

私立東海大學化學系研究所

碩士論文

合成 IMD-0354 衍生物以及探討其對於轉錄因子  
NF- $\kappa$ B 的抑制效果

Studies on the synthesis of IMD-0354 derivatives and  
their inhibition to transcription factor NF- $\kappa$ B.

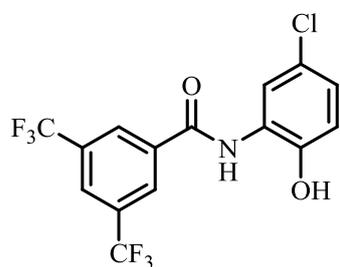
指導教授：吳雨珊 博士

研究生：謝正鴻 撰

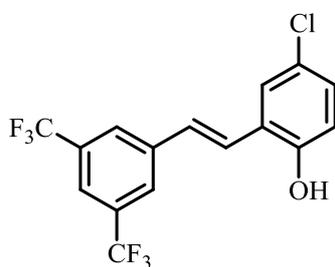
中華民國 一 百 年 七 月

## 中文摘要

Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 為重要的轉錄因子，當細胞受到外來刺激時，NF- $\kappa$ B 將會活化造成細胞異常增生與細胞抗凋亡現象而導致病變。2002 年由 Medical Molecular Design 公司發表的 IMD-0354 為有效的 NF- $\kappa$ B 抑制劑，本研究以 IMD-0354 為前導化合物，合成三種系列的衍生物，探討與前導化合物的結構與活性關係。第一系列以 DCC 偶合反應合成苯甲醯苯胺衍生物，第二系列以霍納-沃茲沃斯-艾蒙斯反應合成二苯乙烯衍生物，第三系列以 DCC 偶合反應合成 *N*-substituted indole 衍生物，並測試其對於 NF- $\kappa$ B 的抑制活性。生物活性結果顯示衍生物受到三氟甲基官能基、醯胺鍵結上氫鍵作用力與衍生物整體剛性的影響。*N*-substituted indole 衍生物對於 NF- $\kappa$ B 的抑制活性不及苯甲醯苯胺與二苯乙烯衍生物。50  $\mu$ M 濃度下以 WY4102 與 WY4201 對於 NF- $\kappa$ B 有最佳的抑制活性。



WY4102



WY4201

## Abstract

Nuclear factor- $\kappa$ B ( NF- $\kappa$ B ) is an important transcription factor. The cell is stimulated by stress, cytokines and toxic metals, leading to NF- $\kappa$ B activation and overexpress of NF- $\kappa$ B would result in proliferation of cell or development of tumor. We took a novel potential NF- $\kappa$ B inhibitor: IMD-0354 as lead compound, and designed, synthesized three series of derivatives. The benzamide analogs were synthesized by  $S_N2$  reaction and DCC coupling reaction. The stilbene derivatives were synthesized by Horner - Wadsworth - Emmons reaction, and *N*-substituted indole derivatives are synthesized by DCC coupling reaction. The structure-activity relationship shows that the trifluoromethyl group, hydrogen bond effect on amide and degree of rigidity of compounds will affect the inhibition of NF- $\kappa$ B.

## 目錄

中文摘要.....	I
Abstract.....	II
目錄.....	III
圖目錄.....	V
表目錄.....	VI
圖譜目錄.....	VIII
<b>第一章 緒論</b> .....	<b>1</b>
1.1 NF- $\kappa$ B 訊息傳遞途徑.....	2
1.2 IKK 複合體.....	4
1.3 I $\kappa$ Bs 家族.....	6
1.4 NF- $\kappa$ B 家族.....	8
1.5 NF- $\kappa$ B 抑制劑.....	10
1.6 研究動機.....	15
<b>第二章實驗材料與方法</b> .....	<b>19</b>
2.1 有機合成.....	19
2.1.1 第一系列.....	21
2.1.2 第二系列.....	28
2.1.3 第三系列.....	30

2.2 生物實驗.....	36
<b>第三章 結果與討論.....</b>	<b>37</b>
3.1 有機合成.....	37
3.1.1 第一系列.....	37
3.1.2 第二系列.....	40
3.1.3 第三系列.....	42
3.2 生物活性.....	44
3.2.1 第一系列.....	44
3.2.2 第二系列.....	49
3.2.3 第三系列.....	50
<b>第四章 結論.....</b>	<b>53</b>
<b>第五章 未來展望.....</b>	<b>55</b>
參考資料.....	56

## 圖目錄

圖 1.1、NF- $\kappa$ B 訊息傳遞途徑.....	4
圖 1.2、IKK 家族單元體結構.....	5
圖 1.3、IKK 複合體活化過程.....	6
圖 1.4、I $\kappa$ Bs 家族.....	7
圖 1.5、I $\kappa$ Bs 與 NF- $\kappa$ B 結合圖.....	8
圖 1.6、NF- $\kappa$ B 與 DNA 結合圖.....	9
圖 1.7、NF- $\kappa$ B 家族單元體結構.....	10
圖 1.8、KL-1156.....	10
圖 1.9、白藜蘆醇 (Resveratrol).....	12
圖 1.10、查耳酮 (Chalcone).....	13
圖 1.11、2-bromo-1-hydroxyphenazine.....	14
圖 1.12、IMD-0354 提供之作用力.....	15
圖 1.13、IMD-0354 與其衍生物結構圖.....	18
圖 3.1、S <sub>N</sub> 2 反應機構.....	38
圖 3.2、DCC 偶合反應機構.....	39
圖 3.3、HWE 反應機構.....	41
圖 3.4、Indole 合成反應機構.....	43

## 表目錄

表 1.1、KL-1156 與其衍生物抑制 LPS 誘導 NF- $\kappa$ B 活性之 IC <sub>50</sub> 值.....	11
表 1.2、白藜蘆醇衍生物對於 TNF- $\alpha$ 的抑制率與抑制 NF- $\kappa$ B 活性的 IC <sub>50</sub> .....	12
表 1.3、查耳酮衍生物抑制 TNF- $\alpha$ 誘發 NF- $\kappa$ B 活性之 IC <sub>50</sub> 值...13	
表 1.4、50 $\mu$ M 下吩嗪衍生物對於 NF- $\kappa$ B 的抑制率與 IC <sub>50</sub> 值.....	14
表 1.5、50 $\mu$ M 下苯甲醯苯胺衍生物對於 NF- $\kappa$ B 的抑制率與 IC <sub>50</sub> 值.....	17
表 1.6、50 $\mu$ M 下苯甲醯苯胺衍生物對於 NF- $\kappa$ B 的抑制率.....	17
表 2.1、以 S <sub>N</sub> 2 反應合成之苯甲醯苯胺衍生物.....	21
表 2.2、以 DCC 偶合反應合成之苯甲醯苯胺衍生物.....	23
表 2.3、以 HWE 反應合成之二苯乙烯衍生物.....	28
表 2.4、以 DCC 偶合反應合成之 <i>N</i> -substituted indole 衍生物.....	31
表 3.1、以 S <sub>N</sub> 2 反應合成之苯甲醯苯胺衍生物產率.....	38
表 3.2、以 DCC 偶合反應合成之苯甲醯苯胺衍生物產率.....	40
表 3.3、以 HWE 反應合成之二苯乙烯之衍生物產率.....	42
表 3.4、以 DCC 偶合反應合成之 <i>N</i> -substituted indole 之衍生物產率.....	44

表 3.5、50 $\mu\text{M}$ 下苯甲醯苯胺衍生物對於 NF- $\kappa\text{B}$ 的抑制率.....	45
表 3.6、50 $\mu\text{M}$ 下苯甲醯苯胺衍生物對於 NF- $\kappa\text{B}$ 的抑制率.....	46
表 3.7、50 $\mu\text{M}$ 下苯甲醯苯胺衍生物對於 NF- $\kappa\text{B}$ 的抑制率.....	47
表 3.8、50 $\mu\text{M}$ 下苯甲醯苯胺衍生物對於 NF- $\kappa\text{B}$ 的抑制率.....	48
表 3.9、50 $\mu\text{M}$ 下苯甲醯苯胺衍生物對於 NF- $\kappa\text{B}$ 的抑制率.....	48
表 3.10、50 $\mu\text{M}$ 下二苯乙烯衍生物對於 NF- $\kappa\text{B}$ 的抑制率.....	49
表 3.11、50 $\mu\text{M}$ 下苯甲醯苯胺與二苯乙烯衍生物對於 NF- $\kappa\text{B}$ 抑制 率的比較.....	50
表 3.12、50 $\mu\text{M}$ 下 <i>N</i> -substituted indole 衍生物對於 NF- $\kappa\text{B}$ 的抑制 率.....	51
表 3.13、50 $\mu\text{M}$ 下苯甲醯苯胺與 <i>N</i> -substituted indole 衍生物對於 NF- $\kappa\text{B}$ 抑制率的比較.....	52

## 圖譜目錄

<i>N</i> -(5-chloro-2-hydroxyphenyl)-3,5-bis(trifluoromethyl)benzamide ( WY4102 ) 氫譜圖.....	62
<i>N</i> -(5-chloro-2-hydroxyphenyl)-3,5-bis(trifluoromethyl)benzamide ( WY4102 ) 碳譜圖.....	63
<i>N</i> -(5-chloro-2-hydroxyphenyl)-3,5-bis(trifluoromethyl)benzamide ( WY4102 ) 質譜圖.....	64
<i>N</i> -(5-chloro-2-methoxyphenyl)-3,5-bis(trifluoromethyl)benzamide ( WY4102P ) 氫譜圖.....	65
<i>N</i> -(5-chloro-2-methoxyphenyl)-3,5-bis(trifluoromethyl)benzamide ( WY4102P ) 碳譜圖.....	66
<i>N</i> -(5-chloro-2-methoxyphenyl)-3,5-bis(trifluoromethyl)benzamide ( WY4102P ) 質譜圖.....	67
4-chloro- <i>N</i> -(2-hydroxyphenyl)benzamide ( WY4108 ) 氫譜圖...	68
4-chloro- <i>N</i> -(2-hydroxyphenyl)benzamide ( WY4108 ) 碳譜圖.....	69
4-chloro- <i>N</i> -(2-hydroxyphenyl)benzamide ( WY4108 ) 質譜圖.....	70
<i>N</i> -(2-hydroxyphenyl)-4-methylbenzamide ( WY4113 ) 氫譜圖.....	71
<i>N</i> -(2-hydroxyphenyl)-4-methylbenzamide ( WY4113 ) 碳譜圖...	72
<i>N</i> -(2-hydroxyphenyl)-4-methylbenzamide ( WY4113 ) 質譜圖...	73
3,5-bis(trifluoromethyl)- <i>N</i> -(2-hydroxyphenyl)benzamide ( WY4114 ) 氫譜圖...	74

3,5-bis(trifluoromethyl)-*N*-(2-hydroxyphenyl)benzamide ( WY4114 )

碳譜圖...75

3,5-bis(trifluoromethyl)-*N*-(2-hydroxyphenyl)benzamide ( WY4114 )

質譜圖...76

*N*-(3-chlorophenyl)-4-(trifluoromethyl)benzamide ( WY4115 )

氮譜圖.....77

*N*-(3-chlorophenyl)-4-(trifluoromethyl)benzamide ( WY4115 )

碳譜圖.....78

*N*-(3-chlorophenyl)-4-(trifluoromethyl)benzamide ( WY4115 )

質譜圖.....79

*N*-(3-chlorophenyl)-3,5-bis(trifluoromethyl)benzamide ( WY4116 )

氮譜圖.....80

*N*-(3-chlorophenyl)-3,5-bis(trifluoromethyl)benzamide ( WY4116 )

碳譜圖.....81

*N*-(3-chlorophenyl)-3,5-bis(trifluoromethyl)benzamide ( WY4116 )

質譜圖.....82

*N*-(5-chloro-2-hydroxyphenyl)-4-(trifluoromethyl)benzamide ( WY4117 )

氮譜圖 83

*N*-(5-chloro-2-hydroxyphenyl)-4-(trifluoromethyl)benzamide ( WY4117 )

碳譜圖 84

*N*-(2-Hydroxy-phenyl)-4-nitro-benzamide ( WY4118 ) 氮譜圖.....85

*N*-(2-Hydroxy-phenyl)-4-nitro-benzamide ( WY4118 ) 碳譜圖.....86

<i>N</i> -(2-Hydroxy-phenyl)-4-nitro-benzamide ( WY4118 ) 質譜圖.....	87
<i>N</i> -(2-Hydroxy-phenyl)-4-trifluoromethyl-benzamide ( WY4119 ) 氮譜圖.....	88
<i>N</i> -(2-Hydroxy-phenyl)-4-trifluoromethyl-benzamide ( WY4119 ) 碳譜圖.....	89
<i>N</i> -(2-Hydroxy-phenyl)-4-trifluoromethyl-benzamide ( WY4119 ) 質譜圖.....	90
3-Chloro- <i>N</i> -(4-trifluoromethyl-phenyl)-benzamide ( WY4120 ) 氮譜圖.....	91
3-Chloro- <i>N</i> -(4-trifluoromethyl-phenyl)-benzamide ( WY4120 ) 碳譜圖.....	92
3-Chloro- <i>N</i> -(4-trifluoromethyl-phenyl)-benzamide ( WY4120 ) 質譜圖.....	93
(3,5-Bis-trifluoromethyl-phenyl)-(4-chloro-indol-1-yl)-methanone ( WY4305 ) 氮譜圖.....	
(3,5-Bis-trifluoromethyl-phenyl)-(4-chloro-indol-1-yl)-methanone ( WY4305 ) 碳譜圖.....	94
(3,5-Bis-trifluoromethyl-phenyl)-(4-chloro-indol-1-yl)-methanone ( WY4305 ) 質譜圖.....	95
(4-Chloro-indol-1-yl)-(4-trifluoromethyl-phenyl)-methanone ( WY4306 ) 氮譜圖.....	96
(4-Chloro-indol-1-yl)-(4-trifluoromethyl-phenyl)-methanone ( WY4306 )	

碳譜圖.....	97
(4-Chloro-indol-1-yl)-(4-trifluoromethyl-phenyl)-methanone ( WY4306 )	
質譜圖.....	98

## 第一章. 緒論

根據衛生署統計資料顯示，2010 年全國國民的十大死因之首仍為癌症，占全體人數百分比達 28.4%<sup>1</sup>。癌症又稱惡性腫瘤，常見於人體主要器官中。有別於人體正常細胞，癌症細胞吸收大量養分並快速生長，使得器官出現壞死、潰瘍及出血，且難以止血和癒合，最後導致病患死亡。

治療癌症的方法有外科手術切除、化學治療與放射線治療。傳統療法以強力藥物或是高能量射線摧毀癌細胞，同時也傷害正常細胞，術後帶來強烈副作用。近年來所開發的是標靶治療法 (Target therapy)，選擇特定分子作為標靶，使用專一性藥物進而達到抑制癌症細胞的效果。特定分子包含癌細胞特有生長因子受體、血管新生因子等，這類分子在細胞接受外來刺激時過度表現，影響癌細胞的存活與生長。理想的分子標靶具有以下特點：1. 標靶分子在癌細胞中大量表現。2. 分子標靶與癌症細胞的生存功能有關。3. 分子標靶與癌症的致病機制有關。4. 標靶分子對正常細胞的表現較少<sup>2</sup>。目前臨床上所使用的標靶治療藥物可分為以下幾類：第一類藥物為抑制血管新生，透過藥物抑制內皮細胞的增長，使血管無法新生，達到抑制癌細胞生長的功效。第二類藥物為阻斷癌細胞訊息傳遞路徑，針對直接導致癌症產生或促進癌症發展的位置作專一性阻斷，進而抑制癌症的發

生與惡化<sup>3</sup>。

在文獻中指出，癌症細胞由相關慢性發炎疾病引發而成，例如：潰瘍性大腸炎與大腸癌、慢性胃炎與胃癌等<sup>4</sup>，慢性發炎為長期受到壓力、病毒或細菌感染等因素影響，在細胞中非活化狀態的 nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 受到一連串訊息傳遞後活化，進入細胞核與 DNA 結合，調控基因表現。

### 1.1 NF- $\kappa$ B 訊息傳遞途徑

NF- $\kappa$ B 為存在於真核細胞中的轉錄因子，在正常情況下與抑制蛋白 I $\kappa$ Bs 結合，以非活化的形態存在於細胞質中。當細胞承受外來刺激 (TNF- $\alpha$ 、IL-1、UV light) 時，IKK 複合體 (IKK $\alpha$ 、IKK $\beta$ ) 經由上游因子 (NIK) 磷酸化後而活化，接著磷酸化下游的 I $\kappa$ Bs，當 I $\kappa$ Bs 被特定磷酸化後接著被泛素標定，泛素化的 I $\kappa$ Bs 將被 26S 蛋白酶體 (26S proteasome) 辨識後降解成胺基酸片段，此時 I $\kappa$ Bs 將失去抑制 NF- $\kappa$ B 的功能<sup>5</sup> (圖 1.1)。

隨著 I $\kappa$ Bs 降解而活化的 NF- $\kappa$ B 進入細胞核中與 DNA 結合，再由轉錄與轉譯作用生成抗凋亡蛋白與發炎蛋白，例如：cIAPs (Caspase inhibitors of apoptosis proteins)、XIAP (X-linked inhibitors of apoptosis)、Bcl-2 (B cell lymphoma 2)<sup>6</sup>，下游的 Caspase 受到抗凋

亡蛋白抑制而中斷細胞凋亡的機制 (Caspase 為富含胱胺酸結構的蛋白質，具有促進細胞凋亡的作用)。細胞凋亡又稱計畫性細胞死亡，是指細胞在正常狀況下受到環境刺激後，在基因調控之下的自然死亡現象，當細胞無法進行凋亡程序，細胞產生異常增生的現象，進而形成腫瘤。

另一方面，正常細胞長期接受發炎蛋白刺激的環境下，會釋放出細胞激素 (Cytokine)、細胞附著分子 (Cell adhesion molecules)、促發炎酵素 (Pro-inflammatory enzymes)<sup>7</sup>，影響細胞的存活、增生等功能，引發許多發炎疾病的產生，例如：風濕性關節炎、動脈硬化、氣喘、發炎型腸疾病、糖尿病等。由上述可知 NF- $\kappa$ B 在人體中的重要性，因此開發抑制 NF- $\kappa$ B 活性達到治療效果的藥物為本研究的目標。

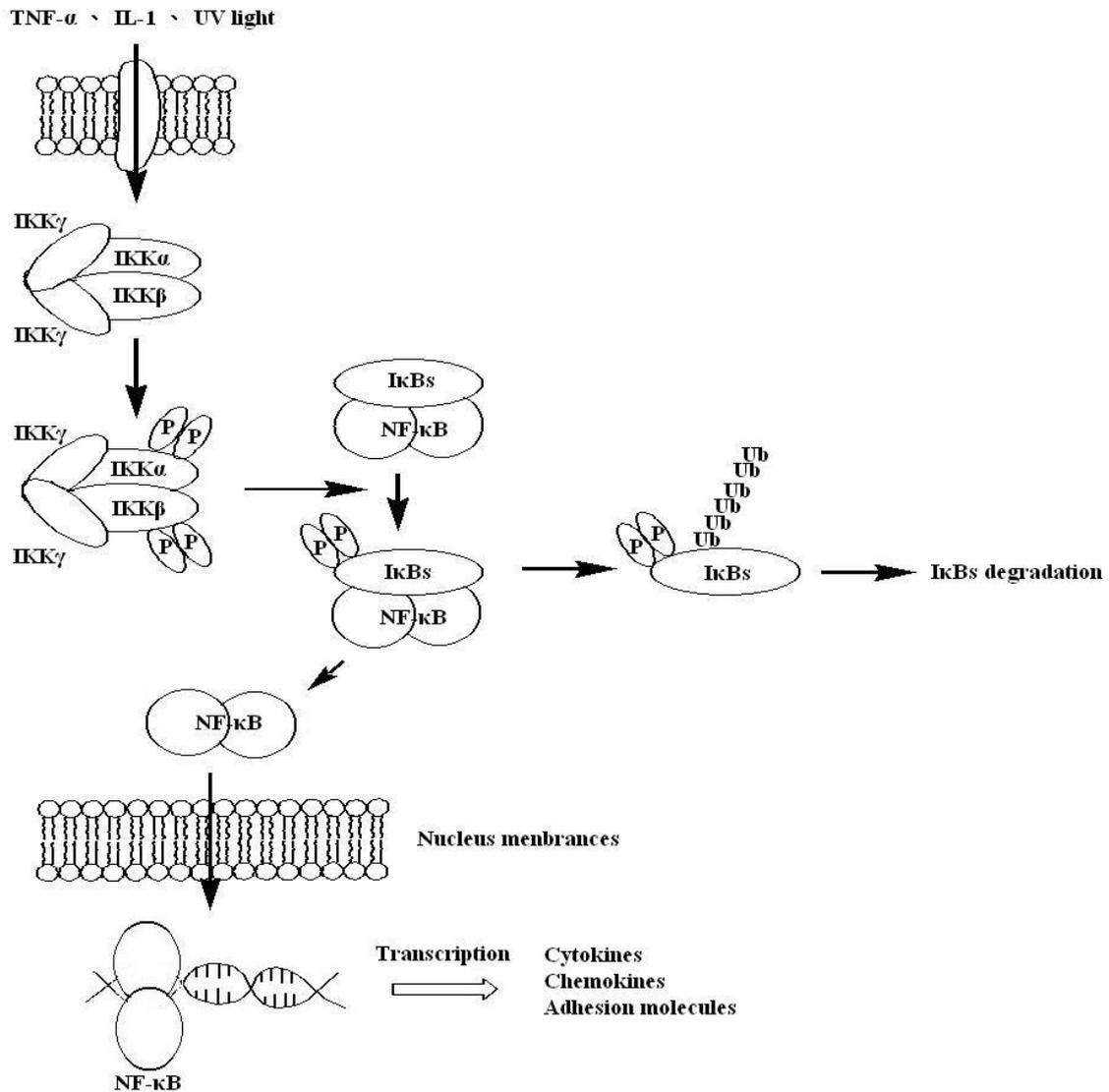


圖 1.1、NF- $\kappa$ B 訊息傳遞途徑

## 1.2 IKK 複合體

IKK Complex 由 **IKK $\alpha$** 、**IKK $\beta$**  與調控次單元 **IKK $\gamma$**  (NF- $\kappa$ B essential modulator, NEMO) 所組成，**IKK $\alpha$** 、**IKK $\beta$**  兩者的結構相似，在氮端有 **Kinase domain (KD)**，碳端有螺旋-環-螺旋結構 (Helix-loop-helix, HLH) 與白氨酸拉鍊結構 (Leucine zipper, LZ)。IKK $\alpha$ 、IKK $\beta$  之間透過 LZ 形成同種雙體或是異種雙體<sup>8</sup>。IKK $\gamma$  由

419 個胺基酸殘基所組成，IKK $\gamma$  之間藉由 coiled-coil motifs 形成雙體結構，在碳端區域具有白氨酸拉鍊結構與鋅指（Zinc fingers），

IKK $\gamma$  藉此與 IKK $\alpha$ 、IKK $\beta$  的異種雙體結合形成複合體<sup>9</sup>（圖 1.2）。

正常情況下 NF- $\kappa$ B 受到 I $\kappa$ Bs 的抑制，當正常細胞受到腫瘤壞死因子（Tumor necrosis  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ）、介白素（Interleukin 1, IL-1）、酯多醣體（Lipopolysaccharide, LPS）等外在因子刺激之後，在 IKK $\beta$  的 KD 中 Tloop 的 Ser-177、Ser-181 磷酸化，使得 HLH 與 KD 之間的作用力改變，複合體的構型也跟著變化，使得 IKK 複合體活化<sup>10</sup>（圖 1.3）。IKK 複合體會各別特定磷酸化 I $\kappa$ B $\alpha$  上的 Ser-32、Ser-36 與 I $\kappa$ B $\beta$  上的 Ser-19、Ser-23 兩個胺基酸，被磷酸化的 I $\kappa$ Bs 會被泛素標定，I $\kappa$ Bs 被降解成胺基酸片段後將失去抑制 NF- $\kappa$ B 的功能。

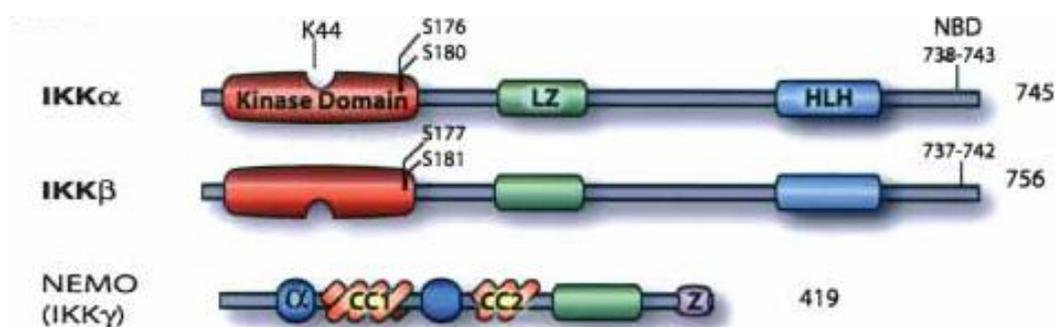


圖 1.2、IKK 家族單元體結構<sup>11</sup>

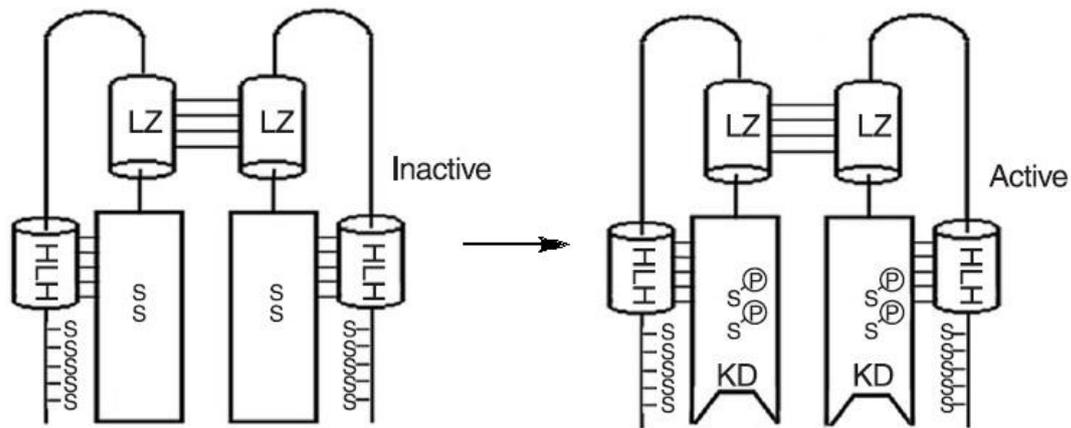


圖 1.3、IKK 複合體活化過程

### 1.3 IκBs 家族

在正常狀況下 NF-κB 與抑制蛋白 IκBs 結合，使 NF-κB 以非活化的型態停留於細胞質中，無法進入細胞核與 DNA 結合。IκBs 家族成員有 IκBα、IκBβ、Bcl-3、IκBε、IκBγ、P100 與 P105<sup>12</sup>。IκBs 結構包含氮端的訊息接收區域 (Signal receiving domains, SRD)、錨狀重複區域 (Ankyrin repeat domain, ARD) 與碳端的 PEST 區域 (圖 1.4)。

IκBs 主要的工作區域為 ARD 與 PEST，ARD 以六個重複單元所組成，每一個重複單元由 33 個胺基酸殘基所組成，包含一個 β-loop 與兩個反平行的 α-helices，兩者相對位置近乎垂直，以 L-shape 堆疊。ARD 的第一與第二個重複單元以疏水性鍵結與 NF-κB 上的 NLS 片段結合，第四與第五個重複單元與 NF-κB 上碳

端的 RHD 結合，第六個重複單元與碳端上的 PEST 以靜電作用力與 NF- $\kappa$ B 上的 NTD 區域結合，使得 NF- $\kappa$ B 無法進入細胞核中與 DNA 結合，藉此抑制 NF- $\kappa$ B 的活性。PEST 為富含 Proline、Glutamic Acid、Serine 與 Threonine 四個胺基酸殘基的片段<sup>13</sup> (圖 1.5)。

當細胞受到 TNF- $\alpha$ 、IL-1 等外來刺激，IKK 複合體特定磷酸化 I $\kappa$ B $\alpha$  上的 Ser-32、Ser-36 與 I $\kappa$ B $\beta$  上的 Ser-19、Ser-23，在氮端的 Lys-21 與 Lys-22 被泛素標定，泛素化的 I $\kappa$ Bs 被 26S 蛋白酶體 (26S proteasome) 作用而降解成胺基酸片段，失去抑制 NF- $\kappa$ B 的功能。

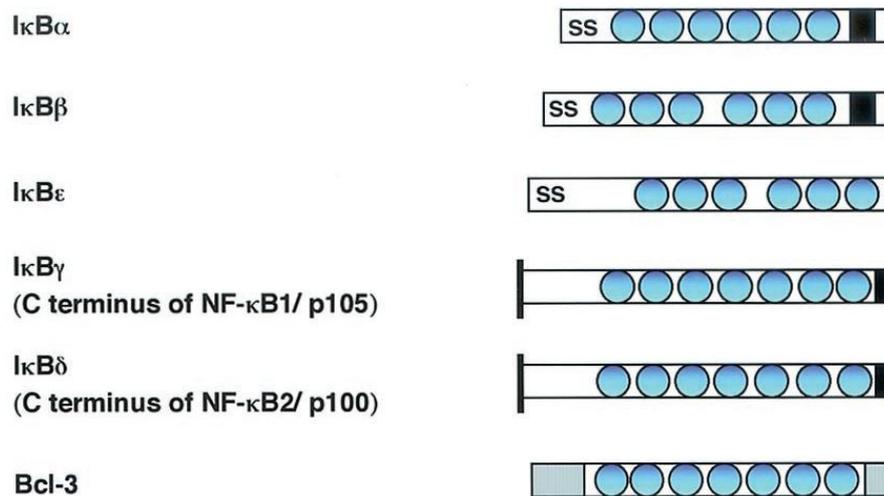


圖 1.4、I $\kappa$ Bs 家族<sup>14</sup>

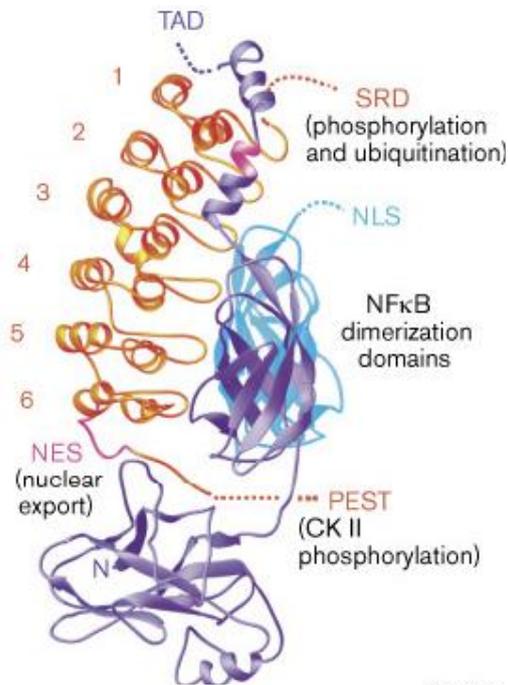


圖 1.5、IκBs 與 NF-κB 結合圖

#### 1.4 NF-κB Family

NF-κB 家族有以下五個成員：p65( Rel A ) 、 Rel B 、 c-Rel 、 p50 / p105 ( NF-κB1 ) 與 p52 / p100 ( NF-κB2 )，在細胞內以同種雙體 ( Homo-dimers ) 或異種雙體 ( Hetero-dimers ) 型態與 IκBs 家族結合。NF-κB 結構擁有一段長約 300 個胺基酸序列，此區域稱為 Rel homology domain ( RHD )，具有將 NF-κB 次單元體雙體化、與抑制蛋白 IκBs 作用以及與 DNA 結合的功能<sup>15</sup>。RHD 的結構可分為 C-terminal domain ( CTD ) 與 N-terminal domain ( NTD ) 兩個區域，CTD 與 NTD 彼此之間以一段 10 個胺基酸殘基連結。RHD 中的 CTD 大約由 100 個胺基酸殘基組成，主要工作為將兩個單體結

