



(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 I473612 B

(45)公告日：中華民國 104 (2015) 年 02 月 21 日

(21)申請案號：100148456 (22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 12 月 23 日

(51)Int. Cl. : *A61K31/341 (2006.01)* *C07D307/77 (2006.01)*
C12N1/14 (2006.01) *A61P3/00 (2006.01)*
C12P17/04 (2006.01) *C12R1/645 (2006.01)*

(30)優先權：2010/12/23 美國 61/426,801

(71)申請人：財團法人食品工業發展研究所(中華民國) FOOD INDUSTRY RESEARCH AND DEVELOPMENT INSTITUTE (TW)

新竹市食品路 331 號

(72)發明人：鄭銘仁 CHENG, MING JEN (TW)；楊秉勳 YANG, PING HSUN (TW)；吳明德 WU, MING DER (TW)；林錫杰 LIN, SHIE JEA (TW)；袁國芳 YUAN, GWO FANG (TW)；陳彥霖 CHEN, YEN LIN (TW)；廖雪君 LIAO, HSUEN CHUN (TW)；陳凱萍 CHEN, KAI PING (TW)

(74)代理人：陳長文

(83)生物材料寄存：

食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 BCRC 930146 2010 年 10 月 27 日

(56)參考文獻：

CN 100347312C

Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol.58, no.13, 2010, pages 7364-7640。

審查人員：徐永任

申請專利範圍項數：29 項 圖式數：7 共 41 頁

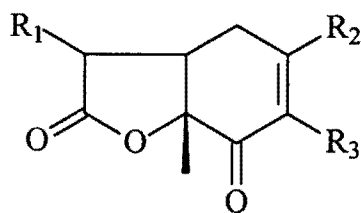
(54)名稱

新穎紫紅麴酮、其製備方法及紫紅麴酮之應用

NOVEL MONASCUSPURPURONES, PREPARATION PROCESS THEREOF, AND USES OF THE MONASCUSPURPURONES

(57)摘要

本發明係關於如本說明書中所述之式(I)之新穎紫紅麴酮，

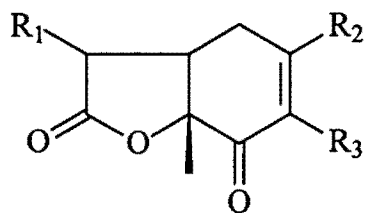


式 (I)

或其醫藥學上可接受之衍生物、其製備方法、及包含該化合物之組合物。本發明亦提供紫紅麴酮用於促進脂肪細胞分化、提高 PPAR γ 及/或 C/EBP α 活性、降低血糖、預防及/或治療與胰島素抗

性相關之疾病或病症及預防及/或治療代謝症候群或其併發症的用途。本發明亦提供紅麴米發酵產物之萃取物及其用於預防及/或治療與胰島素抗性相關之疾病或病症(諸如代謝症候群)的用途。

The present invention relates to a novel monascuspurpurone compound of formula (I):



(I)

or a pharmaceutically acceptable derivative thereof as described in the specification, the process for preparation of the same, and the composition comprising the same. The uses of a monascuspurpurone compound for promoting adipocyte differentiation, for increasing the activity of PPAR γ and/or C/EBP α , for lowering blood glucose, for the prevention and/or treatment of a disease or disorder related to insulin resistance, and for the prevention and/or treatment of metabolic syndrome or its complications are also provided. The invention also provides extracts of red yeast rice-fermented products and their uses for prevention and/or treatment of a disease or disorder related to insulin resistance, such as metabolic syndrome.

(無元件符號說明)

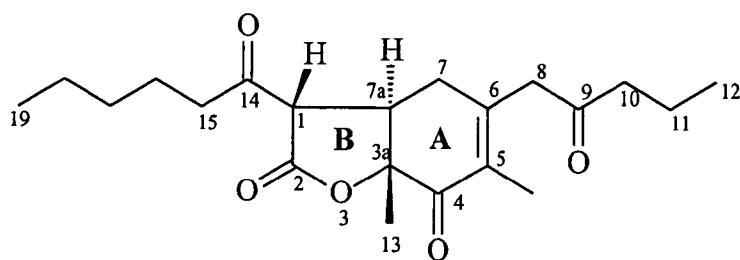
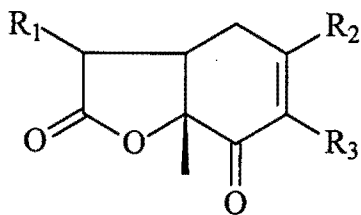


圖 1



發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：100148456

A61K 31/341 (2006.01)

※申請日：

100. 12. 23

※IPC 分類：

C07D 307/77 (2006.01)

C12N 1/14 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

C12P 17/04 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

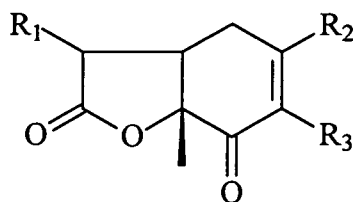
一、發明名稱：(中文/英文)

新穎紫紅麴酮、其製備方法及紫紅麴酮之應用

NOVEL MONASCUSPURPURONES, PREPARATION PROCESS
THEREOF, AND USES OF THE MONASCUSPURPURONES

二、中文發明摘要：

本發明係關於如本說明書中所述之式(I)之新穎紫紅麴酮，

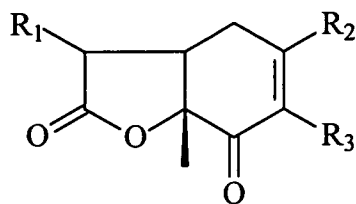


式(I)

或其醫藥學上可接受之衍生物、其製備方法、及包含該化合物之組合物。本發明亦提供紫紅麴酮用於促進脂肪細胞分化、提高PPAR γ 及/或C/EBP α 活性、降低血糖、預防及/或治療與胰島素抗性相關之疾病或病症及預防及/或治療代謝症候群或其併發症的用途。本發明亦提供紅麴米發酵產物之萃取物及其用於預防及/或治療與胰島素抗性相關之疾病或病症(諸如代謝症候群)的用途。

三、英文發明摘要：

The present invention relates to a novel monascuspurpurone compound of formula (I):



(I)

or a pharmaceutically acceptable derivative thereof as described in the specification, the process for preparation of the same, and the composition comprising the same. The uses of a monascuspurpurone compound for promoting adipocyte differentiation, for increasing the activity of PPAR γ and/or C/EBP α , for lowering blood glucose, for the prevention and/or treatment of a disease or disorder related to insulin resistance, and for the prevention and/or treatment of metabolic syndrome or its complications are also provided. The invention also provides extracts of red yeast rice-fermented products and their uses for prevention and/or treatment of a disease or disorder related to insulin resistance, such as metabolic syndrome.

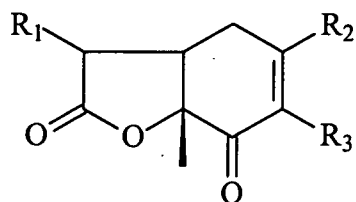
四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於新穎紫紅麴酮及其製備方法。本發明進一步係關於包含紫紅麴酮之組合物，及紫紅麴酮用於促進脂肪細胞分化、提高PPAR γ 及/或C/EBP α 活性、降低血糖、預防及/或治療與胰島素抗性相關之疾病或病症及預防及/或治療代謝症候群或其併發症的用途。本發明亦關於紅麴米發酵產物之萃取物用於預防及/或治療與胰島素抗性相關之疾病或病症(諸如代謝症候群)的用途。

【先前技術】

紅麴菌(*Monascus* spp.)在中國發酵食品中已有數千年的使用歷史。除會產生一些色素外，經紅麴菌發酵之紅麴米還會產生具生物活性之代謝物，諸如 γ -胺基丁酸(GABA)及聚酮化合物紅麴菌素K(monacolin K)，此兩種物質分別被用作抗高血壓藥(參見Tsuji, K.等人，1992, 「Effects of two kinds of Koji on blood pressure in spontaneously hypertensive rats.」 *Nippon. Nogeikagaku Kaishi.*, 66: 1241-1246)及降低膽固醇之藥物(參見Endo, A., 1979, 「Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species.」 *J. Antibiot.*, 32: 852-854 ; Endo, A., 1985, 「Compactin (ML-236B) and related compounds as potential cholesterol-lowering agents that inhibit HMG-CoA reductase.」 *J. Med. Chem.*, 28: 401-405 ; 及Martinokova, L.等人，1995, 「Biological activity of polyketide pigments

produced by the fungus *Monascus*.」 *J. Appl. Bacteriol.*, 79: 609-616), 及德莫姆密酸(demerumic acid)作為抗氧化劑 (Juzlová, P., et al., 1996, 「Secondary Metabolites of the Fungus *Monascus*: a Review.」 *Journal of Industrial Microbiology*, 16: 163-170)。此外，經紅麴菌發酵之紅麴米亦發現可抑制腫瘤生成、護肝功能、抑制脂肪細胞分化、抗疲勞、增進免疫力、降血脂及降血糖之功效，是近來非常熱門之保健食品及藥品(Loret, M.-O. & Morel, S., 2010, 「Isolation and structural characterization of two new metabolites from *Monascus*.」 *J Agric Food Chem.*, 58: 1800-1803)。

