



(21) 申請案號：099137211

(22) 申請日：中華民國 99 (2010) 年 10 月 29 日

(51) Int. Cl. : C07D277/62 (2006.01)

A61K31/428 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(71) 申請人：高雄醫學大學 (中華民國) KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY (TW)

高雄市三民區十全一路 100 號

(72) 發明人：王志鈺 WANG, JEH JENG (TW)；廖昭程 LIAO, CHAO CHENG (TW)；胡婉萍 HU, WAN PING (TW)；沈鶴全 SHEN, HO CHUAN (TW)

(56) 參考文獻：

EP 0213572B1

Eiji Kashiyama et al., Y., "Antitumor Benzothiazoles. 8.1

Synthesis, Metabolic Formation, and Biological Properties of the C- and N-Oxidation Products of Antitumor 2-(4-Aminophenyl)

benzothiazoles", J. Med. Chem., Vol:42, No:20, Pages: 4172-4184,

Published: September 4, 1999.

審查人員：張子威

申請專利範圍項數：11 項 圖式數：12 共 0 頁

(54) 名稱

2-(4-胺苯) 苯并噻唑衍生物的合成與用途

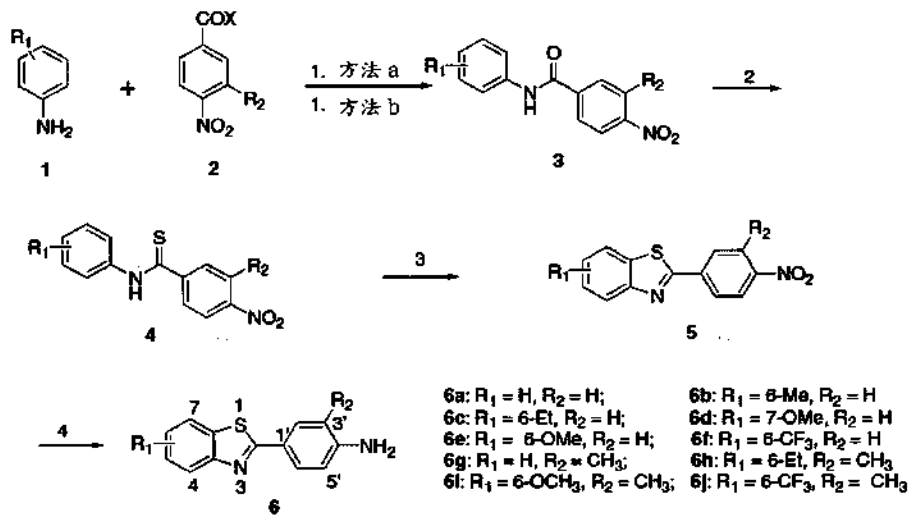
SYNTHESIS OF 2-(4-AMINOPHENYL)BENZOTHIAZOLE DERIVATIVES AND USE THEREOF

(57) 摘要

本發明關於一種製備 2-(4-胺苯) 苯并噻唑的方法。本發明亦關於一種用於提供光動力療法予具有至少一腫瘤的病患以抑制該腫瘤生長的醫藥組合物。

The present invention relates to a method of preparing a compound of 2-(4-aminophenyl)benzothiazoles. The present invention also relates to a pharmaceutical composition for providing photodynamic therapy to a patient having at least one tumor to inhibit growth of the tumor.

圖 2



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：99137211

C07D 277/62 (2006.01)

※申請日：99.10.29

※IPC 分類：

A61K 31/428 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

2-(4-胺苯)苯并噻唑衍生物的合成與用途 / Synthesis of  
2-(4-Aminophenyl)benzothiazole derivatives and use thereof

二、中文發明摘要：

本發明關於一種製備2-(4-胺苯)苯并噻唑的方法。本發明亦關於一種用於提供光動力療法予具有至少一腫瘤的病患以抑制該腫瘤生長的醫藥組合物。

三、英文發明摘要：

The present invention relates to a method of preparing a compound of 2-(4-aminophenyl)benzothiazoles. The present invention also relates to a pharmaceutical composition for providing photodynamic therapy to a patient having at least one tumor to inhibit growth of the tumor.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(2)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無。

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無。

## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明關於一種製備 2-(4-胺苯)苯并噻唑的方法。本發明亦關於一種用於提供光動力療法予具有至少一腫瘤的病患以抑制該腫瘤生長的醫藥組合物。

### 【先前技術】

非黑色素瘤皮膚癌 (NMSC) 是一個在世界上日益嚴重的問題，基底細胞癌 (BCC) 是 NMSC 中最常見的發生類型，而且在白皮膚的人群中最常發生 (Marks, R. *Cancer* 1995, 75, 607)。光動力療法 (PDT) 是一種具有良好美容效果的非侵入性療法，用於預防並治療基底細胞癌細胞 (Grapengiesser, S.; Ericson, M.; Gudmundsson, F. *Clin. Exp. Dermatol.* 2002, 27,493)，此療法運用了感光試劑和光的結合 (Kiesslich, T.; Krammer, B.; Plaetzer, K. *Curr. Med. Chem.* 2006, 13, 2189)。光敏劑的光活化作用會累積於腫瘤中，並在氧分子存在下導致活性氧物質 (ROS) 產生，此物質最終會殺死目標細胞 (Dolmans, D. E.; Fukumura, D.; Jain, R. K. *Cancer* 2003, 3, 380)。然而，被發表的治癒率不盡相通，且光敏劑與可活化此光敏劑之光源，兩者對皮膚的滲透程度都被列為限制因素，這些限制促進了新的光敏劑的研究。

2-苯基苯并噻唑 (2-Phenylbenzothiazoles) (圖 1) 代表一有力且有選擇性的抗腫瘤藥物之新類別 (Bradshaw, T. D.; Wrigley, S.; Shi, D-F.;

Schultz, R. J.; Paull, K. D.; Stevens, M. F.G. *Br. J. Cancer* 1998, 77, 745)。舉例而言，起初在一個要設計酪氨酸激酶抑制劑的計畫中，2-(4-胺苯) 苯并噻唑 (2-(4-aminophenyl) benzothiazoles) (式6, 方案1) 以仿照黃酮槲皮素和異黃酮的結構比較之方法被製備當作人工合成中間物，其在酪氨酸激酶上的ATP結合位點與之競爭 (Stevens, M. F. G.; McCall, C. J.; Lelieveld, P.; Alexander, P.; Richter, A.; Davies, D. E. J. *Med. Chem.* 1994, 37, 1689)。然而，其他生物特性也可能參與這複雜的生物現象，因此需要進一步的研究以解決此問題。

活性氧物質生產過多也許會是有害的，而粒線體積極參與活性氧物質的製造是眾所皆知的，且關鍵性地參與調控細胞死亡途徑 (Gogvadze; Zhivotovsky, B. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2007, 39, 23)。粒線体外膜的通透性以及自膜間質釋放之促凋亡蛋白被視為在啟動和/或執行細胞凋亡中決定性的事件 (Crompton, M. *Biochem. J.* 1999, 341, 233)，此外，現今研究指出活性氧物質在UVA導致的細胞損壞中扮演重要角色 (Valencia, A.; Kochevar, I. E. *Free Radic. Biol. Med.* 2006, 40, 641)，因此被活化的UVA分子式6所誘發的細胞死亡也許與粒線體去極化相關。有絲分裂劑活化蛋白激酶 (MAPK) 家族由細胞外信號調節激酶 (ERK)、c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 和p38有絲分裂劑活化蛋白激酶所組成，JNK和p38 MAPK途徑已知會被各種環境壓力和化學物質活化 (Roulston, A.; Reinhard, C.; Amiri, P.; Williams, L. T. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 10232)，而ERK列序 (cascade) 會被有絲分裂刺激活化且對於增殖與存活是重要的 (Nagata, Y.;

Todokoro, K. *Blood* 1999, 94, 853)。然而，ERK信號已被認為在細胞凋亡過程中有促細胞凋亡的作用 (Xiao, D.; Singh, S. V. *Cancer Res.* 2002, 62, 3615)。

### 【發明內容】

本發明的目標是新合成的式 6 化合物作為光敏劑的用途並研究 BCC 細胞上因 6-UVA 所引起的凋亡機制。

本發明進行式 6 化合物 (2-(4-胺苯)苯并噻唑衍生物) 的合成與用作光敏劑的生物研析。合成式 6 化合物僅需要 4 個步驟，且所需的材料皆相當便宜。因此，藉由本發明可達到大規模合成式 6 化合物。因為這些化合物具有發色結構且在紫外 A 線 (UVA) 範圍 (320-400 nm) 具有光吸收性，在體外 (*in vitro*) 研究中分析 UVA 活化的式 6 在 BCC 細胞中的光敏效果。可以推測 UVA 會產生副作用，如致癌作用或光老化，但在本發明的系統中不會有這些副作用發生，因為活化式 6 所需的暴露時間非常短，不會有長期暴露在 UVA 下的問題。

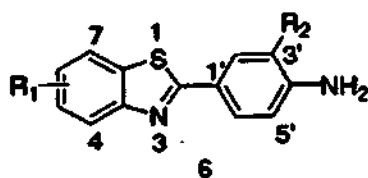
除非另有定義，本文中所使用的術語具有其一般普遍為該領域中熟習技藝人士所瞭解的意義。如本申請案全文中所使用，下面術語應具有下面意義：

術語『UVA』意指相對長波長的紫外線照射。

術語『6-UVA』意指 UVA 活化的式 6 化合物。

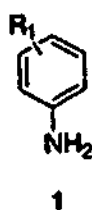
術語『6f-UVA』意指 UVA 活化的式 6f 化合物。

因此，本發明提供一種製備式 6 化合物的方法

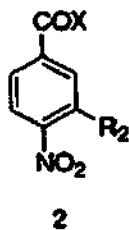


，包含：

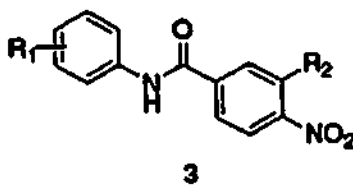
a. 將式 1 化合物



與式 2 化合物



反應以生成式 3 化合物

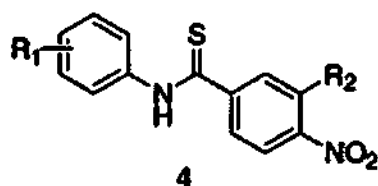


；其中式 2 的 X 係 Cl 或 OH；

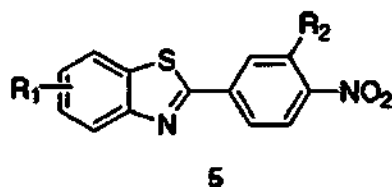
b. 將式 3 化合物以勞森試劑 (Lawesson's reagent) 處理以形成式 4



化合物



c. 將式 4 化合物與鐵氰化鉀反應以產生式 5 化合物



；及

d. 使用鈀炭催化劑 (palladium on charcoal) 將式 5 化合物的硝基催化還原以產生式 6 化合物，

其中式 1 到式 6 中的  $R_1$  為 H、 $C_{1-10}$  烷基、 $C_{1-10}$  烷氧基或  $C_{1-10}$  鹵烷基，且式 1 到式 6 中的  $R_2$  為 H 或  $C_{1-10}$  烷基。

在一較佳實施例中，式 1 到式 6 中的  $R_1$  為 H、6-Et、6-OMe、6-OCH<sub>3</sub>、6-Me、7-OMe 或 6-CF<sub>3</sub>，且式 1 到式 6 中的  $R_2$  為 H 或 CH<sub>3</sub>。較佳地，當式 1 到式 6 中的  $R_2$  為 H 時，式 1 到式 6 中的  $R_1$  為 H、6-Et、6-OMe、6-Me、7-OMe 或 6-CF<sub>3</sub>；當式 1 到式 6 中的  $R_2$  為 CH<sub>3</sub> 時，式 1 到式 6 中的  $R_1$  為 H、6-OCH<sub>3</sub>、6-Et 或 6-CF<sub>3</sub>。更佳地，式 1 到式 6 中的  $R_1$  為 6-CF<sub>3</sub>，且式 1 到式 6 中的  $R_2$  為 H。

