



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การออกแบบและพัฒนาสารต้านมะเร็งที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ IKK β
Design and Development of IKK β Inhibitor as Potential Anticancer Agent

โดย

| | |
|-------------------------|---------------|
| นสภ. กานต์สิริ โพธิ์ทอง | รหัส 55210037 |
| นสภ. สุมิตา หล่อทองแดง | รหัส 55210115 |
| นสภ. อาคเนย์ กิตติปกรณ | รหัส 55210116 |

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต

ปีการศึกษา 2559

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การออกแบบและพัฒนาสารต้านมะเร็งที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ IKK β
Design and Development of IKK β Inhibitor as Potential Anticancer Agent

โดย

| | |
|-------------------------|---------------|
| นสภ. กานต์สิริ โพธิ์ทอง | รหัส 55210037 |
| นสภ. สุมิตา หล่อทองแดง | รหัส 55210115 |
| นสภ. อาคเนย์ กิตติปกรณ์ | รหัส 55210116 |

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาบัณฑิต
ปีการศึกษา 2559
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

ปัจจุบันมีการนำคอมพิวเตอร์มาเป็นเครื่องมือในการออกแบบโครงสร้างเคมีเพื่อพัฒนาเป็นยา มากขึ้น เนื่องจากเป็นวิธีที่ประหยัดเวลา ประหยัดค่าใช้จ่าย และสามารถเข้าใจกระบวนการจับของชีวโมเลกุลเป้าหมายกับสารที่ออกแบบได้อย่างชัดเจน โดยสามารถทำนายการออกฤทธิ์ของโครงสร้างที่ได้ออกแบบขึ้นจากค่าความแรงในการจับ และค่า IC_{50} จึงเป็นแนวทางในการเลือกสารเคมีที่จะนำมาสังเคราะห์

โดยในงานวิจัยนี้มีการใช้คอมพิวเตอร์เพื่อช่วยในการออกแบบสารต้านมะเร็งที่มีกลไกการยับยั้งผ่าน I κ B kinase beta (IKK β) และเลือกโครงสร้างที่มีแนวโน้มในการออกฤทธิ์ที่ดีมาสังเคราะห์ต่อไป ซึ่งงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อออกแบบและพัฒนาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งผ่านเอนไซม์ IKK β

คณะผู้จัดทำ

24 พฤศจิกายน 2559

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2559

เรื่อง การออกแบบและพัฒนาสารต้านมะเร็งที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ IKK β

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. นสภ. กานต์สิริ โพธิ์ทอง รหัส 55210037
2. นสภ. สุมิตา หล่อทองแดง รหัส 55210115
3. นสภ. อาคเนย์ กิตติปกรณ์ รหัส 55210116

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. ญญ.ดร.อนงค์ ตีระวนิชพงศ์

บทคัดย่อ

การวิจัยในครั้งนี้คณะผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการออกแบบและพัฒนาโครงสร้างของสารเพื่อให้มีฤทธิ์เป็นยาต้านมะเร็ง โดยคัดเลือก Lead compounds ได้แก่ อนุพันธ์ของ Aeropylsinin-1, Fluorosalan และ อนุพันธ์ของ 7-Azaindole มาเป็นสารต้นแบบเพื่อออกแบบสารใหม่ให้ออกฤทธิ์โดยการยับยั้งเอนไซม์ IKK kinase beta (IKK- β) โดยใช้กระบวนการทางคอมพิวเตอร์ช่วย (Computer-Aided Drug Design, CADD) และใช้การออกแบบสารใหม่เพื่อศึกษาส่วนสำคัญของโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ (Identify of the Active Part หรือ Pharmacophore) ด้วยวิธีการ combined active parts ได้สารที่ออกแบบใหม่คือ Buu1 ซึ่งสามารถสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา Amidation แบบ One-step synthesis ผลจาก NMR spectrum ของสาร Buu1 พบว่าไม่ปรากฏ peak ที่ 10 ppm ซึ่งเป็นตำแหน่งของ H ของหมู่ aldehyde และผลจาก IR spectrum ไม่ปรากฏ peaks ที่เป็นเอกลักษณ์ของหมู่ C-H stretching ของหมู่ aldehyde ที่ตำแหน่ง 2876.80 และ 2950.97 cm^{-1} เช่นเดียวกัน ซึ่งยืนยันได้ว่า สารที่สังเคราะห์ขึ้นมานี้ มีโครงสร้างเป็นสาร Buu1 ดังที่ได้ออกแบบไว้

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก.....

Senior Project Academic Year 2016

Title: Design and Development of IKK β Inhibitor as Potential Anticancer Agent

By

- | | | | |
|-------------------|--------------|----|----------|
| 1. Miss Karnsiree | Photong | ID | 55210037 |
| 2. Miss Sumita | Lothongdaeng | ID | 55210115 |
| 3. Mr. Arkanea | Kittapakorn | ID | 55210116 |

Advisor:

1. Dr. Anong Teeravanichpong, B.Pharm, Ph.D.

.....

Abstract

This research is aimed to design and synthesis of the new compound as potential anticancer drug. Aeroplysinin-1 derivative, Fluorosalan and 7-Azaindole derivative were selected as Lead compounds for design of IKK kinase beta (IKK- β) inhibitors. With Computer-Aided in drug design step, the new compound was designed in order to investigate the pharmacophore of active drug. Using combined active parts method, the new compound, Buu1 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 disappearance of C-H stretching of aldehyde functional group in IR spectrum at 2876.80 and 2950.97 cm^{-1} , these results confirmed that the newly synthesized compound is the designed Buu1.

Major Advisor.....

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จบรรลุตามจุดมุ่งหมายได้ด้วยดี เพราะได้รับความช่วยเหลือและคำปรึกษาที่มีประโยชน์ต่อการศึกษาค้นคว้า จากอาจารย์ ภญ.ดร.อนงค์ ตีระวนิชพงศ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำแนะนำในการเริ่มต้นค้นคว้า การดำเนินงานวิจัย การเขียนและการเรียบเรียงข้อมูล เพื่อให้งานวิจัยสมบูรณ์ ซื่อปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง และทำให้ได้รับความรู้ประสบการณ์ต่างๆที่เป็นประโยชน์ ทำให้ผู้วิจัยตระหนักถึงความตั้งใจจริงและความทุ่มเทของอาจารย์

ขอกราบขอบพระคุณ ภก. ตินณภพ ไตรอุรวงศ์ สำหรับความช่วยเหลือด้านซอฟต์แวร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้าง และคำแนะนำในการแก้ปัญหาต่างๆ

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ภก.ผศ.ดร. ชำนาญ ภัทรพานิช ที่กรุณาให้คำปรึกษาด้านปัญหาเกิดจากปฏิกิริยาเคมี รวมถึงแนวทางการแก้ไขปรับปรุงเพื่องานวิจัยดำเนินไปอย่างราบรื่น

อนึ่ง ผู้วิจัยหวังว่า งานวิจัยฉบับนี้จะมีประโยชน์อยู่ไม่น้อย จึงขอมอบความดีทั้งหมดนี้ให้แก่เหล่าคุณอาจารย์ ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาจนกระทั่งทำให้งานวิจัยประสบความสำเร็จ

คณะผู้วิจัย

๑
สารบัญ

| เรื่อง | หน้า |
|---|------|
| คำนำ | ๗ |
| บทคัดย่อ | ๘ |
| Abstract | ๙ |
| กิตติกรรมประกาศ | ๑๑ |
| สารบัญเรื่อง | ๑๒ |
| สารบัญตาราง | ๑๓ |
| สารบัญภาพ | ๑๔ |
| บทที่ 1 | 1 |
| บทนำ | 1 |
| ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา | 1 |
| วัตถุประสงค์ | 2 |
| สมมติฐานการวิจัย | 2 |
| กรอบแนวคิดการวิจัย | 3 |
| ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 3 |
| บทที่ 2 | 4 |
| ทบทวนวรรณกรรม | 4 |
| Nuclear factor kappa B (NF- KB) | 4 |
| Inhibition of KB kinase | 7 |
| โครงสร้างผลึก (Crystal structure) ของ Inhibition of KB kinase β (IKK β) | 8 |
| การตรวจค้นหาสารเคมีที่น่าจะมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาใหม่ | 10 |
| Aeropylsinin-1 | 11 |
| Azaindole | 14 |
| ยาเคมีบำบัดออกฤทธิ์ต่อโมเลกุลเป้าหมาย IKK | 15 |

| | |
|---|----|
| Drug Discovery, Design and Development | 16 |
| Molecular simplification | 17 |
| การประยุกต์ใช้คอมพิวเตอร์ในการออกแบบยา (Computer-aided drug design) | 18 |
| ปฏิกิริยาเคมี | 19 |
| เครื่องมือวิเคราะห์ | 21 |
| บทที่ 3 | 24 |
| วิธีการดำเนินการวิจัย | 24 |
| เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย | 24 |
| สารเคมี | 25 |
| วิธีดำเนินงานวิจัย | 25 |
| บทที่ 4 | 31 |
| ผลการวิจัย | 31 |
| Lead Identification | 31 |
| Computer-Aided Drug Design | 31 |
| การสังเคราะห์โครงสร้าง Buu1 | 41 |
| TLC Suitable System | 42 |
| Purification | 43 |
| Identification of Target Compound โดยเครื่องมือ NMR IR และ MS | 44 |
| บทที่ 5 | 48 |
| สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย | 48 |
| ข้อเสนอแนะ | 49 |
| เอกสารอ้างอิง | 50 |

สารบัญตาราง

| เรื่อง | หน้า |
|---|------|
| ตารางที่ 1 ตำแหน่งยีนที่ถูกควบคุมโดย NF-KB และโรคที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน | 5 |
| ตารางที่ 2 ความสัมพันธ์ของชนิดของมะเร็งและการแสดงออกที่ผิดปกติของยีนในตำแหน่งต่างๆ | 6 |
| ตารางที่ 3 ยาที่มีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้ง Inhibitory kappa B kinase (IKK inhibitors) | 16 |
| ตารางที่ 4 พารามิเตอร์ที่ใช้ในการทำ grid | 26 |
| ตารางที่ 5 พารามิเตอร์ที่ใช้ในการทำ docking | 27 |
| ตารางที่ 6 การ Validate เอนไซม์ Ikb kinase beta (IKK-β) | 32 |
| ตารางที่ 7 ผลของ Conformation ที่เกิด Interaction บริเวณ Active site | 37 |
| ตารางที่ 8 แสดงค่า R _f ของ 4-Aminopyridine | 43 |

ณ
สารบัญญภาพ

| เรื่อง | หน้า |
|---|------|
| รูปที่ 1 แสดงกลไกการกระตุ้น NF- KB ผ่าน Classical canonical pathway และ Non-canonical pathway | 5 |
| รูปที่ 2 Domain ทั้ง 3 ส่วนของ IKK β | 9 |
| รูปที่ 3 Dimer ของ IKK β | 9 |
| รูปที่ 4 โครงสร้างโมเลกุล 3 มิติของ IKK β บริเวณ ATP binding site | 9 |
| รูปที่ 5 ความแรงของสาร (uM) ในการยับยั้งผ่าน NF- KB -bla reporter gene, NF- KB -luc reporter gene, GFP-I KB phosphorylation, และ Caspase 3/7 assays | 11 |
| รูปที่ 6 โครงสร้างสารที่สามารถยับยั้งการเกิด I KB phosphorylation | 11 |
| รูปที่ 7 รูปที่ 7 โครงสร้างเคมีของ (+)-Aeropylsinin-1 | 12 |
| รูปที่ 8 โครงสร้างเคมีของ(1'R, 5'R, 6'S)-2-(3', 5'-Dibromo- 1', 6'-dihydroxy- 4'-oxocyclohex-2'-enyl) acetonitrile (DT) | 12 |
| รูปที่ 9 ผลของ Oxidative stress จากการทดลองโดยใช้ (1'R, 5'R, 6'S)-2-(3', 5'-Dibromo- 1', 6'-dihydroxy- 4'- oxocyclohex-2'-enyl) acetonitrile (DT) ต่อ I KB kinases (IKK)/NF- KB และ Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathways โดยภาพซ้ายแสดงเซลล์ที่ได้รับ DT ขนาด 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 6 และ 18 ชั่วโมงตามลำดับ และภาพขวาแสดงเซลล์ที่ได้รับ N-acetyl-cysteine (NAC) เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมงตามด้วย DT ขนาด 2.5 หรือ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 18 ชั่วโมง | 12 |
| รูปที่ 10 แบบจำลองการจับของอนุพันธ์ 4-Aryl-7azaindoles บริเวณ ATP binding site ของโมเลกุล IKK | 14 |
| รูปที่ 11 X-ray structure ของอนุพันธ์ 4-Aryl-7azaindoles บนโมเลกุลของ IKK | 15 |
| รูปที่ 12 กลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งผ่าน NF- KB | 15 |
| รูปที่ 13 Copper-catalyzed oxidative amidation with aldehyde | 19 |
| รูปที่ 14 Proposed mechanism of the Copper-catalyzed oxidative amidation reaction | 20 |

ญ

| | |
|---|----|
| รูปที่ 15 Hydrogen peroxide-catalyzed oxidative amidation with aldehyde | 20 |
| รูปที่ 16 Proposed mechanism of the Hydrogen peroxide-catalyzed oxidative amidation reaction | 21 |
| รูปที่ 17 โครงสร้างทางเคมีของ a) 3,5-Dibromo-2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde ,b) 7-Azaindole และ c) 4-aminopyrimidine | 28 |
| รูปที่ 18 Amidation reaction ระหว่าง Benzaldehyde และ 4-aminopyridine | 28 |
| รูปที่ 19 โครงสร้างชีวโมเลกุลเป้าหมาย IKK- β จากการเอ็กซ์เรย์ผลึกของเอนไซม์ IKK- β ที่จับเป็น Ligand-enzyme complex โดยใช้ผลึกกรหัต 4KIK และ ligand: K_25A | 32 |
| รูปที่ 20 แสดงความเหมือนกันของโครงสร้าง (Structure similarity); Fluorosalan และอนุพันธ์ของ Aeropylsin-1 | 33 |
| รูปที่ 21 โครงสร้าง 4-Phenyl-7-azaindole | 34 |
| รูปที่ 22 Retro-synthesis ของ Design compound : Design1 | 34 |
| รูปที่ 23 Design compound : Buu1 | 35 |
| รูปที่ 24 การออกแบบด้วย Molecular Simplification จากโครงสร้าง 7-Azaindole เป็น 4-Aminopyridine | 35 |
| รูปที่ 25 ปฏิกริยาการสังเคราะห์ Buu1 | 41 |
| รูปที่ 26 กลไกการเกิดปฏิกิริยาเคมีในการสังเคราะห์ Buu1 ระหว่างสารตั้งต้น 3,5-Dibromo-2-hydroxyl-4-methoxybenzaldehyde กับ 4-Aminopyridine | 42 |
| รูปที่ 27 การแยกสารโดยใช้ TLC TLC system (Methanol: Ethyl acetate: Hexane 0.5: 1: 4) : a) Detection UV254, b) Rf Value of Product | 43 |
| รูปที่ 28 Infrared Spectrum (cm ⁻¹) ของ 3,5-Dibromo-2-hydroxyl-4-methoxybenzaldehyde พบตำแหน่ง peak: C-H Aldehyde 2 peak ที่ 2876.80, 2950.97; =C-H Aromatic ที่ 3053.17; C-H Aliphatic ที่ 2987.92; C=O ที่ 1654.57; C=C aromatic ที่ 1468.39, 1548.92, 1607.88; C-Br at 500-600 | 45 |
| รูปที่ 29 Infrared Spectrum (cm ⁻¹) ของ Buu1 พบตำแหน่ง peak: =C-H Aromatic ที่ 3053.17; C-H Aliphatic ที่ 2987.92; C=O ที่ 1654.57; C=C aromatic ที่ 1468.39, 1548.92, 1607.88; C-Br at 500-600 | 45 |

| | |
|--|----|
| รูปที่ 30 $^1\text{H-NMR}$ Spectrum (ppm) ของ 3,5-Dibromo-2-hydroxyl-4-methoxybenzaldehyde | 46 |
| รูปที่ 31 $^1\text{H-NMR}$ Spectrum (ppm) ของ Buu1 | 47 |

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคมะเร็งจัดเป็นโรคที่มีอัตราการเสียชีวิตสูงสุดในประเทศไทยและมีแนวโน้มที่จะสูงขึ้นในแต่ละปี (1) ถึงแม้จะมียารักษา มะเร็งอย่างหลากหลาย แต่ยาเหล่านี้ก็มีผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติค่อนข้างสูงและหลังจากใช้ยาไปแล้วระยะหนึ่งเซลล์มักจะเกิดการดื้อยาที่ใช้รักษาและดื้อต่อยาชนิดอื่นด้วยเช่นกัน ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการเร่งค้นหายาใหม่ที่มีฤทธิ์ต้าน มะเร็ง จากการศึกษาค้นคว้าสารธรรมชาติทางทะเลที่ค้นพบฤทธิ์ต่างๆ พบว่าการนำสารเหล่านั้นมา พัฒนาเพื่อให้ได้สารที่สามารถใช้เป็นยาหรือมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ยังมีไม่แพร่หลาย จากข้อมูลของ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทางทะเล ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2528-2555 จำนวน 4,196 ชนิด พบว่า สารหนึ่งชนิด สามารถมีฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลายมากกว่าหนึ่งฤทธิ์ และพบว่าฤทธิ์ที่มีการรายงานมากที่สุดคือ ฤทธิ์ต้าน มะเร็ง ซึ่งพบในสารถึง 2,225 ชนิด คิดเป็น 56% ของสารทั้งหมด (2) แต่ข้อมูลของการ ทดลองทางคลินิกมีของยาต้าน มะเร็งที่ได้จากสารสกัดทางทะเลยังมีไม่มากนัก ดังนั้นการพัฒนารักษาโรค มะเร็งจากสารธรรมชาติทางทะเลจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ

Sawadogo WR, et al (3) ได้จำแนกสารธรรมชาติทางทะเลที่มีฤทธิ์ต้าน มะเร็งที่รายงานการ ค้นพบในปีค.ศ. 2012 ตามชนิดของโครงสร้างทางเคมี ได้เป็นกลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้ คือ Alkaloids, Amines, Macrolides, Peptides and polypeptides, Phenols and polyphenols, Polysaccharides, Quinones, Steroids, Terpenes พบว่าสารในกลุ่ม Phenol ที่มีฤทธิ์น่าสนใจ คือ Dibromotyrosine acetonitrile derivatives ที่พบในฟองน้ำทะเลตระกูล Verongida (4) และพบได้ในพื้นที่ของประเทศ ไทย (5-7) ซึ่งแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างหลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านปรสิติ (8, 9) ฤทธิ์ต้านจุลชีพต่อเชื้อ แบคทีเรียบางชนิดและเชื้อเอชไอวี (8, 10) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (8, 11) ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างหลอดเลือด ใหม่ และฤทธิ์ยับยั้งเซลล์ มะเร็ง (8, 12, 13) จากฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายรวมถึงฤทธิ์ต้าน

มะเร็ง และจากรายงานการพัฒนาโครงสร้างของสารนี้ (13) ที่ได้ฤทธิ์จำเพาะและมีความแรงเพิ่มขึ้น ทำให้คณะผู้วิจัยสนใจในการพัฒนาโครงสร้างดังกล่าวให้มีฤทธิ์จำเพาะต่อการต้านมะเร็งมากขึ้น

จากผลการศึกษาของ Su JH, et al พบว่าสาร Dibromotyrosine acetonitrile derivatives มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 ผ่านกลไกการยับยั้ง HIF pathway, PTEN pathway, NF- κ B pathway และ IKK pathway (14) จากการคัดกรองด้วยวิธี High-throughput screening และ High-content screening เพื่อสำรวจเป้าหมายใหม่ในการออกฤทธิ์ของสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง พบว่า การยับยั้งที่ κ B kinase β หรือ IKK β (15) สามารถเป็นกลไกหนึ่งในการยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ และยังไม่มียางานของสารที่เป้าหมายนี้มากนัก คณะผู้วิจัยจึงสนใจในการใช้ IKK β เป็นเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของสารที่ต้องการพัฒนาขึ้นมา จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า นอกจากสาร Dibromotyrosine acetonitrile derivatives แล้วยังมีสาร Fluorosalan และ Indole derivatives (16-18) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการส่งสัญญาณไปยัง NF- κ B ผ่านการยับยั้งกระบวนการ Phosphorylation ของ IKK ซึ่งกระบวนการดังกล่าวต้องผ่านการส่งสัญญาณจาก IKK β (16) และส่วนหนึ่งของโครงสร้าง Fluorosalan มีความคล้ายคลึงกับโครงสร้างของ Dibromotyrosine acetonitrile derivatives ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเลือกสาร Dibromotyrosine acetonitrile derivatives, Fluorosalan และ Indole derivatives มาเป็นสารต้นแบบ (Lead) ในการพัฒนาให้ได้สารใหม่ โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อให้มีฤทธิ์ต้านมะเร็งผ่านการยับยั้ง IKK β โดยการพัฒนาสารใหม่นี้ ใช้กระบวนการออกแบบโดยใช้คอมพิวเตอร์ช่วย (Computer-aided drug design, CADD) เพื่อให้ได้สารออกแบบที่คาดว่าจะมีฤทธิ์ดี และทำการคัดเลือกสารที่น่าสนใจในกลุ่มนี้มาทำการสังเคราะห์และทดสอบฤทธิ์ต่อไป

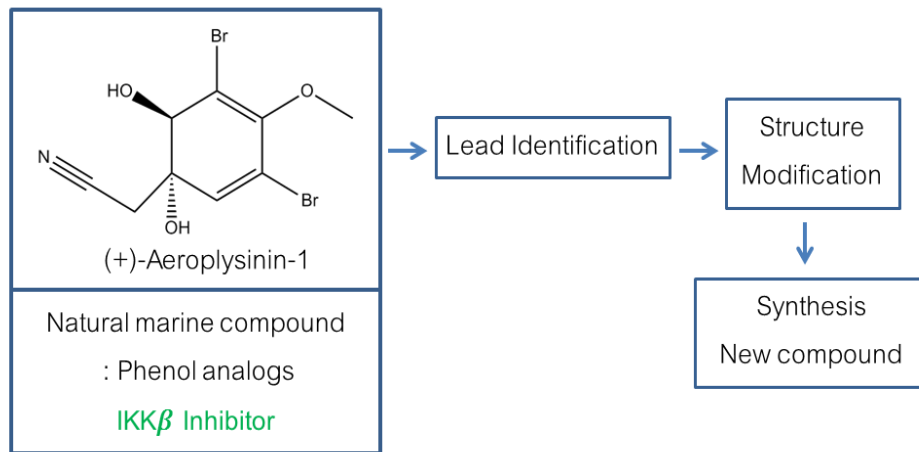
วัตถุประสงค์

เพื่อออกแบบและพัฒนาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็ง

สมมติฐานการวิจัย

1. สารที่พัฒนาขึ้นสามารถจับกับเอนไซม์ IKK β
2. สารที่สังเคราะห์ขึ้นมีโครงสร้างเหมือนกับสารที่ออกแบบในคอมพิวเตอร์

กรอบแนวคิดการวิจัย



ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถออกแบบและพัฒนายาที่คาดว่าจะมีฤทธิ์ต้านมะเร็งจาก Lead compound

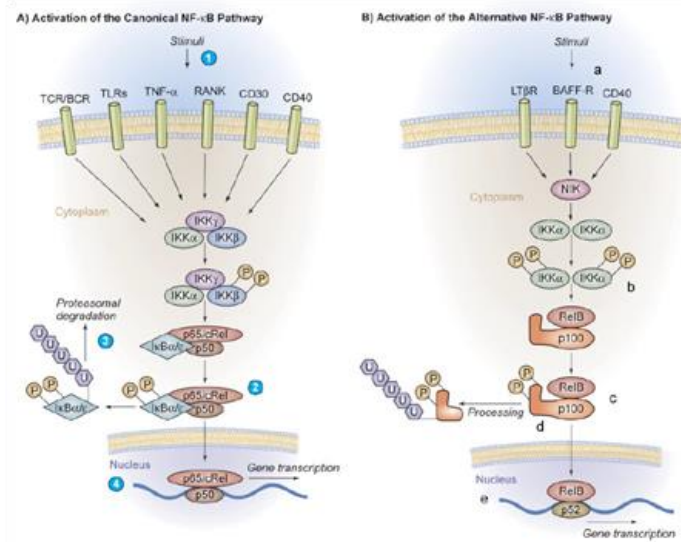
บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

1. Nuclear factor kappa B (NF- κ B)

Nuclear factor kappa B (NF- κ B) สามารถพบได้ทุกเซลล์ในร่างกาย ซึ่งเป็น transcription factor ที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายโอนข้อมูลพันธุกรรม โดยกระตุ้นผ่านความเครียด การสื่อสารระหว่างเซลล์ อนุมูลอิสระ รังสีอัลตราไวโอเล็ต การฉายรังสี การติดเชื้อแบคทีเรียหรือไวรัส เป็นต้น (19) จากการศึกษาพบว่า กลไกการ NF- κ B สามารถเกิดได้ 2 กลไก ได้แก่

- 1.1. Classical canonical pathway (19) สามารถถูกกระตุ้นผ่านไซโตไคน์ (Pro-inflammatory cytokines) เช่น TNF- α , Interleukin-1 (IL-1), Lipopolysaccharide (LPS) เมื่อถูกกระตุ้นแล้ว จะทำให้เกิดกระบวนการ Phosphorylation บริเวณ Inhibitory kappa B kinase (IKK) complex ที่ตำแหน่ง IKK- β ส่งผลให้ IKK- β แยกออก และไปกระตุ้นที่ Inhibition of κ B (IKB) โดยกระบวนการ Phosphorylation และเมื่อ IKB แยกออกจาก NF- κ B จะถูกสลายโดย Proteasome ทำให้ NF- κ B เข้าสู่นิวเคลียสและเกิดการ Transcription (20)
- 1.2. Non-canonical pathway ถูกควบคุมด้วย Receptor บนผิวเซลล์ เมื่อเกิดการกระตุ้น IKK- α ด้วย B-cell activating factor (BAFF), Lymphotoxin β (LT β), CD40 ligand, TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) และ Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) (21, 22) จะทำให้เกิดการ Phosphorylation และถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการสลายโดย Proteasome ทำให้ โปรตีน p100 แยกออกจาก NF- κ B (RelB) จากนั้น NF- κ B จะเข้าสู่ นิวเคลียสและเกิดการ Transcription (20)



รูปที่ 1 แสดงกลไกการกระตุ้น NF-κB ผ่าน Classical canonical pathway และ Non-canonical pathway (20)

กลไกทั้งสองจะทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการตายของเซลล์ (Anti-apoptosis) ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนและขนาดของเซลล์ (Cell proliferation) เกิดการแพร่กระจาย (Metastasis) การลุกลาม(Invasive) และเกิดกระบวนการสร้างหลอดเลือด (Angiogenesis) ของโรคมะเร็ง (23) โดยมีบทบาทสำคัญดังนี้

1.1. NF-κB ควบคุมการแสดงออกของพันธุกรรมที่สัมพันธ์กับโรคต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 (24)

1.2.

ตารางที่ 1 ตำแหน่งยีนที่ถูกควบคุมโดย NF-κB และโรคที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน(24)

| Gene regulated by NF-κB | Related disease |
|-------------------------|-----------------|
| Bcl-xl | Cancer |
| c-Myc | |
| Cyclin D1 | |
| EGFR | |
| Ras | |
| TRAF | |

| | |
|--------------|---------------------------------|
| MMP9 | Cancer, Arthritis |
| COX-2 | Colorectal cancer, Inflammatory |
| 5'deiodinase | Euthyroid sick syndrome |
| HIV LTR | AIDs |
| IL-8 | Asthma |
| iNOS | Septic shock |
| MCP-1 | Atherosclerosis |

จากการศึกษา (21) พบว่า NF-**KB** ประกอบด้วยโปรตีน 5 หน่วย ได้แก่ RelA (p65), RelB, c-Rel, NF-**KB1** (p50) และ NF-**KB2** (p52) พบว่ามีความสัมพันธ์ของการเกิดมะเร็งของโปรตีนแต่ละหน่วย โดยมีความสัมพันธ์กับมะเร็ง ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ความสัมพันธ์ของชนิดของมะเร็งและการแสดงออกที่ผิดปกติของยีนในตำแหน่งต่างๆ (21)

| Genes | Alteration | Tumor type |
|--------------------------|---|---|
| RelA (p65) (25-27) | Amplification | Lymphoma, Head and neck cancer, Breast cancer, Stomach adenocarcinoma |
| | Rearrangement | Non-Hodgkin's lymphoma, Multiple myeloma |
| | Amino acid substitution over-activation | Non-small cell lung carcinoma |
| | | Multiple myeloma |
| RelB (28) | Rearrangement | Adult T-cell leukemia cell |
| c-Rel (25, 26, 28) | Amplification | B-cell lymphoma |
| | Rearrangement | Follicular lymphoma, diffuse large B-cell lymphoma |
| | Overexpression | B-cell lymphoma, Non-small cell lung carcinoma |
| NF- KB1 (p50) | Rearrangement | Acute lymphoblastic leukemia |
| | Overexpression | Non-small cell lung carcinoma, Colon cancer, Prostate |

| | | |
|--------------------------|----------------|---|
| (25, 29) | | cancer, Breast cancer, Brain cancer |
| NF- κ B2 (p52) | Rearrangement | T-cell lymphoma, B-cell non-Hodgkin's lymphoma, B-cell chronic lymphocytic leukemia, Multiple myeloma |
| (25, 29, 30) | Overexpression | Cutaneous T-cell lymphoma, Breast cancer, Colon cancer |

- 1.3. การกระตุ้น NF- κ B จะสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็ง ภาวะอักเสบ โรคภูมิคุ้มกันทำลายตัวเอง ภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด การติดเชื้อไวรัสและการเกิดโรคต่างๆในมนุษย์ (19)
- 1.4. NF- κ B สามารถยับยั้งกระบวนการตายของเซลล์ ทำให้การดำเนินไปของวัฏจักรของเซลล์ เป็นไปอย่างอิสระโดยไม่มีการควบคุม และหากมีภาวะอักเสบเรื้อรังจะเพิ่มโอกาสการเกิดเนื้องอกอย่างมีนัยสำคัญ (19)

2. Inhibition of κ B kinase

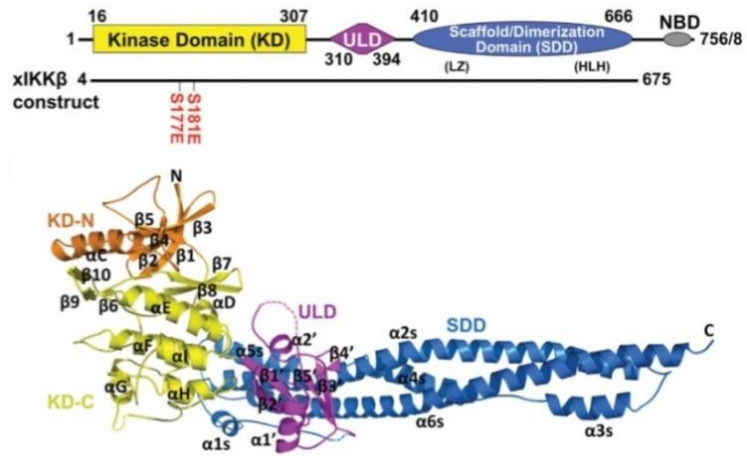
Inhibition of κ B kinase (IKK) ทำหน้าที่กระตุ้นการถ่ายโอนข้อมูลพันธุกรรมของ NF- κ B ประกอบด้วย 3 Subunits ได้แก่ IKK- α พบบริเวณกระดูกและกล้ามเนื้อที่มีความผิดปกติ IKK- β พบในกระบวนการอักเสบและความผิดปกติของภาวะภูมิคุ้มกันทำลายตัวเอง (24) และ IKK- γ (NEMO) ซึ่งจะจับกันเป็นองค์ประกอบเชิงซ้อนใน 2 ลักษณะตามกลไกการกระตุ้น NF- κ B ดังรูปที่ 1 โดยใน Non-canonical pathway IKK- α 2 โมเลกุลจะจับเป็นองค์ประกอบเชิงซ้อน และใน Canonical pathway ทั้ง 3 หน่วยจะจับกันเป็นองค์ประกอบเชิงซ้อนซึ่งประกอบด้วย IKK- α 1 โมเลกุล IKK- β 1 โมเลกุล และ IKK- γ 2 โมเลกุล ซึ่งเป็นองค์ประกอบเชิงซ้อนที่ดีที่สุด

การยับยั้งบริเวณ IKK- α และ IKK- β เป็นแนวทางหนึ่งในการพัฒนายาต้านมะเร็งในปัจจุบัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการยับยั้ง IKK- β เนื่องจากการกระตุ้น IKK- β จะทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนและขนาดของเซลล์ (cell proliferation) และยังเกี่ยวข้องกับการพัฒนาเซลล์ให้มีคุณสมบัติเฉพาะ (differentiation) ดังนั้น IKK- β จึงเป็นเป้าหมายหลักในการยับยั้งให้เฉพาะเจาะจงมากกว่า IKK- α (19, 31) นอกจากนี้ IKK- α ยังไม่มีกลไกการทำงานที่ชัดเจน ในทางคลินิกพบว่า แสงอัลตราไวโอเล็ตและไอออนจากการฉายแสงในการรักษาโรคมะเร็งสามารถกระตุ้น NF- κ B ได้ (19)

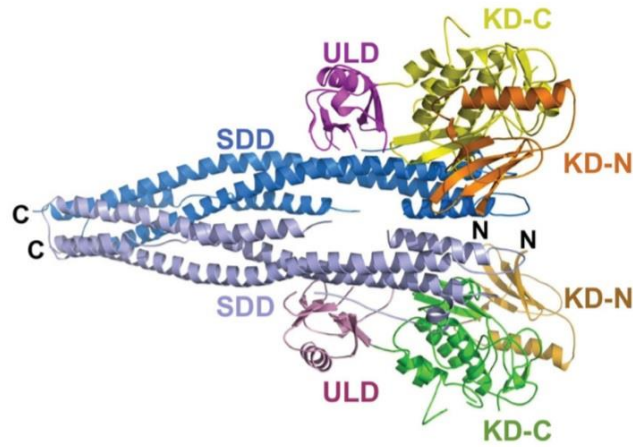
และพบว่า NF- κ B ยังมีความสัมพันธ์กับการดื้อยาเคมีบำบัด โดยพบว่า การเกิดการดื้อยาเคมีบำบัด จะพบการจับกันของ NF- κ B กับ DNA สูง ด้วยเหตุนี้ NF- κ B จึงเป็นอีกเป้าหมายหนึ่งในการรักษามะเร็งในอนาคต ซึ่งยากลุ่ม IKK inhibitor อาจใช้ร่วมกับการใช้ยาเคมีบำบัดหรือการฉายแสงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา (19, 24)

3. โครงสร้างผลึก (Crystal structure) ของ Inhibition of κ B kinase β (IKK β)

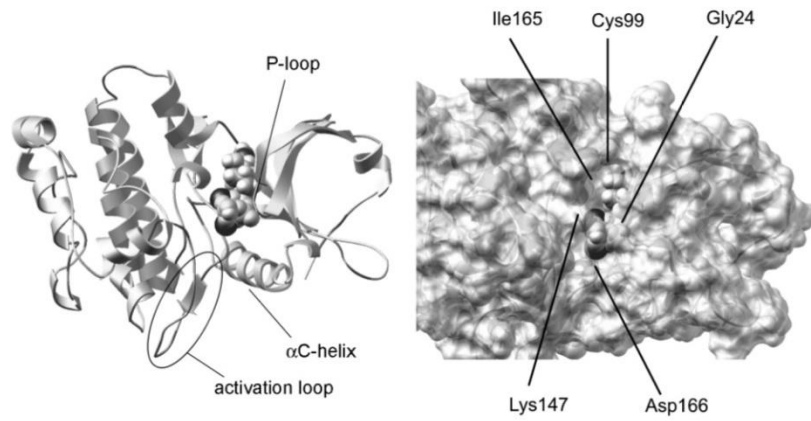
Inhibition of κ B (IKB) kinase (IKK) β หรือ IKK β ประกอบด้วย 3 Domains ได้แก่ N-terminal kinase domain (KD), the central ubiquitin-like domain (ULD) และ α -helical scaffold/dimerization domain (SDD) ดังรูปที่ 2 การกระตุ้น IKK β ต้องอาศัยกระบวนการ Dimerization ซึ่งเกิดผ่าน SDD ดังรูปที่ 3 นอกจากนี้ SDD และ ULD ยังเป็นส่วนที่จับกับส่วน C-terminal ของ IKB (32) ทำให้ IKB เกิด Phosphorylation และปล่อย NF- κ B เข้าสู่นิวเคลียสต่อไป (33) ในส่วนของ KD เป็นบริเวณที่ Inhibitors มาจับ โดยจับบริเวณ hinge loop ซึ่งเชื่อมบริเวณ N-lobes และ C-lobes และเป็นบริเวณที่จำเพาะต่อ Adenine ใน Adenosine triphosphate (ATP) (32) หรือเป็น ATP binding site ซึ่ง Adenine จะถูกจับโดย Hydrophobic contacts เป็นหลัก ผ่าน Amino acid residue ได้แก่ Leu21, Gly22, Gly24, Val29, Ala42, Tyr98 และ Ile165 รวมถึงเกิดพันธะไฮโดรเจนกับ Glu97 และ Cys99 นอกจากนี้ยังมีการจับกันระหว่าง Asp145 และ Asp166 โดยแมกนีเซียมจะเป็นตัวเกิดพันธะระหว่างประจุลบของออกซิเจนในหมู่ฟอสเฟตและประจุลบในหมู่ฟังก์ชัน (Side chain) บนโปรตีน ดังรูปที่ 4 (34)



รูปที่ 2 Domain ทั้ง 3 ส่วนของ IKK β (32)



รูปที่ 3 Dimer ของ IKK β (32)



รูปที่ 4 โครงสร้างโมเลกุล 3 มิติของ IKK β บริเวณ ATP binding site (34)

