

發明專利說明書

99年3月23日修正本

(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：97106589

A61K31/352 (2006.01)

※ 申請日期：97.2.26

※IPC 分類：C07D311/36 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

A61P19/10(2006.01)

異黃酮衍生物及包含此衍生物之醫藥組合物

Isoflavone derivatives and pharmaceutical compositions
comprising the same

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

高雄醫學大學/KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY

代表人：(中文/英文)

余幸司/Yu, Hsin-Su

住居所或營業所地址：(中文/英文)

高雄市三民區十全一路 100 號

Kaohsiung Medical University, 100 Shih-Chuan 1st Road, San Ming
District, Kaohsiung City 807, Taiwan

國 籍：(中文/英文) 中華民國/TW

三、發明人：(共 6 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 曾誠齊/Cherng-Chyi TZENG

2. 陳義龍/Yeh-Long CHEN

3. 王國照/Gwo-Jaw WANG

4. 何美泠/Mei-Ling HO

5. 張瑞根/Je-Ken CHANG

6. 傅尹志/Yin-Chih FU

國 籍：(中文/英文)

中華民國/TW

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

中華民國/TW

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係有關於一種化合物，特別是有關於一種治療骨質疏鬆之異黃酮(isoflavone)衍生物。

【先前技術】

大量存在於大豆及其相關產品中的類異黃酮(isoflavonoids)，不論其天然產品或人工合成之類似物皆已被發現具有廣大生物性功效，例如抗寄生蟲(antiparasitic)、抗細胞增生(antiproliferative)、抗真菌(antifungal)、抗病毒(antiviral)、抗發炎(anti-inflammatory)、抗氧化(antioxidant)及心血管作用(cardiovascular effects)等(Xiao, Z. P. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, *15*, 3703; Stachulski, A. V. *et. al.* *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 1450; Vasselin, D. A. *et. al.* *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3973; Aggarwal, B. B. *et. al.* *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *71*, 1397; Qing, F. *et. al.* Patent No. CN 2003/1475488 A; Wu, E. S. Patent No. US 1986/4668804 A; Chapman and Hall; London, **1999**; Ren, W. *et. al.*, *Med. Res. Rev.* **2003**, *23*, 519)。

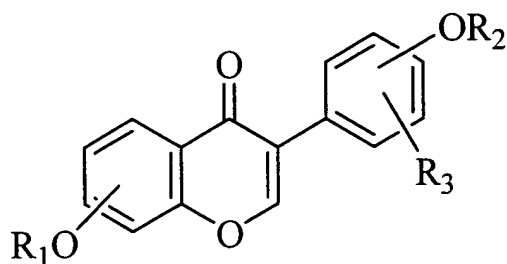
Genistein 為某些植物中主要的異黃酮(isoflavone)植物化學成分，眾所皆知如可與雌激素受體(estrogen receptor)結合的植物雌激素(phytoestrogen)。目前，已有許多文獻探討 genistein 在避免因至少一部份雌激素缺乏導致骨質流失上扮演的角色(Tan, R. *et. al.*, Patent No. CN 2004/1603318 A; Wang, S. F. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*,

2005, 13, 4880; Ishimi, Y., *et. al.*, *Bone*, 2002, 31, 180; Morabito, N. *et. al.*, *J. Bone Miner Res.*, 2002, 17, 1904)。

在某些歐洲國家及日本，合成型異黃酮(isoflavone)衍生物之一的異普黃酮(ipriflavone)已被證實可治療退化性骨質疏鬆(involutional osteoporosis)(Kunikata, K. *et. al.* Patent No. JP 1996/09268187 A; Imamiya, K. *et. al.* Patent No. JP 1997/11012265 A; Yamazaki, I. *et. al.* Patent No. EP 1984/136569 A2; Ferrari, M. Patent No. EP 1999/941992 A1; Ferrari, M. Patent No. EP 2002/941992 B1)。然而，卻鮮少有文獻報導如何促進選擇性雌激素受體調控劑(selective estrogen receptor modulator, SERM)的活性及異黃酮(isoflavone)衍生物抗骨質疏鬆(anti-osteoporotic)的活性(Chiest, P. *et. al.* Patent No. WO 98/29403; Delcanale, M. *et. al.*, *Helv. Chim. Acta* 2001, 84, 2417; Kelly, G. E. *et. al.*, Patent No. US 2006/0100238 A1)。

