



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การออกแบบและพัฒนาสารจากโครงสร้างพื้นฐานของสาร
ธรรมชาติทางทะเล Aeropylsinin-1 เพื่อให้มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง
Structure-based Design and Development of Marine Active
Substances, Aeropylsinin-1, as Potential Anticancer Agents

เกาส์ชกรหญิง ดร. อนงค์ ตีระวนิชพงศ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จันทวรรณ แสงแข

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560

มหาวิทยาลัยบูรพา

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การออกแบบและพัฒนาสารจากโครงสร้างพื้นฐานของสาร
ธรรมชาติทางทะเล Aeroplysinin-1 เพื่อให้มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง

Structure-based Design and Development of Marine Active
Substances, Aeroplysinin-1, as Potential Anticancer Agents

เภสัชกรหญิง ดร. อนงค์ ตีระวนิชพงศ์

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จันทวรรณ แสงแข

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุน
รัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา
ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 19/2560

Acknowledgment

This work was financially supported by the research grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (grant no. 19/2560)

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

(Executive summary)

ข้าพเจ้า เกษัชกรหญิง ดร. อนงค์ ตีระวนิชพงศ์ ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัยจากมหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยเรื่อง (ภาษาไทย) การออกแบบและพัฒนาสารจากโครงสร้างพื้นฐานของสารธรรมชาติทางทะเล Aeroplysinin-1 เพื่อให้มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง

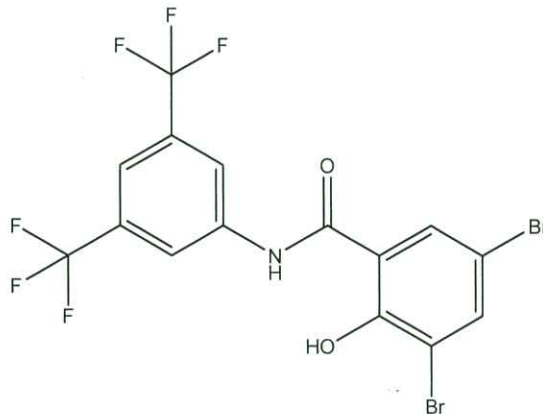
(ภาษาอังกฤษ) Structure-based Design and Development of Marine Active Substances, Aeroplysinin-1, as Potential Anticancer Agents

รหัสโครงการ - / เลขที่สัญญา 19/2560 ได้รับงบประมาณ รวมทั้งสิ้น 462,000 บาท (สี่แสนหกหมื่นสองพันบาทถ้วน)

ระยะเวลาดำเนินงาน 1 ปี (ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม 2559 – 30 กันยายน พ.ศ. 2560)

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการออกแบบและพัฒนาโครงสร้างของสารเพื่อให้มีฤทธิ์เป็นยาต้านมะเร็งแบบจำเพาะเจาะจง (targeted therapy) โดยคัดเลือก lead compounds ได้แก่อนุพันธ์ของ Aeroplysinin-1 มาเป็นสารต้นแบบ เพื่อออกแบบสารใหม่ให้มีฤทธิ์จะเพาะเจาะจงต่อการยับยั้งเอนไซม์ IKB kinase beta (IKK- β) โดยใช้กระบวนการทางคอมพิวเตอร์ช่วยในการออกแบบยา (Computer-Aided Drug Design, CADD) และสารที่ได้ออกแบบจากงานวิจัยนี้ คือ *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide ซึ่งสามารถสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาระหว่าง 3, 5-bis(trifluoromethyl) aniline และ 3, 5-dibromo-2-hydroxy benzoic acid ด้วยปฏิกิริยา amidation จากนั้นนำสารที่สังเคราะห์ได้ไปแยกให้บริสุทธิ์แล้ววิเคราะห์หาโครงสร้างทางเคมีด้วยเครื่องมือทาง spectroscopy ได้แก่ infrared, nuclear magnetic resonance และ mass spectrometers ผลจากเครื่องมือทั้ง 3 ชนิดสอดคล้องกับโครงสร้างของสารใหม่คือ *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide ซึ่งมีสูตรโมเลกุล คือ $C_{15}H_7Br_2F_6NO_2$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 507.02 มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ $187.4^\circ C$ และมีโครงสร้างดังข้างล่างนี้

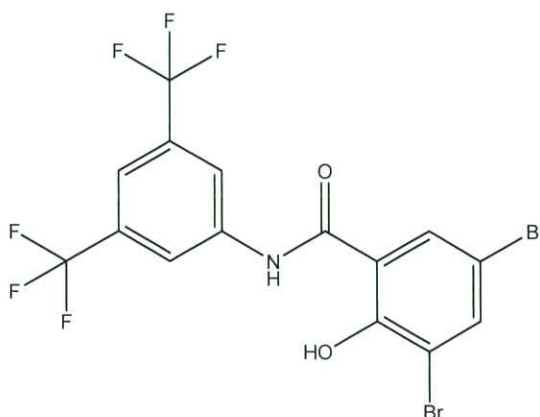


การทดสอบฤทธิ์ด้านการเติบโตของเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT assay ของสาร *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (human cervical cancer cell lines: CaSki) และเซลล์มะเร็งตับ (human hepatoma cell lines, HepG2) พบว่าสาร *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide ที่ความเข้มข้น $5\ \mu M$ เริ่มยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ และความเข้มข้นที่ทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ลดลง 50 % (half maximal inhibitory concentration; IC_{50}) ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki และเซลล์มะเร็งตับ HepG2 มีค่าเท่ากับ 4.85 ± 1.23 และ $3.37 \pm 0.34\ \mu M$ ตามลำดับ ในขณะที่สารเปรียบเทียบกับ doxorubicin มีค่า ความเข้มข้นที่ทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ลดลง 50 % ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki เท่ากับ $1.6 \pm 0.95\ \mu M$ และเซลล์มะเร็งตับ HepG2 เท่ากับ $1.73 \pm 0.85\ \mu M$

ผลจากการทดสอบฤทธิ์ด้านการเติบโตในเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด แสดงให้เห็นว่า สารที่ได้ออกแบบให้มีฤทธิ์ต้านมะเร็งแบบจำเพาะเจาะจง (targeted therapy) โดยใช้กระบวนการทางคอมพิวเตอร์ช่วย ทำให้ได้สารที่มีฤทธิ์ดีในการรักษาในระดับเดียวกับสารเปรียบเทียบคือ doxorubicin ตามที่ได้ตั้งสมมุติฐาน โดยสามารถเลือกสารมาสังเคราะห์และทดสอบฤทธิ์ได้ในระยะเวลาอันสั้น ผลทดสอบตรงตามวัตถุประสงค์ สารใหม่มีฤทธิ์ดีสามารถนำไปเป็นต้นแบบของยามะเร็งในอนาคตได้ ซึ่งทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายในการพัฒนายาใหม่และลดเวลาในการทำวิจัยลงอย่างมาก

Abstract

This research is aimed to design and develop the new anticancer agent as targeted therapy using aeropylsinin-1 derivative as lead compounds. The new agent is designed to be an IKK kinase beta (IKK- β) inhibitor by mean of computer-aided drug design. The designed compound which is *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide was able to synthesized from 3, 5-bis(trifluoromethyl) aniline and 3, 5-dibromo-2-hydroxy benzoic acid by amidation reaction. After purification, its structure was characterized by spectroscopic methods via infrared, nuclear magnetic resonance and mass spectroscopy. The results from these 3 spectroscopic methods were in agreement with the structure of *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl) phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide. The new compound has a molecular formula of $C_{15}H_7Br_2F_6NO_2$, its molecular weight is 507.02 and showed melting point at $187.4^\circ C$. Its structure was shown below



The MTT assay for anticancer activities of this *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide were performed in human cervical cancer cell lines (CaSki) and human hepatoma cell line (HepG2). The results showed that *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide at concentration $5\ \mu M$ was able to inhibit cancer cell growth. Its half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) in CaSki and HepG2 cell lines were 4.85 ± 1.23 and $3.31\ \mu M$ $2 \pm 6.3\ \mu M$ respectively, while the compared compound, doxorubicin possessed its IC_{50} at 1.6 ± 0.95 and $1.73 \pm 0.85\ \mu M$ respectively.

The results from overall studies indicated that the compound which is designed to act as targeted therapy using computer-aided drug design process possessed anticancer activity in the same level as doxorubicin as hypothesized. The chosen compound was synthesized and

test for its activity in a short time with the test results met with objectives. The new compound also possessed good activity and is able to be used as a prototype of cancer drugs in the future. These process saves the cost of developing new drugs and significantly reduces research time.

Output/Outcome

1. ได้สารต้นแบบของยารักษามะเร็งแบบมุ่งเป้า ที่มีฤทธิ์ต้านการเติบโตของเซลล์มะเร็งดี ประหยัดค่าใช้จ่ายและเวลาในการพัฒนายาใหม่
2. รายงานฉบับสมบูรณ์
3. เผยแพร่ผลงานในวารสาร (อยู่ระหว่างเตรียมต้นฉบับ)

ข้อเสนอแนะ

1. ควรดำเนินการเซ็นสัญญาให้เสร็จสิ้นในช่วงไตรมาสแรกของปีงบประมาณ เพื่อที่จะได้มีเวลาในการทำวิจัยได้เร็วขึ้น
2. การขยายเวลาทำวิจัย ควรขยายครั้งละ 6 เดือน เนื่องจากการขยายครั้งละ 3 เดือน ทำให้เสียเวลาในการทำเอกสารและการสั่งซื้อวัสดุ สารเคมีจากต่างประเทศ ก็ใช้เวลา 2-3 เดือน ซึ่งการขยายเวลาครั้งละ 3 เดือน ไม่ได้ช่วยให้ทำวิจัยได้อย่างมีประสิทธิภาพ
3. ควรให้มีการศึกษาดูความเป็นพิษของสารในเซลล์ปกติที่ไม่ใช่เซลล์มะเร็ง
3. ควรให้มีการศึกษาดูฤทธิ์ต้านการเติบโตในเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆ

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้คณะผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการออกแบบและพัฒนาโครงสร้างของสารเพื่อให้มีฤทธิ์เป็นยาต้านมะเร็งแบบมุ่งเป้า(targeted therapy) โดยคัดเลือก lead compounds ได้แก่ อนุพันธ์ของ Aeroplysinin-1 มาเป็นสารต้นแบบในการออกแบบสารใหม่ให้มีฤทธิ์จะเพาะเจาะจงต่อการยับยั้งเอนไซม์ IKB kinase beta (IKK- β) โดยใช้กระบวนการทางคอมพิวเตอร์ช่วยในการออกแบบยา(Computer-Aided Drug Design, CADD) ซึ่งสารใหม่สามารถสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา amidation ระหว่าง 3, 5-bis(trifluoromethyl) aniline และ 3, 5-dibromo-2-hydroxybenzoic acid และทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิคทาง spectroscopy ได้แก่ infrared, nuclear magnetic resonance และ mass spectroscopies ซึ่งผลที่ได้จากเครื่องมือทั้ง 3 ชนิดสอดคล้องกับโครงสร้างของสารใหม่คือ *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1) ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 570.02 มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{15}H_7Br_2F_6NO_2$ และมีจุดหลอมเหลวที่ $187.4^\circ C$

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay ของสารใหม่ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก(human cervical cancer cell lines: CaSki) และเซลล์มะเร็งตับ (human hepatoma cell lines, HepG2) พบว่าความเข้มข้นที่ทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลดลง 50 % (IC_{50}) ในเซลล์มะเร็ง CaSki และ HepG2 มีค่าเท่ากับ 4.85 ± 1.23 และ 3.37 ± 0.34 μM ตามลำดับ เทียบกับสาร doxorubicin ซึ่งมีค่า IC_{50} ในเซลล์ CaSki และ HepG2 เท่ากับ 1.60 ± 0.95 และ 1.73 ± 0.85 μM ตามลำดับ

ผลจากการทดสอบฤทธิ์ต้านการเติบโตในเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด แสดงให้เห็นว่า สารที่ได้ออกแบบให้มีฤทธิ์ต้านมะเร็งแบบจำเพาะเจาะจง (targeted therapy) โดยใช้กระบวนการทางคอมพิวเตอร์ช่วย ทำให้ได้สารที่มีฤทธิ์ดีในการรักษาในระดับเดียวกับสารเปรียบเทียบคือ doxorubicin ตามที่ได้ตั้งสมมุติฐาน โดยสามารถเลือกสารมาสังเคราะห์และทดสอบฤทธิ์ได้ในระยะเวลาอันสั้น ผลทดสอบตรงตามวัตถุประสงค์ สารใหม่มีฤทธิ์ดีสามารถนำไปเป็นต้นแบบของยามะเร็งในอนาคตได้ ซึ่งทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายในการพัฒนายาใหม่และลดเวลาในการทำวิจัยลงอย่างมาก

คำสำคัญ ยาเคมีบำบัด ยาต้านมะเร็งแบบมุ่งเป้า อนุพันธ์ของ Aeroplysinin-1 เอนไซม์ IKB kinase beta (IKK- β)

Abstract

This research is aimed to design and develop the new anticancer agent as targeted therapy using aeroplysinin-1 derivative as lead compound. The new compound is designed to be an IKB kinase beta (IKK- β) inhibitor using computer-aided drug design(CADD) technique. The newly designed compound was able to synthesized by amidation reaction from 3, 5-bis(trifluoromethyl) aniline with 3, 5-dibromo-2-hydroxy benzoic acid and its structure was characterized by spectroscopic methods via infrared, nuclear magnetic resonance and mass spectroscopies. The results from spectroscopic methods were in agreement and revealed that the synthesized compound was *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1) with molecular weight of 507.02. Its molecular formula is $C_{15}H_7Br_2F_6NO_2$ and the melting point is 187.4 °C.

The MTT assay for anticancer activity of this *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1) were performed in two human cervical cancer cell lines (CaSki) and human hepatoma cell lines (HepG2). It was shown that at concentration 5 μ M, *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1) was able to inhibit cancer cell growth and its half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) in CaSki and HepG2 cell lines were 8.06 and $3.314.85 \pm 1.23$ and $3.37 \pm 0.34 \mu$ M respectively, compared to those of doxorubicin which were 1.60 ± 0.95 and $1.73 \pm 0.85 \mu$ M respectively.

The results from overall studies indicated that the compound which is designed to act as targeted therapy using computer-aided drug design process possessed anticancer activity in the same level as doxorubicin as hypothesized. The chosen compound was synthesized and test for its activity in a short time with the test results met with objectives. The new compound also possessed good activity and is able to be used as a prototype of cancer drugs in the future. These process saves the cost of developing new drugs and significantly reduces research time.

Keywords : Chemotherapy, Targeted therapy, Aeroplysinin-1 derivative, IKB kinase beta (IKK- β)

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
Acknowledgement	ข
บทคัดย่อ	ค
Abstract	ง
สารบัญเรื่อง	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์	ฎ
บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
วัตถุประสงค์	4
สมมติฐานการวิจัย	4
กรอบแนวคิดการวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
วิธีการดำเนินการวิจัย	6
เครื่องมือและอุปกรณ์	6
สารเคมี	8
วิธีดำเนินงานวิจัย	10
การศึกษาและออกแบบโครงสร้างยาโดยใช้คอมพิวเตอร์	10
การออกแบบสารใหม่	10
การคัดเลือกสารใหม่	11
การสังเคราะห์สาร	11
การแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วย column chromatography	12

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของสารที่สังเคราะห์ได้	12
การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารที่สังเคราะห์ได้	13
การทดสอบฤทธิ์ต้านการเติบโตของเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT assay	14
ผลการวิจัย	18
การคัดเลือกสารต้นแบบ	18
Computer-Aided Drug Design	20
การสังเคราะห์สาร	32
การตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของสาร	33
Computational chemical data	33
ความสามารถในการละลาย	34
การหาจุดหลอมเหลว	35
การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสาร	37
การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารด้วย IR spectrometer	37
การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารด้วย ^1H NMR spectrometer	44
การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารด้วย ^{13}C NMR spectrometer	55
การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารด้วย Mass spectrometer	60
การวิเคราะห์หาองค์ประกอบในโครงสร้างของสาร	62
การทดสอบฤทธิ์ต้านการเติบโตของเซลล์มะเร็ง	62
อภิปรายผลการทำวิจัย	73
สรุปและเสนอแนะ	75
สรุปรายงานการเงิน	77
เอกสารอ้างอิง	79
ประวัติผู้วิจัย	83

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 การ Validate เอนไซม์ IKK kinase beta (IKK- β)	20
ตารางที่ 2 ผลของ Conformation ที่เกิด Interaction บริเวณ Active site	24
ตารางที่ 3 แสดงคุณสมบัติทางเคมีของสารจากการคำนวณของโปรแกรมคอมพิวเตอร์	33
ตารางที่ 4 แสดงความสามารถในการละลายในตัวทำละลายของสาร	34
ตารางที่ 5 แสดงค่า wavenumber ของ functional groups ที่มีในโครงสร้าง 3, 5-bis(trifluoromethyl) aniline	38
ตารางที่ 6 แสดงค่า wavenumber ของ functional groups ที่มีในโครงสร้าง 3, 5-dibromo-2-hydroxy benzoic acid	40
ตารางที่ 7 แสดงค่า wavenumber ของ functional groups ที่มีในโครงสร้าง <i>N</i> -(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide	42
ตารางที่ 8 แสดงค่าของ $^1\text{H-NMR}$ Spectrum (ppm) ของ 3, 5-bis(trifluoromethyl) aniline ช่วง 0-10 ppm	44
ตารางที่ 9 แสดงค่าของ $^1\text{H-NMR}$ Spectrum (ppm) ของ 3, 5-dibromo-2-hydroxy benzoic acid ช่วง 0-10 ppm	47
ตารางที่ 10 แสดงค่าของ $^{13}\text{C-NMR}$ Spectrum (ppm) ของ <i>N</i> -(3, 5-bis(trifluoromethyl) phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1) ช่วง 0-200 ppm	52
ตารางที่ 11 เปรียบเทียบจำนวน protons และจำนวน $^1\text{H-NMR}$ peaks ในช่วง aromatic region	55
ตารางที่ 12 แสดงค่าของ $^{13}\text{C-NMR}$ Spectrum (ppm) ของ <i>N</i> -(3, 5-bis(trifluoromethyl) phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1) ช่วง 0-200 ppm	59
ตารางที่ 13 แสดงปริมาณองค์ประกอบของธาตุในโมเลกุลของ <i>N</i> -(3, 5-bis (trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1)	62

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 14 ลักษณะของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (CaSki) ภายใต้กล้อง microscope	63
ตารางที่ 15 ลักษณะของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ภายใต้กล้อง microscope	66
ตารางที่ 16 แสดงค่า IC_{50} (μM) ของสาร <i>N</i> -(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1) และ doxorubicin	72

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 แนวทางการออกแบบสารใหม่จาก Aeropylsinin-1	10
รูปที่ 2 Amidation reaction ระหว่าง amine และ carboxylic acid	11
รูปที่ 3 แสดงรูป Hemocytometer และตำแหน่งของช่องที่นับเซลล์	16
รูปที่ 4 กรอบแนวที่แสดงถึงขอบเขตงานวิจัยที่ปรับเปลี่ยน	19
รูปที่ 5 X-ray crystallography ของ enzyme IKK- β รหัส 4KIK และ ligand: K-252A	20
รูปที่ 6 แสดงการจับของสาร K-252A กับ IKK- β or 4KIK enzyme	21
รูปที่ 7 โครงสร้าง 4-Phenyl-7-azaindole และการเกิด hydrogen bond กับ CYS 99	22
รูปที่ 8 แสดงการพัฒนาโครงสร้างเพื่อให้ได้สารที่สามารถสังเคราะห์ได้	22
รูปที่ 9 แสดงปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาร X1	30
รูปที่ 10 แสดงปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาร Y1	31
รูปที่ 11 แสดงปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาร Z1	32
รูปที่ 12 แสดง DSC graph ของ <i>N</i> -(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-Hydroxybenzamide	36
รูปที่ 13 Infrared Spectrum (cm^{-1}) ของ 3, 5-bis(trifluoromethyl) aniline	39
รูปที่ 14 Infrared Spectrum (cm^{-1}) ของ 3, 5-dibromo-2-hydroxy benzoic acid	41
รูปที่ 15 Infrared Spectrum (cm^{-1}) ของ <i>N</i> -(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide	43
รูปที่ 16 $^1\text{H-NMR}$ Spectrum ของ 3, 5-bis(trifluoromethyl)aniline ช่วง 0-10 ppm	45
รูปที่ 17 $^1\text{H-NMR}$ Spectrum ของ 3, 5-bis(trifluoromethyl)aniline ขยายช่วง 5.8-7.4 ppm	46
รูปที่ 18 $^1\text{H-NMR}$ Spectrum ของ 3, 5-dibromo-2-hydroxy benzoic acid ช่วง 0-10 ppm	48
รูปที่ 19 $^1\text{H-NMR}$ Spectrum ของ 3, 5-dibromo-2-hydroxy benzoic acid ช่วง 6.7-8.4 ppm	49

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 20 Intramolecular และ intermolecular H-bond ของ 3, 5-dibromo-2-hydroxy benzoic acid	50
รูปที่ 21 ¹ H-NMR Spectrum (ppm) ของ N-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1) ช่วง 0-13 ppm	51
รูปที่ 22 ¹ H-NMR Spectrum (ppm) ของ N-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide ช่วง 6.2-8.8 ppm	53
รูปที่ 23 โครงสร้างของ N-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxy benzamide	54
รูปที่ 24 แสดงส่วนของ functional groups ในสารตั้งต้น ที่เกี่ยวข้อง ในการเกิดพันธะ amide ของสารใหม่	54
รูปที่ 25 ¹ H-NMR spectra ของ N-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide(a), 3, 5-bis(trifluoromethyl) aniline(b) และ 3-chloro salicylic acid (c)	56
รูปที่ 26 ¹³ C-NMR Spectrum (ppm) ของ N-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1) ช่วง 0-200 ppm	57
รูปที่ 27 ¹³ C-NMR Spectrum (ppm) ของ N-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1) ช่วง 0-145 ppm	58
รูปที่ 28 แสดงตำแหน่ง carbons ในโครงสร้างของ N-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1)	60
รูปที่ 29 แสดง fragmentation pattern ของสาร N-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1)	60

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 30 Mass spectrum (ppm) ของ N-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1)	61
รูปที่ 31 แสดงประสิทธิภาพของสาร N-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1, a) และ doxorubicin (b) ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki	70
รูปที่ 32 แสดงประสิทธิภาพของสาร N-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1, a) และ doxorubicin (b) ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง HepG2	71

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย

(Lists of Abbreviations)

IKK β	= inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta
NF- κ B	= Nuclear Transcription factor kappa-B
4KIK	= Human I κ B kinase beta
K-252A	= (9S-(9 α ,10 β ,12 α))-2,3,9,10,11,12-hexahydro-10-hydroxy-10-(methoxycarbonyl)-9-methyl-9,12-epoxy-1H-di-indolo[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pyrrolo[3,4-i][1,6]benzodiazocin-1-one
IR	= Infrared
NMR	= Nuclear Magnetic resonance
TMS	= Tetramethylsilane
DSC	= Differential Scanning Calorimetry
CaSki	= human cervical cancer cell lines
HepG2	= human hepatoma cell lines
MTT	= (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

บทนำ

(Introduction)

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

มะเร็ง เป็นการเจริญเติบโตของเซลล์ที่แบ่งตัวผิดปกติอย่างควบคุมไม่ได้ หรือเซลล์ที่เกิดการกลายพันธุ์ เกิดเป็นเนื้องอกที่เป็นเนื้อร้ายลุกลามไปตามอวัยวะต่าง ๆ ภายในร่างกายผ่านทางระบบเลือดและน้ำเหลือง (1-3)

มะเร็งเป็นโรคสำคัญที่ก่อให้เกิดปัญหาแก่สาธารณสุขของประชาชนในหลายประเทศ แม้จะมีการพัฒนาความก้าวหน้าทางการแพทย์และเทคโนโลยีแล้ว (1-4) จากข้อมูลขององค์การอนามัยโลก (WHO) พบว่ามีอุบัติการณ์ของประชากรที่เกิดโรคมะเร็งนี้ประมาณ 6 ล้านคนต่อปี และในปี ค.ศ. 2012 มีอุบัติการณ์การเกิดโรคมะเร็งสูงถึง 14 ล้านคนและมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆในอนาคต (3-6) ในปี ค.ศ. 2015 โรคมะเร็งยังเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตของประชากรทั่วโลกถึง 8.8 ล้าน คิดเป็น 14.6% ของผู้เสียชีวิตทั้งหมด (7-8)

โรคมะเร็งในเพศชายชนิดที่พบบ่อยที่สุด ได้แก่ มะเร็งปอด, มะเร็งต่อมลูกหมาก, มะเร็งลำไส้ใหญ่, และมะเร็งกระเพาะอาหาร ในขณะที่พบบ่อยที่สุดในเพศหญิงชนิด คือ มะเร็งเต้านม, มะเร็งลำไส้ใหญ่, มะเร็งปอด, และมะเร็งปากมดลูก (7-8)

มะเร็งปากมดลูก (Cervical cancer) เป็นมะเร็งที่เกิดบริเวณปากมดลูกของผู้หญิง (9) จากสถิติทั่วโลกพบว่า มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งในผู้หญิงที่พบเป็นอันดับสองรองจากมะเร็งเต้านม (9) ซึ่งรวมทั้งในประเทศไทยด้วย (10)

วิธีการรักษาในผู้ป่วยที่ตรวจพบมะเร็งแล้ว ได้แก่ รังสีรักษา (Radiotherapy) เคมีบำบัด (Chemotherapy) และการผ่าตัด (Surgery)

เคมีบำบัด (Chemotherapy) เป็นวิธีการรักษาแบบดั้งเดิม เป็นการรักษาโรคมะเร็งโดยการให้กลุ่มยาที่มีความสามารถในการหยุดการเติบโตของเซลล์มะเร็งโดยการฆ่าเซลล์หรือโดยการหยุดยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ เพื่อรักษา บรรเทาอาการเจ็บป่วย และป้องกันการลุกลามของเซลล์มะเร็ง ในรูปแบบยาเม็ดรับประทานหรือยาฉีด (11) สามารถใช้ร่วมกับรังสีรักษาได้ และสามารถให้ยารักษาเพียงชนิดเดียวหรือให้ยาร่วมกันหลายชนิดเพื่อทำลายเซลล์มะเร็งได้เช่นกัน ในกระบวนการรักษา เคมีบำบัดใช้ในการรักษามะเร็งได้หลากหลายชนิด เนื่องจากสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดี จัดเป็นยาที่มีประโยชน์อย่างมากในการรักษา แต่มีข้อเสียคือ ยาอาจมีผลยับยั้งต่อเซลล์ปกติที่ยังมีการเจริญเติบโตด้วย ทำให้ยากลุ่มเคมีบำบัดนี้มีผลข้างเคียงค่อนข้างมากต่อผู้ป่วย เช่น เกิดอาการวิงเวียนศีรษะ

