嘉南藥理大學 103 年度教師專題研究計畫

Benzodiazepinedione 及其衍生物之合成、生物活性評估與化粧品開發

計畫類別：□個別型計畫　　■整合型計畫
計畫編號：CN10301-03
執行期間：103 年 1 月 1 日至 103 年 12 月 31 日

計畫總主持人: 汪文中

子計畫一：Benzodiazepinedione 衍生物之合成
計畫主持人：汪文中、何文岳

子計畫二：Benzodiazepinedione 及其衍生物之生物活性評估
計畫主持人：劉坤湘

子計畫三：Benzodiazepinedione 及其衍生物之化粧品功能性評估與產品開發
計畫主持人：呂尚謙

執行單位：藥理學院

中華民國　104 年　3 月　6 日

嘉南藥理大學 103 年度教師專題研究計畫

Benzodiazepinedione 及其衍生物之合成、生物活性評估與化粧品開發
子計畫一：Benzodiazepinedione 衍生物之合成

計畫類別: □ 個別型計畫 ■ 整合型計畫

執行期間: 103 年 1 月 1 日至 103 年 12 月 31 日

計畫主持人: 汪文忠/何文岳

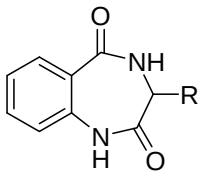
執行單位:

藥理學院

中華民國 104 年 03 月 06 日

一、 摘要:

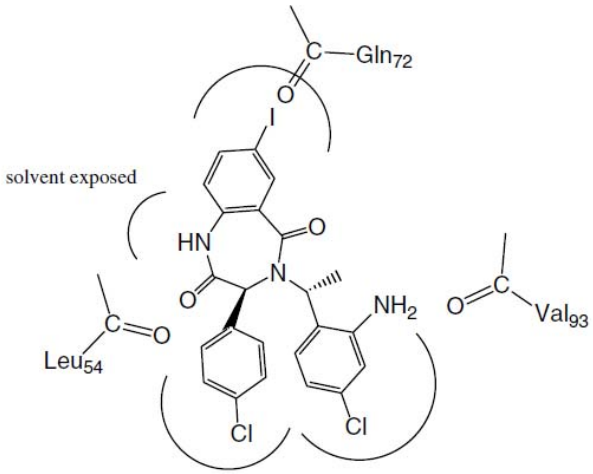
Benzodiazepinedione 具有苯並二氮雜七元環的結構，為 alprazolam, clonazepam, diazepam, estazolam, nitrazepam, triazolam 等藥物的重要結構單元。本研究計畫以 2-胺基苯甲酸為起始物，與二(三氯甲基)碳酸酯反應，形成 isatoic anhydride 後，再分別與甘胺酸(glycine)或脯胺酸(proline)等胺基酸反應，合成不同 benzodiazepinedione 結構衍生物，並做為子計畫二：生物活性評估、與子計畫三：化粧品開發之原料。



圖一 1,4-benzodiazepine-2,5-dione 結構

二、 前言:

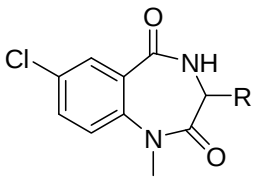
Benzodiazepinedione 具有苯並二氮雜七元環的結構，為alprazolam, clonazepam, diazepam, estazolam, nitrazepam, triazolam 等藥物的重要結構單元。Marugan合成數種1,4-benzodiazepine-2,5-diones結構衍生物，作為Hdm2蛋白(human homolog of the double minute-2 protein)的拮抗劑(antagonists)，其結合模式如圖二所示。研究發現1,4-benzodiazepine-2,5-dione結構衍生物深具藥效潛力。[1]



圖二 benzodiazepinedione結構衍生物之藥效團與Hdm2接合模式

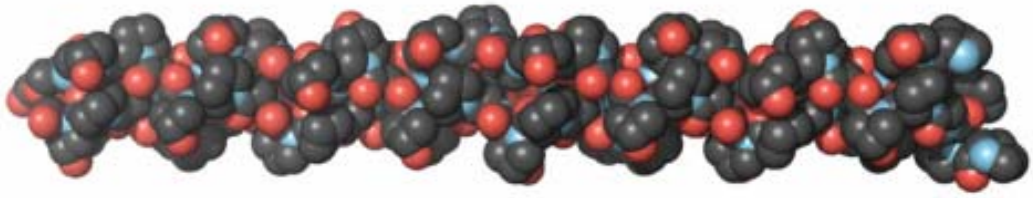
Glick在1,4-benzodiazepine-2,5-diones結構中C3位置引入一系列芳香族基團(圖三)，開發出對T細胞有選擇性的新型淋巴球毒殺試劑(lymphotoxic agents)以期做為紅斑性狼瘡(systemic lupus erythematosus, SLE)治療藥物。[2]

嘉南大學



圖三 Glick 合成的 1,4-benzodiazepine-2,5-diones 結構

膠原蛋白（Collagen）主要存在於結締組織中，是人體的一種重要的蛋白質。它是韌帶、肌腱和細胞外基質的主要組成成分，而膠原蛋白的老化，則使皮膚出現皺紋。在空間結構上，膠原蛋白顯示出特殊的三股螺旋纏繞的結構(圖四)，[3]而在其組成上，甘胺酸含量達到總胺基酸殘基的 1/3，而脯胺酸則接近 1/4。據此，我們計劃在 benzodiazepinedione 結構中引入甘胺酸(glycine)或脯胺酸(proline) ，並由子計畫二與子計畫三探討其相關活性與在化粧品的應用。



圖四 膠原蛋白三股螺旋結構

三、材料與方法

一般實驗敘述

分子結構以^{1}H 核磁共振光譜鑑定，核磁共振光譜儀採用Bruker Avancetm DPX-200 型核磁共振光譜儀測定，化學位移單位為ppm。

實驗步驟與光譜資料

Compound **3**

於冰浴下，將二(三氯甲基)碳酸酯(**2**) (2.97g, 10.0mmole)加入2-胺基苯甲酸(**1**) (1.37g, 10.0mmole) /四氫呋喃(10ml)的混合溶液中，接著置於室溫下反應2天。將混合溶液過濾，固體沉澱物以乙醚清洗，經真空乾燥後可獲得白色固體產物**3**(1.53g, 94%)

光譜資料：

^{1}H-NMR (d-DMSO, 200 MHz) δ: 7.89-7.84 (m, 1H), 7.71-7.63 (m, 1H), 7.23-7.12 (m, 2H).

Compound **5a**

於室溫下將脯胺酸(575mg, 5.0mmole)加入化合物**3**(815mg, 5.0mmole)的二甲基亞碸(5ml)溶液中，然後將混合溶液於140 ℃下反應5.5小時。回至室溫，加水、混合溶液再以乙酸乙酯萃取。有機層經濃縮，初產物以矽膠快速管柱色層分析法純化(hexane/ethyl acetate 1:3)後可獲得白色固體產物**5a**(630mg, 58%)。

嘉南大學

光譜資料：^{1}H-NMR (d-DMSO, 200 MHz) δ: 10.53(s, 1H), 7.83-7.77 (m, 1H), 7.56-7.47 (m, 1H), 7.26-7.11 (m, 2H), 4.12(d, J = 5.6 Hz, 1H), 3.63-3.35 (m, 2H), 2.05-1.71(m, 2H).

