

公告本

C4

495609

申請日期	86.11.04
案 號	86116369
類 別	G01N 33/50 33/48 C12B 1/02

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、發明名稱	中 文	特定胺類作為抗管素(ANTITUBULIN)活性及抗性監測檢測探針之用途
	英 文	USE OF CERTAIN AMIDES AS PROBES FOR DETECTION OF ANTITUBULIN ACTIVITY AND RESISTANCE MONITORING
二、發明人	姓 名	大衛 哈米爾敦 楊
	國 籍	英國
	住、居所	美國賓州安布勒市戴維斯路917號
三、申請人	姓 名 (名稱)	美商羅門哈斯公司
	國 籍	美國
	住、居所 (事務所)	美國賓州費勒費德亞市獨立大道西區100號
	代 表 人 姓 名	馬克 S. 艾德勒

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
I P C 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 1996年11月14日 60/030,920 ☒有 ☐無主張優先權

有關微生物已寄存於： ，寄存日期： ，寄存號碼：

(請先閱讀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

五、發明說明(1)

微細管(microtubule)乃存在於全部真核細胞的胞內纖維狀結構。可做為不同小器官的成份例如有絲分裂紡錘，中心粒，基底體，纖毛，鞭毛，有軸偽足及胞骨骼，微細管與許多細胞功能有關包含有絲分裂過程之染色體移動，細胞運動，小器官轉運，胞質移動，細胞板形成，維持細胞形狀及發育植物細胞壁時細胞微原纖維沉積之取向。微細管的主要成份為微管蛋白(tubulin)，此乃由兩種亞單位稱做 α 及 β 組成的蛋白質。微管蛋白於細胞的重要性質係進行聚合反應形成微細管或於適當條件下解聚合。此種過程於試管試驗也可使用離體微管蛋白發生。

微細管於細胞分裂扮演要角，做為有絲分裂紡錘的成份，有絲分裂紡錘是一種小器官，牽涉正確分配分裂當中細胞內部的染色體於兩個子代核。多種藥物及農藥經由結合至微管蛋白或微細管而阻礙細胞分裂。藉此種機轉作用的抗癌藥物包含生物鹼文克里斯汀(vincristine)及文布拉斯汀(vinblastine)，及基於紫杉烷(taxane)之化合物如paclitaxel及docetaxel{例如參見E.K. Rowinsky and R.C. Donehower，藥理及治療學，52，35-84 (1991)}。其它可有效對抗哺乳類細胞之抗微管蛋白化合物包含苯駢咪唑類例如諾卡答左(nocodazole)及天然產物如秋水仙素(colchicine)，鬼臼毒素(podophyllotoxin)及combretastatins。可結合微管蛋白的苯駢咪唑化合物也廣泛用做驅蟲藥{McKellar, Q.A. and Scott, E.W., J. Vet. Pharmacol. Ther., 13, 223-247 (1990)}。抗微管蛋白殺草

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(2)

劑敘述於"農藥之生化作用模式"，作者J.R. Corbett, K. Wright及A.C. Baillie, pp. 202-223，且包含二硝基苯胺類如 trifluralin，N-苯基胺基甲酸酯類如 chlorpropham，amiprophos-methyl，及 pronamide。結合於微管蛋白作用之殺真菌劑包含 zarilamide {Young, D.H. and Reitz, E.M., 第十屆國際系統性殺真菌劑及抗真菌化合物會議議事錄, Reinhardtsbrunn, ed by H. Lyr and C. Polter, 381-385, (1993)}，苯駢咪唑類 benomyl 及 carbendazim，及 N-苯基胺基甲酸酯 diethofencarb {Davidse, L.C and Ishi, H. 於"近代選擇性殺真菌劑"，ed. by H. Lyr, 305-322 (1995)}。

由於微管蛋白成功地用做藥物及農藥的生化目標，故相當努力開發可結合微管蛋白之新穎化合物。多種不含細胞之方法可供檢測此種化合物。一種常見方法包括測良試驗化合物於試管試驗中抑制離體微管蛋白聚合成微細管的能力 {例如參見 E. Hamel, 醫藥研究綜覽, 16, 207-231 (1996)}。第二方法，試驗化合物與離體微管蛋白之交互作用可於結合檢定分析檢測，係經由測良試驗化合物影響第二微管蛋白結合配合基做為探針結合能力而檢測。典型，探針藉放射性標記而可測量其結合。結合於微管蛋白之試驗化合物經由結合於做為探針的微管蛋白相同位置而影響探針的結合，如此減少探針結合數量。另外，結合可利用"變構"("allosteric")交互作用影響，變構交互作用中試驗化合物結合至探針不同位置而誘使微管蛋白形態改變

五、發明說明⁽³⁾

而影響探針結合位置。此種變構交互作用可增加或減少探針的結合。第三種方法係關測量試驗化合物對微管蛋白結合鳥核苷三磷酸酶活性的影響{Duanmu, C., Shahrik, L. K., Ho, H.H. and Hamel, E., Cancer Research, 49, 1344-1348 (1989)}。

欲藉任一種方法篩檢大量化合物，目前僅可使用得自哺乳類腦組織的微管蛋白進行，原因為無法由其它來源分離足夠大量純微管蛋白。如此，限制此等方法的用途，原因為多種抗微管蛋白化合物對於來自不同來源的微細管顯示相當大的作用特異性。例如殺草劑 oryzalin 及 amiprophosmethyl 抑制植物微管蛋白之聚合但無法抑制腦微管蛋白之聚合；秋水仙素做為腦微管蛋白抑制劑的效果比植物微管蛋白聚合抑制劑高100倍{Morejohn, L.C. and Fosket, D.E., 'Tubulin from Plants, Fungi, and Protists', 於"胞骨骼之細胞及分子生物學", ed. by J.W. Shay, 257-329 (1986)}。

本發明係關於使用某些已知可抑制真核細胞生長，包含真菌細胞與植物細胞的醯胺衍生物{例如參考美國專利案 3,661,991, 4,863,940 及 5,254,584 號}做為結合檢定分析之探針而篩檢化合物之抗微管蛋白活性。雖然放射性標記探針如秋水仙素{例如參考 M.H. Zweig and C.F. Chignell, 生化藥理, 22, 2141-2150 (1973)}及 vinblastine(例如參考 R. Bai et al., 生物化學期刊, 265, 17141 (1990))廣泛用於使用離體微管蛋白之結合檢定分析，但此等化合物非

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(4)

共價結合至微管蛋白。本發明之醯胺衍生物於競爭結合檢定分析優於現有抗微管蛋白化合物之優點來自於其可以高度特異性方式共價結合至微管蛋白，特別結合至微管蛋白β亞單位的獨特能力。結合檢定分析中，需要測量結合至微管蛋白之探針數量，通常需要由未結合的探針分離與微管蛋白結合的探針。於醯胺類之例，由於結合乃共價結合，故微管蛋白結合探針之化學性質安定，故容易藉過濾或離心等方法由未結合的探針分離。如此，使其不僅可用於使用離體微管蛋白的檢定分析，同時也可用於使用全細胞。粗細胞萃出物及部份純化微管蛋白製劑的檢定分析，如此，可免除離體微管蛋白的需求因而可使微管蛋白的檢定分析於多種不同類型細胞或細胞萃出物進行。例如，可結合植物或真菌微管蛋白之試驗化合物可於使用植物或真菌細胞或細胞萃出物及醯胺探針的檢定分析檢測，故提供篩檢大量化合物的適當檢定分析。醯胺探針也可用於哺乳類細胞檢測結合至微管蛋白之化合物，提供一種由腦部以外的來源研究試驗化合物對哺乳類微管蛋白影響的工具。典型地，測量試驗化合物對醯胺探針初結合速率的影響。全細胞檢定分析優於使用離體微管蛋白之不含細胞檢定分析的優點為其可使試驗化合物積聚於細胞及其可使代謝活化或失活化，可能為影響生物活性的重要因素。

本發明之第二態樣包括使用醯胺探針於檢定分析評估真核細胞對藉由結合於微管蛋白發揮作用的農藥或藥物之敏感度。抗微管蛋白農藥或藥物使用一段時間後可能導致細

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(5)

胞出現對抗微管蛋白化合物的敏感度降低(抗藥物性)。抗藥性可能來自於微管蛋白改變或牽涉其它機轉例如抗微管蛋白的攝取或代謝變化。因微管蛋白改變造成對抗微管蛋白化合物抗藥性出現於真菌病原菌{Davidse, L.C. and Ishi, H. in "近代選擇性殺真菌劑", ed. by H. Lyr, 305-322 (1995)}, 藻類{James, S.W. et al., 細胞科學期刊, 106, 209-218 (1993)}及蠕蟲類{Beech, R.N. et al., 遺傳學, 138, 103-110 (1994)}。含改變微管蛋白之抗藥性細胞顯示對醯胺類之結合親和力不同, 可使醯胺探針用於結合檢定分析來測知此等變異株。此種檢定分析可經由比較醯胺探針結合至先前暴露於抗微管蛋白農藥或藥物之細胞或細胞萃出物的結合速率與未處理對照細胞或細胞萃出物的結合速率進行。

例如, 業界已知苯駢咪唑及噻吩酸鹽殺真菌劑如 benomyl(1-(丁基胺基甲醯基)苯駢咪唑-2-基胺基甲酸甲酯), fuberidazole(2-(2'-呋喃基)苯駢咪唑), thiabendazole(2-(4-噻唑基)苯駢咪唑), carbendazim(苯駢咪唑-2-基胺基甲酸甲酯), 噻吩酸鹽-甲基(1,2-貳(3-甲氧羰基-2-硫脲基)苯), 及噻吩酸鹽(1,2-貳(3-乙氧羰基-2-硫脲基)苯)可對抗植物病原性真菌。但使用苯駢咪唑及噻吩酸鹽殺真菌劑一段時間後, 導致出現對此等殺真菌劑之敏感度下降的真菌菌株, 因而殺真菌劑控制特定真菌疾病效果遠更下降。此種"抗藥性"真菌分離為純培養時對苯駢咪唑類及噻吩酸鹽類的敏感度比較得自未暴露於殺真菌

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(6)

劑部位的真菌低10倍至大於1000倍。此外，對一種苯駢咪唑或噻吩酸鹽殺真菌劑出現敏感度下降的真菌經常也顯示對其它苯駢咪唑或噻吩酸鹽殺真菌劑的敏感度下降。N-苯基胺基甲酸酯殺真菌劑達因索菲卡(diethofencarb)商業上用於控制苯駢咪唑抗藥性真菌如灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)。但使用此種殺真菌劑導致出現對苯駢咪唑類及達因索菲卡皆出現抗性的真菌菌株。目前檢測對苯駢咪唑類，噻吩酸鹽類或達因索菲卡具抗藥性的真菌菌株方法費時費力。此等方法包括分離純試驗培養，接著使用經殺菌劑修改的瓊脂平板進行試管試驗菌絲體生長檢定分析，或使用殺真菌劑處理葉進行活體試驗檢定分析。另外，可於殺真菌劑存在下進行孢子之載玻片發芽試驗。對達因索菲卡及/或苯駢咪唑及噻吩酸鹽類具抗性的真菌菌株典型含有被改變的微管蛋白{參見Koenraad, H. et al., 植物病理學, 82, 1348-1354 (1992) 及 Yarden, O. and Katan, T., 植物病理學, 83, 1478-1483 (1993)}。苯駢咪唑抗性而達因索菲卡敏感性真菌菌株典型顯示對本發明醯胺衍生物的敏感度增強，而苯駢咪唑抗性且達因索菲卡抗性真菌菌株典型顯示敏感度下降。雖然不欲受理論所限，但相信醯胺探針可用於結合檢定分析來分辨苯駢咪唑抗性而達因索菲卡敏感性真菌菌株，該等菌株於使用全細胞或細胞萃出物之檢定分析中顯示對醯胺探針之結合能力增強；或苯駢咪唑抗性且達因索菲卡抗性真菌菌株其顯示結合醯胺探針的能力減弱與非抗藥性菌株區別。此種檢定分析較非

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(7)

勞力密集且較不耗時，也可提供有關微管蛋白改變之抗藥性機轉相關資訊。有關抗藥性機轉之資訊可用於設計抗藥性管理策略。

本發明之第三態樣包括醯胺探針用於結合檢定分析來檢測及定量細胞或細胞萃出物之微管蛋白。微管蛋白由於可成功地做為藥物及農藥的目標以及具有重要細胞功能，故構成密集研究的主題。此等研究中，經常希望檢測及定量細胞或細胞萃出物內的微管蛋白。目前係藉多種免疫檢定分析達成{D. Thrower et al.，細胞生物學方法，vol. 37，pp. 129-145 (1993)}，硫酸十二酯鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳{B.M. Spiegelman et al.，細胞，vol. 12，pp. 587-600 (1977)}，結合至DEAE纖維素{J.C. Bulinski et al.，分析生物化學，vol. 104，432-439 (1980)}，或藉測量秋水仙素結合活性{Wilson，L.，Biochemistry，vol. 9，pp. 4999-5007 (1970)}達成。醯胺探針提供基於測量醯胺結合活性而檢測與定量微管蛋白之替代方法。使用醯胺探針可免除抗微管蛋白抗體的需求，提供一種比較硫酸十二酯鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳或結合至DEAE-纖維素更簡單而更快速的方法，可應用於多種細胞如對秋水仙素不敏感的植物或真菌細胞測量微管蛋白濃度。