คลื่นไส้อาเจียน ท้องร่วง อ่อนล้า หมดแรง ไม่อยากอาหาร ผมร่วง เสี่ยงต่อการติดเชื้อและภาวะแทรกซ้อนอื่นได้ง่าย นอกจากนี้ยังมีราคาค่อนข้างแพงด้วยเช่นกัน จากผลข้างเคียงและราคายาที่แพงนี้จึงทำให้ผู้ป่วยรู้สึกท้อแท้และไม่อยากเข้ารับยาเคมีบำบัด หรือรับการรักษาไม่ต่อเนื่องส่งผลให้การรักษามะเร็งไม่หายขาดหรือไม่ได้ผล

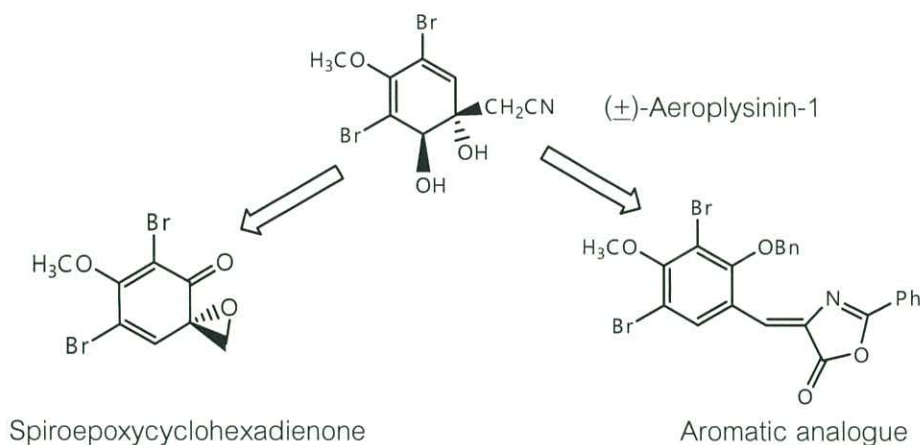
การรักษาแบบจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็ง (Targeted Therapy) จากปัญหาข้างต้นดังกล่าว ทำให้มีการพัฒนายาที่ใช้รักษามะเร็งกลุ่มใหม่ คือ ยาที่มุ่งการรักษาแบบจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็ง ซึ่งเป็นการรักษาด้วยการกำหนดเป้าหมายให้ยาออกฤทธิ์จำเพาะเจาะจงและยับยั้ง genes หรือ proteins ในกระบวนการส่งสัญญาณระดับเซลล์ที่เป็นต้นเหตุของการเจริญเติบโตและแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง ยาในกลุ่มใหม่นี้ด้วยความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งมากขึ้น และเป็นอันตรายต่อเซลล์ปกติน้อยลง ทำให้ผลข้างเคียงจากยาที่เกิดจากการไปทำลายเซลล์ปกติของร่างกายส่วนอื่นๆ ลดลง ดังนั้นผลข้างเคียงจะเกิดขึ้นน้อยกว่าการให้เคมีบำบัด แต่ก็ยังมีผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นได้ ซึ่งผลข้างเคียงอาจแตกต่างกันไปตามชนิดและขนาดของ targeted therapy ที่ได้รับ (12-14) ปัญหาหลักของการใช้ยารักษามะเร็งกลุ่มใหม่นี้คือ ในเซลล์มะเร็งบางชนิดไม่มี genes หรือ proteins ที่เป็นเป้าหมายของยา การที่ยายังมีราคาค่อนข้างแพง และต้องใช้ยาในกลุ่มนี้ร่วมกับยาเคมีหรือการรักษาวิธีอื่นในการรักษามะเร็งหลายชนิด

จากปัญหาข้างต้นดังกล่าวมาจะเห็นได้ว่ายังคงมีความจำเป็นในการพัฒนายารักษามะเร็งที่มีประสิทธิภาพจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็ง โดยที่ตัวยามีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติน้อยและมีความปลอดภัยต่อผู้ใช้มากขึ้นรวมทั้งราคาไม่แพงเกินไป ด้วยเหตุนี้ ผู้วิจัยจึงได้มุ่งทำการวิจัยโดยการพัฒนายารักษามะเร็งแบบมุ่งเป้าที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็ง เพื่อให้ได้ยาที่มีประสิทธิภาพสูง มีความปลอดภัย และมีราคาถูกลง โดยหวังว่ายาที่พัฒนาขึ้นมาจะช่วยลดปัญหาข้างต้นดังกล่าวไม่มากนักน้อย

ในการพัฒนายามะเร็งในกลุ่ม small molecules ที่เป็น targeted therapy ในครั้งนี้ ผู้วิจัยเลือกเป้าหมายของยา เป็น enzyme ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งใน classical หรือ canonical pathway คือ inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta (IKK- β enzyme) ซึ่งเป็น enzyme ที่กระตุ้นการทำงานของ transcription factor ชื่อ Nuclear Transcription factor kappa-B NF-kappaB (NF-KB) ซึ่งมีการรายงานความเชื่อมโยงนี้อย่างแพร่หลาย (15-22) อีกประการหนึ่งคือ enzyme IKK- β นี้มีอยู่ในฐานข้อมูล protein data bank (23-24) ซึ่งสามารถนำข้อมูลส่วนนี้มาใช้ในขั้นตอนของ computer-aided drug design ได้ (25-28)

จากการทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งผ่านกลไกแบบจำเพาะเจาะจง พบว่ามีการรายงานถึงอนุพันธ์ของสารธรรมชาติทางทะเล คือ อนุพันธ์ของ Aeroplysinin-1 ที่แสดงฤทธิ์ต้านมะเร็ง (29-32) และมีฤทธิ์อื่น เช่น ฤทธิ์ต้านอักเสบ (anti-inflammatory) ฤทธิ์ฆ่าเชื้อ (antibiotic) ฤทธิ์ต้านไวรัส (antiviral) ฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เซลล์ตาย (apoptosis) และฤทธิ์ต้านการสร้างเส้นเลือดใหม่ (anti-angiogenic) เป็นต้น

จากรายงานของ Martínez-Poveda B. et al (33) ซึ่งได้ทำการพัฒนาโครงสร้างของ Aeroplysinin-1 จนได้เป็นอนุพันธ์ที่มีความจำเพาะต่อฤทธิ์ต้านการสร้างเส้นเลือดใหม่ (anti-angiogenic) ดีกว่าสารเดิม ซึ่งโครงสร้างของอนุพันธ์ใหม่นี้ คือ โครงสร้างที่เป็น Spiroepoxycyclohexadienone analogs และ Aromatic analogs ดังข้างล่างนี้



ผลจากการศึกษาสาร Aeroplysinin-1 และพัฒนาจนได้อนุพันธ์ดังกล่าวข้างต้น แสดงให้เห็นว่า สารอนุพันธ์ของ Aeroplysinin-1 นี้สามารถนำมาเป็น lead ในการพัฒนายาต่อไปได้

ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงเลือกศึกษาโครงสร้างของสาร Aeroplysinin-1 และอนุพันธ์ มาพัฒนาด้วยกระบวนการออกแบบยาด้วยวิธีการทางคอมพิวเตอร์ (Computer-Aided Drug Design) เพื่อให้ได้โครงสร้างสารที่สามารถนำไปสังเคราะห์และทดสอบฤทธิ์ต่างๆ โดยคาดหวังว่าสารที่ออกแบบและสังเคราะห์ได้จากงานวิจัยนี้ จะมีฤทธิ์จำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็ง ที่ทำให้ได้ยาที่มีความปลอดภัยมากขึ้น มีผลข้างเคียงลดลงและสามารถลดต้นทุนการใช้จ่ายในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งได้ในอนาคต และ/หรือสารที่สังเคราะห์ได้นี้ อาจมีฤทธิ์ในการรักษาทางเภสัชวิทยาอื่นๆ

วัตถุประสงค์

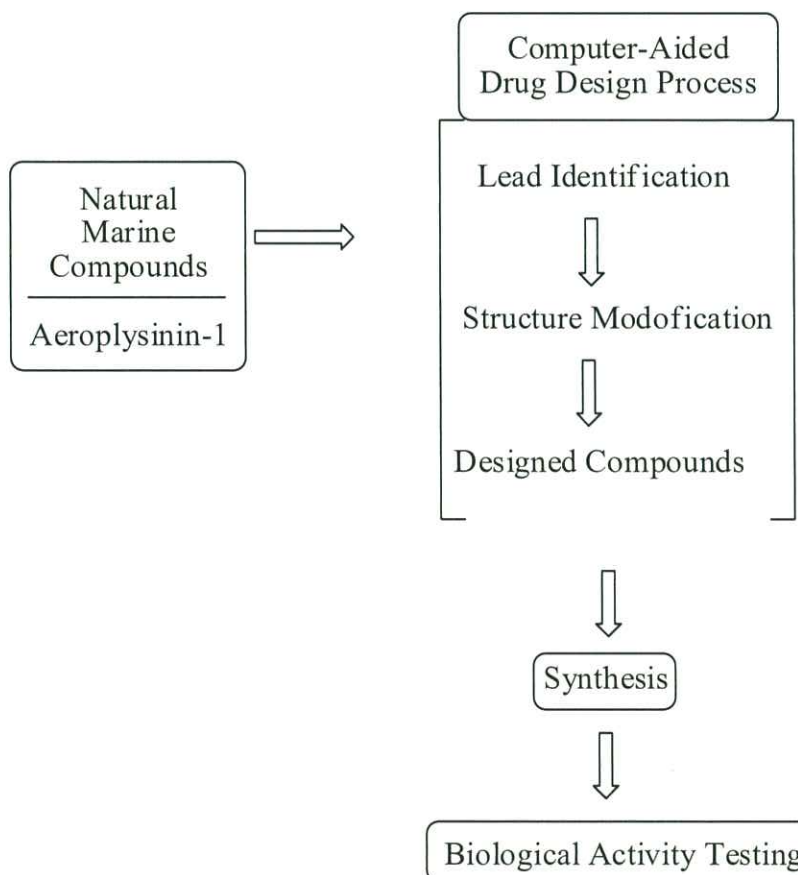
เพื่อพัฒนาสารที่มีฤทธิ์เป็นยาระงับหรือฤทธิ์อื่นๆที่ได้จากการพัฒนาโครงสร้างพื้นฐานของสารสารธรรมชาติทางทะเล Aeroplysinin-1

ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

1. ทฤษฎี สมมุติฐาน

1. สารที่ออกแบบและสังเคราะห์ได้จะมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง
2. สารที่ออกแบบและสังเคราะห์ได้มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่นๆ

2. กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย



โดยการใช้โครงสร้างของสารธรรมชาติทางทะเลที่มีฤทธิ์น่าสนใจ คือ Aeroplysinin-1 มาเป็นสารต้นแบบ (lead) เพื่อนำไปพัฒนาโดยการออกแบบและเปลี่ยนแปลงสูตรโครงสร้างด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (computer-aided drug design) เพื่อให้ได้สารออกแบบใหม่

ที่คาดว่าจะมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา(designed compounds) ทำการสังเคราะห์สารออกแบบใหม่
และนำไปทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น ฤทธิ์ต้านมะเร็ง เป็นต้น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น ด้านวิชาการ ด้านนโยบาย ด้านเศรษฐกิจ/พาณิชย์ ด้านสังคมและชุมชน รวมถึงการเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ได้เสนอแนวทางใหม่ในการพัฒนาสารจากธรรมชาติทางทะเลให้มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา
2. ได้พัฒนาโครงสร้างสารอนุพันธ์ของ Aeropylsinin-1 เพื่อเป็น lead compound ในการออกแบบยาและพัฒนาเป็นยาที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งได้
3. สามารถนำความรู้ที่ได้ไปเป็นข้อมูลในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีของสารให้เหมาะสมเพื่อให้ได้มาซึ่งคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ของสารที่ดียิ่งขึ้น
4. สามารถนำองค์ความรู้ใหม่ๆ ไปประยุกต์ใช้ในด้านการแพทย์และด้านเทคโนโลยีชีวภาพได้
5. เพื่อแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของสารธรรมชาติทางทะเลในการนำมาพัฒนาเป็นยาใหม่ ตลอดจนแสดงให้เห็นถึงคุณค่าและความสำคัญของการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติจากทะเล เพื่อนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์
6. สามารถตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานวิจัยลงในวารสารวิชาการระดับชาติหรือนานาชาติในฐานข้อมูล TCI หรือ SJR หรือ ICI

วิธีการดำเนินการวิจัย

(Materials and Methods)

1. เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย

1.1. คอมพิวเตอร์

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

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

1.2. โปรแกรม

AutoDock 4.0

Cygwin64

ChemDraw Ultra 12.0

Chem3D Ultra 12.0

1.3. เครื่องมือและอุปกรณ์

Glass chromatography column (Sigma-Aldrich, USA)

Magnetic bar (Fisher Scientific, USA)

Magnetic stirrer (Fisher Scientific, USA)

TLC tank (Fisher Scientific, USA)

TLC plates (Merck, Germany)

UV lamp (254/365nm 6-Watt 230V 50Hz 0.12Amps, Cambridge, UK)

Rotary evaporator (254/365nm, Buchi Thailand Ltd.)

Fourier-Transform Infrared spectroscopy (Thermo Spectra-Tech, P/N 700-0085,
Ver3.9 10/01, Shelton, USA and APW1200202, Becthai Thailand)

Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer, 400 MHz (Bruker, Germany)

Mass Spectrometer (Bruker, Germany)

Analytical balance (Sartorius, Switzerland)

Centrifuge (Thermo Fisher, USA)

Inverted microscope (Olympus CKX41, USA)
Biohazardous Hood Type 2A (Telstar, Spain)
Humidified incubator 37 °C, 5% CO₂ (Mitre 4000 Serie, Contherm[®], NZ)
Vortex (vertex-2 genie, Scientific Industries, USA)
Water bath 37°C (WiseBath[™], Korea)
Pipette gun (Biohit Midi Plus, SARTORIUS)
Serological pipette, 5ml, 10 ml (SPL Life Sciences, Korea)
Auto Pipette, 1000 µl, 200 µl, 10 µl, 2 µl (RAININ)
Well slide chamber (SPL Life Sciences, Korea)
Multichannel Pipettes (Research Plus, Eppendorf[®], USA)
Reagent Reservoir (SPL Life Sciences, Korea)
Plastic ware (Glasslock, USA)
25 cm², 75 cm² Cell culture flask (SPL Life Sciences, Korea)
96 well plate (SPL Life Sciences, Korea)
Surfactant-free cellulose acetate syringe filter 0.2 µM (Minisart[®], Sartorius, Germany)
Microplate reader (Versa Max, USA)
High speed refrigerated micro centrifuge (MX-307 Tomy Kogy, JAPAN)
Hemocytrometer, cover slide (Boeco, Germany)
Autoclave (Systec, Germany)
Electrophoresis power supply (Fisher Scientific, USA)
Eppendorf BioSpectrometer[®] basic spectrophotometer (Eppendorf[®], Germany)
Heat box (Thermo Fisher, USA)
Microcentrifuge tube 1.5 ml (Thermo Fisher[®], USA)
Parafilm M film (Sigma-Aldrich, USA)
UV Gel documentation system (Bio rad, USA)
Horizontal gel tray (Fisher Scientific, USA)

1.2 สารเคมี

3, 5-dibromo-2-hydroxybenzoic acid (Sigma-Aldrich, USA)
7-Azaindole (Sigma-Aldrich, USA)
2-Aminopyridine (Sigma-Aldrich, USA)
3, 5-Bis(trifluoromethyl) aniline (Sigma-Aldrich, USA)
Sodium sulphate anhydrous crystal (Carlo Erba, Italy)
Sodium chloride (Carlo Erba, Italy)
Sodium bicarbonate (Ajax, USA)
Methanol (Avanter Performance Materials, USA)
Ethyl acetate (Ajax, USA)
Hexane (Avanter Performance Materials, USA)
Silica gel 1.07734.2500 (Merck, Germany)
Dichloromethane (Labscan, USA)
Dimethyl sulfoxide *d*6 (Sigma-Aldrich, USA)
Chloroform-*d* (Sigma-Aldrich, USA)
Deuteriated water, D₂O (Sigma-Aldrich, USA)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco[®], USA)
Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco[®], USA)
Penicillin Streptomycin (Gibco[®], USA)
HEPES, free acid (Hyclone[™], USA)
Sodium pyruvate 100 mM solution (Hyclone[™], USA)
10 X Phosphate Buffered saline pH 7.4 (PBS) (Vivantis Inc. USA)
0.25% Trypsin-EDTA (Invitrogen, U.S.A)
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (invitrogen[™])
70% Ethanol (Fluka, Germany)
Dimethyl sulphoxide (DMSO) for MTT assay (Carlo Erba, France)
Dimethyl sulphoxide (DMSO) Ultra pure (VivantisInc, USA)
Trypan Blue Stain 0.4% (Gibco[™], USA)
Cell culture freezing medium (Gibco[®], USA)

5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1)
(Invitrogen, USA)

2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCHF-DA) (Life Technologies, USA)

2.5% Glutaraldehyde (Sigma-Aldrich, USA)

Ribonuclease A (Vivantis Inc, USA)

4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (AppliChem, USA)

Propidium Iodide [1mg/mL] (Invitrogen, USA)

Glycerol (Sigma-Aldrich, USA)

Blood and cell culture DNA mini kit (Qiagen, Germany)

Agarose powder (VWR Life Science, USA)

SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen, USA)

1X Tris/Borate/EDTA buffer (TBE buffer) (Thermo Fisher[®], USA)

6X DNA Loading dye (Fermentas[®], USA)

GeneRuler 1Kb DNA ladder (Fermentas, USA)

Isopropanol (Fluka, Germany)

TE buffer (Sigma-Aldrich, USA)

2. วิธีดำเนินงานวิจัย

2.1 การศึกษาและออกแบบโครงสร้างยาโดยใช้คอมพิวเตอร์

2.1.1 การเตรียมและคัดเลือกโครงสร้างชีวโมเลกุลเป้าหมาย คือ IKK kinase β (IKK- β)

โดยการเลือกและนำโครงสร้าง 3 มิติ ของ targeted molecule คือ IKK- β จากฐานข้อมูล (4KIK, Human I κ B kinase beta, <http://www.rscb.org/pdb/>) ที่จับกับ ligand ที่อยู่ในฐานข้อมูลในรูป .pdb file มาเตรียมเป็น .pdbqt file เพื่อใช้ในการ docking

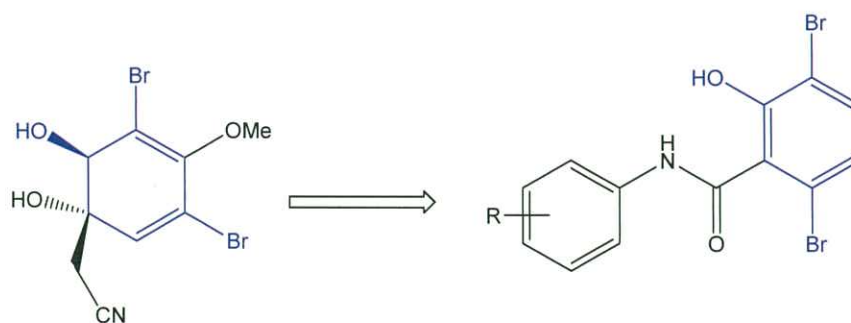
2.1.2 เตรียม ligand ที่จะใช้ในการ docking

a. เตรียมโครงสร้าง 2 มิติ และ 3 มิติ ของสารที่ออกแบบด้วยโปรแกรม Chem 3D ทำการ minimize energy ด้วย MM2 บันทึกเป็นไฟล์ Protein dat bank (.pdb)

b. นำโครงสร้าง ligand ที่เตรียมไว้จากขั้นตอน 2.1.2 a. มาใช้ในโปรแกรม Autodock 4.0 เพื่อทำการ docking และหาค่าความแรงในการจับกับเอนไซม์ IKK β และรายงานผลเป็นค่า 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

2.2 การออกแบบสารใหม่

โดยการใช้โครงสร้างของอนุพันธ์ Aeroplysinin-1 มาเป็นสารต้นแบบ (lead compounds) ในการออกแบบ โดยสารที่ออกแบบใหม่นี้ จัดเป็นสารในกลุ่ม aromatic amide หรือ benzamide



รูปที่ 1 แนวทางการออกแบบสารใหม่จาก Aeroplysinin-1

จากนั้น นำโครงสร้างสารใหม่ที่ได้ออกแบบนี้ ไปทำตามขั้นตอน 2.1

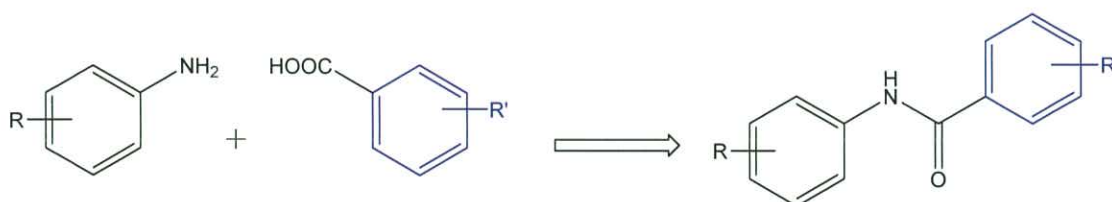
2.3. การคัดเลือกสารใหม่เพื่อสังเคราะห์

การคัดเลือกสารใหม่เพื่อทำการสังเคราะห์จะพิจารณาจากหลักการ ดังนี้

1. ค่าที่แสดงจากการทำ docking ของโครงสร้างในกระบวนการ 2.1
2. ความยากง่ายและจำนวนขั้นตอนในการสังเคราะห์สาร
3. ค่าใช้จ่ายและความยากง่ายในการจัดหาสารตั้งต้นและสารอื่นในการทำปฏิกิริยา
4. ระยะเวลาในการจัดหาสารตั้งต้น
5. ความบริสุทธิ์และ % yield ที่ได้จากปฏิกิริยา

2.4 การสังเคราะห์สารที่ได้รับการคัดเลือก

จะใช้ปฏิกิริยาเคมี คือ amidation จากสารตั้งต้น คือ amines และ carboxylic acids ได้เป็นอนุพันธ์ amides ของสารที่ได้ออกแบบไว้ ปฏิกิริยาแสดงดังรูปข้างล่าง



รูปที่ 2 Amidation reaction ระหว่าง amine และ carboxylic acid

2.5 การสังเคราะห์สาร

1. ชั่ง carboxylic acid จำนวน 5.14 mmol ใส่ใน round bottom flask ขนาด 100 mL
2. เติม toluene 15 mL ลงใน flask จากนั้นทำให้อุณหภูมิลดลงจนถึง 0 °C
3. เติม oxalyl chloride (0.64 mL, 7.20 mmol) ตามด้วย dimethylformamide 2 - 3 หยด
ปล่อยให้สารละลายผสมนี้ทำปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 0 °C นาน 20 นาที
4. จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิจนสารละลายถึงจุดเดือด และทำปฏิกิริยาแบบ reflux ต่ออีก 1.5 ชั่วโมงภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน

5. ระบายเอาตัวทำละลายออกแล้ว แล้วเติม dichloromethane 5 mL ลงใน flask ที่มีของแข็งเหลืออยู่
6. เติมสารละลายผสมของ amine (7.71 mmol) และ triethylamine (0.72 mL, 5.14 mmol) ที่ละลายอยู่ใน dichloromethane 10 mL ลงใน flask และให้สารทำปฏิกิริยากันภายใต้บรรยากาศไนโตรเจนนาน 24 ชั่วโมง
7. เติม dichloromethane 100 mL ลงในสารละลาย และทำการกำจัดสารปนเปื้อนที่ไม่ต้องการด้วย 1 M NaOH จำนวน 30 mL 1 ครั้ง ตามด้วย น้ำ 100 mL อีก 3 ครั้ง
8. นำชั้น dichloromethane ไปกำจัดน้ำที่เหลือติดอยู่ด้วย anhydrous $MgSO_4$ จากนั้นระบาย dichloromethane ออกด้วยเครื่อง rotary evaporator

2.6 การแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วย column chromatography

นำสารที่ได้จากข้อ 2.5 ไปแยกสิ่งปนเปื้อนที่ค้างค้างและทำให้ได้สารบริสุทธิ์มากขึ้นด้วยวิธีการ column chromatography โดยใช้ hexane : dichloromethane ในอัตราส่วน 6 : 4 เป็น mobile phase หลังจากกระเหยสารละลายที่รองรับได้จาก column แล้ว นำสารที่เหลืออยู่ใน flask ไปตรวจสอบโครงสร้างในขั้นตอนต่อไป

2.7 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของสารที่สังเคราะห์ได้

คุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ที่ต้องการศึกษา คือ ความสามารถในการละลาย และการหาจุดหลอมเหลวของสาร

2.7.1 การทดสอบความสามารถในการละลาย

ในกรณีที่สารเป็นของแข็ง การตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ที่นิยม ได้แก่ การศึกษาความสามารถในการละลายของสารในตัวทำละลายชนิดต่างๆ ทั้งชนิดที่แสดงความเป็นขั้วหรือประจุสูง ไปจนถึงมีความเป็นขั้วต่ำหรือไม่มีขั้ว เช่น น้ำ methanol, chloroform, hexane เป็นต้น

2.7.2 การหาจุดหลอมเหลวด้วยวิธี Differential scanning calorimetry (DSC)

ใช้เป็นวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางความร้อน (thermal transition) ของสารตัวอย่าง ที่ใช้วัดการเปลี่ยนแปลงพลังงาน (การดูดหรือคายพลังงาน) ของสารตัวอย่าง เมื่อถูกเพิ่ม หรือลด อุณหภูมิ ใน

บรรยากาศที่ถูกควบคุม ซึ่งในการวิจัยนี้ จะใช้วัดการดูดพลังงานในขณะที่เปลี่ยนสถานะของสารที่สังเคราะห์ได้ซึ่งมีลักษณะเป็นของแข็ง เมื่อเพิ่มอุณหภูมิ สารจะดูดพลังงานและเปลี่ยนสถานะจากของแข็งเป็นของเหลว ซึ่งพลังงานที่ถูกดูดกลืนจะสัมพันธ์กับจุดหลอมเหลวของสาร บันทึกผลของการเปลี่ยนสถานะในลักษณะของกราฟ

2.8 การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารที่สังเคราะห์ได้

2.7.2 Infrared Spectroscopy (IR) Spectrometry

เป็นเทคนิคที่ใช้ดูหมู่ฟังก์ชันในโมเลกุลของสารประกอบอินทรีย์ ซึ่งในงานวิจัยนี้จะใช้เทคนิคนี้เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันในโครงสร้างเคมีของสารตั้งต้นเทียบกับสารที่สังเคราะห์ใหม่ โดยการเตรียมสารด้วยวิธี KBr disc