Compound **5b**

以甘胺酸為反應試劑，依據**5a**之合成步驟可獲得白色固體產物**5b**，產率：25%。

光譜資料：^{1}H-NMR (d-DMSO, 200 MHz) δ: 10.35(s, 1H), 8.52(t, J = 5.4 Hz, 1H), 7.70(d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.47(d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.21-7.04 (m, 2H), 3.54(d, J = 5.8 Hz, 1H).

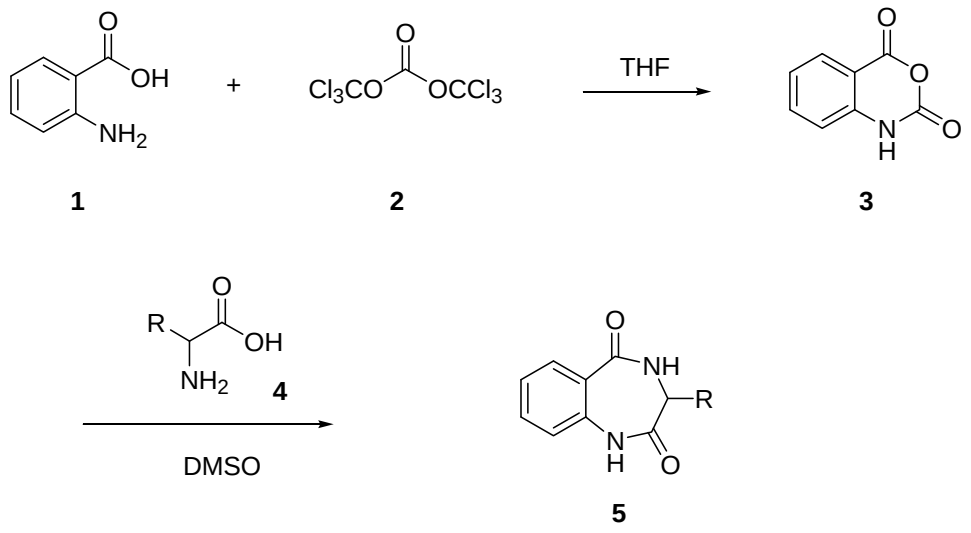
四、結果與討論

Benzodiazepinedione結構衍生物合成

Benzodiazepinedione為具有苯並二氮雜七元環的結構，而相關文獻資料顯示1,4-benzodiazepine-2,5-dione結構化合物可能具有抗凝血、抗腫瘤、抗菌與抗癌攣的活性。

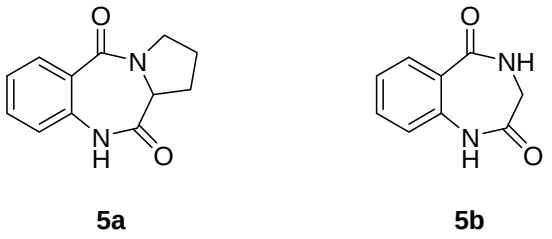
本研究計畫分別以2-胺基苯甲酸(**1**)為起始物，與triphosgene (**2**)反應，合成isatoic anhydride (**3**)後，接著將化合物**3**分別與脯胺酸或甘胺酸在140℃的二甲基亞碸(5ml)溶液中反應，即可合成benzodiazepinedione結構衍生物**5**。反應式如圖五所示：

嘉南大學



圖五 benzodiazepinedione結構衍生物合成流程

各式benzodiazepinedione衍生物結構如圖六所示：



圖六 benzodiazepinedione衍生物結構

本研究方法經由兩個合成步驟即可合成 1,4-benzodiazepine-2,5-dione 結構化合物，合成步驟簡易，有助於未來在新穎代謝物與先導藥物的開發。

五、參考文獻

1. J. J. Marugan, K. Leonard, P. Raboisson, J. M. Gushue, R .Calvo, H. K. Koblish, J. Lattanze, S. Zhao, M. D. Cummings, M. R. Player, C. Schubert, A. C. Maroney, T. Lu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**; *16*, 3115.
2. T. M. Francis, T. B. Sundberg, J. Cleary, T. Groendyke, A. W. Opipari, Jr. G. D. Glicka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16*, 2423.
3. M. D. Shoulders, R. T. Raines, *Annu. Rev. Biochem*. **2009** , *78*, 929.

嘉南藥理大學 103 年度教師專題研究計畫成果報告

計畫編號：CN10302

總計畫計畫名稱：Benzodiazepinedione 及其衍生物之合成、生物活性評估與化粧品開發

子計畫二計畫名稱：Benzodiazepinedione 及其衍生物之生物活性評估

執行期間：103 年 1 月 1 日至 103 年 12 月 31 日

■整合型計畫　　□個別型計畫

計畫總主持人：汪文忠　　計畫主持人：

子計畫主持人：劉坤湘

中華民國 104 年 03 月 05 日

研究計畫內容

(一) 摘要

真菌二次代謝物之於人類有相當大的利用價值，例如抗生素、降膽固醇藥物等。屬於子囊菌門的麴菌屬 (*Aspergillus*) 由於二次代謝物的種類繁多且含量高，在生技工業上的應用非常廣泛；其中的土麴黴 (*Aspergillus terreus*) 以及與其親緣關係接近的費式麴菌 (*Neosartorya fischeri*) 被發現主要二次代謝產物之一為 acetylaszonalenin，其生合成推測由 *anaAT-anaPS-anaPT* 基因叢集所產生的基因產物所調控，中間產物之一的 benzodiazepinedione，為已知之多種藥物化學結構主要骨架。此整合計畫由子計畫一為可穩定獲得 benzodiazepinedione 不受真菌生長環境歧異所導致的二次代謝物獲得不易，以有機合成方式合成 benzodiazepinedione 及其衍生物。本子計畫為整合型計畫中之第二項子計畫，為研究所得到之化合物是否具有生物活性，將進行細胞存活率測試、自由基清除能力試驗、HIV-1 反轉錄酶抑制能力測定、DNA 拓樸異構酶 II 抑制能力測定。另為求擴展真菌二次代謝物的應用空間，子計畫三進行與化粧品功能相關的基質金屬蛋白酶活性抑制試驗、玻尿酸酶活性抑制試驗、膠原蛋白活性測試。本整合型計畫希望藉由：(1) 有機合成真菌二次代謝物之 benzodiazepinedione 及其衍生物；(2) 評估 benzodiazepinedione 及其衍生物之生物活性；(3) benzodiazepinedione 及其衍生物之化粧品開發；未來除了將 benzodiazepinedione 做為 acetylaszonalenin 生合成的前驅物外，不同胺基酸或胜肽之 benzodiazepinedione 衍生物，也預期將可表現生物活性潛能，有進一步學術研究與產品開發的價值。

(二) 實驗架構

1. Benzodiazepinedione 及其衍生物之使用

Benzodiazepinedione 及其衍生物之合成由子計畫一執行之，共提供化合物代號 HB020、HB026、HB079、HB086、HB091 進行本子計畫之實驗。

2. 實驗步驟－反轉錄酶抑制能力測定

反轉錄酶活性抑制分析利用 Roche Diagnostics 公司 (Germany) 生產之反轉錄酶活性測定實驗套組進行實驗，實驗目的為偵測本研究計畫中合成之化合物是否具有抑制反轉錄酶的能力而可治療由 RNA 病毒感染所引起之病症。取 4 ng 反轉錄酶 (於 20 µl 的 lysis buffer 中) 置入微量離心管，再加入 20 µl 各種不同濃度的 benzodiazepinedione 及其衍生物，並加入 20 µl 的 polyA×oligo(dT)$_{15}$ 於 37^{o}C 反應 1 小時，接著將樣品吸取至 MP module 中，覆蓋鋁箔紙後於 37^{o}C 反應 1 小時。之後將液體吸乾，加入 250 µl 的 washing buffer 潤洗 30 秒，小心抽乾，重複此步驟 5 次，加入 200 µl

