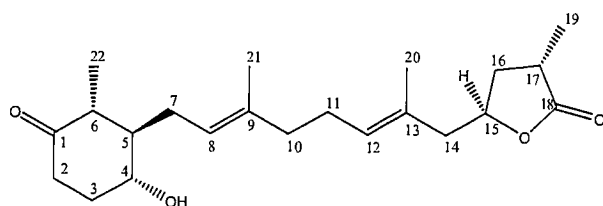


AC011

【0045】 EIMS,  $m/z$  475.2553 [M+Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

$\delta$  5.81 (1H, d,  $J = 3.2$  Hz, H-4), 5.57 (1H, m, H-16), 5.55 (1H, m, H-15), 5.15 (1H, t,  $J = 6.8$  Hz, H-12), 5.12 (1H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-8), 3.99 (3H, s, H-23), 3.62 (3H, s, H-22), 2.66 (1H, d,  $J = 5.2$  Hz, H-14), 2.38 (2H, m, H-6), 2.09 (3H, s, -OAc), 2.05 (2H, m, H-11), 2.03 (1H, m, H-7a), 2.01 (2H, m, H-10), 1.99 (1H, m, H-7b), 1.92 (1H, m, H-5), 1.58 (3H, s, H-20), 1.58 (3H, s, H-21), 1.25 (3H, s, H-19), 1.25 (3H, s, H-18); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  197.1 (s, C-1), 171.6 (s, -COCH<sub>3</sub>), 161.8 (s, C-3), 140.5 (d, C-15), 139.5 (s, C-2), 135.2 (s, C-13), 126.2 (d, C-16), 126.0 (d, C-12), 122.2 (d, C-8), 121.9 (s, C-9), 71.1 (s, C-17), 71.1 (d, C-4), 61.1 (q, C-22), 60.0 (q, C-23), 43.5 (t, C-14), 40.8 (t, C-10), 39.2 (t, C-6), 38.3 (d, C-5), 30.1 (t, C-7), 30.0 (q, C-18), 30.0 (q, C-19), 27.5 (t, C-11), 20.7 (q, -COCH<sub>3</sub>), 16.3 (q, C-21), 16.2 (q, C-20).

### 實施例2.6



AC-05-01

【0046】 EIMS,  $m/z$  385.2379  $[M+Na]^+$ ;  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ )

$\delta$  5.25 (1H, t,  $J = 4.3$  Hz, H-12), 5.20 (1H, t,  $J = 4.8$  Hz, H-8), 4.69 (1H, m, H-15), 4.16 (1H, q,  $J = 4.1$  Hz, H-4), 2.73 (1H, m, H-17), 2.36 (1H, m, H-14a), 2.31 (1H, m, H-6), 2.29 (1H, m, H-7a), 2.27 (2H, m, H-3), 2.23 (1H, m, H-14b), 2.19 (1H, m, H-16a), 2.16 (2H, m, H-11), 2.08 (2H, m, H-10), 2.02 (1H, m, H-7b), 1.98 (1H, m, H-16b), 1.88 (2H, m, H-2), 1.67 (3H, s, H-20), 1.65 (3H, s, H-21), 1.41 (1H, m, H-5), 1.23 (3H, d,  $J = 4.9$  Hz, H-19), 1.06 (3H, d,  $J = 4.3$  Hz, H-22);  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  213.8 (s, C-1), 182.7 (s, H-18), 137.9 (s, C-9), 131.8 (s, C-13), 129.3 (d, C-12), 122.7 (d, C-8), 78.8 (d, C-15), 76.2 (d, C-4), 48.6 (d, C-6), 48.2 (d, C-5), 46.0 (t, C-14), 40.6 (t, C-10), 36.6 (t, C-3), 35.7 (t, C-16), 35.1 (d, C-17), 32.9 (t, C-7), 29.6 (t, C-2), 27.5 (t, C-11), 16.5 (q, C-20), 16.3 (q, C-21), 16.0 (q, C-19), 11.8 (q, C-22).

### 實施例3 牛樟芝化合物取代基水解

【0047】 前述牛樟芝化合物分析其化學結構後，將其C3以及C4之取代基進行水解改造；其取代基改造之產物若於C4以羥基(-OH)取代者，以H1標示；若其取代基改造之產物若於C4以羥基取代且於C4以二甲氧基(dimethoxy)取代者，以H2標示。該水解方法詳述如下：