業界人士已知多種方法可用於使用全細胞、粗細胞萃出物、部份純化微管蛋白製劑或離體微管蛋白之檢定分析檢測醯胺探針對微管蛋白之結合。例如包括使用放射性標記或螢光醯胺探針。探針典型與細胞、細胞萃出物或微管蛋

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

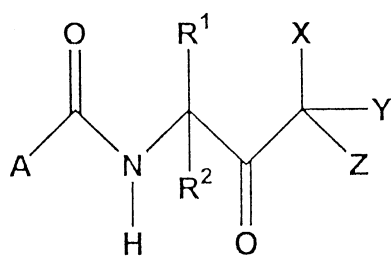
訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明⁽⁸⁾

白製劑培育而結合探針數量係藉多種分離技術或此等技術組合由未結合探針分離後測定。分離技術包含但非僅限於離心、層析、相分離、沉澱結合或未結合探針，或結合或未結合探針黏附於固體基質。閃爍近似檢定分析技術(U.S. 4,568,649)提供另一種測量探針與微管蛋白之結合的方法。又另一種方法包括藉質譜術技術檢測藉化學或酶學處理由微管蛋白釋放的醯胺結合微管蛋白或醯胺結合肽類。

使用某些可抑制真核細胞生長的醯胺類，本發明提供進行結合檢定分析之方法，其可用於真核細胞、細胞萃出物、及微管蛋白製劑篩檢化合物之抗微管蛋白活性，監測抗性及測定微管蛋白含量，該等醯胺類具有結構式



(I)

其中

A 為 (C₃-C₇) 環烷基，(C₁-C₆) 烷基，鹵 (C₁-C₆) 烷基，(C₂-C₆) 烯基，鹵 (C₂-C₆) 烯基，(C₂-C₆) 炔基，鹵 (C₂-C₆) 炔基，苯基，吡啶基，呋喃基，噻吩基，異噁唑基，噁唑基，吡咯基，異噻唑基，噻唑基，吡唑基，咪唑基，嘧啶基，喹啉基，異喹啉基，萘基，噻吡基，吡吡基，苯駢噻

五、發明說明(9)

吩基，吡啶基，苯駢呋喃基或苣基；或苯基，吡啶基，呋喃基，噻吩基，異噻唑基，噻唑基，吡咯基，異噻唑基，噻唑基，吡唑基，咪唑基，噻啶基，噻啶基，異噻啶基，萘基，噻吩基，吡吩基，苯駢噻吩基，吡吩基，苯駢呋喃基或苣基以4個或少於4個分別選自下列之取代基取代：鹵原子，氬基，(C₁-C₆)烷基，鹵(C₁-C₆)烷基，(C₂-C₆)烯基，鹵(C₂-C₆)烯基，(C₂-C₆)炔基，鹵(C₂-C₆)炔基，(C₁-C₆)烷氧基，鹵(C₁-C₆)烷氧基，(C₁-C₆)烷硫基，鹵(C₁-C₆)烷硫基，硝基，-NR⁶R⁷，-CR⁸=NOR⁹，-NHCOOR¹⁰，-CONR¹¹R¹²及-COOR¹³；或當A為未飽和環且由二或多個彼此毗鄰的取代基取代時，其中兩個取代基可形成稠合5，6或7員環含有至多兩個選自氧，氮，硫及磷之雜原子：

R¹及R²分別為氬原子，(C₁-C₆)烷基，鹵(C₁-C₆)烷基，(C₂-C₆)烯基，鹵(C₂-C₆)烯基，(C₂-C₆)炔基或鹵(C₂-C₆)炔基，但R¹及R²非皆為氬原子；

R⁶及R⁷分別為氬原子，(C₁-C₆)烷基或(C₁-C₆)烷基羰基；

R⁸為氬原子，(C₁-C₆)烷基，(C₂-C₆)烯基或(C₂-C₆)炔基；

R⁹為氬原子，(C₁-C₆)烷基，(C₂-C₆)烯基，(C₂-C₆)炔基或(C₁-C₄)烷基羰基；

R¹⁰，R¹¹，R¹²及R¹³分別為氬原子，(C₁-C₆)烷基，(C₂-C₆)烯基或(C₂-C₆)炔基；及

五、發明說明(10)

X，Y及Z分別為氫原子，鹵原子，氰基，硫氰基，異硫
氰基，或(C₁-C₆)烷基磺醯氧基，但X，Y及Z中之至少一
者非為氫原子；或

其光學對映異構物。

如此處使用"鹵原子"包含氟，溴，氯或碘。

"烷基"包含每基含有1至6個碳之直鏈或分支飽和烴基，
例如甲基，乙基，正丙基，異丙基，正丁基，異丁基，第
三丁基，戊基及己基。

"烯基"包含每基含至少一個雙鍵及2至6個碳之直鏈或分
支烴基，例如乙烯基，2-丙烯基，2-丁烯基及2-甲基-2-
丙烯基。

"炔基"包含每基含至少一個三鍵及2至6個碳之直鏈或分
支烴基，例如乙炔基，2-丙炔基及2-丁炔基。

"烷氧基"包含每基含1至6個碳之直鏈或分支烷氧基，例
如甲氧基，丙氧基，正丁氧基及第三丁氧基。

"烷硫基"包含每基含1至6個碳之直鏈或分支烷硫基，例
如甲硫基，丙硫基。

"鹵烷基"，"鹵烯基"，"鹵炔基"，"鹵烷氧基"及"鹵烷
硫基"分別為含1至5個鹵取代基取代基之"烷基"，"烯基
"，"炔基"，"烷氧基"及"烷硫基"。

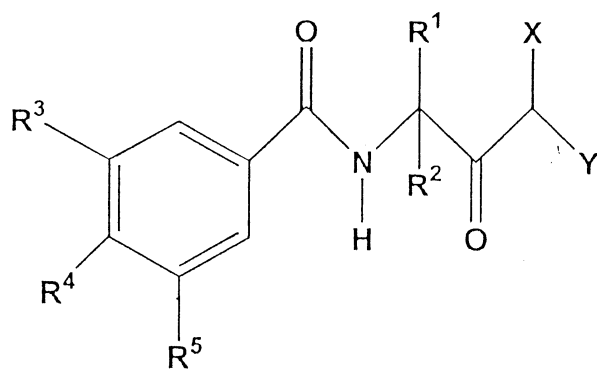
"環烷基"包含含3至7個碳原子之環系環，例如環丙基，
環戊基及環己基。

"烷基羰基"包含每基含1至6個碳原子之直鏈或分支烷基
其聯結至羰基例如甲基羰基及丁基羰基。

五、發明說明 (11)

"烷基磺醯氧基"包含每基含1至6個碳原子之直鏈或分支烷基其聯結至磺醯氧基例如甲基磺醯氧基，及丙基磺醯氧基。

本發明之較佳方法使用具如下結構式之醯胺



(II)

其中

R^1 及 R^2 分別為氫原子， (C_1-C_6) 烷基，鹵 (C_1-C_6) 烷基， (C_2-C_6) 烯基或 (C_2-C_6) 炔基，但 R^1 及 R^2 非皆為氫原子；

R^3 ， R^4 及 R^5 分別為氫原子，鹵原子，氰基， (C_1-C_6) 烷基，鹵 (C_1-C_6) 烷基， (C_2-C_6) 烯基， (C_2-C_6) 炔基， (C_1-C_6) 烷氧基， (C_1-C_6) 烷硫基，鹵 (C_1-C_6) 烷基，硝基， $-NR^6R^7$ ， $-CR^8=NOR^9$ ， $-NHCOOR^{10}$ ， $-CONR^{11}R^{12}$ 或 $-COOR^{13}$ ；或 R^4 及 R^5 共同形成稠合5，6或7員環，其可含有至多2個選自O，S，N及P之雜原子；

R^6 ， R^7 ， R^8 ， R^9 ， R^{10} ， R^{11} ， R^{12} 及 R^{13} 分別為氫原子或 (C_1-C_6) 烷基；及

X及Y分別為氫原子，鹵原子，氰基，硫氰基，異硫氰基

五、發明說明(12)

或(C₁-C₆)烷基磺醯氧基，但X及Y非皆為氫原子；或

其光學對映異構物。

本發明之更佳方法使用具結構式(II)之苯甲酸鹽胺類其中

R¹為甲基；

R²為甲基或乙基；

R³及R⁵分別為氫原子，鹵原子，甲基，硝基，氰基，
-NR⁶R⁷，-CR⁸=NOR⁹或-NHCOOR¹⁰，但R³及R⁵非皆為
氫原子；

R⁴為氫原子，鹵原子，-NR⁶R⁷，氰基，-CR⁸=NOR⁹，
-NHCOOR¹⁰，-COOR¹³或(C₁-C₆)烷基；

R⁶，R⁷，R⁸，R⁹，R¹⁰及R¹³分別為氫原子或(C₁-C₆)烷
基；

X為氯；及

Y為氫原子；或

其光學對映異構物。

使用哺乳類細胞、細胞萃出物或微管蛋白之檢定分析
中，本發明又更佳方法使用結構式(II)苯甲酸鹽胺類其中

R¹為甲基；

R²為乙基；

R³為鹵原子或氰基；

R⁴及R⁵為胺基或-CH=NOCH₃但R⁴及R⁵不相同；

X為氯；及

Y為氫原子；或

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (13)

其光學對映異構物。

使用真菌細胞、細胞萃出物或微管蛋白其中真菌屬於子囊菌(Ascomycete)，半分生孢子菌(Deuteromycete)或擔子菌(Basidiomycete)綱真菌之檢定分析中，本發明之又更佳方法使用具結構式(II)之苯甲酸醯胺類其中

R^1 為甲基，

R^2 為甲基或乙基，

R^3 為 $-CH=NOCH_3$ ，

R^4 為氫原子，鹵原子，胺基，氰基或甲基，

R^5 為鹵原子，甲基，硝基或氰基，

X 為氯及

Y 為氫原子；或

其光學對映異構物。

使用真菌細胞、細胞萃出物或微管蛋白其中真菌屬於卵菌(Oomycete)綱真菌之檢定分析中，本發明之又更佳方法使用具有結構式(II)之苯甲酸醯胺類其中

R^1 為甲基；

R^2 為乙基；

R^3 及 R^5 分別為氫原子，鹵原子，甲基，硝基，氰基，
 $-NR^6R^7$ ， $-CR^8=NO R^9$ 或 $-NHCOOR^{10}$ ，但 R^3 及 R^5 非皆為
氫原子；

R^4 為氫原子，鹵原子， $-NR^6R^7$ ，氰基， $-CR^8=NO R^9$ ，
 $-NHCOOR^{10}$ ， $-COOR^{13}$ 或 (C_1-C_4) 烷基；

R^6 ， R^7 ， R^8 ， R^9 ， R^{10} 及 R^{13} 分別為氫原子或甲基；

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準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

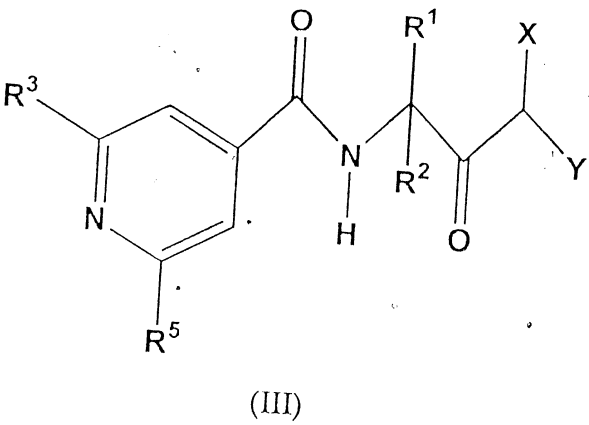
五、發明說明 (14)

X 為 氯 ; 及
Y 為 氫 原 子 ; 或
其 光 學 對 映 異 構 物 。

使用植物細胞、細胞萃出物或微管蛋白之檢定分析中，
本發明之又更佳方法使用具有結構式(II)之苯甲酸醯胺類
其中

R¹ 為 甲 基 ;
R² 為 甲 基 或 乙 基 ;
R³ 及 R⁵ 分別為氫原子，鹵原子，甲基，硝基或氰基，但
R³ 及 R⁵ 非皆為氫原子 ;
R⁴ 為 氫 原 子 ,
X 為 氯 ; 及
Y 為 氫 原 子 ; 或
其 光 學 對 映 異 構 物 。

本發明之其它較佳方法使用具如下結構式之吡啶羧醯胺
類



五、發明說明 (15)

其中

R^1 及 R^2 分別為氫原子， (C_1-C_6) 烷基，鹵 (C_1-C_6) 烷基， (C_2-C_6) 烯基或 (C_2-C_6) 炔基，但 R^1 及 R^2 非皆為氫原子；