【發明內容】

本發明之一實施例，提供一種異黃酮(isoflavone)衍生物，具有下列化學式：



其中 R₁ 與 R₂ 獨立地包括 C₁-C₁₂ 烷基，該 C₁-C₁₂ 烷基

選擇性地取代有環氧乙基(oxirane)、噻喃基(thiirane)、氮丙啶基(aziridine)、胺基(amino)、環胺基(cycloamino)、羥基胺基(hydroxyamino)或羥基環胺基(hydroxycycloamino)；以及 R₃ 包括氫、羥基(hydroxy)或 C₁-C₁₂ 烷氧基，該 C₁-C₁₂ 烷氧基選擇性地取代有環氧乙基(oxirane)、噻喃基(thiirane)、氮丙啶基(aziridine)、胺基(amino)、環胺基(cycloamino)、羥基胺基(hydroxyamino)或羥基環胺基(hydroxycycloamino)。

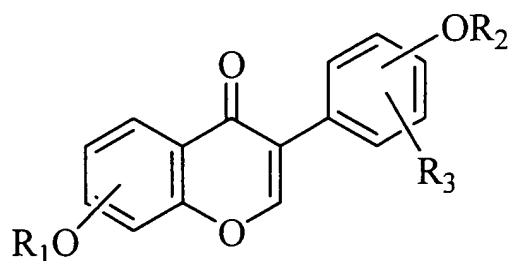
本發明之一實施例，提供一種醫藥組合物，包括一上述之異黃酮(isoflavone)衍生物或其藥學上可接受之鹽類；以及一藥學上可接受之載體。

本發明之一實施例，提供一種治療骨質疏鬆(osteoporosis)之醫藥組合物，包括一上述之異黃酮(isoflavone)衍生物或其藥學上可接受之鹽類；以及一藥學上可接受之載體。

為讓本發明之上述目的、特徵及優點能更明顯易懂，下文特舉一較佳實施例，並配合所附圖式，作詳細說明如下：

【實施方式】

本發明之一實施例，提供一種異黃酮(isoflavone)衍生物，具有下列化學式：



上述結構中， R_1 與 R_2 可獨立地包括 C_1 - C_{12} 烷基。 C_1 - C_{12} 烷基可選擇性地取代有環氧乙基(oxirane)、噻喃基(thiirane)、氮丙啶基(aziridine)、胺基(amino)、環胺基(cycloamino)、羥基胺基(hydroxyamino)或羥基環胺基(hydroxycycloamino)。

R_3 可包括氫、羥基或 C_1 - C_{12} 烷氧基。 C_1 - C_{12} 烷氧基可選擇性地取代有環氧乙基(oxirane)、噻喃基(thiirane)、氮丙啶基(aziridine)、胺基(amino)、環胺基(cycloamino)、羥基胺基(hydroxyamino)或羥基環胺基(hydroxycycloamino)。

本發明具有上述化學式的異黃酮(isoflavone)衍生物可以水合物(hydrate)或立體異構物(stereoisomer)的型式存在。

本發明之一實施例，提供一種醫藥組合物，包括一上述之異黃酮(isoflavone)衍生物或其藥學上可接受之鹽類，以及一藥學上可接受之載體。

本發明之一實施例，提供一種治療骨質疏鬆(osteoporosis)的醫藥組合物，包括一上述之異黃酮(isoflavone)衍生物或其藥學上可接受之鹽類，以及一藥學上可接受之載體。

上述藥學上可接受鹽類(pharmaceutically acceptable

salt) 可由無機酸、有機酸或氨基酸所製備。無機酸可包括鹽酸、氫溴酸 (hydrobromic acid)、硫酸或磷酸。有機酸可包括醋酸、馬來酸 (maleic acid)、酒石酸 (tartaric acid) 或甲基磺酸 (methanesulfonic acid)。氨基酸可包括精氨酸 (arginine)、天門冬氨酸 (aspartic acid) 或麩氨酸 (glutamic acid)。

上述藥學上可接受載體 (pharmaceutically acceptable carrier) 可包括任何適當溶劑、崩散劑 (disintegrating agent)、黏著劑 (binding agent)、賦形劑 (excipient)、潤滑劑 (lubricant)、吸收延遲劑 (absorption delaying agent) 或其類似物。

本發明異黃酮 (isoflavone) 衍生物或包含此衍生物的醫藥組合物可有效治療骨質疏鬆，其可製備成任何適當劑型，例如無菌水溶液或分散液、無菌粉末、錠劑、含片 (troche)、丸劑 (pill)、膠囊或其類似物，以注射或口服方式施予病患，此外，本發明異黃酮 (isoflavone) 衍生物或包含此衍生物的醫藥組合物可單獨施予或配合其他抗骨質疏鬆劑或藥學上可接受之載體共同使用。

