



(21)申請案號：100115387

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 05 月 02 日

(51)Int. Cl. : A61K31/095 (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：王志鉦 WANG, JEH JENG (TW)；胡婉萍 HU, WAN PING (TW)；駱威勝 LO, WEI SHENG (TW)

(74)代理人：蔡清福

(56)參考文獻：

James R. Schaeffer , Charles T. Goodhue , Hugh A. Risley , Richard E. Stevens Synthesis, stability, and sulfur-elimination reactions of some bis(N-arylimido) disulfides, J. Org. Chem., 1967, 32 (2), pp 392-395 全文

Walter Beerhei, et al. Idenactivation of the Human Papillomavirus-16 E6 Oncoprotein by Organic Disulfides, Bioorganic & Medicinal Chemistry 8 (2000) 2549, 全文

審查人員：任志民

申請專利範圍項數：8 項 圖式數：3 共 0 頁

(54)名稱

雙(苯亞甲基-苯胺)二硫化物之合成與抗癌活性之評估

SYNTHESIS AND ANTITUMOR ACTIVITY OF NOVEL BIS (BENZYLIDENE-BENZENAMINE) DISULFIDES

(57)摘要

本案合成新穎的雙硫二聚體及其製備方法，其係以二個硫代甲醯苯胺在氧化劑、低溫、短時間之作用下，經由分子間耦合反應合成出雙硫二聚體。該雙硫二聚體經實驗證實對癌細胞具有細胞毒殺效果，尤其是人類乳癌細胞 MCF-7。此外，雙硫二聚體並將癌細胞週期停滯於 sub-G1 期並增加 p38 蛋白磷酸化，造成細胞凋亡。雙硫二聚體亦會抑制小鼠黑色素瘤 B16 細胞生長，對人類纖維母細胞並沒有毒殺作用，由小鼠模式亦得到雙硫二聚體化合物可降低小鼠黑色素瘤大小，本發明所製備的化合物將可應用於抗癌及抗腫瘤治療上。

Novel synthetic bis(benzylidene-benzenamine)disulfides and the preparation method are disclosed in the present invention. These compounds are afforded with the oxidizing reagent at low temperature and short time period via intra-molecular coupling reaction. In vitro experiments have been revealed that bis-disulfides are cytotoxic to cancer cells, especially human breast cancer cells MCF-7. Additionally, bis-disulfides arrest the cell cycle at sub-G1 phase and increase p38 phosphorylation to result in apoptosis. Bis-disulfides also inhibit growth of murine melanoma B16 cells but have no cytotoxicity to human fibroblasts. Bis-disulfides also can reduce murine melanoma size in the mouse model. The prepared compounds of the invention would be applicable in anti-cancer and anti-tumor therapies.

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： 100115387

A61K 31/45 (2006.01)

※ 申請日： 100. 5. 02 ※IPC 分類：

A61P 35/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

雙(苯亞甲基-苯胺)二硫化物之合成與抗癌活性之評估

SYNTHESIS AND ANTITUMOR ACTIVITY OF NOVEL

BIS(BENZYLIDENE-BENZENAMINE)DISULFIDES

二、中文發明摘要：

本案合成新穎的雙硫二聚體及其製備方法，其係以二個硫代甲醯苯胺在氧化劑、低溫、短時間之作用下，經由分子間耦合反應合成出雙硫二聚體。該雙硫二聚體經實驗證實對癌細胞具有細胞毒殺效果，尤其是人類乳癌細胞 MCF-7。此外，雙硫二聚體並將癌細胞週期停滯於 sub-G1 期並增加 p38 蛋白磷酸化，造成細胞凋亡。雙硫二聚體亦會抑制小鼠黑色素瘤 B16 細胞生長，對人類纖維母細胞並沒有毒殺作用，由小鼠模式亦得到雙硫二聚體化合物可降低小鼠黑色素瘤大小，本發明所製備的化合物將可應用於抗癌及抗腫瘤治療上。

三、英文發明摘要：

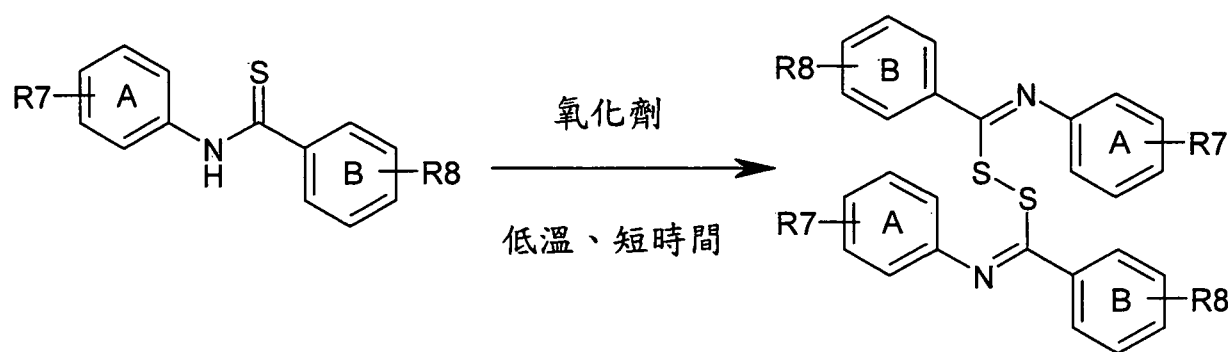
Novel synthetic bis(benzylidene-benzenamine)disulfides and the preparation method are disclosed in the present invention. These compounds are afforded with the oxidizing reagent at low temperature and short time period via intra-molecular coupling reaction. *In vitro* experiments have been revealed that bis-disulfides are cytotoxic to cancer cells, especially human breast cancer cells MCF-7. Additionally, bis-disulfides arrest the cell cycle at sub-G1 phase and increase p38 phosphorylation to result in apoptosis. Bis-disulfides also inhibit growth of murine melanoma B16 cells but have no cytotoxicity to human fibroblasts. Bis-disulfides also can reduce murine melanoma size in the mouse model. The prepared compounds of the invention would be applicable in anti-cancer and anti-tumor therapies.

