公告本
A4
C4

申請日期	88.5.27
案號	88108925
類別	C07D 209/44, 403/06, A61K 31/40, 31/535

（以上各欄由本局填註）

發明 ~~新型~~ 專利說明書

一、發明 ~~新型~~ 名稱	中文	經吡咯取代之2-吲哚啉酮蛋白質激酶抑制劑
	英文	"PYRROLE SUBSTITUTED 2-INDOLINONE PROTEIN KINASE INHIBITORS"
二、發明 ~~創作~~ 人	姓名	1.潘秋堂 2.李桑 3.吉拉德 麥克瑪洪
	國籍	1.3.美國　　2.中國
	住、居所	1.美國加州摩洛高市卡米諾里卡多路827號 2.美國加州佛斯特市拉克巴伯巷64號 3.美國加州肯伍市郵政信箱807號
三、申請人	姓名（名稱）	美商莎郡公司
	國籍	美國
	住、居所（事務所）	美國加州南舊金山市東葛蘭大道230號
	代表人姓名	史帝芬·伊瓦司-弗瑞克

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

裝 訂 線

（由本局填寫）

承辦人代碼：	
大　　類：	
ＩＰＣ分類：	

A6
B6

本案已向：

國（地區）	申請專利，申請日期：	案號：	，□有　□無主張優先權
美國	1998年05月29日	60/087,310	☑有 □無主張優先權
美國	1999年01月15日	60/116,106	☑有 □無主張優先權

有關微生物已寄存於：　　，寄存日期：　　，寄存號碼：

（請先閱背面之注意事項再填寫本頁各欄）

裝　訂　線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 1 ）

相關申請案

本申請案與美國歷時專利申請案序號60/087,310(1998年5月29日申請)及美國臨時專利申請案序號60/116,106(1999年1月15日申請)有關且優先於此等臨時專利申請案申請專利權，此等臨時專利申請案已完全以提及之方式併入本文中。

緒言

本發明一般而言係有關有機化學、生化學、藥學及醫學。更特定言之，其係有關新穎之經吡咯取代2-吲哚啉酮化合物，及其生理上可接受之鹽與前藥，其可調控蛋白質激酶("PKs")活性，因此應對與PK活性異常有關之病變具有有利效果。

發明背景

下文僅供說明背景，不應視爲本發明之先前技藝。

PKs爲催化蛋白質之酪胺酸、絲胺酸、與蘇胺酸殘基上羥基之磷酸化之酵素。此看似簡單活性之結果其實錯綜複雜；細胞生長、分化及增殖，亦即細胞生命之實質上各方面均以某種方式依賴PK活性。此外，PK活性異常與病變之宿主亦有關，此等病變範圍由相當不威脅生命之疾病如：牛皮癬至極端惡性之疾病(如：神經膠質母細胞瘤)(腦癌)等。

PKs很容易分解成二種，蛋白質酪胺酸激酶(PTKs)及絲胺酸-蘇胺酸激酶(STKs)。

PTK活性之一項主要作用爲其涉及生長因子受體。生長因

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（2）

子受體為細胞表面蛋白質。生長因子受體當與生長因子配位體結合時，會轉化成活性型，與細胞膜之內表面上蛋白質交互作用。其結果造成受體及其他蛋白質之酪胺酸殘基上進行磷酸化，而在細胞內與許多種細胞質訊號分子形成複合物，進而影響許多不同細胞反應如：細胞分裂（增殖）、細胞分化、細胞生長、表現在細胞外微環境之代謝效果，等等。為了更完整討論，可參見史雷辛格(Schlessinger)與烏力奇(Ullrich)之Neuron, 9:303-391 (1992)，該文獻包括其中任何圖示宛如完全示於本文中，係以提及之方式併入本文。

已知具PTK活性之生長因子受體為受體酪胺酸激酶("RTKs")。其包含具有不同生物活性之穿膜受體大族群。目前至少鑑定出19種不同之RTKs副族群。其中一項實例為稱為"HER" RTKs之副族群，其包括EGFR(表皮生長因子受體)、HER2、HER3及HER4。這些RTKs由細胞外糖化配位體結合區、穿膜區及細胞內細胞質催化區組成，可使蛋白質上酪胺酸殘基磷酸化。

另一種RTK副族群由胰島素受體(IR)、似胰島素生長因子I受體(IGF-1R)及與胰島素受體相關之受體(IRR)組成。IR及IGF-1R會與胰島素、IGF-I及IGF-II交互作用，形成含二個完全細胞外之糖化α-副單位及二個β副單位之雜四聚體，其穿透細胞膜且包含酪胺酸激酶區。

第三種RTK副族群稱為血小板衍生之生長因子受體("PDGFR")族群，其包括PDGFRα、PDGFRβ、CSFIR，c-

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 3 ）

kit與c-fms。此等受體由包含不同數量似免疫球蛋白之環形之糖化細胞外區與細胞內區組成，其中酪胺酸激酶區中穿插不相關之胺基酸序列。

另一種由於其類似PDGFR副族群，因此有時候涵括在PDGFR副族群中，其係胎肝激酶("flk")受體副族群。咸信此族群由激酶嵌插區-受體胎肝激酶-1(KDR/FLK-1)、flk-1R、flk-4及似fms酪胺酸激酶-1(flt-1)組成。

酪胺酸激酶生長因子受體族群之另一個成員爲纖維母細胞生長因子("FGF")受體副族群。此族群由四種受體FGFR1-4及七種配位體FGF1-7組成。雖然尚未完全定義，但似乎受體係由含不同數量似免疫球蛋白之環形之糖化細胞外區與細胞內區組成，其中酪胺酸激酶序列中穿插不相關之胺基酸序列區。

酪胺酸激酶生長因子受體族群另一個成員爲血管內皮生長因子("VEGF")受體副族群。VEGF爲類似PDGF之二聚合糖蛋白，但其生物功能及活體內目標細胞專一性則與PDGF不同。特定言之，目前認爲VEGF之基本角色爲脈管生成性及血管分佈形成性。

已知RTK副族群之更完整列表說明於普羅曼(Plowman)等人，DN&P，7(6)：334-339 (1994)，該案包括任何圖示宛如其完全示於本文中，係以提及之方式併入本文。

除了RTKs外，尚有一種完全細胞內之PTKs族群，稱爲"非受體酪胺酸激酶"或"細胞酪胺酸激酶"。後者簡稱"CTK"，且以此簡稱用於本文中。CTKs不含細胞外區及穿膜區。目

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社

本張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（ 4 ）

前11個副族群(Src、Frk、Btk、Csk、Abl、Zap70、Fes、Fps、Fak、Jak及Ack)中，已鑑定出超過24種CTKs。Src副族群爲目前最大CTKs族群，且包括Src、Yes、Fyn、Lyn、Lck、Blk、Hck、Fgr及Yrk。有關CTKs之更詳細討論可參見波倫(Bolen), Oncogene, 8:2025-2031 (1993)，該案包括任何圖示，宛如完全示於本文中，係以提及之方式併入本文。

絲胺酸/蘇胺酸激酶STKs，如同CTKs，爲細胞內主要族群，但其中仍有少數幾種STK型受體激酶。STKs爲最常見之胞液激酶，亦即該激酶在細胞質部份而不在細胞質小器官及細胞骨架部份發揮其功能。胞液爲細胞內許多細胞中間代謝及生合成活性發生之區域，例如：蛋白質於核糖體上合成之過程即在胞液中進行。

RTKs、CTKs及STKs均涉及具病原性病症之宿主，該病症明確而言，包括癌症。其他與PTKs有關之病原性病症包括(但不限於)：牛皮癬、肝硬化、糖尿病、血管分佈形成、血管再狹窄、眼部疾病、類風濕關節炎及其他炎症，免疫性疾病如：自體免疫疾病、心血管疾病如：動脈硬化，及各種腎臟病變。

在癌症方面，有二個主要假說可進一步解釋衍生成腫瘤發展之過度細胞增殖與已知之PK調節之功能之相關性。亦即該假說認爲在控制細胞分裂及/或分化之機轉中，分解作用造成惡性細胞生長。已知許多種原始致癌基因之蛋白質產物涉及調節細胞生長與分化之訊號轉導途徑。這些原始致癌基因之蛋白質產物包括如上文討論之細胞外生長因子、

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（ 5 ）

穿膜生長因子PTK受體(RTKs)、細胞質PTKs (CTKs)及胞液STKs。

就PK相關之細胞活性與許多種人類病變之間表觀相聯性而言，不難發現許多努力都耗在試圖鑑定調節PK活性之途徑上。其中有些涉及生物擬態法，其係使用以確實之細胞過程所涉及之分子爲樣板產生之大分子(例如：突變株配位體(美國專利申請案No. 4,966,849)；可溶性受體與抗體(專利申請案No. WO 94/10202)，甘達爾與湯馬斯(Kendall and Thomas), Proc. Nat'l Acad. Sci., 90:10705-09 (1994)，金(Kim)等人, Nature, 362:841-844 (1993))；RNA配位體(傑林克(Jelinek)等人, Biochemistry, 33:10450-56)；塔卡諾(Takano)等人, Mol. Bio. Cell 4:358A (1993)；金賽拉(Kinsella)等人, Exp. Cell Res. 199:56-62 (1992)；萊特(Wright)等人, J. Cellular Phys., 152:448-57)及酪胺酸激酶抑制劑(WO 94/03427；WO 92/21660；WO 91/15495；WO 94/14808；美國專利案NO. 5,330,992；馬里安尼(Mariani)等人, Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 35:2268 (1994))。

除了上述研究外，亦曾試圖鑑別具有PK抑制劑作用之小分子。例如：已有文獻說明雙-單環系、雙環系及雜環系芳基化合物(PCT WO 92/20642)、伸乙烯基-氮雜吲哚衍生物(PCT WO 94/14808)及1-環丙基-4-吡啶基喹啉酮(美國專利案No. 5,330,992)爲酪胺酸激酶抑制劑。苯乙烯基化合物(美國專利案No. 5,217,999)、苯乙烯基取代之吡啶基化合物(美國專利案No. 5,302,606)、喹唑啉衍生物(歐洲申請案No. 0

（請先閱讀背面之注意事項填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（ 6 ）

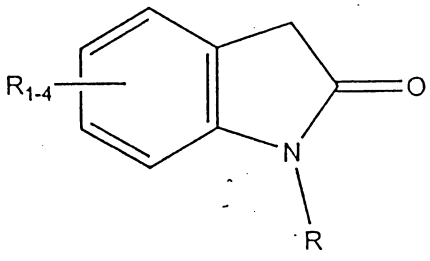
566 266 A1)、硒吲哚及硒化物(PCT WO 94/03427)、三環系多元羥基化合物(PCT WO 92/21660)及苄基膦酸化合物(PCT WO 91/15495)均被指稱爲適用於治療癌症之PTK抑制劑。

發明概要

吾等本身在鑑定調控PK活性且因此應適用於治療及預防涉及PK活性異常之病變之小型有機分子之努力已帶領吾等發現一種新穎之經吡咯取代之2-吲哚啉酮化合物，其具有PK調控能力，因此對與PK活性異常有關之病變應有有益的效果；此等化合物即爲本發明之主題。

因此，本發明一般而言係有關新穎之經吡咯取代之2-吲哚啉酮，其可調控受體酪胺酸激酶(RTKs)、非受體蛋白質酪胺酸激酶(CTKs)及絲胺酸/蘇胺酸蛋白質激酶(STKs)之活性。此外，本發明尚有關含本發明化合物與其生理上可接受之鹽與前藥之醫藥組合物之製法及於治療或預防PK相關病變上之用途，該等病變如，例如(但不限於)：癌症、糖尿病、肝硬化、心血管疾病如：動脈硬化、血管分佈形成、免疫性疾病如：自體免疫疾病及腎臟疾病。

在本文中交換使用之"2-吲哚啉酮"、"吲哚啉-2-酮"及"2-羥吲哚"係指如下化學結構式之分子：



（請先閱讀背面之注意事項填寫本頁）

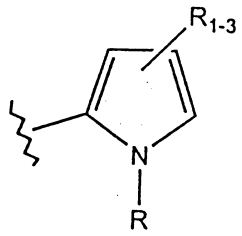
裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（ 7 ）

"吡咯"指如下化學結構式之分子：



本文中交換使用之"經吡咯取代之2-吲哚啉酮"及"3-吡咯啶基-2-吲哚啉酮"係指如式I通式之化合物。

"醫藥組合物"指本文所述一種或多種化合物，或其生理上可接受之鹽或前藥，與其他化合物(如生理上可接受之載體與賦形劑)之混合物。醫藥組合物之目的爲協助投與化合物於生物體。

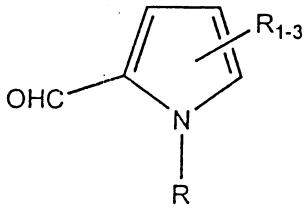
"前藥"指可於活體內轉化成母化合物之製劑。通常以前藥較適用，因爲其有時候比母藥更容易投藥。例如，前藥口服時，生物可以利用，而母藥則不然。前藥在醫藥組合物中亦比母藥更具有改良之溶解性。前藥實例(但不限於)爲呈酯("前藥")投藥之本發明化合物，以助於穿透細胞膜傳送，此時水溶性會影響移動性，但隨後即代謝水解成羧酸，即活性部份，一旦此部份位於細胞內部時，水溶解度則有助益。

前藥另一項實例可爲短多肽，例如(但不限於)：2至10個胺基酸多肽，經由末端胺基與本發明化合物之羧基鍵結，其中多肽於活體內水解或代謝釋出活性分子。

"吡咯醛"指如下化學結構之分子：

（請先閱讀背面之注意事項填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（ 8 ）



本文採用之"生理上可接受之載體"指不會對生物體產生顯著刺激性且不會破壞所投與化合物之生物活性與性質之載體或稀釋劑。

"賦形劑"指加至醫藥組合物中進一步協助投與化合物之惰性物質。賦形劑實例包括(但不限於)碳酸鈣、磷酸鈣、各種不同糖及澱粉型態，纖維素衍生物、明膠、植物油及聚乙二醇。

1.化學

A.一般結構特性

本發明一方面係有關經吡咯取代之2-吲哚啉酮，其除了在化合物之吡咯與2-吲哚啉酮二個部份上可視需要經取代外，尚必須於吡咯部份上經1個或多個烴鏈取代，該烴鏈本身則經至少一個極性基因取代。本申請專利之化合物之生理上可接受之鹽與前藥亦在本發明範圍內。

"烴鏈"係指如本文定義之烷基、烯基或炔基。

"極性"基團指該基團之原子核心互相共價鍵結，所形成之基因不與連接此等原子之共價鍵平等地共用電子；亦即其中一個原子之電子雲比另一個原子之電子雲濃密。其結果造成共價鍵的一端帶相當高負電，另一端則帶相當高正電；亦即有一個負極及一個正極。極性基團實例包括(但不

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

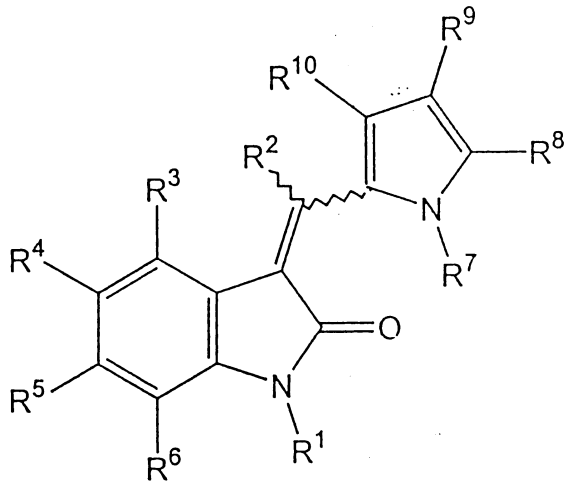
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（ 9 ）

限於)：羥基、烷氧基、羧基、硝基、氰基、胺基、銨、醯胺基、脲基、磺醯胺基、亞磺醯基、磺醯基、亞磷羧基、嗎啉基、六氫吡啡基及四唑幷基。

雖然未受到任何特定理論限制，但申請者認爲極性基團可進行電子交互作用，例如(但不限於)：透過氫鍵、凡德瓦力及/或離子鍵(但非共價鍵結)，以胺基酸位於PTK活性位置。此等交互作用可協助本發明化合物與活性位置結合，其具有充份韌性足以干擾或預防天然受質進入該位置。極性基團亦可能影響化合物之選擇性，亦即一個極性基團可能對PTK結合區之親和力大於其他極性基團，以致含第一個特定極性基團之化合物比含另一個極性基團之化合物更強效。

因此本發明一方面係有關具有下列化學結構式之化合物：



1

其中：

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（ 10）

R^1係選自：氫、烷基、烯基、炔基、環烷基、芳基、羥基、烷氧基、C-羧基、O-羧基、乙醯基、C-醯胺基、C-硫醯胺基、磺醯基及三鹵甲磺醯基。

R^2係選自：氫、鹵素、烷基、環烷基、芳基、雜芳基及雜脂環基。

R^3、R^4、R^5與R^6分別選自：氫、烷基、三鹵烷基、環烷基、烯基、炔基、芳基、雜芳基、雜脂環基、羥基、烷氧基、芳氧基、氫硫基、烷硫基、芳硫基、亞磺醯基、磺醯基、S-磺醯胺基、N-磺醯胺基、三鹵甲磺醯胺基、羰基、C-羧基、O-羧基、C-醯胺基、N-醯胺基、氰基、硝基、鹵素、O-胺甲醯基、N-胺甲醯基、O-硫胺甲醯基、N-硫胺甲醯基、胺基及-$NR^{11}R^{12}$。

R^{11}及R^{12}分別選自：氫、烷基、環烷基、芳基、羰基、乙醯基、磺醯基、三氟甲磺醯基、及組合形成5或6員雜脂環。

R^3與R^4、R^4與R^5或R^4與R^5可組合形成6員芳基環，亞甲二氧基或伸乙二氧基。

R^7選自：氫、烷基、環烷基、烯基、炔基、芳基、雜芳基、雜脂環基、羥基、烷氧基、芳氧基、羰基、乙醯基、C-醯胺基、C-硫醯胺基、脒基、C-羧基、O-羧基、磺醯基及三鹵甲磺醯基。

R^8、R^9與R^{10}分別選自：氫、烷基、三鹵烷基、環烷基、烯基、炔基、芳基、雜芳基、雜脂環基、羥基、烷氧基、芳氧基、氫硫基、烷硫基、芳硫基、亞磺醯基、磺醯基、S-

（請先閱讀背面之注意事項填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（11）

磺醯胺基、N-磺醯胺基、羰基、C-羧基、O-羧基、氰基、硝基、鹵素、O-胺甲醯基、N-胺甲醯基、O-硫胺甲醯基、N-硫胺甲醯基、C-醯胺基、N-醯胺基、胺基及-$NR^{11}R^{12}$，然而，R^8、R^9或R^{10}中至少一個為如式-(alk_1)Z基團。

Alk_1為選自：烷基、烯基或炔基。

Z為極性基團。

本文中採用之"烷基"一詞指包括直鏈與分支鏈基團之飽和脂系烴。較佳者，烷基具有1至20個碳原子(本文中指出之數字範圍(例如"1至20")係指該基團若為烷基時，可包含1個碳原子、2個碳原子、3個碳原子、等等，直到包括20個碳原子)。更佳者，為含1至10個碳原子之中等大小烷基。最佳者，為含1至4個碳原子之低碳數烷基。烷基可經取代或未取代。當經取代時，取代基為分別選自下列之一個或多個基團：環烷基、芳基、雜芳基、雜脂環基、羥基、烷氧基、芳氧基、氫硫基、烷硫基、芳硫基、氰基、鹵素、羰基、硫羰基、O-胺甲醯基、N-胺甲醯基、O-硫胺甲醯基、N-硫胺甲醯基、C-醯胺基、N-醯胺基、C-羧基、O-羧基、硝基、矽烷基、胺基及-$NR^{11}R^{12}$，R^{11}與R^{12}如上述定義。

"環烷基"指全碳單環或稠合環(亦即共同相鄰碳原子對之環)基團，其中一個或多個環不具有完全共軛π-電子系。環烷基實例為(不限於)：環丙烷、環丁烷、環戊烷、環戊烯、環己烷、金剛烷、環己二烯、環庚烷及環庚三烯。環烷基可經取代或未取代。當經取代時，取代基為分別選自下列之一個或多個基團：烷基、芳基、雜芳基、雜脂環

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 12）

基、羥基、烷氧基、芳氧基、氫硫基、烷硫基、芳硫基、氰基、鹵素、羰基、硫羰基、C-羧基、O-羧基、O-胺甲醯基、N-胺甲醯基、C-醯胺基、N-醯胺基、硝基、胺基及-$NR^{11}R^{12}$，R^{11}與R^{12}如上述定義。

"烯基"指如本文中定義之烷基包含至少2個碳原子與至少一個碳-碳雙鍵。

"炔基"指如本文中定義之烷基包含至少2個碳原子與至少一個碳-碳叁鍵。

"芳基"指具有完全共軛π-電子系之全碳單環或稠合環多環(亦即共用相鄰碳原子對之環)。芳基實例爲(但不限於)；苯基、萘基及蒽基。芳基可經取代或未取代。當經取代時，取代基最好爲選自下列之一個或多個基團：鹵素、三鹵甲基、烷基、羥基、烷氧基、芳氧基、氫硫基、烷硫基、芳硫基、氰基、硝基、羰基、硫羰基、C-羧基、O-羧基、O-胺甲醯基、N-胺甲醯基、O-硫胺甲醯基、N-硫胺甲醯基、C-醯胺基、N-醯胺基、亞磺醯基、磺醯基、胺基、及-$NR^{11}R^{12}$，R^{11}與R^{12}如本文中定義。

本文中採用之"雜芳基"指環中含有一個或多個選自氮、氧與硫中原子且另具有完全共軛π-電子系之單環或稠合環(亦即共用相鄰電子對之環)基團。雜芳基實例爲(但不限於)：吡咯、呋喃、噻吩、咪唑、噁唑、噻唑、吡唑、吡啶、嘧啶、喹啉、異喹啉、嘌呤與吖唑。雜芳基可經取代或未取代。當經取代時，取代基最好爲選自下列一個或多個取代基：烷基、環烷基、鹵素、三鹵甲基、羥基、烷氧

（請先閱讀背面之注意事項填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（ 13）

基、芳氧基、氫硫基、烷硫基、芳硫基、氰基、硝基、羰基、硫羰基、磺醯胺基、C-羧基、O-羧基、亞磺醯基、磺醯基、O-胺甲醯基、N-胺甲醯基、O-硫胺甲醯基、N-硫胺甲醯基、C-醯胺基、N-醯胺基、胺基及-$NR^{11}R^{12}$，以R^{11}與R^{12}如上述定義。

"雜脂環基"指環中含有一個或多個選自：氮、氧與硫中原子之單環或稠合環。環中可具有一個或多個雙鍵。然而環中不具有完全共軛π-電子系。雜脂環基環可經取代或未取代。當經取代時，取代基最好選自下列一個或多個取代基：烷基、環烷基、鹵素、三鹵甲基、羥基、烷氧基、芳氧基、氫氧基、烷硫基、芳硫基、氰基、硝基、羰基、硫羰基、C-羧基、O-羧基、O-胺甲醯基、N-胺甲醯基、O-硫胺甲醯基、N-硫胺甲醯基、亞磺醯基、磺醯基、C-醯胺基、N-醯胺基、胺基及-$NR^{11}R^{12}$，以R^{11}與R^{12}如上述定義。

"羥基"指-OH基團。

"烷氧基"指如本文定義之-O-烷基與-O-環烷基。

"芳氧基"指如本文定義之-O-芳基與-O-雜芳基。

"氫硫基"指-SH基團。

"烷硫基"指如本文定義之S-烷基與S-環烷基。

"芳硫基"指如本文定義之S-芳基與S-雜芳基。

"羰基"指-C(=O)-R"基團，其中R"基團選自如本文定義之氫、烷基、環烷基、芳基、雜芳基(經由環碳鍵結)及雜脂環(經由環碳鍵結)。

"醛"基指羰基，其中R"爲氫。

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（ 14）

"硫羰基"指-C(=S)-R"基團，R"如本文定義。

"C-羧基"指-C(=O)O-R"基團，R"如本文定義。

"O-羧基"指-OC(=O)R"基團，R"如本文定義。

"酯基"指-C(=O)O-R"基團，R"如本文定義，但R"不可爲氫。

"乙醯基"指-C(=O)CH_3基團。

"羧酸"指C-羧基，其中R"爲氫。

"鹵素"基團指氟、氯、溴或碘。

"三鹵甲基"指-CX_3基團，其中X爲如本文定義之鹵素基團。

"三鹵甲磺醯基"指$X_3CS(=O)_2$-基團，X如上述定義。

"氰基"指-C≡N基團。

"亞磺醯基"指-S(=O)-R"基團，其中R"除了如上述定義外，亦可爲羥基。

"磺醯基"指-$S(=O)_2R$"基團，其中R"除了如上述定義外，亦可爲羥基。

"亞甲二氧基"指-OCH_2O-基團，其中二個氧原子與相鄰碳原子鍵結。

"伸乙二氧基"指-OCH_2CH_2O-基團，其中二個氧原子與相鄰碳原子鍵結。

"S-磺醯胺基"指-$S(=O)_2NR^{11}R^{12}$基團，其中R^{11}與R^{12}如本文定義。

"N-磺醯胺基"指-$NR^{11}S(=O)_2R^{12}$基團，其中R^{11}與R^{12}如本文定義。

（請先閱讀背面之注意事項填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 15）

"O-胺甲醯基"指-OC(=O)NR^{11}R^{12}基團，其中R^{11}與R^{12}如本文定義。

"N-胺甲醯基"指R^{12}OC(=O)NR^{11}-基團，其中R^{11}與R^{12}如本文定義。

"O-硫胺甲醯基"指-OC(=S)NR^{11}R^{12}基團，其中R^{11}與R^{12}如本文定義。

"N-硫胺甲醯基"指R^{12}OC(=S)NR^{11}-基團，其中R^{11}與R^{12}如本文定義。

"胺基"指-NR^{11}R^{12}基團，其中R^{11}與R^{12}均爲氫。

"C-醯胺基"指-C(=O)NR^{11}R^{12}基團，其中R^{11}與R^{12}如本文定義。

"N-醯胺基"指R^{12}C(=O)NR^{11}-基團，其中R^{11}與R^{12}如本文定義。

"銨"基團指-$^{+}$NHR^{11}R^{12}基團，其中R^{11}與R^{12}分別選自：烷基、環烷基、芳基、及雜芳基。

"脲基"指-NR^{11}C(=O)NR^{12}R^{13}基團，其中R^{11}與R^{12}如本文定義，且R^{13}之定義與R^{11}及R^{12}相同。

"胍基"指-R^{11}NC(=N)NR^{12}R^{13}基團，其中R^{11}、R^{12}與R^{13}如本文定義。

"脒基"指R^{11}R^{12}NC(=N)-基團，其中R^{11}與R^{12}如本文定義。

"硝基"指-NO_2基團。

"膦醯基"指-$OP(=O)_2OR$"，其中R"如本文定義。

"嗎啉基"指如下化學結構式之基團：

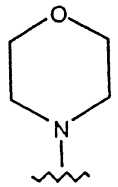
（請先閱讀背面之注意事項填寫本頁）

裝 訂 線

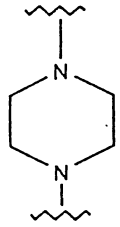
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

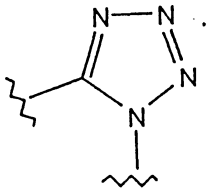
五、發明說明（ 16）



"六氫吡咔基"指如下化學結構式之基團：



"四唑幷基"指如下化學結構式之基團：



B.較佳結構特色。

本發明目前較佳特色爲R^1爲氫。

亦爲本發明目前較佳特色爲R^2爲氫。

同樣爲本發明目前較佳特色爲R^7爲氫。

本發明目前較佳特色爲上述三個限制條件均出現在同一個分子中，亦即本發明化合物中R^1、R^2與R^7爲氫。

本發明目前亦較佳者爲R^3、R^4、R^5與R^6選自：氫、未取代低碳數烷基、經選自下列基團取代之低碳數烷基：羥基、鹵素、C-羧基(其係經選自氫及未取代之低碳數烷基取代)、胺基或$-NR^{11}R^{12}$；未取代之低碳數烷基烷氧基，經一

（請先閱讀背面之注意事項填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（ 17）

個或多個鹵素-基團取代之低碳數烷氧基、經選自未取代之芳基或經取代之芳基取代之低碳數烷氧基，該經取代之芳基係經一個或多個選自下列之基團取代：未取代之低碳數烷基、羥基、未取代之低碳數烷基烷氧基、鹵素、胺基、未取代之低碳數烷基S-磺醯胺基或-$NR^{11}R^{12}$；未取代之芳基或經一個或多個分別選自下列之基團取代之芳基：未取代之低碳數烷基、未取代之低碳數烷基烷氧基、經一個或多個鹵素基團取代之低碳數烷氧基、經選自未取代芳基或經取代芳基之基團取代之低碳數烷氧基，該經取代芳基係經一個或多個分別選自下列之基團取代：未取代之低碳數烷基、羥基、未取代之低碳數烷基烷氧基、鹵素、胺基、未取代低碳數S-磺醯胺基或-$NR^{11}R^{12}$；羥基、胺基、未取代之低碳數烷磺醯胺基、經選自氫或未取代低碳數烷基之基團取代之C-羧基、嗎啉基、-$NR^{11}R^{12}$、三鹵甲基、芳基、經一個或多個分別選自下列之基團取代之芳基：羥基、鹵素、三鹵甲基、胺基、-$NR^{11}R^{12}$、磺醯胺基、經選自氫或未取代之低碳數烷基取代之C-羧基、未取代之低碳數烷基或經選自下列之基團取代之低碳數烷基：羥基、鹵素、經選自氫或低碳數烷基取代之C-羧基；胺基或-$NR^{11}R^{12}$；未取代之雜脂環基、經一個或多個分別選自下列之基團取代之雜脂環基：鹵素、羥基、未取代之低碳數烷基、未取代之低碳數烷羰基、羥基、未取代之低碳數烷基烷氧基、或經一個或多個鹵素基團取代之烷氧基、未取代之芳氧基、經一個或多個分別選自下列之基團取代之芳氧基：未取代之低碳數烷基、

（請先閱讀背面之注意事項填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 18 ）

三鹵甲基、鹵素、羥基、胺基或-$NR^{11}R^{12}$；氫硫基、未取代之低碳數烷基烷硫基、未取代之芳硫基、經一個或多個選自下列之基團取代之芳硫基：鹵素、羥基、胺基或-$NR^{11}R^{12}$；經選自氫及未取代之低碳數烷基中之基團取代之C-羧基、未取代之低碳數烷基O-羧基、未取代之低碳數烷基S-磺醯胺基、硝基、未取代之低碳數烷基C-醯胺基、未取代之低碳數烷基N-醯胺基、胺基及-$R^{11}R^{12}$。

本發明另一項目前較佳具體實施例中，R^3、R^4、R^5及R^6分別選自：氫、鹵素、未取代之低碳數烷基、經一個或多個選自下列之基團取代之低碳數烷基：羥基、鹵素、C-羧基(其係經選自氫及未取代之低碳數烷基取代)、胺基或-$NR^{11}R^{12}$；未取代之低碳數烷基烷氧基，經一個或多個鹵素基團取代之低碳數烷氧基、未取代之芳氧基、經一個或多個選自下列之基團取代之芳氧基：未取代之低碳數烷基、經一個或多個鹵素基團取代之低碳數烷基、羥基、未取代之低碳數烷基烷氧基、鹵素、胺基或-$NR^{11}R^{12}$；S-磺醯胺基，其中R^{11}與R^{12}分別選自：氫及未取代之低碳數烷基；未取代之芳基、經一個或多個分別選自下列之基團取代之芳基：鹵素、未取代之低碳數烷基、經一個或多個鹵素基團取代之低碳數烷基、未取代之低碳數烷基烷氧基、胺基或-$NR^{11}R^{12}$；未取代之雜芳基、經一個或多個分別選自下列之基團取代之雜芳基：未取代之低碳數烷基、經一個或多個鹵素基團取代之低碳數烷基、未取代之低碳數烷基烷氧基、羥基、鹵素、胺基或-$NR^{11}R^{12}$，未取代之雜脂環基、經一個或多個

（請先閱讀背面之注意事項填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（ 19）

分別選自下列之基團取代之雜脂環基：鹵素、羥基、未取代之低碳數烷基、經一個或多個鹵素取代之低碳數烷基、未取代之低碳數烷基烷氧基、胺基或-$NR^{11}R^{12}$，未取代之低碳數烷基O-羧基、C-醯胺基、其中R^{11}與R^{12}爲分別選自下列之基團：氫、未取代之低碳數烷基及未取代之芳基，及N-醯胺基，其中R^{11}與R^{12}爲分別選自下列之基團：氫、未取代之低碳數烷基及未取代之芳基。

本發明目前較佳特色爲R^8、R^9與R^{10}中之一爲-$(alk_1)Z$，而另二者分別選自：氫、羥基、未取代之低碳數烷基、未取代之低碳數烯基、未取代之低碳數炔基、未取代之低碳數烷基烷氧基、經一個或多個鹵素基團取代之低碳數烷氧基、未取代之芳基烷氧基、胺基、-$NR^{11}R^{12}$、鹵素、經選自氫或未取代之低碳數烷基取代之C-羧基、未取代之低碳數烷基O-羧基、未取代之低碳數烷基C-醯胺基、未取代之低碳數烷基N-醯胺基、乙醯基、未取代之低碳數烷基S-磺醯胺基、未取代之芳基或經選自下列之基團取代之芳基：鹵素、羥基、未取代之低碳數烷基烷氧基、經一個或多個鹵素基團取代之烷氧基、經選自氫或未取代之低碳數烷基取代之C-羧基、未取代之低碳數烷基O-羧基、胺基、未取代之低碳數烷基S-磺醯胺基及-$NR^{11}R^{12}$。

本發明目前較佳特色爲R^8與R^{10}選自氫及未取代低碳數烷基。

亦爲本發明目前較佳特色爲alk_1爲未取代低碳數烷基。

本發明另一項目前較佳特色爲Z選自：羥基、胺基、

（請先閱讀背面之注意事項填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 20 ）

$-NR^{11}R^{12}$、四級銨、經選自氫或未取代低碳數烷基之基團取代之C-羧基、經選自氫或未取代低碳數烷基之基團取代之C-醯胺基、嗎啉基、六氫吡啶基、四唑幷基及膦醯基。

本發明另一項目前較佳特色爲alk_1爲2至4個碳原子之未取代低碳數烷基且Z爲羧酸。

本發明目前較佳特色爲R^9爲alk_1Z。

同樣爲本發明目前較佳特色爲R^{11}與R^{12}分別選自：氫、未取代低碳數烷基、羥基、未取代低碳數烷基烷氧基、未取代低碳數烷基羰基、未取代低碳數烷基O-羧基及乙醯基。

本發明另一項目前較佳具體實施例中，R^1、R^2、R^3、R^4、R^5、R^6及R^7爲氫，R^8與R^{10}爲甲基且R^9爲$-CH_2CH_2C(=O)OH$。

亦爲本發明目前較佳具體實施例爲R^1、R^2、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7及R^8爲氫，R^{10}爲甲基且R^9爲$-CH_2CH_2C(=O)OH$。

本發明另一項目前較佳具體實施例爲R^7係選自：氫、未取代之低碳數烷基、經選自下列之基團取代之低碳數烷基：未取代之環烷基、未取代之芳基、及經選自：羥基、未取代之低碳數烷基烷氧基及鹵素取代之芳基。

亦爲本發明目前較佳具體實施例中，Z係選自：$-C(=O)NR^{13}R^{14}$，其中R^{13}與R^{14}分別選自：氫、未取代之低碳數烷基、經選自胺基及$-NR^{11}R^{12}$之基團取代之低碳數烷基、未取代之芳基、經一個或多個選自下列之基團取代之芳基、鹵素、羥基、未取代之低碳數烷基烷氧基及三鹵甲基；未取代之雜芳基、未取代之雜環基。及組合形成之5員或6員未取代雜脂環基，及$-NR^{11}R^{12}$，其中R^{11}與R^{12}分別選

（請先閱讀背面之注意事項填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（21）

自：未取代之低碳數烷基及組合形成之5或6員未取代雜脂環。

另一項本發明目前較佳具體實施例爲R^7選自：未取代低碳數烷基、經一個或多個選自下列之基團取代之低碳數烷基：未取代之環烷基、未取代之芳基、經一個或多個分別選自下列之基團取代之芳基：鹵素及未取代低碳數烷基烷氧基；及未取代之低碳數烷基羧烷基，且Z係選自：未取代之C-羧基及未取代之低碳數烷基C-羧基。

最後，本發明目前較佳具體實施例中，R^3、R^4、R^5與R^6分別選自：氫、鹵素、未取代之低碳數烷基、經一個或多個羥基取代之低碳數烷基、未取代之低碳數烷氧基、未取代之芳基、經一個或多個低碳數烷氧基取代之芳基、及$-S(O)_2NR^{11}R^{12}$，R^5爲氫，R^6爲$-NR^{11}R^{12}$，且R^{11}與R^{12}分別選自：氫、未取代之低碳數烷基及組合形成之5或6員未取代雜脂環。

本文所述之化學式可具有互變異構性及結構異構化現象。例如：本文說明之化合物可依連接2-吲哚啉酮部份與吡咯部份之雙鍵呈E或Z組態，或可爲E與Z之混合物。本發明涵括任何互變異構型或結構異構型，及其混合物，其具有調控RTK、CTK及/或STK活性之能力，且不限於任一種互變異構型或結構異構型。

2.合成/組合庫

本發明另一方面爲可由結構式2羥吲哚與結構式3醛反應形成之至少10種3-吡咯啶基-2-吲哚啉酮化合物之組合庫

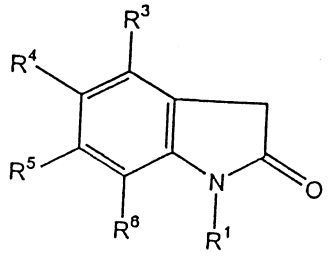
（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

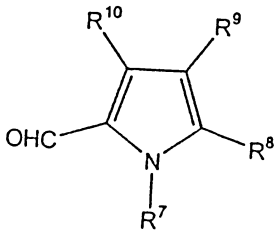
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（22）



2



3

其中R^1-R^{10}如上述定義。

本文中採用之"組合庫"係指在多次元排列化合物中，由一種次元之各化合物與另一種次元之各化合物反應形成之所有化合物。本發明內容中，該排列爲二種次元，其中一個次元代表本發明所有羥吲哚，第二個次元代表本發明所有醛。各羥吲哚可與各個及每一個醛反應，以形成3-吡咯啶基-2-吲哚啉酮化合物。依此方式形成之所有3-吡咯啶基-2-吲哚啉酮化合物均在本發明範圍內。本發明範圍內亦包括由某些羥吲哚與所有醛反應、所有羥吲哚與某些醛反應，或某些羥吲哚與某些醛反應等形成之較小組合庫。

上述組合庫中之羥吲哚最好選自：羥吲哚本身及經取代之羥吲哚如(但不限於)：6-溴羥吲哚、5-羥基羥吲哚、5-甲氧基羥吲哚、6-甲氧基羥吲哚、5-苯胺磺醯基羥吲哚、4-[2-(2-異丙基苯氧基)乙基]羥吲哚、4-[2-(3-異丙基苯氧基)乙基]羥吲哚、4-[2-(4-異丙基苯氧基)乙基]羥吲哚、5-氟羥吲哚、6-氟羥吲哚、7-氟羥吲哚、6-三氟甲基羥吲哚、5-氯羥吲哚、6-氯羥吲哚、吲哚-4-羧酸、5-溴羥吲哚、6-(N-乙醯胺基)羥吲哚、4-甲基羥吲哚、5-甲基羥吲哚、4-甲基

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（23）

-5-氯羥吲哚、5-乙基羥吲哚、6-羥基羥吲哚、5-乙醯基羥吲哚、羥吲哚-5-羧酸、5-甲氧基羥吲哚、6-甲氧基羥吲哚、5-胺基羥吲哚、6-胺基羥吲哚、4-(2-N-嗎啉乙基)羥吲哚、7-氮雜羥吲哚、羥吲哚-4-胺甲酸第三丁酯、羥吲哚-6-胺甲酸第三丁酯、4-(2-羥乙基)羥吲哚、4-正丁基羥吲哚、4,5-二甲氧基羥吲哚、6-(甲磺醯胺基)羥吲哚、6-(苯醯胺基)羥吲哚、5-乙氧基羥吲哚、6-苯基羥吲哚、6-(2-甲氧苯-1-基)羥吲哚、6-(3-甲氧苯-1-基)羥吲哚、6-(4-甲氧苯-1-基)羥吲哚、5-胺磺醯基羥吲哚、5-異丙胺磺醯基羥吲哚、二甲胺磺醯基羥吲哚、5-(N-嗎啉磺醯基)羥吲哚及4-(2-羥乙基)羥吲哚。

上述組合庫中之醛最好選自(但不限於)：3-(5-甲醯基-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基)丙酸、3-(5-甲醯基-4-甲基-1H-吡咯-3-基)丙酸、3-(1-苄基-5-甲醯基-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基)丙酸、3-(5-甲醯基-1-甲氧羰基-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基)丙酸、3-(5-甲醯基-1,2,4-三甲基-1H-吡咯-3-基)丙酸、3-[5-甲醯基-1-(3-甲氧苄基)-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基)丙酸甲酯、3-(1-環己基甲基-5-甲醯基-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基)丙酸甲酯、3-[1-(2,2-二甲基丙基)-5-甲醯基-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基)丙酸甲酯、1,3,5-三甲基-4-(3-嗎啉-4-基-3-氧丙基)-1H-吡咯-2-甲醛、3-(5-甲醯基-1,2,4-三甲基-1H-吡咯-3-基)-N-(2-嗎啉-4-基-乙基)丙醯胺、3-(5-甲醯基-1,2,4-三甲基-1H-吡咯-3-基)-N-苯基丙醯胺、1,3,5-三甲基-4-(3-氧-3-六氫吡啶-1-基丙基)-1H-吡咯-2-甲醛、1,3,5-三甲基-4-(3-氧

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（24）

-3-吡咯啶-1-基丙基)-1H-吡咯-2-甲醛、3-(5-甲醯基-1,2,4-三甲基-1H-吡咯-3-基)-N-(4-甲氧苯基)丙醯胺、N-(4-氟苯基)-3-(5-甲醯基-1,2,4-三甲基-1H-吡咯-3-基)丙醯胺、3-(5-甲醯基-1,2,4-三甲基-1H-吡咯-3-基)-N-(4-三氟甲苯基)丙醯胺、3-[5-甲醯基-1-(3-甲氧苄基)-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基]丙酸、3-(1-環己基甲基-5-甲醯基-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基)丙酸、3-[1-(3-氟苄基)-5-甲醯基-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基]丙酸甲酯、3-(1-苄基-5-甲醯基-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基]丙酸、3-[1-(4-氟苄基)-5-甲醯基-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基]丙酸甲酯、3-[1-(4-(氟苄基)-5-甲醯基-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基]丙酸、3-[1-(3-氟苄基)-5-甲醯基-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基]丙酸、3,5-二甲基-4-(3-嗎啉-4-基丙基)-1H-吡咯-2-甲醛、4-(3-二甲胺丙基)-3,5-二甲基-1H-吡咯-2-甲醛、5-甲醯基-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-羧酸、3,5-二甲基-4-(4-甲基六氫吡哄-1-羰基)-1H-吡咯-2-甲醛、5-甲醯基-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-羧酸(2-二甲胺乙基)醯胺。

本發明另一方面提供一種合成式1 3-吡咯啶基-2-吲哚啉酮之方法，其包括由式2羥吲哚與式3醛於溶劑中，最好於鹼之存在下反應。

可與式3醛反應產生式1 3-吡咯啶基-2-吲哚啉酮之式2羥吲哚實例爲羥吲哚本身及經取代之羥吲哚如(但不限於)：6-溴羥吲哚、5-羥基羥吲哚、5-甲氧基羥吲哚、6-甲氧基羥吲哚、5-苯胺磺醯基羥吲哚、4-[2-(2-異丙基苯氧基)乙基]羥吲哚、4-[2-(3-異丙基苯氧基)乙基]羥吲哚、4-[2-(4-異丙

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（25）

基苯氧基）乙基]羥吲哚、5-氟羥吲哚、6-氟羥吲哚、7-氟羥吲哚、6-三氟甲基羥吲哚、5-氯羥吲哚、6-氯羥吲哚、吲哚-4-羧酸、5-溴羥吲哚、6-(N-乙醯胺基)羥吲哚、4-甲基羥吲哚、5-甲基羥吲哚、4-甲基-5-氟羥吲哚、5-乙基羥吲哚、6-羥基羥吲哚、5-乙醯基羥吲哚、羥吲哚-5-羧酸、5-甲氧基羥吲哚、6-甲氧基羥吲哚、5-胺基羥吲哚、6-胺基羥吲哚、4-(2-N-嗎啉乙基)羥吲哚、7-氮雜羥吲哚、羥吲哚-4-胺甲酸第三丁酯、羥吲哚-6-胺甲酸第三丁酯、4-(2-羥乙基)羥吲哚、4-正丁基羥吲哚、4,5-二甲氧基羥吲哚、6-(甲磺醯胺基)羥吲哚、6-(苯醯胺基)羥吲哚、5-乙氧基羥吲哚、6-苯基羥吲哚、6-(2-甲氧基-1-基)羥吲哚、6-(3-甲氧基-1-基)羥吲哚、6-(4-甲氧基-1-基)羥吲哚、5-胺磺醯基羥吲哚、5-異丙胺磺醯基羥吲哚、二甲胺磺醯基羥吲哚、5-(N-嗎啉磺醯基)羥吲哚及4-(2-羥乙基)羥吲哚。

可與結構式2羥吲哚反應之結構式3醛之實例爲(但不限於)：3-(5-甲醯基-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基)丙酸、3-(5-甲醯基-4-甲基-1H-吡咯-3-基)丙酸、3-(1-苄基-5-甲醯基-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基)丙酸、3-(5-甲醯基-1-甲氧羰甲基-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基)丙酸、3-(5-甲醯基-1,2,4-三甲基-1H-吡咯-3-基)丙酸、3-[5-甲醯基-1-(3-甲氧苄基)-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基)丙酸甲酯、3-(1-環己基甲基-5-甲醯基-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基)丙酸甲酯、3-[1-(2,2-二甲基丙基)-5-甲醯基-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基)丙酸甲酯、1,3,5-三甲基-4-(3-嗎啉-4-基-3-氧丙基)-1H-吡咯-2-甲醛、3-(5-甲醯

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（26）

基-1,2,4-三甲基-1H-吡咯-3-基)-N-(2-嗎啉-4-基-乙基)丙醯胺、3-(5-甲醯基-1,2,4-三甲基-1H-吡咯-3-基)-N-苯基丙醯胺、1,3,5-三甲基-4-(3-氧-3-六氫吡啶-1-基丙基)-1H-吡咯-2-甲醛、1,3,5-三甲基-4-(3-氧-3-吡咯啶-1-基丙基)-1H-吡咯-2-甲醛、3-(5-甲醯基-1,2,4-三甲基-1H-吡咯-3-基)-N-(4-甲氧苯基)丙醯胺、N-(4-氟苯基)-3-(5-甲醯基-1,2,4-三甲基-1H-吡咯-3-基)丙醯胺、3-(5-甲醯基-1,2,4-三甲基-1H-吡咯-3-基)-N-(4-三氟甲苯基)丙醯胺、3-[5-甲醯基-1-(3-甲氧苄基)-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基]丙酸、3-(1-環己基甲基-5-甲醯基-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基)丙酸、3-[1-(3-氟苄基)-5-甲醯基-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基]丙酸甲酯、3-(1-苄基-5-甲醯基-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基]丙酸、3-[1-(4-氟苄基)-5-甲醯基-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基]丙酸甲酯、3-[1-(4-(氟苄基)-5-甲醯基-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基]丙酸、3-[1-(3-氟苄基)-5-甲醯基-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基]丙酸、3,5-二甲基-4-(3-嗎啉-4-基丙基)-1H-吡咯-2-甲醛、4-(3-二甲胺丙基)-3,5-二甲基-1H-吡咯-2-甲醛、5-甲醯基-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-羧酸、3,5-二甲基-4-(4-甲基六氫吡呯-1-羰基)-1H-吡咯-2-甲醛、5-甲醯基-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-羧酸(2-二甲胺乙基)醯胺。

該反應可於鹼之存在下進行。鹼可爲有機或無機鹼。若使用有機鹼時，最好爲含氮鹼。有機含氮鹼實例包括(但不限於)：二異丙胺、三甲胺、三乙胺、苯胺、吡啶、1,8-重氮雙環[5.4.1]十一碳-7-烯、吡咯啶及六氫吡啶。

無機鹼實例爲(但不限於)：氨、鹼金屬或鹼土金屬氫氧化

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（27）

物、磷酸鹽、碳酸鹽、碳酸氫鹽、硫酸氫鹽及胺化物。鹼金屬包括鋰、鈉及鉀，而鹼土金屬包括鈣、鎂及鋇。

本發明目前較佳具體實施例中，當溶劑爲質子性溶劑如：水或醇時，該鹼爲鹼金屬或鹼土金屬無機鹼，以鹼金屬或鹼土金屬氫氧化物較佳。

相關技藝專家咸了解，根據有機合成法之已知一般原則及本文所揭示內容，即可知道何種鹼最適合該特定反應。

進行該反應之溶劑可爲質子性或非質子性溶劑，以質子性溶劑較佳。"質子性溶劑"爲具有與氧或氮原子共價鍵結之氫原子之溶劑，使得該氫原子呈相當酸性，因而可透過氫鍵與溶質"共用"該氫原子。質子性溶劑實例包括(但不限於)：水及醇。

"非質子性溶劑"可爲極性或非極性，但此二種情形均不含酸性氫，因此無法與溶質形成氫鍵。非極性非質子性溶劑實例爲(但不限於)：戊烷、己烷、苯、甲苯、二氯甲烷及四氯化碳。極性非質子性溶劑實例爲氯仿、四氫呋喃、二甲亞碸及二甲基甲醯胺。

本發明目前較佳具體實施例中，該溶劑爲質子性溶劑，以水或醇(如：乙醇)較佳。

該反應係在高於室溫之溫度下進行。該反應通常約30℃至約150℃，以約80℃至約100℃較佳，以約75℃至約85℃最佳，此溫度約爲乙醇之沸點。"約"係指該溫度範圍最好在所指示溫度之10℃範圍內，以所指示溫度之5℃內較佳，在所指示溫度之2℃範圍內最佳。因此，例如："約75℃"指75℃

