



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การออกแบบ สังเคราะห์และการจำลองโมเลกุลของสารที่เป็นอนุพันธ์ของ IMD 0354

Design, Synthesis and Molecular Modeling of IMD 0354 Analog

โดย

นศภ. จิรานุวัฒน์	ฤกษ์นิยม	รหัส 57210163
นศภ. ทวีนันท์	สุริโย	รหัส 57210178
นศภ. ภาสกร	งามดี	รหัส 57210207

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2561

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การออกแบบ สังเคราะห์และการจำลองโมเลกุลของสารที่เป็นอนุพันธ์ของ IMD 0354

Design, Synthesis and Molecular Modeling of IMD 0354 Analog

โดย

นศม. จิราวุฒน์ ฤกษ์นิยม

รหัส 57210163

นศม. ทวินันท์ สุริโย

รหัส 57210178

นศม. ภาสกร งามดี

รหัส 57210207

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2561

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

โครงการวิจัยฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนายาให้มีฤทธิ์ด้านการเติบโตของเซลล์มะเร็ง โดยใช้ IMD 0354 เป็นสารต้นแบบในการออกแบบ และใช้กระบวนการทางคอมพิวเตอร์ช่วยในการออกแบบ คณะผู้วิจัยหวังว่าผลของงานวิจัยนี้จะสามารถนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ ในการพัฒนายามะเร็งต่อไปในอนาคต

คณะผู้วิจัย

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2561

เรื่อง การออกแบบ สังเคราะห์และการจำลองโมเลกุลของสารที่เป็นอนุพันธ์ของ IMD
0354

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

- | | | |
|---------------------|----------|---------------|
| 1. นสพ. จีรานุวัฒน์ | ฤกษ์นิยม | รหัส 57210163 |
| 2. นสพ. ทวินันท์ | สุริโย | รหัส 57210178 |
| 3. นสพ. ภาสกร | งามดี | รหัส 57210207 |

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

- | | | |
|-------------------|--------------|---|
| 1. ภญ.ดร.อนงค์ | ตีระวนิชพงศ์ | |
| 2. ผศ.ดร.จันทวรรณ | แสงแข | อาจารย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา |

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนายาให้มีฤทธิ์ด้านการเติบโตของเซลล์มะเร็ง โดยใช้เทคนิค computer-aided drug design ช่วยในการออกแบบ โดยใช้ค่าพารามิเตอร์ที่สำคัญ คือ ค่า BE และ IC_{50} ในการคัดเลือกสารมาสังเคราะห์ และ พิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคทาง Spectroscopy ผลจาก Infrared , Nuclear Magnetic Resonance และ Mass spectrometers สอดคล้องกับโครงสร้างของสารที่ได้ออกแบบไว้ คือ 5-chloro-2-hydroxy-N-phenylbenzamide

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ภญ.อ.ดร.อนงค์ ตีระวนิชพงศ์

Senior Project Academic Year 2018

: Design, Synthesis and Molecular Modeling of IMD 0354 Analog

By

1. Mr. Jeranuwat Larkniyom ID 57210163
2. Miss. Tawinun Suriyo ID 57210178
3. Mr. Pasakorn Ngamdee ID 57210207

Advisor

1. Dr. Anong Teeravanichpong
2. Assistant Professor, Dr. Chuntharawan Saengkae, Faculty of Allied Health Sciences

ABSTRACT

This research is aimed to develop, synthesize and identify the structure of potential anticancer drug. Computer-aided drug design and its parameters, which were BE and IC_{50} , were used to select an appropriate compound for synthesis. The structure of synthesized compound was identified by spectroscopic techniques. The results from infrared, nuclear magnetic resonance and mass spectrometers indicated that the design compound was 5-chloro-2-hydroxy-*N*-phenylbenzamide.

Major Advisor Anong Teeravanishpong, Ph.D.

สารบัญ

บทที่ 1 บทนำ	1
1. ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
2. วัตถุประสงค์	2
3. สมมติฐาน	2
4. กรอบแนวความคิด	2
5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	3
1. มะเร็ง (cancer)	3
2. การรักษาโรคมะเร็ง	5
3. NF-kB pathway (IKK pathway)	8
4. IKK complex	8
5. สารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง IKK complex	9
6. การพัฒนา IMD 0354 ในการรักษามะเร็ง	10
7. เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย IMD 0354	11
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	13
1. เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย	13
2. วิธีการดำเนินงานวิจัย	14
บทที่ 4 ผลการวิจัย	21
1. การออกแบบโครงสร้างจากสารต้นแบบ (lead compound)	21
2. ผลการทำ computer-aided drug design	22
3. การสังเคราะห์สาร 5-chloro-2-hydroxy-N-phenylbenzamide	24
4. การตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีด้วยเครื่องมือทาง spectroscopy	25
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย	33
1. ออกแบบโครงสร้าง	33
2. Computer-aided drug design	34
3. สังเคราะห์สารด้วยปฏิกิริยา amidation	35
4. การทำสารให้บริสุทธิ์	37
5. พิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคทาง spectroscopy	37
เอกสารอ้างอิง	40

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ตัวอย่างยาเคมีบำบัด	7
ตารางที่ 2 พารามิเตอร์ที่ใช้ในการทำ grid	15
ตารางที่ 3 พารามิเตอร์ที่ใช้ในการทำ docking	16
ตารางที่ 4 ผลของ conformation ของ IMD 0354 บริเวณ active site	22
ตารางที่ 5 ผลของ conformation ของ A12B3 บริเวณ active site	23
ตารางที่ 6 ผลการสังเคราะห์สาร 5-chloro-2-hydroxy- <i>N</i> -phenylbenzamide	24
ตารางที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่าง wavenumber (cm^{-1}) กับหมู่ฟังก์ชันทางเคมีของ 5-chloro-2-hydroxy- <i>N</i> -phenylbenzamide	25
ตารางที่ 8 แสดงค่า chemical shifts และ coupling pattern ของ proton ในโครงสร้าง 5-chloro-2-hydroxy- <i>N</i> -phenylbenzamide (A12B3)	27
ตารางที่ 9 ผลของ conformation ที่เกิด interaction บริเวณ active site	34

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 1 จำนวนและอัตราการตายของประชากรชาวไทย ตั้งแต่ พ.ศ.2539-2554 จากสถาบันมะเร็ง	3
รูปที่ 2 ลักษณะของเซลล์เนื้อ (tumor)	4
รูปที่ 3 ระยะของเซลล์มะเร็ง	5
รูปที่ 4 การผ่าตัดผ่านกล้องโดยใช้หุ่นยนต์ช่วย	6
รูปที่ 5 การฉายรังสี (radiotherapy)	6
รูปที่ 6 Targeted therapy ต่างๆ	7
รูปที่ 7 Classical pathway และ alternative pathway	8
รูปที่ 8 สารต่างๆ ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง IKK	9
รูปที่ 9 กลไกการยับยั้ง IMD 0354	10
รูปที่ 10 เครื่อง fourier transform infrared spectroscopy	11
รูปที่ 11 เครื่อง nuclear magnetic resonance spectroscopy	11
รูปที่ 12 เครื่อง mass spectroscopy	12
รูปที่ 13 การสังเคราะห์สารด้วยปฏิกิริยา amidation	17
รูปที่ 14 ปฏิกิริยา amidation ระหว่าง carboxylic acid และ amine ได้เป็น amide	18
รูปที่ 15 ตำแหน่งที่สนใจบน FT-IR ของสาร 5-chloro-2-hydroxy- <i>N</i> -phenylbenzamide	25
รูปที่ 16 ^1H spectrum (ppm) ของสาร 5-chloro-2-hydroxy- <i>N</i> -phenylbenzamide (A12B3) ช่วง 0-12 ppm ในสารละลาย dmsd-d6	26
รูปที่ 17 ตำแหน่งของ aromatic protons ใน ^1H spectrum (ppm) ของสาร 5-chloro-2-hydroxy- <i>N</i> -phenylbenzamide (A12B3) ใน dmsd-d6 ช่วง 6.9-8.1 ppm	28
รูปที่ 18 ความสัมพันธ์ของ protons และค่า chemical shift ที่ปรากฏใน ^1H spectrum (ppm) ของสาร 5-chloro-2-hydroxy- <i>N</i> -phenylbenzamide (A12B3)	29
รูปที่ 19 จำนวน carbons ในโครงสร้างของสาร 5-chloro-2-hydroxy- <i>N</i> -phenylbenzamide (A12B3)	29
รูปที่ 20 ตำแหน่งของ carbons ใน ^{13}C -NMR spectrum (ppm) ของ 5-chloro-2-hydroxy- <i>N</i> -phenylbenzamide (A12B3) ใน dmsd-d6 ช่วง 0-210 (ppm)	30

รูปที่ 21 ตำแหน่งของ carbons ใน ^{13}C -NMR spectrum (ppm) ของ 5-chloro-2-hydroxy- <i>N</i> -phenylbenzamide (A12B3) ใน dmsd-d6 ช่วง 100-165 (ppm)	31
รูปที่ 22 ค่า m/z ของสาร 5-chloro-2-hydroxy- <i>N</i> -phenylbenzamide	32
รูปที่ 23 ปฏิกริยา เปลี่ยนหมู่ carboxylic acid เป็น acyl chloride	35
รูปที่ 24 กลไก การเปลี่ยนหมู่ carboxylic acid เป็น acyl chloride	35
รูปที่ 25 ปฏิกริยา amidation	36
รูปที่ 26 กลไกของ amidation	36
รูปที่ 27 ความสัมพันธ์ของ protons และค่า chemical shift ที่ปรากฏใน ^1H spectrum (ppm) ของสาร 5-chloro-2-hydroxy- <i>N</i> -phenylbenzamide (A12B3)	38
รูปที่ 28 ค่า m/z ของสาร 5-chloro-2-hydroxy- <i>N</i> -phenylbenzamide	39

บทที่ 1 บทนำ

1. ที่มาและความสำคัญของปัญหา

มะเร็งคือความผิดปกติของของเซลล์ในร่างกายเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ส่งผลให้เซลล์เจริญเติบโตมากกว่าผิดปกติและพัฒนาจนเป็นก้อนเนื้อออก (tumor) และสามารถแพร่กระจายรุกรานไปทั่วร่างกายและอาจทำให้เสียชีวิตได้ (1, 2)

โรคมะเร็งเป็นสาเหตุที่ทำให้ประชากรของทั่วโลกเสียชีวิตเป็นอันดับต้นจากสถิติของ World Health Organization (WHO) ปี ค.ศ. 2000 พบว่าผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็งอยู่ที่จำนวน 13 ล้านคนคิดเป็น 7.6% ของคนทั่วโลก ขณะเดียวกันสถาบันมะเร็งแห่งชาติได้มีการเก็บสถิติในช่วง พ.ศ.2553-2557 พบว่าโรคมะเร็งในประเทศไทยมีจำนวนผู้ป่วยใหม่ 98,852 คน และเสียชีวิตจากโรคมะเร็งประมาณ 61,082 คน ซึ่งอาจจะมีแนวโน้มที่จะสูงขึ้นเรื่อยๆ (3, 4)

แนวทางการรักษาผู้ป่วยมะเร็งในปัจจุบันแบ่งออกเป็น 2 วิธี คือ 1. การรักษาแบบไม่ใช้ยา เช่น การผ่าตัด การใช้รังสีรักษา และ 2. การรักษาแบบใช้ยา เช่น การใช้ยาเคมีบำบัด (Chemotherapy) และการรักษามะเร็งแบบมุ่งเป้า (Target therapy) เป็นต้น ซึ่งการรักษาโดยใช้ยาเคมีบำบัด ตัวยาจะเข้าไปทำลายเซลล์ที่เติบโตเร็ว เช่น เซลล์มะเร็ง เซลล์เส้นผม เซลล์ไขกระดูก เนื่องจากการใช้ยาเคมีบำบัดไปทำลายเซลล์ที่เติบโตเร็ว จึงส่งผลเสียทำให้มีอาการข้างเคียงจากการใช้ยา คือ กดไขกระดูก ผมร่วง อาเจียน ท้องเสียได้ง่าย เป็นต้น แต่การรักษามะเร็งแบบมุ่งเป้าตัวยาจะออกฤทธิ์ในการยับยั้งที่กลไกการเจริญเติบโตของเซลล์ ส่งผลทำให้เกิดผลข้างเคียงน้อยกว่าการใช้ยาเคมีบำบัด และ ออกฤทธิ์ได้จำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็งมากกว่า (5)

จากการที่โรคมะเร็งที่เป็นสาเหตุการตายของประชากรในประเทศไทยเป็นอันดับต้นๆ และการรักษาเคมีบำบัดที่มีผลข้างเคียง ทำให้ผู้วิจัยต้องการพัฒนายาที่มีฤทธิ์จำเพาะเจาะจงกับเซลล์มะเร็ง