本發明異黃酮 (isoflavone) 衍生物可由下述 *Scheme 1* 揭露之合成步驟所製備。

進行真空抽乾，所得的殘留物續以 50 毫升的水沖洗。接著，將收集的沈澱物以色層分析管柱(甲醇:二氯甲烷=1:50)進行純化。待進一步以乙醇結晶後，即可獲得 0.14 克的化合物 3，產率 43%，熔點 153-154°C。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 2.72 (dd, 1H, $J = 2.8, 5.2$ Hz), 2.85 (dd, 1H, $J = 4.4, 4.8$ Hz), 3.33-3.34 (m, 1H), 3.86 (dd, 1H, $J = 6.4, 11.2$ Hz), 3.90 (s, 3H, OMe), 4.37 (dd, 1H, $J = 2.4, 11.2$ Hz), 7.02 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz), 7.08 (dd, 1H, $J = 2.8, 9.2$ Hz), 7.15 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz), 7.2 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz), 8.02 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 8.42 (s, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 43.78, 49.74, 56.12, 68.99, 100.56, 114.22 (2C), 114.81, 117.58, 123.29, 124.45, 126.95, 130.11 (2C), 153.56, 157.46, 157.99, 163.73, 174.63. Anal. calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{O}_5$: C 70.36, H 4.97; found: C 70.46, H 4.95。

【實施例 2】

3-(3,4-二甲氧基苯基)-7-(環氧-2-基-甲氧基)-4*H*-色酮(化合物 4)

(3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-7-(oxiran-2-ylmethoxy)-4*H*-chromen-4-one)之合成

首先，混合 0.30 克的化合物 2 (1mmol)、0.41 克的碳酸鉀(3mmol)、0.3 克的環氧氯丙烷(3mmol)與 30 毫升的乙腈(acetontrile)，並迴流攪拌 4 小時。之後，對上述混合物進行真空抽乾，所得的殘留物續以 50 毫升的水沖洗。接著，將收集的沈澱物以色層分析管柱(甲醇:二氯甲烷=1:100)進行純化。待進一步以甲醇結晶後，即可獲得 0.25

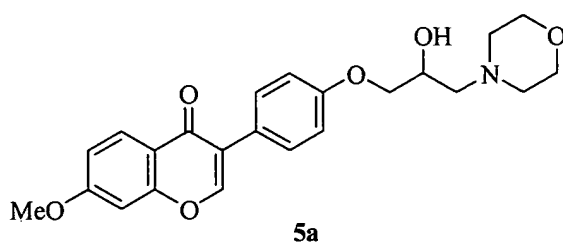
克的化合物 4，產率 70%，熔點 161-162°C。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 2.81 (dd, 1H, $J = 2.8, 5.2$ Hz), 2.96 (dd, 1H, $J = 4.4, 4.8$ Hz), 3.40-3.44 (m, 1H), 3.92 (s, 3H, OMe), 3.93 (s, 3H, OMe), 4.03 (dd, 1H, $J = 6.0, 11.2$ Hz), 4.38 (dd, 1H, $J = 2.8, 11.2$ Hz), 6.90 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 6.92 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.02-7.06 (m, 2H), 7.20 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz), 7.95 (s, 1H), 8.21 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz).
 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 44.53, 49.76, 55.92, 55.94, 69.28, 101.04, 111.12, 112.45, 114.73, 118.75, 121.00, 124.53, 124.96, 127.90, 148.74, 149.08, 152.29, 157.73, 162.69, 175.83. Anal. calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_6 \cdot 1.0\text{H}_2\text{O} \cdot 0.8\text{HCl}$: C 59.81, H 5.23; found: C 59.90, H 5.46。

【實施例 3】

3-[4-(2-羥基-3-嗎啉丙氧基)苯基]-7-甲氧基-4*H*-色酮(化合物 5a)

(3-[4-(2-Hydroxy-3-morpholinopropoxy)phenyl]-7-methoxy-4*H*-chromen-4-one)之合成



首先，混合 0.32 克的化合物 3 (1mmol)、0.43 克的嗎啉(5mmol)與 30 毫升的乙醇，迴流 4 小時。待真空抽乾溶劑後，所得的殘留物續以 50 毫升的水沖洗。接著，將收集的沈澱物以色層分析管柱(甲醇:二氯甲烷=1:20)進行純

