



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การออกแบบยาต้านมะเร็งชนิดใหม่ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์Cyclooxygenase-2

โดยใช้เทคนิค molecular docking

Design of new Cyclooxygenase-2 inhibitor as new anticancer drug by using

molecular docking technique

โดย

นสภ. วรวิพรรณ จิตต์การุณย์ รหัส 55210078

นสภ. อัญชิตา นวลวิสัย รหัส 55210090

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม

หลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต

ปีการศึกษา 2559

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

## โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

### เรื่อง

การออกแบบยาต้านมะเร็งชนิดใหม่ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์Cyclooxygenase-2

โดยใช้เทคนิค molecular docking

Design of new Cyclooxygenase-2 inhibitor as new anticancer drug by using

molecular docking technique

### โดย

นสภ. วรวิพรรณ จิตต์การุณย์ รหัส 55210078

นสภ. อัญชิตา นวลวิไล รหัส 55210090

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม

หลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต

ปีการศึกษา 2559

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

## คำนำ

โรคมะเร็งนับว่าเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญยิ่ง ถึงแม้ว่ายาที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งจะมีอย่างแพร่หลาย แต่ยาเหล่านี้มักมีพิษค่อนข้างสูงและมีผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ หลังจากใช้ยาไปแล้วระยะหนึ่งเซลล์มักจะเกิดการดื้อยาที่ใช้รักษาและดื้อต่อยาอีกหลายชนิด ดังนั้นจึงต้องมีความจำเป็นในการเร่งค้นหายาใหม่ที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง ซึ่งข้อมูลการทดลองทางคลินิกมีการค้นพบฤทธิ์ในการต้านมะเร็งที่ได้จากสารสกัดทางทะเลแต่ยังมีไม่มากนัก

Aeroplysinin-1 เป็นสารธรรมชาติทางทะเลและมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายอย่างรวมถึงฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะพัฒนาและศึกษาฤทธิ์ของสารใหม่ที่ได้จากการออกแบบโครงสร้าง Aeroplysinin-1 ที่ได้จากฟองน้ำทะเล *Aplisina aerophoba* และโครงสร้างอนุพันธ์ให้มีฤทธิ์จำเพาะต่อการต้านมะเร็งมากขึ้น โดยทางคณะผู้วิจัยคาดหวังว่าโครงการวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์หรือสามารถนำไปพัฒนายาต้านมะเร็งได้ต่อไป

คณะผู้วิจัย

25 พฤศจิกายน 2559

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ประจำปี 2559 เรื่อง การออกแบบยาต้านมะเร็งชนิดใหม่ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Cyclooxygenase-2 โดยใช้เทคนิค molecular docking ในครั้งนี้สามารถประสบความสำเร็จลงได้เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จาก ภาญ.อ.สุจิตรา เหลืองนฤมิตรชัย อาจารย์ที่ปรึกษา ภาญ.อ.ดร.อนงค์ ตีระวนิชพงศ์อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม และ ภาค.ผศ.อ.ดร.ชำนาญ ภัทรพานิช ที่ให้ความกรุณาให้คำแนะนำและคำปรึกษาในการค้นคว้าวิจัย การเขียนและเรียบเรียงข้อมูลต่างๆตลอดจนถึงความช่วยเหลือในด้านเครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการดำเนินงานวิจัย ขอขอบพระคุณ ภาค.ดิฉันทภาพ โตอุรวงศ์ ที่ให้ช่วยให้คำแนะนำและคำปรึกษาในด้านการใช้โปรแกรม Autodock รวมไปถึงคณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์ คณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยรังสิต ที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือและอุปกรณ์ในการดำเนินงานวิจัย จนโครงการวิจัยครั้งนี้ประสบความสำเร็จไปได้ด้วยดี

นอกจากนี้ทางคณะผู้วิจัยต้องขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่สำนักงานและคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์ในด้านอุปกรณ์และเครื่องมือ ขอขอบพระคุณคณะกรรมการและอาจารย์ทุกท่านที่ให้คำแนะนำในการดำเนินงานวิจัย ทางคณะผู้วิจัยจึงขอแสดงความขอบคุณมา ณ ที่นี้

คณะผู้วิจัย

25 พฤศจิกายน 2559

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2559

เรื่อง การออกแบบยาต้านมะเร็งชนิดใหม่ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Cyclooxygenase-2 โดยใช้เทคนิค molecular docking.

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

- |                               |      |          |
|-------------------------------|------|----------|
| 1. นสภ.วีรวิวรรณ จิตต์การุณย์ | รหัส | 55210078 |
| 2. นสภ. อัญชิตา นวลวิไลย์     | รหัส | 55210090 |

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. ภาณุ.อ. สุจิตรา เหลืองนฤมิตรชัย
2. ภาณุ.อ.ดร.อนงค์ ตีระวนิชพงศ์

บทคัดย่อ

การวิจัยในครั้งนี้ คณะผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการออกแบบและพัฒนาโครงสร้างของสารเพื่อให้มีฤทธิ์เป็นยาต้านมะเร็ง โดยคัดเลือก Lead compounds ได้แก่อนุพันธ์ของ Aeropylsinin-1 มาเป็นสารต้นแบบ เพื่อออกแบบสารใหม่ให้ออกฤทธิ์โดยการยับยั้งเอนไซม์ Cyclooxygenase-2 (COX-2) โดยใช้กระบวนการทางคอมพิวเตอร์ช่วย (Computer-Aided Drug Design, CADD) และใช้การออกแบบสารใหม่ เพื่อศึกษาส่วนสำคัญของโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ (Identify of the Active Part หรือ Pharmacophore) ด้วยวิธีการ Structure Modification ได้สารที่ออกแบบใหม่คือ PY6 ซึ่งสามารถสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา Amidation แบบ One-step synthesis ผลจาก NMR spectrum ของสาร PY6 พบว่าไม่ปรากฏ peak ที่ 10 ppm ซึ่งเป็นตำแหน่งของ H ของหมู่ aldehyde และพบ peaks ที่เป็นของหมู่ methoxy และ aniline ใน spectrum ด้วยเช่นกัน ซึ่งยืนยันได้ว่า สารที่สังเคราะห์ขึ้นมานี้ มีโครงสร้างเป็นสาร PY6 ดังที่ได้ออกแบบไว้

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก.....

Senior Project Academic Year 2016

: Design of new Cyclooxygenase-2 inhibitor as new anticancer drug by using molecular docking technique

By

1. Miss. Wareewan Jitkaroon ID 55210078
2. Miss. Anchita Naulwilai ID 55210090

Advisor:

1. Sujitra Luangnarumitchai, Ph.D.
2. Dr. Anong Teeravanichpong, Ph.D.

#### ABSTRACT

This research aims to design and synthesis of the new compound as potential anticancer drug. Aeropylsinin-1 derivatives are selected as Lead compounds for design of Cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. With Computer-Aided Drug Design(CADD) step, the new compounds are designed in order to investigate the pharmacophore of active drug. Using structure modification method, the new compound, PY6 was designed and was able to synthesize by amidation reaction in one-step synthesis. The NMR spectrum of this new compound shows no aldehyde-H peak at 10 ppm. Together with the methoxy and aniline peaks in this spectrum, it was confirmed that the newly synthesized compound is the designed PY6.

Major Advisor.....

## สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1.ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2.วัตถุประสงค์	3
1.3.สมมติฐาน	3
1.4.ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	4
2.1. โรคมะเร็งและการรักษา	4
2.1.1. โรคมะเร็ง	4
2.1.2. การรักษา	4-6
2.2. เอนไซม์ Cyclooxygenase (COX) และการเกิดมะเร็ง	7
2.2.1. เอนไซม์ Cyclooxygenase	7-8
2.2.2. ความสัมพันธ์ของเอนไซม์ Cyclooxygenase-2 กับมะเร็ง	8-9
2.2.3. ฤทธิ์ Anti-angiogenesis	10
2.2.4. การใช้ Selective COX-2 ในการป้องกันและรักษามะเร็ง	11-12
2.3. ตำแหน่งออกฤทธิ์ของเอนไซม์ Cyclooxygenase-2	12-14
2.4. Aeropylsinin-1	15-17
2.5. การประยุกต์ใช้คอมพิวเตอร์ในการออกแบบยา	17
2.5.1. Molecular modeling และ Docking study	18
2.5.2. โปรแกรม Autodock	18-19
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	20
3.1. อุปกรณ์และสารเคมีในการทำวิจัย	20
3.1.1. โปรแกรมคอมพิวเตอร์	20

3.1.2. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	20
3.1.3. สารเคมี	21
3.2. วิธีการทดลอง	21
3.2.1. ศึกษาและออกแบบโครงสร้างยาโดยใช้คอมพิวเตอร์เข้าช่วย	21-26
3.2.2. สังเคราะห์อนุพันธ์ของยาที่ได้รับการคัดเลือก	26-27
3.2.3. วิเคราะห์หาโครงสร้างและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่ได้	27
บทที่ 4 ผลการวิจัย	28
4.1. Lead Identification	28
4.2. Design and Target compounds	28
4.2.1. Validation of Target Molecule	28-30
4.2.2. Design of Target Compound	30
4.2.3. การ Docking สารที่ออกแบบ	31-33
4.3. Synthesis	33-34
4.4. Suitable TLC system	34-35
4.5. ขั้นตอนการแยกสารที่สังเคราะห์	35-36
4.6. การพิสูจน์โครงสร้างด้วยเครื่อง Nuclear Magnetic Resonance (NMR)	36-38
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	39
5.1. ปัญหาของงานวิจัยในครั้งนี้	40
5.2. ข้อเสนอแนะ	40
เอกสารอ้างอิง	41-45



## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 กลุ่มยาที่ออกฤทธิ์กระบวนกรที่สำคัญต่างๆของเซลล์มะเร็ง	7
รูปที่ 2 กระบวนการกระตุ้นการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ COX-2 ในเซลล์มะเร็ง	10
รูปที่ 3 ความสัมพันธ์ของเอนไซม์ COX-2 กับ PGE2 และ Angiogenesis	11
รูปที่ 4 การยับยั้งเอนไซม์ COX-2 ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ angiogenesis และ metastasis	11
รูปที่ 5 ตำแหน่งออกฤทธิ์เอนไซม์ Cyclooxygenase-2 ที่แตกต่างกับ Cyclooxygenase-1	13
รูปที่ 6 การจับของ Flurbiprofen, Diclofenac, Indomethacin และ SC-558 กับเอนไซม์COX-2	14
รูปที่ 7 แสดงโครงสร้างของ Aeropylsinin-1	15
รูปที่ 8 โครงสร้าง Spiroepoxycyclohexadienones ( $\pm$ ) และ Aromatic analogues	16
รูปที่ 9 แสดงการตั้งค่าพารามิเตอร์เพื่อกำหนดขนาดของพื้นที่	24
รูปที่ 10 แสดงการตั้งค่าพารามิเตอร์สำหรับการ Docking molecule	25
รูปที่ 11 แสดงข้อมูลค่า binding energy ของแต่ละconformation	26
รูปที่ 12 ตำแหน่งของสารที่แยกได้ บนแผ่น TLC	27
รูปที่ 13 แสดงโครงสร้างของ lead compound	28
รูปที่ 14 แสดง cluster ของ COX6	29
รูปที่ 15 แสดงถึง Cluster ของ 1CX2	30
รูปที่ 16 แสดงปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาร PY6	34
รูปที่ 17 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของ Copper sulfate	34
รูปที่ 18 แสดง <sup>1</sup> H-NMR ของสารที่สังเคราะห์ได้	37
รูปที่ 19 แสดงผล HSQC ของสารที่สังเคราะห์ได้	3
รูปที่ 20 แสดง Peak NMR ของสาร PY6 ที่ไม่พบ peak ที่ 10 ppm	38
รูปที่ 21 แสดง Peak NMR ของสาร 3, 5- dibromo-2-methoxybenzaldehyde	38

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงผลการการ validate เอนไซม์ COX-2	29
ตารางที่ 2 แสดงผลการ docking ของสารที่ออกแบบ	32-33
ตารางที่ 3 แสดงข้อมูล system ที่ใช้ในการทำ TLC	35
ตารางที่ 4 แสดงผล $^1\text{H-NMR}$ spectrum ในโครงสร้างสาร	36

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคมะเร็งนับว่าเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญอย่างยิ่ง จากสถิติโรคมะเร็งเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตลำดับต้นๆของประชากรทั่วโลกและเป็นโรคสำคัญที่ก่อให้เกิดปัญหาแก่สาธารณสุขของประชาชนในหลายประเทศแม้จะมีการพัฒนาความก้าวหน้าทางการแพทย์และเทคโนโลยีแล้ว (1, 2) องค์การอนามัยโลกมีการรายงานเกี่ยวกับอุบัติการณ์ของประชากรทั่วโลกที่เป็นโรคมะเร็งประมาณ 6 ล้านคนต่อปี ในปี ค.ศ. 2012 โรคมะเร็งเป็นสาเหตุในการเสียชีวิตของประชากรทั่วโลกคิดเป็น 8.2 ล้านคนและมีอุบัติการณ์การเกิดโรคมะเร็งถึง 14 ล้านคน โดยองค์การอนามัยโลกคาดการณ์ในปี ค.ศ. 2030 ว่าจะมีผู้ป่วยมะเร็งเพิ่มขึ้นเป็น 21.4 ล้านคนและคาดว่าจะมีผู้เสียชีวิตประมาณ 30 ล้านคน (3) สำหรับประเทศไทยโรคมะเร็งจัดเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับหนึ่งของประเทศนับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2542 จนถึงปัจจุบันและเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ จากข้อมูลในปี พ.ศ. 2555 มีผู้เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งประมาณ 63,272 คน ชนิดของมะเร็งที่เป็นปัญหาสำคัญ 5 อันดับแรกของประเทศไทย คือ มะเร็งตับ, มะเร็งปอด, มะเร็งเต้านม, มะเร็งปากมดลูกและมะเร็งลำไส้ใหญ่ คิดเป็นค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลเฉลี่ยไม่น้อยกว่าหนึ่งแสนบาทต่อราย ส่งผลให้ประเทศชาติต้องสูญเสียงบประมาณในการรักษาพยาบาลจำนวนมาก (4)

มะเร็งสามารถเกิดได้จากหลายปัจจัยซึ่งกระบวนการอักเสบ (Inflammation) เป็นหนึ่งในสาเหตุของการเกิดมะเร็ง เนื่องจากกระบวนการอักเสบ (Inflammation) เป็นกระบวนการที่ร่างกายตอบสนองเมื่อร่างกายเกิดการบาดเจ็บขึ้นจากปัจจัยกระตุ้น เช่น การได้รับสารเคมี การติดเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรีย เป็นต้น (5)

ถึงแม้ว่ายาที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งจะมีอย่างแพร่หลาย แต่ยาเหล่านี้มักมีพิษค่อนข้างสูงและมีผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์และมีโอกาสเกิดการดื้อต่อยาที่ใช้รักษา (6) จากปัญหาข้างต้นจึงมีความจำเป็นในการเร่งค้นหาสารใหม่ที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งมากขึ้น และมีความเป็นพิษลดลง เป็นต้น ปัจจุบันได้มีการศึกษาเกี่ยวกับสารธรรมชาติทางทะเล พบว่าสารสกัดจากทะเลมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง ดังนั้นการหาแนวทางการรักษามะเร็งโดยใช้สารธรรมชาติจากทะเลจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ ซึ่งในเขตพื้นที่ทะเลของประเทศไทย มีการสำรวจพบฟองน้ำทะเลตระกูล Verongida ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างหลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านอักเสบ, ฤทธิ์ต้านไวรัส, ฤทธิ์ต้านมะเร็ง เป็นต้น (7-11) จากการศึกษาโดยการนำโครงสร้างทางเคมีของสารที่พบในฟองน้ำทะเล *Aplisina aerophoba* คือ Aeroplysinin-1 ไปพัฒนาพบว่ามีความแรงของฤทธิ์ในการต้านมะเร็งมากขึ้น (12) แต่ฤทธิ์ที่ได้ยังไม่สามารถนำไปใช้ในทางการแพทย์ได้ ทางคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะพัฒนาและศึกษาฤทธิ์ของสารใหม่ที่ได้จากการออกแบบจากโครงสร้าง Aeroplysinin-1 และโครงสร้างที่เป็นอนุพันธ์ให้มีฤทธิ์จำเพาะต่อการต้านมะเร็งมากขึ้น

จากรายงานการศึกษาฤทธิ์ของสาร Aeroplysinin-1 ในเยื่อบุเซลล์มนุษย์เพื่อดูผลยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) พบว่า Aeroplysinin-1 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้โดยผ่านกลไกการยับยั้งเอนไซม์ Cyclooxygenase-2 (13) ซึ่งยามะเร็งในปัจจุบันที่สามารถต้านมะเร็งโดยผ่านกลไกการยับยั้ง Cyclooxygenase-2 นั้นยังมีไม่มาก ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะพัฒนาสาร Aeroplysinin-1 และโครงสร้างที่เป็นอนุพันธ์ให้มีฤทธิ์จำเพาะในการต้านมะเร็งมากขึ้นโดยผ่านกลไกการยับยั้ง Cyclooxygenase-2 โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ช่วยในการจำลองโครงสร้างและออกแบบโครงสร้างที่คาดว่าจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ในอนาคต

## 1.2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อออกแบบ พัฒนาและสังเคราะห์โครงสร้างที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Cyclooxygenase-2