本發明亦提供一種用於提供光動力療法予具有至少一腫瘤的病患以抑制該腫瘤生長的醫藥組合物，包含式 6 化合物 (其中  $R_1$  為 H、 $C_{1-10}$

烷基、 $C_{1-10}$  烷氧基或  $C_{1-10}$  鹵烷基 1，且  $R_2$  為 H 或  $C_{1-10}$  烷基；較佳地， $R_1$  為 H、6-Et、6-OMe、6-OCH<sub>3</sub>、6-Me、7-OMe 或 6-CF<sub>3</sub>，且式 1 到式 6 中的  $R_2$  為 H 或 CH<sub>3</sub>；更佳地，當  $R_2$  為 H 時， $R_1$  為 H、6-Et、6-OMe、6-Me、7-OMe 或 6-CF<sub>3</sub>；當  $R_2$  為 CH<sub>3</sub> 時， $R_1$  為 H、6-OCH<sub>3</sub>、6-Et 或 6-CF<sub>3</sub>；還更佳地， $R_1$  為 6-CF<sub>3</sub> 且  $R_2$  為 H)。

在一較佳實施例中，該醫藥組合物包含至少一式 6 化合物或其藥學上可接受的鹽類。該醫藥組合物可進一步包含一藥學上可接受的載體或稀釋劑。

在一較佳實施例中，該光動力療法包含下面步驟：將該組合物施予病患；等待足夠時間使該施予的組合物被具有至少一腫瘤的目標組織吸收；及照射病患含有該目標組織的區域。

在一較佳實施例中，該病患具有皮膚癌。較佳地，該病患具有基底細胞癌。

在一較佳實施例中，式 6 化合物係藉由 UVA 活化。較佳地，腫瘤的生長係藉由腫瘤細胞的凋亡來抑制。更佳地，腫瘤細胞的細胞內 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 層級上升，且腫瘤細胞的細胞內粒線體膜電位 ( $\Delta\Psi_{mt}$ ) 下降。

### 【實施方式】

本發明可能以不同的形式來實施，並不僅限於下列文中所提及的實例。下列實施例僅作為本發明不同面向及特點中的代表。

#### 實施例 1 方法與材料

##### 合成

2-(4-胺苯)苯并噻唑(式6)之製備顯示於圖2。藉由苯胺(anilines)(式1)與硝基氯化物(式2)在吡啶中反應4小時(方法A),取得4-硝基-N-苯基苯并噻唑(4-Nitro-N-phenyl benzamides)(式3)。或者,在於苯中的亞硫醯氯的存在下,於回流條件下將苯胺(式1)與硝基苯甲酸(式2)偶合以得出高產率的苯甲醯胺(式3)(方法B)。將該苯甲醯胺(分子式3)於回流條件下以氯苯中的勞森試劑處理以形成具有良好產率的4-硝基-N-苯硫基苯甲醯胺(4-nitro-N-phenylthiobenzamides)(式4)。藉由鐵氰化鉀促進式4之環化,以生成2-(4-胺苯)苯并噻唑(2-(4-nitrophenyl) benzothiazoles)(式5)(Hutchinson, I.; Chua, M. S.; Browne, H. L.; Trapani, V.; Bradshaw, T. D.; Westwell, A. D.; Stevens, M. F. G. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1446),接著,將式5中之硝基以甲醇中的鈀炭催化劑催化還原,產生良好產率的目標化合物6。

取得的化學試劑不再進一步純化,使用前以無溶劑(solvents free)蒸餾。使用薄層層析片 Merck plates 60 F<sub>254</sub> 進行薄層色層分析以監測反應,使用指示的溶劑以矽膠薄層板(Merck Silica Gel 60)(40-63 lm)進行快速色層分析。使用 Fargo MP-2D 熔點測試器測定熔點並校正,<sup>1</sup>H和<sup>13</sup>C核磁共振光譜會於400 MHz和100 MHz分別記錄於核磁共振儀 Varian UNITY plus-400上,並使用 CDCl<sub>3</sub>作為溶劑。<sup>1</sup>H核磁共振化學位移以 TMS 或 CDCl<sub>3</sub>(7.26 ppm)為參考,<sup>13</sup>C核磁共振以 CDCl<sub>3</sub>(77.0 ppm)為參考。質譜會以 Bruker APEX II 質譜儀記錄。元素分析以元素分析儀 Elementar vario EL III 進行,結果會在±0.4%的理論質

範圍內。測試之化合物純度>95%。

#### 合成苯甲醯胺 (3a-3f) 的一般製程 (方法 a)

在苯胺 (225 mmol, 1.2 當量) 於吡啶 (450 mL) 的攪拌溶液中，於室溫氮氣下加入 4-硝基苯甲醯氯 (186 mmol)，接著將該混合物回流 4 小時。冷卻至室溫後，將該溶液倒入冰/水中。將所生成的沈澱物過濾並從二氯甲烷再結晶以得出對應的化合物 3。

**4-硝基-N-苯基苯甲醯胺 (3a)**。白色固體；產率 91%；熔點 214-216°C；<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ9.42 (bs, NH), 8.38 (dt, J = 2.4 and 3.6 Hz, 2H), 8.23 (dt, J = 2.4 and 3.6 Hz, 2H), 7.85-7.82 (m, 2H), 7.40-7.35 (m, 2H), 7.17-7.13 (m, 1H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ165.3, 151.2, 142.6, 140.5, 130.5, 130.3, 125.8, 125.1, 121.8; HRMS (EI, m/z) for C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> calcd 242.0691, found 242.0692; Anal. calcd for C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: C, 64.46; H, 4.16; N, 11.56. Found, C, 64.72; H, 4.25; N, 11.54.

**N-(4-甲苯基)-4-硝基苯甲醯胺 (3b)**。白色固體；產率 93%；熔點 201-203°C；<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ9.37 (bs, NH), 8.26 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 8.11 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.58 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.16 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 2.34 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ163.8, 149.3, 140.7, 135.3, 134.4, 129.3, 128.7, 123.4, 120.8, 20.8; HRMS (ESI, m/z) for C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Na calcd 279.0746, found 279.0744; Anal. calcd for C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: C, 65.62; H, 4.72; N, 10.93. Found C, 65.71; H, 5.00; N, 10.92.

**N-(4-乙苯基)-4-硝基苯甲醯胺 (3c)**。白色固體；產率 96%；熔點 186-188°C；<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ8.32 (dd, J = 5.2 and 1.6 Hz,

2H), 8.03 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.92 (bs, NH), 8.23 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.22 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 2.65 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 1.24 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$ 163.6, 149.6, 141.5, 140.6, 134.8, 128.6, 128.2, 124.0, 120.6, 28.4, 15.6; HRMS (ESI,  $m/z$ ) for  $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_3$  calcd 271.1083, found 271.1084; Anal. calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$ : C, 66.66; H, 5.22; N, 10.36. Found C, 66.48; H, 5.41; N, 10.15.

**N-(3-甲氧苯基)-4-硝基苯甲醯胺 (3d)**。黃色固體；產率 80%；  
熔點 158-160°C； $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$ 9.98 (bs, NH), 8.31~8.28 (m, 2H), 8.18 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.94 (s, 1H), 7.32~7.23 (m, 2H), 6.72~6.69 (m, 1H), 3.82 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$ 163.8, 159.5, 149.0, 140.5, 139.2, 129.1, 128.7, 123.0, 112.8, 109.9, 106.3, 54.9; HRMS (ESI,  $m/z$ ) for  $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}$  calcd 295.0695, found 295.0694; Anal. Calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$ : C, 61.76; H, 4.44; N, 10.29. Found C, 61.49; H, 4.59; N, 10.33.

**N-(4-甲氧苯基)-4-硝基苯甲醯胺 (3e)**。黃色固體；產率 80%；  
熔點 196-197°C； $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$ 9.35 (bs, NH), 8.22 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 8.07 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.68 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.95 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 3.75 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$ 163.7, 156.6, 149.2, 140.7, 130.9, 128.6, 123.3, 122.5, 113.9, 55.3; HRMS (ESI,  $m/z$ ) for  $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_4$  calcd 273.0875, found 273.0873; Anal. Calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$ : C, 61.76; H, 4.44; N, 10.29. Found C, 61.88; H, 4.65; N, 10.14.

**N-(4-三氟甲苯基)-4-硝基苯甲醯胺 (3f)**。白色固體；產率 95%；  
熔點 194-196°C； $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}$ , 400 MHz)  $\delta$ 10.87 (bs, NH), 8.37 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 8.14 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.97 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.70 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{DMSO}$ , 100 MHz)  $\delta$ 164.9, 149.6, 142.5, 140.3, 129.6, 126.3, 124.5 (q,  $J = 140$  Hz, 1C), 123.9, 120.7, 114.1; HRMS (EI,

m/z) for  $C_{14}H_9F_3N_2O_3$  calcd 310.0560, found 310.0563; Anal. calcd for  $C_{14}H_9F_3N_2O_3$ : C, 54.20; H, 2.92; N, 9.03. Found C, 54.50; H, 2.84; N, 9.25.

#### 合成苯甲醯胺 (3g-3j) 的一般製程 (方法 b)

將 4-硝基苯甲酸 (82 mmol) 於苯 (165 ml) 的攪拌溶液於氮氣室溫下以亞硫醯氯 (58 mL, 820 mmol, 10 當量) 處理, 接著將該混合物回流 4 小時。移除溶劑後, 將苯甲醯氯中間物緩慢加入至適當取代的苯胺 (123 mmol, 1.5 當量) 於吡啶 (165ml) 的溶液中。將該混合物於氮氣室溫下回流 4 小時。冷卻至室溫後, 將該溶液倒入冰/水。將所生成的沈澱物過濾並從二氯甲烷再結晶以得出對應的化合物 3。

**N-(苯基)-3-甲基-4-硝基苯甲醯胺 (3g)**。白色固體; 產率 82%; 熔點 149-151°C;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz)  $\delta$ 8.01 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.98 (bs, NH), 7.84 (s, 1H), 7.78 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.63 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 7.40-7.36 (m, 2H), 7.21-7.17(m, 1H), 2.64 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz)  $\delta$ 163.9, 150.9, 138.8, 137.27, 134.2, 131.8, 139.2, 125.4, 125.3, 125.0, 120.4, 20.3; HRMS (ESI, m/z) for  $C_{14}H_{13}N_2O_3$  calcd 257.0926, found 257.0925; Anal. calcd for  $C_{14}H_{12}N_2O_3$ : C, 65.62; H, 4.72; N, 10.93. Found C, 65.53; H, 4.60; N, 11.00.

**N-(4-乙苯基)-3-甲基-4-硝基苯甲醯胺 (3h)**。白色固體; 產率 80%; 熔點 137-139°C;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz)  $\delta$ 8.03 (bs, NH), 7.97 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.75 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.52 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.29 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 2.67-2.61 (m, 5H), 1.24 (t,  $J = 8.4$  Hz, 3H);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz)  $\delta$ 163.8, 150.8, 141.4, 138.9, 134.9, 134.1, 131.8, 128.5, 125.4, 125.0, 120.6, 28.3, 20.3, 15.6; HRMS (ESI, m/s) for  $C_{16}H_{17}N_2O_3$  calcd 285.1239, found 285.1241; Anal. calcd for

$C_{16}H_{16}N_2O_3$ : C, 67.59; H, 5.67; N, 9.85. Found C, 67.50; H, 5.45; N, 9.85.

**N-(4-甲氧苯基)-3-甲基-4-硝基苯甲醯胺 (3i)**。白色固體；產率 71%；熔點 152-154 °C； $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz)  $\delta$ 7.98 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.94 (bs, NH), 7.81 (s, 1H), 7.75 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.52 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 6.89 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 2.62 (s, 3H)； $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz)  $\delta$ 163.7, 157.0, 150.8, 138.8, 134.1, 131.7, 130.2, 125.3, 124.9, 122.3, 114.3, 114.2, 55.4, 20.2；HRMS (ESI,  $m/z$ ) for  $C_{15}H_{15}N_2O_4$  calcd 287.1032, found 287.1033；Anal. calcd for  $C_{15}H_{14}N_2O_4$ : C, 62.93; H, 4.93; N, 9.79. Found C, 62.77; H, 5.17; N, 9.82.

**3-甲基-4-硝基-N-(4-三氟甲苯基) 苯甲醯胺 (3j)**。白色固體；產率 75%；熔點 154-156°C； $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz)  $\delta$ 9.38 (bs, NH), 8.01 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.87-7.83 (m, 2H), 7.61 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 2.64 (s, 3H)； $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz)  $\delta$ 164.8, 150.8, 141.0, 138.4, 133.8, 132.1, 126.1 (q,  $J = 38$  Hz,  $CF_3-C$ ), 125.8, 124.7, 123.2 (q,  $J = 140$  Hz,  $CF_3$ ), 120.3, 120.2, 20.0；HRMS (EI,  $m/z$ ) for  $C_{15}H_{11}N_2O_2F_3$  calcd 324.0722, found 324.0725；Anal. calcd for  $C_{15}H_{11}F_3N_2O_3$ : C, 55.56; H, 3.42; N, 8.64. Found, C, 55.50; H, 3.48; N, 8.64.