วิธีการทำ KBr disc ของสาร

- นำสารที่สังเคราะห์ได้ 10 mg ใส่ลงใน mortar หินอ่อนสำหรับเตรียม KBr disc
- เติม KBr (IR grade) 50 mg ใน mortar
- ทำการบดสารผสมทั้งสองให้เข้ากันและเป็นเนื้อละเอียด
- นำสารที่บดละเอียดแล้ว ไปอัดแน่นด้วยเครื่องมือทำ KBr disc
- นำแผ่น KBr disc ไปวัดการดูดกลืนแสง infrared
- บันทึกผล

2.7.3 Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectrometry

เป็นเทคนิคที่วัดการดูดกลืนพลังงานจากสนามแม่เหล็กของนิวเคลียสของธาตุแต่ละชนิดซึ่งจะมีความแตกต่างกัน หรือแม้กระทั่งนิวเคลียสของธาตุชนิดเดียวกันที่อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกัน ก็จะทำให้สัญญาณการดูดกลืนพลังงานที่แตกต่างกันด้วย ในงานวิจัยนี้ จะตรวจสอบการดูดกลืนพลังงานของนิวเคลียสของ H และ C อะตอม ของโมเลกุลระหว่างสารตั้งต้นกับสารใหม่ที่สังเคราะห์ได้ ซึ่งจะมีจำนวน H และตำแหน่งของ protons (ค่า chemical shift) ของแต่ละหมู่ฟังก์ชันแตกต่างกัน

การเตรียมสารสำหรับวัด NMR

- ละลายสารในตัวทำละลายที่ปราศจากอะตอมของ H ในการทดลองนี้ ใช้ตัวทำละลาย คือ dimethylsulfoxide-*d*6

- นำสารละลายที่อยู่ในหลอดสำหรับวัด ^1H และ ^{13}C -NMR ไปวัดจำนวน H และ C ภายใต้สนามแม่เหล็กไฟฟ้า 400 MHz
- ใช้สาร tetramethylsilane (TMS) เป็น reference standard

2.7.4 Mass Spectrometer (MS) Spectrometry

เป็นเทคนิคการตรวจวัดที่ใช้หลักการคัดแยกมวลต่อประจุ (m/z) และหาน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight, M.W) ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้อง ทำให้ทราบโครงสร้างทางเคมีของสารนั้นๆได้ ในงานวิจัยนี้จะใช้เทคนิคนี้เพื่อหา น้ำหนักโมเลกุล และส่วนของโครงสร้างที่เกิดจากการแตกหักของพันธะในโมเลกุลของสารที่สังเคราะห์ได้

การเตรียมสารสำหรับวัด Mass

- ละลายสาร 5 mg ในตัวทำละลาย คือ methanol
- ฉีดสารเข้าในส่วนการทำประจุ
- บันทึกผล

2.8 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเติบโตของเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT assay

2.8.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูกและเซลล์มะเร็งตับ (CaSki and HepG2 cell lines)

นำเซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki และเซลล์มะเร็งตับ HepG2 จำนวน 2×10^5 cell/ml มาเลี้ยงใน 75 cm^2 cell culture flask ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM นำไปบ่มในตู้ humidified incubator อุณหภูมิ 37°C ที่มี $5\% \text{ CO}_2$ เป็นเวลา 2-3 วัน จนเซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นประมาณ 10 เท่า และมีจำนวนเซลล์ประมาณ 1×10^6 cells/ml ก่อนนำเซลล์ไป subculture เพื่อใช้ในการทดลองต่อไปได้

การทำ subculture

- ใช้ปิเปตดูดอาหารเก่าออก
- ล้างชั้นเซลล์ด้วย PBS Buffer pH 7.4 ประมาณ 6-8 ml ดูด PBS ออกทิ้ง
- เติม $0.25\% \text{ Trypsin-EDTA}$ 1 ml
- นำไปบ่มในตู้ humidified incubator อุณหภูมิ 37°C ที่มี $5\% \text{ CO}_2$ ประมาณ 1-2 นาที เพื่อให้เซลล์หลุดออกเป็นเซลล์เดี่ยว จะได้เป็นสารละลายขุ่นๆ

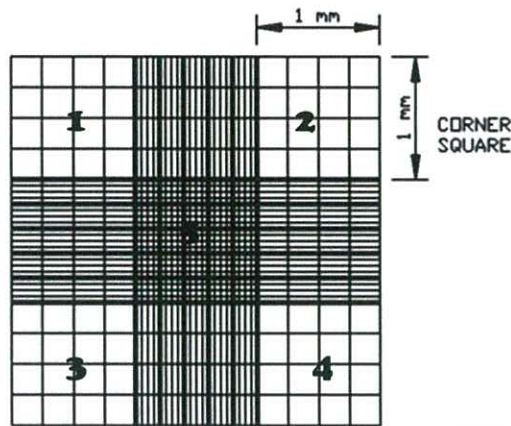
- เติม complete media 9 ml เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ 0.25% Trypsin-EDTA
- ดูดขึ้นลงหลายๆครั้งจนสังเกตเห็น Flask เป็นสีใส
- ทำการนับเซลล์แล้วคำนวณปริมาตรเพื่อให้ได้เซลล์เริ่มต้น 1×10^5 cells/ml
- ดูดเซลล์จาก Flask เก่า (ปริมาตรที่คำนวณได้) ออกมาใส่ Flask ใหม่
- เลี้ยงเซลล์เริ่มต้นที่ 1×10^5 cells/ml ด้วย DMEM บ่มในตู้ Incubator ภายใต้อุณหภูมิ 37°C , มี CO_2 5% เป็นเวลา 2-3 วัน

การนับเซลล์

หลังจาก trypsinized จนได้เป็นเซลล์เดี่ยวแล้ว เซลล์ที่จะนำไปใช้ในการทดลองต้องเป็นเซลล์ที่มีชีวิต > 98% ซึ่งจะทำให้การนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell count) ด้วยสี trypan blue มีรายละเอียดดังนี้ นำเซลล์ดังกล่าวมา 10 μl หยดลงบนแผ่นพาราฟิล์ม ผสมกับสี 0.4% trypan blue 10 μl ใช้ autopipette ดูดขึ้นลงผสมให้เข้ากัน ดูดเซลล์ที่ย้อมสีแล้วมาหยดลงบน hemocytometer ที่มี cover slide ปิดอยู่ นำไปนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตภายใต้กล้อง Inverted microscope โดยนับเซลล์ที่มีชีวิตในช่อง 5 ช่อง คือ ช่องบนซ้าย ล่างซ้าย บนขวา ล่างขวา และช่องตรงกลาง ดังรูปที่ 3 โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะไม่ติดสีน้ำเงินของ trypan blue เนื่องจากสีมีประจุเป็นลบ ไม่สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ที่มีชีวิตเข้าไปได้ ส่วนเซลล์ที่ไม่มีชีวิตจะติดสีน้ำเงิน จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต สามารถคำนวณได้จากสูตรดังนี้

$$\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (cells/ml)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่นับได้} \times \text{dilution factor} \times 10^4}{\text{จำนวนช่องที่นับ}}$$

(dilution factor = 2, นับ hemocytometer 5 ช่อง)



รูปที่ 3 แสดงรูป Hemocytometer และตำแหน่งของช่องที่นับเซลล์

2.8.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกและเซลล์มะเร็งตับ (Cytotoxicity assay)

ขั้นตอนการเตรียมเซลล์

1. เตรียมเซลล์เริ่มต้นที่ความเข้มข้น 2×10^5 cells/ml ลงใน 96 well plate ในปริมาตร 100 μ l/well
2. นำไปบ่มในตู้ humidified incubator อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO_2 นาน 24 ชั่วโมง
3. นำเซลล์มาทดสอบกับสารที่สังเคราะห์ไว้ที่ความเข้มข้น 0 - 500 μM เปรียบเทียบกับ doxorubicin (DOX) (Positive control) ที่ความเข้มข้น 0 - 25 μM นาน 48 ชั่วโมง

ขั้นตอนการวิเคราะห์เซลล์มีชีวิตด้วยเทคนิค MTT assay

1. เลี้ยงเซลล์ใน 96 well plate ไปปั่นตกด้วยเครื่อง High speed refrigerated micro centrifuge ที่ 5000 rpm 5 นาที
2. เทส่วน supernatant ทิ้ง ให้เหลือแต่ส่วน pellet
3. เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM (non-Phenol red) ลงไป 100 μL /well
4. หยดสาร MTT ที่มีความเข้มข้น 5 g/L, 10 μl /well ลงใน 96 well plate
5. นำไปบ่มในตู้ humidified incubator อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO_2 4 ชั่วโมง
6. จากนั้นนำไปปั่นตกด้วยเครื่อง high speed refrigerated micro centrifuge ที่ 5000 rpm

5 นาที

7. เทส่วน supernatant ที่ให้เหลือแต่ส่วน pellet
8. ละลายตะกอนด้วย DMSO ปริมาตร 80 μ L/well
9. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ช่วงคลื่น 570 nm
10. แปลผลด้วยโปรแกรม SoftMax Pro 6.3
11. จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหา % cell viability โดยใช้สูตรดังนี้

$$\% \text{ cell viability} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของ sample} \times 100}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของ control}}$$

2.8.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ (statistic analysis)

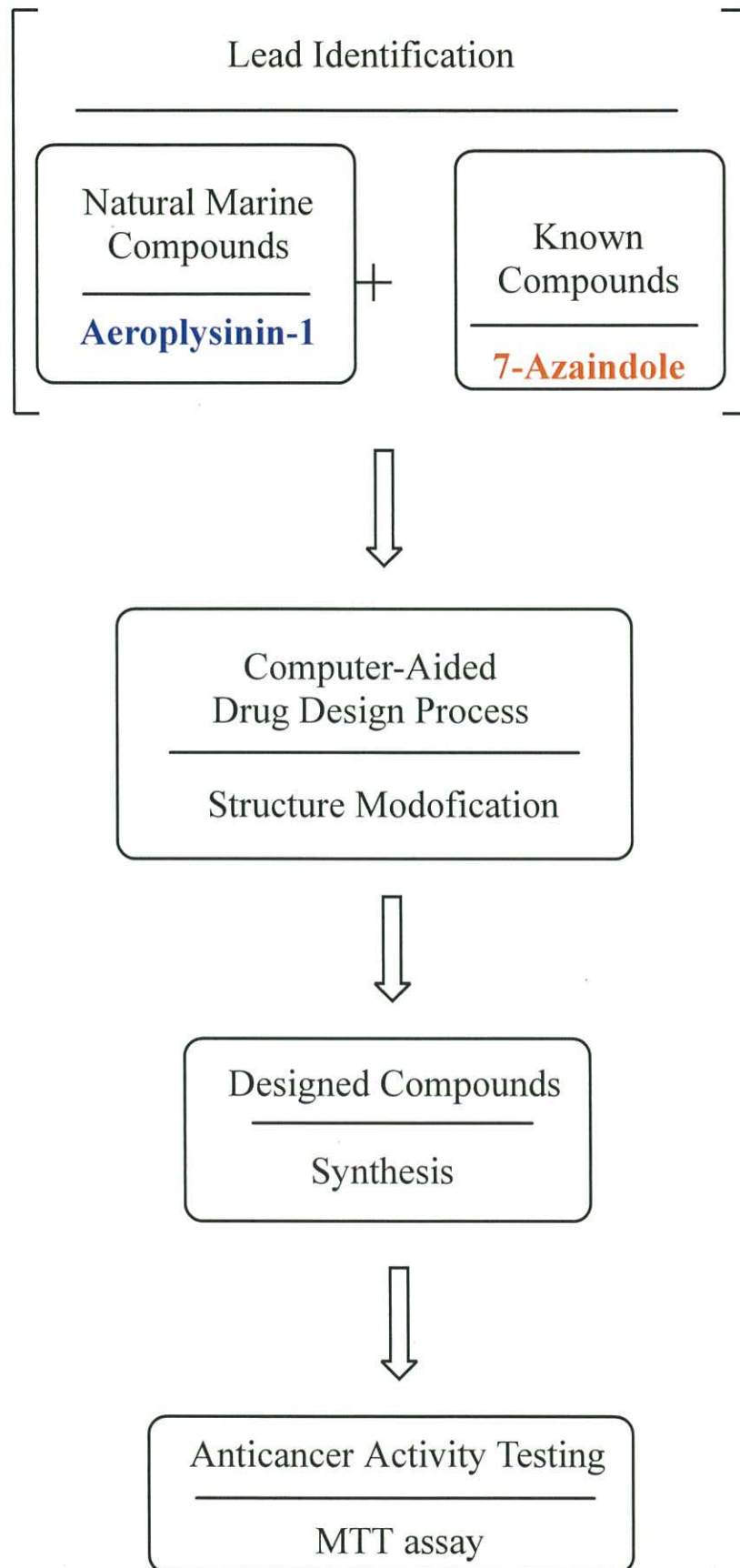
การวิเคราะห์ความเป็นพิษของสารต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก (CaSki cells, SiHa cells) และเซลล์ผิวหนังปกติ (HaCaT cells) ด้วยเทคนิค MTT จะทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง (n=3) เขียนกราฟโดยใช้โปรแกรม microcal origin 6.0 แสดงผลเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ \pm standard error of mean (S.E.M.) โดยใช้ Student's t-test โดยค่า $p\text{-value} < 0.05$ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการวิจัย (Results)

1. การคัดเลือกสารต้นแบบ (Lead Identification)

จากการทบทวนวรรณกรรมเพื่อหาสารธรรมชาติทางทะเลที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ผู้วิจัยสนใจ สารธรรมชาติทางทะเล คือ Aeropysinin-1 ซึ่งเป็นสารที่ได้มีรายงานการพัฒนาโครงสร้างและฤทธิ์ไว้อย่างชัดเจน โดยเฉพาะฤทธิ์ต้านมะเร็ง ซึ่งได้มีรายงานไว้ว่า เกิดผ่านกระบวนการส่งสัญญาณเข้าเซลล์ (cell signaling pathway) และผ่าน inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta (IKK- β enzyme) โดย IKK- β enzyme นี้ มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง พบว่าถ้า IKK- β enzyme ถูกยับยั้งหรือถูกยับยั้งการทำงานจะส่งผลให้เซลล์มะเร็งหยุดการเจริญเติบโตไปด้วย ดังนั้น งานวิจัยนี้ จึงได้เลือก IKK- β enzyme นี้ มาเป็นเป้าหมายของการออกแบบยา นอกจากนี้ IKK- β enzyme ยังมีข้อมูลของโครงสร้างอยู่ในฐานข้อมูลที่เป็น protein databank ซึ่งเป็นข้อมูลที่สามารถนำไปใช้ในการออกแบบด้วยกระบวนการทางคอมพิวเตอร์ได้ทันที

นอกจากนี้ได้มีรายงานการเกิดพันธะของโครงสร้าง 4-Phenyl-7-azaindole ที่เป็น IKK- β inhibitor(39) กับ amino acid ตำแหน่งที่เป็น cysteine 99 และ methionine111 ตรงส่วนของ active site ของ IKK- β enzyme ดังนั้น การพัฒนาโครงสร้างจาก aeropysinin-1 ที่สามารถเกิดพันธะกับ IKK- β enzyme จะช่วยเน้นการออกฤทธิ์ของสารที่พัฒนาให้ตรงกับเป้าหมายมากยิ่งขึ้น



รูปที่ 4 กรอบแนวคิดที่แสดงถึงขอบเขตงานวิจัยที่ปรับเปลี่ยน

2. Computer-Aided Drug Design

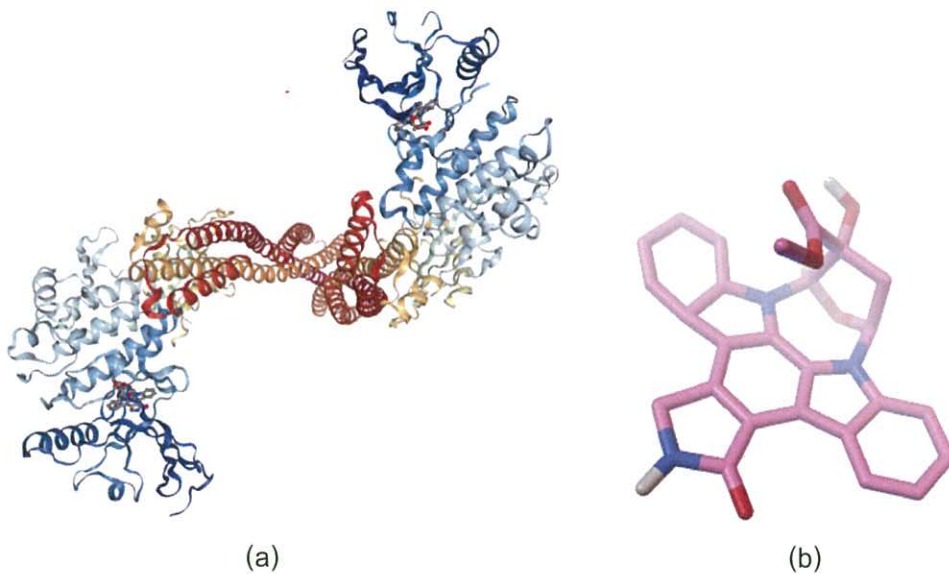
2.1 Validation of Target Molecule

การใช้ targeted molecule จากฐานข้อมูล protein data bank โดยเฉพาะในลักษณะ ligand-enzyme complex จะทำการตรวจสอบความถูกต้องเพื่อดูความคงตัวของ enzyme และความจำเพาะเจาะจงของ ligand ในการจับกับ enzyme โดยยอมรับค่า RMSD < 2Å° ในการวิจัยนี้ได้เลือกใช้ enzyme IKK- β รหัส 4KIK และใช้ ligand ในการทำ validation คือ K_252A (รูปที่ 5a , 5b และ 6)

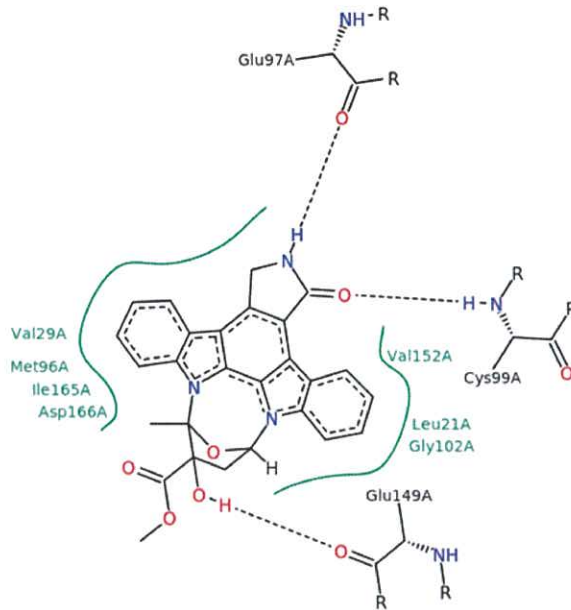
จากการทำ validation มีค่า RMSD เท่ากับ 0.43 (ตารางที่ 1) ผู้วิจัยจึงใช้โครงสร้าง 4KIK ในการ docking และศึกษา parameters ต่างๆ ในการออกแบบสารด้วยคอมพิวเตอร์

ตารางที่ 1 การ Validate เอนไซม์ IKK kinase beta (IKK- β)

PDB Code	Binding Energy (Kcal/mol)	% สมาชิกใน cluster สูงสุด	RMSD (Å°)
4KIK	-6.77	16	0.43



รูปที่ 5 X-ray crystallography ของ enzyme IKK- β รหัส 4KIK (a) และ ligand: K-252A (b)



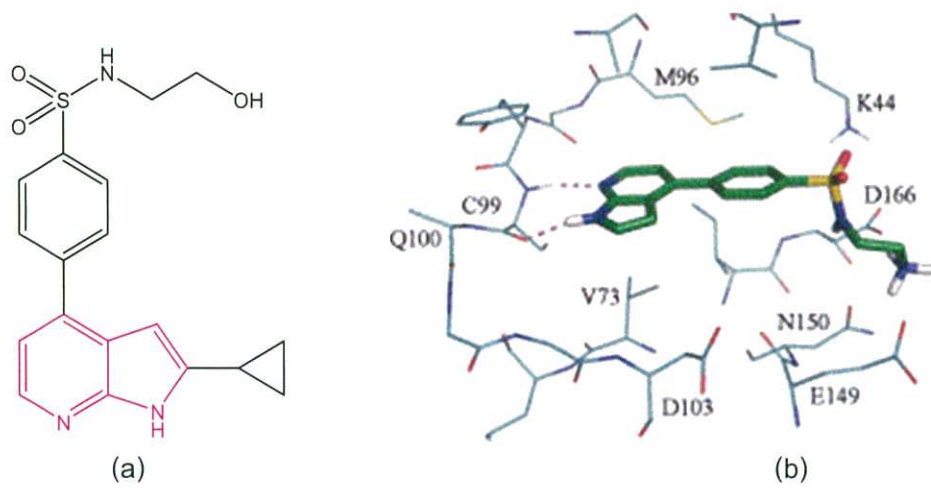
รูปที่ 6 แสดงการจับของสาร K-252A กับ IKK- β or 4KIK enzyme

<https://www.rcsb.org/structure/4KIK>

2.2 Design of Target Compounds

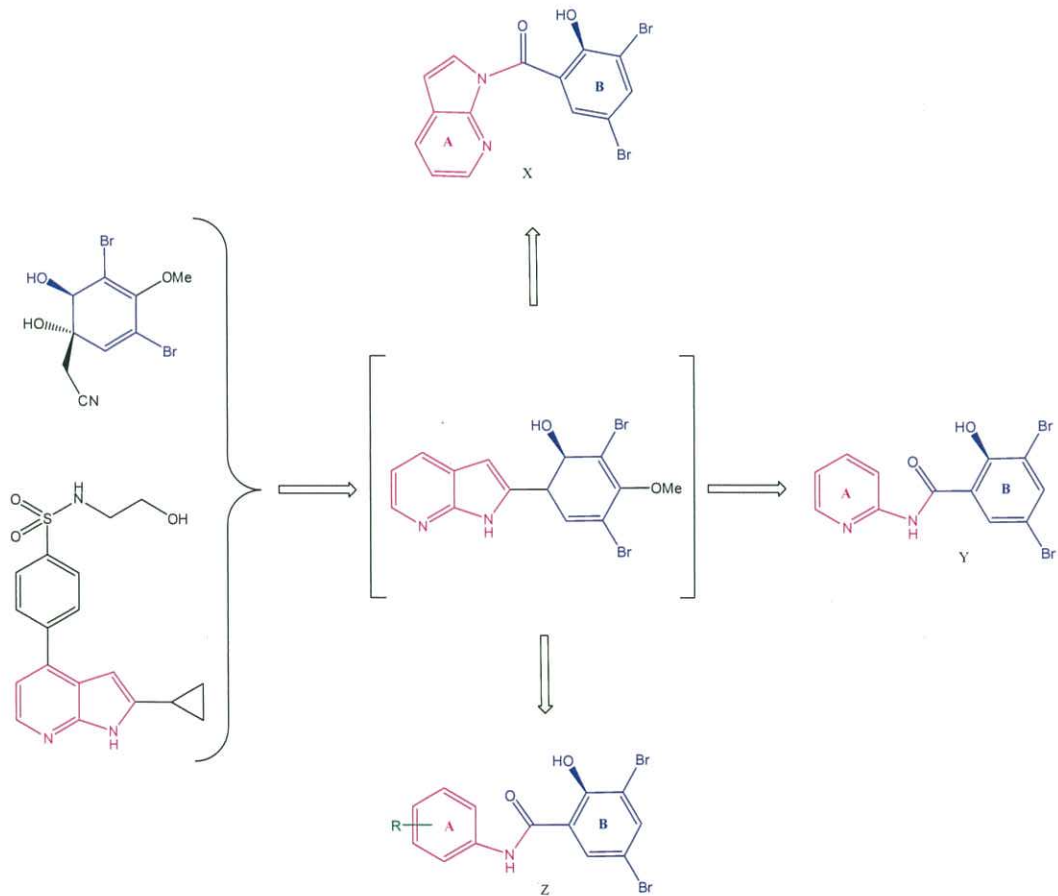
จากโครงสร้างของ อนุพันธ์ Aeropylsinin-1 คือ aromatic analogues ที่ดีพัฒนามาจนได้สารที่มีฤทธิ์จำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็งมากขึ้น ผู้วิจัยจึงเลือก aromatic analogues นี้มาเป็นส่วนของสารที่จะออกแบบ

ในขณะเดียวกัน ได้มีรายงานของ Liddle J et al (39-40) ที่แสดงส่วนของโครงสร้างสาร 7-azaindole ที่เกิด hydrogen bond กับ enzyme IKK kinase beta (รูปที่ 7) ตรง N atom ที่ตำแหน่ง 7 กับ CYS99 และ MET 111 ผู้วิจัยจึงได้นำข้อมูลนี้มาเป็นส่วนของโครงสร้างในการออกแบบ โดยมีแนวคิดที่ว่า การเพิ่มส่วนที่สามารถเกิดพันธะ H กับ enzyme เข้าในโมเลกุลสารใหม่ น่าจะมีส่วนทำให้โครงสร้างของสารที่ออกแบบนี้ มีความจำเพาะเจาะจงต่อ enzyme และเซลล์มะเร็งเพิ่มมากขึ้นกว่าเดิม ดังนั้น ผู้วิจัยจึงได้นำส่วนของ 7-azaindole ring มาพัฒนา โดยการเกิดพันธะกับสารอนุพันธ์ของ Aeropylsinin-1 คือ aromatic analogues จากนั้นตรวจสอบสารที่ออกแบบด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์โดยใช้การเกิดพันธะกับ amino acid CYS 99 และ Met 111 ในการเลือกสารมาสังเคราะห์อีกประเด็นหนึ่ง



รูปที่ 7 โครงสร้าง 4-Phenyl-7-azaindole (a) และการเกิด hydrogen bond กับ CYS 99 (b)
(Liddle et al, 39)

โครงสร้างสารที่ออกแบบสามารถสรุปโครงสร้างได้ดังรูปที่ 8



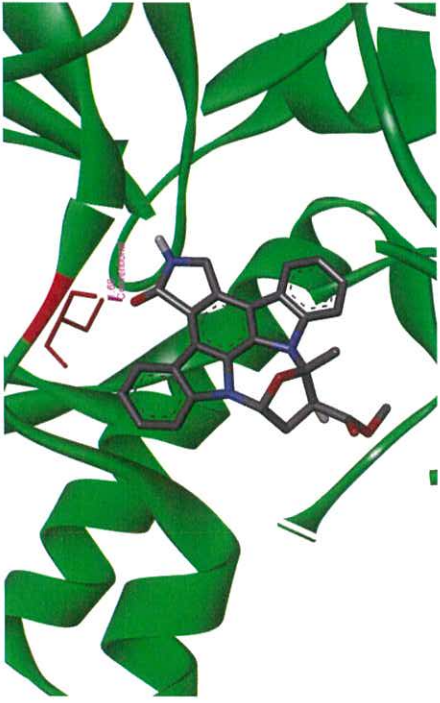
รูปที่ 8 แสดงการพัฒนาและออกแบบโครงสร้างสารใหม่