四、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

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



式 IV

式 III

(反應方程式 1)

R7 為拉電子基團或氫原子，R8 為拉電子基團、推電子基團或氫原子

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本案係關於一種用於抗癌之藥物組合物之合成方法，尤其係關於一種包含雙(苯亞甲基-苯胺)二硫化物之藥物組合物及其合成方法。

【先前技術】

癌症長期以來佔居國人十大死因的第一位，因此，癌症之診斷、治療、追蹤對於國人健康及生命極為重要。在癌症治療上，多以手術治療、放射線治療及化學治療為主。手術治療通常將癌細胞或癌組織連同周圍部份的正常組織及淋巴腺切除，並且依據癌症之特性，輔以放射線治療或化學治療，以控制癌症復發。然而化療藥品及高能量放射線亦將對正常細胞、組織造成傷害，並產生副作用。

而癌症治療藥物可區分為細胞毒殺療法、賀爾蒙療法、標靶療法及癌症輔助療法。癌症輔助療法之藥物用以降低衍生的副作用。而毒殺癌細胞的藥物可包含細胞毒殺療法、賀爾蒙療法及標靶療法，前述的化療藥物即包含這三種療法。

而細胞毒殺療法的藥物類型包括烷基化劑、抗代謝劑、微小管促進劑(例如紫杉醇)、微小管抑制劑(例如長春花生物鹼)、細胞毒殺抗生素、DNA拓撲異構酶抑制劑等。賀爾蒙療法的藥物類型包括影響賀爾蒙作用的賀爾蒙拮抗劑及賀爾蒙促進劑，或是影響賀爾蒙代謝的芳香環轉化酶抑制劑。標靶療法的藥物類型包括血管新生抑制劑、EGFR抑制劑、免疫療法製劑及細胞凋亡促進劑等。前述的抗癌藥物均具有一定療效，但也產生副作用。因此，尋求新穎的抗癌藥物仍是眾多科學家努力不懈的研發項目。

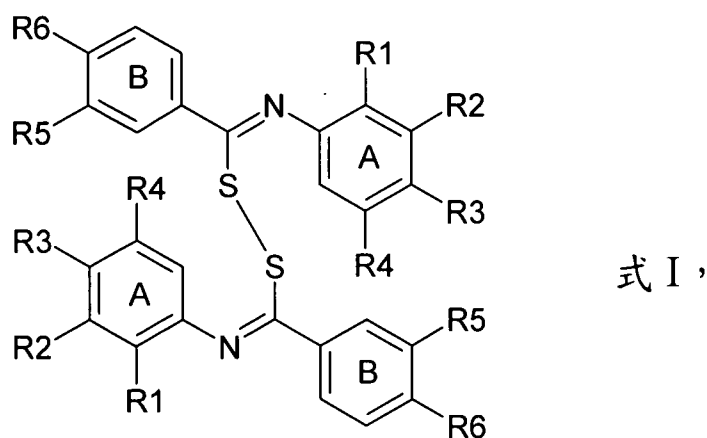
過去，帶有雙硫鍵基團的分子在化學及生物化學上扮演關鍵性角色，例如，Shinkai等人於2000年發表合成多種雙硫化合物，其對人體血漿的膽固醇酯轉型蛋白具有抑制效果(Shinkai et al., 2000)。而Peterson等人提出將胼類化合物與帶有硫氫基的醛類進行縮合反應，合成出具有雙硫鍵的分子，其具有抗癌等生物活性(Peterson et al., 2009)。此外，亦具有利用鹵素及過氧化氫進行硫醇的氧化作用而生成具有雙硫鍵的分子(Ali, 2002; Karami et al., 2005)。

本案申請人鑑於習知技術中的不足，經過悉心試驗與研究，並一本鍥而不捨之精神，終構思出本案，能夠克服先前技術的不足，以下為本案之簡要說明。

【發明內容】

本發明的雙(苯亞甲基-苯胺)二硫化物之製備無須耗費高成本的硫醇原料，並具有自由基反應合成的高反應性、產物較不受三度空間阻障之影響，反應速率快、不嚴苛的反應條件、有機溶劑可與中性物質反應。

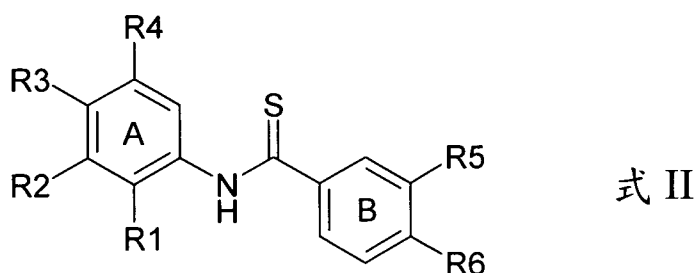
本發明提供一種用於抗癌之藥物組合物，其包含具有下述式 I 之雙(苯亞甲基-苯胺)二硫化物：



其中 A 環之 R1 為氫或烷基($-C_xH_{2x+1}$, $x=1\sim6$), R2 為氫或硝酸根，

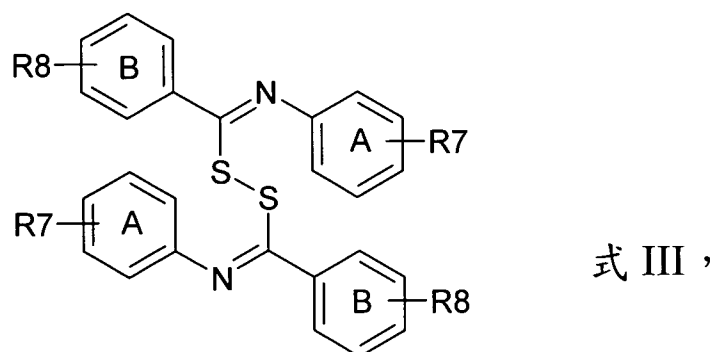
R3 為氫、硝酸根、鹵烷基($-\text{C}_p\text{H}_q\text{X}_r$, $p=1\sim6$, $q+r=2p+1$, p 、 q 、 r 為正整數, X 為氟、氯、溴或碘)、鹵基或烷基($-\text{C}_y\text{H}_{2y+1}$, $y=1\sim6$),
R4 為氫或硝酸根, B 環之 R5 為氫、烷基($-\text{C}_z\text{H}_{2z+1}$, $z=1\sim6$)或烷
氧基($-\text{OC}_n\text{H}_{2n+1}$, $n=1\sim6$), R6 為氫、硝酸根或鹵烷基($-\text{C}_s\text{H}_t\text{X}_u$,
 $s=1\sim6$, $t+u=2s+1$, s 、 t 與 u 為正整數, X 為氟、氯、溴或碘)或
鹵基, 且鹵基為氟、氯、溴或碘。

