บทนำ

ในขบวนการกระตุ้นเซลล์และทำให้เกิดการแบ่งตัวโดยทั่วไปพบว่าที่ผิวเซลล์นั้นจะประกอบด้วย growth factor receptors ซึ่งพบว่าเมื่อ receptor นี้ถูกกระตุ้น จะทำให้ฤทธิ์ของเอ็นไซม์ tyrosine-specific protein kinase (Protein tyrosine kinase, PTK) เพิ่มขึ้นทันที ทำให้สันนิษฐานว่า การเติมหมู่ฟอสเฟสที่ไทโรซีน (tyrosine phosphorylation) ซึ่งถูกเร่งด้วยเอ็นไซม์ตัวนี้เป็นปรากฏการณ์แรกที่เกิดขึ้นในกระบวนการที่เรียกว่า cell signaling processes ซึ่งเมื่อกระบวนการนี้เกิดขึ้นแล้วหลังจากการกระตุ้นจะส่งผลให้เซลล์ที่ถูกกระตุ้นนั้นมีการแบ่งตัวในที่สุด ถ้าเอ็นไซม์ PTK นี้ทำงานอยู่ในระดับปกติ จะพบว่าเซลล์จะอยู่ในสภาพแบ่งตัวตามปกติด้วยอัตราที่ช้าซึ่งไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติ แต่ในทางกลับกันพบว่าในเซลล์ที่มีการแบ่งตัวสูง เช่น เซลล์มะเร็งจะพบว่าเอ็นไซม์ตัวนี้จะทำงานด้วยอัตราที่สูงมาก ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าการจะหยุดการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง อาจทำได้โดยการหยุดการทำงานของเอ็นไซม์ PTKตัวนี้

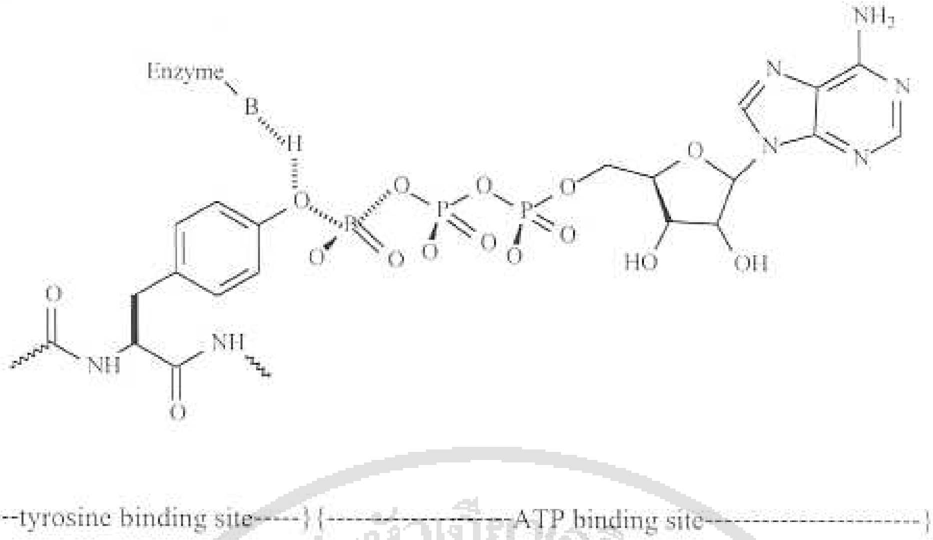
เอ็นไซม์ protein tyrosine kinaseเป็นเอ็นไซม์ที่ทำหน้าที่ย้ายหมู่ฟอสเฟส(phosphate transfering ezyme) หมู่ที่สามจาก adenosine triphosphate (ATP) ไปยังส่วนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ของ tyrosine ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่ active site และส่งผลให้มีการแบ่งตัวของเซลล์ (cell proliferation)ในภายหลัง

เอ็นไซม์นี้สามารถแบ่งออกได้เป็นสองพวกใหญ่ๆด้วยกัน คือ กลุ่มที่เชื่อมต่อกับgrowth factor receptor และกลุ่มที่ไม่ถูกจัดเป็น receptor เช่น พวก *src* family ซึ่งการทำงานของกลุ่มหลังนี้ยังไม่ได้มีการศึกษาออกมาอย่างชัดแจ้ง ดังนั้นการศึกษาและพัฒนายาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ PTK จึงมุ่งไปที่เอ็นไซม์กลุ่มแรกเป็นส่วนใหญ่

ในการศึกษาถึงกลไกเพื่อใช้ในการออกแบบยาที่ยับยั้งเอ็นไซม์นี้ ได้ยึดเอาองค์ประกอบหลักที่เป็นพื้นฐานในการทำงานของเอ็นไซม์ตัวนี้มาเป็นแนวทางสำหรับการออกแบบดังนี้ คือ

1. เอ็นไซม์ PTK ทุกตัวต้องมีจุดจำและจับกับ ATP (recognition and binding of a nucleotide triphosphate sites)
2. ต้องมีสารตั้งต้นที่มีหมู่ไทโรซีนเป็นส่วนประกอบ (tyrosine-containing substrate)
3. ต้องมีการส่งผ่านของหมู่ฟอสเฟสระหว่าง ATP และ substrate (direct transfer of phosphate between the two)

การส่งผ่านของหมู่ฟอสเฟสไปยังไทโรซีนโดยเอ็นไซม์ซึ่งจะผ่านภาวะที่เรียกว่า transition state ที่ active site ได้แสดงไว้ในรูปที่ 1 ข้างล่างนี้



รูปที่ 1 การส่งผ่านของหมู่ฟอสเฟสไปยังหมู่ไฮดรอกซิลของไทโรซีนโดยเอ็นไซม์โปรตีนไทโรซีนไคเนส (proposed transition state of phosphate transfer from ATP to tyrosine residue by PTK)

ปฏิกิริยาของการส่งผ่านพอสรุปได้ดังนี้

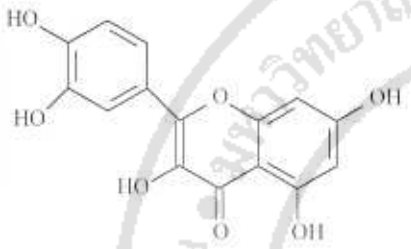
จากหลักการพื้นฐานที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น สามารถนำมาออกแบบและประยุกต์โครงสร้างสารที่ต้องการให้ออกฤทธิ์ที่ active site ดังกล่าวได้ ซึ่งในการออกแบบสารที่ยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ตัวนี้ สามารถแบ่งสารออกได้เป็นสามกลุ่มใหญ่ๆคือ