#### 合成硫苯甲醯胺 (4a-4j) 的一般製程

將 4-硝基-N-苯基苯甲醯胺 (41 mmol) 與勞森試劑 (8.52 g, 21mmol, 0.51 當量) 於氯苯 (30 ml) 中的混合物回流加熱 4 至 6 小時，將其濃縮後，以管柱層析術 ( $CH_2Cl_2$ /己烷=2:3) 純化以得出對應的化合物 4。

**4-硝基-N-苯基硫苯甲醯胺 (4a)**。黃色固體；產率 60%；熔點 154-156 °C； $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz)  $\delta$ 9.08 (bs, NH), 8.26 (d,  $J = 8.4$

Hz, 2H), 7.95 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.77 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 7.47 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.34 (t,  $J = 8.0$  Hz, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$ 195.5, 148.9, 148.2, 138.5, 129.2, 127.7, 127.5, 123.9, 123.5; HRMS (EI,  $m/z$ ) for  $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$  calcd 258.0463, found 258.0463; Anal. calcd for  $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ , C, 60.45; H, 3.90; N, 10.85. Found C, 60.44; H, 4.06; N, 10.75.

**N-(4-甲基)-4-硝基硫苯甲醯胺 (4b)**。黃色固體；產率 60%；  
熔點 195-196°C； $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$ 9.15 (bs, NH), 8.21 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.91 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.60 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.26-7.23 (m, 2H), 2.38 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$ 195.27, 148.8, 148.0, 137.6, 135.9, 129.7, 127.7, 123.8, 123.6, 21.2; HRMS (ESI,  $m/z$ ) for  $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\text{SNa}$  calcd 295.0517, found 295.0516; Anal. calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ : C, 61.75; H, 4.44; N, 10.29. Found C, 61.81; H, 4.55; N, 10.29.

**N-(4-乙苯基)-4-硝基硫苯甲醯胺 (4c)**。黃色固體；產率 65%；  
熔點 142-144°C； $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$ 9.07 (bs, NH), 8.25 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.94 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.66 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.28 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 2.69 (q,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 1.27 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$ 195.2, 148.9, 148.2, 143.9, 136.1, 128.9, 128.6, 127.7, 123.9, 123.5, 28.5, 15.3; HRMS (ESI,  $m/z$ ) for  $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$  calcd 287.0854, found 287.0856; Anal. calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ : C, 62.92; H, 4.93; N, 9.78. Found C, 62.91; H, 4.95; N, 9.60.

**N-(3-甲氧苯基)-4-硝基硫苯甲醯胺 (4d)**。黃色固體；產率 64%；  
熔點 138-140°C； $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$ 10.61 (bs, NH), 8.23 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.96 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.60 (s, 1H), 7.36-7.30 (m, 2H), 6.86-6.83 (m, 1H), 3.83 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$ 195.3, 159.8, 148.8, 148.2, 146.2, 129.6, 128.2, 123.3, 115.8, 112.7, 109.2, 55.4;



HRMS (ESI, m/z) for  $C_{14}H_{12}N_2O_3SNa$  calcd 311.0466, found 311.0464; Anal. calcd for  $C_{14}H_{12}N_2O_3S$ : C, 58.32; H, 4.20; N, 9.72. Found, C, 58.25; H, 4.36; N, 9.61.

**N-(4-甲氧苯基)-4-硝基硫苯甲醯胺 (4e)**。黃色固體；產率 62%；  
熔點 174-175°C； $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz)  $\delta$ 9.98 (bs, NH), 8.31-8.28 (m, 2H), 8.18 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.94 (s, 1H), 7.32-7.23 (m, 2H), 6.72~6.69 (m, 1H), 3.82 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz)  $\delta$ 163.8, 159.5, 149.0, 140.5, 139.2, 129.1, 128.7, 123.0, 112.8, 109.9, 106.3, 54.85; HRMS (EI, m/z) for  $C_{14}H_{12}N_2O_3S$  calcd 288.0569, found 288.0571; Anal. calcd for  $C_{14}H_{12}N_2O_3S$ : C, 58.32; H, 4.20; N, 9.72. Found C, 58.29; H, 4.42; N, 9.47.

**N-(4-三氟甲苯基)-4-硝基硫苯甲醯胺 (4f)**。黃色固體；產率 71%；  
熔點 174-175°C； $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz)  $\delta$ 11.49 (bs, NH), 8.25 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 8.07 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.99 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.68 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz)  $\delta$ 196.1, 148.5, 148.0, 142.4, 128.4, 125.8, 125.8, 123.5, 123.1, 122.3 (q,  $J = 140$ Hz,  $CF_3$ ); HRMS(ESI, m/z) for  $C_{14}H_{10}N_2O_2F_3S$  calcd 326.0337, found 326.0335. Anal. calcd for  $C_{14}H_{10}N_2O_2F_3S$ : C, 51.53; H, 2.78; N, 8.59. Found C, 51.90; H, 2.86; N, 8.63.

**N-(苯基)-3-甲基-4-硝基硫苯甲醯胺 (4g)**。黃色固體；產率 72%；  
熔點 118-120°C； $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz)  $\delta$ 9.09 (bs, NH), 7.99 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.78-7.71 (m, 4H), 7.46 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.33 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 2.64 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz)  $\delta$ 195.7, 146.6, 138.5, 134.2, 131.2, 129.2, 127.4, 125.1, 124.8, 123.5, 20.5; HRMS (ESI, m/z) for  $C_{14}H_{13}N_2O_2S$  calcd 273.0698, found 273.0700; Anal. calcd for  $C_{14}H_{13}N_2O_2S$ : C, 61.75; H, 4.44; N, 10.29. Found C, 62.01; H, 4.39; N, 10.26.

**N-(4-乙苯基)-3-甲基-4-硝基硫苯甲醯胺 (4h)**。黃色固體；產率 70%；熔點 160-162°C；<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ9.03 (bs, NH), 7.99 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.78-7.65 (m, 3H), 7.28 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 2.72-2.64 (m, 5H), 1.26 (t, J = 7.6 Hz, 3H)；<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ195.4, 150.1, 146.6, 143.8, 136.1, 134.2, 131.3, 128.5, 125.0, 124.81 123.5, 28.5, 20.5, 15.4；HRMS (ESI, m/z) for C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S calcd 301.1011, found 301.1012；Anal. calcd for C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S: C, 63.98；H, 5.37；N, 9.33. Found C, 63.99；H, 5.39；N, 9.30.

**N-(4-甲氧苯基)-3-甲基-4-硝基硫苯甲醯胺 (4i)**。黃色固體；產率 61%；熔點 160-162°C；<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ10.81 (bs, NH), 7.96 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.83 (dd, J = 1.6 and 0.8 Hz, 1H), 7.77 (dd, J = 8.4 and 2.0 Hz, 1H), 7.69 (dt, J = 8.8 and 3.2 Hz, 2H), 6.94 (dt, J = 8.8 and 3.2 Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 2.63 (s, 3H)；<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ195.0, 157.9, 149.5, 146.2, 133.3, 132.2, 131.7, 125.4, 124.3, 113.7, 55.2, 20.2；HRMS (ESI, m/z) for C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S calcd 303.0803, found 303.0804；Anal. calcd for C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S: C, 59.59；H, 4.67；N, 9.27. Found C, 59.95；H, 4.90；N, 9.07.

**3-甲基-4-硝基-N-(4-三氟甲苯基)硫苯甲醯胺 (4j)**。黃色固體；產率 74%；熔點 170-172°C；<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ8.04-7.98 (m, 3H), 7.81-7.68 (m, 4H), 2.65 (s, 3H)；<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ208.5, 196.6, 149.8, 146.4, 142.2, 133.5, 131.5, 125.8, 125.3, 124.4, 123.5, 122.3 (q, J = 140Hz, CF<sub>3</sub>), 29.7, 20.0；HRMS (ESI, m/z) for C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>SF<sub>3</sub> calcd 340.0493, found 340.0494；Anal. calcd for C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>SF<sub>3</sub>: C, 52.94；H, 3.26；N, 8.23. Found C, 52.68；H, 3.47；N, 8.27.

合成 2-(4-硝基)苯并噻唑 (5a-5j) 的一般製程

將取代的 4-硝基硫苯甲醯胺 (50 mmol) 於 3 滴 95% EtOH 及 30% 氫氧化鈉水溶液 (10.6 mL, 8 當量) 中的溶液於 90 °C 滴加加入鐵氰化鉀 (13.16 g, 4 當量) 於水 (50 mL) 的溶液中。將該反應混合物加熱額外加熱 1 小時並接著在冰中冷卻。將所生成的沈澱物過濾並以水清洗, 接著進行快速層析 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/己烷=1:4) 以得出對應的化合物 5。

**2-(4-硝苯基)苯并噻唑 (5a)**。白色固體; 產率 68%; 熔點 228-230°C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 8.35 (dt, J = 9.2 and 2.0 Hz, 2H), 8.27 (dt, J = 9.2 and 2.0 Hz, 2H), 8.13 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.96 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.56 (dt, J = 8.0 and 1.2 Hz, 1H), 7.47 (dt, J = 8.0 and 1.2 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ 164.8, 154.1, 149.0, 139.1, 135.4, 128.2, 126.9, 126.2, 124.3, 123.9, 121.8; HRMS (EI, m/z) for C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S calcd 256.0306, found 256.0308; Anal. calcd for C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S: C, 60.93; H, 3.15; N, 10.93. Found C, 60.89; H, 3.34; N, 10.75.

**6-甲基-2-(4-硝苯基)苯并噻唑 (5b)**。白色固體; 產率 65%; 熔點 148-150°C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 8.31 (s, 1H), 8.23 (s, 2H), 7.99 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.36 (s, 1H), 2.52 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ 163.7, 152.2, 148.8, 139.3, 136.6, 135.6, 128.5, 128.0, 124.2, 123.3, 121.4, 21.6; HRMS (EI, m/z) for C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S calcd 295.0517, found 295.0516; Anal. calcd for C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S: C, 62.21; H, 3.73; N, 10.36. Found, C, 62.37; H, 3.91; N, 10.31.

**6-乙基-2-(4-硝苯基)苯并噻唑 (5c)**。白色固體; 產率 72%; 熔點 151-152°C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 8.34 (dd, J = .8 and 2.0 Hz, 2H), 8.25 (dd, J = 4.8 and 2.0 Hz, 2H), 8.02 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.76 (d, J = 0.8

Hz, 1H), 7.40 (dd,  $J = 8.4$  and  $1.6$  Hz, 1H), 2.28 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 1.33 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$ 163.8, 152.4, 148.8, 143.0, 139.3, 135.7, 128.0, 127.6, 124.3, 123.5, 120.3, 29.0, 15.7; HRMS (ESI,  $m/z$ ) for  $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$  calcd 285.0698, found 285.0695; Anal. calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ : C, 63.36; H, 4.25; N, 9.85. Found C, 63.40; H, 4.55; N, 9.53.

**7-甲氧基-2-(4-硝苯基)苯并噻唑 (5d)**。白色固體；產率 25%；熔點 228-230°C； $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz),  $\delta$ 8.33 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 8.25 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.75-7.73 (m, 1H), 7.49 (t,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.89 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 4.03 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$ 165.4, 155.6, 154.3, 148.9, 139.2, 128.2, 127.8, 124.3, 116.4, 105.9, 56.0; HRMS (ESI,  $m/z$ ) for  $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3\text{SNa}$  calcd 309.0310, found 309.0308; Anal. calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ : C, 58.73; H, 3.52; N, 9.78. Found C, 58.94; H, 3.70; N, 9.65.

**6-甲氧基-2-(4-硝苯基)苯并噻唑 (5e)**。黃色固體；產率 63%；熔點 214-216°C； $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$ 8.33 (dt,  $J = 9.2$  and  $2.0$  Hz, 2H), 8.20 (dt,  $J = 9.2$  and  $2.0$  Hz, 2H), 8.00 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H), 7.38 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 7.15 (dd,  $J = 9.2$  and  $2.4$  Hz, 1H), 3.92 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$ 162.2, 158.5, 148.7, 148.6, 139.3, 137.0, 127.8, 124.5, 124.2, 116.6, 104.0, 55.8; HRMS (ESI,  $m/z$ ) for  $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$  calcd 287.0490, found 287.0492. Anal. calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ : C, 58.73; H, 3.52; N, 9.78. Found C, 58.68; H, 3.47; N, 9.75.