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（28）

±10℃，以75℃±5℃較佳，且以75℃±2℃最佳。

3.生化學/醫藥療法

本發明另一方面係有關調控PK催化活性之方法，其係由PK與本發明化合物或其生理上可接受之鹽或前藥接觸。

本文中採用之"PK"指受體蛋白質酪胺酸激酶(RTKs)、非受體或"細胞"酪胺酸激酶(CTKs)及絲胺酸-蘇胺酸激酶(STKs)。

"方法"一詞係指完成指定作業之方式、方法、技術及過程，包括(但不限於)：化學、醫藥學、生物學、生化學及醫學領域之操作者已知之方式、方法、技術及過程或容易由此等已知方式，方法、技術及過程衍生之方式、方法、技術及過程。

本文採用之"調控"係指改變RTKs、CTKs及STKs之催化活性。特定言之"調控"係指活化RTKs、CTKs及STKs之催化活性。以活化或抑制RTKs、CTKs及STKs之催化活性較佳，端賴接觸到RTK、CTK或STK或更佳者，抑制RTKs、CTKs與STKs之催化活性之化合物或鹽之濃度而定。

本文所採用"催化活性"係指直接或間接受到RTKs與/或CTKs影響下之酪胺酸之磷酸化速率或直接或間接受到STKs影響下之絲胺酸與蘇胺酸之磷酸化速率。

本文所採用"接觸"一詞指使本發明化合物及目標PK在一起之方式可令化合物影響PK之催化活性，其係直接影響，亦即與激酶本身交互作用，或間接影響，亦即與激酶之催化活性所依賴之另一個分子交互作用。這種"接觸"可於試

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（29）

管內完成，亦即，於試管中，培養皿，等等中進行。在試管中時，接觸作用可僅涉及化合物及所指定之PK，或可涉及完整細胞。細胞亦可於細胞培養皿中維持或生長，並於此環境中與化合物接觸。本文中，該特定化合物影響PK相關病變之能力，亦即化合物之IC_{50}(如下文定義)可於採用較複雜之活生物體於活體內使用化合物之前決定。對於生物體外之細胞，有多種相關技藝專家習知之方法使PKs與化合物接觸，包括(但不限於)：直接細胞微注射法及多種穿膜式載體技術。

本發明另一方面爲可於試管內或活體內，使用本發明化合物調控PKs之催化活性。

"試管內"指於人工環境進行之過程，如，例如(但不限於)：於試管中或培養基中。

本文中採用之"活體內"指於活生物體中進行之過程，如(但不限於)：小白鼠、老鼠或兔子。

本發明另一方面爲受本發明化合物調控其催化活性之蛋白質激酶係選自：受體蛋白質酪胺酸激酶、細胞酪胺酸激酶及絲胺酸-蘇胺酸激酶。

本發明一方面爲受本發明化合物調控其催化活性之受體蛋白質激酶係選自：EGF、HER2、HER3、HER4、IR、IGF-1R、IRR、PDGFRα、PDGFRβ、CSFIR、C-Kit、C-fms、Flk-1R、Flk4、KDR/Flk-1、Flt-1、FGFR-1R、FGFR-2R、FGFR-3R及FGFR-4R。

此外，本發明另一方面爲受本發明化合物調控其催化活性

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（30）

之細胞酪胺酸激酶係選自：Src、Frk、Btk、Csk、Abl、ZAP70、Fes/Fps、Fak、Jak、Ack、Yes、Fyn、Lyn、Lck、Blk、Hck、Fgr及Yrk。

本發明另一方面為受本發明化合物調控其催化活性之絲胺酸-蘇胺酸蛋白質激酶係選自：CDK2與Raf。

本發明化合物與醫藥上可接受之載體形成之醫藥組合物為本發明另一方面。此等醫藥組合物亦可包含賦形劑。

本發明另一方面為治療或預防生物體之蛋白質激酶相關病變之方法，其包括投與醫療有效量之化合物、鹽或前藥，其係本發明之3-吡咯啶基-2-吲哚啉酮。

本文採用之"PK相關病變"、"受PK驅動之病變"及"異常PK活性"均指出現PK催化活性不適當(亦即過低或更常見之過高)特性之病症，其中該特定PK可為RTK、CTK或STK。不適當之催化活性可因下列因素引起：(1)通常不表現PKs之細胞中卻表現PK，(2) PK表現增加，導致不要之細胞增殖、分化及/或生長，或(3) PK表現減少，導致細胞增殖、分化及/或生長不當地減少。PK活性過高係指編碼特定PK之基因擴增作用或PK活性產生程度與細胞增殖、分化及/或生長病變呈相關性(亦即當PK含量增加時，一種或多種細胞病變之症狀嚴重性會增加)。活性過低當然情形相反，當PK活性下降時，細胞病變之一種或多種症狀之嚴重性會隨之提高。

本文採用之"預防"、"防止"及"保護"等名詞係指阻隔生物體居先得到與PK相關之病變。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（31）

本文採用之"治療"一詞係指減輕或消除PK所調節細胞病變及/或其伴隨出現之病狀。針對癌症而言，此等名詞僅指罹患癌症之個體之壽命延長或減少該病症之一種或多種症狀。

"生物體"一詞指含至少一個細胞之任何活個體。活生物體可簡單至例如：單一真核細胞或複雜至哺乳動物，包括人類。

本文中採用之"醫療有效量"一詞係指化合物可使待治療病變之一個或多個症狀減輕至某種程度之投藥量。就癌症治療而言，醫療有效量係指該用量具有下列效果：(1)縮小腫瘤，(2)抑制(亦即減緩至某種程度，最好為遏止)腫瘤轉移，(3)抑制腫瘤生長至某種程度(亦即減緩至某種程度，最好為遏止)，及/或，(4)減輕(或較佳者為消除)與癌症有關之一種或多種症狀至某種程度。

本發明一方面為上述蛋白質激酶相同病變係選自：受體蛋白質酪胺酸激酶相關病變、細胞酪胺酸激酶病變及絲胺酸-蘇胺酸相關病變。

本發明另一方面為上述蛋白質激酶相關病變係選自：EGFR相關病變、PDGFR相關病變、IGFR相關病變及flk相關病變。

本發明另一方面，上述蛋白質激酶相關病變為選自下列之癌症：鱗狀細胞癌瘤、肉瘤如：卡波西氏肉瘤、星細胞瘤、神經膠質母細胞瘤、肺癌、膀胱癌、結腸直腸癌、胃腸癌、頭與頸癌、黑色素瘤、卵巢癌、攝護腺癌、乳癌、

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（32）

小細胞肺癌及神經膠質瘤。

本發明另一方面，上述蛋白質激酶相關病變係選自：糖尿病、過度增殖病變、凡希波-林島疾病(von Hippel-Lindau disease)、再狹窄現象、纖維變性、牛皮癬、骨關節炎、類風濕關節炎、炎症及血管分佈形成。

其他可使用本發明化合物治療或預防之病變為免疫性病變如：自體免疫疾病(AIDS)及心血管病變如：動脈硬化症。

本發明一方面為調控蛋白質激酶催化活性之化合物之鑑定法可由表現該蛋白質激酶之細胞與本發明3-吡咯啶基-2-吲哚酮化合物、其鹽或前藥接觸，然後追踪該細胞之效應。

"追踪"一詞係指觀察或偵測化合物與表現特定PK之細胞接觸之效應。所觀察或偵測到之效應可為細胞表型變化、PK催化活性變化或PK與天然結合對象之交互作用變化。觀察或偵測此等效應之技術係相關技藝習知者。

本發明最後一方面中，上述效應係選自：細胞表型有或沒有變化、該蛋白質激酶催化活性有或沒有變化、或該蛋白質激酶與天然結合對象之交互作用有或沒有變化。

"細胞表型"指細胞或組織之外觀或細胞或組織之生物功能。細胞表型實例為(但不限於)：細胞大小、細胞生長、細胞增殖、細胞分化、細胞存活、細胞凋亡、及營養素攝取與利用。此等細胞表型特性可利用相關技藝習知之技術測定。

"天然結合對象"指於細胞中與特定PK結合之多肽。天然結合對象可在PK調節之訊號轉導過程中扮演繁殖訊號之角

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（33）

色。當PK/天然結合對象複合物之濃度上升或下降時，天然結合對象與PK交互作用本身會有明顯變化，結果在PK調節訊號轉導之能力上會有顯著變化。

本發明另一方面爲本文說明之化合物或其鹽或前藥，可與其他用於治療上述疾病與病變之化療劑組合。例如：本發明化合物、其鹽或前藥可組合使用烷化劑如：單獨組合氟尿嘧啶(5-FU)或再組合使用洛可林(leukovorin)；或組合使用其他烷化劑如(但不限於)：其他嘧啶類似物如：UFT、卡皮塔本(capecitabine)、金希塔本(gemcitabine)及希塔拉本(cytarabine)，烷基磺酸酯，例如：布速芬(busulfan)(用於治療慢性粒性細胞白血病)、英普速芬(improsulfan)及皮普速芬(piposulfan)；氮丙啶類，例如：苯達波(benzodepa)、卡波昆(carboquone)、米達波(meturedepa)及優達波(uredepa)；乙二胺類及甲基蜜胺類，例如；亞特胺(altretamine)、三伸乙基蜜胺、三伸乙基磷醯胺、三伸乙基硫代磷醯胺及三羥甲基蜜胺；及氮芥類，例如：苯丁酸氮芥(用於治療慢性淋巴性白血病、原發性巨球蛋白血症及非赫金氏(non-Hodgkin's)淋巴瘤)、環磷醯胺(用於治療赫金氏症、多發性骨髓瘤、神經母細胞瘤、乳癌、卵巢癌、肺癌、威倫氏(Wilm's)腫瘤及橫紋肌肉瘤)、伊母斯丁(estramustine)、伊弗醯胺(ifosfamide)、諾凡比金(novembrichin)、普尼母斯丁(prednimustine)及尿嘧啶芥類(用於治療原發性血小板增多症、非赫金氏淋巴瘤、赫金氏症及卵巢癌)；及三咔類，例如：達卡咔(dacarbazine)(用於治療軟組織肉瘤)。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（34）

同樣地，本發明化合物、其鹽或前藥與其他抗代謝化療劑組合使用時，亦應具有有利效果，此等化療劑爲如(但不限於)：葉酸類似物，例如：胺甲碟呤(用於治療急性淋巴球白血病、絨毛膜癌、蕈樣肉芽腫乳癌、頭與頸癌、及成骨性母瘤)及普特林(pteropterin)；及嘌呤類似物如：氫硫基嘌呤與硫脒(可用於治療急性粒性細胞白血病、急性淋巴細胞白血病及慢性粒性細胞白血病。

本發明化合物、其鹽或前藥與天然產物爲主之化療劑之組合亦經證實具有療效，此等化療劑如(但不限於)：長春花生物鹼，例如：長春花鹼(用於治療乳癌與睪丸癌)、長春新鹼及長春素(vinblastin)；epipodophylotoxins，例如：伊普賽(etoposide)及丹普賽(teniposide)，此二者均適用於治療睪丸癌及卡波西肉瘤；抗生素化療劑，例如：道諾紅微素、杜索紅黴素(doxorubicin)、表紅黴素(epirubicin)、絲裂黴素(用於治療胃癌、頸癌、結腸癌、乳癌、膀胱癌、及胰癌)、放線菌素D、狄莫索邁(temozolomide)、摺皺菌黴素(plicamycin)、博萊黴素(用於治療皮膚癌、食道癌及生殖泌尿道癌)；及酵素性化療劑如：L-天冬胺酸酶。

除了上述各點外，本發明化合物、鹽、或前藥與下列藥劑之組合應具有有利效果：鉑配位複合物(例如：希普拉定(cisplatin))；經取代脲類如：羥基脲；甲基肼衍生物，例如：普卡哄(procarbazine)；腎上腺皮質抑制劑例如：明妥丹(mitotane)、胺基谷狄醯胺(aminoglutethimide)；及激素與激素拮抗劑：腎上腺皮質類固醇(例如：脫氫可體松)、孕

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（35）

固酮(例如：羥基黃體酮己酸酯)；雌激素(例如：二乙基己烯雌酚)；抗雌激素如：塔莫希芬(tamoxifen)；雄激素，例如：睪固酮丙酸酯；及芳構化酶抑制劑(如：安索唑(anastrozole)。

最後，本發明化合物與米賽松(mitoxantrone)或帕立塔賽(paclitaxel)之組合對治療固體腫瘤癌症或白血病特別有效，如(但不限於)：急性骨髓性(非淋巴球性)白血病。

與上述一種或多種化療劑組合時應具有有利效果之本發明目前較佳化合物爲3-[2,4-二甲基-5-(2-氧-1,2-二氫(亞吲哚-3-基甲基)-1H-吡咯-3-基]丙酸。

本發明詳細說明

1.圖表之簡要說明

表1出示本發明某些化合物實例之化學結構式與生物活性。化合物編號對應於實例部份中之實例編號。亦即表1中化合物1之合成法即說明於實例1。所採用之生物分析法詳細說明於下文中。其結果以IC_{50}表示，亦即使目標PKT之活性相對於未添加試驗化合物之對照組中之PTK活性變化50%時之試驗化合物微莫耳(μM)濃度。明確言之，其結果顯示使目標PTK活性下降50%時所需之試驗化合物濃度。表1所示化合物僅供範例，並未以任何方式限制本發明範圍。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

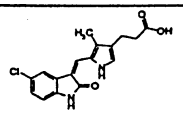
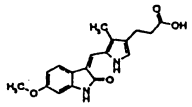
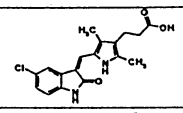
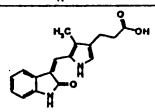
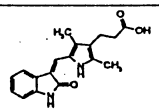
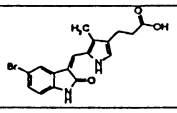
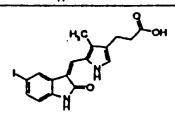
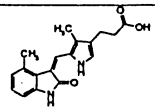
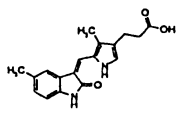
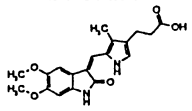
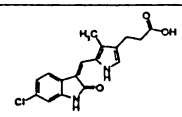
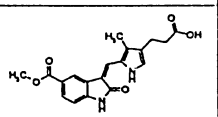
裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（36）

表 1

實例#	結構式	bio-FLK-1 IC_{50} (mM)	bio-PDGFr IC_{50} (mM)	bio-FGFR IC_{50} (mM)	HUVEC-VEGF IC_{50} (mM)	HUVEC-aFGF IC_{50} (mM)	BrdU-PDGFr IC_{50} (mM)	BrdU-FGFr IC_{50} (mM)	BrdU-EGFr IC_{50} (mM)
1		1.3	<0.78	20.2	0.38	21.4	8.4	8.8	12
2		89.1	0.14	12.1	1.6	31.6	1.2	>50	>50
3		1.2	0.042	0.86	0.05	2.8	2.5	30	>50
4		1.2	13	9	0.11	7.1	8.2	>50	>50
5		0.13	<1.2	8.81	0.42	9.3	10.7	46.8	95.9
6		6.8	0.26		0.63	18.4	8.6	>50	>50
7		19.2	2.2		1.34	12.3	11.4	>50	>50
8		0.77	0.37	0.68	0.74	4.52	8.2	>50	>50
9		1.06	0.13		0.33	13.4	6.3	>50	>50
10		11	<0.78	1.63	10.62	>50	5.1	>50	>50
11		0.7	0.13	7.73	1.4	9.6	11.1	>50	>50
12		52.3	13.6	3.3	11	24.6	1	>50	>50

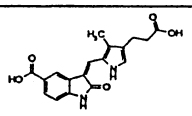
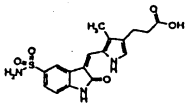
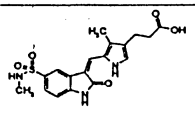
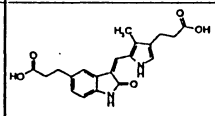
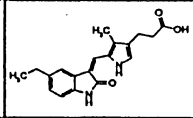
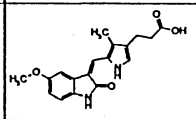
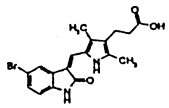
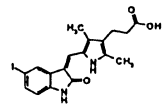
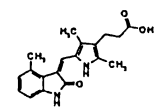
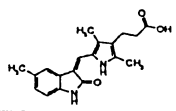
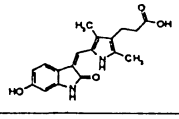
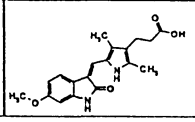
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4 規格（210 × 297 公釐）

五、發明說明（37）

實例#	結構式	bio-FLK-1 IC_{50} (mM)	bio-PDGFr IC_{50} (mM)	bio-FGFR IC_{50} (mM)	HUVEC-VEGF IC_{50} (mM)	HUVEC-aFGF IC_{50} (mM)	BrdU-PDGFr IC_{50} (mM)	BrdU-FGFr IC_{50} (mM)	BrdU-EGFr IC_{50} (mM)
13		31	4.2						
14		17	6						
15		6.6	<0.78						
16		>100	8.7						
17		10	10.3		1.2	20	6.3	44.3	>50
18		2.9	2		2.4	18.4	14.3	46	>50
19		0.006	0.063		0.07	3.6	3.7	39.6	>50
20		0.027	0.7		0.29	5	7.4	>50	>50
21		0.02	0.68	4	4	5.6	24.4	>50	>50
22		0.61	0.73		0.13	15.8	5	18	>50
23		5.2	0.8	0.68	3	1.1	10.8	>50	>50
24		<0.78	0.55	17.9	0.67	25.1	2.4	21	>50

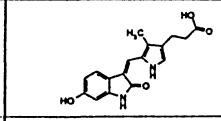
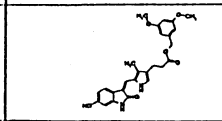
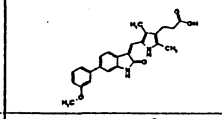
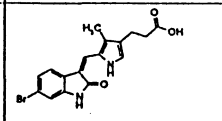
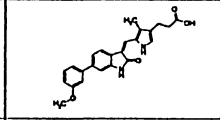
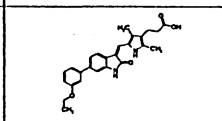
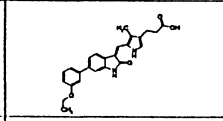
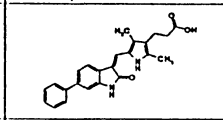
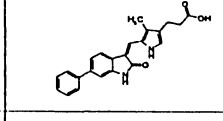
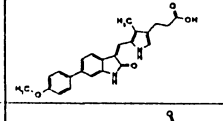
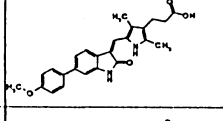
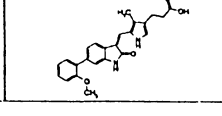
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4 規格（210 × 297 公釐）

五、發明說明（38）

實例#	結構式	bio-FLK-1 IC_{50} (mM)	bio-PDGFr IC_{50} (mM)	bio-FGFR IC_{50} (mM)	HUVEC-VEGF IC_{50} (mM)	HUVEC-aFGF IC_{50} (mM)	BrdU-PDGFr IC_{50} (mM)	BrdU-FGFr IC_{50} (mM)	BrdU-EGFr IC_{50} (mM)
25		0.8	1.2						
26		91.8	>100						
27		16.9	<0.78		0.99	1.5			
28		<0.78	0.16	0.04	0.15	1.9	3.4	37	>50
29		5.9	1.18	6.89	0.18	0.13	0.29	13.2	30.6
30		2.6	0.52	3.5	0.25	0.64	0.4	22	24.7
31		3.1	1.53		0.09	0.18	2.1	35.9	37.2
32		5.1	<0.009		10	10	0.076	12	32.7
33		4.6	0.16		0.81	1	0.1	21	30.5
34		24.7	3.1				3.8	34.7	36.8
35		14.4	1.2				1.59	35.8	>50
36		89.7	1.4						

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4 規格（210 × 297 公釐）

五、發明說明（ 39 ）

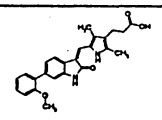
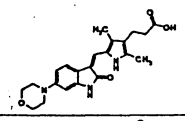
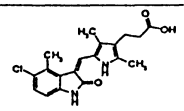
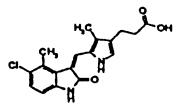
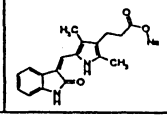
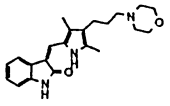
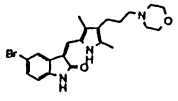
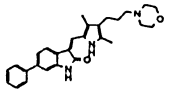
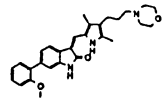
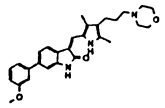
實例#	結構式	bio-FLK-1 IC_{50} (mM)	bio-PDGFr IC_{50} (mM)	bio-FGFR IC_{50} (mM)	HUVEC-VEGF IC_{50} (mM)	HUVEC-aFGF IC_{50} (mM)	BrdU-PDGFr IC_{50} (mM)	BrdU-FGFr IC_{50} (mM)	BrdU-EGFr IC_{50} (mM)
37		85.6	1.5						
38									
39									
40									
41		0.01	0.09	3.2					

表 2

實例#	結構式	bio-FLK-1 IC_{50} (mM)	bio-EGFr IC_{50} (mM)	bio-PDGFr IC_{50} (mM)	HUVEC-VEGF IC_{50} (mM)	HUVEC-aFGF IC_{50} (mM)	BrdU-PDGFr IC_{50} (mM)	BrdU-FGFr IC_{50} (mM)	BrdU-EGFr IC_{50} (mM)
42		<0.78	>100	2.3 1			0.38	34.93	>50
43		<0.78	>100	1.59			0.37	45.48	44.63
44		42.82	>100	0.27			0.44	>50	>50
45		>100	>100	7.53			1.02	4.96	3.9
46		>100	>100	>100			0.52	15.42	41.9

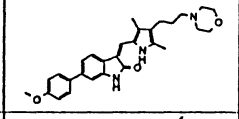
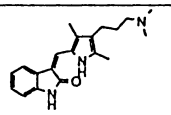
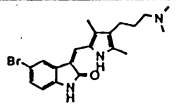
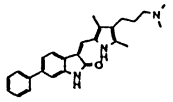
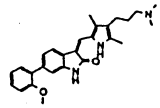
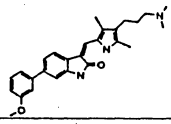
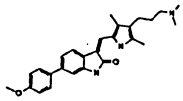
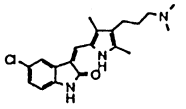
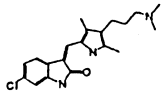
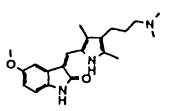
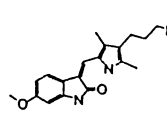
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準 (CNS)A4 規格 (210 × 297 公釐)

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

五、發明說明（ 40 ）

實例#	結構式	bio-FLK-1 IC_{50} (mM)	bio-EGFr IC_{50} (mM)	bio-PDGFr IC_{50} (mM)	HUVEC-VEGF IC_{50} (mM)	HUVEC-aFGF IC_{50} (mM)	BrdU-PDGFr IC_{50} (mM)	BrdU-FGFr IC_{50} (mM)	BrdU-EGFr IC_{50} (mM)
47		>100	>100	0.75			>50	>50	>50
48		<0.78	>100	0.053			0.079	9.93	12.6
49		<0.78	>100	<0.046			<0.069	1.26	4.1
50		5.16	>100	0.1			0.103	3.42	4
51		42.36	22.83	1.02			1.54	3.9	9.56
52		9.77	28.06	0.11			0.7	10.9	9.57
53		99.55	>100	4.35			0.48	3.1	3.86
54		<0.78	>100	<0.0078			<0.069	3.01	7.49
55		<0.78	86.56	<0.0078			<0.069	13.85	25.37
56		<0.78	>100	0.16			0.55	4.86	11.01
57		<0.78	>100	0.05			0.29	15.7	27.47

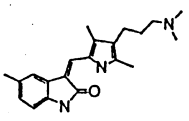
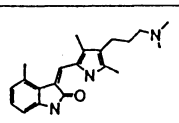
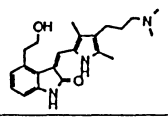
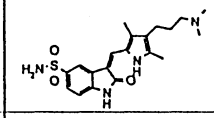
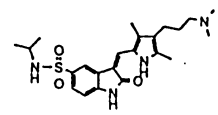
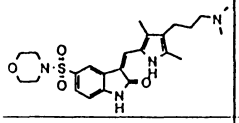
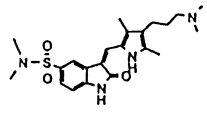
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4 規格（210 × 297 公釐）

五、發明說明（41）

實例#	結構式	bio-FLK-1 IC_{50} (mM)	bio-PDGFr IC_{50} (mM)	bio-FGFR IC_{50} (mM)	HUVEC-VEGF IC_{50} (mM)	HUVEC-aFGF IC_{50} (mM)	BrdU-PDGFr IC_{50} (mM)	BrdU-FGFr IC_{50} (mM)	BrdU-EGFr IC_{50} (mM)
58		<0.78	>100	<0.0078			<0.069	9.18	25.35
59		<0.78	>100	0.067			0.32	9.95	20.2
60		<0.78	>100	0.43			0.56	3	25.34
61		0.91	>100	0.44			1.04	11.31	6.59
62		1.97	>100	2.35			0.57	2.14	8.38
63		12.08	>100	2.41			10.32	29.09	29.77
64		15.07	>100	2.86			1.45	4.58	11.24

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（42）

表2出示本發明某些其他化合物之化學結構式。如表1，化合物編號對應於實例編號。上述生物分析法之一般說明同樣適用於表2之生物分析法。

2.適應症/目標疾病

受本發明化合物調控催化活性之PKs包括蛋白質酶酪胺酸激酶，其分兩種：受體酪胺酸激酶(RTKs)及細胞酪胺酸激酶(CTKs)及絲胺酸-蘇胺酸激酶(STKs)。RTK調節之訊號轉導係由在細胞外與專一性生長因子(配位體)之交互作用所引發，隨後進行受體二聚合作用，暫時刺激內因性蛋白質酪胺酸激酶活性及磷酸化。藉以爲細胞內訊號轉導分子建立結合位置，而與可促進適當細胞效應(例如：細胞分裂、細胞外微環境之代謝效應)之許多種細胞質訊號轉導形成複合物。參見史雷辛格(Schlessinger)與烏力奇(Ullrich), 1992, Neuron 9:303-391。

已有文獻顯示生長因子受體上之酪胺酸磷酸化位置之功能爲訊號分子之SH2 (src同質性)分子之高親和性結合位置。泛塔(Fantl)等人, 1992, Cell, 69:413-423，宋楊(Songyang)等人, 1994, Mol. Cell. Biol. 14:2777-2785；宋揚等人, 1993, Cell, 72:767-778，及柯赫(Koch), 1991, Science, 252:668-678。已鑑定出與RTK相關之數種細胞內受質蛋白質。其主要分成二類：(1)具有催化區之受質，及(2)缺乏此催化區但作爲適應物並與催化活性分子結合之受質。宋楊等人, 1993, Cell 72:767-778。受體與其受質之SH2區之交互作用專一性係由緊臨磷酸化酪胺酸殘基之胺基酸殘基決定。SH2區與特

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（43）

定受體上緊磷酸酪胺酸殘基之胺基酸殘基序列之間結合親和力差異性與其受質磷酸化形態所觀察到之差異性一致。宋揚等人，1993, Cell, 72:767-778。這些現象表示各RTK之功能不僅由其表現形態及配位體可利用性決定，亦由一系列下游訊號轉導途徑(其係受特定受體活性)決定。因此磷酸化作用提供一個重要的調節步驟，可決定由專一性生長因子受體及分化因子受體補充之訊號途徑之選擇性。

STKs(主要在胞液中)會影響細胞之內部生化學，通常爲造成PTK效應之下游反應。STK涉及引發DNA合成之訊號過程，及隨後之有絲分裂，造成細胞增殖。

因此，在其他效應中，PK訊號轉導造成細胞增殖、分化、生長及代謝。異常細胞增殖可能造成許多種病變與疾病，包括細胞增生發展如：癌瘤、肉瘤、神經膠質母細胞瘤及血管瘤，病變如：白血病、牛皮癬、動脈硬化、關節炎及糖尿病性腎病變及其他與未控制之血管分佈形成及/或脈管生成有關之病變。

要操作本發明時，並不需要完全了解本發明化合物抑制PKs之機轉。然而，雖然不因此受到任何特別機制或理論限制，但咸信該化合物與PKs之催化區中之胺基酸交互作用。PKs典型地具有二裂片式結構，其中ATP似乎與保留PKs胺基酸區域中兩葉片之間之裂縫結合。PKs之抑制劑咸信利用非共價交互作用(如：氫鍵、凡德瓦力及離子性交互作用)，在上述ATP與PKs結合之相同一般區中結合。更明確言之，咸認爲本發明化合物之2-吲哚啉酮成份結合在通常由

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（44）

ATP之腺苷環佔據之一般空間中。由於2-吲哚啉酮核心上各種取代基與針對特定PKs之專一胺基酸區之間額外之交互作用，使得特定分子對特定PK具有專一性。因此，不同吲哚啉酮取代基可能造成對特定PKs之優先結合性。在不同ATP(或其他核苷酸)結合位置上選擇化合物活性之能力使得本發明化合物適用於針對具有此等位置之任何蛋白質。因此本文揭示之化合物可用於試管內分析此等蛋白質，並透過與此等蛋白質之交互作用而具有活體內療效。

另一方面，與本發明化合物接觸而調控其催化活性之蛋白質激酶爲蛋白質酪胺酸激酶，更特定言之，受體蛋白質酪胺酸激酶。可受本發明化合物或其鹽調控催化活性之受體蛋白質酪胺酸激酶爲(但不限於)：EGF、HER2、HER3、HER4、IR、IGF-1R、IRR、PDGFRα、PDGFRβ、CSFIR、C-Kit、C-fms、Flk-1R、Flk4、KDR/Flk-1、Flt-1、FGFR-1R、FGFR-2R、FGFR-3R及FGFR-4R。

藉由與本發明化合物或其鹽或前藥接觸而調控其催化活性之蛋白質酪胺酸激酶亦可爲一種非受體或細胞蛋白質酪胺酸激酶(CTK)。因此，CTKs如(但不限於)：Src、Frk、Btk、Csk、Abl、ZAP70、Fes、Fps、Fak、Jak、Ack、Yes、Fyn、Lyn、Lck、Blk、Hck、Fgr及Yrk之催化活性可經由與本發明化合物或鹽接觸來調節。

另一組可經由與本發明化合物接觸而調控其催化活性之PKs爲絲胺酸-蘇胺酸蛋白質激酶如(但不限於)：CDK2及Raf。

本發明另一方面係有關治療或預防PK相關病變之方法，

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（45）

其係投與醫療有效量之本發明化合物或其鹽或前藥給生物體。

本發明另一方面爲含本發明化合物或其鹽或前藥之醫藥組合物，其係投與生物體，供預防或治療PK相關病變。

因此本發明係有關調控PK訊號轉導之化合物，其係影響RTKs、CTKs及/或STKs之酵素活性，藉以干擾此等蛋白質轉導之訊號。更特定言之，本發明係有關調控RTK、CTK及/或STK調節之訊號轉導途徑之化合物，作爲一種治療許多種固體腫瘤之療法，包括(但不限於)：癌瘤、肉瘤(包括卡波西肉瘤)、成紅細胞瘤、神經膠質母細胞瘤、腦膜瘤、星細胞瘤、黑色素瘤及肌胚細胞瘤。本發明亦涵括治療或預防非固體腫瘤癌症如：白血病。適應症包括(但不限於)：腦癌、膀胱癌、卵巢癌、胃癌、胰癌、結腸癌、血癌、肺癌及骨癌。

其他可使用本文說明之化合物預防、治療及研究與PK活性不當有關之病變型態實例爲(但不限於)：細胞增殖病變、纖維變性病變及代謝病變。

可利用本發明預防、治療或進一步研究之細胞增殖病變包括癌症、血管增殖性病變及腎小球細胞增殖性病變。

血管增殖性病變指與脈管生成異常及血管分佈形成異常。雖然脈管生成與血管分佈形成對許多正常生理過程(如：胚胎形成、黃體形成、傷口癒合及器官再生)扮演重要角色，但在癌症發展中亦扮演中樞角色，造成維持腫瘤存活之新毛細血管形成。其他血管增殖病變實例包括關節炎，此時

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（46）

新毛細血管侵入關節並破壞軟骨，及眼部疾病，如：糖尿糖性視網膜病，其中視網膜中之新毛細血管侵入玻璃體，出血，以致失明。

現已鑑定出二種對VEGF具高度結合親和力之結構性相關之RTKs：以fus酪胺酸1(fit-1)受體(希卜亞(Shibuya)等人，1990, Oncogene, 5:519-524；狄弗瑞斯(De Vries)等人，1992, Science, 255:989-991)及KDR/FLK-1受體，亦稱為VEGF-R2。有報告指出血管內皮生長因子(VEGF)為具有試管內內皮細胞生長促進活性之內皮細胞專一性有絲分裂原。費拉(Ferrara)與亨賽(Henzel)，1989, Biochein. Biophys. Res. Comm., 161:851-858；華斯曼(Vaisman)等人，1990, J. Biol. Chem., 265:19461-19566。美國申請案序號08/193,829，08/038,596及07/975,750之報告強烈認為VEGF不僅負責內皮細胞增殖，而且為正常及病理性血管分佈形成作用之主要調節劑。一般參見克拉斯本(Klagsburn)與索克(Soker)，1993, Current Biology, 3 (10) 699-702，胡克(Houck)等人，1992, J. Biol. Chem., 267:26031-26037。

正常之脈管生成及血管分佈形成作用對許多種生理過程扮演重要角色，如：胚胎發展、傷口癒合、器官再生及女性生殖過程如：排卵期間黃體中濾泡發展及懷孕後之胎盤生長。弗克富(Folkman)與新英(Shing)，1992, J. Biological Chem., 276 (16):10931-34。不受控制之脈管生成及/或血管分佈形成與如糖尿病等疾病有關，並與依賴脈管生長作用生長之惡性固體腫瘤有關。克拉斯本與索克，1993, Current

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（47）

Biology, 3(10):699-702；福克漢(Folkham), 1991, J. Natl. Cancer Inst., 82:4-6；威德(Weidner)等人, 1991, New Engl. J. Med., 324:1-5。

據推斷VEGF在血管分佈形成及脈管生成期間之內皮細胞增殖與移動過程扮演之角色顯示，其在此等過程中，對KDR/FLK-1受體佔有重要影響。如：糖尿病(福克曼，198，"栓塞與止血之第十一屆會議(XIth Congress of Thrombosis and Haemostasis)(弗史塔(Verstraeta)等人編輯)，pp. 583-596，李汶大學出版社(Leuven University Press, Leuven)及關節炎，及惡性腫瘤生長等疾病可能由不受控制之血管分佈形成作用引起。參見例如：福克曼(Folkman), 1971, N. Engl. J. Med., 285:1182-1186。與VEGF專一性結合之受體為調節及調控脈管生成及/或血管分佈形成作用及涉及此等過程所引起異常細胞生長之多種嚴重疾病之重要且強力之醫療目標。普洛曼(Plowman)等人, 1994, DN&P, 7(6):334-339。更特定言之，KDR/FLK-1受體在新脈管生成作用中之高度專一性角色使其成為治療癌症及其他涉及不受控制之血管形成之疾病之選擇目標。

因此，本發明一方面係有關可以調節及/或調控酪胺酸激酶訊號轉導(包括KDR/FLK-1受體訊號轉導)以抑制或促進血管分佈形成及/或脈管生成之化合物，亦即可抑制、預防或干擾KDR/FLK-1受配位體(如：VEGF)活化時所轉導之訊號。雖然咸信本發明化合物沿著酪胺酸激酶訊號轉導途徑作用在受體或其他成份上，但其亦可直接作用在因不受控

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（48）

制之血管分佈形成所造成之腫瘤細胞上。

雖然通稱"flk-I"受體在人類及鼠科相對部份之命名上不同，但在許多方面仍可交換使用。鼠科受體(Flk-1)及其人類相對部份(KDR)在細胞內區域序列同質性為93.4%。同樣地，鼠科FLK-I與人類VEGF結合之親和力與小白鼠VEGF之結合親和力相同，因此可被來自這二種品種之配位體活化。米勒爾(Millauer)等人，1993, Cell, 72:835-846；昆恩(Quinn)等人，1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:7533-7537。當FLK-1與隨後之酪胺酸磷酸化人類RTK受質(例如：PLC-γ或p85)共同表現在293細胞(人類胚胎腎纖維母細胞瘤)時，Flk-1與該受質結合。

因此依賴FLK-1受體之模式可直接應用於探討KDR受體。例如：使用鼠科FLK-1受體來鑑定調節鼠科訊號轉導途徑之化合物之方法可直接用於鑑定調節人類訊號轉導途徑之化合物，亦即調節與KDR受體相關活性之化合物。因此，於試管內鑑定為KDR/FLK-1之抑制劑之化合物可於合適之活性內模式中確認。活體內小白鼠及老鼠兩種動物模式均經過證實對檢測作用在KDR/FLK-1誘發之訊號轉導途徑上之製劑之臨休潛力具有極佳價值。

因此本發明一方面係有關調節、調控與/或抑制脈管生成及/或血管分佈形成之化合物，其係影響KDR/FLK-1受體之酵素活性及干擾KDR/FLK-1轉導之訊號。本發明另一方面係有關調節、調控及/或抑制KDR/FLK-1調節之訊號轉導途徑之化合物，作為治療許多種固體腫瘤之療法，包括(但不

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（49）

限於)：神經膠質母細胞瘤、黑瘤及卡波西肉瘤，及卵巢、肺、乳房、攝護腺、胰、結腸及表皮等癌瘤。此外，數據顯示，投與抑制KDR/Flk-1調節之訊號轉導途徑之化合物亦可用於治療血管瘤、再狹窄及糖尿病視網膜病。

本發明另一方面係有關利用其他受體調節之途徑(包括含flt-1受體之途徑)抑制脈管生成及血管分佈形成。

受體酪胺酸激酶調節之訊號轉導係由細胞外與專一性生長因子(配位體)交互作用引發，隨後進行受體二聚合，內因性蛋白質酪胺酸激酶活性之暫時刺激，及自體磷酸化。藉以為細胞內訊號轉導分子建立結合位置，而與許多促進適當細胞效應(例如：細胞分裂及對細胞外微環境之代謝效果)之細胞質訊號分子形成複合物。參見史雷辛格與烏力奇，1992, Neuron, 9:1-20。

KDR/FLK-1之細胞內區域與PDGF-β受體(50.3%同質性)及/或相關flt-1受體之細胞內區域之相近同質性顯示誘發了重疊之訊號轉導途徑。例如：已顯示PDGF-β受體、src族群之成員(湯利(Twamley)等人，1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:7696-7700)、磷醯基肌醇-3'-激酶(胡(Hu)等人，1992, Mol. Cell. Biol., 12:981-990)、磷脂酶cγ(卡希西安(Kashishian) & 古柏(Cooper), 1993, Mol. Cell. Biol., 4:49-51)、ras-GTPase-活化蛋白質(卡希西安等人，1992, EMBO J., 11:1373-1382)，PTP-ID/syp(卡拉斯卡斯(Kazlauskas)等人，1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 10 90:6939-6943)、Grb2(艾弗森(Arvidsson)等人，1994, Mol. Cell. Biol., 14:6715-

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

五、發明說明（50）

6726)，及適應分子Shc與Nck(尼希木拉(Nishimura)等人，1993, Mol. Cell. Biol., 13:6889-6896)等可與涉及不同自體磷酸化位置之區域結合。一般參見克拉森(Claesson)-威爾希(Welsh), 1994, Prog. Growth Factor Res., 5:37-54。因此，受KDR/FLK-1活化之訊號轉導途徑似乎包括ras途徑(洛查克斯(Rozakis)等人, 1992, Nature, 360:689-692)、PI-3'-激酶、src調節途徑及plcγ-調節途徑。此等途徑分別在內皮細胞中KDR/FLK-1之血管分佈形成及/或脈管生成效應中扮演重要角色。因此本發明另一方面係有關以本文說明之有機化合物於調控血管分佈形成及脈管生成作用上之用途，因爲此等作用過程係受此等途徑控制。

反之，與血管萎縮、收縮或封閉有關之病變(如：血管再狹窄)亦涉及其中，因此可使用本發明方法治療或預防。

纖維變性病變指細胞外基質形成異常。纖維變性病變實例包括肝硬化及腎小球細胞增殖性病變。肝硬化特徵爲細胞外基質組成份增加，而形成肝疤。病毒感染(如：肝炎)亦可能引起細胞外基質增加而形成肝疤。脂細胞似乎在肝硬化中扮演主要角色。其他涉及之纖維變性病變包括動脈硬化症。

腎小球細胞增殖性病變指因腎小球細胞增殖異常所致之病變。腎小球增殖性病變包括：各種人類腎病如：血管球性腎炎、糖尿病性腎病及惡性腎硬化，及如：栓塞性微血管病症狀、移植排斥及血管球病等疾病。RTK PDGFR已涉及腎小球細胞增殖作用之維持。弗洛奇(Floege)等人, 1993,

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（51）

Kidney International 43:47S-54S。

許多種癌症為細胞增殖性病變，且如前述，PKs與細胞增殖性病變有關。因此，不難發現PKs(如，例如：RTK族群之成員)與癌症之發展有關。其中有些受體，如：EGFR(土奇(Tuzi)等人，1991, Br. J. Cancer 63:227-233，特普(Torp)等人，1992, APMIS, 100:713-719)、HER2/neu(斯拉門(Slamon)等人，1989, Science 244:707-712)及PDGF-R(庫馬巴(Kumabe)等人，1992, Oncogene, 7:627-633)於許多腫瘤中過度表現，並/或由自體分泌環(autocrine loops)持續活化。事實上，在最常見及嚴重之癌症中，此等受體均過度表現(阿賽卡(Akbasak)與宋能-阿賽卡(Suner-Akbasak)等人，1992, J. Neurol. Sci., 111:119-133，狄克森(Dickson)等人，1992, Cancer Treatment Res., 61:249-273，柯克(Korc)等人，1992, J. Clin. Invest., 90:1352-1360)且已經證實有自體分泌環(李(Lee)與登尼哥(Donoghue), 1992, J. Cell. Biol., 118:1057-1070，柯克(Korc)等人，如上述，阿賽卡及宋能阿賽卡，等人，如上述)。例如：EGFR與鱗狀細胞癌瘤、星細胞瘤、神經膠質母細胞瘤、頭與頸癌、肺癌及膀胱癌有關。HER2與乳癌、卵巢癌、胃癌、肺癌、胰癌及膀胱癌有關。PDGFR與神經膠質母細胞瘤及黑色素瘤，與肺癌、卵巢癌及攝護腺癌有關。RTK c-met與惡性腫瘤形成有關。例如：c-met與癌症中之結腸直腸癌、甲狀腺癌、胰癌、胃癌、及肝細胞癌瘤及淋巴瘤有關。此外c-met與白血病有關。罹患赫金氏症及布克茲症(Burkitts disease)之患者有c-met基因過度表現之現象。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（52）

IGF-IR除了涉及營養性支持及II型糖尿病外，亦與數種癌症有關。例如：IGF-I涉及數種腫瘤型態之自體分泌生長刺激劑，例如：人類乳癌癌瘤細胞(阿狄加(Arteaga)等人，1989, J. Clin. Invest. 84:1418-1423)及小肺腫瘤細胞(馬考利(Macauley)等人，1990, Cancer Res., 50:2511-2517)。此外，IGF-I雖然完全涉及神經系統之正常生長與分化，但亦似乎爲人類神經膠質之自體分泌刺激劑。山柏格(Sandberg)-諾奎斯特(Nordqvist)等人，1993, Cancer Res. 53:2475-2478。IGF-IR及其配位體於細胞增殖作用中之重要性進一步由培養物中多種細胞型態(纖維母細胞、表皮細胞、平滑肌細胞、T-淋巴細胞、骨髓細胞、軟骨細胞及成骨細胞(骨髓之幹細胞))受IGF-I刺激生長之事實來支持。哥林(Goldring)與哥林(Goldring), 1991, Eukaryotic Gene Expression, 1:301-326。在一系列最近文獻中，巴斯加(Baserga)認爲IGF-IR在轉形機轉中扮演中心角色，因此爲治療多種人類惡性疾病之較佳目標。巴斯加，1995, Cancer Res., 55:249-252，巴斯加，1994, Cell 79:927-930，克普拉(Coppola)等人，1994, Mol. Cell. Biol., 14:4588-4595。

STKs涉及許多種癌症，主要包括乳癌(康斯(Cance)等人，Int. J. Cancer., 54:571-77 (1993))。

PK活性異常與疾病之間關係並不限於癌症。例如：RTKs與下列疾病有關，如：牛皮癬、糖尿病、子宮內膜異位、血管分佈形成、粥瘤斑發展、阿茲海默氏症、凡希波-林道症(von Hippel-Lindau disease)、表皮過度增生、神經變性疾

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（53）

病、與年齡有關之斑變性、及血管瘤、例如：EGFR涉及角膜與皮膚傷口癒合。胰島素R及IGF-IR缺陷涉及II型糖尿病。有關專一性RTKs與其醫療適應症之間更完整之相關性示於普浴曼(Plowman)等人, 1994, DN&P 7:334-339。

如上述，不僅RTKs，而且CTKs(包括，但不限於：src、abl、fps、yes、fyn、lyn、lck、blk、hck、fgr、及yrk)(概略說明於波倫(Bolen)等人, 1992, FASEB J., 6:3403-3409)均涉及增生及代謝訊號轉導途徑，因此應該涉及(而且已經證實涉及)許多種與本發明有關之PTK調節之病變。例如：已顯示突變之src(v-src)為小雞之致癌蛋白質($pp60^{v\text{-}src}$)。然而，其細胞同質物，即原生致癌基因$pp60^{c\text{-}src}$傳遞許多種受體之致癌訊號。EGFR或HER2/neu於腫瘤中過度表現會造成$pp60^{csrc}$之構成性活化作用，其係惡性細胞之特性，但不存在於正常細胞中。另一方面，缺乏c-src表現之小白鼠出現骨質石化性表型，表示c-src在成骨功能中之重要參與性，及可能涉及相關病變。

同樣地，Zap70涉及T-細胞訊號，此點可能與自體免疫疾病相關。

STKs與發炎、自體免疫疾病、免疫反應、及過度增生病變如：血管再狹窄、纖維變性、牛皮癬、骨關節炎及類風濕關節炎等有關。

PKs亦涉及胚胎植入。因此本發明化合物可提供預防此等胚胎植入之有效方法，因而適用為生育控制劑。

最後，RTKs與CTKs目前均懷疑涉及過度免疫病變。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（54）

本發明另一方面爲鑑定調節上述一種或多種蛋白質激酶之催化活性之化合物。該方法涉及使表現所需蛋白質激酶之細胞與本發明化合物(或其鹽或前藥)接觸，並追踪化合物對細胞之任何效應。該效應可爲任何可透過肉眼觀察或利用儀器觀察到之細胞表型變化或沒有變化。所追踪之細胞表型有或沒有變化可爲例如(但不限於)：細胞中蛋白質激酶之催化活性有或沒有變化，或蛋白質激酶與天然結合對象之交互作用有或沒有變化。

本發明例舉之許多化合物對數種RTKs之效應實例示於表1與2，及下文生物實例部份。本文出示之化合物及數據未以任何方式構成本發明範圍之限制。

5.醫藥組合物及用途

本發明化合物、其前藥或化合物或其前藥之生理上可接受之鹽可呈其本身投與人類患者或可呈醫藥組合物投藥，該組合物係由上述材料與合適載體或賦形劑混合。調配及投與藥物之技術可參見：雷氏醫藥學"，馬克出版社，賓州伊斯頓市(Remington's Pharmacological Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA)，最新版。

投藥途徑

本文中採用之"投與"或"投藥"係指傳送本發明化合物，其鹽、或前藥或含本發明化合物、其鹽或前藥之醫藥組合物給生物體，供預防或治療PK相關病變。

合適投藥途徑包括(但不限於)：口服、經直腸、經黏膜或經腸部投藥，或肌內、皮下、髓內、椎管內、直接心室

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（55）

內、靜脈內、玻璃體內、腹膜內、鼻內或眼內注射。較佳投藥途徑爲經口及非經腸式。

或者，可採局部投與化合物替代全身性投藥，例如：直接注射化合物至固體腫瘤內，通常呈貯積式或持續釋放式調配物。

此外，可利用例如：經腫瘤專一性抗體包覆之微脂粒投與藥物至目標之藥物傳送系統中。微脂粒可針對腫瘤或被腫瘤選擇性吸收。

組合物/調配物

本發明醫藥組合物可利用相關技藝習知之方法製造，例如：利用傳統混合法、溶解法、製粒法、包糖衣法、磨粉法、乳化法、包埋法、截留法或冷凍乾燥法。

根據本發明使用之醫藥組合物可依傳統方式使用一種或多種生理上可接受之載體調配，該載體包括促進活性化合物加工成醫藥用製劑之賦形劑與輔劑。適當調配物依選用之投藥途徑而定。

用於注射之本發明化合物可調配成水溶液，最好含有生理上可相容之緩衝液中，如：漢克氏(Hanks')溶液，林格氏溶液、或生理食鹽緩衝液。用於經黏膜投藥時，在調配物中採用適合通透障壁之穿透劑。此等穿透劑係相關技藝習知者。

用於口服投藥時，化合物之調配法可由活性化合物與相關技藝上習知之醫藥上可接受之載體組合。此等載體使得本發明化合物調配成錠劑、丸劑、扁囊錠、糖衣錠、膠囊、

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（56）

液體、凝膠、糖漿、漿物、懸浮液、等等，供患者口服。口服用之醫藥製劑可使用固體賦形劑，視需要研磨所得之混合物，加工混合物成粒劑，若必要時可先添加其他合適輔劑再加工，得到錠劑或糖衣錠核心。適用賦形劑特定言之爲填料如：糖類，包括乳糖、蔗糖、甘露糖醇或山梨糖醇，纖維素製劑如，例如：玉米澱粉、小麥澱粉、稻米澱粉、及馬鈴薯澱粉、及其他材料如：明膠、黃蓍膠、甲基纖維素、羥丙基甲基纖維素、羧甲基纖維素鈉、及/或聚乙烯基吡咯烷酮(PVP)。若需要時，可添加崩解劑，如：交鏈聚乙烯吡咯烷酮、洋菜、或藻酸。亦可添加鹽如：藻酸鈉。

糖衣錠核心可包覆合適包衣。因此可使用濃縮洋菜溶液，其可視需要包含阿拉伯膠、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、羧乙烯聚合物膠、聚乙二醇、及/或二氧化鈦、清漆溶液、及合適之有機溶劑或溶劑混合物。可添加染料或色素至錠劑或糖衣錠包衣中，供鑑定或判別不同活性化合物劑量之組合。