กลุ่มที่ 1 สารที่ออกฤทธิ์ป้องกันการจับของ ATP (preventing the binding of ATP)

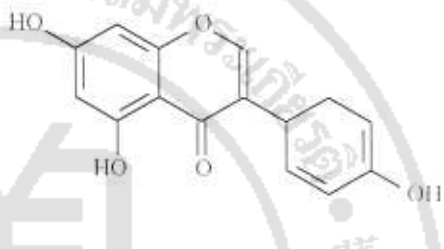
กลุ่มที่ 2 สารที่ออกฤทธิ์ป้องกันการจับของสารตั้งต้น (preventing the binding of substrate)

กลุ่มที่ 3 สารที่รบกวนการทำงานของเอ็นไซม์โดยกลไกอื่น

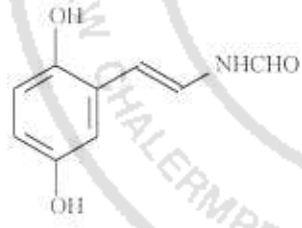
สารที่ออกฤทธิ์ป้องกันการจับของ ATP(inhibitors that mimic ATP binding site) ได้แก่ quercetin (**9**) , genistein(**10**) ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายสารจากธรรมชาติคือฟลาวานอย์(flavanoid analogs) แม้ว่าสารกลุ่มนี้จะแสดงฤทธิ์ดี แต่ส่วนใหญ่มีพิษสูงตามไปด้วย จึงได้มุ่งพัฒนายาที่ออกฤทธิ์โดยป้องกันการจับของสารตั้งต้น(inhibitors which compete at the substrate binding site)แทน โดยอาศัยหลักการที่ว่าสารที่แย่งที่จับ ณ บริเวณของสารตั้งต้น(substrate) จะมีความจำเพาะเจาะจงมากกว่าสารที่แย่งที่ ATP จับกับเอ็นไซม์ และยังคาดว่าการเพิ่มความจำเพาะเจาะจงในระดับโมเลกุลนี้จะส่งผลให้ความเป็นพิษของสารลดลงด้วย พบว่าสารในกลุ่มที่ 2 นี้ ให้ฤทธิ์ที่จำเพาะเจาะจงกว่า ขณะเดียวกันก็แสดงความเป็นพิษที่ต่ำกว่าด้วย ตัวอย่างเช่น สาร erstatin(**11**) และสาร tyrphostins(**12**) แต่ข้อเสียของสาร 2 ตัวนี้คือฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ของทั้งสองอยู่ในระดับปานกลางเท่านั้น(IC_{50} =1-10 mM)



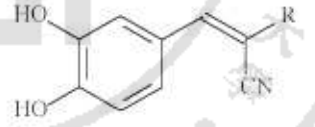
Quercetin (**9**)



Genestein (**10**)



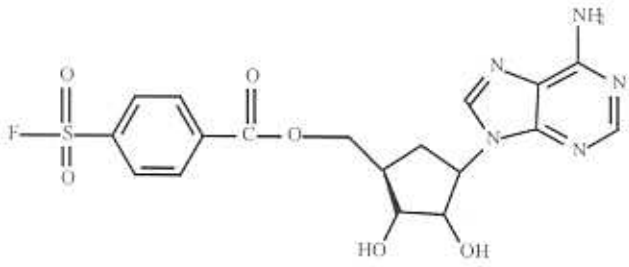
Erstatin (**11**)



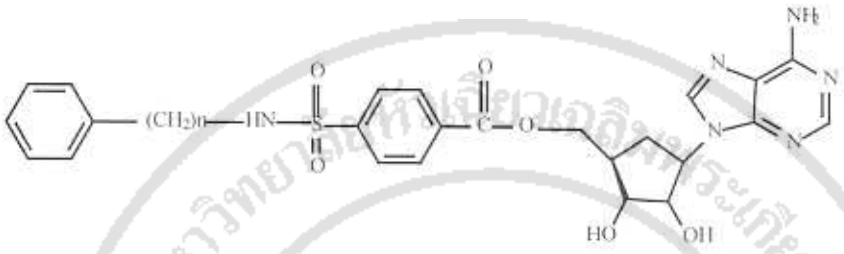
Tyrphostins (**12**)

R = CN, $CONH_2$, CO-Ar

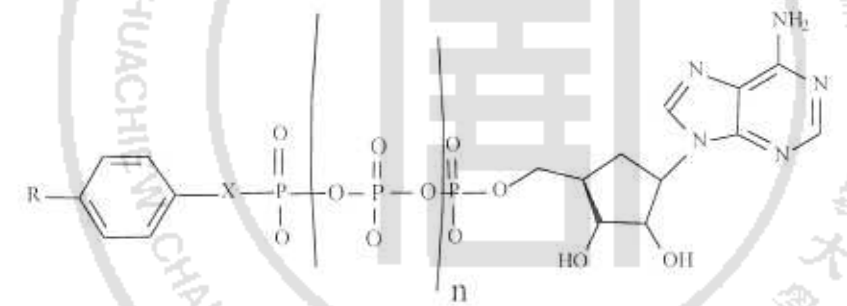
ในระยะต่อมาได้มีการออกแบบตัวยาที่เลียนแบบจุดออกฤทธิ์โดยใช้สารตั้งต้นที่เกี่ยวข้อง ณ จุดออกฤทธิ์ทั้งหมดเรียกว่า multisubstrate inhibitors ซึ่งในโมเลกุลของสารเหล่านี้จะประกอบด้วย ส่วนที่เลียนแบบไทโรซีน(tyrosine mimic)เชื่อมต่อกับส่วนที่เลียนแบบหมู่ฟอสเฟสของ ATP (ATP mimic) เช่น สาร FSBA (**13**) , สาร (**14**) และสาร (**15**) โดยทั้งสามตัวนี้ยังให้ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ในระดับปานกลางเช่นกัน



Fluorosulfonylbenzoic acid (FSBA, **13**)



14



[--tyrosine mimic--] [----------ATP mimic----------]