**2-(4-硝苯基)-6-三氟甲基苯并噻唑 (5f)**。黃色固體；產率 61%；熔點 149-151°C； $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$ 8.35 (dt,  $J = 9.2$  and  $2.0$  Hz, 2H), 8.27-8.23 (m, 3H), 8.19 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.77 (dd,  $J = 8.4$  and  $2.0$  Hz, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$ 167.8, 155.8, 149.4, 138.3, 135.4, 128.4, 128.2, 124.3, 124.2, 123.9, 123.8, 119.5; HRMS (ESI,

m/z) for  $C_{14}H_7N_2O_2SF_3$  calcd 324.0175, found 324.0178; Anal. calcd for  $C_{14}H_7N_2O_2SF_3$ : C, 51.85; H, 2.18; N, 8.64. Found C, 51.86; H, 2.22; N, 8.69.

**2-(3-甲基-4-硝苯基)苯并噻唑 (5g)**。白色固體；產率 71%；熔點 163-165°C； $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz)  $\delta$ 8.13-8.08 (m, 3H), 8.02 (dd,  $J = 8.0$  and  $2.0$  Hz, 1H), 7.95 (dd,  $J = 8.0$  and  $1.2$  Hz, 1H), 7.55 (dt,  $J = 8.0$  and  $1.2$  Hz, 1H), 7.45 (dt,  $J = 8.0$  and  $1.2$  Hz, 1H), 2.71 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz)  $\delta$ 165.1, 153.9, 150.1, 137.4, 135.4, 134.7, 131.4, 126.8, 126.0, 125.8, 125.5, 123.7, 121.8, 20.6; HRMS (ESI, m/z) for  $C_{14}H_{11}N_2O_2S$  calcd 271.0541, found 271.0541. Anal. calcd for  $C_{14}H_{11}N_2O_2S$ : C, 62.21; H, 3.73; N, 10.36. Found C, 62.07; H, 3.88; N, 10.26.

**6-乙基-2-(3-甲基-4-硝苯基)苯并噻唑 (5h)**。黃色固體；產率 75%；熔點 118-120°C； $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz)  $\delta$ 8.10 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 8.08 (s, 1H), 8.02 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 8.01 (dd,  $J = 8.4$  and  $2.0$  Hz, 1H), 7.75 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H), 7.38 (dd,  $J = 8.4$  and  $2.0$  Hz, 1H), 2.83 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 2.71 (s, 3H), 1.33 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3H);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz)  $\delta$ 164.1, 152.4, 149.9, 142.8, 137.7, 135.6, 134.6, 131.3, 127.4, 125.6, 125.5, 123.3, 120.3, 29.0, 20.6, 15.7; HRMS (ESI, m/z) for  $C_{16}H_{15}N_2O_2S$  calcd 299.0854, found 299.0856; Anal. calcd for  $C_{16}H_{15}N_2O_2S$ : C, 64.41; H, 4.73; N, 9.39. Found C, 64.20; H, 4.80; N, 9.14.

**6-甲氧基-2-(3-甲基-4-硝苯基)苯并噻唑 (5i)**。黃色固體；產率 64%；熔點 195-197°C； $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz)  $\delta$ 8.07 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 8.02 (d,  $J = 0.8$  Hz, 1H), 7.98 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H), 7.95 (dd,  $J = 8.4$  and  $2.0$  Hz, 1H), 7.36 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 7.14 (dd,  $J = 9.2$  and  $2.4$  Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 2.71 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz)  $\delta$ 162.3, 158.4,

149.6, 148.6, 137.6, 136.8, 134.6, 130.9, 125.5, 125.3, 124.3, 116.4, 103.9, 55.8, 20.6; HRMS (ESI, m/z) for  $C_{15}H_{14}N_2O_3S$  calcd 301.0647, found 301.0648. Anal. calcd for  $C_{15}H_{14}N_2O_3S$ : C, 59.93; H, 4.03; N, 9.33. Found C, 60.37; H, 4.13; N, 9.36.

**2-(3-甲基-4-硝基)-6-三氟甲基苯并噻唑 (5j)**。黃色固體；產率 30%；熔點 99-101°C； $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz)  $\delta$ 8.21-8.15 (m, 2H), 8.08-8.06 (m, 2H), 8.00 (dd,  $J = 8.8$  and 1.6 Hz, 1H), 7.76 (dd,  $J = 8.8$  and 1.6 Hz, 1H), 2.69 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz)  $\delta$ 168.0, 155.7, 150.4, 136.6, 135.2, 134.6, 131.60, 127.9 (q,  $J = 32.6$  Hz, 1C), 125.9 (d,  $J = 43.2$  Hz, 1C), 125.49, 124.08, 123.8, 122.2, 119.4 (q,  $J = 4.5$  Hz, 1C), 20.4; HRMS (ESI, m/z) for  $C_{15}H_{10}N_2O_2F_3S$  calcd 339.0415, found 339.0414; Anal. calcd for  $C_{15}H_9N_2O_2F_3S$ : C, 53.25; H, 2.68; N, 8.28. Found C, 53.21; H, 2.73; N, 8.14.

#### 合成 2-(4-胺基)苯并噻唑 (6a-6j) 的一般製程

在 2-(4-胺基)苯并噻唑 (1g, 3.9 mmol) 於  $CH_2Cl_2$  (30ml) 的溶液中於室溫氮氣下加入 10% Pd/C (0.1g) 4 小時。將所生成的溶液濃縮並進行快速層析 ( $CH_2Cl_2$ ) 以得出對應的化合物 6。

**2-(4-胺基)苯并噻唑 (6a)**。黃色固體；產率 94%；熔點 130-132°C； $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz)  $\delta$ 7.99 (m, 1H), 7.89 (m, 2H), 7.84 (m, 1H), 7.44 (m, 1H), 7.32 (m, 1H), 6.72 (dt,  $J = 4.2$  and 2.0 Hz, 2H), 4.00 (bs,  $NH_2$ );  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz)  $\delta$ 168.5, 154.2, 149.2, 134.6, 129.1, 126.0, 124.4, 123.9, 122.5, 121.4, 114.8; HRMS (ESI, m/z) for  $C_{13}H_{10}N_2S$  calcd 226.0565, found 226.0567; Anal. calcd for  $C_{13}H_{10}N_2S$ : C, 69.00; H, 4.45; N, 12.38. Found C, 69.01; H, 4.69; N, 12.29.

**2-(4-胺基)-6-甲基苯并噻唑 (6b)**。黃色固體；產率 95%；熔點

181-183°C;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$ 7.88-7.85 (m, 3H), 7.63 (s, 1H), 7.25 (dd,  $J = 6.8$  and  $1.6$  Hz, 1H), 6.71 (dd,  $J = 4.4$  and  $2.4$  Hz, 1H), 7.32 (m, 1H), 6.72 (dt,  $J = 4.2$  and  $2.0$  Hz, 2H), 4.00 (bs,  $\text{NH}_2$ ), 2.46 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$ 167.5, 152.3, 149.0, 134.7, 134.5, 129.5, 129.0, 127.6, 126.3, 124.1, 122.0, 121.2, 114.8, 21.5; HRMS(ESI,  $m/z$ ) for  $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{S}$  calcd 241.0799, found 241.0798; Anal. calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{S}$ : C, 69.97; H, 5.03; N, 11.66. Found C, 69.84; H, 5.01; N, 11.70.

2-(4-胺苯基)-6-乙基苯并噻唑 (6c) 。黃色固體；產率 92%；熔點 154-156°C;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$ 7.90-7.86 (m, 3H), 7.65 (t,  $J = 0.4$  Hz, 1H), 7.27 (dd,  $J = 7.6$  and  $2.0$  Hz, 1H), 6.81 (dt,  $J = 4.8$  and  $2.0$  Hz, 2H), 3.98 (bs,  $\text{NH}_2$ ), 2.76 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 1.29 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$ 167.6, 152.5, 149.0, 141.0, 134.7, 129.0, 126.5, 124.1, 122.1, 114.7, 28.87, 15.8; HRMS (ESI,  $m/z$ ) for  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{OSNa}$  calcd 277.0775, found 277.0776. Anal. calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{S}$ : C, 70.83; H, 5.55; N, 11.01. Found C, 70.62; H, 5.29; N, 10.90.

2-(4-胺苯基)-7-甲氧基苯并噻唑 (6d) 。黃色固體；產率 95%；熔點 142-144°C;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$ 7.90 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.62 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.39 (t,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 6.78 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 6.73 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 3.99 (s, 5H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$ 169.1, 15.9, 154.2, 149.2, 129.1, 126.9, 124.0, 123.0, 115.3, 114.8, 104.7, 55.9; HRMS(ESI,  $m/z$ ) for  $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{OS}$  calcd 257.0749, found 257.0748; Anal. calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{OS}$ : C, 65.60; H, 4.72; N, 10.93. Found C, 65.66; H, 4.86; N, 10.92.

2-(4-胺苯基)-6-甲氧基苯并噻唑 (6e) 。黃色固體；產率 96%；熔點 174-176°C;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$ 7.88 (s, 1H), 7.84 (dt,  $J = 4.8$  and  $2.8$  Hz, 2H), 7.32 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 7.04 (dd,  $J = 4.8$  and  $2.4$  Hz, 1H), 7.73 (dt,  $J = 4.8$  and  $2.8$  Hz, 2H), 3.98 (bs,  $\text{NH}_2$ ), 3.87 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$

NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$ 166.1, 157.3, 148.8, 148.8, 135.9, 135.9, 128.8, 124.2, 123.0, 115.1, 114.8, 104.3, 55.8; HRMS (ESI, m/z) for C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>OS calcd 257.0749, found 257.0748; Anal. calcd for C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>OS: C, 65.60; H, 4.72; N, 10.93. Found C, 65.35; H, 4.90; N, 10.67.

**2-(4-胺苯基)-6-三氟甲基苯并噻唑 (6f)**。黃色固體；產率 91%；熔點 181-183°C；<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$ 8.11 (s, 1H), 8.03 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.90 (dt, J = 4.8 and 2.4 Hz, 2H), 7.67 (dd, J = 6.8 and 1.6 Hz, 1H), 6.73 (dt, J = 4.8 and 2.4 Hz, 2H), 4.08 (bs, NH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$ 169.9, 158.1, 149.9, 132.3, 129.4, 123.1, 123.0, 122.5, 119.0, 119.0, 114.7; HRMS (ESI, m/z) for C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>S calcd 294.0439, found 294.0438; Anal. calcd for C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>S: C, 57.14; H, 3.08; N, 9.52. Found C, 57.20; H, 3.18; N, 9.49.

**2-(4-胺基-3-甲苯基)苯并噻唑 (6g)**。黃色固體；產率 94%；熔點 147-149°C；<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$ 7.99 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.85-7.83 (m, 2H), 7.75 (dd, J = 8.0 and 2.0 Hz, 1H), 7.44 (td, J = 8.0 and 1.2 Hz, 1H), 7.31 (td, J = 8.0 and 1.2 Hz, 1H), 6.71 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 3.94 (bs, NH<sub>2</sub>), 2.23 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$ 168.7, 154.2, 147.5, 134.5, 129.7, 126.9, 126.0, 124.3, 123.8, 122.4, 122.1, 121.3, 114.5, 17.1; HRMS(ESI, m/z) for C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>OSNa calcd 263.0619, found 263.0618. Anal. calcd for C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>OS: C, 69.97; H, 5.03; N, 11.66. Found C, 69.84; H, 5.01; N, 11.70.

**2-(4-胺基-3-甲苯基)-6-乙基苯并噻唑 (6h)**。黃色固體；產率 93%；熔點 171-173°C；<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$ 7.90 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.32 (dd, J = 6.0 and 2.4 Hz, 1H), 7.65 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 7.27 (dd, J = 6.8 and 1.6 Hz, 1H), 6.70 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 3.92 (bs, NH<sub>2</sub>), 2.76 (q, J = 8.0 Hz, 2H), 2.22 (s, 3H), 1.29 (t, J = 7.6 Hz,



3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$ 167.8, 152.5, 147.4, 140.9, 140.9, 134.7, 129.6, 126.8, 126.5, 124.1, 122.1, 122.0, 120.0, 114.6, 28.9, 17.2, 15.8; HRMS(ESI,  $m/z$ ) for  $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{OS}$  calcd 269.1112, found 269.1110; Anal. calcd for  $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{S}$ : C, 71.61; H, 6.01; N, 10.44. Found C, 72.01; H, 6.36; N, 10.52.