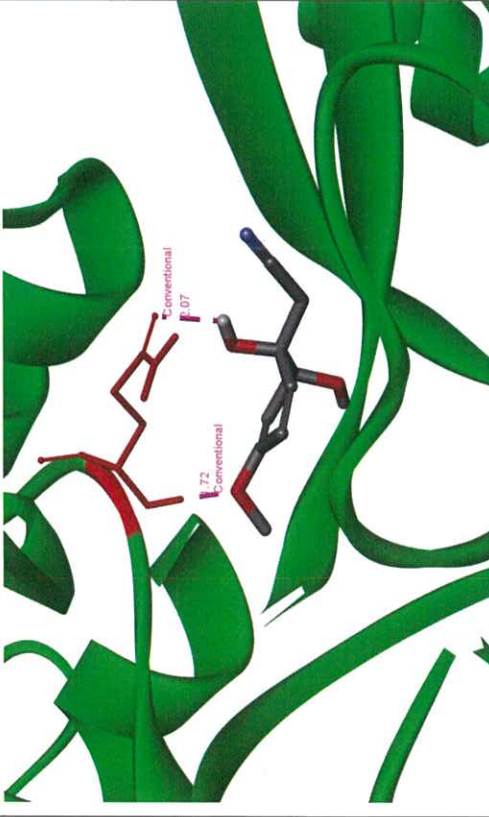
โดยส่วนของ ring A จะเป็นส่วนที่คาดว่าจะเพิ่ม affinity และ/หรือฤทธิ์ของสาร และเป็นส่วนที่มีหมู่ amine ในโมเลกุล เพื่อใช้ในการทำปฏิกิริยากับ carboxylic acid ขณะที่ส่วนของ ring B จะเป็นส่วนที่พัฒนามาจากอนุพันธ์ของ Aeroplysinin-1 แต่ตัดหมู่ 4-methoxy ออก เนื่องจากไม่สามารถหาสารตั้งต้น carboxylic acid ที่มีหมู่ 4-methoxy ในโมเลกุลได้ โดยในขั้นตอนนี้ได้ออกแบบสารไว้ 3 series คือ X, Y และ Z

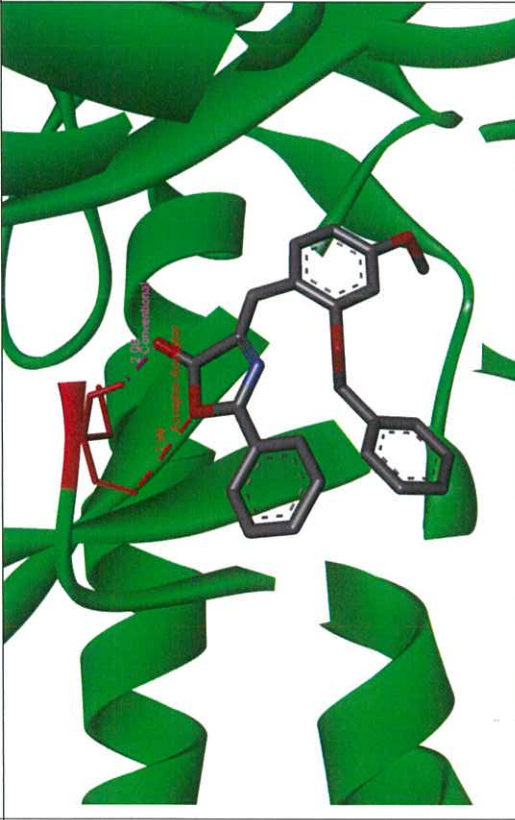
2.3 การจำลองสารที่ออกแบบและหาค่าพารามิเตอร์จากโปรแกรมคอมพิวเตอร์

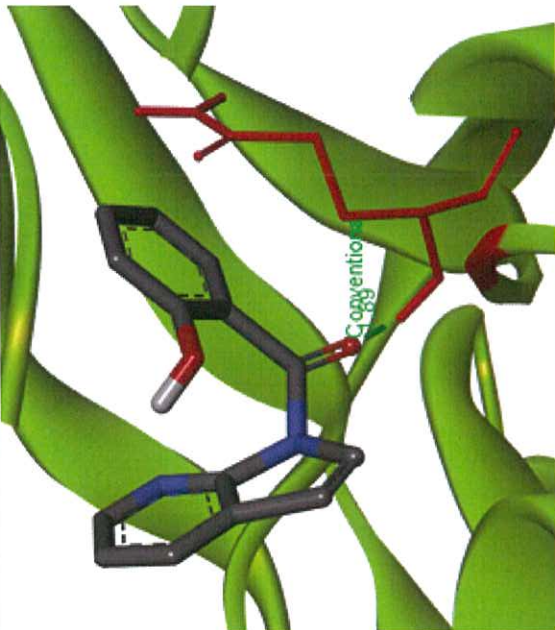
ผลจากการศึกษาการออกแบบสารใหม่โดยใช้คอมพิวเตอร์เข้าช่วยได้ผลการศึกษาแสดงไว้ในตารางที่ 7 โดยโครงสร้าง 3, 5-dibromo-2-hydroxy benzoic acid จะต่อกับโครงสร้าง amines ชนิดต่างๆ ด้วย พันธะเอไมด์ ตามที่ได้แสดงในรูป 8 โดยศึกษาพารามิเตอร์ที่ได้จากการทำ docking ของ conformations ที่จับบริเวณ active site ของ enzyme โดยเน้นการเกิดพันธะไฮโดรเจนที่ตำแหน่งกรดอะมิโน CYS99 เป็นหลัก แต่อาจมีการเกิดพันธะกับกรดอะมิโนตัวอื่นได้เช่นกัน ดังแสดงในตารางที่ 2

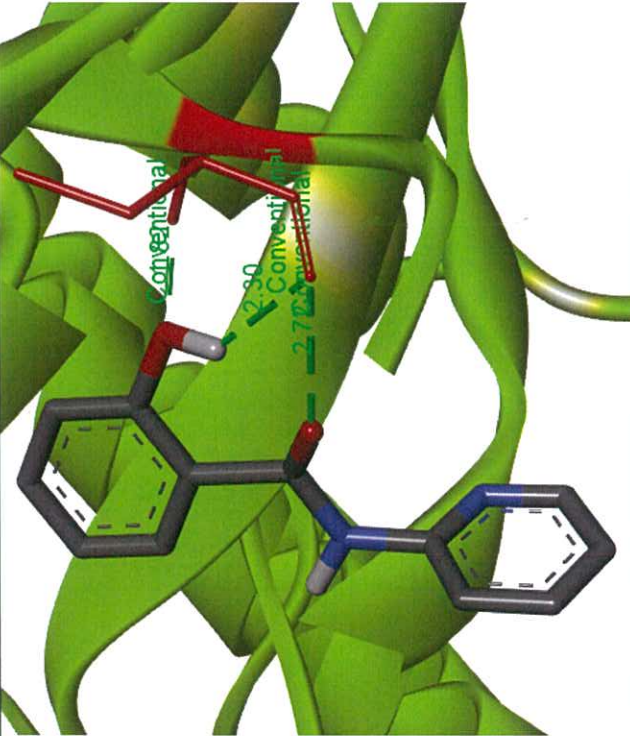
ตารางที่ 2 ผลของ conformations ที่เกิด interaction บริเวณ active site

Compound	Docked pose	Binding Energy (BE)	Ki (μM)	Bonding
K_252A		-10.97	9.03	1 H-Bond (CYS99) 1.68 Å

Compound	Docked pose	BE	Ki (μM)	Bonding
Aeroplysin-1		-5.21, -7.35	152.96, 4.07	closely interaction with CYS 99, 2 H-bonds (GLN 48) 1.72 and 2.07 Å°

Compound	Docked pose	BE	K _i (μM)	Bonding
Aeroplysin-1 derivative (aromatic derivative)		-5.21, -7.35	0.081	1 H-bond (CYS 99) 2.06 Å

Compound	Docked pose	BE	Ki (μM)	Bonding
Design X1		-8.84	0.334	1 H-bond (GLN 48) 1.89 Å

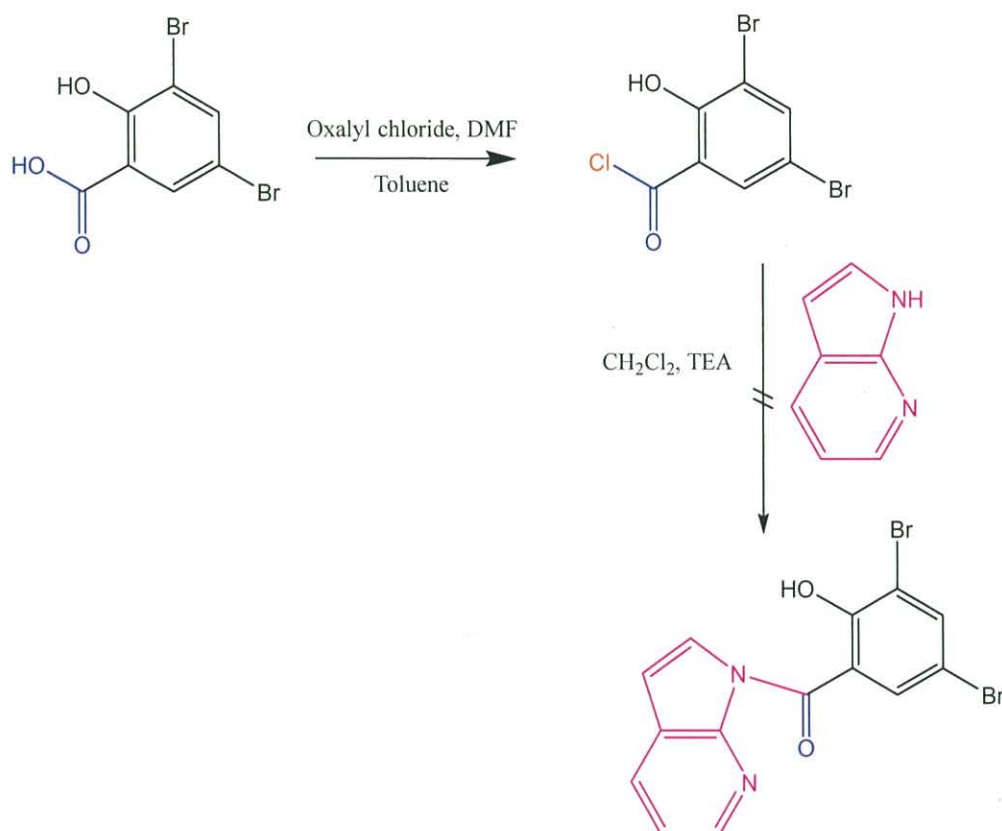
Compound	Docked pose	BE	Ki (μM)	Bonding
Design Y1		-7.04	6.95	3 H-bonds (CYS 99) 2.70, 2.30, 1.82 Å

Compound	Docked pose	BE	Ki (μM)	Bonding
Design Z1		-6.65	13.36	1 H-Bond (CYS99) 2.92 Å

3. การสังเคราะห์สารที่ออกแบบ

3.1 การสังเคราะห์สารที่ออกแบบ X1

การสังเคราะห์สาร X1 สามารถสังเคราะห์ได้จาก 3, 5-dibromo-2-hydroxy benzoic acid และ 7-azaindole ดังแสดงในรูปที่ 9

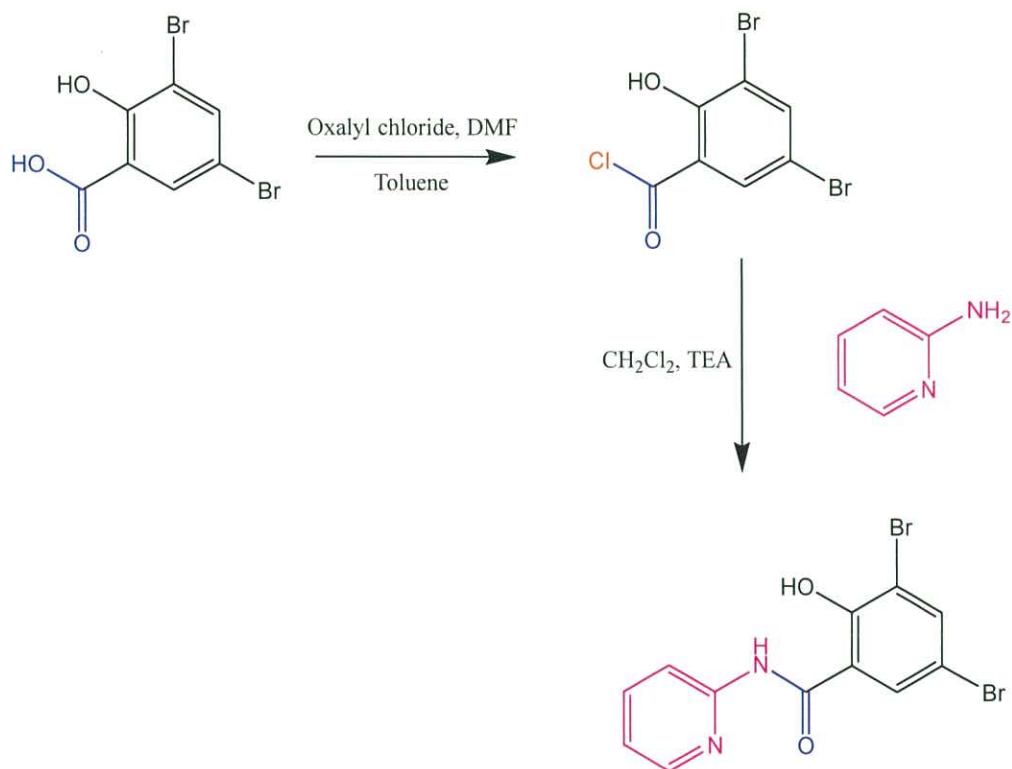


รูปที่ 9 แสดงปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาร X1

พบว่า เมื่อทำการสังเคราะห์และติดตามปฏิกิริยาด้วยเทคนิค thin layer chromatography (TLC) แล้ว ไม่พบว่ามีสารใหม่เกิดขึ้นเมื่อทำปฏิกิริยาจาก 24-48 ชั่วโมง ซึ่งคาดว่า สารไม่สามารถทำปฏิกิริยาได้ เนื่องจากการมีหมู่ bulky ของ 7-azaindole

3.2 การสังเคราะห์สารที่ออกแบบ Y1

การสังเคราะห์สาร Y1 สามารถสังเคราะห์ได้จาก 3, 5-dibromo-2-hydroxy benzoic acid และ 2-aminopyridine ดังแสดงในรูปที่ 10

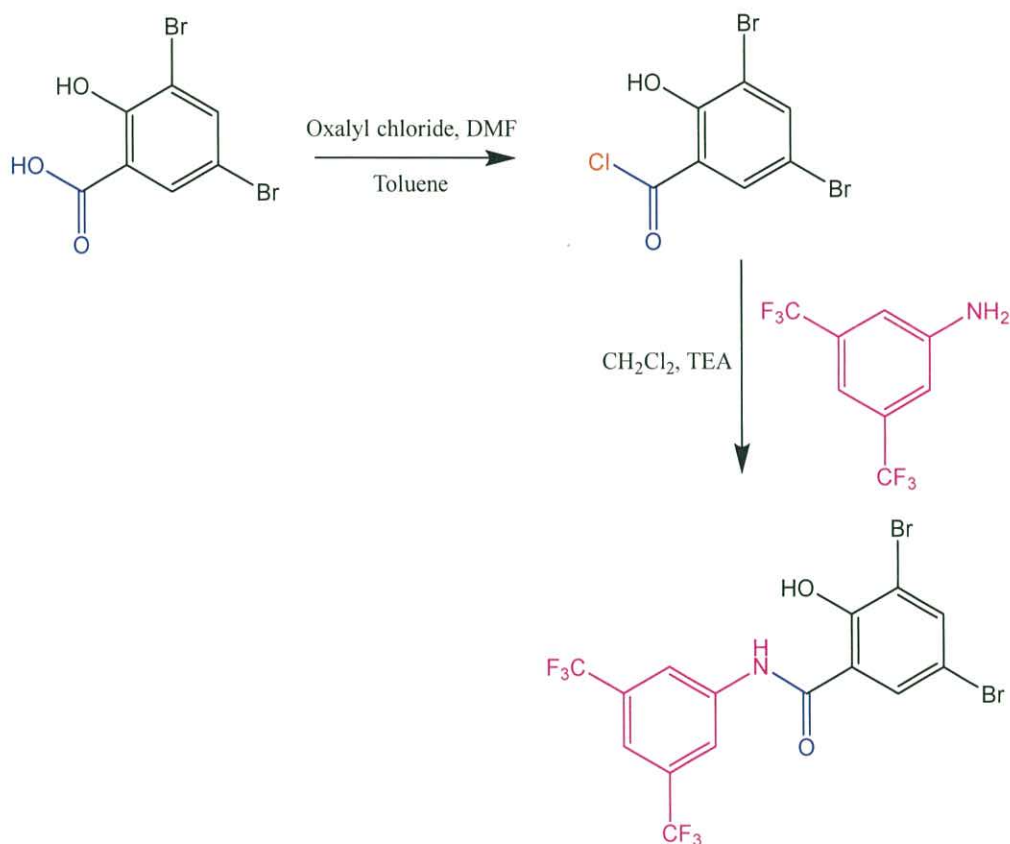


รูปที่ 10 แสดงปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาร Y1

เมื่อทำการสังเคราะห์และติดตามปฏิกิริยาด้วยเทคนิค thin layer chromatography (TLC) ของการสังเคราะห์สาร Y1 พบว่ามีสารใหม่เกิดขึ้นเมื่อทำปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง แต่สารใหม่ที่เกิดขึ้นมีสารปนเปื้อน ทำให้ ¹H-NMR spectrum แสดง H peaks ไม่ชัดเจนและผลผลิตที่สังเคราะห์ได้ เมื่อทำการตกผลึกซ้ำ ได้สารในปริมาณน้อยมากต่อการสังเคราะห์ 1 ครั้ง

3.3 การสังเคราะห์สารที่ออกแบบ Z1

การสังเคราะห์สาร Z1 สามารถสังเคราะห์ได้จาก 3, 5-dibromo-2-hydroxy benzoic acid และ 3, 5-Bis(trifluoromethyl) aniline ดังแสดงในรูปที่ 11



รูปที่ 11 แสดงปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาร Z1

เมื่อทำการสังเคราะห์และติดตามปฏิกิริยาด้วยเทคนิค thin layer chromatography (TLC) ของการสังเคราะห์สาร Z1 พบว่ามีสารใหม่เกิดขึ้นเมื่อทำปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง และสารใหม่ที่ได้นี้สามารถตกผลึกได้ผลผลิตที่มีลักษณะเป็นของแข็งบริสุทธิ์และสังเคราะห์ได้ในปริมาณที่มากพอต่อการนำไปทดสอบและพิสูจน์โครงสร้าง โดย ¹H-NMR spectrum แสดง H peaks ที่ชัดเจนและไม่มีสารปนเปื้อน

จากการสังเคราะห์สารทั้ง 3 ตัว ซึ่งไม่สามารถสังเคราะห์ X1 ได้ ผู้วิจัยจึงตัดสาร X1 ออกในขั้นตอนนี้ และจากการที่ค่าพารามิเตอร์ต่างๆที่รวบรวมได้จากโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ของสาร Y1 และ Z1 มีค่าไม่ต่างกัน ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกสังเคราะห์สารใหม่ คือ Z1 ซึ่งให้ผลผลิตในปริมาณที่สูงและสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ดีกว่าสาร Y1 มาทำการสังเคราะห์เพิ่ม เพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป โดยสาร Z1 ซึ่งมีโครงสร้างเป็น *N*-(3, 5-bis (trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxy benzamide สามารถสังเคราะห์จากสารตั้งต้น คือ 3, 5-bis (trifluoromethyl) aniline และ 3, 5-dibromo-2-hydroxy benzoic acid โดยใช้ปฏิกิริยา amidation ที่จะมีการเปลี่ยนหมู่ carboxylic acid ให้อยู่ในรูปของหมู่ acyl chloride ก่อนทำปฏิกิริยากับสารกลุ่ม amine และเมื่อทำสารให้บริสุทธิ์แล้ว นำสารมาทำการตรวจสอบคุณสมบัติและพิสูจน์โครงสร้างในขั้นตอนต่อไป

4. การตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของสาร *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1)

4.1 Computational Chemical Data

คุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของสารที่สังเคราะห์ได้ สามารถตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ซึ่งจะได้คุณสมบัติต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงคุณสมบัติทางเคมีของสารจากการคำนวณของโปรแกรมคอมพิวเตอร์

Property Name	Property value
Molecular Weight	507.02 g/mol
Molecular Formula	C ₁₅ H ₈ F ₆ Br ₂ NO ₂
Critical Volume	913.5 (cm ³ /mol)
LogP	5.95
tPSA	49.33
MR	88.78 (cm ³ /mol)
cLogP	7.24302

logS	-7.162
pK _a	5.720
Rotatable Bond Count	0
Hydrogen Bond Donor Count	1
Hydrogen Bond Acceptor Count	7

4.2 Experimental Data

สารสังเคราะห์ที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการทาง column chromatography แล้ว นำมาตรวจ สอบคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ที่สำคัญคือ ความสามารถในการละลายในตัวทำละลายต่างๆ และการ หาค่าจุดหลอมเหลว (melting point) ด้วยวิธีการ Differential Scanning Calorimetry (DSC)

4.2.1 ความสามารถในการละลายของสาร

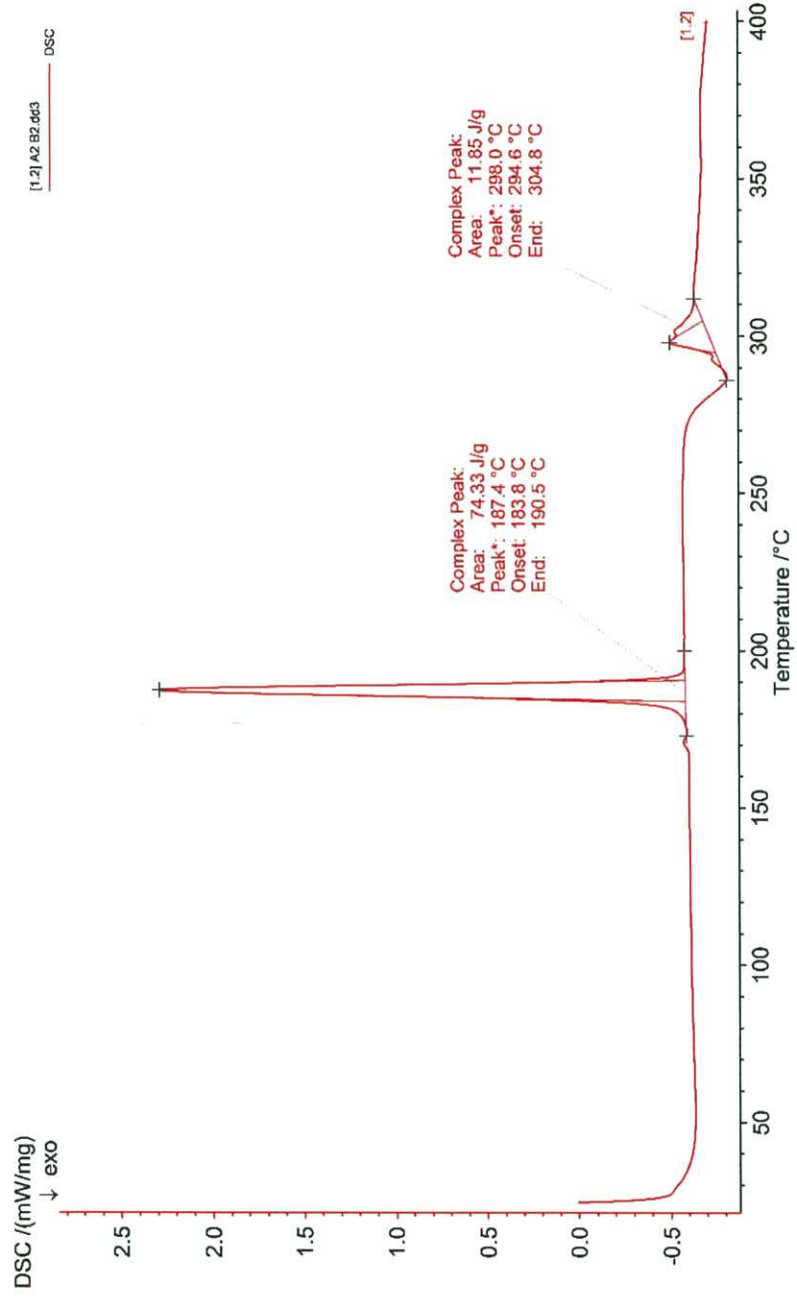
ตารางที่ 4 แสดงความสามารถในการละลายในตัวทำละลายของสาร

ตัวทำละลาย (Solvents)	ความสามารถในการละลาย (Solubility)
Water	ไม่ละลาย
Methanol	ละลายได้เล็กน้อย
Diethyl Acetate	ละลายได้เล็กน้อย
Dimethylsulfoxide	ละลายได้ดี
Acetonitrile	ละลายได้เล็กน้อย
Dichloromethane	ละลายได้ดี
Toluene	ละลายได้ดี
Hexane	ละลายได้ดี

4.2.2 การหาค่าจุดหลอมเหลว (melting point) ด้วยวิธีการ Differential Scanning Calorimetry (DSC)

เมื่อสารได้รับพลังงานความร้อน จะมีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ หรือทางเคมี เช่น มีการหลอมเหลวเปลี่ยนสถานะจากของแข็งเป็นของเหลว มีการเปลี่ยนรูปร่าง เป็นต้น ซึ่ง DSC เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ทดสอบสารโดยการวัดค่าพลังงานความร้อนและอุณหภูมิของสารเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน โดยที่พื้นที่ใต้กราฟที่เกิดขึ้นจะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเปลี่ยนแปลงความร้อนของสาร ซึ่งสาร *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1) แสดงจุดหลอมเหลวด้วย DSC graph ดังรูปที่ 12

จาก DSC graph จะเห็นการเปลี่ยนแปลงของระดับความร้อนในช่วงอุณหภูมิ 183.8 – 190.5 °C ซึ่งเป็นจุดที่สารมีการดูดกลืนพลังงานความร้อนอย่างรวดเร็วในขณะที่มีการเปลี่ยนแปลงสถานะจากของแข็งไปเป็นของเหลว และจุดสูงสุดของ peak คือ 187.4 °C ดังนั้น สารจึงมีค่าของจุดหลอมเหลวที่ 187.4 °C



รูปที่ 12 แสดง DSC graph ของ N-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1)

5. การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสาร *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1)

การตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีของสารที่สังเคราะห์ได้ด้วยเครื่องมือทาง spectroscopy ได้แก่ Infrared Spectroscopy, Nuclear Magnetic Spectroscopy และ Mass Spectroscopy

5.1 การพิสูจน์โครงสร้างของสาร *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1) ด้วยเทคนิค Infrared Spectrometry