4. การตรวจคัดหาสารเคมีที่น่าจะมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาใหม่

การตรวจคัดหาสารสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้เทคนิค High-throughput screening ซึ่งขึ้นกับการประมวลผลทางชีวภาพที่สามารถตรวจวัดได้ ยกตัวอย่างเช่น อาจใช้เทคนิคการตรวจจับสัญญาณไฟฟ้าของเซลล์ (Electrophysiology) หรือเทคนิคการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนที่ติดฉลากสารเปล่งแสงฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescent tag) ที่เรียกว่า High-content screening เป็นต้น เมื่อได้ข้อมูลสารเคมีที่น่าจะมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาใหม่แล้วก็จะดำเนินการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ อย่างละเอียด ซึ่งหมายรวมถึงการศึกษาทางพิษวิทยาด้วย ทั้งนี้โครงสร้างทางสารเคมีส่วนที่สำคัญ (Core chemical structure) อาจจะถูกนำไปเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์สารเคมีอื่นๆ โดยการปรับเปลี่ยนหมู่เคมี เพื่อนำไปศึกษาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างทางเคมีกับฤทธิ์ทางชีวภาพ (Structure-activity relationship; SAR) เมื่อได้สารเคมีที่มีคุณสมบัติตรงตามข้อกำหนดแล้ว สารเคมีนี้จะถูกนำไปศึกษาในสัตว์ทดลองและในคนตามลำดับต่อไป (16)

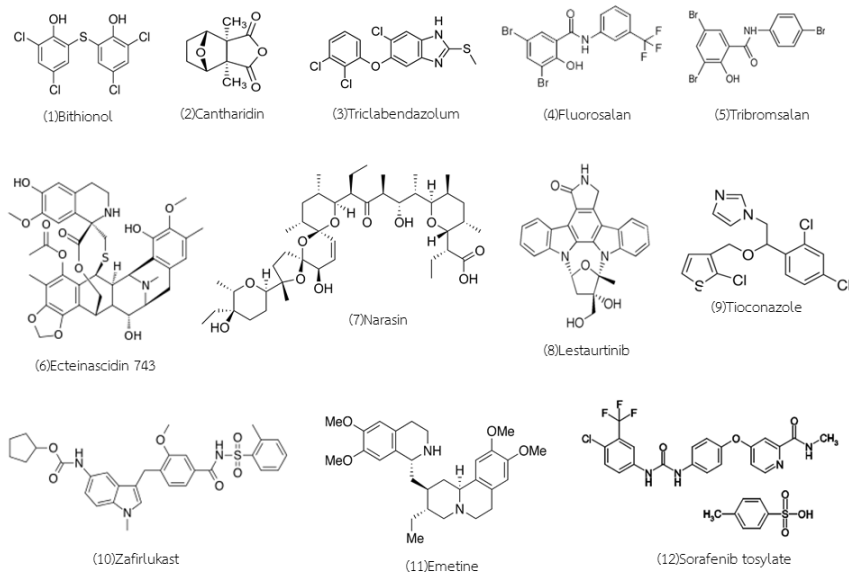
จากการศึกษาของ Susanne C. Miller และคณะ (16) ในการตรวจหาสารเคมีโมเลกุลเล็กที่คาดว่าจะมีศักยภาพในการยับยั้งผ่าน NF- κ B pathway ได้ผลดังรูป โดยเมื่อพิจารณาจากโครงสร้างพบว่ามี 12 โครงสร้างจากทั้งหมดที่ให้ฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิด I κ B alpha phosphorylation ซึ่งในที่นี้จะมีสารคือ Fluorosalan และ Tribromsalan ซึ่งมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 3.2 และ 7.9 μ M ตามลำดับ เมื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างของ Fluorosalan แล้ว พบว่า Fluorosalan มีส่วนโครงสร้างที่คล้ายกับ Aeropylsinin-1 ที่ใช้เป็นสารต้นแบบที่คณะผู้ทำงานวิจัยสนใจศึกษา

Compound potency (μM) in NF κ B-bla reporter gene, NF κ B-luc reporter gene, GFP-I κ B phosphorylation, and caspase 3/7 assays.

| Compound Name | NF κ B-bla TNF- α^a IC ₅₀ | NF κ B-bla IL-1 β^b IC ₅₀ | NF κ B-luc TNF- α^a IC ₅₀ | GFP-I κ B phosphorylation IC ₅₀ | Caspase 5 h EC ₅₀ | Caspase 24 h EC ₅₀ |
|--------------------------|---|--|---|--|---------------------------------|----------------------------------|
| Bithionol | 11.2 | 25.5 | 47.2 | 15.8 | 12.6 | 29.9 |
| Bortezomib | 0.45 | 0.31 | 0.19 | Inactive | 0.35 | 0.05 |
| Cantharidin | 11.2 | 14.2 | 11.0 | 39.8 | 7.9 | 11.3 |
| Chromomycin A3 | 0.56 | 0.26 | 0.13 | Inactive | 0.2 | 0.08 |
| Daunorubicinum | 10.0 | 24.4 | 14.2 | Inactive | 4.0 | 1.3 |
| Digitoxin | 0.09 | 0.07 | 0.17 | Inactive | Inactive | Inactive |
| Ectinascidin 743 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 39.8 | 0.009 | 0.003 |
| Emetine | 2.0 | 4.2 | 0.14 | 0.31 | 1.1 | 17.0 |
| Fluorosalan | 7.9 | 24.4 | 25.3 | 2.8 | Inactive | Inactive |
| Manidipine hydrochloride | 12.6 | 16.8 | 27.3 | Inactive | Inactive | Inactive |
| Narasin | 3.6 | 4.7 | 0.3 | 3.2 | 19.9 | 44.7 |
| Lestaurtinib | 1.6 | 1.9 | 3.2 | 7.9 | 4.7 | 6.2 |
| Ouabain | 0.18 | 0.07 | 0.19 | Inactive | Inactive | Inactive |
| Sorafenib tosylate | 7.9 | 11.8 | 13.3 | 22.4 | Inactive | Inactive |
| Sunitinib malate | 35.5 | 29.5 | 21.7 | Inactive | 79.4 | 79.4 |
| Tioconazole | 39.8 | 61.2 | 54.6 | 44.7 | 79.4 | Inactive |
| Tribromsalan | 11.2 | 21.6 | Inactive | 7.9 | Inactive | Inactive |
| Triclabendazolium | 14.1 | 15.9 | 54.6 | 25.1 | 70.8 | 79.4 |
| Zafirlukast | 35.5 | 23.6 | 56.6 | 31.6 | 50.1 | 75.1 |

^a TNF- α was used as stimulator in NF κ B-bla and NF κ B-luc assays.^b IL-1 β was used as stimulator in NF κ B-bla assay.

รูปที่ 5 ความแรงของสาร (μM) ในการยับยั้งผ่าน NF- κ B-bla reporter gene, NF- κ B-luc reporter gene, GFP-I κ B phosphorylation, และ caspase 3/7 assays (16)



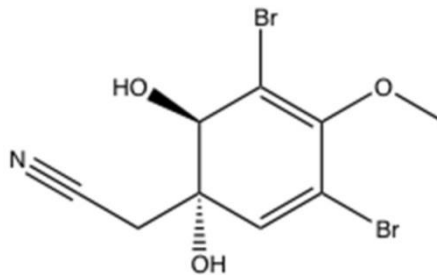
รูปที่ 6 โครงสร้างสารที่สามารถยับยั้งการเกิด I κ B phosphorylation (16)

5. Aeroplysinin-1

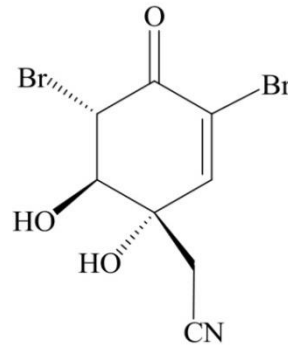
Aeroplysinin-1 เป็นสารกลุ่ม Dibromotyrosine acetonitrile derivatives สามารถพบได้ในฟองน้ำทะเลตระกูล Verongida (4) ที่ประกอบด้วย 4 วงศ์ ได้แก่ Aplysinidae, lanthellidae,

Aplysinellidae และ Pseudoceratinidae (35) ในประเทศไทยสามารถพบฟองน้ำทะเลวงศ์ Pseudoceratinidae ชนิด *Pseudoceratina purpurea* ได้ที่หมู่เกาะทะเลใต้ จังหวัด นครศรีธรรมราช (6) และ *Pseudoceratina sp.* ได้ที่หมู่เกาะทะเลใต้และหมู่เกาะกระ จังหวัด นครศรีธรรมราชและหมู่เกาะโลซิน จังหวัดปัตตานี (5-7)

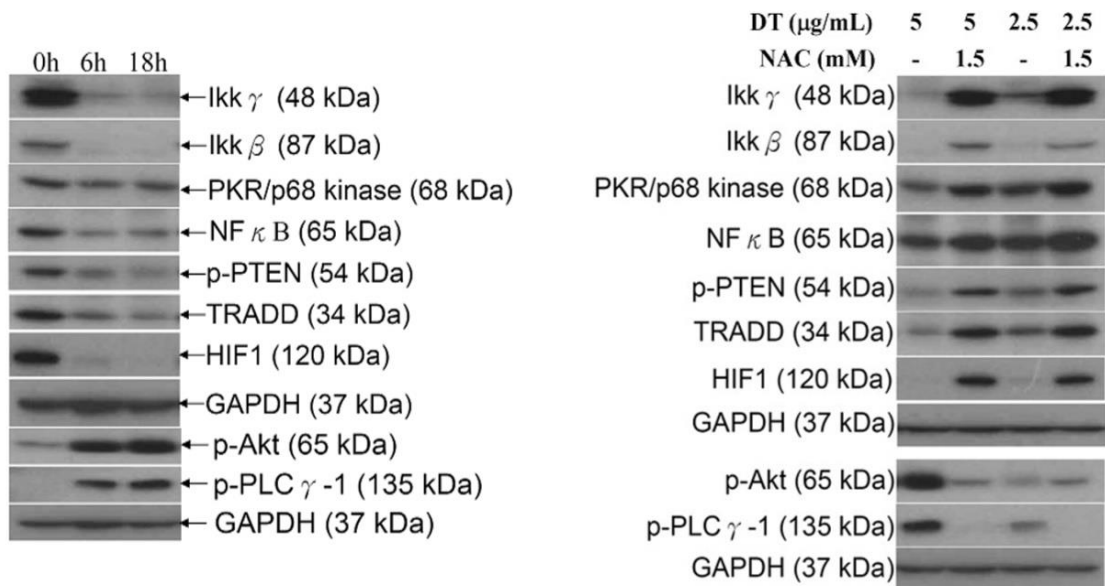
Aeropylsinin-1 เป็นสารที่มี chiral carbon และมีคุณสมบัติเป็น optically active หรือมีคู่ enantiomer คือ (+)-Aeropylsinin-1 และ (-)-Aeropylsinin-1 ซึ่ง (+)-Aeropylsinin-1 ดังรูปที่ 7 มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย (8) ได้แก่ ฤทธิ์ต้านปรสิต (8, 9) ฤทธิ์ต้านจุลชีพต่อเชื้อแบคทีเรียบาง ชนิดและเชื้อเอชไอวี (8, 10) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (8, 11) ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ และ ฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง (8, 12, 13) นอกจากนี้ในฟองน้ำชนิด *Pseudoceratina sp.* ยังพบพบสาร เมตาบอไลต์ของ (+)-Aeropylsinin-1 และมีโครงสร้างคล้ายกันคือ (1'R,5'S,6'S)-2-(3',5'-dibromo-1',6'-dihydroxy-4'-oxocyclohex-2'-enyl) acetonitrile (DT) ดังรูปที่ 8 ซึ่งมีฤทธิ์ต้าน เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว K562 โดยผ่านกลไกการทำให้เซลล์เกิด Apoptosis จากการสร้าง Reactive Oxygen Species (ROS) ที่เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งเป็นผลจากการยับยั้งจาก HIF pathway, PTEN pathway, NF- κ B pathway และ IKK pathway ดังรูปที่ 9 (14)



รูปที่ 7 โครงสร้างเคมีของ (+)-Aeropylsinin-1 (8)



รูปที่ 8 โครงสร้างเคมีของ (1'R, 5'R, 6'S)-2-(3', 5'-Dibromo- 1', 6'-dihydroxy- 4'- oxocyclohex-2'-enyl) acetonitrile (DT) (14)

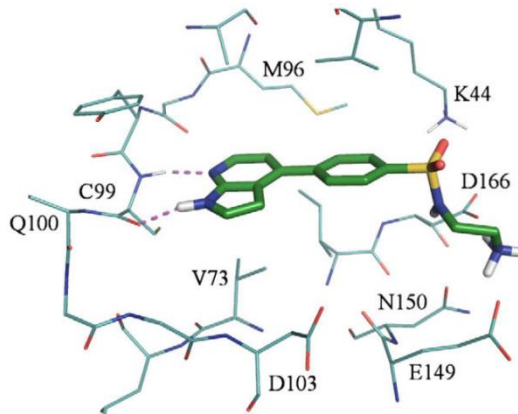


รูปที่ 9 ผลของ Oxidative stress จากการทดลองโดยใช้ (1'R, 5'R, 6'S)-2-(3', 5'-Dibromo- 1', 6'-dihydroxy- 4'- oxocyclohex-2'-enyl) acetonitrile (DT) ต่อ IKK kinases (IKK)/NF- κ B และ Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathways โดยภาพซ้ายแสดงเซลล์ที่ได้รับ DT ขนาด 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 6 และ 18 ชั่วโมงตามลำดับ และภาพขวาแสดงเซลล์ที่ได้รับ N-acetyl-cysteine (NAC) เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมงตามด้วย DT ขนาด 2.5 หรือ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (14)

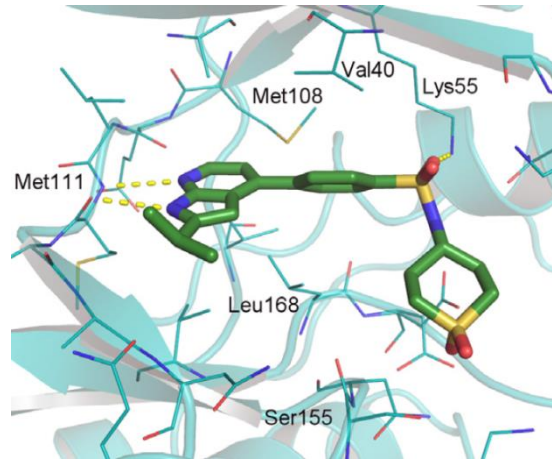
6. Azaindole

โครงสร้างอนุพันธ์ของ Azaindole มีการรายงานตั้งแต่ปี 2003 ถึงปี 2013 พบว่ามี 4 ไอโซเมอร์ ได้แก่ 4-Azaindole ,5-Azaindole ,6-Azaindole ,7-Azaindole โครงสร้างอนุพันธ์ของ 7-Azaindole เป็นโครงสร้างที่พบในสารมากกว่า 100,000 โครงสร้าง โดยจุดออกฤทธิ์หรือจุดที่จับเพื่อออกฤทธิ์ของอนุพันธ์ของ Azaindole คือ เอนไซม์ไคเนส (Kinase) โดยบริเวณ ATP binding site ของเอนไซม์จะมีส่วนของหมู่ฟอสเฟตที่จับกับอะมิโน ซึ่งใช้ไฮโดรเจนอะตอมในการจับกับโครงสร้าง Azaindole ด้วยพันธะไฮโดรเจน โปรตีนไคเนสในมนุษย์มีมากกว่า 500 ชนิด (36)

การยับยั้งเซลล์มะเร็งผ่าน IKB kinase (IKKs) ซึ่งเป็นเซอริน/ทรีโอนีนไคเนส ที่อยู่ในไซโตพลาสซึม เมื่อเกิดการกระตุ้นจะเกิดการจับกับ NF- κ B เป็น IKK/NF- κ B complex โดย phosphorylation และควบคุม mitotic kinase Aurora A ซึ่งโครงสร้างอนุพันธ์ของ Azaindole มีการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้ง IKK alpha และ IKK beta โดยเน้นการศึกษาใน IKK beta เนื่องจาก IKK beta เป็นชนิดของไคเนสที่พบมากในเซลล์ ส่วน IKK alpha พบได้น้อย มักพบในความผิดปกติของกระดูกและผิวหนัง จากงานวิจัยพบว่าโครงสร้าง 4-aryl-7azaindoles sulfonamides สามารถยับยั้ง IKK2 แบบแข่งขันบริเวณ ATP binding site ดังรูปที่ 10 และ 11



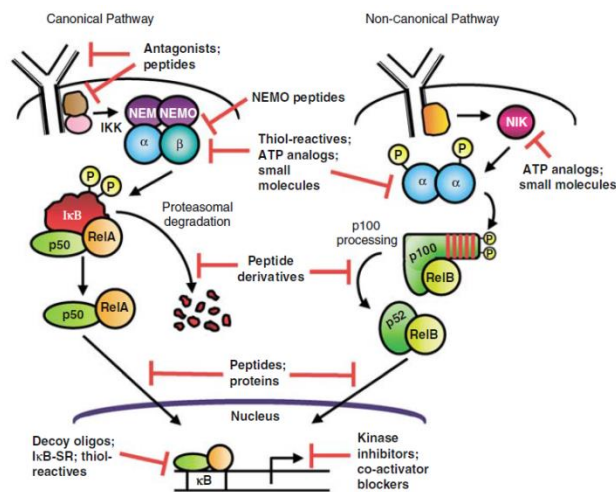
รูปที่ 10 แบบจำลองการจับของอนุพันธ์ 4-aryl-7azaindoles บริเวณ ATP binding site ของโมเลกุล IKK (18)



รูปที่ 11 X-ray structure ของอนุพันธ์ 4-aryl-7azaindoles บนโมเลกุลของ IKK (18)

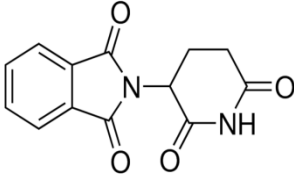
7. ยาเคมีบำบัดออกฤทธิ์ต่อโมเลกุลเป้าหมาย IKK

หลักการในการยับยั้งการเกิดมะเร็งจากการกระตุ้นผ่าน NF- κ B สามารถเกิดขึ้นได้ในหลายระดับ เช่น การยับยั้งเป้าหมายบนผิวเซลล์โดยใช้ Antibody การป้องกันการแยกของ I κ B ผ่านกระบวนการ Proteosomal inhibition โดยมีเอนไซม์เป้าหมายคือ IKK complex การยับยั้งการเข้าไปภายในนิวเคลียสของ NF- κ B และการขัดขวางการจับระหว่าง NF- κ B กับลำดับดีเอ็นเอ ที่จะส่งผลต่อการถอดรหัสพันธุกรรม (Gene transcription) (37)



รูปที่ 12 กลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งผ่าน NF- κ B (38)