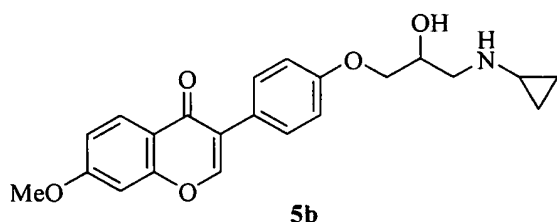
化，即可獲得 0.28 克的化合物 **5a**，產率 68%，熔點 117-118°C。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 2.48-2.52 (m, 2H), 2.57-2.61 (m, 2H), 2.66-2.72 (m, 2H), 3.73-3.76 (m, 4H), 3.92 (s, 3H, OMe), 4.03 (d, 2H, $J = 4.8$ Hz), 4.11-4.17 (m, 1H), 6.85 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 6.97-7.01 (m, 3H), 7.48-7.51 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 7.92 (s, 1H), 8.20 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz).
 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 53.75, 55.81, 61.02, 65.37, 66.97 (3C), 70.22, 94.38, 100.07, 114.55, 114.58, 118.38, 124.62, 124.78, 127.77, 130.15 (2C), 152.10, 157.94, 158.65, 163.97, 175.85. Anal. calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{NO}_6$: C 66.40, H 6.19, N 3.37; found: C 66.09, H 6.17, N 3.34。

【實施例 4】

3-{4-[3-(環丙基胺基)-2-羥基丙氧基]苯基-7-甲氧基-4*H*-色酮(化合物 **5b**)

(3-{4-[3-(Cyclopropylamino)-2-hydroxypropoxy]phenyl-7-methoxy-4*H*-chromen-4-one)-之合成



首先，混合 0.32 克的化合物 **3** (1mmol)、0.29 克的環丙胺(5mmol)與 30 毫升的乙醇，迴流 4 小時。待真空抽乾溶劑後，所得的殘留物續以 50 毫升的水沖洗。接著，將收集的沈澱物以色層分析管柱(甲醇:二氯甲烷=1:20)進行

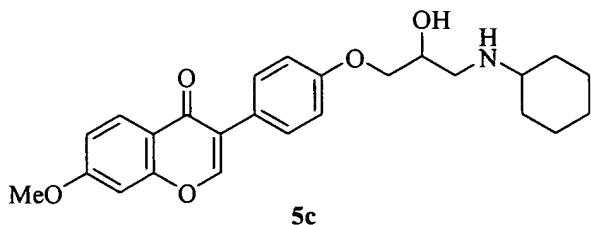
純化，即可獲得 0.30 克的化合物 **5b**，產率 78%，熔點 105-106°C。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 0.22 (m, 2H), 0.36 (m, 2H), 2.11 (m, 1H), 2.66 (dd, 1H, $J = 6.4, 12.0$ Hz), 2.74 (dd, 1H, $J = 4.0, 12.0$ Hz), 3.88-4.05 (m, 6H), 4.97 (br s, 1H, NH), 6.99 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 7.09 (dd, 1H, $J = 2.4, 9.2$ Hz), 7.17 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz), 7.51 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 8.03 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 8.43 (s, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 6.17 (2C), 30.29, 52.21, 56.13, 67.95, 70.83, 100.07, 114.20 (2C), 114.80, 117.59, 123.38, 124.00, 126.95, 130.05 (2C), 153.48, 157.46, 158.52, 163.71, 174.65. Anal. calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{NO}_5 \cdot 0.1\text{H}_2\text{O}$: C 68.94, H 6.11, N 3.66; found: C 68.69, H 6.06, N 3.46。

【實施例 5】

3-{4-[3-(環己基胺基)-2-羥基丙氧基]苯基}-7-甲氧基-4*H*-色酮(化合物 **5c**)

(3-{4-[3-(Cyclohexylamino)-2-hydroxypropoxy]phenyl}-7-methoxy-4*H*-chromen-4-one)之合成



首先，混合 0.32 克的化合物 **3** (1mmol)、0.50 克的環己胺(5mmol)與 30 毫升的乙醇，迴流 4 小時。待真空抽乾溶劑後，所得的殘留物續以 50 毫升的水沖洗。接著，將

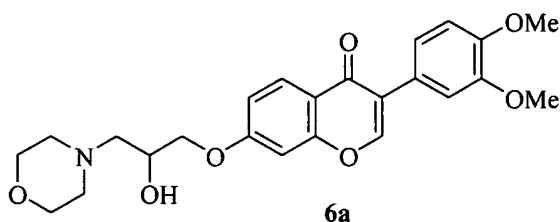
收集的沈澱物以色層分析管柱(甲醇:二氯甲烷=1:20)進行純化，即可獲得 0.28 克的化合物 **5c**，產率 67%，熔點 125-126°C。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 1.05-1.32 (m, 5H), 1.60-1.64 (m, 1H), 1.73-1.77 (m, 2H), 1.92-1.95 (m, 2H), 2.43-2.51 (m, 1H), 2.74 (dd, 1H, $J = 8.0, 12.4$ Hz), 2.95 (dd, 1H, $J = 3.6, 12.4$ Hz), 3.92 (s, 3H, OMe), 3.97-4.08 (m, 3H), 6.85 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 6.96-7.01 (m, 3H), 7.48 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz), 7.92 (s, 1H), 8.19 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 24.97 (2C), 25.99, 33.44, 33.67, 48.74, 55.81, 56.82, 68.26, 70.52, 100.05, 114.54 (2C), 114.57, 118.37, 124.54, 124.78, 127.76, 130.13 (2C), 152.09, 157.93, 158.67, 163.95, 175.84. Anal. calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{NO}_5 \cdot 0.1\text{H}_2\text{O}$: C 70.59, H 6.93, N 3.29; found: C 70.38, H 6.87, N 3.29。

