

東海大學應用化學研究所

碩士論文

Src 蛋白抑制劑：AC93253 衍生物活性評估及吲哚衍生物

合成

Src Protein Inhibitors : Biological Evaluation of AC93253

Derivatives and the Synthesis of Indole Analogs

The seal of Tungshai University is a circular emblem with a scalloped border. It features a central cross, a horizontal line, and a smaller cross above it. The text 'TUNGSHAI UNIVERSITY' is written in a circular path around the inner edge of the seal.

指導教授：吳雨珊 博士

研究生：林長慶 撰

中華民國一百零六年十月

東海大學碩士班研究生

論文指導教授推薦書

化學系 碩士班 林長慶 君所提之論文

Src 蛋白抑制劑:AC93253 衍生物活性評估
及吲哚衍生物合成

Src Protein Inhibitors: Biological Evaluation of
AC93253 Derivatives and
the Synthesis of Indole Analogs

係由本人指導撰述，同意提付審查。

指導教授  (簽章)

106 年 10 月 27 日

東 海 大 學 碩 士 班 研 究 生

論 文 口 試 委 員 審 定 書

化學系 碩士班 林長慶 君所提之論文

Src 蛋白抑制劑:AC93253 衍生物活性評估
及吲哚衍生物合成

Src Protein Inhibitors: Biological Evaluation of
AC93253 Derivatives and
the Synthesis of Indole Analogs

論文口試委員會 召集人 楊定五 (簽章)

委 員

陳偉尉

中 華 民 國 106 年 10 月 27 日

總目錄

謝誌	I
中文摘要	II
英文摘要	III
內文目錄	IV
圖目錄	VI
表目錄	IX
光譜目錄	X

謝誌

碩士論文的完成代表了我在東海大學化學系的求學生涯將告一段落。

首先我要感謝我的指導教授吳雨珊老師。大四那年即將畢業的我課業成績不盡理想，但老師願意讓我進入實驗室學習，讓我延續求學生涯至今順利的完成碩士學業。老師當初對我說：態度才是決定你實驗好壞的關鍵，這句話我一直謹記在心。老師給我的幫助不僅僅是課業與實驗上的指導，還有人生價值觀和生活中的點點滴滴分享，謝謝老師給了我人生不一樣的思考方向。這些年來從老師身上學到許多事情，謝謝老師。

感謝中興大學生物醫學研究所的陳健尉老師和賴怡樺學姊，願意教導化學系的我並提供實驗環境給我，讓我學習到許多生命科學相關的知識，並順利完成這本論文。

此外，我要感謝實驗室中的學長姐們，在我剛進入實驗室時，教導我關於實驗上的知識及技巧和實驗室一切相關的業務，讓我學到許多不一樣的經驗。也感謝實驗室的學弟妹和其他實驗室的同窗同學，謝謝你們的生活上的陪伴和實驗上的幫助，有你們我才能順利完成這本論文。

最後，我要感謝我的父母及家人，因為你們無條件地支持與幫助，才能使我順利的完成學業，願以此成果及喜悅與你們分享。

中文摘要:

肺癌是所有癌症中死亡率最高的。Src 蛋白是一個酪胺酸激酶，在肺癌細胞中 Src 蛋白較一般細胞活躍，會導致癌細胞的增生、移動和血管新生，因此 Src 可以作為肺癌治療的標靶。先前研究中利用電腦模擬輔助藥物設計程式(CADD)和生物活性實驗的方式，得到對 Src 蛋白具有抑制性的兩種化合物 AC93253 及 WY1339。

本研究首先利用西方墨點法和細胞存活分析來探討一系列 AC93253 衍生物，其中衍生物 A10 有最佳的 Src 抑制能力和肺癌細胞毒殺效果。另外在低濃度下，A10 對肺癌細胞的細胞功能皆有顯著的抑制能力，包括癌細胞的增生、移動、轉移、及細胞群落形成的能力。

本研究也以 WY1339 為先導化合物，設計合成出一系列以吡啶為主體，不同長度、不同取代基的衍生物。根據生物活性的結果，WY1339 結構中吡啶 6 號位置的取代基消失會降低抑制肺癌細胞的效果。將吡啶上 6 號位置的苯環取代基更改為苄基時會降低對肺癌細胞株 A549 的抑制能力。而所有衍生物中，L43 對 A549 具有較佳的毒殺效果(IC₅₀ 為 39.91 μ M)。

Abstract:

Lung cancer is the leading cause of cancer death. In lung cancer cells, Src protein is more active than in normal cells as it induces cell proliferation, migration and angiogenesis. It is thus a good target for the development of lung cancer treatment. In previous research, we have identified two compounds, AC93253 and WY1339 by CADD as Src inhibitors and their inhibitory activities were verified by *in vitro* studies.

In this study, western blot and cell survival analysis were performed to a series of AC93253 derivatives. Derivative A10 was found to exhibit most Src inhibitory activity and cytotoxicity against lung cancer cells. At low concentrations, A10 significantly inhibited lung cancer cell functions such as proliferation, migration, invasion, and colony formation.

We have taken WY1339 as lead compound and further designed a series of substituted indole derivative. MTT assay revealed that when there was no substituents or replacement of phenyl by benzyl group at 6th position of indole, the cytotoxicity against lung cancer cells decreased drastically. Within all the derivative synthesized, L43 exhibited better activity against A549 lung cancer cell line with IC_{50} of 39.91 μ M.

內文目錄

第一章、緒論.....	1
第一節、肺癌.....	1
第二節、Src 蛋白.....	3
第三節、Src 蛋白與肺癌.....	7
第四節、Src 蛋白的結構.....	10
第五節、先導化合物的發現.....	12
第二章、篩選並評估 AC93253 衍生物對肺癌抑制能力.....	15
第一節、實驗目的和實驗架構.....	17
第二節、實驗材料與方法.....	19
第三節、實驗結果.....	30
第四節、討論.....	30
第三章、吡啶衍生物合成與構效關係.....	47
第一節、實驗材料與方法.....	49
第二節、結果與討論.....	71
第一項、有機合成.....	71
第二項、生物活性與構效關係探討.....	83
第四章、結論.....	96

第五章、未來展望	98
第六章、文獻資料	99

圖目錄

圖一:細胞週期	5
圖二:Src 與細胞存活、增生、遷移、侵襲和血管新生之間的訊息傳遞途徑.....	6
圖三:EGFR、Src 訊息傳遞途徑圖.....	9
圖四:Src 活化態和非活化態的結構.....	11
圖五:化合物 AC93253 對 Src 蛋白西方墨點法實驗數據	15
圖六:AC93253 衍生物.....	16
圖七:實驗目的和實驗方法	17
圖八:西方墨點法探討不同衍生物對肺癌細胞株中 Src、p-Src、EGFR、p-EGFR 的蛋白質表現量的影響.....	30
圖九: A10、A30、A80 和 A90 對 PC9IR 細胞株存活率及 IC ₅₀ 的差異.....	32
圖十: A10、A30 對 BEAS2B 細胞株存活率及 IC ₅₀ 的差異	33
圖十一:西方墨點法探討 A10 在不同濃度下對 PC9IR 細胞株中 Src 和其相關途徑中蛋白質表現量的影響	35
圖十二:不同濃度的 A10 抑制 PC9IR 細胞株的增生	37
圖十三:不同濃度的 A10 抑制 PC9IR 細胞株侵襲能力	38

圖十四:不同濃度的 A10 抑制 PC9IR 細胞株遷移能力	40
圖十五:不同濃度 A10 抑制 PC9IR 細胞株聚落形成能力 (colony formation/ Anchorage dependent)	41
圖十六:不同濃度的 A10 抑制 PC9IR 細胞株聚落形成的能力 (colony formation/ Anchorage independent)	43
圖十七:Digoxigenin 和 WY1339 結構.....	47
圖十八:鈴木反應之反應機制	73
圖十九:L52 合成方法	76
圖二十: Pd(dppf)Cl ₂ 和 Pd(PPh ₃) ₄ 結構.....	77
圖二十一:推測 Pd(dppf)Cl ₂ 之反應機構	77
圖二十二:BBr ₃ 去甲基之反應機構.....	78
圖二十三:合成化合物 L32 之預期反應機構	82
圖二十四:文獻中 7-Oxabicyclo[2.2.1]heptane 以 TMSOTf/Et ₃ N 條件開環反應.....	82
圖二十五:WY1339 對 A549 之 CC ₅₀ 值及抑制 Src 蛋白活化之西方墨點法實驗數據.....	83
圖二十六:經由電腦計算出最穩定的 Digoxigenin、WY1339、L54、L55 之立體結構圖.....	85

圖二十七:Discovery studio 模擬 WY1339 和 L43 鍵結 Src 蛋白的交互作用力.....	87
圖二十八: Discovery studio 模擬 L54 和 L64 鍵結 Src 蛋白的交互作用力.....	87
圖二十九: 以酵素結合免疫吸附分析法(ELISA)確認化合物 WY1339、L43、L54 和 L64 對 A549 中磷酸化 Src 蛋白的表現.....	89
圖三十: WY1339 衍生一系列長度增加不同親疏水性之衍生物	90
圖三十一: WY1339 衍生物對 A549 細胞之存活率	95
圖三十二:待測生物活性之 L66 和保留 WY1339 平面結構並延長之對位衍生物 L56.....	98

表目錄

表一: WY1339 和 L12 對人類肺腺癌細胞 A549 在 24 小時之活性比較	84
表二: WY1339 和 L43 對人類肺腺癌 A549 在 24 小時之活性比較...	84
表三: Digoxigenin 和 WY1339 對 A549 細胞株之不同時間 IC ₅₀	85
表四: Discovery studio 模擬 WY1339、L43、L54 和 L64 在 Src 蛋白中的 CDcking Energy	86
表五: L43 和 L54 對人類肺腺癌 A549 在 24 小時之活性比較.....	88
表六: L53、L55、L54、L63、L65 和 L64 對人類肺腺癌 A549 之活性 比較.....	91
表七: 馬來醯亞胺結構單鍵與雙鍵之衍生物對人類肺腺癌 A549 活性 比較.....	93

光譜目錄

圖譜一:化合物 L11 之氫核磁共振光譜圖.....	104
圖譜二:化合物 L11 之碳核磁共振光譜圖.....	105
圖譜三:化合物 L11 之質譜圖.....	106
圖譜四:化合物 L12 之氫核磁共振光譜圖.....	107
圖譜五:化合物 L12 之碳核磁共振光譜圖.....	108
圖譜六:化合物 L12 之質譜圖.....	109
圖譜七:化合物 L41 之氫核磁共振光譜圖.....	110
圖譜八:化合物 L41 之碳核磁共振光譜圖.....	111
圖譜九:化合物 L41 之質譜圖.....	112
圖譜十:化合物 L42 之氫核磁共振光譜圖.....	113
圖譜十一:化合物 L42 之碳核磁共振光譜圖.....	114
圖譜十二:化合物 L42 之質譜圖.....	115
圖譜十三:化合物 L43 之氫核磁共振光譜圖.....	116
圖譜十四:化合物 L43 之碳核磁共振光譜圖.....	117
圖譜十五:化合物 L43 之質譜圖.....	118
圖譜十六:化合物 L51 之氫核磁共振光譜圖.....	119
圖譜十七:化合物 L51 之碳核磁共振光譜圖.....	120

圖譜十八:化合物 L51 之質譜圖	121
圖譜十九:化合物 L52 之氫核磁共振光譜圖	122
圖譜二十:化合物 L52 之碳核磁共振光譜圖	123
圖譜二十一:化合物 L52 之質譜圖	124
圖譜二十二:化合物 L53 之氫核磁共振光譜圖	125
圖譜二十三:化合物 L53 之碳核磁共振光譜圖	126
圖譜二十四:化合物 L53 之質譜圖	127
圖譜二十五:化合物 L54 之氫核磁共振光譜圖	128
圖譜二十六:化合物 L54 之碳核磁共振光譜圖	129
圖譜二十七:化合物 L54 之質譜圖	130
圖譜二十八:化合物 L55 之氫核磁共振光譜圖	131
圖譜二十九:化合物 L55 之碳核磁共振光譜圖	132
圖譜三十:化合物 L55 之質譜圖	133
圖譜三十一:化合物 L62 之氫核磁共振光譜圖	134
圖譜三十二:化合物 L62 之碳核磁共振光譜圖	135
圖譜三十三:化合物 L62 之質譜圖	136
圖譜三十四:化合物 L63 之氫核磁共振光譜圖	137
圖譜三十五:化合物 L63 之碳核磁共振光譜圖	138

圖譜三十六:化合物 L63 之質譜圖.....	139
圖譜三十七:化合物 L64 之氫核磁共振光譜圖.....	140
圖譜三十八:化合物 L64 之碳核磁共振光譜圖.....	141
圖譜三十九:化合物 L64 之質譜圖.....	142
圖譜四十:化合物 L65 之氫核磁共振光譜圖.....	143
圖譜四十一:化合物 L65 之碳核磁共振光譜圖.....	144
圖譜四十二:化合物 L65 之質譜圖.....	145
圖譜四十三:化合物 L66 之氫核磁共振光譜圖.....	146
圖譜四十四:化合物 L66 之碳核磁共振光譜圖.....	147
圖譜四十五:化合物 L66 之質譜圖.....	148

第一章、緒論

第一節、肺癌

世界衛生組織(WHO)在《World Cancer Report 2016》統計報告中指出，2015年在全世界約有8,800,000人死於癌症，相當於全球死亡人數的16.7%，其中最普遍發生的癌症依序為：肺癌(1,690,000人次)、肝癌(780,000人次)、結腸直腸癌(774,000人次)、胃癌(754,000人次)、乳腺癌(571,000人次)¹。其中肺癌的死亡人數從2012年的1,590,000人次增加到1,690,000人，是全球死亡率逐年遞增最多的癌症。由於肺癌不易於早期發現，導致死亡率高居不下，因此發展新穎有效治療肺癌的方法是科學家刻不容緩的目標。

肺癌是一種肺部的惡性腫瘤，主要是肺部中支氣管或肺泡上皮細胞產生變異且不受控制的增生所造成的疾病。發生變異的細胞不受人體正常的調節控制，不停地向外生長擴張，進一步侵犯鄰近的組織、血管和淋巴結。如不進行治療，癌細胞會藉由血管、淋巴結隨著血液、淋巴液轉移到其他器官，造成癌症的轉移。

肺癌可分為小細胞肺癌(Small cell lung cancer, SCLC)和非小細胞肺癌(Non-small cell lung cancer, NSCLC)兩大類。其中非小細胞

肺癌占肺癌當中的80~85%²。根據其組織型態可以再區分為鱗狀細胞癌 (Squamous cell carcinoma)，肺腺癌 (Adenocarcinoma)和大細胞肺癌 (Large cell carcinoma)。鱗狀細胞癌占肺癌的25%，分化完全的鱗狀細胞癌通常比其他類型的癌細胞生長的慢^{3,4}。肺腺癌占肺癌的40%，大多數肺腺癌和吸煙有關；但在從不吸煙者當中，肺腺癌是最常見的肺癌類型⁵。

目前對於肺癌的治療方法有手術治療、放射線治療、化學治療和標靶治療。手術治療的目的是將肺部中肺癌腫瘤和局部淋巴結切除，對於原發性的非小細胞肺癌，手術切除是目前最好的治療方法。雖然可以利用外科手術的方式將腫瘤組織切除，但少量的癌細胞還是有可能殘留在腫瘤所生長的器官周遭。隨著時間過去，又會重新生長成一個新的腫瘤，稱為癌症復發。

放射線治療是利用高能量放射線穿過體表將輻射能量集中在腫瘤部位，破壞癌細胞的遺傳物質來阻止細胞生長或分裂達到殺死癌細胞的目的。一般而言，放射線治療對於局部腫瘤的控制率不錯，但若癌細胞有面積過大或有轉移的現象時，則效果有限。

化學治療是使用口服或注射抗癌藥物，藉由血液流至全身的全身性治療。利用癌細胞的生長及分裂速度較正常細胞快的特性，使用抑

制細胞生長的藥物，達到抑制或殺死癌細胞的效果。大部分的化療藥物沒有專一性，所以會同時殺死身體中進行細胞分裂或是生長較快速的正常細胞，例如頭皮毛囊細胞、血球細胞，對患者造成較大的副作用。

相較於化療的非選擇性細胞毒殺作用，副作用較大且難以避免。標靶治療則是利用對特定蛋白有專一性的標靶藥物，針對體內不正常調控的蛋白質進行抑制，阻止細胞的不正常成長，達到癌細胞的抑制效果。此方法從 1990 年開始使用在癌症上並有著明顯的成效，治療效果可以和化療相比，且副作用相對減少許多，是目前癌症治療非常熱門的領域。

第二節、Src 蛋白

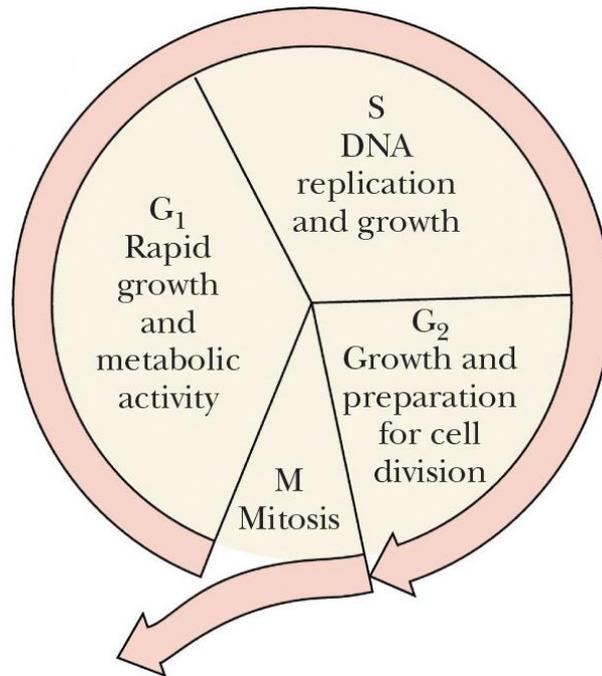
Src 蛋白 (Src protein) 是一個與癌症有著密切關係的蛋白質。在 1911 年，Peyton Rous 從雞的腫瘤上萃取出病毒注射到健康的鳥類，發現有腫瘤產生，因此將這種病毒稱為 Rous sarcoma virus (RSV)。RSV 是第一個成功萃取出來且能夠誘導癌症產生的反轉錄病毒 (Cancer-causing retrovirus)⁶。RSV 與所有的反轉錄病毒一樣，擁有簡單的基因構造，主要由三個基因:gag、 pol及env轉譯出病毒所需的蛋白質。除此之外，RSV擁有第四種基因v-src，v-src 所轉譯出來的蛋白質被認

為是導致腫瘤細胞生長的原因^{7,8}。

v-src是第一個從病毒中萃取出來且會導致腫瘤生成的基因，稱做致癌基因 (Oncogenes)^{8,9}。v-src 之所以稱作致癌基因，是因為它會破壞細胞內訊號的調控，即使在沒有外來的刺激訊號情況下，也會活化原本沒有活性的蛋白質。

1979年 J.Michael Bishop和Harold E. Varmus發現在健康的動物身上，包括人類，都有與v-src 極為相似的蛋白質，稱作c-Src¹⁰。由c-Src轉錄出來的Src蛋白稱為Src蛋白家族，Src蛋白家族有十二個成員: Src、Fyn、Yes、Yrk、Lyn、Hck、Fgr、Blk、Lck、Brk、Srm、以及Frk。這些成員皆是非受體型酪胺酸激酶，存在於細胞質中，具有傳遞訊息的功能¹¹。

在Robert Roskoski Jr.在2004年發表的研究結果表示Src蛋白家族的活化主要發生在細胞週期的G2/M期¹²。細胞週期(Cell cycle)是指能持續分裂的真核細胞從一次有絲分裂結束後生長，再到下一次分裂結束的循環過程。細胞週期分成分為G1期 (Gap 1 growth phase)、S期 (Synthesis phase)、G2期 (Gap 2 growth phase) 和M期(Mitosis phase)(圖一)。

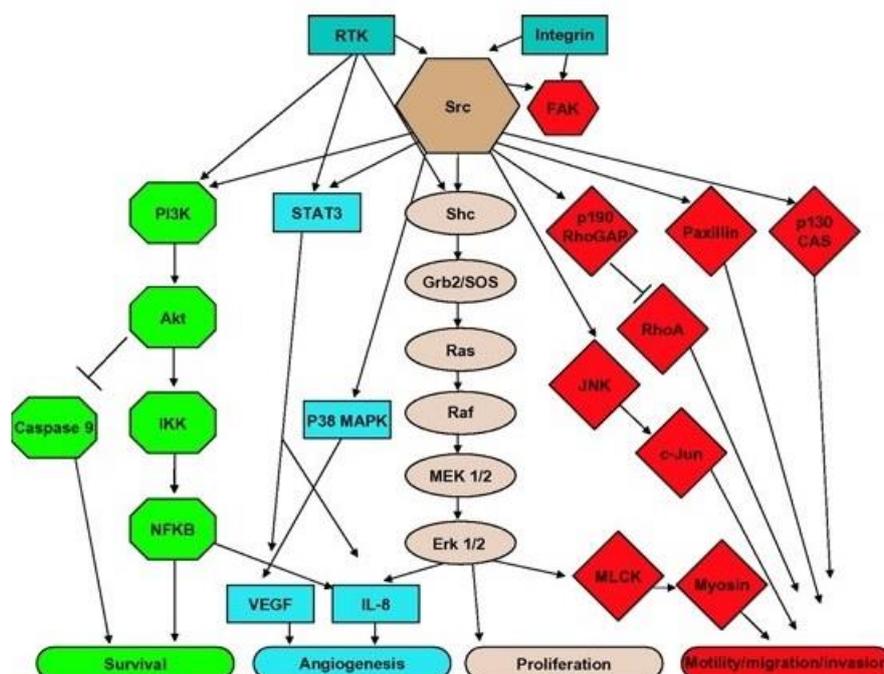


圖一:細胞週期: G₁ 期:進行細胞生長, S 期:進行 DNA 複製,使 DNA 成為相同的兩份, G₂ 期:製造蛋白質,準備細胞分裂的所需物質, M 期:有絲分裂;為進行核裂(染色體分離)和質裂(細胞質分裂)的階段。而當細胞處於 G₀ 期時 就會停止細胞一切的複製分裂過程¹³。

正常細胞的增生和凋亡會處在一個平衡點,但當細胞受到外在因素影響使細胞內 DNA 發生突變,會使細胞進行異常分化,導致細胞過度生長,形成腫瘤。因此,Src 蛋白的活化發生在 G₂/M 期中,可以證明 Src 蛋白在細胞分化、增生和存活中扮演重要的訊息傳遞角色¹⁴。

Src 蛋白和腫瘤生長有很大的關係。Jon R. Wiener 在 1999 年發表於 Cancer Research 期刊中藉由異種移植小鼠實驗發現,在惡性腫瘤細胞中 Src 蛋白的活化量減少,可以抑制惡性腫瘤細胞中的血管新生,能夠有效抑制惡性腫瘤的生長。此外在 c-Src 基因剔除小鼠實驗中發

現，剔除 c-Src 基因並未對小鼠產生致命性的影響，因此推測 Src 蛋白的存在並非促使細胞生長必要的關鍵¹⁴。2007 年 Marcos Vidal 利用果蠅基因培養複眼腫瘤細胞與基因敲除老鼠的實驗結果推論:Src 蛋白在腫瘤細胞生長中扮演兩種角色。一、腫瘤細胞生長初期，Src 蛋白的表現量低於正常細胞時，抑制腫瘤細胞生長使其死亡。二、在癌症的末期，Src 蛋白的活化量高於正常細胞時，腫瘤細胞會有爬行及遷移的現象¹⁵。至今已有許多研究可以證明 Src 在腫瘤生長過程中，對於細胞貼附(Cell adhesion)、細胞移動(Cell motility)、細胞侵襲(Cell invasion)、細胞增殖(Cell proliferation)、細胞存活(Cell survival)及血管新生(Angiogenesis)中佔有關鍵的角色(圖二)。



圖二:Src 與細胞存活、增生、遷移、侵襲和血管新生之間的訊息傳遞途徑¹⁶。

圖二中，Src蛋白和很多訊息傳導路徑都有相關，包括了Focal adhesion kinase (FAK)、Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)¹⁷以及Signal transducer and activator of transcription3 (STAT3)¹⁸途徑。

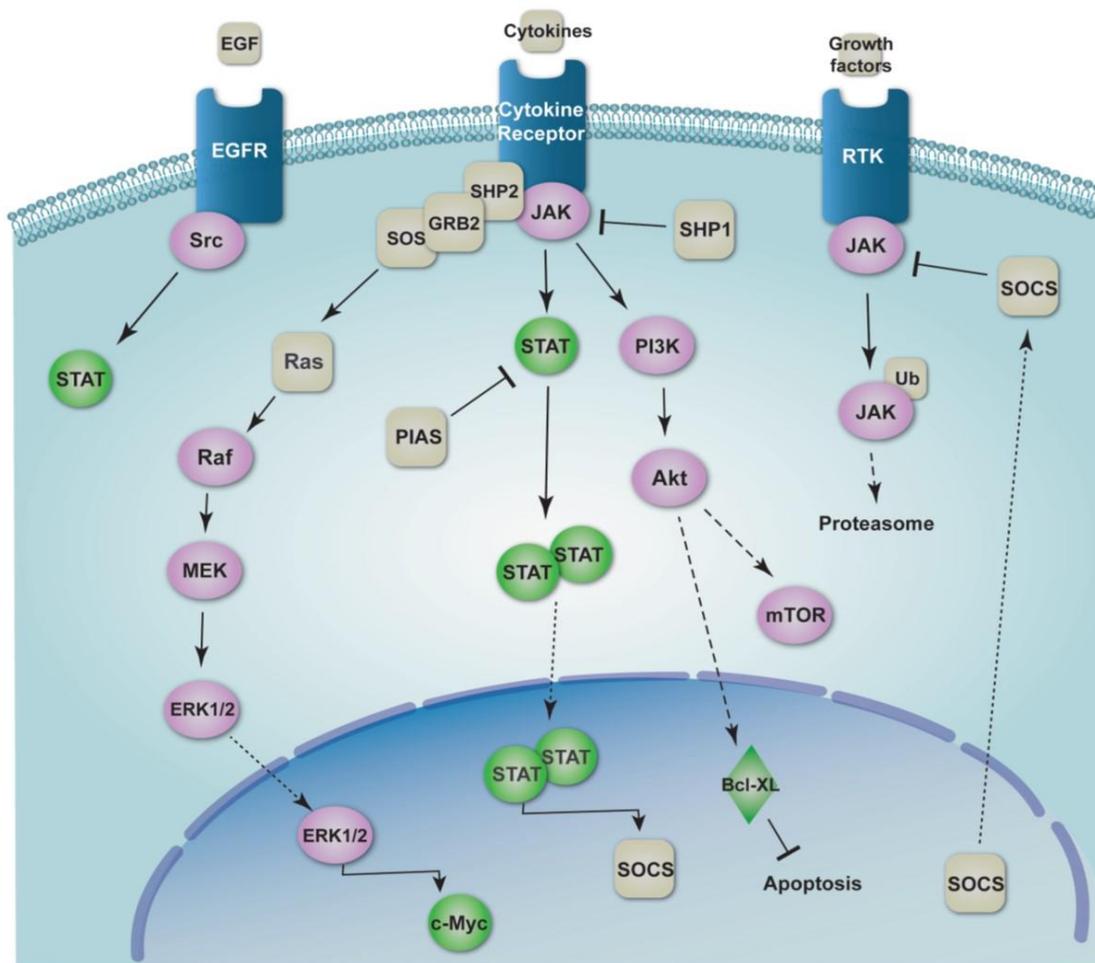
在非小細胞肺癌當中，藉由EGF刺激的STAT3、Interleukin 6、以及肝細胞衍生的生長因子(Hepatocyte-derived growth factor)，都需要經由Src的活化才會被活化¹⁹。這些Src相關的訊息傳導路徑會促進腫瘤生成、血管新生、癌細胞的增生，也會改變癌細胞的貼附、侵襲、移動與轉移能力

第三節、Src 蛋白與肺癌

肺癌是多種癌症中致死案例最高的，其中又以非小細胞肺癌最常見。在 1990 及 2002 年 Mazurenko 研究團隊²¹與 Margaret C.Frame²²分別提出，在肺癌上皮細胞中 Src 蛋白的表現量較一般正常細胞活躍，且 Src 的活化程度也與腫瘤大小有著相當的關係^{20,21}。

2007 年 Jie Zhang 與德州大學安德森癌症中心研究團隊以基因體學和藥理學為基礎，研究抑制 Src 蛋白家族激酶的表現，能有效控制非小細胞肺癌細胞的生長。經由實驗提出 Src 蛋白為肺癌標靶，並發表於文獻中²²。

另外，表皮生長因子受體(Epidermal growth factor receptor，EGFR)對於腫瘤的發展也有密切的關係。非小細胞肺癌當中約 40-80 % 都有 EGFR 過度表達的情形，因此控制 EGFR 的表達對於治療肺癌上有一定的幫助²³。在非小細胞肺癌中，EGFR kinase domain 的突變導致 EGFR 持續活化，進而活化下游的訊息傳導路徑，使細胞失去調控能力²⁴。而 Src 是已知 EGFR 下游訊息的調控者，抑制 Src 的活性，可以使透過 EGFR 調控的訊息傳導路徑被抑制，進而誘發非小細胞肺癌細胞產生凋亡²⁵。由於 Src 和 EGFR 之間有互相調控的關係，因此可以利用抑制 Src 蛋白來針對非小細胞肺癌在 EGFR 上的治療(圖三)。



圖三:EGFR、Src 訊息傳遞途徑圖²⁶。

有研究表示，Src 抑制劑的使用對於癌症病患有正向的效果，其中一項研究是將首次化療的非小細胞肺癌患者投以 Src 抑制劑 Dasatinib 來測試在活化 EGFR 和 Src 的狀態下的關聯，經過免疫組織化學分析，發現 Src 抑制劑可以使因 EGFR 活化而導致的肺癌細胞株死亡²⁷。

總結 Src 蛋白和肺癌的關係，可以發現如果抑制 Src 蛋白就能有效抑制肺癌腫瘤細胞的分化、增生和存活，且不會對正常細胞造成致

命性的影響。因此，本研究選擇 Src 蛋白作為抑制非小細胞肺癌之標靶蛋白。

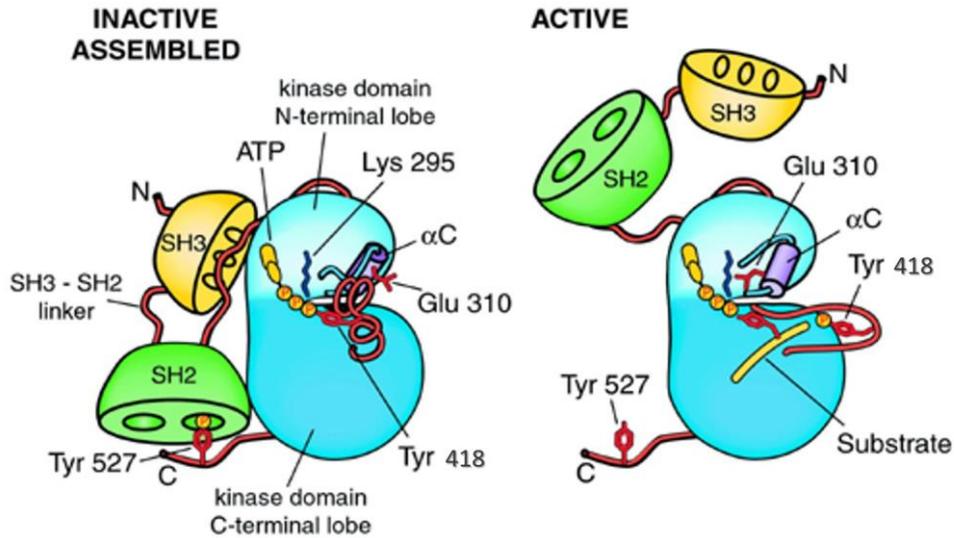
第四節、Src 蛋白的結構

Src 的結構主要可以分成四個部分；SH2 domain、SH3 domain、kinase domain 和 C-terminal。SH2 domain 是第一個被確定的部分，可以與磷酸化的酪胺酸(Tyrosine)結合⁹。SH3 domain 可以和富含脯胺酸(Proline)的胜肽結合，與蛋白質間的結合有重要的關聯²⁸。C-terminal 是一個可以進行負調控的部分，C-terminal 中的 Y527 位置可帶有磷酸根和 SH2 domain 結合²⁹。

Src 蛋白結構的改變會影響其活性。Src 蛋白處於非活化態時，SH2 domain 可以辨識 C-terminal 上 527 號酪胺酸，使其磷酸化，會讓 Src 蛋白結構改變，導致：一、Src 蛋白的 Kinase domain 與 SH2 domain 之間產生交互作用力，結合在一起形成封閉的構型；二、Kinase domain 上的 418 號酪胺酸被隱藏，失去訊息傳遞的作用。

當 C-terminal 上的 527 號酪胺酸去磷酸化，C-terminal 會與 SH2 domain 分離，使 Src 蛋白形成開放式的構型，進而變成活化態。Src 蛋白處於活化態時，Kinase domain 上的活性中心 418 號位置的磷酸

化酪胺酸裸露，因此具有磷酸化受質的能力，藉此達到訊息傳遞的作用³⁰ (圖四)。



圖四:Src 活化態和非活化態的結構³⁰。

除了 Src 蛋白本身的自體抑制機制外，Src 蛋白的活性也會受到細胞內蛋白質間訊息傳遞間接調控與直接調控。間接調控如 EGFR，EGFR 受到細胞外生長因子的刺激，傳遞細胞生長訊息，活化下游的 Src 蛋白。直接調控如 Csk 蛋白，Csk 蛋白是一種酪胺酸蛋白磷酸酶，當 Csk 蛋白作用在 Src 蛋白的 C 端 527 號酪胺酸上，活化的 Csk 蛋白磷酸化 Src 蛋白 527 號胺基酸，令 Src 蛋白結構改變，由活化態變成非活化態¹¹。

為了減少非小型細胞肺癌中 Src 蛋白的過度活化，本研究以化學合成和生物分析的方法來發展和篩選出新穎的小分子化合物，達到抑制 Src 蛋白的目標。

第五節、先導化合物的發現

近年來有許多技術相繼被引入藥物開發的領域中，例如：X-光單晶繞射學、電腦化學、核磁共振學、組合化學以及高通量篩選等，提高了發現先導化合物的機率。

在一個化合物被合成出來前，研究人員可以在電腦中依據理論基礎推理、預測其可能成為藥物的機率。藥物開發可依循下列幾種模式：

1.隨機篩選，2.結構修飾，3.循理藥物設計；大略可以將這三種模式區分為屬於傳統藥物開發的模式與屬於現代藥物開發的模式，這三種藥物開發模式之間具有相互關聯性。

(1) 隨機篩選

需要有一系列細胞實驗的生物活性試驗對來自天然或合成化合物進行快速及合乎經濟效益的篩選，以這種隨機模式，只有極少量的化合物能夠通過臨床前的試驗而進入到人體試驗。雖然以這種傳統方式也產生出許多有效的藥物，但這樣的方式除了效率相當低之外，在藥物可能的作用機制尚未確認前就進入生物活性測試，所得藥物的專一性或治療指數可能會因而降低，甚至會有錯誤標靶的情形發生。

(2) 結構修飾

對現存或是新發現的先導化合物經由各種不同的化學反應，進行

官能基轉變而達到結構修飾的目的，基於某些已知的結構與活性關係 (Structure-activity relationship; SAR) 或作用機轉，例如：受體、酵素等相關資訊，進行結構上的修飾，通常可以提昇藥理活性、降低副作用。

(3) 循理藥物設計

循理藥物設計在藥物開發中屬於比較新的領域，有逐漸取代傳統藥物開發模式的趨勢。藉由高效高速的電腦運算能力，分析比對蛋白序列，建立標的受體(Target receptor)的三度空間結構，產生先導性化合物，再將化合物進行修飾達最佳化，再找出藥物類似物(Drug-like compound)，或是候選藥物(Drug candidate)，整個流程稱之為電腦輔助藥物設計(Computer-assisted drug design, CADD)。

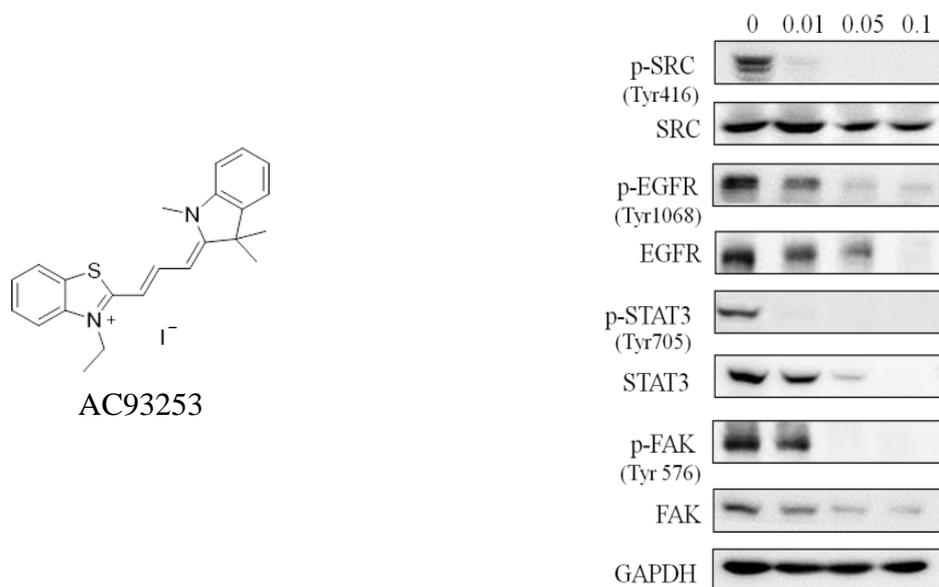
本研究中先導化合物的來源

1. 在 AC93253 衍生物對肺癌抑制能力研究中，先導化合物 AC93253 是從 LOPAC 藥物庫中利用分子對接所篩選出來的。得到先導化合物 AC93253 後，再利用化學合成的方式來修飾其結構，得到一系列衍生物。
2. 在 WY1339 衍生物合成與構效關係實驗中，WY1339 是以 Digoxigenin 為先導化合物所合成的。Digoxigenin 是從 NCI-60 藥物庫中利用 MTT 實驗所篩選出來，本實驗室再利用化學合成的方

式修飾其結構，合成出一系列衍生物，經由肺癌細胞 A549 毒殺實驗後，得到最佳毒殺效果的 WY1339 作為本研究的先導化合物³¹。

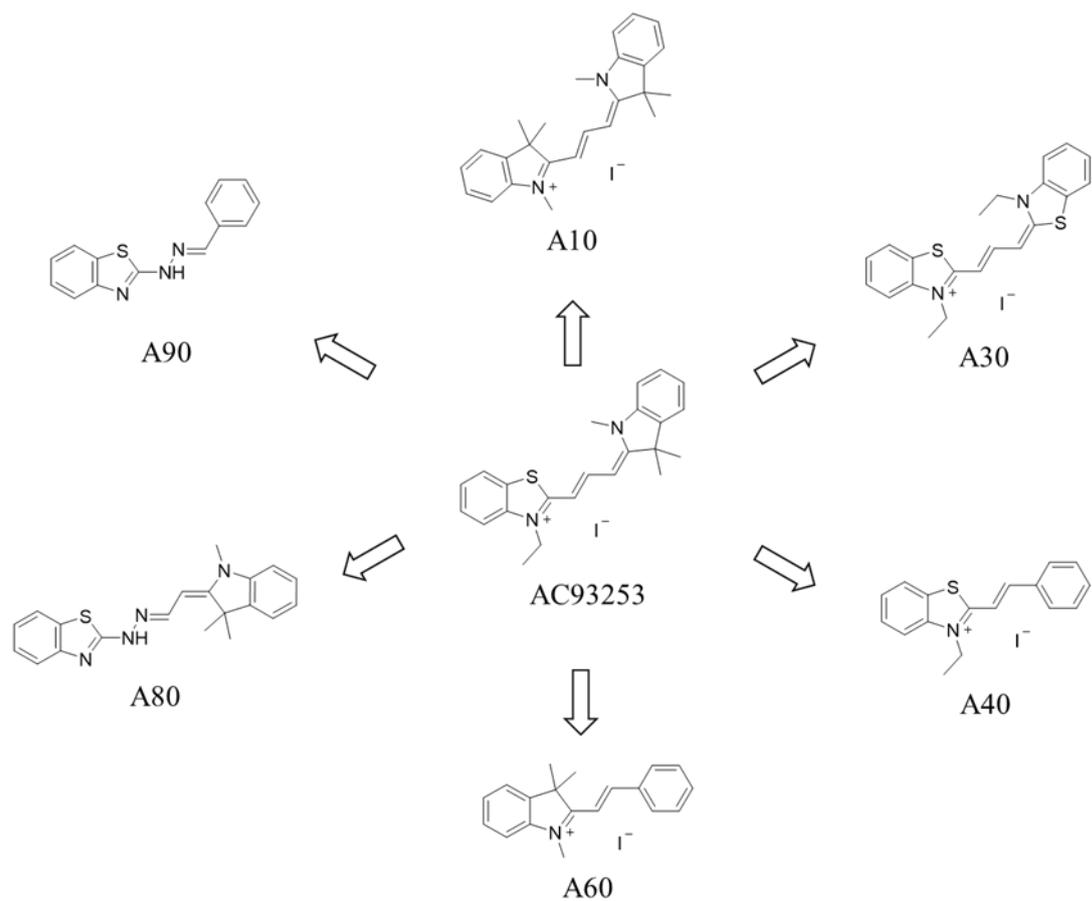
第二章、篩選並評估 AC93253 衍生物對肺癌抑制能力

先前的研究中，我們使用電腦模擬輔助藥物設計程式（CADD）的方式來篩選抑制 Src 蛋白的先導化合物。利用 Discovery studio 模擬軟體從 Library of Pharmacologically Active Compounds（LOPAC）藥物庫中的 1280 個化合物與 Src 蛋白結構進行分子對接篩選。模擬結果顯示，化合物 AC93253 與 Src 有良好的結合能力，我們進行西方墨點法後亦證實這點(圖五)。



圖五：化合物 AC93253 對 Src 蛋白西方墨點法實驗數據。

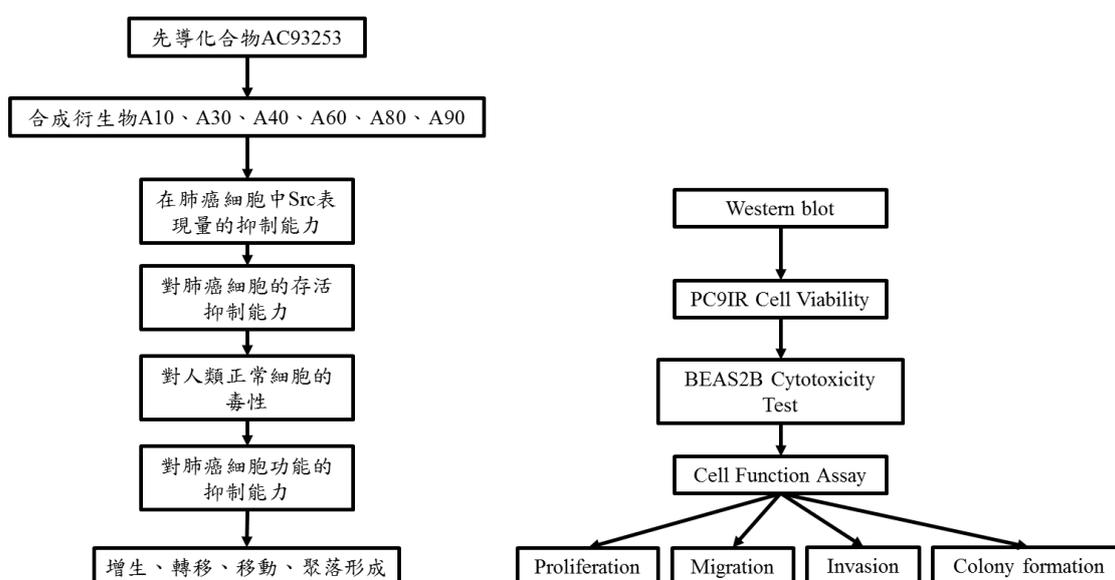
本實驗室再以 AC93253 為先導化合物，設計與合成 6 種以不同長度、不同芳香環組成及具有鹽類或非鹽類的 AC93253 衍生物 A10、A30、A40、A60、A80、A90³² (圖六)。



圖六:AC93253 衍生物之結構。

第一節、實驗目的和實驗架構

本研究將針對 AC93253 衍生物進行生物分析實驗，探討衍生物對非小細胞型肺癌中 Src 蛋白的抑制能力。實驗的主要目的是測試上述 6 種化合物對非小型肺癌細胞中 Src 蛋白是否具有抑制效果和其對癌細胞毒殺能力、正常細胞毒性和對肺癌細胞功能的影響，包括癌細胞的增生、移動、轉移、及細胞群落形成的能力（圖七）。



圖七：實驗目的和實驗方法。

首先我們尋找合適的非小細胞型肺癌細胞作為我們實驗的模型，先前研究中 Src 抑制劑 Dasatinib 曾使用 PC9IR 細胞株作為實驗模型³³。PC9IR 是人類肺腺癌細胞，對吉非替尼（Gefitinib）有抗藥性，Gefitinib 是目前癌症治療非常熱門的 EGFR 抑制劑，主要使用在肺癌

和乳癌上³⁴。EGFR 是 Src 訊息傳遞途徑的上游，如果衍生物可以殺死 PC9IR 細胞且抑制癌細胞中 Src 的磷酸化，可以證明化合物是透過抑制 Src 達到減少 EGFR 的活化，而非透過抑制 EGFR 達到抑制 Src 的磷酸化。因此本研究選擇 PC9IR 作為癌細胞模型。

我們利用西方墨點法來測試不同衍生物是否能夠抑制 PC9IR 細胞中 Src 蛋白的活化，並選擇前 4 名能夠有效抑制 Src 活化的衍生物來進行 PC9IR 細胞毒殺實驗。

在西方墨點法實驗中，Dasatinib 是 Src 的抑制劑，許多文獻中皆指出 Dasatinib 可以有效抑制肺癌細胞的生長^{35, 36}，但是 Dasatinib 對 TKI 有抗性的肺癌細胞，如 A549 和 H1975 的抑制效果不佳。因此實驗中我們使用 Dasatinib 和 AC93253 做為主要的對照組（Positive control）。

從西方墨點法實驗中篩選出能有效抑制 Src 蛋白活化的衍生物來進行 PC9IR 細胞毒殺實驗，再選出能殺死 PC9IR 細胞的衍生物來對 BEAS2B 測試其正常細胞毒性，最後選出最有效能夠殺死癌細胞並對一般細胞影響最小的衍生物來進行一系列的細胞功能實驗。

第二節、實驗材料與方法

材料與儀器

化學藥品、有機溶劑、實驗器材及設備大部分購自於以下廠商：

Amersham Pharmacia Biotech. (Uppsala, Sweden)

Applied Biosystems (Foster City, CA)

BD Biosciences (Palo Alto, CA)

Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA)

Corning (NY, U.S.A.)