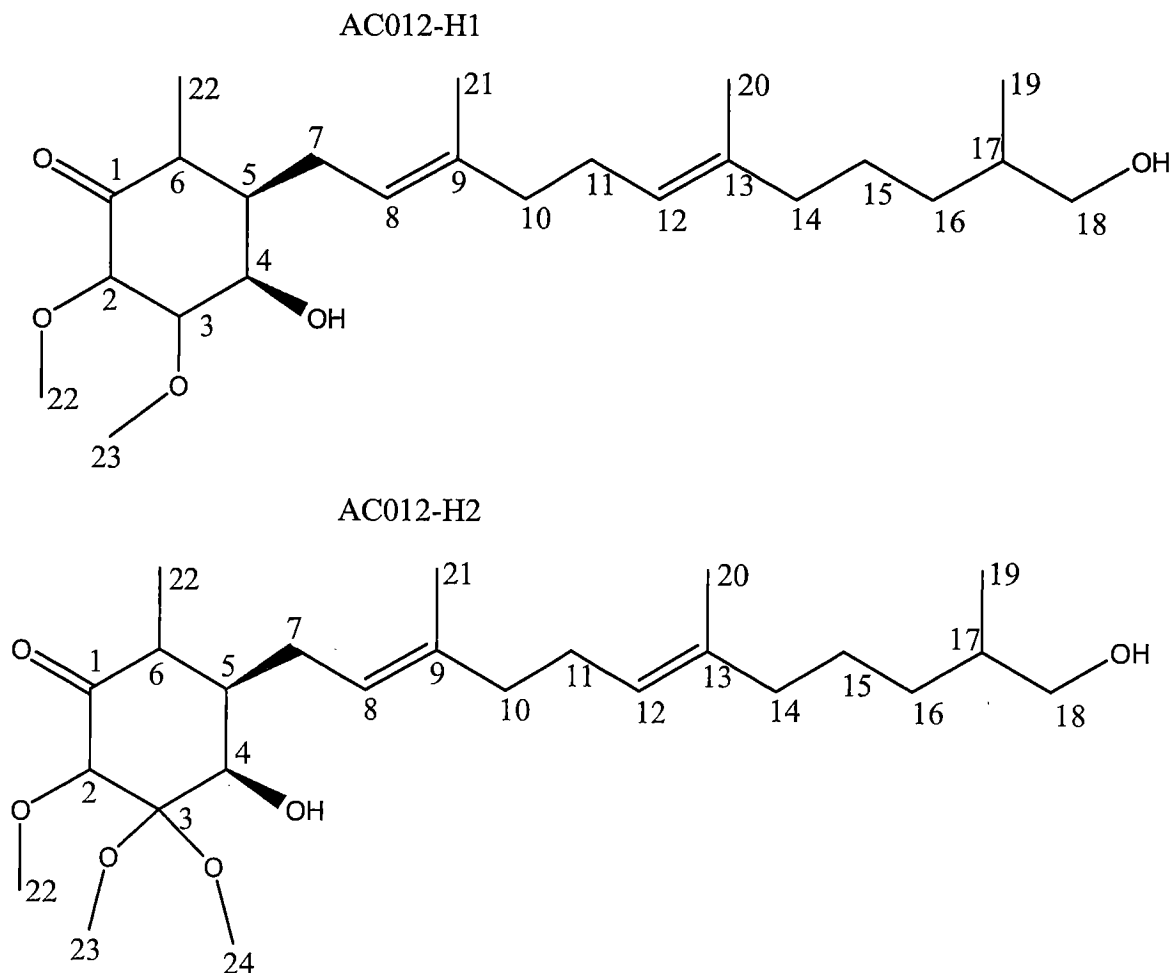
【0048】 AC012以1莫耳當量甲氧基鈉(Sodium methoxide)以及無水甲醇作為溶劑進行水解反應。水解過程以TLC(thin layer chromatography)進行監測，直到完全反應完再加入酸性安柏萊特樹脂(amberlite)中和反應，再將amberlite用濾紙過濾後得到中間產物。

【0049】 該中間產物利用正相系統進行玻璃管柱層析，分離樹酯使

用矽膠，以hexane/ethyl acetate為移動相，沖提比例從hexane:ethyl acetate=4:1至1:1，沖提過程以TLC進行監測，AC012-H1和AC012-H2之混合物約在hexane:ethyl acetate=1:1時被沖提下來，收集並濃縮，得濃縮之產物。

【0050】 將該濃縮之產物使用逆相HPLC進行最後的純化，管柱使用C18半製備不銹鋼管柱，移動相以甲醇:0.1%磷酸鹽緩衝溶液(phosphate buffered saline)= 75:25單一比例進行沖提。AC012-H1之停留時間(retention time)約是31至25分鐘；AC012-H2為39至43分鐘。

【0051】 AC012-H1以及AC012-H2的化學結構如下所示：



【0052】 相同取代基水解方法可應用於其他本發明所提供之牛樟芝化合物。

【0053】 若原始反應物為AC007，AC007-H1停留時間為36-43分鐘；

AC007-H2停留時間為47-53分鐘。

【0054】 若原始反應物為AC009，AC0097-H1停留時間為27-32分鐘；AC009-H2停留時間為35-40分鐘。

#### 實施例4 牛樟芝化合物之抑制血管新生之功效

【0055】 本發明利用SRB試驗以及血管形成試驗(matrigel capillary tube formation assay)，分析自牛樟芝純化所得之化合物的抑制血管新生之功效。