本發明另提供一種用於抗癌之藥物組合物之製備方法, 包括
步驟: 在氧化劑之作用下, 將二個硫代甲醯苯胺合成為一雙(苯亞
甲基-苯胺)二硫化物, 其中該二個硫代甲醯苯胺中的每一個具有下
列式 II 之結構, 而式 II 的 R1~R6 取代基之種類如前段所述。



根據上述構想, 上述製備方法還包括在該二個硫代甲醯苯胺
之間形成雙硫鍵的步驟。而氧化劑可為 2,3-二氯-5,6-二氫苯醌、硝
酸銨銻、戴斯-馬丁氧化劑或雙(三氟乙醯基)碘苯。

本發明另提供一種用於抗癌之藥物組合物, 其包含具有下列
式 III 之雙(苯亞甲基-苯胺)二硫化物:

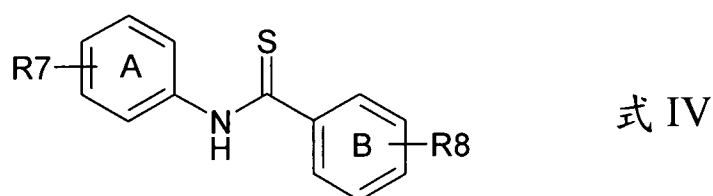


其中 A 環依序鍵結的 4 個碳原子中, 即鄰位、間位、對位及另一
個間位碳原子, 每一個 R7 分別鍵結至 A 環 4 個碳原子之一, 且

每一個 R7 係為第一拉電子基團或氫原子，而 B 環之對位碳原子及間位碳原子分別鍵結一個 R8，且 R8 為第二拉電子基團、推電子基團或氫原子。

而第一拉電子基團為烷基($-C_xH_{2x+1}$ ， $x=1\sim6$)、硝酸根、鹵烷基($-C_aX_{2a+1}$ ， $a=1\sim6$ ，X 為氟、氯、溴或碘)或鹵基，第二拉電子基團為烷基($-C_yH_{2y+1}$ ， $y=1\sim6$)、硝酸根、鹵烷基($-C_bX_{2b+1}$ ， $b=1\sim6$ ，X 為氟、氯、溴或碘)或鹵基，且推電子基團為烷氧基($-OC_nH_{2n+1}$ ， $n=1\sim6$)。

本發明另提供一種用於抗癌之藥物組合物之製備方法，包括步驟：在氧化劑之作用下，將二個硫代甲醯苯胺合成為一雙(苯亞甲基-苯胺)二硫化物，其中該二個硫代甲醯苯胺中的每一個具有下列式 IV 之結構，而式 IV 的 R7 及 R8 取代基之種類，包括拉電子基團及推電子基團，如前所述。該製備方法所使用的氧化劑可溶在二氯甲烷、甲醇或乙腈等溶液。



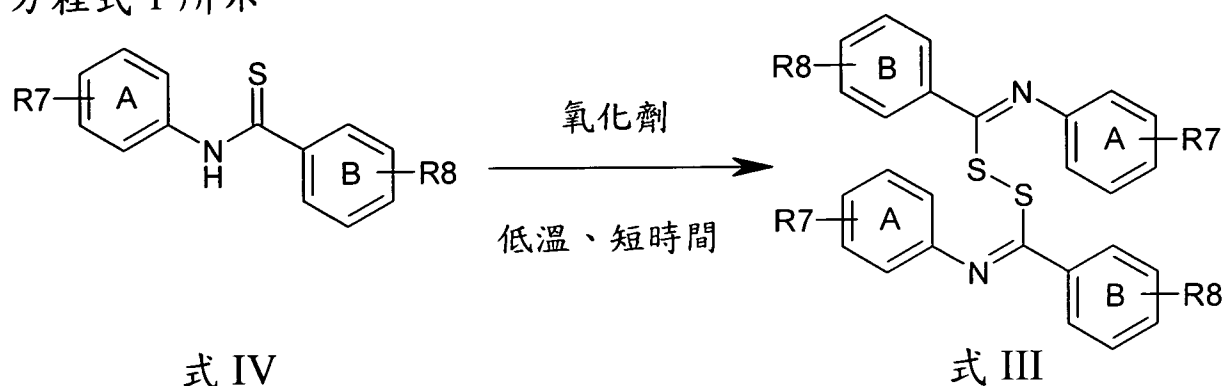
【實施方式】

本案所提出之發明將可由以下的實施例說明而得到充分瞭解，使得熟習本技藝之人士可以據以完成之，然而本案之實施並非可由下列實施例而被限制其實施型態，熟習本技藝之人士仍可依據除既揭露之實施例的精神推演出其他實施例，該等實施例皆當屬於本發明之範圍。

實驗一、製備雙(苯亞甲基-苯胺)二硫化物

本發明之精神在於將二個硫代甲醯苯胺(式 IV)在氧化劑之作

用下，經由分子間耦合反應合成具有雙硫鍵之雙(苯亞甲基-苯胺)二硫化物(簡稱雙硫二聚體，式 III)，前述分子間耦合反應如反應方程式 1 所示。



(反應方程式 1)

每一個 R7 分別鍵結至 A 環之 4 個彼此相鄰的碳原子，意即每一個 R7 依序鍵結至 A 環的鄰位碳原子、間位碳原子、對位碳原子及另一個間位碳原子上，而且每一個 R7 可為拉電子基團或氫原子。而每一個 R8 分別鍵結至 B 環的對位碳原子及間位碳原子上，而且每一個 R8 可為拉電子基團、推電子基團或氫原子。

而本發明之氧化劑可為 2,3-二氯-5,6-二氫苯醌 (2,3-dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone, 簡稱 DDQ)、硝酸銨銻 (cerium(IV) ammonium nitrate, 簡稱 CAN)、戴斯-馬丁氧化劑 (Dess-Martin periodinane, 簡稱 DMP)、雙(三氟乙醯基)碘苯 (phenyliodine(III) bis(trifluoroacetate), 簡稱 PIFA) 或鐵氰化鉀 (potassium ferricyanide, $K_3Fe(CN)_6$)，這些氧化劑依其性質可溶於二氯甲烷、甲醇或乙腈。

本發明之分子間耦合反應在低溫下 0 至 30°C 且於短時間(20 至 120 分鐘)內反應完成。本發明的一個最佳實施例是於 0 至 28°C 及 20 分鐘內完成反應。

請參閱表 1，其為硫代甲醯苯胺以不同氧化劑而形成硫-硫鍵結的最佳化條件。該硫代甲醯苯胺的 B 環具有對位-硝酸根(4-NO₂)