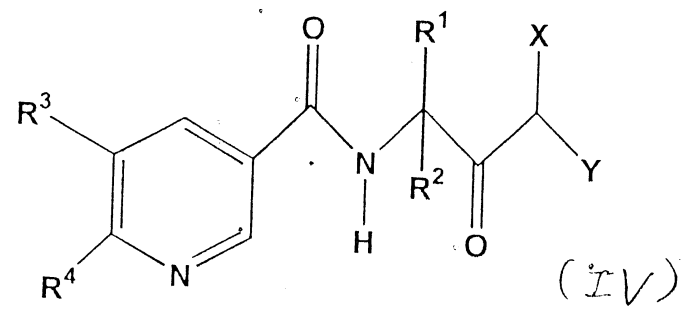
R^3 及 R^5 分別為氫原子，鹵原子， (C_1-C_6) 烷基，鹵 (C_1-C_6) 烷基， (C_2-C_6) 烯基， (C_2-C_6) 炔基， (C_1-C_6) 烷氧基， (C_1-C_6) 烷硫基，鹵 (C_1-C_6) 烷氧基，硝基，羧基， $-NR^6R^7$ ， $-CR^8=NR^9$ ， $-NHCOOR^{10}$ ， $-CONR^{11}R^{12}$ 或 $-COOR^{13}$ ；

R^6 ， R^7 ， R^8 ， R^9 ， R^{10} ， R^{11} ， R^{12} 及 R^{13} 為氫原子或 (C_1-C_6) 烷基；及

X及Y分別為氫原子，鹵原子，氰基，硫氰基，異硫氰基或 (C_1-C_6) 烷基磺醯氧基，但X及Y非皆為氫原子；或

其光學對映異構物。

本發明之又其它較佳方法使用具如下結構式之吡啶羧醯胺類



其中

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (16)

R^1 及 R^2 分別為氫原子， (C_1-C_6) 烷基，鹵 (C_1-C_6) 烷基， (C_2-C_6) 烯基或 (C_2-C_6) 炔基，但 R^1 及 R^2 非皆為氫原子；

R^3 及 R^4 分別為氫原子，鹵原子， (C_1-C_6) 烷基，鹵 (C_1-C_6) 烷基， (C_2-C_6) 烯基， (C_2-C_6) 炔基， (C_1-C_6) 烷氧基， (C_1-C_6) 烷硫基，鹵 (C_1-C_6) 烷氧基，硝基，羧基，
 $-NR^6R^7$ ， $-CR^8=NOR^9$ ， $-NHCOOR^{10}$ ， $-CONR^{11}R^{12}$ 或
 $-COOR^{13}$ ；或 R^3 及 R^4 共同形成一個稠合5，6或7員環且含有至多兩個選自O，S，N及P之雜原子；

R^6 ， R^7 ， R^8 ， R^9 ， R^{10} ， R^{11} ， R^{12} 及 R^{13} 為氫原子或 (C_1-C_6) 烷基；及

X及Y分別為氫原子，鹵原子，氰基，硫氰基，異硫氰基或 (C_1-C_6) 烷基磺醯氧基，但X及Y非皆為氫原子；或其光學對映異構物。

本發明之其它更佳方法使用具結構式(IV)之吡啶羧醯胺類其中

R^1 為甲基；

R^2 為甲基或乙基；

R^3 及 R^4 分別為氫原子，鹵原子，氰基，甲基，硝基，
 $-NR^6R^7$ ， $-CR^8=NOR^9$ 或 $-NHCOOR^{10}$ ，但 R^3 及 R^4 非皆為氫原子；

R^6 ， R^7 ， R^8 ， R^9 ， R^{10} 及 R^{13} 分別為氫原子或 (C_1-C_6) 烷基；

X為氯及Y為氫原子；或

其光學對映異構物。

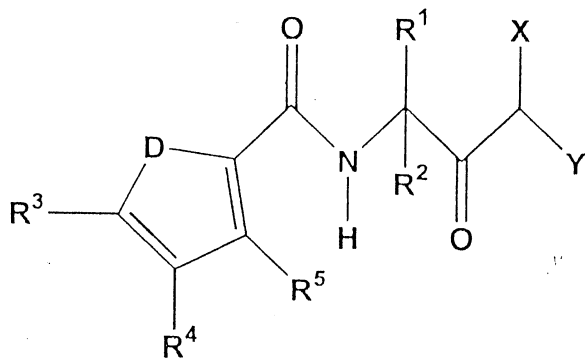
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (17)

本發明之又其它較佳方法使用具如下結構式之呋喃基羧
醯胺類或噻吩基羧醯胺類



其中 (V)

D 為 O 或 S :

R^1 及 R^2 分別為氫原子, (C_1-C_6) 烷基, 鹵 (C_1-C_6) 烷基, (C_2-C_6) 烯基及 (C_2-C_6) 炔基, 但 R^1 及 R^2 非皆為氫原子;

R^3 , R^4 及 R^5 分別為氫原子, 鹵原子, 氰基, (C_1-C_6) 烷基, 鹵 (C_1-C_6) 烷基, (C_2-C_6) 烯基, (C_2-C_6) 炔基, (C_1-C_6) 烷氧基, (C_1-C_6) 烷硫基, 鹵 (C_1-C_6) 烷氧基, 硝基, 羧基, $-NR^6R^7$, $-CR^8=NOR^9$, $-NHCOOR^{10}$,

$-CONR^{11}R^{12}$ 或 $-COOR^{13}$; 或 R^3 及 R^4 共同形成稠合 5, 6 或 7 員環, 其可含有至多 2 個選自 O, S, N 及 P 之雜原子;

R^6 , R^7 , R^8 , R^9 , R^{10} , R^{11} , R^{12} 及 R^{13} 分別為氫原子或 (C_1-C_6) 烷基; 及

X 及 Y 分別為氫原子, 鹵原子, 氰基, 硫氰基, 異硫氰基或 (C_1-C_6) 烷基磺醯氧基, 但 X 及 Y 非皆為氫原子; 或

其光學對映異構物。

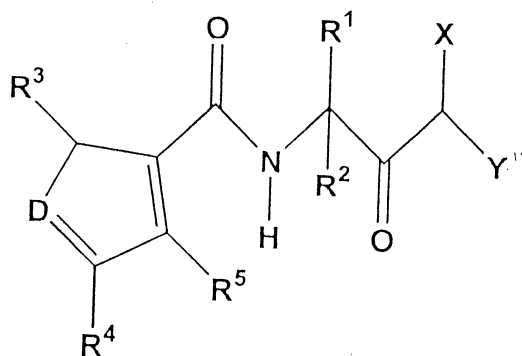
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (18)

本發明之又較佳方法使用具如下結構式之呋喃基羧醯胺類或噻吩基羧醯胺類



(VI)

其中

D 為 O 或 S ；

R^1 及 R^2 分別為氫原子， (C_1-C_6) 烷基，鹵 (C_1-C_6) 烷基， (C_2-C_6) 烯基及 (C_2-C_6) 炔基，但 R^1 及 R^2 非皆為氫原子；

R^3 ， R^4 及 R^5 分別為氫原子，鹵原子，氰基， (C_1-C_6) 烷基，鹵 (C_1-C_6) 烷基， (C_2-C_6) 烯基， (C_2-C_6) 炔基， (C_1-C_6) 烷氧基， (C_1-C_6) 烷硫基，鹵 (C_1-C_6) 烷氧基，硝基，羧基， $-NR^6R^7$ ， $-CR^8=NR^9$ ， $-NHCOOR^{10}$ ，

$-CONR^{11}R^{12}$ 或 $-COOR^{13}$ ；

R^6 ， R^7 ， R^8 ， R^9 ， R^{10} ， R^{11} ， R^{12} 及 R^{13} 分別為氫原子或 (C_1-C_6) 烷基；及

X 及 Y 分別為氫原子，鹵原子，氰基，硫氰基，異硫氰基或 (C_1-C_6) 烷基磺醯氧基，但 X 及 Y 非皆為氫原子；或

其光學對映異構物。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

五、發明說明 (19)

當 R^1 與 R^2 相異時，由於存在有連結 R^1 與 R^2 之非對稱碳原子，故本發明之化合物之光學異構物為可能。此種情況下，兩種對映異構物皆屬於本發明範圍。已知多種生物活性化合物具有光學對映異構物，其中一種結合特殊蛋白質比另一種更有效。同理，用於本發明方法之化合物，一種對映異構物結合至微管蛋白比較另一種對映異構物更有效。例如，化合物 1，2，3 之 "S 對映異構物" 結合至微管蛋白比較對應 "R 對映異構物" 更有效。"S 對映異構物" 一詞表示根據 Cahn-Ingold-Prelog 系統 {Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 5，385-415 (1966)} 之順序法則排序時， R^1 及 R^2 搭接至碳上的 4 個基定義碳具有 S 組態。"R 對映異構物" 一詞表示 4 個基構成 R 組態。

根據本發明方法已經製備且預期有用之特殊化合物包含但非僅限於表 1-6 列舉之化合物。

表 1：式 (II) 苯甲酸鹽胺類

化合物	R^1	R^2	R^3	R^4	R^5	X	Y
1	CH ₃	C ₂ H ₅	Cl	H	Cl	Cl	H
2	CH ₃	C ₂ H ₅	CH=NOCH ₃	NH ₂	Cl	Cl	H
3	CH ₃	C ₂ H ₅	Cl	CH ₃	Cl	Cl	H
4	CH ₃	C ₂ H ₅	H	NHCOOCH ₃	H	Cl	H
5	CH ₃	C ₂ H ₅	Cl	NH ₂	Cl	Cl	H
6	CH ₃	C ₂ H ₅	CN	H	Cl	Cl	H
7	CH ₃	C ₂ H ₅	CH=NOCH ₃	H	Cl	Cl	H

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

裝

訂

五、發明說明 (20)

8	CH ₃	C ₂ H ₅	Br	H	CH ₃	Cl	H
9	CH ₃	C ₂ H ₅	Cl	H	Cl	Br	Br
10	CH ₃	CH ₃	Cl	H	Cl	Br	Cl
11	CH ₃	CH ₃	Cl	H	Cl	Br	Br
12	CH ₃	C ₂ H ₅	Br	NH ₂	Br	Cl	H
13	CH ₃	C ₂ H ₅	CN	H	H	Cl	H
14	CH ₃	C ₂ H ₅	Br	CH ₃	Br	Cl	H
15	CH ₃	C ₂ H ₅	CN	H	CH ₃	Cl	H
16	CH ₃	C ₂ H ₅	CH=NOCH ₃	H	H	Cl	H
17	CH ₃	C ₂ H ₅	Cl	H	Cl	SCN	H
18	CH ₃	CH ₃	Cl	H	Cl	NCS	H
19	CH ₃	CH ₃	Cl	H	Cl	Cl	H
20	CH ₃	CH ₃	Cl	H	Cl	Br	H
21	CH ₃	C ₂ H ₅	Br	CH ₃	Cl	Cl	H
22	CH ₃	C ₂ H ₅	Cl	F	Cl	Cl	H
23	CH ₃	C ₂ H ₅	Cl	Cl	Cl	Cl	H
24	CH ₃	C ₂ H ₅	F	H	F	Cl	H
25	CH ₃	C ₂ H ₅	Cl	H	H	Cl	H
26	CH ₃	C ₂ H ₅	F	F	F	Cl	H
27	CH ₃	異丙基	Cl	H	Cl	Cl	H
28	CH ₃	C ₂ H ₅	Cl	H	Cl	F	Br
29	CH ₃	CH ₃	Cl	H	Cl	Cl	Cl
30	CH ₃	C ₂ H ₅	NHCOOCH ₃	H	H	Cl	H

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (21)

表 2：式 (III) 吡啶羧醯胺類

化合物	R ¹	R ²	R ³	R ⁵	X	Y
31	CH ₃	CH ₃	Cl	Cl	Br	Br
32	CH ₃	CH ₃	Cl	Cl	Cl	H

表 3：式 (IV) 吡啶羧醯胺類

化合物	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	X	Y
33	CH ₃	C ₂ H ₅	Br	H	Cl	H
34	CH ₃	C ₂ H ₅	H	Cl	Cl	H

表 4：式 (V) 噻吩基羧醯胺類及呋喃基羧醯胺類

化合物	D	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	X	Y
35	S	CH ₃	CH ₃	Br	Br	H	Cl	H
36	S	CH ₃	C ₂ H ₅	CH ₃	H	H	Cl	H
37	S	CH ₃	CH ₃	H	H	H	Br	Br
38	O	CH ₃	C ₂ H ₅	Br	H	H	Br	Br

表 5：式 (VI) 噻吩基羧醯胺

化合物	D	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	X	Y
39	S	CH ₃	CH ₃	Cl	Cl	H	Cl	H

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (22)

表 6：式(II)稠合環苯甲酸鹽胺類

化合物	R ¹	R ²	R ³	R ⁴ R ⁵ *	X	Y
40	CH ₃	C ₂ H ₅	H	-N=CH-O-	Cl	H
41	CH ₃	C ₂ H ₅	H	-O-CH=N-	Cl	H
42	CH ₃	C ₂ H ₅	H	-N=CH-S-	Cl	H
43	CH ₃	C ₂ H ₅	Cl	-N=CH-O-	Cl	H
44	CH ₃	C ₂ H ₅	Cl	-N=C(CH ₃)-O-	Cl	H