的 anti-DIG-POD working solution (200 mU/µl)，覆蓋鋁箔紙後於 37°C 反應 1 小時，將液體小心抽乾，加入 250 µl 的 washing buffer 潤洗 30 秒，小心抽乾，重複此步驟 5 次，最後加入 200 µl 的 ABTS (2,2'-azinobis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammonium salt) substrate solution，以 250 rpm 震盪至綠色出現，再以 ELISA 偵測 OD_{405}。

(三) 實驗結果與討論

HB020、HB026、HB079、HB086、HB091 以 0.0625 mM、0.125 mM 及 0.25 mM 三種濃度進行反轉錄酶活性抑制的試驗 (n = 3)，結果如下表。

表一、0.0625 mM化合物對於反轉錄酶活性抑制率量化表 (反應時間5分鐘)。

反應時間	5 min
化合物濃度	0.0625 mM
化合物代號	抑制率 (%)
control	0.00 ± 0.00
HB020	59.57 ± 13.20
HB026	83.28 ± 1.30
HB079	52.85 ± 10.90
HB086	68.22 ± 6.90
HB091	65.01 ± 2.00

表二、0.125 mM化合物對於反轉錄酶活性抑制率量化表 (反應時間5分鐘)。

反應時間	5 min
化合物濃度	0.125 mM
化合物代號	抑制率 (%)
control	0.00 ± 0.00
HB020	30.26 ± 13.50
HB026	39.14 ± 22.00
HB079	72.65 ± 2.50
HB086	85.97 ± 0.70
HB091	79.74 ± 1.70

嘉南藥理大學專題研究計畫

研究成果報告

計畫編號：CN10303

總計畫計畫名稱：Benzodiazepinedione 及其衍生物之合成、生物活性評估與化粧品開發

子計畫三計畫名稱：Benzodiazepinedione 及其衍生物之化粧品功能性評估與產品開發

執行期間：103 年 1 月 1 日至 103 年 12 月 31 日

■整合型計畫　　□個別型計畫

計畫總主持人：汪文忠　　計畫主持人：

子計畫主持人：呂尚謙

中華民國 104 年 03 月 05 日

目　　錄

一、研究摘要 ---------- 2

二、簡介 ---------- 3

三、研究材料與方法 ---------- 7

四、結果與討論 ---------- 9

五、參考文獻 ---------- 15

一、 研究摘要

真菌經由二次代謝調控路徑來調節其生長型態與發育方式，對於人類而言，這些真菌二次代謝物具有相當大的利用價值，例如抗生素、降膽固醇藥物等。費式麴菌 (Neosartorya fischeri)生長於液態培養基，其培養過濾液的主要二次代謝物為 aszonalenin (acetylaszonalenin 代謝合成路徑的中間產物)及 acetylaszonalenin。由於目前文獻研究對於 acetylaszonalenin 之活性功能尚不明確，因此值得進一步探討其真正的生物活性。而 acetylaszonalenin 之分子具有 1,4-benzodiazepine-2,5-dione 的結構，研究數據指出 benzodiazepinedione 骨架的化合物是一種具多樣生物活性的化學結構。本計畫(子計畫三)之實驗目的乃配合子計畫一合成 benzodiazepinedione 及其衍生物之研究成果，分析評估其化粧品相關之功能性，我們預期可尋找出具有化粧品相關功能性之 benzodiazepinedione 及其衍生化合物，可作為新穎性之功能性化粧品原料，並進一步開發為功能性化粧保養品。