## 1.3. สมมติฐาน

1. สารที่ออกแบบและพัฒนาสามารถจับกับเอนไซม์ Cyclooxygenase-2
2. สารที่สังเคราะห์มีโครงสร้างเหมือนกับสารที่ออกแบบในคอมพิวเตอร์
3. ได้เรียนรู้ระเบียบและหลักการของวิธีวิจัย (Research methodology)

## 1.4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้เรียนรู้ระเบียบและหลักการของวิธีวิจัย (Research methodology)
2. ได้เรียนรู้กระบวนการออกแบบโดยใช้คอมพิวเตอร์ (Computer-aided drug design)
3. สามารถออกแบบและพัฒนาโครงสร้างสาร Aeroplysinin-1 เป็น lead compound เพื่อนำไปออกแบบและพัฒนาเป็นยาที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งได้
4. สามารถนำความรู้ที่ได้ไปเป็นข้อมูลในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างเคมีของสารให้เหมาะสมเพื่อให้ได้มาซึ่งคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ที่ดียิ่งขึ้น
5. สามารถนำองค์ความรู้ใหม่ๆ ไปประยุกต์ใช้ในด้านการศึกษาและด้านเทคโนโลยีชีวภาพได้
6. เพื่อแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของสารสกัดจากทะเลในการนำมาเป็นยาใหม่ รวมถึงมีส่วนช่วยในการกระตุ้นให้เห็นถึงคุณค่าและตระหนักถึงความจำเป็นในการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติจากทะเล เพื่อนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อไป

## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรม

#### 2.1. โรคมะเร็งและการรักษา

##### 2.1.1. โรคมะเร็ง

โรคมะเร็ง เป็นโรคที่มีความรุนแรงและเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญ โดยสาเหตุของการเกิดมะเร็งอาจเกิดจากการอักเสบเรื้อรัง หรือพันธุกรรม เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งขั้นตอนการดำเนินไปของโรคมะเร็งมักใช้เวลานานโดยทั่วไปการพัฒนาของมะเร็งมี 3 ระยะหลัก คือ ระยะ Initiation ยีนกลายพันธุ์เกิดเป็นเซลล์มะเร็ง, ระยะ Promotion ยีนกลายพันธุ์มีการแบ่งเซลล์เพิ่มมากขึ้น เกิดเป็นเนื้องอก และระยะ Progression เซลล์ปกติกลายเป็นเซลล์มะเร็งโดยสมบูรณ์แบบ (5)

เมื่อมีการพัฒนาเป็นเซลล์มะเร็งแล้วจะมีการลดลงของกระบวนการควบคุมการแบ่งเซลล์ ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ Growth factor และยังเพิ่มการยับยั้งต่อกระบวนการ program cell death ของเซลล์ ส่งผลให้เกิดการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์ที่มากกว่าเซลล์ปกติ และอีกกระบวนการที่สำคัญต่อการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งคือ กระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (Angiogenesis) เพื่อให้เลือดมาหล่อเลี้ยงเซลล์มะเร็ง นำสารอาหาร ออกซิเจนมาเลี้ยงเซลล์ รวมถึงกำจัดของเสียและคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งการเพิ่มขึ้นของกระบวนการดังกล่าวจะส่งผลเพิ่มการรุกรานของเซลล์มะเร็งอย่างรวดเร็ว (14, 15)

##### 2.1.2. การรักษา

การรักษาโรคมะเร็งจะมีพิจารณาการรักษาที่แตกต่างกันในแต่ละบุคคล โดยการรักษาที่นิยมคือ การผ่าตัด, เคมีบำบัด, การฉายแสง (16) โดยยาเคมีบำบัดปัจจุบันมีด้วยกันหลายกลุ่ม โดยแบ่งได้จาก กลไกการออกฤทธิ์ เช่น

2.1.2.1 Antimetabolite เป็นกลุ่มที่มีกลไกที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆที่สำคัญของการเกิดมะเร็งหรือการไปรบกวนการสังเคราะห์ DNA, RNA ด้วยกลไกที่หลากหลาย ทั้งการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่สำคัญในการสังเคราะห์สารทางพันธุกรรม หรือเข้าแทนที่ nucleic acid จึงมีผลในการยับยั้งการสร้าง DNA

2.1.2.2. DNA interactive agent เป็นกลุ่มที่ใหญ่ที่สุด และถึงเป็นกลุ่มที่มีความสำคัญที่สุดในกลุ่มยาต้านมะเร็งโดย จะมีการออกฤทธิ์ ที่หลากหลาย

- Alkylating agent จะมีผลในปฏิกิริยาแทนที่ของหมู่ alkyl หรือ alkylation ของ DNA base เช่น dacarbazine, procarbazine, temozolomide

- cross-linking agent ออกฤทธิ์โดยจับกับ DNA และมีผลทำต่อ intra-stand หรือ Inter-stand cross-linking ของสาย DNA โดยยาที่มี platinum เป็นตัวที่ไปเกิด complex เช่น cisplatin, carboplatin, oxaliplatin อีกทั้งยังมียาในกลุ่ม nitrogen mustard เช่น cyclophosphamide, ifosfamide โดยทั้งสองกลุ่มเป็นสองกลุ่มหลักที่ออกฤทธิ์เป็น crosslink agent

- Intercalating agent ออกฤทธิ์โดยจับบริเวณ base pairs โดยยาในกลุ่มนี้คือยาในกลุ่ม anthracyclines เช่น doxorubicin, epirubicin และยาในกลุ่ม mitoxantrone, actinomycin-D

- Topoisomerase inhibitor กลไกการออกฤทธิ์จะยับยั้งเอนไซม์ที่ในการสังเคราะห์สารพันธุกรรมเพื่อการแบ่งเซลล์ เช่นยา irinotecan, etoposide

- DNA-cleaving agent ที่จะออกฤทธิ์ต่อการสังเคราะห์ DNA เช่น bleomycin

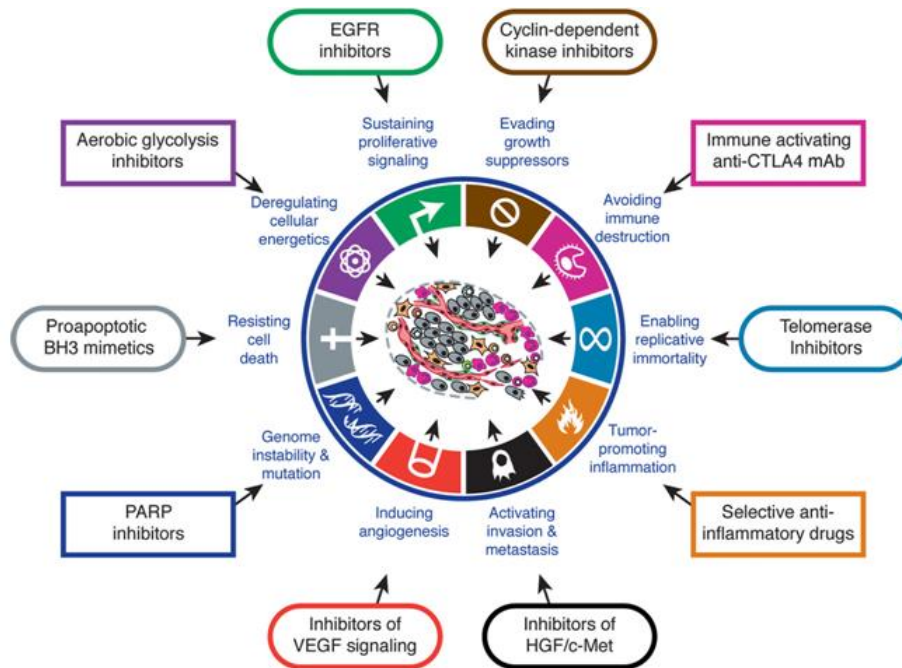
2.1.2.3. Antitubulin agent ที่จะออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ microtubule เช่น การสร้างหรือทำให้ไม่เกิดการรวมตัวกัน ยับยั้งการแยกของ nucleus และทำให้เกิดเซลล์ตาย โดยยาในกลุ่มนี้คือ taxanes และ vinca alkaloid (17, 18)

กลุ่มยาที่เป็น cytotoxic agent ที่กล่าวมาข้างต้น จะมียับยั้งการทำงานหรือการแบ่งตัวของเซลล์อย่างไม่จำเพาะเจาะจง โดยทำให้เกิดผลข้างเคียงต่อเซลล์ปกติ เช่น การกดไขกระดูก, ผม่วรง, เป็นแผลในกระเพาะอาหารหรือคลื่นไส้อาเจียนได้ ทำให้ความร่วมมือในการใช้ยาของ

ผู้ป่วยลดลง (16) รวมถึงการใช้ยามะเร็งบางชนิด อาจเกิดการไม่ตอบสนองต่อยา เช่น เกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงของพันธุกรรม การขับยาออกจากเซลล์ เป็นต้น (6) ในศตวรรษที่ผ่านมา จึงได้มีแนวคิดในการพัฒนายาให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็งมากขึ้น (molecular-target drug) (รูปที่ 1) รวมถึงมีความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดของเซลล์มะเร็ง ส่งผลให้เกิดประสิทธิภาพในการรักษา และลดความรุนแรงในการเกิดผลข้างเคียงได้ โดยตัวอย่างของยาที่ได้พัฒนามาจากแนวคิดดังกล่าว เช่น

- Imatinib mesylate (Gleevec<sup>1</sup>, Novartis) โดยตัวยาจะเป็นโมเลกุลขนาดเล็กที่ยับยั้ง tyrosine kinase enzyme อย่างจำเพาะ โดยเหมาะสำหรับใช้ใน gastrointestinal stromal tumor และ chronic myeloid leukemia.
- Gefitinib (Iressa<sup>1</sup>, AstraZeneca & Teva) เป็นโมเลกุลขนาดเล็กที่ยับยั้ง epidermal growth factor receptor's (EGFR, or erbB1) tyrosine kinase domain โดยจะใช้ใน non-small-cell lung cancer
- Bortezomib (Velcade<sup>1</sup>, Millenium Pharmaceuticals) เป็นโมเลกุลขนาดเล็กที่มีกลไก proteasome inhibitor ส่งผลให้เกิดการ apoptosis ของเซลล์ โดยใช้ในกรณี multiple myeloma ที่ติดต่อการรักษารูปแบบอื่น (19, 20) เป็นต้น





รูปที่ 1 กลุ่มยาที่ออกฤทธิ์กระบวนการที่สำคัญต่างๆของเซลล์มะเร็ง (21)

## 2.2. เอนไซม์ Cyclooxygenase (COX) และการเกิดมะเร็ง

จากการที่ออกเสบเรื้อรังเป็นสาเหตุหนึ่งในการเกิดมะเร็ง โดยกระบวนการเพิ่มการผลิตของ Reactive oxygen species ส่งผลให้ DNA เกิดความเสียหายเกิดการกลายพันธุ์ของยีนมากขึ้นอีก ทั้งยังมีการกระตุ้นให้เกิดการผลิตของ growth factor ได้แก่ epithelial growth factors (EGF) และ fibroblast growth factors (FGF) ทำให้เซลล์เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนที่ผิดปกติจนอาจกลายเป็นเซลล์เนื้องอกได้นั่นเอง (22)

### 2.2.1. เอนไซม์ Cyclooxygenase

โดยเอนไซม์ Cyclooxygenase หรือ Prostaglandin H synthases เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการเปลี่ยน arachidonic acid เป็น Prostaglandin โดย Cyclooxygenase (COX) จะมี 3 isoforms คือ Cyclooxygenase-1(COX-1), Cyclooxygenase-2(COX-2) และ Cyclooxygenase-3(COX-3) แต่มีเพียง COX-1 และ

COX-2 ที่เกี่ยวข้องกับยาต้านอักเสบชนิดไม่ใช้สเตียรอยด์ (non-steroidal anti-inflammatory drug : NSAID) โดย

- เอนไซม์ COX-1 จะพบในสภาวะปกติ โดยจะมีบทบาทเกี่ยวกับการผลิต cytoprotective prostaglandin ในระบบทางเดินอาหาร, ควบคุมการทำงานของเกร็ดเลือดและควบคุมการไหลเวียนเลือดที่ไต
- เอนไซม์ COX-2 จะพบมากในภาวะที่ร่างกายได้รับบาดเจ็บหรือเมื่อมีตัวกระตุ้นที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ แต่สามารถพบได้ในสภาวะปกติของร่างกายเช่นกัน เช่น ที่สมอง, ไต, ไชกระดูก เป็นต้น
- เอนไซม์ COX-3 จะพบน้อย พบหลักๆที่สมองและไขสันหลัง ซึ่งยังไม่ทราบกลไกการออกฤทธิ์ที่แน่ชัด (22, 23)

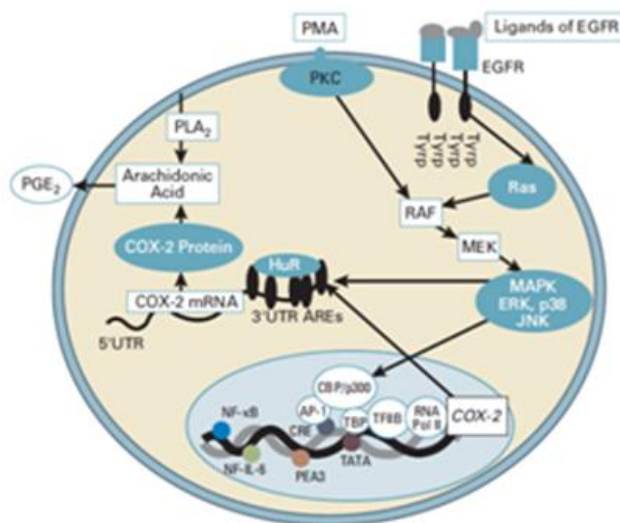
การพัฒนา ยา NSAID ให้มีความจำเพาะต่อเอนไซม์ COX-2 เพิ่มมากขึ้นเพื่อลดผลข้างเคียงของยา NSAID กลุ่มเก่าเกี่ยวกับ GI side effect จึงได้มีการพัฒนาเป็นยาในกลุ่ม COXIBs (rofecoxib, celecoxib, valdecoxib เป็นต้น) แต่ภายหลังพบว่าได้มีการถอนออกจากตลาดเนื่องจากเกิดผลข้างเคียงเกี่ยวกับ cardiovascular นักวิจัยจึงได้มีการเบนความสนใจเกี่ยวไปในฤทธิ์ของการป้องกันมะเร็งและโรคทางระบบประสาทเช่น Parkinson และ Alzheimer ที่ได้มีการศึกษาหาโครงสร้างที่สัมพันธ์ต่อการออกฤทธิ์เพิ่มมากขึ้น (23) อีกทั้งได้มีการรายงานว่าการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ COX-2 และมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดของมะเร็งไม่ว่าจะเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่, มะเร็งกระเพาะอาหาร, มะเร็งเต้านม, มะเร็งปอด, มะเร็งตับอ่อน, มะเร็งหลอดอาหาร, มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ, มะเร็งต่อมลูกหมาก และมะเร็งหูดอกจมูก (22) จะพบมากที่มะเร็งปอด (70%), มะเร็งเต้านม (37%), และมะเร็งลำไส้ใหญ่ (90%) (24, 25)

### 2.2.2. ความสัมพันธ์ของเอนไซม์ Cyclooxygenase-2 กับมะเร็ง

เอนไซม์ COX-2 จะมีผลกับการสังเคราะห์ Prostaglandin โดยมีสารตั้งต้นเป็น membrane phospholipid จะถูก phospholipase A2 เปลี่ยนแปลงไปเป็น Arachidonic

acid และ arachidonic acid จะถูกเอนไซม์ COX-1 หรือ COX-2 เปลี่ยนแปลงไปเป็น Prostaglandin(PG) G<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub> และถูกเอนไซม์ isomerase ที่จำเพาะเจาะจงกับแต่ละขั้นตอนที่จะเปลี่ยนเป็น PG isoform อื่นๆหรือ thromboxane (TX) A<sub>2</sub> ตามลำดับ ซึ่งเอนไซม์ COX-1 จะเป็น constitutive enzyme หรือเอนไซม์ที่มีอยู่แล้วในร่างกาย แต่ COX-2 จะเป็นแบบ inducible enzyme ,rate limiting enzyme(22)หรือเอนไซม์ที่ต้องมีการเหนี่ยวนำจึงจะมีการเพิ่มขึ้น โดยจะถูกกระตุ้นได้จากหลายทางไม่ว่าจะเป็น mitogen, cytokine, growth factor หรือ tumor promoter (24, 26) โดยเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงยีน, growth factor หรือ tumor promoter จะเกิดการกระตุ้นของ RAS หรือ protein kinase C (PKC) signaling เพิ่มขึ้นและจะส่งผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ mitogen-activated protein kinase (MAPK) มีผลทำให้เกิดการเพิ่มการสร้างเอนไซม์ COX-2 ที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 2)