**2-(4-胺基-3-甲基)-6-甲氧基苯并噻唑 (6i)**。黃色固體；產率 95%；熔點 151-153°C； $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$ 7.87 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.77 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H), 7.69 (dd,  $J = 6.0$  and 2.4 Hz, 1H), 7.30 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 7.03 (dd,  $J = 6.0$  and 2.4 Hz, 1H), 6.69 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 3.86 (s, 5H), 2.22 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$ 166.4, 157.2, 148.7, 147.2, 135.8, 129.4, 126.6, 124.0, 122.9, 122.2, 115.0, 114.6, 104.3, 55.8, 17.2; HRMS (ESI,  $m/z$ ) for  $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{OS}$  calcd 271.0905, found 271.0906; Anal. calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{OS}$ : C, 66.64; H, 5.22; N, 10.36. Found C, 66.68; H, 5.38; N, 10.48.

**2-(4-胺基-3-甲基)-6-三氟甲基苯并噻唑 (6j)**。黃色固體；產率 91%；熔點 152-154°C； $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$ 8.12 (s, 1H), 8.04 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.83 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H), 7.77 (dd,  $J = 6.0$  and 2.4 Hz, 1H), 7.66 (dd,  $J = 6.8$  and 1.6 Hz, 1H), 6.72 (d,  $J = 8$  Hz, 1H), 4.20 (bs,  $\text{NH}_2$ ), 2.24 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$ 171.1, 156.3, 148.3, 134.6, 130.0, 127.3, 126.4 (q,  $J = 65.5$  Hz, 1C), 123.0 (q,  $J = 5.6$  Hz, 1C), 122.4, 122.1, 118.9 (q,  $J = 5.6$  Hz, 1C), 114.5, 17.2; HRMS (ESI,  $m/z$ ) for  $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{N}_2\text{S}$  calcd 308.0595, found 308.0597; Anal. calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{N}_2\text{S}$ : C, 58.43; H, 3.60; N, 9.09. Found C, 58.50; H, 3.60; N, 9.09.

### 細胞培養

如前所述，纖維母細胞取自成年包皮樣本 (Yang, C. C.; Lin, S. D.; Yu, H. S. *J. Dermatol. Sci.* 1997, 14, 162)，人類基底細胞癌 (BCC) 購

自美國菌種保存中心 (American Type Culture Collection) (Manassas, VA), 保存在 RPMI1640 培養基中且補充 10%胎牛血清、100 U/mL 青黴素 G 和 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  硫酸鏈黴素 (Gibco, BRL)。在經 5 mM EDTA (Gibco, BRL) 處理後, BCC 細胞會匯合傳代 (passage), 並在 37°C 潮濕環境下以 5%  $\text{CO}_2$  培養。

### 紫外線照射

紫外線照射之方法描述於先前之研究(Kao, C. S.; Yu, H. S. *J. Invest. Dermatol.* 1992, 98, 734)。為了進行紫外線照射, 使用一特定的紫外燈放射出強度為  $0.75 \text{ mW}/\text{cm}^2$  之峰值波長 365 nm (Vilber Lourmat, Moune La Vallee, Cedex, France)。在進行紫外線照射前, 培養之細胞會以  $4 \mu\text{M}$  之不同的藥劑或以不同濃度 (0-4  $\mu\text{M}$ ) 的分子式 6 進行 4 小時的前處理。培養的細胞會以磷酸鹽緩衝液(PBS)沖洗, 然後在 PBS 中以  $1 \text{ J}/\text{cm}^2$  UVA 進行照射以避免紫外線照射引起由培養基衍生的有毒光產物之形成。照射之計量使用 UVX 放射計 (UVP, San Gabriel, CA, USA) 測量。之後立即進行光處理, 去除 PBS 並將媒質加至細胞。所有接續的實驗將一式三份進行三次。

### 細胞存活率

細胞存活率會以 MTT 試驗分析, 此為一種根據活細胞藉由粒線體脫氫酶將氧化還原指示劑 MTT 還原為非溶性甲結晶的粒線體功能分析方法。簡而言之, 細胞會以 2500 細胞/孔之密度種在 96 孔培養盤中。

經過徹夜培養後，細胞會以 4  $\mu\text{M}$  之化合物處理並培養 24 小時。之後將培養液丟棄，並以 10  $\mu\text{L}$  之 MTT 染劑取代。培養盤會在 37  $^{\circ}\text{C}$  下培養 2 小時。產生的甲結晶會溶解於 100  $\mu\text{L}$  二甲亞砜 (DMSO) 中，並以微量盤式分析儀 (MRX-II, Dynex technology, Chantilly, VA) 於 540nm 讀取其光學密度。

### 次 G1 (Sub-G1) 區域分析

BCC 細胞會以 4  $\mu\text{M}$  化合物與 1  $\text{J}/\text{cm}^2$  UVA 處理，經 24 小時照射後，細胞會以胰蛋白酶並經離心收集。細胞團粒 (pellets) 沉澱懸浮於 50% 冷乙醇中並於 -20 $^{\circ}\text{C}$  固定，經固定後，將細胞以冷 PBS 沖洗一次並在含有 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  RNase A 之 0.5 mL PBS 中於 37 $^{\circ}\text{C}$  下培養 20 分鐘。在 400g 離心 5 分鐘狀態下收集細胞，並於細胞團粒中加入含有 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 之 PBS 250  $\mu\text{L}$ 。三十分鐘後，以 FACSscan 流式細胞儀 (Elite ESP, Beckman Coulter, Brea, CA) 測量 10,000 個細胞的 DNA 含量。直方圖則以 Windows Multiple Document Interface (WinMDI) 軟體分析。DNA 含量少於未經處理並處於 G0/G1 期之細胞則被當作是細胞凋亡。

### 硫脲胺酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 比色分析

經 24 小時照射後，細胞藉由離心收集，並以 PBS 沖洗一次，將細胞團粒計數並以 25  $\mu\text{L}/1 \times 10^6$  個細胞之濃度懸浮於冷的裂解緩衝液 (lysis buffer) 中並使其均質化。根據製造商的使用說明 (R&D Systems,

Minneapolis, MN) , 勻漿於 4°C 下以 12,000 rpm 離心 10 分鐘，使用上清液並利用以 ELISA 為基礎之分析法，測量硫胺酸蛋白酶-3 之活性。結果以平均值±標準差的形式顯示。

### 膜聯蛋白 V (Annexin V) 和碘化丙啶 (propidine iodide, PI) 結合分析

為了評估同時觀察早期細胞凋亡和壞死的特點，BCC 細胞於照射之前經不同濃度(0-4  $\mu\text{M}$ )之分子式 6f 處理 4 小時。經照射 24 小時後，細胞會以胰蛋白酶並經離心收集，並根據製造商的使用說明 (Bender MedSystems, Vienna, Austria) 將每個樣本加入膜聯蛋白 V-FITC 蛋白至 106 個細胞並以細胞儀測量，在此同時，將細胞以 PI 染色。流式細胞儀之數據以 WinMDI 軟體分析。

### 型態觀察

將 BCC 或纖維母細胞 ( $5 \times 10^5$  cells/well) 種養於 6 孔培養盤上。細胞以 4  $\mu\text{M}$  的式 6f 處理 4 小時後，以 1 J/cm<sup>2</sup> UVA 照射。經曝光 24 小時後，以顯微鏡在 200 倍下攝影。

### 測定細胞內活性氧物質程度

為了評估細胞內活性氧物質之程度，使用 2',7'-二乙酸二氯螢光黃 (2',7'-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA, Molecular Probes) 螢光染劑用來澄清此問題。在細胞中，當非極性之 DCFH-DA 轉換為極性

衍生 DCFH 時，是藉由酯酶素來進行。DCFH 為非螢光性，但會藉由細胞內之過氧化氫或氧化氮，快速氧化為高螢光性之 DCF。此外，過氧化氫酶 (Sigma)，一個有效的過氧化氫清除劑，也於這項研究中使用。細胞在以式 6f (0-4  $\mu\text{M}$ ) 處理前，會以過氧化氫酶 (800 U/mL) 預處理。在指定的照射進行後，DCFH-DA (10  $\mu\text{M}$ ) 會立即加入培養之細胞中在 37°C 30 分鐘。樣本之螢光會以流式細胞儀測量。2',7'-二氫螢光黃 (DCF) 會使用 FL-1 光倍增器記錄。

### 線粒體膜電位 ( $\Delta\Psi_{mt}$ ) 之評估

將 BCC 細胞培養於 35-mm 培養皿中，並於處理前允許指數成長 24 小時。在以 1 J/cm<sup>2</sup> UVA 照射前，細胞會以 0、2 和 4M 之式 6f 預處理。將培養基移除且黏附的細胞會胰蛋白酶化。將細胞以 400g 離心 5 分鐘而形成團粒，並在室溫下 100 nM/ml DiOC<sub>6</sub> 染劑 (Molecular Probes, Eugene, OR) 中染色 30 分鐘，在以 PBS 沖洗兩次並懸浮於 PBS 中。樣本立刻於 FACScan 流式細胞儀 (Elite ESP, Beckman Coulter, Brea, CA) 進行螢光分析 (FL-1 偵測器，帶通濾波器 530/30nm)。直方圖以 Windows Multiple Document Interface (WinMDI) 軟體分析。

### ATP 生物發光檢測法之內容

細胞內 ATP 之量會根據螢光素-螢光素酶反應的輸出光，以生物發光檢測法測定。以不同濃度之 6f-UVA 處理後，立即從培養的 BBC 細胞中以細胞裂解液萃取出全部細胞。經離心以去除細胞碎片後，收集上

清液以測量ATP。細胞內ATP總量將根據ATPLite分析套組 (Perkin Elmer, Boston, MA) 所提供之流程進行判定。

### 蛋白質萃取與西方墨點法

在含有100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PMSF、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  抑肽酶 (aprotinin)、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  亮抑蛋白酶肽 (leupeptin) 和100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氟化鈉之冰冷的RIPA緩衝液 (1  $\times$  PBS緩衝液, 1% NP-40, 0.5% 去氧膽酸鈉, 0.1% SDS) 中, 裂解培養之BBC細胞以取得全部細胞萃取物。經14,000g離心30分鐘後, 以Bradford法 (Bio-Rad) 量化上清液中之蛋白質, 每一電泳跑道 (lane) 40mg之蛋白質於10%的SDS-聚丙烯酰胺凝膠中進行。電泳後, 將蛋白質從電膠轉移到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜 (Millipore, Bedford, MA), 將該膜於室溫下於含有5%脫脂牛奶之PBS + 0.1% Tween 20 (PBS-T) 內進行阻塞 (block) 一小時。以PBS-T簡單沖洗後, 將墨點以各自的一級抗體於室溫下偵測兩小時, 或於4°C下進行偵測整夜。抗JNK (46 kDa)、p38 (38 kDa)、ERK (42、44 kDa) 之兔子多株抗體與抗p-JNK、p-p38、p-ERK之小鼠單株抗體係自Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) 購買。抗肌動蛋白之小鼠單株抗體係自Chemicon Int. Inc. (Temecula, CA) 購買。在6f-UVA處理前會將25  $\mu\text{M}$  寡黴素 (Sigma, 粒線體專一表現之 $F_0F_1$  ATP合成抑制劑) 或 $1 \times 10^{-4}$  M ATP (Sigma) 分別加入培養基以用於阻塞測試。將該膜以相應之辣根過氧化酶標記之二級抗體 (Santa Cruz Biotechnology) 於室溫下培養1小時。將該膜以PBS-T清洗4次15分鐘, 並以西方墨點化學發光藥劑 (Western Lightning

Chemiluminescence Reagent Plus) (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA) 使蛋白質墨點可見。專一性蛋白的相對量會以X光片之密度測定掃描法量化，並以鷹眼圖像系統 (Eagle Eye Image System) (Stratagene, La Jolla, CA) 分析。

### 統計分析

結果以平均值±標準差表示，並以統計分析系統進行分析 (SPSS, SPSS Inc., Chicago, IL)。組間差異以Student的t檢定進行分析。所有的檢測中，P值< 0.05被當作是顯著的。

## 實例 2 結果

### 細胞存活率

經UVA激活的式6對BCC細胞活性之影響會以MTT分析試驗評估。將BCC細胞以不同濃度之式6 (即式6，其中的R<sub>1</sub>是6-CF<sub>3</sub>且R<sub>2</sub>是H) 處理4小時，之後再以1 J/cm<sup>2</sup> UVA照射。經24小時曝光後，測定細胞活性。如圖3A所示，抑制效果取決於藥物濃度。式6f濃度為4 μM時，經1 J/cm<sup>2</sup> UVA照射後之細胞存活率高於50%。為了釐清1 J/cm<sup>2</sup> UVA照射是否為本研究中最有影響之劑量，在以UVA處理前將細胞以4 μM式6進行預處理。相較於沒有經預處理之對照組，BCC細胞經0.25、0.5和1 J/cm<sup>2</sup> UVA照射後，細胞存活率分別為71、65和45%。此外，此數據亦顯示比起只經UVA照射或只以外源性式6處理，6-UVA都表現較高的抑制活性，且單獨的式6f對BCC細胞不具有細胞毒性 (圖3B)。