*最左邊原子搭接於苯甲酸鹽胺環4-位置而最右邊原子搭接於苯甲酸鹽胺環5-位置。

下列方法及實例進一步說明本發明之用途。

用於製備表1-6列舉之化合物之方法

表1之化合物1，6，8，9，10，11，13，15，17，18，19，20，22，23，24，25，26，27，28及29：

表1之化合物1，6，8，9，10，11，13，15，17，18，19，20，22，23，24，25，26，27，28及29係根據美國專利4,822,902第5-8欄及11-17欄所述合成方法製備。

表1化合物7及16：

表1化合物7及16係根據美國專利5,254,584第7及8欄(化合物16)及第10-14欄(化合物7)所述合成方法製備。

表1化合物3，14及21：

化合物3，14及21係根據美國專利5,304,572第4-8欄所述合成方法製備。

表1化合物5及12：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

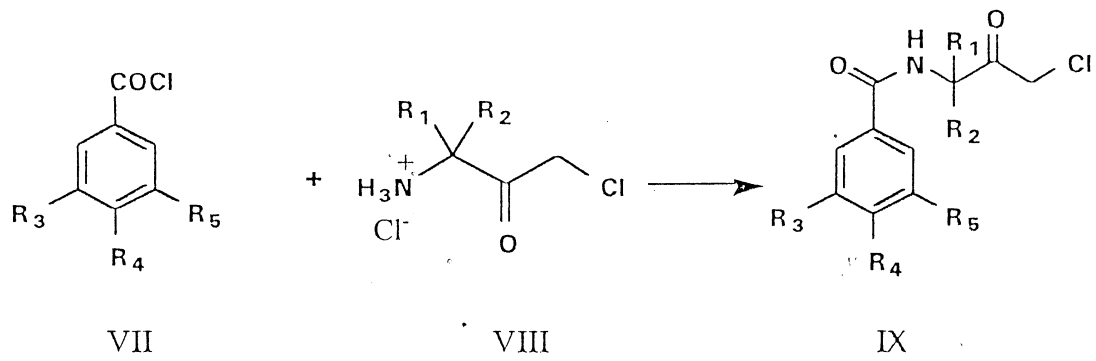
訂

五、發明說明 (23)

化合物 5 及 12 係使用例如美國專利 4,863,940 第 5-7 欄所述習知合成技術由適當苯甲酸類或苯甲醯氯類製備。如此，化合物 5 及 12 分別使用 4-胺基-3,5-二氯苯甲醯氯及 4-胺基-3,5-二溴苯甲醯氯製備。

表 1 化合物 2：

化合物 2 係經由苯甲醯氯 VII，其中 R^3 為 Cl， R^4 為 NH_2 及 R^5 為 $-CH=NOCH_3$ 與 α -胺基- α' -氯甲酮衍生物 VIII，其中 R^1 為甲基及 R^2 為乙基，如反應圖 A 之示例說明反應製備：



反應圖 A

用於製備化合物 2 之起始苯甲醯氯係如下反應圖 B 指示製備。

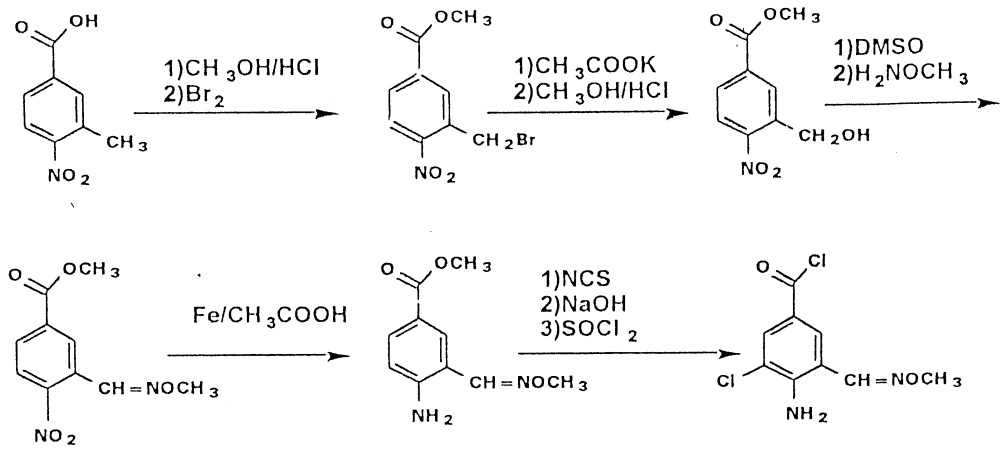
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

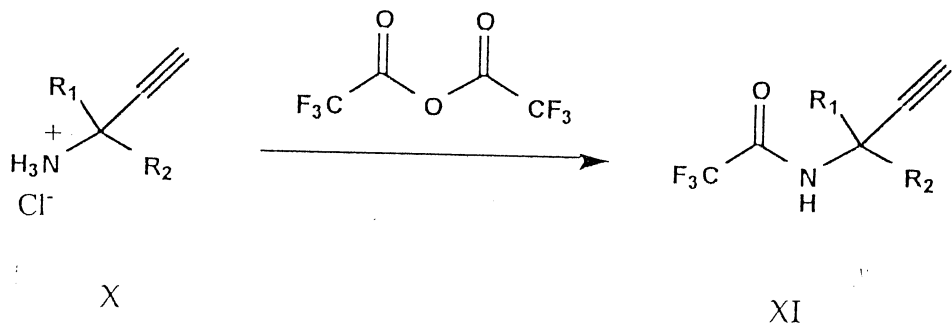
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (24)



反應圖 B

化合物 VIII 係經由以三氟乙酐於溶劑如二氯甲烷，氯仿，乙醚或水及鹼如三乙胺，碳酸鈉，碳酸氫鈉或氫氧化鈉存在下處理乙炔基胺(X)獲得乙炔醯胺 XI 製備：



於 -78°C 至 0°C 溫度於溶劑如二氯甲烷或氯仿存在下以氯或氯源處理乙炔醯胺 XI 獲得中間物嘮唑啉(XII)。嘮唑啉 XII 易使用酸如鹽酸或硫酸於溶劑如甲醇或四氫呋喃於 40°C 至

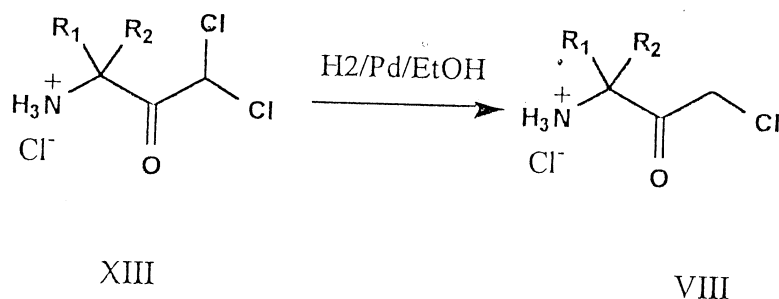
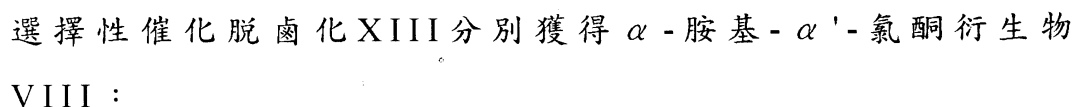
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

60°C溫度於酸性條件下水解獲得 α -胺基- α' , α' -二氯酮 (XIII)。



配備有回流冷凝器，頂攪拌器及氣體入口之5升三頸圓底瓶內，放置300克3-甲基-4-硝基苯甲酸及3升甲醇。所得徹底攪拌之溶液內通入20.8克氯化氫及所得混合物回流3小時。反應混合物冷卻至室溫及任其放置隔夜。期望之3-甲基-4-硝基苯甲酸甲酯沉澱呈淺黃色晶體，於脫水後藉抽取

經濟部中央標準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

五、發明說明 (26)

過濾收集獲得259.3克。此種固體就此用於次一步驟。

b) 3-溴甲基-4-硝基苯甲酸甲酯之製備

於配備有回流冷凝器、頂攪拌器、添加漏斗及氮氣入口之5升三頸圓底瓶內放置220克3-甲基-4-硝基苯甲酸甲酯，2升無水四氯化碳及4克過氧化苯甲醯。所得溶液內以275瓦紫外燈照射，於回流下以2小時時間逐滴加入198克溴。添加完成後，反應混合物又回流60小時。反應混合物冷卻至室溫。生成之固體藉抽取過濾分離。固體(159.1克)包括期望之3-溴甲基-4-硝基苯甲酸甲酯及小量起始物料。母液與又220克3-甲基-4-硝基苯甲酸甲酯及4克過氧化苯甲醯送回燒瓶內如前述以198克溴處理。添加完成後，反應混合物又回流96小時，冷卻至室溫及所得固體藉過濾分離又獲得252克3-溴甲基-4-硝基苯甲酸甲酯。合併固體共獲得411.1克3-溴甲基-4-硝基苯甲酸甲酯及小量起始3-甲基-4-硝基苯甲酸甲酯及3-二溴甲基-4-硝基苯甲酸甲酯。此種固體就此用於次一步驟。

c) 3-乙醯氧甲基-4-硝基苯甲酸甲酯之製備

於配備有回流冷凝器、頂攪拌器及氮氣入口之5升三頸圓底瓶內放置411克前述製備之3-溴甲基-4-硝基苯甲酸甲酯，441克無水乙酸鉀及2升冰醋酸。所得混合物回流4小時，冷卻至室溫及攪拌隔夜。於旋轉蒸發器去除溶劑及所得淺黃色固體以2升乙酸乙酯及1升水之混合物處理。分離有機相，以水(3x400毫升)，鹽水(1x400毫升)洗滌，以無水硫酸鎂脫水及使用旋轉蒸發器去除溶劑。粗反應混合物

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (27)

以己烷研製及過濾獲得318克期望之3-乙醯氧甲基-4-硝基苯甲酸甲酯。此種化合物就此用於次一步驟。

d) 3-羥甲基-4-硝基苯甲酸甲酯之製備

於配備有回流冷凝器、頂攪拌器及氮氣入口之5升三頸圓底瓶內放置318克如前述製備之3-乙醯氧甲基-4-硝基苯甲酸甲酯及3.2升無水甲醇。所得溶液內通入40克氯化氫及所得混合物回流3小時。冷卻至室溫後使用旋轉蒸發器去除溶劑獲得273克3-羥甲基-4-硝基苯甲酸甲酯呈黃色固體含微量甲醇，其就此用於次一步驟。

e) 3-甲醯基-4-硝基苯甲酸甲酯之製備

5升四頸圓底瓶內1.5升二氯甲烷冷卻至 -78°C 。緩慢加入草醯氯(164克，1.29莫耳)，接著逐滴加入202克(2.59莫耳)無水二甲亞碲於125毫升二氯甲烷，溫度維持低於 -70°C 。添加完成後，反應混合物於 -78°C 攪拌30分鐘及逐滴加入273克(1.29莫耳)前述製備之3-羥甲基-4-硝基苯甲酸甲酯溶解於250毫升二氯甲烷。反應混合物又攪拌30分鐘。逐滴加入三乙胺(392克，3.88莫耳)於125毫升二氯甲烷，溫度維持低於 -65°C 。反應混合物緩慢溫熱至室溫及攪拌隔夜。使用旋轉蒸發器去除溶劑及所得固體以2升乙酸乙酯與1升水之混合物處理。分離有機相，通過矽藻土過濾及依序以稀鹽酸水液(2x250毫升)，水(2x250毫升)，飽和碳酸氫鈉水液(2x250毫升)，水(2x200毫升)，鹽水(1x200毫升)洗滌及以無水硫酸鎂脫水。使用旋轉蒸發器去除溶劑。粗反應混合物以己烷研製及過濾獲得234.1克期

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (28)

望之3-甲醯基-4-硝基苯甲酸甲酯呈黃色固體。此種化合物就此用於次一步驟。

f) 3-甲氧亞胺基甲基-4-硝基苯甲酸甲酯之製備

於195克3-甲醯基-4-硝基苯甲酸甲酯，1升二氯甲烷及370毫升水之徹底攪拌混合物內依序加入77.6克甲氧胺鹽酸鹽，76.2克乙酸鈉及6.8克硫酸氫四-正丁銨。所得混合物於室溫攪拌隔夜，然後以2升乙醚稀釋。有機相經分離及依序以水(1x500毫升)，2%鹽酸水液(2x500毫升)，水(2x250毫升)，及鹽水(1x250毫升)洗滌；然後以無水硫酸鎂脫水。使用旋轉蒸發器去除溶劑獲得218.6克期望之3-甲氧亞胺基甲基-4-硝基苯甲酸甲酯呈紅色油，其於靜置時固化及其就此用於次一步驟。

g) 4-胺基-3-甲氧亞胺基甲基苯甲酸甲酯之製備

5升三頸圓底瓶內放置0.9升5%乙酸水液及157克(2.8莫耳)鐵。所得徹底攪拌混合物內加入166.6克(0.7莫耳)先前製備之3-甲氧亞胺基甲基-4-硝基苯甲酸甲酯溶解於0.9升乙酸乙酯接著逐滴加入0.9升乙酸，同時維持溫度低於35°C。所得混合物於35°C攪拌30分鐘及經矽藻土過濾。濾液倒入5升水中。水相經分離及以乙醚(2x500毫升)洗滌。合併有機相依序以水(4x500毫升)，飽和碳酸氫鈉水液(2x500毫升)，水(2x500毫升)及鹽水(1x400毫升)洗滌。有機層以無水硫酸鎂脫水及使用旋轉蒸發器去除溶劑獲得130克期望之4-胺基-3-甲氧亞胺基甲基苯甲酸甲酯。

h) 4-胺基-3-氯-5-甲氧亞胺基甲基苯甲酸甲酯之製備

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(29)