15

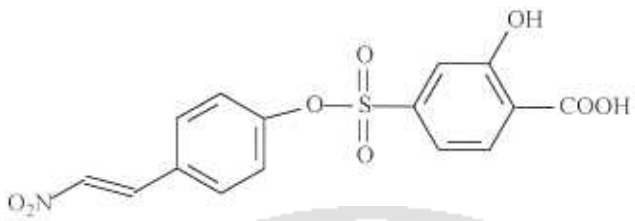
n = 1,2

X = O, NH, CH_2NH

R = H, CH_3

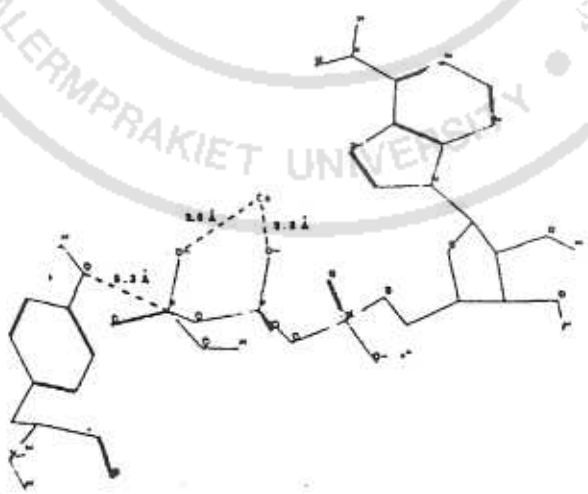
จากการพิจารณาโครงสร้างของสารทั้งสามตัว จะประกอบด้วยส่วนที่เลียนแบบ ATP(ATP mimic) เชื่อมต่อกับส่วนที่เลียนแบบไทโรซีน(tyrosine mimic) ดังนั้นคาดว่าการยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์จะเกิดจากการที่สารทั้งสามตัวเข้าไปรบกวนการจับที่จุดด้านที่มี ATP เป็นสารตั้งต้น (ATP binding site)ก่อน ทำให้สารเหล่านี้นอกจากมีฤทธิ์ปานกลางแล้ว ยังไปยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ตัวอื่นๆที่อยู่นอกระบบอีก เช่น เอ็นไซม์ซีรีน/ทรีโอนีนไคเนสซึ่งใช้ ATP เป็นสารตั้งต้นตัวหนึ่งด้วยเช่นกัน

การพัฒนาในระยะถัดมาได้มีการนำเอาส่วนซัลโฟนิลเบนโซอิล(sulfonyl benzoyl moiety) ของสาร FSBA (**13**) มาเชื่อมต่อกับสารไนโตรสไตรีน เช่น **16** พบว่าสารตัวนี้มีฤทธิ์ดีและค่อนข้างจำเพาะเจาะจง โดยเฉพาะฤทธิ์ต่อเอ็นไซม์ epidermal growth factor receptor kinases(EGFR kinases) ซึ่ง **16** นี้มีค่า IC_{50} = 54 nM.

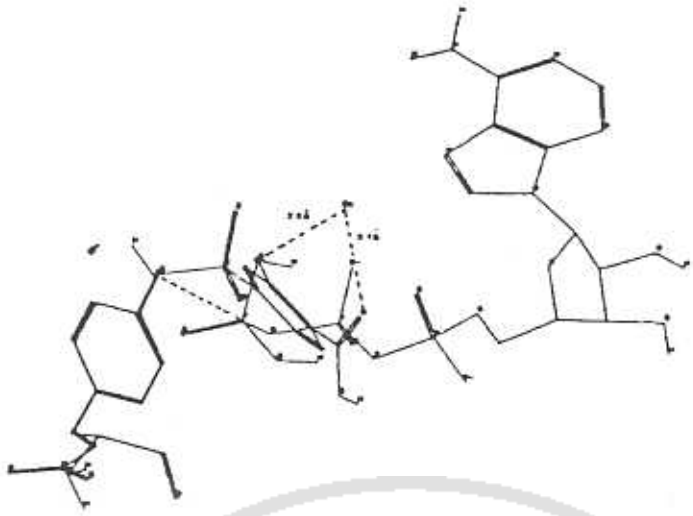


Nitrostyrylsulfonylbenzoic acid (**16**)

จากการศึกษาโครงสร้างของ **16** ด้วยคอมพิวเตอร์(computer-generated model) และจากการทำโครงสร้างแบบซ้อนทับ(molecular superposition) พบว่า **16** ออกฤทธิ์เป็น multisubstrate inhibitor อย่างแท้จริง โดยส่วนที่เป็นหมู่ซัลโฟนิลเบนโซอิล(sulfonylbenzoyl moiety) ของ **16** จะซ้อนทับหรือเลียนแบบหมู่ไดฟอสเฟส(diphosphate moiety) ของ ATP ในขณะอยู่ในสภาวะของtransition state พอดี เมื่อนำ **16** นี้ไปทดลองต่อในเซลล์มะเร็งทั้งแบบเพาะเลี้ยงและในสิ่งมีชีวิตพบว่าสารนี้มีความเป็นพิษสูงในการทดลองทั้งสองแบบ ขณะเดียวกันก็สลายตัวเร็วด้วย จึงจำเป็นต้องมีการค้นคว้า ออกแบบและพัฒนาสารใหม่เพื่อให้ได้ยารักษาโรคมะเร็งที่ดีที่สุดต่อไป



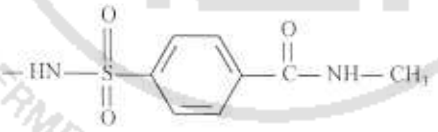
รูปที่ 2 แสดง transition state ของการส่งผ่านหมู่ฟอสเฟสจาก ATP ให้แก่หมู่ไฮดรอกซิลของไทโรซีนโดยเอ็นไซม์ PTK

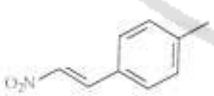


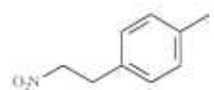
รูปที่ 3 แสดงการซ้อนทับของโครงสร้าง **16** ลงบน active site ของเอ็นไซม์ PTK ขณะที่มีการส่งผ่านหมู่ฟอสเฟส ที่ transition state

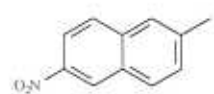
ดังนั้นสาร **1-8** จึงถูกออกแบบขึ้นมาเพื่อแก้ไขข้อบกพร่องที่พบใน **16** โดยที่สารใหม่นี้ยังคงมีฤทธิ์และความจำเพาะเจาะจงเท่ากับหรือมากกว่า **16** ด้วยขั้นตอนที่ใช้ในการออกแบบที่อาศัยโครงสร้างของ **16** เป็นหลักดังนี้