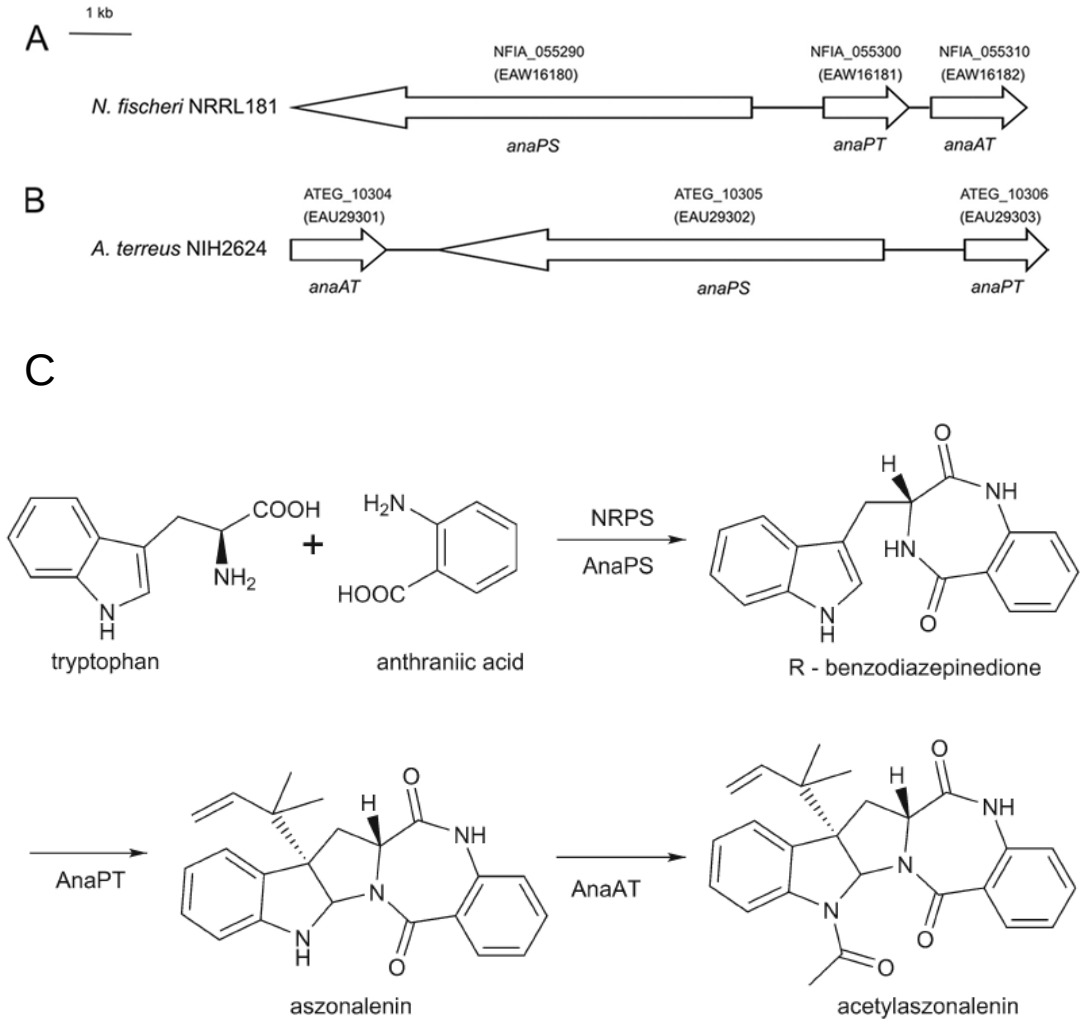
二、簡介

目前對於真菌二次代謝(secondary metabolism)路徑的研究文獻中，大部份的研究多屬子囊菌(Ascomycota)的真菌，其中又以麴菌屬(*Aspergillus*)的研究較為廣泛並深入。費式麴菌 (*Neosartorya fischeri*)生長於液態培養基之過濾液的主要二次代謝物為 acetylaszonalenin。由於目前對於 acetylaszonalenin 之功能尚未明確瞭解，因此值得進一步探討其真正的生物活性。而 acetylaszonalenin 之分子具有 1,4-benzodiazepine-2,5-dione 的結構，研究數據指出 benzodiazepinedione 骨架的化合物具有鎮靜及安眠之中樞神經作用，研究文獻中發現某些 benzodiazepinedione 亦能表現出抗癌與抗菌活性，是一種具多樣生物活性的化學結構。本計畫(子計畫三)之實驗目的乃配合子計畫一合成 benzodiazepinedione 及其衍生物之研究成果，分析評估其化粧品相關之功能性，包括抗菌活性分析、抗玻尿酸酶(anti-hyaluronidase) 活性分析及抑制基質金屬蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)等活性分析，我們預期可尋找出具有化粧品功能性之新穎性化合物，並進一步開發為功能性化粧品。

真菌本身藉由二次代謝路徑來調控其生長型態與發育方式[1]，此外對於人類而言，這些真菌二次代謝物具有相當大的利用價值，例如抗生素、降膽固醇藥物或抗氧化成份等[2]。目前對於真菌二次代謝(secondary metabolism)路徑的研究文獻中，大部份的研究多屬子囊菌 (Ascomycota)的真菌，其中又以麴菌屬(*Aspergillus*)的研究較為廣泛並深入。費式麴菌(*Neosartorya fischeri*)生長於不同溫度、不同培養基及不同轉速振盪下，於菌絲體的主要二次代謝物為 fumitremorgin B，而於培養過濾液的主要二次代謝物可以為 aszonalenin (acetylaszonalenin 代謝合成路徑的中間產物)、acetylaszonalenin 或 12,13-dihydroxyfumitremorgin C (fumitremorgin B 代謝合成路徑的中間產物)。另一方面，土麴黴 (*Aspergillus terreus*) 被發現其

主要二次代謝產物之一的 acetylaszonalenin，其生合成路徑推測由 *anaAT-anaPS-anaPT* 基因叢集所產生的基因產物所調控(如圖一所示)[3, 4]。

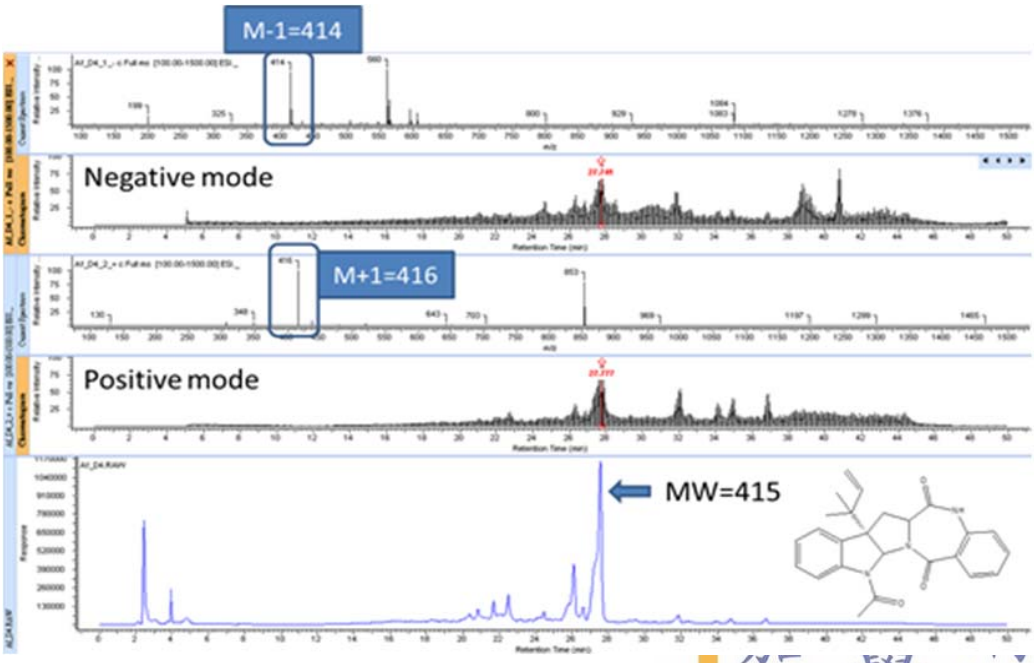
Putative ana gene cluster from N. fischeri (A) and A. terreus (B), and hypothetical biosynthetic pathway for acetylaszonalenin (C).



圖一、費式麴菌(*N. fischeri*)及土麴黴(*A. terreus*)參與生合成 acetylaszonalenin 的基因叢集及路徑

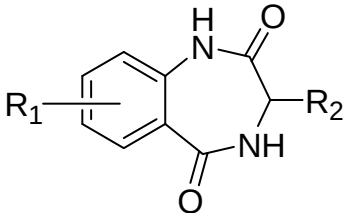
費式麴菌(*N. fischeri*)生合成 acetylaszonalenin 的代謝路徑，其中 *anaPS* 基因產物為 putative non-ribosomal peptide synthetase (anaPS)，參與 acetylaszonalenin 生合成路徑第一步驟之催化作用；*anaPT* 基因產物為 prenyltransferase (anaPT)，參與 acetylaszonalenin 生合成路徑第二步驟之催

化作用；*anaAT* 基因產物為 acetyltransferase (anaAT)，參與 acetylaszonalenin 生合成路徑第三步驟之催化作用。然而此基因叢集在 *N. fischeri* 中的排列順序如圖一 A 所示，為 *anaPS-anaPT-anaAT*；在出現在 *A. terreus* 的基因叢集則如圖一 B 所示，為 *anaAT-anaPS-anaPT*；預測兩株麴菌之 acetylaszonalenin 生合成路徑催化為相同步驟，如圖一 C 所示[3, 5]。由於 acetylaszonalenin 目前在其功能與活性的研究上尚不明確，非常值得進一步的探討研究 acetylaszonalenin 及其衍生物之生物活性。Acetylaszonalenin 為費式麴菌(*N. fischeri*)液態培養時培養過濾液中最主要的二次代謝物，在本實驗室先前的研究成果中亦得到證明，結果如圖三以箭頭標示(在層析圖譜上滯留時間為 22.5 分鐘有主要吸收峰，分子量為 415)。我們先前得到的研究成果顯示，費式麴菌(*N. fischeri*)於 YMG (Yeast and Malt extract with Glucose Media)培養基，在起始酸鹼值 pH 4.5、溫度 40℃、氮源為 meat peptone 的培養條件下，培養 7~14 天能有效提高二次代謝物 acetylaszonalenin 的產量[6]，如圖二之 HPLC 分析圖所示。



圖二、費式麴菌(*N. fischeri*)液態培養 14 天後培養過濾液中二次代謝物的 HPLC 分析圖及其主要二次代謝物 Acetylaszonalenin 之質譜圖