於2升三頸圓底瓶內放置106克(0.51莫耳)先前製備之4-胺基-3-甲氧亞胺基甲基苯甲酸甲酯及500毫升乙腈。所得混合物以70°C加熱及分成數份加入75.2克(0.56莫耳)N-氯丁二醯亞胺同時維持溫度低於80°C。添加完成後，反應混合物回流1小時。反應混合物冷卻至室溫及於旋轉蒸發器去除溶劑。粗產物溶解於5升乙酸乙酯。有機溶液以水(3x500毫升)洗滌然後以鹽水洗滌，以硫酸鎂脫水。反應混合物於旋轉蒸發器濃縮呈漿液，以己烷研製及過濾獲得期望之4-胺基-3-氯-5-甲氧亞胺基甲基苯甲酸甲酯呈黃色固體。使用等量重覆反應共獲得210.5克4-胺基-3-氯-5-甲氧亞胺基甲基苯甲酸甲酯，其就此用於次一步驟。

i) 4-胺基-3-氯-5-甲氧亞胺基甲基苯甲酸之製備

於5升三頸圓底瓶內放置210克(0.86莫耳)先前製備之4-胺基-3-氯-5-甲氧亞胺基甲基苯甲酸甲酯，1.7升甲醇及462克(1.73莫耳)15%氫氧化鈉水液。所得混合物回流3小時，隨後反應混合物於室溫攪拌隔夜。反應混合物使用旋轉蒸發器濃縮。粗反應產物溶解於2升水。所得水溶液以500毫升乙酸乙酯洗一次，於冰浴冷卻及以濃鹽酸酸化至pH=2。期望之4-胺基-3-氯-5-甲氧亞胺基甲基苯甲酸沉澱呈淺黃色固體，其藉抽取過濾分離。濾餅以乙醚及己烷之1:2混合物洗滌於脫水後獲得185.2克(94%產率)。

j) 4-胺基-3-氯-5-甲氧亞胺基甲基苯甲醯氯之製備

於5升三頸圓底瓶內放置180克先前製備之4-胺基-3-氯-5-甲氧亞胺基甲基苯甲酸，2升甲苯，3毫升二甲基甲醯胺

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (30)

及104克(64毫升)亞磺醯氯。所得混合物於70°C加熱2小時，趁熱過濾及使用旋轉蒸發器去除溶劑獲得178.1克期望之4-胺基-3-氯-5-甲氧亞胺基甲基苯甲醯氯。

k) 3-胺基-1-氯-3-甲基-2-戊酮鹽酸鹽(化合物VIII，其中R¹為甲基及R²為乙基)之製備

(i) N-[3-(3-甲基-1-戊炔基)]三氟乙醯胺之製備

於配備有機械攪拌器、氮氣入口及溫度計之3升，四頸圓底瓶放置234克(1.75莫耳)3-胺基-3-甲基-1-戊炔鹽酸鹽及1,000毫升二氯甲烷。所得徹底攪拌之混合物內緩慢逐滴加入354克(3.51莫耳)三乙胺(TEA)，溫度維持低於30°C。添加完成後，反應混合物攪拌120分鐘接著逐滴加入334.5克(1.59莫耳)三氟乙醯溶解於500毫升二氯甲烷，而其添加速率可維持反應溫度於0°C。添加完成後，反應混合物於室溫攪拌隔夜及真空濃縮。所得漿液以乙醚洗滌。乙醚層依次以水，飽和碳酸氫鈉水液及鹽水洗滌，以無水硫酸鎂脫水，以活性炭處理及經西來特(Celite™)過濾。於減壓下去除溶劑。所得粗產物以冷戊烷處理，過濾及脫水獲得255.5克(83%)期望之N-[3-(3-甲基-1-戊炔基)]三氟乙醯胺呈白色固體。

(ii) 5-氯-5-(二氟甲基)-4-乙基-4-甲基-2-三氟甲基嘮唑啉鹽酸鹽之製備

於配備有機械攪拌器、溫度計及氣體入口之5升，四頸圓底瓶溶解255.5克(1.32莫耳)N-[3-(3-甲基-1-戊炔基)]三氟乙醯胺於4,000毫升二氯甲烷。所得混合物冷卻至-30°C

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (31)

及以2小時時間通入235克氯氣。添加完成時，反應混合物於30分鐘時間於-30℃攪拌及溫熱至室溫。粗反應混合物於旋轉蒸發器蒸發獲得期望之5-氯-5-(二氯甲基)-4-乙基-4-甲基-2-三氟甲基嘔唑啉鹽酸鹽，其就此用於次一步驟。

(iii) 3-胺基-1,1-二氯-3-甲基-2-戊酮鹽酸鹽之製備

於前一步驟製備之5-氯-5-(二氯甲基)-4-乙基-4-甲基-2-三氟甲基嘔唑啉鹽酸鹽溶解於1800毫升甲醇，72毫升水及190毫升濃鹽酸，溫熱至50℃及於該溫攪拌隔夜。粗反應混合物經冷卻及倒入冰／水／乙醚混合物內。分離各相及醚層以水萃取一次。保留醚(有機層I)。合併水層以乙醚洗一次，及合併有機層與有機層I(有機層II)。水層以飽和碳酸氫鈉水液中和及以乙醚萃取二次。合併醚層以水、鹽水洗滌，以無水硫酸鎂脫水，以活性炭處理及經西來特過濾。所得無色溶液內通過無水氯化氫氣體維持溫度低於20℃。所得白色固體經過濾及脫水獲得124.8克期望之3-胺基-1,1-二氯-3-甲基-2-戊酮鹽酸鹽呈白色固體。乙醚濾液與有機層II合併及真空濃縮；所得殘餘物(150克)攝取於甲醇／水／濃鹽酸混合物內及於50℃加熱過周末。前述後續處理又獲得51克3-胺基-1,1-二氯-3-甲基-2-戊酮鹽酸鹽。所得總量為175.8克(61%產率)。

(iv) 3-胺基-1-氯-3-甲基-2-戊酮鹽酸鹽之製備

於2升巴爾瓶內放置41克3-胺基-1,1-二氯-3-甲基-2-戊酮鹽酸鹽，0.8克10%鈹／木炭及400毫升乙醇。所得混合

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (32)

物於巴爾裝置於50 psi振搖3小時。粗反應混合物經西來特過濾及真空蒸發獲得黏稠油，油攝取於300-400毫升乙酸乙酯及於室溫攪拌數小時。期望之3-胺基-1-氯-3-甲基-2-戊酮鹽酸鹽結晶呈白色固體；300毫升己烷加至所得懸浮液及過濾獲得34克(98%)期望之3-胺基-1-氯-3-甲基-2-戊酮鹽酸鹽。

始於41克；41克；及51克3-胺基-1,1-二氯-3-甲基-2-戊酮鹽酸鹽重覆反應共獲得132.1克(90%，總產率)3-胺基-1-氯-3-甲基-1-戊酮鹽酸鹽。

1)4-胺基-3-氯-5-甲氧亞胺基甲基-N-(3-氯-1-乙基-1-甲基-2-氧基丙基)苯甲醯胺(化合物2)之製備

於5升三頸圓底瓶內放置93克3-胺基-1-氯-3-甲基-2-戊酮鹽酸鹽及885毫升水。所得溶液內加入138.6克碳酸氫鈉接著加入500毫升乙酸乙酯。所得徹底攪拌之混合物內於室溫以50分鐘時間加入123.5克4-胺基-3-氯-5-甲氧亞胺基甲基苯甲醯氯溶解於100毫升乙酸乙酯。添加完成後，反應混合物於室溫攪拌1小時。分離二相而有機層以水(2x500毫升)，鹽水(1x500毫升)洗滌，以無水硫酸鎂脫水及於旋轉蒸發器去除溶劑獲得粗產物呈褐色油。此油使用二氯甲烷做溶離溶劑通過短矽膠柱。蒸發去除溶劑獲得133.3克期望之4-胺基-3-氯-5-甲氧亞胺基甲基-N-(3-氯-1-乙基-1-甲基-2-氧基丙基)苯甲醯胺呈灰白色固體(mp 140-141°C)。

表1化合物4及30：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (33)

化合物30係藉如下程序製備。

3-硝基-N-(3-氯-1-乙基-1-甲基-2-氧基丙基)苯甲醯胺如反應圖A(如上)，經由3-硝基苯甲醯氯VIII反應製備，然後使用鉍做催化劑，藉催化氫化反應轉成3-胺基-N-(3-氯-1-乙基-1-甲基-2-氧基丙基)苯甲醯胺。

於配備有機械攪拌器、溫度計及添加漏斗之300毫升四頸圓底瓶內懸浮3.5克3-胺基-N-(3-氯-1-乙基-1-甲基-2-氧基丙基)苯甲醯胺於100毫升二氯甲烷。混合物於冰浴中冷卻至0-5℃然後加入1.8毫升三乙胺及任混合物攪拌數分鐘。維持溫度低於5℃緩慢加入氯甲酸甲酯(1.1毫升)，及混合物攪拌20分鐘。移開冰浴及任反應混合物溫熱至室溫。反應混合物以50毫升水洗二次及以無水硫酸鎂脫水。使用旋轉蒸發器蒸發去除溶劑，獲得粗產物。粗產物於矽膠藉層析純化獲得230毫克化合物30。

化合物4係藉化合物30之相同程序製備，但使用4-硝基苯甲醯氯做為起始物料。

表2，3，4及5之化合物：

表2，3，4及5之化合物係根據美國專利4,863,940所述方法製備。

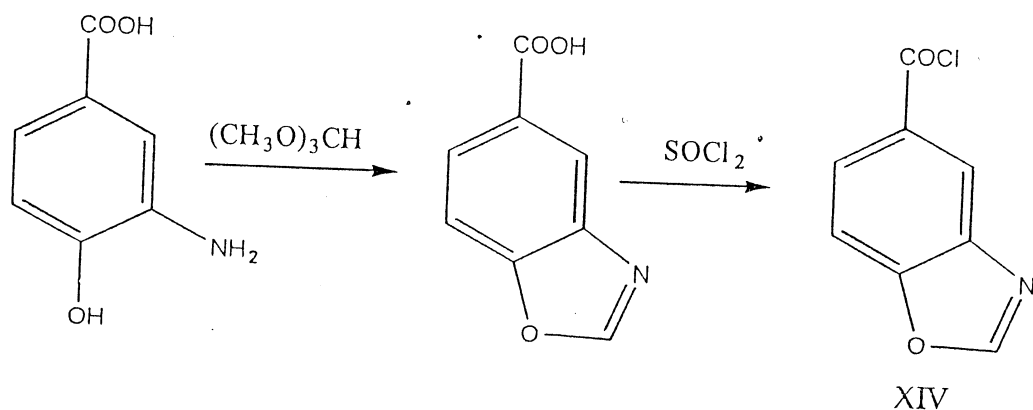
表6之化合物40，41，42，43及44：

化合物40，41，43及44係如上反應圖A之舉例說明經由對應芳族衍生物(VII)，其中R⁴及R⁵形成稠合環與3-胺基-1-氯-3-甲基-2-戊酮鹽酸鹽(化合物VIII，其中R¹為甲基及R²為乙基)反應製備：

五、發明說明 (34)

欲製備化合物 42，6-羧-1,3-苯駢噻唑(購自 Maybridge 化學公司)首先以亞磺醯氯處理獲得醯氯。醯氯於三乙胺存在下以 3-胺基-1-氯-3-甲基-2-戊酮鹽酸鹽處理獲得化合物 42。