可口服之醫藥組合物包括由明膠製備之推合式膠囊，及由明膠與增塑劑如：甘油或山梨糖醇製備之軟式密合膠囊。推合式膠囊可包含活性成份與填料(如：乳糖)、結合劑(如：澱粉)及/或潤滑劑(如：滑石或硬脂酸鎂)及視需要選用增塑劑之混合物。軟式膠囊中，活性化合物可溶解或懸浮於合適液體中如：脂肪油類、液態石蠟、或液態聚乙二醇。此等調配物中亦可添加安定劑。

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（57）

供吸入投藥時，根據本發明使用之化合物宜呈氣溶膠噴液形式，使用加壓罐或霧化器及合適推進劑傳送，例如(但不限於)：二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、或二氧化碳。若使用加壓氣溶膠時，可利用傳送定量之開關控制劑量單位。吸入器或吹藥器使用之例如：明膠膠囊及卡式管可由含化合物及合適粉末基質(如：乳糖或澱粉)之粉末混合物調配。

化合物亦可調配成非經腸式投藥，例如：大九劑注射或連續輸液。注射用調配物可呈單位劑型，例如：安瓶或多劑量容器，其中添加添加物。組合物可呈含於水性或油性載劑中之懸浮液、溶液或乳液形式，且可包含調配材料如：懸浮劑、安定劑及/或勻散劑。

用於非經腸式投藥之醫藥組合物包括活性化合物之水溶型，如(但不限於)：鹽之水溶液。此外，活性化合物之懸浮液可於親脂性載劑中製備。合適之親脂性載劑包括脂肪油類如：芝麻油、合成脂肪酸脂如：油酸乙酯及甘油三酸酯，或如：微脂粒之材料。水性注射懸浮液可包含提高懸浮液黏性之物質，如：羧甲基纖維素鈉、山梨糖醇或葡聚糖。懸浮液可視需要亦包含合適安定劑及/或提高化合物溶解度之製備，供製備高濃度溶液。

或者，活性成份可呈粉末形式，使用前與合適載劑(例如：無菌、無熱原水)重新組成。

化合物亦可調配成直腸用組合物如：塞劑或保留灌腸劑，其係使用例如：一般塞劑基質如：可可奶油或其他甘油酯

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（58）

調配。

除了前述調配物外，化合物亦可調配成貯積式製劑。此等長效性調配物可利用植入式(例如：皮下或肌內)或肌內注射投藥。本發明化合物可使用合適聚合性或疏水性材料(例如：使用醫藥上可接受之油形成乳液)，使用離子交換樹脂，或呈難溶性衍生物如(但不限於)：難溶性鹽調配成適合此投藥途徑。

用於本發明疏水性化合物之醫藥載體之不設限實例爲含苄醇、非極性界面活性劑、與水互溶之有機聚合物及水相之共溶劑系統(如：VPD共溶劑系統)。VPD爲含3% w/v苄醇、8% w/v非極性界面活性劑聚山梨酸酯80™，及65% w/v聚乙二醇300，以無水乙醇補充體積形成之溶液。VPD共溶劑系統(VPD：D5W)包括VPD使用5%右旋糖之水溶液稀釋1：1。此共溶劑系統可完全溶解疏水性化合物，當全身投藥時，其本身產生之毒性低。此等共溶劑系統之比例當然可以有相當大變化，但不應破壞其溶解度及毒性特性。此外，共溶劑成份可以改變：例如：可改用其他低毒性非極性界面活性劑替代聚山梨酸酯80™，聚乙二醇之比例可以改變，可改用其他生物相容性聚合物替代聚乙二醇，例如：聚乙烯吡咯烷酮，且可改用其他糖類或多醣類替代右旋糖。

或者，可使用用於傳送疏水性醫藥化合物之傳送系統。微脂粒及乳液爲用於疏水性藥物之習知傳送載劑或載體實例。此外，亦可使用某些有機溶劑如：二甲亞碸，但通常要冒毒性較高之風險。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（59）

此外，化合物可使用持續釋放系統傳送，如：含醫療劑之固體疏水性聚合物之半通透性基質。已知各種不同持續釋放之材料，且係相關技藝專家們習知者。持續釋放膠囊可依其化學性質而定，釋放化合物長達數週至100天以上。根據醫療劑之化學性質及生物安定性而定，亦可使用其他安定蛋白質之方法。

本文之醫藥組合物亦可包含合適固體相或凝膠相載體或賦形劑。此等載體或賦形劑實例包括(但不限於)：碳酸鈣、磷酸鈣、各種糖類、澱粉、纖維素衍生物、明膠及聚合物如：聚乙二醇。

本發明許多種PK調控化合物可呈生理上可接受之鹽型，其中申請專利權之化合物可形成正電價或負電價物質。化合物形成正電價部份之鹽實例包括(但不限於)：四級銨(如本文中定義)、鹽類如：鹽酸鹽、硫酸鹽、碳酸鹽、乳酸鹽、酒石酸鹽、馬來酸鹽、琥珀酸鹽，其中四級銨基之氮原子爲與適當酸反應之本發明選定之化合物之氮。本發明化合物形成負電價物質之鹽包括(但不限於)：由化合物之羧酸根與適當鹼(例如：氫氧化鈉(NaOH)、氫氧化鉀(KOH)、氫氧化鈣($Ca(OH_2)$，等等反應形成之鈉、鉀、鈣及鎂鹽。

劑量

適用於本發明之醫藥組合物包括其中活性成份含量足以達到預定目的(亦即調控PK活性或治療或預防PK相關病變)之組合物。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（60）

更明確言之，醫療有效量指化合物之用量可有效防止、減輕或改善疾病症狀或延長受治療患者之生命。

醫療有效量之決定方式係在相關技藝專家之能力範圍內，尤其可根據本文提供之詳細說明決定。

本發明方法採用之任何化合物之醫療有效量或劑量可先由細胞培養物分析法估計。然後，調配該劑量用於動物模式，使之達到循環之濃度範圍，其包括於細胞培養物中測定IC_{50}(亦即達到PK活性最大抑制率之一半時之試驗化合物濃度)。此等資料可用於更精確測定適用於人類之劑量。

本文說明之化合物之毒性與療效可依標準醫藥方法，於細胞培養物中或實驗動物中決定，例如：測定特定化合物之IC_{50}及LD_{50}(均討論於本文中)。得自此等細胞培養物分析法及動實驗之數據可用於調配人類用之劑量範圍。該劑量可依採用之劑量形式及投藥途徑而定。各個醫師可根據患者之條件選擇正確調配物、投藥途徑及劑量(參見例如芬格(Fingl)等人，1975，"醫療學之藥理基礎"(The Pharmacological Basis of Therapeutics"，第1章，p.1)。

劑量及投藥間隔可個別調整，使活性物質之血漿濃度足以維持激酶調控效果。此等血漿濃度係指最小有效濃度(MECs)。MEC隨各化合物變化，且可由試管內數據估計，例如：可採用本文說明之分析法確認達到抑制激酶50至90%時之濃度。達到MEC之必要劑量將依個別特性及投藥途徑而定。可採用HPLC分析法或生物分析法來測定血漿濃度。

亦可採用MEC值來測定投藥間隔。投與化合物採用之療

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（61）

程應使當時之血漿濃度維持高於MEC 10至90%，以30至90%較佳，50至90%最佳。

若局部投藥或選擇性吸收時，藥物之有效局部濃度不一定與血漿濃度有關，且可採用其他相關技藝已知之方法來測定正確測量及間隔。

組合物之投藥量當然依待治療之對象、罹病之嚴重性，投藥方式、參與之醫師之判斷，等等決定。

包裝

該組合物若需要時，可呈包裝或配送器裝置(如：FDA核准之套組)，其可包含一種或多種含有活性成份之單位劑型。該包裝可例如：包含金屬箔或塑膠墊，如：發泡包。包裝或配送器裝置可附加投藥指示說明。包裝或配送器裝置亦可在容器上附上由管理醫藥製造、用法或販賣之政府機構署名之告示，該告示表示該組合物之形式或人類或獸醫學投藥形式已取得政府機構核准。此等告示可爲例如：由管理藥品之美國食品藥物管理局核准的標識或合格產品之夾單。含有於可相容之醫藥載體中調配之本發明化合物之組合物亦較佳，置入適當容器中，並標明治療適應症之方法。標示上說明之適應症可包括治療腫瘤、抑制血管分佈形成、治療纖維變性、糖尿病，等等。

6.合成法

本發明化合物及2-羥吲哚前體與醛很容易使用化學技藝上習知之技術合成。相關技藝專家們咸了解，形成本發明化合物之其他合成途徑亦可取得，且下文僅供實例，並未

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（62）

設限。

A. 一般合成法

採用下列一般方法製備本發明化合物：

由適當取代之2-羥吲哚(1當量)、適當取代之醛(1.2當量)及六氫吡啶(0.1當量)與乙醇(1至2毫升/毫莫耳2-羥吲哚)混合，混合物於90℃下加熱3至5小時。冷卻後，反應混合物濃縮，酸化至pH 3。過濾形成之沈澱物，以水洗至pH 7，然後以冷乙醇、乙酸乙酯及/或已烷洗滌，眞空乾燥，產生目標化合物。產物可視需要經層析法進一步純化。

B. 2-羥吲哚

下列實例爲本發明化合物之2-羥吲哚前體之代表性合成法。此等2-羥吲哚採用上述一般合成法或下文C節例舉之方法，與適當取代之吡咯醛反應，形成本申請專利權之化合物。咸了解，下列合成法並未在合成法上或例舉之羥吲哚合成上構成限制。

5-胺基-2-羥吲哚

取5-硝基-2-羥吲哚(6.3克)於甲醇中，經10% Pd/C氫化，產生3.0克(收率60%)標題化合物之白色固體。

5-溴-2-羥吲哚

取含2-羥吲哚(1.3克)之20毫升乙腈冷卻至-10℃，緩緩攪拌添加2.0克N-溴琥珀醯亞胺。於-10℃下攪拌反應1小時，於0℃下2小時。收集沈澱，以水洗滌，乾燥，產生1.9克(收率90%)標題化合物。

4-甲基-2-羥吲哚

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（63）

攪拌添加含草酸二乙酯(30毫升)之20毫升無水醚至含19克乙醇鉀懸浮之50毫升無水醚中。混合物於冰浴中冷卻，緩緩添加含20毫升3-硝基-鄰二甲苯之20毫升無水醚。濃稠之深紅色混合物回流加熱0.5小時，濃縮成深紅色固體，以10%氫氧化鈉處理，直到幾乎所有固體均溶解爲止。深紅色混合物經30%過氧化氫處理，直到紅色變成黃色。混合物以10%氫氧化鈉及30%過氧化氫交替處理，直到深紅色不再出現爲止。濾除固體，以6N鹽酸酸化濾液。所得沈澱物經眞空過濾收集，以水洗滌，眞空乾燥，產生9.8克(收率45%)2-甲基-6-硝基苯乙酸之灰白色固體。固體於甲醇中經10% Pd/C氫化，產生9.04克標題化合物之白色固體。

7-溴-5-氟-2-羥吲哚

取5-氟-2-羥吲哚(16.8克)及19.6克N-溴琥珀醯亞胺懸浮於140毫升乙腈中，回流3小時。回流2小時時，薄層層析法(矽石，乙酸乙酯)顯示有5-氟-2-羥吲哚或N-溴琥珀醯亞胺(Rf 0.8)，再回流1小時後，產物(Rf 0.85)及第二產物(Rf 0.9)之比例沒有改變。混合物冷卻至10℃，眞空過濾收集沈澱，以25毫升乙醇洗滌，於漏斗中抽乾20分鐘，產生14.1克濕產物(收率56%)。固體懸浮於200毫升變性乙醇中，攪拌洗滌漿狀物，回流10分鐘。混合物於冰浴中冷卻至10℃。眞空過濾收集固體產物，以25毫升乙醇洗滌，於40℃眞空乾燥，產生12.7克(收率51%) 7-溴-5-氟-2-羥吲哚。

5-氟-2-羥吲哚

取5-氟吲哚滿二酮(8.2克)溶於50毫升肼水合物中，回流

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（64）

1.0小時。反應混合物倒至冰水中。沈澱物過濾，以水洗滌，於真空烘箱中乾燥，產生標題化合物。

5-硝基-2-羥吲哚

取2-羥吲哚(6.5克)溶於25毫升濃硫酸中，混合物保持-10至-15℃，同時滴加2.1毫升發烟硝酸。添加硝酸後，反應混合物於0℃下攪拌0.5小時，倒至冰水中。過濾收集沈澱，以水洗滌，自50%乙酸中結晶。結晶產物過濾，以水洗滌，真空乾燥，產生6.3克(70%) 5-硝基-2-羥吲哚。

5-碘-2-羥吲哚

取2-羥吲哚(82.9克)懸浮於630毫升乙酸中，並機械攪拌，混合物於冰水浴中冷卻至10℃，以10分鐘時間分批添加N-碘琥珀醯亞胺固體(175克)。添加完畢後，混合物於10℃下攪拌1.0小時。總是存在之懸浮固體在此時轉呈非常黏稠。真空過濾收集固體，以100毫升50%乙酸之水溶液洗滌，然後以200毫升水洗滌，於漏斗中抽乾20分鐘。產物真空乾燥，產生93.5克(36%) 5-碘-2-羥吲哚，由質子NMR測得含約5% 2-羥吲哚。

5-甲基-2-羥吲哚

取5-甲基吲哚滿二酮(15.0克)及60毫升肼水合物於140至160℃下加熱4小時。薄層層析法(乙酸乙酯：己烷1：2，矽膠)顯示不殘留起始物。反應混合物冷卻至室溫，倒至300毫升冰水中，以6N鹽酸酸化至pH 2。於室溫下攪拌2天後，真空過濾收集沈澱，以水洗滌及真空乾燥，產生6.5克(收率47%) 5-甲基-2-羥吲哚。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（65）

5-溴-4-甲基羥吲哚及5,7-二溴-4-甲基羥吲哚

取4-甲基-2-羥吲哚(5克)於40毫升乙腈中，經7.26克N-溴琥珀醯亞胺處理，於室溫下攪拌4小時。薄層層析法(乙酸乙酯：己烷1：2，矽膠)顯示含5-溴(Rf 0.3)及5,7-二溴(Rf 0.5)產物之混合物。再添加7.26克N-溴琥珀醯亞胺，混合物再攪拌4小時。眞空過濾收集固體，以20毫升乙腈洗滌，乾燥，產生單溴與二溴化合物之1：1混合物。濾液濃縮，經矽膠層析(乙酸乙酯：己烷(1：2))，產生1.67克5-溴-4-甲基-2-羥吲哚之米色固體。殘留之1：1混合物固體自冰醋酸中再結晶2次，產生3.2克5,7-二溴-4-甲基-2-羥吲哚之淺橙色固體。此物質之濾液依上述方法層析，產生0.6克5-溴-4-甲基-2-羥吲哚及0.5克5,7-二溴-4-甲基-2-羥吲哚。

6-氟-2-羥吲哚

取氫化鈉(2.6克)及14.5克丙二酸二甲酯於160毫升二甲亞碸中攪拌加熱至100℃ 1.0小時。混合物冷卻至室溫，添加7.95克2,5-二氟硝基苯，混合物攪拌30分鐘。混合物再加熱至100℃ 1.0小時，冷卻至室溫，倒至400毫升飽和氯化銨溶液中。以200毫升乙酸乙酯萃取混合物，有機層以鹽水洗滌，以無水硫酸鈉脫水，眞空濃縮。殘質自甲醇中再結晶，產生24.4克(收率80%) 4-氟-2-硝苯基丙二酸二甲酯之白色固體，薄層層析法Rf 0.2(乙酸乙酯；己烷1：6，矽膠)。濾液濃縮，經矽膠管柱層析(乙酸乙酯：己烷，1：8)，再產生5.03克4-氟-2-硝苯基丙二酸二甲酯，共計29.5克(收率96%)。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（66）

取4-氟-2-硝苯基丙二酸二甲酯(5.0克)於20毫升6N鹽酸中回流24小時。反應冷卻，眞空過濾收集白色固體，以水洗滌，乾燥，產生3.3克(收率87%) 4-氟-2-硝苯基乙酸，薄層層析法Rf 0.6(乙酸乙酯：己烷1：2，矽膠)。

取4-氟-2-硝苯基乙酸(3.3克)溶於15毫升乙酸中，經0.45克10% Pd/C，於60 psi H_2下氫化2小時。過濾排除觸媒，以15毫升甲醇洗滌。合併之濾液濃縮，加水稀釋。眞空過濾收集沈澱，以水洗滌，乾燥，產生1.6克(收率70%) 6-氟-2-羥吲哚，薄層層析法Rf 0.24。濾液濃縮，產生紫色固體，其NMR光譜與第一份產物相似。此紫色固體層析(乙酸乙酯：己烷，1：2，矽膠)，產生第二份6-氟-2-羥吲哚白色固體。

5-胺磺醯基-2-羥吲哚

100毫升燒瓶中添加27毫升氯磺酸，緩緩添加13.3克2-羥吲哚。添加期間，反應溫度保持在30℃以下。添加後，反應混合物於室溫下攪拌1.5小時，加熱至68℃ 1小時，冷卻，倒至水中。以水洗滌沈澱，於眞空烘箱中乾燥，產生11.0克5-氯磺醯基-2-羥吲哚(收率50%)，未再純化即使用。

添加5-氯磺醯基-2-羥吲哚(2.1克)至含10毫升氫氧化銨之10毫升乙醇中，於室溫下攪拌一夜。混合物濃縮，過濾收集固體，產生0.4克(收率20%)標題化合物之灰白色固體。

5-甲胺磺醯基-2-羥吲哚

取含3.38克5-氯磺醯基-2-羥吲哚之10毫升2M甲胺之四氫呋喃溶液之懸浮液於室溫下攪拌4小時，此期間有白色固體

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（67）

形成。真空過濾收集沈澱，以5毫升水洗滌2次，於40℃下真空乾燥一夜，產生3.0克(收率88%) 5-甲胺磺醯基-2-羥吲哚。

5-(4-三氟甲苯胺磺醯基)-2-羥吲哚

取含2.1克5-氯磺醯基-2-羥吲哚、1.6克4-三氟甲基苯胺及1.4克吡啶之20毫升二氯甲烷懸浮液於室溫下攪拌4小時。真空過濾收集所形成之沈澱，以5毫升水洗滌2次，於40℃下真空乾燥一夜，產生2.4克粗產物，經薄層層析法判斷仍含有一些雜質。粗產物經矽膠層析，以乙酸乙酯：己烷(1：2)溶離，產生1.2克(收率37%) 5-(4-三氟甲苯胺磺醯基)-2-羥吲哚。

5-(嗎啉磺醯基)-2-羥吲哚

取含2.3克5-氯磺醯基-2-羥吲哚及2.2克嗎啉之50毫升二氯甲烷懸浮液於室溫下攪拌3小時。真空過濾收集白色沈澱，以乙酸乙酯及己烷洗滌，於40℃下真空乾燥一夜，產生2.1克(收率74%) 5-(嗎啉磺醯基)-2-羥吲哚。

6-三氟甲基-2-羥吲哚

添加二甲亞碸(330毫升)至7.9克氫化鈉中，然後滴加43.6克草酸二乙酯。混合物加熱至100℃ 1.0小時，冷卻至室溫。添加2-硝基-4-三氟甲基甲苯(31.3克)，於室溫下攪拌反應30分鐘，然後於100℃下加熱1小時。反應冷卻，倒至飽和氯化銨水溶液、乙酸乙酯及己烷之混合物中。以飽和氯化銨，水及鹽水洗滌有機層，脫水，濃縮，產生2-(2-硝基-4-三氟甲苯基)丙二酸二甲酯。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（ 68 ）

取二酯溶於含6.4克氯化鈰及2.7毫升水之100毫升二甲亞碸混合物中，於100℃下加熱3小時。反應冷卻，倒至乙酸乙酯與鹽水之混合物中。有機相以鹽水洗滌，以硫酸鈉脫水，濃縮及矽膠層析(10%乙酸乙酯之己烷溶液)。取含產物之溶離份蒸發，產生25.7克2-硝基-4-三氟甲苯基乙酸甲酯。

取2-硝基-4-三氟甲苯基乙酸甲酯(26毫克)經10% Pd/C氫化，然後於100℃下加熱3小時。過濾排除觸媒，蒸發溶劑，產生標題化合物。

5-(2-氯乙基)羥吲哚

取含5-氯乙醯基-2-羥吲哚(4.18克)之30毫升三氟乙酸於冰浴中經4.65克三乙矽烷處理，於室溫下攪拌3小時。混合物倒至150毫升水中，真空過濾收集沈澱，以50毫升水洗滌，乾燥，產生2.53克(收率65%) 5-(2-氯乙基)-2-羥吲哚之紅褐色固體。

5-甲氧羰基-2-羥吲哚

取5-碘-2-羥吲哚(17克)與2克二乙酸鈀、18.2克三乙胺、150毫升甲醇、15毫升二甲亞碸及2.6克DPPP於飽和二氧化碳大氣下回流。24小時後，反應過濾排除觸媒，濾液濃縮。濃縮液經矽膠層析(30%乙酸乙酯之己烷溶液)。濃縮含產物之溶離份，靜置。真空過濾收集沈澱產物，產生0.8克(7%)標題化合物之灰白色固體。

4-羧基-2-羥吲哚

滴加三甲矽烷基重氮甲烷之己烷溶液(2M)至室溫下含2.01克2-氯-3-羧基-硝基苯之20毫升甲醇溶液中，直到不再

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（69）

有氣體冒出爲止。以乙酸中止過量三甲矽烷基重氮甲烷之反應。反應混合物經旋轉蒸發幫浦乾燥，殘質再眞空乾燥一夜。產物(2-氯-3-甲氧羰基-硝基苯)之純度足以進行下一個反應。

添加丙酸二甲酯(6.0毫升)至含2.1克氫化鈉之15毫升DMSO冰冷溶液中。反應混合物於100℃下攪拌1.0小時後，冷卻至室溫。一次添加全量2-氯-3-甲氧羰基硝基苯(2.15克)至上述混合物中，混合物加熱至100℃ 1.5小時。反應混合物冷卻至室溫，倒至冰水中，酸化至pH 5，以乙酸乙酯萃取。有機層以鹽水洗滌，以無水硫酸鈉脫水，濃縮，產生3.0克2-甲氧羰基-6-硝基苯基丙二酸二甲酯。

取2-甲氧羰基-6-硝基苯基丙二酸二甲酯(3.0克)於50毫升6N鹽酸中回流一夜。混合物濃縮至乾，與含1.1克氯化亞錫(II)之20毫升乙醇回流2小時。混合物經寅式鹽過濾，濃縮，經矽膠層析(乙酸乙酯：己烷：乙酸)，產生0.65克(收率37%) 4-羧基-2-羥吲哚之白色固體。

5-羧基-2-羥吲哚

添加2-羥吲哚(6.7克)至冰浴中含23克氯化鋁之30毫升二氯乙烷攪拌懸浮液中。緩緩添加氯乙醯氯(11.3克)，有氯化氫氣體釋出。攪拌10分鐘後，反應於40至50℃下回溫1.5小時。薄層層析法(乙酸乙酯，矽膠)顯示沒有殘留起始物。混合物冷卻至室溫，倒至冰水中。眞空過濾收集沈澱，以水洗滌，眞空乾燥，產生10.3克(98%) 5-氯乙醯基-2-羥吲哚之灰白色固體。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（70）

取9.3克5-氯乙醯基-2-羥吲哚懸浮於90毫升吡啶中，於80至90℃下攪拌3小時後，冷卻至室溫。眞空過濾收集沈澱，以20毫升乙醇洗滌。固體溶於90毫升2.5N氫氧化鈉中，於70至80℃下攪拌3小時。混合物冷卻至室溫，以0.5 N鹽酸酸化至pH 2。眞空過濾收集沈澱，以水徹底洗滌，產生5-羧基-2-羥吲哚粗產物之深褐色固體。濾液靜置一夜後，產生2克5-羧基-2-羥吲哚黃色固體。取深褐色粗產物溶於熱甲醇中，過濾排除不溶物，濾液濃縮，產生5.6克5-羧基-2-羥吲哚之褐色固體。合併收率爲97%。

5-羧乙基-2-羥吲哚

取5-氯乙基-2-羥吲哚(4.02克)之含25毫升濃鹽酸之10毫升水溶液回流4小時。混合物冷卻，加水，眞空過濾收集所產生之固體，以水洗滌，乾燥，產生1.9克(收率44%)標題化合物之黃色固體。

5-碘-4-甲基-2-羥吲哚

添加3.67克N-碘琥珀醯亞胺至冰浴中含2克4-甲基-2-羥吲哚之40毫升冰醋酸中。混合物攪拌1小時，以100毫升50%乙酸之水溶液稀釋，過濾。所得白色固體於高度眞空中乾燥，產生3.27克(收率88%)標題化合物之灰白色固體。5-氯-4-甲基-2-羥吲哚。

取含3.0克4-甲基-2-羥吲哚於室溫下，在50毫升乙腈中攪拌懸浮，同時分批添加3.3克N-氯琥珀醯亞胺。然後添加三氟乙酸(1毫升)。懸浮液於室溫下攪拌3天，此期間仍含有固體。眞空過濾收集白色固體，以少量冷丙酮洗滌，於40℃

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（71）

眞空烘箱中乾燥一夜，產生2.5克(68%) 5-氯-4-甲基-2-羥吲哚。

5-丁基-2-羥吲哚

添加三乙矽烷(2.3克)至室溫下含2克4-丁醯基-2-羥吲哚之20毫升三氟乙酸中，溶液攪拌3小時。反應倒至冰水中，產生之紅色油靜置後固化。眞空過濾收集固體，以水及己烷洗滌，乾燥，產生1.7克(收率91%)標題化合物之灰白色固體。

5-乙基-2-羥吲哚

緩緩添加1.8克三乙矽烷至冰浴中含5-乙醯基-2-羥吲哚(2克)之15毫升三氟乙酸中，反應於室溫下攪拌反應5小時。添加1毫升三乙矽烷，續攪拌一夜。反應混合物倒至冰水中，眞空過濾收集所得之沈澱，以水充份洗滌，眞空乾燥，產生1.3克(收率71%)標題化合物之黃色固體。

5-(嗎啉-4-乙基)-2-羥吲哚

取5-氯乙基-2-羥吲哚(2.3克)、1.2毫升嗎啉及1.2毫升二異丙基乙胺於100℃下，在10毫升二甲亞碸中加熱一夜。混合物冷卻，倒至水中，以乙酸乙酯萃取。有機層以鹽水洗滌，脫水及蒸發。殘質經矽膠層析(5%甲醇之氯仿溶液)，產生0.9克(31%)標題化合物之白色固體。

5-(4-甲氧羰基苯醯胺基)-2-羥吲哚

取82.0毫克5-胺基-2-羥吲哚及131.0毫克4-甲氧羰基苯甲醯氯含於吡啶中之混合物於室溫下攪拌3小時，倒至冰水中。過濾沈澱，以水洗滌，於眞空烘箱中乾燥，產生138.0

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（72）

毫克5-(4甲氧羰基苯醯胺基)-2-羥吲哚(收率81%)。

5-(4-羧苯醯胺基)-2-羥吲哚

取含5-(4-甲氧羰基苯醯胺基)-2-羥吲哚(0.9克)及0.4克氫氧化鈉之25毫升甲醇回流3小時。混合物濃縮，加水，混合物經6N鹽酸酸化。真空過濾收集沈澱，產生0.75克(87%)標題化合物之白色固體。

5-甲氧基-2-羥吲哚

取三氯乙醛水合物(9.6克)溶於200毫升含83克硫酸鈉之水中。溶液加溫至60℃，添加含11.4克羥胺鹽酸鹽之50毫升水溶液，混合物保持60℃。在另一個燒瓶中，加溫含6.4克4-胺基苯甲醚與4.3毫升濃鹽酸之80毫升水至80℃。添加第一份溶液至第二份溶液中，混合物回流2分鐘後，緩緩冷卻至室溫，然後於冰浴中冷卻。真空過濾收集黃褐色沈澱，以水洗滌，真空乾燥，產生8.6克(收率85%) N-(2-羥亞胺基-乙醯基)胺基苯甲醚。

取含5毫升水之濃硫酸(45毫升)加溫至60℃，一次添加全量8.6克N-(2-羥亞胺乙醯基)胺基苯甲醚。攪拌之混合物加熱至93℃ 10分鐘後，使之冷卻至室溫。混合物倒至500克冰中，以乙酸乙酯萃取3次。合併之萃液經無水硫酸鈉脫水，濃縮，產生5.1克(收率65%) 5-甲氧吲哚滿二酮之深紅色固體。取5-甲氧基吲哚滿二酮(5.0克)及30毫升肼水合物加熱至回流15分鐘。反應混合物冷卻至室溫，添加50毫升水。以各25毫升乙酸乙酯萃取混合物3次，合併有機層，經無水硫酸鈉脫水，濃縮，產生黃色固體。固體於乙酸乙酯

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（73）

中攪拌，眞空過濾排除1.1克不溶物，保留此物質。此物質經證明爲2-肼基羰甲基-4-胺基苯甲醚。濾液濃縮，經矽膠層析，以乙酸乙酯：己烷(1：1)溶離，產生0.7克5-甲氧基-2-羥吲哚之黃色固體。取1.1克2-肼基-羰甲基-4-胺基苯甲醚於20毫升1N氫氧化鈉中回流1小時。混合物冷卻，以濃鹽酸酸化至pH 2，以各25毫升乙酸乙酯萃取3次。合併有機萃液，以鹽水洗滌，以無水硫酸鈉脫水，濃縮，產生0.8克5-甲氧基-2-羥吲哚之黃色固體。合併收量爲1.5克或33%。

7-氮雜羥吲哚

取3,3-二溴-7-氮雜羥吲哚(2.9克)溶於含20毫升乙酸與30毫升乙腈之混合物中。在溶液中添加6.5克鋅粉。混合物於室溫下攪拌2小時。自混合物中過濾固體，蒸發溶劑。殘質與乙酸乙酯和成漿物。取含不溶性固體之乙酸乙酯溶液通過矽膠短管柱。收集之乙酸乙酯溶液蒸發，殘質眞空乾燥，產生1.8克(收率91%) 7-氮雜羥吲哚乙酸鹽。

5-二甲胺磺醯基-2-羥吲哚

取含2.3克5-氯磺醯基-2-羥吲哚之10毫升2M二甲胺之甲醇懸浮液於室溫下攪拌4小時，此時有固體形成。眞空過濾收集沈澱，以5毫升1N氫氧化鈉及5毫升1N鹽酸洗滌，於40℃下眞空乾燥一夜，產生1.9克(收率79%) 5-二甲胺基磺醯基-2-羥吲哚。

6-苯基-2-羥吲哚

滴加丙二酸二甲酯(10毫升)之25毫升二甲亞碸溶液至懸浮於25毫升二甲亞碸之3.5克氫化鈉中，混合物於100℃下

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（74）

加熱10分鐘。混合物冷卻至室溫，添加含4.7克4-氟-3-硝基聯苯之25毫升二甲亞碸。混合物於100℃下加熱2小時，冷卻，以300毫升飽和氯化銨溶液中止反應。以乙酸乙酯萃取混合物3次，合併之有機層以水及鹽水洗滌，蒸發，產生3-硝基聯苯基4-丙二酸二甲酯粗產物之黃色油。

取3-硝基聯苯基-4-丙二酸二甲酯粗產物於30毫升6N鹽酸中回流24小時。過濾收集沈澱，以水洗滌，乾燥，產生4.5克3-硝基聯苯基-4-乙酸乙酯之乳色固體。

一次添加全量鐵粉(2.6克)至含4.5克3-硝基聯苯基-4-乙酸之40毫升乙酸中。混合物回流2小時，濃縮至乾，溶於乙酸乙酯中。過濾排除固體，以1N鹽酸及鹽水洗滌濾液2次，以無水硫酸鈉脫水。濾液濃縮，產生3.4克(收率93%) 6-苯基-2-羥吲哚淺褐色固體。

6-(2-甲氧苯基)-2-羥吲哚

添加肆(三苯基膦)鈀(1克)至含5克2-甲氧苯基二羥硼酸，6.6克5-溴-2-氟硝基苯與30毫升2M碳酸鈉溶液之50毫升甲苯與50毫升乙醇混合物中。混合物回流2小時，濃縮，以乙酸乙酯萃取殘質2次。以水及鹽水洗滌乙酸乙酯層，脫水，濃縮，產生之深綠色油，靜置時固化，爲4-氟-2'-甲氧基-3-硝基聯苯粗產物。

滴加丙二酸二甲酯(14毫升)至含2.9克氫化鈉懸浮之50毫升二甲亞碸中。混合物於100℃下加熱15分鐘，冷卻至室溫，添加4-氟-2'-甲氧基-3-硝基聯苯粗產物之60毫升二甲亞碸溶液，混合物於100℃下加熱2小時。反應混合物冷

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（75）

卻，以300毫升飽和氯化鈉溶液中止反應，以乙酸乙酯萃取2次。合併萃液，以飽和氯化銨，水及鹽水洗滌，以無水硫酸鈉脫水，濃縮，產生粗產物2'-甲氧基-3-硝基聯苯-4-丙二酸二甲酯之黃色油。

取2'-甲氧基-3-硝基聯苯-4-丙二酸二甲酯粗產物於100℃下。於50毫升6N鹽酸中加熱24小時，冷卻。過濾收集沈澱，以水及己烷洗滌，乾燥，產生9.8克2'-甲氧基-2-硝基聯苯基-4-乙酸之淺黃褐色固體。

一次添加全量鐵粉(5克)至含9.8克2'-甲氧基-3-硝基聯苯基-4-乙酸之50毫升冰醋酸溶液加熱至100℃ 3小時。反應混合物濃縮至乾，於乙酸乙酯中經音波處理，過濾排除不溶物。濾液以1N鹽酸、水洗滌2次，然後以鹽水洗滌，經無水硫酸鈉脫水，及濃縮。殘質經矽膠，以乙酸乙酯：己烷(1：2)層析，產生5.4克6-(2-甲氧苯基)-2-羥吲哚之玫瑰色固體。

6-(3-甲氧苯基)-2-羥吲哚

添加肆(三苯基膦)鈀(0.8克)至含5克3-甲氧苯基二羥硼酸，5克5-溴-2-氟-硝基苯及11毫升2M碳酸鈉溶液之100毫升甲苯混合物中。混合物回流2小時，以水稀釋，以乙酸乙酯萃取。以飽和碳酸氫鈉及鹽水洗滌乙酸乙酯層，脫水及濃縮，產生油性固體。固體經矽膠層析(乙酸乙酯：己烷(1：6))，產生4.3克(收率77%) 4-氟-3'-甲氧基-3-硝基聯苯。

滴加丙二酸二甲酯(9.7毫升)至含2.0克氫化鈉懸浮之50毫升二甲亞碸中。混合物加熱至100℃ 35分鐘，冷卻至室

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（76）

溫。添加4-氟-2'-甲氧基-3-硝基聯苯(4.2克)之50毫升二甲亞碸溶液，混合物於100℃下加熱1小時。反應混合物冷卻，以300毫升飽和氯化銨溶液中止反應，以乙酸乙酯萃取2次。合併萃液，以鹽水洗滌，經無水硫酸鈉脫水，濃縮，產生3'-甲氧基-3-硝基聯苯基-4-丙二酸二甲酯之淺黃色固體。

取3'-甲氧基-3-硝基聯苯基-4-丙二酸二甲酯粗產物於45毫升6N鹽酸中，於110℃下加熱4天，然後冷卻。過濾收集沈澱物，以水及己烷洗滌，乾燥，產生5.3克3'-甲氧基-2-硝基聯苯基-4-乙酸之淺黃褐色固體。

取3'-甲氧基-3-硝基聯苯基-4-乙酸(5.2克)溶於甲醇中，經0.8克10% Pd/C，於室溫下氫化3小時。過濾排除觸媒，以甲醇洗滌，合併濾液，濃縮，產生褐色固體。固體經矽膠使用乙酸乙酯：己烷：乙酸(33：66：1)層析，產生3.0克6-(3-甲氧苯基)-2-羥吲哚之粉紅色固體。

6-(4-甲氧苯基)-2-羥吲哚

添加肆(三苯基膦)鈀(1克)至含5克4-甲氧苯基二羥硼酸，6.6克5-溴-2-氟硝基苯與30毫升2M碳酸鈉溶液之50毫升甲苯與50毫升乙醇混合物中。混合物回流2小時，濃縮，以乙酸乙酯萃取殘質2次。以水及鹽水洗滌乙酸乙酯層，脫水，及濃縮，產生褐色油性固體。此固體經矽膠層析(5%乙酸乙酯之己烷溶液)，產生粗產物4-氟-4'-甲氧基-3-硝基聯苯淺黃色固體。

滴加丙二酸二甲酯(10毫升)至含2.0克氫化鈉懸浮之60毫升二甲亞碸中。混合物於100℃下加熱10分鐘，冷卻至室

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（77）

溫。添加4-氟-2'-甲氧基-3-硝基聯苯粗產物(5.2克)之50毫升二甲亞碸溶液，混合物於100℃下加熱2小時。反應混合物冷卻，以300毫升飽和氯化銨溶液中止反應，以乙酸乙酯萃取2次。合併萃液，以飽和氯化銨，水及鹽水洗滌，以無水硫酸鈉脫水，濃縮，產生粗產物4'-甲氧基-3-硝基聯苯基-4-丙二酸二甲酯之黃色油。

取4'-甲氧基-3-硝基聯苯基-4-丙二酸二甲酯粗產物於100℃下，於60毫升6N鹽酸中加熱15小時，冷卻。過濾收集沈澱，以水及己烷洗滌，乾燥，產生7.2克4'-甲氧基-3-硝基聯苯基-4-乙酸之淺黃褐色固體。

一次添加全量鐵粉(3.6克)至含7.2克4'-甲氧基-3-硝基聯苯基-4-乙酸之50毫升冰醋酸溶液中，於100℃加熱一夜。反應混合物濃縮至乾，於乙酸乙酯中經音波處理，過濾排除不溶物。濾液以1N鹽酸及鹽水洗滌2次，經無水硫酸鈉脫水，及濃縮。產生2.7克6-(4-甲氧苯基)-2-羥吲哚之玫瑰色固體。

6-(3-乙氧苯基)-2-羥吲哚

添加肆(三苯基膦)鈀(0.8克)至含4.2克3-乙氧苯基二羥硼酸，5.0克5-溴-2-氟-硝基苯及22毫升2M碳酸鈉溶液之50毫升甲苯與50毫升乙醇之混合物中。混合物回流2小時，濃縮，加水，以乙酸乙酯萃取混合物2次。以水及鹽水洗滌乙酸乙酯層，脫水及濃縮。殘質經矽膠層析(5%乙酸乙酯之己烷溶液)，產生5.3克(收率90%) 4-氟-3'-乙氧基-3-硝基聯苯粗產物之黃色油。

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（78）

滴加丙二酸二甲酯(11.4毫升)至含4.0克氫化鈉懸浮之20毫升二甲亞碸中。混合物加熱至100℃ 10分鐘，冷卻至室溫。添加4-氟-3'-乙氧基-3-硝基聯苯(5.3克)之25毫升二甲亞碸溶液，混合物於100℃下加熱2小時。反應混合物冷卻，以300毫升飽和氯化銨溶液中止反應，以乙酸乙酯萃取3次。合併萃液，以水及鹽水洗滌，經無水硫酸鈉脫水，濃縮，產生3'-乙氧基-3-硝基聯苯基-4-丙二酸二甲酯之黃色油。

取3'-乙氧基-3-硝基聯苯基-4-丙二酸二甲酯粗產物於60毫升6N鹽酸中，於100℃下加熱4天，然後冷卻。過濾收集沈澱物，以水及己烷洗滌，乾燥，產生4.7克3'-乙氧基-3-硝基聯苯基-4-乙酸之淺黃褐色固體粗產物。

一次添加全量鐵粉(2.4克)至含4.6克3'-乙氧基-3-硝基聯苯基-4-乙酸之40毫升冰醋酸溶液中，回流2小時。反應混合物濃縮至乾，以乙酸乙酯中重覆處理，過濾排除不溶物。濾液以1N鹽酸及鹽水洗滌2次，然後經無水硫酸鈉脫水，及濃縮。產生3.5克(收率91%) 6-(3-乙氧苯基)-2-羥吲哚之淺褐色固體。

6-溴-2-羥吲哚

滴加丙二酸二甲酯(13毫升)至含2.7克氫化鈉懸浮之20毫升二甲亞碸中。混合物加熱至100℃ 10分鐘後，冷卻至室溫。添加5-溴-2-氟硝基苯(5.0克)之25毫升二甲亞碸溶液，混合物於100℃下加熱2小時。反應混合物冷卻，以300毫升飽和氯化銨溶液中止反應，以乙酸乙酯萃取3次。合併萃

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（79）

液，以飽和氯化銨、水及鹽水洗滌，以無水硫酸鈉脫水，濃縮，產生4-溴-2-硝苯基丙二酸二甲酯粗產物之淺黃色油。

取4-溴-2-硝苯基丙二酸二甲酯粗產物於110℃下，於40毫升6N鹽酸中加熱24小時，冷卻。過濾收集沈澱，以水洗滌，脫水，產生5.3克(收率89%) 4-溴-2-硝基-苯乙酸灰白色固體。

取4-溴-2-硝苯基乙酸(0.26克)、0.26克鋅粉及3毫升50%硫酸於5毫升乙醇中，於100℃下加熱一夜。反應混合物過濾，以少量乙酸稀釋，濃縮排除乙醇，以水稀釋，以乙酸乙酯萃取2次。合併之萃液以鹽水洗滌，以無水硫酸鈉脫水，濃縮，產生0.19克(收率90%) 6-溴-2-羥吲哚之黃色固體。

5-乙醯基-2-羥吲哚

取2-羥吲哚(3克)懸浮於1,2-二氯乙烷中，緩緩添加3.2毫升乙醯氯。所得懸浮液加熱至50℃ 5小時，冷卻，倒至水中。所得沈澱經眞空過濾收集，以水充份洗滌，眞空乾燥，產生2.9克(收率73%)標題化合物之褐色固體。

5-丁醯基-2-羥吲哚。

依序添加7.5克2-羥吲哚及12克丁醯氯至冰浴中含15克氯化鋁懸浮之30毫升1,2-二氯乙烷中。所得懸浮液加熱至50℃一夜。混合物倒至冰水中，以乙酸乙酯萃取3次。合併之乙酸乙酯層以鹽水洗滌，以硫酸鈉脫水，濃縮至乾，產生褐色固體。固體經矽膠層析(50%乙酸乙酯之己烷溶液)，產生3克(25%)標題化合物之黃色固體。

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（80）

5-氰乙基-2-羥吲哚

添加氰化鉀(2.0克)至15毫升二甲亞碸中，加熱至90℃。取5-氰乙基-2-羥吲哚(3.0克)溶於5毫升二甲亞碸中，緩緩攪拌添加，反應加熱至150℃ 2小時。混合物冷卻，倒至冰水中，眞空過濾收集沈澱，以水洗滌，乾燥，經矽膠層析(5%甲醇之氯仿溶液)，產生1.2克(收率42%)標題化合物。

6-(嗎啉-4-基)-2-羥吲哚

取6-胺基-2-羥吲哚(2.2克)，4.0克2,2'-二溴乙基醚及7.9克碳酸鈉於20毫升乙醇中回流一夜，濃縮，以50毫升水稀釋。混合物以50毫升乙酸乙酯萃取3次，合併有機萃液，以20毫升鹽水洗滌，以無水硫酸鈉脫水，濃縮至乾。固體經矽膠管柱層析(乙酸乙酯：己烷(1：1)，含0.7%乙酸)，產生1.2克(收率37%)標題化合物之米色固體。

6-(3-三氟乙醯苯基)-2-羥吲哚

取3-胺苯基二羥硼酸(3.9克)、5克5-溴-2-氟硝基苯，0.8克肆(三苯基膦)鈀與23毫升2M碳酸氫鈉溶液之50毫升甲苯溶液於氮氣下回流2.5小時。反應混合物倒至200毫升冰水中，以50毫升乙酸乙酯萃取混合物3次。合併之有機層以50毫升水及20毫升鹽水洗滌，經無水硫酸鈉脫水，及濃縮，產生9.7克(收率92%) 2-氟-5-(3-胺苯基)硝基苯之深褐色油。

緩緩添加三氟乙酸酐(5.4毫升)至0℃下，含9.7克2-氟-5-(3-胺苯基)硝基苯及5.3毫升三乙胺之50毫升二氯甲烷攪拌溶液中，混合物再攪拌20分鐘。混合物濃縮，殘質經矽膠

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（81）

管柱層析(10%乙酸乙酯之己烷溶液)，產生8.6克(收率65%)2-氟-5-(3-三氟乙醯胺苯基)硝基苯之淺橙色油，靜置時固化。

滴加丙二酸二甲酯(9.6毫升)至氮氣下，含3.2克60%氫化鈉(含於礦物油中)之40毫升無水二甲亞碸中。混合物攪拌10分鐘，添加含2-氟-5-(3-三氟乙醯胺苯基)硝基苯之20毫升二甲亞碸。所得深紅色混合物加熱至100℃ 2小時。反應倒至100毫升飽和氯化銨溶液中止反應，以各50毫升乙酸乙酯萃取2次。有機相以各50毫升飽和氯化銨溶液、水及鹽水洗滌，經無水硫酸鈉脫水，濃縮，形成黃色油。此油經矽膠管柱層析(乙酸乙酯：己烷(1：4))，產生4.4克(收率50%)2-[2-硝基-4-(3-三氟乙醯胺苯基)苯基]丙二酸二甲酯之淺黃色固體。

取2-[2-硝基-4-(3-三氟乙醯胺苯基)苯基]丙二酸二甲酯(4.4克)於50毫升6N鹽酸中回流一夜。反應混合物冷卻至室溫，眞空過濾收集固體，以水洗滌，眞空乾燥，產生2.7克(收率73%) 2-[2-硝基-4-(3-三氟乙醯胺苯基)苯基]乙酸。

取2-[2-硝基-4-(3-三氟乙醯胺苯基)苯基]乙酸(100毫克)與50毫克鐵粉於3毫升乙酸中，於100℃中加熱2小時。反應混合物濃縮，殘質於5毫升乙酸乙酯中經音波處理。眞空過濾排除不溶性固體，以1N鹽酸、水及鹽水洗滌濾液，經無水硫酸鈉脫水，濃縮，產生10毫克(收率14%)標題化合物之玫瑰色固體。

B.醛類

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（82）

5-甲醯基-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-羧酸

取3-氧丁酸第三丁酯(158克，1莫耳)溶於含在附裝溫度計、滴加漏斗及機械攪拌之三項圓底燒瓶之200毫升乙酸中。混合物於冰浴中冷卻至約10℃。以75分鐘添加亞硝酸鈉(69克，1莫耳)，並保持在15℃以下之溫度，離開冷水浴，混合物攪拌30分鐘，靜置3.5小時，產生2-羥亞胺基-3-氧丁酸第三丁酯。

取3-氧丁酸乙酯(130克，1莫耳)溶於含於附裝溫度計、滴加漏斗、機械攪拌器且置於油浴中之2升3頸圓底燒瓶中之400毫升乙酸中。添加鋅粉(50克，0.76莫耳)，混合物攪拌加熱至60℃。緩緩添加上述製備之2-羥亞胺基-3-氧丁酸第三丁酯溶液，反應混合物溫度維約65℃。添加更多鋅粉(4×50克，3.06莫耳)，最後一份鋅粉保留在所有第三丁酯添加完畢後才添加。添加結束時之溫度爲64℃。溫度提高至70-75℃，攪拌1小時後，倒至5升水中。

眞空過濾收集灰色之浮動沈澱物，以2升水洗滌，產生354克濕粗產物。粗產物溶於1升熱甲醇中，趁熱過濾排除鋅。濾液冷卻，使沈澱形成。眞空過濾收集沈澱，乾燥，產生118克產物。濾液置入冷藏庫一夜，此時另有一份產物沈澱。共得到173.2克3,5-二甲基-1H-吡咯-2,4-二羧酸2-第三丁酯4-乙酯。

取3,5-二甲基-1H-吡咯-2,4-二羧酸2-第三丁酯4-乙酯(80.1克，0.3莫耳)及400毫升三氟乙酸於附裝機械攪拌器並於油浴中加溫至40℃之2升3頸圓底燒瓶中攪拌5分鐘。混合物冷

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（83）

卻至-5℃，一次添加全量正甲酸三乙酯(67.0克，0.45莫耳)。溫度升高至15℃。混合物攪拌約1分鐘，離開冷水浴，再攪拌1小時。經旋轉蒸發排除三氟乙酸，殘質置入冷藏庫中，使之固化。固體加溫溶解，倒至500克冰中。以800毫升二氯甲烷萃取混合物。產生紅色溶液及褐色沈澱，此二份物質均保留。分離沈澱物，以150毫升飽和碳酸氫鈉溶液洗滌。二氯甲烷相亦以150毫升飽和碳酸氫鈉溶液洗滌。再以100毫升水洗滌二氯甲烷溶液3次。二氯甲烷溶液蒸發至乾。殘留之深色殘質自含達可碳黑(Darco carbon black)之乙酸乙酯中再結晶2次，產生金黃色針狀物。褐色沈澱物自350毫升同樣含達可碳黑之乙酸乙酯中再結晶，產生黃紅色固體。合併所有再結晶之固體，自500毫升乙醇中再結晶，產生37.4克(63.9%) 5-甲醯基-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-羧酸乙酯之黃色針狀物(mp 165.6-166.3℃，文獻上記錄163-164℃)。乙酸乙酯蒸發後得到之殘質與乙醇母液合併，自500毫升乙醇中再結晶，產生第二份產物(10.1克)之污黃色針狀物。

添加5-甲醯基-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-羧酸乙酯(2克，10毫莫耳)至含氫氧化鉀(3克，53毫莫耳)之甲醇(3毫升)與水(10毫升)溶液中。混合物回流3小時，冷卻至室溫，以6N鹽酸酸化至pH 3。過濾收集形成之固體，以水洗滌，於真空烘箱中乾燥一夜，產生1.6克(93%) 5-甲醯基-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-羧酸。

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d6) δ ：12.09(s, br, 2H, NH & COOH), 9.59(s, 1H, CHO), 2.44(s, 3H, CH_3), 2.40(s, 3H, CH_3)。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（84）