【0056】 SRB試驗係將內皮前驅細胞(EPC, endothelial progenitor cells)以 $5 \times 10^3$ 細胞/培養皿孔洞(cell/well)之數量置於96孔培養皿，並令其處於無血清(serum free)之培養基飢餓48小時，再置於10%FBS培養基以及不同濃度AC012中培養48小時，AC012濃度分別為0.1, 0.3, 1, 3, 10 and 30微克/毫升( $\mu\text{g/ml}$ )。經處理藥物培養後，取出培養基並於培養皿孔洞加入100微升( $\mu\text{l}$ ) 10%三氯乙酸(trichloroacetic acid) (w/v)，於4°C放置1小時以固定細胞。再將培養皿以去離子水洗淨晾乾。於各孔洞加入50微升0.4% Sulforhodamine B (SRB) (w/v)(另含1%乙酸) 並於室溫放置5分鐘，再以1%乙酸清洗未與細胞結合的SRB，之後晾乾。與細胞結合的SRB以100微升10 mM Tris緩衝液(pH 10.5)溶解，並於光度計以495nm定量。

【0057】 Matrigel capillary tube formation試驗包含以下步驟：將Matrigel以10 $\mu\text{l}$ /well加入15孔培養皿中，於37°C放置30分鐘以形成膠膜(gel layer)。形成膠膜後， $5 \times 10^3$  EPC細胞、VEGF(vascular endothelial growth factor)、以及不同濃度的AC012(0, 0.1, 0.3, 1 $\mu\text{g/ml}$ )置入培養皿孔洞中，於37°C、5%二氧化碳之條件下放置16小時。16小時之後，使用反向相位差顯微



鏡(inverted contrast phase microscope (Nikon, Japan))觀察細胞生成。

【0058】 AC012抑制血管新生之功效：IC<sub>50</sub>為29 µg/ml；1 µg/ml

AC012可抑制31.89%的血管新生。

#### 實施例5 牛樟芝化合物之抑制癌細胞增生之功效

【0059】 利用SRB試驗分析自牛樟芝純化之化合物及其衍生物之抑制癌細胞增生之功效；此實施例即分析AC006、AC007、AC009、AC011、以及AC012，以及其水解改造取代基之產物，抑制多種癌細胞株增生之功效。

【0060】 各細胞株分別以 $5 \times 10^3$  cells/well置於96孔培養皿，並令其處於無血清(serum free)之培養基飢餓48小時，再置於10%FBS培養基以及0.1、0.3、1、3、10、30 µg/ml等不同濃度AC006、AC007、AC009、AC012中培養48小時。經處理藥物培養後，取出培養基並於培養皿孔洞加入100微升(µl) 10%三氯乙酸(trichloroacetic acid) (w/v)，於4°C放置1小時以固定細胞。再將培養皿以去離子水洗淨晾乾。於各孔洞加入50微升0.4% Sulforhodamine B (SRB) (w/v)(另含1%乙酸) 並於室溫放置5分鐘，再以1%乙酸清洗未與細胞結合的SRB，之後晾乾。與細胞結合的SRB以100微升10 mM Tris緩衝液(pH 10.5)溶解，並於光度計以495nm定量。

#### 實施例5.1 AC006抑制效果

【0061】 以AC006測試5種不同癌症，包括8種不同癌細胞株，其抑制半數癌細胞生長有效濃度，即IC<sub>50</sub>效果，其結果揭示於表1：

表. 1

| 細胞類型              | 細胞株      | IC <sub>50</sub> (μg/mL)           |
|-------------------|----------|------------------------------------|
| Prostate          | PC3      | 19.68                              |
| Liver             | Huh-7    | 0.72                               |
|                   | Sk-Hep-1 | 26.76                              |
| Melanoma          | B16F10   | 28.69                              |
| Lung              | A549     | >10 (inhibition=12.21% in 10μg/ml) |
| Brain<br>(Glioma) | U251     | >30 (inhibition=22.64% in 30μg/ml) |
|                   | U87      | >30 (inhibition=11.26% in 30μg/ml) |
|                   | LN-229   | >30 (inhibition=22.58% in 30μg/ml) |

實施例5.2 AC007及其衍生物抑制效果

【0062】 以AC007及其衍生物測試不同癌症及其細胞株之IC<sub>50</sub>效果，其結果揭示於表2、表3：

表 2

| 細胞類型       | 細胞株    | IC <sub>50</sub> (μg/mL)          |
|------------|--------|-----------------------------------|
| Melanoma   | B16F10 | 23.45                             |
| Prostate   | PC-3   | 22.06                             |
| Breast     | 4T-1   | 24.83                             |
| Colorectal | DLD-1  | 19.74                             |
|            | RKO    | 17.60                             |
| Brain      | LN-229 | >25 (inhibition=19.1% in 25μg/ml) |

表 3

| 細胞類型       | 細胞株   | IC <sub>50</sub> (μg/mL)                 |                                            |                                          |
|------------|-------|------------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------------|
|            |       | AC007                                    | AC007-H1                                   | AC007-H2                                 |
| Lung       | A549  | 3.57                                     | 1.69                                       | NA                                       |
| Liver      | Huh-7 | 0.88                                     | <0.3<br>(inhibition=85.16%<br>in 0.3μg/ml) | NA                                       |
| Colorectal | RKO   | >10<br>(inhibition=29.51%<br>in 10μg/ml) | >10<br>(inhibition=33.03%<br>in 10μg/ml)   | >10<br>(inhibition=29.88%<br>in 10μg/ml) |
|            | DLD-1 | >10<br>(inhibition=25.58%<br>in 10μg/ml) | >10<br>(inhibition=16.07%<br>in 10μg/ml)   | >10<br>(inhibition=27.05%<br>in 10μg/ml) |

|  |         |                                          |                                            |                                          |
|--|---------|------------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------------|
|  | SW-480  | >10<br>(inhibition=21.47%<br>in 10µg/ml) | >10<br>(inhibition=18.19%<br>in 10µg/ml)   | >10<br>(inhibition=25.74%<br>in 10µg/ml) |
|  | HCT-116 | 0.93                                     | <0.3<br>(inhibition=59.50%<br>in 0.3µg/ml) | >10<br>(inhibition=48.03%<br>in 10µg/ml) |