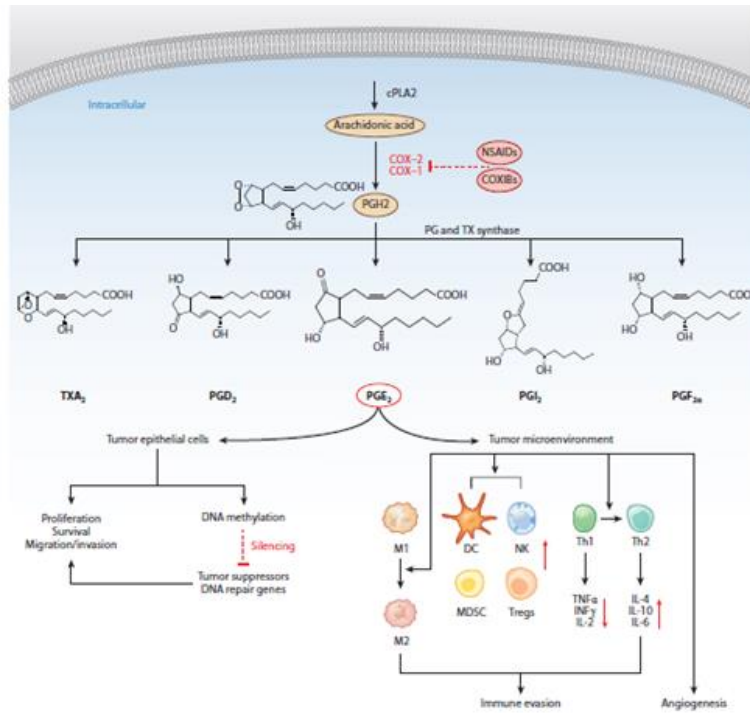
การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ COX-2 ที่มากกว่าปกติจะมีผลเพิ่มการสร้าง Prostaglandin E<sub>2</sub> โดย PGE<sub>2</sub> เป็น prostanoid ที่พบมากใน epithelial malignancies เนื่องจาก PGE<sub>2</sub> สามารถกระตุ้นการเจริญของเนื้องอก รวมถึงมีผลเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันและ angiogenesis (26, 27)



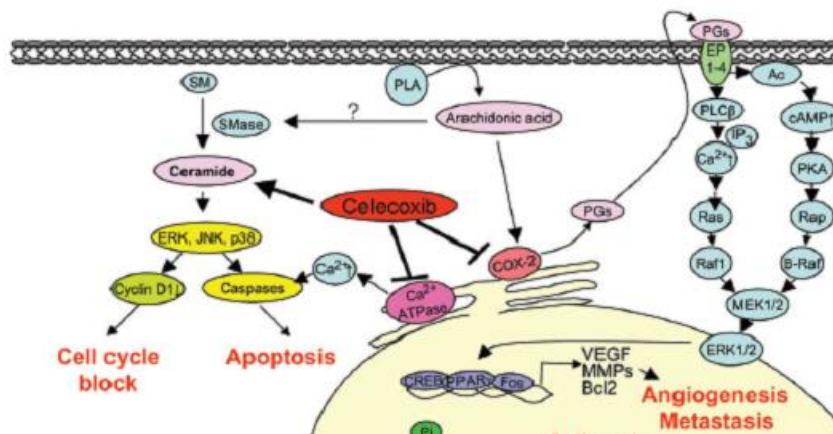
รูปที่ 2 กระบวนการกระตุ้นการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ COX-2 ในเซลล์มะเร็ง (26)

### 2.2.3. ฤทธิ์ Anti-angiogenesis

ความสามารถในการสร้างหลอดเลือดใหม่หรือ angiogenesis เป็นกระบวนการสำคัญในการเจริญเติบโตและแพร่กระจายของมะเร็ง โดย Vascular endothelial growth factor A (VEGF) เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการ angiogenesis เมื่อมีการจับกับ VEGF receptor (VEGFR) บนเซลล์เยื่อหลอดเลือด ซึ่งในศตวรรษที่ผ่านมาได้มีความสนใจในการพัฒนายาที่ออกฤทธิ์ผ่านกระบวนการนี้ เช่น ยา bevacizumab และต่อมาได้มีการพัฒนา ยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง tyrosine kinase เช่น anxitinib, sunitinib ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพในการรักษามะเร็ง แต่ยังคงมีการเกิด angiogenesis ได้อยู่ถึงแม้จะมีให้ใช้ยาที่ยับยั้ง VEGFR ซึ่งยังไม่ทราบถึงกระบวนการที่แน่ชัด แต่พบว่าการเพิ่มขึ้นของ PGE2 มีผลสัมพันธ์กับการเกิด VEGFR-independent angiogenesis ในเซลล์มะเร็ง ถ้าได้และมะเร็งเต้านม ดังนั้นการยับยั้งการเพิ่มขึ้นหรือการยับยั้งการออกฤทธิ์ของ COX-2 จึงเป็นที่สนใจในการพัฒนาเพื่อเป้าหมาย ยับยั้งการเกิด VEGFR-independent angiogenesis (25,28)



รูปที่ 3 ความสัมพันธ์ของเอนไซม์ COX-2 กับ PGE2 และ Angiogenesis (29)



รูปที่ 4 การยับยั้งเอนไซม์ COX-2 ที่เกี่ยวข้องกับการกระบวนการ angiogenesis และ metastasis (30)

#### 2.2.4. การใช้ Selective COX-2 ในการป้องกันและรักษามะเร็ง

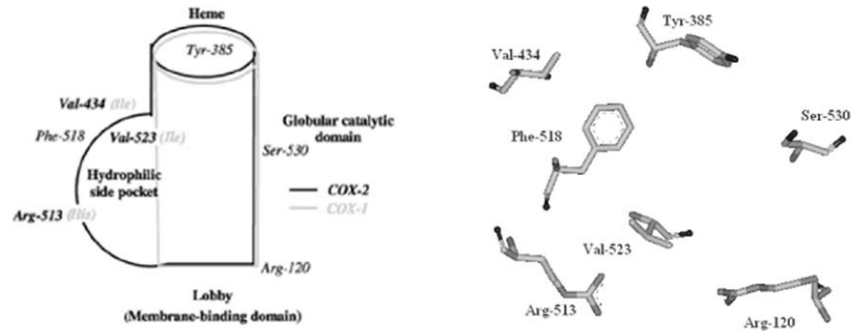
การใช้ Selective COX-2 inhibitors ในผู้ป่วย Familial adenomatous polyposis (FAP) ที่เป็นโรคทางพันธุกรรมที่พบ < 1:10,000 คน ที่จะพบการเพิ่มจำนวนของเซลล์เนื้องอก (polyps) ใน colon, rectum และ duodenum ซึ่งผู้ที่มีการเกิด FAP

ทุกคนจะมีการพัฒนาไปเป็น colorectal cancer โดยมีการศึกษาเพื่อดูผลในการยับยั้ง การเจริญเติบโตของ colorectal adenomatous polyps จากการให้ Celecoxib ขนาด 400 mg วันละ 2 ครั้งเป็นเวลา 6 เดือน ผลการศึกษาพบว่า Celecoxib สามารถลด จำนวนการเกิดของ colon polyps ได้อย่างมีนัยสำคัญ , ลดจำนวนและขนาดของเนื้องอก ลงได้ 40-60% และสามารถยับยั้งการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ในระยะเริ่มต้นได้ อีกทั้งในปี 2003 สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกาได้มีการอนุมัติให้มีการใช้ celecoxib 800 mg ต่อวันในการป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ และใน ประเทศญี่ปุ่นในปี 2007 (31-33) แต่ผลข้างเคียงที่พบเมื่อใช้ในระยะเวลายาวพบว่ายา celecoxib มีผลเพิ่มความเสียหายและความรุนแรงของ โรคทางหัวใจและหลอดเลือด จึงมี การกำหนดข้อห้ามใช้ยานี้ในผู้ป่วยที่มีการผ่าตัดทำทางเบี่ยงหลอดเลือดหัวใจ(34,35) และในปี 2012 พบว่าได้มีการถอนตัวยา celecoxib สำหรับข้อบ่งใช้ในการรักษา FAP เนื่องจากการศึกษา post marketing พิจารณาเกี่ยวกับ risk และ benefit พบว่าข้อมูลที่ได้ไม่ชัดเจน และมีความเสี่ยงในการใช้มากกว่าประโยชน์ (36-38)

### 2.3. ตำแหน่งออกฤทธิ์ของเอนไซม์ COX-2

ตำแหน่งที่ออกฤทธิ์ของเอนไซม์ Cyclooxygenase มีลักษณะ Hydrophobic โดยส่วนของ arachidonate binding site จะจับบริเวณส่วนบนของ receptor ในบริเวณ Arg-120 และ Tyr-385 โดยตำแหน่ง Ser-530 ที่อยู่บริเวณกลางของ receptor จะเป็นที่จับและเกิด acetylation โดยความแตกต่างระหว่าง enzyme COX-1 และ COX-2 คือ COX-2 จะมี valine ที่ตำแหน่ง 523 แทน isoleucine ที่มีส่วนโครงสร้างรบกวนมาก (steric) ทำให้ enzyme COX-2 มี pocket site มากกว่า COX-1 การพัฒนายาจึงสนใจในการพัฒนาโครงสร้างที่จำเพาะต่อบริเวณนี้เพิ่มมากขึ้น และนอกจากนั้นยังมีความแตกต่างเช่นเดียวกันในตำแหน่ง 434 และการที่เปลี่ยน Ileu ไปเป็น Val มีผลทำให้ Phe-518 ที่อยู่บริเวณใกล้เคียงมีการบิดออกจาก cavity และนอกจากการเปลี่ยนชนิดของ amino acid จะมีผลต่อลักษณะของ drug-binding site แล้ว ยังมีผลต่อลักษณะทางเคมีอีก

ด้วย โดยการเปลี่ยน จาก Histidine-513 ใน COX-1 ไปเป็น arginine ใน COX-2 ยังมีผลต่อความ มีขั้วของจุดที่เอนไซม์จับกับสาร

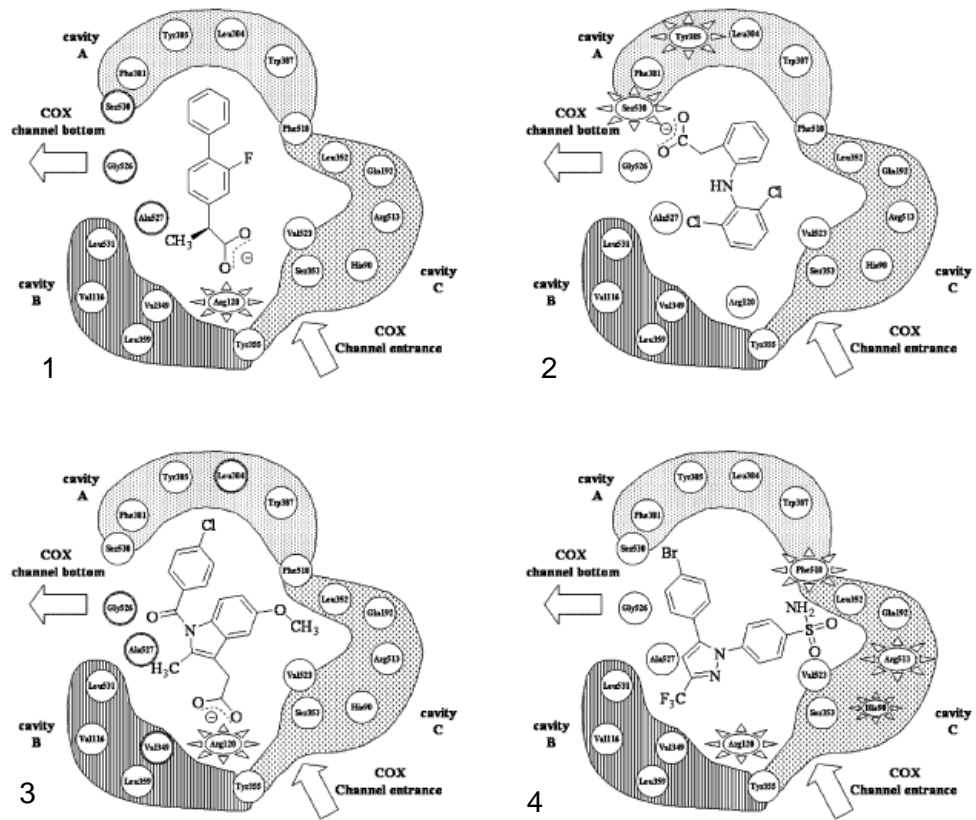


รูปที่ 5 ตำแหน่งออกฤทธิ์เอนไซม์ Cyclooxygenase-2 ที่แตกต่างกับ Cyclooxygenase-1 (23)

จากการศึกษาที่ได้มีการพิจารณา X-ray structures ของเอนไซม์ COX-2 ที่มีการจับกับสาร COX-2 inhibitor เช่น Flurbiprofen, Indomethacin, Diclofenac และ SC-558 ซึ่งผลที่ได้ออกมาตาม รูปที่ 6 โดยจะพบว่าการจับของโมเลกุลต่างๆจะจับกับ amino ที่แตกต่างกัน ซึ่งบริเวณออกฤทธิ์ แบ่งออกเป็น 3 cavities คือ cavities A, B, C

โดยการพัฒนาแต่ละโมเลกุลก็จะมี ความแตกต่างของการจับกับตำแหน่งออกฤทธิ์ที่ต่างกัน เช่น

- บริเวณ ที่มี หมู่ carboxylate ของ โมเลกุล flurbiprofen, indomethacin และ หมู่ trifluoromethyl ของโมเลกุล SC-558 จับบริเวณ Cavity B ที่ประกอบด้วย Leu531, Val116, Val349, Leu359 และ Tyr355
- หมู่ sulphonamide ของ SC-558 จะจับกับ cavity C บริเวณของ Val523 Phe518, Leu352, Val523, Ser353 และ Tyr 355 เพิ่มขึ้น



รูปที่ 6 การจับของ Flurbiprofen, Diclofenac, Indomethacin และ SC-558 กับเอนไซม์ COX-2

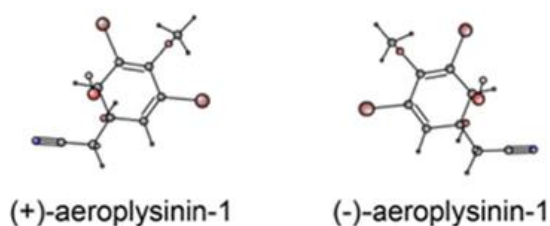
(39)

โดยโมเลกุล SC-558 จัดว่ามี Selectivity ต่อ COX-2 มากที่สุด ด้วยโครงสร้างที่มี bromophenyl ring จะจับกับ cavity A บริเวณตำแหน่ง hydrophobic แบบ indomethacin และ flurbiprofen ส่วนหมู่ fluoromethyl group จะจับกับ Arg120 และ 1 อะตอมของ fluorine จะจับกับ hydrophilic region อีกทั้งส่วน nitrogen ของวง pyrazole และ aromatic ที่มีหมู่ phenylsulphonamide จะจับบริเวณ hydrophobic แต่หมู่ของ sulphonamide จะจับกับบริเวณ hydrophilic region และสามารถเกิด hydrogen bond กับ nitrogen ของ Gln192 อีกทั้ง oxygen บนหมู่ sulphonamide สามารถเกิด hydrogen bond กับ nitrogen ของ Phe518 ได้



## 2.4. Aeroplysinin-1

Aeroplysinin-1 เป็นหนึ่งในสาร secondary metabolite ที่พบในฟองน้ำ Order verogida ที่ประกอบด้วย 4 families คือ Aplysinidae, lanthellidae, Aplysininellidae และ Pseudoceratinidae โดยใน order นี้จะมีการผลิตสาร secondary metabolite ในรูปของ bromotyrosine ที่ประกอบด้วยอนุพันธ์ของ bromotyrosine, dibromo verongilquinol และ aeroplysinin-1 ที่ใช้ในการป้องกันการรุกรานจากสิ่งมีชีวิตอื่น โดยสาร aeroplysinin-1 จะมีส่วนของ chiral carbon ทำให้สารดังกล่าวมี 2 enantiomer คือ levorotatory enantiomer((-)-aeroplysinin-1) ที่สกัดได้จาก *Lanthella ardis* และในรูปของ dextrorotatory enantiomer ((+)-Aeroplysinin-1) สกัดมาได้จาก *Aplysina aerophoba* โดยจากการศึกษาของคุณสมบัติพบว่า โครงสร้างที่คงตัวที่สุดอยู่ในรูปของ (+)-Aeroplysinin-1 ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษางานวิจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับอนุพันธ์ของ (+)-Aeroplysinin-1 เพื่อนำไปพัฒนาโมเลกุลดังกล่าวต่อไป



รูปที่ 7 แสดงโครงสร้างของ Aeroplysinin-1 (10)

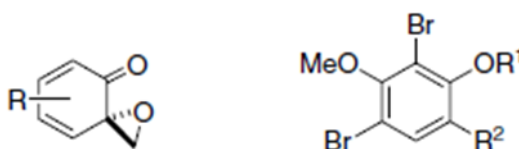
จากการศึกษาพบว่าสาร (+)-Aeroplysinin-1 มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้แก่ *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *Vibrio anguillarum*, *Flexibacter sp.* และ *Moraxella sp.* แต่ไม่ได้แสดงผลในการยับยั้งของเชื้อแกรมลบ (10) และพบว่าสารนี้ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัส HIV-1 โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ reverse transcriptase และ RNA-DNA polymerase (40)

สาร Aeroplysinin-1 ยังแสดงผลต่อการอักเสบ จากการศึกษานี้ในหลอดทดลองโดยใช้ human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) และ human monocytic leukemia cell line (THP-1) พบว่าการใช้ (+)-aeroplysinin-1 มีผลต่อขั้นตอนที่สำคัญของการอักเสบ โดยจะพบว่าใน

เซลล์ของ HUVEC ที่ได้รับ 10–20  $\mu\text{M}$  ของ (+)-aerophysinin-1 พบว่ามีการลดลงของการสร้างโปรตีน monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), thrombospondine-1 (TSP-1), และ cyclooxygenase 2 (COX-2) ที่เป็นสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบ รวมถึงยังมีการลดลงของ interleukin 1 alpha (IL-1 alpha) และ matrix metalloproteinase 1 (MMP-1) (10)