及鄰位-甲基(3-CH₃)，在 1.2 當量的氧化劑 DDQ 溶於 0°C 之二氯甲烷，並於溫度 0 至 28°C 及反應時間 20 分鐘的條件下，可獲得產率 88% 之化合物 1，但並未產生副產物(表 1 之試驗 1)。然而，若 DDQ 溶於甲醇且其他實驗參數相同的條件下，獲得產率 62% 之化合物 1 以及產生產率 31% 之分子內環化副產物(式 VI)(表 1 之試驗 2)。

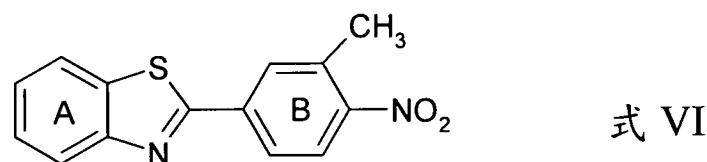


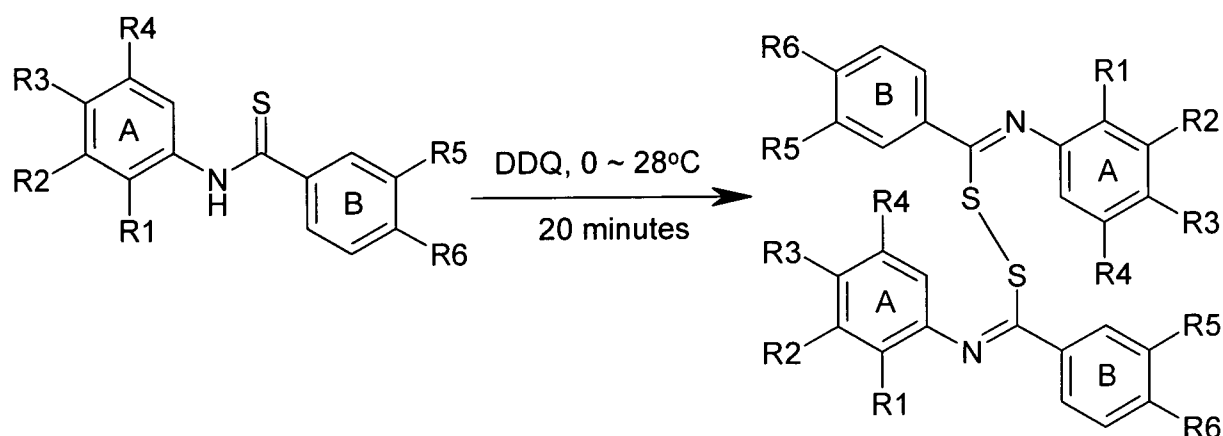
表 1、以不同氧化劑形成硫-硫鍵結的最佳化條件

試驗	試劑	試劑 當量	溶劑	溫度(°C)	時間 (分)	化合物 1 產率(%)	式 VI 副產物 產率(%)
1	DDQ	1.2	二氯甲烷	0~28	20	88	0
2	DDQ	1.2	甲醇	0~28	20	62	31
3	CAN	4.2	乙腈	0	30	43	55
4	CAN	4.2	甲醇	0	30	57	33
5	DMP	1.2	二氯甲烷	0	40	42	46
6	DMP	2.2	甲醇	0	30	12	54
7	PIFA	1.2	二氯甲烷	28	30	17	58
8	PIFA	2.2	乙腈	0	90	14	64
9	K ₃ Fe(CN) ₆	4	乙腈	0	120	0	72
10	K ₃ Fe(CN) ₆	4	乙醇	迴流	90	0	0

請繼續參閱表 1，若將 4.2 當量之 CAN 溶於 0°C 之乙腈並與硫代甲醯苯胺反應 30 分鐘時，則化合物 1 之產率與式 VI 副產物之比率為 1:1 (表 1 之試驗 3)，然而若反應在甲醇中進行，則獲得產率 57% 之化合物 1 及產率 33% 之式 VI 副產物(表 1 之試驗 4)。若以高價碘試劑 DMP 或 PIFA 作為氧化劑，式 VI 副產物的產率高於化合物 1 的產率而成為主要產物(表 1 之試驗 5~8)。若將 4 當量之 K₃Fe(CN)₆ 溶於 0°C 之乙腈時並與硫代甲醯苯胺反應 2 小時，式 VI 副產物之產率為 72%，但未獲得化合物 1 (表 1 之試驗 9)。此外，以 K₃Fe(CN)₆ 進行實驗且增加溶劑(乙醇)之極性及反應溫度並無法

進行反應，而回復為起始材料(表 1 之試驗 10)。

接著，以化合物 1 的最佳條件為基礎，設計及合成在 A 環及 B 環具有不同取代基之雙硫二聚體。如同前述，將 A 環的每一個 R7 指定為拉電子基團或氫原子，而 B 環的對位碳原子及間位碳原子則鍵結可為拉電子基團、推電子基團或氫原子的 R8 取代基。為了說明方便，將反應方程式 1 改寫為反應方程式 2，其中，A 環的 R7 以 R1、R2、R3 及 R4 取代基分別表示鄰位、間位、對位及另一個間位取代基，而 B 環的 R8 以 R5 及 R6 取代基分別表示間位及對位取代基。



式 II

式 I

(反應方程式 2)

請參閱表 2，為本發明以氧化劑 DDQ 進行合成之化合物 1~24。在表 2 中，化合物 1 的 A 環僅鍵結氫原子而未鍵結其他取代基，B 環的 R5 取代基則選擇硝酸根(-NO₂)作為強拉電子基團。化合物 2 及 3 的 A 環的 R3 取代基以硝酸根為強拉電子基團，且 B 環的 R5 取代基為甲氧基(-OCH₃)，化合物 2 及 3 之產率亦相當高(74%)。化合物 4~7 的 A 環的 R3 取代基則設計為相對弱之拉電子基團(氯(-Cl)或三氟甲基(-CF₃))，而 B 環的 R6 取代基為強拉電子基團(-NO₂)，化合物 4~7 亦具有相當高之產率(74~82%)。在化合物 8~15，其 A 環的 R3 對位取代基設計為拉電子的硝酸根，而

B 環的 R6 對位取代基設計為較弱的拉電子鹵基或三氟甲基，其產率則介於 71~83%。至於化合物 16~24，其 A 環的 R2 間位或 R4 間位取代基為強拉電子基團(-NO₂)且 R3 對位取代基為弱拉電子基團(例如氯、氟或甲基)，B 環的 R6 取代基為較弱的拉電子鹵基或三氟甲基，化合物 16~24 仍具有相當高的產率(72~86%)。