ตารางที่ 3 ยาที่มีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้ง inhibitory kappa B kinase (IKK inhibitors) (39)

| FDA-approved pharmacologic agents that inhibit Nf-kB activity by inhibition of IKK | | | |
|---|-----------------------------|-------------------|--|
| Agent | Trade name | Mechanism | Indication |
| Arsenic trioxide (As ₂ O ₃) | Trisenox (Cephalon Inc.) | inhibition of IKK | Acute promyelocytic leukaemia. NSCLC, liver, multiple myeloma, chronic lymphocytic leukemia หมายเหตุ FDA-approved phase II |
| Thalidomide  | Thalomid (Celgene Inc.) | inhibition of IKK | Multiple myeloma. Chronic lymphocytic leukemia หมายเหตุ FDA-approved phase I |

ตัวอย่าง IKK inhibitors เช่น manumycin A, PS-1145, BMS-345541, CHS-828, ACHP, AS602868, blocking peptides, Bay 11-7085, BAY 11-7082, WS3, WS6, LY2409881 triHCl, SC-514 เป็นต้น

8. Drug Discovery, Design and Development

ยาที่มีใช้ในปัจจุบันได้จากการศึกษาสารประกอบทั้งจากธรรมชาติและจากการสังเคราะห์โดยพัฒนามาจากสารต้นแบบที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Lead compound) ซึ่งถูกค้นพบและดัดแปลงโครงสร้าง Lead compound ให้มีฤทธิ์ตามต้องการด้วยวิธีต่างๆ ดังนี้

8.1. วิธีการค้นหา Lead compound ได้แก่

8.1.1. Random Screening คือการตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารทุกชนิดโดยไม่คำนึงถึงโครงสร้างทางเคมี

- 8.1.2. Nonrandom Screening คือการนำสารที่มีฤทธิ์คลุมเครือหรือมีฤทธิ์อ่อนมาทดสอบด้วยวิธีการที่เฉพาะเจาะจงขึ้น
- 8.1.3. Drug Metabolism Studies คือการนำสารที่ได้จากกระบวนการ Metabolism หรือ Metabolite ของยามาทดสอบฤทธิ์เทียบกับสารเดิม
- 8.1.4. Clinical Observations คือการนำสารที่แสดงฤทธิ์ข้างเคียงจากการทดลองในสัตว์มาพัฒนาโครงสร้างต่อเพื่อให้เป็นฤทธิ์ข้างเคียงให้เป็นฤทธิ์หลักต่อไป
- 8.1.5. Rational Approaches to Lead Discovery คือการค้นหายาที่มีฤทธิ์ตามต้องการโดยอาศัยสมมติฐานและขั้นตอนอย่างมีเหตุผล
- 8.2. การดัดแปลงโครงสร้าง Lead compound ได้แก่
- 8.2.1. Identify of The Active Part : The Pharmacophores คือการหาส่วนของโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการจับ Receptor ที่มีผลในการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารหรือที่เรียกว่า Pharmacophore โดยสารที่เป็น Lead compound อาจมีโครงสร้างบางส่วนที่ไม่จำเป็นต่อการจับ Receptor จึงสามารถตัดโครงสร้างส่วนดังกล่าวออกได้และเหลือเพียงส่วนโครงสร้างที่จำเป็นต่อการออกฤทธิ์เท่านั้น
- 8.2.2. Functional Group Modification คือการปรับปรุงหมู่ฟังก์ชันภายในโครงสร้างเพื่อลดฤทธิ์ที่ไม่ต้องการหรือลดฤทธิ์ข้างเคียงลงได้
- 8.2.3. Structure-Activity Relationships (SAR) หมายถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างทางเคมีของสาร ซึ่งแบ่งเป็น 2 ประเภทคือ Structurally Specific Drugs และ Structurally Nonspecific Drugs
- 8.2.4. Structure Modification to Increase Potency and Therapeutic Index คือการดัดแปลงโครงสร้างเพื่อเพิ่มฤทธิ์และ Therapeutic Index ของยา (40-44)

9. Molecular simplification

การปรับโครงสร้างของสารตั้งต้นที่ได้จากธรรมชาติ ซึ่งมักเป็นโครงสร้างทางโมเลกุลที่ซับซ้อนยากต่อการสังเคราะห์ มีความเป็นพิษ หรือมีค่าชีวประสิทธิผลค่อนข้างต่ำ จากการศึกษาทาง Medical chemistry ทำให้ทราบว่า มีเพียงบางส่วนของโครงสร้างที่สำคัญต่อการออกฤทธิ์ (Pharmacophore) ดังนั้น การทำ Molecular simplification จึงเป็นขั้นแรกของการปรับโครงสร้าง

จากสารต้นแบบ โดยอาจเปลี่ยนหมู่แทนที่ (Substituents) หรือทำลายวงโครงสร้าง (Elimination of Cycle) แต่ก็อาจทำให้ลด Selectivity เนื่องจาก Selectivity มักพบโครงสร้างทางโมเลกุลที่ซับซ้อนมากกว่า ตรวจสอบโดยพิสูจน์เอกลักษณ์ของฟาร์มาโคฟออร์ (pharmacophore) หรือทำ Molecular simplification เพื่อลดผลข้างเคียงร้ายแรงที่เกิดจากสารต้นแบบ โดยมีการทำ Molecular simplification จากสารต้นแบบที่ประสบผลสำเร็จแล้ว ได้แก่ Morphine, Quinine, Cocaine เป็นต้น (45)

10. การประยุกต์ใช้คอมพิวเตอร์ในการออกแบบยา (Computer-aided drug design)

จากความก้าวหน้าทางชีวโมเลกุล ทำให้สามารถทราบสาเหตุรวมไปถึงปัจจัยการเกิดโรคในระดับโมเลกุลของร่างกาย และมีความรู้เกี่ยวกับชีวโมเลกุลเป้าหมาย (Macromolecular biological targets) ส่งผลให้มีการประยุกต์ใช้คอมพิวเตอร์ในการสร้างแบบจำลองโมเลกุลสามมิติของชีวโมเลกุลเป้าหมาย ทำให้สามารถค้นหาสารต้นแบบ เพื่อให้ได้ยาใหม่ที่ใช้รักษาโรคและนำมาใช้ในการพัฒนายาต่อไป ดังนั้นการใช้คอมพิวเตอร์เข้ามาช่วยในการคิดค้นยาใหม่จะช่วยลดระยะเวลา ค่าใช้จ่ายในการสังเคราะห์ และทดลองฤทธิ์ของยา

10.1. Molecular modeling และ Docking study Molecular modeling

เป็นวิธีการจำลองแบบโครงสร้างและคุณสมบัติของโมเลกุล โดยใช้ Computational chemistry และเทคนิค Graphical visualization เพื่อปรับปรุงโครงสร้างสามมิติให้อยู่ในสภาวะที่กำหนด การจำลองโมเลกุลสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการค้นพบสารเคมีใหม่ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับโมเลกุลเป้าหมาย โดย Molecular modeling ที่ใช้ในการศึกษาการจับของยากับเป้าหมายของยาเรียก Docking ซึ่งมีวิธีการค้นหาและออกแบบยาโดยใช้ข้อมูลตำแหน่ง Binding site บนสารชีวโมเลกุลเป้าหมาย โดย Molecular docking เป็นวิธีการคัดกรองยาแบบเสมือน (Virtual screening) สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการทำนายรูปร่างสามมิติของสารที่จับกับชีวโมเลกุลเป้าหมายและคำนวณค่าพลังงานอันตรกิริยา จึงเป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้เนื่องจากลดระยะเวลาในการทดสอบฤทธิ์ในห้องปฏิบัติการจริง

10.2. โปรแกรม AutoDock

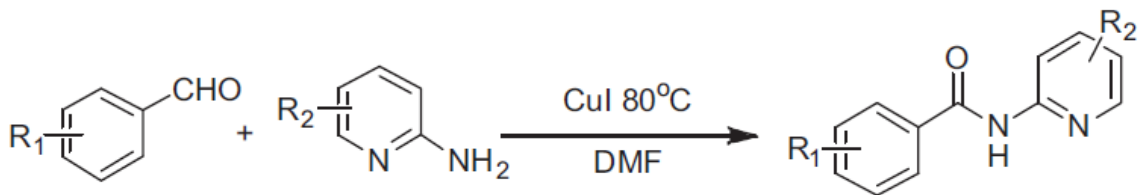
โปรแกรม AutoDock เป็นซอฟต์แวร์ที่ใช้ในการ Docking โดยจะทำการวิเคราะห์โครงสร้างสามมิติของสารเคมีที่สามารถจับกับชีวโมเลกุลเป้าหมาย โดยพิจารณาจากค่าพลังงาน เช่น

Docking energy, Binding energy หรือค่า K_i ซึ่งจะนำค่าดังกล่าวมาพิจารณาว่าสารเคมีสามารถจับกับสารชีวโมเลกุลได้ดีหรือไม่ โดยโปรแกรม AutoDock จะมีโปรแกรมย่อยชื่อว่า Autogrid ที่ใช้คำนวณกริดพลังงานที่กำหนดบริเวณเป้าหมายที่จะทดสอบการจับกับยา ซึ่งสามารถกำหนดจำนวนรอบที่ใช้ในการทดสอบ (Number of GA run) และ Maximum number of energy evaluations และทำการวิเคราะห์โครงสร้างสามมิติของสารในบริเวณที่กำหนดด้วยขอบเขตของพลังงานกริด จากนั้นทำการสุ่มโดยใช้หลักการของการคำนวณทางพันธุกรรม (Genetic algorithm) แบบ Lamarckian GA ในแต่ละรอบของการทดสอบได้มีการจัดเรียงโครงสร้างสามมิติของยาจนได้ผลลัพธ์ออกมา และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์เพื่อเลือกผลลัพธ์ที่มีค่าพลังงานต่ำและมีค่าความถี่มากที่สุดในกลุ่มที่นำมาทดสอบ (46)

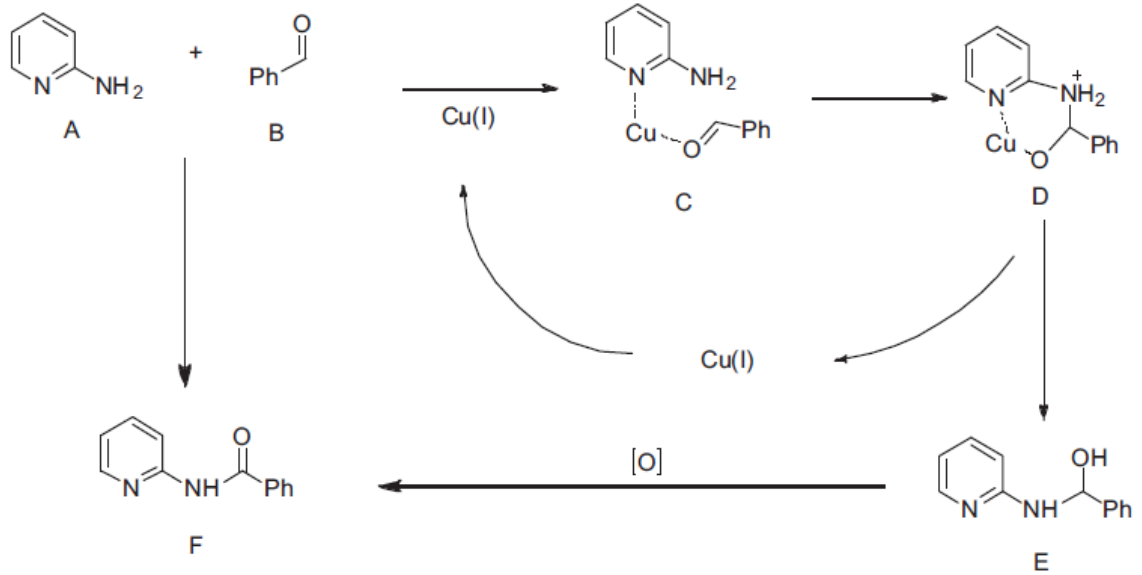
11. ปฏิกิริยาเคมี

การสังเคราะห์สารประกอบเอไมด์ (Amidation Reaction) สามารถเตรียมขึ้นจากการปฏิกิริยาระหว่างสารตั้งต้นที่เป็นสารกลุ่มแอลดีไฮด์และเอมีน โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาในการสังเคราะห์เอไมด์ เช่น

11.1. การใช้โลหะทรานซิชันซึ่งเกิดกระบวนการ Transition-metal complexes (47) เช่น Cu, Rh, Ru, Pd, Ni, Au, Fe ดังรูปที่ 13 โดยกลไกการเกิดปฏิกิริยาเป็นดังรูปที่ 14

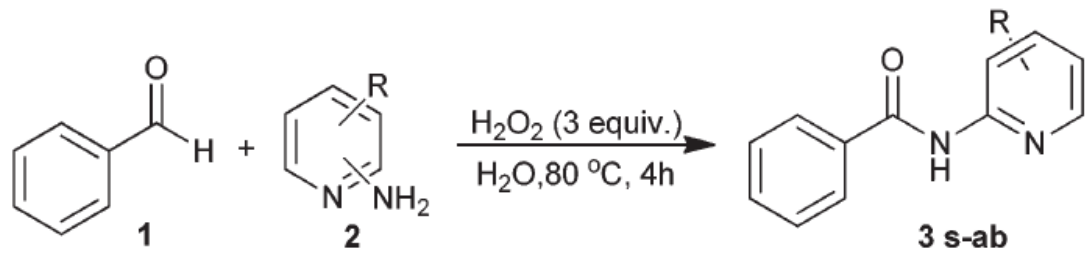


รูปที่ 13 Copper-catalyzed oxidative amidation with aldehyde (47)

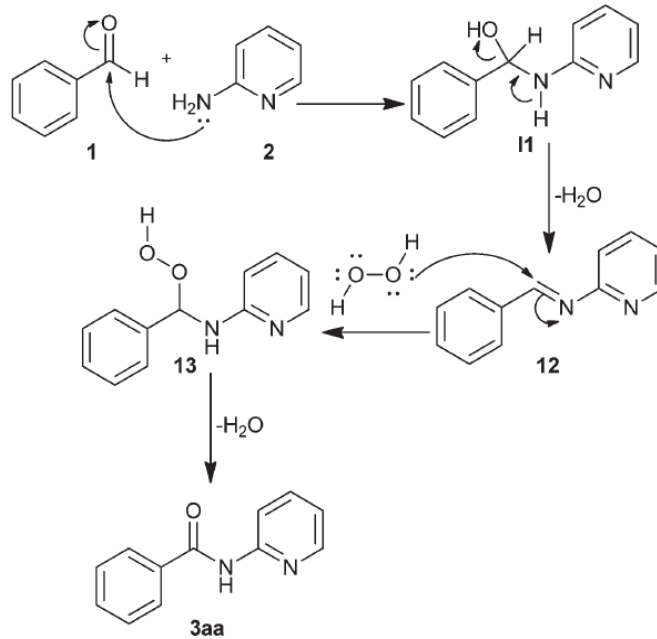


รูปที่ 14 Proposed mechanism of the Copper-catalyzed oxidative amidation reaction (47)

11.2. การใช้ Oxidant เช่น Hydrogen peroxide (48) , di-t-butyl peroxide (DTBP), tert-butyl peroxybenzoate (TBPB) ดังรูปที่ 15 โดยกลไกการเกิดปฏิกิริยาเป็นดังรูปที่ 16



รูปที่ 15 Hydrogen peroxide-catalyzed oxidative amidation with aldehyde (48)



รูปที่ 16 Proposed mechanism of the Hydrogen peroxide-catalyzed oxidative amidation reaction (48)

12. เครื่องมือวิเคราะห์

12.1. รงค์เลขผิวบาง (Thin layer chromatography หรือ TLC)

หลักการของรงค์เลขผิวบางคือการแยกสารต่างชนิดกันโดยใช้วัฏภาคนิ่ง (Stationary phase) และวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase) ซึ่งมีความเร็วต่างกัน โดยสารต่างชนิดกันจะเคลื่อนที่ผ่านวัฏภาคนิ่งโดยการพาของวัฏภาคเคลื่อนที่ด้วยความเร็วที่ไม่เท่ากันจึงสามารถแยกสารแต่ละชนิดออกจากกันได้ ซึ่งแสดงผลออกมาในค่าคงที่เฉพะตัวของสารที่เรียกว่า Retardation factor (R_f) value ที่คำนวณได้จากระยะทางที่สารเคลื่อนที่หารด้วยระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ โดยวัฏภาคนิ่งสามารถเตรียมได้จากการเคลือบตัวดูดซับบนแผ่นกระจก แผ่นอะลูมิเนียม หรือแผ่นพลาสติก โดยตัวดูดซับที่นิยมใช้เช่น ซิลิกาเจล อะลูมินา เป็นต้น ซึ่งจะมีการผสมสารเรืองแสงลงในตัวดูดซับเพื่อใช้ตรวจสอบตำแหน่งที่สารเคลื่อนที่ไปบนวัฏภาคนิ่งผ่านการมองภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต (UV light)

12.2. คอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column Chromatography)

คอลัมน์โครมาโตกราฟีมีหลักการเช่นเดียวกับวงโคจรของอิเล็กตรอนในอะตอม แต่บรรจุสารดูดซับลงในคอลัมน์ เพื่อให้เป็นวัฏภาคหนึ่ง จากนั้นจึงเติมสารที่ต้องการแยกลงบนคอลัมน์และผ่านตัวทำละลายที่เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ลงไป โดยวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมจะให้ค่า R_f value ของสารที่ต้องการแยกอยู่ในช่วง 0.2-0.8 ซึ่งการเก็บสารตัวอย่างที่แยกได้จากคอลัมน์มักเก็บแยกเป็นหลอดๆ ที่เรียกว่าส่วนแยก (Fraction) และนำไปตรวจสอบด้วยวงโคจรของอิเล็กตรอนเพื่อหา Fraction ของสารตัวอย่างส่วนที่ต้องการต่อไป

12.3. อินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (Infrared spectroscopy)

อินฟราเรดสเปกโตรสโคปี ใช้ในการตรวจหาหมู่ฟังก์ชันในโครงสร้างสารประกอบอินทรีย์ซึ่งจะดูดกลืนรังสีอินฟราเรดในช่วงที่สัมพันธ์กับการสั่นของพันธะต่างๆ ที่มีโมเมนต์ไดโพล แสดงผลออกมาในรูปของสเปกตรัมในตำแหน่งที่ต่างกันไปตามหมู่ฟังก์ชันที่พบในโครงสร้าง โดยรังสีอินฟราเรดในช่วงความถี่ระหว่าง 700-5,000 ต่อเซนติเมตร (cm^{-1}) จะให้พลังงานประมาณ 2-12 กิโลแคลอรีต่อโมลซึ่งมากพอต่อการทำให้พันธะต่างๆ ในโมเลกุลเกิดการสั่น เช่น การยืดหดของพันธะ (Bond stretching) การโค้งงอของพันธะ (Bond bending) เป็นต้น

12.4. นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy หรือ NMR)

นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปีคือเครื่องมือช่วยพิสูจน์โครงสร้างสารโดยอาศัยการหมุนของนิวเคลียสที่มีประจุและเกิดเป็นสนามแม่เหล็ก เมื่อนิวเคลียสดังกล่าวเคลื่อนที่ผ่านสนามแม่เหล็กกำลังสูงจะเกิดการเรียงตัวขึ้น โดยนิวเคลียสที่มีการเรียงตัวไปในทิศทางเดียวกับสนามแม่เหล็กจะมีพลังงานต่ำกว่านิวเคลียสที่มีการเรียงตัวในทิศทางตรงข้ามกับสนามแม่เหล็กที่ให้เข้าไป และเมื่อให้พลังงานในช่วงคลื่นความถี่วิทยุ (Radiofrequency; rf) จะทำให้เกิดนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์หรือนิวเคลียสที่อยู่ในระดับพลังงานต่ำจะขึ้นไปอยู่ในระดับพลังงานที่สูงกว่า ซึ่งแสดงผลออกมาในรูปของ NMR Spectrum ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพลังงานที่ถูกดูดในนิวเคลียสของสารตัวอย่างกับพลังงานของช่วงคลื่นความถี่วิทยุที่ให้เข้าไป

12.5. แมสสเปกโตรเมทรี (Mass Spectroscopy หรือ MS)

แมสสเปกโตรเมทรีคือเครื่องมือในการหามวลโมเลกุล โดยใช้หลักการเปลี่ยนโมเลกุลเป็นไอออนโดยการยิง (Bombard) อิเล็กตรอนที่มีพลังงานสูง (70 อิเล็กตรอนโวลต์) เข้าไปในโมเลกุล ทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลหลุดออก เกิดเป็นอนุมูลประจุบวก (Cation radical) ซึ่งไม่เสถียรและ

แตกเป็นส่วนเล็กๆ (Fragments) โดยรูปแบบของการแตกเป็นส่วน (Fragmentation pattern) นี้ จะสามารถนำมาใช้ในการพิสูจน์โครงสร้างอย่างคร่าวๆได้เนื่องจากสามารถบอกมวลโมเลกุลของ สารได้จาก Molecular ion (M^+) peak และสามารถบอกประเภทของโครงสร้างสารได้เนื่องจาก สารแต่ละประเภทมีรูปแบบการแตกตัวที่ต่างกัน (49)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย

1.1. คอมพิวเตอร์

1.1.1. Notebook PC, Processor Core(TM) i5-3210M CPU @2.50GHz with 4 GB of RAM ,Microsoft Windows 7 Ultimate

1.1.2. Notebook PC, Processor Core(TM) i5-2450M CPU @2.50GHz with 4 GB of RAM ,Microsoft Windows 7 Ultimate

1.1.3. Notebook PC, Processor Core(TM) i5-5200U CPU @2.20 GHz with 4 GB of RAM ,Microsoft Windows 10

1.2. โปรแกรม

1.2.1. AutoDock 4.0

1.2.2. Cygwin64

1.2.3. ChemDraw Pro12.0

1.2.4. Chem3D Ultra12.0

1.3. เครื่องมือและอุปกรณ์

1.3.1. Glass chromatography column

1.3.2. Magnetic bar

1.3.3. Magnetic stirrer

1.3.4. TLC tank

1.3.5. TLC plates

1.3.6. TLC glass plates

- 1.3.7. Heating magnetic stirrer
- 1.3.8. Infrared spectroscopy (Thermo Spectra-Tech, P/N 700-0085, Ver3.9 10/01, Shelton, USA and APW1200202, Becthai Thailand)
- 1.3.9. Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (400 MHz.)
- 1.3.10. UV lamp (254/365nm 6-Watt 230V 50Hz 0.12Amps, Cambridge, UK)
- 1.3.11. Rotary evaporator (254/365nm, Buchi Thailand Ltd.)

2. สารเคมี

- 2.1. 3,5-Dibromo-2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde (Sigma-Aldrich, USA)
- 2.2. 4-aminopyridine (ACROS, New Jersey, USA)
- 2.3. Hydrogen peroxide (Siribuncha, Thailand)
- 2.4. Sodium sulphate anhydrous crystal (Carlo Erba, Italy)
- 2.5. Sodium chloride (Carlo Erba, Italy)
- 2.6. Methanol (Avanter Performance Materials, USA)
- 2.7. Ethyl acetate (Ajax, New Zealand)
- 2.8. Hexane (Avanter Performance Materials, USA)
- 2.9. Silica gel 1.07734.1000 (Merck, Germany)

3. วิธีดำเนินงานวิจัย

- 3.1. ศึกษาและออกแบบโครงสร้างยาโดยใช้คอมพิวเตอร์
 - 3.1.1. การเตรียมและคัดเลือกโครงสร้างชีวโมเลกุลเป้าหมาย คือ เอนไซม์ Inhibition of **KB** kinase β (IKK β)
 - 1) คัดเลือกและนำโครงสร้างสามมิติของชีวโมเลกุลเป้าหมาย จากข้อมูลการเอ็กซ์เรย์ผลึกสามมิติของเอนไซม์ IKK β (4KIK, <http://www.rscb.org/pdb/>) ที่จับเป็นสารประกอบกับไลแกนด์ที่อยู่ในฐานข้อมูลในรูปแบบ .pdb file มาเตรียมเป็น .pdbqt file เพื่อใช้ในการ Docking

- 2) เตรียมชีวโมเลกุลเป้าหมายให้อยู่ในรูปแบบ .pdbqt file โดยเปิดโครงสร้างชีวโมเลกุลเป้าหมายที่ได้ดาวน์โหลดมาโดยใช้โปรแกรม AutoDock 4.0 ดังนี้
 - (1) กำจัดโมเลกุลไลแกนด์ และน้ำ จากนั้นเติมอะตอมของไฮโดรเจน จากนั้นคำนวณประจุแบบ Gasteiger
 - (2) บันทึกเป็นไฟล์ในนามสกุล .pdbqt
- 3) เตรียมไลแกนด์ให้อยู่ในรูปแบบไฟล์ .pdbqt โดยเปิดโครงสร้างของชีวโมเลกุลเป้าหมายที่ได้ดาวน์โหลดมาโดยใช้โปรแกรม AutoDock 4.0 ลบโมเลกุลอื่นๆ ให้เหลือไว้เพียงเฉพาะไลแกนด์ และเตรียมตามขั้นตอน 3.1.1.2 (1) และ 3.1.1.2 (2)
- 4) Validate เอนไซม์ IKK β เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของชีวโมเลกุลเป้าหมายในการทำ docking โดยใช้โปรแกรม AutoDock 4.0 และ Cygwin ดังนี้
 - (1) เตรียม Grid parameter (การทำ Autogrid)ในรูปแบบ .gpf โดยเลือกชีวโมเลกุลเป้าหมาย ซึ่งเป็นไฟล์ .pdb ที่เตรียมไว้ จากเมนู grid จากนั้นจึงเลือกชนิดของ Grid map ที่ต้องการสร้าง และกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ตามตารางที่ 4 บันทึกเป็นไฟล์ .gpf

ตารางที่ 4 พารามิเตอร์ที่ใช้ในการทำ grid

| | Parameter |
|-----------------------------|------------------|
| Num. grid points in x, y, z | 106, 126, 116 |
| Spacing (A \circ) | 0.511 |
| Grid center | Center to ligand |

- (2) กำหนด Energy grid เพื่อให้ได้ Grid map ซึ่งอยู่ในรูปแบบไฟล์ .glg ในโปรแกรม Cygwin
- (3) เตรียม Docking parameter (การทำ Autodock) ในรูปแบบ .dpf โดยเปิดไฟล์ชีวโมเลกุลเป้าหมาย (IKK β) และไลแกนด์ ซึ่งเป็นไฟล์ .pdbqt file ที่เตรียมไว้จากเมนู docking จากนั้นกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ตามตารางที่ 5 และบันทึกไฟล์เป็น Lamarckian GA

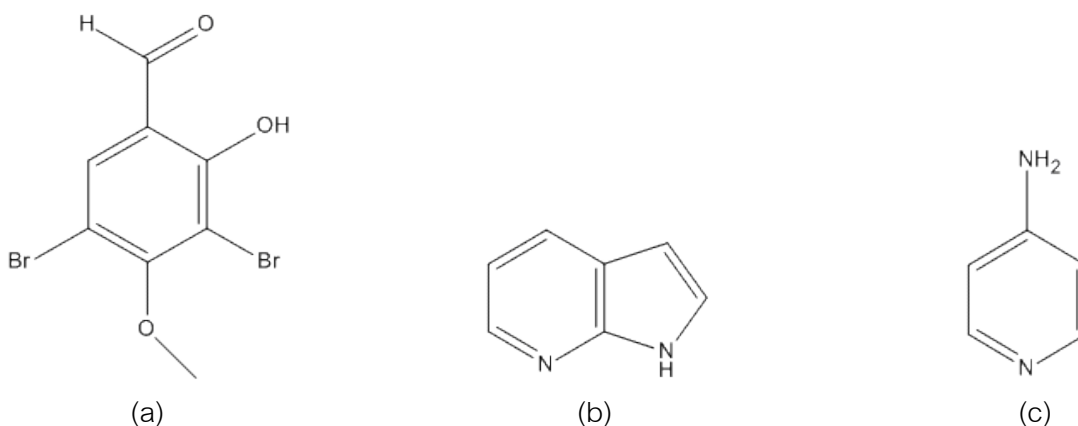
ตารางที่ 5 พารามิเตอร์ที่ใช้ในการทำ docking

| Docking Parameters | |
|--|-----------|
| Number of GA run | 100 |
| Population size | 150 |
| Maximum number of energy evaluations | 2,500,000 |
| Maximum number of generation | 27,000 |
| Maximum number of top individuals that automatically survive | 1 |
| Rate of gene mutation | 0.02 |
| Rate of crossover | 0.8 |
| Mean of Cauchy distribution for gene mutation | 0.0 |
| Variance of Cauchy distribution for gene mutation | 1.0 |
| Number of generation for picking worst individual | 10 |

(4) ทำการ Docking parameter เพื่อให้ได้ไฟล์ .dlg โดย Run docking ใน cygwin และวิเคราะห์ผลที่ได้ จากไฟล์ .dlg

3.1.2. เตรียมไลแกนด์ที่จะใช้ในการ docking

- 1) โครงสร้างที่ออกแบบเป็นสารในกลุ่มเอไมด์ ที่จะประกอบด้วยสารจำพวกแอลดีไฮด์ ทำปฏิกิริยากับ สารจำพวกเอมีน เริ่มต้นด้วยการวาดโครงสร้างของสารที่ออกแบบ จำนวน 1 โครงสร้าง โดยมีโครงสร้างหลักของแอลดีไฮด์ คือ 3,5-Dibromo-2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde ซึ่งมีโครงสร้างหลักคล้ายคลึงกับ (+)-Aeropylsinin-1 และมี side chain ที่เป็น 7-Azaindole โดยวาดโครงสร้าง 2 มิติ ของสารที่ออกแบบด้วยโปรแกรม Chem3D Ultra12.0 หลังจากนั้นทำให้เป็นสามมิติ และจัดโครงสร้างให้อยู่ในมุมที่มีพลังงานต่ำสุด โดยการ Minimize energy ด้วยหลักการ MM2 ที่อยู่ในโปรแกรม Chem3D Ultra12.0 และบันทึกเป็นไฟล์ Protein dat bank (.pdb)



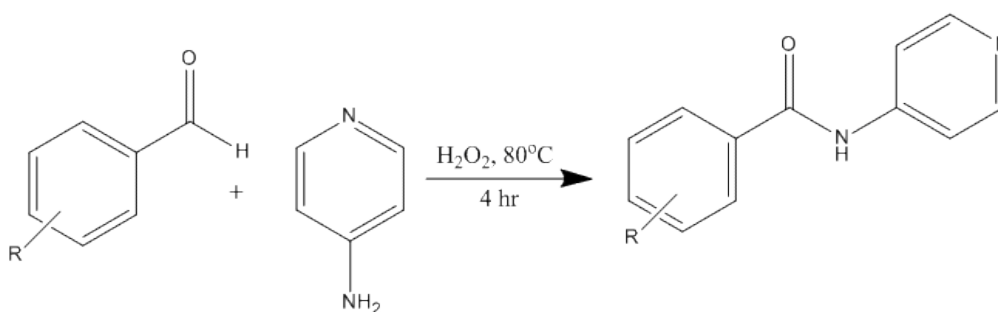
รูปที่ 17 โครงสร้างทางเคมีของ a) 3,5-Dibromo-2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde , b) 7-Azaindole และ c) 4-Aminopyrimidine

2) เปิดโครงสร้างไลแกนดท์ที่เตรียมไว้จาก 3.2.1 โดยใช้โปรแกรม Autodock 4.0 เพื่อทำการ docking โดยเริ่มจากการเตรียมตามขั้นตอนที่ 3.1.1.2 (1) และ 3.1.1.2 (2)

3.1.3. การทำ Docking เพื่อหาแรงในการจับกับเอนไซม์ IKK โดยทำเหมือนขั้นตอนการ Validate และรายงานผลของการศึกษาเป็นค่า Binding energy (ประกอบด้วย Intermolecular energy และ Torsional energy) และ Docking energy (ประกอบด้วย Intermolecular energy และ Internal energy) โดยรายงาน Conformation ที่มี Binding energy และ Docking energy เป็นลบมากที่สุด

3.2. สังเคราะห์อนุพันธ์ของยาที่ได้รับการคัดเลือก

3.2.1. การเชื่อมหมู่แอลดีไฮด์กับหมู่เอมีนได้เป็นสารประกอบเอไมด์ โดยมีแนวคิดดังรูปที่ 18



รูปที่ 18 Amidation reaction ระหว่าง Benzaldehyde และ 4-Aminopyridine (50)

3.2.2. กระบวนการสังเคราะห์สารเคมี

- 1) ชั่ง สาร 3,5-Dibromo-2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde และ 4-Aminopyrimidine อย่างละ 1 มิลลิโมล เทสารใส่ขวดก้นกลม (Round bottom flask)
- 2) ผสม 3,5-Dibromo-2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde และ 4-Aminopyrimidine ใน round bottom flask จากนั้นจึงเติมน้ำ 2 มิลลิลิตร
- 3) เติมตัวเร่งปฏิกิริยา คือ H_2O_2 (3% w/v) 3 Equivalent
- 4) นำ Round bottom flask ไปให้ความร้อนใน Water bath ที่อุณหภูมิ $80^{\circ}C$ จนเกิดปฏิกิริยาที่ 4 ชั่วโมง
- 5) เก็บสารตัวอย่างที่ 0, $\frac{1}{2}$, 1, 2, และ 4 ชั่วโมง เพื่อตรวจการเกิดปฏิกิริยาเคมี
- 6) หาค่า % yield
- 7) ขึ้นเตรียมสารเคมีเพื่อพิสูจน์การเกิดปฏิกิริยาเคมี
 - (1) เตรียมสารตัวอย่าง 4-Aminopyrimidine ผสมกับ Methanol
 - (2) เตรียมสารตัวอย่าง 3,5-Dibromo-2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde ผสมกับ Methanol
 - (3) ดูดสารตัวอย่างจาก Round bottom flask โดยใช้หลอดแคปิลลารี (Capillary)
 - (4) จุด (spot) สารตัวอย่างบนแผ่น TLC โดยกำหนด Starting point ห่างจากขอบล่าง 1 cm และกำหนด Solvent front ให้ห่างจากขอบบน 0.5 cm
- 8) วางแผ่น TLC ในภาชนะแก้วที่บรรจุวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase) โดยวัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วย Methanol: Ethyl acetate: Hexane = 0.5:1:4 เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนขึ้นไปจนเกือบถึงขอบบน จึงนำแผ่น TLC ออก
- 9) จากนั้นนำแผ่น TLC ส่องดูภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่นแสง 254 nm. และ 365 nm. คำนวณหาค่า Rate flow (R_f)

3.3. การแยกสกัดสารด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction)

- 3.3.1. เติม Ethyl acetate 10 ml ลงใน Round bottom flask จากนั้นดูดสารละลายใส่ในกรวยแยก (Separatory funnel) จากนั้นเติมน้ำ 10 ml จำนวน 2 ครั้ง เขย่าเบาเพื่อให้เกิดการดึงสารตามสภาพขั้วให้ไปอยู่ในแต่ละวัฏภาค
- 3.3.2. ไซ้ชั้นน้ำออก
- 3.3.3. แยกสกัดด้วย Brine 10 ml จำนวน 2 ครั้ง เขย่าเบา

- 3.3.4. ไซ้ชั้น Brine ออก
- 3.3.5. กำจัดน้ำโดยการเติม Anhydrous Na_2SO_4 ในกระดาศกรอง จากนั้นเปิด Stopper ให้สารละลายชั้น Ethyl acetate ผ่าน Anhydrous Na_2SO_4 แล้วจึงเก็บสารละลายในขวด Round bottom flask เพื่อที่จะนำไประเหยโดยใช้เครื่อง Rotary Evaporator ก่อนจะนำสารละลายเข้มข้นลงคอลัมน์โครมาโตกราฟี
- 3.3.6. พิสูจน์เอกลักษณ์สารเคมีโดยใช้ TLC จุด (Spot) โดยจะจุดสารตั้งต้น, วัฏภาคน้ำ, และวัฏภาค Ethyl acetate จากนั้นจึงส่องดูภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่นแสง 254 nm. และ 365 nm. คำนวณค่า Rate flow (R_f)
- 3.4. การแยกสารให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี
- 3.4.1. บรรจุซิลิกาเจลลงในคอลัมน์ โดยมีวัฏภาคเคลื่อนที่ Methanol : Ethyl acetate : Hexane = 0.5 : 1 : 4
- 3.4.2. จากนั้นใส่สารตัวอย่างเข้มข้นชั้น Ethyl acetate ลงคอลัมน์ แล้วเปิด Stopper ให้อัตราการไหลเหมาะสม
- 3.4.3. เก็บสารตัวอย่างจากคอลัมน์ โดยใช้การสังเกตสีของสารละลายแต่ละส่วนที่ออกมา และเก็บสารที่แยกออกมาเป็น Fraction
- 3.4.4. พิสูจน์เอกลักษณ์สารเคมีโดยจุด (Spot) สารในแผ่น TLC ส่องดูภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่นแสง 254 nm. และ 365 nm. จากนั้นจึงคำนวณหาค่า Rate flow (R_f)
- 3.4.5. นำ fraction ของสารที่มีค่า R_f value เท่ากันมารวมกัน แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง Rotary Evaporator
- 3.4.6. เก็บสารตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์
- 3.5. พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่สังเคราะห์ได้โดยใช้เครื่องมือต่างๆ ดังนี้
- 3.5.1. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) ใช้หาสูตรโครงสร้าง
- 3.5.2. Infrared Spectroscopy (IR) หาหมู่ฟังก์ชันในโครงสร้างเคมี
- 3.5.3. Mass Spectrometer (MS) เพื่อหา Molecular weight ของ Product ที่สังเคราะห์ได้

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. Lead Identification

จากการสืบค้นข้อมูลเพื่อเป็นสารต้นแบบในการออกแบบยาใหม่ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งผ่าน IKK kinase beta (IKK- β) พบว่าสาร Aeroplysinin-1 ที่สกัดจาก *Pseudocercaria purpurea* ซึ่งเป็นพองน้ำที่พบบริเวณภาคใต้ของประเทศไทย เป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งและอีกสารหนึ่งคือ Fluorosalan ซึ่งเป็นสารที่มีการนำมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้ง Nf-kB pathway ผ่านการยับยั้งการเกิด I κ B alpha phosphorylation โดยรายงานค่า IC₅₀ เท่ากับ 3.2 μ M เมื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างของ Fluorosalan แล้ว พบว่า Fluorosalan มีส่วนโครงสร้างที่คล้ายกับอนุพันธ์ของ Aeroplysinin-1 ที่ใช้เป็นสารต้นแบบ จึงนำสองสารมาใช้เป็นสารต้นแบบของงานวิจัยนี้