โดยใช้ IMD 0354 เป็นสารต้นแบบ

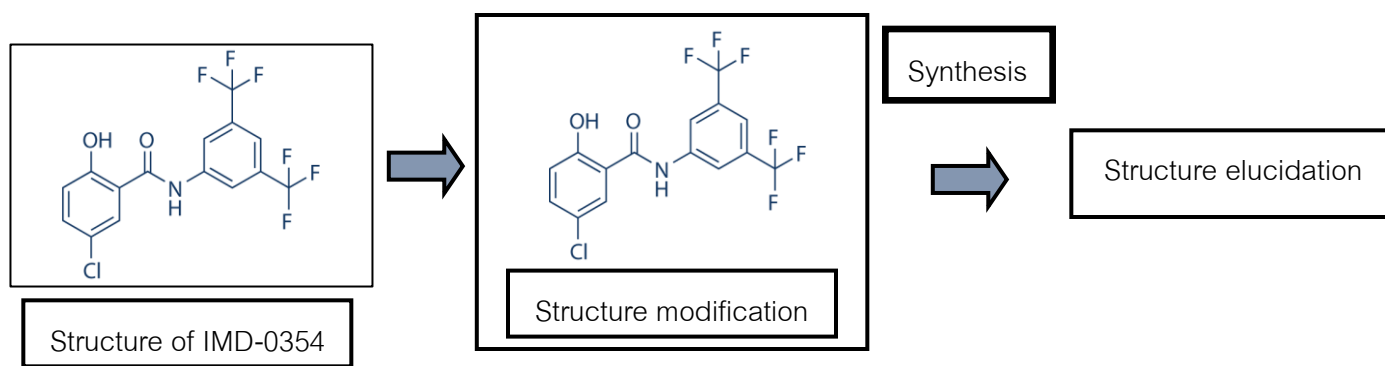
2. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาสารให้มีฤทธิ์ด้านการเติบโตของเซลล์มะเร็ง โดยใช้ IMD-0354 เป็นสารต้นแบบ

3. สมมติฐาน

สารที่ออกแบบและสังเคราะห์ได้จะมีโครงสร้างตามทีออกแบบไว้

4. กรอบแนวความคิด



โดยการใช้โครงสร้างของสาร IMD 0354 มาเป็นสารต้นแบบในการออกแบบ

5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

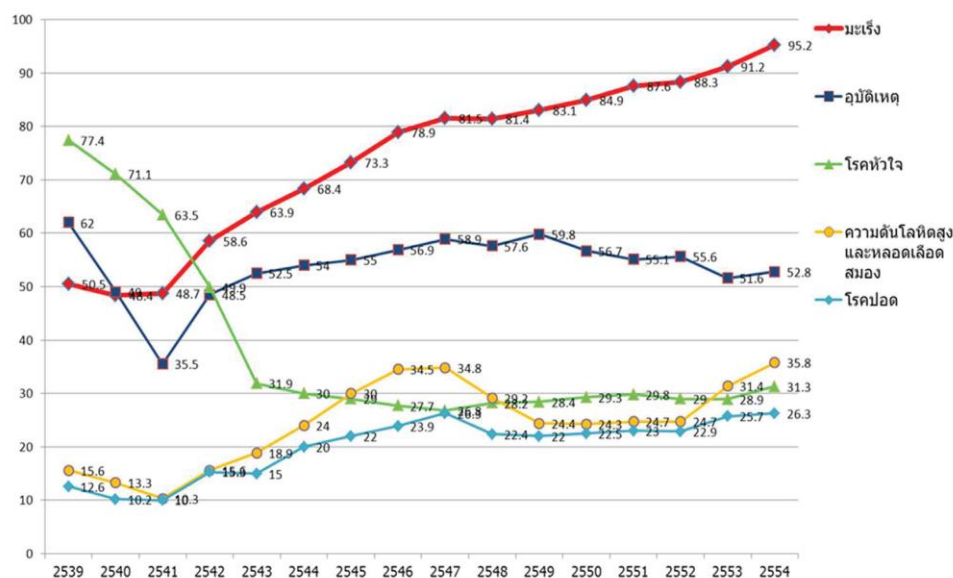
1. ได้รับความรู้เกี่ยวกับกระบวนการทำงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์
2. ได้รับความรู้เกี่ยวกับวิธีการออกแบบยาใหม่
3. ได้รับความรู้เกี่ยวกับวิธีการใช้โปรแกรมทางคอมพิวเตอร์สำหรับออกแบบโครงสร้างของยา
4. ได้รับความรู้เกี่ยวกับกระบวนการสังเคราะห์ยาใหม่
5. ได้รับความรู้เกี่ยวกับการพิสูจน์โครงสร้างสาร

บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม

1. มะเร็ง (Cancer)

7.1 อุบัติการณ์

โรคมะเร็งเป็นสาเหตุที่ทำให้ประชาชนทั่วโลกเสียชีวิตเป็นอันดับต้นๆ จากสถิติของ World Health Organization (WHO) พบว่ามีผู้เป็นมะเร็งรายใหม่ 14 ล้านคน และ จะเพิ่มขึ้นอีก 70 % ในอีก 20 ปี ซึ่งต่อมาในปี พ.ศ.2558 พบว่ามีผู้ป่วยเสียชีวิตจากโรคมะเร็งเป็นจำนวน 8.8 ล้านคน (คิดเป็น 1 ใน 6 ของจำนวนผู้เสียชีวิตทั่วโลก) ในขณะเดียวกันสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ได้เก็บรวบรวมข้อมูล ในช่วงปี พ.ศ.2553 - 2557 พบว่าโรคมะเร็งในไทยมีผู้ป่วยโรคมะเร็งถึง 98,852 คน และเสียชีวิตจากโรคมะเร็งถึง 61,082 คน ซึ่งพบว่าในอนาคตมีแนวโน้มที่อัตราการเสียชีวิตจะสูงขึ้นเรื่อยๆ (1, 2)

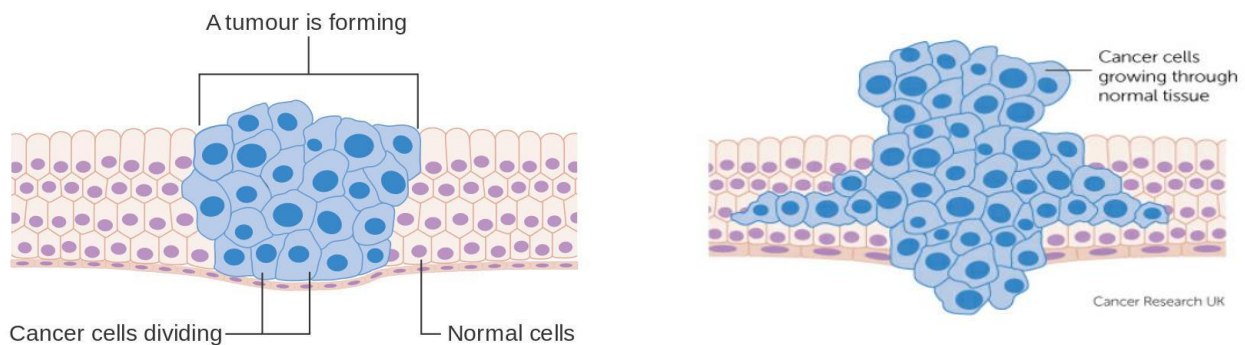


รูปที่ 1 จำนวนและอัตราการตายของประชากรชาวไทย
ตั้งแต่ พ.ศ.2539-2554 จากสถาบันมะเร็ง

7.2 มะเร็ง

I. เซลล์มะเร็ง

มะเร็งคือความผิดปกติของเซลล์ที่เกิดจากการแบ่งเซลล์จนไม่สามารถควบคุมตัวเองได้ โดยปกติแล้วเซลล์ในร่างกายจะแบ่งตัวขึ้นมาใหม่ เพื่อทดแทนเซลล์ตัวเก่าที่ตาย ซึ่งในการแบ่งเซลล์ตามปกติจะมีกลไกควบคุม แต่เซลล์มะเร็งนั้นจะไม่สามารถควบคุมได้ ทำให้เกิดการแบ่งตัวไปเรื่อยๆ จนได้เป็นก้อนเนื้องอก (tumor) ซึ่งเนื้องอกนี้สามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็ง (cancerous) โดยเซลล์มะเร็งจะแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ เนื้องอกที่ไม่เป็นอันตราย (benign) โดยเนื้องอกชนิดนี้จะมีการเติบโต แต่ไม่แพร่กระจายไปยังบริเวณอื่น ส่วนเนื้องอกชนิดร้าย (malignant tumor) ซึ่งเซลล์มะเร็งจะแพร่กระจายไปยังบริเวณอื่นส่งผลทำให้เกิดอันตรายต่อร่างกาย และ เสียชีวิตได้



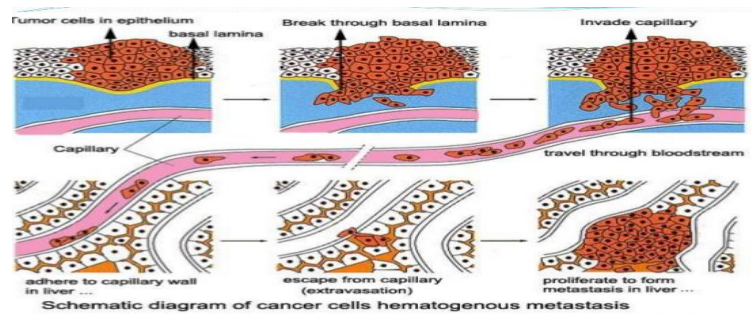
รูปที่ 2 ลักษณะของเซลล์เนื้อ (tumor)

II. สาเหตุของโรคมะเร็ง

สาเหตุของโรคมะเร็งแบ่งเป็น 2 ประเภทคือ 1. สาเหตุจากสิ่งแวดล้อม เช่น สารเคมี, รังสี UV, การติดเชื้อเรื้อรัง (ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี, ติดเชื้อมะเร็งปากมดลูก) เป็นต้น 2. สาเหตุภายในร่างกาย เช่น กรรมพันธุ์ที่ผิดปกติ, ภูมิคุ้มกันที่บกพร่อง, ความไม่สมดุลทางฮอร์โมน

III. ระยะของมะเร็ง

เป็นตัวบ่งบอกความรุนแรงของโรคโดยทั่วไปโรคมะเร็งมี 4 ระยะดังนี้คือ ระยะที่ 1: ก้อนเนื้อมีขนาดเล็ก และ ไม่ลุกลาม ระยะที่ 2: ก้อนเนื้อมีขนาดใหญ่ขึ้น และเริ่มลุกลามอวัยวะอื่น ระยะที่ 3: ก้อนเนื้อมีขนาดใหญ่ขึ้น และเริ่มลุกลามเข้าสู่ต่อมน้ำเหลือง ระยะที่ 4: ก้อนเนื้อมีขนาดโตมากและเริ่มลุกลามไปยังน้ำเหลืองและเซลล์อื่น เป็นต้น



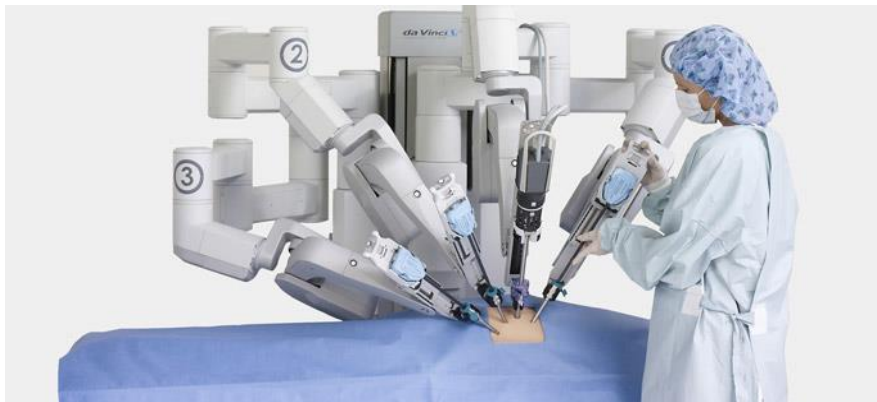
รูปที่ 3 ระยะของเซลล์มะเร็ง

2. การรักษาโรคมะเร็ง

ในปัจจุบันแนวทางการรักษาโรคมะเร็งแบ่งออกดังนี้

7.1 การผ่าตัด (Surgery)