Invitrogen (Carlsbad, U.S.A.)

Merck Chemical Co. (Darmstadt, Germany)

Millipore (Billerica, MA)

Santa Cruz Biotechnology (California, U.S.A.)

Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)：購入AC93253化合物

Upstate Biotechnology (Waltham, MA)

分光光譜儀 (spectrophotometer DU800, Beckman Coulter)

一、細胞株 (Cell line)、細胞培養 (Cell culture) 及藥物處理

1.細胞株

實驗中所用到的細胞分別為 PC9IR 和 BEAS2B。PC9IR 是人類肺腺癌細胞 PC9 對藥物 Iressa 具有抗藥性的細胞株。BEAS2B 是將正常人類支氣管上皮細胞 (BE) 和病毒雜交所轉化的非致瘤性人類支氣管上皮細胞。以上這些細胞接培養在培養液中，培養液都含有 10% 胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS) 和 Penicillin/Streptomycin (100 mg/mL) 培養在 37 °C 與 5% CO₂ 的培養箱中。

2.細胞培養

將細胞培養於 10 cm 培養皿中，待細胞長至八分滿，吸掉培養液並以 1×PBS 緩衝液 (27 mM KCl、15 mM KH₂PO₄、1.4 M NaCl、80 mM Na₂HPO₄) 清洗，藉由 trypsin-EDTA (TE, 0.25% trypsin、1mM EDTA, invitrogen) 使其覆蓋所有細胞後，馬上吸掉 TE，放置 37 °C 約 3 分鐘，等到細胞懸浮時，再加入 2 mL 培養液，將細胞打散，接著取 1:6 稀釋細胞至另一個培養皿，並加入適量培養液於 37 °C、5% 二氧化碳培養箱中培養。

3.藥物處理

AC93253 從 Sigma (St Louis, MO) 購入，化合物 A10、A30、A40、A60、A80、A90 可溶於 Dimethyl sulfoxide (DMSO)，保存濃度為 0.1M，保存於 -4 °C。

二、細胞蛋白質之萃取 (Protein extraction) 與定量 (Protein amount assay)

1.細胞蛋白質之萃取

將細胞培養於 10 cm 培養皿中，待細胞長約九分滿後，吸掉培養液，以冰的 1×PBS 緩衝液輕輕沖洗，再吸乾殘餘的 PBS 緩衝液。加入適量 RIPA 緩衝液 (含 50 mM Tris (pH 7.4)、1mM EDTA、150mM NaCl、1% NP-40；Proteinase inhibitor) 至 10 cm 培養皿後，再以細胞刮勺將細胞刮下，並將細胞懸浮液收集至微量離心管，置於冰上作用 30 分鐘，每 10 分鐘震盪微量離心管，以 4 °C 12,000 rpm 離心 15 分鐘，吸取上清液至另一微量離心管，儲存在-80 °C 中備用或是進行蛋白質定量。

2.蛋白質定量

蛋白質濃度是以 Bradford 的方法來定量，利用酸性溶液 CBG (Coomassie brilliant blue G-250) 染劑和不同濃度的蛋白質反應，產生差異性的顏色變化。蛋白質的濃度越高，染劑與蛋白質結合而產生顏色變化的量也相對成正比。分析程序：1、製備蛋白質標準液，以 0.5 mg/mL、0.25 mg/mL、0.125 mg/mL 和 0.0625 mg/mL 的 BSA (Bovine serum albumin, Sigma) 當作標準液，以去離子水作為空白組。2、取 2 μL 標準液與 1 mL CBG 染劑 (0.12 mM Coomassie brilliant

blue G-250、95% Ethanol、85 % Orth-phospaoric acid) 混合作用。3、以分光光譜儀在 OD 590 nm 測定樣品吸光值。4、劃出標準曲線，以內插法計算出樣品濃度 ($Y=A+BX$; Y: OD590nm 讀值; X: 待測樣品濃度)。

三、蛋白質凝膠電泳分析 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

取出玻璃片、白色氧化鋁板和間隔條，將間格條至於玻璃片與氧化鋁板後固定在鑄膠器上。依目標蛋白質分子量不同之需求，配製含有 SDS 之 10% 聚丙烯醯氨 (30% Acrylamide mix, Acrylamide : Bis-Acrylamide=29 : 1) 的解析凝膠 (Resolving gel)，並注入已架設好之電泳玻璃中至八分滿的高度，再覆蓋上一層 95% 甲醇，置於室溫 30 分鐘等待膠體凝結。倒掉甲醇再加入 5% 聚焦凝膠 (Stacking gel)，插入齒梳，置於室溫 30 分鐘等待膠體凝結。等待期間，取出蛋白質樣品在冰上回溶後，加入 6 倍膠體電泳染劑 (6×Protein loading dye) 混合均勻，在 100 °C 下加熱 10 分鐘使蛋白質變性。將凝固的膠連同玻璃片與氧化鋁板固定於裝有 1× Running buffer [5×Running buffer (pH 8.3) : 125 mM Tris、1.25 M Glycine、0.5% SDS] 的電泳槽內。把蛋白質樣品依序注入到齒模中，另外以相同體積的 1 倍膠體電泳染劑填補空白齒模。設定電壓 70 伏特 (V)，直到追蹤染料到達解

析凝膠後，提高電壓到 120 伏特（V），當追蹤染料到達膠體底部後即可停止。此時，該膠體可以進一步被固定、染色或進行免疫墨點分析。

四、西方墨點法（Western blot）

將定量後的蛋白質經SDS-PAGE 分離後，切除集焦凝膠部分，將解析凝膠浸入1×轉漬緩衝液〔10× Transfer buffer（pH 8.2）：200 mM Tris、1.5 M Glycine〕。取轉漬紙PVDF 薄膜（Polyvinylidene fluoride）裁切成膠體大小，PVDF 需先以少量甲醇潤濕約1分鐘加以活化，再以去離子水清洗數次，將PVDF浸入轉漬緩衝液。取一個塑膠盤倒入約3 cm 高的轉漬緩衝液，打開轉漬夾平放到轉漬緩衝液中，先墊上一片海綿，再鋪上一張濾紙，疊上一張濕潤的PVDF，小心平鋪膠體上去，再鋪上另一張濾紙和墊上海綿，以此方式將其緊緊夾住。操作期間不可以有氣泡夾雜在裡面，否則會形成阻礙而降低轉漬效率。將組裝好的膠體和PVDF浸入裝有轉漬緩衝液的轉漬槽裡。以300伏特（V）、400毫安培（mA）轉漬120 分鐘。轉漬完成後，打開轉漬夾並取出PVDF。將PVDF浸入阻斷緩衝液（Blocking buffer，PBST + FBS），置於室溫下輕輕搖晃半小時，進行阻斷反應步驟以填塞PVDF上沒有蛋白質轉漬的空間。PVDF以PBST（1× PBS 緩衝液 + 0.05% Tween-20）清洗3次，每次10分鐘，去除多餘的填塞物質。加入適量

之一級抗體(不同抗體有不同稀釋倍數,例如:anti-GAPDH 為1:5000, anti-Src 為1:5000, anti-phospho Src 為1:3000, anti-EGFR為1:1500, anti-phospho EGFR為1:1500, anti-STAT3為1:1000, anti-phospho STAT3 為1:000 稀釋),在4°C下搖晃反應隔夜,辨識目標蛋白質。PVDF以PBST清洗3次,每次10分鐘,去除多餘的抗體。再加入二級抗體(HRP Conjugated IgG, 1:10000 稀釋)中,置於室溫下輕輕搖晃1小時,放大目標蛋白質的訊號。PVDF再以PBST清洗3次,每次10分鐘。

取出PVDF稍微瀝乾,並放置在透明投影片上,加上顯影劑(Western blotting luminol reagent, 取buffer A及buffer B以1:1的比例混合均勻),蓋上透明片,避光反應1分鐘。利用冷光暨螢光影像處理系統(UVP autochemi image system)進行顯影步驟。

此外,同一張PVDF要偵測不同的蛋白質,可將壓完片的PVDF以PBST清洗10分鐘,加入Strip buffer(2-Mercaptoethanol、2% SDS、255 mM Tris, pH 6.8)在60 °C的雜合烘箱(hybridization oven)中反應2~3分鐘,以PBST清洗10分鐘,即可再重複進行阻斷反應(blocking)的步驟。

五、細胞毒性分析 (Cell cytotoxicity assay)

細胞先以每孔 2.5×10^3 /100 μ L的細胞數種在96孔培養盤中,37 °C

培養12~16小時後。吸去培養液，補上配好濃度的藥每孔100 μL ，37 $^{\circ}\text{C}$ 下培養，每24小時更換一次含有藥物的培養液，直到72小時後結束實驗並加入10 μL PrestoBlue[®]試劑，置於37 $^{\circ}\text{C}$ 培養1小時，再以ELISA Reader讀取在波長570/600 nm的吸光值

PrestoBlue[®] 做為細胞存活率試劑，定量測量細胞增殖的能力，因此可以被用來建立在許多不同類型的細胞中的各種試劑的相對生存能力。

PrestoBlue[®] 試劑是一種含有刃天青(Resazurin)溶液，其功能為通過活細胞的還原能力，含細胞穿透物的化合物的顏色是藍色的，幾乎無螢光性。當添加到細胞中時會因為活細胞的還原性而使得PrestoBlue[®] 試劑變成紅色，並成為高螢光。這種螢光的變化可以利用ELISA Reader來測量。

六、細胞增殖能力分析 (Proliferation)

細胞先以每孔 $2.5 \times 10^3/100 \mu\text{L}$ 的細胞數種在96孔培養盤中，37 $^{\circ}\text{C}$ 培養12~16小時後加入10 μL PrestoBlue[®]試劑，置於37 $^{\circ}\text{C}$ 培養1小時，再以ELISA Reader讀取在波長570/600 nm的吸光值作為第0小時標準。吸去培養液，補上配好濃度的藥每孔100 μL ，37 $^{\circ}\text{C}$ 下培養，每24小時測量一次，直到72小時後結束實驗。

七、細胞侵襲能力分析 (Invasion assay)

利用 Membrane invasion culture system (MICS) 方法分析，雙層通透性的培養盤底部具有孔徑為 $8\mu\text{m}$ 的多碳膜。以細胞穿過功能性類似細胞基質能力的不同，來分析比較藥物對細胞侵襲能力的影響。

以 $1\times\text{PBS}$ 緩衝液浸泡 transwell 至隔夜。取出 Matrigel (R&D)，放在 4°C 溶解，以無血清培養液 (Serum-Free medium) 做 $1:5$ 稀釋 ($50\mu\text{L}$ Matrigel + $250\mu\text{L}$ SF medium)。取出浸泡好的 transwell，吸掉 $1\times\text{PBS}$ 緩衝液，於 upper chamber 中加入 $20\mu\text{L}$ ($1:5$) Matrigel，小心不要有氣泡，放在 37°C 培養2小時使其凝固。

用 2 mL SF medium 將細胞 (加藥處理細胞培養至 24 小時) 打下來，將 transwell 放置於 24 孔盤上，於 upper chamber 中注入 $2\times 10^4/200\mu\text{L}$ ($1\times 10^5/\text{mL}$ ，每 1 mL 加入 $1\mu\text{L}$ 藥物) 的細胞數，於 lower chamber 中加入 1 mL 含有血清的培養液，放在 37°C 培養 24 小時後，將 upper chamber 中的培養液吸掉，再以 $1\times\text{PBS}$ 緩衝液清洗。加入 1 mL 100% 甲醇固定細胞，將刮乾淨的 upper chamber 放入甲醇中，浸泡 10 分鐘，使細胞固定於 mesh 上，再以 $1\times\text{PBS}$ 清洗。將固定好的 upper chamber 加入 1 mL Giemza (吉姆氏， $1:10$) 染色。用無菌水輕輕沖洗 chamber，將多餘的染劑及雜質去除。將 chamber 晾乾後，於顯微

鏡下計算細胞數目。於固定 20 倍數的鏡頭，計算整張 mesh 中的細胞數目。

八、細胞遷移能力分析 (Migration assay)

利用 Membrane invasion culture system (MICS) 方法分析，雙層通透性的培養盤底部具有孔徑為 $8\ \mu\text{m}$ 的多碳膜。以細胞穿過多碳膜能力的不同，來分析比較藥物對細胞侵襲能力的影響。以 $1\times\text{PBS}$ 緩衝液浸泡 transwell 至隔夜。取出浸泡好的 transwell，吸掉 $1\times\text{PBS}$ 緩衝液，將 transwell 放置於 24 孔盤上，於 upper chamber 中注入 $1\times 10^4/200\ \mu\text{L}$ ($5\times 10^4/\text{mL}$ ，每 1 mL 加入 $1\ \mu\text{L}$ 藥物) 的細胞數 (加藥處理細胞至 72 小時)，於 lower chamber 中加入 1 mL 含有血清的培養液，放在 $37\ ^\circ\text{C}$ 培養 12 小時後，將 upper chamber 中的培養液吸掉，再以 $1\times\text{PBS}$ 緩衝液清洗。加入 1 mL 100% 甲醇固定細胞，將刮乾淨的 upper chamber 放入甲醇中，浸泡 10 分鐘，使細胞固定於 mesh 上，再以 $1\times\text{PBS}$ 清洗。將固定好的 upper chamber 加入 1 mL Giemza (吉姆氏，1:10) 染色。用無菌水輕輕沖洗 chamber，將多餘的染劑及雜質去除。將 chamber 晾乾後，於顯微鏡下計算細胞數目。於固定 20 倍數的鏡頭，計算整張 mesh 中的細胞數目。

九、細胞聚落形成分析 (Colony formation)

1. 非貼附性細胞生長 (Anchorage independent)

取0.7 g Low-melting point agarose (LMP) 溶於100 mL 1×PBS 緩衝液，121 °C滅菌15分鐘，於37 °C備用 (用完後冰在4 °C，下次使用時直接微波至溶解即可)。1、0.7% LMP agarose (下層膠)：取2 mL 0.7% LMP agarose注入培養皿中 (每個培養皿2 mL)，小心不要有氣泡，放置4°C冰箱直到凝固。2、0.35% LMP agarose (上層膠)：計算 1×10^4 /mL的細胞數 (加藥處理細胞至72小時)，取其中的100 μ L，並加入900 μ L培養液，再加入1 mL 0.7% LMP agarose 混合均勻，注入培養皿中 (每個培養皿2 mL，含1000顆細胞)，小心不要有氣泡，放置4 °C冰箱10 ~ 30分鐘。加入1 mL RPMI medium (1 mL RPMI medium+1 μ L藥物)，以保持agarose濕潤，放置37 °C培養，每2 ~4天觀察生長情形，並補充培養液，持續2~3星期直到聚落形成。聚落形成後，吸掉培養液，加入1 mL 0.5 mg/mL p-碘硝四唑紫 (p-iodonitrotetrazolium violet) 染色24小時以上。聚落會呈現藍紫色，拍照擷取其影像結果，並計算大於0.2 mm聚落之數目。

2. 貼附性細胞生長 (Anchorage dependent)

計算 5×10^2 /mL的細胞數，取其中的100 μ L至含有2 mL培養液的6 cm培養皿中，最終細胞數為500顆。每2~3天換一次培養液，經過一

段時間(約7~10天)培養後，聚落逐漸形成。先吸掉培養液，以1×PBS 緩衝液清洗，加入1 mL 甲醇作用15分鐘以固定細胞，再以1×PBS 緩衝液清洗，最後加入1 mL 0.005% 結晶紫 (Crystal violet，溶於1×PBS 緩衝液) 染色8小時以上，聚落會呈現深藍色，拍照擷取其影像結果，並計算大於0.2 mm 聚落之數目。

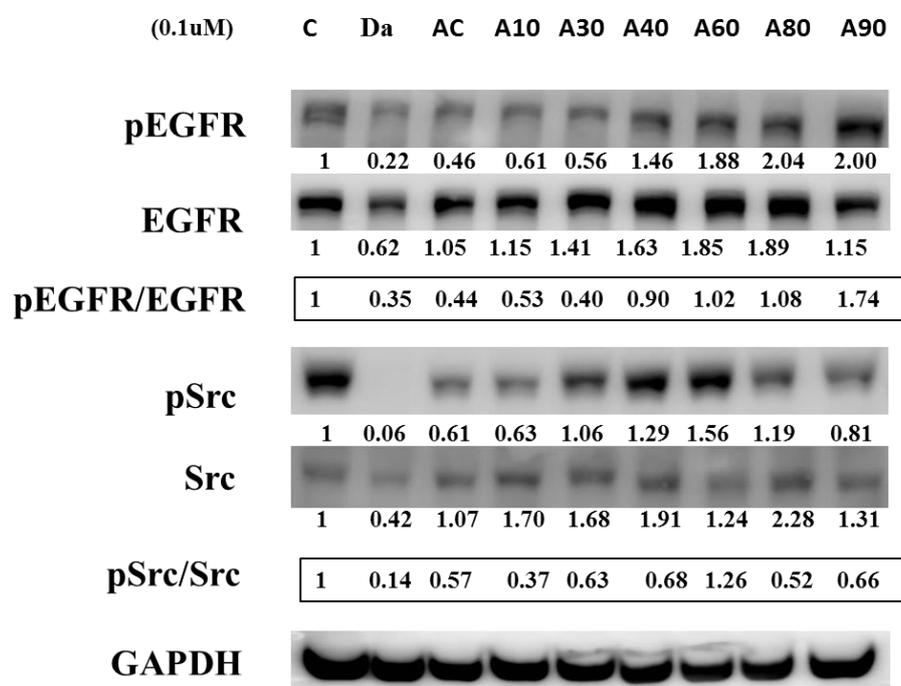
十、統計分析 (Statistical analysis)

利用雙尾T-test檢定(Two-tailed tests)進行分析，以測定實驗結果是否具有顯著差異。當P值小於0.05時，表示統計上的顯著差異，以*表示。

第三節、實驗結果

一、西方墨點法探討不同衍生物對PC9IR細胞株中Src、磷酸化Src (p-Src)、EGFR、p-EGFR的蛋白質表現量的影響

一開始先以PC9IR細胞株進行6個衍生物的篩選，以Dasatinib 和 AC93253做為positive control，去比較Dasatinib、AC93253和6個衍生物對Src活性的抑制效果，所有藥物皆以0.1 μ M處理細胞株24小時候收細胞，利用抗體進行西方墨點法分析，並以GAPDH作為內在控制組，C為只有加入0.1% DMSO。



圖八:西方墨點法探討不同衍生物對肺癌細胞株中Src、磷酸化Src (p-Src)、EGFR、p-EGFR的蛋白質表現量的影響。

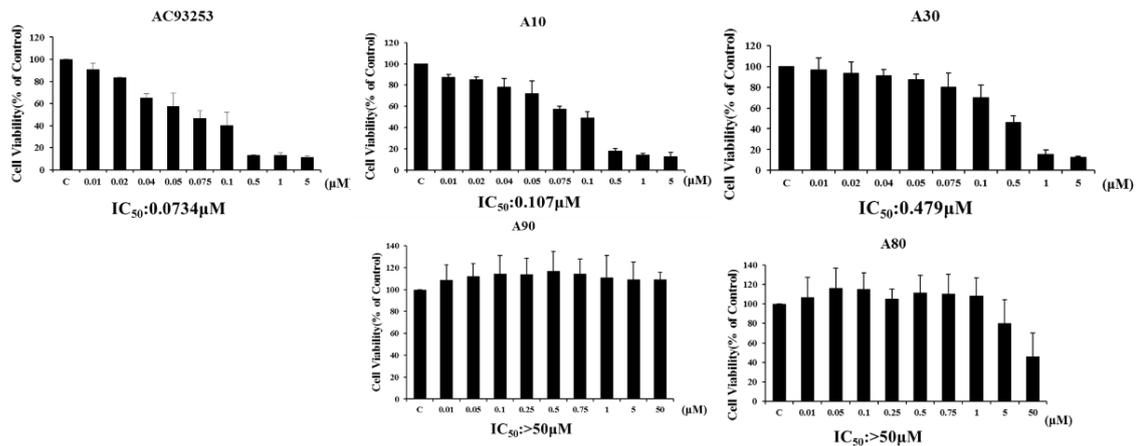
由結果顯示 A10、A30、A80 和 A90，共 4 個藥物抑制 Src 活性

的效果較明顯(p-Src 活化比例分別為 A10: 37%、A30: 63%、A80: 52%、A90: 66%) (圖八)。結果顯示，6 種衍生物在 PC9IR 細胞中，A10、A30、A80、A90 抑制 Src 活性 (p-Src) 的效果較好，且 A10 和 A80 比先導化合物 AC93253 (p-Src 活化比例為 57%) 的抑制效果更好。除此之外，A10 和 A30 處理過的 PC9IR 中，p-EGFR 也有受到抑制使表現量下降的情形。

所以我們選擇了 A10、A30、A80 和 A90 來進行後續的癌細胞存活率分析。

二、探討 A10、A30、A80 和 A90 對 PC9IR 細胞株存活率和細胞毒性的影響

測試 A10、A30、A80 和 A90 在不同濃度、時間點對 PC9IR 細胞株的影響並和 AC93253 做比較。將 2.5×10^3 顆 PC9IR 細胞種到 96 孔盤中 12-16 小時後加入不同濃度的 AC93253、A10、A30、A80 和 A90，處理 72 小時後加入 PrestoBlue® 試劑，再以 ELISA reader 讀取波長 570/600 nm 的吸光值，分析這 4 種衍生物對 PC9IR 在 72 小時存活率及細胞毒性的變化。



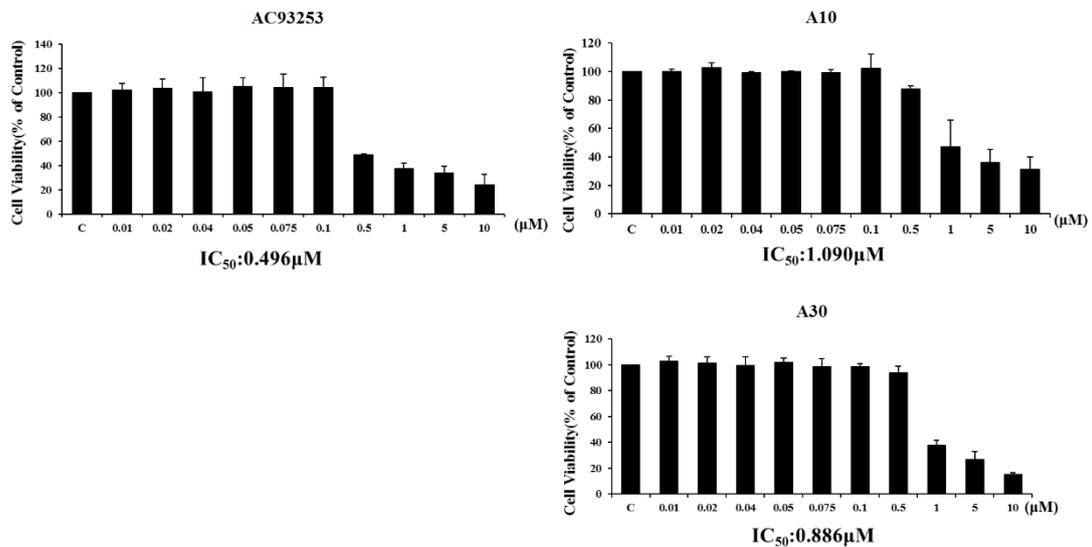
圖九: A10、A30、A80 和 A90 對 PC9IR 細胞株存活率及 IC₅₀ 的差異。

PC9IR 細胞株處理 AC93253 後，隨著濃度和時間的增加，PC9IR 細胞株存活率有明顯的下降，在 72 小時的 IC₅₀ 為 0.0734 μM，以 AC93253 作為衍生物比較的標準。PC9IR 細胞株處理不同濃度的 4 種衍生物後，隨著藥物的濃度和時間的增加，PC9IR 細胞株的存活率都受到影響而下降。PC9IR 細胞株受到 4 種藥物處理 72 小時後，IC₅₀ 分別為 A10:0.107 μM、A30: 0.479 μM、A80: >50 μM、A90: >50 μM(圖九)。

比較 AC93253 和 4 種衍生的 IC₅₀ 可以發現 AC93253 對 PC9IR 細胞株的毒殺效果最好 (IC₅₀:0.0734 μM)，而 4 種衍生物中 A10 的毒殺效果最好 (IC₅₀: 0.107 μM)，其次為 A30 (IC₅₀: 0.479 μM)，而 A80、A90 的 IC₅₀ 最差 (IC₅₀ 皆大於 50 μM)，所以我們選擇 A10 和 A30 來進行正常細胞的毒性測試。

三、探討 A10 和 A30 對 BEAS2B 細胞株存活率和細胞毒性的影響

測試 A10、A30 在不同濃度、時間點對 BEAS2B 細胞株的影響並和先導化合物 AC93253 做比較。將 2.5×10^3 顆 BEAS2B 細胞種到 96 孔盤中 12-16 小時後加入不同濃度的 AC93253、A10、A30，處理 24、48、72 小時之後加入 PrestoBlue® 試劑，再以 ELISA reader 讀取波長 570/600 nm 的吸光值，分析這 4 種衍生物對 BEAS2B 在 72 小時存活率及細胞毒性的變化。



圖十: A10、A30 對 BEAS2B 細胞株存活率及 IC₅₀ 的差異。

BEAS2B 是人類支氣管上皮細胞株，經由處理 AC93253 和其衍生物後，可以得知 AC93253 和其衍生物對正常細胞的毒殺性。

由結果顯示 BEAS2B 處理 AC93253 後，72 小時的 IC₅₀ 為 0.496

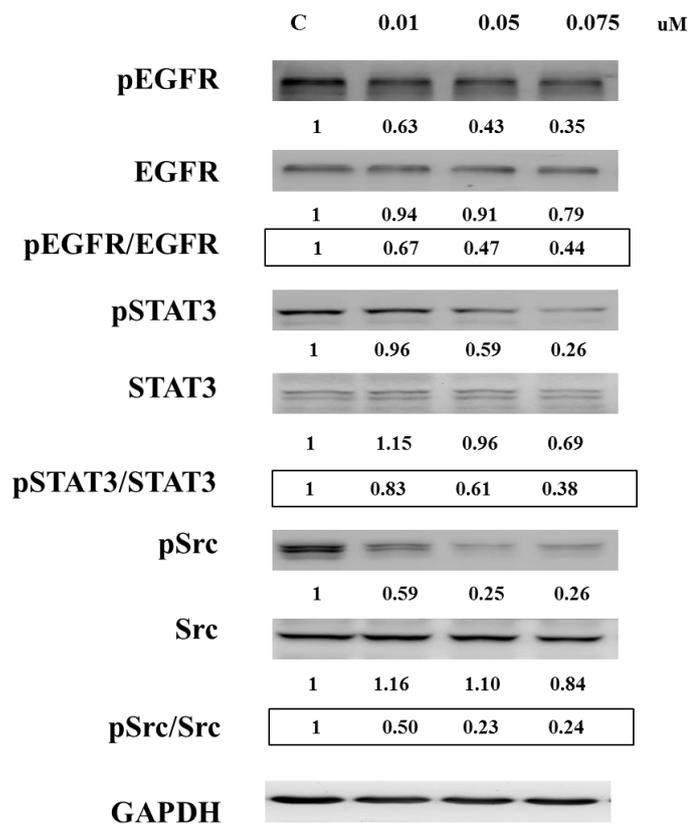
μM ；BEAS2B 處理 A10 和 A30 後，72 小時的 IC_{50} 分別為 $1.090 \mu\text{M}$ 和 $0.886 \mu\text{M}$ (圖十)。

從 IC_{50} 的結果可以發現處理 AC93253 和其衍生物對於正常的細胞株 BEAS2B 的濃度，都比處理肺癌細胞株的濃度要高，而且衍生物 A10 和 A30 的 IC_{50} 又大於 AC93253，所以我們可以得知 A10 和 A30 對正常人體細胞的毒殺性是小於 AC93253。將處理 A10 和 A30 的 PC9IR 細胞株和 BEAS2B 細胞株比較，可以發現 A30 對正常細胞 IC_{50} 是 $0.886 \mu\text{M}$ ，肺癌細胞的 IC_{50} 是 $0.479 \mu\text{M}$ ，相差 1.85 倍；A10 對正常細胞 IC_{50} 是 $1.090 \mu\text{M}$ ，肺癌細胞的 IC_{50} 是 $0.107 \mu\text{M}$ ，相差 10.18 倍。所以在肺癌細胞株半抑制濃度下，A10 對人體正常細胞的危害較 A30 小。

因此我們選擇 A10 來做 PC9IR 細胞株的細胞功能(Cell function) 實驗，觀察是否有機會可以抑制 PC9IR 細胞株的發展。

四、西方墨點法探討 A10 在不同濃度下對 PC9IR 細胞株中 Src 和其相關途徑中蛋白質表現量的影響

A10 以 0.01 μM 、0.05 μM 和 0.075 μM 處理 24 小時，並以 DMSO 做為控制組，比較不同濃度的 A10 對 PC9IR 細胞中 Src 和其相關途徑中蛋白質表現量的抑制能力。A10 對 PC9IR 的 IC_{50} 為 0.107 μM ，所以我們選擇小於半抑制濃度的 0.01 μM 、0.05 μM 和 0.075 μM 作為實驗濃度，0.01 μM 、0.05 μM 和 0.075 μM 分別為 A10 對 PC9IR 抑制 15%、抑制 25%和抑制 35%的濃度。



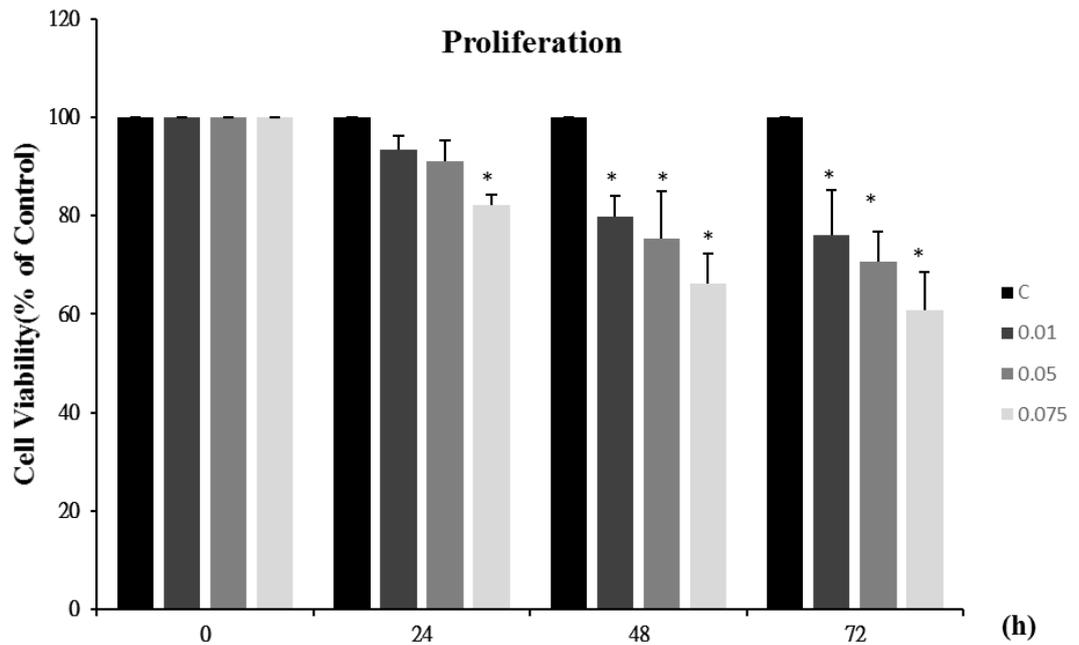
圖十一:西方墨點法探討 A10 在不同濃度下對 PC9IR 細胞株中 Src 和其相關途徑中蛋白質表現量的影響。

圖十一顯示，A10 在 0.01 μM 、0.05 μM 和 0.075 μM 濃度下，PC9IR 中 p-Src 活化比例分別為 50%、23%和 24%。可以發現在低濃度 0.01 μM 下就可以抑制 50% p-Src 的表現量，且在 0.05 μM 濃度下可以抑制近 75%。除此之外，與 Src 途徑相關的蛋白質如 EGFR、STAT3 的活化表現量也隨之下調。

五、探討 A10 對 PC9IR 細胞株增殖能力(Proliferation)的影響

癌細胞無節制的增長是腫瘤的形成主因，所以我們探討 A10 對 PC9IR 細胞的增殖能力（Proliferation）的影響。

將 2.5×10^3 顆 PC9IR 細胞種到 96 孔盤中 12-16 小時後加入 PrestoBlue® 試劑，再以 ELISA reader 讀取波長 570/600 nm 的吸光值做為第 0 小時。再加入 0.01 μM 、0.05 μM 和 0.075 μM 濃度 A10 處理 24、48、72 小時，並以 DMSO 做為控制組，每 24 小時加入 PrestoBlue® 試劑，再以 ELISA reader 讀取波長 570/600 nm 的吸光值，分析 PC9IR 細胞株在處理不同濃度 A10 後 0、24、48、72 小時細胞增殖的變化。



圖十二:不同濃度的 A10 抑制 PC9IR 細胞株的增生。

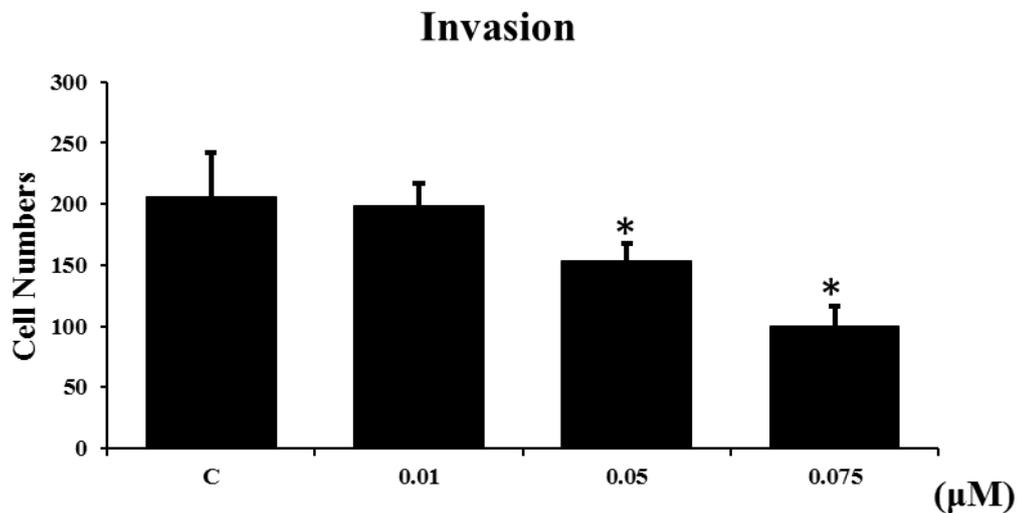
從圖十二顯示，隨著藥物濃度和時間增加，PC9IR 細胞株的增殖能力受到抑制。在第 24 小時，0.075 μM 濃度和控制組的增殖比例已出現明顯差異。在 48 小時和 72 小時，低濃度 (0.01 μM、0.05 μM) 和控制組也出現差異；表示 A10 可以抑制 PC9IR 細胞株增殖的能力。

(n=3, *代表其統計數值與不加藥組比較後，P value < 0.05，具有統計上的顯著差異)。

六、探討 A10 對 PC9IR 細胞株侵襲能力(Invasion)的影響

癌細胞的轉移是導致癌症病人死亡的主要原因，在肺癌病患當中肺癌細胞通常透過侵襲 (Invasion) 與轉移 (Metatasis) 使病情惡化。因此，我們利用 PC9IR 細胞穿過底部孔徑為 8 μM 多碳膜的雙層通透性培養盤和功能性類似細胞基質能力的不同來分析 A10 對 PC9IR 細胞侵襲能力之影響。

將 PC9IR 細胞株經過不同濃度的 A10 處理 (0.01 μM 、0.05 μM 和 0.075 μM) 24 小時後，以 2×10^4 細胞數種在 transwell 中進行實驗，於 24 小時後利用甲醇固定，並以吉姆氏染劑(Giemza)染色，計數 Mesh 上的總細胞數。



圖十三:不同濃度的 A10 抑制 PC9IR 細胞株侵襲能力。

圖十三顯示，PC9IR 細胞株處理藥物 24 小時後，不同濃度處理

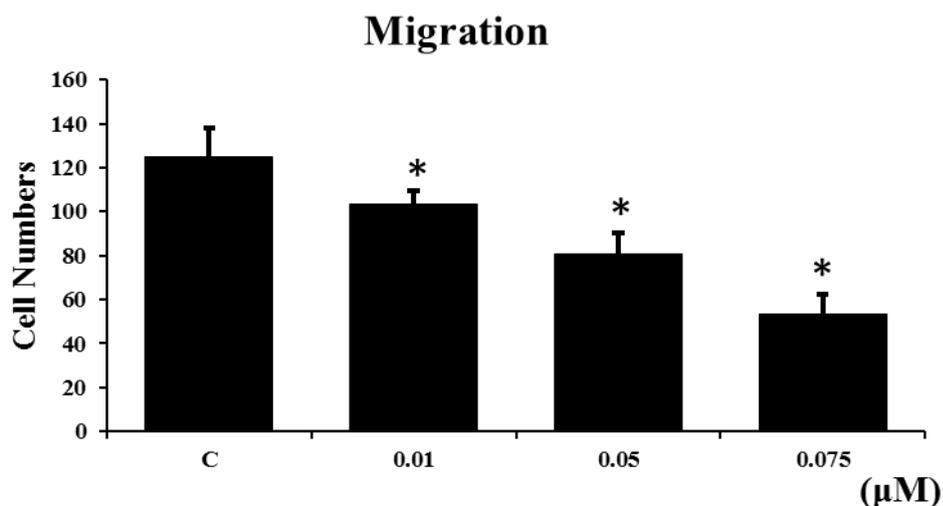
的組別與控制組相較下有顯著差異，且隨著藥物濃度增加，抑制癌細胞侵襲能力也隨著增加；表示 A10 可以抑制 PC9IR 細胞株侵襲能力。

(n=3, *代表其統計數值與不加藥組比較後，P value < 0.05，具有統計上的顯著差異)。

七、探討 A10 對 PC9IR 細胞株遷移能力的影響

癌細胞的轉移是導致癌症病人死亡的主要原因，在肺癌病患當中肺癌細胞通常透過侵襲 (Invasion) 與轉移 (Metastasis) 使病情惡化。因此，我們利用 PC9IR 細胞穿過底部孔徑為 8 μ M 多碳膜的雙層通透性培養盤 (Transwell) 能力的不同來分析 A10 對 PC9IR 細胞侵襲能力之影響。

將 PC9IR 細胞株經過不同濃度處理 (0.01 μ M、0.05 μ M 和 0.075 μ M) 24 小時後，以 1×10^4 細胞數種在 Transwell 中進行實驗，於 12 小時後利用甲醇固定，並以吉姆氏染劑 (Giemza) 染色，計數 Mesh 上的總細胞數。



圖十四:不同濃度的 A10 抑制 PC9IR 細胞株遷移能力。

圖十四顯示，PC9IR 細胞株處理藥物 24 小時後，不同濃度處理的組別與控制組相較下有顯著差異，且隨著藥物濃度增加，抑制癌細胞移動能力也隨著增加；表示 A10 可以抑制 PC9IR 細胞株移動能力。

(n=3，*代表其統計數值與不加藥組比較後，P value < 0.05，具有統計上的顯著差異)。

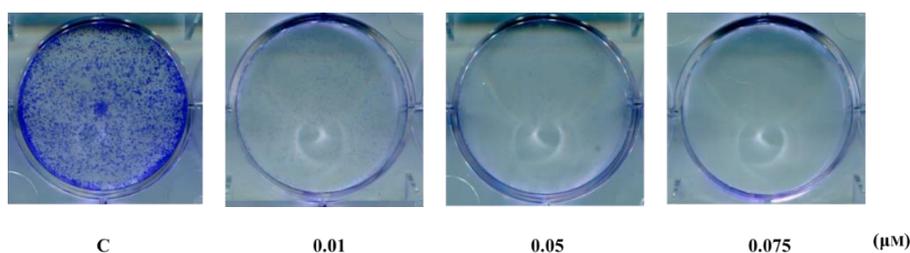
八、探討 A10 對 PC9IR 細胞株貼附性生長的影响

我們觀察到 A10 處理細胞後，有抑制 PC9IR 細胞株生長速度的情形。因此進一步觀察 A10 在處理細胞之後，對 PC9IR 細胞株聚落形成的影响。

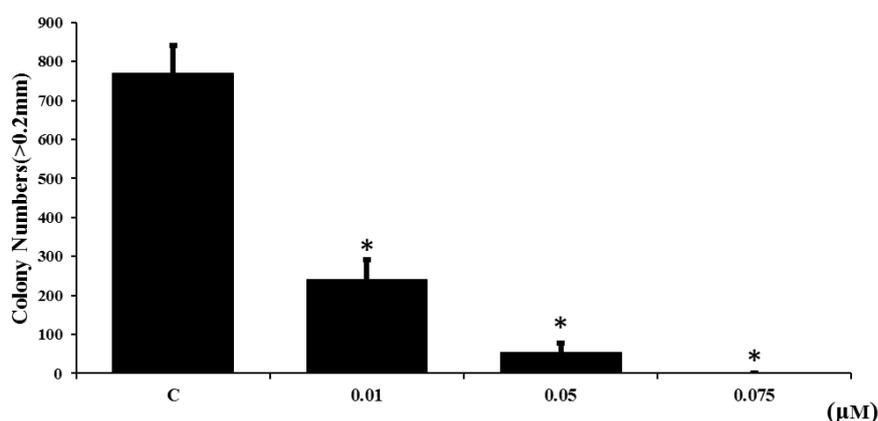
首先我們將 PC9IR 細胞株種植 5×10^2 細胞數於六孔盤細胞培養盤中，觀察細胞在貼附性生長 (Anchorage-dependent growth) 的情形，

培養 7-8 天後再以結晶紫染色，觀察細胞聚落形成的數目及大小 (colony 計數大小的標準為 ≥ 0.2 mm 的細胞聚落)，並計算聚落數目 (圖十五)。

(a)



(b)



圖十五: 不同濃度 A10 抑制 PC9IR 細胞株聚落形成能力 (colony formation/ Anchorage dependent)。

(a) 為實驗結果圖，由結果發現 (b)，PC9IR 細胞株處理不同濃度 A10 後與 control 組相比有顯著差異。在 0.01 μM 濃度下 PC9IR 細胞株聚落比例剩下 31.3%，在 0.05 μM 抑制比例剩下 7%，而在 0.075 μM 濃度下更可以 100% 抑制 PC9IR 細胞株聚落形成的能力；表示 A10 可以抑制 PC9IR 細胞株貼附性生長的能力。(n=3, *代表其統計數值