表 2、本發明以氧化劑 DDQ 進行合成之化合物 1~24

化合物	R1	R2	R3	R4	R5	R6	產率(%)
1	H	H	H	H	CH ₃	NO ₂	88
2	H	H	NO ₂	H	OCH ₃	H	74
3	CH ₃	H	NO ₂	H	OCH ₃	H	74
4	H	H	CF ₃	H	H	NO ₂	76
5	H	H	Cl	H	H	NO ₂	74
6	H	H	CF ₃	H	CH ₃	NO ₂	82
7	H	H	Cl	H	CH ₃	NO ₂	77
8	H	H	NO ₂	H	H	CF ₃	75
9	H	H	NO ₂	H	H	F	76
10	H	H	NO ₂	H	H	Cl	72
11	H	H	NO ₂	H	H	Br	72
12	CH ₃	H	NO ₂	H	H	CF ₃	81
13	CH ₃	H	NO ₂	H	H	F	79
14	CH ₃	H	NO ₂	H	H	Cl	83
15	CH ₃	H	NO ₂	H	H	Br	71
16	H	NO ₂	Cl	H	H	CF ₃	72
17	H	NO ₂	CH ₃	H	H	CF ₃	72
18	CH ₃	NO ₂	H	H	H	F	83
19	CH ₃	NO ₂	H	H	H	Cl	74
20	CH ₃	H	H	NO ₂	H	CF ₃	86
21	CH ₃	H	H	NO ₂	H	F	84
22	CH ₃	H	H	NO ₂	H	Cl	81

23	H	NO ₂	F	H	H	CF ₃	78
24	CH ₃	NO ₂	H	H	H	CF ₃	82

當雙硫二聚體的 A 環不具有其他取代基且 B 環具有拉電子基團時，其產率為 76%。因此，A 環及 B 環上之取代基在雙硫鍵的形成上扮演重要角色。

本發明的雙硫二聚體是以反應方程式 1 為架構進行合成，而反應方程式 2 為反應方程式 1 更細部之合成架構，表 1 所示之取代基為最佳實施例。然而，經過多次實驗證實，A 環及 B 環的烷基、鹵烷基、烷氧基之碳數可為 1 個或多個，碳數較佳地為 6 或 6 以內，其均可被成功地合成出本發明的雙硫二聚體。

實驗二、化合物對癌細胞之細胞毒殺作用

為了證實本發明之雙(苯亞甲基-苯胺)二硫化物對不同癌細胞具有細胞毒殺作用，其以本領域的技術人員所熟知的 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 呈色試驗法進行，在此不再詳述。請參閱表 3，在化合物 1~24 中選擇化合物 12 進行毒殺癌細胞實驗，由表 3 可知化合物 12 抑制 50% 癌細胞生長(GI₅₀)的平均值為 0.372 μM，其表示化合物 12 具有可作為具有高度抗癌潛力的藥物或試劑，以抑制多種癌細胞株之生長。

表 3、化合物 12 在試管內對癌細胞株之細胞毒殺作用

細胞株	GI ₅₀ (μM)	細胞株	GI ₅₀ (μM)
非小細胞肺癌		黑色素瘤	
HOP-92	0.175	LOX MVI	0.304
NCI-H226	0.427	MALME-3M	0.252
大腸癌		SK-MEL-5	0.262
HCT-15	0.388	卵巢癌	
中樞神經系統癌症		IGROV1	0.217

SNB-75	0.141	乳癌		
			T-47D	0.221
			總平均	0.372

而本發明的雙硫二聚體所對抗之癌症及腫瘤並非只限於表 3，本領域的技術人員有動機將雙硫二聚體實施於罹有肉瘤、血癌、胃癌、淋巴瘤、皮膚癌、睪丸癌、胃癌、胰臟癌、膀胱結腸直腸癌、頭頸部癌、腦癌、食道癌、膀胱癌、腎上腺皮質癌、肺癌、支氣管癌、子宮內膜癌、鼻咽癌、子宮頸癌、肝臟癌及原發部位不明之癌症等癌症或腫瘤之對象或前述癌症或腫瘤之細胞，對象可為人體或動物。

接著，進一步分析多種化合物對不同細胞株的胞外細胞毒殺作用，其亦是以 MTT 呈色試驗法進行。請參閱表 4，各種化合物對所列舉的癌細胞均具有程度不一的抑制效果，表示本發明所製備的雙硫二聚體可應用於抑制癌細胞之生長，對癌細胞具有細胞毒殺效果。當乳癌細胞 MCF-7 與其他癌細胞比較時，大部分所列舉的化合物對 MCF-7 細胞具有較高的抑制活性。因此，在往後實驗中選擇乳癌細胞 MCF-7 作為研究對象。

此外，為了瞭解所製備的雙硫二聚體對正常細胞及鼠類動物細胞是否具有細胞毒殺效果，則選擇人類皮膚纖維母細胞及鼠類黑色素瘤 B16 細胞作為研究對象，並以 MTT 呈色試驗法進行實驗。首先，在 96 孔盤的每一個孔洞植入 2500 個纖維母細胞或是 B16 細胞，並培養隔夜直到細胞貼附孔洞底部。再加入 10 μ M 的各種化合物至細胞培養液並培養 48 小時，最後加入 MTT 試劑並偵測吸收值。每種化合物進行三重複實驗。

請參閱第 1 圖，其為本發明之各種化合物對人類皮膚纖維母細胞及 B16 細胞之生長抑制之示意圖。在第 1 圖可得知各種所製

備的化合物並未顯著地造成人類正常纖維母細胞的細胞凋亡，但顯著地對鼠類黑色素瘤 B16 細胞造成細胞凋亡，例如化合物 23 及 24。

實驗三、化合物對細胞週期之影響

本實驗係以化合物處理癌細胞，再以本領域的技術人員所熟知的流式細胞技術分析乳癌細胞 MCF-7 的細胞週期。首先以 5 μ M 所製備的化合物處理乳癌細胞 MCF-7，24 小時後以碘化丙啶染色細胞，並以流式細胞儀分析每個樣本中的 10000 個細胞。結果發現，所製備的化合物 4、5、7、18、21、23 及 24 導致 MCF-7 細胞具有亞二倍體 DNA 含量，其表明 MCF-7 停滯於 sub-G1 週期，而化合物 4、5、7、18、21、23 及 24 的 sub-G1 DNA 波峰高度依序為 20.64%、17.92%、26.22%、11.95%、19.85%、4.35%及 33.89% (結果未示出)，而未以藥物處理的控制組的 sub-G1 DNA 波峰高度為 11.54%。