加州大學洛杉磯分校醫學中心，曾針對高血脂症的美國人病患，隨機雙盲對照控制法進行試驗(Heber D., et al., 1999, 「Cholesterol-lowering effects of a propriety Chinese red-yeastrice dietary supplement.」 *Am J Clin Nutr.*, 69: 231-236)，結果顯示經紅麴菌發酵之紅麴米治療之實驗組中LDL降低22%、總膽固醇降低17%、三酸甘油脂下降11%，而對照組則仍維持原數值。同時，在該研究也證實經紅麴菌發酵之紅麴米比常用的降血脂藥優良，不會影響肝功能，也未發現有任何其他副作用。上海市第一人民醫院採用隨機單盲對照法，觀察比較經紅麴菌發酵之紅麴米與普伐他汀(Pravastatin)的降脂質效果(Yang HT., et al., 1997, 「A comparative Study of Xuezhikang and Mevalotin in treatment of Essential Hyperlipidemia.」 *Chinese Journal*

of *New Drugs*, 6: 265-268), 紅麴組與Pravastatin組在總膽固醇、低密度脂蛋白膽固醇、分離蛋白B之下降率分別為26.59%和18.92%、33.32%和24.24%、18.42%和8.89% , 顯示經紅麴菌發酵之紅麴米是療效顯著的新一代降脂血藥。包括中國醫學科學院等四所醫院也證實, 經紅麴菌發酵之紅麴米對高膽固醇的病患, 具有上述同等功效(Lin, Feng., 1992, 「Evolution of research and development of *Monascus*.」 *Scientific agriculture*, 40: 193-198)。因此, 經紅麴菌發酵之紅麴米發展為降血脂及冠心病防治之臨床用藥。

另一方面, 經紅麴菌發酵之紅麴米之降血糖功效亦於1988年發現(Tamada Hideaki, 1988, 「Red yeast rice application of a variety of seasonings.」 *Food and Science*, July: 96-99), 兔子餵食紅麴菌發酵物後, 有降低血糖之功效達30%左右。亦曾有報告指出紅麴菌發酵產物具有抗糖尿病作用(參見Shi, Y.及Pan, T., J. 2010, 「Anti-diabetic effects of *Monascus purpureus* NTU 568 fermented products on streptozotocin-induced diabetic rats.」 *J. Agric. Food Chem.*, 58(13): 7634-7640)。

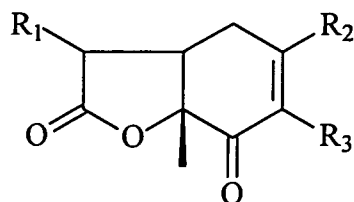
調節脂類代謝為治療代謝症候群之策略之一。噻唑啉二酮(TZD)為20世紀80年代初研發之第2型糖尿病治療藥物。關於TZD機制之研究顯示, TZD藉由活化PPAR γ 使胰島素敏感性增強。活化PPAR γ 之特有效應之一為促進脂肪細胞分化。因此, 促進脂肪細胞分化已成為一種篩選能夠活化

PPAR γ 及降低胰島素抗性之藥劑的通用方法。

然而，經紅麴菌發酵之紅麴米中具有抗糖尿病作用之化合物及其藥理學機制尚未可知。

【發明內容】

本發明之目的之一為提供一種式(I)化合物，



式(I)

或其醫藥學上可接受之衍生物，

其中R¹及R²為獨立選自由烷基、烯基及羰基所組成之群，且R³為烷基。

本發明之另一目的為提供一種組合物，其包含式(I)化合物或其醫藥學上可接受之衍生物及視情況選用之醫藥學上可接受之載劑或賦形劑。

本發明之另一目的為提供一種製備式(I)化合物或其醫藥學上可接受之衍生物之方法。

本發明之另一目的為提供一種紅麴米萃取物。

本發明之另一目的為提供一種組合物，其包含本發明之紅麴米萃取物及視情況選用之醫藥學上可接受之載劑或賦形劑。

本發明之另一目的為提供一種於一個體中促進脂肪細胞分化之方法。

本發明之另一目的為提供一種提高PPAR γ 及/或C/EBP α

活性之方法。

本發明之另一目的為提供一種預防及/或治療個體與胰島素抗性相關之疾病或病症之方法。

本發明之另一目的為提供一種於一個體中降低血糖之方法。

本發明之又一目的為提供一種預防及/或治療代謝症候群或其併發症之方法。

於以下部分中詳細描述本發明。可在以下[實施方式]及申請專利範圍中容易地發現本發明之其他特徵、目的及優點。

【實施方式】

參考以下對本發明之各態樣、實例、及伴隨相關描述之化學圖式及表格的詳細描述，可更容易地瞭解本發明。在揭示及描述本發明之化合物、組合物及/或方法之前，應瞭解，除非由申請專利範圍另外特別地指出，否則本發明不受限於特定製備方法、載劑或調配物、或將本發明化合物調配成用於局部、經口或非經腸投予之產物或組合物的特定模式，此係由於熟習相關技術之通常知識者非常清楚此等事情是可以加以變化的。亦應瞭解，本文所用之術語僅用於描述特定態樣之目的而不意欲用於限制性本發明之範疇。

定義

除非另外指出，否則如本發明所用之以下術語應解釋為具有以下含義。

如本文所用之術語「烷基」及「烯基」包括直鏈及分支鏈。

「烷基」係指在概念上可藉由自具有直鏈或分支碳鏈之非環烴化合物之結構中移除氫且該氫原子經另一原子或有機或無機取代基置換而由烷烴形成之烴基。在本發明之一些態樣中，烷基為「C₁至C₁₀烷基」，諸如甲基、乙基、丙基、異丙基、正丁基、異丁基、第二丁基、第三丁基、戊基、第三戊基、己基及其類似基團。本發明之許多態樣包含「C₁至C₇烷基」，其包括甲基、乙基、丙基、異丙基、正丁基、異丁基、第二丁基、第三丁基、戊基、己基及庚基。

術語「烯基」在結構上類似於包含至少一個碳碳雙鍵之烷基或殘基。在一些態樣中，烯基為「C₂至C₇烯基」，例如乙烯基、烯丙基、丙烯基、2-丁烯基、3-丁烯基、2-戊烯基、3-戊烯基、4-戊烯基、2-己烯基、3-己烯基、4-己烯基、5-己烯基、2-庚烯基、3-庚烯基、4-庚烯基、5-庚烯基及6-庚烯基，以及直鏈及分支鏈之二烯及三烯。在其他態樣中，烯基限於二至四個碳原子。

術語「羰基」包括直鏈及分支鏈。

「羰基」係指一官能基，其包含碳原子雙鍵鍵結氧原子：C=O。在一些態樣中，羰基為「C₁至C₁₀羰基」。

如本文所用之術語「醫藥學上可接受之衍生物」表示自本發明化合物改質而來，但性質及功效與本發明化合物相同或更佳的化合物。醫藥學上可接受之衍生物較佳為本發

明化合物之醫藥學上可接受之鹽、溶劑合物、水合物或前藥。

一或多種本發明化合物可以鹽形式存在。術語「鹽」涵蓋與有機陰離子及陽離子以及無機陰離子及陽離子形成之鹽。此外，此術語包括由鹼性基團與有機酸或無機酸之標準酸鹼反應而形成之鹽。該等酸包括鹽酸、氫氟酸、三氟乙酸、硫酸、磷酸、乙酸、丁二酸、檸檬酸、乳酸、順丁烯二酸、反丁烯二酸、棕櫚酸、膽酸、雙羥萘酸、黏液酸、D-麩胺酸、D-樟腦酸、戊二酸、鄰苯二甲酸、酒石酸、月桂酸、硬脂酸、水楊酸、甲烷磺酸、苯磺酸、山梨酸、苦味酸、苯甲酸及肉桂酸。

本發明之化合物亦可以溶劑合物及水合物形式存在。因此，此等化合物可與例如水合水或一個、許多或任何分率之母液溶劑分子一起結晶。該等化合物之溶劑合物及水合物包括在本發明之範疇內。

如本文所用之術語「個體」表示任何動物，較佳為哺乳動物，且更佳為人類。個體之實例包括人類、非人類靈長類動物、齧齒動物、天竺鼠、兔、綿羊、豬、山羊、母牛、馬、狗及貓。

術語如本文所提供之化合物的「有效量」意謂該化合物之量足以提供對所需功能(諸如基因表現、蛋白質功能或誘導特定類型之反應)之所需調節。如下文所指出，確實的需要量將在個體之間有變化，此視個體之疾病病況、身體狀況、年齡、性別、物種及體重、組合物之特性及配方

等而定。給藥方案可經調整以誘導最佳治療反應。舉例而言，可每日投予若干分次劑量，或可依治療情形之緊急程度按比例減少劑量。因此，很難指定確實的「有效量」。然而，本發明領域中具有通常知識者使用常規實驗即可確定適當的有效量。

術語「預防」為本發明領域中所公認，且當用於描述病狀時，其包括在個體之該病狀發作之前投予藥劑，以相對於未接受該藥劑之個體，降低醫學病狀的出現率或減輕病狀嚴重程度或延遲病狀症狀之發作。