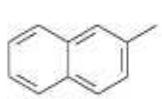
โครงสร้างของสาร **1- 8**

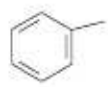


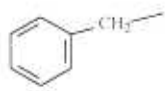
1 = 

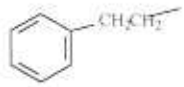
2 = 

3 R = 

4 = 

5 = 

6 = 

7 = 

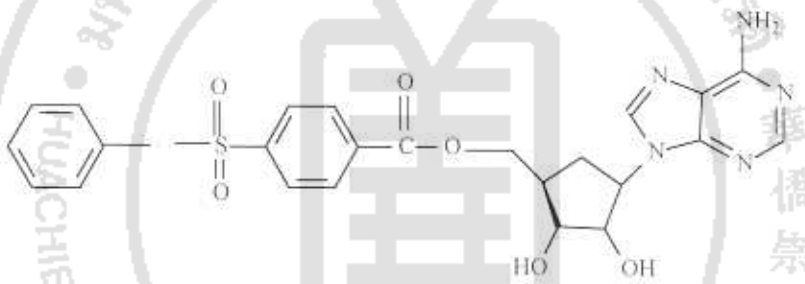
8 =

ขั้นตอนในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและออกแบบสาร **1-8** มีดังนี้

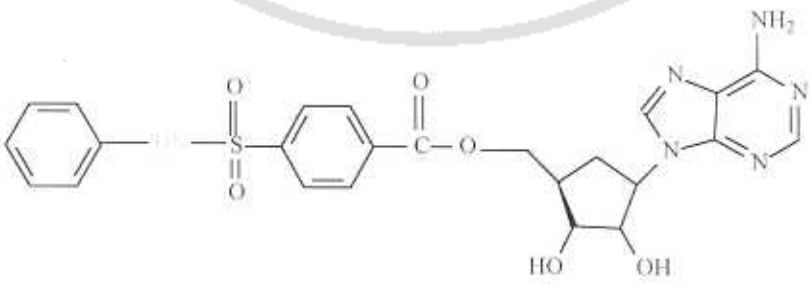
ก. พันธะเชื่อมระหว่างส่วนที่เลียนแบบไทโรซีนและส่วนของหมู่ซัลโฟนิลเบนโซอิล

(Bond linking the tyrosine mimic or analogs to the sulfonylbenzoyl moiety)

ในโครงสร้างของ **16** พันธะที่เชื่อมหมู่ไทโรซีนกับหมู่ซัลโฟนิลเบนโซอิลเป็นพันธะที่เรียกว่า sulfonate ester bond โดยพันธะนี้จะเป็นส่วนที่เลียนแบบหมู่ฟอสเฟส ซึ่งพันธะนี้เป็นส่วนที่ทำให้สารไม่คงตัวในระหว่างการทดลอง ดังนั้นเพื่อให้ได้สารใหม่ที่มีความคงตัวทั้งระหว่างการทดลองและเมื่อเข้าสู่ร่างกายในระยะหนึ่ง ผู้วิจัยจึงได้เปลี่ยนพันธะ sulfonyl ester นี้เป็นพันธะที่เรียกว่า sulfonamide bond โดยการเปลี่ยนแปลงพันธะแบบนี้ได้มีรายงานในการเปลี่ยนแปลงของ **22** ที่เปลี่ยนมาจาก **21** แล้วพบว่านอกจากจะทำให้มีความคงตัวเพิ่มขึ้นแล้ว ยังทำให้ **22** มีฤทธิ์เพิ่มสูงขึ้น โดย **22** จะมีฤทธิ์เพิ่มเป็น 10 เท่าของ **21**



21 (IC_{50} = 170 μM)

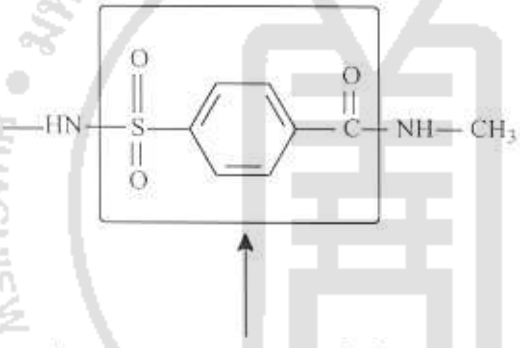


22 (IC_{50} = 19 μM)

ข. หมู่ซัลโฟนิลเบนโซอิล(Sulfonylbenzoyl moiety)

จากการศึกษาโครงสร้างของ **16** เทียบกับ transition state ของเอ็นไซม์โดยจำลองด้วยคอมพิวเตอร์ ดังแสดงในรูป 2 พบว่าหมู่ออร์โทไฮดรอกซิลและคาร์บอนิลออกซิเจน(*o*-hydroxyl and carbonyl oxygens)ในส่วนของเบนโซอิกเอซิดของโครงสร้าง **16** จะจับกับอะตอมของแมกนีเซียม ขณะเดียวกันหมู่ซัลโฟนิลในส่วนของซัลโฟนิลเบนโซอิลจะครอบคลุมระยะทางประมาณ 5.3 Å ซึ่งเป็นระยะห่างระหว่างหมู่แกมม่าฟอสฟอรัสและหมู่ไฮดรอกซิลออกซิเจนของไทโรซีน[spans the distance (d) of (γ-P, O-Tyr)]

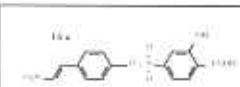
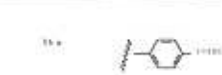
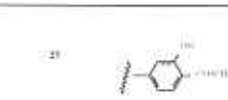
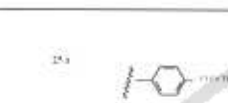
จากแบบที่จำลองในคอมพิวเตอร์นี้แสดงให้เห็นว่าหมู่ sulfonylbenzoyl ของ **16** เลียนแบบส่วนที่เป็น diphosphate ของ ATP อย่างใกล้เคียงที่สุด ดังนั้นจึงใช้ส่วนนี้มาเป็นส่วนหนึ่งของโครงสร้างสาร **1-8** ด้วย



ส่วนของ sulfonylbenzoyl ในโมเลกุล

ค. อนุพันธ์เอไมด์ (amide derivatives)