### 細胞次G1累積作用

為了探討化合物6對BCC細胞之細胞週期進行之影響，以流式細胞儀分析法測定細胞核之DNA含量。藥劑作用導致細胞含有亞二倍體 (hypodiploid) DNA (sub-G1材料)，其為細胞凋亡之特徵且反映出DNA的碎片化。將BCC細胞以4 $\mu$ M藥劑處理4小時，再以1 J/cm<sup>2</sup> UVA照射，經24小時照射後，再使用PI試劑。各組皆約有10000個細胞以FACScan流式細胞儀分析。取得在次G1 DNA峰值的細胞凋亡影響：2.2% (控制組)、6.5% (6a)、13.4% (6b)、29.2% (6c)、24.4% (6d)、6.5% (6e)、35.4% (6f)、13.6% (6g)、13.8% (6h)、14.8% (6i) 和 6.4% (6j) (%表示細胞含量之百分比)。由於式6f化合物在BCC細胞中呈現最多的次G1累積，因此式6f被選為進一步研究之模型。

### 細胞凋亡檢測

硫胺酸蛋白酶-3已被證明在細胞凋亡中，是最重要的細胞死亡執行者之一 (Shi, Y. *Mol. Cell* 2002, 9, 459)。硫胺酸蛋白酶-3之活性表現採用比色法來判定。相較於未經處理之控制組，經6f-UVA處理後BCC細胞之硫胺酸蛋白酶-3之活性有增加 ( $p < 0.01$ ) (圖4A)。再者，BCC細胞在1 J/cm<sup>2</sup> UVA照射下，以0、2、和4  $\mu$ M之式6處理，可誘發細胞凋亡 (annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) 程度分別達0.2%、19.5%和27.5%。相反地，壞死的細胞並無明顯改變 (annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) (圖4B)。此外，



了解6f-UVA對正常細胞之細胞凋亡活性可能是有趣的，因此，使用人類皮膚纖維母細胞來釐清此課題。型態學觀察數據與膜聯蛋白V/PI結合分析顯示，與控制組相較，經6f-UVA處理後並無顯著之細胞凋亡影響（圖4C）。這些結果鼓舞了進一步在BCC細胞內，由6f-UVA涉及之光敏效應誘發之細胞凋亡機制之研究。

### 粒線體功能障礙

越來越多的證據暗示，粒線體功能障礙在氧化壓力中扮演重要角色（Hail, N. Jr. *Apoptosis* 2005, 10, 687），其會誘使活性氧物質之生產，並會導致細胞凋亡模式之細胞死亡（Hildeman, D. A.; Mitchell, T.; Teague, T. K.; Henson, P.; Day, B. J.; Kappler, J.; Marrack, P. C. *Immunity*. 1999, 10, 735）。為了確定活性氧物質是否涉及經6f-UVA誘發之粒線體依賴性凋亡，使用DCFH-DA探測器測量細胞內 $H_2O_2$ 之產量。結果顯示6f-UVA顯著地使細胞內 $H_2O_2$ 增加。此外，過氧化氫酶顯著地抑制經4  $\mu M$  6f-UVA處理之BBC細胞之增加的活性氧物質之產量（圖5A）。粒線體膜電位（ $\Delta\Psi_{mt}$ ）不僅對粒腺體而言是重要的參數，對細胞狀態亦是。 $\Delta\Psi_m$ 之減少在細胞死亡過程中是一早期事件，螢光強度的減少反映了 $\Delta\Psi_m$ 之崩毀，其通常表示已經不可逆之早期的細胞凋亡階段。因此，本發明檢驗經6f-UVA照射後，初始之活性氧物質生成是否會改變 $\Delta\Psi_{mt}$ 。在以0、2和4  $\mu M$ 之6f-UVA處理後，收集BBC細胞，以DiOC<sub>6</sub>染劑染色後接著以流式細胞儀分析。染劑會結合於粒線體之內膜與外膜，並在膜去極化期間經歷螢光紅移（red shift）。如圖5B中所示，以

2  $\mu\text{M}$ 或更多之劑量處理之細胞，BCC細胞內 $\Delta\Psi_{\text{mt}}$ 表現顯著的減少。ATP是細胞能量、代謝調控與細胞訊號之中心參數，因此確定細胞內之ATP對於細胞生理特性是具有價值的。相較於未經處理之控制組，以2和4  $\mu\text{M}$ 之6f-UVA處理之BCC細胞之細胞內ATP含量分別下降了約30%和45%（圖5C）。

### 有絲分裂劑活化蛋白激酶（MAPKs）途徑之激活

為了確定6f-UVA誘發之細胞凋亡中，各種蛋白激酶路徑之參與可能性，藉由測量MAPK亞科（subfamilies）來評估有絲分裂劑活化蛋白激酶之活性。相較於未經處理之控制組，BBC細胞在經4  $\mu\text{M}$ 濃度之6f-UVA處理後，其磷酸化細胞外信號調節激酶（p-ERK）和磷酸化p38（p-p38）會增加。相較於ERK和p38，以6f-UVA處理之BBC細胞並不會刺激JNK MAPK之磷酸化（圖6A）。再者，為了釐清MAPK之活化是否是因為細胞ATP合成減少所致，細胞在以4  $\mu\text{M}$  6f-UVA處理前，會先以寡黴素（一種粒線體專一表現之 $F_0F_1$  ATP合成抑制劑）或ATP預處理。結果顯示，以寡黴素但未以ATP預處理者ERK之活化有所增加（圖6B）。

一個熟知此領域技藝者能很快體會到本發明可很容易達成目標，並獲得所提到之結果及優點，以及那些存在於其中的東西。本發明中之組合物及其製造程序與方法乃較佳實施例的代表，其為示範性且不僅侷限於本發明領域。熟知此技藝者將會想到其中可修改之處及

其他用途。這些修改都蘊含在本發明的精神中，並在申請專利範圍中界定。

本發明的內容敘述與實施例均揭示詳細，得使任何熟習此技藝者能夠製造及使用本發明，即使其中有各種不同的改變、修飾、及進步之處，仍應視為不脫離本發明之精神及範圍。

說明書中提及之所有專利及出版品，都以和發明有關領域之一般技藝為準。所有專利和出版品都在此被納入相同的參考程度，就如同每一個個別出版品都被具體且個別地指出納入參考。

在此所適當地舉例說明之發明，可能得以在缺乏任何要件，或許多要件、限制條件或並非特定為本文中所揭示的限制情況下實施。所使用的名詞及表達是作為說明書之描述而非限制，同時並無意圖使用這類排除任何等同於所示及說明之特點或其部份之名詞及表達，但需認清的是，在本發明的專利申請範圍內有可能出現各種不同的改變。因此，應了解到雖然已根據較佳實施例及任意的特點來具體揭示本發明，但是熟知此技藝者仍會修改和改變其中所揭示的內容，諸如此類的修改和變化仍在本發明之申請專利範圍內。

### 【圖式簡單說明】

圖 1 顯示了 2-苯基苯并噻唑 (2-Phenylbenzothiazoles) 的結構

圖 2 顯示了 2-(4-胺基) 苯并噻唑 (2-(4-aminophenyl) benzothiazoles)

(式 6) 的完整合成反應。試劑和條件：(1) 方法 a：X = Cl，吡啶，

回流；方法 b: X = OH, SOCl<sub>2</sub>, 苯, 回流。(2) 勞森試劑, 氯苯, 135°C。  
(3) K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 水溶液, NaOH, 90°C。(4) H<sub>2</sub>/Pd/C 10%、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 25°C。

圖 3 顯示了 6-UVA 細胞活力的影響。(A) 測試 BCC 細胞對混合物 6f 之劑量反應曲線。將細胞種在每孔 2500 細胞之 96 孔板並培養過夜, 直到細胞附著。將 6f-UVA 以指定濃度加入培養液中 (做三重複) 並在培養 4 小時後以 1 J/cm<sup>2</sup> 的紫外線照射。24 小時紫外線照射後在每個孔中加入 MTT 試劑。吸光度直接與活細胞數量成正比。(B) 為了釐清相較於單獨照射 UVA 或單獨以式 6 處理, 6-UVA 是否有更多細胞毒性, 細胞在以不同劑量之紫外線照射前會以 4μM 的式 6f 培養或不培養。與對照組相比, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01。

圖 4 顯示 6f-UVA 處理對於細胞凋亡的作用。(A) 在細胞凋亡中, 硫胱胺酸蛋白酶-3 (caspase-3) 之酵素活性會藉由比色反應決定。由硫胱胺酸蛋白酶裂解之胜肽會釋放發色基 (chromophore) p-硝基苯胺 (pNA, p-nitroaniline), 其可在波長 405nm 以分光光度計量化。(B) 以各種濃度之 6f-UVA 處理之 BBC 細胞點陣圖。BBC 細胞經處理後再以 PI 染色, 然後殘留在細胞表面的 PS 會專一地與膜聯蛋白 V - FITC 結合而被檢測到。(C) 使用形態觀察以及膜聯蛋白 V / PI 雙染色來偵測纖維母細胞細胞凋亡。每一組都取約 10000 個細胞以流式細胞儀分析。顯示的數據為代表性的實驗結果, 其重複三次且結果均相似。與對照組

相比，\*\*  $p < 0.01$ 。

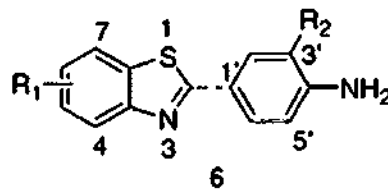
圖 5 顯示了 6f-UVA 對粒線體功能之影響。(A) 6f-UVA 導致活性氧物質在 BCC 細胞中生成，圖為螢光比上以不同濃度 6f-UVA 處理並以 DCFH-DA 染色之 BBC 細胞之細胞數。在過氧化氫酶（一種  $H_2O_2$  清除劑）的存在下測定 ROS 以作為對照。(B) 曝露於 6f-UVA 後，BBC 細胞之粒線體膜電位 ( $\Delta\Psi_{mi}$ )。細胞以 0、2 和  $4\mu M$  之 6f 處理 4 小時，再以  $1 J/cm^2$  UVA 照射，然後以 DiOC<sub>6</sub> 染色並立即以下方描述的材料與方法之流式細胞儀分析。M1 中的數量表示粒線體膜電位減少的細胞之所佔百分比。每組約有 10000 個細胞會以流式分析儀分析。(C) 以百分比計算之相對 ATP 量，以  $0 \mu M$  之量做為標準。在三次非相關之實驗中，所得之結果皆相似。與對照組相比，\* $p < 0.05$ ，\*\*  $p < 0.01$ 。

圖 6 顯示免疫印跡分析，其顯示了 6f-UVA 對 BCC 細胞上之 MAP 激酶之蛋白表現有影響。(A) 將細胞曝露於不同濃度之 6f-UVA 後，收集細胞溶解液並以特定抗體做免疫印跡做標示。對於內部控制，相同數量的蛋白質萃取物也以激動蛋白抗體做探測。(B) 測定在寡黴素 (oligomycin) ( $25 \mu M$ ) 和 ATP ( $1 \times 10^{-4} M$ ) 存在下磷酸化之細胞外信號調節激酶 (p-ERK) 之表現量以作為對照。

公 告 本
-------

## 七、申請專利範圍：

1. 一種醫藥組合物在製備用於光動力療法中提供予具有皮膚癌腫瘤的病患以抑制該腫瘤生長的藥物的用途，其中該醫藥組合物包含式6化合物



，其中式6中的R<sub>1</sub>為H、C<sub>1-10</sub>烷基、C<sub>1-10</sub>烷氧基或C<sub>1-10</sub>鹵烷基，且R<sub>2</sub>為H或C<sub>1-10</sub>烷基。

2. 如申請專利範圍第1項之用途，其中該光動力療法包含下面步驟：將該藥物施予病患；等待足夠時間使該施予的藥物被具有至少一腫瘤的目標組織吸收；及照射病患含有該目標組織的區域。
3. 如申請專利範圍第1項之用途，其中該病患具有基底細胞癌。
4. 如申請專利範圍第1項之用途，其中該式6化合物係藉由UVA活