เป็นวิธีที่เหมาะสมกับการรักษามะเร็งเฉพาะที่ (tumor) เป็นการตัดก้อนเนื้อที่มีความผิดปกติออกจากร่างกาย ในอดีตการผ่าตัดจะส่งผลให้อวัยวะที่ผ่าตัดไม่สามารถทำงานได้ และ เสียรูปทรง แต่ในปัจจุบันการแพทย์มีความพัฒนามากขึ้น ทำให้การผ่าตัดนั้นอวัยวะนั้นสามารถกลับมาทำงาน และ ไม่เสียรูปทรง เช่น การผ่าตัดผ่านกล้อง (laparoscopic surgery), การผ่าตัดผ่านกล้องโดยใช้หุ่นยนต์ช่วย (robotic assisted laparoscopic surgery) เป็นต้น



รูปที่ 4 การผ่าตัดผ่านกล้องโดยใช้หุ่นยนต์ช่วย

7.2 การฉายรังสี (Radiotherapy)

เป็นวิธีที่เหมาะสมกับการรักษามะเร็งเฉพาะที่ (tumor) โดยอาศัยรังสีส่งลงไปยังตำแหน่งใกล้กับเซลล์มะเร็งโดยตรง (brachytherapy) เช่น มะเร็งปากมดลูก



รูปที่ 5 การฉายรังสี (radiotherapy)

7.3 เคมีบำบัด (Chemotherapy)

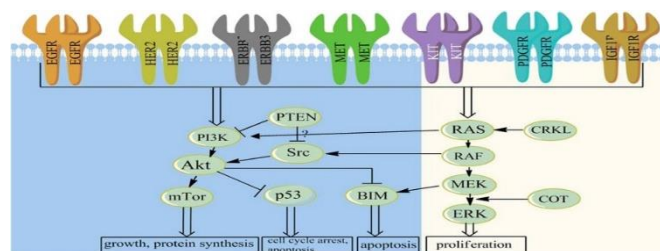
เป็นวิธีที่ใช้ยาเคมีบำบัด (chemotherapy) ซึ่งในการใช้ยาเคมีบำบัด เป็นการให้ยาเข้าไปทำลายหรือหยุดยั้งเซลล์มะเร็ง แต่เนื่องจากการรักษาด้วยเคมีบำบัดนี้เป็นการใช้ยารักษาพร้อมกันหลายตัว ส่งผลให้เกิดอาการข้างเคียง เช่น กดไขกระดูก ผอมว่อง อ่อนเพลียได้ง่าย อาเจียน ทานอาหารไม่ได้ ติดเชื้อได้ง่าย เป็นต้น (3, 4)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างยาเคมีบำบัด

Alkylating Agents	Plant Alkaloids	Antitumor Antibiotics	Antimetabolites
Mustard gas	Vinca alkaloids	Anthracyclines	Folic acid antagonist
Ethenamine	Taxanes	Chromomycin	Pyrimidine antagonist
Alkyl Sulfonate	Podophyllotoxin	Miscellaneous	Purine antagonist
Hydrazine	Camptothecin analog		Adenosine deaminase inhibitor
Nitrosoureas			
Meta salt			

7.4 การรักษาแบบมุ่งเป้า (Targeted Therapy)

เป็นวิธีที่พัฒนาจากยาเคมีบำบัด โดยเป็นการรักษาที่มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งมากขึ้น ทำให้ผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นลดลง ซึ่งแนวทางการรักษาแบบ targeted Therapy แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ แบบ monoclonal antibodies และ small molecules โดยการพัฒนาแบบ monoclonal antibodies จะเป็นการพัฒนายาทางด้าน biotechnology ส่วน small Molecules จะเน้นพัฒนายาไปทางด้านการรบกวนการส่งสัญญาณระดับเซลล์ ซึ่งสารที่ไปยับยั้งการเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็งแบบมุ่งเป้า เช่น PARP inhibitors , CDK inhibitors , PI3K inhibitors , MEK inhibitors , ALK inhibitors , Braf inhibitors และ IKK inhibitors เป็นต้น (5)



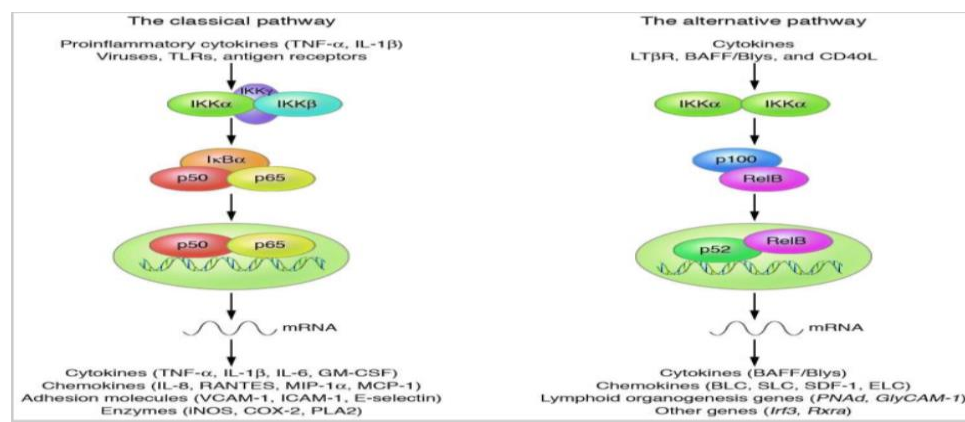
รูปที่ 6 Targeted therapy ต่างๆ

3. NF-KB Pathway (IKK pathway)

จากการศึกษาค้นคว้า IKK pathway (NF-KB Pathway) พบว่า NF-KB จะเป็นตัวกระตุ้นให้เซลล์อยู่รอด และยับยั้งการเกิด apoptosis ซึ่งกลไกแบ่งออกเป็น 2 ประเภท

1. Classical pathway เป็นกลไกที่เกิดจากการกระตุ้นเมื่อเซลล์ในร่างกายเกิดการติดเชื้อแบคทีเรีย และ ไวรัส โดยจะจับกับ p50 และ RelA ซึ่งกลไกนี้มีความสำคัญในการเติบโตของเซลล์ และยับยั้งการเกิด programmed cell death

2. Alternative pathway เป็นกลไกที่เกิดจากการจับกับ p52 และ RelB โดยจะส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการหลั่ง TNF-cytokine และกระตุ้นการทำงานของ IKK α ซึ่งกลไกนี้มีความสำคัญต่อการอยู่รอดของ B-cell และการพัฒนา B-cell (6) ดังนั้นทั้ง 2 กลไกจะมีส่วนในการควบคุมการอยู่รอดของเซลล์ และการตายของเซลล์แต่ classical pathway จะมีบทบาทมากกว่าในการพัฒนายา



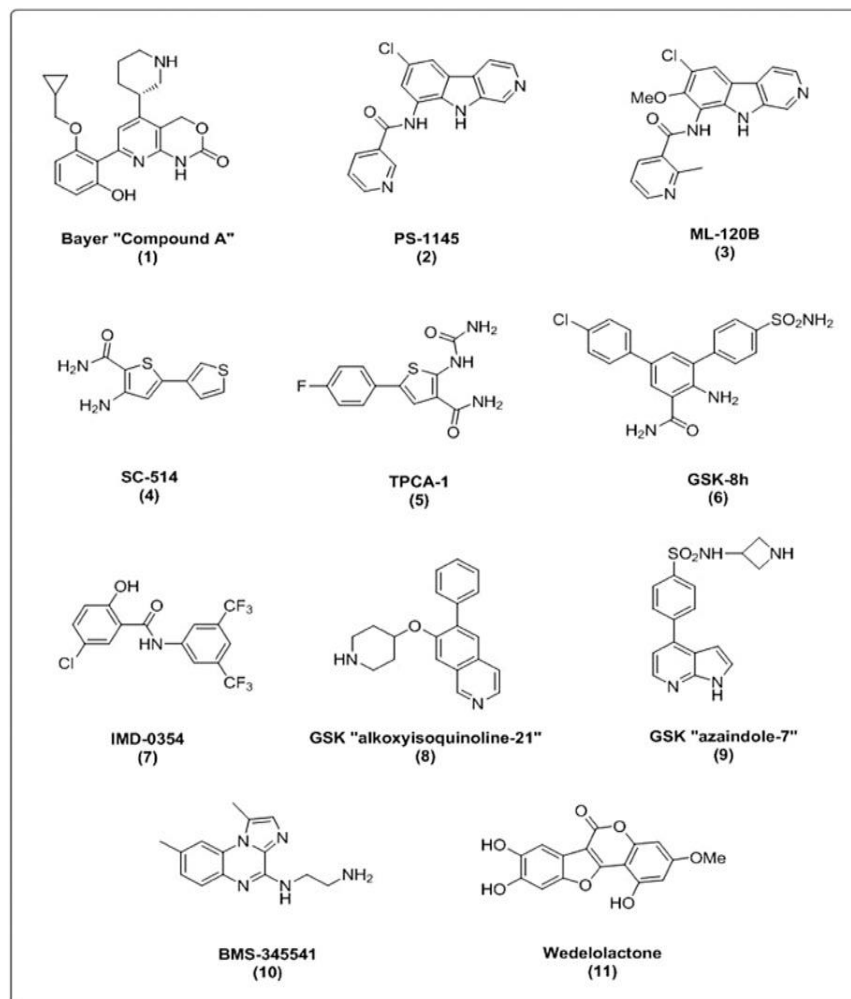
รูปที่ 7 Classical Pathway และ Alternative Pathway

4. IKK complex

IKK complex ประกอบไปด้วย IKK α , IKK β , IKK γ เป็นต้น โดย IKK β จะมีบทบาทเกี่ยวกับ apoptosis ของเซลล์โดยจะไปจับกับ p50 และ RelA เพื่อกระตุ้นให้เซลล์เติบโต หากยับยั้ง IKK complex จะส่งผลให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis ส่วน IKK α จะควบคุมกระบวนการ transcription ของ NF-KB (6, 7)

5. สารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง IKK complex

จากการศึกษาค้นคว้า พบรายงานของสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง IKK ได้แก่ Bayer compound A , BMS - 345541 , GSK-benzamide-8, GSK-azaindole-7, ML120B , PS-1145 , SC-514 , TPCA1 , Wedelolactone และ IMD 0354 เป็นต้น (รูปที่ 8) ซึ่ง IMD 0354 มีความจำเพาะเจาะจงต่อ IKK β และโครงสร้างไม่ซับซ้อนต่อการสังเคราะห์ ทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะพัฒนาอนุพันธ์ของ IMD 0354 ให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็ง (8)

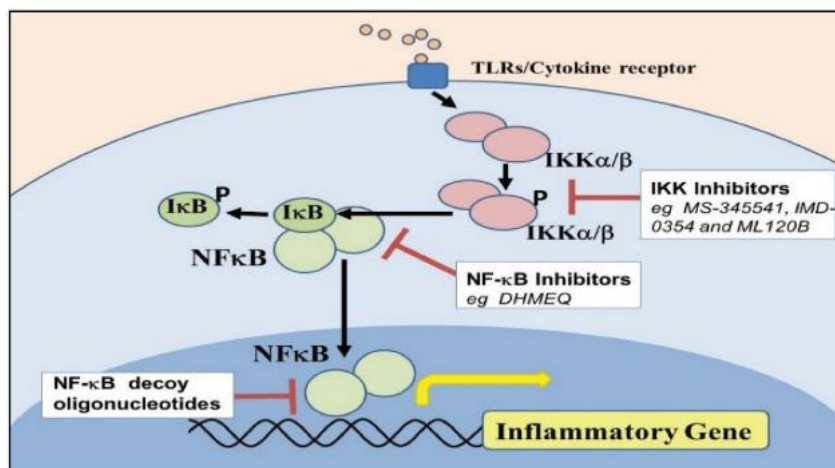


รูปที่ 8 สารต่างๆ ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง IKK complex

6. การพัฒนา IMD 0354 ในรักษามะเร็ง

จากการทบทวนวรรณกรรมทำให้ ผู้วิจัยพบงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ของ IMD 0354 (*N*-(3, 5-bis-trifluoromethyl-phenyl)-5-chloro-2-hydroxy-benzamide) ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวซึ่ง IMD 0354 ออกฤทธิ์ในการยับยั้งกระบวนการ phosphorylation ของ IKB α ส่งผลให้ยับยั้ง NF- κ B pathway โดยในการศึกษานี้ได้พบว่า IMD 0354 สามารถยับยั้งการกระตุ้น NF- κ B pathway และทำให้เกิด apoptosis ในเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยความเป็นพิษกับเซลล์ขึ้นอยู่กับขนาดของยา

จากการที่ IMD 0354 มีกลไกการยับยั้ง nuclear factor kappa B (NF- κ B) ซึ่งกลไกนี้ส่งผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง ดังนั้น การพัฒนาโครงสร้างของ IMD 0354 ให้มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งแบบมุ่งเป้า เป็นอีกกระบวนการหนึ่งในการพัฒนายารักษามะเร็ง