如本文所用之術語「治療」表示逆轉、減輕或改善此術語所適用之病症或病狀、或該病症或病狀之一或多種症狀，或抑制其進展。

如本文所用之術語「載劑」或「賦形劑」係指自身並不為治療劑，而是用作用於將治療劑傳遞至個體之載劑及/或稀釋劑及/或佐劑或媒劑，或添加至調配物中以改善調配物之處理或儲存性質或允許或有助於組合物之劑量單位形成適於經口投予之劑量單位(諸如膠囊或錠劑)的任何物質。適合之載劑或賦形劑為一般熟習製造醫藥調配物或食品之通常知識者所熟知。載劑或賦形劑可包括(舉例而言但不限於)緩衝劑、稀釋劑、崩解劑、黏合劑、黏著劑、濕潤劑、聚合物、潤滑劑、滑動劑、為遮蔽或抵消不良味道或氣味而添加之物質、調味劑、染料、芳香劑及為改善組合物之外觀而添加之物質。可接受之載劑或賦形劑包括檸檬酸鹽緩衝劑、磷酸鹽緩衝劑、乙酸鹽緩衝劑、碳酸氫

鹽緩衝劑、硬脂酸、硬脂酸鎂、氧化鎂、磷酸及硫酸之鈉鹽及鈣鹽、碳酸鎂、滑石、明膠、阿拉伯膠、海藻酸鈉、果膠、糊精、甘露糖醇、山梨糖醇、乳糖、蔗糖、澱粉、明膠、纖維素物質(諸如烷酸之纖維素酯及纖維素烷基酯)、低熔點蠟、可可脂、胺基酸、尿素、醇類、抗壞血酸、磷脂、蛋白質(例如血清白蛋白)、乙二胺四乙酸(EDTA)、二甲亞砜(DMSO)、氯化鈉或其他鹽、脂質體、甘露糖醇、山梨糖醇、甘油或粉末、聚合物(諸如聚乙烯吡咯啉酮、聚乙烯醇及聚乙二醇)、及其他醫藥學上可接受之物質。載劑不應破壞治療劑之藥理學活性，且在以足以傳遞治療量之藥劑的劑量投予時應無毒性。

範圍在本文中通常表述為「約」一個特定值及/或至「約」另一個特定值。當表述此類範圍時，一態樣為包括一個特定值及/或至另一個特定值之範圍。類似地，當值藉由使用字「約」表述為近似值時，應瞭解特定值可形成另一態樣。另外應瞭解，每一範圍之各端點皆有顯著性，一端點與另一端點既有相關性，亦彼此獨立。

「視情況」或「視情況地」意謂隨後所述之事件或狀況可能發生或可能不發生，且該描述包括該事件或狀況發生之情況及其未發生之情況。舉例而言，「視情況包含藥劑」意謂該藥劑可能存在或可能不存在。

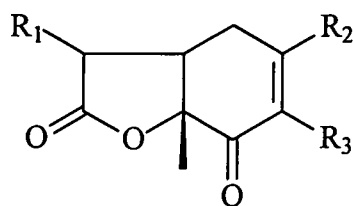
必須指出，除非上下文另外清楚規定，否則如本說明書及隨附申請專利範圍中所用之單數形式「一」及「該」包括複數個所指標的物。因此，除非上下文另外需要，否則

單數術語應包括複數且複數術語應包括單數。

本發明之化合物

本發明係關於紫紅麴酮或其醫藥學上可接受之衍生物。

本發明之紫紅麴酮具有下式(I)所示之結構：



式(I)

其中 R^1 及 R^2 為獨立選自由烷基、烯基及羰基所組成之群，且 R^3 為烷基。

在式(I)化合物之一些態樣中， R^1 及 R^2 獨立為 C_1 - C_{10} 烷基、 C_2 - C_7 烯基或 C_1 - C_{10} 羰基。較佳地， R^1 為己醯基。另一方面， R^2 較佳為2-氧戊基。

在式(I)化合物之一些較佳態樣中， R^3 為 C_1 - C_{10} 烷基。更佳地， R^3 為甲基。

在一個最佳態樣中，式(I)化合物為*rel*-(1*S*,7*aR*,3*aR*)-1-己醯基-5,13-二甲基-6-(2-氧戊基)-7*a*,7-二氫苯并呋喃-2,4-二酮 (*rel*-(1*S*,7*aR*,3*aR*)-1-hexanoyl-5,13-dimethyl-6-(2-oxopentyl)-7*a*,7-dihydrobenzofuran-2,4-dione)。

本發明之化合物可藉由任何已知之方法進一步轉化為醫藥學上可接受之衍生物，諸如醫藥學上可接受之鹽、溶劑合物或前藥。

本發明之組合物

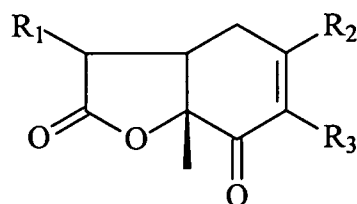
本發明亦提供一種組合物，其包含本發明化合物或其醫

藥學上可接受之衍生物。本發明之組合物可為食品組合物或醫藥組合物。該組合物中的本發明之式(I)化合物可以紅麴米之萃取物或化合物形式提供。

本發明之醫藥組合物可藉由本發明領域中已知之任何方法局部或全身投予，包括(但不限於)藉由肌肉內、皮內、靜脈內、皮下、腹膜內、鼻內、經口、黏膜或外部途徑投予。適當的投藥途徑、調配方法及投藥時程可由本發明領域中具有通常知識者來決定。在本發明中，醫藥組合物可根據相應投藥途徑以多種方式調配，諸如液體溶液、懸浮液、乳液、糖漿、錠劑、丸劑、膠囊、持續釋放調配物、散劑、顆粒、安瓿、注射液、輸注液、套組、軟膏、洗劑、擦劑、乳膏或其組合。在必要時，其可經滅菌或與任何醫藥學上可接受之載劑或賦形劑混合，其中有許多醫藥學上可接受之載劑或賦形劑已為一般技術者所知，例如參見[實施方式]第14段。

本發明之製備方法

本發明提供製備式(I)化合物之方法：



式(I)

或其醫藥學上可接受之衍生物，

其中R¹及R²為獨立選自由烷基、烯基及羰基所組成之群，且R³為烷基。

在一個較佳態樣中，本發明之方法包含以下步驟：

- (a) 以紅麴菌屬分離菌株將米發酵，獲得紅麴米；
- (b) 以甲醇、乙醇或乙酸乙酯萃取該紅麴米；
- (c) 以乙酸乙酯與H₂O萃取步驟(b)中獲得之萃取物，獲得可溶於乙酸乙酯之部分；
- (d) 利用溶離劑經由矽膠層析管柱溶離該可溶於乙酸乙酯之部分；及
- (e) 利用矽膠層析管柱及/或製備型薄層層析法(TLC)純化(d)之溶離份，以獲得該化合物。

根據本發明之方法，分離菌株可為叢毛紅麴菌 (*Monascus pilosus*)、紫色紅麴菌 (*Monascus purpureus*) 或粉紅色紅麴菌 (*Monascus ruber*)，較佳為紫色紅麴菌，更佳為紫色紅麴菌 M615 BCRC 930146 (DSM 24162)。

根據本發明之方法，在步驟(b)之前，紅麴米可經乾燥。

根據本發明之方法，步驟(a)較佳包含在酒石酸存在下，以紅麴菌屬分離菌株將米發酵，獲得紅麴米。

根據本發明之方法，步驟(c)中乙酸乙酯與H₂O之比率為約1:1。

根據本發明之方法，步驟(d)較佳包含將該可溶於乙酸乙酯之部分裝載至矽膠層析管柱中，且利用包含10:1至5:1正己烷/乙酸乙酯之溶離劑溶離該管柱，產生15個溶離份。步驟(e)中所用之溶離份為溶離份10。

根據本發明之一個較佳方法，步驟(e)中之純化方法係以

5:1正己烷/EtOAc為溶劑之TLC。

本發明提供製備紅麴米萃取物之方法。在一個較佳態樣中，該方法包含以下步驟：

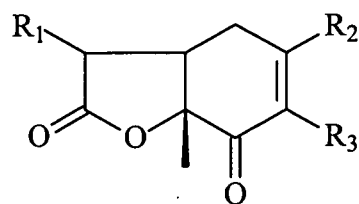
- (a) 用紅麴菌屬分離菌株使米發酵，獲得紅麴米；及
- (b) 用甲醇、乙醇或乙酸乙酯萃取該紅麴米。

根據本發明之紅麴米萃取物製備方法，分離菌株可為叢毛紅麴菌、紫色紅麴菌或粉紅色紅麴菌，較佳為紫色紅麴菌，更佳為紫色紅麴菌M615 BCRC 930146(DSM 24162)。

根據本發明之紅麴米萃取物製備方法，在步驟(b)之前，紅麴米可經乾燥。

效用

本發明之治療方法之一個態樣為於一所需之個體中促進脂肪細胞分化，其包含向該個體投予有效量之式(I)化合物：



式(I)

或其醫藥學上可接受之衍生物，

其中R¹及R²為獨立選自由烷基、烯基及羰基所組成之群，且R³為烷基；
或紅麴米萃取物。

本發明之治療方法之另一態樣為增加PPAR γ 及/或C/EBP α 之活性。較佳地，式(I)化合物或其醫藥學上可接受之衍生物或紅麴米萃取物係經由PPAR γ /C/EBP α 途徑以