5-甲醯基-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-羧酸(2-二甲胺乙基)醯胺

依序添加苯幷三唑-1-基氧叁(二甲胺基)鏻六氟磷酸鹽(BOP試劑，6克，13.5毫莫耳)及3毫升二異丙基乙胺至含5-甲醯基-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-羧酸(1.67克，10毫莫耳)之二甲基甲醯胺(10毫升)混合物中。攪拌5分鐘後，添加1毫升N,N-二甲基乙二胺，混合物於室溫下攪拌24小時。在反應混合物中添加25毫升1N氫氧化鈉及25毫升鹽水。攪拌30分鐘後，反應混合物倒至水(100毫升)中，以10%甲醇之二氯甲烷溶液萃取(3×200毫升)。合併有機層，經無水硫酸鈉脫水，使用旋轉蒸發器蒸發。殘留之殘質經層析純化(矽膠管柱，5%至10%甲醇之二氯甲烷溶液)，產生1克(42%)5-甲醯基-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-羧酸(2-二甲胺乙基)醯胺。

^{1}H NMR (360 MHz, DMSO-d6) δ：11.77(s, 1H, NH), 9.53(s, 1H, CHO), 7.34(t, J=5.6 Hz, 1H, CONH), 3.27(m, 2H, CONC$\underline{H_2}$CH$_2$), 2.37(t, J=6.8 Hz, 2H, CONCH$_2$C$\underline{H_2}$), 2.35(s, 3H, CH$_3$), 2.3(s, 3H, CH$_3$), 2.17(s, 6H, 2 x CH$_3$)。

MS m/z 238.3 $[M+1]^+$。

3,5-二甲基-4-(4-甲基-六氫吡哄-1-羰基)-1H-吡咯-2-羧基醛

依序添加苯幷三唑-1-基氧叁(二甲胺基)鏻六氟磷酸鹽(BOP試劑，6克，13.5毫莫耳)及3毫升二異丙基乙胺至含5-甲醯基-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-羧酸(1.67克，10毫莫耳)之二甲基甲醯胺(10毫升)混合物中。攪拌5分鐘後，添加2毫升1-甲基六氫吡哄，混合物於室溫下攪拌24小時。然後添加25毫升1N氫氧化鈉及25毫升鹽水至反應中。攪拌30分

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（85）

鐘後，反應混合物倒至水(100毫升)中，以10%甲醇之二氯甲烷溶液萃取(3×200毫升)。合併有機層，經無水硫酸鈉脫水，經旋轉蒸發器蒸發。殘留之殘質經層析純化(矽膠管柱，5%至10%甲醇之二氯甲烷溶液)，產生1克(40%) 3,5-二甲基-4-(4-甲基六氫吡呾-1-羰基)-1H-吡咯-2-羧基醛。

^{1}H NMR (360 MHz, DMSO-d6) δ：11.82(s, 1H, NH), 9.50(s, 1H, CHO), 3.14(br m, 4H, 2xCH_2), 2.29(br m, 4H, 2xCH_2), 2.19(s, 3H, CH_3), 2.17(s, 3H, CH_3), 2.14(s, 3H, CH_3)。

MS EI 249 $[M]^+$。

C.實例-經吡咯取代之2-吲哚啉酮之合成法

本發明代表性化合物之下列合成法僅供範例且未構成本發明合成法或包括本發明化合物在內之化合物之限制。

實例1

3-[5-(5-氯-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-4-甲基-1H-吡咯-3-基]-丙酸

取4-(2-羧乙基)-2-甲醯基-3-甲基吡咯(4.5克)、4.2克5-氯-2-羥吲哚及2.9毫升六氫吡啶於50毫升乙醇中加熱至95℃ 5小時。反應混合物冷卻，及濃縮。殘質懸浮於丙酮中，過濾黃色沈澱，以冷乙醇、2N鹽酸水溶液及水洗滌至pH 6後，於眞空烘箱中乾燥一夜，產生7.2克標題化合物(88%)黃色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6) δ：13.31(s, br, 1H, NH-1'), 12.06(s, br, 1H, COOH), 10.88(s, br, 1H, NH-1), 7.93(d, J=1.88 Hz, 1H, H-4), 7.75(s, 1H, H-乙烯基), 7.19(d, J=3.1 Hz,

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（86）

1H, H-2'), 7.1(dd, b, J=1.88, 8.40 Hz, 1H, H-6), 6.84(d, J=8.40 Hz, 1H, H-7), 2.65(t, J=7.44 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.46(t, J=7.44 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.28(s, 3H, CH_3)。

實例2

3-[5-(6-甲氧基-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-4-甲基-1H-吡咯-3-基]-丙酸

取4-(2-羧乙基)-2-甲醯基-3-甲基吡咯(190毫克)、163毫克6-甲氧基-2-羥吲哚及2滴六氫吡啶於2毫升乙醇中加熱至90℃ 3小時。反應混合物冷卻及濃縮。殘質懸浮於6N鹽酸水溶液中。過濾沈澱，以水洗滌至pH 6，於眞空烘箱中乾燥，產生140毫克標題化合物(43%)褐色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6) δ ：13.1(s, br, 1H, NH-1'), 12.04(s, br, 1H, COOH), 10.76(s, br, 1H, NH-1), 7.63(d, J=8.29 Hz, 1H, H-4), 7.46(s, 1H, H-乙烯基), 7.07(d, J=3.03 Hz, 1H, H-2'), 6.55(dd, J=2.32, 8.29 Hz, 1H, H-5), 6.43(d, J=2.32 Hz, 1H, H-7), 3.74(s, 3H, OCH_3), 2.63(t, J=7.31 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.45(t, J=7.31 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.23(s, 3H, CH_3); MS m/z (相對強度, %) 327 ($[M+1]^+$, 100)。

實例3

3-[5-(5-氯-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基]-丙酸

取3-(2-羧乙基)-2,4-二甲基-5-甲醯基吡咯(220毫克)、147毫克5-氯-2-羥吲哚及2滴六氫吡啶於2毫升乙醇中加熱至90℃ 3小時。反應混合物冷卻及濃縮。殘質懸浮於6N鹽酸水溶液

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（87）

中。過濾沈澱，以水洗滌至pH 6，於真空烘箱中乾燥，產生172毫克標題化合物(50%)褐色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6) δ：13.42(s, br, 1H, NH-1'), 12.03(s, br, 1H, COOH), 10.80(s, br, 1H, NH-1), 7.87(d, J=2.06 Hz, 1H, H-4), 7.67(s, 1H, H-乙烯基), 7.06(dd, J=2.06, 8.3 Hz, 1H, H-6), 6.83(d, J=8.3 Hz, 1H, H-7), 2.64(t, J=7.6 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.34(t, J=7.6 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.29(s, 3H, CH_3), 2.27(s, 3H, CH_3); MS m/z (相對強度, %) 345 ($[M+1]^+$, 64)。

實例4

3-[4-甲基-5-(2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-1H-吡咯-3-基]-丙酸

取金屬鈉(1.5克)置入附裝溫度計、回流冷凝器及機械攪拌器並置入油浴中之3升3項圓底燒瓶中。攪拌添加無水乙醇(1升)。當鈉溶解時，一次添加全量350克戊-2,4-二酮，然後以30分鐘添加310克丙烯酸乙酯。混合物回流2.5小時後，冷卻至室溫一夜。添加冰醋酸(3毫升)，旋轉蒸發排除溶劑。殘質經矽藻土過濾，於塗膜之蒸餾器中，0.1毫米壓力下蒸餾。餾出物使用10吋真空外套菲格勒管柱(Vigreux column)再蒸餾，產生518克5-乙醯基-4-氧己酸乙酯，BP 84-92℃(0.2至0.7毫米)。

在附裝溫度計及機械攪拌器且於蒸汽浴上加熱之5升三頸燒瓶中添加350克5-乙醯基-4-氧己酸乙酯、329克胺基丙二酸乙酯鹽酸鹽、133克乙酸鈉及1.2升乙酸。混合物於37分

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（88）

鐘內加熱至99℃。於62℃時，二氧化碳已快速釋出。於99℃下共35分鐘後，CO_2之釋出已大幅減緩。再過1小時後，混合物冷卻，眞空過濾排除氯化鈉，蒸發溶劑。殘質與1升冷水混合。眞空過濾收集沈澱，以400毫升水洗滌，溶於1升熱95%乙醇中。以20克達可G-60處理溶液，趁熱過濾，並冷卻至室溫。眞空過濾收集結晶固體，於濾器上，使用200毫升50%乙醇洗滌2次，於70℃下眞空乾燥，產生285克(收率64%) 2-乙氧羰基-4-(2-乙氧羰乙基)-3,5-二甲基吡咯。濾液於冷藏庫中一夜，再產生53.1克(收率11.9%)產物，總收率75.9%。

取2-乙氧羰基-4-(2-乙氧羰乙基)-3,5-二甲基吡咯(285克)及3500毫升乙醚置入附裝機械攪拌器、回流冷凝器及滴加漏斗且於冰浴中冷卻之5升三頸燒瓶中。以145分鐘時間滴加亞硫醯氯(435克)。當滴加時，混合物轉呈混濁及綠色，然後澄清。添加完畢時，混合物澄清且呈微黃色。混合物再攪拌1小時，然後回流加熱1小時。混合物冷卻，旋轉蒸發，以1500毫升醚稀釋，再旋轉蒸發一次。再重覆稀釋與蒸發。添加殘質至含802克乙酸及535克氫氧化鈉之8升水中。混合物短暫加熱至85℃，然後攪拌冷卻一夜。分離含有固體之水層，以800毫升醚萃取。添加固體及醚層至含300克碳酸鈉之2.5升水中，攪拌1小時，過濾排除少量(約7克)固體。添加亞硫酸(137克)至混合物中，所得沈澱以250毫升洗滌2次，眞空乾燥，產生56.4克產物。添加亞硫酸(92克)至濾液中，所得沈澱以0.5升水洗滌2次，眞空乾

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（89）

燥，產生220克產物，共計276.4克(收率86.8%) 2-羧基-5-乙氧羰基-3-(2-乙氧羰乙基)-4-甲基吡咯。

取2-羧基-5-乙氧羰基-3-(2-乙氧羰乙基)-4-甲基吡咯(50.5克)及400毫升10%氫氧化鈉溶液於帕爾高壓釜中加熱至180℃ 90分鐘。再重覆此過程4次，直到共處理252.5克2-羧基-5-乙氧羰基-3-(2-乙氧羰乙基)-4-甲基吡咯爲止。合併五份溶液，旋轉蒸發成約1.8升體積之濃稠黑色殘質。混合物於水浴中冷卻至10℃，緩緩添加50%硫酸，以保持溫度在20℃以下，直到pH爲2止。添加乙醚(1400毫升)，混合物過濾，保留沈澱物。於索克斯萃取器(Soxhlet extractor)中，以500毫升醚萃取沈澱。合併之醚層依序以250毫升水及150毫升水洗滌。合併之水層再以150毫升醚回萃取。所有醚層均經旋轉蒸發，殘質乾燥，產生123.5克3-(2-羧乙基)-4-甲基吡咯。

取3-(2-羧乙基)-4-甲基吡咯(123克)與1500毫升乙醚及250毫升甲醇於機械攪拌之接收瓶中混合。取另一個3升三頸圓底燒瓶加裝磁鐵攪拌器，蒸餾頭，及通往接收燒瓶入口之冷凝器，於水浴中加熱。在此三升燒瓶中置入240克溶於1800毫升乙醚中之Diazald及含73克氫氧化鉀之360毫升95%乙醇與112毫升水之溶液。攪拌3升燒瓶，於水浴中加熱至65至75℃，蒸餾重氮甲烷-醚混合物至攪拌中之接收燒瓶中約2.5小時以上。添加乙醚(200毫升)至3升燒瓶中，繼續蒸餾至完全爲止。再攪拌接收燒瓶30分鐘，然後添加10毫升乙酸。以500毫升水萃取混合物2次，再以飽和碳酸氫鈉萃

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（90）

取2次。醚層經無水硫酸鈉脫水，蒸餾成深色液體殘質。殘質經4吋維格洛管蒸餾2次，經10吋真空外套維格洛管柱蒸餾1次，產生108克(收率80.6%) 3-(2-乙氧羰乙基)-4-甲基吡咯。BP 108-113℃(0.5毫米)。

添加二甲基甲醯胺至加裝機械攪拌器、溫度計、滴加漏斗及保持在氮大氣下之500毫升三頸圓底燒瓶中。燒瓶冷卻至0℃，以80分鐘滴加58.4毫升磷醯氯。添加二氯乙烷(280毫升)，使混合物回升至室溫，然後冷卻至-10℃。取3-(2-甲氧羰乙基)-4-甲基吡咯(55.7克)溶於80毫升二氯乙烷中，以1小時時間滴加，混合物再攪拌35分鐘。混合物於30℃以下旋轉蒸發。液體殘質倒至2700毫升冰冷之2N氫氧化鈉溶液中。所得溶液以20分鐘時間加熱至88℃，再保持此溫度30分鐘。溶液冷卻至周溫，以200毫升乙醚萃取。水溶液冷卻至0℃，緩緩添加約1350毫升5N鹽酸酸化至pH 3.5。真空過濾收集黃色沈澱，以100毫升水洗滌4次，於周溫下之真空烘箱中乾燥，產生54.4克(收率90.2%) 4-(2-羧乙基)-2-甲醯基-3-甲基吡咯粗產物。

粗物質置於425毫升乙醇及700毫升乙醚之回流混合物中，趁熱過濾，排除不溶性殘質，保留此殘質。濾液置入冷凍庫中，真空過濾收集沈澱，以50毫升醚洗滌。再萃取一次濾液中之不溶性殘質，趁熱過濾，置入冷凍庫中。合併所得沈澱及第一份沈澱，產生26.1克4-(2-羧乙基)-2-甲醯基-3-甲基吡咯之褐色粉末，MP 149.0-150.3℃。濾液與前一次製備之濾液合併，濃縮，產生43克褐色固體。固體置入含500

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（91）

毫升醚與100毫升乙醇之回流混合物中，過濾。濾液於回流下經諾力得(Norit)處理，再次趁熱過濾。濾液置入冷凍庫中，再產生3份4-(2-羧乙基)-2-甲醯基-3-乙基吡咯，7.7克，MP 148-151℃，3.2克MP 128-134℃及4.1克 MP 148.2-150.0℃。

取4-(2-羧乙基)-2-甲醯基-3-甲基吡咯(9.0克)與6.0克2-羥吲哚於50毫升乙醇中，在250毫升加裝溫度計、回流冷凝器及磁鐵攪拌器之三頸圓底燒瓶中加熱至70℃。當大多數固體溶解時，緩緩添加4.5克六氫吡啶，混合物回流4小時。緩緩添加乙酸(12毫升)，產生很多沈澱。混合物回流5分鐘，冷卻至室溫，眞空過濾收集沈澱，以30毫升乙醇洗滌。沈澱物於回流下，呈漿物狀經30毫升乙醇洗滌，冷卻至室溫，眞空過濾收集，以20毫升乙醇洗滌，眞空乾燥，產生11.9克(收率80%) 3-[4-(2-羧乙基)-3-甲基吡咯-2-亞甲基]-2-吲哚啉酮，SU6663，爲橙色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6) δ ：13.29(s, br, 1H, NH-1'), 12.05(s, br, 1H, COOH), 10.78(s, br, 1H, NH-1), 7.73(d, J=7.34 Hz, 1H, H-4), 7.61(s, 1H, H-乙烯基), 7.13(d, J=2.75 Hz, 1H, H-2'), 7.10(t, J=7.43 Hz, 1H, H-6), 6.97(t, J=7.43 Hz, 1H, H-5), 6.85(d, J=7.43 Hz, 1H, H-7), 2.64(t, J=7.38 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.46(t, J=7.38 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.25(s, 3H, CH_3); MS m/z(相對強度,%) 297 ($[M+1]^+$, 100)。

實例5

3-[2,4-二甲基-5-(2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-1H-吡咯-3-基]-丙酸

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（92）

取2,4-二甲基-5-乙氧羰基-3-(2-乙氧羰乙基)吡咯(1.07公斤)與3.2升5N氫氧化鈉於附裝回流冷凝器及滴加漏斗，且於油浴中加熱之12升三頸圓底燒瓶中機械攪拌。混合物回流3小時後，內溫爲96℃，所有固體均溶解，薄層層析法顯示已完全水解。離開加熱槽，混合物於水浴中冷卻至50℃。緩緩添加12N鹽酸(約1.3升)。添加約50%酸後，氣體開始釋出，溫度達到60℃。添加更多酸，氣體釋出增加，有黃色沈澱形成。以鹽酸調整最終pH至3.5。混合物於冰浴中冷卻至8℃。眞空過濾收集固體，以0.5升蒸餾水洗滌2次，於55至60℃之眞空烘箱中乾燥48小時，產生677克(收率101%)3-(2-羧乙基)-2,4-二甲基吡咯。

^{1}HNMR (d_6-DMSO) δ 11.9(s, 1H, COOH), 9.9(s, 1H, NH), 6.2(s, 1H, 芳香系), 2.5(t, 2H, CH_2), 2.2(t, 2H, CH_2), 2.0(s, 3H, CH_3), 1.9(s, 3H, CH_3); MP 134-136℃。

取含二甲基甲醯胺(28.5克)之250毫升二氯甲烷溶液於附裝磁鐵攪拌器、溫度計、及滴加漏斗之1升三頸圓底燒瓶中，於冰-鹽浴中冷卻至-1℃。取磷醯氯(59.3克)置入滴加漏斗中，緩緩加至反應混合物中。以25毫升二氯甲烷冲刷漏斗，確定所有磷醯氯均耗盡。混合物達到之最高溫爲5℃。混合物攪拌15分鐘，此時溫度爲-3℃。以15分鐘時間，分批添加3-(2-羧乙基)-2,4-二甲基吡咯(32.6克)固體。混合物達到之最高溫度爲7℃。紅黑色混合物再攪拌30分鐘，然後加熱至回流1小時。混合物冷卻至15℃，添加300毫升水，導致反應激烈，此時溫度上升。混合物攪拌並冷卻至22℃，

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（93）

分層，保留。有機層以100毫升水萃取，合併水層，以50毫升二氯甲烷洗滌。有機層棄置。水層經約180毫升1N氫氧化鈉調至pH 11。溫度上升至60℃。混合物攪拌30分鐘，此時溫度爲27℃。混合物經約120毫升10 N鹽酸酸化至pH 2，溫度上升至30℃。添加乙酸乙酯(150毫升)，攪拌混合物萃取產物。攪拌期間有大量黑色固體出現在水層表面。分離乙酸乙酯層，以100毫升乙酸乙酯萃取水層及固體。眞空過濾收集仍殘存之固體，以水徹底洗滌，於40℃下眞空乾燥，產生12克(收率31%) 3-(2-羧乙基)-2,4-二甲基-5-甲醯基吡咯之褐黑色固體。薄層層析法(二氯甲烷：乙酸，95：5，矽膠)顯示在Rf 0.7有一個點，在起點有一個有色點。合併乙酸乙酯層，經無水硫酸鈉脫水，蒸發成褐黑色固體，於40℃下眞空乾燥，產生21克(收率55%，總收率86%) 3-(2-羧乙基)-2,4-二甲基-5-甲醯基吡咯，其經薄層層析法分析之外觀與前一份固體相同。

或者，取含二甲基甲醯胺(124毫升)之750毫升二氯甲烷於附裝機械攪拌器、溫度計及滴加漏斗之5升三頸圓底燒瓶中，於冰-鹽浴中冷卻至-9℃。利用滴加漏斗迅速添加磷醯氯(114毫升)，使用50毫升二氯甲烷沖刷至反應混合物中。混合物之最高溫達到-4℃。以20分鐘時間，分批添加固體3-(2-羧乙基)-2,4-二甲基吡咯(133.6克)。混合物之最高溫達到3℃。暗紅色混合物加熱至回流1分鐘後，冷卻至-1℃。混合物冷卻至-1℃，迅速添加800毫升冰水。最高溫達到15℃。分離有機層，棄置，以約800毫升10 N氫氧化鈉緩緩調整水

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（94）

層至pH 12-13，加冰控制溫度。溫度上升至37℃。混合物於周溫下攪拌90分鐘，此時薄層層析法顯示起點只有微量淡色物質，產物之Rf爲0.3。混合物冷卻至0℃。混合物經約600毫升10 N鹽酸酸化至pH 3，加冰控制溫度。最高達到10℃。混合物於冷卻下攪拌1小時。眞空過濾收集固體，以100毫升洗滌4次，於50至60℃下眞空乾燥，產生140.6克(收率90%) 3-(2-羧乙基)-2,4-二甲基-5-甲醯基吡咯之褐色固體。

^{1}HNMR (d_6-DMSO)：δ 12.0(s, 1H, COOH), 11.3(s, 1H, NH), 9.4(s, 1H, CHO), 2.6(t, 2H, CH_2), 2.3(t, 2H, CH_2), 2.2(s, 3H, CH_3), 2.1(s, 3H, CH_3)。MP 145-147℃。

取3-(2-羧乙基)-2,4-二甲基-5-甲醯基吡咯(18.2克)與11.7克2-羥吲哚溶於100毫升乙醇中，於附裝磁鐵攪拌器及回流冷凝器且於油浴中之250毫升圓底燒瓶中加熱。添加吡咯啶(7.0克)，反應混合物回流2小時，此時出現大量褐黑色固體。薄層層析法(乙酸乙酯：乙醇：乙酸96：2：2，矽膠)顯示沒有羥吲哚起始物。添加8毫升乙酸，混合物回流15分鐘。濃稠混合物經50毫升乙醇稀釋，冷卻至10℃。眞空過濾收集固體，以50毫升乙醇洗滌。固體於125毫升乙醇中，在回流下攪拌10分鐘，冷卻至10℃，眞空過濾收集，以50毫升乙醇洗滌。產物於45℃下眞空乾燥一夜，產生25.5克(收率88%) 3-[2,4-二甲基-3-(2-羧乙基)吡咯-5-亞甲基]-2-吲哚啉酮之橙色固體。

或者，取含3-(5-甲醯基-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基)丙酸(10克，51毫莫耳)、2-羥吲哚(6.5克，49毫莫耳)與氫氧化

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（95）

鈉(40克，58毫莫耳)溶於50毫升水之混合物於50℃下攪拌4小時。反應混合物冷卻至室溫，過濾，濾液經12 N鹽酸酸化至pH 3。真空過濾收集沈澱固體，以10毫升水洗滌，真空乾燥一夜。粗固體與熱乙醇和成漿物2次。真空過濾收集固體，以10毫升乙醇洗滌，真空乾燥，產生13.8克(91%) 3-[2,4-二甲基-5-(2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-1H-吡咯-3-基]-丙酸。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 13.38(s, br, 1H, NH-1'), 12.05(s, br, 1H, COOH), 10.70(s, br, 1H, NH-1), 7.69(d, J=7.39 Hz, 1H, H-4), 7.53(s, 1H, H-乙烯基), 7.06(t, J=7.39 Hz, 1H, H-6), 6.95(t, J=7.39 Hz, 1H, H-5), 6.85(d, J=7.39 Hz, 1H, H-7), 2.63(t, J=7.45 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.34(t, J=7.45 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.28(s, 3H, CH_3), 2.24(s, 3H, CH_3); MS m/z (相對強度, %) 311 ($[M+1]^+$, 100)。

實例6

3-[5-(5-溴-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-4-甲基-1H-吡咯-3-基]-丙酸

取2-羥吲哚(53.3克)懸浮於640毫升乙腈中，混合物於冰浴中，以機械攪拌冷卻至7℃。以20分鐘時間分批添加N-溴琥珀醯亞胺固體(74.8克)。添加約三分之一之N-溴琥珀醯亞胺(5分鐘時間)後，溫度上升至12℃。暫停添加，直到混合物溫度降至10℃爲止。再開始添加，並保持12℃以下之溫度。添加完畢後，混合物於10℃下攪拌1小時，然後再攪拌1小時，使混合物回升至周溫。真空過濾收集沈澱，以80

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（96）

毫升乙醇洗滌，於過濾漏斗中抽乾20分鐘，產生產物，經HPLC判斷其中含有6.4% 2-羥吲哚。取此固體溶於1440毫升變性乙醇中，攪拌和成漿物洗滌，回流5分鐘，此時大多數固體已溶解。混合物於冰浴中冷卻至13℃。眞空過濾收集固體產物，以80毫升乙醇洗滌，眞空乾燥，產生57.7克(68.0%) 5-溴-2-羥吲哚，經HPLC判斷含1.13% 2-羥吲哚。以30%以下之乙醇和成漿物洗滌，產生之收率更高(88%)，但含更多2-羥吲哚(1.76%)。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 10.44(s, br, 1H, NH-1), 7.32-7.36(m, 2H), 6.76(d, J=8.50 Hz, 1H, H-7), 3.5(s, 2H, CH_2), MS m/z 212.1/214.1 (M^+ / $[M+2]^+$)。

取4-(2-羧乙基)-2-甲醯基-3-甲基吡咯(90毫克)、106毫克5-溴-2-羥吲哚、及75微升六氫吡啶於2毫升乙醇中加熱至95℃ 5小時。反應混合物冷卻，濃縮。殘質懸浮在2 N鹽酸水溶液中。過濾沈澱，以水洗至pH 6，於眞空烘箱中乾燥，產生120毫克(64%)標題化合物之褐色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 13.31 (s, br, 1H, NH-1'), 12.06(s, br, 1H, COOH), 10.90(s, br, 1H, NH-1), 8.06(s, br, 1H, H-4), 7.75(s, 1H, H-乙烯基), 7.23(d, br, J=8.50 Hz, 1H, H-6), 7.19(d, J=2.84 Hz, 1H, H-2'), 6.80(d, br, J=8.50 Hz, 1H, H-7), 2.65(t, J=7.65 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.46(t, J=7.65 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.28(s, 3H, CH_3); MS m/z 375.1/377.2 (M^+ / $[M+2]^+$)。

實例7

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（97）

3-[5-(5-碘-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-4-甲基-1H-吡咯-3-基]-丙酸

取2-羥吲哚(82.9克)懸浮於630毫升乙酸中，混合物經機械攪拌，於冰水浴中冷卻至10℃。以10分鐘分批添加N-碘琥珀醯亞胺固體(175克)。添加完畢後，混合物於10℃下攪拌1小時。仍然懸浮之固體在此時轉呈極爲濃稠。眞空過濾收集固體，以100毫升50%乙酸之水溶液洗滌，然後以200毫升水洗滌，於過濾漏斗中抽乾20分鐘。產物眞空乾燥，產生93.5克(36%) 5-碘-2-羥吲哚，經質子NMR判斷仍含約5% 2-羥吲哚。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 10.45(s, 1H, NH-1), 7.49 (s, 1H, H-4), 7.48(d, J=8.10 Hz, 1H, H-6), 6.64(d, J=8.10 Hz, 1H, H-7), 及 3.46(s, 2H, CH_2-3); MS m/z 258 $[M-1]^+$。

取4-(2-羧乙基)-2-甲醯基-3-甲基吡咯(90毫克)、130毫克5-碘-2-羥吲哚及75微升六氫吡啶於2毫升乙醇中，在95℃下加熱5小時。反應混合物冷卻及濃縮。殘質懸浮於2 N鹽酸水溶液中。過濾沈澱物，以水洗至pH 6，於眞空烘箱中乾燥，產生162毫克(77%)標題化合物之褐色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 13.30(s, br, 1H, NH-1'), 12.06(s, br, 1H, COOH), 10.88(s, br, 1H, NH-1), 8.18(s, br, 1H, H-4), 7.73(s, 1H, H-乙烯基), 7.40(d, br, J=8.03 Hz, 1H, H-6), 7.19(d, J=2.94 Hz, 1H, H-2'), 6.69(d, br, J=8.03 Hz, 1H, H-7), 2.65(t, J=7.40 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.46(t, J=7.40 Hz, 2H, CH_2CH_2OOH), 2.28(s, 3H, CH_3); MS m/z 423 $[M+1]^+$。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（98）

實例8

3-[4-甲基-5-(4-甲基-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-1H-吡咯-3-基]丙酸

攪拌添加含草酸二乙酯(30毫升)之20毫升無水醚至懸浮於50毫升無水醚中之19克乙醇鉀中。混合物於冰浴中冷卻，緩緩添加20毫升3-硝基鄰二甲苯之20毫升無水醚。濃稠之深紅色混合物加熱至回流0.5小時，濃縮成深紅色固體，以10%氫氧化鈉處理，直到幾乎所有固體均溶解爲止。深紅色混合物經30%過氧化氫處理，直到紅色轉呈黃色爲止。混合物經10%氫氧化鈉及30%過氧化氫交替處理，直到不再出現紅色爲止。固體過濾，以6 N鹽酸酸化濾液。眞空過濾收集所產生之沈澱，以水洗滌，眞空乾燥，產生9.8克(收率45%) 2-甲基-6-硝苯基乙酸之灰白色固體。固體於甲醇中經10% Pd/C氫化，產生9.04克4-甲基-2-羥吲哚之白色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 10.27(s, br, 1H, NH-1), 7.06(t, J=7.71 Hz, 1H, H-6), 6.74(d, J=7.73 Hz, H-5), 6.63(d, J=7.73 Hz, 1H, H-7), 3.36(s, 2H, CH_2), 2.18(s, 3H, CH_3)。

取4-(2-羧乙基)-2-甲醯基-3-甲基吡咯(90毫克)，74毫克4-甲基-2-羥吲哚，及75微升六氫吡啶於2毫升乙醇中，於95℃下加熱5小時。反應混合物冷卻及濃縮。殘質懸浮於6 N鹽酸水溶液中。過濾沈澱，以水洗至pH 6，於眞空烘箱中乾燥，產生80毫克(52%)標題化合物之褐色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 13.33(s, br, 1H, NH-1'),

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（99）

10.84(s, br, 1H, NH-1), 7.54(s, 1H, H-乙烯基), 7.12(d, J=2.0 Hz, 1H, H-2'), 7.01(t, J=7.75 Hz, 1H, H-6), 6.79(d, J=7.75 Hz, H-5), 6.74(d, J=7.75 Hz, 1H, H-7), 2.64(t, J=7.65 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.57(s, 3H, CH_3), 2.42(t, J=7.65 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.19(s, 3H, CH_3); MS m/z (相對強度, %), 311 ($[M+1]^+$, 100)。

實例9

3-[4-甲基-5-(5-甲基-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-1H-吡咯-3-基]丙酸

取5-甲基吲哚滿二酮(15.0克)及60毫升肼水合物於140至160℃下加熱4小時。薄層層析法(乙酸乙酯：己烷，1：2，矽膠)顯示沒有殘留起始物。反應混合物冷卻至室溫，倒至300毫升冰水中，以6 N鹽酸酸化至pH 2。於室溫下靜置2天後，真空過濾收集沈澱，以水洗滌，真空乾燥，產生6.5克(收率47%) 5-甲基-2-羥吲哚。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 10.20(s, br, 1H, NH-1), 6.99(s, 1H, H-4), 6.94(d, J=8.11 Hz, 1H, H-6), 6.68(d, J=8.11 Hz, 1H, H-7), 3.39(s, 2H, CH_2-3), 及2.22(s, 3H, CH_3-5)。

取4-(2-羧乙基)-2-甲醯基-3-甲基吡咯(90毫克)，74毫克5-甲基-2-羥吲哚，及75微升六氫吡啶於2毫升乙醇中，於95℃下加熱5小時。反應混合物冷卻及濃縮。殘質懸浮於6 N鹽酸水溶液中。過濾沈澱，以水洗至pH 6，於真空烘箱中乾燥，產生65毫克(42%)標題化合物之褐色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 13.30(s, br, 1H, NH-1'),

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（100）

12.05(s, br, 1H, COOH), 10.67(s, br, 1H, NH-1), 7.57(s, 2H, H-乙烯基, H-4), 7.12(d, J=2.65 Hz, 1H, H-2'), 6.91(d, J=7.82 Hz, 1H, H-6), 6.74(d, J=7.82 Hz, 1H, H-7), 2.65(t, J=6.94 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.46(t, J=6.94 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.30(s, 3H, CH_3), 2.25(s, 3H, CH_3); MS m/z（相對強度，%），311 ($[M+1]^+$, 100)。

實例10

3-[5-(5,6-二甲基-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-4-甲基-1H-吡咯-3-基]-丙酸

取4-(2-羧乙基)-2-甲醯基-3-甲基吡咯(90毫克)，97毫克5,6-二甲氧基-2-羥吲哚，及75微升六氫吡啶於2毫升乙醇中，於95℃下加熱5小時。反應混合物冷卻及濃縮。殘質懸浮於6 N鹽酸水溶液中。過濾沈澱，以水洗至pH 6，於真空烘箱中乾燥，產生104毫克(58%)標題化合物之褐色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 13.19(s, br, 1H, NH-1'), 12.05(s, br, 1H, COOH), 10.53(s, br, 1H, NH-1), 7.46(s, 1H), 7.41(s, 1H), 7.02(s, 1H, H-2'), 6.45(s, 1H), 3.74(s, 3H, OCH_3), 3.70(s, 3H, OCH_3), 2.59(t, J=7.43 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.44(t, J=7.43 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.22(s, 3H, CH_3); MS m/z 357 $[M+1]^+$。

實例11

3-[5-(6-氯-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-4-甲基-1H-吡咯-3-基]-丙酸

取4-(2-羧乙基)-2-甲醯基-3-甲基吡咯(200毫克)，167.6毫

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（101）

克6-氯-2-羥吲哚，及166微升六氫吡啶於2毫升乙醇中，於95℃下加熱5小時。反應混合物冷卻及濃縮。殘質懸浮於6 N鹽酸水溶液中。過濾沈澱，以水洗至pH 6，於真空烘箱中乾燥，產生246毫克(74%)標題化合物之褐色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 13.22(s, br, 1H, NH-1'), 12.09(s, br, 1 H, COOH), 10.95(s, br, 1H, NH-1), 7.78(d, J=7.95 Hz, 1H, H-4), 7.66(s, 1H, H-乙烯基), 7.18(d, J=2.64 Hz, 1H, H-2'), 7.01(dd, J=1.90, 7.95 Hz, 1H, H-5), 6.86(d, J=1.90 Hz, 1H, H-7), 2.65(t, J=7.14 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.45(t, J=7.14 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.26(s, 3H, CH_3)。

實例12

3-[4-(2-羧乙基)-3-甲基-1H-吡咯-2-基亞甲基]-2-氧-2,3-二氫-1H-吲哚-5-羧酸甲酯

取5-碘-2-羥吲哚(17克)與2克二乙酸鈀、18.2毫升三乙胺、150毫升甲醇、15毫升二甲亞碸及2.6克DPPP於飽和含一氧化碳之大氣中回流。24小時後，反應混合物過濾排除觸媒，濾液濃縮。濃縮物經矽膠使用30%乙酸乙酯之己烷溶液層析。含產物之溶離份濃縮後，靜置。有產物沈澱，真空過濾收集，產生0.8克(7%) 5-甲氧羰基-2-羥吲哚之灰白色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6) δ 10.70(s, br, 1H, NH-1), 7.83(dd, J=1.77, 8.29 Hz, 1H, H-6), 7.77(s, br, 1H, H-4), 6.89(d, J=8.29 (Hz, 1H, H-7), 3.80(s, 3H, $COOCH_3$-5), 3.51(s, 2H, CH_2-3)。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（102）

取4-(2-羧乙基)-2-甲醯基-3-甲基吡咯(90.6毫克)，88.6毫克5-甲氧羰基-2-羥吲哚，及75微升六氫吡啶於2毫升乙醇中，於95℃下加熱5小時。反應混合物冷卻及濃縮。殘質懸浮於6 N鹽酸水溶液中。過濾沈澱，以水洗至pH 6，於真空烘箱中乾燥，產生123毫克(69%)標題化合物之黃色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 13.27(s, br, 1H, NH-1'), 12.0(s, vbr, 1H, COOH), 11.16(s, br, 1H, NH-1), 8.36(s, br, 1H, H-4), 7.80(s, 1H, H-乙烯基), 7.40(dd, J=1.80, 8.14 Hz, 1H, H-6), 7.20(d, J=2.91 Hz, 1H, H-5'), 6.96(d, J=8.14 Hz, 1H, H-7), 3.84(s, 3H, $COOCH_3$), 2.66(t, J=7.55 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.46(t, J=7.55 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.30 (s, 3H, CH_3); MS m/z (相對強度, %), 355 ($[M+1]^+$, 100)。

實例13

3-[4-(2-羧乙基)-3-甲基-1H-吡咯-2-基亞甲基]-2-氧-2,3-二氫-1H-吲哚-5-羧酸

添加2-羥吲哚(6.7克)至冰浴中含23克氯化鋁之30毫升二氯乙烷攪拌懸浮液中。緩緩添加氯乙醯氯(11.3克)，有氯化氫氣體釋出。攪拌10分鐘後，反應加溫至40-50℃ 1.5小時。薄層層析法(乙酸乙酯，矽膠)顯示沒有起始物殘留。混合物冷卻至室溫，倒至冰水中。真空過濾收集沈澱，以水洗滌，真空乾燥，產生10.3克(98%) 5-氯乙醯基-2-羥吲哚之灰白色固體。

取9.3克5-氯乙醯基-2-羥吲哚於90毫升吡啶中，於80至90℃下攪拌3小時後，冷卻至室溫。真空過濾收集沈澱，以

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（103）

20毫升乙醇洗滌。固體溶於90毫升2.5 N氫氧化鈉中，於70-80℃下攪拌3小時。混合物冷卻至室溫，以0.5 N鹽酸酸化至pH 2。眞空過濾收集沈澱，以水充份洗滌，產生粗產物5-羧基-2-羥吲哚之深褐色固體。靜置一夜後，濾液產生2克5-羧基-2-羥吲哚之黃色固體。此深褐色粗產物溶於熱甲醇中，過濾排除不溶物，濾液濃縮，產生5.6克5-羧基-2-羥吲哚之褐色固體。合併收率爲97%。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 12.56(s, br, 1H, COOH-5), 10.70(s, 1H, NH-1), 7.82(dd, J=15.7, 7.79 Hz, 1H, H-6), 7.74(s, br, 1H, H-4), 6.87(d, J=7.79 Hz, 1H, H-7), 及3.53(s, 2H, CH_2-3)。MS m/z (相對強度, %) 178 ($[M+1]^+$, 100)。

取4-(2-羧乙基)-2-甲醯基-3-甲基吡咯(90.6毫克)，88.6毫克5-羧基-2-羥吲哚，及75微升六氫吡啶於2毫升乙醇中，於95℃下加熱5小時。反應混合物冷卻及濃縮。殘質懸浮於6 N鹽酸水溶液中。過濾沈澱，以水洗至pH 6，於眞空烘箱中乾燥。粗產物經矽膠管柱層析，使用乙酸乙酯-己烷-乙酸爲溶離液純化，產生51毫克(30%)標題化合物之黃色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 13.27(s, br, 1H, NH-1), 12.28(s, vbr, 2H, 2xCOOH), 11.11(s, br, 1H, NH-1), 8.34(d, J=1.36 Hz, 1H, H-4), 7.78(s, 1H, H-乙烯基), 7.40(dd, J=1.36, 8.20 Hz, 1H, H-6), 7.19(d, J=3.07 Hz, 1H, H-5'), 6.93(d, J=8.20 Hz, 1H, H-7), 2.65(t, J=7.56 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.46(t, J=7.56 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.29(s, 3H, CH_3); MS m/z 341.0 $[M+1]^+$。

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（104）

實例14

3-[4-甲基-5-(2-氧-5-胺磺醯基-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-1H-吡咯-3-基]-丙酸

在含27毫升氯磺酸之100毫升燒瓶中緩緩添加13.3克2-羥吲哚。添加期間之反應溫度保持在30℃以下。添加後，反應混合物於室溫下攪拌1.5小時，加熱至68℃ 1小時，冷卻，倒至水中。以水洗滌沈澱，於眞空烘箱中乾燥，產生11.0克5-氯磺醯基-2-羥吲哚(收率50%)，未再純化即使用。

添加5-氯磺醯基-2-羥吲哚(2.1克)至含10毫升氫氧化銨之10毫升乙醇中，於室溫下攪拌一夜。混合物濃縮，眞空過濾收集固體，產生0.4克(收率20%) 5-胺磺醯基-2-羥吲哚之灰白色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 10.67(s, 1H, NH-1), 7.63-7.66(m, 2H, H-4, 6), 7.13(s, 2H, 5-SO_2NH_2), 6.91(d, J=8.04 Hz, 1H, H-7), 及3.56(s, 2H, CH_2-3); MS m/z (相對強度, %) 211 ([M-1]$^+$, 100)。

取4-(2-羧乙基)-2-甲醯基-3-甲基吡咯(90.6毫克)，106毫克5-胺磺醯基-2-羥吲哚，及75微升六氫吡啶於2毫升乙醇中，於95℃下加熱5小時。反應混合物冷卻及濃縮。殘質懸浮於6 N鹽酸水溶液中。過濾沈澱，以水洗至pH 6，於眞空烘箱中乾燥，產生132毫克(70%)標題化合物之黃色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 13.28(s, br, 1H, NH-1'), 12.0(s, vbr, 1H, COOH), 11.15(s, br, 1H, NH-1), 8.20(d, J=1.60 Hz, 1H, H-4), 7.73(s, 1H, H-乙烯基), 7.59(dd, J=1.60,

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（105）

8.17 Hz, 1H, H-6), 7.22(d, J=2.85 Hz, 1H, H-2'), 7.10(s, 2H, NH_2), 6.98(d, J=8.17 Hz, 1H, H-7), 2.67(t, J=7.41 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.46(t, J=7.41 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 及2.29 (s, 3H, CH_3)。

實例15

3-[4-甲基-5-(5-甲基胺磺醯基-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-1H-吡咯-3-基]-丙酸

取含3.38克5-氯磺醯基-2-羥吲哚之10毫升2 M甲胺之四氫呋喃溶液之懸浮液於室溫下攪拌4小時，此時出現白色固體。真空過濾收集沈澱，以5毫升水洗滌2次，於40℃下真空乾燥一夜，產生3.0克(收率88%) 5-甲胺磺醯基-2-羥吲哚。

^{1}HNMR (300 MHz, DMSO-d6)：δ 10.87(s, br, 1H, NH-1), 7.86(s, br, 1H, 5-SO_2NHCH_3), 7.61(d, J=7.80 Hz, 1H, H-6), 7.32(d, J=4.67 Hz, 1H, H-4), 6.97(d, J=7.80 Hz, 1H, H-7), 2.53(s, 2H, CH_2-3), 及2.36(s, 3H, 5-SO_2NHCH_3); MS m/z (相對強度, %) 226 (M^+, 100)。

取4-(2-羧乙基)-2-甲醯基-3-甲基吡咯(90.6毫克)，113毫克5-甲胺磺醯基-2-羥吲哚，及75微升六氫吡啶於2毫升乙醇中，於95℃下加熱5小時。反應混合物冷卻及濃縮。殘質懸浮於6 N鹽酸水溶液中。過濾沈澱，以水洗至pH 6，於真空烘箱中乾燥，產生163毫克(83%)標題化合物之黃色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 13.30(s, br, 1H, NH-1'),

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（106）

12.0(s, vbr, 1H, COOH), 11.19(s, br, 1H, NH-1), 8.18(d, J=1.64 Hz, 1H, H-4), 7.80(s, 1H, H-乙烯基), 7.53(dd, J=1.64, 8.17 Hz, 1H, H-6), 7.23(d, J=2.80 Hz, 1H, H-2'), 7.13(q, J=5.15 Hz, 1H, $NHCH_3$), 7.02(d, J=8.17 Hz, 1H, H-7), 3.84(s, 3H, $COOH_3$), 2.66(t, J=7.54 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.47(t, J=7.54 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.41(d, J=5.15 Hz, 3H, NCH_3), 2.30(s, 3H, CH_3); MS m/z 390 $[M+1]^+$。

實例16

3-{3-[4-(2-羧乙基)-3-甲基-1H-吡咯-2-基亞甲基]-2-氧-2,3-二氫-1H-吲哚-5-基}-丙酸

以4.65克三乙矽烷處理冰浴中含5-氯乙醯基-2-羥吲哚(4.18克)之30毫升三氟乙酸，於室溫下攪拌3小時。混合物倒至150毫升水中，眞空過濾收集沈澱，以50毫升水洗滌，乾燥，產生2.53克(收率65%) 5-(2-氯乙基)-2-羥吲哚之紅褐色固體。

添加氰化鉀(2.0克)至15毫升二甲亞碸中，加熱至90℃。取5-氯乙基-2-羥吲哚(3.0克)溶於5毫升二甲亞碸中，緩緩攪拌添加，反應加熱至150℃ 2小時。混合物冷卻，倒至冰水中，眞空過濾收集沈澱，以水洗滌，乾燥，產生粗產物。粗產物經矽膠使用5%甲醇之氯仿溶液層析，產生1.2克(收率42%)標題化合物。

取5-氯乙基-2-羥吲哚(4.02克)於含25毫升濃鹽酸之10毫升水中回流4小時。混合物冷卻，加水，眞空過濾收集所得固體，以水洗滌，乾燥，產生1.9克(收率44%) 5-羥乙基-2-

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（107）

羥吲哚之黃色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 12.00(s, br, 1H, 5-CH_2CH_2COOH), 10.21(s, 1H, NH-1), 7.05(s, 1H, H-4), 6.99(d, J=8.68 Hz, 1H, H-6), 6.69(d, J=8.68 Hz, 1H, H-7), 3.40(s, 2H, CH_3-3), 2.74(t, J=7.44 Hz, 2H, 5-CH_2CH_2COOH), 及 2.46(t, J=7.44 Hz, 2H, -CH_2CH_2COOH)。

取4-(2-羧乙基)-2-甲醯基-3-甲基吡咯(90.6毫克)，102.6毫克5-羧乙基-2-羥吲哚，及75微升六氫吡啶於2毫升乙醇中，於95℃下加熱5小時。反應混合物冷卻及濃縮。殘質懸浮於6 N鹽酸水溶液中。過濾沈澱，以水洗至pH 6，於真空烘箱中乾燥一夜。粗固體經矽膠管柱層析，以乙酸乙酯-己烷-乙酸溶離，產生121毫克(66%)標題化合物之黃色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 13.30(d, J=2.38 Hz, 1H, NH-1'), 12.0 3(s, vbr, 2H, 2xCOOH), 10.68(s, br, 1H, NH-1), 7.63(s, 1H, H-4), 7.59(s, 1H, H-乙烯基), 7.12(d, J=2.64 Hz, 1H, H-2'), 6.96(dd, J=1.22, 7.93 Hz, 1H, H-6), 6.75(d, J=7.93 Hz, H1, H-7), 2.81(t, J=7.75 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.65(t, J=7.75 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.55(t, J=7.75 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.46(t, J=7.42 Hz, CH_2CH_2COOH), 及2.26(s, 3H, CH_3)。

實例17

3-[5-(5-乙基-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-4-甲基-1H-吡咯-3-基]-丙酸

取2-羥吲哚(3克)懸浮於1,2-二氯乙烷中，緩緩使用3.2毫

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（108）

升乙醯氯處理。所得懸浮液加熱至50℃ 5小時，冷卻，倒至水中。真空過濾收集所得沈澱，以水充份洗滌，真空乾燥，產生2.9克(收率73%) 5-乙醯基-2-羥吲哚之褐色固體。

以1.8克三乙矽烷緩緩處理冰浴中含5-乙醯基-2-羥吲哚(2克)之15毫升三氟乙酸，然後於室溫下攪拌5小時。添加1毫升三乙矽烷，續攪拌一夜。反應混合物倒至冰水中，真空過濾收集沈澱，以水充份洗滌，真空乾燥，產生1.3克(收率71%)標題化合物之黃色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 10.25(s, br, NH-1), 7.03 (s, 1H,H-4), 6.97(d, J=8.05 Hz, 1H, H-6), 6.69(d, J=8.05 Hz, 1H, H-7), 3.40(s, 2H, CH_2-3), 2.51(q, J=7.69 Hz, 2H, CH_2CH_2-5), 及 1.12(t, J=7.42 Hz, 3H, CH_2CH_3-5)。

取4-(2-羧乙基)-2-甲醯基-3-甲基吡咯(90.6毫克)，80.5毫克5-乙基-2-羥吲哚，及75微升六氫吡啶於2毫升乙醇中，於95℃下加熱5小時。反應混合物冷卻及濃縮。殘質懸浮於6N鹽酸水溶液中。過濾沈澱，以水洗至pH 6，於真空烘箱中乾燥一夜。粗固體經矽膠管柱層析，以乙酸乙酯-己烷-乙酸溶離純化，產生52毫克(32%)標題化合物。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 13.31(s, 1H, NH-1), 12.04(s, vbr, 1H, COOH), 10.66(s, 1H, NH-1), 7.59(s, 2H, H-4及H-乙烯基), 7.11(d, J=3.29 Hz, 1H, H-2'), 6.94(d, J=7.85 Hz, 1H, H-6), 6.75(d, J=7.85 Hz, 1H, H-7), 2.65(t, J=7.66 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.57(q, J=7.83 Hz, 2H, CH_3CH_2), 2.46(t, J=7.66 Hz, CH_2CH_2COOH), 1.20(t, J=7.83, 3H, CH_3CH_2), 2.26(s, 3H,

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（109）

CH_3); MS m/z 325 $[M+1]^+$。

實例18

3-[5-(5-甲氧基-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-4-甲基-1H-吡咯-3-基]-丙酸

取三氯乙醛水合物(9.6克)溶於200毫升含83克硫酸鈉之水中。溶液加溫至60℃，添加含11.4克羥胺鹽酸鹽之50毫升水溶液，混合物保持60℃。在另一個燒瓶中，加溫含6.4克4-胺基苯甲醚與4.3毫升濃鹽酸之80毫升水至80℃。添加第一份溶液至第二份溶液中，混合物回流2分鐘後，緩緩冷卻至室溫，然後於冰浴中冷卻。眞空過濾收集黃褐色沈澱，以水洗滌，眞空乾燥，產生8.6克(收率85%) N-(2-羥亞胺基-乙醯基)胺基苯甲醚。

取含5毫升水之濃硫酸(45毫升)加溫至60℃，一次添加全量8.6克N-(2-羥亞胺乙醯基)胺基苯甲醚。攪拌之混合物加熱至93℃ 10分鐘後，使之冷卻至室溫。混合物倒至500克冰中，以乙酸乙酯萃取3次。合併之萃液經無水硫酸鈉脫水，濃縮，產生5.1克(收率65%) 5-甲氧吲哚滿二酮之深紅色固體。

取5-甲氧基吲哚滿二酮(5.0克)及30毫升肼水合物加熱至回流15分鐘。反應混合物冷卻至室溫，添加50毫升水。以各25毫升乙酸乙酯萃取混合物3次，合併有機層，經無水硫酸鈉脫水，濃縮，產生黃色固體。固體於乙酸乙酯中攪拌，眞空過濾排除1.1克不溶物，保留此物質。此物質經證明爲2-肼基羰甲基-4-胺基苯甲醚。濾液濃縮，經矽膠層