【0063】

實施例 5.3 AC009 及其衍生物抑制效果

【0064】 以AC009及其衍生物測試不同癌症及其細胞株之IC<sub>50</sub>效果，其結果揭示於表4、表5：

表 4

| 細胞類型     | 細胞株     | IC <sub>50</sub> (µg/mL)                 |
|----------|---------|------------------------------------------|
| Prostate | PC3     | 14.99                                    |
| Melanoma | B16F10  | 22.43                                    |
| Colon    | RKO     | 15.94                                    |
|          | NST     | >25<br>(inhibition=44.42%<br>in 25µg/ml) |
|          | HT-29   | 33.23                                    |
|          | SW480   | 18.55                                    |
|          | DLD-1   | 14.61                                    |
|          | COLO205 | 2.45                                     |
| Brain    | LN-229  | 19.5                                     |

表 5

| 細胞類型       | 細胞株   | IC <sub>50</sub> (µg/mL)                    |                                             |                                           |
|------------|-------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------|
|            |       | AC009                                       | AC009-H1                                    | AC009-H2                                  |
| Lung       | A549  | 8.08                                        | >10<br>(inhibition=40.79<br>% in 10µg/ml)   | NA                                        |
| Liver      | Huh-7 | <0.3<br>(inhibition=88.17<br>% in 0.3µg/ml) | <0.3<br>(inhibition=90.59<br>% in 0.3µg/ml) | NA                                        |
| Colorectal | RKO   | >10<br>(inhibition=33.22<br>% in 10µg/ml)   | >10<br>(inhibition=8.79%<br>in 10µg/ml)     | >10<br>(inhibition=47.01<br>% in 10µg/ml) |

|  |         |                                         |                                            |                                          |
|--|---------|-----------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------------|
|  | DLD-1   | >10<br>(inhibition=8.75%<br>in 10µg/ml) | >10<br>(inhibition=11.04%<br>in 10µg/ml)   | >10<br>(inhibition=9.46%<br>in 10µg/ml)  |
|  | SW-480  | >10<br>(inhibition=7.98%<br>in 10µg/ml) | >10<br>(inhibition=4.01%<br>in 10µg/ml)    | >10<br>(inhibition=14.94%<br>in 10µg/ml) |
|  | HCT-116 | 2.56                                    | <0.3<br>(inhibition=54.42%<br>in 0.3µg/ml) | >10<br>(inhibition=48.94%<br>in 10µg/ml) |

【0065】

實施例 5.4 AC011 抑制效果

【0066】 以AC011測試不同癌症及其細胞株之IC<sub>50</sub>效果，其結果揭示於表6：

表 6

| 細胞類型       | 細胞株     | IC <sub>50</sub> (µg/mL)           |
|------------|---------|------------------------------------|
| Colorectal | RKO     | >10 (inhibition=24.13% in 10µg/ml) |
|            | DLD-1   | >10 (inhibition=7.57% in 10µg/ml)  |
|            | SW-480  | >10 (inhibition=31.56% in 10µg/ml) |
|            | HCT-116 | 2.43                               |

實施例 5.5 AC012 及其衍生物抑制效果

【0067】 以AC012及其衍生物測試不同癌症及其細胞株之IC<sub>50</sub>效果，其結果揭示於表7、表8：

表 7

| 細胞類型              | 細胞株      | IC <sub>50</sub> (µg/mL) |
|-------------------|----------|--------------------------|
| Prostate          | PC3      | 11.36                    |
| Liver             | Sk-Hep-1 | 8.27                     |
| Melanoma          | B16F10   | 9.16                     |
| Brain<br>(Glioma) | U251     | 22.72                    |
|                   | U87      | 18.63                    |
|                   | LN-229   | 19.45                    |