รูปที่ 9 กลไกการยับยั้งโดย IMD 0354

7. เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย IMD 0354

7.1 เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrometer

เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับวิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชันของสารประกอบอินทรีย์ โดยอาศัยหลักการของการดูดกลืนคลื่นรังสีอินฟราเรด เมื่อโมเลกุลได้รับพลังงานจากคลื่นรังสีอินฟราเรด จะเกิดการสั่น (stretching) หรือ การงอ (bending) ของพันธะโควาเลนต์ในโมเลกุล และทำให้โมเลกุลดังกล่าวเกิดการดูดกลืนแสง infrared (IR) ผลที่ได้เรียกว่า infrared spectrum (11)



รูปที่ 10 เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy

9.1 เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR Spectrometer)

หลักการทำงานคือ เครื่องจะส่งคลื่นวิทยุเข้าไปยังตัวอย่างที่เราต้องการวิเคราะห์ ซึ่งจะทำให้นิวเคลียสของอะตอมมีการจัดเรียงตัวใหม่ในสนามแม่เหล็ก ได้เป็นสเปกตรัมของอะตอมที่เราต้องการวัดนั้นๆ



รูปที่ 11 เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

9.2 เครื่อง Mass Spectrometer

หลักการทำงานคือ สารจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปประจุ แล้ววัดมวลของประจุ ที่เกิดขึ้นนั้นๆ ได้ เป็น mass spectrum (13)



รูปที่ 12 เครื่อง Mass Spectroscopy

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำงานวิจัย

1.1 คอมพิวเตอร์

- 1.1.1 Notebook PC, Processor Core (™) I7-7700 HQ CPU@ 2.8GHz with 8 GB of RAM, Microsoft Windows 10 Pro
- 1.1.2 Notebook PC, Processor Core (™) I7-4510 HQ CPU@ 2.8GHz with 8 GB of RAM, Microsoft Windows 10 Pro

1.2 โปรแกรม

- 1.2.1 AutoDock 4.2.6
- 1.2.2 ChemDraw 12.0
- 1.2.3 Chem 3D Ultra 12.0
- 1.2.4 Discover Studio

1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 1.3.1 Glass chromatography column
- 1.3.2 Magnetic bar
- 1.3.3 Heating Magnetic stirrer
- 1.3.4 TLC tank
- 1.3.5 TLC plates
- 1.3.6 Infrared spectroscopy (Thermo spectra-Tech, P/N 700-0085, Ver3.910/01, Shelton, USA and APW1200202, Becthai Thailand)
- 1.3.7 Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (Bruker Avance III HD 400 nanobay)
- 1.3.8 UV lamp (254/365nm 6-Watt 230v 50Hz 0.12Amps, Cambridge, UK)
- 1.3.9 Rotary evaporator (254/365nm, Buchi Thailand Ltd.)
- 1.3.10 Mass spectrometer (GC-MS/MS TQ-Gas Chromatograph-Mass Spectrometer/Mass Spectrometer (7890GC/ 7000C GC/ MS Triple Quad))

1.4 สารเคมี

- 1.4.1 Aniline (SIGMA-ALDRICH, USA)
- 1.4.2 5-Chlorosalicylic acid (SIGMA-ALDRICH, USA)
- 1.4.3 Sodium sulphate anhydrous crystal (QReC, New Zealand)
- 1.4.4 Sodium chloride (UNIVAR, Ajax Finechem Pty Ltd, Australia)
- 1.4.5 Sodium hydroxide (LOBA CHEMIE, India)
- 1.4.6 Methanol (RCI Labscan, Australia)
- 1.4.7 Ethyl acetate (RCI Labscan, Australia)
- 1.4.8 Hexane (RCI Labscan, Australia)
- 1.4.9 Silica gel (MERCK, Germany)
- 1.4.10 Oxalyl chloride (SIGMA-ALDRICH, USA)
- 1.4.11 Dimethylformamide (RCI Labscan, Australia)
- 1.4.12 Dichloromethane (RCI Labscan, Australia)
- 1.4.13 Triethylamine (CARLO ERBA, Italy)
- 1.4.14 Toluene (RCI Labscan, Australia)

2. วิธีการดำเนินงานวิจัย

2.1 ออกแบบโครงสร้างยาโดยใช้คอมพิวเตอร์

การเตรียมและคัดเลือกโครงสร้างชีวโมเลกุลเป้าหมาย คือ enzyme nuclear factor kappa-B kinase subunit beta (IKK β) (<http://www.rcsb.org/structure/4KIK>)

- I. คัดเลือกและนำโครงสร้างสามมิติของชีวโมเลกุลเป้าหมาย จากข้อมูลผลึก 3 มิติของ เอนไซม์ IKK β (4KIK, <http://www.rcsb.org/pdb/>) ที่จับเป็นสารประกอบ กับไลแกนด์ที่อยู่ในฐานข้อมูลในรูปแบบ .pdb file มาเตรียมเป็น .pdbqt file เพื่อใช้ในการ docking
- II. ใช้โปรแกรม Biovia เพื่อตัดโมเลกุลที่ไม่ต้องการในโปรตีนออกเพื่อให้มีความจำเพาะต่อสารมากยิ่งขึ้น

- III. เตรียมชีวโมเลกุลเป้าหมายให้อยู่ในรูปแบบ .pdbqt file โดยเปิดโครงสร้างชีวโมเลกุลเป้าหมายที่ได้ดาวน์โหลดมาโดยใช้โปรแกรม Autodock 4.2.6 ดังนี้
 - a. กำจัดโมเลกุลไลแกนด์ และน้ำ จากนั้นเติมอะตอมของไฮโดรเจน จากนั้นคำนวณประจุแบบ Gasteiger
 - b. บันทึกเป็นไฟล์ในนามสกุล .pdbqt
- IV. เตรียมไลแกนด์ให้อยู่ในรูปแบบไฟล์ .pdbqt โดยเปิดโครงสร้างของชีวโมเลกุลเป้าหมายที่ได้ดาวน์โหลดมาโดยใช้โปรแกรม Autodock 4.2.6 ลบโมเลกุลอื่นๆ ให้เหลือไว้เพียงเฉพาะไลแกนด์
- V. Validate เอนไซม์ IKK β เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของชีวโมเลกุลเป้าหมายในการทำ docking โดยใช้โปรแกรม Autodock 4.2.6 ดังนี้
 - a. เตรียม Grid parameter (การทำ Autogrid) ในรูปแบบ .gpf โดยเลือกชีวโมเลกุลเป้าหมาย ซึ่งเป็นไฟล์ .pdb ที่เตรียมไว้ จากเมนู grid จากนั้นจึงเลือกชนิดของ Grid map ที่ต้องการสร้าง และกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ตามตารางที่ 2 บันทึกเป็นไฟล์ .gpf

ตารางที่ 2 พารามิเตอร์ที่ใช้ในการทำ Grid

	Parameters
Number of points in x,y,z	100,100,100
Spacing (angstrom)	0.375
Center grid box x,y,z	-15.418,-32.994,-71.224
<offset>x,y,z	2.250,9.361,-20.444

- b. เตรียม docking parameters (การทำ autodock) ในรูป .dpf โดยเปิดไฟล์
ชีวโมเลกุลเป้าหมาย (IKK β) และไลแกนด์ ซึ่งเป็นไฟล์ .pdbqt file ที่เตรียม
ไว้จากเมนู docking จากนั้นกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ตามตารางที่ 3
และบันทึกไฟล์เป็น Lamarckian GA

ตารางที่ 3 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

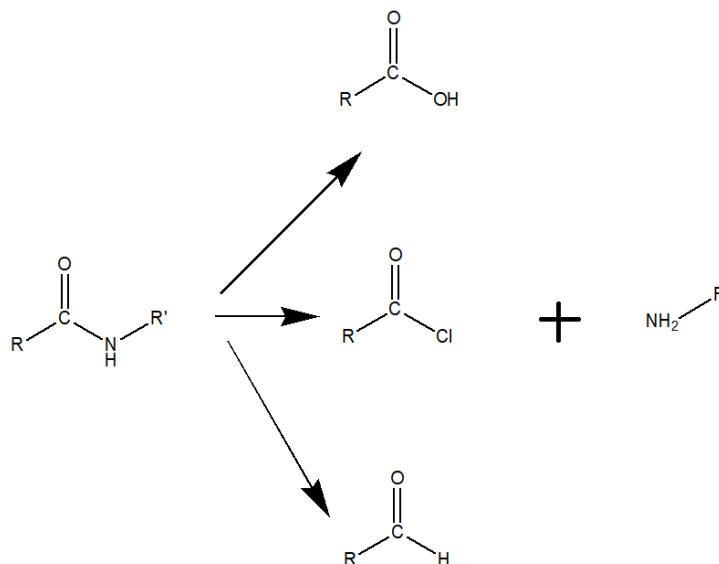
- c. ทำการ docking parameters เพื่อให้ได้ไฟล์ .dlg และ analysis ใน
โปรแกรม เพื่อหาค่า binding energy

2.2 เตรียมไลแกนด์ที่จะใช้ในการ docking

- I. โครงสร้างที่ออกแบบเป็นสารกลุ่มเอไมด์ เริ่มด้วยการวาดโครงสร้างของสารที่ออกแบบโดยใช้โปรแกรม ChemDraw 12.0 วาดโครงสร้างเป็น 2 มิติ หลังจากนั้นใช้โปรแกรม Chem3D Ultra 12.0 เพื่อแปลงโครงสร้างจาก 2 มิติ เป็น 3 มิติ และจัดโครงสร้างให้มี conformation ที่มีพลังงานต่ำสุด โดยการ minimize energy ด้วยหลักการ MM2 ที่อยู่ในโปรแกรม Chem3D Ultra 12.0 และบันทึกเป็นไฟล์ protein data bank (.pdb)
- II. เปิดโครงสร้างไลแกนด์ที่เตรียมไว้ โดยใช้โปรแกรม Autodock 4.2.6 เพื่อทำการ docking ซึ่งการ docking จะเป็นการหาแรงในการจับกับเอนไซม์ IKK โดยทำเหมือนขั้นตอนการ validate และรายงานผลของการศึกษาเป็นค่า binding energy (ประกอบด้วย intermolecular energy และ torsional energy) โดยรายงาน conformation ที่มี binding energy และ docking energy เป็นลบมากที่สุด

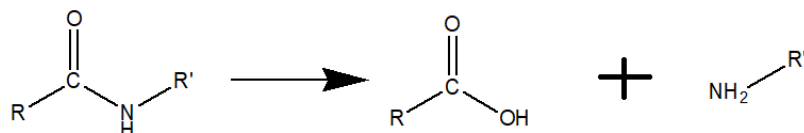
2.3 สังเคราะห์อนุพันธ์ของยาที่ได้รับการคัดเลือก

การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ด้วยปฏิกิริยา amidation มีหลากหลายวิธีดังนี้



รูปที่ 13 การสังเคราะห์สารด้วยปฏิกิริยา amidation

ได้เลือกใช้ปฏิกิริยา amidation ระหว่าง carboxylic acid และ amine



รูปที่ 14 ปฏิกิริยา amidation ระหว่าง carboxylic acid และ amine ได้เป็น amide

A. กระบวนการสังเคราะห์สารเคมี

การเปลี่ยน carboxylic acid เป็น acyl chloride

- I. ชั่งสาร B (5-chlorosalicylic acid) ใส่ขวดก้นกลม (round bottom flask) จำนวน 1.77 กรัม (5.14 mmol)
- II. ใช้ dry toluene เป็น solvent โดยเติมลงไปในขวดก้นกลมที่มีสาร B ประมาณ 10 มิลลิลิตร
- III. ตั้ง condenser โดยตั้งขวดก้นกลมที่เตรียมสารไว้ให้อยู่ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นเติม oxalyl chloride ลงไป 1.48 มิลลิลิตร (17.23 mmol)
- IV. เติม dimethylformamide ลงไป 3 หยด โดยใช้ dropper ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา
- V. รอให้ฟองที่เกิดขึ้นหมดก่อนแล้วเปลี่ยนจากอ่างน้ำแข็งมาเป็นอ่างน้ำมันที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส โดยตั้ง condenser และ ปลดปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาจนสาร B ละลายหมด
- VI. นำสารละลาย B ที่ได้ไประเหยโดยใช้เครื่อง rotary evaporator รอจนแห้ง
- VII. นำ B ที่ได้จากการระเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator มาตั้งภายใต้บรรยากาศ nitrogen

การเตรียมสารละลาย Amine

- I. ตวงสาร A (aniline) ใส่ขวดก้นกลม (round bottom flask) ปริมาณ 1.40 มิลลิลิตร (7.72 mmol) แล้วเติม dry dichloromethane ลงไปเล็กน้อยเป็น solvent
- II. เติม triethylamine ลงไป 1.44 มิลลิลิตร