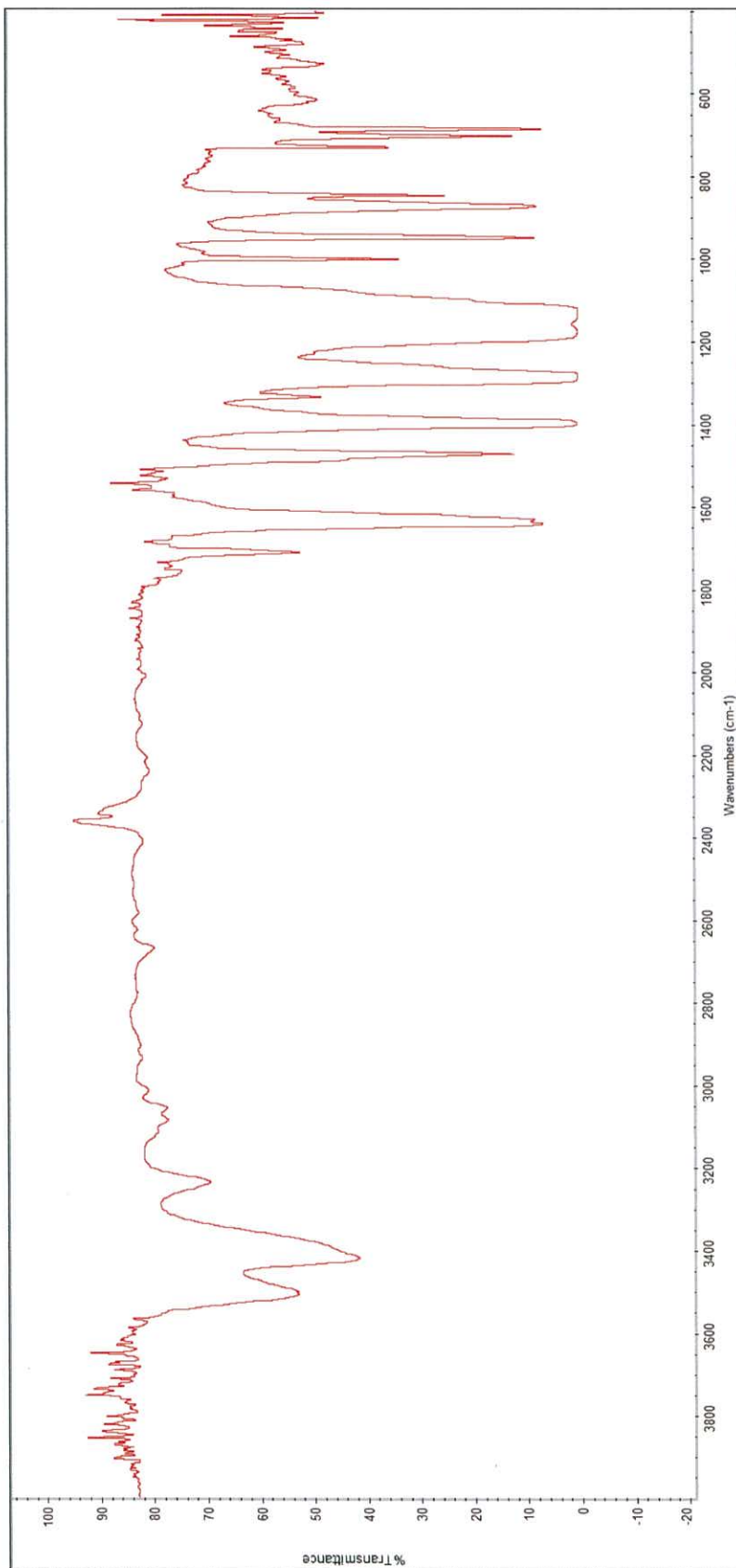
นำสารที่สังเคราะห์ได้มาเตรียมวัดด้วยการทำให้อยู่ในรูปของ KBr disc เพื่อตรวจหาหมู่ฟังก์ชันในโครงสร้างด้วยเครื่อง infrared spectroscopy โดยดูการเปลี่ยนแปลงของหมู่ที่เกี่ยวข้องในการเกิดพันธะ amide พบว่า ใน IR spectrum ของสาร *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1) นี้มีหมู่ NH ที่ตำแหน่ง wavenumber 3323.87 cm^{-1} ที่เป็นแบบ single peak ซึ่งเป็นลักษณะของ secondary amine (รูปที่ 15) และไม่ปรากฏ peak ในลักษณะ doublet ของ primary amine ซึ่งพบในสารตั้งต้น คือ 3, 5-bis(trifluoromethyl) aniline ดังปรากฏในรูปที่ 13 และ พบ หมู่ C=O amide ที่ wavenumbers 1635.33 และ 1616.20 cm^{-1} ในขณะที่หมู่ C=O ของ carboxylic acid ของ 3, 5-dibromo-2-hydroxy benzoic acid จะพบ wavenumber 1669.04 cm^{-1} นอกจากนี้ยังไม่ปรากฏ หมู่ OH ของ carboxylic acid ใน IR spectrum ของสารสังเคราะห์ *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide นี้เช่นกัน จากการเปลี่ยนแปลงใน IR spectra ดังกล่าวข้างต้น แสดงให้เห็นว่าหมู่ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์ด้วยปฏิกิริยา amidation คือ หมู่ primary amine ของ 3, 5-bis(trifluoromethyl) aniline และ หมู่ carboxylic acid ของ 3, 5-dibromo-2-hydroxy benzoic acid ได้เป็น สาร *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1) ซึ่งเป็น amide derivative ตามที่ได้ตั้งสมมุติฐานไว้จริง

5.1.1 Infrared spectrum ของสารตั้งต้น 3, 5-bis(trifluoromethyl) aniline

Infrared spectrum ของ สารตั้งต้น 3, 5-bis(trifluoromethyl) aniline เตรียมโดยวิธี KBr disc แสดงดังรูปที่ 13 และตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงค่า wavenumber ของ functional groups ที่มีในโครงสร้าง 3, 5-bis(trifluoromethyl) aniline

Wavenumber (cm ⁻¹)	characteristic	Attributed to
3505.74, 3417.48	Doublet, medium	N-H stretching, primary amine
3083.77, 3045.83	Doublet, weak	=C-H, aromatic
1639.68	Singlet, strong	N-H bending, primary amine
1470.73	Triplet, medium	C=C, aromatic
1280.48	singlet	C-N
1126.25, 1178.45	doublet, strong	C-F



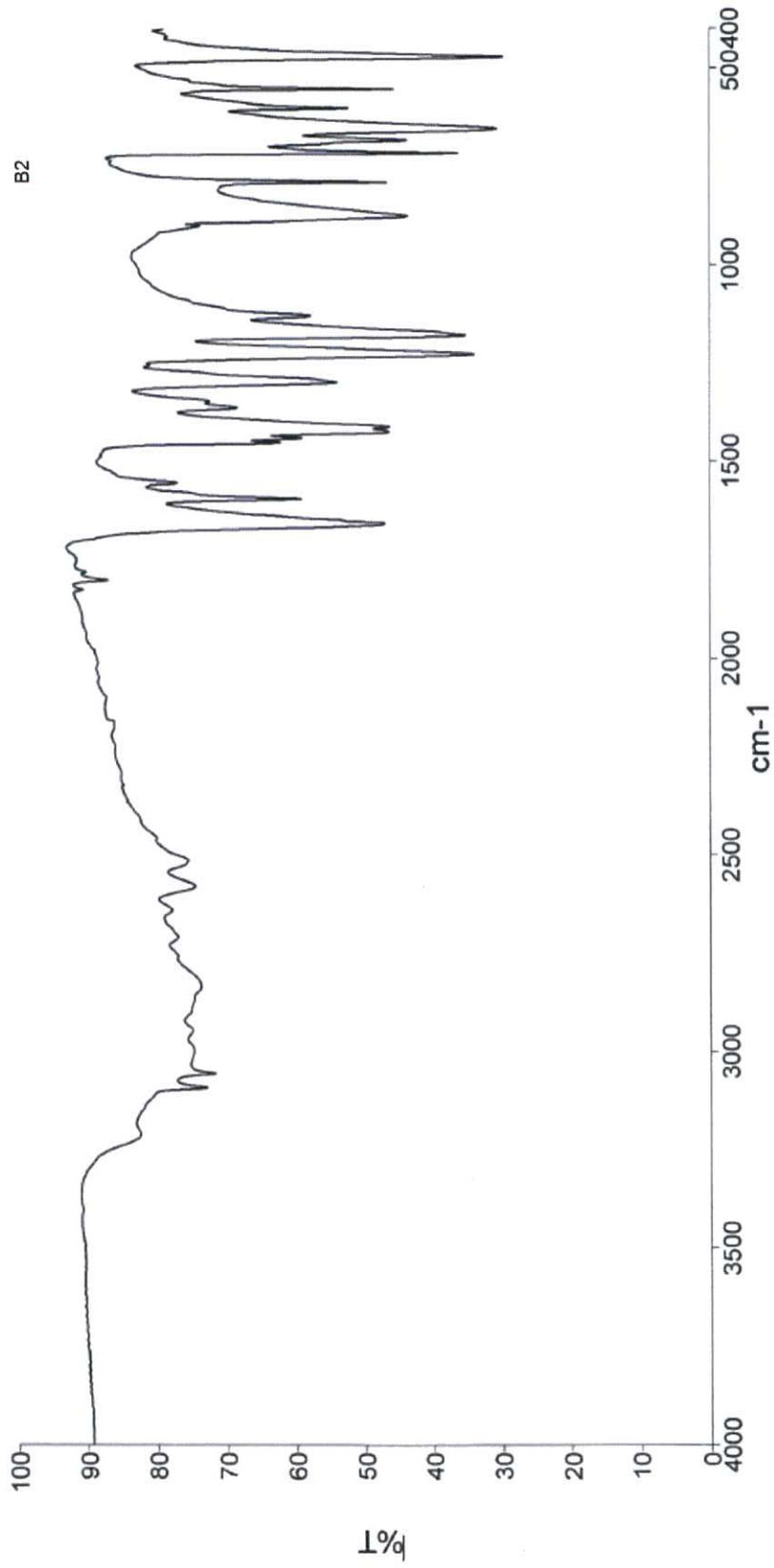
รูปที่ 13 Infrared Spectrum (cm^{-1}) ของ 3, 5-bis(trifluoromethyl) aniline

5.1.2 Infrared spectrum ของสารตั้งต้น 3, 5-dibromo-2-hydroxy benzoic acid

ในขณะที่ infrared spectrum ของ สารตั้งต้น 3, 5-dibromo-2-hydroxy benzoic acid เตรียมโดยวิธี KBr disc แสดงดังรูปที่ 14 และตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงค่า wavenumber ของ functional groups ที่มีในโครงสร้าง 3, 5-dibromo-2-hydroxy benzoic acid

Wavenumber (cm ⁻¹)	characteristic	Attributed to
3231.57	Doublet, medium	O-H stretching, phenol
3500-3000	Broad , medium	O-H stretching, carboxylic acid
3093.71, 3,057.75	multiplet, weak	=C-H, aromatic
1655.49	Singlet, strong	C=O stretching, carboxylic acid
1595.89	Triplet, medium	C=C, aromatic
1,226.26, 1178.11	Singlet, strong	C-O stretching
874.00	Singlet, strong	C-Br



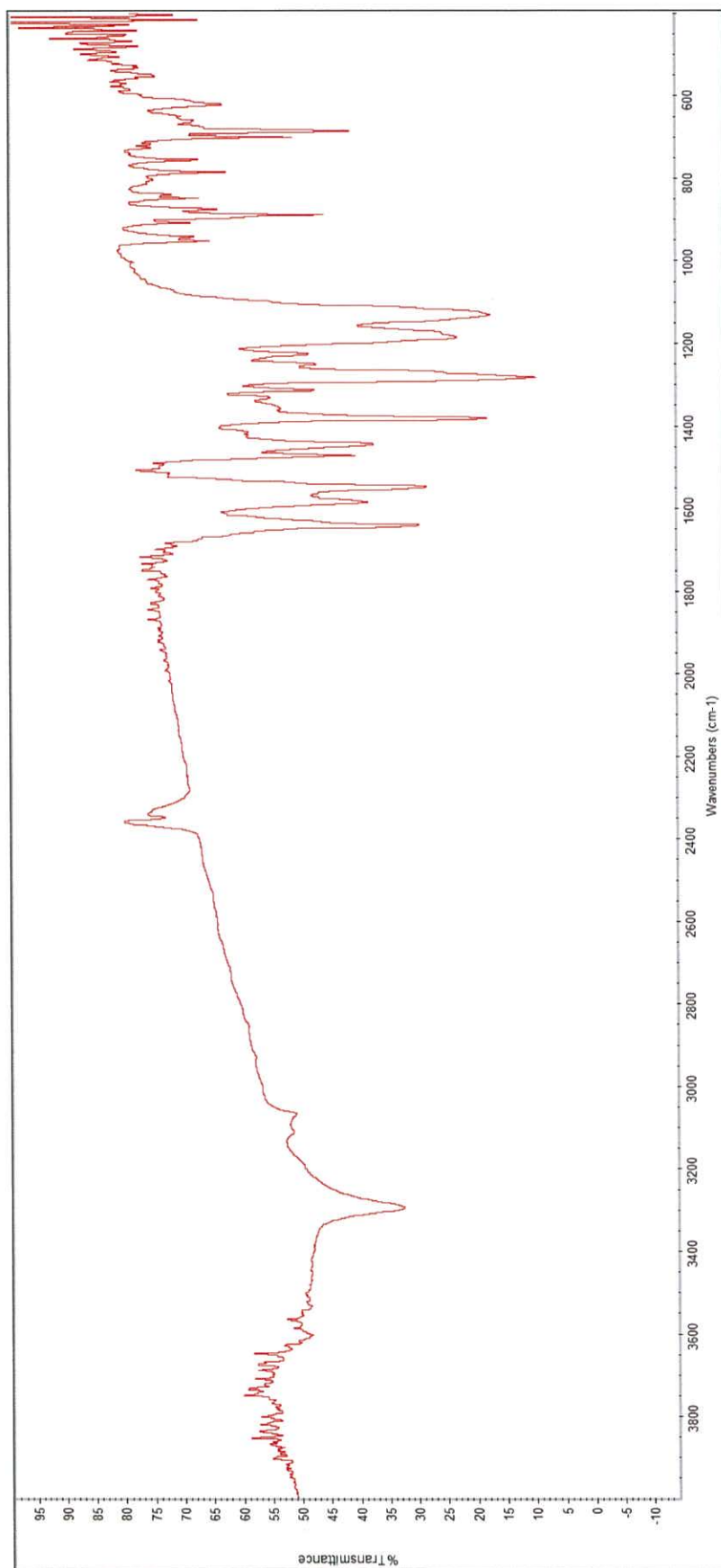
รูปที่ 14 Infrared Spectrum (cm⁻¹) ของ 3, 5-dibromo-2-hydroxy benzoic acid

5.1.3 Infrared spectrum ของสาร *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1)

สำหรับ infrared spectrum ของ สารที่สังเคราะห์ คือ สาร *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1) เตรียมโดยวิธี KBr disc แสดงดังรูปที่ 15 และตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงค่า wavenumber ของ functional groups ที่มีในโครงสร้าง *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1)

Wavenumber (cm ⁻¹)	characteristic	Functional group
3294.36	Singlet, medium	N-H stretching, secondary amide
3107.61, 3055.71	Multiplet, weak	=C-H, aromatic
1639.94	Singlet, strong	C=O stretching
1584.33, 1547.30	doublet	Amide band
1440.91, 1493.90	Triplet, medium	C=C, aromatic
1281.83	Singlet, medium	C-N stretching
1130.25	Singlet, strong	C-F, aliphatic
1184.17	Singlet, strong	C-O, aromatic
684.64	Singlet, medium	C-Br



รูปที่ 15 Infrared Spectrum (cm⁻¹) ของ N-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1)

5.2 การพิสูจน์โครงสร้างของสาร *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1) ด้วยเครื่อง Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectrometer

จากการนำสารสังเคราะห์ที่ได้ไปตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิค nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy เพื่อตรวจสอบชนิดและจำนวน protons ที่มีในโครงสร้างเทียบกับสารตั้งต้น ผลที่ได้เป็นดังนี้

5.2.1 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารตั้งต้น 3, 5-bis(trifluoromethyl) aniline

รูปที่ 16 เป็น $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของ 3, 5-bis(trifluoromethyl) aniline ในตัวทำละลาย DMSO-*d*6 ในช่วง 0-10 ppm ซึ่งจะพบ peaks ของจำนวน protons ใน spectrum ทั้งหมดเท่ากับ 5 protons โดย protons ของ primary amine peak พบที่ 6.127 ppm ซึ่ง peak มีลักษณะ singlet เนื่องจากไม่มีการ coupling ส่วน aromatic protons พบในช่วง 6.0-7.1 ppm และ integrated รวมกันได้เท่ากับ 3 protons ซึ่งตรงกับจำนวน protons ที่อยู่ตรงส่วนของ aromatic ring ของโครงสร้าง โดยตำแหน่ง peaks จำนวน protons และชนิดของ protons แสดงในตารางที่ 8 และรูปที่ 16

ตารางที่ 8 แสดงค่าของ $^1\text{H-NMR}$ Spectrum (ppm) ของ 3, 5-bis(trifluoromethyl) aniline
ช่วง 0-10 ppm

Assigned Hs	Signal position (ppm)	Relative Number of Protons	Multiplicity
NH ₂	6.127	2	s
Ha	6.990	1	s
Hb / Hc	7.114	2	s

5.2 การพิสูจน์โครงสร้างของสาร *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1) ด้วยเครื่อง Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectrometer

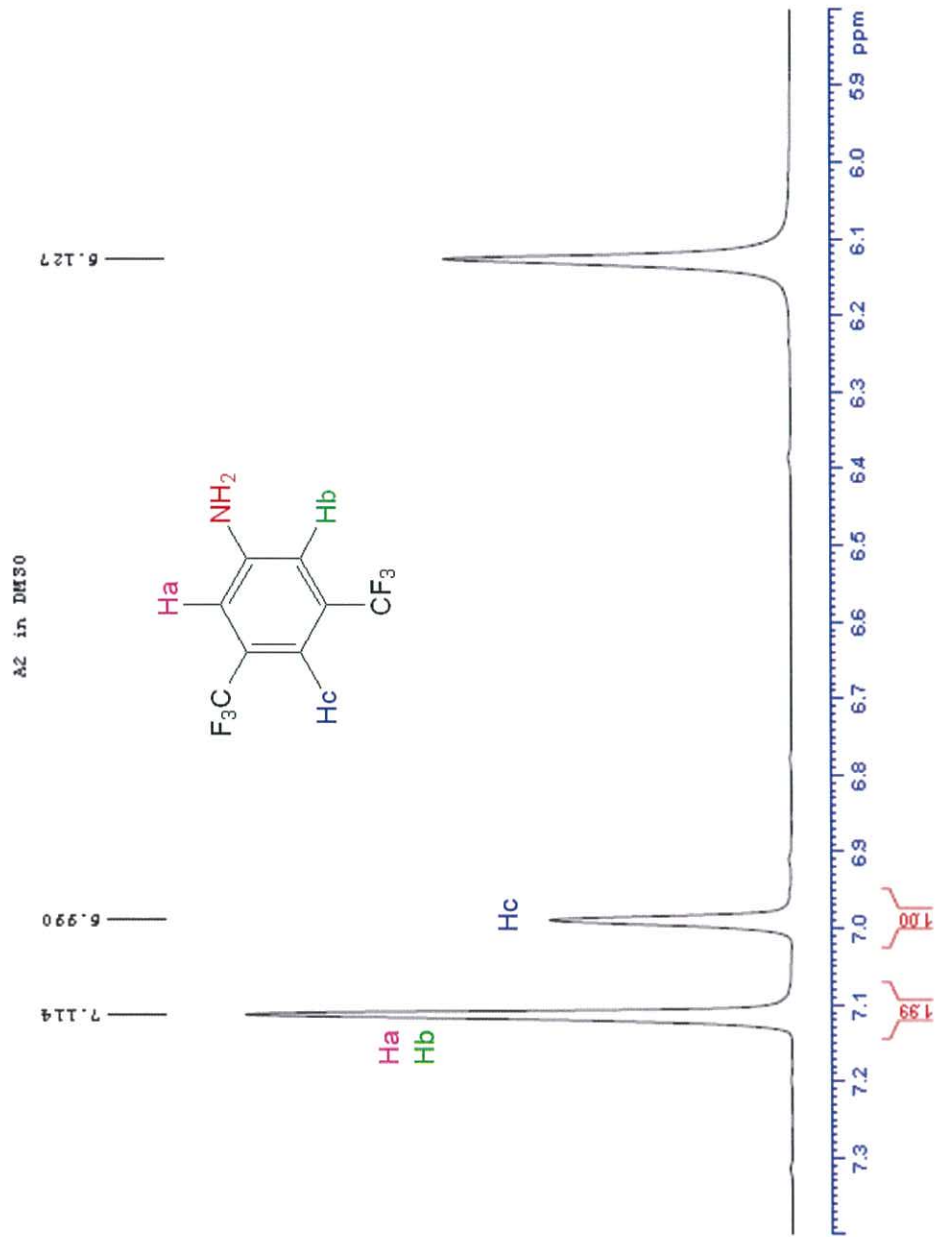
จากการนำสารสังเคราะห์ที่ได้ไปตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิค nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy เพื่อตรวจสอบชนิดและจำนวน protons ที่มีในโครงสร้างเทียบกับสารตั้งต้น ผลที่ได้เป็นดังนี้

5.2.1 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารตั้งต้น 3, 5-bis(trifluoromethyl) aniline

รูปที่ 16 เป็น $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของ 3, 5-bis(trifluoromethyl) aniline ในตัวทำละลาย DMSO-*d*6 ในช่วง 0-10 ppm ซึ่งจะพบ peaks ของจำนวน protons ใน spectrum ทั้งหมดเท่ากับ 5 protons โดย protons ของ primary amine peak พบที่ 6.127 ppm ซึ่ง peak มีลักษณะ singlet เนื่องจากไม่มีการ coupling ส่วน aromatic protons พบในช่วง 6.0-7.1 ppm และ integrated รวมกันได้เท่ากับ 3 protons ซึ่งตรงกับจำนวน protons ที่อยู่ตรงส่วนของ aromatic ring ของโครงสร้าง โดยตำแหน่ง peaks จำนวน protons และชนิดของ protons แสดงในตารางที่ 8 และรูปที่ 16

ตารางที่ 8 แสดงค่าของ $^1\text{H-NMR}$ Spectrum (ppm) ของ 3, 5-bis(trifluoromethyl) aniline ช่วง 0-10 ppm

Assigned Hs	Signal position (ppm)	Relative Number of Protons	Multiplicity
NH ₂	6.127	2	s
Ha	6.990	1	s
Hb / Hc	7.114	2	s



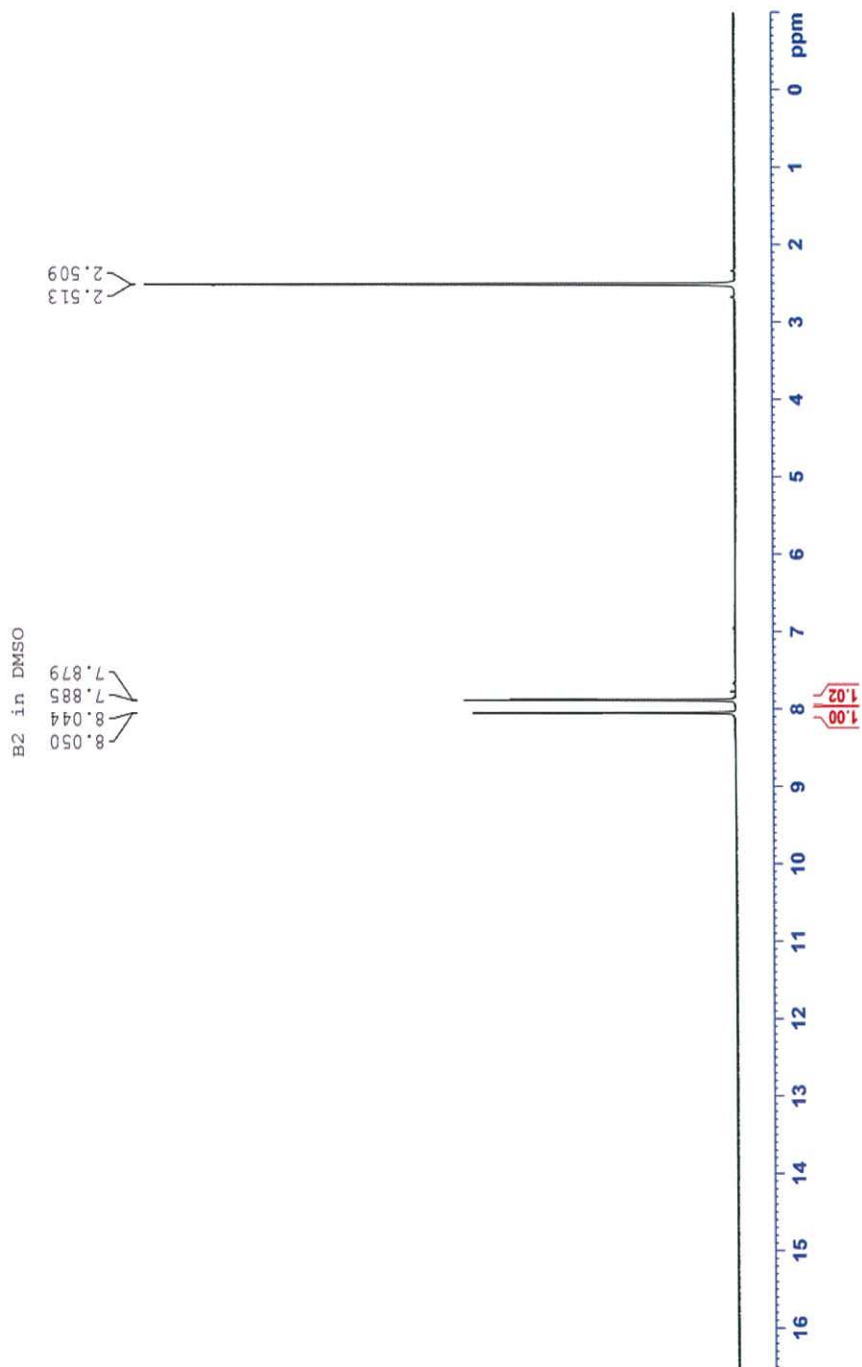
รูปที่ 17 ¹H-NMR Spectrum (ppm) ของ 3, 5-bis(trifluoromethyl) aniline ปรากฏที่ 5.8-7.4 ppm

5.2.2 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารตั้งต้น 3, 5-dibromo-2-hydroxy benzoic acid