表 8

| 細胞類型       | 細胞株     | IC <sub>50</sub> (μg/mL)                   |                                            |                                          |
|------------|---------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------------|
|            |         | AC012                                      | AC012-H1                                   | AC012-H2                                 |
| Lung       | A549    | >10<br>(inhibition=49.50%<br>in 10μg/ml)   | 6.4                                        | NA                                       |
| Liver      | Huh 7   | <0.3<br>(inhibition=78.92%<br>in 0.3μg/ml) | <0.3<br>(inhibition=91.18%<br>in 0.3μg/ml) | NA                                       |
| Colorectal | RKO     | >10<br>(inhibition=34.67%<br>in 10μg/ml)   | >10<br>(inhibition=17.52%<br>in 10μg/ml)   | >10<br>(inhibition=31.58%<br>in 10μg/ml) |
|            | DLD-1   | >10<br>(inhibition=20.21%<br>in 10μg/ml)   | >10<br>(inhibition=11.75%<br>in 10μg/ml)   | >10<br>(inhibition=8.31% in<br>10μg/ml)  |
|            | SW-480  | >10<br>(inhibition=9.05% in<br>10μg/ml)    | >10<br>(inhibition=14.78%<br>in 10μg/ml)   | >10<br>(inhibition=5.66% in<br>10μg/ml)  |
|            | HCT-116 | 2.29                                       | <0.3<br>(inhibition=52.73%<br>in 0.3μg/ml) | >10<br>(inhibition=40.27%<br>in 10μg/ml) |

【0068】 綜實施例所揭示，本發明提供牛樟芝化合物及其萃取方法，並且分析其化學結構、揭示其於低濃度之下具有抑制血管新生之功效；基於該牛樟芝化合物，本發明亦提供化學合成新穎化合物之方法。本發明所揭示之新穎萃取方法可大量純化該化合物、降低培養牛樟芝子實體之成本。

【0069】 本發明亦揭示該化合物具有抑制癌細胞增生之功效，可用於製備治療癌症之藥物。此外，藉由水解牛樟芝化合物，改造其取代基所得之新穎化合物H1，可有效地提升化合物抑制癌細胞增生的效果，尤其是針對大腸癌細胞株；其中HCT116具有特徵為低表現量之Bax(Wang et al. 2012)、以及growth factor(TGF  $\alpha$  and EGFR)-independent (Howell et al. 1998)。

此外，本發明提供之化合物對於肝癌細胞亦有高度抑制其增生的功效，特別是針對Huh-7，一取自亞裔人種之肝癌上皮細胞株(epithelial-like tumorigenic cells)，具有HFE突變之特徵(Vecchi et al. 2009)。

**【0070】** 綜上所述，本發明提供純化牛樟芝化合物的方法、其化學結構、以及其抑制血管新生以及抑制癌細胞增生之功效。

**【0071】** 上列詳細說明係針對本發明之可行實施例之具體說明，惟該實施例並非用以限制本發明之專利範圍，凡未脫離本發明技藝精神所為之等效實施或變更，均應包含於本案之專利範圍中。

#### **【符號說明】**

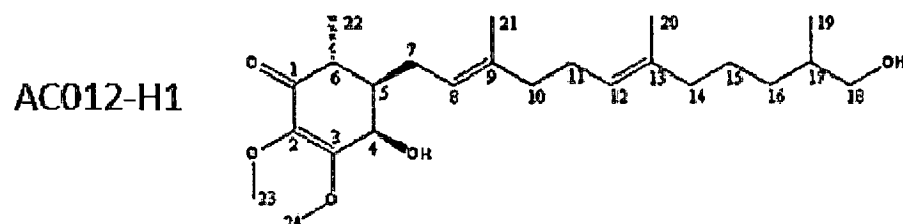
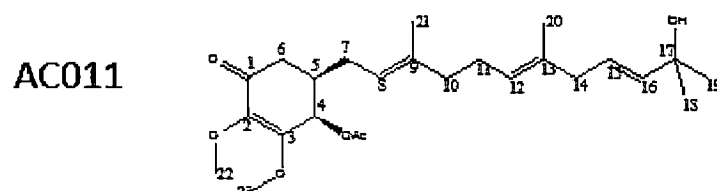
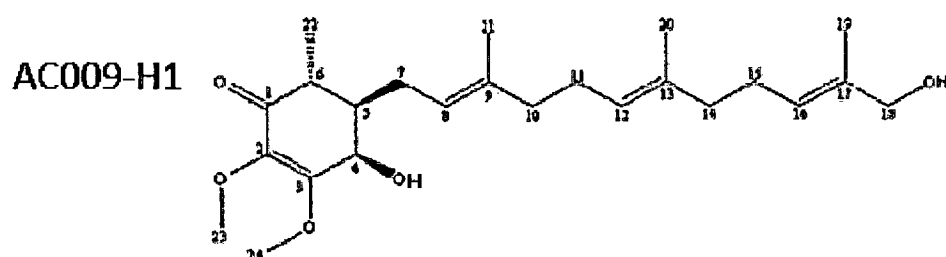
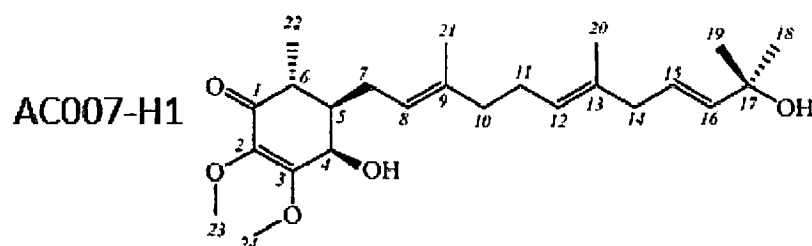
**【0072】**