นอกจากนี้ (+)-aerophysinin-1 นี้ยังมีผลยับยั้งมะเร็งโดยกระบวนการ Anti-angiogenesis อย่างมีประสิทธิภาพ ในการทดสอบใน bovine aortic endothelial cell (BAEC) ซึ่ง สารนี้จะเหนี่ยวนำให้เกิดการ late apoptosis ซึ่งแสดงให้เห็นว่าส่งผลต่อ intrinsic apoptotic pathway และยังพบว่า aerophysinin-1 สามารถยับยั้งกระบวนการอื่นๆของ angiogenesis รวมถึงมีการศึกษาในเซลล์หลอดเลือดของมนุษย์ทั้ง microvascular (HMEC) และ macrovascular (EVL-2 และ RF-24) (13)

ซึ่งจากงานวิจัยต่างๆพบว่า (+)-aerophysinin-1 เป็นสารที่มีศักยภาพดีในการยับยั้งกระบวนการ angiogenesis (10,13,41) ซึ่งต่อมาได้มีการศึกษาอนุพันธ์ของ (+)-aerophysinin-1 (41) เพื่อดูฤทธิ์ความจำเพาะต่อฤทธิ์ anti angiogenesis มากกว่า ฤทธิ์ cytotoxicity ซึ่งผลจากการพัฒนาโครงสร้างของอนุพันธ์พบว่ามีอนุพันธ์ 2 กลุ่มคือ Spiroepoxycyclohexadienones ( $\pm$ ) และ aromatic โดยจะพิจารณาความจำเพาะต่อการยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ และ ลดฤทธิ์ที่เป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic activities) โดยจะมีการนำสารอนุพันธ์มาสังเคราะห์เพื่อดูค่าอัตราส่วนระหว่าง ความเข้มข้นของยาที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ Bovine aortic endothelial cell ได้ 50% ( $\text{IC}_{50}$ : cytotoxic assay) เทียบกับ ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ไม่มีการสร้างหลอดเลือดใหม่ (MIC: sprouting inhibition assay)



รูปที่ 8 แสดงโครงสร้าง Spiroepoxycyclohexadienones ( $\pm$ ) และ Aromatic analogues

สำหรับการพัฒนาอนุพันธ์ในกลุ่มของ aromatic พบว่าโครงสร้างหลักที่สำคัญต่อการออกฤทธิ์ที่มี  $R^2$  เป็น aldehyde และ  $R^1$  เป็นหมู่ hydroxyl คือ โครงสร้างที่ 4 หาก ไม่มีหมู่แทนที่ -OMe หรือไม่มีหมู่ -Br พบว่าฤทธิ์ลดลงและมีพิษต่อเซลล์เพิ่มมากขึ้น โครงสร้าง 4 จึงเป็นโครงสร้างที่พบว่าออกฤทธิ์ได้ปานกลางและพิษต่อเซลล์ลดลง แต่ผลที่มีการยับยั้งการเกิดของหลอดเลือดที่ดีที่สุดคือ โครงสร้างที่มีแทนที่  $R^1$  ด้วย Benzylic group มีผลป้องกัน หมู่ Phenolic และหมู่ oxazolone บนตำแหน่ง  $R^1$  ทำให้เพิ่มฤทธิ์ Anti-angiogenesis เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับ aeroplysin-1 มากที่สุด

จากข้อมูลที่กล่าวถึงยาที่ออกฤทธิ์ anti-angiogenesis ในปัจจุบัน พบว่ายังเกิดการดื้อหรือเกิด VEGFR-independent angiogenesis ประกอบกับข้อมูลการพัฒนาโครงสร้างเพื่อเพิ่มฤทธิ์ Anti-angiogenesis ทางผู้วิจัยจึงได้นำอนุพันธ์ของ Aeroplysin-1 ที่เป็นกลุ่มของ Aromatic analogue มาออกแบบและพัฒนาเพื่อให้ได้สารที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้ง COX-2 receptor ที่จำเพาะเจาะจงเพิ่มมากขึ้น

## 2.5 การประยุกต์ใช้คอมพิวเตอร์ในการออกแบบยา (Computer-Aided Drug Design)

คอมพิวเตอร์สามารถช่วยในการค้นพบการออกแบบและการพัฒนาตัวยา มีบทบาทสำคัญอย่างมากในวงการแพทย์และเภสัชกรรมในการผลิตตัวยา ซึ่งไม่เพียงเพิ่มโอกาสที่จะประสบความสำเร็จในการผลิตตัวยาออกสู่ตลาดยังเป็นการช่วยลดระยะเวลา งบประมาณ และการใช้สัตว์ทดลองอีกด้วย การวิจัยทางเภสัชกรรมคอมพิวเตอร์ได้เข้ามามีบทบาทอย่างมากในกระบวนการคิดค้นเพื่อให้ได้ตัวยาใหม่ๆ ให้ทันต่อสภาวะการณ์ในยุคปัจจุบัน

งานวิจัยสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (natural product) มีแนวโน้มที่จะขยายตัวสูงขึ้นเรื่อยๆ และมีบทบาทสำคัญในงานวิจัยทางชีวภาพหลายแขนง เนื่องจากความหลากหลายทางชีวภาพของพืชหรือสิ่งมีชีวิตแถบเมืองร้อน ส่งผลให้เกิดสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีคุณสมบัติที่น่าสนใจมากมาย ซึ่งโดยส่วนใหญ่งานวิจัยทางสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมีจุดประสงค์ในการพัฒนาเป็นสารออกฤทธิ์ที่น่าสนใจ เช่น การต้านมะเร็ง การต้านจุลชีพหรือลดอาการไม่พึงประสงค์ ซึ่งปัญหาที่สำคัญอย่างยิ่งในการพัฒนาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจำเป็นต้องอาศัยข้อมูลระดับเชิงลึกในระดับ

โมเลกุล ได้แก่ การระบุโมเลกุลตัวจับเป้าหมายของสาร (molecule target receptor) พร้อมทั้งกลไกการออกฤทธิ์ของสารดังกล่าว จัดเป็นขั้นตอนที่ค่อนข้างใช้เวลานานและใช้งบประมาณสูงหนึ่งในวิธีการลดปัญหาดังกล่าว คือ การประยุกต์ข้อมูลทางชีวสารสนเทศ (bioinformatics) และเทคนิคการใช้คอมพิวเตอร์ช่วย (computer-aided techniques) ควบคู่ไปกับผลการทดลองด้วยวิธีทางชีวเคมี (biochemical technique) จึงเป็นทางเลือกที่มีการให้ความสนใจ เนื่องจากใช้ต้นทุนค่อนข้างต่ำอีกทั้งยังสามารถใช้ในการจำลองการจับของสารกับตำแหน่งเอนไซม์ เพื่อช่วยคัดกรองกลุ่มโมเลกุลตัวจับได้และมีประสิทธิภาพ (42)

### 2.5.1 Molecular modeling และ Docking study

งานวิจัยแบบจำลองโมเลกุล (Molecular modeling) เป็นการนำเอาคอมพิวเตอร์มาใช้ในการศึกษาทางทฤษฎี ซึ่งเป็นการคำนวณโครงสร้างและสมบัติต่างๆของโมเลกุล โดยอาศัยหลักการว่าคุณสมบัติที่คำนวณได้นี้ขึ้นกับโครงสร้าง 3 มิติของโมเลกุล ผลการคำนวณที่ได้จากการศึกษาทางเคมีเชิงคอมพิวเตอร์ ช่วยทำนายผลการทดลองในห้องปฏิบัติการ และเป็นการอธิบายในระดับโมเลกุลรวมถึงการทำนายผลการทดลองที่ไม่สามารถทำได้หรือทำได้ยากในห้องปฏิบัติการโดย molecular modeling ที่ใช้ในการศึกษาการจับกันของยาเรียกว่า Docking

### 2.5.2. โปรแกรม Autodock

เป็นโปรแกรมหนึ่งที่ใช้ในการทำ docking โดยจะทำการค้นหาโครงสร้างสามมิติของยาที่สามารถจับกันกับเป้าหมายได้ดีที่สุดโดยพิจารณาจากค่าพลังงาน เช่น binding energy ซึ่งเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการออกแบบโมเลกุลใหม่เพื่อให้มีคุณสมบัติตามต้องการ เช่น การออกแบบโมเลกุลของยา (drug design) ซึ่งเป็นการศึกษาการเข้ายึดจับกันและศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลยากับตำแหน่งที่ยาออกฤทธิ์ (active site) ของโมเลกุลเป้าหมาย (เช่น DNA Protein และ Enzyme) และวิธีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้าง 3 มิติของโมเลกุลยากับการออกฤทธิ์ (3D quantitative structure-

activity relationships, 3D QSAR) (43) โดยที่วัตถุประสงค์ของ Molecular docking คือ ทำนายลักษณะการวางตัวของสารเมื่อจับกับโมเลกุลเป้าหมาย แล้วคำนวณหาค่าพลังงานการจับระหว่างสารกับโมเลกุลเป้าหมายนั้นโดยคำนวณจากทุกพันธะที่เกี่ยวข้อง จากนั้นนำค่าพลังงานการจับที่คำนวณได้มาเรียงลำดับ โดยที่ค่าพลังงานการจับต่ำสุดจะเป็นค่าการจับระหว่างสารกับโมเลกุลเป้าหมายที่เสถียรที่สุด (44)

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินการวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์และสารเคมีในการทำวิจัย

##### 3.1.1. โปรแกรมคอมพิวเตอร์

1. AutoDockTools-1.5.6
2. Chem3D Ultra 8.0

##### 3.1.2. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

- |  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. Nuclear Magnetic Resonance (300 MHz)                      | 13. Test tubes + Rack   |
| 2. Ultraviolet Radiation<br>(UVGL-58, Handheld UV Lamp, USA) | 14. Syringes            |
| 3. Column chromatography (CC)                                | 15. Round bottom flasks |
| 4. Thin layer chromatography (TLC)                           | 16. Parafilm            |
| 5. Rotary evaporator (R-210, BUCHI, Switzerland)             | 17. Forceps             |
| 6. TLC Silica gel 60 F <sub>254</sub>                        | 18. Plaster pipette     |
| 7. Beakers   | 19. Funnel              |
| 8. Cylinders   | 20. Magnetic bars       |
| 9. Stand Clamps  | 21. ขวดยาหม่อง          |
| 10. Watch Glasses  | 22. Capillary Spot TLC  |
| 11. Droppers, ลูกยาง   | 23. Magnetic stirrer    |
| 12. กระดาษกรอง   |                         |

### 3.1.3 สารเคมี

1. 3-(Trifluoromethyl) aniline >99% (SIGMA-ALDRICH Ltd., USA)
2. 3, 5-Dibromo-2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde (SIGMA-ALDRICH Ltd., USA)
3. *Tert*-Butyl Hydroperoxide solution , TBH70X (SIGMA-ALDRICH Ltd., USA)
4. Silica gel 60 (0.063-0.200 mm) (Merck Ltd., Germany)
5. Ethyl acetate (Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)
6. Copper sulfate (Merck Ltd., Germany)
7. Hexane (LAB-SCAN Ltd., Thailand)
8. Methyl alcohol, Anhydrous (Mallinckrodt Ltd., USA)
9. Dichloromethane (Fisher Scientific Ltd., UK)
10. Sodium chloride (CARLO Erba Ltd., Italy)
11. Sodium sulphate anhydrous crystals (CARLO Erba Ltd., Italy)

## 3.2 วิธีการทดลอง

### 3.2.1 ศึกษาและออกแบบโครงสร้างยาโดยใช้คอมพิวเตอร์ช่วย

1. เลือก Lead compound ที่ต้องการพัฒนาและออกแบบโครงสร้างสารใหม่
2. วาดโครงสร้างทางเคมีของสาร Aeropylsinin-1 และอนุพันธ์ให้อยู่ในโครงสร้างทางเคมีรูปแบบสามมิติ โดยใช้โปรแกรม Chem3D Ultra 8.0 บันทึกไฟล์เป็น .pdb
3. เตรียมโครงสร้างทางเคมีของสาร Aeropylsinin-1 และโครงสร้างที่อนุพันธ์ที่ต้องการศึกษา
4. ทำการดาวน์โหลดโครงสร้างทางเคมีแบบสามมิติของเอนไซม์ Cyclooxygenase-2 (1CX\_2.pdb) จาก Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>) และทำการตัด Ligand ที่จับอยู่กับโปรตีน ที่ได้มีการรายงานในข้อมูลของโปรตีนใน RCSB และบันทึกไฟล์ .pdb
5. ทำการจำลองโครงสร้างสามมิติของสารและ 1CX-2 โดยใช้โปรแกรม AutoDockTools-1.5.6 โดยมีขั้นตอนการทำงานของโปรแกรมดังนี้

5.1 นำโครงสร้างทางเคมีในลักษณะสามมิติของสาร Aeropylsinin-1 (สมมติเป็นของ A1.pdb) มาทำให้อยู่ในรูปไฟล์ .pdbqt มีขั้นตอน ดังนี้

5.1.1 เปิดโปรแกรม AutoDockTools-1.5.6

5.1.2 เข้าไปที่เมนู File จากนั้นไปที่ Read Molecule เลือกไฟล์ 1CX2\_free.pdb แล้ว open

5.1.3 เติมอะตอมไฮโดรเจน กด Edit เลือก Hydrogen กด Add แล้ว OK

5.1.4 คลิกช่อง Show/Hide ของ 1CX2\_free ให้ขึ้นสีขาว

5.1.5 เข้าไปที่เมนู Ligand เลือก Input แล้ว Open ไฟล์ A1.pdb เลือก Open แล้ว OK

5.1.6 เข้าไปที่เมนู Ligand เลือก Torsion Tree แล้ว Detect Root

5.1.7 ดู Number of rotatable bonds โดยไปที่ Ligand เลือก Torsion Tree แล้วเลือก Choose Torsions

5.1.8 ดู Number of Active Torsions โดยไปที่ Ligand เลือก Torsion Tree แล้ว Set Number of Torsions

5.1.9 เข้าไปที่เมนู Ligand เลือก Torsion Tree แล้วเลือก Show/Hide Root Marker

5.1.10 บันทึกไฟล์จาก A1.pdb ให้เป็น A1.pdbqt โดยไปที่ Ligand เลือก Output แล้วกด Save as PDBQT จะได้ไฟล์เป็น A1.pdbqt

5.1.11 คลิกช่อง Show/Hide ของ A1 ให้ขึ้นสีขาว

5.1.12 เข้าไปที่เมนู Flexible Residues เลือก Input แล้วกด Choose Macromolecule เลือกไฟล์ 1CX2\_free เลือก Select Molecule กด Yes กด OK

5.1.13 เข้าไปที่เมนู Select เลือก Select from String กด Clear form ป้อน ข้อมูลตำแหน่งโปรตีนของเอนไซม์ลงไปในช่วง Residue โดยป้อนข้อมูล เข้าไปที่ละชนิดแล้วกด Add หลังจากป้อนข้อมูลตำแหน่งโปรตีนของ



เอนไซม์ครบ กดDismiss

5.1.14 ดู Number of rotatable bonds โดยไปที่ Flexible Residues เลือก

Choose Torsions in Currently Select Residues กด Close

5.1.15 เข้าไปที่เมนู Flexible Residues เลือก Output กด Save Rigid PDBQT ตั้งชื่อไฟล์ว่า 1Cx2\_rigid.pdbqt กด Save

5.1.16 เข้าไปที่เมนู Edit กด Delete แล้ว Delete Molecule เลือก 1CX2\_free แล้ว Delete Molecule กด Continue กด Dismiss

## 5.2 เตรียมพารามิเตอร์สำหรับAutoGrid

5.2.1 เลือกMacromoleculeซึ่งเป็นไฟล์ .pdbqtโดยไปที่ Grid เลือก

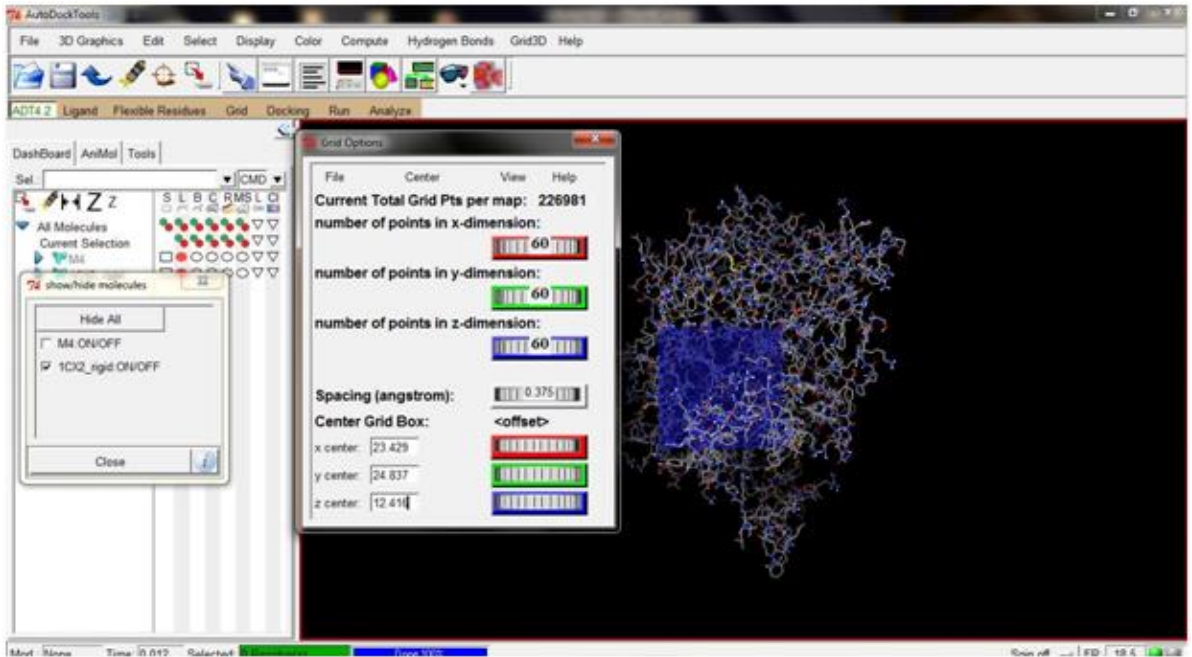
Macromolecule แล้ว Open เลือก 1CX2\_rigid.pdbqt แล้ว Open กด