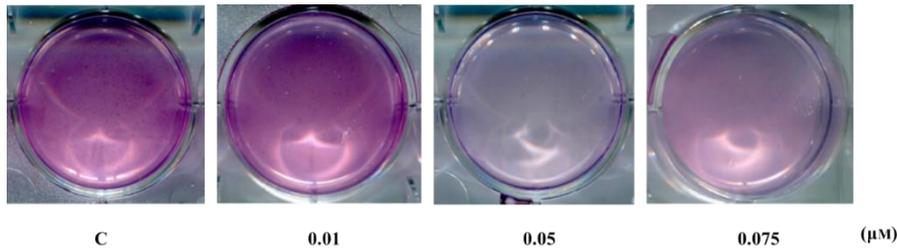
與不加藥組比較後，P value < 0.05，具有統計上的顯著差異）。

九、探討 A10 對 PC9IR 細胞株非貼附性生長的影响

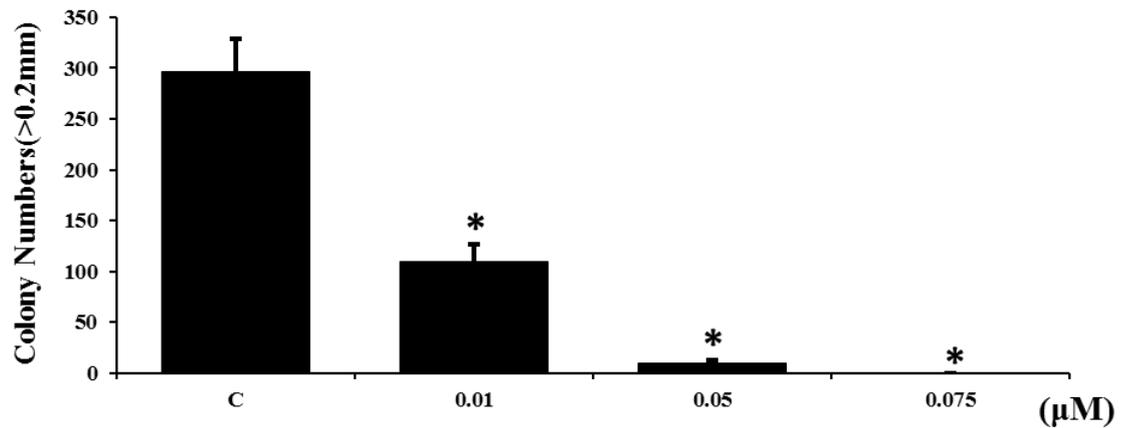
以軟瓊脂中細胞聚落形成實驗（Colony formation in soft agarose assay）探討 PC9IR 細胞株在處理 A10 後，對 PC9IR 細胞株聚落形成之影响。

將 1×10^4 細胞數目的 PC9IR 細胞種於含有 0.35% 軟瓊脂的六孔盤細胞培養盤中，觀察在非貼附性（Anchorage-independent growth）的情況下其細胞的生長能力，培養 2~3 星期直到聚落形成後，以 p-碘硝四挫紫（Iodonitrotetrazolium chloride）染色，觀察細胞聚落形成的數目及大小（colony 大小標準 ≥ 0.2 mm 的細胞聚落），計數聚落數目後，並以圖表表示(圖十六)。

(a)



(b)



圖十六:不同濃度的 A10 抑制 PC9IR 細胞株聚落形成的能力 (colony formation/ Anchorage independent)。

(a) 為實驗結果圖，由結果發現 (b)，PC9IR 細胞株處理不同濃度 A10 後與 control 組相比有顯著差異。在 0.01μM 濃度下 PC9IR 細胞株聚落比例剩下 37.2%，在 0.05 μM 抑制比例剩下 3.2%，而在 0.075 μM 濃度下更可以 100%抑制 PC9IR 細胞株聚落形成的能力；表示 A10 可以抑制 PC9IR 細胞株非貼附性生長的能力。(n=3，*代表其統計數值與不加藥組比較後，P value < 0.05，具有統計上的顯著差異)。

第四節、討論

我們選用 PC9IR 細胞株作為生物活性實驗模型，原因有兩個：第一、PC9IR 細胞株中 Src 表現量較其他肺癌細胞多，我們較好觀察 Src 蛋白表現量的增減³³。第二、PC9IR 細胞是對吉非替尼（Gefitinib）有抗藥性，Gefitinib 是 EGFR 抑制劑。EGFR 是 Src 訊息傳遞途徑的上游，但 EGFR 和 Src 之間存在著互相調控的關係。從西方墨點法的結果顯示(圖八)，在 p-Src 活化比例相較於 Control 組有明顯下降的組別，如 AC93253、Dasatinib、A10、A30 中，p-EGFR 的活化比例也有明顯的下降。此實驗結果可以證實，Src 和 EGFR 之間具有互相調節的關係，不用直接針對 EGFR 作抑制，藉由抑制 Src 就可以降低 EGFR 的表現量。

在利用西方墨點法探討 A10 對 PC9IR 細胞株中 Src 相關途徑的影響實驗中，除了 EGFR，Src 蛋白外，我們也觀察了 STAT3 蛋白的活化比例。STAT3 是一個轉錄因子，和細胞週期以及細胞凋亡有關；在非小細胞肺癌細胞株中發現 Src 活化時，同時也會伴隨著 STAT3 的活化¹⁹。STAT3 為 Src 下游蛋白。從圖十一中可以發現，隨著 A10 濃度的增加，Src 的活化比例也隨之下降，而 Src 的下游蛋白 STAT3 的活化比例也隨之下降。

先前的研究中證實 Src 蛋白與許多細胞功能途徑有關³⁷，所以

當我們從西方墨點法和細胞存活測試實驗中確認A10可以抑制Src蛋白活化比例和可以有效殺死PC9IR細胞株後，我們探討A10對PC9IR細胞功能的影響。從細胞功能實驗結果圖(圖十二、圖十三、圖十四、圖十五、圖十六)可以發現，A10在低濃度下就可以抑制PC9IR細胞株細胞功能的發展，A10藉由抑制PC9IR細胞株中Src蛋白的活化，達到抑制PC9IR細胞的增殖、貼附、侵襲、移動與轉移能力。驗證先前研究中提出Src與細胞的存活、增生、遷移、侵襲和血管新生之間的訊息傳遞途徑有關。

在尋找AC93253相關文獻時，發現有研究指出AC93253可以作為SIRT2抑制劑³⁸，且SIRT2和Src蛋白之間具有互相調節的能力，於是我們嘗試探討AC93253、SIRT2和Src蛋白之間的關係。2014年You Hee Choi研究中指出，Src的活化會使SIRT2磷酸化而失去活性，Src與SIRT2之間存在負調控的關係³⁹。原本我們預期藉由Src和SIRT2之間上下游的關係來找到AC93253抑制的目標蛋白，但是從我們的實驗結果和先前的研究結果中可以發現，AC93253針對Src和SIRT2皆有抑制效果。

這是一個很有趣的發現，先前的研究結果顯示 Src 會負調控SIRT2，當 AC93253 抑制 Src 蛋白時，理論上 SIRT2 應會受到負調控而增加表現量，但從先前的研究結果可以發現，加入 AC93253 也可

以作為 SIRT2 蛋白的抑制劑。

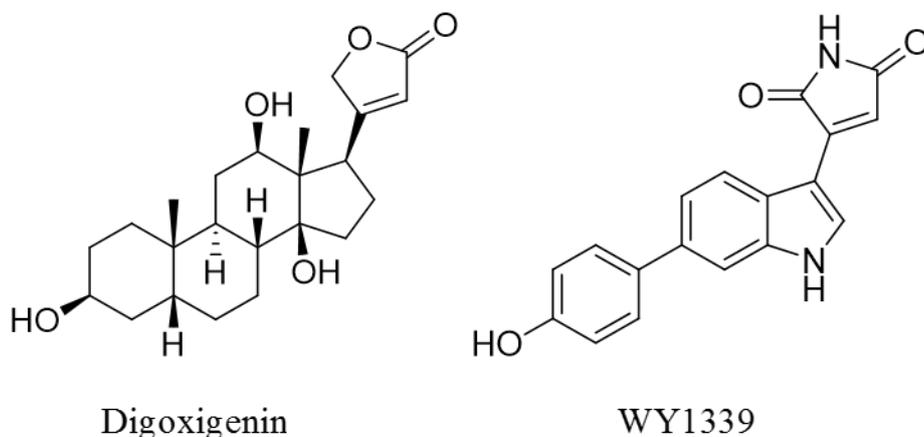
我們推測是因為 AC93253 會同時抑制 Src 和 SIRT2 的表現量，且 AC93253 會藉由抑制肺癌細胞中 Src 表現量達到抑制肺癌細胞功能的效果，如果要探討 AC93253 對 SIRT2 抑制後的效果，可能需要去實驗不同的 SIRT2 抑制劑對癌症細胞功能的影響。

第三章、吲哚衍生物合成與構效關係

為了抑制 Src 蛋白在肺癌細胞中過度活化，本研究以化學合成的方法來發展新穎的小分子化合物作為 Src 蛋白的抑制劑。

先前研究中，以生物活性篩選的方式對分子庫中約 400-500 種化合物進行 MTT 實驗對人類肺腺癌細胞 A549 進行細胞毒性的篩選，結果顯示 Digoxigenin 對肺腺癌細胞 A549 具有毒殺效果³³。

先前本實驗室以 Digoxigenin 作為先導化合物，探討其結構對生物活性影響的關係。由於 Digoxigenin 屬於天然物，較難由有機合成的方式合成出相似的結構，所以先前實驗室以吲哚和吲哚啉為主體，合成出一系列平面的衍生物，並且探討衍生物平面結構和 Digoxigenin 非平面結構對抑制肺癌細胞活性的影響³¹。



圖十七: Digoxigenin 和 WY1339 結構。

其中衍生物 WY1339 對肺腺癌細胞株 A549 具有最佳的生物活性 (圖十七)。但是跟 Digoxigenin 生物活性相比，沒有非常明顯的改善。故本研究以 WY1339 結構來設計一系列衍生物，保留結構中吡啶的部分作為平面主體，在吡啶中加入不同長度、不同親水性疏水性的官能基。並且嘗試在吡啶接上非平面結構的雜環，使結構趨近於 Digoxigenin 的非平面結構。

我們同時利用 Discovery Studio 軟體中的 CDock 來模擬不同衍生物和 Src 蛋白之間的交互作用力，計算其在 Src 蛋白中的 CDocking Energy 作為參考，合成出衍生物後對人類肺腺癌細胞 A549 進行毒殺實驗，探討其活性與結構的關係，來發展新穎的 Src 抑制劑。

第一節、實驗材料與方法

一、化學試劑與儀器介紹

1. 有機合成所使用的一般試藥購自 Aldrich、Alfa Aesar、Acros、日本東京化成工業株式會社 TCI 及 Merk 藥廠。反應、萃取及沖提用的溶劑如正己烷、乙酸乙酯及二氯甲烷均為試藥級，購自景明化工股份有限公司及友和貿易股份有限公司。
2. 薄層色層分離(thin layer chromatography)使用德國默克藥廠 Silica gel 60 F254 型薄層色層分離片。利用紫外光燈(UV light)直接觀察
3. 管柱層析分離(column chromatography)使用加拿大 SILICYCLE Silica gel60-200 μm (70-230 mesh) 型矽膠。
4. 減壓濃縮使用 BÜCHI R114 迴旋蒸發儀和 EYELA A-1000S 循環水流抽氣機，室溫下真空度約為 25 mmHg。
5. 氫核磁共振光譜(^1H NMR)使用 Bruker 400 (400 MHz solars system)，碳核磁共振光譜(^{13}C NMR)使用 Bruker 400 (400 MHz solars system)。測試樣品使用氘氯仿(CDCl_3)、丙酮 (Acetone-d_6)、二甲基亞砜(DMSO-d_6)為溶劑，以四甲基矽烷 (tetramethylsilane)為內部基準(internal standard)。化學位移以 ppm 為單位，J 代表偶合常數(coupling constant)，單位為 Hz。分裂形式 (splitting pattern)定義如下:s 代表單峰(singlet)；d 代表雙重峰 (doublet)；t 代表三重峰

(triplet)；m 代表多重峰(multiplet)。

6. 高解析質譜(high resolution mass spectroscopy)委託科技部中部貴重儀器中心，國立中興大學貴重儀器中心，質譜儀型號為 Finnigan / Thermo Quest MAT95xl。

二、Discovery studio 操作

利用 SWISS MODLE 程式模擬人類 Src 蛋白質結構後，開啟 Discovery studio 軟體後開啟新視窗，將模擬的人類 Src 蛋白質結構檔案匯入，點選 **Macromolecules** 中 **Prepare Protein** 之選項，經由程式計算後得到格式化的蛋白質結構，選取欲鍵結胺基酸位點。

在 Ligand 的製備上，先以 ChemDraw 畫出化合物小分子，儲存成 MDL Molfile V3000(*.mol)的檔案類型，以 WordPad 開啟檔案後，修改檔名。在開啟另一新視窗，將小分子的 MDL Molfile V3000(*.mol) 檔案匯入，選擇小分子後點選 **Small Molecules** 中 **Minimize Ligand** 的 **Full Minimization** 的選項，將 ligand 經由計算得到穩定的構型。將計算完畢的 Ligand 匯入蛋白質視窗，點選 **Receptor-Ligand Interactions** 中 **Dock Ligands** 的 Dock Ligand，進行分子對接模擬實驗。

將不同 Ligand 進行分子對接實驗後，計算出不同 Ligand 和 Src 結構之間的 CDocker Energy 之高低，並和其生物活性進行比較。

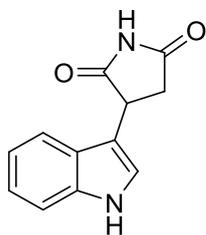
CDocker Energy 是 Discovery studio 程式計算化合物在最穩定構型下與蛋白質鍵結的能量，計算公式如下⁴⁰:

$$E_{\text{binding}} = E_{\text{complex}} - (E_{\text{protein}} - E_{\text{ligand}})$$

計算出 CDocker Energy 後，能量越低表示化合物與蛋白質的鍵結能力越好，此數據可以作為設計衍生物結構的參考。

三、有機合成

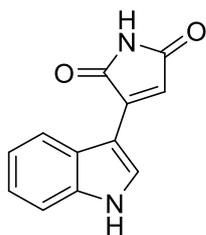
3-(1H-inden-3-yl)pyrrolidine-2,5-dione (**L11**)



取 indole (50 mg, 0.427 mmol) 與 maleimide (50 mg, 0.513 mmol) 溶於 dichloroethane (10 mL) 後，再加入 AlCl_3 (28.4 mg, 0.214 mmol) 並迴流 30 分鐘，反應完成後用 EA 及飽和食鹽水萃取，將有機層用無水硫酸鎂除水並濃縮後，再利用管柱層析純化即可得產物。產率 80%

$R_f=0.31$ (50% EA/Hexane); mp 198-201 °C; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 3.03 (dd, $J=5.2, 5.6$ Hz, 1H), 3.28 (dd, $J=9.6, 9.6$ Hz, 1H), 4.42 (dd, $J=4.8, 5.6$ Hz, 1H), 7.18 (t, $J=14.44$ Hz, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.26 (d, $J=7.44$ Hz, 1H), 7.43 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 7.49 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 8.04 (br, 1H), 8.18 (br, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (Acetone- d_6 , 100 MHz) δ 37.58, 39.43, 111.66, 111.78, 118.63, 119.09, 121.72, 122.86, 126.35, 137.08, 176.88, 178.80。MS(EI): m/z $[\text{M}]^+$: 214.0748。

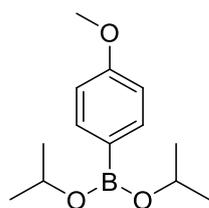
3-(1H-inden-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione (L12)



取 L11 (50 mg, 0.235 mmol) 溶於 DCE(10 mL) 中，加入 DDQ (53.3 mg, 0.235 mmol)，在室溫下攪拌 5 分鐘，反應完成後用 EA 和飽和食鹽水萃取，將有機層用無水硫酸鎂除水並濃縮後，再利用管柱層析純化即可得產物。產率 70%

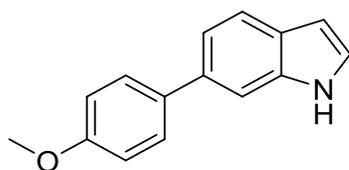
$R_f = 0.40$ (50% EA/Hexane) ; mp 257-260 °C ; $^1\text{H NMR}$ (Acetone- d_6 , 400 MHz) δ 6.72(s, 1H) , 7.25-7.30 (m, 2H), 7.58 (d, $J=6.3$ Hz, 1H), 7.98 (d, $J=6.3$ Hz, 1H), 8.48 (s, 1H), 9.56 (br, 1H), 11.12 (br, 1H) ; $^{13}\text{C NMR}$ (Acetone- d_6 , 100 MHz) δ 106.03, 112.46, 115.64, 120.26, 121.57, 123.12, 126.07, 130.96, 137.07, 140.06, 172.38, 172.62 。 MS(EI) : m/z $[\text{M}]^+$: 212.0594 。

diisopropyl (4-methoxyphenyl)boronate



將反應瓶用氮氣完全除氣後，取 1-bromo-4-methoxybenzene (0.5 mL，3.994 mmol) 溶於無水 THF (10 mL)，加入 2.5 M n-Butyllithium (2.5 mL，6.250 mmol)，在 -78 °C 下反應 30 分鐘後再加入 triisopropyl borate (2.76 mL，11.960 mmol)，在室溫中反應 12 小時，反應完成後用 EA 和飽和食鹽水萃取，將有機層用無水硫酸鎂除水並濃縮後可以到白色固體並直接進行下一步反應(產率 100%)。

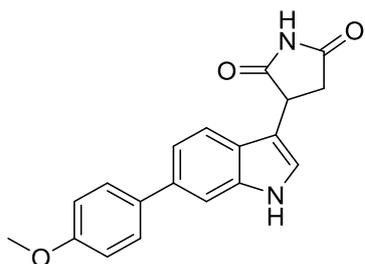
6-(4-methoxyphenyl)-1H-indole (**L41**)



取 diisopropyl (4-methoxyphenyl)boronate (50 mg, 0.212 mmol) 與 6-bromo-1H-indole (41.3 mg, 0.212 mmol) 溶於 THF/H₂O(4:1)(10 mL), 加入 K₂CO₃ 及 Pd(dppf)Cl₂ 並迴流 3 小時, 反應完成後用 EA 及飽和食鹽水萃取, 將有機層用無水硫酸鎂除水並濃縮後, 再利用管柱層析純化即可得產物。產率 80%

R_f =0.45 (20% EA/Hexane); mp 103-105 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 3.87(s, 3H), 6.57 (s, 1H), 7.00 (d, *J*=8.7 Hz, 2H), 7.22 (s, 1H), 7.36 (d, *J*=8.1 Hz, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.59 (d, *J*=8.7 Hz, 2H), 7.69 (d, *J*=8.3 Hz, 1H), 8.17(br, 1H); ¹³C NMR (Acetone-d₆, 100 MHz) δ 54.67, 54.94, 101.33, 109.03, 114.12, 114.57, 115.73, 118.54, 120.43, 125.22, 127.20, 127.92, 134.35, 134.92, 137.06。MS(EI): *m/z* [M]⁺: 223.1。

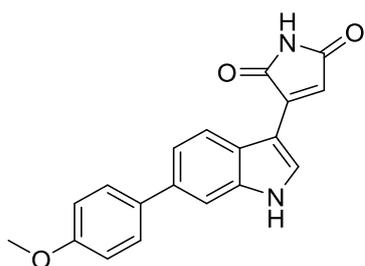
3-(6-(4-methoxyphenyl)-1H-indol-3-yl)pyrrolidine-2,5-dione(L42)



取 L41 (50 mg , 0.224 mmol)與 maleimide (26.1 mg , 0.269 mmol)溶於 dichloroethane (10 mL)後 , 再加入 AlCl_3 (14.9 mg, 0.112 mmol)並迴流 15 分鐘 , 反應完成後用 EA 及飽和食鹽水萃取 , 將有機層用無水硫酸鎂除水並濃縮後 , 再利用管柱層析純化即可得產物。產率 75%

$R_f=0.30$ (50% EA/Hexane) ; mp 242-244 °C ; $^1\text{H NMR}$ (Acetone- d_6 , 400 MHz) δ 2.90 (dd, $J=5.32, 5.2$ Hz, 1H), 3.35(dd, $J=9.64, 9.72$ Hz, 1H), 3.85 (s, 3H), 4.48 (dd, $J=5.28, 5.32$ Hz, 1H), 7.02 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.34 (d, $J=8.3$ Hz, 1H) , 7.39 (s, 1H), 7.59-7.63 (m, 3H) , 7.64 (s, 1H), 10.15 (br, 1H), 10.29 (br, 1H) ° ; $^{13}\text{C NMR}$ (Acetone- d_6 , 100 MHz) δ 37.55, 39.45, 109.40, 111.81, 114.14, 118.57, 118.96, 123.34, 125.35, 127.97, 134.67, 134.91, 137.79, 158.93, 176.74, 178.64 ° MS(EI) : m/z $[\text{M}]^+$: 320.1169 °

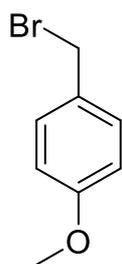
3-(6-(4-methoxyphenyl)-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione (**L43**)



取 L42 (50 mg, 0.156 mmol) 溶於 DCE (10 mL) 中，加入 DDQ (35.4 mg, 0.156 mmol)，在室溫下攪拌 5 分鐘，反應完成後用 EA 和飽和食鹽水萃取，將有機層用無水硫酸鎂除水並濃縮後，再利用管柱層析純化即可得產物。產率 85%

$R_f = 0.42$ (50% EA/Hexane); mp 238-240 °C ; $^1\text{H NMR}$ (Acetone- d_6 , 400 MHz) δ 3.85(s, 3H), 6.75 (s, 1H), 7.04 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.54 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.65 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.78 (s, 1H), 8.03 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 8.49 (s, 1H), 9.59 (brs, 1H), 11.16 (brs, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (Acetone- d_6 , 100 MHz) δ 54.72, 106.06, 110.09, 114.27, 115.75, 120.58, 120.81, 124.88, 128.06, 131.40, 133.88, 136.29, 137.81, 139.96, 159.25, 172.28, 172.56。MS(EI): m/z $[\text{M}]^+$: 318.1000。

1-(bromomethyl)-4-methoxybenzene (**L51**)

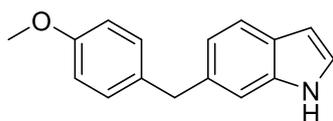


取 4-Methoxybenzyl alcohol (100 μ l, 0.803 mmol) 溶於 Et₂O (10 mL), 在冰浴下緩慢滴入 PBr₃ (38.1 μ l, 0.402 mmol) 後攪拌 2 小時, 加入飽和 NaHCO₃ 水溶液中和溴離子, 加入 EA 萃取後, 將有機層用無水硫酸鎂除水並濃縮可得產物。產率 100%

R_f = 0.70 (20% EA/Hexane); ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 3.89 (s, 1H), 4.55 (s, 1H), 6.91-6.93 (d, *J*=8Hz, 2H), 7.36-7.38 (d, *J*=8Hz, 2H)。¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 34.63, 55.43, 114.39, 130.14, 130.77, 159.85。

MS(EI) : m/z [M]⁺ : 200。

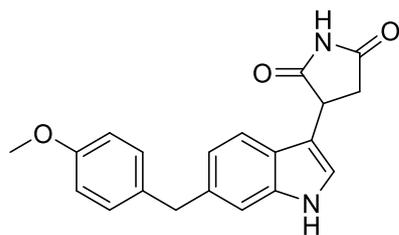
6-(4-methoxybenzyl)-1H-indole (**L52**)



取 6-Indolylboronic acid (100 mg, 0.50 mmol) 與 1-(bromomethyl)-4-methoxybenzene (1.5 mmol) 溶於 THF/H₂O(4:1)(10 mL), 加入 K₂CO₃ 及 Pd(dppf)Cl₂ 並迴流 14 小時, 反應完成後用 EA 及飽和食鹽水萃取, 將有機層用無水硫酸鎂除水並濃縮後, 再利用管柱層析純化即可得產物。產率 97%

R_f = 0.64 (20% EA/Hexane); mp 42-43 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 3.79 (s, 3H), 4.04 (s, 2H), 6.50 (s, 1H), 6.84 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.98 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.11-7.17 (m, 4H), 7.55 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.09 (br, 1H)。
¹³C NMR (Acetone-d₆, 100 MHz) δ 30.42, 40.97, 54.51, 101.24, 111.08, 111.21, 113.52, 113.63, 118.46, 118.75, 119.99, 120.60, 121.18, 122.71, 124.31, 129.40, 129.71, 157.97。MS(EI): *m/z* [M]⁺: 237.1。

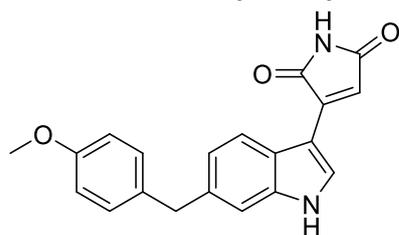
3-(6-(4-methoxybenzyl)-1H-indol-3-yl)pyrrolidine-2,5-dione (**L53**)



取 L52 (50 mg, 0.211 mmol)與 maleimide (22.5 mg, 0.232 mmol)溶於 DCE (10 mL)後，再加入 AlCl₃ (14 mg, 0.105 mmol)並迴流 5 分鐘，反應完成後用 EA 及飽和食鹽水萃取，將有機層用無水硫酸鎂除水並濃縮後，再利用管柱層析純化即可得產物。產率 73%

R_f =0.33 (50% EA/Hexane) ; mp 130-132 °C ; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 2.98 (dd, *J*= 5.24, 5.28 Hz, 1H), 3.29(dd, *J*= 9.0, 9.5 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 4.02 (s, 2H), 4.34 (dd, *J*=4.3, 5.3 Hz, 1H), 6.83 (d, *J*=8.6 Hz, 2H), 7.01 (d, *J*=8.2 Hz, 1H) , 7.09-7.15 (m, 4H) , 7.39 (d, *J*=8.2 Hz, 1H), 7.98-8.12 (br, 2H) ; ¹³C NMR (Acetone-d₆, 100 MHz) δ37.55, 39.46, 40.89, 54.53, 111.48, 111.71, 113.65, 118.50, 120.64, 122.48, 124.63, 129.71, 134.17, 135.76, 137.47, 158.08, 176.72, 178.63 。 MS(EI) : m/z [M]⁺ : 334.1319 。

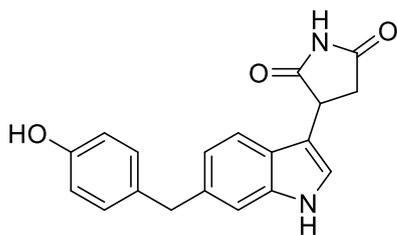
3-(6-(4-methoxybenzyl)-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione (**L54**)



取 L53 (50 mg, 0.150 mmol) 溶於 DCE (10 mL) 中，加入 DDQ (34 mg, 0.0150 mmol)，在室溫下攪拌 5 分鐘，反應完成後用 EA 和飽和食鹽水萃取，將有機層用無水硫酸鎂除水並濃縮後，再利用管柱層析純化即可得產物。產率 72%

$R_f = 0.50$ (50% EA/Hexane); mp 164-166 °C ; $^1\text{H NMR}$ (Acetone- d_6 , 400 MHz) δ 3.76(s, 3H), 4.04 (s, 2H), 6.67 (s, 1H), 6.85 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.14-7.20 (m, 3H), 7.37 (s, 1H), 7.88 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 8.42 (s, 1H), 9.51 (br, 1H), 10.97 (br, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (Acetone- d_6 , 100 MHz) δ 13.45, 22.43, 40.72, 54.55, 112.24, 113.75, 113.75, 115.45, 120.15, 123.01, 129.78, 130.74, 133.73, 137.46, 172.31, 172.57。MS(EI): m/z $[\text{M}]^+$: 332.1168。

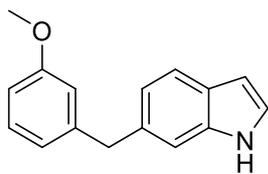
3-(6-(4-hydroxybenzyl)-1H-indol-3-yl)pyrrolidine-2,5-dione (**L55**)



取 L53 (50 mg, 0.150 mmol) 溶於 DCE (10 mL) 中，在冰浴條件下緩慢滴入 BBr_3 (37.5 mg, 0.150 mmol) 後，置於室溫中反應 5 分鐘，反應完成後用 EA 和飽和食鹽水萃取，將有機層用無水硫酸鎂除水並濃縮後，再利用管柱層析純化即可得到產物。產率 60%

$R_f = 0.30$ (100% EA); mp 114-127 °C ; $^1\text{H NMR}$ (Acetone- d_6 , 400 MHz) δ 3.28 (dd, $J=9.7, 8.4$ Hz, 1H), 3.95 (s, 2H), 4.40 (dd, $J=5.4, 4.4$ Hz, 1H), 6.74 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 6.93 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 7.05 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.21 (s, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.44 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 8.05 (s, 1H), 10.06 (br, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (Acetone- d_6 , 100 MHz) δ 37.56, 39.47, 40.94, 111.47, 115.06, 118.45, 120.65, 122.44, 124.58, 129.74, 129.74, 132.92, 135.96, 137.48, 155.56, 176.77, 178.68。MS(EI): m/z $[\text{M}]^+$: 320.1158。

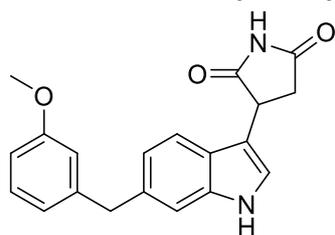
6-(3-methoxybenzyl)-1H-indole (**L62**)



取 6-Indolylboronic acid (100 mg , 0.50 mmol) 與 3-Methoxybenzyl bromide (1.5 mmol) 溶於 THF/H₂O(4:1)(10 mL) , 加入 K₂CO₃ 及 Pd(dppf)Cl₂ 並迴流 14 小時, 反應完成後用 EA 及飽和食鹽水萃取, 將有機層用無水硫酸鎂除水並濃縮後, 再利用管柱層析純化即可得產物。產率 74%。

R_f=0.62 (20% EA/Hexane) ; mp 85-87 °C ; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 3.77 (s, 3H), 4.07(s, 2H), 6.51 (s, 1H), 6.73-6.85 (m, 3H), 7.00 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 7.13-7.23 (m, 3H) , 7.56 (d, *J*=8.2 Hz, 1H), 8.02 (br, 1H) ; ¹³C NMR (Acetone-d₆, 100 MHz) δ42.22, 55.19, 102.40, 111.15, 111.30, 114.88, 120.61, 121.49, 121.55, 123.99, 126.25, 129.40, 135.00, 136.23, 143.60, 159.75。MS(EI) : m/z [M]⁺ : 237.1。

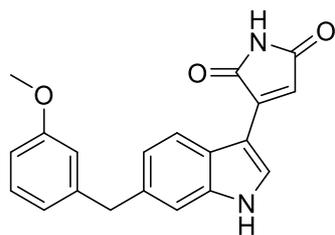
3-(6-(3-methoxybenzyl)-1H-indol-3-yl)pyrrolidine-2,5-dione(L63)



取 L62 (50 mg, 0.211 mmol)與 maleimide (24.6 mg, 0.253 mmol)溶於 dichloroethane (10 mL)後，再加入 AlCl₃ (14 mg, 0.105 mmol)並迴流 5 分鐘，反應完成後用 EA 及飽和食鹽水萃取，將有機層用無水硫酸鎂除水並濃縮後，再利用管柱層析純化即可得產物。產率 70%。

R_f=0.31 (50% EA/Hexane); mp 129-131 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 2.87 (dd, *J*= 5.2, 5.2 Hz, 1H), 3.17(dd, *J*= 8.9, 9.6 Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 4.02 (s, 2H), 4.22 (dd, *J*=4.3, 5.2 Hz, 1H), 6.72-6.82 (m, 3H), 6.94 (s, 1H), 6.99 (d, *J*=8.2 Hz, 1H), 7.10 (s, 1H), 7.19 (t, *J*=7.8 Hz, 1H), 7.36 (d, *J*=8.2 Hz, 1H), 8.14 (br, 1H), 8.82 (br, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 29.72, 37.63, 39.59, 42.08, 55.17, 110.89, 111.25, 111.708, 114.89, 118.41, 121.45, 121.73, 122.10, 124.02, 129.42, 135.88, 137.00, 143.22, 159.71, 176.62。MS(EI) : m/z [M]⁺ : 334.1313。

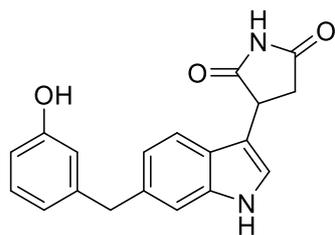
3-(6-(3-methoxybenzyl)-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione (L64)



取 L63(50 mg, 0.150 mmol)溶於 DCE(10 mL)中，加入 DDQ(34 mg, 0.150 mmol)，在室溫下攪拌 5 分鐘，反應完成後用 EA 和飽和食鹽水萃取，將有機層用無水硫酸鎂除水並濃縮後，再利用管柱層析純化即可得產物。產率 76%。

$R_f=0.46$ (50% EA/Hexane) ; mp 186-189 °C ; $^1\text{H NMR}$ (Acetone- d_6 , 400 MHz) δ 3.88(s, 3H) ,6.86 (s, 1H), 7.20-7.24 (m, 1H), 7.32-7.40 (m, 2H), 7.48 (t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.77 (d, $J=8.5$ Hz, 1H), 8.07 (s, 1H), 8.15 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 8.67 (s, 1H), 9.63 (br, 1H), 11.39 (br, 1H) ; $^{13}\text{C NMR}$ (Acetone- d_6 , 100 MHz) δ 41.62, 54.47, 106.02, 111.13, 112.37, 114.72, 115.49, 120.17, 121.14, 123.07, 124.37, 129.31, 130.80, 136.81, 137.55, 140.07, 143.35, 159.97, 172.32, 172.57。MS(EI) : m/z $[\text{M}]^+$: 332.1158。

3-(6-(3-hydroxybenzyl)-1H-indol-3-yl)pyrrolidine-2,5-dione (**L65**)

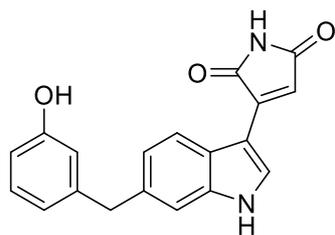


取 L63 溶於 DCE 中，在冰浴條件下緩慢滴入 1 當量的 BBr_3 後，置於室溫中反應 5 分鐘，反應完成後用 EA 和飽和食鹽水萃取，將有機層用無水硫酸鎂除水並濃縮後，再利用管柱層析純化即可得到產物。產率 64%。

$R_f = 0.33$ (100% EA) ; mp 225-227 °C ; $^1\text{H NMR}$ (Acetone- d_6 , 400 MHz) δ 2.84 (dd, $J=8.8, 5.2$ Hz, 1H), 3.30 (dd, $J=2.5, 2.5$ Hz, 1H), 3.99 (s, 2H), 4.43 (dd, $J=2.2$ Hz, 1H), 6.64-6.68 (m, 2H), 6.74 (d, $J=7.8$ Hz, 1H) , 6.94 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 7.09 (t, $J=2.8$ Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.31 (d, $J=6.8$ Hz, 1H), 7.47 (d, $J=8.1$ Hz, 1H) , 8.13 (s, 1H), 10.09 (br, 2H) ; $^{13}\text{C NMR}$ (Acetone- d_6 , 100 MHz) δ 37.54, 39.46, 41.68, 111.69, 112.74, 115.73, 118.5, 119.96, 120.79, 122.55, 129.17, 135.15, 137.45, 157.44, 176.71 。

MS(EI) : m/z $[\text{M}]^+$: 320.1163 。

3-(6-(3-hydroxybenzyl)-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione (**L66**)



取 L64 溶於 DCE 中，在冰浴條件下緩慢滴入 1 當量的 BBr_3 後，置於室溫中反應 5 分鐘，反應完成後用 EA 和飽和食鹽水萃取，將有機層用無水硫酸鎂除水並濃縮後，再利用管柱層析純化即可得到產物。產率 76%。

$R_f = 0.66$ (100% EA) ; mp 258-260 °C ; $^1\text{H NMR}$ (Acetone- d_6 , 400 MHz) δ 4.05 (s, 2H), 6.67-6.69 (d, $J=8$ Hz, 1H), 6.70 (s, 1H), 6.71 (s, 1H), 6.75-6.77 (d, $J=7.3$ Hz, 1H), 7.12 (t, 1H), 7.17-7.19 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.90-7.92 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.44-8.45 (d, $J=3.0$ Hz, 1H), 9.56 (s, 1H), 11.03 (s, 1H) ; $^{13}\text{C NMR}$ (Acetone- d_6 , 100 MHz) δ 41.51, 106.02, 112.41, 112.89, 115.49, 115.79, 120.01, 120.15, 123.15, 129.29, 130.77, 136.88, 137.43, 140.06, 143.33, 157.50, 172.29, 172.56。MS(EI) : m/z $[\text{M}]^+$: 318.1010。

四、生物活性實驗方法

一、衍生物對肺癌細胞 A549 毒性測試由中興大學生物醫學研究所陳健尉老師實驗室所操作

二、酵素結合免疫吸附分析法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

使用 DuoSet Human Phospho-Src(Y418)套組來偵測磷酸化 Src 的表現量。

(一)細胞樣品前處理

計算 1.5×10^5 細胞數/well 培養於 6 孔培養盤中，培養 18~24 小時候，加入含有藥物的培養液 1 mL/well，培養 24 小時候，吸掉培養液，以冰的 1xPBS 緩衝液潤洗，在吸乾殘餘的 1xPBS 緩衝液；加入 20 μ L Lysis Buffer#6，再以細胞刮勺將細胞刮下，並將細胞懸浮液收集於離心管，於 4 $^{\circ}$ C 下作用 30 分鐘，每 5 分鐘震盪一次，幫助裂解細胞。於 4 $^{\circ}$ C 下 12,000 rpm 離心 15 分鐘，吸取上清液至另一微量離心管，並進行蛋白質定量。再以 IC Diluent#8 稀釋細胞蛋白萃取液(Lysata)6 倍，並以 IC Diluent#3 做序列稀釋，使待測樣品及標準品中尿素濃度為 1M。

標準曲線(Standard curve)至少應有 5 個點，再以兩倍序列稀釋，以 IC Diluent#3 進行序列稀釋，其最小濃度為 0 pg/mL，最

高濃度為 500 pg/mL，分別為 0 pg/mL、16.625 pg/mL、31.25 pg/mL、62.5 pg/mL、125 pg/mL、500 pg/mL。

(二)培養盤前處理

以 1xPBS 緩衝液稀釋初級抗體(Capture antibody)至反應濃度為 4μg/mL 後，加入 100 μL/well 至 8 連排培養盤中，密封於 4 °C 反應至隔夜。吸棄初級抗體後，以每 well 適量 wash buffer(0.05% Tween-20 in PBS, pH = 7.2~7.4)沖洗 6~8 次(簡稱此步驟為清洗步驟)，每次都要將液體清除乾淨；加入 300 μL/well 阻斷緩衝液(Block buffer)，置於室溫反應 1~2 小時後，重複清洗步驟。

(三)檢測步驟

加入 100 μL/well 待測樣品或標準品，密封後並於室溫反應 2 小時之後，重複清洗步驟。以 IC Diluen#1 偵測稀釋抗體(Detection antibody)至反應濃度 500 ng/mL 後，並加入 100μL/well，密封後並於室溫反應 2 小時，重複清洗步驟。使用 IC Diluen#1 為溶劑，以 1:2000 的比例稀釋 Streptavidin HRP 至反應濃度後，加入 100μL/well，避光下於室溫反應 1 小時後，重複清洗步驟。加入 100μL/well 受質溶液(Substrate solution)避光下於室溫反應 20 分鐘後，加入 50μL/well 終止溶液(Stop solution, 2N H₂SO₄)，並輕敲培養盤以確保 well 中溶液充分混合。以酵素免疫判讀機(ELISA reader)讀取吸光值 OD_{450 nm} 和

OD_{570 nm}，以 OD_{570 nm} 吸光值扣掉 OD_{450 nm} 吸光值來計算磷酸化 Src 的表現量。

Lysis Buffer#6 (1 mM EDTA、0.5% Triton-x100、5 mM NaF、10 µg/mL Leupeptin、10 µg/mL peptatin、100 µM PMSF、3µg/mL Aprotinin in PBS、2.5 mM Sodium pyrophosphate、1 mM activated sodium orthovanadate in PBS, pH = 7.2~7.4)

IC Diluent#1 (1% BSA in PBS, pH = 7.2~7.4、0.22µm filtered)

IC Diluent#3 (1 mM EDTA、0.5% Triton-x100、5 mM NaF、1M urea in PBS, pH = 7.2~7.4)

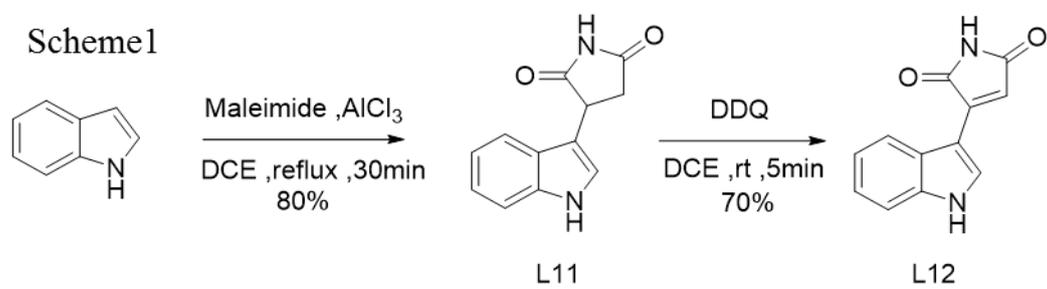
IC Diluent#8 (1 mM EDTA、0.5% Triton-x100、5 mM NaF in PBS, pH = 7.2~7.4)

阻斷緩衝液 (Block Buffer、1% BSA、0.005% NaN₃ in PBS, pH = 7.2~7.4)

第二節、結果與討論

第一項、有機合成

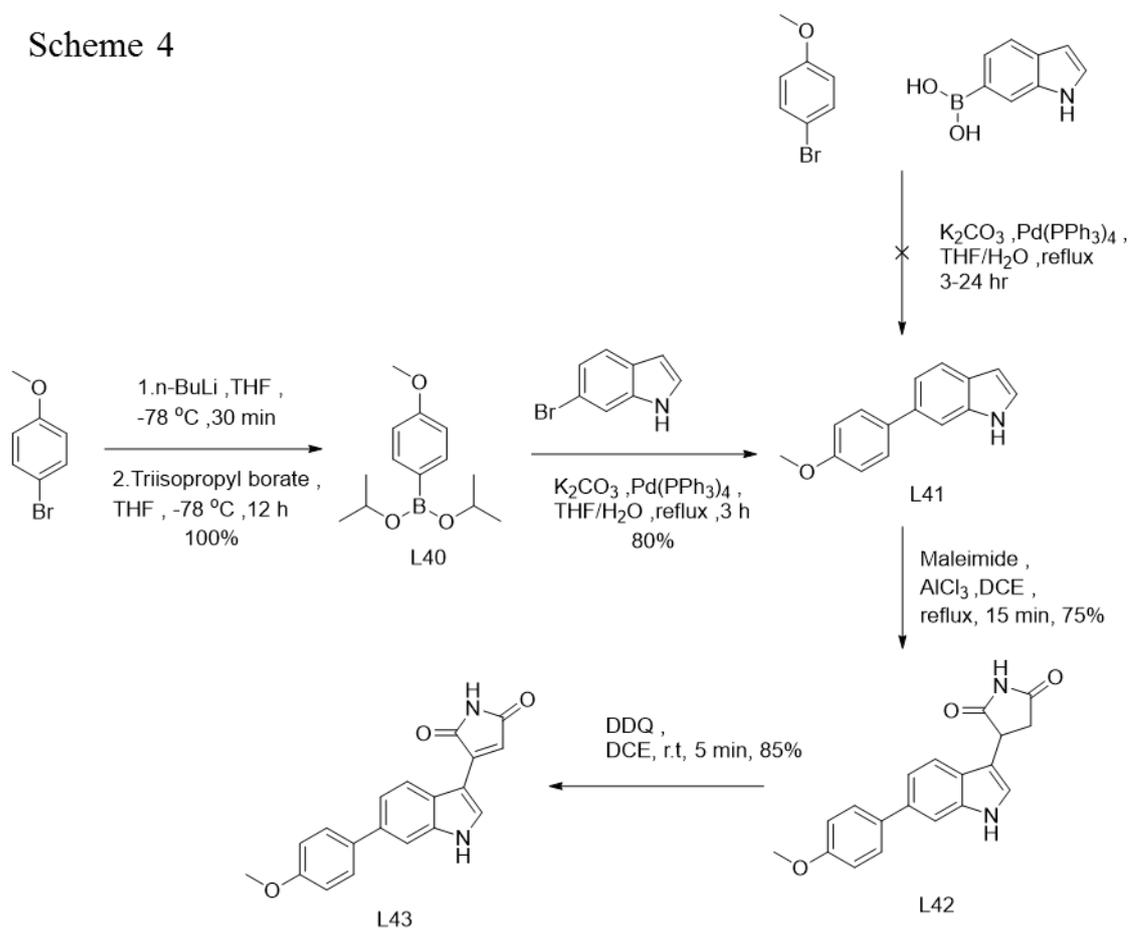
我們嘗試著將 WY1339 上吲哚的 6 號位置官能基移除，保留 3 號位置上馬來醯亞胺的結構來探討 6 號位置官能基對活性的重要性，因此合成化合物 L11 和 L12 (Scheme1)。