合成雙體以及非特異性的與 DNA 結合，在 CTD 末端的細胞核定位訊號（Nuclear localization signal, NLS）在正常狀況下受到 IκBs 蛋白的錨狀重複區域（Ankyrin repeat domain, ARD）遮蔽而失去活性<sup>16</sup>。NTD 由兩組 β-sheet 折疊所組成，大約為 180 個胺基酸殘基，以延伸的 loop 與 DNA 做特異性的結合<sup>17</sup>（圖 1.6）。

NF-κB 家族以碳端上是否有轉錄活化區域（Transcription activation domain, TAD）分為兩類型，TAD 為開始轉錄的重要區域，與被調控基因的啟動子中的目標 DNA 結合，啟動轉錄機制，調控基因表現。第一類像是 Rel A、Rel B 與 C-Rel，在碳端擁有 TAD，第二類像是 P50 與 P52，在碳端沒有 TAD<sup>18</sup>（圖 1.7）。

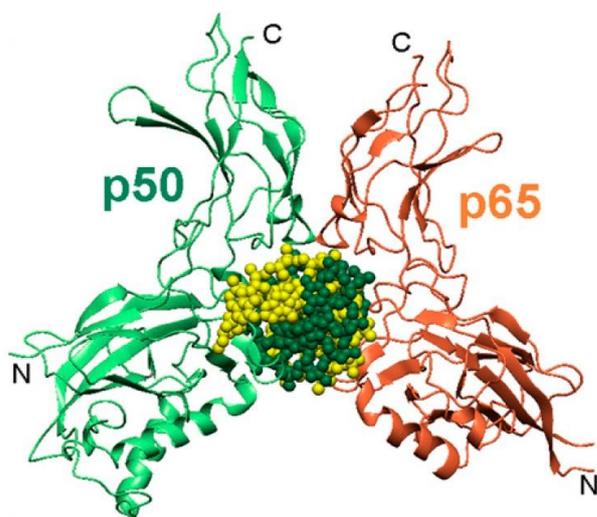


圖 1.6、NF-κB 與 DNA 結合圖<sup>19</sup>

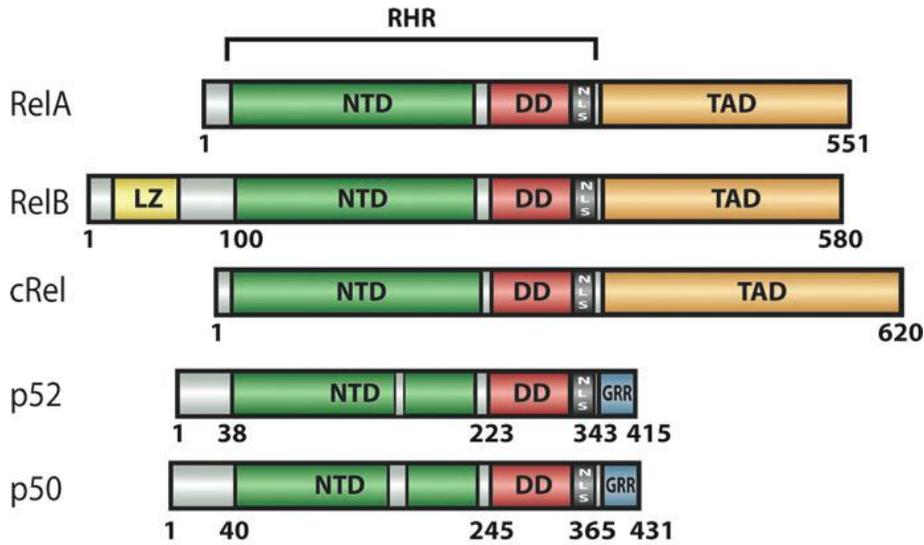


圖 1.7、NF- $\kappa$ B 家族單元體結構<sup>20</sup>

### 1.5 NF- $\kappa$ B 抑制劑

目前發現數種化合物對於 NF- $\kappa$ B 有抑制效果。KL-1156 為 2004 年由 Jae-Hwan Kwak 、 Byung Hak Kim 等人針對 LPS 誘發 NF- $\kappa$ B 活性所開發的抑制劑<sup>21</sup>(圖 1.10)。在 2007 年研發團隊改變苯環上的取代基，測試衍生物對於抑制 NF- $\kappa$ B 活性的效果，結果顯示取代基為氯、三氟甲基衍生物的抑制效果優於氫氧基、甲氧基衍生物<sup>22</sup>(表 1.3)。

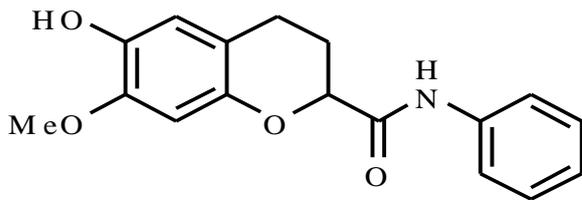


圖 1.8、KL-1156

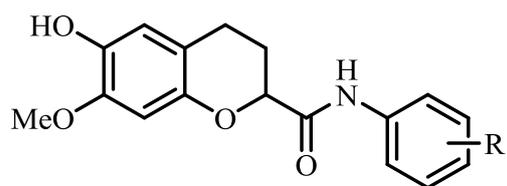


表 1.1、KL-1156 與其衍生物抑制 LPS 誘導 NF- $\kappa$ B 活性之 IC<sub>50</sub> 值。

編號	R	IC <sub>50</sub> (μM)
KL-1156	H	23.5
2a	2-OH	>100
2b	3-OH	>100
2c	4-OH	>100
2d	2-OCH <sub>3</sub>	43.9
2e	3-OCH <sub>3</sub>	>100
2f	4-OCH <sub>3</sub>	>100
2g	2-CH <sub>3</sub>	>100
2h	3-CH <sub>3</sub>	48.7
2i	4-CH <sub>3</sub>	32.0
2j	3-CF <sub>3</sub>	10.9
2k	4-CF <sub>3</sub>	52.0
2l	2-Cl	62.0
2m	3-Cl	21.1
2n	4-Cl	6.0

2006 年 Justin J. Heynekamp 等人以白藜蘆醇 (Resveratrol) 結構為前導化合物 (圖 1.8)，合成一系列的衍生物，並測試衍生物對

於 TNF- $\alpha$  誘發的 NF- $\kappa$ B 的抑制活性。實驗結果如下，將 Resveratrol 中 R' 端以氫取代氫氧基後，抑制效果提高少許，進一步將 R 端的 4-氫氧基以 4-甲氧基取代後增加 NF- $\kappa$ B 的抑制效果。將 R' 端的 3 號位置以甲基、甲氧基、氟與氯取代時發現抑制效果大為提升，但是以溴取代後沒有抑制效果反而增加 NF- $\kappa$ B 的活性 (表 1.2)<sup>23</sup>。

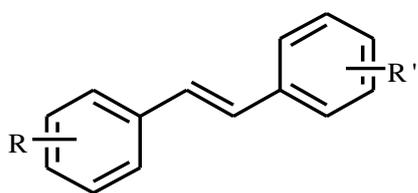


圖 1.9、白藜蘆醇 (Resveratrol)

表 1.2、白藜蘆醇衍生物對於 TNF- $\alpha$  誘發 NF- $\kappa$ B 活性的抑制率與其 IC<sub>50</sub>

編號	R	R'	% inhibition of NF- $\kappa$ B (50 $\mu$ M)	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
Resveratrol	4-OH	3,5-OH	58	20 $\pm$ 3
4l	4-OH	H	47	-
6i	4-OCH <sub>3</sub>	3-CH <sub>3</sub>	7	0.8 $\pm$ 0.2
6r	4-OCH <sub>3</sub>	3-OCH <sub>3</sub>	-	0.6 $\pm$ 0.1
6n	4-OCH <sub>3</sub>	3-F	6	1.1 $\pm$ 0.6
6h	4-OCH <sub>3</sub>	3-Cl	6	1.0 $\pm$ 0.1
6w	4-OCH <sub>3</sub>	3-Br	108	-

在 2009 年由 Balasubramanian Srinivasan 等人，合成以查耳酮 (chalcone) 為主結構之衍生物，並測試衍生物對於 TNF- $\alpha$  誘發的 NF- $\kappa$ B 的抑制活性。結果顯示左方苯環上取代基為 3,4,5-甲氧基時，將 R<sub>1</sub> 上的醇基以氫取代，其 IC<sub>50</sub> 數值大幅增加，因此 R<sub>1</sub> 位置上的醇基對於抑制活性來說是很重要的。接著固定 R<sub>1</sub> 上的醇基，更改 R<sub>2</sub> 上的取代基，結果發現以醇基取代者 **11h** 的抑制濃度最低<sup>24</sup>。

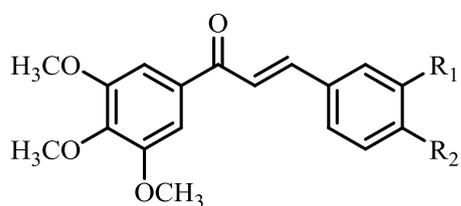


圖 1.10、查耳酮 (Chalcone)

表 1.3、查耳酮衍生物抑制 TNF- $\alpha$  誘發 NF- $\kappa$ B 活性之 IC<sub>50</sub> 值

編號	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
11a	-OH	-OCH <sub>3</sub>	5.1 $\pm$ 1.9
11f	-OH	-H	2.3 $\pm$ 0.3
11g	-H	-OH	11.6 $\pm$ 2.7
11h	-OH	-OH	1.9 $\pm$ 0.1
11i	-H	-OCH <sub>3</sub>	19.3 $\pm$ 3.8
11j	-H	-H	8.9 $\pm$ 1.4

在 2010 年由 M. C. Sheridan, L. Marler 等人，以化學方法合成 2-bromo-1-hydroxyphenazine 衍生物，改變吩嗪 (Phenazine) 右側環

上的取代基，測試衍生物對於抑制 NF- $\kappa$ B 活性的效果，結果顯示衍生物中以溴為取代基的抑制效果最好 (1, 31, 32)，此外發現 1 號位置上以甲氧基取代的衍生物，其抑制效果不及以醇基取代 (11, 12 or 14, 15)<sup>25</sup>。

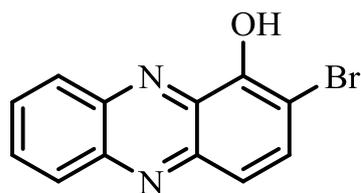


圖 1.11、2-bromo-1-hydroxyphenazine

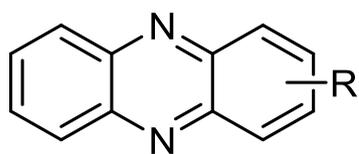


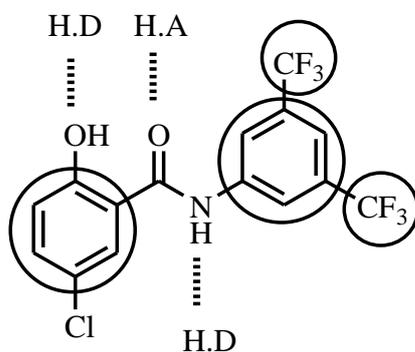
表 1.4、50  $\mu$ M 下吩嗪衍生物對於 NF- $\kappa$ B 的抑制率與 IC<sub>50</sub> 值

編號	R	% inhibition of NF- $\kappa$ B (50 $\mu$ M)	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
1	1-OH, 2-Br	50	73
31	1-OH, 2-CH <sub>3</sub>	10.5	-
32	1-OH, 2-OCH <sub>3</sub>	16.5	-
11	1-OCH <sub>3</sub> , 4-Br	54	-
12	1-OH, 4-Br	75	5.19 $\pm$ 2.4
14	1-OCH <sub>3</sub> , 3-Br	0	-
15	1-OH, 3-Br	99.8	5.42 $\pm$ 0.4

## 1.6 研究動機

目前抑制 NF- $\kappa$ B 活化機制大致歸納成以下五點：1. 防止 IKK 複合體活化。2. 防止 I $\kappa$ Bs 被磷酸化。3. 防止 I $\kappa$ Bs 被降解。4. 阻礙 NF- $\kappa$ B 進入細胞核中。5. 阻止 NF- $\kappa$ B 與 DNA 結合。

在 2002 年由 Medical Molecular Design 公司（日本東京）研究團隊所開發的小分子藥物 IMD-0354<sup>26</sup>（圖 1.12），文獻中指出 IMD-0354 與 IKK $\beta$  上的 ATP 結合位置先行結合，阻止 ATP 磷酸化 IKK $\beta$ ，因此 IMD-0354 可抑制 IKK $\beta$  活化，阻斷 NF- $\kappa$ B 活化機制<sup>27</sup>。IMD-0354 分子結構中羰基上的氧可當作氫鍵接受者，也可因共振現象使得醯胺鍵具有部分雙鍵的特性，使分子形成一個平面。除了醯胺鍵上 -NH 基之外，醯胺鍵碳端上 2 號位置的醇基也可當作氫鍵提供者，而結構上的兩個苯環與雙取代 3,5-三氟甲基可產生疏水性鍵結。



H.A.: 氫鍵接收； H.D.: 氫鍵提供；○: 疏水性鍵結

圖 1.12、IMD-0354 提供之作用力

本研究以 IMD-0354 作為前導化合物，合成三系列衍生物。第一系列以 IMD-0354 苯甲醯苯胺結構為主，改變其兩側官能基，合成相關衍生物。李宜蓉於 2011 年論文<sup>28</sup>中苯甲醯苯胺衍生物中，推測當取代基交換後，醯胺鍵上氫鍵提供者與氫鍵接收者的位置完全不同，與 IKK $\beta$  上結合位置之間作用力也不相同，因此將 R 端與 R' 端取代基交換的衍生物 **WY5107** 與 **WY5118** 進行生物活性測試。從數據結果發現 (表 3.5)，在 R 端與 R' 端取代基交換後抑制效果大為下降，取代基的交換對於抑制效果有極大的影響，因此本研究選擇前導化合物 IMD-0354 將其兩側的取代基交換，合成 WY4102 衍生物，實驗結果發現 WY4102 與 IMD-0354 同樣具有抑制效果，推測醯胺鍵上的氫鍵提供者與氫鍵接受者效應之外，兩側取代基對於生物活性也有所影響 (表 1.5)。在此挑選 **WY3113F**、**WY1117**、**WY3116**、**WY4115** 與 **WY5105**，對於 NF- $\kappa$ B 具有抑制效果的衍生物，合成其 R 端與 R' 端取代基交換苯甲醯苯胺衍生物，比較其對於 NF- $\kappa$ B 抑制效果(表 1.6)。

表 1.5、50  $\mu\text{M}$  下苯甲醯苯胺衍生物對於 NF- $\kappa\text{B}$  的抑制率與  $\text{IC}_{50}$  值。

編號	R	R'	% inhibition of NF- $\kappa\text{B}$ ( 50 $\mu\text{M}$ )	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
WY5107	2-OH, 5-Cl	4-NO <sub>2</sub>	>100 <sup>e</sup>	2.1±0.3
WY5118	4-NO <sub>2</sub>	2-OH, 5-Cl	28 <sup>e</sup>	>50
IMD0354	2-OH, 5-Cl	3,5-CF <sub>3</sub>	>100	1.2±0.3
WY4102	3,5-CF <sub>3</sub>	2-OH, 5-Cl	>100	1.2±0.5

<sup>e</sup>數據來源：李宜蓉同學 2011 東海碩博士論文

表 1.6、50  $\mu\text{M}$  下苯甲醯苯胺衍生物對於 NF- $\kappa\text{B}$  的抑制率與  $\text{IC}_{50}$  值。

編號	R	R'	% inhibition of NF- $\kappa\text{B}$ ( 50 $\mu\text{M}$ )	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
WY3113F	2-OH	3,5-CF <sub>3</sub>	>100	2.4±0.6 <sup>c</sup>
WY1117	3-Cl	3,5-CF <sub>3</sub>	>100	11.4±1.1 <sup>a</sup>
WY3116	2-OH, 5-Cl	4-CF <sub>3</sub>	>100	0.6±0.1 <sup>c</sup>
WY4115	4-CF <sub>3</sub>	3-Cl	>100	11.3 ± 0.8
WY5105	2-OH	4-NO <sub>2</sub>	75	10.3±1.6 <sup>e</sup>

<sup>a</sup>數據來源：羅仁志 2010 東海碩博士論文。<sup>c</sup>數據來源：黃志遠 2010

東海碩博士論文。<sup>e</sup>數據來源：李宜蓉 2011 東海碩博士論文。

第二系列以雙鍵取代醯胺鍵為中心結構的二苯乙烯衍生物，可與苯甲醯苯胺衍生物比較缺少形成氫鍵的雙鍵對於抑制活性的重要性，而二苯乙烯衍生物中挑選反式的原因在於，苯甲醯苯胺兩側苯環對於醯胺鍵為反式相位，因此合成反式二苯乙烯衍生物為本研究目標。

第三系列以吲哚（indole）結構取代苯環合成 *N*-substituted indole 衍生物，與第一系列苯甲醯苯胺結構相比，其整體結構剛性與體積增加，同時缺少一醯胺鍵上的氫鍵提供者，在取代基相同的條件下可知對於 NF- $\kappa$ B 抑制活性的重要性。

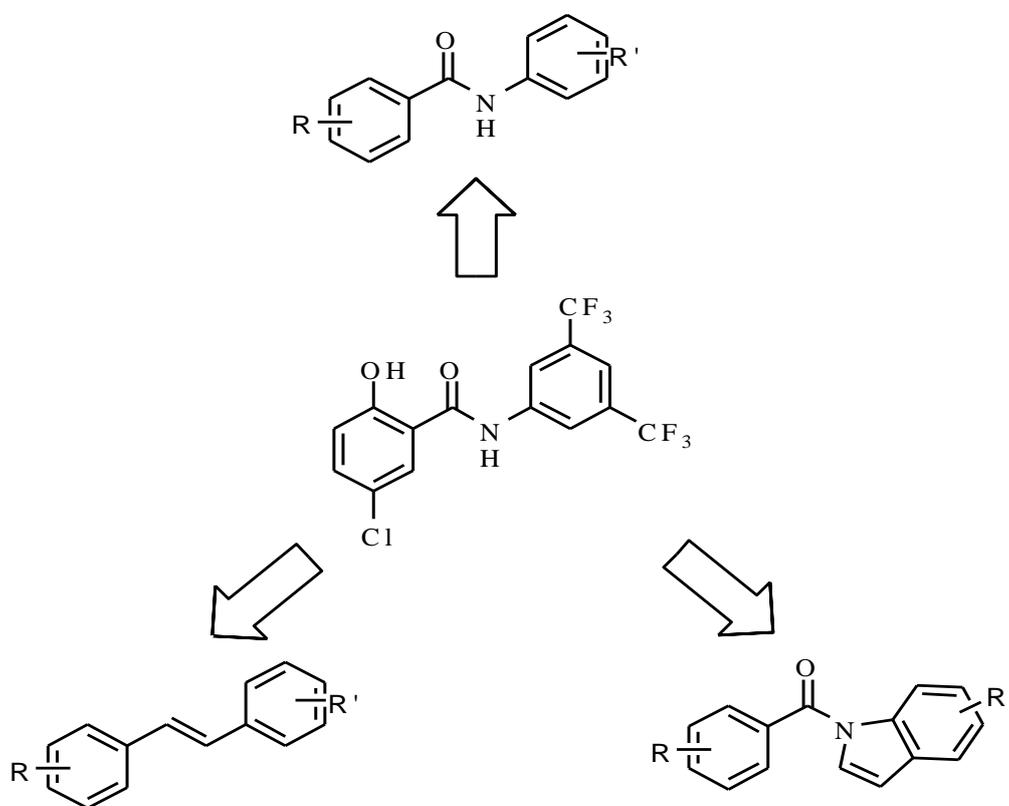


圖 1.13、IMD-0354 與其衍生物結構圖

## 第二章. 實驗材料與方法

### 2.1 有機合成：

本研究以 IMD-0354 為前導化合物，依照結構上的不同分成三個系列合成其衍生物，並探討結構與活性之間的關係。接下來說明在實驗中在有機合成與生物活性測試所使用的材料與方法。

實驗中所使用的溶劑、試劑，其縮寫如下：

IUPAC 命名	縮寫
Sulfurous dichloride	SOCl <sub>2</sub>
Chloform	CHCl <sub>3</sub>
Sodium bicarbonate	NaHCO <sub>3</sub>
Ethyl acetate	EA
Dichloromethane	DCM
<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimide	DCC
4-Dimethylaminopyridine	DMAP
Sodium hydrate	NaH
Potassium carbonate	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
Benzyl bromide	PhBr
Sodium borohydride	NaBH <sub>4</sub>
Tetrahydrofuran	THF
Phosphorus tribromide	PBr <sub>3</sub>
Triethyl phosphite	P(OEt) <sub>3</sub>

Acetic anhydride	OAc <sub>2</sub>
Sulfuric acid	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Nitric acid	HNO <sub>3</sub>
Nitromethane	CH <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>
Ammonium Acetate	NH <sub>4</sub> OAc
Iron	Fe
Acetic acid	AcOH
Ethanol	EtOH
Potassium-tert-butoxide	t-BuOK

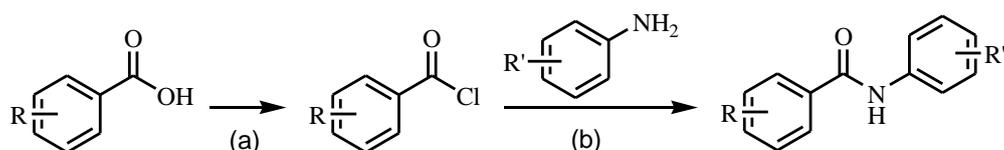
實驗中所合成的衍生物，均用以下儀器進行結構鑑定：

核磁共振光譜 <sup>1</sup> H NMR	Varian Unity - 300 MHz 核磁共振光譜儀
核磁共振光譜 <sup>13</sup> C NMR	Bruck - 500MHz 核磁共振光譜儀
高解析質譜 HRMS	Finnigan / Thermo Quest MAT 95XL 質譜儀
元素分析 EA	Elementar vario EL III CHN - OS Rapid 儀

### 2.1.1 第一系列

此系列使用兩種合成方法，分別為親核性取代反應<sup>29</sup>(S<sub>N</sub>2 反應)與 DCC 偶合反應<sup>30</sup>合成苯甲醯苯胺。Scheme 1 為親核性取代反應實驗流程，以 WY4108 為代表說明：

Scheme 1



Reagents and Conditions: (a) SOCl<sub>2</sub>, dry DCM, reflux; (b) acetonitrile, reflux.

表 2.1、以 S<sub>N</sub>2 反應合成之苯甲醯苯胺衍生物

代號	R	R'
WY4108	4-Cl	2-OH
WY4113	4-CH <sub>3</sub>	2-OH

取 0.10g 4-chlorobenzoic acid 於二口圓底燒瓶中，以 5mL CHCl<sub>3</sub> 為溶劑，在氮氣系統下加入 0.14 mL sulfurous dichloride (SOCl<sub>2</sub>) 後加熱迴流 20 小時，反應終了以旋轉濃縮機將溶劑抽乾。另取 20mL acetonitrile 溶解，加入 0.1045g 2-Aminophenol 後加熱迴流，反應時間為 6 小時。將溶劑抽乾後以 sodium bicarbonate (NaHCO<sub>3</sub>) 與 ethyl acetate (EA) 萃取數次後收集有機層，加入無水硫酸鎂並抽氣過濾，

以 EA: hexane = 1: 2 的比例配置沖提液，進行管柱層析分離。

4-chloro-*N*-(2-hydroxyphenyl)benzamide ( WY4108 )

固體， $R_f$ : 0.32 ( EA: hexane = 1: 2 ), m.p: 188-189 °C

$^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.28 (s, 1H, -OH), 8.09 (br, 1H, -NH), 7.86 (dd, 2H,  $J=3.3\text{Hz}$ ), 7.50 (dd, 2H,  $J=3.45\text{Hz}$ ), 7.25 (dd, 1H,  $J=3.9\text{Hz}$ ), 7.18 (t, 1H,  $J=7.8\text{Hz}$ ), 7.07 (dd, 1H,  $J=4.2\text{Hz}$ ), 6.93 (t, 1H,  $J=7.65\text{Hz}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  165.918, 148.509, 138.916, 131.617, 128.250, 128.748, 127.308, 128.748, 127.308, 125.463, 122.287, 120.826, 119.612.

Anal. Calcd for  $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{ClNO}_2$ : C, 63.04; H, 4.07; N, 5.66. Found: C, 63.92; H, 4.28; N, 5.45. MS (EI):  $m/z$   $[\text{M}]^+$ : 247

*N*-(2-hydroxyphenyl)-4-methylbenzamide ( WY4113 )

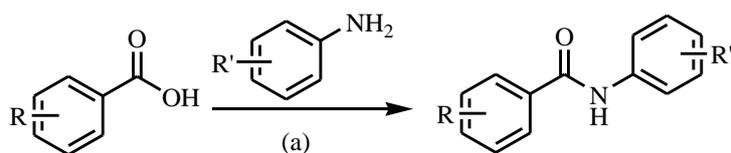
固體， $R_f$ : 0.3 ( EA: hexane = 1: 3 ), m.p: 168-169 °C

$^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.797 (s, 1H, -OH), 8.08 (br, 1H, -NH), 7.81 (d, 2H,  $J=3.3\text{Hz}$ ), 7.32 (d, 2H,  $J=4.2\text{Hz}$ ), 7.17 (t, 1H,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 7.15 (d, 1H,  $J=3.6\text{Hz}$ ), 7.07 (d, 1H,  $J=4.2\text{Hz}$ ), 6.91 (t, 1H,  $J=7.5\text{Hz}$ ), 2.45 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  167.133, 148.792, 143.269, 130.221, 129.606, 127.344, 127.178, 125.698, 122.319, 120.583, 119.807, 21.546.

Anal. Calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}_2$ : C, 73.99; H, 5.77; N, 6.16; Found: C, 73.47; H, 5.58; N, 7.75. MS (EI):  $m/z$   $[\text{M}]^+$ : 227.1

第二部分為 DCC 偶合反應進行合成。Scheme 2 為 DCC 偶合反應，實驗流程以 WY4115 為代表說明：

Scheme 2



Reagents and Conditions: (a) DCC, DMAP, dry DCM.