實驗四、與細胞凋亡相關之蛋白表現

本實驗選擇 p38 MAPK 路徑的 p38 蛋白作為細胞凋亡之指標，並以本領域的技術人員所熟知的西方點漬法檢測 p38 磷酸化蛋白之表現。其係以化合物 24 處理 MCF-7 細胞後，收集細胞蛋白，並經電泳解析、西方點漬法分析。請參閱第 2 圖，p38 蛋白的磷酸化程度與化合物 24 濃度成正比，化合物 24 劑量越高，磷酸化 p38 蛋白表現也越高，MCF-7 細胞凋亡程度越高。合併前述實驗結果，化合物 24 及其他化合物均可促進癌細胞之細胞凋亡。

實驗五、化合物對小鼠體內腫瘤的抗癌活性

首先，將 5×10^6 個黑色素瘤 B16 細胞皮下注射至 7~9 周齡、19~21 克重之雌性 C57BL/6 小鼠，以皮下注射腫瘤細胞將導致腫瘤在注射處生成。當腫瘤達到 4 mm \times 4 mm 時，將小鼠進行分組，

每一組具有 4 隻小鼠。施打所製備的化合物 24 於小鼠腳底或不注射化合物(控制組)後，每 2 天以卡尺量測腫瘤體積，且腫瘤體積以下列公式 I 計算：

$$\text{腫瘤體積} = 1/2 \times \text{長度} \times \text{寬度}^2 \quad (\text{公式 I})$$

請參閱第 3 圖，控制組小鼠的腫瘤尺寸顯著地隨著時間增加而增加，然而注射 4 mg/kg 之化合物 24 將顯著地抑制腫瘤尺寸的增加，注射 2 mg/kg 之化合物 24 並未使腫瘤尺寸顯著增加。

綜上所述，本發明合成出利用氧化劑(例如 DDQ)合成出具有高產率及雙硫鍵之雙硫二聚體，所製備的雙硫二聚體已證實可抑制癌細胞生長、促進細胞凋亡，更可被實施於動物模式的治癒癌症上。此外，本發明亦可應用於其他不同的硫代取代基分子及多種類似物的雙硫鍵生成方法。

本發明實屬難能的創新發明，深具產業價值，援依法提出申請。此外，本發明可以由本領域技術人員做任何修改，但不脫離如所附申請專利範圍所要保護的範圍。

【圖式簡單說明】

第 1 圖為本發明之各種化合物對人類皮膚纖維母細胞及 B16 細胞之生長抑制之示意圖。

第 2 圖為本發明之不同濃度化合物 24 對乳癌細胞 MCF-7 之磷酸化 p38 蛋白表現之影響。

第 3 圖為以本發明之化合物 24 抑制被注射 B16 細胞之 C57BL/6 小鼠體內之腫瘤生長，其腫瘤尺寸與時間關係圖。

【主要元件符號說明】

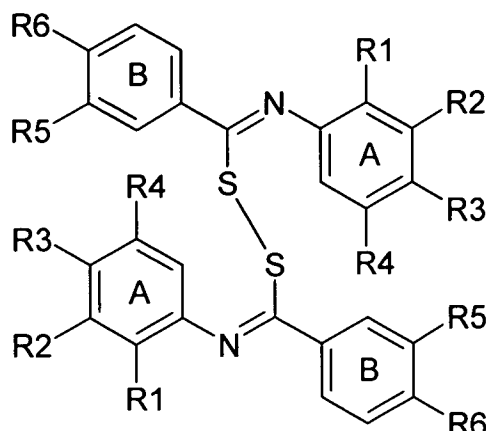
無

表 4、化合物抑制細胞之細胞存活率

細胞株	化合物(10 μM)之存活率(%)									
	1	4	5	7	17	18	21	23	24	
黑色素瘤										
A2058		92.6±0.05	97.5±0.02	99.6±0.02		95.9±0.02	76.3±0.15	93.2±0.04	34.9±0.42	
A375	90.3±0.05	84.6±0.08	79.4±0.11	92.4±0.04	103.2±0.02	91.5±0.04	81.1±0.10	94.3±0.03	59.5±0.22	
腎癌										
293T	76.5±0.19	64.6±0.28	70.9±0.24	71.2±0.23	75.3±0.21	71.1±0.23	32.8±0.52	57.8±0.33	24.2±0.59	
肺癌										
H1335	69.8±0.13	66.0±0.14	75.8±0.10	67.4±0.13	81.4±0.08	70.0±0.13	80.6±0.08	80.2±0.08	26.0±0.32	
A549	71.5±0.09	65.4±0.11	82.4±0.06	78.7±0.07	76.9±0.07	75.5±0.08	62.1±0.12	64.4±0.12	53.4±0.15	
乳癌										
MCF-7		59.6±0.28	54.3±0.32	51.7±0.34		33.1±0.47	13.8±0.60	57.1±0.30	8.6±0.64	
口腔癌										
Cal-27	100.9±0.09	102.5±0.06	100.1±0.07	101.7±0.09	107.1±0.08	94.9±0.07	76.6±0.20	92.4±0.16	73.5±0.22	
Ca-922	80.8±0.08	80.1±0.08	79.4±0.08	96.2±0.02	82.1±0.07	79.4±0.09	66.7±0.13	65.8±0.14	45.5±0.22	

七、申請專利範圍：

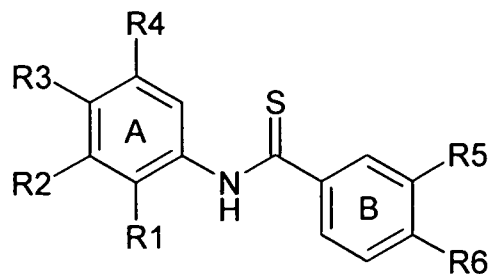
- 1.一種用於抗癌之藥物組合物，其包含具有下列式 I 之雙(苯亞甲基-苯胺)二硫化物：