化。

5. 如申請專利範圍第1項之用途，其中該腫瘤的生長係藉由腫瘤細胞的凋亡來抑制。
6. 如申請專利範圍第5項之用途，其中該腫瘤細胞的細胞內 $H_2O_2$ 層級上升。
7. 如申請專利範圍第6項之用途，其中該腫瘤細胞的細胞內粒線體膜電位 ( $\Delta\Psi_{mt}$ ) 下降。
8. 如申請專利範圍第1項之用途，其中式6中的 $R_1$ 為H、6-Et、6-OMe、6-Me、7-OMe或6-CF<sub>3</sub>，且 $R_2$ 為H或CH<sub>3</sub>。
9. 如申請專利範圍第1項之用途，其中式6中的 $R_1$ 為H、6-Et、6-OMe、6-Me、7-OMe或6-CF<sub>3</sub>，且 $R_2$ 為H。
10. 如申請專利範圍第1項之用途，其中式6中的 $R_1$ 為H、6-OCH<sub>3</sub>、6-Et或6-CF<sub>3</sub>，且 $R_2$ 為CH<sub>3</sub>。
11. 如申請專利範圍第1項之用途，其中式6中的 $R_1$ 為6-CF<sub>3</sub>，且 $R_2$ 為

H。



八、圖式：

圖 1

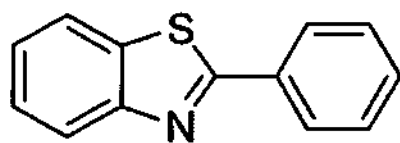


圖 2