จากการพิจารณาผลการทดลองในตารางที่ 1 แม้ว่า **16** จะมีฤทธิ์สูงสุดก็จริง (IC_{50} = 0.054 μM) แต่ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตในเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นต่ำมาก เนื่องจากไม่สามารถซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ได้นั่นเอง ดังนั้นส่วนที่เป็นหมู่คาร์บอกซิลิก(carboxylic acid portion) จึงถูกเปลี่ยนแปลงเพื่อลดความมีขั้ว(polarity) ของหมู่นี้ จากตารางจะเห็นว่า **26** จะมีฤทธิ์รองลงโดยมีค่า IC_{50} = 0.4 μM แต่ความสามารถในการผ่านเซลล์และออกฤทธิ์ในเซลล์เพาะเลี้ยงกลับดีที่สุด ซึ่งจะเห็นได้จากค่า IC_{50} = 5.2 μM (antiproliferative activity) ดังนั้นสาร **1-8** จึงออกแบบให้ส่วนคาร์บอกซิลิกของเบนโซอิกเอซิดเปลี่ยนไปเป็นหมู่เอไมด์เพื่อหวังผลในการซึมผ่านผนังเซลล์และเพิ่มฤทธิ์ในเซลล์มีชีวิต

	IC_{50} (μM)		
	EGFR	PKC	antiprolif. activity, MK cells
	0.054	500	> 50
	1.0	> 500	> 50
	1.8	not determined	5.7
	1.5	> 500	12
	0.4	200	5.2
	0.6	13	61

ตารางที่ 1 ผลทางเภสัชวิทยาของสารในกลุ่มอนุพันธ์ของเบนโซอิลซัลโฟนิลไนโตรสไตรีน

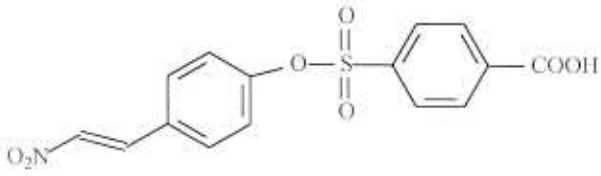
ข. **การแทนที่หมู่ไนโตรสไตรีลด้วยอะโรมติกเอมีน**(replacement of nitrostyryl group by aromatic amines)

สาร **1-8** จะถูกแบ่งออกเป็นสองกลุ่มตามวัตถุประสงค์ของการค้นคว้า โดยกลุ่มแรกได้แก่สาร **1-4** ซึ่งออกแบบเพื่อศึกษาความสำคัญของหมู่ไนโตรสไตรีลที่มีผลต่อความเป็นพิษของสารและลักษณะความราบแบนของจุดออกฤทธิ์(planarity of the catalytic cavity of the enzyme) ส่วนสาร **5-8** ถูกออกแบบขึ้นมาเพื่อศึกษาถึงความยาวหรือความลึกของจุดออกฤทธิ์

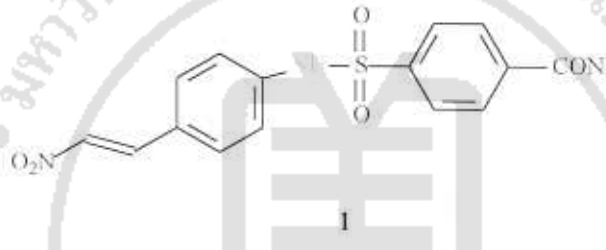
1. สาร (1)-(4)

สารทั้งสี่ตัวนี้ได้ถูกออกแบบมาเพื่อศึกษาความเป็นพิษของหมู่ไนโตรสไตริลของ **16** เนื่องจากข้อสันนิษฐานที่ว่าความเป็นพิษที่พบใน **16** อาจเกิดจากการที่หมู่ไนโตรสไตรีลนี้สามารถทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็คตรอนในปฏิกิริยาไมเคิลแอดดิชั่น (1,4 Michael addition) ซึ่งเกิดระหว่าง **16** และส่วนของโปรตีนที่มีหมู่อิเล็คตรอนหนาแน่น(electron-rich portion)

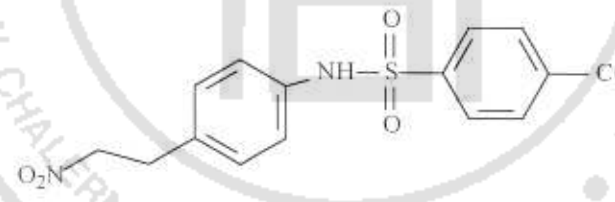
โครงสร้าง **1** ต่างจาก **16a** ตรงส่วนพันธะ sulfonamide ดังได้อธิบายไว้ในข้อ ก โดยคาดว่า **1** นี้จะมีความคงตัวมากกว่า **16a** แต่จะยังคงความเป็นพิษอยู่ เพราะหมู่ไนโตรสไตรีลยังไม่ได้ถูกเปลี่ยนแปลงแต่อย่างใด