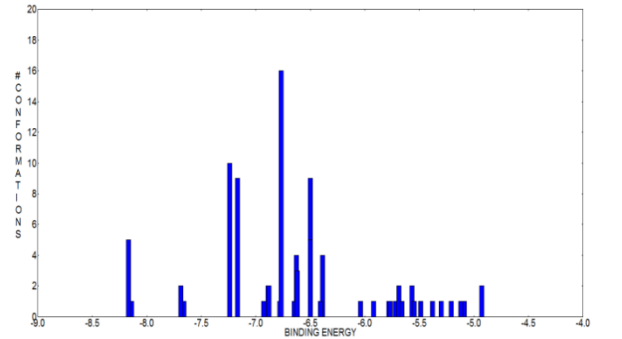
2. Computer-Aided Drug Design

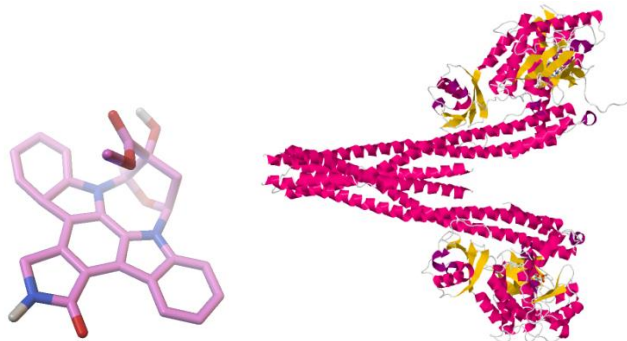
2.1. Validation of Target Molecule

การศึกษาโดยใช้คอมพิวเตอร์ช่วยในการออกแบบ โดยเริ่มจากการเตรียมชีวโมเลกุลเป้าหมาย 4KIK จากผลึก 4KIK ในรูปของ Ligand-enzyme complex โดยนำ ligand ออกจาก complex จากนั้นตรวจสอบความถูกต้อง (validation) โดยการนำ ligand กลับเข้าไป docking ใหม่ ซึ่ง ligand ที่ใช้คือ K_25A นำผลการ docking ที่มีการจัดกลุ่มในรูปคลัสเตอร์ซึ่งในแต่ละคลัสเตอร์จะประกอบด้วยโครงสร้างที่มีรูปร่าง 3 มิติเหมือนกัน (RMSD < 2Å) จะได้ผลดังตารางที่ 6 จากผลการ Validate พบว่า IKK- β ที่เตรียมจากผลึกหัตถ์ 4KIK ได้กลุ่มคลัสเตอร์สูงสุดมีจำนวนสมาชิก 16% และพบว่าโครงสร้าง 3 มิติของสมาชิกในคลัสเตอร์สูงสุดที่ได้จากการ docking แตกต่างจากโครงสร้าง 3 มิติของ ligand ที่อยู่ในผลึก (Crystal pose) โดยมีค่า RMSD เท่ากับ 0.43 จึงเลือกใช้

โครงสร้างผลึกเอนไซม์ IKK kinase beta ที่เตรียมจากผลึกกรหัด 4KIK เป็นต้นแบบในการ ออกแบบสารด้วยคอมพิวเตอร์

ตารางที่ 6 การ Validate เอนไซม์ IKK kinase beta (IKK- β)

| PDB Code | Cluster | Binding Energy (Kcal/mol) | % สมาชิก ใน cluster สูงสุด | RMSD (A°) |
|----------|--|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 4KIK |  | -6.77 | 16 | 0.43 |



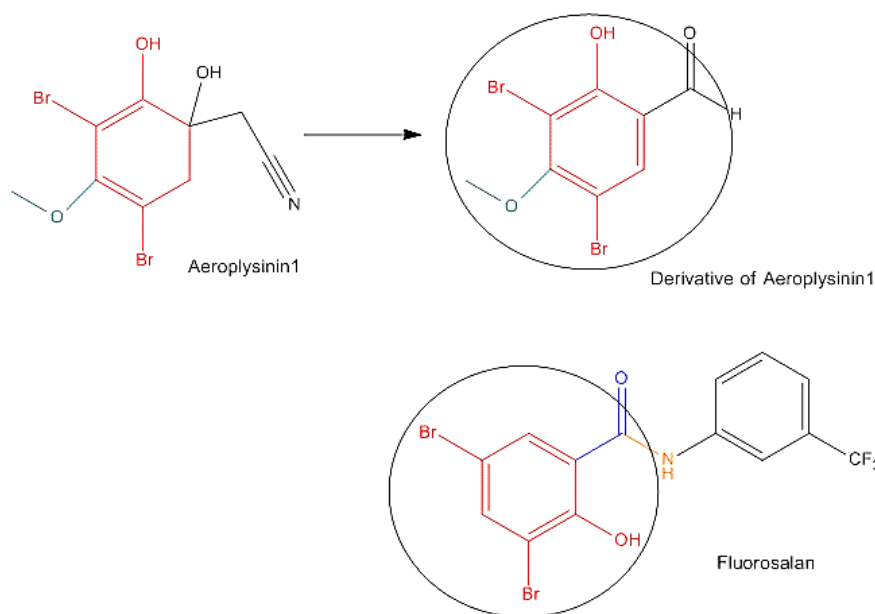
รูปที่ 19 โครงสร้างชีวโมเลกุลเป้าหมาย IKK- β จากการเอ็กซ์เรย์ผลึกของเอนไซม์ IKK- β ที่จับเป็น Ligand-enzyme complex โดยใช้ผลึกกรหัด 4KIK และ ligand: K_252A

2.2. Design of Target Compound

ผู้วิจัยจึงได้ออกแบบโครงสร้างโดยการนำส่วนโครงสร้างที่มีสัมพันธ์กับการออกฤทธิ์ของสาร ต้นแบบ Aeropylsinin-1, Fluorosalan และ 7-Azaindole

จากการพัฒนาฤทธิ์ของ Aeropylsini-1 (13) จนได้เป็นอนุพันธ์ที่มีหมู่แอลดีไฮด์ในโครงสร้าง ดังรูปที่ 20 จะเห็นว่าโครงสร้างของอนุพันธ์ Aeropylsinin-1 นี้จะมีส่วนที่ใกล้เคียงกับส่วนของ

โครงสร้าง Fluorosalan และ Aeroplysinin-1 (Structure similarity) และจากการที่สารทั้งสองมีการรายงานในการออกฤทธิ์ผ่านการยับยั้งเอนไซม์ IKB kinase ผู้วิจัยจึงนำส่วนของโครงสร้างดังกล่าวมาเป็นส่วนหนึ่งของสารที่ออกแบบใหม่ โดยปรับเปลี่ยนโครงสร้างในส่วนของ Trifluoroaniline ใน Fluorosalan ให้จับกับเอนไซม์ได้ดีขึ้น

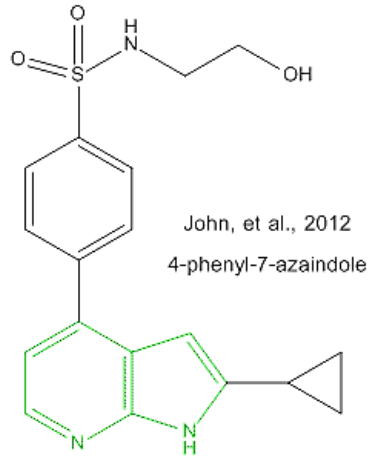


รูปที่ 20 แสดงความเหมือนกันของโครงสร้าง(Structure similarity); Fluorosalan และอนุพันธ์ของ Aeroplysinin-1

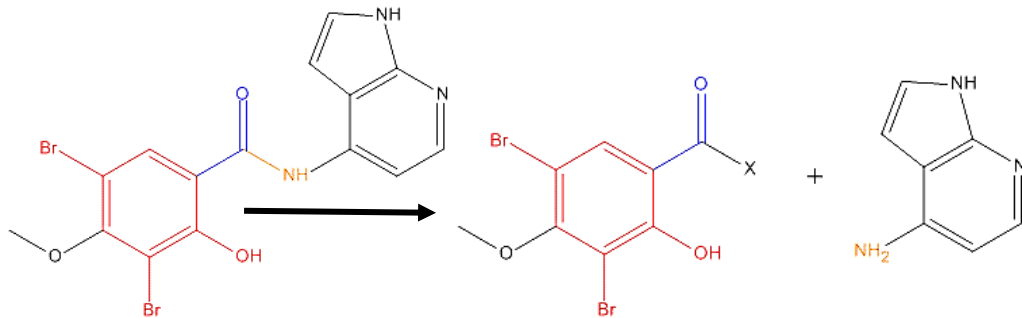
จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าการจับด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างเอนไซม์ IKB kinase beta โดยโครงสร้าง 7-Azaindole จากโครงสร้างดังรูปที่ 21 ซึ่งมีไนโตรเจนตำแหน่ง 7 ของ 7-Azaindole ในโครงสร้างจะสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจน โดยมีคุณสมบัติเป็น H-accepter และไนโตรเจนตำแหน่ง 1 มีคุณสมบัติเป็นได้ทั้ง H-accepter และโปรตอนตำแหน่งเดียวกัน จะทำหน้าที่เป็น H-donor จากการศึกษารายการออกฤทธิ์ที่เอนไซม์ พบว่าเกิดพันธะไฮโดรเจนที่ตำแหน่ง CYS99 (18) ด้วยเหตุนี้จึงนำส่วนของ 7-Azaindole มาเป็นส่วนที่ต่อกับอนุพันธ์ของ Aeroplysinin-1 ได้โครงสร้าง Design1 เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างที่ออกแบบจะเห็นว่าสารมีพันธะไฮโดรเจนโมเลกุลซึ่งสามารถสังเคราะห์ได้จาก Amidation reaction ระหว่าง Benzaldehyde หรือ Carboxylic acid หรือ Benzoyl chloride กับ Amine

ดังนั้นสารที่ออกแบบจึงสามารถสังเคราะห์ได้จาก methoxybenzaldehyde และ 7-Azaindole ดังรูปที่ 22

3,5-Dibromo-2-hydroxyl-4-

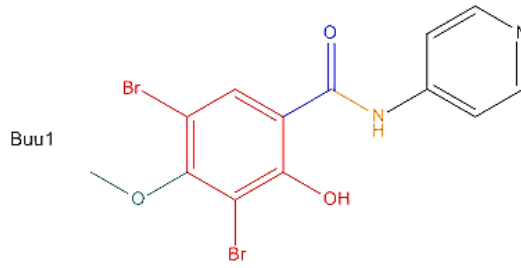


รูปที่ 21 โครงสร้าง 4-Phenyl-7-azaindole

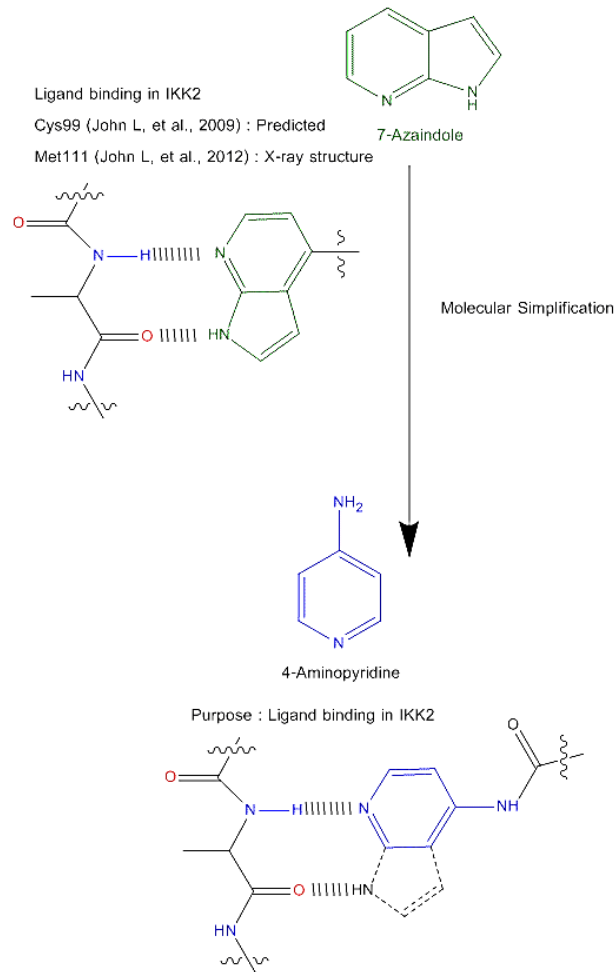


รูปที่ 22 Retro-synthesis ของ Design compound : Design1

เนื่องจาก 7-azaindole ในโครงสร้าง 4-Phenyl-7-azaindole พบรายงานการจับกับ เอนไซม์ IKB kinase beta โดยใช้ไนโตรเจนตำแหน่งที่ 7 ซึ่งเป็น H-acceptor ที่อยู่บนวง Pyridine ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ออกแบบและปรับปรุงโครงสร้างของสารใหม่โดยใช้หลักการของ Molecular Simplification ทำให้ได้โครงสร้างสารใหม่คือ Buu1 ดังรูปที่ 23 ซึ่งส่วนของ 7-Azaindole จะเหลือเพียงวง Pyridine โดยไนโตรเจนของ Pyridine คาดว่าจะเป็นตัวเกิดพันธะไฮโดรเจนกับเอนไซม์ เหมือนกับสารตั้งต้น ดังรูปที่ 24



รูปที่ 23 Design compound : Buu1



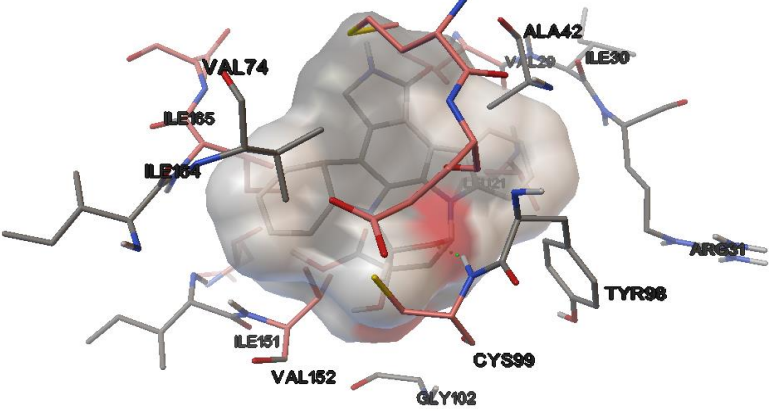
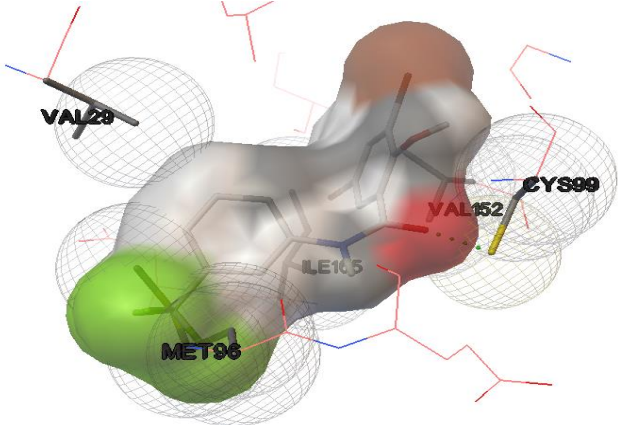
รูปที่ 24 การออกแบบด้วย Molecular Simplification จากโครงสร้าง 7-Azaindole เป็น 4-Aminopyridine

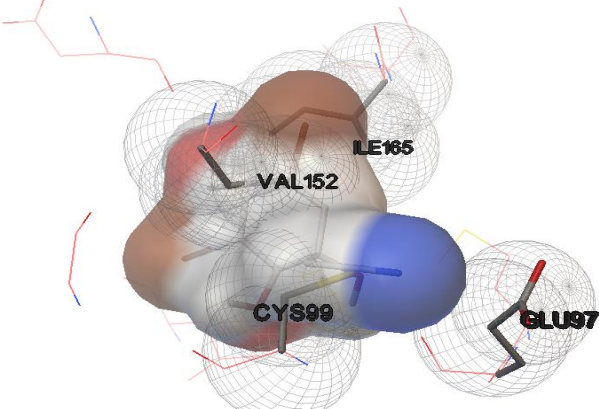
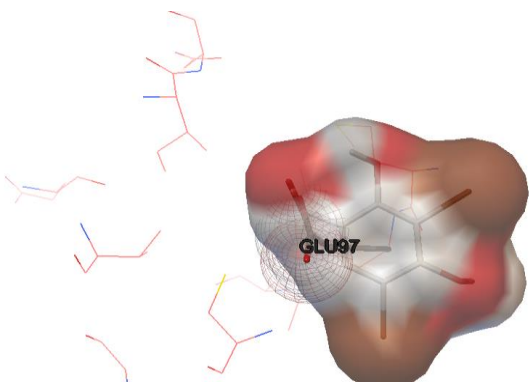
ผลจากการศึกษาการออกแบบสารใหม่โดยใช้คอมพิวเตอร์เข้าช่วยได้ผลการศึกษา
 แสดงไว้ในตารางที่ 7 โดยโครงสร้าง 3,5-Dibromo-2-hydroxyl-4-methoxybenzaldehyde
 และต่อกับโครงสร้าง 4-Amino-7-azaindole ด้วยพันธะเอไมด์ ซึ่งเมื่อนำไป Docking ผลที่ได้

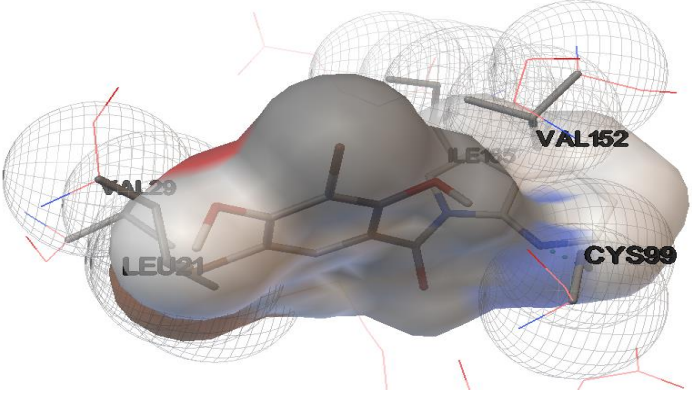
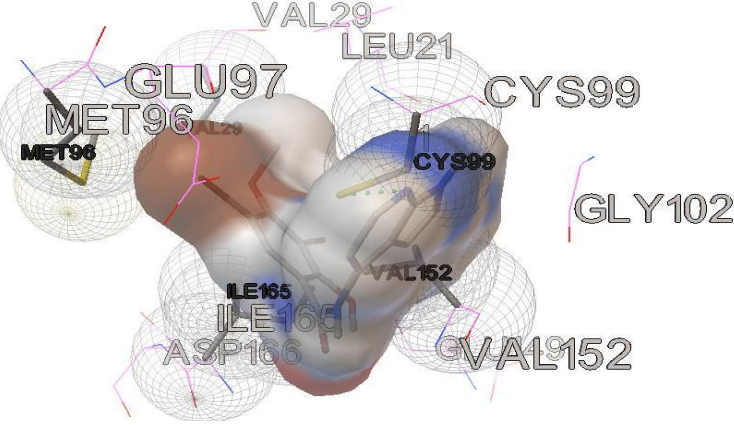
ของ Conformation ที่จับบริเวณ Active site โดยเกิดพันธะไฮโดรเจนที่ตำแหน่งกรดอะมิโน CYS99 ได้ค่า IC_{50} เท่ากับ 57.08 μM และค่าแรงในการจับเท่ากับ -5.79 Kcal/mol