Yes กด OK

5.2.2 เข้าไปที่เมนู Grid เลือก Set Map Types แล้ว Choose Ligand เลือก A1 กด Select Ligand

5.2.3 เข้าไปที่เมนู Grid เลือก Set Map Types แล้ว Directlyเลือก Set Map Types เติม N ตำแหน่งที่ 4

5.2.4 กำหนดขนาดของแผนที่กริด (Grid Map) ที่ต้องการ โดยไปที่ Grid Box ตั้งค่าใน Grid Options โดยกำหนดพารามิเตอร์ เมื่อเสร็จแล้วให้ไปที่ File กด Close saving current



รูปที่ 9 แสดงการตั้งค่าพารามิเตอร์เพื่อกำหนดขนาดของพื้นที่

5.2.5 บันทึกเป็นไฟล์ .gpfโดยไปที่ Grid เลือก Output กด Save GPF ตั้งชื่อไฟล์ว่า 1CX2.gpf กด Save

5.2.6 เข้าไปที่เมนู Grid เลือก Edit GPF กด OK

5.2.7 เข้าไปที่เมนู Run เลือก Run AutoGridแล้ว Launch รอโปรแกรม run เมื่อโปรแกรมทำการrun เสร็จสิ้นให้กด OK

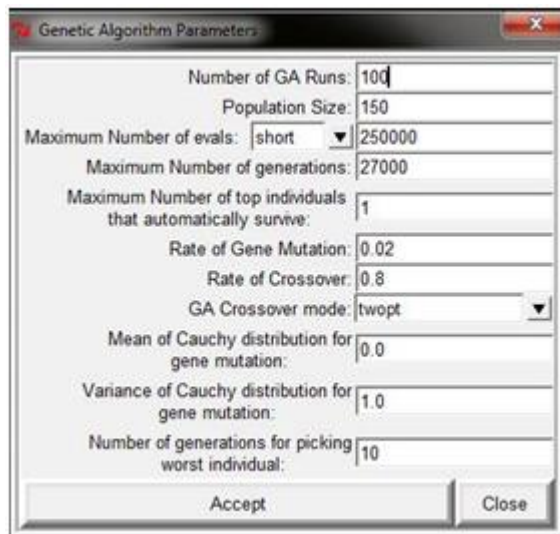
### 5.3 เตรียมพารามิเตอร์สำหรับ Autodock

5.3.1 เปิดMacromoleculeซึ่งเป็นไฟล์ .pdbqtที่เตรียมไว้ โดยไปที่ Docking เลือกMacromolecule กด Set Rigid Filename เลือก 1CX2\_rigid.pdbqt กด Open

5.3.2 เปิด Ligand ซึ่งเป็นไฟล์ .pdbqt ที่เตรียมไว้โดยไปที่ Dockingเลือก Ligand ไปที่ Choose เลือกA1 แล้ว Select Ligand กด Accept

5.3.3 กำหนดพารามิเตอร์ต่างๆ โดยไปที่ Dockingเลือก Search Parameters ไปที่ Genetic Algorithm แล้วกำหนดค่าพารามิเตอร์ดังรูปที่ 10 เมื่อกำหนด

ค่าพารามิเตอร์เสร็จสิ้นแล้ว ให้กด Accept



รูปที่ 10 แสดงการตั้งค่าพารามิเตอร์สำหรับการ Docking molecule

5.3.4 บันทึกไฟล์เป็น Lamarckian GA จะได้ไฟล์ประเภท .dpf โดยไปที่ Docking เลือก Output ไปที่ Lamarckian GA ตั้งชื่อไฟล์ว่า A1.dpf กด Save

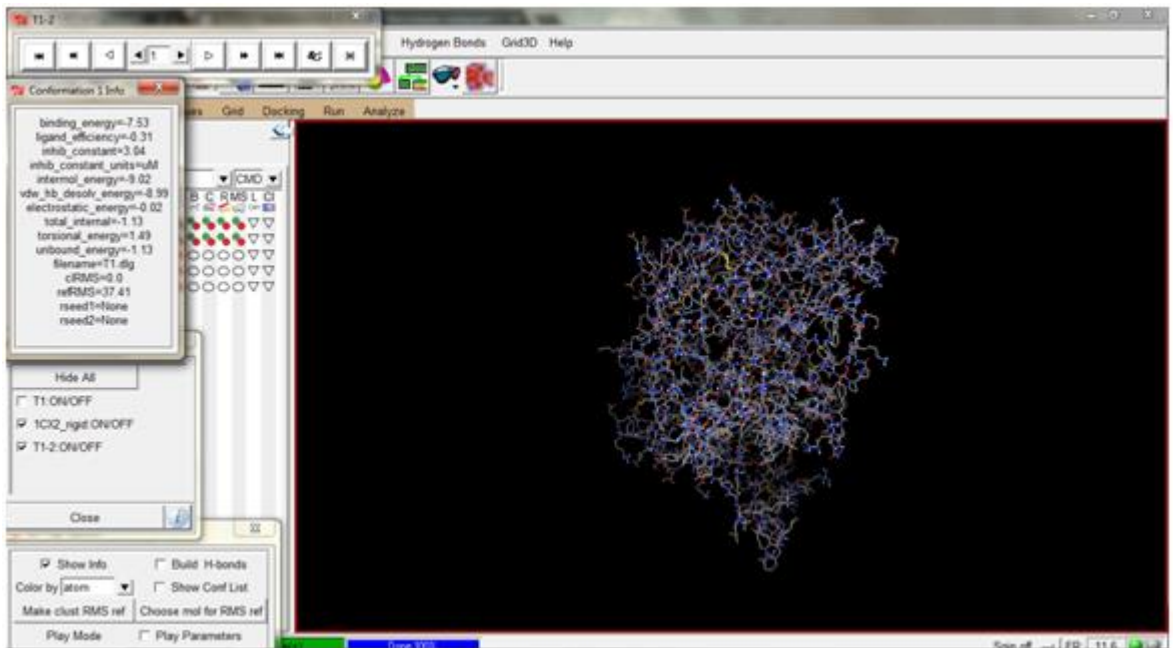
5.4 ทำการ Docking Molecule ผลลัพธ์ที่ได้จะเป็นไฟล์ .dlg (โดยอัตโนมัติ) โดยทำดังนี้ Run แล้ว Run AutoDock เลือก Launch รอ run เมื่อโปรแกรมทำการ Run เสร็จสิ้น ให้กด OK

5.5 วิเคราะห์ผลจากการศึกษา Docking Molecule

5.5.1 เข้าไปที่เมนู Analyze เลือก Dockings แล้ว Open เลือกไฟล์ A1.dlg กด Open หน้าจอจะปรากฏ A1-2 ให้กด OK

5.5.2 เข้าไปที่เมนู Analyze เลือก Macromolecule กด Choose เลือก 1CX2\_rigid แล้วกด Select Macromolecule

5.5.3 เข้าไปที่เมนู Analyze เลือก Conformations กด Play, ranked by energy



รูปที่ 11 แสดงข้อมูลค่า binding energy ของแต่ละconformation

5.5.4 เลือกค่า binding energy ของ conformation ที่มีค่ามากที่สุด (มีค่าติดลบมากที่สุด) นำมาทดลองในห้องปฏิบัติการ

### 3.2.2 การสังเคราะห์ยาใหม่

การสังเคราะห์สารใหม่ที่ได้จากการออกแบบมีขั้นตอนดังนี้

- 3.2.2.1 ซังสาร 3-(Trifluoromethyl) aniline, Copper sulfate และ 3, 5-Dibromo-2-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyde ใส่ลงไปใน round bottom Flask
- 3.2.2.2 เติมสาร Tert-Butyl Hydroperoxide Solution (TBHP) ลงไป
- 3.2.2.3 ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง นาน 3 ชั่วโมง และใช้ Magnetic stirrer คนตลอดเวลา
- 3.2.2.4 ทำการสกัดแยกสารด้วย Ethyl acetate
- 3.2.2.5 นำสารที่แยกได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย column chromatography และ Preparative TLC plate
- 3.2.2.6 ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารด้วย TLC โดยใช้ system ที่มี Methanol:

Ethyl acetate: Hexane = 1: 1: 4 และนำไปดูการดูดกลืนแสงภายใต้ UV lamp ที่ 254 และ 365 nm

จุด A คือ 3-(Trifluoromethyl) aniline, จุด B คือ 3,5-Dibromo-2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde และจุด C คือ product



รูปที่ 12 ตำแหน่งของสารที่แยกได้ บนแผ่น TLC

### 3.3.3 วิเคราะห์หาโครงสร้างและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่ได้

#### 3.3.3.1 ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

เครื่อง NMR เป็นเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์โครงสร้างของสาร ในรูปสเปกตรัมของ  $^1\text{H}$  และ  $^{13}\text{C}$  ใน 1D-NMR และสเปกตรัมแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง  $^1\text{H}$  -  $^1\text{H}$  และ  $^1\text{H}$  -  $^{13}\text{C}$  ใน 2D-NMR ใช้สำหรับยืนยันความใกล้เคียงของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐานได้

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### 4.1. Lead Identification

จากการทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับสารที่มีฤทธิ์ Cyclooxygenase-2 ที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง เมื่อศึกษาลักษณะของโครงสร้างสารอนุพันธ์ของ Aeroplysinin-1 ซึ่งเป็นสาร secondary metabolite ที่ได้จากฟองน้ำทะเลตระกูล Verongida ที่พบในเขตพื้นที่ทะเลของประเทศไทย พบว่าสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ ซึ่งมีรายงานการศึกษา (41) ว่าโครงสร้างที่แสดงดังรูปที่ 13 เป็นโครงสร้างที่นำมาเป็น lead ในการออกแบบครั้งนี้ ซึ่งโครงสร้างนี้สามารถออกฤทธิ์ได้ปานกลาง และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ลดลง มีผลยับยั้งการเกิดของหลอดเลือดดีเมื่อเทียบกับ aeroplysinin-1 และมีค่า Binding energy และค่า  $IC_{50}$  ที่ดี โครงสร้างสามารถสังเคราะห์ได้ง่าย จึงนำมาใช้เป็นสารต้นแบบของงานวิจัยนี้



รูปที่ 13 แสดงโครงสร้างของ lead compound

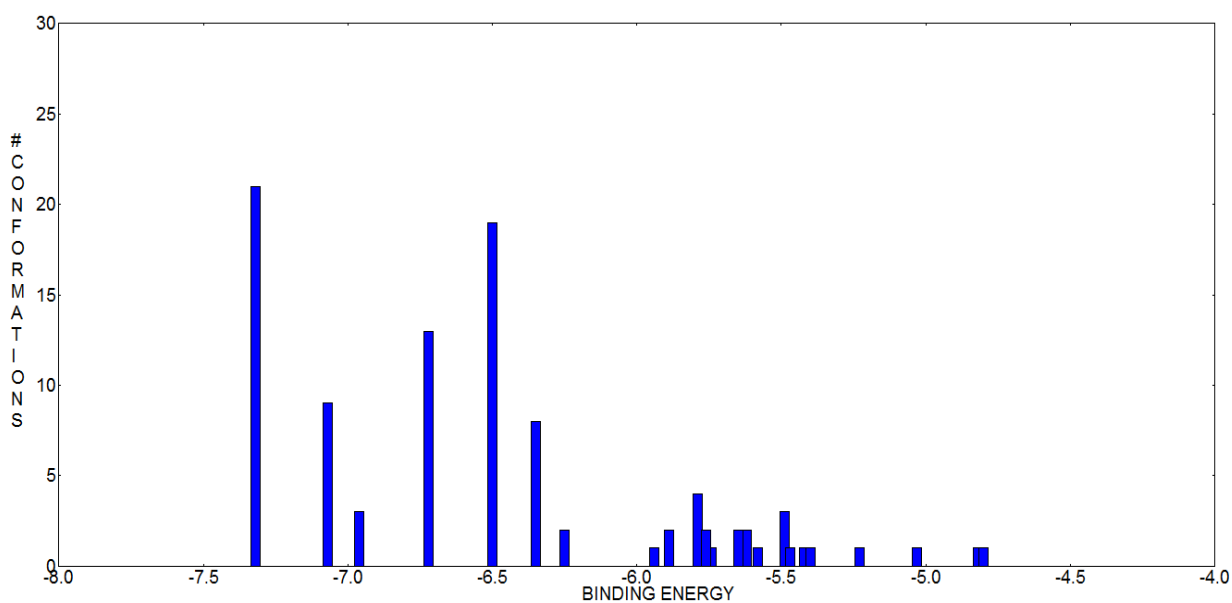
#### 4.2. Design and Target compounds

##### 4.2.1. Validation of Target Molecule

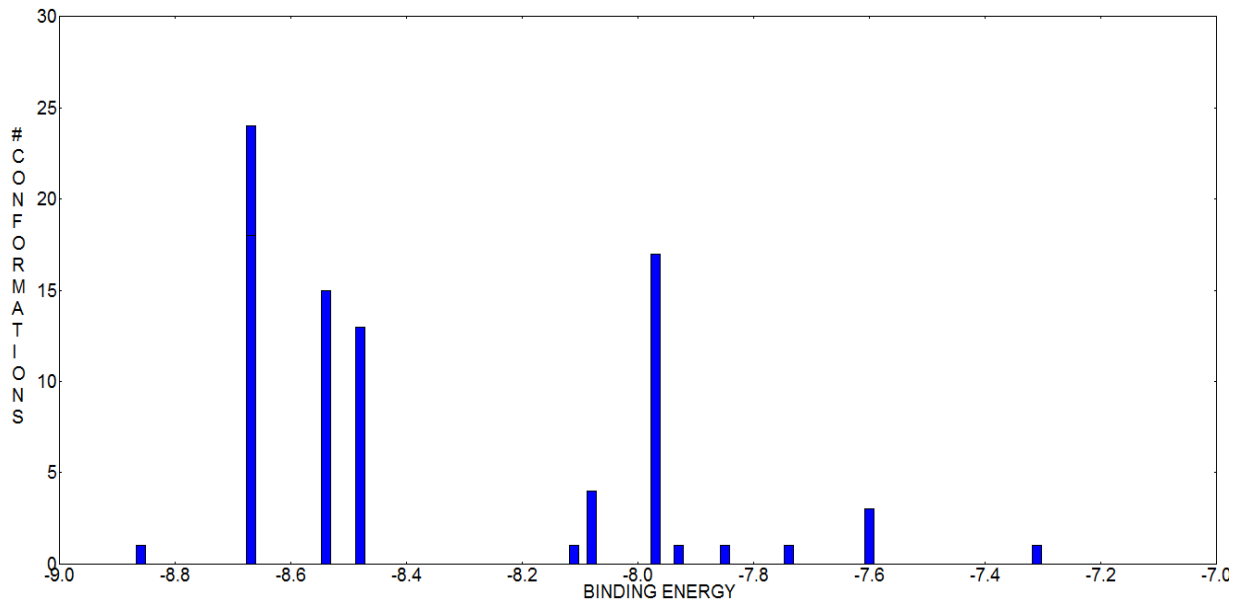
การศึกษาโดยใช้คอมพิวเตอร์ช่วยในการออกแบบ(Computer- Aided Drug Design) เริ่มจากการพิจารณาโมเลกุลเอนไซม์ที่มีการจับด้วยสาร SC-558 ที่มีการรายงานว่าสามารถจับกับเอนไซม์ COX-2 ได้ดีที่สุดพบว่าค่า RMSD ของเอนไซม์ที่รายงานในฐานข้อมูลทั้ง 2 ตัวมีค่าน้อยกว่า 2 แต่ผลึกเอนไซม์ 1CX2 มีค่า Binding energy ที่มากกว่าและจำนวน cluster % ที่มากกว่า จึงได้เลือกผลึกเอนไซม์ 1CX2 มาเป็นต้นแบบในการออกแบบสารด้วยคอมพิวเตอร์

ตารางที่ 1 แสดงผลการ validate เอนไซม์ COX-2

PDB file	Ligand	Binding energy	จำนวน Cluster ที่สูงที่สุด (%)	RMSD
6COX	SC558	-7.32	21	0.93
1CX2	SC558	-8.67	24	1.1



