

製藥與生物技術國家型計畫

計畫編號：NSC91-2323-B-002-002-

執行期限：91年1月1日至91年12月31日

主持人：郭悅雄 台灣大學化學系

計畫參與人員：劉漢康

一、中文摘要

本計畫分兩部份。1. 是由植物 A 分出化合物 A 具有強抗巨細胞病毒(HCMV)之複製活性。化合物 A 為非核酸物對 HCMV(Human cytomegarovirus)之抑制複製活性其 $IC_{50} < 10$ nM，比最新臨床藥物 Ganciclovir 活性強且無細胞毒性，活性與毒性比超過五千倍，具作藥潛力，已向美國專利局提出專利申請(2002年5月23日登錄)，Application No 60/382,692。2. 從羅氏鹽膚木根部找出40種成分，其中四種三帖類為新化合物，以 3,5-dihydroxy-4-methoxybenzoic acid 之抗癌性較高。

關鍵詞：抗巨細胞病毒、抗腫瘤、羅氏鹽膚木

Abstract

This project divided into two parts. One is an anti-Human cytomegarovirus (HCMV), compound A, isolated from plant A. Compound A is not a nucleic acid and exhibited strong growth inhibition to HCMV. The IC_{50} is small than 10nM. The biological activity is more than the clinic drug

Ganciclovir. Ganciclovir is a nucleic acid with potential cytotoxicity. But compound A showed very lower toxicity to normal and cancer cell. Rate of activity to toxicity is over five thousand fold. We have submitted the America patent (registrated on May 23, 2002 was registrated). The application number is 60/382,692. The second subject is the analysis of the compounds from root of *Rhus semialata*. Forty pure compounds were isolated with 4 new terpenoids. From those compounds, 3,5-dihydroxy-4-methoxybenzoic acid exhibited strong cytotoxic activity.

Keywords: Anti-HCMV; Antitumor; *Rhus semialata*.

二、緣由與目的

製藥產業是高附加價值，跨領域科技結合的高科技產業，歐美日等國政府均能體認製藥工業對經濟與國民健康的重要性，故其製藥工業均是蓬勃發展。隨著醫學與製藥技術的進展，人類健康更具保障，但因工業發達所造成的環境污染，使各國之癌症發生及死亡率節節升高，全世

界每年有 600 萬人死於癌症，有 1000 萬癌症病人處於死亡邊緣。

在台灣，癌症死亡率自 1982 年已位居第一位，且蟬連至今，而肝癌、肺癌與直腸癌更佔一半左右，其中又以肝癌死亡率佔 20%。我們要以本土性的疾病，且國外藥廠不列為首要開發目標之天然藥物為開發標地物。

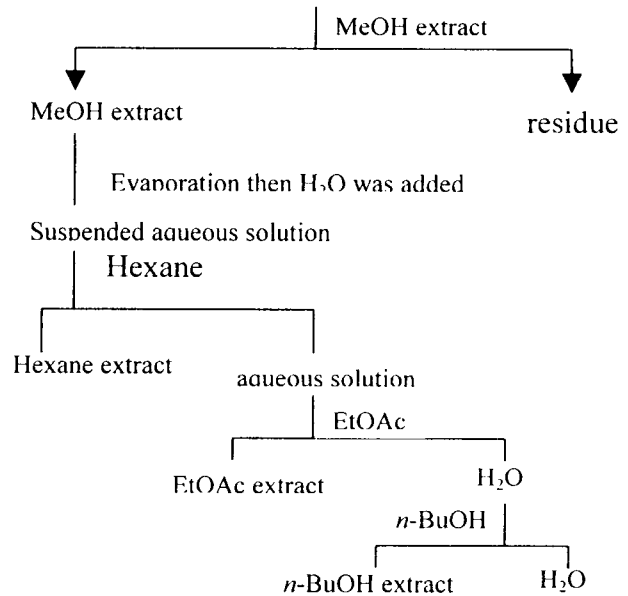
肝癌之病因與台灣罹患率高的 B 型肝炎有關，近年對新生兒施打 B 型肝炎疫苗，使感染率大幅下降。另外抗 C 型肝炎有待開發，腸病毒、登革熱也是本土性的傳染病，也急待去找尋對策。

HCMV 的感染或復發對於愛滋病人，或器官移植接受者，或過敏病人使用過多免疫抑制劑者具有極高的致命率。一般用於治療 HCMV/Herpevirus 感染之藥物皆為核苷酸類似物，這些藥物不僅具細胞毒性，更引發抗藥性病毒株的產生，因此研發天然產物來作抗 HCMV 是有其必要性。當免疫力低的病者(如 AIDS 病者，器官移植者，過敏症使用免疫抑制者)都易受 HCMV 的侵入，而造成死亡的肺炎腸炎，及失明的視網膜炎。目前使用藥為 ganciclovir, cidofovir 及 foscarnet。主要機制為抑制所產生的 DNA polymerase 活性，這些藥不僅具高度細胞毒性，更引起抗藥性病毒株產生，故由天然物尋找非核酸之抗病毒藥物深具重要性。