費式麴菌 (*Neosartorya fischeri*)與土麴黴 (*Aspergillus terreus*) 均被發現可以合成 acetylaszonalenin，對於兩種真菌一定會有其真正的必要目的，但由於目前對於 acetylaszonalenin 之生物功能尚不明確，因此值得進一步探討其真正的生物活性。而 acetylaszonalenin 之分子具有 1,4-benzodiazepine-2,5-dione 的結構，研究數據指出 benzodiazepinedione 骨架的化合物具有鎮靜及安眠之中樞神經作用，研究文獻中亦發現某些 benzodiazepinedione 類衍生物表現出抗癌與抗菌的活性，是一種具多樣生物活性的化學結構。在另一方面，Benzodiazepinedione 是具有苯並二氮雜七元環的結構，為 alprazolam, clonazepam, diazepam, estazolam, nitrazepam, triazolam 等藥物的重要結構單元。而 1,4-benzodiazepine-2,5-dione 結構化合物(如圖三所示)，在相關研究文獻則顯示可能具有抗凝血、抗腫瘤、抗菌與抗痙攣的活性[7-9]。



圖三、1,4-benzodiazepine-2,5-dione 化合物結構

因此，本計畫(子計畫三)之實驗目的乃配合子計畫一合成 benzodiazepinedione 及其相關衍生物之研究成果，分析評估其化粧品相關之功能性，包括細胞毒性分析、清除 DPPH 自由基(α,α-diphenyl-β-picrylhydrazyl)之抗氧化活性測定、抗酪胺酸酶(anti-tyrosinase)的美白活性分析、抗玻尿酸酶(anti-hyaluronidase)的抗過敏活性分析及抑制基質金屬蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)之延緩膠原蛋白破壞的活性分析，我們預期可尋找出具有化粧品功能性之新穎性 benzodiazepinedione 類化合物，作為功能性化粧品原料，並進一步開發為具有積極功能性的化粧品。

嘉南大學

三、研究材料與方法

1. 抗菌活性分析(紙錠抑菌試驗又名瓊脂紙錠擴散法，Agar disc diffusion method)：

紙錠抑菌試驗是最常用的抑菌實驗方法之一。將欲觀察之細菌塗抹於培養基之後， 再將圓形 paper disc (8mm) (Tokyo Roshi Kaisha, Japan) 置於培養基，以微量滴管給予紙錠定量之待測試樣品後，置入烘箱培養，觀察固定時間之後紙錠週圍產生抑菌圈的大小，並測量含紙錠直徑的抑菌圈(Diameter of inhibition zone)大小，判斷待測樣品的抑菌能力。抑菌活性之判讀是依測量抑菌圈直徑大小所得之平均值，直徑大小大於 10.0 mm 是具有抗菌活性。10.0 mm 為輕度活性，11.0-15.0 mm 為中度活性，16.0-20.0 mm 為高度活性。單一抑菌成份抑菌實驗步驟簡述如下：(1)所有培養基必須先用滅菌斧滅菌過。(2)菌種先用液態培養基於 37℃ 震盪培養活化一天。(3)將菌液的濃度控制於 107 cfu/ml，取 100 μl 的活化菌液，以三角玻棒均勻的塗佈於固態培養基中。(4)靜置 30 分鐘，使菌液乾燥，以防止菌液集中於 disc 上，也可防止 disc 因吸收了菌液而無法吸收足量的樣品。(5)於每盤固態培養基上放置 3 枚 disc (三重複實驗)，於 disc 上分別滴入 40 μl 的樣品溶液。(6)放置於 37℃ 培養箱中，培養 24 小時後觀察結果。

2. 抗玻尿酸酶(anti-hyaluronidase)活性分析：

首先收集有處理或無處理(控制組) *A. terreus* 或 *A. nidulans* 基因轉型株餵食後產生之代謝產物與玻尿酸酶之混合液，進行蛋白質電泳分析；電泳結束後，將電泳槽中之膠片取出，浸泡於 washing buffer 中，於室溫震盪 1 小時後，移除 buffer，再加入 reaction buffer 於 37℃ 水浴鍋震盪反應 16 小時。反應完畢後將膠片取出，浸泡於 0.5% Alcian blue solution 中震盪，進行膠片染色 2 小時後，再浸泡於 destaining buffer 中，

退染約 1~2 小時至 band 清晰可見為止，最後再以玻璃紙封片固定於壓克力板上，放置室溫下自然風乾。

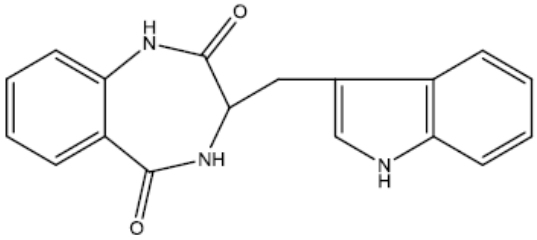
3. 基質金屬蛋白酶(MMPs)酵素活性電泳分析方法(zymography)：

收集有處理或無處理(控制組) *A. terreus* 或 *A. nidulans* 基因轉型株餵食後產生之代謝產物之 3T3 老鼠纖維母細胞的胞外培養基，收集的胞外培養基經 Centricon 10 (Millipore)的濃縮(約 100 倍濃縮)，其蛋白質濃度以 Bio-Rad protein determination assay kit 測量，取約相同量(10 g)的蛋白質，於 10%的 Tris-Glycine gels (with 0.1% 膠原蛋白)進行 non-denaturing 的蛋白質電泳分析，電泳完成後，於室溫、緩和搖擺振盪的情形下，電泳膠片以 2.5%的 Triton X-100 處理 30 分鐘以恢復蛋白質的活性，電泳膠片再與 developing buffer (Bio-Rad) 於室溫下先反應 30 分鐘，然後於 37℃下再反應至少 24 小時，反應完成後，電泳膠片以 0.1%的 Coomassie blue (in 9.2% acetic acid and 45.4% methanol) 於室溫下染色 20 分鐘，然後以 9.2% acetic acid 與 45.4% methanol 清洗 10 分鐘，重複 2 次，最後以 10% acetic acid 與 10% methanol 清洗至代表基質金屬蛋白酶活性強弱的的白色 bands 出現為止，即完成 *A. terreus* 或 *A. nidulans* 基因轉型株餵食後產生之代謝產物對於基質金屬蛋白酶活性影響的分析步驟。