รูปที่ 14 แสดง cluster ของ COX6



รูปที่ 15 แสดงถึง Cluster ของ 1CX2

#### 4.2.2. Design of Target Compound

เมื่อเลือก Lead compound ในการพัฒนายาแล้วผู้วิจัยจึงได้ออกแบบโครงสร้างโดยการนำส่วนโครงสร้างที่มีความสัมพันธ์กับการออกฤทธิ์ของสารต้นแบบ Aeropylsinin-1 ที่ได้มีการรายงานการพัฒนาฤทธิ์ของ Aeropylsinin-1 ไว้แล้ว จนได้เป็นอนุพันธ์ที่มีหมู่แอลดีไฮด์ในโครงสร้างดังรูปที่ 13 ผู้วิจัยจึงนำส่วนของโครงสร้างดังกล่าวมาเป็นส่วนหนึ่งของสารที่ออกแบบใหม่ โดยการปรับเปลี่ยนและดัดแปลงโครงสร้างทางเคมี เพื่อให้ได้ยาที่มีความแรงหรือจำเพาะต่อเอนไซม์มากขึ้น

จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าโครงสร้างที่ออกฤทธิ์เป็น Selective COX-2 inhibitors โดยส่วนมากเป็นแบบ Tricyclics (ortho-diarylheterocycles หรือ carbocycles) และ Non-tricyclics การมีหมู่ ester และ amide ในโครงสร้าง จะทำให้มีความแรงและจำเพาะต่อ COX-2 inhibitors มากขึ้น พบว่าขณะเดียวกันการมีหมู่แทนที่ methoxy หรือ fluorine ที่ตำแหน่ง C-1 หรือ C-3 ของ phenyl ring จะช่วยเพิ่มความจำเพาะและความแรงของ COX-2 inhibitor ได้เช่นกันถ้ามีหมู่  $\text{NH}_2$  ที่ต่อกับวง Benzene ได้เป็น Anilide จะช่วยลดความเป็นเบส ทำให้พิษต่อกระเพาะอาหารและเกร็ดเลือดลดลงเมื่อพิจารณาจากโครงสร้างที่ออกแบบจะเห็นว่าสารมีพันธะเอไมด์ในโมเลกุลซึ่งสามารถสังเคราะห์ได้จาก Amidation reaction ดังนั้นสารที่ออกแบบจึง



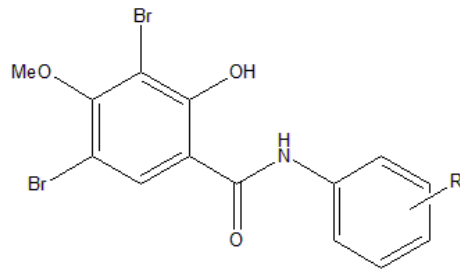
สามารถสังเคราะห์ได้จาก 3-(Trifluoromethyl)aniline และ 3,5-dibromo-2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde

#### 4.2.3. การ Docking สารที่ออกแบบ

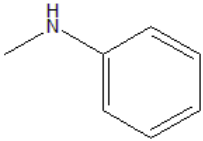
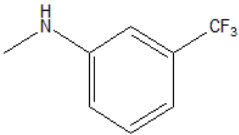
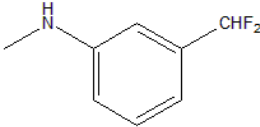
นำสารใหม่ที่มีส่วนของ โครงสร้าง 3-(Trifluoromethyl) aniline ที่เชื่อมต่อกับโครงสร้าง 3,5-Dibromo-2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde ด้วยพันธะเอไมด์ ไป docking เพื่อตรวจสอบค่าความแรงในการจับของ Conformation บริเวณ Active site ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน PHE518 , VAL523 และ SER530 ได้ค่าความแรงในการจับเท่ากับ -7.04Kcal/mol และ RMSD เท่ากับ 1.16

จากผลการ Docking ของสารที่ออกแบบดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าโมเลกุลที่มีร้อยละ cluster, binding energy ที่สูงที่สุดคือโมเลกุล PY4 แต่เมื่อพิจารณาด้านราคาสารเคมีพบว่า โมเลกุล PY6 มีราคาที่ถูกกว่า และค่าความแรงในการจับอยู่ในระดับพอกัน จึงเลือก PY6 มาสังเคราะห์

ตารางที่ 2 แสดงผลการ docking ของสารที่ออกแบบ

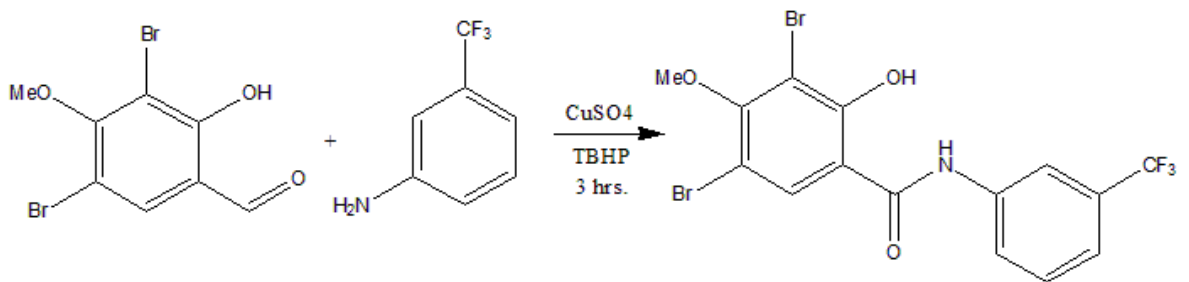


Molecule	R	Binding energy (Kcal/mol)	จำนวน Cluster ที่ สูงที่สุด (%)	RMSD	Bonding
PY1		-6.78	14	1.31	VAL523 TYR385
PY2		-7.4	28	1.47	SER530 TYR385
PY3		-8.89	26	1.83	PHE518 VAL434
PY4		-9.03	35	1.55	PHE518 VAL434

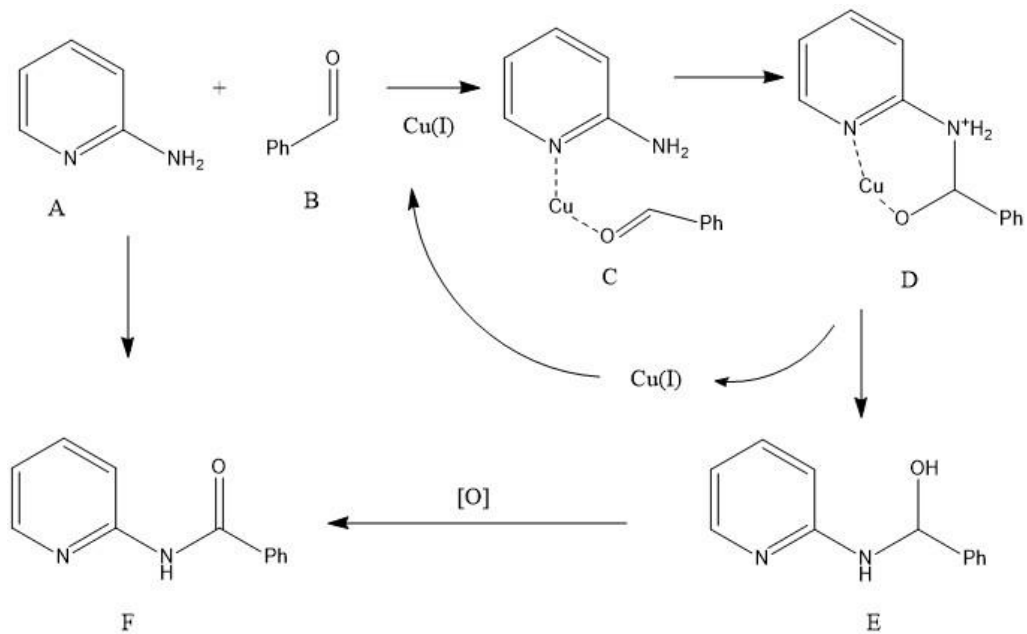
Molecule	R	Binding energy (Kcal/mole)	จำนวน Cluster ที่สูงที่สุด (%)	RMSD	Bonding
PY5		-7.61	25	1.64	PHE518 VAL434
PY6		-7.04	7	1.16	PHE518 VAL523 SER530
PY7		-7.85	11	1.96	VAL434 PHE518 VAL523

### 4.3. Synthesis

การสังเคราะห์สาร PY6 เป็นการสังเคราะห์แบบ One-step reaction ซึ่งเป็นการสังเคราะห์ที่ประหยัดเวลาเนื่องจากผ่านเพียงปฏิกิริยาเดียว ใช้สารน้อยกว่า Multiple step reaction โดยปฏิกิริยาที่ใช้ในการสังเคราะห์แสดงดังรูปที่ 16 โดยมี Copper sulfate กับ *Tert*-Butyl Hydroperoxide solution (TBH70X) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยผ่านกลไกการเกิดปฏิกิริยาเคมีดังรูปที่ 17 ในขั้นตอนการสังเคราะห์ได้ติดตามการดำเนินไปของปฏิกิริยา โดยการทดสอบด้วย TLC ที่เวลา 0, ½, 1, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ พบว่าเวลา 3 ชั่วโมงเป็นต้นไป ปฏิกิริยาเกิดขึ้นค่อนข้างคงที่ จึงนำปฏิกิริยาที่ 3 ชั่วโมงมาใช้ในการสังเคราะห์ โดยพิจารณาตามลักษณะทางกายภาพของสารที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็น semisolid คล้ายตะกอนมีสีเหลือง



รูปที่ 16 แสดงปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาร PY6



รูปที่ 17 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของ Copper sulfate

#### 4.4. Suitable TLC system

จากการสังเคราะห์ในปฏิกิริยา Amidation ดังกล่าวจะทำการตรวจสอบสารตั้งต้นและสารที่ได้จากการทำ TLC ทั้งหมด 5 ระบบดังแสดงในตารางที่ 3 เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารที่สังเคราะห์ พบว่าระบบที่สามารถแยกสารออกมาได้ดีที่สุด คือ Methanol: Ethyl acetate: Hexane = 1 : 1 : 4 มีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.65

ตารางที่ 3 แสดงข้อมูล system ที่ใช้ในการทำ TLC

System	Rf ของสาร A	Rf ของสาร B	Rf ของสาร C
EtOAc : Hexane = 1 : 4	0.487	0.53	0.53
MeOH : EtOAc : Hexane = 0.5 : 1 : 4	0.50	0.57	0.65
MeOH : EtOAc : Hexane = 1 : 1 : 4	0.45	0.56	0.65
MeOH : EtOAc : Hexane = 1 : 2 : 4	0.76	0.69	0.70
MeOH : EtOAc : Hexane = 1 : 1 : 8	0.63	0.50	0.53

\* A คือ 3-(Trifluoromethyl)aniline

\* B คือ 3,5-Dibromo-2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde

\* C คือ product

#### 4.5. ขั้นตอนการแยกสารที่สังเคราะห์

หลังจากทำการสกัดสารที่สังเคราะห์และระเหยเอาตัวทำละลายออกไปแล้ว นำสารที่ได้มาทำการแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธี Column chromatography โดยใช้ system เป็น Methanol : Ethyl acetate : Hexane = 1 : 1 : 4 และนำ fraction ที่เก็บมาตรวจด้วย TLC มี spot ของสารที่ค่า  $R_f$  ไม่ตรงกันของสารตั้งต้นทั้งสองตัว ซึ่งคาดว่าจะจะเป็นสารที่สังเคราะห์ได้ในปฏิกิริยานี้ จากนั้นทำ

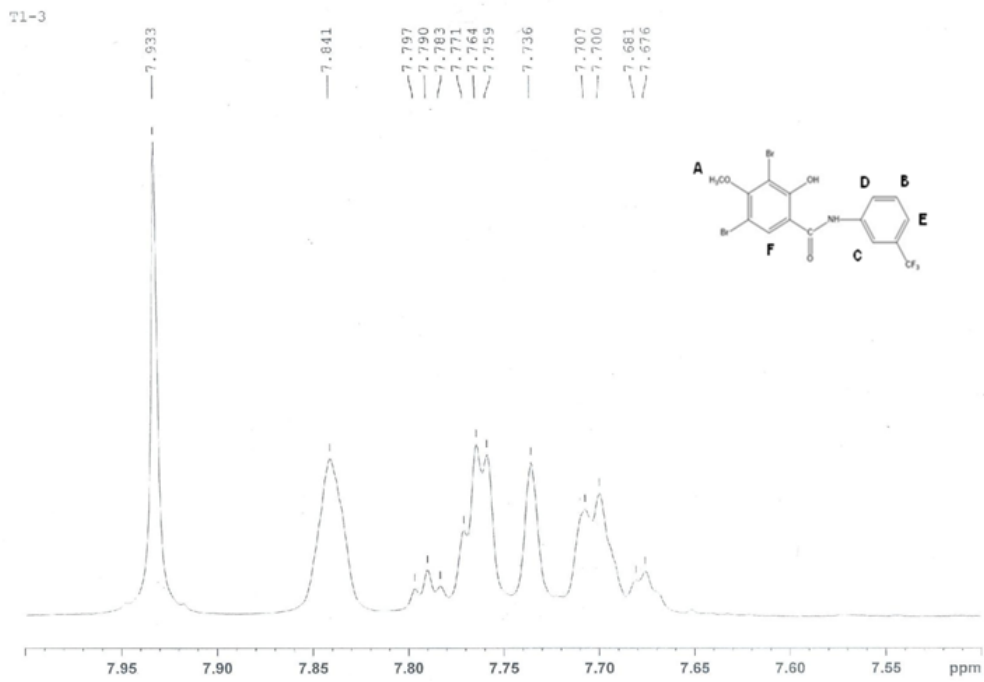
การแยกสารโดยใช้วิธี Preparation Thin layer chromatography ซึ่งประหยัดเวลาและสามารถแยกสารที่ต้องการจากสารตั้งต้นได้ดียิ่งขึ้น โดยจะเลือกนำสารที่มีค่า  $R_f$  ตรงกับสารใหม่มาสกัดด้วย Solvent m เหมาะสมและกำจัด Solvent ออกโดยการระเหย จากนั้นพิสูจน์เอกลักษณ์ต่อไป

#### 4.6. การพิสูจน์โครงสร้างด้วยเครื่อง NMR

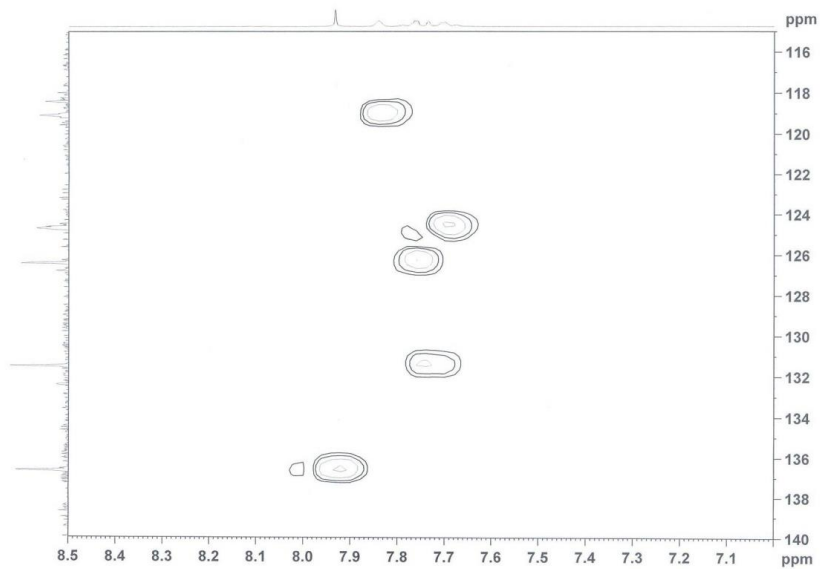
ตารางที่ 4 แสดงผล  $^1\text{H-NMR}$  spectrum ในโครงสร้างสาร

ตำแหน่งในโครงสร้าง	$^1\text{H-NMR}$ (ppm)	จำนวน H
A	3.933	3
B	7.76	1
C	7.84	1
D	7.70, 7.73 คาดว่า เกิดการซ้อนทับกันของ peak	2
E		
F	7.933	1

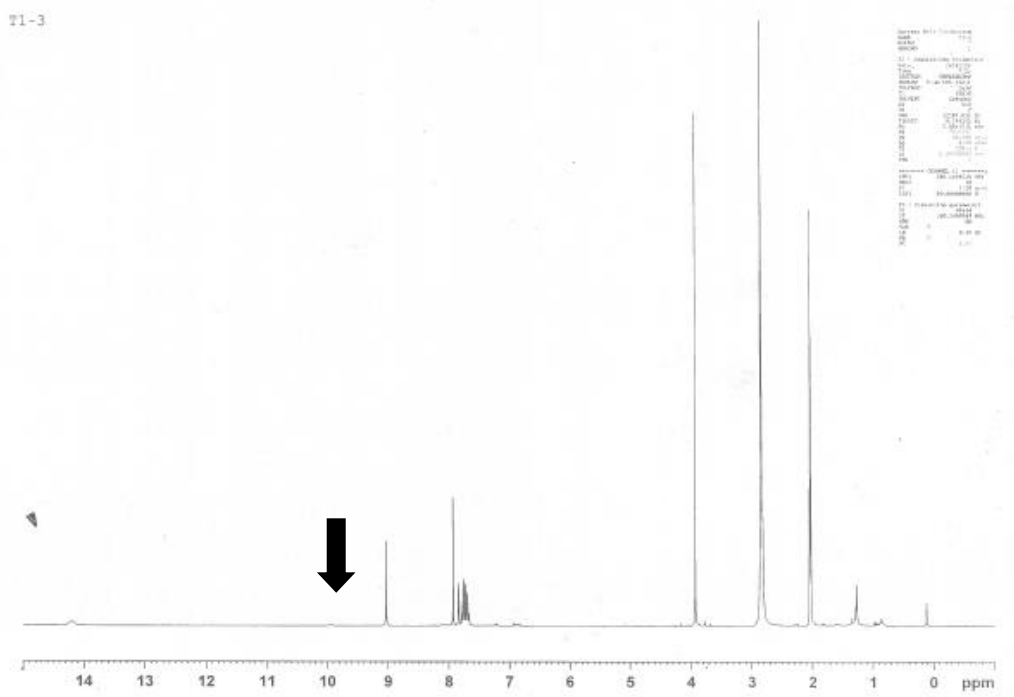
จากการเปรียบเทียบสเปกตรัม  $^1\text{H-NMR}$  ของ PY6 กับ 3,5-dibromo-2-hydroxyl-4-methoxybenzaldehyde และ 3-(Trifluoromethyl)aniline จะเห็นว่าสเปกตรัมที่ตำแหน่ง 10 ppm ซึ่งเป็นตำแหน่ง peak ของ H-Aldehyde ไม่ปรากฏใน Spectrum ของสาร PY6 และจาก HSQC spectrum ของสารแสดงถึงการจับของ C-H จำนวน 5 คู่ ซึ่งตรงกับ 5 H ที่มีอยู่ในวง benzene ทั้งสองวงซึ่งผลทาง NMR spectrum ของ PY6 นี้สอดคล้องกับโครงสร้างของ PY6 ที่ออกแบบไว้ ดังนั้นจึงยืนยันได้ว่าสารที่สังเคราะห์ได้มีโครงสร้างตรงตามที่ได้ออกแบบไว้