式 I，

其中 A 環之 R1 係為一第一氫及一第一烷基($-C_xH_{2x+1}$, $x=1\sim6$)其中之一，R2 係為一第二氫及一第一硝酸根其中之一，R3 係選自由一第三氫、一第二硝酸根、一第一鹵烷基($-C_pH_qX_r$, $p=1\sim6$, $q+r=2p+1$, p 、 q 、 r 為整數，X 係選自由氟、氯、溴與碘所組成的群組其中之一)、一第一鹵基與一第二烷基($-C_yH_{2y+1}$, $y=1\sim6$)所組成的群組其中之一，R4 係為一第四氫及一第三硝酸根其中之一，B 環之 R5 係為一第五氫、一第三烷基($-C_zH_{2z+1}$, $z=1\sim6$)及一烷氧基($-OC_nH_{2n+1}$, $n=1\sim6$)其中之一，R6 係為一第六氫、一第四硝酸根、一第二鹵烷基($-C_sH_tX_u$, $s=1\sim6$, $t+u=2s+1$, s 、 t 與 u 為整數，X 係選自由氟、氯、溴與碘所組成的群組其中之一)與一第二鹵基所組成的群組其中之一，該第一及該第二鹵基係選自由氟、氯、溴與碘所組成的群組其中之一，且個別的 R1 至 R6 並非同時為該第一氫、該第二氫、該第三氫、該第四氫、該第五氫及該第六氫。

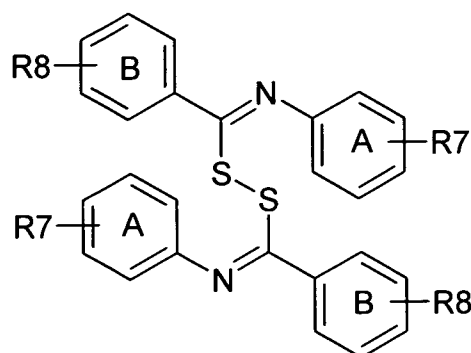
- 2.一種用於抗癌之藥物組合物之製備方法，包括步驟：在一氧化劑之作用下，將二個硫代甲醯苯胺合成為一雙(苯亞甲基-苯胺)二硫化物，其中各該硫代甲醯苯胺具有下列式 II 之結構：



式 II,

其中 A 環之 R1 係為一第一氫及一第一烷基($-C_xH_{2x+1}$, $x=1\sim6$)其中之一, R2 係為一第二氫及一第一硝酸根其中之一, R3 係選自由一第三氫、一第二硝酸根、一第一鹵烷基($-C_pH_qX_r$, $p=1\sim6$, $q+r=2p+1$, p 、 q 與 r 為整數, X 係選自由氟、氯、溴與碘所組成的群組其中之一)、一第一鹵基與一第二烷基($-C_yH_{2y+1}$, $y=1\sim6$)所組成的群組其中之一, R4 係為一第四氫及一第三硝酸根其中之一, B 環之 R5 係為一第五氫、一第三烷基($-C_zH_{2z+1}$, $z=1\sim6$)及一烷氧基($-OC_nH_{2n+1}$, $n=1\sim6$)所組成的群組其中之一, R6 係為一第六氫、一第四硝酸根、一第二鹵烷基($-C_sH_tX_u$, $s=1\sim6$, $t+u=2s+1$, s 、 t 與 u 為整數, X 係選自由氟、氯、溴與碘所組成的群組其中之一)與一第二鹵基所組成的群組其中之一, 該第一及該第二鹵基係選自由氟、氯、溴與碘所組成的群組其中之一, 且個別的 R1 至 R6 並非同時為該第一氫、該第二氫、該第三氫、該第四氫、該第五氫及該第六氫。

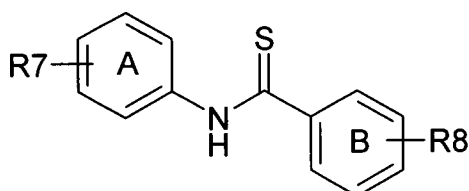
- 3.如申請專利範圍第 1 項所述之製備方法, 還包括步驟: 於該二個硫代甲醯苯胺之間形成一雙硫鍵。
- 4.如申請專利範圍第 2 項所述之製備方法, 其中該氧化劑係選自由一 2,3-二氯-5,6-二氫苯醌、一硝酸銨銻、一戴斯-馬丁氧化劑及一雙(三氟乙醯基)碘苯所組成的群組其中之一。
- 5.一種用於抗癌之藥物組合物, 其包含具有下列式 III 之雙(苯亞甲基-苯胺)二硫化物:



式 III,

其中 A 環依序鍵結的 4 個碳原子中，每一個 R7 分別鍵結至該 A 環 4 個碳原子之一，且各該 R7 係為一第一拉電子基團及一第一氫原子其中之一，而 B 環之一對位碳原子及一間位碳原子分別鍵結一個 R8，且該 R8 係選自由一第二拉電子基團、一推電子基團及一第二氫原子，各該 R7 及各該 R8 並非同時為該第一氫原子及該第二氫原子，該第一拉電子基團係選自由一第一烷基 ($-\text{C}_x\text{H}_{2x+1}$, $x=1\sim6$)、一第一亞硝酸根、一第一鹵烷基 ($-\text{C}_a\text{X}_{2a+1}$, $a=1\sim6$, X 係選自由氟、氯、溴與碘所組成的群組其中之一)與一第一鹵基所組成的群組其中之一，該第二拉電子基團係選自由一第二烷基 ($-\text{C}_y\text{H}_{2y+1}$, $y=1\sim6$)、一第二亞硝酸根、一第二鹵烷基 ($-\text{C}_b\text{X}_{2b+1}$, $b=1\sim6$, X 係選自由氟、氯、溴與碘所組成的群組其中之一)與第二鹵基所組成的群組其中之一，且該推電子基團係為一烷氧基 ($-\text{OC}_n\text{H}_{2n+1}$, $n=1\sim6$)。

6. 一種用於抗癌之藥物組合物之製備方法，包括步驟：在一氧化劑之作用下，將二個硫代甲醯苯胺合成為一雙(苯亞甲基-苯胺)二硫化物，其中各該硫代甲醯苯胺具有下列式 IV 之結構：