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（110）

析，以乙酸乙酯：己烷(1：1)溶離，產生0.7克5-甲氧基-2-羥吲哚之污黃色固體。取1.1克2-肼基-羰甲基-4-胺基苯甲醚於20毫升1N氫氧化鈉中回流1小時。混合物冷卻，以濃鹽酸酸化至pH 2，以各25毫升乙酸乙酯萃取3次。合併有機萃液，以鹽水洗滌，以無水硫酸鈉脫水，濃縮，產生0.8克5-甲氧基-2-羥吲哚之黃色固體。合併收量爲1.5克或33%。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 10.13(s, 1H, NH-1), 6.84(s, 1H, H-4), 6.72(d, J=8.68 Hz, 1H, H-6), 6.69(d, J=8.68 Hz, 1H, H-7), 3.68(s, 3H, OCH_3-5), 3.41(s, 2H, CH_2-3)。MS m/z (相對強度, %) 163 ($[M+1]^+$, 100)。

取4-(2-羧乙基)-2-甲醯基-3-甲基吡咯(90毫克)，82毫克5-甲氧基-2-羥吲哚及2滴六氫吡啶於2毫升乙醇中加熱至95℃一夜。反應混合物冷卻，濃縮。殘質懸浮於6 N鹽酸水溶液中。沈澱物過濾，以水洗至pH 6，眞空乾燥一夜，產生110毫克(67%)標題化合物之褐色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 13.38(s, br, 1H, NH-1'), 12.03(s, vbr, 1H, COOH), 10.57(s, 1H, NH-1), 7.63(s, 1H, H-乙烯基), 7.42(d, J=2.46 Hz, 1H, H-4), 7.12(d, J=3.08 Hz, 1H, H-2'), 6.74(d, J=8.26 Hz, 1H, H-6), 6.75(dd, J=2.46, 8.26 Hz, 1H, H-7), 3.77(s, 3H, OCH_3), 2.65(t, J=7.40 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.46(t, J=7.40 Hz, CH_2CH_2COOH), 2.27(s, 3H, CH_3); MS m/z (相對強度, %) 327 ($[M+1]^+$, 100)。

實例19

3-[5-(5-溴-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-2,4-二甲基-

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（111）

1H-吡咯-3-基]-丙酸

取3-(2-羧乙基)-2,4-二甲基-5-甲醯基吡咯(97.5毫克)，106毫克5-溴-2-羥吲哚，及75微升六氫吡啶於3毫升乙醇中，於95℃下加熱5小時。反應混合物冷卻及濃縮。殘質懸浮於6 N鹽酸水溶液中。過濾沈澱，以水洗至pH 6，於真空烘箱中乾燥一夜，產生171毫克(88%)標題化合物之澄色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 12.04(s, vbr, 1H, COOH), 10.80(s, br, 1H, NH-1), 8.0(d, J=2.06 Hz, 1H, H-4), 7.67(s, 1H, H-乙烯基), 7.19(dd, J=2.06, 8.40 Hz, 1H, H-6), 6.79(d, J=8.40 Hz, 1H, H-7), 2.65(t, J=7.63 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.35(t, J=7.63 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.29(s, 3H, CH_3), 2.27(s, 3H, CH_3); MS m/z (相對強度, %) 389 ($[M+1]^+$, 100)。

3-[5-(5-碘-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基]-丙酸

取3-(2-羧乙基)-2,4-二甲基-5-甲醯基吡咯(97.5毫克)，130毫克5-碘-2-羥吲哚，及75微升六氫吡啶於3毫升乙醇中，於95℃下加熱5小時。反應混合物冷卻及濃縮。殘質懸浮於6 N鹽酸水溶液中。過濾沈澱，以水洗至pH 6，於真空烘箱中乾燥一夜，產生155毫克(71%)標題化合物之橙色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 13.41(s, br, 1H, NH-1'), 12.03(s, br, 1H, COOH), 10.79(s, br, 1H, NH-1), 8.12(d, J=1.70 Hz, 1H, H-4), 7.65(s, 1H, H-乙烯基), 7.36(dd, J=1.70, 7.93 Hz, 1H, H-6), 6.79(d, J=7.93 Hz, 1H, H-7), 2.64(t, J=7.76 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.34(t, J=7.76 Hz, 2H,

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（112）

CH_2CH_2COOH), 2.29(s, 3H, CH_3), 2.27(s, 3H, CH_3); MS m/z (相對強度, %) 437 ($[M+1]^+$, 100)。

實例20

3-[5-(5-碘-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基]-丙酸

取3-(2-羧乙基)-2,4-二甲基-5-甲醯基吡咯(97.5毫克)，130毫克5-碘-2-羥吲哚，及75微升六氫吡啶於3毫升乙醇中，於95℃下加熱5小時。反應混合物冷卻及濃縮。殘質懸浮於6 N鹽酸水溶液中。過濾沈澱，以水洗至pH 6，於眞空烘箱中乾燥一夜，產生155毫克(71%)標題化合物之橙色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6) δ 13.41(s, br,1H, NH-1'), 12.03(s, br, 1H, COOH), 10.79(s, br, 1H, NH-1), 8.12(d, J=1.70 Hz, 1H, H-4), 7.65(s, 1H, H-乙烯基), 7.36(dd, J=1.70, 7.93 Hz, 1H, H-6), 6.79(d, J=7.93 Hz, 1H, H-7), 2.64(t, J=7.76 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.34(t, J=7.76 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.29(s, 3H, CH_3), 2.27(s, 3H, CH_3)。

MS m/z (相對強度, %) 437 ($[M+1]^+$, 100)。

實例21

3-[2,4-二甲基-5-(4-甲基-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-1H-吡咯-3-基]-丙酸

取3-(2-羧乙基)-2,4-二甲基-5-甲醯基吡咯(97.5毫克)，74毫克4-甲基-2-羥吲哚，及75微升六氫吡啶於3毫升乙醇中，於95℃下加熱5小時。反應混合物冷卻及濃縮。殘質懸浮於6 N鹽酸水溶液中。過濾沈澱，以水洗至pH 6，於眞空

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（113）

烘箱中乾燥一夜，產生60毫克(37%)標題化合物之綠色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 13.41(s, br, 1H, NH-1'), 12.03(s, br, 1H, COOH), 10.72(s, br, 1H, NH-1), 7.50(s, 1H, H-乙烯基), 7.01(t, J=7.82 Hz, 1H, H-6), 6.79(d, J=7.82 Hz, H-5), 6.74(d, J=7.82 Hz, 1H, H-7), 2.64(t, J=7.76 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.56(s, 3H, CH_3), 2.34(t, J=7.76 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.29(s, 3H, CH_3), 2.18(s, 3H, CH_3); MS m/z (相對強度, %) 325 ($[M+1]^+$, 1000)。

實例22

3-[2,4-二甲基-5-(5-甲基-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-1H-吡咯-3-基]-丙酸

取3-(2-羧乙基)-2,4-二甲基-5-甲醯基吡咯(97.5毫克)，74毫克5-甲基-2-羥吲哚，及75微升六氫吡啶於3毫升乙醇中，於95℃下加熱5小時。反應混合物冷卻及濃縮。殘質懸浮於6 N鹽酸水溶液中。過濾沈澱，以水洗至pH 6，於真空烘箱中乾燥一夜，產生104毫克(64%)標題化合物之黃色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 13.38(s, br, 1H, NH-1'), 12.02(s, br, 1H, COOH), 10.57(s, br, 1H, NH-1), 7.52(s, br, 1H, H-4), 7.50(s,1H, H-乙烯基), 6.87(d, J=7.86 Hz, 1H, H-6), 6.73(d, J=7.86 Hz, 1H, H-7), 2.63(t, J=7.49 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.34(t, J=7.49 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.29(s, 3H, CH_3), 2.28(s, 3H, CH_3), 及 2.24(s, 3H, CH_3); MS m/z (相對強度, %) 325 ($[M+1]^+$, 66)。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（114）

實例23

3-[5-(6-羥基-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基]-丙酸

取含3.26克6-甲氧基-2-羥吲哚之60毫升二氯甲烷冷卻至-2℃，滴加40毫升1M三溴化硼之二氯甲烷溶液。反應混合物於冰浴中攪拌1小時後，於室溫下1小時。倒至冰水中，以乙酸乙酯萃取。以水及鹽水洗滌有機層，經無水硫酸鈉脫水，濃縮，過濾所形成之沈澱，於眞空烘箱中乾燥一夜，產生2.56克6-羥基-2-羥吲哚(收率86%)。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 10.13(s, 1H, NH-1), 9.22 (s, 1H, OH-6), 6.93(d, J=7.76 Hz, 1H, H-4), 6.27-6.31(m, 2H, H-5,7), 及 3.29(s, 2H, CH_2-3); MS m/z 150 $[M+1]^+$。

取3-(2-羧乙基)-2,4-二甲基-5-甲醯基吡咯(82毫克)，63毫克6-羥基-2-羥吲哚及48微升六氫吡啶於2毫升乙醇中，於90℃加熱二天。反應混合物冷卻，濃縮，經矽膠管柱層析法使用乙酸乙酯-己烷-乙酸溶離純化，產生55毫克(40%)標題化合物之深褐色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 13.10(s, br, 1H, NH-1'), 12.0(s, vbr, 1H, COOH), 10.51(s, br, 1H, NH-1), 9.41(s, 1H, OH), 7.44(d, J=7.83, 1H, H-4), 7.29(s, 1H, H-乙烯基), 6.37 (dd, J=2.16, 7.83 Hz, 1H, H-5), 6.33(d, J=2.16 Hz, 1H, H-7), 2.62(t, J=7.75 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.32(t, J=7.75 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.25(s, 3H, CH_3), 2.20(s, 3H, CH_3); MS m/z 325 $[M+1]^+$。

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（115）

實例24

3-[5-(6-甲氧基-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基]-丙酸

取3-(2-羧乙基)-2,4-二甲基-5-甲基吡咯(97.5毫克)，82毫克6-甲氧基-2-羥吲哚及2滴六氫吡啶於2毫升乙醇中於95℃加熱一夜。反應混合物冷卻，濃縮。殘質懸浮於2 N鹽酸水溶液中。沈澱物過濾，以水洗至pH 6，於眞空烘箱中乾燥一夜，產生130毫克(76%)標題化合物之黃色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 13.15(s, br, 1H, NH-1'), 11.75(s, vbr, 1H, COOH), 10.65(s, br, 1H, NH-1), 7.58(d, J=8.27 Hz, 1H, H-4), 7.29(s, 1H, H-乙烯基), 6.37(dd, J=2.26, 8.27 Hz, 1H, H-5), 6.33(d, J=2.26 Hz, 1H, H-7), 3.74(s, 3H, OCH_3), 2.62(t, J=7.67 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.33(t, J=7.67 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.26(s, 3H, CH_3), 及 2.22(s, 3H, CH_3); MS m/z (相對強度, %) 341 ($[M+1]^+$, 100)。

實例25

3-[5-(6-羥基-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-4-甲基-1H-吡咯-3-基]-丙酸

取4-(2-羧乙基)-2-甲醯基-3-甲基吡咯(543毫克)，450毫克6-羥基-2-羥吲哚及450微升六氫吡啶於10毫升乙醇中於90℃加熱一夜。反應混合物冷卻，濃縮。殘質懸浮於2 N鹽酸水溶液中。沈澱物過濾，以水洗至pH 6，於眞空烘箱中乾燥一夜，產生褐色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 13.05(s, br, 1H, NH-1'),

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210 × 297公釐)

五、發明說明（116）

10.60(s, br, 1H, NH-1), 9.4(s, 1H, OH), 7.49(d, J=8.08, 1H, H-4), 7.35(s, 1H, H-乙烯基), 7.02(d, J=3.22 Hz, 1H, H-2'), 6.38(dd, J=2.28, 8.08 Hz, 1H, H-5), 6.32(d, J=2.28 Hz, 1H, H-7), 2.62(t, J=7.67 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.44(t, J=7.67 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 及 2.21(s, 3H, CH_3); MS m/z (相對強度, %) 313 ($[M+1]^+$, 60)。

實例26

3-[5-(6-羥基-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-4-甲基-1H-吡咯-3-基]-丙酸3,5-二甲氧苄酯

取3-[5-(6-羥基-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-4-甲基-1H-吡咯-3-基]-丙酸(100毫克)、56毫克3,5-二甲氧苄基氯及207毫克碳酸鉀於2毫升無水二甲基甲醯胺中，於90℃下加熱一夜。反應混合物冷卻，倒至水中，以乙酸乙酯萃取。有機層以水及鹽水洗滌，經無水硫酸鈉脫水，濃縮。粗產物經矽膠管柱層析法，使用乙酸乙酯-己烷-乙酸溶離純化，產生39毫克標題化合物之褐色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 13.06(s, br, 1H, NH-1'), 10.60(s, br, 1H, NH-1), 9.4(s, br, 1H, OH), 7.49(d, J=8.03, 1H, H-4), 7.35(s, 1H, H-乙烯基), 7.01(d, J=3.08 Hz, 1H, H-2'), 6.47(d, J=2.29 Hz, 2H, 芳香系), 6.42(t, J=2.29 Hz, 1H, 芳香系), 6.38(dd, J=2.15, 8.03 Hz, 1H, H-5), 6.33(d, J=2.15 Hz, 1H, H-7), 5.01(s, 2H, CH_2-Ph), 3.70(s, 6H, 2xOCH_3), 2.59-2.72(m, 4H, CH_2CH_2COOH), 及 2.20(s, 3H, CH_3)。

實例27

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（117）

3-{5-[6-(3-甲氧苯基)-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基]-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基}-丙酸

添加肆(三苯基膦)鈀(0.7克)至含5克3-甲氧苯基二羥硼酸，3.8克5-溴-2-氟-硝基苯及11毫升2M碳酸鈉溶液之100毫升甲苯混合物中。混合物回流2小時，以水稀釋，以乙酸乙酯萃取。依序以飽和碳酸氫鈉及鹽水洗滌乙酸乙酯層，脫水及濃縮，產生油性固體。固體經矽膠層析(乙酸乙酯：己烷(1：6))，產生4.3克(收率77%) 4-氟-3'-甲氧基-3-硝基聯苯。

滴加丙二酸二甲酯(9.7毫升)至含2.0克氫化鈉懸浮之50毫升二甲亞碸中。混合物加熱至100℃ 35分鐘，冷卻至室溫。添加4-氟-2'-甲氧基-3-硝基聯苯(4.2克)之50毫升二甲亞碸溶液，混合物加熱至100℃下加熱1小時。反應混合物冷卻，以300毫升飽和氯化銨溶液中止反應，以乙酸乙酯萃取2次。合併萃液，以鹽水洗滌，經無水硫酸鈉脫水，濃縮，產生3'-甲氧基-3-硝基聯苯基-4-丙二酸二甲酯之淺黃色固體。

取3'-甲氧基-3-硝基聯苯基-4-丙二酸酯粗產物於45毫升6 N鹽酸中，於110℃下加熱4天，然後冷卻。過濾收集沈澱物，以水及己烷洗滌，乾燥，產生5.3克3'-甲氧基-2-硝基聯苯基-4-乙酸之淺黃褐色固體。

取3'-甲氧基-3-硝基聯苯基-4-乙酸(5.2克)溶於甲醇中，經0.8克10% Pd/C，於室溫下氫化3小時。過濾排除觸媒，以甲醇洗滌，合併濾液，濃縮，產生褐色固體。固體經矽

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（118）

膠使用乙酸乙酯：己烷：乙酸(33：66：1)層析，產生3.0克(收率75%，以4-氯-3'-甲氧基-3-硝基聯苯爲基準計)6-(3-甲氧苯基)-2-羥吲哚之粉紅色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 10.39(s, br, 1H, NH), 7.35(t, J=7.85 Hz, 1H), 7.26(d, J=7.78 Hz, 1H), 7.19(dd, J=1.22, 7.8 Hz, 1H), 7.13-7.16(m, 1H), 7.09-7.1(m, 1H), 7.01(d, J=1.48 Hz, 1H), 6.90-6.93(m, 1H), 3.8(s, 3H, OCH3), 3.49(s, 2H, CH2); MS m/z(相對強度, %) 240.0 ([M+1]$^+$, 100)。

取3-(2-羧乙基)-2,4-二甲基-5-甲基吡咯(117毫克)，120毫克6-(3-甲氧苯基)-2-羥吲哚及3滴六氫吡啶於3毫升乙醇中於90℃加熱一夜。反應混合物冷卻，濃縮。殘質懸浮於6 N鹽酸水溶液中。沈澱物過濾，以水洗至pH 6，於眞空烘箱中乾燥一夜，產生190毫克(91%)標題化合物之褐色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 13.38(s, br, 1H, NH-1'), 12.04(s, br, 1H, COOH), 10.79(s, br, 1H, NH-1), 7.77(d, J=8.05, 1H, H-4), 7.58(s, 1H, H-乙烯基), 7.27(dd, J=1.49, 8.05 Hz, 1H, H-5), 7.09(d, J=1.49 Hz, 1H, H-7), 6.89-7.59(m, 4H), 3.81(s, 3H, OCH_3), 2.65(t, J=7.62 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.35(t, J=7.62 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.30(s, 3H, CH_3), 及2.27(s, 3H, CH_3); MS m/z (相對強度, %), 417 ([M+1]$^+$, 75)。

實例28

3-[5-(6-溴-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-4-甲基-1H-吡咯-3-基]-丙酸

滴加丙二酸二甲酯(13毫升)至含2.7克氫化鈉懸浮之20毫

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（119）

升二甲亞碸中。混合物加熱至100℃ 10分鐘後，冷卻至室溫。添加5-溴-2-氟硝基苯(5.0克)之25毫升二甲亞碸溶液，混合物於100℃下加熱2小時。反應混合物冷卻，以300毫升飽和氯化銨溶液中止反應，以乙酸乙酯萃取3次。合併萃液，以飽和氯化銨、水及鹽水洗滌，以無水硫酸鈉脫水，濃縮，產生4-溴-2-硝苯基丙二酸二甲酯粗產物之淺黃色油。

取4-溴-2-硝苯基丙二酸二甲酯粗產物於110℃下，於40毫升6N鹽酸中加熱24小時，冷卻。過濾收集沈澱，以水洗滌，脫水，產生5.3克(收率89%) 4-溴-2-硝基-苯乙酸灰白色固體。

取4-溴-2-硝苯基乙酸(0.26克)、0.26克鋅粉及3毫升50%硫酸於5毫升乙醇中，於100℃下加熱一夜。反應混合物過濾，以少量乙酸稀釋，濃縮排除乙醇，以水稀釋，以乙酸乙酯萃取2次。合併之萃液以鹽水洗滌，以無水硫酸鈉脫水，濃縮，產生0.19克(收率90%) 6-溴-2-羥吲哚之黃色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 10.45(s, br, 1H, NH-1), 7.14(d, J=7.89 Hz, 1H, H-4), 7.09(dd, J=1.53, 7.89 Hz, 1H, H-5), 6.93(d, J=1.53 Hz, 1H, H-7), 及 3.43(s, 2H, CH_2-3); MS m/z (相對強度, %) 210 ($[M-2]^+$, 100) 及 212 (M^+, 100)。

取4-(2-羧乙基)-2-甲醯基-3-甲基吡咯(90毫克)，106毫克6-溴-2-羥吲哚及3滴六氫吡啶於3毫升乙醇中於90℃加熱4小時。反應混合物冷卻，濃縮。殘質懸浮於6 N鹽酸水溶液中。沈澱物過濾，以水洗至pH 6，於真空烘箱中乾燥一

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（120）

夜，產生172毫克(92%)標題化合物之黃色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 13.22(s, br, 1H, NH-1'), 12.04(s, br, 1H, COOH), 10.92(s, br, 1H, NH-1), 7.73(d, J=8.37, 1H, H-4), 7.67(s, 1H, H-乙烯基), 7.18(d, J=3.22 Hz, 1H, H-2'), 7.14(dd, J=1.33, 8.37 Hz, 1H, H-5), 6.99(d, J=1.33 Hz, 1H, H-7), 2.64(t, J=7.39 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.46(t, J=7.39 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.25(s, 3H, CH_3); MS (APCI) m/z 375.0 $[M+1]^+$。

實例29

3-{5-[6-(3-甲氧苯基)-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基]-4-甲基-1H-吡咯-3-基}-丙酸

取4-(2-羧乙基)-2-甲醯基-3-甲基吡咯(90.5毫克)，120毫克6-(3-甲氧苯基)-2-羥吲哚及3滴六氫吡啶於3毫升乙醇中於90℃加熱一夜。反應混合物冷卻，濃縮。殘質懸浮於6 N鹽酸水溶液中。沈澱物過濾，以水洗至pH 6，於真空烘箱中乾燥一夜，產生195毫克(97%)標題化合物之褐色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 13.29(s, br, 1H, NH-1'), 12.07(s, br, 1H, COOH), 10.88(s, br, 1H, NH-1), 7.82(d, J=7.77, 1H, H-4), 7.65(s, 1H, H-乙烯基), 7.27(dd, J=1.41, 7.77 Hz, 1H, H-5), 7.09(d, J=1.41 Hz, 1H, H-7), 6.89-7.36(m, 5H), 3.82(s, 3H, OCH_3), 2.65(t, J=7.55 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.47(t, J=7.55 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.27(s, 3H, CH_3); MS (APCI) m/z 401 $[M-1]^+$。

實例30

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（121）

3-{5-[6-(3-乙氧苯基)-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基]-4-甲基-1H-吡咯-3-基}-丙酸

添加肆(三苯基膦)鈀(0.8克)至含4.2克3-乙氧苯基二羥硼酸，5.0克5-溴-2-氟-硝基苯及22毫升2M碳酸鈉溶液之50毫升甲苯與50毫升乙醇混合物中。混合物回流2小時後濃縮，加水，以乙酸乙酯萃取混合物2次。以水及鹽水洗滌合併之乙酸乙酯層，脫水及濃縮，殘質經矽膠使用5%乙酸乙酯之己烷溶液層析，產生5.3克(收率90%) 4-氟-3'-乙氧基-3-硝基聯苯之黃色油。

滴加丙二酸二甲酯(11.4毫升)至含4.0克氫化鈉懸浮之20毫升二甲亞碸中。混合物加熱至100℃ 10分鐘，冷卻至室溫。添加4-氟-3'-乙氧基-3-硝基聯苯(5.3克)之25毫升二甲亞碸溶液，混合物加熱至100℃下加熱2小時。反應混合物冷卻，以300毫升飽和氯化銨溶液中止反應，以乙酸乙酯萃取3次。合併萃液，以水及鹽水洗滌，經無水硫酸鈉脫水，濃縮，產生3'-乙氧基-3-硝基聯苯基-4-丙二酸二甲酯之黃色油。

取3'-乙氧基-3-硝基聯苯基-4-丙二酸二甲酯粗產物於60毫升6 N鹽酸中，於100℃下加熱4天，然後冷卻。過濾收集沈澱物，以水及己烷洗滌，乾燥，產生4.7克(收率77%，以5-溴-2-氟硝基苯爲基準計) 3'-乙氧基-3-硝基聯苯基-4-乙酸之淺黃褐色固體。

一次添加全量鐵屑(2.4克)至含4.6克3'-乙氧基-3-硝基聯苯基-4-乙酸之40毫升冰醋酸溶液中，混合物回流2小時。

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（122）

反應混合物濃縮至乾，以乙酸乙酯重覆處理，過濾排除不溶物。濾液以1 N鹽酸洗滌2次，然後以鹽水洗滌，經無水硫酸鈉脫水，及濃縮。產生3.5克（收率91%）6-(3-乙氧苯基)-2-羥吲哚之淺褐色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 10.4(s, br, 1H, NH), 7.33 (t, J=8.4 Hz, 1H, H-3'), 7.35(d, J=7.77 Hz, 1H), 7.19(dd, J=1.3, 7.66 Hz, 1H), 7.13(d, J=7.69 Hz, 1H), 7.07-7.08(m, 1H), 7.0(s, br, 1H), 6.9(dd, J=2.82, 8.08 Hz, 1H), 4.08(q, J=7 Hz, 2H, OEt), 3.49(s, 2H, CH2), 1.34(t, J=7 Hz, 3H, OEt); MS m/z (相對強度, %) 254.2 ([M+1]$^+$, 100)。

取3-(2-羧乙基)-2,4-二甲基-5-甲醯基吡咯(97.6毫克)，127毫克6-(3-乙氧苯基)-2-羥吲哚，及2滴六氫吡啶於2毫升乙醇中，於90℃下加熱一夜。反應混合物冷卻及濃縮。殘質懸浮於6 N鹽酸水溶液中。過濾沈澱，以水洗至pH 6，於真空烘箱中乾燥一夜，產生227毫克(約100%)標題化合物之褐色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 13.38(s, br, 1H, NH-1'), 12.06(s, br, 1H, COOH), 10.81(s, br, 1H, NH-1), 7.77(d, J=7.97, 1H, H-4), 7.58(s, 1H, H-乙烯基), 7.26(dd, J=1.35, 7.97 Hz, 1H, H-5), 7.08(d, J=1.35 Hz, 1H, H-7), 6.87-7.36(m, 4H), 4.09(q, J=7.0 Hz, 2H, CH_3CH_2), 2.65(t, J=7.54 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.47(t, J=7.54 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.30 (s, 3H, CH_3), 2.26(s, 3H, CH_3), 1.34(t, J=7.0 Hz, 3H, CH_3CH_2); MS m/z (相對強度, %) 431 ([M+1]$^+$, 21)。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（123）

實例31

3-{5-[6-(3-乙氧苯基)-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基]-4-甲基-1H-吡咯-3-基}-丙酸

取4-(2-羧乙基)-2-甲醯基-3-甲基吡咯(90.5毫克)，127毫克6-(3-乙氧苯基)-2-羥吲哚及2滴六氫吡啶於2毫升乙醇中於90℃加熱一夜。反應混合物冷卻，濃縮。殘質懸浮於6 N鹽酸水溶液中。沈澱物過濾，以水洗至pH 6，於眞空烘箱中乾燥一夜，產生200毫克(96%)標題化合物之褐色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 13.29(s, br, 1H, NH-1'), 12.07(s, vbr, 1H, COOH), 10.88(s, br, 1H, NH-1), 7.82(d, J=7.97, 1H, H-4), 7.65(s, 1H, H-乙烯基), 7.28(dd, J=1.20, 7.97 Hz, 1H, H-5), 7.08(d, J=1.20 Hz, 1H, H-7), 6.87-7.36(m, 5H), 4.09(q, J=6.98 Hz, 2H, CH_3CH_2), 2.65(t, J=7.47 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.47(t, J=7.47 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.27(s, 3H, CH_3), 1.34(t, J=6.98 Hz, 3H, CH_3CH_2)。

實例32

3-[2,4-二甲基-5-(2-氧-6-苯基-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-1H-吡咯-3-基]-丙酸

添加肆(三苯基膦)鈀(0.8克)至含3.1克苯二羥硼酸，5克5-溴-2-氟-硝基苯及22毫升2M碳酸鈉溶液之50毫升甲苯與50毫升乙醇混合物中。混合物回流2小時，濃縮，以乙酸乙酯萃取2次。以水及鹽水洗滌乙酸乙酯層，脫水及濃縮，產生黃色油。此油經矽膠使用5%乙酸乙酯之己烷溶液層析，產生4.75克(收率96%) 4-氟-3-硝基聯苯之黃色油。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（124）

滴加含丙二酸二甲酯(10毫升)之25毫升二甲基甲醯胺至含3.5克氫化鈉懸浮之25毫升二甲亞碸中。混合物於100℃加熱10分鐘。冷卻至室溫。添加4-氟-3-硝基聯苯(4.7克)之25毫升二甲亞碸溶液。混合物於100℃下加熱2小時，冷卻，以300毫升飽和氯化銨溶液中止反應，以乙酸乙酯萃取混合物3次。合併有機萃液，以水及鹽水洗滌，蒸發，產生黃色油，3-硝基聯苯基-4-丙二酸二甲酯粗產物。

取3-硝基聯苯基-4-丙二酸二甲酯粗產物於30毫升6 N鹽酸中回流24小時。過濾收集沈澱，以水洗滌，乾燥，產生4.5克(佔4-氟-3-硝基聯苯之80%) 3-硝基聯苯-4-乙酸之乳色固體。

一次添加全量鐵屑(2.6克)至含4.5克3-硝基聯苯基-4-乙酸之40毫升乙酸中。混合物回流2小時，濃縮至乾，溶於乙酸乙酯中。過濾排除固體，以1 N鹽酸及鹽水洗滌液2次，經無水硫酸鈉脫水。濾液濃縮，產生3.4克(收率93%) 6-苯基-2-羥吲哚之淺褐色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 10.4(s, br, 1H, NH-1), 7.57-7.6(m, 2H), 7.42-7.46(m, 2H), 7.32-7.37(m, 1H), 7.27(d, J=7.7, 1H, H-4), 7.19(dd, J=1.6, 7.7 Hz, 1H, H-5), 7.01(d, J=1.6 Hz, 1H, H-7), 3.49(s, 2H, CH_2); MS m/z (相對強度, %) 210 ($[M+1]^+$, 100)。

取3-(2-羧乙基)-2,4-二甲基-5-甲醯基吡咯(97.6毫克)，105毫克6-苯基-2-羥吲哚及2滴六氫吡啶於2毫升乙醇中於90℃加熱一夜。反應混合物冷卻，濃縮。殘質懸浮於6 N鹽酸水

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（125）

溶液中。沈澱物過濾，以水洗至pH 6，於真空烘箱中乾燥一夜，產生138毫克(71%)標題化合物之褐色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 13.38(s, br, 1H, NH-1'), 12.05(s, br, 1H, COOH), 10.81(s, br, 1H, NH-1), 7.78(d, J=7.84, 1H, H-4), 7.58(s, 1H, H-乙烯基), 7.25-7.63(m, 6H), 7.09(s, br, 1H, H-7), 2.64(t, J=7.71 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.35(t, J=7.71 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.30(s, 3H, CH_3), 及 2.26(s, 3H, CH_3); MS m/z (相對強度, %) 387 ($[M+1]^+$, 100)。

實例33

3-[4-甲基-5-(2-氧-6-苯基-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-1H-吡咯-3-基]-丙酸

取4-(2-羧乙基)-2-甲醯基-3-甲基吡咯(90.5毫克)，105毫克6-苯基-2-羥吲哚及2滴六氫吡啶於2毫升乙醇中於90℃加熱一夜。反應混合物冷卻，濃縮。殘質懸浮於6 N鹽酸水溶液中。沈澱物過濾，以水洗至pH 6，於真空烘箱中乾燥一夜，產生146毫克(78%)標題化合物之褐色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 13.29(s, br, 1H, NH-1'), 12.01(s, vbr, 1H, COOH), 10.89(s, br, 1H, NH-1), 7.83(d, J=7.92, 1H, H-4), 7.65(s, 1H, H-乙烯基), 7.30-7.65(m, 5H), 7.16(d, J=2.83 Hz, 1H, H-2'), 7.28(dd, J=1.58, 7.92 Hz, 1H, H-5), 7.09(d, J=1.58 Hz, 1H, H-7), 2.66(t, J=7.76 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.45(t, J=7.76 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 及 2.27(s, 3H, CH_3); MS m/z (相對強度, %) 373 ($[M+1]^+$, 100)。

實例34

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（126）

3-{5-[6-(4-甲氧基苯基)-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基]-4-甲基-1H-吡咯-3-基}-丙酸

添加肆(三苯基膦)鈀(1克)至含5克4-甲氧苯基二羥硼酸，6.6克5-溴-2-氟硝基苯與30毫升2M碳酸鈉溶液之50毫升甲苯與50毫升乙醇混合物中。混合物回流2小時，濃縮，以乙酸乙酯萃取殘質2次。以水及鹽水洗滌乙酸乙酯層，脫水，濃縮，產生褐色油性固體。此固體經矽膠使用5%乙酸乙酯之己烷溶液層析，產生粗產物：4-氟-4'-甲氧基-3-硝基聯苯之淺黃色固體。

滴加丙二酸二甲酯(10毫升)至含2.0克氫化鈉懸浮之60毫升二甲亞碸中。混合物於100℃下加熱10分鐘。冷卻至室溫。添加4-氟-4'-甲氧基-3-硝基聯苯粗產物(5.2克)之50毫升二甲亞碸溶液，混合物於100℃下加熱2小時。反應混合物冷卻，以300毫升飽和氯化鈉溶液中止反應，以乙酸乙酯萃取3次。合併萃液，以飽和氯化銨，水及鹽水洗滌，以無水硫酸鈉脫水，濃縮，產生粗產物4'-甲氧基-3-硝基聯苯-4-丙二酸二甲酯之黃色油。

取4'-甲氧基-3-硝基聯苯-4-丙二酸二甲酯粗產物於100℃下，於60毫升6 N鹽酸中加熱15小時，冷卻。過濾收集沈澱，以水及己烷洗滌，乾燥，產生7.2克4'-甲氧基-3-硝基聯苯基-4-乙酸之淺黃褐色固體。

一次添加全量鐵屑(3.6克)至含7.2克4'-甲氧基-3-硝基聯苯基-4-乙酸之50毫升冰醋酸溶液，於100℃下加熱一夜。反應混合物濃縮至乾，於乙酸乙酯中經音波處理，過濾排

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（127）

除不溶物。濾液以1 N鹽酸洗滌2次，然後以鹽水洗滌，經無水硫酸鈉脫水，及濃縮。產生2.7克(收率54%) 6-(4-甲氧苯基)-2-羥吲哚之玫瑰色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 10.38(s, br, 1H, NH-1), 7.52(d, J=9 Hz, 2H), 7.23(d, J=7.3 Hz, 1H, H-4), 7.14(d, d, J=1.38, 7.3 Hz, 1H, H-5), 7.0(d, J=9 Hz, 2H), 6.96(d, J=1.38 Hz, 1H, H-7), 3.78(s, 3H, OCH_3), 3.47(s, 2H,CH_2); MS m/z (相對強度, %) 214.0 ([M+1]$^+$, 100)。

取4-(2-羧乙基)-2-甲醯基-3-甲基吡咯(90.5毫克)，120毫克6-(4-甲氧苯基)-2-羥吲哚及3滴六氫吡啶於2毫升乙醇中於90℃加熱一夜。反應混合物冷卻，濃縮。殘質懸浮於6 N鹽酸水溶液中。沈澱物過濾，以水洗至pH 6，於眞空烘箱中乾燥一夜，產生118毫克(59%)標題化合物之褐色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 13.26(s, br, 1H, NH-1'), 10.83(s, br, 1H, NH-1), 7.78(d, J=8.07 Hz, 1H, H-4), 7.61(s, 1H, H-乙烯基), 7.56(d, J=8.97 Hz, 2H), 7.22(dd, J=1.44, 8.07 Hz, 1H, H-5), 7.13(d, J=3.09 Hz, 1H, H-2'), 7.04(d, J=1.44 Hz, 1H, H-7), 7.0(d, J=8.97 Hz, 2H), 3.79(s, 3H, OCH_3), 2.65(t, J=7.54 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.44(t, J=7.54 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 及 2.27(s, 3H, CH_3); MS m/z (相對強度, %) 404 ([M+1]$^+$, 100)。

實例35

3-{5-[6-(4-甲氧基苯基)-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基]-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基}-丙酸

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（128）

取3-(2-羧乙基)-2,4-二甲基-5-甲醯基吡咯(98毫克)，120毫克6-(4-甲氧苯基)-2-羥吲哚及3滴六氫吡啶於2毫升乙醇中於90℃加熱一夜。反應混合物冷卻，濃縮。殘質懸浮於6 N鹽酸水溶液中。沈澱物過濾，以水洗至pH 6，於眞空烘箱中乾燥一夜，產生118毫克(57%)標題化合物之褐色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 13.35(s, br, 1H, NH-1'), 12.02(s, br, 1H, COOH), 10.75(s, br, 1H, NH-1), 7.73(d, J=6.75 Hz, 1H, H-4), 7.56(d, J=9.01 Hz, 2H), 7.54(s, 1H, H-乙烯基), 7.21(dd, J=1.59, 6.75 Hz, 1H, H-5), 7.04(d, J=1.59 Hz, 1H, H-7), 7.01(d, J=9.01 Hz, 2H), 3.79(s, 3H, OCH_3), 2.65(t, J=7.54 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.35(t, J=7.54 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.29(s, 3H, CH_3), 及 2.26(s, 3H, CH_3); MS m/z (相對強度, %) 417 ($[M+1]^+$, 100)。

實例36

3-{5-[6-(2-甲氧苯基)-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基]-4-甲基-1H-吡咯-3-基}-丙酸

添加肆(三苯基膦)鈀(1克)至含5克2-甲氧苯基二羥硼酸，6.6克5-溴-2-氟硝基苯與30毫升2M碳酸鈉溶液之50毫升甲苯與50毫升乙醇混合物中。混合物回流2小時，濃縮，以乙酸乙酯萃取殘質2次。以水及鹽水洗滌乙酸乙酯層，脫水，濃縮，產生之深綠色油靜置時固化，爲4-氟-2'-甲氧基-3-硝基聯苯粗產物。

滴加丙二酸二甲酯(14毫升)至含2.9克氫化鈉懸浮之50毫升二甲亞碸中。混合物於100℃下加熱15分鐘，冷卻至室溫。

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（129）

添加4-氟-2'-甲氧基-3-硝基聯苯粗產物之60毫升二甲亞碸溶液，混合物於100℃下加熱2小時。反應混合物冷卻，以300毫升飽和氯化鈉溶液中止反應，以乙酸乙酯萃取2次。合併萃液，以飽和氯化銨，水及鹽水洗滌，以無水硫酸鈉脫水，濃縮，產生粗產物2'-甲氧基-3-硝基聯苯-4-丙二酸二甲酯之黃色油。

取2'-甲氧基-3-硝基聯苯-4-丙二酸二甲酯粗產物於100℃下。於50毫升6N鹽酸中加熱24小時，冷卻。過濾收集沈澱，以水及己烷洗滌，乾燥，產生9.8克2'-甲氧基-2-硝基聯苯基-4-乙酸之淺黃褐色固體。

一次添加全量鐵粉(5克)至含9.8克2'-甲氧基-3-硝基聯苯基-4-乙酸之50毫升冰醋酸溶液中，混合物加熱至100℃ 3小時。反應混合物濃縮至乾，於乙酸乙酯中經音波處理，過濾排除不溶物。濾液以1N鹽酸、水洗滌2次，然後以鹽水洗滌，經無水硫酸鈉脫水，及濃縮。殘質經矽膠，以乙酸乙酯：己烷(1：2)層析，產生5.4克(收率69%，以5-溴-2-氟硝基苯爲基準計) 6-(2-甲氧苯基)-2-羥吲哚之玫瑰色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 10.32(s, br, 1H, NH), 7.29-7.34(m, 1H), 7.19-7.25(m, 2H), 7.08(d, J=8 Hz, 1H, H-4), 6.97-7.02(m, 2H), 6.91(d, J=1.05 Hz, 1H, H-7), 3.8(s, 3H, OCH_3), 3.47(s, 2H, CH_2); MS m/z (相對強度, %) 239.8 (100, $[M+1]^+$)。

取4-(2-羧乙基)-2-甲醯基-3-甲基吡咯(217毫克)，239毫克6-(2-甲氧苯基)-2-羥吲哚及3滴六氫吡啶於2毫升乙醇中於

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（130）

90℃加熱一夜。反應混合物冷卻，濃縮。殘質懸浮於6 N鹽酸水溶液中。沈澱物過濾，以水洗至pH 6，於眞空烘箱中乾燥一夜，產生348毫克(86%)標題化合物之褐色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 13.29(s, br, 1H, NH-1'), 11.59(s, br, 1H, COOH), 10.78(s, br, 1H, NH-1), 7.75(d, J=8.13 Hz, 1H, H-4), 7.62(s, 1H, H-乙烯基), 7.0-7.34(m, 7H), 3.76(s, 3H, OCH_3), 2.66(t, J=7.46 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.46(t, J=7.46 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 及 2.27(s, 3H, CH_3); MS m/z (相對強度, %) 401 ($[M+1]^+$, 100)。

實例37

3-{5-[6-(2-甲氧苯基)-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基]-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基}-丙酸

取3-(2-羧乙基)-2,4-二甲基-5-甲醯基吡咯(234毫克)，239毫克6-(2-甲氧苯基)-2-羥吲哚及3滴六氫吡啶於2毫升乙醇中於90℃加熱一夜。反應混合物冷卻，濃縮。殘質懸浮於6 N鹽酸水溶液中。沈澱物過濾，以水洗至pH 6，於眞空烘箱中乾燥一夜。粗固體經矽膠管柱層析，使用含0.1%乙酸之乙酸乙酯：己烷1：1溶離，產生182毫克(44%)標題化合物之褐色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 13.38(s, br, 1H, NH-1'), 12.0(s, br, 1H, COOH), 10.7(s, br, 1H, NH-1), 7.71(d, J=7.74 Hz, 1H, H-4), 7.55(s, 1H, H-乙烯基), 7.0-7.33(m, 6H), 3.76(s, 3H, OCH_3), 2.65(t, J=7.6 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.35(t, J=7.6 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.3(s, 3H, CH_3), 及 2.26(s, 3H,

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（131）

CH_3); MS(APCI neg) m/z (相對強度, %) 415 ([M-1], 100)。

實例38

3-[2,4-二甲基-5-(6-嗎啉-4-基-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-1H-吡咯-3-基]-丙酸

添加氯化錫二水合物(225克)至含2,4-二硝基苯乙酸(22.6克)之乙醇(450毫升)溶液中。混合物於90℃下加熱10小時。反應混合物冷卻，以12 M氫氧化鈉鹼化至pH 11。過濾排除固體，濾液濃縮。殘質經乙醇(300毫升)處理。過濾不溶物，以乙醇洗滌(5×60毫升)。合併之乙醇洗液蒸發，真空乾燥，產生15克6-胺基-2-羥吲哚之褐色粉末。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 10.03(s, br, NH), 6.78(d, J=8.55 Hz, 1H, H-4), 6.09-6.11(m, 2H), 4.95(s, br, 2H, NH_2), 3.22(s, 2H, H-3); MS (+ APCI) m/z (相對強度, %) 147 ($[M-1]^+$, 100)。

取6-胺基-2-羥吲哚(2.2克)、4.0克2,2'-二溴乙醚及7.9克碳酸鈉於20毫升乙醇中回流一夜，濃縮，以50毫升水稀釋。混合物經50毫升乙酸乙酯萃取3次，合併有機萃液，以20毫升鹽水洗滌，經無水硫酸鈉脫水，濃縮至乾。固體經矽膠管柱，以乙酸乙酯：己烷1：1(含0.7%乙酸)溶離，產生1.2克(收率37%) 6-(嗎啉-4-基)-2-羥吲哚之米色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 10.2(s, br, 1H, NH-1), 7.02(d, J=7.87 Hz, 1H, H-4), 6.47(dd, J=2.11, 7.87 Hz, 1H, H-5), 6.37(d, J=2.11 Hz, 1H, H-7), 3.69-3.72(m, 4H), 3.32(s, 2H, CH_2), 3.01-3.04(m, 4H); MS m/z (相對強度, %) 219

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（132）

([M+1]$^+$, 100)。

取3-(2-羧乙基)-2,4-二甲基-5-甲醯基吡咯(3.3克)，4克6-(嗎啉-4-基)-2-羥吲哚及1.8毫升六氫吡啶於60毫升乙醇中，於90℃下加熱7小時。反應混合物冷卻及濃縮。殘質懸浮於6 N鹽酸水溶液中。過濾沈澱，以水洗至pH 6，於眞空烘箱中乾燥一夜。所得固體經矽膠管柱層析，使用乙酸乙酯-己烷-乙酸溶離，產生2.78克(收率38%)標題化合物之褐色固體。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 13.13(s, br, 1H, NH-1'), 12.02(s, br, 1H, COOH), 10.57(s, br, 1H, NH-1), 7.52(d, J=8.46 Hz, 1H, H-4), 7.32(s, 1H, H-乙烯基), 6.58(dd, J=1.99, 8.46 Hz, 1H, H-5), 6.41(d, J=1.99 Hz, 1H, H-7), 3.71-3.74(m, 4H), 3.06-3.09(m, 4H), 2.62(t, J=7.57 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.33(t, J=7.57 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.26(s, 3H, CH_3), 及2.21(s, 3H, CH_3); MS m/z (相對強度, %) 396 ([M+1]$^+$, 100)。

實例39

3-[5-(5-氯-4-甲基-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基]-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基]-丙酸

取含3.0克4-甲基-2-羥吲哚於室溫下，於50毫升乙腈中攪拌懸浮，同時分批添加3.3克N-氯琥珀醯亞胺。添加三氟乙酸(1毫升)。懸浮液於室溫下攪拌3天，此期間仍有固體出現。眞空過濾收集白色固體，以少量冷丙酮洗滌，於40℃之眞空烘箱中乾燥一夜，產生2.5克(68%) 5-氯-4-甲基-2-羥吲哚。

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（133）

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 10.38(s, br, 1H, NH), 7.19(d, J=8 Hz, 1H, 芳香系), 6.64(d, J=8 Hz, 1H, 芳香系), 3.46(s, 2H, H-3), 2.19(s, 3, CH_3)。

取3-(2-羧乙基)-2,4-二甲基-5-甲醯基吡咯(98毫克)，91毫克5-氯-4-甲基-2-羥吲哚及2滴六氫吡啶於2毫升乙醇中於90℃加熱4小時。反應混合物冷卻，濃縮。殘質懸浮於6 N鹽酸水溶液中。沈澱物過濾，以水洗至pH 6，於眞空烘箱中乾燥一夜，產生100毫克標題化合物。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 13.47(s, br, 1H, NH-1'), 12.03(s, br, 1H, COOH), 10.83(s, br, 1H, NH-1), 7.61(s, 1H, H-乙烯基), 7.14(d, J=8.17 Hz, 1H, 芳香系), 6.74(d, J=8.17 Hz, 1H, 芳香系), 2.64(s, 3H, CH_3), 2.64(t, J=7.62 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.34(t, J=7.62 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.3 (s, 3H, CH_3), 及 2.20(s, 3H, CH_3)。

實例40

3-[5-(5-氯-4-甲基-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基]-4-甲基-1H-吡咯-3-基]-丙酸

取4-(2-羧乙基)-2-甲醯基-3-甲基吡咯(91毫克)，91毫克5-氯-4-甲基-2-羥吲哚及2滴六氫吡啶於2毫升乙醇中於90℃加熱4小時。反應混合物冷卻，濃縮。殘質懸浮於6 N鹽酸水溶液中。沈澱物過濾，以水洗至pH 6，於眞空烘箱中乾燥一夜，產生95毫克標題化合物。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 13.36(s, br, 1H, NH-1'), 11.98(s, br, 1H, COOH), 10.92(s, br, 1H, NH-1), 7.68(s, 1H),

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（134）

7.19(d, J=7.14 Hz, 1H, 芳香系), 7.17(s, 1H), 6.75(d, J=7.14 Hz, 1H, 芳香系), 2.66(s, 3H, CH_3-4), 2.66(t, J=7.51 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.45(t, J=7.51 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.21 (s, 3H, CH_3); MS m/z (相對強度, %) 345 ($[M+1]^+$, 100)。

實例41

3-[2,4-二甲基-5-(2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-1H-吡咯-3-基]-丙酸鈉鹽

添加含8克3-[2,4-二甲基-5-(2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-1H-吡咯-3-基]丙酸之60毫升水懸浮液至含0.98克氫氧化鈉之10毫升水中。混合物於室溫下攪拌30分鐘後，過濾。濾液冷凍及冷凍乾燥，產生8克標題化合物。

或者，添加含117克318-005之470毫升水懸浮液至含16.47克氫氧化鈉之74毫升水中。混合物於室溫下攪拌15分鐘，過濾。濾液加至210毫升乙醇中，抽吸過濾收集所形成之沈澱。乾燥後，共得到106克標題化合物。

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d6)：δ 13.34(s, br, 1H, NH-1'), 10.82(s, br, 1H, NH-1), 7.65(d, J=7.52 Hz, 1H, H-4), 7.5(s, 1H, H-乙烯基), 7.04(t, J=7.52 Hz, 1H, H-6), 6.93(t, J=7.52 Hz, 1H, H-5), 6.85(d, J=7.52 Hz, 1H, H-7), 2.55(t, J=6.95 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH), 2.28(s, 3H, CH_3), 2.24(s, 3H, CH_3), 及 1.99(t, J=6.95 Hz, 2H, CH_2CH_2COOH)。

實例42

3-[3,5-二甲基-4-(3-嗎啉-4-基丙基)-1H-吡咯-2-基亞甲基]-1,3-二氫吲哚-2-酮

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（135）

步驟1：依序添加1,1'-羰基二咪唑(11.6克，71.8毫莫耳)及嗎啉(5.5毫升，60.8毫莫耳)與N,N-二異丙基乙胺(亨尼氏鹼，10毫升，60.8毫莫耳)至含3-(2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基)丙酸(10克，60.8毫莫耳)之60毫升二氯甲烷懸浮液中。深紅色反應混合物於室溫下攪拌一夜，倒至冰水中。以鹽水洗滌有機層，直到洗液之pH約6止，經無水硫酸鈉脫水，及濃縮。粗產物經矽膠管柱使用二氯甲烷-甲醇(98：2)溶離純化，產生13.84克(96%) 3-(2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基)-1-嗎啉-4-基丙-1-酮。

步驟2：滴加3-(2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基)-1-嗎啉-4-基丙-1-酮(13.84克，59毫莫耳)之四氫呋喃(50毫升)溶液至含氫化鋰鋁(2.67克，70毫莫耳)之四氫呋喃(100毫升)懸浮液中。反應混合物於80℃攪拌1小時，於冰浴中冷卻。緩緩加冰至反應混合物中，直到氣體停止釋出止。添加幾滴2 N氫氧化鈉，反應混合物於室溫下攪拌30分鐘。反應混合物經乙酸乙酯萃取，經無水硫酸鈉脫水，濃縮，產生10.37克(79%) 4-[3-(2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基)丙基]嗎啉之淺褐色油，未再純化即使用。

步驟3：滴加磷醯氯(6.5毫升，70毫莫耳)至含N,N-二甲基甲醯胺(5.5毫升，70毫莫耳)之二氯甲烷(30毫升)冰冷溶液中。當添加完畢時，反應混合物於室溫下攪拌15分鐘，之後於0℃下滴加3,5-二甲基-4-(3-嗎啉-4-基丙基)-1H-吡咯-2-羧基醛(10.37克，46.6毫莫耳)之二氯甲烷(20毫升)溶液。最終反應混合物於60℃下回流4小時後，於冰浴中冷卻。緩

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（136）

緩加冰至反應混合物中，然後添加2 N氫氧化鈉，直到達pH 12止。反應混合物於室溫下攪拌30分鐘，以乙酸乙酯萃取。有機層以鹽水洗滌，經無水硫酸鈉脫水，濃縮，產生之粗產物經矽膠管柱使用二氯甲烷-甲醇-氫氧化銨(9.5：0.5)純化，產生4.57克(39%) 3,5-二甲基-4-(3-嗎啉-4-基丙基)-1H-吡咯-3-羧基醛之深紅色油：