สาร **16a**



1

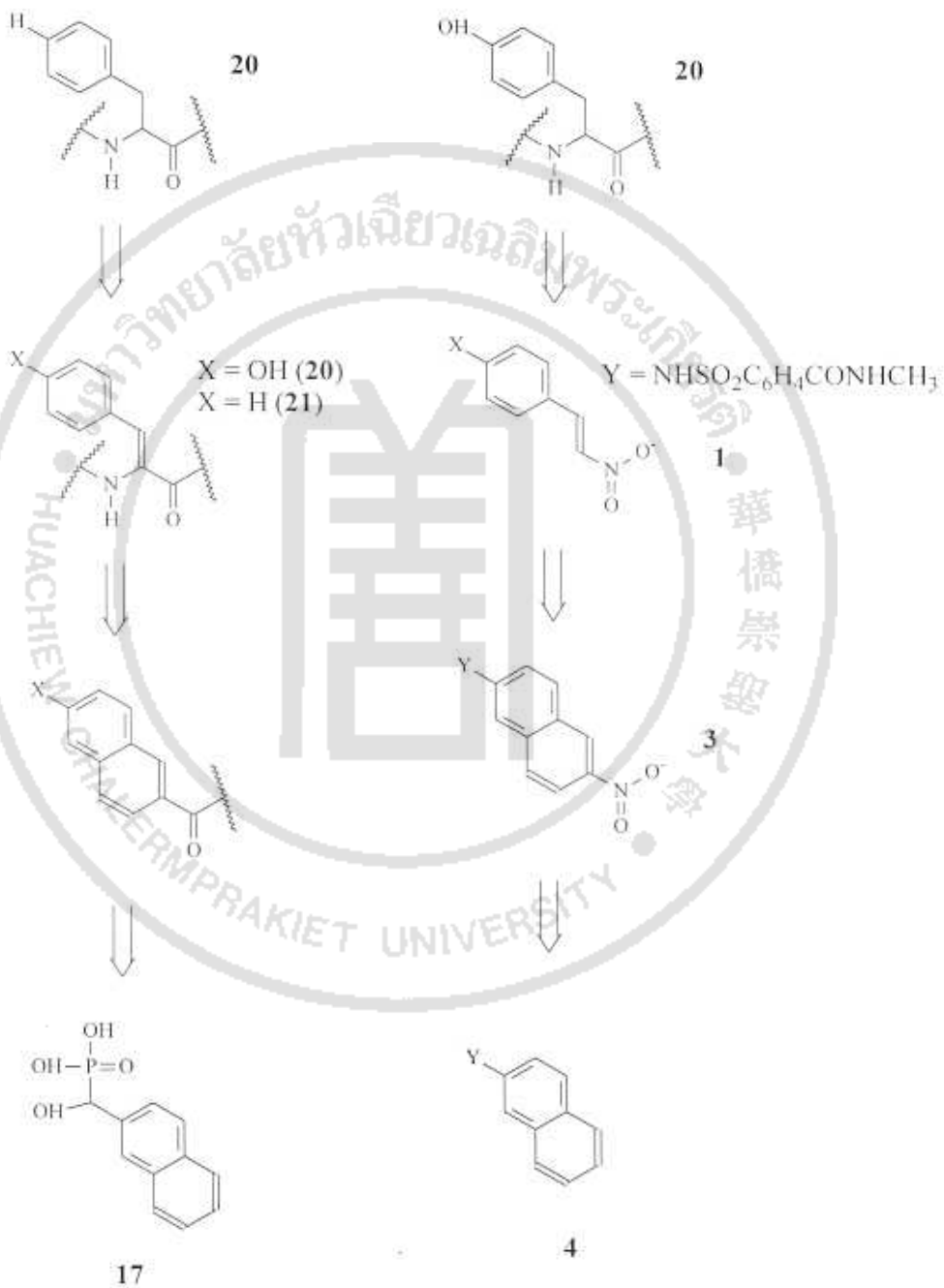


2

ในโครงสร้าง **2** จะถูกเปลี่ยนเป็นพันธะ sulfonamide เช่นเดียวกับ **1** แต่ส่วนของไวนิล(vinyl side chain) จะถูกเปลี่ยนเป็นพันธะที่อิ่มตัว(saturated bond) ซึ่งจะทำให้ความสามารถในการรับอิเล็กตรอนหมดไป ดังนั้น ถ้าความเป็นพิษของสารเกี่ยวข้องกับส่วนไนโตรสไตรีลนี้จริง **2** ซึ่งไม่มีหมู่ดังกล่าวก็ควรจะไม่มีพิษหรือมีในระดับที่ต่ำกว่า **1** และ **16** มาก แต่อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนแปลงที่หมู่ไวนิลนี้มีผลต่อความยืดหยุ่นที่ส่วนนี้ของโมเลกุลสารด้วยเช่นกัน ใน **1** หมู่ไนโตรไวนิลจะค่อนข้างอยู่ในลักษณะที่คงตัว(rigid)พอดี ณ ตำแหน่งหนึ่ง แต่ใน **2** พันธะอิ่มตัวจะทำให้หมู่ไนโตรเอ็ททิลนี้ สามารถเคลื่อนไหวอย่างอิสระในหลายทิศทาง ซึ่งถ้าฤทธิ์ของสารขึ้นกับการอยู่ในทิศทางที่คงที่ของหมู่ไนโตรอัลคิลแล้ว ก็คาดได้ว่า **2** น่าจะมีฤทธิ์ต่ำกว่า**1** และ **16**

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學

สำหรับ **3** และ **4** ส่วนที่เป็นไนโตรสไตรีล ได้เปลี่ยนเป็นหมู่วงแหวนคู่ของแนฟทาลีน(bicyclic naphthalene ring system) โดยยึดหลักการที่ใช้ในการออกแบบ **17** จาก **20** ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ใช้กับการออกแบบสารที่ยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ (PTK inhibitors) นี้เช่นเดียวกัน ขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงเป็นหมู่วงแหวนคู่ของแนฟทาลีนได้แสดงไว้ในรูป 4



รูปที่ 4 การพัฒนาโครงสร้างของ **1**, **3** และ **4** (ด้านขวามือ) โดยยึดหลักการที่ใช้ในการเปลี่ยนโครงสร้างจาก **20** มาเป็น **17** (ด้านซ้ายมือ)

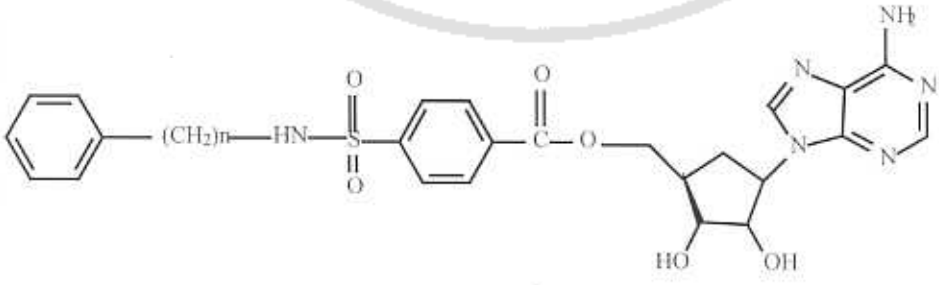
สาร **20** เป็นส่วนหนึ่งของไทโรซีนที่เป็นส่วนประกอบบริเวณที่สารไปออกฤทธิ์ (active site component) เมื่อทำให้เป็นพันธะไม่อิ่มตัว หมู่นี้จะเปลี่ยนจาก tyrosine(Tyr) ไปเป็น dehydrophenylalanine (dehydroPhe) พบว่าส่วนนี้จะอยู่ในระนาบเดียวกัน(planar geometry)กับส่วนอะโรเมติก ในลักษณะที่เหมือนกับวงแหวนแนฟทาลีน (naphthalene ring) หลักการนี้ได้นำมาใช้ในการเปลี่ยนแปลงหมู่ไนโตรสไตรีลใน **1** มาเป็นหมู่วงแหวนแนฟทาลีนใน **3** และ **4** ดังแสดงไว้ในรูป 4 ข้างต้น