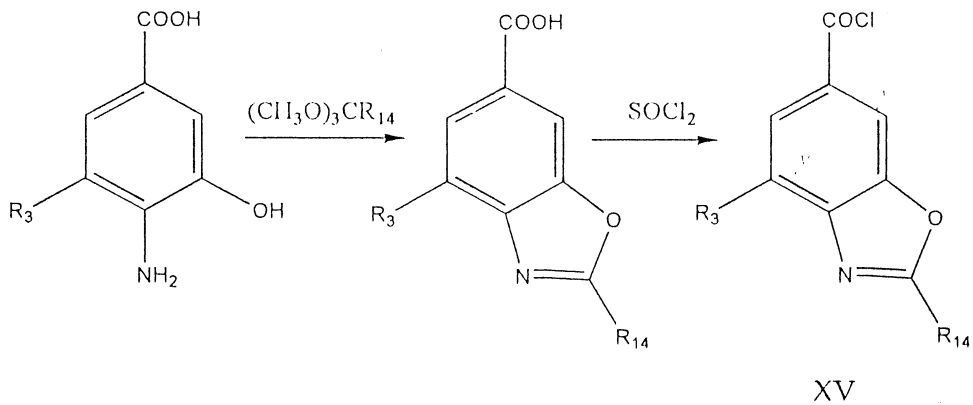
欲製備化合物 41 之芳族部份，5-羧苯駢噻唑衍生物 XIV 係藉業界已知程序由對應 2-胺基酚衍生物製備，例如述於 E.C. Taylor, ed., 雜環化合物化學, vol. 47, John Wiley & Sons, 1987 "稠合雜環之合成", edited by G.P. Ellis; p. 50, part I and pp. 713-714 part II。合成程序敘述如下：



然後 XIV 於三乙胺存在下於 3-胺基-1-氯-3-甲基-2-戊酮鹽酸鹽處理獲得化合物 41。

欲製備化合物 40，43 及 44 之芳族部份，6-羧苯駢噻唑衍生物 (XV) 係藉下述程序由對應 2-胺基酚衍生物製備：

五、發明說明 (35)



其中 R¹⁴ 為 H 或 CH₃。

欲製備化合物 40，6-羧-1,3-苯駢呋唑係由 4-胺基-3-羥苯甲酸以原甲酸三甲酯處理製備。6-羧-1,3-苯駢呋唑首先以亞磺醯氯處理獲得酸氯。酸氯以三乙胺存在下以 3-胺基-1-氯-3-甲基-2-戊酮鹽酸鹽處理獲得化合物 40。

欲製備化合物 43，6-羧-4-氯-1,3-苯駢呋唑係以原甲酸三甲酯處理 4-胺基-5-氯-3-羥苯甲酸製備。6-羧-4-氯-1,3-苯駢呋唑首先以亞磺醯氯處理獲得醯氯。醯氯於三乙胺存在下以 3-胺基-1-氯-3-甲基-2-戊酮鹽酸鹽處理獲得化合物 43。

欲製備化合物 44，6-羧-2-甲基-4-氯-1,3-苯駢呋唑經由以原甲酸三甲酯處理 4-胺基-5-氯-3-羥苯甲酸製備。6-羧-2-甲基-4-氯-1,3-苯駢呋唑首先以亞磺醯氯處理獲得醯氯。醯氯於三乙胺存在下以 3-胺基-1-氯-3-甲基-2-戊酮鹽酸鹽處理獲得化合物 44。

提出下列實例舉例說明本發明之方法。

實例 1：本例顯示當化合物 3 施用於卵菌綱 (Oomycete) 真菌辣椒疫霉 (Phytophthora capsici) 時化合物 3 共價結合 β-微管蛋白之能力。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(36)

辣椒疫霉(ATCC15399)維持於V-8瓊脂，pH 7.0上，每升含有200毫升V-8果汁，4克碳酸鈣及20克瓊脂。含20毫升天冬醯胺-蔗糖培養基(如Erwin, D.C. and Katznelson, K., 1971, 加拿大微生物學期刊, vol.7, p. 15-25 (1971)所述)之錐形瓶(125毫升容量)內接種於V-8瓊脂上生長的辣椒疫霉培養株生長邊緣切下的菌絲體柱(直徑7毫米)。錐形瓶於26°C於旋轉振搖機上於120 rpm振搖培養72小時，然後加入50微升0.8 mM ^{14}C -標記化合物3。又培育1小時後，過濾收集真菌菌絲體，及以100毫升水洗滌。菌絲體於液態氮中冷凍及研磨成細粉。蛋白質於變性條件下萃取(於100°C於62 mM Tris緩衝液，pH 6.8，內含3%硫酸十二酯鈉，5%巰基乙醇及10%甘油，加熱5分鐘)預期造成非共軛結合之配合基解離。萃取出之蛋白質部份接受硫酸十二酯鈉聚丙稀醯胺凝膠電泳(SDS-PAGE)於重覆7.5%聚丙稀醯胺凝膠上根據Laemmli, U.K., Nature(London), vol. 277, pp. 680-685, 1970分離蛋白質。一塊凝膠以庫瑪西亮藍R250染色蛋白質。第二塊凝膠之蛋白質以電泳方式移轉至硝基纖維素膜。膜噴霧EN³HANCETM噴霧劑(杜邦NEN研究產品公司)及使用柯達X-OMAT AR軟片曝光三周進行自動放射性攝影測定放射性標記蛋白質所在位置。 β -微管蛋白於硝基纖維素上所在位置係使用單株抗體對 β -微管蛋白進行免疫標記測定。結果示於圖1。虛線表示庫瑪西染色凝膠之密度測量掃描並顯示蛋白質的分布。實線表示自動放射性照片之密度計量掃描並顯示單一 ^{14}C -標記

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (37)

帶。藉免疫標記測定 β -微管蛋白所在位置以箭號表示且重合 ^{14}C -標記蛋白質帶位置。

實例2：本例顯示化合物1施用於懸浮培養菸草細胞時化合物1共價結合至微管蛋白之能力。

懸浮培養菸草葉細胞於 27°C 於旋轉振搖機於200 rpm於根據 Nagata, K. et al., Molecular and General Genetics, vol. 184, pp. 161-165 (1981) 製備的生長培養基生長。細胞以 ^{14}C -標記化合物1以 $10\text{ }\mu\text{M}$ 濃度處理1小時然後藉過濾收集。細胞於液態氮冷凍及研磨成細粉然後如實例1所述藉SDS-PAGE於重覆凝膠萃取及分離蛋白質。一塊凝膠做蛋白質染色而第二塊凝膠如實例1所述藉自動放射性攝影及免疫標記分析。結果示於圖2。虛線表示庫瑪西染色凝膠之密度測量掃描顯示蛋白質之分布。實線表示自動放射性照片之密度計量掃描，顯示單一 ^{14}C -標記帶。藉免疫標記測定 β -微管蛋白所在位置以箭號表示且重合 ^{14}C -標記蛋白質帶位置。

實例3：本例顯示化合物1共價鍵結至離體牛微管蛋白之 β -亞單位之能力。

使用 Vallee, R.B. 於酶學方法 vol. 134, pp. 89-104 (1986) 所述方法由牛腦分離微管蛋白。微管蛋白 $10\text{ }\mu\text{M}$ 於 1.0 M 麩胺酸鈉， $\text{pH } 6.6$ 含 1 mM 氯化鎂與 $25\text{ }\mu\text{M}$ ^{14}C -標記化合物1於 37°C 培育4小時。樣品移轉至冰浴歷3分鐘及微管蛋白藉加入20%三氯乙酸沉澱，又於冰上培育20分鐘。於 $12,000\text{ g}$ 離心5分鐘後，微管蛋白丸粒以80%冰冷丙酮洗

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (38)

一次，及溶解於室溫 62 mM Tris 緩衝液，pH 6.8，含有 3% 硫酸十二酯鈉，5% 巰基乙醇及 10% 甘油。樣品於 100°C 加熱 2 分鐘，然後液分如實例 1 所述於重覆凝膠上接受 SDS-PAGE。一塊凝膠做蛋白質染色而第二塊凝膠如實例 1 所述藉自動放射性攝影及免疫標記進行分析。免疫標劑係使用單株抗體對 β -微管蛋白及 α -微管蛋白進行。結果示於圖 3。藉放射性標記測得 α -微管蛋白及 β -微管蛋白之位置，以箭頭標示。虛線表示庫瑪西染色凝膠之密度計量掃描且顯示蛋白質之分布，由兩個主要蛋白質帶分別對應於 α -微管蛋白及 β -微管蛋白。實線表示自動放射性相片之密度計量掃描且顯示主要標記 β -微管蛋白亞單位。

實例 4：本例顯示得自不同化學類別之多種抗微管蛋白化合物對化合物 1 結合至菸葉懸浮培養細胞內之微管蛋白之影響。

整分 (2 毫升) 如實例 2 所述生長之懸浮培氧菸葉細胞添加至容量 25 毫升之玻璃小瓶內。然後各小瓶接受 5 微升 DMSO (對照組) 或 5 微升抗微管蛋白化合物溶解於 DMSO。小瓶於 27°C 振搖培育 2 小時，然後加入 5 微升 100 μ M 氚標記化合物 1 於 DMSO 之溶液。小瓶於 27°C 振搖培養 20 分鐘，然後藉加入 5 微升未加標記之 40 mM 化合物 1 中止放射性配合基之結合。樣品又於 27°C 振搖培養 20 分鐘，然後移轉至冰浴內容量 15 毫升之聚丙烯離心管。各小瓶以 2 毫升冰冷生長培養基 (如實例 2 所述) 清洗而清洗溶液加至其餘樣品。於 2500 rpm 於 4°C 離心 3 分鐘後，拋棄上清液而經造粒之細

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (39)

胞再懸浮於4℃冰冷三氟乙酸。樣品於冰浴中保持1小時，再離心及細胞再懸浮於4毫升冰冷乙醇。又於冰浴培育1小時後，於玻璃纖維濾膜上過濾收集細胞及以10毫升冰冷乙醇洗二次。帶有經洗滌細胞之濾膜移轉至閃爍小瓶內，各加入10毫升Hydrofluor™閃爍液(國家診斷公司，紐澤西州，曼維亞)，及樣品於閃爍計數器內計算測定結合的放射性數量。不同抗微管蛋白化合物對放射性配合基結合的影響示於表7，於各種抗微管蛋白化合物存在下，放射性配合基之結合數量係以於DMSO對照組之放射性配合基結合數量之百分率表示。派堤索(Paclitaxel)及抗微管蛋白殺草劑普諾邁(pronamide)及普羅方(chlorpropham)可減低放射性配合基的結合，而抗微管蛋白殺草劑堤符林(trifluralin)可提高放射性配合基的結合。

表7：於使用菸草懸浮培養細胞進行全細胞結合檢定分析，各種抗微管蛋白化合物對氙化化合物1結合至微管蛋白之影響。

抗微管蛋白化合物	濃度 (μ M)	放射性配合基之結合 (%對照)
無(DMSO 對照組)		100.0
派堤索(Paclitaxel)	25	50.3
普諾邁(Pronamide)	100	68.7
堤符林(Trifluralin)	100	129.0
普羅方(Chlorpropham)	100	29.1

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(40)

實例5：本例顯示於辣椒疫霉派堤索對化合物1結合至微管蛋白之影響。

辣椒疫霉於天冬醯胺-蔗糖培養基之液體菌絲體之振搖培養用於製備真菌菌絲體均質懸浮液進行結合檢定分析。天冬醯胺-蔗糖培養基(100毫升)接種由V-8培養基生長的培養株切下的菌絲體柱並於旋轉振搖機於26°C培育48小時。培養於攪混機內均化及30毫升均化物於100毫升新鮮培養基內進行次培養，然後於26°C於旋轉振搖機培育17小時。所得菌絲體藉離心由培養基回收及再懸浮於1170毫升新鮮培養基。整分(2毫升)懸浮液添加至25毫升容量玻璃小瓶內。然後各小瓶接受5微升DMSO(對照組)或5微升派堤索溶解於5微升。小瓶於26°C振搖培養1小時，然後加入5微升100 μ M 氘標記化合物1於DMSO之溶液。小瓶於26°C振搖培養20分鐘，然後藉加入5微升未加標記的40 mM化合物1中止放射性配合基的結合。樣品又於27°C振搖培養20分鐘然後移轉至冰浴內容量15毫升之離心管。各小瓶以2毫升冰冷培養基清洗然後添加至其餘樣品。於3,400 rpm於4°C離心5分鐘後，拋棄上清液及造粒妥之細胞再懸浮於4毫升冰冷10%三氯乙酸。樣品於冰浴保持1小時，再度離心及細胞再懸浮於4毫升冰冷乙醇。又於冰浴培育2小時後，細胞於玻璃纖維過濾膜上藉過濾收集及以10毫升冰冷乙醇洗二次。濾膜經洗滌，細胞移轉入閃爍小瓶內，加入10毫升HydrofluorTM閃爍液，樣品於閃爍計數器計算測定結合的放射性數量。派堤索於各種濃度對放射性配合基結

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (41)

合的影響示於表8，於派堤索存在下，放射性配合基結合量係以於DMSO對照組之放射性配合基結合量之百分率表示。

表8：於使用辣椒疫霉菌絲體進行全細胞結合檢定分析，
派堤索對氙化化合物1結合至微管蛋白之影響。

處理	濃度 (μ M)	放射性配合基之結合 (%對照)
無(DMSO 對照組)		100.0
派堤索	0.004	84.5
派堤索	0.02	54.6
派堤索	0.1	34.6
派堤索	0.5	23.6