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d_6) δ 11.34(s, br, 1H, NH-1), 9.40(s, 1H, CHO-2), 3.55(t, J=4.68 Hz, 4H, O($CH_2C\underline{H_2}$)$_2$N$CH_2CH_2CH_2$-4), 2.28-2.34(m, 6H, O($C\underline{H_2}CH_2$)$_2$N$CH_2CH_2C\underline{H_2}$-4), 2.21(t, 2H, J=7.10 Hz, 2H, O(CH_2CH_2)$_2$N$C\underline{H_2}CH_2CH_2$-4) CH_3-3), 2.19(s, 3H, CH_3-5), 2.14(s, 3H, CH_3-3), 1.51(quint., J=7.10 Hz, 2H, O(CH_2CH_2)$_2$N$CH_2C\underline{H_2}CH_2$-4),

MS m/z (相對強度, %) 251 ([M+1]$^+$, 100)。

步驟4：取含1,3-二氫吲哚-2-酮(133毫克，1.0毫莫耳)、3,5-二甲基-4-(3-嗎啉-4-基丙基)-1H-吡咯-2-羧基醛(250毫克，1.0毫莫耳)及3滴吡咯啶於2毫升乙醇中，於90℃下回流4小時後，冷卻至室溫。過濾沈澱，以冷乙醇及己烷洗滌，於真空烘箱中乾燥一夜，產生308.9克(85%) 3-[3,5-二甲基-4-(3-嗎啉-4-基丙基)-1H-吡咯-2-基亞甲基]-1,3-二氫吲哚-2-酮之黃色固體：

^{1}HNMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 13.37(s, 1H, NH-1'), 10.71(s, 1H, NH-1), 7.68(d, J=7.47 Hz, 1H, H-4), 7.53(s, 1H, H-乙烯基), 7.06(dt, J=7.47 Hz, 1H, H-6), 6.94(dt, J=7.74 Hz, 1H, H-5), 6.84(d, J=7.47 Hz, 1H, H-7), 3.55(t, J=4.37 Hz, 4H, O($C\underline{H_2}CH_2$)$_2$N$CH_2CH_2CH_2$-4'),

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（137）

2.40(t, J=7.31 Hz, 2H, $O(CH_2CH_2)_2NCH_2CH_2C\underline{H}_2$-4'), 2.31(t, J=4.37 Hz, 4H, $O(CH_2C\underline{H}_2)_2NCH_2CH_2CH_2$-4'), 2.28(s, 3H, CH_3-3'), 2.23(s, 3H, CH_3-5'), 2.23(t, J=7.31 Hz, 2H, $O(CH_2CH_2)_2NCH_2CH_2CH_2$-4'), 1.56(quint., J=7.31 Hz, 2H, $O(CH_2CH_2)_2NCH_2C\underline{H}_2CH_2$-4'),

MS m/z (相對強度, %) 365 ($M^{+\cdot}$, 100)。

實例43

5-溴-3-[3,5-二甲基-4-(3-嗎啉-4-基丙基)-1H-吡咯-2-基亞甲基]-1,3-二氫吲哚-2-酮

取含5-溴-1,3-二氫吲哚-2-酮(212毫克，1.0毫莫耳)、3,5-二甲基-4-(3-嗎啉-4-基丙基)-1H-吡咯-2-羧基醛(250毫克，1.0毫莫耳)及3滴吡咯啶於2毫升乙醇中，於90℃下回流4小時後，冷卻至室溫。過濾沈澱，以冷乙醇及己烷洗滌，於真空烘箱中乾燥一夜，產生399.8毫克(90%) 5-溴-3-[3,5-二甲基-4-(3-嗎啉-4-基丙基)-1H-吡咯-2-基亞甲基]-1,3-二氫吲哚-2-酮之紅色固體：

^{1}HNMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 13.43(s, 1H, NH-1'), 10.81 (s, 1H, NH-1), 7.99(d, J=2.07 Hz, 1H, H-4), 7.66(s, 1H, H-乙烯基), 7.18(dd, J=2.07, 7.58 Hz, 1H, H-6), 6.79(d, J=7.58 Hz, 1H, H-7), 3.55(t, J=4.39 Hz, 4H, $O(C\underline{H}_2CH_2)_2NCH_2CH_2CH_2$-4'), 2.40(t, J=7.32 Hz, 2H, $O(CH_2CH_2)_2NCH_2CH_2C\underline{H}_2$-4'), 2.31(t, J=4.39 Hz, 4H, $O(CH_2C\underline{H}_2)_2NCH_2CH_2CH_2$-4'), 2.29(s, 3H, CH_3-3'), 2.26(s, 3H, CH_3-5'), 2.23(t, J=7.32 Hz, 2H, $O(CH_2CH_2)_2NC\underline{H}_2CH_2CH_2$-4'), 1.56(quint., J=7.32 Hz, 2H,

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（ 138）

$O(CH_2CH_2)_2NCH_2C\underline{H}_2CH_2$-4'),

MS m/z (相對強度, %) 443 ($M^{+\cdot}$, 100), 445 ($[M+2]^{+\cdot}$, 100)。

實例44

3-[3,5-二甲基-4-(3-嗎啉-4-基-丙基)-1H-吡咯-2-基亞甲基]-6-苯基-1,3-二氫吲哚-2-酮

採用實例2之方法，得到收率88%標題化合物之黃色固體：

^{1}HNMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 13.37(s, 1H, NH-1'), 10.81 (s, 1H, NH-1), 7.77(d, J=8.20 Hz, 1H, H-4), 7.62(d, J=7.39 Hz, 2H, H-2", 6"), 7.58(s, 1H, H-乙烯基), 7.44(t, J=7.39 Hz, 2H, H-3", 5"), 7.32(t, br, J=7.39 Hz, 1H, H-4"), 7.26(dd, J=1.49, 8.29 Hz, 1H, H-5), 7.09(d, J=1.49 Hz, 1H, H-7), 3.56 (t, J=4.48 Hz, 4H, $O(C\underline{H}_2CH_2)_2NCH_2CH_2CH_2$-4'), 2.41(t, J=7.18 Hz, 2H, $O(CH_2CH_2)_2NCH_2CH_2C\underline{H}_2$-4'), 2.31(t, J=4.48 Hz, 4H, $O(CH_2C\underline{H}_2)_2NCH_2CH_2CH_2$-4'), 2.29(s, 3H, CH_3-3'), 2.26 (s, 3H, CH_3-5'), 2.24(t, J=7.18 Hz, 2H, $O(CH_2CH_2)_2NC\underline{H}_2CH_2CH_2$-4'), 1.56(quint., J=7.18 Hz, 2H, $O(CH_2CH_2)_2NCH_2C\underline{H}_2CH_2$-4'),

MS m/z (相對強度, %) 441 ($M^{+\cdot}$, 100)。

實例45

3-[3,5-二甲基-4-(3-嗎啉-4-基-丙基)-1H-吡咯-2-基亞甲基]-6-(2-甲氧苯基)-1,3-二氫吲哚-2-酮

採用實例2之方法，得到收率86%標題化合物之黃色固體：

^{1}HNMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 13.37(s, 1H, NH-1'), 10.72(s, 1H, NH-1), 7.71(d, J=7.79 Hz, 1H, H-4), 7.55(s, 1H, H-乙烯基), 7.27-7.34(m, 2H), 6.98-7.10(m, 4H), 3.76(s, 3H,

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（139）

OCH_3-2"), 3.56(t, J=4.50 Hz, 4H, $O(C\underline{H}_2CH_2)_2NCH_2CH_2CH_2$-4'), 2.41(t, J=7.12 Hz, 2H, $O(CH_2CH_2)_2NCH_2CH_2C\underline{H}_2$-4'), 2.21-2.31(m, 6H, $O(CH_2C\underline{H}_2)_2NC\underline{H}_2CH_2C\underline{H}_2$-4'), 2.29(s, 3H, CH_3-3'), 2.25(s, 3H, CH_3-5'), 1.57(quint., J=7.12 Hz, 2H, $O(CH_2CH_2)_2NCH_2C\underline{H}_2CH_2$-4'),

MS m/z (相對強度, %) 471 ($M^{+\cdot}$, 100)。

實例46

3-[3,5-二甲基-4-(3-嗎啉-4-基-丙基)-1H-吡咯-2-基亞甲基]-6-(3-甲氧苯基)-1,3-二氫吲哚-2-酮

採用實例2之方法，得到收率87%標題化合物之黃色固體：

^{1}HNMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 13.38(s, 1H, NH-1'), 10.80(s, 1H, NH-1), 7.76(d, J=7.93 Hz, 1H, H-4), 7.57(s, 1H, H-乙烯基), 7.35(t, J=8.08 Hz, 1H, H-5"), 7.26(dd, J=1.73, 7.93 Hz, 1H, H-5), 7.18(d, br, J=8.08 Hz, 1H, H-4"), 7.13(t, br, J=1.94 Hz, 1H, H-2"), 7.08(d, J=1.73 Hz, 1H, H-7), 6.90 (dd, J=1.94, 8.08 Hz, 1H, H-6"), 3.81(s, 3H, OCH_3-3"), 3.56(t, J=4.38 Hz, 4H, $O(C\underline{H}_2CH_2)_2NCH_2CH_2CH_2$-4'), 2.41(t, J=7.19 Hz, 2H, $O(CH_2CH_2)_2NCH_2CH_2C\underline{H}_2$-4'), 2.31(t, J=4.38 Hz, 4H, $O(CH_2C\underline{H}_2)_2NCH_2CH_2C\underline{H}_2$-4'), 2.29(s, 3H, CH_3-3'), 2.26(s, 3H, CH_3-5'), 2.24(t, J=7.19 Hz, 2H, $O(CH_2CH_2)_2NCH_2CH_2CH_2$-4'), 1.56(quint., J=7.19 Hz, 2H, $O(CH_2CH_2)_2NCH_2C\underline{H}_2CH_2$-4'),

MS m/z (相對強度, %) 471 ($M^{+\cdot}$, 100)。

實例47

3-[3,5-二甲基-4-(3-嗎啉-4-基-丙基)-1H-吡咯-2-基亞甲

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（140）

基]-6-(4-甲氧苯基)-1,3-二氫吲哚-2-酮

採用實例2之方法，得到收率52%標題化合物之黃色固體：

^{1}HNMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 13.35(s, 1H, NH-1'), 10.77 (s, 1H, NH-1), 7.72(d, J=7.97 Hz, 1H, H-4), 7.55(d, J=8.57 Hz, 2H, H-2", 6"), 7.54(s, 1H, H-乙烯基), 7.20(dd, J=1.35, 7.97 Hz, 1H, H-5), 7.04(d, J=1.35 Hz, 1H, H-7), 6.99(d, J=8.57 Hz, 1H, H-3", 5"), 3.78(s, 3H, OCH_3-4"), 3.55(t, J=4.57 Hz, 4H, $O(C\underline{H}_2CH_2)_2NCH_2CH_2CH_2$-4'), 2.40(t, J=6.97 Hz, 2H, $O(CH_2CH_2)_2NCH_2CH_2C\underline{H}_2$-4'), 2.30(t, J=4.57 Hz, 4H, $O(CH_2C\underline{H}_2)_2NCH_2CH_2C\underline{H}_2$-4'), 2.28(s, 3H, CH_3-3'), 2.24(s, 3H, CH_3-5'), 2.23(t, J=6.97 Hz, 2H, $O(CH_2CH_2)_2NC\underline{H}_2CH_2CH_2$-4'), 1.55(quint., J=6.97 Hz, 2H, $O(C\underline{H}_2CH_2)_2NCH_2C\underline{H}_2CH_2$-4'),

MS m/z (相對強度, %) 471 ($M^{+\cdot}$, 100)。

實例48

3-[4-(3-二甲胺丙基)-3,5-二甲基-1H-吡咯-2-基亞甲基]-1,3-二氫吲哚-2-酮

採用實例1步驟1、2與3之方法，得到收率63%之4-(3-二甲胺丙基)-3,5-二甲基-1H-吡咯-2-羧基醛之深紅色油：

^{1}HNMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 11.33(s, br, 1H, NH-1), 9.40(s, 1H, CHO-2), 2.30(t, J=7.42 Hz, 2H, $(CH_3)_2NCH_2CH_2C\underline{H}_2$-4), 2.18(s, 3H, CH_3-3), 2.15(t, J=7.42 Hz, 2H, $(CH_3)_2NC\underline{H}_2CH_2CH_2$-4), 2.14(s, 3H, CH_3-5), 2.10(s, 6H, $(C\underline{H}_3)_2NCH_2CH_2CH_2$-4), 1.47 (quint., J=7.42 Hz, 2H, $(CH_3)_2NCH_2C\underline{H}_2CH_2$-4),

MS m/z (相對強度, %) 208 ($[M+1]^{+\cdot}$, 100)。

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（141）

採用實例1步驟4之方法，得到收率52%標題化合物之黃色固體：

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d_6) δ 13.38(s, 1H, NH-1'), 10.70 (s, 1H, NH-1), 7.68(d, J=7.54 Hz, 1H, H-4), 7.53(s, 1H, H-乙烯基), 7.06(t, J=7.54 Hz, 1H, H-6), 6.94(t, J=7.54 Hz, 1H, H-5), 6.85(d, J=7.54 Hz, 1H, H-7), 2.38(t, J=7.25 Hz, 2H, $(CH_3)_2NCH_2CH_2C\underline{H_2}$-4'), 2.27(s,3H, CH_3-3'), 2.23(s, 3H, CH_3-5'), 2.17(t, J=7.25 Hz, 2H, $(CH_3)_2NC\underline{H_2}CH_2CH_2$-4'), 2.11(s, 6H, $(CH_3)_2NCH_2CH_2C\underline{H_2}$-4'), 1.52(quing., J=7.25 Hz, 2H, $(CH_3)_2NCH_2C\underline{H_2}CH_2$-4'),

MS m/z (相對強度, %) 323 ($M^{+\cdot}$, 100)。

實例49

5-溴-3-[4-(3-二甲胺丙基)-3,5-二甲基-1H-吡咯-2-基亞甲基]-1,3-二氫吲哚-2-酮

採用實例2之方法，得到收率71%標題化合物之紅色固體：

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d_6) δ 13.42(s, 1H, NH-1'), 10.81 (s, 1H, NH-1), 7.98(d, J=1.89 Hz, 1H, H-4), 7.66(s, 1H, H-乙烯基), 7.17(dd, J=1.89, 8.23 Hz, 1H, H-6), 6.79(d, J=8.23 Hz, 1H, H-7), 2.38(t, J=7.23 Hz, 2H, $(CH_3)_2NCH_2CH_2C\underline{H_2}$-4'), 2.27(s, 3H, CH_3-3'), 2.25(s, 3H, CH_3-5'), 2.16(t, J=7.23 Hz, 2H, $(CH_3)_2NC\underline{H_2}CH_2CH_2$-4'), 2.10(s, 6H, $(C\underline{H_3})_2NCH_2CH_2C\underline{H_2}$-4'), 1.51(quint., J=7.23 Hz, 2H, $(CH_3)_2NCH_2C\underline{H_2}CH_2$-4'),

MS m/z (相對強度, %) 401 ($[M-1]^{+\cdot}$, 100及403 ($[M+1]^+$, 100)。

實例50

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（142）

3-[4-(3-二甲胺丙基)-3,5-二甲基-1H-吡咯-2-基亞甲基]-6-苯基-1,3-二氫吲哚-2-酮

採用實例2之方法，得到收率83%標題化合物之橙色固體：

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d_6) δ 13.38(s, 1H, NH-1'), 10.81 (s, 1H, NH-1), 7.77(d, J=7.82 Hz, 1H, H-4), 7.62(d, J=7.59 Hz, 2H, H-2", 6"), 7.58(s, 1H, H-乙烯基), 7.44(t, J=7.59 Hz, 2H, H-3", 5"), 7.32(t, J=7.59 Hz, 1H, H-4"), 7.27(dd, J=1.11, 7.82 Hz, 1H, H-5), 7.09(d, J=1.11 Hz, 1H, H-7), 2.39(t, J=7.18 Hz, 2H, $(CH_3)_2NCH_2C\underline{H_2}C\underline{H_2}$-4'), 2.29(s, 3H, CH_3-3'), 2.25(s, 3H, CH_3-5'), 2.17(t, J=7.18 Hz, 2H, $(CH_3)_2NC\underline{H_2}C\underline{H_2}CH_2$-4'), 2.11(s, 6H, $(C\underline{H_3})_2NCH_2CH_2CH_2$-4'), 1.53(quint., J=7.18 Hz, 2H, $(CH_3)_2NCH_2C\underline{H_2}CH_2$-4'),

MS m/z (相對強度, %) 399 (M^+, 100)。

實例51

3-[4-(3-二甲胺丙基)-3,5-二甲基-1H-吡咯-2-基亞甲基]-6-(2-甲氧苯基)-1,3-二氫吲哚-2-酮

採用實例2之方法，得到收率83%標題化合物之黃色固體：

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d_6) δ 13.38(s, 1H, NH-1'), 10.72 (s, 1H, NH-1), 7.70(d, J=8.06 Hz, 1H, H-4), 7.55(s, 1H, H-乙烯基), 7.28-7.36(m, 2H, H-4", 5"), 7.14(d, J=8.32 Hz, 1H, H-6"), 7.04(dd, J=1.21, 8.06 Hz, 1H, H-5), 6.99(d, J=7.42 Hz, 1H, H-3"), 6.99(d, J=1.21 Hz, 1H, H-7), 3.76(s, 3H, OCH_3-2"), 2.39(t, J=7.24 Hz, 2H, $(CH_3)_2NCH_2CH_2C\underline{H_2}$-4'), 2.28(s, 3H, CH_3-3'), 2.25(s, 3H, CH_3-5'), 2.18(t, J=7.24 Hz, 2H,

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（143）

$(CH_3)_2NCH_2CH_2CH_2$-4'), 2.11(s, 6H, $(CH_3)_2NCH_2CH_2CH_2$-4'), 1.53(quint., J=7.24 Hz, 2H, $(CH_3)_2NCH_2CH_2CH_2$-4'),

MS m/z (相對強度, %) 429 (M^+, 100)。

實例52

3-[4-(3-二甲胺丙基)-3,5-二甲基-1H-吡咯-2-基亞甲基]-6-(3-甲氧苯基)-1,3-二氫吲哚-2-酮

採用實例2之方法，得到收率83%標題化合物之紅色固體：

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d_6) δ 13.38(s, 1H, NH-1), 10.80 (s, 1H, NH-1), 7.60(d, J=8.06 Hz, 1H, H-4), 7.57(s, 1H, H-乙烯基), 7.35(t, J=8.15 Hz, 1H, H-5"), 7.26(dd, J=1.39, 8.06 Hz, 1H, H-5), 7.19(d, br, J=8.15 Hz, H-6"), 7.13(m, 1H, H-2"), 7.09(d, J=1.39 Hz, 1H, H-7), 6.90(dd, J=2.57, 8.15 Hz, 1H, H-4"), 3.81(s, 3H, OCH_3-3"), 2.39(t, J=7.17 Hz, 2H, $(CH_3)_2NCH_2CH_2CH_2$-4'), 2.29(s, 3H, CH_3-3'), 2.25(s, 3H, CH_3-5'), 2.17(t, J=7.17 Hz, 2H, $(CH_3)_2NCH_2CH_2CH_2$-4'), 2.11(s, 6H, $(CH_3)_2NCH_2CH_2CH_2$-4'), 1.53(quint., J=7.17 Hz, 2H, $(CH_3)_2NCH_2CH_2CH_2$-4'),

MS m/z (相對強度, %) 429 (M^+, 100)。

實例53

3-[4-(3-二甲胺丙基)-3,5-二甲基-1H-吡咯-2-基亞甲基]-6-(4-甲氧苯基)-1,3-二氫吲哚-2-酮

採用實例2之方法，得到收率83%標題化合物之褐色固體：

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d_6) δ 13.35(s, 1H, NH-1'), 10.77 (s, 1H, NH-1), 7.73(d, J=7.82 Hz, 1H, H-4), 7.56(d, J=8.83 Hz, 2H, H-2", 6"), 7.54(s, 1H, H-乙烯基), 7.20(dd, J=1.64,

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（144）

7.82 Hz, 1H, H-5), 7.04(d, J=1.64 Hz, H-7), 7.00(d, J=8.83 Hz, 2H, H-3", 5), 3.78(s, 3H, OCH_3-4"), 2.39(t, J=7.24 Hz, 2H, $(CH_3)_2NCH_2CH_2C\underline{H}_2$-4'), 2.28(s, 3H, CH_3-3'), 2.25(s, 3H, CH_3-5'), 2.17(t, J=7.24 Hz, 2H, $(CH_3)_2NC\underline{H}_2CH_2CH_2$-4'), 2.11 (s, 6H, $(C\underline{H}_3)_2NCH_2CH_2CH_2$-4'), 1.52(quint., J=7.24 Hz, 2H, $(CH_3)_2NCH_2C\underline{H}_2CH_2$-4'),

MS m/z (相對強度, %) 429 (M^+, 100)。

實例54

5-氯-3-[4-(3-二甲胺丙基)-3,5-二甲基-1H-吡咯-2-基亞甲基]-1,3-二氫吲哚-2-酮

採用實例2之方法，得到收率53%標題化合物之褐色固體：

^{1}HNMR (360 MHz, DMSO-d_6) δ 13.43(s, 1H, NH-1'), 10.84 (s, 1H, NH-1), 7.87(dd, J=1.85 Hz, 1H, H-4), 7.66(s, 1H, H-乙烯基), 7.05(dd, J=1.85, 8.15 Hz, 1H, H-6), 6.83(d, J=8.15 Hz, 1H, H-7), 2.36-2.45(m, 4H, $(CH_3)_2NC\underline{H}_2CH_2C\underline{H}_2$-4'), 2.30(s, 6H, $(C\underline{H}_3)_2NCH_2CH_2CH_2$-4'), 2.28(s, 3H, CH_3-3'), 2.26 (s, 3H, CH_3-5'), 1.58(quint., J=7.52 Hz, 2H, $(CH_3)_2NCH_2C\underline{H}_2CH_2$-4'),

MS m/z (相對強度, %) 357 ($[M-1]^+$, 100)。

實例55

6-氯-3-[4-(3-二甲胺丙基)-3,5-二甲基-1H-吡咯-2-基亞甲基]-1,3-二氫吲哚-2-酮

採用實例2之方法，得到收率77%之標題化合物：

MS EI 357 $[M-1]^+$。

實例56

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（145）

3-[4-(3-二甲胺丙基)-3,5-二甲基-1H-吡咯-2-基亞甲基]-5-甲氧基-1,3-二氫吲哚-2-酮

採用實例2之方法，得到收率77%之標題化合物：

MS EI 353 $[M]^+$。

實例57

3-[4-(3-二甲胺丙基)-3,5-二甲基-1H-吡咯-2-基亞甲基]-6-甲氧基-1,3-二氫吲哚-2-酮

採用實例2之方法，得到收率74%之標題化合物。

實例58

3-[4-(3-二甲胺丙基)-3,5-二甲基-1H-吡咯-2-基亞甲基]-5-甲基-1,3-二氫吲哚-2-酮

採用實例2之方法，得到收率45%之標題化合物：

MS EI 337 $[M]^+$。

實例59

3-[4-(3-二甲胺丙基)-3,5-二甲基-1H-吡咯-2-基亞甲基]-4-甲基-1,3-二氫吲哚-2-酮

採用實例2之方法，得到收率99%之標題化合物：

^{1}HNMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 13.45(s, br, 1H, NH), 10.78 (s, br, 1H, NH), 7.50(s, 1H, H-乙烯基), 6.98(t, J=8.1 Hz, 1H, H-6), 6.76(t, J=8.1 Hz, 2H, H-5 & H-7), 2.88(m, 2H, CH_2), 2.64(s, 6H, 2xCH_3), 2.56(s, 3H, CH_3), 2.43(t, J=7.4 Hz, 2H, CH_3), 2.29(s, 3H, CH_3), 2.19(s, 3H, CH_3), 1.65-1.75(m, 2H, CH_2),

MS EI 337 $[M]^+$。

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（146）

實例60

3-[4-(3-二甲胺丙基)-3,5-二甲基-1H-吡咯-2-基亞甲基]-4-(2-羥乙基)-1,3-二氫吲哚-2-酮

採用實例2之方法，得到收率98%之標題化合物。

實例61

3-[4-(3-二甲胺丙基)-3,5-二甲基-1H-吡咯-2-基亞甲基]-2-氧-2,3-二氫-1H-吲哚-5-磺酸醯胺

採用實例2之方法，得到收率59%之標題化合物：

^{1}HNMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 13.41(s, 1H, NH-1'), 11.12 (s, 1H, NH-1), 8.16(d, J=1.78 Hz, 1H, H-4), 7.66(s, 1H, H-乙烯基), 7.55(dd, J=1.78, 8.18 Hz, 1H, H-6), 7.11(s, br, 2H, $\underline{H}_2NSO_2$-5), 6.98(d, J=8.18 Hz, 1H, H-7), 2.47-2.50(m, 2H, $(CH_3)_2NCH_2CH_2C\underline{H}_2$-4'), 2.41(t, J=7.37 Hz, 2H, $(CH_3)_2NC\underline{H}_2CH_2CH_2$-4'), 2.36(s, 6H, $(C\underline{H}_3)_2NCH_2CH_2CH_2$-4'), 2.30(s, 3H, CH_3-3'), 2.28(s, 3H, CH_3-5'), 1.61(quint., J=7.37 Hz, 2H, $(CH_3)_2NCH_2C\underline{H}_2CH_2$-4'),

實例62

3-[4-(3-二甲胺丙基)-3,5-二甲基-1H-吡咯-2-基亞甲基]-2-氧-2,3-二氫-1H-吲哚-5-磺酸異丙醯胺

採用實例2之方法，得到收率64%之標題化合物：

MS EI 444 $[M]^+$。

實例63

3-[4-(3-二甲胺丙基)-3,5-二甲基-1H-吡咯-2-基亞甲基]-5-(嗎啉-4-磺醯基)-1,3-二氫吲哚-2-酮

採用實例2之方法，得到收率90%之標題化合物：

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（147）

MS EI 472 $[M]^+$。

實例64

3-[4-(3-二甲胺丙基)-3,5-二甲基-1H-吡咯-2-基亞甲基]-2-氧-2,3-二氫-1H-吲哚-5-磺酸二甲醯胺

採用實例2之方法，得到收率92%之標題化合物：

^{1}HNMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 13.5(s, br, 1H, NH), 12.21 (s, br, 1H, NH), 8.18(d, J=1.8 Hz, 1H, H-4), 7.84(s, 1H, H-乙烯基), 7.44(dd, J=1.8, 8.4 Hz, 1H, H-6), 7.05(d, J=8.4 Hz, 1H, H-7), 2.59(s, 6H, 2xCH_3), 2.59-2.64(m, 2H, CH_2), 2.44(s, 6H, 2xCH_3), 2.38-2.44(m, 2H, CH_2), 2.31(s, 6H, 2xCH_3), 1.59-1.69(m, 2H, CH_2),

MS EI 430 $[M]^+$。

7.生物評估法

咸了解，任何指定之一系列化合物均有生物活性範圍。本發明目前較佳具體實施例中，係有關新穎之經吡咯取代之2-吲哚啉酮證實具有調控RTK、CTK及STK活性之能力。採用下列分析法選拔展現最佳所需活性程度之化合物。

A.分析法

可採用下列試管內分析法測定本發明不同化合物對一種或多種PKs之活性程度及影響。亦可採用相關技藝習知之技術，爲相同系列之化合物針對任何PK設計類似之分析法。

本文說明之細胞/催化分析法係以ELISA形式進行。其一般程序如下：添加化合物至表現試驗激酶之細胞中(天然細胞或重組細胞)一段指定時間期，之後若試驗激酶爲受體

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（148）

時，添加已知可活化受體之配位體。溶解細胞，取溶胞液移至預先塗佈可辨識酵素磷酸化反應之受質之專一抗體之ELISA板之孔中。洗除細胞溶胞液之非受質成份，使用辨識磷酸酪胺酸之專一抗體檢測受質上磷酸化量，與未接觸試驗化合物之對照組細胞比較。本文說明之細胞/生物分析法測定因應試驗激酶之活化作用製法之DNA量，其係增殖反應之一般測定法。此分析法之一般過程如下：添加化合物至表現試驗激酶之細胞中(天然細胞或重組細胞)一段指定時間期，之後若試驗激酶爲受體時，添加已知可活化受體之配位體。至少培養一夜後，添加DNA標識試劑如：溴去氧尿嘧啶核苷(BrdU)或3H-胸苷。採用抗-BrdU抗體檢測標識之DNA量或測定放射活性並與未接觸試驗化合物之對照組細胞比較。

細胞/催化分析

可採用酵素連結免疫吸收分析法(ELISA)檢測及測定PK活性之存在。可根據述於例如：弗勒(Voller)等人，1980，"酵素連結免疫吸收分析法"，述於"臨床免疫學手册"，第2版，洛斯與弗德曼編輯，p 359-371，華盛頓特區美國微生物學會("Enzyme-Linked Immunosorbent Assay," In: Manual of Clinccal Immunology, 2d ed., edited by Rose and Friedman, pp 359-371 Am. Soc. Of Microbiology, Washington, D.C.)之已知方法進行ELISA。

所揭示之方法可用於測定對專一性PK之活性。亦即，專一性PK之ELISA實驗較佳進行方式如下。然而，擷用此等

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（149）

測定化合物對RTK族群中其他成員及對CTKs與STKs之活性之方法係相關技藝專家之知識範圍內。

FLK-1分析法

進行ELISA分析法測定FLK-1受體之激酶活性，更明確言之，測定TK對FLK-1受體之抑制或活化活性。明確言之，進行下列分析法測定經基因工程處理可表現Flk-1之細胞中FLK-1受體之激酶活性。

材料與試驗

a. 康寧96孔ELISA板(康寧產品目錄No. 25805-96)，

b. 卡波公司山羊抗兔子IgG(目錄No. 55641)，

c. PBS(奇布可(Gibco)產品目錄No. 450-1300EB)，

d. TBSW緩衝液(50 mM Tris (pH 7.2)，150 mM NaCl與0.1% Tween-20)，

e. 乙醇胺母液(10%乙醇胺(pH 7.0)，存放在4℃)，

f. HNTG緩衝液(20 mM HEPES緩衝液(pH 7.5)，150 mM NaCl，0.2% Triton X-100，及10%甘油)，

g. EDTA(0.5 M(pH 7.0)，100倍母液)，

h. 正釩酸鈉(0.5 M，100倍母液)，

i. 焦磷酸鈉(0.2 M，100倍母液)，

j. NUNC 96孔V型底聚丙烯板(應用科學公司(Applied Scientific)目錄No. AS-72092)，

k. NIH3T3 C7#3細胞(FLK-1表現細胞)，

l. DMEM含1X高葡萄糖L-麩醯胺(目錄No. 11965-050)，

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（150）

m. FBS(奇布可公司目錄No. 16000-028)，

n. L-麩醯胺(奇布可公司，目錄No. 25030-016)，

o. VEGF，必普科技公司(PeproTech, Inc.)(目錄No. 100-20)(以含在Milli-Q dH_2O中1微克/100微升之母液保存在-20℃下)，

p. 親和性純化抗-FLK-1抗血清，

q. 針對磷酸酪胺酸之UB40單株抗體(參見芬德利(Fendley)等人, 1990, Cancer Research 50:1550-1558)，

r. EIA級山羊抗小白鼠IgG-POD(拜瑞公司(BioRad)目錄No. 172-1011)，

s. 2,2-連氮基-雙(3-乙基苯幷噻唑啉)-6-磺酸(ABTS)溶液(100 mM檸檬酸(無水)，250 mM Na_2HPO_4(pH 4.0)，0.5毫克/毫升ABTS(希格馬(Sigma)目錄No. A-1888)，溶液應保存在4℃暗處中，直到使用前爲止，

t. H_2O_2(30%溶液)(費雪公司(Fisher)目錄No. H325)，

u. ABTS/H_2O_2(15毫升ABTS溶液，2微升H_2O_2)，使用前5分鐘製備，置於室溫下，

v. 0.2 M HCl水溶液母液，

w. 二甲亞碸(100%)(希格馬公司目錄No. D-8418)，及

y. 胰蛋白酶-EDTA(奇布可公司RRL目錄No. 25200-049)。

方法

1. 在康寧96孔ELISA板上，每孔塗佈含1.0微克卡波抗兔子IgG抗體之0.1 M Na_2CO_3 pH 9.6。補充每孔終體積至150

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（151）

微升。塗佈ELISA板於4℃下一夜。當板子存放在4℃下時，可保存至長2週。

2. 使細胞於生長培養基(DMEM，補充2.0 mM L-麩醯胺，10% FBS)中，於合適培養皿中，在37℃，5% CO_2下生長至融合止。

3. 利用胰蛋白酶處理收集細胞，接種至康寧25850聚苯乙烯96孔圓底細胞板中，25,000個細胞/孔含於200微升生長培養基中。

4. 使細胞於37℃，5% CO_2下生長至少一天。

5. 以D-PBS 1X洗滌細胞。

6. 添加200微升/孔斷食培養基(DMEM，2.0 mM 1-麩醯胺，0.1% FBS)。於37℃，5% CO_2下培養一夜。

7. 於聚丙烯96孔板中，使用斷食培養基稀釋化合物1：20。稀釋二甲亞碸1：20用於對照組孔中。

8. 自96孔細胞培養板中排除斷食培養基，在各孔中添加162微升新鮮斷食培養基。

9. 在各孔中添加18微升1：20稀釋化合物溶液(來自步驟7)，於對照組孔中添加1：20二甲亞碸稀釋液(+/-VEGF)，細胞刺激作用後之最終稀釋度爲1：200。最終二甲亞碸爲0.5%。板子於37℃，5% CO_2下培養2小時。

10. 板子反轉排除液體，以排除ELISA板中未結合之抗體。以TBSW+0.5%乙醇胺pH 7.0洗滌3次。以紙巾拍打板子，排除過多液體與氣泡。

11. 以每孔150微升TBSW+0.5%乙醇胺，pH 7.0組斷板子

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（ 152）

反應。板子於微滴定板振盪器上振盪培養30分鐘。

12. 依步驟10所述洗滌板子3次。

13. 添加0.5微克/孔親和性純化之抗-FLU-1多株兔子抗血清。以TBSW+0.5%乙醇胺pH 7.0補充至終體積150微升/孔。板子振盪培養30分鐘。

14. 添加180微升斷食培養基至細胞中，以20微升/孔10.0 mM正釩酸鈉及500毫微克/毫升VEGF刺激細胞(每孔終濃度爲1.0 mM正釩酸鈉及50毫微克/毫升VEGF)，於37℃，5% CO_2下8分鐘。陰性對照組僅接受斷食培養基。

15. 8分鐘後，應自細胞中排除培養基，以200微升/孔PBS洗滌一次。

16. 於150微升/孔HNTG中溶解細胞，同時於室溫下振盪5分鐘。HNTG調配物包括正釩酸鈉、焦磷酸鈉及EDTA。

17. 依步驟10所述洗滌ELISA板三次。

18. 自細胞培養板中轉移細胞溶胞液至ELISA板中，振盪培養2小時。爲了轉移溶胞液，使吸管上下移動，同時刮除孔壁。

19. 依步驟10洗滌板子3次。

20. ELISA板與0.02微克/孔UB40於TBSW + 0.5%乙醇胺中培養。使終體積達150微升/孔。振盪培養30分鐘。

21. 依步驟10洗滌板子3次。

22. ELISA板與稀釋1：10,000之EIA級山羊抗小白鼠IgG共軛辣根過氧化酶，於TBSW加0.5%乙醇胺，pH 7.0中培養。使終體積達150微升/孔。振盪培養30分鐘。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（ 153）

23. 依步驟10洗滌板子。

24. 添加100微升ABTS/H_2O_2溶液至孔中。振盪培養10分鐘。

25. 添加100微升0.2 M HCl，終濃度爲0.1 M HCl，以中止呈色反應。於室溫下振盪1分鐘。以緩慢流動之空氣排除汽泡，於410 nm ELISA板讀數器上讀取ELISA板。

完整細胞之EGF受體-HER2嵌合受體分析法

依下文說明測定完整EGFR-NIH3T3細胞之HER2激酶活性：

材料與試劑：

a. EGF：母液濃度：16.5 ILM，EGF 201，日本TOYOBO公司。

b. 05-101 (UBI)(辨識EGFR細胞外區之單株抗體)。

c. 抗磷酸酪胺酸抗體(抗-Ptyr)(多株)(參見上述芬德利等人文獻)。

d. 檢測抗體：山羊抗兔子IgG辣根過氧化酶共軛物，加州塔哥公司(TAGO, Inc. Burlingame, CA)。

e. TBST緩衝液：

Tris-HCl，pH 7.2	50 mM
NaCl	150 mM
Triton X-100	0.1

f. HNTG 5X母液：

HEPES	0.1 M
NaCl	0.75 M

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（154）

甘油	50%
Triton X-100	1.0%

g. ABTS母液：

檸檬酸	100 mM
Na_2HPO_4	250 mM
濃HCl	0.5 mM
ABTS*	0.5毫克/毫升

*(2,2'-連氮雙(3-乙基苯幷噻唑啉磺酸))。溶液保存在4℃黑暗中，直到使用前爲止。

h. 母液試劑：

EDTA 100 mM pH 7.0

Na_3VO_4 0.5 M

$Na_4(P_2O_7)$ 0.2 M

方法

預塗佈ELISA板

1. 以05-101抗體塗佈ELISA板(康寧，96孔，目錄#25805-96)，每孔0.5微克含於PBS中，100微升終體積/孔，於4℃下保存一夜。已塗佈之板子於4℃下保存時，可存放達10天。

2. 使用當天，排除塗佈緩衝液，改換100微升阻斷緩衝液(5%康乃馨即溶脫指奶粉，含於PBS中)。板子於室溫下(約23℃至25℃)振盪培養30分鐘。臨用前，排除阻斷緩衝液，以TBST緩衝液洗滌板子4次。

接種細胞

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（155）

1. 此分析法採用過度表現嵌合受體且包含EGFR細胞外區及細胞內HER2激酶區之NIH3T3細胞株。

2. 選出融合度80-90%之培養皿進行實驗。以胰蛋白酶處理細胞，添加10%胎牛血清中止反應。細胞懸浮在DMEM培養基中(10% CS DMEM培養基)，於1500 rpm，室溫下離心一次。

3. 細胞懸浮在接種培養基中(DMEM，0.5%牛血清)，採用錐蟲藍計算細胞數。生存率超過90%才可接受。細胞接種在96孔微滴定板之DMEM培養基(0.5%牛血清)中，每孔密度10,000個細胞，每孔100微升。接種之細胞於5% CO_2及37℃下培養約40小時。

分析過程

1. 採用反轉式顯微鏡檢查接種細胞之污染情形。以DMEM培養基稀釋藥物母液(10毫克/毫升DMSO) 1：10，然後取5微升移至TBST孔中，最終藥物稀釋度1：200，最終DMSO濃度1%。對照組孔僅接受DMSO。於5% CO_2及37℃培養2小時。

2. 製備EGF配位體：於DMEM中稀釋EGF母液，因此當取10微升稀EGF(稀釋1：12)移至孔內時，終濃度達100 mM。

3. 製備新鮮HNTG*，使之足夠供應每孔100微升，並置於冰上。

HNTG* (10毫升)：

HNTG母液	2.0毫升
milli-Q H_2O	7.3毫升

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（156）

EDTA，100 mM pH 7.0	0.5毫升
Na_3VO_4 (0.5 M)	0.1毫升
$Na_4(P_2O_7)$ (0.2 M)	0.1毫升

4. 與藥物培養120分鐘後，添加製備之SGF配位體至細胞中，每孔10微升，至終濃度100 nM。對照組孔僅接受DMEM。於室溫下振盪培養5分鐘。

5. 排除藥物、EGF及DMEM。以PBS洗滌細胞2次。取HNTG*移至細胞中，每孔100微升。置於冰上5分鐘。同時排除其他ELISA板上之阻斷緩衝液，依上述使用TBST洗滌。

6. 在微滴定管上小心加裝吸管尖頭，刮除板上細胞，重覆吸出及添加HNTG*溶胞緩衝液，使細胞材料均質化。轉移溶胞液至經塗佈、阻斷及洗滌之ELISA板中。於室溫下振盪培養1小時。

7. 排出溶胞液，以TBST洗滌4次。取新鮮稀釋之抗-Ptyr抗體移至ELISA板中，每孔100微升。於室溫下，於抗-Ptyr抗血清之存在下(於TBST中稀釋1：3000)，振盪培養30分鐘。

8. 排除抗-Ptyr抗體，以TBST洗滌4次。取新鮮稀釋之TAGO抗兔子IgG抗體移至ELISA板中，每孔100微升。於室溫下振盪培養30分鐘(抗兔子IgG抗體：於TBST中稀釋1：3000)。

9. 排除TAGO檢測抗體，以TBST洗滌4次。取新鮮製備之ABTS/H_2O_2溶液移至ELISA板中，每孔100微升。於室溫

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（157）

下振盪培養20分鐘(ABTS/H_2O_2溶液：1.0微升30% H_2O_2含於10毫升ABTS母液中)。

10. 添加50微升5N H_2SO_4(視需要添加)中止反應，於410 nm下測定光密度。

11. 由陽性對照組減去陰性對照組數值，即測得磷酸酪胺酸最大訊號。扣除陰性對照組後，計算含萃液之孔中磷酸酪胺酸內容物之抑制百分比。

PDGF-R分析法

除非另有說明，否則所有細胞培養基、麩醯胺及胎牛血清均可購自奇布可生命技術公司(Gibco Life Technologies, Grand Island, NY)。所有細胞均於90-85%空氣與5-10% CO_2之潮濕大氣中，於37℃下生長。所有細胞株均例行每週次培養二次，並由Mycotect法(奇布可公司)判定沒有黴漿菌生長。

進行ELISA分析法時，細胞(U1242，得自約瑟夫史雷辛格公司(Joseph Schlessinger, NYU))於生長培養基中(含10% FBS、NEAA、1 mM NaPyr及2 mM GLW之MEM)生長至融合度80-90%，並接種至含0.5%血清之96孔組織培養板中，每孔25,000至30,000個細胞含於0.5%血清中。於含0.5%血清之培養基中培養一夜後，細胞換成無血清培養基，於5% CO_2，37%培養箱中，以試驗化合物處理2小時。再以配位體刺激細胞5至10分鐘，然後以HNTG溶解細胞(20 mM Hepes，150 mM NaCl，10%甘油，5 mM EDTA，5 mM Na_3VO_4，0.2% Triton X-100及2 mM NaPyr)。取溶胞液(0.5

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（158）

毫克/孔，含於PBS中)移至預先塗佈受體專一性抗體且經含5%牛奶之TBST(50 mM Tris-HCl pH 7.2，150 mM NaCl及0.1% Triton X-100)於室溫下阻斷30分鐘之ELISA板中。溶胞液於室溫下振盪培養1小時。以TBST洗滌板子4次，然後於室溫下與多株抗磷酸酪胺酸抗體培養30分鐘。以TBST潤洗板子4次，以排除過量之抗磷酸酪胺酸抗體。添加山羊抗兔子IgG抗體至ELISA板中，於室溫下30分鐘後，再以TBST潤洗4次。添加ABTS (100 mM檸檬酸，250 mM Na_2HPO_4及0.5毫克/毫升2,2'-連氮基-雙-(3-乙基苯幷噻唑啉-6-磺酸))加H_2O_2(1.2毫升30% H_2O_2加至10毫升ABTS中)至ELISA板中，開始呈色。添加ABTS後約15至30分鐘，記錄410 nm下之吸光度，參考波長630 nm。

IGF-1受體分析法

採用下列方法測定IGF-1受體上磷酸酪胺酸含量，此表示IGF-1受體酪胺酸激酶活性。

材料與試劑

a. 本方法採用之細胞株爲3T3/IGF-1R，係經基因工程處理可過度表現IGF-1受體之細胞株。

b. 由NIH3T3/IGF-1R於5% CO_2及37℃之培養箱中生長。生長培養基爲DMEM + 10% FBS(加熱去活性)+ 2 mM L-麩醯胺。

c. 親和性純化之抗-IGF-1R抗體17-69。

d. D-PBS：

KH_2PO_4	0.20 克/升

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（159）

KH_2PO_4	2.16 克/升
KCl	0.20 克/升
NaCl	8.00 克/升 (pH 7.2)

e. 阻斷緩衝液：TBST加5%牛奶(康乃馨即溶脫脂奶粉)。

f. TBST緩衝液：

Tris-HCl	50 mM
NaCl	150 mM (pH 7.2/HCl 10 N)
Triton X-10	0.1%

製備TBS (10X)母液，稀釋過程中添加Triton X-100至緩衝液中。

g. HNTG緩衝液：

HEPES	20 mM
NaCl	150 mM (pH 7.2/HCl 1N)
甘油	10%
Triton X-100	0.2%

製備母液(5X)，保存在4℃下。

h. EDTA/HCl：0.5 M pH 7.0 (NaOH)，爲100X母液。

i. Na_3VO_4：0.5 M，100X母液，分成數等份保存在80℃。

j. $Na_4P_2O_7$：0.2 M，100X母液。

k. 似胰島素生長因子-1，來自普美加公司(Promega)，目錄# G5111。

l. 兔子多株抗磷酸酪胺酸抗血清。

m. 山羊抗兔子IgG，POD共軛物(檢測抗體)，Tago(目錄No. 4520，批號1802)：塔哥公司(Tago, Inc., Burlingame,

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（160）

CA)。

n. ABTS(2,2'-連氮基雙(3-乙基苯幷噻唑啉磺酸))溶液：

檸檬酸	100 mM
Na_2HPO_4	250 mM (pH 4.0/1 N HCl)
ABTS	0.5毫克/毫升

ABTS溶液應保存在4℃暗處。當轉呈綠色時，應拋棄此溶液。

o. 過氧化氫：30%溶液，保存在4℃暗處。

方法

下列所有步驟均於室溫下進行，除非另有說明。所有ELISA板之洗滌法均以自來水潤洗板子3次，然後以TBST潤洗一次。以紙巾拍乾板子。

細胞接種法：

1. 細胞於組織培養皿(康寧25020-100)中生長至80至90%融合度後，以胰蛋白酶-EDTA(0.25%，0.5毫升/D-100，奇布可公司)收穫細胞。

2. 細胞再度懸浮於新鮮DMEM + 10% FBS +2 mM L-麩醯胺中，移至96孔組織培養板(康寧25806-96)，20,000個細胞/孔(100微升/孔)。培養1天後，改換成無血清培養基(90/微升)，於5% CO_2及37℃下培養一夜。

ELISA板塗佈及阻斷法：

1. 以抗-IGF-1R抗體塗佈ELISA板(康寧25805-96)至少2小時，0.5微克/孔100微升PBS中。

2. 排除塗佈塗液，改換100微升阻斷緩衝液，振盪30分

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（161）

鐘。即將添加溶胞液之前方排除阻斷緩衝液及洗滌板子。

分析法

1. 於無血清條件下試驗藥物。

2. 於96孔聚丙烯板中，以DMEM稀釋藥物母液(含於100% DMSO中)1：10，取10微升/孔此溶液移至細胞中，最終藥物稀釋度1：100，最終DMSO濃度10%。細胞於5% CO_2，37℃下培養2小時。

3. 製備新鮮細胞溶胞緩衝液(HNTG*)

HNTG	2毫升
EDTA	0.1毫升
Na_3VO_4	0.1毫升
$Na_4(P_2O_7)$	0.1毫升
H_2O	7.3毫升

4. 藥物培養2小時後，取10微升/孔200 nM IGF-1配位體之PBS溶液移至細胞中(終濃度20 nM)，於5% CO_2及37℃下培養10分鐘。

5. 排除培養基，添加100微升/孔HNTG*，振盪10分鐘。於顯微鏡下檢視細胞，觀察是否適當溶解。

6. 採用12個通道之吸管自板上刮除細胞，以重覆吸出及添加之方式使溶胞液均質化。轉移所有溶胞液至塗佈抗體之ELISA板中，振盪1小時。

7. 排除溶胞液，洗滌板子，添加抗-pTyr(以TBST稀釋1：3,000) 100微升/孔，振盪30分鐘。

8. 排除抗-pTyr，洗滌板子，添加TAGO(以TBST稀釋

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（162）

1：3,000) 100微升/孔，振盪30分鐘。

9. 排除檢測抗體，洗滌板子，添加新鮮ABTS/H_2O_2 (1.2微升H_2O_2至10毫升ABTS中) 100微升/孔至板子中，開始呈色。

於Dynatec MR5000檢測410 nm之吸光度，參考波長510 nm。

EGFR分析法

依下列方法測定經基因工程處理可表現人類EGF-R之細胞中EGF受體激酶活性：

材料與試劑：

a. EGF配位體：母液濃度=16.5μM，EGF 201，日本TOYOBO公司。

b. 05-101 (UBI)(辨識EGFR細胞外區之單株抗體)。

c. 抗磷酸酪胺酸抗體(抗-Ptyr)(多株)。

d. 檢測抗體：山羊抗兔子IgG辣根過氧化酶共軛物，加州塔哥公司(TAGO, Inc. Burlingame, CA)。

e. TBST緩衝液：

Tris-HCl，pH 7	50 mM
NaCl	150 mM
Triton X-100	0.1

f. HNTG 5X母液：

HEPES	0.1 M
NaCl	0.75 M
甘油	50

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（163）

Triton X-100	1.0%

g. ABTS母液：

檸檬酸	100 mM
Na_3VO_4	250 mM
濃HCl	4.0 pH
ABTS*	0.5毫克/毫升

*溶液保存在4℃黑暗中，直到使用前為止。

h. 母液試劑：

EDTA 100 mM pH 7.0

Na_3VO_4 0.5 M

$Na_4(P_2O_7)$ 0.2 M

方法

預塗佈ELISA板

1. 以05-101抗體塗佈ELISA板（康寧，96孔，目錄#25805-96），每孔0.5微克含於PBS中，150微升終體積/孔，於4℃下保存一夜。已塗佈之板子於4℃下保存時，可存放達10天。

2. 使用當天，排除塗佈緩衝液，改換阻斷緩衝液（5%康乃馨即溶脫脂奶粉，含於PBS中）。板子於室溫下（約23℃至25℃）振盪培養30分鐘。臨用前，排除阻斷緩衝液，以TBST緩衝液洗滌板子4次。

接種細胞

1. 此分析法採用NIH 3T3/C7細胞株（亨尼格(Honegger)

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（164）

等人，Cell 51:199-209，1987)。

2. 選出融合度80-90%之培養皿進行實驗。以胰蛋白酶處理細胞，添加10% CS DMEM培養基中止反應。細胞懸浮在DMEM培養基中(10% CS DMEM培養基)，於1000 rpm，室溫下離心5分鐘一次。