การทำปฏิกิริยา

- I. เติมสารละลายผสมของ A ลงในสารละลายผสมของ B ภายใต้ nitrogen จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยา 24 ชั่วโมงภายใต้บรรยากาศ nitrogen
- B. การแยกสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction)
 - I. เติมสารละลายอิ่มตัว sodium chloride 20 มิลลิลิตร ลงในสารละลายที่ทำปฏิกิริยา
 - II. แยกสกัดสารด้วย separatory funnel จากนั้นเติม dichloromethane 150 มิลลิลิตร แล้วทำการแยกด้วย separatory funnel อีก 2 รอบ
 - III. สกัดซ้ำด้วย dichloromethane ด้วยน้ำจำนวน 2 ครั้ง
 - IV. เติม anhydrous magnesium sulfate ลงไปโดยเติมจนกว่า anhydrous magnesium sulfate ไม่จับกันเป็นก้อน
 - V. กรองผ่านสำลีแล้วนำไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator
 - VI. ชั่งน้ำหนักสารที่ได้และคิด % yield
- C. การแยกสารให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี
 - I. บรรจุซิลิกาเจลลงในคอลัมน์ โดยมีวัฏภาคเคลื่อนที่คือ hexane : dichloromethane = 1 : 1
 - II. จากนั้นใส่สารตัวอย่างเข้มข้น dichloromethane ลงคอลัมน์ แล้วเปิด stopper ให้ได้อัตราการไหลเหมาะสมและแยกสารได้ดี
 - III. เก็บสารตัวอย่างจากคอลัมน์ โดยใช้การสังเกตสีของสารละลายแต่ละส่วนที่ออกมา และเก็บสารแยกออกมาเป็น fraction
 - IV. พิสูจน์เอกลักษณ์สารที่กำลังแยกด้วย TLC
 - V. นำ fraction ของสารที่มีค่า Rf value เท่ากันมารวมกัน แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator
 - VI. เก็บสารตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์

D. การตกผลึก

การตกผลึกจะทำหลังจากที่นำสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ผ่านคอลัมน์แล้วนำไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator เรียบร้อยแล้ว เพื่อให้ได้สารที่เราสังเคราะห์ได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น โดยการนำสารละลาย methanol ในปริมาณที่น้อยที่สุด จากนั้นเติม hexane เพื่อทำการตกผลึกและกรองเก็บสารที่ได้แล้วนำไปหาโครงสร้างต่อไป

2.4 พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่สังเคราะห์ โดยใช้เครื่องมือทาง spectroscopy ดังนี้

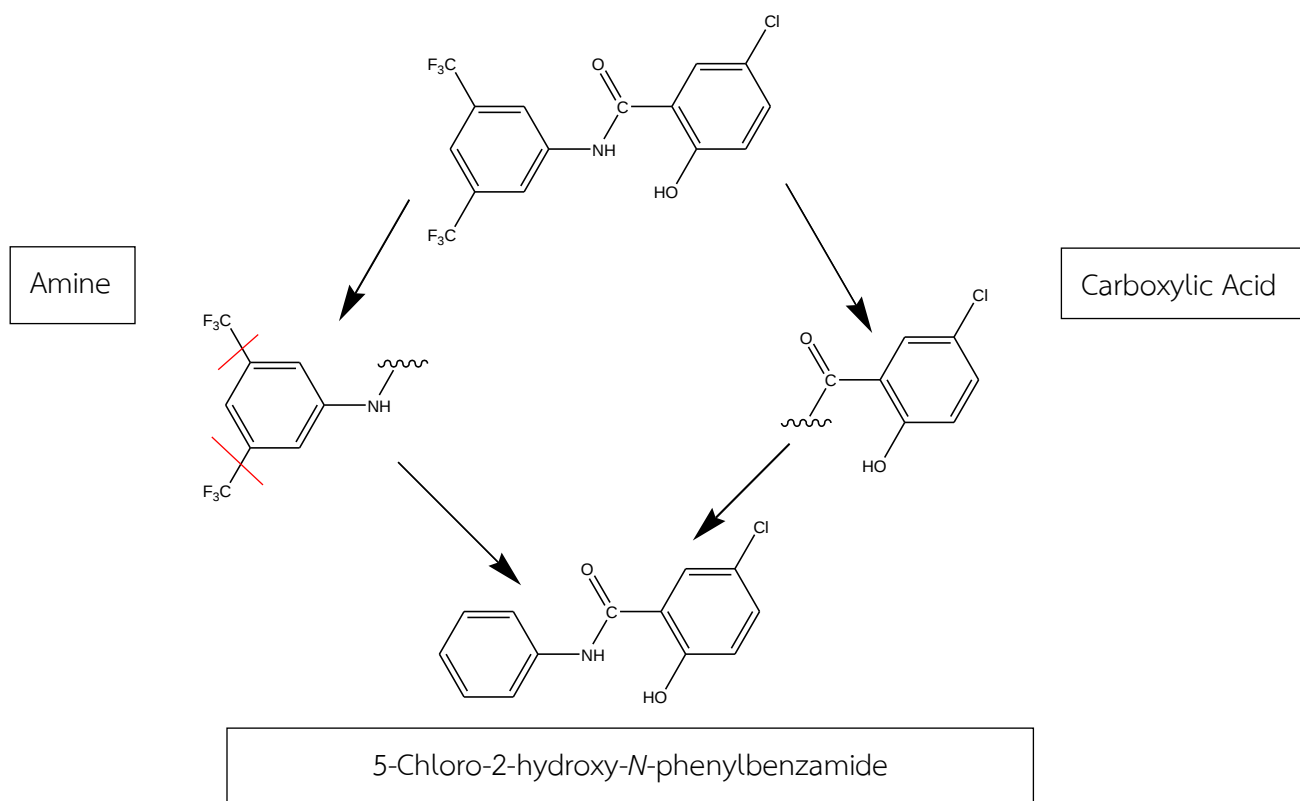
- I. Infrared Spectrometer (IR spectrometer)
- II. Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR spectrometer)
- III. Mass Spectrometer (MS spectrometer)

บทที่ 4 ผลการวิจัย

1. การออกแบบโครงสร้างจากสารต้นแบบ (Lead compound)

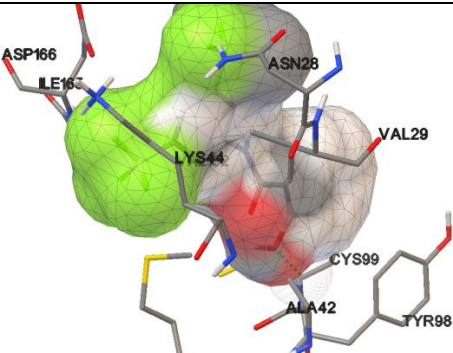
จากการออกแบบโครงสร้างโดยใช้ IMD 0354 (*N*-(3, 5-bis-trifluoromethyl-phenyl)-5-chloro-2-hydroxyl-benzamide) เป็นสารต้นแบบ ซึ่ง IMD 0354 นี้ มีโครงสร้างเป็น amide จึงทำการออกแบบสารให้มีอนุพันธ์คล้ายกับสารต้นแบบโดยแบ่งโครงสร้างออกเป็นส่วนของ amine และ carboxylic acid

ทำการเปลี่ยนส่วนของ amine โดยตัด trifluoromethyl ทั้ง 2 ตัวออก ในขณะที่ส่วนของ carboxylic acid ยังคงไว้เหมือนเดิม

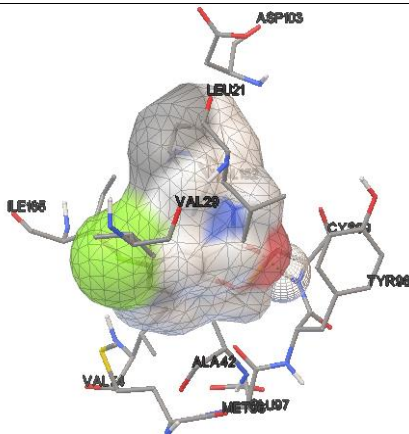


2. ผลการทำ Computer-Aided Drug Design

ตารางที่ 4 ผลของ conformation ของ IMD 0354 บริเวณ active site

Compound	Order conformation	Docked pose	BE	Bonding	IC ₅₀
IMD 0354	100		-5.9	1 H-bond (CYS99)	40.88

ตารางที่ 5 ผลของ conformation ของ A12B3 บริเวณ active site

Compound	Order conformation	Docked pose	BE	Bonding	IC ₅₀
A12B3	100		-6.64	1 H-bond (CYS99)	13.64

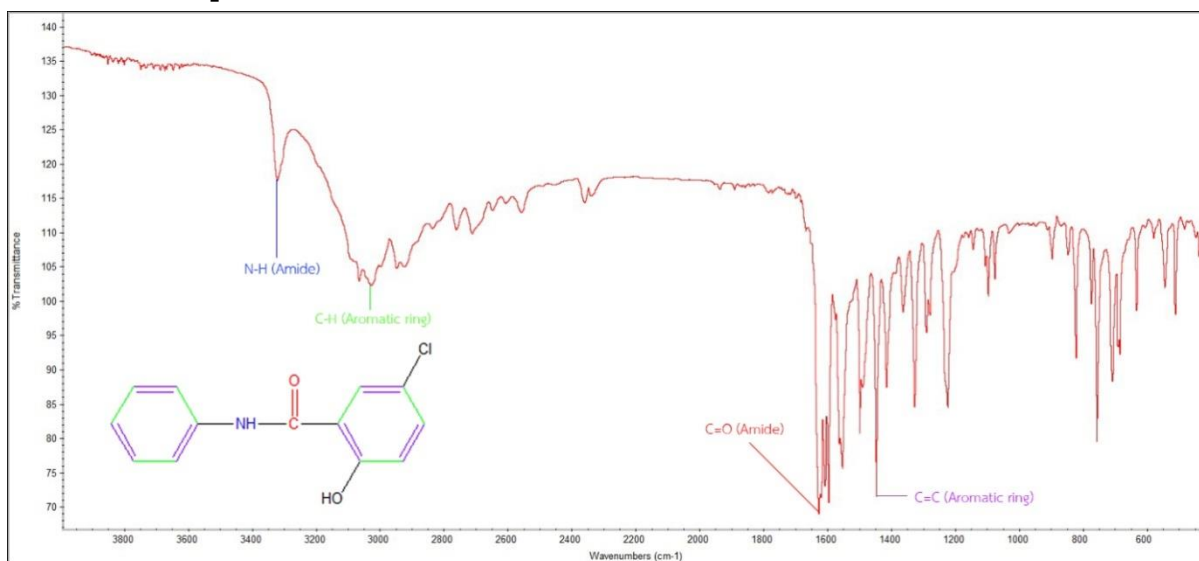
3. การสังเคราะห์สาร 5-chloro-2-hydroxy-*N*-phenylbenzamide

ตารางที่ 6 ผลการสังเคราะห์สาร 5-chloro-2-hydroxy-*N*-phenylbenzamide

List	A12B3 (toluene)
%Yield (Pure)	16.73 %
Product appearance	มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว

4. การตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีด้วยเครื่องมือทาง Spectroscopy

4.1 การพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิค Infrared (IR) Spectroscopy



รูปที่ 15 ตำแหน่งที่สำคัญบน FT-IR ของสาร 5-chloro-2-hydroxy-*N*-phenylbenzamide

IR spectrum ของ สาร 5-chloro-2-hydroxy-*N*-phenylbenzamide จะพบ หมู่ N-H ของ amide ที่ wavenumber $3,322.14\text{ cm}^{-1}$ หมู่ C-H ของ aromatic ring อยู่ในตำแหน่งที่ $3,022.10\text{ cm}^{-1}$ หมู่ C=O ของ amide อยู่ในตำแหน่งที่ $1,622.74\text{ cm}^{-1}$ และ หมู่ C=C ของ aromatic ring อยู่ในตำแหน่งที่ $1450.58, 1553.88, 1598.14\text{ cm}^{-1}$ ดังในตารางที่ 7 และยังแสดง peaks เด่นๆ ดังรูปที่ 15