促進脂肪細胞分化。

本發明之治療方法之另一態樣為於一個體中降低血糖，其包含向該個體投予有效量之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之衍生物或紅麴米萃取物。

本發明之治療方法之另一態樣為預防及/或治療個體與胰島素抗性相關之疾病或病症，其包含向該個體投予有效量之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之衍生物或紅麴米萃取物。

在某些態樣中，與胰島素抗性相關之疾病或病症為代謝症候群或其併發症，諸如致動脈粥樣硬化血脂異常、血壓升高、胰島素抗性或葡萄糖耐受不良、第2型糖尿病或心血管疾病。

根據本發明之方法，式(I)化合物或其醫藥學上可接受之衍生物可藉由本發明領域中已知之任何方法局部或全身投予，包括(但不限於)藉由肌肉內、皮內、靜脈內、皮下、腹膜內、鼻內、經口、黏膜或外部途徑投予。適當投藥途徑、調配方法及投藥時程可由本發明領域中具有通常知識者來決定。

根據本發明之方法，式(I)化合物或其醫藥學上可接受之衍生物可與第二種可有效預防及/或治療代謝症候群或其併發症之藥劑共同投予，從而改良本發明化合物之治療效果。本發明領域中已知有多種藥劑可有效預防及/或治療代謝症候群或其併發症。該等藥劑之實例包括(但不限於)控制膽固醇含量及脂質之藥物，諸如士他汀(statin)、纖維

酸酯或菸鹼酸；控制高血壓之藥物，諸如利尿劑或血管收縮素轉化酶(ACE)抑制劑；及控制高血糖之藥物，諸如二甲雙胍(metformin)、胰島素、磺醯脲(sulfonylurea, SU)、雙胍(biguanide)、 α -葡糖苷酶抑制劑、噻唑啉二酮(TZD)及其類似藥物。

提供以下實例以有助於熟習此項技術者實施本發明。

實例

微生物

於 2010 年 10 月 28 日將紫色紅麴菌 M615 BCRC 930146(DSM 24162)根據布達佩斯條約寄存於德國微生物菌種保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ) (Mascheroder Weg 1b, D38124, Braunschweig, Germany)，且寄存編號為 DSM 24162。於 2010 年 10 月 27 日亦寄存於食品工業發展研究所(Food Industry Research and Development Institute, FIRDI)之生物資源保存及研究中心(Bioresource Collection and Research Center, BCRC)(331 Shih-Pin Road, 300, Hsinchu, Taiwan, R.O.C.)，且寄存編號為 BCRC 930146。

實例 1. 製備酵母材料

將紫色紅麴菌 M615 BCRC 930146 接種於馬鈴薯葡萄糖瓊脂(Potato Dextrose Agar, PDA)(Difco, USA)平板上且在 30°C 下培養 7 天。用 6 ml 無菌水將孢子自 PDA 平板中洗出，且將 1 ml 孢子懸浮液接種於 250 ml 含有 GSP 培養基(其含有 7% 甘油、3% 麵粉、1.2% 聚蛋白腴、3% 大豆粉、0.1%

硫酸鎂及0.2%硝酸鈉)之錐形瓶中並震盪，且在30°C、150 rpm下培養3天，獲得種麴菌液。

實例2. 固態發酵

將75 ml 0.2%酒石酸溶液添加至10個各自含有75 g在來米(Zailai rice)之450 ml寬口玻璃瓶中。在4°C下浸泡隔夜。接著將米瀝乾並滅菌。將實例1中獲得之種麴菌液分別接種7.5 ml於各瓶中，置於25°C下培養14天(在培養第7天時，添加7.5 ml GSP培養基至培養物中)，以獲得紅麴米。

實例3. 自紅麴米中萃取及分離新穎化合物

乾燥實例2之紅麴米，且在室溫下將乾燥之紅麴米以95% EtOH萃取三次。使乙醇漿萃取物分配於EtOAc與H₂O(1:1)之間，得到可溶於EtOAc(2.5 g)及水(10.2 g)之部分。將可溶於EtOAc之部分(*Fr. A*, 2.5 g)經矽膠(75 g, 70-230目)(Merck, Germany)層析，且以正己烷/乙酸乙酯溶離，產生15個溶離份(*Fr. A1-A15*)。溶離份11(*Fr. A11*, 1.2 g)經管柱(30 g SiO₂, 70-230目)層析，且以正己烷/乙酸乙酯(10:1→5:1)溶離，產生10個次溶離份(*Fr. A11.1-A11.10*)。次溶離份8(18 mg)係藉由製備型TLC(SiO₂; 5:1正己烷/EtOAc)來純化，得到新穎化合物1(1.3 mg)。

實例4. 新穎化合物之表徵

旋光度係在Jasco P-1020數位旋光儀上量測。紫外光譜係在Jasco UV-240分光光度計上於MeOH中獲得，且IR光譜(KBr或純)係在Perkin-Elmer系統2000 FT-IR光譜儀上獲得。使用CDCl₃作為溶劑之1D(¹H、¹³C、DEPT)及2D

(COSY、NOESY、HSQC、HMBC)NMR譜係在 Varian Unity Plus 400(^1H NMR為 400 MHz, ^{13}C NMR為 100 MHz)上記錄。化學位移內部參考 CDCl_3 中之溶劑信號(^1H , δ 7.26; ^{13}C , δ 77.0), 以 TMS 為內部標準品。高解析度 ESI-MS 譜係在 Bruker Daltonics APEX II 30e 光譜儀上獲得。矽膠 (70-230, 230-400 目)(Merck) 用於管柱層析法, 且矽膠 60 F-254(Merck) 用於 TLC 及製備型 TLC。

化合物 1 之特徵

化合物 1 之特徵示於表 1。

表 1: 化合物 1 之 ^1H 及 ^{13}C -NMR 數據 (CDCl_3 , 600 及 150 MHz) δ 單位為 ppm, J 單位為 Hz

1		
	$\delta(\text{C})$	$\delta(\text{H})$
H-C(1) or C(1)	54.8	3.46 (<i>d</i> , $J=12.8$)
C(2)	169.5	-
H-C(3)	-	-
C(3a)	83.2	-
C(4) or $\text{CH}_2(4)$	193.4	-
C(5) or H-C(5)	148.2	-
Me(5)	11.8	-
C(6)	131.9	-
$\text{CH}_2(7)$ or C(7)	42.9	2.58 (<i>dt</i> , $J=18.0, 10.8, H_{\text{ax}}$) 2.99 (<i>dt</i> , $J=18.0, 4.4, H_{\text{eq}}$)
H-C(7a)	42.3	3.16 (<i>ddd</i> , $J=12.8, 10.8, 4.4$)
$\text{CH}_2(8)$ or C(8)	48.4	3.25 (<i>d</i> , $J=17.0$) 3.65 (<i>d</i> , $J=17.0$)
C(9)	205.9	-
$\text{CH}_2(10)$ or C(10)	45.3	2.57 (<i>t</i> , $J=7.6$)
$\text{CH}_2(11)$ or Me(11)	17.3	1.57-1.67 (<i>m</i>)
Me(12)	13.6	0.94 (<i>t</i> , $J=7.6$)
Me(13)	17.2	1.49 (<i>s</i>)
C(14)	202.4	-
$\text{CH}_2(15)$	33.4	2.47 (<i>t</i> , $J=7.6$)
$\text{CH}_2(16)$	22.8	1.57-1.67 (<i>m</i>)
$\text{CH}_2(17)$	31.1	1.31-1.38 (<i>m</i>)
$\text{CH}_2(18)$	22.4	1.31-1.38 (<i>m</i>)
Me(19)	13.9	0.87 (<i>t</i> , $J=7.6$)

rel-(1*S*,7*aR*,3*aR*)-1-己醯基-5,13-二甲基-6-(2-氧戊基)-7*a*,7-二氫苯並呋喃-2,4-二酮之化合物 1，無色油狀， $[\alpha]_D^{25} +494.4$ ($c=0.4$ ， CHCl_3)。UV (MeOH)：253 (4.05)。IR (純)：1779 (γ -內酯)，1697 (連結 C=O)，1644 (烯)。 ^1H -及 ^{13}C -NMR 之結果參看表 1。ESI-MS：362 ($[M+\text{Na}]^+$)。HR-ESI-MS：362.2097 ($[M+\text{Na}]^+$ ， $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{NaO}_5^+$ ；計算值 362.2093)。

化合物 1 之結構說明

化合物 1 為無色油狀，該分子式經 HR-ESI-MS (m/z 362.2093，($[M+\text{Na}]^+$ ， $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{NaO}_5^+$ ；計算值 362.2093)) 測定為 $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_5$ (七個不飽和度)，此結果與 ^1H -及 ^{13}C -NMR 數據一致(如上所述)。於 253 nm 之 λ_{max} (MeOH) UV 光譜吸收度、於 1697 cm^{-1} 之強 IR 吸收度及 ^{13}C -NMR 碳共振光譜之觀察 [$\delta(\text{C})$ 193.4 (qC, C(4))，131.9 (qC, C(6))及 148.2 (qC, C(5))](如表 1 所示)顯示化合物 1 存在一個 α,β -不飽和羰基(2-環己烯酮基)。IR 光譜則顯示 γ -內酯(1779 cm^{-1})、連結 C=O(1697 cm^{-1})及一個烯(1644 cm^{-1})官能基。由 ^1H -及 ^{13}C -NMR (表 1)、HMBC (圖 2)、COSY (圖 2)及 NOESY (圖 2)測定化合物 1 為 *rel*-(1*S*,7*aR*,3*aR*)-1-己醯基-5,13-二甲基-6-(2-氧戊基)-7*a*,7-二氫苯並呋喃-2,4-二酮。