3. 細胞懸浮在接種培養基中(DMEM，0.5%牛血清)，採用錐蟲藍計算細胞數。生存率超過90%才可接受。細胞接種在96孔微滴定板之DMEM培養基(0.5%牛血清)中，每孔密度10,000個細胞，每孔100微升。接種之細胞於5% CO_2及37℃下培養約40小時。

分析過程

1. 採用反轉式顯微鏡檢查接種細胞之污染情形。以DMEM培養基稀釋藥物母液(10毫克/毫升DMSO) 1：10，然後取5微升移至試驗孔中，最終試驗化合物藥物稀釋度1：200，最終DMSO濃度1%。對照組孔僅接受DMSO。於5% CO_2及37℃培養1小時。

2. 製備EGF配位體：於DMEM中稀釋EGF母液，因此當取10微升稀EGF(稀釋1：12)移至孔內時，終濃度達25 mM。

3. 製備新鮮10毫升HNTG*，使之足夠供應每孔100微升，其中HNTG*包含：HNTG母液(2.0毫升)，milli-Q H_2O (7.3毫升)，EDTA，100 mM pH 7.0 (0.5毫升)，Na_3VO_4 (0.5 M) (0.1毫升)，Na_4 (P_2O_7) (0.2 M) (0.1毫升)。

4. 置於冰上。

5. 與藥物培養120分鐘後，添加製備之EGF配位體至細

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（165）

胞中，每孔10微升，至終濃度25 nM。對照組孔僅接受DMEM。於室溫下振盪培養5分鐘。

6. 排除試驗化合物、EGF及DMEM。以PBS洗滌細胞2次。取HNTG*移至細胞中，每孔100微升。置於冰上5分鐘。同時排除其他ELISA板上之阻斷緩衝液，依上述使用TBST洗滌。

7. 在微滴定管上小心加裝吸管尖頭，刮除板上細胞，重覆吸出及添加HNTG*溶胞緩衝液，使細胞材料均質化。轉移溶胞液至經塗佈、阻斷及洗滌之ELISA板中。於室溫下振盪培養1小時。

8. 排出溶胞液，以TBST洗滌4次。取新鮮稀釋之抗-Ptyr抗體移至ELISA板中，每孔100微升。於室溫下，於抗-Ptyr抗血清之存在下(於TBST中稀釋1：3000)，振盪培養30分鐘。

9. 排除抗-Ptyr抗體，以TBST洗滌4次。取新鮮稀釋之TAGO 30抗兔子IgG抗體移至ELISA板中，每孔100微升。於室溫下振盪培養30分鐘(抗兔子IgG抗體：於TBST中稀釋1：3000)。

10. 排除檢測抗體，以TBST洗滌4次。取新鮮製備之ABTS/H_2O_2溶液移至ELISA板中，每孔100微升。於室溫下振盪培養20分鐘(ABTS/H_2O_2溶液：1.2微升30% H_2O_2含於10毫升ABTS母液中)。

11. 添加50微升5N H_2SO_4(視需要添加)中止反應，於410 nm下測定光密度。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（166）

12. 由陽性對照組減去陰性對照組數值，即測得磷酸酪胺酸最大訊號。扣除陰性對照組後，計算含萃液之孔中磷酸酪胺酸內容物之抑制百分比。

Met自體磷酸化分析法

此分析法測定Met酪胺酸激酶活性，其係分析Met受體上之Met蛋白質酪胺酸激酶含量。

試劑

a. HNTG (5X母液)：取23.83克HEPES及43.83克NaCl溶於約350毫升dH_2O中。以HCl或NaOH調至pH 7.2，添加500毫升甘油及10毫升Triton X-100，混合，添加dH_2O至總體積1升。製備1升1X操作溶液時，添加200毫升5X母液至800毫升dH_2O中，必要時檢查及調整pH，保存在4℃下。

b. PBS(杜氏(Dulbecco's)磷酸鹽緩衝食鹽水)，奇布可公司目錄# 450-1300EB(1X溶液)。

c. 阻斷緩衝液：在500毫升dH_2O中添加100克BSA，12.1克Tris-pH 7.5，58.44克NaCl及10毫升Tween-20，稀釋至總體積1升。

d. 激酶緩衝液：在500毫升dH_2O中添加12.1克TRIS (pH 7.2)，58.4克NaCl，40.7克$MgCl_2$及1.9克EGTA，以dH_2O調至總體積1升。

e. PMSF (苯甲磺醯氟)，希格馬目錄# P-7626，435.5毫克，添加100%乙醇至總體積25毫升，渦轉混合。

f. ATP(來自細菌)，希格馬目錄#A-7699，以粉末保存在-20℃下，使用特製成溶液，取3.31毫克溶於1毫升dH_2O

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（167）

中。

g. RC-20H HRPO共軛抗磷酸酪胺酸，轉導實驗室(Transduction Laboratories)目錄# E120H。

h. Pierce 1-Step™ Turbo TMB-ELISA (3,3',5,5'-四甲基聯苯胺，皮爾斯(Pierce)目錄# 34022。

i. H_2SO_4，添加1毫升濃H_2SO_4 (18 N)至35毫升dH_2O中。

j. TRIS HCL，費雪目錄# BP 152-5，121.14克，添加600毫升MilliQ H_2O，以HCl調至pH 7.5（或7.2），以MilliQ H_2O補充至1升體積。

k. NaCl，費雪目錄# S271-10，補充至5M溶液。

l. Tween-20，費雪目錄# S337-500。

m. Na_3VO_4，費雪目錄# S454-50，1.8克，添加80毫升MelliQ H_2O，以HCl或NaOH調至pH 10.0，於微波爐中煮沸，冷卻，檢查pH，查重覆此步驟直到pH穩定達到10.0爲止，添加MilliQ H_2O至總體積100毫升，取1毫升分裝，保存在-80℃。

n. $MgCl_2$，費雪目錄# M33-500，配成1M溶液。

o. HEPES，費雪目錄# BP310-500，取59.6克加至200毫升MilliQ H_2O中，調至pH 7.5，補充至總體積250毫升，無菌過濾。

p. 牛白蛋白(BSA)，希格馬目錄# A-4503，30克，添加無菌蒸餾水至總體積300毫升，保存在4℃。

q. TBST緩衝液；在含約900毫升dH_2O之1升定量筒中添加6.057克TRIS及8.766克NaCl，溶解時以HCl調整至pH

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（168）

7.2，添加1.0毫升Triton X-100，以dH_2O補充至總體積1升。

r. 親和性純化之山羊抗體兔子IgG(完整分子)，卡波目錄# 55641。

s. 抗h-Met (C-28)兔子多株IgG抗體，山塔克魯茲化學(Santa Cruz Chemical)目錄# SC-161。

t. 暫時轉感染EGFR/Met嵌合細胞(EMR)(柯馬達(Komada)等人，Oncogene，8:2381-2390 (1993))。

u. 碳酸鈉緩衝液(Na_2SO_4，費雪目錄# S495)：10.6克，添加800毫升MilliQ H_2O，溶解時，以NaOH調至pH 9.6，以MilliQ H_2O補充至1升總體積，過濾，保存在4℃下。

方法：

下列所有步驟均在室溫下進行，除非另有說明。所有ELISA板均以TBST洗滌4次。

EMR溶胞法

在開始捕捉受體前一晚或之前可進行此方法。

1. 於37℃水浴中，以旋轉運動迅速解凍溶胞液，直到最後一個晶胞消失爲止。

2. 以含1 mM PMSF之1X HNTG溶解細胞塊。每個15公分細胞培養皿使用3毫升HNTG。添加HNTG計算體積之1/2，渦轉試管1分鐘，添加其餘HNTG，再渦轉1分鐘。

3. 試管平衡稱重，於4℃及10,000 x g下離心10分鐘。

4. 收集上澄液，取部份進行蛋白質測定。

5. 收集之樣本於乾冰/乙醇浴中迅速冷凍。不論溶胞液是否保存一夜在或在測定蛋白質後立即使用均應進行此步

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（169）

驟。

6. 採用二辛可寧酸(BCA)法(BCA分析試劑套組，皮爾斯化學公司目錄# 23225)測定蛋白質。

ELISA法

1. 以每孔含5微克山羊抗兔子抗體之碳酸鹽緩衝液塗佈康寧96孔ELISA板，孔總體積50微升。於4℃下保存一夜。

2. 反轉板子排除液體，以排除未結合之山羊抗兔子抗體。

3. 在各孔中添加150微升阻斷緩衝液。振盪培養30分鐘。

4. 以TBST洗滌4次。於紙巾上拍打，以排除過量液體與汽泡。

5. 每孔添加1微升兔子抗Met抗體，於TBST中稀釋，孔總體積100微升。

6. 於HNTG中稀釋溶胞液(90微克溶胞液/100微升)。

7. 各孔中添加100微升稀釋之溶胞液。振盪60分鐘。

8. 以TBST洗滌4次。於紙巾上拍打去除過量液體與汽泡。

9. 每孔添加50微升1X溶胞液緩衝液。

10. 於聚丙烯96孔板中，以1X激酶緩衝液稀釋化合物/萃液1：10。

11. 取5.5微升稀釋之化合物加至ELISA板之孔中。於室溫下振盪培養20分鐘。

12. 每孔添加5.5微升60 μM ATP溶液。陰性對照組未接受任何ATP。振盪培養90分鐘。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（170）

13. 以TBST洗滌4次。於紙巾上拍打，以排除過量液體與汽泡。

14. 每孔添加100微升RC 20(於阻斷緩衝液中稀釋1：3000)。振盪培養30分鐘。

15. 以TBST洗滌4次，於紙巾上拍打，以去除過量液體與汽泡。

16. 每孔添加100微升Turbo-TMB。振盪培養30至60分鐘。

17. 每孔添加100微升1M H_2SO_4，以中止反應。

18. 於Dynatech MR 7000 ELISA讀數器上讀取分析數據。試驗濾墊=450 nm，參考濾墊=410 nm。

生化src分析法

採用此分析法測定src蛋白質激酶活性，測定生物素化肽之磷酸化數值。

材料與試劑：

a. 以src(蘇根公司(Sugen, Inc., Redwood City, CA))轉化酵母。

b. 細胞溶胞液：取表現src之酵母細胞離心集結成塊，以水洗滌一次，再離心集結成塊，保存在-80℃下至使用前止。

c. N-末端生物素基化EEEYEEYEEEYEEEYEEEY係依相關技藝專家習知之標準方法製備。

d. DMSO：希格馬公司(Sigma, St. Louis, MO)。

e. 96孔 ELISA板：康寧96孔易洗滌改良式平底板，康

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（171）

寧目錄# 25805-96。

f. NUNC 96孔V型底聚丙烯板，用於稀釋化合物：應用科學公司目錄# A-72092。

g. Vecastain ELITE ABC試劑：菲特公司(Vector, Burlingame, CA)。

h. 抗-src (327) mab：採用粟酒裂殖酵母(Schizo-saccharomyces Pombe)來表現重組之src(斯柏地-富加(Superti-Furga)等人，EMBO J., 12:2625-2634，斯柏地-富加等人，Nature Biochem., 14:600-605)。粟酒裂殖酵母菌株SP 200(h-s leul. 32 ura4 ade210)依上述方法生長，且利用乙酸鋰法(上述斯柏地-富加文獻)轉化成pRSP表現質體。細胞於1μM硫胺酸存在下生長，以抑制nmtl發動子表現，或於1μM硫胺素不存在下生長，以誘發表現。

i. 單株抗磷酸酪胺酸，UBI 05-321(可改用UB 40替代)。

j. Turbo TMB-ELISA過氧化酶受質：皮爾斯化學公司。

緩衝溶液

a. PBS(杜氏磷酸鹽緩衝食鹽水)：GIBCO PBS，奇布可目錄# 450-1300EB。

b. 阻斷緩衝液：5%脫脂奶粉(康乃馨牌)含於PBS中。

c. 碳酸鹽緩衝液：Na_2CO_4來自費雪公司，目錄# S495，配成100 mM母液。

d. 激酶緩衝液：1.0毫升(來自1M母液)$MgCl_2$，0.2毫升(來自1M母液)$MnCl_2$，0.2毫升(來自1M母液)DTT，5.0毫升(來自1M母液)HEPES，0.1毫升TX-100，以MilliQ H_2O調至

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（172）

10毫升總體積。

e. 溶胞緩衝液：5.0 HEPES(來自1M母液)，2.74毫升NaCl(來自5M母液)，10毫升甘油，1.0毫升TX-100，0.4毫升EDTA(來自100 mM母液)，1.0毫升PMSF(來自100 mM母液)，0.1毫升Na_3NO_4(來自0.1 M母液)，以MilliQ H_2O配至總體積100毫升。

f. ATP：希格馬目錄# A-7699，配成10 mM母液(5.51毫克/毫升)。

g. TRIS-HCl：費雪目錄# BP 152-5，添加12.14克至600毫升MilliQ H_2O中，以HCl調至pH 7.5，以MilliQ H_2O配至總體積1升。

h. NaCl：費雪目錄# S271-10，以MilliQ H_2O配成5M母液。

i. Na_3NO_4：費雪目錄# S454-50，添加1.8克至80毫升MilliQ H_2O中，以HCl或NaOH調至pH 10.0，於微波爐中煮沸，冷卻，檢查pH，經過加熱/冷卻循環後，重覆調整pH直到pH保持穩定爲止，以MilliQ H_2O配成100毫升總體積，取1毫升保存在-80℃下。

j. $MgCl_2$：費雪目錄# M33-500，以MilliQ H_2O配成1M母液。

k. HEPES：費雪目錄# BP 310-500，添加59.6克至200毫升MilliQ H_2O中，調至pH 7.5，以MilliQ H_2O配成250毫升總體積，無菌過濾(1M母液)。

l. TBST緩衝液：添加6.057克TRIS及8.766克NaCl至900

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（173）

毫升dH_2O中，以HCl調至pH 7.2，添加1.0毫升Triton X-100，以dH_2O配成1升總體積。

m. $MnCl_2$：費雪目錄# M87-100，以MilliQ H_2O配成1M母液。

n. DTT：費雪目錄# BP172-5。

o. TBS(TRIS緩衝食鹽水)：添加6.057克TRIS及8.777克NaCl至900毫升MilliQ H_2O中，以MilliQ H_2O配成1升總體積。

p. 激酶反應混合物：每個分析板之用量(100孔)：1.0毫升激酶緩衝液，200微克GST-ζ，以MilliQ H_2O配成終體積8.0毫升。

q. 標識生物素之EEEYEEYEEEYEEEYEEEY：臨用前於水中新鮮製備肽母液(1 mM，2.98毫克/毫升)。

r. Vectastain ELITE ABC試劑：製備14毫升操作試劑時，取1滴試劑A加至15毫升TBST中，反轉試管數次混合。然後添加1滴試劑B。試管置於室溫下環繞式振盪器上，混合30分鐘。

方法：

塗佈src之ELISA板製法

1. 以含0.5微克/孔抗-src mab之100微升pH 9.6碳酸鈉緩衝液塗佈ELISA板，保持4℃下一夜。

2. 以PBS洗滌孔一次。

3. 以0.15毫升5%牛奶之PBS之溶液於室溫下阻斷培養板一夜。

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（174）

4. 以PBS洗滌板子5次。

5. 添加10微克/孔src轉化之酵母溶胞液，於溶胞緩衝液中稀釋(每孔總體積0.1毫升)(每批次之間之溶胞液量可能會有變化)。板子於室溫下振盪20分鐘。

塗佈磷酸酪胺酸抗體之ELISA板之製法

1. 4G10板：於4℃下，以含0.5微克/孔4G10之100微升PBS塗佈一夜，於室溫下，以150微升含5%牛奶之PBS阻斷30分鐘。

激酶分析法

1. 排除板子上未結合之蛋白質，以PBS洗滌板子5次。

2. 每孔添加0.08毫升激酶反應混合物(含10微升10X激酶緩衝液及於水中稀釋成每孔10μM(終濃度)生物素-EEEYEEYEEEYEEEYEEEY。

3. 添加10微升於含10% DMSO之水中稀釋之化合物，於室溫下預培養15分鐘。

4. 添加10微升/孔0.05 mM ATP之水溶液(最終5μM ATP)開始反應。

5. ELISA板於室溫下振盪15分鐘。

6. 每孔添加10微升0.5 M EDTA中止反應。

7. 取90微升上澄液加至經阻斷之塗佈4G10之ELISA板中。

8. 於室溫下振盪培養30分鐘。

9. 以TBST洗滌板子5次。

10. 於室溫下與Vectastain ELITE ABC試劑(100微升/孔)

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（175）

培養30分鐘。

11. 以TBST洗滌孔5次。

12. 以Turbo TMB展開。

生化lck分析法

採用此分析法測定lck蛋白質激酶活性，以GST-ζ之磷酸化數值爲測定值。

材料與試劑：

a. 經lck轉化之酵母：採用粟酒裂殖酵母(Schizosaccharomyces Pombe)來表現重組之lck（斯柏地-富加(Superti-Furga)等人，EMBO J., 12:2625-2634，斯柏地-富加等人，Nature Biochem., 14:600-605)。粟酒裂殖酵母SP 200 (h-s leul. 32 ura4 ade210)依上述方法生長，且利用乙酸鋰法(上述斯柏地-富加文獻)轉化成pRSP表現質體。細胞於1μM硫胺素存在下生長，以誘發表現。

b. 細胞溶胞液：使表現lck之酵母細胞離心集結成塊，以水洗滌一次，再離心集結成塊，於-80℃下冷凍保存至使用時止。

c. GST-ζ：自舊金山加州大學霍華胡斯醫學研究所(Howard Hughes Medical Institute)之亞瑟懷斯(Arthur Weiss)得到用於在細菌中表現之編碼GST-ζ融合蛋白質之DNA。轉化之細菌於25℃下振盪生長一夜。利用穀胱甘肽親和性層析法(法馬藥廠，Pharmacia, Alameda, CA)純化GST-ζ。

d. DMSO：希格馬公司(Sigma, St. Louis, MO)。

e. 96孔ELISA板：康寧96孔易洗改良式平底板，康寧

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（176）

目錄#25805-96。

f. NUNC 96孔V型底聚丙烯板，用於稀釋化合物：應用科學公司目錄#AS-72092。

g. 純化之兔子抗-GST抗血清：安瑞(Amrad)公司(澳洲)目錄# 90001605。

h. 山羊抗兔子-IgG-HRP：艾莫珊(Amersham)公司目錄# V010301。

i. 綿羊抗小白鼠IgG (H+L)：傑克森實驗室目錄# 5215-005-003。

j. 抗-Lck (3A5) mab：山塔克魯茲生物科技公司目錄# sc-433。

k. 單株抗磷酸酪胺酸UBI 05-321(可改用UB40)。

緩衝溶液

a. PBS(杜氏磷酸鹽緩衝食鹽水)：GIBCO PBS，奇布可目錄# 450-1300EB。

b. 阻斷緩衝液：100克BSA，12.1克TRIS (pH 7.5)，58.44克NaCl，10毫升Tween-20，以MilliQ H_2O補充至1升總體積。

c. 碳酸鹽緩衝液：Na_2CO_4來自費雪公司，目錄# S495，以MilliQ H_2O配成100 mM母液。

d. 激酶緩衝液：1.0毫升(來自1M母液)$MgCl_2$，0.2毫升(來自1M母液)$MnCl_2$，0.2毫升(來自1M母液)DTT，5.0毫升(來自1M母液)HEPES，0.1毫升TX-100，以MilliQ H_2O調至10毫升總體積。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（177）

e. 溶胞緩衝液：5.0 HEPES(來自1M母液)，2.74毫升NaCl(來自5M母液)，10毫升甘油，1.0毫升TX-100，0.4毫升EDTA(來自100 mM母液)，1.0毫升PMSF(來自100 mM母液)，0.1毫升Na_3NO_4(來自0.1 M母液)，以MilliQ H_2O配至總體積100毫升。

f. ATP：希格馬目錄# A-7699，配成10 mM母液(5.51克/毫升)。

g. TRIS-HCl：費雪目錄# BP 152-5，添加121.14克至600毫升MilliQ H_2O中，以HCl調至pH 7.5，以MilliQ H_2O配至總體積1升。

h. NaCl：費雪目錄# S271-10，以MilliQ H_2O配成5M母液。

i. Na_3NO_4：費雪目錄# S454-50，添加1.8克至80毫升MilliQ H_2O中，以HCl或NaOH調至pH 10.0，於微波爐中煮沸，冷卻，檢查pH，經過加熱/冷卻循環後，重覆調整pH直到pH保持穩定爲止，以MilliQ H_2O配成100毫升總體積，取1毫升保存在-80℃下。

j. $MgCl_2$：費雪目錄# M33-500，以MilliQ H_2O配成1M母液。

k. HEPES：費雪目錄# BP 310-500，添加59.6克至200毫升MilliQ H_2O中，調至pH 7.5，以MilliQ H_2O配成250毫升總體積，無菌過濾(1M母液)。

l. 牛白蛋白(BSA)，希格馬目錄# A4503，取30克加至150毫升MilliQ H_2O中，以MilliQ H_2O配成300毫升總體積，

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（178）

經0.22微米濾紙過濾，保存在4℃下。

m　TBST緩衝液：添加6.057克TRIS及8.766克NaCl至900毫升dH_2O中，以HCl調至pH 7.2，添加1.0毫升Triton X-100，以dH_2O配成1升總體積。

n.　$MnCl_2$：費雪目錄# M87-100，以MilliQ H_2O配成1M母液。

o.　DTT：費雪目錄# BP172-5。

p.　TBS(TRIS緩衝食鹽水)：添加6.057克TRIS及8.777克NaCl至900毫升MilliQ H_2O中，以MilliQ H_2O配成1升總體積。

q.　激酶反應混合物：每個分析板之用量(100孔)：1.0毫升激酶緩衝液，200微克GST-ζ，以MilliQ H_2O配成終體積8.0毫升。

方法：

塗佈Lck之ELISA板之製法

1.　以含於100微升pH 9.6碳酸鈉緩衝液中之2.0微克/孔綿羊抗-小白鼠IgG塗佈，於4℃下一夜。

2.　以PBS洗滌孔一次。

3.　以0.15毫升阻斷緩衝液於室溫下阻斷板子反應30分鐘。

4.　以PBS洗滌板子5次。

5.　於室溫下添加含於0.1毫升PBS中之0.5微克/孔抗-lck (mab 3A5) 1至2小時。

6.　以PBS洗滌板子5次。

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝　訂　線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（179）

7. 添加於溶胞緩衝液中稀釋(每孔總體積0.1毫升)之20微克/孔經lck轉化之酵母溶胞液。板子於4℃下振盪一夜，以防喪失活性。

塗佈磷酸酪胺酸抗體之ELISA板之製法

1. UB40板：含於100微升PBS中之1.0微克/孔UB40於4℃下一夜，以150微升阻斷緩衝液阻斷至少1小時。

激酶分析法

1. 排除板子上未結合之蛋白質，以PBS洗滌板子5次。

2. 每孔添加0.08毫升激酶反應混合物(含10微升10X激酶緩衝液及加水稀釋之每孔2微克GST-ζ)。

3. 添加10微升於含10% DMSO之水中稀釋之化合物，於室溫下預培養15分鐘。

4. 添加10微升/孔0.1 mM ATP之水溶液(最終10μM ATP)開始反應。

5. ELISA板於室溫下振盪15分鐘。

6. 每孔添加10微升0.5 M EDTA中止激酶反應。

7. 取90微升上澄液加至經阻斷之塗佈4G10之ELISA板中。

8. 於室溫下振盪培養30分鐘。

9. 以TBST洗滌板子5次。

10. 於室溫下與於100微升TBST中稀釋1：5000之兔子抗-GST抗體培養30分鐘。

11. 以TBST洗滌孔5次。

12. 於室溫下與於100微升TBST中稀釋1：20,000之山羊

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（180）

抗兔子-IgG-HRP培養30分鐘。

13. 以TBST洗滌孔5次。

14. 以Turbo TMB展開。

測定RAF之磷酸化功能之分析法

下列分析法說明其目標蛋白質MEK及MEK之目標MAPK之RAF-催化磷酸量。RAF基因序列說明於波尼(Bonner)等人，1985, Molec. Cell. Biol., 5:1400-1407，且很容易且多重基因序列數據銀行取得，本發明此部份採用之核酸媒體之構築法及細胞株已詳細說明於莫里森(Morrison)等人之1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:8855-8859。

材料與試劑

1. Sf9(草地黏蟲(Spodoptera frugiperda)細胞，奇布可公司(GIBCO-BRL，Gaithersburg, MD)。

2. RIPA緩衝液：20 mM Tris/HCl pH 7.4，137 mM NaCl，10%甘油，1 mM PMSF，5毫克/升抗蛋白酶肽、0.5% Triton X-100。

3. 硫氧化還原蛋白-MEK融合蛋白質(T-MEK)：根據製造商之方法進行親和性層析法表現及純化T-MEK。目錄# K350-01及R 350-40，因維金公司(Invitrogen Corp., San Diego, CA)。

4. 於經編碼His-MAPK之pUC18媒體轉化之XL1 Blue細胞中表現His-MAPK (ERK-2)，附His之MAPK。採用Ni-親和性層析法純化His-MAPK。目錄# 27-4949-01，法馬藥廠(Pharmacia, Alameda, CA)。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（181）

5. 綿羊抗小白鼠IgG：傑克森實驗室(Jackson laboratories, West Grove, PA)，目錄# 515-006-008，批號28563。

6. RAF-1蛋白質激酶專一性抗體：來自UBI之URP2653。

7. 塗佈緩衝液：PBS，磷酸鹽緩衝食鹽水，奇布可公司(GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD)。

8. 洗滌緩衝液：TBST(50 mM Tris/HCL pH 7.2，150 mM NaCl，0.1% Triton X-100)。

9. 阻斷緩衝液：TBST，0.1%乙醇胺，pH 7.4。

10. DMSO，希格馬公司(Sigma, St. Louis, MO)。

11. 激酶緩衝液(KB)：20 mM HEPES/HCl pH 7.2，150 mM NaCl，0.1% Triton X-100，1 mM PMSF，5毫升/升抗蛋白酶肽、75 mM正釩酸鈉，0.5 mM DTT及10 mM $MgCl_2$。

12. ATP混合物：100 mM $MgCl_2$，300 mM ATP，10 mCi γ^{33}P ATP(杜邦-NEN)/毫升。

13. 中止反應溶液：1%磷酸，費雪公司(Fisher, Pittsburgh, PA)。

14. 華克纖維素磷酸酯濾墊，芬蘭華克公司(Wallac, Turku, Finnland)。

15. 濾墊洗滌溶液：1%磷酸，費雪公司(Fisher, Pittsburgh, CA)。

16. 湯狄克板收集器(Tomtec plate harvester)，華克公司(Wallac, Turku, Finnland)。

17. 華克β-板讀數機# 1205，華克公司(Wallac, Turku,

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（182）

Finnland)。

18. NUNC 96孔V型底聚丙烯板，供化合物用，應用科學公司目錄# AS-72092。

方法

下列所有步驟均在室溫下進行，除非另有說明。

1. 塗佈ELISA板：以100毫升綿羊抗小白鼠經親和性純化之抗血清(1毫克/100毫升塗佈緩衝液)塗佈ELISA孔，於4℃下一夜。ELISA板當於4℃下存放時，可使用2週。

2. 反轉板子並排除液體。添加100毫升阻斷溶液，培養30分鐘。

3. 排除阻斷溶液，以洗滌緩衝液洗滌4次。板子於紙巾上拍打以排除過量液體。

4. 添加1毫克針對RAF-1之抗體至各孔中，培養1小時。依步驟3所述洗滌。

5. 取RAS/RAF感染之Sf9細胞之溶胞液解凍，以TBST稀釋至10毫克/100毫升。添加10毫克稀釋之溶胞液至孔中，培養1小時，板子振盪培養。陰性對照組不接受溶胞液。細胞經重組桿病毒感染(各病毒之MOI爲5)後，由RAS/RAF感染之Sf9昆蟲細胞製備溶胞液。以PBS洗滌細胞一次，於RIPA緩衝液中溶解細胞。離心排除不溶物(5分鐘，10,000 x g)。取部份溶胞液於乾冰/乙醇中冷凍，保存在-80℃下直到使用時爲止。

6. 排除未結合之物質，依上述步驟3所述洗滌。

7. 每孔添加2毫克T-MEK及2毫克His-MAEPK，並以激

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（183）

酶緩衝液調至40毫升體積。本文例舉自細胞萃液中純化T-MEK及MAPK之方法。

8. 於含1% DMSO之TBST中預先稀釋化合物(母液10毫克/毫升DMSO)或萃液20倍。添加5毫升預先稀釋之化合物/萃液至步驟6說明之孔中。培養20分鐘。對照組不接受藥物。

9. 添加5毫升ATP混合物開始激酶反應，板子於ELISA板振盪器上振盪培養。

10. 60分鐘後，添加30毫升中止反應溶液至各孔中，中止激酶反應。

11. 取磷酸纖維素墊及ELISA板置於湯狄克(Tomtec)板收集器上。根據製造適之建議，以濾墊洗液收集及洗滌濾墊。濾墊乾燥，濾墊密封，置入固定器中。將固定器嵌入放射活性檢測器內，定量濾墊上之放射活性磷。

或者，自分析板上各孔取40毫升移至磷酸纖維素濾墊上相應位置。濾墊風乾後，置於平盤上。溫和搖動平盤，每15分鐘換一次洗滌溶液，歷1小時。濾墊風乾。濾墊密封並置入適合測定樣本中放射活性磷之固定器中。將固定器嵌入檢測器中，定量濾墊上放射活性磷。

CDK2/環素(Cyclin) A-抑制作用分析法

本分析法分析外用性受質中CDK2之蛋白質激酶活性。

試劑：

A. 緩衝液A：(80 mM Tris (pH 7.2)，40 mM $MgCl_2$)，4.84克Tris (F.W.=121.1克/莫耳)，4.07克$MgCl_2$ (F.W.=

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（184）

203.31克/莫耳)溶於500毫升H_2O中。以HCl調至pH 7.2。

B. 組織蛋白H1溶液(0.45毫克/毫升組織蛋白H1及20 mM HEPES pH 7.2)：5毫克組織蛋白H1(百靈藥廠(Boehinger Mannheim)含於11.111毫升20 mM HEPES pH 7.2 (477毫克HEPES (F.W.=238.3克/莫耳)溶於100毫升ddH_2O中)，分裝成1毫升保存在-80℃下。

C. ATP溶液(60 μM ATP，300微克/毫升BSA，3 mM DTT)：120微升10 mM ATP，600微升10毫克/毫升BSA，加至20毫升，分成1毫升保存在-80℃下。

D. CDK2溶液：cdk2/環素A含於10 mM HEPES pH 7.2，25 mM NaCl，0.5 mM DTT，10%甘油中，分裝成9微升保存在-80℃下。

方法

1. 於ddH_2O/15% DMSO(體積比)中製備抑制劑溶液，濃度爲所需最終分析濃度之3倍。

2. 取20微升抑制劑加至聚丙烯96孔板之各孔中(或陽性與陰性對照組使用20微升15% DMSO)。

3. 解凍組織蛋白H1溶液(1毫升/板)、ATP溶液(1毫升/板加11份陰性對照組)及CDK2溶液(9微升/板)。CD2保持在冰上至使用時爲止。適當分裝CDK2溶液，以避免重覆冷凍-解凍循環。

4. 取9微升CDK2溶液稀釋至2.1毫升緩衝液A中(每板)。混合，取20微升加至各孔中。

5. 混合1毫升組織蛋白H1溶液及1毫升ATP溶液(每板)

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（185）

加至10毫升附旋轉蓋之試管中。添加γ^{33}P ATP至濃度0.15 μCi/20微升(0.15 μCi/分析板孔)。小心混合以避免BSA起泡。取20微升加至適當孔中。板子於板振盪器上混合。陰性對照組係由ATP溶液與等量20 mM HEPES pH 7.2混合，添加γ^{33}P ATP至濃度爲0.15 μCi/20微升溶液。取20微升加至適當孔中。

6. 使反應進行60分鐘。

7. 取35微升10% TCA加至各孔中。板子於板振盪器上混合。

8. 取40微升各樣本加在P30濾墊上。使濾墊乾燥(約10至20分鐘)。

9. 以250毫升1%磷酸(每升ddH_2O含10毫升磷酸)洗滌濾墊4 X 10分鐘。

10. 以β-板讀數器爲濾墊計數。

細胞/生物分析法

PDGF-誘發之BrdU吸收分析法

材料與試劑

(1) PDGF：人類PDGF B/B，1276-956，德國百靈藥廠。

(2) BrdU標識試劑；10 mM含於PBS(pH 7.4)中，目錄No. 1 647 229，德國百靈藥廠。

(3) FixDenat：固定溶液(現成可用)，目錄No. 1 647 229，德國百靈藥廠。

(4) 抗-BrdU-POD：小白鼠單株抗體與過氧化酶之共軛物，目錄No. 1 647 229，德國百靈藥廠。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（186）

(5) TMB受質溶液：四甲基聯苯胺(TMB)，現成可用，目錄No. 1 647 229，德國百靈藥廠。

(6) PBS洗滌液：1X PBS，pH 7.4(蘇根公司，Sugen, Inc., Redwood City, California)。

(7) 牛白蛋白(BSA)：第V部份粉末，A-8551，希格馬公司(Sigma Chemical Co., USA)。

(8) 經基因工程處理可表現人類PDGF-R之3T3細胞株。

方法

(1) 細胞接種在96孔板中含10% CS，2 mM Gln之DMEM中，每孔8000孔細胞。細胞於37℃及5% CO_2下培養一夜。

(2) 24小時後，以PBS洗滌細胞，於不含血清之培養基(0% CS DMEM，含0.1% PSA)中停止供應血清24小時。

(3) 第3天時，同時添加配位體(PDGF，3.8 nM，於含0.1% BSA之DMEM中製備)及試驗化合物至細胞中。陰性對照組孔僅接受不含血清但含0.1% BSA之DMEM，陽性對照組孔則接受配位體(PDGF)，但不接受試驗化合物。試驗化合物係於96孔板中，不含血清但含配位體之DMEM中製備，連續稀釋7種試驗濃度。

(4) 配位體活化20小時後，添加稀釋之BrkU標記試劑(1：100 DMEM，0.1% BSA)，細胞與BrdU(終濃度=10μM)培養1.5小時。

(5) 與標記試劑培養後，傾析排除培養基，板子反轉，於紙巾上拍打。添加FixDenat溶液(50微升/孔)，板子於室溫下之板振盪器上培養45分鐘。

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（187）

(6) 傾析徹底排除FixDenat溶液，反轉板子，於紙巾上拍打。添加牛奶(5%脫水奶粉含於PBS中，200微升/孔)作爲阻斷溶液，板子於室溫下之板振盪器上培養30分鐘。

(7) 傾析排除阻斷溶液，以PBS洗滌孔一次。添加抗-BrdU-POD溶液(於PBS中稀釋1：100，10% BSA)(100微升/孔)，板子於室溫下之板振盪器上培養90分鐘。

(8) 傾析徹底排除抗體共軛物，以PBS洗滌孔5次，板子反轉，以紙巾拍打乾燥。

(9) 添加TMB受質溶液(100微升/孔)，於室溫之板振盪器上培養20分鐘，直到顏色發展至足以進行光度測定爲止。

(10) 於Dynatech ELISA板讀數器上，於410 nm測定樣本吸光度(採"雙波長"法，以490 nm爲參考波長讀取濾墊讀數)。

EGF誘發之BrdU吸收分析法

材料與試劑

(1) EGF：小白鼠EGF，210，日本Toyobo公司。

(2) BrdU標識試劑；10 mM，含於PBS(pH 7.4)中，目錄No. 1 647 229，德國百靈藥廠。

(3) FixDenat：固定溶液(現成可用)，目錄No. 1 647 229，德國百靈藥廠。

(4) 抗-BrdU-POD：小白鼠單株抗體與過氧化酶之共軛物，目錄No. 1 647 229，德國百靈藥廠。

(5) TMB受質溶液：四甲基聯苯胺(TMB)，現成可用，目錄No. 1 647 229，德國百靈藥廠。

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（188）

(6) PBS洗滌液：1X PBS，pH 7.4(蘇根公司，Sugen, Inc., Redwood City, California)。

(7) 牛白蛋白(BSA)：第V部份粉末，A-8551，希格馬公司(Sigma Chemical Co., USA)。

(8) 經基因工程處理可表現人類EGF-R之3T3細胞株。

方法

(1) 細胞接種在96孔板中含10% CS，2 mM Gln之DMEM中，每孔8000孔細胞。細胞於37℃及5% CO_2下培養一夜。

(2) 24小時後，以PBS洗滌細胞，於不含血清之培養基(0% CS DMEM，含0.1% BSA)中停止供應血清24小時。

(3) 第3天時，同時添加配位體(EGF，2 nM，於含0.1% BSA之DMEM中製備)及試驗化合物至細胞中。陰性對照組孔僅接受不含血清但含0.1% BSA之DMEM，陽性對照組則接受配位體(EFG)，但不接受試驗化合物。試驗化合物係於96孔板中，不含血清但含配位體之DMEM中製備，連續稀釋7種試驗濃度。

(4) 配位體活化20小時後，添加稀釋之BrdU標記試劑(1：100 DMEM，0.1% BSA)，細胞與BrdU(終濃度=10μM)培養1.5小時。

(5) 與標記試劑培養後，傾析排除培養基，板子反轉，於紙巾上拍打。添加FixDenat溶液(50微升/孔)，板子於室溫下之板振盪器上培養45分鐘。

(6) 傾析徹底排除FixDenat溶液，反轉板子，於紙巾上拍打。添加牛奶(5%脫水奶粉含於PBS中，200微升/孔)作爲

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（189）

阻斷溶液，板子於室溫下之板振盪器上培養30分鐘。

(7) 傾析排除阻斷溶液，以PBS洗滌孔一次。添加抗-BrdU-POD溶液(於PBS中稀釋1：100，1% BSA)(100微升/孔)，板子於室溫下之板振盪器上培養90分鐘。

(8) 傾析徹底排除抗體共軛物，以PBS洗滌孔5次，板子反轉，以紙巾拍打乾燥。

(9) 添加TMB受質溶液(100微升/孔)，於室溫之板振盪器上培養20分鐘，直到顏色發展至足以進行光度測定爲止。

(10) 於Dynatech ELISA板讀數器上，於410 nm測定樣本吸光度(採"雙波長"法，以490 nm爲參考波長讀取濾墊讀數)。

EGF誘發Her2-驅動之BrdU吸收分析法

材料與試劑

(1) EGF：小白鼠EGF，210，日本Toyobo公司。

(2) BrdU標識試劑；10 mM，含於PBS(pH 7.4)中，目錄No. 1 647 229，德國百靈藥廠。

(3) FixDenat：固定溶液(現成可用)，目錄No. 1 647 229，德國百靈藥廠。

(4) 抗-BrdU-POD：小白鼠單株抗體與過氧化酶之共軛物，目錄No. 1 647 229，德國百靈藥廠。

(5) TMB受質溶液：四甲基聯苯胺(TMB)，現成可用，目錄No. 1 647 229，德國百靈藥廠。

(6) PBS洗滌液：1X PBS，pH 7.4，室內製備。

(7) 牛白蛋白(BSA)：第V部份粉末，A-8551，希格馬公

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（190）

司(Sigma Chemical Co., USA)。

(8) 經基因工程處理可表現具有EGF-R之細胞外區與Her2之細胞內區之嵌合受體之3T3細胞株。

方法

(1) 細胞接種在96孔板中含10% CS，2 mM Gln之DMEM中，每孔8000個細胞。細胞於37℃及5% CO_2下培養一夜。

(2) 24小時後，以PBS洗滌細胞，於不含血清之培養基(0% CS DMEM，含0.1% BSA)中停止供應血清24小時。

(3) 第3天時，同時添加配位體(EGF，2 nM，於含0.1% BSA之DMEM中製備)及試驗化合物至細胞中。陰性對照組孔僅接受不含血清但含0.1% BSA之DMEM，陽性對照組則接受配位體(EGF)，但不接受試驗化合物。試驗化合物係於96孔板中，不含血清但含配位體之DMEM中製備，連續稀釋7種試驗濃度。

(4) 配位體活化20小時後，添加稀釋之BrdU標記試劑(1：100 DMEM，0.1% BSA)，細胞與BrdU(終濃度=10μM)培養1.5小時。

(5) 與標記試劑培養後，傾析排除培養基，板子反轉，於紙巾上拍打。添加FixDenat溶液(50微升/孔)，板子於室溫下之板振盪器上培養45分鐘。

(6) 傾析徹底排除FixDenat溶液，反轉板子，於紙巾上拍打。添加牛奶(5%脫水奶粉於PBS中，200微升/孔)作爲阻斷溶液，板子於室溫下之板振盪器上培養30分鐘。

(7) 傾析排除阻斷溶液，以PBS洗滌孔一次。添加抗-

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（191）

BrdU-POD溶液（於PBS中稀釋1：100，1% BSA)(100微升/孔)，板子於室溫下之板振盪器上培養90分鐘。

(8) 傾析徹底排除抗體共軛物，以PBS洗滌孔5次，板子反轉，以紙巾拍打乾燥。

(9) 添加TMB受質溶液(100微升/孔)，於室溫之板振盪器上培養20分鐘，直到顏色發展至足以進行光度測定爲止。

(10) 於Dynatech ELISA板讀數器上，於410 nm測定樣本吸光度(採"雙波長"法，以490 nm爲參考波長讀取濾墊讀數)。

IGF1誘發之BrdU吸收分析法

材料與試劑

(1) IGF1配位體：人類，重組體，G511，美國普美加公司(Promega Corp. USA)。

(2) BrdU標識試劑；10 mM，含於PBS(pH 7.4)中，目錄No. 1 647 229，德國百靈藥廠。

(3) FixDenat：固定溶液(現成可用)，目錄No. 1 647 229，德國百靈藥廠。

(4) 抗-BrdU-POD：小白鼠單株抗體與過氧化酶之共軛物，目錄No. 1 647 229，德國百靈藥廠。

(5) TMB受質溶液：四甲基聯苯胺(TMB)，現成可用，目錄No. 1 647 229，德國百靈藥廠。

(6) PBS洗滌液：1X PBS，pH 7.4(蘇根公司，Sugen, Inc., Redwood City, California)。

(7) 牛白蛋白(BSA)：第V部份粉末，A-8551，希格馬公

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（192）

司(Sigma Chemical Co., USA)。

(8) 經基因工程處理可表現人類IGF-1受體之3T3細胞株。

方法

(1) 細胞接種在96孔板中含10% CS，2 mM Gln之DMEM中，每孔8000個細胞。細胞於37℃及5% CO_2下培養一夜。

(2) 24小時後，以PBS洗滌細胞，於不含血清之培養基(0% CS DMEM，含0.1% BSA)中停止供應血清24小時。

(3) 第3天時，同時添加配位體(IGF1=3.3 nM，於含0.1% BSA之DMEM中製備)及試驗化合物至細胞中。陰性對照組孔僅接受不含血清但含0.1% BSA之DMEM，陽性對照組細胞則接受配位體(IGF1)，但不接受試驗化合物。試驗化合物係於96孔板中，不含血清但含配位體之DMEM中製備，連續稀釋7種試驗濃度。

(4) 配位體活化16小時後，添加稀釋之BrdU標記試劑(1：100 DMEM，0.1% BSA)，細胞與BrdU(終濃度=10μM)培養1.5小時。

(5) 與標記試劑培養後，傾析排除培養基，板子反轉，於紙巾上拍打。添加FixDenat溶液(50微升/孔)，板子於室溫下之板振盪器上培養45分鐘。

(6) 傾析徹底排除FixDenat溶液，反轉板子，於紙巾上拍打。添加牛奶(5%脫水奶粉於PBS中，200微升/孔)作爲阻斷溶液，板子於室溫下之板振盪器上培養30分鐘。

(7) 傾析排除阻斷溶液，以PBS洗滌孔一次。添加抗-

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（193）

BrdU-POD溶液（於PBS中稀釋1：100，1% BSA)(100微升/孔)，板子於室溫下之板振盪器上培養90分鐘。

(8) 傾析徹底排除抗體共軛物，以PBS洗滌孔5次，板子反轉，以紙巾拍打乾燥。

(9) 添加TMB受質溶液(100微升/孔)，於室溫之板振盪器上培養20分鐘，直到顏色發展至足以進行光度測定為止。

(10) 於Dynatech ELISA板讀數器上，於410 nm測定樣本吸光度(採"雙波長"法，以490 nm為參考波長讀取濾墊讀數)。

FGF誘發之BrdU吸收分析法

材料與試劑

1. FGF：人類FGF2/bFGF (奇布可公司No. 13256-029)。

2. BrdU標識試劑；10 mM含於PBS(pH 7.4)中，目錄No. 1 647 229，德國百靈藥廠。

3. FixDenat：固定溶液，目錄No. 1 647 229，德國百靈藥廠。

4. 抗-BrdU-POD：小白鼠單株抗體與過氧化酶之共軛物，目錄No. 1 647 229，德國百靈藥廠。

5. TMB：四甲基聯苯胺，目錄No. 1 647 229，德國百靈藥廠。

6. PBS洗滌液：1X PBS，pH 7.4(蘇根公司，Sugen, Inc.)。

7. 牛白蛋白(BSA)：第V部份粉末，目錄No. A-8551，希格馬公司(Sigma Chemical Co., USA)。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（194）

方法

1. 3T3基因工程處理細胞株：3T3c7/EGFr。

2. 細胞接種在96孔板中含10% CS，2 mM Gln之DMEM中，每孔8000個細胞。細胞於37℃及5% CO_2下培養一夜。

3. 24小時後，以PBS洗滌細胞，於不含血清之培養基(0% CS DMEM，含0.1% BSA)中停止供應血清24小時。

4. 同時添加配位體(FGF2，1.5 nM，於含0.1% BSA之DMEM中製備)及試驗化合物。陰性對照組孔僅接受不含血清但含0.1% BSA之DMEM，陽性對照組孔則接受FGF2配位體，但不接受試驗化合物。試驗化合物係於96孔板中，不含血清但含配位體之DMEM中製備，連續稀釋7種試驗濃度。

5. 20小時後，添加稀釋之BrkU標記試劑(1：100 BrdU：DMEM，0.1% BSA，終濃度=10μM)至細胞中，培養1.5小時。

6. 傾析培養基，以紙巾排除微量物質。添加FixDenat溶液(50微升/孔)，板子於室溫下之板振盪器上培養45分鐘。

7. 排除FixDenat溶液。添加阻斷溶液(5%脫水奶粉含於PBS中，200微升/孔)，於室溫下之板振盪器上培養30分鐘。

8. 傾析阻斷溶液，以PBS洗滌孔一次。添加抗-BrdU-POD溶液(於PBS中稀釋1：100，1% BSA)，於室溫下之板振盪器上培養90分鐘。

9. 傾析除抗體共軛物，以PBS洗滌孔5次，板子反轉，以紙巾拍打乾燥。

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（ 195 ）

10. 添加TMB受質溶液(100微升/孔)，於室溫之板振盪器上培養20分鐘，直到顏色發展至足以進行光度測定為止。

11. 於Dynatech ELISA板讀數器上，於410 nm測定樣本吸光度(採"雙波長"法，以490 nm為參考波長讀取濾墊讀數)。

生化EGFR分析法

此分析法使用ELISA於試管內測定EGFR之激酶活性。

材料與試劑

1. 康寧96孔ELISA板(康寧目錄No. 25805-96)。

2. SUMO1單株抗-EGFR抗體(蘇根公司生化實驗室)。

3. PBS(杜氏磷酸鹽緩衝食鹽水，奇布可目錄No. 450-1300 EB)。

4. TBST緩衝液

試劑	分子量	操作濃度	每升含量
Tris	121.14	50 mM	6.057克
NaCl	58.44	150 mM	8.766克
Triton X-100	NA	0.1%	1.0毫升

5. 阻斷緩衝液：

試劑	分子量	操作濃度	每100毫升用量
康乃馨牌即溶脫脂奶粉		5%	5.0克
PBS	NA	NA	100毫升

6. A431細胞溶胞液(蘇根公司篩選實驗室(Screening Lab., SUGEN, Inc.))。

7. TBS緩衝液：

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（196）

試劑	分子量	操作濃度	每升用量
Tris	121.14	50 mM	6.057克
NaCl	58.44	150 mM	8.766克

8. TBS+10 % DMSO

試劑	分子量	操作濃度	每升用量
Tris	121.14	50 mM	1.514克
NaCl	58.44	150 mM	2.192克
DMSO	NA	10%	25毫升

9. 腺苷-5'-三磷酸(ATP，來自馬肌肉，希格馬目錄No. A-5394)。

於dH_2O中製成1.0 mM溶液。此試驗應於臨用前方製備，並保持在冰上。

10. $MnCl_2$。

於dH_2O中製備1.0 M母液。

11. ATP/$MnCl_2$磷酸化混合物

試劑	母液	每10毫升用量	操作濃度
ATP	1.0 mM	300微升	30 μM
$MnCl_2$	1.0 M	500微升	50 mM
dH_2O			9.2毫升

此試劑應於臨用前方製備，並保持在冰上。

12. NUNC 96孔V型底聚丙烯板(應用科學目錄No. AS-72092)。

13. 乙二胺四乙酸(EDTA)

於dH_2O中製備200 mM操作溶液。以10 N NaOH調至

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（197）

pH 8.0。

14. 兔子多株抗磷酸酪胺酸血清(蘇根公司生化實驗室)

15. 山羊抗兔子IgG過氧化酶共軛物(生物資源公司(Biosource)目錄No. ALI0404)。

16. ABTS(2,2'-連氮基-雙(3-乙基苯幷噻唑啉-6-磺酸)，希格馬目錄No. A-1888)。

試劑	分子量	操作濃度	每升用量
檸檬酸	192.12	100 mM	19.21克
Na_2HPO_4	141.96	250 mM	35.49克
ABTS	NA	0.5毫克/毫升	500毫克

於約900毫升dH_2O中混合前2種成份，以磷酸調至pH 4.0。添加ABTS，加蓋，靜置約0.5小時，過濾。溶液應保存在4℃暗處直到使用前爲止。

17. 過氧化氫30%溶液(費雪目錄No. H325)。

18. ABTS/H_2O_2

混合15毫升ABTS溶液與2.0微升H_2O。臨用前5分鐘才製備。

19. 0.2 M HCl。

方法

1. 以含於100微升PBS之每孔0.5微克SUMO1塗佈康寧96孔ELISA板，於4℃下保存一夜。

2. 反轉板子排除液體，以排除孔中未結合之SUMO1。於紙巾上拍打板子，以排除過量液體。

3. 在各孔中添加150微升阻斷緩衝液。於室溫下振盪培

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（198）

養30分鐘。

4. 以去離子水洗滌板子3次，然後以TBST洗滌一次。板子於紙巾上拍打，以排除過量液體與汽泡。

5. 於PBS中稀釋溶胞液(7微克溶胞液/100微升PBS)。

6. 在各孔中添加100微升稀釋之溶胞液。於室溫下振盪60分鐘。

7. 依上述(4)之步驟洗滌板子。

8. 添加120微升TBS至含有捕捉之EGFR之ELISA板子中。

9. 於96孔聚丙烯板中，以TBS稀釋試驗化合物1：10(亦即10微升化合物+90微升TBS)。

10. 添加13.5微升稀釋之試驗化合物至ELISA板中。對照組孔(即不接受任何試驗化合物之孔)中則添加13.5微孔TBS + 10% DMSO。

11. 於室溫下振盪培養30分鐘。

12. 直接添加15微升磷酸化混合物至各孔中，但陰性對照組除外，該孔中不接受ATP/$MnCl_2$(孔中終體積應約150微升，各孔終濃度3μM ATP/5 mM $MnCl_2$)。振盪培養5分鐘。