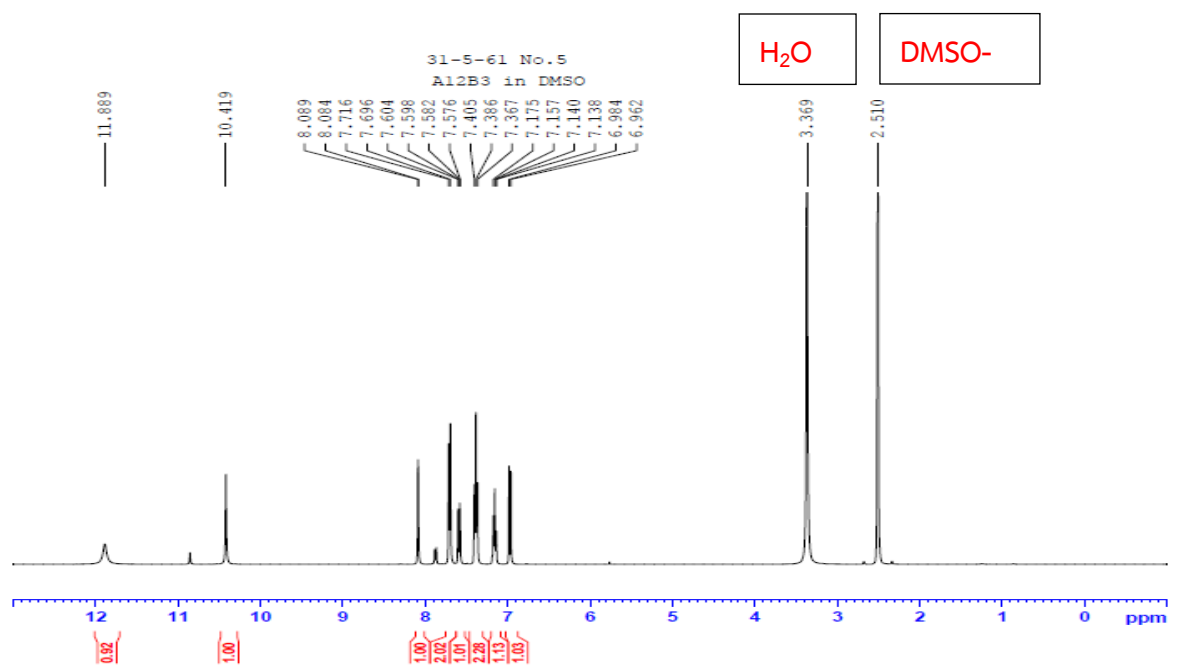
ตารางที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่าง wavenumber (cm^{-1}) กับหมู่ฟังก์ชันทางเคมีของ 5-chloro-2-hydroxy-*N*-phenylbenzamide

Wavenumber (cm^{-1})	Attributed to
3,322.14	หมู่ N-H ของ amide
3,022.10	C-H ของ aromatic ring
1,622.74	หมู่ C=O ของ amide
1450.58, 1553.88, 1598.14	C=C ของ aromatic ring

4.2 การพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance (^1H -NMR)

Spectroscopy

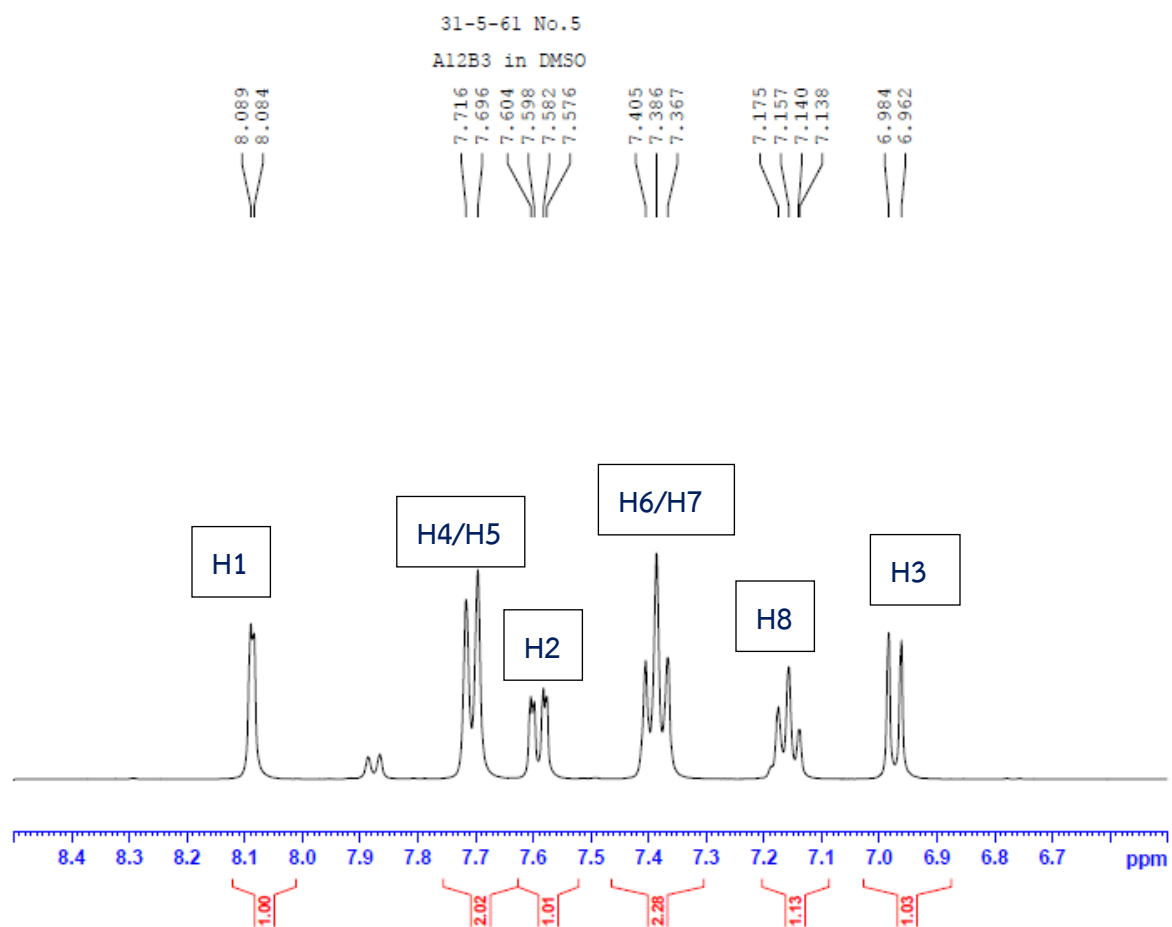
รูปที่ 16 แสดงตำแหน่ง peaks จำนวนและชนิดของ protons ซึ่งสรุปในตารางที่ 9 และ รูปที่ 17 เป็นการขยาย ^1H -NMR spectrum ของสารคือ 5-chloro-2-hydroxy-*N*-phenylbenzamide (A12B3) ในช่วง aromatic protons ที่สนใจ คือ 6.9 - 8.1 ppm ซึ่งจะสอดคล้องกับตำแหน่งของ protons ในโครงสร้าง ดังรูปที่ 18



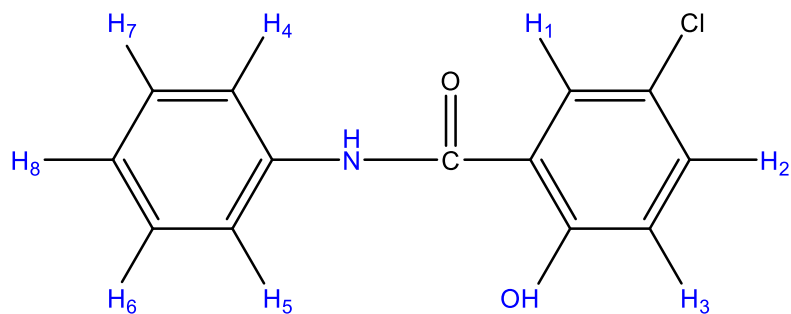
รูปที่ 16 ^1H spectrum (ppm) ของสาร 5-chloro-2-hydroxy-*N*-phenylbenzamide (A12B3)
ช่วง 0-12 ppm ในสารละลาย dms_o-d₆

ตารางที่ 8 แสดงค่า chemical shifts และ coupling pattern ของ protons ในโครงสร้าง
5-chloro-2-hydroxy-*N*-phenylbenzamide (A12B3)

Assigned Protons	Chemical shifts (ppm)	Characteristic
CONH	11.889	Singlet
OH	10.419	Singlet
H1	8.089 8.084	Doublet
H4, H5	7.716 7.696	Doublet
H2	7.604 7.598 7.582 7.576	Multiplet
H6, H7	7.405 7.386 7.367	Multiplet
H8	7.175 7.157 7.140 7.138	Multiplet
H3	6.984 6.962	Doublet



รูปที่ 17 ตำแหน่งของ aromatic protons ใน ^1H spectrum (ppm) ของสาร 5-chloro-2-hydroxy-*N*-phenylbenzamide (A12B3) ใน dmsO-d_6 ช่วง 6.9-8.1 ppm

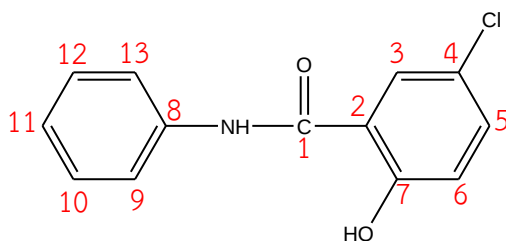


รูปที่ 18 ความสัมพันธ์ของ protons และค่า chemical shifts ที่ปรากฏใน ^1H spectrum (ppm) ของสาร 5-chloro-2-hydroxy-*N*-phenylbenzamide (A12B3)

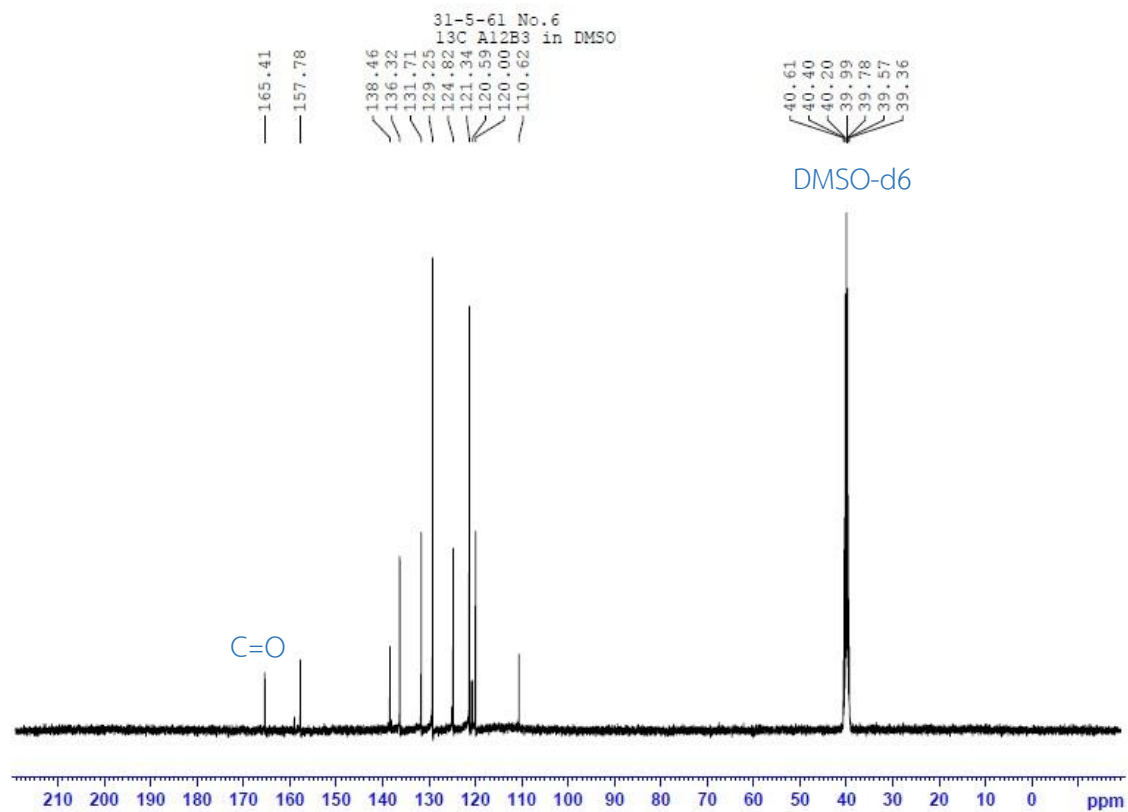
4.3 การพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิค ^{13}C -Nuclear Magnetic Resonance (^{13}C -NMR) Spectroscopy

เมื่อนำสารที่สังเคราะห์ไปตรวจสอบจำนวน carbons ในโครงสร้าง จะได้ ^{13}C -NMR spectrum ดังรูปที่ 19 โดย peak ของ carbonyl carbon จะปรากฏที่ chemical shift เท่ากับ 165.41 ppm ส่วน peak ที่ chemical shift ในช่วง 40 ppm จะเป็นของ dmsd-d6