表 2.2、以 DCC 偶合反應合成之苯甲醯苯胺衍生物

編號	R	R'
WY4102	3,5-CF <sub>3</sub>	2-OH, 5-Cl
WY4102P	3,5-CF <sub>3</sub>	2-OCH <sub>3</sub> , 5-Cl
WY4114	3,5-CF <sub>3</sub>	2-OH
WY4115	4-CF <sub>3</sub>	3-Cl
WY4116	3,5-CF <sub>3</sub>	3-Cl
WY4117	4-CF <sub>3</sub>	2-OH, 5-Cl
WY4118	4-NO <sub>2</sub>	2-OH
WY4119	4-CF <sub>3</sub>	2-OH
WY4120	3-Cl	4-CF <sub>3</sub>

*N*-(3-chlorophenyl)-4-(trifluoromethyl)benzamide ( WY4115 )

取 0.264g 4-(trifluoromethyl)benzoic acid 於二口圓底燒瓶中，以 5mL 除水 DCM 為溶劑，加入 0.171g 3-chlorobenzeneamine ( 1 eq. )

與 0.170g DMAP ( 1 eq. ) , 另取 0.431g DCC ( 1.5 eq. ) 預先溶解於 1mL 除水 DCM 後用針筒打入圓底燒瓶 , 室溫下反應 3.5 小時。反應終了將溶劑抽乾 , 加入 EA 後產生白色固體 , 抽氣過濾並收集溶液 , 與飽和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液萃取數次後收集有機層 , 加入無水硫酸鎂並抽氣過濾 , 以 EA: hexane = 1: 7 的比例進行管柱層析分離。

*N*-(5-chloro-2-hydroxyphenyl)-3,5-bis(trifluoromethyl)benzamide  
( WY4102 )

固體 , R<sub>f</sub>: 0.34 ( EA: hexane = 1: 3 ) , m.p: 205-206 °C

<sup>1</sup>H NMR ( 300MHz, CDCl<sub>3</sub> ) δ 8.61 (br, 1H, -NH), 8.38 (s, 2H), 8.09 (s, 1H), 7.80 (d, 1H, *J*=2.4Hz), 7.27 (s, 1H, -OH), 7.11 (dd, 1H, *J*=2.4Hz, *J*=8.7Hz), 6.96 (d, 1H, *J*=8.7Hz). <sup>13</sup>C NMR ( 500MHz, CDCl<sub>3</sub> ) δ 163.588, 147.715, 137.180, 131.699, 128.655, 127.286, 125.740, 125.421, 124.573, 123.947, 122.911, 122.409, 117.758. Anal. Calcd for C<sub>15</sub>H<sub>8</sub>ClF<sub>6</sub>NO<sub>2</sub>: C, 46.96; H, 2.10; N, 3.65. Found:  
MS (EI): m/z [M]<sup>+</sup>: 383.2

*N*-(5-chloro-2-methoxyphenyl)-3,5-bis(trifluoromethyl)benzamide  
( WY4102P )

固體 , R<sub>f</sub>: 0.3 ( EA: hexane = 1: 10 ) , m.p: 158 °C

<sup>1</sup>H NMR ( 300MHz, CDCl<sub>3</sub> ) δ 8.54 (d, 1H, *J*=2.7Hz), 8.49 (br, 1H, -NH), 8.31 (s, 2H), 8.07 (s, 1H), 7.11 (dd, 1H, *J*=2.7Hz, *J*=8.7Hz), 7.87 (d, 1H, *J*=9Hz), 3.96 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR ( 600MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO ) δ 163.791,

149.658, 138.329, 132.270 (q,  $J=33.45\text{Hz}$ ,  $\text{CF}_3$ ), 129.202, 125.953, 125.564, 125.346, 124.148 (q,  $J=270.65\text{Hz}$ ,  $\text{CF}_3$ ), 122.295, 122.186, 112.925, 56.597. Anal. Calcd for  $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{ClF}_6\text{NO}_2$ : C, 48.32; H, 2.53; N, 3.52. Found:

MS (EI):  $m/z$   $[\text{M}]^+$ : 397.2

3,5-bis(trifluoromethyl)-*N*-(2-hydroxyphenyl)benzamide ( WY4114 )

固體， $R_f$ : 0.32 ( EA: hexane = 1: 8 ), m.p: 207-208 °C

$^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.37 (d, 2H,  $J=8.7\text{Hz}$ ), 8.31 (br, 1H, -NH), 8.10 (d, 2H,  $J=8.7\text{Hz}$ ), 7.54 (dd, 1H,  $J=1.8\text{Hz}$ ,  $J=8.1\text{Hz}$ ), 7.19 (td, 1H,  $J=1.5\text{Hz}$ ,  $J=7.8\text{Hz}$ ), 7.05 (dd, 1H,  $J=1.5\text{Hz}$ ,  $J=7.8\text{Hz}$ ), 6.99 (td, 1H,  $J=1.5\text{Hz}$ ,  $J=7.8\text{Hz}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (600MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  164.256, 149.974, 137.860, 132.331 (q,  $J=33.3\text{Hz}$ ,  $\text{CF}_3$ ), 129.303, 127.389, 126.632, 126.005, 124.419, 124.168 (q,  $J=270.75\text{Hz}$ ,  $\text{CF}_3$ ), 120.709, 117.947. Anal. Calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{F}_6\text{NO}_2$ : C, 52.00; H, 3.00; N, 4.01. Found: C, 51.80; H, 3.15; N, 4.33. MS (EI):  $m/z$   $[\text{M}]^+$ : 349.2

*N*-(3-chlorophenyl)-4-(trifluoromethyl)benzamide ( WY4115 )

固體， $R_f$ : 0.31 ( EA: hexane = 1: 7 ), m.p: 132-133 °C

$^1\text{H}$  NMR ( 300MHz,  $\text{CDCl}_3$  )  $\delta$  7.97 (d, 2H,  $J=8.7\text{Hz}$ ), 7.84 (br, 1H, -NH), 7.77 (d, 1H,  $J=\text{Hz}$ ), 7.76 (dd, 2H,  $J=8.7\text{Hz}$ ), 7.48 (dq, 1H,  $J=8.1\text{Hz}$ ), 7.31 (t, 1H,  $J=8.7\text{Hz}$ ), 7.16 (dq, 1H,  $J=8.7\text{Hz}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( 600MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$  )  $\delta$  165.352, 141.344, 139.535, 134.639, 133.383 ( q,  $J=32.1\text{Hz}$ ,  $\text{CF}_3$  ), 131.059, 129.226, 126.329, 126.305, 124.678, 120.774, 119.930 ( q,  $J=222.3\text{Hz}$ ,  $\text{CF}_3$  ), 119.265. Anal. Calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{ClF}_3\text{NO}$ : C, 56.06;

H, 3.00; N, 5.00. Found: 56.63, H, 3.44, N, 5.26. MS (EI): m/z [M]<sup>+</sup>:  
229.0

*N*-(3-chlorophenyl)-3,5-bis(trifluoromethyl)benzamide ( WY4116 )

固體，R<sub>f</sub>: 0.3 ( EA: hexane = 1: 20 )，

<sup>1</sup>H NMR ( 300MHz, CDCl<sub>3</sub> ) δ 8.31 (s, 2H), 8.07 (s, 1H), 7.93 (br, 1H, -NH), 7.76 (t, 1H, *J*=1.8 Hz), 7.50 (dq, 1H, *J*=9Hz), 7.33 (t, 1H, *J*=8.1Hz), 7.19 (dq, 1H, *J*=7.8Hz). <sup>13</sup>C NMR ( 600MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO ) δ 163.313, 140.988, 138.196, 134.684, 132.319 ( q, *J*=33.3Hz, CF<sub>3</sub> ), 131.132, 129.202, 126.017, 125.030, 123.258, 120.698, 120.102 ( q, *J*=228.15Hz, CF<sub>3</sub> ), 119.451. Anal. Calcd for C<sub>15</sub>H<sub>8</sub>ClF<sub>6</sub>NO: C, 49.00; H, 2.19; N, 3.81. Found: C, 51.07; H, 3.45; N, 3.23. MS (EI): m/z [M]<sup>+</sup>: 367.0

*N*-(5-chloro-2-hydroxyphenyl)-4-(trifluoromethyl)benzamide ( WY4117 )

固體，R<sub>f</sub>: 0.3 ( EA: hexane = 1: 10 )，m.p: 200-201 °C

<sup>1</sup>H NMR ( 300MHz, CDCl<sub>3</sub> ) δ 8.22 (br, 1H, -NH), 7.95 (d, 2H, *J*=8.4Hz), 7.73 (d, 2H, *J*=8.1Hz), 7.65 (s, 1H, -OH), 7.48 (d, 1H, *J*=2.7Hz), 7.05 (dd, 1H, *J*=2.7Hz, *J*=8.7Hz), 6.90 (d, 1H, *J*=8.4Hz). <sup>13</sup>C NMR ( 600MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO ) δ 165.526, 147.631, 138.827, 133.622 (q, *J*=32.1Hz, CF<sub>3</sub>), 129.222, 128.417, 126.515, 126.491, 124.35 (q, *J*=115.95Hz, CF<sub>3</sub>), 122.518, 118.213. Anal. Calcd for C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>ClF<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>: C, 53.22; H, 3.00; N, 5.00. Found: C, 53.73; H, 3.45; N, 4.85. MS (EI): m/z [M]<sup>+</sup>:

*N*-(2-Hydroxy-phenyl)-4-nitro-benzamide ( WY4118 )

固體，R<sub>f</sub>: 0.3 ( EA: hexane = 1: 9 )，m.p: 211 °C

$^1\text{H}$  NMR ( 300MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$  )  $\delta$  9.58 (br, 1H, -NH), 9.03 (s, 1H, -OH), 8.41 (d, 2H,  $J=8.7\text{Hz}$ ), 8.29 (d, 2H,  $J=8.7\text{Hz}$ ), 7.85 (d, 1H,  $J=8.1\text{Hz}$ ), 7.10 (td, 1H,  $J=1.2\text{Hz}$ ,  $J=7.5\text{Hz}$ ), 6.99 (dd, 1H,  $J=1.2\text{Hz}$ ,  $J=8.1\text{Hz}$ ), 6.92 (td, 1H,  $J=1.5\text{Hz}$ ,  $J=8.1\text{Hz}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( 500MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$  )  $\delta$  165.110, 150.694, 149.326, 140.919, 129.845, 126.944, 124.516, 123.529, 120.754, 117.743. Anal. Calcd for  $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_4$ : C, 60.47; H, 3.90; N, 10.85. Found: MS (EI):  $m/z$   $[\text{M}]^+$ : 258.0

*N*-(2-Hydroxy-phenyl)-4-trifluoromethyl-benzamide ( WY4119 )

固體 ,  $R_f$ : 0.28 ( EA: hexane = 1: 10 )

$^1\text{H}$  NMR ( 300MHz,  $\text{CDCl}_3$  )  $\delta$  8.17 (br, 1H, -NH), 8.33 (d, 1H,  $J=8.1\text{Hz}$  ), 7.97 (s, 1H, -OH), 7.79 (d, 1H,  $J=8.1\text{Hz}$  ), 7.35 (dd, 1H,  $J=7.8\text{Hz}$ ), 7.19 (td, 1H,  $J=7.8\text{Hz}$ , 15.6Hz), 7.07 (dd, 1H,  $J=8.25\text{Hz}$ ), 6.96 (td, 1H,  $J=7.65\text{Hz}$ , 15.3Hz).  $^{13}\text{C}$  NMR ( 500MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$  )  $\delta$  165.688, 149.359, 138.960, 133.504 ( q,  $J=32.25\text{Hz}$ ,  $\text{CF}_3$  ), 129.258, 127.187, 126.871, 126.471, 126.446, 123.464, 120.754, 117.925. Anal. Calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{F}_3\text{NO}_2$ : C, 59.79; H, 3.58; N, 4.98. Found: MS (EI):  $m/z$   $[\text{M}]^+$ : 281.0

3-Chloro-*N*-(4-trifluoromethyl-phenyl)-benzamide ( WY4120 )

固體 ,  $R_f$ : 0.31 ( EA: hexane = 1: 7 ), m.p: 148 °C

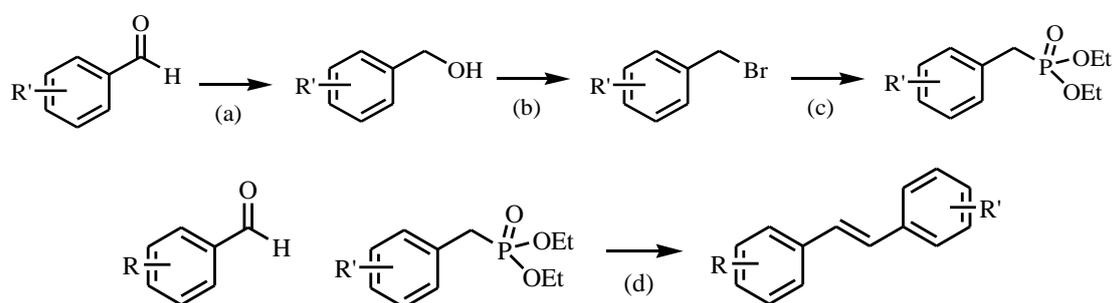
$^1\text{H}$  NMR ( 300MHz,  $\text{CDCl}_3$  )  $\delta$  7.91 (br, 1H, -NH), 7.86 (t, 1H,  $J=1.65\text{Hz}$ , 3.3Hz), 7.77 (d, 2H,  $J=8.1\text{Hz}$ ), 7.75 (d, 1H,  $J=8.4\text{Hz}$ ), 7.64 (d, 2H,  $J=8.1\text{Hz}$ ), 7.56 (dq, 1H,  $J=8.4\text{Hz}$ ), 7.45 (t, 1H,  $J=7.65\text{Hz}$ , 15.3Hz).  $^{13}\text{C}$  NMR( 600MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$  )  $\delta$  165.292, 143.500, 137.686, 134.870,

132.564, 131.180, 128.376, 127.045, 126.89 (q,  $J=3.6\text{Hz}$ ,  $\text{CF}_3$ ), 125.188 (q,  $J=204.75\text{Hz}$ ,  $\text{CF}_3$ ), 120.883, 120.794. Anal. Calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{F}_3\text{NO}_2$ : C, 59.79; H, 3.58; N, 4.98. Found: C, 56.06; H, 3.34; N, 4.67. MS (EI):  $m/z$   $[\text{M}]^+$ :299.0

### 2.1.2 第二系列

此系列實驗以霍納-沃茲沃斯-艾蒙斯反應 (Horner - Wadsworth - Emmons reaction, HWE reaction) 合成反式二苯乙烯 (Scheme 2), 實驗流程以 WY4201 為代表說明:

Scheme 2



Reagents and Conditions: (a)  $\text{NaBH}_4$ , THF; (b)  $\text{PBr}_3$ , dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , ice bath; (c)  $\text{P}(\text{OEt})_3$ , microwave; (d)  $\text{NaH}$ , THF.

表 2.3、以 HWE 反應合成之二苯乙烯衍生物

編號	R	R'
WY4201	3,5- $\text{CF}_3$	2-OH, 5-Cl

取 0.5g 5-chloro-2-hydroxybenzaldehyde 於二口圓底燒瓶中，以

acetone 為溶劑，加入過量 potassium carbonate ( $K_2CO_3$ ) 與 0.37mL benzyl bromide (PhBr) 後反應溫度為迴流，反應時間約 1 小時，抽氣過濾將  $K_2CO_3$  去除後以 EA: hexane = 1: 5 的進行管柱層析分離，得到 2-(benzyloxy)-5-chloro- benzaldehyde。

取 0.5g 2-(benzyloxy)-5-chlorobenzaldehyde 於二口圓底燒瓶中，以除水 tetrahydrofuran (THF) 為溶劑，加入 0.08g sodium borohydrid ( $NaBH_4$ , 1eq.) 在室溫反應約 1 小時，以 EA 與水萃取後收集有機層。另取 5mL 除水 DCM 為溶劑，在冰浴下加入 0.2mL phosphorus tribromide ( $PBr_3$ )，反應時間約 2 小時，以飽和  $NaHCO_3$  溶液與 DCM 萃取後收集有機層。另取 0.41g triethyl phosphate ( $P(OEt)_3$ ) 進行微波反應，反應終了以 EA 與水萃取後收集有機層，得到 diethyl (2-(benzyloxy)-5-chlorophenyl)methylphosphonate。

取 0.1g diethyl (2-(benzyloxy)-5-chlorophenyl) methylphosphonate，以除水 THF 為溶劑，在室溫下加入 0.033g potassium-tert-butoxide (t-BuOK, 1 eq.) 並攪拌至淡黃色，少量除水 THF 與 0.065g 3,5-Bis(trifluoro- methyl) benzaldehyde 預先混合之後緩緩滴入，在室溫反應約 3 小時後以 EA 與水萃取收集有機層，以 EA: Hexane = 1: 40 的比例進行管柱層析分離，得到 2-(3,5-bis(trifluoromethyl)styryl)-1-(benzyloxy)- 4-chlorobenzene。

取 0.05g 2-(3,5-bis(trifluoromethyl)styryl)-1-(benzyloxy)-4-chlorobenzene 於二口圓底燒瓶中，另取 4mL 除水 DCM 為溶劑，在冰浴下加入 0.5mL BBr<sub>3</sub>，反應時間約 1 小時後以 DCM 與水萃取收集有機層，以 EA: hexane = 1: 5 的比例進行管柱層析分離，得到 2-(3,5-bis(trifluoromethyl)styryl)-4-chlorophenol。

2-[2-(3,5-Bis-trifluoromethyl-phenyl)-vinyl]-4-chloro-phenol ( WY4201 )

固體，R<sub>f</sub>: 0.4 ( EA: hexane = 1: 5 )

<sup>1</sup>H NMR ( 300MHz, CDCl<sub>3</sub> ) δ 7.93 (s, 2H), 7.75 (s, 1H), 7.52 (d, 1H, *J*=2.7Hz), 7.45 (d, 1H, *J*=16.5Hz), 7.19 (d, 1H, *J*=16.5Hz), 7.15 (dd, 1H, *J*=2.7Hz, *J*=8.4Hz), 6.77 (d, 1H, *J*=8.4Hz)

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ

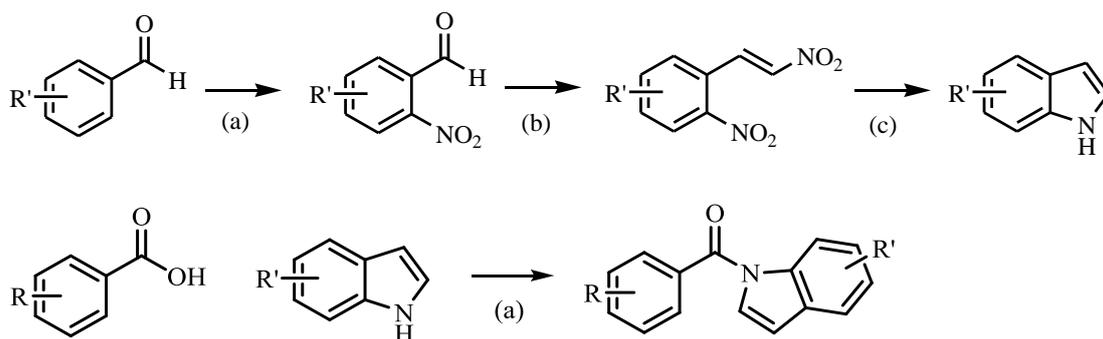
Anal. Calcd for C<sub>16</sub>H<sub>9</sub>ClF<sub>6</sub>O: C, 52.41; H, 2.47. Found:

MS (EI): m/z [M]<sup>+</sup>:

### 2.1.3 第三系列

此系列合成分成兩個部分，第一部分為合成吲哚 ( indole )，將起始物醛類硝化，在鄰位接上硝基後進行 Henry reaction<sup>31</sup>，經環化後得到吲哚<sup>32</sup>。第二部份分成兩種合成方法，第一種為苯酸與 PCl<sub>5</sub> 混合後以針頭緩慢滴入吲哚與 t-BuOK 進行 S<sub>N</sub>2 反應得到第三系列最終產物。實驗流程以 WY4301 為代表說明：

Scheme 3



Reagents and Conditions: (a) Acetic anhydride,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 0.5 hr;  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 3 hrs; (b)  $\text{CH}_3\text{NO}_2$ ,  $\text{NH}_4\text{OAc}$ , microwave; (c) Fe powder, AcOH, EtOH, reflux; (d)  $\text{PCl}_5$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; indole, t-BuOK.

表 2.4、以  $\text{S}_{\text{N}}2$  反應合成之 N-substituted indole 衍生物

編號	R	R'
WY4301	3,5- $\text{CF}_3$	7- $\text{OCH}_3$
WY4302	4- $\text{CF}_3$	7- $\text{OCH}_3$
WY4303	3,5- $\text{CF}_3$	7-OH
WY4304	4- $\text{CF}_3$	7-OH

取 0.3058g m-Anisaldehyde 於二口圓底燒瓶中，以 5mL 除水 DCM 為溶劑，在冰浴下加入  $\text{OAc}_2$  與  $\text{H}_2\text{SO}_4$  各 1mL，攪拌約 30mins。預先在冰浴下混合 0.21g  $\text{HNO}_3$  與等量的  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ，緩緩加入二口圓底燒瓶中，反應時間約 3 小時。使用冰水與 DCM 萃取有機層，以 EA: hexane=1: 2.5 的比例管柱層析純化得到 3-Methoxy-2-nitro-benzaldehyde。取 0.1058g 3-methoxy-2-nitro-benzaldehyde 於

20mL 樣品瓶中，加入過量  $\text{NH}_4\text{OAc}$  ( 使用前預先研碎 ) 與過量  $\text{CH}_3\text{NO}_2$ ，攪拌均勻後進行微波反應約 4 分鐘，先以 EA: hexane=1: 2.5 的比例，再以 EA: hexane=1: 4 的比例管柱層析純化，得到 1-Methoxy-2-nitro-3-(2-nitro-vinyl)-benzene。取 0.1g 1-methoxy-2-nitro-3-(2-nitro-vinyl)-benzene 於二口圓底燒瓶中，以 5mL AcOH 為溶劑，依序加入過量鐵粉與 EtOH，將反應溫度升至迴流，反應時間約 40 分鐘，以 DCM 與大量蒸餾水萃取多次後收集有機層，加入無水硫酸鎂並抽氣過濾，以 DCM: hexane=1: 3 的比例管柱層析純化得到 7-methoxy-1*H*-indole。

取 0.109g 3,5-bis(trifluoromethyl)benzoic acid 於二口圓底燒瓶中，以 THF 為溶劑，加入 0.081g  $\text{PCl}_5$ ，在將反應溫度升至迴流攪拌約 4 小時。另取 0.05mL 7-methoxy-1*H*-indole 以 THF 為溶劑溶於 20mL 樣品瓶中，加入二口圓底燒瓶中，再加入 0.08g t-BuOK，在室溫下攪拌約 16 小時，以 DCM 與大量蒸餾水萃取後收集有機層，加入無水硫酸鎂並抽氣過濾，以 EA: hexane=1: 20 的比例管柱層析純化得到 WY4301。

(3,5-Bis-trifluoromethyl-phenyl)-(7-methoxy-indol-1-yl)-methanone  
( WY4301 )

$^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  8.36 (s, 1H), 7.71 (d, 1H,  $J=3.6\text{Hz}$ ), 7.30 (dd, 1H,  $J=1.2\text{Hz}$ , 7.8Hz), 7.23 (t, 1H,  $J=7.5\text{Hz}$ ), 6.84 (dd, 1H,

J=1.2Hz, 7.8Hz), 6.82 (d, 1H, J=3.6Hz), 3.42 (s, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$

Anal. Calcd for  $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_3$ : C, 68.11; H, 4.84; N, 6.11. Found:

MS (EI): m/z  $[\text{M}]^+$ :

(7-Methoxy-indol-1-yl)-(4-trifluoromethyl-phenyl)-methanone

( WY4302 )

$^1\text{H}$  NMR ( 300MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$  )  $\delta$  7.89 (d, 2H, J=9.6Hz), 7.86 (d, 2H, J=9.6Hz), 7.63 (d, 1H, J=3.6Hz), 7.28 (dd, 1H, J=1.8Hz, 7.8Hz), 7.23 (t, 1H, 7.8Hz), 6.81 (dd, 1H, J=1.8Hz, 7.8Hz), 6.77 (d, 1H, J=3.6Hz), 3.44 (s, 3H)

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$

Anal. Calcd for  $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_3$ : C, 68.11; H, 4.84; N, 6.11. Found:

MS (EI): m/z  $[\text{M}]^+$ :

第二種為將吲哚先行與 TBAB、NaH 混合後，以針頭緩慢滴入預先與 DMAP、DCC 的苯酸中進行偶合反應，得到第三系列最終產物<sup>33</sup>。實驗流程以 WY4305 為代表說明：

表 2.5、以 DCC 偶合反應合成之 *N*-substituted indole 衍生物

編號	R	R'
WY4305	3,5-CF <sub>3</sub>	4-Cl
WY4306	4-CF <sub>3</sub>	4-Cl

取 0.109g 3,5-bis(trifluoromethyl)benzoic acid 於二口圓底燒瓶中，以 DCM 為溶劑，加入 0.047g DMAP 與 0.08g DCC，在室溫下攪拌約 0.5 小時。另取 0.05mL 7-methoxy-1*H*-indole 以 DCM 為溶劑溶於 20mL 樣品瓶中，加入二口圓底燒瓶中，再加入 0.2 mL LiHMDS，在室溫下攪拌約 16 小時，以 DCM 與大量蒸餾水萃取後收集有機層，加入無水硫酸鎂並抽氣過濾，以 EA: hexane=1: 20 的比例管柱層析純化得到 WY4305。

(3,5-Bis-trifluoromethyl-phenyl)-(4-chloro-indol-1-yl)-methanone  
( WY4305 )

固體， $R_f$ : 0.6 ( EA: hexane = 1: 20 )

$^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.32 (dd, 1H,  $J=0.9$  Hz, ), 8.20 (s, 2H), 8.14 (s, 1H), 7.175 (d, 1H,  $J=3.9$ Hz), 6.85 (dd, 1H,  $J=0.9$ Hz, 3.9Hz).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  165.43, 136.55, 136.15, 132.57 (q,  $J=\text{Hz}$ ,  $\text{CF}_3$ ), 129.55, 129.33, 126.72, 126.50, 126.43, 125.67, 124.54, 123.53, 121.72, 114.91, 108.47.

Anal. Calcd for  $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_3$ : C, 68.11; H, 4.84; N, 6.11. Found:

MS (EI):  $m/z$   $[\text{M}]^+$ : 391.1

(4-Chloro-indol-1-yl)-(4-trifluoromethyl-phenyl)-methanone ( WY4306 )

固體， $R_f$ : 0.5 ( EA: hexane = 1: 20 )

$^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.33 (dd, 1H,  $J=0.6$  Hz, 5.4Hz), 7.864 (d, 2H,  $J=8.7$ Hz), 7.822 (d, 2H,  $J=8.7$ Hz), 7.245 (d, 1H,  $J=3.6$  Hz), 6.785 (dd,

1H, J=0.6 Hz, 3.6Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 167.23, 137.42, 136.57, 133.78 (q, J=Hz, CF<sub>3</sub>), 129.51, 129.44, 127.46, 126.25, 126.04, 125.80, 125.77, 124.12, 114.92, 107.42.

Anal. Calcd for C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>: C, 68.11; H, 4.84; N, 6.11. Found:

MS (EI): m/z [M]<sup>+</sup>: 323.1

## 2.2 生物活性

生物實驗所用細胞、耗材、設備與實驗，由台中榮民總醫院與台中中興大學醫學科技所林季千博士所提供，由李宜蓉同學操作實驗，以下為實驗方法。

### 細胞培養 (Ncubated)

將 CL1-0 (人類肺腺癌細胞) 培養於 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 培養液中，培養液中含有 10% FBS (Fetal bovine serum)、4 mg/mL G418 (Geneticin)，放置於 37°C，含有 5% CO<sub>2</sub> 的細胞培養箱中。

### 加藥處理 (Treatment)

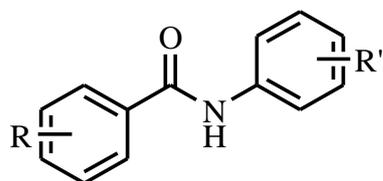
將 CL1-0 細胞培養在 24 孔盤中，細胞數為  $4 \times 10^4$  / well，加入 1  $\mu$ L 濃度為 50  $\mu$ M 的樣品，放置於細胞培養箱中培養 20 分鐘，再加入 100  $\mu$ g / mL TNF- $\alpha$ ，放置於細胞培養箱中培養三小時，取出細胞後使用冷光分析儀分析。

### 第三章 結果與討論

本實驗合成三種不同主體結構的化合物，探討其結構與生物活性之間的關係，因此本章的討論將分成有機合成與生物活性兩大部分。有機合成部份將討論合成方式與實驗上相關問題之解決方法，生物活性部分將探討三個系列在結構上以及取代基不同與活性之間的關係。

#### 3.1 有機合成部分

##### 3.1.1 第一系列



本系列以苯酸與苯胺作為起始物，使用雙分子親核取代反應 ( $S_N2$  reaction) 與 DCC 偶合反應兩種方式，合成苯甲醯苯胺的衍生物。第一部分  $S_N2$  反應的速率快慢取決於溶劑、離去基與立體障礙，起始物苯酸上的氫氧基 (-OH) 並非好的離去基，因此苯酸先與亞硫酸氯 ( $SOCl_2$ ) 反應進行醯氯化，以 -Cl 取代 -OH 成為好的離去基。苯酸醯氯化之後，加入親核性試劑苯胺，苯胺上  $-NH_2$  一對孤對電子攻擊苯甲醯氯上的碳原子形成過渡態，當離去基離去後形成最終產物苯甲醯苯胺。(圖 3.1)

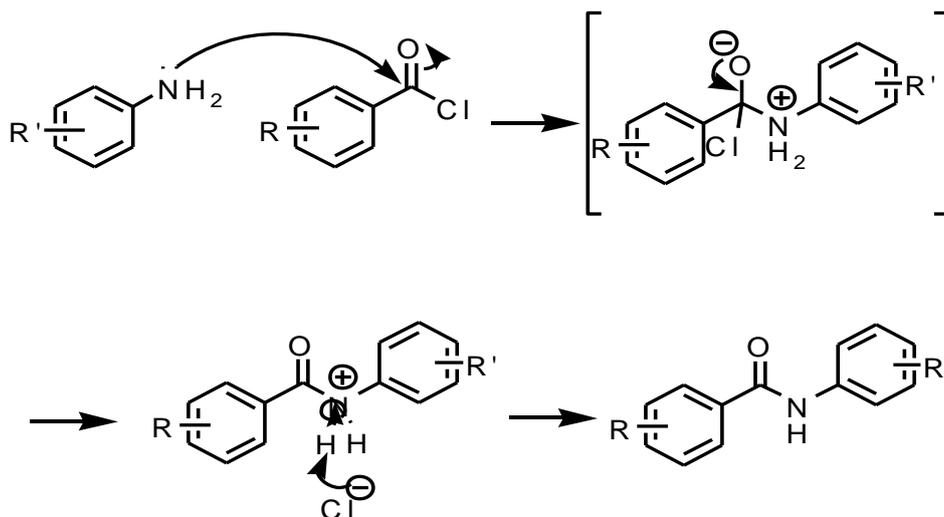


圖 3.1、 $S_N2$  反應機構。

表 3.1、以  $S_N2$  反應合成之苯甲醯苯胺衍生物產率

編號	R	R'	產率
WY4108	4-Cl	2-OH	34%
WY4113	4-CH <sub>3</sub>	2-OH	30%

苯酸醯氯化反應的步驟全程必須在除水的狀態下進行，若反應中除水不完全，苯醯氯和水反應回到苯酸，反應性變差而影響產率，因此改以 DCC 偶合反應合成苯甲醯苯胺。DCC 偶合反應為合成胜肽鍵結上常用的方法，使用 4-Dimethylaminopyridine (DMAP) 當作催化劑，*N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) 當作脫水與活化劑。當苯酸與 DCC 反應時，DCC 氮上的孤對電子攻擊羧酸上的氫，形成羧酸根負離子後攻擊 DCC 雙氮中間偏正電的碳，形成強力拉電子基團，此離去基的離去能力優於醯氯化後的中間產物，親核性試劑的苯

胺攻擊中間產物帶有部份正電的碳，離去基離去後形成苯甲醯苯胺 (圖 3.2)。在 DCC 偶合反應終了會產生大量白色沉澱，為反應的副產物 DCU (*N,N'*-Dicyclohexylurea)，進行數次抽氣過濾可將大多數 DCU 分離後，經由管柱層析純化得到最終產物苯甲醯苯胺。DCC 偶合反應的優點為不必使用高溫迴流，在室溫下即可進行反應，反應也由兩步驟減少為一步驟完成，節省許多反應的時間。此外使用  $S_N2$  反應的產率約為 30% 至 40%，而 DCC 偶合反應的產率可達 70% 至 90%，全體產率大為提升。

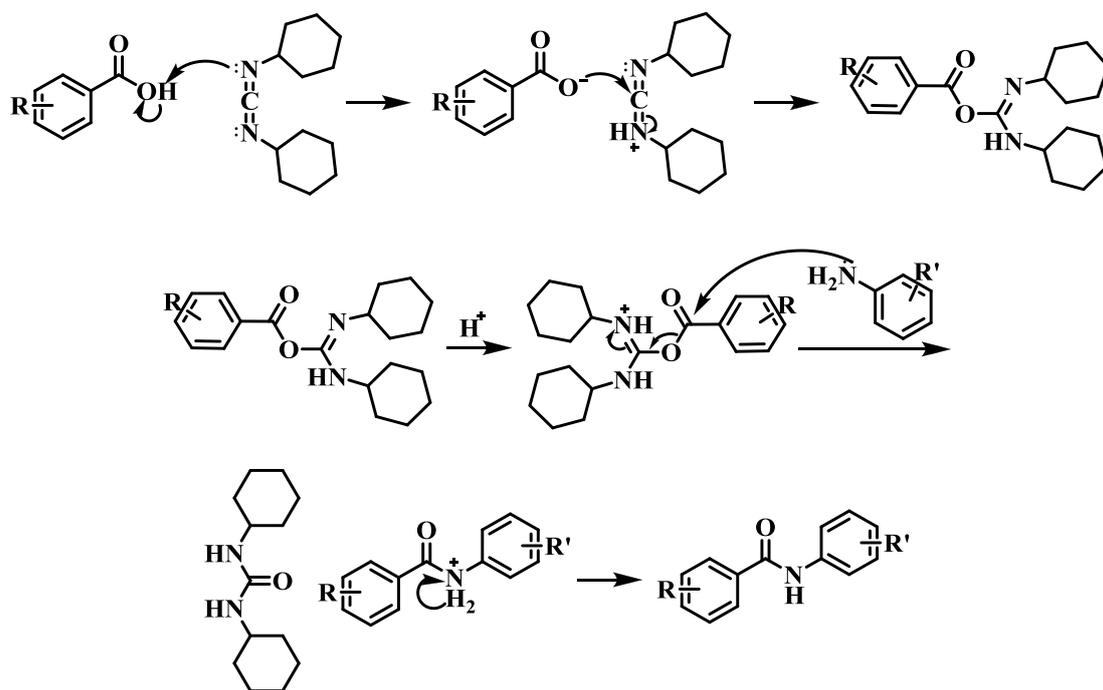
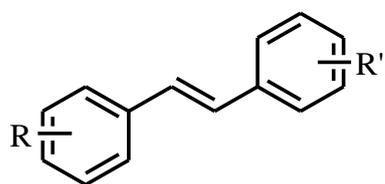