# 申請專利範圍

1. 一種治療癌症之醫藥組合物，包含治療有效量之化合物或其鹽類，以及至少一種藥學上可接受之載劑；

該化合物係選自 AC011、AC007-H1、AC009-H1、以及 AC012-H1 所組成之群組或前述化合物之至少二者任意組合；

其中 AC011、AC007-H1、AC009-H1、以及 AC012-H1 的結構式如下：



其中該癌症係選自前列腺癌、肝癌、黑色素瘤、腦癌、第IV期直腸結腸癌所組成之群組。

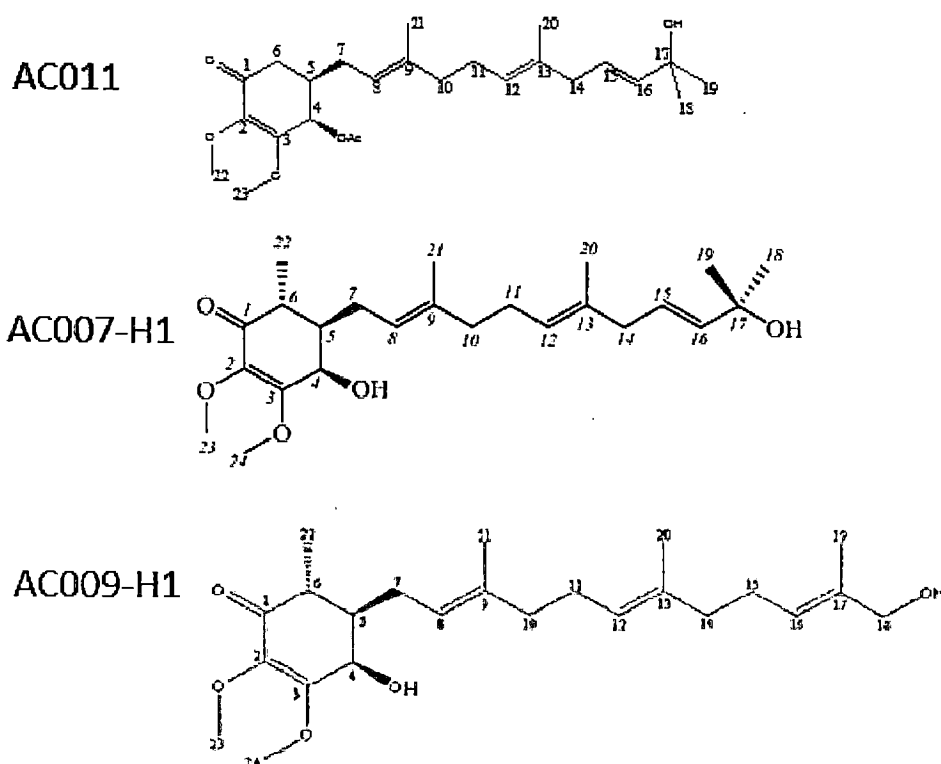
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之醫藥組合物，該載劑包含賦形劑、稀釋

劑、增稠劑、填充劑、黏結劑、崩解劑、潤滑劑、油性或非油性的基質、表面活性劑、懸浮劑、膠凝劑、佐劑、防腐劑、抗氧化劑、穩定劑、色素或香料。

3. 如申請專利範圍第 1 項所述之醫藥組合物，該醫藥組合物係藉由抑制癌細胞增生以致治療。
4. 如申請專利範圍第 1 項所述之醫藥組合物，該醫藥組合物係以靜脈注射、皮下注射、口服、或塗抹方式施予患者。
5. 如申請專利範圍第 1 項所述之醫藥組合物，該醫藥組合物之劑型包含溶液、乳劑、懸浮液、粉末、錠劑、油劑、軟膏、口含錠、膠囊。
6. 一種化合物用於製備治療癌症之醫藥組合物之用途，該治療癌症之醫藥組合物包含治療有效量之化合物；

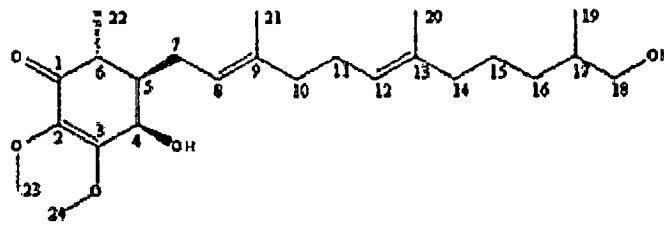
該化合物係選自於由 AC011、AC007-H1、AC009-H1 和 AC012-H1 所組成的群組；

其中 AC011、AC007-H1、AC009-H1、AC012-H1 的結構式如下：





AC012-H1



;