【實施例 6】

3-(3,4-二甲氧基苯基)-7-(2-羥基-3-嗎啉丙氧基)-4*H*-色酮
(化合物 **6a**)

(3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-7-(2-hydroxy-3-morpholinopropoxy)-4*H*-chromen-4-one)之合成



首先，混合 0.35 克的化合物 **4** (1mmol)、0.43 克的嗎

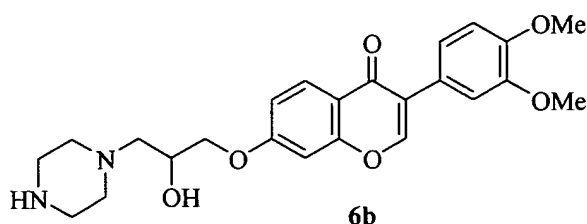
啉(5mmol)與 30 毫升的乙醇，迴流 6 小時。待真空抽乾溶劑後，所得的殘留物續以 50 毫升的水沖洗。接著，將收集的沈澱物以色層分析管柱(甲醇:二氯甲烷=1:25)進行純化，即可獲得 0.23 克的化合物 **6a**，產率 51%，熔點 135-136°C。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 2.47- 2.73 (m, 6H), 3.54 (br s, 1H, OH), 3.71-3.80 (m, 4H), 3.92 (s, 3H, OMe), 3.93 (s, 3H, OMe), 4.07-4.11 (m, 2H), 4.13-4.20 (m, 1H), 6.90 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 6.92 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 7.02-7.06 (m, 2H), 7.20 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz), 7.95 (s, 1H), 8.20 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 30.85, 53.69, 55.91, 55.93, 60.78, 65.08, 66.92 (2C), 70.67, 100.89, 111.12, 112.45, 114.77, 118.61, 121.00, 124.54, 124.93, 127.80, 148.73, 149.07, 152.26, 157.75, 162.99, 175.83. Anal. calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{NO}_7$: C 65.29, H 6.16, N 3.17; found: C 65.20, H 6.19, N 3.14。

【實施例 7】

3-(3,4-二甲氧基苯基)-7-[2-羥基-3-(哌嗪-1-基)丙氧基]-4*H*-色酮(化合物 **6b**)

(3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-7-[2-hydroxy-3-(piperazin-1-yl)propoxy]-4*H*-chromen-4-one)之合成



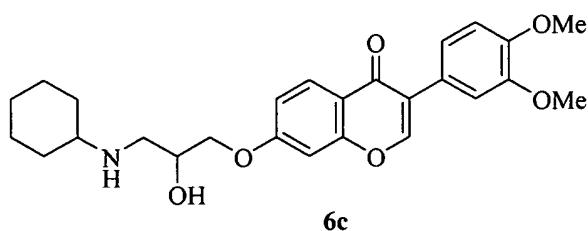
首先，混合 0.35 克的化合物 **4** (1mmol)、0.43 克的哌嗪 (5mmol) 與 30 毫升的乙醇，迴流 6 小時。待真空抽乾溶劑後，所得的殘留物續以 50 毫升的水沖洗。接著，將收集的沈澱物以色層分析管柱 (甲醇:二氯甲烷=1:25) 進行純化，即可獲得 0.25 克的化合物 **6b**，產率 56%，熔點 84-85°C。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 2.45-2.68 (m, 7H), 2.88-2.96 (m, 3H), 3.92 (s, 3H, OMe), 3.93 (s, 3H, OMe), 4.05-4.17 (m, 3H), 6.89 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 6.92 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.01-7.06 (m, 2H), 7.21 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz), 7.95 (s, 1H), 8.19 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 30.84, 46.05, 54.50, 55.84, 55.86, 60.80, 64.99, 65.13, 70.81, 100.80, 111.04, 112.38, 114.77, 118.46, 120.94, 124.51, 124.82, 127.67, 148.65, 148.98, 152.21, 157.69, 163.03, 175.77. Anal. calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_6 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O} \cdot 0.5\text{HCl}$: C 61.62, H 6.37, N 5.99; found: C 61.92, H 6.75, N 5.62。