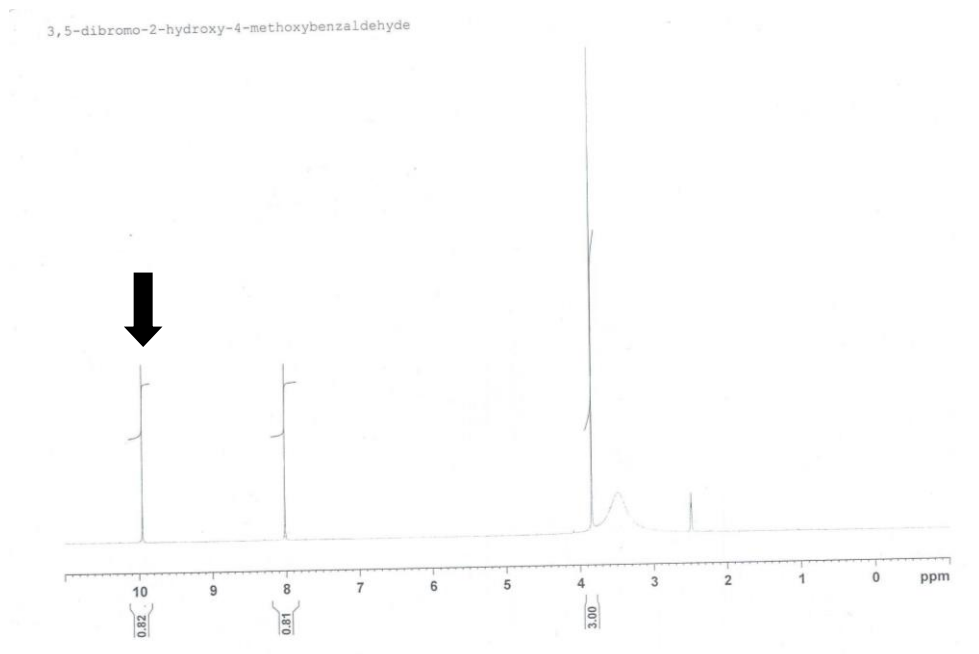
รูปที่ 18 แสดง  $^1\text{H-NMR}$  ของสารที่สังเคราะห์ได้



รูปที่ 19 แสดงผล HSQC ของสารที่สังเคราะห์ได้



รูปที่ 20 แสดง Peak NMR ของสาร PY6



รูปที่ 21 แสดง Peak NMR ของสาร 3, 5- dibromo-2-methoxybenzaldehyde



## บทที่ 5

### สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้ คณะผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการออกแบบและพัฒนาโครงสร้างของสารธรรมชาติทางทะเลเพื่อให้มีฤทธิ์เป็นยาต้านมะเร็ง โดยวิธีการเริ่มด้วย การคัดเลือก Lead compounds ซึ่งจากการทบทวนวรรณกรรม คณะผู้วิจัยได้เลือกอนุพันธ์ของ Aeropylsinin-1 มาเป็นสารต้นแบบ โดยเป้าหมายของสารใหม่ที่ได้ออกแบบจะออกฤทธิ์โดยการยับยั้งเอนไซม์ Cyclooxygenase-2 (COX-2) โดยคณะผู้วิจัยได้ออกแบบสารใหม่โดยใช้กระบวนการทางคอมพิวเตอร์ช่วย (Computer-Aided Drug Design, CADD) โดยมีปัจจัยที่ใช้ในการพิจารณาคือ ค่าความแรงในการจับ (Binding energy) ระหว่างสารที่ออกแบบกับเอนไซม์ และเปรียบเทียบกับ ค่าความแรงในการจับ (Binding energy) ของสารที่มีการรายงานฤทธิ์และสารที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของระบบของเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง ผ่านการยับยั้งเอนไซม์ Cyclooxygenase-2 (COX-2) ผู้วิจัยได้เน้นการออกแบบสารใหม่เพื่อให้จับกับเอนไซม์ที่จุดออกฤทธิ์โดยตรง ซึ่งเป็นวิธีการออกแบบเพื่อศึกษาส่วนสำคัญของโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ (Identify of the Active Part หรือ Pharmacophore) จากการทบทวนวรรณกรรม พบว่า อนุพันธ์ Aeropylsinin-1 ที่มีการรายงานค่า  $IC_{50}$  ของฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Cyclooxygenase-2 (COX-2) และมีผลยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็ง คือ 3,5-Dibromo-2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde คณะผู้วิจัย จึงได้นำมาศึกษาส่วนของโครงสร้างที่ทำให้ฤทธิ์ดีขึ้น จากค่า binding energy ของสารที่ออกแบบ คณะผู้วิจัยจึง PY6 มาทำการสังเคราะห์โดยใช้ปฏิกิริยา Amidation แบบ One-step synthesis โดยมีสารตั้งต้น คือ 3-(Trifluoromethyl)aniline และ 3,5-Dibromo-2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde โดยมี copper sulfate และ *t*-butylhydroperoxide เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง นาน 3 ชั่วโมง นำสารที่ได้จากการสังเคราะห์ มาทำการแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี Column Chromatography และ

Preparative Thin Layer Chromatography โดยระบบที่ใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่คือ Methanol: Ethyl acetate: Hexane (1:1:4) เป็นสารระเหยออก สารที่สังเคราะห์ได้มีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.65 จากนั้นนำสารที่ได้ทำการแยกแล้วไปทำการพิสูจน์โครงสร้างด้วยเครื่อง Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy ผลจาก NMR spectrum ของสาร PY6 พบว่าไม่ปรากฏ peak ที่ 10 ppm ซึ่งเป็นตำแหน่งของ H ของหมู่ aldehyde และ H ที่ตำแหน่งอื่นสอดคล้องกับ หมู่ methoxy และวง aniline ที่ใน ซึ่งผลจาก NMR spectrum นี้ สามารถยืนยันได้ว่า สารที่สังเคราะห์ขึ้นมาี้มีโครงสร้างเป็นสาร PY6 ดังที่ได้ออกแบบไว้

### 5.1. ปัญหาของงานวิจัยในครั้งนี้

1. สารเคมีที่ใช้ต้องสั่งจากต่างประเทศ ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาในการสั่งซื้อ
2. สารมีราคาแพง
3. ระยะเวลาในการทำวิจัยสั้นเกินไป
4. เครื่องมือที่ใช้ในการตรวจสอบไม่พร้อมสำหรับการทำวิจัย
5. งบประมาณในการทำวิจัยที่ได้น้อยเกินไป

### 5.2. ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการพิสูจน์เอกลักษณ์ของโครงสร้างสาร PY6 ด้วยเครื่อง IR และ MS เพิ่มเติม
2. ควรมีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่ให้ % yield สูงที่สุด
2. ควรนำงานวิจัยนี้ไปศึกษาพฤติกรรมการต้านมะเร็ง เพื่อความสมบูรณ์ของข้อมูลในงานวิจัยและเป็นประโยชน์ต่อการวิจัยและพัฒนายามะเร็งในอนาคต

## เอกสารอ้างอิง

1. Estimated cancer incidence mortality and prevalence worldwide. World Health Organization 2012; 1(11).
2. Global status report on noncommunicable diseases. World Health Organization 2010:11-5.
3. World health organization media centre. Cancer fact sheet N°297[Online]. 2012[cited 2016 Jun 8]; Available from: URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.
4. คณะกรรมการจัดทำแผนการป้องกันและควบคุมโรคมะเร็งแห่งชาติ. แผนการป้องกันและควบคุมโรคมะเร็งแห่งชาติ[Online]. 2013[cited 2016 Jun 8]; Available from: URL: [http://www.nci.go.th/th/File\\_download/D\\_index/NCCP\\_2556-2560.pdf](http://www.nci.go.th/th/File_download/D_index/NCCP_2556-2560.pdf)
5. Nahoum SR. Cancer mechanism. Yale journal of biology and medicine 2006: 123-30.
6. Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, et al. Drug resistance in cancer. Cancer 2014; 6: 1769-92
7. Hongpadharakiree K, Putchakarn S. Species Diversity of Demosponges around Koh Losin Pattani Province Gulf of Thailand. Kasetsart University 2010.
8. Ivanova EP, Kuznetsova TA, Mikhailov VV. Antifungal compounds produced by bacterial populations of the Sea Sponge *Verongia* sp. Russian Journal of Marine Biology. 2000; 26(2): 118-9.
9. Galeano E, Thomas OP, Robledo S, Munoz D, Martinez A. Antiparasitic bromotyrosine derivatives from the marine sponge *Verongula rigida*. Marine drugs. 2011;9:1902-13.
10. García JA, Poveda BM, Quesada AR, Medina MA. Aeroplysinin-1 a sponge-derived multi-targeted bioactive marine drug. Marine drug 2016; 14:1.

11. Teeyapant R, Woerdenbag HJ, Kreis P, Hacker J, Wray V, Witte L, et al. Antibiotic and cytotoxic activity of brominated compounds from the marine sponge *Verongia aerophoba*. *Z Naturforsch C*. 1993; 48(11-12): 939-45.
12. Senthilraja M, Atamanyuk VV, Lesyk RB, Atamanyuk DV, Pinyazhko R, Nektogayev IO, et al. Development of rational strategy for selective COX-2 inhibitors searching as potential anticancer drugs. *J Pharm Sci*. 2009; 34: 127-36.
13. Martínez B, García JA, Cárdenas C, Melgarejo E, Quesada AR, Medina MA. The brominated compound aeroplysinin-1 inhibits proliferation and the expression of key pro-inflammatory molecules in human endothelial and monocyte Cells. *PLoS One* 2013; 8(1): e55203.
14. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer the next generation. *Cell* 2011.
15. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in Cancer. *Vasc Health Risk Manag* 2006; 2(3): 213–19.
16. Shewach DS, Kuchta RD. Introduction to cancer chemotherapeutics. *Chem Rev*. 2009; 109(7): 2859–61.
17. Avendaño C, Menéndez JC. Medicinal chemistry of anticancer drugs. 6<sup>th</sup> ed; 2013.
18. Nussbaumer S, Bonnabrya P, Veutheyb JL, Souveraina SF. Analysis of anticancer drugs. *Talanta*. 2011; 85: 2265– 89.
19. Connors T. Anticancer drug development the way forward. *The Oncologist Commentary*. 1996; 1: 180-81.
20. Targeted cancer therapies. National cancer institute; 2014 [updated 25 April 2014; cited 2016 15 June 2016]. Available from: URL: <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/targeted-therapies/targeted-therapies-fact-sheet>.
21. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer the next generation. *Cell* 2011; 144.

22. Sobolewski C, Cerella C, Dicato M, Ghibelli L, Diederich M. The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies. *International Journal of Cell Biology*. 2010:1-21.
23. Zarghi A, Arfaei S. Selective COX-2 inhibitors a review of their structure activity relationships. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 2011; 10(4): 655-83.
24. Urade M. Cyclooxygenase-2 as a potent molecular target for prevention and therapy of oral cancer. *Japanese Dental Science Review*. 2008; 44: 57—65.
25. Xu L, Stevens J, Hilton MB, Seaman S, Conrads TP, Veenstra TD, et al. COX-2 inhibition potentiates antiangiogenic cancer therapy and prevents metastasis in preclinical models. *Sci Transl Med*. 2014; 6(242): 242-84.
26. Dannenberg AJ, Lippman SM, Mann JR, Subbaramaiah K, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor: pharmacologic targets for chemoprevention. *J Clin Oncol*. 2005; 23(2): 254-66.
27. Mutoh M, Watanabe K, Kitamura T, Shoji Y, Takahashi M, Kawamori T, et al. Involvement of prostaglandin E receptor subtype EP4 in colon carcinogenesis. *Cancer Res* 2002; 62(1): 28-32.
28. Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, Raymond N. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer research* 1998; 58: 362-66.
29. Wang D, DuBois RN. The role of anti-inflammatory drugs in colorectal cancer. *Annu Rev Med* 2013; 64:131-44.
30. Grösch S, Maier TJ, Schiffmann S, Geisslinger G. Cyclooxygenase-2 (COX-2) – Independent Anticarcinogenic Effects of Selective COX-2 Inhibitors. *Journal of the National Cancer Institute* 2006; 98(11): 736-44.
31. Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I, Bukasa A, Mitchell JA, Vane JR Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated

with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 96(13):7563–8.

32. Thun MJ, Henley SJ, Patrono C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. J Natl Cancer Inst 2002; 94(4): 252-66.

33. Committee Oncologic Drugs Advisory. Celecoxib therapy of familial Adenomatous Polyposis. Briefing Document. FDA 2003[cited 2016 Jul 6]. Available from: URL: [http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/05/briefing/2005-4191B1\\_06\\_Pfizer-Celebrex.pdf](http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/05/briefing/2005-4191B1_06_Pfizer-Celebrex.pdf).

34. Administration USFaD. Information for Healthcare Professionals: Celecoxib marketed as Celebrex 2005 [cited 2016 Jul 6]. Available from: URL: <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm124655.htm>.

35. Koki AT, Masferrer JL. Celecoxib a specific COX-2 inhibitor with anticancer properties. Cancer Control 2002:28-35.

36. European medicines agency. Onsenal (celecoxib) withdrawal of the marketing authorisation in the European Union. 2011[cited 2016 3 Oct]. Available from: URL: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Public\\_statement/2011/04/WC500104950.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Public_statement/2011/04/WC500104950.pdf)

37. Pfizer. Withdrawal of approval of familial adenomatous polyposis indication for CELEBREX. Federal register 2012[cited 2016 3 Oct]. Available from: URL: <https://www.federalregister.gov/documents/2012/06/08/2012-13900/pfizer-inc-withdrawal-of-approval-of-familial-adenomatous-polyposis-indication-for-celebrex>

38. Pfizer Withdraws Indication for RA Drug After It Fails to Complete Required Study. Regulatory affairs professionals society 2012[cited 2016 3 Oct]. Available from: URL: <http://raps.org/focus-online/news/news-article-view/article/1680/>

39. Ermondi G, Caron G, Lawrence R, Longo D. Docking studies on NSAID/COX-2 isozyme complexes using contact statistics analysis. *J Comput Aided Mol Des* 2004; 18(11): 683-96.
40. Zapata W, Gabriel L, Galeano E, Martinez A, Castrillon F, Rugeles M. Bromotyrosine derivatives from marine sponges inhibit the HIV-1 replication in vitro. *Researchgate* 2014; 21(2): 114-25.
41. Córdoba R, Tormo NS, Medarde AF, Plumet J. Antiangiogenic versus cytotoxic activity in analogues of aeroplysinin-1. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2007; 15: 5300–15.
42. Molecular docking and western blotting for furthering natural product. 2016[cited 2016 Oct 3]. Available from: URL: [http://www.sci.nu.ac.th/admin/tmp/Files\\_upload/2016-04-26/26-04-2016-11-22-37.pdf](http://www.sci.nu.ac.th/admin/tmp/Files_upload/2016-04-26/26-04-2016-11-22-37.pdf)
43. Computational chemistry. Department of Chemistry KKU 2016[cited 2016 Oct 3]. Available from: URL: <http://chemsci.kku.ac.th/khatcharin/compchem.php>
44. Computer-Aided Drug Discovery, design and development The Crucial Tool for Pharmaceutical Research. EAU heritage journal: Available from: URL: <https://www.tci-thaijo.org/index.php/EAUHJSci/article/download/25724/21847>

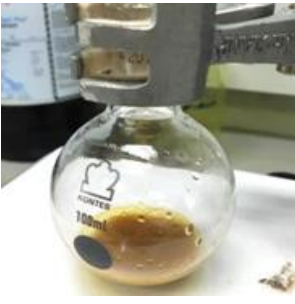
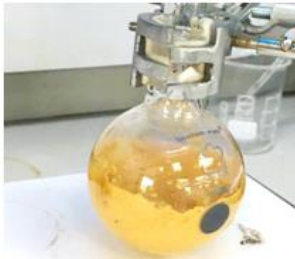
ภาคผนวก