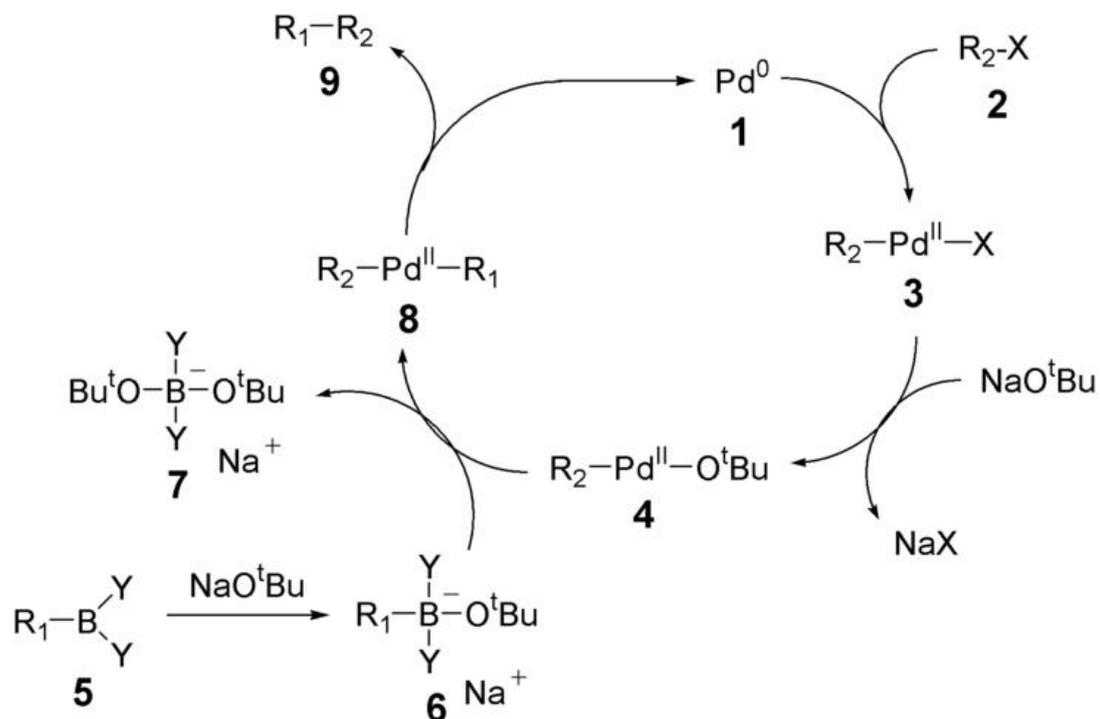
我們參考 Jan Bergman⁴¹ 和 Sheng-Yin Zhao⁴² 的合成條件，利用吲哚和馬來醯亞胺加入路易斯酸三氯化鋁進行麥可加成反應(Michael addition)得到化合物 L11，再使用 DDQ 將 L11 氧化得到產物 L12。

接著我們將 WY1339 結構中吲哚 6 號官能基上羥基置換成甲氧基，如 Scheme 4。

Scheme 4



為了合成化合物 L41，我們利用 4-bromoanisole 和 6-indolylboronic acid 進行鈴木反應嘗試合成出 L41，但反應結果不如預期。鈴木反應 (Suzuki reaction) 是一個有機偶聯反應，在鈀催化下，芳基或烯基的硼酸或硼酯與氯、溴、碘代芳烴或烯烴發生交叉偶聯反應⁴³。反應機制如圖二十。



圖十八:鈴木反應之反應機制⁴⁴。

在圖十八中，鹵代烴 2 與零價鈰先進行氧化加成，與鹼作用生成強親電性的有機鈰中間體 4。同時芳基硼酸與鹼作用生成酸根型配合物四價硼酸鹽中間體 6，具親核性，與 4 作用生成 8。最後 8 經還原消除，得到目標產物 9 以及催化劑 1。

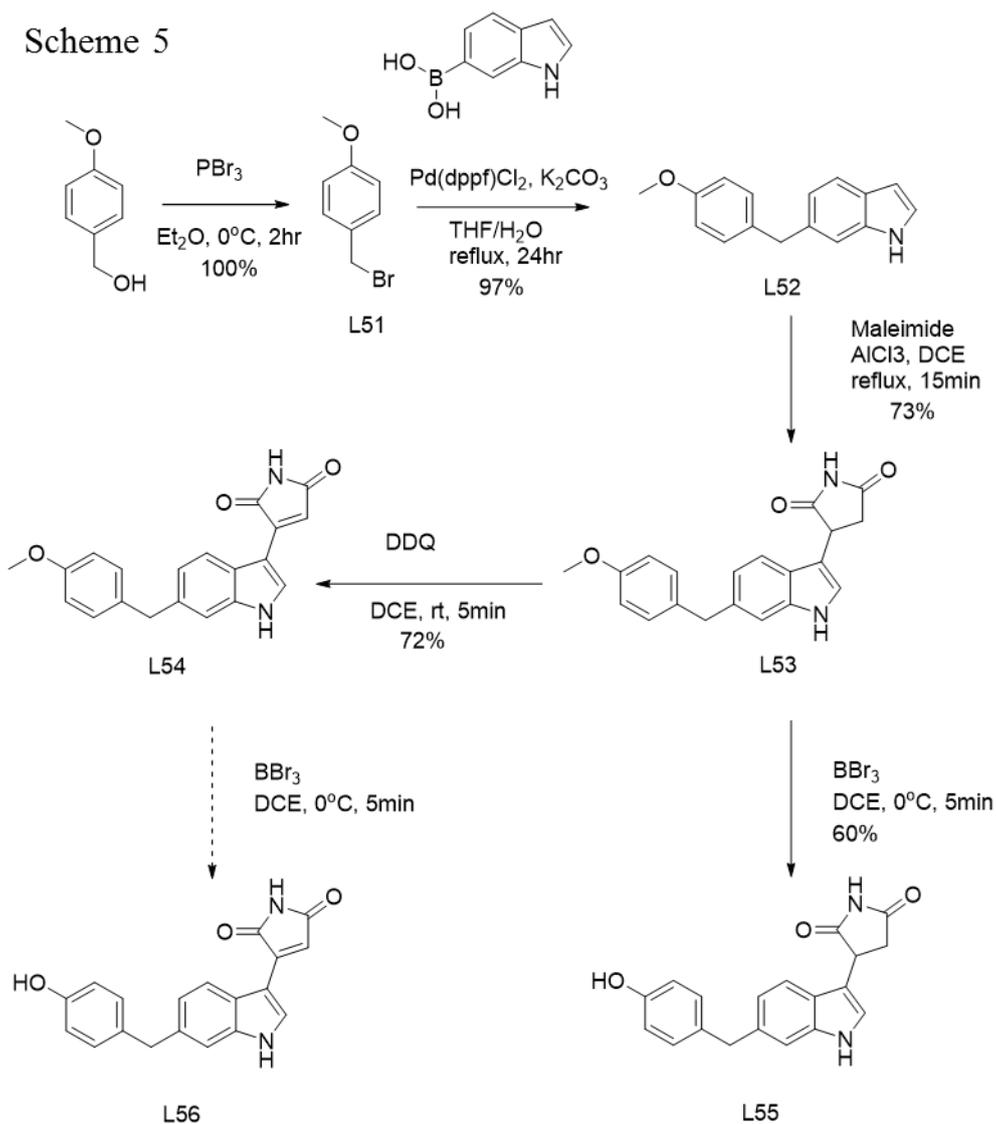
藉由 TLC 片觀察反應過程，起始物 4-bromoanisole 逐漸減少但是起始物 6-indolylboronic acid 並未減少，且有新產物出現，透過光譜分析後並非 L41。

透過反應機構推測失敗原因為:在反應過程中，催化劑 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ 和 4-bromoanisole 進行氧化加成後，在與鹼作用生成強親電性的有機鈰中間體的過程中，因為 K_2CO_3 強度不夠，導致反應無法形成有機鈰

中間體導致反應失敗。所以我們改變反應的策略，將 4-bromoanisole 硼酯化後再與 6-bromoindole 進行鈴木反應。

由於硼酯具有比硼酸更好保存的特性，所以我們選擇將 4-bromoanisole 反應成硼酯後再進行反應。首先將 4-bromoanisole 溶在 THF 中，在低溫下滴入 n-BuLi 後再加入 triisopropyl borate 後在室溫反應，觀察反應過程有新化合物產生，經由過濾萃取後得到化合物 L40。

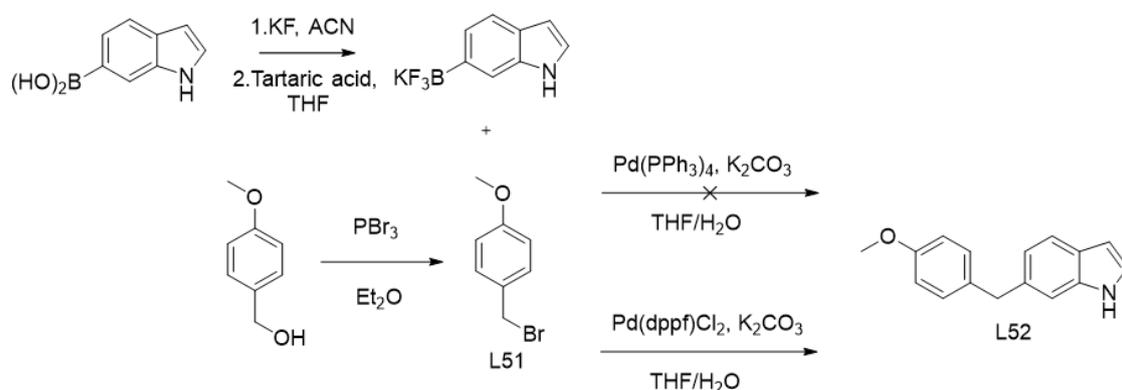
將化合物 L40 和 6-bromoindole 溶在 THF/H₂O 中，加入 K₂CO₃ 和 Pd(PPh₃)₄ 進行鈴木反應，反應過程中有新化合物產生，經管柱純化後，藉由光譜測定確認為產物 L41。接著將 L41 和馬來醯亞胺利用麥可加成和 DDQ 氧化的方式，成功合成化合物 L42 和 L43。



我們在苯環和吲哚主結構間多加一個碳來增加衍生物的長度，如 Scheme 5。首先將 4-methoxybenzyl alcohol 進行溴化反應合成化合物 L51。

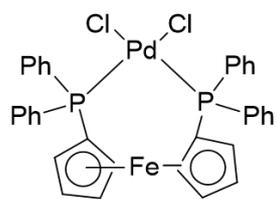
我們希望透過合成 L41 的鈴木反應條件來合成化合物 L52，但是透過 TLC 觀察反應過程，發現一直沒有新產物產生，我們參考 Gary A. Molander 的反應過程⁴⁵，先將 6-indolylboronic acid 反應成 potassium indole-6-trifluoroborate，再使用 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ 進行鈴木反應，還是未出現

預期之產物。有文獻指出當鈴木反應的反應物變成芳香環和苄基鹵時較難進行偶聯反應⁴⁶。在鹵代烴與零價鈀氧化加成時，首先生成的是順式的鈀配合物，而後立即轉變為反式的異構體⁴⁷，在還原消除生成構型固定的產物⁴⁸。但用苄基鹵反應則會生成構型翻轉的產物⁴⁹，此現象會降低鈴木反應的反應效率，所以必須選用更有選擇性的鈀催化劑。

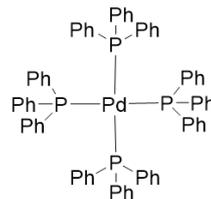


圖十九:L52 合成方法。

因此我們參考 Tamio Hayashi 的反應條件⁵⁰，將 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ 改為 $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ ([1,1-bis(diphenylphosphino)ferrocene]dichloropalladium (II))，從 TLC 片觀察反應過程有出現新產物，純化後透過光譜分析，確認為產物 L52。我們猜測反應成功原因為 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ 和 $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ 結構上的不同有關(圖二十)。 $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ 中二茂鐵會讓苄基的有機硼化合物在進行耦合時形成立體障礙，使苯環所形成的硼酸鹽中間體只能從單一方向進行耦合(圖二十一)，此特性可以避免苄基鹵和零價鈀形成構型翻轉的產物，加速芳香環和溴化苄的偶聯反應。

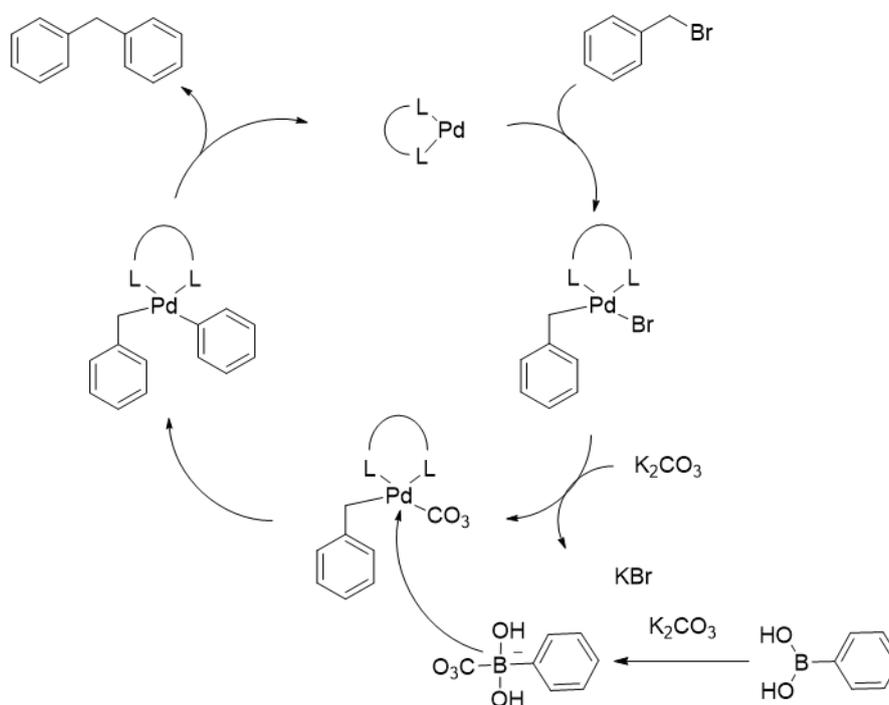


Pd(dppf)Cl_2



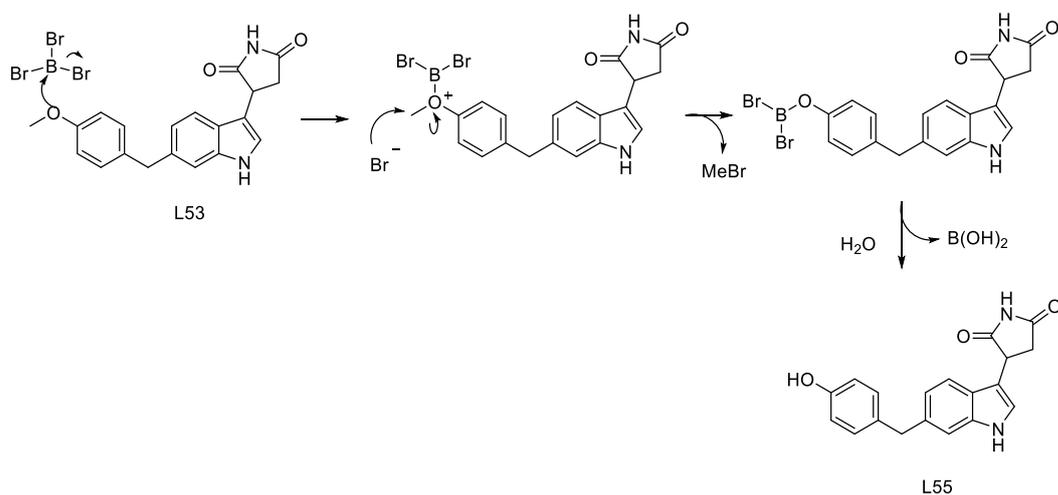
$\text{Pd(PPh}_3)_4$

圖二十: Pd(dppf)Cl_2 和 $\text{Pd(PPh}_3)_4$ 結構。



圖二十一: 推測 Pd(dppf)Cl_2 之反應機構。

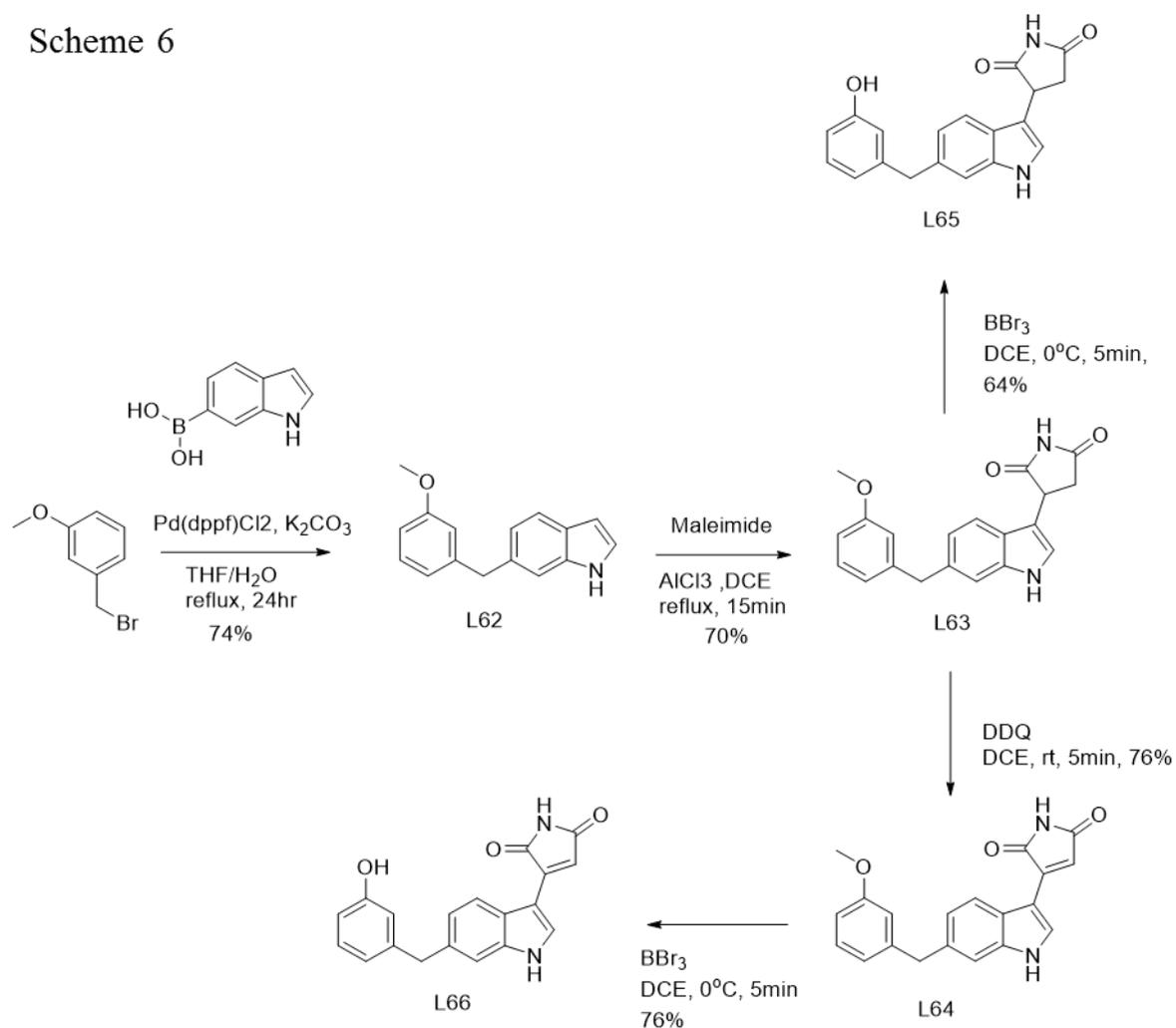
合成出 L52 後，加入馬來醯亞胺進行麥可加成反應合成 L53，再利用 DDQ 氧化反應合成出 L54。將 L53 溶在 DCE 中緩慢滴入路易斯士酸 BBr_3 進行去甲基反應，得到 L55。



圖二十二: BBr_3 去甲基之反應機構。

在 L54 利用 BBr_3 進行去甲基合成 L56 反應中，藉由 TLC 觀察反應有新產物產生，但是純化後出現藉由光譜分析發現並非預期之產物。

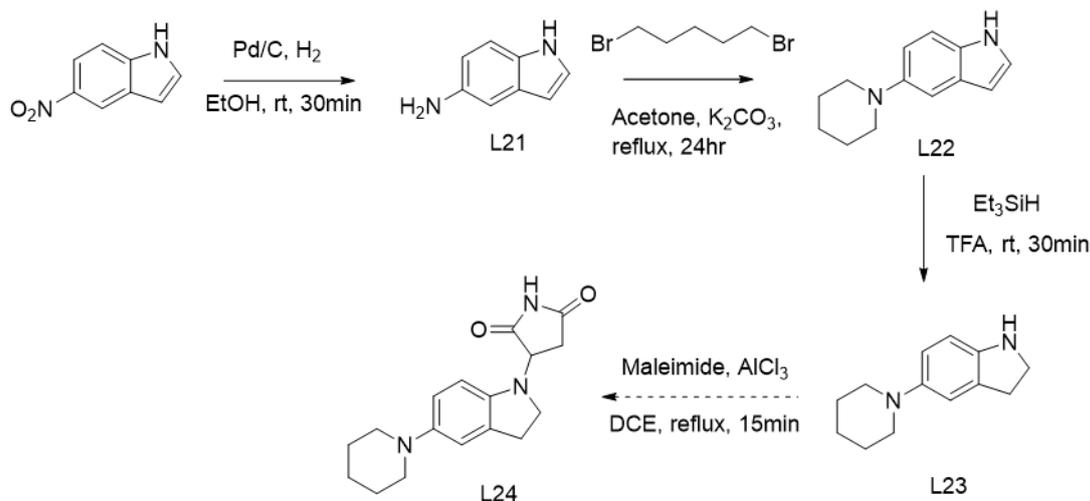
Scheme 6



藉著成功合成 L52 的經驗，我們將 6-indolylboronic acid 與 3-methoxybenzyl bromide 利用鈴木反應合成出 L62，再藉由麥可加成反應和 DDQ 氧化的方法合成出 L63 和 L64，L63 和 L64 去甲基後得到 L65 和 L66 (Scheme 6)。

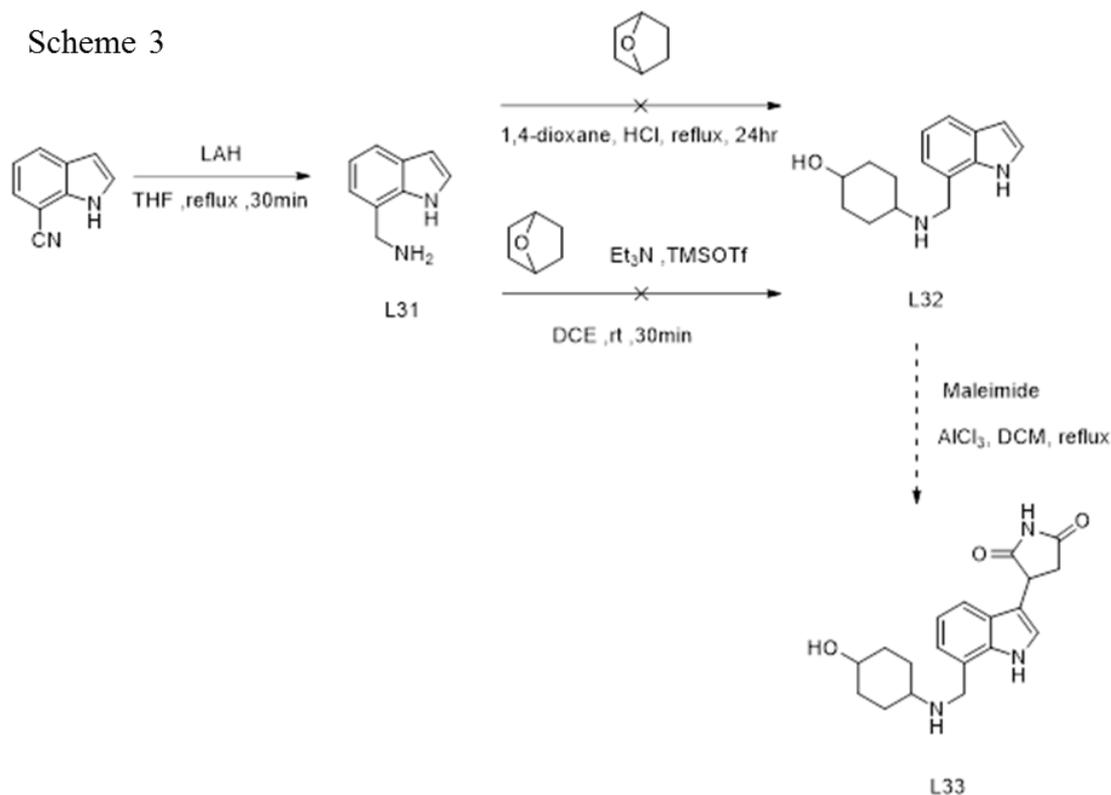
我們希望讓化合物結構可以接近 Digoxigenin 的非平面結構，所以設計了以吲哚為主體的化合物 L24。

Scheme 2



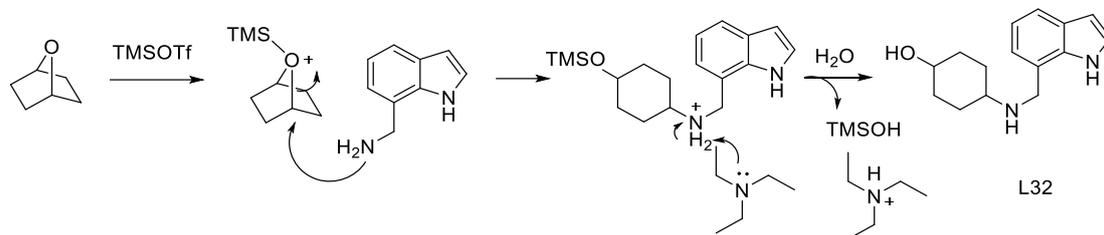
將 5-nitroindole 和鈀碳金屬在氫氣下加壓進行氫化反應，經光譜鑑定後得到化合物 L21。將 L21 和 1,5-dibromopentane 進行合環反應，光譜鑑定後得到化合物 L22。化合物 L22 再利用三乙基矽烷 (triethylsilane)/三氟醋酸(trifluoroacetic acid)系統進行還原得到化合物 L23⁵¹。然而我們將化合物 L23 和 maleimide 進行麥可加成時，藉由 TLC 觀察反應過程，有新產物產生，但是經管柱層析後產物消失，且有許多副產物產生。再次進行此反應時，全程在避光條件下進行，產物並無消失，我們推測在吲哚啉 5 號位置接上 piperidine 後並在 1 號位置接上馬來醯亞胺，因為馬來醯亞胺拉電子基的關係，照光後會反應形成副產物。由於其極度怕光的特性會使藥物在保存上出現問題，所以我們決定設計另一個結構和長度趨近於 Digoxigenin 的化合物 L33。

Scheme 3

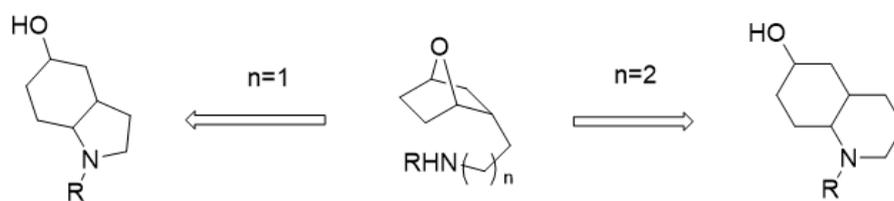


首先將 7-cyanoindole 利用 LAH 進行還原反應，得到化合物 L31，經光譜鑑定後確認產物。將化合物 L31 和 7-oxabicyclo[2.2.1]heptane 在 1,4-dioxane 中加入鹽酸迴流進行開環反應，希望能得到化合物 L32，但是觀察反應過程，發現沒有新產物出現。所以我們參考 Carreira⁵² 的合成條件，在化合物 L31 和 7-oxabicyclo[2.2.1]heptane 溶於 DCE 中，加入三乙胺增加化合物 L31 中胺基的攻擊性和以 TMSOTf 作為路易斯酸在室溫下反應，透過 TLC 觀察發現還是沒有產生預期的產物。由於兩次反應的條件都是利用路易斯酸讓 7-oxabicyclo[2.2.1]heptane 中的氧原子質子化，增加開環的機會，與文獻中最大的差別在於本反應是分子間反應，而文獻上的反

應是分子內反應，所以我們推測此為反應無法如預期發生的原因 (圖二十四)。



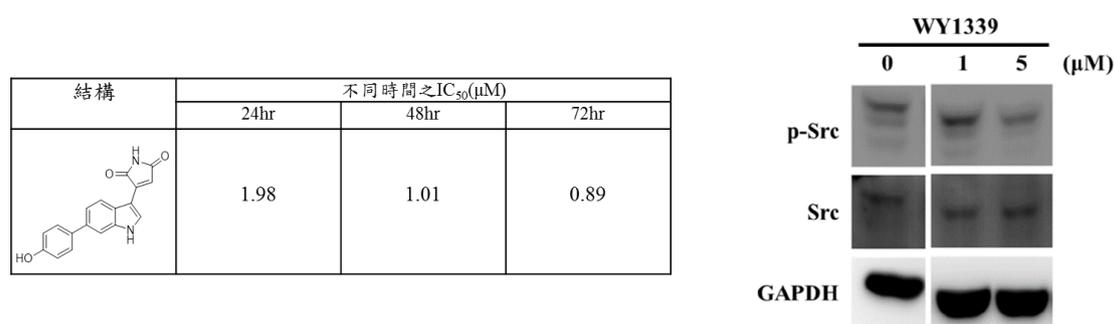
圖二十三:合成化合物 L32 之預期反應機構。



圖二十四:文獻中 7-oxabicyclo[2.2.1]heptane 以 TMSOTf/Et₃N 條件開環反應。

第二項、生物活性與構效關係探討

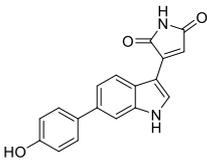
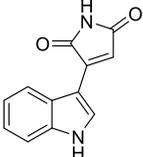
先前的研究結果顯示，Digoxigenin 衍生物中平面結構的 WY1339 對肺癌細胞株 A549 有最好的抑制效果，在 24 小時對 A549 的 IC_{50} 為 $1.98 \mu\text{M}$ ，且從西方墨點法實驗中發現可以有效減少 Src 蛋白的活化 (圖二十五)³¹。



圖二十五:WY1339 對 A549 之 IC_{50} 值及抑制 Src 蛋白活化之西方墨點法實驗數據。

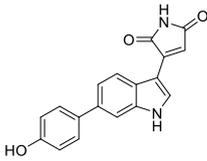
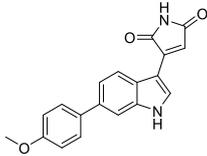
從 A549 的細胞毒殺實驗結果顯示，吡啶 6 號位置上取代基移除的化合物 L12 對 A549 肺癌細胞株在 24 小時毒殺效果較 WY1339 低， IC_{50} 分別為 WY1339: $1.98 \mu\text{M}$; L12: $65.59 \mu\text{M}$ (表一)。初步證實移除吡啶上 6 號位置的取代基會降低其生物活性。

表一:WY1339 和 L12 對人類肺腺癌細胞 A549 在 24 小時之活性比較。

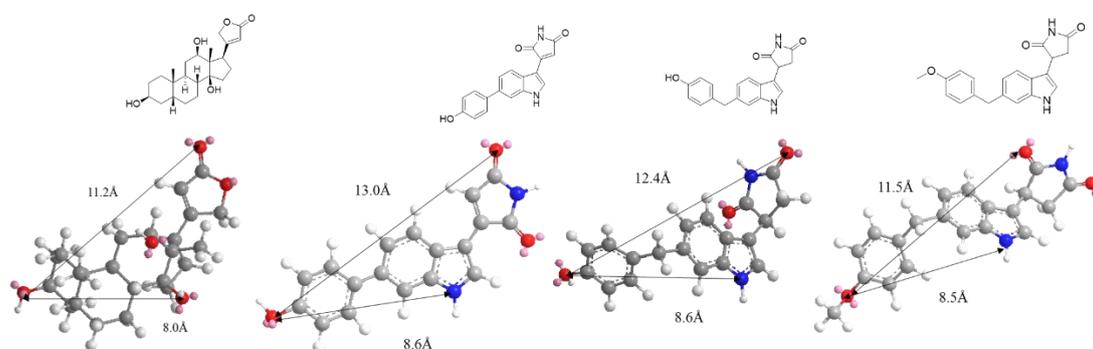
NO.	結構	IC ₅₀ (μ M)
WY1339		1.98
L12		65.59

接著我們將 WY1339 結構上吡啶的 6 號位置官能基更改為疏水性的苯甲醚合成出 L43，比較親水性和疏水性官能基對肺癌細胞抑制能力的影響。比較 WY1339 和 L43 對 A549 的半抑制濃度，L43 的半抑制濃度增加到 WY1339 的 20 倍(表二)，推測羥基可以和 Src 結構形成氫鍵，增加鍵結的效果，所以我們將羥基替換成甲氧基時，會導致鍵結能力下降。

表二:WY1339 和 L43 對人類肺腺癌 A549 在 24 小時之活性比較。

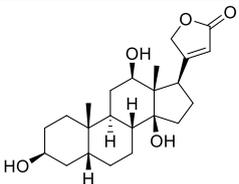
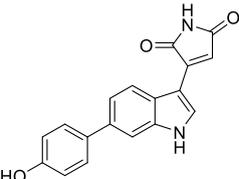
NO.	結構	IC ₅₀ (μ M)
WY1339		1.98
L43		39.91

先前的研究中，化合物 WY1339 是依照 Digoxigenin 的結構設計合成的平面衍生物，但對照其立體結構，WY1339 的兩個氫鍵提供者(hydrogen bond donor)之間的距離與 Digoxigenin 兩羥基間距離相差了約 1.8 Å(圖二十六)。從表三中 Digoxigenin 和 WY1339 生物活性的差異，我們猜測此長度差異會對衍生物的生物活性造成影響。



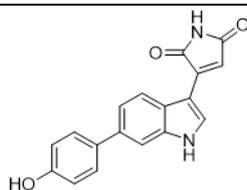
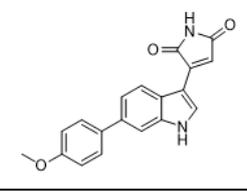
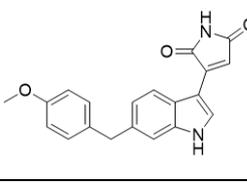
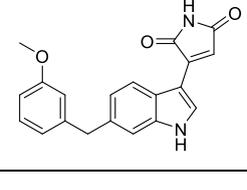
圖二十六:經由電腦計算出最穩定的 Digoxigenin、WY1339、L54、L55 之立體結構圖。

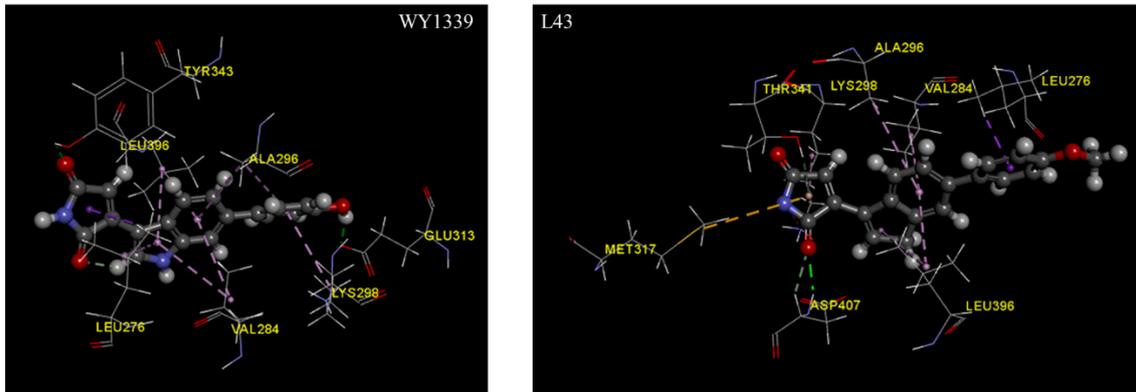
表三:Digoxigenin 和 WY1339 對 A549 細胞株之不同時間 IC₅₀。

NO.	結構	IC ₅₀ (μM)		
		24hr	48hr	72hr
Digoxigenin		0.790	0.234	0.191
WY1339		1.98	1.01	0.89

所以我們利用 Discovery studio 進行 CDock 來模擬不同長度的衍生物在人類 Src 蛋白中的 CDocking Energy。模擬的結果顯示，先導化合物在 Src 蛋白中的最低的 CDocking Energy 為-14.1841，我們利用 Src 蛋白對不同親疏水性，不同長度衍生物進行 CDock，觀察當衍生物長度增加時 CDocking Energy 的變化(表四)。我們比較 WY1339 和 L43 與 Src 蛋白間的交互作用力發現，當吡啶 6 號位置上的親水性官能基改為疏水性官能基時，會減少 WY1339 上的羥基與 Src 蛋白上 313 號麩胺酸(Glutamic)的氫鍵交互作用力使鍵結能力下降，導致抑制效果減少(圖二十七)，與生物活性結果相符。

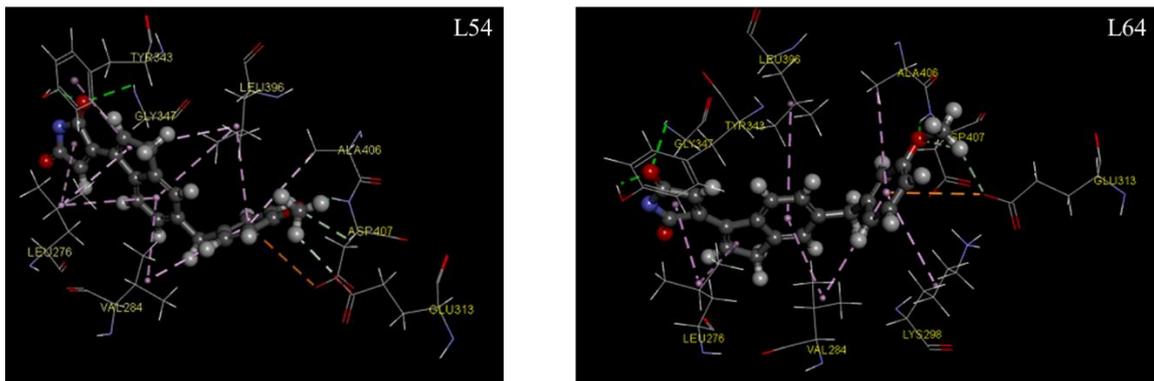
表四: Discovery studio 模擬 WY1339、L43、L54 和 L64 在 Src 蛋白中的 CDocking Energy。

NO.	結構	CDocking Energy
WY1339		-14.1841
L43		26.3539
L54		19.1729
L64		18.1411



圖二十七: Discovery studio 模擬 WY1339 和 L43 鍵結 Src 蛋白的交互作用力。

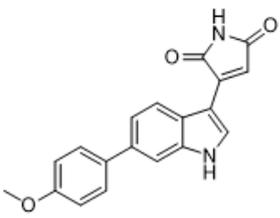
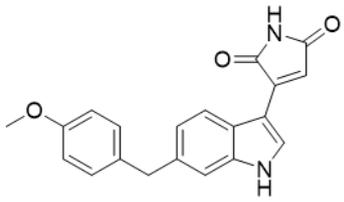
從表四中可以發現衍生物 L41、L54 和 L64 結構延長會使 CDocking Energy 上升，增加衍生物對 Src 蛋白的鍵結能力。比較 L54 和 L64 與 Src 蛋白間的交互作用力發現，當衍生物結構延長可以增加苯環和 Src 蛋白中 406 號的丙胺酸(alanine)的疏水性交互作用力和 π - π 鍵結的交互作用力，讓鍵結能力上升(圖二十八)。



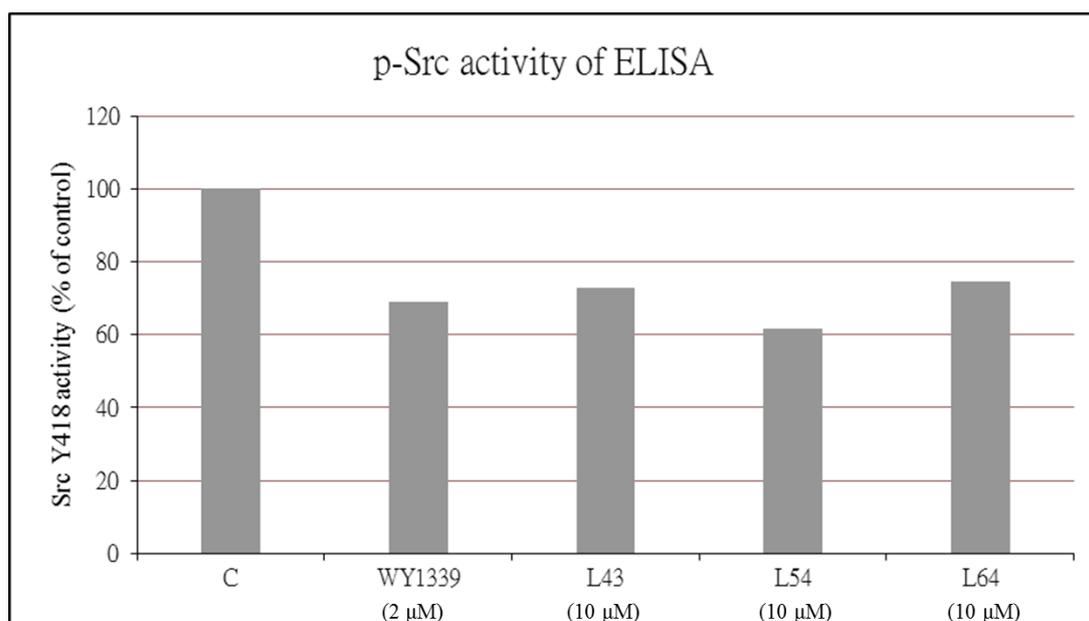
圖二十八: Discovery studio 模擬 L54 和 L64 鍵結 Src 蛋白的交互作用力。

所以我們增加衍生物的長度，觀察增加結構的長度對抑制肺癌細胞的影響。根據生物活性結果，長度增加的 L54 在 24 小時下 $IC_{50} > 100 \mu M$ ，與化合物 L43 在相同條件下的細胞活性(IC_{50} 為 $39.91 \mu M$)效果並無增加(表五)。

表五:L43 和 L54 對人類肺腺癌 A549 在 24 小時之活性比較。

NO.	結構	A549 Cell viability (24hr)			IC_{50} (μM)
		20 μM	50 μM	100 μM	
L43		73%	38%	-3%	39.91
L54		108%	92%	57%	>100

從肺癌細胞株 A549 毒殺實驗中我們發現衍生物在長度增加的情況下，無法增加對肺癌細胞株 A549 的毒殺效果。為了探討這些衍生物是否真的與 Src 蛋白鍵結並抑制 Src 活化，所以我們利用酵素結合免疫吸附分析法(ELISA)來驗證由 Discovery studio 所模擬 L54 和 L64 兩種衍生物和 Src 蛋白是否真的具有鍵結能力且可以抑制 Src 的活化(圖二十九)。



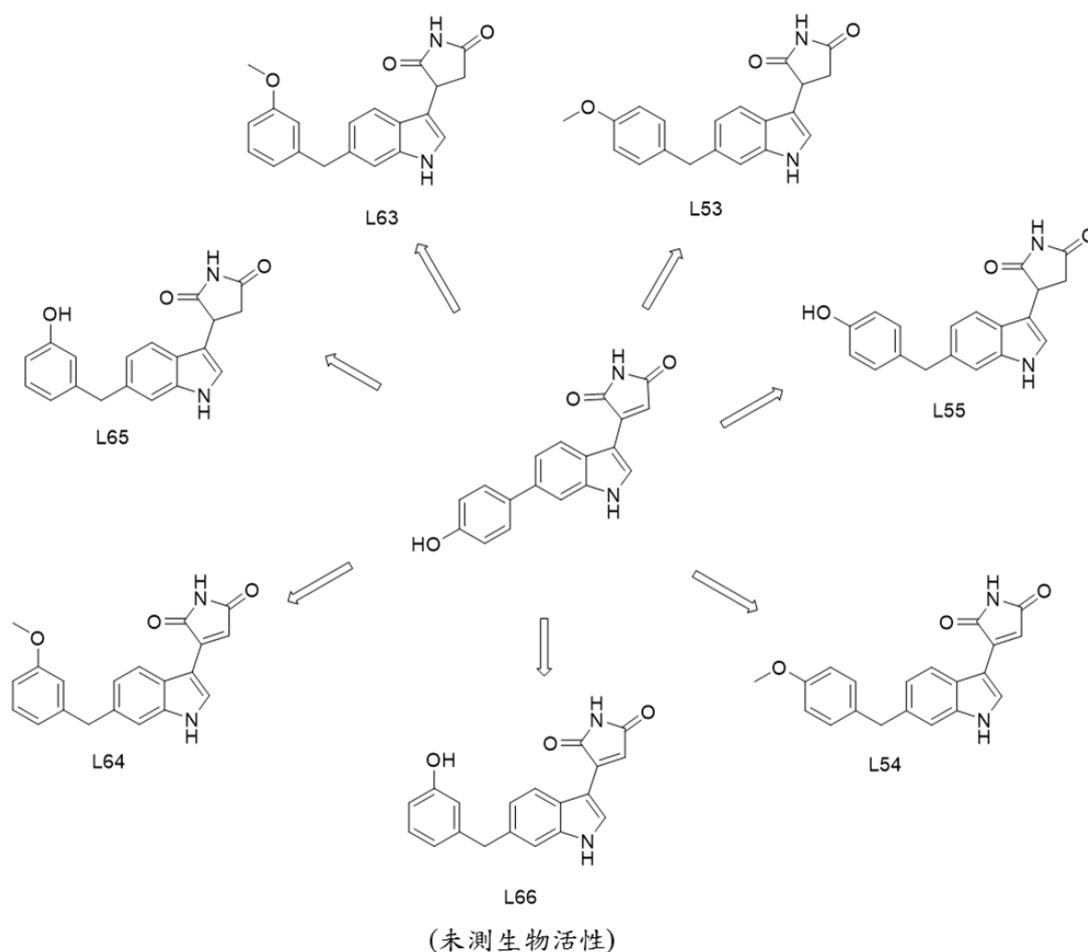
圖二十九:以酵素結合免疫吸附分析法(ELISA)確認化合物 WY1339、L43、L54 和 L64 對 A549 中磷酸化 Src 蛋白的表現。