【實施例 8】

7-[3-(環己基胺基)-2-羥基丙氧基]-3-(3,4-二甲氧基苯基)-4*H*-色酮 (化合物 **6c**)

(7-[3-(Cyclohexylamino)-2-hydroxypropoxy]-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-4*H*-chromen-4-one) 之合成



首先，混合 0.35 克的化合物 **4** (1mmol)、0.50 克的環

己胺(5mmol)與 30 毫升的乙醇，迴流 6 小時。待真空抽乾溶劑後，所得的殘留物續以 50 毫升的水沖洗。接著，將收集的沈澱物以色層分析管柱(甲醇:二氯甲烷=1:25)進行純化，即可獲得 0.24 克的化合物 **6c**，產率 54%，熔點 70-71°C。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 1.06-1.32 (m, 5H), 1.61-1.65 (m, 1H), 1.72-1.77 (m, 2H), 1.92-1.95 (m, 2H), 2.42-2.48 (m, 1H), 2.76 (dd, 1H, $J = 8.0, 12.4$ Hz), 2.96 (dd, 1H, $J = 3.6, 12.4$ Hz), 3.92 (s, 3H, OMe), 3.93 (s, 3H, OMe), 4.03-4.08 (m, 3H), 6.89 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 6.92 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 7.02 (dd, 1H, $J = 2.4, 8.8$ Hz), 7.04 (dd, 1H, $J = 2.4, 8.4$ Hz), 7.20 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 7.95 (s, 1H), 8.20 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 24.96 (2C), 25.98, 33.61, 33.91, 48.52, 55.90, 55.92, 56.75, 68.04, 71.04, 100.82, 111.09, 112.42, 114.82, 118.53, 120.99, 124.55, 124.90, 127.75, 148.70, 149.04, 152.26, 157.77, 163.05, 175.86. Anal. calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{NO}_6 \cdot 0.2\text{H}_2\text{O}$: C 68.32, H 6.92, N 3.06; found: C 68.51, H 6.99, N 3.01。

【實施例 9】

抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)溶液試驗

首先，將 10^3 個 Raw 264.7 細胞置於含有 100ng/mL 核因子 kappa B 配體受體活化素(receptor activator of nuclear factor kappa B ligand, RANKL)(R&D Systems, Minneapolis, MN)的 96-井盤中，於 5%二氧化碳，溫度 37°C 環境下培養 5 天，並於第 3 天時，倒入含有新鮮 RANKL

的培養基。在抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)溶液試驗中，每一井的酵素活性係藉由 2M L-酒石酸溶液(Sigma Chemical Co.) 中 α -萘基磷酸 (α -naphthyl phosphate)(4mmol/liter; Sigma Chemical Co.)轉變為 α -萘酚(α -naphthol)的情形加以評估。之後，利用一微量盤偵測器(microplate reader)(model 550; Bio-Rad Labs.)量測 405nm 的吸收值(Bandyopadhyay, S. *et. al. Biochem. Pharmacol.* 2006, 72, 184.)。

【實施例 10】

細胞培養及藥物處理

D1 細胞為自近交系小鼠(Balb/c mice)骨髓細胞(bone marrow cell)複製而來的間葉幹細胞株(mesenchymal stem cell line)，購買自美國菌種中心(American Type Culture Collection, ATCC)(Rockville, MD)。D1 細胞可導入成骨細胞(osteoblasts)、脂肪細胞(adipocytes)及軟骨細胞(chondrocytes)。將 D1 細胞培養在含有 10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、100U/ml 盤尼西林(penicillin)及鏈黴素(streptomycin)的 DMEM 培養基(Gibco BRL, Gaithersburg, MD)。

MC3T3E1 細胞為取自近交系小鼠(C57BL/6 mice)頭頂的前造骨細胞株(preosteoblast cell line)，購買自美國菌種中心(American Type Culture Collection, ATCC)(Rockville, MD)。將 MC3T3E1 細胞培養在含有 10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、100U/ml 盤尼西林

(penicillin) 及鏈黴素 (streptomycin) 的 DMEM 培養基 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD)。