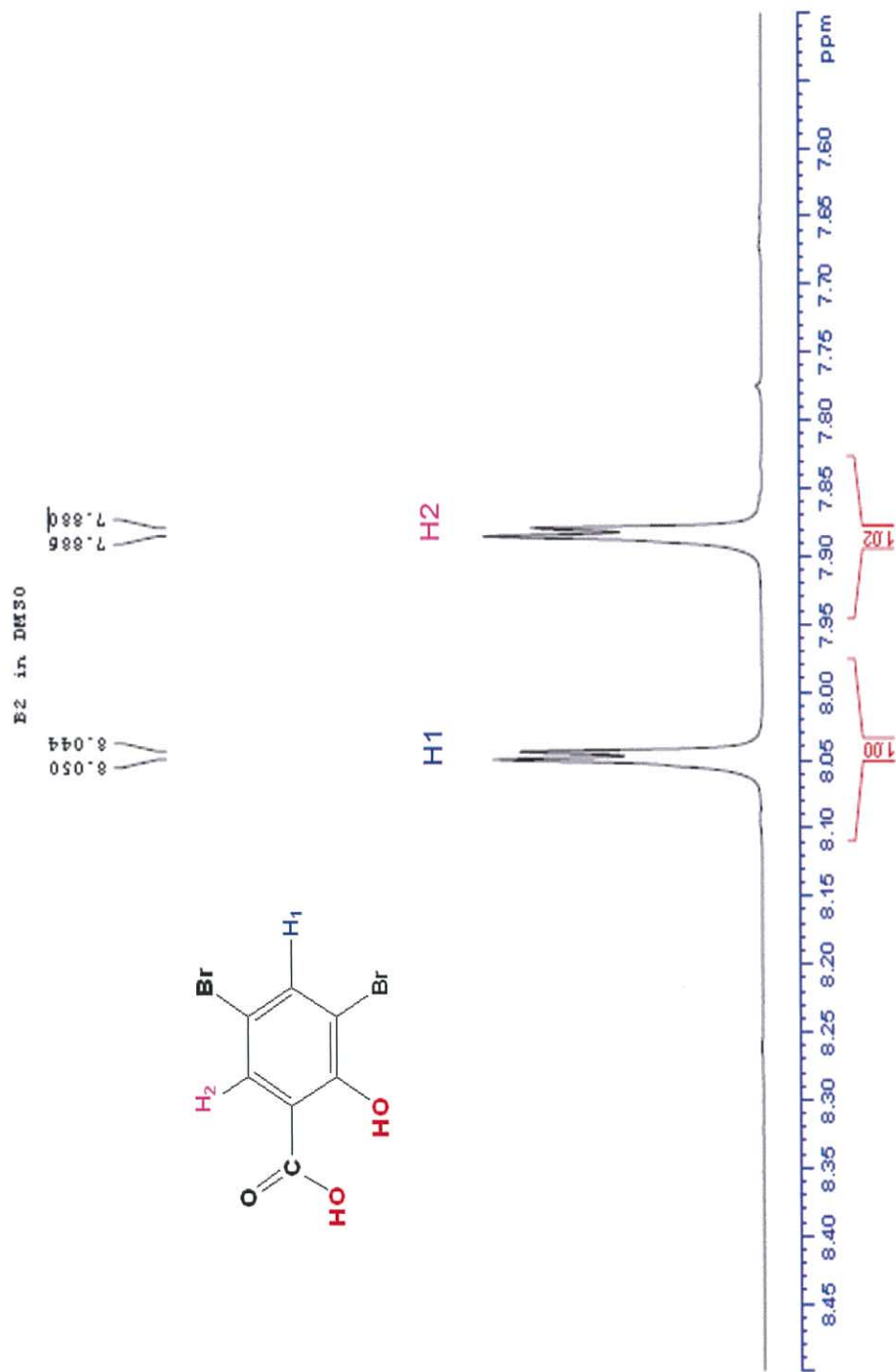
รูปที่ 18 เป็น $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของ 3, 5-dibromo-2-hydroxy benzoic acid ในตัวทำละลาย DMSO- d_6 ในช่วง 0-16 ppm ซึ่งจะพบ peaks เด่นๆของจำนวน protons ใน spectrum ทั้งหมดเท่ากับ 2 protons ซึ่งตรงกับจำนวน protons ที่มีในโครงสร้าง โดยตำแหน่ง peaks หลักๆ จะปรากฏในช่วง 7.8-8.0 ppm และ integrated ได้เท่ากับ 2 protons ซึ่งเป็น peaks ของ aromatic protons ในโครงสร้าง ซึ่งตำแหน่ง peaks จำนวน protons และชนิดของ protons แสดงในตารางที่ 9 และรูปที่ 18

ตารางที่ 9 แสดงค่าของ $^1\text{H-NMR}$ Spectrum (ppm) ของ 3, 5-dibromo-2-hydroxy benzoic acid ช่วง 0-10 ppm

Assigned Hs	Signal position (ppm)	Relative Number of Protons	Multiplicity
H ₁	8.050	1	d, $J = 2.4$ Hz
	8.044		
H ₂	7.886	1	d, $J = 2.4$ Hz
	7.880		

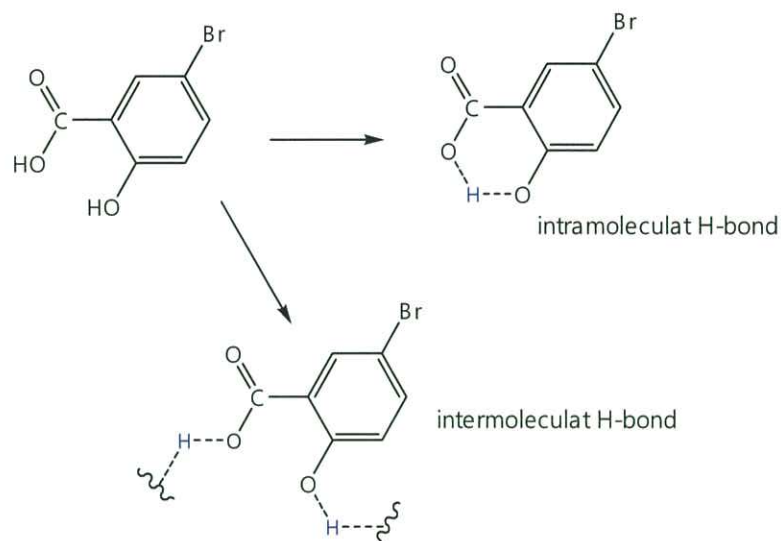


รูปที่ 18 $^1\text{H-NMR}$ Spectrum (ppm) ของ 3, 5-dibromo-2-hydroxy benzoic acid ช่วง 0-16 ppm



รูปที่ 19 ¹H-NMR Spectrum (ppm) ของ 3, 5-dibromo-2-hydroxy benzoic acid ช่วง 7.60 - 8.45 ppm

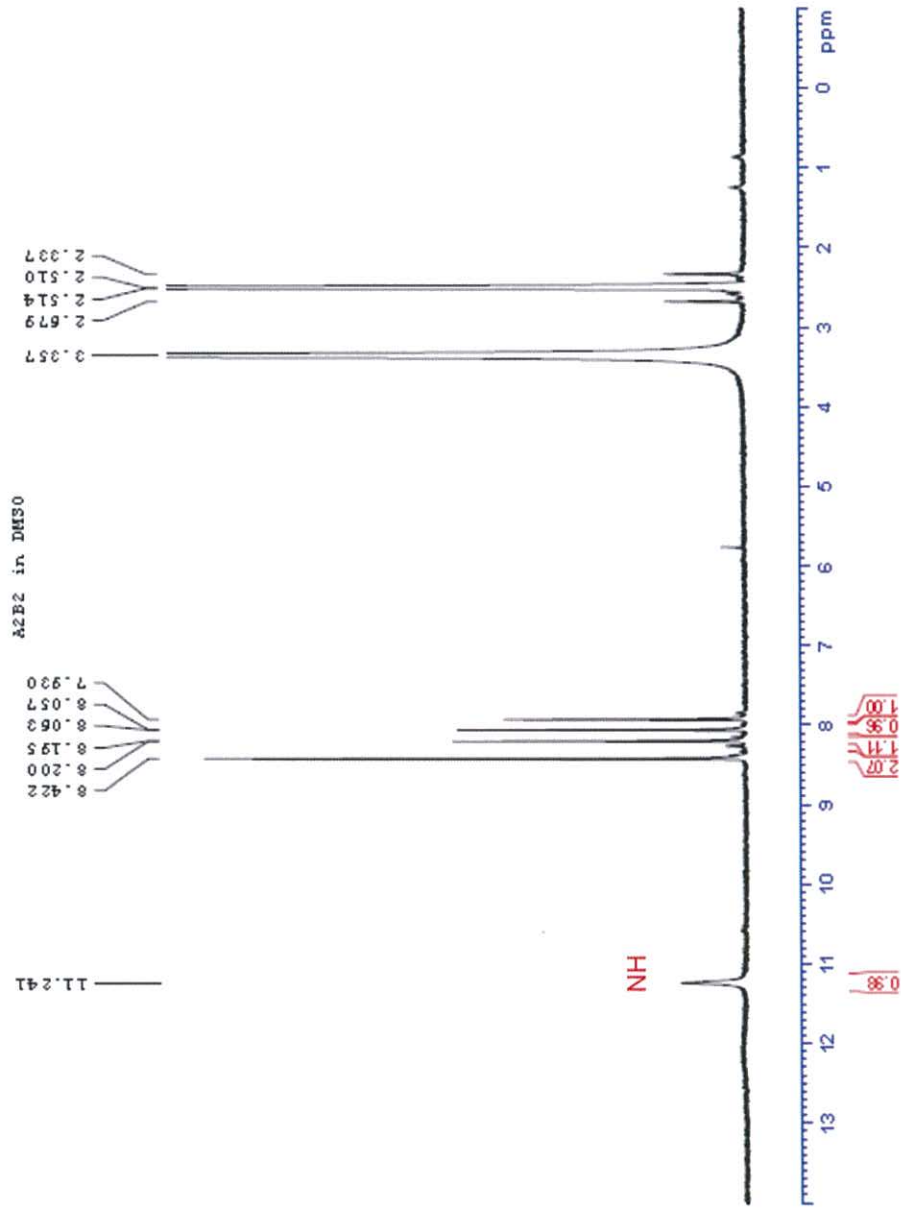
สำหรับ peaks ของ carboxylic OH และ phenolic OH นั้น อาจเกิด intramolecular หรือ intermolecular H-bond ทำให้ peak มีลักษณะ broad มาก ในช่วง 10-13 ppm



รูปที่ 20 Intramolecular และ intermolecular H-bond ของ 3, 5-dibromo-2-hydroxy benzoic acid

5.2.3 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสาร *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1)

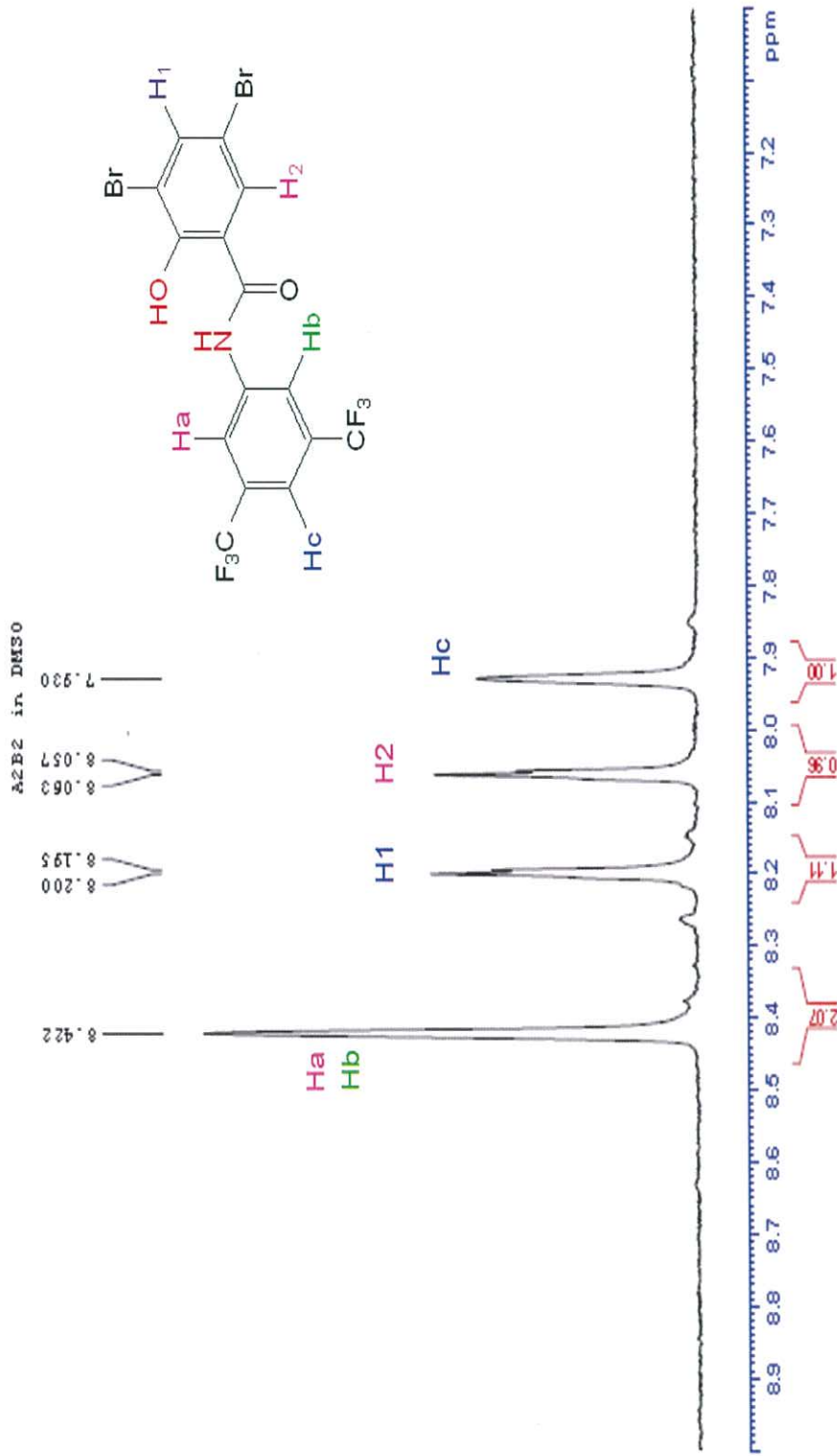
$^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสาร *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxy benzamide (Z1) ในตัวทำละลาย คือ $\text{DMSO-}d_6$ ในช่วง 0-13 ppm และแสดงดังรูปที่ 21 จาก $^1\text{H-NMR}$ spectrum พบ peak ที่ 11.684 ppm มีลักษณะ singlet และอยู่ในช่วง downfield เป็น peak ของ NH ของ secondary amide และ peaks ช่วง 7.9-8.4 ppm อีก 5 protons เป็นของ aromatic protons ของทั้งสองวง โดยตำแหน่ง peaks จำนวนและชนิดของ protons แสดงในตารางที่ 10 และรูปที่ 21



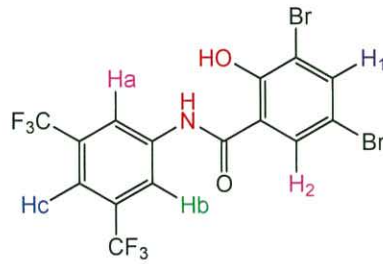
รูปที่ 21 $^1\text{H-NMR}$ Spectrum (ppm) ของ *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1) ช่วง 0-13 ppm

ตารางที่ 10 แสดงค่าของ $^1\text{H-NMR}$ Spectrum (ppm) ของ *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl) phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1) ช่วง 0-12 ppm

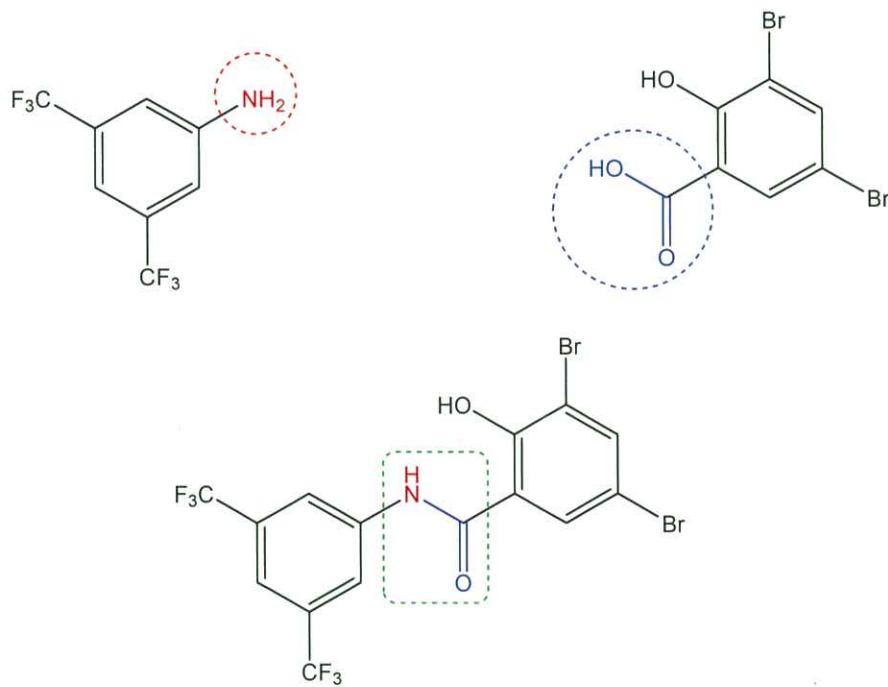
Assigned Hs	Signal position (ppm)	Relative Number of Protons	Multiplicity
NH	11.241	1	s
Ha / Hb	8.442	2	s
Hc	7.930	1	s
H1	8.200 8.195	1	d, $J = 2.0$ Hz
H2	8.063 8.057	1	d, $J = 2.4$ Hz



รูปที่ 22 $^1\text{H-NMR}$ Spectrum (ppm) ของ *N*-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3,5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1) ช่วง 6.2-8.8 ppm



รูปที่ 23 Protons ในโครงสร้างของ *N*-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3,5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1)



รูปที่ 24 แสดงส่วนของ functional groups ในสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้องในการเกิดพันธะ amide ของสารใหม่

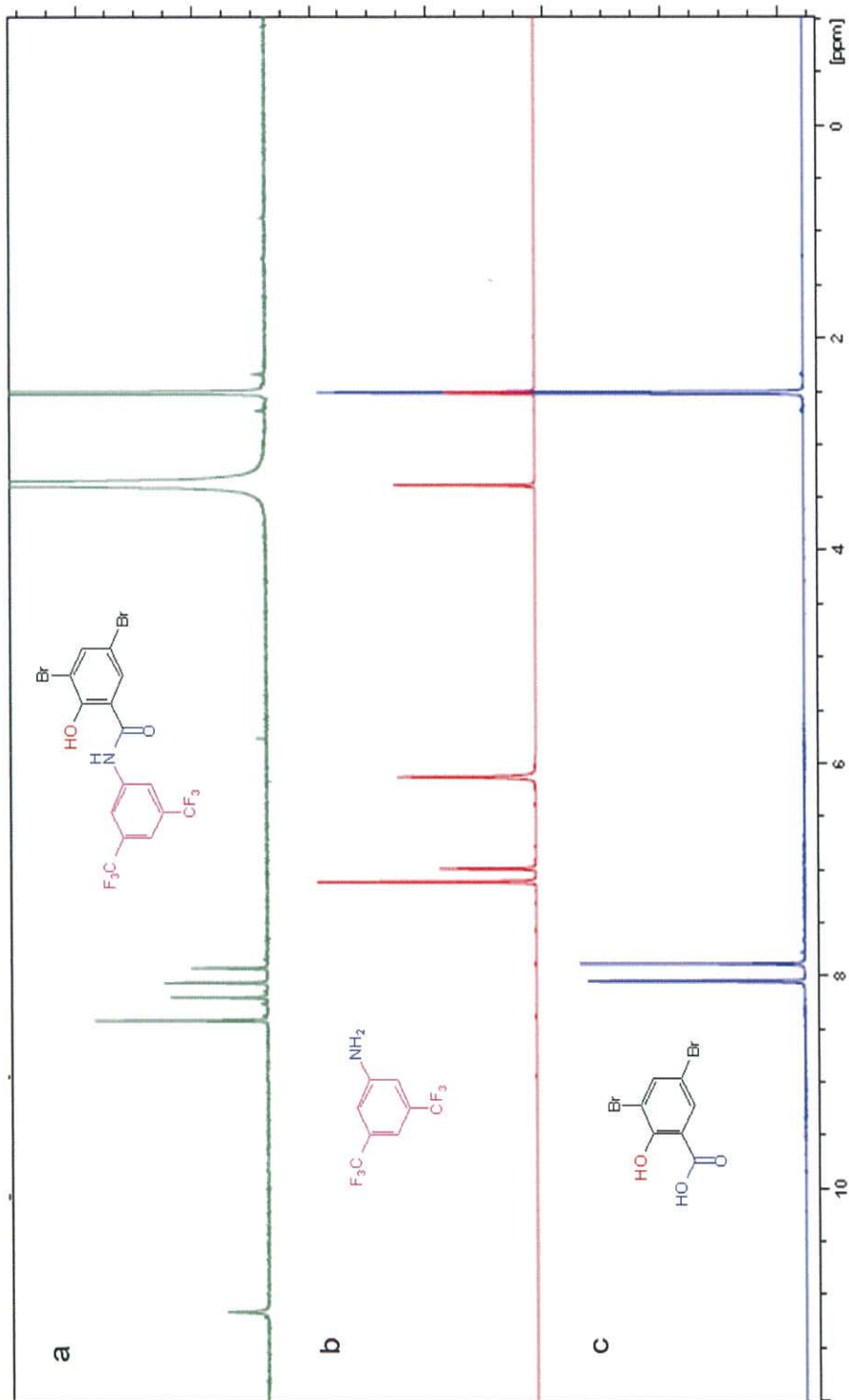
เมื่อนำ $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารที่สังเคราะห์ได้ (รูปที่ 21) ไปเปรียบเทียบกับ $^1\text{H-NMR}$ spectra ของสารตั้งต้น คือ 3,5-bis(trifluoromethyl) aniline (รูปที่ 16) และ 3-chloro salicylic acid (รูปที่ 18) จะพบความแตกต่างดังแสดงในตารางที่ 11 และรูปที่ 25

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบจำนวน protons และจำนวน $^1\text{H-NMR}$ peaks ในช่วง aromatic region

สาร	จำนวน Aromatic protons	จำนวน peaks ช่วง aromatic region
A2	3	2
B2	2	2
A2B2	5	4

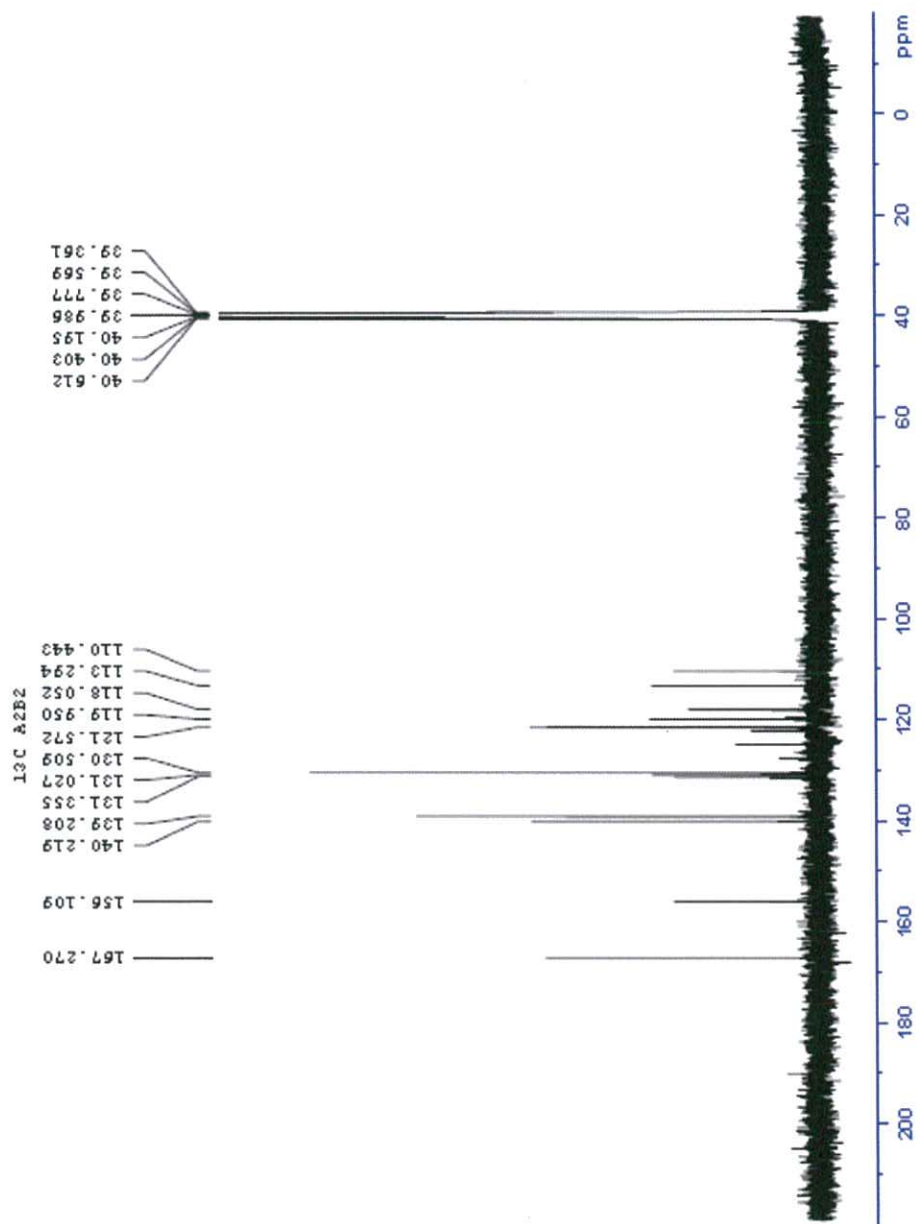
5.2.4 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum ของสาร *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1)

$^{13}\text{C-NMR}$ spectroscopic technique เป็นเทคนิคที่ใช้ดูความแตกต่างของชนิดของ carbons ที่อยู่ในสภาพแวดล้อมแตกต่างกัน โดย $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum ของ *N*-(3, 5-bis (trifluoromethyl) phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1) แสดง ดังรูปที่ 26-27 และในตารางที่ 12 ซึ่ง peaks ของ carbons ที่เด่นๆ ได้แก่ carbonyl carbon ซึ่งจะพบที่ตำแหน่ง downfield มากที่สุดใน spectrum คือ ที่ 167.270 ppm และ carbon ตำแหน่งที่ 1 ที่มีหมู่แทนที่เป็น หมู่ hydroxyl จะพบ peak ที่เกิด downfield เช่นกัน คือ ที่ 156.109 ppm