在 ^{13}C -NMR 及 DEPT 光譜中所觀察而得之二十一個碳原子訊號(表 1)係相應於七個四級碳原子、兩個 CH、八個 CH_2 及四個 Me 基。化合物 1 之 ^1H -NMR 光譜顯示一個烯丙基 Me ($\delta(\text{H})$ 1.79 (br. *t*, $J=1.8$ Hz, Me-C(5)))；兩個酮之 α -亞甲基質子訊號 ($\delta(\text{H})$ 2.47 (*t*, $J=7.6$ Hz, $\text{CH}_2(15)$)、2.57 (*t*,

$J=7.6$ Hz, $\text{CH}_2(10))$ 、 3.25 (d , $J=17.0$ Hz, $\text{CH}_2(8)$ 之1 H) 及 3.65 (d , $J=17.0$ Hz, $\text{CH}_2(8)$ 之1 H)；兩個酮之四個 β -亞甲基質子 ($\delta(\text{H})$ 1.57-1.67 (m , $\text{CH}_2(11)$ 及 $\text{CH}_2(16)$))；一個亞甲基質子 ($\delta(\text{H})$ 2.58 (dd , $J=18.0$, 4.4 Hz, $\text{CH}_2(7)$ 之1 H) 及 2.99 (dd , $J=18.0$, 10.8 Hz, $\text{CH}_2(7)$ 之1 H))及兩個末端 Me基 ($\delta(\text{H})$ 0.87 (t , $J=7.6$ Hz, Me(19))及 0.94 (t , $J=7.6$ Hz, Me(12))。 ^{13}C -NMR及DEPT光譜顯示存在四個C=O羰基，包含一個 α,β -不飽和C=O基 ($\delta(\text{C})$ 193.4 (C(4))；一個內酯C=O基 ($\delta(\text{C})$ 169.5 (C(2))及兩個酮基 ($\delta(\text{C})$ 202.4 (C(14))及 205.9 (C(9))；一個C=C鍵 ($\delta(\text{C})$ 131.9 (C(6))及 148.2 (C(5)))；及一個氧甲基 ($\delta(\text{C})$ 17.2 (C(13)))。由七個不飽和當量中之五個已由 ^{13}C -NMR數據所解析，化合物1推斷具有兩個環(A環是一個六員環及B環是一個五員環)。此外，A及B環經HMBC及COSY進一步測定為2-環己烯酮骨架合併一個 γ -內酯環。

由 ^1H - ^1H COSY光譜(H-C(10) ($\delta(\text{H})$ 2.57)/H-C(11) ($\delta(\text{H})$ 1.57-1.67), H-C(11)/H-C(12) ($\delta(\text{H})$ 0.94)；H-C(15) ($\delta(\text{H})$ 2.47)/H-C(16) ($\delta(\text{H})$ 1.57-1.67), H-C(16)/H-C(17) ($\delta(\text{H})$ 1.31-1.38), H-C(17)/H-C(18) ($\delta(\text{H})$ 1.31-1.38), H-C(18)/H-C(19) ($\delta(\text{H})$ 0.87))配合介於C=O基 ($\delta(\text{C})$ 205.9 (C(9)))及 $\text{CH}_2(8)$ ($\delta(\text{H})$ 3.25/3.65)間、介於 $\text{CH}_2(10)$ ($\delta(\text{H})$ 2.57)及 $\text{CH}_2(11)$ ($\delta(\text{H})$ 1.57-1.67)間；及介於C=O基 ($\delta(\text{C})$ 202.4 (C(14)))及H-C(1) ($\delta(\text{H})$ 3.64)間，介於H-C(7a) ($\delta(\text{H})$ 3.16)、 $\text{CH}_2(15)$ ($\delta(\text{H})$ 2.47)及 $\text{CH}_2(16)$ ($\delta(\text{H})$ 1.57-1.67)間之HMBC相關性，證實

2-氧戊基 ($C_3H_7COCH_2-$ ，自 $CH_2(8)$ 至 $Me-C(12)$) 及己醯基 ($C_5H_{11}CO-$ ，自 $C(14)$ 至 $Me-C(19)$) 之存在。

進一步以 $^1H-^1H$ COSY 圖 ($H-C(1)$ ($\delta(H)$ 3.64)/ $H-C(7a)$ ($\delta(H)$ 3.16)/ $CH_2(7)$ ($\delta(H)$ 2.58/2.99)) 確認，及以 $Me(13)$ 與 $C(3a)$ 、 $C(7a)$ 及 $C(4)$ ； $H-C(7a)/C(3a)$ 及 $C(2)$ ； $CH_2(7)/C(3a)$ 及 $C(7a)$ ； $Me(5)/C(4)$ 、 $C(5)$ 及 $C(6)$ 之 HMBC 相關性確認並測定化合物 1 之骨架為 5,13-二甲基-7a,7-二氫苯並呋喃-2,4-二酮 (A 及 B 環)。

H -原子訊號介於 $\delta(H)$ 3.25/3.65 ($CH_2(8)$) 與 C -原子訊號在 $\delta(C)$ 131.9 ($C(6)$) 及 148.2 ($C(5)$) 間之 HMBC 相關性建立 2-氧戊基係位在 $C(6)$ 位置。介於 H -原子訊號在 $\delta(H)$ 2.47 ($CH_2(15)$) 及 C -原子在 $\delta(C)$ 54.8 ($C(1)$) 間；及介於 H -原子在 $\delta(H)$ 3.16 ($H-C(7a)$) 及 C -原子在 $\delta(C)$ 202.4 ($C(14)$) 間之 HMBC 相關性顯示鑑定出己醯基係連結至 γ -內酯環之 $C(1)$ 。其他關鍵 HMBC 之相關性示於圖 1。

由 NOESY 光譜 (圖 2) 配合生物成因考量及比較類似化合物，以建立化合物 1 之相對構型。 $Me-C(13)/H-C(1)$ 、 $Me-C(13)/H_{ax}-C(7)$ 及 $H-C(1)/H_{ax}-C(7)$ 之 NOEs 指出 $Me-C(13)$ 、 $H-C(1)$ 及 $H_{ax}-C(7)$ 係位於分子平面之同側，試驗性地推測為 β -方向。進一步由 NOE $H-C(7a)/H_{eq}-C(7)$ 確認 $H-C(7a)$ 為 α -方向。因此， $H-C(7a)$ ($\delta(H)$ 3.16)/ $H-C(1)$ ($\delta(H)$ 3.64) 之 *trans*-構型係經由介於 $H-C(7a)$ 及 $H-C(1)$ 間與介於 $H-C(1)/H-C(7a)$ 及 $H-C(7a)/H_{ax}-C(7)$ 間並無 NOE 相關性及偶合常數³ J 值為 12.8 Hz 所確定。 $H-C(7a)/CH_2(15)$ 及 $CH_2(7)/CH_2(8)$ 間

NOESY之交叉峰顯示己醯基及2-氧戊基較佳為分別於C(1)-C(14)及C(6)-C(8)鍵。另一方面，CH₂(8)/Me-C(5)、CH₂(10)/CH₂(11)及CH₂(10)/Me-C(12)間NOE之交叉峰示於圖2。基於¹H NMR、COSY及NOESY光譜之資訊，以前述之分子模型程式及MM2能量最小化的力場計算由電腦建立之3D結構(圖3)。計算所得之H-C(1)/Me-C(13) (2.396 Å)間距離小於4.00 Å，及H-C(1)/H-C(7a) (4.486 Å)與Me-C(13)/H-C(7a) (4.320 Å)間距離大於4.00 Å；此結果與每個質子對間良好定義之NOESY (圖2)觀察一致。因此，C(1)、C(7a)及C(3a)之相對構型指定為*rel*-(1*S*,7a*R*,3a*R*) (圖3)。

實例5. 化合物1促進3T3-L1細胞之脂肪細胞分化

3T3-L1前脂肪細胞之製備

誘發3T3-L1前脂肪細胞分化之方法係根據Waki等人(2007, 「The small molecule harmine is an antidiabetic cell-type-specific regulator of PPAR γ expression.」 *Cell Metabolism*, 5(5): 357-370)所述之方法來製備。將前脂肪細胞培養於含有10%胎牛血清(FBS)之高葡萄糖DMEM(達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), Sigma D-7777)中，放在5% CO₂培養箱中於37°C下培養。

在分化誘導實驗之前，將細胞接種於96或24孔盤中(各孔中細胞濃度為約 2×10^4 個/平方公分)。將培養盤培養約2天使細胞長滿，接著再培養2天。根據不同實驗，將培養