圖 3.2、DCC 偶合反應機構。

表 3.2、以 DCC 偶合反應合成苯甲醯苯胺衍生物產率

編號	R	R'	產率
WY4102	3,5-CF <sub>3</sub>	2-OH, 5-Cl	85%
WY4102P	3,5-CF <sub>3</sub>	2-OCH <sub>3</sub> , 5-Cl	92%
WY4114	3,5-CF <sub>3</sub>	2-OH	76%
WY4116	3,5-CF <sub>3</sub>	3-Cl	87%
WY4117	4-CF <sub>3</sub>	2-OH, 5-Cl	89%
WY4119	4-CF <sub>3</sub>	2-OH	71%
WY4115	4-CF <sub>3</sub>	3-Cl	88%
WY4120	3-Cl	4-CF <sub>3</sub>	79%

### 3.1.2 第二系列



本系列衍生物以醛類當作起始物，還原為醇類後以 PBr<sub>3</sub> 溴化，加入 P(OEt<sub>3</sub>) 進行微波反應得到磷酸酯化合物，使用霍納-沃茲沃斯-艾蒙斯反應 (Horner - Wadsworth - Emmons reaction, HWE reaction) 進行合成得到二苯乙烯衍生物。早期烯類的合成以 Wittig 反應為主，直到 1985 年由 Leopold Horner 以磷酸酯取代磷苯基改進 Wittig 反應，再由 William S. Wadsworth 與 William D. Emmons 研究改

良，合稱 HWE 反應。

反應機制為將磷酸酯的  $\alpha$  碳進行去質子化，形成穩定的碳負離子後攻擊醛類上的碳，由於在空間中攻擊的位相不同，會產生兩種中間產物 a 與 b，中間產物氧上的孤對電子會攻擊磷原子，形成四圓環的過渡狀態，經消除反應後形成順式與反式結構產物（圖 3.3）。順、反式結構的生成與立體障礙、反應溫度有關，若立體障礙較大，反式二苯乙烯形成的比例增加，立體障礙較小，順式二苯乙烯形成比例增加。另外反應溫度控制在  $-78^{\circ}\text{C}$  與  $0^{\circ}\text{C}$  之間，得到順式二苯乙烯的比例較高，將溫度控制在  $0^{\circ}\text{C}$  到室溫之間，得到反式二苯乙烯的比例較高，因此本系列的反應溫度皆在室溫下反應得到反式二苯乙烯。

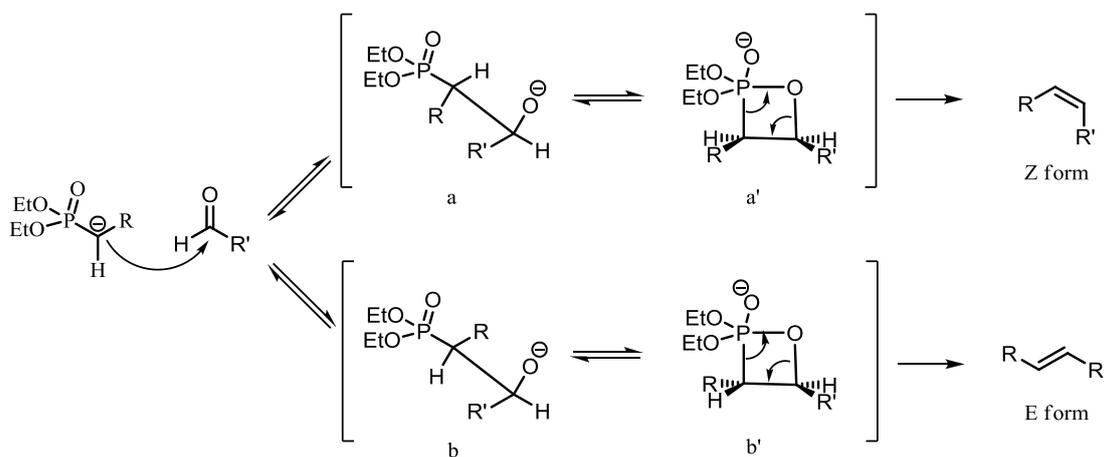


圖 3.3 HWE 反應機構。

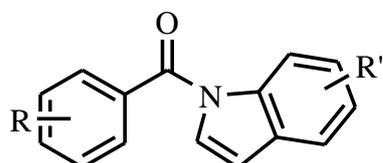
在第二系列中，取代基為醇類的化合物，必須先與保護基反應，直接進行反應會產生其他副產物，使得最終產物產率降低，因此使用

溴化苯 (Benzyl bromide) 為保護基。最後將保護基去除的步驟，若使用氫氣與 Pd 當作催化劑的條件去除保護基，在本系列結構中的雙鍵結構會被還原成單鍵，此外實驗上有反應時間太長以及還原效果較差的現象，因此選擇在冰浴下加入  $\text{BBr}_3$  將保護基去除還原成醇類的方法，實驗反應時間縮短且產率高。

表 3.3、以 HWE 反應合成之二苯乙烯衍生物產率

編號	R	R'	產率
WY4201	3,5- $\text{CF}_3$	2-OH, 5-Cl	19%

### 3.1.3 第三系列



本系列分成合成吲哚與 DCC 偶合反應兩個部分，第一部份使用 Fischer 吲哚合成反應，起始物苯胺在冰浴下加入濃鹽酸形成胺鹽，再加入亞硝酸鈉 (Sodium nitrite) 與帶有兩個結晶水的氯化亞錫 (Tin (II) chloride dihydrate) 得到聯胺 (Hydrazine)，加入 Pyruvic acid 後形成脞 (Hydrazone)，在高溫下以濃鹽酸催化，環化得到吲哚。Fischer 吲哚合成中聯胺的合成步驟中必須控溫在  $0-5^\circ\text{C}$  的低

溫，整體反應時間長且中間產物聯胺容易變質不易保存，升溫後反應沒有得到預期的產物。因此採用將醛類進行硝化反應，硝基在鄰位取代的化合物與硝基甲烷（Nitromethane）與乙酸銨（Ammonium Acetate）預先混合後，以微波反應合成  $\beta$ -硝基烯（Nitroalkene），以酒精為溶劑，加入醋酸鐵粉催化後，加熱至迴流，經環化得到吲哚，此方法反應較為單純且所得到的吲哚產率較高。（圖 3.4）。

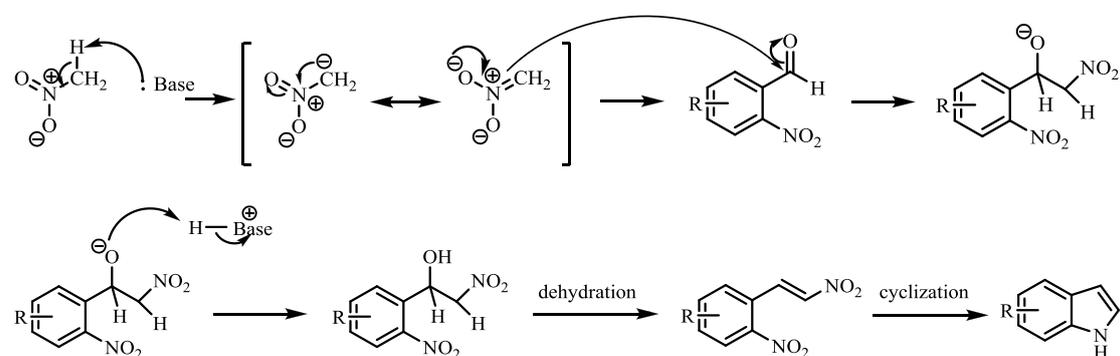


圖 3.4、Indole 合成反應機構。

第二部份使用 DMAP 與 DCC 將吲哚接上苯酸，唯一不同的是吲哚先與強鹼 NaH 反應，讓強鹼將吲哚氮上的氫去除，增加其親核性後再與苯酸進行反應得到最終產物 WY4305, WY4306。在同樣的條件下則無法合成 WY4301 與 WY4302，推測進行偶合反應時吲哚上 7-OMe 對於雜環上的偶合位置造成立體障礙，而苯酸和 DCC 所形成的中間產物同樣具有較大的立體障礙，使得反應無法進行。因此挑選可減少偶合位置立體障礙的  $\text{PCl}_5$  將苯酸醯氯化，而吲哚與強鹼

t-BuOK 先行混合後再緩慢滴入反應瓶中，反應溫度為迴流約 20 小時，以醯氯化所得到的產率大為提升。而加入 BBr<sub>3</sub> 將 -OMe 還原成 -OH 的步驟中，反應溫度由冰浴到室溫再昇溫至迴流，反應依然沒有進行。

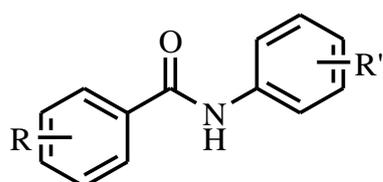
表 3.4、以 DCC 偶合反應合成之 *N*-substituted indole 衍生物產率

編號	R	R'	產率
WY4301	3,5-CF <sub>3</sub>	7-OMe	34%
WY4302	4-CF <sub>3</sub>	7-OMe	58%
WY4305	3,5-CF <sub>3</sub>	4-Cl	26%
WY4306	4-CF <sub>3</sub>	4-Cl	30%

### 3.2 生物活性部分

本系列以 IMD-0354 作為前導化合物，合成三種系列的衍生物，測試衍生物抑制 NF-κB 的效果，探討結構與活性之間的關係。

#### 3.2.1 第一系列



挑選羅仁志、黃志遠與李宜蓉同學論文中，在 50 μM 濃度下對於 NF-κB 具有抑制效果的衍生物，合成其 R 端與 R' 端取代基交

換苯甲醯苯胺衍生物，實驗結果顯示大部分的衍生物其 R 端與 R' 端取代基交換之後，抑制 NF-κB 效果有減弱的趨勢，其中抑制效果唯一不減反增的為 WY4116 (表 3.5)。

表 3.5、50 μM 下苯甲醯苯胺衍生物對於 NF-κB 的抑制率

編號	R	R'	% inhibition of NF-κB ( 50 μM )	IC <sub>50</sub> (μM)
WY3113F	2-OH	3,5-CF <sub>3</sub>	>100	2.4±0.6 <sup>c</sup>
WY4114	3,5-CF <sub>3</sub>	2-OH	>100	13.1±1.6
WY1117	3-Cl	3,5-CF <sub>3</sub>	>100	11.4 ± 1.1 <sup>a</sup>
WY4116	3,5-CF <sub>3</sub>	3-Cl	>100	9.8±1.2
WY3116	2-OH, 5-Cl	4-CF <sub>3</sub>	>100	0.6±0.1 <sup>c</sup>
WY4117	4-CF <sub>3</sub>	2-OH, 5-Cl	>100	5.06±1.09
WY4115	4-CF <sub>3</sub>	3-Cl	>100	11.3 ± 0.8
WY4120	3-Cl	4-CF <sub>3</sub>	29.81	>50
WY5105	2-OH	4-NO <sub>2</sub>	75	10.3±1.6 <sup>e</sup>
WY4118	4-NO <sub>2</sub>	2-OH	0	>50

<sup>a</sup>數據來源：羅仁志 2010 東海碩博士論文。<sup>c</sup>數據來源：黃志遠 2010 東海碩博士論文。<sup>e</sup>數據來源：李宜蓉 2011 東海碩博士論文。

從羅仁志與黃志遠的論文<sup>34,35</sup>中苯甲醯苯胺衍生物中發現，取代基中含有三氟甲基 (-CF<sub>3</sub>) 衍生物對於 NF-κB 有明顯抑制效果，因

此保留 WY4102 中 R 端的 3,5- 三氟甲基取代，對 R' 端進行官能基的修飾，表 3.6 所列出衍生物為固定 3,5- 三氟甲基取代，對 R' 端官能基進行修飾的結果。結果顯示將 5-Cl (WY4114) 或 2-OH (WY4116) 去除時，對於 NF-κB 同樣具有抑制效果，從 IC<sub>50</sub> 值發現，將 5-Cl 移去的衍生物 (WY4114)，其抑制效果略低於將 2-OH 移去的衍生物 (WY4116)，推測 5 號位置上的 -Cl 在此對於抑制效果有正面的幫助，而 -OH 與 -Cl 官能基兩者共存時抑制效果最為明顯。

表 3.6、50 μM 下苯甲醯苯胺衍生物對於 NF-κB 的抑制率

編號	R	R'	% inhibition of NF-κB (50 μM)	IC <sub>50</sub> (μM)
WY4102	3,5-CF <sub>3</sub>	2-OH, 5-Cl	>100	1.2±0.5
WY4114	3,5-CF <sub>3</sub>	2-OH	>100	13.1±1.6
WY4116	3,5-CF <sub>3</sub>	3-Cl	>100	9.8±1.2

從 WY4102 與 WY4102P 發現，將醯胺鍵鄰位上的醇基以疏水性官能基 (-CH<sub>3</sub>) 遮蔽後，抑制 NF-κB 的活性大幅下降，在 WY3116 與 WY4120 中也可以看見相同趨勢，當醯胺鍵鄰位的醇基以氫取代後活性大幅減少，推測在醯胺鍵鄰位的醇基對於 NF-κB 的抑制效果是重要的官能基 (表 3.7)。

表 3.7、50  $\mu\text{M}$  下苯甲醯苯胺衍生物對於 NF- $\kappa\text{B}$  的抑制率

編號	R	R'	% inhibition of NF- $\kappa\text{B}$ ( 50 $\mu\text{M}$ )	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
WY4102	3,5-CF <sub>3</sub>	2-OH, 5-Cl	>100	1.2±0.5
WY4102P	3,5-CF <sub>3</sub>	2-OCH <sub>3</sub> , 5-Cl	45	>50
WY3116	2-OH, 5-Cl	4-CF <sub>3</sub>	>100	0.6±0.1 <sup>c</sup>
WY4120	3-Cl	4-CF <sub>3</sub>	29.81	>50

<sup>c</sup>數據來源：黃志遠 2010 東海碩博士論文。

為了探討多取代與單取代對於抑制效果的不同，進一步將 3,5-三氟甲基以 4-三氟甲基修飾，合成 **WY4115**、**WY4117** 與 **WY4119**。活性測試結果顯示以 4-三氟甲基取代的衍生物 (**WY4115**、**WY4117** 與 **WY4119**) 具有抑制效果，推測單取代三氟甲基與雙取代三氟甲基衍生物，同樣可與 IKK $\beta$  上的結合位置之間產生疏水性作用力，達到抑制 NF- $\kappa\text{B}$  的效果。從 IC<sub>50</sub> 值中也可以發現，三氟甲基單取代衍生物抑制效果不及雙取代衍生物的趨勢。(表 3.8)。

表 3.8、50  $\mu\text{M}$  下苯甲醯苯胺衍生物對於 NF- $\kappa\text{B}$  的抑制率

編號	R	R'	% inhibition of NF- $\kappa\text{B}$ ( 50 $\mu\text{M}$ )	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
WY4102	3,5-CF <sub>3</sub>	2-OH, 5-Cl	>100	1.2±0.5
WY4117	4-CF <sub>3</sub>	2-OH, 5-Cl	99	5.06±1.09
WY4114	3,5-CF <sub>3</sub>	2-OH	>100	13.1±1.6
WY4119	4-CF <sub>3</sub>	2-OH	91.68	-
WY4116	3,5-CF <sub>3</sub>	3-Cl	>100	9.8±1.2
WY4115	4-CF <sub>3</sub>	3-Cl	>100	11.3 ± 0.8

在 WY4108、WY4113 與 WY4119 之中，在 R 端 4 號位置上同樣為疏水端官能基，其中以三氟甲基取代的衍生物抑制活性最好，推測三氟甲基上的 -F 可與結合部位之間產生氫鍵效應，因此結合度較高，對於 NF- $\kappa\text{B}$  有明顯抑制效果。(表 3.9)

表 3.9、50  $\mu\text{M}$  下苯甲醯苯胺衍生物對於 NF- $\kappa\text{B}$  的抑制率

編號	R	R'	% inhibition of NF- $\kappa\text{B}$ ( 50 $\mu\text{M}$ )
WY4119	4-CF <sub>3</sub>	2-OH	91.68
WY4108	4-Cl	2-OH	0
WY4113	4-CH <sub>3</sub>	2-OH	0

### 3.2.2 第二系列

此系列實驗選擇第一系列中對於 NF- $\kappa$ B 具有抑制效果的衍生物，做結構上的修飾，將醯胺鍵修飾成雙鍵並合成一系列衍生物，主要探討主結構上雙鍵對於抑制活性的影響。

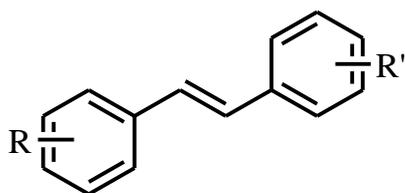


表 3.10、50  $\mu$ M 下二苯乙烯衍生物對於 NF- $\kappa$ B 的抑制率

編號	R	R'	% inhibition of NF- $\kappa$ B ( 50 $\mu$ M )	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
WY4201	3,5-CF <sub>3</sub>	2-OH, 5-Cl	>100	5.23 $\pm$ 0.203

表 3.11 為比較苯甲醯苯胺與二苯乙烯衍生物，在相同取代基的對應結構之生物活性。結果顯示主結構為雙鍵的二苯乙烯衍生物之抑制效果不及苯甲醯苯胺衍生物，推測醯胺鍵可擔任氫鍵提供者與氫鍵接受者的角色，但雙鍵不具有這種特性，因此在抑制活性上有相當大的差異。生物活性結果顯示 **WY4201** 對於 NF- $\kappa$ B 有明顯的抑制效果，而 IC<sub>50</sub> 數值與 **WY4102** 相差不多，推測醯胺鍵上的氫鍵提供者與氫鍵接收者在此的效益並不明顯，二苯乙烯上取代基為疏水性者

有較好的抑制活性。(表 3.11)

表 3.11、50  $\mu\text{M}$  下苯甲醯苯胺與二苯乙烯衍生物對於 NF- $\kappa\text{B}$  抑制率的比較。

編號	R	R'	% inhibition of NF- $\kappa\text{B}$ ( 50 $\mu\text{M}$ )	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
WY1107	3-CH <sub>3</sub>	4-NO <sub>2</sub>	80	17.4±4.405 <sup>a</sup>
WY1208	3-CH <sub>3</sub>	4-NO <sub>2</sub>	0	>50
WY2114	-	4-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	>100 <sup>b</sup>	-
WY2210	-	4-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0	-
WY2102	2-OCH <sub>3</sub>	2-OCH <sub>3</sub>	87 <sup>b</sup>	-
WY2201	2-OCH <sub>3</sub>	2-OCH <sub>3</sub>	0	>50 <sup>b</sup>
WY4102	3,5-CF <sub>3</sub>	2-OH, 5-Cl	>100	1.2±0.5
WY4201	3,5-CF <sub>3</sub>	2-OH, 5-Cl	>100	5.23±0.203

<sup>a</sup>數據來源：羅仁志 2010 東海碩博士論文。<sup>b</sup>數據來源：歐佩蓉 2010 東海碩博士論文<sup>36</sup>。

### 3.2.3 第三系列

此系列實驗主要探討主結構上失去氫鍵提供者 -NH 與衍生物整體結構剛性以及體積增加後，對於抑制活性的影響，選擇第一系列中對於 NF- $\kappa\text{B}$  具有抑制效果的衍生物，做結構上的修飾，將苯環修

飾成吲哚結構合成一系列衍生物。

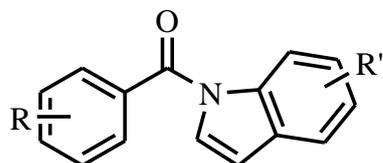


表 3.12、50  $\mu\text{M}$  下 *N*-substituted indole 衍生物對於 NF- $\kappa$ B 的抑制率

編號	R	R'	% inhibition of NF- $\kappa$ B (50 $\mu\text{M}$ )
WY4306	4-CF <sub>3</sub>	4-Cl	76.4

比較 *N*-substituted indole 與苯甲醯苯胺衍生物之間的差異，其結構中缺乏氫鍵提供者，此外整體剛性與體積大於苯甲醯苯胺衍生物。表 3.13 為比較苯甲醯苯胺與 *N*-substituted indole 衍生物，在相同取代基的對應結構之生物活性。由實驗結果得知，在相同取代基條件下 *N*-substituted indole 衍生物的抑制活性不及苯甲醯苯胺衍生物的趨勢，推測整體剛性與體積增加之後，產生的立體障礙使得化合物對於結合部位的結合程度下降，因此提高整體剛性與體積對於抑制活性是負面的效益。而移除氫鍵提供者後抑制活性下降，推測氫鍵提供者在此可能與結合部位之間形成氫鍵作用力 (表 3.13)。

表 3. 13、50  $\mu\text{M}$  下苯甲醯苯胺與 *N*-substituted indole 衍生物對於

NF- $\kappa$ B 抑制率的比較

編號	R	R'	% inhibition of NF- $\kappa$ B ( 50 $\mu\text{M}$ )
WY5107	2-OH, 5-Cl	4-NO <sub>2</sub>	>100 <sup>e</sup>
WY5301	2-OH, 5-Cl	5-NO <sub>2</sub>	56.64 <sup>e</sup>
WY5115	2-OH, 5-CH <sub>3</sub>	4-NO <sub>2</sub>	97.5 <sup>e</sup>
WY5302	2-OH, 5-CH <sub>3</sub>	5-NO <sub>2</sub>	20.28 <sup>e</sup>
WY4115	4-CF <sub>3</sub>	3-Cl	>100
WY4306	4-CF <sub>3</sub>	4-Cl	76.4

<sup>e</sup>數據來源：李宜蓉 2011 東海碩博士論文。

## 第四章 結論

### 4.1 有機合成部份

第一系列以親核性取代反應 ( $S_N2$  反應) 與 DCC 偶合反應合成苯甲醯苯胺衍生物。 $S_N2$  反應為在無水環境下將苯酸醯氯化，再與苯胺形成最終產物。DCC 偶合反應為加入 DMAP 與 DCC 試劑後，再與苯胺形成最終產物。DCC 偶合反應可提高產率且縮短反應時間，且可使用平行反應器同時進行多個反應。

第二系列以霍納 - 沃茲沃斯 - 艾蒙斯反應 (HWE 反應) 合成二苯乙烯衍生物，反應溫度控制在室溫下所得反式二苯乙烯的比例較高，但總產率不高。在起始物上的醇類先與溴化苯作用形成保護基，避免反應產生副產物。

第三系列 *N*-substitued indole 衍生物以醛類為起始物，經硝化後以微波反應合成  $\beta$ -硝基烯，經環化得到吲哚，加入強鹼 NaH 混合後，與苯酸進行反應得到最終產物。

### 4.2 生物活性部分

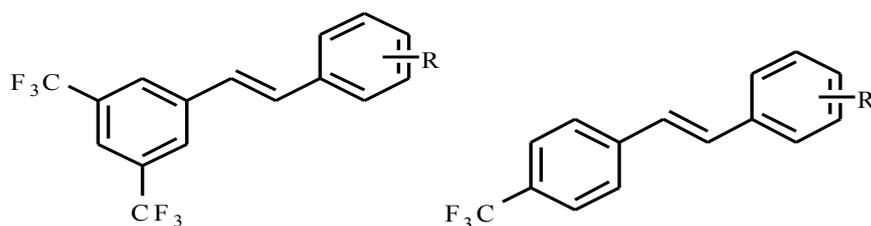
將前導化合物 IMD-0354 兩側取代基交換，合成 WY4102，對於 NF- $\kappa$ B 有極佳的抑制效果，在 R 端保留雙取代 3,5-三氟甲基修飾 R' 端的官能基，同樣對於 NF- $\kappa$ B 有抑制效果，當醯胺鍵鄰位上

的醇基以疏水性官能基保護後，其抑制活性大幅下降，因此鄰位上的醇基有利於衍生物與結合部位之間形成氫鍵。將雙取代 3,5- 三氟甲基修飾為單取代 4- 三氟甲基衍生物後，由  $IC_{50}$  值可發現單取代衍生物其抑制效果不及雙取代衍生物的趨勢，可知雙取代衍生物對於結合部位有較高的結合適性。而同樣為疏水性官能基，官能基為三氟甲基之衍生物對於 NF- $\kappa$ B 有較高的抑制效果。

結構部分，以雙鍵取代苯甲醯苯胺中心結構的醯胺鍵結之二苯乙烯衍生物同樣對於 NF- $\kappa$ B 有抑制效果，醯胺鍵上氫鍵接受與氫鍵提供的效應在此並不明顯。而以 indole 結構取代苯甲醯苯胺中一苯環，提升衍生物整體剛性與體積的 *N*-substitued indole 衍生物，在相同取代基的條件下，其抑制活性不及苯甲醯苯胺衍生物，結構剛性影響與結合部位的作用力，此外 *N*-substitued indole 衍生物失去一氫鍵提供者，為降低活性的原因之一。

## 第五章 未來展望

本研究中以 WY4102 與 WY4201 的抑制效果最為顯著，而 WY4201 為二苯乙烯衍生物中對於 NF- $\kappa$ B 有較好的抑制效果，未來可嘗試合成二苯乙烯主要以三氟甲基取代的衍生物並探討其結構活性關係。



同時配合分子模擬技術，預測衍生物與 IKK $\beta$  結合部位的立體結構以及彼此間的鍵結作用力，期望未來能合成出對於 NF- $\kappa$ B 有抑制效果的衍生物。

## 參考資料

1. 99 年國人主要死因統計. 行政院衛生署 **2010**,  
[http://www.doh.gov.tw/CHT2006/DM/SEARCH\\_RESULT.aspx](http://www.doh.gov.tw/CHT2006/DM/SEARCH_RESULT.aspx).
2. 陳若白; 黃敬倫; 鄭安理, 第十四章 癌症的分子標靶治療. *特定標地之新藥開發* **2005**.
3. 謝興邦, 簡介癌症標靶治療藥物研究現況. *國家衛生研究院電子報* **2007**, 199.
4. Maeda, S.; Omata, M., Inflammation and cancer: Role of nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Science* **2008**, 99 (5), 836-842.
5. Harari, O. A.; Liao, J. K., NF- $\kappa$ B and innate immunity in ischemic stroke. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2010**, 1207 (1), 32-40.
6. Ciucci, A.; Gianferretti, P.; Piva, R.; Guyot, T.; Snape, T. J.; Roberts, S. M.; Santoro, M. G., Induction of Apoptosis in Estrogen Receptor-Negative Breast Cancer Cells by Natural and Synthetic Cyclopentenones: Role of the I B Kinase/Nuclear Factor- B Pathway. *Molecular Pharmacology* **2006**, 70 (5), 1812-1821.
7. Morwick, T.; Berry, A.; Brickwood, J.; Cardozo, M.; Catron, K.; DeTuri, M.; Emeigh, J.; Homon, C.; Hrapchak, M.; Jacober, S.; Jakes, S.; Kaplita, P.; Kelly, T. A.; Ksiazek, J.; Liuzzi, M.; Magolda, R.; Mao, C.; Marshall, D.; McNeil, D.; Prokopowicz, A., 3rd; Sarko, C.; Scouten, E.; Sledziona, C.; Sun, S.; Watrous, J.; Wu, J. P.; Cywin, C. L., Evolution of the thienopyridine class of inhibitors of IkappaB kinase-beta: part I: hit-to-lead strategies. *J Med Chem* **2006**, 49 (10), 2898-908.