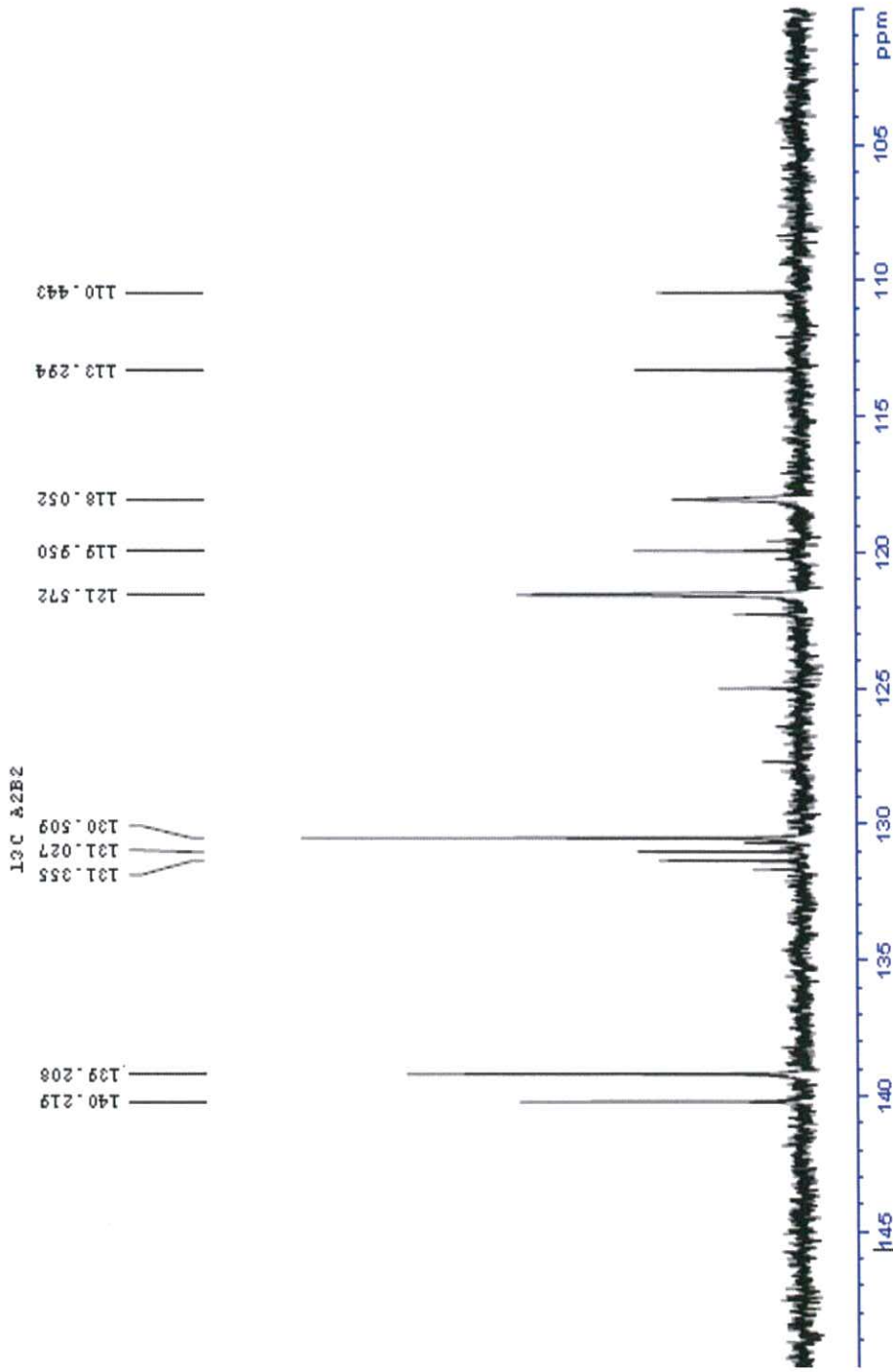


รูปที่ 25 $^1\text{H-NMR}$ spectra ของ *N*-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3,5-dibromo-2-hydroxybenzamide(a),

3,5-bis(trifluoromethyl) aniline(b) และ 3-chloro salicylic acid (c)



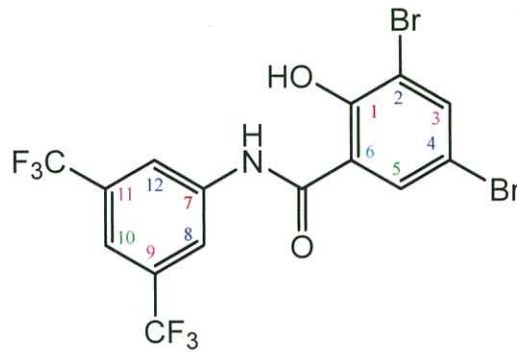
รูปที่ 26 ¹³C-NMR Spectrum (ppm) ของ N-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1) ช่วง 0-200 ppm



รูปที่ 27 ¹³C-NMR Spectrum (ppm) ของ N-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1) ใน CDCl₃ 0-145 ppm

ตารางที่ 12 แสดงค่าของ ^{13}C -NMR Spectrum (ppm) ของ *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl) phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1) ช่วง 0-200 ppm

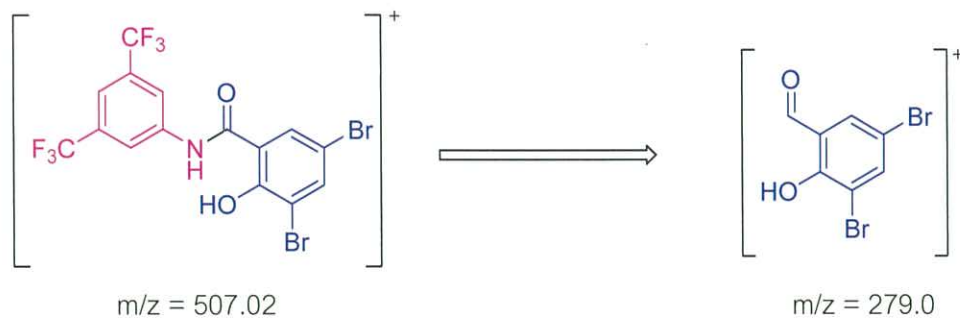
Assigned Cs	Signal position (ppm)
C=O	167.270
C1	156.109
C3	140.219
C7	139.208
C5	131.355
C9/C11	131.027
C8/C12	130.509
CF3	121.572
C6	119.950
C10	118.052
C4	113.294
C2	110.443



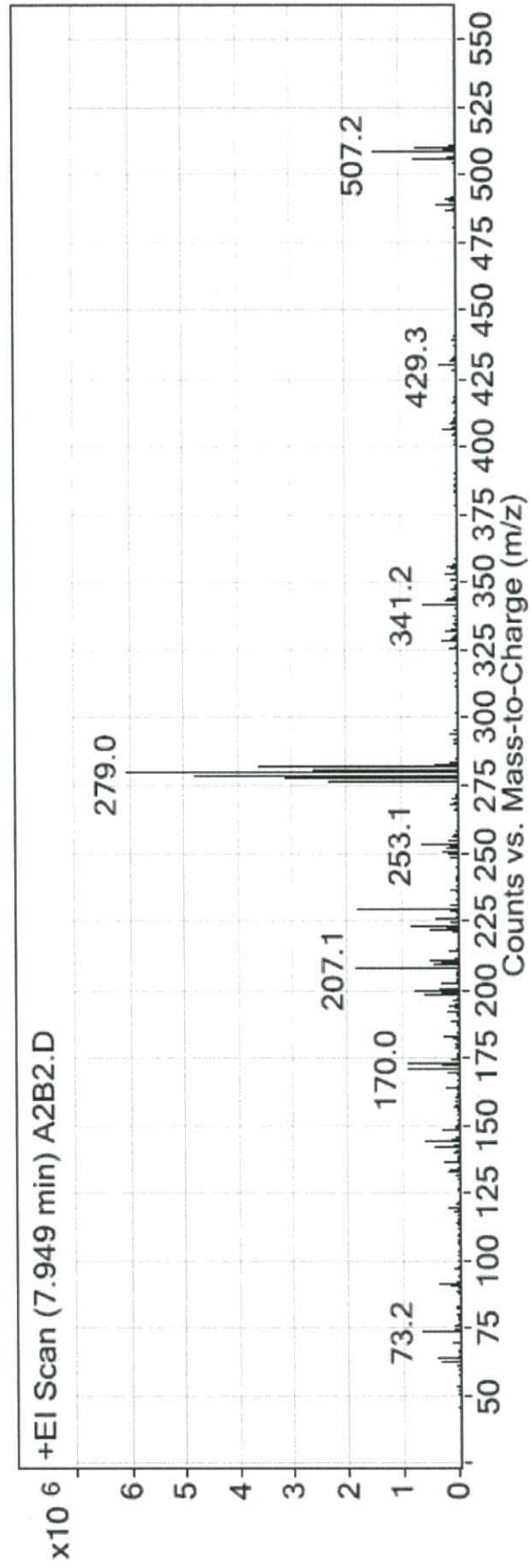
รูปที่ 28 แสดงตำแหน่ง carbons ในโครงสร้างของ *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1)

5.3 การพิสูจน์โครงสร้างของสาร *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1) ด้วยเครื่อง Mass Spectrometer (MS)

จาก mass spectra ของสาร *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1) ที่สังเคราะห์ ในรูปที่ 28 จะพบ peak ที่แสดง fragment ของส่วนที่เรียกว่า molecular ion (M^+) ซึ่งจะบอกถึง น้ำหนักโมเลกุลของสาร ในที่นี้ M^+ peak เกิดที่ $m/z = 507.2$ ซึ่งมีค่าเท่ากับ น้ำหนักโมเลกุลของสาร Z1 ขณะเดียวกันส่วนของการแตกหักในโครงสร้างของสาร ซึ่งเกิดจากการแตกของพันธะ amide ทำให้ได้ peaks ที่เป็น fragment ของ 3, 5-dibromo-2-hydroxybenzoyl cation ซึ่งมี mass = 279.0 ซึ่งเป็น base peak ของ mass spectrum นี้ ดังแสดงในรูป ที่ 29



รูปที่ 29 แสดง fragmentation pattern ของสาร *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1)



รูปที่ 30 Mass spectrum (ppm) ของ N-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1)

6. การวิเคราะห์หาธาตุที่เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างของสาร *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1) ด้วยวิธี elemental analysis

จากสูตรโมเลกุลของสาร สามารถคำนวณมวลของธาตุที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของสารเป็นร้อยละต่อมวลทั้งหมดในโมเลกุล โดยวิธีการที่เรียกว่า elemental analysis ได้ผลดังตารางที่ 13 ข้างล่างนี้

ตารางที่ 13 แสดงปริมาณองค์ประกอบของธาตุในโมเลกุลของ *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1)

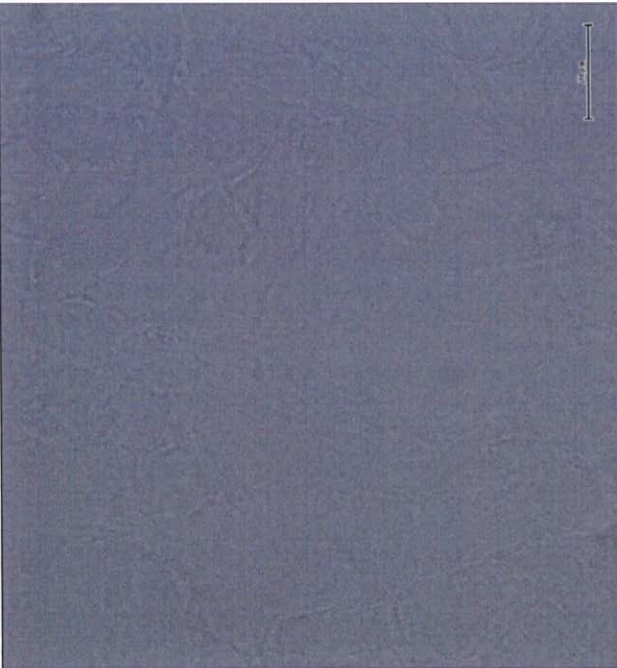
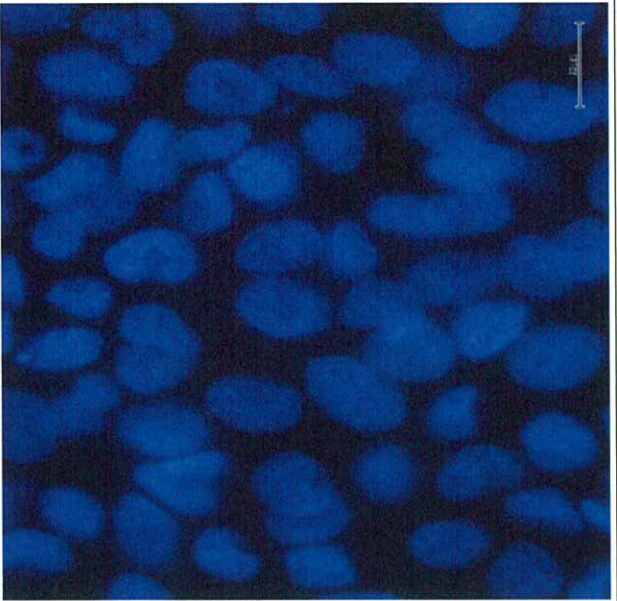
ธาตุที่เป็นองค์ประกอบ	Calculation (%)	Found (%)	A2B2.H ₂ O
C	35.53	34.731 + 0.034	34.31
H	1.39	1.717 + 0.018	1.73
N	2.76	2.653 + 0.016	2.67

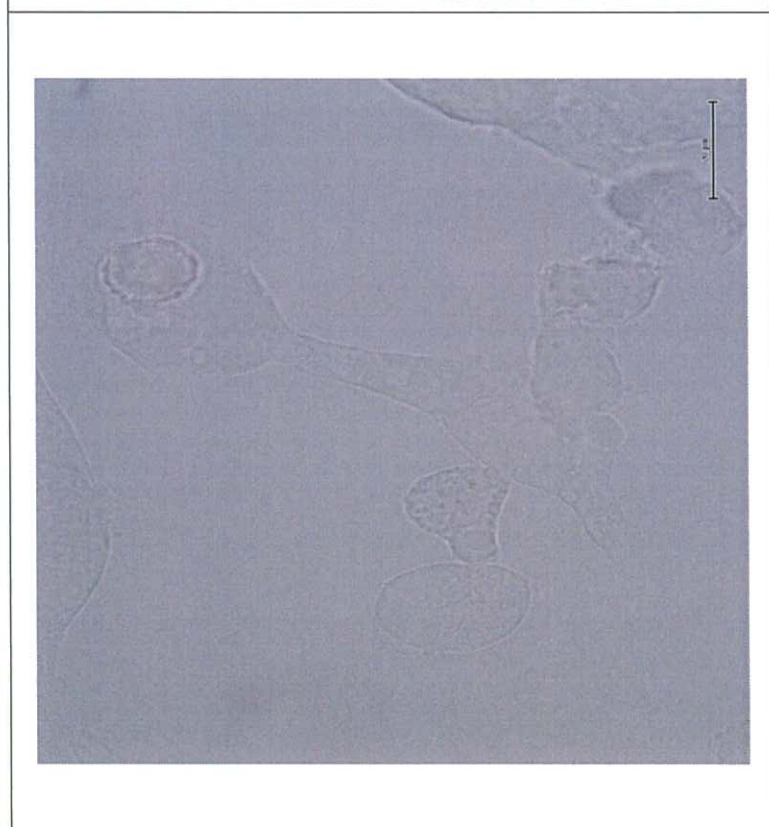
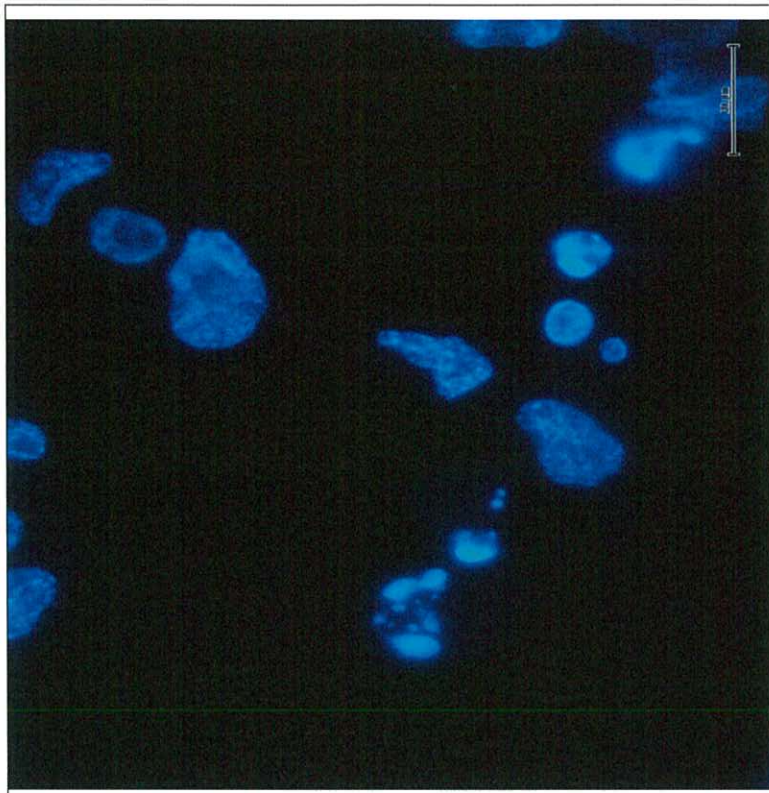
พบว่า สารที่ส่งตรวจสอบธาตุที่เป็นองค์ประกอบ มีความชื้นอยู่ ดังนั้น ผลที่วิเคราะห์จึงใกล้เคียงกับค่าที่คำนวณได้ของสารที่มีน้ำ 1 โมเลกุลในโครงสร้าง

7. การทดสอบฤทธิ์ต้านการเติบโตของเซลล์มะเร็งของสาร *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1) ด้วยเทคนิค MTT

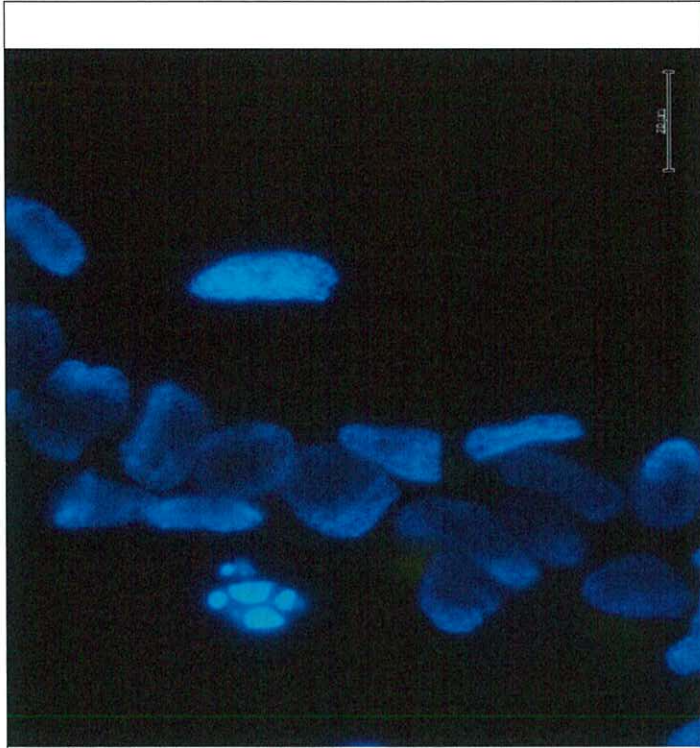
การทดสอบฤทธิ์ของสาร *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1) ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (human cervical cancer cell lines: CaSki) และเซลล์มะเร็งตับ (human hepatoma cell line, HepG2) โดยเลี้ยงเซลล์เริ่มต้นให้เกาะพื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วบ่มเซลล์กับสาร A2B2 ความเข้มข้น 0-500 μ M และ doxorubicin (DOX) ความเข้มข้น 0-25 μ M (positive control) และ 0.5% DMSO (negative control) ใน 96 well plate เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นศึกษาลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้อง microscope ซึ่งลักษณะของเซลล์มะเร็ง CaSki แสดงดังตารางที่ 14 และลักษณะของเซลล์มะเร็งตับ แสดงดังตารางที่ 15

ตารางที่ 14 ลักษณะของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (CaSki) ภายใต้กล้อง microscope

CaSki Cells		
Compounds	Bright Field	DAPI
DMSO 0.5 %		

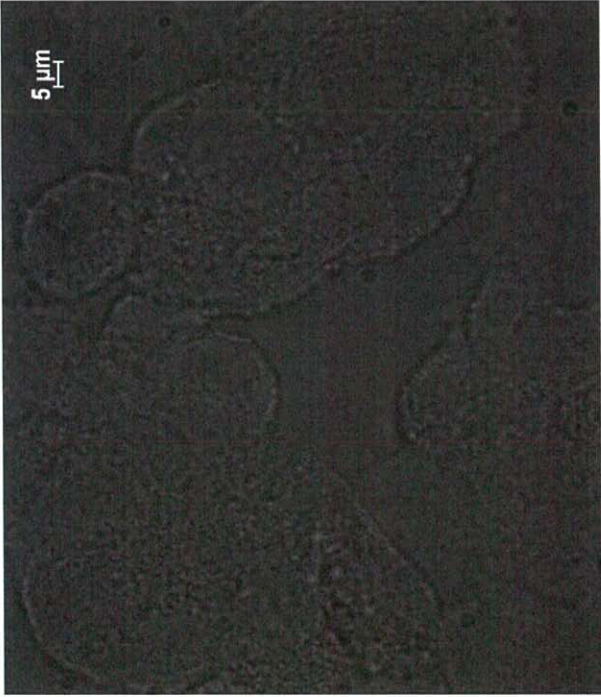
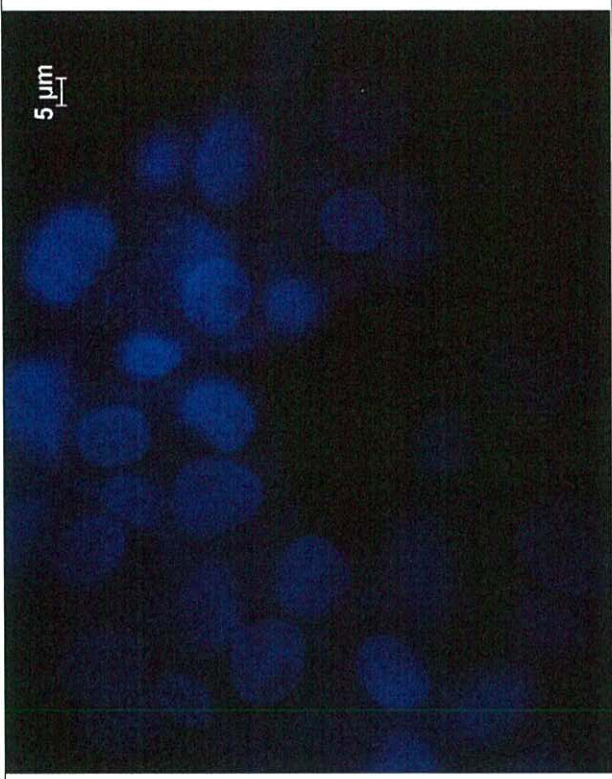


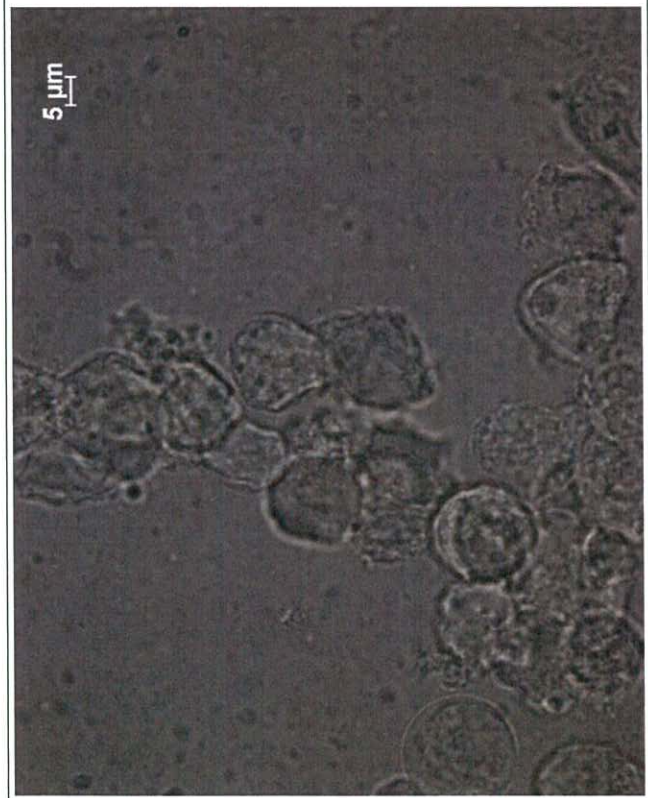
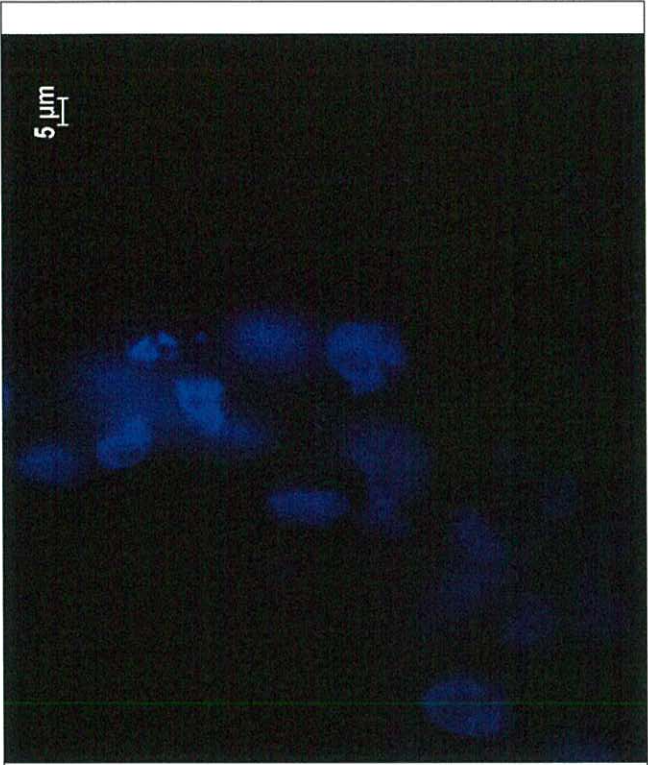
Z1