基換成不同分化培養基。更換分化培養基之日指定為第0天。

胰島素分化模型

胰島素分化模型中使用之分化培養基為含有10% FBS及10 $\mu\text{g/ml}$ 胰島素之DMEM。將分別含有化合物1之分化培養基添加至24或96孔3T3-L1前脂肪細胞培養盤之各孔中(各孔中化合物1之最終濃度分別為2 $\mu\text{g/ml}$ 、5 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ 及20 $\mu\text{g/ml}$)。對照組為僅含有分化培養基而無樣品之培養物。放置在5% CO_2 培養箱中，於37°C下培養7天(在此期間，以含或無樣品之分化培養基替換2次)，接著將培養基替換為含有10% FBS之DMEM。繼續培養至第9天或第10天。在第9天或第10天以AdipoRed染色細胞，並分析三酸甘油酯之濃度。

(1) AdipoRed染色

以PBS清洗96孔盤，添加200 μl PBS及5 μl AdipoRed試劑(Lonze Walkersville, Inc., Walkersville, MD, USA,目錄號PT-7009)至各孔中。均勻混合作用10至15分鐘後，以設定在485 nm激發波長及572 nm發射波長下之光譜螢光計(Infinite M200)讀取。將實驗組之螢光數據除以對照組之螢光數據，換算為促分化的百分比。

(2) 三酸甘油酯濃度之量測

以PBS清洗24孔盤，然後每孔以0.1 ml 1% Triton X 100洗出細胞。接著冷凍、解凍細胞，並離心(每5分鐘10,000 rpm)，收集上清液。使用三酸甘油酯檢定套組(Audit

Diagnostics, Ltd.)分析 0.05 ml 上清液之試樣。

另以 Bio-Rad Dc 蛋白質檢定試劑 (Bio-Rad) 分析蛋白質之量。將三酸甘油酯濃度除以由 Bio-Rad Dc 蛋白質檢定試劑所得之蛋白質濃度，計算出每微克蛋白質中三酸甘油酯之量 (μg)。將實驗組之三酸甘油酯之量除以對照組之三酸甘油酯之量，換算為樣品之促分化率。

結果

圖 4(A) 至 (D) 及表 2 顯示在倒立顯微鏡下所觀測之胰島素及不同濃度之化合物 1 對 3T3-L1 前脂肪細胞分化之影響 (胰島素分化模型)。較深顏色表明在分化脂肪細胞中存在豐富的三酸甘油酯小液滴。由結果可發現，分別經 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (圖 4B)、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (圖 4C)、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (圖 4D) 之化合物 1 處理之培養物含有的三酸甘油酯小液滴比對照培養物 (圖 4A) 多，且三酸甘油酯小液滴之含量隨化合物 1 之劑量增加而增加，顯示化合物 1 可顯著地促進 3T3-L1 前脂肪細胞之分化。

化合物 1 對 3T3-L1 前脂肪細胞分化之促進程度示於表 2。

表 2：化合物 1 對 3T3-L1 分化之影響

	濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	油紅測試 (控制組%)
MnE	2	127 \pm 4
	5	140 \pm 5
	10	148 \pm 8

由結果可發現，在胰島素模型中，化合物 1 可促進 3T3-L1 前脂肪細胞之分化。

實例 6. 化合物 1 具有 PPAR γ 結合活性

以 10、20、40、80 及 160 $\mu\text{g/ml}$ 之化合物 1 進行配體之結合測試，其係依 LanthaScreen TR-FRET PPAR 競爭結合測試套組 (Invitrogen New York, NY. Catalog no. PV4894) 手冊之描述進行。於 96 孔盤中，於每一孔中依序加入下列反應劑：20 μL 2X 測試化合物、10 μL 4X Fluormone™ Pan-PPAR Green 及 10 μL 4X PPAR γ -LBD/Tb-抗-GST Ab，總體積為 40 μl /孔。藉由將培養盤置放在迴轉式振盪器 30 秒以徐緩地混合反應劑。將樣品於室溫 (20-25 $^{\circ}\text{C}$) 在黑暗中培養 2 小時，接著使樣品中之結合達到均衡。以微量盤吸收度讀取儀 (Spectra Max M5 from Molecular Devices LLC) 於 495 nm 及 520 nm 測量每個孔中之螢光發散訊號。

其結果顯示化合物 1 可結合 PPAR γ ，其 IC₅₀ 值為 68 \pm 21 $\mu\text{g/mL}$ 。

實例 7. 化合物 1 調節可調節 3T3-L1 前脂肪細胞分化上游基因之 mRNA 表現

可調節 3T3-L1 前脂肪細胞分化之上游基因已經報導 (F.M. Gregoire, C.M. Smas and H.S. Sul, Understanding adipocyte differentiation. *Physiological Reviews*, 783 (1998), pp. 783-809.)。自其中，分析 aP2、LPL、PPAR γ 、脂聯素、GLUT4、GLUT1 及 C/EBP α 以監測 3T3-L1 前脂肪細胞分化之調節，並使用 β -肌動蛋白及甘油醛-3-磷酸去氫酶 (GADPH) 之家務基因作為控制組。「do」代表 3T3-L1 前脂肪細胞於加入誘導劑前之狀態。於「NC」組中，3T3-

L1前脂肪細胞係未經任何誘導劑處理。「do」及「NC」兩組皆為對照組。於「胰島素」、「E」及「曲格列酮」組中，3T3-L1前脂肪細胞分別經胰島素、化合物1與胰島素、以及曲格列酮處理。

在培養3T3-L1細胞9天後，將胰島素、化合物1與胰島素、以及曲格列酮分別加入於培養基。將細胞繼續培養，並於第4天(脂肪細胞分化前期)、第7天(脂肪細胞分化中期)及第9天(脂肪細胞分化後期)收集樣品以進行下述分析。

RNA製備及定量即時PCR

以TRIZOL反應劑根據製造商(GIBCO 15596-026; Molecular research center, INC.)之指示萃取3T3-L1細胞之總RNA。根據反轉錄系統[RevertAid H Minus First Strand cDNA合成套組(Fermentas K1632)]之程序以寡(dT)18引子將每個樣品之4 μ g總RNA反轉錄為cDNA。

使用TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix反應套組及引子與探針(Applied Biosystems, Foster, CA)進行定量即時PCR，並接著進行TaqMan基因表現分析。aP2 (Mm00445878_ml)、LPL (Mm00434770_ml)、PPAR γ (Mm01184322_ml)、脂聯素 (Mm00456425_ml)、GLUT4 (Mm01245502_ml)、GLUT1 (Mm01192270_ml)、C/EBP α (Mm01265914_sl)、C/EBP δ (Mm00786711_sl)、 β -肌動蛋白 (Mm01205647_gl)及GADPH (Mm99999915_gl)為於PCR擴大之序列。家務基因(β -肌動蛋白及GADPH)之mRNA量

亦以即時PCR分析測定。在cDNA合成後，依據製造商之程序以ABI Prism 7300儀(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)定量即時PCR。PCR之條件為1循環之50°C進行2分鐘，再來95°C進行10分鐘，接著40個循環之95°C進行15秒及60°C進行1分鐘。此定量重複進行，且此實驗獨立進行三次。

圖5顯示E組在脂肪細胞分化之前期(第4天)與胰島素組相比可促進C/EBP α 、PPAR γ 及脂聯素之表現，其增加量為約50%，然而GluT1之表現為胰島素組之0.6倍。圖6顯示在脂肪細胞分化中期(第7天)，與胰島素組相比，E組些微增加PPAR γ 之表現(1.8倍)，但aP2、LPL及GluT1之表現則顯著降低(0.3倍)。圖7顯示E組在脂肪細胞分化後期(第9天)，與胰島素組相比，C/EBP α 、PPAR γ 及脂聯素之表現些微增加(分別為1.59、1.35、1.49倍)，GluT1之表現為胰島素組之0.6倍。

其結果顯示化合物1在脂肪細胞分化之前期、中期及晚期可刺激PPAR γ 及C/EBP α 之表現，但對aP2、LPL、脂聯素、GLUT4及GLUT1之影響不大。此顯示化合物1可促進前脂肪細胞分化為脂肪細胞係經由PPAR γ /C/EBP α 途徑(Evan D. Rosen, Chung-Hsin Hsu, Xinzhong Wang, Shuichi Sakai, Mason W. Freeman, Frank J. Gonzalez, and Bruce M. Spiegelman. (2002) C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : a unified pathway. *Genes Dev.* 16(1): 22-26)。

雖然已結合上述特定態樣描述了本發明，但一般熟習此

項技術者應顯而易知本發明之許多替代形式以及其修改及變化。所有該等替代形式、修改及變化均視為在本發明之範疇內。

【圖式簡單說明】

圖 1 顯示 *rel*-(1*S*,7*aR*,3*aR*)-1-己醯基-5,13-二甲基-6-(2-氧戊基)-7*a*,7-二氫苯並呋喃-2,4-二酮(化合物 1)之結構。

圖 2 展示化合物 1 之 COSY(—)、NOESY(↔)及 HMBC(→)之顯著相關性。

圖 3 顯示以分子機構(MM2)計算得之化合物 1 最穩定構型。

圖 4(A)至 4(D)展示胰島素(A)及化合物 1(濃度為 2 $\mu\text{g/ml}$ (B)、5 $\mu\text{g/ml}$ (C)及 10 $\mu\text{g/ml}$ (D))對 3T3-L1 前脂肪細胞分化之影響。