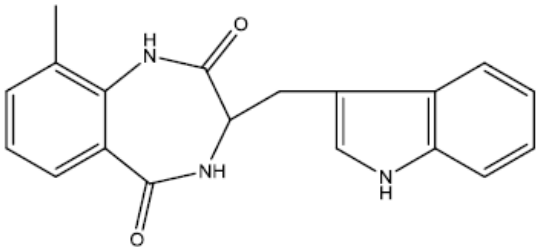
四、結果與討論

1. Benzodiazepinedione 是具有苯並二氮雜七元環的結構，而如圖三所示為 1,4-benzodiazepine-2,5-dione 的基本結構，目前已取得共 9 個結構相關且具有不同官能基之合成物(如圖四所示)。

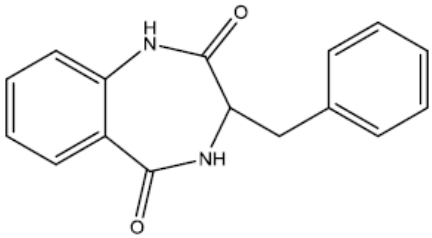
(A) HB020



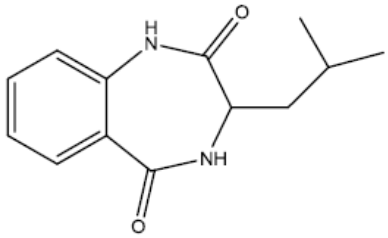
(B) HB026



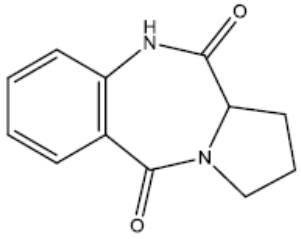
(C) HB079



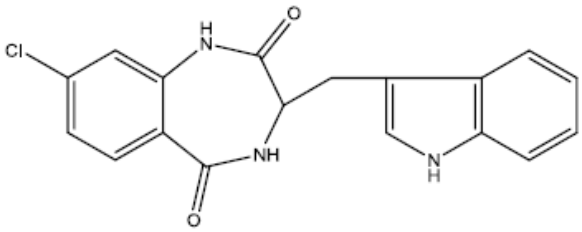
(D) HB080



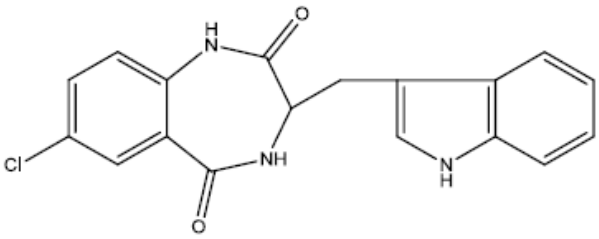
(E) HB083



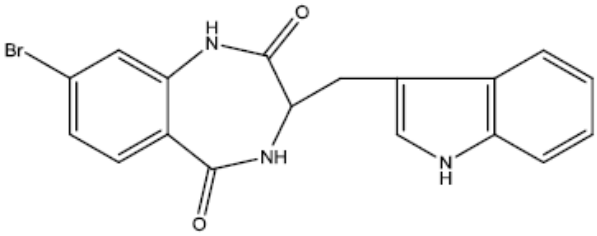
(F) HB086



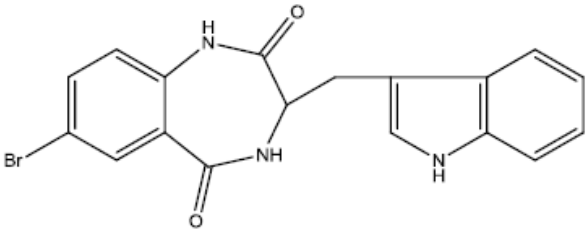
(G) HB089



(H) HB091



(I) HB093



圖四、與 1,4-benzodiazepine-2,5-dione 結構相關所衍生的 9 個結構相關且具有不同官能基之化合物(A~I)

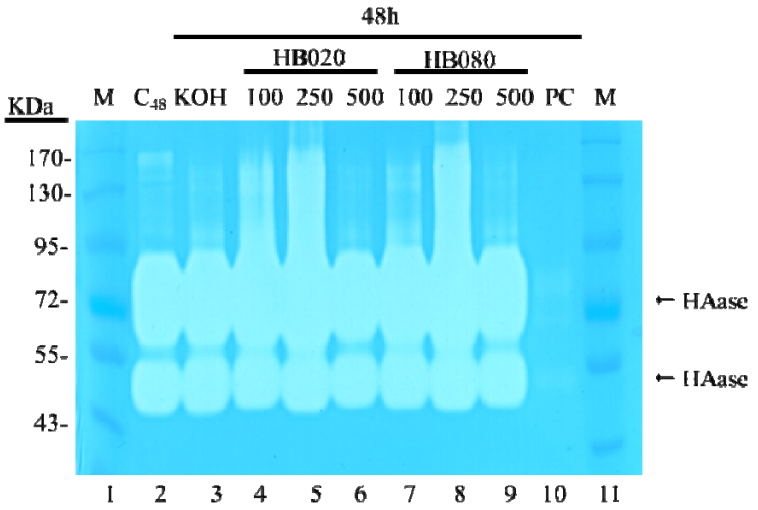
2. 完成之工作項目完成具有不同官能基之 1,4-benzodiazepine-2,5-dione 合成物之抗菌(anti-microbial)活性分析。

以 9 個具有不同官能基之 1,4-benzodiazepine-2,5-dione 基本結構的合成物(圖二之化合物 A~I)進行抗菌活性分析，測試的菌種包括 *Escherichia coli* (大腸桿菌), *Staphylococcus aureus* (金黃色葡萄球菌), *Pseudomonas aeruginosa* (綠膿桿菌), *Candida albicans* (白色念珠菌), *Propionibacterium acne* (痤瘡桿菌), *Corynebacterium spp.* (短棒狀桿菌)等共 6 種微生物，以 disc diffusion method 進行測試，並以抑菌圈的直徑大小判斷其抗菌能力，結果顯示化合物 A~I

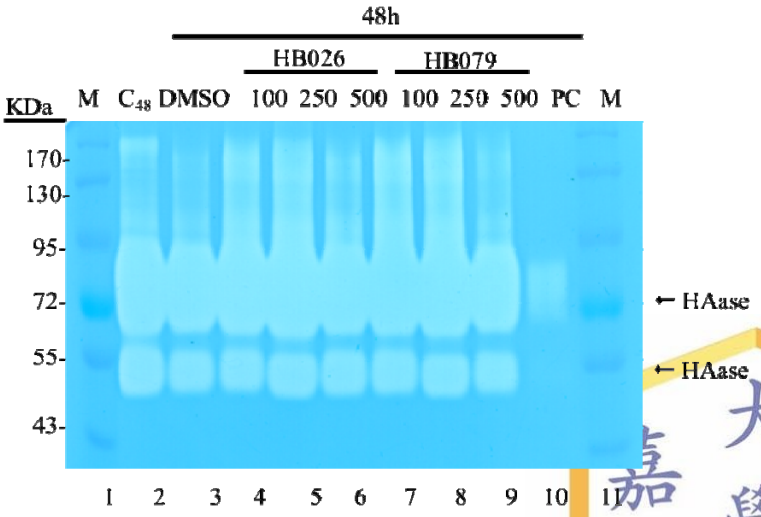
對於此 6 種微生物均無抑菌圈產生，代表化合物 A~I 對於此 6 種微生物無抗菌活性。

3. 完成之工作項目完成具有不同官能基之 1,4-benzodiazepine-2,5-dione 合成物之抗玻尿酸酶(anti-hyaluronidase)活性分析。

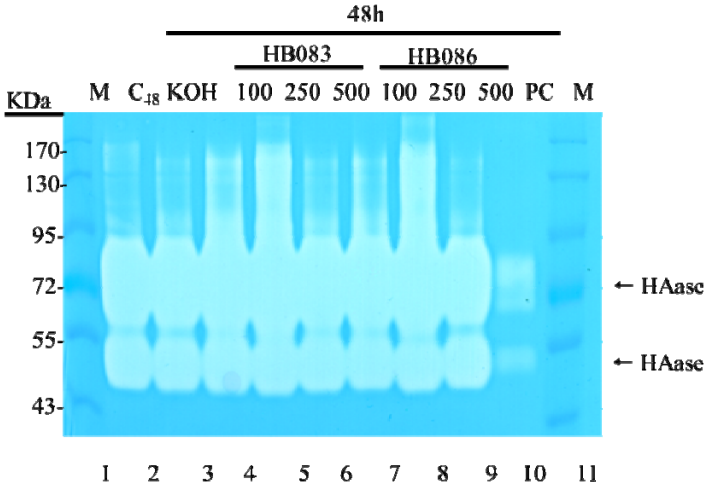
以 9 個具有不同官能基之 1,4-benzodiazepine-2,5-dione 基本結構的合成物(圖二之化合物 A~I)進行抗玻尿酸酶活性分析，結果顯示化合物 A~I 對於玻尿酸酶均無抑制活性(圖五之 1~5)。