三、研究方法

將各植物洗清，陰乾後用 MeOH 作萃取，其萃取物以 hexane 及 H₂O 作分配分離，爾後其 H₂O 層再與 EtOAc 及 *n*-BuOH 之分配分離，其中以 EtOAc 層為最有效之抗癌及抗病毒的成份，其一般分離過程如下

植物(植物A、台灣鵝掌材、台灣肖楠、羅氏鹽膚木)



有活性的 EtOAc 可溶層經管柱分離(SiO₂)及各種 HPLC 作純化動作，所得純化物以光譜來執行其結構的鑑定，每個 pure compound 再來做活性測試。

四、結果與討論

Compound A 由植物 A 分離出，其分子式為 C₂₀H₁₂O₆ (MW348)，可以用人工合成，不具不對稱中心，非核酸，對酸與鹼相當穩定，對巨細胞病毒(HCMV)有超強抗複製活性，因為它不是核酸，所以不至於產生抗藥性，對毒性的測試，它對 fibroblast(正常的人體纖維母細胞)之 IC₅₀>10000 nM。對下列二種癌細胞其毒性

測試如下(%為藥物處理過後的存活率)。

NUGC-3		HONE-1	
50 μ M	10 μ M	50 μ M	10 μ M
78%	93%	95%	95%

Compound A 對病毒之活性測試用 plaque assay。以 petri dish 養正常細胞分三種實驗。1.先加藥後加 virus、2.藥與 virus 同時加、3.先加 virus 後用藥，以染色方法，看看藥物的活性，其 $IC_{50} < 10nM$ 。如果與現在臨床使用的抗 HCMV 之藥 Ganciclovir 以等濃度作空斑實驗，發現比臨床的專利藥 Ganciclovir 還佳的結果，如以活性與毒性比超過 5000 倍，可以說比現下的用藥更具潛力。virus 之 gene expression 有三段 enzyme 表現 [第一段為 IE(regulatory proteins) ，第二段為 enzyme(DNA polymerase) ，第三段為 structural protein] ，已知 Ganciclovir 之抑制是在第二段。當把 Compound A 與 Ganciclovir 一齊使用，發現活性只依 Compound A 之濃度，此示 Compound A 與 Ganciclovir 有相同抑制活性機制，但它是抑制在第一段。一般抑制在第一段的 early stage enzyme 是最好的，也因此向美國申請專利，其 Application number 為 No 60/382,692。

羅氏鹽膚木之根部之 EtOAc 的可溶部經 SiO_2 之管柱層析及配合 HPLC 的分離，得純化合物，配合 ^1H-NMR ， ^1H-CMR 及 two dimension 之技術(HMQC，HMBC，COCY，NOSEY 等)，把純化過的化合物決定其結構，共得 40 個成分。分別為 betulonic

acid，belulinic acid，belulin，lantabetulic acid(1)，lantabetulal，3-oxoolean-18-en-28-oic acid， 3β -hydroxyolean-18-en-28-oic acid，3-oxo- 6β -hydroxyolean-18-en-28-oic acid，semimoronic acid(2)，3-O-methyl semimoronic acid，3-oxoolean-12-en-28-oic acid，oleanolic acid，lantanollic acid(3)，lantanolal，lantanolol，3-oxotirucalla-7,24-dien-21-oic acid，dipterocarpol， 3β -hydroxy-22,23,24,25,26,27-hexanordammarane-20-one， β -sitosterol，stigmast-4-en-3-one，stigmast-4-en-3,6-dione，stigmastane-3,6-dione，stigmast-7-en-3-ol，pinoresinol，4-oxopinoresinol，(2S)-4',5,7-trihydroxyflavanone，trans-3,4,7-trihydroxyflavanone，vanillin，methyl ferulate，3,5-dihydroxytoluene，4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde，3,5-dihydroxy-4-methoxybenzoic acid(4)，2,6-dimethoxy-[1,4]-benzoquinone，3,4,5-trimethoxybenzylalcohol，gallic acid，ficusal，2-hydroxy-6-pentadec-8(Z)-enylbenzoic acid，5-formylmellein，5-hydroxymethylmellein，alkyls caffeate。以上化合物 1、2、3、4 具有抗癌活性，其中以 4 之活性最高，在 20 μ g/ml 使 NUGC-3 及 HONE-1 之活存率在 13% 及 24%。

	NUGC-3		HONE-1	
	20µg/ml	4µg/ml	20 µg/ml	4 µg/ml
1	10	94	38	81
2	96	51	94	99
3	60	77	44	75
4	13	78	24	26