以 A549 非小細胞肺癌細胞株針對 Discovery studio 所模擬出的對 Src 蛋白具有鍵結能力的 WY1339、L43、L54 和 L64 進行 ELISA 實驗。不同藥物使用不同濃度(WY1339:2 μM。L43、L54 和 L64 皆為 10 μM)處理 24 小時後，抽取其蛋白質，利用 ELISA 偵測 Src(Y418)活化程度；以 0.1%DMSO 為控制組(negative control)並以先導化合物 WY1339 作為陽性對照組(positive control)，觀察不同衍生物對 Src 蛋白是否具有抑制效果。

ELISA 實驗結果顯示，衍生物 L43、L54 和 L64 在高濃度(10 μM)下處理 24 小時後對抑制 Src 活化的效果和先導化合物 WY1339 在低濃度下(2 μM)的抑制效果皆在 60%到 80%之間，衍生物 L43、L54 和 L64 抑制 Src 蛋白活化的效果較 WY1339 差。這可以證明衍生物 L43、

L54 和 L64 對肺癌細胞株沒有抑制能力的可能原因為這三個衍生物無法抑制 Src 蛋白的磷酸化。

羥基會增加衍生物在 Src 蛋白結構中的氫鍵作用力，讓衍生物和 Src 蛋白擁有更好的鍵結效果。所以我們也合成具有羥基的衍生物來比較在結構長度增加的情況下，疏水性和親水性官能基的影響(圖三十)。



圖三十:WY1339 衍生一系列長度增加不同親疏水性之衍生物。

藉由先前的結果，我們推測結構延長的平面羥基衍生物 L66 對肺癌細胞株 A549 應會具有良好的細胞毒殺效果，但合成出來後尚未測

試對肺癌細胞株 A549 的細胞毒殺效果，我們暫時無法討論此部分的構效關係。

表六:L53、L55、L54、L63、L65 和 L64 對人類肺腺癌 A549 之活性比較。

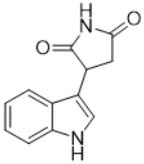
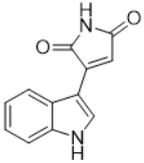
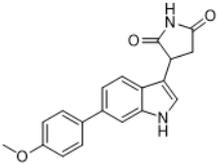
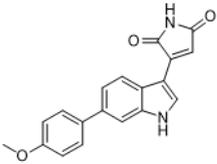
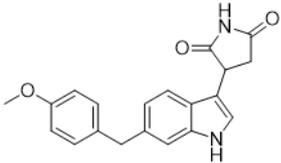
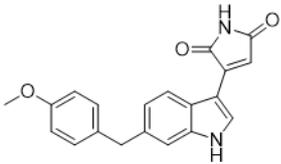
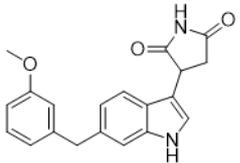
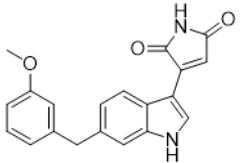
NO.	結構	A549 Cell viability (24hr)			IC ₅₀ (μ M)
		20 μ M	50 μ M	100 μ M	
L55		121%	111%	105%	>100
L53		118%	106%	59%	>100
L54		108%	92%	57%	>100
L65		99%	52%	35%	51.65
L63		103%	73%	28%	73.32
L64		105%	87%	71%	>100

從生物活性結果可以發現，當衍生物長度增加的情況下，L53、L54 和 L55 的 IC_{50} 皆大於 $100\ \mu\text{M}$ ，但從表五中可以發現，甲氧基取代的 L53 和 L54 在 $100\ \mu\text{M}$ 濃度下可以毒殺近 40% 的肺癌細胞，而羥基取代的 L55 仍然沒有毒殺效果。當化合物長度增加的情況下疏水性官能基的抑制效果大於親水性官能基，且非平面結構的抑制效果會大於平面結構。

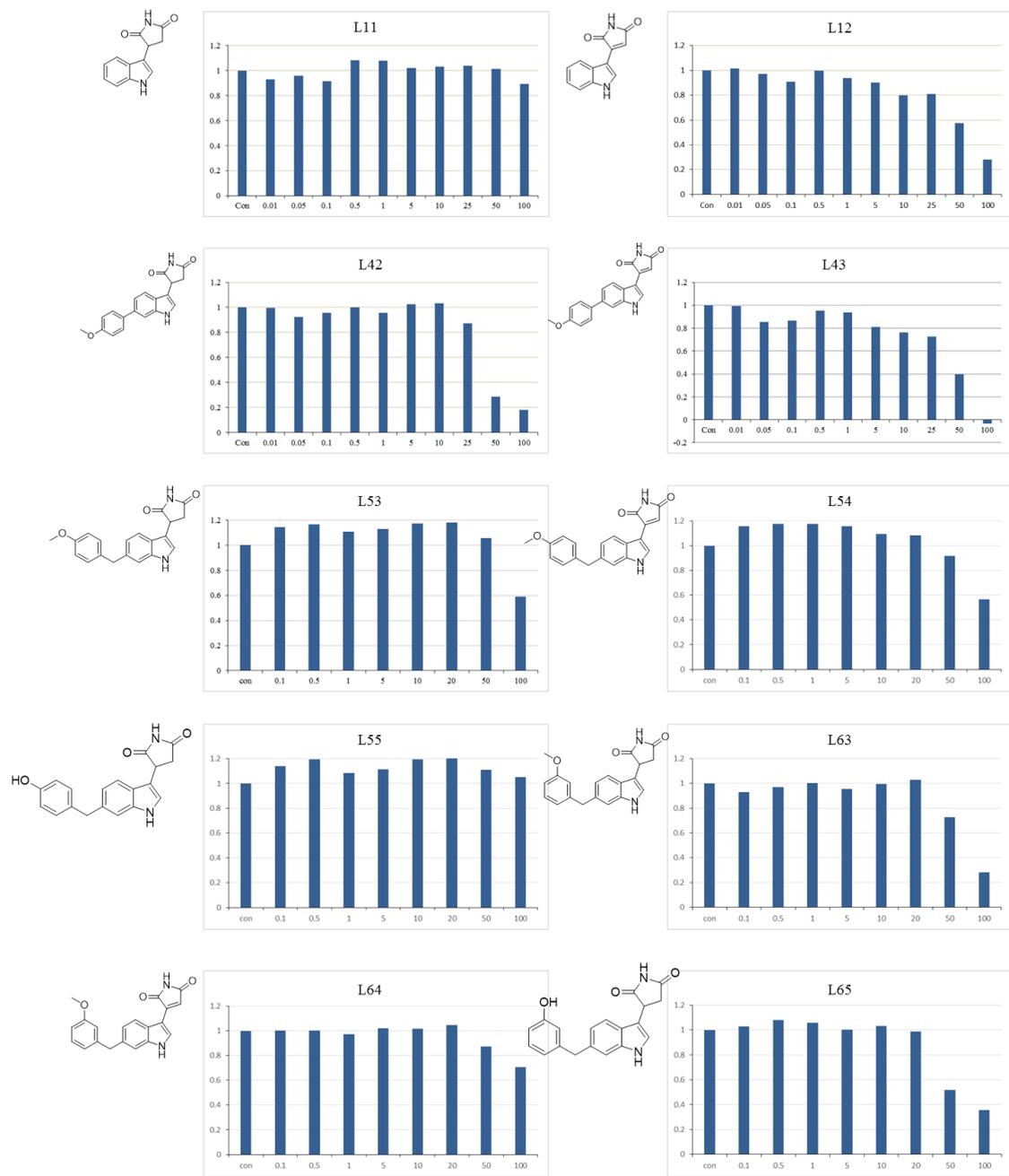
另外，我們從表六中可以發現，官能基從對位變成間位時，不論甲氧基或羥基取代的衍生物 L63 和 L65，對於肺癌細胞株 A549 的抑制效果比對應的 L53、L55 皆增加。但整體而言，延長衍生物的結構對抑制 A549 細胞株並無明顯的改善，與 Discovery studio 所模擬的結果不同。

先前的研究中提到衍生物中馬來醯亞胺的結構雙鍵相較於單鍵對肺癌細胞的抑制效果較好，猜測原因為馬來醯亞胺結構平面性會對抑制肺癌細胞有正面的影響。我們想確認是不是具有馬來亞胺官能基的衍生物都擁有這樣的趨勢，所以比較馬來醯亞胺單鍵和雙鍵對每個化合物所造成的影響(表七)。

表七:馬來醯亞胺結構單鍵與雙鍵之衍生物對人類肺腺癌 A549 活性比較。

NO.	結構	A549 Cell viability (24hr)			IC ₅₀ (μ M)
		20 μ M	50 μ M	100 μ M	
L11		104%	101%	89%	>100
L12		81%	58%	28%	65.59
L42		87%	29%	18%	40.11
L43		73%	40%	-3%	39.91
L53		118%	106%	59%	>100
L54		108%	92%	57%	>100
L63		103%	73%	28%	73.32
L64		105%	87%	71%	>100

從表七中可以發現，當化合物結構沒有延長的情況下，雙鍵的 L12 對 A459 的抑制效果大於單鍵的 L11，而化合物 L42 和 L43 抑制效果差不多；化合物結構延長後，對位的衍生物 L53 和 L54 的抑制效果差異不大，間位的化合物則是單鍵的 L63 抑制效果大於雙鍵的 L64。我們推測：馬來醯亞胺官能基的平面性不是衍生物抑制 A549 的關鍵因素。



圖三十一:WY1339 衍生物對 A549 細胞之存活率(縱軸為細胞存活率，橫軸為化合物容於 DMSO 之濃度，單位為 μM)。

第四章、結論

在篩選並評估 AC93253 衍生物對肺癌抑制能力實驗，西方墨點法中 A10 在低濃度(0.01 μM)下即可抑制 p-Src 活化達到 50%的程度，在細胞毒性測試中，A10 對肺癌細胞 PC9IR 有良好的毒殺效果(IC_{50} : 0.107 μM)和對人類支氣管上皮細胞 BEAS2B 細胞有較低的毒殺效果(IC_{50} : 1.090 μM)，說明 A10 在對肺癌細胞半抑制濃度下，對人體正常細胞的危害較 AC93253 小。

在 A10 對 PC9IR 細胞功能實驗中，A10 皆可以有效抑制 PC9IR 細胞的功能，包含:增殖能力(Proliferation)、侵襲能力(Invasion)、轉移能力(Migration)、細胞聚落形成能力(Colony formation)。A10 在西方墨點法中抑制 Src 蛋白活化能力和對肺癌細胞功能的抑制能力也證明: A10 可以藉由抑制肺癌細胞中 Src 的活化來達到抑制肺癌細胞功能的效果。

吡啶衍生物合成與構效關係實驗中，WY1339 衍生物可以透過三氯化鋁進行麥可加成和 DDQ 氧化合成。在 L52 和 L62 的合成中，苄基鹵無法以 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ 為催化劑進行鈴木反應，必須改用 $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ 作為催化劑。

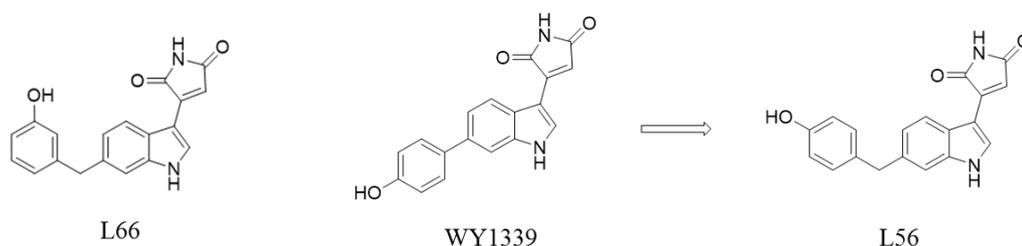
生物活性實驗是以 A549 作為細胞毒殺實驗模型，結果顯示

WY1339 結構中吡啶上 6 號取代基移除會降低抑制肺癌細胞的效果。
將吡啶上 6 號位置的苯環取代基更改為苄基時會降低對肺癌細胞株
A549 的抑制能力。而所有衍生物中，L43 對 A549 具有較佳的毒殺效
果(IC₅₀ 為 39.91 μM)。

第五章、未來展望

AC93253 衍生物中，A10 對肺癌細胞具有最佳的毒殺效果且在低濃度下可以有效抑制肺癌細胞中 Src 蛋白的活化；藉由抑制 Src 的活化，可以達到抑制肺癌細胞細胞功能的效果。未來希望 A10 可以進行動物體內試驗(in vivo)，了解 A10 在生物體內的作用機制和藥物動力學，看看能否有更大的發展空間。

WY1339 衍生物中，我們發現當衍生物結構延長時，會降低對 A549 的抑制效果，但是其官能基的位置、親疏水性和衍生物結構的平面性皆會影響抑制效果。期望在未來可以先測試衍生物 L66 對肺癌細胞株 A549 的細胞毒殺效果，且能夠合成出 WY1339 結構增長，且羥基在對位的衍生物 L56，再藉由 L56 和 L66 的生物活性結果找出衍生物抑制肺癌細胞株 A549 的構效關係。



圖三十二:待測生物活性之 L66 和保留 WY1339 平面結構並延長之對位衍生物 L56。

第六章、文獻資料

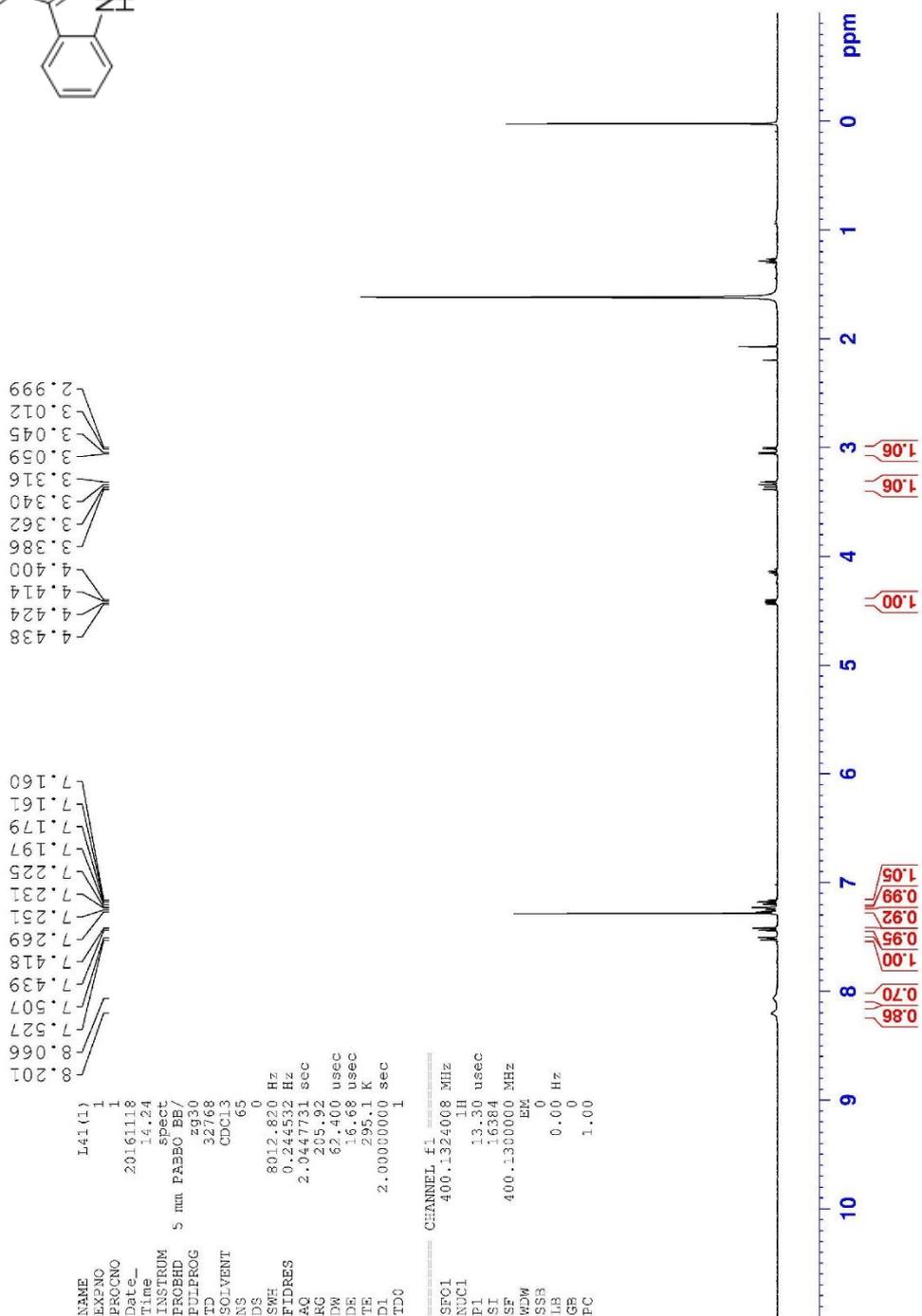
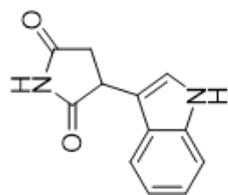
1. 世界衛生組織
[<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>]
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A: **Cancer statistics, 2015**. *CA Cancer J Clin* 2015, **65**(1):5-29.
3. Collins LG, Haines C, Perkel R, Enck RE: **Lung cancer: diagnosis and management**. *Am Fam Physician* 2007, **75**(1):56-63.
4. Stinchcombe TE: **Novel agents in development for advanced non-small cell lung cancer**. *Ther Adv Med Oncol* 2014, **6**(5):240-253.
5. Cancer Genome Atlas Research N: **Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma**. *Nature* 2014, **511**(7511):543-550.
6. Rubin H: **Quantitative relations between causative virus and cell in the Rous no. 1 chicken sarcoma**. *Virology* 1955, **1**(5):445-473.
7. Czernilofsky AP, Levinson AD, Varmus HE, Bishop JM, Tischer E, Goodman HM: **Nucleotide sequence of an avian sarcoma virus oncogene (src) and proposed amino acid sequence for gene product**. *Nature* 1980, **287**(5779):198-203.
8. Yeatman TJ: **A renaissance for SRC**. *Nat Rev Cancer* 2004, **4**(6):470-480.
9. Martin GS: **The hunting of the Src**. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001, **2**(6):467-475.
10. Bishop JM: **Cellular oncogenes and retroviruses**. *Annu Rev Biochem* 1983, **52**:301-354.
11. Sen B, Johnson FM: **Regulation of SRC family kinases in human cancers**. *J Signal Transduct* 2011, **2011**:865819.
12. Roskoski R, Jr.: **Src protein-tyrosine kinase structure and regulation**. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **324**(4):1155-1164.
13. Garrett RH, Grisham CM: **Biochemistry 6Ed**; 2006.
14. Wiener JR, Nakano K, Kruzelock RP, Bucana CD, Bast RC, Jr., Gallick GE: **Decreased Src tyrosine kinase activity inhibits malignant human ovarian cancer tumor growth in a nude mouse model**. *Clin Cancer Res* 1999, **5**(8):2164-2170.
15. Vidal M, Warner S, Read R, Cagan RL: **Differing src signaling levels have distinct outcomes in drosophila**. *Cancer Res* 2007,

- 67(21):10278-10285.
16. Summy JM, Gallick GE: **Treatment for advanced tumors: Src reclaims center stage.** *Clinical Cancer Research* 2006, **12(5)**:1398-1401.
 17. Lu Y, Wang H, Mills GB: **Targeting PI3K-AKT pathway for cancer therapy.** *Rev Clin Exp Hematol* 2003, **7(2)**:205-228.
 18. Cao X, Tay A, Guy GR, Tan YH: **Activation and association of Stat3 with Src in v-Src-transformed cell lines.** *Mol Cell Biol* 1996, **16(4)**:1595-1603.
 19. Song L, Morris M, Bagui T, Lee FY, Jove R, Haura EB: **Dasatinib (BMS-354825) selectively induces apoptosis in lung cancer cells dependent on epidermal growth factor receptor signaling for survival.** *Cancer Res* 2006, **66(11)**:5542-5548.
 20. Mazurenko NN, Kogan YA, Zborovskaya IB, Sukhova NM, Kiselev FL: **Identification of C-Src Gene-Encoded Protein in Human Lung-Tumors.** *Vop Onkol+* 1991, **37(6)**:683-&.
 21. Frame MC: **Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour.** *Bba-Rev Cancer* 2002, **1602(2)**:114-130.
 22. Zhang J, Kalyankrishna S, Wislez M, Thilaganathan N, Saigal B, Wei W, Ma L, Wistuba, II, Johnson FM, Kurie JM: **SRC-family kinases are activated in non-small cell lung cancer and promote the survival of epidermal growth factor receptor-dependent cell lines.** *Am J Pathol* 2007, **170(1)**:366-376.
 23. Mendelsohn J, Baselga J: **Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer.** *J Clin Oncol* 2003, **21(14)**:2787-2799.
 24. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG *et al*: **Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib.** *New Engl J Med* 2004, **350(21)**:2129-2139.
 25. Mazurenko NN, Kogan EA, Zborovskaya IB, Kissel'ov FL: **Expression of Pp60c-Src in Human Small-Cell and Non-Small-Cell Lung Carcinomas.** *Eur J Cancer* 1992, **28a(2-3)**:372-377.
 26. **JAK-STAT Signaling Pathway**
[<https://www.tocris.com/pathways/jak-stat-signaling-pathway>]
 27. Masaki T, Igarashi K, Tokuda M, Yukimasa S, Han F, Jin YJ, Li JQ, Yoneyama H, Uchida N, Fujita J *et al*: **pp60(c-src) activation in**

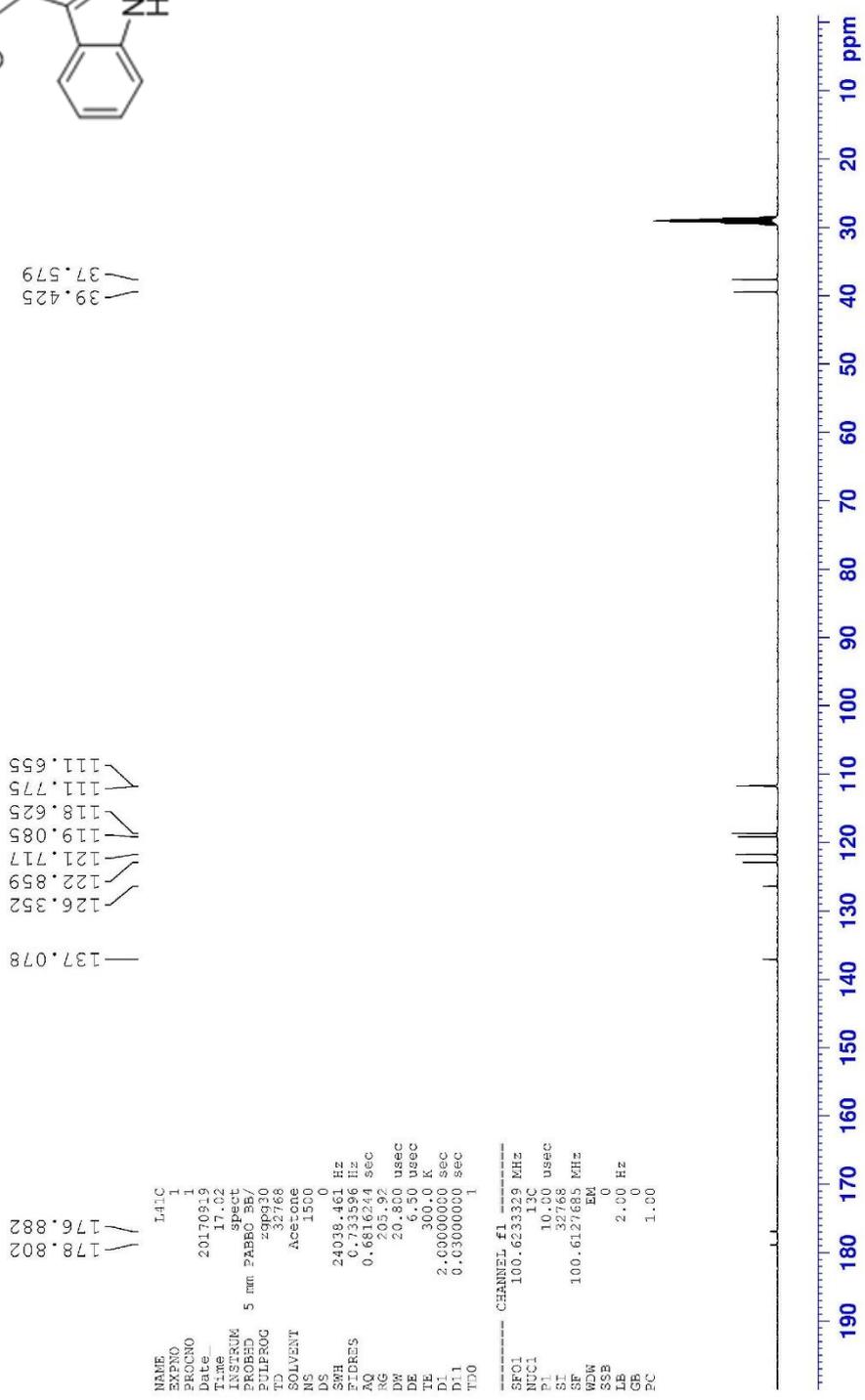
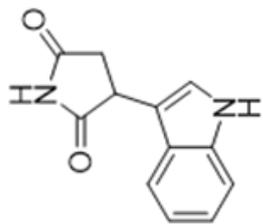
- lung adenocarcinoma.** *Eur J Cancer* 2003, **39**(10):1447-1455.
28. Visser CJT, Rijksen G, Woutersen RA, DeWeger RA: **Increased immunoreactivity and protein tyrosine kinase activity of the protooncogene pp60(c-src) in preneoplastic lesions in rat pancreas.** *Lab Invest* 1996, **74**(1):2-11.
29. Yu HT, Rosen MK, Shin TB, Seideldugan C, Brugge JS, Schreiber SL: **Solution Structure of the Sh3 Domain of Src and Identification of Its Ligand-Binding Site.** *Science* 1992, **258**(5088):1665-1668.
30. Xu WQ, Harrison SC, Eck MJ: **Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src.** *Nature* 1997, **385**(6617):595-602.
31. 郭昕銓: 設計並合成吡啶及吡啶嘧啶衍生物作為具抗癌潛力藥物之新型 Src 蛋白抑制劑. tunghai university; 2015.
32. 謝昫臻: 設計合成萘與苯並噻唑衍生物作為非小細胞肺癌治療之 Src 蛋白抑制劑. tunghai university; 2015.
33. Lin SY, Chang HH, Lai YH, Lin CH, Chen MH, Chang GC, Tsai MF, Chen JJW: **Digoxin Suppresses Tumor Malignancy through Inhibiting Multiple Src-Related Signaling Pathways in Non-Small Cell Lung Cancer.** *Plos One* 2015, **10**(5).
34. Tan M, Li P, Klos KS, Lu J, Lan KH, Nagata Y, Fang DX, Jing T, Yu DH: **ErbB2 promotes Src synthesis and stability: Novel mechanisms of Src activation that confer breast cancer metastasis.** *Cancer Res* 2005, **65**(5):1858-1867.
35. Luo FR, Yang Z, Camuso A, Smykla R, McGlinchey K, Fager K, Flefleh C, Castaneda S, Inigo I, Kan D *et al*: **Dasatinib (BMS-354825) pharmacokinetics and pharmacodynamic biomarkers in animal models predict optimal clinical exposure.** *Clin Cancer Res* 2006, **12**(23):7180-7186.
36. Johnson FM, Saigal B, Talpaz M, Donato NJ: **Dasatinib (BMS-354825) tyrosine kinase inhibitor suppresses invasion and induces cell cycle arrest and apoptosis of head and neck squamous cell carcinoma and non-small cell lung cancer cells.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**(19 Pt 1):6924-6932.
37. Summy JM, Gallick GE: **Treatment for advanced tumors: SRC**

- reclaims center stage.** *Clin Cancer Res* 2006, **12**(5):1398-1401.
38. Botta G, De Santis LP, Saladino R: **Current advances in the synthesis and antitumoral activity of SIRT1-2 inhibitors by modulation of p53 and pro-apoptotic proteins.** *Curr Med Chem* 2012, **19**(34):5871-5884.
39. Choi YH, Kim H, Lee SH, Jin YH, Lee KY: **Src regulates the activity of SIRT2.** *Biochem Biophys Res Commun* 2014, **450**(2):1120-1125.
40. Fatima A, Abdul ABH, Abdullah R, Karjiban RA, Lee VS: **Binding Mode Analysis of Zerumbone to Key Signal Proteins in the Tumor Necrosis Factor Pathway.** *Int J Mol Sci* 2015, **16**(2):2747-2766.
41. Pardo C, Pirat C, Elguero J: **The synthesis of a linear Troger's Base derived from naphthalene: 7H-15H-6,14-methanodinaphtho[2,3-b : 2',3'-f][1,5]diazocine.** *J Heterocyclic Chem* 2007, **44**(6):1303-1307.
42. Bergman J, Desarbre E, Koch E: **Synthesis of indolo[3,2-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole in one step from indole and maleimide.** *Tetrahedron* 1999, **55**(8):2363-2370.
43. Matos K, Soderquist JA: **Alkylboranes in the Suzuki-Miyaura coupling: Stereochemical and mechanistic studies.** *J Org Chem* 1998, **63**(3):461-470.
44. Miyaura N, Suzuki A: **Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds.** *Chem Rev* 1995, **95**(7):2457-2483.
45. Molander GA, Elia MD: **Suzuki-Miyaura cross-coupling reactions of benzyl halides with potassium aryltrifluoroborates.** *J Org Chem* 2006, **71**(24):9198-9202.
46. Negishi E: **Handbook of Organopalladium Chemistry for Organic Synthesis;** 2002.
47. Casado AL, Espinet P: **On the configuration resulting from oxidative addition of RX to Pd(PPh₃)₄ and the mechanism of the cis-to-trans isomerization of [PdRX(PPh₃)₂] complexes (R equals aryl, X equals halide).** *Organometallics* 1998, **17**(5):954-959.
48. Ridgway BH, Woerpel KA: **Transmetalation of alkylboranes to palladium in the Suzuki coupling reaction proceeds with retention of stereochemistry.** *J Org Chem* 1998, **63**(3):458-460.

49. Stille JK, Lau KSY: **Mechanisms of Oxidative Addition of Organic Halides to Group-8 Transition-Metal Complexes.** *Accounts Chem Res* 1977, **10**(12):434-442.
50. Hayashi T, Konishi M, Kobori Y, Kumada M, Higuchi T, Hirotsu K: **Dichloro[1,1'-Bis(Diphenylphosphino)Ferrocene]Palladium-(II) - an Effective Catalyst for Cross-Coupling of Secondary and Primary Alkyl Grignard and Alkylzinc Reagents with Organic Halides.** *J Am Chem Soc* 1984, **106**(1):158-163.
51. An YL, Shao ZY, Cheng J, Zhao SY: **Highly Efficient Aluminum Trichloride Catalyzed Michael Addition of Indoles and Pyrroles to Maleimides.** *Synthesis-Stuttgart* 2013, **45**(19):2719-2726.
52. Schindler CS, Diethelm S, Carreira EM: **Nucleophilic Opening of Oxabicyclic Ring Systems.** *Angew Chem Int Edit* 2009, **48**(34):6296-6299.



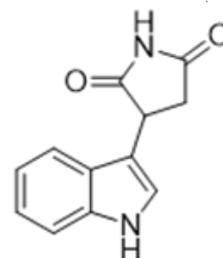
圖譜一:化合物 L11 之氫核磁共振光譜圖。



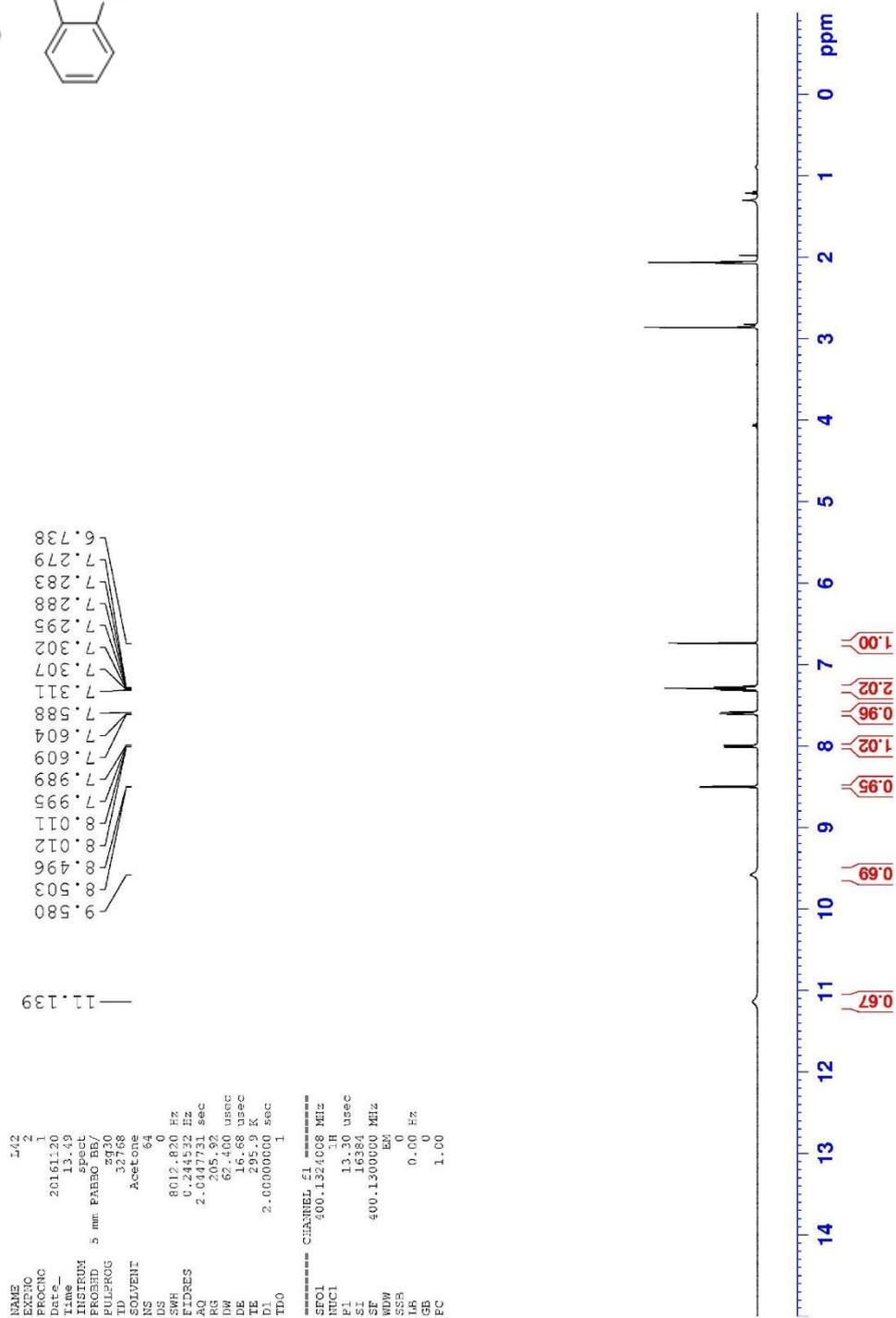
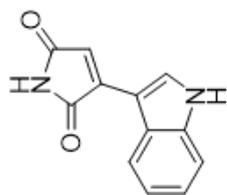
圖譜二:化合物 L11 之碳核磁共振光譜圖。

LIST: hei1873_41-c1 21-Sep-17 REG : 15:17.5 #9
Samp: Start : 14:01:51 4902
Mode: EI +VE +LMR ESCAN (EXP) UP HR NRM
Oper: Inlet :
Limt: (0)
: (239) C13.H23.N2.O2
Peak: 1000.00 mmu R+D: -2.0 > 60.0
Data: +/2600>2610 (CMASS : converted |CMASS : converted |CMASS : con

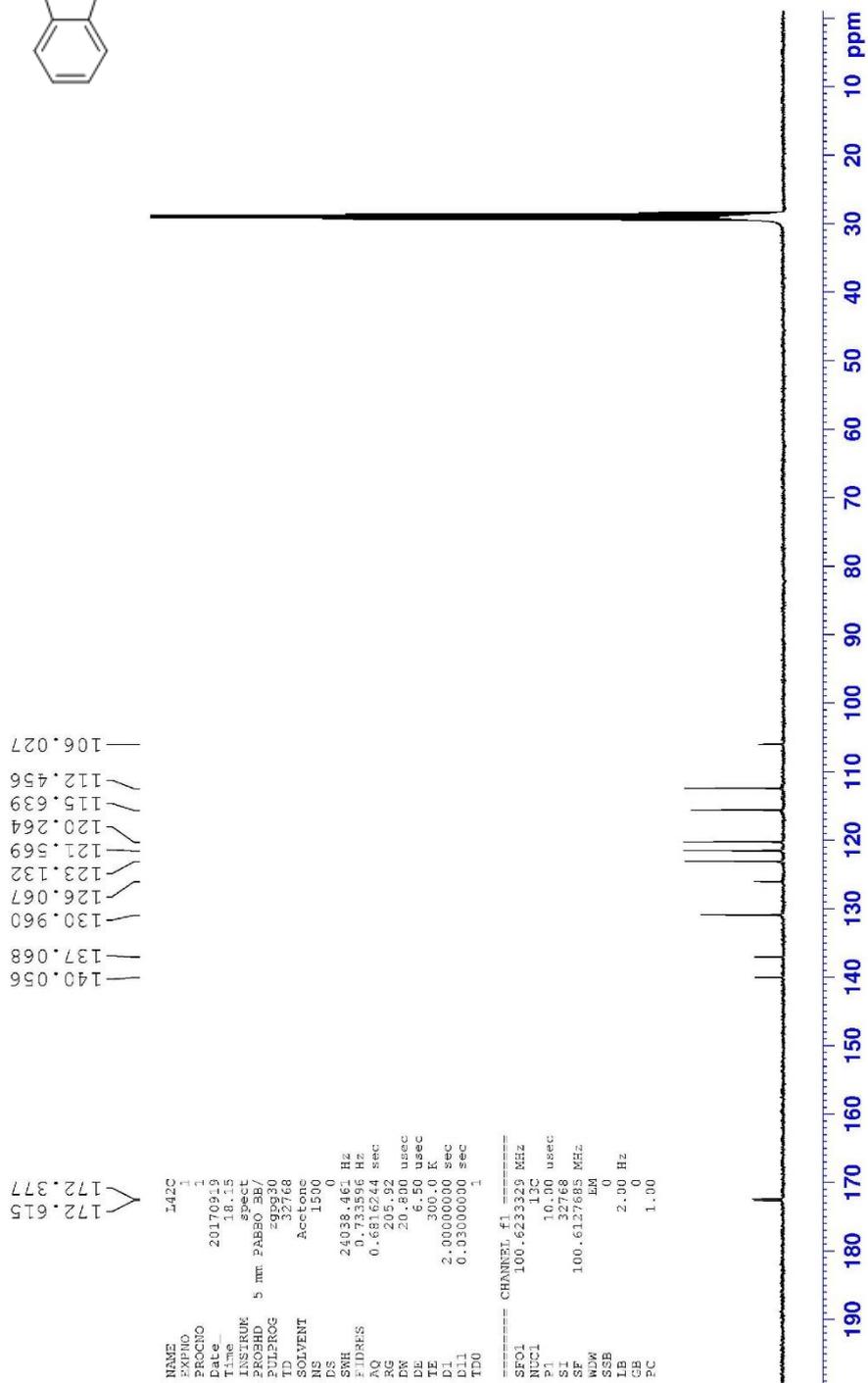
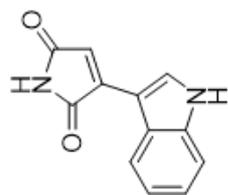
Mass	Intensity	%RA	Flags	Delta	R+D	Composition
214.0748	221970	100.00	#	-0.5	9.0	C12.H10.N2.O2



圖譜三:化合物 L11 之質譜圖。



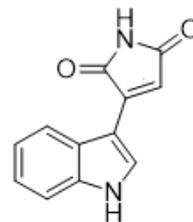
圖譜四:化合物 L12 之氫核磁共振光譜圖。



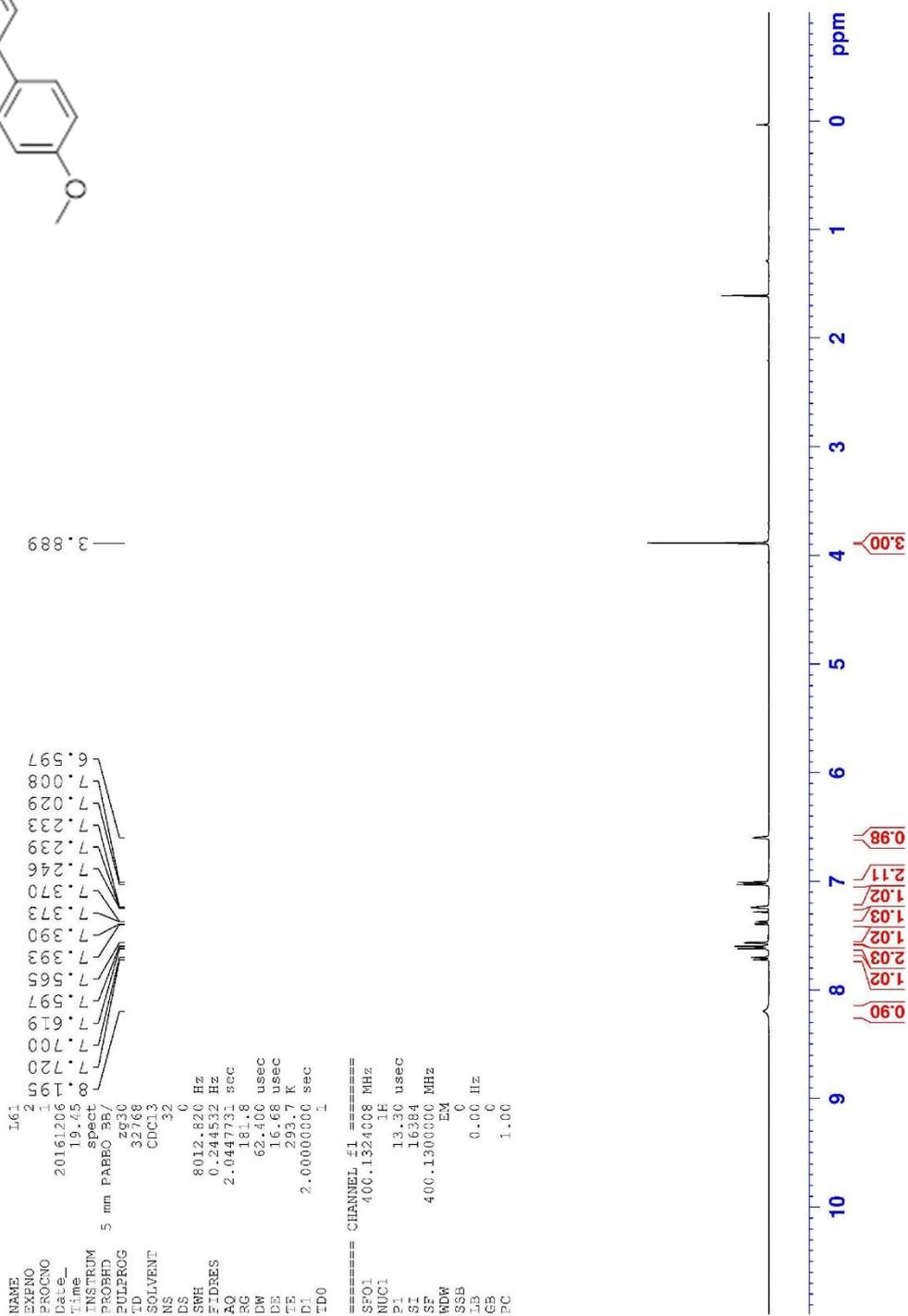
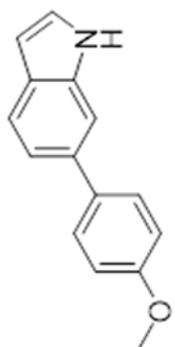
圖譜五:化合物 L12 之碳核磁共振光譜圖。

LIST: hei1874_42-c4 .21-Sep-17 REG : 07:09.6 #9
Samp: Start : 15:31:55 4789
Mode: EI +VE +LMR .ESCAN (EXP) UP HR NRM Inlet :
Oper:
Limit: (0)
: (239) C13.H23.N2.O2
Peak: 1000.00 mmu R+D: -2.0 > 60.0
Data: +/1218>1306 (CMASS : converted; CMASS : converted |CMASS : con