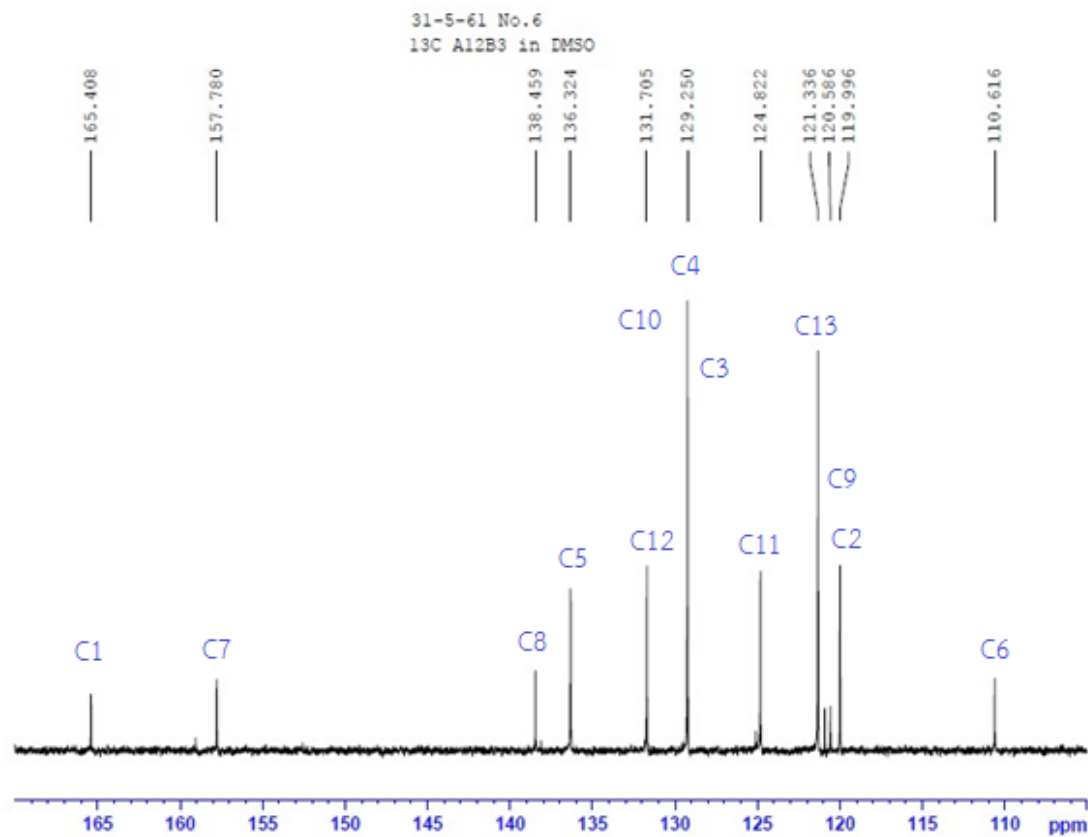
เมื่อทำการขยาย peaks ในช่วง 110-165 ppm ซึ่งเป็นช่วง peaks ของ aromatic carbons จะพบ peaks จำนวน 10 peaks ที่สอดคล้องกับตำแหน่ง carbons ที่มีในโครงสร้าง



รูปที่ 19 จำนวน carbons ในโครงสร้างของสาร 5-chloro-2-hydroxy-*N*-phenylbenzamide (A12B3)



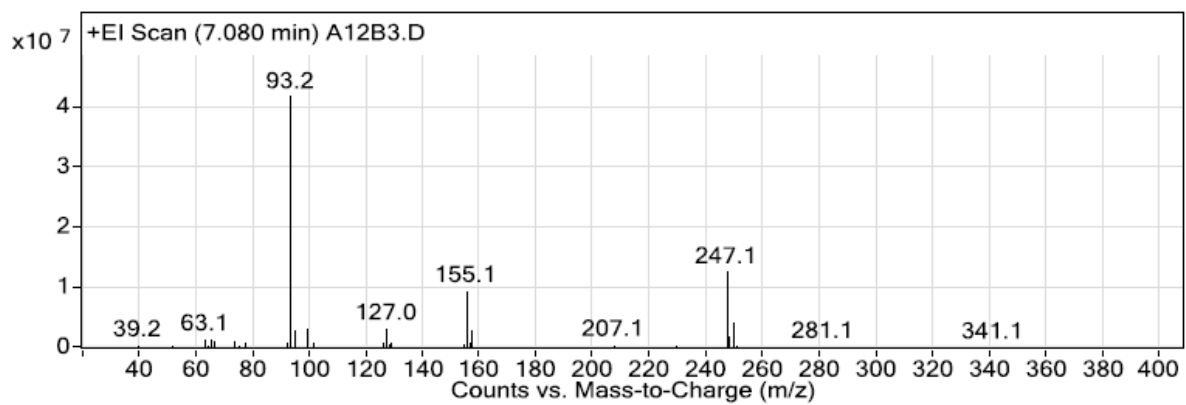
รูปที่ 20 ตำแหน่งของ carbons ใน ¹³C-NMR spectrum (ppm) ของ
 5-chloro-2-hydroxy-*N*-phenylbenzamide (A12B3) ใน dmso-d6 ช่วง 0-210 (ppm)



รูปที่ 21 ตำแหน่งของ carbons ใน ¹³C-NMR spectrum (ppm) ของ
 5-chloro-2-hydroxy-*N*-phenylbenzamide (A12B3) ใน dms_o-d₆ ช่วง 100-165 (ppm)

4.4 การพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิค Mass spectroscopy

Mass spectrum ของสารที่สังเคราะห์ได้ แสดงดังรูปที่ 25



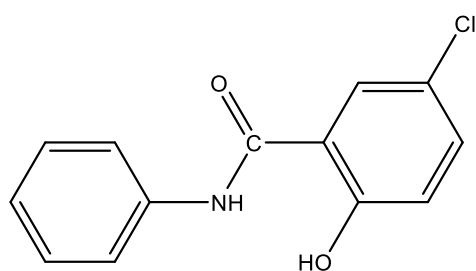
รูปที่ 22 ค่า m/z ของสาร 5-chloro-2-hydroxy-*N*-phenylbenzamide

บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย

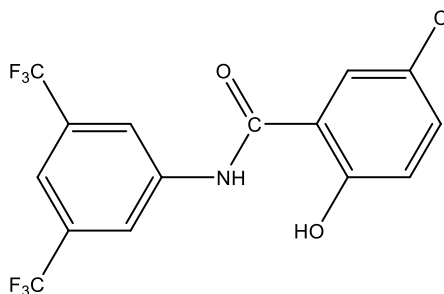
1. ออกแบบโครงสร้าง

การออกแบบโครงสร้างจากสารตั้งต้น (lead compound) คือ IMD 0354 ได้ออกมาเป็น A12B3 จากนั้นนำมาทำการ docking แล้วดูค่า binding energy ของสารที่จับกับ receptor ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

จากโครงสร้าง IMD 0354 ที่ใช้เป็น lead และมีฤทธิ์ พบว่า A12B3 ในส่วนของ ring A (amine) มีความคล้ายคลึงกับโครงสร้างที่ได้ทำการศึกษาก่อนหน้านี้ คือ IMD 0354 แต่แตกต่างกันตรง ring A ของ IMD 0354 จะมีหมู่แทนที่ di-trifluoromethyl ซึ่ง A12B3 ไม่มีหมู่แทนที่นี้



A12B3



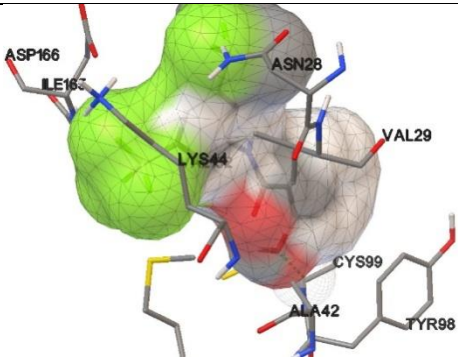
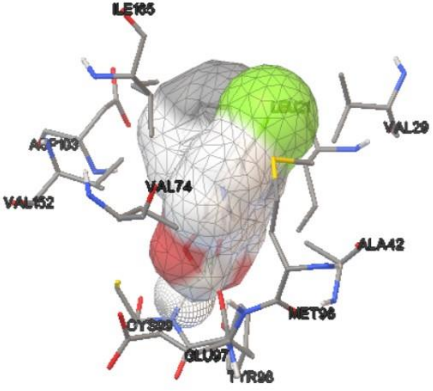
IMD 0354

โดยผู้วิจัยสนใจศึกษาว่าหมู่แทนที่ di-trifluoromethyl จะมีผลต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งหรือไม่

2. Computer – Aided Drug Design

จากผลการ docking สาร A12B3 เมื่อเทียบกับ IMD 0354 พบว่า การตัด di-trifluoromethyl มีผลต่อค่า binding energy และ IC_{50} ซึ่งแสดงผลในตาราง 9 เมื่อเปรียบเทียบค่า binding energy จะพบว่า A12B3 มีค่า binding energy ที่เป็นลบมากกว่า IMD 0354 ดังนั้น A12B3 จึงน่าจะจับกับเอนไซม์ได้ดีกว่า ซึ่งค่า IC_{50} ที่ได้จากโปรแกรม แสดงค่าที่น้อยกว่า IMD 0354 ซึ่งสอดคล้องกัน

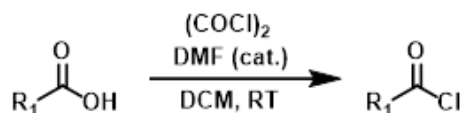
ตารางที่ 9 ผลของ conformation ที่เกิด interaction บริเวณ active site

Compounds	Order conformation	Docking Post	BE	Bonding	IC_{50}
IMD-0354	100		-5.9	1 H-bond (CYS99)	40.88
A12B3	100		-6.64	1 H-bond (CYS99)	13.64

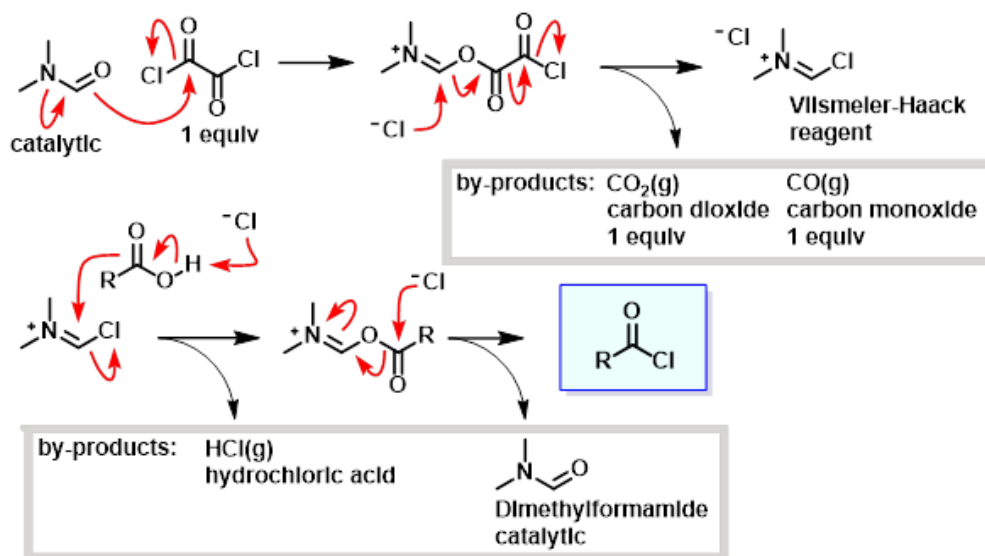
3. สังเคราะห์สารด้วยปฏิกิริยา Amidation

เนื่องจาก % yield ที่ได้จากการทดลอง โดยการคำนวณจาก $\frac{\text{mol ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จริง}}{\text{mol ของสารตั้งต้นที่ใช้หมด (acid)}}$

ได้ค่าเท่ากับ 16.73% ซึ่งถือว่าสังเคราะห์สารออกมาได้น้อย อาจเนื่องมาจากในขั้นตอนการเปลี่ยนสารจาก carboxylic acid เป็น acyl chloride ที่ทำภายใต้บรรยากาศ nitrogen อาจมีความชื้นทำให้ acyl chloride เปลี่ยนกลับไปเป็น carboxylic acid ดังเดิม ทำให้เกิดปฏิกิริยา amidation ได้น้อยลง การเปลี่ยน carboxylic acid เป็น acyl chloride เป็นดังรูปข้างล่างนี้ โดยมี dimethylformamide เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาโดยมีกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังนี้



รูปที่ 23 ปฏิกิริยา เปลี่ยนหมู่ carboxylic acid เป็น acyl chloride



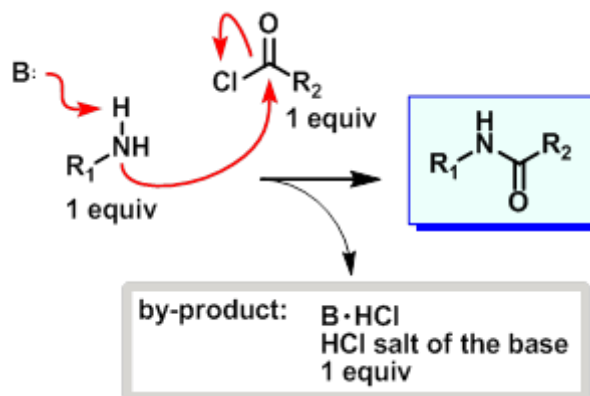
รูปที่ 24 กลไก การเปลี่ยนหมู่ carboxylic acid เป็น acyl chloride