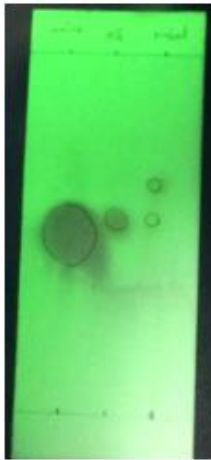

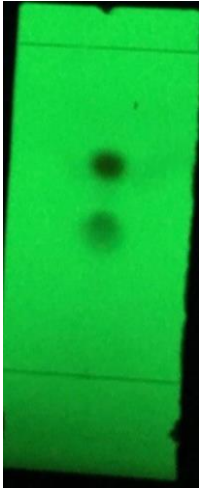

ตารางที่ 1 ค่า  $R_f$  ของสาร A , B และ C ที่เวลา 0 นาที , 30 นาที และ 3 ชั่วโมง

สาร/เวลา	0 นาที	30 นาที	3 ชั่วโมง
A (3-(Trifluoromethyl)aniline)	0.49	0.50	0.45
B (3,5-Dibromo-2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde)	0.58	0.58	0.56
C (Product)	0.63	0.68	0.65

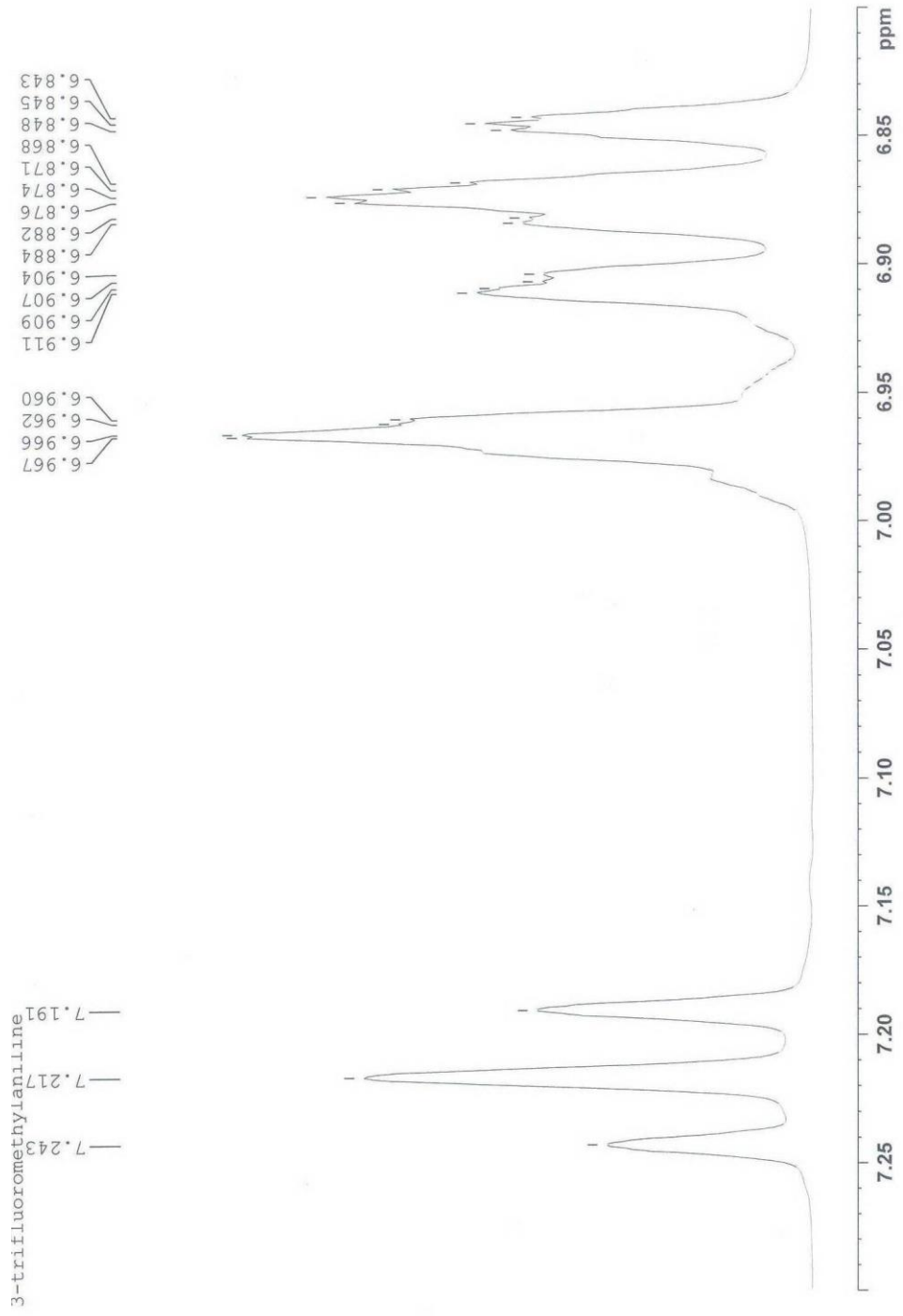
ตารางที่ 2 ลักษณะสารที่ได้ในการทำปฏิกิริยา

เวลาที่สารทำปฏิกิริยา	ลักษณะทางกายภาพของสาร	รูปภาพแสดงลักษณะสาร
0 นาที	ลักษณะสารเป็นของเหลว ตะกอนสีน้ำตาล	
30 นาที	ลักษณะสารเป็นของเหลวเข้มข้น สีเหลืองส้ม	
3 ชั่วโมง	ลักษณะสารเป็นของเหลวเข้มข้น สีเหลืองมัสตาร์ด	

ตารางที่ 3 ข้อมูล TLC ของสาร (Detection 254 และ 365 nm)

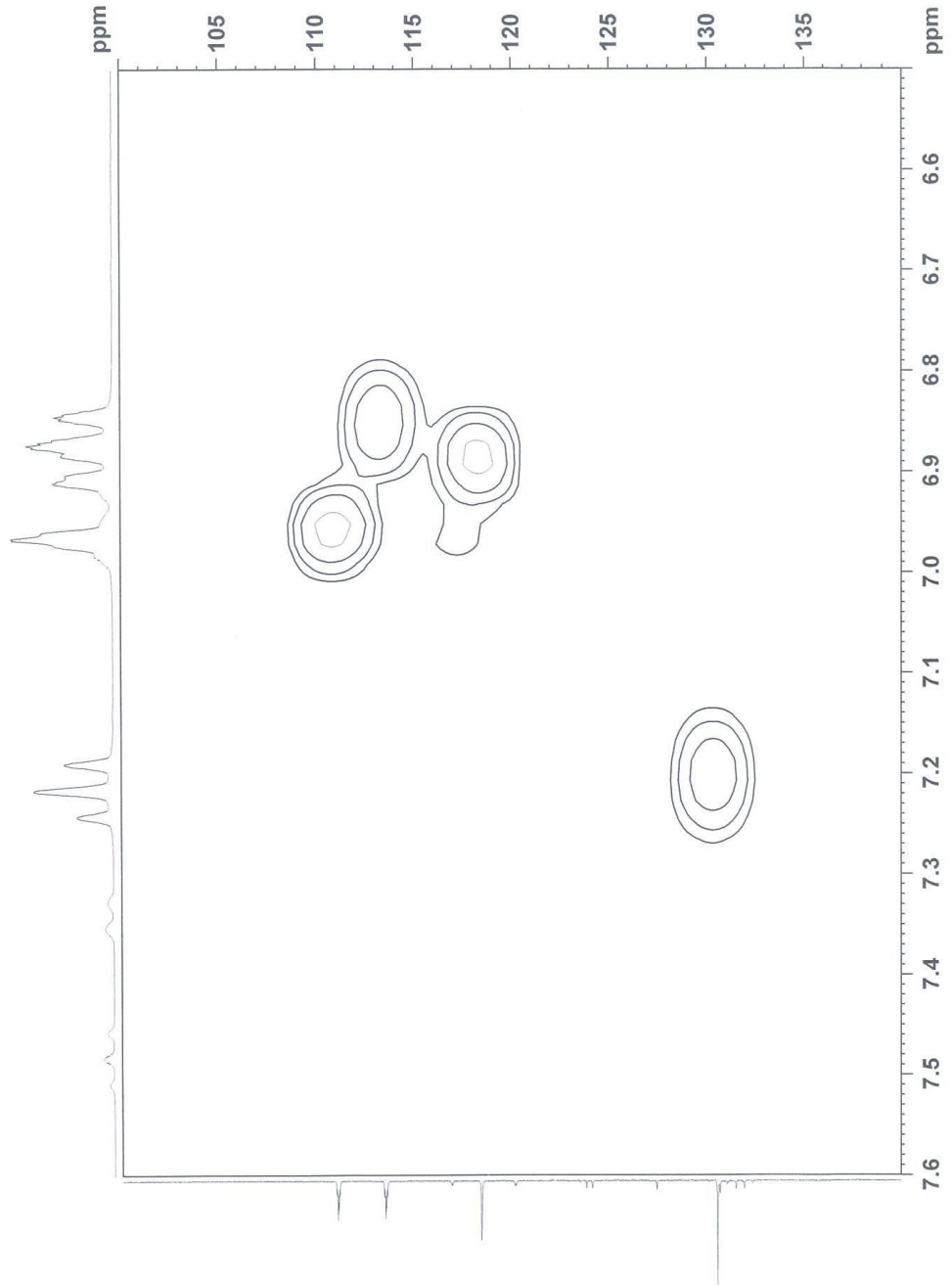
เวลาที่สารทำปฏิกิริยา	Short wave	Long wave
0 นาที		
30 นาที		
3 ชั่วโมง		

รูปที่ 1 แสดง peak NMR สำหรับ 3-(trifluoromethyl)aniline



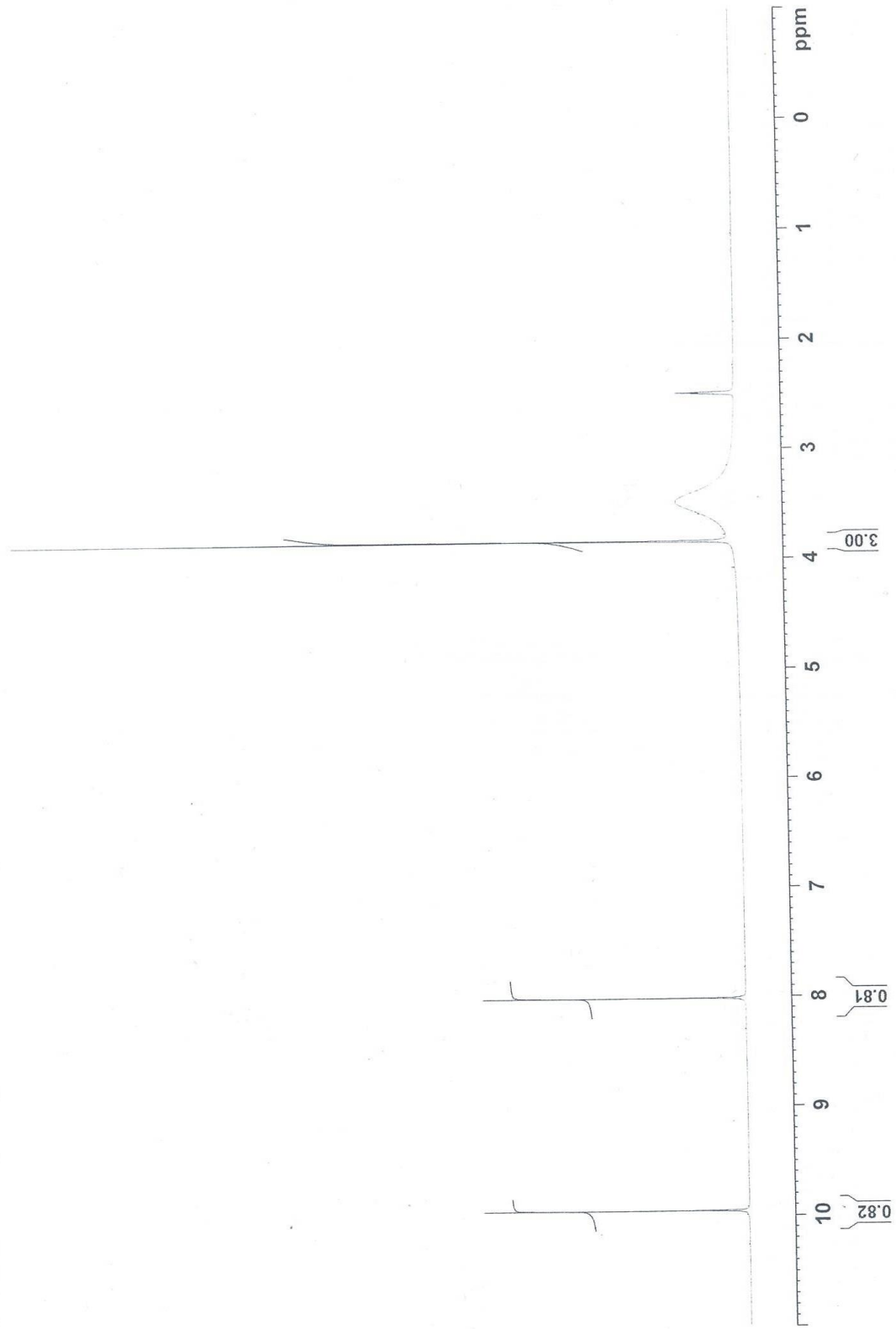
รูปที่ 2 แสดง HSQC ของสาร 3-(trifluoromethyl)aniline

3-trifluoromethylaniline\_gHSQC

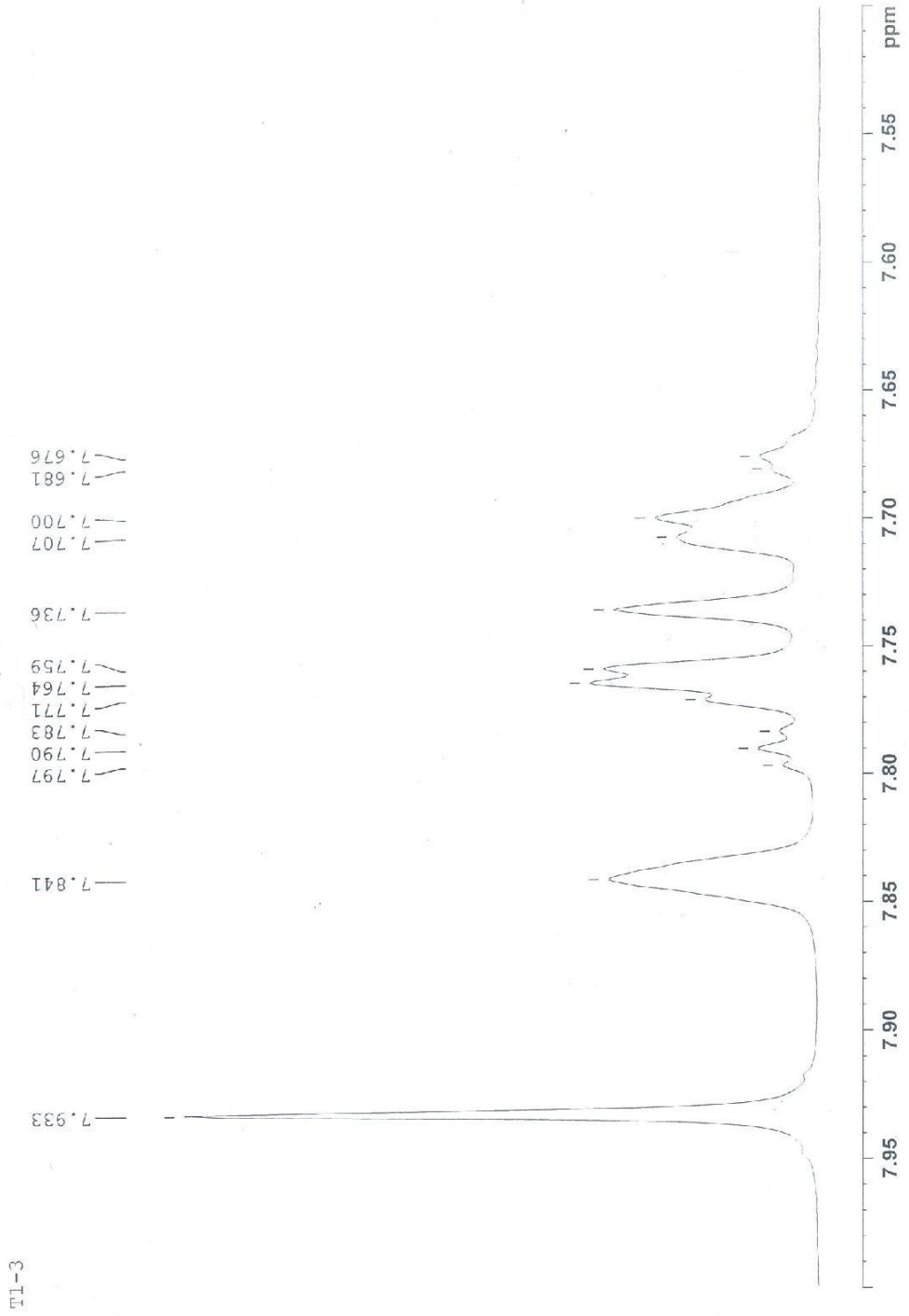


รูปที่ 3 แสดง peak NMR สำหรับ 3, 5- dibromo-2-methoxybenzaldehyde

3, 5-dibromo-2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde



รูปที่ 4 แสดง peak NMR ของ PY6



3-11

รูปที่ 5 แสดง HSQC ของสาร PY6

T1-3\_gHSQC