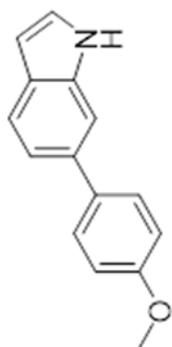
Mass	Intensity	%RA	Flags	Delta	R+D	Composition
212.0594	30533376	100.00	#	(mmu) -0.8	10.0	C12.H8.N2.O2



圖譜六:化合物 L12 之質譜圖。



圖譜七:化合物 L41 之氫核磁共振光譜圖。



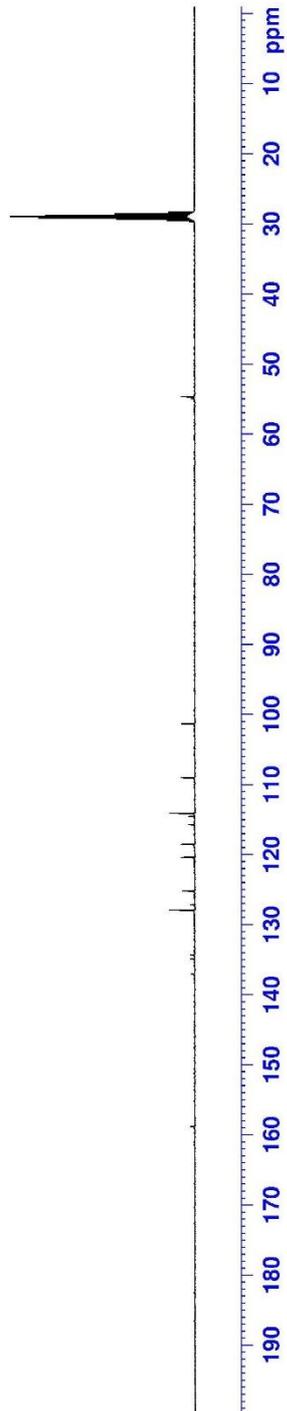
54.941
54.674

137.057
134.922
134.845
127.919
127.203
125.222
120.427
118.543
115.729
114.572
114.121
109.029
101.333

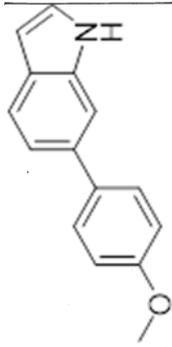
```

NAME          L61C
EXPNO         1
PROCNO        1
Date_         20170919
Time          15.51
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm PABBO BB/
PULPROG       zgpg30
TD            32768
SOLVENT       Acetone
NS            1500
DS            0
SWH           24038.461 Hz
FIDRES       0.733596 Hz
AQ           0.6816244 sec
RG           205.92
DW           20.800 usec
DE           6.50 usec
TE           299.9 K
D1            2.0000000 sec
D11          0.03000000 sec
TD0           1

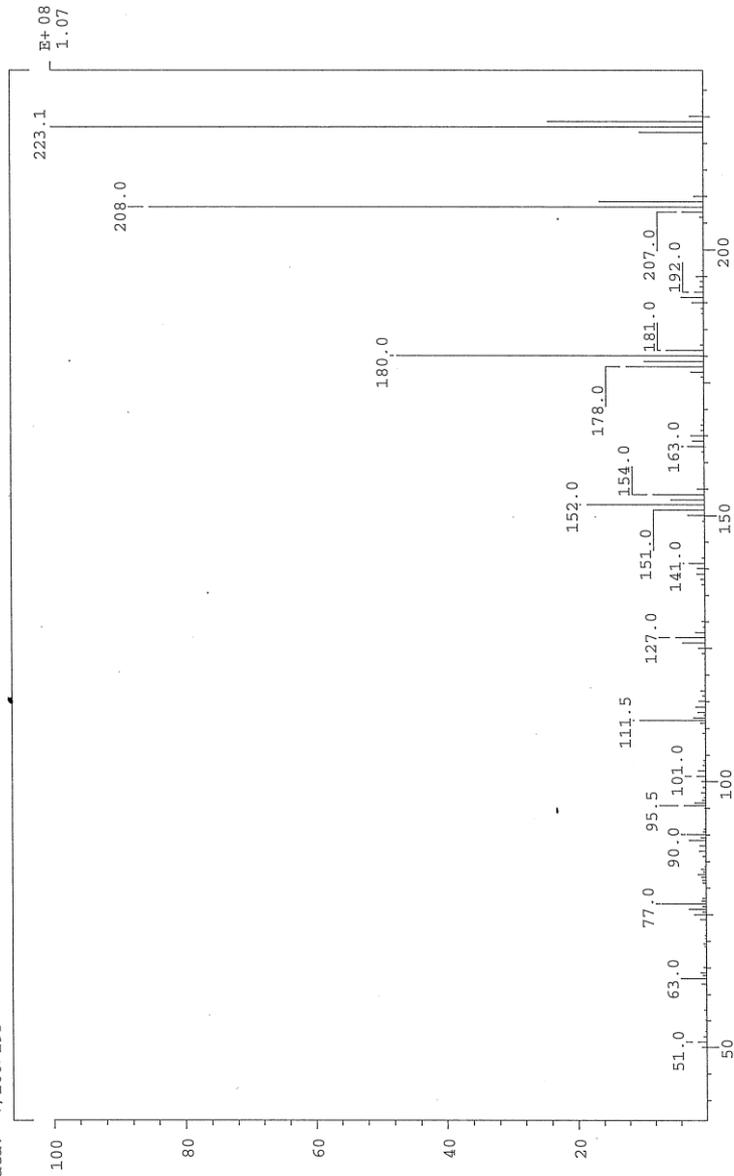
===== CHANNEL f1 =====
SFO1         100.6233329 MHz
NUC1         13C
P1           10.00 usec
SI           32768
SF           100.6127685 MHz
WDW          EM
SSB          0
TB           2.00 Fz
GB           0
PC           1.00
  
```



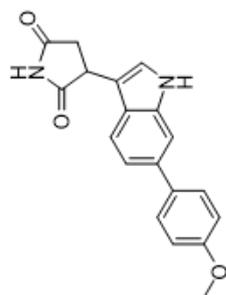
圖譜八:化合物 L41 之碳核磁共振光譜圖。



SPEC: lei1896_61
 Samp: 21-Sep-17 REG : 07:08.1 #9
 Mode: EI +VE +LMR BSCAN (EXP) UP LR NRM Start : 13:35:18 596
 Oper: Inten : 107000184
 Base: 223.1 RIC : 507363245
 Norm: 223.1
 Peak: 1000.00 mmu
 Data: +/160>195



圖譜九:化合物 L41 之質譜圖。



```

NAME          I62
EXPNO         1
PROCNO        1
Date_         20161210
Time          16.20
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm PABBO 15b7
PULPROG       zg30
SOLVENT       Acetone
NS            32
DS            0
SMH           8012.820 Hz
FIDRES        0.244532 Hz
AQ            2.0447731 sec
RG            205.92
DM            62.400 usec
DE            16.68 usec
TE            296.7 K
D1            2.00000000 sec
TD0           1
===== CHANNEL f1 =====
SFO1          400.1324008 MHz
NUC1          1H
P1            13.30 usec
SI            16384
SF            400.1300000 MHz
WDW           EM
SSB           0
GB            0
PC            1.00
  
```

```

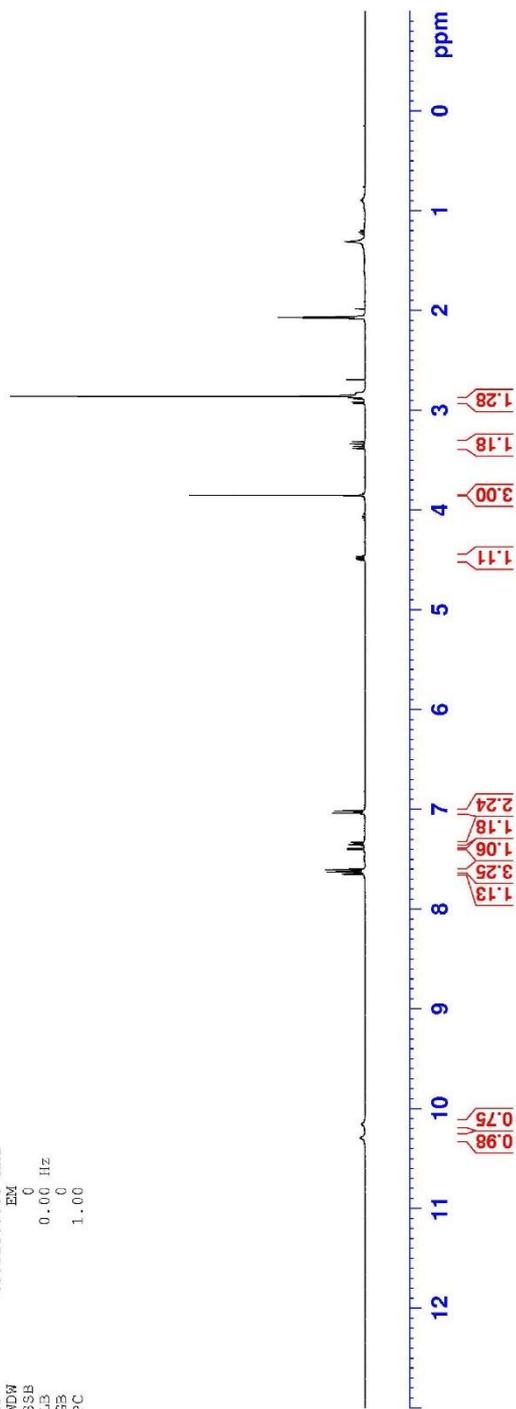
7.646
7.643
7.625
7.603
7.397
7.390
7.353
7.349
7.332
7.328
7.035
7.013
  
```

```

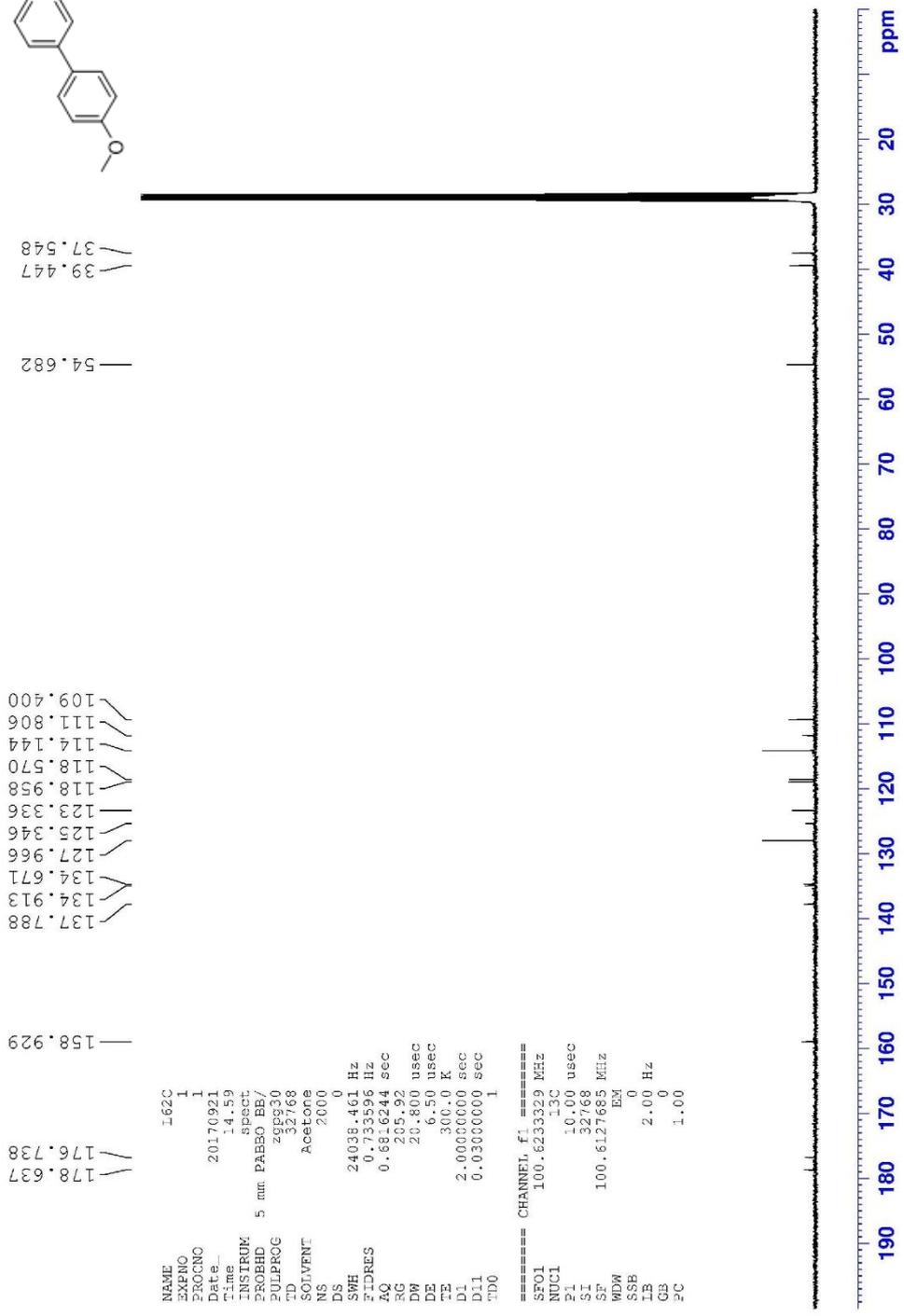
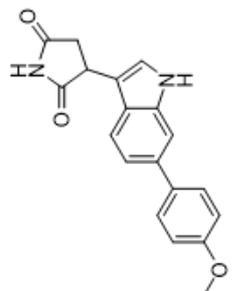
10.289
10.152
  
```

```

4.498
4.484
4.473
4.460
3.851
3.851
3.381
3.357
3.336
3.312
2.927
2.914
2.882
2.869
  
```



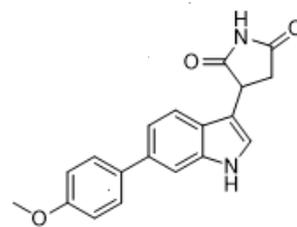
圖譜十:化合物 L42 之氫核磁共振光譜圖。



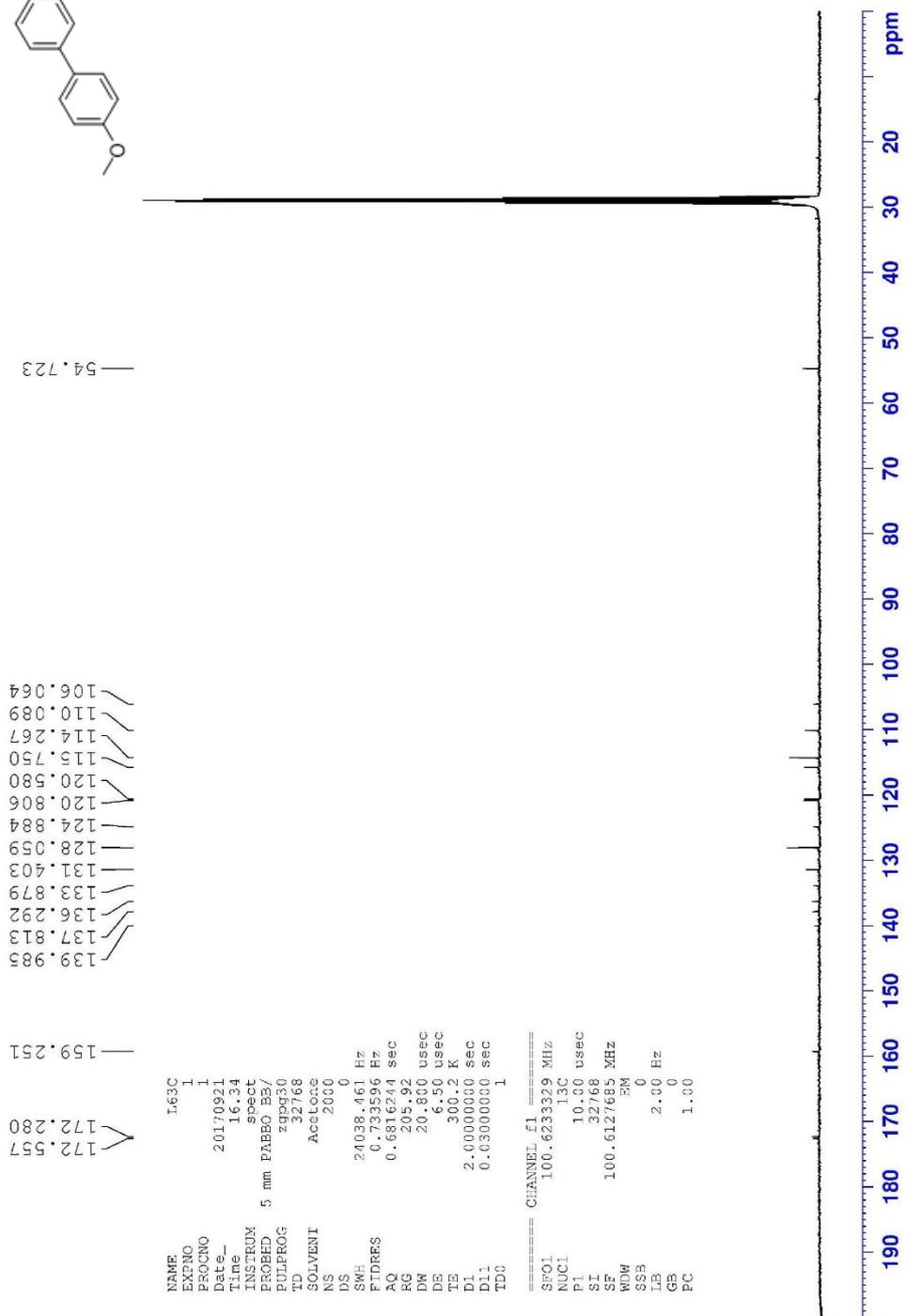
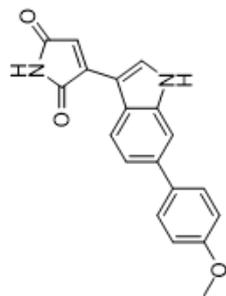
圖譜十一:化合物 L42 之碳核磁共振光譜圖。

LIST: hei1872_62-c5 21-Sep-17 REG : 02:34.9 #9
 Samp: Start : 13:35:21 4234
 Mode: EI +VE +LMR ESCAN (EXP) UP HR NRM
 Oper: Inlet :
 Limit: (0)
 : (375) C23.H23.N2.O3
 Peak: 1000.00 mmu R+D: -2.0 > 60.0
 Data: +/451>526 (CMASS : converted |CMASS : converted |CMASS : conve

Mass	Intensity	%RA	Flags	Delta	R+D	Composition
320.1169	85211	100.00	#	-0.8	13.0	C19.H16.N2.O3



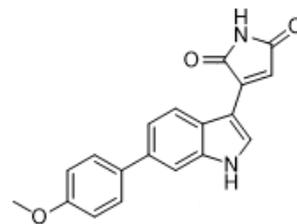
圖譜十二:化合物 L42 之質譜圖。



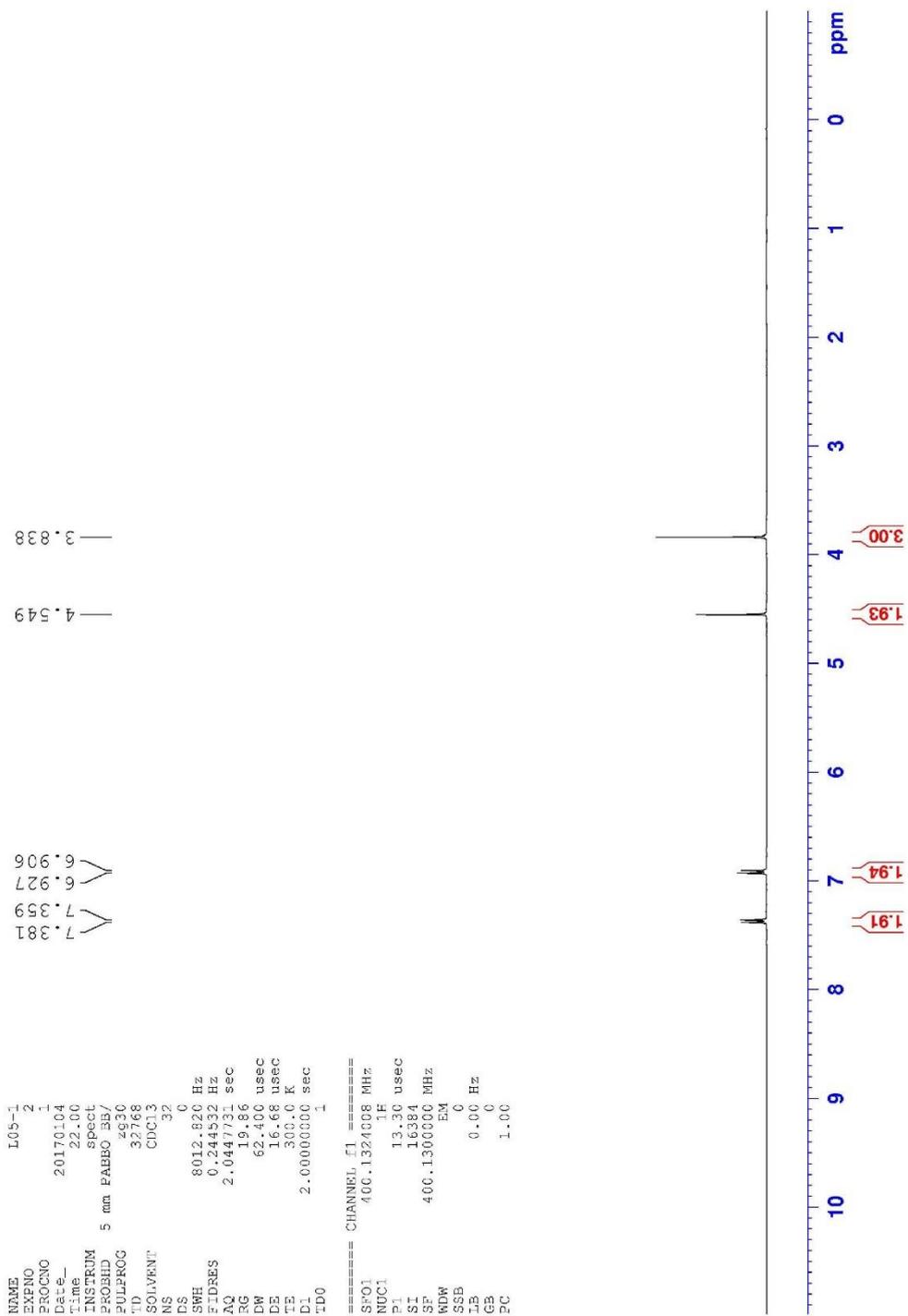
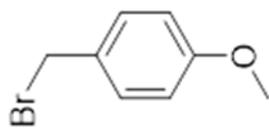
圖譜十四:化合物 L43 之碳核磁共振光譜圖。

LIST: hei1871_63-c3 .21-Sep-17 REG : 21:10.4 #9
 Samp: Start : 12:03:26 4873
 Mode: EI +VE +LMR .ESCAN (EXP) UP HR NRM
 Oper: Inlet :
 Limit: (0)
 : (375) C23.H23.N2.O3
 Peak: 1000.00 mmu R+D: -2.0 > 60.0
 Data: +/3708>3718 (CMASS : converted |CMASS : converted |CMASS : con

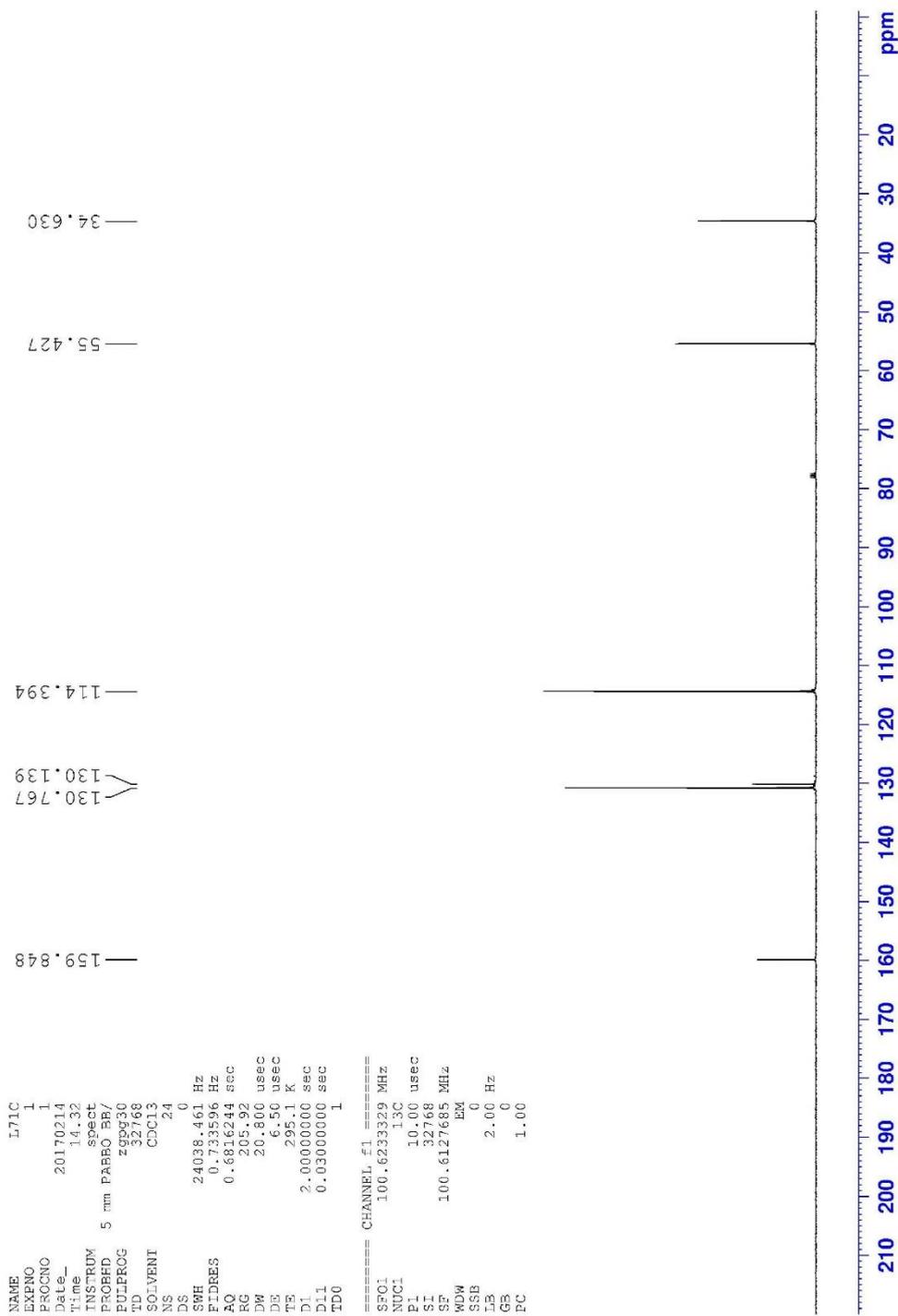
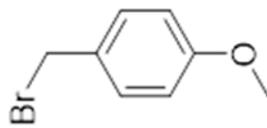
Mass	Intensity	%RA	Flags	Delta	R+D	Composition
318.1000	193803	100.00	#	0.4	14.0	C19.H14.N2.O3



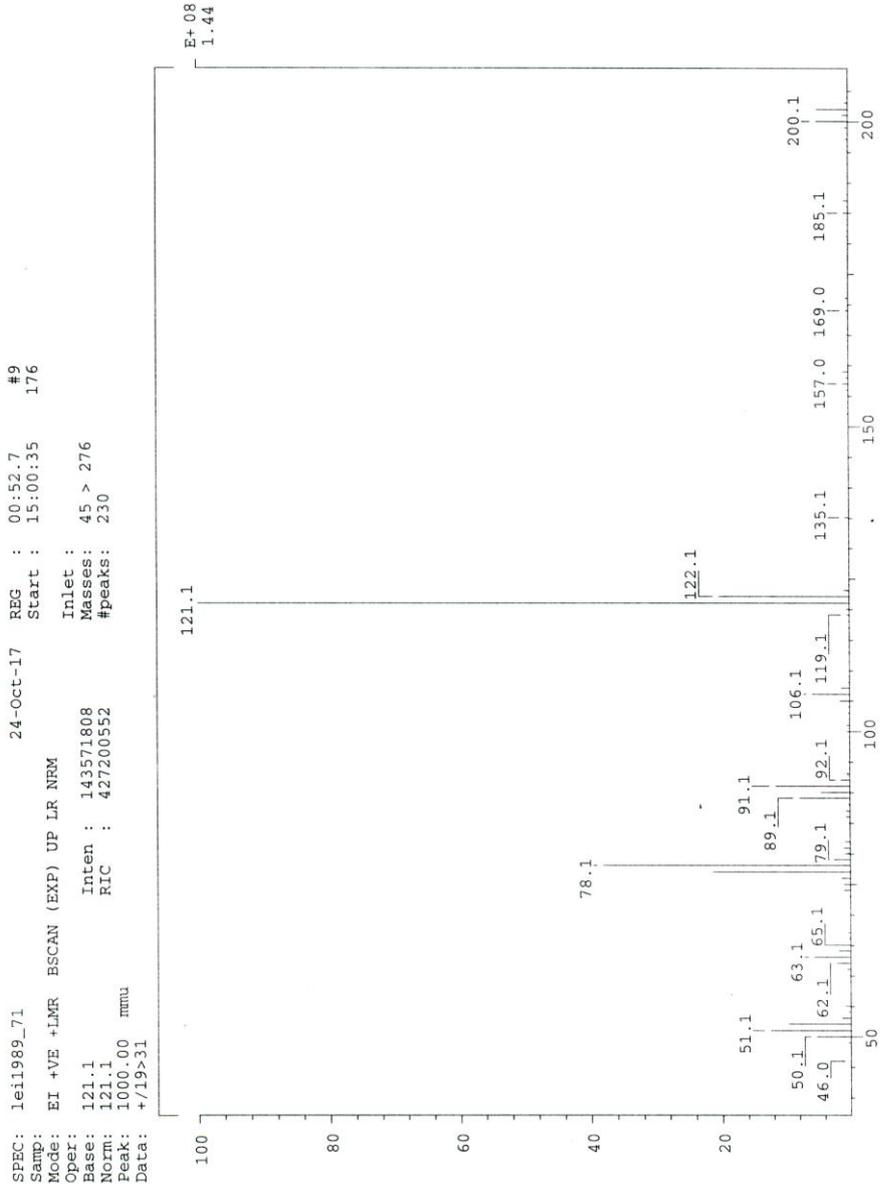
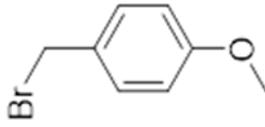
圖譜十五:化合物 L43 之質譜圖。



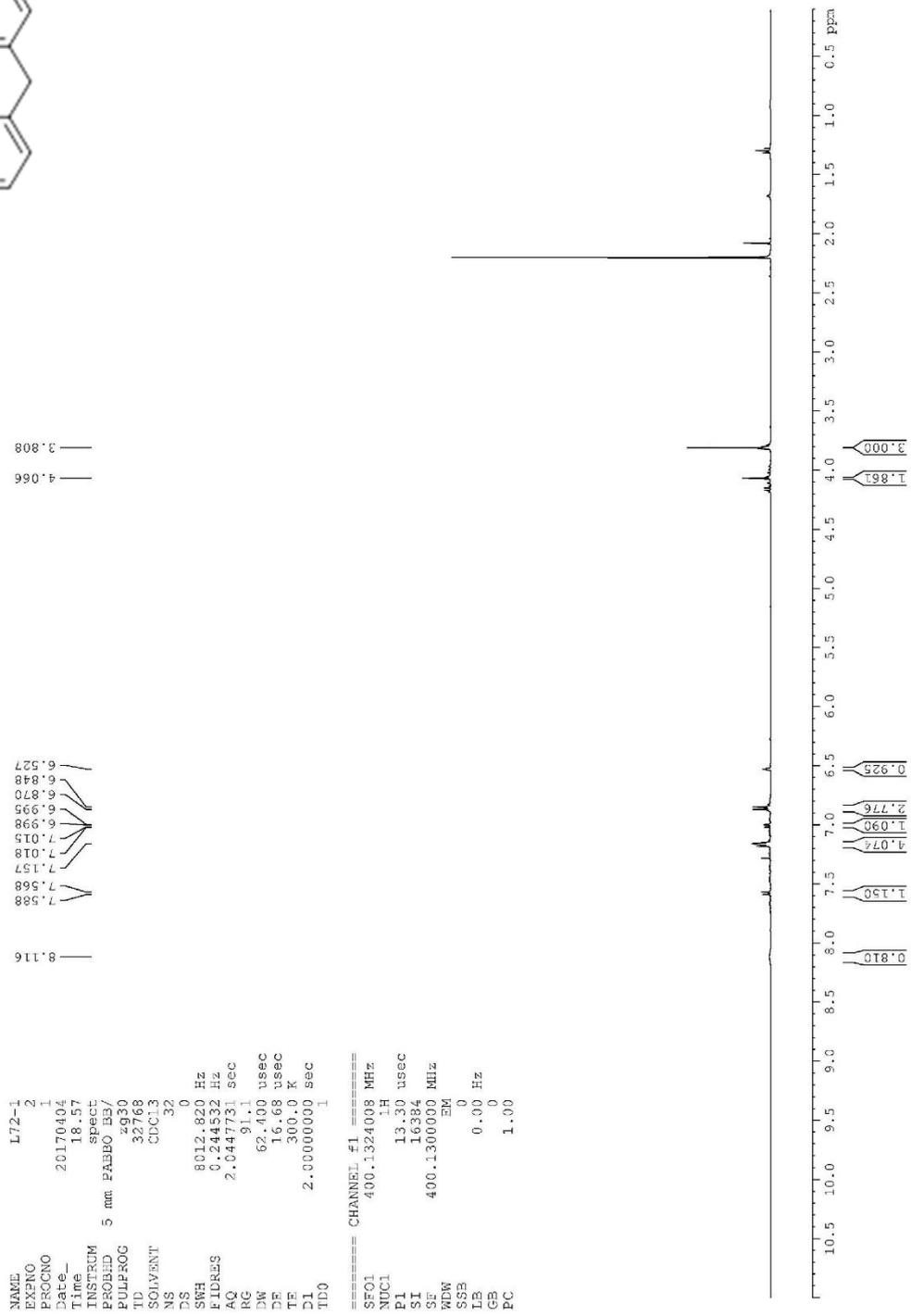
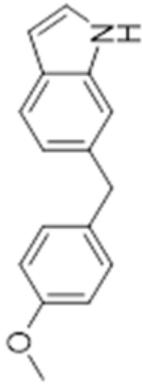
圖譜十六:化合物 L51 之氫核磁共振光譜圖。



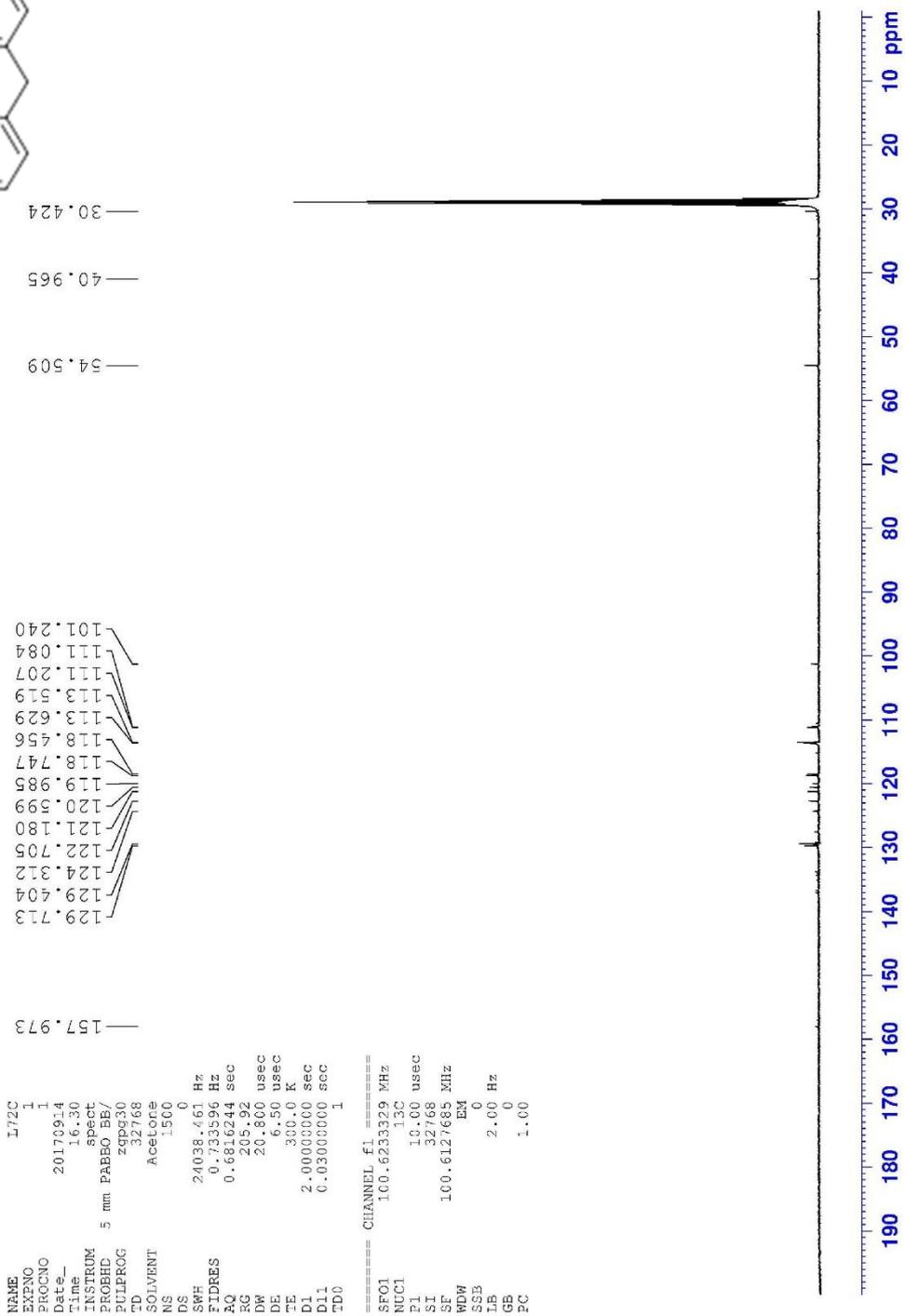
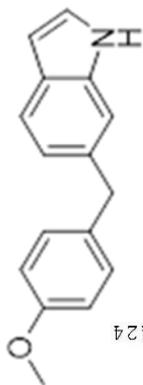
圖譜十七:化合物 L51 之碳核磁共振光譜圖。



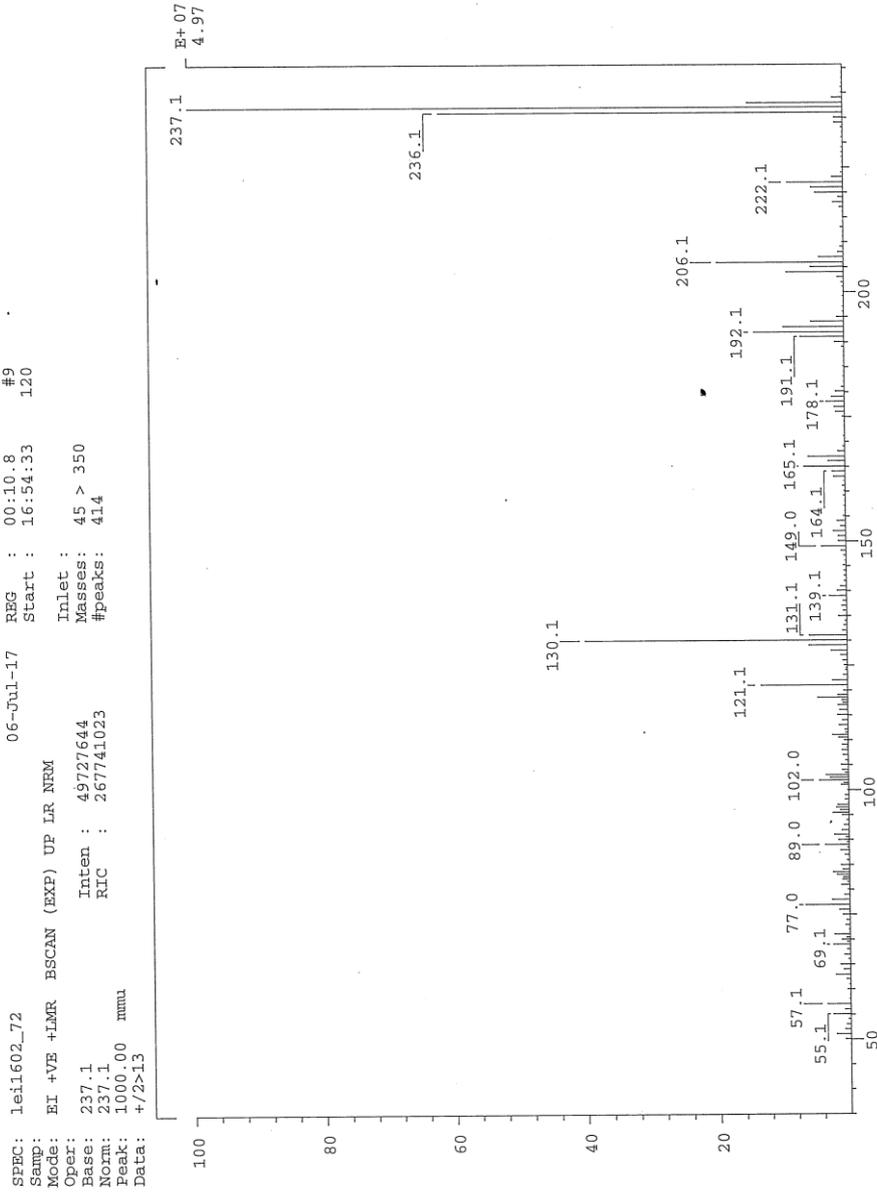
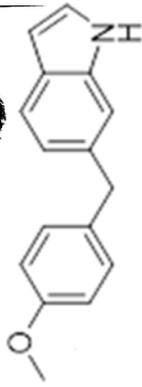
圖譜十八:化合物 L51 之質譜圖。



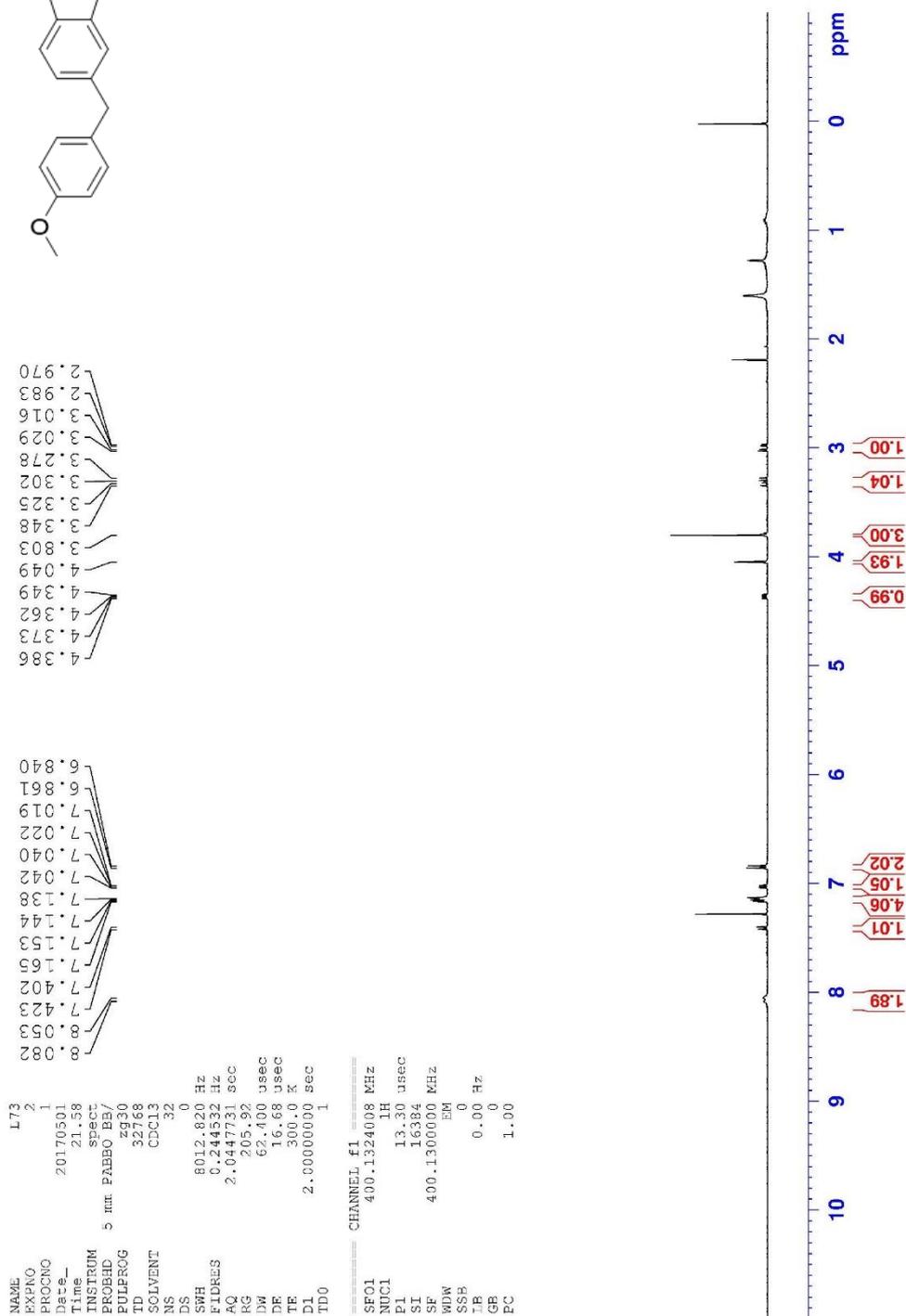
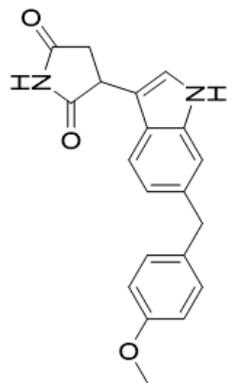
圖譜十九:化合物 L52 之氫核磁共振光譜圖。