8. Tripathi, P.; Aggarwal, A., NF- $\kappa$ B transcription factor: a key player in the generation of immune response. *CURRENT SCIENCE* **2006**, *90* (4), 519-531.
9. Israel, A., The IKK Complex, a Central Regulator of NF- B Activation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2009**, *2* (3), a000158-a000158.
10. Delhase, M., Positive and Negative Regulation of IB Kinase Activity Through IKK Subunit Phosphorylation. *Science* **1999**, *284* (5412), 309-313.
11. Hayden, M. S., Signaling to NF- B. *Genes & Development* **2004**, *18* (18), 2195-2224.
12. Neumann, M.; Naumann, M., Beyond IkappaBs: alternative regulation of NF-kappaB activity. *FASEB J* **2007**, *21* (11), 2642-54.
13. Zheng, C.; Yin, Q.; Wu, H., Structural studies of NF- $\kappa$ B signaling. *Cell Research* **2010**, *21* (1), 183-195.
14. Caamano, J.; Hunter, C. A., NF- B Family of Transcription Factors: Central Regulators of Innate and Adaptive Immune Functions. *Clinical Microbiology Reviews* **2002**, *15* (3), 414-429.
15. Sullivan, J. C.; Kalaitzidis, D.; Gilmore, T. D.; Finnerty, J. R., Rel homology domain-containing transcription factors in the cnidarian *Nematostella vectensis*. *Dev Genes Evol* **2007**, *217* (1), 63-72.
16. Cervantes, C. F.; Bergqvist, S.; Kjaergaard, M.; Kroon, G.; Sue, S.-C.; Dyson, H. J.; Komives, E. A., The RelA Nuclear Localization Signal Folds upon Binding to I $\kappa$ B $\alpha$ . *Journal of Molecular Biology* **2011**, *405* (3), 754-764.
17. Gauthier, M.; Degnan, B. M., The transcription factor NF-kappaB in

- the demosponge *Amphimedon queenslandica*: insights on the evolutionary origin of the Rel homology domain. *Dev Genes Evol* **2008**, *218* (1), 23-32.
18. Yamamoto, M.; Horie, R.; Takeiri, M.; Kozawa, I.; Umezawa, K., Inactivation of NF- $\kappa$ B Components by Covalent Binding of (-)-Dehydroxymethylepoxyquinomicin to Specific Cysteine Residues. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 5780-5788.
19. Suea, S.-C.; Alverdib, V.; A, E.; Komivesb; Dyson, H. J., Detection of a ternary complex of NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B $\alpha$  with DNA provides insights into how I $\kappa$ B $\alpha$  removes NF- $\kappa$ B from transcription sites. *PNAS* **2011**, *108* (4), 1367–1372.
20. Ghosh, G.; Huang, D.-B.; Huxford, T., Recognition of Nucleic Acids by Transcription Factor NF- $\kappa$ B. **2010**, 85-106.
21. Kim, B.; Reddy, A.; Lee, K.; Chung, E.; Cho, S.; Lee, H.; Min, K.; Kim, Y., Inhibitory mechanism of chroman compound on LPS-induced nitric oxide production and nuclear factor- $\kappa$ B activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2004**, *325* (1), 223-228.
22. Kwak, J.-H.; Kim, B. H.; Jung, J.-K.; Kim, Y.; Cho, J.; Lee, H., Structure-Activity Relationships of 6-Hydroxy-7-methoxychroman-2-carboxylic acid N-(substituted)phenylamides as Inhibitors of Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation. *Arch Pharm Res* **2007**, *30* (10).
23. Heynekamp, J. J.; Weber, W. M.; Hunsaker, L. A.; Gonzales, A. M.; Orlando, R. A.; Deck, L. M.; Jagt, D. L. V., Substituted trans-stilbenes, including analogues of the natural product resveratrol, inhibit the human tumor necrosis factor alpha-induced activation of transcription factor

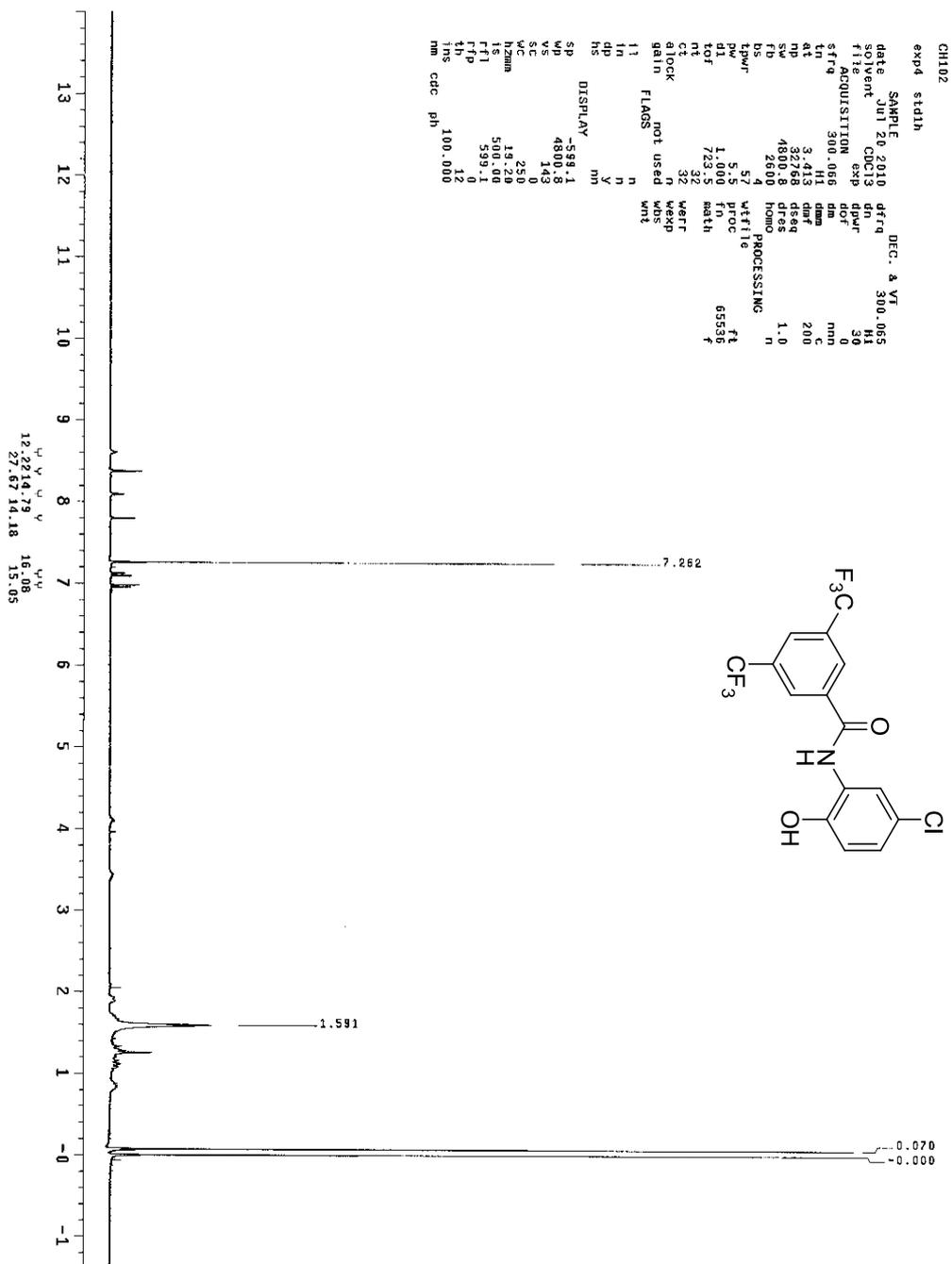
- nuclear factor kappaB. *J Med Chem* **2006**, *49*, 7182-7189.
24. Srinivasan, B.; Johnson, T. E.; Lad, R.; Xing, C., Structure–Activity Relationship Studies of Chalcone Leading to 3-Hydroxy-4,3',4',5'-tetramethoxychalcone and Its Analogues as Potent Nuclear Factor  $\kappa$ B Inhibitors and Their Anticancer Activities. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *52* (22), 7228-7235.
25. Conda-Sheridan, M.; Marler, L.; Park, E.-J.; Kondratyuk, T. P.; Jermihov, K.; Mesezar, A. D.; Pezzuto, J. M.; Asolkar, R. N.; Fenical, W.; Cushman, M., Potential Chemopreventive Agents Based on the Structure of the Lead Compound 2-Bromo-1-hydroxyphenazine, Isolated from *Streptomyces* Species, Strain CNS284. *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *53* (24), 8688-8699.
26. Muto, S.; Nagano, T.; Sotome, T.; Itai, A., Inhibitors against the production and release of inflammatory cytokines. *Patent WO02 / 49632* **2004**.
27. Matsuda, A.; Tanaka, A.; Muto, S.; Ohmori, K.; Furusaka, T.; Jung, K.; Karasawa, K.; Okamoto, N.; Oida, K.; Itai, A., A novel NF- $\kappa$ B inhibitor improves glucocorticoid sensitivity of canine neoplastic lymphoid cells by up-regulating expression of glucocorticoid receptors. *Research in Veterinary Science* **2010**, *89* (3), 378-382.
28. 李宜蓉, 合成轉錄因子 NF- $\kappa$ B 小分子抑制劑並探討其構效關係. *東海大學碩士論文* **2011**.
29. DiMauro, E. F.; Newcomb, J.; Nunes, J. J.; Bemis, J. E.; Boucher, C.; Buchanan, J. L.; Buckner, W. H.; Cee, V. J.; Chai, L.; Deak, H. L.; Epstein, L. F.; Faust, T.; Gallant, P.; Geuns-Meyer, S. D.; Gore, A.; Gu, Y.;

- Henkle, B.; Hodous, B. L.; Hsieh, F.; Huang, X.; Kim, J. L.; Lee, J. H.; Martin, M. W.; Masse, C. E.; McGowan, D. C.; Metz, D.; Mohn, D.; Morgenstern, K. A.; Oliveira-Dos-Santos, A.; Patel, V. F.; Powers, D.; Rose, P. E.; Schneider, S.; Tomlinson, S. A.; Tudor, Y. Y.; Turci, S. M.; Welcher, A. A.; White, R. D.; Zhao, H. L.; Zhu, L.; Zhu, X. T., Discovery of aminoquinazolines as potent, orally bioavailable inhibitors of Lck: Synthesis, SAR, and in vivo anti-inflammatory activity. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *49* (19), 5671-5686.
30. Johnson, S. M.; Connelly, S.; Wilson, I. A.; Kelly, J. W., Toward optimization of the linker substructure common to transthyretin amyloidogenesis inhibitors using biochemical and structural studies. *J Med Chem* **2008**, *51* (20), 6348-58.
31. De Luca, L.; De Grazia, S.; Ferro, S.; Gitto, R.; Christ, F.; Debyser, Z.; Chimirri, A., HIV-1 integrase strand-transfer inhibitors: Design, synthesis and molecular modeling investigation. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *46* (2), 756-764.
32. Wu, Y.-S.; Coumar, M. S.; Chang, J.-Y.; Sun, H.-Y.; Kuo, F.-M.; Kuo, C.-C.; Chen, Y.-J.; Chang, C.-Y.; Hsiao, C.-L.; Liou, J.-P.; Chen, C.-P.; Yao, H.-T.; Chiang, Y.-K.; Tan, U.-K.; Chen, C.-T.; Chu, C.-Y.; Wu, S.-Y.; Yeh, T.-K.; Lin, C.-Y.; Hsieh, H.-P., Synthesis and Evaluation of 3-Aroylindoles as Anticancer Agents: Metabolite Approach. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *52* (15), 4941-4945.
33. Bremner, J. B.; Samosorn, S.; Ambrus, J. I., N-Acylation of 5-Substituted Indoles with Carboxylic Acids via DCC Coupling. *Synthesis* **2004**, *2004* (16), 2653-2658.

34. 羅仁志, IMD-0354 衍生物之合成以及其對於 TNF- $\alpha$  誘導 NF- $\kappa$ B 活化的抑制效果. 東海大學碩士論文 2010.
35. 黃志遠, 苯甲醯胺苯及吡啶化合物的合成與抑制 NF- $\kappa$ B 之生物活性探討. 東海大學碩士論文 2010.
36. 歐佩蓉, 合成 NF- $\kappa$ B 抑制劑並探討結構與活性之間的關係. 東海碩博士論文 2010.

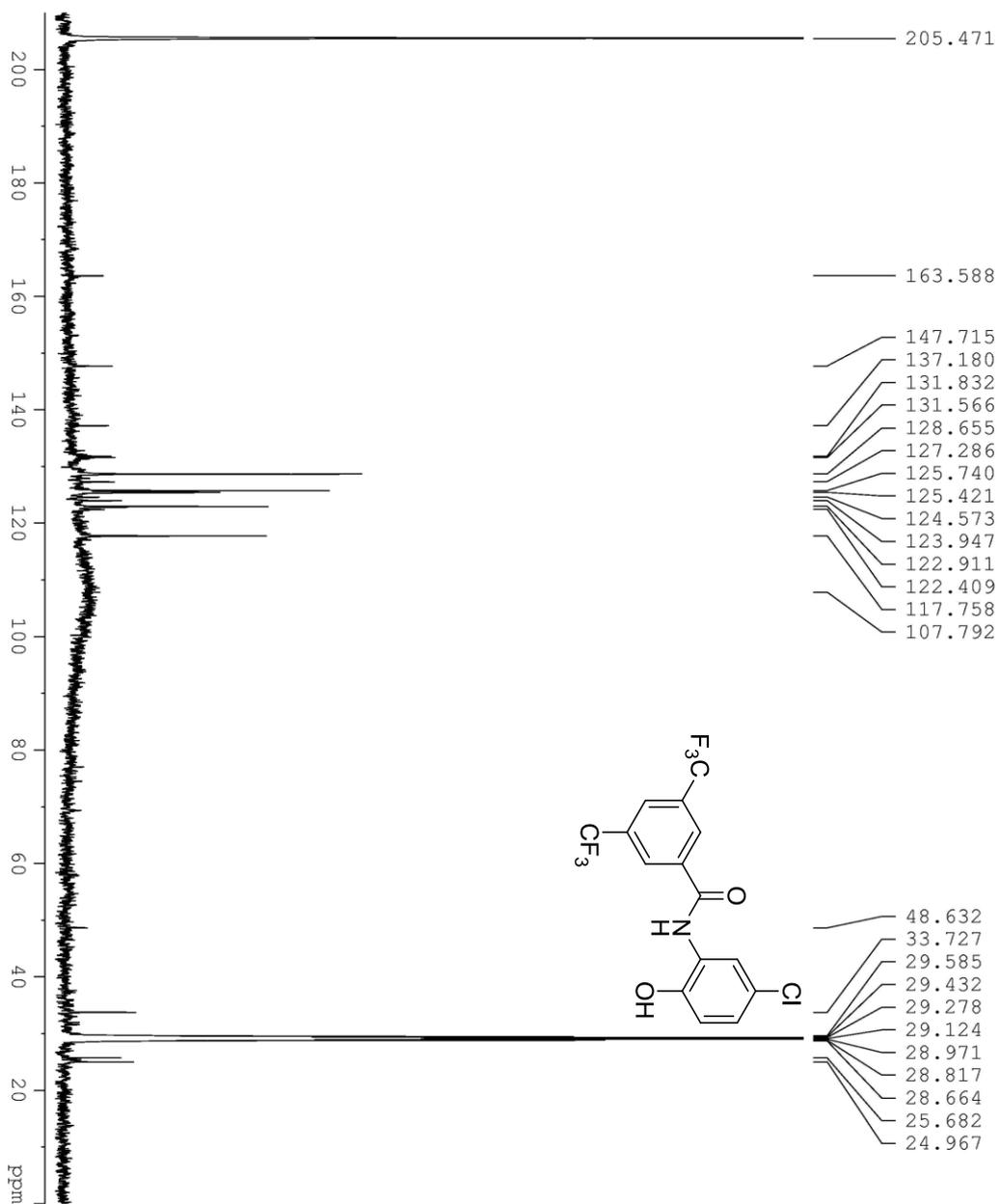
N-(5-chloro-2-hydroxyphenyl)-3,5-bis(trifluoromethyl)benzamide

( WY4102 ) 氣譜圖



# N-(5-chloro-2-hydroxyphenyl)-3,5-bis(trifluoromethyl)benzamide

( WY4102 ) 碳譜圖



```

Current Data Parameters
NAME      WY4102
EXPNO    2
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20110224
Time     22.49
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm TXI IH-13
PULPROG  zgpg
SOLVENT  CDCl3
NS       512
DS       8
SWH      31446.541 Hz
FIDRES   0.472836 Hz
AQ       1.042083 sec
RG       4096
TM       15.900 usec
DE       6.50 usec
TE       298.0 K
D1       3.00000000 sec
d11      0.03000000 sec
PCRSST   0.00000000 sec
KORNAK   0.01000000 sec

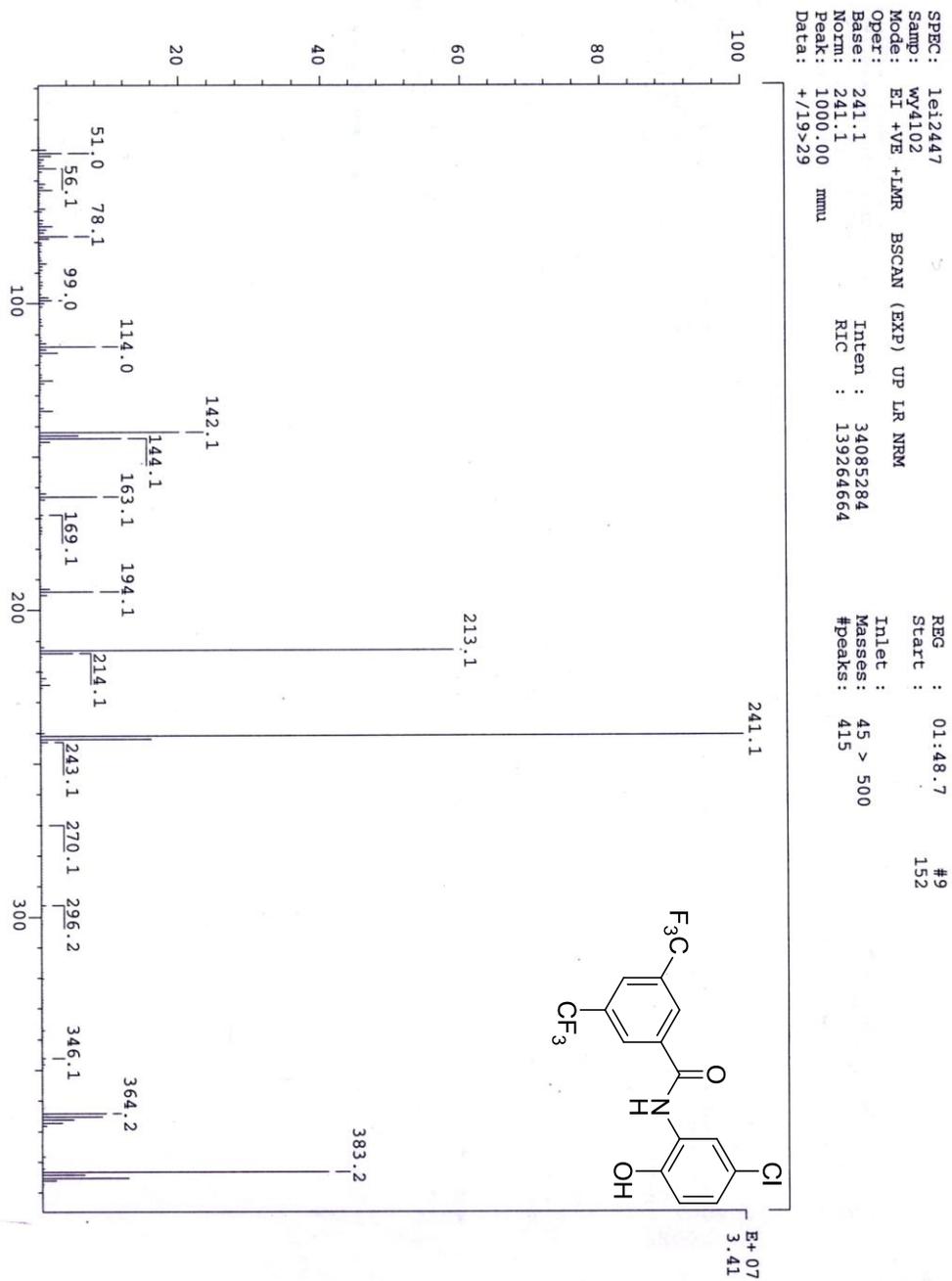
===== CHANNEL f1 =====
NUC1      13C
P1       10.10 usec
PL1      -4.90 dB
SFO1     125.7702890 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2  waltz16
NUC2      1H
PCPD2    90.00 usec
PL2      0.00 dB
PL12     17.50 dB
SFO2     500.1326000 MHz

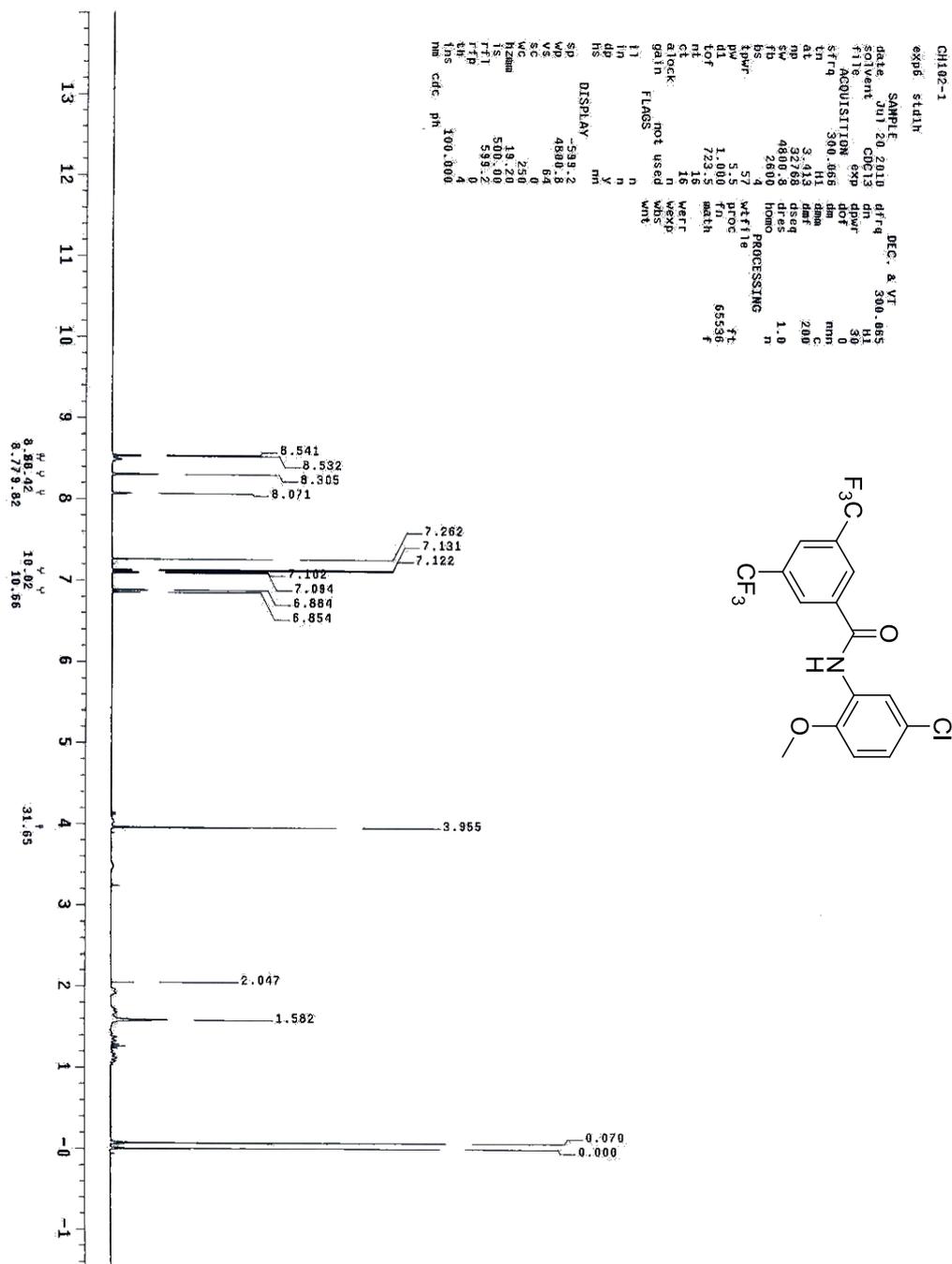
F2 - Processing parameters
SI       32768
SF       125.7577658 MHz
WDW      EM
SSB      0
GB       0
PC       1.05
    
```

# N-(5-chloro-2-hydroxyphenyl)-3,5-bis(trifluoromethyl)benzamide

## ( WY4102 ) 質譜圖

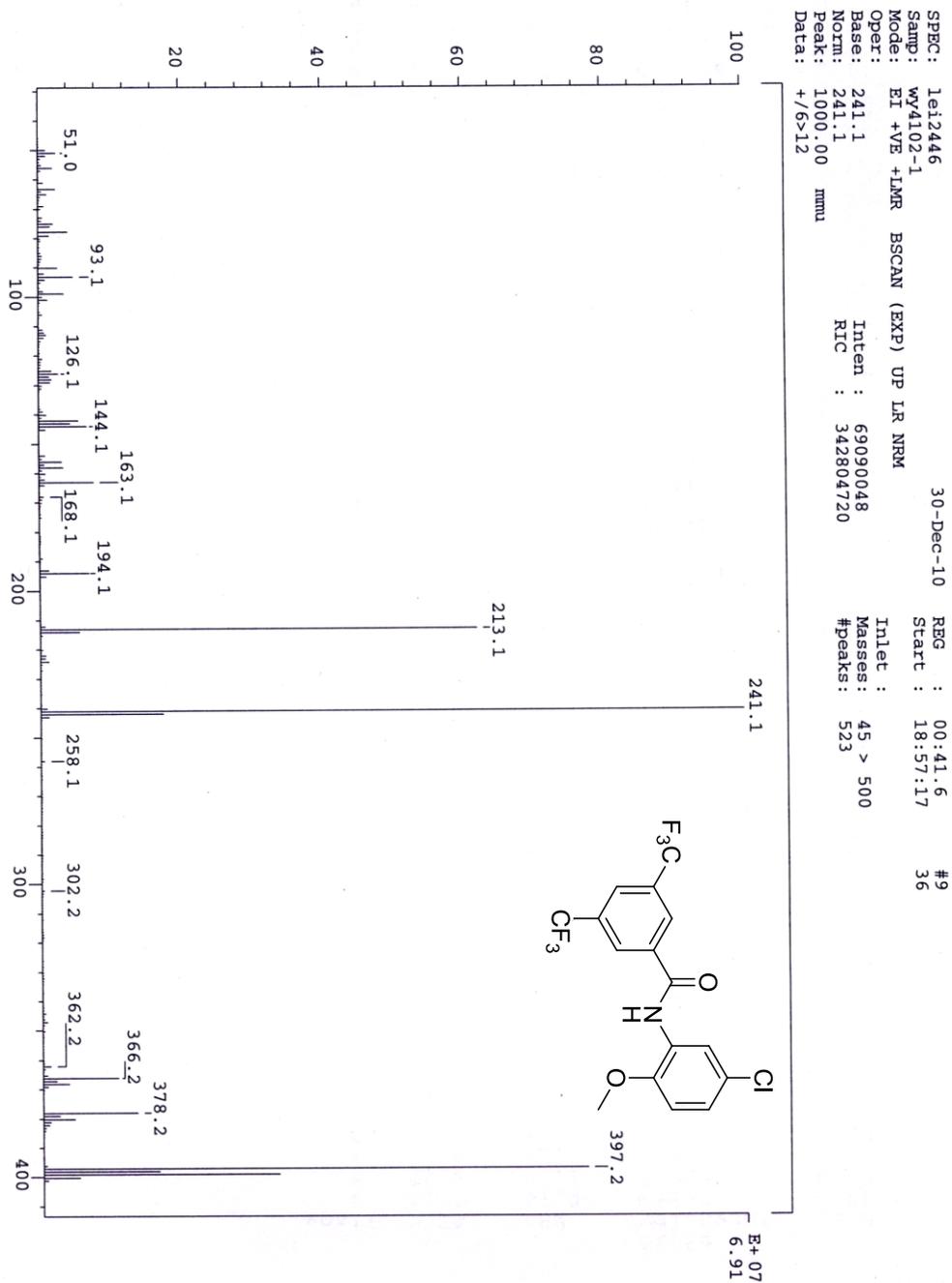


N-(5-chloro-2-methoxyphenyl)-3,5-bis(trifluoromethyl)benzamide  
 (WY4102P) 氫譜圖



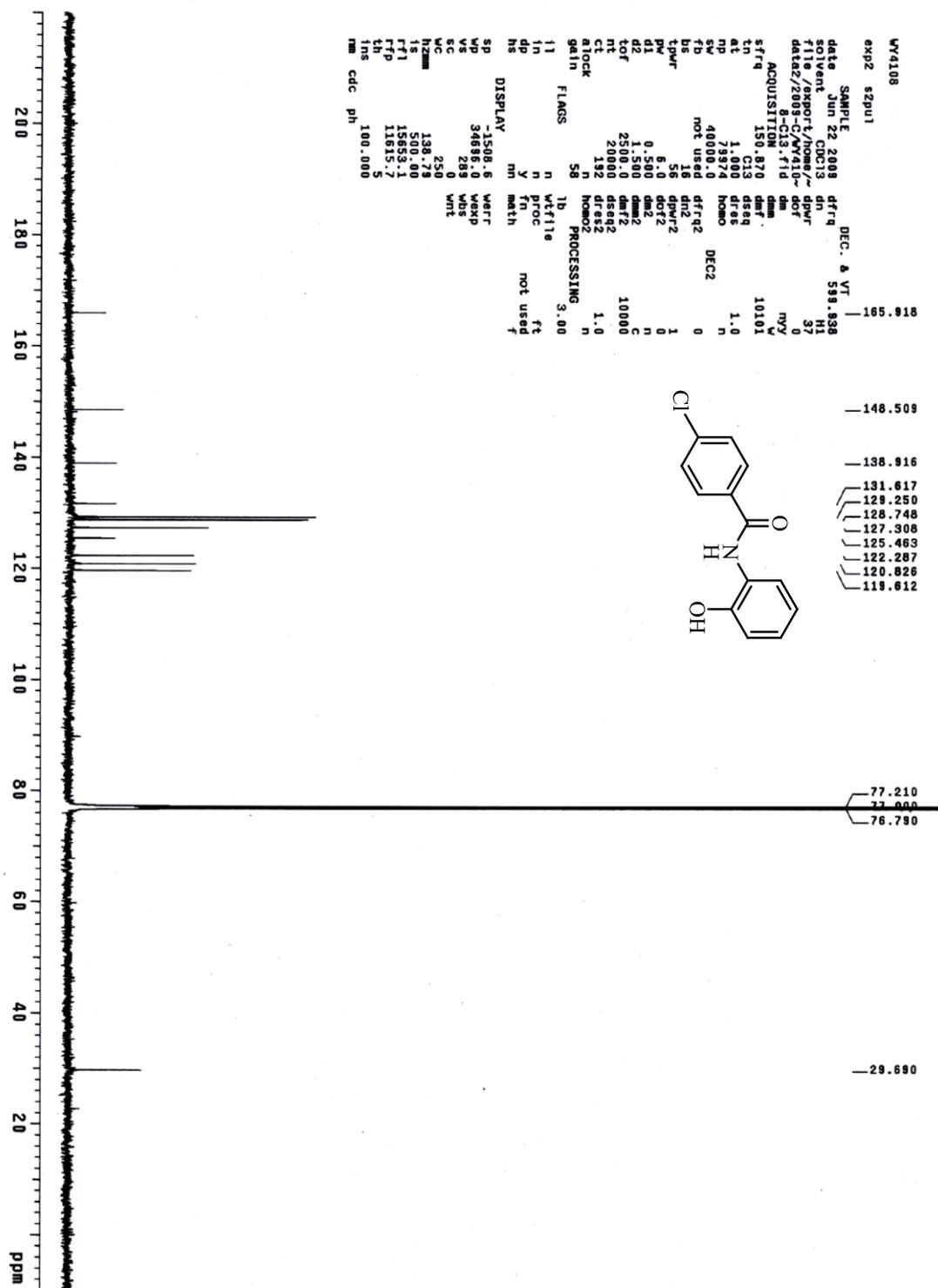


N-(5-chloro-2-methoxyphenyl)-3,5-bis(trifluoromethyl)benzamide  
 ( WY4102P ) 質譜圖