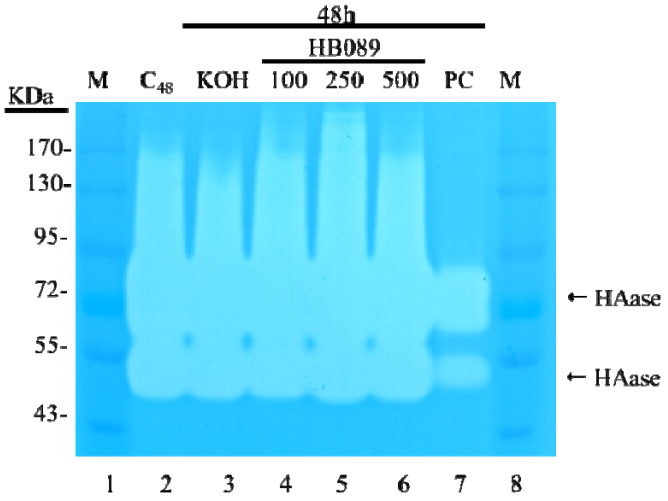
圖五之 1 化合物 A、D 對於玻尿酸酶(hyaluronidase)活性抑制分析



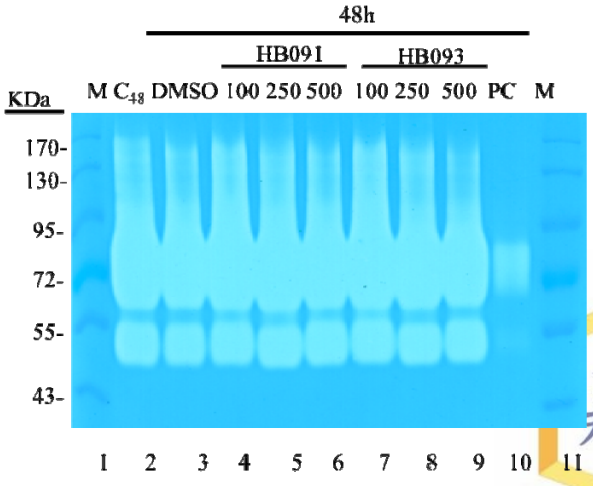
圖五之 2 化合物 B、C 對於玻尿酸酶(hyaluronidase)活性抑制分析



圖五之 3 化合物 E、F 對於玻尿酸酶(hyaluronidase)活性抑制分析



圖五之 4 化合物 G 對於玻尿酸酶(hyaluronidase)活性抑制分析

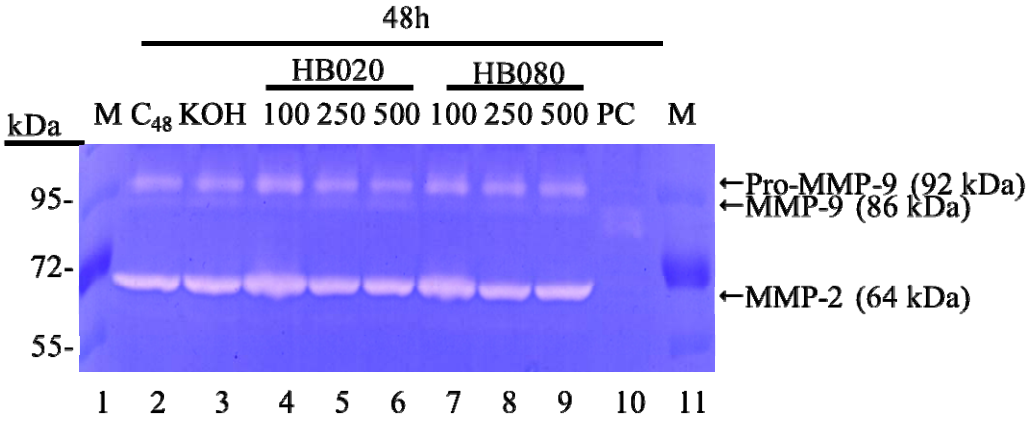


圖五之 5 化合物 H、I 對於玻尿酸酶(hyaluronidase)活性抑制分析

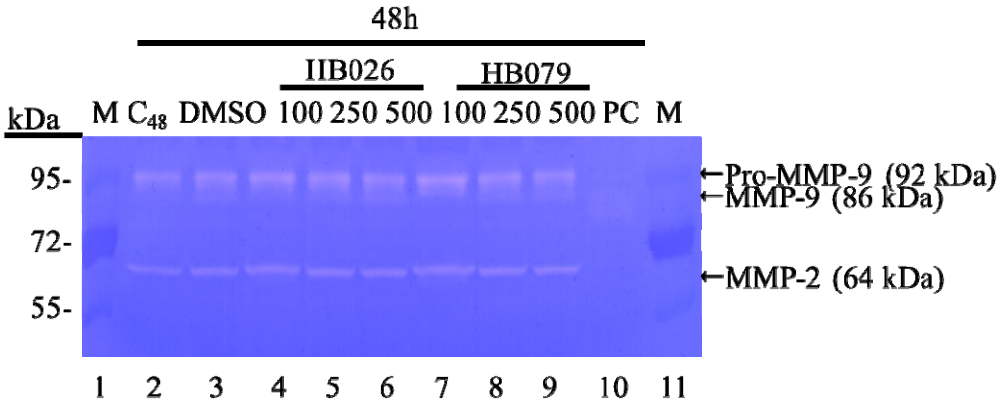
嘉南大學

4. 完成之工作項目完成具有不同官能基之 1,4-benzodiazepine-2,5-dione 合成物之基質金屬蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)酵素活性抑制分析。

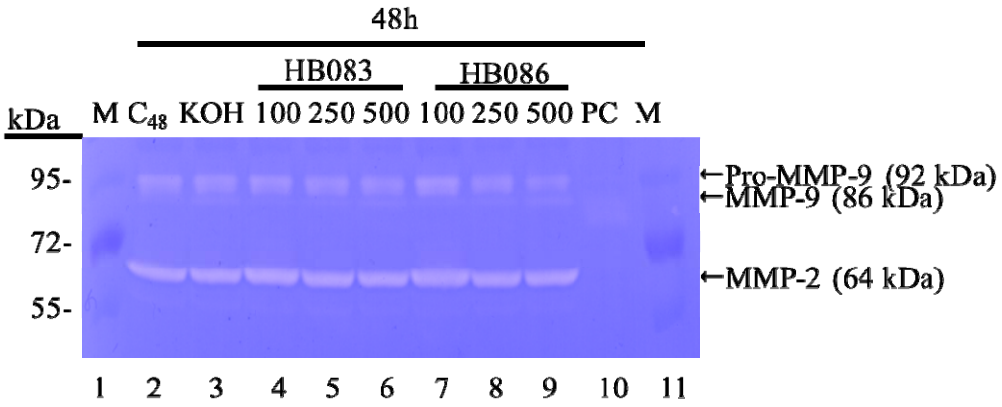
以 9 個具有不同官能基之 1,4-benzodiazepine-2,5-dione 基本結構的合成物(圖二之化合物 A~I)進行基質金屬蛋白酶之酵素活性抑制分析，結果顯示化合物 A~J 對於基質金屬蛋白酶 MMP-2 及 MMP-9 均無抑制活性(圖六之 1~5)。