其中該癌症係選自前列腺癌、肝癌、黑色素瘤、腦癌、第IV期直腸結腸癌所組成之群組。

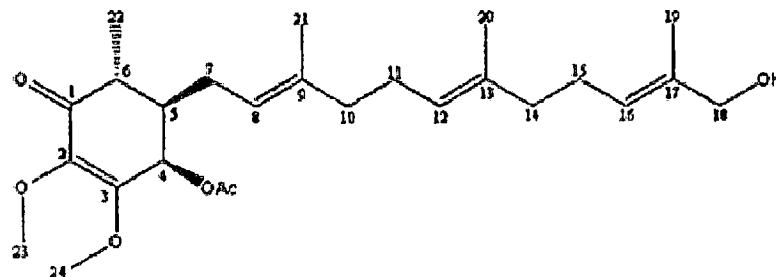
7. 如申請專利範圍第 6 項之用途，其中該癌症係第IV期直腸結腸癌和肝癌。
8. 如申請專利範圍第 6 項之用途，該醫藥組合物係以靜脈注射、皮下注射、口服、或塗抹方式施予患者。
9. 一種化合物用於製備治療癌症之醫藥組合物的用途，該治療癌症之醫藥組合物包含治療有效量之化合物；

該化合物係選自於由 AC009 和 AC012 所組成的群組；

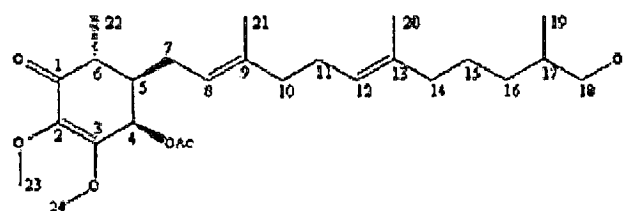
其中該癌症係選自於由前列腺癌、黑色素瘤、腦癌、肺癌和直腸結腸癌所組成之群組；

其中 AC009、AC012 的結構式如下：

AC009



AC012



。

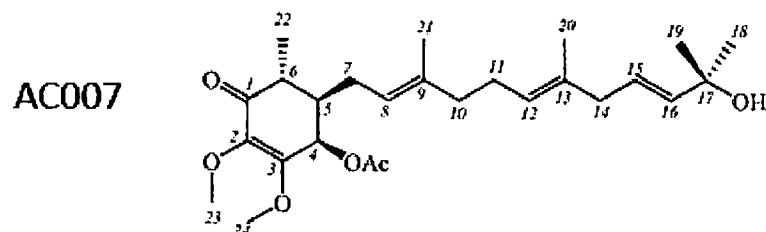
10. 一種化合物用於製備治療癌症之醫藥組合物的用途，該治療癌症之醫

藥組合物包含治療有效量之化合物；

該化合物係 AC007；

其中該癌症係選自於由黑色素瘤、腦癌和直腸結腸癌所組成之群組；

其中 AC007 的結構式如下：

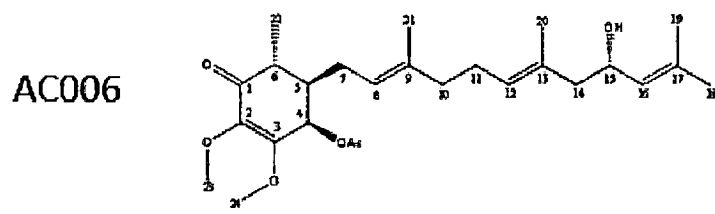


11. 一種化合物用於製備治療癌症之醫藥組合物的用途，該治療癌症之醫藥組合物包含治療有效量之化合物；

該化合物係 AC006；

其中該癌症係選自於由黑色素瘤和腦癌所組成之群組；

其中 AC006 的結構式如下：



12. 一種製備具生物活性之化合物及其衍生物的方法，包括以下步驟：

將牛樟芝菌絲體以正己烷回流萃取二次，每次一至三小時，再將二次萃取液混合並過濾；

取 70-230 孔洞之矽膠(silica gel) (70-230mesh)與菌絲體重量 1:1(w/w)填充管柱，以 *n*-Hexane /乙酸乙酯( Ethyl acetate)梯度沖提，沖出物分成分層(fraction) F1、F2 與 F3，梯度分別為 17-22%% Ethyl acetate、23-27% Ethyl acetate 及 28-33% Ethyl acetate，將 F3 依停留時間(retention time)順序分成三個區段 F3-1~F3-3；

取F3-1使用移動相為二氯甲烷/丙酮( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Acetone}$ )以矽膠管柱層析分離(極性由50:1到20:1梯度沖提)，取40:1-15:1之區段，進一步使用正相MPLC半製備管柱以 $n\text{-Hexane} / \text{Ethyl acetate}$  (4:1)分離純化得到化合物AC006；

將F3-2以正相MPLC矽膠管柱，使用移動相 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/ \text{Acetone}$ 梯度分離(100%:0% to 70%: 30%)，取95%:5%至85%:15%區段分成3個區段F3-2-1至 F3-2-3；

將F3-2-3進一步分離純化，使用移動相 $n\text{-hexane}/\text{Acetone}$ (100%:0% to 0%:100%)以矽膠管柱層析，取 $n\text{-hexane}/\text{Acetone}$ =90/10至70/30之區段繼續以移動相 $n\text{-hexane}/\text{Ethyl acetate}$ (100%:0% to 0%:100%)以矽膠管柱層析於 $n\text{-hexane}/\text{Ethyl acetate}$ =60/40獲得AC007；