圖 5 顯示以化合物 1 處理之脂肪細胞第 4 天之脂肪細胞分化相關基因表現之即時 PCR 之結果。

圖 6 顯示以化合物 1 處理之脂肪細胞第 7 天之脂肪細胞分化相關基因表現之即時 PCR 之結果。

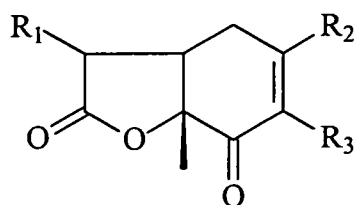
圖 7 顯示以化合物 1 處理之脂肪細胞第 9 天之脂肪細胞分化相關基因表現之即時 PCR 之結果。

七、申請專利範圍：

1. 一種式(I)化合物，

公告本

103年7月4日修正本



式(I)

或其醫藥學上可接受之鹽，

其中 R^1 及 R^2 為獨立選自由烷基、烯基及羰基所組成之群，且 R^3 為烷基。

2. 如請求項1之化合物，其中 R^1 及 R^2 獨立為 C_1 - C_{10} 烷基、 C_2 - C_7 烯基或 C_1 - C_{10} 羰基。
3. 如請求項1之化合物，其中 R^3 為 C_1 - C_{10} 烷基。
4. 如請求項1之化合物，其中 R^1 為己醯基。
5. 如請求項1之化合物，其中 R^2 為2-氧戊基。
6. 如請求項1之化合物，其中 R^3 為甲基。
7. 如請求項1之化合物，其中該化合物為 *rel*-(1*S*,7*aR*,3*aR*)-1-己醯基-5,13-二甲基-6-(2-氧戊基)-7*a*,7-二氫苯并咪喃-2,4-二酮，或其醫藥學上可接受之鹽。
8. 一種組合物，其包含如請求項1至7中任一項之化合物或其醫藥學上可接受之鹽及視情況選用之醫藥學上可接受之載劑或賦形劑。
9. 一種製備如請求項1至7中任一項之化合物或其醫藥學上可接受之鹽之方法，該方法包含以下步驟：
 - (a) 以紅麴菌屬分離菌株將米發酵，獲得紅麴米；
 - (b) 以甲醇、乙醇或乙酸乙酯萃取該紅麴米；

(c) 以乙酸乙酯與H₂O萃取步驟(b)中獲得之萃取物，獲得可溶於乙酸乙酯之部分；

(d) 利用溶離劑經由矽膠層析管柱溶離該可溶於乙酸乙酯之部分；及

(e) 利用矽膠層析管柱及/或製備型薄層層析法(TLC)純化(d)之溶離份，以獲得該化合物。

10. 如請求項9之方法，其中該分離菌株為紫色紅麴菌(*Monascus purpureus*)。
11. 如請求項10之方法，其中該分離菌株為紫色紅麴菌M615 BCRC 930146(DSM 24162)。
12. 如請求項9之方法，其中步驟(a)包含在酒石酸存在下，以紅麴菌屬分離菌株將米發酵，獲得紅麴米。
13. 一種如請求項1至7中任一項之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽之用途，其係用於製備於個體中促進脂肪細胞分化之醫藥品。
14. 一種紅麴米萃取物之用途，其係用於製備於個體中促進脂肪細胞分化之醫藥品，其中該紅麴米萃取物係藉由包含以下之方法來獲得：
 - (a) 以紅麴菌屬分離菌株將米發酵，獲得紅麴米；及
 - (b) 用甲醇、乙醇或乙酸乙酯萃取該紅麴米。
15. 一種組合物之用途，其係用於製備於個體中促進脂肪細胞分化之醫藥品，其中該組合物係如請求項8之組合物。
16. 一種組合物之用途，其係用於製備於個體中促進脂肪細

- 胞分化之醫藥品，其中該組合物包含如請求項14之用途中所述之紅麴米萃取物及視情況選用之醫藥學上可接受之載劑或賦形劑。
17. 一種如請求項1至7中任一項之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽之用途，其係用於製備預防及/或治療個體與胰島素抗性相關之疾病或病症之醫藥品。
18. 一種組合物之用途，其係用於製備預防及/或治療個體與胰島素抗性相關之疾病或病症之醫藥品，其中該組合物係如請求項8之組合物。
19. 一種如請求項1至7中任一項之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽之用途，其係用於製備在有需要之個體提高PPAR γ 及/或C/EBP α 活性之醫藥品。
20. 一種紅麴米萃取物之用途，其係用於製備在有需要之個體提高PPAR γ 及/或C/EBP α 活性之醫藥品，其中該紅麴米萃取物係藉由包含以下之方法來獲得：
- (a) 以紅麴菌屬分離菌株將米發酵，獲得紅麴米；及
 - (b) 用甲醇、乙醇或乙酸乙酯萃取該紅麴米。
21. 一種組合物之用途，其係用於製備在有需要之個體提高PPAR γ 及/或C/EBP α 活性之醫藥品，其中該組合物係如請求項8之組合物。
22. 一種組合物之用途，其係用於製備在有需要之個體提高PPAR γ 及/或C/EBP α 活性之醫藥品，其中該組合物包含如請求項14之用途中所述之紅麴米萃取物及視情況選用之醫藥學上可接受之載劑或賦形劑。

23. 一種如請求項1至7中任一項之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽之用途，其係用於製備於一個體中降低血糖之醫藥品。
24. 一種組合物之用途，其係用於製備於一個體中降低血糖之醫藥品，其中該組合物係如請求項8之組合物。
25. 一種如請求項1至7中任一項之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽之用途，其係用於製備預防及/或治療個體之代謝症候群或其併發症之醫藥品。
26. 一種組合物之用途，其係用於製備預防及/或治療個體之代謝症候群或其併發症之醫藥品，其中該組合物係如請求項8之組合物。
27. 如請求項25或26之用途，其中該代謝症候群或其併發症係選自由以下組成之群、包含：腹部肥胖、致動脈粥樣硬化血脂異常、血壓升高、胰島素抗性或葡萄糖不耐性、第2型糖尿病及心血管疾病。
28. 如請求項25或26之用途，其中該醫藥品係與第二種用於預防或治療代謝症候群或其併發症之治療劑併用。
29. 如請求項28之用途，其中該第二種治療劑係選自由以下組成之群：士他汀(statin)、纖維酸酯、菸鹼酸；利尿劑、血管收縮素轉化酶(ACE)抑制劑；二甲雙胍(metformin)、胰島素、磺醯脲(sulfonylurea, SU)、雙胍(biguanide)、 α -葡糖苷酶抑制劑及噻唑啉二酮(TZD)。

八、圖式：

公告本

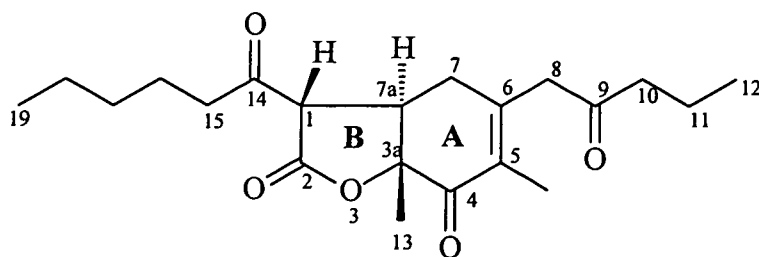


圖 1

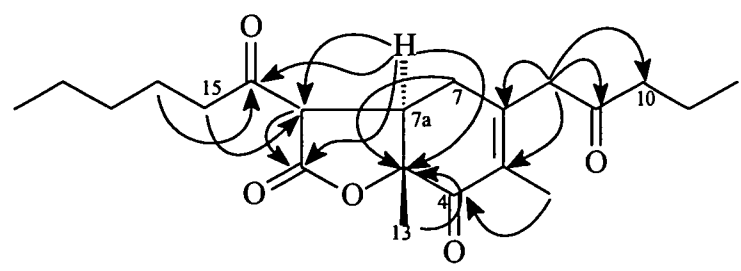
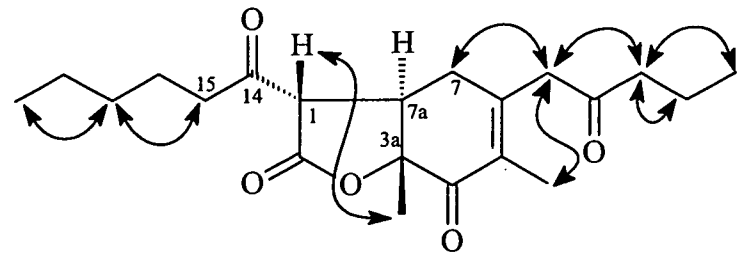
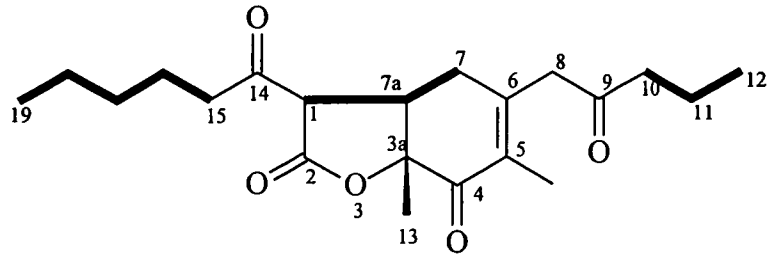