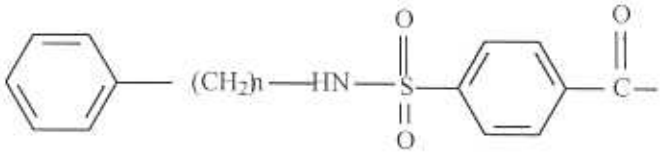
การเปลี่ยนเป็นหมู่วงแหวนแนฟทาลีนนี้จะทำให้ความสามารถในการรับอิเล็คตรอนที่หมู่ไนโตรสไตริลของ **3** และ **4** หมดไป ดังได้กล่าวในข้างต้น ถ้าความเป็นพิษของสารเกิดจากหมู่นี้จริง ความเป็นพิษของ **3** และ **4** ควรจะลดหรือหมดไปด้วย

โครงสร้าง **4** ต่างจาก **3** ตรงที่ไม่มีหมู่ไนโตร ทั้งนี้เพื่อศึกษาดูว่าหมู่ไนโตรเดี่ยวๆที่ไม่ได้เชื่อมต่อกับหมู่สไตรีลจะเกี่ยวข้องกับฤทธิ์และความเป็นพิษของ **16** หรือไม่ ซึ่งถ้าเกี่ยวข้อง **4** ก็ควรจะแสดงฤทธิ์ที่อ่อนกว่า **3** มากเพราะ **4** ไม่มีหมู่ไนโตรที่จะไปเพิ่มฤทธิ์ ในขณะที่ **3** มีหมู่นี้

2. สาร **5-8**

สาร **5-8** ได้ถูกออกแบบมาเพื่อศึกษาความลึกหรือความยาวที่พอดี ณ บริเวณที่สารตั้งต้นไปจับ (the optimum length or the depth of the substrate binding site at the catalytic cavity) โดยการใช้ข้อมูลที่ได้มีผู้ศึกษาไว้แล้วในชุดของ **14** มาประยุกต์เข้ากับ **16** โดยในชุดของ **14** นั้นค่าที่พอดีของหมู่อัลคิลที่ต่อกับพันธะซัลโฟนาไมด์คือ n = 3 แต่ค่านี้ไม่สามารถใช้กับสารที่ได้ออกแบบไว้เพราะในชุด **14** นั้นโครงสร้างสารทุกตัวในส่วนของ benzoyl carbonyl จะต่อกับ adenine moiety ซึ่งความลึกหรือยาวที่พอดีนั้นจะเป็นของทั้งส่วนสารตั้งต้นและ ATP จับ(both substrate and ATP binding sites)





5 n = 0

6 n = 1

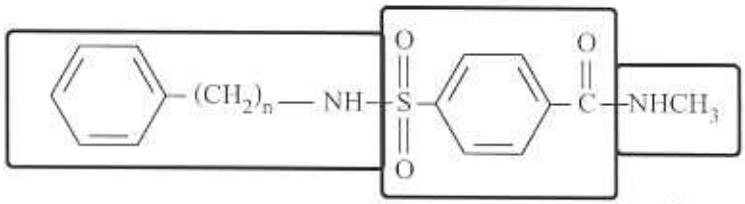
7 n = 2

8 n = 3

ในสาร **1- 8** ส่วนนี้จะถูกเปลี่ยนเป็นเอไมด์(amide) ซึ่งจะทำให้สารจับเฉพาะส่วนของสารตั้งต้น (substrate binding site) ดังนั้นความยาวหรือความลึกที่จะศึกษาจึงเป็นเฉพาะในส่วนของสารตั้งต้น ด้วยเหตุนี้ค่าที่ n = 3 ในชุดของ **14** จึงไม่สามารถนำมาใช้กับสารที่ออกแบบไว้ได้ ซึ่งสาร **5-8** ได้ศึกษาโดยให้ค่า n = 0-3 ตามลำดับ ขณะเดียวกันสาร **5-8** นี้ได้ตัดส่วนไนโตรสไตรีลออกเหลือแต่ส่วนอะโรเมติกเอมีน(aromatic amine) เพื่อศึกษาดูว่านอกจากความเป็นพิษแล้วฤทธิ์ในการยับยั้งเอ็นไซม์จะขึ้นอยู่กับหมู่นี้มากน้อยเพียงใด ทั้งนี้จากการเปรียบเทียบกับสาร (14) ซึ่งแสดงฤทธิ์ปานกลาง ที่น่าจะคาดได้ว่าสาร **5-8** จะยังคงมีฤทธิ์อยู่และฤทธิ์ของสาร **5-8** นี้ น่าจะสูงหรือดีกว่า **14** เพราะสาร **14** จับกับเอ็นไซม์ที่จุดจับของ ATP เป็นจุดแรกทำให้สาร **14** ไม่มีความจำเพาะเจาะจง แต่สำหรับสาร **5-8** นั้นจะจับกับเอ็นไซม์ที่จุดจับของสารตั้งต้น จึงมีความจำเพาะเจาะจงมากกว่า ฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์จึงน่าจะสูงและดีกว่า **14** เช่นกัน

1. แผนการสังเคราะห์สาร 1-8

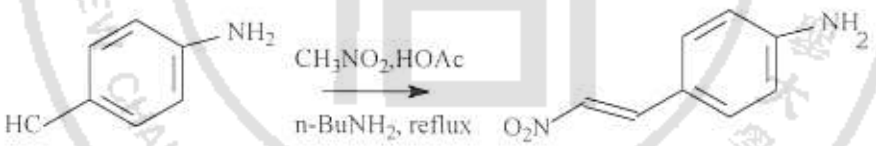
โครงสร้างสาร **1-8** สามารถแบ่งออกตามขั้นตอนการทำปฏิกิริยาได้เป็นสามส่วนใหญ่ๆ คือ ส่วนที่ 1 ที่เป็นอะโรเมติกเอมีน(aromatic amine) ส่วนที่ 2 ส่วนของซัลโฟนิลเบนโซอิล(sulfonylbenzoyl) และส่วนที่ 3 ส่วนของเอไมด์ (amide)



ส่วนที่ 1 (อะโรเมติกเอมีน) ส่วนที่ 2 (ซัลโฟนิลเบนโซอิล) ส่วนที่ 3 (เอไมด์)