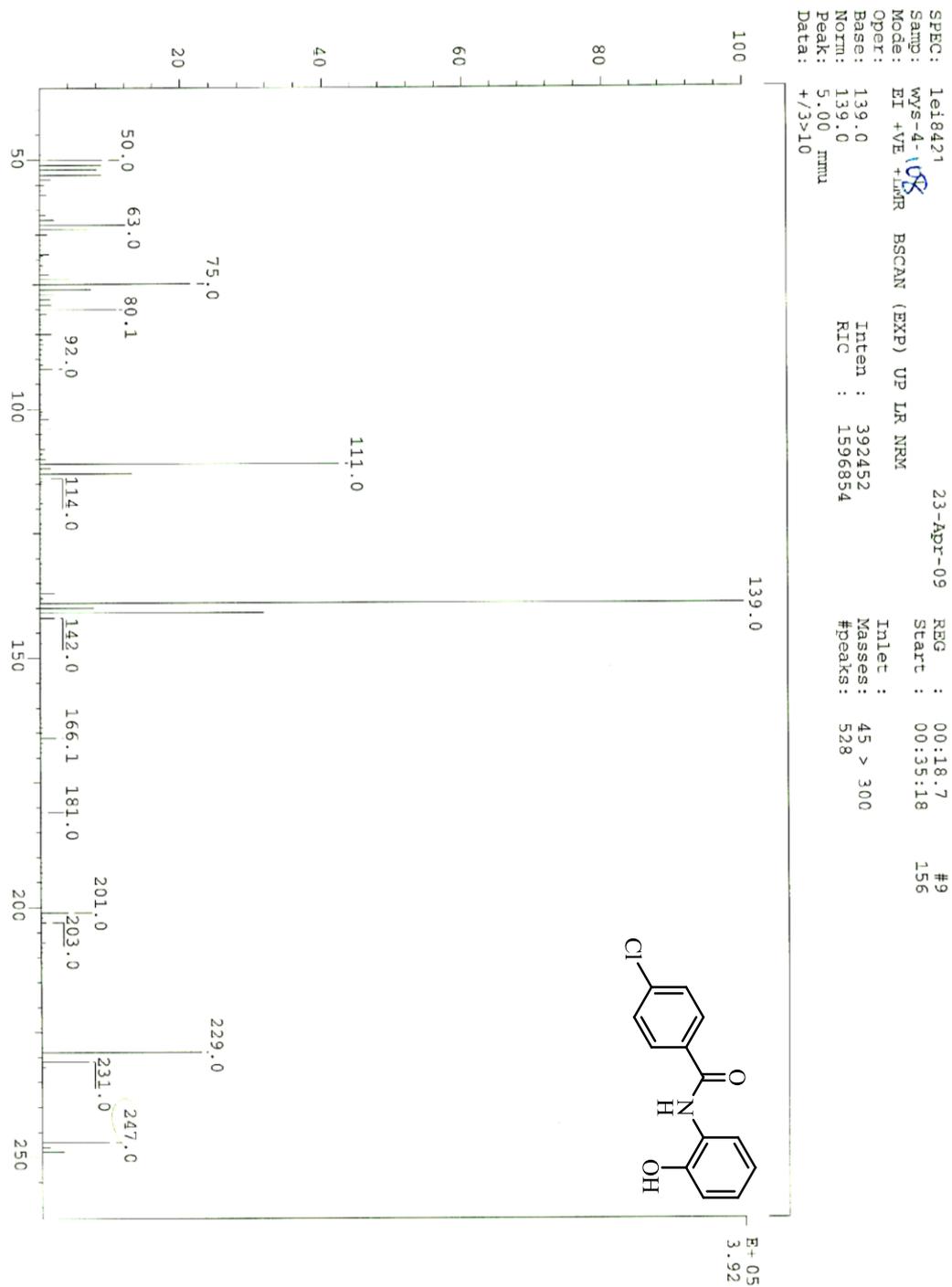




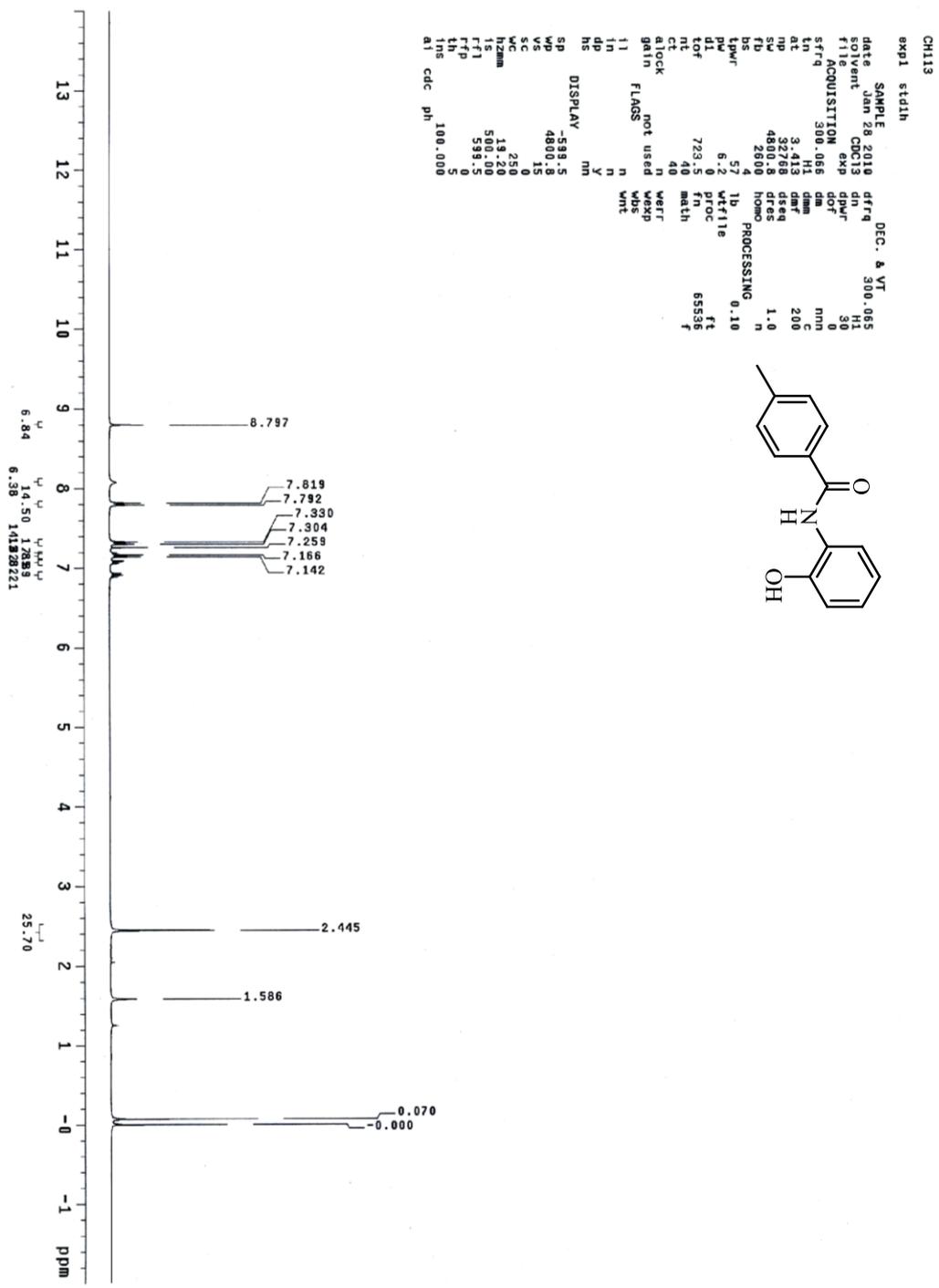
4-chloro-N-(2-hydroxyphenyl)benzamide ( WY4108 ) 碳譜圖



4-chloro-N-(2-hydroxyphenyl)benzamide ( WY4108 ) 質譜圖



N-(2-hydroxyphenyl)-4-methylbenzamide ( WY4113 ) 氣譜圖



```

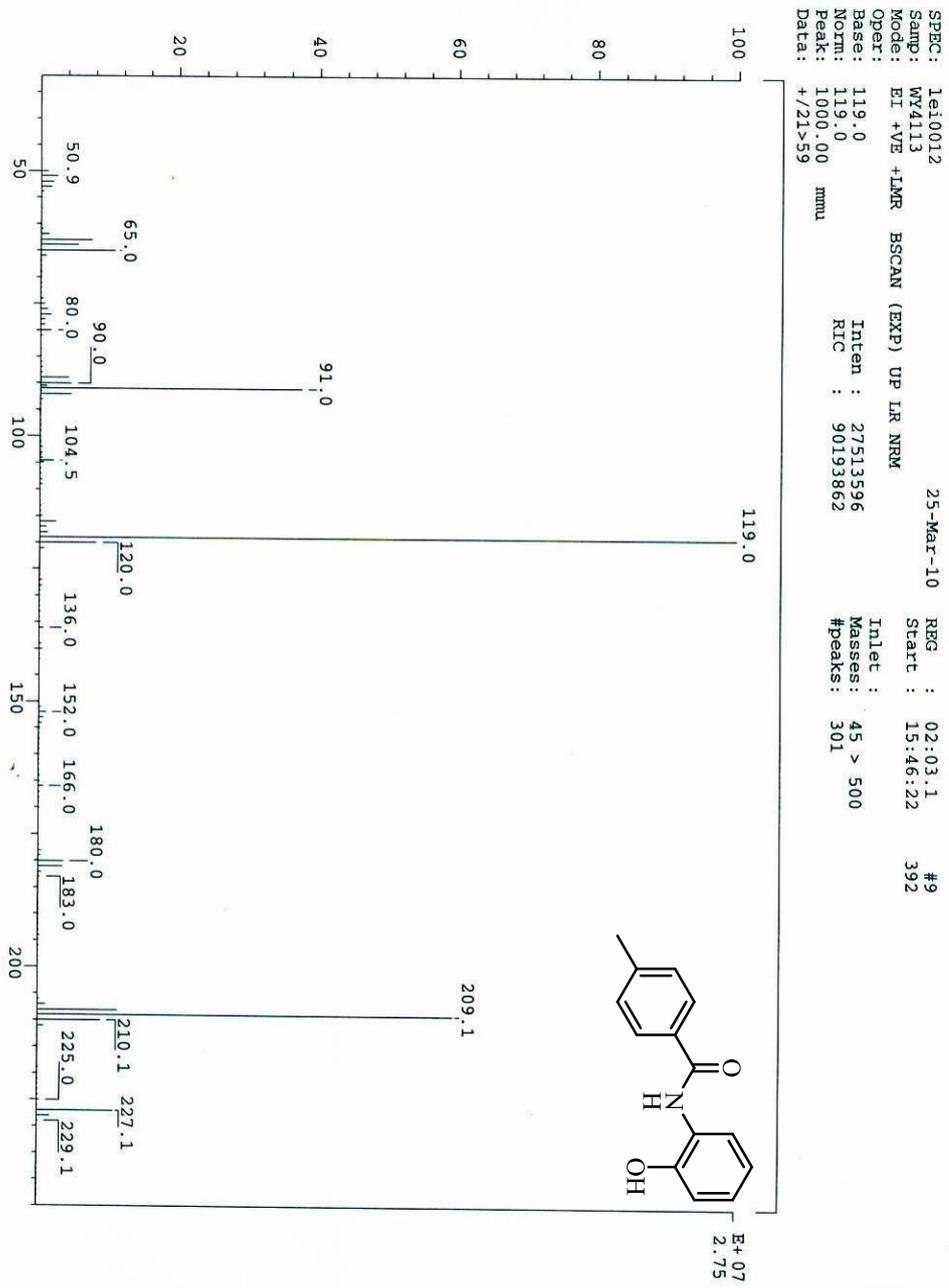
CH113
expt stidih

SAMPLE          Dec. & VT
date            Jan 28, 2010   dfrq      300.065
solvent         CDCl3         dn        H1
file            exp          dprf      30
ACQUISITION    exp          dof        0
sfrq           300.065      dm         nmh
in             3.41         dnm        200
md             32768        dres       1.0
sw             4800.8       homo       n
fb             2600
bs             57
lpwr          6.2
d1             6.6
d2             7.23
tof            723.5        fn         65536
nt             40          math       f
ct             40
alock          n
gain           n
not used      n
flags         n
in            n
in            n
in            n
dp            n
hs            y
hs            y
SR            DISPLAY -598.5
WP            4800.8
VS            15
SC            0
WC            250
HZMM          543.20
F1            593.5
F2            593.5
F3            593.5
F4            593.5
F5            593.5
F6            593.5
F7            593.5
F8            593.5
F9            593.5
F10           593.5
F11           593.5
F12           593.5
F13           593.5
F14           593.5
F15           593.5
F16           593.5
F17           593.5
F18           593.5
F19           593.5
F20           593.5
F21           593.5
F22           593.5
F23           593.5
F24           593.5
F25           593.5
F26           593.5
F27           593.5
F28           593.5
F29           593.5
F30           593.5
F31           593.5
F32           593.5
F33           593.5
F34           593.5
F35           593.5
F36           593.5
F37           593.5
F38           593.5
F39           593.5
F40           593.5
F41           593.5
F42           593.5
F43           593.5
F44           593.5
F45           593.5
F46           593.5
F47           593.5
F48           593.5
F49           593.5
F50           593.5
F51           593.5
F52           593.5
F53           593.5
F54           593.5
F55           593.5
F56           593.5
F57           593.5
F58           593.5
F59           593.5
F60           593.5
F61           593.5
F62           593.5
F63           593.5
F64           593.5
F65           593.5
F66           593.5
F67           593.5
F68           593.5
F69           593.5
F70           593.5
F71           593.5
F72           593.5
F73           593.5
F74           593.5
F75           593.5
F76           593.5
F77           593.5
F78           593.5
F79           593.5
F80           593.5
F81           593.5
F82           593.5
F83           593.5
F84           593.5
F85           593.5
F86           593.5
F87           593.5
F88           593.5
F89           593.5
F90           593.5
F91           593.5
F92           593.5
F93           593.5
F94           593.5
F95           593.5
F96           593.5
F97           593.5
F98           593.5
F99           593.5
F100          593.5
at            cdc     ph
  
```

N-(2-hydroxyphenyl)-4-methylbenzamide ( WY4113 ) 碳譜圖

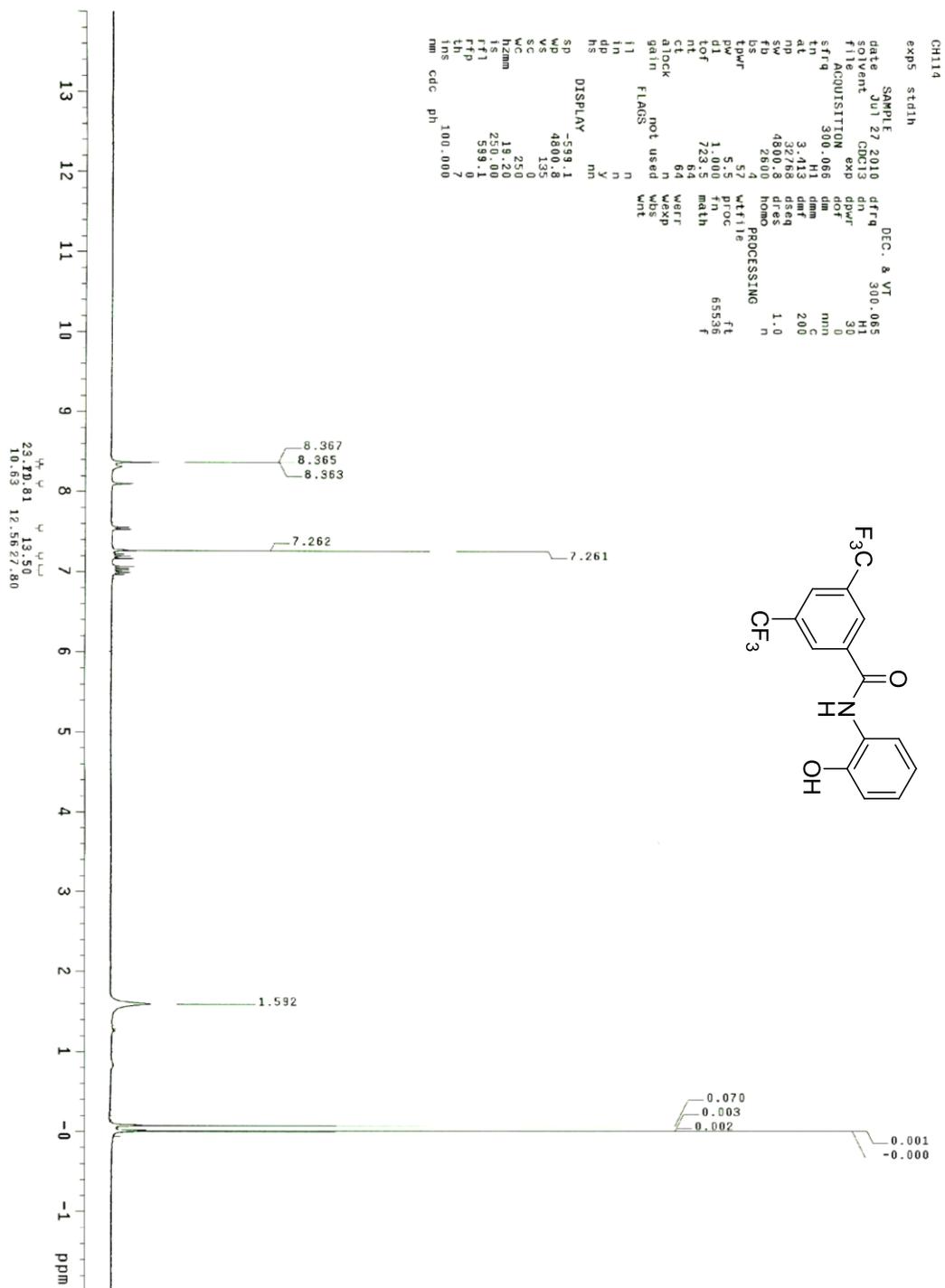


N-(2-hydroxyphenyl)-4-methylbenzamide ( WY4113 ) 質譜圖



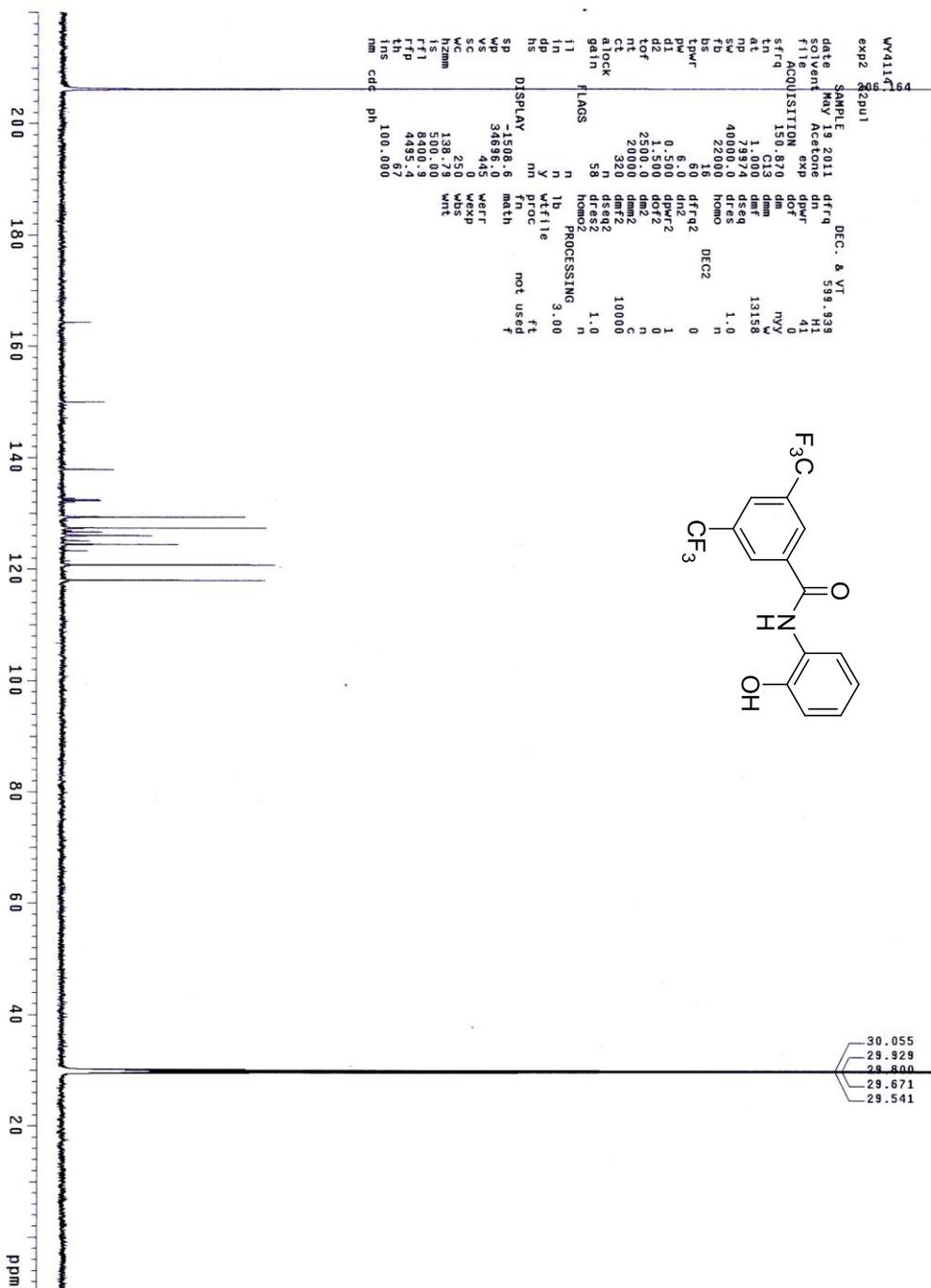
# 3,5-bis(trifluoromethyl)-*N*-(2-hydroxyphenyl)benzamide ( WY4114 )

氮譜圖



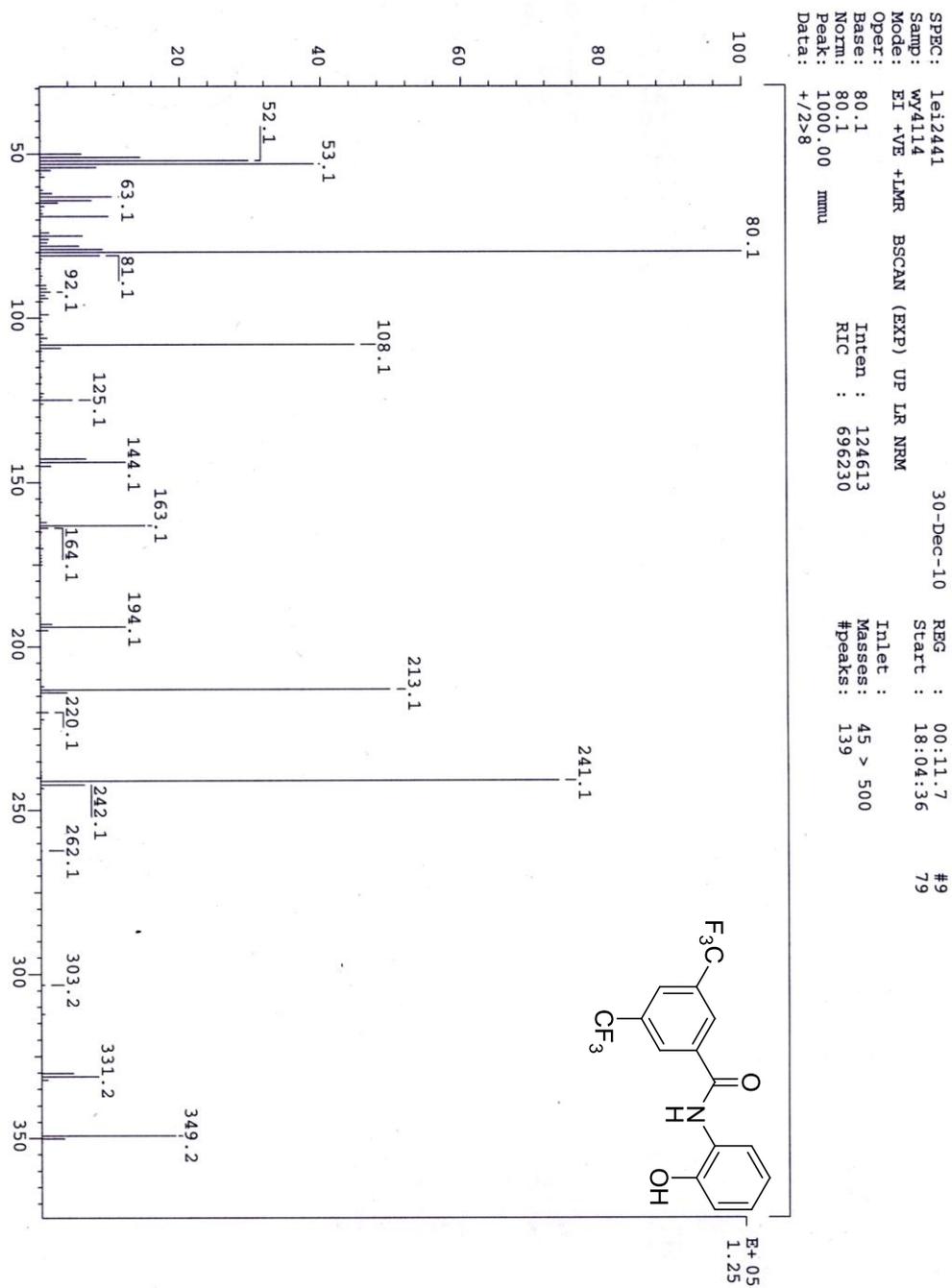
3,5-bis(trifluoromethyl)-N-(2-hydroxyphenyl)benzamide ( WY4114 ) 碳

譜圖

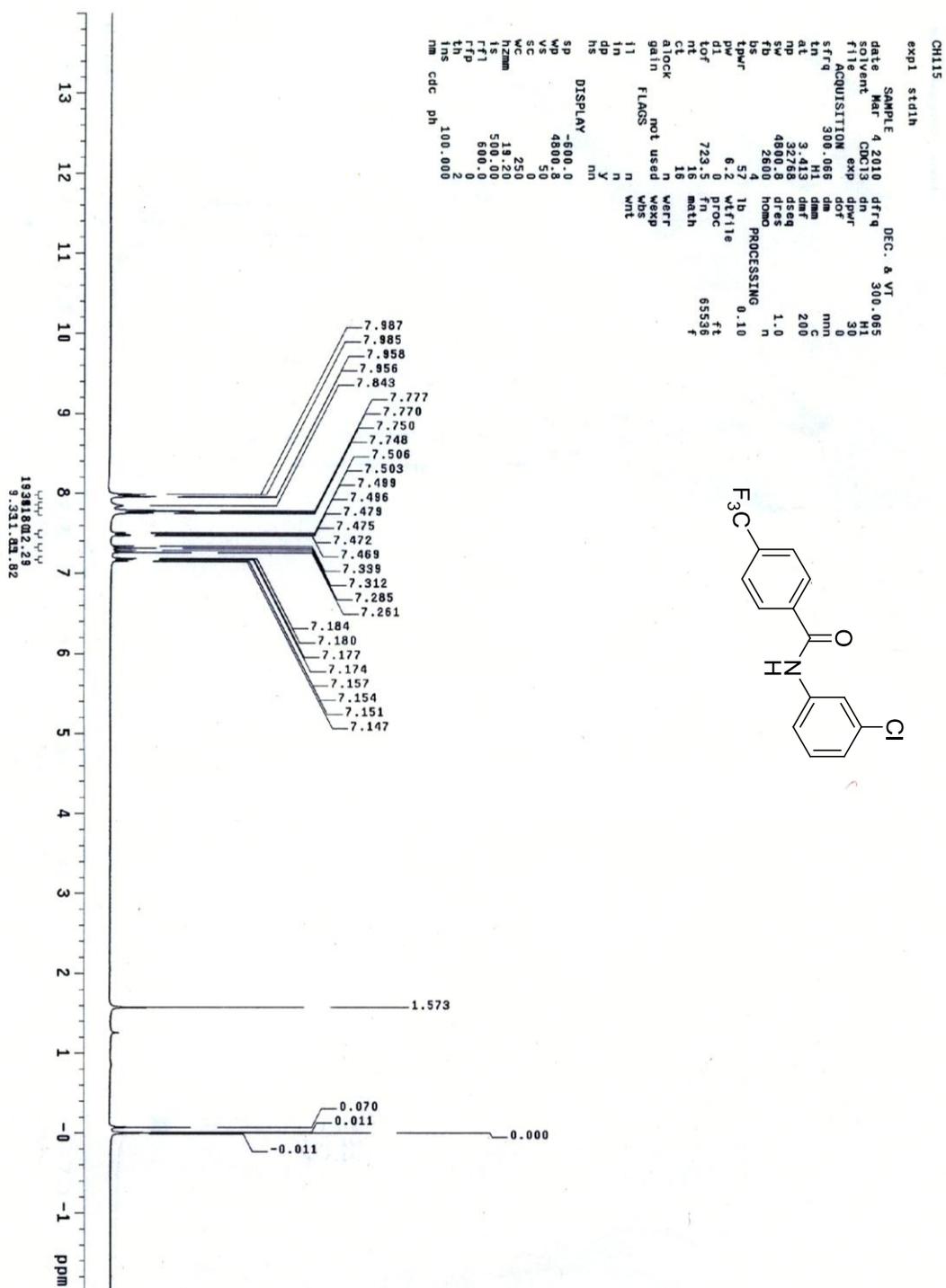


3,5-bis(trifluoromethyl)-*N*-(2-hydroxyphenyl)benzamide ( WY4114 ) 質

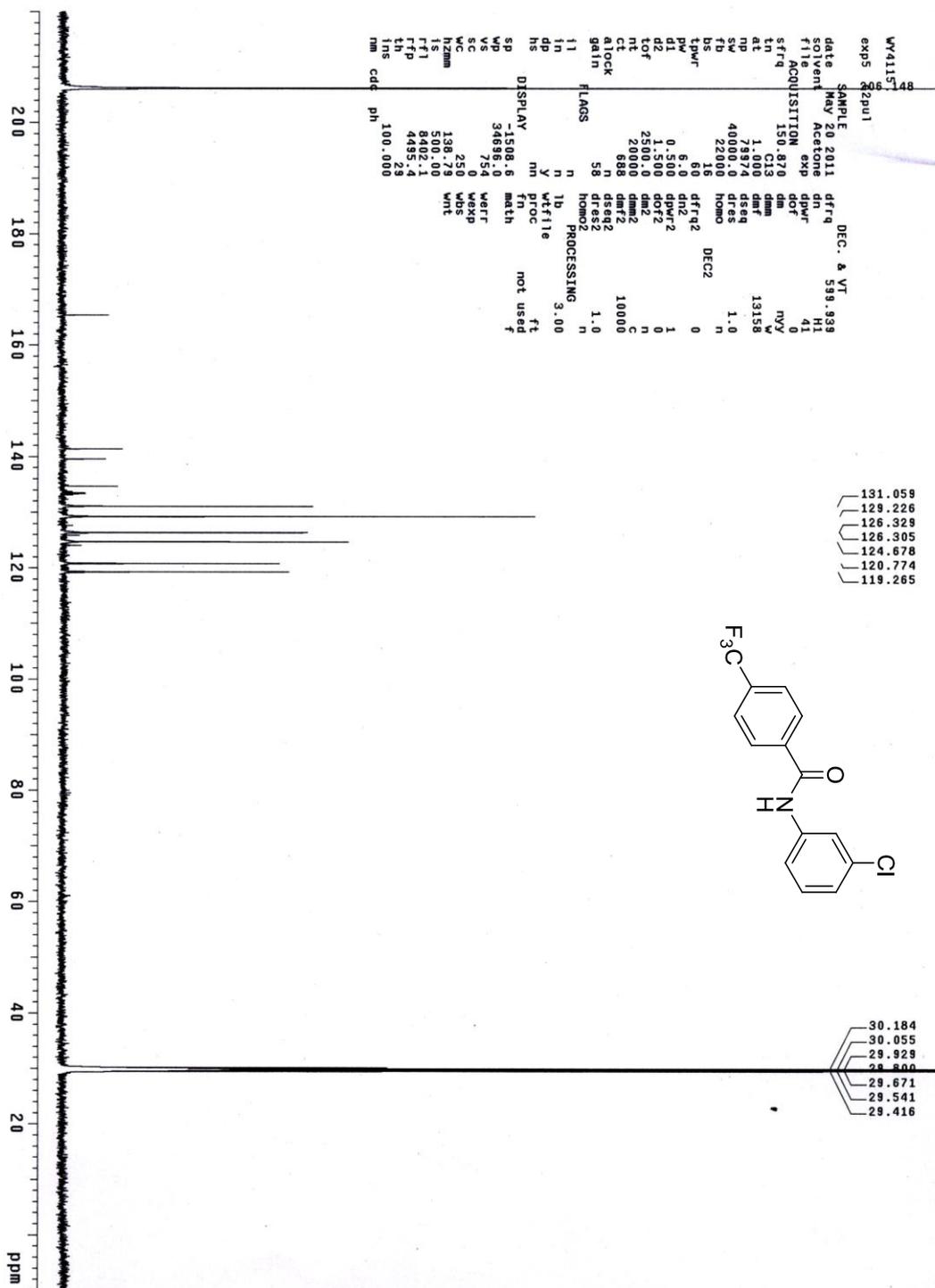
譜圖



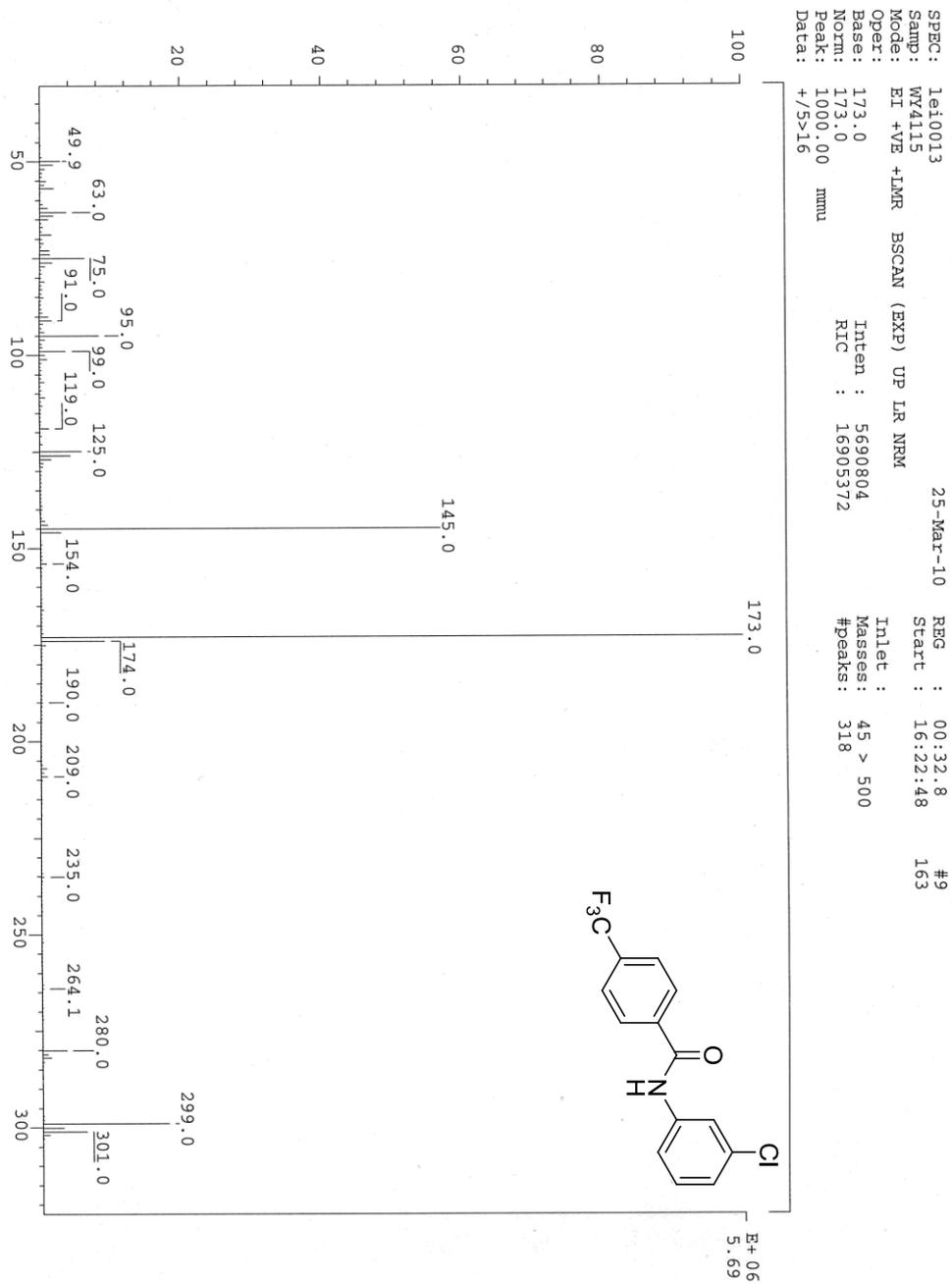
N-(3-chlorophenyl)-4-(trifluoromethyl)benzamide ( WY4115 ) 氣譜圖