圖 2

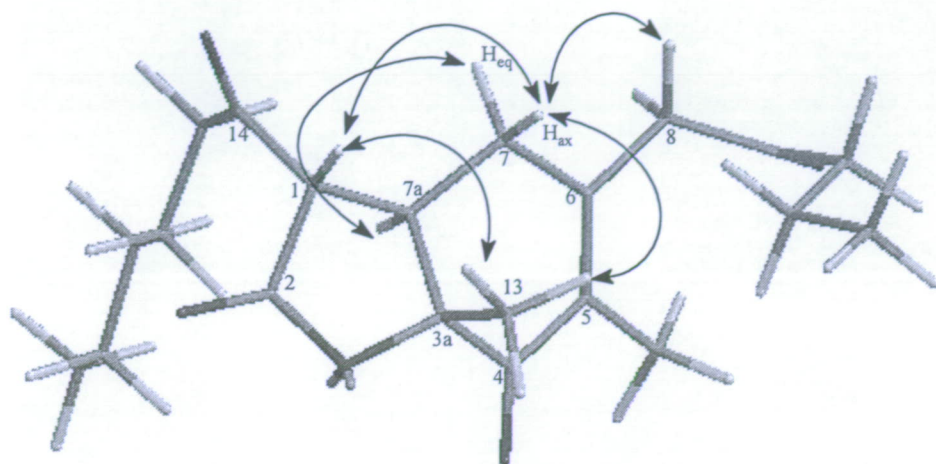
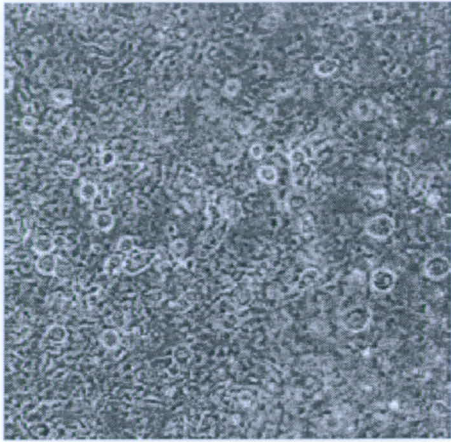
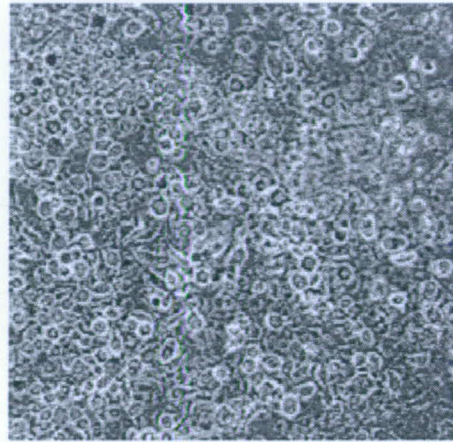


圖 3

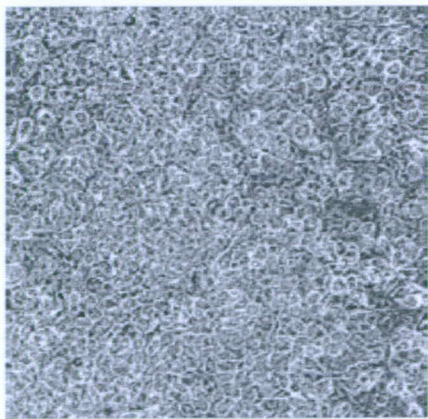
(A) 胰島素



(B) 2 $\mu\text{g/ml}$



(C) 5 $\mu\text{g/ml}$



(D) 10 $\mu\text{g/ml}$

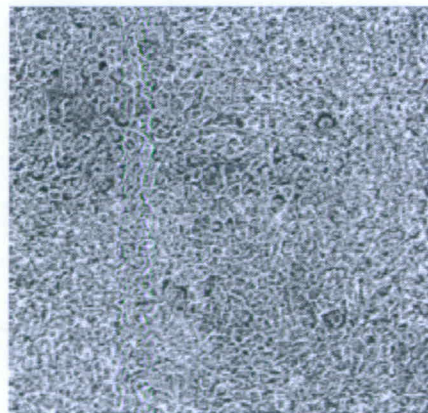


圖 4

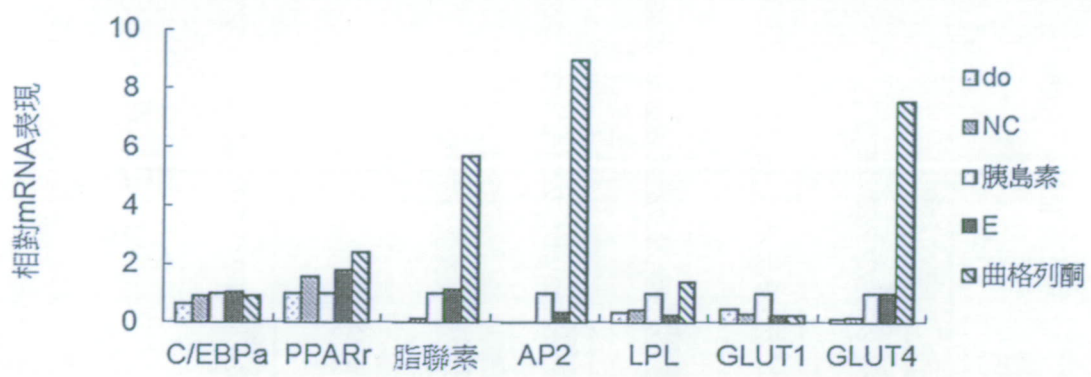


圖 5

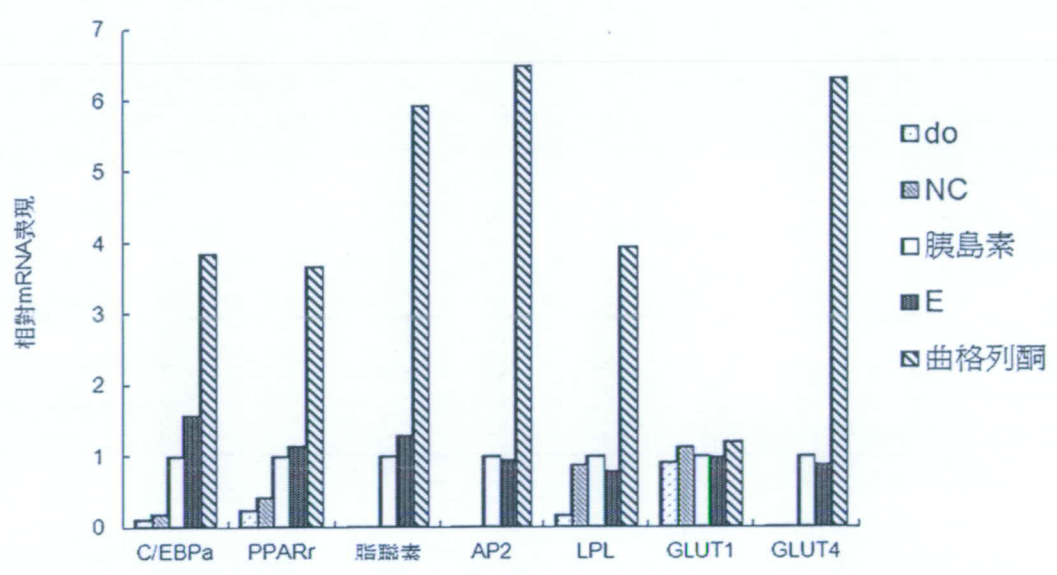


圖 6

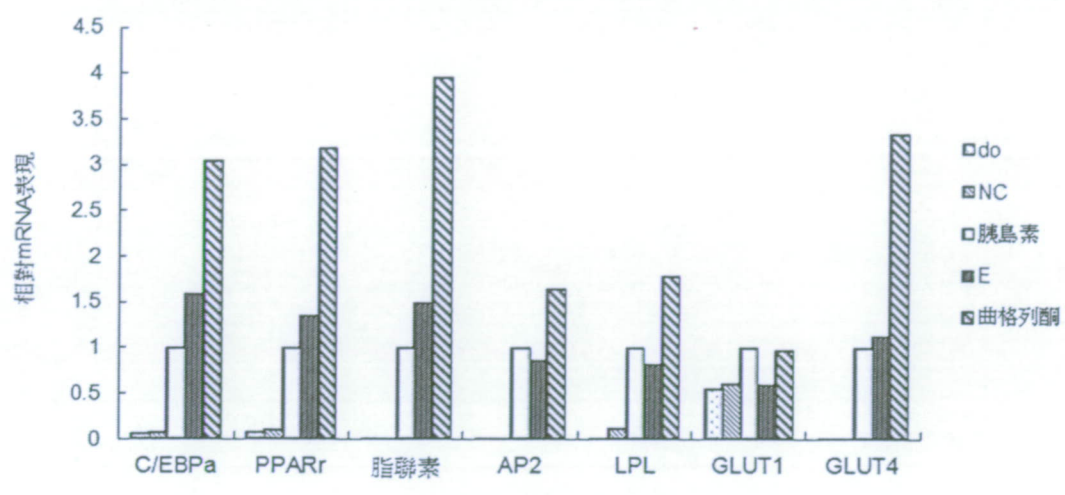


圖 7