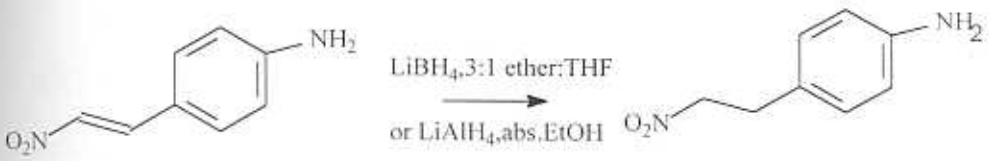
ก. การสังเคราะห์ที่เกี่ยวข้องกับส่วนที่ 1 ที่เป็นอะโรเมติกเอมีน

สารอะโรเมติกเอมีนที่จำเป็นต้องสังเคราะห์ขึ้นมาได้แก่ ไนโตรเอทินีลอะนิลีน [4-(2-nitroethenyl) aniline, **A**] และไนโตรเอทานิลอะนิลีน [4-(2-nitroethanyl)aniline, **B**] โดยมีแผนการสังเคราะห์ดังนี้



อะมิโนเบนซัลดีไฮด์ 4-(2)-ไนโตรเอทินิลอะนิลีน (A)

การทำปฏิกิริยาระหว่าง อะมิโนเบนซัลดีไฮด์(4-aminobenzaldehyde) กับไนโตรมีเทน (nitromethane) ในสารละลายกรดอะซีติกเข้มข้น(glacial acetic acid) ที่มีบิวทิลเอมีน (n-butylamine) อยู่ จะให้4-(2)-ไนโตรเอทินิลอะนิลีน (**A**) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของสาร **1** และเมื่อนำสาร **A** ไปทำปฏิกิริยาด้วยลิเธียมบอโรไฮไดรด์ ที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส หรือทำกับลิเธียมอะลูมิเนียมไฮไดรด์ ที่ –40 องศาเซลเซียส จะได้4-(2)-ไนโตรเอทานิลอะนิลีน (**B**) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของสาร **2**

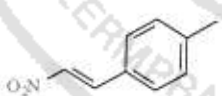


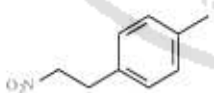
4-(2)-ไนโตรเอทีนิลอะนิลีน (**A**)

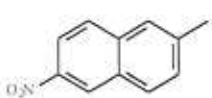
4-(2)-ไนโตรเอทานิลอะนิลีน (**B**)

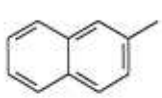
ข. การสังเคราะห์อนุพันธ์เอริลซัลโฟนามิโดเบนโซอิกเอซิด

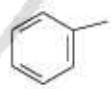
ส่วนที่ 1 ที่เป็นอะโรมติกเอมีนของสารแต่ละตัว จะถูกนำมาทำปฏิกิริยากับสารคลอโรซัลโฟนิลเบนโซอิกเอซิด ในสารละลายไพริดีน ได้เป็นอนุพันธ์ของเอริลซัลโฟนามิโดเบนโซอิกเอซิด ดังแสดงไว้ข้างล่างนี้

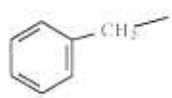
28 R = 

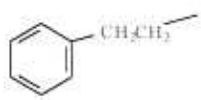
29 R = 

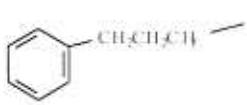
30 R = 

31 R = 

32 R = 

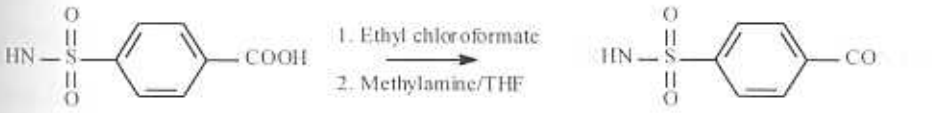
33 R = 

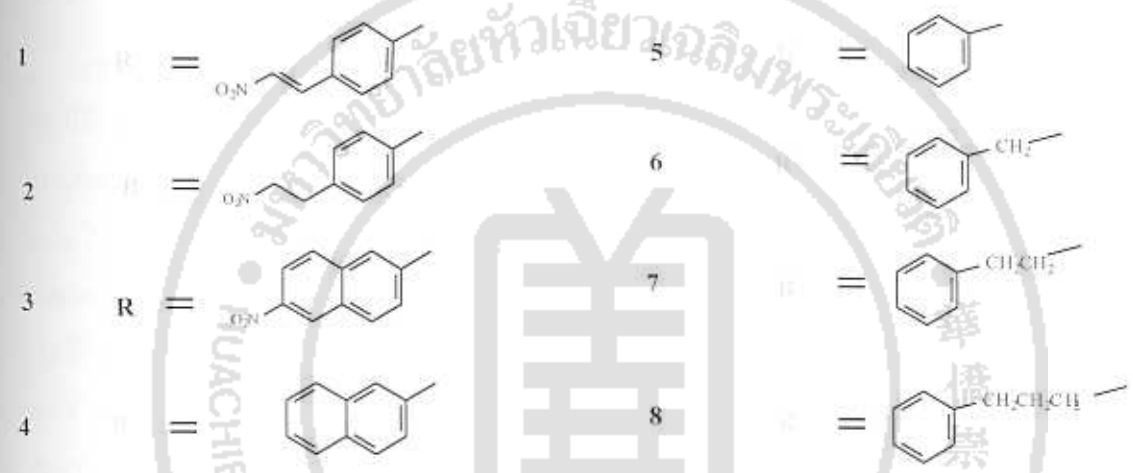
34 R = 

35 R = 

ค. การสังเคราะห์อนุพันธ์เบนโซอิลซัลโฟนามีด

เมื่อได้อนุพันธ์ซัลโฟนามิโดเบนโซอิกเอซิดแล้ว อนุพันธ์แต่ละตัวจะถูกนำมาทำปฏิกิริยากับเอทิลคลอโรฟอร์เมทและเมทิลเอมีนตามลำดับ ได้เป็นสาร 1-8





2. การทดสอบฤทธิ์ทางเคมีชีววิทยาของสาร 1-8

สารที่ได้จากการสังเคราะห์จะนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์และเนื้อเยื่อที่เป็นมะเร็ง โดยการวัดความสามารถของสารในการหยุดการแบ่งตัวของเซลล์(antiproliferative activity) ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยโปรตีนกระตุ้นการแบ่งตัว(epidermal growth factor)