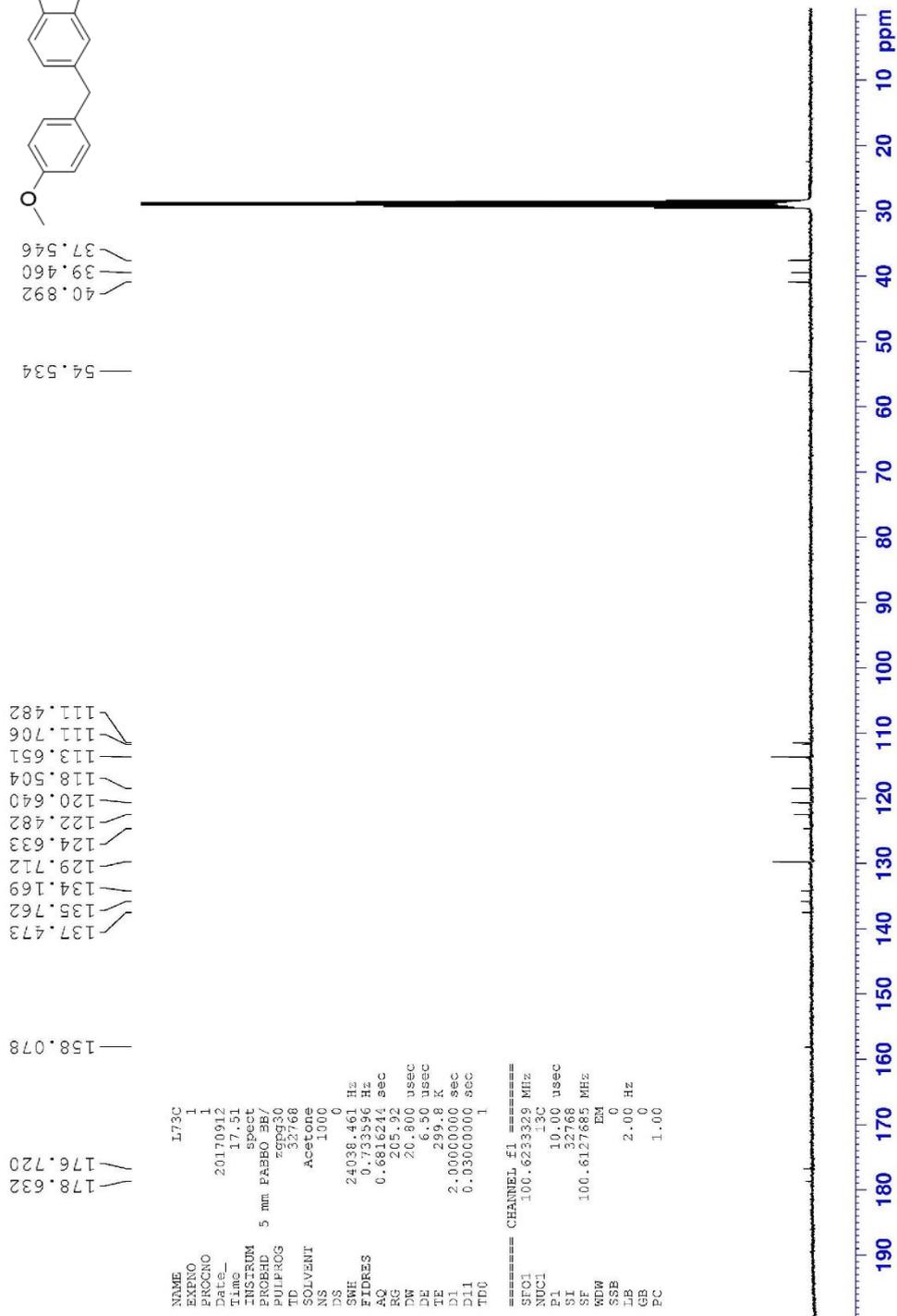
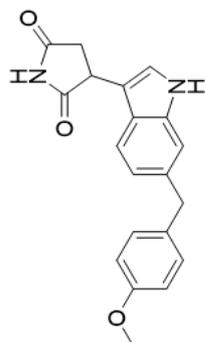
圖譜二十:化合物 L52 之碳核磁共振光譜圖。



圖表二十一:化合物 L52 之質譜圖。



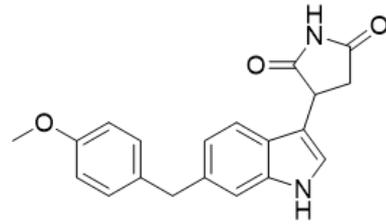
圖譜二十二:化合物 L53 之氫核磁共振光譜圖。



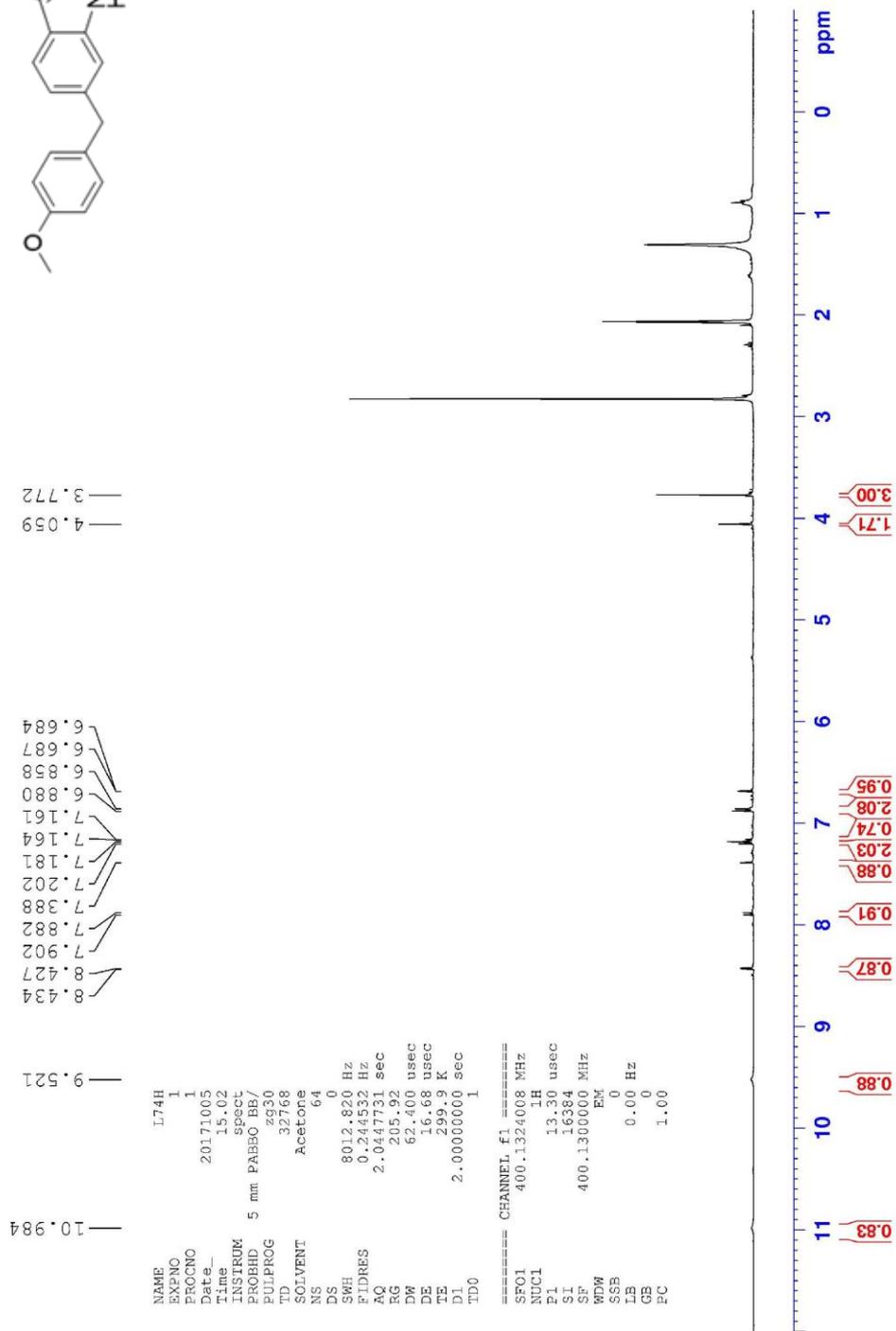
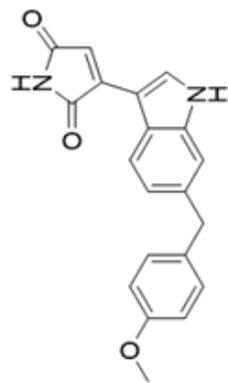
圖譜二十三:化合物 L53 之碳核磁共振光譜圖。

LIST: he11485_l73-c1 17-Jul-17 REG : 06:37.6 #9
 Samp: Start : 10:15:08 855
 Mode: EI +VE +LMR ESCAN (EXP) UP HR NRM
 Oper: Inlet :
 Limt: (0)
 : (418) C22.H62.N2.O4
 Peak: 1000.00 mmu R+D: -2.0 > 60.0
 Data: +/539>549 (CMASS : converted |CMASS : converted |CMASS : conve

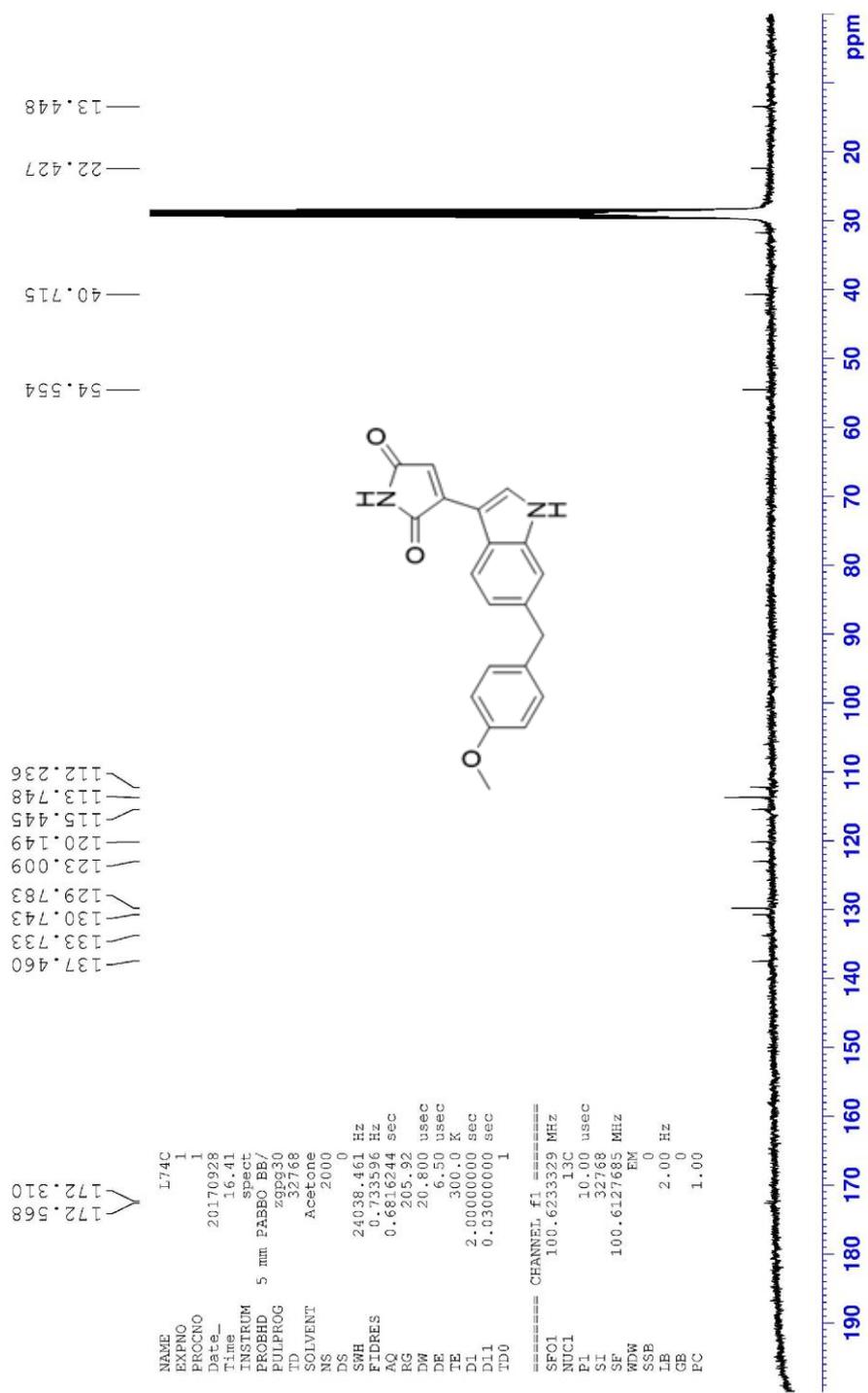
Mass	Intensity	%RA	Flags	Delta	R+D	Composition
334.1319	1907587	100.00	#	-0.2	13.0	C20.H18.N2.O3



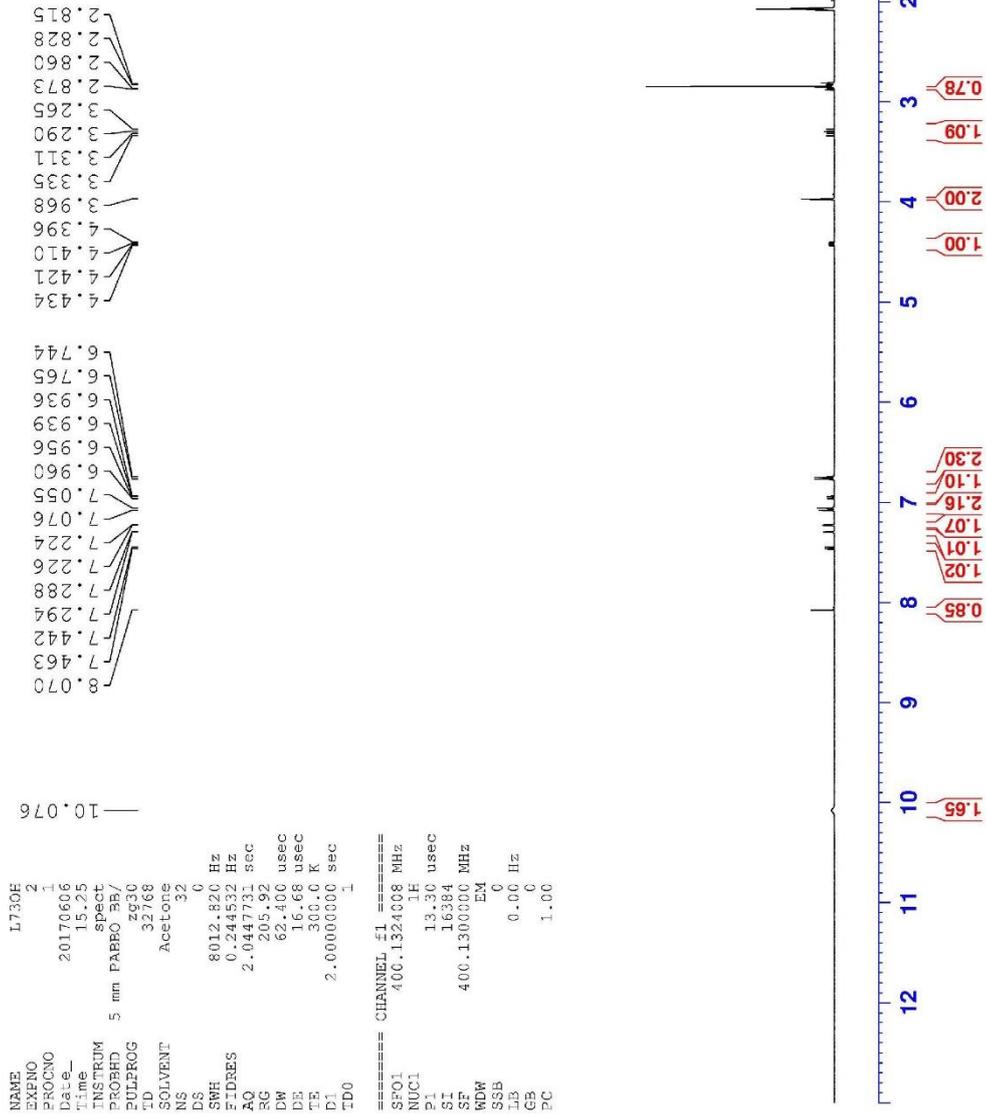
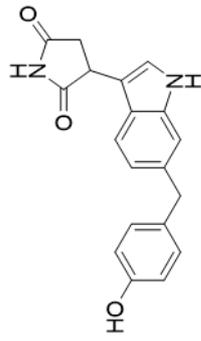
圖譜二十四:化合物 L53 之質譜圖。



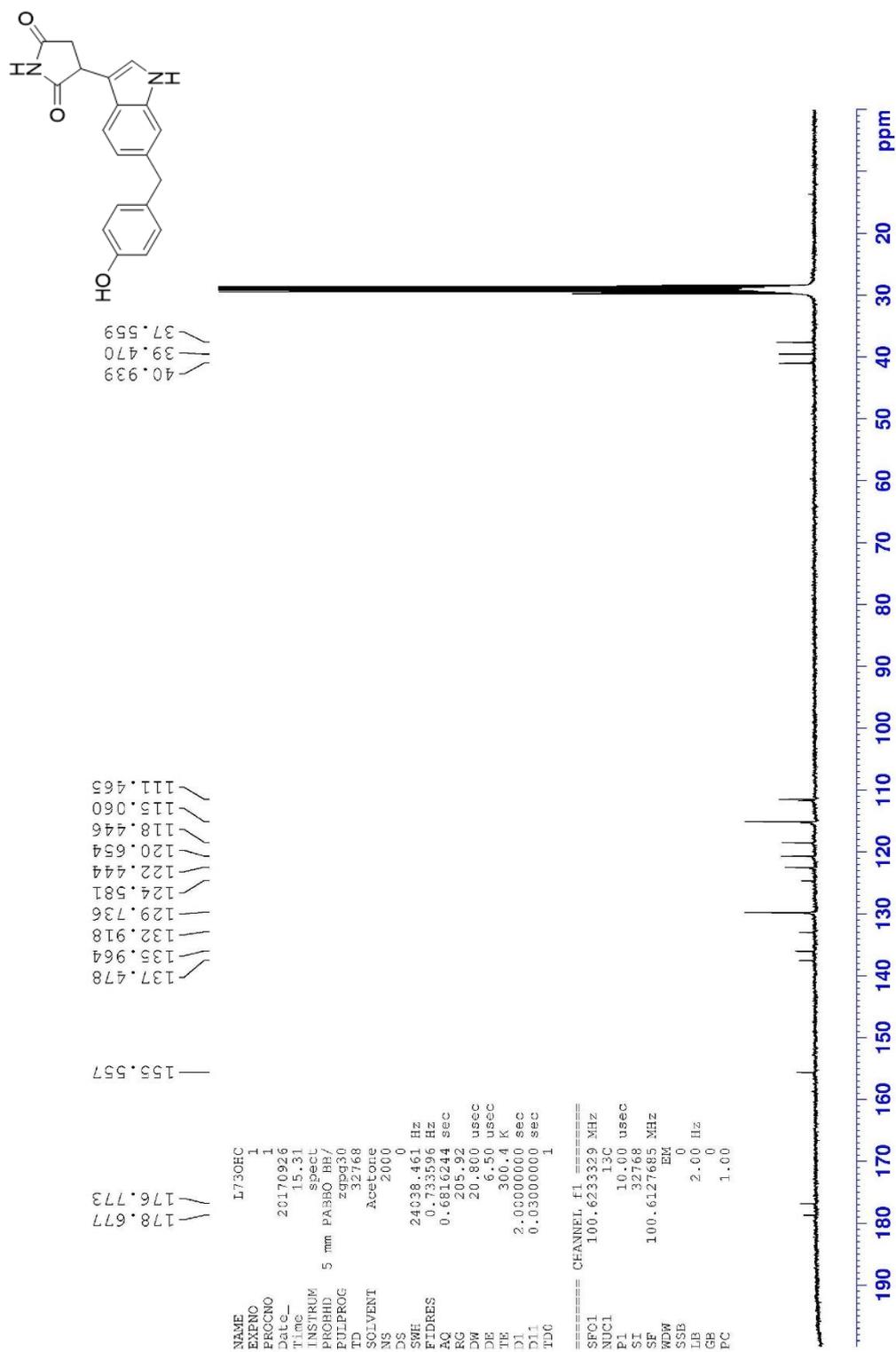
圖譜二十五:化合物 L54 之氫核磁共振光譜圖。



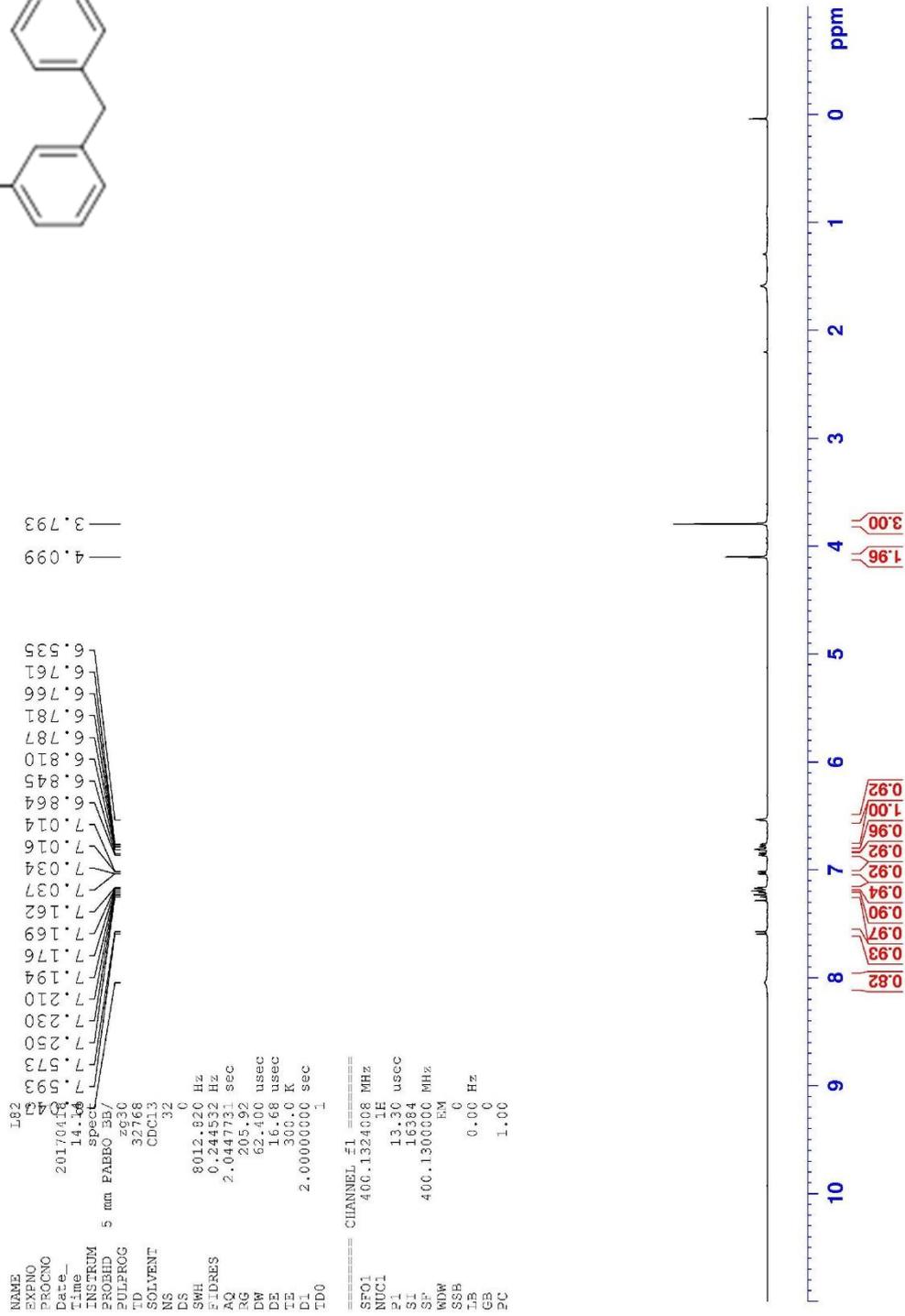
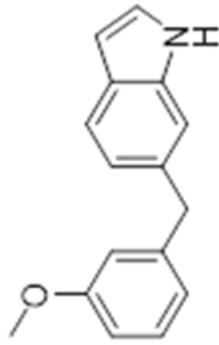
圖譜二十六:化合物 L54 之碳核磁共振光譜圖。



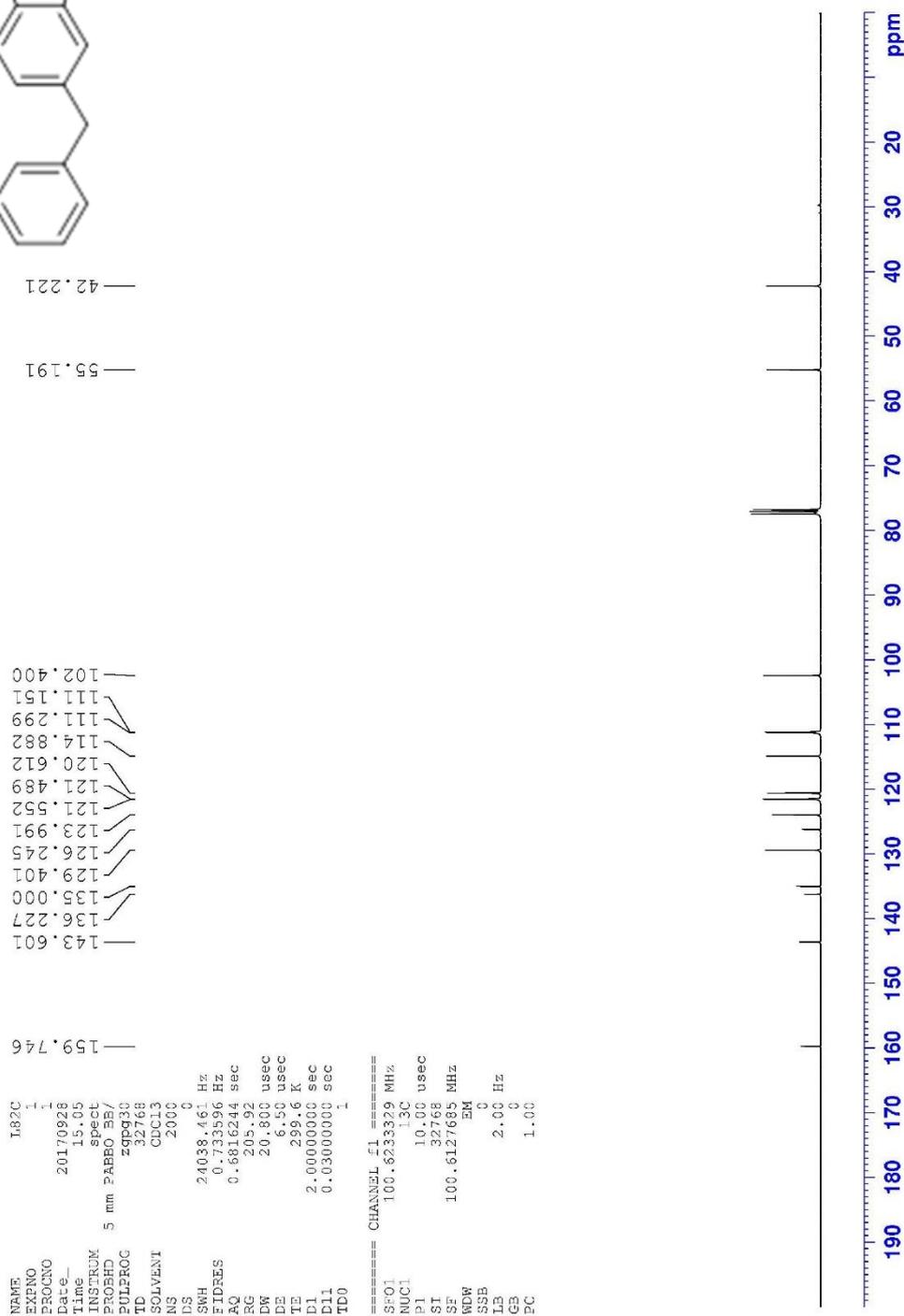
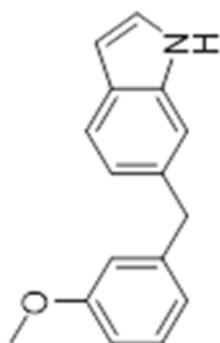
圖譜二十八:化合物 L55 之氫核磁共振光譜圖。



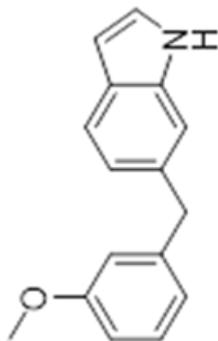
圖譜二十九:化合物 L55 之碳核磁共振光譜圖。



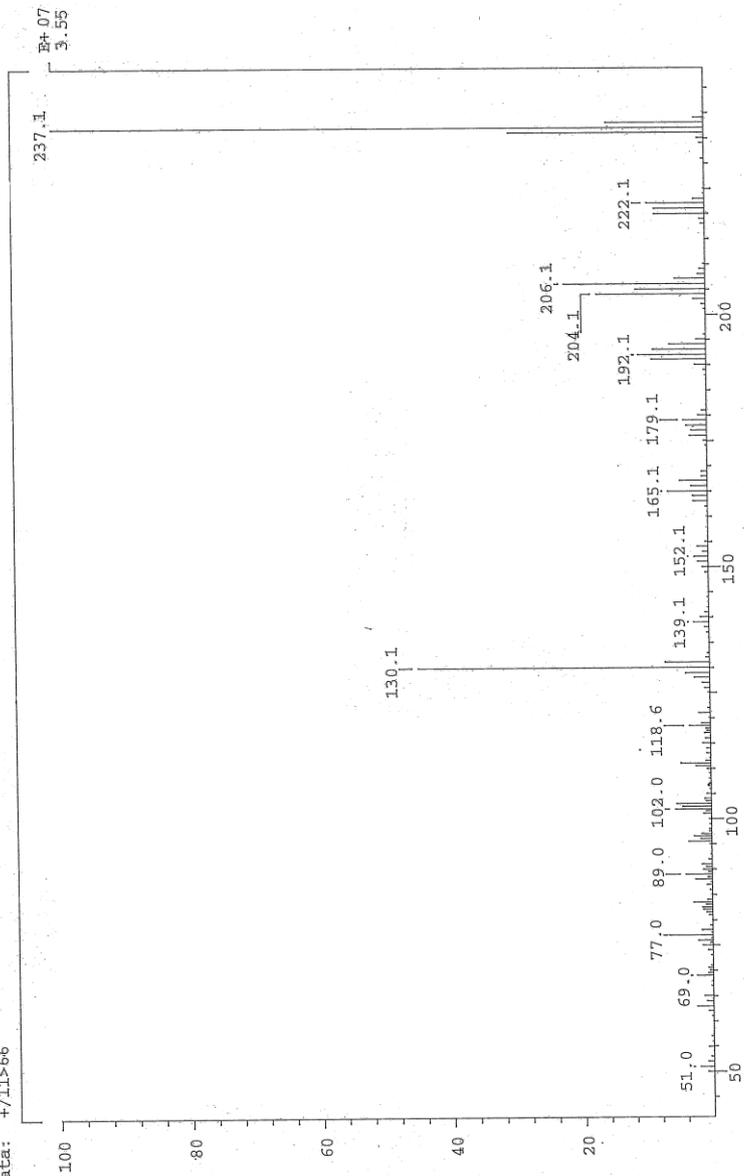
圖譜三十一:化合物 L62 之氫核磁共振光譜圖。



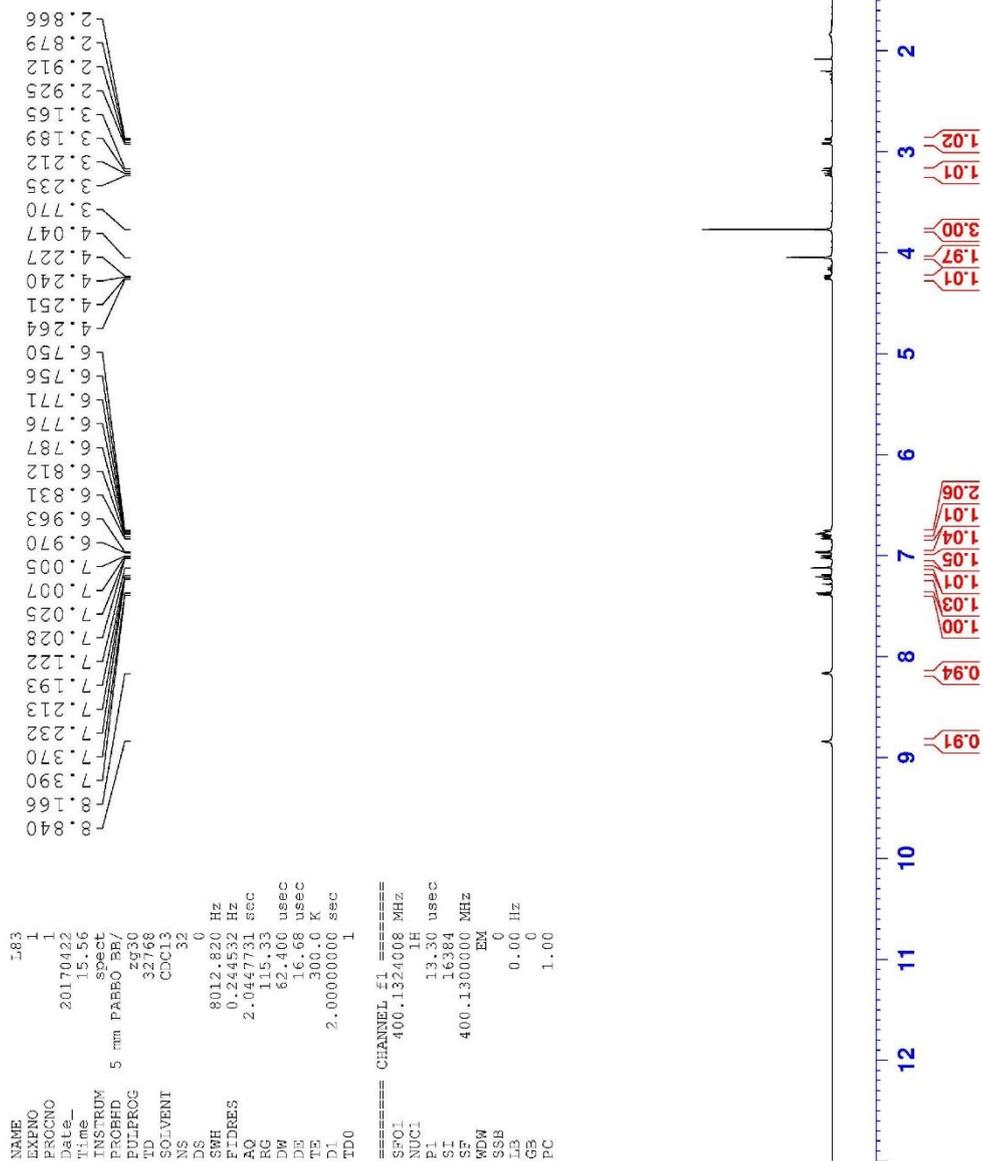
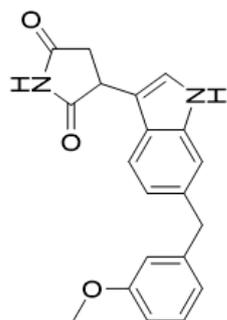
圖譜三十二:化合物 L62 之碳核磁共振光譜圖。



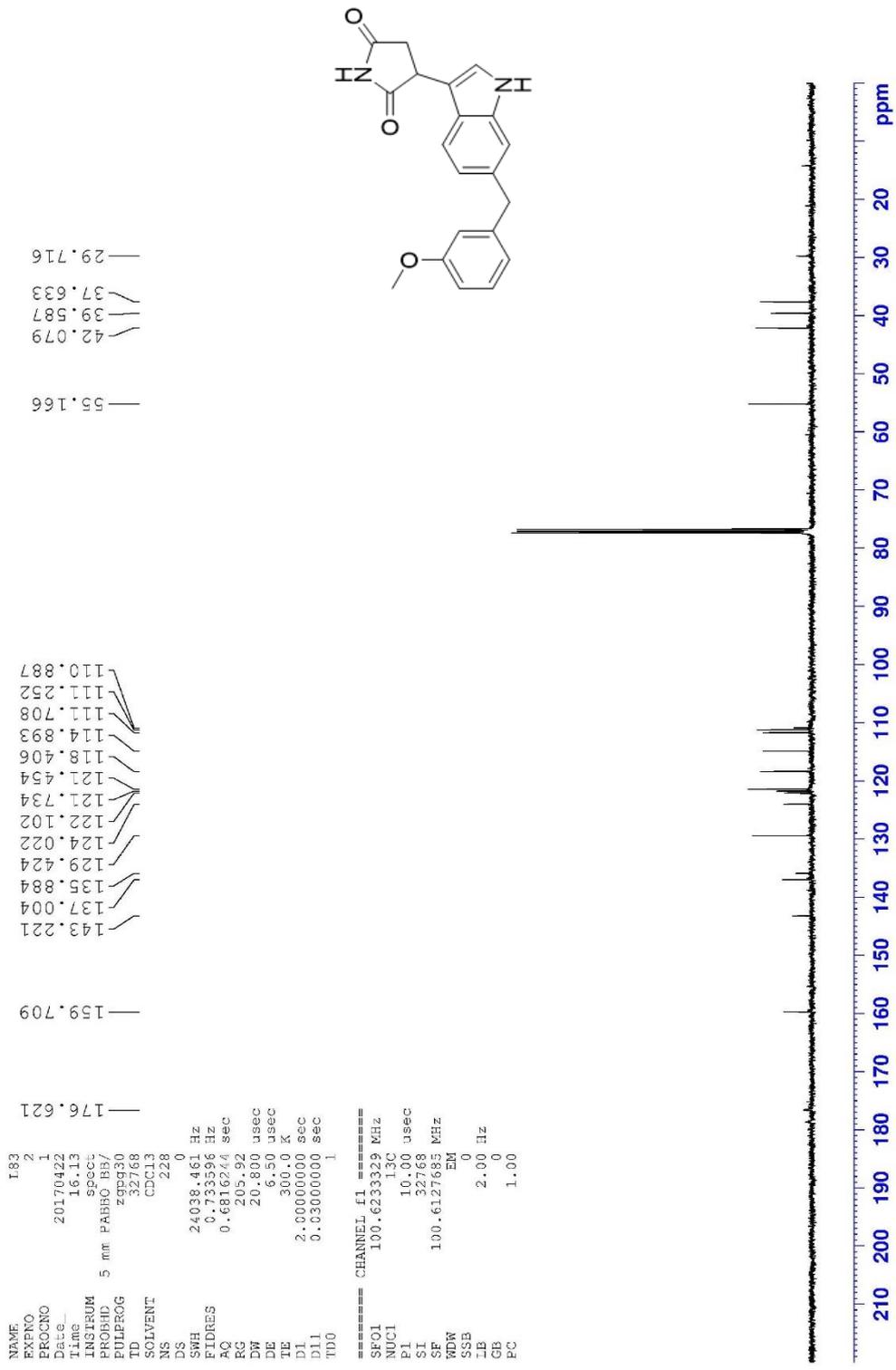
SPEC: le11603_182
 Samp: 06-Jul-17 REG : 00:30.8 #9
 Start : 17:01:39 187
 Mode: EI +VE +LMR BSCAN (EXP) VP LR NRM
 Oper: 237.1 Inlet :
 Base: 237.1 Inten : 35522208 Masses: 45 > 245
 Norm: 237.1 RIC : 176213941 #peaks: 282
 Peak: 1000.00 m/z
 Data: +/11>66



圖譜三十三:化合物 L62 之質譜圖。



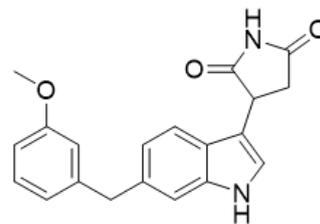
圖譜三十四:化合物 L63 之氫核磁共振光譜圖。



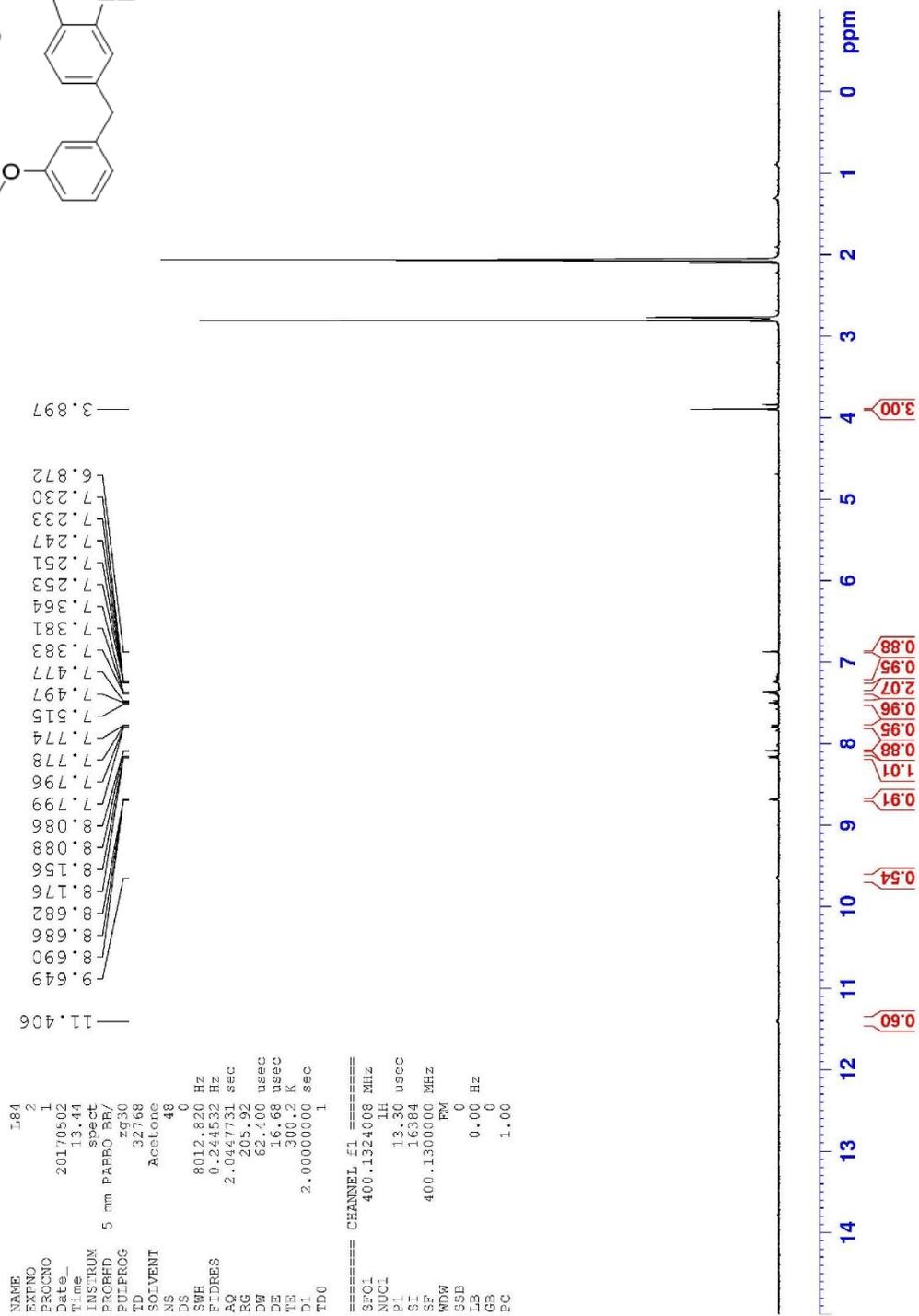
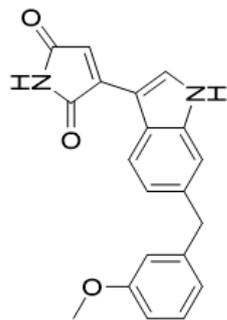
圖譜三十五:化合物 L63 之碳核磁共振光譜圖。