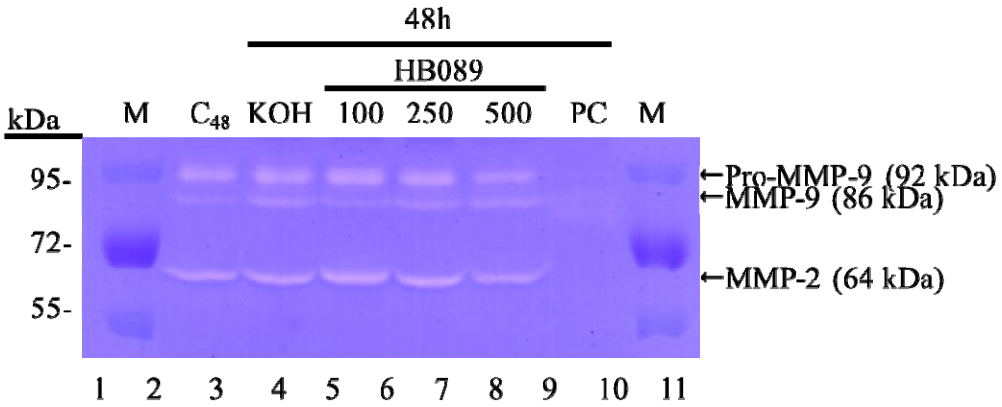
圖六之 1 化合物 A、D 對於基質金屬蛋白酶(MMP)酵素活性抑制分析



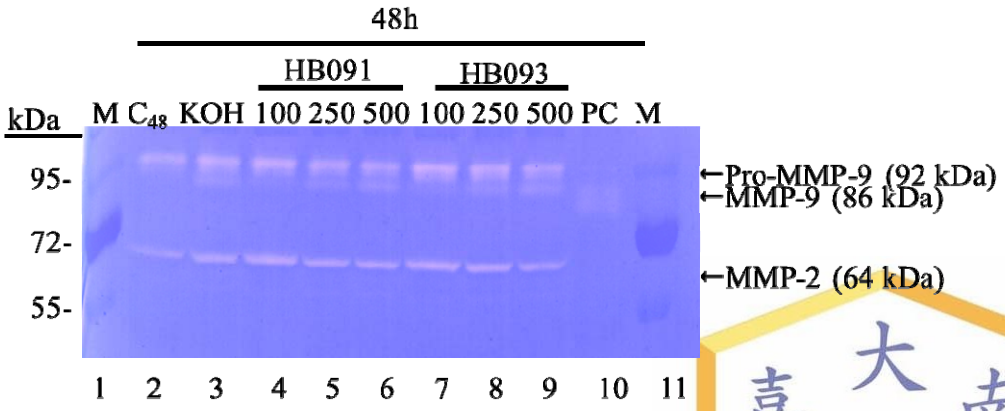
圖六之 2 化合物 B、C 對於基質金屬蛋白酶(MMP)酵素活性抑制分析



圖六之 3 化合物 E、F 對於基質金屬蛋白酶(MMP)酵素活性抑制分析



圖六之 4 化合物 G 對於基質金屬蛋白酶(MMP)酵素活性抑制分析



圖六之 5 化合物 H、I 對於基質金屬蛋白酶(MMP)酵素活性抑制分析

嘉南大學

五、參考文獻

1. Calvo AM, Wilson RA, Bok JW, Keller NP. Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. Microbiol Mol Biol Rev. 2002; 66: 447–459.
2. Keller NP, Turner G, Bennett JW. Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol*. 2005; 3: 937-947.
3. Yin WB, Grundmann A, Cheng J, Li SM. Acetylaszonalenin biosynthesis in Neosartorya fischeri: Identification of the biosynthetic gene cluster by genomic mining and functional proof of the genes by biochemical investigation. J Biol Chem. 2009; 284: 100-109.
4. Li SM. Prenylated indole derivatives from fungi: structure diversity, biological activities, biosynthesis and chemoenzymatic synthesis. Nat Prod Rep. 2010; 27: 57-78.
5. Ames BD, Walsh CT. Anthranilate-Activating Modules from Fungal Nonribosomal Peptide Assembly Lines. Biochemistry. 2010; 49: 3351-3365.
6. 趙昱揚，費氏麴菌二次代謝物之培養最適化條件與生物活性研究。嘉南藥理科技大學藥物科技研究所碩士論文，2011 年。
7. Cuny G, Bois-Choussy M, Zhu J. Palladium- and copper-catalyzed synthesis of medium- and large-sized ring-fused dihydroazaphenanthrenes and 1,4-benzodiazepine-2,5-diones. Control of reaction pathway by metal-switching. J Am Chem Soc. 2004; 126: 14475-14484.
8. Breslin HJ, Kukla MJ, Kromis T, Cullis H, De Knaep F, Pauwels R, Andries K, De Clercq E, Janssen MA, Janssen PA. Synthesis and anti-HIV activity of 1,3,4,5-tetrahydro-2*H*-1,4-benzodiazepin-2-one (TBO) derivatives. Truncated ,5,6,7-tetrahydro-5-methylimidazo[4,5,1-*jk*][1,4]benzodiazepin-2(1*H*)-on es (TIBO) analogues. *Bioorg Med Chem*. 1999; 7: 2427-2436.
9. Matthew JM, Dyatkin AB. Synthesis, resolution, and absolute configuration of novel tricyclic benzodiazepines. Tetrahedron: Asymmetry. 2004; 15:

嘉南大學

1259-1267.

10. Lee JH, Zhou HY, Cho SY, Kim YS, Lee YS, Jeong CS. Anti-inflammatory mechanisms of apigenin: inhibition of cyclooxygenase-2 expression, adhesion of monocytes to human umbilical vein endothelial cells, and expression of cellular adhesion molecules. Arch Pharm Res. 2007; 30: 1318-1327.

表三、0.25 mM化合物對於反轉錄酶活性抑制率量化表 (反應時間5分鐘)。

反應時間	5 min
化合物濃度	0.25 mM
化合物代號	抑制率 (%)
control	0.00 ± 0.00
HB020	70.91 ± 10.00
HB026	85.62 ± 5.30
HB079	87.36 ±1.90
HB086	89.03 ± 0.50
HB091	85.52 ± 1.30

化合物會隨著反應時間增加，對反轉錄酶活性抑制率降低(於本報告中只以反應5分鐘為例)，推測反轉錄酶抑制活性效果不夠持久，往後若要開發為疾病治療之輔助藥劑，可能必須藉由調整劑量或劑型，延長藥物有效成分活性的時間。HB020及HB026在0.0625 mM時高於0.125 mM的抑制率，顯示HB020及HB026沒有dose-dependent的趨勢。其餘化合物大致上具有dose-dependent的現象，因此若要開發為疾病治療之輔助藥劑，這兩種化合物與濃度並無直接的關係，必須再做更進一步的測試與研究。所有化合物0.25 mM的濃度反應5分鐘，對反轉錄酶抑制率皆為70%以上，未來可針對此類化合物進行更多活性及細胞毒性的分析，並進一步評估其應用價值。

(四) 結論

由實驗結果得知，此類化合物在特定反應條件下，具有抑制反轉錄酶活性的功能，對於開發為RNA 病毒感染所造成之疾病治療的輔助藥劑，增加對於真菌二次代謝物的應用範圍與經濟價值皆具助益。