F3-3以正相MPLC 矽膠管柱，使用移動相 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Acetone}$  (100%:0% to 0%:100%) 梯度沖提分離，取90%:10% to 70%:30%分成5個區段F3-3-1至 F3-3-5；將F3-3-5( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Acetone}$ =73/27的區段)進一步分離純化，使用移動相 $n\text{-hexane}/\text{Acetone}$ (95%:5% to 50%:50%)以矽膠管柱取85%:15% to 70%:30%之區段層析分成5個區段F3-3-5-1至 F3-3-5-5；

取F3-3-5-1( $n\text{-hexane}/\text{Acetone}$ =90/10-80/20)進一步以逆相MPLC C-18管柱分離純化，移動相以1%甲酸水溶液/ $\text{Methanol}$ = 35%/65%至20%/80%為梯度，取28%/72%-22%/78%的區段進一步使用移動相 $n\text{-hexane}/\text{Ethyl acetate}$ =80%:20%至50%:50%以矽膠管柱層析，於 $n\text{-hexane}/\text{Ethyl acetate}$ =75%:25%-65%:35%得到AC012；

取F3-3-5-3以逆相 MPLC C-18矽膠管柱分離純化，移動相為1%甲酸水

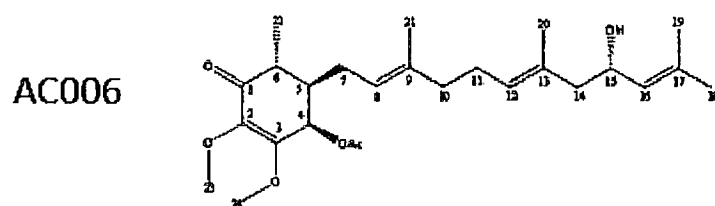
溶液/Methanol= 25/75 等梯度以15毫升/分鐘流度沖提，取以AC009為主之區段(停留時間130-170分鐘)進一步純化，使用移動相CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Ethyl acetate以silica gel 梯度沖提(90%:0% to 0%:100%)管柱層析，於

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Ethyl acetate=80%/20%- 60%/40%得到AC009；

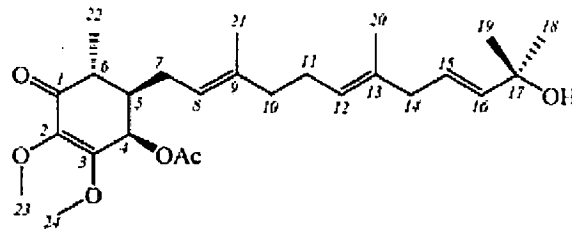
取F3-3-5-4(*n*-hexane/Acetone=76/24)以逆相HPLC C-18矽膠管柱分離純化，移動相為1%甲酸水溶液/Methanol =25%:75% 等梯度沖提，純化產物為 AC011；

其中該AC006、AC007、AC009、AC011、AC012 即具生物活性之化合物；

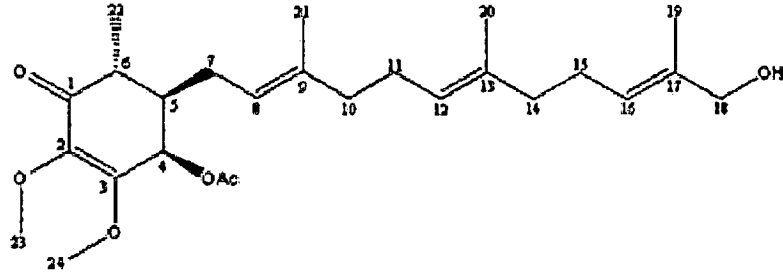
其中AC006、AC007、AC009、AC011、AC012的結構式如下：



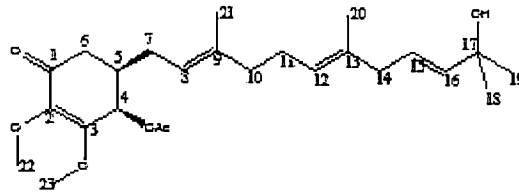
AC007



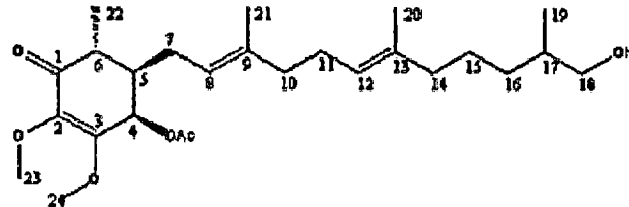
AC009



AC011



AC012



13. 如申請專利範圍第 13 項之方法，該生物活性之化合物可進一步用於製備其 C4 為羥基取代基之衍生物，包含以下步驟：  
以 1 莫耳當量之甲醇水解該生物活性之化合物；  
水解反應完成後加入安柏萊特樹脂並用濾紙過濾後得到中間產物；  
該中間產物利用矽膠管柱層析，以正己烷與乙酸乙酯為移動項，沖提比例為正己烷/乙酸乙酯 4:1 至 1:1，約於沖提比例 1:1 時收集產物；  
該產物以逆相 HPLC 以及 C18 半製備管柱純化，以甲醇/FA（Formic acid，甲酸）緩衝液沖提梯度 75:25 等梯度沖提，可得 C4 為羥基取代基之衍生物。