LIST: heil504_183-c1 19-Jul-17 REG : 01:08.7 #9
 Samp: Start : 11:51:45 387
 Mode: EI +VE +LMR ESCAN (EXP) UP HR NRM
 Oper: Inlet :
 Limt: (0)
 : (432) C22.H62.N3.O4
 Peak: 1000.00 mmu R+D: -2.0 > 60.0
 Data: +/203>276 (CMASS : converted |CMASS : converted |CMASS : conve

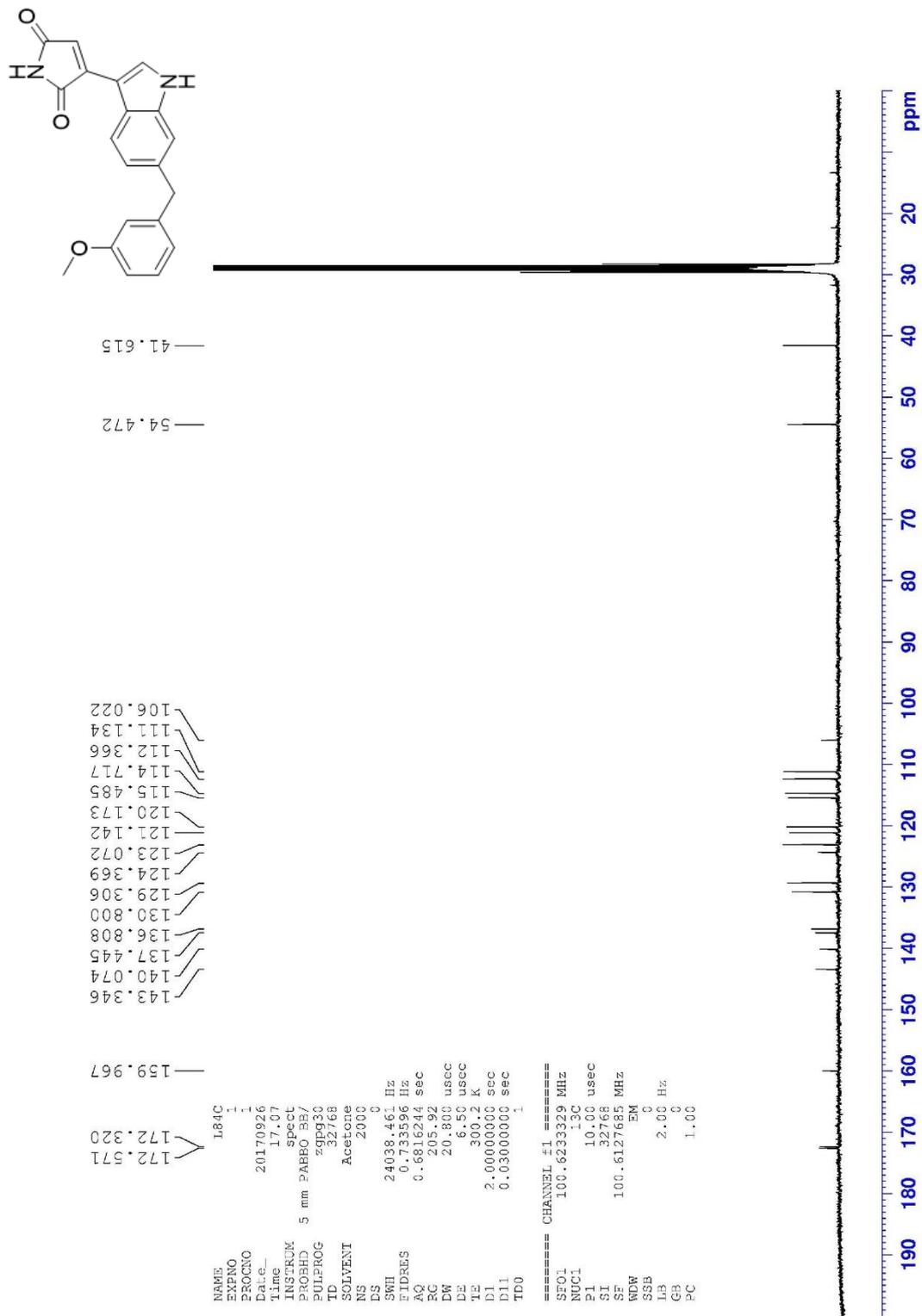
Mass	Intensity	%RA	Flags	Delta	R+D	Composition
334.1313	178368	89.35	#	0.4	13.0	C20.H18.N2.O3



圖譜三十六:化合物 L63 之質譜圖。



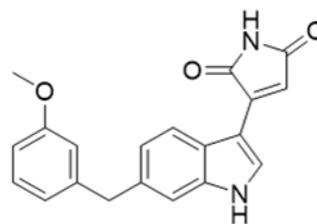
圖譜三十七:化合物 L64 之氫核磁共振光譜圖。



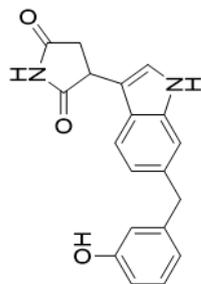
圖譜三十八:化合物 L64 之碳核磁共振光譜圖。

LIST: hei1492_184-c2 18-Jul-17 REG : 07:51.1 #9
 Samp: Start : 07:50:56 1432
 Mode: EI +VE +LMR ESCAN (EXP) UP HR NRM
 Oper: Inlet :
 Limit: (0)
 : (418) C22.H62.N2.O4
 Peak: 1000.00 mmu R+D: -2.0 > 60.0
 Data: +/247>345 (CMASS : converted |CMASS : converted |CMASS : conve

Mass	Intensity	%RA	Flags	Delta	R+D	Composition
332.1158	596315	100.00	#	0.3	14.0	C20.H16.N2.O3



圖譜三十九:化合物 L64 之質譜圖。



```

NAME          L830E
EXPNO         2
PROCNO        1
Date_         20170812
Time          13.30
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm PABBO BB
PULPROG       zgpg30
ID            32768
SOLVENT       Acetone
NS            32
DS            0
SWH           8012.820 Hz
FIDRES       0.244532 Hz
AQ           2.0447731 sec
RG           205.92
CW           62.400 usec
DE           16.68 usec
TE           298.4 K
IE           2.0000000 sec
C1           1
ID0          1

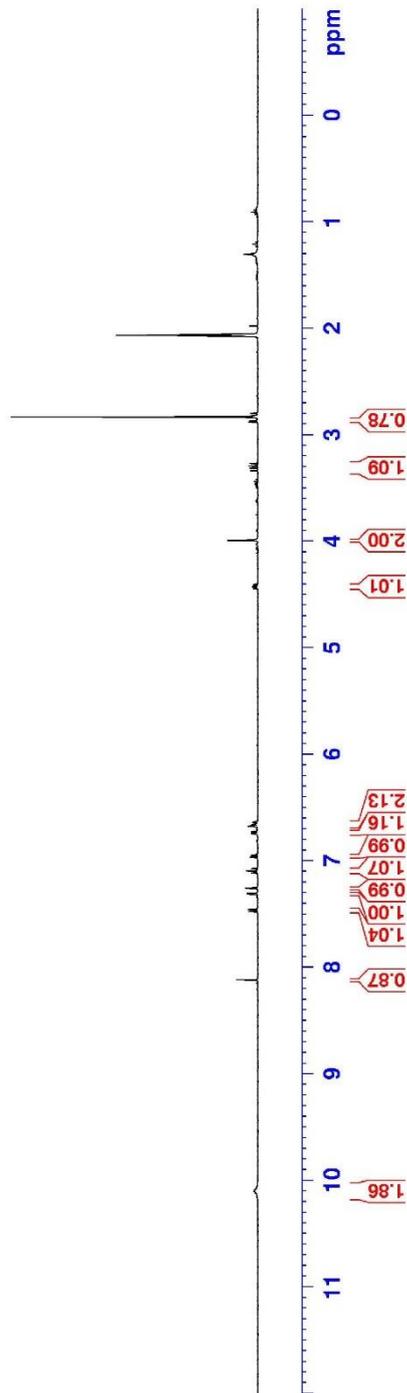
===== CHANNEL f1 =====
SFO1         400.1324008 MHz
NUC1         1H
PC1         13.30 usec
SI1         16384
SF1         400.1300000 MHz
SFB         EM
SSB         0
LB          0.00 Hz
GB          1.00
PC

```

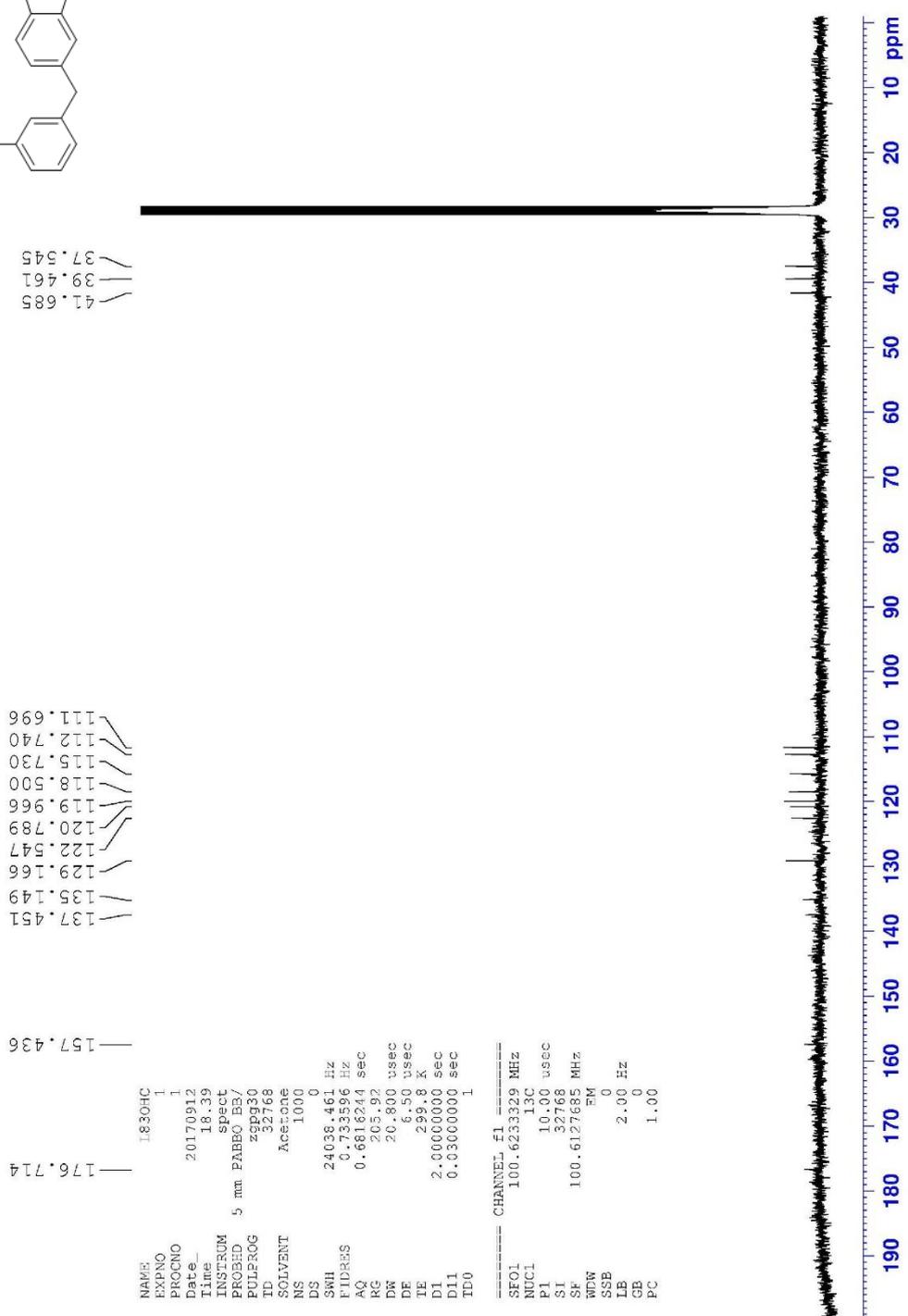
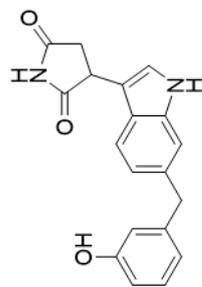
```

8.121
7.479
7.458
7.314
7.308
7.259
7.115
7.096
7.077
6.971
6.968
6.950
6.947
6.728
6.676
6.662
6.641
4.445
4.432
4.421
4.408
3.992
3.340
3.315
3.295
3.270
2.881
2.868
2.823
2.801

```



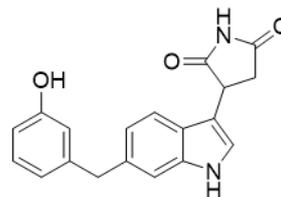
圖譜四十:化合物 L65 之氫核磁共振光譜圖。



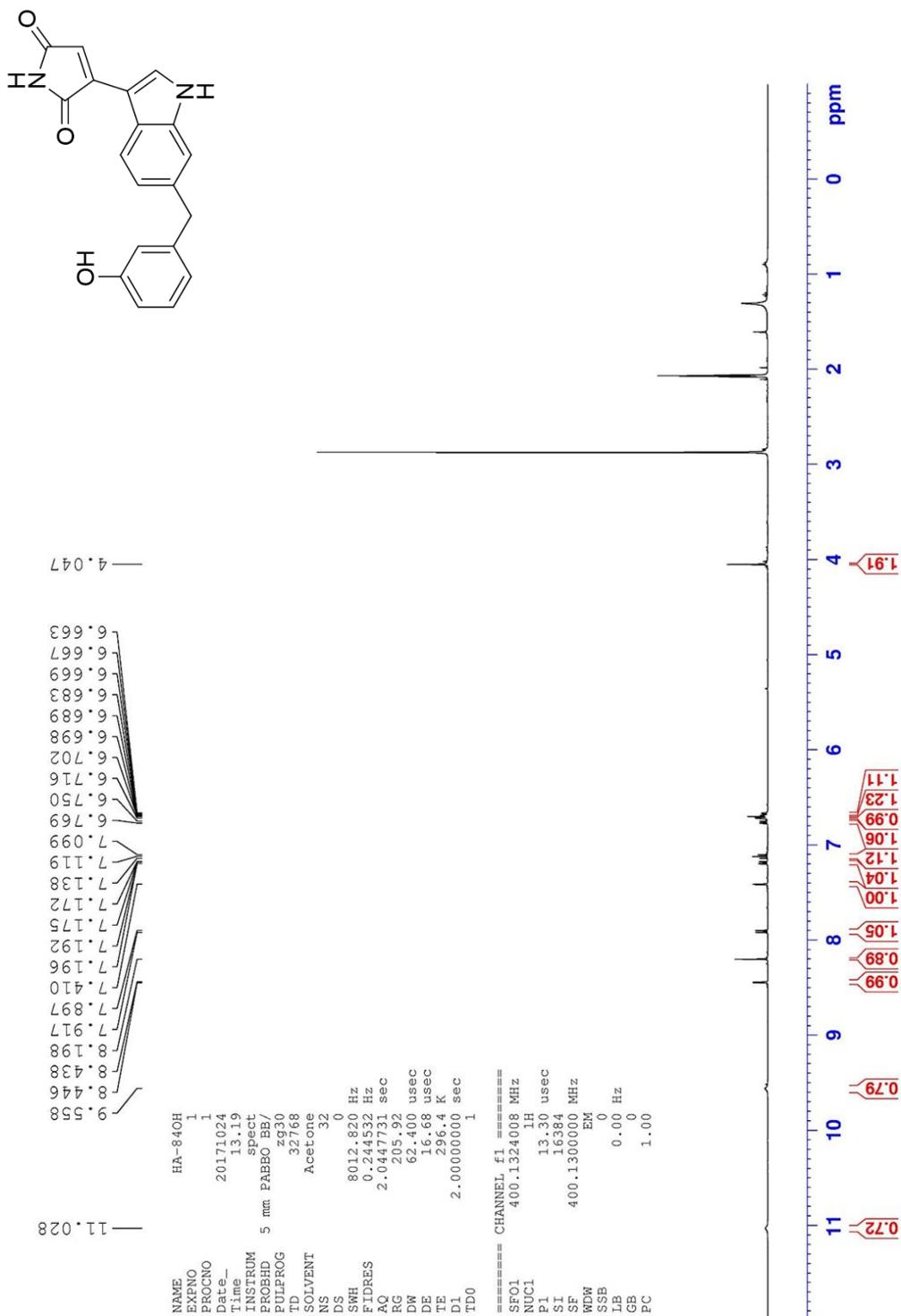
圖譜四十一:化合物 L65 之碳核磁共振光譜圖。

LIST: hei1846_83oh-c3 .02-Sep-17 REG : 14:34.7 #9
Samp: Start : 18:06:29 3062
Mode: EI +VE +LMR ESCAN (EXP) UP HR NRM Inlet :
Oper:
Limit: (0)
: (363) C22.H23.N2.O3
Peak: 1000.00 mmu R+D: -2.0 > 60.0
Data: +/2553>2853 (CMASS : converted |CMASS : converted |CMASS : con

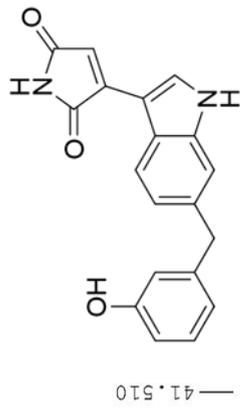
Mass	Intensity	%RA	Flags	Delta	R+D	Composition
320.1163	177106	100.00	#	(mmu) -0.2	13.0	C19.H16.N2.O3



圖譜四十二:化合物 L65 之質譜圖。



圖譜四十三:化合物 L66 之氫核磁共振光譜圖。



— 41.510

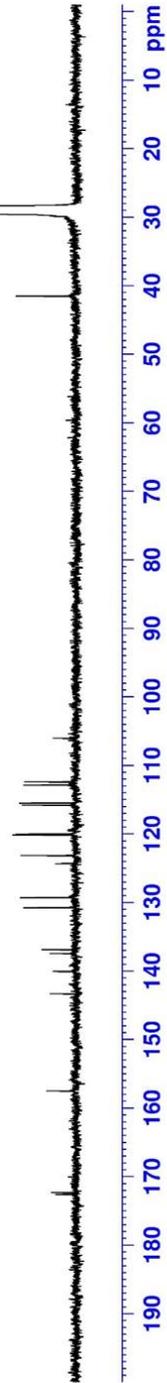
143.327
140.065
137.432
136.881
130.771
129.293
123.147
120.154
120.015
115.794
115.489
112.890
112.410
106.025

172.558
172.285
157.502

```

NAME      20171116-Wy-LAB-L840H-2
EXPNO     1
PROCNO    1
Date_     20171117
Time      6.44
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm PABBO BE/
PULPROG   zgpg30
RG         32768
SOLVENT   Acetone
NS         8000
DS         0
SWH        24038.461 Hz
FIDRES     0.733596 Hz
AQ         0.6816244 sec
RG         205.92
DW         20.800 usec
DE         6.50 usec
TE         300.2 K
D1         2.0000000 sec
D11        0.03000000 sec
TD0        1

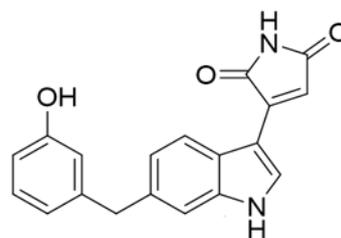
===== CHANNEL f1 =====
SF01      100.6233329 MHz
NUC1      13C
P1         10.00 usec
SI         32768
SR         100.6127685 MHz
SFO2
SFB        0
LB         2.00 Hz
GB         0
PC         1.00
  
```



圖譜四十四:化合物 L66 之碳核磁共振光譜圖。

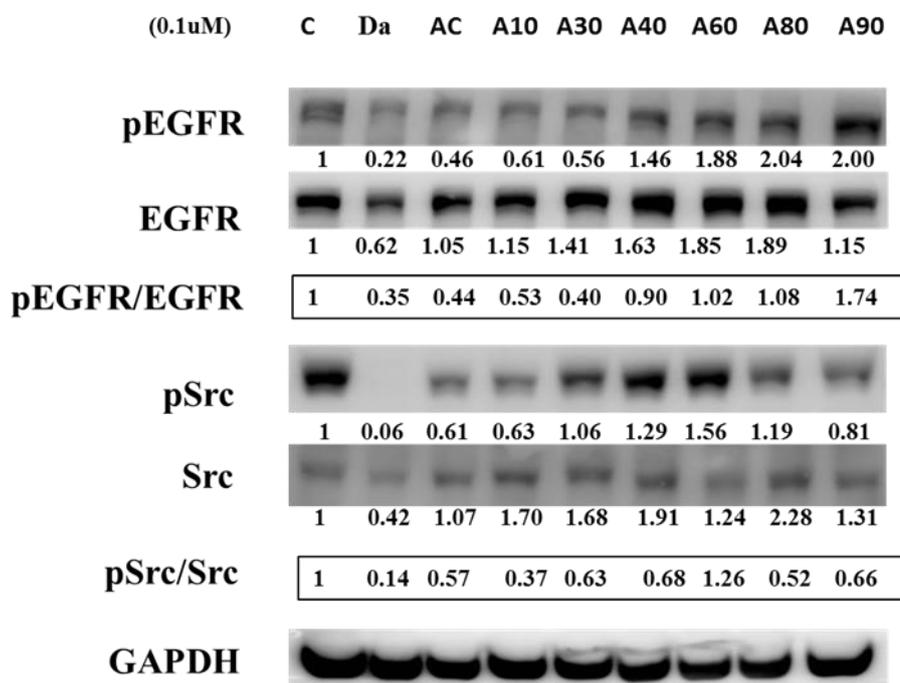
LIST: hei1977_184oh-c3 03-Nov-17 REG : 08:23.2 #9
 Samp: Start : 12:14:28 3208
 Mode: EI +VE +LMR ESCAN (EXP) UP HR NRM Inlet :
 Oper:
 Limit: (0)
 : (348) C20.H32.N2.O3
 Peak: 1000.00 mmu R+D: -2.0 > 60.0
 Data: +/-1450>1494 (CMASS : converted |CMASS : converted |CMASS : con

Mass	Intensity	%RA	Flags	Delta	R+D	Composition
318.1010	543819	100.00	#	-0.5	14.0	C19.H14.N2.O3



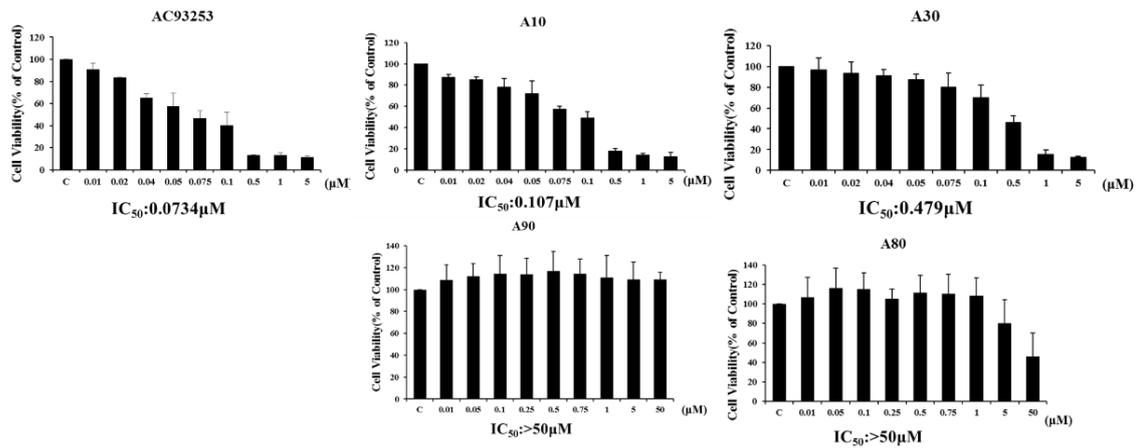
圖譜四十五:化合物 L66 之質譜圖。

篩選並評估 AC93253 衍生物活性實驗結果表圖



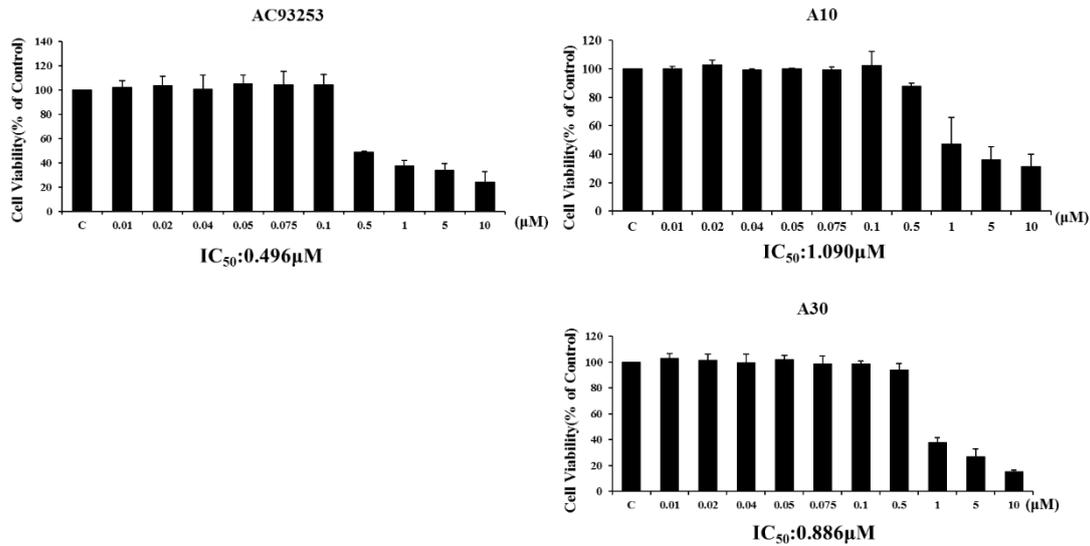
西方墨點法探討不同衍生物對肺癌細胞株中Src、磷酸化Src (p-Src)、EGFR、p-EGFR的蛋白質表現量的影響

C 為只有加入 0.1% DMSO，Da 為 Dasatinib，AC 為先導化合物 AC93253，我們以 Dasatinib 和 AC93253 做為對照組。將 3.5×10^5 顆細胞種至 6 公分細胞培養皿中，加入 0.1 μ M 藥物，24 小時之後收細胞，利用抗體進行西方墨點法分析，並以 GAPDH 作為內在控制 (internal control)。六種衍生物中 A10、A30、A80 和 A90 在 p-Src 的表現量較低 (p-Src 活化比例為 A10:37%、A30:63%、A80:52%、A90:66%)，而 A40 和 A60 在 p-Src 的表現量較高 (p-Src 活化比例為 A40:68%、A60:126%)。濃度為 C：只有加入 0.1% DMSO。



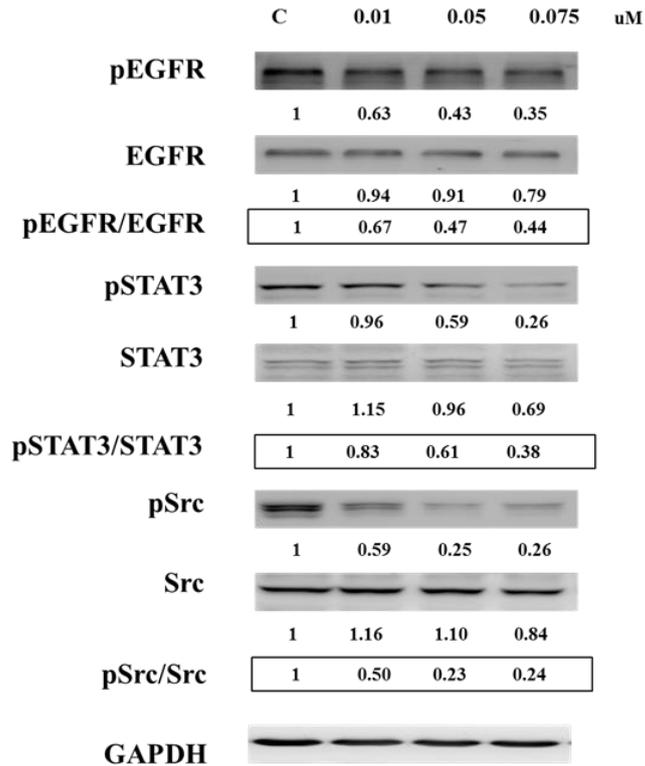
A10、A30、A80 和 A90 對 PC9IR 細胞株存活率及 IC₅₀ 的差異

將 2.5×10^3 顆細胞種到 96 孔盤中 12-16 小時後加入不同濃度的 A10、A30、A80 和 A90，處理 72 小時後加入 PrestoBlue® 試劑，再以 ELISA reader (Victor3) 讀取波長 570/600 nm 的吸光值，分析不同濃度的衍生物對 PC9IR 細胞株存活率的影響。PC9IR 細胞株處理 AC93253，隨著濃度和時間的增加，PC9IR 細胞株存活率有明顯的下降，在 72 小時的 IC₅₀ 為 $0.0734 \mu\text{M}$ ，以 AC93253 作為衍生物比較的標準。PC9IR 細胞株處理不同濃度的 4 種衍生物後，隨著藥物的濃度和時間的增加，PC9IR 細胞株的存活率都受到影響而下降。PC9IR 細胞株受到 4 種藥物處理 72 小時後，IC₅₀ 分別為 A10: $0.107 \mu\text{M}$ 、A30: $0.479 \mu\text{M}$ 、A80: $>50 \mu\text{M}$ 、A90: $>50 \mu\text{M}$ 。濃度為 C: 只有加入 0.1% DMSO。



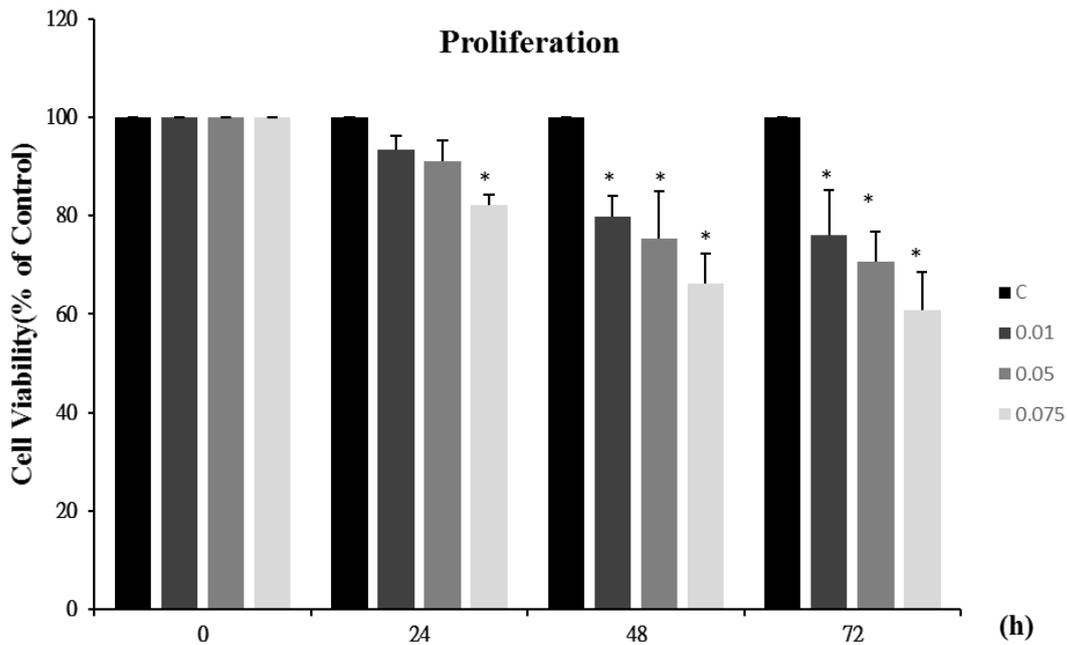
A10、A30 對 BEAS2B 細胞株存活率及 IC₅₀ 的差異

將 2.5×10^3 顆 BEAS2B 細胞種到 96 孔盤中 12-16 小時後加入不同濃度的 AC93253、A10、A30，處理 24、48、72 小時之後加入 PrestoBlue® 試劑，再以 ELISA reader (Victor3) 讀取波長 570/600 nm 的吸光值，分析這 4 種衍生物對 BEAS2B 在 72 小時存活率及細胞毒性的變化。BEAS2B 是正常的人類支氣管上皮細胞株，經由處理 AC93253、A10 和 A30 後，可以得知 AC93253、A10 和 A30 對正常細胞的毒殺性。由結果顯示 BEAS2B 處理 AC93253 後，72 小時的 IC₅₀ 分別為 0.496 μM；BEAS2B 處理 A10 和 A30 後，72 小時的 IC₅₀ 分別為 1.090 μM 和 0.886 μM。濃度為 C：只有加入 0.1% DMSO。



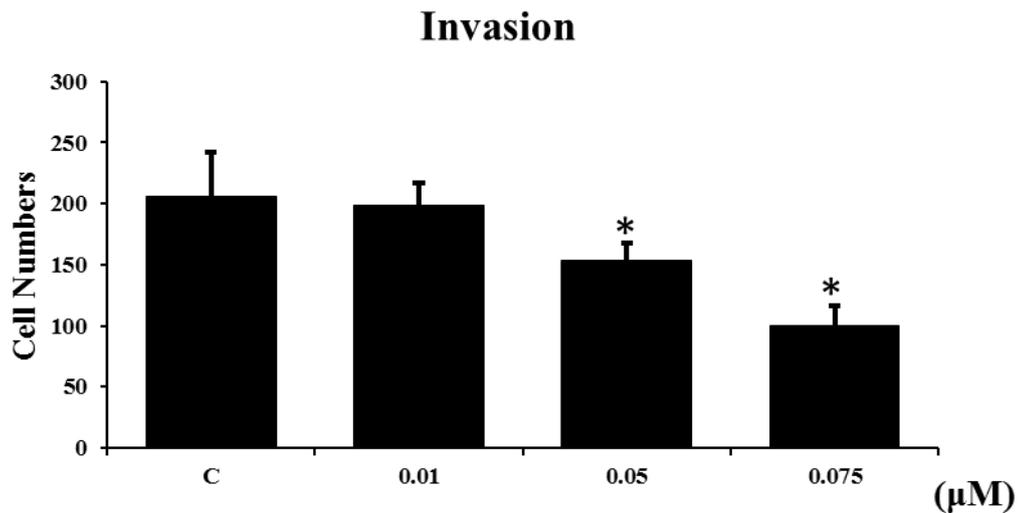
西方墨點法探討 A10 在不同濃度下對 PC9IR 細胞株中 Src 和其相關途徑中蛋白質表現量的影響

AC 為先導化合物 AC93253，我們以 AC93253 做為對照組。將 3.5×10^5 顆細胞種至 6 公分細胞培養皿中，加入不同濃度的 A10，24 小時之後收細胞，利用抗體進行西方墨點法分析，並以 GAPDH 作為內在控制 (internal control)。低濃度下的 A10 (0.01 μ M、0.05 μ M 和 0.075 μ M) 皆可以抑制 PC9IR 細胞株中 p-Src、p-EGFR 和 p-STAT3 蛋白質的活化 (p-Src 活化比例為 0.01 μ M:50%、0.05 μ M:23%、0.075 μ M:24%；p-EGFR 活化比例為 0.01 μ M:67%、0.05 μ M:47%、0.075 μ M:44%；p-STAT3 活化比例為 0.01 μ M:83%、0.05 μ M:61%、0.075 μ M:38%)。濃度為 C：只有加入 0.1% DMSO。



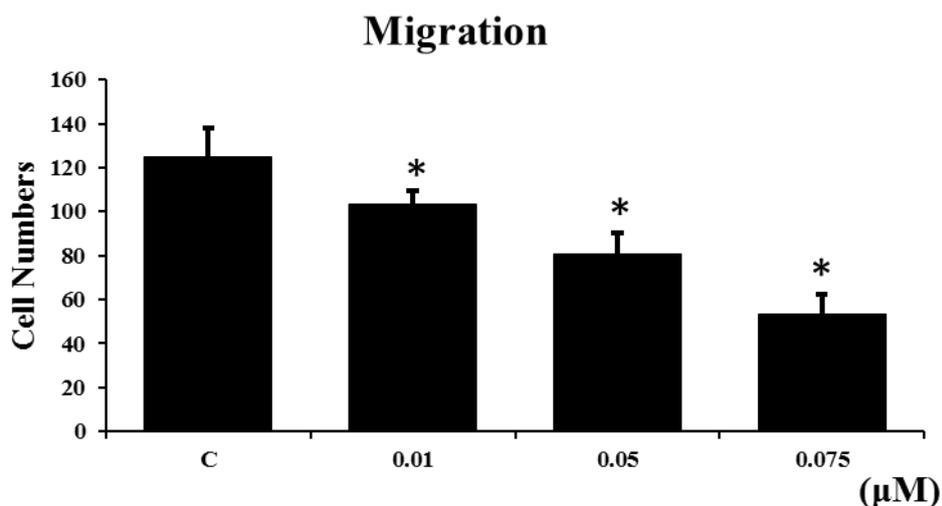
不同濃度的 A10 抑制 PC9IR 細胞株的增生 (proliferation)

將 2.5×10^3 顆 PC9IR 細胞種到 96 孔盤中 12-16 小時後加入 PrestoBlue® 試劑，再以 ELISA reader (Victor3) 讀取波長 570/600 nm 的吸光值做為第 0 小時。再加入 $0.01 \mu\text{M}$ 、 $0.05 \mu\text{M}$ 和 $0.075 \mu\text{M}$ 濃度 A10 處理 24、48、72 小時，並以 DMSO 做為控制組，每 24 小時加入 PrestoBlue® 試劑，再以 ELISA reader (Victor3) 讀取波長 570/600 nm 的吸光值，分析 PC9IR 細胞株在處理不同濃度 A10 後 0、24、48、72 小時細胞增殖的變化。濃度為 C：只有加入 0.1% DMSO。(n=3，*代表其統計數值與不加藥組比較後，P value < 0.05，具有統計上的顯著差異)。



不同濃度的 A10 抑制 PC9IR 細胞株侵襲能力 (invasion)

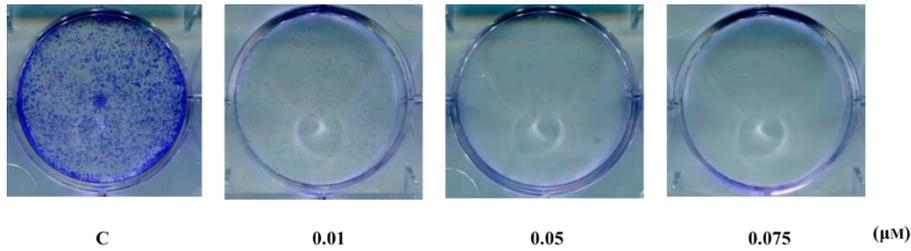
將 PC9IR 細胞株經過不同濃度的 A10 處理 (0.01μM、0.05μM 和 0.075μM) 24 小時後，以 2×10^4 細胞數種在已預先製作基質膠的 transwell 上，在 37°C、5% CO₂ 培養箱中培養 24 小時後，利用甲醇 (methanol) 固定，並以吉姆氏染劑 (giemza) 染色，藉由細胞穿透 transwell 的數量多寡，來模擬腫瘤細胞在生物體中侵入血管或其他組織的情況。處理不同濃度的 A10 後，都有抑制 PC9IR 細胞株侵襲能力的情形，且在 0.05μM 和 0.075μM 濃度下有顯著抑制效果。濃度為 C:是只有加入 0.1% DMSO，作為 control。(n=3，*代表其統計數值與 control 比較後，P value<0.05，具有統計上顯著的差異)。



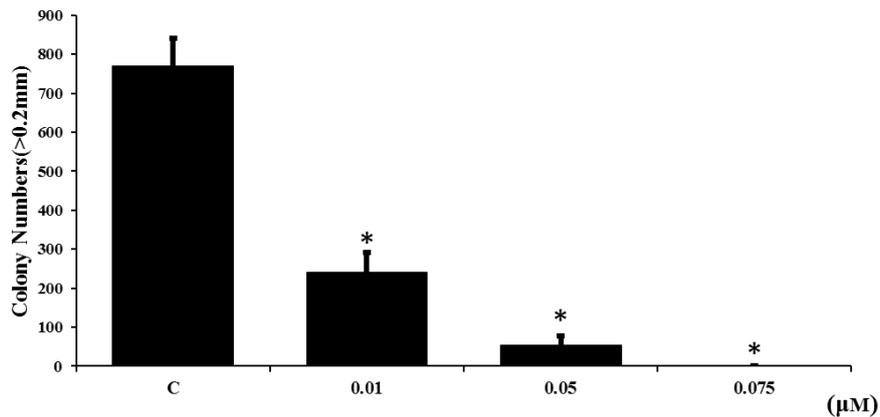
不同濃度的 A10 抑制 PC9IR 細胞株遷移能力 (migration)

將 PC9IR 細胞株經過不同濃度的 A10 處理 (0.01 μ M、0.05 μ M 和 0.075 μ M) 24 小時後，以 1×10^4 細胞數種在 transwell 上，在 37°C、5% CO₂ 培養箱中培養 24 小時後，利用甲醇 (methanol) 固定，並以吉姆氏染劑 (giemza) 染色，藉由細胞穿透 transwell 的數量多寡，來模擬腫瘤細胞在生物體中侵入血管或其他組織的情況。處理不同濃度的 A10 後，都有顯著的抑制 PC9IR 細胞株侵襲能力的情形。濃度為 C: 是只有加入 0.1% DMSO，作為 control。(n=3, *代表其統計數值與 control 比較後，P value<0.05，具有統計上顯著的差異)。

(a)



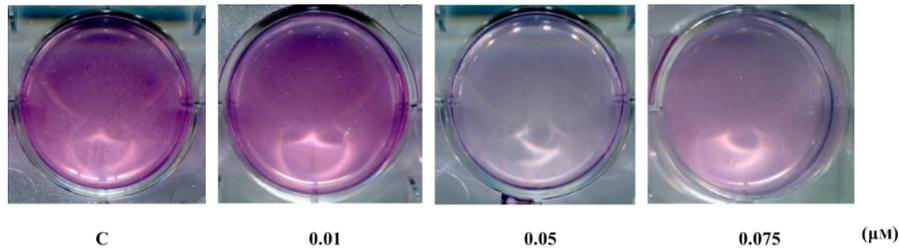
(b)



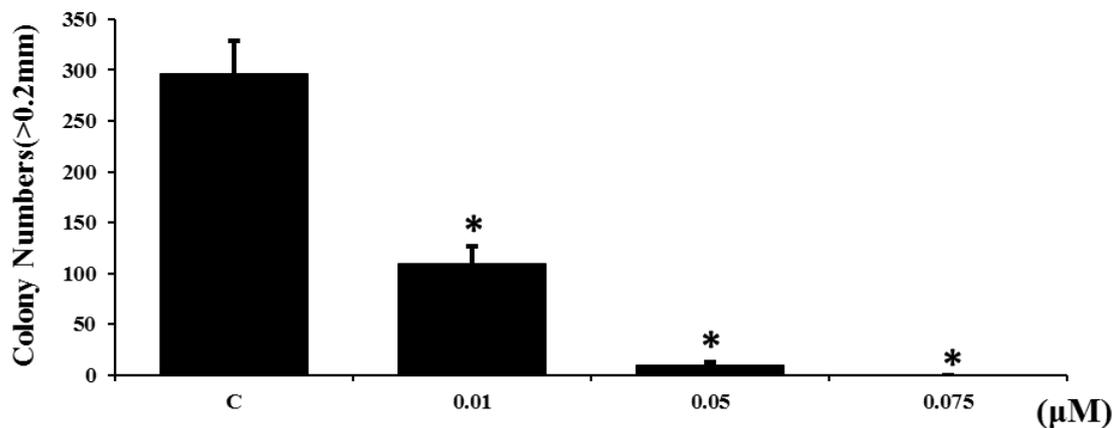
不同濃度 A10 抑制 PC9IR 細胞株聚落形成能力 (colony formation/dependent)

將 5×10^2 顆細胞種至 6 孔盤中，再加入不同濃度的藥物，在 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培養箱中培養約七到八天後，利用細胞聚落形成試驗 (colony formation)，觀察處理不同濃度的 A10 對 PC9IR 細胞株貼附性生長 (dependent growth) 的影響。(a) 為實驗結果圖，由結果發現 (b)，不同濃度的 A10 皆會抑制 PC9IR 細胞株的貼附性生長能力。(colony 大小 $\geq 0.2\text{mm}$)。其中濃度為 C:是只有加入 0.1% DMSO，作為 control。(n=3,*代表其統計數值與 control 比較後，P value<0.05，具有統計上顯著的差異)。

(a)



(b)



不同濃度的 A10 抑制 PC9IR 細胞株聚落形成的能力 (colony formation/independent)

將混合好的 0.7 % LMP agarose、 1×10^3 顆細胞及不同濃度的藥物，種至已製備好含有 0.7 % LMP agarose 的 6 孔盤中，再依序加入不同濃度的藥物，在 37°C 、5% CO_2 培養箱中培養約 2 至 3 星期後，利用細胞聚落形成試驗 (colony formation)，觀察處理不同濃度的 A10 對 PC9IR 細胞株非貼附性生長 (independent growth) 的影響。(a) 為實驗結果圖，由結果發現 (b)，不同濃度的 A10 會抑制 PC9IR 細胞株的非貼附性生長能力。(colon 大小 $\geq 0.2\text{mm}$)。其中濃度為 C:是只有加入 0.1% DMSO，作為 control。(n=3, *代表其統計數值與 control

比較後，P value<0.05，具有統計上顯著的差異)。