實例6：本例顯示達芮德邁(zarilamide)及表1所述化合物7，8，16，19，23及27對化合物1結合至辣椒疫霉之微管蛋白之影響。

準備辣椒疫霉之游動孢子如下。直徑9公分之培養皿內含15毫升之V-8瓊脂接種辣椒疫霉菌絲體柱及於暗處於25℃培育4日，然後置於連續螢光照射下三日誘使出芽。欲誘使釋放游動孢子於各板加入15毫升無菌水。平板於室溫培育10分鐘接著於4℃培育20分鐘，及最終回復至室溫歷15分鐘。然後由各平板移出含游動孢子之流體及調整至每毫升含 5×10^5 游動孢子密度。準備含發芽游動孢子孢囊的檢

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (42)

定分析試管，係將100微升游動孢子懸浮液添加至16 × 1.25厘米聚丙烯管之400微升天冬醯胺-蔗糖培養基，然後鬆鬆加蓋及於26°C於旋轉振搖機於120 rpm培育24小時。

然後含發芽游動孢子孢囊之試管內加入2.5微升DMSO(對照組)或2.5微升試驗化合物溶解於DMSO。各化合物於一系列濃度試驗。試管於26°C振搖培育1小時然後加入2.5微升40 μM氚標記化合物1與DMSO之溶液。小瓶於26°C振搖培育20分鐘，然後加入1.5毫升冰冷未加標記133 μM化合物1中止放射性配合基的結合及將管移至冰浴。於3,400 rpm離心3分鐘後，拋棄上清液，造粒妥的細胞再懸浮於2毫升冰冷10%三氯乙酸。樣品於冰浴中維持1小時，再度離心及細胞再懸浮於2毫升冰冷乙醇。又於冰浴培育1小時後4毫升冰冷乙醇又加至各試管及於Brandell細胞收穫機(Brandell生醫研究開發實驗室，馬里蘭州蓋瑟堡)藉過濾收及於玻璃纖維過濾膜上，並以4毫升冰冷乙醇洗二次。帶有經洗滌細胞之濾膜移轉至閃爍小瓶內，加入0.1毫升水接著加入1毫升Protosol™(杜邦NEN研究產品公司)。小瓶於60°C培育30分鐘及冷卻至室溫。加入10毫升Econofluor™閃爍流體(杜邦NEN研究產品公司)，及樣品於閃爍計數器計數測定結合的放射性數量。各試驗化合物之IC50值(定義為比較不含試驗化合物之對照組，抑制放射性配合基結合達50%所需濃度)由劑量-反應曲線測定及示於表9。

五、發明說明 (43)

表 9

化合物	IC50(微克/毫升)
達芮德邁	7.02
7	0.98
8	0.25
16	1.17
19	0.25
23	0.06
27	1.83

實例 7：本例顯示化合物 1 做為探針用來檢測抗微管蛋白化合物對離體牛微管蛋白之影響的用途。

檢定分析混合物含 10 μ M 離體牛微管蛋白於 1.0 M 麩胺酸鈉，pH 6.6 含 1 mM 氯化鎂，及 2.5 微升 DMSO (對照組) 或 2.5 微升試驗化合物溶解於 DMSO 於 0.5 毫升聚丙烯試管。混合物於 37°C 培育 30 分鐘，然後加入 2.5 微升 640 μ M 氚標記化合物 1 於 DMSO 之溶液。於 37°C 培育 120 分鐘後，整分 (80 微升) 檢定分析混合物施用於 2.3 厘米直徑 Whatman 3MM 濾紙圓盤，濾紙於溫熱空氣箱乾燥 15 秒，浸沒於 3 毫升冰冷 10% 三氯乙酸及於 4°C 放置隔夜。圓盤移轉至 5% 三氯乙酸歷 30 分鐘，又於 5% 三氯乙酸洗二次，於 37°C 於乙醇／醚 (1：1，v／v) 洗滌 30 分鐘，然後於室溫於乙醇／醚 (1：1，v／v) 洗滌 15 分鐘及最終於室溫於醚連續洗滌二次各 15 分鐘。圓盤經乾燥，移至內含 10 毫升 HydrofluorTM 之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (44)

閃爍小瓶內及於閃爍計數器計數。終濃度100 μ M抗微管蛋白化合物對放射性配合基結合的影響示於表10，於各抗微管蛋白化合物存在下放射性配合基結合數量係以占DMSO對照組之放射性配合基結合數量之百分率表示。

表 10

化合物	結合(%對照組)
秋水仙素	18.7
鬼臼毒素	21.7
諾卡答左(Nocodazole)	31.3
文布拉斯汀(Vinblastine)	90.7

需了解本說明書僅供舉例說明之用，而絕非限制其範圍，可未背離如隨附之申請專利範圍界定之本發明之精髓及範圍做出多種修改與變化。

圖式簡單說明

圖1顯示以¹⁴C標記化合物處理辣椒疫霉後藉硫酸十二酯鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳和自動放射性攝影術分析放射性標記蛋白質。

圖2顯示以¹⁴C標記化合物處理懸浮培養菸草細胞後藉硫酸十二酯鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳和自動放射性攝影術分析放射性標記蛋白質。

圖3顯示以¹⁴C標記化合物處理離體牛微管蛋白後藉硫酸十二酯鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳和自動放射性攝影術分析放射性標記蛋白質。

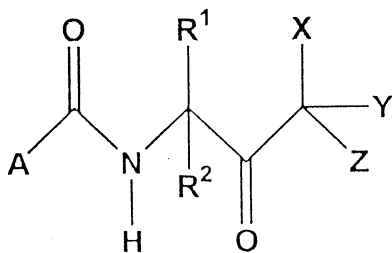
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

四、中文發明摘要 (發明之名稱： 特定胺類作為抗管素(ANTITUBULIN)活性及)
抗性監測檢測探針之用途

本發明係關於使用某種可抑制真核細胞生長的醯胺做為探針於結合檢定分析篩檢化合物之抗微管蛋白(antitubulin)活性，監測及定量微管蛋白(tubulin)抗性之方法，該醯胺具有結構式

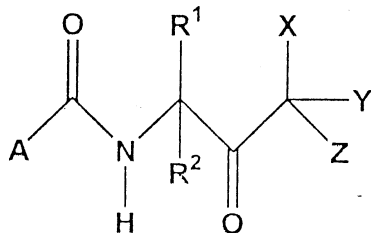


其中

A 為環烷基，烷基，鹵烷基，烷硫基，鹵烷硫基，烯基，鹵烯基，炔基，鹵炔基，烷氧基，鹵烷氧基或苯基，吡啶

英文發明摘要 (發明之名稱： USE OF CERTAIN AMIDES AS PROBES FOR DETECTION OF)
ANTITUBULIN ACTIVITY AND RESISTANCE MONITORING

This invention relates to methods for screening compounds for antitubulin activity, resistance monitoring and quantifying tubulin using certain amides that inhibit the growth of eukaryotic cells as probes in binding assays, said amides having the structural formula



wherein

A is cycloalkyl, alkyl, haloalkyl, alkylthio, haloalkylthio, alkenyl, haloalkenyl, alkynyl, haloalkynyl, alkoxy, haloalkoxy, or phenyl, pyridyl, furyl, thienyl, isoxazolyl, oxazolyl, pyrrolyl, isothiazolyl, thiazolyl, pyrazolyl, imidazolyl,

四、中文發明摘要 (發明之名稱：)

基，呋喃基，噻吩基，異噁唑基，噁唑基，吡咯基，異噻唑基，噻唑基，吡唑基，咪唑基，噻啉基，噻啉基，異噻啉基，萘基，噻吩基，吡啶基，苯駢噻吩基，吡啶基，苯駢呋喃基或苣基，全部皆可以可接受方式以至多4個取代基取代；

R^1 及 R^2 分別為氫原子，烷基，鹵烷基，烯基，鹵烯基，炔基或鹵炔基，但 R^1 及 R^2 非皆為氫原子；及

X，Y及Z分別為氫原子，鹵原子，氰基，硫氰基，異硫氰基，或烷基磺醯氧基，但X，Y及Z中之至少一者非為氫原子；或

其光學對映異構物。

英文發明摘要 (發明之名稱：)

pyrimidinyl, quinolyl, isoquinolyl, naphthyl, pyridazinyl, pyrazinyl, benzothienyl, indolyl, benzofuranyl or benzyl, all optionally substituted in an acceptable manner with up to 4 substituents;

R^1 and R^2 are each independently a hydrogen atom, alkyl, haloalkyl, alkenyl, haloalkenyl, alkynyl or haloalkynyl, provided that both R^1 and R^2 are not a hydrogen atom; and

X, Y and Z are each independently a hydrogen atom, halo, cyano, thiocyno, isothiocyno or alkylsulfonyloxy, provided that at least one of X, Y and Z is not a hydrogen atom; or

the optical enantiomers thereof.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

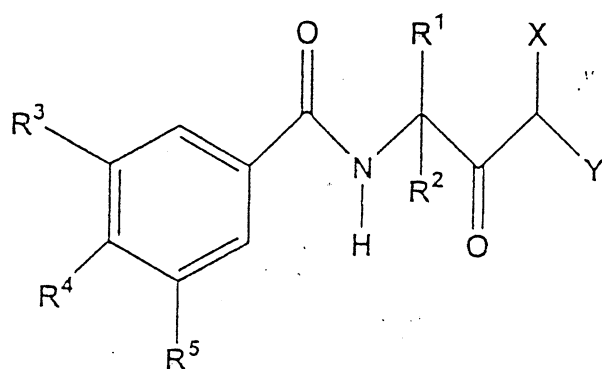
線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

公告 申請專利範圍

91.6.14 修正
年 月 日 補充

1. 一種進行結合檢定分析之方法，其可用於篩選具抗微管蛋白活性之化合物、監測抗性及測定真核細胞、細胞萃出物及微管蛋白製劑內微管蛋白含量，其係利用可抑制真核細胞生長之醯胺，該醯胺類具有結構式(II)



(II)

其中

R^1 及 R^2 分別為氫原子， (C_1-C_6) 烷基，鹵 (C_1-C_6) 烷基， (C_2-C_6) 烯基或 (C_2-C_6) 炔基，但 R^1 及 R^2 非皆為氫原子；

R^3 ， R^4 及 R^5 分別為氫原子，鹵原子，氰基， (C_1-C_6) 烷基，鹵 (C_1-C_6) 烷基， (C_2-C_6) 烯基， (C_2-C_6) 炔基， (C_1-C_6) 烷氧基， (C_1-C_6) 烷硫基，鹵 (C_1-C_6) 烷基，硝基， $-NR^6R^7$ ， $-CR^8=NOR^9$ ， $-NHCOOR^{10}$ ， $-CONR^{11}R^{12}$ 或 $-COOR^{13}$ ；或 R^4 及 R^5 共同形成稠合 5，6 或 7 員環，其可含有至多 2 個選自 O，S，N 及 P 之雜原子；

六、申請專利範圍

R^6 , R^7 , R^8 , R^9 , R^{10} , R^{11} , R^{12} 及 R^{13} 分別為氫原子或(C₁-C₆)烷基；及

X 及 Y 分別為氫原子，鹵原子，氰基，硫氰基，異硫氰基或(C₁-C₆)烷基磺醯氧基，但 X 及 Y 非皆為氫原子；或

其光學對映異構物。

2. 如申請專利範圍第1項之方法，該方法使用具結構式(II)之苯甲酸醯胺，其中

R^1 為甲基；

R^2 為甲基或乙基；

R^3 及 R^5 分別為氫原子，鹵原子，甲基，硝基，氰基， $-NR^6R^7$ ， $-CR^8=NOR^9$ 或 $-NHCOOR^{10}$ ，但 R^3 及 R^5 非皆為氫原子；

R^4 為氫原子，鹵原子， $-NR^6R^7$ ，氰基， $-CR^8=NOR^9$ ， $-NHCOOR^{10}$ ， $-COOR^{13}$ 或(C₁-C₄)烷基；

R^6 , R^7 , R^8 , R^9 , R^{10} 及 R^{13} 分別為氫原子或(C₁-C₆)烷基；

X 為氰；及

Y 為氫原子；或

其光學對映異構物。

3. 如申請專利範圍第1項之方法，其中哺乳類細胞、細胞萃出物或微管蛋白係使用於分析中，且其中

R^1 為甲基；

六、申請專利範圍

R^2 為乙基；

R^3 為鹵原子或氰基；

R^4 及 R^5 為胺基或 $-\text{CH}=\text{NOCH}_3$ 但 R^4 及 R^5 不相同；

X 為氯；及

Y 為氫原子；或

其光學對映異構物。

4. 如申請專利範圍第1項之方法，其中真菌細胞、細胞萃
出物或微管蛋白係使用於分析中，其中該真菌屬於子囊
菌綱(Ascomycete)，半分生孢子菌綱(Deuteromycete)
或擔子菌綱(Basidiomycete)真菌，及其中

R^1 為甲基，

R^2 為甲基或乙基，

R^3 為 $-\text{CH}=\text{NOCH}_3$ ，

R^4 為氫原子，鹵原子，胺基，氰基或甲基，

R^5 為鹵原子，甲基，硝基或氰基，

X 為氯及

Y 為氫原子；或

其光學對映異構物。

5. 如申請專利範圍第1項之方法，其中真菌細胞、細胞萃
出物或微管蛋白係使用於分析中，其中該真菌屬於卵菌
綱(Oomycete)真菌，及其中

R^1 為甲基；

R^2 為乙基；

六、申請專利範圍

R^3 及 R^5 分別為氫原子，鹵原子，甲基，硝基，氰基， $-NR^6R^7$ ， $-CR^8=NOR^9$ 或 $-NHCOOR^{10}$ ，但 R^3 及 R^5 非皆為氫原子；