และการเกิดปฏิกิริยา amidation เป็นดังนี้



รูปที่ 25 ปฏิกิริยา Amidation

โดยมีกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังนี้



รูปที่ 26 กลไกของ Amidation

วิธีการคำนวณหา % yield

Acid = 5.14×10^{-3} mol , Amine = 7.72×10^{-3} mol , มวลโมเลกุลของ 5-chloro-2-hydroxy-N-phenylbenzamide = 247.68 , ผลผลิตที่ได้ = 0.213 g

$$\text{mol ผลผลิต} = \frac{0.213}{247.68} = 8.60 \times 10^{-4} \text{ mol}$$

$$\begin{aligned} \% \text{ yield} &= \frac{\text{ผลผลิตที่ได้จริง}}{\text{ผลผลิตตามทฤษฎี}} \times 100\% \\ &= \frac{8.60 \times 10^{-4}}{5.14 \times 10^{-3}} \times 100\% \end{aligned}$$

$$= 16.73\%$$

4. การทำสารให้บริสุทธิ์

หลังจากสังเคราะห์แล้วได้ทำให้สารบริสุทธิ์ โดยใช้ column chromatography โดยใช้ mobile phase เป็น hexane : dichloromethane เท่ากับ 1 : 1 จะได้สารที่บริสุทธิ์ออกมา และนำไปตรวจสอบโครงสร้างต่อด้วยวิธีทาง spectroscopy ต่อไป

5. พิสูจน์โครงสร้างด้วย Spectroscopy

5.1 Infrared Spectrometer (IR spectrometer)

Aniline ซึ่งเป็นสารตั้งต้นจะพบ N-H peak เป็น doublet ที่ wavenumber 3422.77 cm^{-1} และ 3350.17 cm^{-1} ซึ่งเป็นเอกลักษณ์ของ primary amine ในขณะที่ IR spectrum ของ A12B3 จะไม่พบ doublet peaks ของหมู่ N-H แต่จะพบ singlet peak ของหมู่ amide ที่เป็น secondary amine ที่ wavenumber 3322.14 cm^{-1} และพบ peak ของหมู่ carbonyl ของ amide ที่ wavenumber 1622.74 cm^{-1} และพบ peak ของ C-H และ C=C ของ aromatic ring ที่ wavenumber 3022.10 cm^{-1} และ 1450.58, 1553.88, 1598.14 cm^{-1} แสดงว่าสารที่ได้เป็น amide compound

5.2 Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (^1H -NMR spectrometer)

^1H -NMR spectrum ให้ peak ทั้งหมด 10 peaks โดยมี 2 peaks เป็นของ dmso-d₆ และ H₂O จะเหลือ 8 peaks เป็นของสาร โดย 6 peaks ที่อยู่ในช่วงประมาณ 6.9-8.1 ppm เป็น peak ของ H ที่ต่อกับ aromatic ring

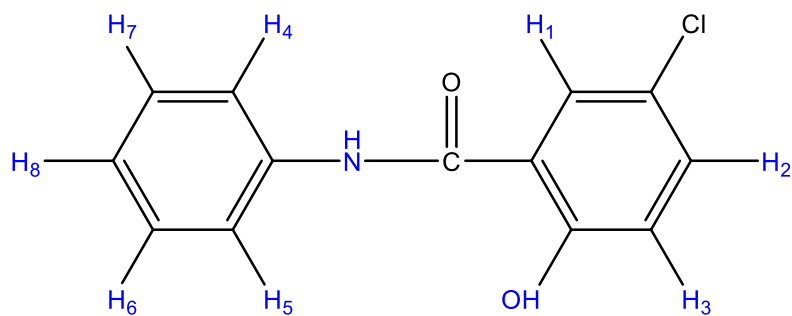
เมื่อพิจารณาจาก H ของ ring B (carboxylic acid) นี้จะเกิด 3 ตำแหน่ง โดยตำแหน่งที่ H1 เกิดที่ 8.089 ppm ซึ่ง integrated ได้เท่ากับ 1 proton เหตุผลที่ downfield เนื่องจากอยู่ใกล้หมู่ดึง electron ส่วนอีก 2 ตำแหน่งคือที่ 7.604 ppm และ 6.984 ppm ซึ่ง integrated ได้ peak ละ 1 proton และทั้ง 2 peaks มี splitting แยกเป็น doublet

เมื่อพิจารณา peak ของ ring A จะพบ 3 ตำแหน่งโดยตำแหน่งของ H4, H5 พบที่ 7.716 และ 7.696 ppm ซึ่ง integrated ได้ 2 proton เหตุผลที่ downfield เนื่องจากอยู่ใกล้หมู่ CONH และ peak ที่ได้จะแตกสัญญาณเป็น doublet สำหรับ H6, H7 พบที่ 7.138-7.175

ppm integrated ได้ 2 protons แตกสัญญาณเป็น multiplet ส่วนตำแหน่ง H8 เกิดที่ตำแหน่ง 7.175- 7.138 ppm integrated ได้ 1 proton แตกสัญญาณออกมาเป็น multiplet และเนื่องจากอยู่ใกล้กับหมู่ดึง electron ทำให้พบที่ upfield มากกว่า

เมื่อพิจารณาจากตำแหน่งสัญญาณที่ 11.89 ppm ซึ่งเป็น singlet และ integrated ได้ 1 proton ซึ่งเป็นของ amide proton เนื่องจากอยู่ใกล้กับหมู่ดึง electron คือ carbonyl group ทำให้เกิด downfield ส่วนตำแหน่งที่สัญญาณที่ 10.419 ppm เป็น singlet เนื่องจากเป็น H ที่อยู่ติดกับหมู่ดึง e^- ทำให้เกิด downfield เช่นกัน

ดังนั้นจากผล ^1H -NMR spectrum ได้ของสารสังเคราะห์ A12B3 ที่สังเคราะห์มีตำแหน่ง proton สอดคล้องกับโครงสร้าง ดังรูปที่ 30



รูปที่ 27 ความสัมพันธ์ของ protons และค่า chemical shifts ที่ปรากฏใน ^1H spectrum (ppm) ของสาร 5-chloro-2-hydroxy-*N*-phenylbenzamide (A12B3)

5.3 Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (^{13}C -NMR spectrometer)

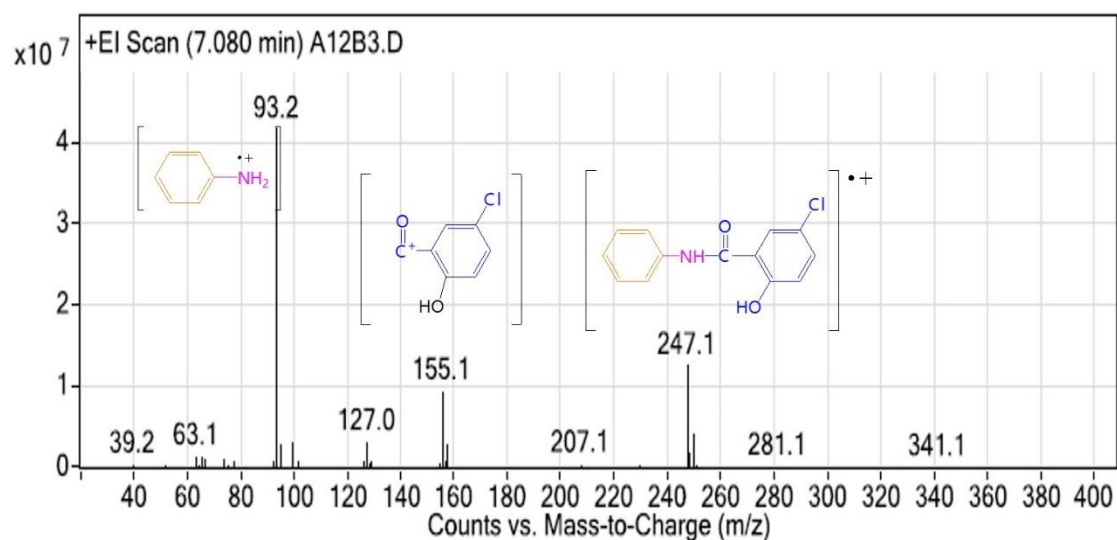
ได้ผลคือ มี peaks ทั้งหมด 11 peaks โดย peak ของ carbonyl จะพบที่ 165.14 ppm และพบ peaks ของ aromatic ring ในช่วงของ 100-160 ppm

5.4 Mass Spectrometer (MS)

พบ M^+ peak ที่ m/z เท่ากับ 247.1 ซึ่งสอดคล้องกับมวลโมเลกุลของสาร A12B3

ส่วนของ ring A พบสัญญาณที่ m/z เท่ากับ 93.2 ซึ่งเป็นส่วนของ amine และเป็น base peak ส่วน B พบสัญญาณที่ 155.1 ซึ่งเป็นส่วนของ carboxylic acid

ดังนั้นจากผล mass spectrum ตรงกับโครงสร้างของสารสังเคราะห์ A12B3



รูปที่ 28 ค่า m/z ของสาร 5-chloro-2-hydroxy-N-phenylbenzamide

ข้อเสนอแนะ

ควรจะมีการทดสอบฤทธิ์การต้านการเติบโตของเซลล์มะเร็ง ของสารที่สังเคราะห์ได้ ซึ่งในการทำวิจัยครั้งนี้มีเวลาน้อย ไม่อาจนำสารไปทดสอบฤทธิ์ได้ทัน

เอกสารอ้างอิง

- 1.Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013.
2. สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์. แผนการป้องกันและควบคุมมะเร็งแห่งชาติ(พ.ศ.2556-2560) 2556 มิถุนายน:10-14
3. Honestdocs. วิธีรักษาโรคมะเร็ง:แหล่งที่มา:<https://www.honestdocs.co/cancer-treatment:11,2017>.
4. Butler T, Maravent S, Boisselle J, Valdes J, Fellner C. A review of 2014 cancer drug approvals, with a look at 2015 and beyond. Pharmacy and Therapeutics. 2015 Mar;40(3):191.
5. Li J, Chen F, Cona MM, Feng Y, Himmelreich U, Oyen R, Verbruggen A, Ni Y. A review on various targeted anticancer therapies. Targeted oncology. 2012 Mar 1;7(1):69-85.
6. Luo JL, Kamata H, Karin M. IKK/NF- κ B signaling: balancing life and death—a new approach to cancer therapy. The Journal of clinical investigation. 2005 Oct 3;115(10):2625-32.
7. Gamble C, McIntosh K, Scott R, Ho KH, Plevin R, Paul A. Inhibitory kappa B Kinases as targets for pharmacological regulation. British journal of pharmacology. 2012 Feb 1;165(4):802-19.
8. H.Yiwen ,Y.Jie ,C.Jiahui ,H.Guping .Statistical Research on the Bioactivity of New Marine Natural Products Discovered during the 28 Years from 1985 to 2012 .Marine drugs .2015:202-21.

9. Commonorganicchemistry. Acid to acid chloride:แหล่งที่มาhttp://commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Acid_to_Acid_Chloride/Acid_to_Acid_Chloride_Index.htm:10/2018.

- 10.Env.eng.chula.ac.th. (2018). *Fourier Transform InfraRed Spectrometer | Environmental Engineering*. [online] Available at: <http://www.env.eng.chula.ac.th/?q=content/fourier-transform-infrared-spectrometer> [Accessed 25 Feb. 2018].

- 11.User, S. (2018). องค์ประกอบและการประยุกต์ใช้งาน. [online] Science.buu.ac.th. Available at: <http://science.buu.ac.th/part/nmr/index.php/home/components-and-applications.html> [Accessed 25 Feb. 2018].

- 12.science-equipment - Mass (MAT 95XL) : Prob และ crucible สำหรับใส่ตัวอย่าง เทคนิค EI [Internet]. share.psu.ac.th. 2018 [cited 25 November 2018]. Available from: <http://share.psu.ac.th/blog/science-equipment/39205?locale=en>

- 13.Materials Innovation Center [Internet]. Mic.eng.ku.ac.th. 2018 [cited 25 November 2018]. Available from: http://www.mic.eng.ku.ac.th/facilities-detail.php?id_sub=31&id=45

- 14.CellVia Enhanced Cell Viability Assay Kit >> [Internet]. Biopcr.com. 2018 [cited 25 November 2018]. Available from: <http://www.biopcr.com/Shop/cellbioch/60990.html>