將分離自脂肪組織的人類脂肪組織來源幹細胞 (human adipose tissue derived stem cells, hADSCs) 培養在含有 5% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、100U/ml 盤尼西林 (penicillin) 及鏈黴素 (streptomycin) 的無血清角化細胞培養基 (keratinocyte SFM medium) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD)。將上述人類脂肪組織來源幹細胞 (hADSCs) 續培養在含有 10% 胎牛血清與 50 μ g/mL 抗壞血酸鈉 (sodium ascorbate) 的 DMEM 培養基 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD)，並將培養基置於含 5% 二氧化碳的濕潤大氣環境，溫度維持 37 $^{\circ}$ C，結果顯示，幹細胞會進行造骨 (osteogenic)。培養基每隔 2 天會有所變化。

將新合成的化合物溶於 DMSO 至 10mM 的最終濃度並儲存於 -20 $^{\circ}$ C 環境中。此處所使用的濃度為 10 μ M，係以最終濃度 0.1% 的 DMSO 對培養基新鮮稀釋而成。控制培養基亦以相同量的 DMSO 進行處理。

【實施例 11】

細胞存活率測定

以 MTT 試驗法測定細胞存活率。MTT 試驗法為一種比色試驗法 (colorimetric assay)，係依據存活細胞將水溶性黃色四唑鹽 (tetrazolium salt) 還原為藍色甲潛 (formazan) 結晶的能力 (Carmichael, J. *et. el. Cancer Research* 1987, 47, 936)。待化合物處理後，加入 350 μ L 的 MTT 溶液 (0.5 μ g/mL in PBS) 至各別井中培養 4 小時。之後，加入 DMSO 0.5 小時，以完全溶解上述藍色結晶。接著，以一

酵素免疫分析儀(ELISA reader)量測 570nm 的吸收值。粒線體代謝(mitochondrial metabolism)的抑制率顯示於表 2 (相對於控制組活性的百分比)。

【實施例 12】

骨向分化及礦化作用之定量

首先，藉由一誘導造骨培養基(osteo-induction medium, OIM)(於低濃度葡萄糖的 DMEM 中含有 10%胎牛血清(FBS)、0.1 μ M 腎上腺皮質酮(dexamethasone)、10mM β -甘油磷酸(β -glycerophosphate)及 100 μ M L-抗壞血酸-2-磷酸(L-Ascorbic-2-phosphate))的培養細胞誘導進行骨向分化(osteogenic differentiation)持續 7-14 天。接著，以茜素紅 S 染色法(Alizarin red S stain)評估細胞外基質(extracellular matrix)的鈣化(calcification)(Carl, A. *et al Anal. Biochem.* **2004**, 329, 77)。之後，被茜素紅 S 染色的礦化物以一造骨定量儀(osteogenesis quantification kit)(CHEMICON[®])進行定量，結果顯示於表 2。

本發明具有一 3-胺基-2-羥基丙氧基(3-amino-2-hydroxypropoxy)側鏈的異黃酮(isoflavone)衍生物，例如化合物 **5c** (3-{4-[3-(環己基胺基)-2-羥基丙氧基]苯基}-7-甲氧基-4*H*-色酮)，與異普黃酮(ipriflavone)相較，有高出 4 倍多的蝕骨細胞抑制活性(osteoclast inhibitory activity)(Raw 264.7 細胞中抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)活性的抑制率，見表 1)。化合物 **5c** 亦較異普黃酮(ipriflavone)有高出 10 倍多的成骨細胞活性(osteoblast activity)(MC3T3E1 細胞的礦化作用，見表 2)。除化合物 **5c** 外，本發明具有一環氧-2-基-甲氧基(oxiran-2-ylmethoxy)

基團的異黃酮(isoflavone)衍生物，例如化合物 4 (3-(3,4-二甲氧基苯基)-7-(環氧-2-基-甲氧基)-4H-色酮)，亦具有與化合物 5c 相當的抗骨質疏鬆活性(anti-osteoporotic activity)。因此，本發明異黃酮(isoflavone)衍生物為未來極具發展潛力的抗骨質疏鬆藥。

表 1 異黃酮(isoflavone)衍生物於 Raw 264.7 細胞中酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)抑制活性的百分率(%)

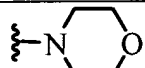
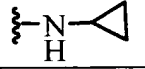
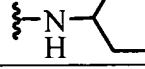
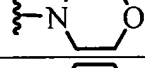
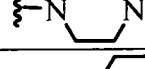
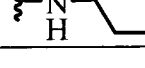
化合物	NR ₁ R ₂	10 μ M 的抑制百分率	ED ₅₀ (M)
3	-	107%	6.39
4	-	119%	< 1
5a		0%	ND
5b		103%	4.85
5c		119%	2.28
6a		0%	ND
6b		0%	ND
6c		120%	4.17
異普黃酮 (ipriflavone)		31%	ND