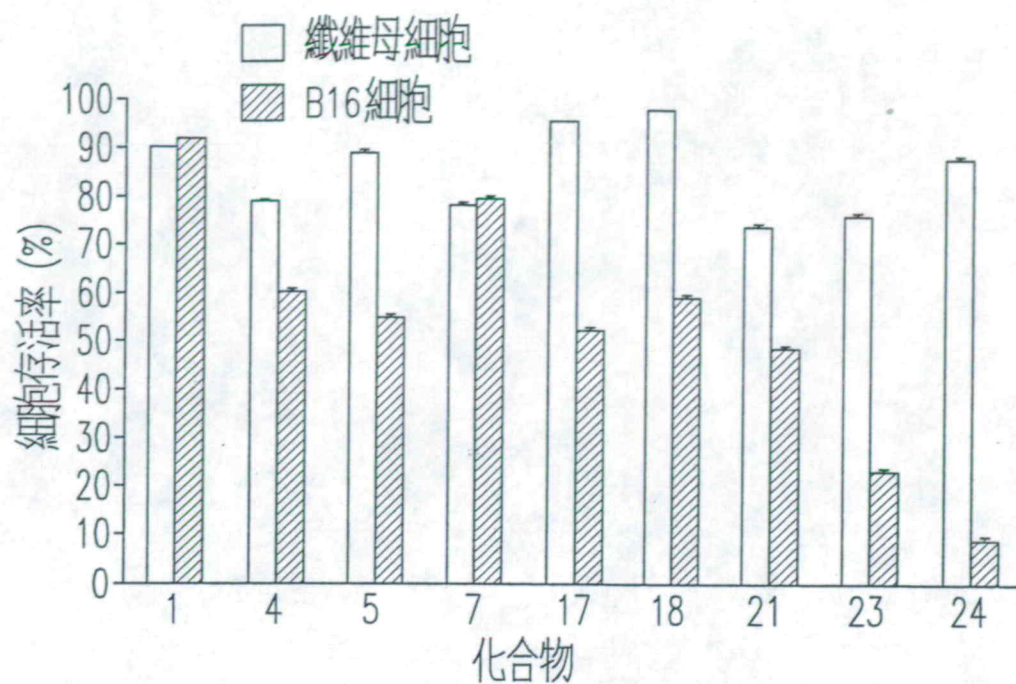
式 IV,

其中 A 環依序鍵結的 4 個碳原子中，每一個 R7 分別鍵結至該 A 環 4 個碳原子之一，且各該 R7 係為一第一拉電子基團及一第一

氫原子其中之一，而 B 環之一對位碳原子及一間位碳原子分別鍵結一個 R8，且該 R8 係選自由一第二拉電子基團、一推電子基團及一第二氫原子，各該 R7 及各該 R8 並非同時為該第一氫原子及該第二氫原子，該第一拉電子基團係選自由一第一烷基($-\text{C}_x\text{H}_{2x+1}$, $x=1\sim6$)、一第一亞硝酸根、一第一鹵烷基($-\text{C}_a\text{X}_{2a+1}$, $a=1\sim6$, X 係選自由氟、氯、溴與碘所組成的群組其中之一)與一第一鹵基所組成的群組其中之一，該第二拉電子基團係選自由一第二烷基($-\text{C}_y\text{H}_{2y+1}$, $y=1\sim6$)、一第二亞硝酸根、一第二鹵烷基($-\text{C}_b\text{X}_{2b+1}$, $b=1\sim6$, X 係選自由氟、氯、溴與碘所組成的群組其中之一)與一第二鹵基所組成的群組其中之一，且該推電子基團係為一烷氧基($-\text{OC}_n\text{H}_{2n+1}$, $n=1\sim6$)。

- 7.如申請專利範圍第 6 項所述之製備方法，其中該氧化劑係選自由一 2,3-二氯-5,6-二氫苯醌、一硝酸銨銻、一戴斯-馬丁氧化劑及一雙(三氟乙醯基)碘苯所組成的群組其中之一。
- 8.如申請專利範圍第 6 項所述之製備方法，其中該氧化劑溶於一溶劑中，且該溶劑係選自由一二氯甲烷、一甲醇與一乙腈所組成的群組其中之一。

八、圖式：



第 1 圖

化合物 24 (μ M)

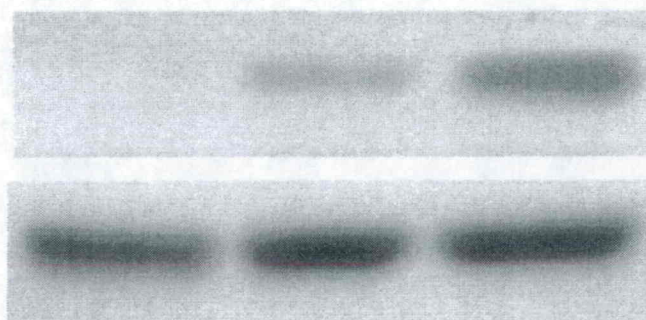
0

1

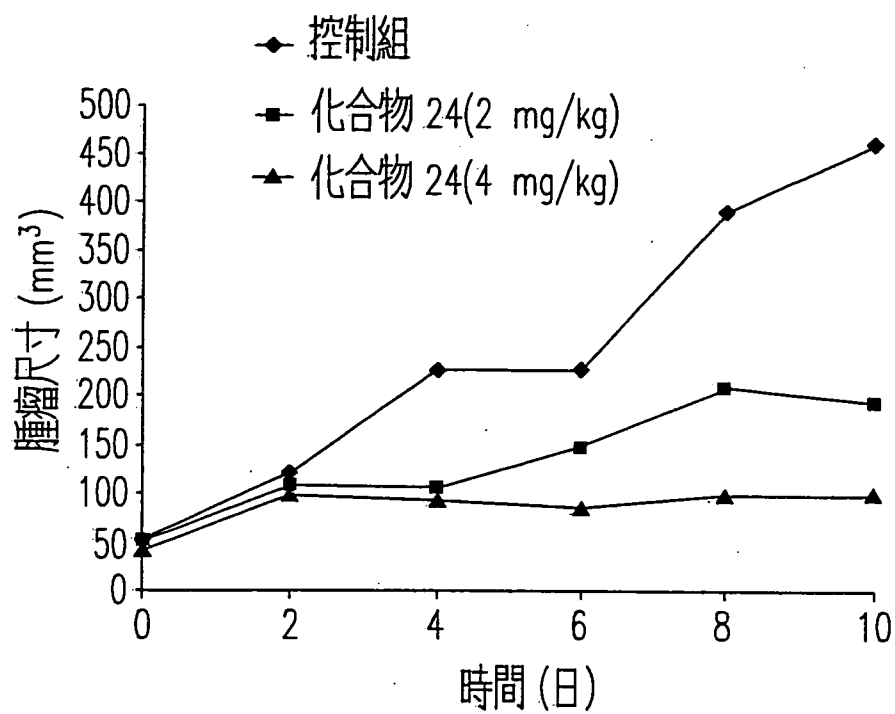
10

p-p38

Actin



第 2 圖



第3圖