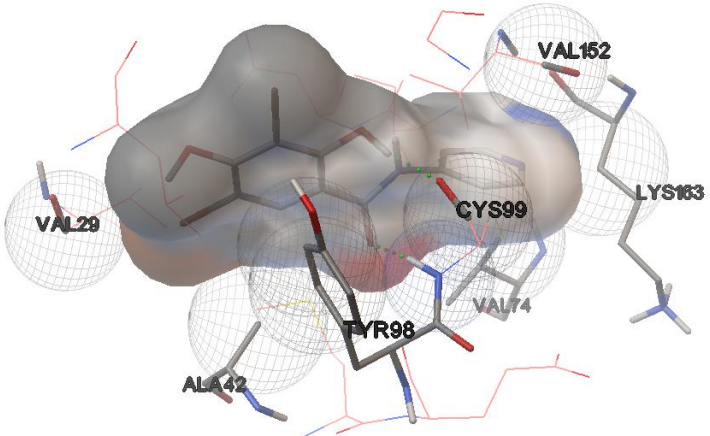
จากที่คาดการณ์ว่าไนโตรเจนในวง Pyridine จะสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนที่ตำแหน่งกรดอะมิโน CYS99 เช่นเดียวกับโครงสร้างที่ต่อกับ 4-Amino-7-azaindole จากนั้นเมื่อทำการ Docking พบว่า ค่า IC_{50} เท่ากับ 32.51 μM และค่าแรงในการจับเท่ากับ -6.12 Kcal/mol ซึ่งค่าแรงในการจับและ IC_{50} ของ Buu1 มากกว่า Design1 ดังนั้นจึงเลือกสาร Buu1 ซึ่งเป็นสารใหม่ที่ประกอบด้วย 3,5-Dibromo-2-hydroxyl-3-methoxybenzaldehyde ที่ต่อกับ 4-Aminopyridine มาสังเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 7 ผลของ Conformation ที่เกิด Interaction บริเวณ Active site

| Compound | Order Conformation | Docked pose | BE | Ki | Bonding |
|-------------|--------------------|---|-------|-------|------------------|
| K_252A | 10 |  | -7.24 | 4.93 | 1 H-Bond (CYS99) |
| Fluorosalan | 46 |  | -5.67 | 70.18 | 1 H-Bond (CYS99) |

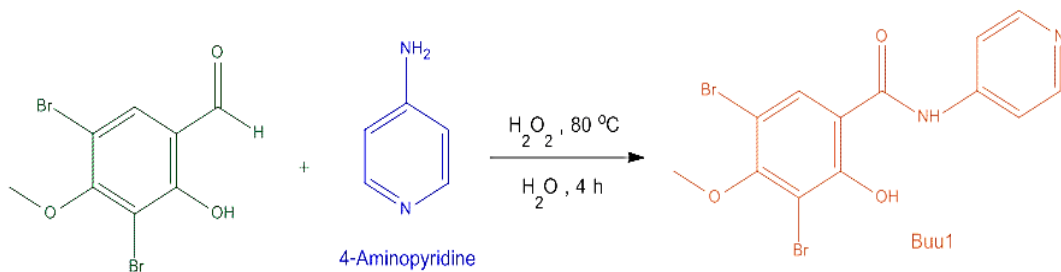
| Compound | Order Conformation | Docked pose | BE | Ki | Bonding |
|--|--------------------|---|-------|--------|---------------------|
| Aeropylinin | 57 |  | -5.21 | 152.96 | closely interaction |
| 3,5-Dibromo-2-hydroxyl-4-methoxybenzaldehyde | 66 |  | -4.57 | 447.6 | closely interaction |

| Compound | Order Conformation | Docked pose | BE | Ki | Bonding |
|-------------------------------|--------------------|---|-------|-------|------------------|
| 7-Azaindole | 37 |  | -6.70 | 12.17 | 1 H-Bond (CYS99) |
| 4-Amino-7-Azaindole (Design1) | 42 |  | -5.79 | 57.08 | 1 H-Bond (CYS99) |

| Compound | Order Conformation | Docked pose | BE | Ki | Bonding |
|-------------------------------|-----------------------|--|-------|-------|---------------------|
| 4- Aminopyridine (Buu1) | 30 |  | -6.12 | 32.51 | 1 H-Bond (CYS99) |

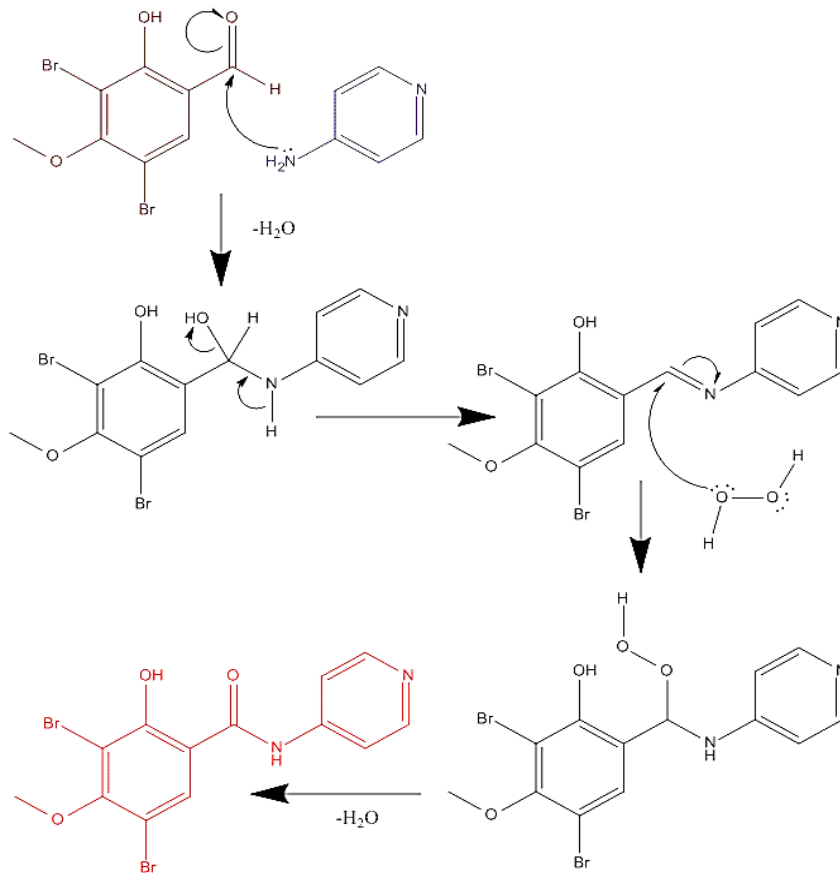
3. การสังเคราะห์โครงสร้างสาร Buu1

การสังเคราะห์สาร Buu1 เป็นการสังเคราะห์แบบ One-step reaction ซึ่งเป็นการสังเคราะห์ที่ประหยัดเวลาเนื่องจากผ่านเพียงปฏิกิริยาเดียว ใช้สารน้อยกว่า Multi-step reaction โดยปฏิกิริยาที่ใช้ในการสังเคราะห์สารประกอบเอไมด์ คือปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยเป็นปฏิกิริยาดังรูป 25 ระหว่างสารตั้งต้นที่เป็นสารกลุ่มแอลดีไฮด์และเอมีน โดยคาดว่ามีการเกิดปฏิกิริยาเคมีดังรูปที่ 26 การเกิดปฏิกิริยาเคมีได้ติดตามการดำเนินไปของปฏิกิริยา โดยการทดสอบด้วย TLC ที่เวลา 0, ½, 1, 3, 4, และ 6 ตามลำดับ พบว่าเงื่อนไขที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาใช้เวลาประมาณ 4 ชั่วโมง สามารถเพียงพอในการเกิดปฏิกิริยาและไม่เพิ่ม Yield มากไปกว่าเดิม จึงใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 4 ชั่วโมงเป็นเกณฑ์ที่ใช้ในการสังเคราะห์สาร โดยพิจารณาตามลักษณะทางกายภาพของสารที่เกิดขึ้นเป็นสารลักษณะ Viscous semisolid สีน้ำตาลเข้ม ร่วมกับข้อมูลที่ได้จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า การเกิดปฏิกิริยาที่นานขึ้นมากกว่า 4 ชั่วโมงก็ไม่ได้ %yield ที่ไม่แตกต่างเมื่อเทียบกับเวลา 4 ชั่วโมง (50)



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

รูปที่ 25 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ Buu1



รูปที่ 26 กลไกการเกิดปฏิกิริยาเคมีในการสังเคราะห์ Buu1 ระหว่างสารตั้งต้น 3,5-Dibromo-2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde กับ 4-Aminopyridine

4. TLC Suitable System

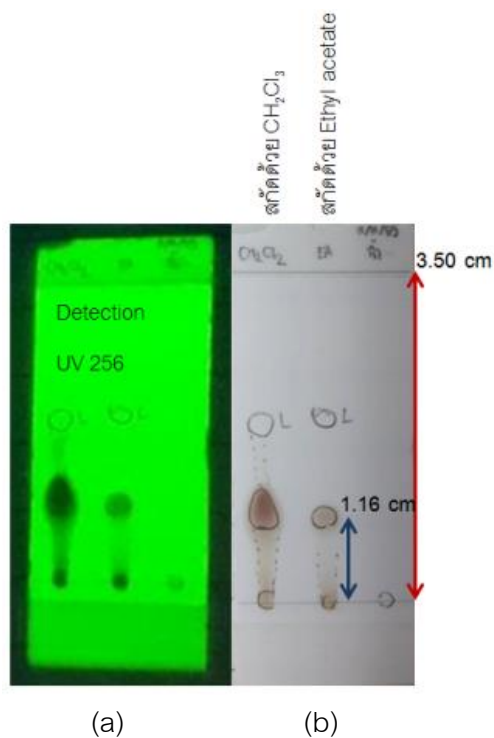
จากการสังเคราะห์ในปฏิกิริยา Amidation ดังกล่าวได้ผลผลิตที่เป็นของแข็งกึ่งเหลวสีน้ำตาล จะทำการตรวจสอบสารที่ทำปฏิกิริยาออกจากกัน โดยใช้ TLC ในการตรวจสอบ ซึ่งได้ทดลองโดย คีทจา ระบบ TLC system จำนวน 5 ระบบ แสดงดังตารางที่ 8 พบว่าระบบที่สามารถแยกสาร ออกมาได้ดีที่สุด คือ Methanol : Ethyl acetate : Hexane = 0.5 : 1 : 4 ผลที่ได้คือ เกิดสารจุด เดียว มีค่า R_f เท่ากับ 0.33 ดังรูปที่ 26

ตารางที่ 8 แสดงค่า R_f ของ 4-aminopyridine

| TLC system | | R_f (A)‡,† | R_f (B)‡ | R_f (C)‡ | หมายเหตุ |
|------------|---|--------------|------------|------------|----------|
| 1 | Ethyl acetate: Petroleum ether (5:1) | 0.43 | 0 | 0.11 | - |
| 2 | Methanol: Ethyl acetate: Hexane (0.5:1:4) | 0.60 | | 0.33 | - |
| 3 | Methanol: Ethyl acetate: Hexane (1:1:4) | 0.54 | | 0.23 | Tail |
| 4 | Methanol: Ethyl acetate: Hexane (2:1:4) | N/S | | 0.50 | Tail |
| 5 | Methanol: Ethyl acetate: Hexane (1:1:3) | 0.58 | | 0.31 | Tail |

‡Detection: 254 nm, †Detection: 356 nm

A: 3,5-Dibromo-2-hydroxyl-4-methoxybenzaldehyde, B: 4-Aminopyridine, C: Product



รูปที่ 27 การแยกสารโดยใช้ TLC TLC system (Methanol: Ethyl acetate: Hexane 0.5: 1: 4):

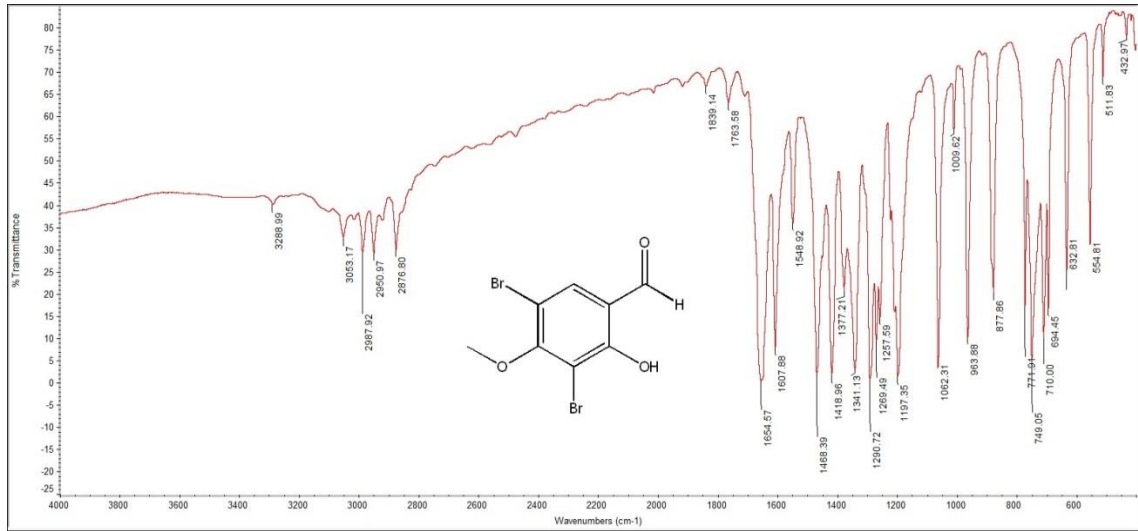
a) Detection UV254, b) R_f Value of Product

5. Purification

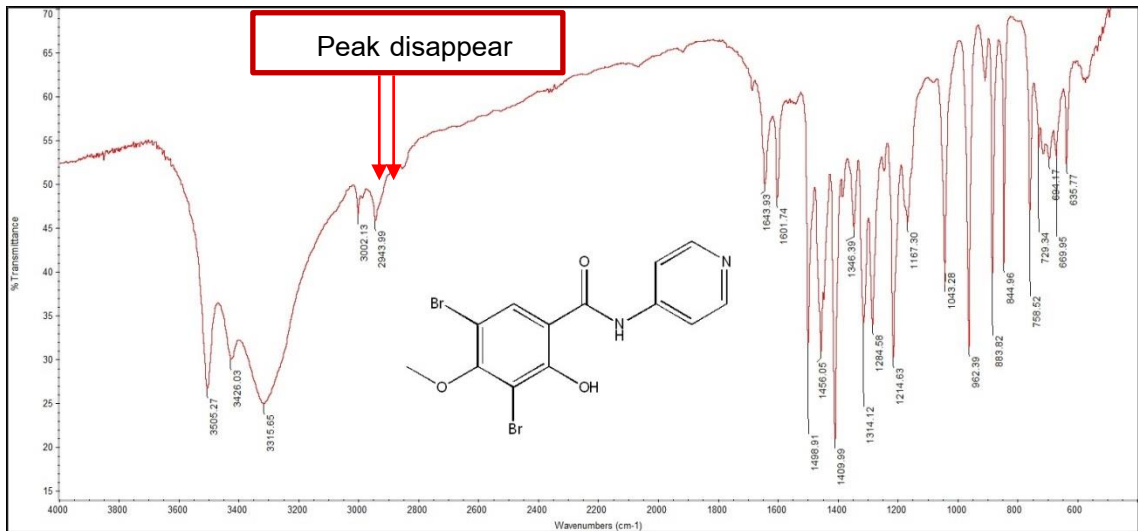
หลังจากทำการสกัดสารสังเคราะห์และระเหยเอาตัวทำละลายออกไปแล้ว จากนั้นจึงทำการแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธี Column chromatography โดยใช้ System Methanol: Ethyl acetate: Hexane (0.5:1:4) เป็นสารชะออก (Eluent) และนำ Fraction ที่เก็บมาตรวจด้วย TLC พบจุดขึ้นตำแหน่ง R_f ที่ 0.33 ซึ่งเป็นจุดเดียวกับที่พบในการเกิดปฏิกิริยาแต่เนื่องจากการทำ Column chromatography พบว่าได้สารที่ต้องการปริมาณน้อย และมีการปนเปื้อนของสารตัวอื่นในปฏิกิริยา จึงเปลี่ยนวิธีการแยกสารโดยใช้วิธี Preparation Thin layer chromatography ทำให้จะได้สารที่ไม่มีการปนเปื้อนของสารตั้งต้น 3,5-Dibromo-2-hydroxyl-4-methoxybenzaldehyde โดยจากการศึกษาผลผลิตที่สังเคราะห์ได้มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองเข้ม หนัก 48 mg

6. Identification of Target Compound โดยเครื่องมือ NMR IR และ MS

จากปฏิกิริยาระหว่าง 3,5-Dibromo-2-hydroxyl-4-methoxybenzaldehyde และ 4-Aminopyridine ได้สารประกอบเอไมด์จากนั้นนำสารใหม่มาทำการแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย Infrared spectroscopy ซึ่ง Peak ที่เราสนใจคือการดูการเปลี่ยนแปลงของตำแหน่ง C-H stretching (Aldehyde) ซึ่งขึ้น 2 Peaks ที่ตำแหน่งที่ $2876.80, 2950.97 \text{ cm}^{-1}$ ใน Infrared Spectrum ของ 3,5-Dibromo-2-hydroxyl-4-methoxybenzaldehyde และเมื่อตรวจ Infrared Spectrum ของ Buu1 ไม่พบตำแหน่ง C-H stretching (Aldehyde) จึงแสดงว่าสารตั้งต้น 3,5-Dibromo-2-hydroxyl-4-methoxybenzaldehyde เปลี่ยนจากสารประกอบแอลดีไฮด์เป็นสารประกอบเอไมด์ โดยแสดงดังรูปที่ 27 และ 28