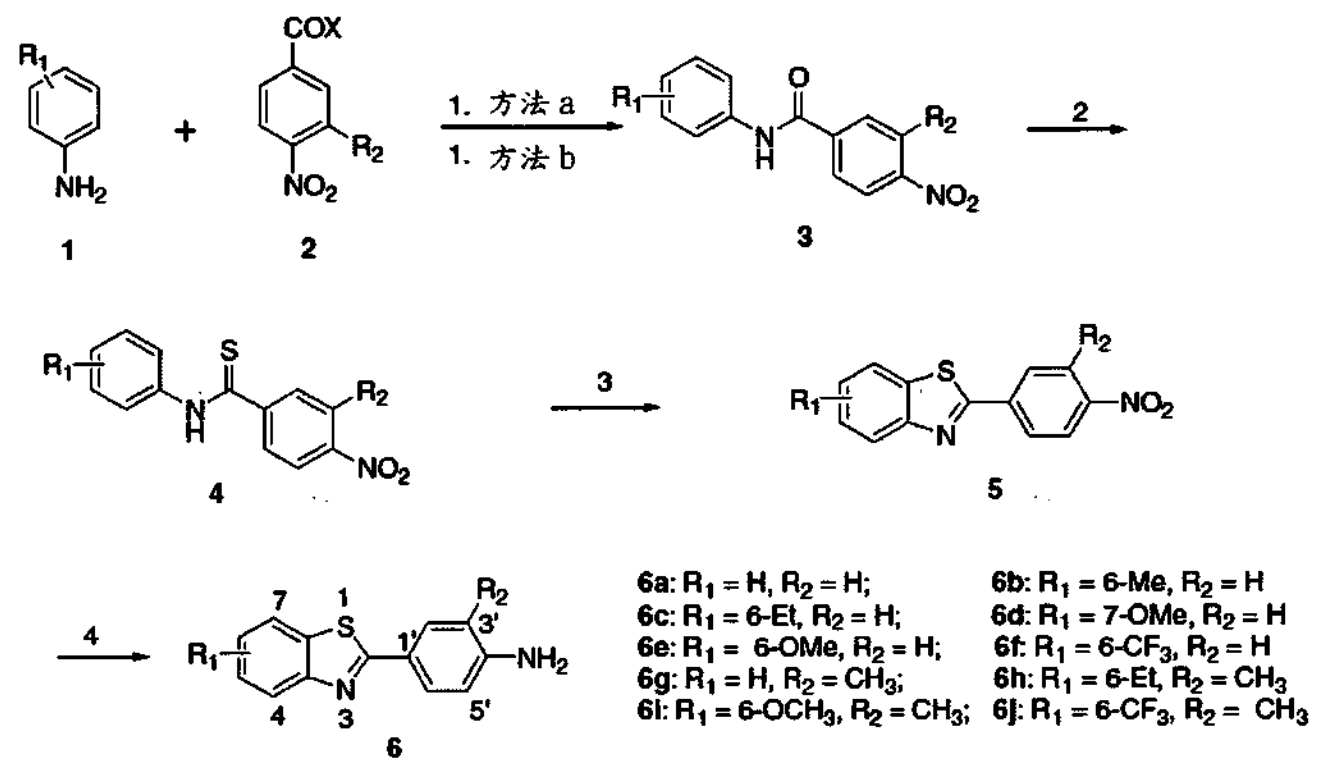


圖 3A

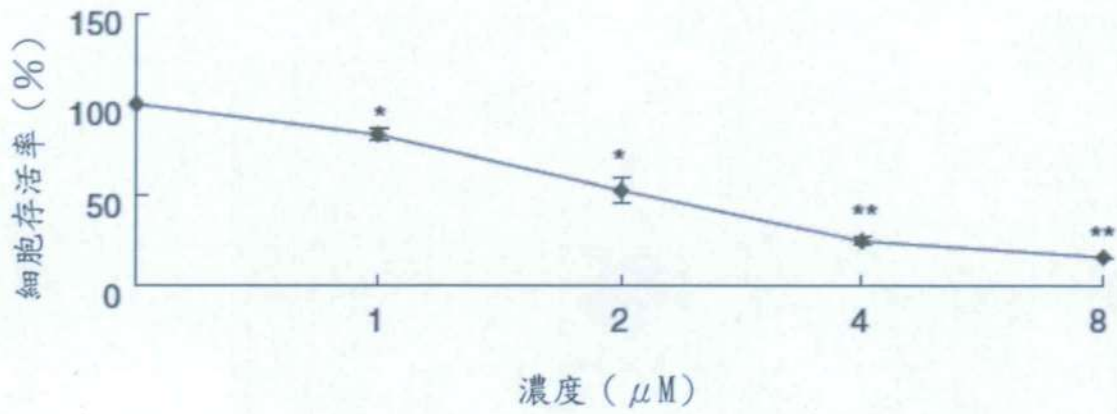


圖 3B

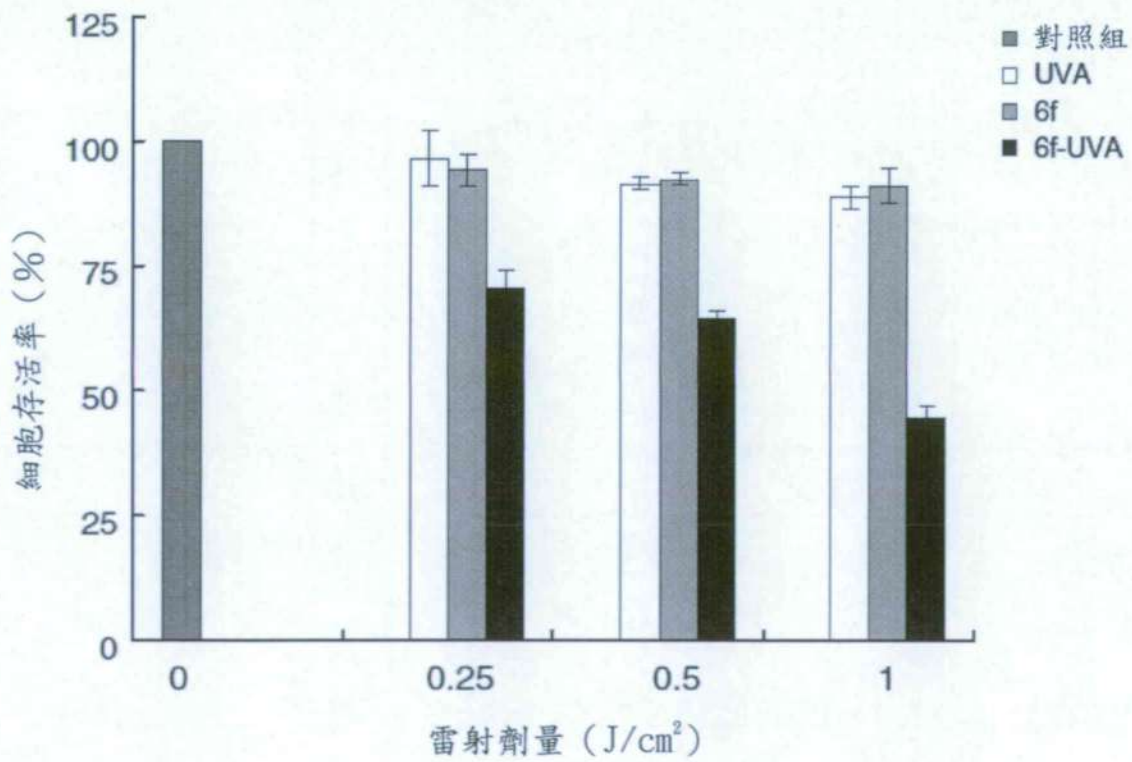


圖 4A

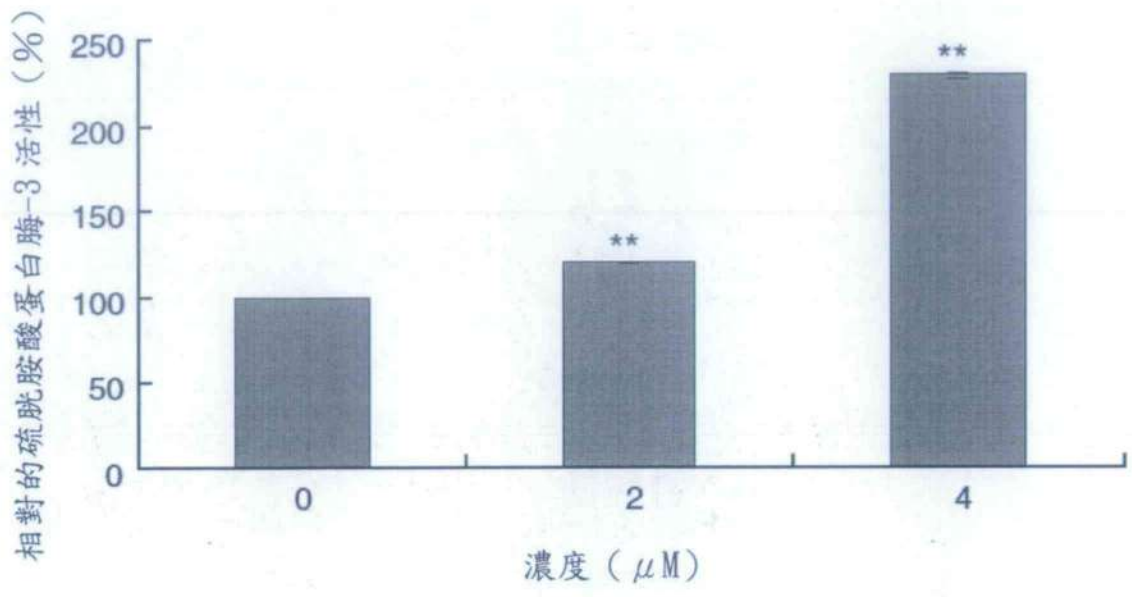


圖 4B

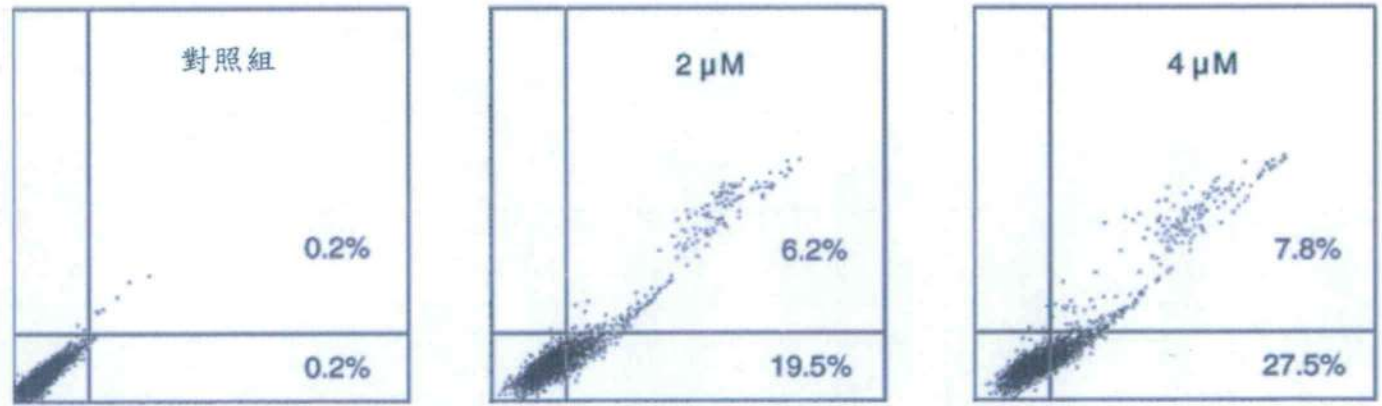


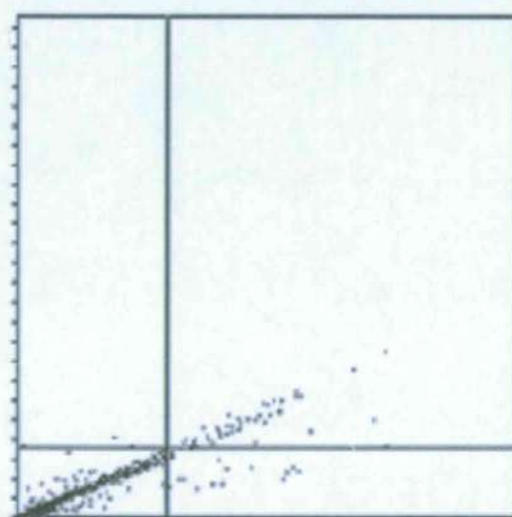
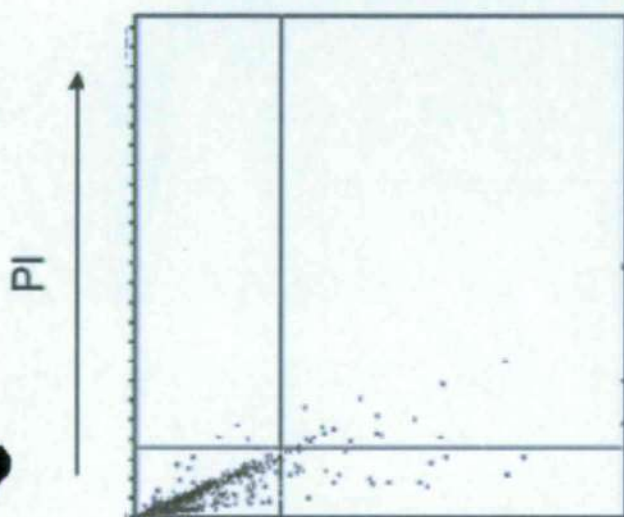
圖 4C

纖維母細胞

0

4

$\mu\text{M}$



膜聯蛋白-FITC

圖 5A

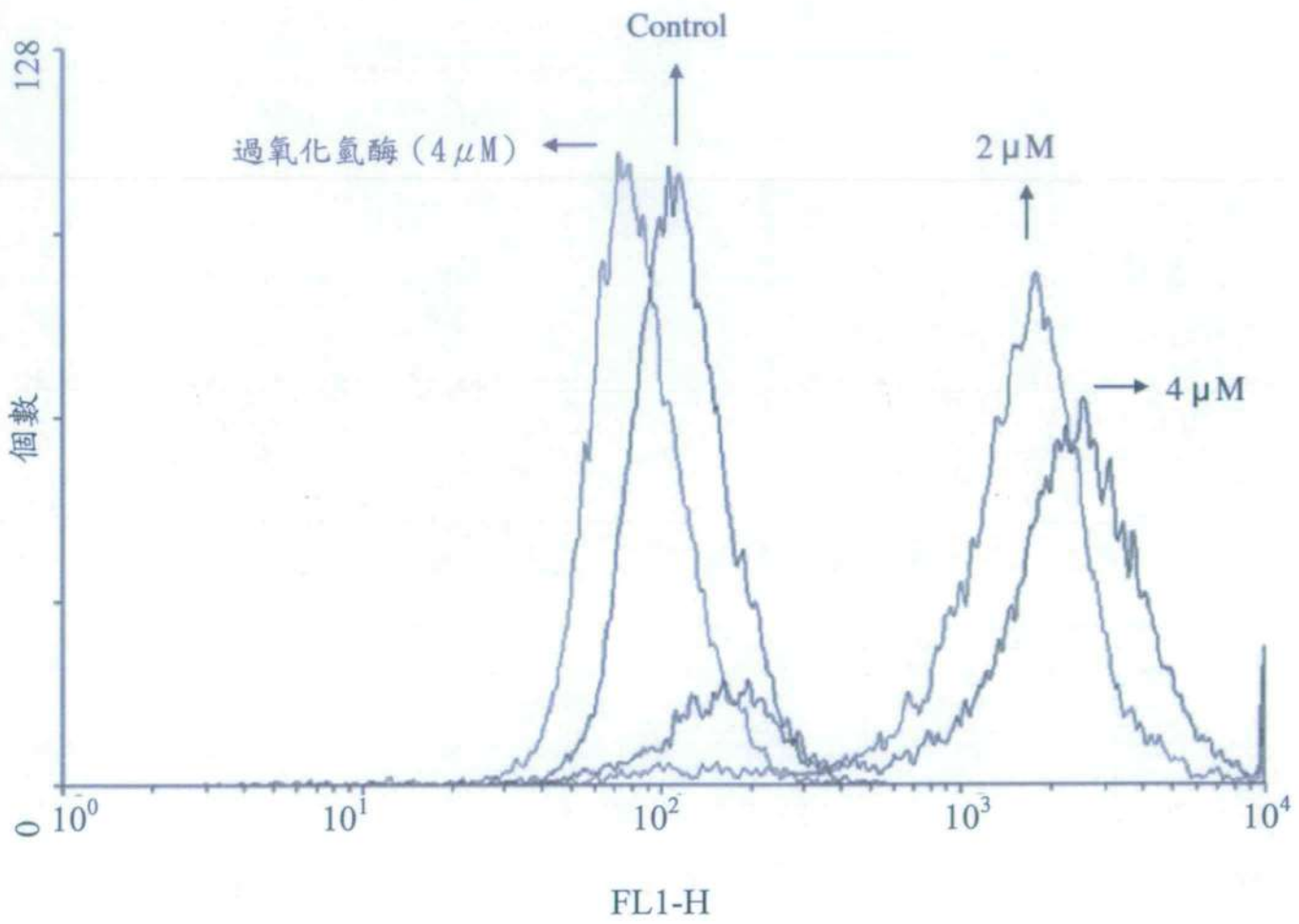


圖 5B

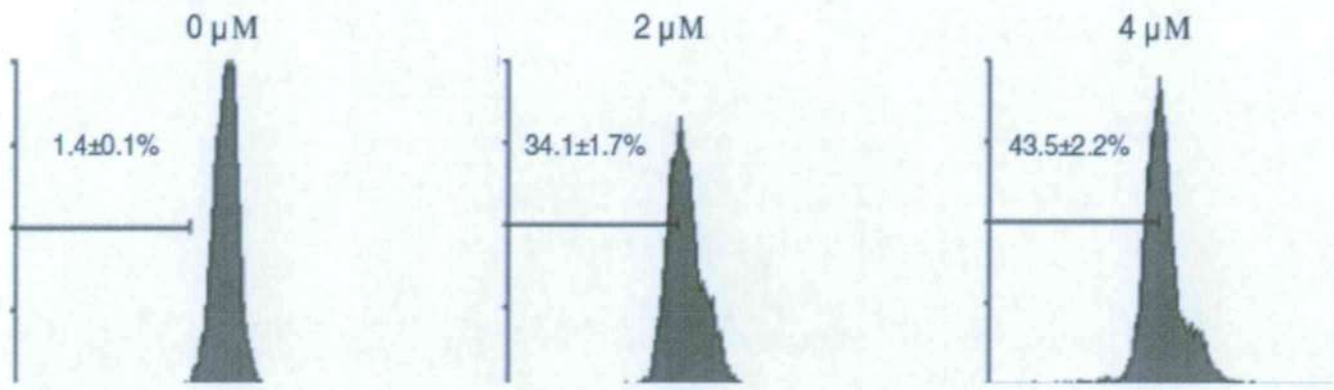


圖 5C

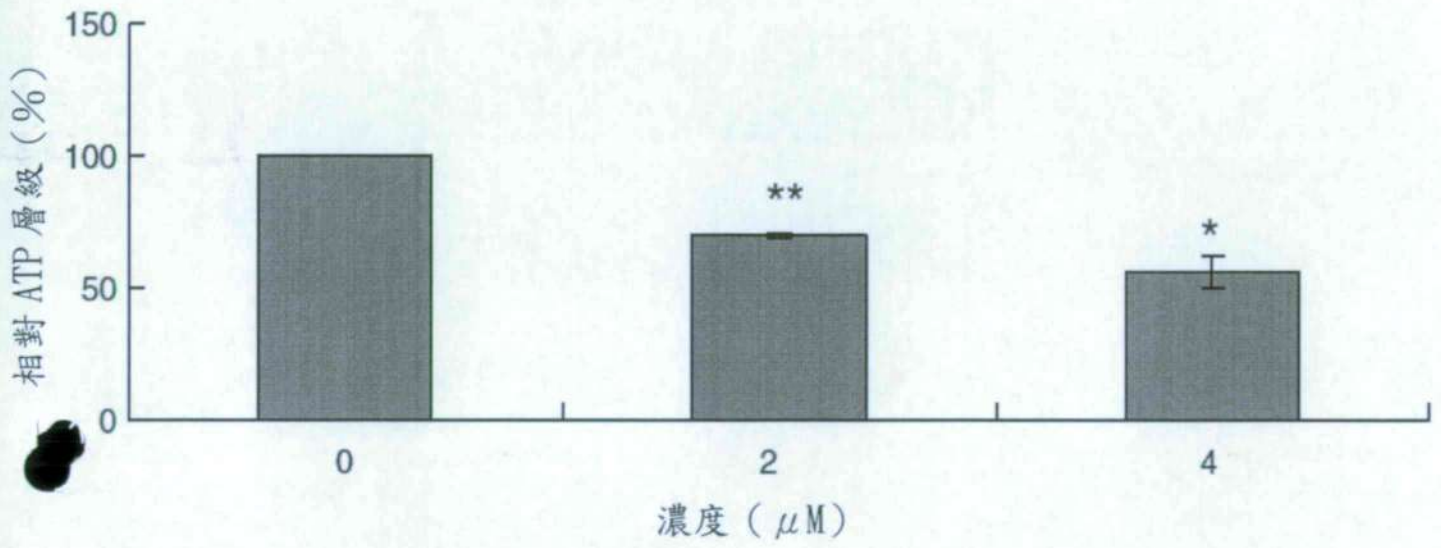


圖 6A

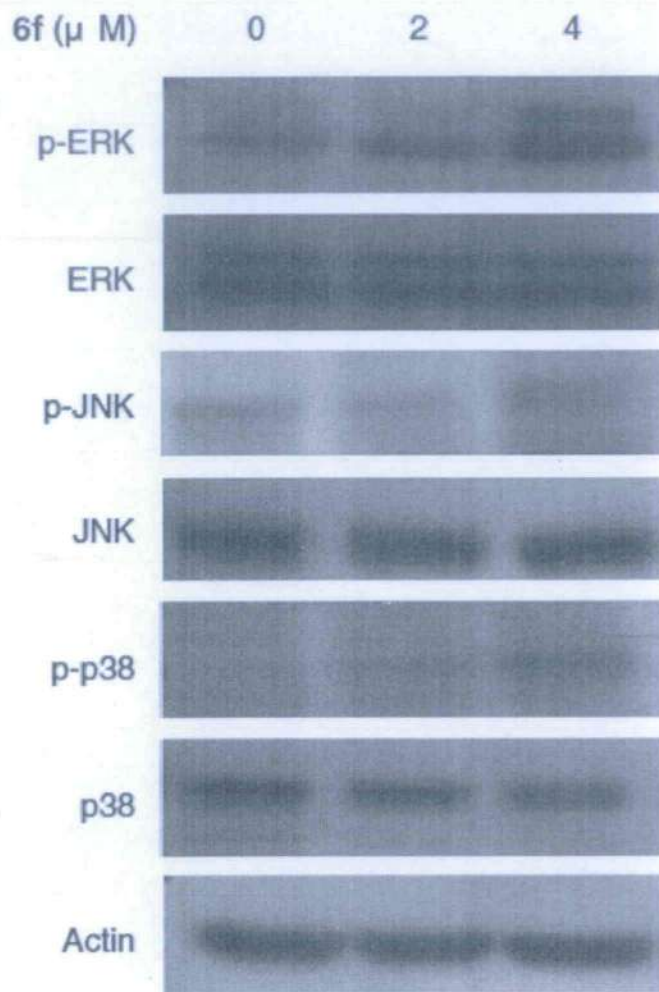


圖 6B