N-(3-chlorophenyl)-4-(trifluoromethyl)benzamide ( WY4115 ) 碳谱图

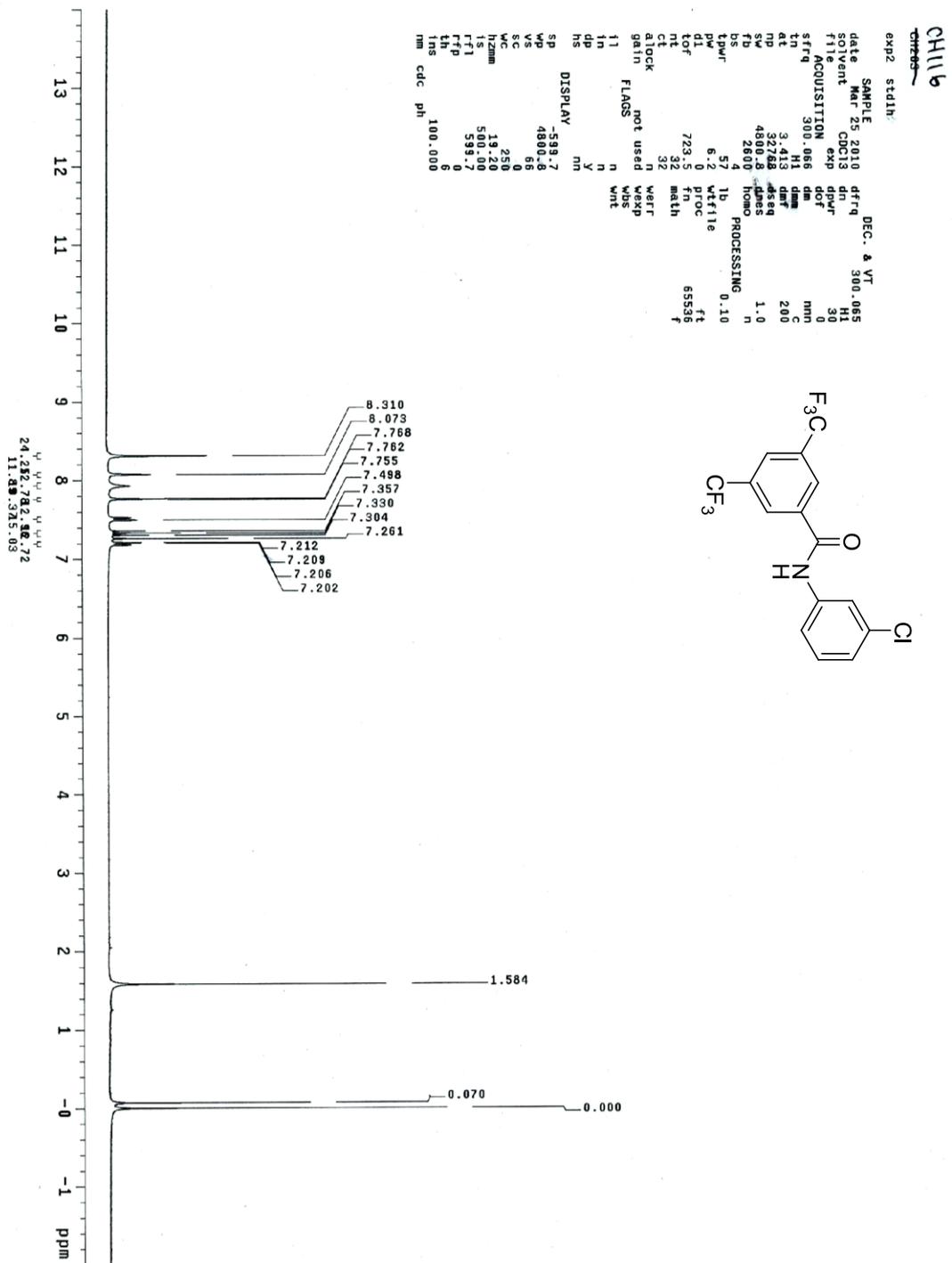


N-(3-chlorophenyl)-4-(trifluoromethyl)benzamide ( WY4115 ) 質譜圖



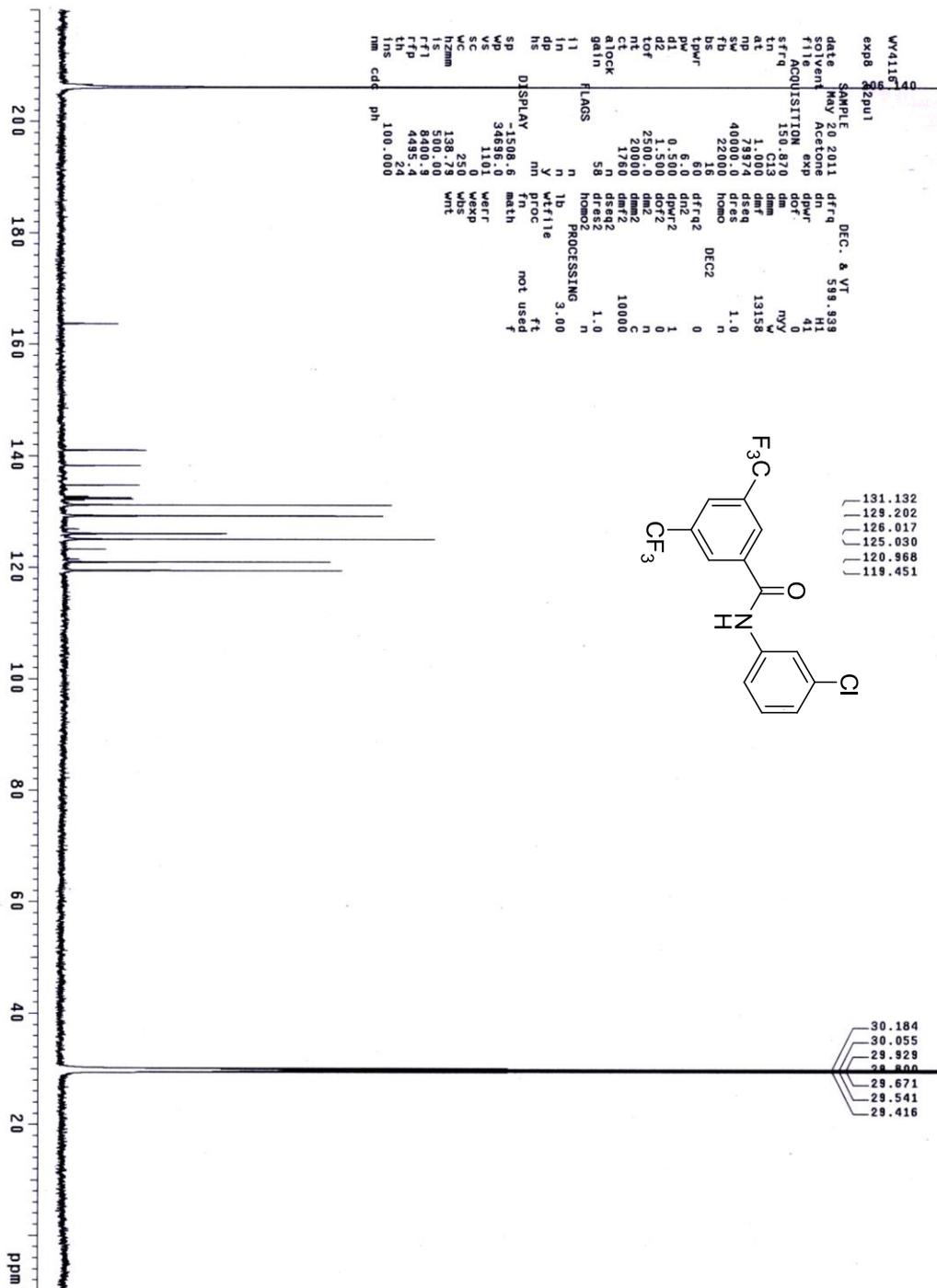
N-(3-chlorophenyl)-3,5-bis(trifluoromethyl)benzamide ( WY4116 )

氮譜圖



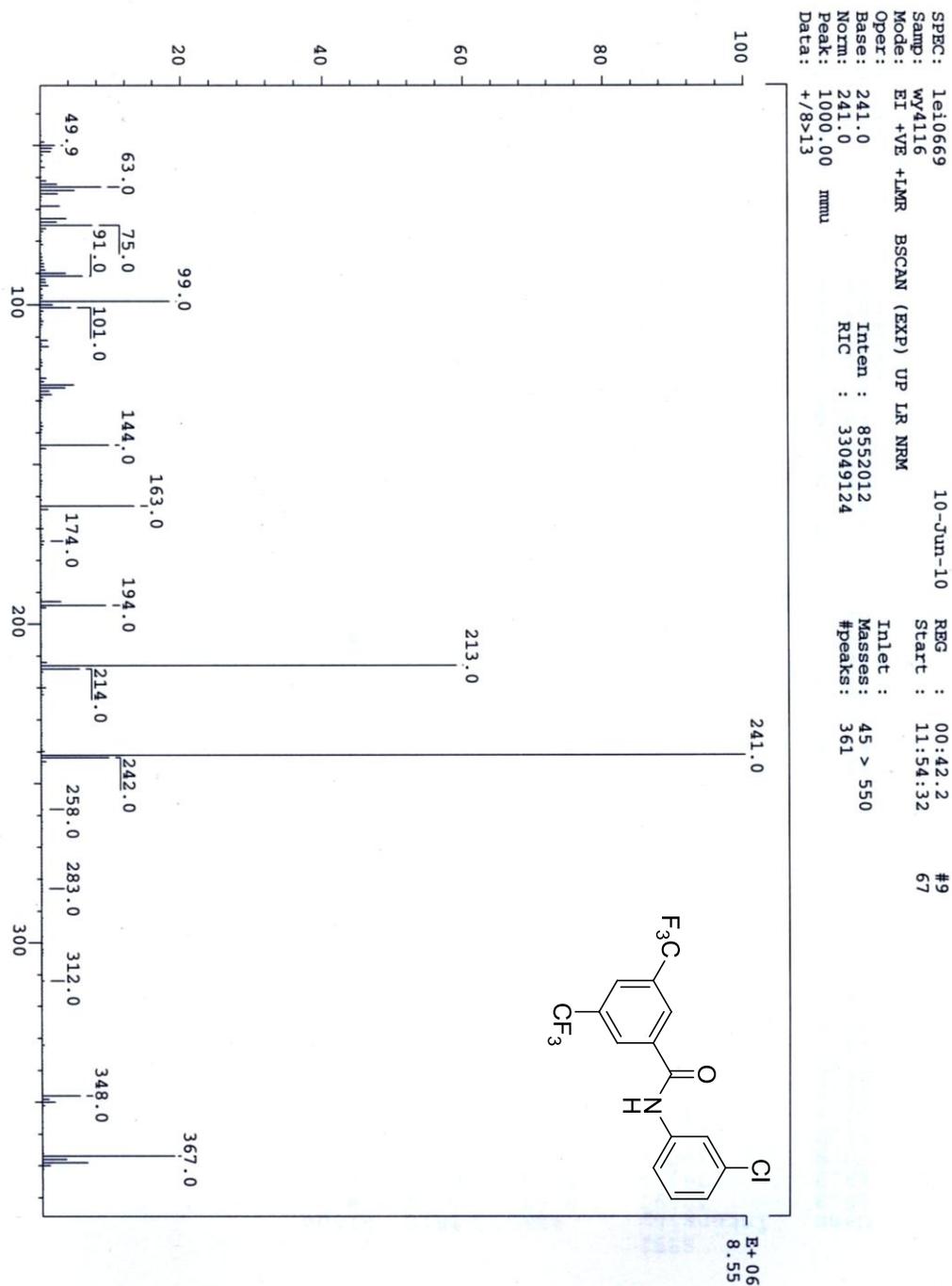
N-(3-chlorophenyl)-3,5-bis(trifluoromethyl)benzamide ( WY4116 )

碳譜圖



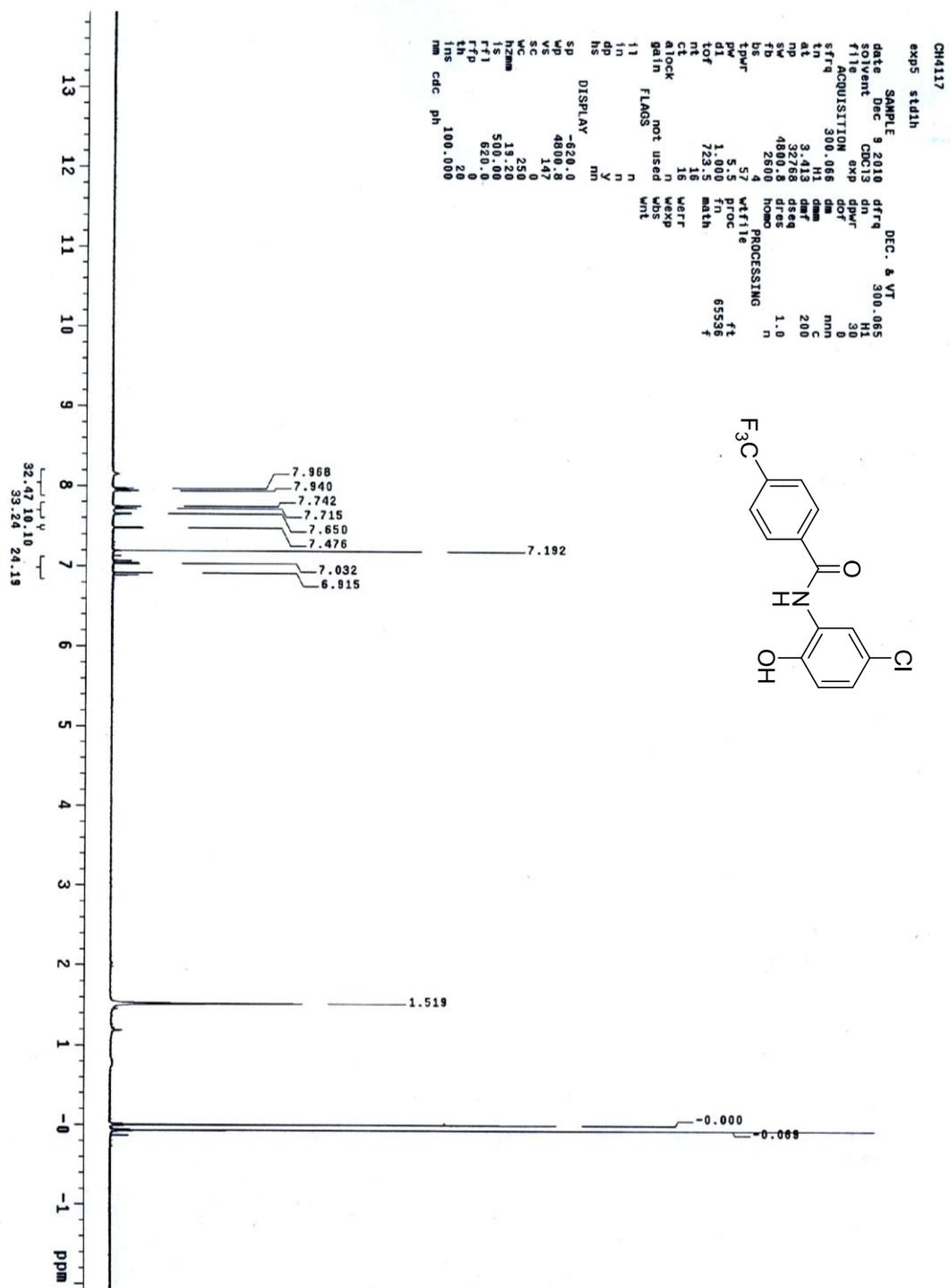
N-(3-chlorophenyl)-3,5-bis(trifluoromethyl)benzamide ( WY4116 )

質譜圖



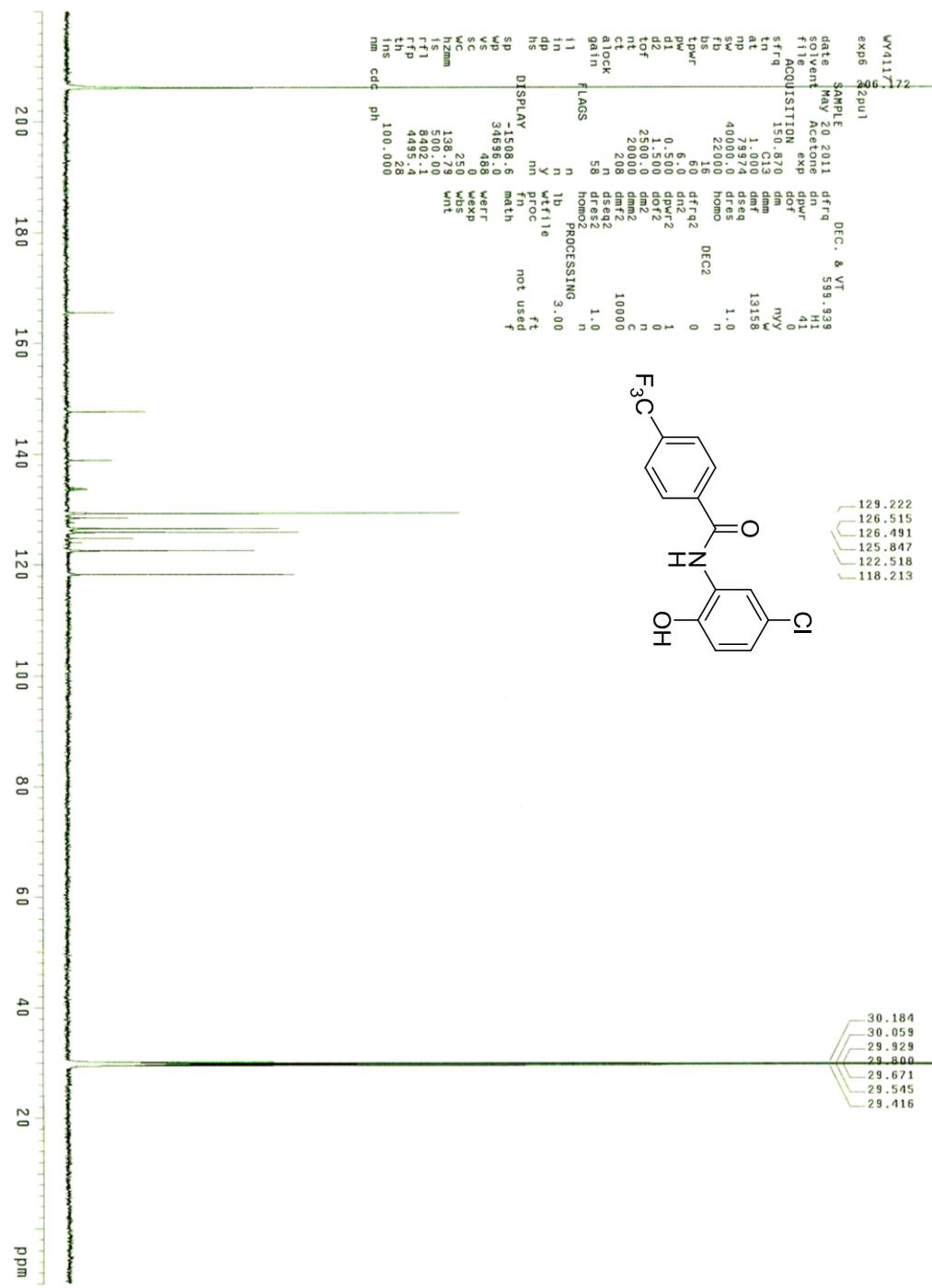
N-(5-chloro-2-hydroxyphenyl)-4-(trifluoromethyl)benzamide ( WY4117 )

氮譜圖



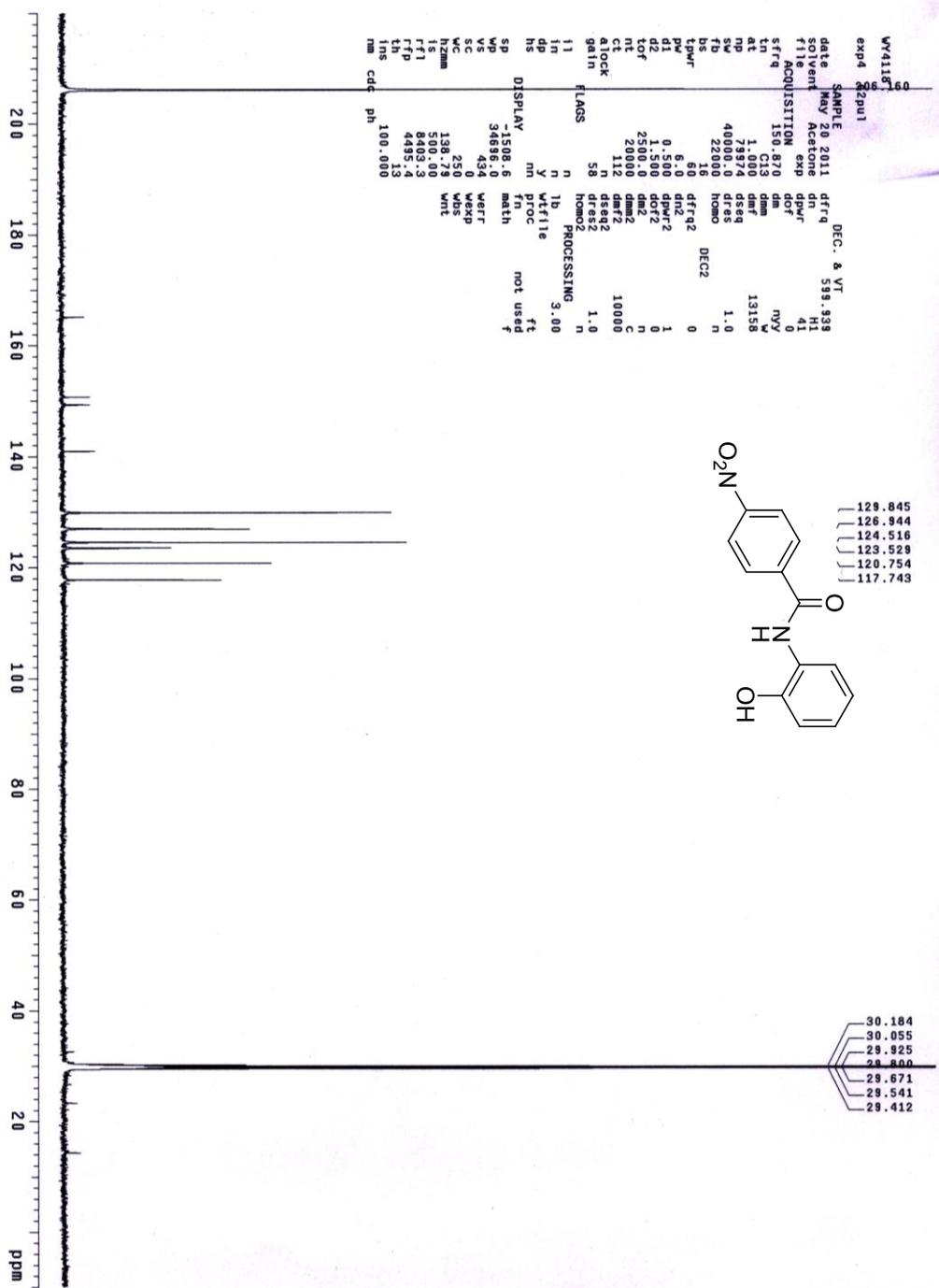
N-(5-chloro-2-hydroxyphenyl)-4-(trifluoromethyl)benzamide ( WY4117 )