13. 5分鐘後，添加16.5微升200 mM EDTA(pH 8.0)至各孔中，以中止反應，並持續振盪。添加EDTA後，振盪1分鐘。

14. 以去離子水洗滌4次，以TBST洗滌2次。

15. 每孔中添加100微升抗磷酸酪胺酸(於TBST中稀釋1：3000)。於室溫下振盪培養30至45分鐘。

16. 依上述第(4)步驟所述滌滌。

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（199）

17. 在各孔中添加100微升生物資源公司之山羊抗兔子IgG過氧化酶共軛物(於TBST中稀釋1：2000)。於室溫下振盪培養30分鐘。

18. 依上述第(4)步驟洗滌。

19. 在各孔中添加100微升ABTS/H_2O_2溶液。

20. 振盪培養5至10分鐘。排除任何汽泡。

21. 若必要時，每孔添加100微升0.2 M HCl中止反應。

22. 於Dynatech MR 7000 ELISA讀數器上讀取分析數值。試驗濾墊：410 nm，參考濾墊：630 nm。

生化PDGFR分析法

此分析法採用ELISA於試管內測定PDGFR之激酶活性。

材料與試劑

除非另有說明，否則下列試劑之操作溶液製法與上述生化EGFR分析法相同。

1. 康寧96孔ELISA板(康寧目錄No. 25805-96)。

2. 28D4C10單株抗-PDGFR抗體(蘇根公司生化實驗室)。

3. PBS(杜氏磷酸鹽緩衝食鹽水，奇布可目錄No. 450-1300EB)。

4. TBST緩衝液。

5. 阻斷緩衝液。

6. 表現PDGFR-β之NIH 3T3細胞溶胞液(蘇根公司篩選實驗室)。

7. TBS緩衝液。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（200）

8. TBS + 10% DMSO。

9. 腺苷-5'-三磷酸(ATP，來自馬肌肉，希格馬目錄No. A-5394)。

10. $MnCl_2$。

11. 激酶緩衝液磷酸化混合物。

試劑	母液	每10毫升含量	操作濃度
Tris	1 M	250 微升	25 mM
NaCl	5 M	200 微升	100 mM
$MnCl_2$	1 M	100 微升	10 mM
TX-100	100 mM	50 微升	0.5 mM

12. NUNC 96孔V型底聚丙烯板(應用科學目錄No. AS-72092)。

13. 乙二胺四乙酸(EDTA)。

14. 兔子多株抗磷酸酪胺酸血清(蘇根公司生化實驗室)。

15. 山羊抗兔子IgG過氧化酶共軛物(生物資源目錄No. ALI 0404)。

16. 2,2'-連氮基-雙(3'-乙基苯幷噻唑啉-6-磺酸)(ABTS，希格馬目錄No. A-1888)。

17. 過氧化氫30%溶液(費雪目錄No. H325)。

18. ABTS/H_2O_2

19. 0.2 M HCl。

方法

1. 以含於100微升PBS之每孔0.5微克28D4C10塗佈康寧

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（201）

96孔ELISA板，於4℃下保存一夜。

2. 反轉板子排除液體，以排除孔中未結合之28D4C10。以dH_2O洗滌1次。於紙巾上拍打板子，以排除過量液體。

3. 在各孔中添加150微升阻斷緩衝液。於室溫下振盪培養30分鐘。

4. 以去離子水洗滌板子3次，然後以TBST洗滌一次。板子於紙巾上拍打，以排除過量液體與汽泡。

5. 於HNTG中稀釋溶胞液(10微克溶胞液/100微升HNTG)。

6. 在各孔中添加100微升稀釋之溶胞液。於室溫下振盪60分鐘。

7. 依上述(4)之步驟洗滌板子。

8. 添加80微升操作激酶緩衝液至含有捕捉之PDGFR之ELISA板子中。

9. 於96孔聚丙烯板中，以TBS稀釋試驗化合物1：10(亦即10微升化合物+90微升TBS)。

10. 添加10微升稀釋之試驗化合物至ELISA板中。對照組孔(即不接受任何試驗化合物之孔)中則添加10微升TBS + 10% DMSO。

11. 於室溫下振盪培養30分鐘。

12. 直接添加10微升ATP至各孔中，但陰性對照組除外，(各孔中終體積應約100微升，20μM ATP)。振盪培養30分鐘。

13. 30分鐘後，添加10微升200 mM EDTA(pH 8.0)至各孔

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（202）

中，以中止反應。

14. 以去離子水洗滌4次，以TBST洗滌2次。

15. 每孔中添加100微升抗磷酸酪胺酸(於TBST中稀釋1：3000)。於室溫下振盪培養30至45分鐘。

16. 依上述第(4)步驟所述洗滌。

17. 在各孔中添加100微升生物資源公司之山羊抗兔子IgG過氧化酶共軛物(於TBST中稀釋1：2000)。於室溫下振盪培養30分鐘。

18. 依上述第(4)步驟洗滌。

19. 在各孔中添加100微升ABTS/H_2O_2溶液。

20. 振盪培養10至30分鐘。排除任何汽泡。

21. 若必要時，每孔添加100微升0.2 M HCl中止反應。

22. 於Dynatech MR 7000 ELISA讀數器上讀取分析數值。試驗濾墊：410 nm，參考濾墊：630 nm。

生化FGFR分析法

此分析法採用ELISA於試管內測定Myc-GyrB-FGFR融合蛋白質之激酶活性。

材料與試劑

1. HNTG

試劑	分子量	5x母液濃度	每升用量	1x操作濃度
HEPES	238.3	100 mM	23.83克	20 mM
NaCl	58.44	750 mM	43.83克	150 mM
甘油	NA	50%	500毫升	10%
Triton X-100	NA	5%	10毫升	1.0%

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（203）

製備1升5x母液時，取HEPES及NaCl溶於約350毫升dH_2O，以HCl或NaOH調至pH 7.2(依採用之HEPES而定)，添加甘油，Triton X-100，然後添加dH_2O補充體積。

2. PBS(杜氏磷酸鹽緩衝食鹽水，奇布可目錄# 450-1300 EB)。

3. 阻斷緩衝液。

4. 激酶緩衝液。

試劑	分子量	10x母液濃度	1x操作濃度
HEPES (pH 7.2)	238.3	500 mM	50 mM
$MnCl_2$		20 mM	2 mM
$MgCl_2$	203.32	200 mM	10 mM
Triton-X-100		1%	0.1%
DTT	380.35	5 mM	0.5 mM

5. 苯甲磺醯氟(PMSF，希格馬目錄# P-7626)

操作溶液：100 mM乙醇溶液

6. ATP(來自細菌，希格馬目錄No. A-7699)

每升使用3.31毫克MilliQ H_2O，配成母液濃度6 mM。

7. 生物素共軛抗磷酸酪胺酸mab(純系4G10，奧普生物科技公司(Upstate Biotechnology)目錄No. 16-103，序號14495)。

8. Vectastain Elite ABC試劑(抗生物素蛋白過氧化酶共軛物，菲特實驗室(Vector Laboratories)目錄No. PK-6 100)。

9. ABTS溶液。

10. 過氧化氫30%溶液(費雪目錄# H325)。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（204）

11. ABTS/H_2O_2。

12. 0.2 M HCl。

13. TRIS HCl(費雪目錄No. BP 152-5)。

於MilliQ H_2O中製備1.0 mM溶液，以HCl調至pH 7.2。

14. NaCl(費雪目錄No. S271-10)。

於MilliQ H_2O中製備5 M溶液。

15. $MgCl_2$(費雪目錄No. M33-500)。

於MilliQ H_2O中製備1 M溶液。

16. HEPES(費雪目錄No. BP310-500)。

於MilliQ H_2O中製備1 M溶液，調至pH 7.5，無菌過濾。

17. TBST緩衝液。

18. 碳酸鈉緩衝液(費雪目錄No. S495)。

於MilliQ H_2O中製備0.1 M溶液，以NaOH調至pH 9.6，過濾。

19. 二硫異赤蘚糖醇(DTT，費雪目錄No. BP172-25)。

臨用前方於MilliQ H_2O中製備0.5 M操作溶液。存放在-20℃下直到使用時爲止，剩餘部份均丟棄。

20. $MnCl_2$。

21. Triton X-100。

22. 山羊α-兔子IgG(卡波公司)。

23. 親和性純化之兔子α GST GyrB(蘇根公司生化實驗室)。

方法

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（205）

下列所有步驟均在室溫下進行，除非另有說明。

1. 以含在碳酸鹽緩衝液中之每孔2微克山羊α-兔子抗體塗佈康寧96孔ELISA板，使孔中總體積爲100微升。於4℃下存放一夜。

2. 板子反轉排除液體，以排除未結合之山羊α-兔子抗體。板子於紙巾上拍打，以排除過量液體與汽泡。

3. 添加150微升阻斷緩衝液(5%低脂奶粉溶於PBS中)至各孔中。於微滴定板振盪器上振盪培養30分鐘。

4. 以TBST洗滌4次。板子於紙巾上拍打，以排除過量液體與汽泡。

5. 每孔中添加0.5微克兔子α-GyrB抗體，於DPBS中稀釋抗體，至每孔終體積100微升。於室溫下之微滴定板振盪器上振盪培養1小時。

6. 依步驟4所述，以TBST洗滌4次。

7. 各孔中添加含於HNTG中之2微克COS/FGFR細胞溶胞液(Myc-GyrB-FGFR來源)，每孔終體積100微升。於微滴定板振盪器上振盪培養1小時。

8. 依步驟4所述，以TBST洗滌4次。

9. 每孔添加80微升1x激酶緩衝液。

10. 於聚丙烯96孔板中，以1x激酶緩衝液+1% DMSO稀釋試驗化合物1：10。

11. 自聚丙烯板之孔中取10微升稀釋之試驗化合物溶液及對照組溶液移至相應之ELISA板之孔中，於微滴定板振盪器上振盪培養20分鐘。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（206）

12. 添加10微升於激酶緩衝液中稀釋之70μM ATP至陽性對照組及試驗組孔中(ATP終濃度爲7μM/孔)。添加10微升1x激酶緩衝液至陰性對照組孔中。於微滴定板振盪器上振盪培養15分鐘。

13. 所有孔均添加5微升0.5 M EDTA中止激酶反應。

14. 依步驟4所述，以TBST洗滌4次。

15. 各孔中添加於TBST中稀釋之100微升生物素共軛α-磷酸酪胺酸mab(b4G10)。於微滴定板振盪器上振盪培養10分鐘。

16. 製備Vectastain ABC試劑。滴加1滴試劑A至15毫升TBST中。反轉試管混合數次。滴加1滴試劑B，再混合一次。

17. 依步驟4所述，以TBST洗滌4次。

18. 各孔中添加100微升ABC HRP試劑。於微滴定板振盪器上振盪培養30分鐘。

19. 依步驟4所述，以TBST洗滌4次。

20. 各孔中添加100微升ABST/H_2O_2溶液。

22. 振盪培養5至15分鐘。排除任何汽泡。

23. 若必要時，添加100微升0.2 M HCl/孔，中止反應。

24. 於Dynatech MR7000 ELISA板讀數器上讀取分析數值，試驗濾墊：410 nm，參考濾墊：630 nm。

<u>生化FLK-1分析法</u>

此分析法採用FLISA於試管內分析flk-1自體磷酸化活性。

材料與試劑

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（207）

1. 15公分組織培養皿。

2. Flk-1/NIH細胞：過度表現人類flk-1純系3之NIH纖維母細胞株(蘇根公司，得自德國MPI公司(MPI，Martinsried, Germany))。

3. 生長培養基：DMEM加10%熱去活性FBS及2 mM麩醯胺(奇布可公司)。

4. 斷食培養基：DMEM加0.5%熱去活性TBS，2 mM麩醯胺(奇希可公司)。

5. 康寧96孔ELISA板(康寧目錄No. 25805-96)。

6. 針對flk-1之L4或E38單株專一性抗體，經蛋白質A瓊脂糖親和性層析法純化(蘇根公司)。

7. PBS(杜氏磷酸鹽緩衝食鹽水)，奇布可目錄No. 450-1300EB)。

8. HNTG(其製法參見BIOCHEMICAL FGFR)。

9. 皮爾斯BCA蛋白質測定套組。

10. 阻斷緩衝液。

11. TBST (pH 7.0)。

12. 激酶緩衝液。

13. 激酶中止溶液：200 mM EDTA。

14. 生物素基化4G10，針對磷酸酪胺酸(UBI，目錄No. 16-103)。

15. AB套組(菲特實驗室目錄No. PK 4000)。

16. DMSO

17. NUNC 96孔V型底聚丙烯板(應用科學公司目錄No.

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（208）

AS-72092)。

18. Turbo-TMB(皮爾斯公司)。

19. Turbo-TMB中止溶液：1 M H_2OS_4。

20. ATP(希格馬目錄No. A-7699)。

21. 20% DMSO含於TBS中(pH 7.0)。

方法

細胞生長及溶胞液製法

1. 接種細胞至生長培養基中，於37℃及5% CO_2下生長至90至100%融合度。不要轉移20次以上。

2. 排除培養基，以PBS洗滌細胞2次。以HNTG溶胞緩衝液溶解細胞。收集所有溶胞液，渦轉混合20至30秒。

3. 離心排除不溶物(於約10,000 x g下5至10分鐘)。

4. 採用BCA套組測定蛋白質濃度。

5. 溶胞液以1毫克分裝，存放在-80℃下。

分析法

1. 以含於100微升PBS之每孔2微克純化之L4(或E38)塗佈康寧96孔ELISA板，於4℃下保存一夜。

2. 反轉板子排除液體，以排除孔中未結合之蛋白質。以dH_2O洗滌1次。於紙巾上拍打板子，以排除過量液體。

3. 在各孔中添加150微升阻斷緩衝液。於4℃下振盪培養45至60分鐘。

4. 排除阻斷緩衝液，以去離子水洗滌板子3次，然後以TBST洗滌一次。板子於紙巾上拍打，以排除過量液體。

5. 於PBS中稀釋溶胞液，終濃度爲50微克/100微升。各

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（209）

孔中加100微升稀釋之溶胞液。於4℃下振盪培養一夜。

6. 反轉板子，以排除孔中未結合之蛋白質。依步驟4所述洗滌。

7. 添加80微升激酶緩衝液至孔中(陰性對照組中添加90微升)。

8. 在含20% DMSO之PBS溶液之聚丙烯板之孔中稀釋試驗化合物(通常10倍)。

9. 添加10微升稀釋化合物至含固定化flk-1之ELISA孔中，並振盪。對照組孔中則不接受化合物。

10. 由1 mM ATP母液，使用dH_2O製備0.3 mM ATP溶液(或可使用激酶緩衝液製備)。

11. 除了陰性對照組外，各孔中均添加10微升0.3 mM ATP。於室溫下振盪培養60分鐘。

12. 1小時後，添加11微升200 mM EDTA中止激酶反應。振盪1至2分鐘。

13. 以dH_2O洗滌ELISA板4次，以TBST洗滌2次。

14. 在所有孔中均添加100微升1：5000生物素基化4G10：TBST。於室溫下振盪培養45分鐘。

15. 上述培養過程期間，添加50微升來自ABC套組之A與B溶液至10毫升TBST中。此等溶液必須在使用前約30分鐘方可組合。

16. 依步驟4所述洗滌板子。

17. 所有孔中均添加100微升預先形成之A & B錯合物。於室溫下振盪培養30分鐘。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（210）

18. 依步驟4洗滌板子。

19. 添加100微升turbo-TMB。於室溫下振盪培養10至15分鐘。

20. 當陽性對照組孔中顏色達吸光度約0.35至0.4時，以100微升turbo-TMB中止反應溶液中止反應。

21. 於Dynatech MR7000 ELISA讀數器上讀取分析數值。試驗濾墊：450 nM，參考濾墊：410 nM。

HUV-EC-C分析法

亦採用下列方法來測定化合物對抗PDGF-R、FGF-R、VEGF、aFGF或Flk-1/KDR之活性，其均於HUV-EC細胞中天然表現。

第0天

1. 洗滌HUV-EC-C細胞(人類臍靜脈內皮細胞，美國菌種培養物收集處，目錄No. 1730 CRL)，以胰蛋白酶處理。以杜氏磷酸鹽緩衝食鹽水(D-PBS，得自奇布可公司，目錄No. 14190-029)洗滌2次，約1毫升/10公分^{2}組織培養瓶。以含於非酵素性細胞解離溶液之0.05%胰蛋白酶-EDTA(希格馬化學公司，目錄No. C-1544)處理。由0.25%胰蛋白酶/1 mM EDTA(奇布可公司，目錄No. 25200-049)於細胞解離溶液中稀釋，製成0.05%胰蛋白酶。以約1毫升/25至30公分^{2}組織培養瓶，於37℃下進行胰蛋白酶處理約5分鐘。細胞自燒瓶上剝離後，添加等體積之分析培養基，移至50毫升無菌離心管(費雪科技，目錄No. 05-539-6)。

2. 於50毫升無菌離心管中，以約35毫升分析培養基洗

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（211）

滌細胞，其係添加分析培養基，於約200 x g離心10分鐘，吸出上澄油，使用35毫升D-PBS再懸浮。再以D-PBS重覆洗滌2次，細胞再懸浮於約1毫升分析培養基/15公分^{2}組織培養瓶中。分析培養基包括F12K培養基(奇布可公司，目錄No. 21127-014)及0.5%熱去活性之胎牛血清。使用考特計數器(Coulter Counter®)(考特電子公司(Coulter Electronics, Inc.)計算細胞數，並添加分析培養基至細胞中，得到濃度0.8-1.0 x 10^5個細胞/毫升。

3. 添加細胞至96孔平底板中，100微升/孔或0.8至1.0 x 10^4個細胞/孔，於37℃及5% CO_2下培養約24小時。

第1天

1. 在另一個96孔板上，製備2倍試驗化合物滴定濃度，通常為50 μM下降至0 μM。採用上述第0天第2步驟之相同分析培養基。滴定過程係添加90微升/孔200 μM試驗化合物(孔中終濃度之4倍)至特殊多層培養板之上層孔中。由於試驗化合物母液通常於含於DMSO中之20 mM溶液，因此200 μM藥物濃度含有2% DMSO。

採用以分析培養基(F12K+0.5%胎牛血清)稀釋至2% DMSO之稀釋液作為滴定試驗化合物之稀釋液，以稀釋試驗化合物，但保持DMSO濃度恆定。添加此稀釋液至其餘各層孔中，60微升/孔。自多層孔之上層孔中120微升200 μM試驗化合物稀釋液取60微升，與多層孔之第二層孔中60微升混合。自此孔取60微升，與多層孔之第三層孔中60微升混合，依此類推，直到完成兩倍稀釋為止。當混合倒數第二

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（212）

層孔時，自此孔中120微升取出60微升並丟棄。留下最後一個孔含有60微升DMSO/培養基稀釋液作爲不含試驗化合物之對照物。製成九層經滴定之試驗化合物，足以供三重覆分析：(1) VEGF(得自必普技術公司(Pepro Tech Inc.)，目錄No. 100-200，(2)內皮細胞生長因子(ECGF)(亦稱爲酸性纖維母細胞生長因子，或aFGF)(來自百靈藥廠(Boehringer Mannheim Biochemica)，目錄No. 1439 600)，或(3)人類PDGF B/B(1276-956，德國百靈藥廠)，及分析培養基對照組。ECGF爲使用肝素鈉之製劑。

2. 第0天時，取50微升/孔試驗化合物稀釋液移至含0.8至1.0×10^4個第0天之HUV-EC-C細胞/100微升/孔之96孔分析板中，於37℃及5% CO_2下培養約2小時。

3. 在三重覆中，對各試驗化合物條件添加50微升/孔之80微克/毫升VEGF，20毫微克/毫升ECGF或培養基對照組。試驗化合物組中，生長因子濃度爲所需終濃度之4倍。採用第0天第2步驟之分析培養基製備生長因子濃度。於37℃，5% CO_2下培養約24小時。各孔將含有50微升試驗化合物稀釋液，50微升生長因子或培養基，及100微升細胞，經計算共200微升/孔。因此當所有材料均加至孔中後，試驗化合物濃度爲4倍，生長因子爲1倍。

第2天

1. 添加^{3}H-胸苷(艾莫珊(Amersham)，目錄no，TRK-686)，1 μCi/孔(於RPMI培養基 + 10%熱去活性胎牛血清中配成100 μCi/毫升溶液，取10微升/孔)，於37℃，5% CO_2

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（213）

下培養約24小時。PRMI來自奇布可公司，目錄No. 11875-051。

第3天

1. 培養板於-20℃下冷凍一夜。

第4天

板子解凍，以96孔板收集器（湯狄克收集器(Tomtec Harvester 96®)收集在濾墊（華克公司，目錄No. 1205-401）上，於華克貝他板™液相閃爍計數器上計數。

活體內動物模式

外來移植物動物模式

人類腫瘤於無胸腺小白鼠（例如：Balb/c，nu/nu）中呈外來移植物形式生長之能力可作爲活體內研究治療人類腫瘤之生物反應之適用模式。自從人類腫瘤外來移植物第一次成功移植至無胸腺小白鼠體內後（李加德(Rygaard)與波森(Povlsen), 1969, Acta Pathol. Microbial. Scand. 77:758-760），已移殖過許多不同人類腫瘤細胞株（例如：乳房、肺、生殖泌尿器、胃腸、頭與頸、神經膠質母細胞瘤、骨骼、及惡性黑色素瘤），且於無毛小白鼠體內成功生長。可採用下列分析法來測定本發明不同化合物之活性程度、專一性及影響。有三種一般分析法適用於評估化合物：細胞/催化性、細胞/生物性及活體內。細胞/催化性分析法之目的爲測定化合物對TK使細胞中已知受質上酪胺酸進行磷酸化之能力之影響。細胞/生物分析法之目的爲測定化合物對細胞中受TK刺激之生物效應之影響。活體內分析法之目的爲

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（214）

測定化合物在特定病變(如：癌症)之動物模式中之影響。

適合皮下外來移植物實驗之細胞株包括C6細胞(神經膠質，ATCC # CCL 107)，A375細胞)黑色素瘤，ATCC # CRL 1619)，A431細胞(表皮樣癌瘤，ATCC # CRL 1555)，Calu 6細胞(肺，ATCC # HTB 56)，PC3細胞(攝護腺，ATCC # CRL 1435)，SKOV3TP5細胞及經基因工程處理可過度表現EGFR、PDGFR、IGF-1R或其他試驗激酶之NIH 3T3纖維母細胞。採用下列方法進行外來移植物實驗：

自西蒙森實驗室(Simonsen Laboratories ,Gilroy, CA)取得雌性無胸腺細胞(BALB/c，nu/nu)。所有動物均保持在乾淨室內條件下之鋪設α-dri底層之微隔離籠中。接受無菌老鼠飼料及自由飲水。

細胞株於適當培養基中生長(例如：MEM，DMEM，Ham's F10，或Ham's F12 + 5%至10%胎牛血清(FBS)及2 mM麩醯胺(GLN))。所有培養基、麩醯胺、及胎牛血清均購自奇布可生命科技(Gibco Life Technologies, Grand Island, NY)，除非另有說明。所有細胞均於90至95%空氣與5至10% CO_2之潮濕大氣下，於37℃下生長。所有細胞照例每週次培養二次，並由Mycotect法(奇布可公司)判定沒有黴漿菌存在。

於融合時或接近融合時，以0.05%胰蛋白酶-EDTA收集細胞，於450 x g下離心10分鐘集結成塊。離心塊再懸浮於無菌PBS或培養基(不含FBS)中，至達特定濃度，細胞移植至小白鼠後腹部(每組8至10隻小白鼠，2至10×10^6個細胞/隻)。採用測徑器測量腫瘤體積3至6週。以腫瘤長度×寬×

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（215）

高計算腫瘤體積，除非另有說明。採用史都登t-試驗計算p值。含於50至100微升賦形劑(DMSO，或VPD：D5W)中之試驗化合物通常係於移植後第1天開始，依不同濃度進行IP注射。

腫瘤侵害模式

已發展出下列腫瘤侵害模式，用於評估所鑑定化合物在選擇性抑制KDR/FLK-1受體上之醫療價值及效力。

方法

採用8週大無毛小白鼠(雌性)(西蒙森公司)作爲實驗動物。腫瘤細胞之植入法可於通風櫥中進行。麻醉時，經腹膜內投與賽哱(Xylazine/克它胺(Ketamine)混合液(100毫克/公斤克它胺與5毫克/公斤賽哱)。切開中線，曝露出腹腔(約1.5公分長)，注射含在100微升培養基中之10^7個腫瘤細胞)。細胞係注入胰臟之十二腸葉或注入結腸之漿膜。以6-0號連續絲縫線縫合腹膜及肌肉，使用傷口夾夾住皮膚。每天觀察動物。

分析

2至6週後(依動物之大體觀察而定)，殺死小白鼠，取下轉移至各種不同器官(肺、肝、腦、胃、胰、心、肌肉)之局部腫瘤，並分析(測量腫瘤大小、侵害程度、免疫化學、原位雜交測定、等等)。

細胞毒性測定法

醫療性化合物於抑制受體酪胺酸激酶活性上應比產生細胞毒性效應更強效。化合物之有效性及細胞毒性之測定法係

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（216）

由醫療指數（亦即IC_{50}/LD_{50}，IC_{50}）決定，達到50%抑制率時所需之劑量可採用如本文說明之標準技術測定。LD_{50}係產生50%毒性時之劑量，亦可由標準技術測定（莫斯曼(Mossman, 1983, J. Immunol. Methods, 65:55-63），其係測定LDH釋出量（柯森尼斯基(Korzeniewski)與卡勒華特(Callewaert, 1983, J. Immunol. Methods, 64:313，狄克(Decker)與洛曼-馬狄斯(Lohmann-Matthes), 1988, J. Immunol. Methods, 115:61），或於動物模式中測定致死劑量。醫療指數高之化合物較佳。醫療指數應大於2，至少10較佳，至少50更佳。

B. 實例-生物活性

本發明化合物之試管內效力實例示於表1與2。數據顯示化合物於試管內對抗多種PTKs時，通常相當強效。該化合物於活體內試驗時亦保持優越活性。例如本發明數種化合物當經口投藥時，使皮下植入小白鼠體內之C6神經膠質腫瘤之平均大小顯著縮小。然而化合物5顯然優於本發明其他化合物。在一項實驗中，於第0天，在雌性BALB/c nu/nu小白鼠之後腹部皮下植入C6人類神經膠質細胞（3×10^6個細胞，n=10至20隻動物/組）。植入後第一天開始經口投與含於拉布索水溶液(aqueous labrasol)中之化合物3、5、19及20，200毫克/公斤/天。採用測徑器測量腫瘤生長，並由長×寬×高計算腫瘤體積。

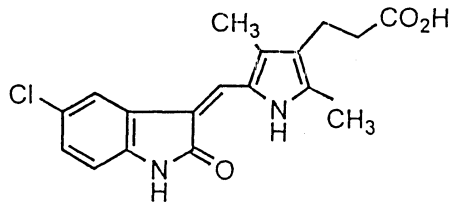
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

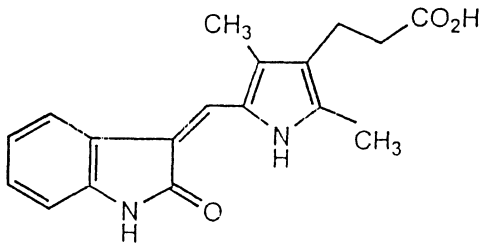
裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

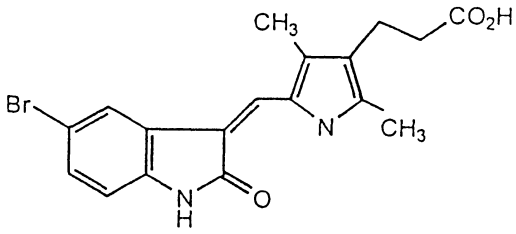
五、發明說明（217）



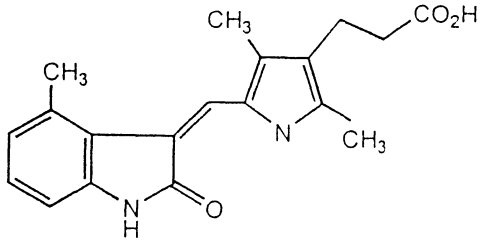
3



5



19



21

由下圖可見，所有試驗化合物均展現比僅使用載劑之對照組更顯著之抑制作用。然而，由試驗化合物之結構相近性而言，化合物5顯然優於其化化合物。亦即，當化合物3、19及21均使植入後第18天腫瘤生長之抑制作用集中在約40-45%時，化合物5於此時抑制腫瘤生長達80至85%。

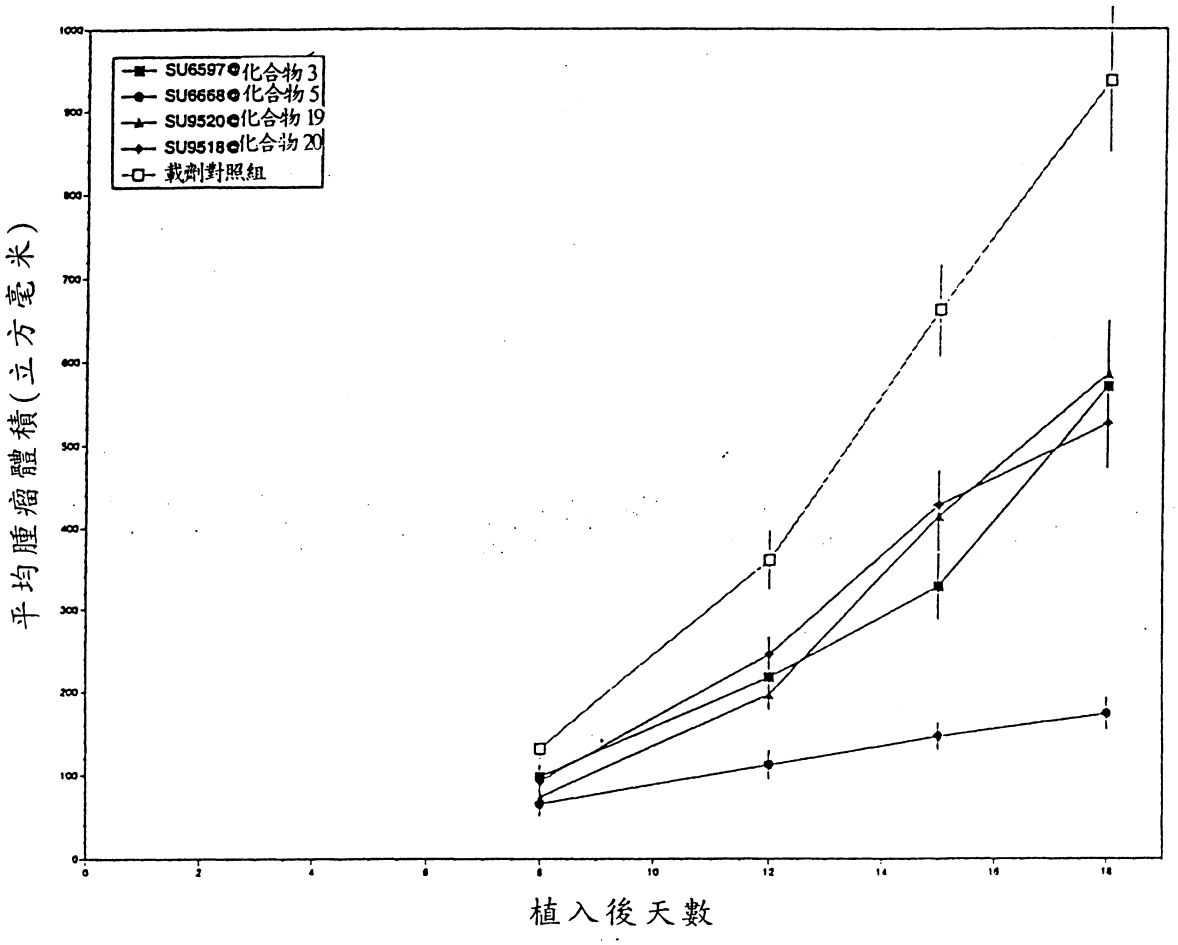
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

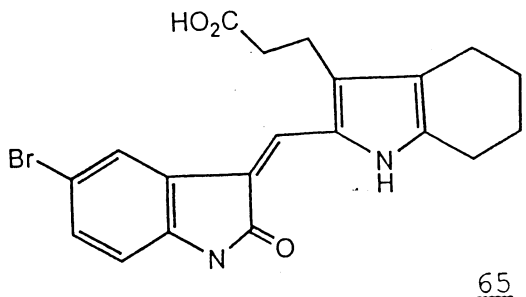
（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線

A7
B7

五、發明說明（218）



化合物5於活體內之驚人效力(尤其當經口投藥時)，進一步由與化合物65比較來證實：



65

化合物65於試管內之效力幾乎比化合物5高一倍(未出示

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

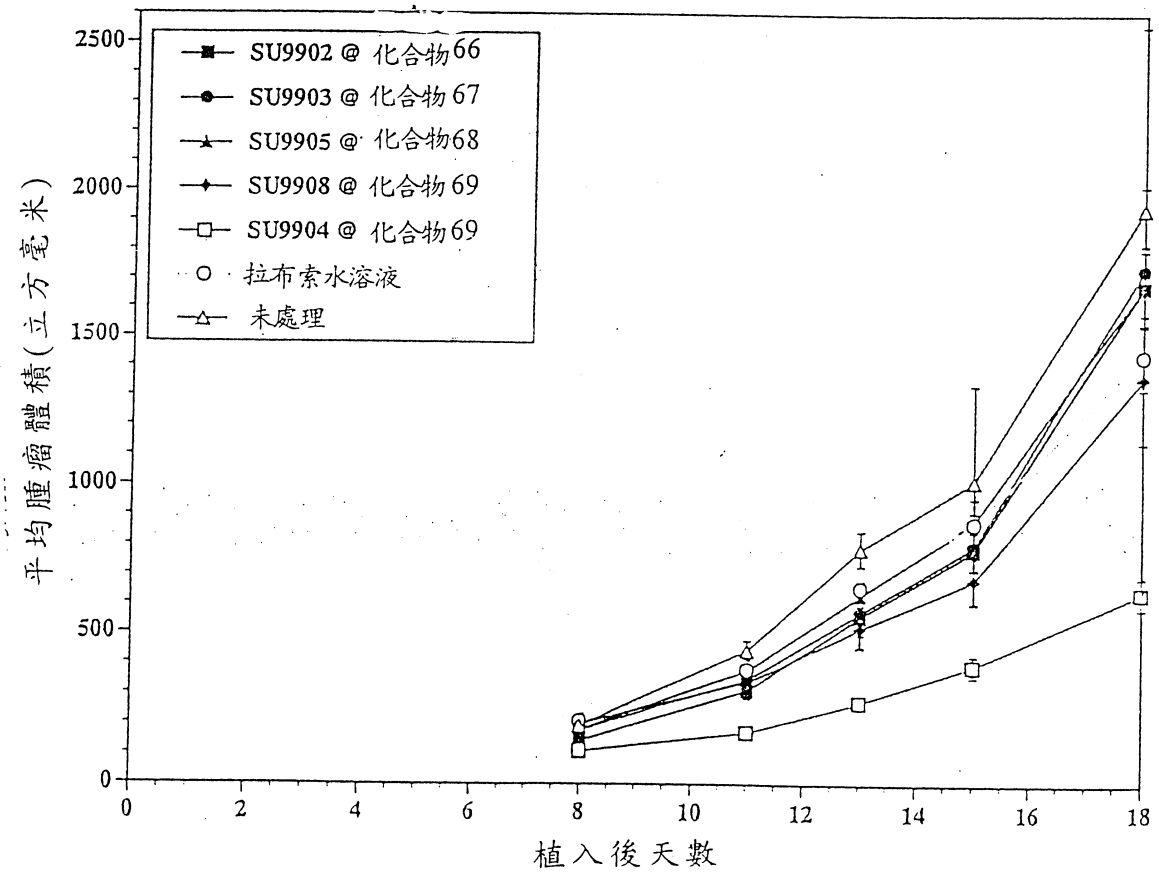
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線

五、發明說明（219）

數據）。然而，當於小白鼠腹膜內對抗兩種不同腫瘤細胞株(SF763T及SF767T)時，化合物5之效力稍高於(於第12天時之抑制作用高出5%)至顯著高於(於第21天時之抑制作用高出14%)化合物65。

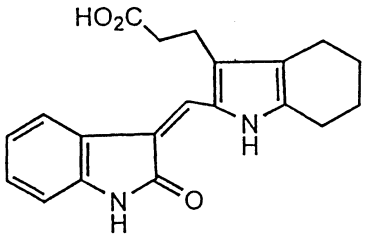
當化合物5及化合物65經口投藥時，此二種化合物之間之活性差異更大。化合物65及其數種類似物(化合物66至69)之口服效力圖示如下：



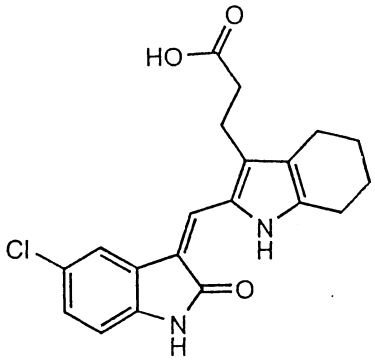
（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

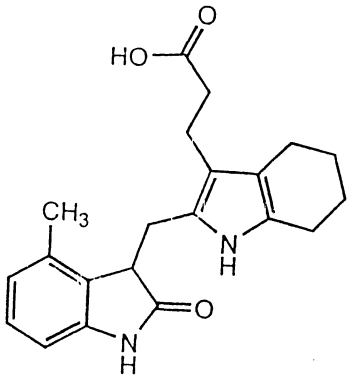
五、發明說明（220）



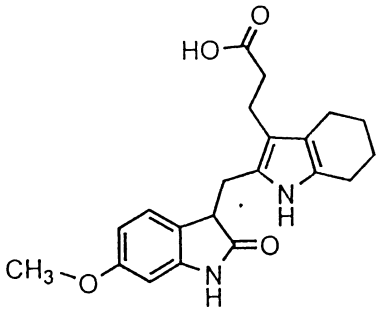
66



67



68



69

由圖可見，化合物65經口投與200毫克/公斤/天時，於小白鼠皮下植入C6腫瘤18天後，展現約65%抑制作用，此點顯著優於其類似物，後者平均抑制腫瘤生長約14至16%。然而，化合物65之口服效力仍驚人地顯著低於化合物5，此化合物5如上已述，在同時間及相同腫瘤模式中展現80-85%抑制作用。

當與化合物70比較時，化合物5對抗FGF-R1及PDGFR之Ki's(抑制常數)顯著較小(亦即效力較高)，對抗FGF-R1之K1爲化合物5之1.2，而化合物70則爲19.49，對抗PDGFR之Ki則未出示。

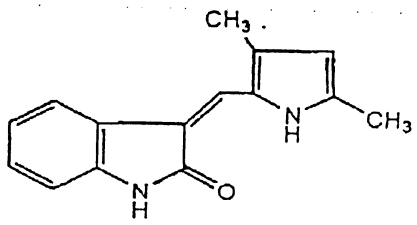
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

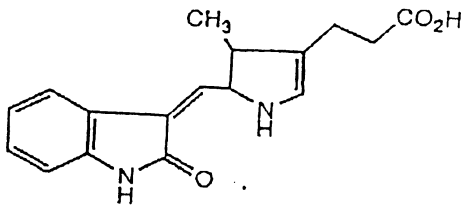
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（221）



70

化合物5之驚人優異性尚可由其口服效力與其相近類似物(化合物71)之口服效力之比較來證實：



71

儘管其具有結構相似性，但當於200毫克/公斤/天下進行口服試驗，在BALB/c nu/nu小白鼠體內對抗皮下C6人類黑色素瘤時，於植入後第18天時之化合物71僅抑制57%腫瘤生長(未示出數據)，而化合物5則再度展現80至85%抑制作用。

根據上述化合物5口服時之驚人效力，化合物5爲本發明目前較佳具體實施例。

結論

因此，咸了解本發明化合物、方法及醫藥組合物可有效調節PK活性，因此應爲對抗RTK、CTK-及STK-相關病變之有效醫療劑。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（222）

相關技藝專家咸了解，本發明完全配合進行達到目的並得到本文說明及固有之結果與優點。本文說明之分子錯合物及方法、過程、處理、分子、明確化合物爲目前較佳具體實施例之代表，爲範例，並無意限制本發明之範圍。相關技藝專家們可能進行之變化及其他用法均涵括在申請專利範圍所定義之本發明內涵範圍內。

相關技藝專家們咸了解，本文揭示之發明內容可在不偏離本發明之範圍及內涵內進行各種替代及修改。

本說明書中述及之所有專利案及文獻說明與彼等相關技藝與本發明之相關程度。所有專利案及文獻均依相同程度，以提及方式併入本文中，宛如各文獻已明確且個別地以提及之方式併入本文中。

本文說明之本發明可在缺少本文未明確揭示之任何元件(群)、限制(群)下操作。因此例如：本文中出現之任何"包含"，"基本上包括"及"包括"可被其他任二個名詞替代。已使用之名詞及表示法係用爲說明名詞，且不受限制，且在此等名詞與表示法之用法中無意排除其所出示特色及其說明或部份之任何同等物，但咸了解可在申請專利範圍內進行各種修改。因此咸了解，雖然本發明已利用較佳具體實施例及視需要選用之特色進行明確說明，但相關技藝專家們仍可能修飾及改變本文揭示之觀念，而此等修飾與改變仍在申請專利範圍所定義之本發明範圍內。

此外，若本發明之特色或方面以馬庫希族群(Markush groups)之名稱說明時，相關技藝專家咸了解，本發明亦藉

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（223）

由馬庫希族群之任何個別成員或成員之次族群說明。例如：若X說明爲選自包含溴、氯及碘之族群中時，則完全說明X爲溴之申請專利範圍及X爲溴與氯之申請專利範圍。

其他具體實施例均在下列申請專利範圍中。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

A5
B5

四、中文發明摘要（發明之名稱：經吡咯取代之2-吲哚啉酮蛋白質激酶抑制劑）

本發明係有關新穎之經吡咯取代之2-吲哚啉酮化合物及其生理上可接受之鹽與前藥，其調控蛋白質激酶活性，因此應適用於預防及治療與蛋白質激酶有關之細胞病變如：癌症。

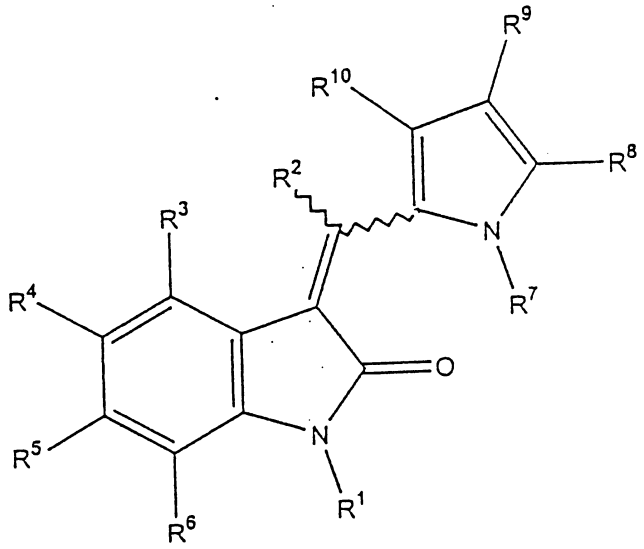
英文發明摘要（發明之名稱："PYRROLE SUBSTITUTED 2-INDOLINONE PROTEIN KINASE INHIBITORS"）

The present invention relates to novel pyrrole substituted 2-indolinone compounds and physiologically acceptable salts and prodrugs thereof which modulate the activity of protein kinases and therefore are expected to be useful in the prevention and treatment of protein kinase related cellular disorders such as cancer.

（請先閱讀背面之注意事項再填本頁各欄）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

六、申請專利範圍

1. 一種如下化學結構式之經吡咯取代之2-吲哚啉酮：



其中：

R^1、R^2及R^7為氫；

R^3、R^4、R^5與R^6分別選自：

氫；

羥基；

鹵素；

未取代之C_{1-4}烷基；

經羧酸取代之C_{1-4}烷基；

未取代之C_{1-4}烷氧基；

羧酸；

未取代之C_{6-10}芳基；

經一個或多個低碳數烷基烷氧基取代之C_{6-10}芳基；及

嗎啉基；

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

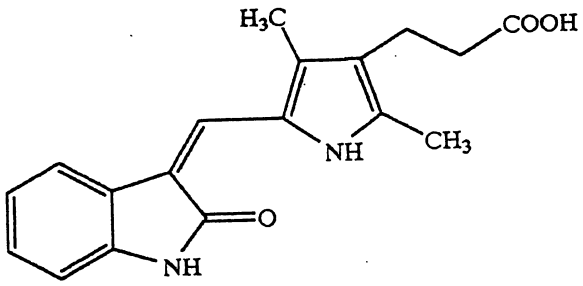
六、申請專利範圍

R^8為未取代之C_{1-4}烷基；

R^9為$-(CH_2)(CH_2)C(=O)OH$；及

R^{10}為未取代之C_{1-4}烷基。

2. 根據申請專利範圍第1項之化合物，其具有下式



稱為3-[2,4-二甲基-5-(2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-1H-吡咯-3-基]-丙酸。

3. 一種用於治療或預防生物體之蛋白質激酶相關病變之醫藥組合物，包含治療有效量之根據申請專利範圍第1項之化合物。

4. 根據申請專利範圍第3項之醫藥組合物，包含治療有效量之根據申請專利範圍第2項之化合物。

5. 根據申請專利範圍第3項之醫藥組合物，其中該蛋白質激酶相關病變係選自：受體酪胺酸激酶相關病變、非受體酪胺酸激酶相關病變及絲胺酸-蘇胺酸激酶相關病變。

6. 根據申請專利範圍第4項之醫藥組合物，其中該蛋白質激酶相關病變係選自：受體酪胺酸激酶相關病變、非受體

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

裝 訂

六、申請專利範圍

酪胺酸激酶相關病變及絲胺酸-蘇胺酸激酶相關病變。

7. 根據申請專利範圍第3項之醫藥組合物，其中該蛋白質激酶相關病變係選自：EGFR相關病變、PDGFR相關病變、IGFR相關病變及flk相關病變。

8. 根據申請專利範圍第4項之醫藥組合物，其中該蛋白質激酶相關病變係選自：EGFR相關病變、PDGFR相關病變、IGFR相關病變及flk相關病變。

9. 根據申請專利範圍第3項之醫藥組合物，其中該蛋白質激酶相關病變為選自下列之癌症：鱗狀細胞癌瘤、星細胞瘤、卡波西氏肉瘤、神經膠質母細胞瘤、肺癌、膀胱癌、頭與頸癌、黑色素瘤、卵巢癌、攝護腺癌、乳癌、小細胞肺癌、神經膠質瘤、結腸直腸癌、生殖泌尿器官癌及腸胃癌。

10. 根據申請專利範圍第4項之醫藥組合物，其中該蛋白質激酶相關病變為選自下列之癌症：鱗狀細胞癌瘤、星細胞瘤、卡波西氏肉瘤、神經膠質母細胞瘤、肺癌、膀胱癌、頭與頸癌、黑色素瘤、卵巢癌、攝護腺癌、乳癌、小細胞肺癌、神經膠質瘤、結腸直腸癌、生殖泌尿器官癌及腸胃癌。

11. 根據申請專利範圍第3項之醫藥組合物，其中該蛋白質激酶相關病變係選自：糖尿病、過度增殖病變、血管分佈形成、炎症、免疫病變及心血管病變。

12. 根據申請專利範圍第4項之醫藥組合物，其中該蛋白質激酶相關病變係選自：糖尿病、過度增殖病變、血管分佈

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

裝 訂 線

六、申請專利範圍

形成、炎症、免疫病變及心血管病變。

13. 根據申請專利範圍第9項之醫藥組合物，其中該生物體為哺乳動物。

14. 根據申請專利範圍第10項之醫藥組合物，其中該生物體為哺乳動物。

15. 根據申請專利範圍第1項之化合物，其係選自下列：

3-[5-(5-氯-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基]-丙酸，

3-[2,4-二甲基-5-(2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-1H-吡咯-3-基]-丙酸，

3-[5-(5-溴-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基]-丙酸，

3-[5-(5-碘-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基]-丙酸，

3-[2,4-二甲基-5-(4-甲基-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-1H-吡咯-3-基]-丙酸，

3-[2,4-二甲基-5-(5-甲基-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-1H-吡咯-3-基]-丙酸，

3-[5-(6-羥基-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基]-丙酸，

3-[5-(6-甲氧基-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基]-丙酸，

3-{5-[6-(3-甲氧苯基)-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基]-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基}-丙酸，

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

裝 訂 線

六、申請專利範圍

3-{5-[6-(3-乙氧苯基)-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基]-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基}-丙酸，

3-[2,4-二甲基-5-(2-氧-6-苯基-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-1H-吡咯-3-基]-丙酸，

3-{5-[6-(4-甲氧苯基)-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基]-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基}-丙酸，

3-{5-[6-(2-甲氧苯基)-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基]-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基}-丙酸，

3-[2,4-二甲基-5-(6-嗎啉-4-基-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基)-1H-吡咯-3-基]-丙酸，

3-[5-氯-4-甲基-2-氧-1,2-二氫亞吲哚-3-基甲基]-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-基]-丙酸。

16. 根據申請專利範圍第11項之醫藥組合物，其中該過度增殖病變係選自血管再狹窄、纖維變性及牛皮癬。

17. 根據申請專利範圍第11項之醫藥組合物，其中該炎症係選自骨關節炎及類風濕關節炎。

18. 根據申請專利範圍第12項之醫藥組合物，其中該過度增殖病變係選自血管再狹窄、纖維變性及牛皮癬。

19. 根據申請專利範圍第12項之醫藥組合物，其中該炎症係選自骨關節炎及類風濕關節炎。

20. 根據申請專利範圍第11項之醫藥組合物，其中該免疫病變為自體免疫病變。

21. 根據申請專利範圍第12項之醫藥組合物，其中該免疫病變為自體免疫病變。

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

裝 訂 線