R^4 為氫原子，鹵原子， $-NR^6R^7$ ，氰基， $-CR^8=NOR^9$

， $-NHCOOR^{10}$ ， $-COOR^{13}$ 或 (C_1-C_4) 烷基；

R^6 ， R^7 ， R^8 ， R^9 ， R^{10} 及 R^{13} 分別為氫原子或甲基；

X 為氯；及

Y 為氫原子；或

其光學對映異構物。

6. 如申請專利範圍第1項之方法，其中植物細胞、細胞萃
出物或微管蛋白係使用於分析中，及其中

R^1 為甲基；

R^2 為甲基或乙基；

R^3 及 R^5 分別為氫原子，鹵原子，甲基，硝基或氰基，但 R^3 及 R^5 非皆為氫原子；

R^4 為氫原子，

X 為氯；及

Y 為氫原子；或

其光學對映異構物。

圖 1 以 ^{14}C 標記化合物處理辣根疫毒後藉硫酸十二酯鈉聚丙
烯醯胺凝膠電泳和自動放射性攝影術分析放射性標記蛋白質

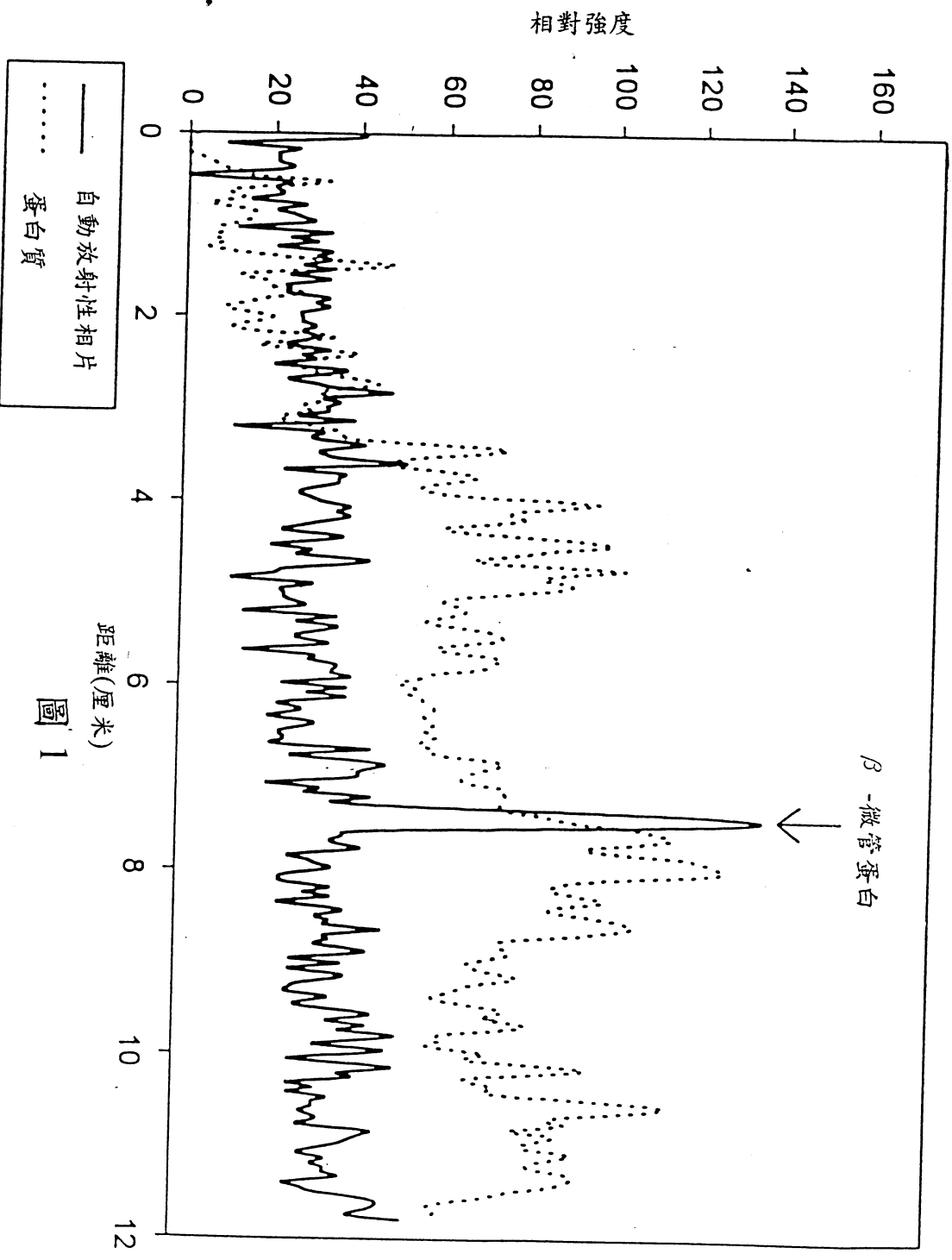


圖 1

圖 2 以 ^{14}C 標記化合物處理懸浮培養菸草細胞後藉硫酸十二酯鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳和自動放射性攝影術分析放射性標記蛋白質

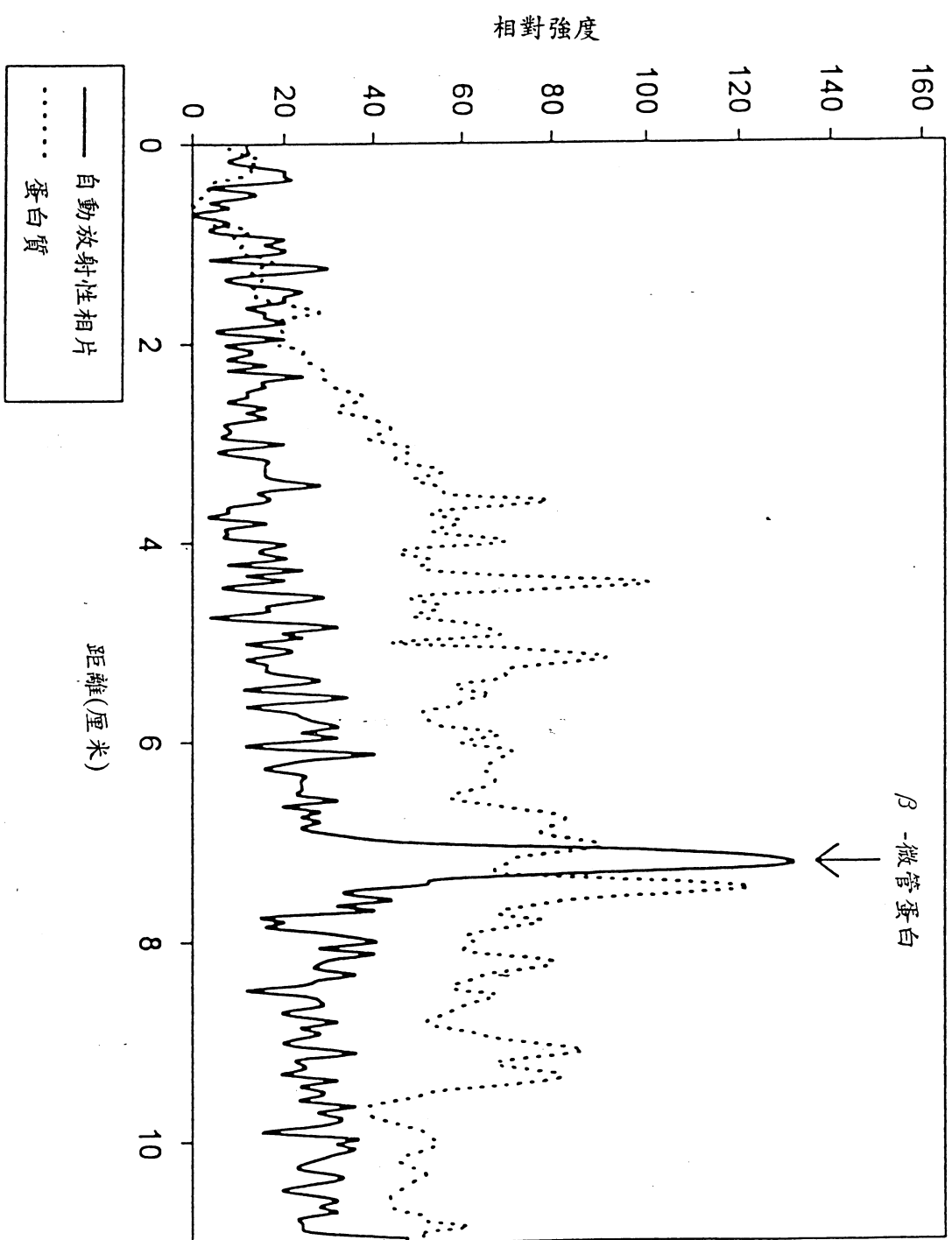


圖 2

圖 3 以 ^{14}C 標記化合物處理離體牛微管蛋白後藉硫酸十二酯
鈉聚丙烯酰胺凝膠電泳和自動放射性攝影術分析放射性標記蛋白質

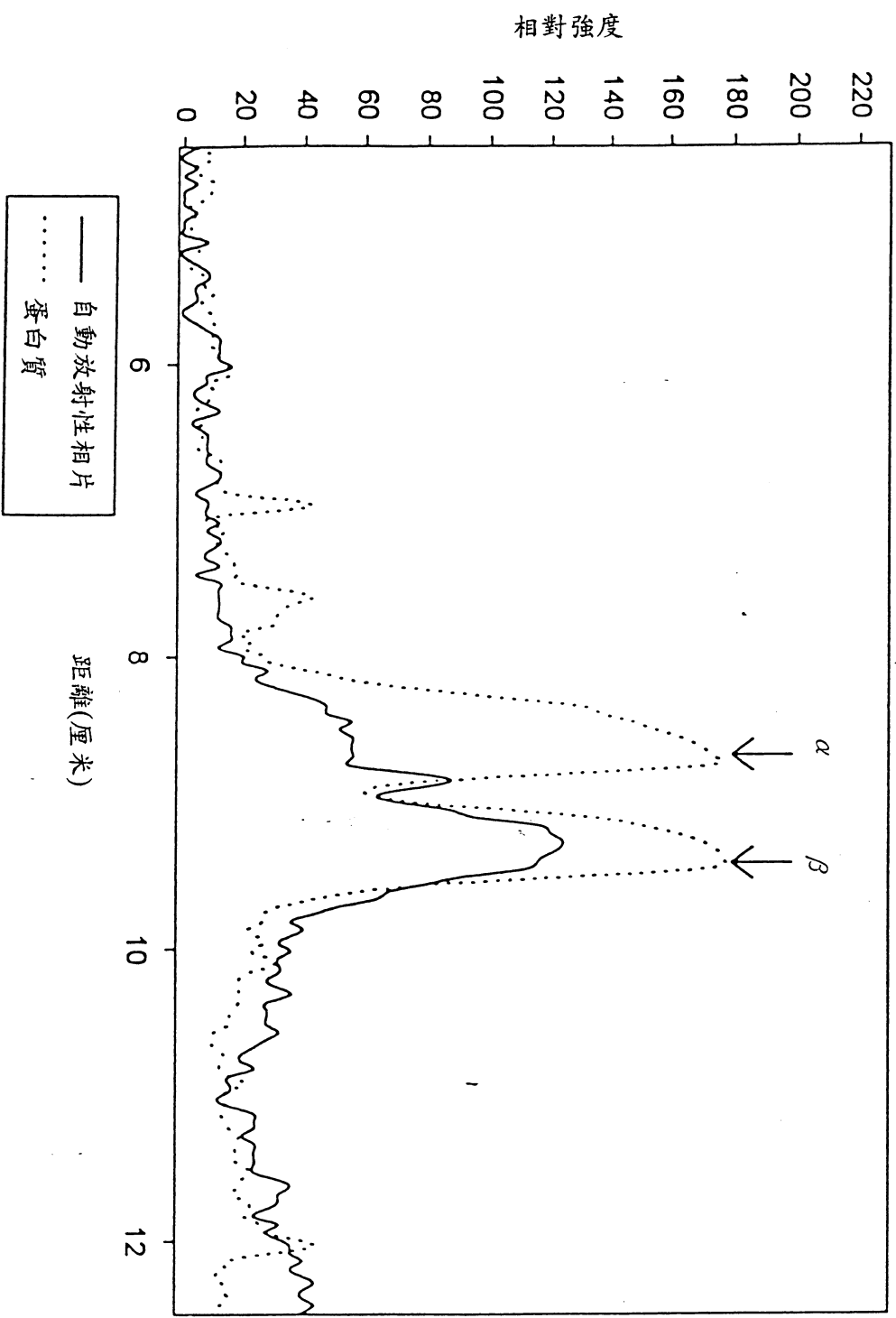


圖 3