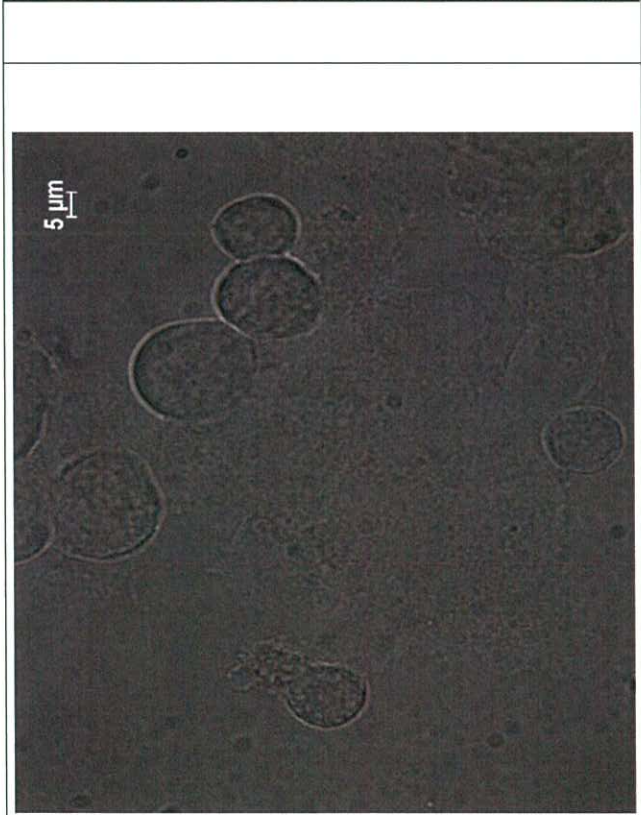
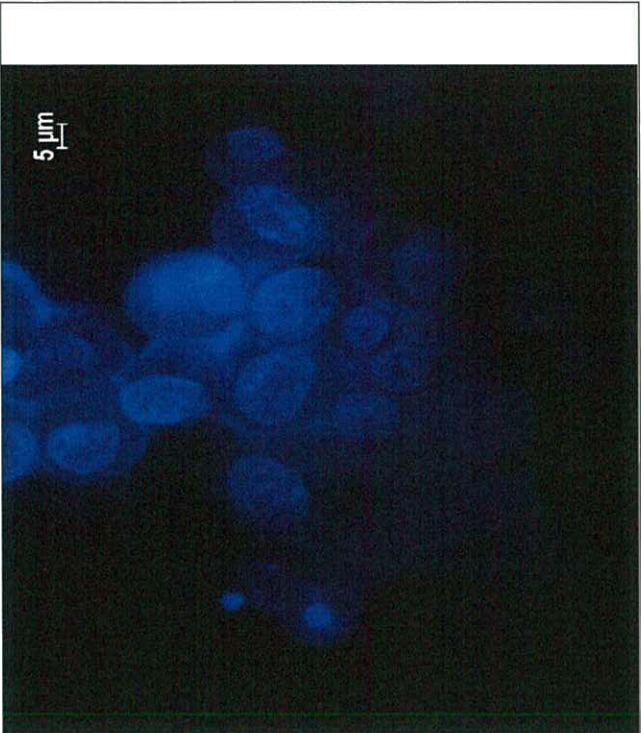
DOXORUBICIN

ตารางที่ 15 ลักษณะของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ภายใต้กล้อง microscope

HepG2 Cells		
Compounds	Bright Field	DAPI
DMSO 0.5 %		



Z1



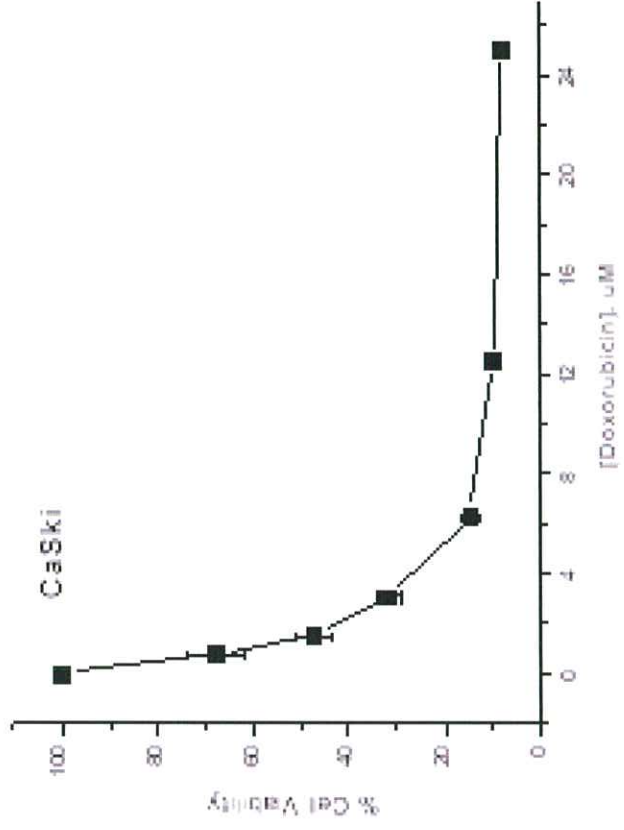
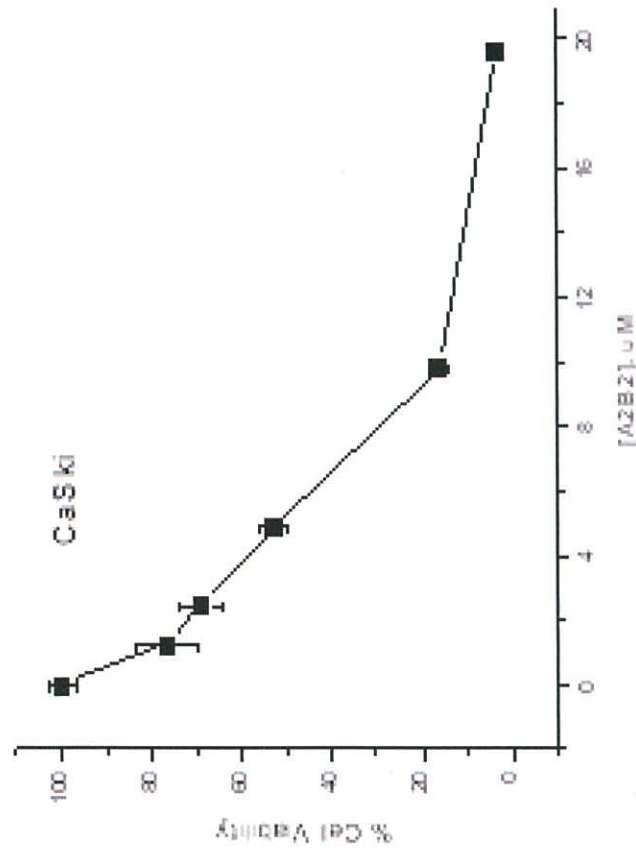
DOXORUBICIN

พบว่าในกลุ่มที่บ่มด้วย 0.5% DMSO ทั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก (CaSki) และเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) มีลักษณะปกติ เหยียดตัวเป็นรูปกระสวย เยื่อหุ้มเซลล์และไซโตพลาซึมเรียบ และมีจำนวนเซลล์เกาะพื้นมากกว่า 90% เมื่อได้รับการเขย่าแรงๆ เซลล์ยังคงไม่หลุดจากพื้นผิว ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มเซลล์ที่บ่มด้วยสาร *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide ((Z1) และ doxorubicin ที่เซลล์จะมีรูปร่างกลม เยื่อหุ้มเซลล์เป็นถุงน้ำ (bleb) และไซโตพลาซึมขรุขระ ลักษณะการเกาะพื้นผิวไม่แน่น พบเซลล์ลอยจำนวนมาก เมื่อเขย่าเบาๆ เซลล์หลุดจากพื้นผิวได้ง่าย

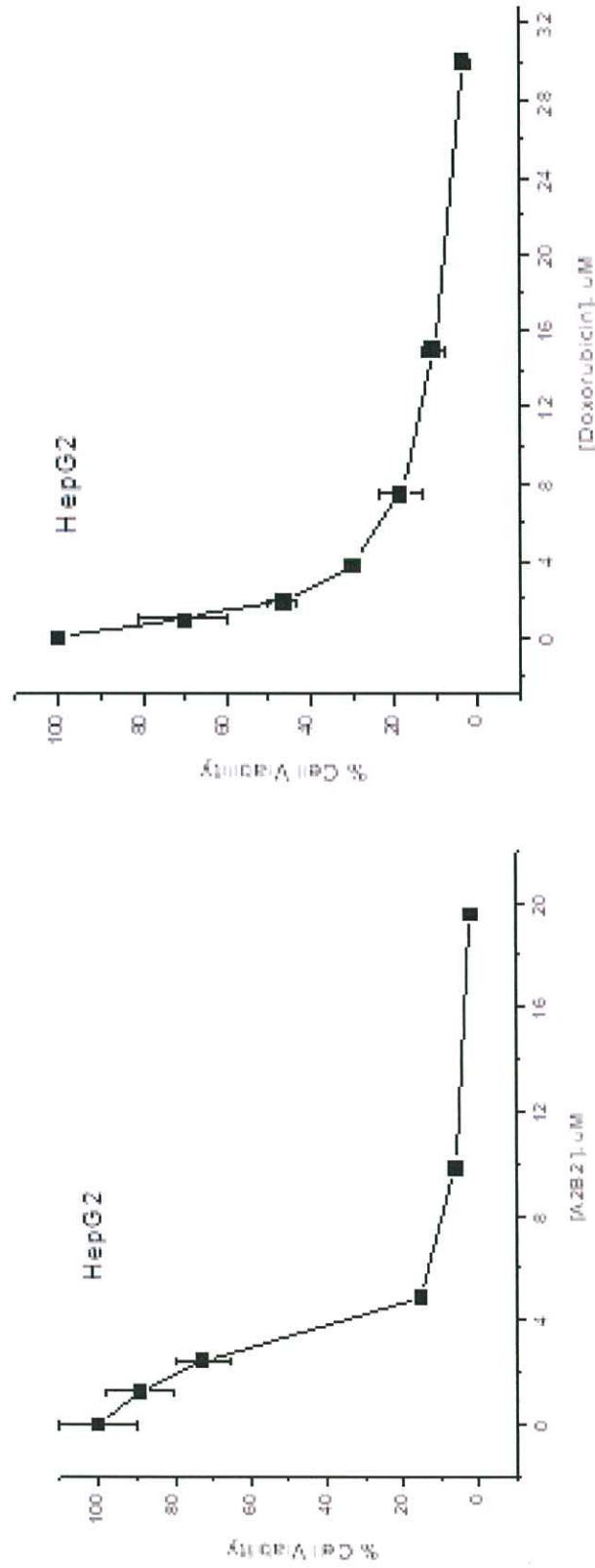
จากการวิเคราะห์หาจำนวนการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT พบว่าเซลล์ที่บ่มด้วยสาร *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide ((Z1) และ doxorubicin มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตลดลงตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้นแตกต่างจากกลุ่มที่บ่มด้วย 0.5% DMSO อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ซึ่งผลการนับเซลล์มีชีวิตด้วยเทคนิค MTT มีความสัมพันธ์กับการศึกษาลักษณะของเซลล์ด้วยกล้อง microscope

การทดสอบประสิทธิภาพของสาร *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide(Z1) ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (CaSki) พบว่าสาร *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxy benzamide (Z1) ที่ความเข้มข้น 5 μ M เริ่มยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ และความเข้มข้นของสาร *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)-phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide((Z1) ที่ทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก ลดลง 50 % (50% inhibitory concentration, IC_{50}) มีค่าเท่ากับ $4.85 \pm 1.23 \mu$ M ในขณะที่สาร doxorubicin มีค่า IC_{50} เท่ากับ $1.60 \pm 0.95 \mu$ M ดังแสดงด้วยกราฟในรูปที่ 30 a, b และตารางที่ 15

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสาร *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide(Z1) ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) พบว่าสาร *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxy benzamide (Z1) ที่ความเข้มข้น 5 μ M เริ่มยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับได้เช่นกัน และความเข้มข้นของสาร *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)-phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide((Z1) ที่ทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับ ลดลง 50 % (50% inhibitory concentration, IC_{50}) มีค่าเท่ากับ $3.37 \pm 0.34 \mu$ M ในขณะที่สาร doxorubicin มีค่า IC_{50} เท่ากับ $1.73 \pm 0.85 \mu$ M ดังแสดงด้วยกราฟในรูปที่ 31 a, b และตารางที่ 16



รูปที่ 31 แสดงประสิทธิภาพของสาร N-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1, a) และ doxorubicin (b) ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN ± SEM (N=3)



b

a

รูปที่ 32 แสดงประสิทธิภาพของสาร N-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1, a) และ doxorubicin (b) ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง HepG2 ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN ± SEM (N=3)

ตารางที่ 16 แสดงค่า IC₅₀ (μM) ของสาร *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1) และ doxorubicin

ชนิดเซลล์มะเร็ง	สารสังเคราะห์ Z1	Doxorubicin
CaSki	4.85 ± 1.23	1.60 ± 0.95
HepG2	3.37 ± 0.34	1.73 ± 0.85

จากผลการวิจัยดังกล่าวข้างต้น สารที่ได้ออกแบบไว้ 3 สาร สามารถสังเคราะห์ได้ 2 สาร และสารที่สามารถนำมาทดสอบฤทธิ์ตลอดจนพิสูจน์โครงสร้างได้ มี 1 สาร คือ สาร Z1 ที่จากการพิสูจน์โครงสร้างแล้ว คือ สาร *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxylbenzamide หรือ Z1 ซึ่งสารมีฤทธิ์ต้านการเติบโตของเซลล์มะเร็งในระดับเดียวกับ doxorubicin

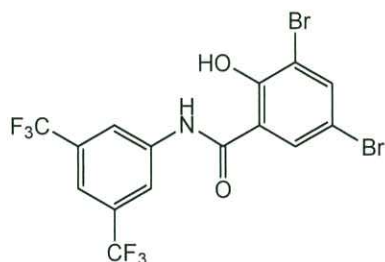
สรุปและอภิปราย/วิจารณ์ผลการวิจัย (Conclusion and Discussion)

งานวิจัยครั้งนี้เป็นงานวิจัยที่มุ่งเน้นไปที่การพัฒนาตัวยาต้านมะเร็งกลุ่มใหม่ คือ กลุ่ม small molecules ของการรักษามะเร็งแบบจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็ง หรือ targeted therapy โดยเลือกอนุพันธ์ของสาร aeropylsinin-1 มาเป็นสารต้นแบบ (lead compound) ในการพัฒนา โดยมีเป้าหมายในการออกฤทธิ์ที่เอนไซม์ IKK kinase beta (IKK- β) ซึ่งในขบวนการพัฒนายาต้านมะเร็งนี้ ผู้วิจัยได้นำเอาเทคนิคการออกแบบยาโดยใช้กระบวนการทางคอมพิวเตอร์ (Computer-aided drug design) มาใช้ในขั้นตอนการออกแบบยา ซึ่งขั้นตอนนี้สามารถทำได้เนื่องจากเป้าหมาย คือ enzyme IKK kinase beta (IKK- β) มีอยู่ในฐานข้อมูลของ protein data bank ทำให้สามารถจำลองจุดออกฤทธิ์ (active site simulation) ของสารและการจับกันของสารกับ enzyme ในโปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ได้ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากกระบวนการทางคอมพิวเตอร์ของสารต้นแบบและสารที่ออกแบบ ถูกนำมาพิจารณาและเปรียบเทียบเพื่อดูโอกาสและความเป็นไปได้ว่าสารที่ออกแบบ จะมีแนวโน้มเป็นสารที่มีฤทธิ์มากน้อยเพียงใด ซึ่งขั้นตอนนี้สามารถจำลองโมเลกุลได้หลากหลายแบบและทำซ้ำๆ ได้ จนกว่าจะได้สารที่คาดว่าจะมีฤทธิ์ดี และในงานวิจัยนี้ ได้สารที่มาจากกระบวนการนี้ คือ สาร X1, Y1 และ Z1 จากนั้นเลือกกระบวนการสังเคราะห์ที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างของสารทั้ง 3 ตัวนี้ โดยวิธีการที่เรียกว่า retro synthesis พบว่ามีทุกสารมีพันธะ amide อยู่ในโมเลกุลซึ่งสามารถเลือกกระบวนการสังเคราะห์ด้วยปฏิกิริยา amidation โดยใช้ สารตั้งต้น คือ aniline และ carboxylic acid ได้

ในขั้นตอนการสังเคราะห์ทั้ง 3 สาร พบว่า สาร X1 ไม่เกิดปฏิกิริยา ในขณะที่ สาร Y1 สามารถสังเคราะห์ได้ แต่ได้ผลผลิตที่ต่ำ ไม่บริสุทธิ์และไม่สามารถตกผลึกได้ในปริมาณมากพอ ส่วนสาร Z1 เป็นสารเดียวที่ให้ผลผลิตสูงพอควรและบริสุทธิ์มากพอนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกสาร Z1 มาทำการศึกษาต่อแต่เพียงสารเดียว

หลังจากผ่านกระบวนการทำสารให้บริสุทธิ์ด้วย column chromatography แล้ว นำสาร Z1 ที่สังเคราะห์ได้ มาตรวจสอบโครงสร้างว่าเป็นสารเดียวกับที่ได้ออกแบบไว้หรือไม่ ด้วยกระบวนการทาง spectroscopy คือ Infrared spectroscopy, ^1H และ ^{13}C -NMR spectroscopy, mass spectroscopy และ CHN analysis พบว่า IR spectra มีการเปลี่ยนแปลงของหมู่ที่เกี่ยวข้องของสารตั้งต้น 2 สารในการเกิดปฏิกิริยา คือ amine กับ carboxylic acid ได้เป็น amide bond ในสารใหม่จริง ในขณะที่ ^1H -NMR และ ^{13}C -NMR spectra ของสารใหม่ มี H และ C peaks ที่สอดคล้องกับโครงสร้างทางเคมีและ

เกิดที่ตำแหน่งที่แตกต่างจากสารตั้งต้นอย่างชัดเจน ซึ่งผลจาก mass spectrum สนับสนุนว่าสารสังเคราะห์มีโครงสร้างแตกต่างจากสารตั้งต้น โดยสารใหม่มี น้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 507.02 ในขณะที่สารตั้งต้น amine และ carboxylic acid มีน้ำหนักโมเลกุล คือ 229.12 และ 295.91 ตามลำดับ โดยสารใหม่ที่สังเคราะห์ได้นี้ มีโครงสร้างทางเคมี ดังข้างล่าง และมีชื่อเรียกทางเคมีว่า *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide



ซึ่งสารใหม่นี้ มีลักษณะเป็นของแข็ง ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีใน dimethylsulfoxide จึงสามารถนำไปทดสอบการออกฤทธิ์ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกและเซลล์มะเร็งตับได้ และให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 4.85 ± 1.23 และ 3.37 ± 0.34 μ M ตามลำดับ โดยสารมีฤทธิ์อยู่ในระดับเดียวกับสารที่ใช้เปรียบเทียบคือ doxorubicin แต่เนื่องจาก doxorubicin มีพิษต่อหัวใจและมีพิษต่อเซลล์ปกติมากกว่า เนื่องจากออกฤทธิ์แบบไม่เจาะจงต่อเซลล์ ดังนั้นสารใหม่ *N*-(3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3, 5-dibromo-2-hydroxybenzamide (Z1) ซึ่งออกแบบให้มีฤทธิ์แบบมุ่งเป้าต่อเซลล์มะเร็ง จึงเป็นทางเลือกที่ดีของการพัฒนาสารใหม่แบบ targeted therapy ในกลุ่ม small molecules ที่คาดว่าจะปลอดภัยมากกว่าและมีความเป็นพิษน้อยกว่ายาเคมีบำบัดแบบเดิม

สรุปและเสนอแนะ

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทดสอบฤทธิ์ของสารที่สังเคราะห์ใหม่ในเซลล์มะเร็งหลากหลายชนิด
2. ควรมีการศึกษาความเป็นพิษของสารที่สังเคราะห์ใหม่ในเซลล์ปกติที่ไม่ใช่เซลล์มะเร็ง
3. ควรมีการศึกษากลไกการตายแบบอะพอโทซิสของสารที่สังเคราะห์ใหม่
4. ควรมีการศึกษาประสิทธิภาพของสารที่สังเคราะห์ใหม่ในสัตว์ทดลอง
5. ควรมีการศึกษาความเป็นพิษของสารที่สังเคราะห์ใหม่ในสัตว์ทดลอง

ปัญหา

1. ไม่สามารถสั่งซื้อสารตั้งต้นและสารที่จำเป็นต้องใช้ในการสังเคราะห์ได้ เนื่องจากสารบางตัวไม่อนุญาตให้นำเข้าในประเทศ
2. ไม่สามารถสังเคราะห์สารที่ออกแบบบางตัวได้ เนื่องจากไม่เกิดปฏิกิริยา amidation และปฏิกิริยาระหว่างสารตั้งต้นทั้งสองสารเกิดช้าและได้สารใหม่น้อยมากไม่เพียงพอต่อการนำไปทดสอบในขั้นต่อไป
3. ไม่สามารถทดสอบฤทธิ์ของสารได้เนื่องจากสารที่สังเคราะห์ได้ตกตะกอนในตัวกลางที่ใช้ทดสอบฤทธิ์
4. ไม่สามารถสังเคราะห์และทดสอบฤทธิ์สารหลายตัวพร้อมกันได้ เนื่องจากสารตั้งต้นต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ ทำให้การนำส่งสารไม่พร้อมกัน และต้องรอการนำเข้าประมาณ 60-90 วัน ทำให้งานล่าช้าตามไปด้วย

Output/Outcome

1. ได้สารต้นแบบของยารักษามะเร็งแบบมุ่งเป้า ที่มีฤทธิ์ต้านการเติบโตของเซลล์มะเร็งดี ประหยัดค่าใช้จ่ายและเวลาในการพัฒนายาใหม่
2. รายงานฉบับสมบูรณ์
3. เผยแพร่ผลงานในวารสาร (อยู่ระหว่างเตรียมต้นฉบับ)

เอกสารอ้างอิง

1. "Defining Cancer". <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>. Cited; May 24, 2018.
2. "Cancer Fact sheet N°297". February 2014.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Cited; May 24, 2018.
3. "The top 10 causes of death Fact sheet N°310". May 2014.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>. Cited; May 24, 2018.
4. *World Cancer Report 2014*. World Health Organization. 2014. pp. Chapter 1.1. [ISBN 9283204298](#). Cited; May 24, 2018.
5. 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
6. Plummer M, de Martel C, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Franceschi S. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob Health*. 2016 Sep; 4(9):e609-16. doi: 10.1016/S2214-109X(16)30143-7.
7. Cancer Facts & Figures 2018, American Cancer Society,
<https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2018.html> Cited; May 24, 2018.
8. GBD 2015 Risk Factors Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioral, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016 Oct; 388 (10053):1659-1724.
9. Waggoner, Steven E. "Cervical Cancer". *The Lancet* 2003. 361 (9376): 2217-25. doi: 10.1016/S0140-6736(03)13778-6.
10. National Cancer Institute (NCI) <https://theleader.asia/2017/07/5147>.

11. Lind M.J., M.J. "Principles of cytotoxic chemotherapy". *Medicine* 2008, 36 (1): 19 - 23. doi:10.1016/j.mpmed.2007.10.003
12. National Cancer Institute (Dec 2012). "Targeted Cancer Therapies".
<http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/targeted>
13. Abramson, R. 2017. Overview of Targeted Therapies for Cancer. *My Cancer Genome* <https://www.mycancergenome.org/content/molecular-medicine/overview-of-targeted-therapies-for-cancer/> (Updated August 1).
14. Understanding Targeted Therapy <https://www.cancer.net/navigating-cancer-care/how-cancer-treated/personalized-and-targeted-therapies/understanding-targeted-therapy>.
15. Florian R. G et al. IKK β Links Inflammation and Tumorigenesis in a Mouse Model of Colitis-Associated Cancer. *Cell* 2007, Vol. 118, 285 - 296.
16. Hacker H, Karin M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE* 2006;2006:re13.
17. Yanting Z et al. Targeting IKK β kinase β /NF- κ B signaling in human prostate cancer by a novel IKK β inhibitor CmpdA. *Mol Cancer Ther.* 2016 Jul; 15(7): 1504 -1514.
18. Perkins N. D. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:49–62
19. Scheidereit C. IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. *Oncogene* 2006;25:6685–705.
20. Angustias P, Manuel N, Cristian SC, Ana B and Angel R. Context-Dependent Role of IKK β in Cancer. *Genes* 2017, 8, 376; doi:10.3390.
21. Gamble C, McIntosh K, Scott R, Ho H. K, Plevin R, and Paul A. *Inhibitory kappa B kinases as targets for pharmacological regulation* *Br J Pharmacol.* 2012 Feb; 165(4): 802–819. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01608.x
22. Dung-Fang L and Mien-Chie H. Advances in Targeting IKK and IKK-Related Kinases for Cancer Therapy. *Clin Cancer Res.* 2008 Sep 15; 14(18): 5656–5662. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0123
23. Helen M. B et al. The Protein Data Bank, *Nucleic Acids Res.* 2000 Jan 1; 28(1): 235–242.

24. Rose P. W et al. The RCSB Protein Data Bank: new resources for research and education. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan;41(Database issue):D475-82. doi: 10.1093/nar/gks1200.
25. Awanish K. Drug Development Strategies. in *Anticandidal Agents*, 2017.
26. Cavalla D. *Chemoinformatics Software Programs. The Practice of Medicinal Chemistry (Fourth Edition)*, 2015.
27. Ban F, Dalal K, Li H, LeBlanc E, Rennie P. S, and Cherkasov A. Best Practices of Computer-Aided Drug Discovery: Lessons Learned from the Development of a Preclinical Candidate for Prostate Cancer with a New Mechanism of Action. *J. Chem. Inf. Model.*, 2017, 57 (5), pp 1018-1028.
DOI: 10.1021/acs.jcim.7b00137
28. Yu W, MacKerell A. D Jr. *Computer-Aided Drug Design Methods. Methods Mol Biol.* 2017;1520:85-106. doi: 10.1007/978-1-4939-6634-9_5.
29. García-Vilas J. A, Martínez-Poveda B, Quesada A. R, Medina MÁ. Aeroplysinin-1, a Sponge-Derived Multi-Targeted Bioactive Marine Drug. *Mar Drugs.* 2016;14(1):1-12.
30. Martínez-Poveda B, García-Vilas J. A, Ca´rdenas 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.
31. 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.
32. Su J. H 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.
33. 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.

34. Twentyman P. R and Luscombe M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br. J. Cancer.* 1987, 56, 279-285.
35. Alley M. C, Scudiere D. A, Monks A, Czerwinski M, Shoemaker R, Boyd M. R. Validation of an automated microculture tetrazolium assay (MTA) to assess growth and drug sensitivity of human tumor cell lines. *Proc Am Assoc Cancer Res.* 1986; 27: 389-91
36. Morgan D. M. Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. *Methods Mol Biol.* 1998; 79: 179-84.
37. Berridge M. V, Herst P. M, Tan A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev.* 2005; 11: 127-52.
38. van Meerloo J, Kaspers G. J, Cloos J. Cell sensitivity assays: The MTT assay. *Methods Mol Biol.* 2011; 731: 237-45.
39. Liddle J et al. 4-Phenyl-7-azaindoles as potent and selective IKK2 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2009, 1;19(9):2504-8. doi: 10.1016/j.bmcl.2009.03.034.
40. Liddle J et al. 4-Phenyl-7-azaindoles as potent, selective and bioavailable IKK2 inhibitors demonstrating good in vivo efficacy. *Bioorg Med Chem Lett.* 2012, 15;22(16):5222-6. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.06.065.