表 2 異黃酮(isoflavone)衍生物對鼠類細胞(D1 及 MC3T3E1)及人類細胞(hADSCs)之存活率及礦化作用

化合物	存活率		礦化作用		
	D1 細胞 (3 天 , MTT)	hADSCs 細 胞 (3 天, MTT)	D1 細胞 (7 天)	MC3T3E1 細胞 (12 天)	hADSCs 細胞 (10 天)
4	76%	84%	112%	977%	429%
5c	82%	97%	78%	976%	ND

異普黃酮 (ipriflavone)	81%	99%	100%	100%	100%
-----------------------	-----	-----	------	------	------

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，任何熟習此項技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作更動與潤飾，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】

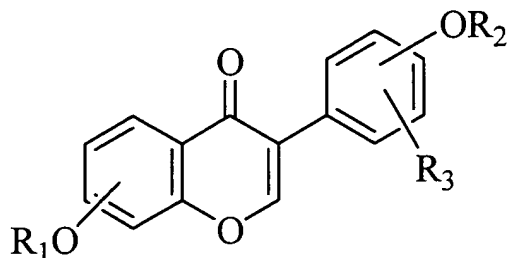
無。

【主要元件符號說明】

無。

五、中文發明摘要：

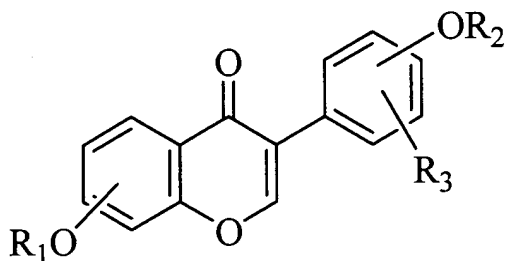
本發明提供一種異黃酮衍生物，具有下列化學式：



其中 R_1 與 R_2 獨立地包括 C_1 - C_{12} 烷基，該 C_1 - C_{12} 烷基選擇性地取代有環氧乙基、噻喃基、氮丙啶基、胺基、環胺基、羥基胺基或羥基環胺基；以及 R_3 包括氫、羥基或 C_1 - C_{12} 烷氧基，該 C_1 - C_{12} 烷氧基選擇性地取代有環氧乙基、噻喃基、氮丙啶基、胺基、環胺基、羥基胺基或羥基環胺基。

六、英文發明摘要：

An isoflavone derivative is provided. The isoflavone derivative has following formula:



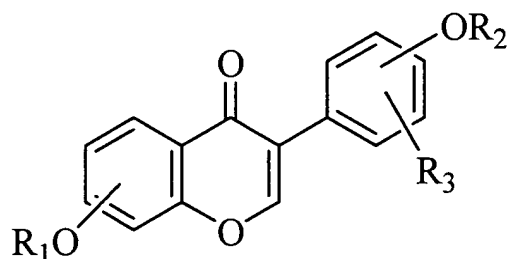
wherein R_1 and R_2 , independently, comprise C_1 - C_{12} alkyl optionally substituted with oxirane, thiirane, aziridine, amino, cycloamino, hydroxyamino or hydroxycycloamino, and R_3 comprise hydrogen, hydroxy or C_1 - C_{12} alkoxy optionally substituted with

oxirane, thiirane, aziridine, amino, cycloamino, hydroxyamino or hydroxycycloamino.

十、申請專利範圍：

99年3月23日修正本

1. 一種異黃酮(isoflavone)衍生物，具有下列化學式：



其中 R_1 與 R_2 獨立地包括 C_1 - C_{12} 烷基，該 C_1 - C_{12} 烷基選擇性地取代有環氧乙基(oxirane)、噁喃基(thiirane)、氮丙啶基(aziridine)、胺基(amino)、環胺基(cycloamino)、羥基胺基(hydroxyamino)或羥基環胺基(hydroxycycloamino)；以及

R_3 包括氫、羥基或 C_1 - C_{12} 烷氧基，該 C_1 - C_{12} 烷氧基選擇性地取代有環氧乙基(oxirane)、噁喃基(thiirane)、氮丙啶基(aziridine)、胺基(amino)、環胺基(cycloamino)、羥基胺基(hydroxyamino)或羥基環胺基(hydroxycycloamino)。

2. 一種醫藥組合物，包括：

一如申請專利範圍第 1 項所述之異黃酮(isoflavone)衍生物或其藥學上可接受之鹽類；以及
一藥學上可接受之載體。

3. 一種治療骨質疏鬆(osteoporosis)之醫藥組合物，包括：

一如申請專利範圍第 1 項所述之異黃酮(isoflavone)衍生物或其藥學上可接受之鹽類；以及
一藥學上可接受之載體。

七、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。

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：