碳譜圖

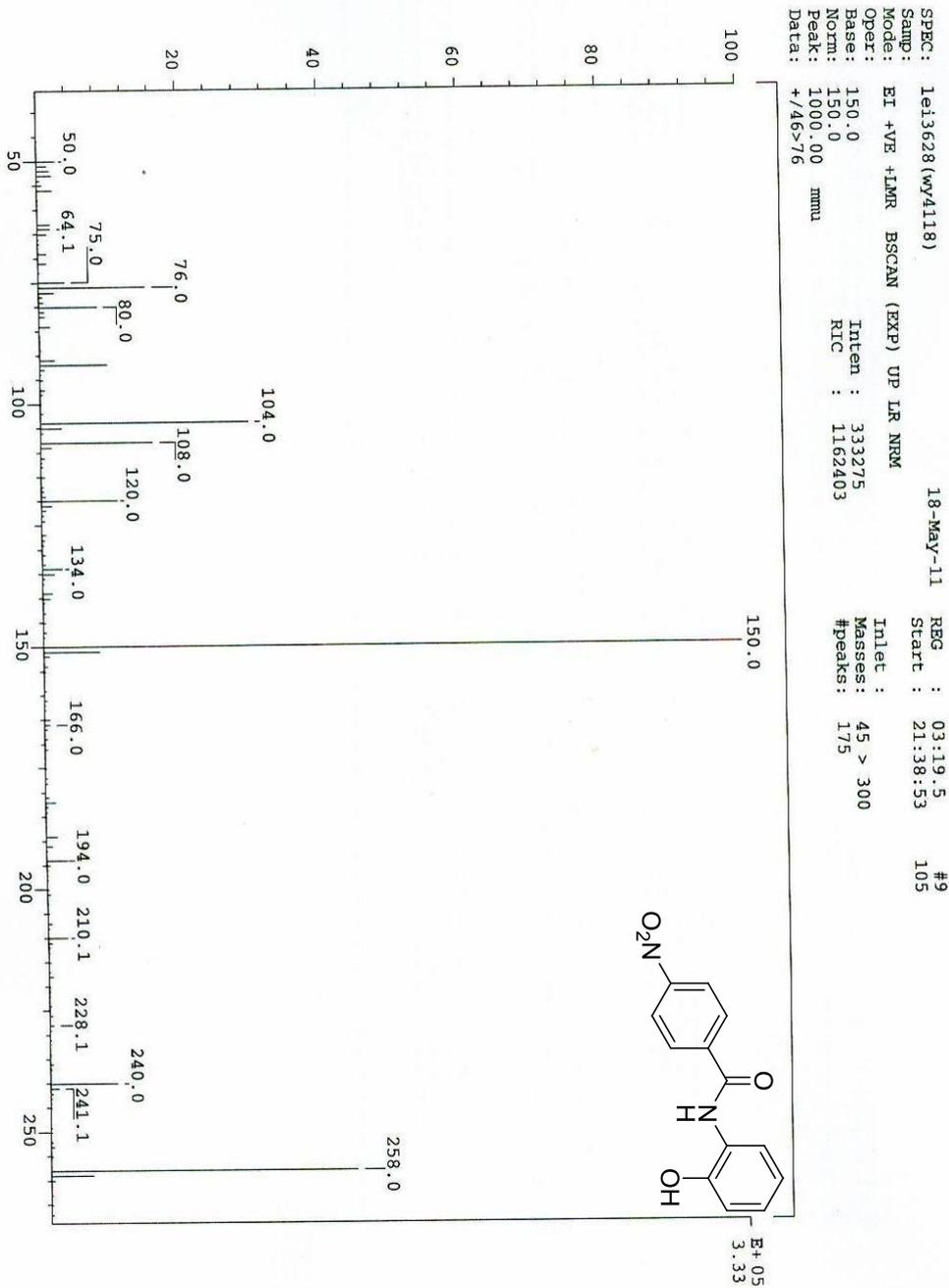




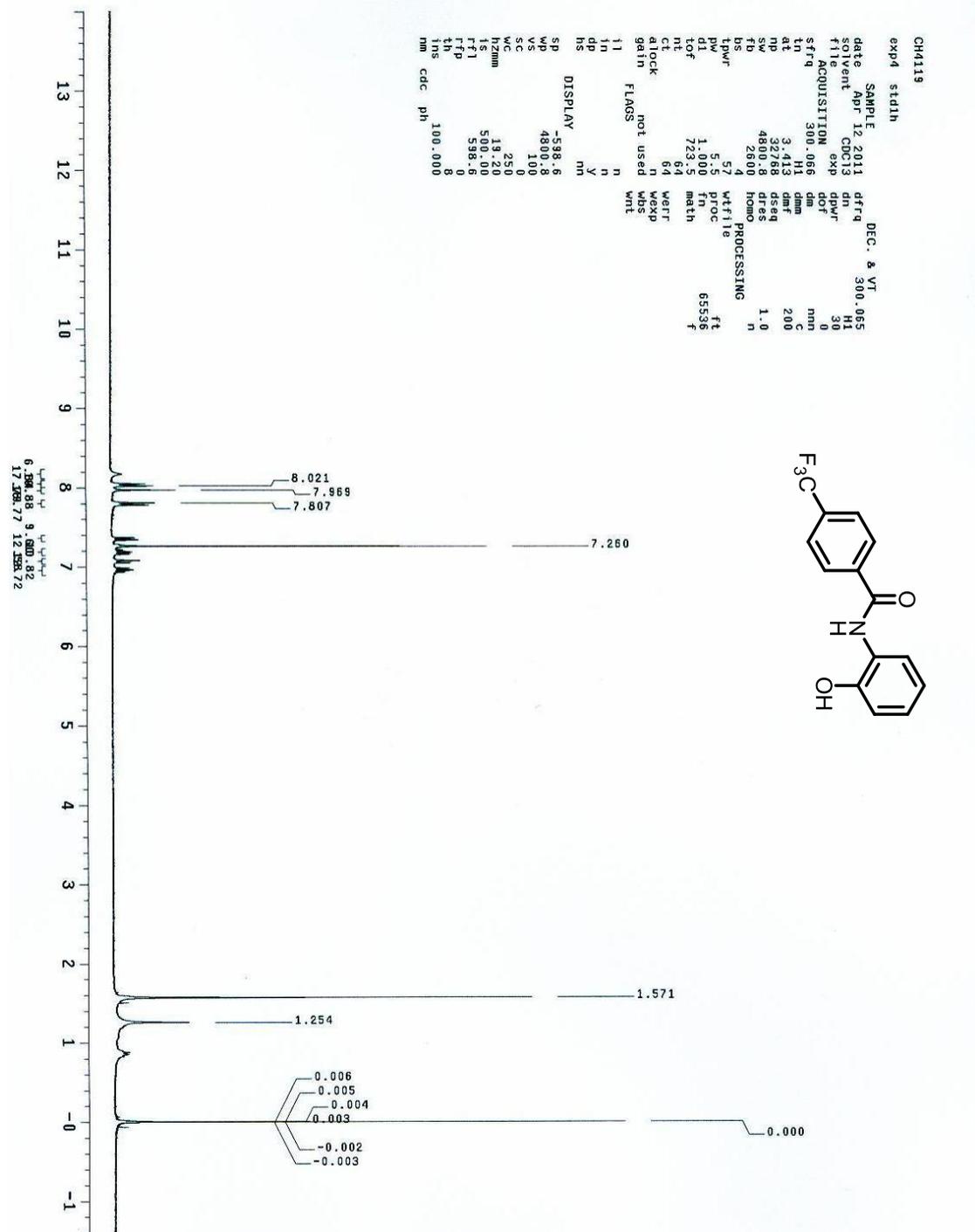
N-(2-Hydroxy-phenyl)-4-nitro-benzamide ( WY4118 ) 碳譜圖



N-(2-Hydroxy-phenyl)-4-nitro-benzamide ( WY4118 ) 質譜圖

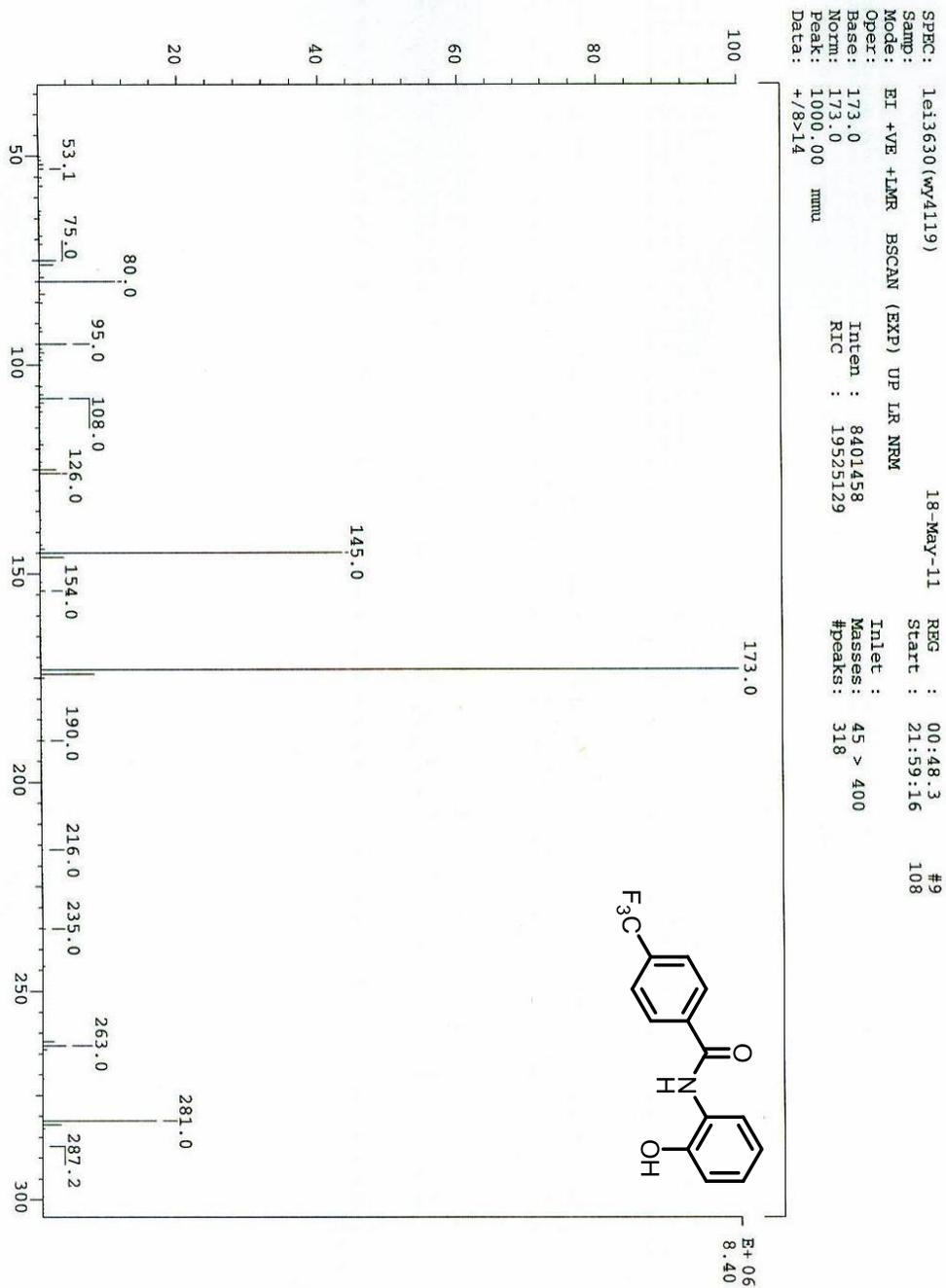


N-(2-Hydroxy-phenyl)-4-trifluoromethyl-benzamide ( WY4119 ) 圖譜

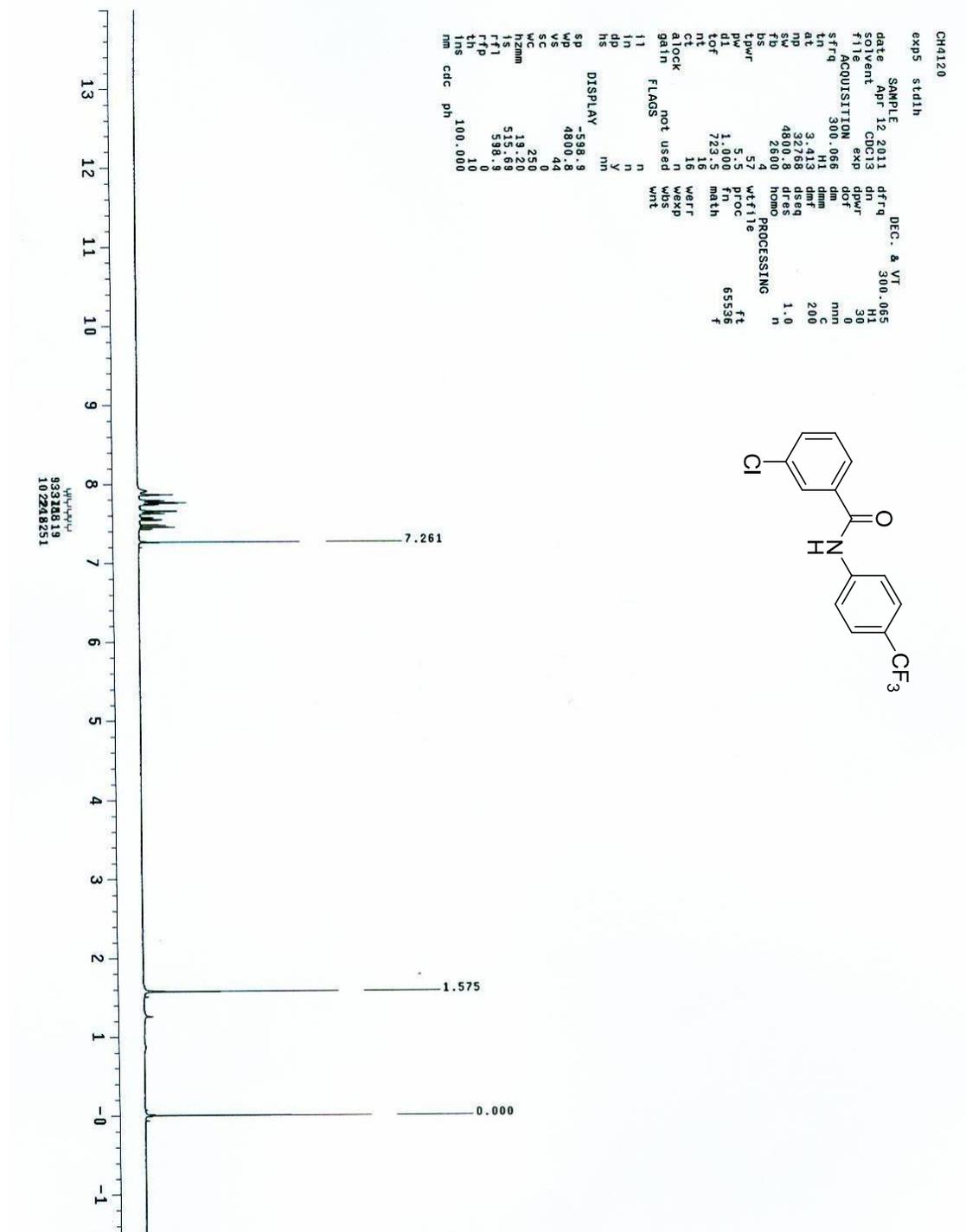




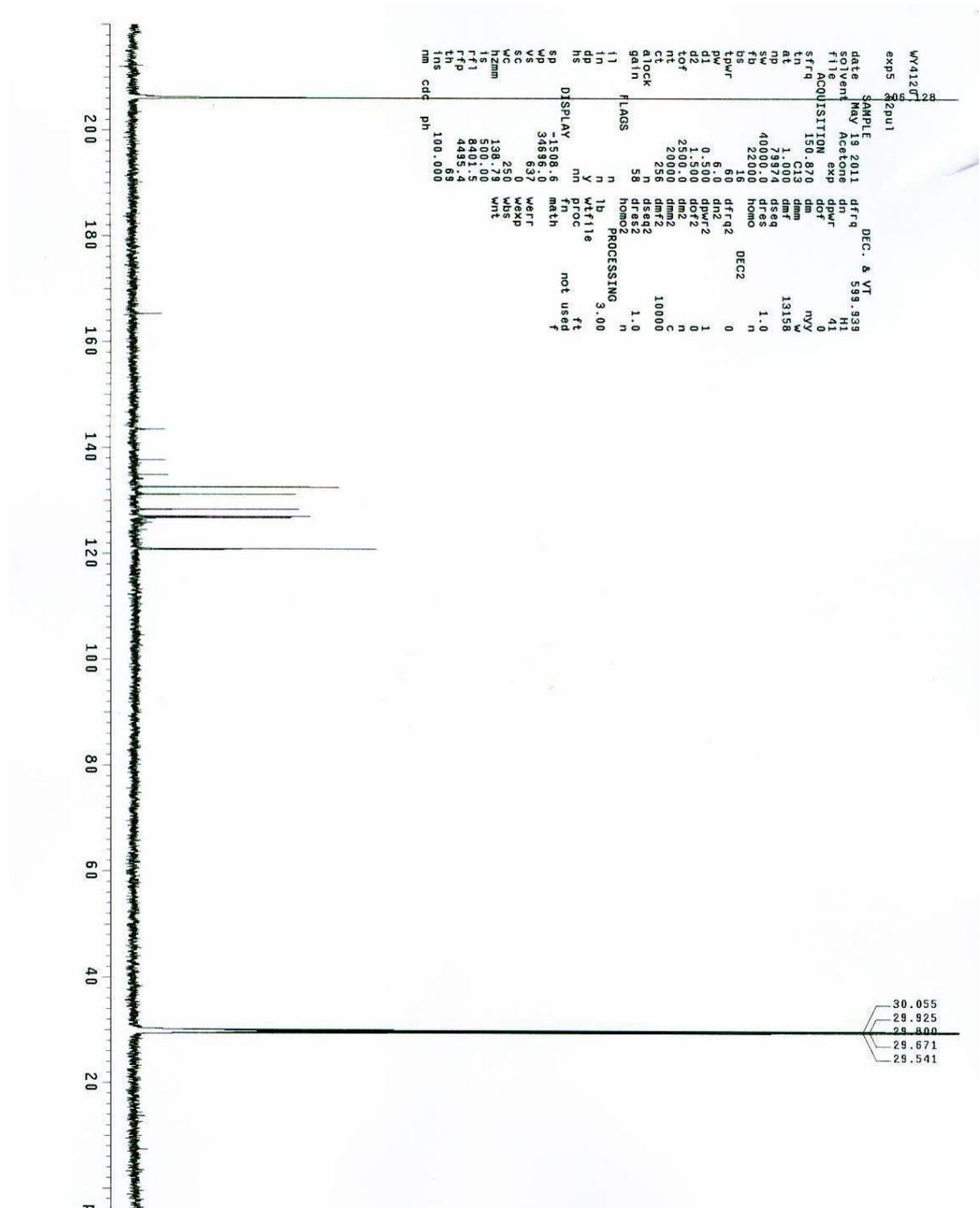
N-(2-Hydroxy-phenyl)-4-trifluoromethyl-benzamide ( WY4119 ) 質譜圖



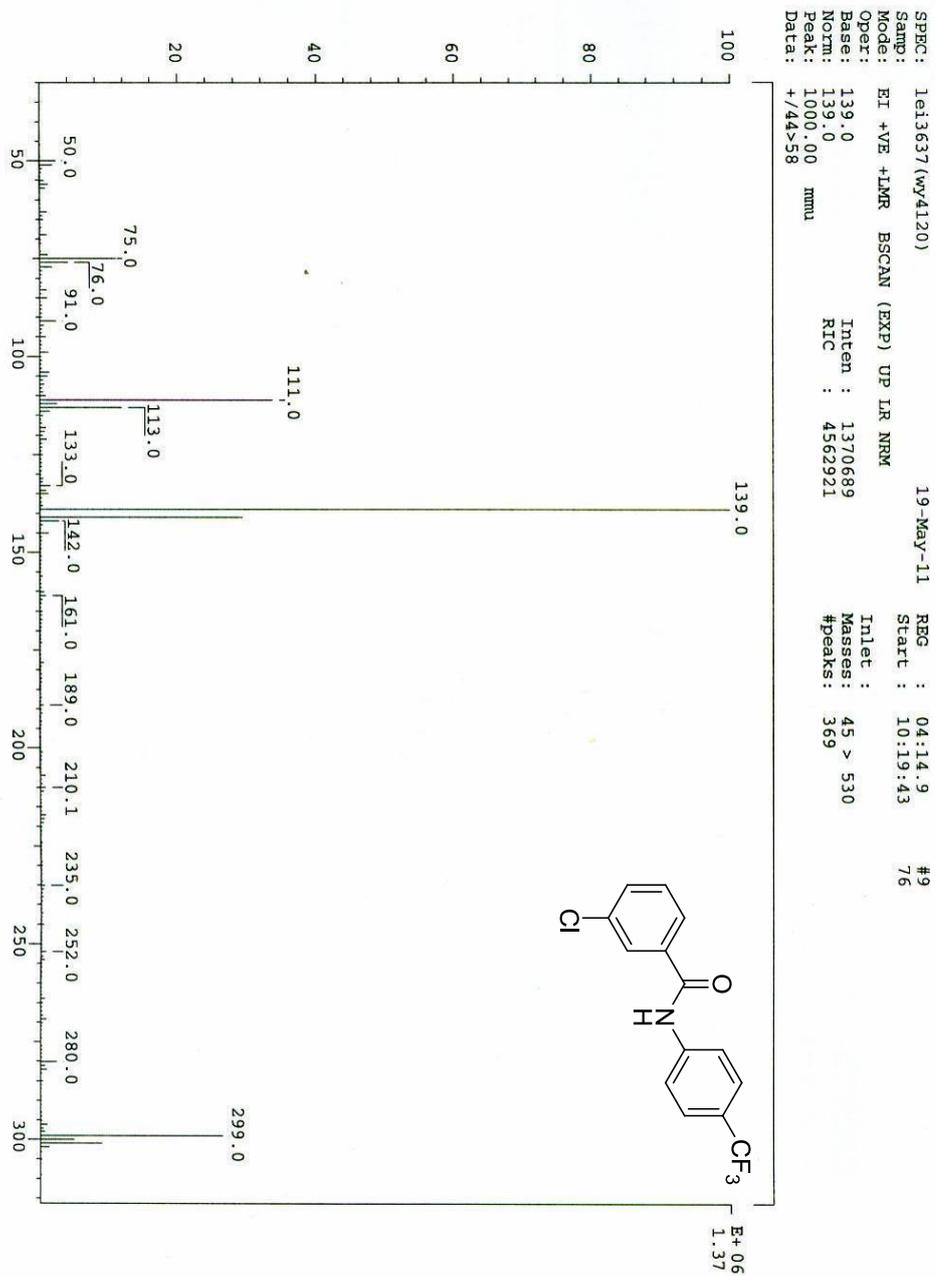
3-Chloro-N-(4-trifluoromethyl-phenyl)-benzamide ( WY4120 ) 氣譜圖



3-Chloro-N-(4-trifluoromethyl-phenyl)-benzamide ( WY4120 ) 碳譜圖



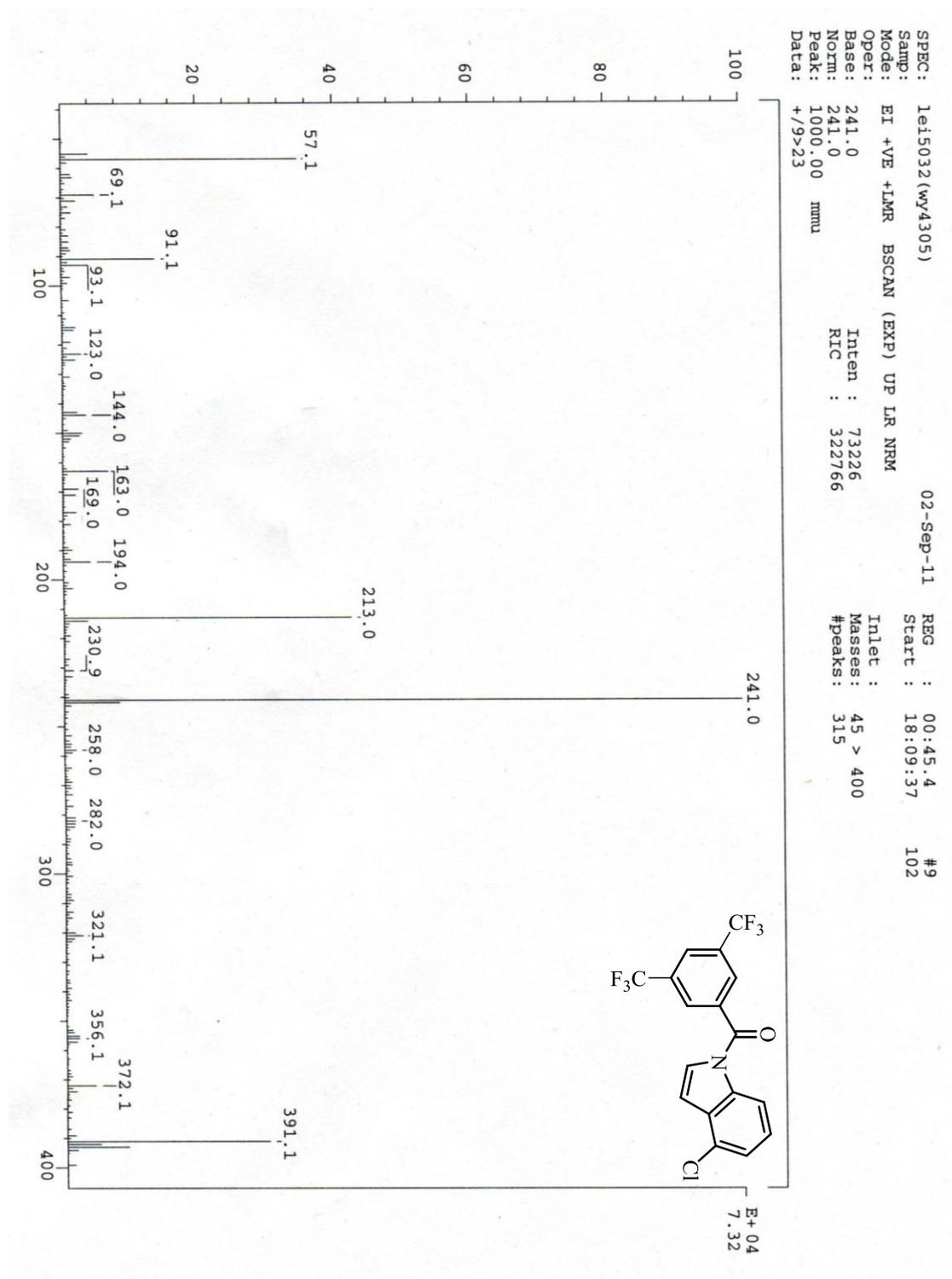
3-Chloro-N-(4-trifluoromethyl-phenyl)-benzamide ( WY4120 ) 質譜圖





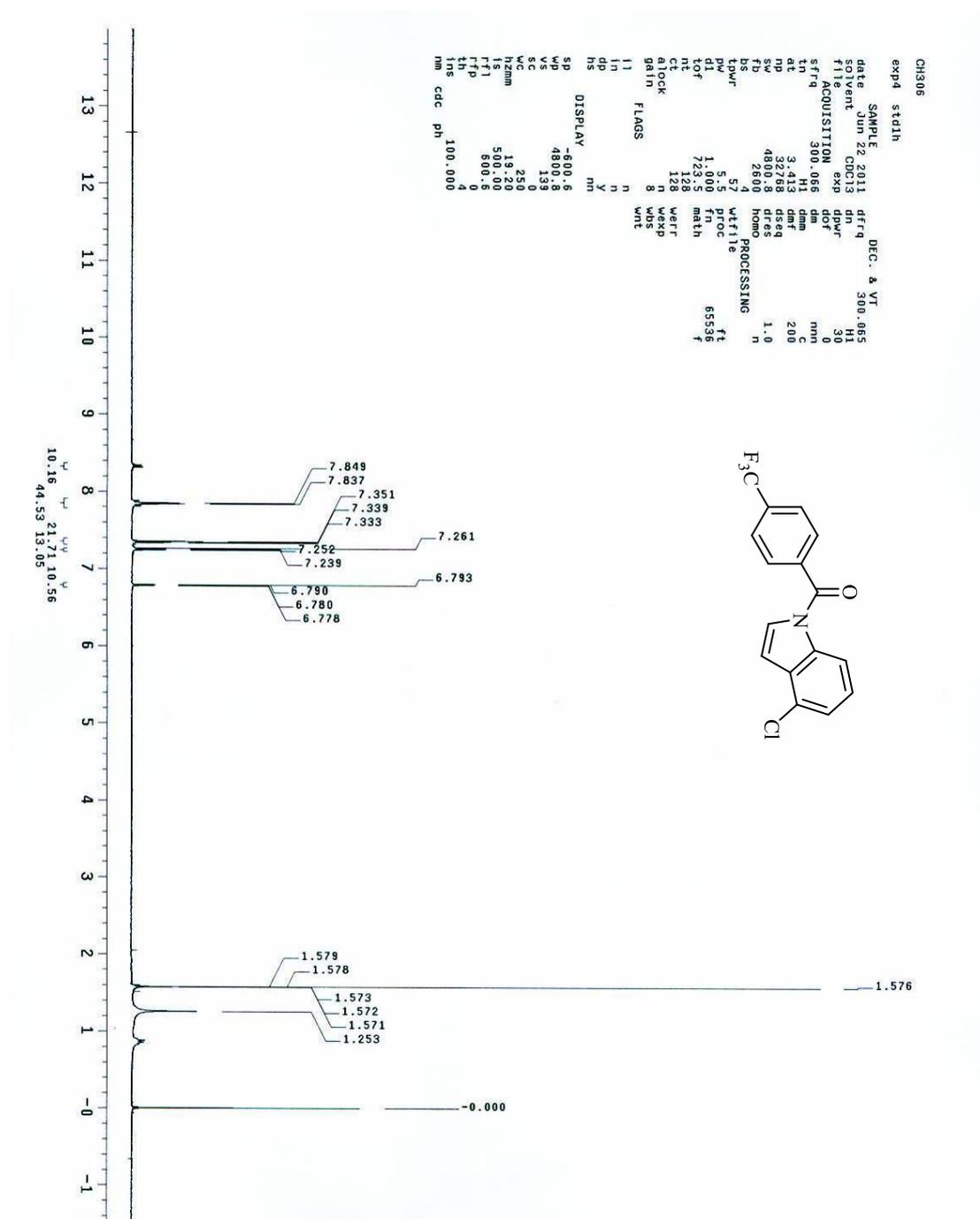
(3,5-Bis-trifluoromethyl-phenyl)-(4-chloro-indol-1-yl)-methanone

( WY4305 ) 質譜圖



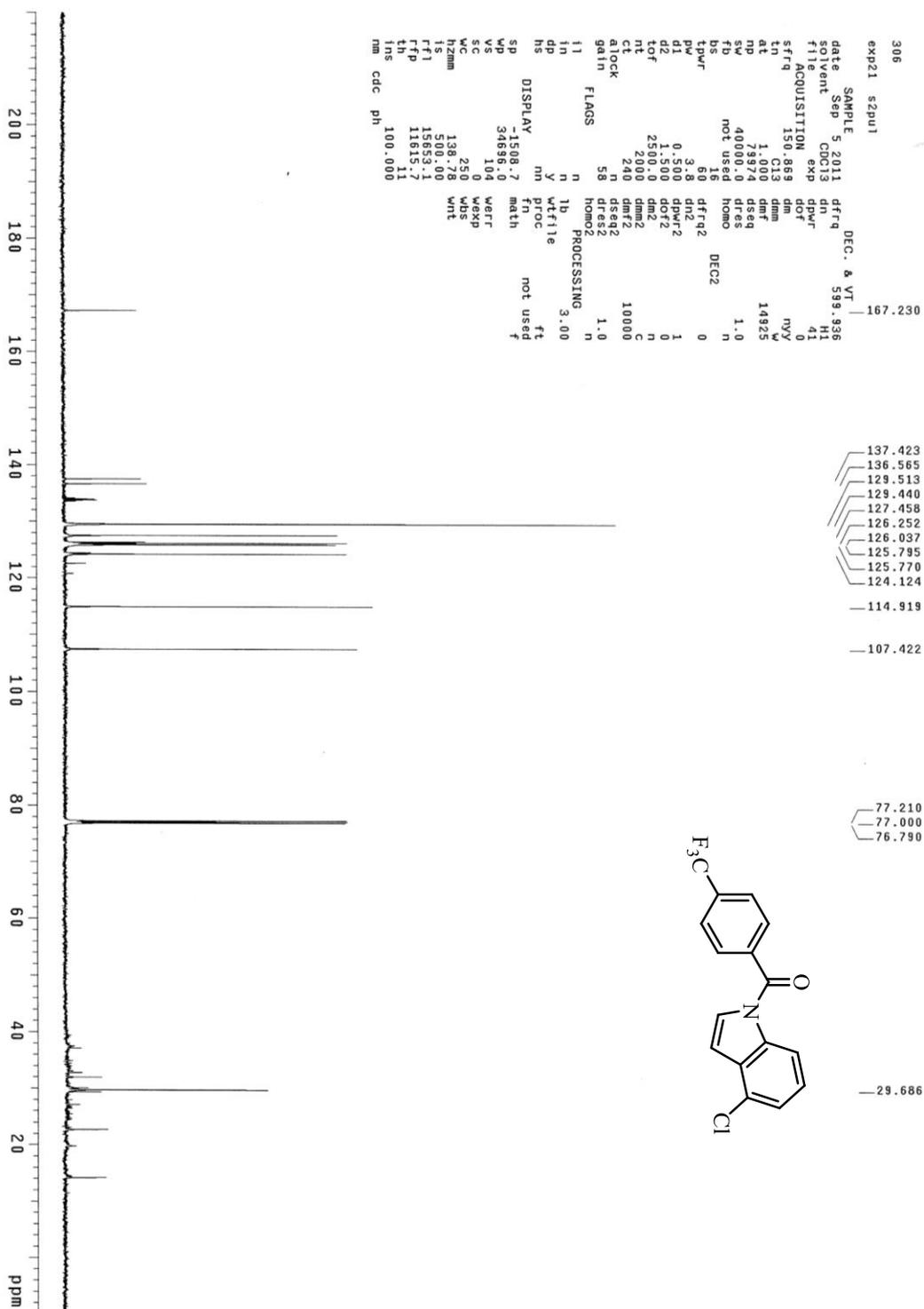
(4-Chloro-indol-1-yl)-(4-trifluoromethyl-phenyl)-methanone ( WY4306 )

氣譜圖



(4-Chloro-indol-1-yl)-(4-trifluoromethyl-phenyl)-methanone ( WY4306 )

碳譜圖



(4-Chloro-indol-1-yl)-(4-trifluoromethyl-phenyl)-methanone ( WY4306 )

質譜圖