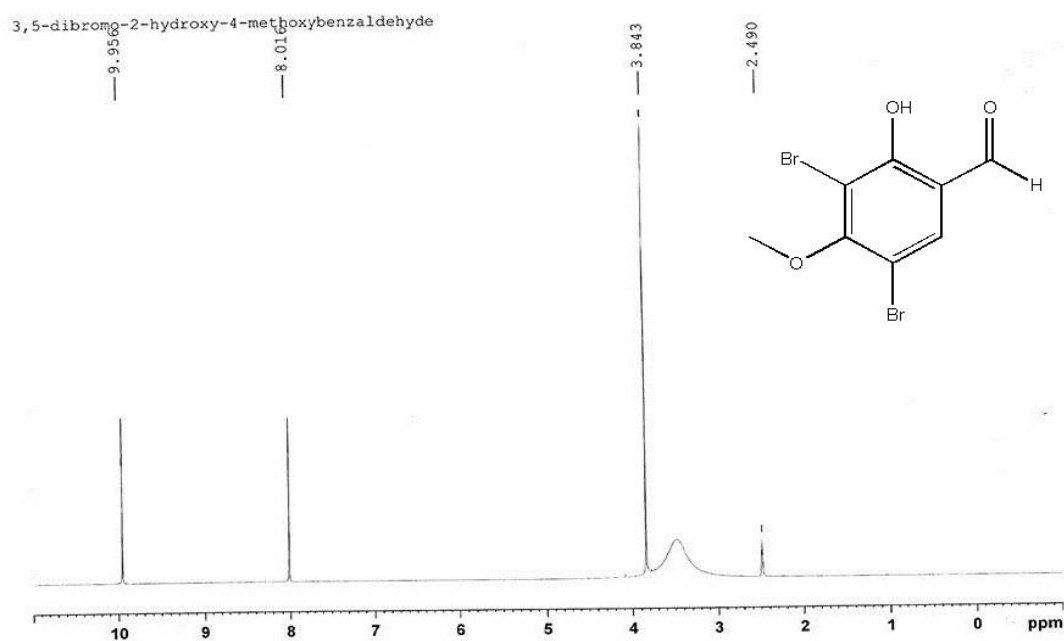


รูปที่ 28 Infrared Spectrum (cm^{-1}) ของ 3,5-Dibromo-2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde พบตำแหน่ง Peak: C-H Aldehyde 2 peak ที่ 2876.80, 2950.97; =C-H Aromatic ที่ 3053.17; C-H Aliphatic ที่ 2987.92; C=O ที่ 1654.57; C=C aromatic ที่ 1468.39, 1548.92, 1607.88; C-Br at 500-600

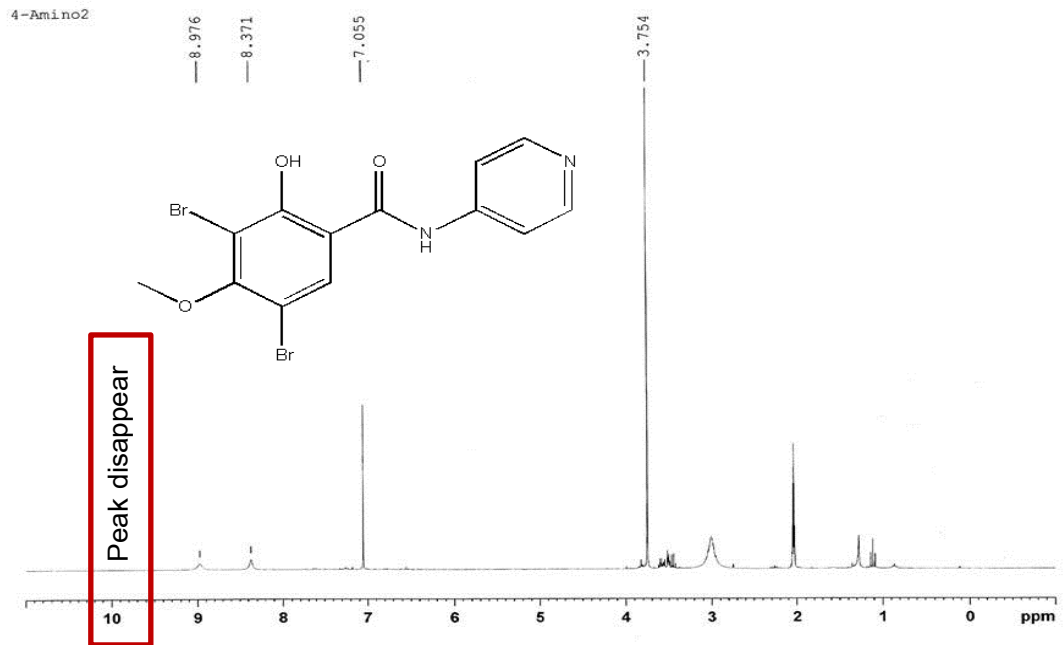


รูปที่ 29 Infrared Spectrum (cm^{-1}) ของ Buu1 พบตำแหน่ง Peak: =C-H Aromatic ที่ 3053.17; C-H Aliphatic ที่ 2987.92; C=O ที่ 1654.57; C=C aromatic ที่ 1468.39, 1548.92, 1607.88; C-Br at 500-600

จากการเปรียบเทียบสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของ 3,5-Dibromo-2-hydroxyl-4-methoxybenzaldehyde และ Buu1 จะเห็นว่าสเปกตรัมที่ตำแหน่ง 10 ppm ซึ่งเป็นตำแหน่ง Peak ของ H-Aldehyde จะหายไป $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสาร 3,5-Dibromo-2-hydroxyl-4-methoxybenzaldehyde แต่ไม่เกิด Peak ดังกล่าวขึ้นใน $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของ Buu1 แสดงว่าสารประกอบที่เกิดขึ้นมีการเปลี่ยนจากสารประกอบแอลดีไฮด์เป็นสารประกอบเอไมด์ โดยแสดงดังรูปที่ 30 และ 31



รูปที่ 30 $^1\text{H-NMR}$ Spectrum (ppm) ของ 3,5-Dibromo-2-hydroxyl-4-methoxybenzaldehyde



รูปที่ 31 $^1\text{H-NMR}$ Spectrum (ppm) ของ Buu1

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้ ผู้ทำงานวิจัยได้ทำการออกแบบและพัฒนายาต้านมะเร็ง โดยเริ่มด้วยการคัดเลือก Lead compound ซึ่งได้แก่อนุพันธ์ของ Aeropylsinin-1 และ Fluorosalan มาเป็นสารต้นแบบ โดยมีเป้าหมายในการออกฤทธิ์ที่เอนไซม์ IKK kinase beta (IKK- β) ซึ่งผู้วิจัยได้ออกแบบสารใหม่โดยใช้กระบวนการทางคอมพิวเตอร์ช่วย (Computer-aided drug design) โดยพิจารณาจากค่าแรงในการจับ (Binding energy) ระหว่างสารที่ออกแบบใหม่ (Buu1) กับโครงสร้างผลึกของเอนไซม์ IKK- β (รหัสผลึก 4KIK) แล้วนำค่า Binding energy นี้ไปเปรียบเทียบกับค่า Binding energy ของสารที่มีการรายงานไว้ก่อนหน้านี้ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง พบว่าสาร Buu1 มีค่า Binding energy เท่ากับ -6.12 Kcal/mol และค่า IC_{50} เท่ากับ 32.51 μ M ดังนั้นจึงเลือกสังเคราะห์โครงสร้าง Buu1 ด้วยปฏิกิริยา Amidation แบบ One-step synthesis โดยใช้ 3,5-Dibromo-2-hydroxyl-4-methoxybenzaldehyde และ 4-Aminopyridine เป็นสารตั้งต้น และใช้ Hydrogen peroxide เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

จากนั้นนำสารที่สังเคราะห์ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Column Chromatography และ Preparation Thin Layer Chromatography โดยระบบที่ใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่คือ Methanol: Ethyl acetate: Hexane ในอัตราส่วน 0.5:1:4 ซึ่งใช้เป็นสารชะออก เมื่อได้สารที่บริสุทธิ์จึงนำไปพิสูจน์โครงสร้างของสารใหม่ด้วย Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy พบว่า peak ที่เป็นตำแหน่งของ H-Aldehyde ที่ 10 ppm หายไปและปรากฏ peak ของหมู่ฟังก์ชัน Methoxy และ Aromatic และผลจาก Infrared Spectroscopy พบว่า peak ที่เป็นของตำแหน่ง H-C aldehyde ที่ตำแหน่ง 2876.80, 2950.97 cm^{-1} ไม่ปรากฏ Peak ใน IR Spectrum ของสารสังเคราะห์ Buu1 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารที่สังเคราะห์ได้เป็นไปตามที่ได้ออกแบบไว้

ข้อเสนอแนะ

1. ควรส่งวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารด้วยเครื่อง Mass spectrometer เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ของโครงสร้าง Buu1
2. ควรมีการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเพื่อเปรียบเทียบกับค่าที่แสดงจากโปรแกรมคอมพิวเตอร์
3. ควรมีการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมที่ให้ % yield สูงที่สุด

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ กระทรวงสาธารณสุข. สถิติสาธารณสุข พ.ศ.2557: Public Health Statistics 2014. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก; 2558.
2. Hu Y, Chen J, Hu G, Yu J, Zhu X, Lin Y, et al. Statistical Research on the Bioactivity of New Marine Natural Products Discovered during the 28 Years from 1985 to 2012. *Marine Drugs* 2015;13:202-21.
3. Sawadogo WR, Boly R, Cerella C, Teiten MH, Dicato M, Diederich M. A Survey of Marine Natural Compounds and Their Derivatives with Anti-Cancer Activity Reported in 2012. *Molecules*. 2015;20:7097-142.
4. Ivanova E, Kuznetsova T, Mikhailov V. Antifungal compounds produced by bacterial populations of the Sea Sponge *Verongia* sp. *Russ J Mar Biol*. 2000;26(2):118-9.
5. คมสัน หงษ์ทศศิริ, สุเมตต์ ปุจฉาการ. ความหลากหลายทางชนิดของฟองน้ำชั้น Demospongiae บริเวณเกาะโลซิน จังหวัดปัตตานี. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48; 2553; กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์;สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา;กระทรวงศึกษาธิการ;กระทรวงเกษตรและสหกรณ์;กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี;กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม;กระทรวงเทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร;สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ;สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย; 2553.
6. สุเมตต์ ปุจฉาการ. ความหลากหลายทางชนิดของฟองน้ำทะเลบริเวณหมู่เกาะทะเลใต้ จังหวัดนครศรีธรรมราช การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 53; 2558; กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์;สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา;กระทรวงศึกษาธิการ;กระทรวงเกษตรและสหกรณ์;กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี;กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม;กระทรวงเทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร;สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ;สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย; 2558.
7. คมสัน หงษ์ทศศิริ, นิษฐกานต์ เหมินทร์, ปิยะวัฒน์ สุจิระชาติ. ความหลากหลายทางชนิดของฟองน้ำทะเลบริเวณหมู่เกาะกระ จังหวัดนครศรีธรรมราช. การประชุมวิชาการของ

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49; 2554; กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์;สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา;กระทรวงศึกษาธิการ;กระทรวงเกษตรและสหกรณ์;กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี;กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม;กระทรวงเทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร;สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ;สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.; 2554.

8. García-Vilas JA, Martínez-Poveda B, Quesada AR, Medina MÁ. Aeroplysinin-1, a Sponge-Derived Multi-Targeted Bioactive Marine Drug. *Mar Drugs*. 2016;14(1):1-12.
9. Galeano E, Thomas OP, Robledo S, Munoz D, Martinez A. Antiparasitic Bromotyrosine Derivatives from the Marine Sponge *Verongula rigida*. *Mar Drugs*. 2011;9:1902-13.
10. Teeyapant R, Woerdenbag H, 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.
11. Martínez-Poveda B, García-Vilas JA, Cardenas C, Melgarejo E, Quesada AR, Medina MA. The Brominated Compound Aeroplysinin-1 Inhibits Proliferation and the Expression of Key ProInflammatory Molecules in Human Endothelial and Monocyte Cells. *PLoS One*. 2013;8(1):e55203.
12. Martínez-Poveda B, Rodríguez-Nieto S, García-Caballero M, Medina M, Quesada A. The antiangiogenic compound aeroplysinin-1 induces apoptosis in endothelial cells by activating the mitochondrial pathway. *Mar Drugs*. 2012;10(9):2033-46.
13. Córdoba R, Tormo N, Medarde A, Plumet J. Antiangiogenic versus cytotoxic activity in analogues of aeroplysinin-1. *Bioorg Med Chem*. 2007;15(15):5300-15.
14. Su JH, Chen YC, El-Shazly M, Du YC, Su CW, Tsao CW, et al. Towards the Small and the Beautiful: A Small Dibromotyrosine Derivative from *Pseudoceratina* sp. Sponge Exhibits Potent Apoptotic Effect through Targeting IKK/NF- κ B Signaling Pathway *Mar Drugs*. 2013;11:3168-85.
15. Mol T. COMPOUND LIBRARIES 2016-2017. In: Corp. TM, editor. Boston2016.

16. Miller SC, Huang R, Sakamuru S, Shukla SJ, AtteneRamos MS, Shinn P, et al. Identification of Known Drugs that Act as Inhibitors of NF- κ B Signaling and their Mechanism of Action. *Biochem Pharmacol.* 2010;79(9):1272-80.
17. Liddlea J, Bamborougha P, Barkera MD, Camposa S, Chunga C-W, Cousinsa RPC, et al. 4-Phenyl-7-azaindoles as potent, selective and bioavailable IKK2 inhibitors demonstrating good in vivo efficacy. *Bioorg Med Chem Lett.* 2012;22(16):5222-6.
18. Liddlea J, Bamborougha P, Barkera MD, Camposa S, Cousinsa RPC, Cutlerb GJ, et al. 4-Phenyl-7-azaindoles as potent and selective IKK2 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2009;19(9):2504-8.
19. Gamble CM, K. Scott, R. Ho, K. H. Plevin, R. Paul, A. Inhibitory kappa B Kinases as targets for pharmacological regulation. *British journal of pharmacology.* 2012;165(4):802-19.
20. Jost PJ, Ruland J. Aberrant NF-kappaB signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications. *Blood.* 2007;109(7):2700-7.
21. Gutian Xiao JF. NF-kB and cancer. *Am J Cancer Res.* 2011;1(2):192-221.
22. Xiao G, Rabson AB, Young W, Qing G, Qu Z. Alternative pathways of NF-kappaB activation: a double-edged sword in health and disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006;17(4):281-93.
23. Maeda S, Omata M. Inflammation and cancer: role of nuclear factor-kappaB activation. *Cancer science.* 2008;99(5):836-42.
24. Takashi Okada YL, Yong Song Guan, Qing He, Ming Quan Wang, Ying Hu, Lin Yang, Zi La,. *Gene therapy and cancer research focus.* 1 ed. Nova science publishers, Inc. New York2008.
25. C. RBaG. Aberrant rel-nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene (1999).* (18):6938-47.

26. Houldsworth J MS, Rao PH, Dyomina K, Louie DC, Parsa N, Offit K and Chaganti RS. REL proto-oncogene is frequently amplified in extranodal diffuse large cell lymphoma. *Blood*.1996(87):25-9.
27. Bargou RC LC, Krappmann D, Emmerich F, Mapara MY, Bommert K, Royer HD, Scheidereit C and Dorken B. High-level nuclear NF-kappa B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood*.1996;(87):4340-7.
28. Joos S O-JM, Ziegler S, Bruderlein S, du Manoir S, Bentz M, Moller P and Lichter P. Primary mediastinal (thymic) B-cell lymphoma is characterized by gains of chromosomal material including 9p and amplification of the REL gene. *Blood*.1996(87):1571-8.
29. Liptay S SR, Perkins ND, Meltzer P, Altherr MR, McPherson JD, Wasmuth JJ and Nabel GJ. Related subunits of NF-kappa B map to two distinct loci associated with translocations in leukemia, NFKB1 and NFKB2. *Genomics*.1992(13):287-92.
30. Chang CC ZJ, Lombardi L, Neri A and Dalla-Favera R. Rearranged NFKB-2 genes in lymphoid neoplasms code for constitutively active nuclear transactivators. *Mol Cell Biol*. MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, .Sept 1995(15):5180-7.
31. Karin SGaM. Missing Pieces in the NF-kB Puzzle. *Cell*. 2002;109:81–96.
32. Xu G, Lo Y-C, Li Q, Napolitano G, Wu X, Jiang X, et al. Crystal structure of inhibitor of κ B kinase β (IKK β). *Nature*. 2011;472(7343):325–30.
33. Scheidereit C. IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. *Oncogene*. 2006;25(51):6685–705
34. Kalia M, Kukola A. Structure and dynamics of the kinase IKK- β --A key regulator of the NF-kappa B transcription factor. *J Struct Biol*. 2011;176(2):133-42.
35. Erwin PM, Thacker RW. Phylogenetic analyses of marine sponges within the order Verongida: a comparison of morphological and molecular data. *Invertebrate Biology*. 2007;126(3):220-34.

36. Mérour J-Y, Buron F, Plé K, Bonnet P, Routier S. The Azaindole Framework in the Design of Kinase Inhibitors. *Molecules*. 2014;19(12):19935-79.
37. Liou HC, Schattner EJ, Furman RR, Bernal A. NF- κ B/Rel Transcription Factor Family 2006.
38. Gilmore T, Herscovitch M. Inhibitors of NF- κ B signaling: 785 and counting. *Oncogene*. 2006;25:6887-99.
39. Kukongviriyapan V, Buranrat B. New Strategy of Cancer Targeting Chemotherapy. *Srinagarind Med J*. 2009;24:78-90.
40. Foye WO. *Principle of Medical Chemistry*. 3 rd ed. Lea & Febiger, 1989.
41. Silverman RB. *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*. Academic Press Inc.: New York; 1992.
42. T. N. *Medical Chemistry : A Biochemical approach*. 2 nd ed. New York: Oxford University Press 1988.
43. Martin YC KE, Austel V. *Modern Drug Research: Path to Better and Safer Drugs*. New York: Marcel Dekker Incl. 1989.
44. FD K. *Medical Chemistry: Principles and Practice*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry 1994.
45. *Organic and Bio-molecular Chemistry*. Oxford: EOLSS Publishers; 2009. Available from: https://books.google.co.th/books?id=cbC2CwAAQBAJ&pg=PA28&lpg=PA28&dq=molecular+symplication&source=bl&ots=FFWn4ugq3r&sig=6nxTz-ZdUNwGJ59M9_Vd-_qcZlk&hl=th&sa=X&ved=0ahUKEwiur8PFhJbQAhVLQo8KHd9QBE0Q6AEIWjAH#v=onepage&q&f=true.
46. Mandal S, Moudgil Mn, Mandal SK. Rational drug design. *Eur J Pharmacol*. 2009;625:90-100.

47. Sizhuo Y, Hao Y, Xiaoyu R, Xiaokang S, Jian L, Yuling W, et al. Copper-catalyzed dehydrogenative reaction: synthesis of amide from aldehydes and aminopyridine. *Tetrahedron*. 2013;69(31):6431-5.
48. Sankari D, Anitha A, Tamilselvi A, Subbiah N, Vellaisamy S, C U. Metal-free oxidative amidation of aldehydes with aminopyridines employing aqueous hydrogen peroxide. *Org Biomol Chem*. 2016;14:8228-31.
49. บัญชา พูลโกศา. สเปกโตรสโกปีและการพิสูจน์ทราบโครงสร้างสาร (Spectroscopy and Structural Determination). กรุงเทพฯ: ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
50. Devi ES, Alanthadka A, Tamilselvi A, Nagarajan S, Sridharana V, Maheswari CU. Metal-free oxidative amidation of aldehydes with aminopyridines employing aqueous hydrogen peroxide. *Org Biomol Chem*. 2016;14:8228-31.